

(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
2020年2月6日(06.02.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/025013 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/098793

(22) 国际申请日: 2019年8月1日(01.08.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810861135.5 2018年8月1日(01.08.2018) CN

(71) 申请人: 三生国健药业(上海)股份有限公司(SUNSHINE GUOJIAN PHARMACEUTICAL (SHANGHAI) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 陈建鹤(CHEN, Jianhe); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 张学赛(ZHANG, Xuesai); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 赵乐(ZHAO, Le); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 徐菲(XU, Fei); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 李晴柔(LI, Qingrou); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 黄浩旻(HUANG, Haomin); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 朱祯平(ZHU, Zhenping); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 北京律诚同业知识产权代理有限公司(LECOMME INTELLECTUAL PROPERTY AGENT

LTD.); 中国北京市海淀区西土城路1号院1号楼泰富酒店写字楼三层, Beijing 100081 (CN)。

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

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

本国际公布:

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

(54) Title: ANTIBODY BINDING TO HUMAN HER2 AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 结合人HER2的抗体、其制备方法和用途

(57) Abstract: Provided is an antibody binding to human HER2 or an antigen-binding fragment thereof capable of specifically binding to human HER2. Compared with Perjeta, the combination of the antibody or an antigen-binding fragment thereof and Herceptin has improved biological activity in inhibiting the proliferation of tumor cells overexpressing HER2. The antibody or an antigen-binding fragment thereof has an antigen-binding epitope different from known antibodies binding to human HER2, can be used to prepare a drug for treating a disease related to HER2 overexpression, such as cancer, and has good prospects for clinical application.

(57) 摘要: 提供了一种结合人HER2的抗体或其抗原结合片段, 能够特异性与人HER2结合, 与已知的Perjeta相比, 其与Herceptin联用具有更好的抑制HER2过表达的肿瘤细胞增殖的生物学活性, 并且具有与已知的结合人HER2的抗体不同的抗原结合表位, 可应用于制备治疗HER2过表达的疾病(例如癌症)的药物, 具有良好的临床应用前景。



WO 2020/025013 A1

结合人 HER2 的抗体、其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及抗体领域，更具体地，本发明公开了一种结合人 HER2 的抗体、其制备方法
5 和用途。

背景技术

HER2/neu (人表皮生长因子受体 2)，又称 erbB2，具有酪氨酸蛋白激酶活性，是人表皮生长因子受体家族成员之一，只在成年人的少数正常组织中呈低水平表达。但研究表明，HER2
10 在多种肿瘤中过表达，如在约 30%的乳腺癌患者和 16%的胃癌患者中均存在过度表达情况，HER2 在肿瘤中的过表达可以显著促进肿瘤血管的新生、肿瘤的生长，并增强肿瘤的侵袭和转移能力，是这类患者预后较差的重要指征。因此，早在 1998 年，第一个靶向于 HER2 的单克隆抗体药物 Herceptin (赫赛汀，Trastuzumab/曲妥珠单抗，Genentech/Roche，其重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 25 和 26 所示，也即美国专利 US5821337
15 中的 SEQ ID NO: 41 和 42) 被 FDA 批准上市，并用于 HER2 过表达的乳腺癌和胃癌的治疗。长期的临床治疗证明，虽然 Herceptin 作为乳腺癌的一线用药与化疗药物联用可以显著延长病人的生存期，降低肿瘤的复发，但在治疗后期，仍有约 70%的病人对 Herceptin 的治疗无响应或产生耐药。在 2012 年，FDA 批准了另一个靶向 HER2 的单克隆抗体药物 Perjeta (帕罗嘉，Pertuzumab/帕妥珠单抗，Genentech/Roche) 上市，其与 Herceptin 的作用机制不同，Herceptin
20 主要是阻断 HER2 下游信号转导引起细胞增殖抑制，Perjeta 则主要是抑制 HER2 与 HER3 异源二聚体的形成，故二者联用对病人的治疗作用显著强于 Herceptin 单用，但仍未满足临床治疗需求。因此，仍有必要并迫切需要继续开发新型的靶向 HER2 的药物以对患有 HER2 过表达的疾病的患者提供更多、更有效的治疗方案。

25 发明内容

为了解决上述技术问题，本发明的发明人进行了大量试验，从抗原免疫、杂交瘤筛选、抗体表达纯化到生物活性鉴定，筛选获得了一个特异性结合人 HER2 的鼠源单克隆抗体 19H6，并在此基础上，进一步构建获得其嵌合抗体 19H6-ch 以及人源化抗体 19H6-Hu。出人意料的，本发明的研究表明 19H6 对人 HER2 的结合表位与 Herceptin 和 Perjeta 均不同，实验结果证据
30 显示 19H6 的结合表位位于人 HER2 的胞外域 (HER2-ECD) 的功能结构域 DIII 内，这是首次发现并报道的能够与人 HER2-ECD 的功能结构域 DIII 特异性结合的单克隆抗体，而在本发明的研究之前，对于能够与人 HER2-ECD 的功能结构域 DIII 结合的单克隆抗体的结构及性质仍然是不清楚的，并且本发明的研究进一步确定了影响 19H6 对靶抗原人 HER2-ECD 结合的关键位点。细胞水平的实验结果表明 19H6 与 Herceptin 联用可以显著抑制乳腺癌细胞 BT474、
35 SKBR3 和胃癌细胞 NCI-N87 的体外增殖，且其效果更是明显优于 Perjeta 与 Herceptin 的联用。

进一步的，嵌合抗体 19H6-ch 以及人源化抗体 19H6-Hu 在细胞水平的实验结果显示具有与 19H6 相当的抗肿瘤生物学活性。动物水平的实验结果显示，在 Herceptin 敏感型细胞 NCI-N87 和耐药型细胞 HCC1954 的移植瘤模型中，19H6-Hu 与 Herceptin 联用具有明显优于 Herceptin 单药的抗肿瘤活性，并且在 HCC1954 的移植瘤模型上 19H6-Hu 与 Herceptin 联用的药效也明显优于 Perjeta 与 Herceptin 联用。因此，本发明开发的、具有全新的 HER2 结合表位的结合人 HER2 的抗体有望成为 HER2 过表达疾病患者的更好的潜在治疗药物。

因此，本发明的第一个目的在于提供一种结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段。

本发明的第二个目的在于提供另一种结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段。

本发明的第三个目的在于提供另一种结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段。

10 本发明的第四个目的在于提供编码所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的核苷酸。

本发明的第五个目的在于提供含有所述核苷酸的表达载体。

本发明的第六个目的在于提供含有所述表达载体的宿主细胞。

本发明的第七个目的在于提供所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的制备方法。

15 本发明的第八个目的在于提供含有所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的药物组合物。

本发明的第九个目的在于提供所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段或所述的药物组合物的用途。

为了实现上述目的，本发明采用了如下技术方案：

20 本发明的第一个方面提供了一种结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其结合的人 HER2 表位位于人 HER2 的胞外域的第三个功能结构域 DIII 内且包括下列氨基酸残基中的一个或多个：SEQ ID NO: 1 的 D502、V505、E507 或 L509。

根据本发明的优选实施方式，所述的人 HER2 表位包括选自以下组的氨基酸残基：

- (a) SEQ ID NO: 1 的 D502;
- 25 (b) SEQ ID NO: 1 的 V505;
- (c) SEQ ID NO: 1 的 E507;
- (d) SEQ ID NO: 1 的 L509;
- (e) SEQ ID NO: 1 的 D502 和 V505;
- (f) SEQ ID NO: 1 的 D502 和 E507;
- 30 (g) SEQ ID NO: 1 的 D502 和 L509;
- (h) SEQ ID NO: 1 的 V505 和 E507;
- (i) SEQ ID NO: 1 的 V505 和 L509;
- (j) SEQ ID NO: 1 的 E507 和 L509;
- (k) SEQ ID NO: 1 的 D502、V505 和 E507;
- 35 (l) SEQ ID NO: 1 的 D502、V505 和 L509;

(m) SEQ ID NO: 1 的 V505、E507 和 L509; 和

(n) SEQ ID NO: 1 的 D502、V505、E507 和 L509。

本发明的第二个方面提供了一种结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段, 其结合的人 HER2 表位位于人 HER2 的胞外域的第三个功能结构域 DIII 内且具有如 SEQ ID NO: 1 的第 5 499-510 位所示的氨基酸序列。

根据本发明, 所述的人 HER2 的胞外域的第三个功能结构域 DIII 具有如 SEQ ID NO: 1 的第 343-510 位所示的氨基酸序列。

本发明的第三个方面提供了一种结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段, 包括:

(a) 重链互补决定区 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述的 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示, 所述的 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示, 所述的 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示, 和

(b) 轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 所述的 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 所述的 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示, 所述的 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示。

根据本发明, 所述的抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。优选的, 所述的抗体为单克隆抗体。

根据本发明, 所述的抗体为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体等。

根据本发明, 所述的抗原结合片段包括 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、单链抗体 (scFV) 及单域抗体 (sdAb) 等。

根据本发明, 所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段能够抑制 HER2 过表达的肿瘤细胞增殖。优选的, 所述的肿瘤细胞包括乳腺癌细胞 BT474、乳腺癌细胞 SKBR3、胃癌细胞 NCI-N87、乳腺癌细胞 HCC1954。

根据本发明的优选实施方式, 所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示; 或所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示, 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示; 或所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示, 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示。

根据本发明的优选实施方式, 所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的重链的恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, 轻链的恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

本发明的第四个方面提供了一种分离的核苷酸, 所述的核苷酸编码如上任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段。

根据本发明的优选实施方式, 所述的核苷酸具有如 SEQ ID NO: 4 所示的编码重链可变区的核苷酸序列, 如 SEQ ID NO: 6 所示的编码轻链可变区的核苷酸序列; 或所述的核苷酸具有如 SEQ ID NO: 18 所示的编码重链可变区的核苷酸序列, 如 SEQ ID NO: 20 所示的编

码轻链可变区的核苷酸序列；或所述的核苷酸具有如 SEQ ID NO: 22 所示的编码重链可变区的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 24 所示的编码轻链可变区的核苷酸序列。

根据本发明的优选实施方式，所述的核苷酸编码重链的恒定区的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示，编码轻链的恒定区的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

5 本发明的第五个方面提供了一种表达载体，所述的表达载体含有如上任一项所述的核苷酸。

本发明的第六个方面提供了一种宿主细胞，所述的宿主细胞含有如上所述的表达载体。

本发明的第七个方面提供了如上所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的制备方法，所述方法包括以下步骤：

10 (a) 在表达条件下，培养如上所述的宿主细胞，从而表达所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段；

(b) 分离并纯化 (a) 所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段。

本发明的第八个方面提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有如上任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

15 根据本发明的优选实施方式，所述的药物组合物还包括第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段。

根据本发明的优选实施方式，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段不与人 HER2 胞外域的第三个功能结构域 DIII 结合，所述的第三个功能结构域 DIII 具有如 SEQ ID NO: 1 的第 343-510 位所示的氨基酸序列。

20 根据本发明的优选实施方式，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段与人 HER2 胞外域的第四个功能结构域 DIV 结合，所述的第四个功能结构域 DIV 具有如 SEQ ID NO: 1 的第 511-582 位所示的氨基酸序列。

根据本发明的优选实施方式，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。根据本发明的优选实施方式，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段为曲妥珠单抗。

25 本发明的第九个方面提供了如上任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段或如上任一项所述的药物组合物在制备治疗 HER2 过表达的疾病的药物中的用途。

30 根据本发明的优选实施方式，所述的 HER2 过表达的疾病为癌症。更优选的，所述的癌症包括乳腺癌、胃癌、卵巢癌等。

有益效果：

35 本发明筛选获得的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段能够特异性与人 HER2 结合，与已知的 Perjeta 相比，其与 Herceptin 联用具有更好的抑制 HER2 过表达的肿瘤细胞增殖的生物学活性，并且具有与已知的结合人 HER2 的抗体不同的抗原结合表位，可应用于制备治疗 HER2 过表达的疾病（例如癌症）的药物，具有良好的临床应用前景。

附图说明

图 1 为候选的 14 株鼠源抗人 HER2 单克隆抗体联合 Herceptin 抑制乳腺癌细胞 BT474 增殖的结果，其中，图 1A 为 19H6、18B6、17D4、14F4 和 12D8 联合 Herceptin 给药组，图 1B 为 33B5、30A1、27D1 和 25H10 联合 Herceptin 给药组，图 1C 为 11D10、10C4、4A4、2C5 和 1H10 联合 Herceptin 给药组。

图 2 为候选的 14 株鼠源抗人 HER2 单克隆抗体联合 Herceptin 抑制乳腺癌细胞 SKBR3 增殖的结果，其中，图 2A 为 19H6、18B6、17D4、14F4 和 12D8 联合 Herceptin 给药组，图 2B 为 11D10、10C4、4A4、2C5 和 1H10 联合 Herceptin 给药组，图 2C 为 33B5、30A1、27D1 和 25H10 联合 Herceptin 给药组。

图 3 为通过 ELISA 的方法测定鼠源抗体 19H6 与人 HER2-ECD 的亲合力的结果。

图 4 为通过 FACS 的方法测定鼠源抗体 19H6 对乳腺癌细胞 BT474 的结合亲和力的结果。

图 5 为测定鼠源抗体 19H6 与 Herceptin 联用对乳腺癌细胞 BT474 的增殖的抑制活性的结果。

图 6 为测定鼠源抗体 19H6 与 Herceptin 联用对乳腺癌细胞 SKBR3 的增殖的抑制活性的结果。

图 7 为测定鼠源抗体 19H6 与 Herceptin 联用对胃癌细胞 NCI-N87 的增殖的抑制活性的结果。

图 8 为通过竞争 ELISA 的方法测定鼠源抗体 19H6 与 Herceptin 和 Perjeta 对人 HER2-ECD 的结合表位竞争关系的结果，其中，图 8A 为梯度稀释的 19H6/Herceptin/Perjeta 分别与 10ng/mL 生物素化的 19H6 按照 1: 1 比例混合后与 HER2-ECD 孵育，图 8B 为梯度稀释的 19H6/Herceptin/Perjeta 分别与生物素化的 10ng/mL Perjeta 按照 1: 1 比例混合后与 HER2-ECD 孵育，图 8C 为梯度稀释的 19H6/Herceptin 分别与 10ng/mL 生物素化的 Herceptin 按照 1: 1 比例混合后与 HER2-ECD 孵育。

图 9 为通过 Western blot 的方法测定鼠源抗体 19H6 与还原变性的人 HER2-ECD 的结合能力的结果。

图 10 为通过 Western blot 和 ELISA 的方法确定鼠源抗体 19H6 对人 HER2-ECD 的各功能结构域的结合结果，其中，图 10A 为 Western blot 检测结果，图 10B 为 ELISA 检测结果。

图 11 为通过 ELISA 的方法测定鼠源抗体 19H6 与 HER2-ECDDIII 区域内 6 条多肽的结合活性的结果。

图 12 为通过 ELISA 的方法测定鼠源抗体 19H6 与肽 HA-21 区域内 4 条多肽的结合活性的结果。

图 13 为通过 ELISA 的方法检测鼠源抗体 19H6 与丙氨酸扫描突变的 12 条多肽的结合活性的结果。

图 14 为通过 ELISA 的方法检测 19H6 与各定点突变后的人 HER2-ECD 蛋白的结合能力。

图 15 为通过 SDS-PAGE 电泳的方法检测嵌合抗体 19H6-ch 的结果。

图 16 为通过 ELISA 的方法测定嵌合抗体 19H6-ch 对人 HER2-ECD 蛋白的亲合力的结果。

图 17 为通过 FACS 的方法测定嵌合抗体 19H6-ch 对乳腺癌细胞 BT474 的结合亲和力的结果。

5 图 18 为测定嵌合抗体 19H6-ch 与 Herceptin 联用对乳腺癌细胞 BT474 的增殖的抑制活性的结果。

图 19 为测定嵌合抗体 19H6-ch 与 Herceptin 联用对乳腺癌细胞 SKBR3 的增殖的抑制活性的结果。

10 图 20 为测定嵌合抗体 19H6-ch 与 Herceptin 联用对胃癌细胞 NCI-N87 的增殖的抑制活性的结果。

图 21 为通过 SDS-PAGE 电泳的方法检测人源化抗体 19H6-Hu 和 19H6-graft 的结果，其中，图 21A 为添加 DTT 的还原电泳结果，图 21B 为未添加 DTT 的非还原电泳结果。

图 22 为通过 ELISA 的方法测定人源化抗体 19H6-Hu 和 19H6-graft 对人 HER2-ECD 的亲合力的结果。

15 图 23 为通过 FACS 的方法测定人源化抗体 19H6-Hu 对乳腺癌细胞 BT474 的结合亲和力的结果。

图 24 为测定人源化抗体 19H6-Hu 与 Herceptin 联用对乳腺癌细胞 BT474 的增殖的抑制活性的结果。

20 图 25 为测定人源化抗体 19H6-Hu 与 Herceptin 联用对乳腺癌细胞 SKBR3 的增殖的抑制活性的结果。

图 26 为测定人源化抗体 19H6-Hu 与 Herceptin 联用对胃癌细胞 NCI-N87 的增殖的抑制活性的结果。

图 27 为通过 ELISA 的方法测定人源化抗体 19H6-Hu 对不同种属 HER2-ECD 蛋白的结合亲和力结果。

25 图 28 为通过 ELISA 的方法测定人源化抗体 19H6-Hu 对家族成员 HER1、HER3 和 HER4 的选择性的结果。

图 29-图 31 为采用 Western blot 的方法测定 19H6-Hu 对 HER2 下游相关信号通路的影响；其中，

图 29 显示对乳腺癌细胞 BT474 细胞的作用；

30 图 30 显示对 SKBR3 细胞的作用；

图 31 显示对胃癌细胞 NCI-N87 的作用。

图 32 为在 BT474 细胞中 19H6-Hu 对 HER2/HER3 二聚化的抑制作用。

图 33 为在 SKBR3 细胞中 19H6-Hu 对 HER2/HER3 二聚化的抑制作用。

图 34 为 19H6-Hu 与 Herceptin 联用在 NCI-N87 移植瘤模型上的抗肿瘤作用。

35 图 35 为 19H6-Hu 与 Herceptin 联用在 HCC1954 移植瘤模型上的抗肿瘤作用。

具体实施方式

本发明中，术语“抗体 (Ab)”和“免疫球蛋白 G (IgG)”是有相同结构特征的约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链 (L) 和两个相同的重链 (H) 组成。每条轻链
5 通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区 (VH)，其后是恒定区。每条轻链的一端有可变区 (VL)，另一端有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。本发明的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种抗体形成的多特异性抗体 (例如双特异性抗体)、抗体的抗原结合片段等。本发明的抗
10 体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体等。

