(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 12 月 14 日 (14.12.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/236949 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 47/65 (2017.01) *A61K 31/4745* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/098596

(22) 国际申请日: 2023 年 6 月 6 日 (06.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210638941.2 2022年6月7日 (07.06.2022) CN
202310391084.5 2023年4月12日 (12.04.2023) CN

(71) 申请人: 映恩生物制药（苏州）有限公司 (**DUALITY BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区樱花路868号1106室, Shanghai 201204 (CN)。

(72) 发明人: 朱忠远 (**ZHU, Zhongyuan**); 中国上海市浦东新区樱花路868号1106室, Shanghai 201204 (CN)。钟琛 (**ZHONG, Chen**); 中国上海市浦东新区樱花路868号1106室, Shanghai 201204 (CN)。张禹 (**ZHANG, Yu**); 中国上海市浦东新区樱花路868号1106室, Shanghai 201204 (CN)。李成刚 (**LI, Chenggang**); 中国上海市浦东新区樱花路868号1106室, Shanghai 201204 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所 (**ZHONGZI LAW OFFICE**); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (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, CV, 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, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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 2023/236949 A1

(54) **Title:** ANTI-B7H4 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗B7H3抗体-药物偶联物及其用途

(57) **Abstract:** Provided are an antibody-drug conjugate specifically binding to B7H3 and a pharmaceutical composition comprising same. Further provided are a method for using the antibody-drug conjugate and use thereof.

(57) 摘要: 提供了与B7H3特异性结合的抗体-药物偶联物和包含其的药物组合物，还提供了使用抗体-药物偶联物的方法和用途。

抗 B7H3 抗体-药物偶联物及其用途

技术领域

本发明提供了与 B7H3 特异性结合的抗体-药物偶联物和包含其的组合物。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

B7H3，也称为 CD276、B7RP-2 和 B7-H3，是 B7 家族成员，与其他 B7 家族成员有 20%-27%的氨基酸序列同源性。虽然 B7H3 转录物广泛表达，但在正常组织和免疫细胞上的表达有限且维持在低水平，并且在多种人类恶性肿瘤中过度表达，包括黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌等。据报道，B7-H3 在细胞膜、细胞质中表达，或者在癌细胞核内，也在肿瘤相关血管系统上表达。B7H3 在 T 细胞和 NK 细胞上没有组成性表达，但在部分 APCs 如 DCs 上有组成性低表达，且 GM-CSF、IFNγ 等可诱导其在 APCs 上表达。

B7-H3 是一个很有希望的抗癌靶点。尽管 B7-H3 的确切功能尚不清楚，但其不同的免疫功能已被证明，包括刺激、抑制 T 细胞增殖和抑制 NK 细胞功能。认为免疫细胞上存在不同的受体，这些受体可能与肿瘤上的 B7H3 竞争结合。除了其免疫检查点功能外，据报道，B7H3 的高表达水平与癌症预后较差相关，并增强细胞增殖、迁移、侵袭、血管生成、转移能力和抗癌耐药性。

与其他 B7 家族分子一样，B7H3 是一种 1 型跨膜糖蛋白，其胞外域包含 IgV-IgC 结构域。与小鼠 B7H3 基因只有一个 IgV-IgC 结构域不同，人类 B7H3 有两个亚型，一个亚型包含一个 IgV-IgC 结构域拷贝（命名为 2IgB7H3），另一个亚型包含两个 IgV-IgC 结构域（命名为 4IgB7H3），这是基因复制和差异剪接的结果。4IgB7H3 而非 2IgB7H3 是免疫细胞和恶性细胞上表达的主要亚型，这表明 4IgB7H3 可能在肿瘤发展和肿瘤免疫中发挥独特的重要作用。

由于 B7H3 在许多肿瘤细胞上过度表达，目前正在开发针对 B7H3 的治疗分子来治疗相关适应症。然而，新型抗 B7H3 抗体，或抗体-药物偶联物的开发仍有改进空间和临床需求。

发明内容

本申请提供了一种抗 B7H3 的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，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）与人 B7H3 亲和力更好；（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。

一方面，本申请提供一种抗体-药物偶联物，其包含：靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段，接头单元和细胞毒性药物；所述靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 HCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的 HCDR2、氨基酸序列如 SEQ

ID NO:3 所示的 HCDR3、氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 或 7 所示的 LCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 LCDR2 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR3。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述抗体或其抗原结合片段包含：

(I) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示的轻链可变区；或氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示的轻链可变区； 或

(II)与 SEQ ID NO:8 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链可变区，和与 SEQ ID NO:9 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链可变区；或与 SEQ ID NO:10 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链可变区，和与 SEQ ID NO:11 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链可变区；或

(III) 与 SEQ ID NO:8 或 10 相比，其框架区具有一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个)氨基酸的添加、缺失和/或替换的重链可变区，和与 SEQ ID NO:9 或 11 相比，其框架区具有一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个)氨基酸的添加、缺失和/或替换的轻链可变区。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述抗体选自：人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方式中，本发明的抗体-药物偶联物中的所述抗体为单克隆抗体。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述抗体为全长抗体或抗体的抗原结合片段，所述抗原结合片段例如选自：Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、ScFv、Fab'-SH、sdAb、VHH、双抗体和线性抗体。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述抗体包含免疫球蛋白恒定区，所述免疫球蛋白恒定区是人 IgG 恒定区，例如人 IgG1 恒定区。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，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。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述抗体或其抗原结合片段包含：

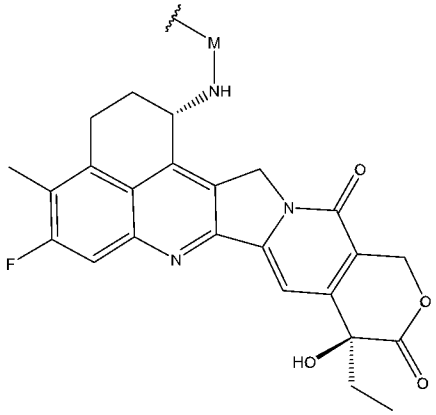
(I) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示的轻链；或氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示的轻链；或

(II) 与 SEQ ID NO:12 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链，和与 SEQ ID NO:13 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链；或与 SEQ ID NO:14 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链，和与 SEQ ID NO:15 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链。

在一些实施方式中，本发明所述抗体为抗 B7H3 抗体 WBP301088。

在本发明的某些优选实施方案中，本发明的抗体-药物偶联物中的所述如式(A-1)、(A-2) 、(A-1a)和(A-1b)所示的化合物或其药学上可接受的盐中的某些基团如下定义，未提及的基团同本申请任一方案所述（简称“在一些实施方式中”）。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述细胞毒性药物包含或选自以下结构：式(A-1)所示结构、其互变异构体、对映异构体、非对映异构体、或异构体的混合物，或其药学上可用的盐或其溶剂化物，



(A-1)

其中，

M 为-L^2-L^1-C(O)-；

L^2 为-O-或-S-；

L^1 为-$(C(R^{1a})(R^{1b}))_m$-CH_2-、C_3-C_6 饱和的环烷基或 3-6 元饱和的杂环基，所述 C_3-C_6 饱和的环烷基和 3-6 元饱和的杂环基各自独立地任选被一个或多个 R^{2a} 取代；

m 选自 1、2、3 或 4；所述的 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；

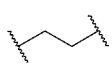
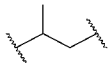
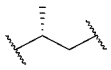
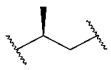
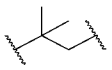
R^{1a} 各自独立地选自氢、卤素、羟基、氨基和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任选被一个或多个 R 取代；

R^{1b} 和 R^{2a} 各自独立地选自氢、卤素、羟基、氨基和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任选被一个或多个 R 取代；

R 各自独立地为氢或卤素。

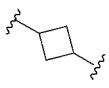
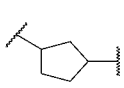
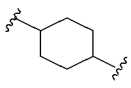
在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述 L^1 为-$(C(R^{1a})(R^{1b}))_m$-CH_2-；R^{1a} 选自：氢、卤素和 C_1-C_6 烷基；R^{1b} 选自：氢、卤素和 C_1-C_6 烷基。在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中 L^1 为-$(C(R^{1a})(R^{1b}))_m$-CH_2-；R^{1a} 为氢或-CH_3；R^{1b} 选自：氢和-CH_3；例如 R^{1a} 为-CH_3；R^{1b} 选自：氢和-CH_3。

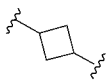
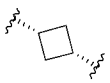
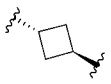
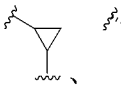
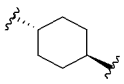
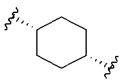
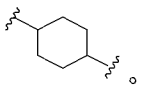
在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中 L^1 为-$(C(R^{1a})(R^{1b}))_m$-CH_2-；m 为 1 或 2。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中 L^1 选自：、、、和。

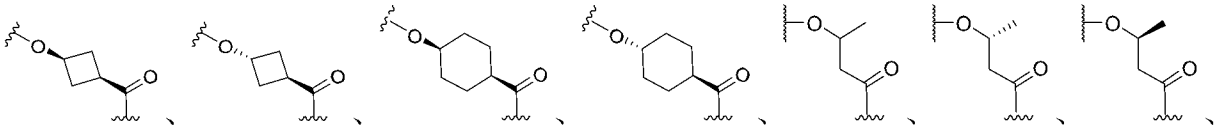
在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中 L^1 为 C_3-C_6 饱和的环烷基或 3-6 元饱和的杂环基，所述 C_3-C_6 饱和的环烷基和 3-6 元饱和的杂环基各自独立地任选被一个或多个 R^{2a} 取代，R^{2a} 各自独立地选自：氢、卤素和 C_1-C_6 烷基。

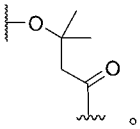
在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中 L^1 为任选被一个或多个 R^{2a} 取代的 C_3-C_6 饱和的环烷基；R^{2a} 各自独立地选自：氢、卤素和 C_1-C_6 烷基。在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中 L^1 为 C_3-C_6 饱和的环烷基。

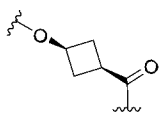
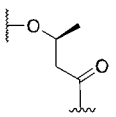
在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中 L^1 为任选被 1、2 或 3 个 R^{2a} 取代的：、、和；R^{2a} 各自独立地选自：氢、卤素和 C_1-C_6 烷基。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中 L^1 选自：、、、、、和。

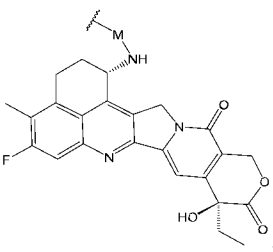
在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述-M-选自：

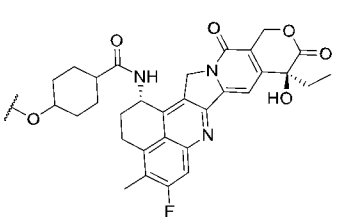
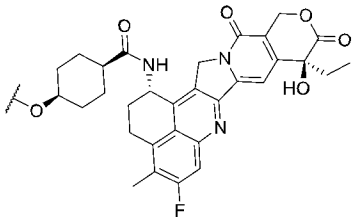
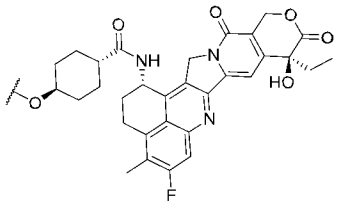
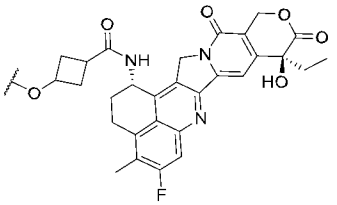
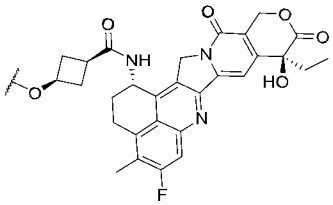
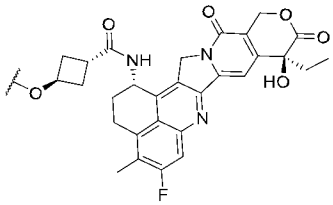
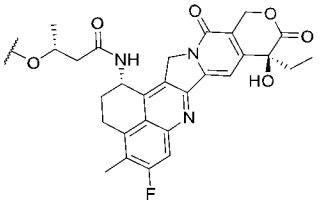
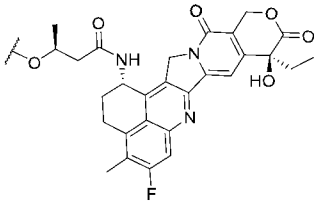
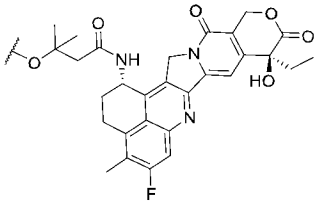
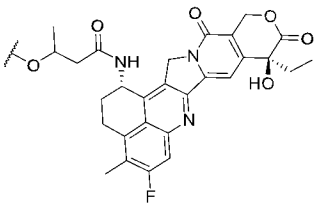


。

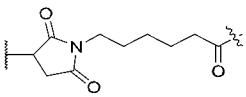
在一些实施方式中，本发明提供了抗 B7H3 抗体药物偶联物、其异构体、其药学上可接受的盐或其混合物,其中所述-M-为：或。

在一些实施方案中，本发明提供了抗 B7H3 抗体药物偶联物，其中细胞毒性药物

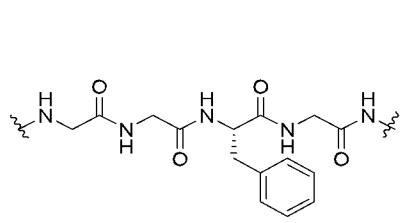
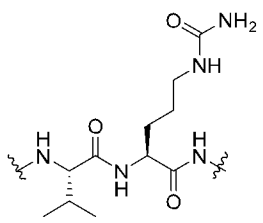
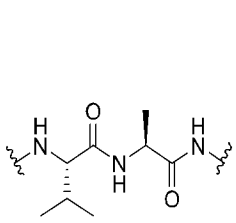
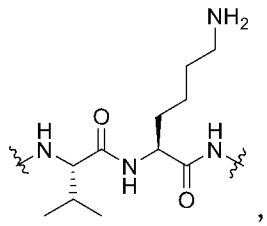
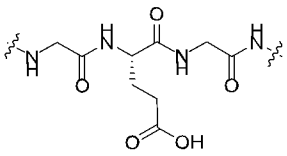
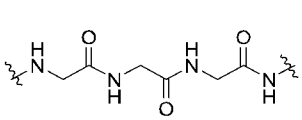
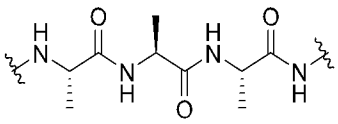
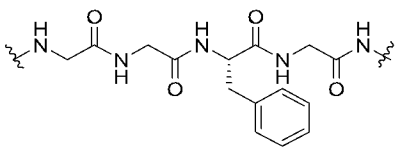
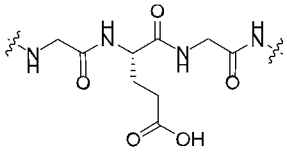
选自以下任一结构：

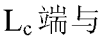
、、、
、、、
、、和
。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述接头单元 L 为-L_a-L_b-L_c-，且

-L_a-为或；

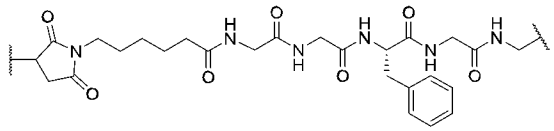
-L_b-选自：

，，，，
，，和；优选为
或；

-L_c-为。

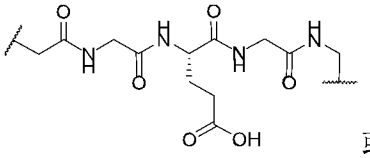
在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述的接头单元 L，其 L_a 端与 Ab 相连，L_c 端与接头单元 M 相连。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述接头单元 L 为

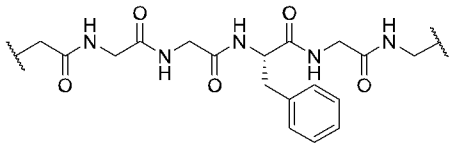


。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述接头单元 L 为

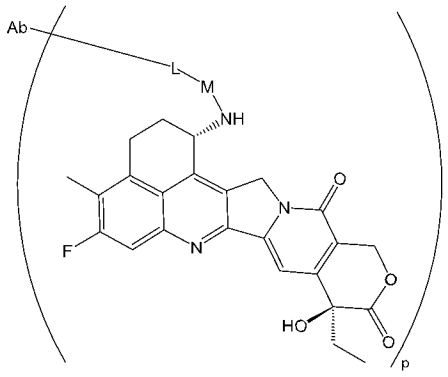


或



。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述抗体-药物偶联物结构如式（A-2）所示：



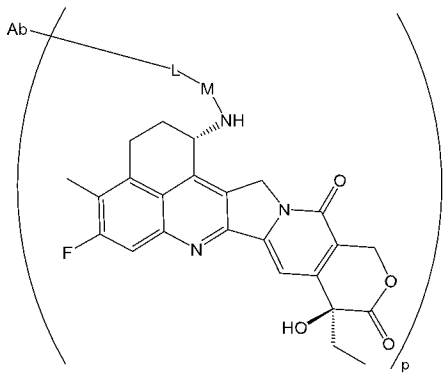
（A-2）

其中，

p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数；

Ab、M、L 同本申请任一方案所述。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述抗体-药物偶联物结构如式（A-2）所示：



（A-2）

其中，

p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数；

Ab 为靶向 B7H3 的抗体或所述抗体的抗原结合片段，其包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 HCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的 HCDR2、氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所

示的 HCDR3、氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 LCDR2 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR3；

M 为-L^2-L^1-C(O)-；

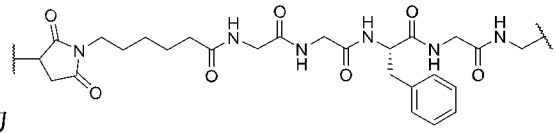
L^2 为-O-或-S-；优选为-O-；

L^1 为-$(C(R^{1a})(R^{1b}))_m$-CH_2-；

m 选自 1、2、3 或 4；优选为 1 或 2；

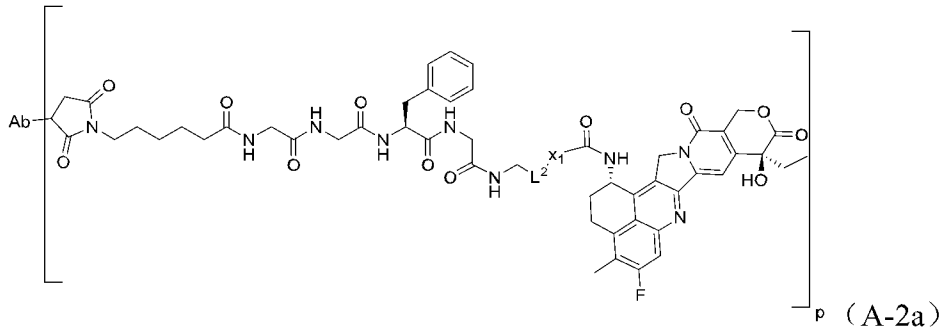
R^{1a} 或 R^{1b} 各自独立可以为氢、卤素或被 1、2 或 3 个 R 任选取代的 C_1-C_6 烷基；

R 各自独立地可以为氢或卤素；

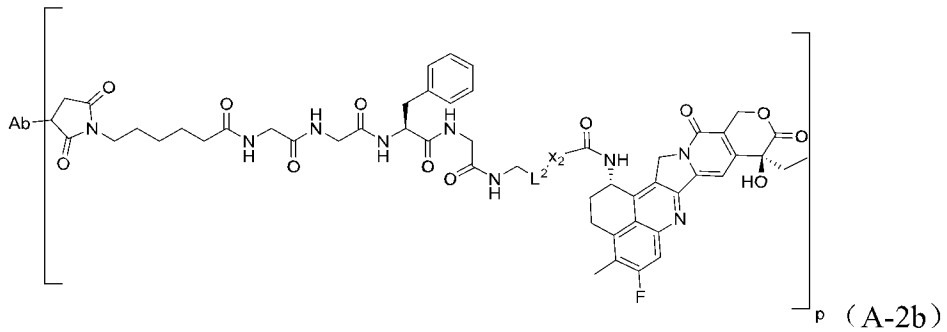
L 为  。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中 p 为 2-8 的整数或小数；例如 p 为 4-8 的整数或小数，例如 p 为 4-6 或 6-8 的整数或小数。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述抗体-药物偶联物结构如式（A-2a）或式（A-2b）所示：



（A-2a）



（A-2b），

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 2-8 的整数或小数，例如 p 为 4-8 的整数或小数，例如 p 为 4-6 或 6-8 的整数或小数；

Ab 为靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段，其包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 HCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的 HCDR2、氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR3、氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 LCDR2 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR3；

L^2 为-O-或-S-；优选为-O-；

X_1 选自任选被 1、2 或 3 个 R^{2a} 取代的 C_3-C_6 饱和的环烷基；

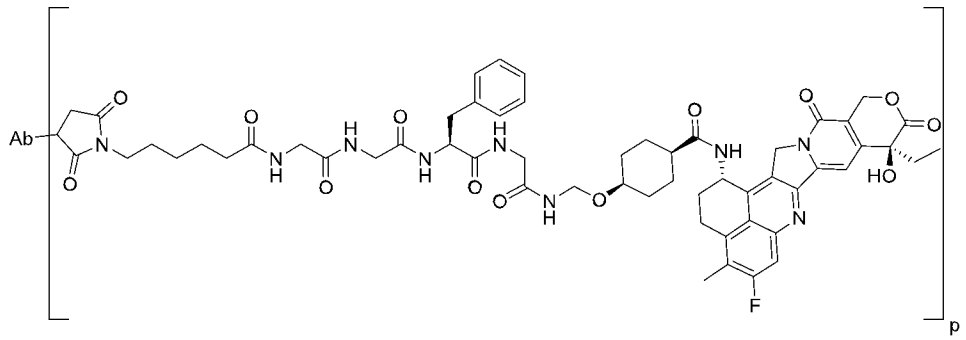
X_2 选自-$(C(R^{1a})(R^{1b}))_m$-CH_2-；

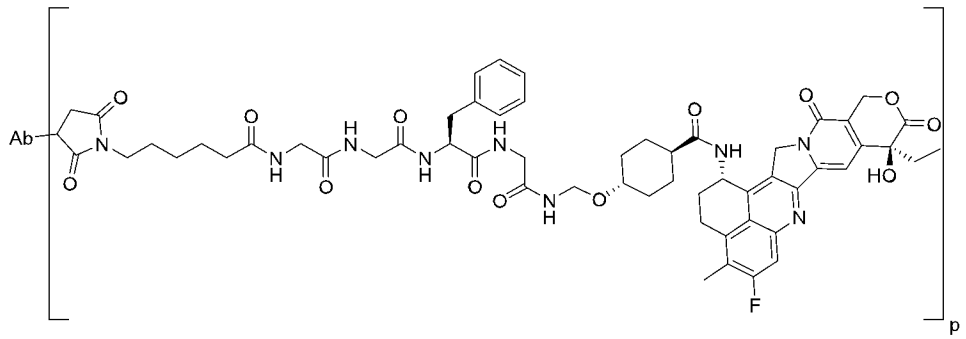
m 选自 1、2、3 或 4；优选为 1 或 2；

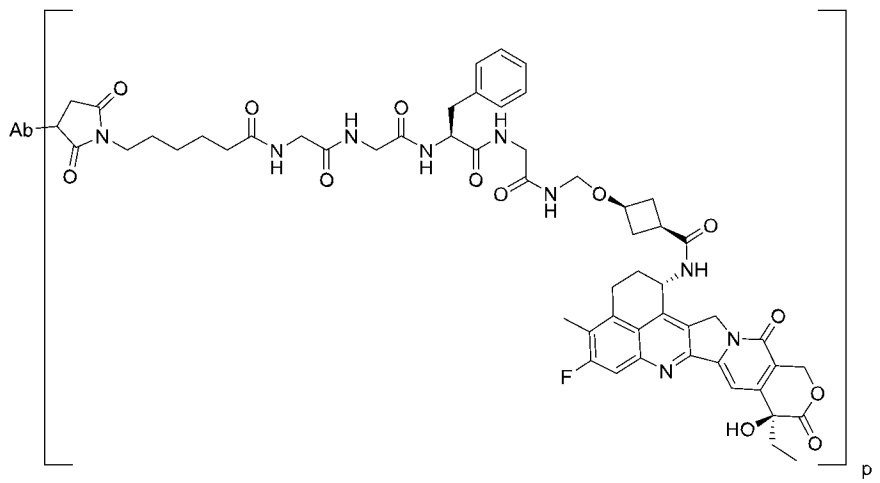
R^{1a}、R^{1b} 或 R^{2a} 各自独立可以为氢、卤素或被 1、2 或 3 个 R 任选取代的 C_1-C_6 烷基；

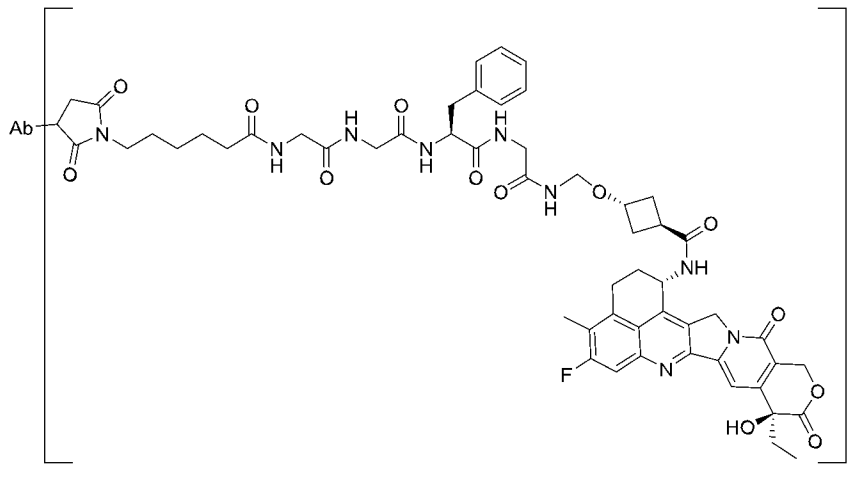
R 各自独立地可以为氢或卤素。

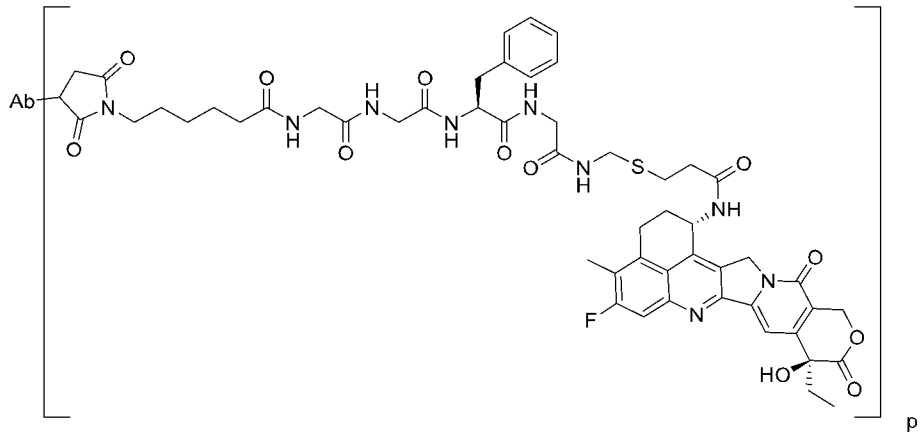
在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物，其中所述抗体-药物偶联物选自以下结构式：

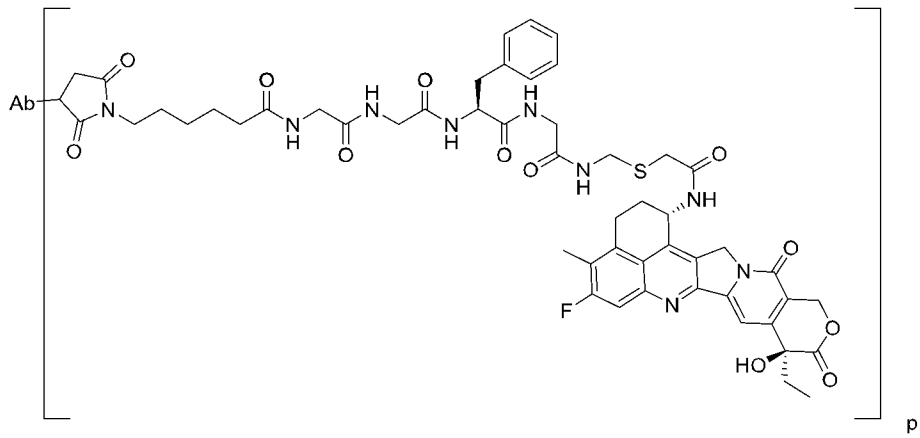


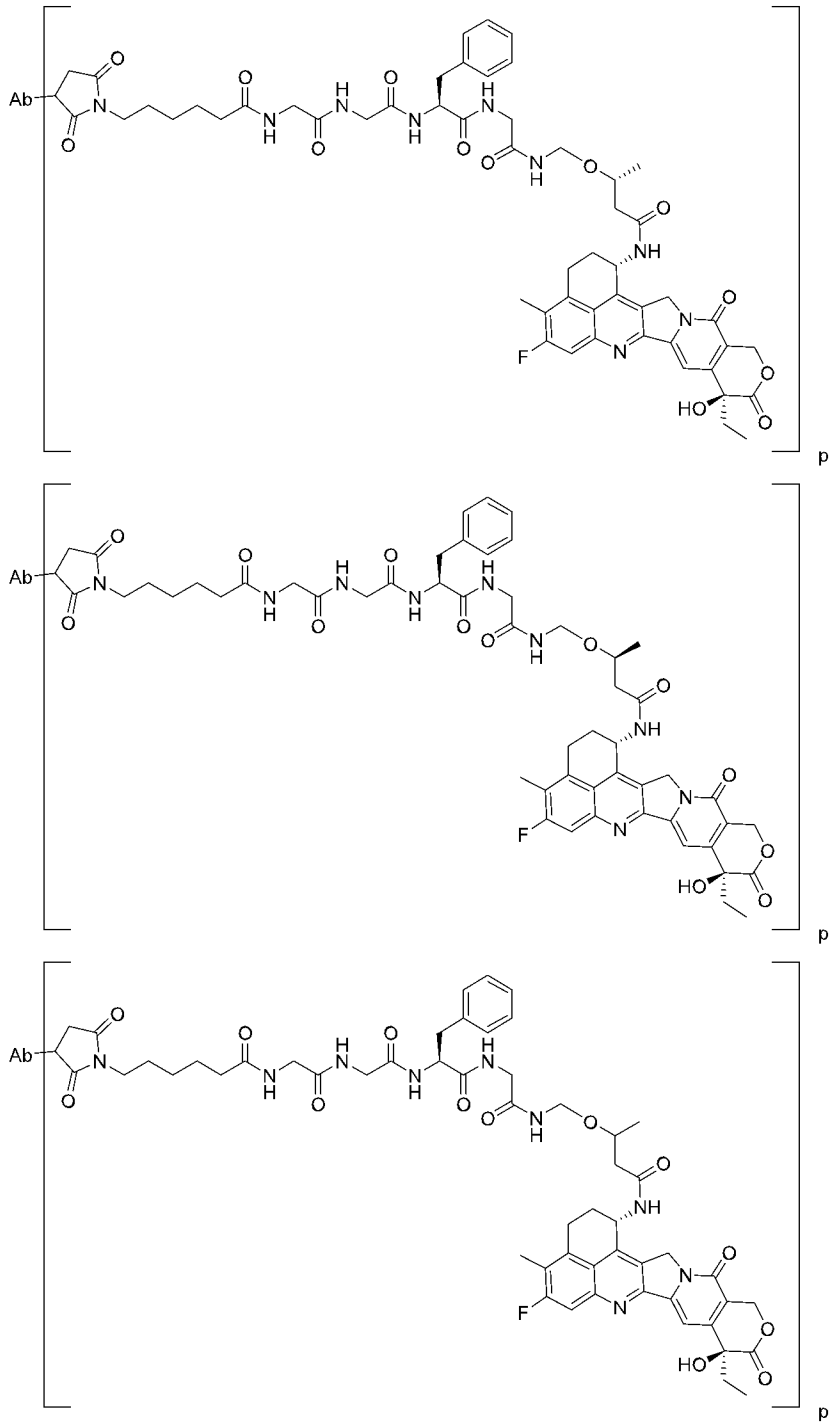


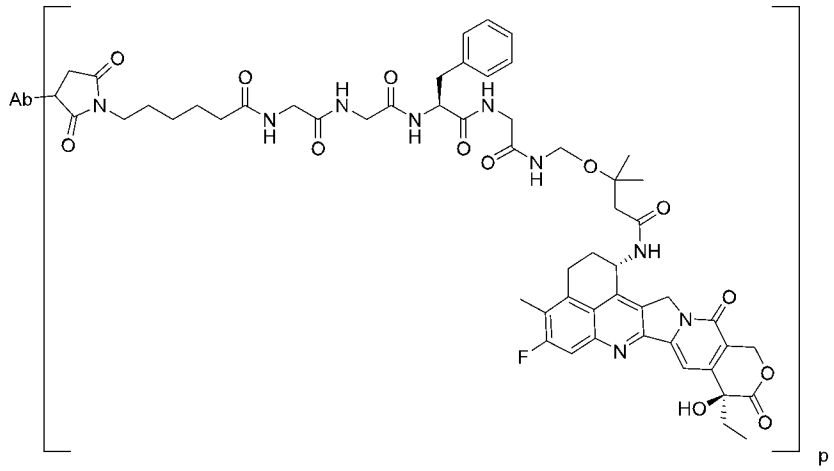








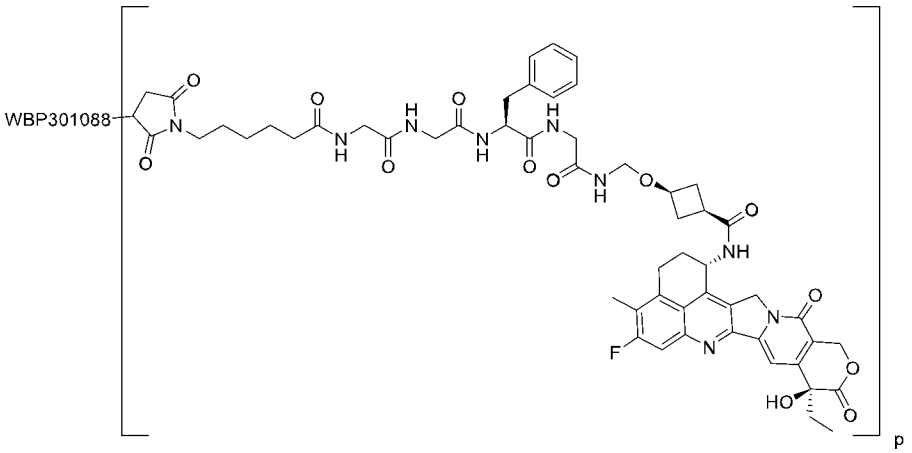


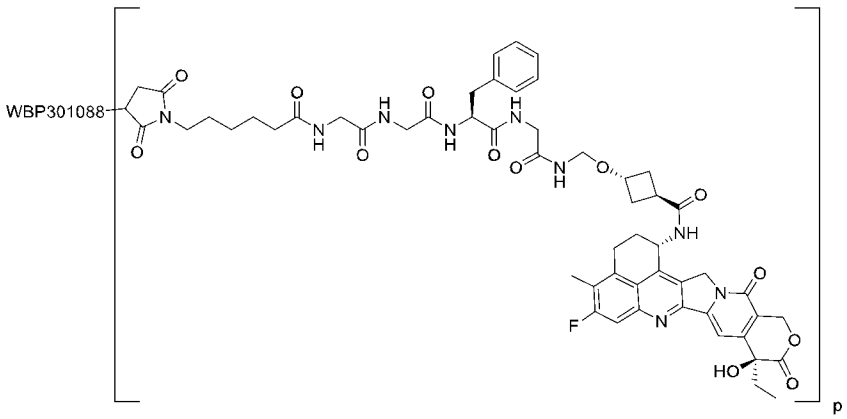


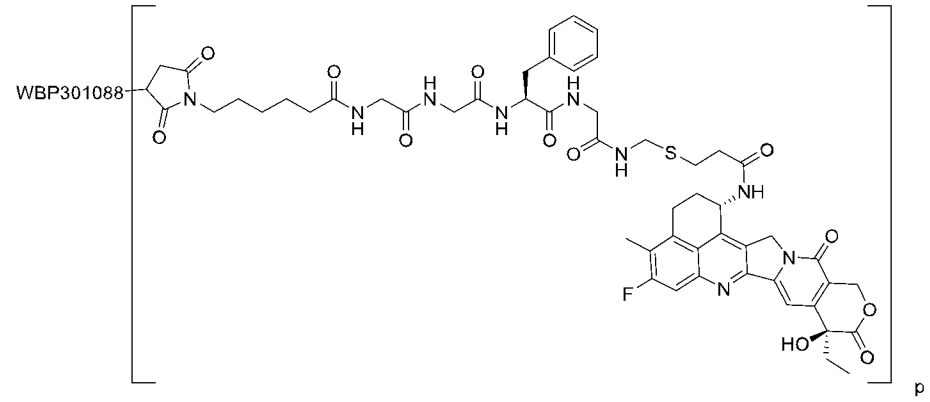
其中，

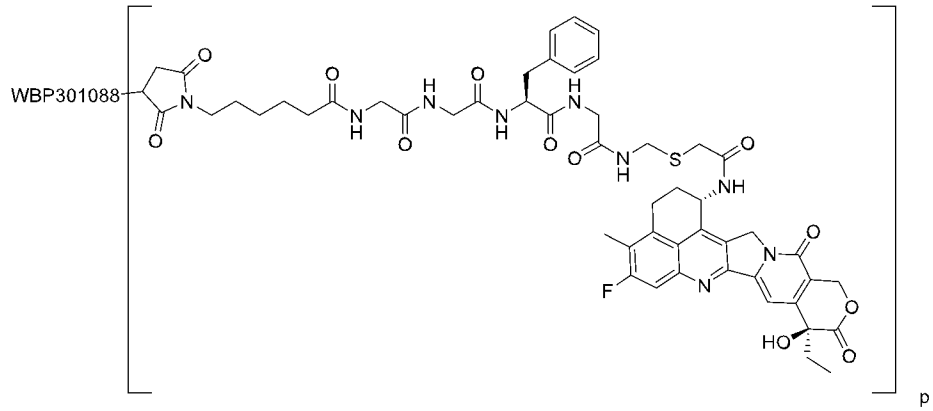
p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 2-8 的整数或小数，例如 p 为 4-8 的整数或小数，例如 p 为 4-6 或 6-8 的整数或小数；Ab 同本申请任一方案所述。

