

Her3 抗体药物偶联物及其用途

技术领域

本发明提供了与 Her3 特异性结合的抗体药物偶联物和包含其的组合。还提供了使用本发明的抗体药物偶联物的方法和用途。

背景技术

表皮生长因子受体(EGFR)是一个巨大的跨膜糖蛋白,分子量约为 170KDa,属于 ErbB 受体家族的一个成员。EGFR 受体本身是一种酪氨酸激酶,当与配体如 EGF、TNF- α 等结合后可形成二聚体,通过传递磷酸化作用激活下游信号(如 MAPK,PI3K,Stat 等通路),从而维持细胞生长,促进细胞分裂增殖。由于 ErbB 家族受体的保守性,EGFR 还能与家族其他蛋白(如 Her2,Her3,Her4)形成异源二聚体,从而更广泛的调控细胞的生长。

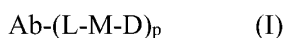
Her3 是 ErbB 家族的成员,在细胞增殖、肿瘤转移和耐药中起关键作用。虽然靶向 EGFR 和 Her2 的药物在缓解多种癌症方面表现出巨大的临床益处,但之前开发用于癌症治疗的抗 Her3 抗体的努力屡屡失败,这表明仅处理 Her3 及其悬而未决的途径可能不足以抑制肿瘤生长。

抗体药物偶联体(antibody drug conjugate, ADC)由抗体或其抗原结合片段(靶向)、接头和小分子药物三部分组成。抗体或其抗原结合片段经由可裂解或不可裂解的接头与具有生物活性例如细胞毒性的小分子药物如细胞毒素缀合,充分利用了抗体或其抗原结合片段靶向于感兴趣的细胞(靶向细胞)的特异性或结合高表达抗原的特异性以及小分子药物的高效性,降低或避免了对非靶向细胞的毒副作用。这意味着,与传统肿瘤化疗药物相比,用于肿瘤的抗体药物偶联物能精准地靶向肿瘤细胞并降低对非肿瘤细胞的影响。

本领域仍需要在亲和力、特异性等方面优异的抗 Her3 抗体药物偶联物。

发明内容

一方面,本申请提供一种抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,所述抗 Her3 抗体药物偶联物结构如式(I)所示:



其中,

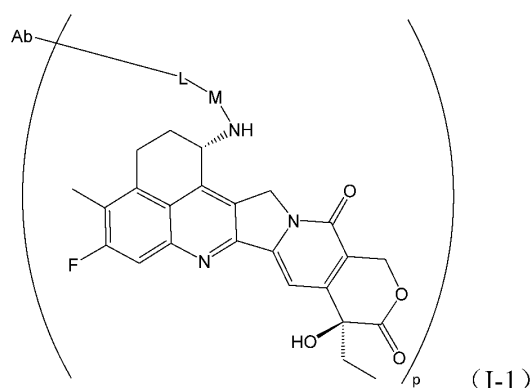
L 和 M 是接头单元;

D 是细胞毒性药物;

p 表示平均连接数,且 p 选自 1 到 10 的整数或小数,优选 3-8 的整数或小数;

Ab 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,和所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物结构如式(I-1)所示:



其中，

L、M 是接头单元；

p 表示平均连接数，且 n 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 3-8 的整数或小数；

Ab 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：

(I) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的轻链可变区；或

(II) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的轻链可变区；或

(III) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的轻链可变区。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：

(I) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区；或

(II) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区；或

(III) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体或抗原结合片段为鼠源抗体或其片段、嵌合抗体或抗原结合片段、人源化抗体或抗原结合片段、或全人抗体或抗原结合片段。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或其片段。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab'、Fab'-SH、

Fv、scFv、F(ab')₂、sdAb、双抗体或线性抗体。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体为单克隆抗体。

在一些实施方式中，本发明所述抗体为 IgG1 形式的抗体、IgG2 形式的抗体、IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体。

在一些实施方式中，本发明所述抗体为 IgG1 形式的抗体。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99% 同一性的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99%同一性的轻链；或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99% 同一性的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99%同一性所示的轻链；或

(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99% 同一性的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99%同一性的轻链。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的轻链；或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示或的轻链；或

(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的轻链。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中

M 为 -L²-L³-X-L¹-；

L² 为 -O-或-S-；

L³ 为 -(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-，m 选自 0、1、2 或 3，其中当 L³ 包含亚甲基单元时，所述 L³ 的 0 个或 1 个亚甲基单元可以被 -C(O)-、或-C(S)-替代；

L¹ 为 -(C(R^{2a})(R^{2b}))_n-，n 选自 1、2 或 3，其中当 L¹ 可以包含亚甲基单元时，所述 L¹ 的 0 个或 1 个亚甲基单元可以被 -C(O)-、或-C(S)-替代；

X 选自 3 到 6 元饱和的碳环基、3 到 6 元饱和的杂环基或单键，所述 3 到 6 元饱和的碳环基和 3 到 6 元饱和的杂环基任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代；

其中每个 R^{1a}，R^{1b}，R^{2a}，R^{2b}，R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团；

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些实施方式中，本发明所述 3-6 元饱和的杂环基中的杂原子选自 N、O 和 S，杂原子数为 1-3 个。

在一些实施方式中，本发明 L³ 和 X 不同时为单键。

在一些实施方式中,本发明 L^2 为-O-。在一些实施方式中,本发明 L^2 为-S-。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述的接头单元 M,其 L^2 端与接头单元 L 相连, L^1 端与细胞毒性药物 D 相连。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 L^3 选自单键、-C(R^{1a})(R^{1b})-或-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-;

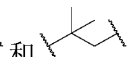
其中每个 R^{1a} 和 R^{1b} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 L^3 选自单键、-C(R^{1a})(R^{1b})-或-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-;

其中每个 R^{1a} 和 R^{1b} 各自独立可以为氢、卤素、CH₃ 或 CH₂CH₃。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 L^3 选自单键、-CH₂-、-CH(CH₃)-、-C(CH₃)₂-、-CH₂CH₂-、-CH(CH₃)CH₂-或-C(CH₃)₂CH₂-。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 L^3 选自  和 .

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 L^3 选自单键。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 L^1 选自-C(R^{2a})(R^{2b})-、-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-或-C(O)-;

其中每个 R^{2a}, R^{2b} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 L^1 选自-C(R^{2a})(R^{2b})-、-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-或-C(O)-;

其中每个 R^{2a}, R^{2b} 各自独立可以为氢、卤素、CH₃ 或 CH₂CH₃。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 L^1 选自-CH₂-、-CH₂C(O)-、-CH(CH₃)C(O)-或-C(O)-。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 L^1 选自-C(O)-。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 X 为任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基或单键;

其中每个 R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 X 为任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基或单键;

其中每个 R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素、CH₃ 或 CH₂CH₃。

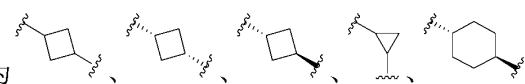
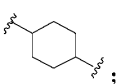
在一些实施方式中,本发明所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受

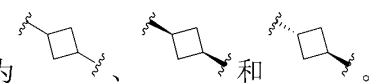
的盐或其混合物,其中 X 为环丙基、环丁基、环戊基、环己基或单键。

在一些实施方式中,本发明所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 X 为单键。

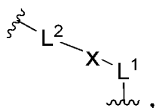
在一些实施方式中,本发明所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中 X 为环丙基、环丁基、环戊基或环己基,优选为环丁基。

在一些实施方式中,本发明所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的

的盐或其混合物,其中 X 为  和 ;

优选地, X 为 .

在一些实施方式中,本发明所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:



L^2 为-O-或-S-;

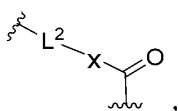
X 选自任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基;

L^1 选自-C(R^{2a})(R^{2b})-、-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-或-C(O)-;

其中每个 R^{2a} , R^{2b} 或 R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:



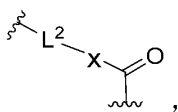
L^2 为-O-或-S-;

X 选自任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基;

其中每个 R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

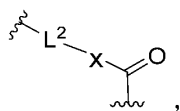
在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:



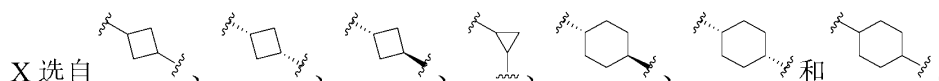
L^2 为-O-或-S-;

X 选自环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

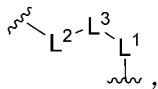
在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:



L^2 为-O-或-S-;



在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:



L^2 为-O-或-S-;

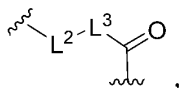
L^3 选自-C(R^{1a})(R^{1b})-或-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-;

L^1 选自-C(R^{2a})(R^{2b})-、-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-或-C(O)-;

其中每个 R^{1a}, R^{1b}, R^{2a} 或 R^{2b} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:



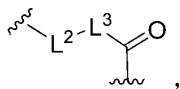
L^2 为-O-或-S-;

L^3 选自-C(R^{1a})(R^{1b})-或-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-;

其中每个 R^{1a} 和 R^{1b} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:

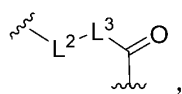


L^2 为-O-或-S-;

L^3 选自-CH₂-、-CH(CH₃)-、-C(CH₃)₂-、-CH₂CH₂-、-CH(CH₃)CH₂-或-C(CH₃)₂CH₂-。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的

盐或其混合物,其中所述-M-选自:

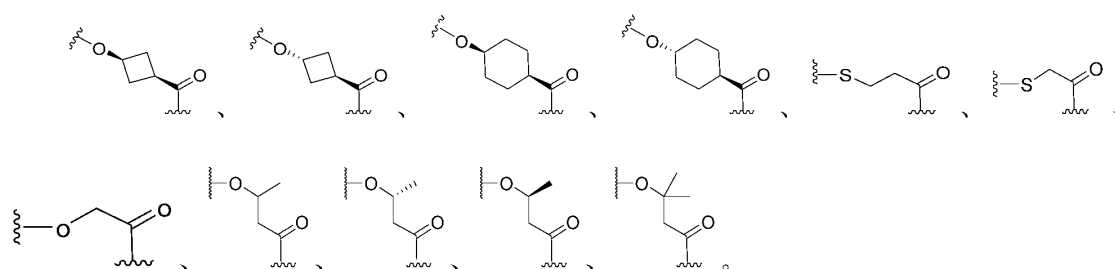


L^2 为-O-或-S-;

L^3 选自 。

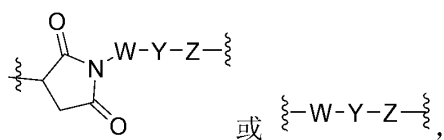
在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述的接头单元 M, 其 L^2 端与接头单元 L 相连。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:



在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述 L 为- L_a - L_b - L_c -,

所述- L_a -为



其中, W 为- $(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}$ -, Y 为- $(OCH_2CH_2)_{yn}-O_{yp}$ -, Z 为- $(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}$;

其中 wn 为 1、2、3 或 6,

W 的 1 个亚甲基单元各自独立地被-Cyr-、- $N(R^{wx})C(O)$ -、- $C(O)N(R^{wx})$ -、或-C(O)-替代;

其中 yn 为 0、4 或 8, yp 为 0 或 1;

其中 zn 为 1、2 或 3,

Z 的 1 个亚甲基单元各自独立地被-Cyr-、- $N(R^{zx})C(O)$ -、- $C(O)N(R^{zx})$ -、或-C(O)-替代;

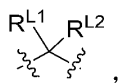
-Cyr-为 3 到 10 元饱和的亚碳环基, 其中所述-Cyr-是未取代的或独立地被 1 到 3 个取代基 R^{cx} 取代;

其中每个 R^{wa} , R^{wb} , R^{za} , R^{zb} , R^{wx} , R^{zx} , R^{cx} 各自独立地为氢、卤素、- OR^r 或被 R^r 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团;

其中每个 R^r 各自独立地为氢、卤素或 C_{1-6} 脂肪族基团;

所述- L_b -由 2 到 7 个氨基酸构成的肽残基, 所述- L_b -的肽残基为由选自以下组中的氨基酸形成的肽残基: 苯丙氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、瓜氨酸、赖氨酸、丝氨酸、谷氨酸、和天冬氨酸;

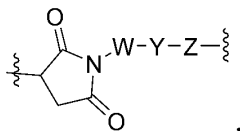
所述-L_c-为



其中 R^{L1}、R^{L2} 各自独立地选自以下组：氢、卤素、-OH 和 C₁₋₆ 脂肪族基团。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述 L 为-L_a-L_b-L_c-，

所述-L_a-为



其中，W 为-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-，Y 为-(OCH₂CH₂)_{yn}-O_{yp}-，Z 为-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}；

其中 wn 为 1、2、3 或 6，

W 的 1 个亚甲基单元各自独立地被-Cyr-、-N(R^{wx})C(O)-、-C(O)N(R^{wx})-、或-C(O)-替代；

其中 yn 为 0、4 或 8，yp 为 0 或 1；

其中 zn 为 1、2 或 3，

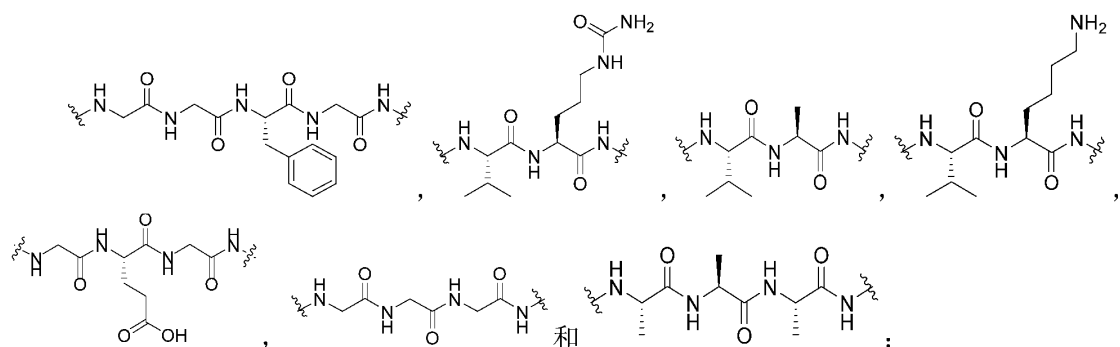
Z 的 1 个亚甲基单元各自独立地被-Cyr-、-N(R^{zx})C(O)-、-C(O)N(R^{zx})-、或-C(O)-替代；

-Cyr-为 3 到 10 元饱和的亚碳环基，其中所述-Cyr-是未取代的或独立地被 1 到 3 个取代基 R^{cx} 取代；

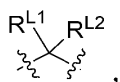
其中每个 R^{wa}，R^{wb}，R^{za}，R^{zb}，R^{wx}，R^{zx}，R^{cx} 各自独立地为氢、卤素、-OR^r 或被 R^r 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团；

其中每个 R^r 各自独立地为氢、卤素或 C₁₋₆ 脂肪族基团；

所述-L_b-选自以下组：

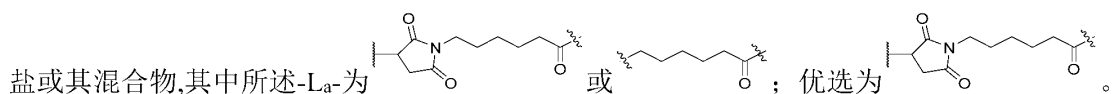


所述-L_c-为

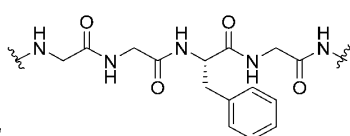
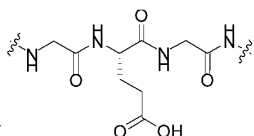
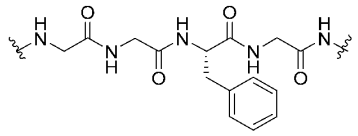


其中 R^{L1}、R^{L2} 各自独立地选自以下组：氢、卤素、-OH 和 C₁₋₆ 脂肪族基团。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的

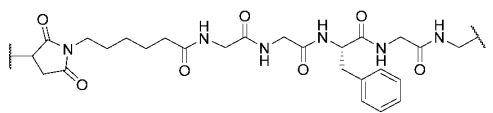


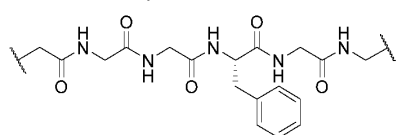
在一些实施方式中,本发明所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-L_a-为 。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-L_b-为  或 ; 优选为 。

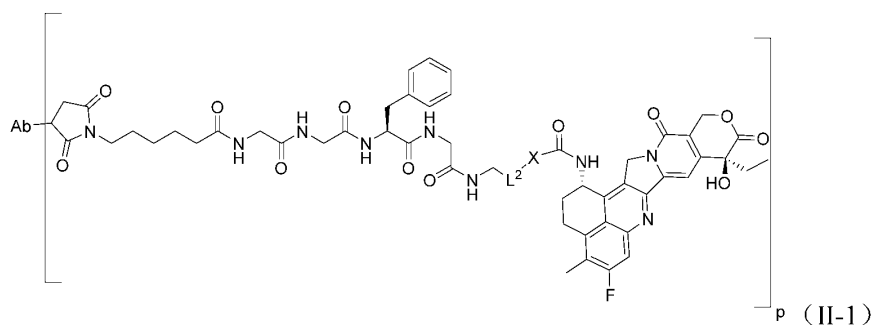
在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-L_c-为 。

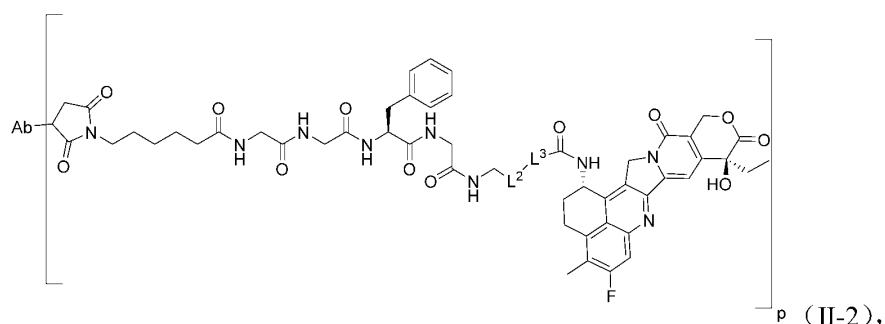
在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述的接头单元 L, 其 L_a 端与 Ab 相连, L_c 端与接头单元 M 相连。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述 L 为 。

在一些实施方式中,本发明所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述 L 为 。

在一些实施方式中,本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物结构如式 (II-1) 或 (II-2) 所示:

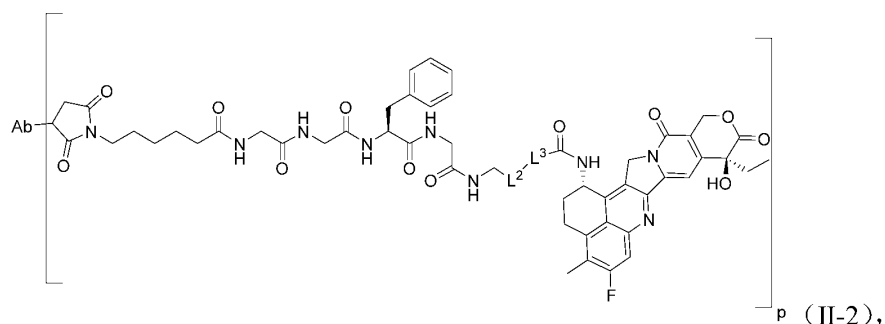
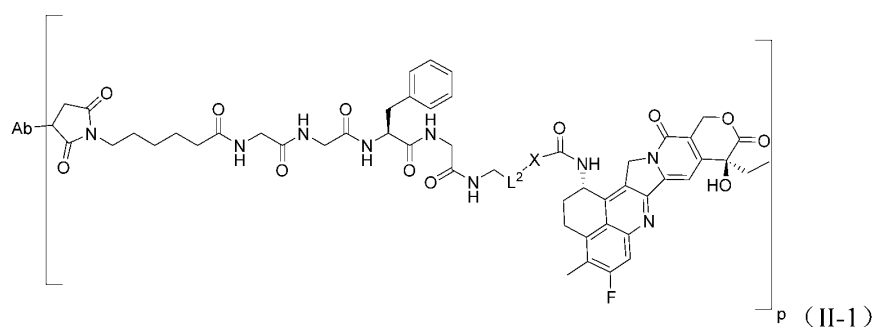




其中,

Ab、L²、X、p 和 L³ 分别如本文任一方案所定义。

在一些实施方式中, 本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物结构如式 (II-1) 或 (II-2) 所示:



其中,

p 表示平均连接数, 且 p 选自 1 到 10 的整数或小数, 优选 3-8 的整数或小数;

Ab 如本文任一方案所定义;

L² 为-O-或-S-;

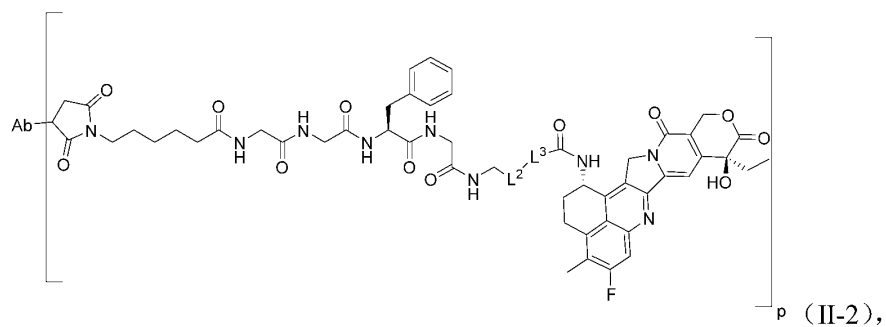
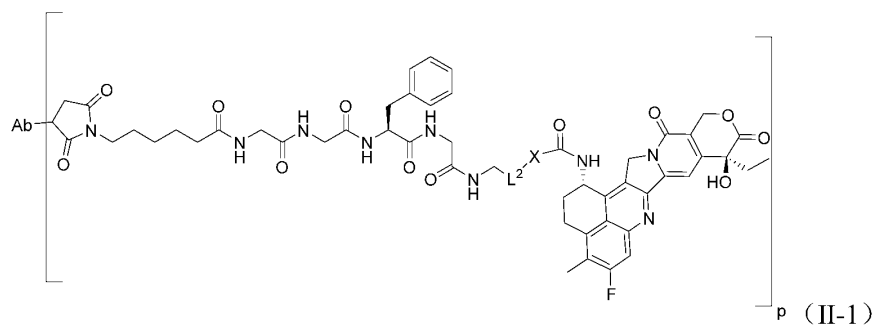
X 选自任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基;

L³ 选自-C(R^{1a})(R^{1b})-或-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-;

其中每个 R^{1a}、R^{1b} 或 R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些实施方式中, 本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物结构如式 (II-1) 或 (II-2) 所示:



其中,

p 表示平均连接数, 且 p 选自 1 到 10 的整数或小数, 优选 3-8 的整数或小数;

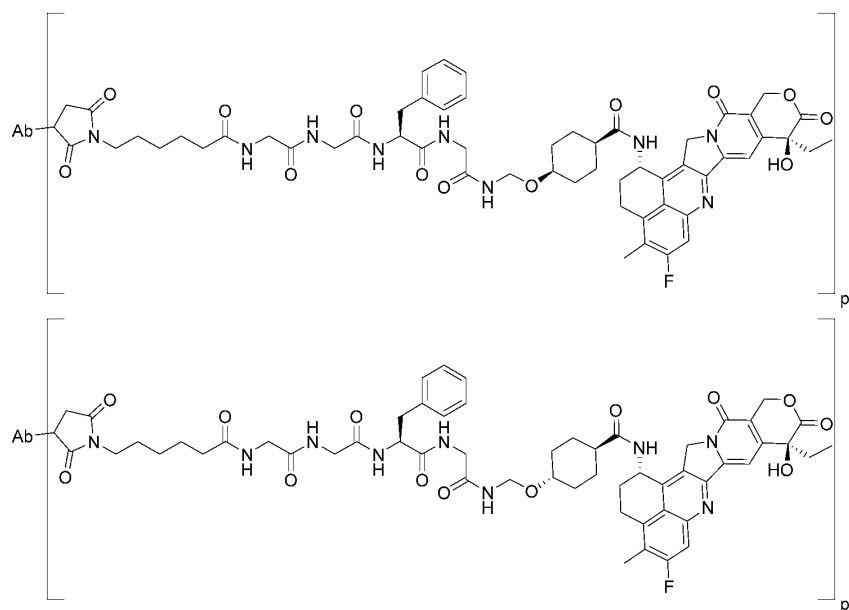
Ab 如本文任一方案所定义;

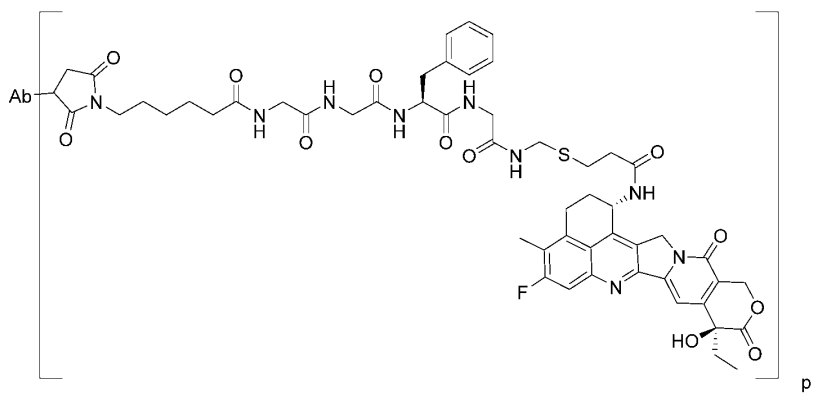
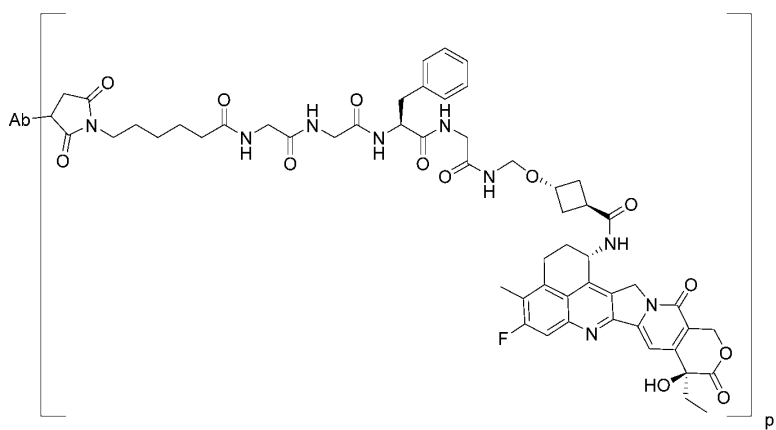
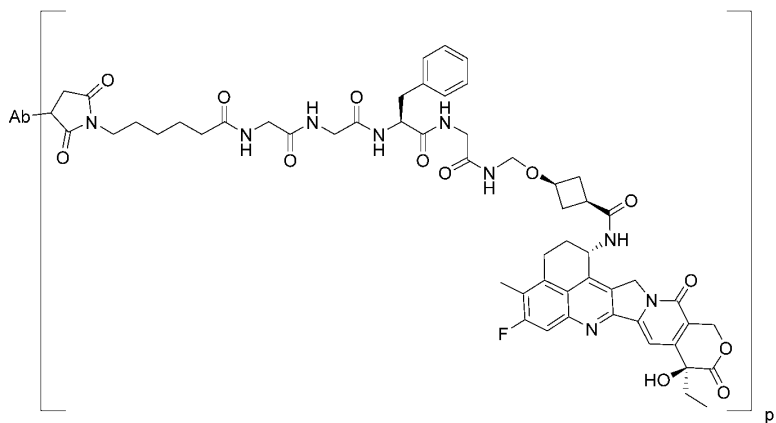
L^2 为-O-或-S-;

