(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2023 年 1 月 12 日 (12.01.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/280092 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/46 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/103592

(22) 国际申请日: 2022 年 7 月 4 日 (04.07.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110757803.1 2021年7月5日 (05.07.2021) CN

(71) 申请人: 江苏康宁杰瑞生物制药有限公司 (JIANGSU ALPHAMAB BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区方洲路175号, Jiangsu 215000 (CN)。

(72) 发明人: 徐霆 (XU, Ting); 中国江苏省苏州市苏州工业园区方洲路175号, Jiangsu 215000 (CN)。 王媲琳 (WANG, Pilin); 中国江苏省苏州市苏州工业园区方洲路175号, Jiangsu 215000 (CN)。 郭康平 (GUO, Kangping); 中国江苏省苏州市苏州工业园区方洲路175号, Jiangsu 215000 (CN)。 赵永浩 (ZHAO, Yonghao); 中国江苏省苏州市苏州工业园区方洲路175号, Jiangsu 215000 (CN)。 彭建建 (PENG, Jianjian); 中国江苏省苏州市苏州工业园区方洲路175号, Jiangsu 215000 (CN)。

(74) 代理人: 上海巅石知识产权代理事务所（普通合伙） (SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.); 中国上海市浦东新区盛夏路608号2号103室/张琤, Shanghai 201210 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。
— 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

WO 2023/280092 A1

(54) **Title:** ANTIBODY-DRUG CONJUGATE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 抗体药物偶联物及其应用

(57) **Abstract:** An antibody-drug conjugate, comprising a bispecific antibody targeting HER2 or an antigen-binding fragment thereof. Also provided are a preparation method for and an application of the antibody-drug conjugate, and a pharmaceutical composition comprising the antibody-drug conjugate. The antibody-drug conjugate can effectively kill tumors.

(57) 摘要: 一种抗体药物偶联物，其包含靶向HER2的双特异性抗体或其抗原结合片段。该抗体药物偶联物的制备方法以及用途，以及包括所述抗体药物偶联物的药物组合物。所述抗体药物偶联物可以有效地杀伤肿瘤。

抗体药物偶联物及其应用

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种抗体药物偶联物及其应用。

背景技术

HER 受体酪氨酸激酶家族的成员是细胞生长、分化和存活的重要介导物。该受体家族包括四种独特的成员，包括表皮生长因子受体（EGFR、ErbB1、或 HER1）、HER2（ErbB2 或 p185neu）、HER3（ErbB3）和 HER4（ErbB4 或 tyro2）。该受体家族的成员已牵连于多种类型的人恶性肿瘤。

双特异性抗体（Bispecific antibody, BsAbs）是含有两个不同配体结合位点的免疫球蛋白分子。它取代了经典的抗体 Fab 两臂相同的序列，而是用两个不同的 Fab 序列，因此 Y 型两臂可以结合不同的抗原表位。双特异性抗体在癌症治疗中的应用已经被多篇文献所综述（Carter 2001; Chames and Baty 2009; Chames and Baty 2009）。

向与在癌细胞表面表达、并且能向细胞内化的抗原结合的抗体上连接具有细胞毒性的药物得到的抗体-药物偶联物能够选择性地向癌细胞输送药物，从而可预计其能使药物在癌细胞内蓄积，并杀死癌细胞。

发明内容

本申请提供了一种抗体药物偶联物，包括靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段。所述抗体药物偶联物可以特异性地结合人 HER2 中的至少一个（例如至少 2 个）表位。本申请所述的抗体药物偶联物可以有以下的性质：（1）有效地杀伤肿瘤细胞，其中抗体部分和药物部分可以发挥协同杀伤肿瘤的功能；（2）特异性地结合肿瘤细胞；（3）在血清中有良好的稳定性；（4）对肿瘤细胞有更强的旁观者杀伤效应；（5）具有良好的 ADCC 效应；和/或（6）具有较好的内吞效率。本申请还提供了所述抗体药物偶联物的制备方法，包含所述抗体药物偶联物的组合物，以及所述抗体药物偶联物和组合物的应用。

一方面，本申请提供了一种抗体药物偶联物，其包含靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段特异性结合人

HER2 的至少一个表位。

在某些实施方式中，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段特异性结合人 HER2 的胞外结构域 II 和/或人 HER2 的胞外结构域 IV。

在某些实施方式中，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一轻链和第二轻链。

在某些实施方式中，所述第一轻链包含第一 LCDR1-3，其中所述第一 LCDR1 包含 SEQ ID NO. 4 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一 LCDR2 包含 SEQ ID NO. 5 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一 LCDR3 包含 SEQ ID NO. 6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一轻链能够与帕妥珠单抗的重链结合。

在某些实施方式中，所述第二轻链包含第二 LCDR1-3，其中所述第二 LCDR1 包含 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二 LCDR2 包含 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二 LCDR3 包含 SEQ ID NO. 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二轻链能够与曲妥珠单抗的重链结合。

在某些实施方式中，所述第一轻链和所述第二轻链的可变区包含 SEQ ID NO. 7-12 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一轻链和所述第二轻链的可变区包含 SEQ ID NO. 7 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一轻链和所述第二轻链包含 SEQ ID NO. 13-18 中任一项所述的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一轻链选自下组：帕妥珠单抗的轻链或其突变体和曲妥珠单抗的轻链或其突变体；和/或，所述第二轻链选自下组：帕妥珠单抗的轻链或其突变体和曲妥珠单抗的轻链或其突变体。

在某些实施方式中，所述第一轻链和所述第二轻链的氨基酸序列相同。

在某些实施方式中，所述第一轻链和所述第二轻链包含 SEQ ID NO. 13 所述的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一重链和第二重链，其中所述第一重链能够在生理条件或体外的蛋白表达状态下与所述第一轻链正确结合。

在某些实施方式中，所述第二重链能够在生理条件或体外的蛋白表达状态下与所述第二轻链正确结合。

在某些实施方式中，所述第一重链包含第一重链可变区，所述第一重链可变区为帕妥珠单抗的重链可变区。

在某些实施方式中，所述第二重链包含第二重链可变区，所述第二重链可变区为曲妥珠单抗的重链可变区。

在某些实施方式中，所述第一重链和所述第二重链包含重链恒定区，其中所述重链恒定区源自人 IgG 的恒定区。

在某些实施方式中，所述第一重链和所述第二重链的 Fc 片段包含 SEQ ID NO. 25-57 中任一项所述的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一重链包含 21 或 23 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二重链包含 22 或 24 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体药物偶联物，包含式 1 所示的结构：

M-（L1）$_a$-（L2）$_b$-D（式 1），其中 M 表示本申请所述的靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段；L1 表示与 M 连接的连接子，L2 表示与 D 连接的连接子，a，b 各自独立地选自 0-10，D 表示药物。

在某些实施方式中，所述 L1 和/或 L2 选自下组：可裂解的连接子、不可裂解的连接子、亲水的连接子、疏水的连接子、带电荷的连接子、不带电荷的连接子和基于二羧酸的连接子。

在某些实施方式中，所述 L1 与所述 M 通过所述 M 上的巯基、叠氮基或酰胺基连接。

在某些实施方式中，所述 M 包含第一重链和第二重链，所述第一重链和/或所述第二重链包含能够与所述 L1 连接的连接位点。

在某些实施方式中，所述连接位点包含去糖基化修饰后能够与所述 L1 连接的基团。

在某些实施方式中，所述基团位于所述第一重链的第 297 位氨基酸 Q 的侧基；和/或，位于所述第二重链的第 298 位氨基酸 Q 的侧基。

在某些实施方式中，所述基团包括酰胺基。

在某些实施方式中，所述连接位点包含经糖基化修饰后能够与所述 L1 连接的基团。

在某些实施方式中，所述基团位于所述第一重链的第 299 位氨基酸 N 的侧基；和/或，位于所述第二重链的第 300 位氨基酸 N 的侧基。

在某些实施方式中，所述基团包含-N_3。

在某些实施方式中，所述经糖基化修饰包括：所述 M 已经与 UDP-GalNAz、β-1,4-半乳糖基转移酶或其变体接触。

在某些实施方式中，所述 L1 能够参与 SPAAC 反应。

在某些实施方式中，所述 L1 选自下组：马来酰亚胺、琥珀酰亚胺-3-基-N 和 DBCO。

在某些实施方式中，所述 L1 为 DBCO-（PEG）$_{n1}$，其中 $_{n1}$ 为 0-10 的整数，或者，所述 L1 为马来酰亚胺。

在某些实施方式中，所述 L2 选自下组：多肽、VC-PAB、N-琥珀酰亚胺基-3-（2-吡啶基二硫代）丙酸酯（SPDP）、N-琥珀酰亚胺基 4-（2-吡啶基二硫代）戊酸酯（SPP）、N-琥珀酰亚胺基 4-（2-吡啶基二硫代）丁酸酯（SPDB）、 N-琥珀酰亚胺基-4-（2-吡啶基二硫基）-2-磺基丁酸酯（sulfo-SPDB）、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯（SIA）、N-琥珀酰亚胺基（4-碘乙酰基）氨基苯甲酸酯（SIAB）、马来酰亚胺 PEG NHS、N- 4-（马来酰亚胺基甲基）环己基羧酸琥珀酰胺基酯（SMCC）、N-磺基（4-亚马来酰亚胺甲基）环己基羧酸磺基琥珀酯（磺基-SMCC）和 2,5-二氧吡咯烷基-1-基 17-（2,5-二氧代-2,5-二氢- 1H-吡咯-1-基）-5,8,11,14-四氧-4,7,10,13-四氮杂十八烷-1-酸酯（CX1-1）。

在某些实施方式中，所述 L2 为 GGFG。

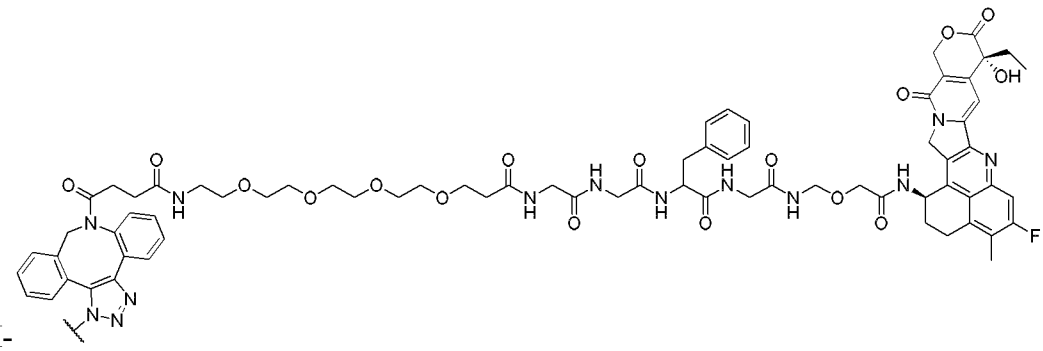
在某些实施方式中，所述药物具有杀伤肿瘤细胞，和/或抑制肿瘤细胞生长的能力。

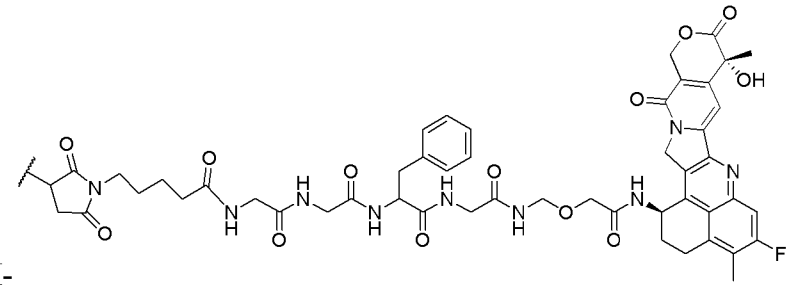
在某些实施方式中，所述药物包括小分子药物。

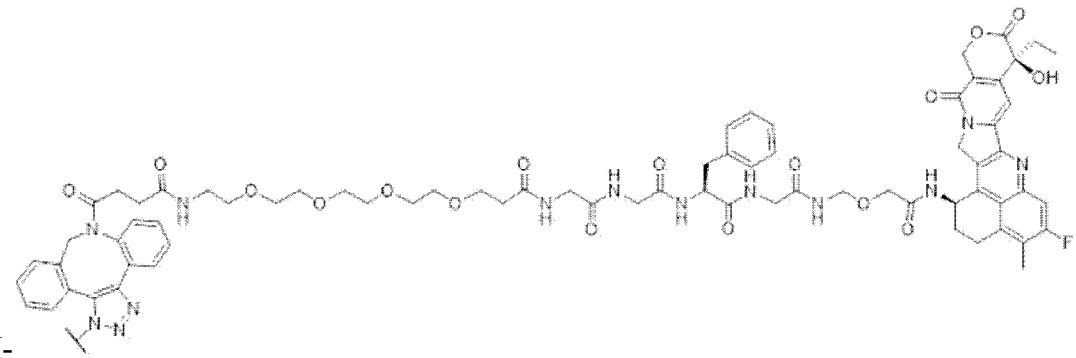
在某些实施方式中，所述药物选自下组：V-ATPase 抑制剂、Bcl2 抑制剂、MCL1 抑制剂、HSP90 抑制剂、IAP 抑制剂、mTor 抑制剂、微管稳定剂、微管去稳定剂、auristatin、dolastatin、美登木素生物碱、 MetAP（蛋氨酸氨基肽酶）、蛋白质 CRM1 的核输出抑制剂、DPPIV 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、线粒体中的磷酸转移反应抑制剂、蛋白质合成抑制剂、CDK2 抑制剂、CDK9 抑制剂、驱动蛋白抑制剂、HDAC 抑制剂、DNA 破坏剂、DNA 烷化剂、DNA 嵌入剂、DNA 小沟结合剂、DHFR 抑制剂、核苷类似物、HD AC 抑制剂、蒽环类、NAMPT 抑制剂、SN-38 葡糖醛酸、依托泊苷磷酸酯、氮芥末、蛋白体抑制剂、细胞因子和 Toll 样受体激动剂。

在某些实施方式中，所述药物选自下组：DM1、exatecan、DXd、MMAE、SN -38、Calicheamicin、Anthracyclin-5G、DM4、微管抑制剂 SHR153024、PNU-159682、Duo5 毒素、SN38 衍生物或他们的衍生物。

在某些实施方式中，所述的抗体药物偶联物具有选自下组的结构：

M-  和

M-  和

M-  。

在某些实施方式中，所述抗体药物偶联物的药物/抗体比率约 2-6。

另一方面，本申请提供一种制备本申请所述的抗体药物偶联物的化合物，其具有式 2 所示的结构：M-（L1）$_a$（式 2），其中 M 表示本申请所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段；L1 表示与 M 连接的连接子； a 选自 0-10。

在某些实施方式中，所述 L1 选自下组：可裂解的连接子、不可裂解的连接子、亲水的连接子、疏水的连接子、带电荷的连接子、不带电荷的连接子和基于二羧酸的连接子。

在某些实施方式中，所述 L1 与所述 M 通过所述 M 上的巯基、叠氮基或酰胺基连接。

在某些实施方式中，所述 M 包含第一重链和第二重链，所述第一重链和/或所述第二重链包含能够与所述 L1 连接的连接位点。

在某些实施方式中，所述连接位点包含去糖基化修饰后能够与所述 L1 连接的基团。

在某些实施方式中，所述基团位于所述第一重链的第 297 位氨基酸 Q 的侧基；和/或，位于所述第二重链的第 298 位氨基酸 Q 的侧基。

在某些实施方式中，所述基团包括酰胺基。

在某些实施方式中，所述连接位点包含经糖基化修饰后能够与所述 L1 连接的基团。

在某些实施方式中，所述基团位于所述第一重链的第 299 位氨基酸 N 的侧基；和/或，位于所述第二重链的第 300 位氨基酸 N 的侧基。

在某些实施方式中，所述基团包含-N_3。

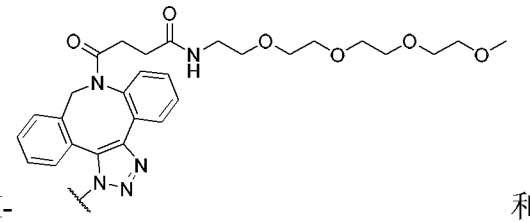
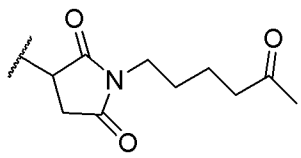
在某些实施方式中，所述经糖基化修饰包括：所述 M 已经与 UDP-GalNAz、β-1,4-半乳糖基转移酶或其变体接触。

在某些实施方式中，所述 L1 能够参与 SPAAC 反应。

在某些实施方式中，所述 L1 选自下组：马来酰亚胺、琥珀酰亚胺-3-基-N 和 DBCO。

在某些实施方式中，所述 L1 为 DBCO-（PEG）$_{n1}$，其中 n1 为 0-10 的整数，或者，所述 L1 为马来酰亚胺。

在某些实施方式中，所述化合物包括选自下组的结构：

M-  和 M-  。

另一方面，本申请提供了制备本申请所述的抗体药物偶联物的方法，其包括以下步骤：将本申请所述的化合物与本申请所述的药物接触。

另一方面，本申请提供了药物组合物，其包含本申请所述的抗体药物偶联物，或药学上可接受的载体。

另一方面，本申请提供了调节受试者的肿瘤微环境的方法，其包括以下步骤：向受试者施用本申请所述抗体药物偶联物、或者本申请所述的药物组合物。

另一方面，本申请提供了调节受试者的免疫反应的方法，其包括以下步骤：向受试者施用本申请所述的抗体药物偶联物、或者本申请所述的药物组合物。

另一方面，本申请提供了本申请所述的抗体药物偶联物、或者本申请所述的药物组合物制备药物中的应用，其中所述药物可以预防和/或治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限

制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下：

图 1 显示的是本申请所述靶向 HER2 的双特异性抗体进行糖基化修饰的反应。

图 2 显示的是糖基化修饰的本申请所述靶向 HER2 特异性的双特异性抗体的 HPLC 图谱。

图 3 显示的是获得本申请所述抗体药物偶联物的反应步骤。

图 4 显示的是本申请所述抗体药物偶联物的 HPLC 图谱。

图 5 显示的是获得本申请所述抗体药物偶联物的反应步骤。

图 6 显示的是本申请所述抗体药物偶联物的 Waters Xevo G2-QTOF 质谱分析结果。

图 7 显示的是本申请所述抗体药物偶联物的 Waters Xevo G2-QTOF 质谱分析结果。

图 8 显示的是 DS-8201 中的轻链部分的 Waters Xevo G2-QTOF 质谱分析结果。

图 9 显示的是 DS-8201 中的重链部分的 Waters Xevo G2-QTOF 质谱分析结果。

图 10 显示的是本申请所述靶向 HER2 的双特异性抗体与 FcγRIIIa 的结合亲和力情况。

图 11 显示的是本申请所述抗体药物偶联物与 FcγRIIIa 的结合亲和力情况。

图 12 显示的是本申请所述靶向 HER2 的双特异性抗体与 FcγRI 的结合亲和力情况。

图 13 显示的是本申请所述抗体药物偶联物与 FcγRI 的结合亲和力情况。

图 14 显示的是本申请所述抗体药物偶联物对肿瘤细胞的结合能力。

图 15 显示的是本申请所述抗体药物偶联物处理 3 天对肿瘤细胞的杀伤能力。

图 16 显示的是本申请所述抗体药物偶联物处理 5 天对肿瘤细胞的杀伤能力。

图 17 显示的是本申请所述抗体药物偶联物处理 3 天对肿瘤细胞的杀伤能力。

图 18 显示的是各个实验组对于 SK-BR-3 细胞的增殖抑制结果。

图 19 显示的是各个实验组对于 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制结果。

图 20 显示的是本申请所述抗体药物偶联物 ADCC 活性的分析结果。

图 21 显示的是利用 PBMC 体系测定本申请所述抗体药物偶联物 ADCC 活性的步骤。

图 22-23 显示的是利用 PBMC 体系测定本申请所述抗体药物偶联物 ADCC 活性的结果。

图 24-26 显示的是本申请所述抗体药物偶联物在肿瘤细胞中的内吞作用。

图 27 显示的是本申请所述抗体药物偶联物在肿瘤细胞中的内吞作用。

图 28 显示的是本申请所述抗体药物偶联物的药代动力学研究结果。

图 29 显示的是本申请所述抗体药物偶联物的诱导内吞后 NCI-N87 阳性细胞比例结果。

图 30 显示的是人源胃癌 PDX 肿瘤模型中各组小鼠肿瘤体积的生长曲线。

图 31 显示的是人源胃癌 HER2 IHC- PDX 肿瘤模型小鼠肿瘤体积的生长曲线。

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，本领域技术人员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

在本申请中，术语“抗体药物偶联物”通常是指 ADC，即与一个或多个化学药物连接的结合蛋白（例如抗体或其抗原结合片段）。所述化学药物可以为任意的治疗剂和/或细胞毒性及。所述抗体药物偶联物可以具有从 1-8 任何数目的与抗体偶联的药物，例如可以包括 2、4、6 或 8 的载药种类（drug loaded species）。在本申请中，所述药物可以包括有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、用于基因疗法的载体、烷化剂、抗血管生成剂、抗代谢物、含硼剂、化疗保护剂、激素、抗激素剂、皮质类固醇、光敏治疗剂、寡核苷酸、放射性核素剂、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和/或放射致敏剂。

在本申请中，术语“药物/抗体比率”或“DAR”通常是指与 ADC 的抗体连接的药物的数目。ADC 的 DAR 范围可以为 1-8，也可以为更高载量（例如 10），DAR 的范围可以取决于抗体上连接位点的数目。在本申请中，所述 DAR 可以为负载到单个抗体上的药物的数目。所述 DAR 也可以为一组 ADC 的平均或均值 DAR。

在本申请中，术语“HER2”通常是指人表皮生长因子受体 2（SwissProt P04626）。在本申请中，所述 HER2 也可以称为 rbB-2、NEU、HER-2 或 CD340。所述 HER2 可以包括 HER2 的任何变体、同工型、和物种同源物，其由细胞-包括肿瘤细胞-天然地表达，或由以 HER2 基因或 cDNA 转染的细胞表达。

在本申请中，术语“胞外结构域”通常是指人 HER2（SwissProt P04626）的胞外结构域，其可以包括 I、II、III 和 IV 四个胞外结构域。

在本申请中，术语“抗体”通常是指由两对相同的多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ、δ、γ、α 或 ε，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多

个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区（VH）和重链恒定区（CH）组成。重链恒定区由3个结构域（CH1、CH2和CH3）组成。各轻链由轻链可变区（VL）和轻链恒定区（CL）组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一组分（C1q）的结合。VH和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域（称为互补决定区（CDR）），其间散布有较保守的称为构架区（FR）的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区（VH 和 VL）分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest （National Institutes of Health, Bethesda, Md. （1987 and 1991）），或 Chothia & Lesk （1987） J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 （1989） Nature 342:878-883 的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG （例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型），IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

在本申请中，术语“抗原结合部分”是指全长抗体的一个或多个部分，所述部分保持结合抗体所结合的相同抗原（例如，HER2）的能力，与完整抗体竞争对抗原的特异性结合。通常参见，Fundamental Immunology, Ch. 7 （Paul, W., ed., 第 2 版，Raven Press, N.Y. （1989），其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗原结合部分。在一些情况下，抗原结合部分包括 Fab、Fab'、F（ab'）2、Fd、Fv、dAb 和互补决定区（CDR）片段、单链抗体（例如，scFv）、嵌合抗体、双抗体（diabody）和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。可使用本领域技术人员已知的常规技术（例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法）从给定的抗体（例如单克隆抗体 2E12）获得抗体的抗原结合部分（例如，上述抗体片段），并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合部分。

在本申请中，术语“Fd 片段”意指由 VH 和 CH1 结构域组成的抗体片段; 术语“Fv 片段”意指由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成的抗体片段；术语“dAb 片段”意指由 VH 结构域组成的抗体片段（Ward 等人, Nature 341:544 546 （1989））；术语“Fab 片段”意指由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的抗体片段；术语“F（ab'）2 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。

在本申请中，术语“抗体 Fc”通常是指基于抗体的木瓜蛋白酶裂解而定义的，人免疫球蛋白链恒定区。所述 Fc 可以是免疫球蛋白重链恒定区的羧基端或其中的一部分。例如，免疫球

蛋白 Fc 区可包括重链 CH2、CH3、CH4 的两个或更多结构域与免疫球蛋白铰链区的组合。根据重链恒定区的氨基酸序列，免疫球蛋白可以分为不同的种类，主要有 5 类免疫球蛋白：IgA，IgD，IgE，IgG 和 IgM，其中一些还可进一步分成亚类（同种型），如 IgG-l，IgG-2，IgG-3，IgG-4，IgA-l 和 IgA-2。从特定的免疫球蛋白类别和亚类中选择特定的免疫球蛋白 Fc 区在本领域技术人员所掌握的范围之内。例如，所述 Fc 可以包括至少一个免疫球蛋白绞链区，一个 CH2 结构域和一个 CH3 结构域，例如为人 IgG1 Fc。

