

(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3月28日 (28.03.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/061224 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/32 (2006.01) **C12N 15/13** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/119763

(22) 国际申请日: 2023年9月19日 (19.09.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202211142864.8 2022年9月20日 (20.09.2022) CN

(71) 申请人: 普米斯生物技术(珠海)有限公司 (**BIOTHEUS INC.**) [CN/CN]; 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。

(72) 发明人: 吴凡 (**WU, Fan**); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 陈连娣 (**CHEN, Liandi**); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 缪小牛 (**MIAO, Xiaoniu**); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。 许英达 (**XU, Yingda**); 中国广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元, Guangdong 519080 (CN)。

(74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有限公司 (**CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE**); 中国北京市西城区复兴门内大街158号远洋大厦F10层, Beijing 100031 (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 ANTIBODIES AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗HER2抗体及其用途

(57) **Abstract:** Provided are anti-HER2 antibodies and use thereof, and specifically provided are a series of anti-HER2 antibodies. The antibodies have high binding affinity for HER2, have cross-reaction activity with human and cynomolgus monkey HER2, and exhibit good thermal stability, and show excellent anti-tumor effect in various tumors (such as neurocytoma, breast cancer, ovarian cancer, gastric cancer, lung cancer, kidney cancer, intestinal cancer, pancreatic cancer, bladder cancer, and the like).

(57) 摘要: 抗HER2抗体及其用途, 具体提供了系列抗HER2抗体, 其与HER2的结合亲和力高, 具备与人、食蟹猴HER2的交叉反应活性, 热稳定性良好, 在多种肿瘤(如神经细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、肾癌、肠癌、胰腺癌、膀胱癌等)中具有优异的抗肿瘤效果。



WO 2024/061224 A1

抗 HER2 抗体及其用途

技术领域

本发明涉及抗体药物领域，具体涉及抗 HER2 抗体及其用途。

5

背景技术

HER2, 又名 ErbB2。它属于 I 型受体酪氨酸激酶家族中的 HER 亚家族，亚家族中还包括 HER1(ErbB1 或 EGFR)、HER3(ErbB3)和 HER4(ErbB4)等 3 个成员。HER 亚家族成员可形成同二聚体和异二聚体，HER2 是其它 ErbB 受体的最强二聚配偶体。HER2 活化导致受体磷酸化，可通过 MAPK、PI3K/AKT、JAK/STAT 和 PKC 等多条信号通路触发下游的信号级联放大，对细胞的增殖、分化、发育、黏附及迁移起重要的调节作用。研究人员发现 HER2 的高表达与很多肿瘤有关，如：神经细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、肾癌、肠癌、胰腺癌、膀胱癌等等。

15 目前，曲妥珠单抗 (Trastuzumab) 和帕妥珠单抗 (Pertuzumab) 是市售的主要 HER2 靶向治疗抗体，曲妥珠单抗识别 HER2 胞外 IV 结构域，帕妥珠单抗识别 HER2 胞外结构域 II 异源二聚化位点，显著的改善了患者的生存期。然而，研究人员也发现，曲妥珠单抗 (Trastuzumab) 对许多同样是 HER2 高表达的肿瘤病人没有治疗效果。

20 因此，本领域仍然存在开发新的抗 HER2 抗体需求。

发明内容

本申请的发明人经过大量的研究，筛选获得了系列抗 HER2 抗体，其与 HER2 的结合亲和力高，具备与人、食蟹猴 HER2 的交叉反应活性，热稳定性良好，在多种肿瘤（如神经细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、肾癌、肠癌、胰腺癌、膀胱癌等）中具有优异的抗肿瘤效果。由此，本发明提供了以下方面。

抗体或其抗原结合片段

在第一方面，本发明提供了能够特异性结合 HER2 的抗体或其抗原结合

片段，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 下述 3 个重链可变区 (VH) 互补决定区 (CDR)：

(a) VH CDR1，其具有如 GFNIKDTY (SEQ ID NO: 10) 所示的结构；

(b) VH CDR2，其具有如 IYPTQGYT (SEQ ID NO: 11) 所示的结构；

5 (c) VH CDR3，其具有如 SRWGGEGFYAMDY (SEQ ID NO: 12) 所示的结构；

和/或，

(2) 下述 3 个轻链可变区 (VL) 互补决定区 (CDR)：

(d) VL CDR1，其具有如 X₁X₂VQX₃A (SEQ ID NO: 33) 所示的结构；

10 (e) VL CDR2，其具有如 SAS (SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 23 或 SEQ ID NO: 27) 所示的结构；

(f) VL CDR3，其具有如 QQHX₄X₅TPPT (SEQ ID NO: 34) 所示的结构；
其中：

X₁ 选自氨基酸残基 Q、N；

15 X₂ 选自氨基酸残基 N、Y、S；

X₃ 选自氨基酸残基 G、T；

X₄ 选自氨基酸残基 Y、F、S；

X₅ 选自氨基酸残基 S、M、T。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

20 如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3；和，

如 SEQ ID NOs: 18、22 或 26 任一项所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NOs: 19、23 或 27 任一项所示的 VL CDR2，以及，如 SEQ ID NOs: 20、24 或 28 所示的 VL CDR3。

25 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3；和，如 SEQ ID NO: 18 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 19 所示的 VL CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 20 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO:

10 所示的 VH CDR1, 如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2, 以及, 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3; 和, 如 SEQ ID NO: 22 所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NO: 23 所示的 VL CDR2, 以及, 如 SEQ ID NO: 24 所示的 VL CDR3。

5 在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1, 如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2, 以及, 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3; 和, 如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NO: 27 所示的 VL CDR2, 以及, 如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL CDR3。

10 在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 9 所示的序列或其变体的 VH, 和, 如 SEQ ID NOs: 17、21 或 25 任一项所示的序列或其变体的 VL;

其中, 所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加), 或具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 15 100% 的序列同一性的序列; 优选地, 所述的置换是保守置换。

在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的 VH, 和, 如 SEQ ID NO: 17 所示的序列的 VL。

在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的 VH, 和, 如 SEQ ID NO: 21 所示的序列的 VL。

20 在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的 VH, 和, 如 SEQ ID NO: 25 所示的序列的 VL。

在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段进一步包含来源于人免疫球蛋白的恒定区。

25 在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的重链包含来源于人免疫球蛋白 (例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4) 的重链恒定区。

在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链包含来源于人免疫球蛋白 (例如 κ 或 λ) 的轻链恒定区。

在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段进一步包含如 SEQ ID NO: 29 所示的重链恒定区和/或如 SEQ ID NO: 31 所示的轻链恒定区。

在一些实施方案中，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、双抗体(diabody)和单域抗体(sdAb)。

本发明的抗体可以本领域已知的各种方法来制备，例如通过基因工程重组技术来获得。例如，通过化学合成或 PCR 扩增获得编码本发明抗体的重链和轻链基因的 DNA 分子。将所得 DNA 分子插入表达载体内，然后转染宿主细胞。然后，在特定条件下培养转染后的宿主细胞，并表达本发明的抗体。

本发明的抗原结合片段可以通过水解完整的抗体分子获得（参见 Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)）。另外，这些抗原结合片段也可以直接由重组宿主细胞产生（reviewed in Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)）。比如，Fab'片段可以直接从宿主细胞中获得；可以将 Fab'片段化学偶联形成 F(ab')₂片段（Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)）。另外，Fv、Fab 或 F(ab')₂片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中直接分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备这些抗原结合片段的其它技术。

本发明的 CDR 是按照 IMGT 划分网站 <http://aligncdr.labshare.cn/aligncdr/abrsa.php> 划分得到的。

单臂抗体

在第二方面，本发明提供了单臂抗体，其包含：

(1) 第一肽链，所述第一肽链包含下述 3 个重链可变区 (VH) 互补决定区 (CDR)：

(a) VH CDR1，其具有如 GFNIKDTY (SEQ ID NO: 10) 所示的结构；

(b) VH CDR2，其具有如 IYPTQGYT (SEQ ID NO: 11) 所示的结构；

(c) VH CDR3，其具有如 SRWGGEGGFYAMDY (SEQ ID NO: 12) 所示的结构；

(2) 第二肽链，所述第二肽链包含下述 3 个轻链可变区 (VL) 互补决定区 (CDR)：

(d) VL CDR1，其具有如 X₁X₂VQX₃A (SEQ ID NO: 33) 所示的结构；

(e) VL CDR2，其具有如 SAS (SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 23 或 SEQ

ID NO: 27) 所示的结构;

(f) VL CDR3, 其具有如 QQH₄X₅TPPT (SEQ ID NO: 34) 所示的结构;
和,

(3) 第三肽链, 所述第三肽链能够和所述第一肽链形成二聚体;

5 其中:

X₁ 选自氨基酸残基 Q、N;

X₂ 选自氨基酸残基 N、Y、S;

X₃ 选自氨基酸残基 G、T;

X₄ 选自氨基酸残基 Y、F、S;

10 X₅ 选自氨基酸残基 S、M、T。

在一些实施方案中, 所述第一肽链包含如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1, 如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2, 以及, 如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3。

15 在一些实施方案中, 所述第二肽链包含如 SEQ ID NOs: 18、22 或 26 任一项所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NOs: 19、23 或 27 任一项所示的 VL CDR2, 以及, 如 SEQ ID NOs: 20、24 或 28 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中, 所述第二肽链包含如 SEQ ID NO: 18 所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NO: 19 所示的 VL CDR2, 以及, 如 SEQ ID NO: 20 所示的 VL CDR3。

20 在一些实施方案中, 所述第二肽链包含如 SEQ ID NO: 22 所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NO: 23 所示的 VL CDR2, 以及, 如 SEQ ID NO: 24 所示的 VL CDR3。

25 在一些实施方案中, 所述第二肽链包含如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL CDR1, 如 SEQ ID NO: 27 所示的 VL CDR2, 以及, 如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL CDR3。

在一些实施方案中, 所述第一肽链包含如 SEQ ID NO: 9 所示的序列或其变体的重链可变区 (VH), 其中, 所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个, 2 个, 3 个, 4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加), 或具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少

91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列；优选地，所述的置换是保守置换。

5 在一些实施方案中，所述第一肽链包含如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的重链可变区 (VH)。

10 在一些实施方案中，所述第二肽链包含如 SEQ ID NOs: 17、21 或 25 任一项所示的序列或其变体的轻链可变区 (VL)，其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加 (例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加)，或具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100%的序列同一性的序列；优选地，所述的置换是保守置换。

15 在一些实施方案中，所述第二肽链包含如 SEQ ID NOs: 17、21 或 25 任一项所示的序列的轻链可变区 (VL)。

20 在一些实施方案中，所述第二肽链进一步包含来源于人免疫球蛋白的恒定区。

在一些实施方案中，所述第二肽链包含来源于人免疫球蛋白 (例如 κ 或 λ) 的轻链恒定区。

25 在一些实施方案中，所述第二肽链包含如 SEQ ID NO: 31 所示的轻链恒定区。

在一些实施方案中，所述第一肽链进一步包含来源于人免疫球蛋白的恒定区。在一些实施方案中，所述来源于人免疫球蛋白的恒定区为来源于人免疫球蛋白 (例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4) 的重链恒定区。在一些实施方案中，所述重链恒定区具有第一修饰，以促进所述第一肽链和所述第三肽链的二聚化。

在一些实施方案中，所述第三肽链包含 Fc 结构域单体。在一些实施方案中，所述 Fc 结构域单体是 IgG 的 Fc 结构域单体，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 结构域单体。在一些实施方案中，所述 Fc 结构域单体具有第二修饰，以促进所述第三肽链和所述第一肽链的二聚化。

在一些实施方案中，所述第一修饰和所述第二修饰中，任意一个为“节”修饰，另一个为“穴”修饰，以形成节-入-穴(knob-into-hole)修饰，促进所述第一肽链和所述第三肽链的二聚化。

5 在一些实施方案中，所述第一修饰为“节”修饰，所述第二修饰为“穴”修饰，以形成节-入-穴(knob-into-hole)修饰，促进所述第一肽链和所述第三肽链的二聚化。

在一些实施方案中，所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列，所述 Fc 结构域单体包含如 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

10 节-入-穴技术记载于例如 US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway 等, Prot Eng 9, 617-621(1996)和 Carter, J Immunol Meth 248, 7-15(2001)。一般地，该方法牵涉在第一多肽的界面处引入隆起(“节”)并在第二多肽的界面中引入相应的空腔(“穴”)，使得隆起可以置于空腔中从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过将来自第一多肽界面的小氨基酸侧链用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换来构建隆起。在第二多肽的界面中创建具有与隆起
15 相同或相似大小的互补性空腔，其通过将大氨基酸侧链用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换进行。

分离的核酸分子

20 在第三方面，本发明提供了分离的核酸分子，其编码第一方面的抗体或其抗原结合片段，或其重链可变区和/或轻链可变区；或者，其编码第二方面的单臂抗体，或其重链可变区和/或轻链可变区。

25 在一些实施方案中，所述分离的核酸分子包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的重链或重链可变区的第一核苷酸序列和编码所述抗体或其抗原结合片段的轻链或轻链可变区的第二核苷酸序列，其中所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列存在于相同或不同的分离的核酸分子上。当所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列存在于不同的分离的核酸分子上时，本发明所述的分离的核酸分子包含含有所述第一核苷酸序列的第一核酸分子以及含有所述第二核苷酸序列的第二核酸分子。

在一些实施方案中，所述分离的核酸分子包含编码本发明单臂抗体的第一肽链或其重链可变区的第一核苷酸序列、编码所述单臂抗体的第二肽链或

其轻链可变区的第二核苷酸序列和编码所述单臂抗体的第三肽链的第三核苷酸序列，其中所述第一核苷酸序列、所述第二核苷酸序列和所述第三核苷酸序列存在于相同或不同的分离的核酸分子上。当所述第一核苷酸序列、所述第二核苷酸序列和所述第三核苷酸序列存在于不同的分离的核酸分子上时，本发明所述的分离的核酸分子包含含有所述第一核苷酸序列的第一核酸分子、含有所述第二核苷酸序列的第二核酸分子和含有所述第三核苷酸序列的第三核酸分子。

