

# (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  
2019年2月7日 (07.02.2019)



(10) 国际公布号  
WO 2019/024911 A1

- (51) 国际专利分类号:  
A61K 39/395 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)  
C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
C07K 16/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/098480
- (22) 国际申请日: 2018年8月3日 (03.08.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201710660432.9 2017年8月4日 (04.08.2017) CN
- (71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。
- (72) 发明人: 顾津明 (GU, Jinming); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。叶鑫

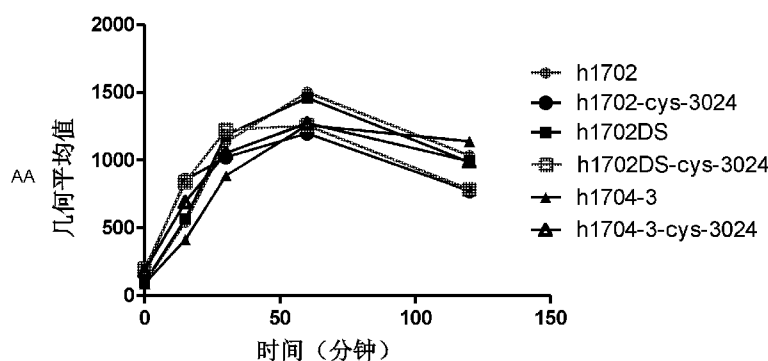
(YE, Xin); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。杨柳青 (YANG, Liuqing); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。梁金栋 (LIANG, Jindong); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。蒋贵阳 (JIANG, Guiyang); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康 (TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。张连山 (ZHANG, Lianshan); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。应华 (YING, Hua); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。张玲 (ZHANG, Ling); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼19层程伟 (David W. CHENG), Beijing 100738 (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,

(54) Title: B7H3 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE AND MEDICAL USE THEREOF

(54) 发明名称: B7H3抗体-药物偶联物及其医药用途



BB 图 4

AA Geometric mean  
BB Time (minutes)

(57) Abstract: Provided are a B7H3 antibody-drug conjugate and medical use thereof. In particular, provided are a B7H3 antibody-cytotoxic drug conjugate or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, a pharmaceutical composition comprising the aforementioned conjugate or the pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, and use thereof in the preparation of a medicament for the treatment of a B7H3-mediated disease or condition, especially in the preparation of anticancer drugs.

(57) 摘要: 一种B7H3抗体-药物偶联物及其医药用途。具体而言, B7H3抗体-细胞毒性药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 以及包含前述偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物的药物组合物, 以及其制备用于治疗B7H3介导的疾病或病症的药物中的用途; 尤其在制备抗癌药物中的用途。



WO 2019/024911 A1

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))。

## B7H3 抗体-药物偶联物及其医药用途

### 技术领域

5 本发明涉及 B7H3 抗体-药物偶联物及其在医药上的应用,进一步地,本发明涉及 B7H3 抗体-细胞毒性药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,以及包含前述偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物的药物组合物,以及其制备用于治疗 B7H3 介导的疾病或病症的药物中的用途;尤其在制备抗癌药物中的用途。

10

### 背景技术

T 细胞介导的免疫反应在机体抗肿瘤过程中发挥着极其重要的作用,而 T 细胞的活化和增殖不仅需要 TCR 识别的抗原信号,还需要共刺激分子提供的第二信号。B7 家族分子属于共刺激分子免疫球蛋白超家族,越来越多的研究表明,该家族分子在机体正常免疫功能和病理状态下均发挥了重要的调节作用。

15 B7H3 是 B7 家族的成员之一,属于 I 型跨膜蛋白,包含氨基端的一个信号肽,一个细胞外的免疫球蛋白样可变区(IgV)和恒定区(IgC)、一个跨膜区和一个含有 45 个氨基酸的胞质尾区(Tissue Antigens. 2007 Aug;70(2):96-104)。目前,B7H3 主要存在 2 种剪切体,B7H3a 和 B7H3b。B7H3a 胞外段由 IgV-IgC 2 个免疫球蛋白结构域组成,又称为 2IgB7H3,而 B7H3b 胞外段由 IgV-IgC-IgV-IgC 4 个免疫球蛋白结构域组成,又称为 4IgB7H3。

25 B7H3 蛋白质在正常组织、细胞中不表达或极低表达,却高表达于多种肿瘤组织,并与肿瘤的进展、患者的生存及预后密切相关。临床上已经报道,B7H3 在许多癌症类型中、特别是在非小细胞肺癌、肾癌、泌尿道上皮癌、结直肠癌、前列腺癌、多形性胶质母细胞瘤、卵巢癌和胰腺癌中过表达(Lung Cancer. 2009 Nov;66(2): 245-249; Clin Cancer Res. 2008 Aug 15;14(16):5150-5157)。此外,也有文献报道,在前列腺癌中,B7H3 的表达强度与临床病理学恶性(诸如肿瘤体积、前列腺外侵袭或 Gleason 评分)正相关,且也与癌症进展相关(Cancer Res. 2007 Aug 15;67(16):7893-7900)。类似地,在多形性胶质母细胞瘤中,B7H3 的表达与无事件存活负相关,且在胰腺癌中,B7H3 的表达与淋巴结转移和病理学进展相关。因此,B7H3 被认为是一种新的肿瘤标志物和潜在的治疗靶点

30 目前,已有针对 B7H3 靶点的治疗策略用于临床前研究,如靶向小鼠 B7H3 的抗体会增强瘤内的浸润性的 CD8-阳性的 T 细胞和抑制肿瘤生长(Mod Pathol. 2010 Aug;23(8):1104-1112)。此外,WO 2008/066691 专利显示,识别 B7H3 变体 B7H3a 的抗体会对腺癌表现出体内抗肿瘤作用。在临床研究中,一种鼠源的 B7H3 抗体与放射性 I<sup>131</sup> 的偶联药物可显著抑制患者成神经母细胞瘤的生长[J Neufocool

97(3):409-18 (2010]。但目前在研的项目都是鼠源抗体经人源化改造的人源化抗体，而人源化抗体在免疫时存在免疫原性相对较高的问题，在人体应用时是一个不利的因素。

噬菌体展示技术(phage display technology)是将外源蛋白质或多肽与噬菌体外壳蛋白融合表达，从而将外源蛋白表达在噬菌体的表面。噬菌体抗体库是将噬菌体展示技术、PCR 扩增技术、蛋白表达技术相结合的一项运用综合技术手段所建立起来的抗体库。

噬菌体抗体库最大的优点是不经体内免疫，模拟体内抗体生成的三个过程而制备出完全人源化抗体。除此之外，噬菌体抗体库还具有以下优势：①实现了基因型与表型的统一。此外，实验方法简单、快速，传统的通过杂交瘤技术抗体产生方法需历经数月，而抗体库技术只需短短几周的时间。②表达的是完全人源抗体，且分子量小，主要以活性片段 Fab、scFV 的形式表达，与完整抗体相比在组织穿透力方面都有明显优势。③筛选容量大，杂交瘤技术是在上千个克隆内筛选，抗体库技术可以对百万甚至亿万个分子选择。筛选到的抗体种类越多。④用途广泛，采用了原核表达系统，当大规模生产时优势更加明显 (Curr Opin Biotechnol. 2002 Dec;13(6):598-602; Immunotechnology,2013 ,48(13) 48(13) :63-73)。

抗体-药物偶联物(antibody drug conjugate, ADC) 把单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的化学接头化合物与具有生物活性的细胞毒素相连，充分利用了抗体对正常细胞和肿瘤细胞表面抗原结合的特异性和细胞毒性物质的高效性，同时又避免了前者疗效偏低和后者毒副作用过大等缺陷。这也就意味着，与以往传统的化疗药物相比，抗体-药物偶联物能更精准地结合肿瘤细胞并降低将对正常细胞的影响。

目前已有多种ADC药物被用于临床或临床研究，如 Kadcyla，是靶向Her2的曲妥珠单抗与DM1形成的ADC药物。同时，也有靶向B7H3的抗体及ADC药物的专利报道，如 WO2008100934、WO2012147713、WO2014061277、WO2015184203、WO2016044383。但仍没有B7H3靶点的ADC 药物上市或用于临床治疗研究，因此，开发新的B7H3靶点的ADC药物具有广阔的前景。

## 30 发明内容

本发明的目的是提供与B7H3 的胞外区的氨基酸序列或三维结构结合的单克隆抗体与细胞毒性物质偶联的ADC药物。通过筛选高活性和高稳定性的抗人B7H3 全人抗体ADC药物，提供使用所述抗体ADC药物作为活性成分的治疗剂。

本发明提供一种通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，



其中：

D 是细胞毒性药物；

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> 是接头单元；

y 为选自 1-8 的数，优选为选自 2-4 的数；y 可以为小数或整数；

5 Ab 为 B7H3 抗体或其抗原结合片段，其与人 B7H3 结合，所述 B7H3 抗体或其抗原结合片段是选自下面 (a) 至 (c) 中任一种的单克隆抗体或其抗原结合片段：

(a) 单克隆抗体，其包含 1 个或多个选自以下的 CDR 区序列或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列：

10 抗体重链可变区 HCDR 区序列：如 SEQ ID NO : 10、11 和 12 氨基酸序列所示；和抗体轻链可变区 LCDR 区序列：如 SEQ ID NO : 13、14 和 15 氨基酸序列所示；

(b) 单克隆抗体，其包含 1 个或多个选自以下的 CDR 区序列或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列：

15 抗体重链可变区 HCDR 区序列：如 SEQ ID NO : 16、17 和 18 氨基酸序列所示；和抗体轻链可变区 LCDR 区序列：如 SEQ ID NO : 19、20 和 21 氨基酸序列所示；

(c) 单克隆抗体，其包含 1 个或多个选自以下的 CDR 区序列或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列：

20 抗体重链可变区 HCDR 区序列：如 SEQ ID NO : 30、31 和 32 氨基酸序列所示；和抗体轻链可变区 LCDR 区序列：如 SEQ ID NO : 33、34 和 35 氨基酸序列所示。

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其中所述 B7H3 抗体或其抗原结合片段是选自下面 (a) 至 (c) 中任一种的单克隆抗体或其抗原结合片段：

25 (a) 单克隆抗体，其包含分别如 SEQ ID NO : 10、11 和 12 氨基酸序列所示抗体重链可变区的 HCDR1, HCDR2, HCDR3；和如 SEQ ID NO : 13、14 和 15 氨基酸序列所示抗体轻链可变区的 LCDR1, LCDR2, LCDR3；

30 (b) 单克隆抗体，其包含分别如 SEQ ID NO : 16、17 和 18 氨基酸序列所示抗体重链可变区的 HCDR1, HCDR2, HCDR3；和如 SEQ ID NO : 19、20 和 21 氨基酸序列所示抗体轻链可变区的 LCDR1, LCDR2, LCDR3；

(c) 单克隆抗体，其包含分别如 SEQ ID NO : 30、31 和 32 氨基酸序列所示抗体重链可变区的 HCDR1, HCDR2, HCDR3；和如 SEQ ID NO : 33、34 和 35 氨基酸序列所示抗体轻链可变区的 LCDR1, LCDR2, LCDR3。

35 在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，



其中：

D 是细胞毒性药物；

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> 是接头单元；

y 为选自 1-8 的数，优选为选自 2-4 的数；

5 Ab 为与如上所定义的 B7H3 抗体或其抗原结合片段竞争结合人 B7H3 的单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 是重组抗体。

10 在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 是人源的重组抗体或其抗原结合片段。

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 的轻链和重链可变区上的轻链和重链 FR 区序列分别来源于人种系轻链和重链序列或其突变序列。

15 在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 的恒定区包括来源于人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，优选人源 IgG1 重链恒定区；和来源于人源 κ、λ 链或其变体的轻链恒定区，优选人源 κ 链轻链恒定区。

20 在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 含有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO:36 或 SEQ ID NO:37 所示的重链可变区或其变体；所述变体是在 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO:36 或 SEQ ID NO:37 所示的重链可变区序列上具有 1-10 个氨基酸替换的序列。

25 在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 含有 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:38 或 SEQ ID NO:39 所示的轻链可变区或其变体；所述变体是在 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:38 或 SEQ ID NO:39 所示的轻链可变区序列上具有 1-10 个氨基酸替换的序列。

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 含有选自下面 (1) 至 (7) 中任一种的单克隆抗体或其抗原结合片段：

(1) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:6 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:7 所示抗体轻链可变区；

30 (2) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:8 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:9 所示抗体轻链可变区；

(3) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:28 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:29 所示抗体轻链可变区；

35 (4) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:36 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:38 所示抗体轻链可变区；

(5) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:36 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID

NO:39 所示抗体轻链可变区；

(6) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:37 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:38 所示抗体轻链可变区；

(7) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:37 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:39 所示抗体轻链可变区。

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 为全长抗体，其进一步包括人抗体恒定区；其中所述的全长抗体选自：

h1702 抗体，其是由 SEQ ID NO:22 所示的重链序列和 SEQ ID NO:23 所示的轻链序列组成的全长抗体，

h1703 抗体，其是由 SEQ ID NO:24 所示的重链序列和 SEQ ID NO:25 所示的轻链序列组成的全长抗体，

h1702-DS 抗体，其是由 SEQ ID NO:22 所示的重链序列和 SEQ ID NO:26 所示的轻链序列组成的全长抗体，

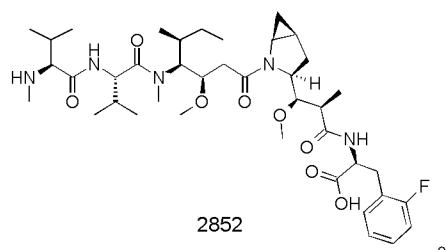
或者 h1704-3 抗体，其是由 SEQ ID NO:40 所示的重链序列和 SEQ ID NO:41 所示的轻链序列组成的全长抗体。

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体 (scFv)、二聚化的 V 区 (双抗体)、二硫键稳定化的 V 区 (dsFv) 和包含 CDR 的肽的抗原结合片段。

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中细胞毒性药物选自毒素、化疗药物、抗生素、放射性同位素和核溶酶。

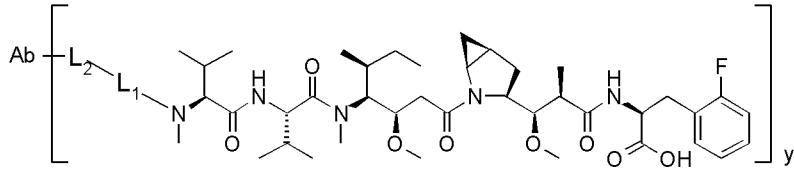
在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中细胞毒性药物选自 DM1、DM3、DM4、MMAF 和 MMAE。

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中细胞毒性药物选自：



25

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其为式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，



(1)

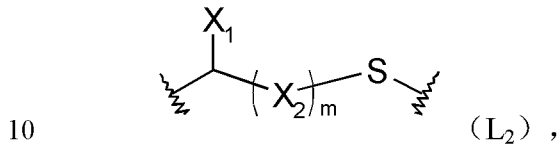
其中：

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> 是接头单元；

y 为选自 1-8 的数，优选为选自 2-4 的数；

- 5 Ab 为如上所定义的 B7H3 抗体或其抗原结合片段、或与如上所定义的 B7H3 抗体或其抗原结合片段竞争结合人 B7H3 的单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中 L<sub>2</sub> 如以下通式 L<sub>2</sub> 所示：



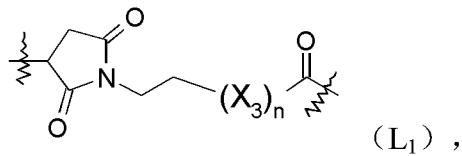
其中

X<sub>1</sub> 选自氢原子、卤素、羟基、氰基、烷基、烷氧基和环烷基；

X<sub>2</sub> 选自烷基、环烷基和杂环基；

m 为选自 0-5 的整数，优选为 1、2 或 3；S 为硫原子。

- 15 在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中 L<sub>1</sub> 如以下通式 (L<sub>1</sub>) 所示：

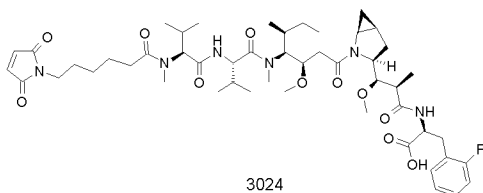


其中

X<sub>3</sub> 为烷基，任选所述的烷基进一步被选自卤素、羟基和氰基的取代基所取代；

n 为选自 0-5 的整数，优选为 1、2 或 3。

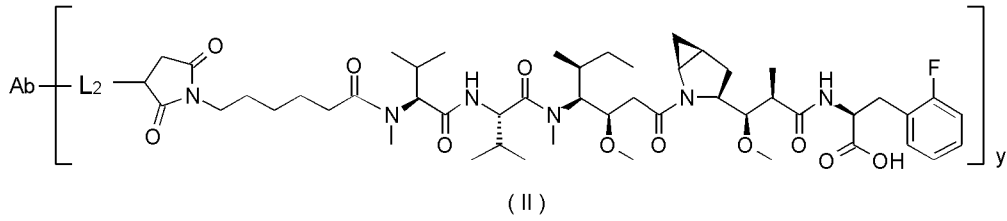
在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，其中细胞毒性药物经与连接物 L1 连接后，得到化合物：



3024



在一个优选的实施方案中，如通式(A)所示的抗体-药物偶联物，其为通式(II)所示的抗体-药物偶联物：

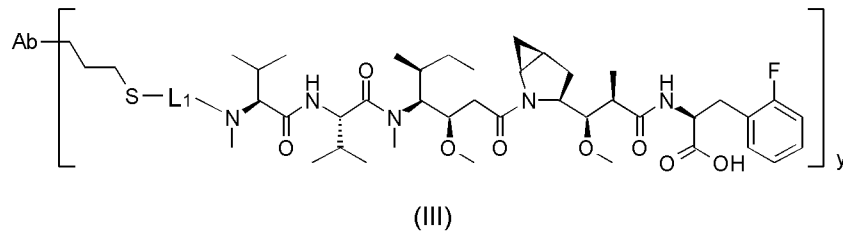


其中，L<sub>2</sub>是接头单元；

5 y 为选自 1-8 的数，优选为选自 2-4 的数；

Ab 为如上所定义的 B7H3 抗体或其抗原结合片段、或与如上所定义的 B7H3 抗体或其抗原结合片段竞争结合人 B7H3 的单克隆抗体或其抗原结合片段。

10 在一个优选的实施方案中，如通式(A)所示的抗体-药物偶联物，其为通式(III)所示的抗体-药物偶联物：



其中，L<sub>1</sub>是接头单元；

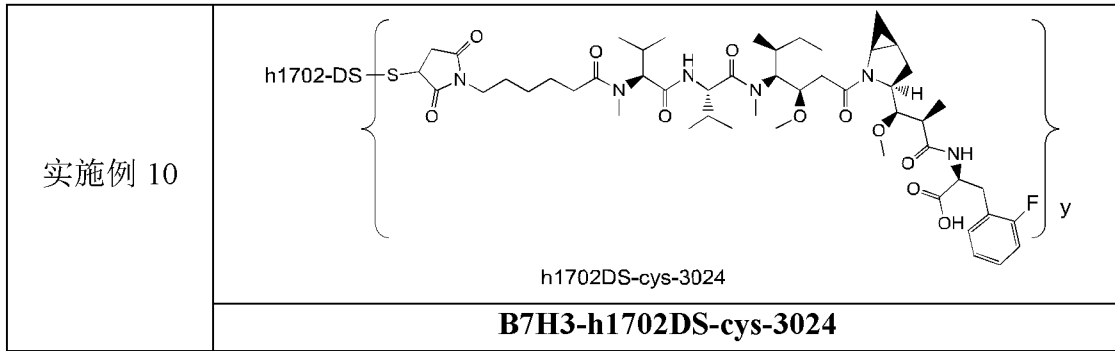
y 为选自 1-8 的数，优选为选自 2-4 的数；

15 Ab 为如上所定义的 B7H3 抗体或其抗原结合片段、或与如上所定义的 B7H3 抗体或其抗原结合片段竞争结合人 B7H3 的单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一个优选的实施方案中，如通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物，或其可药用盐，包括但不限于：

实施例编号	抗体-药物偶联物结构与命名
实施例 4	<div style="text-align: center;"> <p>h1702-MMAF</p> <p><b>B7H3-h1702-L2-MC-MMAF</b></p> </div>





本发明进一步涉及一种药物组合物，其包含如本发明通式（A）所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，和一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

5 本发明进一步涉及通式（A）所示的抗体-药物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，或包含其的药物组合物，在制备用于治疗与人 B7H3 阳性细胞相关的疾病的药物中的用途；优选的，其中所述的用途，其在于制备用于治疗 B7H3 高表达癌症的药物中的用途。