在本申请中，术语“双特异性抗体”通常是指能够分别和两种抗原或抗原表位结合的抗体。所述双特异性抗体可以包括能够特异性结合第一抗原或抗原表位的抗体的轻链和重链，以及能够特异性结合第二抗原或抗原表位的抗体的轻链和重链。在本申请的一个实施方案中，所述双特异性抗体中能够特异性结合第一抗原或抗原表位的抗体的轻链和能够特异性结合第二抗原或抗原表位的抗体的轻链具有相同的序列。在本申请的一个实施方案中，所述双特异性抗体中能够特异性结合第一抗原或抗原表位的抗体的重链和能够特异性结合第二抗原或抗原表位的抗体的重链具有不同的序列。

在本申请中，术语“表位”或“抗原表位”通常是指，抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，表位通常以独特的空间构象包括至少 3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14 或 15 个连续或非连续的氨基酸，其可以是“线性的”或“构象的”。参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第 66 卷，G. E. Morris，Ed. （1996）。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子（例如抗体）之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

在本申请中，术语“特异性结合”通常是指相对于非特异的吸附的结合。作为结合是否特异的判定基准，例如，可举出解离常数（例如，“KD”）。例如，所述双特异性抗体或其抗原结合片段对 HER2 蛋白的 KD 值为 1×10^{-5}M 以下、5×10^{-6}M 以下、2×10^{-6}M 以下、或 1×10^{-6}M 以下；为 5×10^{-9}M 以下、2×10^{-9}M 以下、或 1×10^{-9}M 以下。所述结合可利用表面等离子共振（Surface Plasmon Resonance）法、ELISA 法、RIA 法等已知的方法测定。

本说明书中的“CDR”是指，互补性决定区（CDR：Complementarity deterring region）。已知抗体分子的重链及轻链中分别具有 3 个 CDR。CDR 也被称为高度可变区（hypervariable domain），其为在抗体的重链及轻链的可变区域内一级结构的变异性特别高的部位，在重链及

轻链的多肽链的一级结构上，分别地，分离在 3 处。本说明书中，关于抗体的 CDR，针对重链的 CDR，从重链氨基酸序列的氨基末端侧开始记载为 CDRH1、CDRH2、CDRH3，针对轻链的 CDR，从轻链氨基酸序列的氨基末端侧开始，记载为 CDRL1、CDRL2、CDRL3。这些部位在立体结构上相互接近，决定针对结合的抗原的特异性。

在本申请中，20 种常规氨基酸和其缩写遵从常规用法。参见 Immunology A Synthesis（第 2 版, E.S. Golub 和 D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. （1991）），其通过引用合并入本文。

在本申请中，术语“帕妥珠单抗”通常是指 Pertuzumab，也被称作 2C4，商品名 Perjeta。所述帕妥珠单抗的轻链和重链可变区的氨基酸序列可以参见 US20090285837A1 的图 2。所述帕妥珠单抗是重组人源化单克隆抗体，可以与表皮生长因子受体 2（HER2）的细胞外二聚化结构域（亚结构域 II）发生特异性结合。 所述帕妥珠单抗可以通过结合 HER2，阻滞了 HER2 与其它 HER 受体的异二聚化，从而可以减缓了肿瘤的生长。所述帕妥珠单抗可以用于治疗 HER2 阳性的转移性乳腺癌，可以用于治疗早期乳腺癌。

在本申请中，术语“曲妥珠单抗”通常是指 Trastuzumab，商品名赫赛汀® Herceptin®。所述曲妥珠单抗的轻链和重链的氨基酸序列可以参见 US20090285837A1 的图 16。所述曲妥珠单抗是一种重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体，其可以是由悬浮培养于无菌培养基中的哺乳动物细胞（中国仓鼠卵巢细胞 CHO）生产的。所述曲妥珠单抗可以特异性结合 HER2 的胞外结构域，也可以以刺激身体自身的免疫细胞去摧毁肿瘤细胞。所述曲妥珠单抗可以用于治疗 HER2 阳性的转移性乳腺癌、早期乳腺癌和 HER2 阳性的转移性胃腺癌或胃食管交界腺癌。

在本申请中，术语“Exatecan”通常是指依喜替康（DX-8951），其是一种 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂，CAS 号为 171335-80-1。DXd 是依喜替康（DX-8951）衍生物，CAS 号为 1599440-33-1。作为一种药物喜树碱类衍生物，依喜替康和 DXd 属于中等毒性类药物，此类药物应用于 ADC 中可降低因毒素脱落而带来的毒副作用。

在本申请中，术语“连接子”通常是指为双功能或多功能的且用于将本申请所述双特异性抗体或其抗原结合片段连接于本申请所述药物的化学部分。所述连接子可以包括一个偶联成分，或者可以包括多个偶联成分。

在本申请中，术语“肿瘤”通常是指哺乳动物中通常特征是不受调节的细胞生长的生理状况。所述肿瘤包括一个或多个癌性细胞。所述肿瘤可以包括实体瘤和/或非实体瘤。

在本申请中，术语“肿瘤微环境”通常是指肿瘤存在其中的环境，该环境是肿瘤内的非细胞区域和直接在肿瘤组织外侧但不属于癌细胞本身的细胞内区室的区域。肿瘤与肿瘤微环境

密切相关，并可以不断相互作用。例如，肿瘤可以改变所述肿瘤微环境，所述肿瘤微环境可以影响肿瘤的生长和扩散。通常，所述肿瘤微环境具有 5.8 至 7.0 范围内的低 pH。所述肿瘤微环境可以具有较低浓度的葡萄糖和其他营养物，但具有较高浓度的乳酸。此外，所述肿瘤微环境的温度可以比正常生理温度高 0.3 至 1℃。所述肿瘤微环境已经描述于 Gillies 等的“MRI of the Tumor Microenvironment”，Journal of Magnetic Resonance Imaging，第 16 卷，第 430-450 页，2002。

在本申请中，术语“治疗”通常是指治疗性处理及预防性或防范性措施二者，其中目标是预防或减缓（减轻）不想要的生理学变化或病症，诸如高增殖性状况诸如癌症的生长，形成或传播。为了本发明，有利或期望的临床结果包括但不限于：缓解症状，削弱疾病的程度，疾病状态稳定（即不恶化），延迟或减缓疾病发展，改善或减轻疾病状态，及康复（无论是部分的还是完全的），无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”或“处理”还可以指与不接受治疗的预期存活相比延长存活。需要治疗的受试者包括早就患有疾病或病症的受试者以及倾向于患上疾病或病症的受试者或者要预防状况或病症的受试者。

发明详述

一方面，本申请提供一种抗体药物偶联物，其包含靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述抗体药物偶联物，可以包含式 1 所示的结构：M-（L1）$_a$-（L2）$_b$-D（式 1），其中 M 表示本申请所述的靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段；L1 表示与 M 连接的连接子，L2 表示与 D 连接的连接子，a，b 各自独立地选自 0-10，D 表示药物。

靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合部分

在本申请中，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段可以特异性结合人 HER2 的至少一个表位。例如，可以特异性结合人 HER2 的 2 个不同的表位。在本申请中，所述至少两个表位可以位于人 HER2 蛋白中的同一个结构域，例如，也可以位于人 HER2 蛋白中的至少两个不同的结构域。

例如，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段可以特异性结合人 HER2 的胞外结构域 II 和/或人 HER2 的胞外结构域 IV。例如，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段可以特异性结合人 HER2 的胞外结构域 II 和人 HER2 的胞外结构域 IV。

在本申请中，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段可以包含第一轻链和第二轻链。

在本申请中，所述第一轻链可以包含第一 LCDR1-3，其中所述第一 LCDR1 可以包含 SEQ

ID NO. 4 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一 LCDR2 可以包含 SEQ ID NO. 5 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一 LCDR3 可以包含 SEQ ID NO. 6 所示的氨基酸序列。

例如，所述第一轻链中，所述第一 LCDR1 可以包含 SEQ ID NO. 4 所示的氨基酸序列；所述第一 LCDR2 可以包含 SEQ ID NO. 5 所示的氨基酸序列；且所述第一 LCDR3 可以包含 SEQ ID NO. 6 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一轻链能够与帕妥珠单抗的重链结合。

在本申请中，所述第二轻链可以包含第二 LCDR1-3，其中所述第二 LCDR1 包可以含 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二 LCDR2 可以包含 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二 LCDR3 可以包含 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列。

例如，所述第二轻链中，所述第二 LCDR1 包可以含 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列；所述第二 LCDR2 可以包含 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列；且所述第二 LCDR3 可以包含 SEQ ID NO. 3 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二轻链能够与曲妥珠单抗的重链结合。

在本申请中，所述第一轻链和/或所述第二轻链可以从两株原始单克隆抗体（例如，可以为已知单克隆抗体）改造获得。在本申请中，所述两株原始单克隆抗体可以靶向 HER2。例如，所述两株原始单克隆抗体可以特异性结合人 HER2 的至少一个表位。例如，所述两株原始单克隆抗体可以分别特异性结合人 HER2 的 2 个不同的表位。例如，所述两株原始单克隆抗体可以分别特异性结合人 HER2 的胞外结构域 II 和人 HER2 的胞外结构域 IV。例如，所述两株原始单克隆抗体可以为曲妥珠单抗和帕妥珠单抗。

例如，所述第一轻链和/或所述第二轻链可以与所述两株原始单克隆抗体中任意一株的轻链的氨基酸序列不同。又例如，所述第一轻链和/或所述第二轻链可以与所述两株原始单克隆抗体中任意一株的轻链的氨基酸序列相同，或者，所述第一轻链和/或所述第二轻链的氨基酸序列，可以是在所述两株原始单克隆抗体中任意一株的轻链的氨基酸序列的基础上经过改造获得的。例如，所述改造可以包括氨基酸序列改造。例如，所述改造的目的可以为尽可能保持与所述两株原始单克隆抗体所对应的抗原或抗原表位的亲和力。

在本申请中，所述改造可以包括氨基酸的突变、缺失或添加，例如突变、缺失或添加不超过 3 个氨基酸，不超过 2 个氨基酸，或者不超过 1 个氨基酸。

在本申请中，所述第一轻链的可变区的氨基酸序列可以与所述第二轻链的可变区的氨基酸序列相同。

在本申请中，所述第一轻链和所述第二轻链的可变区可以包含 SEQ ID NO. 7-12 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一轻链和所述第二轻链的可变区可以包含 SEQ ID NO. 7 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一轻链和所述第二轻链可以包括轻链恒定区。所述轻链恒定区可以为 κ 型或 λ 型。例如，所述 κ 型轻链恒定区包括各种同种异型，如 Km1、Km1,2、Km3；所述 λ 型轻链恒定区包括各种同种异型，如 CL1、CL2、CL3、CL6 和 CL7。

在本申请中，所述第一轻链和所述第二轻链可以包含 SEQ ID NO. 13-18 中任一项所述的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一轻链可以选自下组：帕妥珠单抗的轻链或其突变体和曲妥珠单抗的轻链或其突变体。在本申请中，所述第二轻链可以选自下组：帕妥珠单抗的轻链或其突变体和曲妥珠单抗的轻链或其突变体。

在本申请中，所述第一轻链可以为帕妥珠单抗的轻链或其突变体。

在本申请中，所述第二轻链可以为曲妥珠单抗的轻链或其突变体。

在本申请中，所述第一轻链和所述第二轻链的氨基酸序列可以相同。

在本申请中，所述第一轻链和所述第二轻链可以包含 SEQ ID NO.13 所述的氨基酸序列。

在本申请中，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段可以包含第一重链和第二重链，其中所述第一重链能够在生理条件或体外的蛋白表达状态下与所述第一轻链正确结合。

在本申请中，所述第二重链能够在生理条件或体外的蛋白表达状态下与所述第二轻链正确结合。

在本申请中，所述第一重链可以包含第一重链可变区，所述第一重链可变区可以为帕妥珠单抗的重链可变区。

在本申请中，所述第二重链可以包含第二重链可变区，所述第二重链可变区可以为曲妥珠单抗的重链可变区。

在本申请中，所述第一重链和所述第二重链可以包含重链恒定区，其中所述重链恒定区可以源自人 IgG 的恒定区。

在某些情况下，所述第一重链的重链恒定区，和/或所述第二重链的重链恒定区可以包含 Fc 区域。所述 Fc 区域可以经过改造，例如，所述改造可以提高所述第一重链和所述第二重链形成异二聚体的比例。

在本申请中，所述改造的技术可以是本领域技术人员所熟知的，例如可以参见参考

Ridgway, Presta et al. 1996; Carter 2001，专利 CN 102558355A，专利 CN 103388013A。

在本申请中，所述第一重链的重链恒定区和所述第二重链的重链恒定区的重链类型可以相同，也可以不同。例如，所述第一重链的重链恒定区和所述第二重链的重链恒定区可以与两株原始单克隆抗体的重链恒定区的氨基酸序列不同。又例如，所述第一重链的重链恒定区的氨基酸序列可以与其中一株所述原始单克隆抗体的重链恒定区的氨基酸序列相同；和/或，所述第二重链的重链恒定区的氨基酸序列可以与其中另一株所述原始单克隆抗体的重链恒定区的氨基酸序列相同。

在本申请中，所述第一重链和所述第二重链的 Fc 片段可以包含 SEQ ID NO.24-57 中任一项所述的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一重链可以包含 SEQ ID NO. 21-24 中任一项所示的氨基酸序列。例如，所述第一重链可以包含 SEQ ID NO. 21 或 23 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二重链可以包含 SEQ ID NO. 21-24 中任一项所示的氨基酸序列。例如，所述第二重链可以包含 SEQ ID NO. 22 或 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一重链可以包含 SEQ ID NO. 21 或 23 所示的氨基酸序列，且所述第二重链可以包含 SEQ ID NO. 22 或 24 所示的氨基酸序列。例如，在本申请中，所述第一重链可以包含 SEQ ID NO. 21 所示的氨基酸序列，且所述第二重链可以包含 SEQ ID NO. 22 所示的氨基酸序列。例如，在本申请中，所述第一重链可以包含 SEQ ID NO. 23 所示的氨基酸序列，且所述第二重链可以包含 SEQ ID NO. 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段可以根据本领域常规的技术手段获得。例如，可以从宿主细胞中纯化获得。所述纯化方法可以包括色谱技术如体积排阻、离子交换、亲和色谱法及超滤法。

药物偶联物及化合物

在本申请中，所述抗体药物偶联物可以包含式 1 所示的结构：M-（L1）$_a$-（L2）$_b$-D（式 1），其中 M 表示本申请所述的靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段；L1 表示与 M 连接的连接子，L2 表示与 D 连接的连接子，a，b 各自独立地选自 0-10，D 表示药物。

在本申请中，一种制备本申请所述的抗体药物偶联物的化合物，其具有式 2 所示的结构：M-（L1）$_a$（式 2），其中 M 表示本申请所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段；L1 表示与 M 连接的连接子；a 选自 0-10。

M 的修饰与 L1 的连接

在本申请中，所述 L1 与所述 M 可以通过所述 M 上的巯基、叠氮基或酰胺基连接。

在本申请中，所述 M 可以包含第一重链和第二重链，所述第一重链和/或所述第二重链可以包含能够与所述 L1 连接的连接位点。

在本申请中，所述连接位点可以包含去糖基化修饰后能够与所述 L1 连接的基团。

在本申请中，所述基团可以位于所述第一重链的第 297 位氨基酸 Q 的侧基；和/或，可以位于所述第二重链的第 298 位氨基酸 Q 的侧基。例如，所述基团可以包括酰胺基。例如，可以使用谷氨酰胺转移酶（TGs）将所述氨基酸 Q 作为所述连接位点，形成 DAR 等于约 2 的所述抗体药物偶联物。

在本申请中，所述连接位点可以包含经糖基化修饰后能够与所述 L1 连接的基团。

在本申请中，所述基团可以位于所述第一重链的第 299 位氨基酸 N 的侧基；和/或，可以位于所述第二重链的第 300 位氨基酸 N 的侧基。在重链的 CH2 域内，N299 或 N300 可以具有一个保守的糖基化位点。可以利用所述 N 处的糖基化位点进行定点偶联。

其中所述氨基酸的位置的编号可以自所述第一重链和/或所述第二重链的 N 端的氨基酸起始计算。

在本申请中，所述糖基化修饰位点上可以进行糖基化修饰。在本申请中，所述糖基化形式可以通过，例如，在具有改变的糖基化结构的细胞中表达蛋白质而完成。具有改变的糖基化结构的细胞已经在本领域中描述且可以用作在其中表达具有所述糖基化修饰的蛋白质（例如，本申请所述的靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段）。

蛋白质的糖基化可以取决于蛋白质（例如，本申请所述的靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段）的氨基酸序列以及蛋白质在其中表达的宿主细胞。不同生物体可以产生不同的糖基化酶（例如，糖基转移酶和糖苷酶），且具有不同的可用底物（核苷酸糖）。由于这些因素，蛋白质糖基化模式和糖基化修饰位点的残基的组成可能根据在其中表达特定蛋白质的宿主系统而不同。可用于本申请中的糖基残基可以包括葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、n-乙酰葡糖胺和/或唾液酸。例如，所述糖基化修饰可以包括适应于人的糖基化修饰的模式。

在本申请中，所述糖基化修饰可以使蛋白质（例如，本申请所述的靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段）的性质产生变化。

不同的蛋白质糖基化可以影响和/或导致不同的蛋白质特性（例如在表达量、体内半衰期、蛋白质折叠、溶解性、对蛋白酶的易感性、运输、转运、区室化、分泌、其它蛋白质或因子的识别、抗原性或变应原性等特性的变化）。

在本申请中，所述蛋白质糖基化的具体结构和制备方式可以根据不同的糖基化目的而进行调整，本领域技术人员可以根据本领域现有技术来进行调整。在某些情况下，所述糖基化修饰可以根据人和/或动物的物种特异性来进行调整。在某些情况下，所述糖基化修饰可以通

过借助糖基化酶（例如，来源于宿主细胞的异源糖基化酶）来得以实现。例如，所述糖基化修饰可以获得表现出人蛋白糖基化特征的蛋白质（例如，本申请所述的靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段）。所述糖基化酶可以是天然来源的，也可以是非天然来源的。

在本申请中，所述经糖基化修饰可以包括：所述 M 已经与 UDP-GalNAz、β-1,4-半乳糖基转移酶或其变体接触。例如，所述 β-1,4-半乳糖基转移酶或其变体（例如 β-1,4-Gal-T1-Y289）可以具有整合修饰的 N-乙酰半乳糖胺（GalNAc）的能力，可以与蛋白质（例如所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段）聚糖上的末端 N-乙酰氨基葡萄糖（GlcNAc）残基相连。

在本申请中，所述 M 与 UDP-GalNAz、β-1,4-半乳糖基转移酶或其变体接触后，所述 M 可以包含本申请所述的基团。例如，所述 M 的所述第一重链的 N299 位点上氨基酸 N 的侧基；和/或所述 M 的所述第二重链的 N300 位点上氨基酸 N 的侧基可以获得-N_3 基修饰，成为糖基化修饰的 M。

例如，在本申请所述的抗体药物偶联物和/或本申请所述的化合物中，通过所述基团，所述 M 的 Fc 区域可以与所述 L1 连接。例如，在本申请所述的抗体药物偶联物和/或本申请所述的化合物中，通过所述基团，所述 M 可以与所述 L1 连接。例如，所述糖基化修饰的 M 可以与所述 L1 进行加成反应。

连接子

在本申请中，所述 a 可以为选自 0-10 的整数，例如，可以为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在本申请中，所述 b 可以为选自 0-10 的整数，例如，可以为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在本申请中，所述 L1 和/或 L2 可以选自下组：可裂解的连接子、不可裂解的连接子、亲水的连接子、疏水的连接子、带电荷的连接子、不带电荷的连接子和基于二羧酸的连接子。

在本申请中，所述 L1 和所述 L2 都可以被认为属于连接子。

在本申请中，所述连接子可以为延伸药物连接以避免例如屏蔽抗体的活性位点或提高 ADC 的溶解性的部分。所述连接子可以包括延伸体（stretcher）单元和/或氨基酸单元。

在本申请中，所述连接子可以用于将抗体（例如，本申请所述的靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段）与所述药物进行偶联（例如，可以通过共价连接）。

例如，所述偶联可以通过抗体的半胱氨酸巯基或胺（例如 N-末端或氨基酸侧链如赖氨酸）与所述连接子的官能团形成键。

例如，所述连接子可以具有能够与所述抗体上存在的游离的半胱氨酸反应以形成键（例

如共价键）的官能团。例如，所述官能团可以包括：马来酰亚胺、卤代乙酰胺类、α-卤代乙酰基、活性酯如琥珀酰亚胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯、酸酐、酰基氯、磺酰氯、异氰酸酯和/或异硫氰酸酯。

在某些情况下，所述连接子可以包括能够与抗体上存在的亲电子基团反应的官能团。例如，所述官能团可以包括：醛、酮羰基、肼、肟、氨基、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯和/或芳基酰肼。

在本申请中，所述连接子可以包括可裂解的连接子和不可裂解的连接子。例如，所述连接子（例如 L2）可以为可裂解（例如，可以自切割的（self immolative））的连接子，其可以利于所述药物的释放。例如，所述连接子（例如 L1）可以为不可裂解的连接子，其可以与所述抗体连接且是不可切割的。在本申请中，所述可裂解的连接子可以在细胞内的条件下发生裂解。例如，所述可裂解的连接子可以包括：酸不稳定的连接子（例如，包含腙）蛋白酶敏感的连接子（例如，对肽酶敏感）、光不稳定的连接子和/或包含二硫化物的连接子。例如，所述可裂解的连接子可以包括能够被细胞内蛋白酶（例如溶酶体蛋白酶）和/或胞内体蛋白酶切割的肽连接子。在某些情况下，所述连接子在细胞内环境下是可裂解的。例如，所述连接子的裂解可以使得所述抗体药物偶联物中的药物发挥有效的治疗作用。

在本申请中，所述连接子的结构和/或性质在细胞外是稳定的。本申请所述的抗体药物偶联物在被转运或递送进入细胞之前，其结构可以是稳定的。例如，所述抗体药物偶联物中，所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段和所述药物保持偶联的状态。

在某些情况下，如果所述抗体药物偶联物中的所述连接子能够例如，保持所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段的特异性结合性质；参与所述抗体药物偶联物的递送，和/或，保持所述药物的治疗效果（例如，细胞毒性效应）。

在本申请中，所述连接子可以包括亲水的连接子（例如，可以为 PEG4Mal 和磺基-SPDB）和疏水的连接子。例如，所述亲水的连接子可以降低所述抗体药物偶联物可通过 MDR（多药耐药性）或功能上类似的转运蛋白泵送到抗性癌细胞外的程度。

在本申请中，所述连接子也可以发挥直接或间接地抑制细胞生长和/或细胞增殖的功能。例如，所述连接子可以在所述裂解中发挥嵌入剂的功能。例如，所述连接子可以发挥间接的作用以抑制大分子生物合成。

在本申请中，所述连接子可以促进所述抗体药物偶联物进入细胞（例如可以促进“内化”作用）。在本申请中，所述连接子还可以被设计以提高所述抗体药物偶联物的稳定性。

在本申请中，所述 L1 能够参与 SPAAC 反应。所述 SPAAC 反应为叠氮-炔基环加成反应。SPAAC 反应可以作为加成反应中的一种，应用于所述抗体药物偶联物的制备过程中。

在本申请中，所述 L1 可以选自下组：马来酰亚胺、琥珀酰亚胺-3-基-N 和 DBCO。

在本申请中，所述 L1 可以为 DBCO-（PEG）$_{n1}$，其中 $_{n1}$ 为 0-10 的整数，或者，所述 L1 为马来酰亚胺。例如，所述 L1 可以为 DBCO-（PEG）$_4$、DBCO-（PEG）$_3$。在本申请中，所述 PEG 分子可以用来增加所述抗体药物偶联物的亲水性。所述 PEG 分子可以用来满足 L2（例如 GGFG）裂解（例如酶切时）对空间距离的要求。

在本申请中，所述可以 L2 选自下组：多肽、VC-PAB、N-琥珀酰亚胺基-3-（2-吡啶基二硫代）丙酸酯（SPDP）、N-琥珀酰亚胺基 4-（2-吡啶基二硫代）戊酸酯（SPP）、N-琥珀酰亚胺基 4-（2-吡啶基二硫代）丁酸酯（SPDB）、 N-琥珀酰亚胺基-4-（2-吡啶基二硫基）-2-磺基丁酸酯（sulfo-SPDB）、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯（SIA）、N-琥珀酰亚胺基（4-碘乙酰基）氨基苯甲酸酯（SIAB）、马来酰亚胺 PEG NHS、N- 4-（马来酰亚胺基甲基）环己基羧酸琥珀酰胺基酯（SMCC）、N-磺基（4-亚马来酰亚胺甲基）环己基羧酸磺基琥珀酯（磺基-SMCC）和 2,5-二氧吡咯烷基-1-基 17-（2,5-二氧代-2,5-二氢- 1H-吡咯-1-基）-5,8,11,14-四氧-4,7,10,13-四氮杂十八烷-1-酸酯（CX1-1）。

