

一种抗体药物偶联物的药物组合物

技术领域

本发明涉及一种抗体药物偶联物的药物组合物和该组合物的制备方法。

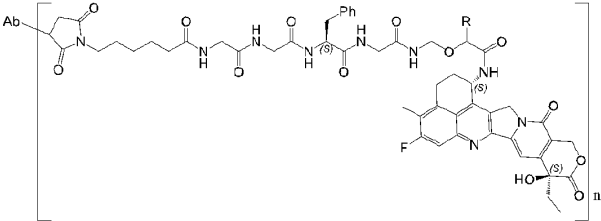
背景技术

抗体-药物偶联物(Antibody-drug Conjugate, ADC)由三个不同的组件(抗体、接头和药物)组成, ADC 技术是通过接头(linker)将抗体和药物分子偶联在一起, 利用抗体的特异性靶向运输药物分子到靶组织发挥作用, 降低药物的系统性毒副作用, 扩展药物治疗窗和提高抗体治疗潜能。

EGFR 是原癌基因 c-erbB1 的表达产物, 是表皮生长因子受体(HER)家族成员之一。该家族包括 HER1(erbB1, EGFR)、HER2(erbB2, NEU)、HER3(erbB3)及 HER4(erbB4)。EGFR 是一种跨膜蛋白, 在细胞生长、发育和分化过程中发挥重要作用。其中, EGFR 的过度表达及其特异性配体 EGF、TGF α 等的结合, 可导致 EGFR 的异常激活; 而活化的 EGFR 可进一步激活、调控多条信号转导通路, 从而抑制肿瘤细胞凋亡, 促进肿瘤细胞增殖、迁移, 并通过介导 VEGF 表达促进肿瘤血管新生, 进而在肿瘤的发生、发展、恶性程度及预后等过程中发挥重要作用。因此, 通过阻断 EGFR 介导的信号转导通路能达到治疗肿瘤的效果。

HER3(又称 ERBB3, 人表皮生长因子受体 3)是跨膜受体, 是表皮生长因子受体家族(EGFR)中的一员, 其基因位于人类第 12 号染色体的长臂上(12q13), 其编码的蛋白分子量为 160 或 180kDa。已知 HER3 在各种癌症、诸如乳腺癌、肺癌和结肠直肠癌中表达, 并且其与酪氨酸激酶受体、诸如 HER2 和 EGFR 一起形成异二聚体, 其后, HER3 被磷酸化, 由此诱导癌细胞生长或凋亡抑制信号。

CN202211461614.0 公开了一种靶向 EGFR 的抗体偶联药物:



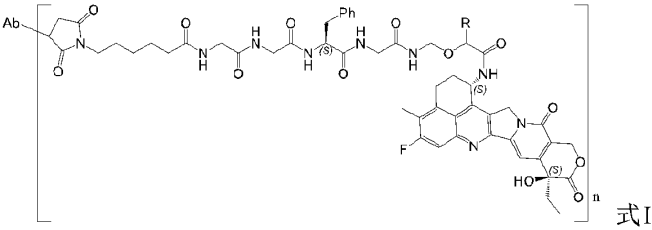
其中 Ab 为靶向 HER2、HER3 或 EGFR 的抗体或其抗原结合片段, R 选自 C₁₋₆ 烷基, n 选自 1-8 的整数或 1-8 的小数。体外研究显示, 该 ADC 对多种肿瘤细胞有很好的抑制作用。

在抗体和抗体药物偶联物(ADC)制剂的研究中, 聚集体的形成和分解产物的产生引起药理学上不希望的副作用, 其带来接受药物治疗的患者的增加的免疫原性或静脉病症相关风险。基于上述原因, 在配制相关制剂时, 需要抑制聚集体的形成和分解产物的产生。特别是在研究抗体药物缀合物的药物制剂时, 会面临更多技术难题, 不仅需要考虑到抗体部分的具体性质, 而且需要考虑到药物-接头部分的具体性质, 例如: 抗体药物缀合物在储存过程中会有小分子毒素脱落的情况出现, 这种脱落对相关药物的有效性和毒性产生影响。

开发稳定的药物组合物, 解决抗体药物偶联物的药物组合物中 ADC 分子的聚集和降解问题, 是我们的研究方向。

发明内容

本发明提供一种药物组合物，其包含式 I 所示的抗体药物偶联物：



其中Ab为靶向HER2、HER3或EGFR的抗体或其抗原结合片段，R选自C₁₋₆烷基，n选自1-8的整数或1-8的小数。

进一步，n选自4-8的整数或4-8的小数。

进一步，当n为选自1-8的整数时，其可以为1、2、3、4、5、6、7、8；当n为选自4-8的整数时，其可以为4、5、6、7、8。

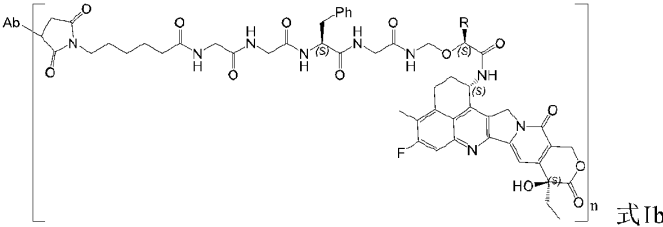
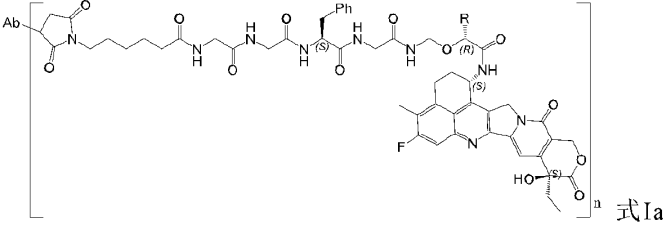
进一步，当n为小数时，其指每个抗体单元缀合的接头-药物分子个数的平均数。

在本发明的一个优选实施例中，R选自C₁₋₃烷基。

在本发明的一个优选实施例中，R选自甲基、乙基、丙基、异丙基。

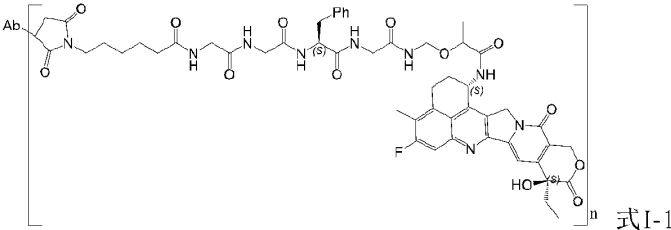
在本发明的一个优选实施例中，R选自甲基。

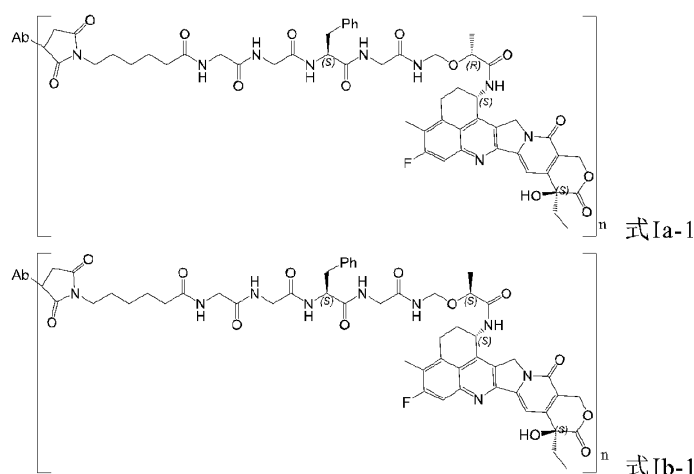
进一步，式I所示的抗体药物偶联物具有式Ia或式Ib所示结构：



其中，式Ia和式Ib中，Ab、R和n的定义如式I。

进一步，式I所示的抗体药物偶联物具有式I-1、Ia-1和Ib-1所示结构：





其中，式I-1、式Ia-1和式Ib-1中，Ab和n的定义如式I。

在本发明的一个优选实施例中，上述抗体-药物偶联物中，所述Ab为靶向HER2的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV)，其中，重链可变区序列包括重链互补决定区1(HCDR1)、重链互补决定区2(HCDR2)和重链互补决定区3(HCDR3)，轻链可变区包括轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链互补决定区2(LCDR2)和轻链互补决定区3(LCDR3)，其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示，HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，和/或LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示，LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示，LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

进一步优选地，所述Ab为靶向HER2的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV)，其中HV的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示，LV的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

更优选地，所述Ab为靶向HER2的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链(HC)和轻链(LC)，其中HC的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，LC的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

在本发明的一个优选实施例中，所述Ab为靶向HER3的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV)，其中，重链可变区序列包括重链互补决定区1(HCDR1)、重链互补决定区2(HCDR2)和重链互补决定区3(HCDR3)，轻链可变区包括轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链互补决定区2(LCDR2)和轻链互补决定区3(LCDR3)，其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示，HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示，HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示，和/或LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示，LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示，LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。

进一步优选地，所述Ab为靶向HER3的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV)，其中HV的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示，LV的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。

更优选地，所述Ab为靶向HER3的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链(HC)和轻链(LC)，其中HC的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示，LC的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示。

在本发明的一个优选实施例中,所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时,其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV),其中,重链可变区序列包括重链互补决定区1(HCDR1)、重链互补决定区2(HCDR2)和重链互补决定区3(HCDR3),轻链可变区包括轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链互补决定区2(LCDR2)和轻链互补决定区3(LCDR3),其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示,和/或LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示。

在本发明的一个优选实施例中,所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时,其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV),其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:38所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:32所示,和/或LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示。

在本发明的一个优选实施例中,所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时,其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV),其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:38所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示,和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示,LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示。

进一步优选地,所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时,其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV),其中HV的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示,LV的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示。

进一步优选地,所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时,其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV),其中HV的氨基酸序列如SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:39所示,LV的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示。

更优选地,所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时,其包括重链(HC)和轻链(LC),其中HC的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示,LC的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示。

更优选地,所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时,其包括重链(HC)和轻链(LC),其中HC的氨基酸序列如SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:40所示,LC的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示。