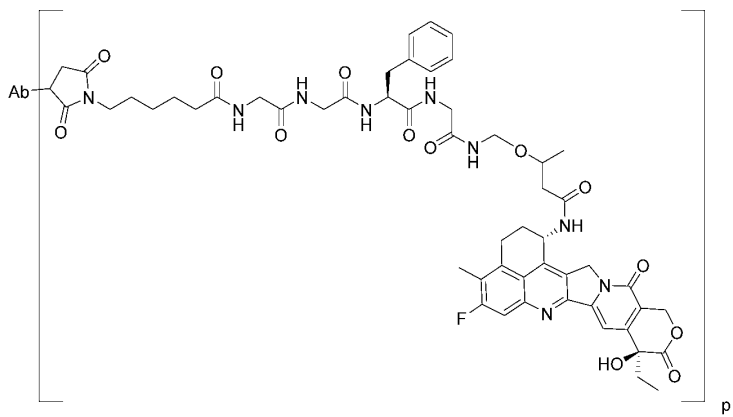
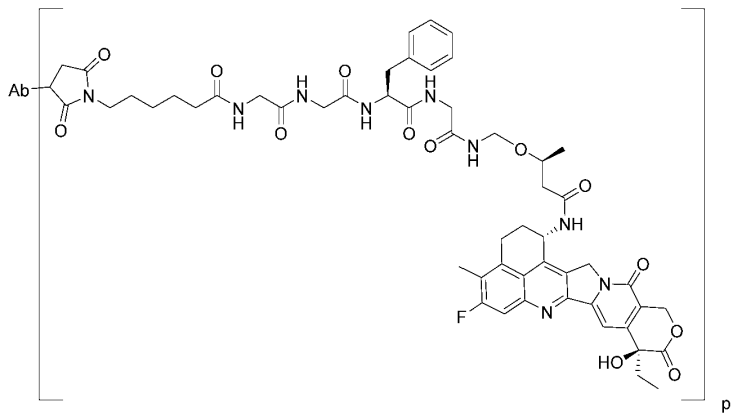
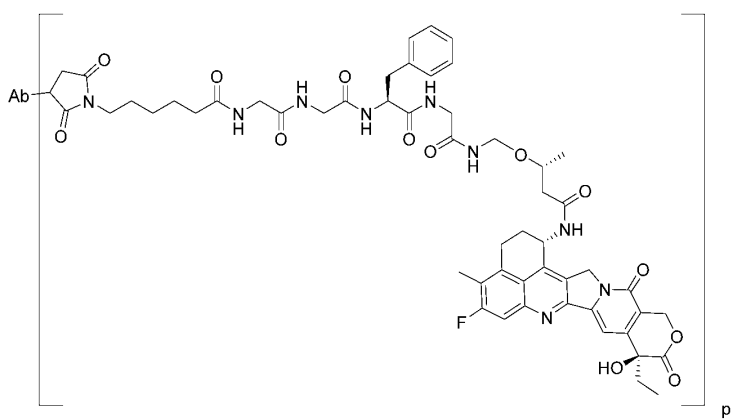
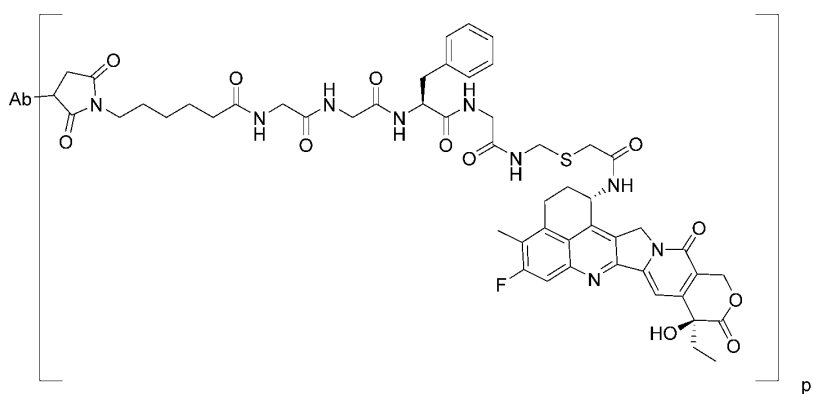
X 选自环丙基、环丁基、环戊基或环己基;

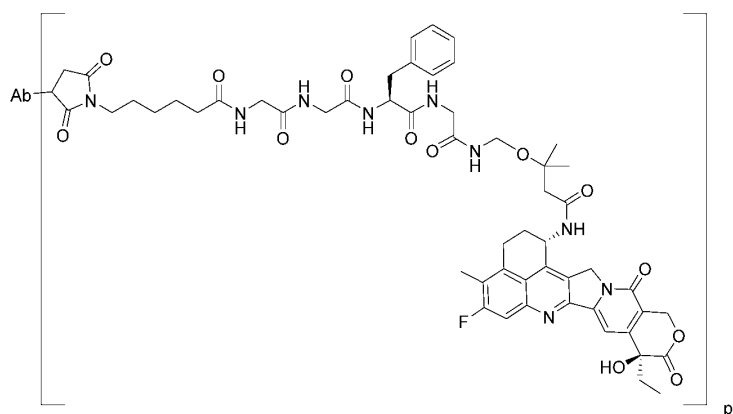
L^3 选自-CH₂-、-CH(CH₃)-、-C(CH₃)₂-、-CH₂CH₂-、-CH(CH₃)CH₂-或-C(CH₃)₂CH₂-。

在一些实施方式中, 本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物选自以下结构式:







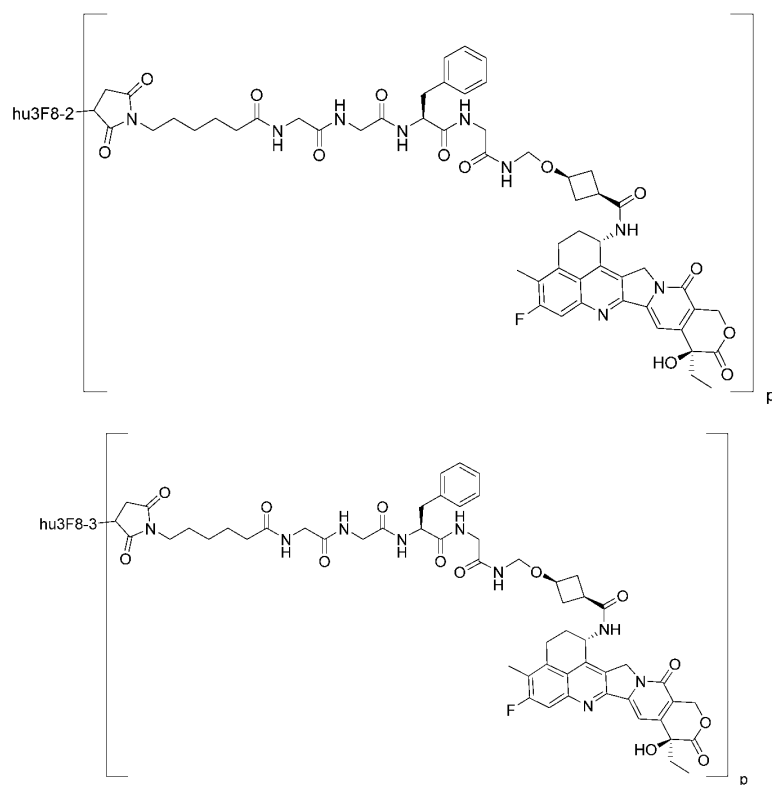


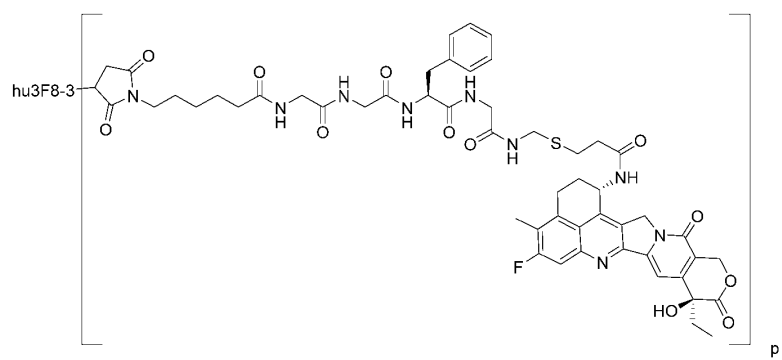
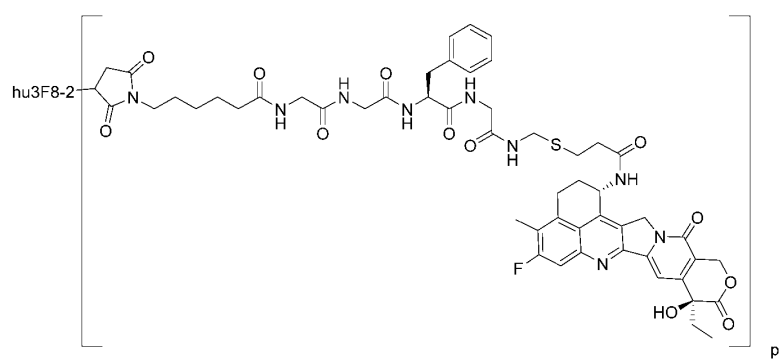
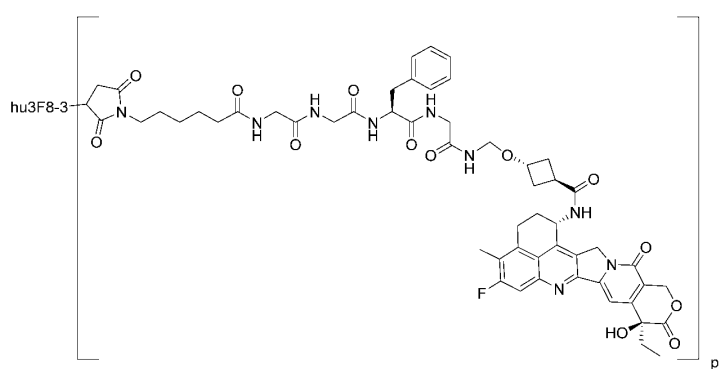
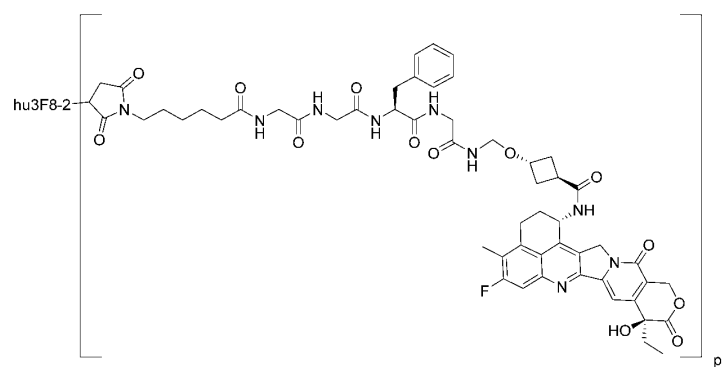
其中,

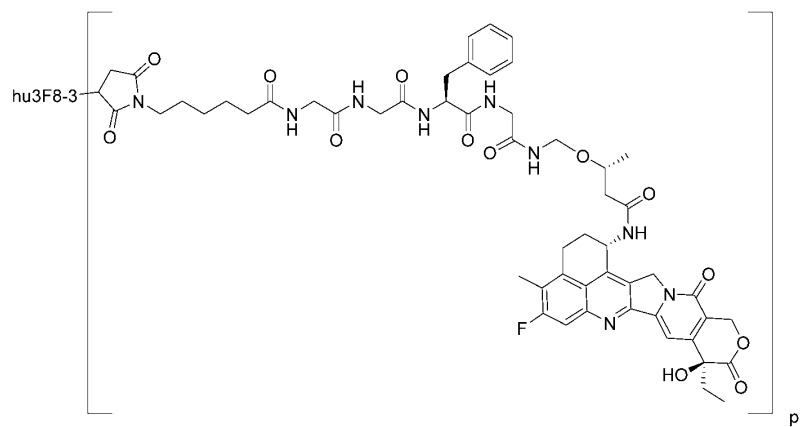
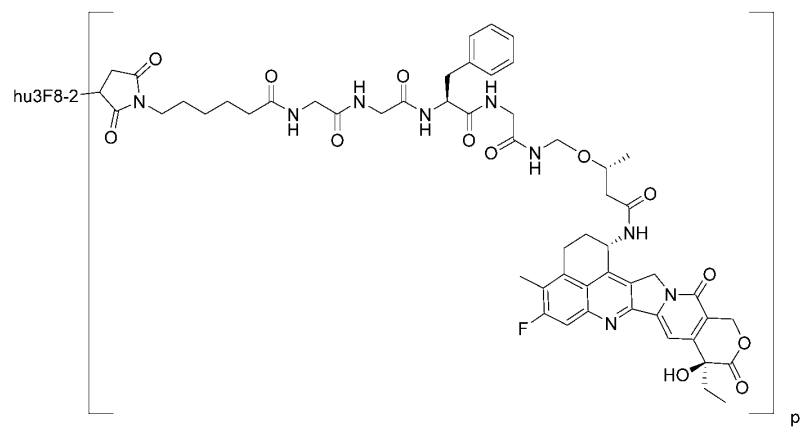
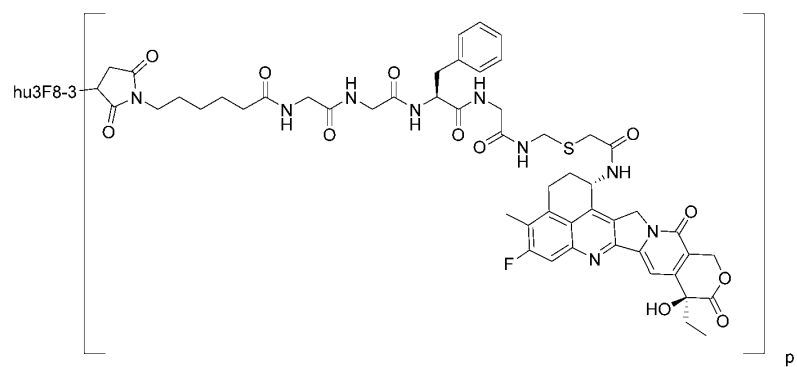
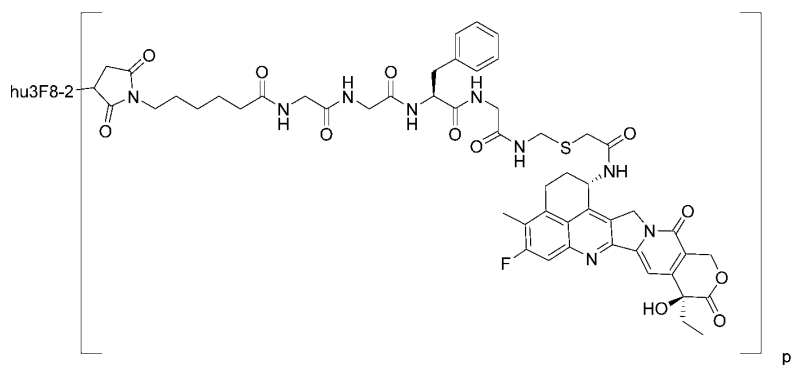
p 表示平均连接数, 且 p 选自 1 到 10 的整数或小数, 优选 3-8 的整数或小数;

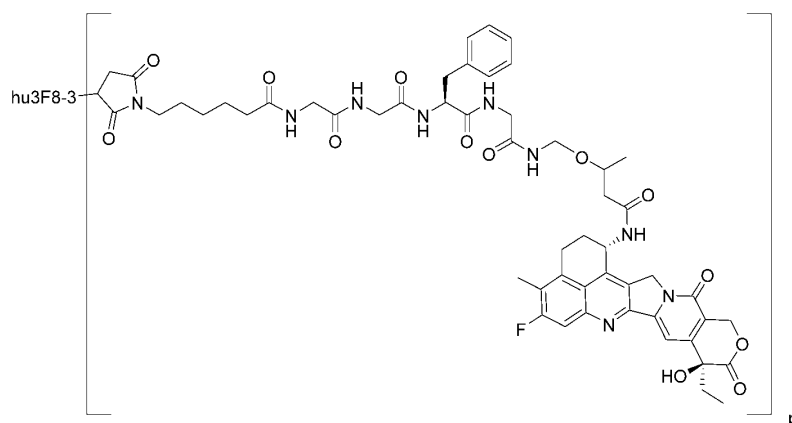
Ab 如本文任一方案所定义。

在又一个方面, 本发明提供了一种抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物选自:









其中，

p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 3-8 的整数或小数。

本发明 hu3F8-2 和 hu3F8-3 为抗 Her2 抗体，所述抗 Her2 抗体 hu3F8-2 的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO.: 13 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO.: 12 所示；所述抗 Her2 抗体 hu3F8-3 的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO.: 14 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO.: 12 所示。

在一些实施方式中，本发明所述平均连接数 p 可以为 2 到 8 的整数或小数。例如，所述平均连接数 n 可以为 3 到 8 的整数或小数。例如，所述平均连接数 n 可以为 1 到 2、2 到 3、3 到 4、4 到 5、5 到 6、6 到 7、7 到 8、8 到 9、9 到 10 的整数或小数。

在又一个方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含如本文所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，和药学上可接受的载体或赋形剂。

在又一个方面，本发明提供了如本文所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物或药物组合物在制备用于治疗 and/or 预防 Her3 介导的疾病或病症的药物中的用途，优选地，所述疾病或病症为癌症。

在又一个方面，本发明提供了一种治疗和/或预防 Her3 介导的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用如本文所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物或药物组合物，优选地，所述疾病或病症为癌症。

在又一个方面，本发明提供了如本文所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物或药物组合物，其用于治疗 and/or 预防 Her3 介导的疾病或病症，优选地，所述疾病或病症为癌症。

在一些实施方式中，本发明所述癌症选自肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌和食道癌。

在又一个方面，本发明提供了一种药物组合，其包含如本文所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或本文所述的药物组合物，以及一种或多种另外的治疗剂。

在又一个方面，本发明提供了一种试剂盒，其包括如本文所述的抗体药物偶联物、或本文所述的药物组合物。

附图说明

图 1：鼠源 3F8 特异性结合 SP2/0-HER3 细胞。

图 2: 通过 ELISA 测定鼠源 3F8 与人 HER3、HER2 和 EGFR 的结合亲和力。

图 3: 通过 ELISA 测定鼠源 3F8 识别人和猴 HER3 的效力。

图 4: 鼠源 3F8 阻断 NRG1 诱导的 HER3 磷酸化。

图 5: 鼠源 3F8 被不同 HER3 表面水平的细胞迅速摄取。

图 6: 抗 HER3 抗体在 BT474 皮下异种移植模型中抑制肿瘤生长。

图 7: 胃 PDX 模型 GAS078 的^[89Zr]Zr-ch3F8 成像。

图 8: 在 6 个 PDX 模型中具有代表性的^[89Zr]Zr-ch3F8 成像。

图 9A-9C: hu3F8 在热、酸和重复冻融的应激测试后保持结合亲和力。图 9A, 将 hu3F8 的三个克隆在 pH3.5 下孵育 0、2、4 和 6 小时, 然后进行 ELISA 测定以测量结合亲和力。图 9B, 将 hu3F8 的三个克隆在 40℃ 下孵育不同天, 然后进行 ELISA 测定以测量结合亲和力。图 9C, 将 hu3F8 的三个克隆重复冻融 3 或 5 个周期, 然后进行 ELISA 测定以测量结合亲和力。

图 10: 抗体药物偶联物的细胞内吞活性。

图 11A-11C: 抗体药物偶联物 ADC-1-X1 和 ADC-1-X2 对 HER3 靶标的肿瘤细胞的体外增殖抑制测试; 图 11A 为 Her3 高表达的 HCC1569 肿瘤细胞; 图 11B 为 Her3 高表达的 MDA-MB-453 肿瘤细胞; 图 11C 为 Her3 不表达的 MDA-MB-231 肿瘤细胞。

图 12A-12B: 抗体药物偶联物 ADC-1-X1 和 ADC-1-X2 对 HCC1569 荷瘤小鼠的抗肿瘤体内药效。图 12A 为肿瘤体积变化。图 12B 为肿瘤抑制率。

图 13A-13B: 抗体药物偶联物 ADC-1-X1 和 ADC-1-X2 对 Colo205 荷瘤小鼠的抗肿瘤体内药效。图 13A 为肿瘤体积变化。图 13B 为肿瘤抑制率。

图 14: 抗体药物偶联物 ADC-1-X2 对 NCI-H441 肺癌细胞荷瘤小鼠的抗肿瘤体内药效。

图 15: 抗体药物偶联物 ADC-1-X2 对人源肺癌 LU1542 皮下异种移植荷瘤小鼠的抗肿瘤体内药效。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式, 熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

术语定义

除非另有说明, 本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术, 这些都在本领域的技术范围内。

为了可以更容易地理解本发明, 某些科技术语具体定义如下。除非本文其它部分另有明确定义, 否则本文所用的科技术语都具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。关于本领域的定义及术语, 专业人员具体可参考 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。本文(包括权利要求书)所用单数形式包括其相应的复数形式, 除非文中另有明确规定。

术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。

术语“人表皮生长因子受体 3 (Her3)”，也称为受体酪氨酸蛋白激酶 ERBB-3 (ERBB3)，是 EGFR/erBB 家族的成员。与其他 erBB 家族成员 Her2 和 EGFR 不同，Her3 本身不具有激酶活性。因此，Her3 必须与其激酶活性成员 EGFR 或 Her2 结合，作为异二聚体来触发其下游活性。在与其天然配体 NRG1 结合后，Her3 经历构象变化、异二聚化和磷酸化，然后通过信号转导激活 MAPK、PI3K/Akt 和 PLC γ 。

术语“抗体”是指具有所需生物活性的任何形式的抗体。因此，其以最广义使用，具体包括但不限于单克隆抗体（包括全长单克隆抗体）、多克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、人源化抗体、全人抗体、嵌合抗体和骆驼源化单结构域抗体。

术语“单克隆抗体”是指获自基本均质抗体群的抗体，即组成该群的各个抗体除可少量存在的可能天然存在的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一抗原表位。相比之下，常规（多克隆）抗体制备物通常包括大量针对不同表位（或对不同表位有特异性）的抗体。修饰语“单克隆”表明获自基本均质抗体群的抗体的特征，且不得解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

术语“全长抗体”，是指在天然存在时包含四条肽链的免疫球蛋白分子：两条重(H)链(全长时约 50-70kDa)和两条轻(L)链(全长时约 25kDa)通过二硫键互相连接。每一条重链由重链可变区（在本文中缩写为 VH）和重链恒定区（在本文中缩写为 CH）组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每一条轻链由轻链可变区（在本文中缩写为 VL）和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区可被进一步细分为具有高可变性的互补决定区（CDR）和其间隔以更保守的称为框架区（FR）的区域。每一个 VH 或 VL 区由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白对宿主组织或因子（包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一组分（C1q）的结合。

术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区。在重链和轻链的各个可变区中存在 3 个 CDR，其对于各个重链和轻链可变区被命名为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 或 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。本发明的所述抗体的可变区 CDR 的精确氨基酸序列边界可使用许多公知的方案的任何方案来确定，包括基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia(Chothia 等人, (1989) Nature 342:877-883；Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)) 基于抗体序列可变性的 Kabat(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM(University of Bath), Contact(University College London), 国际 ImMunoGeneTics database(IMG) (1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。本发明抗体的 CDR 可以由本领域的技术人员根据本领域的任何方案(例如不同的指派系统或组合)确定边界。

应该注意，基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此，在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体，其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列，但是由于应用了不同的方案(例如不同的指派系统或组合)而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

术语抗体(“亲代抗体”)的“抗原结合片段”包括抗体的片段或衍生物，通常包括亲代抗体的抗原结合区或可变区(例如一个或多个 CDR)的至少一个片段，其保持亲代抗体的至少一些结合特异性。抗体结合片段的实例包括但不限于 Fab, Fab', F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子，例如 scFv；由抗体片段形成的纳米抗体(nanobody)和多特异性抗体。当抗原的结合活性在摩尔浓度基础上表示时，结合片段或衍生物通常保持其抗原结合活性的至少 10%。优选结合片段或衍生物保持亲代抗体的抗原结合亲和力的至少 20%、50%、70%、80%、90%、95%或 100%或更高。还预期抗体的抗原结合片段可包括不明显改变其生物活性的保守或非保守氨基酸取代(称为抗体的“保守变体”或“功能保守变体”)。

术语“嵌合抗体”是具有第一抗体的可变结构域和第二抗体的恒定结构域的抗体，其中第一抗体和第二抗体来自不同物种。通常，可变结构域获自啮齿动物等的抗体(“亲代抗体”)，而恒定结构域序列获自人抗体，使得与亲代啮齿动物抗体相比，所得嵌合抗体在人受试者中诱导不良免疫应答的可能性较低。

术语“人源化抗体”是指含有来自人和非人(例如小鼠、大鼠)抗体的序列的抗体形式。一般而言，人源化抗体包含基本所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本所有的超变环相当于非人免疫球蛋白的超变环，而所有或基本所有的构架(FR)区是人免疫球蛋白序列的构架区。人源化抗体任选可包含至少一部分的人免疫球蛋白恒定区(Fc)。

术语“全人抗体”是指只包含人免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。如在小鼠中、在小鼠细胞中或在来源于小鼠细胞的杂交瘤中产生，则全人抗体可含有鼠糖链。同样，“小鼠抗体”是指仅包含小鼠免疫球蛋白序列的抗体。或者，如果在大鼠中、在大鼠细胞中或在来源于大鼠细胞的杂交瘤中产生，则全人抗体可含有大鼠糖链。同样，“大鼠抗体”是指仅包含大鼠免疫球蛋白序列的抗体。

术语“同种型”抗体是指由重链恒定区基因提供的抗体种类(例如，IgM、IgE、IgG 诸如 IgG1、IgG2 或 IgG4)。同种型还包括这些种类之一的修饰形式，其中修饰已被产生来改变 Fc 功能，例如以增强或减弱效应子功能或对 Fc 受体的结合。

术语“Fc 区”用于定义包含至少一部分恒定区的免疫球蛋白重链的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变异 Fc 区。在一些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区从 Cys226 或 Pro230 延伸至重链的羧基末端。但是，Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447)可能存在或不存在(此段中的编号是根据 EU 编号系统，也称为 EU 索引，如 Rabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)。

术语“交叉反应”指的是对人类、猴、和/或鼠源(小鼠或大鼠)相同靶分子的抗原片段的结合。因此，“交叉反应”应被理解为与在不同物种中表达的相同分子 X 的种属间反应。识别人 Her3R、猴、和/或鼠 Her3R(小鼠或大鼠)的单克隆抗体的交叉反应特异性可通过 FACS 分析确定。