在本申请中，所述 L2 可以为 GGFG、LP、 VK、 VC、GFG、GGFGG、GGFGS、GGFGGG、GGFGGE、 GGFGGGFG、DGGF、DGGFG、D^d GGFG、DG^{Me} GFG、DGGFS、DDGGFG、KDGGFG、 KGGFG、EGGFG 或者 SGGFG。例如，所述 L2 可以为 GGFG。组织蛋白酶 B 可裂解的四肽 Gly-Gly-Phe-Gly（GGFG）是一种亲水性强（例如强于 Gly-Phe-Leu-Gly）的连接子。

药物

在本申请中，所述药物可以具有杀伤肿瘤细胞，和/或抑制肿瘤细胞生长的能力。

在本申请中，所述药物可以包括小分子药物。

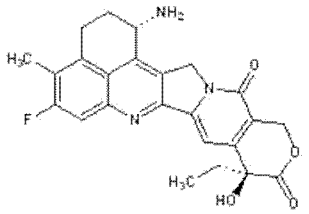
在本申请中，所述药物可以选自下组：V-ATPase 抑制剂、Bcl2 抑制剂、MCL1 抑制剂、HSP90 抑制剂、IAP 抑制剂、mTor 抑制剂、微管稳定剂、微管去稳定剂、auristatin、dolastatin、美登木素生物碱、 MetAP（蛋氨酸氨基肽酶）、蛋白质 CRM1 的核输出抑制剂、DPPIV 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、线粒体中的磷酸转移反应抑制剂、蛋白质合成抑制剂、CDK2 抑制剂、CDK9 抑制剂、驱动蛋白抑制剂、HDAC 抑制剂、DNA 破坏剂、DNA 烷化剂、DNA 嵌入剂、DNA 小沟结合剂、DHFR 抑制剂、核苷类似物、HD AC 抑制剂、蒽环类、NAMPT 抑制剂、SN-38 葡糖醛酸、依托泊苷磷酸酯、氮芥末、蛋白体抑制剂、细胞因子和 Toll 样受体激动剂。

在本申请中，所述药物可以选自下组：DM1、exatecan、DXd、MMAE、SN -38、Calicheamicin、Anthracyclin-5G、DM4、微管抑制剂 SHR153024、PNU-159682、Duo5 毒素、SN38 衍生物或他们的衍生物。

在本申请中，所述药物可以为喜树碱或其衍生物。在本申请中，所述药物可以为 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂。

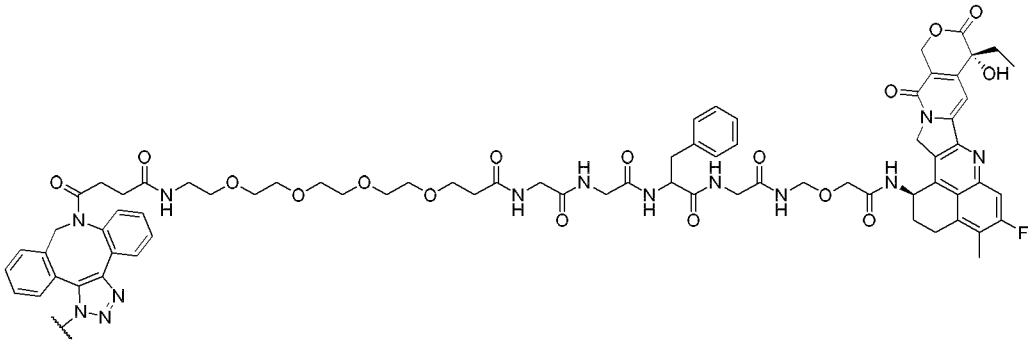
在本申请中，所述药物可以为依喜替康 Exatecan（DX-8951）、DXd、杜卡霉素、丝裂霉素 C、塔利霉素、美登素、TLR7 激动剂、TLR8 激动剂、TLR7/8 激动剂或 TLR9 激动剂。

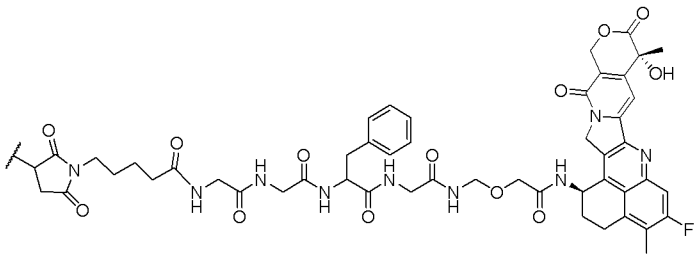
例如，所述药物可以具有以下的结构：

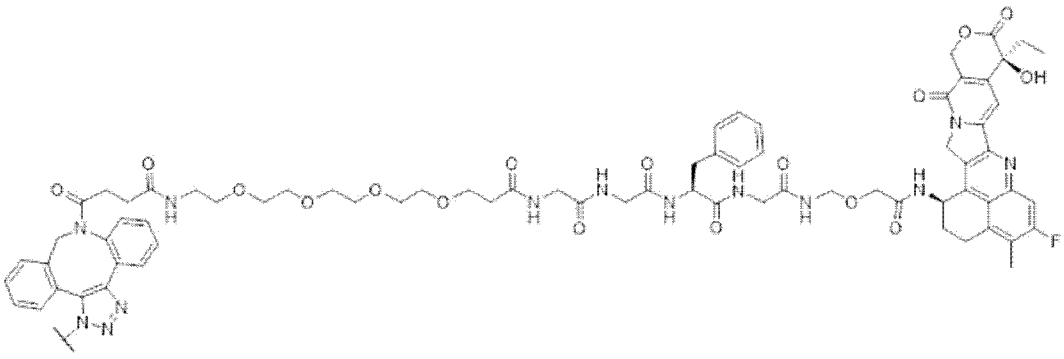


。

在本申请中，所述的抗体药物偶联物可以具有选自下组的结构：

M-  和

M-  和

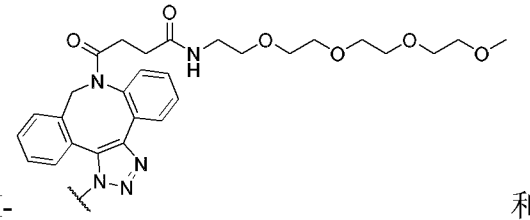
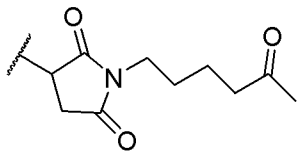
M-  。

在本申请中，所述抗体药物偶联物的药物/抗体比率可以为约 2-6。例如，所述药物/抗体比率可以为约 1、约 2、约 3、约 4、约 5 或约 6。例如，所述药物/抗体比率可以为 4。例如，所述药物/抗体比率可以为 3。

化合物和制备方法

另一方面，本申请提供了一种用以本申请所述的抗体药物偶联物的化合物，其具有式 2 所示的结构：M-（L1）$_a$（式 2），其中 M 本申请所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段；L1 表示与 M 连接的连接子； a 选自 0-10。

在本申请中，所述化合物可以包括选自下组的结构：

M-  和 M-  。

另一方面，本申请提供了制备本申请所述的抗体药物偶联物的方法，其包括以下步骤：将本申请所述的化合物与本申请所述的药物接触。

在某些情况下，所述的抗体药物偶联物的制备方法可以包括以下的步骤：（1）将本申请所述的 L1、所述的 L2 和所述的药物的接触；（2）获得化合物（L1）$_a$-（L2）$_b$-D；（3）将本申请所述的 M 与所述化合物（L1）$_a$-（L2）$_b$-D 接触，得到本申请所述的抗体药物偶联物。例如，步骤（3）中的 M 进行了所述糖基化修饰。

药物组合物和应用

另一方面，本申请提供了药物组合物，其包含本申请所述的抗体药物偶联物，或药学上可接受的载体。

在本申请中，所述药物组合物可以包括“治疗有效剂量”或“预防有效剂量”的本申请所述的抗体药物偶联物。所述“治疗有效剂量”可以为在必要的剂量和持续时间下有效地实现所需治疗结果的量。所述治疗有效剂量可以由本领域技术人员确定，例如，可以根据疾病的状态、受试者的年龄、性别、体重、所述抗体药物偶联物在受试者体内引起说所需反应的能力等因素变化。所述“预防有效剂量”可以为在必要的剂量和持续时间下，有效地实现所需预防结果的量。例如，所述预防有效剂量可以低于所述治疗有效剂量。

在本申请中，所述药物组合物可以被配置为适用于施用的形式（例如，适用于肠胃外、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内和皮下、肿瘤内和/或粘膜施用）。在本申请中，所述药物组合物可以包括其他的药物活性成分。

在本申请中，所述药学上可接受的载体可以包括生理上相容的任何或所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。所述药学上可接受的载体可以包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等等以及其组合中的一种或多种。所述

药学上可接受的载体还可以包括等渗即、润湿剂、乳化剂、防腐剂和/或缓冲剂。

另一方面，本申请提供了调节受试者的肿瘤微环境的方法，其包括以下步骤：向受试者施用本申请所述抗体药物偶联物、或者本申请所述的药物组合物。

另一方面，本申请提供了调节受试者的免疫反应的方法，其包括以下步骤：向受试者施用本申请所述的抗体药物偶联物、或者本申请所述的药物组合物。

本申请提供了本申请所述的抗体药物偶联物、或者本申请所述的药物组合物制备药物中的应用，其中所述药物可以调节受试者的肿瘤微环境和/或调节受试者的免疫反应。

本申请提供了所述的抗体药物偶联物、或者本申请所述的药物组合物，其用于调节受试者的肿瘤微环境和/或调节受试者的免疫反应。

另一方面，本申请提供了本申请所述的抗体药物偶联物、或者本申请所述的药物组合物制备药物中的应用，其中所述药物可以预防和/或治疗肿瘤。

本申请提供了一种预防和/或治疗肿瘤的方法，其包括以下步骤：向受试者施用本申请所述的抗体药物偶联物或者本申请所述的药物组合物制备药物。

本申请提供了所述的抗体药物偶联物、或者本申请所述的药物组合物，其用于预防和/或治疗肿瘤。

在本申请中，所述肿瘤可以包括实体瘤和/或非实体瘤。

例如，所述肿瘤可以包括胃癌、乳腺癌（例如乳腺导管癌）和/或胰腺癌。例如，本申请的肿瘤可以包含 HER2 弱阳性肿瘤和/或 HER2 阴性肿瘤，例如本申请的技术方案可以具有旁观者杀伤效应。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅是为了阐释本申请发明的各个技术方案，而不用于限制本申请发明的范围。

实施例

靶向 HER2 的双特异性抗体（以下简称抗体 A），其中抗体 A 包含一个第一轻链，一个第二轻链，一个第一重链和一个第二重链，其中所述第一轻链和所述第二轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO.13 所示，其中所述第一重链的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 19 所示；所述第二重链的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 20 所示。其中所述第一重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO.21 所示；所述第二重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 22 所示。

根据抗体 A 的氨基酸序列，人工合成并分离纯化抗体 A。

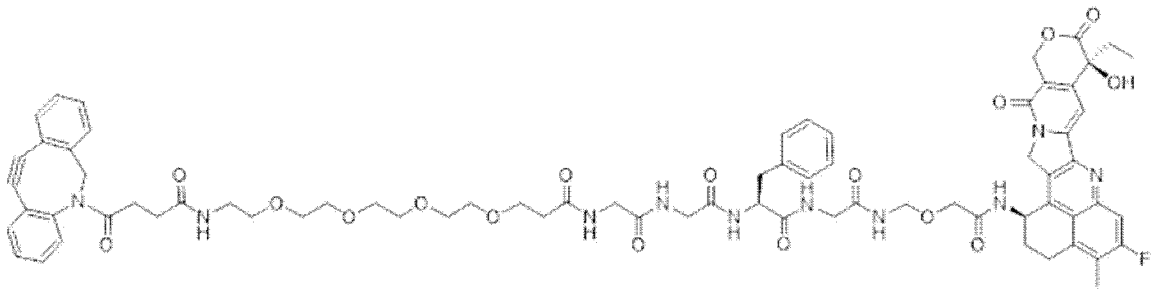
DS-8201（又称：T-DXd，商品名 ENHERTU）由第一三共、阿斯利康制备。DS-8201 由抗 HER2 的 IgG1 单抗通过连接体与拓扑异构酶 I 抑制剂 DXd 偶联而成。

U3-1402 由第一三共制备。U3-1402 由 HER3 抗体 Patritumab 与拓扑异构酶抑制剂 DXd 通过共价键偶联而成。

实施例 1 制备抗体 A-ADC1 分子

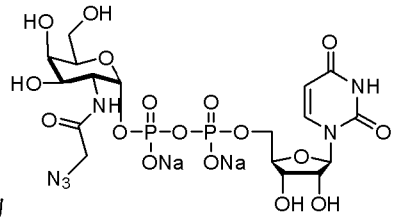
（1）制备包含连接子和毒素的化合物

获得 DXd（即 exatecan DX-8951 衍生物，购自联宁生物），并包含连接子和毒素的化合物 1：DBCO-PEG4-GGFG-DXd，其具有以下的结构式：



（2）制备糖基化的抗体 A

将抗体 A 与 β-1,4-半乳糖基转移酶（β-1,4-al-T1）（购自上海保森生物）在存在 UDP-GalNAz



的情况下接触。其中 UDP-GalNAz 的结构式为 。

经接触后，抗体 A 上第一重链的 N299 和第二重链的 N300 位点上获得了-N_3 基修饰，成为糖基化修饰的抗体 A。抗体 A 糖基化修饰的反应如图 1 所示。

对所得的糖基化修饰的抗体 A 进行 HPLC 检测，检测结果如图 2 所示，图 2 的结果说明，糖基化修饰的抗体 A 具有其独特的特征峰，且分子量为 148796 Da。

（3）制备抗体 A-ADC1 分子

将步骤（1）中的 DBCO-PEG4-GGFG-DXd 与步骤（2）制得的糖基化修饰的抗体 A 在 25-35℃条件下接触并反应 10-15 个小时，其中 DBCO 与糖基化修饰的抗体 A 中的-N_3 基发生 SPAAC 反应，获得抗体 A-ADC1 分子。

获得抗体 A-ADC1 分子的反应如图 3 所示。对抗体 A-ADC1 进行 HPLC 检测，检测结果如图 4 所示，图 4 的结果说明，抗体 A-ADC1 分子具有其独特的特征峰，且分子量为 154299。

（4）制备 Herceptin-ADC1 分子

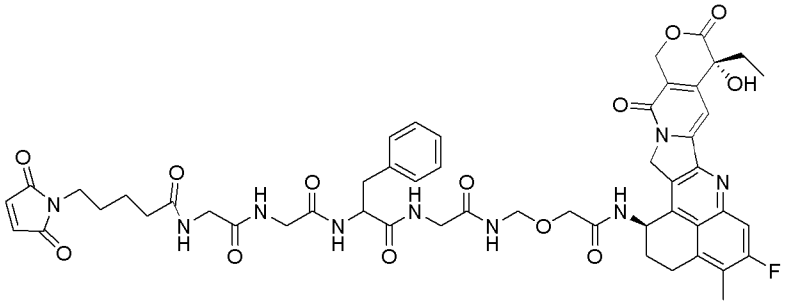
将 Herceptin 按照实施例 1 记载的方法进行糖基化修饰，并与 DBCO-PEG4-GGFG-DXd

反应，获得 Herceptin-ADC1 分子，其中其 DAR 为 8。

实施例 2 制备抗体 A-ADC2 分子

（1）制备包含连接子和毒素的化合物

将马来酰亚胺与 GGFG-DXd 反应，获得包含连接子和毒素的化合物 2，其结构式为：



（2）制备修饰的抗体 A

将抗体 A 与 TECP 反应，使得抗体 A 存在巯基（例如 8 个-SH），获得修饰的抗体 A。

（3）制备抗体 A-ADC2 分子

将步骤（2）制得的修饰的抗体 A 与步骤（1）制得的包含连接子和毒素的化合物 2 接触，获得抗体 A-ADC2 分子。

获得抗体 A-ADC2 分子的反应如图 5 所示。

实施例 3 包含抗体 A 的 ADC 分子的稳定性分析

分别考察实施例 1 制备的抗体 A-ADC1、实施例 2 制备的抗体 A-ADC2、以及 DS-8201 在人血清中的稳定性。

（1）抗体 A-ADC1 在血清中的稳定性

利用 Protein L 把加入血清里的抗体 A-ADC1 纯化出来，发现 3 天、7 天后没有明显硫醇交换发生。

具体实验步骤：分别取处理后的人血清 100 μL 加入到 1.5 mL 的离心管中，然后加入抗体 A-ADC1, 使抗体 A-ADC1 的终浓度为 0.1 mg/mL，放在 37℃培养箱分别孵育 3、7 天。

取 20 μL 的 Protein L 磁珠悬浮液加入到 1.5mL 离心管中，放在磁力架上分离除去保存液。加入 200 μL 的 DPBS 混匀磁珠，放在磁力架上分离除去上清液（该步骤重复 2 次）。

将孵育 3 天或 7 天的抗体 A-ADC1 加入到装有磁转的 1.5ml 离心管中，混匀，室温下置于混匀仪中 1 h，然后放在磁力架上除去上清液。接着加入 200 μL 的 DPBS，混匀，放在磁力架上分离除去上清液（该步骤重复 3 次）。最后加入 20 μL 的洗脱液（100 mM Glycine, PH = 2. 8），放在磁力架上室温混匀，收集上清液，然后向收集的上清液中加入 20 μL 中和缓冲液

（200 mM tris, PH = 8.0）），测其浓度，通过 Waters Xevo G2-QTOF 质谱分析纯化后的抗体 A-ADC1。

结果如图 6 所示。图 6 的结果说明，在人血清中孵育 0 天、3 天、7 天后的抗体 A-ADC1 的分子量（154299 左右）基本没有变化，在血清中 3 天、7 天后 DAR 值仍然保持在 4，偶联药物分子在血清中孵育 3 天、7 天后没有明显硫醇交换发生，说明抗体 A-ADC1 在血清中的稳定性良好，不易发生在体内运送过程中将毒素释放到血液中的情况，更利于将偶联的小分子毒素药物运送到肿瘤靶点，可降低毒素分子因脱靶而对正常机体组织产生毒副作用风险。

（2）抗体 A-ADC2 在血清中的稳定性

按照步骤（1）涉及的方法，检测抗体 A-ADC2 在血清中的稳定性。

Waters Xevo G2-QTOF 质谱分析的结果如图 7 所示。图 7 的结果说明，当抗体 A-ADC2 在人血清中分别孵育 0 天，3 天、7 天。孵育 3 天后，轻链上的马来酰亚胺因发生开环水解，所以能在人血清中稳定存在；而重链孵育 3 天后 DAR 值由 6 减少到 2 左右，孵育 7 天后重链的 DAR 值几乎为 0，说明 7 天后抗体 A-ADC2 的重链会在血清中发生消除。

（3）DS-8201 在血清中的稳定性

按照步骤（1）涉及的方法，检测 DS-8201 在血清中的稳定性。

Waters Xevo G2-QTOF 质谱分析 DS-8201 重链和轻链在血清中孵育的结果分别如图 8 和图 9 所示。图 8 和图 9 的结果说明，当 DS-8201 在人血清中分别孵育 0 天、3 天、7 天。孵育 3 天后轻链上的马来酰亚胺因发生开环水解，所以能在人血清中稳定存在；而 7 天后重链的 DAR 值由 6 减少到 2 左右，DS-8201 的重链在血清中发生了明显的消除，重链上的小分子毒素脱靶严重。

实施例 3 包含抗体 A 的 ADC 分子与 FcγR 的结合亲和力测试

采用生物膜干涉法（BLI）（丹纳赫公司的 Fortebio 大分子相互作用仪）分别测定抗体 A、实施例 1 制备的抗体 A-ADC1 与 FcγRI、FcγRIIIa 等的亲和力。

亲和力测试的具体步骤：

固定抗体 A-WS-161018（母分子抗体 A）或者抗体 A-ADC1 到 FAB2G biosensor，固化浓度为 10μg/ml，固化高度 2nm。

将 FcγRIIIa 稀释至 1000nM、500nM、250nM、125nM、62.5nM，基线 60s，结合 30s，解离 150s。稀释液为动力学缓冲液，再生液为甘氨酸-HCl（pH1.7），中和液为稀释液。拟合时解离时间按 10s 拟合，实验结果如图 10-图 11 和表 1 所示。图 10 和图 11 分别显示了抗体 A 和抗体 A-ADC1 与 FcγRIIIa 的结合亲和力情况。

表 1

样品	KD（M）	Kon（1/Ms）	Kdis（1/s）
抗体 A	1.65E-07	5.60E+05	9.21E-02
抗体 A-ADC1	1.50E-07	5.76E+05	8.61E-02

固定抗体 A-WS-161018（母分子抗体 A）或者抗体 A-ADC1 到 FAB2G biosensor，固化浓度为 10μg/ml，固化高度 2nm。

将 FcγRI 稀释至 200 nM、100nM、250nM、50 nM、25nM，基线 60s，结合 30s，解离 150s。稀释液为 0.02%PBST20，再生液为甘氨酸-HCl（pH1.7），中和液为稀释液。拟合时解离时间按 10s 拟合，实验结果如图 12-图 13 和表 2 所示。图 12 和图 13 分别显示了抗体 A 和抗体 A-ADC1 与 FcγRI 的结合亲和力情况。

表 2

样品	KD（M）	Kon（1/Ms）	Kdis（1/s）
抗体 A	2.89E-10	8.54E+05	2.47E-04
抗体 A-ADC1	6.05E-10	9.23E+05	5.58E-04

以上的结果说明，抗体 A-ADC1 与 FcγRIIIa 亲和力与母分子抗体 A 一致；抗体 A-ADC1 与 FcγRI 具有较强的结合亲和力，其 KD 值达到了 6.05×10^{-10}M，与母分子抗体 A 的亲和力类似。

FcγR 结合实验说明，抗体 A-ADC1 涉及的定点偶联不影响 ADC 中抗体部分的 Fc 功能，抗体 A-ADC1 仍然保留了母分子抗体 A 的 Fc 功能，抗体 A-ADC1 中的抗体部分可与毒素协同作用共同杀伤肿瘤细胞。

实施例 4 包含抗体 A 的 ADC 分子对肿瘤细胞的结合能力

分别考察实施例 1 制备的抗体 A-ADC1、实施例 2 制备的抗体 A-ADC2 以及抗体 A 对 NCI-N87 细胞的结合活性。

具体试验步骤：

（1）1% BSA/PBS 配置药物，配制最高浓度 120μg/ml（工作浓度 60μg/ml），向下 3 倍稀释，共 10 个浓度；

（2）收集 NCI-N87 细胞（购自上海中科院），离心，计数，5% BSA/PBS 封闭 15min，1.5mL 离心管每管 2×10^5 个细胞/50μL，每管加入 50μL 抗体药物，4℃放置 1 小时；

（3）2000rpm/5min，离心洗涤 2 次，每次洗涤加入 1000μL 1%BSA/PBS，最后一次吸干，

每孔加入 90μL 1%BSA/PBS 稀释的 APC-IgG（1:100 稀释），4℃放置 30min，避光。

（4）2000rpm/5min，离心洗涤 2 次，每次洗涤加入 1000μL 1%BSA/PBS，最后一次吸干；最后每管加入 300μL 1%BSA/PBS，避光，进行 FACS 检测。

结果如图 14 和表 3 所示。

表 3

	抗体 A	抗体 A-ADC1	抗体 A-ADC2
谷值	675.3	485.8	660.8
峰值	40787	36596	30780
EC50	1.103	1.154	0.9369

图 14 和表 3 的结果显示，高浓度抗体 A 的结合活性最高, 抗体 A-ADC1 略低于抗体 A，二者平均荧光强度（MFI）分别达到峰值后趋于稳定；而抗体 A-ADC2 活性较低。说明抗体 A-ADC1 及其母分子抗体 A 与 NCI-N87 细胞的结合更稳定。

从 EC50 值同样可以看出，在与 HER2 高表达的 NCI-N87 细胞结合性方面，抗体 A-ADC1 与母分子抗体 A 的 EC50 一致，都为 1.1μg/ml 左右，说明抗体 A-ADC1 与母分子抗体 A 与 HER2 高表达的 NCI-N87 细胞的结合活性一致；抗体 A-ADC1 的峰值大于抗体 A-ADC2，说明抗体 A-ADC1 与 HER2 高表达的 NCI-N87 细胞结合活性稍强于抗体 A-ADC2。

实施例 5 包含抗体 A 的 ADC 分子对肿瘤细胞的杀伤能力

分别考察实施例 1 制备的抗体 A-ADC1、实施例 2 制备的抗体 A-ADC2、抗体 A 以及 DS-8201 对 NCI-N87 细胞和 BT474 细胞的杀伤能力。

具体试验步骤：

（a）针对 5 天处理时间的 NCI-N87 细胞

（1）配制生长培养基：RPMI-1640+10%FBS+1%P/S，胰酶消化 NCI-N87 细胞，按 10000 个细胞/孔/150μL 接种 96 孔板，37℃培养过夜；