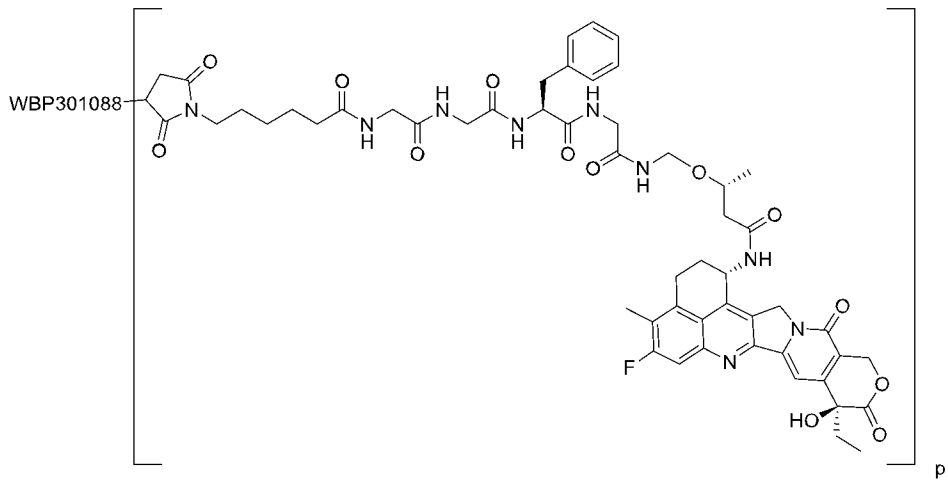
在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗体-药物偶联物选自：

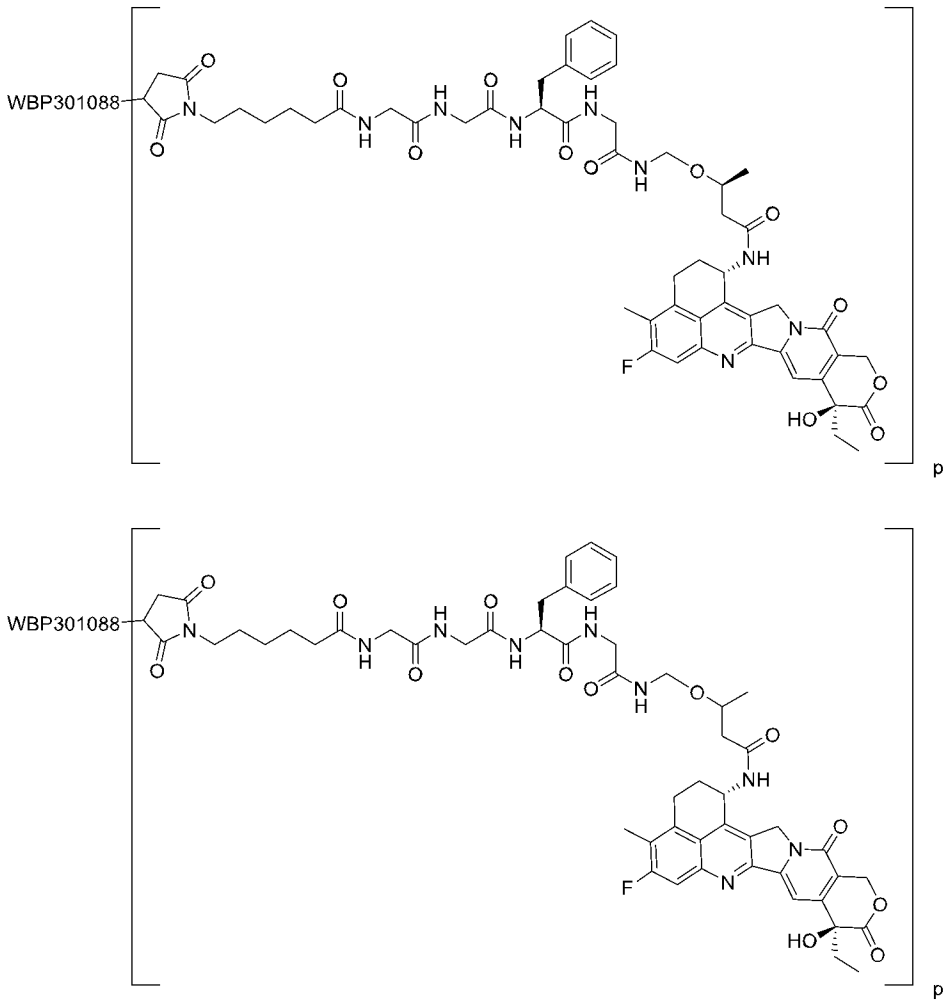





WBP301088
p


WBP301088
p

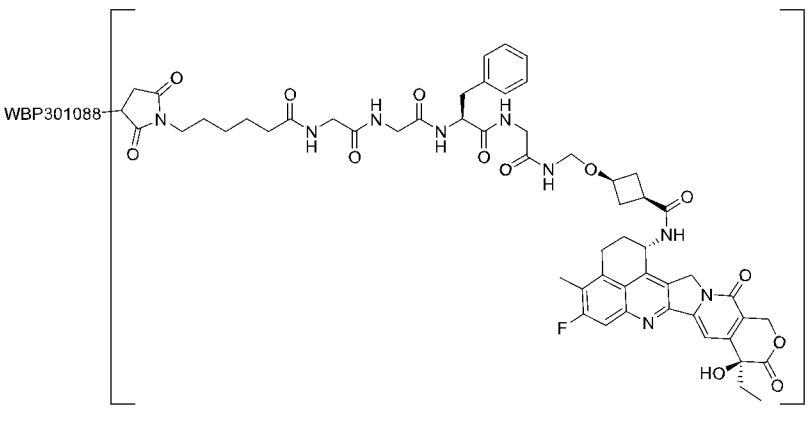

WBP301088
p



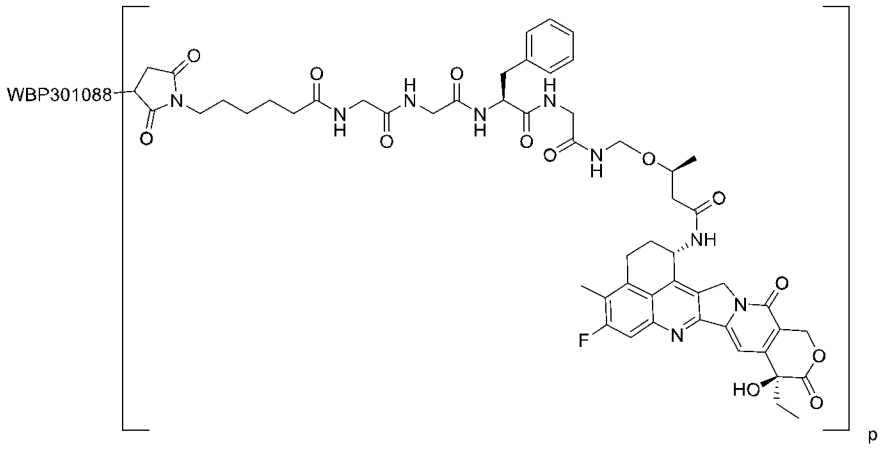
其中，

p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 2-8 的整数或小数，例如 p 为 4-8 的整数或小数，例如 p 为 4-6 或 6-8 的整数或小数，例如 p 为 7.45、5.68 或 4.02；WBP301088 为抗 B7H3 抗体，其包含如 SEQ ID NO:12 所示的重链和如 SEQ ID NO:13 所示的轻链。

在一些实施方式中，本发明提供了抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，其中所述抗体-药物偶联物选自：



或



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 2-8 的整数或小数，例如 p 为 4-8 的整数或小数，例如 p 为 4-6 或 6-8 的整数或小数，例如 p 为 7.45、5.68 或 4.02；

WBP301088 为抗 B7H3 抗体，其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示，和轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示。在一些实施方式中，本发明的抗体-药物偶联物中的所述平均连接数 p 可以为 2 到 8 的整数或小数。例如，所述平均连接数 p 可以为 3 到 8 的整数或小数。例如，所述平均连接数 p 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体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，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的抗体-药物偶联物、其药学上可接受的盐或如本文所述的药物组合物在制备用于治疗和/或预防 B7H3 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。优选地，所述疾病或病症为 B7H3 阳性表达的疾病或病症。

在又一个方面，本发明提供了一种治疗和/或预防 B7H3 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、其药学上可接受的盐或如本文所述的药物组合物，优选地，所述疾病或病症为癌症。优选地，所述疾病或病症为 B7H3 阳性表达的疾病或病症。

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药物组合物，其用于治疗和/或预防 B7H3 介导的疾病或病症，优选地，所述疾病或病症为癌症。优选地，所述疾病或病症为 B7H3 阳性表达的疾病或病症。

在一些实施方式中，本发明所述癌症选自乳腺癌、神经肿瘤、黑色素瘤、肺癌、头颈癌、结直肠癌、胰腺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、食管癌、肾细胞癌、子宫内膜癌、皮肤癌、睾丸癌，甲状腺癌、尿路上皮癌、淋巴瘤（如非霍奇金淋巴瘤）、慢性淋巴细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

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：W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 的 SDS-PAGE 结果。M：PageRuler™未染色蛋白梯；泳道 1：W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320，非还原性；泳道 2：W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320，还原性；凝胶信息：NuPAGE，Novex 4-12% Bis-Tris 凝胶。

图 2：W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 的 SEC-HPLC 结果。

图 3：W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 的 DSF 曲线。

图 4：W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 的 HIC-HPLC 曲线。

图 5：W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 的 DLS-k_D 曲线。

图 6：抗体 W301088-1.145.16-xIgG1KV320 和抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 对表达人 B7H3 的细胞 MCF-7 的 FACS 结合结果。使用抗 B7H3 抗体依诺妥珠单抗（Enoblituzumab）作为阳性对照；使用 hIgG1 同种型作为阴性对照。

图 7：抗体 W301088-1.145.16-xIgG1KV320 和抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 对食蟹猴 B7H3 转染的细胞的 FACS 结合结果。使用抗 B7H3 抗体依诺妥珠单抗（Enoblituzumab）作为阳性对照；使用 hIgG1 同种型作为阴性对照。

图 8A－图 8C：抗体 W301088-1.145.16-xIgG1KV320（图 8A）、抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320（图 8B）和 MacroGenics 的依诺妥珠单抗（图 8C）与人 4IgB7H3 的结合。

图 9A－图 9C：抗体 W301088-1.145.16-xIgG1KV320（图 9A）、抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320（图 9B）和 MacroGenics 的依诺妥珠单抗（图 9C）与人 2IgB7H3 的结合。

图 10A－图 10C：抗体 W301088-1.145.16-xIgG1KV320（图 10A）、W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320（图 10B）和 MacroGenics 的依诺妥珠单抗（图 10C）与食蟹猴 B7H3 的结合。

图 11：表达人 B7H3 的细胞 MCF-7 在结合抗体后对抗体 W301088-1.145.16-xIgG1KV320 和抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 的内化。使用抗 B7H3 抗体依诺妥珠单抗（Enoblituzumab）作为阳性对照；使用 hIgG1 同种型作为阴性对照。

图 12A-图 12B：抗体 W301088-1.145.16-xIgG1KV320 和抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 之间的 VH 区和 VL 区的氨基酸序列比对。图中带框的氨基酸段是 VH 区和 VL 区中的各 CDR 区。

图 13：ELISA 检测抗体-药物偶联物及其未偶联抗体对人 B7H3 抗原的结合活性。图中“WBP301088”表示未偶联抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320。

图 14：ELISA 检测抗体-药物偶联物及其未偶联抗体对各 B7 家族蛋白的结合。图中“WBP301088”表示未偶联抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320。

图 15：抗体-药物偶联物对 Calu-6 荷瘤小鼠的药效评价。

图 16：抗体-药物偶联物对 A375 荷瘤小鼠的药效评价。

图 17：抗体-药物偶联物对 U87 荷瘤小鼠的药效评价。

图 18：抗体-药物偶联物对 PC-3 荷瘤小鼠的药效评价。

图 19A 和图 19B：抗体-药物偶联物对前列腺癌人源肿瘤异种移植模型的药效评价。

图 20A 和图 20B：抗体-药物偶联物对前列腺癌微小人源肿瘤异种移植模型药效评价。

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

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，本领域技术人员具体可参考 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel F.等人编著，John Wiley & Sons, New York, 2000)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准三字母和/或单字母代码。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“抗体”或“Ab”在本文中以其最广义使用，包括各种抗体结构，包括多克隆抗体、单特异性和多特异性抗体（例如双特异性抗体）。天然完整抗体通常是Y形四聚体蛋白质，其包含通过共价二硫键和非共价相互作用结合在一起的两条重链（H）和两条轻链（L）多肽链。抗体的轻链可分类成κ轻链和λ轻链。重链可分类成μ、δ、γ、α和ε，它们分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链中，可变区经由大约12个或更多个氨基酸的“J”区与恒定区连接，并且重链还包含大约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。重链恒定区通常由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。VH和VL区可进一步分成高变区（称为互补决定区（CDR）），它们之间由相对保守的区域（称为框架区（FR））隔开。每个VH和VL从N末端至C末端由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4的3个CDR和4

个FR组成。每个重链/轻链对的可变区（VH和VL）分别形成抗原结合位点。框架区和CDR的范围可以使用本领域已知的方法来精确鉴定，例如通过Kabat定义、Dr. Martin网站的定义、Chothia定义、AbM定义、EU定义和Contact定义，所有这些方法都是本领域熟知的。参见例如，Kabat, E.A.等人（1991年）《*Sequences of Proteins of Immunological Interest*》，第五版，U.S. Department of Health and Human Services，NIH公告号91-3242；Martin A，“Antibody bioinformatics website of Dr. Andrew Martin's lab at UCL”，最后更新于2018年7月31日；Chothia等人（1989年），Nature，第342卷：第877页；Chothia, C.等人（1987年），J. Mol.Biol.，第196卷：第901-917页；Al-lazikani等人（1997年），J. Molec.Biol.，第273卷：第927-948页；Edelman等人，Proc Natl Acad Sci U S A，1969年五月，第63卷第1期：第78-85页；以及Almagro，J. Mol.Recognit.，第17卷：第132-143页（2004年）。还可参见hgmp.mrc.ac.uk and bioinf.org.uk/abs。根据不同定义的编号之间的对应或比对例如可见于http://www.imgt.org/（也参见Giudicelli V等人，“IMGT, the international ImMunoGeneTics database”，Nucleic Acids Res.，（1997年）第25卷：第206-211页；Lefranc MP等人，“Unique database numbering system for immunogenetic analysis”，Immunol Today（1997年），第18卷：第509页；以及Lefranc MP等人，“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains”，Dev Comp Immunol.（2003年），第27卷：第55-77页）。抗体可以是不同的抗体同种型，例如IgG（例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型）、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM抗体。

术语“B7H3”，也称为 CD276 抗原，是指一种 I 型跨膜蛋白，属于 B7 家族，具有由单个 IgV-IgC 结构域组成的胞外结构域。B7 家族蛋白含有胞外 IgV 样和 IgC 样结构域，并具有短胞质尾。B7H3 是一种免疫检查点分子，在多种癌症中异常过表达。B7H3 蛋白的氨基酸序列包括全长 B7H3 蛋白（如人 4IgB7H3 蛋白或人 2IgB7H3 蛋白），或 B7H3 的胞外结构域（B7H3 ECD）或含有 B7H3 ECD 的片段；B7H3-ECD 融合蛋白。B7H3 蛋白质的示例性序列见 Uniprot ID：Q5ZPR3（人 4IgB7H3）、Genebank 登录号 NP_001019907（人）、NP_001316557（人）、NP_001316558（人）、NP_079516（人）和 NP_598744（小鼠）。食蟹猴 B7H3 与人和小鼠 B7H3 的氨基酸序列同源性分别约为 97%和 88%。

术语“结合 B7H3 的抗体”或“抗 B7H3 抗体”包括其特异性识别 B7H3 蛋白的抗体和抗原结合片段，以及其特异性结合 B7H3 蛋白的抗体和抗原结合片段。这里使用的“抗 B7H3 抗体”包括具有单一特异性的单价抗体，以及包含结合 B7H3 的第一抗原结合位点和结合第二抗原的第二抗原结合位点的双特异性抗体。

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”，是指天然存在的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（在本文中缩写为 CL)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 CDR 之间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（Clq))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方案中的任何方案来确定，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)，International ImMunoGeneTics database(IMGT) (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。

术语抗体（“亲代抗体”）的“抗原结合片段”或“抗体片段”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。当与抗原的结合活性在摩尔浓度基础上表示时，抗原结合片段或衍生物通常保持亲代抗体的抗原结合活性的至少 10%。优选抗原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氨基酸取代（称为抗体的“保守变体”或“功能保守变体”）或非保守氨基酸取代。

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框架（FR)区是人免疫球蛋白序列的框架区。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)。

在本申请中，术语“卤素”通常是指氟、氯、溴、碘，例如可以是氟、氯。

在本申请中，术语“烷基”通常是指烷除去氢原子所衍生的残基。烷基可以是取代的或非取代的，替代或者非替代的。术语“烷基”通常指饱和的直链或支链脂肪族烃基，其具有从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去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 个碳原子的链烷基。烷基的非限制性实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基等。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，所述取代基可以独立地任选选自烷基、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、卤素、-NO_2、-CN、-OH、-SH、-NH_2、-C(O)H、-CO_2H、-C(O)C(O)H、-$C(O)CH_2C(O)$H、-S(O)H、-$S(O)_2$H、-$C(O)NH_2$、-SO_2NH_2、-OC(O)H、-$N(H)SO_2$H 或 C_{1-6} 脂肪族基团。例如当被环烷基取代时，为环烷基烷基。

在本申请中，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，术语“亚甲基”可以是指 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；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(-CH_2-)、1,1-亚乙基(-$CH(CH_3)$-)、1,2-亚乙基(-CH_2CH_2)-、1,1-亚丙基(-$CH(CH_2CH_3)$-)、1,2-亚丙基(-$CH_2CH(CH_3)$-)、1,3-亚丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)、1,4-亚丁基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-)和 1,5-亚戊基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-)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，所述取代基可以独立地任选选自烷基、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、卤素、-NO_2、-CN、-OH、-SH、-NH_2、-C(O)H、-CO_2H、-C(O)C(O)H、-$C(O)CH_2C(O)$H、-S(O)H、-$S(O)_2$H、-$C(O)NH_2$、-SO_2NH_2、-OC(O)H、-$N(H)SO_2$H 或 C_{1-6} 脂肪族基团。亚甲基或亚烷基可以是取代的或非取代的。

术语 “烷氧基” 指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基)， 其中烷基或环烷基的定义如本文所述。烷氧基的非限制性示例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、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。

在本申请中，术语“烯基”通常是指含有一个或多个双键的直链或支链烃基。烯基的示例性实例包括烯丙基、高烯丙基、乙烯基、巴豆基、丁烯基、戊烯基和己烯基等。具有一个以上双

键的 C2-6 链烯基的示例性实例包括丁二烯基、戊二烯基、己二烯基和己三烯基以及它们的支化形式。不饱和键(双键)的位置可以是在碳链的任何一个位置。烯基可以是取代的或非取代的。例如，当被取代时，可以在任何可用的连接点上进行取代基的取代，并且该取代基优选地独立地任选选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷氨基、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、环烷基硫基、杂环烷基硫基、杂环烷基硫基和氧代中的一个或多个组成的组，例如，它可以是氢、氘、氚、氟、卤素、-NO_2、-CN、-OH、-SH、-NH_2、-C(O)H、-CO_2H、-C(O)C(O)H、-$C(O)CH_2C(O)$H、-S(O)H、-$S(O)_2$H、-$C(O)NH_2$、-SO_2NH_2、-OC(O)H、-N(H)SO_2H 或 C_{1-6} 脂肪族基团。

在本申请中，术语“亚烯基”通常是指具有从烯烃的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。例如，可以是亚烯丙基、亚乙烯基、亚丁烯基、亚戊烯基和亚己烯基等。亚烯基可以是取代的或非取代的。例如，当被取代时，可以在任何可用的连接点上进行取代基的取代，并且该取代基优选地独立地任选选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷氨基、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、环烷基硫基、杂环烷基硫基、杂环烷基硫基和氧代中的一个或多个组成的组，例如，它可以是氢、氘、氚、氟、卤素、-NO_2、-CN、 -OH、-SH、-NH_2、-C(O)H、-CO_2H、-C(O)C(O)H、-$C(O)CH_2C(O)$H、-S(O)H、-$S(O)_2$H、-$C(O)NH_2$、-SO_2NH_2、-OC(O)H、-N(H)SO_2H 或 C_{1-6} 脂肪族基团。

在本申请中，术语“炔基”通常是指含有一个或多个三键的直链或支链烃基。炔基可以是不饱和直链或支链炔基，例如乙炔基、1-丙炔基、炔丙基、丁炔基等。炔基可以是取代的或非取代的。例如，当被取代时，可以在任何可用的连接点上进行取代基的取代，并且该取代基优选地独立地任选选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷氨基、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、环烷基硫基、杂环烷基硫基、杂环烷基硫基和氧代中的一个或多个组成的组，例如，它可以是氢、氘、氚、氟、卤素、-NO_2、-CN、 -OH、-SH、-NH_2、-C(O)H、-CO_2H、-C(O)C(O)H、-$C(O)CH_2C(O)$H、-S(O)H、-$S(O)_2$H、-$C(O)NH_2$、-SO_2NH_2、-OC(O)H、-N(H)SO_2H 或 C_{1-6} 脂肪族基团。

在本申请中，术语“亚炔基”通常是指具有从炔烃的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。例如，可以是亚乙炔基、亚丙炔基、亚炔丙基、亚丁炔基等。亚炔基可以是取代的或非取代的。例如，当被取代时，可以在任何可用的连接点上进行取代基的取代，并且该取代基优选地独立地任选选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷氨基、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、环烷基硫基、杂环烷基硫基、杂环烷基硫基和氧代中的一个或多个组成的组，例如，它可以是氢、氘、氚、氟、卤素、-NO_2、-CN、-OH、-SH、-NH_2、-C(O)H、-CO_2H、-C(O)C(O)H、-$C(O)CH_2C(O)$H、-S(O)H、-$S(O)_2$H、-$C(O)NH_2$、-SO_2NH_2、-OC(O)H、-N(H)SO_2H 或 C_{1-6} 脂肪族基团。

在本申请中，术语“芳基”通常是指具有芳环上除去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，取代基可以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。芳基可以是取代的或非取代的。

在本申请中，术语“杂芳基”通常是指具有从杂芳环的碳原子上除去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。杂芳基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以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。杂芳基可以是取代的或非取代的。

在本申请中，术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，环烷基环包含 3 至 20 个碳原子，优选包含 3 至 12 个碳原子，优选包含 3 至 10 个碳原子，优选包含 3 至 8 个碳原子，更优选包含 3 至 6 个碳原子。单环环烷基的非限制性示例包括环丙烷基、环丁烷基、环戊烷基、环戊烯基、环己烷基、环己烯基、环己二烯基、环庚烷基、环庚三烯基、环辛烷基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。环烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选选自氢原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基所取代。

在本申请中，术语“部分不饱和的”通常是指环状结构中环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。

在本申请中，术语“杂环基”指饱和或部分不饱和的非芳香族单环或多环环状烃取代基，其包含 3 至 20 个环原子， 其中一个或多个环原子为选自氮、氧或硫的杂原子，其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个环原子，其中 1~4 个是杂原子；更优选包含 3 至 8 个环原子，其中 1-3 是杂原子；更优选包含 3 至 6 个环原子，其中 1-3 个是杂原子；最优选包含 5 或 6 个环原子，其中 1-3 个是杂原子。单环杂环基的非限制性示例包括吡咯烷基、四氢吡喃基、哌啶基、吗啉基、硫代吗啉基和高哌嗪基的等。多环杂环基包括螺环、稠环和桥环的杂环基。所述杂环基环可以稠合于芳基、杂芳基或环烷基环上，其与母体结构连接在一起的环为杂环基。杂环基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选独立地任选选自氢原子、卤素、烷基、烷氧基、卤代烷基、羟基、羟烷基、氰基、氨基、硝基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基中的一个或多个取代基所取代。

在本申请中，术语“成环原子”通常是指环状结构上包含的原子。例如，成环原子可以是苯环上的碳原子，可以是吡啶环上的氮原子。当成环原子上连接氢原子时，成环原子可以是取代的或非取代的。

在本申请中，术语“各自独立地”通常是指变量适用于任何一种情况，而不考虑在相同化合物中具有相同或不同定义的变量存在与否。例如其中的变量可以是指化合物的取代基种类、数

量或化合物中原子的种类等。例如，在化合物中出现 2 次 R 并且 R 被定义为“独立地碳或氮”时，两个 R 可以均为碳，两个 R 可以均为氮，或一个 R 可以为碳而另一个 R 为氮。

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的场合。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。

在本申请中，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(通过实验或理论)确定可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和(如烯属)键的碳原子结合时可能是不稳定的。

在本申请中，术语 0 个或多个（例如，0 个或 1 个以上、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-、-SO_2-、-PH-、-P(=O)H-、-$NHSO_2$-、-SO_2NH-、-C(＝S)-、-C(＝NH)-、-N＝N-、-C＝N-、-N＝C-或-C(＝N_2)-）所替代。

在本申请中，基团 X 与基团 Y 的“连接”通常可以处于任一定向，任一定向通常是指在基团 X 用于连接体 Y 和基团 Z 时，所述基团 X 的两个或更多个连接位点可以任意地与基团 Y 或基团 Z 连接。

在本申请中，术语“化合物”通常指具有两种或两种以上不同元素的物质。例如，本申请的化合物可以是有机化合物，例如本申请的化合物可以是分子量 500 道尔顿以下的化合物，可以是分子量 1000 道尔顿以下的化合物，也可以是分子量 1000 道尔顿以上的化合物，也可以是 10000 道尔顿以上、100000 道尔顿以上的化合物。在本申请中，化合物还可以是指通过化学键相连的化合物，例如可以是一个或多个分子量 1000 道尔顿以下的分子通过化学键与生物大分子相连的化合物，所述生物大分子可以是高聚糖、蛋白、核酸、多肽等。例如本申请的化合物可以包括蛋白质与一个或多个分子量 1000 道尔顿以下的分子相连的化合物，可以是包括蛋白质与一个或多个分子量 10000 道尔顿以下的分子相连的化合物，可以是包括蛋白质与一个或多个分子量 100000 道尔顿以下的分子相连的化合物。

在本申请中，如本领域技术人员可知的，“烷基”、“烯基”、“环烷基”等之类的术语可以在名称前加一个标识表示在特定情况下基团中存在的原子数，例如，C_1-C_4 烷基，C_3-C_7 环烷氧基，C_1-C_4 烷基羰基氨基等，“C”后所跟下标数字表示在基团中存在的碳原子数。例如，C_3 烷基是指具有三个碳原子的烷基（例如，正丙基，异丙基）；$C_{1\text{-}10}$ 中，基团的成员可具有落入 1-10 范围内的任何数目的碳原子。

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(通过实验或理论)确定可能或不可能的取代。例如，具有游离氢的氨基或羟基与具有不饱和(如烯属)键的碳原子结合时可能是不稳定的。

在本申请中，本申请的化合物或配体-药物偶联物包含其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、和/或非对映异构体。在本申请中，术语“非对映异构体”通常是指具有两个或更多个手性中心并且其分子不是彼此的镜像的立体异构体。非对映异构体可以具有不同的物理性质，例如，熔点、沸点、波谱性质和反应性。在本申请中，术语“互变异构体”或“互变异构形式”可互换使用，通常是指可通过低能垒(low energy barrier)互相转化的不同能量的结构异构体。例如，质子互变异构体(protontautomer)(也称为质子移变互变异构体(prototropic tautomer))包括通过质子迁移进行的互相转化，诸如酮-烯醇异构化和亚胺-烯胺异构化。价键互变异构体(valence tautomer)包括通过一些成键电子的重组进行的互相转化。在本申请中，术语“内消旋体”通常是指分子内含有不对称性的原子，但具有对称因素而使分子内总旋光度为零。术语"外消旋体"或"外消旋混合物"是指由等摩尔量的两种对映异构体物质构成的组合物。

在本申请中，术语化合物或配体-药物偶联物的“异构体”通常包含化合物的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体非对映异构体。

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 可以是指将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药物（例如，细胞毒性药物）相连。

在本申请中，术语“配体”通常指能识别和结合目标细胞相关的抗原或受体的大分子化合物。配体的作用可以是将药物呈递给与配体结合的目标细胞群，这些配体包括但不限于蛋白类激素、凝集素、生长因子、抗体或其他能与细胞、受体和/或抗原结合的分子。在本申请中，配体可以表示为 Ab，配体抗原通过配体上的杂原子与连接单元形成连接键。配体可以为抗体或其抗原结合片段（Ab），所述抗体可以选自嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或鼠源抗体；所述抗体可以是单克隆抗体。

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是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。直接或间接连接配体可以是指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，可以使用包含酸不稳定接头结构(例如腙)、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“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 DAR，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。

在本申请中，本申请的化合物的某些原子可能以一种以上的同位素形式出现。例如，氢可能以氕（^{1}H）、氘（^{2}H）和氚（^{3}H）的形式存在，碳可能以三种不同的同位素（^{12}C、^{13}C 和 ^{14}C）自然存在。可并入本申请化合物中的同位素示例还包括但不限于 ^{15}N、^{18}O、^{17}O、^{18}F、^{32}P、^{33}P、^{129}I、^{131}I、^{123}I、^{124}I、^{125}I，或者类似的同位素。因此，相对于这些同位素的自然丰度，本申请的化合物可富集在一种或多种这些同位素中。如本领域技术人员所知，此类同位素富集化合物可用于多种用途。例如，用重同位素如氘（^{2}H）替代可能会提供某些治疗优势，这可以是由于更高的代谢稳定性。例如，氘（^{2}H）的自然丰度约为 0.015%。因此，自然界中大约每 6500 个氢原子，就有一个氘原子。因此，本申请的含氘化合物在一个或多个位置（视情况而定）的氘丰度大于 0.015%。除非另有指明，否则本申请所述的结构还可以包括仅在是否存在一个或多个同位素富集原子方面存在差别的化合物。举例而言，除了氢原子被氘或氚所取代，或碳原子被碳 13 或碳 14 所取代之外，其余部分均与本申请结构一致的化合物均在本申请的范围之内。

术语“药物组合物”通常是指含有一种或多种本申请所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物可以是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。常规的药物组合物的制备可以见中国药典。药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液，例如 1,3-丁二醇中制备的溶液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。例如，可使用包括合成甘油单酯或二酯在内的任何调和固定油。此外，脂肪酸例如油酸也可以制备注射剂。

术语“药学上可接受的盐”或“可药用的盐”通常是指本申请化合物或配体-药物偶联物的盐，或本申请中所述的化合物的盐，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，本申请的抗体-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、山梨酸盐、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“药学上可接受的载体”通常是指给予治疗剂，例如抗体或多肽、基因和其它治疗剂的载体或载剂。该术语指本身不诱导对接受组合物的个体有害的抗体产生并且可以给予而不产生过度毒性的任何药物载体。合适的载体可以是大的、代谢缓慢的大分子，例如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物、脂质聚集物和灭活的病毒颗粒。本领域技术人员熟知这些载体。治疗组合物中药学上可接受的载体可包括液体，例如水、盐水、甘油和乙醇。这些载体中也可存在辅助物质，例如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。

术语“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”通常是指获得有益或希望的效果的方法，所述有益或希望的效果包括但不限于治疗益处。治疗益处包括但不限于根除、抑制、减少或改善所治疗的潜在疾病。另外，治疗益处是通过根除抑制、减少或改善与潜在的疾病相关的一种或多种生理症状实现的，从而在患者中观察到改善，但是患者仍然可能患有潜在疾病。

术语“B7H3 相关疾病”是指由 B7H3(如人 B7H3)的表达或活动增加或减少(一般增加)引起、加剧或以其他方式与之相关的任何疾病或病症。

术语“预防(prevention)”和“预防(preventing)”通常是指获得有益或希望的效果的方法，所述有益或希望的效果包括但不限于预防益处。为了预防益处，可以向处于患上特定疾病的风险的患者或向报告具有疾病的一种或多种生理症状的患者施用药物组合物，即使尚未诊断出该疾病。

术语“受试者”或“患者”通常是指人类(即，任何年龄组的男性或女性，例如，小儿对象(例如，婴儿、儿童、青少年)或成人对象(例如，年轻人、中年人或老年人))和/或其他灵长类动物(例如，食蟹猴、恒河猴)；哺乳动物，包括商业上相关的哺乳动物，如牛、猪、马、绵羊、山羊、猫和/或犬；和/或禽类，包括商业上相关的禽类，如鸡、鸭、鹅、鹌鹑和/或火鸡。

术语“治疗有效量”、“治疗有效剂量”和“有效量”是指本发明配体-药物偶联物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剂量，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血液病癌细胞。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 B7H3 抗体

本发明提供特异性结合 B7H3 的抗体，例如，特异性结合人 B7H3、小鼠 B7H3、食蟹猴 B7H3 及其 ECD 结构域的抗体。本文使用的术语“抗体”如上定义，包括全长免疫球蛋白及其结合到相同抗原的抗体部分。抗体可以是例如单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或单链抗体。在一些实施例中，抗体部分为 Fab 片段或 $F(ab')_2$ 片段。在一些实施方案中，抗体部分保留特异性结合 B7H3 的能力。