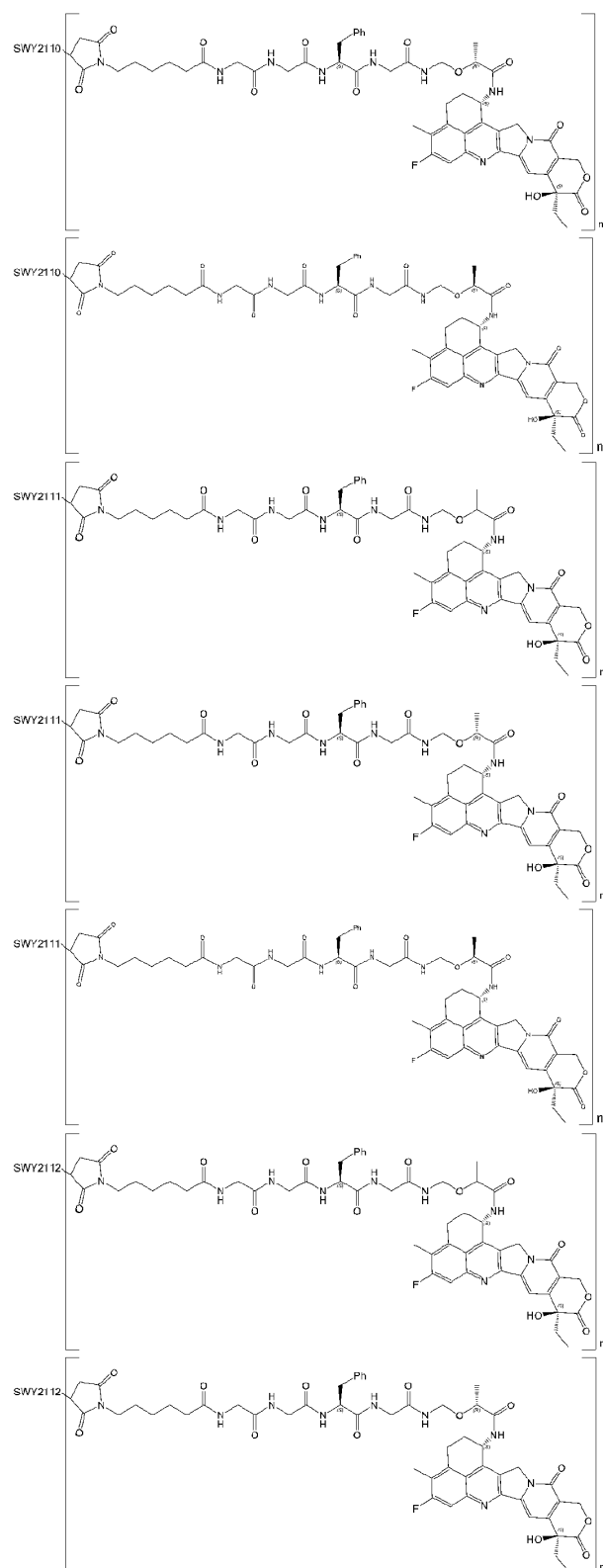
当Ab为靶向HER2、HER3或EGFR的抗体时,所述抗体优选为单克隆抗体,所述单克隆抗体优选选自人源抗体、人源化抗体、嵌合抗体。

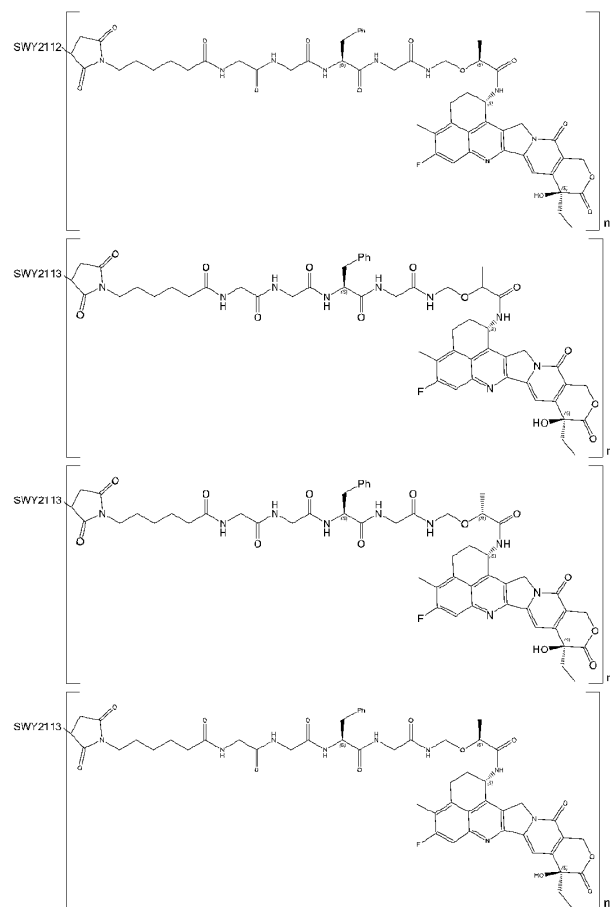
当Ab为靶向HER2、HER3或EGFR的抗原结合片段时,所述抗原结合片段优选选自Fab'、(Fab')₂、Fab、Fv、scFv、dAb。

本发明中,抗体氨基酸序列的编号规则采用Kabat编号规则。

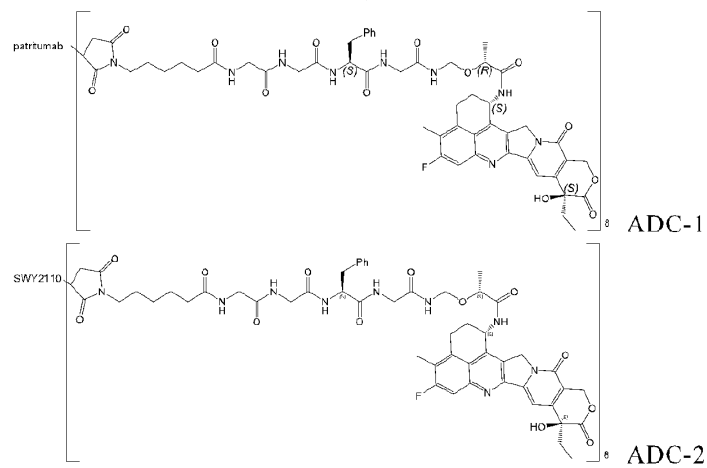
进一步,式I所示的抗体-药物偶联物具有如下所示结构:

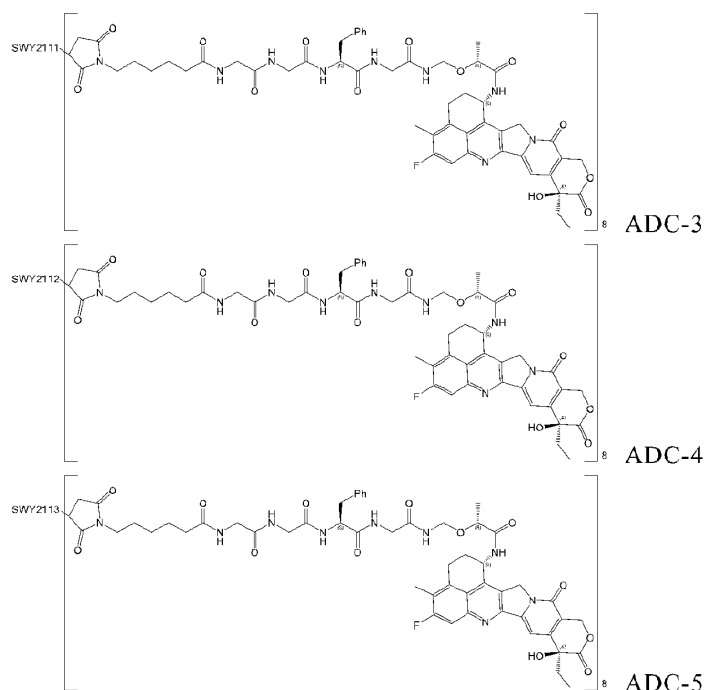






进一步，式I所示的抗体-药物偶联物具有如下所示结构：





上述抗体-药物偶联物中：

DP001 为具有两条如 SEQ ID NO:9 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

Patritumab 为具有两条如 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

SWY2110 为具有两条如 SEQ ID NO:29 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

SWY2111 为具有两条如 SEQ ID NO:34 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

SWY2112 为具有两条如 SEQ ID NO:37 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

SWY2113 为具有两条如 SEQ ID NO:40 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

n 选自 1-8 的整数或 1-8 的小数。

进一步，n 选自 4-8 的整数或 4-8 的小数。

进一步，n 为 8。

进一步，当 n 为选自 1-8 的整数时，其可以为 1、2、3、4、5、6、7、8；当 n 为选自 4-8 的整数时，其可以为 4、5、6、7、8。

进一步，所述药物组合物为注射剂，优选注射液或冻干注射剂，更优选冻干注射剂。

所述冻干注射剂是固体注射剂(即冻干粉)，其可以通过在使用时溶解在水(优选注射用水)中来使用，其通过冻干包含预定量的药物组分的水溶液来获得。

在本发明中，注射用水指符合中国药典(2020)注射用水项下规定的水。

进一步，所述药物组合物，包含式 I 所示的抗体-药物偶联物和缓冲剂。

进一步, 所述药物组合物还包含稳定剂。

进一步, 所述药物组合物还包含表面活性剂。

进一步, 所述药物组合物还可以包含水。

在一些实施方案中, 所述药物组合物, 包含式I所示的抗体-药物偶联物和缓冲剂、稳定剂、表面活性剂。

在一些实施方案中, 所述药物组合物还包含水。

在一些实施方案中, 所述药物组合物中, 式I所示的抗体-药物偶联物选自ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5。

在一些实施方案中, 所述缓冲剂包括但不限于: 醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸盐、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸、氨丁三醇(Tris)、吗啉乙磺酸(MES)和其它有机酸缓冲剂。

在一些实施方案中, 所述组氨酸盐缓冲剂是包含组氨酸根离子的缓冲剂。组氨酸盐缓冲剂的实例包括组氨酸-组氨酸盐酸盐、组氨酸-醋酸盐, 组氨酸-磷酸盐, 组氨酸-硫酸盐等缓冲剂, 其中组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲剂是组氨酸与组氨酸盐酸盐配制而成, 组氨酸-醋酸盐缓冲剂是组氨酸与醋酸配制而成。类似地, 琥珀酸盐缓冲剂可以是琥珀酸-琥珀酸钠, 柠檬酸盐缓冲剂可以是: 柠檬酸-柠檬酸钠。