载体

在第四方面，本发明提供了载体，其包含第三方面的核酸分子。在一些实施方案中，所述载体为克隆载体或表达载体。

在一些实施方案中，所述载体包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的重链或重链可变区的第一核苷酸序列和编码所述抗体或其抗原结合片段的轻链或轻链可变区的第二核苷酸序列，其中所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列存在于相同或不同的载体上。当所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列存在于不同的载体上时，本发明所述的载体包含含有所述第一核苷酸序列的第一载体以及含有所述第二核苷酸序列的第二载体。

在一些实施方案中，所述载体包含编码本发明的单臂抗体的第一肽链或其重链可变区的第一核苷酸序列、编码所述单臂抗体的第二肽链或其轻链可变区的第二核苷酸序列和编码所述单臂抗体的第三肽链的第三核苷酸序列，其中所述第一核苷酸序列、所述第二核苷酸序列和所述第三核苷酸序列存在于相同或不同的载体上。当所述第一核苷酸序列、所述第二核苷酸序列和所述第三核苷酸序列存在于不同的载体上时，本发明所述的载体包含含有所述第一核苷酸序列的第一载体、含有所述第二核苷酸序列的第二载体和含有所述第三核苷酸序列的第三载体。

宿主细胞

在第五方面，本发明提供了宿主细胞，其包含如第三方面的核酸分子或第四方面的载体。此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如细菌细胞（如大肠杆菌细胞），以及真核细胞例如真菌细胞（例如酵母细胞），昆虫细胞，植物细胞和动物细胞（如哺乳动物细胞，例如小鼠细胞、人细胞等）等等。

制备方法

在第六方面，本发明提供了制备第一方面的抗体或其抗原结合片段或者第二方面的单臂抗体的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段或者所述单臂抗体表达的条件下，培养第五方面的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段或者所述单臂抗体。

治疗用途

在第七方面，本发明提供了药物组合物，其包含如第一方面的抗体或其抗原结合片段或者第二方面的单臂抗体，以及任选的药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些示例性实施方案中，所述药学上可接受的载体和/或赋形剂包含无菌可注射液体（如水性或非水性悬浮液或溶液）。在某些示例性实施方案中，此类无菌可注射液体选自注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液（例如0.9% (w/v) NaCl）、葡萄糖溶液（例如5%葡萄糖）、含有表面活性剂的溶液（例如0.01%聚山梨醇20）、pH缓冲溶液（例如磷酸盐缓冲溶液）、Ringer氏溶液及其任意组合。

在第八方面，本发明提供了第一方面的抗体或其抗原结合片段、第二方面的单臂抗体、第三方面的分离的核酸分子、第四方面的载体或第五方面的宿主细胞用于制备药物的用途，所述药物用于在受试者中激活 HER2，提高免疫细胞活性，增强免疫应答，和/或预防和/或治疗肿瘤或者感染。

在一些实施方案中，所述免疫细胞是 T 细胞，B 细胞，DC 细胞，巨噬细胞，和/或，NK 细胞。

在一些实施方案中，所述免疫应答是 HER2 介导的免疫应答。

在一些实施方案中，所述肿瘤选自实体肿瘤或血液肿瘤（例如，白血病、淋巴瘤、骨髓瘤）。在某些实施方案中，所述肿瘤选自实体肿瘤或淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤选自神经细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、肾癌、肠癌、胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、结肠癌、子宫/宫颈癌、前列腺癌、睾丸癌、食管癌、胃肠癌、头颈癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统的肿瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤、黑色素瘤。

在一些实施方案中，所述感染选自病毒感染、细菌感染、真菌感染和寄生虫感染。

在一些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

5 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段或者所述单臂抗体单独使用，或与另外的药学活性剂联合使用。

在第九方面，本发明提供了一种在受试者中增强免疫应答，和/或，预防和/或治疗肿瘤或感染的方法，所述方法包括：给有此需要的受试者施用有效量的第一方面的抗体或其抗原结合片段或者第二方面的单臂抗体或者第七方面的药物组合物。

10 在一些实施方案中，所述免疫应答是 **HER2** 介导的免疫应答。

在一些实施方案中，所述肿瘤选自实体肿瘤或血液肿瘤（例如，白血病、淋巴瘤、骨髓瘤）。在某些实施方案中，所述肿瘤选自实体肿瘤或淋巴瘤。

15 在一些实施方案中，所述肿瘤选自神经细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、肾癌、肠癌、胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、结肠癌、子宫/宫颈癌、前列腺癌、睾丸癌、食管癌、胃肠癌、头颈癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统的肿瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤、黑色素瘤。

在一些实施方案中，所述感染选自病毒感染、细菌感染、真菌感染和寄生虫感染。

20 在一些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

本发明的抗体或其抗原结合片段或者单臂抗体或者药物组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预
25 期的给药方式和治疗用途。本发明的抗体或其抗原结合片段或者单臂抗体或者药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的抗体或其抗原结合片段或者单臂抗体，以及任选地，同时掺入其他期望的成分（包括但不限于，

pH 调节剂, 表面活性剂, 佐剂, 离子强度增强剂, 等渗剂、防腐剂、稀释剂, 或其任何组合), 随后过滤除菌。此外, 可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如, 通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中, 例如注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液(例如 0.9% (w/v)NaCl)、葡萄糖溶液(例如 5% 葡萄糖)、含有表面活性剂的溶液(例如 0.01%聚山梨醇 20)、pH 缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲溶液)、Ringer 氏溶液及其任意组合。

本发明的抗体或其抗原结合片段、或者本发明的单臂抗体、或者本发明的药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用, 包括但不限于, 口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部(如, 粉剂、药膏或滴剂), 或鼻腔途径。但是, 对于许多治疗用途而言, 优选的给药途径/方式是胃肠外给药(例如静脉注射或推注, 皮下注射, 腹膜内注射, 肌内注射)。本领域技术人员应理解, 给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在某些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段或者单臂抗体或者药物组合物通过静脉注射或推注给予。

检测用途

在第十方面, 本发明提供了缀合物, 其包含第一方面的抗体或其抗原结合片段或者第二方面的单臂抗体, 以及任选的与所述抗体或其抗原结合片段或者所述单臂抗体连接的可检测的标记。

在一些实施方案中, 所述可检测的标记选自酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)、化学发光试剂(例如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物)、荧光染料(例如荧光素或荧光蛋白)、放射性核素或生物素。

在第十一方面, 本发明提供了试剂盒, 其包含第一方面的抗体或其抗原结合片段或者第二方面的单臂抗体或者第十方面的缀合物。

在一些实施方案中, 所述试剂盒包含第十方面的缀合物。

在一些实施方案中, 所述试剂盒包含第一方面的抗体或其抗原结合片段, 以及特异性识别所述抗体或其抗原结合片段的第二抗体。在某些实施方案中, 所述第二抗体还包括可检测的标记, 例如酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷

酸酶)、化学发光试剂(例如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物)、荧光染料(例如荧光素或荧光蛋白)、放射性核素或生物素。

在一些实施方案中,所述试剂盒包含第二方面的单臂抗体,以及特异性识别所述单臂抗体的第二抗体。在某些实施方案中,所述第二抗体还包含可
5 检测的标记,例如酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)、化学发光试剂(例如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物)、荧光染料(例如荧光素或荧光蛋白)、放射性核素或生物素。

在第十二方面,本发明提供了用于检测 **HER2** 在样品中的存在或其水平的方法,其包括使用第一方面的抗体或其抗原结合片段或者第二方面的单臂
10 抗体或者第十方面的缀合物。在某些实施方案中,所述方法用于治疗目的,诊断目的。在另一些实施方案中,所述方法用于非治疗非诊断目的。

在一些实施方案中,所述方法是免疫学检测,例如免疫印迹法、酶免疫测定法(例如 **ELISA**)、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。

15 在一些实施方案中,所述方法包括使用第十方面的缀合物。

在一些实施方案中,所述方法包括使用第一方面的抗体或其抗原结合片段,并且所述方法还包括使用携带可检测的标记(例如酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)、化学发光试剂(例如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物)、荧光染料(例如荧光素或荧光蛋白)、放射性核素或生
20 物素)的第二抗体来检测所述抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中,所述方法包括使用第二方面的单臂抗体,并且所述方法还包括使用携带可检测的标记(例如酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)、化学发光试剂(例如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物)、荧光染料(例如荧光素或荧光蛋白)、放射性核素或生物素)的第二
25 抗体来检测所述单臂抗体。

在某些实施方案中,所述方法包括:(1)将所述样品与本发明的抗体或其抗原结合片段或者单臂抗体接触;(2)检测抗原-抗体免疫复合物的形成或检测所述免疫复合物的量。所述免疫复合物的形成表明存在 **HER2** 或表达 **HER2** 的细胞。

在第十三方面，本发明提供了第一方面的抗体或其抗原结合片段或者第二方面的单臂抗体或者第三方面的缀合物在制备检测试剂中的用途，所述检测试剂用于检测 **HER2** 在样品中的存在或其水平。

5 在一些实施方案中，所述检测试剂通过第十二方面的用于检测 **HER2** 在样品中的存在或其水平的方法来检测 **HER2** 在样品中的存在或其水平。

在一些实施方案中，所述样品为来自受试者(例如哺乳动物，优选人或食蟹猴)的细胞样品(例如，免疫细胞)。

术语定义

10 在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的病毒学、生物化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

15 当本文使用术语“例如”、“如”、“诸如”、“包括”、“包含”或其变体时，这些术语将不被认为是限制性术语，而将被解释为表示“但不限于”或“不限于”。

除非本文另外指明或根据上下文明显矛盾，否则术语“一个”和“一种”以及“该”和类似指称物在描述本发明的上下文中(尤其在以下权利要求的上下文中)应被解释成覆盖单数和复数。

20 本文所用的术语“抗体”是指能够特异性结合靶抗原的源自免疫球蛋白的分子，所述源自免疫球蛋白的分子通过位于其可变区中的至少一个抗原结合位点来结合所述靶抗原。当提及术语“抗体”时，除非上下文明确指出，其不仅包括完整抗体，而且包括能够特异性结合靶抗原的抗原结合片段。“完整抗体”典型地由两对多肽链(每对具有一条轻链(LC)和一条重链(HC))组成。抗体轻链可分类为 κ (kappa) 和 λ (lambda) 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 **IgM**、**IgD**、**IgG**、**IgA** 和 **IgE**。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构

域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应子功能,如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组
5 分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循
10 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。

如本文中所使用的,术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区中负责抗原结合的氨基酸残基。在重链和轻链的可变区中各含有三个 CDR,
15 命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。这些 CDR 的精确边界可根据本领域已知的各种编号系统进行定义,例如可按照 Kabat 编号系统 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)、Chothia 编号系统 (Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989)
20 Nature 342:878-883) 或 IMGT 编号系统 (Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003) 中的定义。对于给定的抗体,本领域技术人员将容易地鉴别各编号系统所定义的 CDR。并且,不同编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的(例如,可参见 Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003)。

25 如本文中所使用的,术语“构架区”或“FR”残基是指,抗体可变区中除了如上定义的 CDR 残基以外的那些氨基酸残基。

术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如,其包括,重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体,例

如, IgG (例如, IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的, 术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽, 其保持特异性结合全长抗体所结合的共同抗原的能力, 和/或
5 或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合, 其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文, 用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。抗原结合片段的非限制性实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、互
10 补决定区(CDR)片段、scFv、双抗体 (diabody)、单域抗体 (single domain antibody)、嵌合抗体、线性抗体 (linear antibody)、纳米抗体 (技术来自 Domantis)、probody 和这样的多肽, 其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。工程改造的抗体变体综述于 Holliger 等, 2005; *Nat Biotechnol*, 23: 1126-1136 中。

如本文中所使用的, 术语“全长抗体”意指, 由两条“全长重链”和两条“全长轻链”组成的抗体。其中, “全长重链”是指这样的多肽链, 其在N端到C端的方向上由重链可变区 (VH)、重链恒定区CH1结构域、铰链区 (HR)、重链恒定区CH2结构域、重链恒定区CH3结构域组成; 并且, 当所述全长抗体为IgE同种型时, 任选地还包括重链恒定区CH4结构域。优
20 选地, “全长重链”是在N端到C端方向上由VH、CH1、HR、CH2和CH3组成的多肽链。“全长轻链”是在N端到C端方向上由轻链可变区(VL)和轻链恒定区 (CL) 组成的多肽链。两对全长抗体链通过在CL和CH1之间的二硫键和两条全长重链的HR之间的二硫键连接在一起。本发明的全长抗体可以来自单一物种, 例如人; 也可以是嵌合抗体或人源化抗体。本发明的
25 全长抗体包含分别由VH和VL对形成的两个抗原结合部位, 这两个抗原结合部位特异性识别/结合相同的抗原。

如本文中所使用的, 术语“Fd”意指由 VH 和 CH1 结构域组成的抗体片段; 术语“dAb 片段”意指由 VH 结构域组成的抗体片段 (Ward 等人, *Nature* 341:544 546 (1989)); 术语“Fab 片段”意指由 VL、VH、CL 和

CH1 结构域组成的抗体片段；术语“F(ab')₂ 片段”意指包含通过较链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段；术语“Fab'片段”意指还原连接 F(ab')₂ 片段中两个重链片段的二硫键后所获片段，由一条完整的轻链和重链的 Fd 片段（由 VH 和 CH1 结构域组成）组成。

5 如本文中所使用的，术语“Fv”意指由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成的抗体片段。Fv 片段通常被认为是，能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为，六个 CDR 赋予抗体的抗原结合特异性。然而，即便是一个可变区（例如 Fd 片段，其仅仅含有三个对抗原特异的 CDR）也能够识别并结合抗原，尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