本发明中，术语“单克隆抗体 (单抗)”指从一类基本均一的群体获得的抗体，即该群体中包含的单个抗体是相同的，除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地
15 针对单个抗原位点。而且，与常规多克隆抗体制剂 (通常是具有针对不同决定簇的不同抗体) 不同，各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外，单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤细胞的培养来合成的，不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性，是从基本均一的抗体群中获得的，这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

本发明中，术语“鼠源抗体”是指来源于大鼠或小鼠的抗体，优选小鼠。本发明的鼠源抗体为使用人 HER2 的胞外域为抗原免疫小鼠并进行杂交瘤细胞筛选获得。更优选的，本发
20 明的鼠源抗体包括 1H10、2C5、4A4、10C4、11D10、12D8、14F4、17D4、18B6、19H6、25H10、27D1、30A1 和 33B5。最优选的，本发明的鼠源抗体为 19H6。

本发明中，术语“嵌合抗体”是指包含来源于一个物种的重和轻链可变区序列以及来源于另一个物种的恒定区序列的抗体，例如具有与人恒定区连接的鼠重和轻链可变区的抗体。优
25 选的，本发明的嵌合抗体是由鼠源抗体 19H6 的重链可变区序列和轻链可变区序列与人的恒定区拼接获得。更优选的，本发明的嵌合抗体的重链由鼠源抗体 19H6 的重链可变区序列与人的 IgG1 恒定区拼接获得，轻链由鼠源抗体 19H6 的轻链可变区序列与人的 kappa 链拼接获得。最优选的，本发明的嵌合抗体为 19H6-ch。

本发明中，术语“人源化抗体”是指其 CDR 来源于非人物种 (优选小鼠) 抗体，抗体分子中残余的部分 (包括框架区和恒定区) 来源于人抗体。此外，框架区残基可被改变以维持
30 结合亲和性。优选的，本发明的人源化抗体由鼠源抗体 19H6 的 CDR 区和来源自人抗体的非 CDR 区重组，并对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基，以及对 19H6 的 VL 和 VH 的构象有重要影响的残基进行回复突变获得。更优选的，本发明的人源化抗体包括 19H6-Hu 和 19Hu-graft。最优选的，本发明的人源化抗体为 19H6-Hu。

本发明中，术语“抗原结合片段”是指能够与人 HER2 表位特异性结合的抗体的片段。
35 本发明的抗原结合片段的例子包括 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、单链抗体 (scFv)、单

域抗体 (sdAb) 等。Fab 片段是用木瓜蛋白酶消化抗体产生的片段。F(ab')₂ 片段是用胃蛋白酶消化抗体产生的片段。Fv 片段是由抗体的重链可变区和轻链可变区紧密非共价关联的二聚物组成。单链抗体 (scFv), 是由抗体重链可变区和轻链可变区通过 15~20 个氨基酸的短肽 (linker) 连接而成的抗体。单域抗体 (sdAb) 又称为纳米抗体 (nanobody) 或重链抗体, 5 仅由重链构成, 其抗原结合区仅是一个通过铰链区与 Fc 区连接的单结构域。

本发明中, 术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同, 它形成各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而, 可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区 (CDR) 或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为框架区 (FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个 FR 区, 它们大致 10 上呈 β-折叠构型, 由形成连接环的三个 CDR 相连, 在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密地靠在一起并与另一链的 CDR 一起形成了抗体的抗原结合部位 (参见 Kabat 等, NIH Publ.No.91-3242, 卷 I, 647-669 页 (1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合, 但是它们表现出不同的效应功能, 例如参与抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 等。

本发明中, 术语“表位”和“人 HER2 表位”是指位于人 HER2 上并与抗体特异性结合的区域。优选的, 本发明的人 HER2 表位位于人 HER2 的胞外域内, 所述的人 HER2 的胞外域具有如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。优选的, 本发明的人 HER2 表位位于人 HER2 的胞外域的第三个功能结构域 DIII 内, 所述的第三个功能结构域 DIII 具有如 SEQ ID NO: 1 的第 343-510 位所示的氨基酸序列。更优选的, 本发明的人 HER2 表位包括下列残基中的一个或多个: SEQ ID NO: 1 的 D502、V505、E507 或 L509。更优选的, 本发明的人 HER2 表位具有如 SEQ ID NO: 1 的第 499-510 位所示的氨基酸序列。 20

本发明中, 术语“结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段”和“抗人 HER2 抗体或其抗原结合片段”是指能够与人 HER2 表位特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 且其不会与其他人表皮生长因子受体家族成员 (HER1、HER3、HER4) 发生交叉反应。优选的, 本发明的 25 结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段能够抑制 HER2 过表达的肿瘤细胞 (例如乳腺癌细胞 BT474、SKBR3 和 HCC1954 以及胃癌细胞 NCI-N87 等) 增殖。

本发明中, 术语“表达载体”可以为 pTT5, pSECtag 系列, pCGS3 系列, pCDNA 系列载体等, 以及其它用于哺乳动物表达系统的载体等, 表达载体中包括连接有合适的转录和翻译调节序列的融合 DNA 序列。

本发明中, 术语“宿主细胞”是指适用于表达上述表达载体的细胞, 可以是真核细胞, 如哺乳动物或昆虫宿主细胞培养系统均可用于本发明的融合蛋白的表达, CHO (中国仓鼠卵巢, Chinese Hamster Ovary), HEK293, COS、BHK 等及上述细胞的衍生细胞均可适用于本 30 发明。

本发明中, 术语“细胞”和“细胞系”可互换使用。

本发明中, 术语“药物组合物”是指本发明的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段可 35

以和药学上可以接受的载体一起组成药物制剂组合物从而更稳定地发挥疗效，这些制剂可以保证本发明公开的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的氨基酸核心序列的构像完整性，同时还保护蛋白质的多官能团防止其降解（包括但不限于凝聚、脱氨或氧化）。优选的，本发明的药物组合物还包括第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段。更优选的，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段不与人 HER2 胞外域的第三个功能结构域 DIII 结合，所述的第三个功能结构域 DIII 具有如 SEQ ID NO: 1 的第 343-510 位所示的氨基酸序列。更优选的，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段与人 HER2 胞外域的第四个功能结构域 DIV 结合，所述的第四个功能结构域 DIV 具有如 SEQ ID NO: 1 的第 511-582 位所示的氨基酸序列。更优选的，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。更优选的，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段为曲妥珠单抗。

本发明中，术语“HER2 过表达的疾病”是指处于异常疾病状态的细胞中 HER2 的表达水平高于相同组织类型的正常细胞中的 HER2 表达水平。本发明的 HER2 过表达的疾病包括 HER2 过表达的癌症，包括但不限于：乳腺癌、胃癌、卵巢癌等。

以下实施例、实验例是对本发明进行进一步的说明，不应理解为对本发明的限制。实施例不包括对传统方法的详细描述，如那些用于构建表达载体和质粒制备的方法，将编码蛋白的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒转染入宿主细胞的方法。这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的，并且在许多出版物中都有所描述，包括 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press。

以下实施例中所使用的 HER2 高表达的细胞系包括乳腺癌细胞 BT474、乳腺癌细胞 SKBR3、胃癌细胞 NCI-N87、乳腺癌细胞 HCC1954，其中，HCC1954（目录号：ATCC[®] CRL-2338[™]）和 SKBR3（目录号：ATCC[®] HTB-30[™]）购自于美国典型培养物保藏中心(ATCC)，BT474（目录号：TCHu143）和 NCI-N87（目录号：SCSP-534）购自于中国科学院细胞库，并按照相应的说明进行培养。

以下实施例中使用的阳性对照抗体为 Herceptin（购自 Roche, 440mg/20ml, 批号 N3723）和 Perjeta（购自 Roche, 420mg/14ml, 批号 H0248B02）。

以下实施例中使用的人 HER2-ECD 蛋白按照以下方法制备：将人 HER2-ECD（NCBI 登记号为 NP_004439.2 的 1 至 652 位氨基酸，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示）的 C-端添加 6×His 标签的核酸序列克隆至 pTT5 载体（购自 NRC biotechnology Research Institute）构建 HER2-ECD-His-pTT5，并转染至中国仓鼠卵巢细胞 CHO 进行表达，转染后 7d，收取表达上清进行纯化，备用。

以下实施例中，缩写的术语含义说明如下：

HAT: 次黄嘌呤 (hypoxantin)、氨基蝶呤 (aminopterin) 和胸腺嘧啶脱氧核苷 (thymidin);

PBS: 10mM 的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline);

PBST: 含 0.05% 的 Tween20 的 10mM 的磷酸缓冲盐溶液;

TBS: Tris-HCl 缓冲盐溶液, pH=7.5;

5 TBST: 含 0.1% 的 Tween20 的 TBS 溶液;

BSA: 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin);

TMB: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine);

HRP: 辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase);

DTT: 二硫苏糖醇 (DL-Dithiothreitol)。

10

实施例 1 特异性结合人 HER2 的鼠源单克隆抗体的制备

1.1 小鼠免疫

用哺乳动物细胞-中国仓鼠卵巢细胞 CHO 表达的人 HER2-ECD 蛋白 (自制, 纯度>95%) 常规免疫 Balb/c 小鼠 (购自上海灵畅生物科技有限公司)。第 1 天, 可溶性人 HER2-ECD 蛋白
15 与弗氏完全佐剂乳化后, 对 Balb/c 小鼠进行皮下多点注射 (人 HER2-ECD 50 μ g/鼠/0.5mL), 第 21 天, 可溶性人 HER2-ECD 蛋白与弗氏不完全佐剂乳化后, 对 Balb/c 小鼠进行皮下注射 (人 HER2-ECD 50 μ g/鼠/0.5mL), 在第 41 天, 可溶性人 HER2-ECD 蛋白, 50 μ g/小鼠/0.2mL, 腹腔内注射激发, 3-4 天后, 取小鼠脾脏进行融合实验。

20 1.2 杂交瘤细胞制备及筛选

在小鼠末次免疫后 3-4 天, 使用常规的杂交瘤技术方案, 将小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 通过电融合仪 (购自 BTX 公司) 进行电融合。融合后的细胞在完全培养基 (即将 RPMI1640 和 DMEM F12 培养基 1: 1 混匀后加入 1% 的 Glutamine (谷氨酰胺), 1% Sodium pyruvate (丙酮酸钠), 1% MEM-NEAA (最小基本培养基-非必需氨基酸溶液),
25 1% Penicillin-streptomycin (青霉素-链霉素), 50 μ M 的 β -巯基乙醇及 20% FBS (胎牛血清); 所有产品均购自 Gibco 公司) 中悬浮均匀, 按 10⁵ 个细胞/100 μ L/孔, 分入共 36 块 96 孔培养板中培养过夜, 次日, 每孔加入 100 μ L 孔含有 2 \times HAT 的完全培养基, 使 96 孔板内培养液为 200 μ L/孔 (含 1 \times HAT)。在 7-12 天后, 收获上清液, 通过间接酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 筛选人 HER2-ECD 结合活性阳性的杂交瘤孔, 共获得 839 个阳性孔。通过检测杂交瘤孔对乳
30 腺癌细胞系 BT474 增殖抑制的方法, 进一步筛选获得 36 个阳性孔。将人 HER2-ECD 结合阳性且 BT474 细胞增殖抑制阳性的杂交瘤孔通过有限稀释法进行第一、第二轮亚克隆, 获得 14 株阳性克隆杂交瘤细胞株, 命名为 1H10、2C5、4A4、10C4、11D10、12D8、14F4、17D4、18B6、19H6、25H10、27D1、30A1 和 33B5。

其中, 间接酶联免疫吸附测定法筛选人 HER2-ECD 结合活性阳性的杂交瘤孔的方法如下:
35 将重组人 HER2-ECD 蛋白以包被液 (50mM 的碳酸盐包被缓冲液, pH 9.6) 稀释至 1 μ g/mL,

100 μ L/孔加入酶标板, 4 $^{\circ}$ C包被过夜。PBST洗板3次, 加入200 μ L/孔封闭液(2%BSA-PBS), 37 $^{\circ}$ C放置1h后PBST洗板1次待用。将收取的杂交瘤上清液依次加入封闭后的酶标板, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C放置1h。PBST洗板3次, 加入HRP标记的羊抗小鼠IgG二抗(购自Millipore, 货号AP181P), 37 $^{\circ}$ C放置30min; PBST洗板5次后, 在吸水纸上尽量拍干残留液滴, 每孔加入

5 100 μ L的TMB(购自BD公司, 货号555214), 室温(20 \pm 5 $^{\circ}$ C)避光放置5min; 每孔加入50 μ L 2M H₂SO₄终止液终止底物反应, 酶标仪450nm处读取OD值, 分析待测抗体与靶抗原HER2-ECD结合能力。

其中, 检测杂交瘤孔对乳腺癌细胞系BT474增殖抑制的方法如下: 将处于对数生长期的乳腺癌细胞BT474用胰蛋白酶消化, 计数, 重悬于含10%胎牛血清的完全培养基并按照每孔

10 5000个BT474细胞铺制96孔细胞培养板, 150 μ L/孔, 于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂细胞培养箱中培养16h, 加入不同浓度的待测抗体, 每个药物浓度设置3个复孔, 作用6d后, 倾去培养液, 加入CCK-8(Cell counting kit-8, 购自Dojindo公司, 货号Cat#CK04)反应液, 100 μ L/孔, 于37 $^{\circ}$ C反应至预期颜色深浅, 测定每组的细胞活力(OD450nm), 并设置空白孔为未铺制细胞的培养孔, 对照孔为铺制细胞但未给药的细胞培养孔, 按照以下公式计算细胞存活率和生长抑

15 制率并通过GraphPad Prism 6软件进行拟合分析:

存活率=(OD 给药-OD 空白)/(OD 对照-OD 空白) \times 100%。

生长抑制率=1-存活率。

1.3 鼠源抗人HER2单克隆抗体的大量制备及鉴定

20 在含血清完全培养基中扩增实施例1.2中筛选获得的14株杂交瘤细胞株, 离心换液至无血清培养液SFM培养基(购自life technologies公司, 货号12045-076), 使细胞密度为1 \sim 2 \times 10⁷/mL, 在5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C条件下培养1周, 离心获取培养上清, 通过Protein G亲和层析进行纯化, 获得14株鼠源抗人HER2单克隆抗体。

通过与Herceptin联合作用, 抑制乳腺癌细胞BT474和SKBR3增殖的方法进一步筛选候

25 选的14株鼠源抗人HER2单克隆抗体, 其中按照每孔5000个BT474或3000个SKBR3细胞铺制96孔细胞培养板, 150 μ L/孔, 于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂细胞培养箱中培养16h后, 加入用细胞完全培养基按照3倍梯度稀释待测抗体和Herceptin, 各抗体最高工作浓度为20 μ g/mL, 设置与Herceptin联合给药和Herceptin单独给药组, 数据处理及分析方法参照实施例1.2中所述的方法。

30 结果如图1A-图1C所示, 其中4株单抗, 即27D1、25H10、4A4和19H6可以明显协同Herceptin抑制BT474细胞的增殖, 使Herceptin对BT474的最大抑制率明显提高, 也使达到Herceptin单药最大抑制率的浓度大大降低, 尤其是19H6。

结果如图2A-图2C所示, 其中1株单抗, 即19H6可以明显协同Herceptin抑制SKBR3细胞的增殖, 使对SKBR3细胞生长的最大抑制率明显提高; 其他3株单抗, 即4A4, 25H10,

35 27D1, 虽然能够协同Herceptin抑制BT474细胞的增殖, 但不能明显协同Herceptin抑制SKBR3

细胞的增殖。

综合以上筛选结果，选取鼠源抗人 HER2 单克隆抗体 19H6 按上述方法进行大量制备，用于后续体内生物学活性和其他实验。

5 实施例 2 鼠源抗人 HER2 单克隆抗体 19H6 的体外活性测定

2.1 鼠源抗体 19H6 对靶抗原的亲合力的测定

本实施例通过 ELISA 的方法测定 19H6 对人 HER2-ECD 的亲合力。

实验方法参照实施例 1.2 所述。

结果如图 3 所示，结果表明 19H6 能够与人 HER2 特异性结合，在本检测体系中，结合
10 的 EC₅₀ 为 0.28nM。

2.2 鼠源抗体 19H6 对靶细胞的结合亲和力的测定

本实施例通过流式细胞荧光分选技术（Fluorescence activated Cell Sorting, FACS）的方法测定 19H6 对乳腺癌细胞 BT474 的结合亲和力。