10 本发明进一步涉及通式（A）所示的抗体-药物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，或包含其的药物组合物在制备用于治疗疾病的药物中的用途，所述疾病选自治疗胶质瘤（非限制性实施例为人脑星形胶质母细胞瘤）、人咽头癌、肾上腺肿瘤、AIDS-相关癌症、腺泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、肾嫌色细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、促结缔组织增生性小圆

15 细胞肿瘤、室管膜细胞瘤、尤文肿瘤、骨外黏液样软骨肉瘤、骨纤维发育不全、骨纤维性发育不良、胆囊或胆管癌、胃癌、妊娠滋养细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、白血病、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤性肿瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、小儿癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑色素瘤、肾转移性癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌和子宫癌。

25 本发明进一步涉及一种治疗疾病的方法，该方法包括向需要其的患者施用治疗有效剂量的该通式（A）所示的抗体-药物偶联物，或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，或包含其的药物组合物，所述疾病选自人脑星形胶质母细胞瘤、人咽头癌、肾上腺肿瘤、AIDS-相关癌症、腺泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊

索瘤、肾嫌色细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、促结缔组织增生性小  
圆细胞肿瘤、室管膜细胞瘤、尤文肿瘤、骨外黏液样软骨肉瘤、骨纤维发育不全、  
骨纤维性发育不良、胆囊或胆管癌、胃癌、妊娠滋养细胞病、生殖细胞瘤、头颈  
5 性肿瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、多发性内  
分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿  
瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、小儿癌症、外周神经鞘瘤、  
嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑色素瘤、肾转移性癌、横纹肌样  
10 瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、  
胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌和子宫癌。

## 附图说明

- 图 1: 抗体与 U87MG 细胞的结合力;  
图 2: 不同抗体在 U87MG 细胞上的内吞效果;  
15 图 3: 本发明不同 ADC h1702-3024, h1703-3024 在 U87MG 细胞上的内吞效  
果;  
图 4: 本发明不同 ADC h1702-cys-3024, h1702DS-cys-3024 和  
h1704-3-cys-3024, 及其相应抗体在 U87MG 细胞上的内吞效果;  
图 5: h1702-3024 对裸鼠 U87MG 移植瘤的疗效;  
20 图 6: h1702-3024 对 U87MG 裸鼠体重的影响。  
图 7: h1702DS-cys-3024 和 h1704-3-cys-3024 的稳定性结果

## 具体实施方式

### 一. 术语

25 为了更容易理解本发明, 以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文  
中另有明确定义, 本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一  
般技术人员通常理解的含义。

本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem,243,p3558(1968)中  
所述。

30 本发明所述的“抗体”指免疫球蛋白, 是由两条相同的重链和两条相同的轻链通  
过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排  
列顺序不同, 故其抗原性也不同。据此, 可将免疫球蛋白分为五类, 或称为免疫  
球蛋白的同种型, 即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE, 其相应的重链分别为  $\mu$  链、 $\delta$   
链、 $\gamma$  链、 $\alpha$  链、和  $\epsilon$  链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目  
35 和位置的差别, 又可分为不同的亚类, 如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。  
轻链通过恒定区的不同分为  $\kappa$  链或  $\lambda$  链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有  $\kappa$  链或  $\lambda$  链。

抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大, 为可变区 (Fv 区); 靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定, 为恒定区。可变区包括 3 个高变区 (HVR) 和 4 个序列相对保守的骨架区 (FR)。3 个高变区决定抗体的特异性, 又称为互补性决定区 (CDR)。每条轻链可变区 (LCVR) 和重链可变区 (HCVR) 由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成, 从氨基端到羧基端依次排列的顺序为: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3; 重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。本发明所述的抗体或抗原结合片段的 LCVR 区和 HCVR 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号规则 (LCDR1-3, HCDR2-3), 或者符合 kabat 和 chothia 的编号规则 (HCDR1)。

10 本发明的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体, 优选人源化抗体。

术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的对人 B7H3 的单克隆抗体。制备时用 B7H3 抗原注射试验对象, 然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本发明一个优选的实施方案中, 所述的鼠源 B7H3 抗体或其抗原结合片段, 可进一步包含鼠源  $\kappa$ 、 $\lambda$  链或其变体的轻链恒定区, 或进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链恒定区。

术语“重组抗体”包括“嵌合抗体”、“人源化抗体”和“完全人源抗体”。

术语“嵌合抗体 (chimeric antibody)”, 是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体, 可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体, 要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤, 然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因, 再根据需要克隆人抗体的恒定区基因, 将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中, 最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。在本发明一个优选的实施方案中, 所述的 B7H3 嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源  $\kappa$ 、 $\lambda$  链或其变体的轻链恒定区。所述的 B7H3 嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区, 优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区, 或者使用氨基酸突变(如 YTE 突变或回复突变)的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体。

术语“人源化抗体 (humanized antibody)”, 也称为 CDR 移植抗体 (CDR-grafted antibody), 是指将鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架, 即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分, 从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库 (在因特网 [www.mrccpe.com.ac.uk/vbase](http://www.mrccpe.com.ac.uk/vbase) 可获得), 以及在 Kabat, E.A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时, 引起的活性下降, 可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变, 以保持活性。本发明的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。在本发明

一个优选的实施方案中，所述的 B7H3 人源化抗体中鼠的 CDR 序列选自 SEQ ID NO:8-13 或 14-19；人的抗体可变区框架经过设计选择，其中所述抗体重链可变区上的重链 FR 区序列，来源于人种系重链 IGHV1-18\*01 和 hjh4.1 的组合序列或 IGHV3-7\*01 和 hjh4.1 的组合序列；其中所述抗体轻链可变区上的轻链 FR 区序列，来源于人种系轻链 IGKV1-33\*01 和 hjk4.1 的组合序列或 IGKV1-39\*01 和 hjk2.1 的组合序列。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区可进行最少反向突变，以保持活性。

CDR 的移植可由于与抗原接触的构架残基而导致产生的 B7H3 抗体或其抗原结合片段对抗原的亲合力减弱。此类相互作用可以是体细胞高度突变的结果。因此，可能仍然需要将此类供体构架氨基酸移植至人源化抗体的构架。来自非人 B7H3 抗体或其抗原结合片段的参与抗原结合的氨基酸残基可通过检查鼠单克隆抗体可变区序列和结构来鉴定。CDR 供体构架中与种系不同的的各残基可被认为是相关的。如果不能确定最接近的种系，那么可将序列与亚型共有序列或具有高相似性百分数的鼠序列的共有序列相比较。稀有构架残基被认为可能是体细胞高度突变的结果，从而在结合中起着重要作用。

术语“完全人源抗体”或“全人抗体”，也称“全人源单克隆抗体”，其抗体的可变区和恒定区都是人源的，去除免疫原性和毒副作用。单克隆抗体的发展经历了四个阶段，分别为：鼠源性单克隆抗体、嵌合性单克隆抗体、人源化单克隆抗体和全人源单克隆抗体。全人源抗体制备的相关技术主要有：人杂交瘤技术、EBV 转化 B 淋巴细胞技术、噬菌体显示技术 (phage display)、转基因小鼠抗体制备技术 (transgenic mouse) 和单个 B 细胞抗体制备技术等。本发明中的“完全人抗体”采用噬菌体显示技术获得抗体可变区，可与抗体恒定区进一步重组获得完整抗体。

术语抗体的“抗原结合片段”或“功能片段”是指抗体的保持特异性结合抗原 (例如，B7H3) 的能力的一个或多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')<sub>2</sub> 片段，包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段，(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段；(v) 单结构域或 dAb 片段 (Ward 等人, (1989) Nature 341 : 544-546)，其由 VH 结构域组成；和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR) 或 (vii) 可任选地通过合成的接头连接的两个或更多个分离的 CDR 的组合。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码，但可使用重组方法，通过合成的接头连接它们，从而使得其能够产生为其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单个蛋白质链 (称为单链 Fv (scFv))；参见，例如，Bird 等人 (1988) Science 242 : 423-426；和 Huston 等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术

语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。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)，

5 IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

本发明的抗原结合片段包括Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、单链抗体(scFv)、二聚化的V区(双抗体)、二硫键稳定化的V区(dsFv)、包含CDR的肽等。

Fab是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶(切割H链的224位的氨基酸残基)处理IgG抗体分子所获得的片段中的具有约50,000的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段，  
10 其中H链N端侧的约一半和整个L链通过二硫键结合在一起。

本发明的Fab可以通过用木瓜蛋白酶处理本发明的特异性识别人B7H3并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体来生产。此外，可以通过将编码所述抗体的Fab的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab来生产所述Fab。

15 F(ab')<sub>2</sub>是通过用酶胃蛋白酶消化IgG铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约100,000并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个Fab区的抗体片段。

本发明的F(ab')<sub>2</sub>可以通过用胃蛋白酶处理本发明的特异性识别人B7H3并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体来生产。此外，可以通过用硫  
20 醚键或二硫键连接下面描述的Fab'来生产所述F(ab')<sub>2</sub>。

Fab'是通过切割上述F(ab')<sub>2</sub>的铰链区的二硫键而获得的分子量为约50,000并具有抗原结合活性的抗体片段。本发明的Fab'可以通过用还原剂例如二硫苏糖醇处理本发明的特异性识别B7H3并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的F(ab')<sub>2</sub>来生产。

25 此外，可以通过将编码抗体的Fab'片段的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab'来生产所述Fab'。

术语“单链抗体”、“单链 Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域(或区域; VH) 和抗体轻链可变结构域(或区域; VL) 的分子。此类 scFv  
30 分子可具有一般结构: NH<sub>2</sub>-VL-接头-VH-COOH 或 NH<sub>2</sub>-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，例如使用 1-4 个重复的变体 (Holliger 等人(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan 等人(1995), Protein Eng 8:725-731, Choi 等人(2001), Eur.J.Immuno 1.31:94-106, Hu 等人(1996), Cancer Res.56:3055-3061,  
35 Kipriyanov 等人(1999), J.Mol.Biol.293:41-56 和 Roovers 等人(2001), Cancer Immunol. 描述。

本发明的scFv可以通过以下步骤来生产：获得本发明的特异性识别人B7H3并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA，构建编码scFv的DNA，将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达scFv。

5 双抗体是其中scFv被二聚体化的抗体片段，是具有二价抗原结合活性的抗体片段。在二价抗原结合活性中，两个抗原可以是相同或不同的。

本发明的双抗体可以通过以下步骤来生产：获得本发明的特异性识别人B7H3并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA，构建编码scFv的DNA以使肽接头的氨基酸序列长度为8个残基或更少，将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达双抗体。

dsFv是通过将其中每个VH和VL中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽经由半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。可以按照已知方法(Protein Engineering, 7, 697(1994))基于抗体的三维结构预测来选择被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基。

本发明的dsFv可以通过以下步骤来生产：获得获得本发明的特异性识别人B7H3并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA，构建编码dsFv的DNA，将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达dsFv。

20 包含CDR的肽是通过包含VH或VL的CDR中的一个或多个区域而构成的。包含多个CDR的肽可以被直接相连或经由适合的肽接头相连。

本发明的包含CDR的肽可以通过以下步骤来生产：构建本发明的特异性识别人B7H3并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的CDR的编码DNA，将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达所述肽。也可以通过化学合成方法例如Fmoc方法或tBoc方法来生产所述包含CDR的肽。

术语“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的6个高变区之一。所述6个CDR的最常用的定义之一由Kabat E.A.等人，(1991)Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242)提供。如本文中使用的，CDR的Kabat定义只应用于轻链可变结构域的LCDR1、LCDR2和LCDR3(CDR L1、CDR L2、CDR L3或L1、L2、L3)，以及重链可变结构域的HCDR2和HCDR3(CDR H2、CDR H3或H2、H3)。

本文中使用的术语“抗体框架”，是指可变结构域VL或VH的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲，其不具有CDR的可变结构域。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位



(例如, B7H3 分子上的特定部位)。表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸。参见, 例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, G.E.Morris, Ed.(1996)。

5 术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常, 抗体以大约小于  $10^{-7}M$ , 例如大约小于  $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$  或  $10^{-10}M$  或更小的亲和力(KD) 结合。

术语“KD”或“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常, 本发明的抗体以小于大约  $10^{-7}M$ , 例如小于大约  $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$  或  $10^{-10}M$  或更小的解离平衡常数(KD) 结合 B7H3, 例如, 如使用表面等离子体共振(SPR) 技术在 BIACORE 仪中测定的。

术语“与B7H3抗体竞争结合人B7H3的单克隆抗体”是指与本发明的单克隆抗体竞争识别人B7H3的胞外区上的相同表位(也称为抗原决定簇)或相同表位的一部分并与所述表位结合的抗体。与本发明的B7H3抗体结合相同表位的抗体是指识别并结合于本发明的B7H3抗体识别的人B7H3 的氨基酸序列的抗体。

本文中使用的术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的, 但优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时, 核酸是“有效连接的”。例如, 如果启动子或增强子影响编码序列的转录, 那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

20 术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中, 载体是“质粒”, 其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。在另一个实施方案中, 载体是病毒载体, 其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如, 具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体) 或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组, 从而随宿主基因组一起复制(例如, 非附加型哺乳动物载体)。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法, 如冷泉港的抗体实验技术指南, 5-8 章和 15 章。例如, 鼠可以用人 B7H3 或其片段免疫, 所得到的抗体能被复性、纯化, 并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或多个个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件, 从 ImMunoGeneTics(IMGT)的网站 <http://imgt.cines.fr> 得到, 或者从免疫球蛋白杂志, 2001ISBN012441351 上获得。

35 术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae) 的成员, 例如大肠杆菌(*Escherichia coli*) 或沙门氏菌(*Salmonella*) 的菌株; 芽孢杆菌科

(Bacillaceae) 例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ; 肺炎球菌(*Pneumococcus*) ; 链球菌(*Streptococcus*) 和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO(中国仓鼠卵巢细胞系) 和 NS0 细胞。

5 本发明工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如, 编码重链和轻链的 cDNA 序列, 可以克隆并重组至 GS 表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术, 哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化, 特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。通过表达与人 B7H3 特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如, 用含调整过的缓冲液的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 PH 梯度法洗脱结合的抗体, 用 SDS-PAGE 检测抗体片段, 收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体, 也可以用常规方法去除, 比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻, 如-70℃, 或者冻干。

15 “给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时, 是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触, 以及试剂与流体的接触, 其中所述流体与细胞接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时, 是指治疗处理、预防或预防性措施, 研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂, 例如包含本发明的任一种结合化合物的组合物, 所述患者具有一种或多种疾病症状, 而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常, 在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂, 以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床右测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化, 例如患者的疾病状态、年龄和体重, 以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法, 可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本发明的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解每个目标疾病症状方面可能无效, 但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定, 其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

35 “保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸, 使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓, 一般而言, 多肽

的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性(参见例如 Watson 等 (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页, (第 4 版))。另外, 结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。

“有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化: 例如, 待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

“外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。“内源性”指根据情况在细胞、生物或人体内产生的物质。

“同源性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时, 例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时, 那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100$  的函数。例如, 在序列最佳比对时, 如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源, 那么两个序列为 60%同源; 如果两个序列中的 100 个位置有 95 个匹配或同源, 那么两个序列为 95%同源。一般而言, 当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用, 并且所有这类名称都包括后代。因此, 单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物, 而不考虑转移数目。还应当理解的是, 由于故意或非有意的突变, 所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意旨不同名称的情况下, 其由上下文清楚可见。

本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美国专利号 4,683,195 中所述扩增的程序或技术。一般来说, 需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息, 使得可以设计寡核苷酸引物; 这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2 个引物的 5' 末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR 可用于扩增特定的 RNA 序列、来自总基因组 DNA 的特定 DNA 序列和由总细胞 RNA 转录的 cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见 Mullis 等(1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263; Erlich 编辑, (1989) *PCR TECHNOLOGY* (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被视为用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个实例, 但不是唯一的实例, 所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶, 以扩增或产生核酸的特定部分。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生, 该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如, “任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

5 此外，本发明涉及用于免疫检测或测定 B7H3 的方法、用于免疫检测或测定 B7H3 的试剂、用于免疫检测或测定表达 B7H3 的细胞的方法和用于诊断与 B7H3 阳性细胞相关的疾病的诊断剂，其包含本发明的特异性识别 B7H3 并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体或抗体片段作为活性成分。

10 在本发明中，用于检测或测定 B7H3 的量的方法可以是任何已知方法。例如，它包括免疫检测或测定方法。

免疫检测或测定方法是使用标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。免疫检测或测定方法的实例包括放射性物质标记的免疫抗体方法（RIA）、酶免疫测定法（EIA 或 ELISA）、荧光免疫测定法（FIA）、发光免疫测定法、蛋白质免疫印迹法、物理化学方法等。

15 上述与 B7H3 阳性细胞相关的疾病可以通过用本发明的单克隆抗体或抗体片段检测或测定表达 B7H3 的细胞来诊断。

为了检测表达多肽的细胞，可以使用已知的免疫检测方法，并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外，可以使用利用 FMAT8100HTS 系统（Applied Biosystem）的荧光抗体染色法等。

20 在本发明中，对用于检测或测定 B7H3 的活体样品没有特别限制，只要它具有包含表达 B7H3 的细胞的可能性即可，例如组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

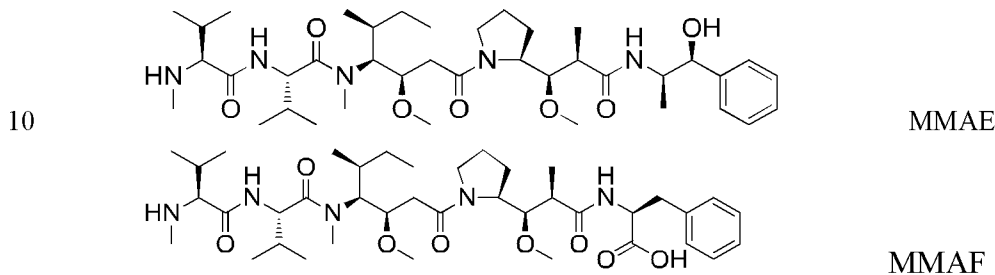
根据所需的诊断方法，含有本发明的单克隆抗体或其抗体片段的诊断剂还可以含有用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测反应的试剂。用于执行抗原-抗体反应的试剂包括缓冲剂、盐等。用于检测的试剂包括通常用于免疫检测或测定方法的试剂，例如识别所述单克隆抗体、其抗体片段或其结合物的标记的第二抗体和与所述标记对应的底物等。

30 术语“细胞毒性药物”是指在肿瘤细胞内具有较强破坏其正常生长的化学分子。细胞毒性药物原则上在足够高的浓度下都可以杀死肿瘤细胞，但是由于缺乏特异性，在杀伤肿瘤细胞的同时，也会导致正常细胞的凋亡，导致严重的副作用。该术语意在包括放射性同位素(例如 At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup> 和 Lu 的放射性同位素)，化疗药物，毒素如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段和/或变体。

35 术语“毒素”指来自细菌、真菌、植物或动物的小分子毒素及其衍生物，包括美登木素生物碱及其衍生物（CN101573384）如 DM1、DM3、DM4，auristatin F (AF) 及其衍生物，如 MMAF、MMAE、3024（WO 2016/127790 A1，化合物 7），白喉

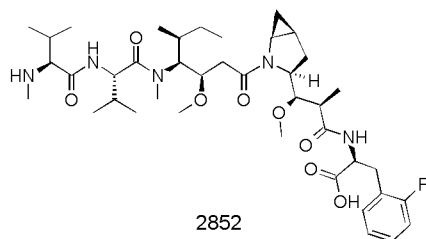
毒素、外毒素、蓖麻毒蛋白(ricin)A 链、相思豆毒蛋白(abrin)A 链、modeccin、 $\alpha$ -  
 帚曲霉素(sarcin)、油桐 (Aleutites fordii) 毒蛋白、香石竹 (dianthin) 毒蛋白、美  
 洲商陆 (Phytolaca americana) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (Momordica  
 5 charantia) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (croton)、肥皂草 (sapaonaria  
 officinalis) 抑制物、白树毒蛋白 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin) 局限曲霉素  
 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌素  
 (trichothecenes)。

MMAF、MMAE 为澳瑞他汀衍生物, 参见 US2005/0238649 及 Daronina 等(2006)  
 Bioconjugate Chem. 17: 114-124, 结构式如下:

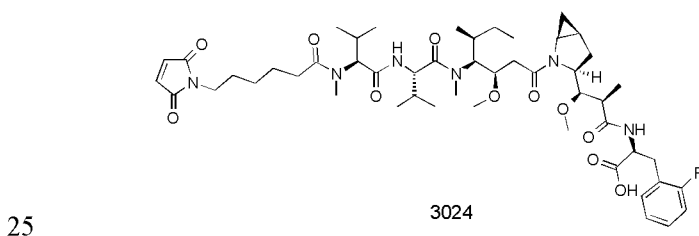


具体而言, 澳瑞他汀/多拉司他汀药物模块诸如 MMAF 及其衍生物可以使用  
 US2005-0238649A1 及 Daronina 等(2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124 中记载的  
 15 方法来制备。澳瑞他汀/多拉司他汀药物模块诸如 MMAE 及其衍生物可以使用  
 Daronina 等(2003) Nat. Biotech. 21: 778-784 中记载的方法来制备。可以通过常规方  
 法方便地合成药物-接头模块 MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF 和  
 MC-vc-PAB-MMAE, 例如 Daronina 等(2003) Nat. Biotech. 21: 778-784 及美国专利  
 20 申请公开号 US2005/0238649A1 中所记载的, 然后将它们偶联至感兴趣的抗体。

20 本发明中所述药物 2852, 参见 WO 2016/127790 A1 (化合物实施例 7), 其结  
 构式如下:



通过该发明中所述方法 (化合物实施例 8) 或所属领域人员所能推定的方法,  
 合成药物-接头模块 (本发明中所述的 3024) 后, 其结构式如下:



术语“化疗药物”是在肿瘤治疗中使用的化学化合物。化疗药物实例包括烷化剂，如噻替哌(thiotepa);环磷酰胺(cyclophamide)(CYTOXAN™);烷基磺酸脂如白消安(busulfan)，英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶(aziridine)如苯并多巴(benaodopa)，卡波醌(carboquone)，美妥替哌(meturedopa)和尿烷亚胺(uredopa);氮丙啶和 methylamelamine 包括六甲蜜胺(altretamine)，三亚胺嗪(triethylenemelamine)，三亚乙基磷酰胺，三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);氮芥(nitrogen mustards)如苯丁酸氮芥，萘氮芥，胆磷酰胺(cholophosphamide)，雌氮芥(estramustine)，异环磷酰胺(ifosfamide)，氮芥(mechlorethamine)，盐酸氧氮芥；左旋苯丙氨酸氮芥(melphalan)，新氮芥(novembichin)，胆甾醇苯乙酸氮芥，松龙苯芥(prednimustine)，曲磷胺(trofosfamide)，尿嘧啶氮芥；亚硝基脲(nitrosureas)如亚硝基脲氮芥(carmustine)，氯脲菌素(chlorozotocin)，福莫司汀(fotemustine)，洛莫司汀(lomustine)，尼莫司汀(nimustine)，雷莫司汀(ranimustine);抗生素如阿克拉霉素，放线菌素，authramycin，重氮丝氨酸，博来霉素，放线菌素 C(cactinomycin)，加利车霉素(calicheamicin)，carabycin,洋红霉素(chromomycin)，嗜癌素(carzinophilin)，色霉素，放线菌素 D，柔红菌素(daunorubicin)，地托比星(detorubicin)，6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸，阿霉素(doxorubicin)，表阿霉素(epirubicin)，依索比星(esorubicin)，伊达比星(idarubicin)，发波霉素(marcellomycin)，丝裂霉素，霉酚酸，诺加霉素(nogalamycin)，橄榄霉素(olivomycin)，培洛霉素(peplomycin)，potfiromycin,嘌呤霉素，三铁阿霉素(quelamycin)，罗多比星(rodorubicin)，链黑菌素;链脲霉素(streptozocin)，杀结核菌素，乌苯美司(ubenimex)，净司他丁(zinostatin)，佐柔比星(zorubicin);抗代谢药如氨甲蝶呤，5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物如二甲叶酸(denopterin)，氨甲蝶呤，蝶罗呤，三甲曲沙(trimetrexate);喋呤类似物氟达拉滨(fludarabine)，6-巯基蝶呤，硫咪喋呤，硫鸟喋呤;嘧啶类似物如安西他滨(ancitabine)，阿扎胞苷(azacitidine)，6-氮尿苷，卡莫氟(carmofur)，阿糖胞苷，双脱氧尿苷，去氟氧尿苷(doxitluridine),依诺他滨(enocitabine)，氟尿苷，5-FU;雄激素类如二甲睾酮(calusterone),丙酸甲雄烷酮(dromostanolong propionate)，环硫雄醇(epitiostanol)，美雄氨(mepitiostane)，睾内酯(testolactone);抗肾上腺类如氨鲁米特(aminoglutethimide)，米托坦(mitotane)，曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂如 frolinic acid;醋葡内脂;醛磷酰胺糖苷(aldophosphamideglycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);安吡啶(amsacrine);bestrabucil;比生群(biasntrene);依达曲沙(edatraxate);defofamine;秋水仙胺;地吡醌(diaziquone);elfomithine;依利醋铵(elliptinium acetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidamine);米托胍脲(mitoguanzone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);硝呋旦(nitracrine);喷司他丁(pintostatin);phenamet;吡柔比星(pirarubicin);鬼臼树酸(podophyllinic acid);2-乙酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);PSK®;雷佐生(razoxane);西索菲兰(sizofiran);锗螺胺

(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2, 2', 2"-三氯二乙胺 (trichlorotriethylamine); 乌拉坦(urethan); 长春碱酰胺; 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露醇氮芥; 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇; 哌溴烷坑(pipobroman); gacytosine; 阿拉伯糖苷("Ara-C"); 环磷酰胺; 三胺硫磷(thiotepa); 紫杉烷, 如紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 和 docetaxel(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨(gemcitabine); 6-硫代鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 氨甲蝶呤; 铂类似物如顺铂和卡铂; 长春花碱; 铂; 依托泊甙(etoposide)(VP-16); 异环磷酰胺; 丝裂霉素 C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞宾(vinorelbine); 新萘酰胺(navelbine); novantrone; 替尼泊甙(teniposide); 柔红霉素; 氨基蝶呤; xeloda; 伊拜磷酸盐(ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 维甲酸 esperamicins; capecitabine; 以及上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。此定义还包括能调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素制剂, 如抗雌激素制剂包括他莫昔芬(tamoxifen), 雷洛昔芬(raloxifene), 芳香酶抑制剂 4(5)-咪唑, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬(trioxifene), keoxifene, LY117018, onapristone, 和托瑞米芬(Fareston); 和抗雄激素制剂如氟他氨(flutamide), 尼鲁米特(nilutamide), bicalutamide, 亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin); 和上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。

术语“接头单元”在本发明中为 L1 和 L2, 指一端与抗体共价连接而另一端与细胞毒性药物相连的化学结构片段或键。

术语“载药量”是指分子中每个配体上加载的细胞毒性药物平均数量, 也可以表示为药物量和抗体量的比值, 药物载量的范围可以是每个配体 (Pc) 连接 1-8 个细胞毒性药物, 在本发明的实施方式中, 载药量表示为 y, 可用常规方法如 UV/可见光光谱法, 质谱, ELISA 试验和 HPLC 特征鉴定偶联反应后每个 ADC 分子的药物均数量。

在本发明中, y 可能受连接位点数量的限制。本发明的一个实施方式中, 细胞毒性药物通过接头单元偶联在配体的 N 端氨基和/或赖氨酸残基的ε-氨基上, 一般地, 偶联反应中能与抗体偶联的药物分子数将小于理论上的最大值。

可以用以下非限制性方法控制抗体细胞毒性药物偶联物的载量, 包括:

- (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比,
- (2) 控制反应时间和温度,
- (3) 选择不同的反应试剂。

术语“载体”用于本发明的药物, 是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释放和靶向系统能够减少药物降解及损失, 降低副作用, 提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构, 可以进行自组装, 形成各种形式的聚集体, 优选的实例如胶束、微乳液、凝胶、液晶、囊泡等。这些聚集体具有包

载药物分子的能力，同时又对膜有良好的渗透性，可以作为优良的药物载体。

术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的黏合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、抗氧化剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持“干燥”状态，以利于制成片剂。

10 药物组合物可以是无菌注射水溶液形式。可在使用的可接受的溶媒和溶剂中有水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。无菌注射制剂可以是其中活性成分溶于油相的无菌注射水包油微乳。可通过局部大量注射，将注射液或微乳注入患者的血流中。或者，最好按可保持本发明化合物恒定循环浓度的方式给予溶液和微乳。为保持这种恒定浓度，可使用连续静脉内递药装置。这种装置的实例是 Deltec  
15 CADD-PLUS. TM. 5400 型静脉注射泵。

药物组合物可以是用于肌内和皮下给药的无菌注射水或油混悬液的形式。可按已知技术，用上述那些适宜的分散剂或湿润剂和悬浮剂配制该混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中制备的无菌注射溶液或混悬液。此外，可方便地用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。

20 本发明还涉及治疗人B7H3 阳性细胞相关的疾病的方法，特别是在治疗癌症和炎症中的用途。

## 二. 实施例与测试例

以下结合实施例进一步描述本发明，但这些实施例及测试例并非限制着本发明的范围。本发明实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规  
25 条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

### 实施例 1. B7H3 抗原及检测用蛋白的制备

以 SEQ ID NO:1 所示人 B7H3 作为本发明 B7H3 的模板，设计本发明涉及的抗原及检测用蛋白的氨基酸序列。以下 B7H3 抗原未特殊说明的均指人 B7H3。

30 1.1 人 B7H3 全长氨基酸序列：B7H3 (SEQ ID NO: 1):

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFS  
PEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASL  
RLQRVVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVT  
ITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGAN  
35 GTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSE  
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASL  
RLQRVVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVT



ITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSSOMANEQGLFDVHSLRVVLGAN  
GTYSCLVRNPVLQODAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFV  
*CWRKIKQSC EEENAGAEDQD GEGEGSKTALQPLKHS DSKEDDGQEIA*

注释:

- 5 双横线部分为信号肽 (Signal peptide: 1 – 28);  
 划横线部分为 B7H3 胞外区 (Extracellular domain: 29-466), 其中 29-139 为 Ig-样 V-型 1 结构域, 145 – 238 为 Ig-样 C2-型 1 结构域; 243-357 为 Ig-样 V-型 2 结构域, 363 – 456 为 Ig-样 C2-型 2 结构域;  
 点划线部分为跨膜区部分 (Transmembrane domain: 467-487);

- 10 斜体部分为胞内区 (Cytoplasmic domain: 488-534)。

1.2 鼠B7H3全长氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)

MLRGWGGPSVGVCRVLTALGVLCLCLTGAVEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSF  
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYSNRTALFPDLLVQGNAS  
LRLQVRVVTDEGSYTCFVSIQDFDSA AVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGN  
 15 MVTITCSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGNVTTSSOMANERGLFDVHSLRVV  
LGANGTYSCLVRNPVLQODAHGSVTITGQPLTFPPEALWVTVGLSVCLVLLV  
ALAFVCWRKIKQSC EEENAGAEDQD GEGEGSKTALRPLKPS ENKEDDGQEIA

注释:

- 双横线部分为信号肽 (Signal peptide: 1 – 28);
- 20 划横线部分为 B7H3 胞外区 (Extracellular domain: 29-248), 其中 29 – 139 为 Ig-样 V-型结构域, 145 – 238 为 Ig-样 C2-型结构域;  
 点划线部分为跨膜区部分 (Transmembrane domain: 249-269);  
 斜体部分为胞内区 (Cytoplasmic domain: 270-316)。

1.3 筛选及检测用人 B7H3 抗原 (SEQ ID NO: 3)

- 25 为商业化产品(R&D cat# 1949-B3-050/CF, 简称 2Ig-B7H3), 序列如下:

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEG  
QDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS  
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTG  
NVTTSSOMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQODAHSSVTITPQR  
 30 SPTG-HHHHHH

注释: 划横线部分为 B7H3 胞外区; 斜体部分为 His-tag 标记。

1.4 检测用人B7H3抗原 (SEQ ID NO: 4)

- 为商业化产品(SinoBiological cat# 11188-H08H, 简称4Ig-B7H3), 序列如下:

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEG  
 35 QDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS  
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTG  
NVTTSSOMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQODAHSSVTITPQR  
SPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVH

SFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAOGNASLRLQRVVADEGSFTCFVSIRDFGS  
AAVSLOVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITICSSYRGYPEAEVFWQDGQGV  
PLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLOQDAHGSVTI  
TGQPMT-*HHHHHH*

5 注释：划横线部分为 B7H3 胞外区；斜体部分为 His-tag 标记。

1.5 筛选及检测用鼠 B7H3 抗原 (SEQ ID NO: 5)

为商业化产品(R&D cat#1397-B3-050/CF)，序列如下：

VEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEG  
RDQGSAYSNRALFPDLLVQGNASLRLQRVVRTDEGSYTCFVSIQDFDSA  
10 QVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMVTITICSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGN  
VTTSQMANERGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLOQDAHGSVTITGQPL  
TF-*HHHHHH*

注释：划横线部分为 B7H3 胞外区；斜体部分为 His-tag 标记。

## 15 实施例 2. 完全人源抗体的制备

### 2.1 阳性序列的筛选

利用人 PBMC、脾脏、淋巴结组织分离 B 细胞，并提取 RNA，构建天然单链噬菌体抗体库（库容  $3.2 \times 10^{10}$ ）。将构建的天然单链噬菌体文库经过包装形成噬菌体颗粒后，采用液相法进行淘筛，噬菌体与生物素化的 B7H3 液相结合，再采用链霉亲和素磁珠分离。为了获得可分别与人 B7H3 (R&D cat# 1949-B3-050/CF) 和鼠 B7H3 (R&D cat#1397-B3-050/CF) 交叉结合的阳性序列，分别采用生物素化的人 B7H3 和生物素化的鼠 B7H3 进行交替淘筛，首轮采用  $2 \mu\text{g/ml}$  生物素化的人 B7H3 进行淘筛，第二轮采用  $2 \mu\text{g/ml}$  生物素化的鼠 B7H3 进行淘筛，第三轮采用  $0.5 \mu\text{g/ml}$  生物素化的人 B7H3 进行淘筛，经三轮淘筛后，挑取 500 个单克隆包装成噬菌体，用于噬菌体 ELISA 测试。分别测试单克隆噬菌体与人 B7H3 (R&D cat# 1949-B3-050/CF) 和鼠 B7H3 (R&D cat#1397-B3-050/CF) 的结合活性：ELISA 板上分别包被  $1 \mu\text{g/ml}$  人 B7H3 或鼠 B7H3 以及 1%BSA，加入 1:1 封闭缓冲液稀释的噬菌体上清，最后用 anti-M13 HRP 检测；将 ELISA 测试到的 OD450 值大于 0.5，以及结合人和鼠 B7H3 的 ELISA OD450 值除以结合 1%BSA 的 ELISA OD450 值的两个比值均大于 2.0 的克隆进行测序，得到 9 个特异性序列。

### 2.2 完整单克隆抗体的构建

噬菌体库筛选得到的 9 个特异性序列构建完整抗体后通过 ELISA 结合实验确定其中 2 个抗体结合力强，分别是 h1702 和 h1703。对其完整单克隆抗体构建的过程如下：

根据测序得到的单链抗体序列，设计引物 PCR 搭建各单链抗体序列的 VH/VK/VL 基因片段。获得 h1702 和 h1703 的重轻链可变区。

>h1702 重链可变区序列

*QVQLVQSGGGVVPQGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS  
NKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQG  
ALVTVSS*

5

SEQ ID NO: 6

>h1702 轻链可变区序列

*QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRS  
SGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVL*

SEQ ID NO: 7

10 >h1703 重链可变区序列

*QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG  
STYYADSVKGRYISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGVGPVHALDVWGQG  
TTVTVSS*

SEQ ID NO: 8

15 >h1703 轻链可变区序列

*DIRLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPILLINAVSGLQSGVP  
SRFSGSGSGTHFTLITSLQPEDFATYYCQQSYSTPMWTFGQGTKVEIK*

SEQ ID NO: 9

注：顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列，

20 下划线为 CDR 序列。

其中各抗体轻重链中 CDR 序列如表 1 所示。

表1 各重链及轻链CDR区序列

抗体	重链		轻链	
1702	HCDR1	GFIFSSSA SEQ ID NO: 10	LCDR1	SGSVSTSHY SEQ ID NO: 13
	HCDR2	ISYDGSNK SEQ ID NO: 11	LCDR2	NTN SEQ ID NO: 14
	HCDR3	ARSARLYASFDY SEQ ID NO: 12	LCDR3	AIHVDRDIWV SEQ ID NO: 15
1703	HCDR1	GFTFSSYA SEQ ID NO: 16	LCDR1	QSISTY SEQ ID NO: 19
	HCDR2	ISGSGGST SEQ ID NO: 17	LCDR2	AVS SEQ ID NO: 20
	HCDR3	AKGVGPVHALDV SEQ ID NO: 18	LCDR3	QQSYSTPMWT SEQ ID NO: 21

抗体可变区再与恒定区基因(CH1-FC/CL)片段进行同源重组，构建完整抗体 VH-CH1-FC /VK-CL /VL-CL。

25 构建的完整全长抗体 h1702、h1703 序列如下：

h1702:

h1702 重链 (IgG1) 氨基酸序列: (SEQ ID NO: 22)

QVQLVQSGGGVVPQGTSLRLSCAASGFIFSSAMHWVRQAPGKGLEWVAV  
 ISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYA  
 5 SFDYWGQ GALVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV  
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
 10 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

h1702 轻链氨基酸序列: Lamada (SEQ ID NO: 23)

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIY  
 NTNTRSSGV PDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYCAIHVDRDIWVFGGGT  
 15 KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK  
 AGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE  
 CS

h1703:

h1703 重链 (IgG1) 氨基酸序列: (SEQ ID NO: 24)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
 AISGSGGSTYYADSVKGRYTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGVGP  
 VHALDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  
 TVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT  
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
 25 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

h1703 轻链氨基酸序列: Kappa (SEQ ID NO: 25)

DIRLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPKGAPILLINAVSG  
 30 LQSGVPSRFRSGSGS GTHFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPMWTFGQGTKVEIK  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
 SVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

35 为进一步提高抗体的稳定性, 对 h1702 的轻链序列进行氨基酸突变, 具体突变为轻链 (SEQ ID NO: 23) N 端第一个氨基酸残基 Q 替代为 D, 缺失突变 C 端第一个氨基酸残基 S, 以获得更加稳定和均一的单克隆抗体 h1702-DS。

突变修饰后的 h1702-DS 的重链序列为 SEQ ID NO: 22, 轻链氨基酸序列如下: (SEQ ID NO: 26)。

DTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIY  
 NTNTRSSGVPPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCAIHVDRDIWVFGGGT  
 KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK  
 AGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE

5 C

**2.3 全人抗体的表达与纯化**

分别表达抗体轻重链的质粒以 1.5:1 的比例转染 HEK293E 细胞，6 天后收集表达上清，高速离心去除杂质，用 Protein A 柱进行纯化。用 PBS 冲洗柱子，至 A280 读数降至基线。用 pH3.0-pH3.5 的酸性洗脱液洗脱目的蛋白，用 1M Tris-HCl, pH8.0-9.0 中和。洗脱样品适当浓缩后，利用 PBS 平衡好的凝胶层析 Superdex200 (GE) 进一步纯化，以去除聚体，收集单体峰，分装备用。

B7H3 抗体-药物偶联物制备实施例

15 **实施例 3、鼠源抗体的制备**

**3.1 抗原的制备**

编码带 huFc 标签的人 B7-H3 (h-B7H3-Fc) 序列由 Integrated DNA Technology (IDT) 公司合成 (以上 B7-H3 重组蛋白均由本发明设计模版序列)，分别克隆到 pTT5 载体上 (Biovector)。重组的 B7-H3 蛋白在 293T 细胞表达后，通过所属领域的常规技术进行纯化。纯化的蛋白可用于小鼠免疫获得抗体。

h-B7H3-Fc 的序列:

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQ  
 DQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQV  
 AAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVT  
 25 TSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTG  
 AVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEG  
 RDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQ  
 VAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNV  
 TTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMT  
 30 GSGGGGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVM  
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 27

35

**3.2 抗体的制备**

抗人B7H3单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用Swiss Webster白小鼠，雌性，6周龄 (Charles River公司)。饲养环境：SPF级。小鼠购进后，实验室环境饲养1周，

12/12小时光/暗周期调节，温度20-25℃；湿度40-60%。免疫抗原为带Fc标签的人B7H3重组蛋白(huB7H3-Fc)。用Titermax(sigma Lot Num: T2684)为佐剂。抗原与佐剂(titermax)比例为1:1，抗原乳化后进行接种，时间为第0、21、35、49、63天。第0天腹膜内(IP)注射15 μg+爪垫(footpad) 25/只的乳化后抗原。21,35,49,63  
 5 天腹膜内(IP)注射15 μg+爪垫(footpad) 15/只的乳化后抗原，在进行脾细胞融合前3天加强免疫，腹膜内(IP)注射15 μg+爪垫(footpad) 15/只的生理盐水配制的抗原溶液。于第42, 56, 70天进行血检，用ELISA及FACS方法检测小鼠血清，确定小鼠血清中的抗体滴度。在第5次免疫以后，选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合，采用优化的电融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0  
 10 细胞(ATCC® CRL-8287™)进行融合得到杂交瘤细胞。

