

(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
2024 年 12 月 12 日 (12.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/251240 A1

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

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/097980

(22) 国际申请日: 2024 年 6 月 7 日 (07.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310684362.6 2023年6月9日 (09.06.2023) CN
202311002749.5 2023年8月10日 (10.08.2023) CN
202311490098.9 2023年11月9日 (09.11.2023) CN
202410237969.4 2024年3月1日 (01.03.2024) CN

(71) 申请人: 徠特康 (苏州) 生物制药有限公司 (**LATTICON (SUZHOU) BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市中国 (江苏) 自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区裕新路108号A栋6楼613室, Jiangsu 215164 (CN)。

(72) 发明人: 李约翰 (**LI, John Yuehua**); 中国江苏省苏州市中国 (江苏) 自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区裕新路108号A栋6楼613室, Jiangsu 215164 (CN)。

(74) 代理人: 北京信慧永光知识产权代理有限公司 (**BEIJING SUNHOPE INTELLECTUAL PROPERTY LTD.**); 中国北京市海淀区知春路9号坤讯大厦1106室, Beijing 100191 (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))。

(54) **Title:** ANTI-HER2 COMPLEMENTARY BISPECIFIC ANTIBODY-DRUG CONJUGATE, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗HER2互补性双特异抗体-药物偶联物及其制备方法和用途

(57) **Abstract:** Provided are an anti-HER2 antibody or an antigen-binding fragment thereof, or an anti-HER2 complementary bispecific antibody constructed therefrom and a complementary bispecific antibody-drug conjugate (ADC), and a pharmaceutical composition and a kit comprising same. Also provided is a method of using the antibodies, ADC, pharmaceutical composition and kit for the treatment of HER2 abnormal expression-associated diseases.

(57) 摘要: 提供一种抗HER2抗体或其抗原结合片段、由其构建的抗HER2互补性双特异抗体和互补性双特异抗体-药物偶联物(ADC)、以及包含它们的药物组合物和药盒。还提供所述抗体、ADC、药物组合物和药盒用于治疗与HER2异常表达相关联的疾病的方法。



WO 2024/251240 A1

抗 HER2 互补性双特异抗体-药物偶联物及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 以及基于此而构建的抗 HER2 互补性双特异抗体和包含该类抗体的抗体-药物偶联物。本发明还提供了制备该互补性双特异抗体及其抗体-药物偶联物的方法, 以及用于治疗与 HER2 异常表达相关联的疾病的方法。

背景技术

人表皮生长因子受体 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, 简称 HER2 或 ErbB2) 是受体酪氨酸激酶 ErbB/HER 家族成员之一。ErbB/HER 家族受体通过二聚化而激活其介导的下游信号转导通路, 并由此参与细胞生长、分化和存活的调控。HER2 是分子量约为 185 kDa 的跨膜糖蛋白, 它由胞外结构域 (Extracellular Domain)、跨膜结构域 (Transmembrane Domain) 和胞内酪氨酸激酶结构域 (Intracellular Tyrosine Kinase Domain) 组成。ErbB2/HER2 基因突变和/或基因扩增会导致 HER2 过表达 (Overexpression), 其在 IHC 及 FISH 检测中表现为 IHC 3⁺ 或 IHC 2⁺/FISH⁺。临床研究显示 HER2 在多种癌症 (例如乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胃癌、前列腺癌、肺癌等) 中过表达, 且该过表达与肿瘤的侵袭性和不良预后有关联。

多款靶向 HER2 的治疗性药物已获批用于治疗 HER2 过表达的乳腺癌和胃癌, 这些药物显著延长了患者的生存期; 但是, 仍有相当一部分的癌症患者对这些疗法不响应。除此之外, 现有的 HER2 靶向疗法还存在以下缺陷而限制了其临床疗效并导致安全性风险:

(1) 现有的 HER2 靶向疗法对 HER2 表达量相对较低的肿瘤细胞缺乏有效杀伤力, 所述 HER2 表达量相对较低是指在 IHC 检测中表现为 2⁺/FISH⁻ 或 IHC 1⁺ (定义为“HER2 低表达”); 由于 HER2 的表达量在 HER2 过表达肿瘤中具有高度异质性, 因此所述肿瘤中 HER2 低表达的肿瘤细胞很容易对现有疗法产生耐药性, 导致大多数癌症患者在接受现有 HER2 靶向疗法 6~12 月后会因耐药性而发生疾病进展;

(2) 相对于 HER2 过表达, 约 70% 的乳腺癌病人表征为 HER2 低表达, 针对这一患病人群, DS-8201 是目前唯一获批的 HER2 靶向药物, 但其在三期临床试验 DESTINY-Breast04 中也仅有约 50% 的应答率, 并且在试验期间与药物相关的间质性肺病/肺炎的发生率为 12.1% (Modi 等, N Engl J Med 2022, 387:9-20), 突显现有靶向 HER2 疗法在治疗 HER2 低表达肿瘤的有效性和安全性方面存在极大的提升空间;

(3) HER2 介导的信号转导通路对于维持心肌细胞的生存、修复心肌细胞的损伤、以及保持心肌细胞功能的完善至关重要; 目前获批的抗 HER2 抗体、ADC 或小分子抑制剂都能够阻断或者扰乱 HER2 信号转导通路, 因此均具有诱发心脏功能障碍的毒副作用 (Cardiotoxicity), 例如 Trastuzumab 和 Pertuzumab 在治疗中均可能引发左心室射血分数 (LVEF) 降低和充血性心脏衰竭, 尤其是 Trastuzumab 在与蒽环类药物同时给药时诱发心脏衰竭的风险更高, 这导致在应用这些药物进行治疗前需要严格筛选适应症人群或对患者进行预防性心脏保护治疗。

因此, 本领域仍存在较大的未满足的临床需求, 亟需开发一种更加安全 (尤其是解决现有靶向 HER2 疗法的心脏毒性问题), 并且对 HER2 低表达的肿瘤细胞具有更强杀伤活性的靶向药物以破解现有疗法的安全性及耐药性问题。

发明内容

本发明提供了一种靶向 HER2 的互补性双特异抗体-药物偶联物 (HER2-targeting Biparatopic ADC)。一方面, 所述互补性双特异 ADC 能够特异性地结合 HER2 胞外结构域 (也称“胞外区”) 中的两个不同表位, 因此能够有效地交联 (Crosslink) 细胞表面 HER2 以形成矩阵状多聚体, 进而诱发快速、高效内吞, 并引导内吞后的胞内体 (Endosome) 由通常的重循环转运途径 (Recycling) 转变为溶酶体转运途径 (Lysosomal Trafficking), 由此使得结合于细胞表面的 ADC 被高效转运 (几乎 100%) 进入溶酶体发生降解, 从而释放出更多的小分子毒素至细胞质中以发挥细胞毒性以及后续的旁观者杀伤效应。因此, 所述互补性双特异 ADC 具有更广谱的靶向杀伤活性, 其不仅能杀伤 HER2 过表达的癌细胞, 也能够直接杀伤 HER2 低表达 (IHC 2⁺/FISH⁻ 或 IHC 1⁺) 的癌细胞, 由此极大地降低了因 HER2 表达的异质性而产生耐药性的几率; 另一方面, 所述互补性双特异 ADC 的抗原结合表位不同于 Trastuzumab 或 Pertuzumab, 其不会干扰 HER2 的二聚化或影响 HER2 下游信号转导通路的调控, 因此不会影响 HER2 在心肌细胞中的正常生物学功能。

一方面, 本发明提供了一种分离的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外结构域, 对表达 HER2 的肿瘤细胞具有较高的结合活性或结合亲和力 (例如结合亲和力常数 [K_D] 值 $<1 \times 10^{-8}$ M、 $<5 \times 10^{-9}$ M、或 $<1 \times 10^{-9}$ M), 以及不与 ErbB/HER 家族其它成员 (包括 EGFR、HER3 和 HER4) 发生交叉结合反应。所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段对 HER2 及其下游信号转导通路不具有抑制或激活作用。

在一些实施方案中,所述抗 HER2 抗体包括鼠源抗 HER2 抗体或其衍生的嵌合抗体和/或人源化抗体及其优化抗体。在一些实施方案中,所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的亚结构域 (Subdomain) 1、3 和/或 4, 优选 HER2 胞外区亚结构域 1 或 3。在一些实施方案中,用于构建抗 HER2 互补性双特异抗体的两种抗 HER2 抗体或其抗原结合片段分别特异性地识别 HER2 胞外区中的不同表位,且彼此之间不存在竞争性结合关系。

一方面,本发明提供了一种抗 HER2 互补性双特异抗体,其包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,所述第一和第二抗原结合结构域特异性地结合 HER2 的不同表位,导致所述双特异性抗体能够在细胞表面交联 HER2 形成簇 (Cluster), 并且簇的形成受制于细胞表面 HER2 的表达丰度;簇的形成会引发其被细胞快速内吞并被转运至溶酶体中降解。相较于本发明所述的单特异性抗 HER2 抗体和/或 Trastuzumab, 所述互补性双特异抗体具有显著提高了的 HER2 内化率以及更高的溶酶体转运/降解效率。

在一些实施方案中,所述抗 HER2 互补性双特异抗体的第一和第二抗原结合结构域特异性地结合 HER2 的不同 (非重叠或非竞争) 表位,所述表位包括位于 HER2 胞外区亚结构域 1、3 和/或 4 中的序列。在一个实施方案中,所述第一抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 3, 所述第二抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 1, 所结合的表位均不同于 Trastuzumab 或 Pertuzumab 的抗原结合表位。在一个实施方案中,所述互补性双特异抗体对细胞表面 HER2 及其下游信号转导通路不具有抑制或激活作用。在一个实施方案中,所述互补性双特异抗体在结合并交联细胞表面的 HER2 后引发其被细胞快速内化以及高效的溶酶体转运。在一个实施方案中,所述互补性双特异抗体能够诱导细胞表面 HER2 降解。在一个实施方案中,所述互补性双特异抗体通过交联细胞表面 HER2, 使其内化并转运至溶酶体内降解, 导致细胞表面 HER2 的丰度显著降低, 因而有效抑制 HER2 过表达肿瘤细胞的增殖。

一方面,本发明提供了一种 ADC, 其将小分子毒素化合物通过接头 (Linker) 偶联至本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体。所述 ADC 能够特异性地结合/交联表达于肿瘤细胞表面的 HER2 而聚集成“簇”, 使得 ADC 被快速内吞并转运至溶酶体内降解, 显著提高了 ADC 中的小分子毒素化合物进入肿瘤细胞和在肿瘤细胞内释放的效率, 因此所述互补性双特异 ADC 相较于 T-DM1 和/或 DS-8201 具有更广谱的肿瘤细胞杀伤活性, 即所述 ADC 对 HER2 过表达和 HER2 低表达的肿瘤细胞均具有直接杀伤活性。所述 ADC 可以由式 (I) 表示:

Ab-(L-D)_p (I)

其中 Ab 表示本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体;

D 表示小分子毒素化合物 (Drug);

L 表示将 Ab 偶联至 D 的可裂解接头 (Cleavable Linker); 以及

p 表示偶联至 Ab 上的 (L-D) 的拷贝数, 为 2 至 8。

在一些实施方案中,所述小分子毒素化合物包括细胞毒素和化疗药物。在一个实施方案中,所述小分子毒素化合物是细胞毒素,包括微管蛋白抑制剂和 DNA 损伤剂; 优选地,所述微管蛋白抑制剂包括艾日布林 (Eribulin)、奥瑞他汀 (Auristatins) 类衍生物 (例如, MMAE、MMAF、MMAD)、Tubulysins、Cryptomycins 和美登素 (Maytansinoids) 类衍生物 (例如, DM1、DM2、DM3、DM4), 所述 DNA 损伤剂包括拓扑异构酶抑制剂 (例如, 喜树碱类衍生物 SN-38、依沙替康 [Exatecan] 和 DXd [Exatecan derivative for ADC])、吡咯并苯并二氮杂卓 (PBD)、卡奇霉素 (Calicheamicin) 及其衍生物 (例如 N-乙酰基卡奇霉素 [CMC])、和倍癌霉素 (Duocarmycin)。在一个实施方案中,所述小分子毒素化合物为艾日布林。

在一些实施方案中,所述可裂解接头可以为包含可裂解部分的任何接头,所述可裂解部分包含可裂解的任何化学键。在一些具体实施方案中,所述可裂解接头包含可裂解肽部分,其能够被细胞内肽酶或蛋白酶裂解,所述可裂解肽部分包含氨基酸单元,所述氨基酸单元包含二肽、三肽、或四肽。在一些具体实施方案中,所述可裂解接头可以包含至少一种将本发明抗 HER2 互补性双特异抗体 (Ab) 缀合于小分子毒素化合物 (D) 的间隔区 (Spacer), 所述间隔区包含与抗体缀合的间隔区, 和/或与小分子毒素化合物缀合的第二间隔区。在一些实施方式中,所述与抗体缀合的间隔区是亲水性的, 示例性的间隔区包含聚乙二醇 (PEG)。在一些实施例中,所述间隔区经由丁烯二酰亚胺 (Mal) 连接于本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体。在一些实施方式中,所述与小分子毒素化合物缀合的第二间隔区用于将可裂解接头的可裂解部分 (例如可裂解肽) 连接于小分子毒素化合物。在一些实施例中,所述与小分子毒素化合物缀合的第二间隔区具有自焚碎裂 (Self-immolation) 的特性, 所述自焚碎裂间隔区包含对氨基苯甲基单元。在一些具体实施方案中,所述可裂解接头包含 Mal-间隔区和可裂解肽部分。在一些具体实施方案中,所述可裂解接头的 Mal-间隔区与本发明 ADC 中的抗体部分的一个或多个氨基酸残基偶联。在一些实施方案中,所述 Mal-间隔区的顺丁烯二酰亚胺基可以与所述抗体的恒定区和/或可变区中特定位置处的半胱氨酸残基的巯基反应。在一些具体实施方案中,所述可裂解接头的第二间隔区偶联至本发明 ADC 中的小分子毒素化合物部分, 所述小分子毒素化合物是艾日布林或其衍生物。在一些具体实施方案中,所述可裂解接头的可裂解部分 (例如可裂解肽) 可以直接缀合于所述 ADC 的小分子毒素化合物部分, 所述小分子毒素化合物是艾日布林或

其衍生物。

在一些实施方案中，p 为 2 至 8，例如 4 至 8。在本文中，p 可为大于 0 的整数或非整数。

在另一个方面，本发明涉及编码抗 HER2 互补性双特异抗体及其对应的单特异性抗体或其抗原结合片段的分离的核酸分子（也称为“多核苷酸”），以及包含所述核酸的表达载体和包含核酸或表达载体的宿主细胞。本发明还涉及使用所述宿主细胞制备本文所述单特异性抗 HER2 抗体或其抗原结合片段以及抗 HER2 互补性双特异抗体的方法，所述方法包括培养所述宿主细胞并从培养基中回收所述抗体或其抗原结合片段。

在另一个方面，本发明涉及一种药物组合物，其包含本文所述的单特异性抗 HER2 抗体或其抗原结合片段，或抗 HER2 互补性双特异抗体，或抗 HER2 互补性双特异抗体-药物偶联物，以及药学上可接受的载体。

在另一个方面，本发明涉及一种药盒，所述药盒包含有效量的本发明所述的抗 HER2 单特异性抗体或其抗原结合片段、抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体-药物偶联物、或药物组合物，以及任选的至少一种另外的肿瘤治疗剂。

在另一个方面，本发明涉及一种对受试者中的表达 HER2 的肿瘤进行治疗的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本发明所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体-药物偶联物、药物组合物或药盒。或者，本发明涉及本文所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体-药物偶联物、药物组合物或药盒在用于制备对受试者中的表达 HER2 的肿瘤进行治疗的药物中的用途。或者，本发明涉及用于对受试者中的表达 HER2 的肿瘤进行治疗的本文所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体-药物偶联物、药物组合物或药盒。在一些实施方案中，所述肿瘤包括 HER2 过表达（IHC 3⁺、或 IHC 2⁺/FISH⁺）的肿瘤和/或 HER2 低表达（IHC 2⁺/FISH⁻、或 IHC 1⁺）的肿瘤。在一些实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体-药物偶联物或其药物组合物对 HER2 过表达和/或 HER2 低表达的肿瘤细胞均具有杀伤作用。在一些实施方案中，所述受试者为哺乳动物。在一些实施方案中，所述肿瘤包括乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、食管癌、肺癌、头颈癌、膀胱癌、黑色素瘤、胰腺癌、肝癌、胆管癌、肾癌、膀胱癌、甲状腺癌、前列腺癌、子宫内膜癌等，所述肿瘤可以是 HER2 过表达或低表达的。

在一些实施方案中，所述肿瘤为对现有 HER2 靶向治疗剂产生耐药性的肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤为对包括 Trastuzumab、Pertuzumab、T-DM1 和/或 DS-8201 的 HER2 靶向治疗剂具有耐药性的肿瘤。在一个实施方案中，所述肿瘤为对包括 Trastuzumab、Pertuzumab、T-DM1、DS-8201 和/或紫杉烷类（例如，Paclitaxel、Docetaxel、Cabazitaxel 等）的靶向治疗剂不响应或响应较差的肿瘤。

在一些实施方案中，所述受试者包括不适合接受现有 HER2 靶向疗法或难治疗、或在接受现有 HER2 靶向疗法后产生耐药性或复发的患者。在一些实施方案中，所述的现有 HER2 靶向疗法包括使用 Trastuzumab、Pertuzumab、T-DM1、和/或 DS-8201 进行治疗。

在另一个方面，本发明涉及一种检测和/或测量样品中的 HER2 或表达 HER2 的肿瘤细胞的方法，或者筛选对本发明所述的抗 HER2 互补性双特异 ADC 治疗有响应的癌症患者的方法，包括将本发明所述的抗 HER2 单特异性抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体与所述样品或分离自所述患者的生物样本进行孵育，检测所述抗体是否结合至所述样品或生物样本。

通过下面的附图和具体实施方案进一步说明本发明，本发明所公开的其它特征和优点将是显而易见，并且这些附图和具体实施方案不应被认为限制本发明的范围，并且本领域技术人员容易想到的改变将包括在本发明的精神和所附权利要求的保护范围内。在本发明中引用的所有参考文献，包括公开出版物、专利和专利申请都通过引用的方式全文并入。

附图说明

图 1. 利用 ELISA 检测各抗 HER2 嵌合抗体与人源 ErbB/HER 家族蛋白 EGFR、HER2、HER3 和 HER4 的结合活性，其中对照抗体包括 Trastuzumab、Cetuximab、Patritumab。

图 2. 流式细胞术检测抗 HER2 嵌合抗体与过表达 HER2 的 NCI-N87 细胞的结合活性，其中对照抗体为 Trastuzumab。

图 3. 人-鼠嵌合的 HER2 胞外区重组蛋白结构示意图（图 3A），以及利用 ELISA 方法测定抗 HER2 嵌合抗体的抗原结合表位所在的 HER2 胞外区亚结构域（图 3B）。

图 4. 利用竞争 ELISA 方法检测各抗 HER2 嵌合抗体之间或与对照抗体 Trastuzumab 之间是否存在竞争结合关系，其中图 4A 为生物素标记的 mAb2164 分别与 mAb2117、mAb2126、mAb2170 和 Trastuzumab 竞争结合 HER2 重组蛋白的结果，图 4B 是 mAb2117 与生物素标记的 mAb2128 或生物素标记的 mAb2126 竞争结合 HER2 重组蛋白，以及 mAb2164 与生物素标记的 mAb2128 竞争结合 HER2 重组蛋白的结果。

图 5. 抗 HER2 嵌合抗体 mAb2117 和 mAb2126 对 SKBR-3 细胞中 HER2 胞内结构域 Y1248 位点磷酸化的作用，其中对照抗体包括 Trastuzumab 和 Pertuzumab。

图 6. 抗 HER2 嵌合抗体 mAb2117 和 mAb2126 对 NRG-1 诱导的 T47D 细胞内 AKT 磷酸化的影响, 其中对照抗体包括 Trastuzumab 和 Pertuzumab。

图 7. 利用流式细胞术检测含有单点/多点突变的抗 HER2 单链抗体优化分子分别与 BT474 细胞(图 7A) 和 RT-112 细胞(图 7B) 的结合活性, 其中对照抗体为母本单链抗体 Hu2117HK。

图 8. 利用流式细胞术检测含有组合突变的抗 HER2 单链抗体优化分子 (Hu2117-HK203、Hu2117-HK303、Hu2117-HK304、Hu2117-HK309、Hu2117-HK310) 分别与 BT474 细胞和 RT-112 细胞的结合活性, 其中对照抗体为母本单链抗体 Hu2117HK。

图 9. 示例性抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-109-WT 的结构示意图。所述示例性互补性双特异抗体的构型为 DVD-IgG 结构, 其中 Fv 结构域为 Hu2117-HK304 的可变区序列, IgG 结构域为 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14 的全长序列, Fv 结构域重链可变区与 IgG 结构域的重链通过连接子 $(G_4S)_1$ 相连, Fv 结构域轻链可变区与 IgG 结构域的轻链通过连接子 $(G_4S)_3$ 相连, 抗体重链 Fc 区含有 L234F/L235E/P331S (EU Numbering) 突变。

图 10. 利用流式细胞术测定抗 HER2 人源化抗体 Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14 (简称 Hu2126-7172b-Mu14) 与 BT474 细胞的共结合或竞争结合关系。

图 11. 利用流式细胞术检测抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-109-WT 及其突变体分子在表达不同水平 HER2 的细胞株 (BT474、JMT-1、RT-112) 中的内吞反应, 其中对照抗体包括 Trastuzumab、以及所述互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 对应的单特异性抗体 Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14 (简称 Hu2126-7172b-Mu14)。

图 12. 利用共聚焦显微镜方法检测抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 在被 SKBR-3 细胞内吞后的溶酶体转运效率, 其中对照抗体包括 Trastuzumab 和人源 IgG 同型抗体; 图中箭头所指处为抗体的荧光信号位点与溶酶体的荧光信号位点相互重合, 代表所述互补性双特异抗体与 HER2 所形成的交联聚集体或簇被细胞内吞并转运入溶酶体内; T 代表抗体孵育时间 (小时)。

图 13. 利用 Western-blot 方法检测抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 引起的 BT474 细胞中 HER2 蛋白的降解反应, 其中对照抗体包括 Trastuzumab 以及所述互补性双特异性抗体对应的单特异性抗体 Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14 (简称 Hu2126-7172b-Mu14)。

图 14. 抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 对 BT474 细胞体外增殖的影响, 其中对照抗体包括 Trastuzumab、Pertuzumab、以及所述互补性双特异性抗体对应的单特异性抗体 Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14 (简称 Hu2126-7172b-Mu14)。

图 15. 利用报告基因法检测抗 HER2 单特异性抗体 (图 15A) 和抗 HER2 互补性双特异抗体 (图 15B) 对 NRG-1 诱导的 HER2/HER4 二聚化的影响, 其中对照抗体包括 Trastuzumab 和 Pertuzumab。

图 16. 利用 Western-blot 方法检测抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 对 NRG-1 诱导的人心肌细胞内 AKT 磷酸化的影响, 其中对照抗体包括 Trastuzumab 和 Pertuzumab。

图 17. 利用报告基因法检测抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 的 ADCC 活性, 其中阳性对照抗体为 Trastuzumab。

图 18. 利用 ELISA 方法检测抗 HER2 互补性双特异 ADC (ST06-VCP-Eribulin) 与人源 ErbB/HER 家族成员 (包括 EGFR、HER2、HER3 和 HER4) 的结合特异性。

图 19. 利用体外细胞杀伤实验检测抗 HER2 互补性双特异 ADC (包括 ST06-GGFG-Eribulin 和 ST06-VCP-Eribulin) 以及对标分子 DS-8201 在表达不同水平 HER2 的肿瘤细胞株中的增殖抑制活性。

图 20. 通过体外细胞杀伤实验检测抗 HER2 互补性双特异 ADC 的旁观者效应, 其中图 20A 展示的结果为在 ST06-GGFG-Eribulin 处理 BT474 细胞 3 天后, 检测其对 BT474 细胞的杀伤活性, 同时收集培养上清 (BT474-conditioned Medium) 用于孵育 MDA-MB-468 细胞, 并于 3 天后检测 MDA-MB-468 细胞的存活情况以检测所述 ADC 的旁观者杀伤效应, 其中对照组为同步进行的用新鲜配制的 ST06-GGFG-Eribulin 孵育的 MDA-MB-468 细胞的存活情况。图 20B 为利用流式细胞术检测过表达 HER2 的 BT474 细胞与不表达 HER2 的 Jurkat 细胞在各自单独培养或共培养情况下的 ST06-GGFG-Eribulin 的细胞杀伤活性, 图中左上角和右下角显示的数字分别是 BT474 细胞和 Jurkat 细胞的存活细胞计数。

图 21. 在基于肿瘤细胞株 NCI-N87 (图 21A)、JMT-1 (图 21B) 和 RT-112 (图 21C) 而构建的小鼠皮下异种移植肿瘤模型中检测抗 HER2 互补性双特异 ADC (ST06-GGFG-Eribulin) 的体内抑瘤活性, 其中对照组包括抗体和小分子化合物的混合物 (ADMix) 组、DS-8201 组和溶媒组 (Vehicle), 所有荷瘤小鼠均通过尾静脉注射给药, 图中箭头表示给药时间点。

图 22. 利用对 DS-8201 具有后天获得型耐药性的小鼠皮下异种移植肿瘤模型检测抗 HER2 互补性双特异 ADC (ST06-GGFG-Eribulin) 的体内抑瘤活性, 其中对照组包括 DS-8201 组和溶媒组 (Vehicle)。

发明详述

定义

除非另有定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域一般技术人员通常所理解的含义相同的含义。为了本发明的目的，下文定义了以下术语。

在本文中，术语“HER2”和“HER2 受体”可以互换使用，该蛋白也称为 ErbB2、c-ERB2、c-ERB-2、NEU、HER-2/neu、p185 (erbB2) 或 CD340。除非另外指明其来自非人物种，例如，“小鼠 HER2”、“猴 HER2”等，本文所表述的“HER2”是指人 HER2 的任何天然形式，可以具有如 SEQ ID NO: 234 所示的氨基酸序列和/或如 NCBI 登记号 NP_004439.2 所示的全长 HER2 氨基酸序列，也可以由细胞（包括肿瘤细胞）天然地表达，或以 HER2 基因或 cDNA 转染的细胞表达。该术语包括天然存在的 HER2 等位基因变体和剪接变体、同种型、同源物和物种同源物。HER2 可以从人体中分离，或可以通过重组或合成的方法产生。

HER2 的胞外结构域由 4 个亚结构域组成，即亚结构域 1 (Subdomain 1, 简称 D1, 约第 1-195 位氨基酸残基)、亚结构域 2 (Subdomain 2, 简称 D2, 约第 196-319 位氨基酸残基)、亚结构域 3 (Subdomain 3, 简称 D3, 约第 320-488 位氨基酸残基)、和亚结构域 4 (Subdomain 4, 简称 D4, 约第 489-630 位氨基酸残基) (残基编号无信号肽)；其中，D2 和 D4 是负责受体二聚化的富含半胱氨酸的结构域 (Garrett 等, Mol Cell 2003, 11:495-505; Cho 等, Nature 2003, 421:756-760; Franklin 等, Cancer Cell 2004, 5:317-328)。

在本文中，“表达 HER2 的细胞”可以是天然存在的细胞或细胞株（例如，肿瘤细胞），也可以是通过将编码 HER2 的核酸导入到宿主细胞中重组产生的。

在本文中，“双特异性抗体”或“双特异抗体”旨在包括任何能够特异性地结合两个不同抗原表位的抗体或抗原结合片段，其包含两个独立的抗原结合结构域且各自具有独特的抗原结合特异性。例如，本文所述的“互补性双特异抗体”特指一类双特异性抗体，其第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域分别结合至同一抗原上的不同表位。

单特异性抗体是指只有一种结合特异性的抗体或抗原结合片段，即单特异性抗体的抗原结合结构域结合至某单一抗原的单一表位。在一些实施方案中，所述的单特异性抗体的实例包括本发明的抗 HER2 单特异性抗体。

在本文中，“抗原结合结构域”或“抗原结合区”或“表位结合结构域”或“抗原结合多肽”可互换使用，是指抗体或抗原结合片段或其衍生物上的特定区域，该区域直接涉及与靶抗原的特异性相互作用，例如通过结合、空间位阻、使稳定/使不稳定、空间分布等方式与靶抗原相互作用以至达到动态平衡。本发明中“抗原结合结构域”也指所述抗体或抗原结合片段或其衍生物上的特定区域，该区域与 HER2 上的特定表位相互作用，通过结合、空间位阻、使稳定/使不稳定、空间分布等方式使二者之间的结合达至动态平衡。

“抗体”是指大体上由一个免疫球蛋白基因或多个免疫球蛋白基因、或其片段编码的能够特异性识别并结合抗原的多肽或蛋白质。公认的免疫球蛋白基因包含 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因，以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链被分类为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，其依次分别定义了免疫球蛋白类别 (Class) 或同种型 (Isotype) IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE，其中的几类可进一步分为亚类 (Subclass)，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2。典型的免疫球蛋白（例如抗体）结构单元为四聚体，每个四聚体由相同的两对多肽链构成，每对具有一条“轻”链（约 25 kD）和一条“重”链（约 50-70 kD）。每条链的 N 端结构域定义了主要负责抗原识别的由约 100 至 110 个或更多氨基酸组成的可变 (V) 区。抗体重链由重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH) 组成，其中重链恒定区通常包括三个域，CH1、CH2 和 CH3。轻链由轻链可变区 (VL) 和轻链恒定域 (CL) 组成，其中轻链恒定域通常包含一个域，CL。VH 和 VL 的配对一起形成单个抗原结合位点。内源性 VL 由基因区段 V (可变的) 和 J (接合的) 编码，并且内源性 VH 由 V、D (多样性) 和 J 编码。VL 或 VH 都包括高变区 (Region of Hypervariability) 或称为互补决定区 (Complementarity Determining Region, 简称 CDR) 和框架区 (Framework Region, 简称 FR)。术语“可变区”或“V 区”可互换地使用，是指从氨基端到羧基端以 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 顺序排列的重链可变区或轻链可变区。术语“J 区”是指编码包含 CDR3 和 FR4 的 C-末端部分的可变区的子序列。V 区或 J 区可以是天然存在的、重组的或者合成的。在本文中，抗体轻链可变区和/或抗体重链可变区有时可统称为“抗体可变区”，抗体轻链和/或抗体重链统称为“抗体链”。在某些实施方案中，本文提供的抗体或其抗原结合片段的 FR 可以与人种序列相同，也可以是天然的或人工修饰的。

CDR 和 FR 的位置可以使用本领域熟知的多种定义方法确定，例如，Kabat、Chothia、IMGT 和 Contact (参见: Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991 第五版, NIH 公开号 91-3242; Johnson 等, Nucleic Acids Res 2001, 29:205-206; Chothia & Lesk, J Mol Biol 1987, 196:901-917; Chothia 等, Nature 1989, 342:877-883; Chothia 等, J Mol Biol 1992, 227:799-817; Al-Lazikani 等, J Mol Biol 1997, 273:927-748; Lefranc 等, Nucleic Acids Research 1999, 27:209-212; MacCallum 等, J Mol Biol 1996, 262:732-745)。抗原结合位点的定义还在以下文献中描述: Ruiz 等, Nucleic Acids Res 2000, 28:219-221; Lefranc, Nucleic Acids Res 2001, 29:207-209; Lefranc, The Immunologist 1999, 7:132-136; Lefranc 等, Dev Comp Immunol 2003, 27:55-77;

MacCallum 等, J Mol Biol 1996, 262:732-745; Martin 等, Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:9268-9272; Martin 等, Methods Enzymol 1991, 203:121-153; Sternberg 编辑, Protein Structure Prediction: A Practical Approach, 1996 Oxford University Press, 141-172。本发明包含任何一种定义方法来确定本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体或本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段中的 CDR, 表 1 显示了使用不同定义方法所确定的抗体 CDR 氨基酸序列的位置编号。涵盖特定 CDR 的确切氨基酸残基数量随 CDR 的序列而变化。在明确了抗体可变区氨基酸序列的情况下, 本领域技术人员能够通过包括不限于所述定义的常规方法确定所述抗体的 CDR。

表 1. 不同定义方法确定的 CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	IMGT	Contact
HCDR1	31-35	26-32	27-38	30-35
HCDR2	50-65	52-56	56-65	47-58
HCDR3	95-102	95-102	105-117	93-101
LCDR1	24-34	24-34	27-38	30-36
LCDR2	50-56	50-56	56-65	46-55
LCDR3	89-97	89-97	89-97	89-96

¹: 表 1 中所有 CDR 定义的编号均依照 Kabat 等人提出的编号系统 (Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991 第五版, NIH 公开号 91-3242)。

此外, Kabat 等人还定义了针对可变区序列的编号系统, 其可应用于任何抗体。本领域的普通技术人员能够明确地将此“Kabat 编号”系统应用到任何抗体的可变区序列, 而无需依赖于抗体序列本身以外的任何实验数据来确定可变区序列。除非另外说明, 本发明所述的抗 HER2 抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体、或互补性双特异 ADC 的抗原结合结构域的可变区中特定氨基酸残基位置的编号均按照 Kabat 编号系统确定。

抗体以完整的免疫球蛋白形式存在, 或者以通过多种肽酶消化产生的许多片段形式存在。尽管按照完整抗体的消化, 定义了多种抗体片段, 但是技术人员应当理解, 可以通过化学裂解方法或者通过使用重组 DNA 方法合成该类片段。在本文中, 术语抗体的“抗原结合片段”(或简称为“抗体部分”或“抗体片段”)是指含有一个或多个 CDR 的抗体部分或者其他任何能够与抗原(例如, HER2 或 HER2 的胞外结构域)结合但不具有完整抗体结构的抗体片段。抗原结合片段可以与完整抗体一样具有特异性结合抗原的活性。优选的抗原结合片段还保留了能够内化进入表达靶抗原的细胞的能力。在某些实施方案中, 抗原结合片段可以含有来自某特定人抗体的一个或多个 CDR, 移接至来自一个或多个不同人抗体的框架区。抗原结合片段包括但不限于: (i) “Fab”片段, 由 VH、VL、CL 和 CH1 结构域组成的单价抗体片段; (ii) “F(ab')₂”片段, 包含两个由铰链区的二硫键连接的 Fab 片段的二价片段; (iii) “Fv”片段, 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成, 是含有完整抗原结合位点的最小抗体片段; (iv) “Fd”片段, 由 VH 和 CH1 结构域组成; (v) “单链 Fv 抗体(scFv)”或“单链抗体”, 是指由轻链可变区与重链可变区直接相连或通过一个肽链连接而成的工程化抗体(Huston 等, Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:5879-5883; Bird 等, Science 1988, 242:423-426), 该类 scFv 抗体在与细胞表面抗原结合时可以内化至细胞内(He 等, J Nucl Med 2010, 51:427-432; Fitting 等, MAbs 2015, 7:390-402); 此外, 单链抗体还包括包含一对串联的 Fv 区段(VH-CH1-VH-CH1)的“线性抗体”, 其与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata 等, Protein Eng 1995, 8:1057-1062; US5641870); (vi) “dAb”片段(Ward 等, Nature 1989, 341:544-546; WO90/05144A1)包含单个可变域, 例如 VH 结构域。单结构域抗体(sdAb)是独立免疫球蛋白结构域; (vii) “双功能抗体(Diabody)”为二价双特异性抗体, 其中 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达, 但是使用的连接子太短而不能使同一链上的两个结构域配对, 因此迫使这两个结构域与另一条链的互补结构域配对, 形成两个抗原结合位点(Holliger 等, Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90:6444-6448; Poljak 等, Structure 1994, 2:1121-1123; EP404097; WO93/11161)。

在本文中, 术语“Fc 区”或“Fc 结构域”是指免疫球蛋白重链的 C 末端区域, 其至少含有恒定区的一部分, 例如除了第一恒定区(CH1)之外的免疫球蛋白重链恒定区。对于 IgG, 所述 Fc 区可以包含免疫球蛋白结构域 CH2 和 CH3 以及 CH1 和 CH2 之间的铰链区。本文所使用的 Fc 区包括天然序列 Fc 区和/或 Fc 区变体, 并且可以是本发明的抗 HER2 抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体或其 ADC 的一部分。在本领域中应理解, Fc 区的边界可以变化, 然而, 人 IgG 重链 Fc 区通常被定义为在其氨基端包含第 226 位半胱氨酸残基或第 230 位脯氨酸残基, 其根据 EU 编号系统/方案, 如见于 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991 第五版, NIH 公开号 91-3242。

术语“抗 HER2 抗体”或“特异性结合 HER2 的抗体”是指特异性结合 HER2 的任何形式的抗体或其片段, 且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段, 只要所述片段特异

性结合 HER2 即可。

在本文中，术语“特异性结合”或“结合特异性”或“对...具有特异性”或“结合”是指结合反应，该结合反应决定了在蛋白质的异质群体以及其它生物制品（例如，生物样品，如血液、血清、血浆或组织样品）中靶分子（例如，抗原）的存在，也就是说此结合对于靶分子是具有选择性的，并且能区分那些不期望的或非特异性的相互作用。例如，与靶分子（可以是抗原）特异性结合的抗体是相较于该抗体与其它非靶分子的结合，该抗体结合该靶分子时具有更高的亲和力、更强的结合活性、更容易结合和/或结合持续时间更长。因此，根据需要，这种选择可以通过去除与其它 ErbB/HER 家族成员交叉结合的抗体来实现。可以将多种免疫测定方法用于选择与特定蛋白特异性地反应的抗体，例如 ELISA 测定法。通常在设定的测定条件下，抗体或结合剂与抗原的特异性或选择性结合反应会产生至少两倍于背景的信号，更一般地至少是 10-100 倍于背景的信号，并且基本上不以显著量与样品中存在的其它抗原结合。在某些实施例中，抗体与靶抗原特异性结合的平衡解离常数 (K_D) 为 $<1\ \mu\text{M}$ 、 $<100\ \text{nM}$ 、 $<10\ \text{nM}$ 、 $<1\ \text{nM}$ 、或 $<0.1\ \text{nM}$ 。

在本文中，术语“单克隆抗体”是指从基本上具有同质性的抗体群中所获得的抗体，即，除了可能以少量存在的天然突变之外，构成抗体群中的各个抗体是相同的。单克隆抗体表现出对特定表位的高度结合特异性和亲和力。单克隆抗体可以通过 Kohler 等, *Nature* 1975, 256:495 最先描述的杂交瘤方法制备，也可以通过重组 DNA 方法制备（参见 US4816567），还可以从噬菌体抗体库，例如参照 Clackson 等, *Nature* 1991, 352:624-628; Marks 等, *J Mol Biol* 1991, 222:581-597 中描述的技术进行分离。

在本文中，术语“嵌合抗体”是指含有源自两种不同抗体的序列的抗体（例如，US4816567），所述抗体通常源自不同物种。例如，嵌合抗体包含人类和啮齿类动物抗体片段，通常是人类恒定区和小鼠可变区。用于产生嵌合抗体的方法包含本领域一般技术人员已知的重组 DNA 和基因转染技术（例如 Morrison 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:6851-6855; US 5202238 和 US 5204244）。

在本文中，术语“人源化抗体或抗原结合片段”，是指包括来源于非人类动物的 CDR、来源于人的 FR 区，以及来源于人的恒定区的抗体或抗原结合片段。人源化抗体任选的还包含至少一部分的人类免疫球蛋白的恒定区。由于人源化的抗体或抗原结合片段具有降低了的免疫原性，可以作为施用于人体的治疗剂。在一些实施方案中，所述非人类动物是哺乳类动物例如小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠。在一些实施方案中，所述人源化抗体或抗原结合片段除了 CDR 序列是非人源的以外，抗体的其它部分基本上全部由人源序列组成。在一些实施方案中，人源化抗体可以通过以非人类物种抗体中的残基取代人免疫球蛋白 FR 框架区中相应的残基，以进一步修饰、改善和优化抗体的特异性、亲和力和/或活性。在一些实施方案中，所述来源于人的 FR 区可以包括与其来自的人源抗体相同的氨基酸序列，或其可以包括一些氨基酸改变，例如，不超过 5、4、3、2、或 1 个氨基酸改变。在一些实施方式中，该氨基酸改变可以仅存在于重链 FR 区、仅存在于轻链 FR 区或同时存在于两条链中。

在本文中，术语“相应的人种系 (Germline) 序列”是指抗体可变区氨基酸序列或子序列，与所有其他已知人种系免疫球蛋白可变区氨基酸序列相比，该抗体可变区氨基酸序列或子序列与参照的人种系免疫球蛋白可变区氨基酸序列具有最高的氨基酸序列同一性。相应的人种系序列可以是单独的框架区、单独的互补性决定区、框架区和互补性决定区、可变区、或包含可变区序列或子序列的其它组合。可以使用本文所述的方法，例如，使用 BLAST、ALIGN 或本领域已知的其它比对算法比对两个序列，来确定序列同一性。相应的人种系氨基酸序列可以与参照的人种系免疫球蛋白可变区氨基酸序列具有至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 序列同一性。

本发明的抗 HER2 抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体或 ADC 的抗体部分可以选自以下任一个或多个形式，包括嵌合形式、非人形式、人源化形式或全人形式，只要所述形式能够特异性地结合 HER2 即可。

如本文所用的术语“表位 (Epitope)”是指蛋白质决定簇 (Protein Determinant)，能够被抗体识别且特异性结合的抗原部分。表位通常由分子的表面基团如氨基酸或糖侧链组成，且通常具有特定的三维结构特征，以及特定的电荷特征。抗体或其抗原结合片段识别该表位的部分被称为互补位 (Paratope)。

竞争性结合 (Competitive Binding) 和表位分组 (Epitope Binning) 也可以用于测定不同抗体是否结合于相同表位或重叠表位，例如使用 Harlow 和 Lane 编辑, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory 中描述的方法来评估。在一些实施方案中，通过竞争结合 ELISA 方法检测抗体或其抗原结合片段（例如包含选自表 2 和表 3 中鉴别的 CDR 和/或可变区的抗体或抗原结合片段）与其它抗体或其抗原结合片段之间彼此抑制与靶抗原（例如 HER2）结合的活性，当结合活性减少至少约 50%（例如 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99% 或更多，或所列举数值之间的任何百分比）时，确定二者为竞争性结合，即结合于相同表位或重叠表位。在一些实施方案中，竞争性结合可以归因于共享的 (Shared) 或类似（例如部分重叠）的表位，或归因于抗体或抗原结合片段结合在附近表位而导致的位阻效应（参见 Morris 编辑, *Methods in Molecular Biology* 1998, 第 66 卷, 第 55-66 页）。在一些实施方案中，竞争性结合可以用来将结合于共用类似表位的抗体或抗原结合片段进行分组，例如竞争结合的抗体或抗原结合片段可以“分组”为具有重叠或接近表位的一组抗体或抗原结合片段，而不竞争的抗体或抗原结合片段则归为不具有重叠或

接近表位的另一组抗体或抗原结合片段。

术语“亲和力”或“结合亲和力”是指分子（例如受体或抗原）与其配对体（例如配体或抗体）之间相互作用的内在结合能力，即全部非共价相互作用总和的强度。除非另外陈述，本文中使用的“结合亲和力”是用于反映结合对的成员（例如受体与配体或抗原与抗体）之间一对一相互作用的内在结合能力。分子 X 对其配对体 Y 的亲和力通常可以用平衡解离常数 (K_D) 表示，平衡解离常数是解离速率常数 (k_{dis} 或 k_{off}) 和结合速率常数 (k_a 或 k_{on}) 的比值。亲和力可以通过本领域已知的常见方法来测量，包括本发明中所使用的方法。