15 本实验以乳腺癌细胞 BT474 作为靶细胞，将 100 μ L 按照 3 倍梯度从 1000nM 连续稀释 12 个梯度的 19H6 作为一抗，分别与悬浮于 100 μ L RPMI-1640 无血清培养基（购自 Gibco 公司，货号 22400089）中的 3×10^5 个 BT474 细胞于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1h（19H6 的最高工作浓度为 500nM），PBS 洗涤细胞两次以去除未结合的 19H6，再将细胞与 200 μ L、2 μ g/mL、FITC 标记的抗鼠 Fc 的二抗（购自 BD Biosciences 公司，货号 554001）于 4 $^{\circ}$ C 孵育 30min，PBS 洗涤细胞两次以
20 去除未结合的二抗，最后将细胞重悬在 200 μ L PBS 中，通过流式细胞仪测定 19H6 对该细胞的结合亲和力，所得数据通过 GraphPad Prism 6 软件拟合分析。

结果如图 4 所示，结果表明 19H6 可以特异性结合细胞表面 HER2 高表达的乳腺癌细胞 BT474，且其 EC₅₀ 为 1.1nM。

2.3 鼠源抗体 19H6 对靶细胞增殖抑制活性的测定

25 本实施例测定了 19H6 与 Herceptin 联用对 HER2 高表达的靶细胞（乳腺癌细胞 BT474、乳腺癌细胞 SKBR3、胃癌细胞 NCI-N87）增殖的抑制活性。

实验方法参照实施例 1.2 所述，其中按照每孔 5000 个 BT474 或 NCI-N87 或 3000 个 SKBR3 细胞铺制 96 孔细胞培养板，并直接用细胞完全培养基按照 3 倍梯度稀释待测抗体，最高工作
30 浓度为 10 μ g/mL 作为单独给药组；用终浓度为 1 μ g/mL 的 Herceptin 于细胞完全培养基中按照 3 倍梯度稀释其他待测抗体作为与 Herceptin 的联合给药组。

结果如图 5 所示，19H6 与 1 μ g/mL 的 Herceptin 联用后，可有效的抑制乳腺癌细胞 BT474 的增殖，且其抑制效果明显优于 Perjeta 与 Herceptin 的联用以及 Herceptin 的单药作用，最大抑制效果为 Perjeta 与 Herceptin 的联用以及 Herceptin 单药的 2 倍以上。

35 结果如图 6 所示，19H6 与 1 μ g/mL 的 Herceptin 联用后，可有效的抑制乳腺癌细胞 SKBR3

的增殖，且其抑制效果明显优于 Perjeta 与 Herceptin 的联用以及 Herceptin 的单药作用，最大抑制效果为 Perjeta 与 Herceptin 的联用以及 Herceptin 单药的 1.5 倍以上。

结果如图 7 所示，19H6 与 1 μ g/mL 的 Herceptin 联用后，可有效的抑制胃癌细胞 NCI-N87 的增殖，且其抑制效果明显优于 Perjeta 与 Herceptin 的联用以及 Herceptin 的单药作用，最大抑制效果约为 Perjeta 与 Herceptin 的联用的 4 倍，Herceptin 单药的 4.5 倍。

实施例 3 鼠源抗人 HER2 单克隆抗体 19H6 的抗原结合表位的测定

3.1 鼠源抗体 19H6 与 Herceptin 和 Perjeta 竞争结合抗原表位的测定

本实施例通过竞争 ELISA 的方法测定 19H6 与 Herceptin 和 Perjeta 对人 HER2-ECD 的结合表位关系。

将 19H6、Perjeta 和 Herceptin 分别进行生物素标记。采用 Sigma 公司 NHS 活化的生物素（货号 Cat#H1759）按说明书进行。NHS 活化的生物素以 DMSO 溶解，使终浓度在 10mg/mL，取 19H6、Perjeta、Herceptin 各 1mg（1mL），加入生物素 50 μ g（5 μ L），混匀，室温 2 小时后加入 Tris 缓冲液（1M，pH 8.0）100 μ L，4 $^{\circ}$ C 过夜后，于大体积 PBS（pH7.2）中透析后备用。

将靶抗原，即人 HER2-ECD 通过包被液稀释至 1 μ g/mL，包被酶标板，100 μ L/孔，4 $^{\circ}$ C 过夜；PBST 洗涤 3 次后，加入 2%的 BSA-PBS 200 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 封闭 1h；分别梯度稀释 19H6、Perjeta、Herceptin，并分别稀释生物素化的 19H6、Perjeta、Herceptin 至 10ng/mL，将 19H6、Perjeta、Herceptin 梯度稀释系列样品分别与稀释的生物素化的 19H6、Perjeta、Herceptin 按照 1:1 的体积比混合，同时将 19H6、Perjeta、Herceptin 梯度稀释系列样品分别与稀释液（1%BSA-PBST）按照 1:1 的体积比混合作为空白对照，按照 100 μ L/孔，取上述混合液加入酶标板，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h，PBST 洗 3 次后，加入 HRP 标记的链霉亲和素（SA，streptavidin，Sigma，Cat#S4672-5MG）（按说明书稀释）100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min，PBST 洗 5 次后，加入 TMB 100 μ L/孔，避光室温反应 5min 后，加入 50 μ L/孔 2M 的 H₂SO₄，酶标仪于 450nm 波长测定吸光度 OD450。

结果如图 8A-图 8C 所示，19H6 可以明显抑制生物素化的 19H6 与人 HER2-ECD 的结合，但 Herceptin 与 Perjeta 则不能抑制生物素化的 19H6 与人 HER2-ECD 的结合，并且 19H6 也不能抑制生物素化的 Herceptin 或 Perjeta 与人 HER2-ECD 的结合，说明 19H6 与 Herceptin/Perjeta 结合人 HER2-ECD 的表位没有相关性，即 19H6 对人 HER2-ECD 的结合表位与 Herceptin 和 perjeta 不同。

3.2 鼠源抗体 19H6 与还原变性的 HER2-ECD 结合能力的测定

本实施例通过蛋白免疫印迹（Western Blot）的方法测定 19H6 与还原变性的人 HER2-ECD 的结合能力。

将还原变性的人 HER2-ECD 进行 SDS-PAGE 电泳（2ng/泳道）后，通过电转移法转印至 PVDF 膜，于 3%BSA-TBS 中封闭（37 $^{\circ}$ C，2 小时），分别加入 1 μ g/ml 的 19H6、Herceptin 和

Perjeta 溶液 (1%BSA-TBST 稀释), 37°C 孵育 1h, TBST 洗 3 次后, 加入 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 二抗 (购自 Millipore 公司, 货号 Cat#AP181P, 按说明书以 1%BSA-TBST 稀释 5000 倍) 或 HRP 标记羊抗人 IgG 二抗 (购自 Millipore 公司, 货号 AP101P, 按说明书以 1%BSA-TBST 稀释 5000 倍), 37°C 孵育 0.5h 后, TBST 洗 5 次后, PVDF 膜上滴加适量 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate 溶液 (购自 Millipore 公司, 货号 Cat#WBKLS0500), 室温避光于生物分子成像仪 (购自 GE 公司, 型号 Las400mini) 上自动成像。

结果如图 9 所示, 在 95kD 至 130kD 的目标位置之间出现了特异的免疫印迹, 说明 19H6 可以特异性结合还原变性的人 HER2-ECD, 提示了 19H6 特异性结合人 HER2 蛋白的表位为线性表位。与 19H6 相反, Herceptin 和 Perjeta 在相同的实验中, 没有显示与还原变性的人 HER2-ECD 的结合能力。

3.3 鼠源抗体 19H6 对靶抗原结合区域的确定

本实施例通过常规的 Western blot 和 ELISA 的方法确定 19H6 对人 HER2-ECD 的结合区域。

为确认 19H6 对人 HER2 的结合表位, 经查阅文献及 NCBI 获取人 HER2 的胞外域 (HER2-ECD) 基因 (NCBI 登记号为 NP_004439.2 的 1 至 652 位氨基酸, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示), 其中, SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列包含了信号肽序列 SP (1-22)、功能结构域 DI (23-217)、功能结构域 DII (218-342)、功能结构域 DIII (343-510)、功能结构域 DIV (511-582)。然后组合表达 HER2-ECD 四个功能结构域 (DI-DIV), 即 HER2-ECD-DI (1-217)、HER2-ECD-DI-DII (1-342)、HER2-ECD-DI-DIII (1-510) 及 HER2 胞外域全长蛋白 HER2-ECD-fl (1-652)。随之, 参照实施例 3.2 和 1.2 所述的方法, 分别通过常规的 Western blot 和 ELISA 方法测定 19H6 对人 HER2-ECD 各结构域的识别情况。

结果如图 10A 和图 10B 所示, Western blot 和 ELISA 检测结果均表明 19H6 的识别位点位于人 HER2-ECD 的第三个功能结构域 DIII, 这与 Herceptin 和 Perjeta 的识别结构域均不相同, 查阅文献表明 Herceptin 的识别结构域为 DIV, Perjeta 的识别结构域为 DII。

3.4 影响鼠源抗体 19H6 对靶抗原结合的关键位点的确认

本实施例通过 ELISA 的方法检测 19H6 与人 HER2-ECDDIII 区域内多肽的结合能力, 进一步确认影响 19H6 对人 HER2-ECD 结合的关键位点。

由实施例 3.2 和 3.3 的结果已经确认 19H6 可以结合变性的 HER2-ECD 和 HER2-ECD DIII, 判断 19H6 结合的表位为线性表位, 可以采用合成多肽经 ELISA 方法检测, 进一步明确 19H6 结合表位的位置。

首先将人 HER-ECD DIII 分解成相互有重叠的 6 个部分, 每个部分合成一条 N 端生物素修饰 (即 bio-) 的多肽, 即:

YC-25: bio-YGLGMEHLREVRVAVTSANIQEFAG (343-366);
 AA-26: bio-AGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTA (365-390);
 NC-38: bio-NTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSV (388-424);
 LC-41: bio-LSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLREL (422-461);
 5 EC-34: bio-ELGSGLALIHHTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQA (460-492);
 HA-21: bio-HQALLHTANRPEDECVGEGLA (490-510)。

结果如图 11 所示, 19H6 只与肽 HA-21, 即人 HER2-ECD 蛋白 N 端的第 490-510 位氨基酸的多肽结合, 说明 19H6 的结合表位位于人 HER2 蛋白的 H490 至 A510 之间。

10 然后, 将 HA-21 多肽进一步分解, 合成相互有重叠的 N 端生物素修饰的 4 条多肽, 即:
 3-2: bio-DQLFRNPHQALL (483-494);
 3-3: bio-QALLHTANRPED (491-502);
 3-4: bio-RPEDECVGEGLA (499-510);
 3-5: bio-EGLACHQLCARG (507-518)。

15 结果如图 12 所示, 19H6 只与肽 3-4, 即人 HER2-ECD 蛋白 N 端的第 499-510 位氨基酸的肽段结合, 说明 19H6 结合表位位于人 HER2 蛋白的 R499-A510 之间。

最后, 通过丙氨酸扫描 (将非丙氨酸的氨基酸位点分别单点突变成丙氨酸) 的方式, 合成了 N 端生物素修饰的 12 条多肽 (495-510), 即:

20 4-1: bio-ATANRPEDECVGEGLA;
 4-2: bio-HAANRPEDECVGEGLA;
 4-3: bio-HTAARPEDECVGEGLA;
 4-4: bio-HTANAPEDECVGEGLA;
 4-5: bio-HTANRAEDECVGEGLA;
 25 4-6: bio-HTANRPADECVGEGLA;
 4-7: bio-HTANRPEAECVGEGLA;
 4-8: bio-HTANRPEDACVGEGLA;
 4-9: bio-HTANRPEDEAVGEGLA;
 4-10: bio-HTANRPEDECAGEGLA;
 30 4-11: bio-HTANRPEDECVGAGLA;
 4-12: bio-HTANRPEDECVGEGAA。

结果如图 13 所示, 19H6 基本没有与肽 4-7(D502A)、肽 4-10(V505A)、肽 4-11(E507A) 多肽的结合能力, 与肽 4-12(L509A) 的结合较其他多肽也有一定程度减弱, 据此, 初步确定影响 19H6 对人 HER2-ECD 结合的核心关键氨基酸位点为 D502、V505、E507, L509 为次
 35 重要氨基酸位点。

3.5 鼠源抗体 19H6 对靶抗原结合的关键位点的进一步确认

本实施例通过 ELISA 的方法检测 19H6 与人 HER2-ECD 定点突变蛋白的结合能力。

将 HER2-ECD-His-pTT5 表达载体通过 PCR (聚合酶链式反应) 进行定点突变, 即分别
5 将第 502 位的天冬氨酸突变成丙氨酸 (HER2-ECD-D502A)、第 505 位的缬氨酸突变成丙氨酸
(HER2-ECD-V505A)、第 507 位的谷氨酸突变成丙氨酸 (HER2-ECD-E507A), 同时构建了
第 502 位的天冬氨酸和 505 位的缬氨酸双点突变 (HER2-ECD-D502A/V505A) 以及第 502 位
的天冬氨酸、505 位的缬氨酸和 507 位的谷氨酸三点突变 (HER2-ECD-D502A/V505A/E507A)
表达载体。上述各载体经测序验证正确后, 转染至 HEK293E (购自 NRC biotechnology Research
10 Institute) 进行表达, 转染后 5d, 收取表达上清进行纯化, 备用。取上述纯化的 HER2-ECD
蛋白及各突变体蛋白, 参照实施例 1.2 所述, 进行 19H6 的结合亲和力测定。

结果如图 14 所示, 19H6 靶向 HER2-ECD、HER2-ECD-D502A、HER2-ECD-E505A 和
HER2-ECD-E507A 的 EC_{50} 分别为 0.041nM、0.05nM、0.038nM 和 0.867nM, 而对
HER2-ECD-D502A/V505A 和 HER2-ECD-D502A/V505A/E507A 几乎无结合作用, 这进一步说
15 明, HER2-ECD 第 502 位的天冬氨酸、505 位的缬氨酸和 507 位的谷氨酸三点突变对 19H6
靶向结合 HER2-ECD 的重要性, 其中单点突变尤以第 507 位的谷氨酸影响最为显著, 同样我
们对后续的人源化抗体 19H6-Hu 进行相关的结合表位确定实验也得到相同的结果。

实施例 4 鼠源抗人 HER2 单克隆抗体 19H6 的嵌合抗体的制备及活性鉴定

4.1 嵌合抗体 19H6-ch 的制备

本实施例通过分子生物学的相关方法获取 19H6 的重链可变区和轻链可变区, 并进一步
构建嵌合抗体 19H6-ch。

通过 Trizol 提取 19H6 杂交瘤细胞的 RNA 并进行 mRNA 反转录获取 cDNA, 随后以 cDNA
为模板, 分别用鼠源抗体的重链和轻链简并引物 (《Antibody Engineering》Volume 1, Edited by
25 Roland Kontermann and Stefan Dübel, 组合引物的序列来自第 323 页) 进行 PCR, 对所获得的
PCR 产物 (约 700bp 左右) 进行测序并通过 kabat 数据库分析, 确定所获得的序列为鼠源抗
体的可变区序列。其序列信息如下: 重链可变区基因序列全长 351bp, 编码 117 个氨基酸残
基, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 轻链可变区基
因序列全长 336bp, 编码 112 个氨基酸残基, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 核苷酸序列
30 如 SEQ ID NO: 6 所示。

对所得的重链可变区序列与人的 IgG1 恒定区 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, 核苷
酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示) 拼接, 轻链可变区序列与人的 kappa 链恒定区 (氨基酸序列
如 SEQ ID NO: 9 所示, 核苷酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示) 拼接, 分别构建 19H6-ch 的重
链和轻链至 pTT5 表达载体, 转染 HEK-293E 细胞, 纯化获取嵌合抗体 19H6-ch, 通过
35 SDS-PAGE 电泳初步确定所表达抗体分子量是否正确及抗体纯度, 定量, 分装, 冻存于 -80 度

备用。

结果如图 15 所示，结果表明所制备的 19H6-ch 分子量大小与预期相符，且纯度在 95% 以上。

5 4.2 嵌合抗体 19H6-ch 对靶抗原的亲合力的测定

本实施例通过 ELISA 的方法测定 19H6-ch 对人 HER2-ECD 的亲合力。

实验方法参照实施例 1.2。

结果如图 16 所示，表明 19H6-ch 对人 HER2-ECD 具有与 19H6 相当的结合亲合力， EC_{50} 为 0.1nM。

10

4.3 嵌合抗体 19H6-ch 对靶细胞的结合亲和力的测定

本实施例通过 FACS 的方法测定 19H6-ch 对乳腺癌细胞 BT474 的结合亲合力。

实验方法参照实施例 2.2。

结果如图 17 所示，表明 19H6-ch 可以特异性结合乳腺癌细胞 BT474，从图中计算得出 15 19H6-ch、Herceptin 和 Perjeta 的 EC_{50} 分别为 1.5nM、4.8nM 和 2.4nM，说明 19H6-ch 与乳腺癌细胞 BT474 的结合活性优于当前靶向 HER2 的已上市药物 Herceptin 和 Perjeta。

4.4 嵌合抗体 19H6-ch 对靶细胞增殖抑制活性的测定

本实施例测定了嵌合抗体 19H6-ch 与 Herceptin 联用对 HER2 高表达的靶细胞（乳腺癌细 20 胞 BT474、乳腺癌细胞 SKBR3、胃癌细胞 NCI-N87）增殖的抑制活性。

实验方法参照实施例 2.3。

结果分别如图 18、图 19 和图 20 所示，结果表明 19H6-ch 与 1 μ g/mL 的 Herceptin 联用后， 25 可有效的抑制乳腺癌细胞 BT474、SKBR3 和胃癌细胞 NCI-N87 的增殖，且其抑制效果明显 优于 Perjeta 与 Herceptin 的联用以及 Herceptin 的单药作用，并且其对这三个肿瘤细胞增殖的 抑制活性与 19H6 一致。