（2）实验培养基配制：RPMI-1640+0.1 %FBS +1%P/S，将抗体 A、抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2 和 DS-8201 分别配制成 15μg/mL 的最高工作浓度，3 倍稀释，共 9 个浓度点；

（3）每孔 150μL 各浓度药物稀释液，设置阴性对照孔，37℃培养 72±3 小时或者；

（4）每孔吸取 70μL 上清，弃去。补入 70μL 新配置的 15μg/mL 抗体 A、抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2 或 DS-8201，37℃继续培养 48±2 小时；

（5）96 孔板每孔加入 15μL CCK-8，轻拍板子摇匀，37℃放置 2 小时左右；

（6）以 650nm 为参比波长，在 450nm 下读取吸光值。

（b）针对 3 天处理时间 NCI-N87、BT474 细胞

（1）配制生长培养基：RPMI-1640+10%FBS+1%P/S，胰酶消化 NCI-N87 细胞或 BT474 细胞，按 10000 个细胞/孔/150μL 接种 96 孔板，37℃培养过夜；

（2）实验培养基配制：RPMI-1640+0.1 %FBS +1%P/S，将抗体 A、抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2 和 DS-8201 分别配制成 30μg/mL 的最高工作浓度，8 倍稀释，共 5 个浓度点；

（3）每孔 150μL 各浓度药物稀释液，设置阴性对照孔，37℃培养 72±3 小时或者；

（4）96 孔板每孔加入 15μL CCK-8，轻拍板子摇匀，37℃放置 2 小时左右；

（6）以 650nm 为参比波长，在 450nm 下读取吸光值。

试验结果：

（1）NCI-N87 肿瘤细胞杀伤试验

对 NCI-N87 细胞处理 3 天、处理 5 天的试验结果分别如图 15、图 16 所示。

图 15-图 16 的结果显示，按照上述方法步骤，分别处理 NCI-N87 细胞 3 天，抗体 A-ADC1 对 NCI-N87 的抑制率达到 80%以上，抗体 A 仅次之，DS8201（Herceptin-ADC1）最低仅达 60%。处理 NCI-N87 细胞 5 天，抗体 A-ADC1 的抑制率仍然保持最高，略高于其母分子以及 DS-8201（Herceptin-ADC1）。由此可见抗体 A-ADC1 对 NCI-N87 细胞的杀伤效果显著高于 DS-8201（Herceptin-ADC1）。

（2）BT474 肿瘤细胞杀伤试验

对 BT474 细胞处理 3 天的试验结果分别如图 17 所示。

图 17 的结果显示，按照上述方法步骤，分别处理 BT474 细胞 3 天，抗体 A-ADC1 对 BT474 细胞的抑制率达到了 55%，抗体 A-ADC2 达 36%，而 DS-8201 则仅为 23%，抗体 A-ADC1 对 BT474 细胞的抑制率远优于抗体 A-ADC2、DS-8201，杀伤力是 DS-8201 的 2.4 倍。

对 NCI-N87、BT474 肿瘤细胞杀伤试验说明，抗体 A-ADC1 和抗体 A-ADC2 对 HER2 高表达阳性肿瘤细胞（NCI-N87、BT474）细胞均有较好的杀伤能力；并且抗体 A-ADC1 和抗体 A-ADC2 对 HER2 高表达阳性肿瘤细胞（NCI-N87、BT474 细胞）的杀伤能力优于 DS-8201。

实施例 6 包含抗体 A 的 ADC 分子对 HER2 阴性细胞的旁观者杀伤效应效果

ADC 药物通常先与细胞膜上的抗原相结合，然后抗体抗原复合物通过细胞内吞作用进入细胞内，并形成内含体，随后内含体进一步成熟并融合成溶酶体，在溶酶体内，细胞毒药物被释放（通过与之相对应的特异性蛋白酶分解连接子，如组织蛋白酶 B（cathepsin B），或者

整个 ADC 药物在溶酶体被分解），产生的细胞毒药物穿透溶酶体膜，绑定至 DNA 或者微管导致细胞凋亡。这些药物也可以通过细胞膜上的蛋白转运泵出至肿瘤微环境，进入到相邻的肿瘤细胞上，对其产生杀伤作用，这可以导致“旁观者效应”（Bystander Effect）。

抗体 A-ADC1 一种靶向 HER2 的双表位抗体的糖定点偶联药物，使用可裂解 linker，为了考察抗体 A-ADC1 的旁观者效应，我们分别用抗体 A-ADC1、DS-8201 处理 SK-B-R-3(HER2 高表达)单细胞体系、MDA-MB-468(HER2 不表达)单细胞体系、SK-BR-3 与 MDA-MB-468（1:1）混合细胞体系，处理 3 天后，对所有样本孔细胞进行计数，并且用 APC anti-CD340 Antibody 荧光抗体对混合细胞体系染色，经流式仪检测。

实验方法

T75 培养瓶中对数生长期的 SK-BR-3，MDA-MB-468 细胞，弃去培养基，PBS 洗涤两次后吸干液体；加入胰酶 2ml 进行消化，37℃培养箱放置 4 分钟;转移细胞消化液至 15ml 离心管中，加入 8ml 生长培养基终止消化并吹打细胞至单细胞悬液，1000rpm 离心 5min;弃去上清液，加入 3ml 培养基(RPMI-1640+1%FBS)重悬细胞，吸取 20μl 细胞悬液和 20μl 0.2%台盼蓝混合。

计数：单个细胞铺板（mono-culture）：用培养基(RPMI-1640+1%FBS)将两种细胞密度都调整为 $1*10^5$cells/ml。各自按 100μl /well 铺板 96 孔板，每孔细胞个数为 $1*10^4$，37℃，5%CO2 培养箱培养过夜;混合细胞铺板（co-culture）：用培养基(RPMI-1640+1%FBS)将两种细胞密度都调整为 $2*10^5$cells/ml，每孔加入 50μl SK-BR-3 细胞，以及 50μl MDA-MB-468 细胞。每孔细胞总数为 $2*10^4$，37℃，5%CO_2 培养箱培养过夜；

抗体药物配置：用含 1%FBS 的 RPMI-1640 培养基稀释受试样品，从最高工作浓度 50nM，向下 5 倍梯度稀释，共 4 个浓度；同时设置对照组，即不加药物组(Negative Control)；每孔加入 100μl 上述稀释的受试样品,对照组（Negative Control）直接加入 RPMI-1640+1%FBS 培养基 100μl；37℃，5%CO2 培养 72h；吸去 96 孔板中上清，200μl 1XPBS 洗涤一次后，每孔加入 20μl 胰酶进行消化，37℃培养箱放置 4min；加入 100μl 培养基（RPMI-1640+10%FBS）终止消化并吹打细胞至单细胞悬液，1000rpm 离心 5min；弃去上清液，每孔加入 40μl 1XPBS 重悬细胞，吸取 20μl 细胞悬液和 20μl 0.2%台盼蓝混合计数；计数后，将混合细胞铺板组中每孔加入 100μl (1：100 倍 1XPBS 稀释的 APC anti-human CD340 Antibody)荧光抗体，混匀后，2~8℃，避光孵育 15min；1000 rpm 离心 5min，弃去上清，每孔加入 200μl 1XPBS，1000rpm 离心 5min 洗涤一次，吸干上清，加入 100μl 1XPBS 重悬，流式上机检测。

如图 18 显示的是，各个实验组对于 SK-BR-3 细胞的增殖抑制结果；如图 19 显示的是，各个实验组对于 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制结果。结果显示：（a）抗体 A-ADC1 和

ENHERTU(即 DS-8201)对 SK-BR-3 单细胞体系、SK-BR-3 与 MDA-MB-468 混合体系中的 SK-BR-3 细胞都有旁观者杀伤效果；（b）抗体 A-ADC1 与 ENHERTU 对 HER2 阴性 MDA-MB-468 单细胞体系的杀伤效果不明显，而对混合体系中的 MDA-MB-468 细胞具有明显的杀伤作用。样品浓度为 50nM，10nM，2nM, 0.4nM 时，抗体 A-ADC1 对混合细胞体系中的 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制率分别为：68.65%，46.87%，31.61%，-4.95%；ENHERTU 对混合细胞体系中的 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制率分别为：45.02%，25.4%，-20.02%，-22.08%。浓度为 50nM 时，抗体 A-ADC1 对于 HER2 阴性细胞的旁观者杀伤能力约为 ENHERTU 的 1.5 倍；浓度为 10nM 时，抗体 A-ADC1 对于 HER2 阴性细胞的旁观者杀伤能力约为 ENHERTU 的 1.8 倍；浓度为 2nM 时，抗体 A-ADC1 仍然具有旁观者杀伤能力 31.61%， ENHERTU 无旁观者杀伤能力；因此，抗体 A-ADC1 在 2-50nmM 浓度下，比 ENHERTU 有更强的旁观者杀伤能力。

下表显示了 CountStar 细胞计数的结果

组别	抗体 A-ADC1				ENHERTU(即 DS-8201)				NC
	浓度								
	50nM	10nM	2nM	0.4nM	50nM	10nM	2nM	0.4nM	NA
SK-BR-3 单细胞体系	1940	3640	3812	4680	2012	2808	3572	5120	17400
MDA-MB-468 单细胞体系	7800	10920	8840	8960	8800	11480	10800	10320	8720
(SKBR-3 + MDA-MB-468) 混合体系(1:1)	9080	11240	16640	24200	12000	16760	23680	27860	21960

下表显示了混合细胞组 HER2 阳性，HER2 阴性细胞比例的结果

组别	抗体 A-ADC1				ENHERTU(即 DS-8201)				NC
	浓度								
	50nM	10nM	2nM	0.4nM	50nM	10nM	2nM	0.4nM	NA
SK-BR-3 混合体系 (1:1)	56.41%	40.31%	48.10%	45.24%	42.15%	43.80%	36.00%	44.67%	42.50%
MDA-MB-468 混合体系 (1:1)	43.59%	59.69%	51.90%	54.76%	57.85%	56.20%	64.00%	55.33%	57.50%

下表显示了 SK-BR-3 细胞增殖抑制率的结果

抑制率（%）					
组别	样本	浓度			
		50nM	10nM	2nM	0.4nM
SK-BR-3 单细胞体系	抗体 A-ADC1	88.85%	79.08%	78.09%	73.10%

	ENHERTU(即 DS-8201)	88.44%	83.86%	79.47%	70.57%
SK-BR-3 混合体系(1:1)	抗体 A-ADC1	45.12%	51.45%	14.24%	-17.31%
	ENHERTU(即 DS-8201)	45.81%	21.34%	8.66%	-33.34%

下表显示了 MDA-MB-468 细胞增殖抑制率的结果

抑制率（%）					
组别	样本	浓度			
		50nM	10nM	2nM	0.4nM
MDA-MB-468 单细胞体系	抗体 A-ADC1	10.55%	-25.23%	-1.38%	-2.75%
	ENHERTU(即 DS-8201)	-0.92%	-31.65%	-23.85%	-18.35%
MDA-MB-468 混合体系(1:1)	抗体 A-ADC1	68.65%	46.87%	31.61%	-4.95%
	ENHERTU(即 DS-8201)	45.02%	25.40%	-20.02%	-22.08%

结果与结论

浓度为 50nM 时，抗体 A-ADC1 对于 HER2 阴性细胞的旁观者杀伤能力约为 ENHERTU(即 DS-8201)的 1.5 倍；浓度为 10nM 时，抗体 A-ADC1 对于 HER2 阴性细胞的旁观者杀伤能力约为 ENHERTU 的 1.8 倍；浓度为 2nM 时，抗体 A-ADC1 仍然具有旁观者杀伤能力 31.61%，ENHERTU 无旁观者杀伤能力；因此，抗体 A-ADC1 在 2-50nmM 浓度下，比 ENHERTU 有更强的旁观者杀伤能力。

实施例 7 包含抗体 A 的 ADC 分子的 ADCC 活性分析

（a）利用报告基因体系测定抗体 A-ADC1 的 ADCC 活性

将靶细胞 NCI-N87、效应细胞 Jurkat- FcγRIIIa-V158-NFAT 与实施例 1 制备的抗体 A-ADC1 共培养 6 小时，通过检测荧光 RUL 值测定 ADCC 活性。

具体实验步骤：

（1）配制反应培养基：2%FBS+1640；

（2）利用步骤（1）制备的反应培养基制备不同浓度的抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2 和抗体 A，其中浓度最高为 15000ng/ml（终浓度：10000ng/ml），4 倍稀释至 9 个浓度；

（3）收集 NCI-N87 细胞，利用步骤（1）制备的反应培养基调整细胞数至 1×10^6 个细胞/mL；收集 Jurkat- FcγRIIIa-V158-NFAT 细胞，利用步骤（1）制备的反应培养基调整细胞数至 4×10^6 个细胞/mL；

（4）96 孔板中加入 25 μL 步骤（2）配制的抗体 A 或包含抗体 A 的 ADC、25μLN8 细胞和 25μL Jurkat- FcγRIIIa-V158-NFAT 细胞，培养箱放置 6 小时；

（5）每孔加入 10μL Bio-Glo™luciferase substrate，立即于荧光酶标仪上检测每孔的 RLU

值。

结果如图 20 所示，图 20 的结果说明，其中 1-3 分别显示抗体 A、抗体 A-ADC1 和抗体 A-ADC2 的结果。实施例 1 制备的抗体 A-ADC1 分子在 HER2 阳性/高表达的细胞中（NCI-N87 细胞）仍然保留很好的 ADCC 活性，其 ADCC 活性是母分子抗体 A 的 87.7%（抗体 A EC50/ADC1 EC50）；而实施例 2 制备的抗体 A-ADC2 丧失了大部分的 ADCC 活性，其活性仅为母分子抗体 A 的 37.2%（抗体 A EC50/ADC2 EC50）。说明偶联方式对 ADC 的 ADCC 活性影响较大。

（b）利用 PBMC 体系测定包含抗体 A 的 ADC 的 ADCC 活性

具体试验步骤（BT474 细胞）：

（1）收集 300IU/ml 利用 IL-2 活化 24 小时的 PBMC（活化用培养基：10%FBS+1640+300IU/ml），利用 10%FBS+1640+150IU/ml 调整细胞数至 4.5×10^6 个细胞/mL；

（2）利用活化用培养基配制不同浓度抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、DS8201 和人 IgG1，其中浓度最高为 3μg/mL（终浓度为 1μg/mL），10 倍稀释，3 个浓度；

3、收集 BT474 细胞，利用活化用培养基调整细胞数至 3×10^5 个细胞/mL；

4、96 孔板中加入 50μL 步骤（2）配制的包含抗体 A 的 ADC、50μL BT474，50μL PBMC，培养箱放置 4 小时；

5、检测前 30min，在 TMR 和 VCC 孔中加入 10μL 细胞裂解液；

6、1500rpm/5min，取上清 50μL 至新的 96 孔板中，每孔加入 50μL LDH 检测底物，室温放置 30min；

7、490nm 处检测 OD 值。

具体试验步骤（NCI-N87 细胞）：

（1）收集 300IU/ml 利用 IL-2 活化 24 小时的 PBMC（活化用培养基：10%FBS+1640+300IU/ml），利用 10%FBS+1640+150 IU/ml 调整细胞数至 4.5×10^6 个细胞/mL；

（2）利用活化用培养基配制不同浓度抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、DS8201 和人 IgG1，其中浓度最高为 3000ng/ml（终浓度为 1000ng/ml），6 倍稀释，5 个浓度；

3、收集 NCI-N87 细胞，利用活化用培养基调整细胞数至 3×10^5 个细胞/mL；

4、96 孔板中加入 50μL 步骤（2）配制的包含抗体 A 的 ADC、50μL BT474，50μL PBMC，培养箱放置 4 小时；

5、检测前 30min，在 TMR 和 VCC 孔中加入 10μL 细胞裂解液；

6、1500rpm/5min，取上清 50μL 至新的 96 孔板中，每孔加入 50μL LDH 检测底物，室温

放置 30min；

7、490nm 处检测 OD 值。

按照上述方法步骤，分别测定抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、DS8201 和抗体 A 等在 HER2 高表达的细胞体系中的 ADCC 活性，靶细胞选用的是 HER2 高表达的细胞: BT747 和 NCI-N87，效应细胞是两个捐赠者外周血中的 PBMC（PBMC-qc 和 PBMC-z）。检测流程如图 21 所示，检测结果如图 22-23 所示。

结果显示，抗体 A-ADC1 在 PBMC-qc: BT474（效靶比 15:1）细胞体系、PBMC-z: NCI-N87（效靶比 15:1）细胞体系中的活性均强于抗体 A-ADC2、DS-8201，说明抗体 A-ADC1 在 HER2 高表达的细胞体系中较 DS-8201 显示更高的 ADCC 活性，可见本申请所述的 ADC 可以保留偶联母分子抗体 A 的 ADCC 活性。

实施例 8 检测包含抗体 A 的 ADC 分子在肿瘤细胞中的内吞效率

具体实验步骤（NCI-N87 细胞，购自上海中科院）：

（1）使用含有 10%FBS 的 1640 培养基配制各浓度的抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、DS8201 和抗体 A（与内吞试剂混合）：96 孔板中加入 50μL 终浓度分别为：50nM、10nM、2nM 的抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、DS8201 或抗体 A；

（2）NCI-N87 细胞消化，计数，每含药孔中加入 4×10^4 个细胞/50μL/孔，培养箱中放置 2、 5 和 23 小时；

（3）96 孔板细胞弃上清，每孔加入 50μL 胰酶消化 5min，

（4）每孔加入 200μL 含有 10%FBS 的 1640 培养基重悬，并吹打成单细胞悬液 ；

（5）转移至 1.5ml EP 管中，FACS 检测。

具体实验步骤（BT474 细胞）：

（1）使用含有 10%FBS 的 1640 培养基配制各浓度的抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、DS8201 和抗体 A（与内吞试剂混合）：96 孔板中加入 50μL 终浓度分别为:：40nM、8nM、1.6nM 的抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、DS8201 或抗体 A；

（2）BT474 细胞消化，计数，每含药孔中加入 4×10^4 个细胞/50μL/孔，培养箱中放置 24 小时；

（3）96 孔板细胞弃上清，每孔加入 50μL 胰酶消化 5min，

（4）每孔加入 200μL 含有 10%FBS 的 1640 培养基重悬，并吹打成单细胞悬液 ；

（5）转移至 1.5ml EP 管中，FACS 检测。

按照上述方法步骤，将抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、DS-8201、抗体 A 等抗体-内吞试

剂混合物与肿瘤细胞体系中分别孵育后，通过细胞流式检测细胞对各分子的内吞效率。

（1）在 NCI-N87 肿瘤细胞中的内吞作用

当抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、DS-8201、抗体 A 各分子在 NCI-N87 细胞体系中分别孵育 2h、5h、23h 后，通过细胞流式检测 NCI-N87 细胞对各分子的内吞作用。孵育 2h、5h、23h 后的结果分别如图 24、25、26 所示。

（a）当孵育达到 2h 时，细胞对各分子的内吞效率为：抗体 A> 抗体 A-ADC1> 抗体 A-ADC2> DS-8201；孵育 5h 时，内吞效率为：抗体 A=抗体 A-ADC1>> 抗体 A-ADC2>>DS-8201，此时抗体 A-ADC1 与母分子抗体 A 的内吞效率相当，且远远高于 DS-8201、抗体 A-ADC2。说明经过短时间的孵育（5h），抗体 A-ADC1 保留了与母分子相当的肿瘤细胞内吞效果，且远远优于 DS-8201，说明本申请所述的 ADC 能够快速结合肿瘤细胞表面的 HER2 实现内吞，阻断 HER2 信号通路，发挥肿瘤杀伤作用。

（b）当孵育达到 23h 时， 抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、抗体 A 等的内吞效率相当，50nM 时内吞效率均达到 55%以上，该内吞效率优于 DS-8201，说明施用本申请所述 ADC 23h 后有 55%药物（50nM）都达到了 NCI-N87 肿瘤靶细胞内，肿瘤靶向性较 DS-8201 略强。

（2）在 BT474 肿瘤细胞中的内吞作用

当抗体 A-ADC1、抗体 A-ADC2、DS-8201 在 BT474 细胞体系中孵育达到 24 小时后通过细胞流式检测。孵育 24 小时的结果如图 27 所示。

测定结果显示抗体 A-ADC1 与抗体 A-ADC2 的内吞效率相当，40nM 时内吞效率达到 70%以上，可见本申请所述包含抗体 A 的 ADC 的内吞效率在同等条件下是 DS-8201（30%）的 2.33 倍，同时前者对 BT474 细胞的靶向性远强于 DS-8201。说明抗体 A-ADC1 对靶点介导的信号通路抑制能力更强，肿瘤杀伤力远强于 DS-8201，肿瘤抑制能力更强。

实施例 9 包含抗体 A 的 ADC 分子在动物模型中抑制肿瘤生长

分组给药试验方案：于裸鼠腋下皮下注射 BxPC-3 细胞建立模型，接种浓度为 1×10^6/0.1mL/只。待肿瘤大小长到平均约 190mm^3 时，按肿瘤大小和体重随机分组，每组 4 只，雌性。随机分组当天记为 0 天。于第 0 天腹腔给予受试药物，以后每 3 天 1 次按给药剂量腹腔给予受试物，共 2 次给药。未选入的动物 CO_2 安乐处死。

将试验动物分为 A、B、C 三组，A 组施用 PBS，B 组施用抗体 A-ADC1（DAR=4），C 组施用 DS-8201（DAR=8）。具体的分组给药方案如表 4 所示。

表 4

组别	给药途径	给药次数	受试物剂量	受试物体积	受试物浓度

			（mg/kg）	（mL/kg）	（mg/mL）
组 A	腹腔注射	每周 2 次至少持续 24 天	-	5	-
组 B			10		2
组 C			10		2

按照上述试验方案，对 A、B、C 三组试验动物小鼠分别施用三种受试物 24 天，（A 组 PBS 有 2 只动物因肿瘤生长过大，施用受试物 20 天后被安乐死）。得到三种受试物对 BxPC-3 肿瘤模型的抑瘤曲线。

抑瘤曲线的结果说明，对 BxPC-3 肿瘤模型动物施用抗体 A-ADC1（DAR=4）与 DS-8201（DAR=8），对肿瘤很大程度的抑制，随着时间的推进肿瘤抑制效果明显，且抗体 A-ADC1 与 DS-8201 的抑瘤效果类似。

实施例 10 包含抗体 A 的 ADC 分子在 Balb/c-Nu 裸鼠 NCI-N87 肿瘤模型中药代动力学研究

通过在 Balb/c-Nu 裸鼠皮下接种人胃癌细胞 NCI-N87，采用 NCI-N87 肿瘤模型，单次静脉注射（iv）给予抗体 A-ADC1 1mg/kg、ENHERTU(即 DS-8201) 1mg/kg，于不同时间点采集血样，Elisa 法检测动物血清样本中总抗体及 ADC 含量（方法一：ELISA 检测总抗体含量，包含 ADC 和裸抗体；方法二： ELISA 检测 ADC 含量（包括含有 1-4 个药物的 ADC），不包括释放毒素后的裸抗体），使用 DAS （3.2.8）软件非房室模型计算计算药代动力学参数。

表 5

组别	动物数量 雌	受试物	给药剂量（mg/kg）	给药浓度（mg/ml）	给药体积（ml/kg）	溶剂	给药方式	采集样本	采血时间点
1	每组 8 只小鼠：1-4 号小鼠采血时间点：药前，2min， 6h，48h（2 天），168h（7 天）；5-8 号小鼠采血时间点：药前，1h，24h（1 天），96h（4 天）；	抗体 A-ADC1	1	0.2	5	PBS	IV	血清	药前，2min，1h，6h，24h（1 天），48h（2 天），96h（4 天），168h（7 天）眼眶采血约 100 μl。
2		ENHERTU(即 DS-8201)	1	0.2					

单次静脉注射给予 NCI-N87 肿瘤模型小鼠抗体 A-ADC1 后，总抗体和 ADC 的 C_{max} 分别为 45422.727 μg/L、70056.81675μg/L，$AUC_{(0-t)}$ 分别为 1598292.175 μg/L*h、2098916.987 μg/L*h，T_{max} 均为 0.033 h、 0.033 h，$T_{1/2}$ 分别为 100.976 h、95.32 h。

单次静脉注射给药 NCI-N87 肿瘤模型小鼠 ENHERTU(即 DS-8201) 后，总抗体和 ADC 的 C_{max} 分别为 12343.966 μg/L、19604.51225 μg/L，$AUC_{(0-t)}$ 分别为 421103.345 μg/L*h、586509.313 μg/L*h，T_{max} 均为 0.033 h、 0.033 h，$T_{1/2}$ 分别为 86.744 h、65.384 h。