重组抗 B7H3 抗体，例如嵌合抗体和人源化单克隆抗体，包括人和非人部分，可使用标准重组 DNA 技术制备，属于本发明的范围。此类嵌合和人源化单克隆抗体可通过重组 DNA 技术生产，如美国专利号 7112421 中所述的方法；Better 等人（1988）《科学》240:1041-1043；或 Liu 等人（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 84:3439-3443。本发明还包括进一步修饰/优化的人源化单克隆抗体，例如通过亲和力成熟、反向突变和去除翻译后修饰位点。

优选地，如本文所公开的抗体或其抗原结合部分可以高亲和力结合到人 4IgB7H3。如本文所公开的抗体或其抗原结合部分可以低得多的亲和力结合人 2IgB7H3。如本文所公开的抗体或其抗原结合部分可以高亲和力结合人 4IgB7H3，但以低得多的亲和力结合人 2IgB7H3。

本发明抗体与 B7H3 的结合可使用一种或多种本领域公认的技术进行评估，例如 ELISA 或流式细胞术。在一些实施方案中，可通过流式细胞术分析测试抗体，其中抗体与表达人 B7H3 的细胞系反应，所述表达人 B7H3 的细胞系例如 MCF-7 癌细胞或已转染以在其细胞表面表达 B7H3 的 CHOK1 细胞。此外，也可以在双核结合分析中测试抗体的结合，包括结合动力学（例如，KD 值）。在一些其他实施方案中，通过 ELISA 测试抗体，其中抗体与可溶性 B7H3 蛋白反应。

本发明提供了与人 4IgB7H3 蛋白结合的抗体，通过表面等离子体共振（SPR）测量，其 K_D 为 1×10^{-8} M 或更小、K_D 为 1×10^{-9} M 或更小、K_D 为 5×10^{-10} M 或更小、K_D 为 1×10^{-10} M 或更小、K_D 为 9×10^{-11} M 或更小、K_D 为 8×10^{-11} M 或更小或 K_D 为 7×10^{-11} M 或更小。通过表面等离子体共振（SPR）测量，本文所公开的抗体还可与人 2IgB7H3 蛋白结合，其 K_D 为 5×10^{-9} M 或以上、K_D 为 1×10^{-8} M 或以上、K_D 为 2×10^{-8} M 或以上、K_D 为 3×10^{-8} M 或以上或 KD 为 4×10^{-8} M 或以上。在一些实施方案中，本文中的抗体与人 4IgB7H3 结合，其 K_D 值比与人 2IgB7H3 结合的 K_D 值小 500 倍以上、小 100 倍以上或小 50 倍以上。这些用于比较的 K_D 值可以是通过表面等离子体共振（SPR）所测量得到。

在一些实施方案中，本发明的抗体能够以小于 5 nM、小于 4 nM、小于 3 nM 或小于 2 nM 的 EC_{50} 结合人或食蟹猴 B7H3 表达细胞系，通过 FACS 测定。

在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分是特异性结合 B7H3，优选人 4IgB7H3 的嵌合抗体或鼠抗体。在一些进一步的实施方案中，抗体或其抗原结合部分是特异性结合 B7H3，优选人 4IgB7H3 的人源化抗体。在一些更进一步的实施方案中，人源化抗体或其抗原结合部分在框架区中包含一个或多个回复突变。在一些更进一步的实施方案中，人源化抗体或其抗原结合部分在潜在的翻译后修饰(PTM)位点包含一个或多个修饰，例如以去除 CDR、NXS 和 NXT(X 可以是全长中除 P 之外)中的 NG、NS 和 DG 之外的任何氨基酸。

在一些实施方案中，如本文所公开的抗体或其抗原结合部分包含一个或多个重链 CDR (HCDR)，其选自以下组成的组中的至少一个：

(i) 包含 SEQ ID NO: 1 的 HCDR1；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 2 的 HCDR2；和

(iii) 包含 SEQ ID NO: 3 的 HCDR3；和/或

一个或多个轻链 CDR (LCDR) 选自以下组中的至少一个：

(i) 包含 SEQ ID NO: 4 或 7 或 18 的 LCDR1；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 5 的 LCDR2；和

(iii) 包含 SEQ ID NO: 6 的 LCDR3。

在一些实施方案中，如上所述的抗体或其抗原结合部分可以包括：包含或由 SEQ ID NO: 1 组成的 HCDR1；包含或由 SEQ ID NO: 2 组成的 HCDR2；包含或由 SEQ ID NO: 3 组成的 HCDR3；包含或由 SEQ ID NO: 7 组成的 LCDR1；包含或由 SEQ ID NO: 5 组成的 LCDR2； 包

含或由 SEQ ID NO: 6 组成的 LCDR3。具体地，该抗体可进一步在 CDR 上包含一个或多个修饰以去除潜在的 PTM 位点。在一些实施方案中，抗体在 LCDR1 的序列 SEQ ID NO: 7（“KSSQSLLNSSNQKNYLA”）上包含一个或多个修饰以去除“NS”，该“NS”是该序列中潜在的 PTM 位点。在一些优选的实施方案中，抗体在 LCDR1 的氨基酸序列 SEQ ID NO：7（“KSSQSLLNSSNQKNYLA”)的第 8 或第 9 位包含一个置换。在一些更优选的实施方案中，抗体在 LCDR1 的氨基酸序列的第 8 位包含 N 至 Q 置换 (即 SEQ ID NO: 4，“KSSQSLLQSSNQKNYLA”)。在一些其他实施方案中，抗体在 LCDR1 的氨基酸序列的第 9 位包含 S 到 P 置换(即 SEQ ID NO: 18，“KSSQSLLNPSNQKNYLA”)。本领域技术人员应理解，只要基本上保留对 B7H3 的结合亲和力，其他类型的置换也可以选择。

在一些实施方案中，如上所述的抗体或其抗原结合部分可以包括：包含或由 SEQ ID NO：1 组成的 HCDR1；包含或由 SEQ ID NO: 2 组成的 HCDR2；包含或由 SEQ ID NO: 3 组成的 HCDR3；包含或由 SEQ ID NO: 4 组成的 LCDR1；包含或由 SEQ ID NO: 5 组成的 LCDR2； 包含或由 SEQ ID NO: 6 组成的 LCDR3。

在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中重链可变区和轻链可变区包含分别如上所述的 HCDR1-3 和 LCDR1- 3。

在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分的重链可变区包含：

(i) SEQ ID NO: 8 或 10 的氨基酸序列；(ii) 与 SEQ ID NO: 8 或 10 至少 85%、90% 或 95% 相同的氨基酸序列；或(iii)与 SEQ ID NO: 8 或 10 相比具有一个或多个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多)个氨基酸的添加、缺失和/或替换的氨基酸序列。

在一些实施方案中，氨基酸取代可为保守取代。

在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分的轻链可变区包含：

(i) SEQ ID NO: 9 或 11 的氨基酸序列；(ii) 与 SEQ ID NO: 9 或 11 至少 85%、至少 90% 或至少 95% 同一性的氨基酸序列；(iii) 与 SEQ ID NO: 9 或 11 相比具有一个或多个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多)个氨基酸的添加、缺失和/或替换的氨基酸序列。

在一些实施方案中，氨基酸取代可为保守取代。

在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中 VH 包含：

(i) SEQ ID NO: 8 或 10 的氨基酸序列； (ii) 与 SEQ ID NO: 8 或 10 相比，在框架区中一个或多个 (例如 1、2、3、4、5 或更多)氨基酸替换的氨基酸序列；

和/或 VL 包括：

(i) SEQ ID NO: 9 或 11 的氨基酸序列；或 (ii) 与 SEQ ID NO: 9 或 11 相比，在框架区中一个或多个 (例如 1、2、3、4、5 或更多个) 氨基酸替换的氨基酸序列。

在一些实施方案中，氨基酸取代可为保守取代。

在一些实施方案中，抗体或抗原结合部分包含SEQ ID No: 8或10的重链可变区（VH）的HCDR1、HCDR2和HCDR3，和包含SEQ ID No: 9或11的轻链可变区（VL）的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

如本领域技术人员将理解的，CDR的准确编号和放置在不同编号系统中可能不同。然而，应当理解，可变重链和/或可变轻链序列的公开包括相关（固有）CDR的公开。因此，每个重链可变区的公开是对重链 CDR (例如，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3)的公开，并且每个轻链可变区的公开是对轻链 CDR (例如，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3) 的公开）。氨基酸对每个CDR的分配可根据编号方案的一个或一个组合，所有这些都是本领域众所周知的。下面是一个CDR 编号的比较，参阅Lafranc等人, Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003):

CDR	Kabat	IMGT	Chothia	AbM	Kabat+ Chothia	Martin 博士的描述 (参见 Martin A，“Antibody bioinformatics website of Dr. Andrew Martin's lab at UCL”，最后更新于 2018 年 7 月 31 日)
HCDR1	31-35	27-38	26-32	26-35	26-35	CXXX+HCDR1+W
HCDR2	50-65	56-65	52-56	50-58	50-65	LEWG+HCDR2
HCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	CAR+HCDR3+WGXG
LCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	C+LCDR1+W
LCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	LCDR1 之后的 16 个残基
LCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	C+LCDR3+ FGXG

在一些实施例中，CDR 氨基酸序列可与上述各序列具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性。在一些实施例中，可变区的氨基酸序列可与上述各序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性。

如上所述，VH 或 VL 区域中至少一种氨基酸的添加、缺失和/或替换可能不在任何 CDR 序列中，而是在框架（FR）序列中。例如，其分离抗体或抗原结合部分可包含框架序列中氨基酸的一个或多个置换，例如 VH 或 VL 区域的 FR1、FR2、FR3 和/或 FR4。在一些实施方案中，VH 区的框架区包含一个或多个如下取代：S025T、 V071R、Y091F、V089T。

在一些实施例中，6 个 CDR 中的变化可以具有总共 0、1、2、3、4 或 5 个氨基酸修饰（优选氨基酸取代），以及重链可变区和轻链可变区的框架区域中的变化，只要框架（不包括 CDR）与亲本抗体保持至少约 80、85 或 90%的同一性（例如，W301088-1.145.16）。因此，如本文所述的相同 CDR 可以与来自人类种系序列的不同框架序列组合，只要框架区域与人类种系序列保持至少 80、85 或 90%的同一性。

在某些实施例中，如本文所提供的分离抗体或其抗原结合部分包含任何合适的框架区（FR）序列，只要抗原结合域可以特异性结合到 B7H3，优选人 Ig4B7H3。

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 区变体可包含在一个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”，其中抗体的一个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。

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 B7H3 都可用作产生抗体的免疫原（抗原）。通过举例而非限制，任何 B7H3 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 B7H3 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 84:3439-3443)。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)环移植到人框架上（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 B7H3 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 IgG1。

在一些实施方式中，本发明的嵌合 B7H3 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”的抗体与 B7H3 的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 序列包括抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(简称 WBP301088)的 CDR 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 CDR 序列包括抗体 W301088-1.145.16-xIgG1KV320 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抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 或 W301088-1.145.16-xIgG1KV320 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氨基酸序列包括来自抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 或 W301088-1.145.16-xIgG1KV320 的全长氨基酸序列。

本发明所述的抗 B7H3 抗体 W301088-1.145.16-xIgG1KV320 或其抗原结合片段参考实施例中的描述制备。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，和包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。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氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示的轻链可变区。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包括氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链。

本发明所述的抗 B7H3 抗体 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(简称 WBP301088)或其抗原结合片段参考实施例中所述制备。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氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的重链可化变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示的轻链可变区。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包括氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的重链，和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示的轻链。

本发明嵌合抗体 W301088-1.145.16-xIgG1KV320 和人源化抗体 W301088-1.145.16-z3-pl-ulgGlKV320 的氨基酸序列如下所示。在一些实施例中，本发明抗体 CDR 的编号方法为：Kabat+Chothia 组合编号。

W301088-1.145.16-xlgG1KV320 氨基酸序列(下划线部分为 CDR)

重链可变区 VH SEQ ID NO: 8

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA

HCDR1: DYSITGDYAWN（SEQ ID NO:1）

HCDR2: YISYSGSTSYNPSLQS（SEQ ID NO:2）

HCDR3: SLGRRWYFVV（SEQ ID NO:3）

轻链可变区 VL SEQ ID NO: 9

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDL TDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK
LCDR1: KSSQSLLNSSNQKNYLA（SEQ ID NO:7）
LCDR2: FASTRES（SEQ ID NO:5）
LCDR3: QQHYSAPWT（SEQ ID NO:6）

重链 SEQ ID NO: 14

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTS
YNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVS
AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
轻链 SEQ ID NO: 15

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
W301088-1.145.16-z3-pl-ulgG1KV320 氨基酸序列(下划线部分为 CDR)

重链可变区 VH SEQ ID NO: 10
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHPGKGLEWIGYISYSGSTSYNP
SLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARSLGRRWYFVVWGQGTTVTVSS
HCDR1: DYSITGDYAWN（SEQ ID NO:1）
HCDR2: YISYSGSTSYNPSLQS（SEQ ID NO:2）
HCDR3: SLGRRWYFVV（SEQ ID NO:3）

轻链可变区 VL SEQ ID NO: 11
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSAPWTFGGGTKVEIK
LCDR1: KSSQSLLQSSNQKNYLA（SEQ ID NO:4）
LCDR2: FASTRES（SEQ ID NO:5）
LCDR3: QQHYSAPWT（SEQ ID NO:6）

重链 SEQ ID NO: 12

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHPGKGLEWIGYISYSGSTSYNP
SLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARSLGRRWYFVVWGQGTTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

轻链 SEQ ID NO: 13
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSAPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

本文所公开的抗体或其抗原结合部分具有特定功能特征或特性。在一些实施例中，抗体（包括嵌合抗体和人源化抗体）具有以下一个或多个特性：

（a） 以高亲和力（例如，通过 FACS 测量小于 2 nM）特异性结合人类 4IgB7H3 表达细胞；

（b）与人 4IgB7H3 相比，与人 2IgB7H3 结合的亲和力显著降低，与 2IgB7H3 和 4IgB7H3 结合的抗体亲和力之间的差异显著；

（c） 特异性结合 cyno B7H3，亲和力高（如通过 FACS 测量小于 5 nM），优于基准抗体；和

（d）表达 B7H3 的癌细胞对该抗体表现出良好的内化能力。

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体-药物偶联物、其药学上可接受的盐，和药学上可接受的载体或赋形剂。

应理解，本发明提供的抗体-药物偶联物或、其药学上可接受的盐，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以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 B7H3 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 B7H3 抗体的药物制剂，优选地为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症所需的，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、细胞生长抑制剂、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 B7H3 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、其药学上可接受的盐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、其药学上可接受的盐或如本文所述的药物组合物在制备用于治疗和/或预防 B7H3 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、其药学上可接受的盐或如本文所述的药物组合物用于治疗和/或预防 B7H3 介导的疾病或病症的用途，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 B7H3 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、其药学上可接受的盐或如本文所述的药物组合物，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体-药物偶联物、其药学上可接受的盐或药物组合物，其用于治疗和/或预防 B7H3 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乳腺癌、神经肿瘤、黑色素瘤、肺癌、头颈癌、结直肠癌、胰腺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、食管癌、肾细胞癌、子宫内膜癌、皮肤癌、睾丸癌，甲状腺癌、尿路上皮癌、淋巴瘤（如非霍奇金淋巴瘤）、慢性淋巴细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

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。

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施用本发明的抗体-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。

本申请所述的抗体-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10000nM以下、5000nM以下、4000nM以下、3000nM以下、2000nM以下、1000nM以下、500nM以下、400nM以下、300nM以下、200nM以下、150nM以下、120nM以下、110nM以下、100nM以下、99nM以下、98nM以下、97nM以下、95nM以下、90nM以下、80nM以下、75nM以下、70nM以下、65nM以下、62nM以下、60nM以下、50nM以下、40nM以下、30nM以下、25nM以下、23nM以下、22nM以下、20nM以下、19nM以下、18nM以下、18.5nM以下、17nM以下、15nM以下、12nM以下、10nM以下、9nM以下、8.5nM以下、7nM以下、6.7nM以下、6nM以下、5.9nM以下、5.5nM以下、5.0nM以下、4.8nM以下、4.5nM以下、4.4nM以下、4nM以下、3.5nM以下、3nM以下、2.5nM以下、2nM以下、1.5nM以下、1.0nM以下、0.5nM以下、0.3nM以下、0.29nM以下、0.25nM以下、0.21nM以下、0.20nM以下、0.18nM以下、0.17nM以下、0.15nM以下、0.12nM以下、0.10nM以下、0.09nM以下、0.08nM以下、0.07nM以下、0.06nM以下、0.05nM以下、0.04nM以下、0.03nM以下、0.02nM以下或0.01 nM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肺癌细胞，例如所述肿瘤细胞可以包括但不限于肺癌细胞Calu-6。

本申请所述的抗体-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抗体-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。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肺癌细胞、黑色素瘤细胞、脑癌细胞、前列腺癌细胞，例如所述肿瘤细胞可以包括但不限于肺癌细胞Calu-6、黑色素瘤细胞A375、脑癌细胞U87、前列腺癌细胞PC-3。

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。

材料和方法：

表1. 市售材料的信息

材料	供应商	目录号
MCF7细胞	ATCC	HTB-22
CHOK1细胞	ATCC	CTL-61
Expi293™表达系统试剂盒	Invitrogen	A14635
Expi293F™表达培养基	Invitrogen	A1435101
Flp-In™-CHO细胞系	Invitrogen	R75807
TMB单一溶液	Invitrogen	002023
Lipofectamine™ 2000转染试剂	Invitrogen	11668027
FreeStyle™ CHO表达培养基	Gibco	12651014
Hoechst 33342	Invitrogen	H3570
Calcein AM	Invitrogen	C3099
pHrodo iFL Red STP	Invitrogen	P36011
NuPAGE4%-12% Bis-Tris凝胶	Invitrogen	NP0322BOX
10×PBS	Invitrogen	AM9624
RPMI培养基1640（1×）	Gibco	22400089
0.25%胰蛋白酶-EDTA（1×）	Gibco	25200072
FBS	ExCell Bio	FND500
4% PFA	DING GUO	AR-0211
BSA	BOVOGEN	BSAS 1.0
DPBS	CORNING	21-031-CVC
Ni柱	Cytiva	173712
蛋白质A柱	Cytiva	175438
TSKgel G3000SWXL柱	Tosoh	0008541
山羊抗人IgG-Fc-HRP	Bethyl	A80-304P
山羊抗小鼠IgG-Fc-HRP	Bethyl	A90-231P
山羊抗小鼠IgG1	Bethyl	A90-205A
山羊抗小鼠IgG2a	Bethyl	A90-207A
山羊抗小鼠IgG2b	Bethyl	A90-209A
山羊抗小鼠IgG3	Bethyl	A90-211A
山羊抗小鼠IgG-Fc Alexa 647	Jackson ImmunoResearch	115-605-164
Alexa 647山羊抗人抗体	Jackson ImmunoResearch	109-605-098
山羊抗小鼠IgG Fc PE	Jackson ImmunoResearch	115-115-164
山羊抗人IgG Fc PE	Jackson ImmunoResearch	109-115-098
抗人Fc IgG	Jackson ImmunoResearch	109-005-098
抗小鼠Fc IgG	SouthernBiotech	1013-01
山羊抗小鼠κ轻链HRP	Southern Biotech	A90-119P
山羊抗小鼠λ轻链HRP	Southern Biotech	A90-121P

F(ab')2山羊抗人IgG-Fc	Jackson ImmunoResearch	109-006-098
F(ab')2-山羊抗小鼠IgG-Fc	Jackson ImmunoResearch	115-005-064
人B7-H3/CD276蛋白质，His标签（2IgB7H3）	ACROBiosystems	B73-H52E2
食蟹猴B7-H3/CD276蛋白质，His标签	ACROBiosystems	B73-C52Ha
S系列传感器芯片CM5	Cytiva	29-1496-03
氨基偶联试剂盒	Cytiva	BR100050
10×HBS-EP+	Cytiva	BR100669

样品检测方法

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 $(NH4)_2SO_4$ + 50 mM K_2HPO_4 (pH 7.0)；

流动相 B：50 mM K_2HPO_4 (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 NaH_2PO_4 + 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℃。

实施例 1. 抗 B7H3 抗体的产生和表征

1.1 抗原、基准抗体和细胞系的制备

1.1.1 抗原的产生

首先对编码人4IgB7H3胞外结构域的氨基酸序列（Uniprot ID：Q5ZPR3，氨基酸29-461）的核苷酸序列进行密码子优化以用于哺乳动物表达，然后由Sangon Biotech（上海，中国）合成。将该DNA片段亚克隆到在C末端具有6xHis的pcDNA3.3表达载体中，然后将其转染到Expi293F细胞（Invitrogen，A14635）中。温育五天后，使用Ni柱（Cytiva，173712）纯化上清

液。将洗脱的蛋白质经由透析袋（Spectrum-888-10987，MWCO 3.5kDa）透析到PBS中。通过在NanoDrop装置上280nm处的吸光度确定蛋白质浓度。将2μg纯化的蛋白质在含有和不含有还原剂的SDS-PAGE凝胶（Invitrogen）上电泳。利用TSKgel G3000SWXL体积排阻色谱柱（Tosoh，008541），通过HPLC-SEC定量纯化的蛋白质的纯度。将纯化的蛋白质保存于-80℃下。人2IgB7H3购自ACRO（目录号B73-H52E2）；食蟹猴B7H3购自ACRO（目录号B73-C52Ha）。

1.1.2 基准抗体的产生

抗B7H3抗体依诺妥珠单抗（Enoblituzumab）（MacroGenics，其轻链和重链氨基酸序列为US20120294796A1中的SEQ ID NO：117、119）用作基准抗体。编码抗体的可变结构域的核酸序列首先进行密码子优化以用于哺乳动物表达，然后由Sangon Biotech（上海，中国）合成。然后将DNA片段亚克隆到具有人IgG1的恒定区的修饰的pcDNA3.4表达载体中。将含有VH和VL基因的质粒共转染到Expi293F细胞（Invitrogen，A14635）中。温育五天后，使用蛋白质A柱（Cytiva，175438）纯化上清液。将洗脱的蛋白质经由透析袋（Spectrum，888-10987）透析到PBS中。通过在NanoDrop装置上280nm处的吸光度确定蛋白质浓度。将2μg纯化的蛋白质在含有和不含有还原剂的SDS-PAGE凝胶（Invitrogen）上电泳。利用TSKgel G3000SWXL体积排阻色谱柱（Tosoh，008541），通过HPLC-SEC定量纯化的蛋白质的纯度。将纯化的抗体保存于-80℃下。

1.1.3 稳定的细胞系/细胞池的建立

产生表达人4IgB7H3的细胞系。简言之，根据制造商的方案，使用Lipofectamine 2000转染试剂盒（Invitrogen，11668027），用含有全长4IgB7H3的pcDNA3.3表达载体转染CHOK1细胞。在转染后48小时，将细胞传代培养至T75烧瓶中的选择性培养基（含有10% FBS和15μg/mL杀稻瘟菌素的F12-K）中。选择两次或三次传代后，通过杀稻瘟菌素选择和有限稀释获得人4IgB7H3稳定表达的细胞系（W3XX088-CHOK1.hPro1.2A5），并使用抗B7H3抗体通过FACS测定表达水平。

产生表达食蟹猴B7H3的细胞池。简言之，根据制造商的方案，使用Lipofectamine 2000转染试剂盒（Invitrogen，11668027），用含有全长食蟹猴B7H3的pcDNA5/pOG44表达载体转染FlipinCHO细胞。在转染后48小时，将细胞传代培养至T75烧瓶中的选择性培养基（含有10% FBS和600μg/mL潮霉素B的F12）中。选择两次或三次传代后，通过潮霉素B选择和BD FACSMelody™细胞分选获得稳定地高表达食蟹猴B7H3的细胞池（WBP3XX088-FlpinCHO.cPro1.pool）。

1.2 抗体的产生

1.2.1 动物免疫

用实施例1.1.3的编码人全长4IgB7H3的DNA质粒免疫6周龄-8周龄的4只Balb/c小鼠，每只200μg-400μg。佐剂混合物包括Adju-Phos、CpG-ODN和GM-CSF。每隔一周经由皮下、肌内和流体动力学尾静脉注射动物一次。在第三次注射后（第1次取血）和第五次注射后（第2次取血）自小鼠取血。通过ELISA和FACS测量血清滴度。

ELISA测定法用于测量针对4IgB7H3抗原的血清抗体滴度。用100μL His标签以0.5μg/mL包被板（Nunc），在4℃下过夜，然后用封闭缓冲液（2% BSA的PBS溶液）在环境温度下封闭1

小时。然后洗涤板，并在环境温度下与1μg/mL抗原温育1小时。洗涤后，小鼠血清自1:100稀释度开始在封闭缓冲液中以1:3系列稀释，加入培养板中，并在环境温度下温育2小时。然后洗涤板，随后与第二抗体，即，山羊抗小鼠IgG-Fc-HRP（Bethyl，A90-231P）温育1小时。洗涤后，加入TMB底物，并用2M HCl终止相互作用。使用微板读数器（Molecular Device）读取450nm处的吸光度。血清滴度在2倍背景下测定。

表2. 通过ELISA对结合人4IgB7H3的小鼠血清进行血清滴度测试

抗体滴度	小鼠#1	小鼠#2	小鼠#3	小鼠#4
第2次取血的血清	218700	1968300	656100	1968300
第1次取血的血清	218700	218700	656100	218700
取血前的血清	<100	<100	<100	<100

FACS测定法用于测量针对4IgB7H3抗原的血清抗体滴度。简言之，将实施例1.1.3的经工程改造的表达B7H3的细胞以1×10^5个细胞/孔的密度接种到96孔U底板中，在4℃下以1500rpm离心4分钟，然后去除上清液。将小鼠血清自1:100稀释度开始以1:3系列稀释在1×PBS/1%BSA中，以重悬细胞，并在4℃下温育1小时。用180μL 1×PBS/1%BSA洗涤细胞两次。将第二抗体山羊抗小鼠IgG-Fc Alexa 647（Jackson，109-605-098）添加到重悬细胞中并在4℃下避光温育30分钟，然后用180μL 1×PBS/1%BSA洗涤。最后，将细胞重悬于100μL 1×PBS/1%BSA中，并通过FACS（BD Canto II）测量荧光强度，并通过FlowJo版本软件分析。血清滴度在2倍背景下测定。

表3. 通过FACS对表达人4IgB7H3的细胞系的结合进行血清滴度测试

抗体滴度	小鼠#1	小鼠#2	小鼠#3	小鼠#4
第2次取血的血清	218700	1968300	1968300	接近1968300

当血清滴度足够高时，在与骨髓瘤细胞融合前用400μg实施例1.1.3的编码人全长4IgB7H3的DNA质粒经由流体动力学尾静脉和4×10^6 MCF-7细胞经由足垫和皮下进行最后一次增强免疫。收集淋巴结和脾用于细胞融合。

1.2.2 杂交瘤产生

将来自实施例1.2.1的免疫小鼠的淋巴结和脾均质化并过滤以去除血块和细胞碎片。收集呈对数生长的Sp2/0骨髓瘤细胞并离心。按照常规的电融合程序，在电融合溶液中以1:1的比例将免疫小鼠的淋巴结和脾均质化获得的B细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞融合。将融合的细胞悬浮在补充有20% FBS和1X HAT的DMEM培养基中，然后转移到96孔板（CORNING）中。将融合的细胞在设定为37℃、5% CO_2的培养箱中培养10天～14天。

1.2.3 抗体筛选

第一次筛选：基于细胞的ELISA测定法用作第一次筛选以测试杂交瘤上清液与人4IgB7H3的结合。简言之，将实施例1.1.3的人4IgB7H3转染的CHOK1细胞系以5×10^3个细胞/孔的密度

接种于96孔板（CORNING）中，然后在设置为37℃、5% CO_2的培养箱中保持2天。然后洗涤板，并在环境温度下与杂交瘤上清液温育1小时。然后洗涤板，随后与第二抗体山羊抗小鼠IgG-Fc-HRP（Bethyl，A90-231P）温育1小时。洗涤后，加入TMB底物，并用2M HCl终止相互作用。使用微板读数器（Molecular Device）读取450nm处的吸光度。

第二次筛选：为了证实杂交瘤上清液与人和食蟹猴抗原的结合，进行FACS。亲本CHOK1细胞系和实施例1.1.3的4IgB7H3转染的CHOK1细胞系用CellTrace染料（分别为Violet和FarRed）染色，而实施例1.1.3的B7H3转染的FlipinCHO细胞池不用染料制备。在环境温度下温育15分钟并洗涤后，将三种类型的细胞等量混合至1×10^6个细胞/mL。将三种细胞混合物以1×10^5个细胞/孔的密度转移到96孔U底板（BD）中。然后将杂交瘤上清液转移到板，并在4℃下温育1小时。洗涤后，加入第二抗体，即，山羊抗小鼠IgG Fc PE（Jackson，115-115-164）并在4℃下与细胞在黑暗中温育0.5小时。然后洗涤细胞，并在通过流式细胞术分析之前重悬于1×PBS/1% BSA中。

为了测试杂交瘤上清液与人2IgB7H3的结合，使用传统的ELISA测定法。在环境温度下，用100μL/孔的人2IgB7H3（0.2μg/mL）预包被板，保持1小时。用200μL/孔的1×PBS/2% BSA封闭1小时后，用1×PBST将板洗涤3次。将杂交瘤上清液以100μL/孔的体积加入到板中，并在环境温度下温育2小时。用1×PBST将板洗涤3次后，将100μL/孔的山羊抗小鼠IgG-Fc HRP（Bethyl，A90-231P）加入到板中，并在环境温度下温育1小时。洗涤6次后，通过将TMB底物以100μL/孔加入板中5分钟-10分钟来使颜色显色，然后通过加入100μL/孔的2M HCl使反应停止。使用微板读数器读取450nm处的吸光度。

通过SPR进一步证实通过FACS筛选的选定的阳性细胞系。SPR允许实时、无标记地检测生物分子相互作用。当偏振光入射到两个介质之间的界面处的导电表面时，会发生SPR。这会产生称为等离子体的电子电荷密度波，以与传感器表面质量成比例的特定角度（称为共振角）降低反射光的强度。使用Biacore 8K对上清液与人4IgB7H3的结合分级。通过在注射到通道前立即混合400mM EDC和100mM NHS（GE）来制备激活剂。用激活剂将CM5传感器芯片激活，保持420秒。然后以10μL/min的流速将山羊抗小鼠Fc IgG（30μg/mL，在10mM NaAc中，pH 4.5）注射到通道，保持420秒。用1M乙醇胺-HCl将芯片去激活。将上清液以10μL/min的流速注射到通道，保持30秒。将200nM人4IgB7H3的分析物以30μL/min的流速注射到通道，保持120秒的结合期，随后300秒的解离。在解离期后注射甘氨酸（10mM，pH 1.5），作为再生缓冲液。将传感图与参考通道和缓冲液通道相减。然后用1:1的Langmuir结合模型对数据进行拟合。

pHrodo iFL染料可以与生物分子（诸如抗体）缀合，并且仅当在存在于酸性环境（诸如细胞溶酶体和核内体）中时才变成高度荧光。这使得能够在活细胞测定中检测缀合的生物分子。用pHrodo iFL Red STP酯胺反应性染料标记AffiniPure $F(ab')_2$片段山羊抗人IgG Fcγ和抗小鼠IgG Fcγ，并根据制造商的说明书通过Zeba Spin脱盐柱纯化。将表达人全长B7H3的MCF-7细胞（2×10^4个细胞/孔）接种到用8μg/mL聚-D-赖氨酸预包被的96孔透明底部黑色板中。细胞在设定

为37°C、5% CO_2的培养箱中生长过夜。第二天，将WBP301088-1阳性细胞系上清液以100μL的体积加入到相应的孔中。将细胞在设定为37°C、5% CO_2的培养箱中温育0.5小时。人和小鼠IgG1同种型抗体用作阴性对照。以100μL/孔的体积加入50nM pHrodo iFL Red/F(ab')$_2$山羊抗小鼠或抗人IgG Fcγ缀合物（用完全培养基稀释）。然后将板在设定为37°C、5% CO_2的培养箱中避光温育5小时。温育后，弃去上清液。用完全培养基洗涤板。将混合染料溶液（1μg/mL Hoechst 33342和0.5μg/mL在DPBS中稀释的Calcein AM）以100μL/孔的体积加入到板中，并在环境温度下保持15分钟。温育后，弃去染料溶液，并用1×PBS/1% BSA将板洗涤一次。通过Perkin Elmer Operetta CLS高含量分析系统读取和分析MCF-7细胞的荧光强度。

在初步筛选中测试总共8460个孔，在24孔板中选择279个杂交瘤并扩增。在第二次筛选中，使用来自24孔板的上清液来证实针对人4IgB7H3和食蟹猴B7H3的强结合、针对人2IgB7H3的弱结合以及对MCF-7的强内化活性。基于第二次筛选结果，选择WBP301088-1.145杂交瘤进行亚克隆。

1.2.4 抗体亚克隆

使用实施例1.2.3选定的阳性杂交瘤细胞进行亚克隆。对呈对数生长的细胞计数，并加入1.5mL半固体HAT培养基中。将细胞在涡旋振荡器中轻轻混合5秒-10秒，然后接种在6孔板（CORNING）中。将板在设定为37℃、5% CO_2的培养箱中保持7天～8天。挑取每个可见的单菌落到96孔板（CORNING）中，这些板具有补充有10% FBS的DMEM培养基。2天～3天后，收集细胞上清液，并使用如上所述的抗体筛选方案，通过基于细胞的ELISA（人4IgB7H3）、常规ELISA（人2IgB7H3）筛选。在通过FACS使用表达人4IgB7H3和食蟹猴B7H3的细胞对抗体亚克隆进行确认性筛选后，收集选定的单阳性克隆的培养上清液，并纯化抗体以供进一步表征。在亚克隆筛选和确认性筛选后获得W301088-1.145.16杂交瘤克隆。

1.2.5 抗体分型

在96孔高结合板（Nunc）中进行ELISA分型。每孔分别用2μg/mL捕获抗体山羊抗小鼠IgG1 (Bethyl, A90-205A)、山羊抗小鼠IgG2a (Bethyl, A90-207A)、山羊抗小鼠IgG2b (Bethyl, A90-209A)、山羊抗小鼠IgG3 (Bethyl, A90-211A)包被，在4℃下过夜，并用1×PBS/2% BSA封闭。将实施例1.2.4的杂交瘤上清液在包被的孔中温育，并使用过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠κ/λ轻链抗体测量抗体与固定在板上的捕获抗体的特异性结合。通过加入TMB底物检测HRP信号，12分钟后使用2M HCl终止反应。所有温育步骤均在环境温度下进行，并且在各步骤之间用PBS洗涤板。使用微板读数器（Molecular Device）读取450nm处的吸光度。

W301088-1.145.16克隆的分型结果示于下表（表4）。

表4. W301088-1.145.16克隆的分型结果

克隆编号	同种型
W301088-1.145.16	IgG2b，κ

1.2.6 抗体产生

当需要少量纯化抗体时，T75烧瓶（CORNING）通常用于进行杂交瘤细胞培养规模的扩大。将单克隆杂交瘤细胞以5×10^6至1×10^7个细胞/T75烧瓶接种到烧瓶。使细胞连续生长约7天-10天，直到细胞活力达到约30%-40%。收获培养上清液，并通过离心去除细胞碎片。将上清液无菌过滤并保存用于抗体纯化。

1.2.7 杂交瘤测序

按照TaKaRa MiniBEST通用型RNA提取试剂盒的说明书，首先提取W-301088-1.145.16杂交瘤细胞样品的总RNA。然后使用来自Clonetech的SMART RACE cDNA扩增试剂盒将RNA转变为cDNA。然后用30个PCR循环从cDNA扩增VH和VL结构域DNA序列，每个循环在94℃下变性30秒，在60℃下退火30秒，然后在72℃下延伸30秒。然后将PCR产物亚克隆到TA克隆载体中，送往Biosune Biotech（上海，中国）进行测序。