实施例 5 鼠源抗人 HER2 单克隆抗体 19H6 的人源化抗体的制备及活性鉴定

5.1 人源化抗体 19H6-Hu 和 19H6-graft 的制备

对轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列进行分析，依据 Kabat 规则确定鼠源抗体 19H6 30 的 3 个抗原互补决定区（CDR）和 4 个框架区（FR）。其中，重链互补决定区的氨基酸序列 为 HCDR1：DYAIH（SEQ ID NO：11）、HCDR2：VFSIYYENINYNQKFKG（SEQ ID NO： 12）和 HCDR3：RDGGTINY（SEQ ID NO：13），轻链互补决定区的氨基酸序列为 LCDR1： RSSQSLVHSNGNTYLH（SEQ ID NO：14）、LCDR2：KVSNRFS（SEQ ID NO：15）和 LCDR3： SQSTHIPWT（SEQ ID NO：16）。

35 在 Germline 数据库中选取与 19H6 非 CDR 区匹配最好的人源化模板。然后将 19H6 的

CDR 区移植到所选择的人源化模板上，替换人源模板的 CDR 区，再与 IgG1 恒定区重组，同时以该抗体的三维结构为基础，对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基，以及对 19H6 的 VL 和 VH 的构象有重要影响的残基进行回复突变，最终选取两个人源化抗体，即 19H6-Hu 和 19H6-graft。其中，19H6-graft 的重链可变区基因序列全长 351bp，编码 117 个氨基酸残基，

5 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示；轻链可变区基因序列全长 336bp，编码 112 个氨基酸残基，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示。19H6-Hu 的重链可变区基因序列全长 351bp，编码 117 个氨基酸残基，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示；轻链可变区

10 基因序列全长 336bp，编码 112 个氨基酸残基，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示。使用与 19H6-ch 相同的恒定区，分别构建 19H6-Hu 和 19H6-graft 的重链和轻链至 pTT5 表达载体，转染 HEK-293E 细胞，纯化获取人源化抗体 19H6-Hu 和 19H6-graft，经 SDS-PAGE 电泳确定所表达抗体的分子量大小是否正确及其纯度检测，定量，分装，冻存于-80 摄氏度备用。

15 结果如图 21A 和图 21B 所示，结果表明所制备的 19H6-Hu 和 19H6-graft 分子量与预期相符且纯度在 95%以上。

5.2 人源化抗体 19H6-Hu 和 19H6-graft 对靶抗原的亲力的测定

本实施例首先通过 ELISA 的方法测定人源化抗体 19H6-Hu 和 19H6-graft 对人 HER2-ECD 的亲力。

20 实验方法参照实施例 1.2。

结果如图 22 所示，表明人源化抗体 19H6-Hu 具有与嵌合抗体 19H6-ch 相当的结合活性， EC_{50} 分别为 0.06nM 和 0.05nM，而 19H6-graft 的结合活性相对较弱，为 0.5nM。因此，选取人源化抗体 19H6-Hu 进行进一步研究开发。

25 此外，本实施例还通过 biacore 的方法测定了 19H6-Hu 对 HER2-ECD 的结合动力学，方法如下：采用捕获法，通过 ProteinA 芯片（购自 GE 公司，批号 10261132）捕获 0.5 μ g/mL 的 19H6-Hu 抗体，设置程序如下：contact time（接触时间）为 75s，flow rate（流速）为 10 μ L/min，regeneration contact time（再生接触时间）为 30s；抗原 HER2-ECD 作为分析物，设置程序如下：contact time（接触时间）为 180s，dissociation time（解离时间）为 900s，flow rate（流速）为 30 μ L/min，regeneration contact time（再生接触时间）为 30s。各分析参数如表 1 所示。

30

表 1: biacore 测定结果

样品名称	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
19H6-Hu	1.55E+05	1.11E-04	7.13E-10

5.3 人源化抗体 19H6-Hu 对靶细胞的结合亲和力的测定

本实施例通过 FACS 的方法测定人源化抗体 19H6-Hu 对乳腺癌细胞 BT474 的结合亲和力。

实验方法参照实施例 2.2。

结果如图 23 所示,结果表明 19H6-Hu 可以特异性结合乳腺癌细胞 BT474, EC_{50} 为 1.9nM, 与 19H6-ch 的活性相当。

5 5.4 人源化抗体 19H6-Hu 对靶细胞增殖抑制活性的测定

本实施例测定了人源化抗体 19H6-Hu 与 Herceptin 联用对 HER2 高表达的靶细胞 (乳腺癌细胞 BT474、乳腺癌细胞 SKBR3、胃癌细胞 NCI-N87) 增殖的抑制活性。

实验方法参照实施例 2.3。

10 结果分别如图 24、图 25 和图 26 所示,结果表明 19H6-Hu 与 1 μ g/mL 的 Herceptin 联用后,可有效的抑制乳腺癌细胞 BT474、SKBR3 和胃癌细胞 NCI-N87 的增殖,且其抑制效果明显优于 Perjeta 与 Herceptin 的联用以及 Herceptin 的单药作用,并且其对这三个肿瘤细胞增殖的抑制活性与 19H6-ch 一致,均明显的提高了 Herceptin 单药的最大抑制效果。

实施例 6 人源化抗体 19H6-Hu 的跨种属免疫反应性的测定

15 本实施例通过 ELISA 的方法测定了人源化抗体 19H6-Hu 的跨种属免疫反应性。

将食蟹猴和大鼠的 HER2-ECD 蛋白 (均购自 Sino Biological 公司,货号分别为 90295-C08H-50 和 80079-R08H-50),即 Cyno-HER2-ECD 和 Rat-HER2-ECD 按照 0.2 μ g/孔包被 96 孔 ELISA 板,测定 19H6-Hu 对这两个种属 HER2 的交叉反应,其它具体实验方法参照实施例 1.2。

20 结果如图 27 所示,表明人源化抗体 19H6-Hu 可以很好的识别食蟹猴的 HER2 蛋白, EC_{50} 为 0.1nM,而不能识别大鼠的 HER2 蛋白。

实施例 7 人源化抗体 19H6-Hu 对家族成员 HER1、HER3 和 HER4 的选择性的测定

25 本实施例通过 ELISA 的方法测定了人源化抗体 19H6-Hu 对家族成员 HER1、HER3 和 HER4 的选择性。

将人的 HER1、HER3 和 HER4 蛋白 (均购自 Sino Biological 公司,货号分别为 10001-H08H-20、10201-H08H-20 和 10363-H08H-50),按照 0.2 μ g/孔包被 96 孔 ELISA 板,测定 19H6-Hu 对 HER2 的同家族蛋白的选择性,其它具体实验方法参照实施例 1.2。

30 结果如图 28 所示,表明 19H6-Hu 对 HER1、HER3 和 HER4 均无交叉反应,这进一步的说明 19H6-Hu 是通过特异性的识别 HER2 从而引起 HER2 高表达肿瘤细胞生长的抑制。

实施例 8 人源化抗体 19H6-Hu 对肿瘤细胞的作用机制研究

本实施例采用 Western blot 的方法测定 19H6-Hu 对 HER2 下游相关信号通路的影响及 HER2/HER3 二聚化的抑制作用。

35 将对数生长期的乳腺癌细胞 BT474、SKBR3 或胃癌细胞 NCI-N87 以胰酶消化并重悬于

完全培养基中，按照 50%铺板密度将铺于 12 孔板中，于 CO₂ 细胞培养箱 37℃ 过夜培养。次日细胞贴壁后，用含 1%胎牛血清的培养基将药物稀释为特定浓度（见表 2）。移除 12 孔板中的培养基，每孔轻轻加入 2 mL 室温的无菌 PBS 洗去残余的培养基。移除 PBS，每孔缓慢加入 1mL 已配制好的不同药物，加好后轻摇 12 孔板，并置于培养箱中培养。作用 24 小时后，

5 将 12 孔板置于冰上，移除培养基，每孔轻轻加入 2 mL 无菌冰上预冷的 PBS 洗涤一次。移除 PBS，每孔加入 200μL 1×LDS (NuPAGE LDS Sample Buffer, 十二烷基硫酸锂样品缓冲液, Thermo Fisher, Cat#NP0008)，混匀后静置裂解数分钟。将孔板中的 LDS 细胞裂解液收集入离心管中，按照 v: v= 5% 的浓度加入 β-巯基乙醇，混匀后立即冻入 -80℃ 冰箱中备用或通过常规 Western blot 手段检测如下生物标志物的变化，各检测抗体来源如下：GAPDH (Cell Signal Technology, Cat#5174); p44/42 MAPK (t-ERK1/2)(Cell Signal Technology, Cat#4695); phospho p44/42 MAPK (p-ERK1/2) (Thr202/Tyr204)(Cell Signal Technology, Cat#4376); AKT (t-AKT) (Cell Signal Technology, Cat#4691); phosphoAKT (p-AKT S473) (Cell Signal Technology, Cat#4060); HER2(t-HER2)(Cell Signal Technology, Cat#2165), phospho-HER2(p-HER2 Y1248) (Cell Signal Technology, Cat#2247), HER3 (t-HER3) (Cell Signal Technology, Cat#12708);

15 phospho-HER3 (p-HER3 Y1289) (Cell Signal Technology, Cat#2842), HRP 山羊抗兔 IgG (北京博奥龙免疫技术有限公司, Cat#BF03008)。

表 2: 板布局

20

19H6-Hu_20μg/mL	19H6-Hu_5μg/mL	19H6-Hu_1μg/mL	19H6-Hu_5μg/mL+ Tras_5μg/mL
Tras_20μg/mL	Tras_5μg/mL	Tras_1μg/mL	Pert_5μg/mL +Tras_5μg/mL
Pert_20μg/mL	Pert_5μg/mL	Pert_1μg/mL	NC

Tras: 赫赛汀; Pert: 帕罗嘉; NC: 阴性对照, 未做任何抗体处理

25

结果分别如图 29、图 30 和图 31 所示, 与 NC 对照组比, Herceptin 单药能明显抑制 p-HER3 (Y1289), 并呈剂量依赖性, 另只有 Herceptin 单药能剂量依赖性的抑制 p-AKT (S473) 的磷酸化, 但不抑制 p-HER2(Y1248); 但当 19H6-Hu 和 Heceptin 联用时, 可以显著的抑制 p-HER3 (Y1289)、p-HER2 (Y1248)、p-AKT (S473) 以及 p-ERK1/2 的磷酸化信号和 t-HER2 的表达, 而 Perjeta 和 Heceptin 联用时, 只引起 p-HER3 (Y1289) 和 p-AKT (S473) 的抑制, 并且 19H6-Hu 和 Heceptin 联用对 p-AKT (S473) 以及 p-ERK1/2 的抑制作用明显优于 Perjeta 和 Heceptin 的联用。

30

为了进一步阐述 19H6-Hu 的作用机制, 分别在 BT474 和 SKBR3 细胞水平研究 19H6-Hu 对 HER2/HER3 二聚化的抑制作用。

35

分别将对数生长期的 BT474 和 SKBR3 细胞用胰酶消化重悬, 按照 50%铺板密度将细胞铺于 12 孔板中。培养箱中过夜培养, 待细胞贴壁。次日, 用无血清培养基将药物梯度稀释为

特定浓度，详见表 3。移除 12 孔板中的培养基，每孔轻轻加入 2 mL 室温的无菌 PBS 洗去残余的培养基。移除 PBS，每孔按照下述板布局缓慢加入 1mL 已配制好的不同药物或无血清培养基，加好后轻摇 12 孔板，于细胞培养箱中培养。作用 2 小时后，NC 孔补齐 1mL 无血清培养基，其他孔分别加入 1mL 事先用无血清培养基配制好的 4nM HRG (Heregulin, 神经调节蛋白, 购自 R&D, Cat#396-HB-050), 使 HRG 最终作用浓度为 2nM。于培养箱中作用 15min 后, 将 12 孔板置于冰上, 移除各孔培养液, 每孔轻轻加入 2 mL 冰上预冷的无菌 PBS 洗涤。移除 PBS, 每孔加入 400 μ L 预冷的 IP 细胞裂解液 (购自碧云天, Cat#P0013), 混匀后冰上裂解 5-10min, 镜下观察细胞裂解完全后, 收集裂解液, 于 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 收集上清至干净的 EP 管中, 并分别与 100mM 的 Herceptin 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 然后每管加入 5%BSA 封闭过夜的 20 μ L Protein A/G PLUS-Agarose (beads, 购自 Santa cruz biotechnology, Cat#sc-2003), 用 IP 细胞裂解液补至终体积为 800 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日, 将各样品取出于 4 $^{\circ}$ C 2,000 rpm 离心 6 min, 弃上清, 收集各 beads, 并以预冷的 PBS 洗涤各 beads 两次。每个样品加入 80 μ L 的 1 \times LDS (购自 Invitrogen, Cat#NP0008), 并按照 v: v=5% 的浓度加入 β -巯基乙醇, 轻弹混匀后于 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 以使结合在 beads 的蛋白脱落, 稍待稍冷却, 于 12,000 rpm 离心 5 min, 备用上样, 通过常规的 Western blot 手段检测各生物标志物。

表 3: 板布局

NC1: no mAb, no HRG	19H6-Hu_100nM	19H6-Hu_50nM+ Tras_50nM
PC1: only HRG	Tras_100nM	Tras_50nM + Pert_50nM
NC2: no mAb, no HRG	Pert_100nM	PC2: only HRG

结果分别如图 32 和图 33 所示, 在 SKBR3 和 BT474 这两个细胞株上均观察到, 19H6-Hu 单药作用后 p-HER3(Y1289)和 t-HER3 通过 HER2 被免疫共沉淀的量与阳性对照组 (PC) 相比均未见明显变化, 而 Perjeta 则使 p-HER3(Y1289)和 t-HER3 的量显著下调, Herceptin 只有微调作用, 这说明 19H6-Hu 与 Perjeta 的作用机制不同, 后者可以显著抑制 HER2/HER3 的二聚化。但 19H6-Hu 与 Herceptin 联用后对 HER2/HER3 二聚化的抑制作用与 Perjeta 单用及其与 Herceptin 联用的药效相当。

实施例 9 人源化抗体 19H6-Hu 的体内药效活性测定

本实施例分别测定了 19H6-Hu 与 Herceptin 联用在 NCI-N87 和 HCC1954 移植瘤模型上的抗肿瘤作用。

实验用 BALB/c 裸小鼠, 雌性, 40-45 日龄, 体重 18-20g, 购自上海灵畅生物科技有限公司。

收集对数生长期的 NCI-N87 和 HCC1954 细胞, 将细胞浓度调整为 16×10^7 /mL 重悬于无血清培养基中, 并分别与基质胶 1:1 混合, 在无菌条件下, 接种 100 μ L 细胞悬液于裸小鼠背

部皮下，即 8×10^6 /只。用游标卡尺测量移植瘤长与宽，计算肿瘤体积，待肿瘤生长至 100-200 mm^3 后将动物随机分组。按照图 34 和图 35 中所示剂量进行腹腔给药，给药体积为 0.2mL/鼠 (20g)，给药周期为每周 2 次，共 6 次。设置对照组给以同等剂量的同型对照抗体 (Isotype control)。

- 5 实验过程中，每周测量 2 次移植瘤体积，同时对小鼠称重，记录。肿瘤体积(tumor volume ,TV)的计算公式为： $TV = 1/2 \times \text{长} \times \text{宽}^2$ 。抑瘤率 (TGI) $= (1 - \text{实验组肿瘤体积} / \text{对照组肿瘤体积}) \times 100\%$ 。经统计学分析，* 即 $p \leq 0.05$ 为有效，*** 即 $p \leq 0.001$ 。

结果如图 34 所示，NCI-N87 为 Herceptin (赫赛汀) 敏感模型，因此，在 Herceptin 单药 20mg/kg 剂量时，TGI 为 63.14%， $p < 0.05$ ；但当 Herceptin 与 19H6-Hu 联用剂量为 10mg/kg +10mg/kg 时，抑瘤效果更为显著，TGI 为 86.31%， $p < 0.001$ ，其药效与同等联用剂量下的 Herceptin 和 Perjeta (帕罗嘉) 相当，后者的 TGI 为 91.71%， $p < 0.001$ 。

10 结果如图 35 所示，HCC1954 为 Herceptin (赫赛汀) 不敏感模型，因此，在 Herceptin 单药 15mg/kg 剂量时，几乎无效，TGI 为 4.67%， $p > 0.05$ ；但当 Herceptin 与 19H6-Hu 联用剂量为 5mg/kg +5mg/kg 时，抑瘤效果相对显著，TGI 为 59.74%， $p < 0.05$ ，并且其药效优于同等联用剂量下的 Herceptin 和 Perjeta (帕罗嘉)，后者的 TGI 为 48.05%。

15 在实验过程中，实验动物体重均未出现明显下降，也未发现任何其他毒副作用。这说明 Herceptin 与 19H6-Hu 联用后，19H6-Hu 可以显著增强 Herceptin 的最大抑瘤效果。

权利要求书

1、结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，其结合的人 HER2 表位位于人 HER2 的胞外域的第三个功能结构域 DIII 内且包括下列氨基酸残基中的一个或多个：SEQ ID NO: 1 的 D502、V505、E507 或 L509。

5 2、如权利要求 1 所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的人 HER2 表位包括选自以下组的氨基酸残基：

(a) SEQ ID NO: 1 的 D502；

(b) SEQ ID NO: 1 的 V505；

(c) SEQ ID NO: 1 的 E507；

10 (d) SEQ ID NO: 1 的 L509；

(e) SEQ ID NO: 1 的 D502 和 V505；

(f) SEQ ID NO: 1 的 D502 和 E507；

(g) SEQ ID NO: 1 的 D502 和 L509；

(h) SEQ ID NO: 1 的 V505 和 E507；

15 (i) SEQ ID NO: 1 的 V505 和 L509；

(j) SEQ ID NO: 1 的 E507 和 L509；

(k) SEQ ID NO: 1 的 D502、V505 和 E507；

(l) SEQ ID NO: 1 的 D502、V505 和 L509；

(m) SEQ ID NO: 1 的 V505、E507 和 L509；和

20 (n) SEQ ID NO: 1 的 D502、V505、E507 和 L509。

3、结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，其结合的人 HER2 表位位于人 HER2 的胞外域的第三个功能结构域 DIII 内且具有如 SEQ ID NO: 1 的第 499-510 位所示的氨基酸序列。