融合后的杂交瘤细胞培养7-14天后，取培养基上清，使用B7-H3重组蛋白，ELISA实验对杂交瘤上清进行抗体筛选，得到的阳性抗体株进一步使用稳转表达B7-H3的CHO-S细胞，对比空白CHO-S细胞以排除非特异性结合抗体杂交瘤株，用流式分选方法进行筛选，从而选定两株结合重组蛋白且也结合细胞表达抗原的杂交瘤。  
 15 收集对数生长期杂交瘤细胞，用Trizol(Invitrogen,15596-018)提取RNA并反转录(PrimeScript™ Reverse Transcriptase, Takara #2680A)。将反转录得到的cDNA采用mouse Ig-Primer Set(Novagen, TB326 Rev.B 0503)进行PCR扩增后测序，最终得到鼠源抗体m1704的序列。

鼠单抗m1704的重链和轻链可变区序列如下：

20 m1704 重链

EVQLVESGGGLVKSGGSLKLSCAASGFTFSRYGMSWVRQTPEKRLEWVAAISSN  
 GGSIIYPD TVKGRLTISRDN AKNTLYLQ MISLRSEDTALYFCTRHYLLFEMDYW  
 GRGTSVTVSS

SEQ ID NO: 28

25 m1704 轻链

DIVMTQSQEFMSTTVGDRVYITCKASQNVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIFSASNR  
 YTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAAYFCQQYSSSLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 29

30 为了提高抗体的稳定性，对上述鼠抗的CDR序列进行优化设计。优化后的CDR区具有如下序列：

名称	序列	编号
1704-HCDR1	RYGMS	SEQ ID NO: 30
1704-HCDR2	ISSGGGSIYYPD TVKG	SEQ ID NO: 31
1704-HCDR3	TRHYLLFEMDY	SEQ ID NO: 32
1704-LCDR1	KASQNVNTAVA	SEQ ID NO: 33
1704-LCDR2	SASNRYT	SEQ ID NO: 34

1704-LCDR3	QQYSSSLT	SEQ ID NO: 35
------------	----------	---------------

将鼠抗的重链和轻链可变区分别克隆进入含人IgG1重链恒定区和κ轻链恒定区的pTT载体质粒（Biovector），然后瞬转转染入HEK293细胞，得到了抗B7-H3的嵌合抗体，按常规技术方法纯化后备用。

5

**3.3 小鼠抗体的人源化**

鼠源抗人 B7-H3 单克隆抗体人源化如本领域许多文献公示的方法进行。简言之，使用人恒定结构域替代亲本（鼠源抗体）恒定结构域，根据鼠源抗体和人抗体的同源性选择人种抗体序列，本发明将抗体 m1704 进行人源化。

10 在所获得的鼠源抗体 VH/VL CDR 典型结构的基础上，将重、轻链可变区序列与人源抗体种系数据库比较，获得同源性高的人种系模板。其中人类种系轻链框架区来自人κ轻链基因人种系轻链模板 IGkV1-33，人类种系重链框架区来自人重链模版 IGHV3-23

15 将鼠源抗体 m1704 的 CDR 区移植到选择好的相应人源化模板上，替换人源化可变区，再与 IgG 恒定区（优选重链为 IgG1，轻链为κ）重组。然后，以鼠源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 VL 和 VH 的构象有重要影响的残基进行回复突变，并对 CDR 区化学不稳定氨基酸残基优化，设计并检测了由如下人源化轻重链可变区序列组合而成的抗体。

h1704VH1 (SEQ ID NO: 36):

20 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS  
GGGSIYYPDTVKGRLTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHYLLFEMD  
YWGQGTITVTVSS

h1704VH2 (SEQ ID NO: 37):

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVAAISS  
GGGSIYYPDTVKGRLTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCTRHYLLFEMDY  
WGQGTITVTVSS

h1704VL1 (SEQ ID NO: 38):

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNR  
YTGVPSTRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYFCQQYSSSLT FGQGTKLEIK

30 h1704VL2 (SEQ ID NO: 39):

DIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIFSASNRY  
TGVPSTRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVAAYFCQQYSSSLTFGGGTKLEIK

	h1704VL1	h1704VL2
h1704VH1	h1704-1	h1704-3
h1704VH2	h1704-2	h1704-4

经表达测试和回复突变数量对比, 选择出最终的人源化 h1704-3 抗体分子 (使用 VH1 重链可变区和 VL2 轻链可变区), 其重链和轻链序列如 SEQ ID NO:40 和 41 所示。

5

h1704-3 抗体重链 (IgG1) 序列:

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS  
 GGGSIYYPDTVKGRLTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCTRHYLLFEMD  
 YWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
 10 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKK  
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE  
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVM  
 15 HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 40

h1704-3 抗体轻链 (Kappa) 序列:

DIVLTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIFSASNRY  
 TGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDVAAYFCQQYSSSLTFGGGTKLEIKRTVAA  
 20 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
 DSKDSTYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 41

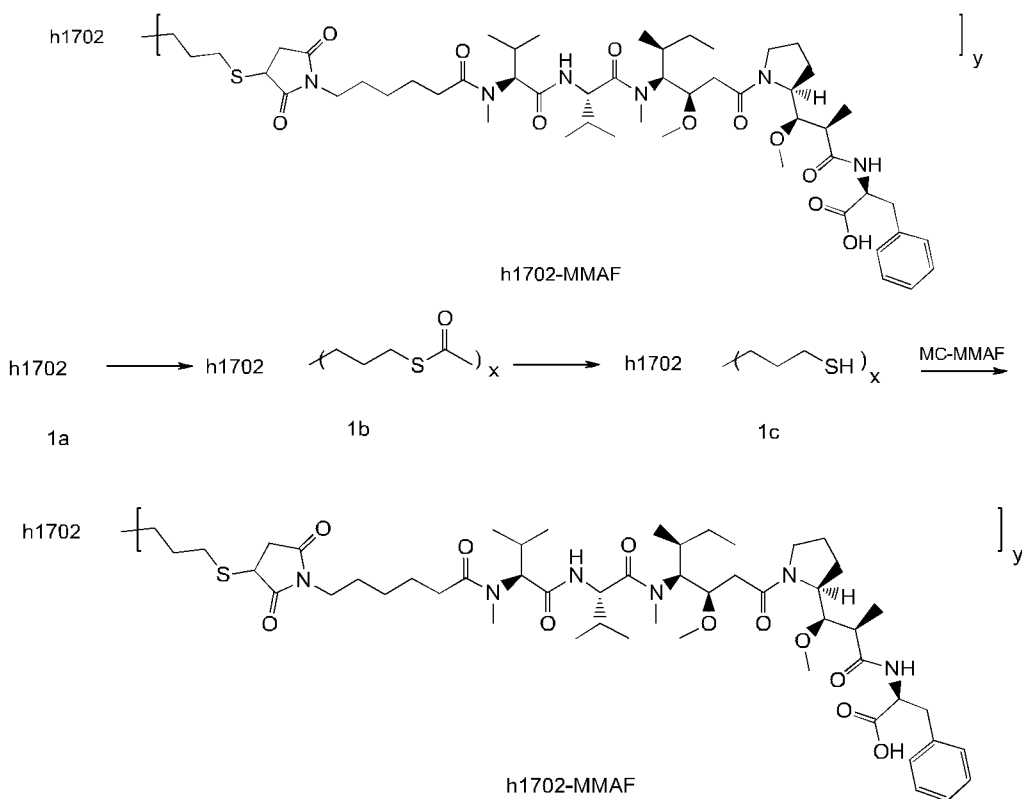
根据以上各人源化抗体轻链和重链的基因序列合成cDNA片段, 插入到  
 25 pcDNA3.1表达载体 (Life Technologies Cat. No. V790-20) 中。将表达载体和转染  
 试剂PEI (Polysciences, Inc. Cat. No. 23966) 以1:2 的比例转染HEK293细胞 (Life  
 Technologies Cat. No. 11625019), 并置于CO<sub>2</sub>孵育箱中孵育4-5天。表达的抗体通  
 过离心回收后, 进行抗体纯化, 得到本发明的人源化抗体蛋白。

### 30 B7H3 抗体-药物偶联物制备实施例

以下实施例 4 至实施例 11 为本发明相关 ADC 的制备过程。其中实施例 4 至  
 实施例 7 中抗体 (h1702、h1703) 通过在其赖氨酸上偶联带有连接单元的药物  
 (MMAF 或 3024) 反应, 制备 ADC; 实施例 8 至实施例 11 通过抗体 (h1702、h1704-3、  
 h1702DS) 半胱氨酸上的巯基, 与带有连接单元的药物 (3024) 反应制备 ADC。

### 35 实施例 4: B7H3-h1702-L2-MC-MMAF (h1702-MMAF) 的制备





将硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯(0.10 mg, 0.75  $\mu\text{mol}$ ), 溶解于 0.2 mL 乙腈溶液, 备用; 向抗体 B7H3-h1702, PH=4.3 的乙酸/乙酸钠缓冲液(2.5 mg/ml, 2.0 mL, 0.034  $\mu\text{mol}$ )加入上述预制的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯的乙腈溶液, 然后滴加 0.1mL 的氰基硼氢化钠(3.4mg, 53  $\mu\text{mol}$ )的水溶液, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡反应 2 小时。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA)进行纯化, 除去未反应的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯以及氰基硼氢化钠, 得到标题产物 1b 的 PBS 缓冲溶液(约 5.5 mL), 超滤离心浓缩至约 2.5ml 进行下一步反应。

### 第二步

向 1b 的 PBS 缓冲溶液(2.5 mL)中加入 0.07 mL 的 2.0M 盐酸羟胺溶液, 加毕, 置于水浴振荡器, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡反应 30 分钟, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA)进行纯化, 得到标题产物 B7H3-h1702 单抗-丙硫醇 1c 的 PBS 缓冲溶液(浓度 0.84 mg/ml, 5.0 mL)。

### 第三步

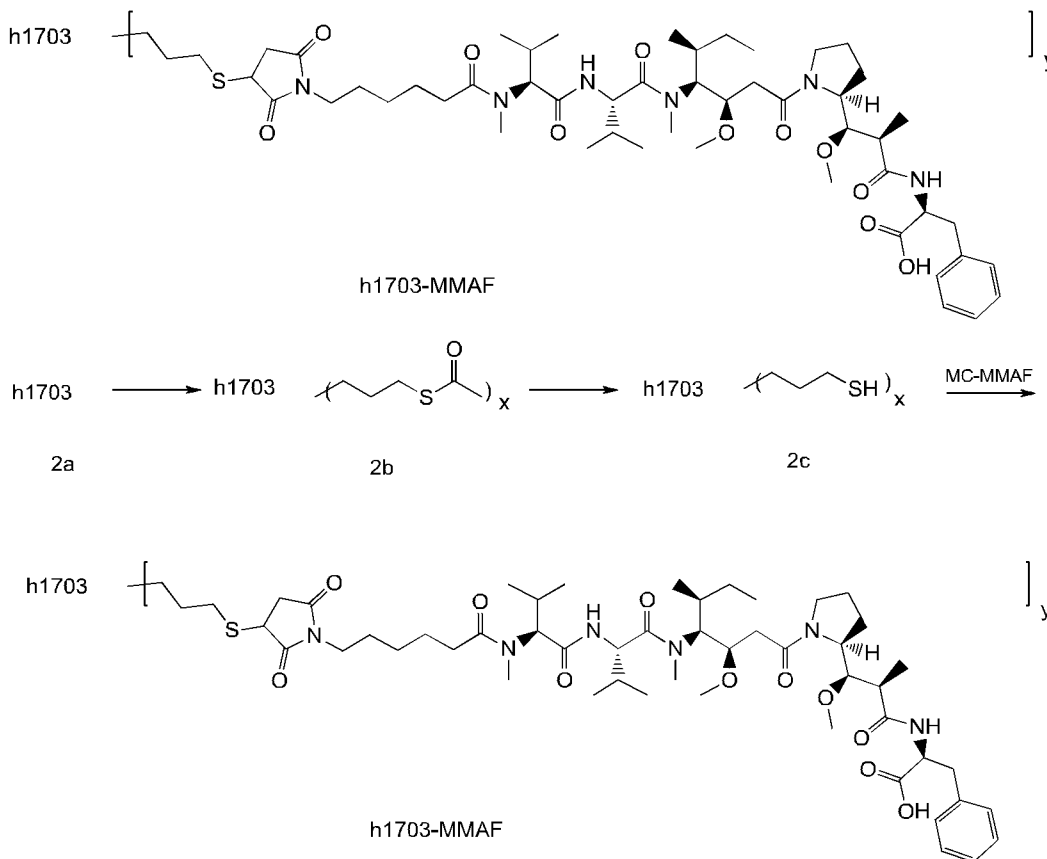
将化合物 (S)-2-((2R,3R)-3-((1S,3S,5S)-2-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-N,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 MC-MMAF (0.32 mg, 0.34  $\mu\text{mol}$ )溶解于 0.5mL 乙腈中, 加入 B7H3-h1702 单抗-丙硫醇 PBS 缓冲溶液 1c (0.84 mg/mL, 5.0 mL)中, 置于水浴振荡器中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡反应 4 小时后停止反应。

将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物 h1702-MMAF 的 PBS 缓冲液(0.21 mg/mL, 14.5 mL), 于 4°C 冷冻储存。

Q-TOF LC/MS 计算平均值:  $y=1.76$ 。

5

### 实施例 5: B7H3-h1703-L2-MC-MMAF (h1703-MMAF) 的制备



将硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯(0.11 mg, 0.82  $\mu\text{mol}$ ), 溶解于 0.2 mL 乙腈溶液, 备用; 向抗体 B7H3-h1703, PH=4.3 的乙酸/乙酸钠缓冲液(2.5 mg/ml, 2.0 mL, 0.034  $\mu\text{mol}$ )加入上述预制的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯的乙腈溶液, 然后滴加 0.1mL 的氰基硼氢化钠(3.4mg, 53  $\mu\text{mol}$ )的水溶液, 于 25°C 下振荡反应 2 小时。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA)进行纯化, 除去未反应的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯以及氰基硼氢化钠, 得到标题产物 2b 的 PBS 缓冲溶液(约 5.5 mL), 超滤离心浓缩至约 2.5ml 进行下一步反应。

#### 第二步

向 2b 的 PBS 缓冲溶液(2.5 mL)中加入 0.07 mL 的 2.0M 盐酸羟胺溶液, 加毕, 置于水浴振荡器, 于 25°C 下振荡反应 30 分钟, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA)进行纯化, 得到标题产物 B7H3-h1703 单抗-丙硫醇 2c 的 PBS 缓冲溶液(浓

度 0.82mg/ml, 5.0 mL)。

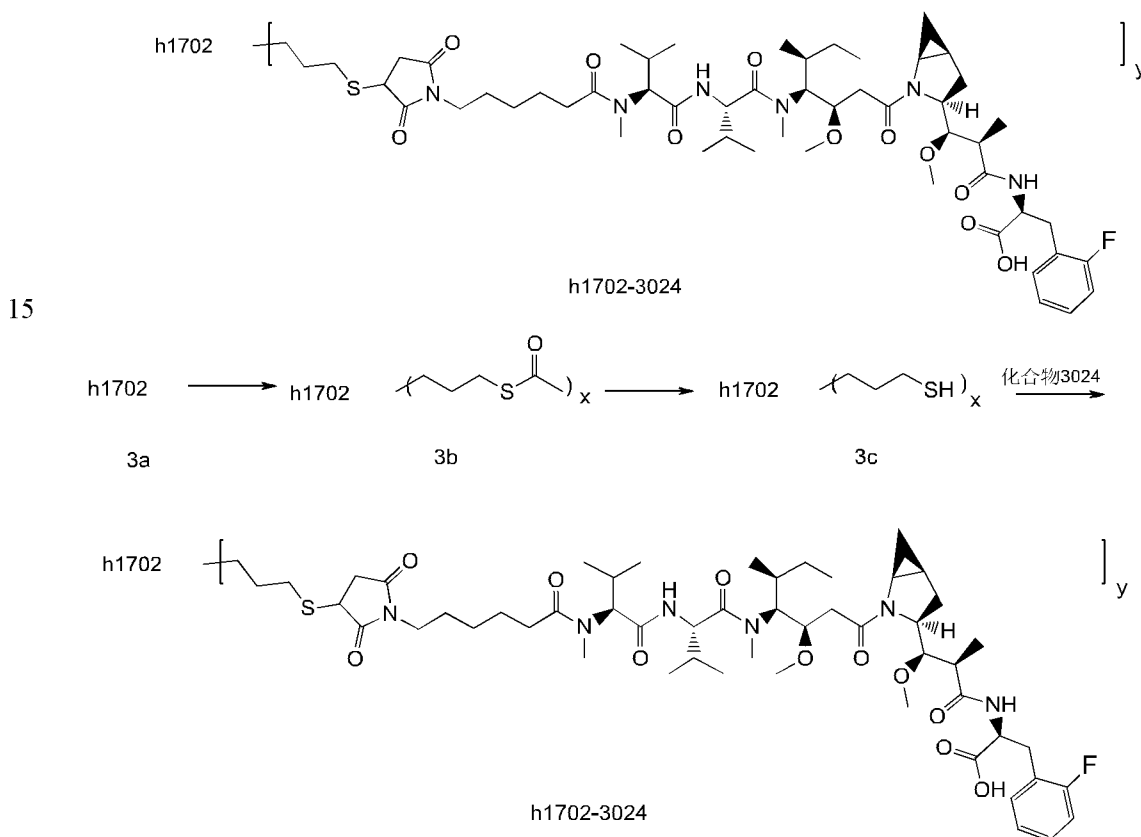
### 第三步

将化合物(S)-2-((2R,3R)-3-((1S,3S,5S)-2-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-N,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯丙酸 MC-MMAF (0.32 mg, 0.34  $\mu$ mol)溶解于 0.5mL 乙腈中, 加入 B7H3-h1703 单抗-丙硫醇 PBS 缓冲溶液 2c (0.82 mg/mL, 5.0 mL)中, 置于水浴振荡器中, 于 25°C 下振荡反应 4 小时后停止反应。

将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物 h1703-MMAF 的 PBS 缓冲液(0.20 mg/mL, 13.0 mL), 于 4°C 冷冻储存。

Q-TOF LC/MS 计算平均值:  $y=2.29$ 。

### 实施例 6: B7H3-h1702-L2-3024 (h1702-3024) 的制备



将硫代乙酸 S-(3-羰基丙基)酯(0.45 mg, 3.38 $\mu$ mol), 溶解于 0.8mL 乙腈溶液, 备用; 向抗体 B7H3-h1702, pH=4.3 的乙酸/乙酸钠缓冲液(5.0mg/ml, 8.0 mL, 0.270 $\mu$ mol)加入上述预制的硫代乙酸 S-(3-羰基丙基)酯的乙腈溶液, 然后滴加 0.1mL 的氰基硼氢化钠(12.8mg, 0.2mmol)的水溶液, 于 25°C 下振荡反应 2 小时。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA)进行纯化, 除去未反应的硫代乙酸 S-(3-羰基丙基)酯

20

以及氰基硼氢化钠，得到标题产物 3b 的 PBS 缓冲溶液(约 14.5 mL)，超滤离心浓缩至约 7.5ml 进行下一步反应。

### 第二步

向 3b 的 PBS 缓冲溶液(7.5 mL)中加入 0.20 mL 的 2.0M 盐酸羟胺溶液，加毕，置于水浴振荡器，于 25℃ 下振荡反应 30 分钟，停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)进行纯化，得到标题产物 B7H3-h1702 单抗-丙硫醇 3c 的 PBS 缓冲溶液(浓度 2.84 mg/ml，14.0 mL)。

### 第三步

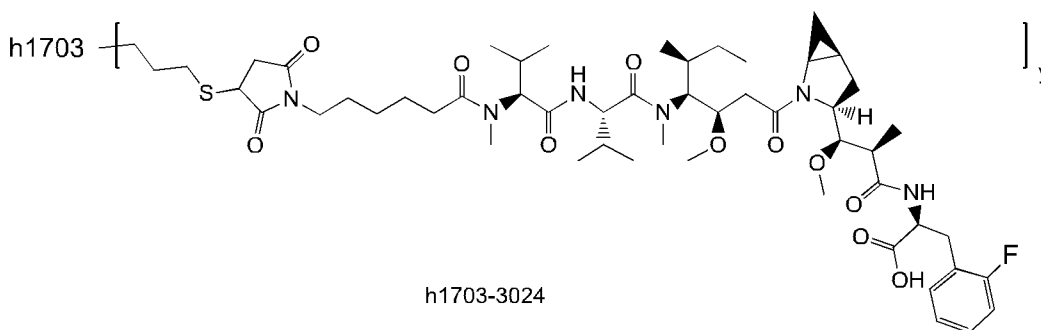
将化合物(S)-2-((2R,3R)-3-((1S,3S,5S)-2-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-N,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸化合物 3024 (2.6 mg, 2.7 μmol)溶解于 1.4mL 乙腈中，加入 B7H3-h1702 单抗-丙硫醇 PBS 缓冲溶液 3c (2.84 mg/mL，14.0 mL)中，置于水浴振荡器中，于 25℃ 下振荡反应 4 小时后停止反应。