一旦测序数据证实杂交瘤细胞样品的单克隆性，则通过PCR扩增VH和VL结构域的DNA序列。引物由Sangon Biotech（上海，中国）合成。然后将DNA片段亚克隆到具有LALA突变的人IgG1恒定区的pcDNA3.4表达载体中，然后通过Tsingke Biotechnology（北京，中国）测序。

1.2.8 IgG转变

一旦测序数据证实杂交瘤细胞样品的单克隆性，则对编码VH和VL结构域的氨基酸序列的核苷酸序列进行密码子优化以用于哺乳动物表达，然后由Sangon Biotech（上海，中国）合成经密码子优化的核苷酸序列。然后将DNA片段亚克隆到具有L234A/L235A (LALA)突变的人IgG1恒定区的pcDNA3.4表达载体中。

以这种方式，将W301088-1.145.16克隆所产生的抗体转变成具有LALA突变形式的人IgG1抗体，由此获得嵌合抗体，命名为抗体W301088-1.145.16-xIgG1KV320。经蛋白质A纯化和缓冲液交换后，通过SDS-PAGE和SEC-HPLC表征。在还原条件下，该蛋白质在SDS-PAGE上以50kDa和25kDa的表观分子量迁移，对应于IgG重链和轻链。纯度高于99%（SEC-HPLC）。

表5. 产生的嵌合抗体

抗体名称	浓度（mg/mL）	缓冲液	纯度 SEC-HPLC（%）	理论分子量
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	2.50	PBS	99.64%	147 kDa

1.2.9 抗体的人源化

运行开源软件ANARCI（Dunbar J和Deane CM，“ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification”，Bioinformatics，2015年；第32卷第5期：第298-300页）的本地副本以在W301088-1.145.16抗体上分配Kabat编号。根据Dr. Martin网站的定义鉴定CDR（Martin，2018年，出处同上），并示于表6中。

表6. 根据Dr. Martin抗体信息学网站定义的CDR范围

CDR	Kabat	前面的残基	后面的残基	长度
L1	L24-L34	总是C	总是W	10个至17个残基
L2	L50-L56	L1后的16个残基	/	7个残基

L3	L89-L97	总是C	总是F-G-X-G	7个至11个残基
H1	H31-H35b	总是C-X-X-X	总是W	10个至12个残基
H2	H50-H65	通常为L-E-W-G	K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A	16个至19个残基
H3	H95-H102	通常为C-A-R	总是W-G-X-G	3个至25个残基

表7. W301088-1.145.16抗体的VH和VL氨基酸序列，其中CDR序列加下划线

抗体ID		氨基酸序列
W301088-1.145.16	VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA （SEQ ID NO: 16）
	VL	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK （SEQ ID NO: 17）

表8. W301088-1.145.16抗体的经鉴定的重链和轻链CDR序列

抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
W301088-1.145.16	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
	DYSITGDYAWN	YISYSGSTSYNPSLQS	SLGRRWYFVV	KSSQSLLNSSNQKNYLA	FASTRES	QQHYSAPWT

将鼠抗体W301088-1.145.16的VH和VL结构域序列分别与IMGT的VH和VL结构域的人种系序列库比对。选择相对于W301088-1.145.16抗体的VH/VL结构域序列在框架中具有最小数目氨基酸差异的VH/VL结构域的人种系序列作为VH/VL结构域的人源化模板。IGHV4-31*02与IGHJ6*01的结合和IGKV4-1*01与IGKJ4*01的结合分别是与W301088-1.145.16抗体的VH和VL结构域序列最同源的人种系序列。将W301088-1.145.16抗体的CDR移植到这两个人种系模板的框架中，以构成种系序列。

根据经验选择框架中的几个“回复突变”位置，以将种系序列中的氨基酸转变为它们在原始鼠序列中的氨基酸对应物。根据经验设计一组人源化变体以研究这些选定回复突变位点的不同组合。在VL结构域的16个位置处和VH结构域的20个位置处，种系序列不同于原始鼠W301088-1.145.16抗体序列。对于回复突变考虑总共36个不同位点中的14个位点，分别为VH：Q001D、S025T、H040F、K043N、G044K、I048M、V067I、V071R、A085E、V089T、Y091F，VL：I021M、P043S、Y087F。根据经验设计一组人源化变体以测试这三个回复突变的不同组合。

1.2.10 PTM去除

扫描人源化变体的VH和VL结构域序列的若干类型的关键翻译后修饰（PTM）位点：CDR

中的天冬酰胺脱氨（N-G和N-S）、CDR中的天冬氨酸异构化（D-G）、整个长度上的未配对C和整个长度上的*N*-连接糖基化位点（N-X-S/T，其中X可以是除P以外的任何氨基酸）。根据经验设计点突变以去除人源化变体中的这些关键PTM位点，以避免PTM修饰的潜在风险。最后，选择与亲本抗体相比不影响表达、结合和热稳定性的PTM去除抗体。

考虑到鼠源抗体W301088-1.145.16的VL结构域序列含有N-S-S *N*连接的糖基化位点，因此，设计VL：N027dQ、VL：S027eP和VL：S027fA（根据Kabat编号）三个点突变以去除关键PTM位点。它们与人源化变体一起通过k_{off}分级进行测试。

1.2.11 通过SPR的k_{off}分级

在Biacore 8K表面等离子体共振（SPR）设备上执行经过滤上清液的k_{off}分级。首先以10μL/min的流速用400mM EDC和100mM NHS（GE）将CM5传感器芯片激活，保持420秒。然后以10μL/min的流速将10mM NaAc（pH 4.5）中的30μg/mL抗人Fc IgG（Jackson）注射到通道1至8中，保持420秒。然后以10μL/min的流速用1M乙醇胺-HCl（GE）将芯片去激活，保持420秒。以10μL/min的流速将稀释的各抗体上清液注射到通道的Fc2。不具有质粒转染的细胞培养物的上清液用作阴性对照，并以10μL/min的流速注射到通道的Fc1。将100nM人4IgB7H3和流动缓冲液以30μL/min的流速依次注射到通道的Fc1-Fc2，保持180秒的结合期，随后3600秒的解离期。每次运行后注射10mM甘氨酸（pH 1.5）以使芯片再生。通过Biacore 8K设备附带的软件分析传感图。将样品的传感图与参考通道和缓冲液通道相减。然后用1:1的Langmuir结合模型对数据进行拟合。

1.2.12 PTM去除突变与人源化变体的组合

将实施例1.2.11中显示出最佳k_{off}速率的PTM去除点突变组合到具有最优k_{off}速率逐点诱变的人源化变体中，以构成用于亲和力验证的最终构建体。

根据k_{off}速率，将VL：N027dQ的PTM去除突变与四个选定的人源化突变氨基酸S025T、V071R、Y091F、V089T组合构成最终抗体。将最终抗体称为W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320。

表9. W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体的重链和轻链CDR序列

抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
	DYSITGDYAWN	YISYSGSTSYNPSLQS	SLGRRWYFVV	KSSQSLLQSSNQKNYLA	FASTRES	QQHYSAPWT

图12A-图12B示出了抗体W301088-1.145.16-xIgG1KV320和抗体W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320之间的VH区和VL区的氨基酸序列比对结果。图中带框的氨基酸段是VH区和VL区中的各CDR区。

1.2.13 生产规模的瞬时转染和纯化

使用ExpiFectamine™瞬时转染试剂盒，将最终浓度为1μg/mL的质粒瞬时转染至20mL Expi293F细胞，细胞密度为3.0×10^6个/mL，并且细胞活力超过95%。细胞培养物在加湿水平振荡器中生长，旋转速度为150rpm。温度保持在37℃，而CO_2水平保持在8%。

细胞培养物温育5天后，收集表达靶抗体的上清液，并过滤，使用GE MabSelect SuRE蛋白质A柱（Cytiva-175438）纯化。所洗脱的抗体经由D-Tube透析器Maxi（EMD Millipore 71508，MWCO 3.5kDa）透析到PBS中。通过在NanoDrop装置上280nm处的吸光度确定抗体浓度。将2μg纯化的抗体样品在含有和不含有还原剂的SDS-PAGE凝胶（Invitrogen NuPAGE™ 4%-12% Bis-Tris蛋白质凝胶）上电泳。利用TSKgel G3000SWXL体积排阻色谱柱（Tosoh 008541）通过HPLC-SEC定量纯化的抗体样品的纯度。将纯化的抗体保存在-80℃下。

1.3 抗体的体外表征

1.3.1 SDS-PAGE和通过SEC-HPLC的纯度检测

将实施例1.2的纯化的抗体样品与上样缓冲液混合，并使用干燥浴在75℃下加热10分钟。样品上样后，SDS-PAGE在恒定电压（200V）下电泳35分钟。将凝胶染色并用eStain™ L1脱色。使用BIO-RAD成像系统获得SDS-PAGE结果。

结果汇总于下表10中。在还原条件下，该蛋白质在SDS-PAGE上以50kDa和25kDa的表观分子量迁移，对应于IgG重链和轻链，而在非还原条件下，以预期的约150kDa带迁移（图1）。

1.3.2 通过SEC-HPLC的纯度检测

通过配有TSKgel G3000SWXL柱（Tosoh Bioscience-0008541）的Agilent 1260 Infinity II系统（Agilent Technologics™）检测实施例1.2的抗体的纯度。将适当体积的抗体样品（5μL-100μL）注射到柱中，并以1mL/min的流速分离20分钟。运行缓冲液为50mM磷酸钠，150mM NaCl，pH 7.0。用280nm波长的UV光检测峰保留。采用SEC-HPLC分析法将从4.5分钟至10.5分钟的所有峰面积积分来分析抗体的纯度。操作分析软件为OpenLab CDS工作站（v2.3.0.443或v2.2.0.484）。

结果汇总于下表10中。W301088-z3-p1抗体经SEC-HPLC检测的纯度高于99%（图2）。

1.3.3 通过DSF测定的热稳定性（T_m）

使用QuantStudio® 7 Flex实时PCR系统（Applied Biosystems）研究各抗体的T_m（熔融温度）。将19μL实施例1.2的抗体溶液与1μL SYPRO Orange溶液（Invitrogen）混合并转移到96孔板（Applied Biosystems）。将板用光学粘合剂膜（Applied Biosystems）密封，并以3,000rpm离心5分钟以去除任何气泡。以0.9℃/min的速率将板从26℃加热至95℃，并收集所得的荧光数据。计算荧光随不同温度变化的负导数，将最大值定义为熔融温度T_m。如果蛋白质具有多个解折叠转变，则报道第一个T_m，将它命名为T_m1。通过QuantStudio®实时PCR软件（v1.3）自动进行数据收集和T_m计算。

将W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体的T_m值定义为荧光随不同温度变化的负导数的最大值，如下表10所列出的。数据分布示于图3，其中虚线表示T_m1值在荧光曲线中的位置。W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体的T_m1为70.1℃，这表明它具有良好的热稳定性。

1.3.4 通过HIC-HPLC检测疏水性

通过HPLC 1260 infinity II系统（Agilent Technologics™）用TSKgel butyl-NPR柱（Tosoh-0042168）检测实施例1.2的抗体的疏水性特性。用PBS缓冲液将抗体样品稀释至

0.5mg/mL，将20μL稀释的样品注射到柱中，并以0.5mL/min的流速分离61分钟。运行缓冲液是25mM磷酸钠，pH 7.0（缓冲液A）和25mM磷酸钠、1.5M $(NH_4)_2SO_4$，pH 7.0（缓冲液D）。3分钟至53分钟的运行梯度为0%至100%缓冲液D。用280nm和230nm波长的UV光检测峰保留。采用HIC-HPLC分析法将从20分钟至40分钟的所有峰面积积分来分析保留时间。操作分析软件为OpenLab CDS工作站（v2.6.0.691）。

W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体的HIC保留时间为23.52分钟（表10和图4），这表明它是一种具有良好亲水性的抗体。

1.3.5 通过DLS测定扩散相互作用参数（k_D）

使用DynaPro读板机III（Wyatt Technology）研究DLS-k_D测量结果。在抗体样品制备过程中，在解冻、过滤和浓缩时记录样品的外观。将抗体样品浓缩至超过20mg/mL，然后用PBS缓冲液稀释至2.5mg/mL、5mg/mL、10mg/mL、15mg/mL和20mg/mL的最终浓度。然后将7.5μL样品溶液加入到1536孔微板（Aurora-ABI1-00110A）中。用ClearSeal膜（Hampton Research-HR4-521）密封板，并以3,000rpm离心5分钟，使样品下降到孔的底部。每个样品一式两份在孔中测试。将板放到相应位置中，并通过DYNAMICS操作软件（v7.8.1.3）进行数据收集。收集每个蛋白质样品的5次采集，同时每次采集时间为5s。对于每次测量，确定扩散系数并针对蛋白质浓度作图。

k_D值由DYNAMICS操作软件（v7.8.1.3）自动计算，结果在表10中示出。数据分布示于图5中。W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体在PBS中的k_D为-5.17mL/g，这表示它是一种具有高溶解度的抗体。在测定过程中，同时记录抗体蛋白质的外观，在解冻并轻轻摇动后观察到一些颗粒。如果将缓冲液换成20mM His、8%蔗糖、0.02% PS80，pH 6.5，则观察不到颗粒。

上述SDS-PAGE、SEC-HPLC、HIC-HPLC、DSF和DLS结果汇总在表10中。

表10. W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体的分析数据汇总

抗体名称	通过SEC-HPLC的纯度	产率（mg/L）	分子量	pI	HIC保留时间（min）	T_m（°C）	DLS-k_D（mL/g）
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	99.26 %	416.0	147 kDa	8.54	23.52	70.1	-5.17

1.3.6 与人B7H3的结合（FACS）

使用FACS来检测抗体与人B7H3的结合。该方法可以定量分析和鉴定在活细胞表面上表达的特定分子。未标记的细胞用作对照以在检测前设定阈值，并且分析超过荧光强度阈值的每组的百分比变化。表达人全长B7H3的MCF-7细胞（1×10^5个细胞/孔）与各种浓度的抗体（用1×DPBS/1% BSA自50nM至0.0005nM系列稀释3.16倍）以100μL/孔的体积在设定为4℃的冰箱中温育1小时。抗人B7H3参考抗体依诺妥珠单抗（MacroGeneics）用作阳性对照。人IgG1同种型抗体用作阴性对照。在用1×DPBS/1% BSA洗涤细胞后，加入Alexa 647山羊抗人抗体（在1×DPBS/1% BSA中以1:500稀释）。将细胞在设定为4℃的冰箱中避光温育0.5小时。用流式细胞仪测量细胞的平均荧光强度（MFI），并用FlowJo进行分析。使用GraphPad Prism 7软件，通过四

参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体示出与表达B7H3的MCF-7细胞良好结合，EC_{50}为1.08nM和最大MFI为19900，这与嵌合抗体W301088-1.145.16-xIgG1KV320相当并优于参考抗体依诺妥珠单抗（MacroGenics）（表11，图6）。

表11. 对表达人B7H3的细胞MCF-7的FACS结合数据

抗体样品	MCF-7	
	EC_{50}（nM）	最大MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	1.16	19800
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	1.08	19900
依诺妥珠单抗（MacroGenics）	2.49	4644
hIgG1同种型	N.A.	47.8

注：N.A.表示不适用。

1.3.7 与食蟹猴B7H3的结合（FACS）

使用FACS来检测抗体与食蟹猴B7H3的结合。用食蟹猴B7H3（W3XX088-FlpinCHO.cProl.pool）（1×10^5个细胞/孔）转染FlpinCHO细胞，并将经转染的细胞与各种浓度的抗体（用1×DPBS/1% BSA自50nM至0.0005nM系列稀释3.16倍）以100μL/孔的体积在设定为4℃的冰箱中温育1小时。抗人B7H3参考抗体依诺妥珠单抗（MacroGeneics）用作阳性对照。人IgG1同种型抗体用作阴性对照。在用1×DPBS/1% BSA洗涤细胞后，加入Alexa 647山羊抗人抗体（在1×DPBS/1% BSA中以1:500稀释）。将细胞在设定为4℃的冰箱中避光温育0.5小时。用流式细胞仪测量细胞的平均荧光强度（MFI），并用FlowJo进行分析。使用GraphPad Prism 7软件，通过四参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体示出以4.68nM的EC_{50}与食蟹猴转染的细胞良好结合，这与嵌合抗体W301088-1.145.16-xIgG1KV320相当并优于依诺妥珠单抗（MacroGenics）（表12，图7）。

表12. 对食蟹猴B7H3转染的稳定细胞池的FACS结合数据

抗体样品	食蟹猴B7H3转染的稳定细胞池	
	EC_{50}（nM）	最大MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	5.25	67100
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	4.68	63600
依诺妥珠单抗（MacroGenics）	9.58	19700
hIgG1同种型	N.A.	6.67

注：N.A.表示不适用。

1.3.8 与人4IgB7H3的结合亲和力（SPR）

使用表面等离子体共振（SPR）来测定抗体对人4IgB7H3的亲和力。通过Biacore 8K测定抗体对人4IgB7H3的亲和力。通过在注射到通道前立即混合400mM EDC和100mM NHS（GE）来

制备激活剂。用激活剂将CM5传感器芯片激活，保持420秒。然后以10μL/min的流速将山羊抗人Fc IgG（30μg/mL，在10mM NaAc中，pH 4.5）注射到通道，保持420秒。用1M乙醇胺盐酸将芯片去激活。将稀释于流动缓冲液（1×HBS-EP+）中的抗体以10μL/min的流速注射到通道，保持30秒。将7种浓度（100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、2.125nM和1.563nM）的分析物人4IgB7H3以30μL/min的流速依次注射到通道，保持180秒的结合期，随后3600秒的解离。在解离期后注射甘氨酸（10mM，pH 1.5），作为再生缓冲液。

从测试传感图中减去参考通道和缓冲液通道的传感图。用1:1结合模型对实验数据进行拟合。用于计算的人4IgB7H3的分子量为47.8kDa。

通过Biacore 8K评估软件附带的1:1结合模型对实验数据进行拟合。如表13和图8A-图8C所示，W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体示出对人4IgB7H3的高结合亲和力。K_D值为7.08E-11M，其优于依诺妥珠单抗（MacroGenics）。

表13. 与人4IgB7H3结合的抗体亲和力结果

分析物	抗体	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）
人4IgB7H3	W301088-1.145.16 -xIgG1KV320	6.57E+05	3.39E-05	5.15E-11
	W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	6.57E+05	4.65E-05	7.08E-11
	依诺妥珠单抗（MacroGenics）	1.24E+05	1.26E-04	1.02E-09

1.3.9 与人2IgB7H3的结合亲和力（SPR）

使用表面等离子体共振（SPR）来测定抗体对人2IgB7H3的亲和力。通过Biacore 8K测定抗体对人2IgB7H3的亲和力。通过在注射到通道前立即混合400mM EDC和100mM NHS（GE）来制备激活剂。用激活剂将CM5传感器芯片激活，保持420秒。然后以10μL/min的流速将山羊抗人Fc IgG（30μg/mL，在10mM NaAc中，pH 4.5）注射到通道，保持420秒。用1M乙醇胺盐酸将芯片去激活。将稀释于流动缓冲液（1×HBS-EP+）中的抗体以10μL/min的流速注射到通道，保持30秒。将7种浓度（500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM、15.625nM和7.813nM）的分析物人2IgB7H3以30μL/min的流速依次注射到通道，保持120秒的结合期，随后300秒的解离。在解离期后注射甘氨酸（10mM，pH 1.5），作为再生缓冲液。

从测试传感图中减去参考通道和缓冲液通道的传感图。用1:1结合模型对实验数据进行拟合。用于计算的人2IgB7H3的分子量为25.2kDa。

通过Biacore 8K评估软件附带的1:1结合模型对实验数据进行拟合。如表14和图9A-图9C所示，相比于对人4IgB7H3的结合，W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体示出对人2IgB7H3的较弱结合亲和力。K_D值为4.64E-08M。

表14. 与人2IgB7H3结合的抗体亲和力结果

分析物	抗体	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）
人2IgB7H3	W301088-1.145.16 -xIgG1KV320	2.35E+05	1.36E-02	5.77E-08
	W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	3.03E+05	1.41E-02	4.64E-08

	依诺妥珠单抗（MacroGenics）	6.44E+04	1.68E-02	2.61E-07

1.3.10 与食蟹猴B7H3的结合亲和力（SPR）

使用表面等离子体共振（SPR）来测定抗体对食蟹猴B7H3的亲和力。通过Biacore 8K测定抗体对食蟹猴B7H3的亲和力。通过在注射到通道前立即混合400mM EDC和100mM NHS（GE）来制备激活剂。用激活剂将CM5传感器芯片激活，保持420秒。然后以10μL/min的流速将山羊抗人Fc IgG（30μg/mL，在10mM NaAc中，pH 4.5）注射到通道，保持420秒。用1M乙醇胺盐酸将芯片去激活。将稀释于流动缓冲液（1×HBS-EP+）中的抗体以10μL/min的流速注射到通道，保持30秒。将9种浓度（50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM、1.563nM、0.781nM、0.391nM和0.196nM）的分析物食蟹猴B7H3以30μL/min的流速依次注射到通道，保持180秒的结合期，随后3600秒的解离。在解离期后注射甘氨酸（10mM，pH 1.5），作为再生缓冲液。

从测试传感图中减去参考通道和缓冲液通道的传感图。用1:1结合模型对6种分析物浓度（50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM和1.563nM）的实验数据进行拟合。用于计算的食蟹猴B7H3的分子量为49kDa。

通过Biacore 8K评估软件附带的1:1结合模型对实验数据进行拟合。如表15和图10A-图10C所示，W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体示出对食蟹猴B7H3的高结合亲和力，这相当于其对人4IgB7H3的结合。K_D值为5.74E-11M，其优于依诺妥珠单抗（MacroGenics）。

表15. 与食蟹猴B7H3结合的抗体亲和力结果

分析物	抗体	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）
食蟹猴B7H3	W301088-1.145.16 -xIgG1KV320	5.21E+05	2.94E-05	5.64E-11
	W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	5.27E+05	3.02E-05	5.74E-11
	依诺妥珠单抗（MacroGenics）	1.85E+05	8.14E-05	4.41E-10

1.3.11 内化测试（HCS）

抗体内化由operetta CLS（PerkinElmer）测定，所述operetta CLS是一种可以以高速和高灵敏度收集和分析样品图像的高含量成像和分析系统。将表达人全长B7H3的MCF-7细胞（1.5×10^4个细胞/孔）接种到用8μg/mL聚-D-赖氨酸预包被的96孔透明底部黑色板中。在设定为37℃、5% CO_2的培养箱中温育过夜后，将各种浓度的抗体（用1×DPBS/1% BSA自50nM至0.0005nM系列稀释3.16倍）以100μL/孔的体积在设定为4℃的冰箱中温育2小时。抗人B7H3参考抗体依诺妥珠单抗（MacroGeneics）用作阳性对照。人IgG1同种型抗体用作阴性对照。在用1×DPBS/1% BSA洗涤细胞后，加入Alexa 647山羊抗人抗体（在1×DPBS/1% BSA中以1:500稀释）。将细胞在设定为4℃的冰箱中避光温育1小时。然后将细胞洗涤一次，并在37℃下在1×DPBS/1% BSA中重悬2小时。温育后，弃去上清液，加入100μL/孔Hoechst 33342（在1×DPBS中以1:5000稀释）并在环境温度下温育15分钟。用1×DPBS洗涤细胞后，加入100μL/孔酸洗缓冲液（100mM甘氨酸、150mM NaCl，pH 2.5），并在设定为4℃的冰箱中温育5分钟。用1×DPBS将细胞洗涤一次，并用60μL 4% PFA固定。通过operetta CLS测量和分析细胞的平均荧光强度（MFI）。使

用GraphPad Prism 7软件，通过四参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320抗体示出以0.51nM的EC_{50}被表达B7H3的MCF-7细胞内化，表明了良好的内化能力，这与嵌合抗体W301088-1.145.16-xIgG1KV320相当并优于参考抗体依诺妥珠单抗（MacroGenics）（表16，图11）。

表16. 表达人B7H3的细胞MCF-7对抗体的内化

样品	抗体内化	
	EC_{50}（nM）	最大MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	0.51	57180
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	0.44	52315
依诺妥珠单抗（MacroGenics）	1.95	39777
hIgG1同种型	N.A.	21

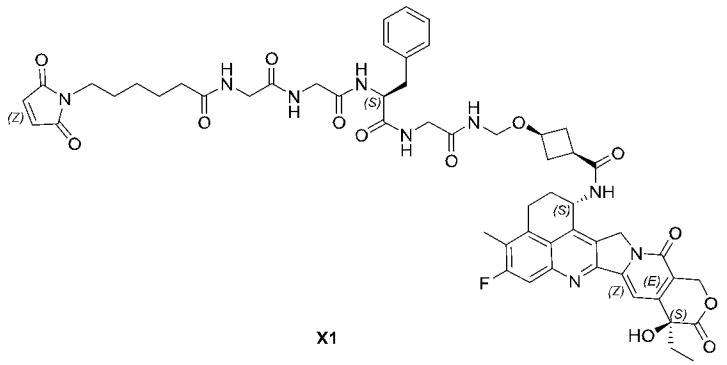
注：N. A. 表示不适用。

实施例 2. 抗体-药物偶联物（ADC）的制备和与 B7H3 抗原的结合活性

本实施例的抗体-药物偶联物中使用的抗 B7H3 抗体为 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(简称 WBP301088)或 W301088-1.145.16-xIgG1KV320。W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 (WBP301088)的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

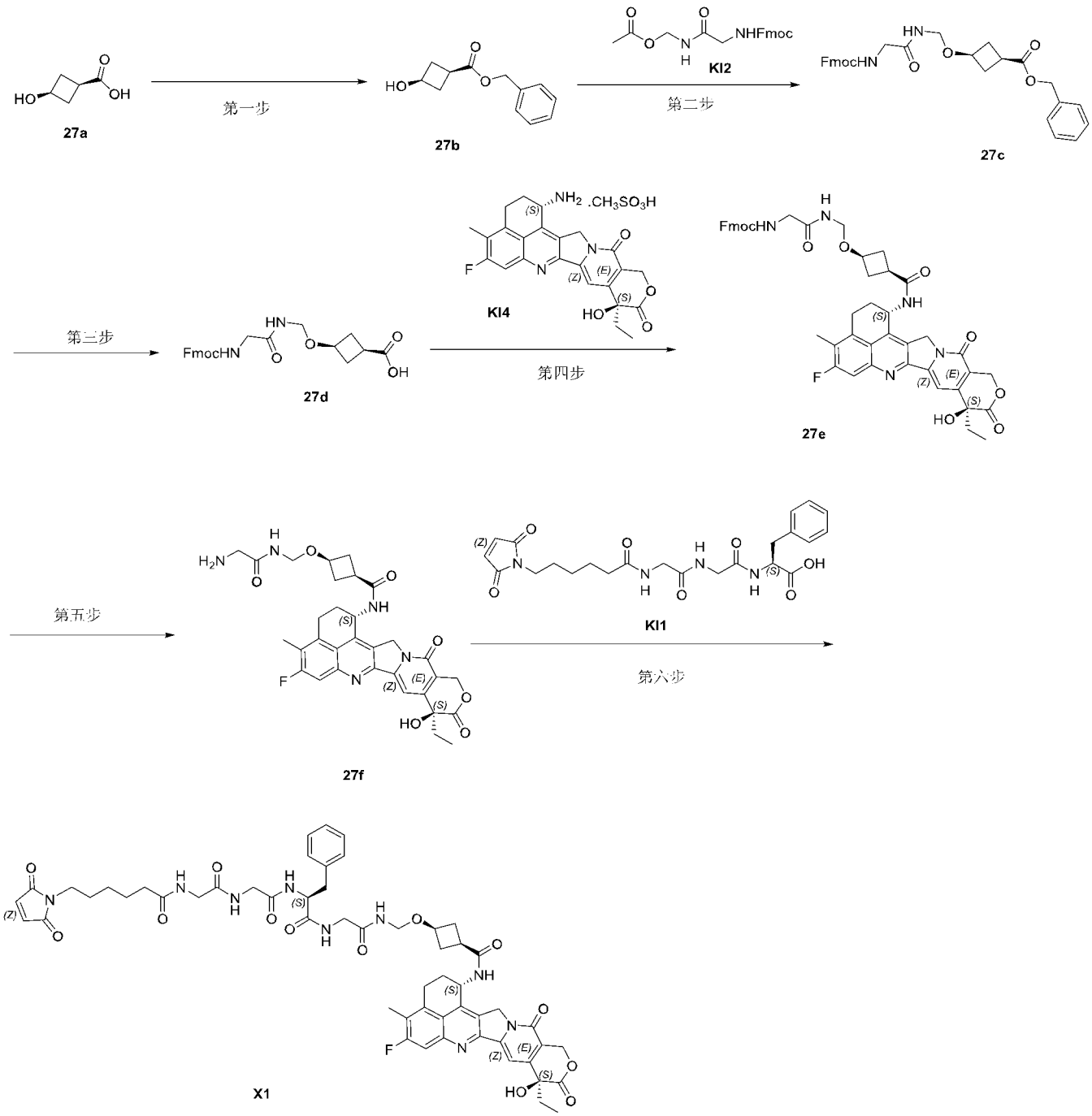
2.1 接头-细胞毒素（linker-payload）的制备

2.1.1 接头-细胞毒素 X1 的制备：



X1

接头-细胞毒素 X1 的制备方案如下所示：



第一步

氮气保护下，向 27a (5.00 g，43.0 mmol)，$NaHCO_3$(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℃反应 17 小时。TLC (PE/EA= 2/1)（PE 是石油醚的缩写；EA 是乙酸乙酯的缩写）显示反应完全后，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 Na_2SO_4 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 KI2 (4.00 g，10.9 mmol)，TsOH(800 mg，4.65 mmol) 的 THF(30 mL)溶液中，在 0℃下，滴加 27b (4.50 g，21.8 mmol)的 THF (10 mL) 溶液，并在 25℃反应 2 小时。TLC (PE/EA = 1/2)显示反应完全后，将反应液加入到 200 mL 水中，用 EA (200 mL)萃取两次分液，无水 Na_2SO_4 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℃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℃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℃下，向 27d (220mg，0.515mmol)，KI4 (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℃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℃下，向 27e (260 mg，0.309 mmol)的二氯甲烷（DCM）(30 mL)溶液中滴加二乙胺(8 mL)，并在 0℃反应 3 小时。LCMS 显示反应完全。将反应液加入 0℃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%。

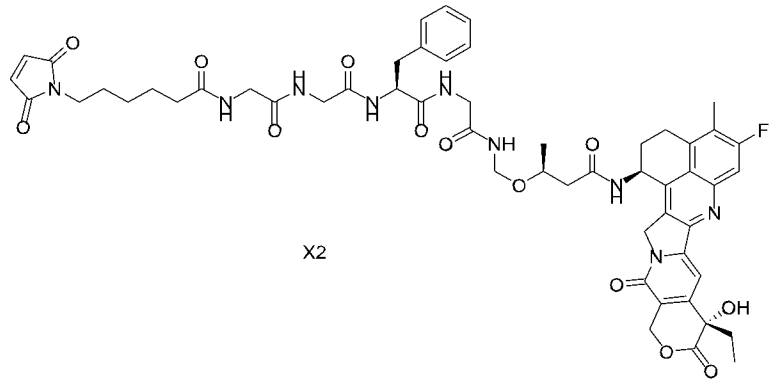
第六步

氮气保护下，在 0℃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℃反应 2 小时。LCMS 显示基本反应结束。在 0℃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]

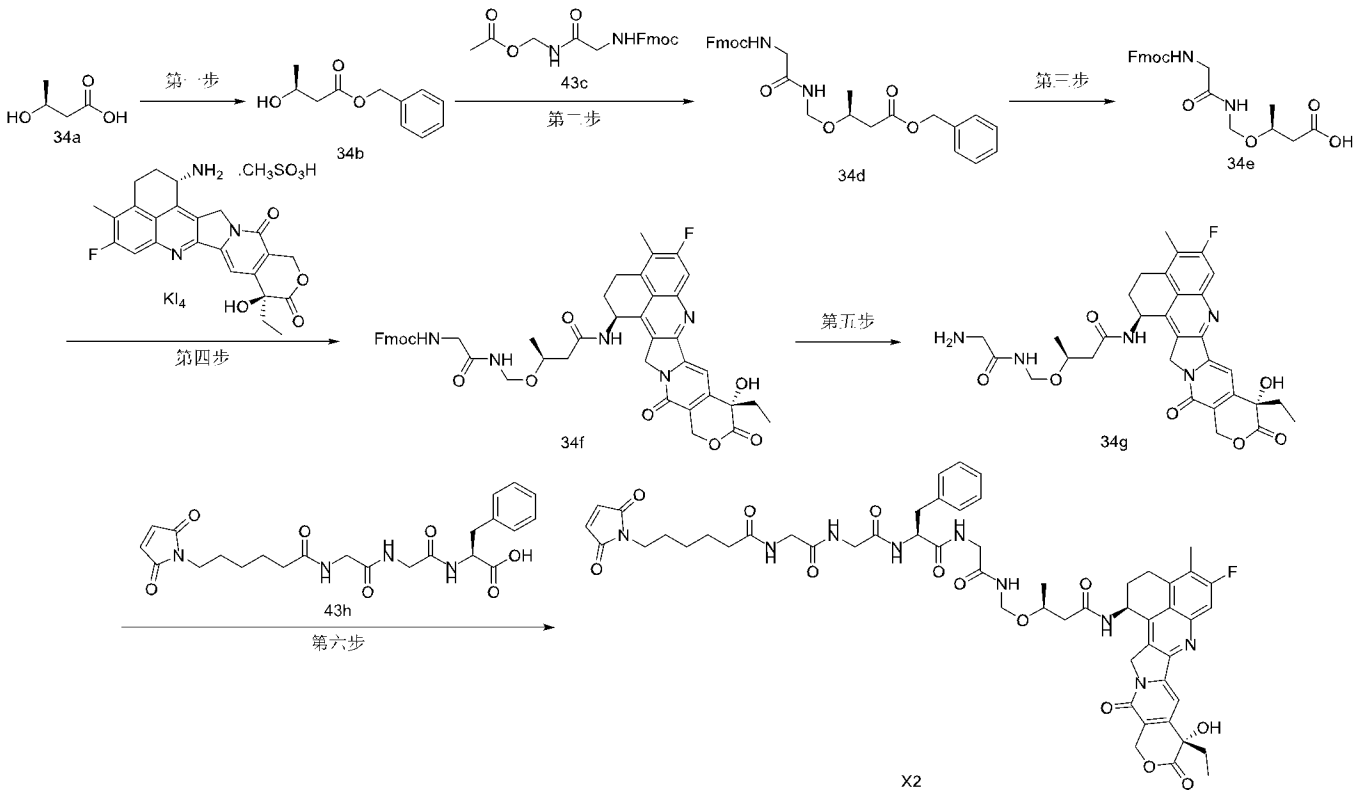
H-NMR (400 MHz，MeOD)：7.65 (d, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.30-7.21(m, 5H), 6.79 (s, 2H), 5.69-5.65 (m, 1 H), 5.57 (d, 1H), 5.43-5.10 (m, 3H), 4.70 (d, 2H), 4.48-4.39 (m, 2H), 4.10-4.05 (m, 1H), 4.01-3.75 (m, 5H),3.46 (t, 2H), 3.22-3.15 (m, 2H), 3.07-3.00 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.37-2.20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

2.1.2 接头-细胞毒素 X2 的制备



X2

接头-细胞毒素 X2 的制备方案如下所示：



第一步

将 34a（5 g，48.0 mmol）、K_2CO_3（19.9 g，144.0 mmol） 溶于 DMF（20 mL）中，滴加苄溴（12.3 g，72.0 mmol），25 ℃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 43c（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℃，滴加 34b（7.7 g，39.6 mmol）的 THF（10 mL）溶液，加完后 0 ℃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 Na_2SO_4 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 ℃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℃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℃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 ℃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℃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℃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]+。

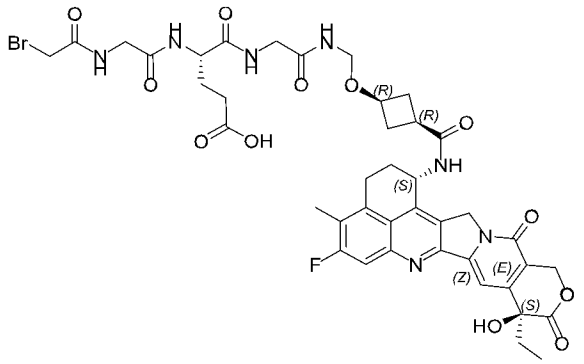
第六步

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）溶液中在 0℃下加入 HATU（45 mg，0.118 mmol）的 DMF（1 mL）溶液，并在 0℃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]+。

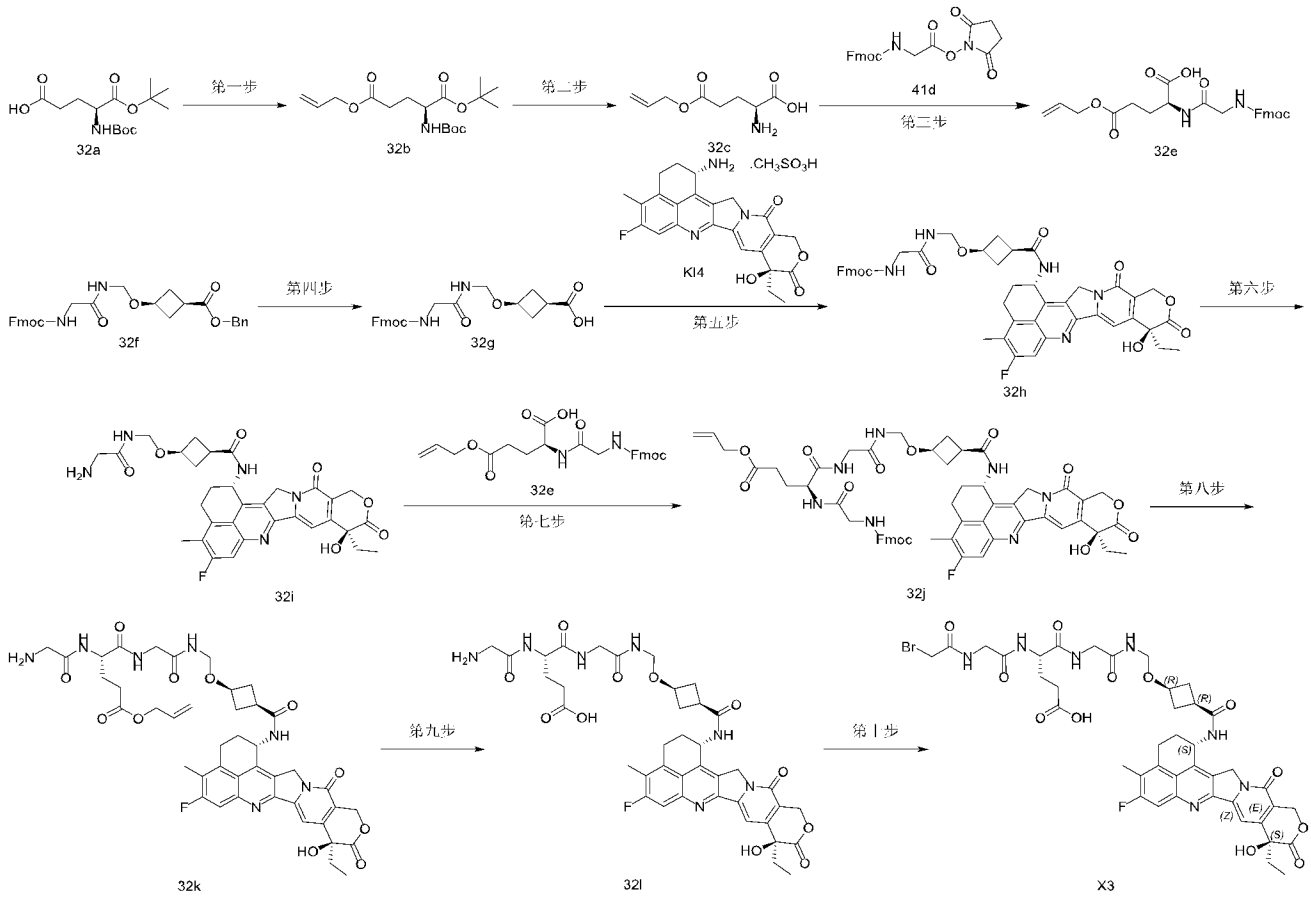
1H NMR (400 MHz, Methanol-d4) δ 7.69 – 7.61 (m, 2H), 7.22 – 7.16 (m, 2H), 7.16 – 7.09 (m, 3H), 6.76 (s, 2H), 5.70 – 5.64 (m, 1H), 5.60 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 5.40 – 5.31 (m, 2H), 5.26 (d, J = 19.0 Hz, 1H), 4.65 – 4.50 (m, 7H), 4.25 – 4.16 (m, 1H), 3.87 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 3.83 – 3.76 (m, 3H), 3.72 (d, 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).