4、如权利要求 1-3 中任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，
25 所述的人 HER2 的胞外域的第三个功能结构域 DIII 具有如 SEQ ID NO: 1 的第 343-510 位所示的氨基酸序列。

5、结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，包括：

(a) 重链互补决定区 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述的 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示，所述的 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示，所述的 HCDR3 的
30 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示，和

(b) 轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2、LCDR3，所述的 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示，所述的 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示，所述的 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示。

6、如权利要求 1-5 中任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，
35 所述的抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

7、如权利要求 1-5 中任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的抗体为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

8、如权利要求 1-5 中任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的抗原结合片段包括 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、单链抗体或单域抗体。

5 9、如权利要求 1-5 中任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段能够抑制 HER2 过表达的肿瘤细胞增殖。

10、如权利要求 9 所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的肿瘤细胞包括乳腺癌细胞 BT474、乳腺癌细胞 SKBR3、胃癌细胞 NCI-N87、乳腺癌细胞 HCC1954。

10 11、如权利要求 1-5 中任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示；或所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示；或所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示。

12、如权利要求 11 所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的重链的恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，轻链的恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

20 13、一种分离的核苷酸，其特征在于，所述的核苷酸编码如权利要求 1-12 中任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段。

14、如权利要求 13 所述的核苷酸，其特征在于，所述的核苷酸具有如 SEQ ID NO: 4 所示的编码重链可变区的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 6 所示的编码轻链可变区的核苷酸序列；或所述的核苷酸具有如 SEQ ID NO: 18 所示的编码重链可变区的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 20 所示的编码轻链可变区的核苷酸序列；或所述的核苷酸具有如 SEQ ID NO: 22 所示的编码重链可变区的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 24 所示的编码轻链可变区的核苷酸序列。

15、如权利要求 13 或 14 所述的核苷酸，其特征在于，所述的核苷酸具有如 SEQ ID NO: 8 所示的编码重链的恒定区的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 10 所示的编码轻链的恒定区的核苷酸序列。

30 16、一种表达载体，其特征在于，所述的表达载体含有如权利要求 13-15 中任一项所述的核苷酸。

17、一种宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞含有如权利要求 16 所述的表达载体。

18、如权利要求 1-12 中任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段的制备方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

35 (a) 在表达条件下，培养如权利要求 17 所述的宿主细胞，从而表达所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段；

(b) 分离并纯化 (a) 所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段。

19、一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有如权利要求 1-12 中任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

20、如权利要求 19 所述的药物组合物，其特征在于，还包括第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段。

21、如权利要求 20 所述的药物组合物，其特征在于，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段不与人 HER2 胞外域的第三个功能结构域 DIII 结合，所述的第三个功能结构域 DIII 具有如 SEQ ID NO: 1 的第 343-510 位所示的氨基酸序列。

22、如权利要求 20 所述的药物组合物，其特征在于，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段与人 HER2 胞外域的第四个功能结构域 DIV 结合，所述的第四个功能结构域 DIV 具有如 SEQ ID NO: 1 的第 511-582 位所示的氨基酸序列。

23、如权利要求 20 所述的药物组合物，其特征在于，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。

24、如权利要求 20-23 中任一项所述的药物组合物，其特征在于，所述的第二结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段为曲妥珠单抗。

25、如权利要求 1-12 中任一项所述的结合人 HER2 的抗体或其抗原结合片段或如权利要求 19-24 中任一项所述的药物组合物在制备治疗 HER2 过表达的疾病的药物中的用途。