在一些实施方案中, 优选组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲剂。

在一些实施方案中, 所述稳定剂包括但不限于: 糖类(如蔗糖、海藻糖)、多元醇(如甘露醇、山梨醇)、氨基酸(L-丝氨酸、谷氨酸钠、丙氨酸、甘氨酸、肌氨酸等)。

在一些实施方案中, 所述表面活性剂包括但不限于: 聚山梨酯(如聚山梨酯20、聚山梨酯80)。

在下述描述pH、质量百分含量(以质量%为单位)和含量(以质量/体积如mg/ml为单位)的实施方案中, 在无相反教导的情况下, 所述药物组合物的pH值是药物组合物的水溶液的pH值(其中的水为注射用水); 在无相反教导的情况下, 在描述质量百分含量时, 是以药物组合物的总重量为100wt%为基准并且以所述药物组合物不包括注射用水为前提; 在无相反教导的情况下, 在描述含量时, 所述药物组合物包括注射用水并且是以药物组合物的体积为基准;

在一些实施方案中, 所述药物组合物的pH为4.0-7.5(如约4.0、约4.5、约4.6、约4.7、约4.8、约4.9、约5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5、约5.6、约5.7、约5.8、约5.9、约6.0、约6.5、约7.0), 优选4.5-7.0, 进一步优选4.5-5.5, 进一步优选5.0-5.5, 最优选约5.0。

在上述实施方案以及以下相似的实施方案中, 点值前的“约”包括所述值本身以及本领域技术人员能够理解的误差范围内的各个值。

在一些实施方案中, 所述药物组合物中, 式I所示的抗体-药物偶联物(如ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5)的质量百分含量为1-30%(如约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约8.5%、约9%、约9.5%、约10%、约10.5%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%), 优选5-25%, 8-20%, 8-15%, 8-10%, 15-25%。

在一些实施方案中, 所述药物组合物中, 式I所示的抗体-药物偶联物(如ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5)的含量为1-30mg/ml(如约1mg/ml、约2mg/ml、约3mg/ml、约4mg/ml、约5mg/ml、约6mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约8.5mg/ml、约9mg/ml、约

9.5mg/ml、约10mg/ml、约10.5mg/ml、约11mg/ml、约12mg/ml、约13mg/ml、约14mg/ml、约15mg/ml、约16mg/ml、约17mg/ml、约18mg/ml、约19mg/ml、约20mg/ml、约21mg/ml、约22mg/ml、约23mg/ml、约24mg/ml、约25mg/ml、约26mg/ml、约27mg/ml、约28mg/ml、约29mg/ml、约30mg/ml)，优选5-25mg/ml，进一步优选5-20mg/ml，5-15mg/ml，15-25mg/ml。

在一些实施方案中，所述药物组合物中，所述缓冲剂(如组氨酸-组氨酸盐酸盐)的质量百分含量为1-10%(如约1%、约2%、约2.8%、约2.9%、约3%、约3.1%、约3.2%、约4%、约4.5%、约4.6%、约4.7%、约4.8%、约4.9%、约5%、约5.1%、约5.2%、约5.3%、约5.4%、约5.5%、约6%、约6.5%、约7%、约8%、约9%、约9.9%、约10%)，优选1-9.9%，2-6%，2-5%，4-6%。

在一些实施方案中，所述药物组合物中，所述缓冲剂(如组氨酸-组氨酸盐酸盐)的含量为1-10mg/ml(如约1mg/ml、约2mg/ml、约3mg/ml、约4mg/ml、约4.5mg/ml、约4.6mg/ml、约4.7mg/ml、约4.8mg/ml、约4.9mg/ml、约5mg/ml、约5.1mg/ml、约5.2mg/ml、约5.3mg/ml、约5.4mg/ml、约5.5mg/ml、约6mg/ml、约6.5mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml、约10mg/ml)，优选2-6mg/ml，2-4mg/ml，3-6mg/ml，4-6mg/ml。

在一些实施方案中，所述药物组合物中，所述缓冲剂为组氨酸-组氨酸盐酸盐，其中所述组氨酸的质量百分含量为0.1-1%(如约0.1%、约0.2%、约0.25%、约0.26%、约0.27%、约0.28%、约0.29%、约0.3%、约0.31%、约0.32%、约0.33%、约0.34%、约0.35%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.55%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%)，优选0.1-0.5%，0.2-0.4%。

在一些实施方案中，所述药物组合物中，所述缓冲剂为组氨酸-组氨酸盐酸盐，其中所述组氨酸的含量为0.1-1mg/ml(如约0.1mg/ml、约0.2mg/ml、约0.21mg/ml、约0.22mg/ml、约0.23mg/ml、约0.24mg/ml、约0.25mg/ml、约0.26mg/ml、约0.27mg/ml、约0.28mg/ml、约0.29mg/ml、约0.3mg/ml、约0.31mg/ml、约0.32mg/ml、约0.33mg/ml、约0.34mg/ml、约0.35mg/ml、约0.4mg/ml、约0.45mg/ml、约0.5mg/ml、约0.55mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1mg/ml)，优选0.1-0.5mg/ml，0.1-0.3mg/ml，0.2-0.4mg/ml。

在一些实施方案中，所述药物组合物中，所述缓冲剂为组氨酸-组氨酸盐酸盐，其中所述组氨酸盐酸盐的质量百分含量为1-10%(如约1%、约2%、约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%、约3%、约3.5%、约4%、约4.5%、约4.6%、约4.7%、约4.8%、约4.9%、约5%、约5.1%、约5.2%、约5.3%、约5.4%、约5.5%、约6%、约6.5%、约7%、约8%、约9%、约9.9%、约10%)，优选1-9.9%，2-6%，2-4%，3-6%，3.5-5.5%，4-5%。

在一些实施方案中，所述药物组合物中，所述缓冲剂为组氨酸-组氨酸盐酸盐，其中所述组氨酸盐酸盐的含量为1-10mg/ml(如约1mg/ml、约2mg/ml、约2.5mg/ml、约2.6mg/ml、约2.7mg/ml、约2.8mg/ml、约2.9mg/ml、约3mg/ml、约3.5mg/ml、约4mg/ml、约4.5mg/ml、约4.6mg/ml、约4.7mg/ml、约4.8mg/ml、约4.9mg/ml、约5mg/ml、约5.1mg/ml、约5.2mg/ml、约5.3mg/ml、约5.4mg/ml、约5.5mg/ml、约6mg/ml、约6.5mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml、约10mg/ml)，优选2-6mg/ml，2-4mg/ml，3-6mg/ml、约4-5.5mg/ml、约4.5-5mg/ml。

在一些实施方案中，所述药物组合物中，稳定剂(如海藻糖、蔗糖)的质量百分含量为50-90%(如约50%、约60%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%)，优选60-90%，70-90%，

80-90%。

在一些实施方案中,所述药物组合物中,所述稳定剂(如海藻糖、蔗糖)的含量为50-110mg/ml(如约50mg/ml、约60mg/ml、约70mg/ml、约75mg/ml、约80mg/ml、约81mg/ml、约82mg/ml、约83mg/ml、约84mg/ml、约85mg/ml、约86mg/ml、约87mg/ml、约88mg/ml、约89mg/ml、约90mg/ml、约91mg/ml、约92mg/ml、约93mg/ml、约94mg/ml、约95mg/ml、约100mg/ml、约105mg/ml、约110mg/ml),优选70-100mg/ml、80-100mg/ml、75-95mg/ml。

在一些实施方案中,所述药物组合物中,所述表面活性剂(如聚山梨酯80)的质量百分含量为0.1-1%(如约0.1%、约0.15%、约0.16%、约0.17%、约0.18%、约0.19%、约0.2%、约0.25%、约0.26%、约0.27%、约0.28%、约0.29%、约0.3%、约0.31%、约0.32%、约0.33%、约0.34%、约0.35%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.55%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%),优选0.2-0.4%,进一步优选0.15-0.4%,0.15-0.35%,0.25-0.35%。

在一些实施方案中,所述药物组合物中,所述表面活性剂(如聚山梨酯80)的含量为0.1-1mg/ml(如约0.1mg/ml、约0.15mg/ml、约0.16mg/ml、约0.17mg/ml、约0.18mg/ml、约0.19mg/ml、约0.2mg/ml、约0.25mg/ml、约0.3mg/ml、约0.35mg/ml、约0.4mg/ml、约0.45mg/ml、约0.5mg/ml、约0.55mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1mg/ml),优选0.1-0.4mg/ml,0.15-0.25mg/ml,0.2-0.4mg/ml,0.25-0.35mg/ml。

在一些实施方案中,所述药物组合物,按质量百分含量计,包含1-30%(如约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约8.5%、约9%、约9.5%、约10%、约10.5%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%)的式I所示的抗体-药物偶联物(如ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5),和0.1-1%(如约0.1%、约0.2%、约0.25%、约0.26%、约0.27%、约0.28%、约0.29%、约0.3%、约0.31%、约0.32%、约0.33%、约0.34%、约0.35%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.55%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%)的组氨酸,1-10%(如1-9.9%,或约1%、约2%、约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%、约3%、约3.5%、约4%、约4.5%、约4.6%、约4.7%、约4.8%、约4.9%、约5%、约5.1%、约5.2%、约5.3%、约5.4%、约5.5%、约6%、约6.5%、约7%、约8%、约9%、约9.9%、约10%)的组氨酸盐酸盐,50-90%(如约50%、约60%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%)的海藻糖,0.1-1%(如约0.1%、约0.15%、约0.16%、约0.17%、约0.18%、约0.19%、约0.2%、约0.25%、约0.26%、约0.27%、约0.28%、约0.29%、约0.3%、约0.31%、约0.32%、约0.33%、约0.34%、约0.35%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.55%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%)的聚山梨酯80。

在一些实施方案中,所述药物组合物,按质量百分含量计,包含1-30%(如约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约8.5%、约9%、约9.5%、约10%、约10.5%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%)的式I所示的抗体-药物偶联物(如ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5),和0.1-1%(如约0.1%、约0.2%、约0.25%、约0.26%、约0.27%、约0.28%、约0.29%、约0.3%、约0.31%、约0.32%、约0.33%、约0.34%、约0.35%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.55%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%)的组氨酸,1-10%(如1-9.9%,或约1%、约2%、约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%、约3%、约3.5%、约4%、约4.5%、约4.6%、约4.7%、约4.8%、约4.9%、约5%、约5.1%、约5.2%、约5.3%、约5.4%、约5.5%、约6%、约6.5%、

约7%、约8%、约9%、约9.9%、约10%)的组氨酸盐酸盐, 50-90%(如约50%、约60%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%)的蔗糖, 0.1-1%(如约0.1%、约0.15%、约0.16%、约0.17%、约0.18%、约0.19%、约0.2%、约0.25%、约0.26%、约0.27%、约0.28%、约0.29%、约0.3%、约0.31%、约0.32%、约0.33%、约0.34%、约0.35%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.55%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%)的聚山梨酯80。