在本文中所使用的“内化 (Internalization) 或内吞 (Endocytosis)”是指抗体或抗原结合片段、或双特异性抗体、或 ADC 与细胞表面靶抗原结合时，能够通过细胞脂质双层膜的内化（即胞吞作用）进入到细胞的内体 (Endosome)，优选能够进入细胞中溶酶体 (Lysosome) 内的抗体或抗原结合片段、或双特异性抗体。在一些实施方案中，本发明所述的抗 HER2 互补性双特异抗体或其 ADC 结合于肿瘤细胞膜上的 HER2 后能够被内吞进入细胞，并能下调肿瘤细胞表面 HER2 的表达量。

在本文中，术语“抗体变异体”或“抗体变体”是指在原始抗体可变区中含有至少一个氨基酸突变的抗体多肽序列。变异体可以与未经修饰的抗体基本同源或基本相同。在一些实施方案中，在本发明的抗 HER2 抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体或 ADC 的抗体部分的一个、两个、三个、四个、五个和/或六个 CDR 内具有氨基酸突变，以改善和优化所述抗体或抗原结合片段的性能，包括但不限于提高人源化程度、增强对 HER2 的结合亲和力或结合活性、提高内化效率、提高表达量、和/或提高稳定性（例如，降低或消除天冬氨酸异构化和/或天冬酰胺脱酰胺基的风险）。在一些实施方案中，在本发明的抗 HER2 抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体或 ADC 抗体部分的一个、两个、三个和/或四个 FR 内具有氨基酸突变，以改善和优化所述抗体或抗原结合部分的性能，包括但不限于提高所述抗体或抗原结合部分的人源化程度、增强对 HER2 的结合亲和力或结合活性、提高表达量、和/或提高稳定性（例如，降低或消除天冬氨酸异构化和/或天冬酰胺脱酰胺基的风险）。在一些实施方案中，在本发明的抗 HER2 抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体或 ADC 的抗体部分的 CDR 和 FR 内进行一个或多个氨基酸突变，以提高所述抗体或抗原结合片段的人源化程度、增强对 HER2 的结合亲和力或结合活性、提高内化率、提高表达量、和/或提高稳定性（例如，降低或消除天冬氨酸异构化和/或天冬酰胺脱酰胺基的风险）。在一些实施方案中，所述氨基酸突变包括氨基酸取代、去除、插入或其任意组合。

其中，氨基酸取代包括保守氨基酸取代和非保守氨基酸取代，保守氨基酸取代涉及用同类中的另一个氨基酸（化学性质或功能相似）进行置换，非保守取代涉及用不同类的氨基酸（化学性质或功能不相似）进行置换。本领域一般技术人员可以基于所涉及残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性进行保守或非保守氨基酸取代。例如，(i) 非极性（疏水）氨基酸包括丙氨酸 (Ala, A)、亮氨酸 (Leu, L)、异亮氨酸 (Ile, I)、缬氨酸 (Val, V)、脯氨酸 (Pro, P)、苯丙氨酸 (Phe, F)、色氨酸 (Trp, W) 和蛋氨酸 (Met, M)；(ii) 极性中性氨基酸包括甘氨酸 (Gly, G)、丝氨酸 (Ser, S)、苏氨酸 (Thr, T)、半胱氨酸 (Cys, C)、酪氨酸 (Tyr, Y)、天冬酰胺 (Asn, N) 和谷氨酰胺 (Gln, Q)；(iii) 带正电荷的（碱性）氨基酸包括精氨酸 (Arg, R)、赖氨酸 (Lys, K) 和组氨酸 (His, H)；(iv) 带负电的（酸性）氨基酸包括天冬氨酸 (Asp, D) 和谷氨酸 (Glu, E)。一般而言，保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能性质，非保守氨基酸取代可能导致蛋白质的性质或功能发生很大变化。尽管对引入氨基酸序列突变的位点或区域可以预先确定，但非保守取代所带来的潜在的蛋白质性质或功能的改变却是无法预见的。

在本文中，对于两个或多个多肽序列，术语“相同的”或“同一性”或“同一性百分比”或“百分比序列同一性”可以互换使用，是指在进行氨基酸序列比对时，并在引入必要的间隔使相同氨基酸数目达到最多后，候选序列中与参比序列相同的氨基酸残基数占所述候选序列总氨基酸残基数的百分比率。所述氨基酸残基的保守替代可以认为或不认为是相同残基。可以通过本领域公开的工具，例如 BLASTp、ClustalW2（也可参见 Higgins 等, *Methods Enzymol* 1996, 266:383-402; Larkin 等, *Bioinformatics* 2007, 23:2947-2948）和 ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件，对序列进行比对以确定氨基酸序列的百分比序列同一性。本领域技术人员可以使用所述工具的默认参数或根据比对的需要适当调整参数，例如通过挑选合适的算法来进行序列比对。

在本文中，当涉及蛋白质时，术语“分离的”表示该蛋白基本上不含在天然状态下与其结合的其他细胞组分，优选处于同质状态，例如，分离的蛋白可以是天然或自然环境中移出的。分离的蛋白可以是冻干的或者是水溶液。通常，其纯度和均一性可以使用分析化学技术（例如，聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法）来确定。在分离的制备物中蛋白质是基本上纯化的。术语“纯化的”表示蛋白在非还原电泳凝胶中基本上只产生一条带。特别地，这意味着蛋白为至少 85% 纯度、更优选地至少 95% 纯度、以及最优选地至少 99% 纯度。就本发明而言，在一些实施方案中，在宿主细胞中表达的重组蛋白则被视为是分离的，同样也适用于通过任何本领域技术人员熟知的技术分开、分级 (Fractionate)、或部分或基本纯化的天然

的或重组的蛋白。在一些实施方案中，“分离的抗体”指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体（例如，特异性地结合 HER2 的分离的抗体基本上不含特异性地结合除 HER2 之外的抗原的抗体）。然而，特异性地结合 HER2 的分离的抗体可以与其它抗原（如来自其它物种的 HER2 蛋白，例如猴 HER2）具有交叉结合反应性。而且，分离的抗体可以基本上不含其它细胞材料和/或化学物质。在一些实施方案中，包含在载体中的编码本发明多肽或蛋白（例如抗 HER2 抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体）的重组多核苷酸被视为分离的。分离的多核苷酸的其它例子包括在异源宿主细胞中包含的重组多核苷酸或溶液中的纯化（部分或基本地）的多核苷酸。

在本文中，术语“工程化”包括对多肽或蛋白质主链的任意操作，或对天然存在的或重组的蛋白质或多肽的翻译后修饰。工程化包括对氨基酸序列进行突变、对糖基化或各氨基酸侧链基团的修饰，以及这些方法的组合。

如本文所用的，术语“多肽”是指氨基酸及其等同物的聚合物，而不是指产物的具体长度；因此，“肽”和“蛋白质”包含在多肽的定义内。多肽的定义内还包含本发明定义的“抗体”。

双重可变结构域（Dual Variable Domain，简称 DVD）免疫球蛋白（DVD-Ig）是在正常 IgG 抗体的重链和轻链的 N 末端分别再接入另一个抗体的重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）结构域，产生一个含有两种不同抗原结合结构域的四价分子。因此，DVD-Ig 的每半侧含有一条重链多肽和一条轻链多肽，二聚化后构成两个独立的抗原结合结构域，其中一个是 Fv 片段，另一个是 Fab 片段或 IgG 结构域。DVD-Ig 可以是双特异性的，即能够结合一种抗原的两个不同表位，或者结合两种不同抗原。

在本文中，术语“表达载体”或“载体”是指可将编码某蛋白的多核苷酸或核酸操作性地插入其中并使该蛋白获得表达的一种运载工具。载体可用于转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内得以表达。

在本文中，术语“宿主细胞”是指导入外源多核苷酸或核酸和/或载体的细胞。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，其包括初级转化的细胞和来源于其的后代，而不考虑传代的数目。后代在核酸内容上可能与亲本细胞不完全相同，并且可能包含突变。本发明中包括在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

在本文中，术语“受试者”、“患者”或“个体”可以互换使用，包括但不限于：哺乳动物，包含例如人、非人灵长类动物（例如，猴）、小鼠、猪、狗、猫、牛、山羊、兔、大鼠、豚鼠、仓鼠、马、绵羊或其它非人类哺乳动物；非哺乳动物，包含例如非哺乳类脊椎动物，如鸟（例如，鸡、鹌鹑或鸭）或鱼；以及非哺乳类无脊椎动物。在一些实施例中，本发明的用途或方法所涉及的受试者和药物组合物用于（预防性地和/或治疗性地）治疗非人类动物。

在本文中，对某种疾病或症状的“治疗（Treating; Treatment; 或 To treat）”是指减轻（Alleviating 或 To alleviate）某种疾病或症状，降低某种疾病或症状发作或发展的速度，减少发展出某种疾病或症状的风险，或延迟与某种疾病或症状相关的症状发展，减少或终止与某种疾病或症状相关的症状，产生某种疾病或症状的完全或部分的逆转，治愈某种疾病或症状，或以上的组合。

术语“治疗有效量”或“有效剂量”是指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现预防或改善与疾病或病症有关的症状和/或减轻疾病或病症严重程度的剂量或浓度。本发明的制剂、抗体或其抗原结合片段、ADC、或组合物的治疗有效量可以根据多种因素而变动，例如疾病状态、个体的年龄、性别和重量、以及抗体或抗体部分或 ADC 在个体中激发所需反应的能力。治疗有效量也可被认为是制剂、抗体或其抗原结合片段、ADC、或组合物的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。术语“有效量”是指足以对受试者提供临床上的益处（包括但不限于改善、缓解或减轻疾病、病症或其相关症状，延迟或停止疾病进展）的活性成分或药剂的量。

在本文中，“低水平 HER2”、“低表达 HER2”、“低 HER2 表达”、“HER2 低表达”、或“HER2 低水平表达”是指肿瘤活检的石蜡包埋组织切片经免疫组织化学法（Immunohistochemistry Staining，简称 IHC）测定（例如 HercepTest[®]）时 ErbB2/HER2 蛋白质染色强度得分为 IHC 1⁺（在多于 10% 的肿瘤细胞中检测到模糊的/几乎不能看出的膜染色，仅在其一部分膜中细胞被染色），或者当得分为 IHC 2⁺（在多于 10% 的肿瘤细胞中观察到弱至中等的全膜染色）时，通过荧光原位杂交法（Fluorescence in Situ Hybridization，简称 FISH）测定（例如 Inform[™] [Ventana]，或 PathVysion[™] [Vysis]）进一步确定肿瘤细胞中 HER2 基因扩增程度的得分为阴性（IHC 2⁺/FISH⁻）的癌细胞/肿瘤、受试者或患者。大多数的 HER2 低表达肿瘤的 HER2 表达水平是显著高于正常组织的。正常组织的 HER2 表达水平可以根据本领域技术人员可用的任何方法来确定。

“HER2 阴性”或“HER2 表达阴性”或“表达有限水平 HER2”是指如上所述的 HER2 低表达和 IHC 测定得分为 0（未观察到染色或膜染色存在于不到 10% 的肿瘤细胞中）的癌细胞/肿瘤、受试者或患者。

“HER2 阳性”或“HER2 表达阳性”或“HER2 过表达”是指 IHC 测定得分为 IHC 3⁺（在超过 10% 的肿瘤细胞中观察到强烈的完整膜染色）的癌细胞/肿瘤、受试者或患者。HER2 阳性还包括 IHC 测定得分

为 IHC 2⁺, 同时 FISH 测试 (例如, 减法探针技术显色原位杂交 [SPoT-Light HER2 CISH] 测试、Inform 双原位杂交 [Inform HER2 Dual ISH] 测试) 中评分为阳性的癌细胞/肿瘤、受试者或患者 (IHC 2⁺/FISH⁺)。

在本文中, ADC 的“旁观者效应 (Bystander Effect)”或“旁观者杀伤效应 (Bystander Killing Effect)”是由游离的具有膜通透性的小分子毒素 (例如, 抗癌剂) 介导的, 该小分子毒素由靶标分子阳性 (如 HER2 阳性) 癌细胞释放并被动扩散到肿瘤微环境中, 进而杀死邻近的细胞, 包括不表达或低表达靶标分子 (如 HER2 阴性) 而对 ADC 不敏感的邻近癌细胞。

在本文中, 术语“药学上可接受的”或“药用可接受的”是指所指的载剂、溶媒、稀释剂、辅料和/或盐, 总的来说在化学上和/或在物理上与制剂中的其他配料相兼容, 并在生理上与受试者相兼容。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5% 的下限和比指定数字数值大 5% 的上限的范围内的数字数值, 或在一个实施方案中为小 10% 的下限和大 10% 的上限, 或在另一个实施方案中为小 15% 的下限和大 15% 的上限, 或在另一个实施方案中为小 20% 的下限和大 20% 的上限。

术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或更多项的组合。

如本文中所用, 术语“包含”或“包括”或“含有”或“具有”或“涉及”可互换使用, 意指包括所述的要素、整数或步骤, 但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中, 当使用术语“包含”或“包括”或“含有”或“具有”或“涉及”时, 除非另有指明, 否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。

如本文中所用, 术语“任选的”表示其修饰的对象存在或者不存在, 例如“药盒包含任选的至少一种另外的肿瘤治疗剂”表示该药盒可包含或不包含至少一种另外的肿瘤治疗剂。

如本文中所提及的“一些实施方案”、“一个实施方案”、“一个具体实施方案”、或“具体实施方案”或其组合表示所描述的与所述实施方案相关的特定特征、结构或特性包含于本发明的至少一个实施方案中。因此, 在本说明书全文各处出现前述用语未必都指同一个实施方案。此外, 所述特定特征、结构或特性可在一个或多个实施方案中以任意适宜方式组合。

除非上下文另有明确指示, 单数术语涵盖复数的指示对象, 反之亦然。

为了描述和公开的目的, 以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们公开早于本发明的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于本发明申请者可获得的信息, 并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。

在以下章节中将更详细地描述本发明的各个方面。

1、抗 HER2 抗体或其抗原结合片段

一方面, 本发明提供了一种分离的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外结构域。

本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区的 D1、D3 和/或 D4, 优选 HER2 胞外区的 D1 或 D3。本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体可以利用两个单特异性抗 HER2 抗体的抗原结合结构域来构建, 所述的两个单特异性抗体能够各自结合于 HER2 胞外区的不同表位, 并且在抗原竞争性结合测试中所述的两个单特异性抗体不存在竞争抑制关系 (即抗原结合表位不重叠)。

在一些实施方案中, 可以利用两个单特异性抗 HER2 抗体的抗原结合结构域来构建本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体, 所述的两个单特异性抗体能够同时结合于 HER2 胞外区中的不同表位, 进一步, 所述的两个单特异性抗体能够同时结合至 HER2 胞外区的 D1、D3 和 D4 中的任意两个表位, 优选地, 可同时结合至 HER2 胞外区的 D1 和 D3, 例如, 其中, 第一抗 HER2 抗体的抗原结合结构域结合 HER2 胞外区的 D3, 第二抗 HER2 抗体的抗原结合结构域结合 HER2 胞外区的 D1。

所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段对表达 HER2 的肿瘤细胞具有较强的结合活性, 所述表达 HER2 的肿瘤细胞包括 HER2 高表达肿瘤细胞 (例如, 乳腺癌细胞 SKBR-3、乳腺导管癌细胞 BT474、胃癌细胞 NCI-N87 以及卵巢癌细胞 SKOV-3)、表达中度水平 HER2 的肿瘤细胞 (例如, 乳腺癌细胞 JIMT-1)、HER2 低表达肿瘤细胞 (例如, 人膀胱癌细胞 RT-112、乳腺癌细胞 ZR-75-1 和 T47D) 和/或表达有限水平 HER2 的肿瘤细胞 (例如, 乳腺癌细胞 MCF-7)。所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段与 HER2 的结合亲和力 (K_D) 值 $< 5 \times 10^{-8}$ M, 优选的是 $< 1 \times 10^{-8}$ M, $< 5 \times 10^{-9}$ M, 或 $< 1 \times 10^{-9}$ M, 更优选的是 $< 1 \times 10^{-9}$ M。所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段不与 ErbB/HER 家族其它成员 (包括 EGFR、HER3 和 HER4) 发生交叉结合反应。

所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段不影响表达于细胞表面的 HER2 及其下游信号转导通路的调控。在一些实施方案中, 所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段不诱导、不阻断、不抑制 HER2 胞内结构域的酪氨酸残基磷酸化和/或去磷酸化, 所述 HER2 胞内结构域的酪氨酸残基磷酸化位点包括但不限于 Y877、Y1221/1222 和 Y1248。在一些实施方案中, 所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段不诱导、不阻断、不抑制依赖于或不依赖于配体诱导的 HER2 二聚化 (包括 HER2:HER4 二聚化和/或 HER2:HER3 二聚化) 及其下

游的信号转导通路，所述配体包括 NRG-1 或 Heregulins。

本发明的抗 HER2 抗体还可以任选地包括 F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv、scFv、scFv-Fc、单结构域抗体(sdAb)，或具有 IgG 类型。本发明的抗体可以是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体，可以是单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或抗体片段，只要所述抗体能够特异性地识别 HER2 胞外区的 D1、D3 和/或 D4（优选 D1 和/或 D3）的表位，且对表达于肿瘤细胞表面的 HER2 及其信号转导通路不具有影响作用即可。在一些实施方案中，所述抗 HER2 抗体选自小鼠抗人 HER2 抗体及其人源化抗体和优化抗体。在一些实施方案中，所述抗 HER2 抗体包括 scFv、scFv-Fc、Fab 片段和/或具有 IgG 类型，例如，特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗体可采用 scFv 或 scFv-Fc 形式，特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗体可采用 Fab 或 IgG 形式，其中 Fab 和 scFv 可以随意转换，转换方法在本领域是已知的（参见，例如，Zhou 等, Mol Cancer Ther 2012, 11:1167-1476 所描述的方法）。

另一方面，本发明提供包含表 2 中所示抗体的 CDRs 和/或可变区的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段，其识别 HER2 胞外区的 D3，并且不诱导、不阻断、不抑制 HER2 胞内结构域的酪氨酸残基磷酸化和/或去磷酸化，和/或不诱导、不阻断、不抑制依赖于或不依赖于 NRG-1 诱导的 HER2 二聚化及其下游信号转导通路。本发明还提供能够识别 HER2 胞外区 D1 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段，其不诱导、不阻断、不抑制 HER2 胞内结构域的酪氨酸残基磷酸化和/或去磷酸化，和/或不诱导、不阻断、不抑制依赖于或不依赖于 NRG-1 诱导的 HER2 二聚化及其下游信号转导通路，优选地，所述抗体包含如表 3 所示的抗体的 CDRs 和/或可变区的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段。本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段，还包括识别 HER2 胞外区 D4 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的 CDRs、可变区、或轻链和重链。

本发明的抗 HER2 抗体的重链可变区 CDRs 和轻链可变区 CDRs 由 Kabat 编号系统定义。然而，如本领域所公知的，CDR 区也可以基于重链/轻链可变区序列的其它诸如 Chothia 和 IMGT、AbM 或 Contact 编号系统/方法定义，以其它编号系统/方法定义的 CDR 区与本发明采用的 Kabat 所定义的 CDR 区均在本发明保护范围之内。

表 2. 抗体 mAb2117 及其人源化抗体的 CDR 区以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列 ID 号

描述	抗体编号	SEQ ID No.							
		HCDR1	HCDR2	HCDR3	VH	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VL
鼠源抗体、嵌合抗体	mAb2117	11	14	32	1	38	46	49	2
人源化抗体	hu2117-H1K1	11	14	32	52	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu01	11	14	32	52	38	46	49	82
	hu2117-HK-Mu02	11	14	32	52	38	46	49	83
	hu2117-HK-Mu03	11	14	32	52	38	46	49	84
	hu2117-HK-Mu04	11	14	32	52	38	46	49	85
	hu2117-HK-Mu05	11	14	32	53	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu06	11	14	32	54	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu08	11	15	32	55	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu09	11	16	32	56	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu10	11	17	32	57	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu11	11	14	32	52	38	47	49	86
	hu2117-HK-Mu12	11	14	32	52	38	48	49	87
	hu2117-HK-Mu13	11	14	32	52	38	46	49	88
	hu2117-HK-Mu14	11	18	32	58	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu23	11	14	32	52	39	46	49	89
	hu2117-HK-Mu24	11	14	32	52	40	46	49	90
	hu2117-HK-Mu25	11	14	32	52	41	46	49	91
	hu2117-HK-Mu27	11	14	32	52	42	46	49	92
	hu2117-HK-Mu28	11	14	32	52	43	46	49	93
	hu2117-HK-Mu29	11	14	32	52	44	46	49	94
	hu2117-HK-Mu32	11	14	32	52	45	46	49	95
	hu2117-HK-Mu34	11	14	32	52	38	46	50	96
	hu2117-HK-Mu37	11	14	32	52	38	46	51	97
	hu2117-HK-Mu38	12	14	32	59	38	46	49	81

描述	抗体编号	SEQ ID No.							
		HCDR1	HCDR2	HCDR3	VH	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VL
	hu2117-HK-Mu39	12	14	32	60	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu40	13	14	32	61	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu41	11	19	32	62	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu42	11	20	32	63	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu45	11	14	33	64	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu46	11	14	34	65	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu48	11	14	35	66	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu49	11	14	36	67	38	46	49	81
	hu2117-HK-Mu50	11	14	37	68	38	46	49	81
	hu2117-HK201	11	21	32	69	42	46	49	92
	hu2117-HK202	11	14	37	68	42	46	49	92
	hu2117-HK203	11	21	37	70	42	46	49	92
	hu2117-HK-301	11	22	37	71	42	46	49	92
	hu2117-HK-303	11	23	37	72	42	46	49	92
	hu2117-HK-304	11	24	37	73	42	46	49	92
	hu2117-HK-305	11	25	37	74	42	46	49	92
	hu2117-HK-306	11	26	37	75	42	46	49	92
	hu2117-HK-309	11	27	37	76	42	46	49	92
	hu2117-HK-310	11	28	37	77	42	46	49	92
	hu2117-HK304-04	11	29	37	78	42	46	49	92
	hu2117-HK304-05	11	30	37	79	42	46	49	92
	hu2117-HK304-06	11	31	37	80	42	46	49	92

表 3. 抗体 mAb2126 及其人源化抗体的 CDR 区以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列 ID 号

描述	抗体编号	SEQ ID No.							
		HCDR1	HCDR2	HCDR3	VH	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VL
鼠源抗体、嵌合抗体	mAb2126	98	100	110	3	114	116	139	4
人源化抗体	Hu2126-H1K1	98	100	110	170	114	116	139	171
	hu2126-H2K1	98	100	110	143	114	116	139	171
	2126-Hu-L02	98	100	110	143	115	116	139	172
	2126-Hu-L05	98	100	110	143	114	116	139	173
	2126-Hu-L06	98	100	110	143	114	117	139	174
	2126-Hu-L07	98	100	110	143	114	118	139	175
	2126-Hu-L08	98	100	110	143	114	119	139	176
	2126-Hu-L09	98	100	110	143	114	120	139	177
	2126-Hu-L10	98	100	110	143	114	121	139	178
	2126-Hu-L11	98	100	110	143	114	122	139	179
	2126-Hu-L12	98	100	110	143	114	123	139	180
	2126-Hu-L13	98	100	110	143	114	124	139	181
	2126-Hu-L14	98	100	110	143	114	125	139	182
	2126-Hu-L15	98	100	110	143	114	126	139	183
	2126-Hu-L16	98	100	110	143	114	127	139	184
	2126-Hu-L17	98	100	110	143	114	128	139	185
	2126-Hu-L18	98	100	110	143	114	116	140	186
	2126-Hu-L19	98	100	110	143	114	116	141	187
	2126-Hu-L21	98	100	110	143	114	116	142	188

描述	抗体编号	SEQ ID No.							
		HCDR1	HCDR2	HCDR3	VH	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VL
	2126-Hu-H22	98	100	110	144	114	116	139	171
	2126-Hu-H23	98	100	110	145	114	116	139	171
	2126-Hu-H24	99	100	110	146	114	116	139	171
	2126-Hu-H25	98	101	110	147	114	116	139	171
	2126-Hu-H27	98	102	110	148	114	116	139	171
	2126-Hu-H28	98	103	110	149	114	116	139	171
	2126-Hu-H29	98	104	110	150	114	116	139	171
	2126-Hu-H31	98	105	110	151	114	116	139	171
	2126-Hu-H32	98	106	110	152	114	116	139	171
	2126-Hu-H33	98	107	110	153	114	116	139	171
	2126-Hu-H34	98	108	110	154	114	116	139	171
	2126-Hu-H35	98	109	110	155	114	116	139	171
	2126-Hu-H36	98	100	110	156	114	116	139	171
	2126-Hu-H37	98	100	110	157	114	116	139	171
	2126-Hu-H38	98	100	110	158	114	116	139	171
	2126-Hu-H39	98	100	110	159	114	116	139	171
	2126-Hu-H40	98	100	110	160	114	116	139	171
	2126-Hu-H42	98	100	110	161	114	116	139	171
	2126-Hu-H43	98	100	110	162	114	116	139	171
	2126-Hu-H44	98	100	110	163	114	116	139	171
	2126-Hu-H45	98	100	110	164	114	116	139	171
	2126-Hu-H46	98	100	110	165	114	116	139	171
	2126-Hu-H50	98	100	111	166	114	116	139	171
	2126-Hu-H54	98	100	112	167	114	116	139	171
	2126-Hu-H59	98	100	113	168	114	116	139	171
	7172b-Mu10	98	102	110	184	115	129	142	189
	7172b-Mu11	98	102	110	169	115	130	142	190
	7172b-Mu12	98	102	110	169	115	131	142	191
	7172b-Mu13	98	102	110	169	115	132	142	192
	7172b-Mu14	98	102	110	169	115	133	142	193
	7172b-Mu15	98	102	110	169	115	134	142	194
	7172b-Mu16	98	102	110	169	115	135	142	195
	7172b-Mu17	98	102	110	169	115	136	142	196
	7172b-Mu18	98	102	110	169	115	137	142	197
	7172b-Mu19	98	102	110	169	115	138	142	198

在一些实施方案中,本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区的 D3, 其包含如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 氨基酸序列和/或如 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 氨基酸序列。

在一些实施方案中,本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区的 D1, 其包含如 SEQ ID NO: 3、7、或 9 所示的 VH 氨基酸序列和/或如 SEQ ID NO: 4、8、或 10 所示的 VL 氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO: 3 所示的 VH 氨基酸序列和/或如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL 氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 氨基酸序列和/或如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO: 9 所示的 VH 氨基酸序列和/或如 SEQ ID NO: 10 所示的 VL 氨基酸序列。

在一些实施方案中,本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区的 D4, 其包含如 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列和/或如 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 氨基酸序列中的一个或多个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 11、14 和 32 所示的氨基酸序列或其变异体，所述变异体包括人源化抗体或本发明所述的任何其它变异体。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段进一步包含 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 氨基酸序列中的一个或多个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 38、46 和 49 所示的氨基酸序列或其变异体，所述变异体包括人源化抗体或本发明所述的任何其它变异体。

在一些实施方案中，所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 3 所示的 VH 氨基酸序列中的一个或多个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 98、100 和 110 所示的氨基酸序列或其变异体，SEQ ID NO: 7 所示的 VH 氨基酸序列中的一个或多个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 205、206 和 207 所示的氨基酸序列或其变异体，和/或 SEQ ID NO: 9 所示的 VH 氨基酸序列中的一个或多个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 211、212 和 213 所示的氨基酸序列或其变异体，所述变异体包括人源化抗体或本发明所述的任何其它变异体。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 4 所示的 VL 氨基酸序列中的一个或多个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 114、116 和 139 所示的氨基酸序列或其变异体，SEQ ID NO: 8 所示的 VL 氨基酸序列中的一个或多个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 208、209 和 210 所示的氨基酸序列或其变异体，和/或 SEQ ID NO: 10 所示的 VL 氨基酸序列中的一个或多个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 214、215 和 216 所示的氨基酸序列或其变异体，所述变异体包括人源化抗体或本发明所述的任何其它变异体。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3；或者，如 SEQ ID NO: 205 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 206 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 207 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 208 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 209 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 210 所示的 LCDR3；或者，如 SEQ ID NO: 211 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 212 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 213 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 214 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 215 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 216 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D4 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列中的一个或多个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 199、200 和 201 所示的氨基酸序列或其变异体，所述变异体包括人源化抗体或本发明所述的任何其它变异体。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D4 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列中的一个或多个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 202、203 和 204 所示的氨基酸序列或其变异体，所述变异体包括人源化抗体或本发明所述的任何其它变异体。

在一些实施方案中，本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D4 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO: 199 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 200 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 201 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 202 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 203 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 204 所示的 LCDR3。

在另一方面，可以使用本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的 VH 和/或 VL 作为起始材料进行工程化改造，以制备成更适合施用于人体的本文所述的抗体。可以通过对一个或两个可变区（即，VH 和/或 VL）内的一个或多个氨基酸残基进行突变来对抗体进行工程化改造，例如，对一个或多个 CDR 区，和/或一个或多个 FR 框架区内的一个或多个氨基酸残基进行突变。

在一些实施方案中，通过 CDR 移植（Grafting）来对本发明的抗 HER2 抗体可变区进行工程化改造。抗体主要通过重链可变区和轻链可变区的六个 CDR 的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此，各个抗体之间的 CDR 区内的氨基酸序列比 CDR 区之外的序列（例如 FR）更加多样化。因为 CDR 区的氨基酸序列负责抗体与抗原大多数的相互作用，所以可以通过构建表达载体来表达重组抗体以模拟特定的天然存在抗体的特性，所述表达载体包含将来自特定的天然存在抗体的 CDR 序列移植到另一个具有不同特性抗体的 FR 序列（参见，例如，Riechmann 等，Nature 1998, 332:323-327; Jones 等，Nature 1986, 321:522-525; Queen 等，Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:10029-10033; 还可参见 US5225539、US5530101、US5585089、US5693762、和 US6180370）。

本发明的抗 HER2 抗体还可以包含不同的框架区序列。此类框架区序列可以从 DNA 公共数据库或已公开的涉及种系抗体基因序列的参考文献中获得。例如，人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可见

于“V Base”人种系序列数据库中(可从网址 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase 处获得);以及 Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991 第五版, NIH 公开号 91-3242; Tomlinson 等, *J Mol Biol* 1992, 227:776-798; 及 Cox 等, *Eur J Immunol* 1994, 24:827-836; 以引用的方式将其各自的内容明确地并入本文。作为另一个实例, 人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可见于 IMGT 数据库中, 例如在人类免疫球蛋白中发现的以下的重链种系序列能够通过 IMGT 登记号获得: IGHV3-23 (DP47; VH26; V3-23) 或 IGHV7-4。作为另一个实例, 在人免疫球蛋白中发现的以下的轻链种系序列能够通过 IMGT 登记号获得: IGKV1-39 或 IGKV1-39*01。

可以使用本领域技术人员公知的称为 Gapped BLAST 的序列相似性搜索方法中的一种, 基于经编译的蛋白序列数据库对抗体氨基酸序列进行比较 (Altschul 等, *Nucleic Acids Res* 1997, 25:3389-3402)。

用于本发明的抗 HER2 抗体中优选的框架序列是与本发明鼠源母本抗体框架序列在结构上相似的(或同源性高的)受体框架区。在一些实施方案中, 可以将 VH 或 VL 的 CDR1 区序列、CDR2 区序列和 CDR3 区序列分别移植到受体框架区, 所述的受体框架区具有与其所在种系免疫球蛋白基因相同或同源性最高的序列。在一个具体实施方案中, 本发明选择将 SEQ ID NO: 1 或 3 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 2 或 4 所示的 VL 的 CDR 区分别移植到人源 IgG FR 区得到人源化抗体, 所述人源化抗体不仅能够保持与包含 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 氨基酸序列, 或者与包含 SEQ ID NO: 3 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 4 所示的 VL 氨基酸序列的母本抗体相似的抗原结合活性, 而且不会影响 HER2 下游信号传导通路, 例如, 不影响 HER2 胞内结构域的酪氨酸残基的磷酸化(如, Y1248 磷酸化)和/或配体(如, NRG-1 或 Heregulins)诱导的 HER2 二聚化及其介导的下游信号传导通路。

此外, 还可以将结合至 HER2 的其它抗 HER2 抗体的 VH 和 VL 序列(或 CDR 序列, 或全长重链和全长轻链序列)与本发明的抗 HER2 抗体的 VH 和 VL 序列(或 CDR 序列、或全长重链和全长轻链序列)进行“混合和匹配”。优选地, 当将 VH 和 VL 链(或这些链内的 CDR, 或全长重链和全长轻链序列)进行混合和匹配时, 来自特定的 VH/VL 对的 VH 序列被结构相似的 VH 序列进行替代。同样地, 优选地, 来自特定的 VH/VL 对的 VL 序列被结构相似的 VL 序列进行替代。同样地, 应当用结构相似的全长重链序列替换来自具体全长重链/全长轻链对的全长重链序列。同样地, 应当用结构相似的全长轻链序列替换来自具体全长重链/全长轻链对的全长轻链序列。

因此, 在一个实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包括: (a) 重链可变区, 该重链可变区包含表 2 或表 3 所列出的氨基酸序列; 以及 (b) 轻链可变区, 该轻链可变区包含表 2 或表 3 所列出的氨基酸序列, 或者, 另一个抗 HER2 抗体的 VL, 其中, 该抗体特异性地结合 HER2 胞外区的 D3 或 D1。

在一个实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包括: (a) 重链可变区, 该重链可变区包含表 2 或表 3 所列出的氨基酸序列, 或另一个抗 HER2 抗体的 VH, 其中, 该抗体特异性地结合 HER2 胞外区的 D3 或 D1; 以及 (b) 轻链可变区, 该轻链可变区包含表 2 或表 3 所列出的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中, 本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包含与 SEQ ID NO: 52 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的 VH 氨基酸序列。所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D3。

在一个具体实施方案中, 本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包含与 SEQ ID NO: 81 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的 VL 氨基酸序列。所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D3。

在一个实施例中, 本发明的人源化抗体包含与 SEQ ID NO: 52 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的 VH 氨基酸序列, 以及与 SEQ ID NO: 81 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的 VL 氨基酸序列。所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D3。

在一个具体实施方案中, 本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包含与 SEQ ID NO: 143 或 170 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的 VH 氨基酸序列。所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D1。

在一个具体实施方案中, 本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包含与 SEQ ID NO: 171 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的 VL 氨基酸序列。所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D1。

在一个实施例中, 本发明的人源化抗体包含与 SEQ ID NO: 143 或 170 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的 VH 氨基酸序列, 以及与 SEQ ID NO: 171 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的 VL 氨基酸序列。所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D1。

在一些实施方案中,可以将 CDR 序列移植到与种系序列相比包含一个或多个突变的框架区上,例如,使框架区内的氨基酸残基发生突变可以维持或增强抗体的抗原结合能力(参见,例如,US5530101、US5585089、US5693762、和 US6180370)。在一些实施方案中,将本发明所述母本抗体的 CDR 移植到与种系序列相比具有一个或多个突变的受体框架区上,可以提高本发明的抗 HER2 抗体的人源化程度和/或改善抗原结合亲和力。

在一些具体实施方案中,本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗 HER2 人源化抗体的 FR 区具有一个或多个氨基酸突变,以改善人源化抗体的抗原结合亲和力,例如,将 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 的 FR 区进行一个或多个氨基酸突变,进一步,可在 HFR1 进行氨基酸突变,例如,在 HFR1 第 30 位(对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 氨基酸序列第 30 位)的丝氨酸残基进行氨基酸突变;和/或将 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 的 FR 区进行一个或多个氨基酸突变,进一步,可在 LFR1、LFR2 和/或 LFR3 进行一个或多个氨基酸突变,具体地,在 LFR1 第 2 位的天冬氨酸残基、第 4 位的蛋氨酸残基, LFR2 第 9 位(对应于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 氨基酸序列第 43 位)的丙氨酸残基, LFR3 第 29 位(对应于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 氨基酸序列第 85 位)的苏氨酸残基进行一个或多个氨基酸突变。

在一个具体实施方案中,本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗 HER2 人源化抗体相对于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 氨基酸序列在 HFR 区具有氨基酸突变 S30N,和/或其相对于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 氨基酸序列在 LFR 区具有一个或多个氨基酸突变,包括 D2I、M4L、A43S、T85V,能够显著提高所述抗体的抗原结合亲和力。

在一些具体实施方案中,本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗 HER2 人源化抗体的 FR 区具有一个或多个氨基酸突变,以提高本发明抗体的人源化程度,例如,将 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 的 FR 区进行一个或多个氨基酸突变,进一步,可在 HFR1 和/或 HFR2 进行氨基酸突变,例如,可在 HFR1 第 29 位的酪氨酸残基,和/或 HFR2 第 14 位(对应于 SEQ ID NO: 52 所示氨基酸序列第 49 位)丙氨酸残基进行氨基酸突变;和/或将 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 的 FR 区进行一个或多个氨基酸突变,进一步,可在 LFR3 进行氨基酸突变,例如,在 LFR3 第 31 位(对应于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 氨基酸序列第 87 位)的苯丙氨酸残基进行氨基酸突变,具体地,所述特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗 HER2 人源化抗体相对于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 氨基酸序列在 HFR 具有以下氨基酸突变 Y29F 和/或 A49S,和/或其相对于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 氨基酸序列在 LFR 区具有氨基酸突变 F87Y,能够提高所述抗体的人源化程度。

在一些具体实施方案中,本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 人源化抗体的 FR 区具有一个或多个氨基酸突变,例如,将 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 的 FR 区进行一个或多个氨基酸突变,可以在 HFR1 和/或 HFR3 进行 1 个或多个氨基酸突变,以提高本发明抗 HER2 抗体的人源化程度。优选地,在 HFR1 第 9 位的丝氨酸残基、第 18 位的缬氨酸残基,和/或在 HFR3 第 3 位的缬氨酸残基(对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 68 位)、第 4 位的苯丙氨酸残基(对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 69 位)、第 6 位的亮氨酸残基(对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 71 位)、第 10 位的缬氨酸残基(对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 75 位)、第 17 位的异亮氨酸残基(对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 82 位)、第 29 位的苯丙氨酸残基(对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 91 位)进行一个或多个氨基酸突变。还可以将 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 的 FR 区进行一个或多个氨基酸突变,以提高本发明的抗 HER2 抗体的人源化程度,例如,可以在 LFR2 的第 15 位的天冬酰胺残基(对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 氨基酸序列第 49 位)进行氨基酸突变。

在一个具体实施方案中,本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 人源化抗体相对于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列在 HFR 区具有以下一个或多个氨基酸突变: S9G、V18L、V68T 或 V68S、F69I、L71V 或 L71R、V75K 或 V75T、I82L 或 I82M、F91Y。在一些实施例中,特异性结合 HER2 胞外区的 D1 人源化抗体相对于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列在 HFR 区包含以下一个或多个氨基酸突变: V68T、F69I、L71R、V75K 和 F91Y,可显著提高所述抗体的人源化程度。

在一些实施方案中,本发明对人源化抗体的 VH 和/或 VL 的 CDR 区进行氨基酸突变,以改善抗体的一种或多种特性,例如,提高人源化程度、改善抗原结合亲和力、提高表达量、增强稳定性(如,降低潜在的天冬氨酸异构化和/或天冬酰胺脱酰胺风险)。可以进行定点突变或 PCR 诱导突变,并且能够以本领域已知的体外或体内检测方法来评价所述突变对抗体的功能特性的影响。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失,优选氨基酸取代。特别地,重链 CDR 或轻链 CDR 区内不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、或 10 个氨基酸残基发生突变。

在一些具体实施方案中,本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗 HER2 人源化抗体的重链 CDR 区或轻链 CDR 区内具有不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、或 10 个氨基酸突变。

在一个具体实施方案中,将 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 中的 CDR 区进行 1 个或多个氨基酸突变,进一步,可以在 HCDR1、HCDR2 和/或 HCDR3 进行 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个氨基酸突变。例如,可

以在 HCDR1 的第 1 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 31 位），在 HCDR2 的第 5 位甘氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 53 位）、第 7 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 55 位）、第 9 位苏氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 57 位）、第 12 位脯氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 60 位）、第 13 位天冬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 61 位）、第 14 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 62 位），和/或在 HCDR3 的第 3 位丙氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 97 位）进行 1 个或多个氨基酸突变。

在一个实施例中，将 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 中的 HCDR1、HCDR2 和/或 HCDR3 进行 1 个或多个氨基酸突变，例如，对 SEQ ID NO: 52 所示 VH 的 HCDR2 第 7 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 55 位）、第 9 位苏氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 57 位）、第 12 位脯氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 60 位）、第 13 位天冬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 61 位）、第 14 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 62 位），和/或对 HCDR3 的第 3 位丙氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 97 位）进行氨基酸突变。

在一个具体实施方案中，将 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 中的 CDR 区进行 1 个或多个氨基酸突变，进一步，可以在 LCDR1、LCDR3 和/或 LCDR3 进行 1 个、2 个、或 3 个氨基酸突变。例如，可以在 LCDR1 第 7 位缬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 第 27c 位）、第 8 位组氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 第 27d 位）、第 11 位甘氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 85 所示的 VL 第 29 位），在 LCDR2 第 6 位苯丙氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 第 55 位），和/或在 LCDR3 第 1 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 第 89 位）、第 8 位酪氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 第 96 位）进行 1 个或多个氨基酸突变。

在一个实施例中，本发明对上述特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗 HER2 人源化抗体的 VH 和 VL 的 CDR 区进行多个氨基酸突变，以提高本发明所述抗体的人源化程度、提高表达量、和/或提高稳定性（例如降低潜在的天冬氨酸异构化风险）。具体地，对 SEQ ID NO: 52 所示 VH 的 HCDR2 第 7 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 55 位）、第 9 位苏氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 57 位）、第 12 位脯氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 60 位）、第 13 位天冬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 61 位）、第 14 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 62 位），和对 HCDR3 的第 3 位丙氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 97 位）进行一个或多个氨基酸突变，以及对 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 的 LCDR1 第 11 位甘氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 第 29 位）进行氨基酸突变。优选地，选择对 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 的 HCDR2 第 12 位脯氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 60 位）、第 13 位天冬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 61 位）、第 14 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 62 位）中的任意一个或两个氨基酸残基，以及选择对 HCDR3 的第 3 位丙氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 第 97 位），和对 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 的 LCDR1 第 11 位甘氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 第 29 位）进行氨基酸突变。

在一些具体实施方案中，本发明的特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 人源化抗体的重链 CDR 区或轻链 CDR 区内具有不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个氨基酸突变。

在一个具体实施方案中，将 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 中的 CDR 区进行 1 个或多个氨基酸突变，进一步，可以在 HCDR1、HCDR2 和/或 HCDR3 进行 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个氨基酸突变。例如，可以在 HCDR1 的第 3 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 第 33 位），在 HCDR2 的第 5 位谷氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 第 53 位）、第 8 位谷氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 第 56 位）、第 14 位天冬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 第 62 位）、第 15 位苯丙氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 第 63 位），和/或在 HCDR3 的第 3 位精氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 第 97 位）、第 4 位酪氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 第 98 位）、第 5 位天冬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 第 99 位）进行 1 个或多个氨基酸突变。

在一个具体实施方案中，将 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 中的 CDR 区进行 1 个或多个氨基酸突变，例如，可以在 LCDR1 的第 1 位赖氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 24 位），在 LCDR2 的第 1 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 50 位）、第 4 位酪氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 53 位）、第 6 位酪氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 55 位），和/或在 LCDR3 的第 3 位组氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 91 位）进行 1 个或多个氨基酸突变。