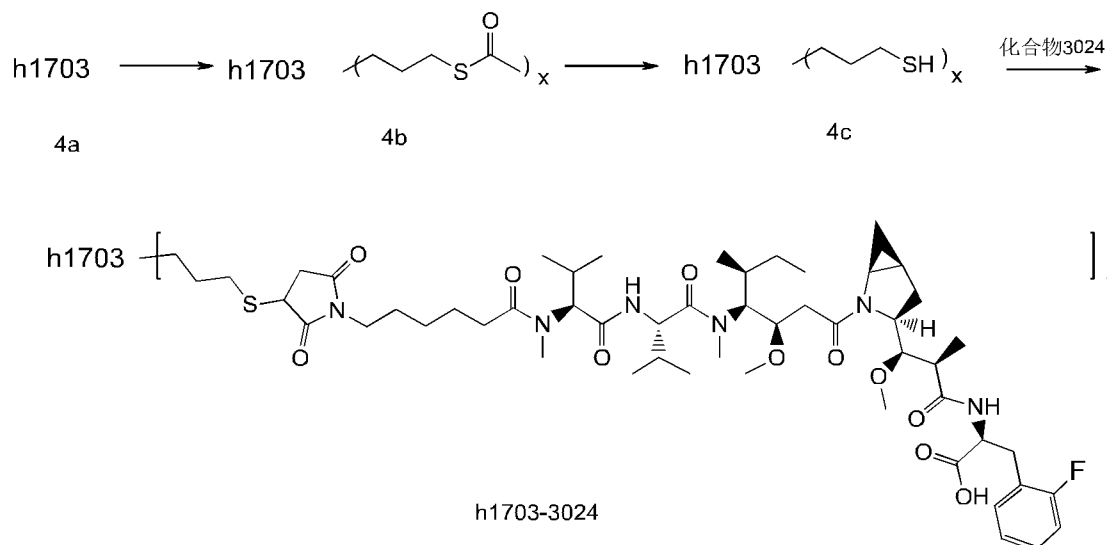
将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到标题产物 h1702-3024 的 PBS 缓冲液(1.35 mg/mL，27.5mL)，于 4℃ 冷冻储存。

Q-TOF LC/MS 计算平均值：y=2.05。

20

### 实施例 7： B7H3-h1703-L2-3024 (h1703-3024) 的制备





将硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯(0.50 mg, 3.78 $\mu$ mol), 溶解于 0.8mL 乙腈溶液, 备用; 向抗体 B7H3-h1703, pH=4.3 的乙酸/乙酸钠缓冲液(5.0mg/ml, 8.0 mL, 0.270 $\mu$ mol)加入上述预制的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯的乙腈溶液, 然后滴加 0.1mL 的氰基硼氢化钠(12.8mg, 0.2mmol)的水溶液, 于 25 $^{\circ}$ C 下振荡反应 2 小时。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA)进行纯化, 除去未反应的硫代乙酸 *S*-(3-羰基丙基)酯以及氰基硼氢化钠, 得到标题产物 4b 的 PBS 缓冲溶液(约 14.0 mL), 超滤离心浓缩至约 7.5ml 进行下一步反应。

#### 10 第二步

向 4b 的 PBS 缓冲溶液(7.5 mL)中加入 0.20 mL 的 2.0M 盐酸羟胺溶液, 加毕, 置于水浴振荡器, 于 25 $^{\circ}$ C 下振荡反应 30 分钟, 停止反应。将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA)进行纯化, 得到标题产物 B7H3-h1703 单抗-丙硫醇 4c 的 PBS 缓冲溶液(浓度 2.64 mg/ml, 14.5 mL)。

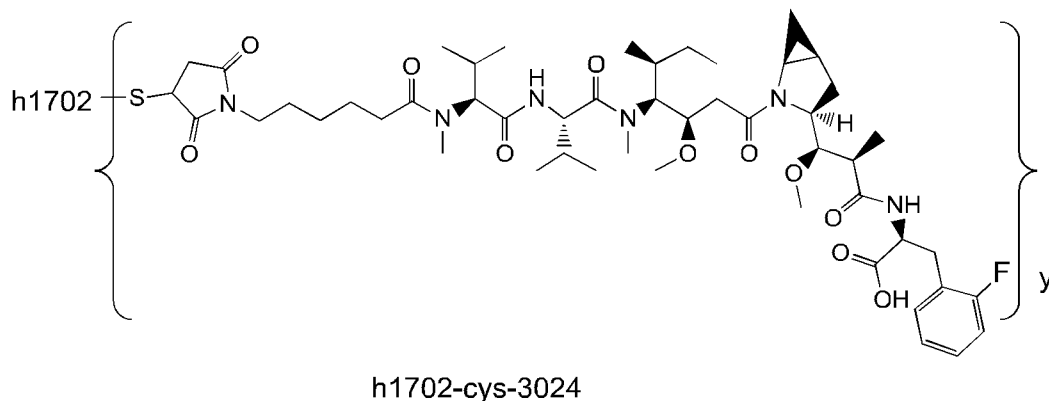
#### 15 第三步

将化合物 *(S)*-2-((2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-*N*-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-*N*,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸化合物 3024 (2.6 mg, 2.7  $\mu$ mol)溶解于 1.45mL 乙腈中, 加入 B7H3-h1703 单抗-丙硫醇 PBS 缓冲溶液 6c (2.64 mg/mL, 14.5mL)中, 置于水浴振荡器中, 于 25 $^{\circ}$ C 下振荡反应 4 小时后停止反应。

将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物 h1703-3024 的 PBS 缓冲液(1.20 mg/mL, 28.0mL), 于 4 $^{\circ}$ C 冷冻储存。

Q-TOF LC/MS 计算平均值:  $y=1.62$ 。

### 实施例 8. B7H3-h1702-cys-3024 (h1702-cys-3024) 的制备



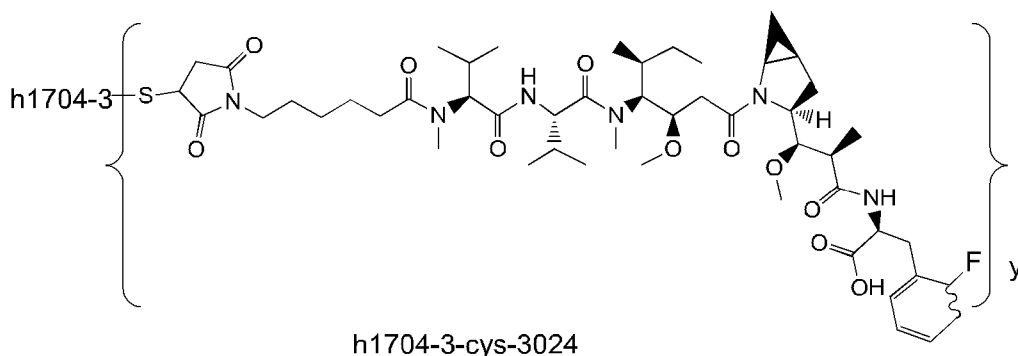
5           在 37°C 条件下，向抗体 h1702，pH=6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液 (10.0mg/ml, 5.0 mL, 0.333umol)加入配置好的 0.01mM 的三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 的 10mM 水溶液 0.07mL (0.7 umol)，置于水浴振荡器，于 37°C 下振荡反应 3 小时，停止反应；

10           将反应液用水浴降温至 25°C，再将化合物 (S)-2-((2R,3R)-3-((1S,3S,5S)-2-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-N,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 SHR3024 (2.6 mg, 2.7 μmol)溶解于 0.5mL 乙腈中，加入到降温至 25°C 的抗体 h1702 (含有 TCEP) 中，置于水浴振荡器，于 25°C 下振荡反应 3 小时，停止反应；

15           将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相：pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到标题产物的 PBS 缓冲液(6.85 mg/mL, 7.5mL)，于 4°C 冷冻储存。

HIC-HPLC 计算平均值：y=3.5。

### 20           实施例 9. B7H3-h1704-3-cys-3024 (h1704-3-cys-3024) 的制备



在 37°C 条件下，向抗体 B7H3-h1704-3，PH=6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液 (10.0mg/ml, 5.0 mL, 0.333umol)加入配置好的 0.01mM 的三(2-羧乙基)膦 (TCEP)

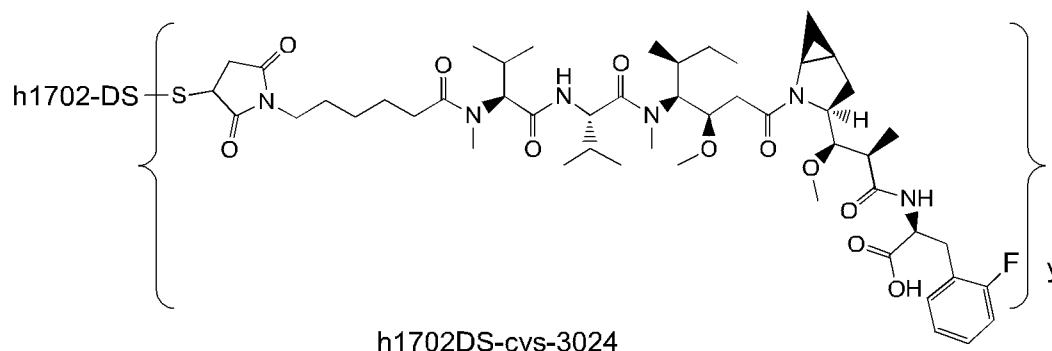
的 10mM 水溶液 0.075mL (0.75  $\mu\text{mol}$ ), 置于水浴振荡器, 于 37°C 下振荡反应 3 小时, 停止反应;

将反应液用水浴降温至 25°C, 再将化合物 (S)-2-((2R,3R)-3-((1S,3S,5S)-2-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-N,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 化合物 3024 (2.6 mg, 2.7  $\mu\text{mol}$ )溶解于 0.5mL 乙腈中, 加入到降温至 25°C 的抗体 B7H3-h1704-3 (含有 TCEP) 中, 置于水浴振荡器, 于 25°C 下振荡反应 3 小时, 停止反应;

将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物的 PBS 缓冲液(6.75 mg/mL, 7.8mL), 于 4°C 冷冻储存。

HIC-HPLC 计算平均值:  $y=3.4$ 。

### 实施例 10. B7H3-h1702DS-cys-3024 (h1702DS-cys-3024) 的制备



15

在 37°C 条件下, 向抗体 H1702-DS, pH=6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液 (10.0mg/ml, 2.0 mL, 0.133 $\mu\text{mol}$ )加入配置好的 0.01mM 的三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 的 10mM 水溶液 0.028mL (0.28  $\mu\text{mol}$ ), 置于水浴振荡器, 于 37°C 下振荡反应 3 小时, 停止反应;

20

将反应液用水浴降温至 25°C, 再将化合物 (S)-2-((2R,3R)-3-((1S,3S,5S)-2-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二羰基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-甲基己酰胺)-3-甲基丁酰胺)-N,3-二甲基丁酰胺)-3-甲氧基-5-甲基庚酰基)-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-(2-氟苯基)丙酸 化合物 3024 (1.02 mg, 1.1  $\mu\text{mol}$ )溶解于 0.2mL 乙腈中, 加入到降温至 25°C 的抗体 h1702-DS (含有 TCEP) 中, 置于水浴振荡器, 于 25°C 下振荡反应 3 小时, 停止反应;

25

将反应液用 Sephadex G25 凝胶柱脱盐纯化(洗脱相: pH 为 6.5 的 0.05M 的 PBS 缓冲水溶液, 含 0.001M 的 EDTA), 得到标题产物的 PBS 缓冲液(6.65 mg/mL, 2.7mL), 于 4°C 冷冻储存。

HIC-HPLC 计算平均值:  $y=3.55$ 。

30

以下用测试方法验证本发明抗体性能及有益效果。

### 测试例 1. ELISA 结合实验

为检测筛选到的 B7H3 抗体, 及相应的不同 B7H3-ADC 对于人不同形式 B7H3 的体外结合能力, 人 2Ig-B7H3 (Cat. # 1949-B3-050/CF, R&D) 和人 4Ig-B7H3 (Cat. # 11188-H08H, Sino Biological) 被用于进行体外结合检测。

用 pH7.4 的 PBS (Sigma, P4417-100TAB) 缓冲液将人 B7H3 蛋白 (2Ig/4Ig) 稀释至 1 $\mu$ g/ml 浓度, 以 100 $\mu$ l/孔的体积加入 96 孔酶标板 (Corning, CLS3590-100EA) 中, 于 4 $^{\circ}$ C 放置过夜 16-20 小时。弃去液体后, 加入用 PBST 缓冲液 (PH7.4PBS 含 0.05% Tween-20) 稀释的 5% 脱脂牛奶 (光明脱脂奶粉) 封闭液 120 $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育 2 小时进行封闭。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液洗板 4 次后, 加入 100 $\mu$ l/孔初始浓度为 1 $\mu$ M 的相应 B7H3 抗体 (或 B7H3-ADC), 用 PBST 缓冲液倍比稀释 8 个梯度, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育 1 小时。孵育结束后, 弃去酶标板中的反应液, 用 PBST 洗板 4 次, 加入 100 $\mu$ l/孔用 PBST 稀释(1:4000)的 HRP 标记的羊抗人 IgG (山羊抗人 IgG) Fc $\gamma$  片段特异性的二抗 (Jackson Immuno Research, 109-005-008), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 4 次后, 加入 100 $\mu$ l/孔 TMB 显色底物 (KPL, 52-00-03), 于室温孵育 3-5min, 加入 100 $\mu$ l/孔 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 用 NOVOSTar 酶标仪在 450nm 处读取吸收值, 计算抗体对抗原的结合 EC50 值, 结果见表 2。

表 2. 不同抗体及抗体 ADC 与人 2Ig-B7H3 及 4Ig-B7H3 抗原的结合力

EC50	人 2Ig-B7H3(nM)	人 4Ig-B7H3(nM)
h1702	0.11	0.16
h1703	10.28	2.10
h1702-3024	0.17	0.26
h1703-3024	15.07	4.97
h1702- MMAF	0.16	0.18
h1703- MMAF	2.36	3.08
h1702-cys-3024		0.29
h1702DS-cys-3024		0.30
h1704-3-cys-3024		0.09

结论: 针对人 2Ig-B7H3 及人 4Ig-B7H3, ADC 与裸抗在 ELISA 实验上具有类似的结合力, 即 ADC 标记后未降低结合力。

### 测试例 2. 与不同种属 B7H3 的交叉结合实验

为检测筛选到的 B7H3 抗体, 及相应的不同 B7H3-ADC, 对于不同种属来源的 B7H3 的体外结合能力, 小鼠 B7H3 (Cat. # 1397-B3-050/CF, R&D) 被用于进行体外结合检测。



用 pH7.4 的 PBS(Sigma, P4417-100TAB)缓冲液将不同种属 B7H3 蛋白(mouse B7H3) 稀释至 1 $\mu$ g/ml 浓度, 以 100 $\mu$ l/孔的体积加入 96 孔酶标板中, 于 4 $^{\circ}$ C 放置过夜 16-20 小时。弃去液体后, 加入用 PBST 缓冲液 (PH7.4PBS 含 0.05% Tween-20) 稀释的 5%脱脂牛奶 (光明脱脂奶粉) 封闭液 120 $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育 2 小时进行封闭。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液洗板 4 次后, 加入 100 $\mu$ l/孔初始浓度为 1 $\mu$ M 的相应 B7H3 抗体 (或 B7H3-ADC), 用 PBST 缓冲液倍比稀释 8 个梯度, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育 1 小时。孵育结束后, 弃去酶标板中的反应液, 用 PBST 洗板 4 次, 加入 100 $\mu$ l/孔用 PBST 稀释(1:4000)的 HRP 标记的山羊抗人 IgG, Fcy 片段特异性的二抗 (Jackson Immuno Research, 109-005-008), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

10 用 PBST 洗板 4 次后, 加入 100 $\mu$ l/孔 TMB 显色底物 (KPL,52-00-03), 于室温孵育 3-5min, 加入 100 $\mu$ l/孔 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 用 NOVOStar 酶标仪在 450nm 处读取吸收值, 计算抗体对抗原的结合 EC<sub>50</sub> 值 (结果见表 3)。

表 3. 不同抗体与鼠 B7H3 抗原的结合力

EC <sub>50</sub>	鼠 B7H3 (nM)
h1702	18.12
h1703	86.68
h1702-3024	130.8
h1703-3024	115.3
h1702-MMAF	58.95
h1703-MMAF	115.6

结果显示, h1702 和 h1703, 及不同 ADC 与鼠 B7H3 结合力相对较弱, 显示出两个单克隆抗体具有良好的人 B7H3 结合特异性。

### 测试例 3. Biacore 抗体亲和力实验

用 Biacore, GE 仪器测定抗 B7H3 抗体, 及抗 B7H3-ADC 和人 2Ig-B7H3 抗原, 人 4Ig-B7H3 抗原各种抗原之间的反应亲和力。

20 用生物传感芯片 Protein A (Cat. # 29127556, GE)亲和捕获一定量的待测抗体/待测 ADC, 然后于芯片表面流经一系列浓度梯度下的人 2Ig-B7H3 抗原 (Cat. # 1949-B3-050/CF, R&D)、人 4Ig-B7H3 抗原 (Cat. # 11188-H08H, Sino Biological)、利用 Biacore 仪器 (Biacore T200, GE) 实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后, 用甘氨酸-盐酸再生溶液 (pH 1.5) (Cat. # BR-1003-54, GE) 将生物芯片洗净再生。实验中用到的缓冲液为 HBS-EP 缓冲溶液 (pH 7.4) (Cat. # BR-1001-88, GE)。

实验得到的数据用 BIAevaluation version 4.1, GE 软件以 (1:1) Langmuir 模型进行拟合, 从而得出亲和力数值。实验结果见表 4。

表 4.不同抗体/ ADC 和各种抗原之间的反应亲和力 (单位: M)

抗体	人 2Ig-B7H3	人 4Ig-B7H3
h1702	7.97E-7	8.55E-9
h1703	4.48E-7	-
h1702-MMAF	4.52E-7	
h1702-3024	5.80E-7	1.05E-8
h1703-MMAF	1.93E-7	
h1703-3024	2.19E-7	结合极弱
h1702-cys-3024		1.12E-8
h1702DS-cys-3024		1.06E-8
h1704-3-cys-3024		7.78E-10

结论：针对与人 2Ig-B7H3, 人 4Ig-B7H3 在 Biacore 实验上的亲和力测试表明, ADC 与裸抗的亲和力相似。

#### 测试例 4. 体外细胞结合实验

5 本实验通过检测细胞表面抗体的荧光信号, 根据荧光信号强弱来评价抗体的结合。将 10 $\mu$ g 一抗与 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个 U87MG 细胞在冰上孵育 30 分钟后洗掉多余的抗体。将细胞与 APC 抗人 IgG Fc (Biolegend, 409306) 在室温孵育 30 分钟, 洗掉多余抗体后使用 BD Verse 读取细胞表面的荧光信号 (结果见图 1)。

结果表明: h1702 与细胞表面的 B7H3 抗原具有很强的结合能力。

10

#### 测试例 5. 体外细胞内吞实验

本实验通过检测细胞内抗体或不同 ADC 的荧光信号, 根据荧光信号强弱来评价抗体的内吞效果。将 B7H3 抗体/ADC 和 APC 抗人 IgG Fc (Biolegend, 409306) 以 1:2 的摩尔比例混合在冰上孵育 15 分钟。将抗体混合物与 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个 U87MG 细胞在冰上孵育 30 分钟后洗掉多余的抗体, 然后将细胞转入预温 37 $^{\circ}$ C 的培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 分别孵育 0, 15, 30, 60 和 120 分钟。离心细胞并将细胞重悬在抗体洗脱液中室温孵育 7 分钟, 洗掉抗体洗脱液, 使用 BD Verse 读取细胞内荧光信号, 见图 2, 图 3, 图 4。结果可见 ADC 在 U87MG 细胞上的内吞效果与裸抗相当。

#### 测试例 6. SD 大鼠 T1/2 评价

SD 大鼠 4 只, 雌雄各半, 12/12 小时光/暗调节, 温度 24 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C 恒温, 湿度 50-60%, 自由进食饮水。购自杰思捷实验动物有限公司。实验当天对 SD 大鼠分别尾静脉注射受试药物 B7H3 抗体/ADC, 给药剂量为 3 mg/kg, 注射体积 5 ml/kg。