术语“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对其配偶物 Y 的亲和力可以通常由平衡解离常数(KD)代表,平衡解离常数是解离速率常数和结合速率常数(分别是 kdis 和 kon)的比值。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的 ForteBio 动力学结合测定法。

术语“不结合”蛋白或细胞是指,不与蛋白或细胞结合,或者不以高亲和力与其结合,即结合蛋白或细胞的 K_D 为 1.0×10^{-6} M 或更高,更优选 1.0×10^{-5} M 或更高,更优选 1.0×10^{-4} M 或更高、 1.0×10^{-3} M 或更高,更优选 1.0×10^{-2} M 或更高。

术语“高亲和性”对于 IgG 抗体而言,是指对于抗原的 K_D 为 1.0×10^{-6} M 或更低,优选 5.0×10^{-8} M 或更低,更优选 1.0×10^{-8} M 或更低、 5.0×10^{-9} M 或更低,更优选 1.0×10^{-9} M 或更低。对于其他抗体亚型,“高亲和性”结合可能会变化。例如,IgM 亚型的“高亲和性”结合是指 K_D 为 10^{-6} M 或更低,优选 10^{-7} M 或更低,更优选 10^{-8} M 或更低。

术语“细胞毒性药物”通常指毒性药物,所述细胞毒性药物可以在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物可以在足够高的浓度下杀死肿瘤细胞。所述“细胞毒性药物”可以包括毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,放射性同位素(例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 或 Lu 的放射性同位素),毒性药物,化疗药物,抗生素和核溶酶,例如,可以是毒性药物,包括但不限于喜树碱衍生物,例如,可以是喜树碱衍生物依沙替康(化学名: (1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-2,3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]咪唑并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮)。

术语“接头单元”或“接头结构”通常指指一端与配体连接而另一端与细胞毒性药物相连的化学结构片段或键,也可以连接其他接头后再与细胞毒性药物相连。所述直接或间接连接配体可以是指所述基团通过共价键直接连接配体,也可以是通过接头结构连接配体。例如,接头结构可以是本申请所述的-Lax-Lb-Lc-和或-La-Lb-Lc-所示的结构。例如,可以使用包含酸不稳定接头结构(例如脲)、蛋白酶敏感(例如肽酶敏感)接头结构、光不稳定接头结构、二甲基接头结构、或含二硫化物接头结构的化学结构片段或键作为接头结构。

术语某个结构“任选地与其它分子部分相连接”通常是指该结构不与任何其它化学结构相连接,或者该结构与一个或多个不同于该结构的其它化学结构(例如本申请所述的配体)相连接(例如,通过化学键连接、或通过接头结构连接)。

术语“配体-药物偶联物”通常是指配体通过稳定的连接单元与具有生物活性的细胞毒性药物相连。在本申请中“配体-药物偶联物”可以为抗体-药物偶联物(antibody drug conjugate, ADC),所述 ADC 可以是指把单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的连接单元与具有生物活性的细胞毒性药物相连。

在本申请中,术语“亚甲基”通常是指 1 个碳原子的基团除去两个氢原子所衍生的残基。亚甲基可以是取代的或非取代的,替代或者非替代的。术语“亚烷基”通常指饱和的直链或支链脂肪族烃基,其具有 2 个从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基,其可以为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团,例如含有 1 至 12 个碳原子,例如含有 1 至 6 个碳原子的亚烷基。亚烷基的非限制性实例包括但不限于亚甲基(-CH₂-)、1,1-亚乙基(-CH(CH₃)-)、1,2-亚乙基(-CH₂CH₂-)、1,1-亚丙基(-CH(CH₂CH₃)-)、1,2-亚丙基(-CH₂CH(CH₃)-)、1,3-亚丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)和 1,5-亚丁基(-

CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-)等。亚烷基可以是取代的或非取代的, 替代或者非替代的, 例如当被取代时, 取代基可以在任何可使用的连接点上被取代, 所述取代基优选独立地任选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基和氧代基中的一个或多个取代基所取代, 例如可以是氢、氘、氚、氟、氯、溴、碘、-NO₂、-CN、-OH、-SH、-NH₂、-C(O)H、-CO₂H、-C(O)C(O)H、-C(O)CH₂C(O)H、-S(O)H、-S(O)₂H、-C(O)NH₂、-SO₂NH₂、-OC(O)H、-N(H)SO₂H、或 C₁₋₆ 脂肪族基团。

术语“亚芳基”通常是指具有两个从芳环的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。术语“芳环”可以指具有共轭的 π 电子体系的 6 至 14 元全碳单环或稠合多环(也就是共享毗邻碳原子对的环), 可以为 6 至 10 元, 例如苯和萘。所述芳环可以稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上, 其中与母体结构连接在一起的环为芳基环。芳基可以是取代的或非取代的, 当被取代时, 取代基优选为一个或多个以下基团, 其独立地选自以下组: 烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、和杂环烷硫基。

在本申请中, 术语“亚杂芳基”通常是指具有两个从杂芳环的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。术语“杂芳环”指包含 1 至 4 个杂原子、5 至 14 个环原子的杂芳族体系, 其中杂原子可以选自以下组: 氧、硫和氮。杂芳基可以为 5 至 10 元, 可以为 5 元或 6 元, 例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环基或环烷基环上, 其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环。亚杂芳基可以是任选取代的或非取代的, 当被取代时, 取代基优选为一个或多个以下基团, 其独立地选自以下组: 烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、和杂环烷硫基。

术语“亚杂环基”通常是指稳定的不具有芳香性的 3 元-7 元单环结构, 融合的 7 元-10 元双环杂环结构或桥联的 6 元-10 元双环杂环结构, 这些环状结构即可以是饱和的, 也可以是部分饱和的, 除碳原子外, 这些环状结构中还可能含有一个或多个杂原子, 其中杂原子可以选自以下组: 氧、硫和氮。例如是含有 1-4 个上述定义的杂原子。当用来表示杂环环状结构上的原子时, 术语“氮”可以包括发生过取代反应的氮。亚杂环基可以是取代的或非取代的。

术语“亚碳环基”通常是指具有两个从碳环的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。术语“碳环”通常指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃, 碳环包含 3 至 20 个碳原子, 可以包含 3 至 12 个碳原子, 可以包含 3 至 10 个碳原子, 可以包含 3 至 8 个碳原子, 例如包含 3 至 6 个碳原子。单环碳环的非限制性实例包括环丙烷、环丁烷、环戊烷、环戊烯、环己烷、环己烯、环己二烯、环庚烷、环庚三烯、环辛烷等; 多环碳环可以包括螺环、稠环和桥环的碳环。例如, “3 到 6 元饱和的碳环基”包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、亚环丙基、亚环丁基、亚环戊基或亚环己基。碳环基和亚碳环基可以是取代的或非取代的, 例如可以被一个或多个卤素、C₁₋₆ 脂肪族基团或被卤素取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团所取代。

在本申请中, 术语“部分不饱和的”通常是指环状结构中分子间至少含一个双键或三键。术语“部分不饱和”涵盖带有多处不饱和的环状结构, 但并非意在包括本申请所定义的芳环或

杂芳环。术语“不饱和的”表示部分具有一个或多个不饱和度。

术语“卤素”通常是指氟、氯、溴、碘，例如可以是氟、氯。

术语“脂肪族基团”通常是指具有 1-12 个碳原子的直链烃、支链烃或环状结构的烃，这些烃或者是完全饱和烃；或者带有一个或多个不饱和单元，但不饱和单元不是芳香类基团。例如，适用的脂肪族基团可以包括取代的或未取代的直链、支链或环状结构的烷基、烯基、炔基以及这些基团的混合物；比如是（环烷基）烷基、（环烯基）烷基或（环烷基）烯基。例如，脂肪族基团具有 1-12、1-8、1-6、1-4 或 1-3 个碳原子。例如，“C₁₋₆ 脂肪族基团”指的是具有 1-6 个碳原子的如上所述的脂肪族基团，包括但不限于具有 1-6 个碳原子的直链、支链或环状结构的烷基、烯基或炔基，例如甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基等。

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

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

在本申请中，术语 0 个或多个（例如，0 个或多个至少 1 个、0 个或 1 个、0 个）亚甲基单元被“替代”通常指当所述结构包含 1 个或多个亚甲基单元时，所述一个或多个亚甲基单元可以不被替代，或被一个或多个不是亚甲基的基团（例如-NHC(O)-、-C(O)NH-、-C(O)-、-OC(O)-、-C(O)O-、-NH-、-O-、-S-、-SO-、-SO₂-、-PH-、-P(=O)H-、-NHSO₂-、-SO₂NH-、-C(=S)-、-C(=NH)-、-N=N-、-C=N-、-N=C-或-C(=N₂)-）所替代。

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

术语“药学上可接受的盐”或“可药用盐”通常是指本申请药物偶联物的盐，这类盐用于哺乳动物体内时可以具有安全性和/或有效性，且可以具有应有的生物活性，本申请抗体药物偶联物可以与酸形成盐，药学上可接受的盐的非限制性实例包括：盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

术语“溶剂化物”或“溶剂化合物”通常是指本申请的药物偶联物与一种或多种溶剂分子形成可药用的溶剂化物，溶剂分子的非限制性实例包括水、乙醇、乙腈、异丙醇、DMSO、乙酸乙酯。

术语“载药量”通常是指每个配体上加载的细胞毒性药物平均数量，也可以表示为细胞毒性药物和抗体量的比值，细胞毒性药物载量的范围可以是每个配体(Ab)连接 0-12 个，例如 1-

10 个细胞毒性药物。在本申请的实施方式中，载药量表示为 Na，示例性的可以为 1，2，3，4，5，6，7，8，9，10 的均值。可用常规方法如 UV/可见光光谱法，质谱，ELISA 试验和 HPLC 特征鉴定偶联反应后每个 ADC 分子的载药量。

“药学上可接受的载体”是指药物制剂或组合物中除活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂，赋形剂，稳定剂或防腐剂。

术语“包含”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。术语“以上”、“以下”通常是指包含本数的情况。

“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。如本文中所示，术语“cyno”或“食蟹猴”是指食蟹猴。

“联合”一种或多种其它治疗剂的施用包括同时(共同)施用和任意次序的连续施用。

“治疗有效量”、“治疗有效剂量”和“有效量”是指本发明的 Her3 抗体或其抗原结合片段当单独或与其它治疗药物组合给予细胞、组织或受试者时，有效预防或改善一种或多种疾病或病况的症状或该疾病或病况的发展的量。治疗有效剂量还指足以导致症状改善的抗体或其抗原结合片段的量，例如治疗、治愈、预防或改善相关医学病况或者提高这类病况的治疗、治愈、预防或改善的速度的量。当对个体施用单独给予的活性成分时，治疗有效剂量仅是指该成分。当组合施用时，治疗有效剂量是指引起治疗效果的活性成分的综合量，不论是组合、依次给予还是同时给予。治疗剂的有效量将导致诊断标准或参数提高至少 10%，通常至少 20%，优选至少约 30%，更优选至少 40%，最优选至少 50%。

术语“癌症”在本文中用于指表现出异常高水平的增殖和生长的一组细胞。癌症可能是良性的（也称为良性肿瘤），恶性前或恶性。癌细胞可以是实体癌细胞或白血病癌细胞。本文使用的术语“肿瘤”是指包含癌症的一个或多个细胞。术语“肿瘤生长”在本文中用于指代包含癌症的一种或多种细胞的增殖或生长，其导致癌症的大小或程度的相应增加。

抗 Her3 抗体

本申请公开了一种新的抗 HER3 抗体，其在体外和体内有效抑制肿瘤细胞生长，具有很好的安全性。用过表达人 HER3 的 SP2/0 细胞免疫的小鼠杂交瘤中鉴定出 HER3 抗体 3F8。3F8 以纳摩尔结合亲和力和识别人和猴 HER3，并对其他 ERBB 家族成员具有高选择性。此外，具有不同 HER3 水平的细胞可以快速有效地摄取 HER3，HER3 被认为是理想的 ADC 药物所必需的特性。PET 成像研究表明， $[^{89}\text{Zr}]$ Zr-3F8 在 PDX 模型的肿瘤中显著积累，表明 3F8 可能是一种高效载体，将细胞毒性带入肿瘤细胞。3F8 和 hu3F8 在 PDX 模型中保持了上述结合亲和力和、选择性和肿瘤抑制的特征。hu3F8 具有良好的可开发性，在反复冻融处理、酸温育和 40℃ 储存的应激试验中，其结合亲和力、聚集和翻译后修饰几乎没有变化。

本发明术语“抗 Her3 抗体”、“抗 Her3”、“Her3 抗体”或“结合 Her3 的抗体”是指能够以足够的亲和力结合 Her3 蛋白或其片段以致所述抗体可以用作靶向 Her3 中的诊断剂和/或治疗剂。

本发明所述的抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包括申请号为 PCT/CN2021/099998 中描述的任意一个抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，该申请公开的全部内容通过引入全文并入本文。

在一些方案中，在本发明的药物偶联物、组合物、用途或方法中使用的抗体的 CDR 序列包括来自于 PCT/CN2021/099998 中描述的抗体 hu3F8-2 的 CDR 序列。在一些方案中，在本发明的药物偶联物、组合物或用途中使用的抗体的可变区序列包括来自于 PCT/CN2021/099998 中描述的抗体 hu3F8-1 的可变区序列。在一些方案中，在本发明的药物偶联物、组合物、用途或方法中使用的抗体的可变区序列包括来自于 PCT/CN2021/099998 中描述的抗体 hu3F8-2 的可变区序列。在一些方案中，在本发明的药物偶联物、组合物或用途中使用的抗体的可变区序列包括来自于 PCT/CN2021/099998 中描述的抗体 hu3F8-3 的可变区序列。

在本文实施例中所用的非限制性、示范性抗体选自 PCT/CN2021/099998 中描述的人源化抗体 hu3F8-1，hu3F8-2 和 hu3F8-3，其氨基酸序列见下表。

在本文中，hu3F8-1、hu3F8-2 和 hu3F8-3 分别对应 PCT/CN2021/099998 中的克隆 1(clone-1)、克隆 2 (clone-2) 和克隆 3 (clone-3)。

人源化抗 Her3 抗体氨基酸序列 (KABAT 方案)

人源化抗体	hu3F8-1	hu3F8-2	hu3F8-3
HCDR1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:1
HCDR2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:2
HCDR3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:3
LCDR1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:4
LCDR2	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:5
LCDR3	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:6
VH	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
VL	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:8
HC	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14
LC	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:12

可采用用于产生抗体的任何合适方法来产生本发明的抗体。任何合适形式的 Her3 都可用作产生抗体的免疫原 (抗原)。通过举例而非限制，任何 Her3 变体或其片段都可用作免疫原。在一些实施方式中，产生鼠源的单克隆抗人 Her3 抗体的杂交瘤细胞可通过本领域公知的方法产生。来源于啮齿动物 (如小鼠) 的抗体在体内用作治疗药物时可能引起不需要的抗体免疫原性，重复使用导致人体产生针对治疗性抗体的免疫应答，这类免疫应答至少导致丧失治疗功效，而严重的则导致潜在致死过敏反应。降低啮齿动物抗体的免疫原性的一种方法包括嵌合抗体的产生，其中将小鼠可变区与人恒定区融合 (Liu 等 (1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-43)。然而，嵌合抗体中的完整啮齿动物可变区的保留仍可能在患者中引起有害的免疫原性。将啮齿动物可变结构域的互补决定区 (CDR) 环移植到人构架上 (即人源化) 已被用于进一步将啮齿动物序列减至最低 (Jones 等 (1986)Nature 321 :522; Verhoeyen 等 (1988)Science 239:1534)。

在一些实施方式中，本发明的嵌合或人源化抗体可基于所制备的鼠单克隆杂交瘤抗体的序列来制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的 DNA 可以从目标鼠杂交瘤中获得，并且使用标准分子生物学技术进行工程改造以包含非鼠 (例如人) 免疫球蛋白序列。

在一些实施方式中，本发明所述的嵌合 Her3 抗体，可使用本领域已知的方法将杂交瘤来源的免疫球蛋白重链和轻链可变区与人 IgG 恒定区有效连接（参见例如属于 Cabilly 等人的美国专利 No.4,816,567），获得嵌合型重链和嵌合型轻链来制备。在一些实施方式中，本发明的嵌合抗体包含的恒定区可选自任何人 IgG 亚型，如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，优选 IgG4。

在一些实施方式中，本发明的嵌合 Her3 抗体可由嵌合型轻链与嵌合型重链表达质粒“混合和匹配”转染表达细胞获得，此类“混合和匹配”的抗体的 Her3 结合可使用上述结合测定和其它常规结合测定（例如，ELISA）来进行测试。

本发明所述的人源化抗体，可以使用本领域已知的方法将鼠源 CDR 区插入人种系框架区。参见 Winter 等人的美国专利 No. 5,225,539 及 Queen 等人的美国专利 No. 5,530,101；5,585,089；5,693,762 和 6,180,370。

在一些实施方式中，氨基酸变化包括氨基酸缺失、插入或置换。在一些实施方式中，本发明的抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包括具有已通过氨基酸缺失、插入或置换突变的，但仍与上述抗体（特别地在上述序列中描绘的 CDR 区中）有至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的氨基酸序列的那些抗体。在一些实施方式中，本发明的抗体与具体序列中描绘的 CDR 区相比较时，在 CDR 区中已通过氨基酸缺失、插入或置换的氨基酸突变不超过 1、2、3、4 或 5 个。

在一些实施方式中，可在本文中所提供抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸修饰，以此产生 Fc 区变体。Fc 区变体可包含在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰（例如置换）的人 Fc 区序列（例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc 区）。

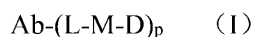
在一些实施方式中，可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体，例如“硫代 MAb”，其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基置换。

在一些实施方式中，本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其他非蛋白质部分。适合抗体衍生作用的部分包括，但不限于，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1, 3-二烷、聚-1, 3, 6-三烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸（均聚物或无规共聚物）、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇（例如甘油）、聚乙烯醇、及其混合物。

药物偶联物

本申请提供了一种抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物形式，其可以具有选自以下组的一种或多种效果：（1）具有对肿瘤细胞的体外增殖的抑制活性；（2）具有靶向抑制性；（3）具有血浆稳定性；（4）具有体内抑瘤效果；（5）具有旁观杀伤效应（Bystander Effect）；（6）具有抗转运体转运能力；（7）具有体内肿瘤靶向能力；和（8）具有良好的体内安全性。

本申请提供一种抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物结构如式（I）所示：



其中，

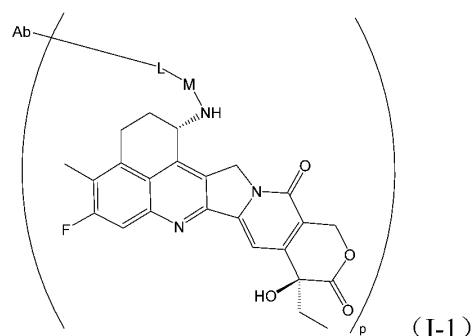
L 和 M 是接头单元；

D 是细胞毒性药物；

p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 3-8 的整数或小数；

Ab 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；优选地，本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：(I) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区；或(II) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区；或(III) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区；更优选地，本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的轻链；或(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的轻链；或(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的轻链。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物结构如式 (I-1) 所示：



其中，

L 和 M 是接头单元；

p 表示平均连接数，且 n 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 3-8 的整数或小数；

Ab 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；优选地，本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：(I) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区；或(II) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区；或(III) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区；更优选地，本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ

ID NO:12 所示的轻链；或（2）氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的轻链；或（3）氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的轻链。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中，

M 为 $-L^2-L^3-X-L^1-$ ；

L^2 为 $-O-$ 或 $-S-$ ；

L^3 为 $-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-$ ，m 选自 0、1、2 或 3，其中当 L^3 包含亚甲基单元时，所述 L^3 的 0 个或 1 个亚甲基单元可以被 $-C(O)-$ 、或 $-C(=S)-$ 替代；优选地， L^3 选自单键、 $-C(R^{1a})(R^{1b})-$ 或 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$ ；更优选地， L^3 选自单键、 $-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)CH_2-$ 或 $-C(CH_3)_2CH_2-$ ；

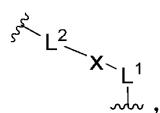
L^1 为 $-(C(R^{2a})(R^{2b}))_n-$ ，n 选自 1、2 或 3，其中当 L^1 可以包含亚甲基单元时，所述 L^1 的 0 个或 1 个亚甲基单元可以被 $-C(O)-$ 、或 $-C(=S)-$ 替代；优选地， L^1 选自 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$ 、 $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$ 或 $-C(O)-$ ；更优选地， L^1 选自 $-CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-CH(CH_3)C(O)-$ 或 $-C(O)-$ ；

X 选自 3 到 6 元饱和的碳环基、3 到 6 元饱和的杂环基或单键，所述 3 到 6 元饱和的碳环基和 3 到 6 元饱和的杂环基任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代；优选地，X 为任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基或单键；更优选地，X 为 3 到 6 元饱和的碳环基或单键；

其中每个 R^{1a} ， R^{1b} ， R^{2a} ， R^{2b} ， R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团；

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中，所述-M-选自：



L^2 为 $-O-$ 或 $-S-$ ；优选地， L^2 为 $-O-$ ；

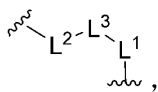
X 选自任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基；优选地，X 选自环丙基、环丁基、环戊基或环己基；更优选地，X 为环丙基；更优选地，X 为环丁基；更优选地，X 为环己基；

L^1 选自 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$ 、 $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$ 或 $-C(O)-$ ；优选地， L^1 为 $-C(O)-$ ；

其中每个 R^{2a} ， R^{2b} 或 R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团；

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些实施方式中，本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述-M-选自：



L^2 为-O-或-S-; 优选地, L^2 为-O-; 优选地, L^2 为-S-;

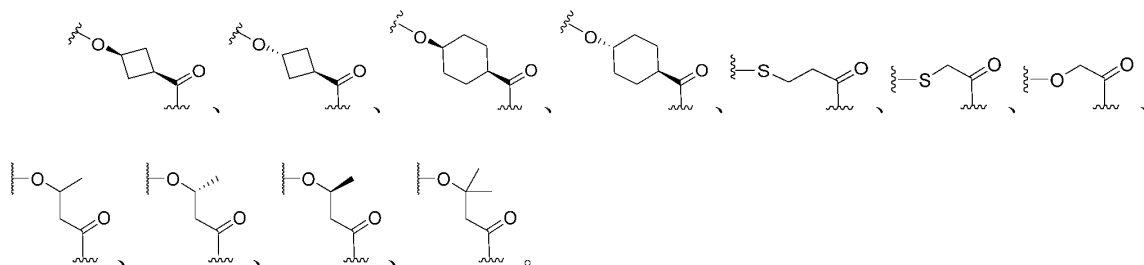
L^3 选自-C(R^{1a})(R^{1b})-或-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-; 优选地, L^3 选自-CH₂-、-CH(CH₃)-、-C(CH₃)₂-、-CH₂CH₂-、-CH(CH₃)CH₂-或-C(CH₃)₂CH₂-; 优选地, L^3 选自 CH₂-、-CH(CH₃)-、-CH₂CH₂-。

L^1 选自-C(R^{2a})(R^{2b})-、-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-或-C(O)-; 优选地, 优选地, L^1 为-C(O)-;

其中每个 R^{1a} , R^{1b} , R^{2a} 或 R^{2b} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团;

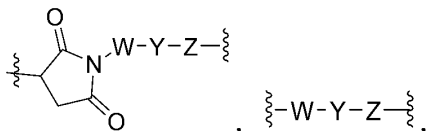
其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

在一些优选地实施例中, 本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中所述-M-选自:



在一些实施方式中, 本发明所述抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中所述 L 为-L_a-L_b-L_c-,

所述-L_a-为



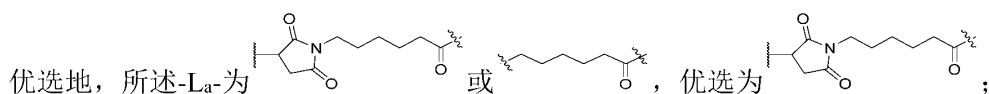
其中, W 为-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-, 其中 wn 为 1、2、3 或 6, W 的 1 个亚甲基单元各自独立地被-Cyr-、-N(R^{wx})C(O)-、-C(O)N(R^{wx})-、或-C(O)-替代; 优选地, W 为-(C(R^{wa})(R^{wb}))₂-或-(C(R^{wa})(R^{wb}))₃-; 优选地, W 为-CH₂CH₂CH₂-或-CH₂CH₂-;

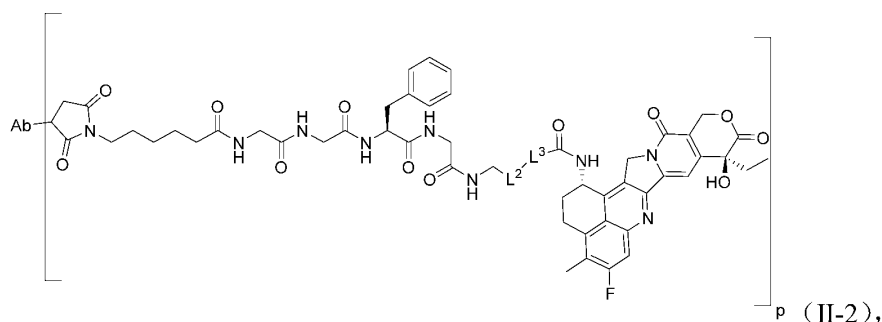
Y 为-(OCH₂CH₂)_{yn}-O_{yp}-其中 yn 为 0、4 或 8, yp 为 0 或 1; 优选地, Y 为单键;

Z 为-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn}-, 其中 zn 为 1、2 或 3, Z 的 1 个亚甲基单元各自独立地被-Cyr-、-N(R^{zx})C(O)-、-C(O)N(R^{zx})-、或-C(O)-替代, -Cyr-为 3 到 10 元饱和的亚碳环基, 其中所述-Cyr-是未取代的或独立地被 1 到 3 个取代基 R^{cx} 取代; 优选地, Z 为-(C(R^{wa})(R^{wb}))₂C(O)-或-(C(R^{wa})(R^{wb}))₃C(O)-; 优选地, Z 为-CH₂CH₂CH₂C(O)-或 CH₂CH₂C(O)-;

其中每个 R^{wa} , R^{wb} , R^{za} , R^{zb} , R^{wx} , R^{zx} , R^{cx} 各自独立地为氢、卤素、-OR^r或被 R^r任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团;

其中每个 R^r各自独立地为氢、卤素或 C₁₋₆ 脂肪族基团;





其中,

L^2 为-O-或-S-; 优选地, L^2 为-O-, 优选地, L^2 为-S-,

X 选自任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基; 优选地, X 选自环丙基、环丁基、环戊基或环己基;

L^3 选自-C(R^{1a})(R^{1b})-或-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-, 其中每个 R^{1a} 、 R^{1b} 或 R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团, 其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素; 优选地, L^3 选自-CH₂-、-CH(CH₃)-、-C(CH₃)₂-、-CH₂CH₂-、-CH(CH₃)CH₂-或-C(CH₃)₂CH₂-;

p 表示平均连接数, 且 n 选自 1 到 10 的整数或小数, 优选 3-8 的整数或小数;

Ab 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 优选地, 本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含: (I) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区, 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区; 或(II) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示的重链可变区, 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区; 或(III) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的重链可变区, 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区; 更优选地, 本发明所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含: (1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的重链, 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的轻链; 或 (2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示的重链, 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的轻链; 或 (3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的重链, 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的轻链。