在一个实施例中，本发明对上述特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 人源化抗体的 VH 和 VL 的 CDR 区进行多个氨基酸突变，以提高本发明抗体的人源化程度、增强抗原结合亲和力、提高表达量，和/或提高稳定性（例如，降低潜在的天冬酰胺脱酰胺的风险）。具体地，对 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 的 HCDR2 第 5 位谷氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 第 53 位），以及 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 的 LCDR1 第 1 位赖氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 24 位），LCDR2 第 1 位丝氨

酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 50 位）、第 4 位酪氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 53 位）、第 6 位酪氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 55 位）和 LCDR3 第 3 位组氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 91 位）进行多个氨基酸突变。

在一些实施方案中，还可以对人源化抗体的可变区的 CDR 区和框架区进行多个氨基酸突变，以更大程度地改善抗体的一种或多种特性（例如，提高人源化程度、提高抗原结合亲和力、增强稳定性、提高表达量）。在一些具体实施方案中，通过对上述特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的人源化抗体的 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 的 1 个或 2 个 CDR 区和 1 个 HFR 区，和/或 SEQ ID NO: 171 所示 VL 的 3 个 CDR 区进行多个氨基酸突变，优选地，对所述 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 的 HCDR2 第 5 位谷氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 第 53 位），HFR3 第 3 位缬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 68 位）、第 4 位苯丙氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 69 位）、第 6 位亮氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 71 位）、第 10 位缬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 75 位）、第 29 位苯丙氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 氨基酸序列第 91 位），和/或对所述 SEQ ID NO: 171 所示的 LCDR1 的第 1 位赖氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 24 位），LCDR2 的第 1 位丝氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 50 位）、第 4 位酪氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 53 位）、第 6 位酪氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 55 位），和在 LCDR3 第 3 位组氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 第 91 位）进行多个氨基酸突变，不仅使本发明的人源化抗体具备了更高的人源化程度，并且显著提高了与 HER2 的结合亲和力（ K_D 值约 $8 \times 10^{-9} \sim 9 \times 10^{-10}$ M，优选地， $5 \times 10^{-9} \sim 9 \times 10^{-10}$ M），同时还降低了潜在的天冬酰胺脱酰胺风险，以及提高了表达量。

在另一些实施方案中，本发明提供了分离的抗 HER2 单克隆抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D3，其包含（1）氨基酸序列为 X_1YGMS （ $X_1=S, N$ 和 D ；即 SEQ ID NO: 217 所示的序列）的 HCDR1，优选地， $X_1=S$ ；（2）氨基酸序列为 $SISGX_2GX_3YX_4KYX_5X_6X_7VKG$ （ $X_2=G$ 或 S ； $X_3=S$ 或 N ； $X_4=T$ 或 A ； $X_5=P, A, G$ 或 V ； $X_6=D, G, E, P, Q$ 或 R ； $X_7=S, K$ 或 N ；即 SEQ ID NO: 218 所示的序列）的 HCDR2，优选地， $X_2=G, X_3=S, X_4=T, X_5=P$ 或 $V, X_6=D, P$ 或 $E, X_7=S$ 或 K ；（3）氨基酸序列为 DYX_8GFFDV （ $X_8=A, I, N, R, S$ 或 V ；即 SEQ ID NO: 219 所示的序列）的 HCDR3，优选地， $X_8=V$ ；（4）氨基酸序列为 $RSSQSLX_9X_{10}SNX_{11}NTYLH$ （ $X_9=V$ 或 L ； $X_{10}=H$ 或 S ； $X_{11}=G, A, I, S, R$ 或 T ；即 SEQ ID NO: 220 所示的序列）的 LCDR1，优选地， $X_9=V$ 或 $L, X_{10}=H, X_{11}=R$ ；（5）氨基酸序列为 $KVSNRX_{12}S$ （ $X_{12}=F, D$ 或 P ；即 SEQ ID NO: 221 所示的序列）的 LCDR2，优选地， $X_{12}=F$ ；（6）氨基酸序列为 $X_{13}QSTHVPX_{14}T$ （ $X_{13}=S$ 或 Q ； $X_{14}=Y$ 或 W ；即 SEQ ID NO: 222 所示的序列）的 LCDR3，优选地， $X_{13}=S, X_{14}=Y$ ，或者分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。所述抗体或其抗原结合片段人源化程度高、表达量高，并且消除了天冬氨酸异构化的风险。

在一些具体的实施方案中，上述特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 11、12、或 13 所示的 HCDR1；如 SEQ ID NO: 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、或 31 所示的 HCDR2；和如 SEQ ID NO: 32、33、34、35、36、或 37 所示的 HCDR3；以及如 SEQ ID NO: 38、39、40、41、42、43、44、或 45 所示的 LCDR1；如 SEQ ID NO: 46、47、或 48 所示的 LCDR2；和如 SEQ ID NO: 49、50、或 51 所示的 LCDR3。

在一个具体的实施方案中，本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D3，其包含如下的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列：

（1）如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 14、15、16、17、18、19、或 20 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3；以及如 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；或

（2）如 SEQ ID NO: 12 或 13 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；或

（3）如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 47 或 48 所示的 LCDR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；或

（4）如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 39、40、41、42、43、44、或 45 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 46 所示的

LCDR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；或

(5) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2、如 SEQ ID NO: 50 或 51 所示的 LCDR3；或

(6) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 33、34、35、36、或 37 所示的 HCDR3；以及如 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；或

(7) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 14、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、或 31 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3；以及如 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；或

(8) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 21 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3。

在一个具体的实施方案中，本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D3，包含：如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 14、17、19、21、23、24、27、28、29、30、或 31 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 32 或 37 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 38 或 42 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2，如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 14、17、19、24、29、30、或 31 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 32 或 37 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 38 或 42 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2、如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。更优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 24、29、30、或 31 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

在另一些实施方案中，本发明提供了分离的抗 HER2 单克隆抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D1，其包含 (1) 氨基酸序列为 DYX₁₅MH (X₁₅=S 或 A；即 SEQ ID NO: 223 所示的序列) 的 HCDR1，优选地，X₁₅=S；(2) 氨基酸序列为 WINTX₁₆TGX₁₇PTYADX₁₈X₁₉KG (X₁₆=E、N、G、Y 或 I；X₁₇=E、D 或 S；X₁₈=D、K 或 N；X₁₉=F 或 V；即 SEQ ID NO: 224 所示的序列) 的 HCDR2，优选地，X₁₆=G，X₁₇=E，X₁₈=D，X₁₉=F；(3) 氨基酸序列为 VGX₂₀X₂₁X₂₂YAMDY (X₂₀=R 或 Y；X₂₁=Y 或 G；X₂₂=D 或 S；即 SEQ ID NO: 225 所示的序列) 的 HCDR3，优选地，X₂₀=R，X₂₁=Y，X₂₂=D；(4) 氨基酸序列为 X₂₃ASQDVYTAVA (X₂₃=K 或 R；即 SEQ ID NO: 226 所示的序列) 的 LCDR1，优选地，X₂₃=R；(5) 氨基酸序列为 X₂₄ASX₂₅RX₂₆T (X₂₄=S、A、D、E、K、L、Q、R、W 或 Y；X₂₅=Y、D、E、K、N、Q、S 或 T；X₂₆=Y、A、E、P 或 Q；即 SEQ ID NO: 227 所示的序列) 的 LCDR2，优选地，X₂₄=S、A、L 或 Y，X₂₅=S，X₂₆=P；(6) 氨基酸序列为 QXX₂₇YSTPPT (X₂₇=H、S、A 或 Y；即 SEQ ID NO: 228 所示的序列) 的 LCDR3，优选地，X₂₇=Y，或者分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。所述抗体或其抗原结合片段不仅对 HER2 具有高亲和力 (例如，K_D 值 < 1×10⁻⁸ M，或 < 5×10⁻⁹ M，或 < 1×10⁻⁹ M，优选地，K_D 值 < 5×10⁻⁹ M，或 < 1×10⁻⁹ M)，而且具有更高的人源化程度以及稳定性。

在一些具体的实施方案中，上述特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 98 或 99 所示的 HCDR1；如 SEQ ID NO: 100、101、102、103、104、105、106、107、108、或 109 所示的 HCDR2；如 SEQ ID NO: 110、111、112、或 113 所示的 HCDR3；以及如 SEQ ID NO: 114 或 115 所示的 LCDR1；如 SEQ ID NO: 116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、或 138 所示的 LCDR2；如 SEQ ID NO: 139、140、141、或 142 所示的 LCDR3。

在一个具体的实施方案中，本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段特异性地结合 HER2 胞外区的 D1，其包含如下的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列：

(1) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, 如 SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、或 128 所示的 LCDR2, 如 SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3; 或

(2) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, 如 SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2, 如 SEQ ID NO: 140、141、或 142 所示的 LCDR3; 或

(3) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 101、102、103、104、105、106、107、108、或 109 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, 如 SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2, 如 SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3; 或

(4) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 111、112、或 113 所示的 HCDR3, 如 SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2, 如 SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3; 或

(5) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, 如 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2, 如 SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3; 或

(6) 如 SEQ ID NO: 99 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, 如 SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2, 如 SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3; 或

(7) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, 如 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 129、130、131、132、133、134、135、136、137、或 138 所示的 LCDR2, 如 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3。

在一个具体的实施方案中, 本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区的 D1, 其包含如下 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列: 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 100 或 102 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, 如 SEQ ID NO: 114 或 115 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 116、123、127、129、130、131、132、133、134、135、136、137、或 138 所示的 LCDR2, 如 SEQ ID NO: 139 或 142 所示的 LCDR3。优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, 如 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 129、133、136、或 138 所示的 LCDR2, 如 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3, 或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。所述抗体或其抗原结合片段与 HER2 的结合亲和力 (K_D) 值 $<5 \times 10^{-9}$ M, 或 $<1 \times 10^{-9}$ M, 优选 $<1 \times 10^{-9}$ M。更优选地, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3, 或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段进一步包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区以及具有 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区。

在一些具体实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段可特异性地结合 HER2 胞外区的 D3, 其包含: 与 SEQ ID NO: 52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、或 80 所示的氨基酸序列具有至少 80% (例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%) 同一性的重链可变区 VH, 以及与 SEQ ID NO: 81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、或 97 所示的氨基酸序列具有至少 80% (例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%) 同一性的轻链可变区 VL。

在一个具体实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段可特异性地结合 HER2 胞外区的 D3, 其包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区各自包括分别与 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、或 97 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 或者分别与 SEQ ID NO: 53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、或 68 所

示的 VH 和 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列；或者分别与 SEQ ID NO: 68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、或 80 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 92 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施例中，所述的特异性地结合 HER2 胞外区的 D3 的抗体或其抗原结合片段包含：分别与 SEQ ID NOs: 52、57、62、68、73、78、79 和 80 中的任一者所示的 VH，以及 SEQ ID NO: 81 或 92 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：分别与 SEQ ID NO: 73、78、79、或 80 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 92 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列，更优选的是分别与 SEQ ID NO: 80 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 92 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些具体实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段可特异性地结合 HER2 胞外区的 D1，其包含：与 SEQ ID NO: 143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、或 170 所示的氨基酸序列具有至少 80%（例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%）同一性的重链可变区 VH，以及与 SEQ ID NO: 171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、或 198 所示的氨基酸序列具有至少 80%（例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%）同一性的轻链可变区 VL。

在一个具体实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段可特异性地结合 HER2 胞外区的 D1，其包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区，其包括分别与 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、或 188 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列；或者分别与 SEQ ID NO: 144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、或 170 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列；或者分别与 SEQ ID NO: 169 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 189、190、191、192、193、194、195、196、197、或 198 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施例中，所述特异性地结合 HER2 胞外区的 D1 的抗体或其抗原结合片段包含：分别与 SEQ ID NOs: 143、148、156、158、160、161、165 和 169 中的任一者所示的 VH，以及 SEQ ID NO: 171、172、180、184、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、或 198 中的任一者所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。优选地，所述的抗体或其抗原结合片段包含：分别与 SEQ ID NO: 169 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 189、190、191、192、193、194、195、196、197、或 198 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列，更优选的是分别与 SEQ ID NO: 169 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 189、193、196、或 198 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。进一步优选地，本发明的上述的抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID NO: 169 所示的 VH，以及 SEQ ID NO: 193 所示的 VL。

本发明的抗 HER2 人源化抗体或其抗原结合片段与表达 HER2 的细胞有较强的结合活性，且对 HER2 介导的信号转导通路不具有影响作用，不与人源 ErbB/HER 家族其它成员（包括 EGFR、HER3 和 HER4）发生交叉结合反应，具有较高的人源化程度和稳定性。

2、抗 HER2 互补性双特异抗体

一方面，本发明提供了一种抗 HER2 互补性双特异抗体，所述互补性双特异抗体包含两种能够非竞争性地同时结合 HER2 胞外区的抗原结合结构域，其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域各自特异性地结合 HER2 胞外区的不同表位。进一步，所述互补性双特异抗体可以同时结合至 HER2 胞外区的 D1、D3 和 D4 中的任意两个表位，优选地，可同时结合至 HER2 胞外区的 D1 和 D3，例如，其中第一抗原结合结构域与 HER2 胞外区的 D3 特异性结合，第二抗原结合结构域与 HER2 胞外区的 D1 特异性结合，所述第一和第二抗原结合结构域的结合表位均不同于 Trastuzumab 或 Pertuzumab 的抗原结合表位。

本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体具有以下功能特性：

(i) 所述抗 HER2 互补性双特异抗体是一个四价分子，其可以同时结合 HER2 胞外区的两个不同表位，因此能够交联细胞表面的 HER2 而形成抗原-抗体交联聚集体或者簇，显而易见地，该聚集体或簇形成的效率及大小受制于细胞表面靶抗原的丰度，并且簇的形成会引发细胞对其的内吞反应，该内吞反应的速率与强度与簇的大小成正相关。具体地，相较于对应的单特异性抗 HER2 抗体或其抗原结合片段以及 Trastuzumab，所述互补性双特异抗体具有显著增强的内化效率，其在 HER2 过表达肿瘤细胞中的内吞率高达 80% 以上，在 HER2 低表达肿瘤细胞中的内吞率高达 60% 以上。

(ii) 不同于对应的单特异性抗 HER2 抗体或其抗原结合片段以及 Trastuzumab 在内化后的胞内转运途径以重循环至细胞表面 (Recycling) 为主，所述互补性双特异抗体与 HER2 在细胞表面形成簇并内化后，溶酶体转运 (Lysosomal Trafficking) 为其占绝对主导地位的胞内转运途径，因此所述互补性双特异抗体与 HER2 形成的簇能够被高效地转运入溶酶体而降解。

(iii) 所述互补性双特异抗体由于能够有效地引发肿瘤细胞表面 HER2 的降解，因而能够显著抑制 HER2 过表达肿瘤细胞的增殖。

(iv) 所述互补性双特异抗体不影响 HER2 及其介导的下游信号转导通路的调控，包括不诱导、不阻断、不抑制配体 (例如，NRG-1) 诱导的 HER2 二聚化及其下游信号转导通路的激活，因此所述抗 HER2 互补性双特异抗体不影响正常组织或细胞 (例如，心肌细胞) 中 HER2 及其介导的下游信号转导通路的正常生物学功能与调控。

(v) 所述抗 HER2 互补性双特异抗体具有较高的稳定性和表达量，以及较高的单体含量 (约 98% 以上)。

所述互补性双特异抗体的形式包括但不限于，基于 scFv 或 Diabody 的双特异性形式 (例如，scFv-scFv 或 scFv-Fab 或 Fab-scFv)、IgG-scFv 融合蛋白、DVD-Ig、四源杂交瘤 (Quadroma)、凸起-进入-孔洞 (Knob-into-hole)、共同轻链 (Common Light Chain)、CrossMab、CrossFab、SEEDbody、亮氨酸拉链 (Leucine Zipper)、Duobody、IgG1/IgG2、双重作用 (Dual-acting) Fab (DAF)-IgG 和 Mab² 双特异性形式 (参见，例如，Klein 等，mAbs 2012, 4:653-663 及其引用的参考文献)。本发明示例性抗 HER2 互补性双特异抗体采用 DVD-Ig 形式，其不仅对表达 HER2 肿瘤细胞的结合活性较高，而且表现出较高的细胞内化率，此外，还能保证本发明的互补性双特异抗体的稳定性 (例如，单体含量较高，约 98% 以上)。

所述抗 HER2 互补性双特异抗体与表达 HER2 的细胞具有较强的结合活性，且与人源 ErbB/HER 家族其它成员 (包括 EGFR、HER3 和 HER4) 无交叉结合活性。

在表达 HER2 的肿瘤细胞中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体表现出显著增强的内化效率。在一些实施方案中，所述互补性双特异抗体相较于对应的单特异性抗 HER2 抗体或其抗原结合片段以及 Trastuzumab，在 HER2 过表达 (IHC 3⁺、或 IHC 2⁺/FISH⁺) 的肿瘤细胞中的内吞率高达 80% 以上。在一些实施方案中，所述互补性双特异抗体相较于对应的单特异性抗 HER2 抗体或其抗原结合片段以及 Trastuzumab，在 HER2 低表达 (IHC 2⁺/FISH⁻、或 IHC 1⁺) 的肿瘤细胞中的内吞率高达 60%。

所述抗 HER2 互补性双特异抗体能够有效促使 HER2 在肿瘤细胞中的降解。在一些实施方案中，通过 Western-blot 方法检测发现所述互补性双特异抗体能够诱导 HER2 过表达肿瘤细胞 (例如，BT474 细胞) 的 HER2 的降解，而与所述互补性双特异抗体相对应的单特异性抗 HER2 抗体或其抗原结合片段以及 Trastuzumab 则不能诱发 HER2 在所述肿瘤细胞内的降解。进一步，所述抗 HER2 互补性双特异抗体能够有效地降低肿瘤细胞表面 HER2 的表达丰度，因此所述抗 HER2 互补性双特异抗体能够显著抑制 HER2 过表达肿瘤细胞的增殖。在一些实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体对 HER2 过表达的肿瘤细胞 (例如，BT474 细胞) 的增殖具有显著抑制作用，其抑制活性与 Trastuzumab 的相当，而与所述互补性双特异抗体相对应的单特异性抗 HER2 抗体或其抗原结合片段则不能抑制肿瘤细胞的增殖。

所述抗 HER2 互补性双特异抗体对 HER2 介导的信号转导通路没有影响作用，保持了相对应的单特异性抗 HER2 抗体或其抗原结合片段不影响 HER2 生物学功能的特性，因此对正常组织或细胞 (例如，心肌细胞) 中 HER2 的正常生物学功能不会产生不良影响。在一些实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体不诱导、不阻断、不抑制配体 (例如，NRG-1) 诱导的 HER2 二聚化及其介导的下游信号通路中的 AKT 的磷酸化和/或去磷酸化。由此，不同于现有靶向 HER2 的治疗剂 (例如基于 Trastuzumab 和/或 Pertuzumab 的治疗剂)，所述抗 HER2 互补性双特异抗体潜在的诱发心脏毒副作用的风险极低。

另一方面，本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体，其第一和第二抗原结合结构域可以衍生自本发明的任何两个互相不竞争性结合 HER2 的单特异性抗 HER2 抗体或其抗原结合片段，也可衍生自目前已知的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段。

本发明的示例性抗 HER2 互补性双特异抗体可基于表 2 所示的特异性结合 HER2 胞外区的 D3 和表 3 所示的特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段构建得到。本发明的示例性抗 HER2 互补性双特异抗体包含两种不同的抗原结合结构域，其中第一抗原结合结构域包含表 2 所示的特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的任意的至少一个 CDR 区和/或任一可变

区,第二抗原结合结构域包含表3所示的特异性结合HER2胞外区的D1的抗HER2抗体或其抗原结合片段的任意的至少一个CDR区和/或任一个可变区。

在一些实施方案中,所述抗HER2互补性双特异抗体的第一或第二抗原结合结构域包含重链可变区CDRs和/或轻链可变区CDRs,所述第一抗原结合结构域的重链可变区CDRs包含表2中所列出的重链可变区CDRs中任一个、两个或三个CDR区的氨基酸序列,或分别与HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列;所述第一抗原结合结构域的轻链可变区CDRs包含表2中所列出的轻链可变区CDRs中任一个、两个或三个CDR区的氨基酸序列,或分别与LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列;所述第二抗原结合结构域的重链可变区CDRs包含表3中所列出的重链可变区CDRs中任一个、两个或三个CDR区的氨基酸序列,或分别与HCDR1、HCDR2和HCDR3具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列;所述第二抗原结合结构域的轻链可变区CDRs包含表3中所列出的轻链可变区CDRs中任一个、两个或三个CDR区的氨基酸序列,或分别与LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列。

在一些具体实施方案中,所述抗HER2互补性双特异抗体的第一抗原结合结构域特异性地结合HER2胞外区的D3,包含:如SEQ ID NO: 11所示的HCDR1,如SEQ ID NO: 21、23、24、27、28、29、30、或31所示的HCDR2,如SEQ ID NO: 37所示的HCDR3,以及如SEQ ID NO: 42所示的LCDR1,如SEQ ID NO: 46所示的LCDR2和如SEQ ID NO: 49所示的LCDR3,或分别与所述的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中,所述抗HER2互补性双特异抗体的第一抗原结合结构域特异性地结合HER2胞外区的D3,包含:如SEQ ID NO: 11所示的HCDR1,如SEQ ID NO: 24、29、30、或31所示的HCDR2,如SEQ ID NO: 37所示的HCDR3,以及如SEQ ID NO: 42所示的LCDR1,如SEQ ID NO: 46所示的LCDR2和如SEQ ID NO: 49所示的LCDR3,或分别与所述的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列。

在一些具体实施方案中,所述抗HER2互补性双特异抗体的第二抗原结合结构域特异性地结合HER2胞外区的D1,包含:如SEQ ID NO: 98所示的HCDR1,如SEQ ID NO: 102所示的HCDR2,如SEQ ID NO: 110所示的HCDR3,以及如SEQ ID NO: 115所示的LCDR1,如SEQ ID NO: 129、130、131、132、133、134、135、136、137、或138所示的LCDR2和如SEQ ID NO: 142所示的LCDR3,或分别与所述的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中,所述抗HER2互补性双特异抗体的第二抗原结合结构域特异性地结合HER2胞外区的D1,包含:如SEQ ID NO: 98所示的HCDR1,如SEQ ID NO: 102所示的HCDR2,如SEQ ID NO: 110所示的HCDR3,以及如SEQ ID NO: 115所示的LCDR1,如SEQ ID NO: 133所示的LCDR2和如SEQ ID NO: 142所示的LCDR3,或分别与所述的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中,所述抗HER2互补性双特异抗体的第一或第二抗原结合结构域进一步包含具有所述HCDR1、HCDR2和HCDR3的重链可变区和/或具有LCDR1、LCDR2和LCDR3的轻链可变区,所述第一抗原结合结构域的重链可变区包含表2中所列出的VH氨基酸序列中任一个的氨基酸序列,或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列;所述第一抗原结合结构域的轻链可变区包含表2中所列出的VL氨基酸序列中任一个的氨基酸序列,或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列;所述第二抗原结合结构域的重链可变区包含表3中所列出的VH氨基酸序列中任一个的氨基酸序列,或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列;所述第二抗原结合结构域的轻链可变区包含表3中所列出的VL氨基酸序列中任一个的氨基酸序列,或与其具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列。

在一些具体实施方案中,所述抗HER2互补性双特异抗体的第一抗原结合结构域特异性地结合HER2胞外区的D3,包含:如SEQ ID NO: 70、72、73、76、77、78、79、或80所示的VH,以及如SEQ ID NO:

92 所示的 VL，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体的第一抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区的 D3，包含：如 SEQ ID NO: 73、78、79、或 80 所示的 VH，以及如 SEQ ID NO: 92 所示的 VL，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些具体实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体的第二抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区的 D1，包含：如 SEQ ID NO: 169 所示的 VH，以及如 SEQ ID NO: 189、190、191、192、193、194、195、196、197、或 198 所示的 VL，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体的第二抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区的 D1，包含：如 SEQ ID NO: 169 所示的 VH，以及如 SEQ ID NO: 193 所示的 VL，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

在一些具体实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体包含第一和第二抗原结合结构域，所述第一抗原结合结构域包含如下重链可变区 CDRs 和轻链可变区 CDRs，或分别与所述各 CDR 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列：如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 21、23、24、27、28、29、30、或 31 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；以及所述第二抗原结合结构域包含如下重链可变区 CDRs 和轻链可变区 CDRs，或分别与所述各 CDR 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列：如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO: 129、130、131、132、133、134、135、136、137、或 138 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3。

在一个具体实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体包含第一和第二抗原结合结构域，所述第一抗原结合结构域包含如下重链可变区 CDRs 和轻链可变区 CDRs，或分别与所述的各 CDR 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列：如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 24、29、30、或 31 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3，以及所述第二抗原结合结构域包含如下重链可变区 CDRs 和轻链可变区 CDRs，或分别与所述各 CDR 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列：如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3。

在一些具体实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体包含第一和第二抗原结合结构域，所述第一抗原结合结构域包含重链可变区 VH 以及轻链可变区 VL，所述重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 包含如 SEQ ID NO: 70、72、73、76、77、78、79、或 80 所示的 VH 氨基酸序列，以及 SEQ ID NO: 92 所示的 VL 氨基酸序列，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列，以及所述第二抗原结合结构域包含重链可变区 VH 以及轻链可变区 VL，所述重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 包含如 SEQ ID NO: 169 所示的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 193 所示的 VL 氨基酸序列，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体包含第一和第二抗原结合结构域，所述第一抗原结合结构域包含重链可变区 VH 以及轻链可变区 VL，所述重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 包含如 SEQ ID NO: 73、78、79、或 80 所示的 VH 氨基酸序列，以及 SEQ ID NO: 92 所示的 VL 氨基酸序列，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列，以及所述第二抗原结合结构域包含重链可变区 VH 以及轻链可变区 VL，所述重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 包含如 SEQ ID NO: 169 所示的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 193 所示的 VL 氨基酸序列，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

本发明的示例性抗 HER2 互补性双特异抗体还可以基于本发明所述的特异性结合 HER2 胞外区的 D1

和 D4 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段构建得到。本发明的示例性抗 HER2 互补性双特异性抗体包含第一和第二抗原结合结构域, 且所述第一和第二抗原结合结构域能够彼此之间非竞争地同时结合 HER2, 其中第一抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 氨基酸序列, 或者, 所述第一抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 所示的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 10 所示的 VL 氨基酸序列, 或者, 所述第一抗原结合结构域包含表 3 所示的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的任意的至少一个 CDR 区和/或任一个可变区, 并能特异性地结合 HER2 胞外区的 D1; 第二抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列, 并能特异性地结合 HER2 胞外区的 D4。

在一些实施方案中, 所述抗 HER2 互补性双特异抗体的第一或第二抗原结合结构域包含重链可变区 CDRs 和/或轻链可变区 CDRs, 所述第一抗原结合结构域的重链可变区 CDRs 包含 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 氨基酸序列中的一个、两个、或三个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 205、206 和 207 所示的氨基酸序列或其变异体, 所述变异体包括人源化抗体或任何其它变异体; 所述第一抗原结合结构域的轻链可变区 CDRs 包含 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 氨基酸序列中的一个、两个、或三个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 208、209 和 210 所示的氨基酸序列或其变异体, 所述变异体包括人源化抗体或任何其它变异体; 或者, 所述第一抗原结合结构域的重链可变区 CDRs 包含 SEQ ID NO: 9 所示的 VH 氨基酸序列中的一个、或两个、或三个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 211、212 和 213 所示的氨基酸序列或其变异体, 所述变异体包括人源化抗体或任何其它变异体; 所述第一抗原结合结构域的轻链可变区 CDRs 包含 SEQ ID NO: 10 所示的 VL 氨基酸序列中的一个、两个、或三个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 214、215 和 216 所示的氨基酸序列或其变异体, 所述变异体包括人源化抗体或任何其它变异体; 或者, 所述第一抗原结合结构域的重链可变区 CDRs 包含表 3 中所列出的重链可变区 CDRs 中任一个、两个或三个 CDR 区的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 所述第一抗原结合结构域的轻链可变区 CDRs 包含表 3 中所列出的轻链可变区 CDRs 中任一个、两个或三个 CDR 区的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 所述第二抗原结合结构域的重链可变区 CDRs 包含 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列中的一个、两个、或三个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 199、200 和 201 所示的氨基酸序列或其变异体, 所述变异体包括人源化抗体或任何其它变异体; 所述第一抗原结合结构域的轻链可变区 CDRs 包含 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列中的一个、两个、或三个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 202、203 和 204 所示的氨基酸序列或其变异体, 所述变异体包括人源化抗体或任何其它变异体。

本发明的示例性抗 HER2 互补性双特异抗体还可以基于本发明所述的特异性结合 HER2 胞外区的 D3 和 D4 的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段构建得到。本发明的示例性抗 HER2 互补性双特异性抗体包含第一和第二抗原结合结构域, 且所述第一和第二抗原结合结构域能够彼此之间非竞争地同时结合 HER2, 其中第一抗原结合结构域包含表 2 所示的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的任意的至少一个 CDR 区和/或任一个可变区; 第二抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列, 并能特异性地结合 HER2 胞外区的 D4。

在一些实施方案中, 所述抗 HER2 互补性双特异抗体的第一或第二抗原结合结构域包含重链可变区 CDRs 和/或轻链可变区 CDRs, 所述第一抗原结合结构域的重链可变区 CDRs 包含表 2 中所列出的重链可变区 CDRs 中任一个、两个、或三个 CDR 区的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 所述第一抗原结合结构域的轻链可变区 CDRs 包含表 2 中所列出的轻链可变区 CDRs 中任一个、两个、或三个 CDR 区的氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 所述第二抗原结合结构域的重链可变区 CDRs 包含 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列中的一个、两个、或三个的 CDR 或如 SEQ ID NOs: 199、200 和 201 所示的氨基酸序列或其变异体, 所述变异体包括人源化抗体或任何其它变异体; 所述第一抗原结合结构域的轻链可变区 CDRs 包含 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列中的一个、两个、或三个 CDR 或如 SEQ ID NOs: 202、203 和 204 所示的氨基酸序列或其变异体, 所述变异体包括人源化抗体或任何其它变异体。

另一方面, 本发明的示例性抗 HER2 互补性双特异抗体可采用 DVD-Ig 形式进行构建(参见 US7612181), 所述抗 HER2 互补性双特异抗体的第一或第二抗原结合结构域可以是 Fv 形式/结构域, 也可以是 Fab 或 IgG 形式/结构域, 即, 如果第一抗原结合结构域是 Fv, 那么第二抗原结合结构域则是 Fab 或 IgG; 如果第二抗原结合结构域是 Fv, 那么第一抗原结合结构域则是 Fab 或 IgG。所述 Fv 结构域通过连接子序列融合到或可操作地连接到所述 Fab 或 IgG 结构域, 所述连接子不仅具有低免疫原性, 而且还能保证所述互补性双特异抗体的稳定性, 优选柔性肽作为连接子。

如本文所使用的, 术语“连接子”是指连接两个化合物, 如两个多肽分子(包括但不限于未修饰或经修饰的氨基酸或氨基酸序列)。连接子可以由 1 个或多个连接分子构成, 或者可以包括连接分子和至少一

个旨在将连接分子和化合物分开特定距离的间隔区分子。

术语“可操作地连接”是指具有不同功能特性的氨基酸序列、肽或蛋白质的连接，如通过本文所述的连接子序列将 Fv 结构域与 Fab 或 IgG 结构域的连接。

在一些实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体的第一抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区的 D3，且为 Fv 结构域，所述第一抗原结合结构域包含表 2 所示的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的重链可变区 CDRs 和轻链可变区 CDRs，和/或重链可变区 VH 和轻链可变区 VL；所述抗 HER2 互补性双特异抗体的第二抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区的 D1，且为 Fab 结构域或 IgG 结构域，所述第二抗原结合结构域包含表 3 所示的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的重链可变区 CDRs 和轻链可变区 CDRs，和/或重链可变区 VH 和轻链可变区 VL；所述 Fv 结构域中的 VH 结构域 C-末端通过连接子序列融合到或可操作地连接到所述 Fab 或 IgG 结构域中的 VH 结构域 N-末端，所述 Fv 结构域中的 VL 结构域 C-末端通过连接子序列融合到或可操作地连接到所述 Fab 或 IgG 结构域中的 VL 结构域 N-末端。

在一些具体实施方案中，所述连接子序列包括不同拷贝数的 GGGGS (G₄S) 序列，例如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个拷贝。所述抗 HER2 互补性双特异抗体 Fv 结构域中的 VH 结构域与所述互补性双特异抗体 Fab 或 IgG 结构域中的 VH 结构域连接的连接子 G₄S 的拷贝数可以和所述互补性双特异抗体 Fv 结构域中的 VL 结构域与所述互补性双特异抗体 Fab 或 IgG 结构域中的 VL 结构域连接的连接子 G₄S 拷贝数相同或者不同，优选地，Fv 结构域与 Fab 或 IgG 结构域之间 VH 结构域连接的连接子 G₄S 拷贝数与二者之间 VL 结构域连接的连接子 G₄S 拷贝数不同，其中二者 VH 结构域之间连接的连接子拷贝数优选 1 个，二者 VL 结构域之间连接的连接子拷贝数优选 3 个，由此可以有效保证本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体的结构稳定性以及提高在表达 HER2 肿瘤细胞中的内吞率。

在一个具体实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体包含第一和第二抗原结合结构域，其中，第一抗原结合结构域包含表 2 所示的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的 VH 和 VL，第二抗原结合结构域包含表 3 所示的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的 VH 和 VL，所述第一抗原结合结构域为 Fv 结构域，第二抗原结合结构域为 Fab 或 IgG 结构域，所述 Fv 结构域中的 VH 结构域 C-末端通过连接子（例如(G₄S)_n，n 为大于 0、如 1-3 的整数；优选(G₄S)₁ 连接到所述 Fab 或 IgG 结构域中的 VH 结构域 N-末端，所述 Fv 结构域中的 VL 结构域 C-末端通过连接子（例如(G₄S)_n，n 为 1-3 的整数；优选(G₄S)₃）连接到所述 Fab 或 IgG 结构域中的 VL 结构域 N-末端。

另一方面，本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体还可以包含恒定区，所述恒定区包括抗体重链恒定区和轻链恒定区。本发明的重链恒定区包括人 IgG 重链恒定区 Fc 区的天然和突变蛋白形式，还包括含有促进二聚体形成的铰链区的多肽截短形式。在一些实施方案中，Fc 区包含抗体 CH2 和 CH3 域。包含 Fc 部分的融合蛋白（和由此形成的低聚物）提供了容易通过蛋白 A（Protein A）或蛋白 G（Protein G）进行亲和和色谱法纯化的优点，以及延长血清半衰期。优选的 Fc 区来源于人 IgG，包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在本文中，Fc 区的特定氨基酸残基的位置是依据 EU 编号系统来确定的。

抗体的 Fc 区的一个功能是在抗体结合其靶分子时与免疫系统产生“效应子功能”，包括产生抗体依赖性细胞毒性（ADCC）、抗体依赖性细胞吞噬作用（ADCP）和/或补体依赖性细胞毒性（CDC）。ADCC 和 ADCP 通过 Fc 与免疫细胞表面上 Fc 受体（FcR）的结合来介导（Raghavan 等, Annu Rev Cell Dev Biol 1996, 12:181-220; Ghetie 等, Annu Rev Immunol 2000, 18:739-766; Ravetch 等, Annu Rev Immunol 2001, 19:275-290），所述的免疫细胞包括单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜曙红细胞、肥大细胞、血小板、B 细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、NK 细胞和 T 细胞。CDC 通过 Fc 与例如 C1q 等补体系统的蛋白质结合来介导（Ward 等, Ther Immunol 1995, 2:77-94）。

在一些实施方案中，本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体包含经工程化改造的 IgG Fc 区，以降低 Fc 介导的效应子功能。具有降低了的效应子功能的示例性抗体包括含有以下氨基酸突变的 Fc 区：

N297A 或 N297Q (IgG1)
S267E/L328F (IgG1)
L234A/L235A (IgG1)
L234F/L235E/P331S (IgG1)
C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)
V234A/G237A (IgG2)
H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)
L235A/G237A/E318A (IgG4)

优选的工程化的 Fc 区是具有 L234F/L235E/P331S（EU 编号系统）氨基酸取代的人 IgG1 Fc，能够降低 Fc 区与一个或多个 FcγR 和 C1q 的结合（Oganesyan 等, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2008, 64:700-704; US5624821; US6194551）。FcγR 蛋白家族包括 FcγRI（又称为 CD64），包括同工型 FcγRIa、FcγRIb 和 FcγRIc；FcγRII（又称为 CD32），包括同工型 FcγRIIa、FcγRIIb 和 FcγRIIc；以及 FcγRIII（又称为 CD16），

包括同工型 Fc γ RIIIa 和 Fc γ RIIIb (Jefferis 等, Immunol Lett 2002, 82:57-65)。其中, Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIc 以及 Fc γ RIIIa 可诱导 ADCC、内吞作用、吞噬作用和/或细胞因子释放。结合性质包括但不限于结合特异性、结合亲和力 (K_D)、以及解离和结合速率 (分别为 k_{dis} 和 k_a)。本领域技术人员可通过任意一种或多种结合性质来分析工程化的 Fc 区是否具有改变了的 ADCC 和/或 CDC 活性。在一些实施方案中, 本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体中的重链恒定区和轻链恒定区可为来自人 IgG1 或 IgG4 的重链恒定区 (可为天然或突变的, 如以 SEQ ID NO: 231 示出的野生型人 IgG1 恒定区), 和人 Kappa (κ) 链或 Lambda (λ) 恒定区。

在一些具体实施方案中, 所述抗 HER2 互补性双特异抗体的重链恒定区包含 L234F/L235E/P331S (EU 编号系统) 氨基酸取代的人 IgG1 Fc (如 SEQ ID NO: 232 所示), 其具有对一个或多个 Fc γ R (例如, Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa 和 Fc γ RIIIa) 以及 C1q 降低了的结合亲和力。在一些实施例中, 在所述抗 HER2 互补性双特异抗体的重链恒定区中引入 L234F/L235E/P331S 突变使得所述互补性双特异抗体与 Fc γ RI、Fc γ RIIa (167H)、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa (176V) 和/或 Fc γ RIIIa (176F) 基本不结合。在一些实施例中, 在所述抗 HER2 互补性双特异抗体的重链恒定区中引入 L234F/L235E/P331S 突变使得所述互补性双特异抗体与 C1q 基本不结合。在一些实施例中, 在所述抗 HER2 互补性双特异抗体的重链恒定区中引入 L234F/L235E/P331S 突变不会影响所述互补性双特异抗体与 Fc γ Rn 的结合亲和力。在一些实施例中, 在所述抗 HER2 互补性双特异抗体的重链恒定区中引入 L234F/L235E/P331S 突变可显著降低所述互补性双特异抗体的 ADCC 活性。在一个实施例中, 相较于 Fc 区不含有所述氨基酸突变的抗体, 所述互补性双特异抗体的 ADCC 活性显著减弱或检测不到, ADCC 活性的减弱或消除可能是由所述的互补性双特异抗体对 Fc γ R 的结合亲和力显著降低所致。

在一些具体实施方案中, 所述抗 HER2 互补性双特异抗体包含轻链恒定区, 所述轻链恒定区选自 Kappa 恒定区 (如 SEQ ID NO: 233 所示)。

在一方面, 本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体包含 4 条多肽链, 其中两条多肽链包含 VH1-L1-VH2-C-(Fc) $_n$, VH1 表示特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的第一抗原结合结构域的重链可变区, L1 表示连接子, VH2 表示特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的第二抗原结合结构域的重链可变区, C 表示重链恒定区 CH1, Fc 表示重链恒定区 Fc 结构域, n 是 0 或 1; 以及另外两条多肽链包含 VL1-L2-VL2-CL, 其中 VL1 表示特异性结合 HER2 胞外区的 D3 的第一抗原结合结构域的轻链可变区, L2 表示连接子, VL2 表示特异性结合 HER2 胞外区的 D1 的第二抗原结合结构域的轻链可变区, CL 是 IgG 轻链恒定区。

在一些实施方案中, 所述 VH1 包含如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1 氨基酸序列, 如 SEQ ID NO: 24、29、30、或 31 所示的 HCDR2 氨基酸序列和如 SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3 氨基酸序列, 或分别与所述的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; L1 包含如 SEQ ID NO: 229 所示的连接子氨基酸序列; VH2 包含如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1 氨基酸序列, 如 SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2 氨基酸序列和如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3 氨基酸序列, 或分别与所述的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; Fc 包含工程化的 Fc 结构域, 包括具有 L234F/L235E/P331S (EU 编号系统) 氨基酸取代的人 IgG1 Fc, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 232 所示。

在一些具体实施方案中, 所述 VH1 包含如 SEQ ID NO: 73、78、79、或 80 所示的 VH 氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 所述 VH2 包含如 SEQ ID NO: 169 所示的 VH 氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述 VL1 包含如 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1 氨基酸序列, 如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2 氨基酸序列和如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与所述的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; L2 包含如 SEQ ID NO: 230 所示的连接子氨基酸序列; VL2 包含如 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1 氨基酸序列, 如 SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR2 氨基酸序列和如 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与所述的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; CL 选自人 κ 恒定区或人 λ 恒定区, 优选人 κ 恒定区 (如 SEQ ID NO: 233 所示的氨基酸序列)。

在一些具体实施方案中, 所述 VL1 包含如 SEQ ID NO: 92 所示的 VL 氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 所述 VL2 包含如 SEQ ID NO: 193 所示的 VL 氨基酸序列, 或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨

基酸序列。

本发明的抗 HER2 互补性双特异性抗体能够特异性地同时结合 HER2 胞外区的两个不同表位，因此可以有效交联细胞表面的 HER2 而形成抗原-抗体交联聚集体或簇，进而诱发细胞内吞并促进内化的簇被转运至溶酶体并在溶酶体内降解。由此，所述互补性双特异性抗体能够显著下调细胞表面 HER2 的表达量，降低 HER2 的二聚化，以致抑制 HER2 过表达的肿瘤细胞的增殖。并且，本发明的抗 HER2 互补性双特异性抗体不干扰 HER2 介导的信号传导通路，因此其不会干扰正常组织/细胞的 HER2 的正常生物学功能。

3、抗 HER2 互补性双特异抗体-药物偶联物（ADC）

本发明进一步提供了抗 HER2 互补性双特异 ADC，所述互补性双特异 ADC 包含小分子毒素化合物通过可裂解接头偶联至本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体，其具有以下一种或多种功能特性：

(i) 所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 为四价分子，能够特异性地结合肿瘤细胞表面 HER2 的两个非重叠表位，因此可以有效地交联 HER2 并在肿瘤细胞膜上形成交联聚集体或簇。一方面，簇的形成导致其被细胞快速且高效地内吞，而且内吞后的胞内转运途径由通常的再循环（Recycling）改变为溶酶体转运（Lysosomal Trafficking），结果显著提高了所述 ADC 转运进入溶酶体的效率，从而在溶酶体内降解后能够释放出更多的小分子毒素化合物至细胞质中。因此，所述互补性双特异 ADC 具有更强的靶向细胞毒性，表现为在 HER2 过表达的肿瘤细胞（IHC 3⁺、或 IHC 2⁺/FISH⁺）中具有比现有的 HER2 靶向药物（例如，Trastuzumab、Pertuzumab、T-DM1、DS-8201）更强的杀伤活性，并且在 HER2 低表达的肿瘤细胞（IHC 2⁺/FISH、或 IHC 1⁺）中也能发挥直接杀伤作用，具有拓展 HER2 靶向治疗适应症范围的潜力；另一方面，释放的小分子毒素化合物是疏水性的，具有细胞膜通透性，因此可以被扩散入肿瘤微环境中发挥旁观者效应（Bystander Effect），即杀伤邻近的表达更低水平或者不表达 HER2 的肿瘤细胞。总之，所述互补性双特异 ADC 相较于普通 ADC 具有更加广谱的肿瘤细胞杀伤活性，更加难以产生耐药性。