10 如本文中所使用的，术语“scFv”是指，包含 VL 和 VH 结构域的单个多肽链，其中所述 VL 和 VH 通过接头（linker）相连（参见，例如，Bird 等人，*Science* 242:423-426 (1988)；Huston 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)；和 Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷，Roseburg 和 Moore 编，Springer-Verlag, 纽约，
15 第 269-315 页(1994)）。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-VL-接头-VH-COOH 或 NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列 (GGGGS)₄ 的接头，但也可使用其变体（Holliger 等人(1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448）。可用于本发明的其他接头由 Alfthan 等人
20 (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi 等人(2001), *Eur. J. Immunol.* 31: 94-106, Hu 等人(1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov 等人 (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 和 Roovers 等人(2001), *Cancer Immunol.* 描述。在一些情况下，scFv 的 VH 与 VL 之间还可以存在二硫键。在本发明的某些实施方案中，scFv 可形成 di-scFv，其指的是两个或两个以上单个
25 scFv 串联而形成抗体。在本发明的某些实施方案中，scFv 可形成(scFv)₂，其指的是两个或两个以上单个 scFv 并联而形成抗体。

如本文中所使用的，术语“双抗体”意指，其 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原

结合部位（参见，例如，Holliger P.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)，和 Poljak R. J.等人，*Structure* 2:1121-1123 (1994)）。

如本文中所使用的，术语“单域抗体（single-domain antibody, sdAb）”具有本领域技术人员通常理解的含义，其是指由单个单体可变抗体结构域（例如单个重链可变区）所组成的抗体片段，其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力。单域抗体也称为纳米抗体（nanobody）。

上述各个抗体片段均保持了特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合。

可使用本领域技术人员已知的常规技术（例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法）从给定的抗体（例如本发明提供的抗体）获得抗体的抗原结合片段（例如，上述抗体片段），并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

如本文中所使用的，术语“嵌合抗体（Chimeric antibody）”是指，这样的抗体，其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体（其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类），且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体（其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类），但无论如何，其仍保留对目标抗原的结合活性（U.S.P 4,816,567 to Cabilly et al.; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 6855 (1984)）。在某些实施方案中，术语“嵌合抗体”可包括这样的抗体，其中抗体的重链和轻链可变区来自第一抗体，而抗体的重链和轻链恒定区来自第二抗体。

如本文中所使用的，术语“Fc 结构域”或“Fc 区域”意指，包含 CH2 和 CH3 的重链恒定区的一部分。抗体的 Fc 片段具有多种不同的功能，但不参与抗原的结合。由 Fc 区介导的“效应子功能”包括 Fc 受体结合；Clq 结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；噬菌作用；对细胞表面受体(例如 B 细胞受体)的下调；和 B 细胞活化等。Fc 区可为任何抗体重链恒定区同型，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

Fc 结构域既可以包括天然 Fc 区，也可以包括变异 Fc 区。天然 Fc 区包含与自然界中发现的 Fc 区的氨基酸序列一致的氨基酸序列，例如天然序列

人类 Fc 区包括天然序列人类 IgG1 Fc 区(非 A 和 A 同种异型); 天然序列人类 IgG2 Fc 区; 天然序列人类 IgG3 Fc 区; 及天然序列人类 IgG4 Fc 区, 以及其天然存在的变异体。变异 Fc 区包含因至少一个氨基酸修饰而与天然序列 Fc 区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。在一些实施方案中, 变异 Fc 区可具备相比于天然 Fc 区改变的效应子功能 (例如 Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能)。在一些实施方案中, 变异 Fc 区可具备促进二聚化的修饰。

如本文中所使用的, 术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。为了测定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性, 为了最佳比较目的将序列进行比对 (例如, 可在第一氨基酸序列或核酸序列中引入缺口以与第二氨基酸或核酸序列最佳比对)。然后比较对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时, 则分子在该位置上是同一的。两个序列之间的百分比同一性是由序列所共享的同一性位置的数目的函数 (即, 百分比同一性=同一重叠位置的数目/位置的总数×100%)。在某些实施方案中, 两个序列长度相同。

两个序列之间的百分比同一性的测定还可使用数学算法来实现。用于两个序列的比較的数学算法的一个非限制性实例是 Karlin 和 Altschul 的算法, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, 如同 Karlin 和 Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877 中改进的。将这样的算法整合至 Altschul 等人, 1990, J. Mol. Biol. 215:403 的 NBLAST 和 XBLAST 程序中。

如本文中所使用的, 术语“变体”, 在多肽的情境中(包括多肽)也指包含已通过引入氨基酸残基置换、缺失或添加改变的氨基酸序列的多肽或肽。在某些情况下, 术语“变体”还指已被修饰 (即, 通过将任何类型的分子共价连接至多肽或肽) 的多肽或肽。例如, 但非限制性地, 多肽可以被修饰, 例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团进行的衍生化、蛋白水解切割、连接至细胞配体或其它蛋白质等。衍生多肽或肽可使用本领域技术人员已知的技术通过化学修饰来产生, 所

述技术包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外，变体具有与其所源自的多肽或肽相似、相同或改善的功能。

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。特异性结合相互作用的强度或亲和力可以该相互作用的平衡解离常数(K_D)表示。在本发明中，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。

两分子间的特异性结合性质可使用本领域公知的方法进行测定。一种方法涉及测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速度。“结合速率常数”(k_a 或 k_{on})和“解离速率常数”(k_{dis} 或 k_{off})两者都可通过浓度及缔合和解离的实际速率而计算得出(参见 Malmqvist M, Nature, 1993, 361:186-187)。 k_{dis}/k_{on} 的比率等于解离常数 K_D (参见 Davies 等人, Annual Rev Biochem, 1990; 59:439-473)。可用任何有效的方法测量 K_D 、 k_{on} 和 k_{dis} 值。在某些实施方案中，可以使用表面等离子体共振术(SPR)在 Biacore 中来测量解离常数。除此以外还可用生物发光干涉测量法或 Kinexa 来测量解离常数。

如本文中所使用的，本发明所述的可检测的标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。这类标记是本领域熟知的，其实例包括但不限于，酶(例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等)、放射性核素(例如， 3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、荧光染料(例如，异硫氰酸荧光素(FITC)、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明(TRITC)、藻红蛋白(PE)、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物(例如 Cy7、Alexa 750))、发光物质(例如化学发光物质，如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、钆衍生物如三联吡啶钆)、磁珠(例如，Dynabeads[®])、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料(例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶，等)珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲和素(例如，链霉亲和素)的生物素。

如本文中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(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)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，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。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO细胞，COS细胞，NSO细胞，HeLa细胞，BHK细胞，HEK 293细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中所使用的，术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如，可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和PCR介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换，例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质，包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、

组氨酸)的氨基酸。因此,优选用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见,例如, Brummell等人, *Biochem. 32:1180-1187 (1993)*; Kobayashi等人 *Protein Eng. 12(10):879-884 (1999)*; 和Burks等人 *Proc. Natl Acad. Set USA*
5 *94:412-417 (1997)*, 其通过引用并入本文)。

本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如, *Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))*, 其以引用的方式并入本文中。在本发明中,术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。
10 并且在本发明中,氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如,丙氨酸可用A或Ala表示。

如本文中所使用的,术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂,其是本领域公知的(参见例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by*
15 *Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995*), 并且包括但不限于: pH调节剂, 表面活性剂, 佐剂, 离子强度增强剂, 稀释剂, 维持渗透压的试剂, 延迟吸收的试剂, 防腐剂。例如, pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子, 阴离子或者非离子型表面活性剂, 例如 **Tween-80**。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。
20 防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂, 例如对羟苯甲酸酯, 三氯叔丁醇, 苯酚, 山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、**NaCl** 及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水, 水性缓冲液(如缓冲盐水), 醇和多元醇(如甘油)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂, 例如硫柳汞, 2-苯氧乙醇,
25 对羟苯甲酸酯, 三氯叔丁醇, 苯酚, 山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义, 其能够稳定药物中的活性成分的期望活性, 包括但不限于谷氨酸钠, 明胶, **SPGA**, 糖类(如山梨醇, 甘露醇, 淀粉, 蔗糖, 乳糖, 葡聚糖, 或葡萄糖), 氨基酸(如谷氨酸, 甘氨酸), 蛋白质(如干燥乳清, 白蛋白或酪蛋白)或其降解产物(如乳白蛋白水解物)等。在某些

示例性实施方案中，所述药学上可接受的载体或赋形剂包括无菌可注射液体（如水性或非水性悬浮液或溶液）。在某些示例性实施方案中，此类无菌可注射液体选自注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液（例如0.9% (w/v)NaCl）、葡萄糖溶液（例如5%葡萄糖）、含有表面活性剂的溶液（例如0.01%聚山梨醇20）、pH缓冲溶液（例如磷酸盐缓冲溶液）、Ringer氏溶液及其任意组合。

如本文中所使用的，术语“预防”是指，为了阻止或延迟疾病或病症或症状在受试者体内的发生而实施的方法。如本文中所使用的，术语“治疗”是指，为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本发明的目的，有益或所需的临床结果包括(但不限于)减轻症状、缩小疾病的范围、稳定(即，不再恶化)疾病的状态，延迟或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状(无论部分或全部)，无论是可检测或是不可检测的。此外，“治疗”还可以指，与期望的存活期相比(如果未接受治疗)，延长存活期。

如本文中所使用的，术语“受试者”是指哺乳动物，例如人。在某些实施方案中，所述受试者（例如人）患有肿瘤、感染或自身免疫性疾病，或者，具有患有上述疾病的风险。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如，肿瘤、感染或自身免疫性疾病）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟所述疾病的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

25

发明的有益效果

本发明提供了抗 HER2 抗体，其与 HER2 的结合亲和力高，具备与人、食蟹猴 HER2 的交叉反应活性，热稳定性良好，在多种肿瘤（如神经细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、肾癌、肠癌、胰腺癌、膀胱癌等）中具有优

异的抗肿瘤效果。

附图说明

图 1 显示本发明所述单克隆抗体和单臂抗体结构示意图。

5 图 2A、图 2B 显示本发明所述的单克隆抗体与 HER2 蛋白的结合亲和力。

图 3 显示在过表达 HER2 的 N87 细胞上检测本发明所述的单克隆抗体与人 HER2 的结合情况。

10 图 4 显示在过表达 HER2 的 N87 细胞上检测本发明所述单克隆抗体阻断 HER2 信号依赖的细胞增殖。

图 5 显示本发明所述单克隆抗体通过 HER2 介导的 ADCC 作用。

图 6 显示本发明所述单克隆抗体在高温处理后的电荷异质性分析，其中 0H 表示高温处理前的样品；HT2W，表示高温处理 2 周的样品；HT4W，表示高温处理 4 周的样品。

15 图 7 显示本发明所述的单克隆抗体在高温处理后的活性验证，其中 0H 表示高温处理前的样品；HT2W，表示高温处理 2 周的样品；HT4W，表示高温处理 4 周的样品。

20 下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将理解，下列附图和实施例仅用于说明本发明，而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述，本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

序列信息

25 翻译后修饰位点 (PTM) 可能对药物的稳定性和安全性有负面影响，降低药物的效果。本发明对 Trastuzumab 序列进行了优化，去除了其翻译后修饰位点 (PTM)，并对抗体的重轻链 CDR 区域做随机突变构建抗体文库，然后通过酵母展示技术从抗体库中筛选出高亲和力的抗体。本发明具体公开了编码该抗体的氨基酸序列，并进一步展示了候选抗体的相关数据。

本发明涉及的序列的描述提供于下表 1-1 和表 1-2 中。

表 1-1. 本发明的序列可变区和 CDR 总结

序列名称	序列编号	CDR1	CDR2	CDR3
Trastuzumab-HC	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Trastuzumab-LC	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
Trastuzumab-PTM removal-HC	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
Trastuzumab-PTM removal-LC	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
Anti-HER2(NO3- 02)-HC	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
Anti-HER2(NO3- 02)-LC	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
Anti-HER2(NO3- 36)-HC	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
Anti-HER2(NO3- 36)-LC	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
Anti-HER2(NO3- 46)-HC	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
Anti-HER2(NO3- 46)-LC	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28

表 1-2. 本发明的序列恒定区和其他序列总结

序列名称	序列编号
人 IgG1 恒定区	SEQ ID NO: 29
含有 Knob 突变的人 IgG1 恒定区	SEQ ID NO: 30
人 Kappa 恒定区	SEQ ID NO: 31
含有 Hole 突变的人 Fc 区域	SEQ ID NO: 32
X ₁ X ₂ VQX ₃ A	SEQ ID NO: 33
QQHX ₄ X ₅ TPPT	SEQ ID NO: 34

SEQ ID NO:1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG
TLVTVSS

5 SEQ ID NO:2

GFNIKDTY

SEQ ID NO:3

IYPTNGYT

SEQ ID NO:4

10 SRWGGDGFYAMDY

SEQ ID NO:5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:6

15 QDVNTA

SEQ ID NO:7

SAS

SEQ ID NO:8

QQHYTTPPT

20 SEQ ID NO:9

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTQ
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGEGGFYAMDYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO:10

25 GFNIKDTY

SEQ ID NO:11

IYPTQGYT

SEQ ID NO:12

SRWGGEGGFYAMDY

SEQ ID NO:13

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVQTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:14

5 QDVQTA

SEQ ID NO:15

SAS

SEQ ID NO:16

QQHYTTPPT

10 SEQ ID NO:17

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNVQGAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:18

QNVQGA

15 SEQ ID NO:19

SAS

SEQ ID NO:20

QQHYSTPPT

SEQ ID NO:21

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASNYVQTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHFMTPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:22

NYVQTA

SEQ ID NO:23

25 SAS

SEQ ID NO:24

QQHFMTPT

SEQ ID NO:25

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVQGAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG

VPSRFGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHSTTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:26