2.1.3 接头-细胞毒素 X3 的制备



X3

接头-细胞毒素 X3 的制备方案如下所示：



第一步

向 32a（2.00 g，6.6 mmol），K_2CO_3（1.82 g，13.2 mmol）的 MeCN（20 mL）中加入溴丙烯（960 mg，7.92 mmol）， 在 20 ℃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 ℃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），$NaHCO_3$（613 mg，7.3 mmol）的 DME/H_2O（20 mL/10 mL）中加入 41d（1.92 g，4.87 mmol），在 25 ℃下搅拌 3 小时。TLC（DCM/MeOH = 1/1）显示反应结束。将反应液倒入水 100mL 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 ℃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 ℃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 ℃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 ℃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 ℃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），$Pd(PPh_3)_4$（82 mg，0.071 mmol）的 THF（5 mL）中加入吗啡啉（93 mg，1.07 mmol）， 在 25 ℃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]+。

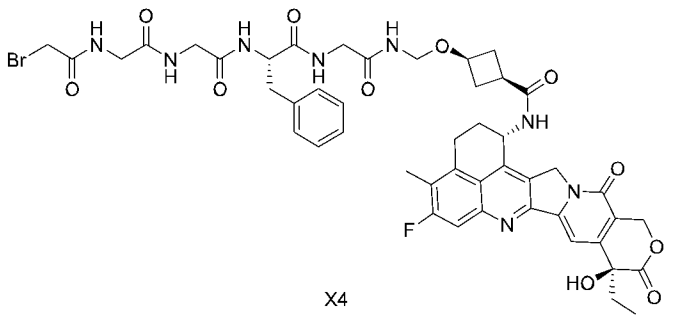
第十步

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 ℃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]+。

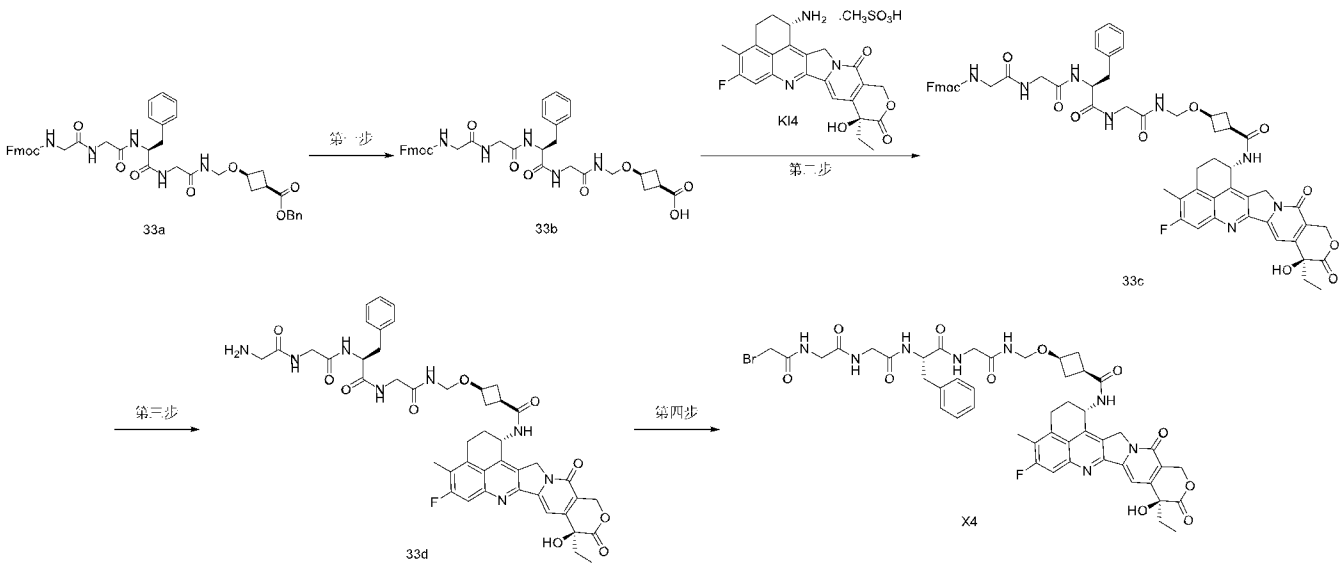
1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.11 (s, 1H), 8.54 – 8.42 (m, 3H), 8.27 – 8.16 (m, 2H), 7.78 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.61 – 5.51 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.20 – 5.05 (m, 2H), 4.56 – 4.42 (m, 2H), 4.32 – 4.22 (m, 1H), 3.96 – 3.87 (m, 3H), 3.79 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.70 (d, J = 5.9 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).

2.1.4 接头-细胞毒素 X4 的制备：



X4

接头-细胞毒素 X4 的制备方案如下所示：



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 ℃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 ℃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 ℃下搅拌 17 小时。TLC（DCM/MeOH = 5/1）显示反应结束。将反应液倒入 PE（100Ml）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℃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 B7H3 抗体药物-偶联物的制备

2.2.1 参照 ADC-1(第一三共，DS7300)的制备

DS-7300 由人源化抗 B7-H3 IgG1 单克隆抗体通过基于四肽的可裂解接头偶联于拓扑异构酶 I 抑制剂有效载荷 Exatecan 衍生物 Deruxtecan 组成。

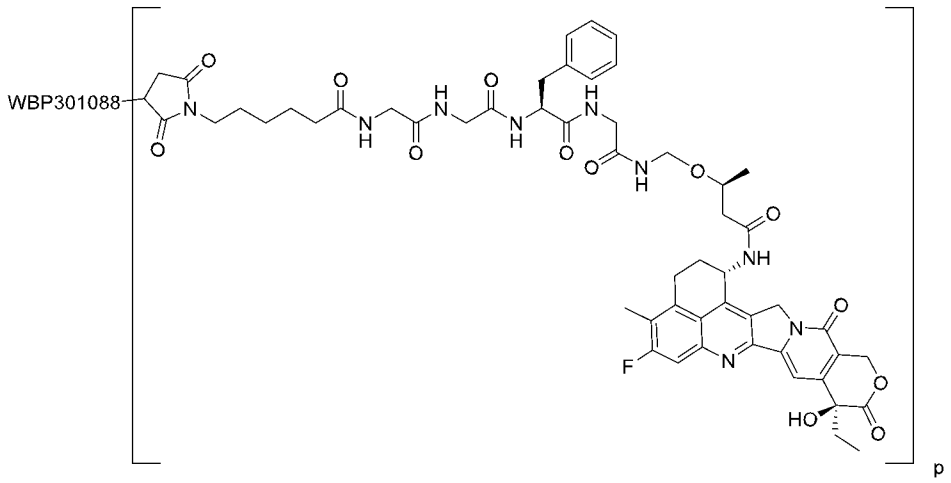
用超纯水分别配制还原剂和保护剂如下：2 mg/ml TCEP (Tris-2- carboxyethyl-phosphine，厂家：Thermo)水溶液和 100 mmol/L EDTA(乙二胺四乙酸二钠厂家：Sigma)水溶液。

将 Linker-payload (Deruxtecan)溶于干燥的 DMA（N,N-Dimethylacetamide，二甲基乙酰胺，厂家：国药集团），配制成 10 mg/mL 的 linker-payload DMA 溶液。

取 16 mg 7.4mg/ml 的参照单抗（抗体序列使用专利“CN104755494B”中序列号 9 所示的重链，序列号 16 所示的轻链，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 50 ml 离心管，加入 30mM His-HAc, pH5.5 缓冲液稀释抗体浓度至 5 mg/ml，按照反应液总体积 5%加入 100 mM EDTA 水溶液，震荡混匀后加入 2 mg/ml TCEP 水溶液进行抗体还原，TCEP 与抗体的摩尔比 2.7：1，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，37℃，2h。按照药物与抗体终浓度摩尔比 9：1 加入前述 Linker-payload 的 DMA 溶液，按照反应液总体积 10%补充 DMA，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，4℃，1h。用超滤管（MWCO 30KD，厂家：密理博公司）置换样品保存缓冲液，先用含有 10% DMSO 的 30mM His-HAc, pH5.5 缓冲液超滤 3 次，再用无 DMSO 的 30mM His-HAc, pH5.5 超滤 6 次，最终用 0.2 μm PES 膜过滤除菌，得到抗体-药物偶联物参照 ADC-1 11 mg，浓度 5.825 mg/mL，收率 68.75%。

经检测，抗体-药物偶联物参照 ADC-1 的载药量（DAR）为 4.59，SEC 纯度为 99.64%。

2.2.2 抗体-药物偶联物 WBP301088-X2 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)水溶液和 100 mmol/L EDTA(乙二胺四乙酸二钠厂家：Sigma)水溶液。

将实施例 2.1.2 制备的 Linker-payload X2 溶于干燥的 DMA（N,N-Dimethylacetamide，二甲基乙酰胺，厂家：国药集团），配制成 10 mg/mL 的 linker-payload DMA 溶液。

1） 如下制备抗体-药物偶联物 WBP301088-X2（DAR4）：

取 20 mg 11.3mg/ml 的 WBP301088 单抗置于 50 ml 离心管，加入 30mM His-HAc, pH5.5 缓冲液稀释抗体浓度至 5 mg/ml，按照反应液总体积 5%加入 100 mM EDTA 水溶液，震荡混匀后加入 2 mg/ml TCEP 水溶液进行抗体还原，TCEP 与抗体的摩尔比 4.5：1，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，37℃，2h。按照药物与抗体终浓度摩尔比 12：1 加入前述 Linker-payload 的 DMA 溶液，按照反应液总体积 10%补充 DMA，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，4℃，1h。用超滤管（MWCO 30KD，厂家：密理博公司）置换样品保存缓冲液，先用含有 10% DMSO 的 30mM His-HAc, pH5.5 缓冲液超滤 3 次，再用无 DMSO 的 30mM His-HAc, pH5.5 超滤 6 次，最终用 0.2 μm PES 膜过滤除菌，得到抗体-药物偶联物 WBP301088-X2（DAR4） 15 mg，浓度 7.162 mg/mL，收率 75%。

经检测，抗体-药物偶联物 WBP301088-X2（DAR4）的载药量（DAR）为 4.02，SEC 纯度为 99.20%。

2） 如下制备抗体-药物偶联物 WBP301088-X2（DAR6）：

取 20 mg 11.3mg/ml 的 WBP301088 单抗置于 50 ml 离心管，加入 30mM His-HAc, pH5.5 缓冲液稀释抗体浓度至 5 mg/ml，按照反应液总体积 5%加入 100 mM EDTA 水溶液，震荡混匀后加入 2 mg/ml TCEP 水溶液进行抗体还原，TCEP 与抗体的摩尔比 8：1，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，37℃，2h。按照药物与抗体终浓度摩尔比 12：1 加入前述 Linker-payload 的 DMA 溶液，按照反应液总体积 10%补充 DMA，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，4℃，1h。用超滤管（MWCO 30KD，厂家：密理博公司）置换样品保存缓冲液，先用含有 10% DMSO 的 30mM His-HAc, pH5.5 缓冲液超滤 3 次，再用无 DMSO 的 30mM His-HAc, pH5.5 超滤 6 次，最终用 0.2 μm PES 膜过滤除菌，得到抗体-药物偶联物 WBP301088-X2（DAR6） 10.8 mg，浓度 4.933 mg/mL，收率 54%。

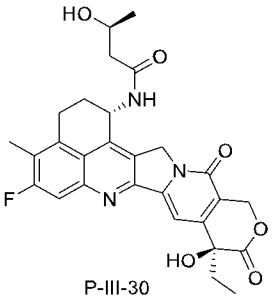
经检测，抗体-药物偶联物 WBP301088-X2（DAR6）的载药量（DAR）为 5.68，SEC 纯度为 99.57%。

3） 如下制备抗体-药物偶联物 WBP301088-X2（DAR8）：

取 20 mg 11.3mg/ml 的 WBP301088 单抗置于 50 ml 离心管，加入 30mM His-HAc, pH5.5 缓冲液稀释抗体浓度至 5 mg/ml，按照反应液总体积 5%加入 100 mM EDTA 水溶液，震荡混匀后加入 2 mg/ml TCEP 水溶液进行抗体还原，TCEP 与抗体的摩尔比 15：1，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，37℃，2h。按照药物与抗体终浓度摩尔比 18：1 加入前述 Linker-payload 的 DMA 溶液，按照反应液总体积 10%补充 DMA，震荡混匀后置于制冷型恒温混匀仪上反应，4℃，1h。用超滤管（MWCO 30KD，厂家：密理博公司）置换样品保存缓冲液，先用含有 10% DMSO 的 30mM His-HAc, pH5.5 缓冲液超滤 3 次，再用无 DMSO 的 30mM His-HAc, pH5.5 超滤 6 次，最终用 0.2 μm PES 膜过滤除菌，得到抗体-药物偶联物 WBP301088-X2（DAR8）10.2 mg，浓度 4.278 mg/mL，收率 51.0%。

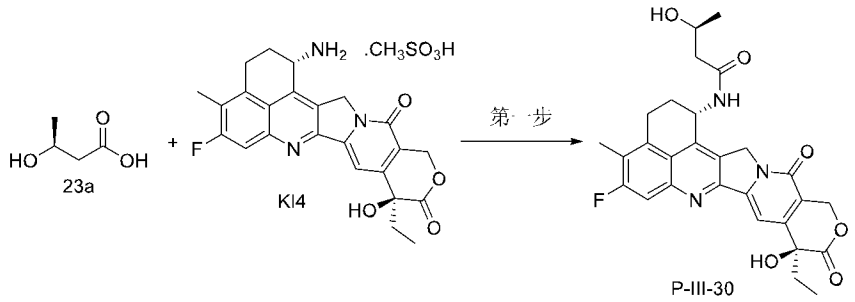
经检测，抗体-药物偶联物 WBP301088-X2（DAR8）的载药量（DAR）为 7.45，SEC 纯度为 98.73%。

2.3. 细胞毒素（Payload）的制备



P-III-30

细胞毒素 P-III-30 的制备方案如下所示：



第一步

氮气保护下，向 KI4（100 mg，0.19 mmol），HATU（85.7 mg，0.23 mmol），23a（21.5 mg，0.21 mmol）的 DMF（2 mL）溶液中滴加 DIEA（60.6 mg，0.47 mmol），加完后在 0 ℃反应 2 小时。LCMS 显示原料反应完全。将反应液滴加到 20 mL 水中搅拌，析出固体后过滤，得 60.2 mg 灰色固体 P-III-30，收率：61%。MS-ESI: m/z 522.2 [M+H]+。

1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.42 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.62 – 5.53 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.30 – 5.16 (m, 2H), 4.63 (d, J = 4.6 Hz, 1H),

4.09 – 3.99 (m, 1H), 3.22 – 3.11 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.28 (dd, J = 13.7, 7.2 Hz, 1H), 2.22 – 2.08 (m, 3H), 1.94 – 1.78 (m, 2H), 1.08 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

2.4 基于 ELISA 检测抗体-药物偶联物及其未偶联抗体对人 B7H3 抗原的结合活性

在本实施例中，使用 ELISA 法检测了抗体与药物偶联之前和之后对 B7H3 抗原蛋白的特异性结合是否有变化。所使用的抗原和检测抗体的信息如下。

材料	供应商	目录号	批次号
人 PD-L1, His Tag	ACRO	PD1-H5229	449-214EF1-142
人 B7-H2, His Tag	ACRO	B72-H5221	741-71AF1-XX
人 B7-H3(4Ig), His Tag（为本实施例中“重组的人 B7H3 抗原”）	ACRO	B7B-H52E7	2856C-2047F1-ZR
人 B7-H4 蛋白, His Tag	ACRO	B74-H5222	1042-21B5F1-123
人 B7-H5, His Tag	ACRO	B75-H52H0	1760-20CAF1-ZL
人 B7-H6	ACRO	B76-H52H8	2058b-89MF1-VD
人 B7-1 蛋白, His Tag	ACRO	B71-H5228	2408-209HF2-111
人 B7-2 蛋白, His Tag	ACRO	CD6-H5223	743-208VF1-YH
人 PD-L2，His Tag (经 SPR 证实的)	ACRO	PD2-H5220	1040-2143F1-W7
人 B7-H7, His Tag	ACRO	B77-H52H5	2060b-219DF1-11B
人 BTNL2 蛋白, His Tag	AtaGenix	ATMP02212HU	64306
抗人 IgG (Fab 特异的)-过氧化物酶，山羊产生的抗体	SIGMA	A0293	0000106803

2.4.1 基于 ELISA 检测结合活性

在 96 孔 ELISA 板上，包被重组的人 B7H3 抗原（见上表）2 μg/mL，30 μL/孔，4℃过夜。次日，将孔板用 PBST 洗 3 次后用 5%脱脂牛奶封闭 2 h，用 PBST 洗板 3 次后，加入梯度稀释的抗体 WBP301088、抗体-药物偶联物 WBP301088-X2(DAR6)或同型对照抗体 hIgG1 同种型，并孵育 1 h。之后，用 PBST 清洗 3 次后加入 100 μL/孔 1:5000 稀释的 HRP 标记的抗人第二抗体并孵育 1 h。孵育完成后，PBST 洗板六次，加 TMB (SurModics，TMBS-1000-01)显色。根据显色结果，加入 2M 的 HCl 终止反应，通过酶标仪(Molecular Devices，SpecterMax 190)在 OD450 下读板，结果显示在图 13 中，结果表明，抗体与药物偶联之前和之后对人 B7H3 抗原蛋白的结合活性没有显著性变化。

2.4.2 基于 ELISA 检测与 B7 家族蛋白的结合活性

通过在 4℃孵育过夜将人 PD-L1 蛋白（见上表）、人 B7-H2 蛋白、人 B7-H3 蛋白、人 B7-H4 蛋白、人 B7-H5 蛋白、人 B7-H6 蛋白、人 B7-1 蛋白、人 B7-2 蛋白、人 PD-L2 蛋白、人 B7-H7 蛋白、人 BTNL2 蛋白分别固定到 96 孔板上。然后将所述 96 孔板通过在 37℃与 PBS 中的 1% BSA 一起孵育 1 小时来封闭。在封闭之后，将所述 96 孔板用 PBST (含有 0.05% Tween20 的 PBS)洗涤 3 次。在结合缓冲液(含有 0.05% Tween20 和 0.5% BSA 的 PBS)中制备连续稀释的抗

体 WBP301088、抗体-药物偶联物 WBP301088-X2(DAR6)或同型对照抗体 hIgG1 同种型，并且在 37℃将它们与固定到 96 孔板上的各 B7 家族蛋白一起孵育 1 小时。在孵育之后，将所述 96 孔板用 PBST 洗涤 3 次，在 37℃与结合缓冲液中的第二抗体（见上表）一起孵育 1 小时，再次洗涤，用 TMB 显影并且使用 1 M H_2SO_4 终止反应。结果示于图 14 中。

由图 14 可见，抗体与药物偶联之前和之后对人 B7H3 抗原蛋白的结合活性没有显著性变化，且仅与人 B7-H3 特异性结合，与其他 B7 家族蛋白均不特异性结合。

实施例 3. 测试抗体-药物偶联物对肿瘤细胞体外增殖的抑制作用

采用 CellTiter-Glo ® 化学发光细胞存活率检测法（即 CTG 方法）评估抗 B7H3 ADC WBP301088-X2(DAR6)及参照分子 ADC-1 与 B7H3 阳性表达的人肿瘤细胞孵育处理 7 天，对细胞增殖的抑制作用。

收集对数生长期细胞，以 1000-3000 个细胞/孔的密度铺板，细胞板放入 37℃、5% CO_2 培养箱培养过夜。实验第二天，将 WBP301088-X2(DAR6)用完全培养基按 3 倍稀释，获得 9 个浓度梯度（以 1000nM 的最高浓度开始）药物后，50μL/孔加入细胞培养板中，完全培养基作为空白对照，设置 3 个复孔；继续于 37°C、5%CO_2 培养箱内孵育 5 天。孵育结束，取出细胞培养板，平衡至室温后，每孔加入 50μL CTG 检测试剂，震荡混匀后放置于暗处静置 10 分钟后，利用酶标仪检测读取信号值。应用 GraphPad Prism 软件，使用非线性回归模型绘制 S 型剂量-反应曲线并计算 IC_{50} 值。细胞存活率计算公式=(Lum $_{待测药}$-Lum $_{空白对照}$)/(Lum $_{溶剂空白对照}$-Lum $_{空白对照}$)×100%。

实验结果如下表所示，其中，CAL-120 来源 DSMZ，其他细胞株来源 ATCC。

表 17：抗体-药物偶联物对人肿瘤细胞的增殖抑制活性

细胞	细胞类别	WBP301088-X2（IC_{50} (nM)）	参照 ADC-1（IC_{50} (nM)）
NCI-H1568	肺癌	4.8	32.8
NCI-H358	肺癌	11.4	122.9
Calu-6	肺癌	52.3	428.5
MCF-7	乳腺癌	55.5	435.2
U87 MG	脑癌	86.5	354.3
HT-29	结直肠癌	446	1144
A375	黑色素瘤	164.7	314.7
A549	肺癌	369.3	378.5
PC-3	前列腺癌	180.8	958.9
CAL-120	乳腺癌	268.8	NA

根据表 17 的结果可见，本申请抗体-药物偶联物 WBP301088-X2(DAR6)对多种 B7H3 阳性表达的肿瘤细胞具有增殖抑制活性，其活性优于参照 ADC-1。

实施例 4. 抗体-药物偶联物对人肺癌细胞 Calu-6 荷瘤小鼠的药效评价

为研究 WBP301088-X2(DAR6)对体内形成肿瘤的抑制作用，在小鼠体内用 B7H3 阳性表达的人肺癌细胞 Calu-6 形成移植瘤后，评估 WBP301088-X2(DAR6)的体内抗肿瘤效果。

使用 6-8 周龄的雌性 BALB/c Nude 小鼠（购自浙江维通利华实验动物技术有限公司）作为试验动物。将 10×10^6 个 Calu-6 肺癌细胞接种于 6-8 周龄的雌性 BALB/c Nude 小鼠右侧背部皮下。观察小鼠的肿瘤生长情况，当肿瘤体积达到约 139 mm^3，对荷瘤小鼠进行随机分组，空白对照组或治疗组每组 6 只小鼠，并于分组当天（第 0 天）通过静脉(i.v.)注射 WBP301088-X2 或参照 ADC-1，共注射 1 次，施用剂量分别为 1mg/kg 或 3mg/kg，于第 28 天结束实验。实验分组和给药如下。每周测量 2 次肿瘤体积和小鼠体重，记录数据。

空白对照（阴性对照组）：生理盐水

WBP301088-X2（治疗组）：1 mg/kg

WBP301088-X2（治疗组）：3 mg/kg

参照 ADC-1（治疗组，为阳性对照组）：1 mg/kg

参照 ADC-1（治疗组，为阳性对照组）：3 mg/kg

所有样品均用生理盐水稀释配制。

实验结束时，将小鼠安乐死，如下计算肿瘤抑制率 TGI：

$TGI\ (\%) = [1-(T_i-T_0)/(V_i-V_0)] \times 100$

T_i：治疗组和阳性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；

T_0：治疗组和阳性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；

V_i：阴性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；

V_0：阴性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值。

实验结果如图 15、表 18 和表 19 所示。

表 18. 各组在不同时间点的肿瘤体积(mm^3)

组别	1	2	3	4	5
天数（天）	空白对照肿瘤体积（mm^3）	参照 ADC-1, 1 mg/kg 肿瘤体积（mm^3）	参照 ACD-1, 3 mg/kg 肿瘤体积（mm^3）	WBP301088-X2, 1 mg/kg 肿瘤体积（mm^3）	WBP301088-X2, 3 mg/kg 肿瘤体积（mm^3）
0	139 ± 10	139 ± 14	139 ± 16	140 ± 14	140 ± 20
3	207 ± 18	195 ± 20	184 ± 20	196 ± 17	192 ± 27
7	355 ± 27	245 ± 28	210 ± 23	238 ± 21	219 ± 28

10	547 ± 44	309 ± 44	225 ± 27	267 ± 22	227 ± 30
14	963 ± 74	446 ± 82	237 ± 29	290 ± 29	198 ± 22
17	1357 ± 97	595 ± 103	252 ± 31	317 ± 35	156 ± 15
21	1866 ± 169	946 ± 151	254 ± 28	363 ± 47	116 ± 3
24	2521 ± 257	1241 ± 160	267 ± 32	394 ± 56	75 ± 9
28	2956 ± 233	1623 ± 201	296 ± 37	457 ± 76	61 ± 9

注：肿瘤体积用平均值 ± 标准误表示；天数为开始给药后的天数。

表 19. 受试抗体-药物偶联物对 Calu-6 细胞皮下异种移植的肿瘤小鼠模型的抑瘤药效评价（基于给药后第 24 天肿瘤体积计算得出）

组别	肿瘤体积 (mm^3)（第 24 天）	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
空白对照	2521 ± 257	--	--	--
参照 ADC-1, 1 mg/kg	1241 ± 160	49.25	53.72	0.056
参照 ADC-1, 3 mg/kg	267 ± 32	10.61	94.62	0.005
WBP301088-X2, 1 mg/kg	394 ± 56	15.61	89.37	0.005
WBP301088-X2, 3 mg/kg	75 ± 9	2.99	102.73	0.003

注：肿瘤体积用平均值 ± 标准误表示；肿瘤生长抑制由 T/C (T/C (%) = T_i/ V_i×100)和 TGI (TGI (%) = [1-(T_i-T_0)/ (V_i-V_0)] ×100) 反映；*p* 值根据肿瘤体积计算（$p > 0.05$ 代表没有统计学差异，$p < 0.01$ 代表有显著性差异）。

图 15、表 18 和表 19 的结果表明，本申请的抗体-药物偶联物 WBP301088-X2 单次给药后表现出显著的剂量依赖性抑瘤活性且在 1 mg/kg 和 3 mg/kg 这两个剂量下的抑瘤效果均显著优于参照 ADC-1。

实施例 5. 抗体-药物偶联物对人黑色素瘤细胞 A375 荷瘤小鼠的药效评价

为研究 WBP301088-X2(DAR6)对体内形成肿瘤的抑制作用，在小鼠体内用 B7H3 阳性表达的人黑色素瘤细胞 A375 形成移植瘤后，评估 WBP301088-X2(DAR6)的体内抗肿瘤效果。

使用 6-8 周龄的雌性 NOD/SCID 小鼠（购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司）作为试验动物。将 5×10^6 个 A375 人黑色素瘤细胞接种于 6-8 周龄的雌性 NOD/SCID 小鼠右侧背部皮下，观察肿瘤生长情况，当肿瘤体积达到约 89 mm^3，对荷瘤小鼠进行随机分组，空白对照组或治疗组每组 6 只小鼠，并于分组当天（第 0 天）通过静脉(i.v.)注射 WBP301088-X2 或参照 ADC-1，共注射 1 次，施用剂量分别为 1mg/kg 、3mg/kg 和 10mg/kg。于第 20 天结束实验。每周测量 2 次肿瘤体积和小鼠体重，记录数据。

空白对照（阴性对照组）：生理盐水

WBP301088-X2（治疗组）：1 mg/kg

WBP301088-X2（治疗组）：3 mg/kg

WBP301088-X2（治疗组）：10 mg/kg

参照 ADC-1（治疗组）：3 mg/kg

参照 ADC-1（治疗组）：10 mg/kg

所有样品均用生理盐水稀释配制。

实验结束时，将小鼠安乐死，并计算TGI_{TV}（相对肿瘤抑制率）。TGI_{TV}（相对肿瘤抑制率）计算公式为：

$$TGI_{TV} = \left(1 - \frac{mean\ RTV_{treat}}{mean\ RTV_{vehicle}}\right) \times 100\%$$

其中，$mean\ RTV_{treat}$：给药组 RTV 平均值；

$mean\ RTV_{vehicle}$：Vehicle 组（溶媒组，在本实施例中是仅施用生理盐水组）RTV 平均值；

所述 RTV 的计算公式为：

$$RTV_n = \frac{V_{nt}}{V_{n0}}$$

其中，V_{nt}：编号为 n 的小鼠在第 t 天的肿瘤体积；

V_{n0}：编号为 n 的小鼠在第 0 天的肿瘤体积；

RTV_n：编号为 n 的小鼠在第 t 天的肿瘤相对体积。

实验结果如图 16、表 20 和表 21 所示。

表 20 不同组别的肿瘤体积变化

组别	肿瘤体积（mm^3）						
	D0	D3	D6	D9	D13	D16	D20
空白对照	88.55 ±9.79	179.90 ±40.56	317.78 ±66.27	484.12 ±77.65	753.85 ±112.97	987.29 ±159.48	1453.17 ±226.44
WBP301088 -X2, 1 mpk	88.92 ±8.64	91.83 ±5.88	71.71 ±11.17	89.8 ±17	152.36 ±36.98	244.50 ±55.84	533.31 ±87.51
WBP301088 -X2, 3 mpk	88.77 ±9.27	78.50 ±20.22	36.83 ±9.16	17.21 ±6.87	9.25 ±6.46	35.24 ±26.23	32.16 ±22.79
WBP301088 -X2, 10 mpk	88.87 ±9.18	69.55 ±11.66	27.76 ±4.21	14.4 ±1.39	1.08 ±1.08	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00
参照 ADC-1, 3 mpk	88.67 ±8.85	64.19 ±8.68	40.14 ±10.24	24.81 ±7.51	11.04 ±4.20	31.20 ±18.76	93.10 ±68.47
参照 ADC-1, 10 mpk	88.89 ±8.57	78.21 ±12.7	29.82 ±4.55	16.94 ±2.89	2.37 ±1.55	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00

备注：数据以平均值 ± 标准误表示。

表 21 不同组别的相对肿瘤抑制率（TGI_{TV}）

组别	D0	D3	D6	D9	D13	D16	D20
WBP301088-X2 1 mpk	0.00%	45.31%	75.46%	80.52%	79.33%	74.28%	62.21%
WBP301088-X2 3 mpk	0.00%	55.27%	88.25%	96.69%	98.95%	96.22%	98.17%
WBP301088-X2 10 mpk	0.00%	59.93%	90.91%	96.91%	99.89%	100.00%	100.00%
参照 ADC-1 3 mpk	0.00%	62.43%	87.68%	95.00%	98.56%	97.13%	94.69%
参照 ADC-1 10 mpk	0.00%	55.14%	90.28%	96.51%	99.75%	100.00%	100.00%

图 16、表 20 和表 21 的结果表明，本申请的抗体-药物偶联物 WBP301088-X2 单次给药后表现出显著的剂量依赖性抑瘤活性。

实施例 6. 抗体-药物偶联物对人脑癌细胞 U87 荷瘤小鼠的药效评价

为研究 WBP301088-X2(DAR6)对体内形成肿瘤的抑制作用，在小鼠体内用 B7H3 阳性表达的人脑癌细胞 U87 形成移植瘤后，评估 WBP301088-X2(DAR6)的体内抗肿瘤效果。

使用 6-8 周龄的雌性 NCG 小鼠（购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司）作为试验动物。将 5×10^6 个 U87 人脑癌细胞接种于 6-8 周龄的雌性 NCG 小鼠右侧颈背部皮下，观察小鼠的肿瘤生长情况，当肿瘤体积达到约 187 mm^3，对荷瘤小鼠进行随机分组，空白对照组或治疗组每组 6 只小鼠，并于分组当天（第 0 天）通过静脉(i.v.)注射 WBP301088-X2 或参照 ADC-1，共注射 1 次，施用剂量分别为 1mg/kg 和 3mg/kg。于第 20 天结束实验。实验分组和给药如下。每周测量 2 次肿瘤体积和小鼠体重，记录数据。