综上，单次静脉注射给予 NCI-N87 肿瘤模型小鼠抗体 A-ADC1、ENHERTU ，Elisa 方法一（总抗体浓度）结果显示 $T_{1/2}$ 分别为 100.976 h 、86.744 h ，抗体 A-ADC1 $T_{1/2}$ 是 ENHERTU 的 1.164 倍， Cmax 是 ENHERTU 的 3.680 倍，$AUC_{(0-t)}$ 是 ENHERTU 的 3.795 倍。方法二（抗体药物偶联物含量）结果显示抗体 A-ADC1 和 ENHERTU $T_{1/2}$ 分别为 95.32 h、65.384 h，抗体 A-ADC1 $T_{1/2}$ 是 ENHERTU 的 1.460 倍， Cmax 是 ENHERTU 的 3.574 倍，$AUC_{(0-t)}$ 是 ENHERTU 的 3.580 倍。结果可以参见图 28。

实施例 11 包含抗体抗体 A 的 ADC 分子对 NCI-N87 细胞表面 HER2 内吞的影响

靶向 Her2 的单克隆抗体可促进 Her2 内在化降解，来进一步抑制 Her2 的下游信号转导，从而抑制细胞增殖。本申请 ADC(抗体 A-ADC1)是在一种靶向 HER2 双表位抗体，例如抗体 A 的基础上偶联小分子 DXd 的 ADC 药物，通过选用 Her2 过表达的人胃癌细胞系 NCI-N87 细胞，比较抗体 A-ADC1，抗体 A 以及上市的同类靶点药物 DS8201 的内吞效果。

实验步骤：

1) 配置实验 Buffer:1640 +10%FBS 培养基;

2) 将 N87 细胞按 350g，5min 离心后，去掉上清，用实验 buffer 调整密度为 1*106 cells/ml;

3) 将实验所需抗体用实验 buffer 稀释为首浓度 200nM 将 pHrodo 用实验 buffer 稀释成浓度为 600nM;

4) 稀释好的 200nM 抗体与 600nM pHrodo 体积 1：1 混合孵育 15min 后，用实验 Buffer 将抗体与 pHrodo 混合物 5 倍稀释共 3 个浓度点，孵育 5min 后加入 50ul 细胞;

5) 样本孔中加入抗体和 pHrodo 混合物 50ul 与 50ul 细胞；

6) NC 孔：25ul Buffer+25ul PHrodo+50ul cell(1E5)；

7) BLANK 孔：50ul Buffer+50ul cell(1E5) 每孔体积为 100ul 吹打混匀;

8) 37℃细胞培养箱孵育 5h;

9) 孵育结束 350xg 离心 5min 后，去掉上清，每孔加胰酶消化细胞 培养基重悬为单细胞悬液 350xg 离心 5min 按 200μl/孔中加入 1xPBS 重悬；

10) 350xg 离心 5min 后，按 150μl/孔中加入 1xPBS 重悬细胞, 细胞移入新 96 孔板流式上机：

实验结果：

抗体 A，抗体 A-ADC1 及 DS8201 都可以诱导 NCI-N87 细胞表面的 HER2 内吞作用，其中抗体 A-ADC1 与抗体 A 的内吞效果相当。另外，抗体 A-ADC1 的内吞效果在三个浓度点都明显强于 DS8201，在 50nM，10nM,2nM 浓度条件下，抗体 A 的内吞比例分别是 92.25%，91.82%，65.71%，抗体 A-ADC1 的内吞比例分别是 85.48%，84.65%，58.95%，DS8201 的内吞比例分别是 34.79%，28.36%，21.26%。抗体 A-ADC1 对 NCI-N87 的内吞效果与抗体 A 相当，并显著强于 DS8201。

表 6

样品浓度	阳性细胞比例				
	无抗体	抗体 A	抗体 A-ADC1	DS8201	空白组
50nM	1.72%	92.25%	85.48%	34.79%	0.70%
10nM	1.29%	91.82%	84.65%	28.36%	
2nM	1.06%	65.71%	58.95%	21.26%	

表 6 显示了抗体 A，抗体 A-ADC1 和 DS8201 内吞后阳性 NCI-N87 细胞比例

图 29 显示的是，抗体 A、抗体 A-ADC1 和 DS8201 诱导内吞后 NCI-N87 阳性细胞比例。

实施例 12 包含抗体 A 的 ADC 分子对 HER2 弱阳性胃癌 PDX 皮下异种移植 NOD/SCID 小鼠模型的抑制效果

评价本申请 ADC(抗体 A-ADC1)在人源 HER2 弱阳性（2+）胃癌 PDX 皮下异种移植 NOD/SCID 小鼠动物模型中的抗肿瘤作用，和已上市阳性对照药物 ENHERTU(即 DS-8201)进行对比。

模型信息

下表显示的是人源胃癌 PDX 异种移植模型样本信息

模型 ID	癌症类型	种族	特性
Case168	胃腺癌	亚洲	HER2 （2+）P6

实验过程

每例 PDX 模型选取 30 只 4-5 周龄性 NOD/SCID 雌性小鼠右前肩胛处皮下接种直径为 2-3 mm 的胃癌 PDX 肿瘤瘤块,待肿瘤平均体积为 213.40 mm^3 时，根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组（见下表），分组当天定义为第 1 天，分组后立即开始给药，给药当天定义为给药后第 1 天。

下表显示的是测试药物在人源胃癌 PDX 肿瘤模型中的抗肿瘤作用实验设计

组别	动物数	给药组	剂量	给药体积	给药方式	计划给药周期	实际给药周期
阴性对照组	5	PBS	--	10 μL/g	尾静脉注射	QW×3 周	共计给药两次：首次分组给药后第一天（day1），和首次分组给药后第 10 天（day10）
测试药物组	5	本申请 ADC(抗体 A-ADC1)	10 mg/kg	10 μL/g	尾静脉注射	QW×3 周	
阳性对照组	5	ENHERTU(即 DS-8201)	10 mg/kg	10 μL/g	尾静脉注射	QW×3 周	

实验结果：

对照组和测试药组在首次给药第 27 天时（此时对照组肿瘤长径最大径已达小鼠实验伦理上限 1.5 cm），各组内动物全部存活，因此选用此时肿瘤体积数据用于分析评估测试药物本申请 ADC(抗体 A-ADC1)抗肿瘤作用。 PBS 对照组（CTL）小鼠在分组首次给药后第 27 天时平均肿瘤体积为 725.39 ± 190.25 mm^3，相对肿瘤体积为 3.58± 1.11；测试药抗体 A-ADC1（10 mg/kg）在分组首次给药后第 27 天时平均肿瘤体积为 112.89 ± 61.65 mm^3，相对肿瘤体积为 0.50 ± 0.16，相对肿瘤抑制率 TGI (%)为 86.05%，相对于 PBS 对照组在统计学上有显著性差异（$p < 0.0001$）；阳性对照药 ENHERTU(即 DS-8201) （10 mg/kg）在分组首次给药后第 27 天时平均肿瘤体积为 106.41 ± 17.77 mm^3，相对肿瘤体积为 0.50 ± 0.11，相对肿瘤抑制率 TGI (%)为 86.08%，相对于 PBS 对照组在统计学上有显著性差异（$p < 0.0001$）。此外，在 10 mg/kg 剂量水平下，分组首次给药后第 27 天时测试药物抗体 A-ADC1 治疗组中的平均肿瘤体积与 ENHERTU 治疗组平均肿瘤体积大小相近，且在统计学上无显著性差异（抗体 A-ADC1 VS ENHERTU , $P = 0.8362 > 0.05$，ns.）。总体来说， 抗体 A-ADC1 在 10 mg/kg 剂量下对人源 HER2 IHC 2+胃癌 PDX 肿瘤模型具有显著的的肿瘤抑制作用，DAR 为 4 的抗体 A-ADC1 与 DAR 为 8 的阳性对照药物 ENHERTU 的抗肿瘤药效相当。图 30 显示的是人源胃癌 PDX 肿瘤模型中各组小鼠肿瘤体积的生长曲线。

下表显示的是在 Case 168 人源胃癌 PDX 肿瘤模型中各组药效分析表

实验组	首次给药后第 27 天				
	肿瘤体积（mm^3）（$\bar{x}$±S）	相对肿瘤体积	T/C（%）	TGI（%）	P Value（相对对照组 CTL）
CTL（PBS）	725.39 ± 190.25	3.58± 1.11	--	--	--

抗体 A-ADC1 (10 mg/kg)	112.89 ± 61.65	0.50 ± 0.16	13.95	86.05	＜0.0001
ENHERTU(即 DS-8201) (10 mg/kg)	106.41 ± 17.77	0.50 ± 0.11	13.92	86.08	＜0.0001

注：1. 数据以“平均值 ($\bar{x}$) ± 标准误差 (S)”表示；

2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%； TGI% =（1-T_{RTV}/C_{RTV}）× 100%。

3.CTL VS 本申请 ADC(抗体 A-ADC1), P ＜0.0001; CTL VS ENHERTU(即 DS-8201) , P ＜0.0001; 抗体 A-ADC1 VS ENHERTU , P =0.8362 ＞ 0.05.

实施例 13 包含抗体 A 的 ADC 分子对 HER2 阴性胃癌 PDX 皮下异种移植 NOD/SCID 小鼠模型的抑制效果

评价本申请 ADC(抗体 A-ADC1)在 HER2 表达阴性的人源胃癌 PDX 肿瘤皮下异种移植 NOD/SCID 小鼠动物模型中的抗肿瘤作用，和已上市阳性对照药物 ENHERTU(即 DS-8201)进行对比

实验过程：

模型信息

下表显示的是人源胃癌 HER2 IHC 2+ PDX 异种移植模型样本信息

模型 ID	癌症类型	种族	特性
Case 111	胃腺癌	亚洲	HER2 （-） P6

实验过程

每例 PDX 模型选取 30 只 4-5 周龄雌性 NOD/SCID 小鼠小鼠右前肩胛处皮下接种直径为 2-3 mm 的胃癌 PDX 肿瘤瘤块。待肿瘤平均体积为 166.53 mm^3 时，根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组，分组当天定义为第 1 天，分组后立即开始给药，给药当天定义为给药后第 1 天。

下表显示的是测试药物在人源胃癌 PDX 肿瘤模型中的抗肿瘤作用实验设计

组别	动物数	给药组	剂量	给药体积	给药方式	实际给药周期
阴性对照组	5	PBS	--	10 μL/g	尾静脉注射	仅给药一次：首次分组给药后第 1 天（day1）
测试药物组	5	抗体 A-ADC1	10 mg/kg	10 μL/g	尾静脉注射	
阳性对照组	5	ENHERTU(即 DS-8201)	10 mg/kg	10 μL/g	尾静脉注射	

实验结果：

对照组和测试药组在分组首次给药后第 17 天时（此时对照组肿瘤长径最大径已达小鼠实验伦理上限 1.5 cm），各组内动物全部存活，因此选用此时的肿瘤体积数据用于评估测试药物本申请 ADC(抗体 A-ADC1)抗肿瘤作用。PBS 对照组小鼠在分组首次给药后第 17 天时平均肿瘤体积为 629.24 ± 146.59 mm^3，相对肿瘤体积为 4.13 ± 0.97；测试药抗体 A-ADC1（10 mg/kg）在分组首次给药后第 17 天时平均肿瘤体积为 238.32 ± 84.57 mm^3，相对肿瘤体积为 1.68 ± 1.01，相对肿瘤抑制率 TGI (%)为 59.41%，相对于 PBS 对照组在统计学上有显著性差异（p ＜0.0001）；阳性对照药 ENHERTU(即 DS-8201) （10 mg/kg）在分组首次给药后第 17 天时平均肿瘤体积为 174.06±71.09 mm^3，相对肿瘤体积为 1.02 ± 0.34，相对肿瘤抑制率 TGI (%)为 75.19%，相对于 PBS 对照组在统计学上有显著性差异（p ＜0.0001）。此外，在 10 mg/kg 剂量水平下，分组首次给药后第 17 天时测试药物抗体 A-ADC1 治疗组的平均肿瘤体积要稍大于阳性对照药物 ENHERTU 治疗组的平均肿瘤体积，但是在统计学上无显著性差异（抗体 A-ADC1 VS ENHERTU , P =0.526 ＞ 0.05，ns.）。总体来说抗体 A-ADC1 在 10 mg/kg 剂量下对人源 HER2 - 胃癌 PDX 肿瘤模型具有显著的的肿瘤抑制作用， DAR 为 4 的抗体 A-ADC1 与 DAR 为 8 的阳性对照药物 ENHERTU 的抗肿瘤药效相当。图 31 显示的是人源胃癌 HER2 IHC- PDX 肿瘤模型小鼠肿瘤体积的生长曲线（仅于 day1 给一次药物处理，尾静脉注射，10mg/kg）。

下表显示的是在 Case 111 人源胃癌 PDX 肿瘤模型中各组药效分析表

实验组	首次给药后第 17 天				
	肿瘤体积（mm^3）（$\bar{x}$±S）	相对肿瘤体积	T/C（%）	TGI（%）	P Value（相对对照组）
CTL（PBS）	629.24 ± 146.59	4.13 ± 0.97	--	--	--
抗体 A-ADC1 (10 mg/kg)	238.32 ± 84.57	1.68 ± 1.01	40.59	59.41	＜0.0001
ENHERTU(即 DS-8201) (10 mg/kg)	174.06 ±71.09	1.02 ± 0.34	24.81	75.19	＜0.0001

注：1. 数据以“平均值 ($\bar{x}$) ± 标准误差 (S)”表示；

2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%； TGI% =（1-T_{RTV}/C_{RTV}）× 100%。

3.CTL VS 本申请 ADC(抗体 A-ADC1), P ＜0.0001; CTL VS ENHERTU(即 DS-8201) , P ＜0.0001; 抗体 A-ADC1 VS ENHERTU , P =0.526 ＞ 0.05， ns.。

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的，并非要限制所附权利要求的范围。目前本

申请所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，且保留在所附的权利要求和其等同方式的范围内。

权 利 要 求 书

1. 抗体药物偶联物，其包含靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段。
2. 根据权利要求 1 所述的抗体药物偶联物，其中所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段特异性结合人 HER2 的至少一个表位。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段特异性结合人 HER2 的胞外结构域 II 和/或人 HER2 的胞外结构域 IV。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一轻链和第二轻链。
5. 根据权利要求 4 所述的抗体药物偶联物，其中所述第一轻链包含第一 LCDR1-3，其中所述第一 LCDR1 包含 SEQ ID NO.4 所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 5 所述的抗体药物偶联物，其中所述第一 LCDR2 包含 SEQ ID NO. 5 所示的氨基酸序列。
7. 根据权利要求 5-6 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一 LCDR3 包含 SEQ ID NO. 6 所示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 4-7 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一轻链能够与帕妥珠单抗的重链结合。
9. 根据权利要求 4-8 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第二轻链包含第二 LCDR1-3，其中所述第二 LCDR1 包含 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列。
10. 根据权利要求 9 所述的抗体药物偶联物，其中所述第二 LCDR2 包含 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列。
11. 根据权利要求 9-10 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第二 LCDR3 包含 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列。
12. 根据权利要求 4-11 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第二轻链能够与曲妥珠单抗的重链结合。
13. 根据权利要求 4-12 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一轻链和所述第二轻链的可变区包含 SEQ ID NO.7-12 中任一项所示的氨基酸序列。
14. 根据权利要求 4-13 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一轻链和所述第二轻链的可变区包含 SEQ ID NO.7 所示的氨基酸序列。
15. 根据权利要求 4-14 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一轻链和所述第二轻链包含 SEQ ID NO. 13-18 中任一项所述的氨基酸序列。
16. 根据权利要求 4-15 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一轻链选自下组：帕妥

珠单抗的轻链或其突变体和曲妥珠单抗的轻链或其突变体；和/或，所述第二轻链选自下组：帕妥珠单抗的轻链或其突变体和曲妥珠单抗的轻链或其突变体。

17. 根据权利要求 4-16 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一轻链和所述第二轻链的氨基酸序列相同。

18. 根据权利要求 4-17 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一轻链和所述第二轻链包含 SEQ ID NO.13 所述的氨基酸序列。

19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一重链和第二重链，其中所述第一重链能够在生理条件或体外的蛋白表达状态下与所述第一轻链正确结合。

20. 根据权利要求 19 所述的抗体药物偶联物，其中所述第二重链能够在生理条件或体外的蛋白表达状态下与所述第二轻链正确结合。

21. 根据权利要求 19-20 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一重链包含第一重链可变区，所述第一重链可变区为帕妥珠单抗的重链可变区。

22. 根据权利要求 19-21 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第二重链包含第二重链可变区，所述第二重链可变区为曲妥珠单抗的重链可变区。

23. 根据权利要求 19-22 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一重链和所述第二重链包含重链恒定区，其中所述重链恒定区源自人 IgG 的恒定区。

24. 根据权利要求 19-23 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一重链和所述第二重链的 Fc 片段包含 SEQ ID NO. 25-57 中任一项所述的氨基酸序列。

25. 根据权利要求 19-24 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第一重链包含 SEQ ID NO. 21 或 23 所示的氨基酸序列。

26. 根据权利要求 19-25 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述第二重链包含 SEQ ID NO. 22 或 24 所示的氨基酸序列。

27. 根据权利要求 1-26 中任一项所述的抗体药物偶联物，其包含式 1 所示的结构：

M-（L1）$_a$-（L2）$_b$-D（式 1），

其中 M 表示权利要求 1-26 中任一项所述的靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段；

L1 表示与 M 连接的连接子，L2 表示与 D 连接的连接子，

a，b 各自独立地选自 0-10，

D 表示药物。

28. 根据权利要求 27 所述的抗体药物偶联物，其中所述 L1 和/或 L2 选自下组：可裂解的连接

子、不可裂解的连接子、亲水的连接子、疏水的连接子、带电荷的连接子、不带电荷的连接子和基于二羧酸的连接子。

29. 根据权利要求 27-28 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述 L1 与所述 M 通过所述 M 上的巯基、叠氮基或酰胺基连接。

30. 根据权利要求 27-29 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述 M 包含第一重链和第二重链，所述第一重链和/或所述第二重链包含能够与所述 L1 连接的连接位点。

31. 根据权利要求 30 所述的抗体药物偶联物，其中所述连接位点包含去糖基化修饰后能够与所述 L1 连接的基团。

32. 根据权利要求 31 所述的抗体药物偶联物，其中，所述基团位于所述第一重链的第 297 位氨基酸 Q 的侧基；和/或，位于所述第二重链的第 298 位氨基酸 Q 的侧基。

33. 根据权利要求 30 所述的抗体药物偶联物，其中所述连接位点包含经糖基化修饰后能够与所述 L1 连接的基团。

34. 根据权利要求 33 所述的抗体药物偶联物，其中所述基团位于所述第一重链的第 299 位氨基酸 N 的侧基；和/或，位于所述第二重链的第 300 位氨基酸 N 的侧基。

35. 根据权利要求 33-34 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述基团包含-N_3。

36. 根据权利要求 33-35 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述经糖基化修饰包括：所述 M 已经与 UDP-GalNAz、β-1,4-半乳糖基转移酶或其变体接触。

37. 根据权利要求 27-36 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述 L1 能够参与 SPAAC 反应。

38. 根据权利要求 27-37 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述 L1 选自下组：马来酰亚胺、琥珀酰亚胺-3-基-N 和 DBCO。

39. 根据权利要求 27-38 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述 L1 为 DBCO-（PEG）$_{n1}$，其中 $_{n1}$ 为 0-10 的整数，或者，所述 L1 为马来酰亚胺。

40. 根据权利要求 27-39 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述 L2 选自下组：多肽、VC-PAB、N-琥珀酰亚胺基-3-（2-吡啶基二硫代）丙酸酯（SPDP）、N-琥珀酰亚胺基 4-（2-吡啶基二硫代）戊酸酯（SPP）、N-琥珀酰亚胺基 4-（2-吡啶基二硫代）丁酸酯（SPDB）、 N-琥珀酰亚胺基-4-（2-吡啶基二硫基）-2-磺基丁酸酯（sulfo-SPDB）、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯（SIA）、N-琥珀酰亚胺基（4-碘乙酰基）氨基苯甲酸酯（SIAB）、马来酰亚胺 PEG NHS、N- 4-（马来酰亚胺基甲基）环己基羧酸琥珀酰胺基酯（SMCC）、N-磺基（4-亚马来酰亚胺甲基）环己基羧酸磺基琥珀酯（磺基-SMCC）和 2,5-二氧吡咯烷基-1-基 17-（2,5-二氧代-2,5-二氢- 1H-吡咯-1-基）-5,8,11,14-四氧-4,7,10,13-四氮杂十八烷-1-酸酯（CX1-1）。

41. 根据权利要求 27-40 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述 L2 为 GGFG。

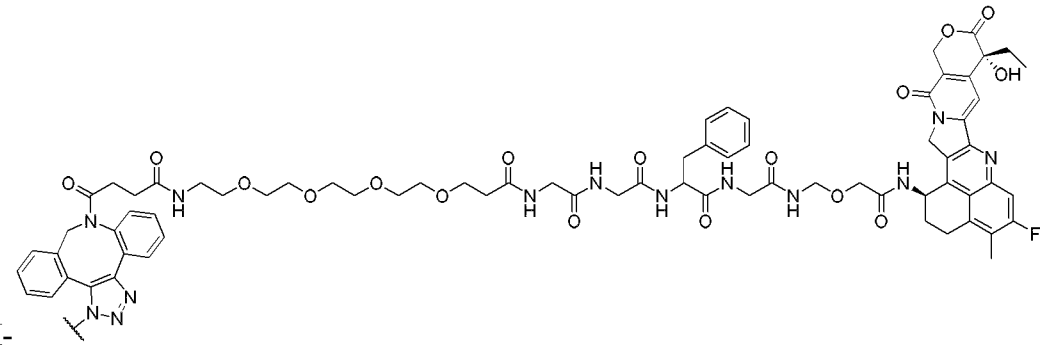
42. 根据权利要求 27-41 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述药物具有杀伤肿瘤细胞，和/或抑制肿瘤细胞生长的能力。

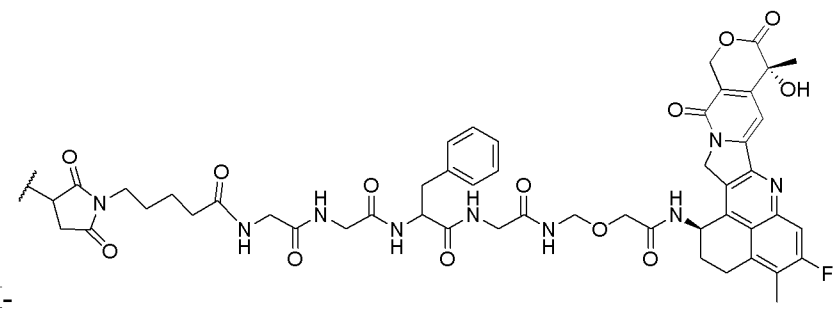
43. 根据权利要求 27-42 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述药物包括小分子药物。

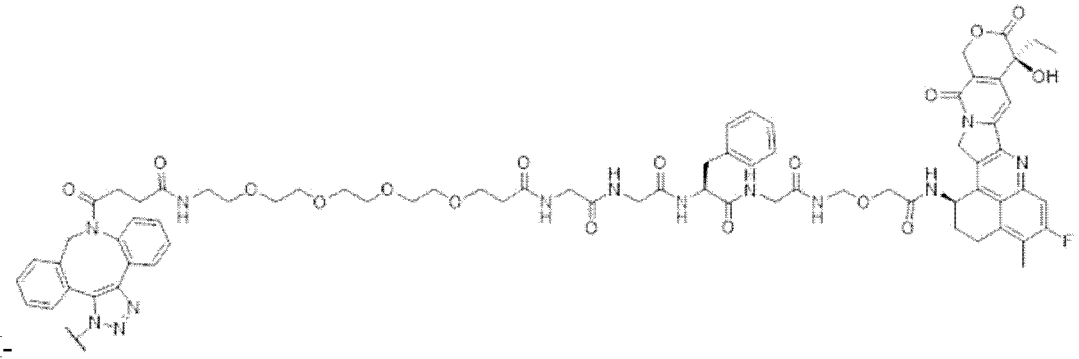
44. 根据权利要求 27-43 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述药物选自下组：V-ATPase 抑制剂、Bcl2 抑制剂、MCL1 抑制剂、HSP90 抑制剂、IAP 抑制剂、mTor 抑制剂、微管稳定剂、微管去稳定剂、auristatin、dolastatin、美登木素生物碱、 MetAP（蛋氨酸氨基肽酶）、蛋白质 CRM1 的核输出抑制剂、DPPIV 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、线粒体中的磷酸转移反应抑制剂、蛋白质合成抑制剂、CDK2 抑制剂、CDK9 抑制剂、驱动蛋白抑制剂、HDAC 抑制剂、DNA 破坏剂、DNA 烷化剂、DNA 嵌入剂、DNA 小沟结合剂、DHFR 抑制剂、核苷类似物、HD AC 抑制剂、蒽环类、NAMPT 抑制剂、SN-38 葡糖醛酸、依托泊苷磷酸酯、氮芥末、蛋白体抑制剂、细胞因子和 Toll 样受体激动剂。