在一些实施方案中, 所述药物组合物中, 包含1-30mg/ml(如约1mg/ml、约2mg/ml、约3mg/ml、约4mg/ml、约5mg/ml、约6mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约8.5mg/ml、约9mg/ml、约9.5mg/ml、约10mg/ml、约10.5mg/ml、约11mg/ml、约12mg/ml、约13mg/ml、约14mg/ml、约15mg/ml、约16mg/ml、约17mg/ml、约18mg/ml、约19mg/ml、约20mg/ml、约21mg/ml、约22mg/ml、约23mg/ml、约24mg/ml、约25mg/ml、约26mg/ml、约27mg/ml、约28mg/ml、约29mg/ml、约30mg/ml)的式I所示的抗体-药物偶联物(如ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5), 和0.1-1mg/ml(如约0.1mg/ml、约0.2mg/ml、约0.21mg/ml、约0.22mg/ml、约0.23mg/ml、约0.24mg/ml、约0.25mg/ml、约0.26mg/ml、约0.27mg/ml、约0.28mg/ml、约0.29mg/ml、约0.3mg/ml、约0.31mg/ml、约0.32mg/ml、约0.33mg/ml、约0.34mg/ml、约0.35mg/ml、约0.4mg/ml、约0.45mg/ml、约0.5mg/ml、约0.55mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1mg/ml)的组氨酸, 1-10mg/ml(如约1mg/ml、约2mg/ml、约2.5mg/ml、约2.6mg/ml、约2.7mg/ml、约2.8mg/ml、约2.9mg/ml、约3mg/ml、约3.5mg/ml、约4mg/ml、约4.5mg/ml、约4.6mg/ml、约4.7mg/ml、约4.8mg/ml、约4.9mg/ml、约5mg/ml、约5.1mg/ml、约5.2mg/ml、约5.3mg/ml、约5.4mg/ml、约5.5mg/ml、约6mg/ml、约6.5mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml、约10mg/ml)的组氨酸盐酸盐, 50-110mg/ml(如约50mg/ml、约60mg/ml、约70mg/ml、约75mg/ml、约80mg/ml、约81mg/ml、约82mg/ml、约83mg/ml、约84mg/ml、约85mg/ml、约86mg/ml、约87mg/ml、约88mg/ml、约89mg/ml、约90mg/ml、约91mg/ml、约92mg/ml、约93mg/ml、约94mg/ml、约95mg/ml、约100mg/ml、约105mg/ml、约110mg/ml)的海藻糖, 0.1-1mg/ml(如约0.1mg/ml、约0.15mg/ml、约0.16mg/ml、约0.17mg/ml、约0.18mg/ml、约0.19mg/ml、约0.2mg/ml、约0.25mg/ml、约0.3mg/ml、约0.35mg/ml、约0.4mg/ml、约0.45mg/ml、约0.5mg/ml、约0.55mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1mg/ml)的聚山梨酯80。

在一些实施方案中, 所述药物组合物中, 包含1-30mg/ml(如约1mg/ml、约2mg/ml、约3mg/ml、约4mg/ml、约5mg/ml、约6mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约8.5mg/ml、约9mg/ml、约9.5mg/ml、约10mg/ml、约10.5mg/ml、约11mg/ml、约12mg/ml、约13mg/ml、约14mg/ml、约15mg/ml、约16mg/ml、约17mg/ml、约18mg/ml、约19mg/ml、约20mg/ml、约21mg/ml、约22mg/ml、约23mg/ml、约24mg/ml、约25mg/ml、约26mg/ml、约27mg/ml、约28mg/ml、约29mg/ml、约30mg/ml)的式I所示的抗体药物偶联物(如ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5), 和0.1-1mg/ml(如约0.1mg/ml、约0.2mg/ml、约0.21mg/ml、约0.22mg/ml、约0.23mg/ml、约0.24mg/ml、约0.25mg/ml、约0.26mg/ml、约0.27mg/ml、约0.28mg/ml、约0.29mg/ml、约0.3mg/ml、约0.31mg/ml、约0.32mg/ml、约0.33mg/ml、约0.34mg/ml、约0.35mg/ml、约0.4mg/ml、约0.45mg/ml、约0.5mg/ml、约0.55mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1mg/ml)的组氨酸, 1-10mg/ml(如约1mg/ml、约2mg/ml、约2.5mg/ml、约2.6mg/ml、约2.7mg/ml、约2.8mg/ml、约2.9mg/ml、约3mg/ml、约3.5mg/ml、约4mg/ml、约4.5mg/ml、约4.6mg/ml、约4.7mg/ml、约4.8mg/ml、

约4.9mg/ml、约5mg/ml、约5.1mg/ml、约5.2mg/ml、约5.3mg/ml、约5.4mg/ml、约5.5mg/ml、约6mg/ml、约6.5mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml、约10mg/ml)的组氨酸盐酸盐, 50-110mg/ml(如约50mg/ml、约60mg/ml、约70mg/ml、约75mg/ml、约80mg/ml、约81mg/ml、约82mg/ml、约83mg/ml、约84mg/ml、约85mg/ml、约86mg/ml、约87mg/ml、约88mg/ml、约89mg/ml、约90mg/ml、约91mg/ml、约92mg/ml、约93mg/ml、约94mg/ml、约95mg/ml、约100mg/ml、约105mg/ml、约110mg/ml)的蔗糖, 0.1-1mg/ml(如约0.1mg/ml、约0.15mg/ml、约0.16mg/ml、约0.17mg/ml、约0.18mg/ml、约0.19mg/ml、约0.2mg/ml、约0.25mg/ml、约0.3mg/ml、约0.35mg/ml、约0.4mg/ml、约0.45mg/ml、约0.5mg/ml、约0.55mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1mg/ml)的聚山梨酯80。

在一些实施方案中, 所述药物组合物溶解后, 包含约10mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.33mg/ml组氨酸、约4.79mg/ml盐酸组氨酸、约0.3mg/ml聚山梨酯80、约90mg/ml海藻糖, pH为约5.0。

在一些实施方案中, 所述药物组合物中, 包含约10mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.33mg/ml组氨酸、约4.79mg/ml盐酸组氨酸、约0.3mg/ml聚山梨酯80、约90mg/ml海藻糖, pH为约5.0。

在一些实施方案中, 所述药物组合物为冻干注射剂, 当冻干注射剂用注射用水稀释时, 使得稀释后的药物组合物包含约10mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.33mg/ml组氨酸、约4.79mg/ml盐酸组氨酸、约0.3mg/ml聚山梨酯80、约90mg/ml海藻糖, 以稀释后的药物组合物的总体积为基准, 稀释后的药物组合物的pH为约5.0, 优选地, 式I所示的抗体药物偶联物选自: SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、和SWY2113-JSSW-001, 优选地是SWY2110-JSSW-001。

在一些实施方案中, 所述药物组合物为注射液, 所述注射液包含约10mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.33mg/ml组氨酸、约4.79mg/ml盐酸组氨酸、约0.3mg/ml聚山梨酯80、约90mg/ml海藻糖, 所述注射液的pH为约5.0, 优选地, 式I所示的抗体药物偶联物选自: SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、和SWY2113-JSSW-001, 优选地是SWY2110-JSSW-001。

换言之, 在本发明的一种实施方案中, 所述的药物组合物包含约10mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.33mg/ml组氨酸、约4.79mg/ml盐酸组氨酸、约0.3mg/ml聚山梨酯80、约90mg/ml海藻糖、和余量的水, 并且所述的药物组合物的pH为约5.0, 优选地, 式I所示的抗体药物偶联物选自: SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、和SWY2113-JSSW-001, 优选地是SWY2110-JSSW-001; 或者所述的药物组合物包含或由以下组成: 约10重量份的式I所示的抗体药物偶联物、约0.33重量份的组氨酸、约4.79重量份的盐酸组氨酸、约0.3重量份的聚山梨酯80、约90重量份的海藻糖, 优选地, 式I所示的抗体药物偶联物选自: SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、和SWY2113-JSSW-001, 优选地是SWY2110-JSSW-001。

在一些实施方案中, 所述药物组合物溶解后, 包含约20mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.21mg/ml组氨酸、约2.86mg/ml盐酸组氨酸、约0.2mg/ml聚山梨酯80、约80mg/ml蔗糖, pH为约5.0。

在一些实施方案中, 所述药物组合物中, 包含约20mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.21mg/ml组氨酸、约2.86mg/ml盐酸组氨酸、约0.2mg/ml聚山梨酯80、约80mg/ml蔗糖, pH为5.0。

在一些实施方案中，所述药物组合物为冻干注射剂，当冻干注射剂用注射用水稀释时，使得稀释后的药物组合物包含约20mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.21mg/ml组氨酸、约2.86mg/ml盐酸组氨酸、约0.2mg/ml聚山梨酯80、约80mg/ml蔗糖，以稀释后的药物组合物的总体积为基准，稀释后的药物组合物的pH为约5.0，优选地，式I所示的抗体药物偶联物是patritumab-JSSW-001。

在一些实施方案中，所述药物组合物为注射液，所述注射液包含约20mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.21mg/ml组氨酸、约2.86mg/ml盐酸组氨酸、约0.2mg/ml聚山梨酯80、约80mg/ml蔗糖，所述注射液的pH为约5.0，优选地，式I所示的抗体药物偶联物是patritumab-JSSW-001。

换言之，在本发明的一种实施方案中，所述的药物组合物包含约20mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.21mg/ml组氨酸、约2.86mg/ml盐酸组氨酸、约0.2mg/ml聚山梨酯80、约80mg/ml蔗糖、和余量的水，并且所述的药物组合物的pH为约5.0，优选地，式I所示的抗体药物偶联物是patritumab-JSSW-001；或者所述的药物组合物包含或由以下组成：约20重量份的式I所示的抗体药物偶联物、约0.21重量份的组氨酸、约2.86重量份的盐酸组氨酸、约0.2重量份的聚山梨酯80、约80重量份的蔗糖，优选地，式I所示的抗体药物偶联物是patritumab-JSSW-001。

在一些实施方案中，所述式I的抗体药物偶联物选自ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-5之一。