(ii) 所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 对 Trastuzumab、Pertuzumab、T-DM1 和 DS-8201 产生耐药性或复发的肿瘤具有杀伤作用，因此能够破解现有 HER2 靶向药物的耐药性问题。

(iii) 所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 不影响 HER2 的二聚化及其介导的信号转导通路的调控，因此不会干扰心肌细胞中 HER2 的正常生物学功能，由此极大地降低了引发心脏毒副作用的可能性。

(iv) 所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 具有显著降低了的 Fc 受体结合亲和力，因此具有极低的 Fc 受体介导的安全性风险。

所述 ADC 可以由式（I）表示：

Ab-(L-D)_p (I)

其中 Ab 表示本发明所述的抗 HER2 互补性双特异抗体；

D 表示小分子毒素化合物（Drug）；

L 表示将 Ab 偶联至 D 的可裂解接头（Cleavable Linker）；以及

p 表示偶联至 Ab 上的（L-D）的拷贝数，为 2 至 8。

所述 ADC 中 Ab 为本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体，其包含第一和第二抗原结合结构域，其中所述第一抗原结合结构域包含表 2 所示的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的 VH 和 VL，能够特异性地结合 HER2 胞外区的 D3，且为 Fv 结构域；所述第二抗原结合结构域包含表 3 所示的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段的 VH 和 VL，能够特异性地结合 HER2 胞外区的 D1，且为 Fab 结构域或 IgG 结构域。

在一些实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 的第一抗原结合结构域包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 和 VL 包含：(i) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1；(ii) 如 SEQ ID NO: 24、29、30、或 31 所示的 HCDR2；(iii) 如 SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3；(iv) 如 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1；(v) 如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2；以及 (vi) 如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；或分别与所述的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 相同的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 的第二抗原结合结构域包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 和 VL 包含：(i) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1；(ii) 如 SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2；(iii) 如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3；(iv) 如 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1；

(v) 如 SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR2；以及 (vi) 如 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3；或分别与所述的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

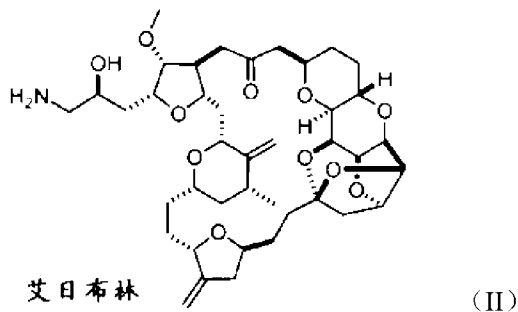
在一些实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 的第一抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO: 73、78、79、或 80 所示的 VH，或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列；和/或如 SEQ ID NO: 92 所示的 VL，或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中,所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 的第二抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO: 169 所示的 VH, 或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列; 和/或如 SEQ ID NO: 193 所示的 VL, 或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

所述 ADC 中的 D 是小分子毒素化合物, 当其不缀合于本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体时对肿瘤细胞和正常细胞均具有细胞毒性或细胞生长抑制作用, 但所述小分子毒素化合物在缀合形成 ADC 后, 只有当 ADC 内化和转运入表达 HER2 的靶细胞溶酶体内, 并通过酶促作用、水解、氧化或任何其它机制从所述 ADC 解离出来后, 所述小分子毒素化合物才具有细胞毒性和/或旁观者杀伤效应。所述小分子毒素化合物包括细胞毒素和化疗药物。

在一些实施方案中, 所述细胞毒素包括微管蛋白抑制剂和 DNA 损伤剂, 所述微管蛋白抑制剂包括艾日布林 (Eribulin)、奥瑞他汀 (Auristatins) 类衍生物 (例如, MMAE、MMAF、MMAD)、Tubulysins、Cryptomycins 和美登素 (Maytansinoids) 类衍生物 (例如, DM1、DM2、DM3、DM4), 所述的 DNA 损伤剂包括拓扑异构酶抑制剂 (例如, 喜树碱类衍生物 SN-38、依沙替康 [Exatecan] 和 DXd)、吡咯并苯并二氮杂卓 (PBD)、和卡奇霉素 (Calicheamicin) 及其衍生物 (例如 N-乙酰基卡奇霉素 [CMC])、倍癌霉素 (Duocarmycin), 优选的小分子毒素化合物是艾日布林。

艾日布林的分子结构如式 (II) 所示:



术语“艾日布林”是指软海绵素 B 的合成类似物, 软海绵素 B 是从海洋海绵冈田软海绵 (Halichondria okadae) 中分离出来的大环化合物。艾日布林作为微管动力学抑制剂, 通过与微管蛋白结合而抑制有丝分裂纺锤体的形成使得细胞分裂周期停滞于 G2/M 期。示例性艾日布林或其类似物的结构及其合成的方法描述于 WO1999065894、WO2004034990、ZL201910197071.8、和/或 ZL201910509222.9 中, 以引用的方式将其公开内容并入本文中。

在一些实施方式中, 小分子毒素化合物为艾日布林, 其具有临床治疗窗口大, 且脱靶细胞毒性低的特点。

在一些实施方案中, 所述化疗药物可以是天然的或合成的化合物, 包括但不限于烷基化剂以及具有烷基化形式的其他化合物 (例如, 氮芥、亚乙基亚胺化合物、烷基磺酸盐、亚硝基脲、顺铂、达卡巴嗪)、抗代谢物 (例如, 叶酸、嘌呤或嘧啶拮抗剂)、有丝分裂抑制剂 (例如, 长春花生物碱和鬼臼毒素的衍生物)、细胞毒性抗生素 (例如, 蒽环类抗生物包括柔红霉素和阿霉素, 以及放线菌素、博来霉素)。

所述可裂解接头在表达 HER2 的肿瘤细胞外是稳定的, 使得本发明的 ADC 在体外或血液循环中保持结构稳定, 不会因小分子毒素化合物的非靶向或随机释放而导致系统性毒性 (脱靶效应), 同时, 在内吞进入表达 HER2 的肿瘤细胞后能够快速进入溶酶体降解并释放出小分子毒素化合物以杀伤肿瘤细胞。所述可裂解接头是指包含可裂解部分的任何接头。如本文所用, 术语“可裂解部分”是指可裂解的任何化学键, 例如, 本领域中众所周知的, 包括但不限于, 对酸不稳定的键、对蛋白酶/肽酶不稳定的键、对光不稳定的键、对酯酶不稳定的键、以及二硫键。包含可裂解部分的接头可以允许小分子毒素化合物经由接头中的特定定位点裂解而从 ADC 中解离出来。

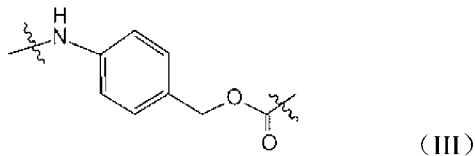
在一些实施方案中, 所述可裂解接头包含可裂解肽部分, 所述可裂解肽部分由细胞内蛋白酶 (例如, 内体 [Endosome] 蛋白酶、溶酶体蛋白酶或肿瘤相关蛋白酶) 裂解后, 即可从 ADC 解离出小分子毒素化合物以杀死肿瘤细胞。在一些实施方式中, 所述可裂解肽部分包含氨基酸单元, 可以由溶酶体半胱氨酸组织蛋白酶 (例如组织蛋白酶 B、C、F、H、K、L、O、S、V、X、或 W) 裂解。所述氨基酸单元可以包含天然存在的氨基酸残基和/或非天然存在的氨基酸类似物, 例如瓜氨酸 (Citrulline, 简称 Cit)。在一些实施例中, 所述氨基酸单元包含二肽、三肽、或四肽, 例如, 可以由组织蛋白酶 B 裂解的 Phe-Lys、Val-Cit (VC)、Glu-Val-Cit、或 Gly-Gly-Phe-Gly (GGFG) 氨基酸序列, 优选的氨基酸单元包括 VC 和 GGFG。

在一些实施方案中, 所述可裂解接头可以包含至少一种将小分子毒素化合物 (D) 偶联至本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体 (Ab) 的间隔区 (Spacer), 所述间隔区包含与抗体缀合的间隔区, 和/或与小分

子化合物缀合的第二间隔区。

在一些实施方式中,所述与抗体缀合的间隔区可以是亲水性的,以增加 ADC 的亲水性而改善其稳定性、减少 ADC 产物聚集和降低免疫原性,示例性的间隔区包含一个或多个聚乙二醇(PEG),例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、或 6 个 PEG,优选 2 个 PEG。在一些实施例中,所述间隔区经由顺丁烯二酰亚胺(Mal)附接于抗体,其中,经由 Mal 附接于抗体的间隔区在本文中又可称为“Mal-间隔区”。在一些实施例中,所述 Mal-间隔区包含一个或多个 PEG 部分(例如 2 个 PEG)。

在一些实施方式中,所述与小分子化合物缀合的第二间隔区用于将可裂解接头的可裂解部分(例如可裂解肽)附接于小分子化合物。在一些实施例中,所述与小分子化合物缀合的第二间隔区具有自焚碎裂(Self-immolation)的特性,有利于小分子化合物在靶细胞内被完整释放,即在靶细胞内释放出的小分子化合物不带有与其缀合的间隔区部分或其它修饰性基团,使得释放的小分子化合物不因带有修饰性基团而影响其抗肿瘤活性。在一些实施例中,所述自焚碎裂间隔区包含对氨基苯甲基单元,对氨基苯甲醇(PABOH)经由酰胺键缀合于可裂解接头的可裂解部分(例如,可裂解肽的氨基酸单元),且在 PABOH 与小分子化合物之间形成氨基甲酸酯基、甲基氨基甲酸酯基或碳酸酯基(Hamann 等, Expert Opinion on Therapeutic Patents 2005, 15:1087-1103)。进一步,所述自焚碎裂间隔区包含式(III)所示的对氨基苯甲基羰基(PAB),PAB 的自焚碎裂涉及自发的 1,6-消去反应(Jain 等, Pharm Res 2015, 32:3526-3540):



在一些实施方案中,所述可裂解接头包含 Mal-间隔区和可裂解肽部分。在一些实施方式中,所述间隔区包含 PEG 部分(例如 2 个 PEG),所述可裂解肽部分包含氨基酸单元(例如,二肽 VC 和四肽 GGFG)。在一些实施方案中,所述可裂解接头包含共价连接的 Mal-间隔区-氨基酸单元,其中,所述氨基酸单元为 Phe-Lys、VC、Glu-Val-Cit 或 GGFG。在一些实施方案中,所述可裂解接头包含共价连接的 Mal-间隔区-氨基酸单元-PAB,其中,所述氨基酸单元为 Phe-Lys、VC、Glu-Val-Cit、或 GGFG。在一些实施例中,所述间隔区为(PEG)_m, m 为 1-5 的整数,优选 2。在一些实施例中,所述可裂解接头包含 Mal-(PEG)₂ 和 VC。在一些实施例中,所述可裂解接头包含 Mal-(PEG)₂ 和 GGFG。

在一些实施方式中,所述可裂解接头包含结构: Mal-间隔区-可裂解肽部分。在一些实施例中,所述可裂解接头包含结构: Mal-(PEG)₂-VC 和 Mal-(PEG)₂-GGFG。

在一些实施方案中,所述可裂解接头包含 Mal-间隔区、可裂解肽部分和第二间隔区。在一些实施例中,所述间隔区包含 PEG 部分(例如 2 个 PEG),所述可裂解肽部分包含氨基酸单元(例如,二肽 VC),所述第二间隔区是自焚碎裂的(例如, PAB)。在一些实施例中,所述可裂解接头包含 Mal-(PEG)₂、VC 和 PAB。

在一些实施方式中,所述可裂解接头包含结构: Mal-间隔区-可裂解肽部分-第二间隔区。在一些实施例中,所述可裂解接头包含结构: Mal-(PEG)₂-VC-PAB。

在一些实施方案中,所述可裂解接头的 Mal-间隔区与本发明 ADC 中的抗体部分的一个或多个氨基酸残基偶联,例如, Mal-间隔区可通过硫醇基团偶联至抗体,包括偶联至抗体的一个或多个半胱氨酸的巯基。在一些实施方式中,所述 Mal-间隔区的顺丁烯二酰亚胺基与所述抗体的半胱氨酸残基的巯基反应,从而使 Mal-间隔区与抗体缀合。在一些实施方案中,所述 Mal-间隔区的顺丁烯二酰亚胺基可以与所述抗体的恒定区和/或可变区中特定位置处的半胱氨酸残基的巯基反应,进一步,所述 Mal-间隔区的顺丁烯二酰亚胺基可以与所述抗体较链区的二硫键和/或链间二硫键经还原后释放出来的游离半胱氨酸残基偶联。在一些实施例中,所述 Mal-间隔区的顺丁烯二酰亚胺基与所述抗体较链区的半胱氨酸残基偶联,可以将抗体较链区的链间二硫键通过化学反应(例如,还原、pH 调节或水解)产生多个游离的半胱氨酸残基,也可以将抗体恒定区的一个或多个特定位点的氨基酸残基通过 DNA 重组技术(例如通过以半胱氨酸残基取代或插入的方式)而产生工程化半胱氨酸残基。

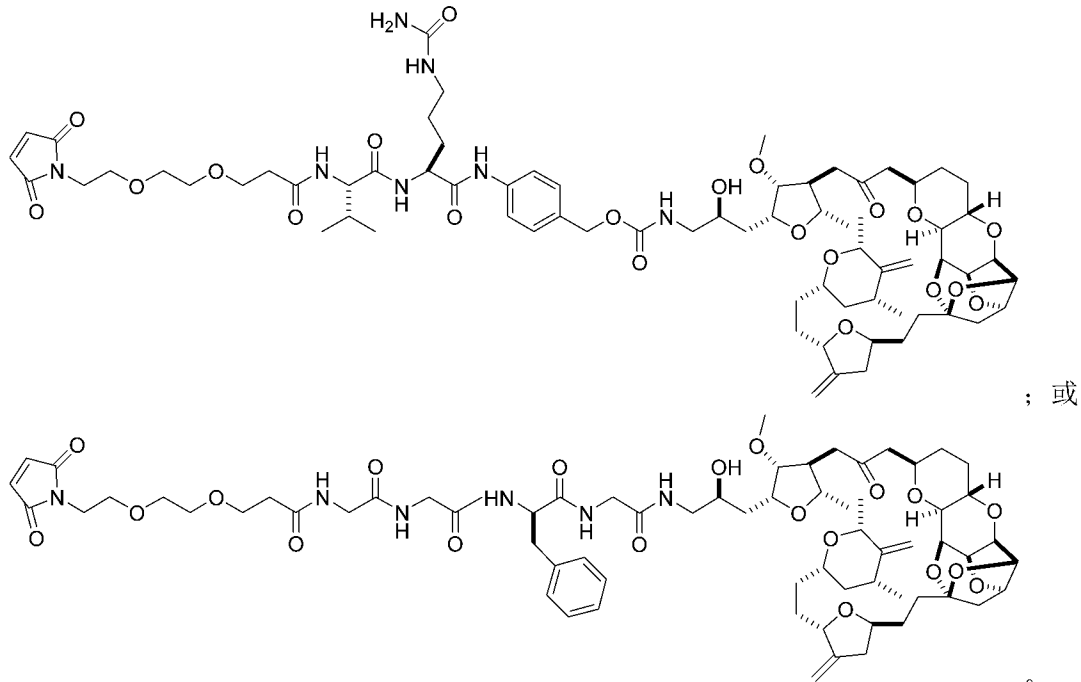
在一些实施方案中,所述可裂解接头的第二间隔区与小分子化合物偶联,所述小分子化合物是艾日布林或其衍生物。在一些实施方式中,所述第二间隔区将可裂解接头中的可裂解肽部分偶联至艾日布林的 C-35 胺,所述第二间隔区是自焚碎裂的(例如, PAB),所述可裂解肽部分包含 VC,自焚碎裂间隔区在可裂解肽部分经酶解后自发进行自焚碎裂,导致艾日布林以天然活性形式从 ADC 中释放。在一些实施例中,自焚碎裂间隔区是 PAB,将可裂解肽部分 VC 缀合于艾日布林的 C-35 胺,以构建为包含 Mal-(PEG)₂-VC-PAB-Eribulin 结构的 ADC。

在一些实施方案中,所述可裂解接头的可裂解部分(例如可裂解多肽)可以直接缀合于所述 ADC 的小分子毒素化合物部分,所述小分子毒素化合物是艾日布林或其衍生物。在一些实施方式中,所述可裂解

多肽包括氨基酸单元,所述氨基酸单元包含 GGFG,该四肽通过羧基与艾日布林的 C-35 胺缀合,以构建为包含 Mal-(PEG)₂-GGFG-Eribulin 结构的 ADC。采用可裂解接头中的 GGFG 四肽直接与艾日布林缀合的方式,同样可以保证所述 ADC 的可裂解接头在靶细胞内经裂解后能够完整地释放出具有天然活性形式的艾日布林,使其发挥靶向杀伤肿瘤细胞的作用和/或旁观者效应。

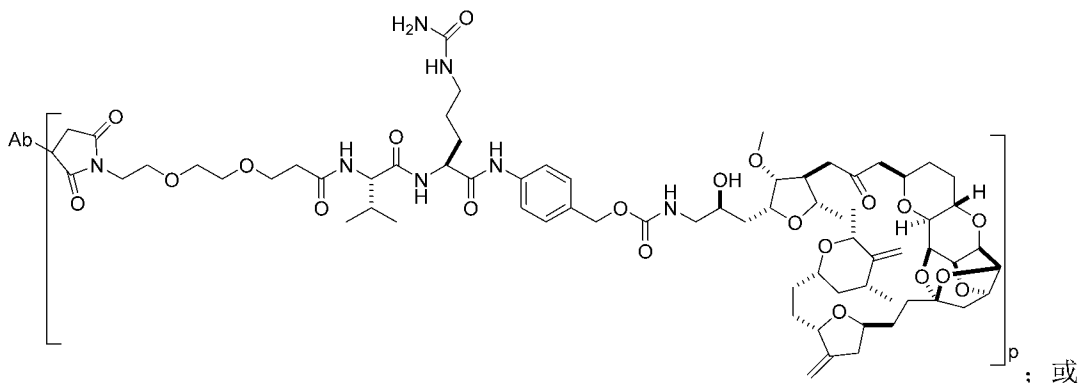
在一些实施方案中,本发明的 ADC 结构包括本发明所述的抗 HER2 互补性双特异抗体通过可裂解接头缀合于艾日布林或其衍生物,所述可裂解接头包含 Mal-间隔区、可裂解肽部分和/或第二间隔区。在一些实施方式中,所述 ADC 结构包含本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体通过可裂解接头与艾日布林的 C-35 胺缀合,所述可裂解接头包含 Mal-(PEG)₂-VC-PAB 或 Mal-(PEG)₂-GGFG,所述抗体铰链区的二硫键和/或链间二硫键经还原后释放出来的游离半胱氨酸残基与所述可裂解接头的 Mal 缀合。

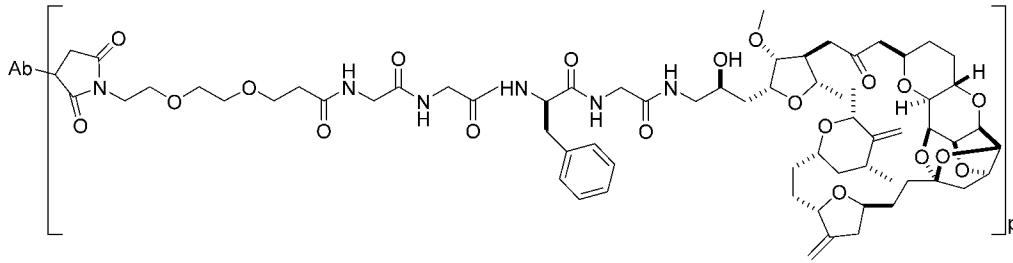
在一些实施方式中,本发明所述的 ADC 包含如下部分:



在一些实施方案中,本发明的 ADC 包括本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体与药物有效载荷(Payload)偶联,所述药物有效载荷包括 Mal-(PEG)₂-VC-PAB-Eribulin 和 Mal-(PEG)₂-GGFG-Eribulin。在一些实施方式中,所述 ADC 包含本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体通过其半胱氨酸残基与药物有效载荷的 Mal 缀合,进一步,所述互补性双特异抗体铰链区的二硫键和/或链间二硫键经还原后释放出来的游离半胱氨酸残基与所述药物有效载荷的 Mal 缀合。

在一些实施方案中,本发明提供了具有下式的 ADC:





其中，Ab 表示本发明所述的抗 HER2 互补性双特异抗体，p 为 2 至 8。

所述式 (1) 中的 p 在本文中也称为药物与抗体比率 (Drug-to-Antibody Ratio, 简称 DAR) 或有效载荷分子的数量，即抗体所偶联的小分子化合物的个数，所述 p 为 2 至 8，例如，4 至 8。本发明所述的 ADC 所包含的抗 HER2 互补性双特异抗体通过可裂解接头与艾日布林缀合的 DAR 值具有合乎需要的特性，即所述 ADC 不仅具有足够的杀伤活性，而且具有足够的稳定性。一般而言，较高的 DAR 值 (例如， $p > 8$) 可能会因为小分子毒素化合物的强疏水性而使得 ADC 在水相环境中因疏水作用而发生聚集和沉淀，甚至会在体内引发安全性风险；较低的 DAR 值 (例如， $p < 2$) 可能会导致 ADC 对肿瘤细胞的杀伤活性较低而影响疗效。在一些实施方案中，最佳 DAR 值约为 4 至 8。本发明的抗 HER2 互补性双特异 ADC 的平均 DAR 值 (即平均有效载荷分子数或平均 p) 可以利用本领域中已知的常规分析方法 (例如，反相 LC-MS 质谱分析和/或 HIC-HPLC) 的结果通过计算来获得。

4、制备本发明所述抗体的方法

4.1 多核苷酸、载体和宿主细胞

一方面，本发明提供了一种编码抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体的核酸。本发明还包括编码本文所述氨基酸序列的多核苷酸变异体。

对应于本发明所述的氨基酸序列、用作核酸分离的探针或引物或者数据库提供可查询的核苷酸序列可以通过氨基酸序列回译来获得。聚合酶链反应 (PCR) 程序可以用以分离和扩增编码本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、抗 HER2 互补性双特异抗体的 DNA 序列。界定 DNA 片段组合的所需末端的寡核苷酸用作 5' 和 3' 引物。寡核苷酸可以另外含有限制内切核酸酶的识别位点，以促进扩增 DNA 片段组合插入表达载体中。PCR 技术参见于 Saiki 等, Science 1988, 239:487-491; Wu 等编著, Recombinant DNA Methodology, 1989 Academic Press, 第 189-196 页; Innis 等编著, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990 Academic Press。

本发明的核酸分子包括单股和双股形式 DNA 和 RNA，以及对应的互补序列，包括分离的核酸分子，优选来源于至少一次呈基本上纯的形式分离并且数量或浓度能够通过标准生物化学法鉴别、操作和回收其组分核苷酸序列的 DNA 或 RNA (例如 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory 中所述的方法)。优选地，此类序列包括以不常存在于真核基因中的内部非翻译序列或内含子中断的开放阅读框的形式所提供和/或构建。非翻译 DNA 的序列可以存在于开放阅读框的 5' 或 3'，其中所述序列不干扰编码区的操控或表达。

本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体通过以下步骤来制备：使用 PCR 诱变或本领域一般技术人员已知的其它技术对编码抗 HER2 抗体或其抗原结合片段或抗 HER2 互补性双特异抗体的 DNA 中的核苷酸进行位点特异性诱变以产生编码变异体的 DNA，此后在如本文中概述的细胞培养物中表达重组 DNA。此外，抗 HER2 抗体或其抗原结合片段和抗 HER2 互补性双特异抗体也可以通过使用已建立的技术体外合成来制备。

如本领域技术人员所已知的，由于遗传密码的简并，本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段或抗 HER2 互补性双特异抗体由极其大量的核酸进行编码，每个部分的核酸都在本发明的范围内并且可以使用标准技术制成。因此，鉴别了特定的氨基酸序列，本领域的技术人员可以通过以不改变本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体氨基酸序列的方式来简单对其各自的编码序列进行一个或多个以上密码子修饰以制备许多不同的核酸。

另一方面，本发明还提供了编码本文的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体的核酸的表达载体。

可以将编码本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体的核酸构建在合适的载体中，以导入宿主细胞进行目的蛋白的表达。载体组分通常包括但不限于以下一种或多种：信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。载体中编码目标蛋白的核酸与启动子可操作地连接。

如本文所使用的，术语“可操作地连接”是指核酸表达控制序列 (例如，启动子、信号序列或转录调节因子结合位点的阵列) 与另一个核酸序列之间的功能性连接，并因此该控制序列控制其他核酸序列的转

录和/或翻译。

合适的载体包括质粒、噬菌粒、柯斯质粒、人工染色体如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 衍生的人工染色体 (PAC)、噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体, 以及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录病毒 (包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒 (如 SV40)。载体可含有多种控制表达的元件, 包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外, 载体还可含有复制起始位点。载体还可包括协助其进入细胞的成分, 包括但不限于病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳。

另一方面, 本发明还提供了包含编码本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体的核酸或表达载体的宿主细胞。

该细胞可以是真核细胞, 例如, 哺乳动物宿主细胞, 包括但不限于, SV40 转化的猴肾细胞 CV1 系 (COS-7, ATCC, CRL-1651)、人胚胎肾细胞系 (293 或悬浮培养的 293 细胞亚克隆, Graham 等, J Gen Virol 1977, 36:59-74)、幼地鼠肾细胞 (BHK-21, ATCC, CCL-10)、中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub 等, Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77:4216-4220)、小鼠睾丸支持细胞 (TM4, Mather, Biol Reprod 1980, 23:243-251)、猴肾细胞 (CV1, ATCC, CCL-70)、非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC, CRL-1587)、人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC, CCL-2)、犬肾细胞 (MDCK, ATCC, CCL-34)、布法罗大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC, CRL-1442)、人肺细胞 (W138, ATCC, CCL-75)、人肝癌细胞系 (HepG2, ATCC, HB-8065)、小鼠乳腺癌瘤 (MMT060562, ATCC, CCL-51)、TRI 细胞 (Mather 等, Ann NY Acad Sci 1982, 383:44-68)、MRC5 细胞、或 FS4 细胞。

4.2 本发明的抗 HER2 抗体的筛选

本发明提供的抗 HER2 抗体可以是鼠源抗体, 也可以是嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。产生单克隆抗体的方法是本领域已知的, 任何一种已知的方法 (例如, 杂交瘤技术、噬菌体展示技术、单淋巴细胞基因克隆技术等) 均可用于本发明中, 以制备特异性结合 HER2 的单克隆抗体。

在一些实施方式中, 可选择 HER2 氨基酸序列中任意片段的多肽 (优选 HER2 胞外区) 作为目的抗原免疫小鼠, 并从小鼠成熟 B 细胞中扩增获得抗体可变区基因, 通过噬菌体展示技术将小鼠抗体可变区展示在噬菌体表面, 构建噬菌体展示文库, 并通过特定靶分子 (例如, 用于免疫小鼠的目的抗原) 进行淘选, 检测噬菌体表面所展示的抗体可变区与所述靶抗原的相互作用, 通过体外选择的方法筛选并扩增抗体可变区文库, 所述体外选择类似于天然选择。

在一些实施方案中, 本发明通过构建噬菌体展示文库并针对目的抗原进行淘选 (Panning), 从抗体文库中筛选出识别目的抗原的抗体。可利用多种本领域已知的噬菌体展示方法来产生本发明的抗体, 例如, US5223409、US5622699 和 US6068829 公开了用于制备噬菌体文库的方法。也可根据 “Antibody Phage Display: Methods and Protocols (O'Brien 和 Aitken 编辑)” 中所描述的方法来构建噬菌体展示文库。在一些实施方式中, 可以将编码抗体可变区的核酸插入至噬菌体外壳蛋白基因中, 使得噬菌体将该抗体可变区展示在其表面, 同时, 在噬菌体内部含有编码该抗体可变区的核酸, 从而实现抗体可变区表型和基因型之间的联系。

关于抗体 (或单链抗体) 的筛选, 在噬菌体展示中, 抗体 (或单链抗体) 的 VH 和/或 VL 区的较大文库可在丝状噬菌体颗粒的表面上表达, 由此使其配对形成结合域。可根据与目的抗原识别和结合及其所展示的结合域, 从文库中筛选出噬菌体。

在一些实施方式中, 所述淘选可以通过噬菌体感染宿主细菌并在所述宿主中繁殖扩增来实现。由宿主细菌分泌的表面展示有单链抗体片段的噬菌体经收集后, 可按需要进行多轮次的淘选直至得到能够选择性或特异性结合靶抗原的噬菌体, 最后通过对噬菌体基因组中的抗体基因进行测序来获得抗体可变区的氨基酸序列 (Arap 等, Science 1998, 279:377-380; Smith 等, Science 1985, 228:1315-1317)。

在特定的实施方式中, 本发明利用 HER2 胞外区重组蛋白作为目的抗原免疫小鼠, 从经免疫的小鼠脾脏组织中得到抗体重链可变区族和轻链可变区族基因片段, 基于此制得 scFv 片段, 并连接在噬菌体表面结构蛋白基因 III 上, 利用共表达方式, 使之参与噬菌体组装并展示在噬菌体表面, 由此构建获得噬菌体展示文库。利用噬菌体展示文库, 针对特定靶抗原 (例如, 用于免疫小鼠的抗原), 通过多轮吸附-洗脱-扩增的重复过程 (淘选), 可富集能特异性结合靶抗原的噬菌体, 再通过基因测序技术得到相应的 DNA 序列信息, 进而推断抗体可变区的氨基酸序列。

5、制备方法

5.1 抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体的制备方法

本发明提供了使用所述宿主细胞制备本发明所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体的方法。

所述方法包括将编码本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体的核酸或表达载体转染到宿主细胞中, 并在培养基中培养宿主细胞一段时间以表达本发明的抗 HER2 抗体或其抗

原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体。不受限制地，商业上可获得的培养基可以用作细胞培养基。

优选地，表达的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体可分泌到培养宿主细胞生长的培养基中。使用常规蛋白质纯化的方法从培养基中回收抗体，例如通过离心或超滤除去杂质，或通过亲和色谱法纯化所得物；还可以使用其他纯化技术，例如阴离子或阳离子交换色谱法、疏水相互作用色谱法和羟基磷灰石色谱法。

5.2 抗 HER2 互补性双特异 ADC 的制备方法

本发明的 ADC 可通过本领域已知的任何方法制备得到，所述方法包括但不限于：（1）抗体的亲核基团或亲电子基团与可裂解接头反应，经由共价键形成抗体-可裂解接头中间产物（Ab-L），再与小分子毒素化合物（D）的反应，所述中间产物 Ab-L 在与小分子毒素化合物反应之前可以经由纯化步骤，也可以不经由纯化步骤；（2）小分子毒素化合物的亲核基团或亲电子基团与可裂解接头反应，经由共价键形成小分子毒素化合物-可裂解接头中间产物（D-L），再与抗体的亲核基团或亲电子基团的反应，所述中间产物 D-L 在与抗体反应之前可以经由纯化步骤，也可以不经由纯化步骤；或（3）可以将抗体、可裂解接头和小分子毒素化合物混合反应，使得抗体与可裂解接头之间以及可裂解接头与小分子毒素化合物之间同时形成共价键，制备为本发明的 ADC。在本领域中已知制备 ADC 的方法的几个具体实例，如 US8624003（一锅法）、US8163888（一步法）和 US5208020（两步法）所描述的。

在一些实施方案中，所述抗体在进行缀合反应前置于还原条件，以产生一个或多个游离的半胱氨酸残基。在一些实施方式中，使用还原剂（例如，二硫苏糖醇[DDT]、2-巯基乙醇或三(2-羧乙基)膦[TCEP]）与抗体作用还原抗体铰链区的链间二硫键，以产生部分或完全还原的具有游离巯基的抗体。所述还原剂优先还原抗体铰链区的链间二硫键，而抗体的链内二硫键保持完整。在一些实施例中，在含有螯合剂的缓冲液中，使用还原剂 TCEP 与抗体反应，可得到部分或完全还原的具有游离巯基的抗体。所述螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸（EDTA）、二亚乙基三胺五乙酸（DTPA），所述缓冲液包括但不限于组氨酸-盐酸、磷酸钠、硼酸钠、乙酸钠溶液。

在一些实施方案中，上述得到的部分或完全还原的具有游离巯基的抗体可以与可裂解接头（L）或小分子毒素化合物-可裂解接头中间产物（D-L）的反应官能团（例如，顺丁烯二酰亚胺基）反应形成共价键（例如，硫醚键），以得到抗体-可裂解接头中间产物（Ab-L）或 ADC。在本文中，所述的小分子毒素化合物-可裂解接头中间产物（D-L）与所述的药物有效载荷（Payload）互换使用。

上述方法制备得到的 ADC 的纯化方法可以是本领域中已知的用于纯化蛋白质的任何生物化学方法或其任何方法组合，包括但不限于亲和色谱法、离子交换色谱法、混合模式色谱法（例如，陶瓷羟基磷灰石层析）、疏水作用色谱法、空间排阻色谱法、渗析法、过滤法、选择性沉淀法或其任何组合。

6、药物组合物

本发明提供了药物组合物，该组合物包含本发明所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、抗 HER2 互补性双特异抗体、或抗 HER2 互补性双特异 ADC，以及药学上可接受的载体。

所述药物组合物可以包含任何种类的药学上可接受的载体。可以使用的载体包括赋形剂、表面活性剂、增稠剂或乳化剂、固体粘合剂、分散或悬浮助剂、增溶剂、着色剂、调味剂、包衣剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、防腐剂、等渗剂或其组合。例如，以下著作教导了选择和使用合适的载体：Gennaro 编著，Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 2003 第 20 版（Lippincott Williams & Wilkins），以引用的方式将其公开内容并入本文。

优选地，药物组合物适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮给药。如本发明所使用的“肠胃外给药”是指非肠内和局部的给药方式，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包膜下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。或者，本发明的抗体还可以通过非肠胃外途径（例如，局部、表皮或粘膜给予途径）给药，例如，鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部给药。鉴于不同的给药途径，可以将活性成分包被在材料中以保护其免受酸/碱和可能使其失活的其它自然条件的作用。

药物组合物可以是无菌水性溶液或分散剂。它们也能够形成微乳液、脂质体、或其它适合于高药物浓度的有序结构组合形式。

可以与载体材料组合以形成单一剂型的活性成分的量是依据受试者和特定的给药方式所确定的，并且通常也是能够产生治疗效果的组合物的量。通常，与药学上可接受的载体形成的组合物包含约 0.01% 至约 99% 的活性成分，优选约 0.1% 至约 70%、最优选约 1% 至约 30% 的活性成分。

调整剂量方案以提供最佳的预期应答（例如治疗应答）。例如，可以单次给药，可以分数次给药，或者可以根据治疗情况按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠胃外给药的组合物是特别有利的，使给药方便和给药剂量均匀。如本发明所使用的，剂量单位形式是指物理上离散的单位，其适合作为治疗受试者的单位剂量；每个单位剂量包含预定量的活性成分，所述活性成分的预定量是通过计算活性成分与所

需的药物载体一起施用产生预期治疗效果而得到的。另外，本发明的抗 HER2 抗体、抗 HER2 互补性双特异抗体、或抗 HER2 互补性双特异 ADC 也可以作为缓释制剂给药，这样可减少给药频率。

本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、抗 HER2 互补性双特异抗体、或抗 HER2 互补性双特异 ADC，或包含抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、抗 HER2 互补性双特异抗体、或抗 HER2 互补性双特异 ADC 的组合物给药剂量的范围可为约 0.0001 mg/kg 至 100 mg/kg 体重，通常为 0.001 mg/kg 至 50 mg/kg 体重。

本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、抗 HER2 互补性双特异抗体、或抗 HER2 互补性双特异 ADC 的“治疗有效剂量”优选可使得疾病症状严重性降低、疾病症状无进展期的频率和持续时间增加、或预防由疾病困扰所造成的机体损伤或失能。例如，相对于未治疗的受试者，荷瘤受试者的“治疗有效剂量”优选抑制肿瘤生长至少约 20%、更优选至少约 40%、甚至更优选至少约 60%、还可以更优选至少约 80%。治疗性抗体或 ADC 的治疗有效量可以减少肿瘤的大小、或改善受试者的症状，所述受试者通常是人或其它哺乳动物。“治疗有效剂量”还可以根据各种因素而不同地确定，所述的各种因素包括但不限于配制方法、给药方法、年龄、身体、体重、患者的性别或病理状况、饮食、给药时间、给药间隔、给药途径、排泄率和反应敏感性。

药物组合物可以选择控释制剂，包括植入物、透皮贴剂和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。参见例如，Robinson 编著，Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, 1978 (Marcel Dekker)。

可以通过如下的医疗装置来传输治疗性药物组合物，所述医疗装置选自：(1) 无针皮下注射装置（例如，US5399163、US5383851、US5312335、US5064413、US4941880、US4790824 和 US4596556）；(2) 微型输注泵（US4487603）；(3) 透皮装置（US4486194）；(4) 输注设备（US4447233 和 US4447224）；以及 (5) 渗透装置（US4439196 和 US4475196）；以引用的方式将其公开内容并入本文。

在某些实施方案中，可以配制本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、抗 HER2 互补性双特异抗体、或抗 HER2 互补性双特异 ADC 以确保在体内的生物分布。例如，为了确保本发明的治疗性抗体或 ADC 穿过血脑屏障，可以将其配制成脂质体，所述脂质体可以另外包含靶向部分，以增强向特定细胞或器官的选择性递送。参见例如，US4522811、US5374548、US5416016 和 US5399331; Ranade, J Clin Pharmacol 1989, 29:685-694; Umezawa 等, Biochem Biophys Res Commun 1988, 153:1038-1044; Bloeman 等, FEBS Lett 1995, 357:140-144; Owais 等, Antimicrob Agents Chemother 1995, 39:180-184; Briscoe 等, Am J Physiol 1995, 268:L374-380; Schreier 等, J Biol Chem 1994, 269:9090-9098; Keinänen 和 Laukkanen, FEBS Lett 1994, 346:123-126; 以及 Killian 和 Fidler, Immunomethods 1994, 4:273-279。

7、药盒

本发明提供了一种药盒，其包含有效量的本发明的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异 ADC、或药物组合物，以及任选的至少一种另外的肿瘤治疗剂（即，所述药盒可包含或不包含至少一种另外的肿瘤治疗剂）。优选地，所述肿瘤治疗剂可包括但不限于 ErbB2/HER2 的另一种拮抗剂；EGFR 拮抗剂；HER3 拮抗剂；MET 拮抗剂，MET 的小分子抑制剂（例如 Capmatinib）；IGF1R 拮抗剂（例如，抗 IGF1R 抗体）；B-Raf 抑制剂（例如，维罗非尼、索拉非尼、GDC-0879、PLX-4720）；PDGFR- α 抑制剂（例如，抗 PDGFR- α 抗体）；PDGFR- β 抑制剂（例如，抗 PDGFR- β 抗体或小分子激酶抑制剂[例如，甲磺酸伊马替尼或苹果酸舒尼替尼]）；PDGF 配体抑制剂（例如，抗 PDGF-A 抗体、抗 PDGF-B 抗体、抗 PDGF-C 抗体或抗 PDGF-D 抗体、适体、siRNA 等）；VEGF 拮抗剂（例如，VEGF-Trap，比如阿柏西普）；抗 VEGF 抗体（例如，贝伐单抗）；VEGF 受体激酶抑制剂（例如，舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼）；DLL4 拮抗剂（例如，REGN421）；Ang2 拮抗剂（例如，WO2011014469 公开的抗 Ang2 抗体，比如 H1H685P）；FOLH1 拮抗剂（例如，抗 FOLH1 抗体）；STEAP1 或 STEAP2 拮抗剂；TMPRSS2 拮抗剂；MSLN 拮抗剂；MUC16 拮抗剂；CLEC12A 拮抗剂；PD-1 或 PD-L1 阻断剂（例如，Pembrolizumab 或 Nivolumab）；激素受体调节剂（例如，雌激素受体调节剂[比如他莫昔芬]；雄性激素受体调节剂）；芳香酶抑制剂（例如，来曲唑、阿那曲唑、依西美坦）；激酶抑制剂（例如，酪氨酸激酶抑制剂[比如拉帕替尼]）；细胞因子激动剂；细胞因子抑制剂（包括小分子细胞因子抑制剂和与细胞因子诸如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18 或其各自的受体结合的抗体）；化学治疗剂（包括但不限于微管破坏物、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA 嵌入剂、烷化剂）等。

在一些实施方案中，所述 ErbB2/HER2 的另一种拮抗剂包括抗 HER2 单克隆抗体（例如，Trastuzumab、Pertuzumab）和/或 ADC（例如，T-DM1、DS-8201），或抗 ErbB2/HER2 小分子抑制剂（例如，酪氨酸激酶抑制剂类的拉帕替尼、吡咯替尼和奈拉替尼等）；所述 EGFR 拮抗剂包括抗 EGFR 抗体（例如，西妥昔单抗、帕尼单抗）、抗 EGFR 小分子抑制剂（例如，Gefitinib、Erlotinib）、抗 EGFRvIII 拮抗剂（例如，抗 EGFRvIII 抗体）；所述 HER3 拮抗剂包括但不限于抗 HER3 抗体（例如，Patritumab）；所述 MET 拮

抗剂包括但不限于抗 MET 抗体（例如，奥那妥珠单抗、依玛妥珠单抗和 H4H14639D）。

8、治疗表达 HER2 的癌症的方法和用途

一方面，本发明涉及一种治疗表达 HER2 的癌症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本发明所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异 ADC、或发明药物组合物或药盒。或者，本发明涉及上述抗体、ADC、药物组合物或药盒在用于制备对表达 HER2 的癌症进行治疗的药物中的用途。或者，本申请涉及用于对表达 HER2 的癌症进行治疗的上述抗体、ADC、药物组合物或药盒。

所述癌症包括但不限于乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、食管癌、肺癌、头颈癌、黑色素瘤、胰腺癌、肝癌、胆管癌、肾癌、膀胱癌、甲状腺癌、前列腺癌、子宫内膜癌，所述癌症还包括各阶段的癌症，例如早期癌症、非转移性癌症、原发性癌症、晚期癌症、局部晚期癌症、转移性癌症或缓解中的癌症。所述癌症可以是 HER2 过表达或低表达的。所述的受试者可为人、非人灵长类动物或其它哺乳动物如狗、小鼠、大鼠。

如本领域已知的，表达 HER2 的癌症可以通过癌细胞表面的 HER2 表达量（即通过“HER2 状态”）来表征。HER2 的表达量可通过免疫组织化学法（IHC）、荧光原位杂交法（FISH）等方法进行评估。在一些实施方案中，所述癌症包括 HER2 过表达的癌症（例如，IHC 3⁺、或 IHC 2⁺/FISH⁺）、和/或 HER2 低表达的癌症（IHC 2⁺/FISH⁻、或 IHC 1⁺）。

在一些实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 或其药物组合物对 HER2 过表达的肿瘤/癌症和/或 HER2 低表达的肿瘤/癌症均具有杀伤作用。