在一些实施方式中, 本发明所述平均连接数 p 可以为 2 到 8 的整数或小数。例如, 所述平均连接数 n 可以为 3 到 8 的整数或小数。例如, 所述平均连接数 n 可以为 1 到 2、2 到 3、3 到 4、4 到 5、5 到 6、6 到 7、7 到 8、8 到 9、9 到 10 的整数或小数。

药物组合物和药物制剂

在又一个方面, 本发明提供了一种药物组合物, 其包含如本文所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 和药学上可接受的载体或赋形剂。

应理解, 本发明提供的抗 Her3 抗体药物偶联物或、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 或其药物组合物可以整合制剂中合适的运载体、赋形剂和其他试剂以联合给药, 从而提供改善的转移、递送、耐受等。

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

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗 Her3 抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐与一种或多种任选的药用辅料(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A.编辑(1980))混合来制备包含本文所述的抗 Her3 抗体的药物制剂，优选地以水溶液或冻干制剂的形式。

本发明的药物组合物或制剂还可以包含一种或多种其它活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的，优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。在一些实施方式中，其它的活性成分为化疗剂、免疫检查点抑制剂、生长抑制剂、抗生素或已知的各种抗肿瘤或抗癌剂，所述活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。在一些实施方式中，本发明的药物组合物还包含编码抗 Her3 抗体的多核苷酸的组合物。

在又一个方面，本发明提供了一种药物组合，其包含如本文所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或本文所述的药物组合物，以及一种或多种另外的治疗剂。

在又一个方面，本发明提供了一种试剂盒，其包括如本文所述的抗体药物偶联物或、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物或本文所述的药物组合物，优选其进一步包括给药装置。

医药用途

在又一个方面，本发明提供了如本文所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，或本文所述的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防 Her3 介导的疾病或病症的药物中的用途，优选地，所述疾病或病症为癌症。

在又一个方面，本发明提供了如本文所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，或本文所述的药物组合物，其用于治疗 and/或预防 Her3 介导的疾病或病症，优选地，所述疾病或病症为癌症。

在又一个方面，本发明提供了一种治疗和/或预防 Her3 介导的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用如本文所述的抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，或本文所述的药物组合物，优选地，所述疾病或病症为癌症。

在一些实施方式中，所述癌症选自肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、和食道癌。

在一些实施方式中，本发明给药方式包括但不限于口服、静脉内、皮下、肌内、动脉内、关节内(例如在关节炎关节中)、通过吸入、气雾剂递送或肿瘤内给予等。

在一些实施方式中，本发明提供了向受试者联合施用治疗有效量的一种或多种疗法(例如治疗方式和/或其它治疗剂)。在一些实施方式中，所述疗法包括手术治疗和/或放射疗法。

在一些实施方式中，本发明提供的方法或用途还包括向个体施用一种或多种疗法(例如治疗方式和/或其它治疗剂)。可以单独或与疗法中的其它治疗剂组合使用本发明的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐。例如，可以与至少一种另外的治疗剂共施用。

本申请所述的药物偶联物可以具有对肿瘤细胞的体外增殖的抑制活性。所述抑制活性可以是本申请的药物偶联物加入肿瘤细胞的培养基中，相比于加入阴性对照或者对照药物，所述肿瘤细胞细胞增殖能力下降 1%以上、2%以上、4%以上、5%以上、8%以上、10%以上、15%

以上、18%以上、20%以上、25%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、或 95%以上。例如，所述抑制活性可以是对于肿瘤细胞的 IC₅₀ 值 (nM) 可以为 10000 以下、5000 以下、4000 以下、3000 以下、2000 以下、1000 以下、500 以下、400 以下、300 以下、200 以下、150 以下、120 以下、110 以下、100 以下、99 以下、98 以下、97 以下、95 以下、90 以下、80 以下、75 以下、70 以下、65 以下、62 以下、60 以下、50 以下、40 以下、30 以下、25 以下、23 以下、22 以下、20 以下、19 以下、18 以下、18.5 以下、17 以下、15 以下、12 以下、10 以下、9 以下、8.5 以下、7 以下、6.7 以下、6 以下、5.9 以下、5.5 以下、5.0 以下、4.8 以下、4.5 以下、4.4 以下、4 以下、3.5 以下、3 以下、2.5 以下、2 以下、1.5 以下、1.0 以下、0.5 以下、0.3 以下、0.29 以下、0.25 以下、0.21 以下、0.20 以下、0.18 以下、0.17 以下、0.15 以下、0.12 以下、0.10 以下、0.09 以下、0.08 以下、0.07 以下、0.06 以下、0.05 以下、0.04 以下、0.03 以下、0.02 以下或 0.01 以下。例如，所述肿瘤细胞可以包括但不限于实体瘤细胞，例如所述肿瘤细胞包括但不限于胃癌细胞、或乳腺癌细胞，例如所述肿瘤细胞可以包括但不限于 HCC1569 细胞或 MDA-MB-453 细胞。

本申请所述的药物偶联物可以具有靶向抑制性。所述靶向抑制性可以是本申请的药物偶联物加入特定靶标高表达的肿瘤细胞的培养基中，相比于加入阴性对照或者对照药物，所述特定靶标高表达的肿瘤细胞细胞增殖能力下降 1%以上、2%以上、4%以上、5%以上、8%以上、10%以上、15%以上、18%以上、20%以上、25%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、或 95%以上。例如，所述靶向抑制性可以是对于特定靶标高表达的肿瘤细胞的 IC₅₀ 值 (nM) 可以为 10000 以下、5000 以下、4000 以下、3000 以下、2000 以下、1000 以下、500 以下、400 以下、300 以下、200 以下、185 以下、150 以下、120 以下、110 以下、100 以下、99 以下、98 以下、97 以下、95 以下、91 以下、80 以下、74 以下、70 以下、65 以下、62 以下、60 以下、50 以下、40 以下、30 以下、25 以下、23 以下、22 以下、20 以下、19 以下、18 以下、18.5 以下、17 以下、15 以下、12 以下、10 以下、9 以下、8.5 以下、7 以下、6.7 以下、6 以下、5.9 以下、5.5 以下、5.0 以下、4.8 以下、4.5 以下、4.4 以下、4 以下、3.5 以下、3 以下、2.5 以下、2 以下、1.5 以下、1.0 以下、0.5 以下、0.3 以下、0.29 以下、0.25 以下、0.21 以下、0.20 以下、0.18 以下、0.17 以下、0.15 以下、0.12 以下、0.10 以下、0.09 以下、0.08 以下、0.07 以下、0.06 以下、0.05 以下、0.04 以下、0.03 以下、0.02 以下或 0.01 以下。例如，所述特定靶标高表达的肿瘤细胞可以包括但不限于实体瘤细胞，例如所述特定靶标高表达的肿瘤细胞包括但不限于胃癌细胞、或乳腺癌细胞，例如所述特定靶标高表达的肿瘤细胞可以包括但不限于 HCC1569 细胞或 MDA-MB-453 细胞。所述特定靶标可以包括但不限于 Her3。

本申请所述的药物偶联物可以具有血浆稳定性。所述血浆稳定性可以是本申请的药物偶联物加入血浆中，所述药物偶联物释放的细胞毒性药物在 1 天、3 天、5 天、7 天、14 天、20 天或 30 天的释放率不超过 50%、不超过 40%、不超过 30%、不超过 20%、不超过 10%、不超过 7%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%、不超过 1.9%、不超过 1.8%、不超过 1.7%、不超过 1.6%、不超过 1.5%、不超过 1.4%、不超过 1.3%、不超过 1.2%、不超过 1.1%、不超过 1.0%、不超过 0.9%、不超过 0.8%、不超过 0.7%、不超过 0.6%、不超过 0.5%、不超过 0.4%、不超过 0.3%、不超过 0.2%或不超过 0.1%。

本申请所述的药物偶联物可以具有体内抑瘤效果。所述抑瘤效果可以是本申请的药物偶联物施用于动物，相比于加入阴性对照或者对照药物，所述动物的肿瘤在 1 天、3 天、5 天、7 天、14 天、20 天、21 天或 30 天的体积减少 1% 以上、2% 以上、4% 以上、5% 以上、8% 以上、10% 以上、15% 以上、18% 以上、20% 以上、25% 以上、40% 以上、50% 以上、55% 以上、60% 以上、70% 以上、73% 以上、75% 以上、80% 以上、90% 以上、或 95% 以上，或者相比于施用阴性对照或者对照药物，所述动物的肿瘤在 1 天、3 天、5 天、7 天、14 天、20 天、21 天或 30 天的体积减少 1.1 倍以上，1.3 倍以上，1.5 倍以上，两倍以上，三倍以上，五倍以上，十倍以上，二十倍以上，二十二倍以上，三十倍以上，五十倍以上，一百倍以上，五百倍以上，一千倍以上，或一千五百倍以上。所述动物可以包括但不限于哺乳动物，例如所述动物可以包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠、猴或人。所述施用可以包括但不限于口服、静脉注射、静脉滴注、腹腔注射、或局部给药。

本申请所述的药物偶联物可以具有旁观杀伤效应 (Bystander Effect)。所述旁观杀伤效应可以是本申请的药物偶联物对特定靶标低表达的肿瘤细胞细胞的细胞增殖无明显抑制作用，而在特定靶标低表达的肿瘤细胞与特定靶标高表达的肿瘤细胞共培养中，本申请的药物偶联物可以同时抑制特定靶标低表达的肿瘤细胞与特定靶标高表达的肿瘤细胞的细胞增殖。例如，在特定靶标低表达的肿瘤细胞与特定靶标高表达的肿瘤细胞共培养中，所述抑制活性可以是对于特定靶标低表达的肿瘤细胞的 IC50 值 (nM) 可以为 10000 以下、5000 以下、4000 以下、3000 以下、2000 以下、1000 以下、500 以下、400 以下、300 以下、200 以下、185 以下、150 以下、120 以下、110 以下、100 以下、99 以下、98 以下、97 以下、95 以下、91 以下、80 以下、74 以下、70 以下、65 以下、62 以下、60 以下、50 以下、40 以下、30 以下、25 以下、23 以下、22 以下、20 以下、19 以下、18 以下、18.5 以下、17 以下、15 以下、12 以下、10 以下、9 以下、8.5 以下、7 以下、6.7 以下、6 以下、5.9 以下、5.5 以下、5.0 以下、4.8 以下、4.5 以下、4.4 以下、4 以下、3.5 以下、3 以下、2.5 以下、2 以下、1.5 以下、1.0 以下、0.5 以下、0.3 以下、0.29 以下、0.25 以下、0.21 以下、0.20 以下、0.18 以下、0.17 以下、0.15 以下、0.12 以下、0.10 以下、0.09 以下、0.08 以下、0.07 以下、0.06 以下、0.05 以下、0.04 以下、0.03 以下、0.02 以下或 0.01 以下。所述特定靶标低表达的肿瘤细胞与特定靶标高表达的肿瘤细胞相比，所述特定靶标的表达可以是降低 1% 以上、2% 以上、4% 以上、5% 以上、8% 以上、10% 以上、15% 以上、18% 以上、20% 以上、25% 以上、40% 以上、50% 以上、60% 以上、70% 以上、80% 以上、90% 以上、或 95% 以上。例如，所述特定靶标高表达的肿瘤细胞可以包括但不限于实体瘤细胞，例如所述特定靶标高表达的肿瘤细胞包括但不限于胃癌细胞、或乳腺癌细胞，例如所述特定靶标高表达的肿瘤细胞可以包括但不限于 HCC1569 细胞或 MDA-MB-453 细胞。例如，所述特定靶标低表达的肿瘤细胞可以包括但不限于实体瘤细胞，例如所述特定靶标低表达的肿瘤细胞包括但不限于乳腺癌细胞，例如所述特定靶标低表达的肿瘤细胞可以包括但不限于 HCC1187 细胞。

本申请所述的药物偶联物可以具有抗转运体转运能力。所述抗转运能力可以是相比于转运底物的标准品，本申请所述药物偶联物的外排比降低 1% 以上、2% 以上、4% 以上、5% 以上、8% 以上、10% 以上、15% 以上、18% 以上、20% 以上、25% 以上、40% 以上、50% 以上、60% 以上、70% 以上、80% 以上、90% 以上、或 95% 以上。例如，所述外排比的测试可以可以为本领

域人员常用方法，或记载在本申请的实施例之中。

本申请所述的药物偶联物可以具有体内肿瘤靶向能力。所述体内靶向能力可以是指将用信号物质标记的所述药物偶联物施用于动物，所述标记的药物偶联物在动物的肿瘤组织的分布，相较于其他组织和器官，可以是分布增加 1%以上、2%以上、4%以上、5%以上、8%以上、10%以上、15%以上、18%以上、20%以上、25%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、或 95%以上，或者可以是分布增加 1.1 倍以上，1.3 倍以上，1.5 倍以上，两倍以上，三倍以上，五倍以上，十倍以上，二十倍以上，二十二倍以上，三十倍以上，五十倍以上，一百倍以上，五百倍以上，一千倍以上，或一千五百倍以上。所述信号物质可以是放射性物质，例如所述信号物质包括但不限于 ¹²⁵I。所述动物可以包括但不限于哺乳动物，例如所述动物可以包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠、猴或人。所述施用可以包括但不限于口服、静脉注射、静脉滴注、腹腔注射、或局部给药。所述组织或器官可以包含但不限于心、肝、脾、肺、肾、脑、或骨髓。

本申请所述的药物偶联物可以具有良好的体内安全性。所述体内安全性可以是本申请的药物偶联物在施用于动物后，所述动物的体内游离毒素释放率不超过 50%、不超过 40%、不超过 30%、不超过 20%、不超过 10%、不超过 7%、不超过 5%、不超过 4%、不超过 3%、不超过 2%、不超过 1.9%、不超过 1.8%、不超过 1.7%、不超过 1.6%、不超过 1.5%、不超过 1.4%、不超过 1.3%、不超过 1.2%、不超过 1.1%、不超过 1.0%、不超过 0.9%、不超过 0.8%、不超过 0.7%、不超过 0.6%、不超过 0.5%、不超过 0.4%、不超过 0.3%、不超过 0.2%或不超过 0.1%。例如，所述体内安全性可以是在动物不产生毒性表现的情况下本申请所述药物偶联物的施用浓度可以是 0.5mg/kg 以上、1mg/kg 以上、2mg/kg 以上、3mg/kg 以上、4mg/kg 以上、5mg/kg 以上、10mg/kg 以上、20mg/kg 以上、30mg/kg 以上、50mg/kg 以上、70mg/kg 以上、100mg/kg 以上、200mg/kg 以上、500mg/kg 以上、或 1000mg/kg 以上。例如所述动物可以包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠、猴或人。所述施用可以包括但不限于口服、静脉注射、静脉滴注、腹腔注射、或局部给药。

样品检测

1.ADC DAR 值分析方法 – HIC-HPLC（疏水色谱法）

高效液相色谱仪：沃特世 e2965 高效液相色谱系统。
色谱柱：MabPac™ HIC-Butyl 5µm 4.6×100mm（厂家：Thermo）；
流动相 A：1.5 M (NH4)₂SO₄ + 50 mM 磷酸钾盐(pH 7.0)；
流动相 B：50 mM 磷酸钠盐(pH 7.0)/异丙醇（75:25 V/V）；
按照以下洗脱程序进行洗脱，

时间	流动相 B
0-2 min	0%-10%
2-22 min	10%-65%
22-24 min	65%-100%
24-26 min	100%-0%
26-30 min	0%

检测条件：设置流动相流速为 1ml/min，检测波长为 280nm，柱温 30℃。

2.SEC 纯度分析 – SEC-HPLC（分子排阻色谱法）

高效液相色谱仪：1260 安捷伦液相色谱仪。

色谱柱：Waters Xbridge BEH200 SEC (7.8×300 mm, 3.5 μm)

流动相：50mM 磷酸钾盐 + 200mM 精氨酸 (pH 6.80) +10% 异丙醇

时间	流动相
0-30 min	100%

检测条件：设置流动相流速为 0.5ml/min，检测波长为 280nm，柱温 30℃。

本发明包括所叙述特定实施方式的所有组合。本发明的进一步实施方式及可应用性的完整范畴将自下文所提供的详细描述变得显而易见。然而，应理解，尽管详细描述及特定实施例指示本发明的优选实施方式，但仅以说明的方式提供这些描述及实施例，因为本发明的精神及范畴内的各种改变及修改将自此详细描述对熟悉此项技术者变得显而易见。出于所有目的，包括引文在内的本文所引用的所有公开物、专利及专利申请将以引用的方式全部并入本文。

实施例

提供以下实施例以证明并进一步解释本发明的一些优选的实施方式和方面，不应被解释为限制其范围。

实施例 1、抗 Her3 抗体

材料和方法：以下试剂购自 Southern Biotech，按规定稀释使用：山羊抗鼠 IgG-HRP (1030-05,1:5000 稀释)、山羊抗人 IgG-PE (2040-09,1:1000 稀释)、羊抗人 Kappa IgG-HRP, 2061-05, 1:20000 稀释)，山羊抗兔 IgG-HRP(4030-05, 1:5000 dilution)、FITC 标记链酶亲和素 (7100-02, 1:500 稀释)，小鼠抗人 Kappa-APC (9230-11,1:500 稀释)，小鼠 IgG APC (0107-11,0.1mg/ml)。NRG1 来自 Origene (TP723155)。细胞培养基 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640、Dulbecco 改良培养基 (DMEM) 和胎牛血清来自 Hyclone。重组 Patritumab 为实验室制备所得。HER3 抗体 3F8 是由杂交瘤或重组产生。m3F8 表示鼠源 3F8 抗体，而 ch3F8 和 hu3F8 分别表示嵌合和人源化 3F8 抗体。

细胞培养：研究中使用的 SP2/0、SP2/0-HER3、SP2/0-HER2、SP2/O-EGFR、NCI-N87、MDA-MB-468、MDA-MB-453、7901、HT29、MCF-7、SK-BR-3 部分从 ATCC 购买并使用其推荐的适当培养基培养。稳定表达人 EGFR、HER2 和 HER3 的 SP2/0-EGFR、SP2/0-HER2、SP2/0HER3 细胞为实验室自己构建所得。

抗 HER3 杂交瘤的制备：在第一天，BALB/c 小鼠（雌性，8-10 周龄）腹腔注射 1-2x10⁶ 表达人 HER3 的 SP2/0-HER3 细胞，该细胞与 Freund's 完全佐剂一起注射。第 8 天，用相同数量的带有 Freund's 不完全佐剂的细胞进行增强免疫。从第 14 天开始，每三天用上述量的细胞免疫小鼠，并重复三次。最后一次免疫后三天，从脾脏中分离 B 淋巴细胞，并与永生骨髓瘤细胞 NS-1 细胞融合，以产生杂交瘤细胞。

杂交瘤细胞在 96 孔板中以梯度稀释培养。收集上清液，通过流式细胞术筛选识别 SP2/0 细胞表面表达 HER3 的抗体，或通过 ELISA 筛选重组 HER3 抗体。

抗体可变区的 DNA 克隆和测序：用 Trizol (ThermoFisher) 从杂交瘤中提取的总 RNA，逆转录到第一条 cDNA 链后，按照 5'RACE 试剂盒 (Invitrogen, 18374-058) 的说明，采用 PCR 快速扩增 5'互补 DNA (5'RACE)，以扩增编码可变区的 DNA 序列。将 PCR 产物克隆到 pGM-T 载体中。阳性克隆进行 DNA 测序，据此推断蛋白质序列。在 Kabat 编号方案分析可变区的氨基酸。

抗体表达：将编码抗体重链和轻链的 DNA 克隆到表达载体 pCDNA3.1 (+) (Invitrogen) 中，并在 293T 细胞中表达。用蛋白 A 或 G 柱 (GE) 纯化抗体。

人源化：人源化由 GenScript 公司完成。首先，通过用人 IgG1 恒定区序列替换鼠源抗体重链的恒定区并用人 Ig κ 恒定区序列替换鼠源抗体轻链的恒定区域，产生鼠源-人嵌合抗体 (ch3F8)。然后按照参考文献 (Kuramochi et al)，在嵌合抗体上进行人源化。在用人抗体框架代替小鼠框架以产生人源化抗体的同时，保留并维持亲和力和特异性所必需的小鼠抗体框架残基。

由 GenScript 公司合成编码人源化抗体的优化密码子的 DNA 序列。

抗体表达和纯化：编码上述抗体 DNA 序列的质粒转染 ExpiCHO-S (Catl.#A2910001, Gibco) 细胞后在 32°C，5% CO₂ 的培养基中生长并保持 12 天。在 4000g 离心 30 分钟后收集上清液，并通过 0.22 μ m 膜过滤。按照制造商手册所推荐，用 20mM 磷酸钠 (pH7.0) 洗涤与蛋白 A 结合的抗体 (Catl.#17508001, GE)，并用 0.1M 甘氨酸 (pH3.0) 洗脱。用 0.1M Tris 缓冲液 (pH9.0) 中和洗脱的部分，然后通过超滤离心将其换至 PBS 缓冲液。用 BCA 测定蛋白浓度。

表面等离子体共振 (SPR) 亲和力测定：抗体动力学和亲和力用 Biacore T200 测定。简言之，将重组人 HER3 抗体固定在蛋白 A 芯片 (GE, Cat.29-1275-5) 上。抗原浓度从 50nM 到最终 0.78125nM，通过 2 倍连续稀释产生，通过芯片以确定亲和力和动力学。

FACS 检测：用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化培养的细胞，然后以 1500rpm 离心 5 分钟。用含有 5% FBS 和 0.2% ProClin300 的 PBS FACS 溶液将细胞重悬到 5×10^6 cells/mL。将 50 μ L 的细胞悬浮液与 100 μ L 浓度为 1 μ g/mL 的一抗冰上孵育 1 小时。用 FACS 溶液洗涤两次。用 100 μ L 含有山羊抗小鼠 IgG-PE (1:1000 稀释) 的 FACS 溶液再细胞重悬，并在避光条件下冰孵育 1 小时。然后将细胞洗涤两次并重新悬浮在 200 μ L FACS 溶液中。

Western blot 检测：将 SDS-PAGE 分离的蛋白质转移到硝化纤维膜上进行 Western blot。使用一抗如下所示：抗 HER2(细胞信号, Catl#: 2165S)、抗 HER3(细胞信号传导, Catl#:12708)、抗 p-HER3 (胞信号传导, Catl#: 4791)、抗 β -肌动蛋白 (细胞信号转导, Catl 号: 4967)。

ELISA 检测：将人 HER2-ex-huFc、人 HER3-huFc 和人 EGFR-his 在 96 孔板中稀释至 2 μ g/mL、50 μ L/孔，在 4°C 下孵育过夜。用 0.5 $\times$ PBST 洗涤，然后在 37°C 下与 100 μ L 封闭缓冲液 (PBS+3%BSA) 孵育 2h，并用 0.5 $\times$ PBST 洗涤。3F8 抗体用封闭缓冲液以 1:3 连续梯度稀释，以 50 μ L/孔加入，在 37°C 孵育 40-50min，然后用 0.5 $\times$ PBST 洗涤。用封闭缓冲液以 1:20000 稀释山羊抗小鼠 IgG-HRP (Southern Biotech, 1030-05)，50 μ L/孔加入，在避光条件下孵育 30 分钟，然后用 0.5 $\times$ PBST 冲洗。在检测之前，将 50 μ L 鲁米诺(Luminol)缓冲

液 A+B 以 1:1 混合加入每个孔中。

NRG1 诱导 HER3 磷酸化：细胞在 6 孔板上培养，当融合度达到 80%时用于实验。实验当天，用 PBS 洗涤细胞两次，在无血清培养基中孵育 6 小时，然后用 10 μg/mL 的抗体诱导过夜。为了诱导 HER3 磷酸化，在收集细胞进行 Western blot 前 30 分钟，添加 NRG1 至 100ng/mL 的工作浓度。

抗体稳定性试验：按常规将 5mg/mL 的纯化抗体储存在 4℃下，在 40℃下孵育 7 天和 14 天后移至 pH3.5 的甘氨酸溶液中再生并保存 2、4 和 6 小时进行酸稳定性评估，或重复冻融处理 4 或 6 个循环进行冻融稳定性评估。通过 SEC-HPLC 测量聚集，并通过 ELISA 测定结合亲和力。

抗体^{[89Zr]Zr} 标记：DFO-NCS 与抗体偶联，如参考文献所示（Zeglis 和 Lewis，2015），DFO 和抗体以 5:1 的摩尔比混合，并在 37℃孵育 1 小时。DFO 偶联抗体用 SEC-HPLC 纯化。

将草酸 ⁸⁹Zr 溶液 0.8mCi 与 DFO 偶联抗体（0.2mg/ml）在 HEPES/Na₂CO₂ 缓冲液（pH 7.0-7.5）中混合，并在室温下孵育 30 分钟。用 TLC 评估放射化学纯度。^{[89Zr]Zr} 抗体 Rf 为 0-0.3，而游离 ⁸⁹Zr 的 Rf 为 0.6-1.0。

PET 成像：每只动物静脉注射约 100uCi^{[89Zr]Zr} 抗体。在注射后的指定时间，用小型动物 PET 成像机收集和分析图像。

体内药效研究：根据 IACUC 的指导原则对动物进行维护和使用。分别从 Charles River 和 SPF Biotech 购买的 BALC/b 裸小鼠和 NPG 小鼠，在 25℃下，在 12 小时的黑暗/光明循环中，自由获取食物和饮料。患者来源的异种移植（PDX）模型是通过皮下植入冷冻保存的组织碎片而产生的。当肿瘤大小达到 100-200mm³ 时，动物开始接受药物治疗，并在 1000mm³ 时实施安乐死。每天观察健康状况。每 3 天监测并记录肿瘤大小和体重。

软件：使用 Olinda、GraphPad Prism 6.0 或 EXCEL 分析数据。

实施例 1.1

将鼠源 3F8 与 SP2/0 野生型细胞或过度表达 HER3、HER2 或 EGFR 的细胞共孵育。在 FACS 仪中用 PE-抗鼠二抗检测结合强度。

结果如图 1 所示。3F8 特异性结合 SP2/0-HER3 细胞，但不结合其他细胞。

实施例 1.2

用 ELISA 测定鼠源 3F8 与人 HER3、HER2 和 EGFR 的结合亲和力。

结果如图 2 所示。鼠源 3F8 只识别 HER3 而不识别 HER2 或 EGFR。

实施例 1.3

用 GraphPad Prism 6.0 分析结合人 HER3、HER2 和 EGFR 的鼠源 3F8 的 EC50。结果如表 1 所示。鼠源 3F8 在纳摩尔范围内表现出强效的结合亲和力。

表 1 鼠源 3F8 与人 HER3、HER2 或 EGFR 结合的 EC50

3F8	huHER3	huHER2	huEGFR
EC50 (nM)	0.11	NA	NA
EC50 (ng/ml)	16.50	NA	NA

HillSlope	1.04	NA	NA
R square	0.99	NA	NA

实施例 1.4

用 ELISA 测定鼠源 3F8 对人、猴、大鼠和小鼠 HER3 的种属选择性。

结果如图 3 所示。鼠源 3F8 识别人和猴 HER3，具有相似的效力，但不识别小鼠和大鼠 HER3。

实施例 1.5

用 GraphPad Prism 6.0 分析鼠源 3F8 与人、猴、大鼠和小鼠 HER3 结合的 EC50。结果如表 2 所示。鼠源 3F8 显示在纳摩尔范围内对人和食蟹猴 HER3 具有相同的结合亲和力。