在另一个方面，本发明还涉及一种用于制备所述药物组合物的方法，所述方法包括如下步骤：

S1)制备式I所示的抗体-药物偶联物；

S2)制备超滤置换缓冲液；

S3)将S1制得抗体-药物偶联物换液至S2)制得的缓冲液。

任选的还包括S4)冷冻干燥。

进一步，所述S2)步骤包括按照处方量称取缓冲剂、稳定剂，加注射用水稀释至目标配制体积，搅拌混合均匀，得到置换缓冲液。

进一步，所述S3)步骤包括采用超滤膜，按一定的体积，将S1制得抗体-药物偶联物超滤置换至S2)制得的缓冲液中，将抗体-药物偶联物稀释至目标浓度，按体积分数加入表面活性剂，得到原液。

进一步，在步骤S3中，所述制备方法任选包括对所得的缓冲液进行无菌过滤的步骤。

本发明提供本发明所述的药物组合物在制备用于治疗增殖性疾病的药物中的用途。所述增殖性疾病优选为与HER2、HER3或EGFR异常表达相关的疾病，包括癌症，所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌(例如小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤)。

本发明提供一种用于治疗或预防增殖性疾病的方法，该方法包括向需要其患者施用治疗有效剂量的本发明的药物组合物；所述增殖性疾病优选为与HER2、HER3或EGFR异常表达相关的疾病，包括癌症。所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫

癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌(例如小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤)。

本发明提供本发明所述的药物组合物在制备用于治疗产生耐药性的增殖性疾病的药物中的用途。所述产生耐药性的增殖性疾病为产生耐药性的与HER2、HER3或EGFR异常表达相关的疾病，包括癌症。所述产生耐药性的癌症优选为HER2、HER3或EGFR基因突变导致的耐药癌症，所述癌症优选乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌(例如小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤)，进一步优选为结肠癌、直肠癌、肺癌或胰腺癌。其中所述耐药性优选对受体酪氨酸激酶抑制剂耐药，进一步优选为对第一代、第二代或第三代EGFR抑制剂耐药，更进一步优选为吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、达克替尼、奥希替尼或阿美替尼耐药，特别是对吉非替尼、阿法替尼、奥希替尼或阿美替尼耐药，更优选为对吉非替尼或奥希替尼耐药。

本发明提供一种用于治疗或预防产生耐药性的增殖性疾病的方法，该方法包括向有需要的患者施用治疗有效剂量的本发明的药物组合物；所述产生耐药性的增殖性疾病为产生耐药性的与HER2、HER3或EGFR异常表达相关的疾病，包括癌症。所述产生耐药性的癌症优选为HER2、HER3或EGFR基因突变导致的耐药癌症。所述癌症优选乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌(例如小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤)，进一步优选为结肠癌、直肠癌、肺癌或胰腺癌。其中所述耐药性优选对受体酪氨酸激酶抑制剂耐药，进一步优选为对第一代、第二代或第三代EGFR抑制剂耐药，更进一步优选为吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、达克替尼、奥希替尼或阿美替尼耐药，特别是对吉非替尼、阿法替尼、奥希替尼或阿美替尼耐药，更优选为对吉非替尼或奥希替尼耐药。

本发明的药物组合物可以单独使用，也可以与其它抗肿瘤剂组合使用。

本发明所述的抗体药物偶联物的制备方法其包括如下步骤

S1：抗体的还原；

具体为：将抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。按照还原量加入适量 10mM TCEP 水溶液及 1M 磷酸氢二钾水溶液，确认了该溶液的 pH 为正确后，于 37°C 孵育数小时，由此将抗体内的二硫键还原。

S2：抗体与接头-药物化合物的偶联；

具体为：在室温下向上述溶液中添加适量二甲基亚砜溶液溶解的 10mM 化合物，

混匀, 在室温下反应 0.5-4 小时, 将接头-药物化合物连接于抗体。接下来, 添加 100mM NAC 水溶液, 进而在室温下搅拌, 终止反应。

S3: 抗体-药物偶联物的纯化:

具体为: 使用超滤离心管对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为纯化缓冲液的 25mM 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES), pH=6.5, 将溶液浓缩至 1-2 mL, 再次加入纯化缓冲液, 置换倍数大于 1000 倍, 由此, 将未偶联的接头-药物化合物及其他低分子量试剂除去, 得到纯化的抗体药物偶联物。

本发明的药物组合物所含的抗体药物偶联物相比现有技术已知的抗体药物偶联物如 DS-8201 或目前在靶点效果较好的实验样品作为对照, 均展现出具有更好的抗细胞增殖效果, 具有显著的抑瘤效果, 对产生耐药性的肿瘤如对 HER2、HER3 或 EGFR 基因突变导致的耐药肿瘤, 特别是对受体酪氨酸激酶抑制剂类抗肿瘤剂耐药的肿瘤具有优于 DS-8201 的抑制活性, 具有更好的稳定性, 包括血浆稳定性和缓冲液稳定性, 具有更低的毒性, 具有更好的旁观者效应, 具有更宽的治疗窗口。本发明对抗体进行 pH 依赖性改造, 将改造后的抗体与接头-药物化合物偶联后获得的 ADC, 在药效方面与原 ADC 具有相当的肿瘤抑制活性, 在安全性方面显示对正常组织的 on target 毒性减轻, 抗体经优化后获得的 ADC 进一步扩大了治疗窗。

本发明的药物组合物在配方条件下, 可以在 2~8°C 下长期储存, 保证抗体部分理化性质稳定性的同时最大限度的降低游离药物的脱落。经长期稳定性研究, 抗体部分理化性质未发生显著变化, 符合抗体制剂的储存要求, ADC 部分的 DAR 值及 DAR8 分布均未发生显著变化, 说明偶联药物储藏中质量均一, 游离药物虽有脱落, 但其脱落量非常低, 不会对临床给药产生安全性风险, 可长期储存。

定义

除另有规定外, 术语“抗体药物偶联物(ADC)”是指将抗体(如单克隆抗体)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药物相连。

除另有规定外, 术语“接头-药物化合物”是指“抗体药物偶联物”中由接头化合物和药物化合物组成的部分结构。

本发明中所述接头-药物化合物与所述抗体通过本领域常规的偶联方式进行连接, 包括: 赖氨酸偶联、轻重链间还原性二硫键偶联和定向偶联(Beck, Alain, and Janice M. Reichert. "Antibody-drug conjugates: present and future." MAbs. Vol. 6. No. 1. Taylor & Francis, 2014.; McCombs, Jessica R., and Shawn C. Owen. "Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry." The AAPS journal 17 (2015): 339-351.). 本发明优选通过轻重链间还原性二硫键偶联, 即轻重链间二硫键位点(重链之间的两个位点, 重链与轻链之间的两个位点)中的一个或多个被还原后形成的硫醇基(半胱氨酸残基的硫原子)反应进行连接。

除另有规定外, 术语“烷基”指一价饱和脂肪族烃基团, 包含 1-20 个碳原子的直链或支链基团, 优选包含 1-10 个碳原子(即 C₁₋₁₀ 烷基), 进一步优选包含 1-8 个碳原子(C₁₋₈ 烷基), 更优选包含 1-6 个碳原子(即 C₁₋₆ 烷基)。例如“C₁₋₆ 烷基”指的是该基团为烷基, 且碳链上的碳原子数量在 1-6 之间(具体地为 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个), 实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、新戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基等。

除另有规定外, 术语“约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可

接受误差范围内,所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如,在本领域每一次出现“约”可意味着其后所示的具体数值 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 的范围。

附图说明

图 1 为 DP001-JSSW-001 DAR 值检测结果

图 2 为 DP001-JSSW-001 DAR 值检测结果

图 3 为 partitumab-JSSW-001 DAR 值检测结果

图 4 为 SWY2110-JSSW-001 DAR 值检测结果

图 5 为 SWY2111-JSSW-001 DAR 值检测结果

图 6 为 SWY2112-JSSW-001 DAR 值检测结果

图 7 为 SWY2113-JSSW-001 DAR 值检测结果

图 8 为 partitumab-Dxd DAR 值检测结果

图 9 为 SWY2110-Dxd DAR 值检测结果

图 10 为 SWY2110-Vc MMAE DAR 值检测结果

图 11 为 DP001-ADC 对 NU/NU 小鼠 HER2-表达的人乳腺癌 JIMT-1 细胞移植瘤肿瘤体积的影响

图 12 为 partitumab-ADC 对 NU/NU 小鼠人肺腺癌 PC9-GR(Gefitinib 耐药细胞)细胞移植瘤肿瘤体积的影响

图 13 为 SWY2110-ADC 对 NU/NU 小鼠人结直肠癌 DiFi 细胞移植瘤肿瘤体积的影响

图 14 为 SWY2110-ADC 对 NU/NU 小鼠人肺腺癌 PC9-GR(Gefitinib 耐药细胞)细胞移植瘤肿瘤体积的影响

图 15 为 SWY2110-ADC 对 DiFi 细胞抑制活性检测结果

图 16 为 SWY2110-ADC 对 PC9-GR 细胞抑制活性检测结果

图 17 为 DP001-ADC 旁观者效应检测结果

图 18 为 SWY2110-ADC 对 NU/NU 小鼠人肺腺癌 PC9-AR(PC9-Dell9/T790M/C797S, Osimertinib 耐药细胞)细胞移植瘤肿瘤体积的影响

图 19 为 SWY2110-ADC、SWY2111-ADC、SWY2112-ADC、SWY2113-ADC 对 NU/NU 小鼠人肺腺癌 NCI-H1975 细胞移植瘤肿瘤体积的影响

图 20 为 SWY2110-ADC、SWY2111-ADC、SWY2112-ADC、SWY2113-ADC 对 NOD-SCID 小鼠人乳腺癌 MDA-MB-468 细胞移植瘤肿瘤体积的影响

图 21 为 SWY2110-ADC、SWY2111-ADC、SWY2112-ADC、SWY2113-ADC 对 NU/NU 小鼠人结直肠癌 DiFi 细胞移植瘤肿瘤体积的影响

图 22 为 SWY2110-ADC、SWY2111-ADC、SWY2112-ADC、SWY2113-ADC 对 NU/NU 小鼠人肺腺癌 PC9-GR(Gefitinib 耐药细胞)细胞移植瘤肿瘤体积的影响

图 23 为 partitumab-ADC 对 NOD-SCID 小鼠人肺腺癌 PC9-DTC(Dell9/T790M/C797S, Osimertinib 耐药细胞)细胞移植瘤体积的影响

图 24 为 partitumab-ADC 对 NU/NU 小鼠人结肠癌 SW620 细胞移植瘤体积的影响

图 25 为 partitumab-ADC 对 DiFi 细胞抑制活性检测结果

具体实施方式

下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照

常规条件或者按照制造厂商所建议的条件。除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域专业人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法之中。文中所示的较佳实施方法与材料仅做示范之用。