在一些实施方案中，所述抗 HER2 互补性双特异抗体或其药物组合物对 HER2 过表达的肿瘤细胞的生长或增殖具有抑制活性。

在一些实施方案中，向有需要的受试者施用有效量的本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异 ADC、药物组合物、或药盒可以缩小所述受试者肿瘤体积、抑制肿瘤生长、延长受试者的无病生存期或无进展生存期、增加受试者的总生存期、减少肿瘤转移、或改善受试者生活质量。

另一方面，本发明还涉及一种治疗对现有 HER2 靶向治疗剂产生耐药性或复发的癌症的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异 ADC、药物组合物、或药盒。或者，本发明涉及所述抗体、ADC、药物组合物、或药盒在用于制备对 HER2 靶向治疗剂产生耐药性或复发的癌症进行治疗的药物中的用途。

在一些实施方案中，所述患者对一种或多种现有的 HER2 靶向治疗剂不响应或响应较差，所述 HER2 靶向治疗剂包括 Trastuzumab、Pertuzumab、T-DM1、DS-8201。所述不响应表现为患者的肿瘤生长、肿瘤体积增加、肿瘤转移形成或转移数目增加，不响应还可以是肿瘤转移发展或疾病进展时间缩短。所述响应较差是指患者在经历 HER2 靶向治疗剂的标准疗法过程中或之后的短时间内其肿瘤生长或转移。

再一方面，本发明还涉及一种治疗对不适合接受现有 HER2 靶向疗法或难治疗、或在接受现有 HER2 靶向疗法后产生耐药性或复发的患者的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异 ADC、药物组合物、或药盒。或者，本发明涉及所述抗体、ADC、药物组合物、或药盒在用于制备对不适合接受现有 HER2 靶向疗法或难治疗、或在接受现有 HER2 靶向疗法后产生耐药性或复发的患者进行治疗的药物中的用途。所述的 HER2 靶向疗法包括使用 Trastuzumab、Pertuzumab、T-DM1、或 DS-8201 进行治疗。

在一些实施方案中，当患者对现有的 HER2 靶向疗法已出现疾病进展时，本发明所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异 ADC、药物组合物、或药盒可用于治疗进展性癌症。

再一方面，本发明的抗 HER2 互补性双特异抗体、抗 HER2 互补性双特异 ADC、药物组合物、或药盒可单独使用，也可与本领域已知的其它类型的癌症疗法，例如，外科手术、化学疗法、放射疗法、基因疗法、免疫疗法、光动力疗法、射频消融等组合施用。

9、检测用途

本发明还涉及所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段或抗 HER2 互补性双特异抗体用于检测和/或测量样品中的 HER2 或表达 HER2 的肿瘤细胞的用途，以及用于筛选对本发明的抗 HER2 互补性双特异 ADC 治疗有响应的癌症患者的用途。或者，本申请涉及一种检测和/或测量样品中的 HER2 或表达 HER2 的肿瘤细胞的方法，以及筛选对上述 ADC 治疗有响应的癌症患者的方法，包括将所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体与所述样品或分离自所述患者的生物样本进行孵育，检测所述抗体是否结合至所述样品或生物样本。或者，本申请涉及用于检测和/或测量样品中的 HER2 或表达 HER2 的肿瘤细胞、或筛选对上述 ADC 治疗有响应的癌症患者的上述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体。

在一些实施方案中，所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或抗 HER2 互补性双特异抗体可以用于诊断 HER2 异常表达（例如，过表达、表达不足或表达缺乏）的病症或疾病，以利于确定治疗方案。例如，

可以将所述抗体与可检测标记物或报告分子偶联标记,并将所标记的抗体与从患者处获得的样品接触以诊断测定 HER2 表达情况。所述可检测标记物或报告分子可以是放射性同位素,例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、或 ^{125}I ; 荧光材料,例如,伞形酮、萤光素、罗丹明、异硫氰酸荧光素、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白; 化学发光材料,例如鲁米诺; 生物发光材料,例如,荧光素酶、荧光素或水母发光蛋白; 或酶,例如,碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、辣根过氧化物酶或萤光素酶。可以用于检测或测量样品中的 HER2 的具体示例性测定法包括酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、放射免疫测定法 (RIA)、免疫 PET (例如, ^{89}Zr 、 ^{64}Cu 等) 和荧光活化细胞流式分析法 (FACS)。

通过以下的实施例进一步阐释了本发明,其不应被解释为进一步限制。本发明全文中引用的所有附图和所有参考文献、专利和专利申请的内容以引用的方式明确地并入本文。除非另有说明,以下的实施例中涉及的材料、试剂和装置为可商购的。

实施例

实施例 1. 抗 HER2 免疫文库的构建以及抗体的筛选

1.1 抗 HER2 免疫文库的构建

利用人 HER2 胞外区重组蛋白 (序列源自 NP_004439.2 的第 23-652 位) 免疫 2 只 BALB/c 小鼠。小鼠经过 3 次免疫后,采血并利用 ELISA 检测免疫效价,结果显示免疫效价均达到 1:1,000,000 以上 (数据未显示)。对小鼠进行加强免疫,3 天后于无菌条件下摘取小鼠脾脏,并制备小鼠脾脏单细胞悬浮液。利用 Animal Total RNA Isolation Kit (FuGene) 将收集的小鼠脾脏细胞裂解后进行 RNA 提取;以提取的 RNA 为模板,利用逆转录试剂盒 (PrimeScript™ II First Strand cDNA Synthesis Kit, Takara) 进行逆转录反应而获得 cDNA;随后以 cDNA 为模板,利用特异引物通过 PCR 方法分别扩增获得全套小鼠抗体重链可变区族和轻链可变区基因的基因片段,再通过重叠 PCR (SOE-PCR) 将轻、重链可变区基因片段各自拼接扩增而得到单链抗体可变区基因片段 (scFv),将 scFv 序列通过酶切连接至噬菌粒展示载体中,然后将连接产物电转至 TG1 感受态细胞中,菌液经过辅助噬菌体 M13KO7 侵染后获得 2 个噬菌体展示文库。

1.2 抗 HER2 抗体的筛选与序列分析

以 HER2 胞外区重组蛋白为靶抗原分别对本实施例第 1.1 项所述的 2 个噬菌体展示文库进行淘选,经过 3~5 轮的“吸附-洗脱-扩增”淘选,再通过单克隆 ELISA 筛选和 PCR 酶切实验验证,以及对候选克隆进行测序分析,最终获得 15 个序列特异的抗 HER2 鼠源单克隆抗体。

1.3 抗 HER2 嵌合抗体的制备

将上述筛选获得的 15 个鼠源抗体的轻、重链基因分别与线性化的表达载体 pcDNA3.1 进行同源重组 (重链可变区 [VH] 与含人源 IgG1 恒定区的 pcDNA3.1 载体连接,轻链可变区 [VL] 与含人源 CK 恒定区的 pcDNA3.1 载体连接),通过菌落 PCR 检测以及 DNA 测序分析获得序列正确的嵌合抗体表达载体。利用常规方法提取并纯化获得嵌合抗体表达载体,然后将 15 组含轻、重链基因片段的嵌合抗体表达载体分别瞬转到 ExpiCHO-S 细胞 (Thermo) 中,通过无血清培养进行嵌合抗体的表达,利用 AKTA Pure 系统进行 Protein A 亲和层析纯化获得抗 HER2 嵌合抗体蛋白。

1.4 抗 HER2 嵌合抗体与 ErbB/HER 家族成员的结合活性检测

利用 ELISA 方法检测抗 HER2 嵌合抗体与人源 ErbB/HER 家族成员的结合活性。具体方法如下:用 PBS 稀释 HER2 胞外区重组蛋白以及人源 ErbB/HER 家族其它成员 (EGFR、HER3 和 HER4) 的胞外区重组蛋白,然后以 100 μL /孔加入到 96 孔 ELISA 板中,4°C 孵育过夜。PBS 洗板后每孔加入 200 μL 封闭液 (含有 1% BSA 的 PBST [PBS+0.1% Tween-20]),室温静置孵育 1 小时。PBST 洗板后以每孔 100 μL 加入梯度稀释于封闭液中的待测抗体 (包括抗 HER2 嵌合抗体和对照抗体 Trastuzumab、Cetuximab 或 Patritumab),室温静置孵育 2 小时。PBST 洗板后以每孔 100 μL 加入 1:10,000 稀释于封闭液中的抗-人 IgG (H+L)-HRP 抗体 (Jackson Immuno),室温静置孵育 1 小时。PBST 洗板后每孔加入 100 μL TMB 显色液,室温避光孵育 3-10 分钟;然后每孔加入 50 μL 终止液 (2 M HCl),通过多功能酶标仪 (Varioskan, Thermo) 读取 OD450 值。利用 GraphPad Prism 9 软件对原始数据进行分析,结果如图 1 所示,mAb2117、mAb2126、mAb2128、mAb2133、mAb2138、mAb2164、mAb2170 与 HER2 结合活性较强且与人源 ErbB/HER 家族其它成员无交叉结合反应。

1.5 抗 HER2 嵌合抗体与表达 HER2 的肿瘤细胞的结合活性检测

利用流式细胞术检测抗 HER2 嵌合抗体与 NCI-N87 细胞的结合活性。具体方法如下:收集 NCI-N87 细胞,用预冷的 FACS 缓冲液 (PBS+1% BSA) 清洗一次后将细胞重悬至 $6\sim 10\times 10^6$ 细胞/mL,并以 50 μL /孔加入至 96 孔 U 型板中,随后加入 50 μL /孔梯度稀释的待测嵌合抗体或阳性对照抗体 Trastuzumab (以 FACS 缓冲液为阴性空白对照),于冰上静置孵育 60 分钟。加入预冷的 FACS 缓冲液清洗细胞两次后以每孔 100 μL 加入 1:1,000 稀释于 FACS 缓冲液中的抗-人 IgG (H+L)-AF488 抗体 (Jackson Immuno),于冰上避光孵育 40 分钟。加入预冷的 FACS 缓冲液清洗细胞两次后每孔加入 100 μL 预冷的 FACS 缓冲液重悬细

胞,随后通过流式细胞仪(NovoCyte 3005, Agilent)检测。结果如图 2 所示,mAb2117、mAb2126、mAb2164、mAb2170 抗体与 NCI-N87 细胞的结合活性较强。

1.6 抗 HER2 嵌合抗体的抗原结合表位分析

根据人源与鼠源 HER2 胞外区亚结构域的结构,将人、鼠 HER2 不同亚结构域的基因序列进行重组拼接,同源重组连接至 pcDNA3.1 载体以构建人-鼠嵌合的 HER2 胞外区重组蛋白表达质粒(图 3A),瞬转表达获得人-鼠嵌合的 HER2 胞外区重组蛋白上清(各重组蛋白的 C 端均带有 6×His 标签)。以所述人-鼠嵌合重组蛋白为抗原,通过 ELISA 法检测嵌合抗体在 HER2 胞外区内的结合表位。具体方法如下:将待测嵌合抗体分别用 PBS 稀释后,以 100 μL/孔加入到 96 孔 ELISA 板中,4℃孵育过夜。PBS 洗板后每孔加入 200 μL 封闭液(含有 1% BSA 的 PBST),室温静置孵育 1 小时。PBST 洗板后每孔加入 100 μL 以 1:200 稀释于封闭液中的人 HER2、小鼠 HER2、或人-鼠嵌合 HER2 重组蛋白,包括 HER2(D1),HER2(D1-2),HER2(D1-3),HER2(D2),HER2(D3)、HER2(D4),其中括号内的后缀表示 HER2 嵌合抗原中的一个或数个胞外区亚结构域的人源序列被相应的鼠源序列所置换,例如 D1 表示胞外区亚结构域 1 被鼠源序列所置换。室温静置孵育 2 小时后,PBST 洗板并每孔加入 100 μL 以 1:10,000 稀释于封闭液中的抗-6×His-HRP 抗体(Proteintech),室温静置孵育 1 小时。PBST 洗板后每孔加入 100 μL TMB 显色液,室温避光孵育 3-10 分钟后每孔加入 50 μL 终止液(2M HCl),然后利用多功能酶标仪(Varioskan, Thermo)读取 OD450 值。利用 GraphPad Prism 9 软件对原始数据进行分析。检测结果如图 3B 所示,mAb2117 的识别表位位于 HER2 胞外区的 D3,mAb2126、mAb2164 和 mAb2170 的识别表位位于 HER2 胞外区的 D1,mAb2128 的识别表位位于 HER2 胞外区的 D4。

1.7 抗 HER2 嵌合抗体的抗原结合竞争性分析

为了进一步验证各嵌合抗体与 HER2 结合的表位是否有重叠或交叉,通过竞争 ELISA 法检测各嵌合抗体间的抗原结合竞争活性。具体方法如下:用 PBS 稀释 HER2 胞外区重组蛋白,并以 100 μL/孔加入到 96 孔 ELISA 板中,4℃孵育过夜。PBS 洗板后每孔加入 200 μL 封闭液(含有 1% BSA 的 PBST),室温静置孵育 1 小时。PBST 洗板后以 50 μL/孔加入梯度稀释于封闭液中的各待测嵌合抗体或对照抗体 Trastuzumab(起始浓度为 50 μg/mL,3 倍梯度稀释,共 7 个浓度梯度),室温静置孵育 1 小时后每孔加入 50 μL 经生物素标记的各嵌合抗体(终浓度均为 0.5 μg/mL),继续室温静置孵育 1 小时。PBST 洗板后以每孔 100 μL 加入 1:10,000 稀释于封闭液中的 HRP-Streptavidin(Jackson Immuno),室温孵育 1 小时。PBST 洗板后每孔加入 100 μL TMB 显色液,室温避光孵育 3-10 分钟后每孔加入 50 μL 终止液(2 M HCl),然后利用多功能酶标仪(Varioskan, Thermo)读取 OD450 值。检测结果显示,mAb2164 与 mAb2170 完全竞争结合 HER2 胞外区重组蛋白(图 4A),mAb2164 与 mAb2117、mAb2126 部分竞争结合 HER2 胞外区重组蛋白,mAb2164 与 Trastuzumab 不竞争结合 HER2 胞外区重组蛋白(图 4A);mAb2164 与 mAb2128 不竞争结合 HER2 胞外区重组蛋白,mAb2117 与 mAb2126、mAb2128 不竞争结合 HER2 胞外区重组蛋白(图 4B)。

1.8 抗 HER2 嵌合抗体的抗原结合动力学分析

利用分子相互作用仪(ForteBio, 型号 R8)检测各嵌合抗体与 HER2 胞外区重组蛋白的结合动力学。具体方法如下:用 PBS 将待测嵌合抗体 mAb2117、mAb2126、mAb2128、mAb2164、mAb2170 稀释至 5 μg/mL,并分别以 200 μL 每孔加入 96 孔黑壁板内;然后用 PBS 将 HER2 胞外区重组蛋白稀释至 200 nM,并作 1:2 梯度稀释后以 200 μL 每孔加入 96 孔黑壁板内。将含有待测样品的 96 孔黑壁板和 Protein A 检测探针放置于检测仪中,设置程序使 Protein A 探针捕获抗体,随后进行与抗原的结合与解离检测;每一次结合与解离循环完毕后将探针浸没于 10 mM 甘氨酸缓冲液(pH 1.5)中使探针再生,然后再开始下一循环检测。待检测完毕后使用分析软件对相应抗体与抗原之间的结合常数和解离常数进行拟合计算,并计算得到亲和力常数(K_D)数值。结果如表 4 所示,嵌合抗体 mAb2117、mAb2126、mAb2128、mAb2164、mAb2170 与 HER2 胞外区重组蛋白的结合亲和力和常数(K_D)值均约为 10⁻⁹ M。

表 4. 嵌合抗体与 HER2 胞外区重组蛋白的结合动力学分析结果

抗体名称	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	Full R ²
mAb2117	4.278×10 ⁻⁹	3.877×10 ⁵	1.658×10 ⁻³	0.9557
mAb2126	1.437×10 ⁻⁹	6.731×10 ⁴	9.671×10 ⁻⁵	0.9983
mAb2128	3.440×10 ⁻⁹	2.759×10 ⁵	9.491×10 ⁻⁴	0.9432
mAb2164	3.066×10 ⁻⁹	9.872×10 ⁴	3.026×10 ⁻⁴	0.9974
mAb2170	2.349×10 ⁻⁹	1.122×10 ⁵	2.636×10 ⁻⁴	0.9965

Full R²表示拟合曲线与实测曲线的相似度。

1.9 抗 HER2 嵌合抗体对 HER2 中 Y1248 位点磷酸化的作用

已有发表的研究结果显示 Trastuzumab 能够诱导心肌细胞中 HER2 胞内结构域的 Y1248 位点发生磷酸

化并由此引发一系列的信号转导级联反应，最终导致心肌细胞的稳态遭到破坏(Mohan 等, Molecular Cancer Therapeutics 2016, 15:1321-1331)，这一机制可能是 Trastuzumab 导致心脏毒性的原因之一，因此本实施例通过检测抗 HER2 抗体能否诱导 SKBR-3 细胞的 HER2-Y1248 位点磷酸化来评估其是否具有类似 Trastuzumab 的心脏毒性。具体方法如下：收集 SKBR-3 细胞并重悬于 RPMI-1640 无血清培养基（含 0.1% BSA）中，然后接种至 6 孔板，37°C 培养过夜。于各孔中分别加入终浓度为 4 μg/mL 的待测抗体或对照抗体（Trastuzumab、Pertuzumab），37°C 孵育 30 分钟。收集各孔细胞于 1.5-mL EP 管中，并用预冷的 PBS 清洗 2 次后加入 150 μL RIPA 细胞裂解液（Porteintech）进行全蛋白提取。4°C 高速离心 10 分钟收集裂解液上清，通过 BCA 法检测各裂解液上清中蛋白浓度，并加入还原缓冲液进行蛋白电泳样品制备，随后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后以 80 V 转膜 90 分钟将蛋白条带转印至 PVDF 膜上，随后在室温条件下用 5% 脱脂牛奶对 PVDF 膜进行封闭。以 1:1000 的稀释比例加入兔抗人 HER2（Y1248）抗体（CST）或兔抗人 HER2 抗体（Abcam），于 4°C 孵育过夜。用 PBST 清洗 PVDF 膜 3 次后加入 1:5000 稀释于 5% 脱脂牛奶中的山羊抗兔 IgG-HRP 抗体（Jackson Immuno），室温下孵育 1 小时。用 PBST 清洗 PVDF 膜 3 次后加入显影液并利用成像仪（Bio-Rad）进行检测。结果如图 5 所示，与阳性对照 Trastuzumab 相比，嵌合抗体 mAb2117 和 mAb2126 没有诱导 HER2-Y1248 的磷酸化，说明它们可能不具有类似 Trastuzumab 的心脏毒性。

1.10 抗 HER2 嵌合抗体对 NRG-1 诱导的 HER2 下游信号转导通路激活的影响

NRG-1 能够诱导 HER2 的异源二聚化并激活下游信号转导通路，其中 AKT 磷酸化是其下游信号转导级联反应中的一个标志性事件，本实施例通过检测抗体对 NRG-1 诱导的 AKT 磷酸化的抑制作用来评估它们对 HER2 受体信号转导通路的影响。具体方法如下：将 T47D 细胞接种至 6 孔板中，待细胞生长至约 80% 融合状态后，弃去培养基并加入不含血清的 RPMI-1640 饥饿培养过夜。于各孔中分别加入终浓度为 100 nM 的待测抗体或对照抗体（Trastuzumab、Pertuzumab），37°C 孵育 20 分钟后，于各孔中加入终浓度为 100 ng/mL 的 NRG-1（NOVUS）并继续孵育 10 分钟。用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次后，按照本实施例第 1.9 项所述方法进行全蛋白提取以及 Western-blot 检测，所用一抗为兔抗 p-AKT（Ser465）抗体（CST）或兔抗 pan-AKT 抗体（CST），二抗为山羊抗兔 IgG-HRP 抗体（Jackson Immuno）。结果如图 6 所示，与阳性对照抗体 Pertuzumab 相比，嵌合抗体 mAb2117 和 mAb2126 对 NRG-1 诱导的 AKT 磷酸化无抑制作用，说明它们不影响 NRG-1 诱导的 HER2 异源二聚化及其下游信号转导通路的激活。

实施例 2 抗 HER2 嵌合抗体 mAb2117 的人源化及优化改造

2.1 抗 HER2 嵌合抗体 mAb2117 的人源化

经 MOE 软件分析，采用 CDR 移植的方法将嵌合抗体 mAb2117 的重链骨架区序列用 Germline IGHV3-23 的骨架区序列替换，标记为 Hu2117-H1；mAb2117 的轻链骨架区序列用 Germline IGKV1-39 的骨架区序列替换，标记为 Hu2117-K1。将 mAb2117 嵌合抗体及其人源化抗体分别构建成为 hIgG1 Fc 的单链抗体融合蛋白（scFv-hIgG1 Fc 融合蛋白），通过基因序列合成方式获得 scFv 抗体基因片段，分别为人源化单链抗体 Hu2117HK 和 Hu2117KH 以及嵌合单链抗体对照 Mu2117HK 和 Mu2117KH，其中 HK 代表单链抗体的结构为“（N 端）重链可变区核酸序列-连接子(G₄S)₃-轻链可变区核酸序列（C 端）”，KH 代表单链抗体的结构为“（N 端）轻链可变区核酸序列-连接子(G₄S)₃-重链可变区核酸序列（C 端）”。将 scFv 基因片段分别同源重组于 pcDNA3.1（含人源 IgG1 Fc 序列）载体中，构建抗体表达质粒，提取表达质粒后分别瞬转到 ExpiCHO-S 细胞（Thermo）中进行无血清培养，利用 AKTA Pure 系统进行 Protein A 亲和层析纯化培养上清中的抗体，获得单链抗体融合蛋白。利用 ForteBio 进行单链抗体融合蛋白与 HER2 重组蛋白的结合动力学分析，检测结果如表 5 所示，所述人源化抗体基本保留了与 HER2 的结合活性，亲和力常数（K_D）约为 10⁻⁷ M。

表 5. 单链抗体融合蛋白与 HER2 重组蛋白的结合动力学分析结果

抗体名称	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	Full R ²
Hu2117HK	1.777×10 ⁻⁷	1.664×10 ⁴	2.956×10 ⁻³	0.9322
Hu2117KH	1.471×10 ⁻⁷	2.589×10 ⁴	3.809×10 ⁻³	0.8669
Mu2117HK	7.599×10 ⁻⁸	6.880×10 ⁴	5.228×10 ⁻³	0.9249
Mu2117KH	7.722×10 ⁻⁸	7.062×10 ⁴	5.453×10 ⁻³	0.9233

Full R² 表示拟合曲线与实测曲线的相似度。

根据实施例 1 中第 1.5 项所述方法，利用流式细胞术检测单链抗体融合蛋白 Hu2117HK 和 Hu2117KH 与 BT474 细胞的结合活性，其中嵌合抗体 mAb2117 和 Trastuzumab 为阳性对照，结果显示 mAb2117、Hu2117HK、Hu2117KH 均能与 BT474 细胞结合，其中 Hu2117HK 结合 BT474 细胞的活性略高于 Hu2117KH（数据未显示）。

2.2 抗 HER2 人源化抗体 Hu2117HK 的单点或多点突变优化

利用在线软件 abYsis (<http://abysis.org/abysis/index.html>) 和 MOE 软件, 对人源化抗体 Hu2117HK 的轻、重链可变区序列中人源化程度较低的氨基酸残基、潜在的稳定性风险位点、以及骨架区中的鼠源氨基酸残基进行分析后, 共设计了 50 个单点/多点突变拟提高抗体的人源化程度、抗原结合亲和力和/或稳定性。具体地, 在单链抗体 Hu2117HK 序列中通过 PCR 分别引入所设计的 50 个单点/多点突变, 并进行表达获得单链抗体突变体蛋白。

利用 ForteBio 分子相互作用仪检测上述 50 个单链抗体突变体及其母本单链抗体 Hu2117HK 的瞬转表达量。具体方法如下: 于 ExpiCHO-S 细胞瞬转表达后收获培养上清, 以 200 μ L/孔加入到 96 孔黑板中, 将待测样品及 Protein A 探针置于 ForteBio 作用仪内, 利用预设的定量程序检测培养上清中各抗体分子与 Protein A 探针的结合速率; 每一循环完毕后将探针浸没于 10 mM 甘氨酸缓冲液 (pH 1.5) 中使探针再生, 然后开始下一循环检测。检测完毕后使用分析软件根据标准曲线进行计算得到各单链抗体的表达量。同时, 按照实施例 1 中第 1.8 项所述方法, 利用 ForteBio 分析各单链抗体突变体与 HER2 的结合动力学。

各单点/多点突变位点与突变氨基酸、瞬转表达量以及抗原结合动力学分析结果如表 6 所示。

表 6. 单链抗体 Hu2117HK 的单点/多点突变、瞬转表达量、以及与 HER2 的结合动力学分析结果

抗体名称	单点/多点突变		瞬转表达量 (mg/L)	抗原结合动力学			
	突变位点	突变氨基酸		K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_{dis} (1/s)	Full R^2
Hu2117HK-Mu01	L43	S43A	184	8.33×10^{-9}	8.62×10^4	7.18×10^{-4}	0.9277
Hu2117HK-Mu02	L85	V85T	135	8.32×10^{-9}	8.86×10^4	7.37×10^{-4}	0.9177
Hu2117HK-Mu03	L2	V2I	81	8.69×10^{-9}	8.16×10^4	7.10×10^{-4}	0.9289
Hu2117HK-Mu04	L4	L4M	94	9.88×10^{-9}	9.06×10^4	8.95×10^{-4}	0.9108
Hu2117HK-Mu05	H29	Y29F	148	6.76×10^{-9}	7.83×10^4	5.29×10^{-4}	0.9394
Hu2117HK-Mu06	H49	A49S	133	8.18×10^{-9}	8.26×10^4	6.76×10^{-4}	0.9311
Hu2117HK-Mu07	H58	K58Y	138	1.17×10^{-8}	3.98×10^4	4.65×10^{-4}	0.9904
Hu2117HK-Mu08	H60	P60A	94	6.65×10^{-9}	7.45×10^4	4.95×10^{-4}	0.9441
Hu2117HK-Mu09		P60G	119	6.38×10^{-9}	7.34×10^4	4.68×10^{-4}	0.9573
Hu2117HK-Mu10		P60V	113	7.05×10^{-9}	7.74×10^4	5.46×10^{-4}	0.9493
Hu2117HK-Mu11	L55	F55D	126	9.41×10^{-9}	8.54×10^4	8.03×10^{-4}	0.9176
Hu2117HK-Mu12		F55P	192	6.40×10^{-9}	7.08×10^4	4.53×10^{-4}	0.9652
Hu2117HK-Mu13	L87	F87Y	362	6.05×10^{-9}	8.01×10^4	4.84×10^{-4}	0.9486
Hu2117HK-Mu14	H61	D61G	277	7.16×10^{-9}	8.72×10^4	6.24×10^{-4}	0.9328
Hu2117HK-Mu15	L28	N28D	410	4.02×10^{-9}	6.08×10^3	2.44×10^{-7}	0.6555
Hu2117HK-Mu16		N28G	449	8.76×10^{-9}	5.82×10^4	5.10×10^{-4}	0.9882
Hu2117HK-Mu17		N28I	417	1.49×10^{-8}	4.95×10^4	7.38×10^{-4}	0.9822
Hu2117HK-Mu18		N28L	408	1.14×10^{-8}	4.26×10^4	4.83×10^{-4}	0.9726
Hu2117HK-Mu19		N28Q	388	1.39×10^{-8}	6.01×10^4	8.37×10^{-4}	0.9590
Hu2117HK-Mu20		N28S	349	1.33×10^{-8}	4.65×10^4	6.16×10^{-4}	0.9889
Hu2117HK-Mu21		N28T	321	1.20×10^{-8}	4.68×10^4	5.60×10^{-4}	0.9915
Hu2117HK-Mu22		N28V	409	1.34×10^{-8}	4.39×10^4	5.90×10^{-4}	0.9927
Hu2117HK-Mu23		G29A	372	6.67×10^{-9}	8.12×10^4	5.42×10^{-4}	0.9320
Hu2117HK-Mu24	L29	G29I	317	6.65×10^{-9}	6.37×10^4	4.23×10^{-4}	0.9652
Hu2117HK-Mu25		G29S	356	6.73×10^{-9}	8.31×10^4	5.60×10^{-4}	0.9288
Hu2117HK-Mu26		G29V	无表达	N/A	N/A	N/A	N/A
Hu2117HK-Mu27		G29R	303	7.38×10^{-9}	8.02×10^4	5.92×10^{-4}	0.9341
Hu2117HK-Mu28	L27C	G29T	350	7.15×10^{-9}	8.28×10^4	5.92×10^{-4}	0.9294
Hu2117HK-Mu29		V27L	374	7.62×10^{-9}	8.77×10^4	6.68×10^{-4}	0.9179
Hu2117HK-Mu30		H27D	399	8.27×10^{-9}	3.64×10^4	3.01×10^{-4}	0.9813
Hu2117HK-Mu31		H27F	338	6.20×10^{-9}	3.74×10^4	2.32×10^{-4}	0.9939
Hu2117HK-Mu32	L27D	H27S	357	6.09×10^{-9}	6.01×10^4	3.66×10^{-4}	0.9712

抗体名称	单点/多点突变		瞬转表达量 (mg/L)	抗原结合动力学			
	突变位点	突变氨基酸		K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	Full R ²
Hu2117HK-Mu33	L89	H27Y	395	2.14×10 ⁻⁸	5.08×10 ⁴	1.08×10 ⁻³	0.9823
Hu2117HK-Mu34		S89Q	307	1.26×10 ⁻⁸	9.35×10 ⁴	1.17×10 ⁻³	0.9065
Hu2117HK-Mu35		S89L	326	5.98×10 ⁻⁸	6.19×10 ⁴	3.70×10 ⁻³	0.9441
Hu2117HK-Mu36		S89M	357	3.14×10 ⁻⁸	6.32×10 ⁴	1.98×10 ⁻³	0.9534
Hu2117HK-Mu37	L96	Y96W	250	1.76×10 ⁻⁸	1.08×10 ⁴	1.91×10 ⁻³	0.8891
Hu2117HK-Mu38	H30, H31	S30N, S31N	240	1.21×10 ⁻⁸	1.00×10 ⁵	1.21×10 ⁻³	0.8951
Hu2117HK-Mu39	H31	S31N	292	1.23×10 ⁻⁸	9.77×10 ⁴	1.20×10 ⁻³	0.9017
Hu2117HK-Mu40	H31	S31D	272	1.19×10 ⁻⁸	7.27×10 ⁴	8.67×10 ⁻⁴	0.9389
Hu2117HK-Mu41	H55, H57	S55N, T57A	291	9.66×10 ⁻⁹	6.24×10 ⁴	6.03×10 ⁻⁴	0.9725
Hu2117HK-Mu42	H53	G53S	282	3.35×10 ⁻⁸	5.30×10 ⁴	1.78×10 ⁻³	0.9635
Hu2117HK-Mu43	H97	A97D	343	5.67×10 ⁻⁸	7.17×10 ⁴	4.06×10 ⁻³	0.8786
Hu2117HK-Mu44		A97E	377	4.25×10 ⁻⁸	8.00×10 ⁴	3.40×10 ⁻³	0.8906
Hu2117HK-Mu45		A97I	353	1.28×10 ⁻⁸	9.80×10 ⁴	1.26×10 ⁻³	0.8998
Hu2117HK-Mu46		A97N	328	1.03×10 ⁻⁸	7.74×10 ⁴	7.94×10 ⁻⁴	0.9425
Hu2117HK-Mu47		A97Q	334	1.53×10 ⁻⁸	5.43×10 ⁴	8.28×10 ⁻⁴	0.9842
Hu2117HK-Mu48		A97R	303	1.21×10 ⁻⁸	9.79×10 ⁴	1.18×10 ⁻³	0.9026
Hu2117HK-Mu49		A97S	288	1.18×10 ⁻⁸	6.45×10 ⁴	7.61×10 ⁻⁴	0.9704
Hu2117HK-Mu50		A97V	381	1.60×10 ⁻⁸	1.00×10 ⁵	1.60×10 ⁻³	0.9111
Hu2117HK	N/A	N/A	412	1.14×10 ⁻⁸	9.17×10 ⁴	1.05×10 ⁻³	0.9145

L 为轻链；H 为重链；N/A 表示不适用；Full R² 表示拟合曲线与实测曲线的相似度。

按照实施例 1 中第 1.5 项所述方法，利用流式细胞术检测含有单点/多点突变的单链抗体与 BT474 细胞以及 RT-112 细胞的结合活性，其中阳性对照抗体为母本单链抗体 Hu2117HK。结果如图 7 所示，与母本单链抗体 Hu2117HK 相比，大多数单链抗体突变体都保留了对 BT474 细胞的结合活性，某些抗体的细胞结合活性甚至略有提高，这些抗体包括 Hu2117HK-Mu01、-Mu02、-Mu03、-Mu04、-Mu05、-Mu06、-Mu08、-Mu09、-Mu10、-Mu11、-Mu12、-Mu13、-Mu17、-Mu20、-Mu21、-Mu23、-Mu24、-Mu25、-Mu27、-Mu28、-Mu32、-Mu33、-Mu36、-Mu37、-Mu38、-Mu39、-Mu40、-Mu45、-Mu46、-Mu47、-Mu48、-Mu49、-Mu50（图 7A）。同时，与 RT-112 细胞的结合结果如图 7B 所示，与母本单链抗体 Hu2117HK 相比，大多数单链抗体突变体都保留了对 RT-112 细胞的结合活性，这些抗体包括 Hu2117HK-Mu01、-Mu02、-Mu03、-Mu04、-Mu05、-Mu06、-Mu08、-Mu09、-Mu10、-Mu11、-Mu12、-Mu13、-Mu14、-Mu23、-Mu24、-Mu25、-Mu27、-Mu28、-Mu29、-Mu32、-Mu34、-Mu37、-Mu38、-Mu39、-Mu40、-Mu41、-Mu42、-Mu45、-Mu46、-Mu48、-Mu49、-Mu50。

2.3 抗 HER2 人源化抗体 Hu2117HK 的组合突变优化

将从上述优选的单点/多点突变进行组合并引入到人源化单链抗体 Hu2117HK 的可变区序列中，构建含有不同组合突变的抗体分子 Hu2117-HK201~HK203（简称 HK201~HK203），以及 Hu2117-HK301~HK312（简称 HK301~HK312）。按照本实施例中第 2.2 项所述方法进行单链抗体样品的制备，并采用 ForteBio 检测各突变体以及母本单链抗体 Hu2117HK 的瞬转表达量。各抗体分子包含的组合突变及瞬转表达量如表 7 所示。

表 7. 单链抗体 Hu2117HK 的组合突变优化以及瞬转表达量

抗体名称	组合突变		瞬转表达量 (mg/L)
	重链突变	轻链突变	
Hu2117-HK201	P60V、S55N、T57A	G29R	109 (第 3 天)
Hu2117-HK202	A97R		116.6 (第 3 天)
Hu2117-HK203	P60V、S55N、T57A、A97R		125.7 (第 3 天)
Hu2117-HK301	P60V、S55N、T57A、A97R、D61G		27.3 (第 3 天)
Hu2117-HK302	P60V、S55N、T57A、A97R、D61A		0 (第 3 天)
Hu2117-HK303	P60V、S55N、T57A、A97R、D61E		317 (第 7 天)
Hu2117-HK304	P60V、S55N、T57A、A97R、D61P		263 (第 7 天)

抗体名称	组合突变		瞬转表达量 (mg/L)
	重链突变	轻链突变	
Hu2117-HK305	P60V、S55N、T57A、A97R、D61Q		15.8 (第 3 天)
Hu2117-HK306	P60V、S55N、T57A、A97R、D61R		9.61 (第 3 天)
Hu2117-HK307	P60V、S55N、T57A、A97R、D61T		0 (第 3 天)
Hu2117-HK308	P60V、S55N、T57A、A97R、D61V		0 (第 3 天)
Hu2117-HK309	P60V、S55N、T57A、A97R、S62K		273 (第 7 天)
Hu2117-HK310	P60V、S55N、T57A、A97R、S62N		307 (第 7 天)
Hu2117-HK311	P60V、S55N、T57A、A97R、S62P		0 (第 3 天)
Hu2117-HK312	P60V、S55N、T57A、A97R、S62R		0 (第 3 天)

按照实施例 1 中第 1.5 项所述方法, 利用流式细胞术检测含有组合突变的单链抗体及其母本单链抗体 Hu2117HK 分别与 BT474 细胞和 RT-112 细胞的结合活性。结果显示, 在 10 $\mu\text{g/mL}$ 的饱和浓度下, HK201、HK202、HK203 抗体与 BT474 细胞和 RT-112 细胞均能结合, 且结合活性与母本抗体 Hu2117HK 相当; HK301、HK303、HK304、HK305、HK306、HK309、HK310 均能与 RT-112 细胞结合, 且与母本抗体 Hu2117HK 的结合活性相当 (数据未显示)。

为了进一步鉴定经组合突变优化后的抗体的细胞结合活性, 优选 HK203、HK303、HK304、HK309、和 HK310 抗体, 按照实施例 1 中第 1.5 项所述方法, 将抗体梯度稀释后利用流式细胞术检测其与 BT474 细胞以及 RT-112 细胞的结合, 其中对照抗体为母本单链抗体 Hu2117HK。结果如表 8 及图 8 所示, 这些优化的人源化抗体均能与 BT474 细胞以及 RT-112 细胞结合, 且结合活性与母本抗体 Hu2117HK 相当。

表 8. 单链抗体 Hu2117HK 的组合突变优化分子与 BT474 细胞以及 RT-112 细胞的结合活性

抗体名称	细胞结合活性 (EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	
	BT474	RT-112
Hu2117-HK303	0.1012	0.1289
Hu2117-HK304	0.0922	0.0622
Hu2117-HK309	0.1032	0.0956
Hu2117-HK310	0.1034	0.1572
Hu2117-HK203	0.1020	0.1436
Hu2117HK	0.1075	0.0593

实施例 3 抗 HER2 嵌合抗体 mAb2126 的人源化及优化改造

3.1 抗 HER2 嵌合抗体 mAb2126 的人源化

经 MOE 软件分析, 采用 CDR 移植的方法将嵌合抗体 mAb2126 的重链骨架区序列用 Germline IGHV4-4 或 IGHV7-4 的骨架区序列替换, 分表标记为 Hu2126-H1、Hu2126-H2; mAb2126 的轻链骨架区序列用 Germline IGKV1-39 的骨架区序列替换, 标记为 Hu2126-K1。通过基因序列合成方式获得人源化抗体可变区基因片段, 将轻、重链基因片段分别与线性化的表达载体 pcDNA3.1 连接以构建抗体表达质粒 (重链可变区[VH]与含人源 IgG1 恒定区的 pcDNA3.1 载体连接, 轻链可变区[VL]与含人源 CK 恒定区的 pcDNA3.1 载体连接), 按照常规方法提取表达质粒后分别瞬转到 ExpiCHO-S 细胞 (Thermo) 中进行无血清表达培养, 培养上清利用 AKTA Pure 系统进行 Protein A 亲和层析纯化, 获得人源化抗体 Hu2126-H1K1 和 Hu2126-H2K1。

按照实施例 1 中第 1.8 项所述方法, 利用 ForteBio 检测各人源化抗体与 HER2 的结合动力学。结果如表 9 所示, 经 CDR 移植而获得的人源化抗体保留了与 HER2 的结合活性, 其中 Hu2126-H2K1 的结合亲和力与母本嵌合抗体 mAb2126 的相当。

表 9. 嵌合抗体 mAb2126 人源化 (CDR 移植) 前后的结合动力学分析结果

抗体名称	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_{dis} (1/s)	Full R^2
mAb2126	5.200×10^{-9}	9.659×10^4	5.023×10^{-4}	0.9990
Hu2126-H1K1	1.909×10^{-8}	9.452×10^4	1.804×10^{-3}	0.9958
Hu2126-H2K1	6.890×10^{-9}	8.427×10^4	5.806×10^{-4}	0.9946

Full R^2 表示拟合曲线与实测曲线的相似度。

3.2 抗 HER2 人源化抗体 Hu2126-H2K1 的单点突变优化

利用在线软件 abYsis (<http://abysis.org/abysis/index.html>) 和 MOE 软件对人源化抗体 Hu2126-H2K1 的

轻、重链可变区序列中人源化程度相对较低的氨基酸残基、潜在的分子稳定性风险位点、以及骨架区中的鼠源氨基酸残基进行分析后，共设计了 63 个单点突变拟提高抗体的人源化程度、抗原结合亲和力，和/或稳定性。具体地，在人源化抗体 Hu2126-H2K1 序列中通过 PCR 分别引入所设计的 63 个单点突变，并构建表达质粒，然后将抗体轻、重链表达质粒组合后瞬转 ExpiCHO-S 细胞进行抗体表达，获得 63 个含单点突变的抗体突变体表达上清。按照实施例 2 第 2.2 项所述方法，利用 ForteBio 检测各抗体突变体在瞬转培养 3 天后的表达量以及与 HER2 的结合动力学。

结果如表 10 所示，与母本抗体 Hu2126-H2K1 相比，所设计的 63 个单点突变中共有 42 个不显著影响抗体的抗原结合亲和力，包括抗体轻链中的 17 个单点突变：2126-Hu-L02、-L05、-L06、-L07、-L08、-L09、-L10、-L11、-L12、-L13、-L14、-L15、-L16、-L17、-L18、-L19、-L21，以及抗体重链中的 25 个单点突变：2126-Hu-H22、-H23、-H24、-H25、-H27、-H28、-H29、-H31、-H32、-H33、-H34、-H35、-H36、-H37、-H38、-H39、-H40、-H42、-H43、-H44、-H45、-H46、-H50、-H54、-H59。