取血时间点为: 第 1 天给药后 5 min、8 h、24h (第 2 天), 第 3 天, 第 5 天, 第 8 天, 第 11 天, 第 15 天, 于大鼠眼底静脉取血, 每次 200  $\mu$ L (相当于取血清 100  $\mu$ L); 收集的血样在室温下置放半小时至凝集, 然后 4 $^{\circ}$ C 下 10000 $\times$ g 离心 10 分钟。收集上清, 立即放置 -80 $^{\circ}$ C 贮存。

用 ELISA 检测血清中的 B7H3 抗体浓度，进行 PK 分析，结果见表 5。

表 5.B7H3 抗体在 SD 大鼠中的 T<sub>1/2</sub>

受试药物	给药方式	T <sub>1/2</sub> (平均值±SD, h)
h1702	IV (3 mg/kg)	185±17

结果表明，本发明 h1702 在大鼠体内的半衰期约为 185 h (7.7 天)。

用 ELISA 检测血清中的 B7H3 抗体 ADC 的浓度，进行 PK 分析，结果见表 6

5

表 6. B7H3 抗体偶联物在 SD 大鼠中的 T<sub>1/2</sub>

受试药物	分析物	给药方式	T <sub>1/2</sub> (平均值±SD, h)
h1702-3024	总 ADC (total ADC)	IV (3 mg/kg)	97±15
h1702DS-cys-3024	总 ADC (total ADC)	IV (3 mg/kg)	98.20±10.16
h1704-3-cys-3024	总 ADC (total ADC)	IV (3 mg/kg)	65.20±4.18

结果表明，大鼠静脉给予 3mg/kg 受试抗体偶联物 h1702-3024，h1702DS-cys-3024, h1704-3-cys-3024 后，总 ADC (total ADC) 在大鼠体内的半衰期约为 97 h (4.04 天)，98 h (4.08 天)，65 h (2.71 天)。

10 **测试例 7. B7H3 抗体的物理稳定性**

利用 DSC 检测不同抗体的热稳定性，比较了不同的缓冲体系不同 pH 条件下的热稳定性情况，不同 pH 对应的示例性缓冲体系如 10mM PB(pH7)，10mM Acetate (pH5.2)。将样品置换到对应缓冲液中，控制样品浓度在 1mg/ml 左右，利用 MicroCal\* VP-Capillary DSC (Malvern) 进行检测。检测前，将各个样品及空白缓冲液用真空脱气器脱气 1~2min。样品板每个孔加入 400μl 样品或空白缓冲液（仪器上样量为 300μl）。最后两对孔板分别加入 14% Decon 90 和 ddH<sub>2</sub>O，以备清洗用，样品板加样完毕后，套上塑料软盖板。扫描温度从 25℃开始到 100℃结束，扫描速率 60℃/h。具体结果如表 7 所示，在几个测试体系中 h1702、h1703 均表现了较好的热稳定性。

20

表 7.不同抗体的 DSC 实验结果

样品	缓冲液	T <sub>m</sub> -onset (°C)	T <sub>M</sub> (°C)
h1702	pH7.0	65.82	77.51
	pH 5.2	65.59	78.97
h1703	pH7.0	61.33	73.19
	pH 5.2	60.65	75.71

通过 SEC-HPLC 监测样品纯度考察一定浓度条件下周期性稳定性，示例性的条件比如将样品浓度控制在约 40-50mg/ml，在 PBS (pH7.4) 体系及 pH5.2 醋酸/蔗糖体系中比较不同抗体在比如-80℃反复冻融及 4℃、30℃、40℃保存一个月的稳定性情况。利用 Xbridge protein BEH SEC 200A (Waters) HPLC 柱子检测抗体纯度，通过一个月的考察，h1702、h1703 均表现了良好的稳定性，结果如表 8 所示。

25

表 8.不同抗体的周期稳定性结果

样品	4°C/月/纯度	30°C/月/纯度	40°C/月/纯度
h1702/醋酸	99.25%	98.68%	97.85%
h1702/PBS	99.21%	98.07%	96.34%
h1703/醋酸	99.31%	99.04%	98.38%
h1703/PBS	99.18%	98.56%	96.99%

结果显示, h1702 和 h1703 在醋酸和 PBS 缓冲液中均显示出良好的周期稳定性。

### 测试例 8. B7H3 抗体的化学稳定性

5 抗体制备后化学修饰是导致产品稳定性的常见问题之一, 尤其是 CDR 区域的部分氨基酸高度脱酰胺、氧化或者异构化修饰一般选择尽量避免或者突变降低。取 500 $\mu$ g 待测抗体溶于 500 $\mu$ l pH 7.4 的 PBS 中, 40°C 水浴; 分别于 0、10、20 天取样, 用于酶解实验。将 100 $\mu$ g 不同时间点取样的样品溶于 100 $\mu$ l 0.2 M His-HCl, 8 M Gua-HCl, pH 6.0 溶液中, 加 3 $\mu$ l 0.1g/mL DTT, 50°C 水浴 1 小时, 后用 0.02 M His-HCl, pH 6.0 的溶液超滤两次, 加入 3 $\mu$ L 0.25mg/ mL 的胰蛋白酶 (trypsin), 37°C 水浴酶解过夜。Agilent 6530 Q-TOF 进行 LC-MS 检测分析, 对潜在的修饰位点进行质谱分析 (结果见表 9), 结果显示本发明中涉及的 h1702、h1703 均无明显的脱酰胺、氧化或者异构化加剧趋势, 提示分子良好的理化稳定性。

表 9.不同抗体的化学稳定性

样品	轻链/重链	位点/修饰	0 天	10 天	20 天
h1702	LC	M48/氧化	2.82%	2.9%	2.83%
		M34/氧化	3.52%	3.46%	3.38%
	HC	M83/氧化	0.98%	1.01%	0.01%
h1703	HC	M34/氧化	1.93%	2.62%	2.16%
		M83/氧化	1.96%	2.62%	2.8%

15

### 测试例 9: 细胞增殖实验

本实验通过检测细胞内 ATP 含量, 根据 IC50 大小评价 B7H3-ADC 对 U87MG 细胞和 ZR-75-1 细胞增殖的抑制效果。

#### 1、对 U87MG 细胞增殖的抑制效果

20 U87MG 细胞(中科院细胞库, Catalog # TCHu138)培养在含 10%FBS 的 EMEM 培养基中, 一周传代 2~3 次, 传代比列 1:2 或 1:5。传代时, 吸掉培养基, 用 5ml 0.25% 的胰酶冲洗细胞层, 然后吸掉胰酶, 将细胞放在培养箱中消化 3~5 分钟, 加入新鲜培养基重悬细胞。在 96 孔细胞培养板中加入 90 $\mu$ L 的细胞悬液, 密度为 4 $\times$ 10<sup>4</sup> 细胞/ml, 培养基为 10%FBS 的 DMEM, 96 孔板外围只加入 100 $\mu$ l 10%FBS 的 DMEM 培养基。将培养板在培养箱培养 24 小时 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。

25

将待测样品用 PBS 或 DMSO 稀释成 50mM，并以 3 倍依次稀释成 10 个浓度，设置成空白和对照的孔。取 10  $\mu$ l 配制成梯度浓度的化合物溶液加入到 90  $\mu$ l 新鲜培养基中。再向培养板中加入 10 $\mu$ l 上述含药物的培养基溶液。将培养板在培养箱孵育 3 天 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。在 96 孔细胞培养板中，每孔加入 100 $\mu$ l CellTiter-Glo 试剂，室温避光放置 5-10min，在 Victor3 中读取化学发光信号值，数据使用 GraphPad 软件处理。测得的 IC50 值见表 10。

表 10.不同 ADC 在 U87MG 细胞上的增殖实验结果

化合物	IC50(nM)	最大抑制 (%)
IgG	>500	-0.7
h1702	>500	3.9
h1703	>500	2.4
2852	298.4	50.9
h1702 -3024	14.63	49.4
h1703-3024	22.58	54.4
MMAF	1477	55.9
h1702-MMAF	20.09	46.4
h1703-MMAF	37.29	55.8

结论:裸抗偶联毒素得到的 ADC 在 U87MG 细胞上具有很好的杀伤作用。

## 10 2、对 ZR-75-1 细胞增殖的抑制效果

ZR-75-1 细胞 (ATCC, Catalog # CRL-1500) 培养在含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基中，一周传代 2~3 次，传代比列 1:4 或 1:6。传代时，吸掉培养基，用 5mL 0.25%的胰酶冲洗细胞层，然后吸掉胰酶，将细胞放在培养箱中消化 3~5 分钟，加入新鲜培养基重悬细胞。在 96 孔细胞培养板中加入 90 $\mu$ L 的细胞悬液，密度为 2.8 $\times$ 10<sup>4</sup> 细胞/mL，96 孔板外围只加入 100 $\mu$ L 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基。将培养板在培养箱培养 24 小时 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。

将待测样品用 PBS 或 DMSO 稀释成 50mM，并以 3 倍依次稀释成 10 个浓度，设置成空白和对照的孔。取 10  $\mu$ l 配制成梯度浓度的化合物溶液加入到 90  $\mu$ l 新鲜培养基中。再向培养板中加入 10 $\mu$ l 上述含药物的培养基溶液。将培养板在培养箱孵育 6 天 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。在 96 孔细胞培养板中，每孔加入 100 $\mu$ L CellTiter-Glo 试剂，室温避光放置 5-10min，在 Victor3 中读取化学发光信号值，数据使用 GraphPad 软件处理。测得的 IC50 值见表 11。

表 11.不同 ADC 在 ZR-75-1 细胞上的增殖实验结果

化合物	IC50(nM)	最大抑制(%)
IgG	>500	1.53
h1702	>500	4.82
h1703	>500	-1.08

2852	92.91	73.73
h1702-3024	2.77	63.83
h1703-3024	15.79	70.68
MMAF	179.3	73.87
h1702-MMAF	4.09	59.65
h1703-MMAF	24.16	66.38

结论:裸抗偶联毒素得到的 ADC 在 ZR-75-1 细胞上具有很好的杀伤作用。

### 3、对 Detroit 562 细胞增殖的抑制效果

Detroit 562 细胞 (ATCC, Catalog # CCL-138) 培养在含 10%FBS 的 EMEM 培养基中,一周传代 2~3 次,传代比列 1:4 或 1:6。传代时,吸掉培养基,用 5mL 0.25% 的胰酶冲洗细胞层,然后吸掉胰酶,将细胞放在培养箱中消化 3~5 分钟,加入新鲜培养基重悬细胞。在 96 孔细胞培养板中加入 90 $\mu$ L 的细胞悬液,密度为  $2.2 \times 10^4$  细胞/mL,96 孔板外围只加入 100 $\mu$ L 10%FBS 的 EMEM 培养基。将培养板在培养箱培养 24 小时 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。

将待测样品用 PBS 或 DMSO 稀释成 50mM,并以 3 倍依次稀释成 10 个浓度,设置成空白和对照的孔。取 10  $\mu$ l 配制成梯度浓度的化合物溶液加入到 90  $\mu$ l 新鲜培养基中。再向培养板中加入 10 $\mu$ l 上述含药物的培养基溶液。将培养板在培养箱孵育 6 天 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。在 96 孔细胞培养板中,每孔加入 100 $\mu$ L CellTiter-Glo 试剂,室温避光放置 5-10min,在 Victor3 中读取化学发光信号值,数据使用 GraphPad 软件处理。测得的 IC<sub>50</sub> 值见表 12。

表 12.不同 ADC 在 Detroit 562 细胞上的增殖实验结果

化合物	IC <sub>50</sub> (nM)	最大抑制(%)
IgG	>500	6.4
h1702DS	>500	4.55
2852	133.8	87.99
h1702DS-3024	20.78	85.92

结论:裸抗偶联毒素得到的 ADC 在 Detroit 562 细胞上具有很好的杀伤作用。

4、以上述方法对 h1702DS, h1704-3 抗体,及其相应的 ADC:h1702-cys-3024, h1702DS-cys-3024, h1704-3-cys-3024 测试对 U87MG, ZR-75-1 及 Detroit 562 细胞的增殖抑制效果,结果如下表 13:

化合物	ZR-75-1		U87MG		Detroit 562	
	IC <sub>50</sub> (nM)	最大抑制 (%)	IC <sub>50</sub> (nM)	最大抑制 (%)	IC <sub>50</sub> (nM)	最大抑制 (%)
人 IgG 对照	>500	20.82 $\pm$ 11.25	>500	0	>500	6.4
h1702	>500	10.96 $\pm$ 5.25	>500	0		

h1702DS	>500	15.40±6.36	>500	8.60±3.12	>500	4.55
h1704-3	>500	12.93±4.36	>500	6.04±3.24		
2852	96.56±8.98	80.43±4.91	93.90±11.70	95.06±0.51	133.8	87.99
h1702-cys-3024	10.30±2.27	77.92±3.75	4.92±1.50	92.63±0.55		
h1702DS-cys-3024	8.29±1.22	79.26±3.67	3.81±1.35	93.07±1.12	20.78	85.92
h1704-3-cys-3024	5.44±0.83	73.99±2.15	1.45±0.21	92.03±1.23		

结论：裸抗偶联毒素得到的 ADC 在 U87MG, ZR-75-1 和 Detroit562 细胞上具有很好的杀伤作用。

5

**体内活性生物学评价**

**测试例 10: ADC 对人脑星形胶质母细胞瘤 U87MG 裸小鼠移植瘤的疗效评价**

一、测试方法

实验用 BALB/cA-nude 裸小鼠，雌性，6-7 周，购自上海西普尔·必凯实验动物  
 10 有限责任公司（合格证号：SCXK（沪）2008—0016）。饲养环境：SPF 级。裸小  
 鼠皮下接种人脑星形胶质母细胞瘤 U87MG 细胞（中科院，货号 TCHu138），接种  
 细胞后第十天(肿瘤平均体积 122 mm<sup>3</sup>)，将动物随机分组(D0)，每组 8 只，开始腹  
 腔注射给药 1 次/周，共给药 3 次，每周测 2—3 次瘤体积和体重，记录数据。肿  
 瘤体积（V）计算公式为：

$$V = 1/2 \times a \times b^2$$

15

其中 a、b 分别表示长、宽。

$$\text{相对体积 (RTV)} = VT/V0$$

$$\text{抑瘤率(\%)} = (CRTV - TRTV) / CRTV(\%)$$

其中 V0、VT 分别为实验开始时及实验结束时的肿瘤体积。CRTV、TRTV  
 分别为实验结束时的对照组(空白)及实验组的相对肿瘤体积。

20

二、测试对象

h1702-3024 ADC(1mpk, 3mpk, 10mpk);

h1702DS-cys-3024 ADC(1mpk, 3mpk);

h1704-3-cys-3024 ADC(1mpk, 3mpk);

空白组（空白）：PH7.4 的 PBS 缓冲液

25

三、抗体 ADC 的抑瘤效果

1)观察至给药开始后第 26 天(D26)时，受试抗体 h1702-3024 ADC(1mpk, 3mpk,

10mpk)的抑瘤率分别为 33.68%，99.13%，100%；见图 5，与对照组相比均有显著差异。给药第 21 天时，对照组由于肿瘤过大，个别鼠体重下降明显，并于给药第 26 天时，对照组有两只鼠因肿瘤太大死亡。其他各组均体重正常，见图 6，表 14，给药过程中未出现小鼠死亡，提示 h1702-3024 各给药剂量没有明显毒副作用。

5 h1702-3024 各剂量间有一定的剂量依赖关系，在 3mpk 的时候已经达到 95% 以上的抑瘤率，10mpk 达到 100%的抑瘤率。

**表14. 给药抗体h1702-3024对荷瘤裸鼠U87MG移植瘤的疗效**

分组	平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		相对肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		抑瘤率 D26	P (bs 空白)
	D0	SEM	D26	SEM	D26	SEM		
空白	122.26	14.47	3265.61	247.43	31.90	4.65	-	-
h1702-3024 1mpk,	121.43	11.69	2616.87	442.66	21.16	2.57	33.68%	0.051771
h1702-3024 3mpk	121.29	10.91	43.78	16.59	0.28	0.10	99.13%***	0.000004
h1702-3024 10mpk	121.56	10.82	0.00	0.00	0.00	0.00	100%***	0.000004

vs 空白: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001

10 2)对受试抗体h1702DS-cys-3024 ADC, h1704-3-cys-3024 ADC抑瘤效果实验结果见表15。结果显示，腹腔注射给药1次/周，共给药3次，观察至D26时，受试ADC h1702DS-cys-3024 (1mpk) 的抑瘤率达到22.99%；h1702DS-cys-3024 (3mpk) 的抑瘤率达到98.16%；h1704-3-cys-3024 (1mpk) 的抑瘤率达到31.05%；h1704-3-cys-3024 (3mpk) 的抑瘤率达到94.83%；1mpk的3个受试抗体组与空白组相比都无显著差异 (P>0.05)，3mpk的3个受试抗体组与空白组相比均有极显著差异 (P<0.001)。

15 给药过程中各组动物体重正常,提示ADC无明显毒副作用。

空白组和1mpk各组在26天时肿瘤体积较大，因此D26时将空白和1mpk各组处死，其余组观察至D36时，h1702DS -cys-3024 (3mpk)组停药后肿瘤生长仍然较慢，抑瘤效果最好。h1702DS-cys-3024 (3mpk)和h1704-3-cys-3024 (3mpk)在D26和D36时的抑瘤率组间比较无明显差异 (P>0.05)。

**表15. 给药抗体对荷瘤裸鼠U87MG移植瘤的疗效 (D26)**

分组	平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		相对肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		抑瘤率 D26	P (bs 空白)
	D1	SEM	D26	SEM	D26	SEM		
空白	119.02	11.05	3312.05	301.25	29.76	4.77	-	-
h1702DS-cys-3024 ADC 1mpk,	119.40	9.76	2877.76	216.64	22.92	0.92	22.99%	0.184423
h1702DS-cys-3024 ADC 3mpk,	119.37	9.87	74.60	49.29	0.55	0.33	98.16%***	0.000053
h1704-3-cys-3024 ADC 1mpk	119.79	9.06	2582.55	139.14	20.52	2.00	31.05%	0.099331
h1704-3-cys-3024 ADC 3mpk	119.28	9.82	211.39	110.54	1.54	0.81	94.83%***	0.000081

vs 空白: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001

**测试例 11: ADC 对人咽头癌胸水转移细胞 Detroit 562 裸小鼠移植瘤的疗效评价**

一、测试方法



实验用 BALB/cA-nude 裸小鼠，雌性，6-7 周，皮下接种人咽头癌胸水转移细胞 Detroit 562 细胞。接种细胞后第十天，将动物随机分组(D0)，每组 8 只，开始腹腔注射给药 1 次/周，共给药 3 次，每周测 2—3 次瘤体积和体重，记录数据。肿瘤体积 (V) 计算公式为：

5  $V = 1/2 \times a \times b^2$

其中 a、b 分别表示长、宽。

相对体积 (RTV) = VT/V0

抑瘤率(%)=(CRTV-TRTV)/ CRTV(%)

其中 V0、VT 分别为实验开始时及实验结束时的肿瘤体积。CRTV、TRTV 分别为实验结束时的对照组(空白)及实验组的相对肿瘤体积。

二、测试对象

h1702DS-cys-3024 ADC(1mpk, 3mpk);

空白组 (空白): PH7.4 的 PBS 缓冲液

15

三、抗体 ADC 的抑瘤效果

观察至 D35 时，受试抗体 ADC 抑瘤率分别是：h1702DS-cys-3024 ADC(1mpk) 的抑瘤率达到 39.22% (P<0.05)；h1702DS-cys-3024 ADC (3mpk) 的抑瘤率达到 70.50% (P<0.001) (见表 16)。药过程中各组动物体重正常。

20 **表 16. 给药抗体对荷瘤裸鼠 Detroit 562 移植瘤的疗效**

分组	平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		平均肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		相对肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		抑瘤率 D35	P (vs 空白)
	D0	SEM	D35	SEM	D35	SEM		
空白	160.47	14.82	1,235.73	155.23	7.64	0.93	-	-
h1702DS-cys-3024 ADC (1mpk)	160.40	14.01	745.49	79.48	4.64	0.60	39.22%*	0.017
h1702DS-cys-3024 ADC (3mpk)	160.43	13.23	318.31	60.14	2.25	0.50	70.50%***	0.000

vs 空白: \* p<0.05, \*\*\*p<0.001

**稳定性评价**

**测试例 12: B7H3 ADC 的物理稳定性**

25 利用 DSC 检测不同抗体 ADC 的热稳定性，比较了不同的缓冲体系不同 pH 条件下的热稳定性情况，不同 pH 对应的示例性缓冲体系如 10mM PBS(pH7.4)，10mM Acetate (pH5.5)。将样品置换到对应缓冲液中，控制样品浓度在 1mg/ml 左右，利用 MicroCal\* VP-Capillary DSC (Malvern) 进行检测。检测前，将各个样品及空白缓冲液用真空脱气器脱气 1~2min。样品板每个孔加入 400μl 样品或空白缓冲液(仪  
30 器上样量为 300μl)。最后两对孔板分别加入 14% Decon 90 和 ddH<sub>2</sub>O，以备清洗用，