26、如权利要求 25 所述的用途，其特征在于，所述的 HER2 过表达的疾病为癌症。

27、如权利要求 26 所述的用途，其特征在于，所述的癌症包括乳腺癌、胃癌或卵巢癌。

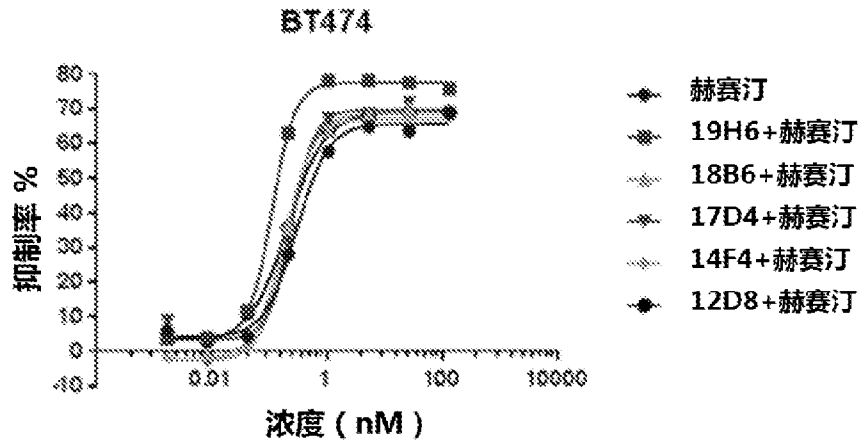


图 1A

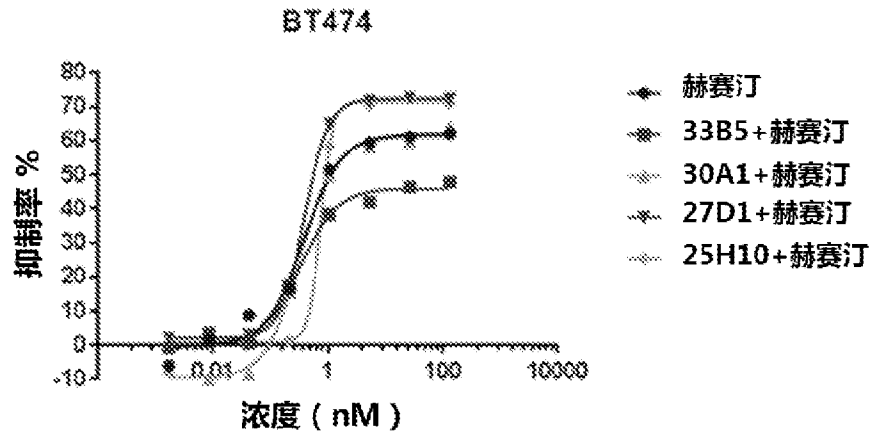


图 1B

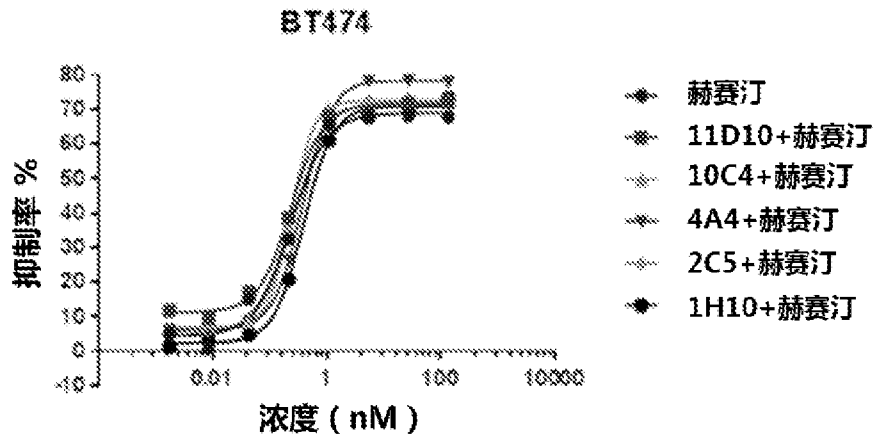


图 1C

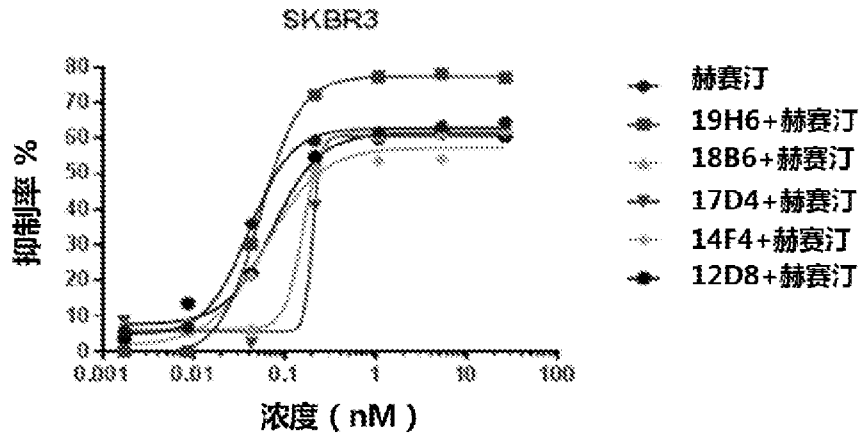


图 2A

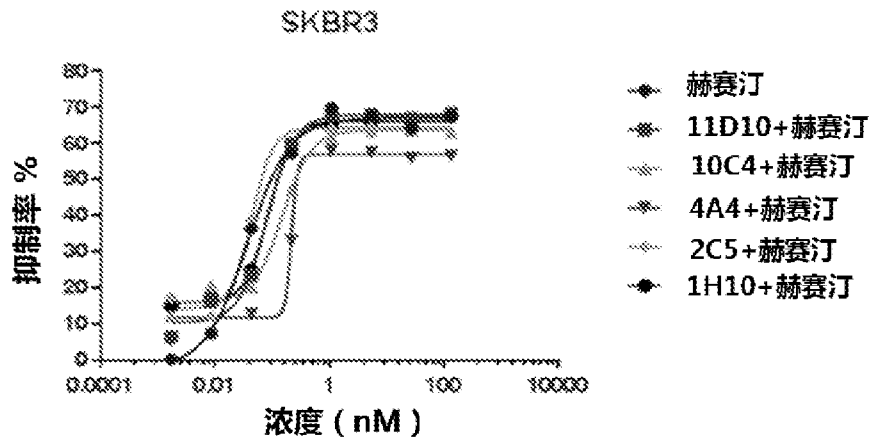


图 2B

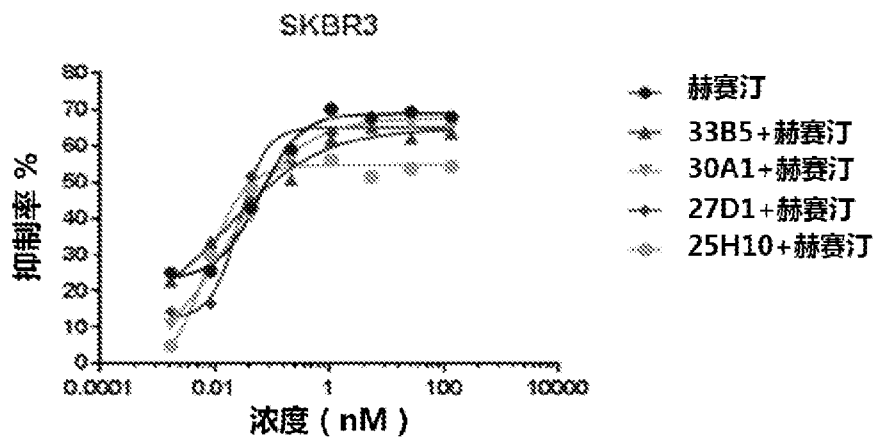


图 2C

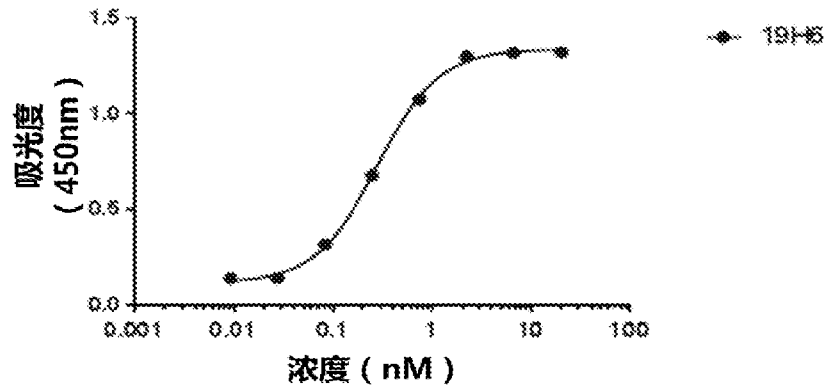


图 3

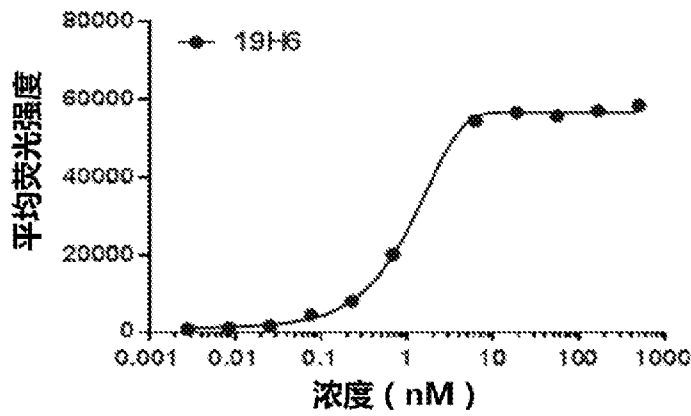


图 4

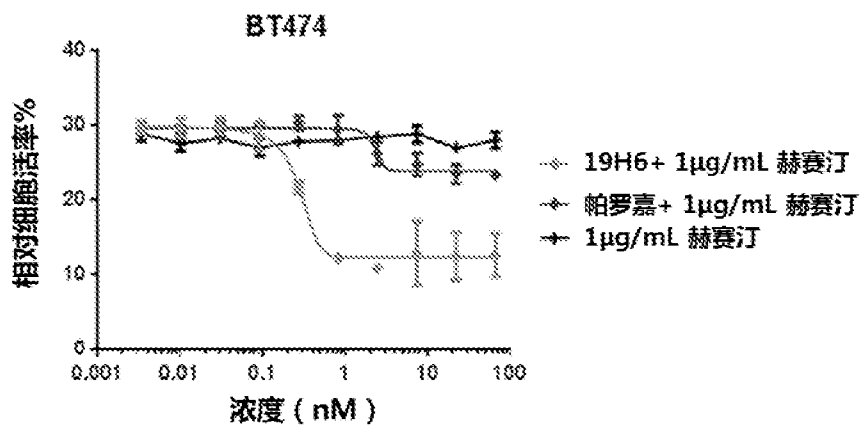


图 5

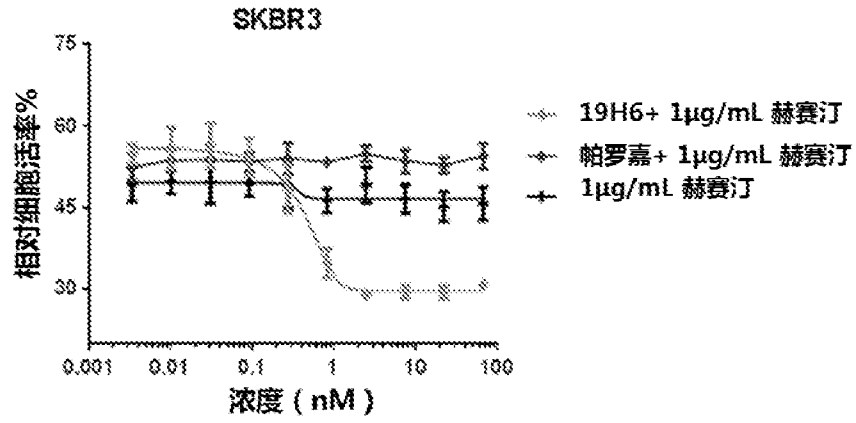


图 6

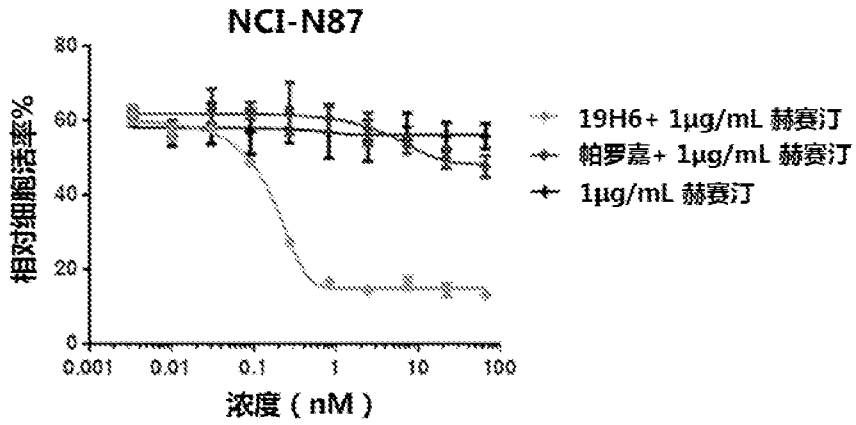


图 7

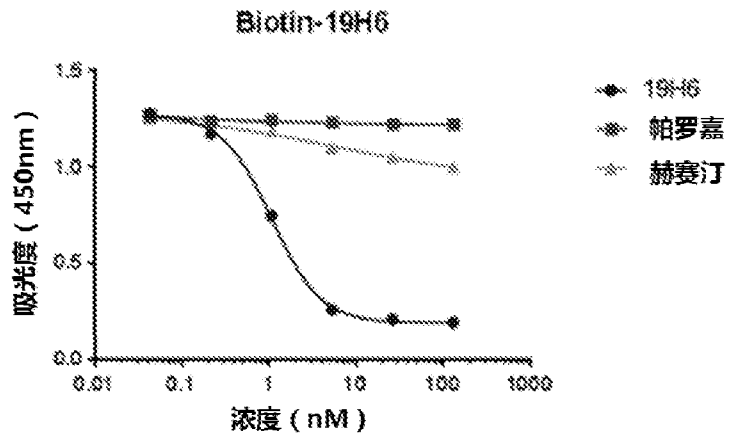


图 8A

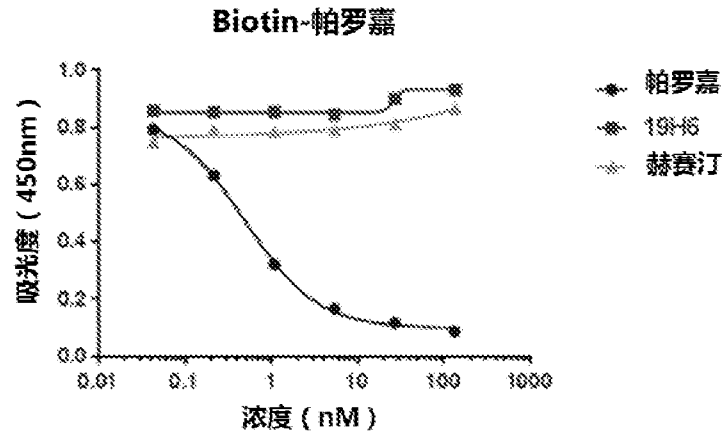


图 8B

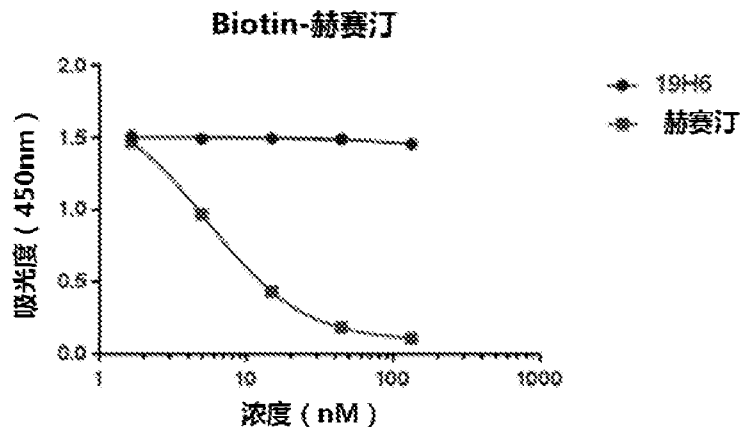


图 8C

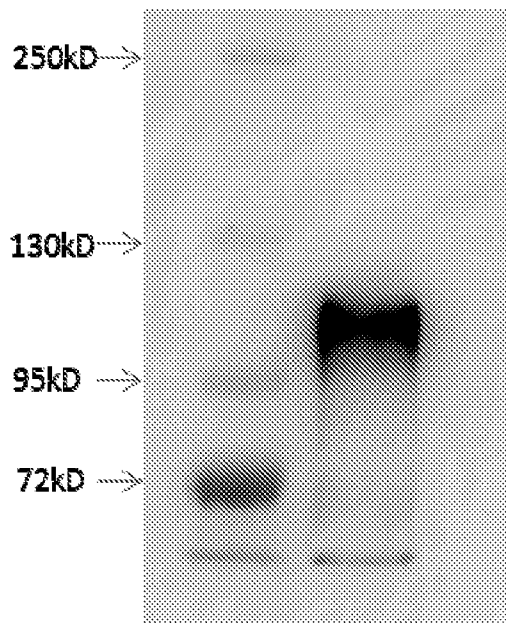


图 9

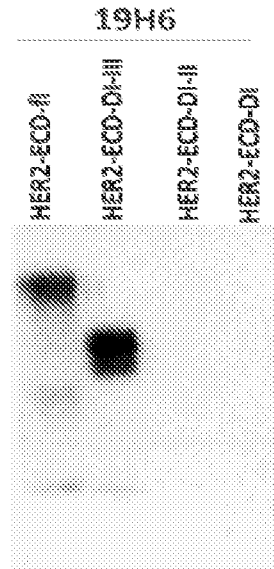


图 10A

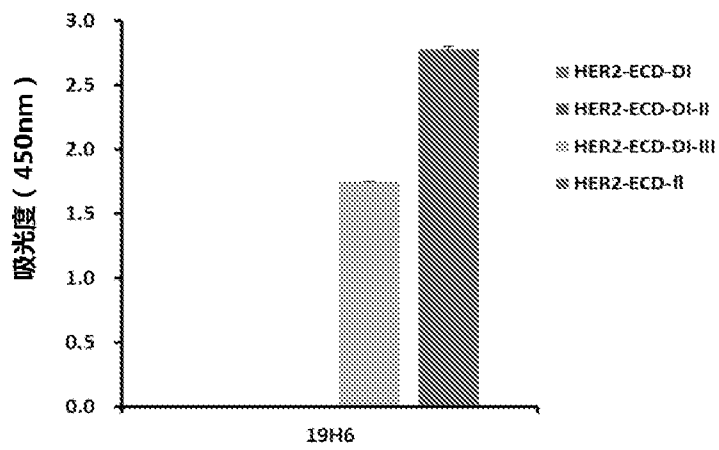


图 10B

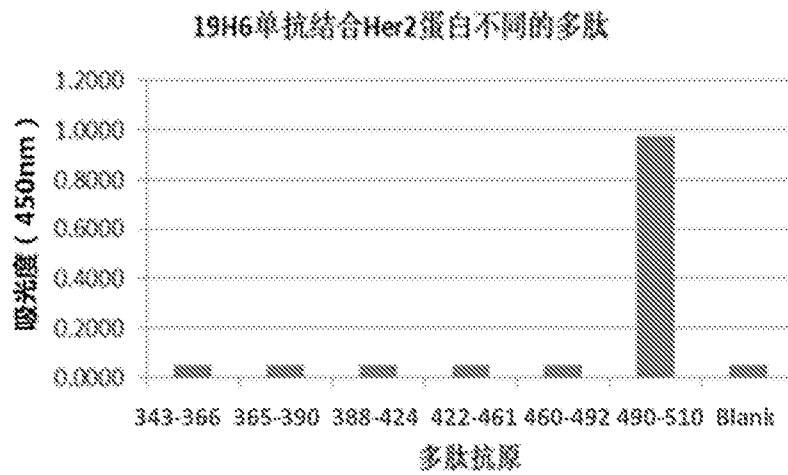


图 11

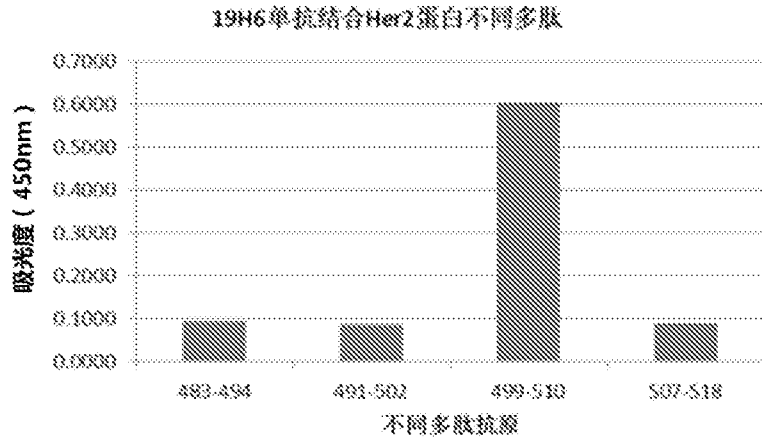


图 12

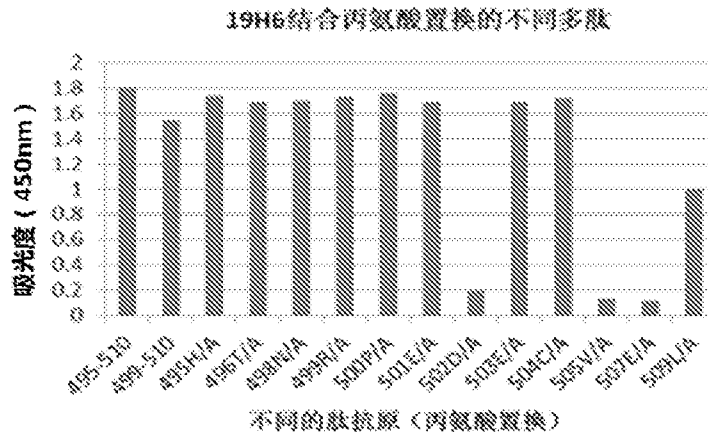


图 13

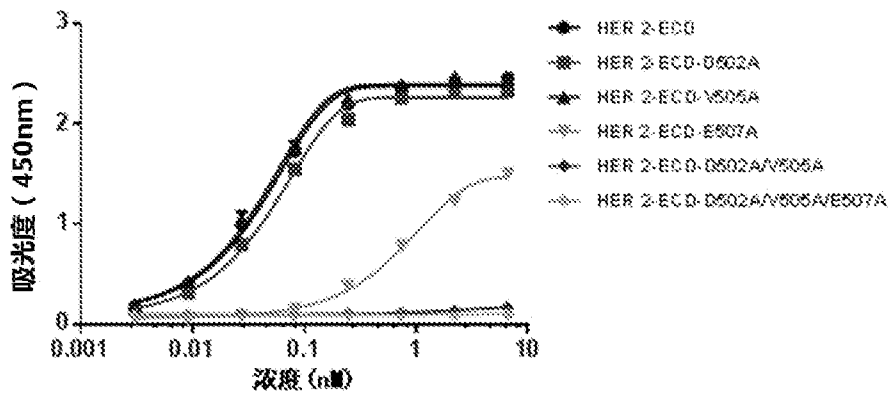


图 14

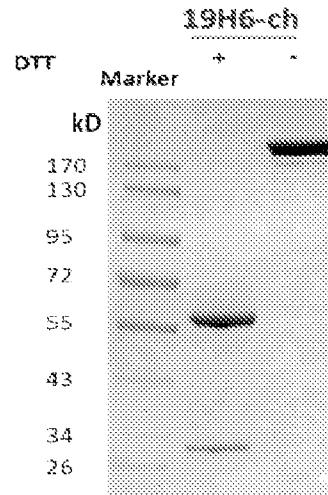


图 15

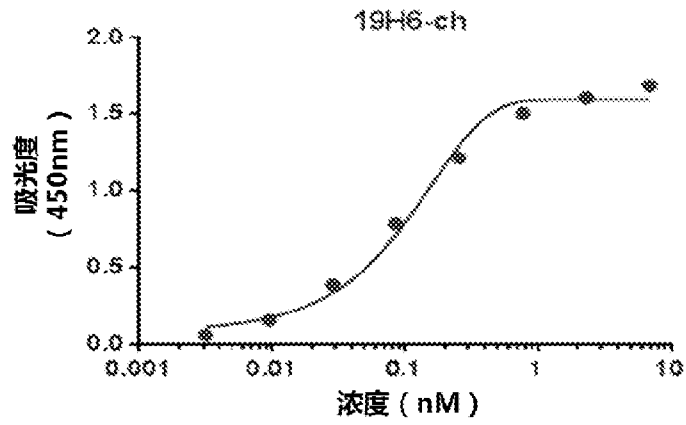


图 16

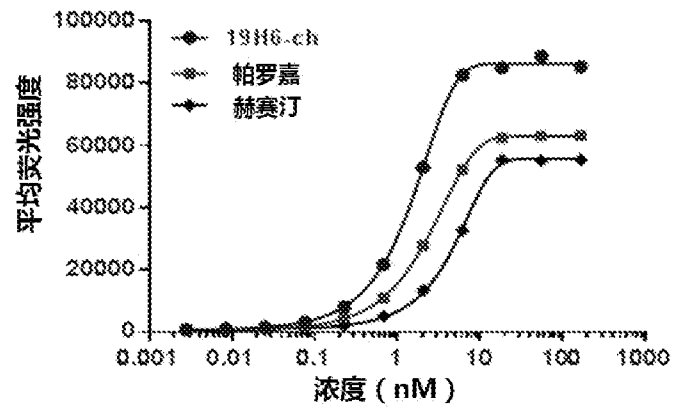


图 17

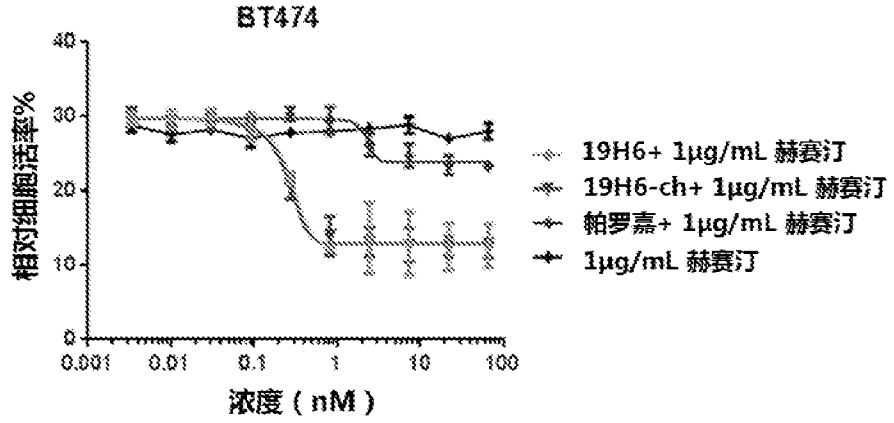


图 18

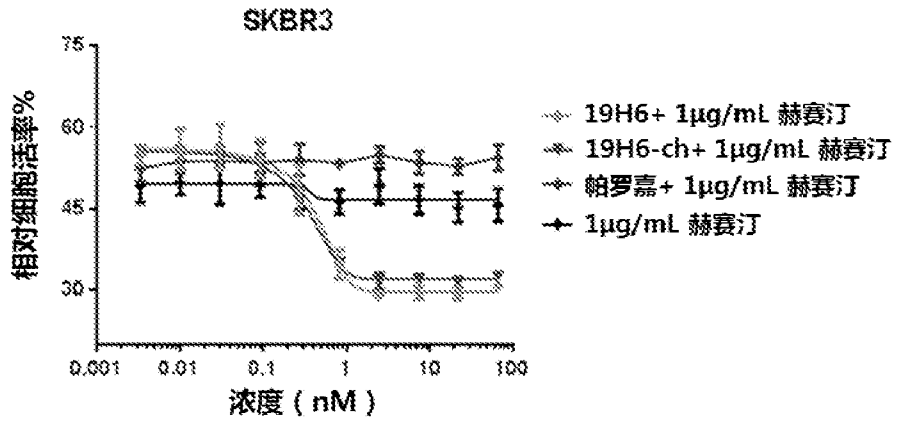


图 19

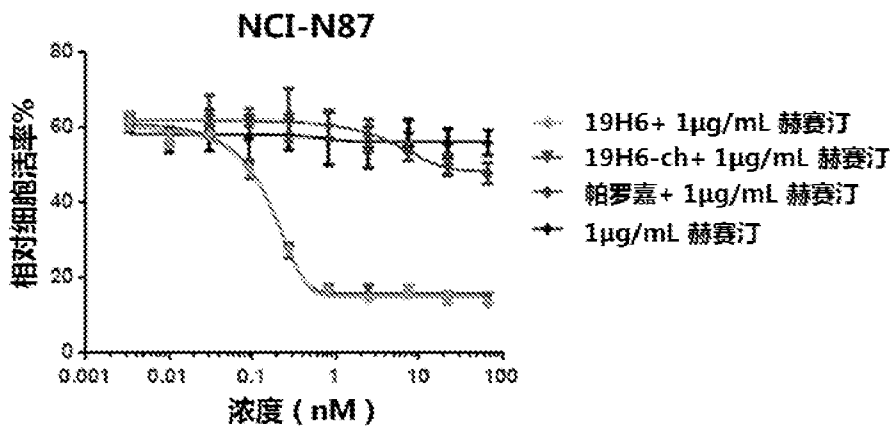


图 20

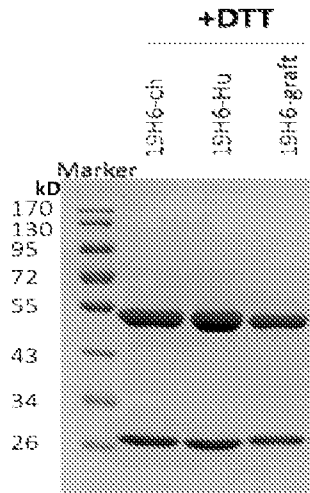


图 21A

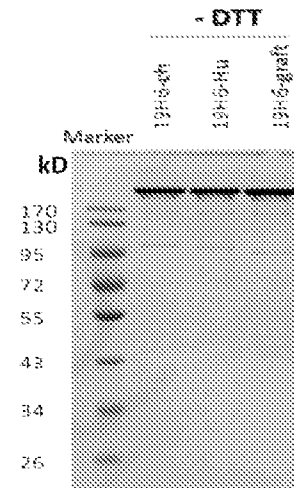


图 21B

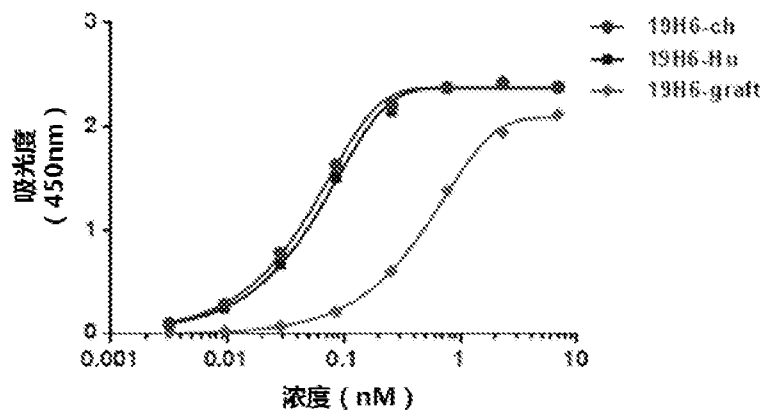


图 22

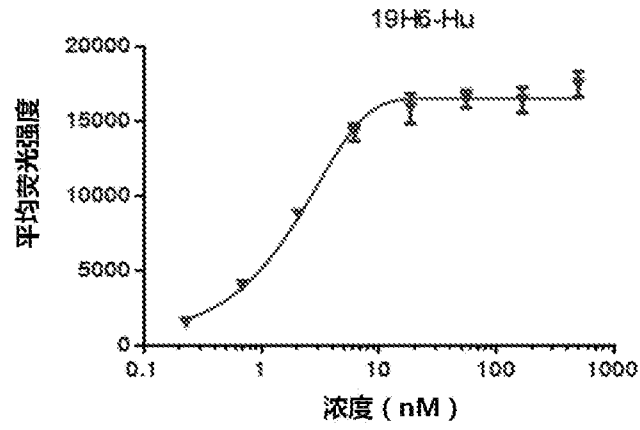


图 23

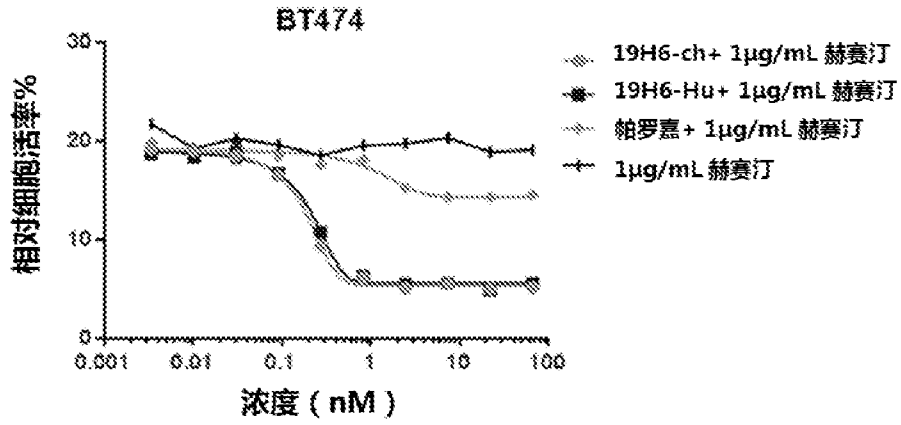


图 24

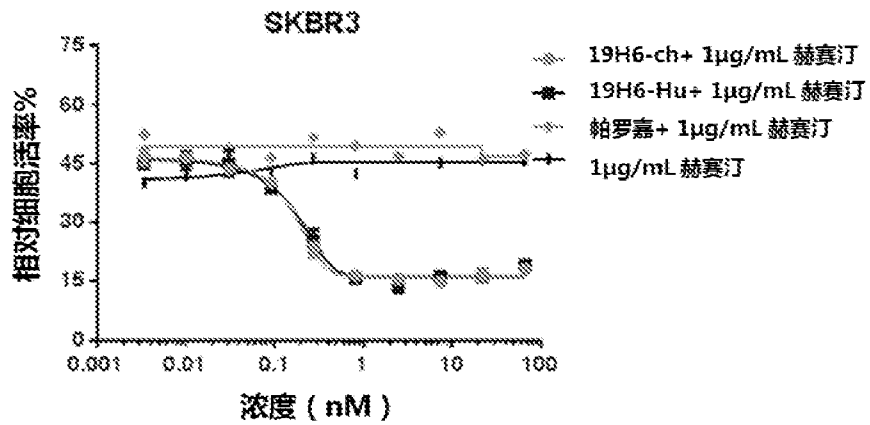


图 25

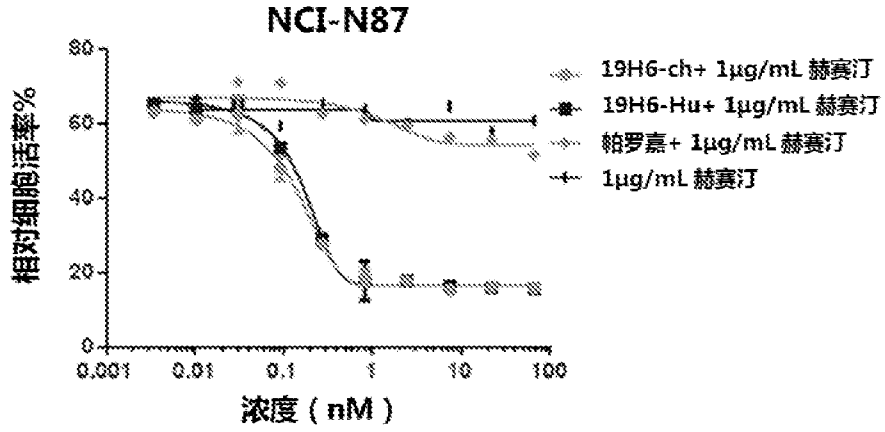


图 26

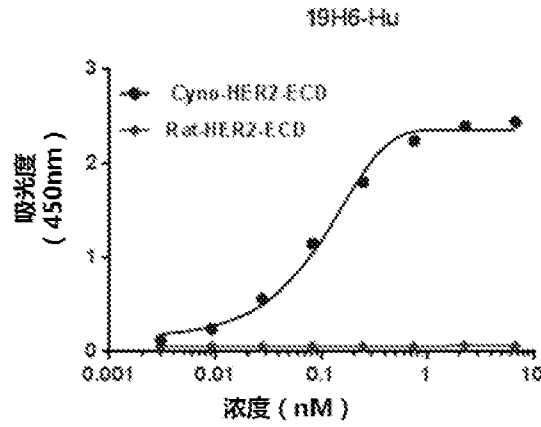


图 27

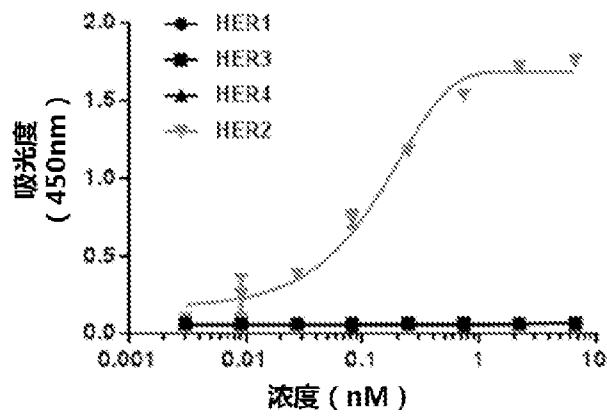


图 28

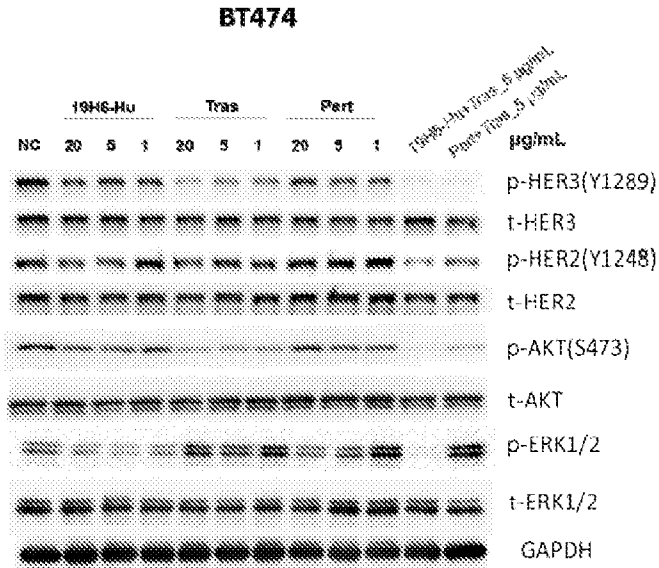


图 29

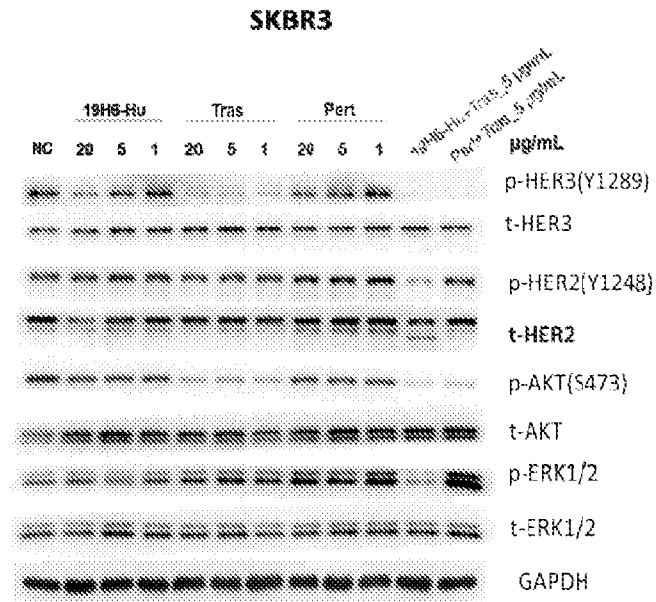


图 30

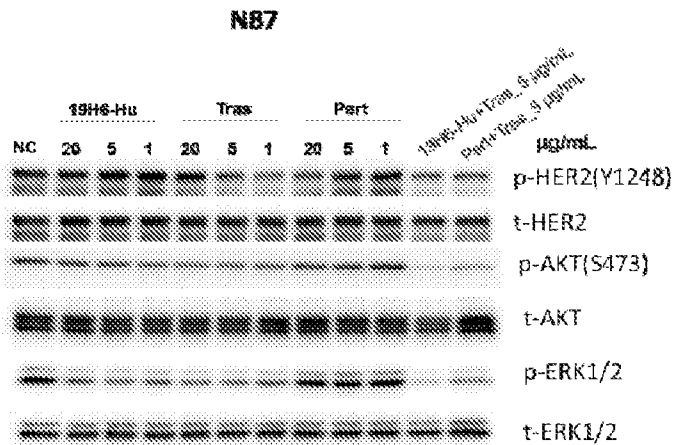


图 31

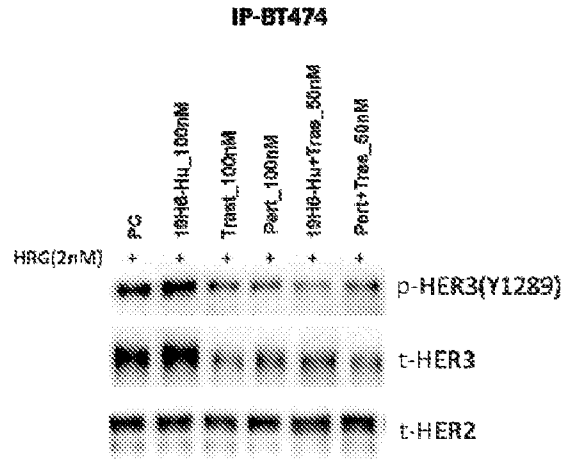


图 32

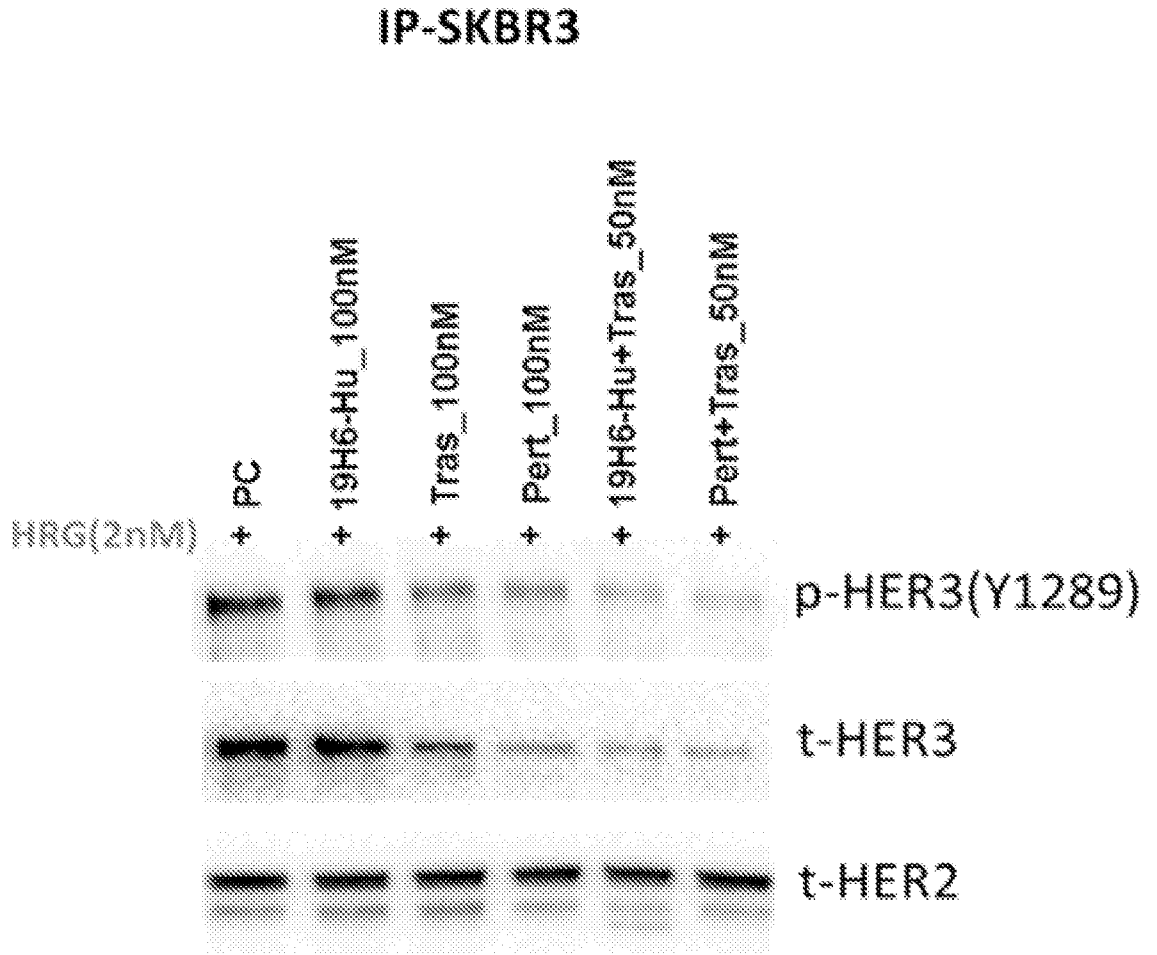


图 33

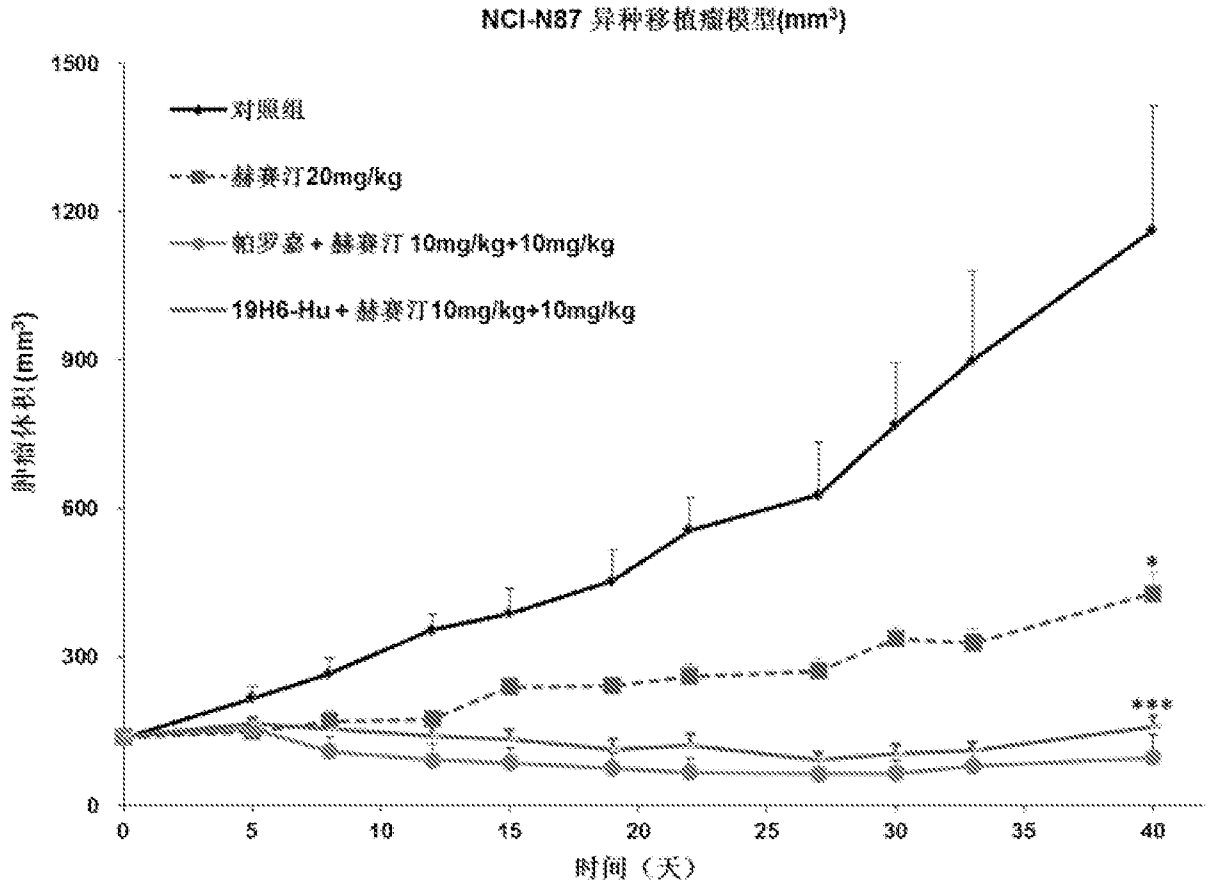


图 34

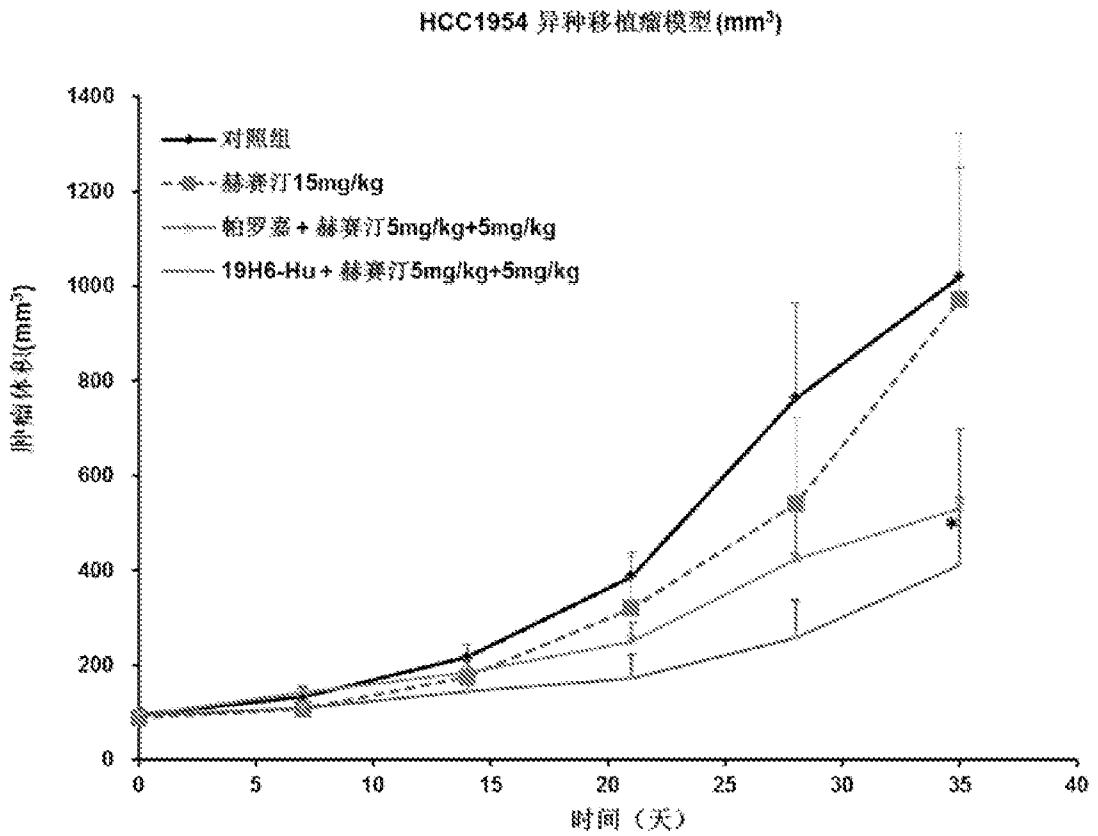


图 35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/098793

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DWPI, CNABS, 百度, BAIDU, 谷歌学术, GOOGLE, CNKI, 万方, WANFANG, WEB OF SCIENCE, NCBI, EBI: 人EGF受体2, 人表皮生长因子受体2, 抗体, 亲和配体, 抗原结合体, 表位, 胞外域, 癌症, 肿瘤, 赫赛汀, 曲妥珠单抗, HER2, HER-2, ERBB2, C-ERBB2, BER2, Human epidermal growth factor receptor 2, Herceptin, Trastuzumab, antibody, antigen binding moieties, epitope, extracellular domain, ECD, Domain III, domain 3, SEQ ID NO: 1的490-510氨基酸, 490-510 amino acids of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3-26		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	傅文燕 (FU, Wenyan). "新型全人抗HER2抗体的制备、优化、及抗肿瘤作用研究 (Construction, Optimization and Characterizat of Novel anti-HER2 Antibody for Cancer Therapy)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑 (Medicine and Health Science, China Master's Theses Full-Text Database), No. 01, 15 January 2016 (2016-01-15), abstract, and the main body, pp. 5, 6, 18-28, 33, 35-41, and 68	1, 2, 4, 6-10, 13, 15-19, 25-27
Y	傅文燕 (FU, Wenyan). "新型全人抗HER2抗体的制备、优化、及抗肿瘤作用研究 (Construction, Optimization and Characterizat of Novel anti-HER2 Antibody for Cancer Therapy)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑 (Medicine and Health Science, China Master's Theses Full-Text Database), No. 01, 15 January 2016 (2016-01-15), abstract, and the main body, pp. 5, 6, 18-28, 33, 35-41, and 68	20-27
X	FISHER, R. D. et al. "Structure of the Complex between HER2 and an Antibody Paratope Formed by Side Chains from Tryptophan and Serine" <i>J.Mol.Biol.</i> , Vol. 402, 21 July 2010 (2010-07-21), abstract, figure 1a, and p. 226, left column, paragraph 2, lines 5-10	1, 2, 4, 6-10, 13, 15-18
<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 "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 11 October 2019	Date of mailing of the international search report 28 October 2019	
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China	Authorized officer	
Facsimile No. (86-10)62019451	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/098793

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FISHER, R. D. et al. "Structure of the Complex between HER2 and an Antibody Paratope Formed by Side Chains from Tryptophan and Serine" <i>J.Mol.Biol.</i> , Vol. 402, 21 July 2010 (2010-07-21), abstract, figure 1a, and p. 226, left column, paragraph 2, lines 5-10	19-27