45. 根据权利要求 27-44 中任一项所述的抗体药物偶联物，其中所述药物选自下组：DM1、exatecan、DXd、MMAE、SN-38、Calicheamicin、Anthracyclin-5G、DM4、微管抑制剂 SHR153024、PNU-159682、Duo5 毒素、SN38 衍生物或他们的衍生物。

46. 根据权利要求 27-45 中任一项所述的抗体药物偶联物，其具有选自下组的结构：

M-、

M-和

M-  。

47. 根据权利要求 1-46 中任一项所述的抗体药物偶联物，其药物/抗体比率为约 1-6。

48. 制备权利要求 1-47 中任一项所述的抗体药物偶联物的化合物，其具有式 2 所示的结构：

M-（L1）$_a$（式 2），其中 M 表示权利要求 1-26 中任一项所述靶向 HER2 的双特异性抗体或其抗原结合片段；

L1 表示与 M 连接的连接子；

a 选自 0-10。

49. 根据权利要求 48 所述的化合物，其中所述 L1 选自下组：可裂解的连接子、不可裂解的连接子、亲水的连接子、疏水的连接子、带电荷的连接子、不带电荷的连接子和基于二羧酸的连接子。

50. 根据权利要求 48-49 中任一项所述的化合物，其中所述 L1 与所述 M 通过所述 M 上的巯基、叠氮基或酰胺基连接。

51. 根据权利要求 48-50 中任一项所述的化合物，其中所述 M 包含第一重链和第二重链，所述第一重链和/或所述第二重链包含能够与所述 L1 连接的连接位点。

52. 根据权利要求 51 所述的化合物，其中所述连接位点包含去糖基化修饰后能够与所述 L1 连接的基团。

53. 根据权利要求 51 所述的化合物，其中，所述基团位于所述第一重链的第 297 位氨基酸 Q 的侧基；和/或，位于所述第二重链的第 298 位氨基酸 Q 的侧基。

54. 根据权利要求 51 所述的化合物，其中所述连接位点包含经糖基化修饰后能够与所述 L1 连接的基团。

55. 根据权利要求 54 所述的化合物，其中所述基团位于所述第一重链的第 299 位氨基酸 N 的侧基；和/或，位于所述第二重链的第 300 位氨基酸 N 的侧基。

56. 根据权利要求 54-55 中任一项所述的化合物，其中所述基团包含-N_3。

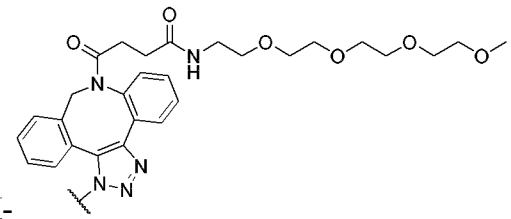
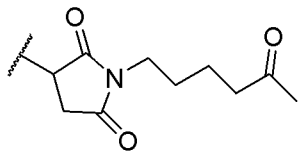
57. 根据权利要求 53-56 中任一项所述的化合物，其中所述经糖基化修饰包括：所述 M 已经与 UDP-GalNAz、β-1,4-半乳糖基转移酶或其变体接触。

58. 根据权利要求 48-57 中任一项所述的化合物，其中所述 L1 能够参与 SPAAC 反应。

59. 根据权利要求 48-58 中任一项所述的化合物，其中所述 L1 选自下组：马来酰亚胺、琥珀酰亚胺-3-基-N 和 DBCO。

60. 根据权利要求 48-59 中任一项所述的化合物，其中所述 L1 为 DBCO-（PEG）$_{n1}$，其中 $_{n1}$ 为 0-10 的整数，或者，所述 L1 为马来酰亚胺。

61. 根据权利要求 48-60 中任一项所述的化合物，其包括选自下组的结构：

M-  和 M-  。

62. 制备权利要求 1-47 中任一项所述的抗体药物偶联物的方法，其包括以下步骤：
将权利要求 48-61 中任一项所述的化合物与权利要求 1-47 中任一项所述的药物接触。

63. 药物组合物，其包含权利要求 1-47 中任一项所述的抗体药物偶联物，任选地，包含药学上可接受的载体。

64. 调节受试者的肿瘤微环境的方法，其包括以下步骤：向受试者施用权利要求 1-47 中任一项所述的抗体药物偶联物、或者权利要求 63 所述的药物组合物。

65. 调节受试者的免疫反应的方法，其包括以下步骤：向受试者施用权利要求 1-47 中任一项所述的抗体药物偶联物、或者权利要求 63 所述的药物组合物。

66. 权利要求 1-47 中任一项所述的抗体药物偶联物、或者权利要求 63 所述的药物组合物制备药物中的应用，其中所述药物可以预防和/或治疗肿瘤。

67. 根据权利要求 66 所述的应用，其中所述肿瘤包括实体瘤和/或非实体瘤。

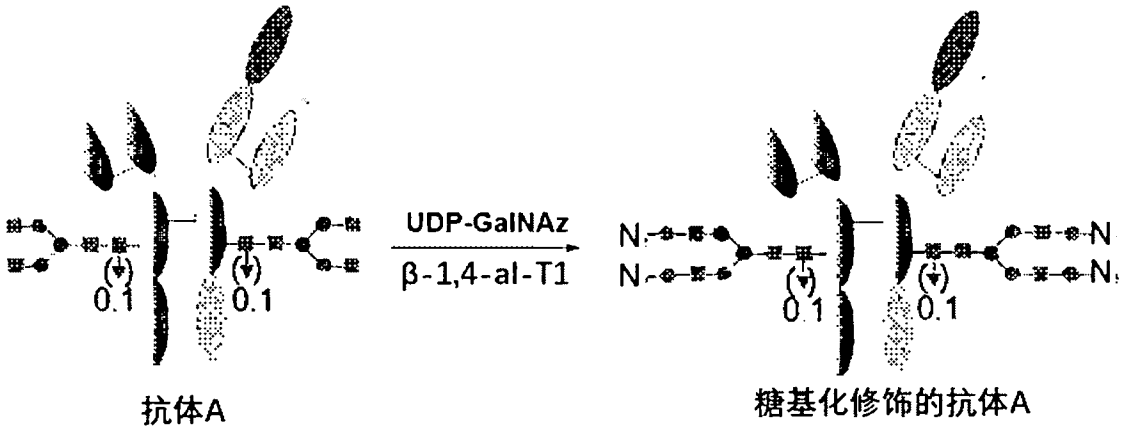

UDP-GalNAz
β-1,4-al-T1
0.1
0.1
0.1
0.1
抗体A
糖基化修饰的抗体A

图 1

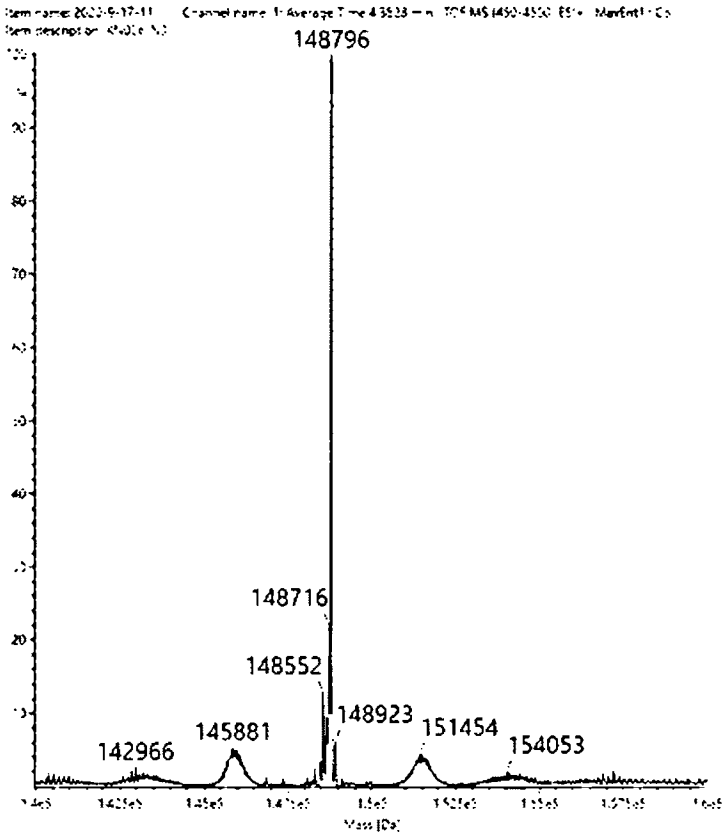

148796
148716
148552
148923
151454
154053
145881
142966

图 2

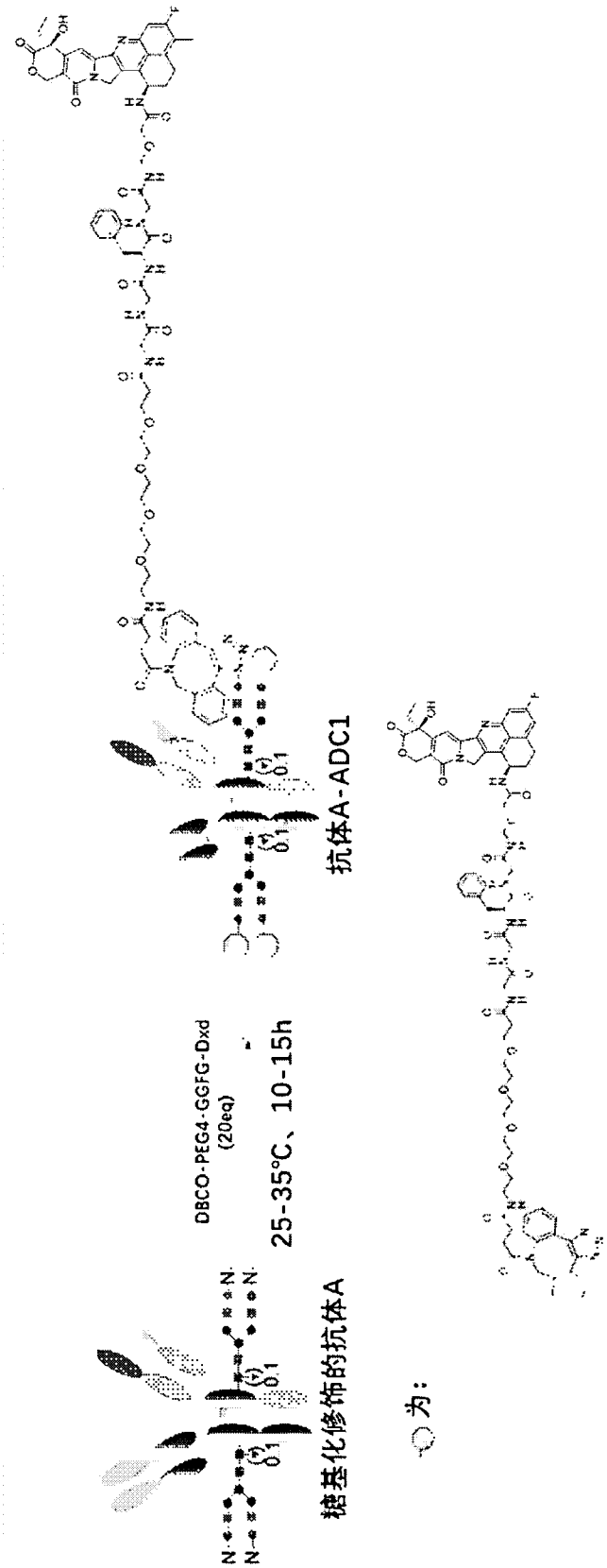


图 3

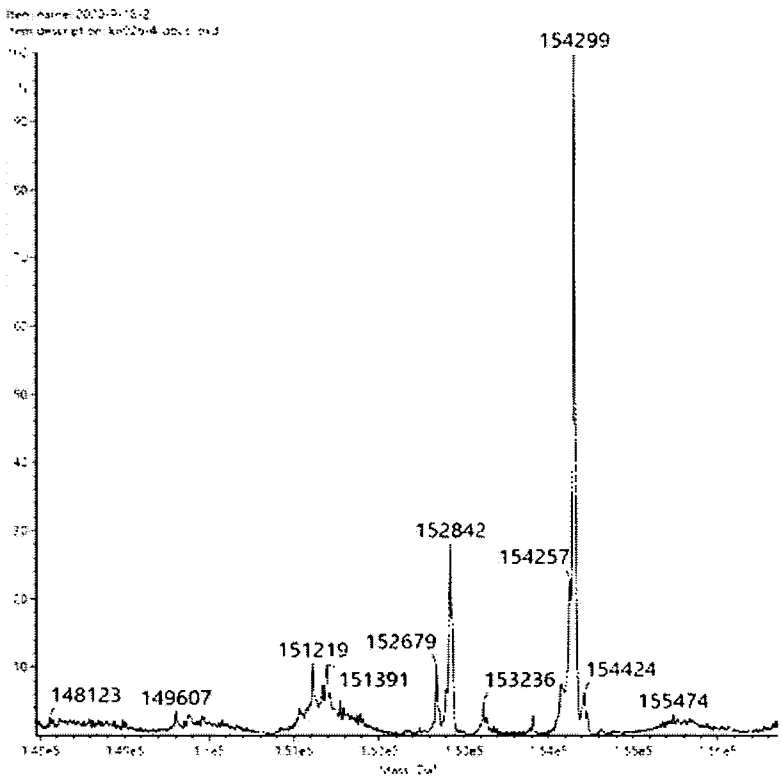
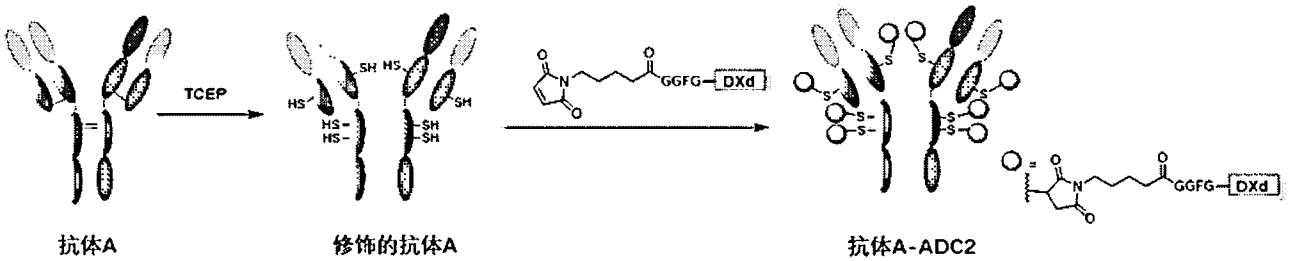
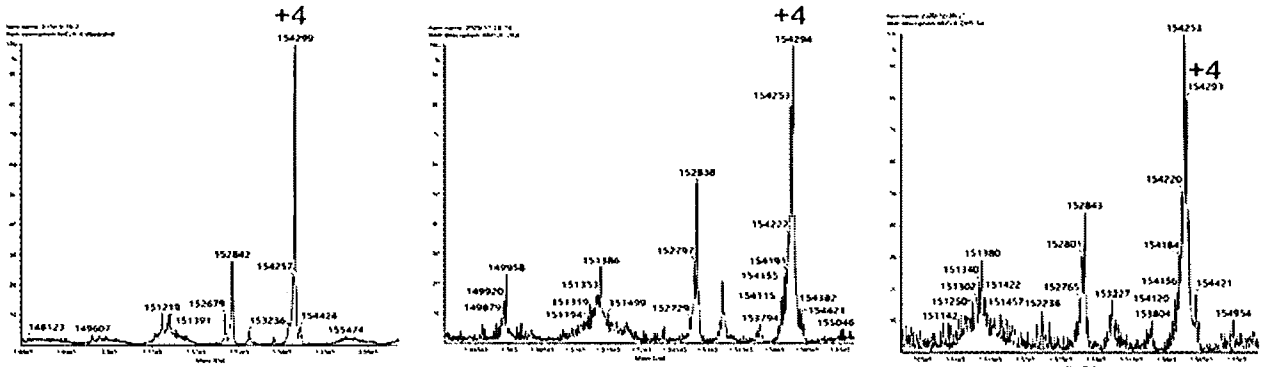


图 4



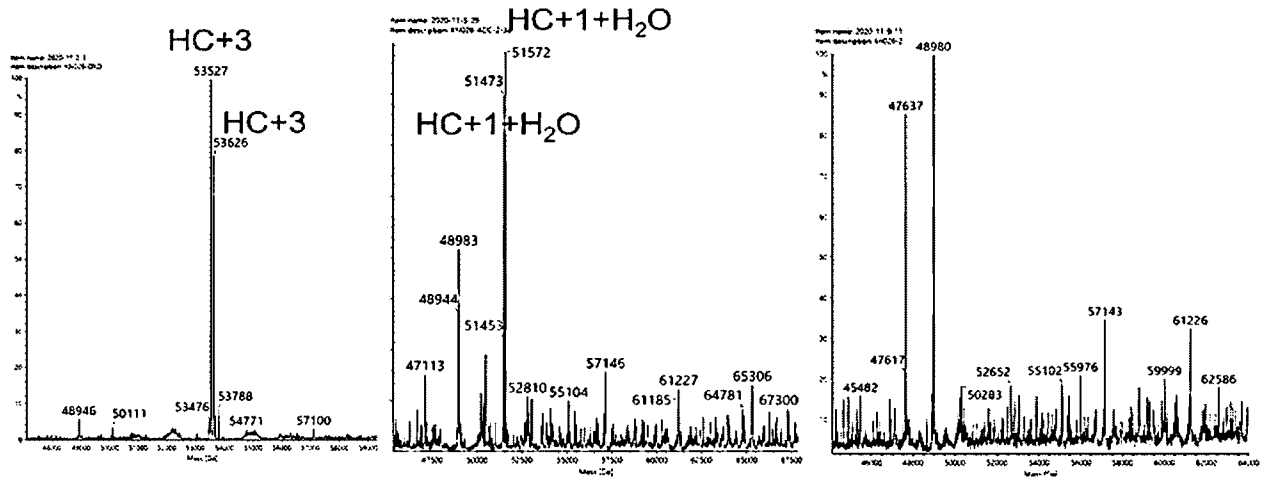
抗体A 修饰的抗体A 抗体A-ADC2

图 5



0 天 3 天 7 天

图 6



0 天 3 天 7 天

图 7

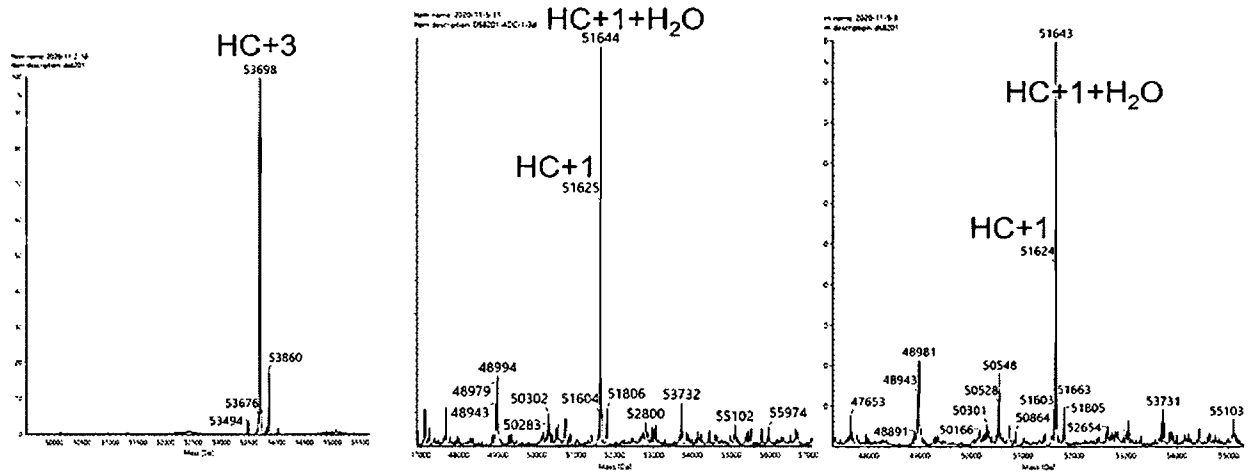

HC+3
53698
53860
53676
53494
HC+1+H2O
51644
HC+1
51625
48994
48979
48943
50302
50283
51604
51806
53732
52800
55102
55974
51643
HC+1+H2O
HC+1
51624
48981
48943
47653
48891
50548
50528
50301
50166
51603
50864
51663
51805
52654
53731
55103
0 天
3 天
7 天