表 10. Hu2126-H2K1 人源化抗体的单点突变、瞬转表达量以及与 HER2 的结合动力学分析结果

抗体名称	单点突变		瞬转表达量 (mg/L)	抗原结合动力学			
	突变位点	突变氨基酸		K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	Full R ²
2126-Hu-L01	L28	D28S	59.2	1.75×10 ⁻⁸	1.12×10 ⁵	1.95×10 ⁻³	0.9988
2126-Hu-L02	L24	K24R	49.6	5.58×10 ⁻⁹	9.87×10 ⁴	5.51×10 ⁻⁴	0.9989
2126-Hu-L03	L30	Y30S	54.6	3.95×10 ⁻⁸	4.71×10 ⁴	1.86×10 ⁻³	0.9997
2126-Hu-L04	L32	A32Y	65	1.39×10 ⁻⁸	4.39×10 ⁴	6.11×10 ⁻⁴	0.9971
2126-Hu-L05	L49	N49Y	61.2	1.34×10 ⁻⁸	1.04×10 ⁵	1.39×10 ⁻³	0.9986
2126-Hu-L06	L50	S50A	59.1	6.63×10 ⁻⁹	9.94×10 ⁴	6.59×10 ⁻⁴	0.9988
2126-Hu-L07	L53	Y53D	54.8	6.46×10 ⁻⁹	9.43×10 ⁴	6.10×10 ⁻⁴	0.9989
2126-Hu-L08		Y53E	48.8	6.57×10 ⁻⁹	9.43×10 ⁴	6.20×10 ⁻⁴	0.9989
2126-Hu-L09		Y53K	46.7	5.11×10 ⁻⁹	9.59×10 ⁴	4.90×10 ⁻⁴	0.9990
2126-Hu-L10		Y53N	46.5	5.38×10 ⁻⁹	1.04×10 ⁵	5.58×10 ⁻⁴	0.9989
2126-Hu-L11		Y53Q	51.9	6.25×10 ⁻⁹	1.04×10 ⁵	6.51×10 ⁻⁴	0.9990
2126-Hu-L12		Y53S	49.9	6.13×10 ⁻⁹	1.01×10 ⁵	6.19×10 ⁻⁴	0.9988
2126-Hu-L13		Y53T	41.7	5.34×10 ⁻⁹	9.95×10 ⁴	5.31×10 ⁻⁴	0.9986
2126-Hu-L14	L55	Y55A	62.5	6.48×10 ⁻⁹	1.03×10 ⁵	6.66×10 ⁻⁴	0.9983
2126-Hu-L15		Y55E	59.5	8.29×10 ⁻⁹	1.09×10 ⁵	9.06×10 ⁻⁴	0.9981
2126-Hu-L16		Y55P	65.7	4.38×10 ⁻⁹	1.06×10 ⁵	4.64×10 ⁻⁴	0.9977
2126-Hu-L17		Y55Q	46	7.91×10 ⁻⁹	9.93×10 ⁴	7.86×10 ⁻⁴	0.9991
2126-Hu-L18	L91	H91S	58.3	8.83×10 ⁻⁹	1.03×10 ⁵	9.12×10 ⁻⁴	0.9989
2126-Hu-L19		H91A	77.9	8.07×10 ⁻⁹	1.05×10 ⁵	8.50×10 ⁻⁴	0.9989
2126-Hu-L20		H91R	无表达	N/A	N/A	N/A	N/A
2126-Hu-L21		H91Y	51.8	1.77×10 ⁻⁹	1.09×10 ⁵	1.93×10 ⁻⁴	0.9988
2126-Hu-H22	H09	S09G	48.3	5.38×10 ⁻⁹	1.01×10 ⁵	5.43×10 ⁻⁴	0.9987
2126-Hu-H23	H18	V18L	57.6	5.90×10 ⁻⁹	1.06×10 ⁵	6.23×10 ⁻⁴	0.9985
2126-Hu-H24	H33	S33A	59.1	7.70×10 ⁻⁹	1.08×10 ⁵	8.30×10 ⁻⁴	0.9983
2126-Hu-H25	H53	E53N	61.3	7.57×10 ⁻⁹	9.90×10 ⁴	7.49×10 ⁻⁴	0.9985
2126-Hu-H26		E53D	43	1.11×10 ⁻⁸	1.07×10 ⁵	1.19×10 ⁻³	0.9989
2126-Hu-H27		E53G	50.9	1.67×10 ⁻⁹	9.79×10 ⁴	1.64×10 ⁻⁴	0.9986
2126-Hu-H28		E53Y	60.6	3.08×10 ⁻⁹	1.14×10 ⁵	3.50×10 ⁻⁴	0.9978
2126-Hu-H29		E53I	46.7	2.61×10 ⁻⁹	9.43×10 ⁴	2.46×10 ⁻⁴	0.9990
2126-Hu-H30	H56	E56N	38	1.31×10 ⁻⁸	1.15×10 ⁵	1.50×10 ⁻³	0.9979
2126-Hu-H31		E56D	34.9	8.81×10 ⁻⁹	1.07×10 ⁵	9.42×10 ⁻⁴	0.9982
2126-Hu-H32		E56S	56.3	8.96×10 ⁻⁹	1.11×10 ⁵	9.98×10 ⁻⁴	0.9980
2126-Hu-H33	H62	D62K	21.4	2.83×10 ⁻⁹	1.09×10 ⁵	3.10×10 ⁻⁴	0.9975
2126-Hu-H34		D62N	38.9	4.31×10 ⁻⁹	1.05×10 ⁵	4.54×10 ⁻⁴	0.9988

抗体名称	单点突变		瞬转表达量 (mg/L)	抗原结合动力学			
	突变位点	突变氨基酸		K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	Full R ²
2126-Hu-H35	H63	F63V	53.8	5.87×10 ⁻⁹	1.03×10 ⁵	6.03×10 ⁻⁴	0.9989
2126-Hu-H36	H68	V68T	60.1	5.30×10 ⁻⁹	1.05×10 ⁵	5.58×10 ⁻⁴	0.9987
2126-Hu-H37		V68S	52.4	5.31×10 ⁻⁹	1.03×10 ⁵	5.45×10 ⁻⁴	0.9988
2126-Hu-H38	H69	F69I	42.5	8.40×10 ⁻⁹	1.04×10 ⁵	8.74×10 ⁻⁴	0.9986
2126-Hu-H39	H71	L71V	50.3	4.87×10 ⁻⁹	1.05×10 ⁵	5.09×10 ⁻⁴	0.9984
2126-Hu-H40		L71R	35.3	1.92×10 ⁻⁹	1.04×10 ⁵	2.00×10 ⁻⁴	0.9980
2126-Hu-H41	H75	V75I	无表达	N/A	N/A	N/A	N/A
2126-Hu-H42		V75K	54.1	5.11×10 ⁻⁹	1.07×10 ⁵	5.46×10 ⁻⁴	0.9975
2126-Hu-H43		V75T	48.9	7.20×10 ⁻⁹	1.07×10 ⁵	7.69×10 ⁻⁴	0.9988
2126-Hu-H44	H82	I82L	66.6	5.30×10 ⁻⁹	1.06×10 ⁵	5.62×10 ⁻⁴	0.9988
2126-Hu-H45		I82M	49.3	5.76×10 ⁻⁹	1.04×10 ⁵	5.98×10 ⁻⁴	0.9984
2126-Hu-H46	H91	F91Y	43.4	5.70×10 ⁻⁹	1.05×10 ⁵	5.97×10 ⁻⁴	0.9986
2126-Hu-H47	H97	R97F	53.2	1.78×10 ⁻⁸	2.04×10 ⁵	3.62×10 ⁻³	0.9186
2126-Hu-H48		R97K	50.4	3.41×10 ⁻⁸	1.15×10 ⁵	3.92×10 ⁻³	0.9958
2126-Hu-H49		R97N	52.5	3.59×10 ⁻⁸	1.49×10 ⁵	5.33×10 ⁻³	0.9856
2126-Hu-H50		R97Y	59.1	8.00×10 ⁻⁹	1.13×10 ⁵	9.02×10 ⁻⁴	0.9434
2126-Hu-H51	H98	Y98F	46.4	2.38×10 ⁻⁸	1.03×10 ⁵	2.44×10 ⁻³	0.9989
2126-Hu-H52		Y98S	23.6	1.93×10 ⁻⁸	1.52×10 ⁵	2.92×10 ⁻³	0.9207
2126-Hu-H53		Y98N	45.8	4.69×10 ⁻⁸	1.01×10 ⁵	4.75×10 ⁻³	0.9917
2126-Hu-H54		Y98G	43	7.96×10 ⁻⁹	1.18×10 ⁵	9.36×10 ⁻⁴	0.9401
2126-Hu-H55	H99	D99A	52.4	3.37×10 ⁻⁸	1.34×10 ⁵	4.52×10 ⁻³	0.9839
2126-Hu-H56		D99E	48.6	3.62×10 ⁻⁸	1.31×10 ⁵	4.76×10 ⁻³	0.9915
2126-Hu-H57		D99G	51.6	1.45×10 ⁻⁸	1.50×10 ⁵	2.17×10 ⁻³	0.9272
2126-Hu-H58		D99Q	108	2.63×10 ⁻⁸	1.55×10 ⁵	4.09×10 ⁻³	0.9834
2126-Hu-H59		D99S	47.5	2.53×10 ⁻⁸	1.13×10 ⁵	2.87×10 ⁻³	0.9971
2126-Hu-H60		D99Y	52.8	2.38×10 ⁻⁸	1.52×10 ⁵	3.61×10 ⁻³	0.9604
2126-Hu-H61	H100B	M100F	39.8	2.20×10 ⁻⁸	9.14×10 ⁴	2.01×10 ⁻³	0.9989
2126-Hu-H62		M100W	45.8	3.48×10 ⁻⁸	1.43×10 ⁵	4.99×10 ⁻³	0.9600
2126-Hu-H63		M100Y	40	2.69×10 ⁻⁸	1.07×10 ⁵	2.87×10 ⁻³	0.9981
Hu2126-H2K1	N/A	N/A	44	4.71×10 ⁻⁹	9.96×10 ⁴	4.69×10 ⁻⁴	0.9983

L 为轻链；H 为重链；N/A 代表不适用；Full R² 表示拟合曲线与实测曲线的相似度。

3.3 抗 HER2 人源化抗体 Hu2126-H2K1 的组合突变优化

优选上述轻链中的单点突变进行组合后引入到 Hu2126-K1 中，以及优选上述重链中的单点突变进行组合后引入到 Hu2126-H2 中，分别构建轻链突变组合表达质粒和重链突变组合表达质粒，然后将轻、重链表达质粒进行配对并瞬转 ExpiCHO-S 细胞，培养表达和纯化后获得 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu10 ~ -Mu19（简称 7172b-Mu10 ~ -Mu19），共计 10 个抗体突变体。按照实施例 1 中第 1.8 项所述方法，利用 ForteBio 检测含组合突变的人源化抗体与 HER2 的结合动力学。

各抗体突变体所含的组合突变以及抗原结合动力学分析结果如表 11 所示，抗体 7172b-Mu10、7172b-Mu14、7172b-Mu17 和 7172b-Mu19 与 HER2 的结合亲和力明显高于母本抗体 Hu2126-H2K1。

表 11. 抗体 Hu2126-H2K1 的组合突变优化，以及与 HER2 的结合动力学分析结果

抗体名称	组合突变		抗原结合动力学			
	轻链突变组合	重链突变组合	K _D (M)	k _a (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	Full R ²
7172b-Mu10	K24R, Y53S, Y55P, H91Y, S50A	E53G, V68T, F69I, L71R, F91Y,	3.38×10 ⁻⁹	1.05×10 ⁵	3.56×10 ⁻⁴	0.9981
7172b-Mu11	K24R, Y53S, Y55P, H91Y, S50D		5.35×10 ⁻⁹	9.01×10 ⁴	4.82×10 ⁻⁴	0.9990
7172b-Mu12	K24R, Y53S, Y55P, H91Y, S50E		6.74×10 ⁻⁹	7.83×10 ⁴	5.28×10 ⁻⁴	0.9991
7172b-Mu13	K24R, Y53S, Y55P, H91Y, S50K		7.23×10 ⁻⁹	9.78×10 ⁴	7.07×10 ⁻⁴	0.9985

7172b-Mu14	K24R, Y53S, Y55P, H91Y, S50L	V75K	8.25×10^{-10}	1.01×10^5	8.31×10^{-5}	0.9978
7172b-Mu15	K24R, Y53S, Y55P, H91Y, S50Q		4.49×10^{-9}	1.06×10^5	4.77×10^{-4}	0.9974
7172b-Mu16	K24R, Y53S, Y55P, H91Y, S50R		5.77×10^{-9}	1.00×10^5	5.78×10^{-4}	0.9971
7172b-Mu17	K24R, Y53S, Y55P, H91Y		2.80×10^{-9}	9.85×10^4	2.76×10^{-4}	0.9968
7172b-Mu18	K24R, Y53S, Y55P, H91Y, S50W		7.96×10^{-9}	1.24×10^5	9.88×10^{-4}	0.9967
7172b-Mu19	K24R, Y53S, Y55P, H91Y, S50Y		2.90×10^{-9}	1.08×10^5	3.14×10^{-4}	0.9978

Full R²表示拟合曲线与实测曲线的相似度。

实施例 4 抗 HER2 互补性双特异抗体的构建、优化及功能活性鉴定

4.1 抗 HER2 互补性双特异抗体的构建

本实施例选择能够分别识别 HER2 胞外区不同表位且彼此之间互不竞争的一对单特异性抗体（Hu2117-HK304 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14）进行示例性互补性双特异抗体的构建。如图 9 所示，双抗构型为 DVD-IgG 结构，Fv 结构域为 Hu2117-HK304 的可变区序列，IgG 结构域为 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14 序列，其中 Fv 结构域的重链可变区与 IgG 结构域的重链通过连接子(G₄S)₁ 相连，Fv 结构域的轻链可变区与 IgG 结构域的轻链通过连接子(G₄S)₃ 相连，同时为了避免抗体 Fc 区介导的效应子功能可能对非靶细胞造成杀伤作用，通过在双抗分子 Fc 区中引入 L234F/L235E/P331S（EU Numbering）突变（简称“TM 突变”）以降低其与 FcγRs 和 C1q 的结合，从而消除 Fc 效应子功能，所构建的互补性双特异抗体命名为 04BS-109-WT。将 04BS-109-WT 双抗表达质粒瞬转 ExpiCHO-S 细胞进行抗体蛋白表达，并通过 Protein A 亲和层析纯化，纯化过程中发现 04BS-109-WT 双抗分子在洗脱时（洗脱液不含 NaCl）发生胶体状沉淀，洗脱产物在溶液中呈浑浊状，但在加入 0.1 M NaCl 后胶状沉淀逐渐溶解，抗体溶液最终呈澄清状。

4.2 抗 HER2 互补性双特异抗体的优化

通过 MOE 软件分析，在互补性双特异抗体 04BS-109-WT 的 Fv 结构域的 HCDR2 序列中设计了一系列突变拟改善双抗分子的稳定性，所设计的突变如表 12 所示并分别命名为 04BS-1123-ST01 ~ -ST06。通过 PCR 在 04BS-109-WT 分子序列中引入突变，将构建的各双抗突变体表达质粒瞬转 ExpiCHO-S 细胞并进行无血清培养以表达抗体蛋白。按照实施例 2 第 2.2 项所述方法，利用 ForteBio 检测培养上清中的抗体表达量，结果显示 04BS-1123-ST03 抗体的表达量过低（<30 mg/L），其余双抗突变体在瞬转培养 10 天后的表达量均在 300 mg/L 以上。在经过 Protein A 亲和层析纯化后，SEC-HPLC 分析显示各双抗突变体的单体纯度均接近 100%。然而，纯化过程中发现各双抗突变体的分子稳定性差异明显（如表 12 所示），其中 04BS-1123-ST06 双抗在 Protein A 亲和层析纯化洗脱过程中，无论洗脱液是否含有 0.1 M NaCl，样品溶液都呈澄清状，表明 04BS-1123-ST06 双抗的分子稳定性似优于其它突变体以及母本抗体 04BS-109-WT。

表 12. 示例性抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-109-WT 及其突变体的分子稳定性表现

抗体名称	Fv 结构域的 HCDR2 氨基酸序列	Protein A 亲和层析洗脱前后分子稳定性表现		
		常规洗脱液（不含 NaCl）		洗脱液含 0.1 M NaCl
		洗脱后不加 NaCl	洗脱后加 NaCl 至 0.1M	
04BS-109-WT	SISIGGGNYAKYVPSVKG	胶体状沉淀，不透光度 5 分	澄清透亮，不透光度 0 分	澄清透亮，不透光度 0 分
04BS-1123-ST01	SISIGGG <u>S</u> YTKYVPSVKG	中和后出现沉淀，不透光度 3 分	出现沉淀，不透光度 2 分	未检测
04BS-1123-ST02	SISIGGG <u>S</u> YTKYVGSVKG	中和后出现沉淀，不透光度 3 分	出现沉淀，不透光度 2 分	未检测
04BS-1123-ST03	SISIGGG <u>S</u> YTKYVESVKG	表达量过低，分子稳定性未评估		
04BS-1123-ST04	SISIGGG <u>S</u> YTKY <u>P</u> ESVKG	中和后出现浑浊，不透光度 2 分	加 NaCl 后逐渐溶解，但仍有部分沉淀	澄清透亮，不透光度 0 分
04BS-1123-ST05	SISIGGG <u>S</u> YTKY <u>P</u> DKVKG	中和后出现浑浊，不透光 1 分	澄清透亮，不透光度 0 分	澄清透亮，不透光度 0 分
04BS-1123-ST06	SISIGGG <u>S</u> YTKYVD <u>K</u> VKG	澄清透亮，不透光度 0 分	澄清透亮，不透光度 0 分	澄清透亮，不透光度 0 分

注：下划线氨基酸残基表示在 Hu2117-HK304 的 HCDR2 序列中引入的氨基酸突变。

4.3 抗 HER2 人源化抗体 Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14 的细胞竞争结合检测

由 04BS-1123-ST06 的 Fv 结构域序列衍生而来的抗 HER2 单特异性抗体被命名为 Hu2117-HK304-06。为了进一步确认优化后的抗体 Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14 是否保留了其母本抗体（嵌合抗体 mAb2117 与 mAb2126）不竞争结合 HER2 的特性，本实验按照实施例 1 中第 1.5 项所述方法，

将梯度稀释自 800 $\mu\text{g/mL}$ 的这两个优化抗体分别与 8 $\mu\text{g/mL}$ 生物素标记的 Hu2117-HK304-06 抗体等体积混合后与 BT474 细胞进行孵育, 然后以 AF488 标记的链酶亲和素 (Jackson Immuno) 为二抗, 通过流式细胞术检测这两个抗体在表达 HER2 的肿瘤细胞上的竞争抑制活性。结果如图 10 所示, Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14 之间不竞争结合表达于细胞表面的 HER2。

4.4 抗 HER2 互补性双特异抗体的细胞内吞反应以及溶酶体转运/降解效率分析

本实施例利用流式细胞术对上述示例性抗 HER2 互补性双特异抗体在表达不同水平 HER2 的细胞 (包括 BT474、JIMT-1、RT-112) 中的内吞率进行了测定。具体方法如下: 细胞经胰蛋白酶消化收集后, 用预冷的 FACS 缓冲液清洗并重悬至 $6\sim 10\times 10^6$ 细胞/mL; 将细胞悬液以 300 μL /孔转移至 96 孔 U 型深孔板中, 随后在各孔中加入 300 μL 待测抗体 (抗体终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$), 混匀后在冰上孵育 30~60 分钟; 用预冷的 FACS 缓冲液清洗两次后, 各孔细胞以 600 μL /孔预冷的 FACS 缓冲液充分重悬, 随后以 100 μL /孔将细胞悬液均匀分装至 5 块 96 孔 U 型板中, 任取其中一块板作为对照组置于冰上孵育, 其余 4 块板作为实验组置于 37°C 孵育并分别于 30 分钟、1 小时、2 小时和 4 小时后将其中一块板转移至冰上冷却以终止内吞反应; 待全部孔板孵育完毕后, 各孔中加入预冷的 FACS 缓冲液清洗细胞 2 次, 并加入 100 μL /孔固定液 (2% 多聚甲醛), 置于 4°C 过夜; 在各板中加入预冷的 FACS 缓冲液清洗 2 次后以 100 μL /孔加入 1:1000 稀释于预冷的 FACS 缓冲液的 AF488 标记的抗-人 IgG(H+L) 抗体 (Jackson Immuno), 重悬细胞后在冰上避光孵育 40 分钟; 加入预冷的 FACS 缓冲液清洗细胞 2 次, 以 100 μL /孔 FACS 缓冲液重悬细胞后利用流式细胞仪进行检测。抗体的内吞率 (百分比值) 以如下公式进行计算: $(\text{MFI}_{\text{对照组}} - \text{MFI}_{\text{实验组}}) / \text{MFI}_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。结果如图 11 所示, 相较于对照抗体 Trastuzumab 以及相关的单特异性抗体 Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14, 抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST04、04BS-1123-ST05、04BS-1123-ST06 及其母本抗体 04BS-109-WT 在 BT474、JIMT-1 和 RT-112 细胞中均能诱发更加快速高效的内吞, 其中, 所述互补性双特异抗体在 JIMT-1 和 RT-112 细胞中内吞率可达 60% 左右, 在 BT474 细胞中内吞率可高达 80% 左右。

为了进一步验证抗 HER2 互补性双特异抗体在内吞后被转运入溶酶体中, 本实施例利用共聚焦显微镜方法对抗体的亚细胞定位进行了检测。具体方法如下: 收集 SKBR-3 细胞, 铺入 5 块 8 孔腔室载玻片 (Thermo) 中进行培养; 待细胞生长至均一单层后, 弃去培养基并用 PBS 润洗一次; 在腔室载玻片的小室中分别加入 500 μL 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06、对照抗体 Trastuzumab、或人 IgG 同型对照抗体 (如 WO2003106496A1 中所述的抗 HIV/gp120 抗体), 于冰上孵育 1 小时; 任选其中一块腔室载玻片作为 0 小时对照, 用预冷的 PBS 润洗一次后加入 2% 多聚甲醛进行固定, 其余 4 块则置于 37°C 分别孵育 0.5 小时、2 小时、4 小时和 8 小时后用预冷 PBS 润洗一次, 并加入 2% 多聚甲醛于 4°C 静置固定过夜; 用 PBST (PBS 含 0.05% Tween-20) 润洗两次后, 于各小室中加入 250 μL 固定破膜液 (PBS 含 2% 山羊血清和 0.5% Triton X-100) 室温孵育 10 分钟; 用 PBST 润洗两次, 在各小室中加入 250 μL 稀释于 FACS 缓冲液 (PBS 含 2% FBS) 的小鼠抗-LAMP1 抗体 (1:50 稀释, BD) 和 AF488 标记的山羊抗人 IgG 抗体 (2 μg , Molecular Probes), 于室温避光孵育 1 小时; 用 PBST 润洗两次, 于各小室中加入 250 μL 含 AF647 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (1:250 稀释, Molecular Probes) 的 FACS 缓冲液, 于室温避光孵育 1 小时; 用 PBST 润洗两次, 于各小室加入终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 DAPI 染色 1 分钟; 用 PBST 润洗 1 次后, 滴加封板液 (Thermo) 进行封板, 并于室温避光静置过夜; 利用共聚焦显微镜进行扫描分析。结果如图 12 所示, 人 IgG 同型对照抗体孵育的细胞在各时间点都未检测到绿色荧光信号, 表明细胞没有非特异性的抗体结合; 阳性对照抗体 Trastuzumab 孵育的细胞能检测到绿色荧光信号, 并且在各时间点没有明显差别, 均呈环状均匀分布于细胞膜上, 与红色荧光所标记的溶酶体未出现重合, 说明 Trastuzumab 能够结合 SKBR-3 细胞上的 HER2, 但未发生显著的内吞和溶酶体转运; 而抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 孵育的细胞随着处理时间的进展, 绿色荧光信号逐渐由细胞膜上转向细胞内, 并与红色荧光标记的溶酶体出现重合 (呈黄色, 如图中箭头所示), 之后黄色荧光信号强度随着时间的推移逐渐减弱甚至完全消失, 说明内吞的抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 被转运进了溶酶体内并发生降解, 其溶酶体转运效率几乎为 100%。

通过 Western-blot 方法检测 HER2 的降解, 更进一步验证了抗 HER2 互补性双特异抗体在结合细胞表面 HER2 后被内吞以及转运进溶酶体内被降解的结局。具体方法如下: 收集 BT474 细胞, 用完全培养基 (含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基) 重悬至 1×10^6 细胞/mL, 以 500 μL /管分装细胞悬液至 1.5-mL EP 管中; 用完全培养基将待测抗体 (包括互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06, 对照抗体 Trastuzumab, 以及所述互补性双特异性抗体对应的单特异性抗体 Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14) 稀释至 300 $\mu\text{g/mL}$, 随后以 100 μL /管分别加入上述 EP 管内 (抗体终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$); 将各 EP 管置于 37°C/5% CO_2 孵箱中静置孵育 24 小时, 然后离心收集细胞并用预冷的 PBS 清洗 2 次; 以 100 μL /管加入 RIPA 裂解液 (Proteintech) 重悬细胞并于冰上孵育 30 分钟; 各管于 4°C 高速离心 10 分钟后收集裂解液上清, 利用 BCA 试剂盒 (Thermo) 对提取液中的蛋白浓度进行定量; 根据蛋白浓度, 用 RIPA 裂解液将各提取液中蛋白浓

度稀释至 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，随后加入含 DTT 的 5 $\times$ SDS-PAGE 样品缓冲液，并于 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 分钟以制备 SDS-PAGE 上样样品。将处理好的样品以 10 $\mu\text{L}/\text{道}$ (即 1 $\mu\text{g}/\text{lane}$) 加样至 10% SDS-PAGE 凝胶上进行电泳，随后以 80V 的电压将蛋白转印至 PVDF 膜上；用 5% 脱脂牛奶室温封闭 PVDF 膜 1 小时，随后在 55 kDa 分子量 Marker 处将膜裁剪成两半，其中上半部分加入 1:5000 稀释的兔抗人 HER2 抗体 (CST) 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，下半部分加入 1:10,000 稀释的鼠抗人 GAPDH 抗体 (Proteintech) 并于室温孵育 1 小时；孵育完成后，用 PBST 清洗 3 次，随后各自加入 1:5000 稀释的山羊抗兔 IgG-HRP 抗体 (Jackson Immuno) 和山羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体 (Jackson Immuno)，室温孵育 1 小时；用 PBST 清洗 3 次，随后利用 ECL 显影液 (南京诺唯赞) 进行曝光显影。结果如图 13 所示，互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 能够有效诱导降解 BT474 细胞的 HER2，而对照抗体则不能诱发 HER2 的降解。

本实施例还检测了互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 对 BT474 细胞增殖的影响。具体方法如下：在 96 孔白壁板中接种 BT474 细胞 (10,000 细胞/孔)，并加入梯度稀释的待测抗体 (包括 04BS-1123-ST06、Trastuzumab、Pertuzumab、Hu2117-HK304-06、Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14)，细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ /5% CO_2 孵育 5 天后加入检测试剂 CellCounting-Lite 2.0 Luminescent Reagent (南京诺唯赞)，并用多功能酶标仪 (Varioskan, Thermo) 读取化学发光值，利用 GraphPad Prism 9 软件对实验数据进行分析。结果如图 14 所示，互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 能够有效抑制 BT474 细胞的增殖，但是对应的单特异性抗体均没有抑制 BT474 细胞增殖的活性。由于 BT474 细胞的增殖依赖于其过表达的 HER2 在细胞膜上形成的同源二聚体所激活的信号转导机制，因此推断所述互补性双特异抗体的细胞增殖抑制活性是因细胞表面 HER2 被内吞/降解而使 HER2 同源二聚体无法形成所致。

4.5 抗 HER2 互补性双特异抗体对 NRG-1 诱导的 HER2/HER4 二聚化的影响

利用 Promega 的 NanoBiT 结构互补报告分子系统对抗 HER2 互补性双特异抗体是否会影响 NRG-1 诱导的 HER2/HER4 二聚化展开了进一步验证。NanoBiT 系统由一个 LgBiT 亚基和一个 SmBiT 亚基组成，可分别与待测蛋白融合；若两个待测蛋白相互作用形成二聚体，LgBiT 则会和 SmBiT 结构互补形成功能性荧光素酶，进而与底物反应产生发光信号。在本实施例中，首先通过分子克隆技术将编码 HER2 和 HER4 膜外区及跨膜区的 DNA 序列插入 NanoBiT 系统 pBiT1.3-C 和 pBiT2.3-C 载体中，然后将这两个质粒共转染 U2OS 细胞；于转染 24 小时后收集细胞，并铺于 96 孔白壁板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。将互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06、人源化抗体 Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14、嵌合抗体 mAb2117 和 mAb2126、以及对照抗体 Trastuzumab 和 Pertuzumab 进行梯度稀释，随后按照 1:1 的体积比与 NRG-1 混匀待用 (NRG-1 的终浓度为 1 nM)。于 96 孔白壁板中加入 Nano-Glo Live Cell Reagent (Promega)，并读取此时的化学发光值作为本底，随后在各孔中加入上述制备好的样品，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 6 分钟后读取化学发光值，并利用 GraphPad Prism 9 软件对实验数据进行分析。结果如图 15 所示，对照抗体 Trastuzumab 和 Pertuzumab 能够显著抑制 NRG-1 诱导的 HER2/HER4 二聚化，而嵌合抗体 mAb2117 和 mAb2126、单特异性人源化抗体 Hu2117-HK304-06 和 Hu2126-H2K1-L71-H72b-Mu14 (图 15A) 以及基于这两个单特异性人源化抗体所构建的互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 (图 15B) 均不具有抑制作用，该结果进一步说明所述抗 HER2 互补性双特异抗体不会影响 HER2 的正常生物学功能，因而其在体内诱发心脏毒性的风险极低。

4.6 抗 HER2 互补性双特异抗体对 NRG-1 诱导的 HER2 下游信号转导通路激活的影响

人体细胞诱导的多能干细胞 (Induced Pluripotent Stem Cell, 简称 iPSC) 以及相关培养试剂盒购自 Fujifilm Cellular Dynamics。按照生产商提供的指导说明书所述的方法，将 iPSC 铺入 6 孔板并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养一周时间使细胞完全分化为人心肌细胞 (iCell Cardiomyocytes)。按照实施例 1 中第 1.10 项所述方法检测抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 对 NRG-1 诱导的人心肌细胞内 AKT 磷酸化的影响。结果如图 16 所示，不同于阳性对照抗体 Pertuzumab，04BS-1123-ST06 对人心肌细胞中 NRG-1 诱导的 AKT 磷酸化无抑制作用，说明所述互补性双特异抗体不影响心肌细胞中 NRG-1 诱导的 HER2 二聚化及其下游信号转导通路的调控。

4.7 抗 HER2 互补性双特异抗体的 Fc 效应子功能改造

为了降低因 Fc 效应子功能而带来的潜在安全性风险，本实施例在所述抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 的 Fc 区中引入了三个点突变：L234F/L235E/P331S (简称 TM 突变)，以降低抗体与 Fc 受体及 C1q 的结合活性。通过 ForteBio 检测证实了含有 TM 突变的互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 与 Fc γ RI、Fc γ RIIa (167H)、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa (176V)、Fc γ RIIIa (176F) 及 C1q 均无明显结合反应，然而，所述互补性双特异抗体与 FcRn 的结合亲和力相较于 Trastuzumab 则无显著变化 (数据未显示)。

此外，本实施例还以表达 Fc γ RIIIa-176V 受体和 NFAT 反应元件调控的萤火虫荧光素酶报告基因的 Jurkat 细胞 (Promega) 为效应细胞，以过表达 HER2 的 BT474 细胞为靶细胞，并以 Trastuzumab 为阳性对照抗体，进一步对含有 TM 突变的互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 是否具有 ADCC 活性进行了验证。具体方法如下：离心收集 BT474 细胞，用 ADCC 检测缓冲液 (含有 0.5% FBS 的 RPMI-1640 培养基) 重悬后，以 1.5×10^4 细胞/孔加入 96 孔白壁板中。用 ADCC 检测缓冲液梯度稀释待测抗体，以 25 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入

上述 96 孔板中。离心收集效应细胞并用 ADCC 检测缓冲液重悬后,以 1.5×10^5 细胞/孔加入上述 96 孔板中,然后于 37°C、5% CO₂ 下孵育过夜。第二天将 96 孔板置于室温平衡,然后加入检测试剂 Bio-Lite Luciferase Reagent (南京诺唯赞),利用多功能酶标仪 (Varioskan, Thermo) 读取化学发光值,并利用 GraphPad Prism 9 软件对实验数据进行分析。检测结果如图 17 所示,不同于阳性对照抗体 Trastuzumab, 04BS-1123-ST06 即使在最高浓度下也未诱导任何荧光素酶的表达,表明在 Fc 区引入 TM 突变的抗 HER2 互补性双特异抗体不具有 ADCC 活性。

实施例 5 抗 HER2 互补性双特异抗体 ADC 的制备与功能活性鉴定

5.1 抗 HER2 互补性双特异抗体-药物偶联物的制备

本实施例将抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 通过可裂解接头 (例如, Mal-(PEG)₂-VC-PAB、Mal-(PEG)₂-GGFG) 与具有抗肿瘤活性的小分子毒素化合物艾日布林 (Eribulin) 偶联以制备抗 HER2 互补性双特异 ADC。所述艾日布林是根据 ZL201910197071.8 或 ZL201910509222.9, 以及 WO1999065894 中所述方法制备得到。

药物有效载荷 (Payload) Mal-(PEG)₂-VC-PAB-Eribulin 的制备参考 WO2017151979 实施例 2.1.1 中所述的方法。

药物有效载荷 Mal-(PEG)₂-GGFG-Eribulin 的制备方法如下: 将 NH₂-(PEG)₂-COOH 和马来酸酐加入醋酸中, 加热回流过夜, 旋蒸除去醋酸, 残留物经 HPLC 制备、冻干即得 Mal-(PEG)₂-COOH。以 2Cl Trt Resin 为固相载体, 用 20% 哌啶/DMF (v/v) 溶液脱除 Fmoc 保护, 再以 HOBT/DIC 为缩合体系, DMF 为反应溶剂, 依次偶联 Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gly-OH, 然后经 DCM:TFE:AcOH=7:2:1 溶液切割, 甲基叔丁基醚沉淀, 离心, 干燥, 再经高效液相制备纯化, 获得 Fmoc-GGFG-OH。将 Fmoc-GGFG-OH 和艾日布林置于单口瓶中, 加入 DMF 溶解, 降温至 0°C, 再加入 DIPEA (161.3 mg, 1.25 mmol) 和 DECP (122.3 mg, 0.75 mmol) 后于室温反应, HPLC 监测, 反应结束后将反应液倒入 MTBE (100 mL) 中, 室温搅拌 1 小时, 过滤, 滤饼用 MTBE 洗涤, 得到 Fmoc-GGFG-Eribulin 粗品。将 Fmoc-GGFG-Eribulin 粗品置于单口瓶中, 加入 THF, 降温至 0°C, 再加入两当量的 LiOH 水溶液, 于室温反应, HPLC 监测, 反应结束后用 50% 乙酸调 pH 至 6-7 左右, 旋蒸除去 THF, 再经高效液相纯化, 收集 NH₂-GGFG-Eribulin 纯品。于室温条件下将 HATU 加入 Mal-(PEG)₂-COOH 和碳酸氢钠的 DMF 溶液中, 搅拌 30 分钟后, 将等当量游离的 NH₂-GGFG-Eribulin 加入上述溶液中再搅拌 1 小时至 TLC 检测反应完毕, 过滤除去固体, 过滤液经 HPLC 制备即得 Mal-(PEG)₂-GGFG-Eribulin。

抗 HER2 互补性双特异 ADC 的制备方法如下: 冰水浴下将 ZnCl₂ (3.0 mM) 和 TCEP (6.0 mM) 缓慢加入到抗 HER2 互补性双特异抗体 04BS-1123-ST06 (1.5 mM) 溶液中 (抗体试剂缓冲液为 50 mM Histidine-HCl, 8% 蔗糖, pH 5.5), 其中 ZnCl₂、TCEP 及 04BS-1123-ST06 抗体的反应终浓度分别为 0.10 mM、0.20 mM 和 0.05 mM, 混匀后在 8°C 震荡还原约 16 小时。冰水浴下加入溶解于 DMSO 中的 Mal-(PEG)₂-VC-PAB-Eribulin 或 Mal-(PEG)₂-GGFG-Eribulin 至终浓度 0.32 mM, 于 8°C 持续反应 3 小时后加入半胱氨酸至终浓度 0.05 mM 以耗尽过量的 Mal-(PEG)₂-VC-PAB-Eribulin 或 Mal-(PEG)₂-GGFG-Eribulin。加入 EDTA 至终浓度 0.15 mM 以螯合 Zn²⁺, 使用 Pellicon XL Ultrafiltration 过滤膜包 (Module Ultracel 30kDa/0.005m², 购自 Merck) 除去相关杂质。最后, 使用 HIC-HPLC (BioCore HIC-Butyl 5μm/4.6×100 mm, 购自 NanoChrom) 分析所制备的 ADC 的药物-抗体比率 (DAR) 和异质性, 并使用 SEC-HPLC (Zenix-C SEC-300, 购自赛分科技) 分析 ADC 产物的纯度。

所制备的 ADC 的平均 DAR 值可以通过以下公式计算: 平均 DAR 值 = $[AUC_{+1} + 2(AUC_{+2}) + 3(AUC_{+3}) + \dots + n(AUC_{+n})] / \Sigma AUC_{\text{总}}$ 。其中, AUC₊₁ 为对应于偶联了一个小分子化合物的 ADC 的峰曲线下面积, AUC₊₂ 为对应于偶联了两个小分子化合物的 ADC 的峰曲线下面积, 以此类推, $\Sigma AUC_{\text{总}}$ 为所有峰曲线下面积。本实施例制备的 ADC 的平均 DAR 值为 4.0±0.5, 纯度为 >95%。

5.2 抗 HER2 互补性双特异 ADC 的抗原结合特异性验证

按照实施例 1 中第 1.4 项所述方法, 利用 ELISA 方法检测示例性抗 HER2 互补性双特异 ADC (ST06-VCP-Eribulin) 与 HER2 重组蛋白的结合活性, 以及与人源 ErbB/HER 家族其它成员的交叉结合活性, 抗原包括人 HER2 胞外区重组蛋白以及人 EGFR、HER3 和 HER4 胞外区重组蛋白。检测结果如图 18 所示, 抗 HER2 互补性双特异 ADC (ST06-VCP-Eribulin) 能够特异性地结合 HER2, 而与人 ErbB/HER 家族其它成员无交叉结合活性。所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 的抗原结合特异性与其相应裸抗 04BS-1123-ST06 的相当 (数据未显示), 表明偶联小分子毒素化合物后并未改变所述互补性双特异抗体的抗原结合特异性。

5.3 抗 HER2 互补性双特异 ADC 的体外肿瘤细胞杀伤活性的检测

本实施例选用了一系列表达不同水平 HER2 的肿瘤细胞株来评估所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 的体外细胞杀伤活性, 所用肿瘤细胞株的 HER2 表达水平以及耐药性情况如表 13 所示; 其中 JIMT-1 为 HER2

过表达且先天型对 DS-8201(体外活性)耐药的细胞株,SKOV-3R*为 HER2 过表达且后天获得型对 DS-8201 耐药的细胞株。

体外肿瘤细胞杀伤活性检测的具体步骤如下:通过胰酶消化收集各细胞,用含 10% FBS 的培养基重悬细胞后接种于 96 孔白壁板中,每孔细胞数为 5,000 或 10,000。将细胞置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,待细胞完全贴壁后,加入梯度稀释于对应培养基中的 ST06-VCP-Eribulin、ST06-GGFG-Eribulin 或 DS-8201。根据各细胞生长速率,在 37℃/5% CO₂ 条件下孵育 3~5 天后将细胞培养板从孵箱中取出,待平衡至室温后加入 CellCount Lite2.0 试剂(南京诺唯赞),振荡混匀 2~5 分钟使细胞充分裂解;室温静置 10 分钟后利用多功能酶标仪(Varioskan, Thermo)读取化学发光值。数据用 GraphPad Prism 9 软件进行分析,并以相对于未处理对照孔的化学发光值的百分比表示。

检测结果如图 19 和表 13 所示,在 HER2 过表达的肿瘤细胞株 NCI-N87、SKBR-3 及 SKOV-3 中,所述抗 HER2 互补性双特异 ADC(包括 ST06-GGFG-Eribulin 和 ST06-VCP-Eribulin)和对标分子 DS-8201 均表现出较强的细胞毒性,并且所述互补性双特异 ADC 的细胞杀伤活性明显高于 DS-8201。在 HER2 低表达的肿瘤细胞株 MDA-MB-361 和 MDA-MB-453 中,所述互补性双特异 ADC 的细胞杀伤活性显著高于 DS-8201;在 HER2 低表达的肿瘤细胞株 ZR-75-1 中,所述互补性双特异 ADC 也显示出有效的细胞杀伤活性,而 DS-8201 则几乎无细胞杀伤活性。在表达更低水平 HER2 的肿瘤细胞株 T47D、RT-112、MCF-7,以及无 HER2 表达的肿瘤细胞株 MDA-MB-468 中,所述互补性双特异 ADC 则没有明显的细胞毒性,显示所述互补性双特异 ADC 具有较好的安全性窗口。此外,在 HER2 高表达且对 DS-8201 具有先天型/固有耐药性的 JIMT-1 细胞中,所述互补性双特异 ADC(包括 ST06-GGFG-Eribulin 和 ST06-VCP-Eribulin)也表现出显著的细胞毒性。由此,所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 具有更加广谱的细胞杀伤活性,不仅能够杀伤 HER2 过表达的肿瘤细胞,也能够直接杀伤 HER2 低表达的肿瘤细胞,而且对 DS-8201 不应答的肿瘤细胞也具杀伤作用。

为了进一步验证抗 HER2 互补性双特异 ADC 是否能够杀伤对 DS-8201 治疗产生耐药性或复发/难治(Relapsed/Refractory)的肿瘤细胞,本实施例通过将 HER2 过表达的 SKOV-3 细胞在含逐步递增 DS-8201 浓度的培养基中持续传代培养的方式,筛选获得了对 DS-8201 具有获得型耐药性(Acquired Resistance)的肿瘤细胞株(命名为 SKOV-3R*),该细胞株能在含有 100 nM DS-8201 的培养基中正常增殖。体外细胞杀伤实验结果显示,所述互补性双特异 ADC(包括 ST06-GGFG-Eribulin 和 ST06-VCP-Eribulin)能够有效杀伤后天获得型耐药细胞株 SKOV-3R*。

表 13. 抗 HER2 互补性双特异 ADC 及 DS-8201 的体外细胞杀伤活性

肿瘤细胞	肿瘤类型	HercepTest® / FISH	细胞表面 HER2 表达量	体外细胞杀伤活性 (EC50, nM)		
				DS-8201	ST06-GGFG-Eribulin	ST06-VCP-Eribulin
NCI-N87	胃癌	3 ⁺	1,493,288	0.9841	0.1337	0.1273
SKBR-3	乳腺癌	3 ⁺	1,105,178	0.2103	0.0376	0.0387
SKOV-3	卵巢癌	3 ⁺	781,484	0.7408	0.0135	0.0140
MDA-MB-361	乳腺癌	2 ⁺	378,707	2.099	0.0019	0.0062
SKOV-3R*	卵巢癌	2 ⁺	271,851	—	0.0104	0.0143
JIMT-1	乳腺癌	2 ⁺ / FISH ⁺	167,741	—	0.0873	0.1754
MDA-MB-453	乳腺癌	2 ⁺	148,810	0.292	0.0079	0.0115
ZR-75-1	乳腺癌	1 ⁺	104,577	—	0.1292	0.1094
T47D	乳腺癌	1 ⁺	81,195	—	—	—
RT-112	膀胱癌	1 ⁺	46,068	—	—	—
MCF-7	乳腺癌	0	29,169	—	—	—
MDA-MB-468	乳腺癌	不表达	未检出	—	—	—

—: 无活性。

5.4 抗 HER2 互补性双特异 ADC 的旁观者杀伤效应

利用 HER2 高表达细胞株 BT474 和不表达 HER2 的细胞株 MDA-MB-468 对抗 HER2 互补性双特异 ADC ST06-GGFG-Eribulin 的旁观者杀伤效应进行了验证,具体方法如下:于第 0 天将 BT474 细胞以 10,000 个细胞/100 μL/孔铺入 96 孔白壁板中,37℃培养过夜;于第 1 天用培养基稀释 ST06-GGFG-Eribulin 至 20 nM,然后作 5 倍梯度稀释并以 100 μL/孔加入 BT474 细胞白壁板中(即起始终浓度为 10 nM),置于 37℃继续培养;于第 3 天将 MDA-MB-468 细胞以 10,000 个细胞/孔铺入新的 96 孔白壁板中,37℃培养过夜;于第 4 天移除 MDA-MB-468 细胞的培养上清,然后加入 100 μL/孔取自 BT474 细胞白壁板中的培养上清(BT474-conditioned Medium)作为旁观者杀伤效应的实验组,并以 100 μL/孔加入新鲜配制的自 10 nM 起始 5 倍梯度稀释的 ST06-GGFG-Eribulin 作为对照组,置于 37℃培养;于此同时,利用 CellCount Lite2.0