X	MANIJEH, M. et al. "Linear and Conformational B Cell Epitope Prediction of the HER 2 ECD-Subdomain III by in silico Methods" <i>Asian Pacific J. Cancer Prev.</i> , Vol. 13, 31 December 2012 (2012-12-31), abstract, table 1, and p. 3053, left column, and first paragraph	1-4, 6-10, 13, 15-18
Y	MANIJEH, M. et al. "Linear and Conformational B Cell Epitope Prediction of the HER 2 ECD-Subdomain III by in silico Methods" <i>Asian Pacific J. Cancer Prev.</i> , Vol. 13, 31 December 2012 (2012-12-31), abstract, table 1, and p. 3053, left column, and first paragraph	19-27
X	周珠哈等 (ZHOU, Zhuha et al.). "人类表皮生长因子受体2的B细胞表位初步预测分析 (Initial Prediction of Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 B Cell Epitope)" <i>中国全科医学 (Chinese General Practice)</i> , No. 05, 31 December 2010 (2010-12-31), abstract, and table 4	1, 2, 4, 6-10, 13, 15-18
Y	CN 104530236 A (GENOR BIOPHARMA CO., LTD.) 22 April 2015 (2015-04-22) claims 1-12, and embodiments 8-19	19-27
Y	CN 105829346 A (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) 03 August 2016 (2016-08-03) description, paragraphs 297-308, and figures 1-3	23
A	EP 2719706 A1 (UNIV. ZUERICH) 16 April 2014 (2014-04-16) entire document	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/098793

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104530236	A	22 April 2015	None			
CN	105829346	A	03 August 2016	RU	2683780	C2	02 April 2019
				EP	3101032	A4	06 September 2017
				PH	12016500904	A1	11 July 2016
				CN	105829346	B	23 August 2019
				JP	2017095457	A	01 June 2017
				JP	2017105789	A	15 June 2017
				KR	101916553	B1	07 November 2018
				SG	10201800210T	A	27 February 2018
				TW	201613649	A	16 April 2016
				SG	11201603960X	A	28 July 2016
				RU	2016123597	A	02 March 2018
				WO	2015115091	A1	06 August 2015
				IL	245252	D0	30 June 2016
				JP	2019112403	A	11 July 2019
				CA	2928794	C	13 August 2019
				LT	3101032	T	25 March 2019
				US	2019077880	A1	14 March 2019
				EP	3101032	B1	16 January 2019
				KR	20180122038	A	09 November 2018
				US	10155821	B2	18 December 2018
				CA	2928794	A1	06 August 2015
				IL	245252	A	30 June 2019
				JP	5998289	B2	28 September 2016
				MX	2016006498	A	04 August 2016
				IL	266790	D0	31 July 2019
				JP	2017036285	A	16 February 2017
				DK	3101032	T3	29 April 2019
				EP	3466976	A1	10 April 2019
				JP	6466895	B2	06 February 2019
				US	2016333112	A1	17 November 2016
				ZA	201602802	B	27 September 2017
				TW	I661839	B	11 June 2019
				RS	58415	B1	30 April 2019
				HR	P20190431	T1	19 April 2019
				SI	3101032	T1	28 February 2019
				JP	6046301	B1	14 December 2016
				EP	3101032	A1	07 December 2016
				JP	WO2015115091	A1	23 March 2017
				KR	20160113099	A	28 September 2016
				RU	2019107788	A	17 May 2019
				TW	201834692	A	01 October 2018
				JP	6105183	B1	29 March 2017
				TW	I627967	B	01 July 2018
				RU	2016123597	A3	12 October 2018
EP	2719706	A1	16 April 2014	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/098793

<p>A. 主题的分类 C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(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) C07K; A61K; 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)) DWPI, CNABS, 百度, 谷歌学术, CNKI, 万方, WEB OF SCIENCE, NCBI, EBI: 人EGF受体2, 人表皮生长因子受体2, 抗体, 亲和配体, 抗原结合体, 表位, 胞外域, 癌症, 肿瘤, 赫赛汀, 曲妥珠单抗, HER2, HER-2, ERBB2, C-ERBB2, BER2, Human epidermal growth factor receptor 2, Herceptin, Trastuzumab, antibody, antigen binding moieties, epitope, extracellular domain, ECD, Domain III, domain 3, SEQ ID NO:1的490-510氨基酸, SEQ ID NO:3-26</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>傅文燕. "新型全人抗HER2抗体的制备、优化、及抗肿瘤作用研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑, 第01期, 2016年 1月 15日 (2016 - 01 - 15), 摘要, 正文第5-6, 18-28, 33, 35-41, 68页</td> <td>1-2、4、6-10、13、15-19、25-27</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>傅文燕. "新型全人抗HER2抗体的制备、优化、及抗肿瘤作用研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑, 第01期, 2016年 1月 15日 (2016 - 01 - 15), 摘要, 正文第5-6, 18-28, 33, 35-41, 68页</td> <td>20-27</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>FISHER, R.D. et al. "Structure of the Complex between HER2 and an Antibody Paratope Formed by Side Chains from Tryptophan and Serine" J.Mol.Biol., 第402卷, 2010年 7月 21日 (2010 - 07 - 21), 摘要, 图1a, 第226页左栏第2段5-10行</td> <td>1-2、4、6-10、13、15-18</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>FISHER, R.D. et al. "Structure of the Complex between HER2 and an Antibody Paratope Formed by Side Chains from Tryptophan and Serine" J.Mol.Biol., 第402卷, 2010年 7月 21日 (2010 - 07 - 21), 摘要, 图1a, 第226页左栏第2段5-10行</td> <td>19-27</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	傅文燕. "新型全人抗HER2抗体的制备、优化、及抗肿瘤作用研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑, 