表 2 鼠源 3F8 与人、食蟹猴、大鼠或小鼠 HER3 结合的 EC50

	人 HER3	食蟹猴HER3	小鼠 HER3	大鼠 HER3
HillSlope	1.015	1.102	NA	NA
EC ₅₀ (nM)	0.1635	0.1855	NA	NA
EC ₅₀ (ng/ml)	24.525	27.825	NA	NA
R square	0.9957	0.9969	NA	NA

实施例 1.6

鼠源 3F8 阻断 NRG1 诱导的 HER3 磷酸化。NCI-N87、MDA-MB-468 和 MDA-MB-453 用 HER3 配体 NRG1 处理，以诱导 HER3 的下游磷酸化。通过 western blot 测定鼠源 3F8 抑制 NRG1 诱导的 p-HER3 的作用。3D4 是之前证实的抗 HER3 抗体，其与 NRG1 竞争结合 HER3，用作阳性对照。

结果如图 4 所示。数据显示，鼠源 3F8 降低了 HER3 蛋白磷酸化水平，但对总 HER3 蛋白水平没有影响。HER2 的 Western blot 也显示 3F8 对 HER2 蛋白水平没有影响。

实施例 1.7

鼠源 3F8 被不同 HER3 表面水平的细胞迅速吸收。将不同 HER3 表面水平的细胞与鼠源 3F8 冰孵育（对照）或在 37℃ 下孵育 1 或 4 小时。通过从冰孵育的对照中减去 37℃ 孵育的细胞表面信号来确定内化分数。

结果如图 5 所示。数据表明，鼠源 3F8 被迅速内化到细胞中。大部分在 1 小时内被吸收，并随着孵育时间延长至 4 小时，细胞内片段量略有增加，这表明 3F8 内吞是一个快速和连续的过程。

实施例 1.8

抗 HER3 抗体在 BT474 皮下异种移植模型中有效地抑制肿瘤生长。抗 HER3 抗体 3F8、3D4 或 3F8+3D4 组合以 25mg/kg 静脉注射，每两周一次，持续三周。每 3-4 天监测一次肿瘤大小。3F8 和 3D4 都是抗 HER3 抗体。3F8 是鼠源抗体。

结果如图 6 所示。3F8 和 3D4 均显著抑制肿瘤生长（单因素方差分析， $p<0.05$ ），而 3F8 显示出更好的疗效。3F8 和 3D4 的组合与单独使用 3F8 疗效相当。

实施例 1.9

[⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 用于对胃 PDX 模型 GAS078 成像。将 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 静脉注射到胃模型 GAS078 中。在注射后 4、24、48、72、96 和 168 小时收集图像。用 Olinda 分析每个器官的放射性摄取，并以 %ID/g（注射剂量百分比/克组织）表示。

图 7 是 GAS078 模型中 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 的代表性成像。Ch3F8 表示嵌合 3F8 抗体。数据显示，随着时间的推移，肿瘤中 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 的摄取逐渐增加。肿瘤摄取在注射后 96 小时保持稳定，随后在注射后 168 小时略有下降。

数据也显示在表 3 中。肿瘤，心脏、肝脏、肾脏和脾脏的主要器官中 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 的摄取量以 %ID/g（%注射剂量/克组织）进行评估。

表 3 肿瘤和主要器官的放射性摄取

%ID/g		心脏	肝脏	肾	脾脏	肿瘤
4h	小鼠1	23.03	20.37	11.64	15.28	5.26
	小鼠2	14.75	14.97	8.77		5.38
24h	小鼠1	12.39	10.59	7.94	7.84	10.33
	小鼠2	8.66	8.41	6.41	9.74	10.31
48h	小鼠1	6.02	8.36	6.72	10.69	12.15
	小鼠2	3.44	6.77	6.31	5.15	11.33
72h	小鼠1	3	8.28	3.51	12.13	12.67
	小鼠2	2.19	7.09	4.19	12.64	10.86
96h	小鼠1	1.61	6.94	3.42	11.49	12.07
	小鼠2	1.44	6.93	2.81	10.89	8.2

实施例 1.10

[⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 用于对多个 PDX 模型成像。静脉注射 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8。在注射后 72 小时收集图像。图 8 显示了 6 个动物模型中 [⁸⁹Zr]Zr-ch3F8 成像的代表性图像。表 4 列出了通过 ELISA 测定的肿瘤组织中 HER3 表达水平以及注射后 72 小时主要器官和肿瘤组织中的放射性摄取。在所有 6 个测试的 PDX 模型中都有相当数量的肿瘤摄取。

表 4 肿瘤组织中 HER3 表达水平 (ng/mg) 和主要器官和肿瘤组织中的放射性摄取 (%ID/g)

No.	Model	HER3(ng/mg, Elisa)	心脏	肾	肝脏	脾脏	肿瘤
1	175P6	9.78	4.80	5.52	15.12	19.24	14.10
2	078P7	11.61	3.09	4.29	12.78	14.19	12.29
3	194P5	4.38 (P3)	7.37	5.56	5.48	15.42	14.92

4	142P7	0.05 (P6)	4.15	4.13	4.93	13.09	18.27
5	143P6	6.07	7.90	8.30	13.64	18.01	15.48
6	176R	13.15	5.12	31.61	11.89	9.03	5.37

实施例 1.11

人源化 3F8 (hu3F8) 和嵌合 3F8 的结合亲和力。通过 Biacore 测定 3 个人源化 3F8 克隆和嵌合 3F8 的结合动力学。三个人源化 3F8 克隆 (clone 1、clone 2 和 clone 3) 具有不同的重链, 和一条相同的轻链。克隆 1 (clone-1)、克隆 2 (clone-2) 和克隆 3 (clone-3) 分别对应 hu3F8-1, hu3F8-2 和 hu3F8-3。

使用 Biacore T200 评估软件 3.1 版处理表 6 中列出的所有数据。

表 6 人源化 3F8 (hu3F8) 与嵌合 3F8 的结合亲和力

Ligand	Analyte	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	Rmax(RU)	Chi²(RU²)
Chimeric	His-HER3	6.28E+05	3.91E-04	6.24E-10	103.1	8.35E-02
Clone 1	His-HER3	5.60E+05	6.12E-04	1.09E-09	110.1	9.52E-02
Clone 2	His-HER3	6.66E+05	3.28E-04	4.92E-10	113.2	4.63E-02
Clone 3	His-HER3	6.44E+05	3.48E-04	5.40E-10	124	3.60E-02

实施例 1.12

将 hu3F8 的三个克隆在 pH3.5 下孵育 0、2、4 和 6 小时, 然后进行 ELISA 以测量结合亲和力。结果 (图 9A) 表明, 酸处理对结合亲和力几乎没有影响。

三个 hu3F8 克隆在 pH3.5 下孵育 0、2、4 和 6 小时后的 EC50 测定。EC50 通过 ELISA 测定。结果 (表 7) 表明, 酸处理对结合亲和力几乎没有影响。

表 7 在 pH3.5 下孵育 0、2、4 和 6 小时后, hu3F8 的三个克隆的 EC50

孵育时间 (hr)	EC50 ng/mL		
	Clone 1	Clone 2	Clone 3
0	38.74	45.04	38.71
2	38.11	48.31	41.71
4	40.89	44.54	39.45
6	38.96	41.18	38.06

将三个 hu3F8 克隆在 40℃孵育不同时间, 然后进行 ELISA 以测定结合亲和力。平行测定嵌合抗体。结果如图 9B 所示。

三个 hu3F8 克隆在 40℃下孵育不同时间的 EC50 测定。将三个人源化 3F8 抗体克隆在 40℃的生理盐水中孵育 7 或 14 天，并通过 ELISA 测定热应激试验后的结合亲和力。平行测量嵌合体 3F8。结果（表 8）表明热应力对结合亲和力几乎没有影响。

表 8 hu3F8 的三个克隆在 40℃下孵育不同天的 EC50

40℃孵育时间 (天)	EC ₅₀ ng/mL			
	嵌合抗体	Clone 1	Clone 2	Clone 3
0	47.37	39.16	45.40	42.44
7	/	42.35	48.09	46.96
14	/	41.00	52.03	41.25

将 hu3F8 的三个克隆冻融 3 或 5 个周期，然后进行 ELISA 以测量结合亲和力。平行测定嵌合抗体。结果（图 9C）表明，重复冻融对结合亲和力几乎没有影响。

表 9 中还显示了经过多次冻融应激试验的三个 hu3F8 克隆的 EC50。

表 9 hu3F8 的三个克隆经过多次冻融应激试验的 EC50

冻融循环	EC ₅₀ ng/mL			
	嵌合抗体	Clone 1	Clone 2	Clone 3
0	47.06	45.41	42.46	42.25
3	/	44.29	46.66	37.42
5	/	38.58	43.79	33.63

综上，这些数据表明，hu3F8 在热、酸和重复冻融的测试后保持结合亲和力，表明 hu3F8 具有良好的稳定性。

实施例 1.13

3 个 hu3F8 克隆在稳定性试验后的聚集性及其在 4℃下储存的聚集性评估。用 SEC-HPLC 测定了三种 hu3F8 抗体在酸处理、反复冻融和 40℃温育后的聚集情况，并与 4℃保存的每种抗体进行了比较。结果列于表 10 中。所有克隆在应激测试后都保持了 95%以上的单体，表明几乎没有聚集的趋势。

表 10 应激测试后 hu3F8 三个克隆的聚集性评估结果

测试项目	Clone 1			Clone 2			Clone 3		
	单体	二聚物	四聚体	单体	二聚物	四聚体	单体	二聚物	四聚体
保留时间	8.84-8.85	7.33-7.35	6.66-6.68	8.86-8.87	7.36-7.37	6.70-6.73	8.86-8.87	7.36-7.37	6.70-6.73

抗体储存在 4℃	94.68%	4.36%	0.96%	96.67%	3.16%	0.17%	97.10%	2.90%	-
40℃第7天	95.02%	4.22%	0.76%	96.94%	3.03%	0.03%	97.09%	2.91%	-
40℃ 14天	95.03%	4.22%	0.75%	96.44%	3.39%	0.17%	97.04%	2.96%	-
pH3.5 2小时	94.63%	4.41%	0.96%	96.98%	2.99%	0.04%	97.04%	2.96%	-
pH3.5小时	95.06%	4.22%	0.73%	96.52%	3.27%	0.22%	97.13%	2.87%	-
pH3.5 6小时	94.80%	4.29%	0.91%	96.57%	3.27%	0.16%	97.06%	2.94%	-
冻融 3个周期	94.63%	4.41%	0.96%	96.65%	3.22%	0.13%	96.97%	2.90%	0.13%
冻融 5个周期	94.69%	4.43%	0.88%	96.31%	3.44%	0.25%	97.01%	2.87%	0.12%

实施例 1.14

hu3F8 的翻译后修饰（PTM）分析。P1:hu3F8 无应激；P2:hu3F8 在 40℃下应激 2 周。用胰蛋白酶消化无应激或 40℃应激 2 周的 hu3F8，然后用质谱分析翻译后修饰。结果显示，在 HC:372-393 时脱酰胺略有增加。总的来说，应激前后的 PTM 没有太大的差异，表明具有良好的可开发性。

表 11 hu3F8 的 PTM 分析结果

Series	Peptide fragment	Peptide sequence	Retention time (min)	Post-translational modification	EIC ratio (%)	
					P1	P2
1	HC:1-13	QVQLQESGPGLVK	29.44	/	/	/
		QVQLQESGPGLVK	37.65	pE (Q)	99.4	99.7
2	HC:58-65	NNFNPSLK	22.99	/	/	/
		NNFNPSLK	24.67	Deamidation (N)	1.1	1.1
3	HC:250-256	DTLMISR	25.38	/	/	/
		DTLMISR	22.07	Oxidation (M)	2.2	3.1
5	HC:298-313	VVSVLTVVHQDWLNGK	62.21	/	/	/
		VVSVLTVVHQDWLNGK	63.86	Deamidation (N)	2.6	2.7
		VVSVLTVVHQDWLNGK	63.55			
		VVSVLTVVHQDWLNGK	65.32	Succinimide formation (N)	3.9	3.9
6	HC:372-393	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	50.8	/	/	/
		GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	51.73	Deamidation (N)	2.2	5.8
		GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	51.55			
7	HC:418-440	WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQK	37.78	/	/	/
		WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQK	38.52	Deamidation (N)	1.8	1.9
8	HC:441-448	SLSLSPGK	23.18	/	/	/
		SLSLSPGK	27.46	-K	96.1	96.0
9	LC:127-142	SGTASVVCLLNNFYPR	64.43	/	/	/
		SGTASVVCLLNNFYPR	53.82	Deamidation (N)	0.9	1.0
		SGTASVVCLLNNFYPR	67.25			

下面列出了本申请抗体的氨基酸序列。

鼠源 3F8 轻链可变区氨基酸序列：

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTFKLLIYYTSILHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGDTLPPTFG AGTKLELK (SEQ ID NO: 15)

鼠源 3F8 重链可变区氨基酸序列：

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSAYYWNWIRQFPGDKLEWMGYISYDGRN
NFNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTSGDTATYYCARDGDYDYFDYWGQGTTTLTVSS
(SEQ ID NO: 16)

人源化 3F8 重链氨基酸序列(Clone 1/ hu3F8-1)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWIGYISYDGRNN
FNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQGTTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 11)

人源化 3F8 重链氨基酸序列(Clone 2 /hu3F8-2)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPFPGKGLEWIMGYISYDGRN
NFNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQGTTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FCSSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 13)

人源化 3F8 重链氨基酸序列 (Clone 3/ hu3F8-3)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPFPGKGLEWIMGYISYDGRN
NFNPSLKNRVISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCARDGDYDYFDYWGQGTTTVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 14)

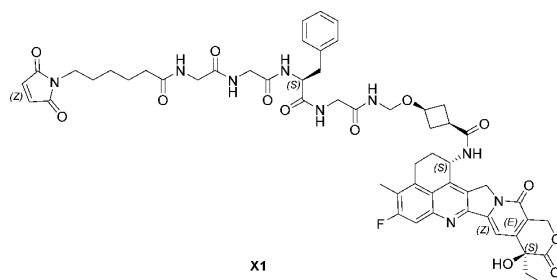
人源化 3F8 轻链氨基酸序列(Clones 1-3/ hu3F8-1~3)

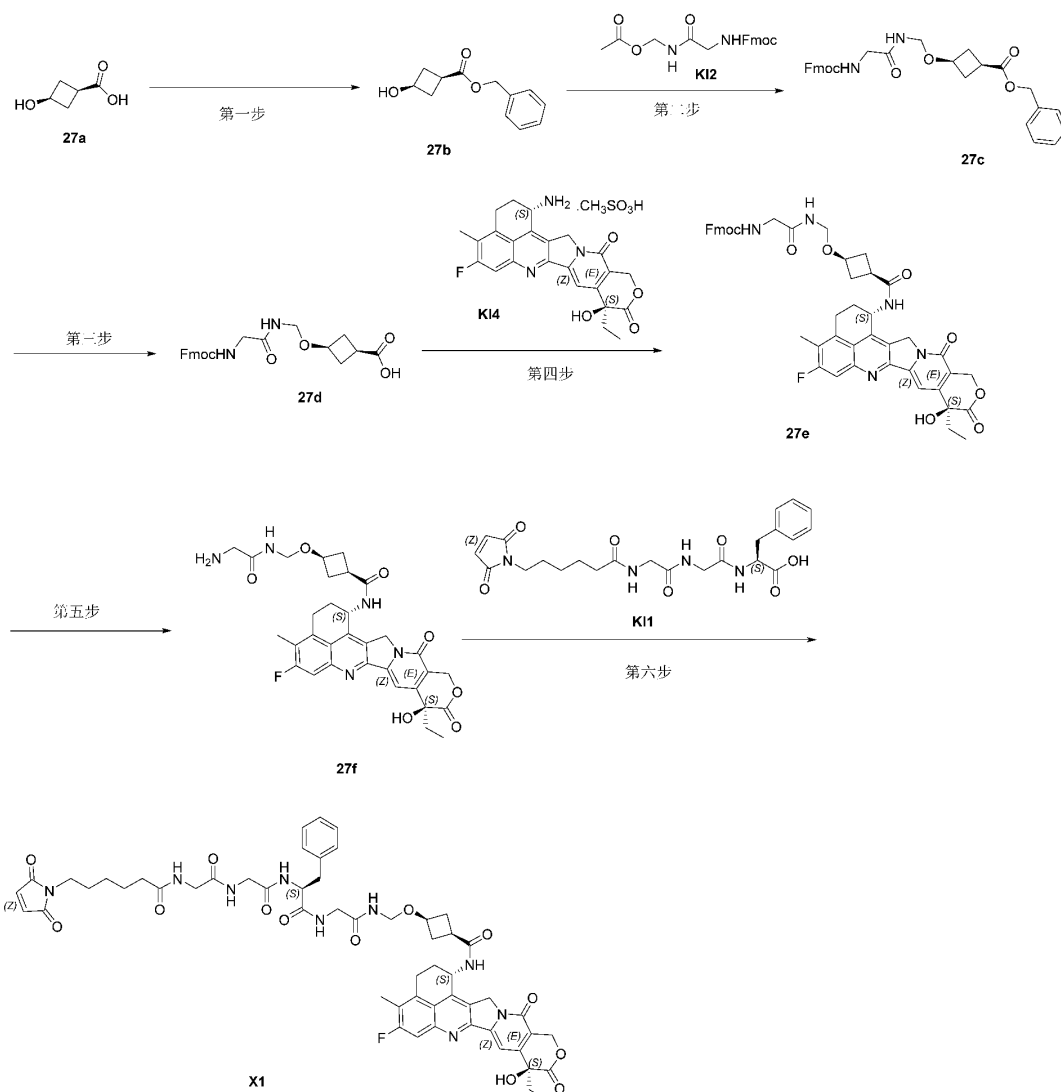
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVP
SRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYFCQQGDTLPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12)

实施例 2、抗 Her3 抗体药物偶联物 (ADC) 的制备

1.1. 接头-细胞毒素 (linker-payload) 的制备

linker-payload X1





第一步

氮气保护下，向 27a (5.00 g, 43.0 mmol), NaHCO₃ (10.9 g, 129 mmol) 的 DMF (50 mL) 溶液中滴加苄溴 (11.0 g, 64.6 mmol)，并在 25°C 反应 17 小时。TLC (PE/EA = 2/1) 显示反应完全，将反应液加入到 500 mL 水中，用 EA (250 mL) 萃取两遍，分液后经饱和氯化钠水溶液 (500 mL) 洗涤，无水 Na₂SO₄ 干燥，浓缩过柱 (PE:EA = 3:2) 得 5.1 g 无色液体，收率：57.1%。

第二步

氮气保护下，向 K12 (4.00 g, 10.9 mmol), TsOH (800 mg, 4.65 mmol) 的 THF (30 mL) 溶液中，在 0°C 下，滴加 27b (4.50 g, 21.8 mmol) 的 THF (10 mL) 溶液，并在 25°C 反应 2 小时。TLC (PE/EA = 1/2) 显示反应完全，将反应液加入到 200 mL 水中，用 EA (200 mL) 萃取两次分液，无水 Na₂SO₄ 干燥，浓缩过柱 (PE/EA = 3/2) 得白色固体 1.56g，收率：26%。

第三步

氢气环境下，在 0°C 下，向 27c (800mg, 1.55mmol) 的 EtOH (8 mL) 和 EA (8 mL) 混合溶液中加入 Pd/C (80 mg)，在 0°C 搅拌 2.5 小时。LCMS 显示反应完全。反应液经硅藻土过滤，用

EA(200 mL)洗涤滤饼浓缩后用 THF(20 mL)溶解旋干得白色固体 600 mg, 收率: 91%

第四步

氮气保护下, 在 0°C下, 向 27d (220mg, 0.515mmol), HY-13631A (250 mg, 0.47mmol)和 HATU (214mg, 0.56mmol)的 DMF(6 mL)溶液中加入 DIEA(152mg, 1.18mmol), 并在 0°C反应 2 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液加入柠檬酸水溶液(pH = 4) (150 mL) 中, 过滤, 并用 175 mL 水洗涤滤饼, 滤干, 用油泵拉干得棕色固体 260mg, 收率: 66%。

第五步

氮气保护下, 在 0°C下, 向 27e (260 mg, 0.309 mmol)的 DCM(30 mL)溶液中滴加二乙胺 (8 mL), 并在 0°C反应 3 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液加入 0°C的石油醚溶液 (600 mL) 中, 有固体析出, 静置待固体吸附于瓶底后, 倒出溶液, 用油泵拉干, 得棕色固体 90mg, 收率: 47.1%。

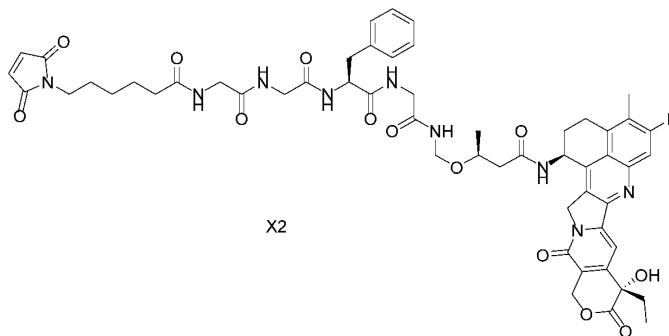
第六步

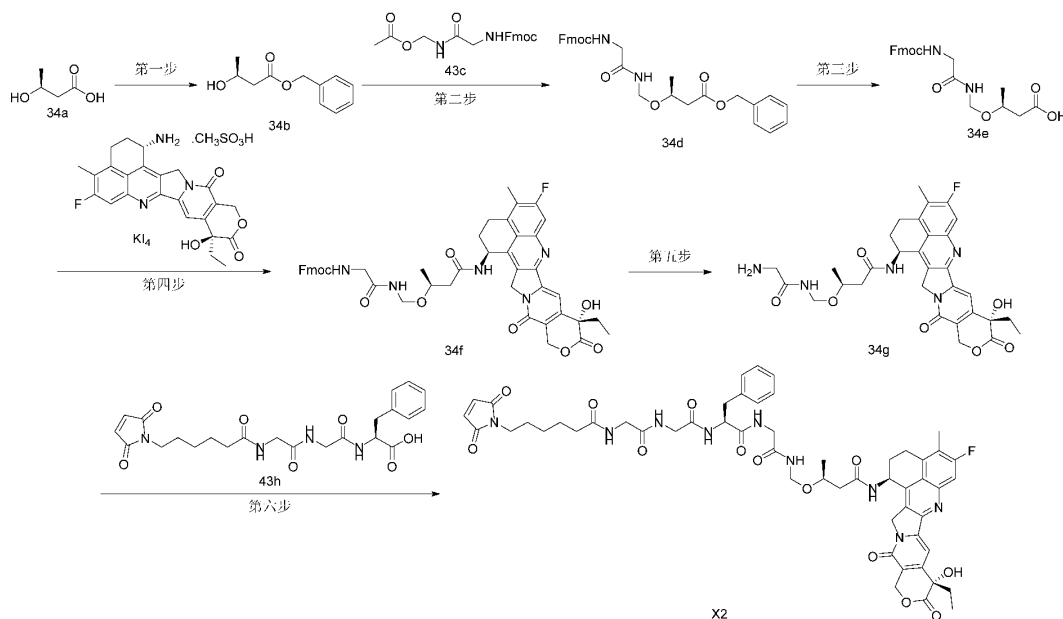
氮气保护下, 在 0°C下, 向 27f(90 mg, 0.13 mmol), KI-1 (92 mg, 0.19 mmol) 和 DIEA(50 mg, 0.39 mmol)的 DMF(2.5 mL)溶液中加入 HATU (74 mg, 0.19 mmol)并在 0°C反应 2 小时。LCMS 显示基本反应结束。在 0°C下, 将反应液加入 PH=4 的柠檬酸水溶液 (30 mL) 中, 有絮状固体析出, 过滤, 经制备板 (DCM/MecOH=10/1) 得 9.2 mg 淡黄色固体 X1, 收率: 6%。

MS m/z (ESI): 1074 [M+1]

H-NMR (400 MHz, MeOD): 7.65 (d, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.30-7.21(m, 5H), 6.79 (s, 2H), 5.69-5.65 (m, 1 H), 5.57 (d, 1H), 5.43-5.10 (m, 3H), 4.70 (d, 2H), 4.48-4.39 (m, 2H), 4.10-4.05 (m, 1H), 4.01-3.75 (m, 5H), 3.46 (t, 2H), 3.22-3.15 (m, 2H), 3.07-3.00 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.37-2.20 (m, 6H), 2.10-2.02 (m, 2H), 2.00-1.92 (m, 2H) 1.68-1.57 (m, 6H), 1.01 (t, 3H)

linker-payload X2





第一步

将 34a (5 g, 48.0 mmol)、K₂CO₃ (19.9 g, 144.0 mmol) 溶于 DMF (20 mL) 中, 滴加苄溴 (12.3 g, 72.0 mmol), 25 °C 下反应 17 小时。TLC (PE/EA = 3/1) 检测原料反应完全。将反应液加入水 (200 mL) 中、用 EA (250 mL) 萃取分液, 用饱和 NaCl 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥后浓缩过柱 (PE:EA = 2:1) 得 8.7 g 无色液体 34b, 收率 93%。MS-ESI: m/z 195.1 [M+H]⁺。

第二步

取 34c (7.3 g, 19.8 mmol)、TsOH (1.46 g, 8.5 mmol) 溶于 THF (20 mL) 中, 氮气保护并降温至 0 °C, 滴加 43b (7.7 g, 39.6 mmol) 的 THF (10 mL) 溶液, 加完后 0 °C 反应 2 小时。TLC (PE/EA = 2/1) 显示原料大部分反应。将反应液倒入 100 mL 水中, DCM (100 mL) 萃取, 分液并用饱和 NaCl 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥后过柱 (PE/EA = 1/1), 得 3.9 g 无色稠状物 34d, 收率: 39%。MS-ESI: m/z 503.3 [M+H]⁺。

第三步

氢气环境下, 在 0 °C 下, 向 34d (1.9 g, 3.78 mmol) 的 EtOH (100 mL) 和 EA (100 mL) 混合溶液中加入 Pd/C (1 g, 10 wt.%), 在 0 °C 反应 3 小时。TLC (PE/EA = 2/1) 显示反应完全。反应液经硅藻土过滤, 用 EA/EtOH (1:1, 100 mL×3) 洗涤滤饼, 滤液浓缩, 并用 THF (50 mL×3) 溶解旋干并重复三次得 1 g 灰色固体 34e, 收率: 64%。MS-ESI: m/z 435.2 [M+Na]⁺。

第四步

在氮气保护下, 0 °C 下向 34e (426 mg, 1.03 mmol), KI₄ (500 mg, 0.94 mmol) 和 HATU (429 mg, 1.13 mmol) 的 DMF (20 mL) 溶液中滴加 DIEA (303 mg, 2.35 mmol), 加完后在 0 °C 反应 2 小时。LCMS 显示反应结束。将反应液滴到 300 mL 水中, 搅拌后静置 5 分钟, 过滤, 滤饼用 DCM/MeOH (10:1, 100 mL) 的溶液溶解后, 干燥旋干拌样, 柱层析 (EA:MeOH = 30:1) 得 600 mg 黄色固体 34f, 收率: 77%。MS-ESI: m/z 830.3 [M+H]⁺。