QSVQGA

SEQ ID NO:27

5 SAS

SEQ ID NO:28

QQHSTTPPT

SEQ ID NO:29

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

10 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

15 SEQ ID NO:30

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP

20 PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:31

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25 SEQ ID NO:32

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

具体实施方式

现参照下列意在举例说明本发明(而非限定本发明)的实施例来描述本发明。

- 5 除非特别指明，本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法，基本上参照 J. Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989，以及 F. M. Ausubel 等人，精编分子生物学实验指南，第 3 版，John Wiley & Sons, Inc.，1995 中所述的方法进行；限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件。本领域技术人员知晓，实施例以举例
- 10 方式描述本发明，且不意欲限制本发明所要求保护的范围。

实施例 1：单克隆抗体亲和力成熟文库的构建及筛选

1.1. 亲和成熟文库构建

- 合成 Trastuzumab 重链可变区基因片段（氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示）、轻链可变区基因片段（氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示）以及引入
- 15 N62Q 和 D110E 突变的重链可变区基因片段（氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示）、引入 N36Q 突变的轻链可变区基因片段（氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示）。以去除 PTM 的 VH 和 VK 为模板，分别对 VH 的 CDR2、CDR3，VK 的 CDR3 区域进行简并引物设计，为保证每个氨基酸都能突变成
- 20 20 种氨基酸的任何一种，以 NNK 作为突变的碱基形式进行 PCR 扩增。利用 PCR 纯化试剂盒(购自 QIAGEN)回收目的片段。将线性化的酵母展示载体和 VH 及 VK 的 PCR 产物混合后分别电转化入酿酒酵母中，分别构建重链突变和轻链突变的亲和力成熟文库并测定库容。

1.2. 抗 HER2 抗体的筛选

- 25 1.2.1 HER2 蛋白的生物素化标记

取适量体积的双蒸水溶解人 HER2 蛋白(购自 AcroBiosystems)，按照生物素标记试剂盒(购自 Thermo)产品说明书，将生物素溶解后与蛋白溶液混合，于 4°C 孵育 2 小时。用脱盐柱(购自 Thermo)去除多余的生物素，脱盐柱预处理及样品收集操作均参考产品说明书步骤进行。

1.2.2 MACS 富集能与人 HER2 特异性结合的酵母

将实施例 1.1 中构建的抗体文库接种于 SD-CAA 扩增培养基(1L SD-CAA 扩增培养基中含 6.7g YNB、5g 酪氨基酸、13.62g Na₂HPO₄·12H₂O、7.44g NaH₂PO₄ 和 2% 葡萄糖)中, 30°C, 225rpm 培养过夜。取适量酵母细胞, 3000rpm×5min 离心(以下离心操作均同此)去除培养基, 用 SD-CAA 诱导培养基重悬酵母细胞, 诱导过夜。测定诱导后的文库浓度, 取适量酵母细胞, 离心去除培养基。用 50ml PBS 重悬酵母细胞, 离心去除上清。用 10ml PBS 重悬酵母细胞。

加入生物素标记的人 HER2 蛋白(终浓度 100nM), 室温孵育 30min, 离心收集酵母细胞, 并用 50ml PBS 洗涤酵母 3 遍。用 5ml 清洗液重悬酵母细胞, 并加入 200 μ l SA 磁珠(购自美天旎), 颠倒孵育 10min。用 PBS 洗涤酵母和磁珠混合物 3 遍, 将混合物加入 LS 纯化柱(购自美天旎)中。将 LS 纯化柱放在磁力架上, 用 PBS 洗涤去除非特异性结合的酵母细胞。将纯化柱从磁力架上取出, 加入 PBS 洗脱酵母。洗脱下来的酵母离心后转入 SD-CAA 扩增培养基中进行扩增。

1.2.3 流式细胞分选获得高亲和力酵母细胞

将经过 MACS 富集的酵母细胞接种于 SD-CAA 扩增培养基中。30°C, 225rpm 摇瓶培养过夜。用 SD-CAA 诱导培养基重悬酵母细胞, 诱导过夜。加入抗-c-Myc 鼠源抗体(购自 Thermo)和 100nM 生物素标记的 HER2 抗原, 孵育 10min。加入 PBS 清洗酵母 3 遍, 加入羊抗小鼠 IgG(H+L) Alexa Fluor Plus 488 荧光抗体 (购自 Invitrogen)和链霉亲和素 APC 结合物荧光抗体(购自 Invitrogen), 孵育 15min。加入 PBS 重悬细胞, 使用 BD FACS AriaIII 仪器进行分选获得可与 HER2 抗原有较高结合能力的酵母。

1.2.4 HER2 抗体候选分子抗体基因的调取

通过 MACS 和 FACS 富集得到的能与人 HER2 抗原有较高结合能力的酵母菌液, 涂布于 SD-CAA 的固体培养板上, 然后挑取单克隆在 SD-CAA 扩增培养基中 30°C, 225rpm 培养过夜, 用 0.1% 的 SDS 处理扩增后的单克隆, 离心并以上清作为模板进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物送测序以获得基因序列。

实施例 2: 单克隆抗体的构建及表达纯化

2.1. 单克隆抗体基因构建入 pCDNA3.1 表达载体

将重链可变区基因序列和人 IgG1 恒定区 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:29 所示) 相连, 利用同源重组酶(购自 Vazyme)构建到 EcoR I/Not I 双酶切线性化的 pCDNA3.1 载体中; 轻链可变区基因序列和人 Kappa 恒定区 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示) 相连, 构建到 EcoR I/Xho I 双酶切线性化的 pCDNA3.1 载体中, 流程按照商品说明书。同源重组产物转入 Top10 感受态细胞, 涂布氨苄抗性平板, 37°C 培养过夜, 挑取单克隆测序, 并抽提质粒。

2.2. 细胞转染及蛋白纯化

采用 HEK293 细胞进行转染表达, 转染前一天将细胞密度调整至 2.5×10^6 细胞/ml, 次日转染时稀释到 3.0×10^6 细胞/ml 使用, 以 MEM 培养基作为转染缓冲液, 按 PEI: 质粒=3:1 比例加入 PEI, 将抽提的重链、轻链两种质粒共转入 HEK293 细胞中, 细胞培养 5 天后收集上清利用 Protein A 填料柱纯化目的蛋白。向填料柱中加 10 倍柱体积的 PBS 平衡柱子, 将上述细胞上清加入到重力柱中, 重力流穿, 上样结束后, 用 20 倍柱体积的 PBS 洗去不结合的杂蛋白, 待没有液体流出后, 将柱子放置于提前加好中和缓冲液 (1M Tris, pH8.54) 的收集管上, 用 3-5 倍柱体积的洗脱缓冲液 (0.1M 柠檬酸钠, pH3.2) 洗脱获得目的蛋白。

实施例 3: Anti-HER2 单臂抗体的构建及表达纯化

为进一步确认单价抗体的亲和力情况, 将重链可变区基因序列和含有 Knob 突变的人 IgG1 恒定区 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:30 所示) 相连, 利用同源重组酶(购自 Vazyme)构建到 EcoR I/Not I 双酶切线性化的 pCDNA3.1 载体中; 轻链可变区基因序列和人 Kappa 轻链恒定区 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示) 相连, 构建到 EcoR I/Xho I 双酶切线性化的 pCDNA3.1 载体中, 将编码含有 Hole 突变的人 Fc 区域 (氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示) 构建到 EcoR I/Xho I 双酶切线性化的 pCDNA3.1 载体中。

流程按照商品说明书。同源重组产物转入 Top10 感受态细胞，涂布氨苄抗性平板，37°C培养过夜，挑取单克隆测序，并抽提质粒，并参照实施例 2.2 进行细胞转染及蛋白纯化。

5 实施例 4: Anti-HER2 抗体的纯度测定

本研究利用 HPLC 检测获得蛋白的纯度。HPLC 方法如下，流动相：150mM Na₂HPO₄•12H₂O, pH7.0。色谱条件：检测波长：280 nm，柱温：25°C，流速：0.35 ml/min，检测时间：20 min，Zenix-C SEC-300 色谱柱 (SEPAX 4.6×300mm, 3μm)。

10 结果如表 2 所示，亲和纯化后的本发明的抗体分子具有较好的纯度，满足下游工艺开发的要求。

表 2. Anti-HER2 抗体的纯度检测结果

编号	单体比例(%)
Trastuzumab	97.6%
Trastuzumab-PTM removal	98.1%
Anti-HER2(NO3-02)	94.6%
Anti-HER2(NO3-36)	94.6%
Anti-HER2(NO3-46)	96.4%
Trastuzumab_single arm	90.9%
Trastuzumab-PTM removal_single arm	95.2%
Anti-HER2(NO3-02)_single arm	95.8%
Anti-HER2(NO3-36)_single arm	95.9%
Anti-HER2(NO3-46)_single arm	95.1%

实施例 5: Anti-HER2 单克隆抗体的热稳定性

15 利用 DSC (Differential scanning calorimetry, 差示扫描量热法) 检测不同抗体的热稳定性。将样品浓缩后用 PBS 稀释到 1mg/ml; 将 5000×荧光显色剂 Cypro Orange (购于 Bio-Rad) 用超纯水稀释 50 倍得到 100×荧光显色剂 Sypro Orange。取 50μl 1mg/ml 的样品加入 10μl 100×荧光显色剂 Sypro

Orange、40 μ l 超纯水，混匀后，取 30 μ l 加入到 96 孔 PCR 板中，每个样品做 3 个复孔，放入 PCR 仪中，设置升温程序为：25 $^{\circ}$ C 恒温 5min，以 0.5 $^{\circ}$ C/min 的速度升温至 99 $^{\circ}$ C。程序结束后在“Melt Curve”图中读取曲线的最低点的温度值，即为样品的 Tm 值。具体结果如下表 3 所示，点突变以及亲和力优化没有降低抗体的热稳定性。

表 3. Anti-HER2 单克隆抗体的 Tm 值

编号	Tm1 ($^{\circ}$ C)	Tm2 ($^{\circ}$ C)
Trastuzumab	68.5	NA
Trastuzumab-PTM removal	68.9	78.8
Anti-HER2(NO3-02)	68.0	77.3
Anti-HER2(NO3-36)	68.3	76.7
Anti-HER2(NO3-46)	71.0	NA

实施例 6: Anti-HER2 抗体的亲和力测定

ForteBio 亲和力测定按照现有的方法(Estep,P 等人, 基于高通量法的抗体-抗原亲和力和表位结合的测定. *MAbs*, 2013.5(2):p.270-8)进行。简言之, 10 传感器在分析缓冲液中线下平衡 30min, 然后线上检测 60s 建立基线, 在线加载如上所述获得的经纯化的抗体至 AHQ 传感器上。再将传感器放入 100nM 的人或食蟹猴的 HER2 抗原 (购自 AcroBiosystems) 中作用 5min, 之后将传感器转移至分析缓冲液中解离 5min, 最后使用 1:1 结合模型进行 15 动力学的分析。

实验结果如图 2A 和图 2B 所示, 本发明中优化的 Anti-HER2 抗体的亲和力与优化前的 Trastuzumab 相当。Trastuzumab PTM removal 单臂抗体的亲和力明显弱于 Trastuzumab 单臂抗体, 而 PTM 改造并进行亲和力优化后的本发明的 Anti-HER2 单臂抗体与人 HER2 抗原结合的亲和力不亚于 20 Trastuzumab 单臂抗体。

实施例 7: 单克隆抗体与人 HER2 结合

本实验将扩大培养的 N87 细胞 (自身表达 HER2) 细胞用 0.25% EDTA

trypsin 消化，用培养基清洗一次后调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml, 100 μ l/孔加入 96 孔流式板，离心备用。将梯度稀释后的抗体按 100 μ l/孔加入上述带有细胞的 96 孔流式板中，4 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。PBS 清洗两次后，100 μ l/孔加入用 2% BSA 溶液稀释 1000 倍的 Goat anti-human IgG-Fc (PE) (Abcam, ab98596), 4 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。PBS 清洗两次，最后按 100 μ l/孔加入 PBS 重悬细胞，在 CytoFlex(Beckman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的平均荧光强度 (MFI)。

实验结果如图 3 所示，本发明中优化后的 Anti-HER2 抗体与人胃癌细胞 N87 上表达的 HER2 的结合活性与 Trastuzumab 相当。Trastuzumab PTM removal 单臂抗体的细胞结合活性明显弱于 Trastuzumab 单臂抗体，而亲和力优化后的 Anti-HER2 单臂抗体与 N87 上的 HER2 抗原结合的亲和力不亚于 Trastuzumab 单臂抗体，且与单抗相当。

实施例 8. Anti-HER2 抗体阻断 HER2 信号依赖的细胞增殖

本实验将扩大培养的 N87 (自身表达 HER2) 细胞用 0.25% EDTA trypsin 消化，用培养基清洗一次后调整细胞密度至 5×10^4 细胞/ml, 80 μ l/孔加入 96 孔板中，备用。将梯度稀释后的抗体按 80 μ l/孔加入上述带有细胞的 96 孔板中，置于细胞培养箱中孵育 3-5 天。最后用 CellTiter-Glo $^{\circledR}$ Luminescent Cell Viability Assay(Promega,G7572)试剂盒显色后用酶标仪收集化学发光信号。

结果如图 4 所示，本发明中优化后的 Anti-HER2 单克隆抗体均能够明显抑制 N87 细胞的增殖，且细胞增殖抑制作用与 Trastuzumab 单克隆抗体相当。

实施例 9. Anti-HER2 抗体诱导 ADCC 效应 (报告基因)

本实验将扩大培养的 N87 (自身表达 HER2) 细胞按照 3×10^4 个/孔与 1.2×10^5 个/孔的 NFAT Luciferase/Jurkat CD16a (过表达 CD16a 和 NFAT-Luc) 效应细胞混合接种至 96 孔细胞培养白底板中，随后将梯度稀释后 HER2 单克隆抗体加入 96 孔板中并混匀，置于细胞培养箱中孵育 6 小时。