空白对照（阴性对照组）：生理盐水

WBP301088-X2（治疗组）：1 mg/kg

WBP301088-X2（治疗组）：3 mg/kg

参照 ADC-1（治疗组，为阳性对照组）：1 mg/kg

参照 ADC-1（治疗组，为阳性对照组）：3 mg/kg

所有样品均用生理盐水稀释配制。

实验结束时，将小鼠安乐死，如下计算肿瘤抑制率 TGI：

$TGI\ (\%) = [1-(T_i-T_0)/(V_i-V_0)] \times 100$

T_i：治疗组和阳性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；

T_0：治疗组和阳性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；

V_i：阴性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；

V_0：阴性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值。

实验结果如图 17、表 22 和表 23 所示。

表 22. 各组在不同时间点的肿瘤体积(mm^3)

组别	天数	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 13 天	第 16 天	第 20 天
1	空白对照	188±25	247±29	362±46	466±47	614±54	988±105	1651±149
2	参照 ADC-1 1 mg/kg 肿瘤体积 (mm^3)	187±25	231±31	301±42	403±61	489±80	808±171	1355±247
3	参照 ADC-1 3 mg/kg 肿瘤体积 (mm^3)	187±22	226±25	285±36	381±57	457±90	846±137	1314±162
4	WBP301088-X2 1 mg/kg 肿瘤体积 (mm^3)	187±25	234±27	308±49	387±42	439±51	646±42	1074±64
5	WBP301088-X2 3 mg/kg 肿瘤体积 (mm^3)	188±20	220±25	254±43	231±45	202±49	266±80	474±148

注：肿瘤体积用平均值 ± 标准误表示；天数为开始给药后的天数。

表 23. 受试抗体-药物偶联物对 U87 MG 细胞皮下异种移植的肿瘤小鼠模型的抑瘤药效评价（基于给药后第 20 天肿瘤体积计算得出）

组别	肿瘤体积 (mm^3)（第 20 天）	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
空白对照	1651±149	--	--	--
参照 ADC-1, 1 mg/kg	1355±247	82.08	20.21	0.969
参照 ADC-1, 3 mg/kg	1314±162	79.63	22.96	0.819
WBP301088-X2, 1 mg/kg	1074±64	65.06	39.40	0.138
WBP301088-X2, 3 mg/kg	474±148	28.70	80.49	0.008

注：肿瘤体积用平均值 ± 标准误表示；肿瘤生长抑制由 T/C (T/C (%) = T_i/ V_i×100)和 TGI (TGI (%) = [1-(T_i-T_0)/ (V_i-V_0)] ×100) 反映；*p* 值根据肿瘤体积计算（$p > 0.05$ 代表没有统计学差异，$p < 0.01$ 代表有显著性差异）。

图 17、表 22 和表 23 的结果表明，本申请的抗体-药物偶联物 WBP301088-X2 单次给药后表现出显著的剂量依赖性抑瘤活性且 3 mg/kg 剂量的抗体-药物偶联物 WBP301088-X2 的抑瘤效果显著优于参照 ADC-1。

实施例 7. 抗体-药物偶联物对人前列腺癌细胞 PC-3 荷瘤小鼠的药效评价

为研究 WBP301088-X2(DAR6)对体内形成肿瘤的抑制作用，在小鼠体内用 B7H3 阳性表达的人前列腺癌细胞 PC-3 形成移植瘤后，评估 WBP301088-X2(DAR6)的体内抗肿瘤效果。

使用 6-8 周龄的雌性 BALB/c Nude 小鼠（购自浙江维通利华实验动物技术有限公司）作为试验动物。将 5×10^6 个人前列腺癌细胞 PC-3 接种于 6-8 周龄的雌性 BALB/c Nude 小鼠右侧颈背部皮下，观察肿瘤生长情况，当肿瘤体积达到约 155 mm^3，对荷瘤小鼠进行随机分组，空白对照组或治疗组每组 6 只小鼠，并于分组当天（第 0 天）通过静脉(i.v.)注射 WBP301088-X2 或参照 ADC-1，共注射 1 次，施用剂量分别为 2 mg/kg 或 6 mg/kg。于第 21 天结束实验。实验分组和给药如下。每周测量 2 次肿瘤体积和小鼠体重，记录数据。

空白对照（阴性对照组）：生理盐水

WBP301088-X2（治疗组）：2 mg/kg

WBP301088-X2（治疗组）：6 mg/kg

参照 ADC-1（治疗组，为阳性对照组）：2 mg/kg

参照 ADC-1（治疗组，为阳性对照组）：6 mg/kg

所有样品均用生理盐水稀释配制。

实验结束时，将小鼠安乐死，如下计算肿瘤抑制率 TGI：

TGI (%) = [1-(T_i-T_0)/ (V_i-V_0)] ×100)

T_i：治疗组和阳性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；

T_0：治疗组和阳性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；

V_i：阴性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；

V_0：阴性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值。

实验结果如图 18、表 24 和表 25 所示。

表 24. 各组在不同时间点的肿瘤体积(mm^3)

组别	天数	0	4	7	11	14	18	21
1	空白对照肿瘤体积（mm^3）	154 ± 8	202 ± 10	269 ± 14	382 ± 29	540 ± 40	826 ± 44	1017 ± 59

2	参照 ADC-1, 2 mg/kg 肿瘤体积（mm^3）	154 ± 7	196 ± 10	249 ± 17	346 ± 45	410 ± 65	540 ± 91	655 ± 115
3	参照 ADC-1, 6 mg/kg 肿瘤体积（mm^3）	154 ± 6	203 ± 9	218 ± 12	262 ± 12	273 ± 14	305 ± 16	349 ± 23
4	WBP301088-X2, 2 mg/kg 肿瘤体积（mm^3）	155 ± 7	202 ± 8	248 ± 23	268 ± 27	274 ± 28	282 ± 32	298 ± 37
5	WBP301088-X2, 6 mg/kg 肿瘤体积（mm^3）	155 ± 9	199 ± 11	233 ± 6	241 ± 6	225 ± 14	231 ± 15	184± 11

注：肿瘤体积用平均值 ± 标准误表示；天数为开始给药后的天数。

表 25. 受试抗体-药物偶联物对 PC-3 细胞皮下异种移植的肿瘤小鼠模型的抑瘤药效评价（基于给药后第 21 天肿瘤体积计算得出）

组别	肿瘤体积 (mm^3)（第 21 天）	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
溶媒	1017 ± 59	--	--	--
参照 ADC-1, 2 mg/kg	655 ± 115	64.40	41.96	< 0.001
参照 ADC-1, 6 mg/kg	349 ± 23	34.26	77.46	< 0.001
WBP301088-X2, 2 mg/kg	298 ± 37	29.30	83.41	< 0.001
WBP301088-X2, 6 mg/kg	184 ± 11	18.06	96.62	< 0.001

注：肿瘤体积用平均值 ± 标准误表示；肿瘤生长抑制由 T/C (T/C (%) = T_i/ V_i×100)和 TGI (TGI (%) = [1-(T_i-T_0)/ (V_i-V_0)] ×100) 反映；*p* 值根据肿瘤体积计算（$p > 0.05$ 代表没有统计学差异，$p < 0.01$ 代表有显著性差异）。

图 18、表 24 和表 25 的结果表明，本申请的抗体-药物偶联物 WBP301088-X2 单次给药后表现出显著的剂量依赖性抑瘤活性且抑瘤效果在 2 mg/kg 和 6 mg/kg 剂量下均显著优于参照 ADC-1。

实施例 8. 抗体-药物偶联物对前列腺癌人源肿瘤异种移植（PDX）模型的药效评价

为研究 WBP301088-X2(DAR6)在前列腺癌人源肿瘤异种移植模型中的药效，将人源前列腺癌 PR9586、PR9587 肿瘤组织（获自冠科生物技术（中山）有限公司）皮下异种移植 NPG 与 NOG 雄性小鼠，评估 WBP301088-X2(DAR6)的抗肿瘤效果。

1.受试药物及材料

空白对照（对照组）：生理盐水

WBP301088-X2（治疗组）：10 mg/kg

2.受试药物配制方法： 所有样品均用生理盐水稀释配制。

3.实验动物： NPG 小鼠购自北京维通达生物技术有限公司，NOG 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

4.实验方法：

将人源前列腺癌 PR9586，PR9587 肿瘤组织分别接种到 NPG 或 NOG 小鼠皮下，待肿瘤长至 500-800mm^3 左右时，收集肿瘤组织，将小鼠安乐死。将收集的肿瘤组织切成直径为 2-3mm 的瘤块，接种于 NPG 或 NOG 小鼠右前肩胛处皮下，当所述瘤块接种的 NPG 或 NOG 小鼠的平均肿瘤体积到达约 100-200 mm^3 时，将小鼠随机分组，空白对照组或治疗组每组 6 只小鼠。

分组当天（第 0 天）通过静脉(i.v.)注射 WBP301088-X2 给药，每两周一次，共注射 2 次，每次施用剂量为 10 mg/kg。分别于第 25 天（对接种 PR9586 的小鼠）或于第 48 天（对接种 PR9587 的小鼠）结束实验。开始给药后，每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式：肿瘤体积（mm^3）= 1/2 ×（a × b^2）（其中 a 表示长径，b 表示短径）。

实验结束时，将小鼠安乐死，计算肿瘤抑制率 TGI：

TGI (%) = [1-(T_i-T_0)/ (V_i-V_0)] ×100

其中

T_i：治疗组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；

T_0：治疗组在给药第 0 天的肿瘤体积均值；

V_i：阴性对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值；

V_0：阴性对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值。

5.实验结果：

实验结果如图 19A、图 19B、表 26 和表 27 所示。

表 26. 受试抗体-药物偶联物对 PR9586 人源肿瘤异种移植模型的抑瘤药效评价
（基于首次给药后第 25 天的肿瘤体积计算得出）

组别	给药	剂量 (mg/kg)	第 25 天			
			肿瘤体积(平均值 ± SEM)	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
1	对照组	-	2524.01 ± 411.33	-	-	-
2	WBP301088-X2	10	17.08 ± 6.02	0.68	99.32	0.00562

注：*p* 值根据肿瘤体积计算（$p > 0.05$ 代表没有统计学差异，$p < 0.01$ 代表有显著性差异）。

表 27. 受试抗体-药物偶联物对 PR9587 人源肿瘤异种移植模型的抑瘤药效评价
（基于首次给药后第 48 天的肿瘤体积计算得出）

组别	给药	剂量 (mg/kg)	第 48 天			
			肿瘤体积(平均值 ± SEM)	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
1	对照组	-	292.06 ± 31.00	-	-	-
2	WBP301088-X2	10	90.29 ± 39.21	30.91	69.09	0.00261

注：*p* 值根据肿瘤体积计算（$p > 0.05$ 代表没有统计学差异，$p < 0.01$ 代表有显著性差异）。

结果表明，本申请的抗体-药物偶联物 WBP301088-X2 在给药后表现出显著的抑瘤活性。

实施例 9. 抗体-药物偶联物对前列腺癌微小人源肿瘤异种移植模型的药效评价

为研究 WBP301088-X2(DAR6)在前列腺癌人源肿瘤异种移植模型中的药效，在前列腺癌微小人源肿瘤异种移植小鼠模型上评价 WBP301088-X2(DAR6)的抗肿瘤效果。

1.受试药物及材料

空白对照（对照组）：生理盐水

WBP301088-X2（治疗组）：10 mg/kg

胶原酶消化液：

名称	供应商	目录号
DNase	SIGMA	D5025-375KU
透明质酸酶	SIGMA	H6254-500MG
II 型胶原酶	GIBCO	17101-015
IV 型胶原酶	GIBCO	17104-019

将表中各组分按照制造商的说明书混合制备胶原酶消化液。

2.受试药物配制方法： 所有样品均用生理盐水稀释配制。

3.实验动物： CB17 SCID 小鼠，雄性，6-8 周龄，体重约 18-22g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

4.实验方法：

将人源前列腺癌移植模型 LD1-2027-410644、LD1-2034-362055 模型的肿瘤组织（获自上海立迪生物技术股份有限公司）接种到小鼠皮下，待肿瘤长至 500-800mm^3 时，自小鼠体内手术无菌摘取肿瘤组织，于生物安全柜中去除非肿瘤组织和坏死组织，以保证接种肿瘤组织的纯度，将小鼠安乐死。将经所述处理的肿瘤组织切成 1-3 立方毫米小块，使用胶原酶消化液 37℃消化肿瘤块 1-2 小时，1200 rpm 离心 3 分钟去除上清，使用 10 ml 含 1 % FBS 的 PBS 重悬细胞并血球计数板计数；去除鼠源细胞，1200 rpm 离心 3 分钟去除上清，用 RPMI1640 细胞培养液重悬细胞，血球计数板计数，调整细胞密度。

将细胞悬液灌装到胶囊中，CB17 SCID 小鼠根据体重随机分组，空白对照组或治疗组每组各 3 只小鼠，每只小鼠左右两侧皮下各接种 1 个胶囊，每组总计接种 6 个胶囊，每个胶囊中含有 5000 个肿瘤细胞。接种当天为第 0 天，进行动物给药，以尾静脉注射的方式单次给药，实验进行 10 天。

实验结束后将小鼠安乐死，取出胶囊，用 CellTiter-Glo 进行细胞活力检测，即将胶囊剪碎，加入等体积的 PBS 以及 CellTiter-Glo™试剂，测量发光值，在光信号和体系中，发光值与 ATP 量成正比，而 ATP 又和活细胞数正相关，因此可通过检测 ATP 含量获知细胞活力。

5.实验结果：

实验结果如图 20A、图 20B、表 28 所示。

表 28. 实验终点细胞活力检测结果

组别	受试物	LD1-2027-410644 模型		LD1-2034-362055 模型	
		平均信号值	标准误	平均信号值	标准误
1	对照组	266766.78	24960.75	2403679.39	563363.25
2	WBP301088-X2, 10 mg/kg	85868.38	6086.40	1118020.86	90799.15

图 20A、图 20B、表 28 的结果表明，WBP301088-X2 具有显著的抗肿瘤效果。

实施例 10. 抗体-药物偶联物单次给药的药代动力学研究

测试目的

食蟹猴单次静脉输注给予抗体-药物偶联物 WBP301088-X2(DAR6)后，测定不同时间点血清中 WBP301088-X2(DAR6)、WBP301088-总抗体和细胞毒素 P-III-30 的浓度，计算 WBP301088-X2(DAR6)、WBP301088-总抗体和细胞毒素 P-III-30 的药代动力学参数，为临床前及临床研究提供依据。

实验方法

18 只食蟹猴，雌雄各半，给药前一天称重，根据体重分层随机分为 3 组（3 雌 3 雄/组），分别为低剂量组（1 mg/kg）、中剂量组（3 mg/kg）、高剂量组（10 mg/kg），每只动物静脉输注给予 WBP301088-X2 溶液。

各组于食蟹猴前肢静脉采集血液，其中将给药前 0 h 和给药后 0.5、1、4、8、24、48、72、96、168、240、336、504、672 h 采集的血液经处理后的样本作为 PK 样本，各个时间点采集血液完成后，离心获得血清，用于样本分析。

采用 ELISA 方法分别定量检测食蟹猴血清样本中 WBP301088 总抗体浓度、WBP301088-X2 浓度；采用 LC-MS/MS 方法定量检测食蟹猴血清样本中 P-III-30 浓度。实验结果见表 29。

表 29. 单次静脉输注给予不同剂量的 WBP301088-X2(DAR6)在食蟹猴体内暴露量参数

待测物	PK 参数	单位	参数均值 低剂量组（1 mg/kg）	中剂量组（3 mg/kg）	高剂量组（10 mg/kg）
WBP301088-X2	C_{max}	μg/mL	22.6	71.9	246
	AUC_{0-t}	h·μg/mL	403	2070	11000
	$AUC_{0-\infty}$	h·μg/mL	430	2110	11100
WBP301088-总抗体	C_{max}	μg/mL	22.4	70.8	253
	AUC_{0-t}	h·μg/mL	319	1760	10200
	$AUC_{0-\infty}$	h·μg/mL	323	1770	10200
P-III-30	C_{max}	ng/mL	NA	0.133	0.573
	AUC_{0-t}	h·ng/mL	NA	1.07	44.5

实验结论

在本实验条件下，食蟹猴单次静脉给予 1、 3 和 10 mg/kg 的 WBP301088-X2 后，抗体-药物偶联物和总抗体（抗体 WBP301088）之间无明显药代动力学差异，均呈剂量依赖性增加，这表明 WBP301088-X2 在体内血浆中稳定性好。同时，检测到 P-III-30 具有较低的血浆浓度，表明 ADC 在猴中缓慢释放，偶联方式稳定，P-III-30 的全身暴露量较低，WBP301088-X2 具有较高的安全性。

实施例 11：抗体-药物偶联物多次给药的药代动力学和毒性研究

测试目的

食蟹猴静脉给予 WBP301088-X2(DAR6)，每 3 周给药 1 次，共给药 2 次。观察抗体-药物偶联物可能引起毒性反应的性质、程度、量效及时效关系，判断毒性靶器官或靶组织，为后续研究提供参考。

实验方法

6 只食蟹猴，雌、雄各半，分组时体重 2.3 ~ 3.4 kg， 低剂量组（30 mg/kg）、高剂量组（80 mg/kg），每 3 周给药 1 次，共给药 2 次，给药容积 5 mL/kg。通过临床观察、体重和摄食量、血液学、血生化、尿液、大体解剖等多个方面考察动物的耐受性，以及药物相关的毒性表现。

实验结论

食蟹猴静脉给予 30 mg/kg、 80 mg/kg 的 WBP301088-X2(DAR6)，每 3 周给药 1 次，共给药 2 次，第 2 次给药后 4 天（即，开始给药后的第 25 天）解剖。

结果表明在试验期间，所有动物对抗体-药物偶联物耐受良好， 体重、 耗食量、 心电图指标、凝血指标和大体解剖，均未见异常。表明抗体-药物偶联物安全性好。

尽管已经出于说明本发明的目的显示了一些代表性实施方案和细节，但是本领域技术人员显而易见的是可以对它们进行多种变化和修改而不脱离主题发明的范围。在这个方面，本发明范围仅由权利要求限定。

权 利 要 求

1. 一种抗体-药物偶联物，其包含：靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段，接头单元和细胞毒性药物；所述靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 HCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的 HCDR2、氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR3、氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 或 7 所示的 LCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 LCDR2 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR3。

2. 如权利要求 1 所述的抗体-药物偶联物，其中所述抗体或其抗原结合片段包含：

(I) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示的轻链可变区；或氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示的轻链可变区；或

(II)与 SEQ ID NO:8 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链可变区，和与 SEQ ID NO:9 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链可变区；或与 SEQ ID NO:10 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链可变区，和与 SEQ ID NO:11 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链可变区；或

(III) 与 SEQ ID NO:8 或 10 相比，其框架区具有一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个)氨基酸的添加、缺失和/或替换的重链可变区，和与 SEQ ID NO:9 或 11 相比，其框架区具有一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个)氨基酸的添加、缺失和/或替换的轻链可变区。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗体-药物偶联物，其中所述抗体选自：人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的抗体-药物偶联物，其中所述抗原结合片段选自：Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、ScFv、Fab'-SH、sdAb、VHH、双抗体和线性抗体。

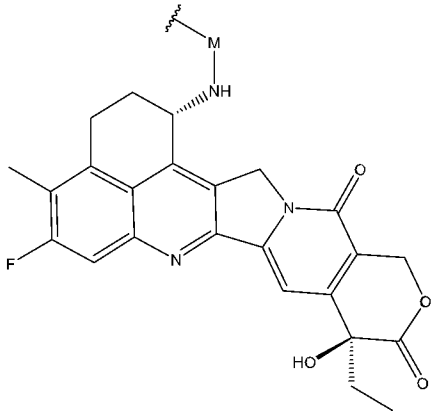
5. 如权利要求 1-3 中任一项所述的抗体-药物偶联物，其中所述抗体包含免疫球蛋白恒定区，所述免疫球蛋白恒定区是人 IgG 恒定区，例如人 IgG1 恒定区。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的抗体-药物偶联物，其中所述抗体或其抗原结合片段包含：

(I) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示的轻链；或氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示的重链和氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示的轻链；或

(II) 与 SEQ ID NO:12 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链，和与 SEQ ID NO:13 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链；或与 SEQ ID NO:14 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的重链，和与 SEQ ID NO:15 具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%同一性的轻链。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的抗体-药物偶联物，其中所述细胞毒性药物包含式(A-1)所示结构、其互变异构体、对映异构体、非对映异构体、或异构体的混合物，或其药学上可用的盐或其溶剂化物，



(A-1)

其中，

M 为-L^2-L^1-C(O)-；

L^2 为-O-或-S-；

L^1 为-$(C(R^{1a})(R^{1b}))_m$-CH_2-、C_3-C_6 饱和的环烷基或 3-6 元饱和的杂环基，所述 C_3-C_6 饱和的环烷基和 3-6 元饱和的杂环基各自独立地任选被一个或多个 R^{2a} 取代；

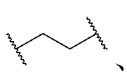
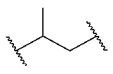
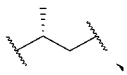
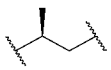
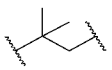
m 选自 1、2、3 或 4；所述的 3-6 元饱和的杂环基中的杂原子选自 N、O 和 S，杂原子数为 1-3 个；

R^{1a}、R^{1b} 和 R^{2a} 各自独立地选自氢、卤素、羟基、氨基和 C_1-C_6 烷基，所述 C_1-C_6 烷基任选被一个或多个 R 取代；

R 各自独立地为氢或卤素。

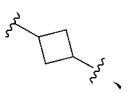
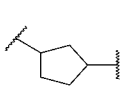
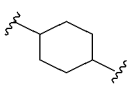
8. 如权利要求 7 所述的抗体-药物偶联物，其中所述 L^1 为-$(C(R^{1a})(R^{1b}))_m$-CH_2-；R^{1a} 选自：氢、卤素和 C_1-C_6 烷基；R^{1b} 选自：氢、卤素和 C_1-C_6 烷基。

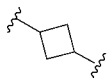
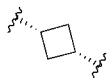
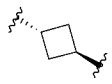
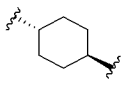
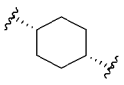
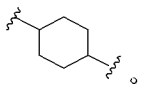
9. 如权利要求 7 或 8 所述的抗体-药物偶联物，其中 L^1 为-$(C(R^{1a})(R^{1b}))_m$-CH_2-；m 为 1 或 2。

10. 如权利要求 9 所述的抗体-药物偶联物，其中 L^1 选自：、、、和。

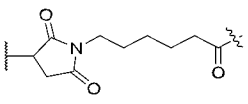
11. 如权利要求 7 所述的抗体-药物偶联物，其中 L^1 为 C_3-C_6 饱和的环烷基或 3-6 元饱和的杂环基，所述 C_3-C_6 饱和的环烷基和 3-6 元饱和的杂环基各自独立地任选被一个或多个 R^{2a} 取代，R^{2a} 各自独立地选自：氢、卤素和 C_1-C_6 烷基。

12. 如权利要求 11 所述的抗体-药物偶联物，其中 L^1 为任选被一个或多个 R^{2a} 取代的 C_3-C_6 饱和的环烷基；R^{2a} 各自独立地选自：氢、卤素和 C_1-C_6 烷基。

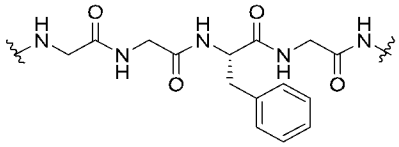
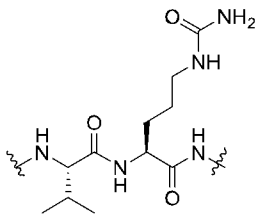
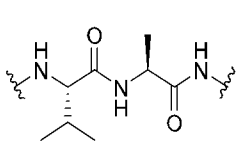
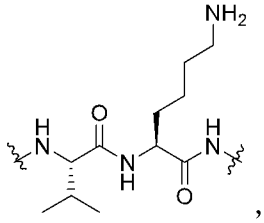
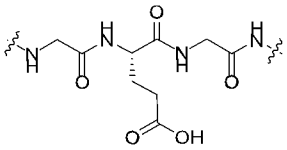
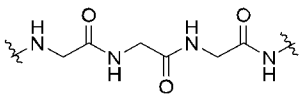
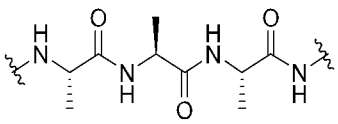
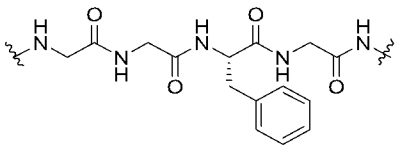
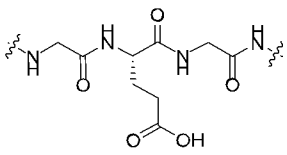
13. 如权利要求 12 所述的抗体-药物偶联物，其中 L^1 为任选被 1、2 或 3 个 R^{2a} 取代的：、、和；R^{2a} 各自独立地选自：氢、卤素和 C_1-C_6 烷基。

14. 如权利要求 13 所述的抗体-药物偶联物，其中 L^1 选自：、、、、、和。

15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的抗体-药物偶联物，其中所述接头单元 L 为-L_a-L_b-L_c-，

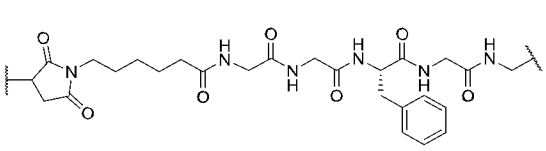
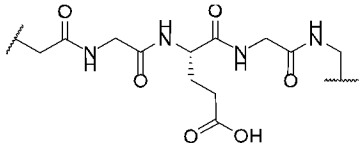
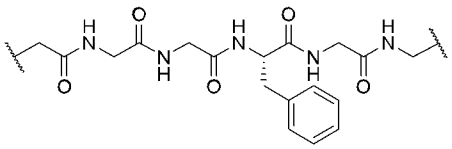
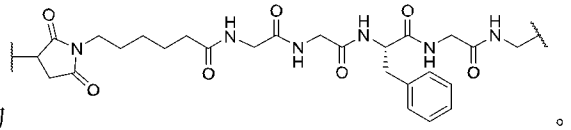
-L_a-为或；

-L_b-选自：

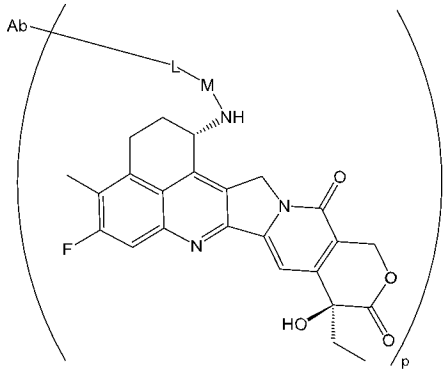
，，，，，，和；优选为或；

-L_c-为。

16. 如权利要求 15 所述的抗体-药物偶联物，其中所述接头单元 L 为

、或；优选为。

17. 如权利要求 1-16 中任一项所述的抗体-药物偶联物，其中所述抗体-药物偶联物结构如式（A-2）所示：



（A-2）

其中，

p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数；

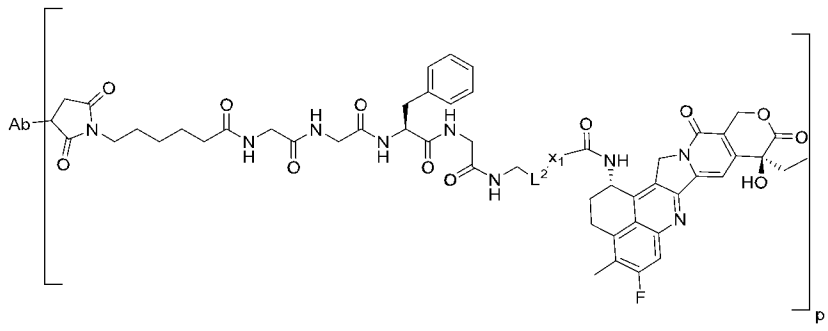
Ab 如权利要求 1-6 中任一项所述；

M 如权利要求 7-14 中任一项所述；

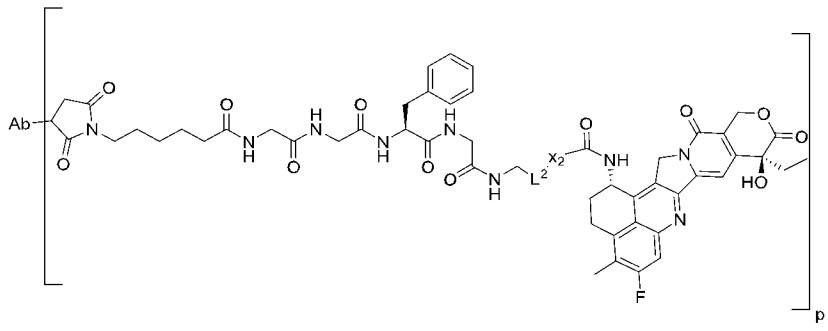
L 如权利要求 15 或 16 所述。

18. 如权利要求 1-17 中任一项所述的抗体-药物偶联物，其中 p 为 2-8 的整数或小数，例如 p 为 4-8 的整数或小数，例如 p 为 4-6 或 6-8 的整数或小数。

19. 如权利要求 18 所述的抗体-药物偶联物，其中所述抗体-药物偶联物结构如式（A-2a）或式（A-2b）所示：



（A-2a）



（A-2b），

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 2-8 的整数或小数，例如 p 为 4-8 的整数或小数，例如 p 为 4-6 或 6-8 的整数或小数；

Ab 为靶向 B7H3 的抗体或其抗原结合片段，其包含：氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 HCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的 HCDR2、氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示的

HCDR3、氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 7 所示的 LCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 LCDR2 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR3；

L^2 为-O-或-S-；优选为-O-；

X_1 选自任选被 1、2 或 3 个 R^{2a} 取代的 C_3-C_6 饱和的环烷基；

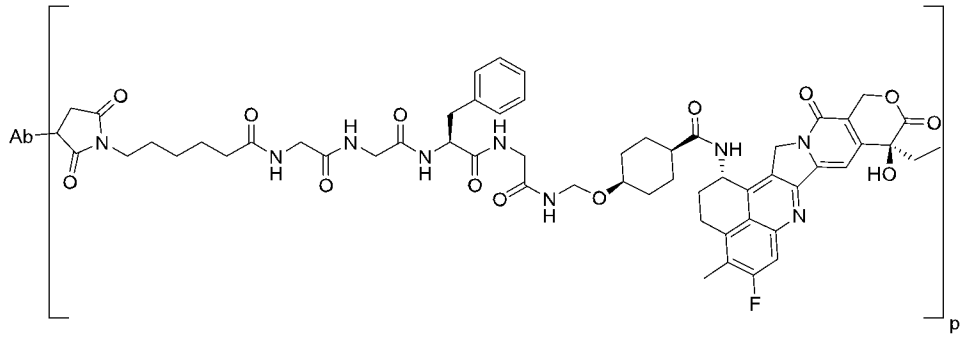
X_2 选自-$(C(R^{1a})(R^{1b}))_m$-CH_2-；

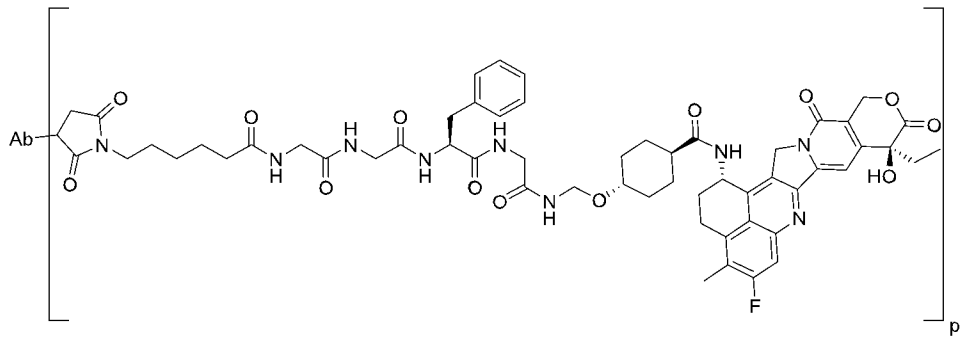
m 选自 1 或 2；

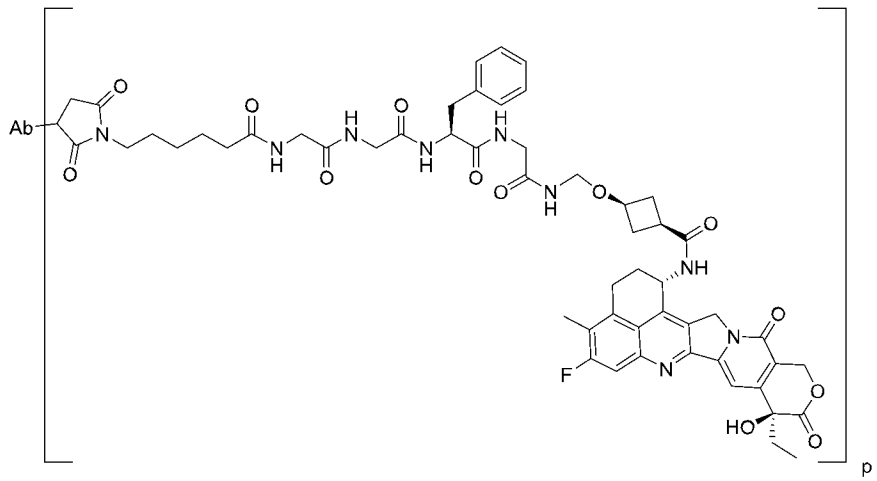
R^{1a}、R^{1b} 或 R^{2a} 各自独立地选自氢、卤素或被 1、2 或 3 个 R 任选取代的 C_1-C_6 烷基；

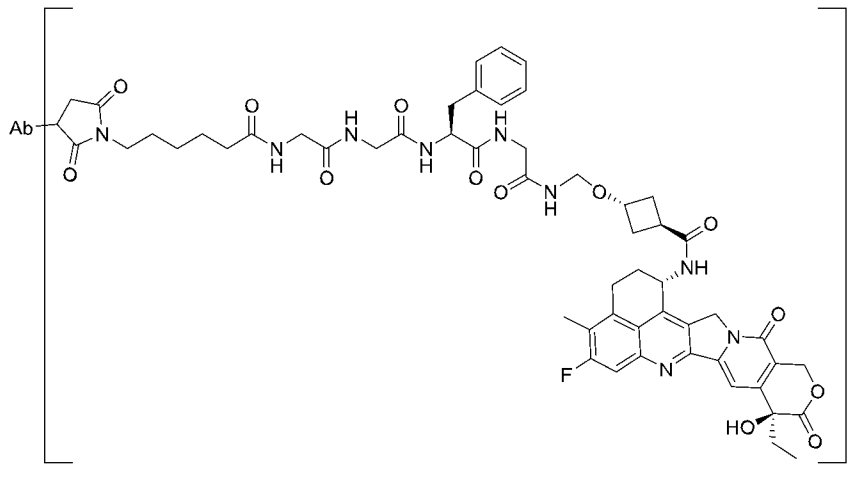
R 各自独立地为氢或卤素。

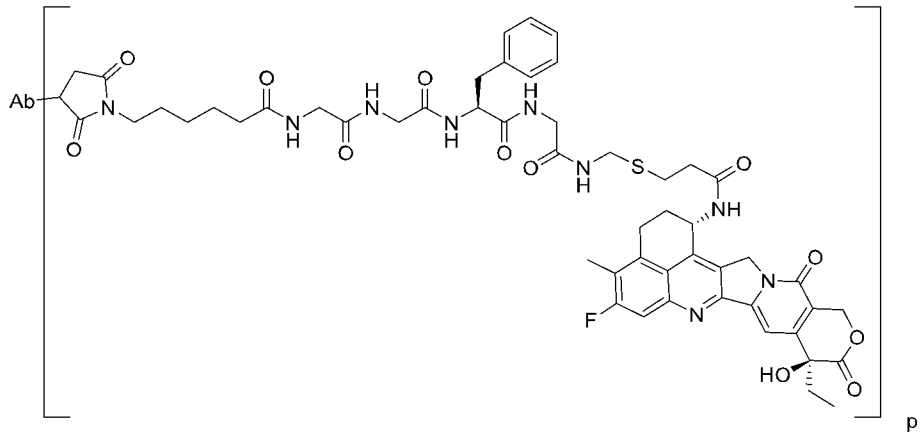
20. 如权利要求 1 所述的抗体-药物偶联物，其中所述抗体-药物偶联物选自以下结构式：