第五步

氮气保护下, 在 0°C 下, 向 34f (150 mg, 0.18 mmol) 的 DCM (5 mL) 溶液中滴加二乙胺 (5 mL), 并在 0°C 反应 2 小时。LCMS 显示反应完全。将石油醚溶液 (100 mL×6) 加入反应液中, 有固体析出, 静置待固体沉淀后, 倒出溶液, 再用油泵拉干, 得 120 mg 白色粉末 34g, LCMS 显示产物含量为 70%, 收率: 76%。MS-ESI: m/z 608.3 $[M+H]^+$ 。

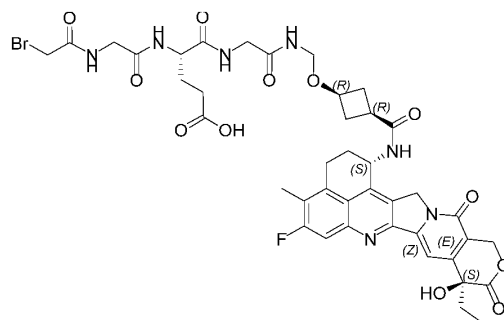
第六步

在氮气保护下, 向 34g (60 mg, 0.099 mmol)、43h (51 mg, 0.108 mmol)、和 DIEA (32 mg, 0.25 mmol) 的 DMF (1 mL) 溶液中加入 HATU (45 mg, 0.118 mmol) 的 DMF (1 mL) 溶液, 并在 0°C 下反应 2 小时。LCMS 显示原料反应完全。将反应液直接过反相柱, 洗脱剂 ((MeCN/MeOH=1/1): H₂O=60%: 40%), 纯化得 14.8 mg 黄色固体 X2, 收率 14%。

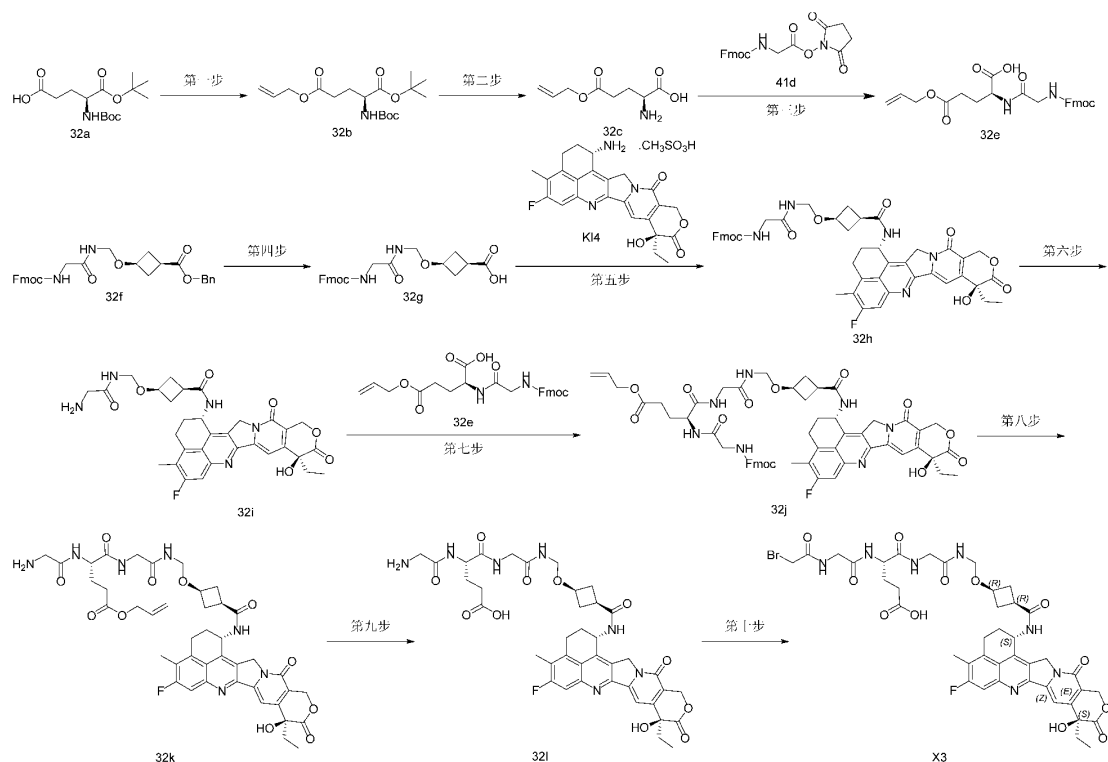
MS-ESI: m/z 1062.4 $[M+H]^+$ 。

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.69 – 7.61 (m, 2H), 7.22 – 7.16 (m, 2H), 7.16 – 7.09 (m, 3H), 6.76 (s, 2H), 5.70 – 5.64 (m, 1H), 5.60 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 5.40 – 5.31 (m, 2H), 5.26 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 4.65 – 4.50 (m, 7H), 4.25 – 4.16 (m, 1H), 3.87 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 3.83 – 3.76 (m, 3H), 3.72 (d, J = 17.0 Hz, 2H), 3.44 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.25 – 3.17 (m, 2H), 3.10 – 3.02 (m, 1H), 2.92 – 2.83 (m, 1H), 2.45 – 2.39 (m, 5H), 2.32 – 2.20 (m, 5H), 1.97 – 1.89 (m, 2H), 1.63 – 1.50 (m, 4H), 1.34 – 1.20 (m, 6H), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

linker-payload X3



X3



第一步

向 32a (2.00 g, 6.6 mmol), K₂CO₃ (1.82 g, 13.2 mmol) 的 MeCN (20 mL) 中加入溴丙烯 (960 mg, 7.92 mmol), 在 20 °C 下搅拌 5 小时。TLC (PE/EA = 1/2) 显示反应结束。将反应液倒入水 100 mL 中, 将 pH 值调至 5, 用 EA (100 mL) 萃取三次, 无水硫酸钠干燥, 旋干过柱纯化 (PE/EA = 2/1) 得 1.83 g 白色固体 32b, 收率: 81%。

第二步

向 32b (1.38 g, 4.02 mmol) 的 DCM (10 mL) 中加入 TFA (10 mL), 在 25 °C 下搅拌 17 小时。TLC (PE/EA = 1/3) 显示反应结束。将反应液旋干得 0.91 g 黄色粘状物 32c, 收率不计。

第三步

向 32c (910 mg, 4.87 mmol), NaHCO₃ (613 mg, 7.3 mmol) 的 DME/H₂O (20 mL/10 mL) 中加入 41d (1.92 g, 4.87 mmol), 在 25 °C 下搅拌 3 小时。TLC (DCM/MeOH = 1/1) 显示反应结束。将反应液倒入水 100 mL 中, 用 aq.HCl (1 N) 将 pH 值调至 5, 用 EA (150 mL) 萃取两次, 无水硫酸钠干燥, 旋干过柱纯化 (DCM/MeOH = 20/1) 得 1.53 g 白色固体 32e, 收率: 67%。MS-ESI: m/z 467.4 [M+H]⁺。

第四步

向 32f (3 g, 5.83 mmol) 的 MeOH (50 mL) 中加入 Pd/C (600 mg), 在 25 °C 在氢气球下搅拌 5 小时。TLC (EA) 显示反应结束。将反应液过滤旋干得 1.9 g 白色固体 32g, 收率: 77%。

第五步

向 32g (789 mg, 1.86 mmol), KI4 (900 mg, 1.69 mmol), 三乙胺 (342 mg, 3.38 mmol)

的 DMF (10 mL) 中加入 HATU (707 mg, 1.86 mmol), 在 0 °C 下搅拌 3.5 小时。TLC (EA) 显示反应结束。将反应液倒入 H₂O (80 mL), 用 EA (100 mL) 萃取两次, 无水硫酸钠干燥, 旋干过柱纯化 (EA) 得 1.186 g 白色固体 32h, 收率: 83%。MS-ESI: m/z 842.3 [M+H]⁺。

第六步

将 32h (1.186 g, 1.41 mmol) 的 DCM/二乙胺 (20 mL, 20/1) 在 25 °C 下搅拌 17 小时。TLC (DCM/MeOH = 10/1) 显示反应结束。将反应液倒入石油醚 (200 mL) 中过滤得 768 mg 白色固体 32i, 收率: 88%。MS-ESI: m/z 620.3 [M+H]⁺。

第七步

向 32i (676 mg, 1.09 mmol), 32e (508 mg, 1.09 mmol), DIEA (423 mg, 3.27 mmol) 的 DMF (10 mL) 中加入 HATU (414 mg, 1.09 mmol), 在 20 °C 下搅拌 17 小时。TLC (PE/EA = 1/5) 显示反应结束。将反应液倒入水中 (30 mL) 过滤, 滤饼过柱纯化 (DCM/MeOH = 50/1) 511 mg 白色固体 32j, 收率: 44%。MS-ESI: m/z 1068.3 [M+H]⁺。

第八步

将 32j (482 mg, 0.451 mmol) 的二乙胺/DCM (10 mL, 1/5) 的溶液在 10 °C 下搅拌 17 小时。TLC (EA) 显示反应结束。将反应液倒入 PE (300 mL) 中过滤得 301 mg 白色固体 32k, 收率不计。

第九步

向 32k (301 mg, 0.356 mmol), Pd(PPh₃)₄ (82 mg, 0.071 mmol) 的 THF (5 mL) 中加入吗啡啉 (93 mg, 1.07 mmol), 在 25 °C 下搅拌 5 小时。LCMS 显示反应结束。将反应液制备得 108 mg 白色固体 32l, 收率: 38%。MS-ESI: m/z 806.3 [M+H]⁺。

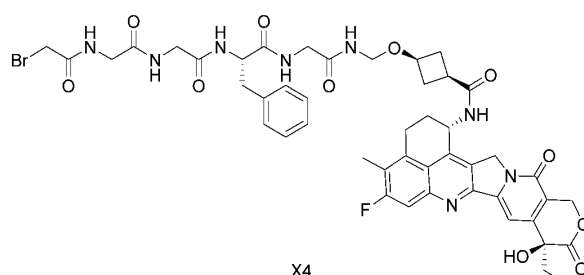
第十步

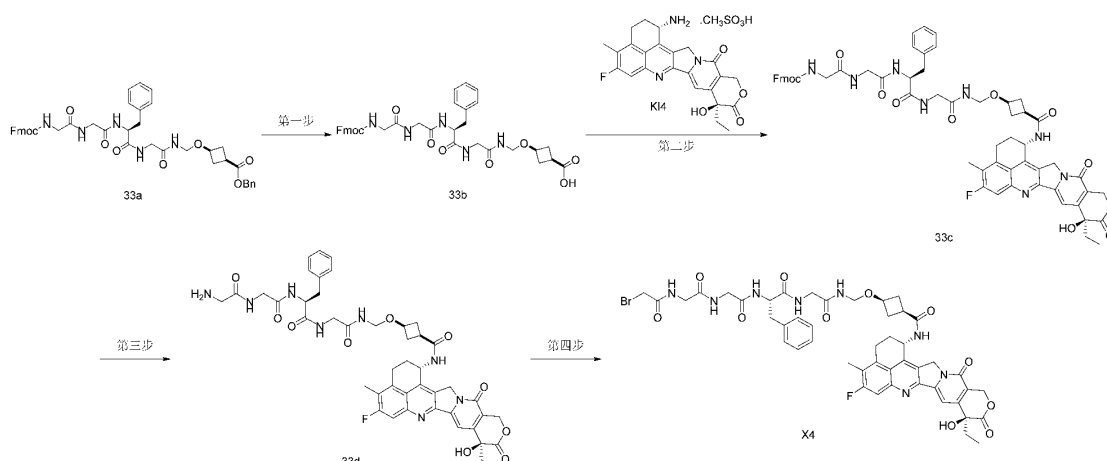
向 32l (108 mg, 0.134 mmol), 三乙胺 (41 mg, 0.402 mmol) 的 THF (2 mL) 和 DMF (2 mL) 中加入溴乙酰溴 (27 mg, 0.134 mmol), 在 0 °C 下搅拌 1 小时。TLC (DCM/MeOH = 10/1) 显示反应结束。将反应液直接制备得 15 mg 白色固体 X3, 收率: 12%。

MS-ESI: m/z 926.3 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.11 (s, 1H), 8.54 – 8.42 (m, 3H), 8.27 – 8.16 (m, 2H), 7.78 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.61 – 5.51 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.20 – 5.05 (m, 2H), 4.56 – 4.42 (m, 2H), 4.32 – 4.22 (m, 1H), 3.96 – 3.87 (m, 3H), 3.79 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.70 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.25 – 3.08 (m, 2H), 2.61 – 2.53 (m, 2H), 2.45 – 2.36 (m, 4H), 2.36 – 2.22 (m, 3H), 2.20 – 2.03 (m, 4H), 1.99 – 1.68 (m, 4H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

linker-payload X4





第一步

向 33a (2.00 g, 2.58 mmol) 的 MeOH (20 mL) 中加入 Pd/C (400 mg, 10 wt.%), 在 20 °C 下搅拌 5 小时。TLC (EA) 显示反应结束。将反应液过滤旋干得 1.3 g 白色固体 33b, 收率: 74%。

第二步

向 33b (0.55 g, 0.802 mmol), KI4 (427 mg, 0.802 mmol) 和 DIPEA (310 mg, 2.40 mmol) 的 DMF (5 mL) 中加入 HATU (305 mg, 0.802 mmol), 在 0 °C 下搅拌 2 小时。TLC (DCM/MeOH = 1/10) 显示反应结束。将反应液倒入水 (40 mL) 中, 过滤得粗品, 经柱纯化 (DCM/MeOH = 20/1) 得 360 mg 黄色固体 33c, 收率 41%。

第三步

向 33c (360 mg, 0.326 mmol) 的 DCM (10 mL) 中加入二乙胺 (2 mL)。在 25 °C 下搅拌 17 小时。TLC (DCM/MeOH = 5/1) 显示反应结束。将反应液倒入 PE (100 mL) 中, 过滤得 205 mg 白色固体 33d, 收率: 71%。MS-ESI: m/z 881.3 [M+H]⁺。

第四步

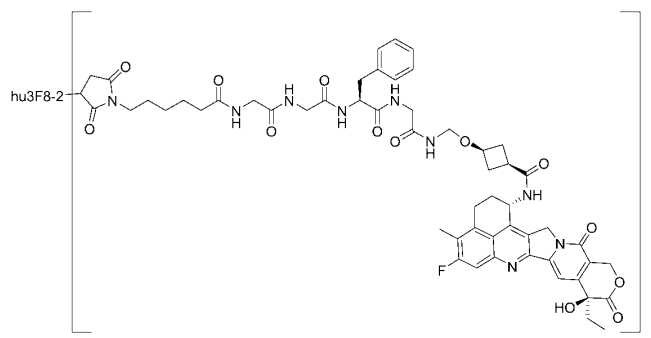
向 33d (205 mg, 0.233 mmol) 和三乙胺 (118 mg, 1.17 mmol) 的 DMF (1 mL) 和水 (1 mL) 中加入溴乙酰溴 (94 mg, 0.446 mmol) 的 THF (2 mL) 溶液, 并在 0 度搅拌 1 小时, 反应液直接制备得 15 mg 白色固体 X4, 收率: 6%。

MS-ESI: m/z 1001.2 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.57 – 8.50 (m, 1H), 8.50 – 8.43 (m, 2H), 8.35 – 8.29 (m, 1H), 8.19 – 8.12 (m, 2H), 7.80 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.27 – 7.14 (m, 7H), 6.53 (s, 1H), 5.59 – 5.51 (m, 1H), 5.44 – 5.39 (m, 2H), 5.20 – 5.07 (m, 2H), 4.56 – 4.44 (m, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.80 – 3.68 (m, 5H), 3.41 (s, 1H), 3.21 – 3.12 (m, 2H), 2.83 – 2.74 (m, 1H), 2.58 – 2.55 (m, 3H), 2.39 (s, 4H), 2.18 – 2.03 (m, 4H), 1.93 – 1.78 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

2.2 抗 Her3 抗体药物偶联物的制备

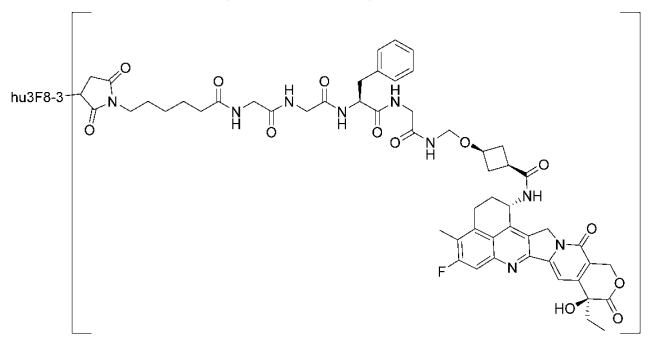
抗体药物偶联物 ADC-1-X1 的制备(hu3F8-2-X1)



用超纯水分别配制还原剂和保护剂如下：2 mg/ml TCEP (Tris-2- carboxyethyl-phosphine, 厂家：Thermo)、100 mmol/L 乙二胺四乙酸钠盐(厂家：Sigma)。取 150 mg 7.4 mg/ml 的抗 Her3 抗体 (hu3F8-2) 置于 50ml 离心管，加入 50 mM 磷酸钠盐缓冲液, pH7.5 稀释抗体反应浓度至 5 mg/ml,按照反应液总体积 5%加入 100 mmol/L 乙二胺四乙酸钠盐震荡混匀后加入 2 mg/ml TCEP 进行抗体还原，TCEP 与抗体的摩尔比为 6.0：1，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，37°C，2 h。配制浓度为 10 mg/ml 的 linker-payload X1 的二甲基亚砜 (厂家：国药集团) 溶液，按照药物与抗体摩尔比 18.0：1 缓慢加入，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，4°C，1h。用超滤管 (MWCO 30KD, 厂家：密理博) 置换样品至储存缓冲液，先用含有 10% 二甲基亚砜的 30 mM 组氨酸醋酸缓冲液，pH 5.5 超滤 3 次，再用无 DMSO 的 30 mM 组氨酸醋酸缓冲液，pH 5.5 超滤 3 次，再经超滤浓缩得到 ADC-1-X1，浓度为 26.8 mg/mL，收率 73%。用分子排阻色谱法和疏水层析色谱法检测纯度和 DAR 值。

经检测，抗体药物偶联物 ADC-1-X1 的纯度为 98.68%，DAR 值 p 为 7.12。

抗体药物偶联物 ADC-2-X1 的制备(hu3F8-3-X1)

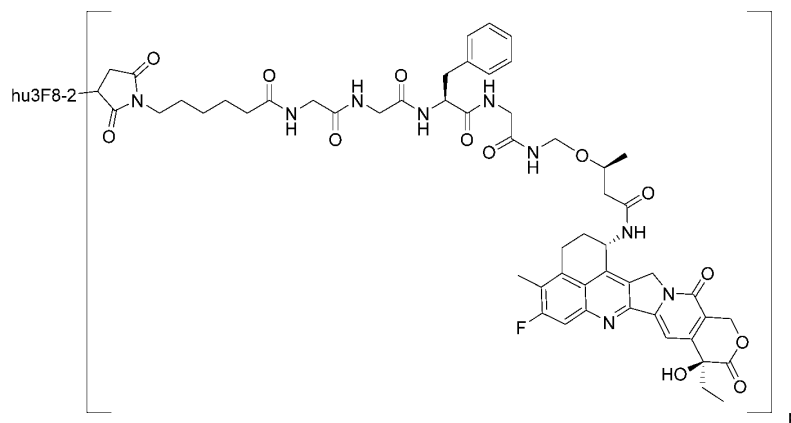


用超纯水分别配制还原剂和保护剂如下：2 mg/ml TCEP (Tris-2- carboxyethyl-phosphine, 厂家：Thermo)、100 mmol/L 乙二胺四乙酸钠盐(厂家：Sigma)。取 150 mg 7.5 mg/ml 的抗 Her3 抗体 (hu3F8-3) 置于 50ml 离心管，加入 50 mM 磷酸钠盐缓冲液, pH7.5 稀释抗体反应浓度至 5 mg/ml,按照反应液总体积 5%加入 100 mmol/L 乙二胺四乙酸钠盐震荡混匀后加入 2 mg/ml TCEP 进行抗体还原，TCEP 与抗体的摩尔比为 6.0：1，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，37°C，2 h。配制浓度为 10 mg/ml 的 linker-payload X1 的二甲基亚砜 (厂家：国药集团) 溶液，按照药物与抗体摩尔比 18.0：1 缓慢加入，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，4°C，1h。用超滤管 (MWCO 30KD, 厂家：密理博) 置换样品至储存缓冲液，先用含有 10% 二甲基亚砜的 30 mM 组氨酸醋酸缓冲液，pH 5.5 超滤 3 次，再用无 DMSO 的 30 mM 组氨酸

酸醋酸缓冲液, pH 5.5 超滤 3 次, 再经超滤浓缩得到抗体药物偶联物 ADC-2-X1, 浓度为 21.15 mg/mL, 收率 67.3%。用分子排阻色谱法和疏水层析色谱法检测纯度和 DAR 值。

经检测, 抗体药物偶联物 ADC-2-X1 的纯度为 99.08%, DAR 值 p 为 7.01。

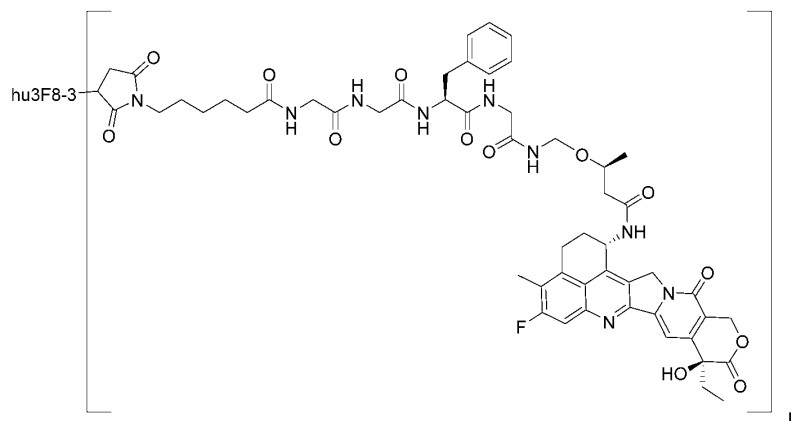
抗体药物偶联物 ADC-1-X2 的制备(hu3F8-2-X2)



用超纯水分别配制还原剂和保护剂如下: 2 mg/ml TCEP (Tris-2- carboxyethyl-phosphine, 厂家: Thermo)、100 mmol/L 乙二胺四乙酸钠盐(厂家: Sigma)。取 150 mg 7.4 mg/ml 的抗 Her3 抗体 (hu3F8-2) 置于 50ml 离心管, 加入 50 mM 磷酸钠盐缓冲液, pH7.5 稀释抗体反应浓度至 5 mg/ml, 按照反应液总体积 5% 加入 100 mmol/L 乙二胺四乙酸钠盐震荡混匀后加入 2 mg/ml TCEP 进行抗体还原, TCEP 与抗体的摩尔比为 6.0 : 1, 震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应, 37°C, 2 h。配制浓度为 10 mg/ml 的 linker-payload X2 的二甲基亚砜 (厂家: 国药集团) 溶液, 按照药物与抗体摩尔比 21 : 1 缓慢加入, 震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应, 4°C, 1h。用超滤管 (MWCO 30KD, 厂家: 密理博) 置换样品至储存缓冲液, 先用含有 10% 二甲基亚砜的 30 mM 组氨酸醋酸缓冲液, pH 5.5 超滤 3 次, 再用无 DMSO 的 30 mM 组氨酸醋酸缓冲液, pH 5.5 超滤 3 次, 再经超滤浓缩得到抗体药物偶联物 ADC-1-X2, 浓度为 20.56 mg/mL, 收率 64%。用分子排阻色谱法和疏水层析色谱法检测纯度和 DAR 值。

经检测, 抗体药物偶联物 ADC-1-X2 的纯度为 99.02%, DAR 值 p 为 7.53。

抗体药物偶联物 ADC-2-X2 的制备(hu3F8-3-X2)



用超纯水分别配制还原剂和保护剂如下：2 mg/ml TCEP (Tris-2- carboxyethyl-phosphine, 厂家: Thermo)、100 mmol/L 乙二胺四乙酸钠盐(厂家: Sigma)。取 150 mg 7.5 mg/ml 的抗 Her3 抗体 (hu3F8-3) 置于 50ml 离心管, 加入 50 mM 磷酸钠盐缓冲液, pH7.5 稀释抗体反应浓度至 5 mg/ml, 按照反应液总体积 5% 加入 100 mmol/L 乙二胺四乙酸钠盐震荡混匀后加入 2 mg/ml TCEP 进行抗体还原, TCEP 与抗体的摩尔比为 6.0 : 1, 震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应, 37°C, 2 h。配制浓度为 10 mg/ml 的 linker-payload X2 的二甲基亚砜 (厂家: 国药集团) 溶液, 按照药物与抗体摩尔比 18.0 : 1 缓慢加入, 震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应, 4°C, 1h。用超滤管 (MWCO 30KD, 厂家: 密理博) 置换样品至储存缓冲液, 先用含有 10% 二甲基亚砜的 30 mM 组氨酸醋酸缓冲液, pH 5.5 超滤 3 次, 再用无 DMSO 的 30 mM 组氨酸醋酸缓冲液, pH 5.5 超滤 3 次, 再经超滤浓缩得到抗体药物偶联物 ADC-2-X2, 浓度为 21.63 mg/mL, 收率 67.3%。用分子排阻色谱法和疏水层析色谱法检测纯度和 DAR 值。

经检测, 抗体药物偶联物 ADC-2-X2 的纯度为 99.24%, DAR 值 p 为 7.11。

参照 ADC-1(U3-1402)的制备

用超纯水分别配制还原剂和保护剂如下：2 mg/ml TCEP (Tris-2- carboxyethyl-phosphine, 厂家: Thermo)、100 mmol/L 乙二胺四乙酸钠盐(厂家: Sigma)。取 40 mg 6.9mg/ml 的 Patritumab 单抗 (抗体序列使用专利“WO2007077028”中序列号 70 重链, 序列号 72 轻链, 转染 CHO 细胞后按照常规抗体表达纯化得到, 抗体纯度>95%) 置于 50ml 离心管, 加入 50 mM 磷酸钠盐缓冲液, pH7.5 稀释抗体反应浓度至 5 mg/ml, 按照反应液总体积 5% 加入 100 mmol/L 乙二胺四乙酸钠盐震荡混匀后加入 2 mg/ml TCEP 进行抗体还原, TCEP 与抗体的摩尔比为 6.0 : 1, 震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应, 37°C, 2h。配制浓度为 10 mg/ml 的 Deruxtecan (CAS 1599440-13-7, 购自上海皓元化学科技有限公司) 的二甲基亚砜 (厂家: 国药集团) 溶液, 按照药物与抗体摩尔比 18.0 : 1 缓慢加入, 震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应, 4°C, 1h。用超滤管 (MWCO 30KD, 厂家: 密理博) 置换样品至储存缓冲液, 先用含有 10% 二甲基亚砜的 30mM 组氨酸醋酸缓冲液, pH 5.5 超滤 3 次, 再用无 DMSO 的 30 mM 组氨酸醋酸缓冲液, pH 5.5 超滤 3 次, 得到参照 ADC-1, 浓度为 8.77 mg/mL, 收率 65%。用分子排阻色谱法和疏水层析色谱法检测纯度和 DAR 值。