使用 Bio-Glo luciferase assay system (Promega,G7940)试剂盒显色后用酶标仪收集化学发光信号。

实验结果如图 5 所示，本发明中优化后的 Anti-HER2 单克隆抗体都能通过 N87 细胞上表达的 HER2 介导 ADCC 作用，从而激活 Jurkat 细胞上的 CD16a-NFAT 信号通路。此外，Anti-HER2(NO3-46)抗体的 ADCC 效应与 Trastuzumab 抗体相当。

实施例 10. Anti-HER2 单克隆抗体的稳定性研究

10.1. Anti-HER2 单克隆抗体的稳定性研究的样品处理

10 纯化后蛋白样品用稀释液稀释到 1mg/ml，分装至西林瓶中后分别置于 4℃冰箱和 40℃培养箱中孵育 2 周和 4 周。样品高温处理 2 周和 4 周后进行抗体表征分析与活性验证，如电荷异质性分析，PTM 分析和活性验证等。

10.2 Anti-HER2 抗体高温处理后的电荷异质性分析

15 采用阳离子交换色谱法 (CEX-HPLC) 测定 Anti-HER2 抗体高温处理后的样品的电荷异质性。CEX-HPLC 方法如下：流动相 A: 20mM MES/MES-Na, pH6.7; 流动相 B: 20mM MES/MES-Na + 200mM NaCl, pH6.7; 色谱条件：检测波长：280 nm; 柱温：40℃; 流速：1 ml/min; 检测时间：20 min; 梯度：3 - 35 min, 0% B -100% B; 色谱柱 ProPac WCX-10 (4 × 250 mm, 10 μm)。

20 实验结果如图 6 所示，Trastuzumab 在高温加速处理后，CEX-HPLC 观察到碱性电荷变体和酸性电荷变体显著增加。相较于 Trastuzumab，PTM 改造并进行亲和力优化后的本发明的 Anti-HER2 抗体的碱性电荷变体和酸性电荷变体无明显变化，稳定性显著更优。

10.3 Anti-HER2 抗体高温处理后的 PTM 分析

25 分别取 Trastuzumab 及改造分子的高温加速样品 200 μg 于 1.5 ml 离心管中，加入 100 μl 蛋白变性液 (8M 盐酸胍, pH6.0)，加入 2 μl 1M DTT，37℃水浴 30 min 进行蛋白变性还原。水浴结束后瞬离 30 s，加入 4.4 μL 1 mol/L 的 IAM 溶液，涡旋 30 s 混匀，瞬离 30 s 后避光放置 30 min。吸取避光孵育后样品至 10 kDa 超滤管中，添加 300 μl 20 mmol/L His-HCl pH 6.0

的酶切缓冲液，13000 rpm/min 离心 15 min，脱盐后 3000g 反离 3 min，回收样品并测定蛋白浓度。取 40 μg 脱盐后的蛋白，加入 2 μl 0.5 mg/ml Trypsin/Lys-C mix 酶溶液（酶：蛋白比例为 1:40），补充酶切缓冲液至 40 μl，轻轻涡旋混匀，瞬离数秒，应避免产生气泡，37℃ 水浴 4 小时。酶切结束后加入 2 μl 20% 甲酸水溶液终止反应，混匀后 13000 rpm/min 离心 5 min，取上清，进行 RP-UHPLC-MS 分析。

实验结果如表 4 所示，Trastuzumab 在 LC-Asn-30/ HC-Asn-55/ HC-Asp-102 位点存在脱酰胺和异构化作用，且样品在高温加速处理后脱酰胺和异构化作用呈现一定程度的提高。RP-UHPLC-MS 分析结果显示 Trastuzumab 在 LC-Asn-30 位点的脱酰胺程度明显升高，HC-Asn-55/ HC-Asp-102 位点的脱酰胺或异构化作用的变化较小。而相较于 Trastuzumab，PTM 改造并进行亲和力优化后的本发明的 Anti-HER2 抗体在这几个位点检测不到脱酰胺或异构化作用，稳定性显著更优。

表 4. Anti-HER2 抗体高温处理后的 PTM 分析结果

Sample	Peptide sequence	Site	Modification	Percentage %
Trastuzumab-0H	A ₂₅ SQDVNTAVAWYQQKPGKAPK ₄₅	N30 (LC CDR1)	Deamidation N	11.70%
Trastuzumab-HT2W				47.40%
Trastuzumab-HT4W				57.20%
Anti-HER2(N03-02)-0H	A ₂₅ SQNVQGVAVAWYQQKPGKAPK ₄₅	Q30 (LC CDR1)	Deamidation Q	N/A
Anti-HER2(N03-02)-HT2W				N/A
Anti-HER2(N03-02)-HT4W				N/A
Anti-HER2(N03-46)-0H	A ₂₅ SQSVQGVAVAWYQQKPGKAPK ₄₅	Q30 (LC CDR1)	Deamidation Q	N/A
Anti-HER2(N03-46)-HT2W				N/A
Anti-HER2(N03-46)-HT4W				N/A
Anti-HER2(N03-36)-0H	A ₂₅ SNVYQTAVAWYQQKPGKAPK ₄₅	Q30 (LC CDR1)	Deamidation Q	N/A
Anti-HER2(N03-36)-HT2W				N/A
Anti-HER2(N03-36)-HT4W				N/A
Trastuzumab-0H	I ₅₁ YPTNGYTR ₅₉	N55 (HC CDR2)	Deamidation N	2.10%
Trastuzumab-HT2W				4.10%
Trastuzumab-HT4W				5.30%
Anti-HER2(N03-02)-0H	I ₅₁ YPTQGYTR ₅₉	Q55 (LC CDR2)	Deamidation Q	N/A
Anti-HER2(N03-02)-HT2W				N/A
Anti-HER2(N03-02)-HT4W				N/A
Anti-HER2(N03-46)-0H	I ₅₁ YPTQGYTR ₅₉	Q55 (LC CDR2)	Deamidation Q	N/A
Anti-HER2(N03-46)-HT2W				N/A
Anti-HER2(N03-46)-HT4W				N/A
Anti-HER2(N03-36)-0H	I ₅₁ YPTQGYTR ₅₉	Q55 (LC CDR2)	Deamidation Q	N/A
Anti-HER2(N03-36)-HT2W				N/A
Anti-HER2(N03-36)-HT4W				N/A
Trastuzumab-0H	W ₉₉ GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSK ₁₃₆	D102 (HC CDR3)	Succinimide D	3.50%
Trastuzumab-HT2W				3.70%
Trastuzumab-HT4W				3.50%
Anti-HER2(N03-02)-0H	W ₉₉ GGEGFYAMDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSK ₁₃₆	E102 (HC CDR3)	Succinimide E	N/A
Anti-HER2(N03-02)-HT2W				N/A
Anti-HER2(N03-02)-HT4W				N/A
Anti-HER2(N03-46)-0H	W ₉₉ GGEGFYAMDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSK ₁₃₆	E102 (HC CDR3)	Succinimide E	N/A
Anti-HER2(N03-46)-HT2W				N/A
Anti-HER2(N03-46)-HT4W				N/A
Anti-HER2(N03-36)-0H	W ₉₉ GGEGFYAMDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSK ₁₃₆	E102 (HC CDR3)	Succinimide E	N/A
Anti-HER2(N03-36)-HT2W				N/A
Anti-HER2(N03-36)-HT4W				N/A

N/A 表示未检测到

10.4 Anti-HER2 抗体高温处理后的活性验证

ForteBio 亲和力测定按照现有的方法(Estep,P 等人, 基于高通量法的抗体-抗原亲和力和表位结合的测定. *MAbs*, 2013.5(2):p.270-8)进行。简言之, 传感器在分析缓冲液中线下平衡 30min, 然后线上检测 60s 建立基线, 在线加载如上所述获得的经纯化的抗体至 **AHQ** 传感器上。再将传感器放入
5 **100nM** 的人 **HER2** 抗原 (购自 **AcroBiosystems**) 中作用 **5min**, 之后将传感器转移至分析缓冲液中解离 **5min**, 最后使用 **1:1** 结合模型进行动力学的分析。

实验结果如图 7 所示, **Trastuzumab** 在高温处理 2 周和 4 周后, 其与人 **HER2** 抗原结合的亲和力呈现明显的下降, 且高温处理时间越长其结合活性越弱。相较于 **Trastuzumab**, **PTM** 改造并进行亲和力优化后的本发明的
10 **Anti-HER2** 抗体在高温处理前后其与 **HER2** 抗原的结合活性无明显变化, 稳定性显著更优。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 但本领域技术人员
15 将理解: 根据已经公布的所有教导, 可以对细节进行各种修改和变动, 并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部分为由所附权利要求及其任何等同物给出。

权利要求

1、能够特异性结合 HER2 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(1) 下述 3 个重链可变区 (VH) 互补决定区 (CDR)：

(a) VH CDR1，其具有如 GFNIKDTY (SEQ ID NO: 10) 所示的结构；

(b) VH CDR2，其具有如 IYPTQGYT (SEQ ID NO: 11) 所示的结构；

(c) VH CDR3，其具有如 SRWGGEGFYAMDY (SEQ ID NO: 12) 所示的结构；

和/或，

(2) 下述 3 个轻链可变区 (VL) 互补决定区 (CDR)：

(d) VL CDR1，其具有如 X₁X₂VQX₃A (SEQ ID NO: 33) 所示的结构；

(e) VL CDR2，其具有如 SAS (SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 23 或 SEQ ID NO: 27) 所示的结构；

(f) VL CDR3，其具有如 QQHX₄X₅TPPT (SEQ ID NO: 34) 所示的结构；

其中：

X₁ 选自氨基酸残基 Q、N；

X₂ 选自氨基酸残基 N、Y、S；

X₃ 选自氨基酸残基 G、T；

X₄ 选自氨基酸残基 Y、F、S；

X₅ 选自氨基酸残基 S、M、T。

2、权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：

如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3；和，

如 SEQ ID NOs: 18、22 或 26 任一项所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NOs: 19、23 或 27 任一项所示的 VL CDR2，以及，如 SEQ ID NOs: 20、24 或 28 所示的 VL CDR3。

3、权利要求 1-2 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(1) 如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3；和，如 SEQ ID NO: 18 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 19 所示的 VL CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 20 所示的 VL CDR3；或者，

(2) 如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3；和，如 SEQ ID NO: 22 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 23 所示的 VL CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 24 所示的 VL CDR3；或者，

(3) 如 SEQ ID NO: 10 所示的 VH CDR1，如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR3；和，如 SEQ ID NO: 26 所示的 VL CDR1，如 SEQ ID NO: 27 所示的 VL CDR2，以及，如 SEQ ID NO: 28 所示的 VL CDR3。

4、权利要求 1-3 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：

如 SEQ ID NO: 9 所示的序列或其变体的 VH，和，如 SEQ ID NOs: 17、21 或 25 任一项所示的序列或其变体的 VL；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加），或具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；优选地，所述的置换是保守置换。

5、权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(1) 如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的 VH，和，如 SEQ ID NO: 17 所示的序列的 VL；或者，

(1) 如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的 VH，和，如 SEQ ID NO: 21 所示的序列的 VL；或者，

(1) 如 SEQ ID NO: 9 所示的序列的 VH，和，如 SEQ ID NO: 25 所示

的序列的 VL。

6、权利要求 1-5 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其进一步包含来源于人免疫球蛋白的恒定区；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段的重链包含来源于人免疫球蛋白（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）的重链恒定区；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段的轻链包含来源于人免疫球蛋白（例如 κ 或 λ ）的轻链恒定区。

7、权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其进一步包含如 SEQ ID NO: 29 所示的重链恒定区和/或如 SEQ ID NO: 31 所示的轻链恒定区。

8、权利要求 1-7 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、双抗体 (diabody) 和单域抗体 (sdAb)。

9、单臂抗体，其包含：

(1) 第一肽链，所述第一肽链包含 3 个重链可变区 (VH) 互补决定区 (CDR)，所述 3 个重链可变区 (VH) 互补决定区 (CDR) 如权利要求 1-3 任一项所限定，

(2) 第二肽链，所述第二肽链包含 3 个轻链可变区 (VL) 互补决定区 (CDR)，所述 3 个轻链可变区 (VL) 互补决定区 (CDR) 如权利要求 1-3 任一项所限定，和，

(3) 第三肽链，所述第三肽链能够和所述第一肽链形成二聚体；

优选地，所述第一肽链包含重链可变区 (VH)，所述重链可变区 (VH) 如权利要求 4-5 任一项所限定；

优选地，所述第二肽链包含轻链可变区 (VL)，所述轻链可变区 (VL) 如权利要求 4-5 任一项所限定。

10、权利要求 9 所述的单臂抗体，其中，所述第二肽链进一步包含来源于人免疫球蛋白的恒定区；

优选地，所述第二肽链包含来源于人免疫球蛋白（例如 κ 或 λ ）的轻链恒定区；

优选地，所述第二肽链包含如 SEQ ID NO: 31 所示的轻链恒定区。

11、权利要求 9-10 任一项所述的单臂抗体，其中，所述单臂抗体进一步具有选自以下 (1) - (2) 中至少一项的技术特征：

(1) 所述第一肽链进一步包含来源于人免疫球蛋白的恒定区；优选地，所述来源于人免疫球蛋白的恒定区为来源于人免疫球蛋白（例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）的重链恒定区；优选地，所述重链恒定区具有第一修饰，以促进所述第一肽链和所述第三肽链的二聚化；

(2) 所述第三肽链包含 Fc 结构域单体；优选地，所述 Fc 结构域单体是 IgG 的 Fc 结构域单体，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 结构域单体；优选地，所述 Fc 结构域单体具有第二修饰，以促进所述第三肽链和所述第一肽链的二聚化；