样品板加样完毕后，套上塑料软盖板。扫描温度从 25℃开始到 100℃结束，扫描速率 60℃/h。具体结果如表 17 所示，在几个测试体系中 h1702-3024、h1703-3024 均表现了较好的热稳定性。

表 17. 不同 ADC 的 DSC 实验结果

样品	缓冲液	Tm-onset (°C)	TM (°C)
h1702-3024	pH7.4	61.22	76.58
	pH 5.5	60.23	77.61
h1703-3024	pH7.4	58.04	71.39
	pH 5.5	58.22	73.11

5

### 测试例 13: ADC 的稳定性

通过 SEC-HPLC 监测样品(h1702DS-cys-3024 ADC, h1704-3-cys-3024 ADC)纯度考察一定浓度条件下稳定性，示例性的条件比如将样品浓度控制在约 50mg/ml，在 PBS (pH7.4) 体系及 pH5.5 醋酸/蔗糖体系（代称 559 体系）中比较不同抗体在 40℃保存 28 天的稳定性情况。利用 Xbridge protein BEH SEC 200A (Waters) HPLC 柱子检测抗体纯度，通过 28 天的考察，h1702DS-cys-3024 ADC 表现了良好的稳定性，结果如图 7 所示。

结果显示，h1702DS-cys-3024 在醋酸和 PBS 缓冲液中均显示出良好的稳定性。

15 虽然为了清楚的理解，已经借助于附图和实例详细描述了上述发明，但是描述和实例不应当解释为限制本发明的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

**权利要求书:**

1. 一种通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物,



5 其中:

D 是细胞毒性药物;

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> 是接头单元;

y 为选自 1-8 的数, 优选为选自 2-4 的数;

Ab 为 B7H3 抗体或其抗原结合片段, 其与人 B7H3 结合, 所述 B7H3 抗体或其  
10 抗原结合片段是选自下面 (a) 至 (c) 中任一种的单克隆抗体或其抗原结合片段:

(a) 单克隆抗体, 其包含 1 个或多个选自以下的 CDR 区序列或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列:

15 抗体重链可变区 HCDR 区序列: 如 SEQ ID NO : 10、11 和 12 氨基酸序列所示; 和抗体轻链可变区 LCDR 区序列: 如 SEQ ID NO : 13、14 和 15 氨基酸序列所示;

(b) 单克隆抗体, 其包含 1 个或多个选自以下的 CDR 区序列或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列:

20 抗体重链可变区 HCDR 区序列: 如 SEQ ID NO : 16、17 和 18 氨基酸序列所示; 和抗体轻链可变区 LCDR 区序列: 如 SEQ ID NO : 19、20 和 21 氨基酸序列所示;

(c) 单克隆抗体, 其包含 1 个或多个选自以下的 CDR 区序列或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列:

25 抗体重链可变区 HCDR 区序列: 如 SEQ ID NO : 30、31 和 32 氨基酸序列所示; 和抗体轻链可变区 LCDR 区序列: 如 SEQ ID NO : 33、34 和 35 氨基酸序列所示。

2. 一种通式 (A) 所示的抗体-药物偶联物,



其中:

30 D 是细胞毒性药物;

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> 是接头单元;

y 为选自 1-8 的数, 优选为选自 2-4 的数;

Ab 为与权利要求 1 中所述的 B7H3 抗体或其抗原结合片段竞争结合人 B7H3  
的单克隆抗体或其抗原结合片段。

35

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗体-药物偶联物, 其中所述 Ab 是重组抗体。

4. 如权利要求 3 所述的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 的恒定区和/或框架区是来源于人的重组抗体或其抗原结合片段。

5 5. 如权利要求 4 所述的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 的轻链和重链可变区上的轻链 FR 区和重链 FR 区序列分别来源于人种系轻链和重链序列或其突变序列；其中所述的恒定区包括来源于人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，优选人源 IgG1 重链恒定区；和来源于人源  $\kappa$ 、 $\lambda$  链或其变体的轻链恒定区。

10

6. 如权利要求 5 所述的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 含有 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO:36 或 SEQ ID NO:37 所示的重链可变区或其变体；所述变体是在 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO:36 或 SEQ ID NO:37 所示的重链可变区序列上具有 1-10 个氨基酸替换的序列；

15

和含有 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:38 或 SEQ ID NO:39 所示的轻链可变区或其变体；所述变体是在 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:38 或 SEQ ID NO:39 所示的轻链可变区序列上具有 1-10 个氨基酸替换的序列。

20

7. 如权利要求 5 所述的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 含有选自下面 (1) 至 (7) 中任一种的单克隆抗体或其抗原结合片段：

(1) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:6 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:7 所示抗体轻链可变区；

(2) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:8 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:9 所示抗体轻链可变区；

25

(3) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:28 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:29 所示抗体轻链可变区；

(4) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:36 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:38 所示抗体轻链可变区；

30

(5) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:36 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:39 所示抗体轻链可变区；

(6) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:37 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:38 所示抗体轻链可变区；

(7) 单克隆抗体，其包含 SEQ ID NO:37 所示的抗体重链可变区；和 SEQ ID NO:39 所示抗体轻链可变区。

35

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的抗体-药物偶联物，其中所述 Ab 为全长抗体，其进一步包括人抗体恒定区；其中所述的全长抗体选自：

h1702 抗体, 其是由 SEQ ID NO:22 所示的重链序列和 SEQ ID NO:23 所示的轻链序列组成的全长抗体,

h1703 抗体, 其是由 SEQ ID NO:24 所示的重链序列和 SEQ ID NO:25 所示的轻链序列组成的全长抗体,

5 h1702-DS 抗体, 其是由 SEQ ID NO:22 所示的重链序列和 SEQ ID NO:26 所示的轻链序列组成的全长抗体, 和

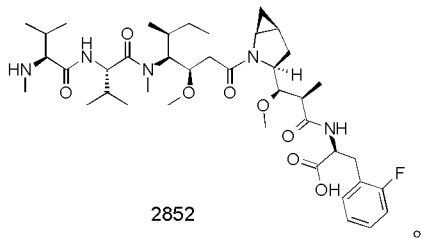
h1704-3 抗体, 其是由 SEQ ID NO:40 所示的重链序列和 SEQ ID NO:41 所示的轻链序列组成的全长抗体。

10 9. 如权利要求 1-7 中任一项所述的抗体-药物偶联物, 其中所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体 (scFv)、二聚化的 V 区 (双抗体)、二硫键稳定化的 V 区 (dsFv) 和包含 CDR 的肽的抗原结合片段。

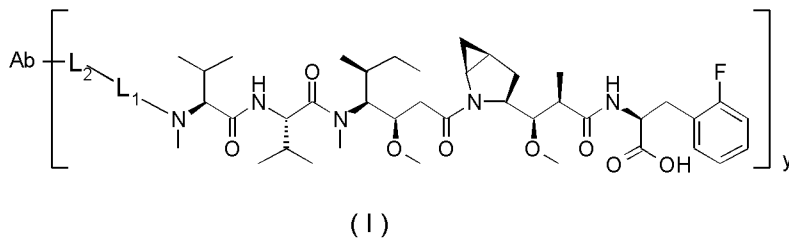
10. 如权利要求 1-9 任一项所述的抗体-药物偶联物, 其中所述细胞毒性药物选自毒素、化疗药物、抗生素、放射性同位素和核溶酶。

11. 如权利要求 10 所述的抗体-药物偶联物, 其中所述细胞毒性药物选自 DM1、DM3、DM4、MMAF 和 MMAE。

20 12. 如权利要求 10 所述的抗体-药物偶联物, 其中所述细胞毒性药物选自:



13. 如权利要求 10 所述的抗体-药物偶联物, 其为式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,



25

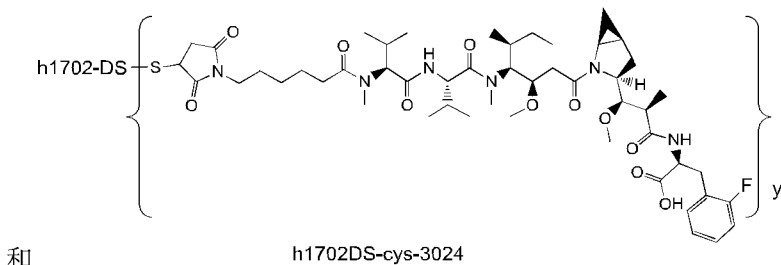
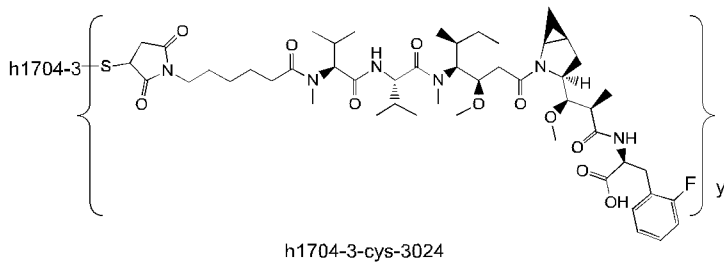
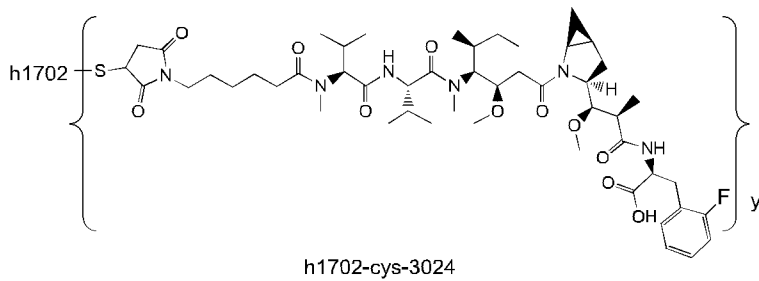
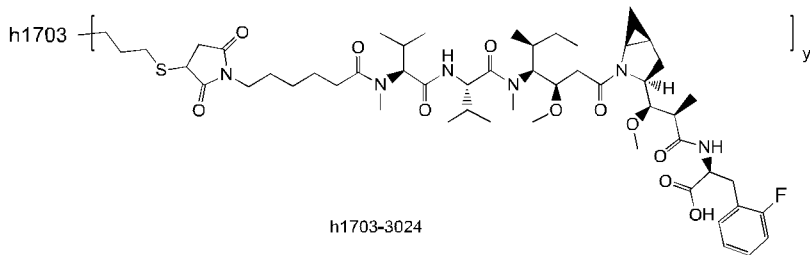
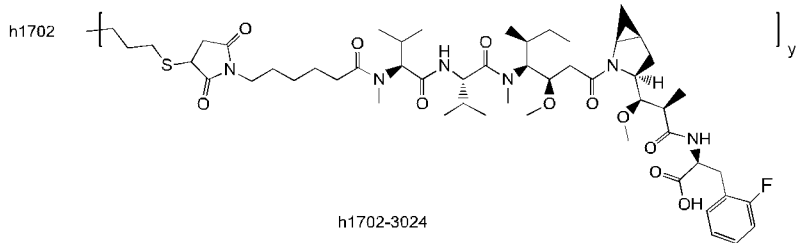
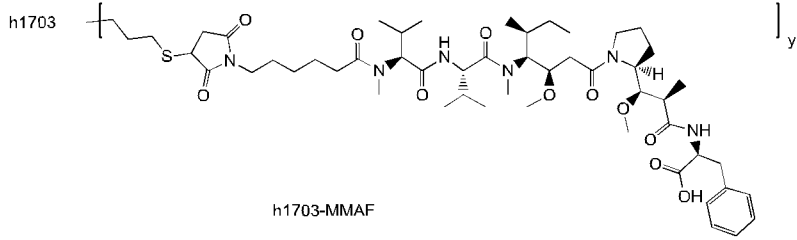
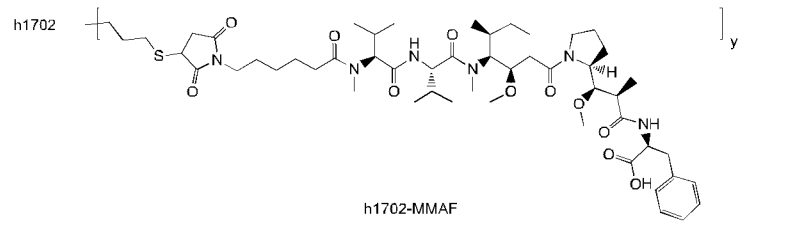
其中:

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> 是接头单元;

y 为选自 1-8 的数, 优选为选自 2-4 的数;

Ab 为权利要求 1-9 中任一项所述的 B7H3 抗体或其抗原结合片段。





和

5

19. 一种药物组合物，其包含如权利要求 1-18 任一项所述的抗体-药物偶联物或所述抗体-药物偶联物药学上可接受的盐或溶剂化合物，和一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

5 20. 如权利要求 1-18 任一项所述的抗体-药物偶联物或如权利要求 19 所述的药物组合物在制备用于治疗与人 B7H3 相关的疾病的药物中的用途。

21. 如权利要求 20 所述的用途，其在于制备用于治疗 B7H3 高表达癌症的药物中的用途。

10

22. 如权利要求 1-18 任一项所述的抗体-药物偶联物或如权利要求 19 所述的药物组合物在制备用于治疗疾病的药物中的用途，所述疾病选自人脑星形胶质母细胞瘤、人咽头癌、肾上腺肿瘤、AIDS-相关癌症、腺泡状软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、转移性脑瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、肾嫌色细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、室管膜细胞瘤、尤文肿瘤、骨外黏液样软骨肉瘤、骨纤维发育不全、骨纤维性发育不良、胆囊或胆管癌、胃癌、妊娠滋养细胞病、生殖细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、白血病、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤性肿瘤、肝癌、淋巴瘤、肺癌、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、成神经细胞瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺瘤、小儿癌症、外周神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑色素瘤、肾转移性癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌和子宫癌。