第01期, 2016年 1月 15日 (2016 - 01 - 15), 摘要, 正文第5-6, 18-28, 33, 35-41, 68页	1-2、4、6-10、13、15-19、25-27	Y	傅文燕. "新型全人抗HER2抗体的制备、优化、及抗肿瘤作用研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑, 第01期, 2016年 1月 15日 (2016 - 01 - 15), 摘要, 正文第5-6, 18-28, 33, 35-41, 68页	20-27	X	FISHER, R.D. et al. "Structure of the Complex between HER2 and an Antibody Paratope Formed by Side Chains from Tryptophan and Serine" J.Mol.Biol., 第402卷, 2010年 7月 21日 (2010 - 07 - 21), 摘要, 图1a, 第226页左栏第2段5-10行	1-2、4、6-10、13、15-18	Y	FISHER, R.D. et al. "Structure of the Complex between HER2 and an Antibody Paratope Formed by Side Chains from Tryptophan and Serine" J.Mol.Biol., 第402卷, 2010年 7月 21日 (2010 - 07 - 21), 摘要, 图1a, 第226页左栏第2段5-10行	19-27
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	傅文燕. "新型全人抗HER2抗体的制备、优化、及抗肿瘤作用研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑, 第01期, 2016年 1月 15日 (2016 - 01 - 15), 摘要, 正文第5-6, 18-28, 33, 35-41, 68页	1-2、4、6-10、13、15-19、25-27															
Y	傅文燕. "新型全人抗HER2抗体的制备、优化、及抗肿瘤作用研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑, 第01期, 2016年 1月 15日 (2016 - 01 - 15), 摘要, 正文第5-6, 18-28, 33, 35-41, 68页	20-27															
X	FISHER, R.D. et al. "Structure of the Complex between HER2 and an Antibody Paratope Formed by Side Chains from Tryptophan and Serine" J.Mol.Biol., 第402卷, 2010年 7月 21日 (2010 - 07 - 21), 摘要, 图1a, 第226页左栏第2段5-10行	1-2、4、6-10、13、15-18															
Y	FISHER, R.D. et al. "Structure of the Complex between HER2 and an Antibody Paratope Formed by Side Chains from Tryptophan and Serine" J.Mol.Biol., 第402卷, 2010年 7月 21日 (2010 - 07 - 21), 摘要, 图1a, 第226页左栏第2段5-10行	19-27															
<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: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</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 "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</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2019年 10月 11日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2019年 10月 28日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>李影</p> <p>电话号码 (86-10)53961973</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
X	MANIJEH, M. et al. "Linear and Conformational B Cell Epitope Prediction of the HER 2 ECD-Subdomain III by in silico Methods" Asian Pacific J. Cancer Prev., 第13卷, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 摘要, 表1, 第3053页左栏第1段	1-4、6-10、 13、15-18
Y	MANIJEH, M. et al. "Linear and Conformational B Cell Epitope Prediction of the HER 2 ECD-Subdomain III by in silico Methods" Asian Pacific J. Cancer Prev., 第13卷, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 摘要, 表1, 第3053页左栏第1段	19-27
X	周珠哈等. "人类表皮生长因子受体2的B细胞表位初步预测分析" 中国全科医学, 第05期, 2010年 12月 31日 (2010 - 12 - 31), 摘要, 表4	1-2、4、6- 10、13、15-18
Y	CN 104530236 A (嘉和生物药业有限公司) 2015年 4月 22日 (2015 - 04 - 22) 权利要求1-12, 实施例8-19	19-27
Y	CN 105829346 A (第一三共株式会社) 2016年 8月 3日 (2016 - 08 - 03) 说明书第297-308段, 图1-3	23
A	EP 2719706 A1 (UNIV. ZUERICH) 2014年 4月 16日 (2014 - 04 - 16) 全文	1-27

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/098793

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	104530236	A	2015年 4月 22日	无			
CN	105829346	A	2016年 8月 3日	RU	2683780	C2	2019年 4月 2日
				EP	3101032	A4	2017年 9月 6日
				PH	12016500904	A1	2016年 7月 11日
				CN	105829346	B	2019年 8月 23日
				JP	2017095457	A	2017年 6月 1日
				JP	2017105789	A	2017年 6月 15日
				KR	101916553	B1	2018年 11月 7日
				SG	10201800210T	A	2018年 2月 27日
				TW	201613649	A	2016年 4月 16日
				SG	11201603960X	A	2016年 7月 28日
				RU	2016123597	A	2018年 3月 2日
				WO	2015115091	A1	2015年 8月 6日
				IL	245252	D0	2016年 6月 30日
				JP	2019112403	A	2019年 7月 11日
				CA	2928794	C	2019年 8月 13日
				LT	3101032	T	2019年 3月 25日
				US	2019077880	A1	2019年 3月 14日
				EP	3101032	B1	2019年 1月 16日
				KR	20180122038	A	2018年 11月 9日
				US	10155821	B2	2018年 12月 18日
				CA	2928794	A1	2015年 8月 6日
				IL	245252	A	2019年 6月 30日
				JP	5998289	B2	2016年 9月 28日
				MX	2016006498	A	2016年 8月 4日
				IL	266790	D0	2019年 7月 31日
				JP	2017036285	A	2017年 2月 16日
				DK	3101032	T3	2019年 4月 29日
				EP	3466976	A1	2019年 4月 10日
				JP	6466895	B2	2019年 2月 6日
				US	2016333112	A1	2016年 11月 17日
				ZA	201602802	B	2017年 9月 27日
				TW	I661839	B	2019年 6月 11日
				RS	58415	B1	2019年 4月 30日
				HR	P20190431	T1	2019年 4月 19日
				SI	3101032	T1	2019年 2月 28日
				JP	6046301	B1	2016年 12月 14日
				EP	3101032	A1	2016年 12月 7日
				JP	W02015115091	A1	2017年 3月 23日
				KR	20160113099	A	2016年 9月 28日
				RU	2019107788	A	2019年 5月 17日
				TW	201834692	A	2018年 10月 1日
				JP	6105183	B1	2017年 3月 29日
				TW	I627967	B	2018年 7月 1日
				RU	2016123597	A3	2018年 10月 12日
EP	2719706	A1	2014年 4月 16日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)