图 8

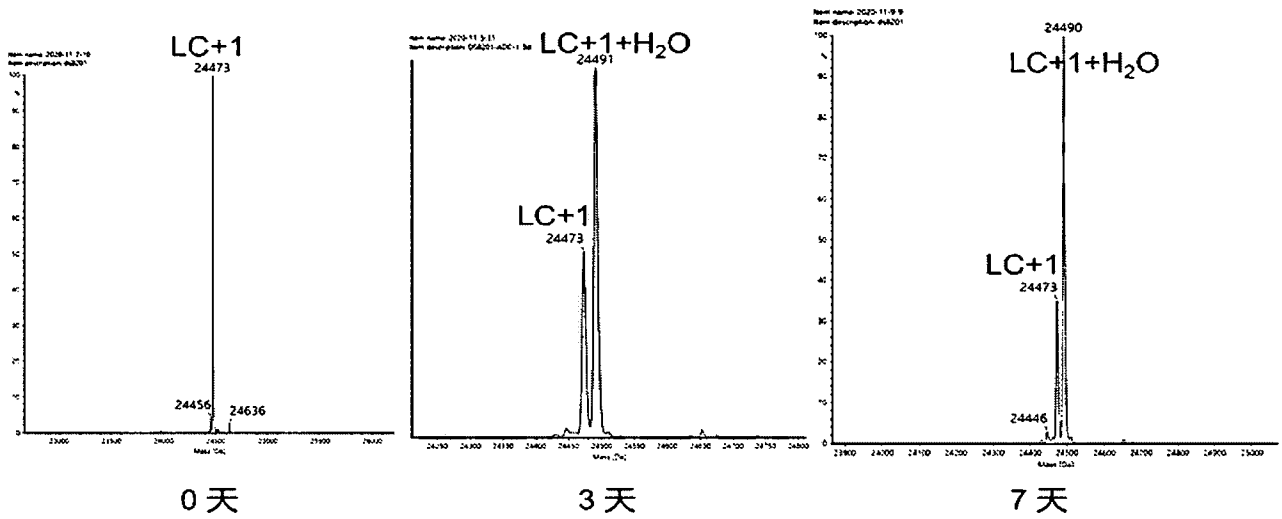

LC+1
24473
24456
24636
LC+1+H2O
24491
LC+1
24473
24490
LC+1+H2O
LC+1
24473
24446
0 天
3 天
7 天

图 9

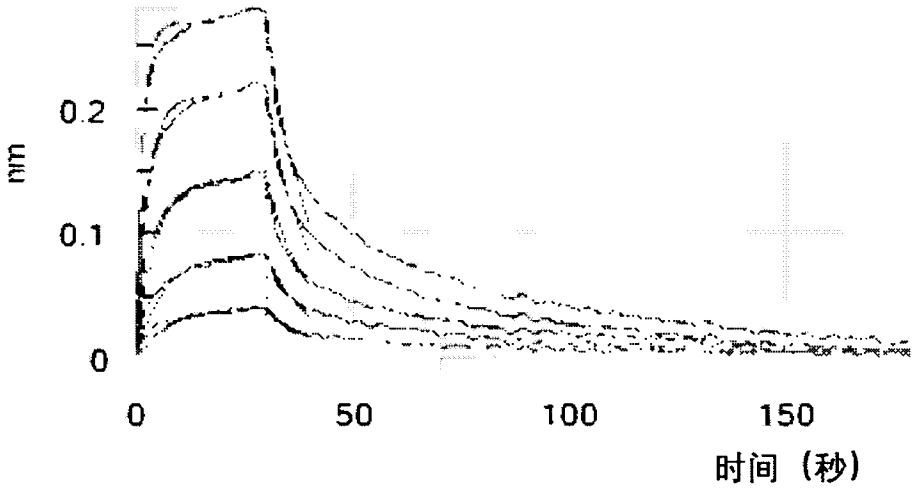

nm
0.2
0.1
0
0
50
100
150
时间（秒）

图 10

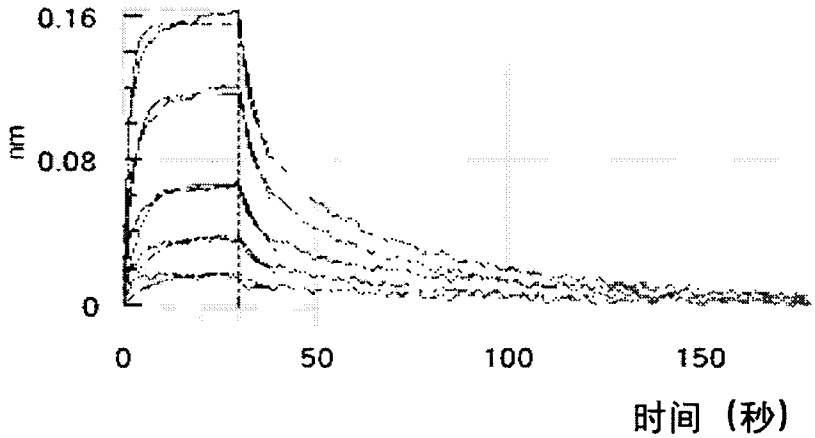

nm
0.16
0.08
0
0
50
100
150
时间（秒）

图 11

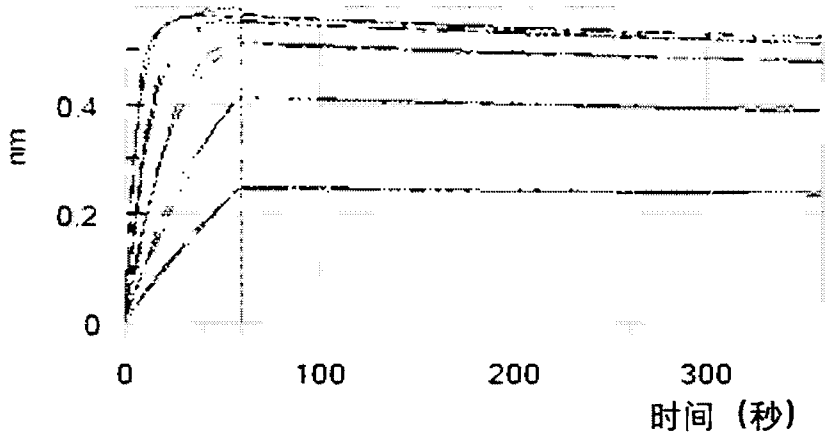

nm
0.4
0.2
0
0
100
200
300
时间（秒）

图 12

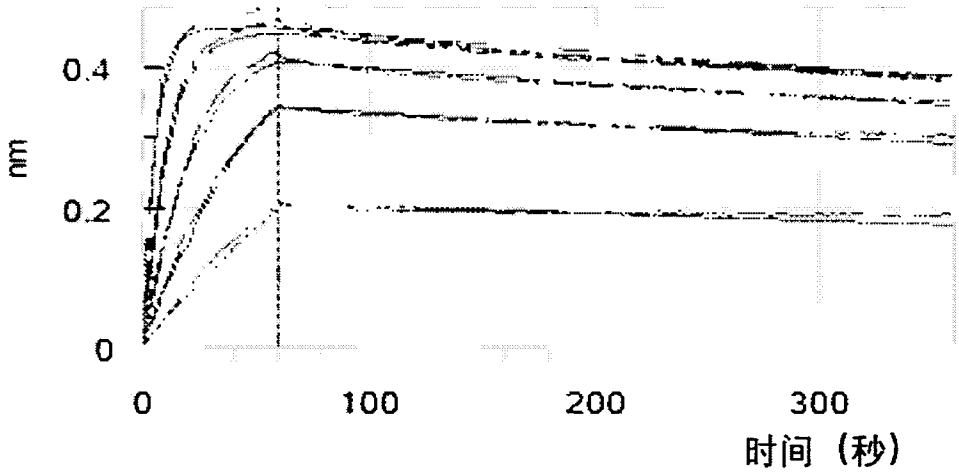

0.4
0.2
0
nm
0
100
200
300
时间（秒）

图 13

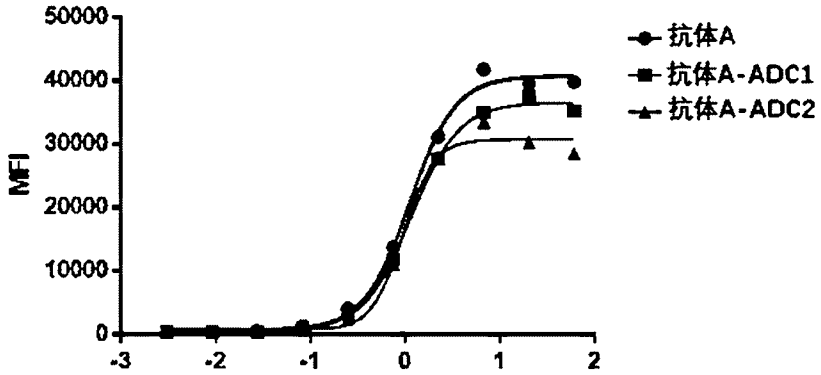

50000
40000
30000
20000
10000
0
MFI
-3
-2
-1
0
1
2
抗体A
抗体A-ADC1
抗体A-ADC2

图 14

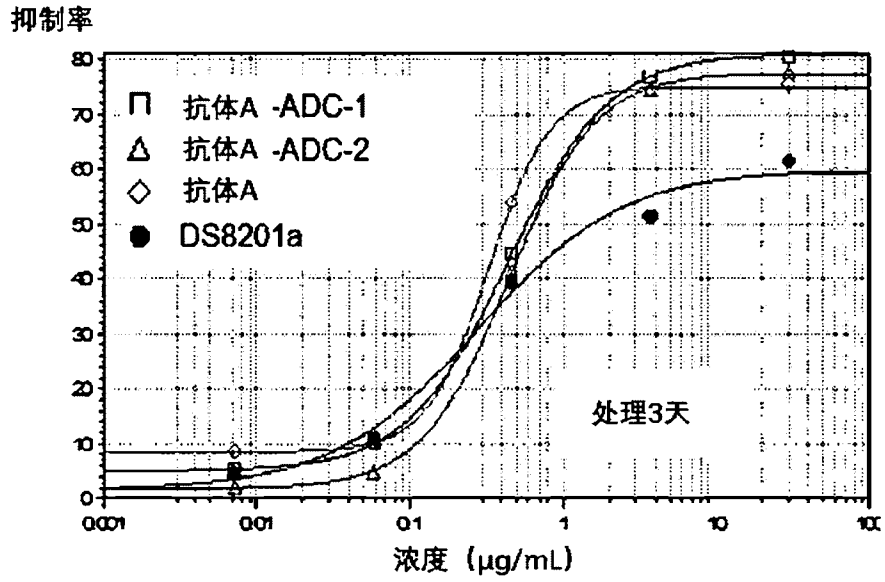

抑制率
抗体A -ADC-1
抗体A -ADC-2
抗体A
DS8201a
处理3天
浓度（μg/mL）

图 15

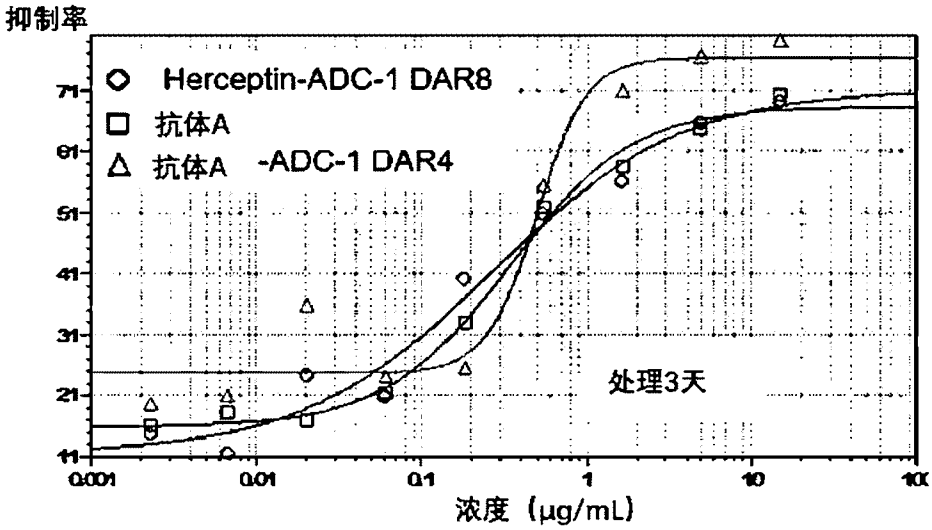

抑制率
Herceptin-ADC-1 DAR8
抗体A
抗体A -ADC-1 DAR4
处理3天
浓度（μg/mL）

图 16

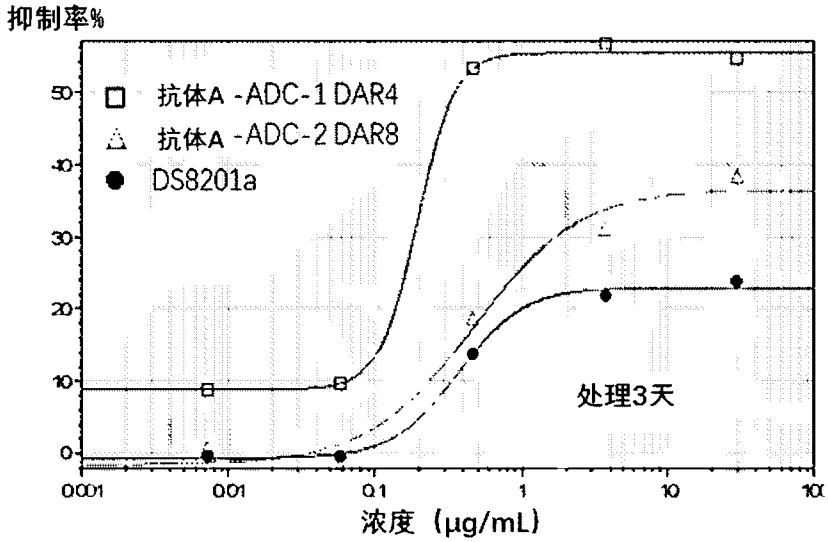

抑制率%
抗体A -ADC-1 DAR4
抗体A -ADC-2 DAR8
DS8201a
处理3天
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
浓度（μg/mL）

图 17

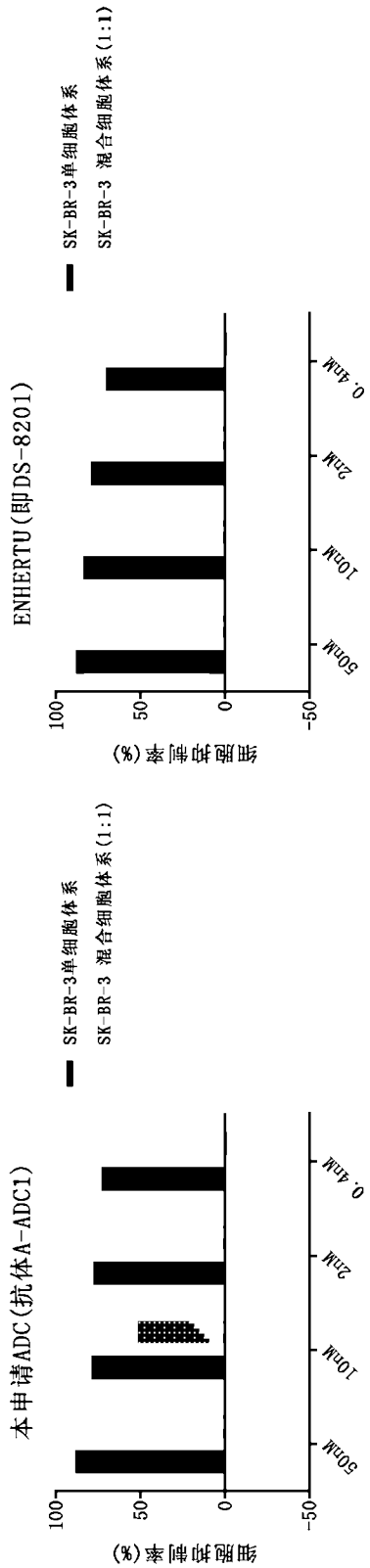

本申请ADC(抗体A-ADC1)
ENHERTU(即DS-8201)
SK-BR-3单细胞体系
SK-BR-3 混合细胞体系(1:1)
细胞抑制率(%)
100
50
0
-50
50nM
10nM
2nM
0.4nM

图 18

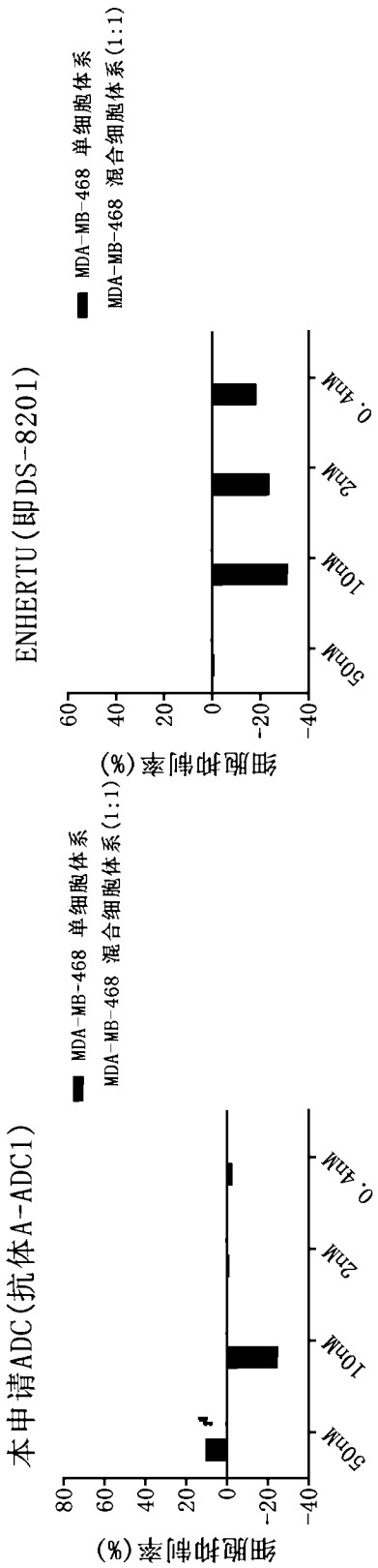

ENHERTU(即DS-8201)
MDA-MB-468 单细胞体系
MDA-MB-468 混合细胞体系(1:1)
细胞抑制率(%)
60
40
20
0
-20
-40
50nM
10nM
2nM
0.4nM
本申请ADC(抗体A-ADC1)
MDA-MB-468 单细胞体系
MDA-MB-468 混合细胞体系(1:1)
细胞抑制率(%)
80
60
40
20
0
-20
-40
50nM
10nM
2nM
0.4nM

图 19

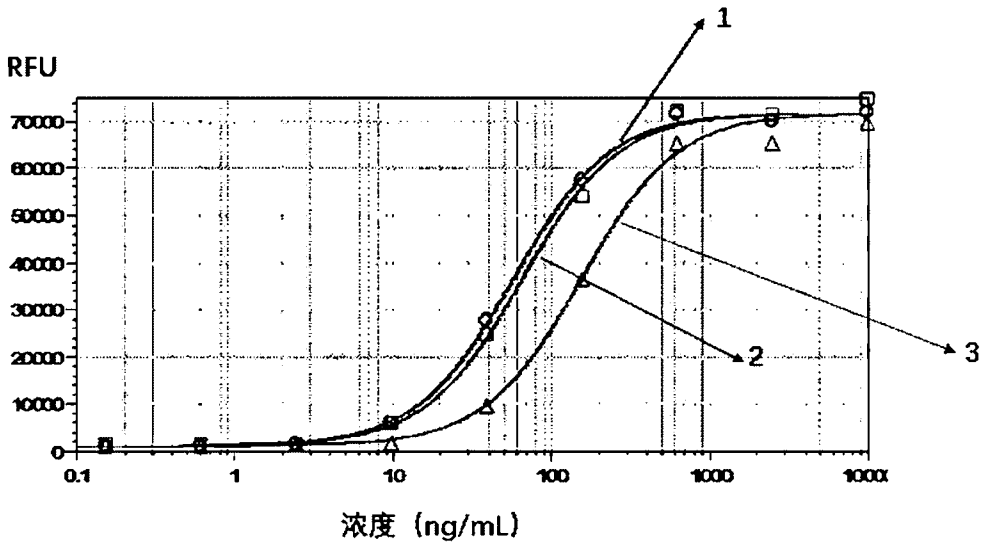


图 20

实验体系-PBMC

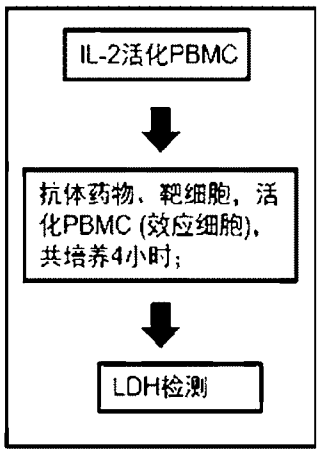


图 21

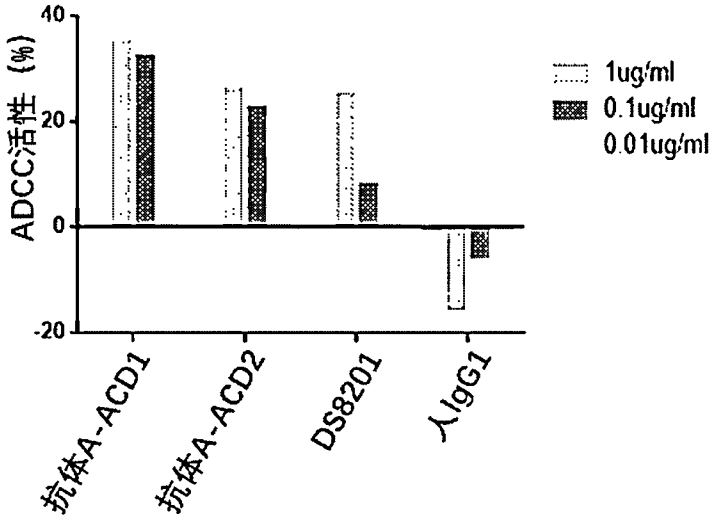

40
20
0
-20
ADCC活性（%）
1ug/ml
0.1ug/ml
0.01ug/ml
抗体A-ACD1
抗体A-ACD2
DS8201
人IgG1

图 22

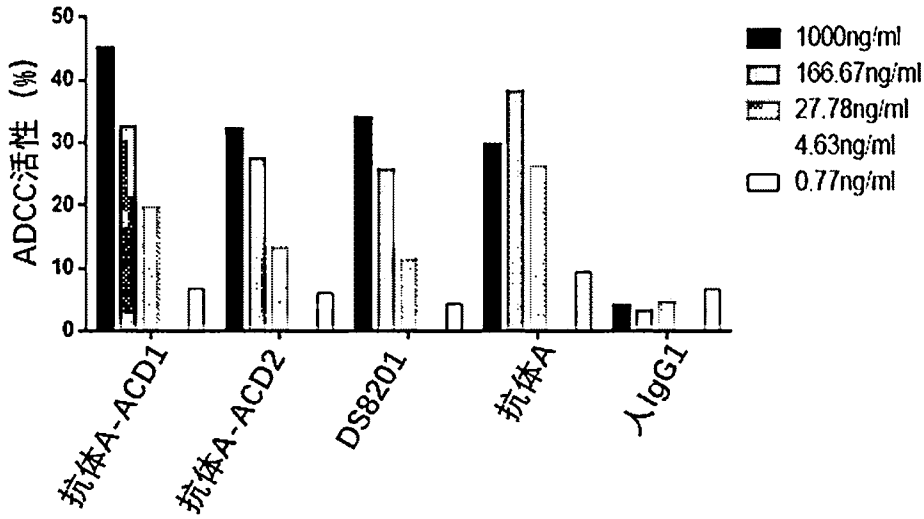

50
40
30
20
10
0
ADCC活性（%）
1000ng/ml
166.67ng/ml
27.78ng/ml
4.63ng/ml
0.77ng/ml
抗体A-ACD1
抗体A-ACD2
DS8201
抗体A
人IgG1

图 23

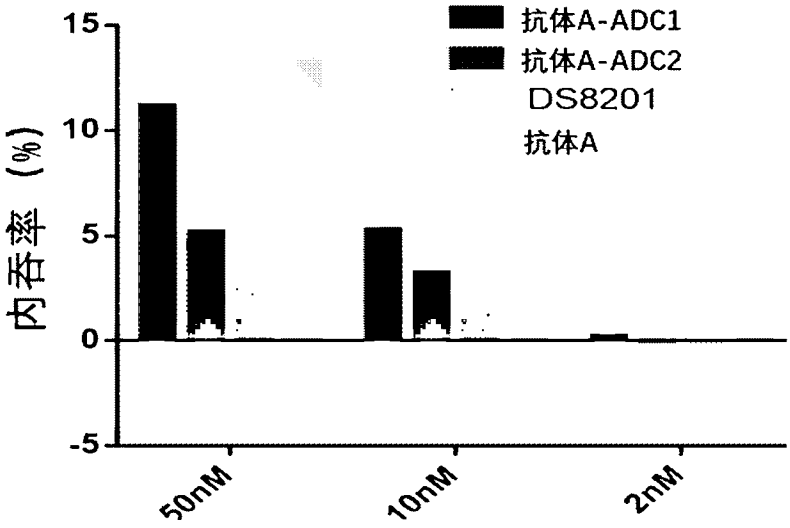

15
10
5
0
-5
内吞率（%）
抗体A-ADC1
抗体A-ADC2
DS8201
抗体A
50nM
10nM
2nM

图 24

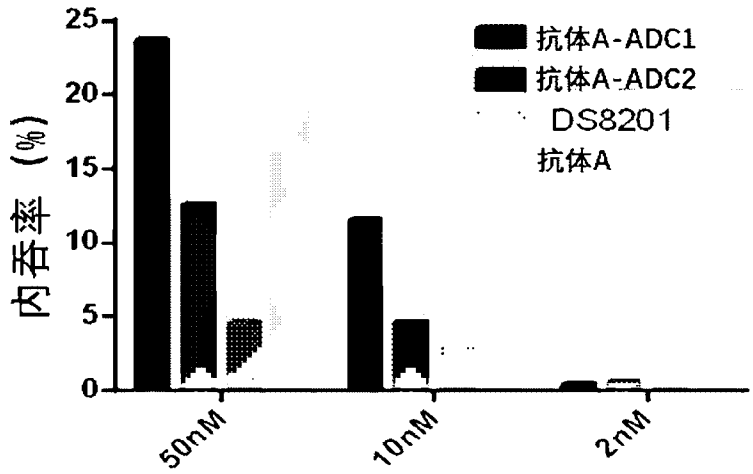

25
20
15
10
5
0
内吞率（%）
抗体A-ADC1
抗体A-ADC2
DS8201
抗体A
50nM
10nM
2nM

图 25

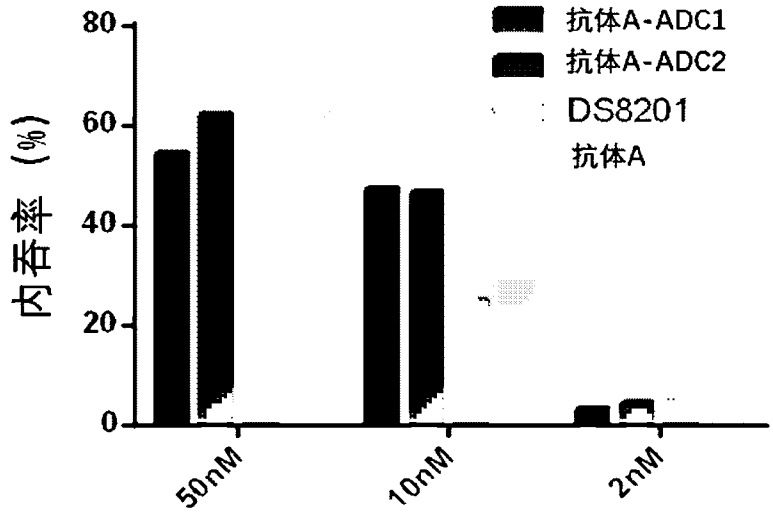

80
60
40
20
0
内吞率（%）
抗体A-ADC1
抗体A-ADC2
DS8201
抗体A
50nM
10nM
2nM

图 26

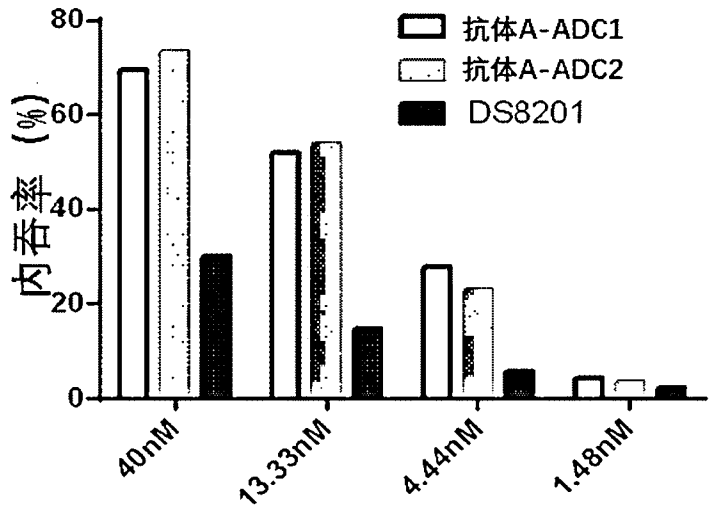

80
60
40
20
0
内吞率（%）
抗体A-ADC1
抗体A-ADC2
DS8201
40nM
13.33nM
4.44nM
1.48nM

图 27

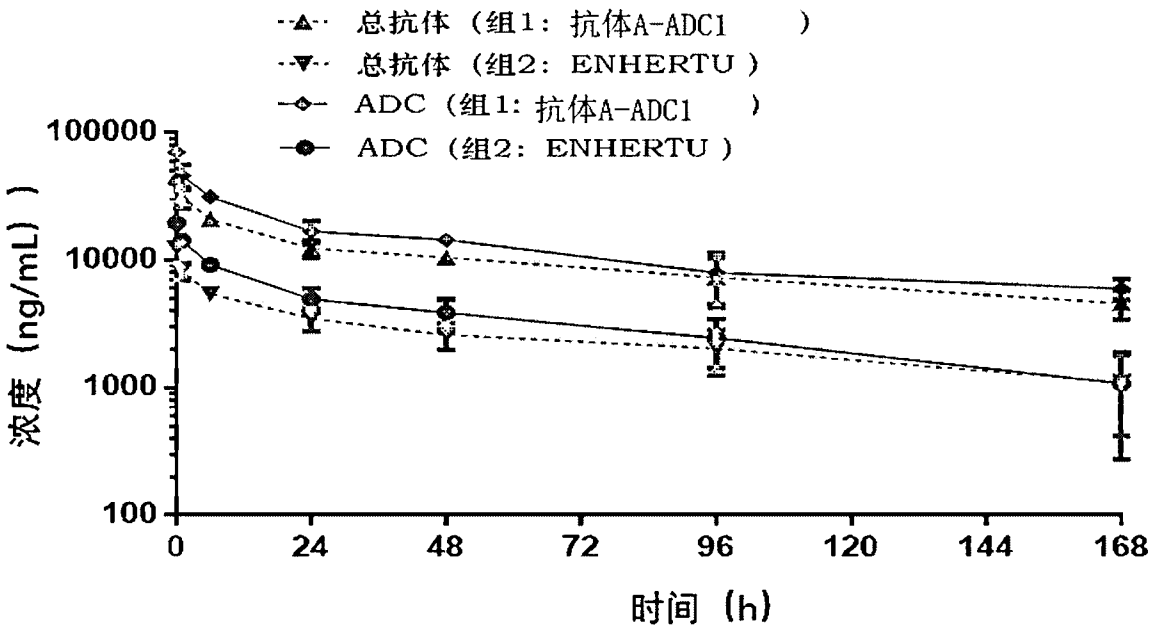

总抗体（组1：抗体A-ADC1 ）
总抗体（组2：ENHERTU ）
ADC（组1：抗体A-ADC1 ）
ADC（组2：ENHERTU ）
浓度（ng/mL））
100000
10000
1000
100
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）