试剂对 BT474 细胞进行检测。待继续培养 72 小时后,加入 CellCount Lite2.0 试剂检测 MDA-MB-468 细胞的存活情况。利用 GraphPad Prism 9 软件对实验数据进行分析。结果如图 20A 所示,ST06-GGFG-Eribulin 作用 BT474 细胞 3 天后能够造成细胞的显著杀伤,且用其培养上清培养的 MDA-MB-468 细胞也表现出显著的细胞死亡,而新鲜配制的 ADC 溶液对该细胞则无任何的杀伤活性,表明 ST06-GGFG-Eribulin 在杀伤 BT474 细胞的同时,所释放到培养基中的小分子毒素化合物 Eribulin 能够杀伤不表达 HER2 的 MDA-MB-468 细胞。

此外,本实施例还通过共培养 BT474 细胞和不表达 HER2 的 Jurkat 细胞的方式进一步对 ST06-GGFG-Eribulin 的旁观者杀伤效应进行了验证,具体方法如下:收集 BT474 细胞和表达 GFP 的 Jurkat 细胞,各自以 1×10^5 细胞/孔单独或共同铺入 24 孔细胞培养板中,随后加入终浓度为 1 nM 的 ST06-GGFG-Eribulin,于 37°C 培养 72 小时后收集各孔中的细胞至流式管中,离心去上清后用 100 μ L FACS 缓冲液(含 1% BSA 的 PBS)重悬细胞,加入 3 μ L 7-AAD 进行死细胞染色后进行流式分析。其中,各管均收集分析 10 μ L 细胞液,在排除 7-AAD 阳性的死细胞后,利用侧向散射光通道和 GFP 通道对 BT474 和 Jurkat 细胞进行区分,最后通过比较在经 ST06-GGFG-Eribulin 或空白培养基(即,作为对照组,命名为 Medium)处理下存活细胞的计数来评估所述互补性双特异 ADC 是否具有旁观者效应。结果如图 20B 所示,在单独培养下,ST06-GGFG-Eribulin 对 BT474 细胞显示出明显的杀伤活性,而对 Jurkat 细胞则无杀伤,但在两种细胞共培养下,ST06-GGFG-Eribulin 对 BT474 和 Jurkat 细胞都造成了明显杀伤。

综上,以上两个实验结果均表明 ST06-GGFG-Eribulin 具有旁观者杀伤效应。

实施例 6 抗 HER2 互补性双特异 ADC 在小鼠皮下异种移植模型中的抗肿瘤活性检测

6.1 抗 HER2 互补性双特异 ADC 在基于肿瘤细胞株构建的小鼠皮下异种移植模型中的抑瘤活性

本实施例检测了抗 HER2 互补性双特异 ADC 在 3 种基于人肿瘤细胞株所构建的小鼠皮下异种移植肿瘤模型中的抗肿瘤活性,其中参比对照药物为 DS-8201(商品名 Enhertu,购自第一三共制药);所述 3 种肿瘤模型为:HER2 过表达的 NCI-N87 胃癌肿瘤模型、HER2 中度表达的 JIMT-1 乳腺癌肿瘤模型、和 HER2 低表达的 RT-112 膀胱癌肿瘤模型。具体方法如下:待细胞株(NCI-N87、JIMT-1、及 RT-112)培养至对数生长期后,收集细胞并以每只 $5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞接种至免疫缺陷型小鼠(Nude 或 SCID)的右侧前肢背部皮下。待肿瘤生长至 $200 \pm 50 \text{ mm}^3$ 后将小鼠随机分组(每组 8 只荷瘤小鼠),包括 ST06-GGFG-Eribulin 试验组、DS-8201 参比对照组、溶媒对照组(含 8% 蔗糖的 50 mM Histidine-HCl 溶液, pH 5.5)、以及抗体-小分子药物混合物 ADMix 对照组(ADMix 由裸抗 04BS-1123-ST06 和 Eribulin 以摩尔比 1:4 混合得到)。所有荷瘤小鼠均经尾静脉注射给药,不同模型中各组的给药剂量和给药频率如图 21 所示。给药后每周测量两次并记录小鼠的体重和肿瘤尺寸(长径、短径),并以下列公式计算肿瘤体积:肿瘤体积=(长径) $\times$ (短径) $^2 \times 0.5$ 。

实验结果如图 21 所示,与溶媒对照相比,DS-8201 和 ST06-GGFG-Eribulin 在 NCI-N87(图 21A)、JIMT-1(图 21B)和 RT-112(图 21C)肿瘤模型中均表现出显著的肿瘤生长抑制作用,而且 ST06-GGFG-Eribulin 的抗肿瘤活性在 NCI-N87 和 JIMT-1 模型中均表现出剂量依赖性的趋势。在相同的给药剂量(3 mg/kg)下,ST06-GGFG-Eribulin 在 HER2 过表达的 NCI-N87 肿瘤模型中表现出与 DS-8201 相当的抗肿瘤活性,但在 HER2 中等表达的 JIMT-1 肿瘤模型中则表现出比 DS-8201 更强的抗肿瘤活性,且具有显著的统计学差异($p < 0.01$)。在 HER2 低表达的 RT-112 肿瘤模型中,考虑到药物分子量及 DAR 的差异,ST06-GGFG-Eribulin 在等当量 DAR 的给药剂量(9 mg/kg)下表现出明显超越 DS-8201 的抗肿瘤活性,且所述抗肿瘤活性的差异具有显著的统计学意义($p < 0.01$)。整个实验期间,未观察到荷瘤小鼠的体重下降或其它毒副反应(数据未显示)。

6.2 抗 HER2 互补性双特异 ADC 在对 DS-8201 具有后天获得型耐药性的小鼠皮下异种移植瘤模型中的抑瘤活性

为了进一步验证所述抗 HER2 互补性双特异 ADC 对经 DS-8201 治疗后产生耐药性或复发的肿瘤是否具有杀伤作用,本实施例利用 NCI-N87 肿瘤细胞株构建了对 DS-8201 具有后天获得型耐药性的小鼠异种移植肿瘤模型。构建方法如下:将野生型 NCI-N87 细胞在含逐步递增 DS-8201 浓度的培养基中持续传代培养,筛选获得对 DS-8201 具有一定耐药性的细胞株亚群并命名其为 NCI-N87(R)。将 NCI-N87(R)细胞在含 10% 血清的 RPMI-1640 培养基中进行扩增培养至指数生长期,收集细胞并重悬于 PBS 与 Matrigel 的混合液(体积比为 1:1)中,然后于每只裸鼠(BALB/c Nude)的右侧前肢背部皮下接种 1×10^7 个细胞,每次接种 5 只雌性裸鼠,并开展获得型耐药性肿瘤的体内筛选,具体筛选步骤如下:待小鼠肿瘤体积达到 $200 \pm 50 \text{ mm}^3$ 时,尾静脉注射 DS-8201(剂量为 3 mg/kg),每周给药一次以筛选肿瘤在给药后仍稳定生长的荷瘤裸鼠;给药次数为 3~5 次,取决于肿瘤的生长速率。在肿瘤体积增长至 $900 \sim 1000 \text{ mm}^3$ 后,将小鼠安乐死并收集肿瘤,在剔除坏死组织后将肿瘤切割成约 30 mm^3 的小块,接种于 5 只雌性裸鼠背部右侧近前肢背部皮下并开展下一轮的 DS-8201 给药和筛选。经过如此 3 轮的筛选后,发现 5 只荷瘤裸鼠的肿瘤在 DS-8201(剂量为 3 mg/kg)给药后均能稳定生长,且增长趋势较为一致。待肿瘤体积增长至约 1000 mm^3 后,随机选取

2 只小鼠安乐死，收集肿瘤并剔除坏死组织，切割成约 30 mm^3 的小块后接种于 50 只雌性裸鼠背部右侧近前肢背部皮下。

在上述 50 只荷瘤小鼠中，选择肿瘤长势较为均一且平均体积达到约 210 mm^3 的 29 只小鼠进行随机分组，包括 2 个 ST06-GGFG-Eribulin 试验组（按照给药剂量分为 3 mg/kg 组和 10 mg/kg 组）、1 个 DS-8201 对照组（给药剂量为 3 mg/kg ）和 1 个溶媒对照组，其中给药剂量为 3 mg/kg 的 ST06-GGFG-Eribulin 试验组、DS-8201 对照组和溶媒对照组各 8 只小鼠，给药剂量为 10 mg/kg 的 ST06-GGFG-Eribulin 试验组为 5 只小鼠。各组小鼠通过尾静脉注射给药，共给药 4 周，其中 DS-8201 组和溶媒组每周给药一次，ST06-GGFG-Eribulin 试验组在第一周给药一次后，余下的 3 周中每周给药 2 次。小鼠每周进行两次测量并记录各组小鼠体重和肿瘤的尺寸，并按下列公式计算肿瘤体积：肿瘤体积 = (长径) × (短径)² × 0.5。

实验结果如图 22 所示，小鼠肿瘤在 DS-8201 给药后持续稳定生长，表明建模成功，即肿瘤模型确为对 DS-8201 具有后天获得型耐药性的异种移植肿瘤模型。ST06-GGFG-Eribulin 在 3 mg/kg 和 10 mg/kg 的剂量下均显示出抗肿瘤活性；尤其是在 10 mg/kg 的剂量（等当量 DAR）下，ST06-GGFG-Eribulin 给药后肿瘤几乎完全消退，显示所述互补性双特异 ADC (ST06-GGFG-Eribulin) 能够突破 DS-8201 的获得型耐药性，对 DS-8201 复发难治性 (Relapsed/Refractory) 肿瘤具有潜在疗效。整个实验期间，未观察到荷瘤小鼠的体重下降或其它毒副反应（数据未显示）。

权利要求书

1. 一种分离的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段具有以下特性中的至少一项:

- (1) 所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 1、3 和/或 4;
- (2) 所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段不影响 HER2 及其介导的下游信号转导通路, 包括不诱导、不阻断、不抑制 HER2-酪氨酸残基磷酸化和/或去磷酸化, 和/或不诱导、不阻断、不抑制依赖于或不依赖于配体诱导的 HER2 二聚化及其下游信号转导通路, 所述 HER2 二聚化包括 HER2/HER4 二聚化和 HER2/HER3 二聚化, 所述配体包括 NRG-1 和 Heregulins; 以及
- (3) 所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段不与人源 ErbB/HER 家族其它成员 (包括 EGFR、HER3 和 HER4) 发生交叉结合反应。

2. 如权利要求 1 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 3, 其包含: (1) 氨基酸序列为 $X_1YGM(S)$ (SEQ ID NO: 217) 的 HCDR1, $X_1=S, N$ 和 D ; (2) 氨基酸序列为 $SISGX_2GX_3YX_4KYX_5X_6X_7VKG$ (SEQ ID NO: 218) 的 HCDR2, $X_2=G$ 或 S ; $X_3=S$ 或 N ; $X_4=T$ 或 A ; $X_5=P, A, G$ 或 V ; $X_6=D, G, E, P, Q$ 或 R ; $X_7=S, K$ 或 N ; (3) 氨基酸序列为 DYX_8GFFDV (SEQ ID NO: 219) 的 HCDR3, $X_8=A, I, N, R, S$ 或 V ; (4) 氨基酸序列为 $RSSQSLX_9X_{10}SNX_{11}NTYLH$ (SEQ ID NO: 220) 的 LCDR1, $X_9=V$ 或 L ; $X_{10}=H$ 或 S ; $X_{11}=G, A, I, S, R$ 或 T ; (5) 氨基酸序列为 $KVSNRX_{12}S$ (SEQ ID NO: 221) 的 LCDR2, $X_{12}=F, D$ 或 P ; (6) 氨基酸序列为 $X_{13}QSTHVPX_{14}T$ (SEQ ID NO: 222) 的 LCDR3, $X_{13}=S$ 或 Q ; $X_{14}=Y$ 或 W , 或者分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 其包含: (1) 如 SEQ ID NO: 11、12、或 13 所示的 HCDR1; (2) 如 SEQ ID NO: 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、或 31 所示的 HCDR2; 和 (3) 如 SEQ ID NO: 32、33、34、35、36、或 37 所示的 HCDR3; 以及 (4) 如 SEQ ID NO: 38、39、40、41、42、43、44、或 45 所示的 LCDR1; (5) 如 SEQ ID NO: 46、47、或 48 所示的 LCDR2; 和 (6) 如 SEQ ID NO: 49、50、或 51 所示的 LCDR3;

进一步, 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 14、15、16、17、18、19、或 20 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 46 (其中 $X_{12}=F$) 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3; 或

(2) 如 SEQ ID NO: 12 或 13 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3; 或

(3) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 47 或 48 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3; 或

(4) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 39、40、41、42、43、44、或 45 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3; 或

(5) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 50 或 51 所示的 LCDR3; 或

(6) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 33、34、35、36、或 37 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3; 或

(7) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 14、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、或 31 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3; 或

(8) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 21 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 32 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3; 或

(9) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 21、23、24、27、28、29、30、或 31 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3; 或

(10) 如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 24、29、30、或 31 所示的 HCDR2, SEQ ID

NO: 37 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3。

4. 如权利要求 1 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 1, 其包含: (1) 氨基酸序列为 DYX₁₅MH (SEQ ID NO: 223) 的 HCDR1, X₁₅=S 或 A; (2) 氨基酸序列为 WINTX₁₆TGX₁₇PTYADX₁₈X₁₉KG (SEQ ID NO: 224) 的 HCDR2, X₁₆=E、N、G、Y 或 I; X₁₇=E、D 或 S; X₁₈=D、K 或 N; X₁₉=F 或 V; (3) 氨基酸序列为 VGX₂₀X₂₁X₂₂YAMDY (SEQ ID NO: 225) 的 HCDR3, X₂₀=R 或 Y; X₂₁=Y 或 G; X₂₂=D 或 S; (4) 氨基酸序列为 X₂₃ASQDVYTAVA (SEQ ID NO: 226) 的 LCDR1, X₂₃=K 或 R; (5) 氨基酸序列为 X₂₄ASX₂₅RX₂₆T (SEQ ID NO: 227) 的 LCDR2, X₂₄=S、A、D、E、K、L、Q、R、W 或 Y; X₂₅=Y、D、E、K、N、Q、S 或 T; X₂₆=Y、A、E、P 或 Q; (6) 氨基酸序列为 QQX₂₇YSTPPT (SEQ ID NO: 228) 的 LCDR3, X₂₇=H、S、A 或 Y, 或者分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

5. 如权利要求 1 或 4 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 其包含: 如 SEQ ID NO: 98 或 99 所示的 HCDR1; 如 SEQ ID NO: 100、101、102、103、104、105、106、107、108、或 109 所示的 HCDR2; 如 SEQ ID NO: 110、111、112、或 113 所示的 HCDR3; 以及如 SEQ ID NO: 114 或 115 所示的 LCDR1; 如 SEQ ID NO: 116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、或 138 所示的 LCDR2; 如 SEQ ID NO: 139、140、141、或 142 所示的 LCDR3;

进一步, 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、或 128 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3; 或

(2) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 140、141、或 142 所示的 LCDR3; 或

(3) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 101、102、103、104、105、106、107、108、或 109 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3; 或

(4) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 111、112、或 113 所示的 HCDR3, SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3; 或

(5) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3; 或

(6) 如 SEQ ID NO: 99 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 100 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, SEQ ID NO: 114 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 116 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 139 所示的 LCDR3; 或

(7) 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 129、130、131、132、133、134、135、136、137、或 138 所示的 LCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3;

优选地, 所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3, SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 129、133、136、或 138 所示的 LCDR2, SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3。

6. 如权利要求 1 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 4, 其包含: 如 SEQ ID NO: 199 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 200 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 201 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 202 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 203 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 204 所示的 LCDR3; 或者,

所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 1, 其包含: 如 SEQ ID NO: 205 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 206 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 207 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID NO: 208 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 209 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 210 所示的 LCDR3; 或者;

所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 1, 其包含: 如 SEQ ID NO: 211 所示的 HCDR1, SEQ ID NO: 212 所示的 HCDR2, SEQ ID NO: 213 所示的 HCDR3, 以及 SEQ ID

NO: 214 所示的 LCDR1, SEQ ID NO: 215 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 216 所示的 LCDR3。

7. 如权利要求 1-3 中任一项所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 其包含: 与 SEQ ID NO: 1、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、或 80 所示的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的重链可变区 VH, 以及与 SEQ ID NO: 2、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、或 97 所示的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的轻链可变区 VL;

进一步, 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 1 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 2 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 52 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、或 97 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、或 68 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 81 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、或 80 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 92 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列;

优选地, 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含分别与 SEQ ID NO: 73、78、79、或 80 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 92 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

8. 如权利要求 1、4 或 5 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 其包含: 与 SEQ ID NO: 3、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、或 170 所示的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的重链可变区 VH, 以及与 SEQ ID NO: 4、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、或 198 所示的氨基酸序列具有至少 80% 同一性的轻链可变区 VL;

进一步, 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 3 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 4 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 或者

(2) 分别与 SEQ ID NO: 143 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、或 188 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 或者

(3) 分别与 SEQ ID NO: 144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、或 170 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 171 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 或者

(4) 分别与 SEQ ID NO: 169 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 189、190、191、192、193、194、195、196、197、或 198 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列;

优选地, 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含分别与 SEQ ID NO: 169 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 189、190、191、192、193、194、195、196、197、或 198 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列;

更优选地, 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段包含分别与 SEQ ID NO: 169 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 189、193、196、或 198 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

9. 如权利要求 1 或 6 所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL, 所述重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 包含:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列; 或者,

(2) 分别与 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列；或者，

(3) 分别与 SEQ ID NO: 9 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 10 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

10. 一种抗 HER2 互补性双特异抗体，其包含两种能够非竞争性地同时结合 HER2 胞外区的抗原结合结构域，其中第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域各自特异性地结合 HER2 胞外区的不同表位，所述表位位于 HER2 胞外区亚结构域 1、3 和 4 中，所述互补性双特异抗体包含以下特性中的至少一项：

(1) 所述互补性双特异抗体能够交联/聚集肿瘤细胞表面的 HER2，进而引发 HER2 交联体的快速、高效内吞，表现为在 HER2 低表达肿瘤细胞中的内吞率高达 60% 以上，在 HER2 过表达肿瘤细胞中的内吞率高达 80% 以上；

(2) 所述互补性双特异抗体能够有效地引发肿瘤细胞表面 HER2 的溶酶体转运和降解，显著降低细胞表面 HER2 的表达，以致能显著抑制 HER2 过表达肿瘤细胞的增殖；

(3) 所述互补性双特异抗体不影响 HER2 及其介导的下游信号转导通路，包括不诱导、不阻断、不抑制配体诱导的 HER2 二聚化及其下游信号转导通路的激活，因此所述互补性双特异抗体不影响正常组织/细胞、包括心肌细胞中 HER2 及其介导的下游信号转导通路的功能与调控，所述配体包括 NRG-1；

(4) 所述互补性双特异抗体能够特异性地结合 HER2，而不与人源 ErbB/HER 家族其它成员（包括 EGFR、HER3 和 HER4）交叉结合。

11. 如权利要求 10 所述的互补性双特异抗体，其中，所述第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域中的一个特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 1，另一个特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 3；

进一步，所述第一抗原结合结构域包含：(1) 氨基酸序列为 X_1YGM_S 的 HCDR1， $X_1=S$ 、N 和 D；

(2) 氨基酸序列为 $SISGX_2GX_3YX_4KYX_5X_6X_7VK_G$ 的 HCDR2， $X_2=G$ 或 S； $X_3=S$ 或 N； $X_4=T$ 或 A； $X_5=P$ 、A、G 或 V； $X_6=D$ 、G、E、P、Q 或 R； $X_7=S$ 、K 或 N；(3) 氨基酸序列为 DYX_8GFFDV 的 HCDR3， $X_8=A$ 、I、N、R、S 或 V；(4) 氨基酸序列为 $RSSQSLX_9X_{10}SNX_{11}NTYL_H$ 的 LCDR1， $X_9=V$ 或 L； $X_{10}=H$ 或 S； $X_{11}=G$ 、A、I、S、R 或 T；(5) 氨基酸序列为 $KVSNRX_{12}_S$ 的 LCDR2， $X_{12}=F$ 、D 或 P；(6) 氨基酸序列为 $X_{13}QSTHVPX_{14}_T$ 的 LCDR3， $X_{13}=S$ 或 Q； $X_{14}=Y$ 或 W，或者分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列；

所述第二抗原结合结构域包含：(1) 氨基酸序列为 DYX_{15}_MH 的 HCDR1， $X_{15}=S$ 或 A；(2) 氨基酸序列为 $WINTX_{16}TGX_{17}PTYADX_{18}X_{19}KG$ 的 HCDR2， $X_{16}=E$ 、N、G、Y 或 I； $X_{17}=E$ 、D 或 S； $X_{18}=D$ 、K 或 N； $X_{19}=F$ 或 V；(3) 氨基酸序列为 $VGX_{20}X_{21}X_{22}YAMD_Y$ 的 HCDR3， $X_{20}=R$ 或 Y； $X_{21}=Y$ 或 G； $X_{22}=D$ 或 S；(4) 氨基酸序列为 $X_{23}ASQDVYTAVA$ 的 LCDR1， $X_{23}=K$ 或 R；(5) 氨基酸序列为 $X_{24}ASX_{25}RX_{26}_T$ 的 LCDR2， $X_{24}=S$ 、A、D、E、K、L、Q、R、W 或 Y； $X_{25}=Y$ 、D、E、K、N、Q、S 或 T； $X_{26}=Y$ 、A、E、P 或 Q；(6) 氨基酸序列为 $QQX_{27}YSTPPT$ 的 LCDR3， $X_{27}=H$ 、S、A 或 Y，或者分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 同一性的氨基酸序列。

12. 如权利要求 10 或 11 所述的抗 HER2 互补性双特异抗体，其中，所述第一抗原结合结构域包含：如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，SEQ ID NO: 21、23、24、27、28、29、30、或 31 所示的 HCDR2，SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3，以及 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1，SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；

所述第二抗原结合结构域包含：如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1，SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2，SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3，以及 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1，SEQ ID NO: 129、130、131、132、133、134、135、136、137、或 138 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3；

进一步，所述第一抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，SEQ ID NO: 24、29、30、或 31 所示的 HCDR2，SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3，以及 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1，SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；

所述第二抗原结合结构域包含：如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1，SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2，SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3，以及 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1，SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3。

13. 如权利要求 10 或 11 所述的抗 HER2 互补性双特异抗体，其中，所述第一抗原结合结构域包含：如 SEQ ID NO: 70、72、73、76、77、78、79、或 80 所示的 VH，以及如 SEQ ID NO: 92 所示的 VL，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列；所述第二抗原结合结构域包含：如 SEQ ID NO: 169 所示的 VH，以及 SEQ ID NO: 189、190、191、192、193、194、195、196、197、或 198 所示的 VL，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列；

优选地，所述第一抗原结合结构域包含：如 SEQ ID NO: 73、78、79、或 80 所示的 VH，以及 SEQ ID NO: 92 所示的 VL，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列；所述第二抗原结合结构域包含：如 SEQ ID NO: 169 所示的 VH，以及 SEQ ID NO: 193 所示的 VL，或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

14. 如权利要求 10-12 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体，所述双特异抗体的结构为 DVD-Ig 形式，其中，所述第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域中的一个为 Fv 结构域，且另一个为 Fab 或 IgG 结构域，所述 Fv 结构域通过连接子与所述 Fab 或 IgG 结构域连接；

进一步，所述第一抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 3，且为 Fv 结构域，所述第二抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 1，且为 Fab 结构域或 IgG 结构域，所述第一或第二抗原结合结构域包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，所述 Fv 结构域中的 VH 结构域 C-末端通过连接子与所述 Fab 或 IgG 结构域中的 VH 结构域 N-末端连接，所述 Fv 结构域中的 VL 结构域 C-末端通过连接子与所述 Fab 或 IgG 结构域中的 VL 结构域 N-末端连接。

15. 如权利要求 10-14 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体，包含 4 条多肽链：

(1) 其中两条多肽链包含 VH1-L1-VH2-C-(Fc)_n，其中 VH1 表示特异性结合 HER2 胞外区亚结构域 3 的第一抗原结合结构域的重链可变区，L1 表示连接子，VH2 表示特异性结合 HER2 胞外区亚结构域 1 的第二抗原结合结构域的重链可变区，C 表示重链恒定区 CH1，Fc 表示重链恒定区 Fc 结构域，n 是 0 或 1；以及

(2) 另外两条多肽链包含 VL1-L2-VL2-CL，其中 VL1 表示特异性结合 HER2 胞外区亚结构域 3 的第一抗原结合结构域的轻链可变区，L2 表示连接子，VL2 表示特异性结合 HER2 胞外区亚结构域 1 的第二抗原结合结构域的轻链可变区，CL 是 IgG 轻链恒定区；

所述 L1 和 L2 连接子包含 (G₄S)_n 序列，n 代表 G₄S 的拷贝数，其为大于 0 的整数，L1 和 L2 连接子的拷贝数 n 可以相同或不同。

16. 如权利要求 15 所述的抗 HER2 互补性双特异抗体，其中，所述 VH1 包含 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1，SEQ ID NO: 24、29、30、或 31 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3；VH2 包含 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1，SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3；所述 VL1 包含 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1，SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3；VL2 包含 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1，SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的抗 HER2 互补性双特异抗体，其中，所述 VH1 包含如 SEQ ID NO: 73、78、79、或 80 所示的 VH，或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列；所述 VH2 包含如 SEQ ID NO: 169 所示的 VH，或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列；所述 VL1 包含如 SEQ ID NO: 92 所示的 VL，或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列；所述 VL2 包含如 SEQ ID NO: 193 所示的 VL，或与其具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

18. 如权利要求 15-17 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体，其中，所述 L1 包含 SEQ ID NO: 229 所示的连接子氨基酸序列；所述 L2 包含 SEQ ID NO: 230 所示的连接子氨基酸序列；所述 Fc 包含工程化的 Fc 结构域，优选地，包括如 SEQ ID NO: 232 所示的具有 L234F/L235E/P331S (EU 编号系统) 氨基酸取代的人 IgG1 Fc 的氨基酸序列；所述 CL 选自人 κ 恒定区或人 λ 恒定区，优选地，如 SEQ ID NO: 233 所示的人 κ 恒定区氨基酸序列。

19. 一种抗 HER2 互补性双特异抗体-药物偶联物 (ADC)，包含如权利要求 10-18 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、小分子毒素化合物和可裂解接头，所述 ADC 包含以下特性中的至少一项：

(1) 所述 ADC 能够同时结合肿瘤细胞表面 HER2 的两个不同表位，交联 HER2 成簇，以及引发 ADC 的快速内吞和溶酶体转运，因此显著提高了 ADC 中的小分子毒素化合物进入靶细胞及其在靶细胞内释放

的效率,使得所述 ADC 具有更加广谱的杀伤活性,表现为不仅在 HER2 过表达的肿瘤细胞中具有比现有的 HER2 靶向药物更强的杀伤活性,而且在 HER2 低表达的肿瘤细胞中也能发挥直接杀伤作用,所述现有的 HER2 靶向药物包括 Trastuzumab、Pertuzumab、T-DM1 和 DS-8201;

(2) 所述 ADC 对上述现有的 HER2 靶向药物产生耐药性或复发的肿瘤具有杀伤作用;

(3) 所述 ADC 不影响 HER2 的生物学活性及其介导的信号转导通路的调控,不会干扰心肌细胞中 HER2 的正常功能,且不具有 Fc 效应子功能,因此其临床安全性显著高于上述现有的 HER2 靶向药物;

进一步,所述的 ADC 由式 (I) 表示:

Ab-(L-D)_p (I)

其中,Ab 表示如权利要求 10-18 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体,所述 Ab 包含第一和第二抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 3,且为 Fv 结构域,所述的第二抗原结合结构域特异性地结合 HER2 胞外区亚结构域 1,且为 IgG 结构域,所述的第一或第二抗原结合结构域包含重链可变区和轻链可变区;

D 表示小分子毒素化合物;

L 表示可裂解接头;以及

p 为 2 至 8。

20. 如权利要求 19 所述的 ADC,其中,所述第一抗原结合结构域包含:(1)如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1,(2)如 SEQ ID NO: 24、29、30、或 31 所示的 HCDR2,(3)如 SEQ ID NO: 37 所示的 HCDR3,

(4)如 SEQ ID NO: 42 所示的 LCDR1,(5)如 SEQ ID NO: 46 所示的 LCDR2,以及(6)如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR3;所述第二抗原结合结构域包含:(1)如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR1,(2)如 SEQ ID NO: 102 所示的 HCDR2,(3)如 SEQ ID NO: 110 所示的 HCDR3,(4)如 SEQ ID NO: 115 所示的 LCDR1,(5)如 SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR2,以及(6)如 SEQ ID NO: 142 所示的 LCDR3。

21. 如权利要求 19 或 20 所述的 ADC,其中,所述第一抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO: 73、78、79、或 80 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 92 所示的 VL,或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列;所述第二抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO: 169 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 193 所示的 VL,或分别与所述的 VH 和 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%同一性的氨基酸序列。

22. 如权利要求 19-21 中任一项所述的 ADC,其中,所述 Ab 进一步包含恒定区,所述恒定区包括重链恒定区和轻链恒定区,所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 232 所示的人 IgG1 Fc,所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO: 233 所示的人 κ 恒定区。

23. 如权利要求 19-22 中任一项所述的 ADC,其中,所述小分子毒素化合物包括艾日布林、奥瑞他汀类衍生物、Tubulysins、Cryptomycins、美登素类衍生物、拓扑异构酶抑制剂、吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)、卡奇霉素及其衍生物、倍癌霉素、烷基化剂以及具有烷基化形式的其他化合物、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、和细胞毒性抗生素;

进一步,所述奥瑞他汀类衍生物包括 MMAE、MMAF、MMAD;所述美登素类衍生物包括 DM1、DM2、DM3、DM4;所述拓扑异构酶抑制剂包括喜树碱类衍生物 SN-38、依沙替康和 DXd;所述烷基化剂以及具有烷基化形式的其他化合物包括氮芥、亚乙基亚胺化合物、烷基磺酸盐、亚硝基脲、顺铂、达卡巴嗪;所述抗代谢物包括叶酸、嘌呤或嘧啶拮抗剂;所述有丝分裂抑制剂包括长春花生物碱和鬼臼毒素的衍生物;所述细胞毒性抗生素包括蒽环类抗生物、放线菌素、博来霉素;优选的小分子毒素化合物是艾日布林。

24. 如权利要求 19-23 中任一项所述的 ADC,其中,所述的可裂解接头包含可裂解肽部分和至少一种间隔区;

进一步,所述可裂解肽部分包含氨基酸单元,所述氨基酸单元包含由组织蛋白酶 B 裂解的 Phe-Lys、Val-Cit (VC)、Glu-Val-Cit、或 Gly-Gly-Phe-Gly (GGFG) 氨基酸序列;

所述间隔区包含与抗体缀合的间隔区,和/或与小分子毒素化合物缀合的第二间隔区,所述与抗体缀合的间隔区是亲水性间隔区,其包含一个或多个聚乙二醇(PEG),所述第二间隔区包含对氨基苯甲基单元。

25. 如权利要求 24 所述的 ADC,所述的氨基酸单元包含 VC 和 GGFG;

所述的亲水性间隔区包含 2 个 PEG,所述的亲水性间隔区与顺丁烯二酰亚胺(Mal)构成 Mal-间隔区而附接于抗体;所述第二间隔区包含对氨基苯甲基羰基(PAB)。

26. 如权利要求 24 或 25 所述的 ADC,所述的可裂解接头包含 Mal-间隔区和可裂解肽部分,所述 Mal-间隔区包含 2 个 PEG,所述可裂解肽部分包含二肽 VC 和四肽 GGFG;或者所述的可裂解接头包含 Mal-间隔区、可裂解肽部分和第二间隔区,所述 Mal-间隔区包含 2 个 PEG,所述可裂解肽部分包含二肽 VC,所述第二间隔区包含 PAB。

27. 如权利要求 24-26 中任一项所述的 ADC，所述的可裂解接头包含 Mal-(PEG)₂-VC，Mal-(PEG)₂-GGFG，或 Mal-(PEG)₂-VC-PAB。

28. 如权利要求 24-27 中任一项所述的 ADC，其中所述可裂解接头的可裂解肽部分可以直接或通过第二间隔区偶联至所述小分子毒素化合物，以制备为包含药物有效载荷的 ADC，所述小分子毒素化合物是艾日布林。

29. 如权利要求 28 所述的 ADC，所述可裂解接头包含 Mal-(PEG)₂-GGFG，所述药物有效载荷包含所述可裂解接头的可裂解肽部分 GGFG 通过羧基偶联至艾日布林 C-35 胺而获得的化合物 Mal-(PEG)₂-GGFG-Eribulin；或者，

所述可裂解接头包含 Mal-(PEG)₂-VC-PAB，所述药物有效载荷包含所述可裂解接头通过第二间隔区 PAB 偶联至艾日布林的 C-35 胺而获得的化合物 Mal-(PEG)₂-VC-PAB-Eribulin。

30. 如权利要求 19-29 中任一项所述的 ADC，所述 p 为 4 至 8。

31. 一种核酸，其编码如权利要求 1-9 中任一项所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、权利要求 10-18 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、或权利要求 19-30 中任一项所述的 ADC 中抗体部分的核酸。

32. 一种表达载体，其能够表达权利要求 31 所述的核酸。

33. 一种宿主细胞，包含权利要求 31 所述的核酸或权利要求 32 所述的表达载体。

34. 一种使用权利要求 33 所述的宿主细胞制备权利要求 1-9 中任一项所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、权利要求 10-18 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、或权利要求 19-30 任一项所述的 ADC 中抗体部分的方法，包括：(i) 在所述的宿主细胞中表达所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、抗 HER2 互补性双特异抗体、或所述 ADC 中抗体部分，和 (ii) 从所述的宿主细胞或细胞培养物中分离所述抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、抗 HER2 互补性双特异抗体、或所述 ADC 中抗体部分。

35. 一种制备如权利要求 19-30 中任一项所述的 ADC 的方法，包括：所述小分子毒素化合物的亲核基团或亲电子基团与可裂解接头反应，经由共价键形成药物有效载荷，再与抗体的亲核基团或亲电子基团的反应，或者优选地，所述抗体铰链区的链间二硫键经还原后产生的游离半胱氨酸残基与药物有效载荷的反应官能团反应形成共价键，所述反应官能团包括顺丁烯二酰亚胺基。

36. 一种药物组合物，包含如权利要求 1-9 中任一项所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、权利要求 10-18 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、或权利要求 19-30 任一项所述的 ADC，以及药学上可接受的载体。

37. 一种药盒，包含有效量的如权利要求 1-9 中任一项所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、权利要求 10-18 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、权利要求 19-30 任一项所述的抗 HER2 互补性双特异 ADC、或权利要求 36 所述的药物组合物，以及任选的至少一种另外的肿瘤治疗剂；

进一步，所述另外的肿瘤治疗剂包括 HER2 拮抗剂、EGFR 拮抗剂、HER3 拮抗剂、MET 拮抗剂、IGF1R 拮抗剂、B-Raf 抑制剂、PDGFR- α 抑制剂、PDGFR- β 抑制剂、PDGF 配体抑制剂、VEGF 拮抗剂、VEGF 受体激酶抑制剂、DLL4 拮抗剂、Ang2 拮抗剂、FOLH1 拮抗剂、STEAP1 或 STEAP2 拮抗剂、TMPRSS2 拮抗剂、MSLN 拮抗剂、MUC16 拮抗剂、CLEC12A 拮抗剂、PD-1 或 PD-L1 阻断剂、激素受体调节剂、芳香酶抑制剂、激酶抑制剂、细胞因子激动剂或细胞因子抑制剂、化学治疗剂。

38. 一种治疗表达 HER2 的癌症的方法，包括向有需要的受试者施用有效量的如权利要求 10-18 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体、权利要求 19-30 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异 ADC、权利要求 36 所述的药物组合物、或权利要求 37 所述的药盒。

39. 如权利要求 38 所述的方法，其中，所述癌症包括乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、食管癌、肺癌、头颈癌、黑色素瘤、胰腺癌、肝癌、胆管癌、肾癌、膀胱癌、甲状腺癌、前列腺癌和子宫内膜癌，所述癌症还包括各阶段的癌症，例如早期癌症、非转移性癌症、原发性癌症、晚期癌症、局部晚期癌症、转移性癌症或缓解中的癌症；所述癌症还包括 HER2 过表达的癌症、HER2 表达水平相对较低的癌症、对现有的 HER2 靶向治疗剂不响应或响应较差的癌症、和/或对现有 HER2 靶向治疗剂产生耐药性或复发的癌症，其中所述现有的 HER2 靶向治疗剂包括 Trastuzumab、Pertuzumab、T-DM1 和 DS-8201；

所述的受试者可以是人、非人灵长类动物或其它哺乳动物如狗、小鼠、大鼠；所述受试者进一步包括不适合接受现有 HER2 靶向疗法或难治疗、或在接受现有的 HER2 靶向疗法后产生耐药性或复发的患者。

40. 一种检测和/或测量样品中 HER2 或表达 HER2 的肿瘤细胞的方法，以及筛选对如权利要求 19-30 中任一项所述的 ADC 治疗有响应的癌症患者的方法，包括将如权利要求 1-9 中任一项所述的抗 HER2 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 10-18 中任一项所述的抗 HER2 互补性双特异抗体与所述样品或分离自所述患者的生物样本进行孵育，检测所述抗体是否结合至所述样品或生物样本。