优选地，所述第一修饰和所述第二修饰中，任意一个为“节”修饰，另一个为“穴”修饰，以形成节-入-穴（knob-into-hole）修饰，促进所述第一肽链和所述第三肽链的二聚化；

优选地，所述第一修饰为“节”修饰，所述第二修饰为“穴”修饰，以形成节-入-穴（knob-into-hole）修饰，促进所述第一肽链和所述第三肽链的二聚化；

优选地，所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列，所述 Fc 结构域单体包含如 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

12、分离的核酸分子，其编码权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或其重链可变区和/或轻链可变区；或者，其编码权利要求 9-11 任一项所述的单臂抗体，或其重链可变区和/或轻链可变区。

13、载体，其包含权利要求 12 所述的核酸分子；优选地，所述载体为克隆载体或表达载体。

14、宿主细胞，其包含权利要求 12 所述的核酸分子或权利要求 13 所述的载体。

15、制备权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求 9-11 任一项所述的单臂抗体的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段或者所述单臂抗体表达的条件下，培养权利要求 14 所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段或者所述单臂抗体。

16、药物组合物，其包含权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求 9-11 任一项所述的单臂抗体，以及任选的药学上可接受的载体和/或赋形剂。

17、权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 9-11 任一项所述的单臂抗体、权利要求 12 所述的分离的核酸分子、权利要求 13 所述的载体或权利要求 14 所述的宿主细胞用于制备药物的用途，所述药物用于在受试者中激活 HER2，提高免疫细胞活性，增强免疫应答，和/或预防和/或治疗肿瘤或者感染；

优选地，所述免疫细胞是 T 细胞，B 细胞，DC 细胞，巨噬细胞，和/或，NK 细胞；

优选地，所述免疫应答是 HER2 介导的免疫应答；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段或者所述单臂抗体单独使用，或与另外的药学活性剂联合使用。

18、一种用于在受试者中增强免疫应答，和/或，预防和/或治疗肿瘤或

感染的方法，所述方法包括：给有此需要的受试者施用有效量的权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求 9-11 任一项所述的单臂抗体或者权利要求 16 所述的药物组合物；

优选地，所述免疫应答是 HER2 介导的免疫应答；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人。

19、缀合物，其包含权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求 9-11 任一项所述的单臂抗体，以及任选的与所述抗体或其抗原结合片段或者所述单臂抗体连接的可检测的标记；

优选地，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

20、试剂盒，其包含权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求 9-11 任一项所述的单臂抗体或者权利要求 19 所述的缀合物；

优选地，所述试剂盒包含权利要求 19 所述的缀合物；

优选地，所述试剂盒包含权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，以及特异性识别所述抗体或其抗原结合片段的第二抗体；任选地，所述第二抗体还包含可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素；

优选地，所述试剂盒包含权利要求 9-11 任一项所述的单臂抗体，以及特异性识别所述单臂抗体的第二抗体；任选地，所述第二抗体还包含可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

21、用于检测 HER2 在样品中的存在或其水平的方法，其包括使用权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求 9-11 任一项所述

的单臂抗体或者权利要求 19 所述的缀合物；

优选地，所述方法是免疫学检测，例如免疫印迹法、酶免疫测定法（例如 ELISA）、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法；

优选地，所述方法包括使用权利要求 19 所述的缀合物；

优选地，所述方法包括使用权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，并且所述方法还包括使用携带可检测的标记（例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素）的第二抗体来检测所述抗体或其抗原结合片段；

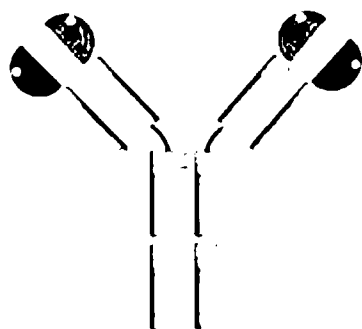
优选地，所述方法包括使用权利要求 9-11 任一项所述的单臂抗体，并且所述方法还包括使用携带可检测的标记（例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吡啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素）的第二抗体来检测所述单臂抗体。

22、权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求 9-11 任一项所述的单臂抗体或者权利要求 19 所述的缀合物在制备检测试剂中的用途，所述检测试剂用于检测 HER2 在样品中的存在或其水平；

优选地，所述检测试剂通过权利要求 21 所述的方法来检测 HER2 在样品中的存在或其水平；

优选地，所述样品为来自受试者（例如哺乳动物，优选人或食蟹猴）的细胞样品（例如，免疫细胞）。

抗HER2单克隆抗体



抗HER2单臂抗体

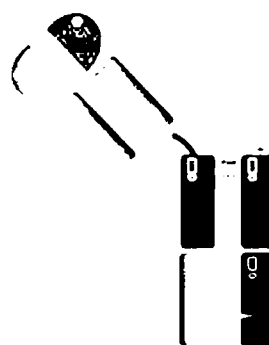


图 1

Loading	Sample ID	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Fortebio Image
Bio-HER2-Ag	Trastuzumab_single arm	0.5272	1.36E-09	4.07E+05	5.54E-04	
Bio-HER2-Ag	Trastuzumab PTM removal_single arm	0.4276	3.48E-09	6.27E+05	2.18E-03	
Bio-HER2-Ag	Anti-HER2(NO3-02)_single arm	0.5726	1.01E-09	7.22E+05	7.28E-04	
Bio-HER2-Ag	Anti-HER2(NO3-36)_single arm	0.5913	1.49E-09	7.82E+05	1.17E-03	
Bio-HER2-Ag	Anti-HER2(NO3-46)_single arm	0.5214	5.68E-10	9.37E+05	5.32E-04	

图 2A

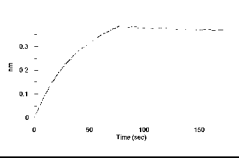
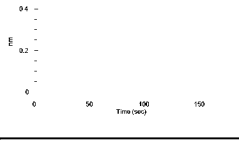
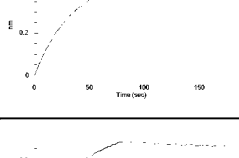
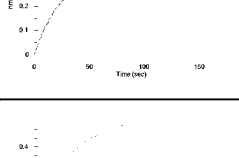
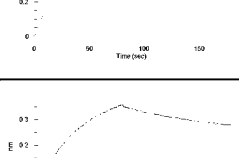
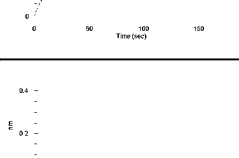
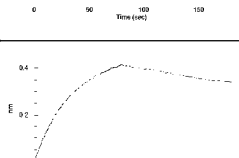
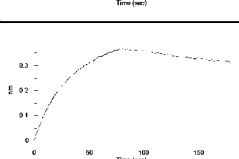
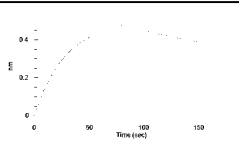

Sample ID	Binding	Response	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Fortebio Image
Trastuzumab	human HER2	0.375	1.97E-09	2.36E+05	4.64E-04	
Trastuzumab PTM removal	human HER2	0.427	4.17E-09	2.23E+05	9.30E-04	
Anti-HER2(NO3-02)	human HER2	0.4212	4.87E-10	2.65E+05	1.29E-04	
Anti-HER2(NO3-36)	human HER2	0.3667	1.57E-09	3.15E+05	4.95E-04	
Anti-HER2(NO3-46)	human HER2	0.5108	4.33E-10	2.99E+05	1.29E-04	
Trastuzumab	Cyno HER2	0.3446	9.33E-09	2.52E+05	2.35E-03	
Trastuzumab PTM removal	Cyno HER2	0.4209	1.19E-08	2.50E+05	2.97E-03	
Anti-HER2(NO3-02)	Cyno HER2	0.403	7.59E-09	2.74E+05	2.08E-03	
Anti-HER2(NO3-36)	Cyno HER2	0.359	5.08E-09	3.18E+05	1.62E-03	
Anti-HER2(NO3-46)	Cyno HER2	0.4666	9.00E-09	3.16E+05	2.84E-03	