15

20



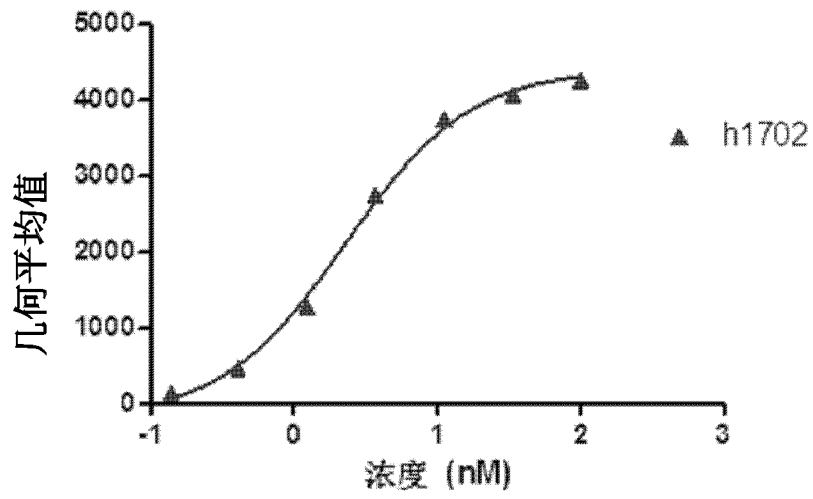


图 1

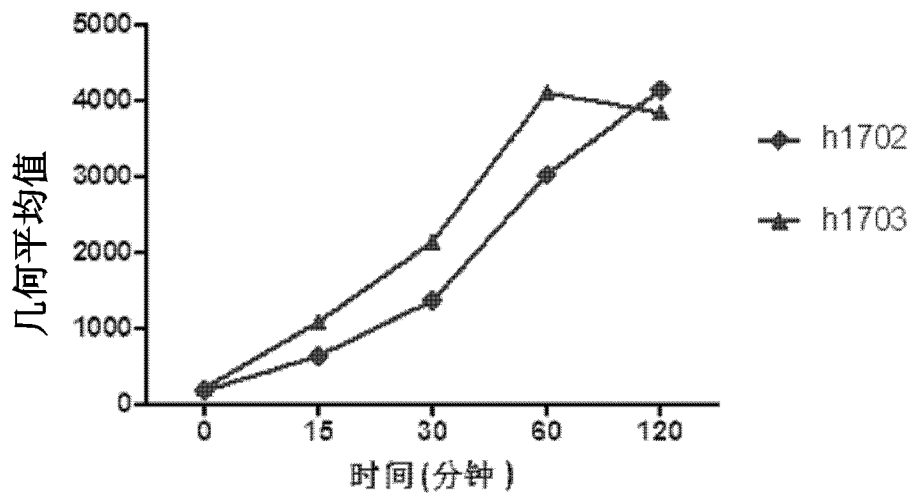


图 2

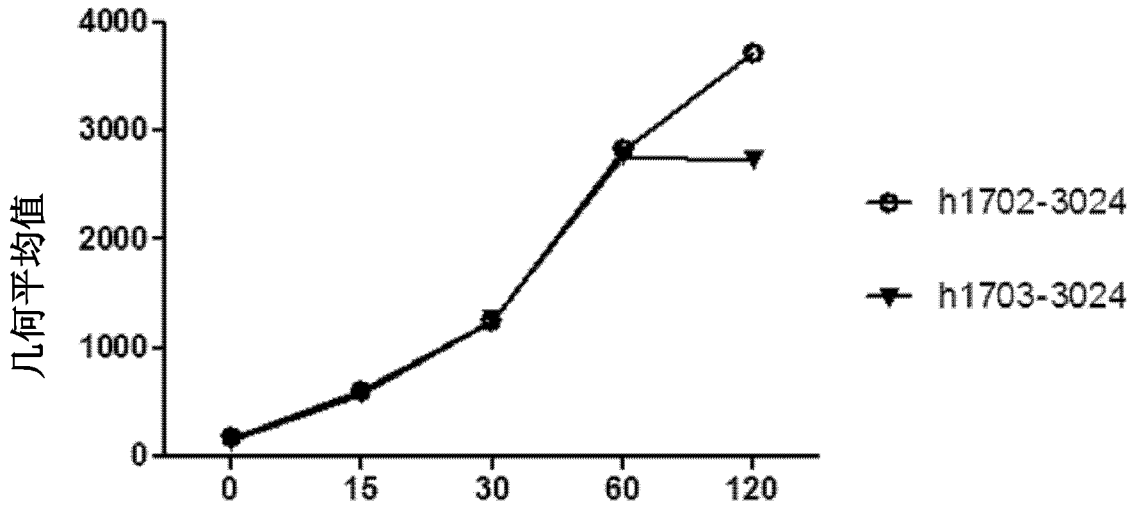


图 3

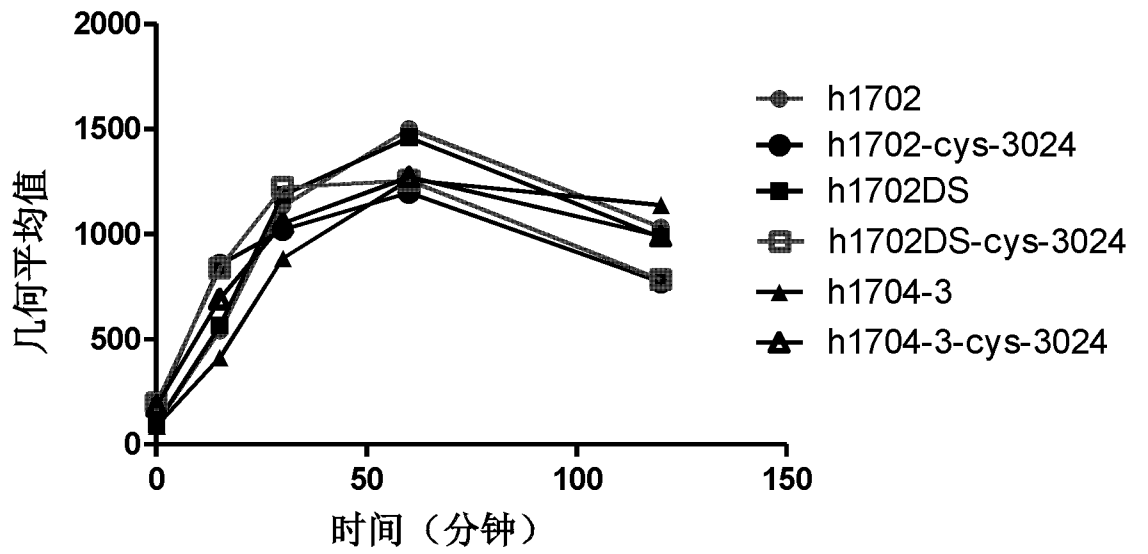


图 4

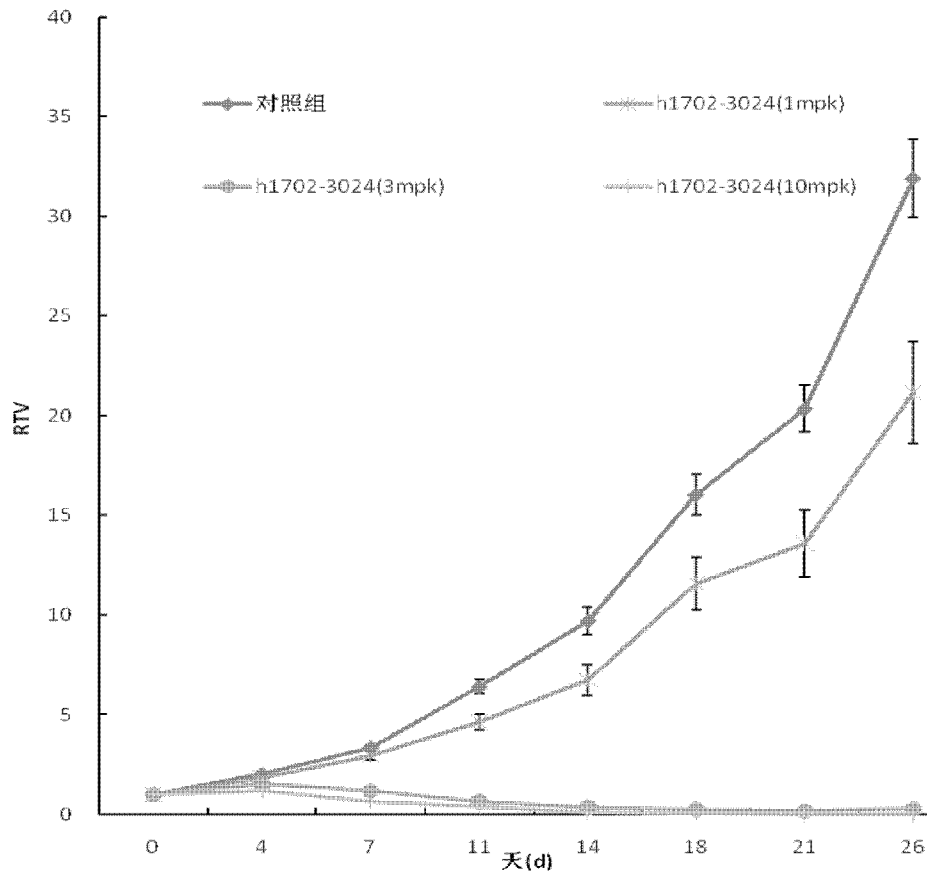


图 5

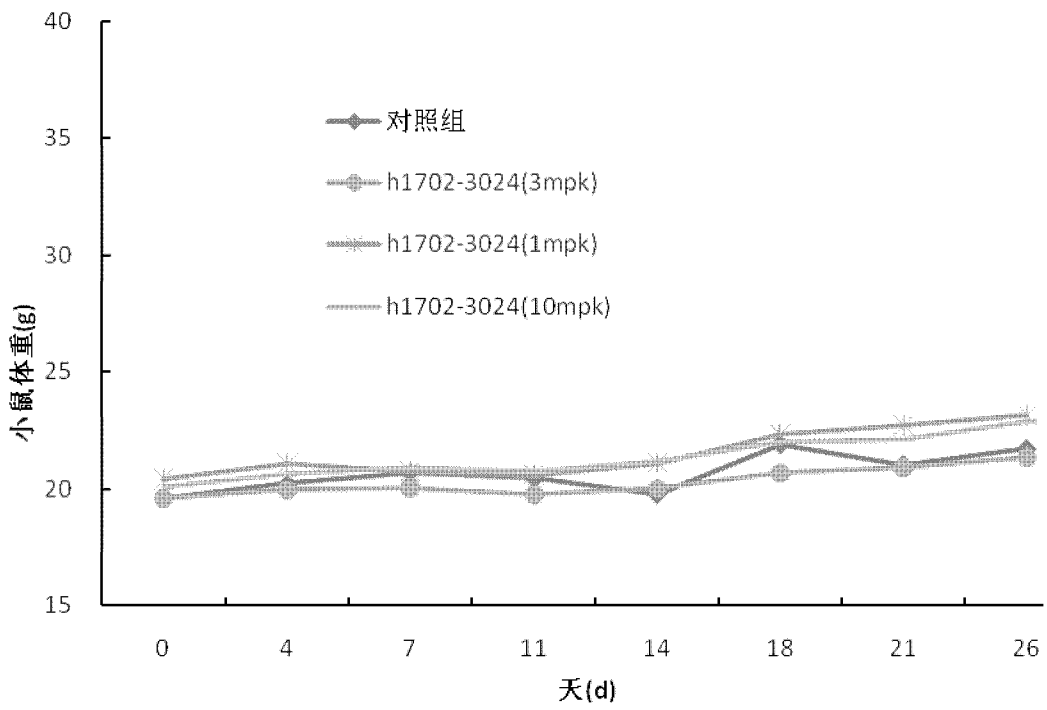


图 6

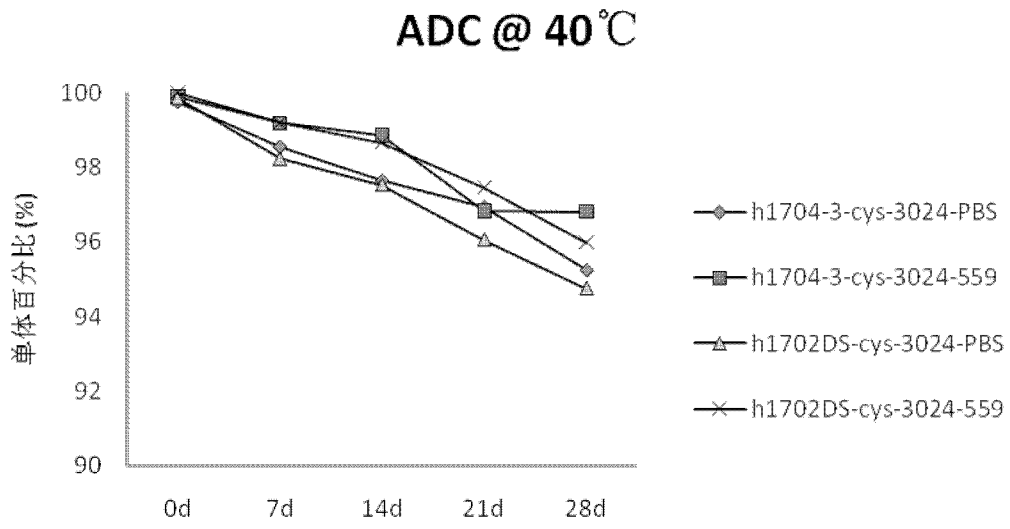


图 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/098480

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 39/395(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)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)

A61K; C07K; 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)

CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据资源系统, WANFANG DATA, PubMed, ISI web of knowledge, 百度, BAIDU, 读秀, DUXIU; Genbank, EBI-EMBL, 中国专利生物序列检索系统, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: 江苏恒瑞医药股份有限公司, 顾津明, 叶鑫, 杨柳青, 蒋贵阳, 陶维康, 张连山, 应华, 张玲, 抗体药物偶联, 细胞毒, ADC, B7同源物3, 分化抗原簇276, B7 homolog 3, cluster of differentiation 276, CD276, B7H3, B7-H3, B7RP-2, 4Ig-B7-H3, 4Ig form of B7H3, antibody, B 7 ホモログ 3, SEQ ID Nos: 1-41

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016207103 A1 (BAYER PHARMA A.G.) 29 December 2016 (2016-12-29) claims 1, 15 and 23-34, and description, page 145, paragraph 2 to page 148, last paragraph, and page 201, paragraph 1	2-5, 9-22
Y	WO 2016207103 A1 (BAYER PHARMA A.G.) 29 December 2016 (2016-12-29) claims 1, 15 and 23-34, and description, page 145, paragraph 2 to page 148, last paragraph, and page 201, paragraph 1	1-22
Y	WO 2017002776 A1 (DAIICHI SANKYO COMPANY LIMITED) 05 January 2017 (2017-01-05) abstract	1-22
Y	CN 103687945 A (DAIICHI SANKYO COMPANY LIMITED) 26 March 2014 (2014-03-26) claims 1-32, and description, paragraphs [0016]-[0056]	1-22
Y	CN 106715469 A (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 24 May 2017 (2017-05-24) claims 1-48	1-22

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

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2018

Date of mailing of the international search report

26 October 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China  
 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/CN2018/098480

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101687021 A (SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 31 March 2010 (2010-03-31) entire document	1-22
A	何娜 等 (HE, Na et al.). "一株特异性识别4IgB7-H3单克隆抗体的研制及其生物学特性的初步分析 (Preparation of a Monoclonal Antibody Against Human 4IgB7-H3 Molecule and Analysis of Its Biological Characteristics)" <i>现代免疫学 (Current Immunology)</i> , Vol. 29, No. (06), 31 December 2009 (2009-12-31), pp. 447-452	1-22

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/098480**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016207103	A1	29 December 2016	JP	2018524313	A	30 August 2018
				CA	2990408	A1	29 December 2016
				CN	108025085	A	11 May 2018
				US	2018185510	A1	05 July 2018
				AR	108021	A1	11 July 2018
				TW	201713364	A	16 April 2017
				EP	3313525	A1	02 May 2018
WO	2017002776	A1	05 January 2017	AU	2016286898	A1	04 January 2018
				EP	3315512	A1	02 May 2018
				US	2018147292	A1	31 May 2018
				IL	256558	D0	28 February 2018
				CA	2990572	A1	05 January 2017
				KR	20180021723	A	05 March 2018
				CN	107922477	A	17 April 2018
				JP	WO2017002776	A1	31 May 2018
TW	201705982	A	16 February 2017				
CN	103687945	A	26 March 2014	CA	2834136	C	17 April 2018
				US	2013078234	A1	28 March 2013
				SI	2703486	T1	31 May 2018
				TW	I561531	B	11 December 2016
				RU	2013152164	A	27 May 2015
				CA	2834136	A1	01 November 2012
				LT	2703486	T	25 May 2018
				HR	2703486	T1	01 June 2018
				DK	2703486	T3	28 May 2018
				JP	WO2012147713	A1	28 July 2014
				AU	2012248470	B2	27 October 2016
				MX	344773	B	06 January 2017
				JP	2016165294	A	15 September 2016
				EP	2703486	A1	05 March 2014
				IL	229061	D0	31 December 2013
				ZA	201307983	B	27 January 2016
				CN	103687945	B	12 October 2016
				US	9371395	B2	21 June 2016
				PT	2703486	T	18 May 2018
				EP	2703486	A4	25 February 2015
				AU	2012248470	A1	21 November 2013
				WO	2012147713	A1	01 November 2012
				US	2016368990	A1	22 December 2016
				MX	2013012285	A	21 November 2013
				CO	6811812	A2	16 December 2013
				SG	194620	A1	30 December 2013
				ES	2667568	T3	11 May 2018
JP	6224759	B2	01 November 2017				
JP	5917498	B2	18 May 2016				
TW	201249869	A	16 December 2012				
EP	2703486	B1	07 March 2018				
KR	20140033018	A	17 March 2014				
PL	2703486	T3	31 July 2018				
NZ	616809	A	28 August 2015				

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/098480**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)			
CN	106715469	A	24 May 2017	KR 20170042786	A 19 April 2017			
				EP 3186277	A4 17 January 2018			
				BR 112017003582	A2 27 February 2018			
				EA 201790465	A1 31 July 2017			
				EP 3186277	A2 05 July 2017			
				JP 2017532952	A 09 November 2017			
				WO 2016033225	A2 03 March 2016			
				US 2017240637	A1 24 August 2017			
				WO 2016033225	A3 21 April 2016			
				AU 2015306621	A1 16 March 2017			
				CA 2959356	A1 03 March 2016			
				-----	-----	-----	-----	-----
				CN	101687021	A	31 March 2010	WO 2008116219
EP 2121008	A4 31 March 2010							
KR 20100014527	A 10 February 2010							
JP 2016020346	A 04 February 2016							
EP 2121008	A2 25 November 2009							
JP 2014088411	A 15 May 2014							
US 2010143245	A1 10 June 2010							
JP 2010523478	A 15 July 2010							
CA 2680111	C 08 May 2018							
CN 101687021	B 17 April 2013							
CA 2680111	A1 25 September 2008							
WO 2008116219	A2 25 September 2008							
-----	-----	-----	-----	-----				



国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/098480

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 39/395(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)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>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; C07K; 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>CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据资源系统, PubMed, ISI web of knowledge, 百度, 独秀, Genbank, EBI-EMBL, 中国专利生物序列检索系统:江苏恒瑞医药股份有限公司, 顾津明, 叶鑫, 杨柳青, 蒋贵阳, 陶维康, 张连山, 应华, 张玲, 抗体药物偶联, 细胞毒, ADC, B7同源物3, 分化抗原簇 276, B7 homolog 3, cluster of differentiation 276, CD276, B7H3, B7-H3, B7RP-2, 4Ig-B7-H3, 4Ig form of B7H3, antibody, B7 ホモロク3, SEQ ID NOs: 1-41</p>																							
<p><b>C. 相关文件</b></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>WO 2016207103 A1 (BAYER PHARMA A.G.) 2016年 12月 29日 (2016 - 12 - 29) 权利要求1、15、23-34、说明书第145页第2段至148页最后一段、201页第1段</td> <td>2-5, 9-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016207103 A1 (BAYER PHARMA A.G.) 2016年 12月 29日 (2016 - 12 - 29) 权利要求1、15、23-34、说明书第145页第2段至148页最后一段、201页第1段</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017002776 A1 (第一三共株式会社) 2017年 1月 5日 (2017 - 01 - 05) 摘要</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103687945 A (第一三共株式会社) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 权利要求1-32, 说明书第[0016]-[0056]段</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106715469 A (纪念斯隆-凯特琳癌症中心) 2017年 5月 24日 (2017 - 05 - 24) 权利要求1-48</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101687021 A (斯隆-凯特琳癌症研究院) 2010年 3月 31日 (2010 - 03 - 31) 全文</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	WO 2016207103 A1 (BAYER PHARMA A.G.) 2016年 12月 29日 (2016 - 12 - 29) 权利要求1、15、23-34、说明书第145页第2段至148页最后一段、201页第1段	2-5, 9-22	Y	WO 2016207103 A1 (BAYER PHARMA A.G.) 2016年 12月 29日 (2016 - 12 - 29) 权利要求1、15、23-34、说明书第145页第2段至148页最后一段、201页第1段	1-22	Y	WO 2017002776 A1 (第一三共株式会社) 2017年 1月 5日 (2017 - 01 - 05) 摘要	1-22	Y	CN 103687945 A (第一三共株式会社) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 权利要求1-32, 说明书第[0016]-[0056]段	1-22	Y	CN 106715469 A (纪念斯隆-凯特琳癌症中心) 2017年 5月 24日 (2017 - 05 - 24) 权利要求1-48	1-22	A	CN 101687021 A (斯隆-凯特琳癌症研究院) 2010年 3月 31日 (2010 - 03 - 31) 全文	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	WO 2016207103 A1 (BAYER PHARMA A.G.) 2016年 12月 29日 (2016 - 12 - 29) 权利要求1、15、23-34、说明书第145页第2段至148页最后一段、201页第1段	2-5, 9-22																					
Y	WO 2016207103 A1 (BAYER PHARMA A.G.) 2016年 12月 29日 (2016 - 12 - 29) 权利要求1、15、23-34、说明书第145页第2段至148页最后一段、201页第1段	1-22																					
Y	WO 2017002776 A1 (第一三共株式会社) 2017年 1月 5日 (2017 - 01 - 05) 摘要	1-22																					
Y	CN 103687945 A (第一三共株式会社) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 权利要求1-32, 说明书第[0016]-[0056]段	1-22																					
Y	CN 106715469 A (纪念斯隆-凯特琳癌症中心) 2017年 5月 24日 (2017 - 05 - 24) 权利要求1-48	1-22																					
A	CN 101687021 A (斯隆-凯特琳癌症研究院) 2010年 3月 31日 (2010 - 03 - 31) 全文	1-22																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><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>“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>“&amp;” 同族专利的文件</p>																							
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																						
2018年 10月 10日	2018年 10月 26日																						
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																						
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	陈莹																						
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(010)-53961975																						

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	何娜 等. "一株特异性识别4IgB7-H3单克隆抗体的研制及其生物学特性的初步分析" 现代免疫学, 第29卷, 第06期, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第447-452页	1-22

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/098480

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2016207103	A1	2016年 12月 29日	JP	2018524313	A	2018年 8月 30日
				CA	2990408	A1	2016年 12月 29日
				CN	108025085	A	2018年 5月 11日
				US	2018185510	A1	2018年 7月 5日
				AR	108021	A1	2018年 7月 11日
				TW	201713364	A	2017年 4月 16日
				EP	3313525	A1	2018年 5月 2日
WO	2017002776	A1	2017年 1月 5日	AU	2016286898	A1	2018年 1月 4日
				EP	3315512	A1	2018年 5月 2日
				US	2018147292	A1	2018年 5月 31日
				IL	256558	D0	2018年 2月 28日
				CA	2990572	A1	2017年 1月 5日
				KR	20180021723	A	2018年 3月 5日
				CN	107922477	A	2018年 4月 17日
				JP	W02017002776	A1	2018年 5月 31日
				TW	201705982	A	2017年 2月 16日
CN	103687945	A	2014年 3月 26日	CA	2834136	C	2018年 4月 17日
				US	2013078234	A1	2013年 3月 28日
				SI	2703486	T1	2018年 5月 31日
				TW	I561531	B	2016年 12月 11日
				RU	2013152164	A	2015年 5月 27日
				CA	2834136	A1	2012年 11月 1日
				LT	2703486	T	2018年 5月 25日
				HR	P20180640	T1	2018年 6月 1日
				DK	2703486	T3	2018年 5月 28日
				JP	W02012147713	A1	2014年 7月 28日
				AU	2012248470	B2	2016年 10月 27日
				MX	344773	B	2017年 1月 6日
				JP	2016165294	A	2016年 9月 15日
				EP	2703486	A1	2014年 3月 5日
				IL	229061	D0	2013年 12月 31日
				ZA	201307983	B	2016年 1月 27日
				CN	103687945	B	2016年 10月 12日
				US	9371395	B2	2016年 6月 21日
				PT	2703486	T	2018年 5月 18日
				EP	2703486	A4	2015年 2月 25日
				AU	2012248470	A1	2013年 11月 21日
				WO	2012147713	A1	2012年 11月 1日
				US	2016368990	A1	2016年 12月 22日
				MX	2013012285	A	2013年 11月 21日
				CO	6811812	A2	2013年 12月 16日
				SG	194620	A1	2013年 12月 30日
				ES	2667568	T3	2018年 5月 11日
				JP	6224759	B2	2017年 11月 1日
				JP	5917498	B2	2016年 5月 18日
				TW	201249869	A	2012年 12月 16日
EP	2703486	B1	2018年 3月 7日				
KR	20140033018	A	2014年 3月 17日				
PL	2703486	T3	2018年 7月 31日				
NZ	616809	A	2015年 8月 28日				

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/098480

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	106715469	A	2017年 5月 24日	KR	20170042786	A	2017年 4月 19日				
				EP	3186277	A4	2018年 1月 17日				
				BR	112017003582	A2	2018年 2月 27日				
				EA	201790465	A1	2017年 7月 31日				
				EP	3186277	A2	2017年 7月 5日				
				JP	2017532952	A	2017年 11月 9日				
				WO	2016033225	A2	2016年 3月 3日				
				US	2017240637	A1	2017年 8月 24日				
				WO	2016033225	A3	2016年 4月 21日				
				AU	2015306621	A1	2017年 3月 16日				
				CA	2959356	A1	2016年 3月 3日				
				CN	101687021	A	2010年 3月 31日	WO	2008116219	A3	2008年 12月 11日
								EP	2121008	A4	2010年 3月 31日
KR	20100014527	A	2010年 2月 10日								
JP	2016020346	A	2016年 2月 4日								
EP	2121008	A2	2009年 11月 25日								
JP	2014088411	A	2014年 5月 15日								
US	2010143245	A1	2010年 6月 10日								
JP	2010523478	A	2010年 7月 15日								
CA	2680111	C	2018年 5月 8日								
CN	101687021	B	2013年 4月 17日								
CA	2680111	A1	2008年 9月 25日								
WO	2008116219	A2	2008年 9月 25日								

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)