本发明的化合物结构是通过核磁共振(NMR)或/和液质联用色谱(LC-MS)或/和液相色谱(HPLC)来确定的。NMR 的测定使用的仪器是 Bruker Avance III 400 MHz 核磁共振仪；LC-MS 使用的仪器是 SHIMADZU LC-20AD-PDA-LCMS-2020；HPLC 使用的仪器是 SHIMADZU LC-20AD-PDA 高效液相色谱仪。

本发明实施例中的起始原料是已知的并且可以在市场上买到，或者可以采用或按照本领域已知的方法来合成。

本发明中抗体的制备可用由 Kohler 等，自然(1975)首次描述的杂交瘤技术制备，或用重组 DNA 方法制备(美国专利 4,816,567 等)。

制备实施例

将具有两条如 SEQ ID NO:9 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列的轻链的抗体定义为 DP001；

将具有两条如 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列的轻链的抗体定义为 patritumab；

将具有两条如 SEQ ID NO:29 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体定义为 SWY2110；

将具有两条如 SEQ ID NO:34 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体定义为 SWY2111；

将具有两条如 SEQ ID NO:37 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体定义为 SWY2112；

将具有两条如 SEQ ID NO:40 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体定义为 SWY2113。

抗体序列说明

1. HER2 抗体 DP001 (trastuzumab)

轻链(SEQ ID NO:10):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL
YSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

重链(SEQ ID NO:9):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

DP001 HCDR1: GFNIKDTYIH (SEQ ID NO:1)

DP001 HCDR2: RIYPTNGYTRYAD (SEQ ID NO:2)

DP001 HCDR3: WGGDGFYAMDY (SEQ ID NO:3)

DP001 LCDR1: RASQDVNTAVA (SEQ ID NO:4)

DP001 LCDR2: SASFLYS (SEQ ID NO:5)

DP001 LCDR3: QQHYTTPPT (SEQ ID NO:6)

DP001 HV: SEQ ID NO:7

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYP
TNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD
YWGQGLTVTVSS

DP001 LV: SEQ ID NO:8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL
YSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

2. HER3 抗体 patritumab

轻链(SEQ ID NO:20):

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPELLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIK
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

重链(SEQ ID NO:19):

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINH
SGSTNYPNLSKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGR
GTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGPPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Patritumab HCDR1: GGSFSGYYWS SEQ ID NO:11

Patritumab HCDR2: EINHSGSTNYPNLSKS SEQ ID NO:12

Patritumab HCDR3: DKWTWYFDL SEQ ID NO:13

Patritumab LCDR1: RSSQSVLYSSSNRNYLA SEQ ID NO:14

Patritumab LCDR2: WASTRES SEQ ID NO:15

Patritumab LCDR3: QQYYSTPRT SEQ ID NO:16

Patritumab HV: SEQ ID NO:17

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINH
SGSTNYPNLSKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGR
GTLTVTVSS

Patritumab LV: SEQ ID NO:18

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPELLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEI
K

3. EGFR 抗体 SWY2110

轻链(SEQ ID NO:30):

EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSFGQGTKLEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

重链(SEQ ID NO:29):

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSNYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIWS
GGNTDYNTPTFTSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDYYDYEFAYW
GQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SWY2110 HCDR1: NYDVH SEQ ID NO:21

SWY2110 HCDR2: VIWSSGGNTDYNTPTFTS SEQ ID NO:22

SWY2110 HCDR3: ALDYYDYEFAY SEQ ID NO:23

SWY2110 LCDR1: RASQSIGTNIH SEQ ID NO:24

SWY2110 LCDR2: YASESIS SEQ ID NO:25

SWY2110 LCDR3: QQNNEWPTS SEQ ID NO:26

SWY2110 HV: SEQ ID NO:27

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSNYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIWS
GGNTDYNTPTFTSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDYYDYEFAYW
GQGTLTVTSS

SWY2110 LV: SEQ ID NO:28

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSFGQGTKLEIK

4. EGFR 抗体 SWY2111

轻链(SEQ ID NO:30):

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSFGQGTKLEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

重链(SEQ ID NO:34):

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSDYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIWS
GGNTDYNTPTFTSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDDYDYEFAYW
GQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SWY2111 HCDR1: DYDVH SEQ ID NO:31

SWY2111 HCDR2: VIWSSGGNTDYNTPTFTS SEQ ID NO:22

SWY2111 HCDR3: ALDDYDYEFAY SEQ ID NO:32

SWY2111 LCDR1: RASQSIGTNIH SEQ ID NO:24

SWY2111 LCDR2: YASESIS SEQ ID NO:25

SWY2111 LCDR3: QQNNEWPTS SEQ ID NO:26

SWY2111 HV: SEQ ID NO:33

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSDYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIS
GGNTDYNTPTFTSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDDYDYEFAYW
GQGLTVTVSS

SWY2111 LV: SEQ ID NO:28

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSFGQGTKLEIK

5. EGFR 抗体 SWY2112

轻链(SEQ ID NO:30):

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSFGQGTKLEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

重链(SEQ ID NO:37):

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSEYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIS
GGNTDYNTPTFTSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDDYDYEFAYW
GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SWY2112 HCDR1: EYDVH SEQ ID NO:35

SWY2112 HCDR2: VIWSGGNTDYNTPTFTS SEQ ID NO:22

SWY2112 HCDR3: ALDDYDYEFAY SEQ ID NO:32

SWY2112 LCDR1: RASQSIGTNIH SEQ ID NO:24

SWY2112 LCDR2: YASESIS SEQ ID NO:25

SWY2112 LCDR3: QQNNEWPTS SEQ ID NO:26

SWY2112 HV: SEQ ID NO:36

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSEYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIS
GGNTDYNTPTFTSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDDYDYEFAYW
GQGLTVTVSS

SWY2112 LV: SEQ ID NO:28

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSFGQGTKLEIK

6. EGFR 抗体 SWY2113

轻链(SEQ ID NO:30):

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSFGQGTKLEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

重链(SEQ ID NO:40):

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSHYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIS
GGNTDYNTPTFTSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDDYDYEFAYW
GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SWY2113 HCDR1: HYDVH SEQ ID NO:38

SWY2113 HCDR2: VIWSGGNTDYNTPTFS SEQ ID NO:22

SWY2113 HCDR3: ALDDYDYEFAY SEQ ID NO:32

SWY2113 LCDR1: RASQSIGTNIH SEQ ID NO:24

SWY2113 LCDR2: YASESIS SEQ ID NO:25

SWY2113 LCDR3: QQNNEWPTS SEQ ID NO:26

SWY2113 HV: SEQ ID NO:39

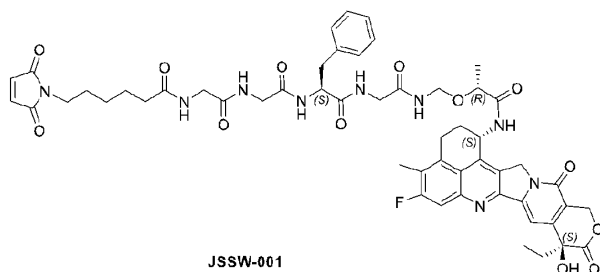
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSHYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIWS
GGNTDYNTPTFSRLTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARALDDYDYEFAYW
GQGTLLTVSS

SWY2113 LV: SEQ ID NO:28

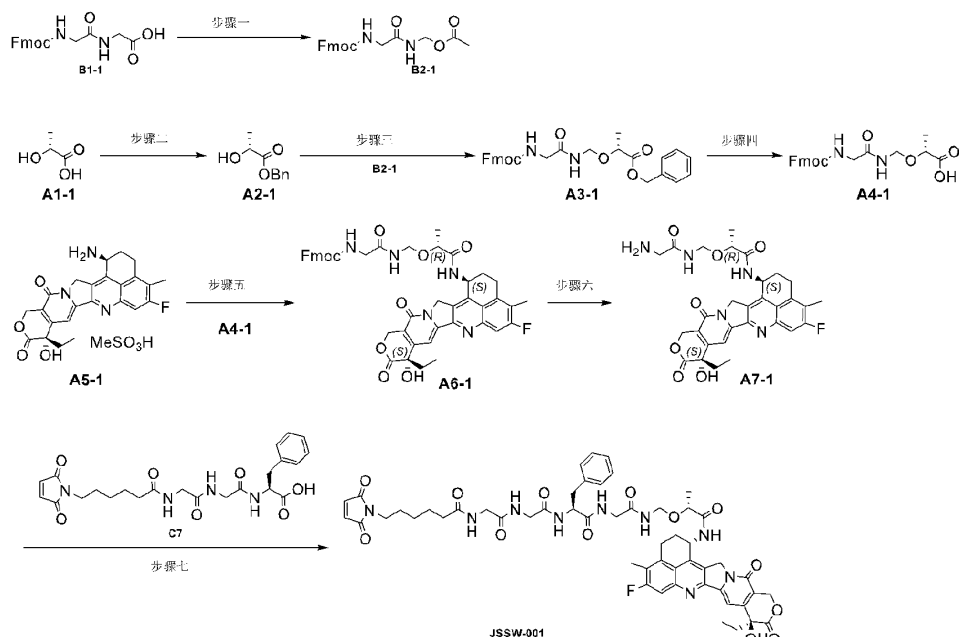
EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESIS
GIPSRFSGSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSFGGQGTKLEIK

实施例 1

N-((2R,10S)-10-苄基-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代
2,3,9,10,13,15 六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃[3',4':6,7]中氮茚并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基
基)-2-甲基-1,6,9,12,15-五氧-3-氧杂-5,8,11,14-四氮杂十六烷-16-基)-6-(2,5-二氧代-
2,5-二氢-1H-吡咯 1-基)己酰胺 (JSSW-001)



方案一:



第一步: 化合物 B2-1 的制备: 在 100ml 三口瓶中加入 B1-1(1.0g, 2.28 mmol)、无水四氢呋喃(30 mL)、甲苯(10ml)、吡啶(0.5ml), 四乙酸铅(1.83g, 4.12mmol), 溶液变成橙色, 加热回流, 一小时后溶液变为无色, 有白色固体生成, 反应三小时后, 溶液使用硅藻土过滤, 固体使用乙酸乙酯淋洗, 滤液使用旋转蒸发仪干燥。得到的粗品使用柱层析提纯, 得到固体(640mg)。LC-MS[M+Na]⁺: m/z 391.1。