图 2B

N87

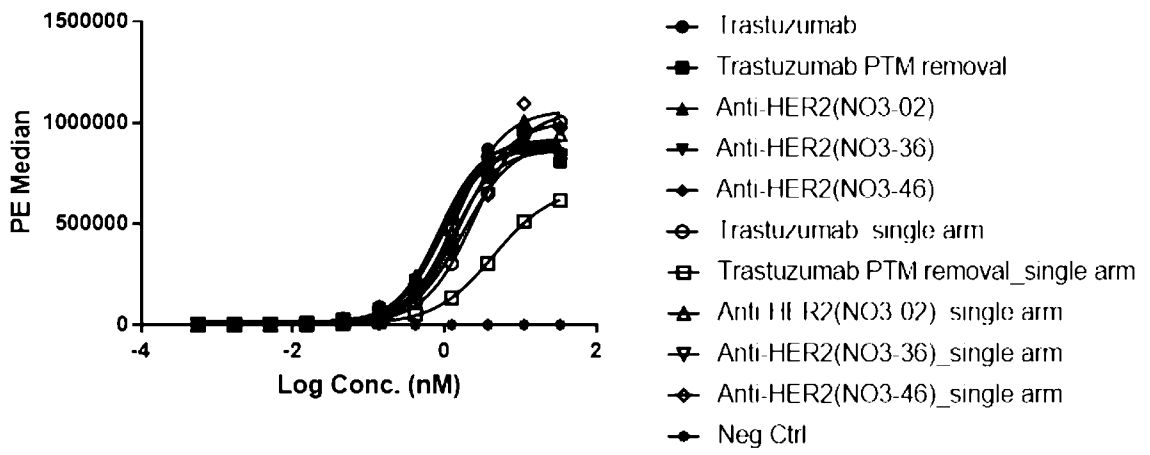


图 3

N87

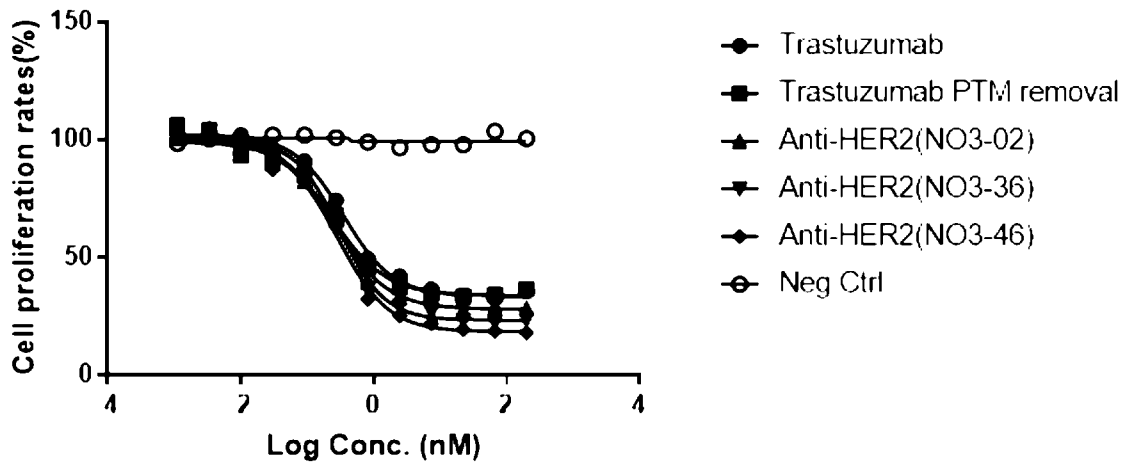


图 4

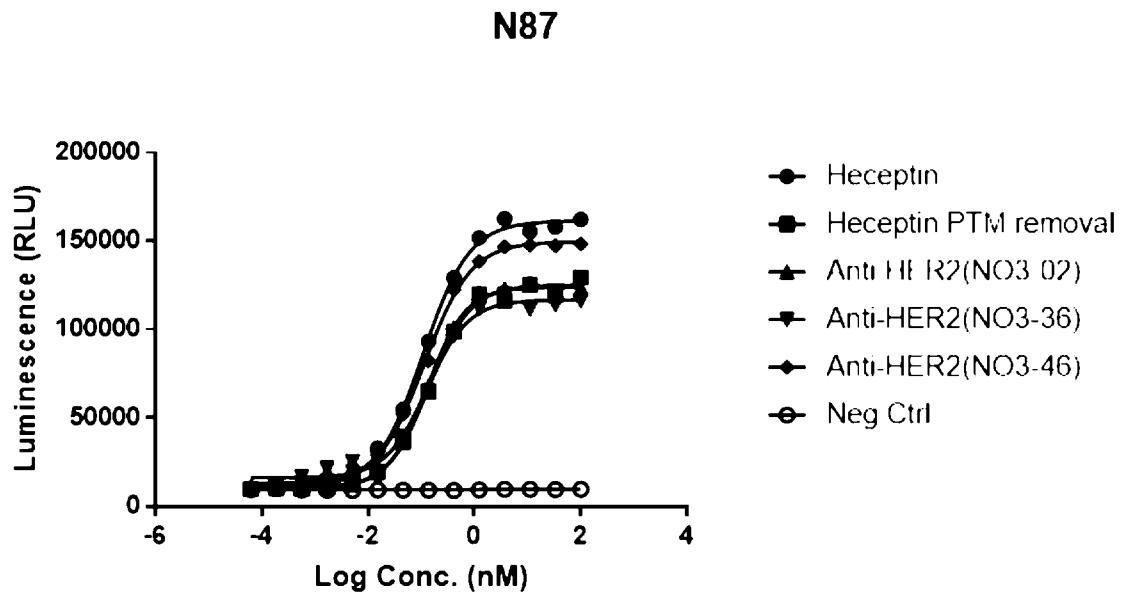


图 5

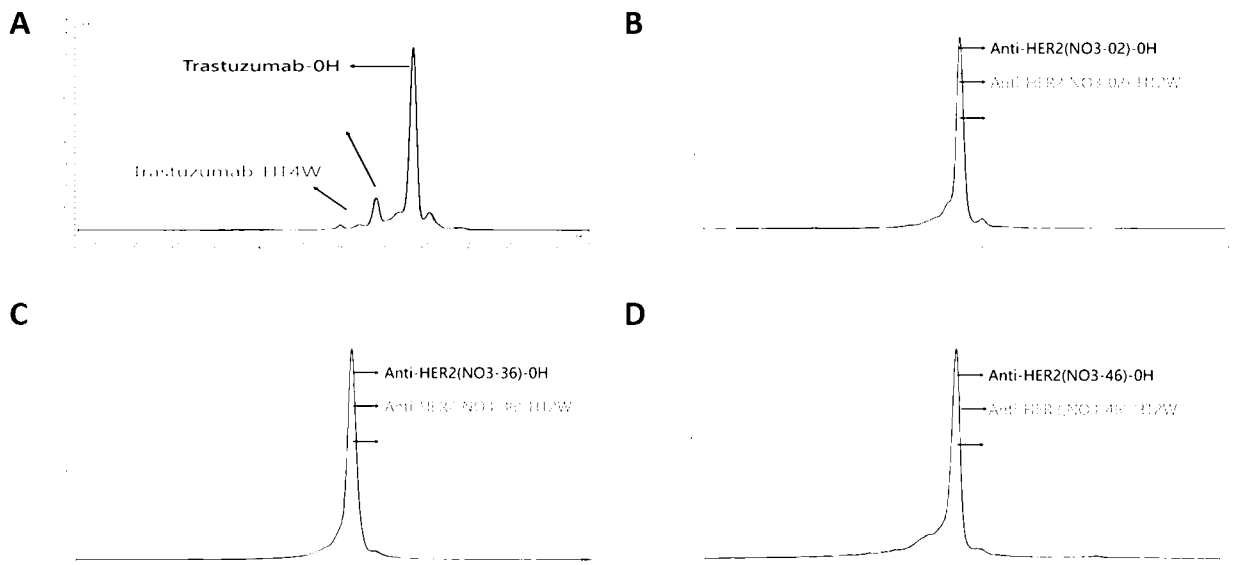


图 6

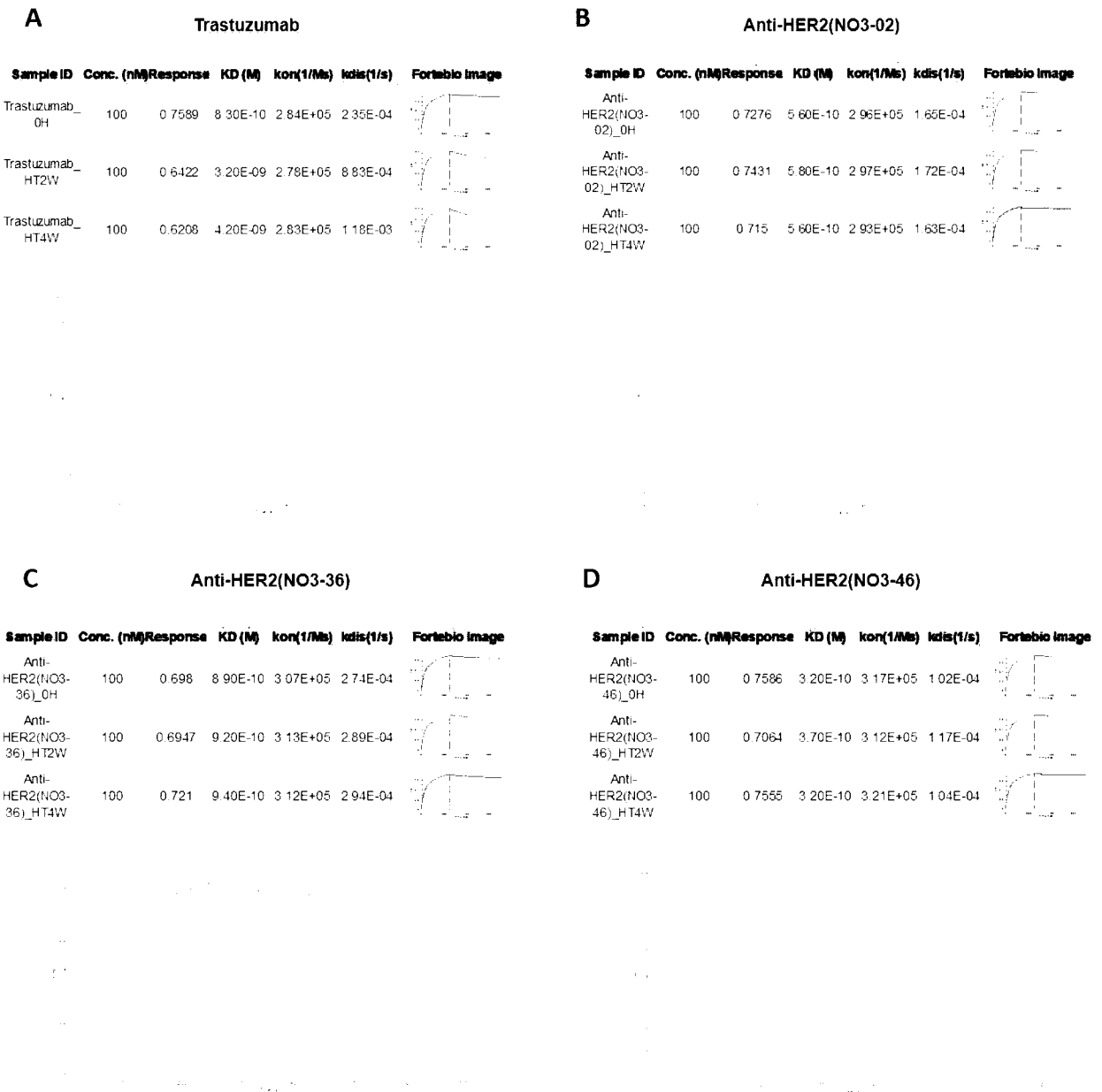


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/119763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K16/32(2006.01)i; C07K16/28(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; C12N15/13(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,C12N,A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方, WANFANG, Pubmed, BING, ISI WEB OF KNOWLEDGE, GENBANK, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索, China Patent Biological Sequence Search, HER2, ERBB2, trastuzumab, 曲妥珠, herceptin, 赫赛汀, 抗体, antibody, 糖基化, 翻译后修饰, PTM, 单臂, N55Q, N54Q, D102E, D98E, N30Q, SEQ ID NO: 1-34		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107787331 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 09 March 2018 (2018-03-09) description, paragraphs 9-22 and 100-119, figure 1	1, 6-8, 12-22
A	WO 03087131 A2 (GENENTECH, INC.) 23 October 2003 (2003-10-23) claims 1-3, 25-27, description, paragraphs 11-43	1-22
A	WO 2006041641 A2 (GENENTECH, INC.) 20 April 2006 (2006-04-20) description page 4 line 26 - page 5 line 33, page 13 lines 9-15	1-22
A	CN 109922864 A (COMBIO PHARMACEUTICAL, INC.) 21 June 2019 (2019-06-21) description, paragraphs 18-25 and 57-81, figures 1-2	1-22
A	CN 111712261 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 25 September 2020 (2020-09-25) claims 1-235, description, paragraphs 17-48	1-22
A	CN 105829347 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 03 August 2016 (2016-08-03) claims 1-22, description, paragraphs 14-17, 166 and 209, embodiment 4	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 November 2023		21 November 2023
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/119763

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111518213 A (SUZHOU KANGJU BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 11 August 2020 (2020-08-11) claims 1-17, description, paragraphs 12-19	1-22
A	WO 9222653 A1 (GENENTECH, INC.) 23 December 1992 (1992-12-23) description page 5 line 25 - page 8 line 27, embodiment 1	1-22
A	NGUYEN, A.W. et al. "Identification of High Affinity HER2 Binding Antibodies Using CHO Fab Surface Display" <i>Protein Engineering, Design & Selection</i> , Vol. 31, No. (3), 16 March 2018 (2018-03-16), pages 91-101	1-22
A	YANG, Yuemei et al. "Improving Trastuzumab's Stability Profile by Removing the Two Degradation Hotspots" <i>Journal of Pharmaceutical Sciences</i> , 31 December 2015 (2015-12-31), pages 1-11	1-22

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:

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.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 18 relates to a method for enhancing immune response, and/or preventing and/or treating tumors or infections in a subject, that is, claim 18 relates 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 conducted on the basis of the use of an effective amount of the antibody or an antigen-binding fragment thereof of any one of claims 1-8 or the single-arm antibody of any one of claims 9-11 or the pharmaceutical composition of claim 16 in the preparation of a drug for enhancing immune response, and/or preventing and/or treating tumors or infections.
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/CN2023/119763

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107787331	A	09 March 2018	WO	2016205531	A2	22 December 2016
				WO	2016205531	A3	09 February 2017
				CA	2986592	A1	22 December 2016
				EP	3310812	A2	25 April 2018
				MX	2017016169	A	15 August 2018
				HK	1251969	A1	10 May 2019
				JP	2018524312	A	30 August 2018
				IL	256086	A	28 February 2018
				JP	2022137087	A	21 September 2022
				KR	20180012859	A	06 February 2018
				JP	2021048860	A	01 April 2021
				JP	7095061	B2	04 July 2022
				US	2018094056	A1	05 April 2018
				US	10377825	B2	13 August 2019
				AU	2016280159	A1	07 December 2017
				<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
WO	03087131	A2	23 October 2003	AU	2003224916	A1	27 October 2003
				AU	2003224916	B2	08 January 2009
				US	2009187007	A1	23 July 2009
				US	7850966	B2	14 December 2010
				ES	2401428	T3	19 April 2013
				US	2017166656	A1	15 June 2017
				US	2003228663	A1	11 December 2003
				US	7435797	B2	14 October 2008
				ES	2429112	T3	13 November 2013
				EP	1501856	A2	02 February 2005
				EP	1501856	A4	06 June 2007
				EP	1501856	B1	19 December 2012
				EP	2289942	A2	02 March 2011
				EP	2289942	A3	08 June 2011
				EP	2289942	B1	31 July 2013
				US	2016060353	A1	03 March 2016
				JP	2009149661	A	09 July 2009
				CA	2481515	A1	23 October 2003
				CA	2481515	C	01 October 2013
				DK	1501856	T3	25 March 2013
				WO	03087131	A3	09 December 2004
				SI	1501856	T1	30 April 2013
				SI	2289942	T1	29 November 2013
				JP	2005522514	A	28 July 2005
				HK	1069586	A1	27 May 2005
				IL	202348	A0	01 August 2011
				IL	202348	A	31 May 2015
				IL	164417	A0	18 December 2005
				IL	164417	A	31 May 2010
				US	2011159014	A1	30 June 2011
				US	8840896	B2	23 September 2014
				US	2018201692	A1	19 July 2018
				JP	2014218505	A	20 November 2014
				AU	2009201370	A1	30 April 2009
AU	2009201370	B2	17 May 2012				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/119763

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				HK 1153763 A1	05 April 2012
				JP 2013006871 A	10 January 2013
				JP 5782419 B2	24 September 2015
WO	2006041641	A2	20 April 2006	JP 2008515889 A	15 May 2008
				US 2006073152 A1	06 April 2006
				BRPI 0516577 A	16 September 2008
				US 2009123376 A1	14 May 2009
				CA 2583137 A1	20 April 2006
				WO 2006041641 A3	29 June 2006
				EP 1796718 A2	20 June 2007
				AU 2005294723 A1	20 April 2006
				RU 2007116973 A	20 November 2008
				MX 2007003907 A	21 May 2007
				IL 182261 A0	24 July 2007
				KR 20070073886 A	10 July 2007
CN	109922864	A	21 June 2019	US 2020140568 A1	07 May 2020
				US 11325982 B2	10 May 2022
				WO 2018191188 A1	18 October 2018
				EP 3609580 A1	19 February 2020
				EP 3609580 A4	24 March 2021
CN	111712261	A	25 September 2020	SG 11202007390 YA	28 August 2020
				IL 276253 A	30 September 2020
				KR 20200118065 A	14 October 2020
				WO 2019157308 A1	15 August 2019
				TW 201946653 A	16 December 2019
				MX 2020008289 A	25 September 2020
				CR 20200391 A	19 October 2020
				MA 51793 A	16 December 2020
				CL 2021002188 A1	04 March 2022
				AR 115360 A1	13 January 2021
				PH 12020551187 A1	16 August 2021
				JP 2021512613 A	20 May 2021
				CA 3089287 A1	15 August 2019
				US 2019270814 A1	05 September 2019
				AU 2019218959 A1	03 September 2020
				CL 2020002029 A1	23 October 2020
				EP 3749361 A1	16 December 2020
				RU 2020127948 A	11 March 2022
				PE 20211116 A1	23 June 2021
				CL 2021000511 A1	23 July 2021
				BR 112020016169 A2	15 December 2020
CN	105829347	A	03 August 2016	BR 112016010706 A2	05 December 2017
				CA 2925677 A1	25 June 2015
				KR 20160099087 A	19 August 2016
				RU 2016129517 A	25 January 2018
				JP 2019141066 A	29 August 2019
				JP 7077263 B2	30 May 2022
				JP 2017501706 A	19 January 2017
				JP 6510532 B2	08 May 2019
				EP 3083696 A1	26 October 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/119763

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				EP 3083696 B1	14 February 2018
				MX 2016008098 A	11 January 2017
				WO 2015091738 A1	25 June 2015
				EP 3327038 A2	30 May 2018
				EP 3327038 A3	13 June 2018
				EP 3327038 B1	23 September 2020
				US 2020291131 A1	17 September 2020
				US 11787873 B2	17 October 2023
				US 2017029529 A1	02 February 2017
				US 10584178 B2	10 March 2020
				HK 1223115 A1	21 July 2017