图 28

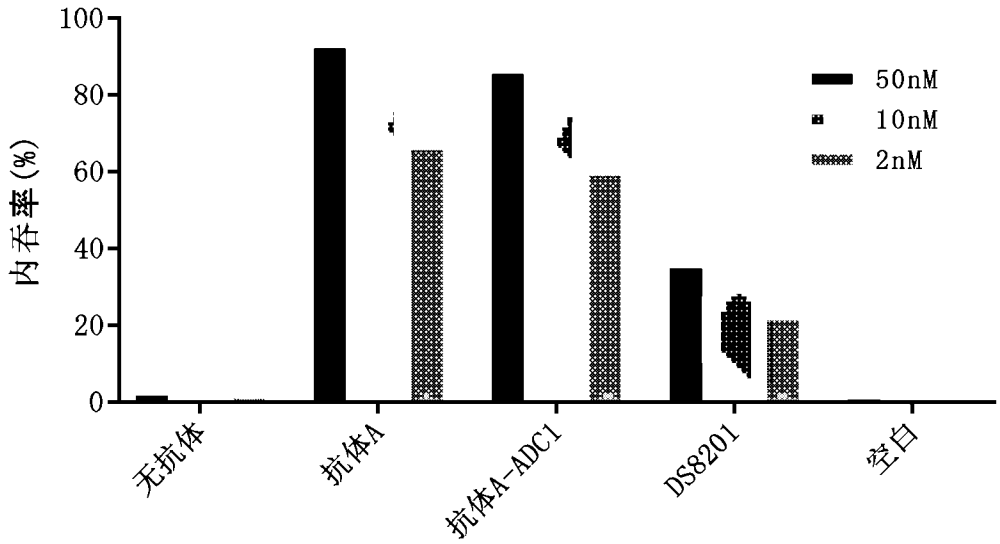

内吞率（%）
100
80
60
40
20
0
50nM
10nM
2nM
无抗体
抗体A
抗体A-ADC1
DS8201
空白

图 29

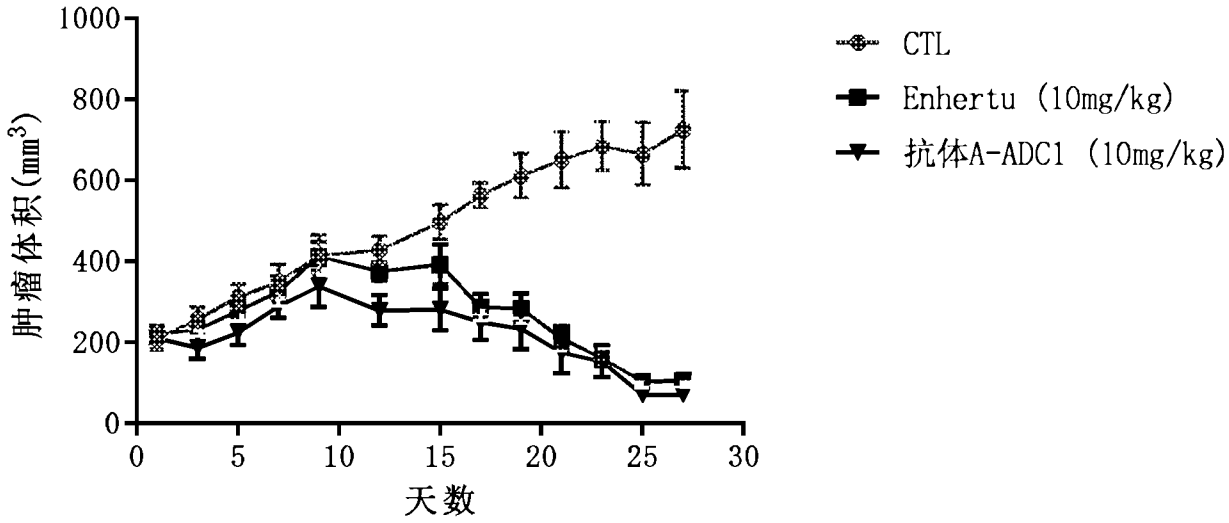

1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积(mm3)
0
5
10
15
20
25
30
天数
CTL
Enhertu (10mg/kg)
抗体A-ADC1 (10mg/kg)

图 30

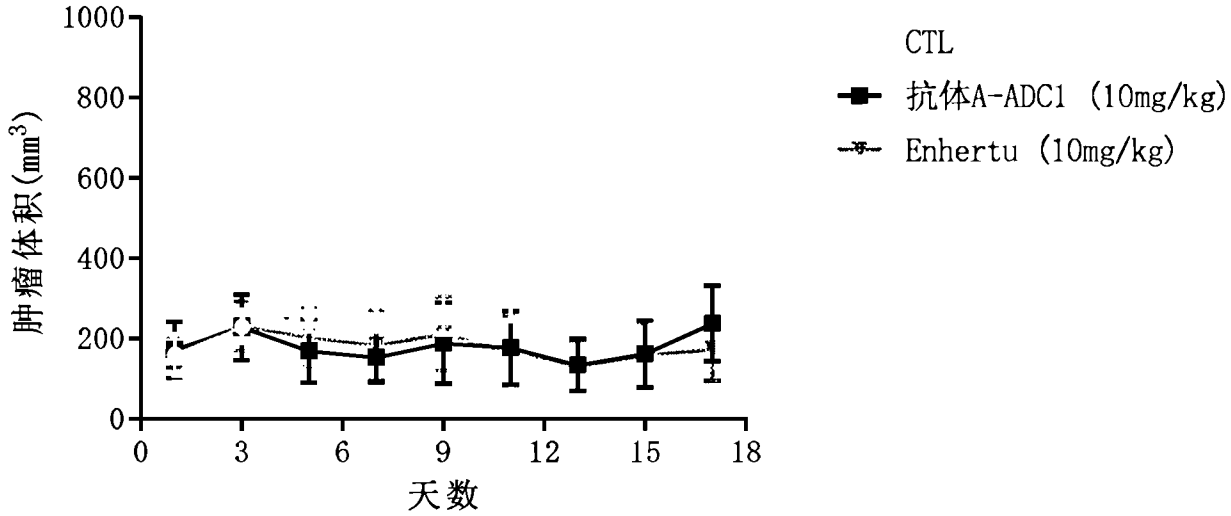

1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积(mm3)
0
3
6
9
12
15
18
天数
CTL
抗体A-ADC1 (10mg/kg)
Enhertu (10mg/kg)

图 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/103592

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/46(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, ENTXT, ENTXTC, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, CNKI, 万方数据资源系统, WANFANG DATA RESOURCE SYSTEM, PubMed, ISI Web of Knowledge, GenBank, EBI-EMBL: 申请人/发明人, HER2, 抗体药物偶联物, ADC, 双特异性, bispecific, biparatopic ADC, BsADC, 胞外结构域II, 胞外结构域IV, ECDII, ECDIV, 帕妥珠, pertuzumab, perjeta, 曲妥珠, trastuzumab, 赫赛汀, DXd, 连接子, linker, 肿瘤, tumor, 癌症, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2021209007 A1 (SHENZHEN ENDURING BIOTECH, LTD.) 21 October 2021 (2021-10-21) description embodiments 2-3 and13-19	1-67
PX	WO 2021174113 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 02 September 2021 (2021-09-02) claims 1-90, and description, embodiments 1-20	1-67
X	CN 105980409 A (ZYMEWORKS INC.) 28 September 2016 (2016-09-28) claims 1-77, and description paragraphs 0215-0236, and embodiments 2, 15-22, 29-33, and 36	1-67
X	CN 105829347 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 03 August 2016 (2016-08-03) claims 1-22, and description paragraphs 0417-0423	1-67
X	CN 106232139 A (MEDIMMUNE, L.L.C.) 14 December 2016 (2016-12-14) claims 1-25	1-67

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 September 2022	**29 September 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 111518213 A (SUZHOU KANGJU BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 11 August 2020 (2020-08-11) claims 1-17, and description paragraphs 0026-0027	1-67
X	LI, J. Y. et al. "A Biparatopic HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate Induces Tumor Regression in Primary Models Refractory to or Ineligible for HER2-Targeted Therapy" *Cancer Cell,* Vol. 29, 11 January 2016 (2016-01-11), pp. 117-129	1-67
X	HAMBLETT, K. J. et al. "Abstract 3914: ZW49, a HER2-targeted biparatopic antibody-drug conjugate for the treatment of HER2-expressing cancers" *Cancer Research,* Vol. 78, No. 18_Supplement, 01 July 2018 (2018-07-01), article number 3914	1-67
X	HAMBLETT, K. J. et al. "Abstract P6-17-13: ZW49, a HER2 targeted biparatopic antibody drug conjugate for the treatment of HER2 expressing cancers" *Cancer Research,* Vol. 79, No. 4_Supplement, 15 February 2019 (2019-02-15), article number P6-17-13	1-67
X	PEGRAM, M. D. et al. "First-in-Human, Phase 1 Dose-Escalation Study of Biparatopic Anti-HER2 Antibody–Drug Conjugate MEDI4276 in Patients with HER2-positive Advanced Breast or Gastric Cancer" *Molecular Cancer Therapeutics,* Vol. 20, 27 May 2021 (2021-05-27), pp. 1442-1453	1-67
X	HAMBLETT, K. J. et al. "HER2-Targeted ADCs: At the Forefront of ADC Technology Development" *Innovations for Next-Generation Antibody-Drug Conjugates,* 31 December 2018 (2018-12-31), pp. 163-185	1-67
X	PERNAS, S. et al. "HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance" *Therapeutic Advances in Medical Oncology,* Vol. 11, 31 December 2019 (2019-12-31), pp. 1-16	1-67
X	PEGRAM, M. et al. "Phase 1 study of bispecific HER2 antibody-drug conjugate MEDI4276 in patients with advanced HER2-positive breast or gastric cancer" *Annals of Oncology,* Vol. 29, No. Supplement 3, 31 March 2018 (2018-03-31), page iii8	1-67
A	WO 2021110107 A1 (JIANGSU ALPHAMAB BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.) 10 June 2021 (2021-06-10) entire document	1-67
A	CN 105820251 A (SUZHOU ALPHAMAB CO., LTD.) 03 August 2016 (2016-08-03) entire document	1-67
A	CN 107446045 A (BEIJING MABWORKS BIOTECH CO., LTD.) 08 December 2017 (2017-12-08) entire document	1-67

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/103592

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/103592

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **64-65**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 64 relates to a method for regulating a tumor microenvironment of a subject, and claim 65 relates to a method for regulating an immunoreaction of a subject, which substantially are methods for treatment of diseases; and claims 64 and 65 do not comply with PCT Rule 39.1(iv). The present report was formed on the basis that claims 64 and 65 are amended to relate to a use of the antibody-drug conjugate according to any one of claims 1-47 or the pharmaceutical composition according to claim 63 in the preparation of a drug for regulating a tumor microenvironment of a subject or regulating an immunoreaction of a subject.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/103592

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021209007	A1	21 October 2021	CN	114502200	A	13 May 2022
WO	2021174113	A1	02 September 2021	US	2022112306	A1	14 April 2022
CN	105980409	A	28 September 2016	BR	112016012157	A2	22 May 2018
				WO	2015077891	A1	04 June 2015
				US	2021403598	A1	30 December 2021
				MX	2016006572	A	09 December 2016
				EP	3074424	A1	05 October 2016
				AU	2014357292	A1	23 June 2016
				US	2018282429	A1	04 October 2018
				JP	2019205432	A	05 December 2019
				KR	20160091961	A	03 August 2016
				US	10000576	B1	19 June 2018
				RU	2016125551	A	09 January 2018
				US	2016289335	A1	06 October 2016
				CA	2931356	A1	04 June 2015
				JP	2017503480	A	02 February 2017
				AU	2020239643	A1	15 October 2020
				JP	2021072788	A	13 May 2021
CN	105829347	A	03 August 2016	BR	112016010706	A2	05 December 2017
				CA	2925677	A1	25 June 2015
				RU	2016129517	A	25 January 2018
				KR	20160099087	A	19 August 2016
				JP	2019141066	A	29 August 2019
				JP	2017501706	A	19 January 2017
				EP	3083696	A1	26 October 2016
				MX	2016008098	A	11 January 2017
				WO	2015091738	A1	25 June 2015
				EP	3327038	A2	30 May 2018
				CN	112062853	A	11 December 2020
				US	2020291131	A1	17 September 2020
				US	2017029529	A1	02 February 2017
				HK	1223115	A1	21 July 2017
CN	106232139	A	14 December 2016	WO	2015157592	A1	15 October 2015
				CL	2016002547	A1	23 June 2017
				TW	201542594	A	16 November 2015
				HK	1232127	A1	05 January 2018
				ES	2819863	T3	19 April 2021
				MX	2016012830	A	05 January 2017
				KR	20160143808	A	14 December 2016
				CA	2943299	A1	15 October 2015
				IL	247478	D0	30 November 2016
				BR	112016022910	A2	17 October 2017
				AU	2015243377	A1	15 September 2016
				RU	2016144176	A	14 May 2018
				EP	3129055	A1	15 February 2017
				JP	2017512765	A	25 May 2017
				US	2017291955	A1	12 October 2017
				SG	11201608192 S	A	28 October 2016
CN	111518213	A	11 August 2020	WO	2020156555	A1	06 August 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/103592

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				JP	2022527652	A	02 June 2022
				US	2022143178	A1	12 May 2022
				CN	113631580	A	09 November 2021
				EP	3988574	A1	27 April 2022
WO	2021110107	A1	10 June 2021	CN	114269781	A	01 April 2022
CN	105820251	A	03 August 2016	ES	2811267	T3	11 March 2021
				CN	114276458	A	05 April 2022
				US	2021070885	A1	11 March 2021
				JP	2018504113	A	15 February 2018
				WO	2016110267	A1	14 July 2016
				CN	110655582	A	07 January 2020
				US	2019031782	A1	31 January 2019
				CN	110658340	A	07 January 2020
				DK	3243840	T3	24 August 2020
				EP	3243840	A1	15 November 2017
				CN	107108747	A	29 August 2017
CN	107446045	A	08 December 2017	EP	3487888	A1	29 May 2019
				CA	3031330	A1	25 January 2018
				AU	2017298251	A1	14 February 2019
				JP	2019528779	A	17 October 2019
				CN	109715671	A	03 May 2019
				US	9745382	B1	29 August 2017
				WO	2018014864	A1	25 January 2018

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/103592

A. 主题的分类

C07K 16/46(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS,SIPOABS,DWPI,CNTXT,WOTXT,EPTXT,USTXT,ENTXT,ENTXTC,中国专利生物序列检索系统,CNKI,万方数据资源系统,PubMed,ISI Web of Knowledge，GenBank，EBI-EMBL：申请人/发明人，HER2，抗体药物偶联物，ADC，双特异性，bispecific，biparatopic ADC，BsADC，胞外结构域II，胞外结构域IV，ECDII，ECDIV，帕妥珠，pertuzumab，perjeta，曲妥珠，trastuzumab，赫赛汀，DXd，连接子，linker，肿瘤，tumor，癌症，cancer

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	WO 2021209007 A1 (SHENZHEN ENDURING BIOTECH, LTD.) 2021年10月21日 (2021-10-21) 说明书实施例2-3、13-19	1-67
PX	WO 2021174113 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2021年9月2日 (2021-09-02) 权利要求1-90，说明书实施例1-20	1-67
X	CN 105980409 A (酵活有限公司) 2016年9月28日 (2016-09-28) 权利要求1-77，说明书第0215-0236段，实施例2、15-22、29-33、36	1-67
X	CN 105829347 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2016年8月3日 (2016-08-03) 权利要求1-22，说明书第0417-0423段	1-67
X	CN 106232139 A (免疫医疗有限责任公司) 2016年12月14日 (2016-12-14) 权利要求1-25	1-67
X	CN 111518213 A (苏州康聚生物科技有限公司) 2020年8月11日 (2020-08-11) 权利要求1-17，说明书第0026-0027段	1-67

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年9月19日	2022年9月29日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 杨佳倩 电话号码 86-(10)-53961939

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	LI, J.Y.等. "A Biparatopic HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate Induces Tumor Regression in Primary Models Refractory to or Ineligible for HER2-Targeted Therapy" Cancer Cell, 第29卷, 2016年1月11日 (2016-01-11), 第117-129页	1-67
X	HAMBLETT, K. J.等. "Abstract 3914: ZW49, a HER2-targeted biparatopic antibody-drug conjugate for the treatment of HER2-expressing cancers" Cancer Res., 第78卷, 第18_Supplement期, 2018年7月1日 (2018-07-01), 文章编号3914	1-67
X	HAMBLETT, K.J.等. "Abstract P6-17-13: ZW49, a HER2 targeted biparatopic antibody drug conjugate for the treatment of HER2 expressing cancers" Cancer Res., 第79卷, 第4_Supplement期, 2019年2月15日 (2019-02-15), 文章编号P6-17-13	1-67
X	PEGRAM, M.D.等. "First-in-Human, Phase 1 Dose-Escalation Study of Biparatopic Anti-HER2 Antibody-Drug Conjugate MEDI4276 in Patients with HER2-positive Advanced Breast or Gastric Cancer" Mol. Cancer Ther., 第20卷, 2021年5月27日 (2021-05-27), 第1442-1453页	1-67
X	HAMBLETT, K.J.等. "HER2-Targeted ADCs: At the Forefront of ADC Technology Development" Innovations for Next-Generation Antibody-Drug Conjugates, 2018年12月31日 (2018-12-31), 第163-185页	1-67
X	PERNAS, S.等. "HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance" Therapeutic Advances in Medical Oncology, 第11卷, 2019年12月31日 (2019-12-31), 第1-16页	1-67
X	PEGRAM, M.等. "Phase 1 study of bispecific HER2 antibody-drug conjugate MEDI4276 in patients with advanced HER2-positive breast or gastric cancer" Annals of Oncology, 第29卷, 第Supplement 3期, 2018年3月31日 (2018-03-31), 第iii8页	1-67
A	WO 2021110107 A1 (JIANGSU ALPHAMAB BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.) 2021年6月10日 (2021-06-10) 全文	1-67
A	CN 105820251 A (苏州康宁杰瑞生物科技有限公司) 2016年8月3日 (2016-08-03) 全文	1-67
A	CN 107446045 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2017年12月8日 (2017-12-08) 全文	1-67

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/103592

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/103592

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 64-65
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求64涉及调节受试者的肿瘤微环境的方法，权利要求65涉及调节受试者的免疫反应的方法，实质上属于疾病的治疗方法，不符合PCT第39.1（iv）的规定，本报告基于权利要求64、65修改为如权利要求1-47任一项所述的抗体药物偶联物、或权利要求63所述的药物组合物在制备调节受试者肿瘤微环境、或调节受试者免疫反应的药物中的用途而作出。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/103592

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2021209007	A1	2021年10月21日	CN	114502200	A	2022年5月13日
WO	2021174113	A1	2021年9月2日	US	2022112306	A1	2022年4月14日
CN	105980409	A	2016年9月28日	BR	112016012157	A2	2018年5月22日
				WO	2015077891	A1	2015年6月4日
				US	2021403598	A1	2021年12月30日
				MX	2016006572	A	2016年12月9日
				EP	3074424	A1	2016年10月5日
				AU	2014357292	A1	2016年6月23日
				US	2018282429	A1	2018年10月4日
				JP	2019205432	A	2019年12月5日
				KR	20160091961	A	2016年8月3日
				US	10000576	B1	2018年6月19日
				RU	2016125551	A	2018年1月9日
				US	2016289335	A1	2016年10月6日
				CA	2931356	A1	2015年6月4日
				JP	2017503480	A	2017年2月2日
				AU	2020239643	A1	2020年10月15日
				JP	2021072788	A	2021年5月13日
CN	105829347	A	2016年8月3日	BR	112016010706	A2	2017年12月5日
				CA	2925677	A1	2015年6月25日
				RU	2016129517	A	2018年1月25日
				KR	20160099087	A	2016年8月19日
				JP	2019141066	A	2019年8月29日
				JP	2017501706	A	2017年1月19日
				EP	3083696	A1	2016年10月26日
				MX	2016008098	A	2017年1月11日
				WO	2015091738	A1	2015年6月25日
				EP	3327038	A2	2018年5月30日
				CN	112062853	A	2020年12月11日
				US	2020291131	A1	2020年9月17日
				US	2017029529	A1	2017年2月2日
				HK	1223115	A1	2017年7月21日
CN	106232139	A	2016年12月14日	WO	2015157592	A1	2015年10月15日
				CL	2016002547	A1	2017年6月23日
				TW	201542594	A	2015年11月16日
				HK	1232127	A1	2018年1月5日
				ES	2819863	T3	2021年4月19日
				MX	2016012830	A	2017年1月5日
				KR	20160143808	A	2016年12月14日
				CA	2943299	A1	2015年10月15日
				IL	247478	D0	2016年11月30日
				BR	112016022910	A2	2017年10月17日
				AU	2015243377	A1	2016年9月15日
				RU	2016144176	A	2018年5月14日
				EP	3129055	A1	2017年2月15日
				JP	2017512765	A	2017年5月25日
				US	2017291955	A1	2017年10月12日
				SG	11201608192S	A	2016年10月28日
CN	111518213	A	2020年8月11日	WO	2020156555	A1	2020年8月6日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/103592

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				JP	2022527652	A	2022年6月2日
				US	2022143178	A1	2022年5月12日
				CN	113631580	A	2021年11月9日
				EP	3988574	A1	2022年4月27日
WO	2021110107	A1	2021年6月10日	CN	114269781	A	2022年4月1日
CN	105820251	A	2016年8月3日	ES	2811267	T3	2021年3月11日
				CN	114276458	A	2022年4月5日
				US	2021070885	A1	2021年3月11日
				JP	2018504113	A	2018年2月15日
				WO	2016110267	A1	2016年7月14日
				CN	110655582	A	2020年1月7日
				US	2019031782	A1	2019年1月31日
				CN	110658340	A	2020年1月7日
				DK	3243840	T3	2020年8月24日
				EP	3243840	A1	2017年11月15日
				CN	107108747	A	2017年8月29日
CN	107446045	A	2017年12月8日	EP	3487888	A1	2019年5月29日
				CA	3031330	A1	2018年1月25日
				AU	2017298251	A1	2019年2月14日
				JP	2019528779	A	2019年10月17日
				CN	109715671	A	2019年5月3日
				US	9745382	B1	2017年8月29日
				WO	2018014864	A1	2018年1月25日