经检测, 参照 ADC-1 的纯度为 99.42%, DAR 值 p 为 7.58。

实施例 3. 抗体药物偶联物的细胞内吞活性

测试目的

检测本申请针对 HER3 靶标的抗体药物偶联物, 在 HER3 表达的 MDA-MB-453 细胞上的内吞效应。将细胞和固定浓度的抗体药物偶联物(ADC)和内吞指示试剂 pHrodo 进行共孵育, 通过观察不同时间点细胞内伴随抗体药物偶联物进入细胞的 pHrodo 所产生的荧光信号亮点数来评价抗体药物偶联物内吞能力。

实验方法

1、细胞培养: MDA-MB-453 细胞使用 10% FBS Leibovitz's L-15 培养基培养。

2、细胞准备: 取对数生长期的 MDA-MB-453 细胞, 用 PBS 洗涤 1 次之后, 加入 2-3 ml Versene 消化 2-3 min, 待细胞消化完全后, 加入 10-15 ml 细胞培养液, 将经过消化的细胞洗

脱下来，1000 rpm 离心 5 min,弃上清， 加入细胞培养液将细胞重悬制成单细胞悬液并调整活细胞密度至 3×10^5 cells/ml。

3、细胞铺板：以 50 ul/孔加入 96 孔细胞培养板。将培养板在培养箱培养 18 小时（37 °C，5% CO₂）。

4、加样操作： 将待测抗体药物偶联物与 Fab-pHrodo 共同孵育形成复合物后调整浓度至 10nM，以 50 ul/孔加到细胞。

5、细胞培养：将培养板在培养箱孵育 2、4、6、24 或 48 小时（37 °C，5% CO₂）。

6、读板操作：到达对应时间点，取出 96 孔细胞培养板，加入 Hoechst33342 进行细胞核染色，置于 operatta CLS 中拍照，读取细胞数量及每个细胞内荧光亮点数。使用 Harmony® imaging and analysis 软件计算平均细胞荧光点数

表 12 本申请抗体药物偶联物在 MDA-MB-453 细胞不同时间点内吞产生荧光信号亮点数

抗体药物偶联物	细胞内平均荧光点数				
检测时间 （小时）	2	4	6	24	48
参照 ADC-1	1.0	1.5	1.8	2.7	2.8
ADC-1-X1	1.1	2.0	2.5	2.7	4.0
ADC-1-X2	2.1	2.3	2.5	3.4	3.7
ADC-2-X1	1.4	2.1	2.5	3.3	3.5
ADC-2-X2	1.4	2.1	2.6	2.6	3.9
IgG1	0.6	0.8	0.8	0.8	0.7

结论：根据图 10 和表 12 的结果，本申请针抗体药物偶联物对 HER3 高表达 MDA-MB-453 细胞具有内吞效应，且内吞能力强于参照 ADC-1。

实施例 4 抗体药物偶联物对 HER3 靶标的肿瘤细胞的体外增殖抑制测试

测试目的

为了检测本申请针对 HER3 靶标的抗体药物偶联物，对 Her3 高表达的 HCC1569 和 MDA-MB-453 以及 Her3 不表达的 MDA-MB-231 肿瘤细胞体外增殖的抑制活性。以不同浓度的抗体药物偶联物体外处理细胞，经 6 天培养后，采用 CTG 试剂对细胞的增值进行检测根据 50% 生长抑制浓度（IC₅₀）值评价该化合物的体外活性。

实验方法

1、细胞培养：HCC1569、 MDA-MB-453 或 MDA-MB-231 细胞用 10% FBS RPMI-1640 培养基培养。

2、细胞准备：取对数生长期的 HCC1569、 MDA-MB-453 或 MDA-MB-231 细胞，用 PBS 洗涤 1 次之后，加入 2-3 ml 胰蛋白酶消化 2-3 min，待细胞消化完全后，加入 10-15 ml 细胞培养液，将经过消化的细胞洗脱下来，1000 rpm 离心 5 min,弃上清， 接着加入 10-20 ml 细胞培养液将细胞重悬， 制成单细胞悬液，台盼兰进行细胞染色并计数活细胞。

3、细胞铺板：将 HCC1569、 MDA-MB-453 或 MDA-MB-231 单细胞悬液混匀， 用细胞培养液分别调整活细胞密度至 6×10^4 cells/ml，将密度调整过后的细胞悬液混匀， 以 50 ul/孔加入 96 孔细胞培养板。将培养板在培养箱培养 18 小时（37°C，5% CO₂）。

- 4、抗体药物偶联物浓度：共 9 个浓度，起始浓度为 100nM，3 倍稀释直到 0.0152nM。
- 5、加样操作：向培养板中加入配置的不同浓度的待测样品，每个样品两复孔。将培养板在培养箱孵育 6 天（37℃，5% CO₂）。
- 6、显色操作：取出 96 孔细胞培养板，放置 30 分钟使其平衡至室温，向每孔加入 50ul CTG 试剂，轨道摇床上振摇 2 分钟，室温避光孵育 10 分钟。
- 7、读板操作：取出 96 孔细胞培养板，置于 2104 EnVision 酶标仪中，用酶标仪测定化学发光。

数据分析

用下列公式来计算检测化合物的抑制率（Inhibition rate，IR）： $IR(\%) = (1 - (RLU_{化合物} - RLU_{空白对照}) / (RLU_{溶媒对照} - RLU_{空白对照})) * 100\%$ 。用 Microsoft Excel 计算不同浓度化合物的抑制率，Graphpad Prism 9 对数据进行处理分析。

表 13 本申请抗体药物偶联物对 HCC1569 和 MDA-MB-453 细胞体外增殖抑制的 IC₅₀ 值

抗体药物偶联物	HCC1569	MDA-MB-453	MDA-MB-231
	IC50 (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)
参照 ADC-1	40.7	9.619	-
ADC-1-X1	0.115	0.042	-
ADC-1-X2	5.167	0.094	-

注：“-”表示无增殖抑制活性。

结论：根据表 13 和图 11（11A/11B/11C）的结果，本申请抗体药物偶联物对 Her3 阳性高表达细胞 HCC1569 和 MDA-MB-453 具有明显的增殖抑制活性且其抑制活性强于参照 ADC-1；同时，它们对 HER3 不表达的 MDA-MB-231 细胞无增殖抑制活性，具有良好的选择性。

实施例 5 抗体药物偶联物对 HCC1569 荷瘤小鼠药效评价

测试目的

评价本申请的抗体药物偶联物在 HCC1569 乳腺癌细胞皮下移植雌性 NOD/SCID 小鼠模型中的抗肿瘤作用。

1. 受试药物及材料

- 空白对照组（阴性对照组）：PBS
- 参照 ADC-1（阳性对照组）：1mg/kg
- ADC-1-X1（治疗组）：1mg/kg
- ADC-1-X2（治疗组）：1mg/kg

2. 配制方法：所有样品均用 PBS 稀释配制。

3. 试验动物

8-10 周 NOD/SCID 小鼠，购自江苏集萃药康生物技术有限公司。

4. 试验方法

实验小鼠于右前肩胛处皮下接种 2×10⁶ HCC1569 细胞，细胞重悬在 1:1 PBS 和 Matrigel 混悬液（0.1 ml/只）中。观察肿瘤生长情况，待肿瘤生长至平均体积 100-150 mm³ 时根据肿瘤

大小和小鼠体重随机分组给药，6 只/ 组。分组给药当天定义为第 0 天。

采用尾静脉注射给药，每周给药 1 次，给药 21 天后结束实验。每周测量 2 次瘤体积和体重，记录数据。实验结束时，将小鼠安乐死，计算肿瘤抑制率 $TGI\% \left(TGI = \frac{1 - (Ti - T0)}{(Vi - V0)} \right)$ 。Ti：治疗组和阳性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；T0：治疗组和阳性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；Vi：阴性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；V0：阴性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值。

数据分析

数据统计使用 Excel 2016 统计软件：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；组间差异 P 值以 TTEST 计算。

实验结果如表 14 和图 12，在实验结束时，空白对照组平均肿瘤体积为 1078.32 mm³。

表 14 本申请抗体药物偶联物对 HCC1569 荷瘤小鼠的体内肿瘤抑制效果

抗体药物偶联物	平均肿瘤体积	肿瘤抑制率%
参照 ADC-1	308.64 ±66.78mm ³	71.38%
ADC-1-X1	254.63±57.6 mm ³	76.39%
ADC-1-X2	25.84±14.38 mm ³	97.60%

结论：本申请的抗体药物偶联物均能显著缩小肿瘤体积。且本申请的抗体药物偶联物比参照 ADC-1 有更好的体内肿瘤抑制效果。

实施例 6 抗体药物偶联物对 Colo205 荷瘤小鼠药效评价

试验目的

以 BALB/c Nude 裸鼠为受试动物，评价本申请的抗体药物偶联物的抗肿瘤作用。

ADC-III-28，参照 ADC-2 腹腔注射给药后，对 Colo205 移植瘤裸小鼠的疗效。

1. 受试药物及材料

空白对照（阴性对照组）：PBS

参照 ADC-1（阳性对照组）：1mg/kg

ADC-1-X1（治疗组）：1mg/kg

ADC-1-X2（治疗组）：1mg/kg

2. 配制方法：均用 PBS 稀释配制。

3. 试验动物

8-10 周 BALB/c-Nude 小鼠，购自江苏集萃药康生物技术有限公司。

4. 试验方法

在小鼠右肋部皮下接种 Colo205 细胞, 1×10⁷cells (100 μL/只)。肿瘤生长达 80-120 mm³ 时将动物随机分组，5 只/ 组。分组给药当天定义为第 0 天。采用尾静脉注射给药，每两周给药 1 次，给药 22 天后结束实验。每周测量 2 次瘤体积和体重，记录数据。实验结束时，将小鼠安乐死，计算肿瘤抑制率 $TGI\% \left(TGI = \frac{1 - (Ti - T0)}{(Vi - V0)} \right)$ 。Ti：治疗组和阳性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；T0：治疗组和阳性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；Vi：阴性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；V0：阴性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值。

数据分析数据统计使用 Excel 2016 统计软件：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；组间差异 P 值以 TTEST 计算。

实验结果如表 15 和图 13，在实验结束时，空白对照组平均肿瘤体积为 515.92mm³。

表 15 本申请抗体药物偶联物对 Colo205 荷瘤小鼠的体内肿瘤抑制效果

抗体药物偶联物	平均肿瘤体积	肿瘤抑制率%
参照 ADC-1	545.75±252 mm ³	-6.38%
ADC-1-X1	385.11±111 mm ³	24.33%
ADC-1-X2	263.20 ±105mm ³	49.09%

结论：本申请的抗体药物偶联物均能显著缩小肿瘤体积。且本申请的抗体药物偶联物比参照 ADC-1 在更低的给药浓度观察到肿瘤抑制效果。

实施例 7 抗体药物偶联物对 NCI-H441 肺癌细胞荷瘤小鼠药效评价

试验目的

以雄性 NU/NU 裸鼠为受试动物，评价本申请的抗体药物偶联物对 NCI-H441 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用。

1.受试药物及材料

- 空白对照（阴性对照组）：生理盐水
- 参照 ADC-1（阳性对照组）：0.3mg/kg 或 1mg/kg
- ADC-1-X2（治疗组）：0.3mg/kg 或 1mg/kg

2.配制方法： 均用生理盐水稀释配制。

3.试验动物：6-8 周 NU/NU 裸鼠，购自维通利华实验动物技术有限公司。

4.试验方法

实验小鼠于右侧背部皮下接种 5×10⁶ NCI-H441 细胞，细胞重悬在 0.1ml 的 PBS 和 Matrigel（1:1），定期观察肿瘤生长情况，待肿瘤生长至平均体积 115.24 mm³ 时根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药，每组 6 只动物。分组给药当天定义为第 0 天。采用尾静脉注射给药，给药 1 次，给药 28 天后结束实验。每周测量 2 次瘤体积和体重，记录数据。实验结束时，将小鼠安乐死，计算肿瘤抑制率 TGI%（ $TGI=(1-(Ti-T0)/(Vi-V0))$ ）。Ti：治疗组和阳性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；T0：治疗组和阳性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；Vi：阴性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；V0：阴性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值。

数据分析数据统计使用 Excel 2016 统计软件： 平均值以 avg 计算； SD 值以 STDEV 计算；； 组间差异 P 值以 TTEST 计算。

实验结果如表 16 和图 14，在实验结束时，空白对照组平均肿瘤体积为 1138.85mm³。

表 16 本申请抗体药物偶联物对 NCI-H441 荷瘤小鼠的体内肿瘤抑制效果

组别	给药	剂量 (mg/kg)	28 天			
			肿瘤体积(mean ± SEM)	T/C (%)	TGI (%)	p 值（与空白对照对比）
1	空白对照	-	882.81 ± 114.09	-	-	-
2	ADC-1-X2	1	162.00 ± 42.47	18.35	81.65	0.00787
3	ADC-1-X2	0.3	546.52 ± 109.10	61.91	38.09	0.497
4	参照 ADC-1	1	760.76 ± 208.92	86.17	13.83	0.987
5	参照 ADC-1	0.3	823.01 ± 109.69	93.23	6.77	1

结论：本申请的抗体药物偶联物能显著缩小肿瘤体积，且本申请的抗体药物偶联物比参照 ADC-1 在同等浓度下有更好的肿瘤抑制。

实施例 8 抗体药物偶联物对人源肺癌 LU1542 皮下异种移植荷瘤小鼠药效评价

试验目的

以雌性 BALB/c nude 鼠为受试动物，评价本申请的抗体药物偶联物对人源肺癌 LU1542 皮下异种移植瘤小鼠的抗肿瘤作用。

1.受试药物及材料

空白对照（阴性对照组）：PBS

参照 ADC-1（阳性对照组）：3mg/kg 或 10mg/kg

ADC-1-X2（治疗组）：3mg/kg 或 10mg/kg

2.配制方法：均用 PBS 稀释配制。

3.试验动物：6-8 周 BALB/c nude 鼠，购自北京安凯毅博生物技术有限公司。

4.试验方法

从 HuPrime®肺癌异种移植模型 LU1542 荷瘤小鼠收取肿瘤组织，切成直径为 2-3mm 的瘤块接种于 Balb/c 裸小鼠右前肩胛处皮下。当荷瘤鼠平均肿瘤体积到达 136.8 mm³ 时，将小鼠随机分组，每组 6 只动物。分组给药当天定义为第 0 天。采用尾静脉注射给药，给药 1 次，给药 28 天后结束实验。每周测量 2 次瘤体积和体重，记录数据。实验结束时，将小鼠安乐死，计算肿瘤抑制率 TGI%（ $TGI=(1-(Ti-T_0)/(Vi-V_0))$ ）。Ti：治疗组和阳性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；T0：治疗组和阳性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；Vi：阴性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；V0：阴性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值。

数据分析数据统计使用 Excel 2016 统计软件：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；组间差异 P 值以 TTEST 计算。

实验结果如表 17 和图 15，在实验结束时，空白对照组平均肿瘤体积为 1580.09mm³。

表 17 本申请抗体药物偶联物对 NCI-H441 荷瘤小鼠的体内肿瘤抑制效果

抗体药物偶联物	平均肿瘤体积	肿瘤抑制率%
ADC-1-X2 3mg/kg	461.39±106.26 mm ³	77.50%
ADC-1-X2 10mg/kg	302.78±129.69 mm ³	88.49%
参照 ADC-1 3mg/kg	1219.23 ±187.13 mm ³	24.98%
参照 ADC-1 10mg/kg	602.13± 898 mm ³	67.75%

结论：本申请的抗体药物偶联物均能显著缩小肿瘤体积。且本申请的抗体药物偶联物比参照 ADC 在更低的给药浓度观察到肿瘤抑制效果，且同等浓度下有更好的肿瘤抑制。

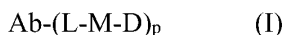
本申请的序列（SEQ ID NO.）:

编号	说明	序列
1	HCDR1	SAYYWN
2	HCDR2	YISYDGRNNFNPSLKN

3	HCDR3	DGDYDYFDY
4	LCDRI	RASQDISNYLN
5	LCDR2	YTSILHS
6	LCDR3	QQGDTLPPT
7	hu3F8- 1 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWIGYISYDGRNNFNPSLKNRVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQGTITVTVSS
8	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLPEDIATYFCQQGDTLPPTFGGGTKLEIK
9	hu3F8- 2 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWMGYISYDGRNNFNPSLKNRV TISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQGTITVTVSS
10	hu3F8- 3 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWMGYISYDGRNNFNPSLKNRV SISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCARDGDYDYFDYWGQGTITVTVSS
11	hu3F8- 1 HC	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWIGYISYDGRNNFNPSLKNRVTI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NHYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTD YTFTISSLPEDIATYFCQQGDTLPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
13	hu3F8- 2 HC	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWMGYISYDGRNNFNPSLKNRV TISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NHYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	hu3F8- 3 HC	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSAYYWNWIRQPPGKGLEWMGYISYDGRNNFNPSLKNRV SISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCARDGDYDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NHYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	m3f8- VL	DIQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTFKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDIATYFCQQGDTLPPTFG AGTKLELK
16	m3f8- VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSAYYWNWIRQPPGDKLEWMGYISYDGRNNFNPSLKNRIS ITRDTSKNQFFLKLNSVTSGDTATYYCARDGDYDYFDYWGQGTITVTVSS

权 利 要 求

1. 一种抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，所述抗 Her3 抗体药物偶联物结构如式 (I) 所示：



其中，

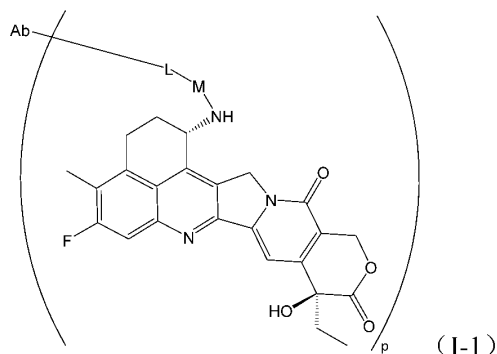
L 和 M 是接头单元；

D 是细胞毒性药物；

p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 3 到 8 的整数或小数；

Ab 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

2. 如权利要求 1 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，所述抗 Her3 抗体药物偶联物结构如式 (I-1) 所示：



其中，

L 和 M 是接头单元；

p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 3-8 的整数或小数；

Ab 为抗 Her3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：

(I) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的轻链可变区；或

(II) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%

或 99%同一性的轻链可变区；或

(III) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链可变区。

4.如权利要求 1 或 2 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体或其片段、嵌合抗体或其片段、人源化抗体或其片段。

5.如权利要求 1 或 2 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂、sdAb、双抗体或线性抗体。

6.如权利要求 1 或 2 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，其中所述抗体为 IgG1 形式的抗体、IgG2 形式的抗体、IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体。

7.如权利要求 1-6 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述抗 Her3 抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链；或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性所示的轻链；或

(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中

M 为-L²-L³-X-L¹-;

L² 为-O-或-S-;

L³ 为-(C(R^{1a})(R^{1b}))_m-, m 选自 0、1、2 或 3，其中当 L³ 包含亚甲基单元时，所述 L³ 的 0 个或 1 个亚甲基单元可以被-C(O)-、或-C(S)-替代；

L¹ 为-(C(R^{2a})(R^{2b}))_n-, n 选自 1、2 或 3,其中当 L¹ 可以包含亚甲基单元时，所述 L¹ 的 0 个或 1 个亚甲基单元可以被-C(O)-、或-C(S)-替代；

X 选自 3 到 6 元饱和的碳环基、3 到 6 元饱和的杂环基或单键，所述 3 到 6 元饱和的碳环基和 3 到 6 元饱和的杂环基任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代；

其中每个 R^{1a}，R^{1b}，R^{2a}，R^{2b}，R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团；

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

9. 如权利要求 8 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其

混合物, 其中 L^3 选自单键、 $-C(R^{1a})(R^{1b})-$ 或 $-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-$;

其中每个 R^{1a} 和 R^{1b} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

10. 如权利要求 9 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中 L^3 选自单键、 $-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)CH_2-$ 或 $-C(CH_3)_2CH_2-$ 。

11. 如权利要求 8 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中 L^1 选自 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$ 、 $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$ 或 $-C(O)-$;

其中每个 R^{2a} , R^{2b} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

12. 如权利要求 11 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中 L^1 选自 $-CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-CH(CH_3)C(O)-$ 或 $-C(O)-$ 。

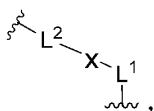
13. 如权利要求 8 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中 X 为任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基或单键;

其中每个 R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

14. 如权利要求 13 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中 X 为 3 到 6 元饱和的碳环基或单键。

15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中所述 -M- 选自:



L^2 为 $-O-$ 或 $-S-$;

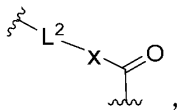
X 选自任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基;

L^1 选自 $-C(R^{2a})(R^{2b})-$ 、 $-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-$ 或 $-C(O)-$;

其中每个 R^{2a} , R^{2b} 或 R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

16. 如权利要求 15 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物, 其中所述 -M- 选自:

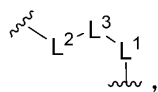


L^2 为 $-O-$ 或 $-S-$;

X 选自 3 到 6 元饱和的碳环基。

17. 如权利要求 1-14 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接

受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:



L^2 为-O-或-S-;

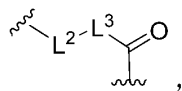
L^3 选自-C(R^{1a})(R^{1b})-或-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-;

L^1 选自-C(R^{2a})(R^{2b})-、-C(R^{2a})(R^{2b})C(O)-或-C(O)-;

其中每个 R^{1a}, R^{1b}, R^{2a} 或 R^{2b} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C₁₋₆ 脂肪族基团;

其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

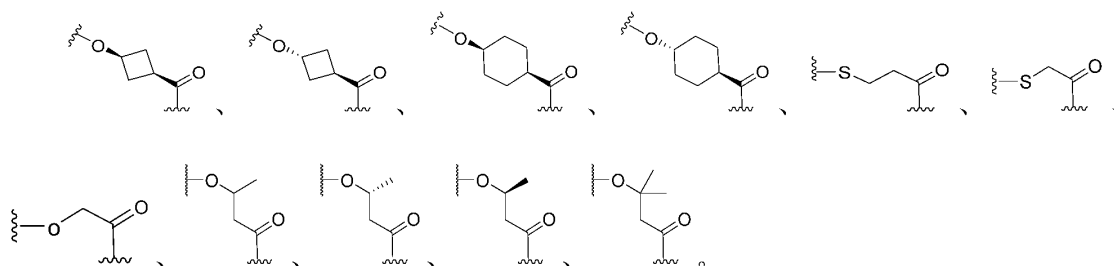
18. 如权利要求 17 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:



L^2 为-O-或-S-;

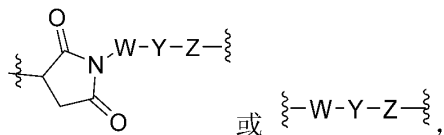
L^3 选自-CH₂-、-CH(CH₃)-、-C(CH₃)₂-、-CH₂CH₂-、-CH(CH₃)CH₂-或-C(CH₃)₂CH₂-。

19. 如权利要求 1-18 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-选自:



20. 如权利要求 1-19 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述 L 为-L_a-L_b-L_c-,

所述-L_a-为



其中, W 为-(C(R^{wa})(R^{wb}))_{wn}-, Y 为-(OCH₂CH₂)_{yn}-O_{yp}-, Z 为-(C(R^{za})(R^{zb}))_{zn};

其中 wn 为 1、2、3 或 6,

W 的 1 个亚甲基单元各自独立地被-Cyr-、-N(R^{wx})C(O)-、-C(O)N(R^{wx})-、或-C(O)-替代;

其中 yn 为 0、4 或 8, yp 为 0 或 1;

其中 zn 为 1、2 或 3,

Z 的 1 个亚甲基单元各自独立地被-Cyr-、-N(R^{zx})C(O)-、-C(O)N(R^{zx})-、或-C(O)-替代;

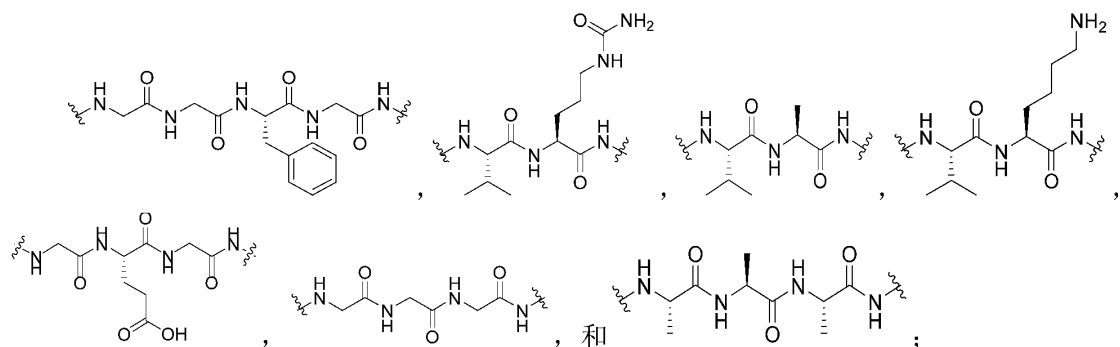
-Cyr-为 3 到 10 元饱和的亚碳环基, 其中所述-Cyr-是未取代的或独立地被 1 到 3 个取代

基 R^{cx} 取代;

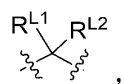
其中每个 R^{wa} , R^{wb} , R^{za} , R^{zb} , R^{wx} , R^{zx} , R^{cx} 各自独立地为氢、卤素、 $-OR^r$ 或被 R^r 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团;

其中每个 R^r 各自独立地为氢、卤素或 C_{1-6} 脂肪族基团;

所述 $-L_b-$ 选自以下组:



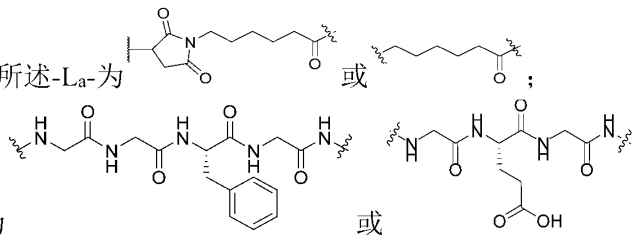
所述 $-L_c-$ 为



其中 R^{L1} 、 R^{L2} 各自独立地选自以下组: 氢、卤素、 $-OH$ 和 C_{1-6} 脂肪族基团。

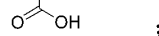
21. 如权利要求 20 所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或