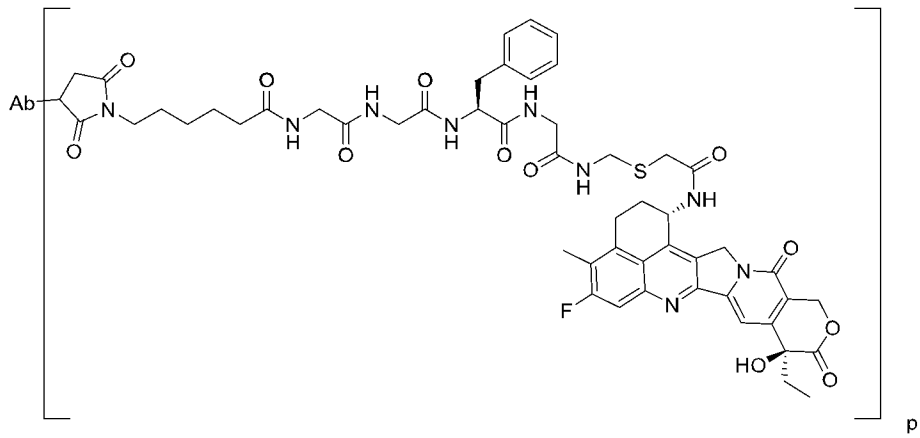


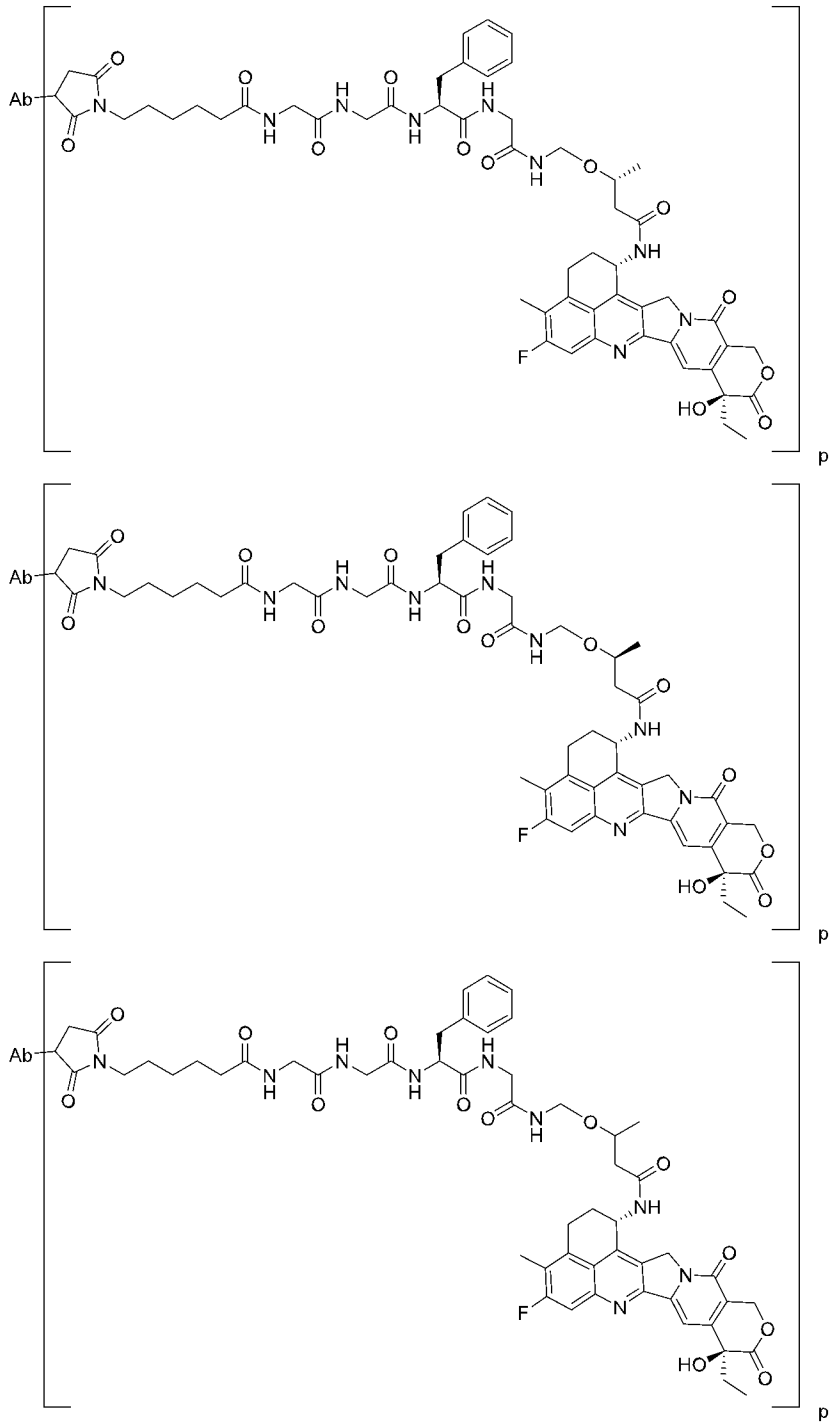


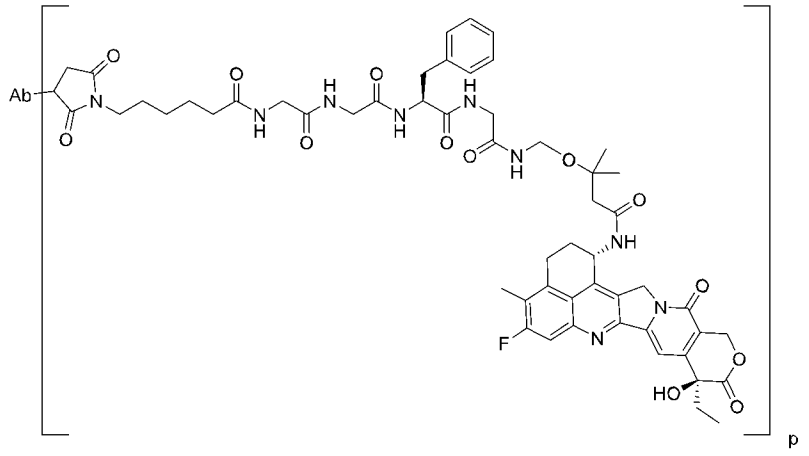










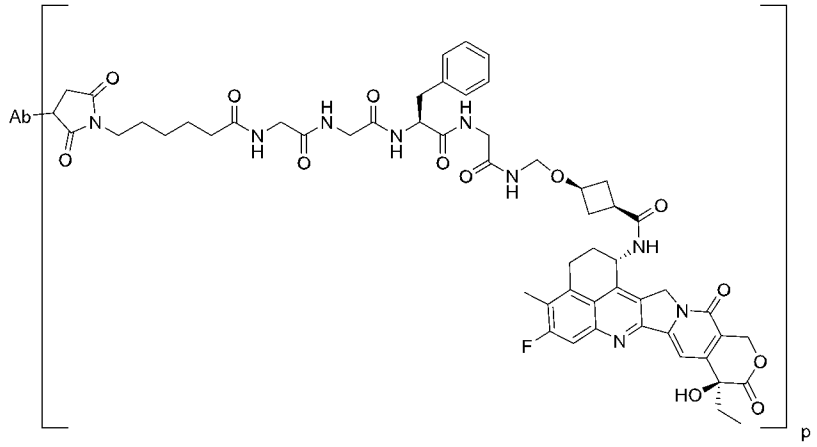


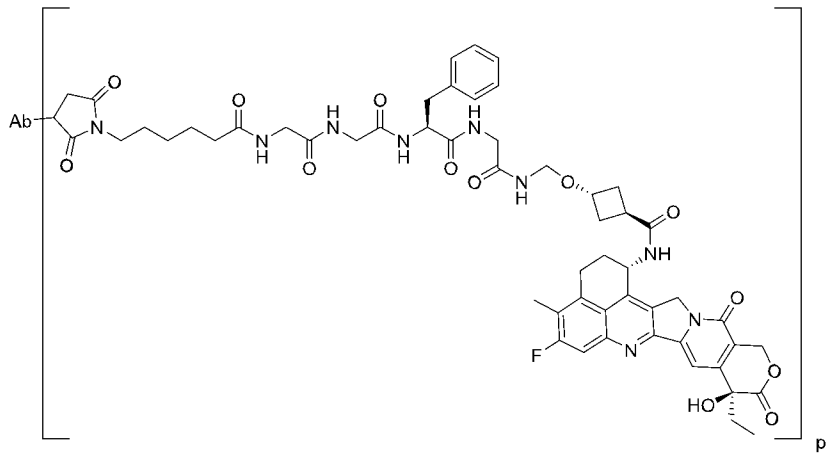
其中，

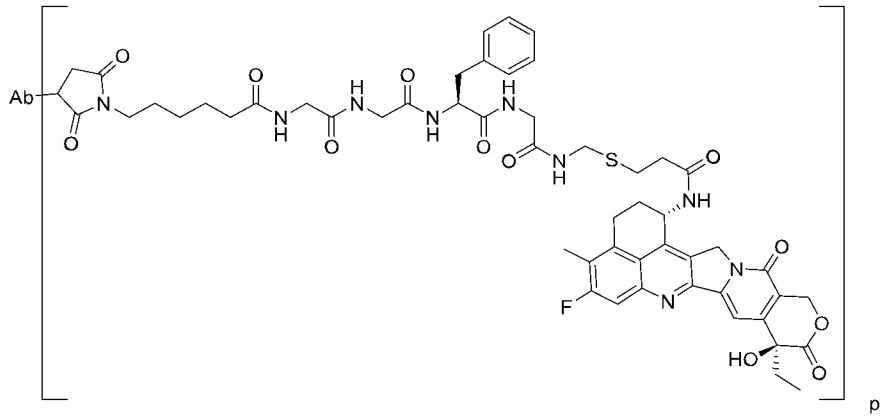
p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 2-8 的整数或小数，例如 p 为 4-8 的整数或小数，例如 p 为 4-6 或 6-8 的整数或小数；

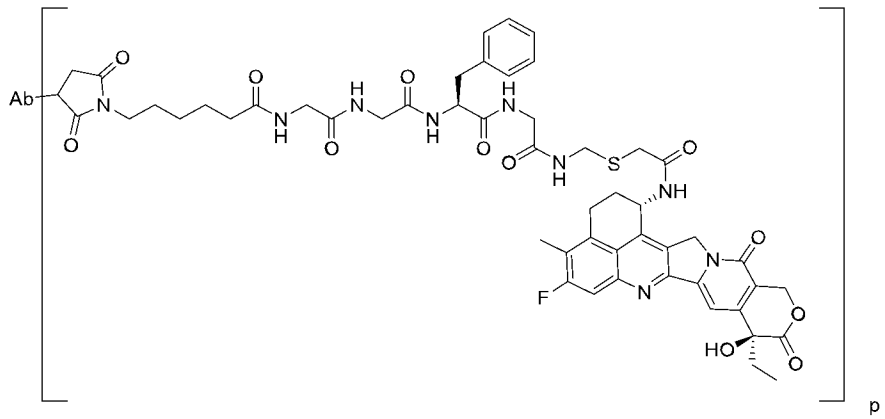
Ab 如权利要求 1-6 中任一项所述。

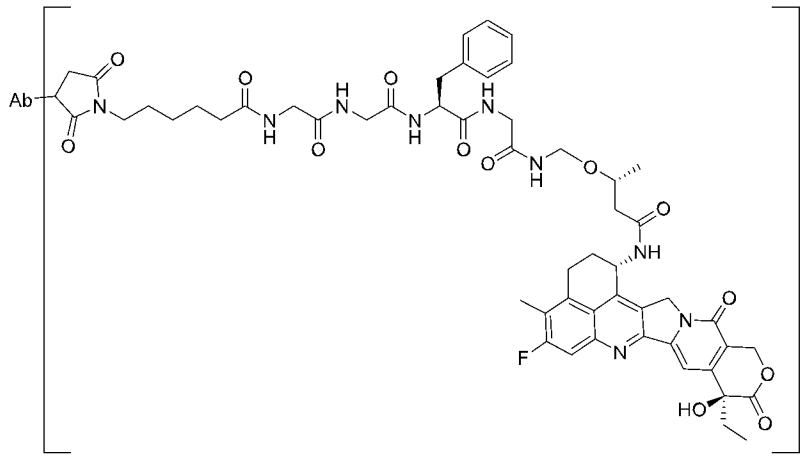
21. 如权利要求 20 所述的抗体-药物偶联物，其中所述抗体-药物偶联物选自：

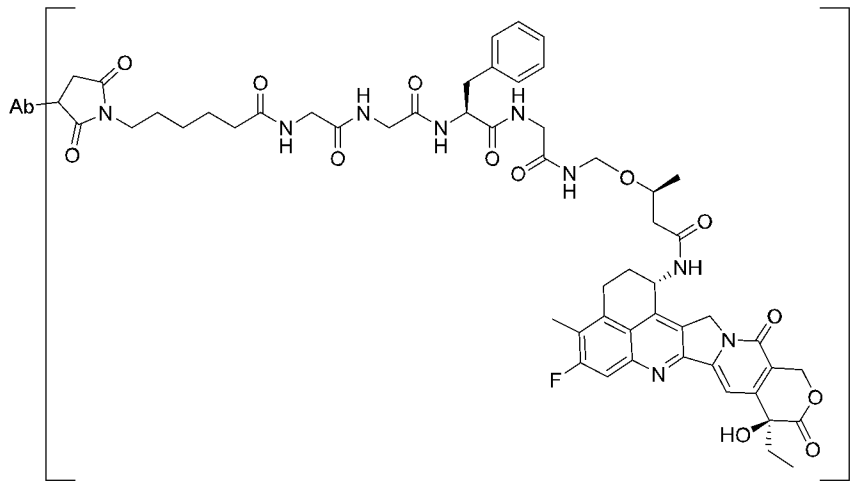


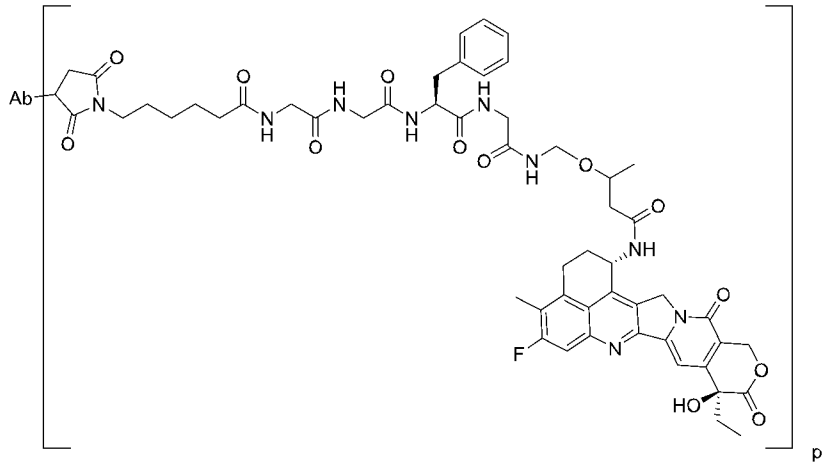








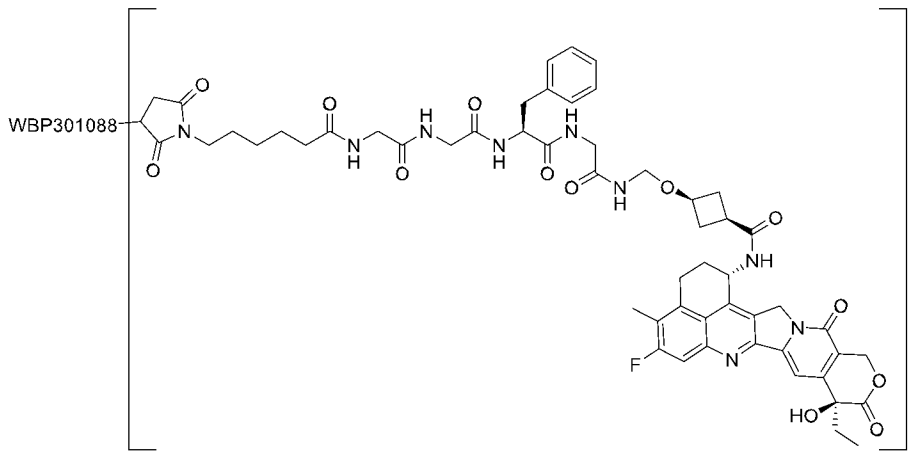




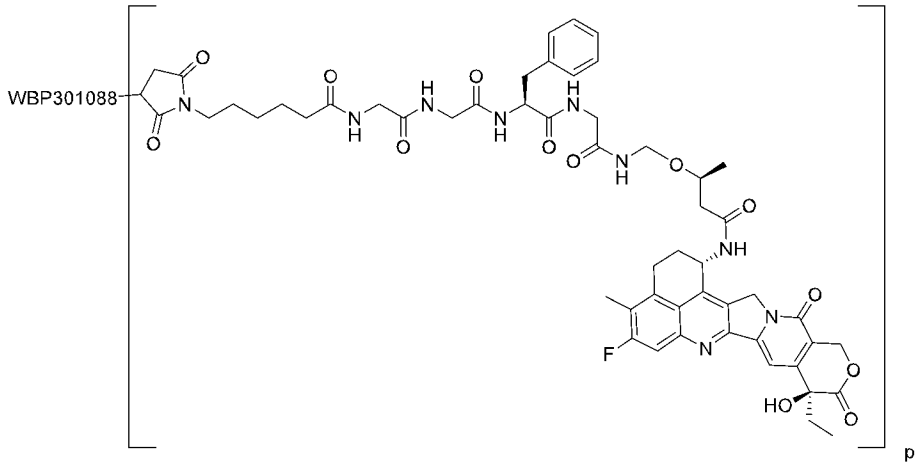
或其药学上可接受的盐；其中，

p 表示平均连接数，且 p 选自 1 到 10 的整数或小数，优选 2-8 的整数或小数，例如 p 为 4-8 的整数或小数，例如 p 为 4-6 或 6-8 的整数或小数；Ab 为抗 B7H3 抗体，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 HCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的 HCDR2、氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR3、氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的 LCDR1、氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的 LCDR2 和氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR3；例如，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示的轻链可变区；例如，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示的重链和如 SEQ ID NO:13 所示的轻链。

22. 如权利要求 21 所述的抗体-药物偶联物，其中所述抗体-药物偶联物选自：



或



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 2-8 的整数或小数；例如 p 为 4-8 的整数或小数，例如 p 为 4-6 或 6-8 的整数或小数，例如 p 为 7.45、5.68 或 4.02；

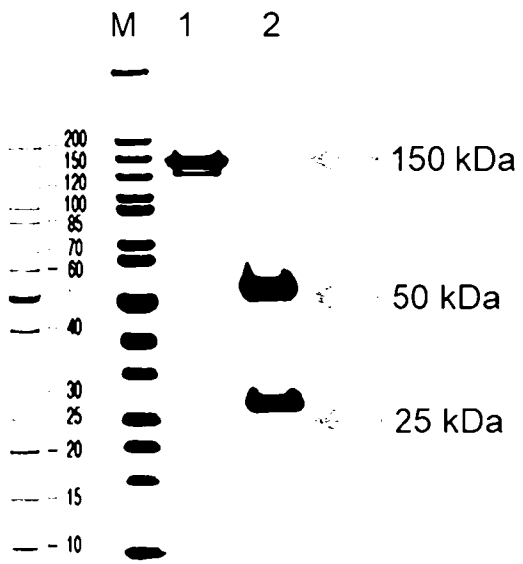
WBP301088 为抗 B7H3 抗体，其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示，和轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示。

23. 一种药物组合物，其包含如权利要求 1-22 中任一项所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐，和药学上可接受的载体或赋形剂。

24. 如权利要求 1-22 中任一项所述的抗体-药物偶联物、其药学上可接受的盐或权利要求 23 所述的药物组合物在制备用于治疗和/或预防 B7H3 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，例如，所述疾病或病症为 B7H3 阳性表达的疾病或病症。

25. 如权利要求 24 所述的用途，其中所述癌症选自乳腺癌、神经肿瘤、黑色素瘤、肺癌、头颈癌、结直肠癌、胰腺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、食管癌、肾细胞癌、子宫内膜癌、皮肤癌、睾丸癌，甲状腺癌、尿路上皮癌、淋巴瘤（如非霍奇金淋巴瘤）、慢性淋巴细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

26. 一种治疗和/或预防 B7H3 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 1-22 中任一项所述的抗体-药物偶联物、其药学上可接受的盐或权利要求 23 所述的药物组合物，优选地，所述疾病或病症为癌症，例如，所述疾病或病症为 B7H3 阳性表达的疾病或病症。



凝胶信息：NuPAGE，Novex 4-12% Bis-Tris 凝胶。

图 1

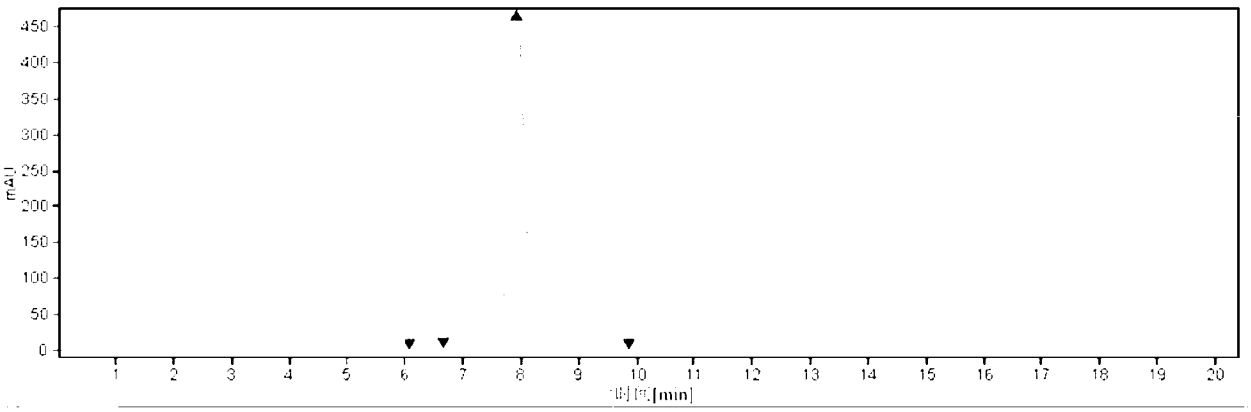


图 2

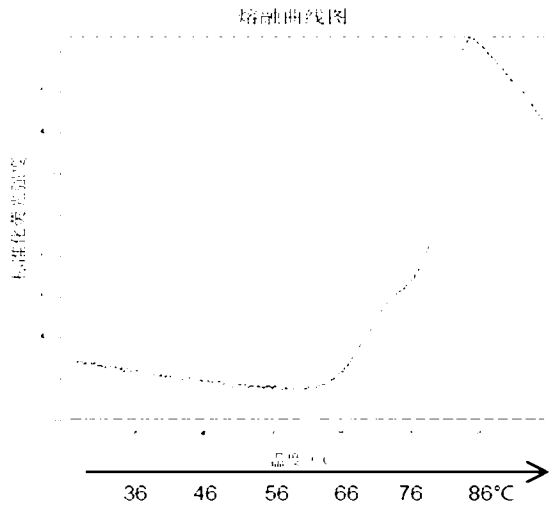

熔融曲线图
36
46
56
66
76
86°C

图 3

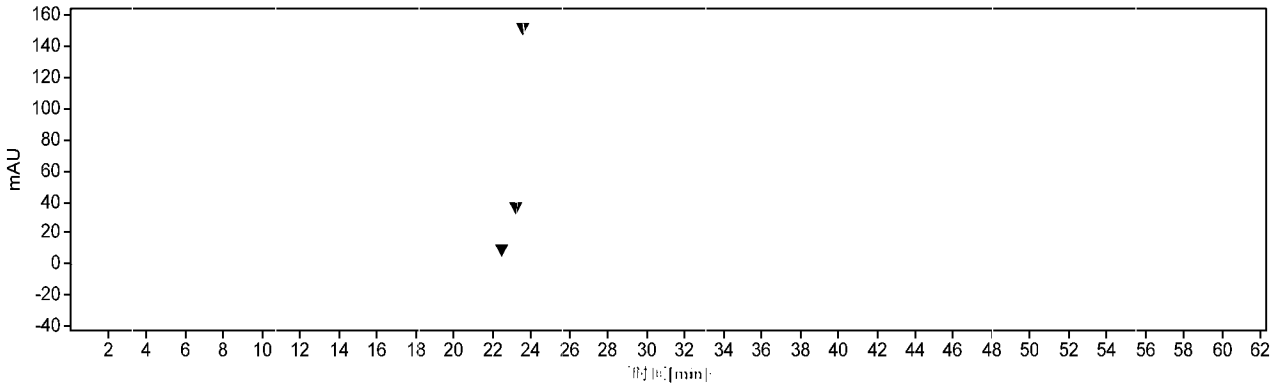

mAU
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62
时间[min]

图 4

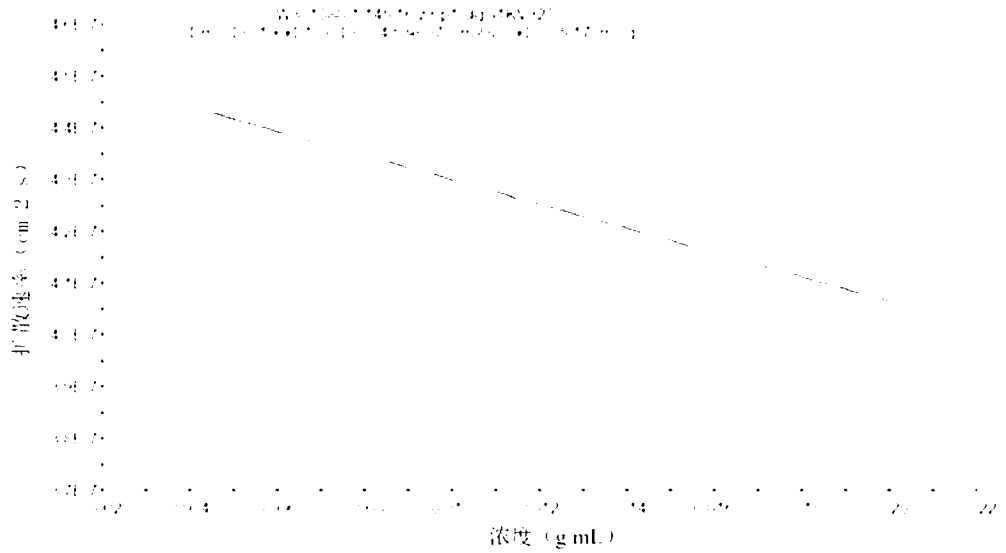

浓度（g mL）

图 5

表达人 B7H3 的细胞 MCF-7

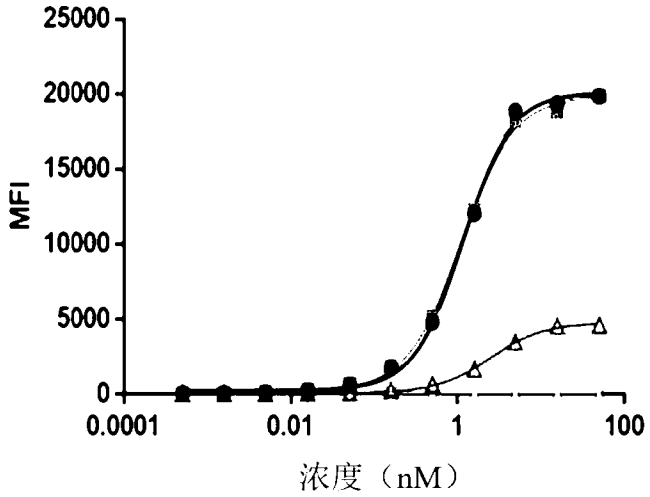


图 6

食蟹猴 B7H3 转染的细胞

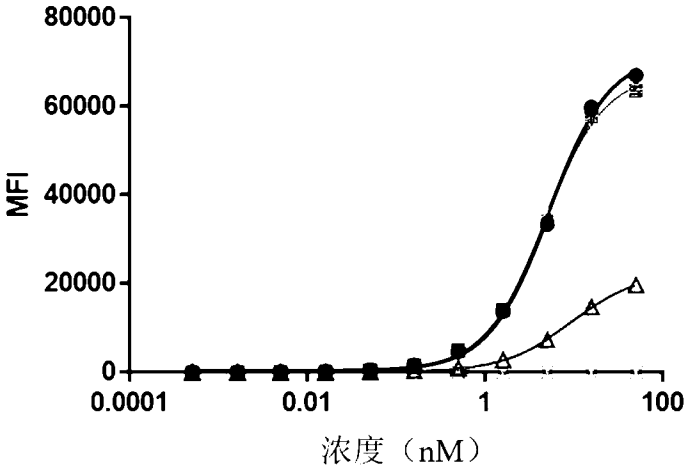


图 7

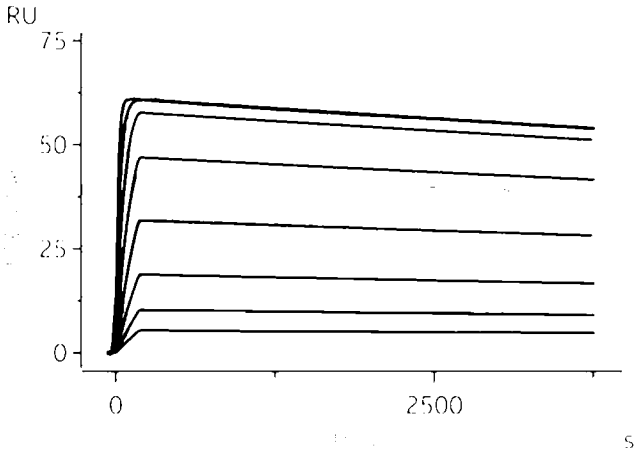


图 8A

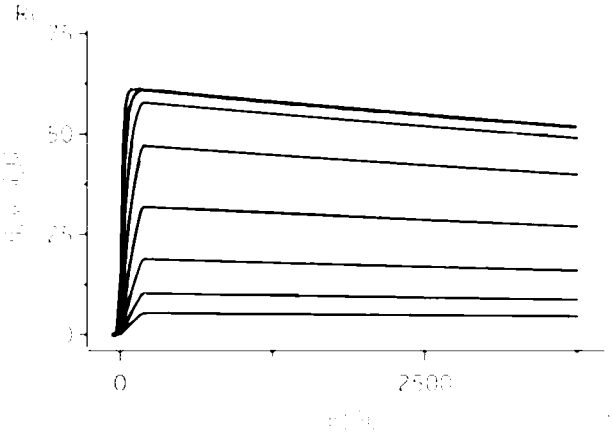


图 8B

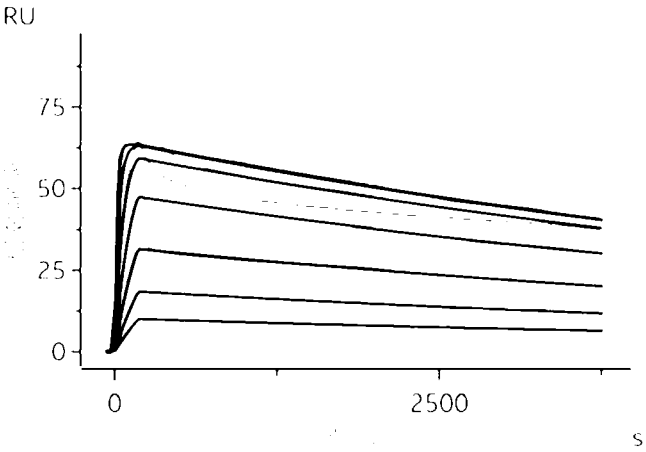


图 8C

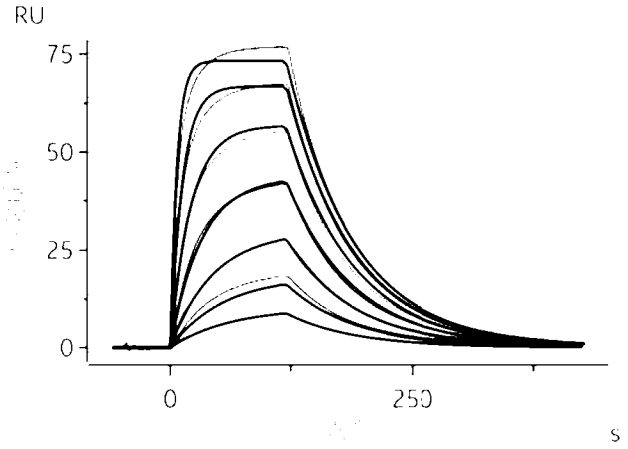

RU
75
50
25
0
0
250
s

图 9A

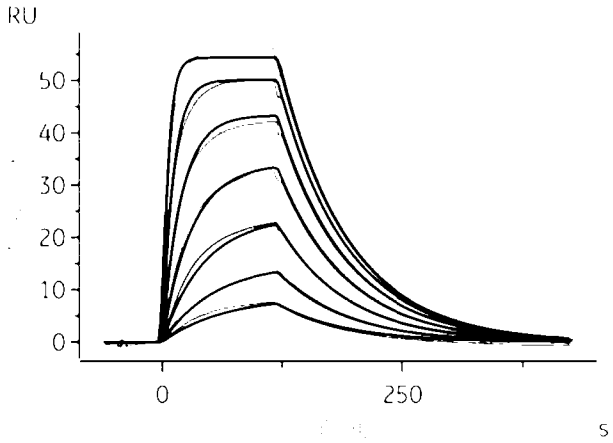

RU
50
40
30
20
10
0
0
250
s

图 9B

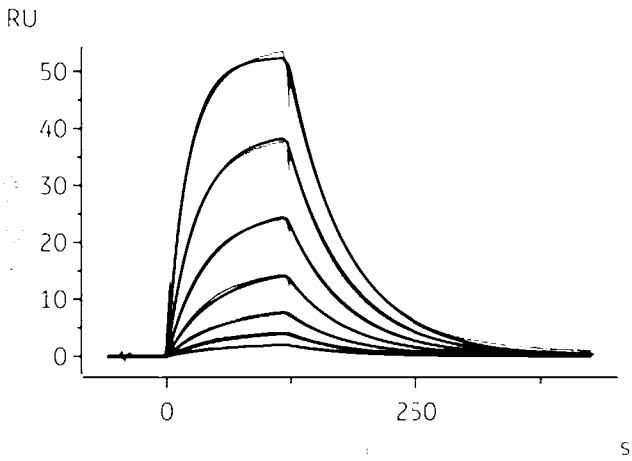

RU
50
40
30
20
10
0
0
250
s

图 9C

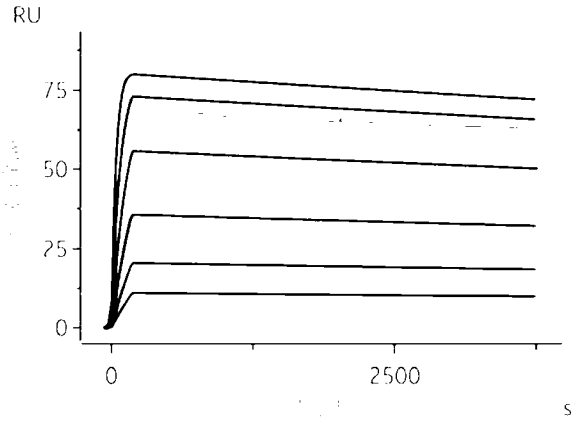


图 10A

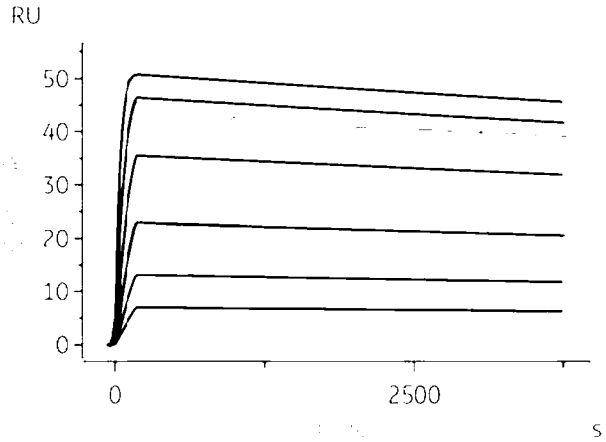


图 10B

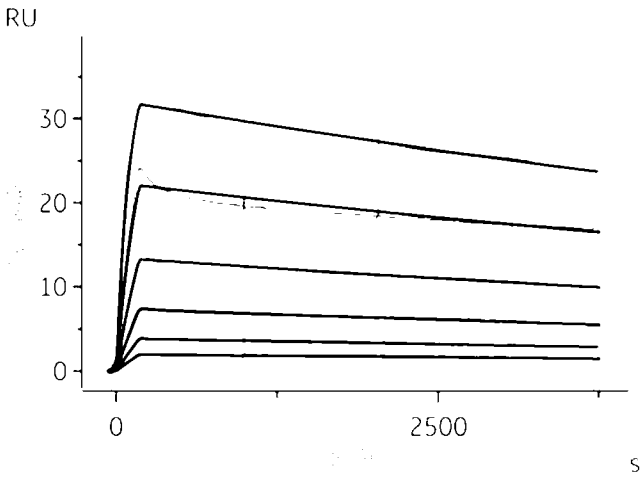


图 10C

抗体结合表达人 **B7H3** 的细胞 **MCF-7** 后的内化

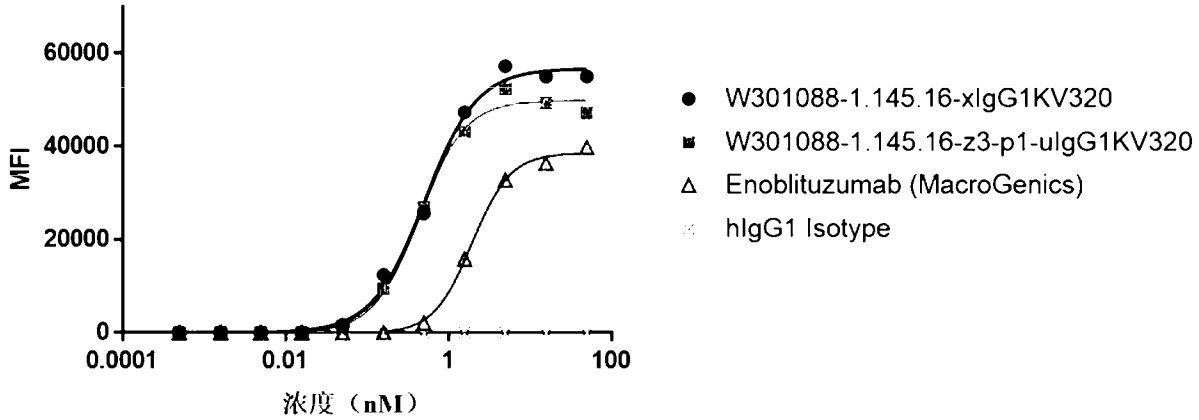


图 11

W301088-1.145.16-xIgG1KV320（“1”）和
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320（“2”）的 VH 区

```
1          1 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMG      50
             .|||||||||||||||:||||||||||||||||||||||.||..|||:|
2          1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHPGKGLEWIG      50

1         51 YISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSL      100
             ||||||||||||||||::|:||||||||.|:|:|||:.|||.|||||||
2         51 YISYSGSTSYNPSLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARSL      100

1        101 GRRWYFVVWGAGTTVTVSA      119
             |||||||||.|||||||:
2        101 GRRWYFVVWGQGTTVTVSS      119
```