第二步: 化合物 A2-1 的制备: 在 100ml 三口瓶中加入 A1-1(2.7 g, 30.0 mmol) 和 N,N-二甲基甲酰胺(30 mL), 然后添加碳酸钾(4.17 g, 30.0 mmol)和溴苄(2.4 mL, 20.0 mmol)。在室温下反应 14 小时后把反应液滴加水中, 使用乙酸乙酯进行萃取, 合并有机层后有机层使用饱和食盐水洗涤, 后有机层使用无水硫酸镁干燥后过滤浓缩, 粗品使用柱层析提纯(PE/EA=3:1), 得到目标化合物 2.61g 无色液体。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.33-7.41 (m, 5H), 5.21 (s, 2H), 4.29-4.35 (m, 1H), 2.77 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 1.44 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。

第三步: 化合物 A3-1 的制备: 在 100ml 三口瓶中加入 A2-1(720 mg, 4.0 mmol)、B2-1(368mg, 1.0mmol)和二氯甲烷(5 mL), 添加 4-甲基苯磺酸吡啶鎓(75 mg, 0.30 mmol), 反应液加热回流过夜, 反应结束后, 反应液中加入乙酸乙酯(20 mL), 水洗三次后使用无水硫酸镁干燥, 过滤除去无水硫酸镁, 溶液进行浓缩, 得到的粗品使用柱层析提纯(PE/EA=2:1), 得到白色固体 A3-1(290mg)。

LC-MS[M+Na]⁺: m/z 511.1. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.77 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.26-7.37 (m, 6H), 6.70 (brs, 1H), 5.12-5.30(m, 3H), 4.76-4.89 (m, 2H), 4.45 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.19-4.27 (m, 2H), 3.69-3.85 (m, 2H), 1.41 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。

第四步: 化合物 A4-1 的制备: 在 100ml 三口瓶中加入 A3-1(291 mg, 0.60 mmol)溶解在四氢呋喃: 乙酸乙酯(4mL/2 mL)中, 加入 Pd/C (10% w/w, 60 mg), 使用氢气进行置换 3 次后套上氢气球搅拌过夜, 反应结束后, 反应液过硅藻土, 使用甲醇进行淋洗, 有机层进行浓缩, 得到产品 A4-1。LC-MS[M+Na]⁺: m/z 399.1。

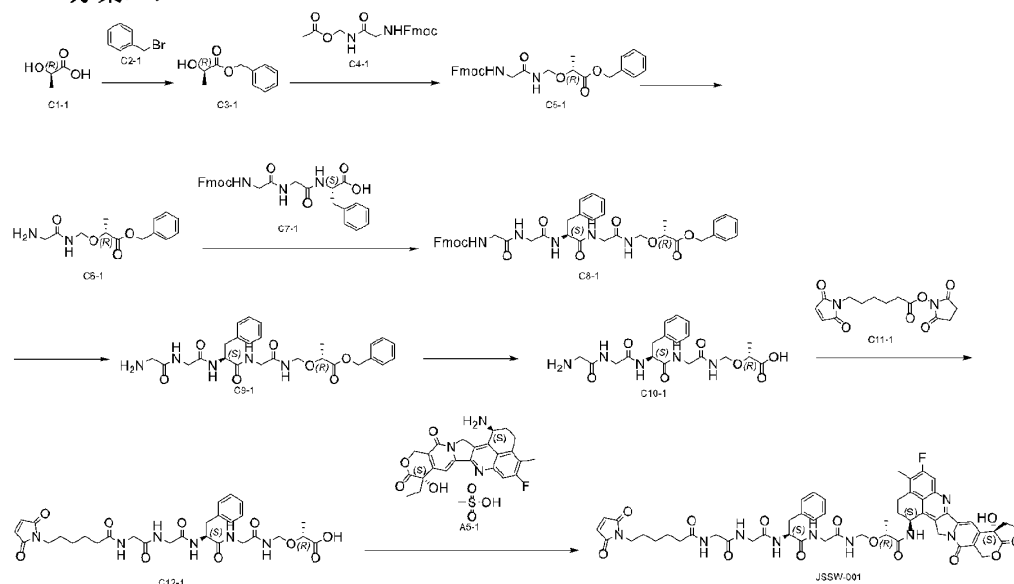
第五步: 化合物 A6-1 的制备: 在 25ml 单口瓶中加入 A4-1(50 mg, 0.13 mmol, 1.3 eq)、依喜替康甲磺酸盐(A5-1)(50 mg, 0.049 mmol, 1.0 eq), 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(48 mg, 0.13mmol, 1.3 eq), N,N-二异丙基乙胺(36mg, 0.28mmol, 3.0eq), 在 N,N-二甲基甲酰胺(2ml)中溶解, 在室温下搅拌过夜, 使用乙酸乙酯进行稀释后用半饱和柠檬酸进行洗涤, 随后使用食盐水洗涤, 碳酸氢钠溶液洗涤, 食盐水洗涤, 有机层使用无水硫酸钠干燥后过滤, 去除无水硫酸钠, 浓缩, 使用 prep-TLC 展开剂体系为(DCM/MeOH=15:1)进行提纯, 得到产物 A6-1(56mg), LC-MS[M+H]⁺: m/z 816.3。

第六步: 化合物 A7-1 的制备: 在 25ml 单口瓶中加入 A6-1(56 mg, 0.069 mmol)、N,N-二甲基甲酰胺(2ml)、哌啶(12 mg, 0.14 mmol), 搅拌 2 小时, 溶液浓缩得到白色固体。LC-MS[M+H]⁺: m/z 594.3。

第七步: 化合物 JSSW-001 的制备: 在 25ml 单口瓶中加入 A7-1(0.069 mmol)、C7(66 mg, 0.14 mmol)、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(53 mg, 0.14mmol), N,N-二异丙基乙胺(36mg, 0.28mmol)在 N,N-二甲基甲酰胺(2ml)中的溶液, 室温下搅拌 2 小时, 使用乙酸乙酯(30ml)进行稀释后用半饱和柠檬酸进行洗涤, 随后使用食盐水洗涤, 碳酸氢钠溶液洗涤, 食盐水洗涤, 有机层使用无水硫酸钠干燥后过滤, 去除无水硫酸钠, 浓缩, 使用 prep-TLC 展开剂体系为(DCM/MeOH=15:1)进行提纯, 得到产物 JSSW-001(21mg)。

LC-MS[M+H]⁺: m/z 1048. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.63 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 8.53 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.28 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 8.03-8.10 (m, 2H), 7.98 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.14-7.25 (m, 5H), 6.99 (s, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.56-5.62 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.08-5.23 (m, 2H), 4.66-4.71 (m, 1H), 4.42-4.56 (m, 2H), 4.09-4.15 (m, 1H), 3.54-3.76 (m, 7H), 3.09-3.27 (m, 1H), 2.97-3.02 (m, 1H), 2.67-2.77 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.16-2.21 (m, 2H), 2.05-2.10 (m, 2H), 1.83-1.89 (m, 2H), 1.37-1.46 (m, 7H), 1.14-1.33 (m, 4H), 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。

方案二:



第一步: 将化合物 C1-1(8 g, 88.86 mmol)和 C2-1(22.66 g, 133.33 mmol)加入到

250 ml 反应瓶中, 加入二甲基乙酰胺(DMAc)(40 mL, 5 v/w), 搅拌溶清, 控温至 0-10°C, 然后滴加 N,N-二异丙基乙胺(DIEA)(34.45 g, 266.6 mmol), 滴加完后让其自然升温至 25°C 左右, 在该温度下搅拌 16 小时。TLC 监测原料反应完全后。将反应液倒入 120 mL 冰水中, 加入甲基叔丁基醚(MTBE)(40 mL)搅拌, 静置分液, 水相用 MTBE (40 mL*4)萃取 4 次, 合并有机相, 有机相依次用 0.5M 的盐酸溶液(40 mL)洗涤一次, 水(40 mL)洗涤一次, 饱和食盐水(40 mL*2)洗涤两次。用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 湿法上样过柱纯化, 石油醚: 乙酸乙酯=30:1→20:1→10:1 的体系过柱, 得到浅黄色液体 C3-1, LC-MS[M+Na]⁺: m/z 203。

第二步: 氮气保护下, 将 C4-1(6 g, 16.29 mmol, 1.0eq)和 C3-1(3.23 g, 17.92mmol, 1.1 eq)溶解于四氢呋喃(THF)(60mL, 10V/w)中, 降温到 10~15°C, 加入对甲苯磺酸(TsOH)(281 mg, 1.63 mmol, 0.1 eq), 加完, 在 14~18°C 下反应 4h, TLC 监控, 反应结束后。将反应液加入到冰水(60mL)中, 再用乙酸乙酯(EA)(60mL*3)萃取, 合并有机相, 用饱和 NaHCO₃ 水溶液(60mL)洗涤, 水(60mL*2)洗涤, 饱和食盐水(60mL)洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩蒸干, 拌样过柱纯化, 正己烷: 乙酸乙酯=10:1→5:1→3:1→2:1→1:1 的体系过柱, 拿到无色油状物 C5-1, LC-MS[M+Na]⁺: m/z 511。

第三步: 氮气保护下, 将 C5-1(2.8g, 5.74mmol, 1.0eq)溶解于 DMAc(28mL, 10V/w)中, 降温到 14~18°C, 滴加 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)(436.6mg, 2.87mmol, 0.5eq), 并在该温度下搅拌反应 1.5h, TLC 监控原料反应完全, 降温到 0~10°C, 加入 4-甲基苯磺酸吡啶鎓(PPTS)(721.23mg, 2.87mmol, 0.5eq), 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI)(1.1g, 5.74mmol, 1.0eq), 1-羟基苯并三唑(HOBT)(775mg, 5.74mmol, 1.0eq)和 C7-1(2.45g, 4.88mmol, 0.85eq), 加完, 在 0~10°C 反应 3~4h, TLC 监控 C7-1 反应完全后。将反应液加入到冰水(100mL)中, 再用 2-甲基四氢呋喃(2-Me THF)(100mL*3)萃取, 合并有机相, 用 0.5M 盐酸(150mL*2)洗涤, 饱和 NaHCO₃ 水溶液(100mL*3)洗涤, 水(100mL)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩蒸干, 拌样过柱纯化, DCM→DCM: MeOH=80:1→60:1→50:1→40:1→30:1→20:1 的体系过柱, 拿到白色泡状固体 C8-1, 3.1g, 收率 72%, LC-MS[M+Na]⁺: m/z 772。