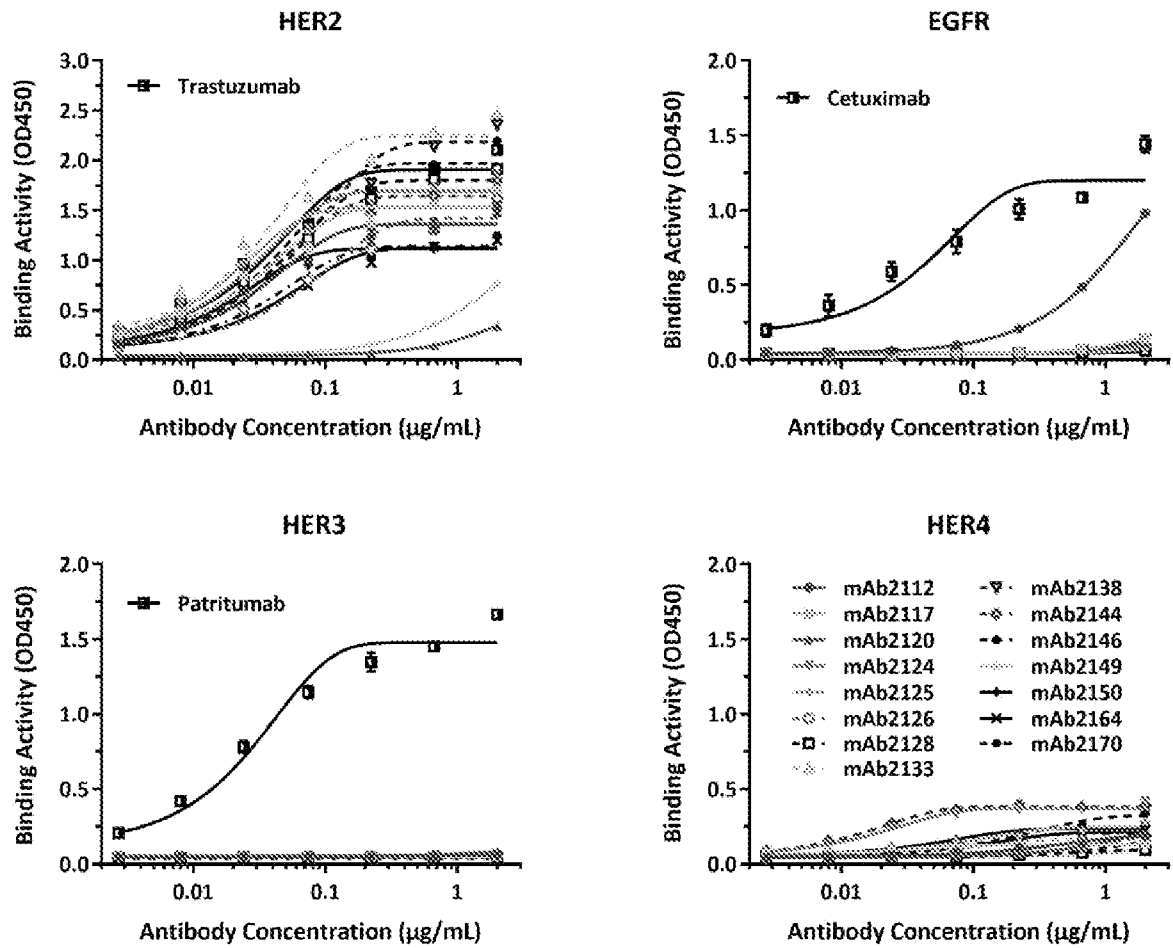


图 1

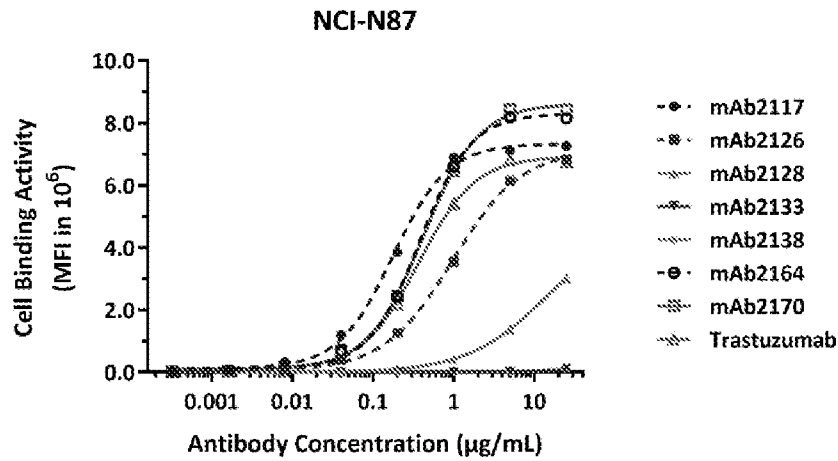


图 2



图 3A

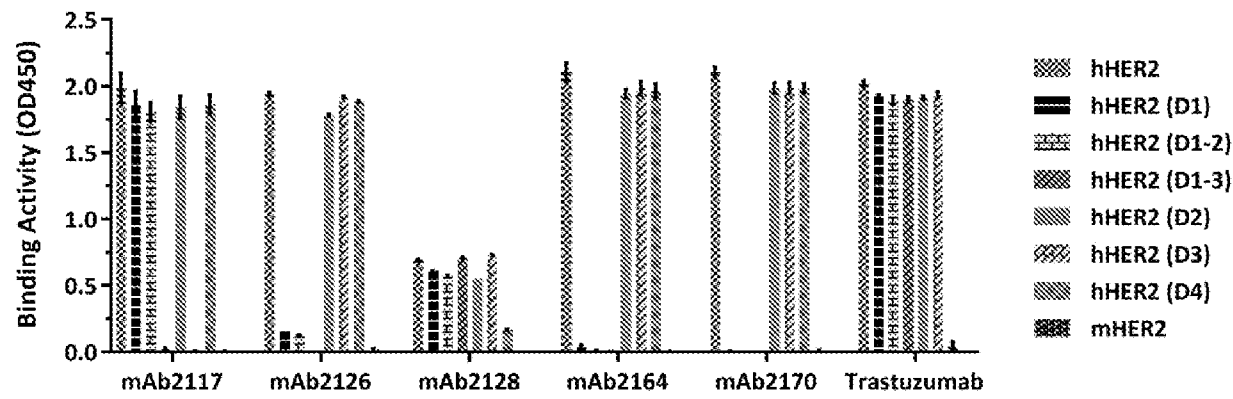


图 3B

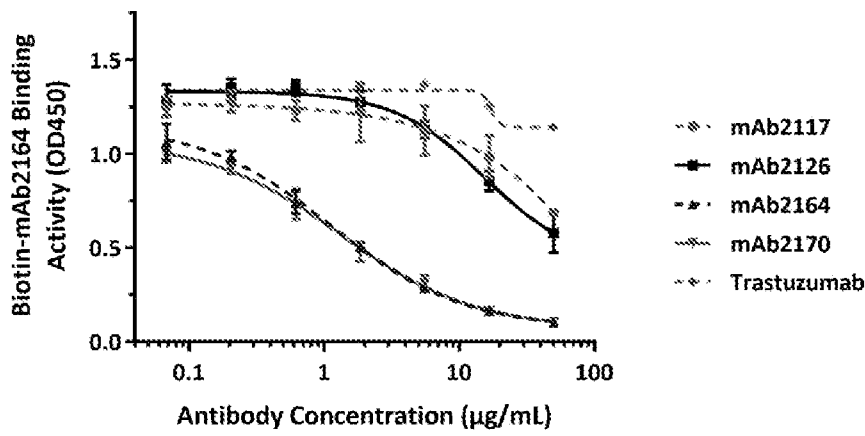


图 4A

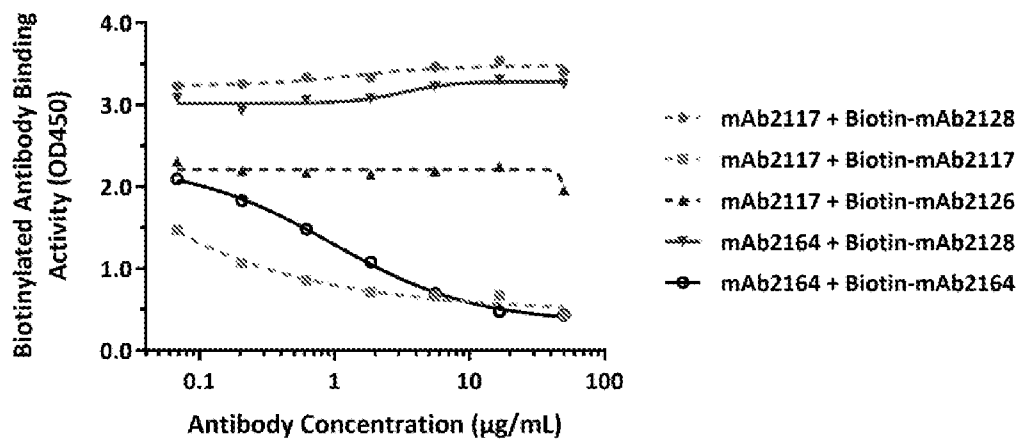


图 4B

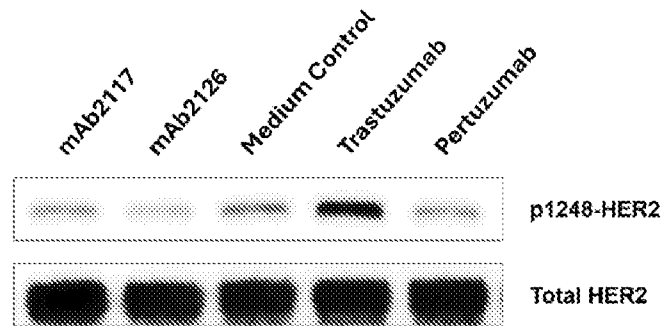


图 5

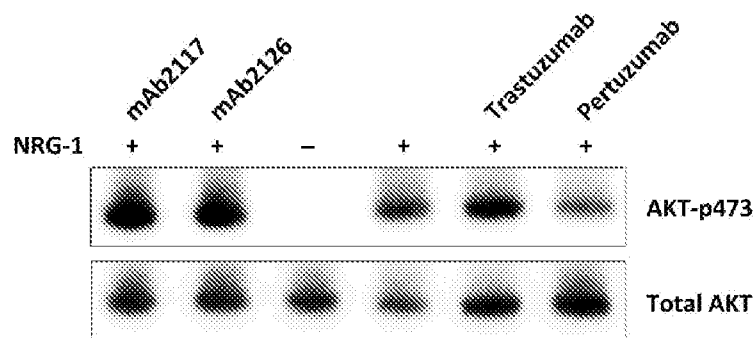


图 6

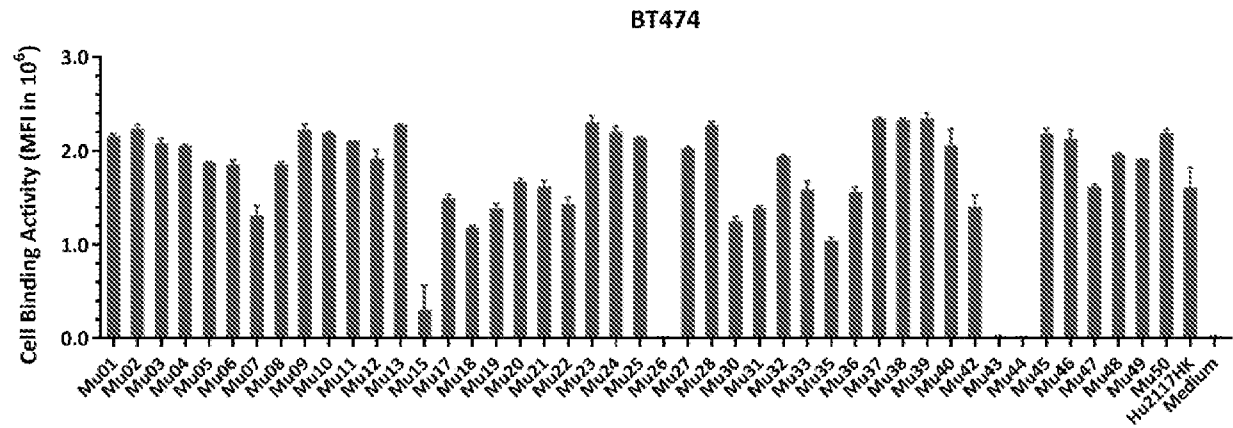


图 7A

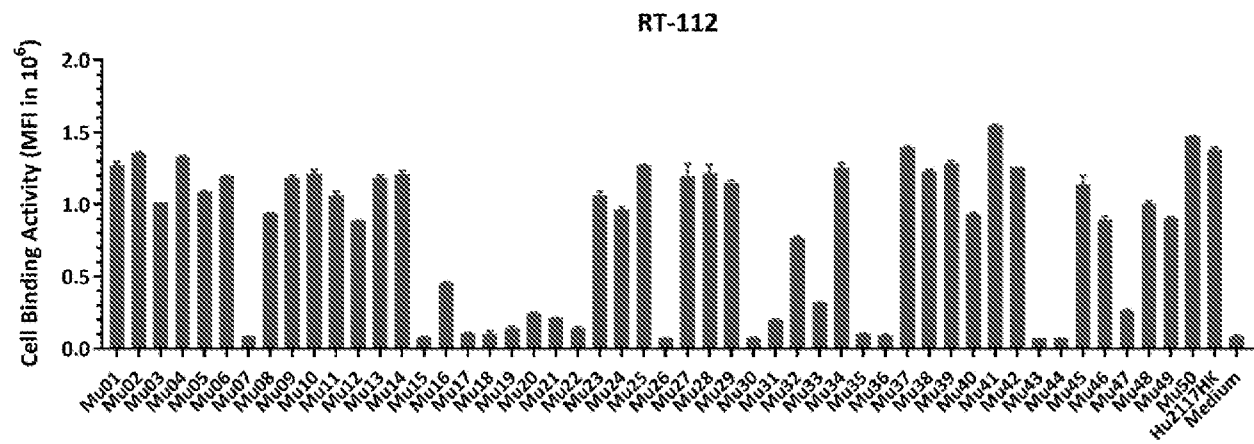


图 7B

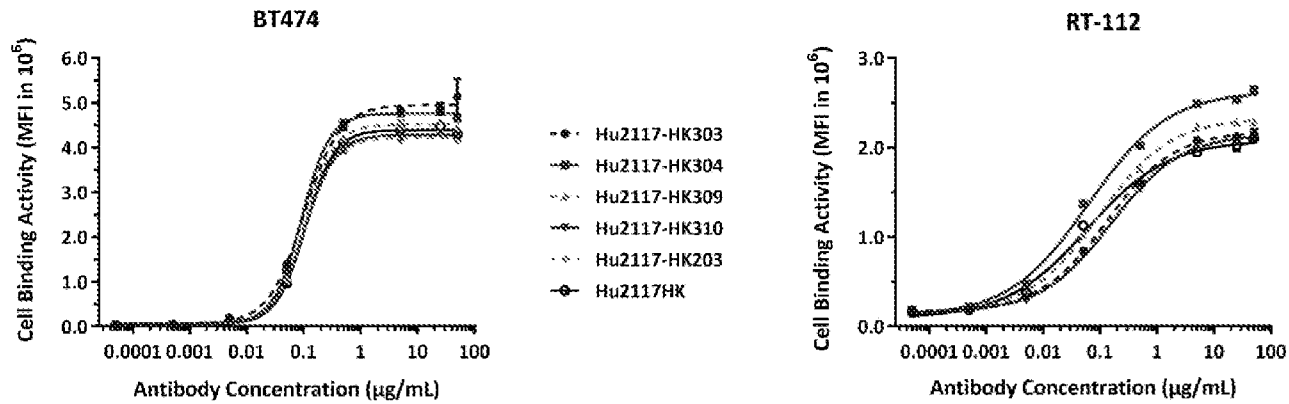


图 8

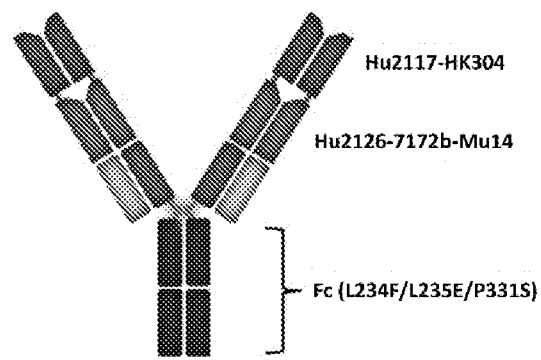


图 9

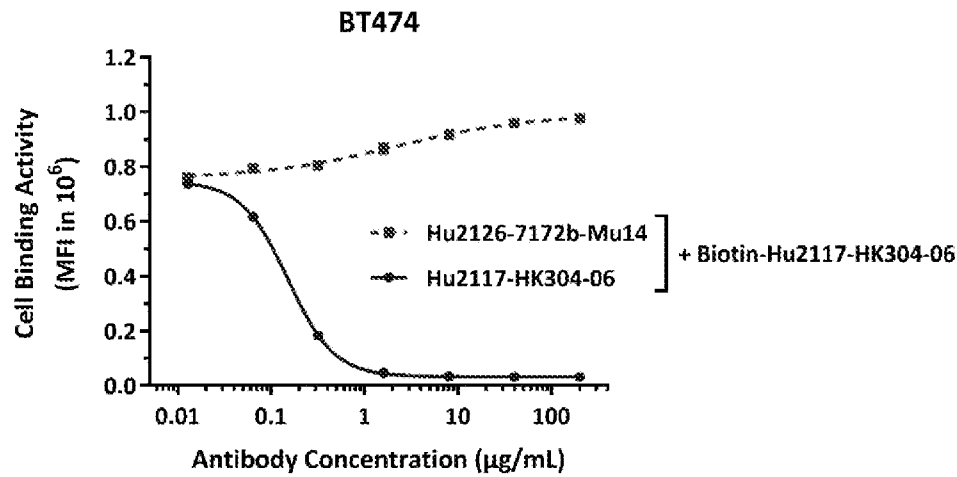


图 10

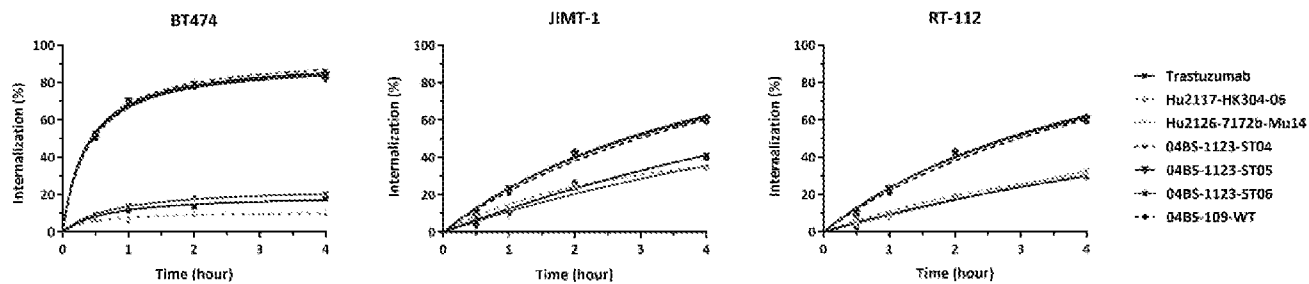


图 11

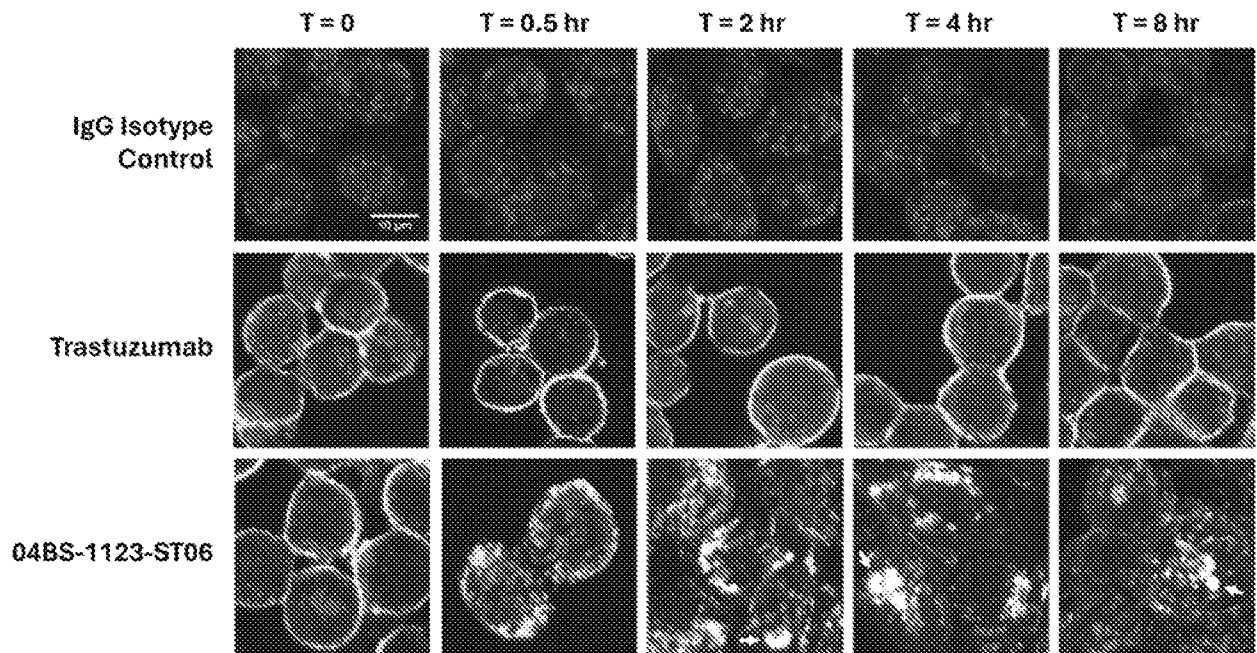


图 12

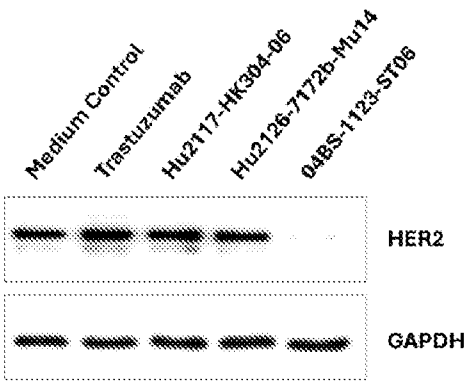


图 13

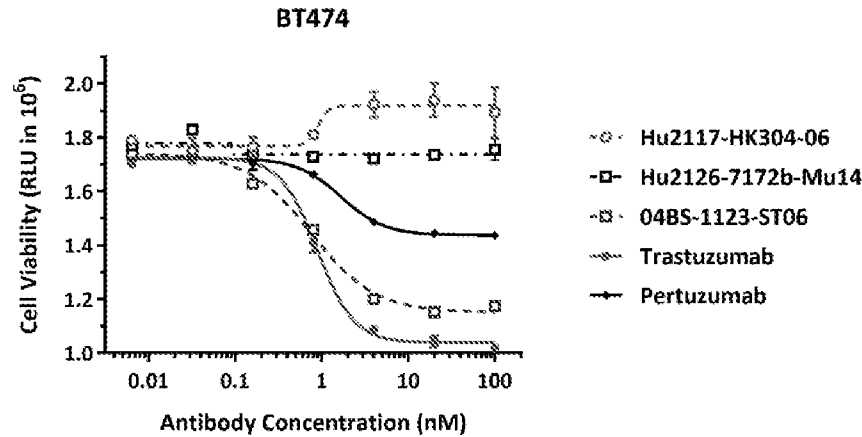


图 14

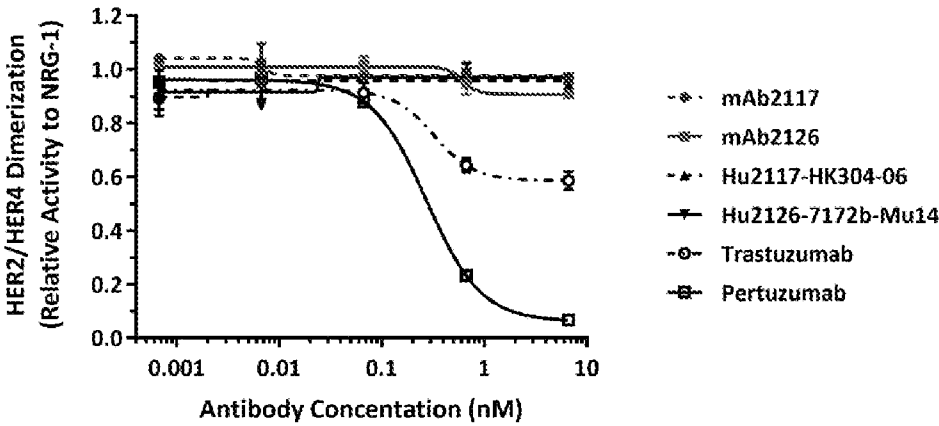


图 15A

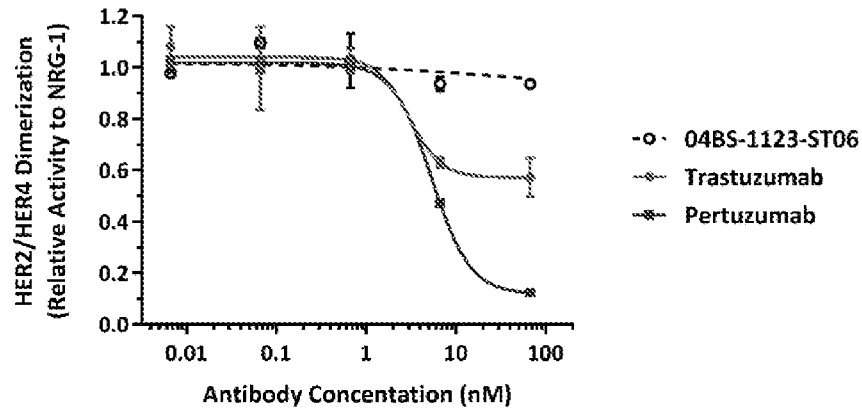


图 15B

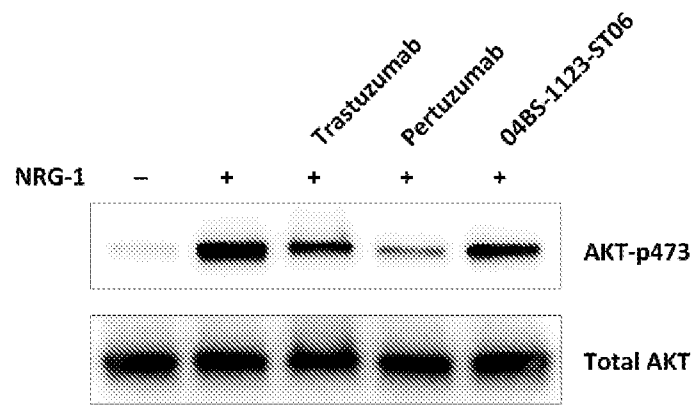


图 16

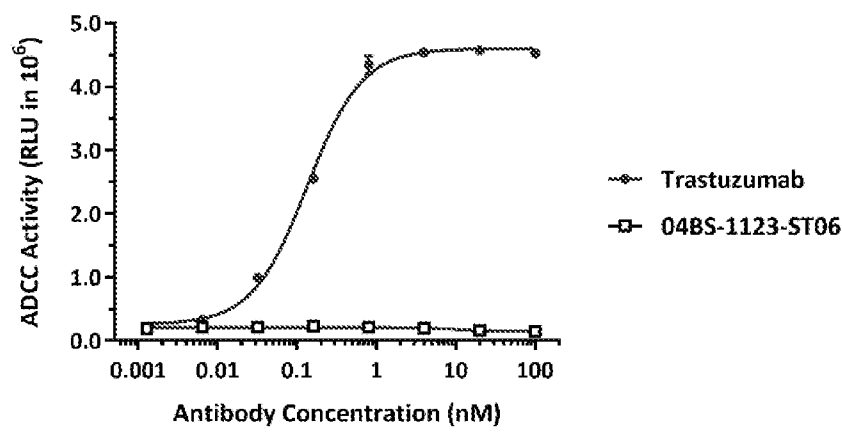


图 17

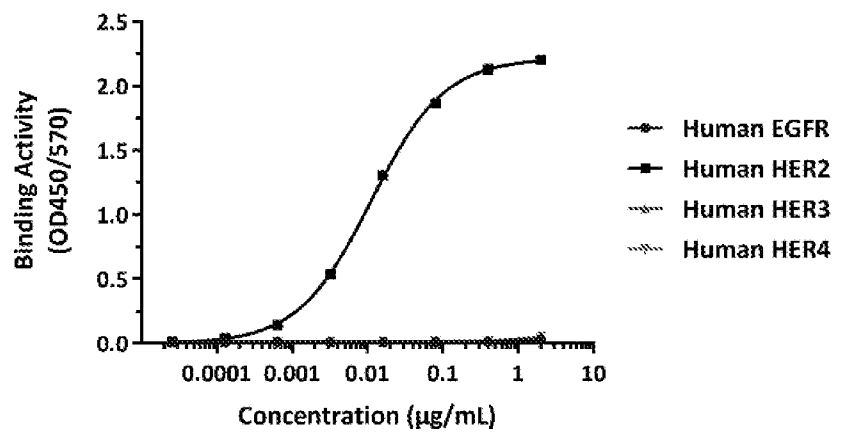


图 18

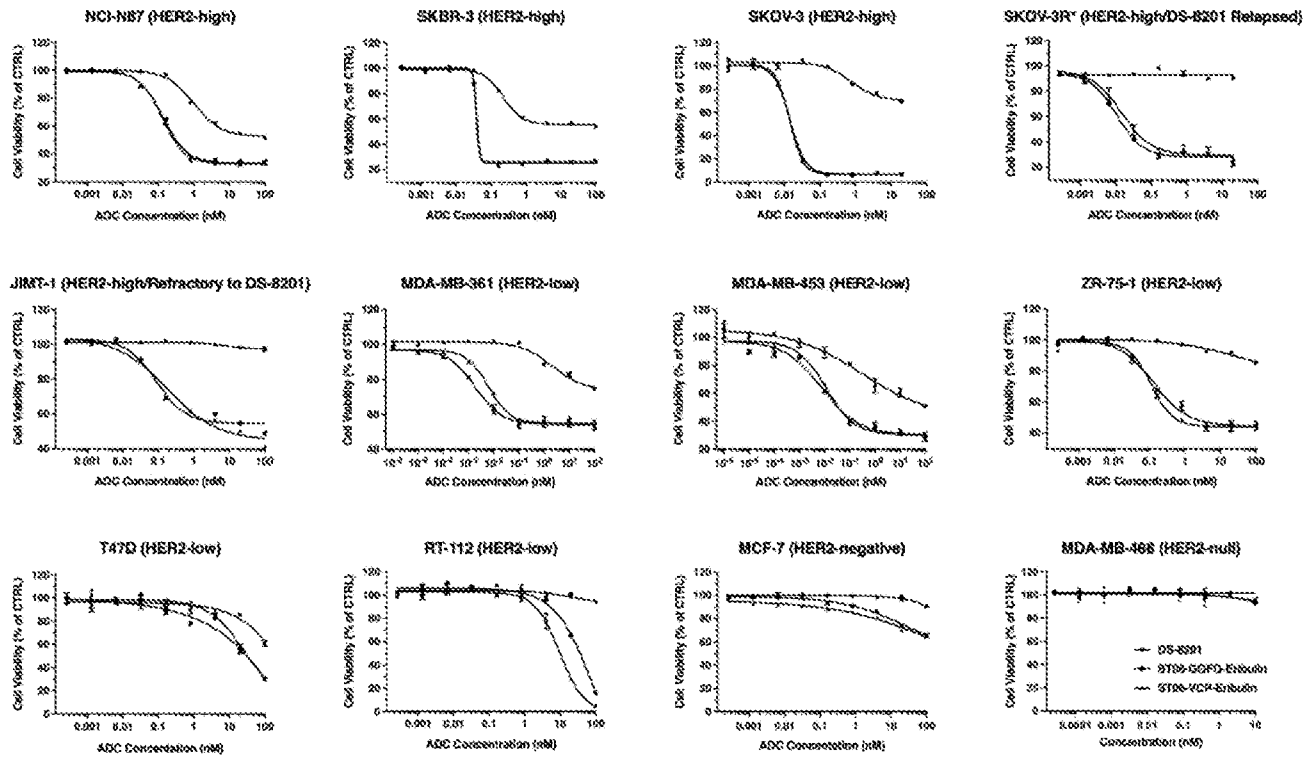


图 19

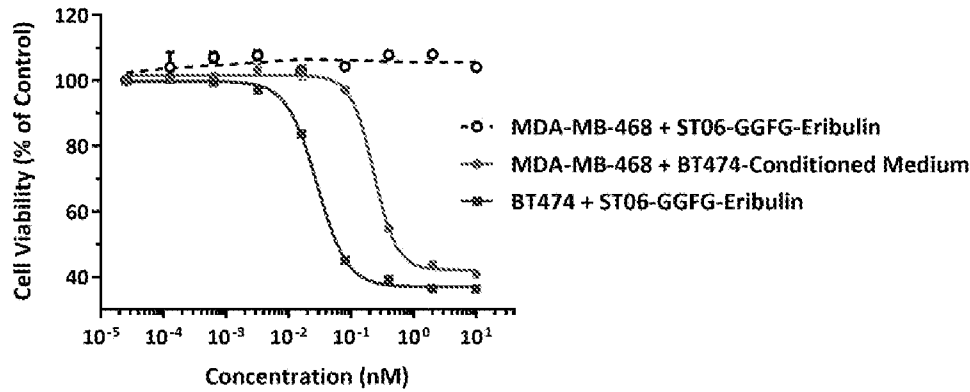


图 20A

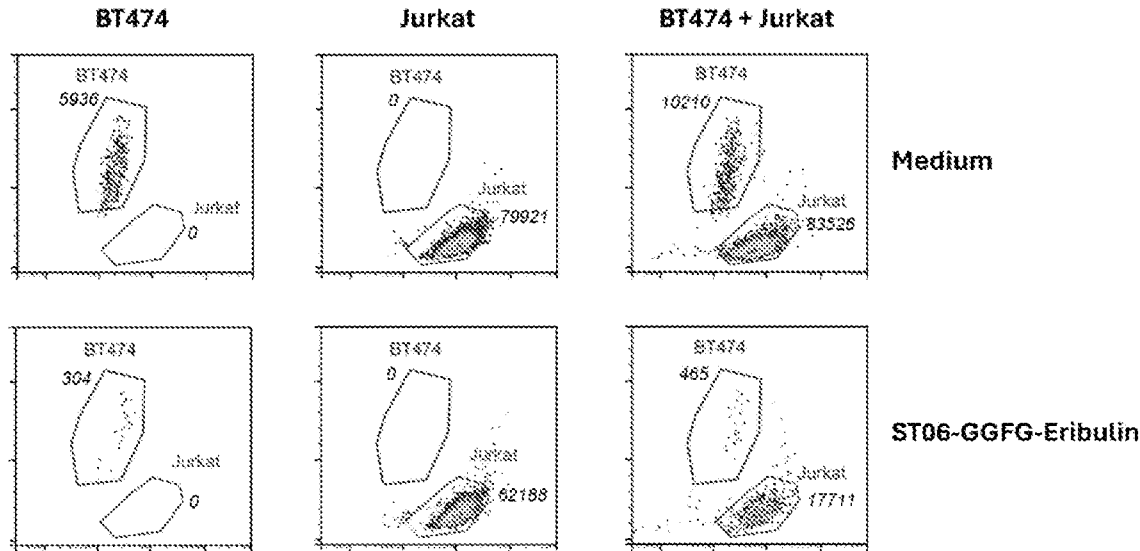


图 20B

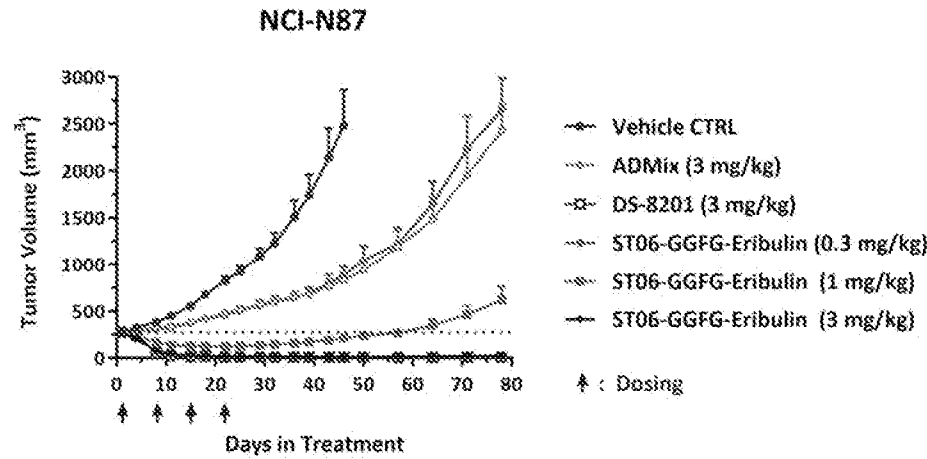


图 21A

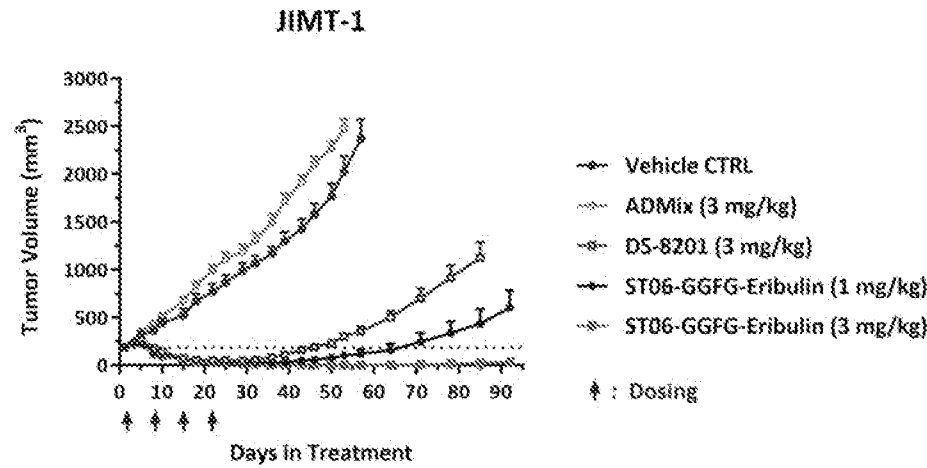


图 21B

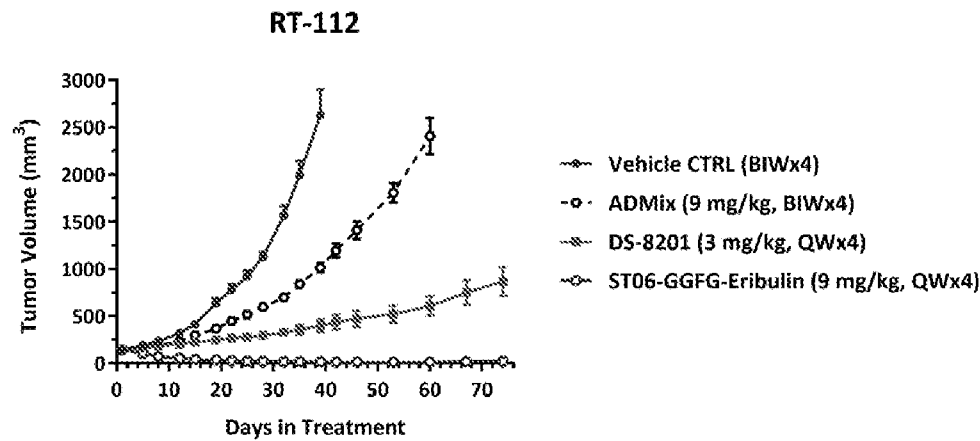


图 21C

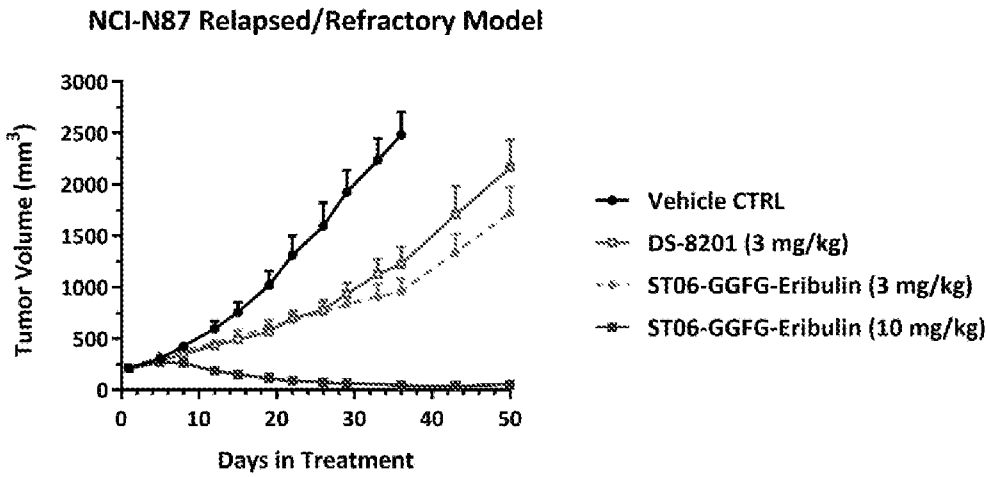


图 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/097980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/46(2006.01)i; A61K39/395(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)

IPC: C07K,A61K,A61P

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

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

CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, CNTXT, ENTXT, VEN, STN, NCBI, ISI: 序列检索, sequence search, HER2, 抗体, 双特异性, bispecific, 艾日布林, eribulin, ADC, 偶联物, ECD, 胞外结构域, 结构域III, 结构域I, 结构域IV, ECD1, ECD3, ECD4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 114805590 A (SUNSHINE GUOJIAN PHARMACEUTICAL (SHANGHAI) CO., LTD.) 29 July 2022 (2022-07-29) claims 1-30	1, 10, 14-15, 17-19, 22-40
Y	CN 114805590 A (SUNSHINE GUOJIAN PHARMACEUTICAL (SHANGHAI) CO., LTD.) 29 July 2022 (2022-07-29) claims 1-30	19, 22-40
X	WO 2014060365 A1 (UNFVERSITAT ZURICH PROREKTORAT MNW) 24 April 2014 (2014-04-24) claims 1-5 and 12-16, and description, embodiment 5	1, 10, 14-15, 17-19, 22-40
Y	WO 2014060365 A1 (UNFVERSITAT ZURICH PROREKTORAT MNW) 24 April 2014 (2014-04-24) claims 1-5 and 12-16, and description, embodiment 5	19, 22-40
X	US 2019127481 A1 (UNIVERSITAT ZURICH) 02 May 2019 (2019-05-02) claims 1-11, and description, paragraphs 23-24	1, 10, 14-15, 17-19, 22-40



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

07 September 2024

Date of mailing of the international search report

12 September 2024

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/097980

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2019127481 A1 (UNIVERSITAT ZURICH) 02 May 2019 (2019-05-02) claims 1-11, and description, paragraphs 23-24	19, 22-40
Y	WO 2023041006 A1 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) 23 March 2023 (2023-03-23) claims 1-10, and description, paragraphs 3, 7, 17 and 45	19, 22-40
A	KETCHEMEN, J.P. et al. "Biparatopic Anti-HER2 Drug Radioconjugates as Breast Cancer Theranostics" <i>British Journal of Cancer</i> , Vol. vol. 129, 24 April 2023 (2023-04-24), pp. 153-162	1-40
X	HAMBLETT, K.J. et al. "Abstract P6-17-13: ZW49, a HER2 Targeted Biparatopic Antibody Drug Conjugate for the Treatment of HER2 Expressing Cancers" <i>Cancer Research</i> , Vol. 79, No. (4_Supplement), 15 February 2019 (2019-02-15), abstract	1
X	PEGGRAM, M.D. et al. "First-in-human, Phase 1 Dose-Escalation Study of Biparatopic Anti- HER2 Antibody-Drug Conjugate MEDI4276 in Patients with HER2-positive Advanced Breast or Gastric Cancer" <i>Molecular Cancer Therapeutics</i> , Vol. 20, No. (8), 31 August 2021 (2021-08-31), pp. 1442-1453	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/097980

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 13ter.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/097980

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.: **38-39**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 38-39 relate to a method for treating cancer expressing HER2, that is, claims 38-39 relate to subject matter for which no search is required by the International Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1: (4) methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods. The international search is made on the basis of the use of the anti-HER2 complementary bispecific antibody of any one of claims 10-18, the anti-HER2 complementary bispecific ADC of any one of claims 19-30, the pharmaceutical composition of claim 36, or the kit of claim 37 in the preparation of a drug for treating cancer expressing HER2.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/097980

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114805590	A	29 July 2022	None			
WO	2014060365	A1	24 April 2014	None			
US	2019127481	A1	02 May 2019	US	2022135700	A1	05 May 2022
WO	2023041006	A1	23 March 2023	TW	202327662	A	16 July 2023
				KR	20240056587	A	30 April 2024
				WO	2023041007	A1	23 March 2023
				CA	3231491	A1	23 March 2023
				EP	4389153	A1	26 June 2024
				IL	311324	A	01 May 2024
				MX	2024003025	A	26 March 2024
				AU	2022345316	A1	02 May 2024
				TW	202327661	A	16 July 2023

A. 主题的分类

C07K16/46(2006.01)i; A61K39/395(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)

IPC: C07K,A61K,A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, 万方数据库, CNTXT, ENTXT, VEN, STN, NCBI, ISI: 序列检索, HER2, 抗体, 双特异性, bispecific, 艾立布林, eribulin, ADC, 偶联物, ECD, 胞外结构域, 结构域III, 结构域I, 结构域IV, ECD1, ECD3, ECD4

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 114805590 A (三生国健药业(上海)股份有限公司) 2022年7月29日 (2022 - 07 - 29) 权利要求1-30	1、10、14-15、17-19、22-40
Y	CN 114805590 A (三生国健药业(上海)股份有限公司) 2022年7月29日 (2022 - 07 - 29) 权利要求1-30	19、22-40
X	WO 2014060365 A1 (UNIVERSITAT ZURICH PROREKTORAT MNW) 2014年4月24日 (2014 - 04 - 24) 权利要求1-5、12-16、说明书实施例5	1、10、14-15、17-19、22-40
Y	WO 2014060365 A1 (UNIVERSITAT ZURICH PROREKTORAT MNW) 2014年4月24日 (2014 - 04 - 24) 权利要求1-5、12-16、说明书实施例5	19、22-40
X	US 2019127481 A1 (UNIVERSITAT ZURICH) 2019年5月2日 (2019 - 05 - 02) 权利要求1-11、说明书第23-24段	1、10、14-15、17-19、22-40
Y	US 2019127481 A1 (UNIVERSITAT ZURICH) 2019年5月2日 (2019 - 05 - 02) 权利要求1-11、说明书第23-24段	19、22-40

☒ 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

2024年9月7日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月12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

授权官员

罗洋

电话号码 (+86) 010-53961959

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

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
Y	WO 2023041006 A1 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO LTD) 2023年3月23日 (2023 - 03 - 23) 权利要求1-10、说明书第3、7、17、45段	19、22-40
A	KETCHEMEN J.P.等. "Biparatopic anti-HER2 drug radioconjugates as breast cancer thera- nostics" BRITISH JOURNAL OF CANCER, 第129卷, 2023年4月24日 (2023 - 04 - 24), 第153-162页	1-40
X	HAMBLETT,K.J.等. "Abstract P6-17-13: ZW49, a HER2 targeted biparatopic antibody drug conjugate for the treatment of HER2 expressing cancers" CANCER RES, 第79卷, 第4_Supplement期, 2019年2月15日 (2019 - 02 - 15), 摘要	1
X	PEGRAM,M.D.等. "First-in-human, phase 1 dose-escalation study of biparatopic an- ti-HER2 antibody-drug conjugate MEDI4276 in patients with HER2-positive advanced breast or gastric cancer" MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, 第20卷, 第8期, 2021年8月31日 (2021 - 08 - 31), 第1442-1453页	1

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:

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： 38–39
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求38–39涉及一种治疗表达HER2的癌症的方法，也即权利要求38–39涉及PCT细则39.1定义的
的不要求国际检索单位检索的主题：（4）通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及
在人体或动物体上实施的诊断方法。国际检索基于权利要求10–18中任一项所述的抗HER2互补性
双特异抗体、权利要求19–30中任一项所述的抗HER2互补性双特异ADC、权利要求36所述的药物
组合物、或权利要求37所述的药盒在制备治疗表达HER2的癌症的药物中的用途作出。
2.

☐

权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.

☐

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

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)
CN	114805590	A	2022年7月29日	无	
WO	2014060365	A1	2014年4月24日	无	
US	2019127481	A1	2019年5月2日	US	2022135700 A1 2022年5月5日
WO	2023041006	A1	2023年3月23日	TW	202327662 A 2023年7月16日
				KR	20240056587 A 2024年4月30日
				WO	2023041007 A1 2023年3月23日
				CA	3231491 A1 2023年3月23日
				EP	4389153 A1 2024年6月26日
				IL	311324 A 2024年5月1日
				MX	2024003025 A 2024年3月26日
				AU	2022345316 A1 2024年5月2日
				TW	202327661 A 2023年7月16日