图 12A

W301088-1.145.16-xIgG1KV320 (“1”)和
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 (“2”)的 VL 区

```
1    1 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSP  50
2    1 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQKPGQPP  50

1   51 KLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSA 100
2   51 KLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSA 100

1  101 PWTFGGGTKLEIK 113
2  101 PWTFGGGTKVEIK 113
```

图 12B

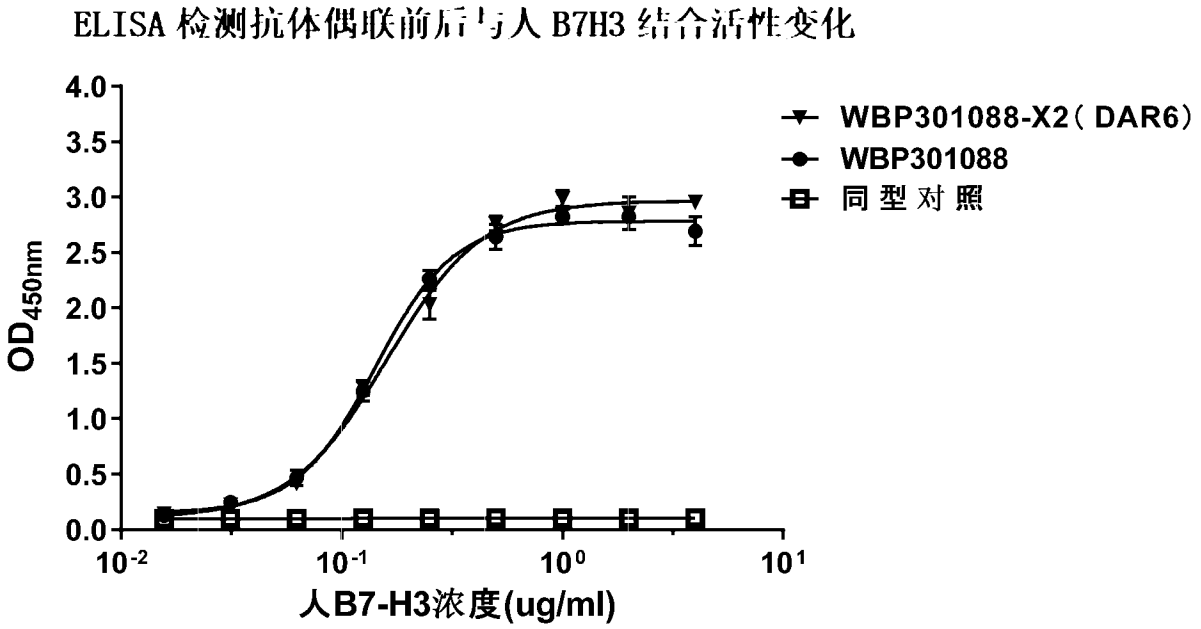


图 13

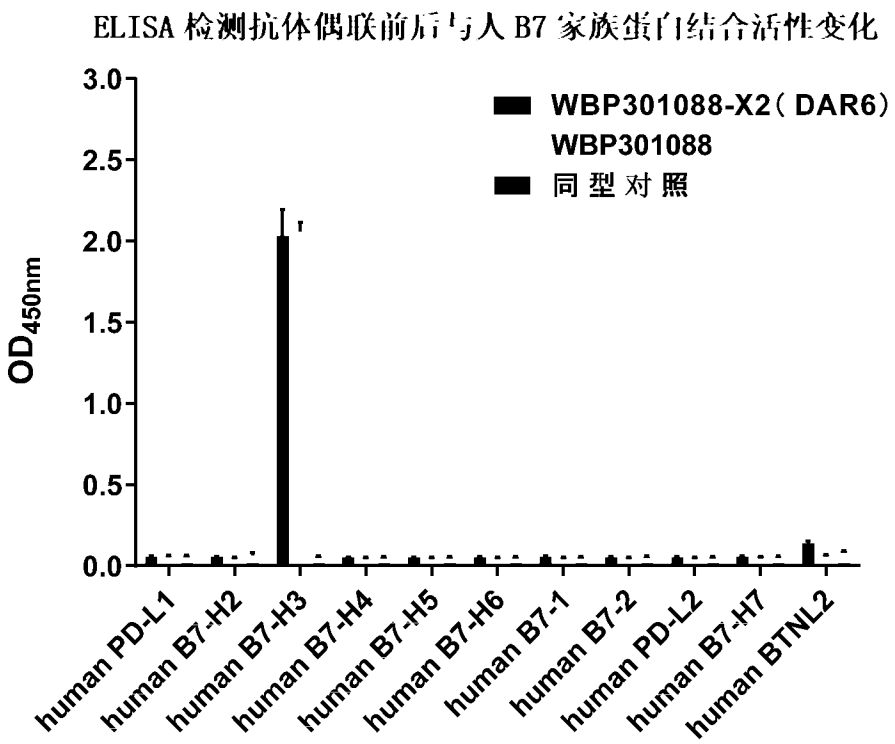

ELISA 检测抗体偶联前后与人 B7 家族蛋白结合活性变化
WBP301088-X2（DAR6）
WBP301088
同型对照
OD450nm
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
human PD-L1
human B7-H2
human B7-H3
human B7-H4
human B7-H5
human B7-H6
human B7-1
human B7-2
human PD-L2
human B7-H7
human BTNL2

图 14

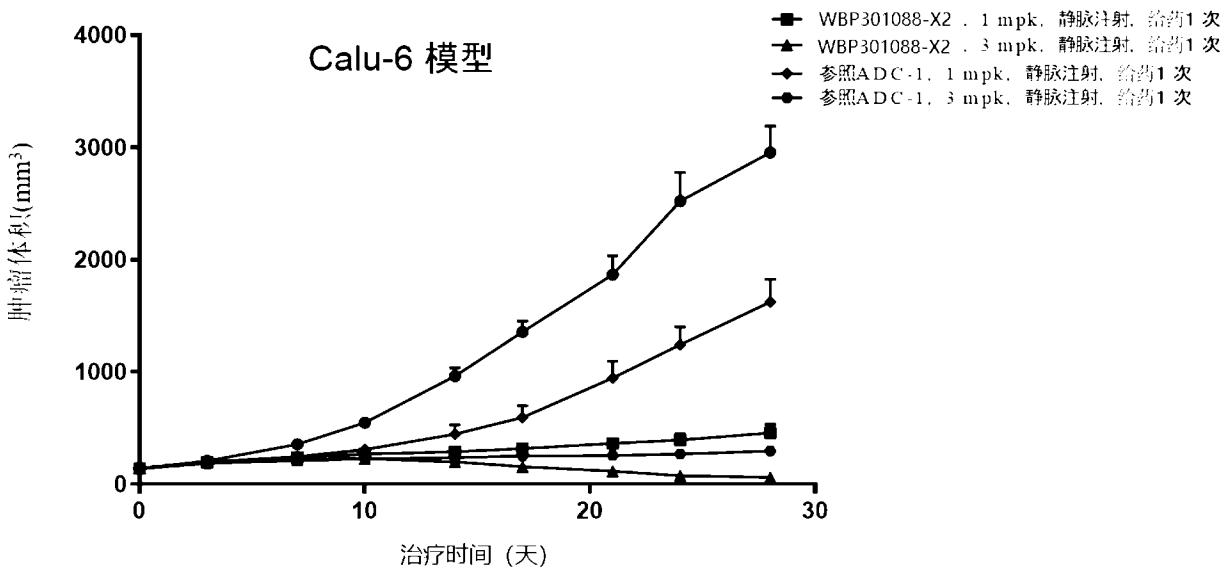

Calu-6 模型
WBP301088-X2，1 mpk，静脉注射，给药1 次
WBP301088-X2，3 mpk，静脉注射，给药1 次
参照ADC-1，1 mpk，静脉注射，给药1 次
参照ADC-1，3 mpk，静脉注射，给药1 次
肿瘤体积(mm3)
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
治疗时间（天）

图 15

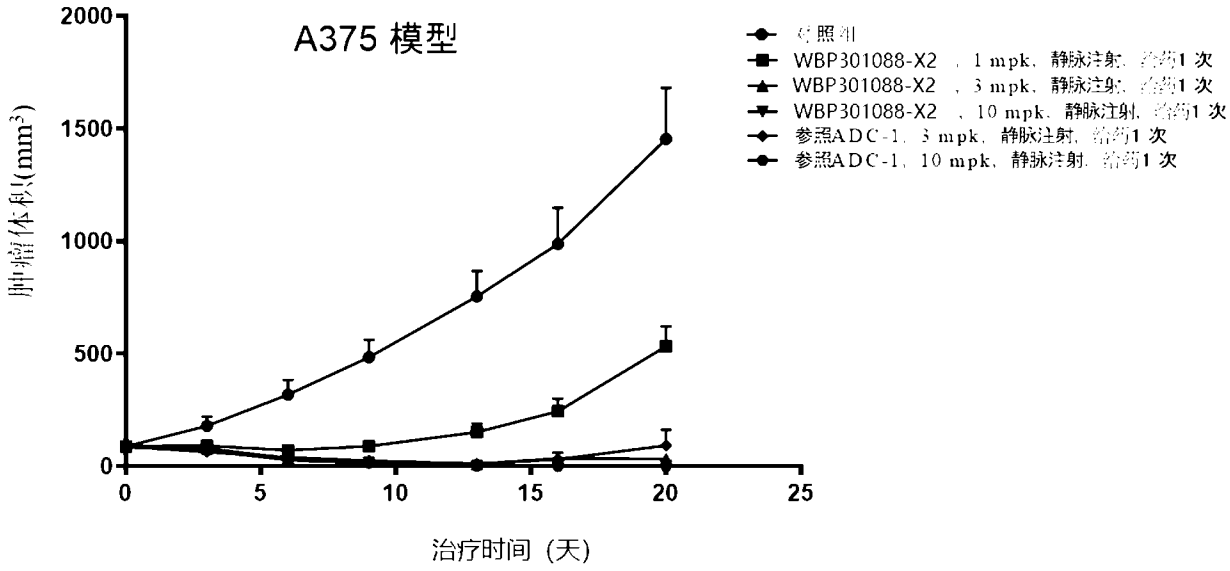

A375 模型
肿瘤体积(mm³)
治疗时间（天）
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
对照组
WBP301088-X2，1 mpk，静脉注射，给药1 次
WBP301088-X2，3 mpk，静脉注射，给药1 次
WBP301088-X2，10 mpk，静脉注射，给药1 次
参照ADC-1，3 mpk，静脉注射，给药1 次
参照ADC-1，10 mpk，静脉注射，给药1 次

图 16

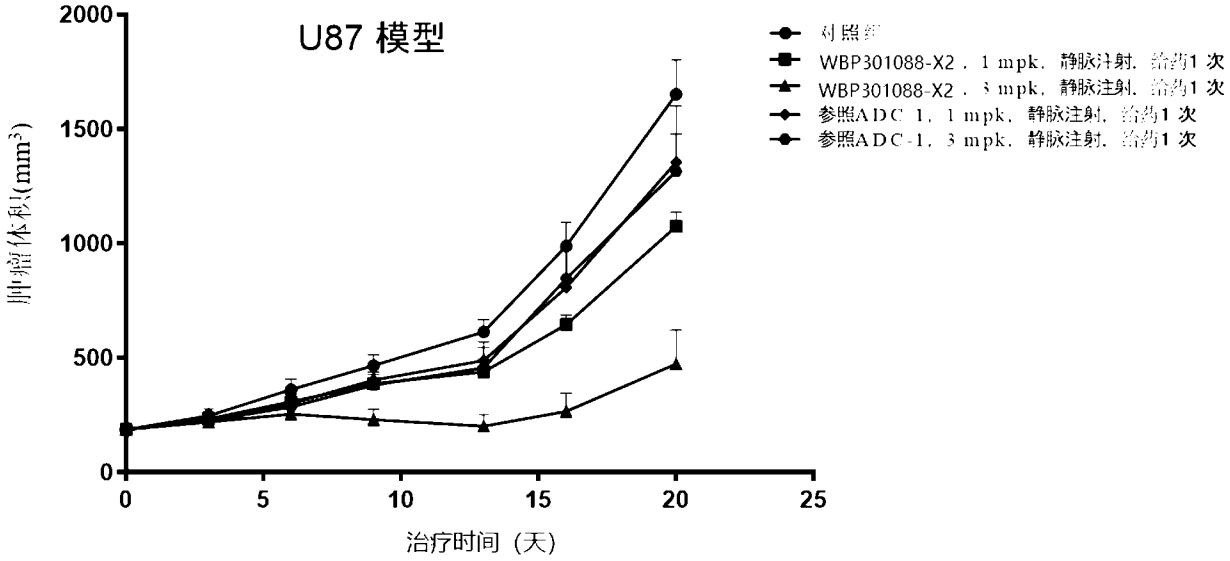

U87 模型
肿瘤体积(mm³)
治疗时间（天）
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
对照组
WBP301088-X2，1 mpk，静脉注射，给药1 次
WBP301088-X2，3 mpk，静脉注射，给药1 次
参照ADC-1，1 mpk，静脉注射，给药1 次
参照ADC-1，3 mpk，静脉注射，给药1 次

图 17

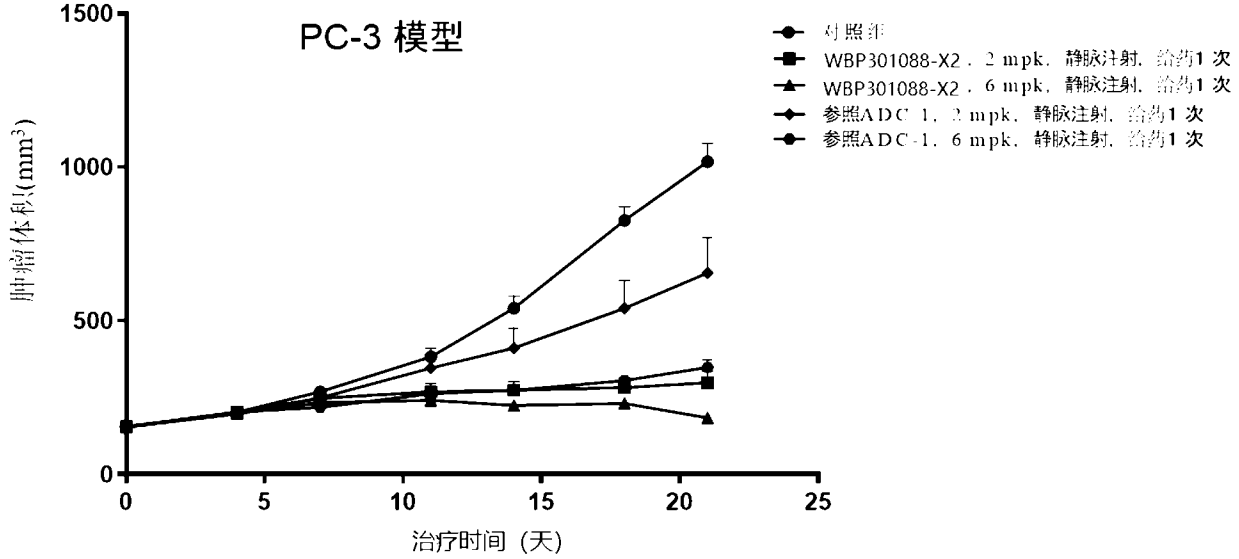


图 18

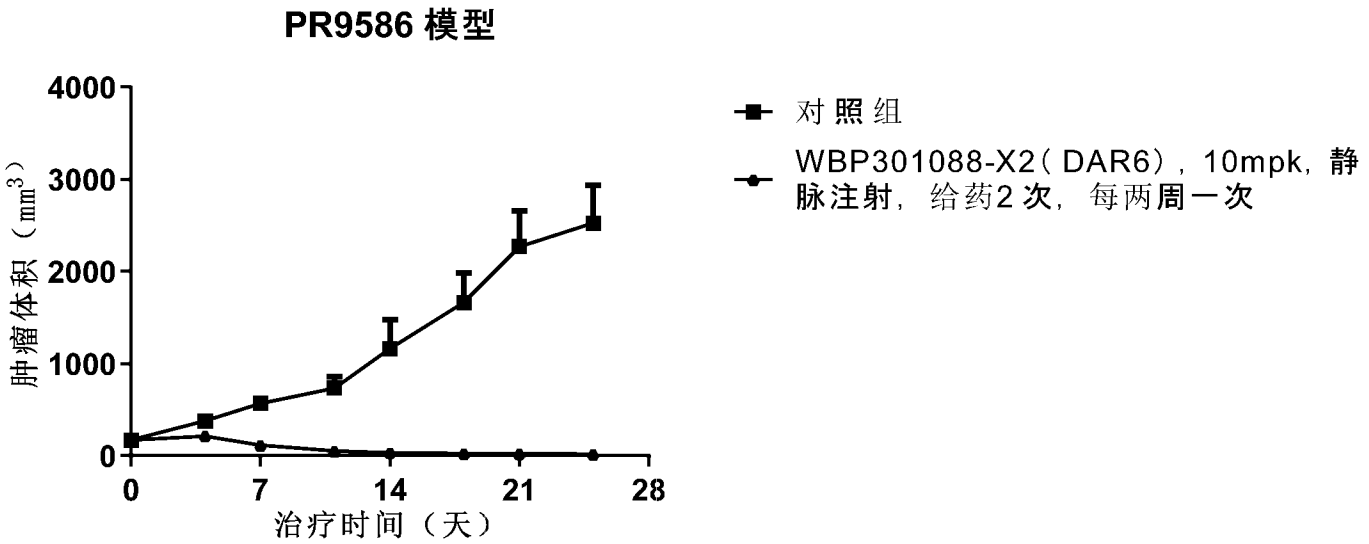


图 19A

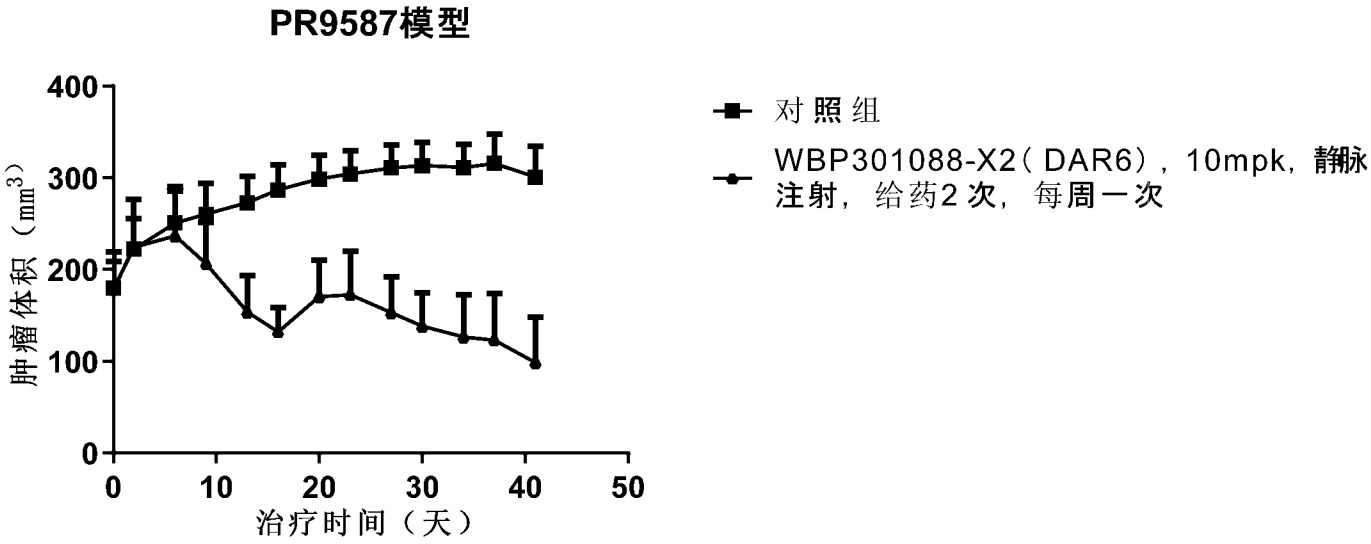


图 19B

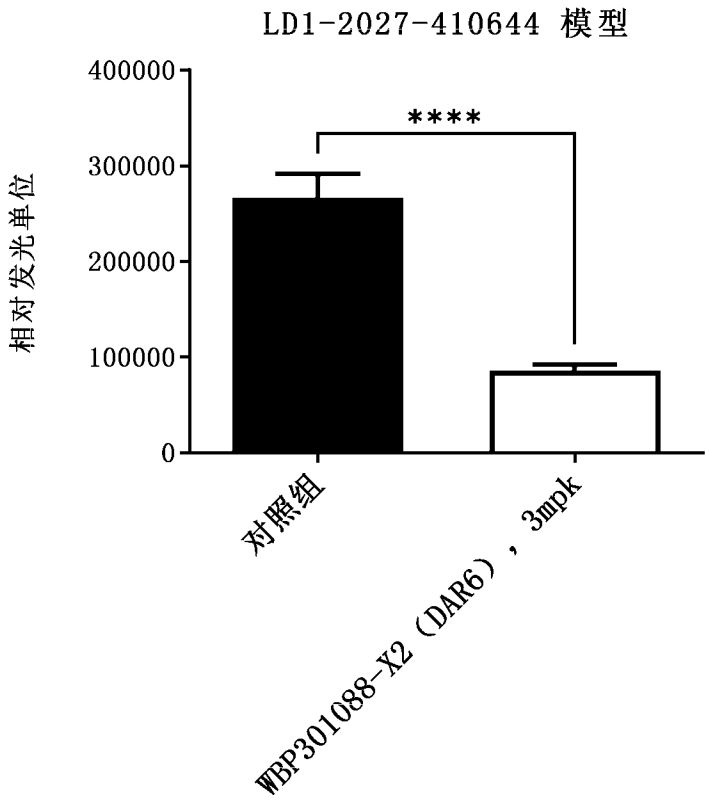

LD1-2027-410644 模型
相对发光单位
400000
300000
200000
100000
0
****
对照组
WBP301088-X2（DAR6），3mpk

图 20A

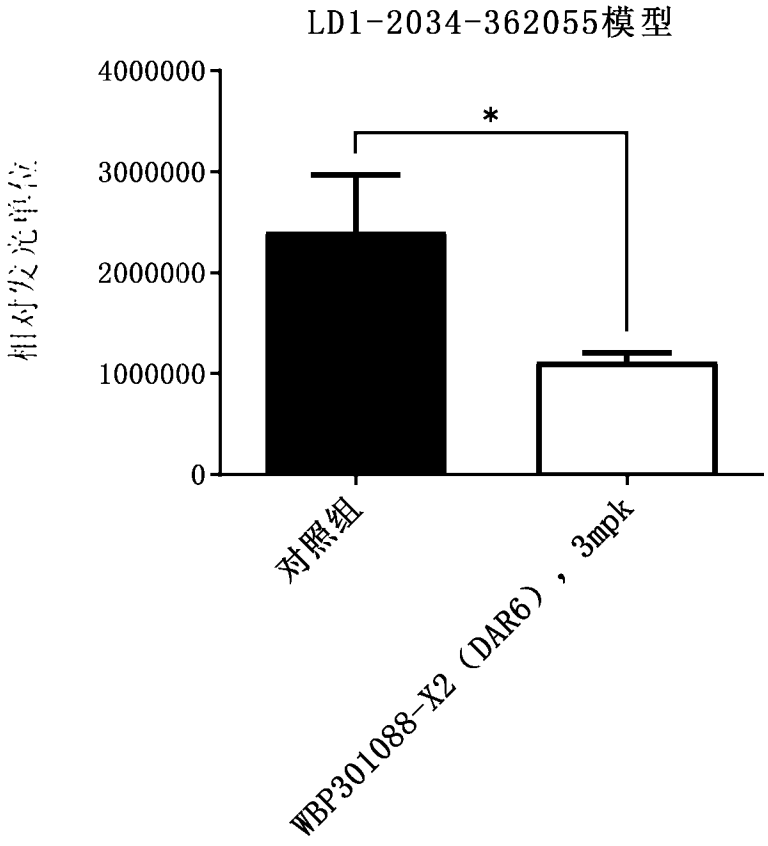

LD1-2034-362055模型
相对发光单位
4000000
3000000
2000000
1000000
0
*
对照组
WBP301088-X2（DAR6），3mpk

图 20B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International applica

PCT/CN2023/098596

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K47/65(2017.01)i; A61K47/68(2017.01)i; A61K31/4745(2006.01)i; A61P35/00(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)

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, CNTXT, DWPI, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, PUBMED, ISI_Web of Science, Science Direct, STNext: 映恩生物制药, B7H3, B7-H3, 抗体, 偶联物, ADC, CDR, 结构式检索, search for structural formula, 序列检索, sequence search, antibod+, receptor, conjugat+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022068878 A1 (DUALITY BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) 07 April 2022 (2022-04-07) abstract, claims 63-74 and 100-103, and description, pages 62 and 155-157	1-26
A	CN 109641962 A (ABBVIE INC.) 16 April 2019 (2019-04-16) abstract, claims 30-37 and 46	1-26
A	US 2012294796 A1 (MACROGENICS, INC.) 22 November 2012 (2012-11-22) abstract, and claims 1-9	1-26
A	WO 2021190586 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 30 September 2021 (2021-09-30) abstract, and claims 1-30	1-26
A	WO 2020063676 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 02 April 2020 (2020-04-02) abstract, claims 1-46	1-26

☑ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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
06 September 2023	**11 September 2023**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	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.
A	WO 2020063673 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 02 April 2020 (2020-04-02) abstract, and claims 1-28	1-26
A	WO 2019024911 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 07 February 2019 (2019-02-07) abstract, and claims 1-22	1-26
A	WO 2018161872 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 13 September 2018 (2018-09-13) abstract, and claims 1-20	1-26

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.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

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.: **26**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 26 relates to a method for treating and/or preventing B7H3-mediated diseases or disorders, which falls within subject matter for which no search is required by the International Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1(iv). A search is carried out on the basis of the designation of the subject matter thereof being a pharmaceutical use.

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 applica
PCT/CN2023/098596

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2022068878 A1	07 April 2022	None	
CN 109641962 A	16 April 2019	CA 3027103 A1	14 December 2017
		AU 2017279554 A1	03 January 2019
		JP 2019521973 A	08 August 2019
		BR 112018075649 A2	09 April 2019
		EP 3469000 A1	17 April 2019
		US 2020338209 A1	29 October 2020
		WO 2017214339 A1	14 December 2017
		WO 2017214339 A4	08 February 2018
		MX 2018015285 A	18 September 2019
US 2012294796 A1	22 November 2012	US 2018134790 A1	17 May 2018
		US 10730945 B2	04 August 2020
		US 2014328750 A1	06 November 2014
		US 9441049 B2	13 September 2016
		US 2016264672 A1	15 September 2016
		US 9896508 B2	20 February 2018
		US 8802091 B2	12 August 2014
WO 2021190586 A1	30 September 2021	None	
WO 2020063676 A1	02 April 2020	CA 3114137 A1	02 April 2020
		JP 2022511351 A	31 January 2022
		BR 112021004656 A2	01 June 2021
		EP 3858386 A1	04 August 2021
		EP 3858386 A4	12 October 2022
		KR 20210066833 A	07 June 2021
		MX 2021003382 A	27 May 2021
		US 2021353764 A1	18 November 2021
		AU 2019349207 A1	08 April 2021
		TW 202027795 A	01 August 2020
WO 2020063673 A1	02 April 2020	MX 2021003446 A	15 June 2021
		JP 2022512568 A	07 February 2022
		EP 3854816 A1	28 July 2021
		EP 3854816 A4	07 September 2022
		TW 202028242 A	01 August 2020
		CA 3114474 A1	02 April 2020
		AU 2019351427 A1	15 April 2021
		BR 112021004829 A2	08 June 2021
		KR 20210068457 A	09 June 2021
		US 2021347894 A1	11 November 2021
WO 2019024911 A1	07 February 2019	None	
WO 2018161872 A1	13 September 2018	TW 201833141 A	16 September 2018
		TWI 673287 B	01 October 2019

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/098596

A. 主题的分类

A61K47/65(2017.01)i; A61K47/68(2017.01)i; A61K31/4745(2006.01)i; A61P35/00(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)

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, CNTXT, DWPI, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, PUBMED, ISI_Web of Science, Science Direct, STNext: 映恩生物制药，B7H3，B7-H3，抗体，偶联物，ADC，CDR，结构式检索，序列检索，antibod+，receptor，conjugat+

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
A	WO 2022068878 A1 (映恩生物制药（苏州）有限公司) 2022年4月7日 (2022-04-07) 说明书摘要，权利要求63-74、100-103，说明书62页、第155-157页	1-26
A	CN 109641962 A (艾伯维公司) 2019年4月16日 (2019-04-16) 说明书摘要，权利要求30-37和46	1-26
A	US 2012294796 A1 (MACROGENICS INC.) 2012年11月22日 (2012-11-22) 说明书摘要，权利要求1-9	1-26
A	WO 2021190586 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2021年9月30日 (2021-09-30) 说明书摘要，权利要求1-30	1-26
A	WO 2020063676 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2020年4月2日 (2020-04-02) 说明书摘要，权利要求1-46	1-26
A	WO 2020063673 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2020年4月2日 (2020-04-02) 说明书摘要，权利要求1-28	1-26
A	WO 2019024911 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2019年2月7日 (2019-02-07) 说明书摘要，权利要求1-22	1-26

☑ 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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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
2023年9月6日	2023年9月11日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 崔传明 电话号码 (+86) 010-53961869

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
A	WO 2018161872 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2018年9月13日 (2018-09-13) 说明书摘要，权利要求1-20	1-26

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/098596

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：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/098596

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： 26
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求26涉及一种治疗和/或预防B7H3介导的疾病或病症的方法，属于PCT细则39.1(iv)定义的不要求国际检索单位检索的主题，基于其主题名称为制药用途进行检索。

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/CN2023/098596

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	2022068878	A1	2022年4月7日	无			
CN	109641962	A	2019年4月16日	CA	3027103	A1	2017年12月14日
				AU	2017279554	A1	2019年1月3日
				JP	2019521973	A	2019年8月8日
				BR	112018075649	A2	2019年4月9日
				EP	3469000	A1	2019年4月17日
				US	2020338209	A1	2020年10月29日
				WO	2017214339	A1	2017年12月14日
				WO	2017214339	A4	2018年2月8日
				MX	2018015285	A	2019年9月18日
US	2012294796	A1	2012年11月22日	US	2018134790	A1	2018年5月17日
				US	10730945	B2	2020年8月4日
				US	2014328750	A1	2014年11月6日
				US	9441049	B2	2016年9月13日
				US	2016264672	A1	2016年9月15日
				US	9896508	B2	2018年2月20日
				US	8802091	B2	2014年8月12日
WO	2021190586	A1	2021年9月30日	无			
WO	2020063676	A1	2020年4月2日	CA	3114137	A1	2020年4月2日
				JP	2022511351	A	2022年1月31日
				BR	112021004656	A2	2021年6月1日
				EP	3858386	A1	2021年8月4日
				EP	3858386	A4	2022年10月12日
				KR	20210066833	A	2021年6月7日
				MX	2021003382	A	2021年5月27日
				US	2021353764	A1	2021年11月18日
				AU	2019349207	A1	2021年4月8日
				TW	202027795	A	2020年8月1日
WO	2020063673	A1	2020年4月2日	MX	2021003446	A	2021年6月15日
				JP	2022512568	A	2022年2月7日
				EP	3854816	A1	2021年7月28日
				EP	3854816	A4	2022年9月7日
				TW	202028242	A	2020年8月1日
				CA	3114474	A1	2020年4月2日
				AU	2019351427	A1	2021年4月15日
				BR	112021004829	A2	2021年6月8日
				KR	20210068457	A	2021年6月9日
				US	2021347894	A1	2021年11月11日
WO	2019024911	A1	2019年2月7日	无			
WO	2018161872	A1	2018年9月13日	TW	201833141	A	2018年9月16日
				TWI	673287	B	2019年10月1日