其混合物,其中所述 $-L_a-$ 为



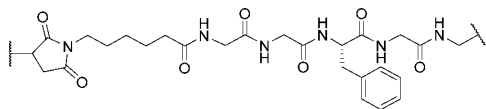
所述 $-L_b-$ 为

或

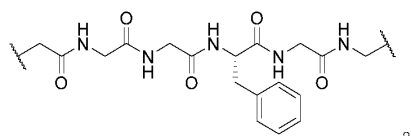


所述 $-L_c-$ 为 $-CH_2-$ 。

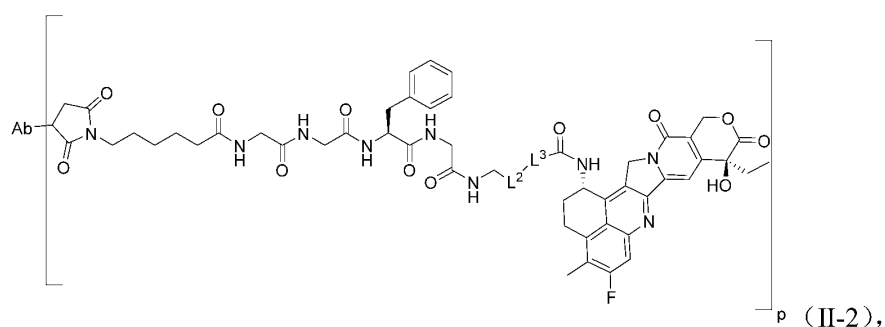
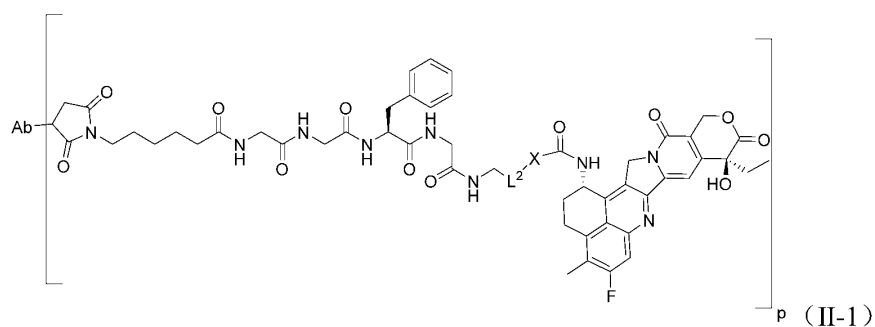
22. 如权利要求 1-21 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述 L 为



23. 如权利要求 1-21 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述 L 为



24. 如权利要求 1-23 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物结构如式 (II-1) 或 (II-2) 所示:



其中,

p 如权利要求 1 所述;

Ab 如权利要求 1-7 中任一项所述;

L^2 为-O-或-S-;

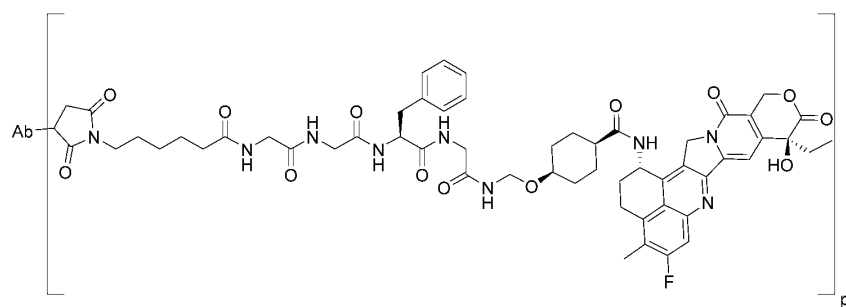
X 选自任选被 0、1、2 或 3 个 R^{3a} 取代的 3 到 6 元饱和的碳环基;

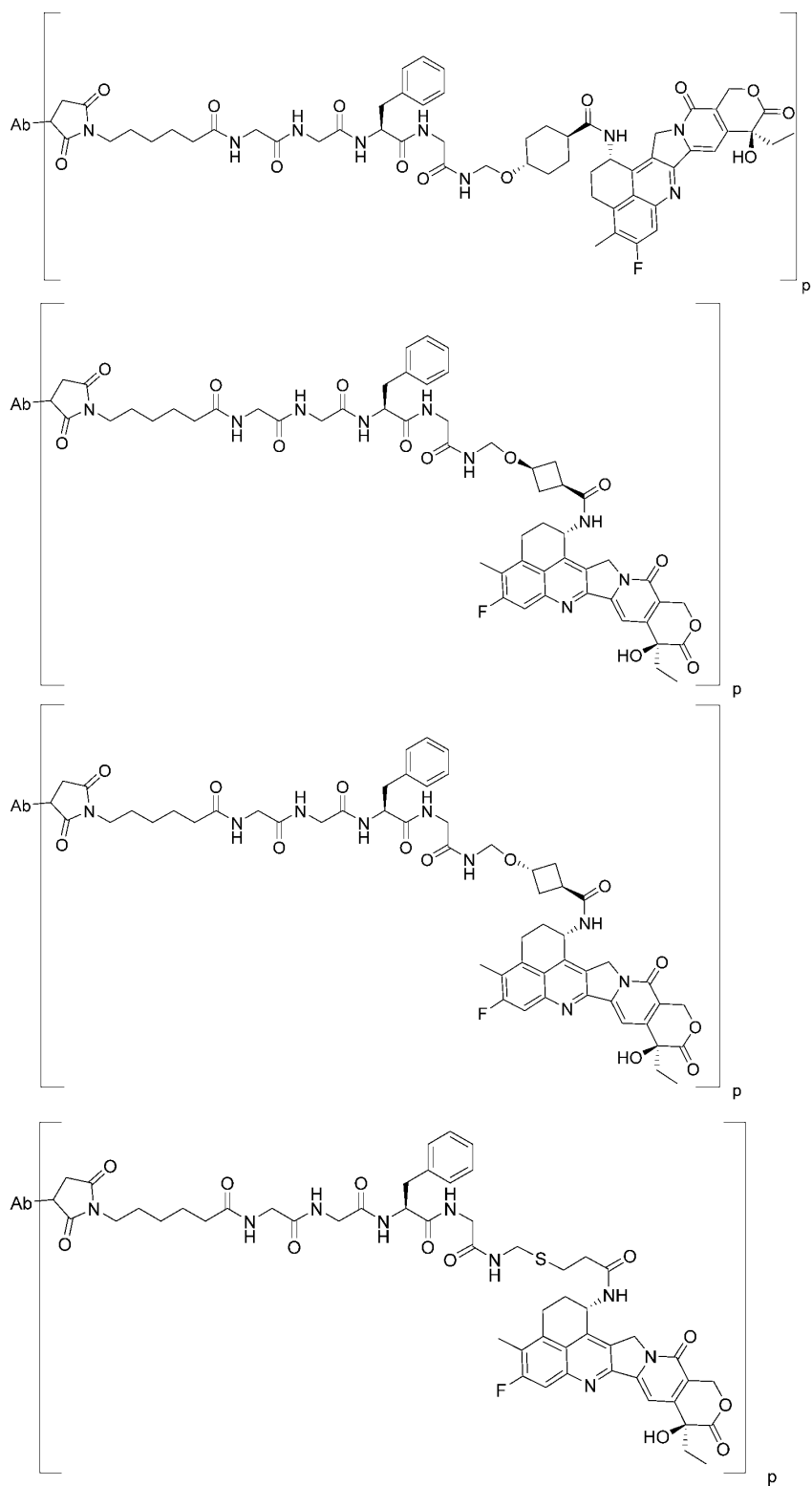
L^3 选自-C(R^{1a})(R^{1b})-或-C(R^{1a})(R^{1b})C(R^{1a})(R^{1b})-;

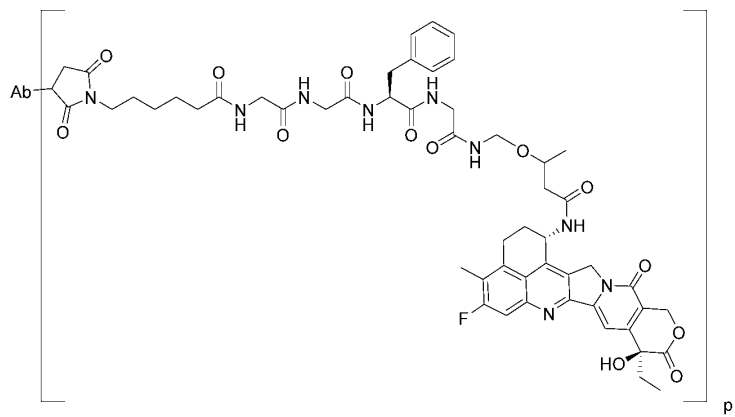
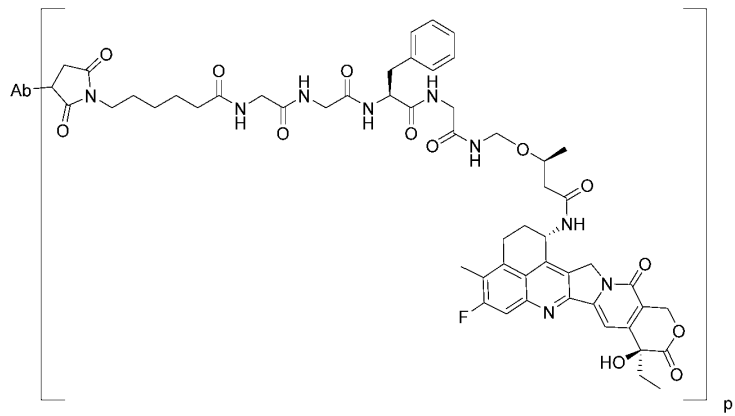
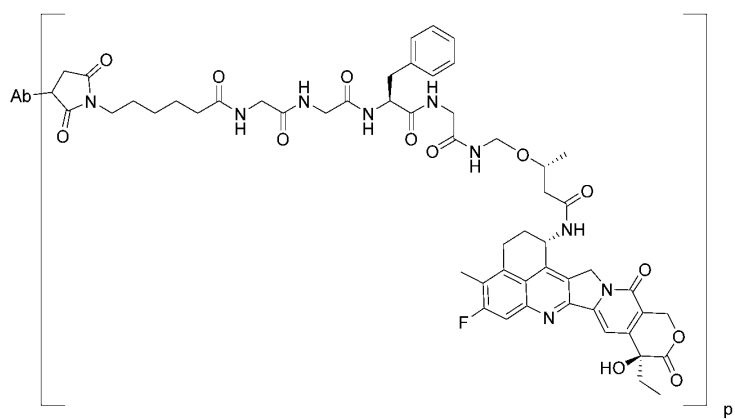
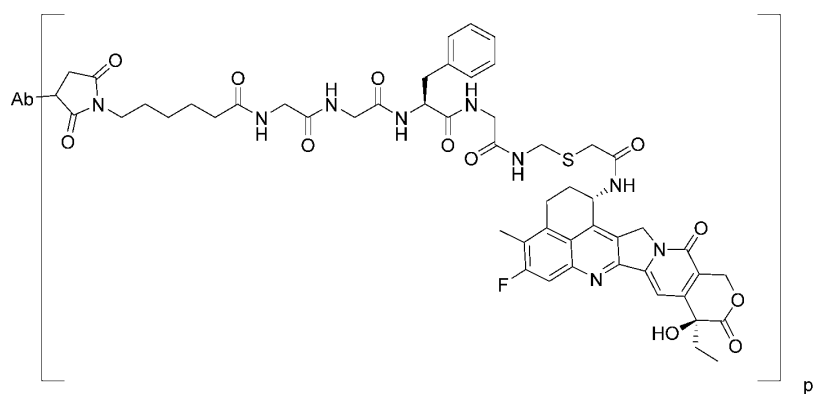
其中每个 R^{1a} 、 R^{1b} 或 R^{3a} 各自独立可以为氢、卤素或可以被 R 任选取代的 C_{1-6} 脂肪族基团;

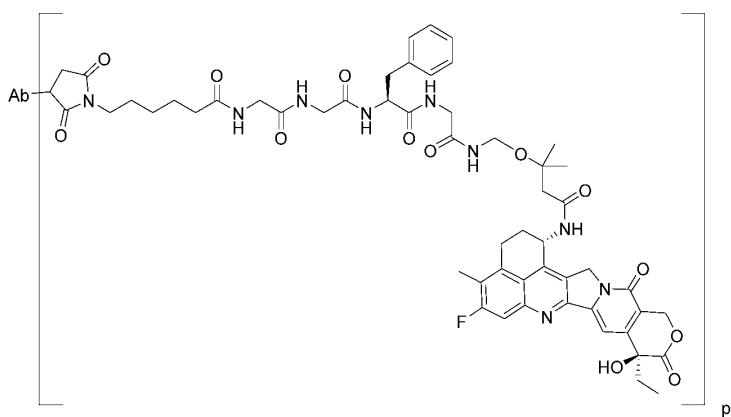
其中每个 R 各自独立地可以为氢或卤素。

25. 如权利要求 1-24 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物选自以下结构式:







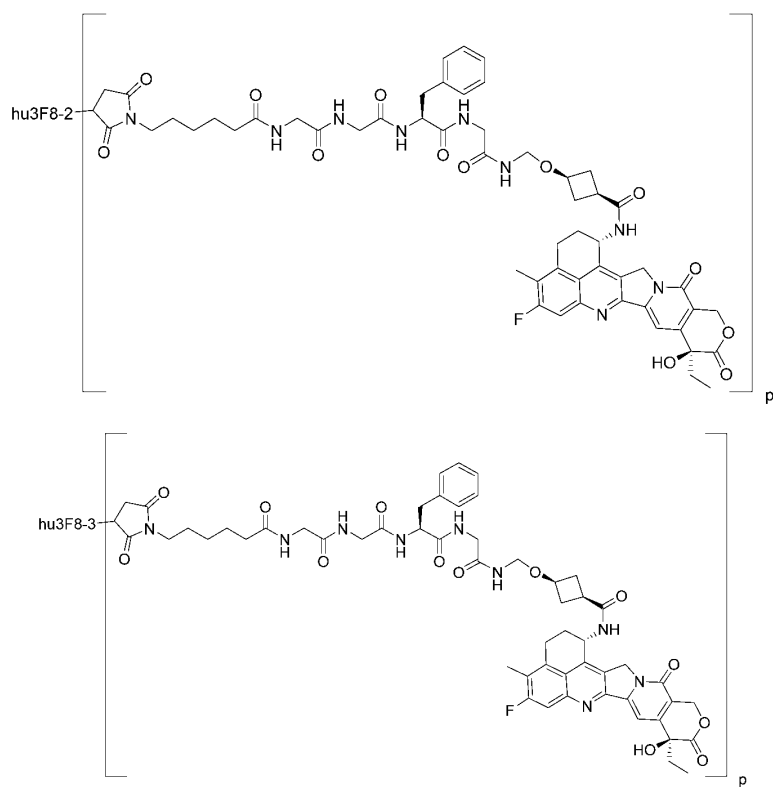


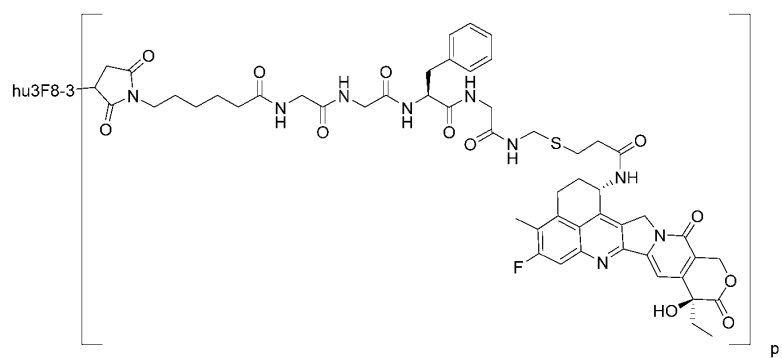
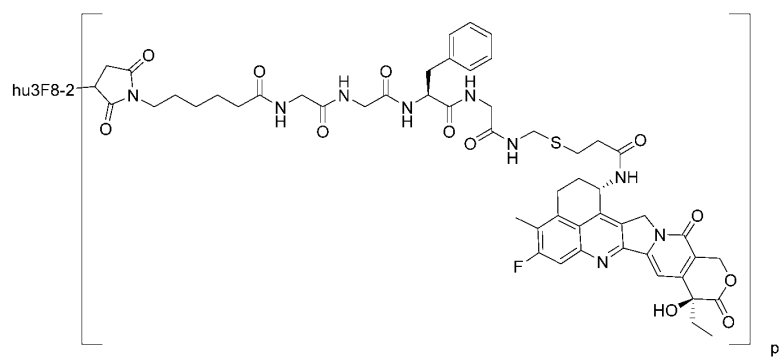
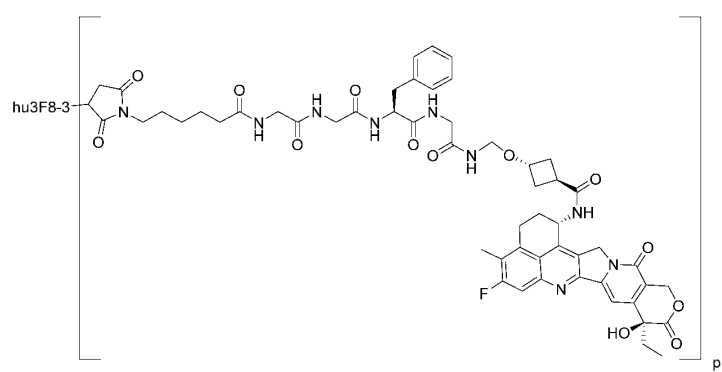
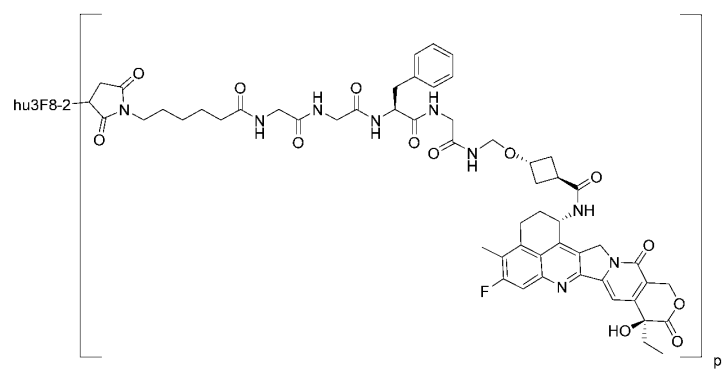
其中,

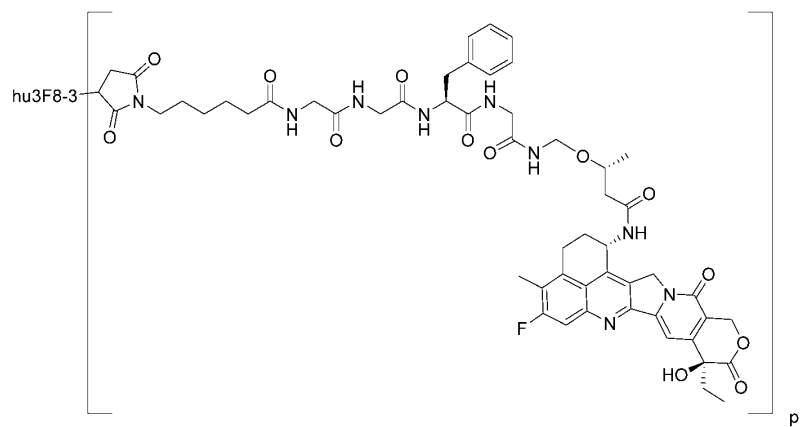
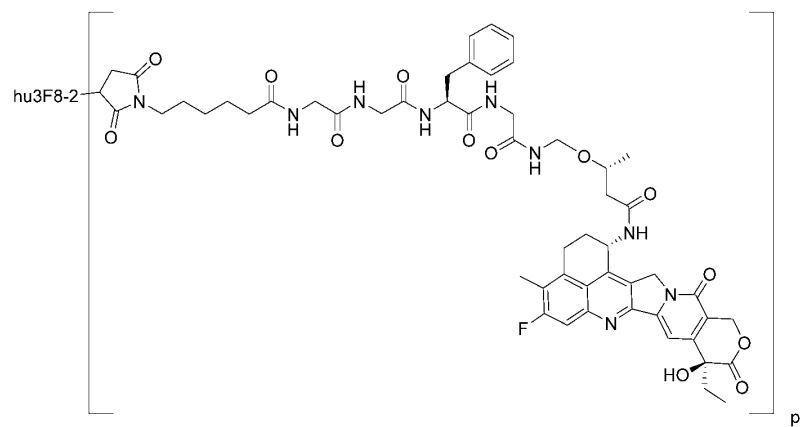
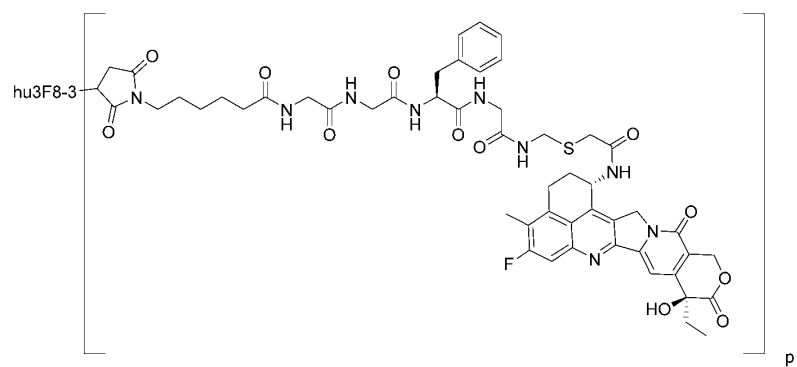
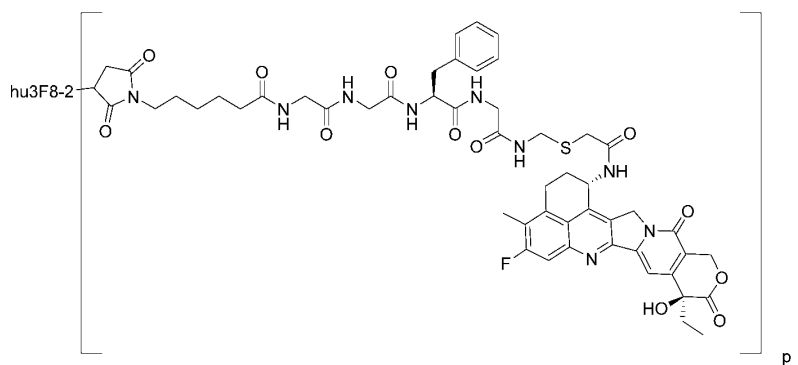
p 如权利要求 1 所述;

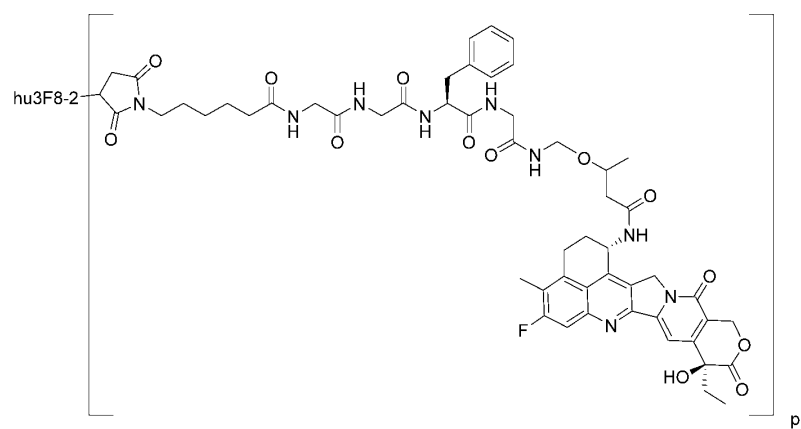
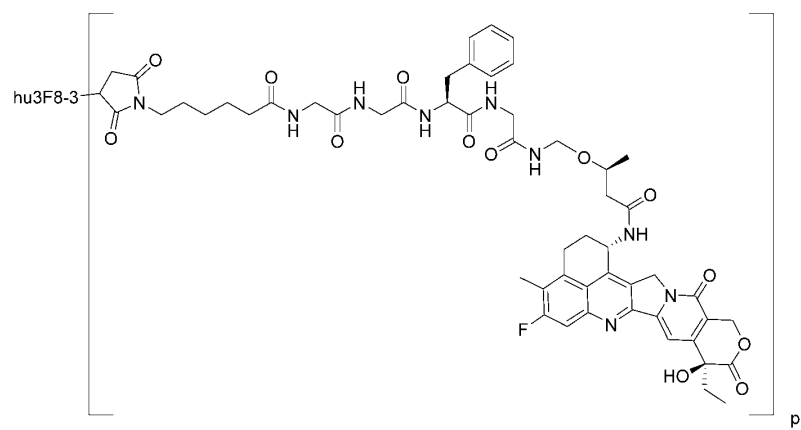
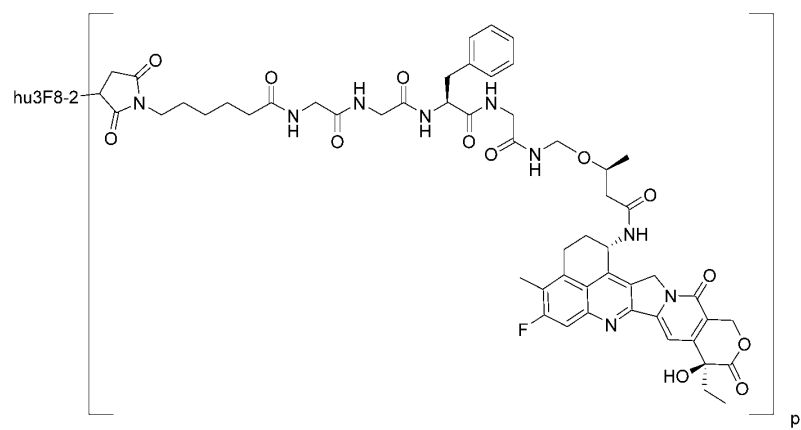
Ab 如权利要求 1-7 中任一项所述。

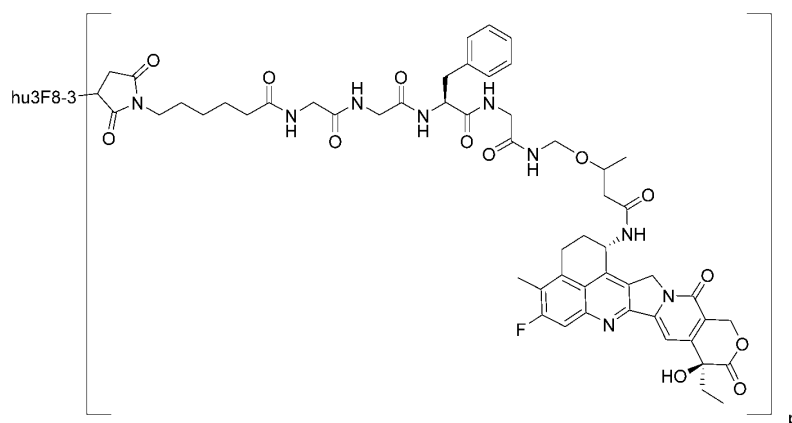
26. 一种抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述抗 Her3 抗体药物偶联物选自:











其中，

p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 3-8 的整数或小数。

27. 一种药物组合物，其包含如权利要求 1-26 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物，和药学上可接受的载体或赋形剂。

28. 如权利要求 1-26 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物或权利要求 27 所述的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防 Her3 介导的疾病或病症的药物中的用途，优选地，所述疾病或病症为癌症；更优选地，所述癌症选自肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌和食道癌。

29. 一种治疗和/或预防 Her3 介导的疾病或病症的方法，其包括向有需要的受试者施用如权利要求 1-26 中任一项所述的抗 Her3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物或权利要求 27 所述的药物组合物，优选地，所述疾病或病症为癌症；更优选地，所述癌症选自肺癌、肾癌、尿道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌和食道癌。