CN	111518213	A	11 August 2020	WO 2020156555 A1	06 August 2020
				JP 2022527652 A	02 June 2022
				US 2022143178 A1	12 May 2022
				EP 3988574 A1	27 April 2022
				EP 3988574 A9	03 August 2022
				EP 3988574 A4	12 October 2022

WO	9222653	A1	23 December 1992	DE 122004000008 I1	09 June 2005
				GEP 20074141 B	10 July 2007
				ES 2206447 T3	16 May 2004
				ATE 255131 T1	15 December 2003
				US 6719971 B1	13 April 2004
				US 6639055 B1	28 October 2003
				NL 300145 I1	01 June 2004
				EP 0590058 A1	06 April 1994
				EP 0590058 B1	26 November 2003
				EP 0940468 A1	08 September 1999
				JP 2008291036 A	04 December 2008
				JP 4836147 B2	14 December 2011
				DE 69233254 D1	08 January 2004
				DE 69233254 T2	16 September 2004
				AU 2250992 A	12 January 1993
				AU 675916 B2	27 February 1997
				DK 0590058 T3	29 March 2004
				CA 2103059 A1	15 December 1992
				CA 2103059 C	22 March 2005
				CY 2500 B1	02 September 2005
				JP 2006083180 A	30 March 2006
				US 5821337 A	13 October 1998
				EP 1400536 A1	24 March 2004
				JP 2005000169 A	06 January 2005
				LU 91067 I2	02 April 2004
				JPH 06508267 A	22 September 1994
				JP 4124480 B2	23 July 2008
				US 6407213 B1	18 June 2002

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K16/32(2006.01)i; C07K16/28(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i</p> <p>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</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: C07K,A61K,C12N,A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS,CNXTXT,ENTXT,ENTXTC,WOTXT,EPTXT,USTXT,CNKI,万方, Pubmed, BING,ISI WEB OF KNOWLEDGE,GENBANK,EMBL,STN,中国专利生物序列检索, HER2, ERBB2, trastuzumab,曲妥珠, herceptin, 赫赛汀, 抗体, antibody, 糖基化, 翻译后修饰, PTM, 单臂, N55Q, N54Q,D102E, D98E,N30Q,SEQ ID NO:1-34</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 107787331 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2018年3月9日 (2018 - 03 - 09) 说明书第9-22段, 第100-119段, 图1</td> <td>1,6-8, 12-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 03087131 A2 (GENENTECH, INC.) 2003年10月23日 (2003 - 10 - 23) 权利要求1-3, 25-27, 说明书第11-43段</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2006041641 A2 (GENENTECH, INC.) 2006年4月20日 (2006 - 04 - 20) 说明书第4页第26行-第5页第33行, 第13页第9行-第15行</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109922864 A (北京康明百奥新药研发有限公司) 2019年6月21日 (2019 - 06 - 21) 说明书第18-25段, 第57-81段, 图1-2</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111712261 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2020年9月25日 (2020 - 09 - 25) 权利要求1-235, 说明书第17-48段</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105829347 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2016年8月3日 (2016 - 08 - 03) 权利要求1-22, 说明书第14-17段, 第166段, 第209段, 实施例4</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111518213 A (苏州康聚生物科技有限公司) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 权利要求1-17, 说明书第12-19段</td> <td>1-22</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 107787331 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2018年3月9日 (2018 - 03 - 09) 说明书第9-22段, 第100-119段, 图1	1,6-8, 12-22	A	WO 03087131 A2 (GENENTECH, INC.) 2003年10月23日 (2003 - 10 - 23) 权利要求1-3, 25-27, 说明书第11-43段	1-22	A	WO 2006041641 A2 (GENENTECH, INC.) 2006年4月20日 (2006 - 04 - 20) 说明书第4页第26行-第5页第33行, 第13页第9行-第15行	1-22	A	CN 109922864 A (北京康明百奥新药研发有限公司) 2019年6月21日 (2019 - 06 - 21) 说明书第18-25段, 第57-81段, 图1-2	1-22	A	CN 111712261 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2020年9月25日 (2020 - 09 - 25) 权利要求1-235, 说明书第17-48段	1-22	A	CN 105829347 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2016年8月3日 (2016 - 08 - 03) 权利要求1-22, 说明书第14-17段, 第166段, 第209段, 实施例4	1-22	A	CN 111518213 A (苏州康聚生物科技有限公司) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 权利要求1-17, 说明书第12-19段	1-22
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
X	CN 107787331 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2018年3月9日 (2018 - 03 - 09) 说明书第9-22段, 第100-119段, 图1	1,6-8, 12-22																								
A	WO 03087131 A2 (GENENTECH, INC.) 2003年10月23日 (2003 - 10 - 23) 权利要求1-3, 25-27, 说明书第11-43段	1-22																								
A	WO 2006041641 A2 (GENENTECH, INC.) 2006年4月20日 (2006 - 04 - 20) 说明书第4页第26行-第5页第33行, 第13页第9行-第15行	1-22																								
A	CN 109922864 A (北京康明百奥新药研发有限公司) 2019年6月21日 (2019 - 06 - 21) 说明书第18-25段, 第57-81段, 图1-2	1-22																								
A	CN 111712261 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2020年9月25日 (2020 - 09 - 25) 权利要求1-235, 说明书第17-48段	1-22																								
A	CN 105829347 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2016年8月3日 (2016 - 08 - 03) 权利要求1-22, 说明书第14-17段, 第166段, 第209段, 实施例4	1-22																								
A	CN 111518213 A (苏州康聚生物科技有限公司) 2020年8月11日 (2020 - 08 - 11) 权利要求1-17, 说明书第12-19段	1-22																								
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																										
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年11月15日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年11月21日</p>																								
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p>		<p>授权官员</p> <p>蔡玉品</p> <p>电话号码 (+86) 010-53961968</p>																								

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 9222653 A1 (GENENTECH, INC.) 1992年12月23日 (1992 - 12 - 23) 说明书第5页第25行-第8页第27行, 实施例1	1-22
A	NGUYEN, A.W.等. "Identification of high affinity HER2 binding antibodies using CHO Fab surface display" Protein Engineering, Design & Selection, 第31卷, 第3期, 2018年3月16日 (2018 - 03 - 16), 第91-101页	1-22
A	YANG, Y.M.等. "Improving Trastuzumab' s Stability Profile by Removing the Two Degradation Hotspots" JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 2015年12月31日 (2015 - 12 - 31), 第1-11页	1-22

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： 18
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求18涉及一种用于在受试者中增强免疫应答，和/或，预防和/或治疗肿瘤或感染的方法，也即权利要求18涉及PCT细则39.1定义的不要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。国际检索基于有效量的权利要求1-8任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求9-11任一项所述的单臂抗体或者权利要求16所述的药物组合物在制备用于增强免疫应答，和或，预防和/或治疗肿瘤或感染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。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/119763

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	107787331	A	2018年3月9日	WO	2016205531	A2	2016年12月22日
				WO	2016205531	A3	2017年2月9日
				CA	2986592	A1	2016年12月22日
				EP	3310812	A2	2018年4月25日
				MX	2017016169	A	2018年8月15日
				HK	1251969	A1	2019年5月10日
				JP	2018524312	A	2018年8月30日
				IL	256086	A	2018年2月28日
				JP	2022137087	A	2022年9月21日
				KR	20180012859	A	2018年2月6日
				JP	2021048860	A	2021年4月1日
				JP	7095061	B2	2022年7月4日
				US	2018094056	A1	2018年4月5日
				US	10377825	B2	2019年8月13日
				AU	2016280159	A1	2017年12月7日
WO	03087131	A2	2003年10月23日	AU	2003224916	A1	2003年10月27日
				AU	2003224916	B2	2009年1月8日
				US	2009187007	A1	2009年7月23日
				US	7850966	B2	2010年12月14日
				ES	2401428	T3	2013年4月19日
				US	2017166656	A1	2017年6月15日
				US	2003228663	A1	2003年12月11日
				US	7435797	B2	2008年10月14日
				ES	2429112	T3	2013年11月13日
				EP	1501856	A2	2005年2月2日
				EP	1501856	A4	2007年6月6日
				EP	1501856	B1	2012年12月19日
				EP	2289942	A2	2011年3月2日
				EP	2289942	A3	2011年6月8日
				EP	2289942	B1	2013年7月31日
				US	2016060353	A1	2016年3月3日
				JP	2009149661	A	2009年7月9日
				CA	2481515	A1	2003年10月23日
				CA	2481515	C	2013年10月1日
				DK	1501856	T3	2013年3月25日
				WO	03087131	A3	2004年12月9日
				SI	1501856	T1	2013年4月30日
				SI	2289942	T1	2013年11月29日
				JP	2005522514	A	2005年7月28日
				HK	1069586	A1	2005年5月27日
				IL	202348	A0	2011年8月1日
				IL	202348	A	2015年5月31日
				IL	164417	A0	2005年12月18日
				IL	164417	A	2010年5月31日
				US	2011159014	A1	2011年6月30日
US	8840896	B2	2014年9月23日				
US	2018201692	A1	2018年7月19日				
JP	2014218505	A	2014年11月20日				
AU	2009201370	A1	2009年4月30日				
AU	2009201370	B2	2012年5月17日				

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/119763

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)
				HK	1153763	A1	2012年4月5日
				JP	2013006871	A	2013年1月10日
				JP	5782419	B2	2015年9月24日
WO	2006041641	A2	2006年4月20日	JP	2008515889	A	2008年5月15日
				US	2006073152	A1	2006年4月6日
				BR-PI	0516577	A	2008年9月16日
				US	2009123376	A1	2009年5月14日
				CA	2583137	A1	2006年4月20日
				WO	2006041641	A3	2006年6月29日
				EP	1796718	A2	2007年6月20日
				AU	2005294723	A1	2006年4月20日
				RU	2007116973	A	2008年11月20日
				MX	2007003907	A	2007年5月21日
				IL	182261	A0	2007年7月24日
				KR	20070073886	A	2007年7月10日
CN	109922864	A	2019年6月21日	US	2020140568	A1	2020年5月7日
				US	11325982	B2	2022年5月10日
				WO	2018191188	A1	2018年10月18日
				EP	3609580	A1	2020年2月19日
				EP	3609580	A4	2021年3月24日
CN	111712261	A	2020年9月25日	SG	11202007390	YA	2020年8月28日
				IL	276253	A	2020年9月30日
				KR	20200118065	A	2020年10月14日
				WO	2019157308	A1	2019年8月15日
				TW	201946653	A	2019年12月16日
				MX	2020008289	A	2020年9月25日
				CR	20200391	A	2020年10月19日
				MA	51793	A	2020年12月16日
				CL	2021002188	A1	2022年3月4日
				AR	115360	A1	2021年1月13日
				PH	12020551187	A1	2021年8月16日
				JP	2021512613	A	2021年5月20日
				CA	3089287	A1	2019年8月15日
				US	2019270814	A1	2019年9月5日
				AU	2019218959	A1	2020年9月3日
				CL	2020002029	A1	2020年10月23日
				EP	3749361	A1	2020年12月16日
				RU	2020127948	A	2022年3月11日
				PE	20211116	A1	2021年6月23日
				CL	2021000511	A1	2021年7月23日
				BR	112020016169	A2	2020年12月15日
CN	105829347	A	2016年8月3日	BR	112016010706	A2	2017年12月5日
				CA	2925677	A1	2015年6月25日
				KR	20160099087	A	2016年8月19日
				RU	2016129517	A	2018年1月25日
				JP	2019141066	A	2019年8月29日
				JP	7077263	B2	2022年5月30日
				JP	2017501706	A	2017年1月19日
				JP	6510532	B2	2019年5月8日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/119763

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)
		EP 3083696 A1	2016年10月26日
		EP 3083696 B1	2018年2月14日
		MX 2016008098 A	2017年1月11日
		WO 2015091738 A1	2015年6月25日
		EP 3327038 A2	2018年5月30日
		EP 3327038 A3	2018年6月13日
		EP 3327038 B1	2020年9月23日
		US 2020291131 A1	2020年9月17日
		US 11787873 B2	2023年10月17日
		US 2017029529 A1	2017年2月2日
		US 10584178 B2	2020年3月10日
		HK 1223115 A1	2017年7月21日
CN 111518213 A	2020年8月11日	WO 2020156555 A1	2020年8月6日
		JP 2022527652 A	2022年6月2日
		US 2022143178 A1	2022年5月12日
		EP 3988574 A1	2022年4月27日
		EP 3988574 A9	2022年8月3日
		EP 3988574 A4	2022年10月12日
WO 9222653 A1	1992年12月23日	DE 122004000008 I1	2005年6月9日
		GEP 20074141 B	2007年7月10日
		ES 2206447 T3	2004年5月16日
		ATE 255131 T1	2003年12月15日
		US 6719971 B1	2004年4月13日
		US 6639055 B1	2003年10月28日
		NL 300145 I1	2004年6月1日
		EP 0590058 A1	1994年4月6日
		EP 0590058 B1	2003年11月26日
		EP 0940468 A1	1999年9月8日
		JP 2008291036 A	2008年12月4日
		JP 4836147 B2	2011年12月14日
		DE 69233254 D1	2004年1月8日
		DE 69233254 T2	2004年9月16日
		AU 2250992 A	1993年1月12日
		AU 675916 B2	1997年2月27日
		DK 0590058 T3	2004年3月29日
		CA 2103059 A1	1992年12月15日
		CA 2103059 C	2005年3月22日
		CY 2500 B1	2005年9月2日
		JP 2006083180 A	2006年3月30日
		US 5821337 A	1998年10月13日
		EP 1400536 A1	2004年3月24日
		JP 2005000169 A	2005年1月6日
		LU 91067 I2	2004年4月2日
		JPH 06508267 A	1994年9月22日
		JP 4124480 B2	2008年7月23日
		US 6407213 B1	2002年6月18日