第四步: 氮气保护下, 将 C8-1(3.1g, 4.14mmol, 1.0eq)溶解于二氯甲烷(DCM)(46.5mL, 15V/w)中, 室温 25~30°C 下, 滴加 DBU(314.6mg, 2.07mmol, 0.5eq), 并在该温度下搅拌反应 16h, TLC 监控原料反应完全。将反应液直接湿法过柱, DCM→DCM: MeOH=50:1→30:1→20:1→10:1 的体系过柱, 拿到白色泡状固体 C9-1。LC-MS[M+H]⁺: m/z 528。

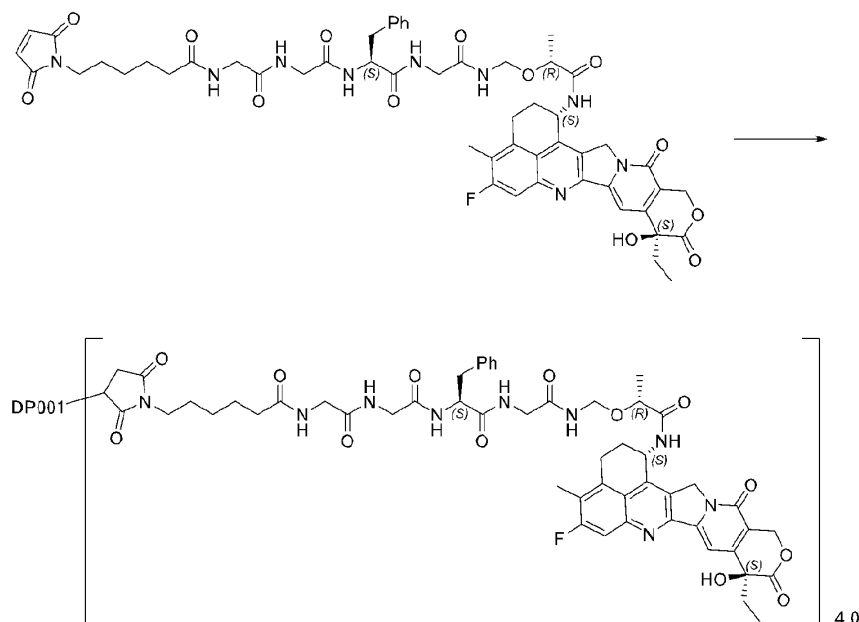
第五步: 氮气保护下, 将 C9-1(1.7g, 3.2mmol, 1.0eq)溶解于水(25.5mL, 15V/w)和叔丁醇(8.5mL, 5V/w)中, 搅拌溶清, 氮气置换一次, 加入 Pd/C(0.34g, 20%w/w), 氢气置换三次, 室温下 25~30°C 下氢化反应 12h, LCMS 监控原料反应完全。将反应液过滤, 滤饼用水(25mL*2)洗涤, 滤液再次过滤一次, 浓缩除去叔丁醇, 水相直接冻干, 拿到白色粉末状固体 C10-1 共 1.5g, 收率 100%。LC-MS[M+H]⁺: m/z 438。

第六步: 氮气保护下, 将 C10-1(1.4g, 3.2mmol, 1.0eq)溶解于乙腈(14mL, 10V/w)和水(28mL, 20V/w)中, 加入 C11-1(1.86g, 6.097mmol, 1.1eq), 搅拌溶清, 降温至 0~10°C 下, 滴加 DIEA(330.24 mg, 2.56 mmol), 滴加完在该温度下搅拌反应 16 h, LC-MS 监控原料反应完全。将 Na₂HPO₄(260mg), NaH₂PO₄(5.6g)加入 20mL 水中,

搅拌溶清配成缓冲液，将缓冲液降温至 0-5℃。将反应液倒入冻好的缓冲液中，并用 DCM/异丙醇=4/1(50mL*4)萃取，合并有机相，干燥，过滤，浓缩蒸干，过柱纯化。DCM→DCM：MeOH=50:1→30:1→20:1→15:1 的体系过柱，拿到黄色固体 C12-1。

第七步：氮气保护下，将 A5-1(547.4mg, 1.03mmol, 1.0eq)溶解于 5%的无水硫酸钠的水(6.5mL)和 THF(7.8mL)中，搅拌溶解不清，降温到 0~10℃下，加入 N-甲基吗啉(NMM)(104mg, 1.03mmol, 1.0eq)，加完在此温度下反应 1h。依次加入 C12-1(650mg, 1.03mmol, 1.1eq)，EDCI(296.2mg, 1.545mmol, 1.5eq)和 2-胍基乙酸乙酯(73.9mg, 0.52mmol, 0.5eq)，加完，在 0~10℃下反应 4~5h，TLC 监控原料反应完全。将反应液加入到冰浴下的 0.1M 盐酸(13mL, 20V/w)中，用 2-甲基四氢呋喃(2-Me THF)(13mL*3)萃取，合并有机相，再用 0.05M 盐酸(13mL, 20V/w)洗一次，水(13mL*2)洗涤，干燥，过滤，浓缩蒸干，过柱纯化。DCM→DCM：MeOH=50:1→30:1→20:1→15:1→12:1 的体系过柱，拿到黄色泡状固体 JSSW-001。LC-MS[M+H]⁺: m/z 1048。

实施例 2 抗体-药物偶联物(DP001-JSSW-001 ADC, DAR=4.0)



第一步 抗体的还原：

通过公知技术将编码轻、重链基因的质粒瞬时转染 HEK293 细胞表达后纯化后得到的 DP001 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液(1.0mL)放入到 1.5mL 聚丙烯制管(tube)中，向其中添加 10mM TCEP(百灵威科技有限公司)水溶液(17μL；相对于一分子抗体为 2.5 当量)及 1M 磷酸氢二钾水溶液(天津市光复科技发展有限公司，50 μL)。确认了该溶液的 pH 为 7.4±0.1 内后，于 37℃孵育 1 小时，由此将抗体内的二硫键还原。

第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加实施例 1 得到的 JSSW-001 化合物 10mM 的二甲基亚砜溶液(31.28μL；相对于一分子抗体为 4.6 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将接

头-药物化合物连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC(百灵威科技有限公司)水溶液 (10.2μL)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

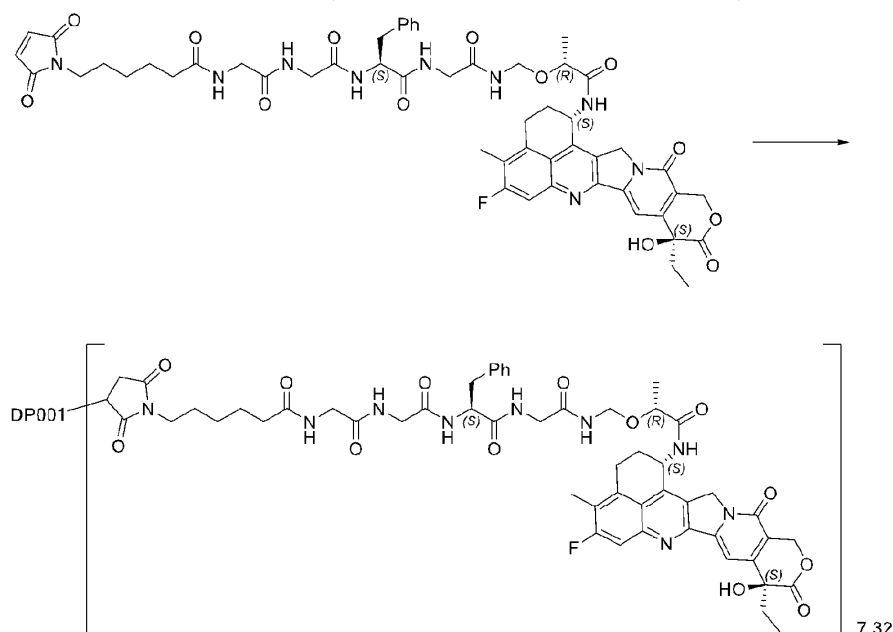
使用超滤离心管(Merck, MLtracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume)对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为纯化缓冲液的 25mM 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)，pH=6.5，将溶液浓缩至 1-2 mL，再次加入纯化缓冲液，置换倍数大于 1000 倍，由此，将未偶联的接头-药物化合物及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物(DP001-JSSW-001 ADC, DAR=4.0)。

第四步 抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比(DAR)的测定：

向 2 mg/kg 抗体—药物偶联物中加入终浓度为 20 mM 的二硫苏糖醇，于 37 °C 水浴 30 分钟，由此将切断了抗体-药物偶联物链间二硫键的样品用于 HPLC 分析。HPLC 系统选择 Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC，色谱柱选择 PLRP-S(5 μm 粒径; 2.1 mm×50 mm; Agilent Technologies)，柱温 80 °C，流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸(TFA)水溶液，流动相 B 为 0.1%三氟乙酸(TFA)乙腈溶液。上样量为 10 μL，梯度程序为 0-3 分钟 27%-27%，3-8 分钟 27%-35%，8-25 分钟 35%-43%，25-26 分钟 43%-95%，26-31 分钟 95%-95%，31-32 分钟 95%-27%，32-40 分钟 27%-27%。相对于未连接的轻链(L0)及重链(H0)，连接了药物的轻链(连接一个药物的轻链，L1)及重链(连接了一个药物的重链，H1；连接了两个药物的重链，H2；连接三个药物的重链，H3)而言，疏水性随着连接药物的数目的增加而增加，因此按照 L0、L1、H0、H1、H2、H3 顺序洗脱。根据 280nm 下的峰面积计算 DAR 值。DAR 值结果如图 1 所示。

$$\text{DAR} = \left(\frac{\text{L1}}{\text{L0} + \text{L1}} \times 1 + \frac{\text{H1}}{\text{H0} + \text{H1} + \text{H2} + \text{H3}} \times 1 + \frac{\text{H2}}{\text{H0} + \text{H1} + \text{H2} + \text{H3}} \times 2 + \frac{\text{H3}}{\text{H0} + \text{H1} + \text{H2} + \text{H3}} \times 3 \right) \times 2$$

实施例 3 抗体-药物偶联物(DP001-JSSW-001 ADC, DAR=7.32)



第一步 抗体的还原：

通过公知技术将编码轻、重链基因的质粒瞬时转染 HEK293 细胞表达后纯化后得到的 DP001 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0mL) 放入到 1.5mL 聚丙烯制管 (tube) 中，向其中添加 100mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (6.66 μ L；相对于一分子抗体为 10 当量) 及 1M 磷酸氢二钾水溶液 (天津市光复科技发展有限公司，18 μ L)。确认了该溶液的 pH 为 7.0 $\pm$ 0.1 内后，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时，由此将抗体内的二硫键还原。

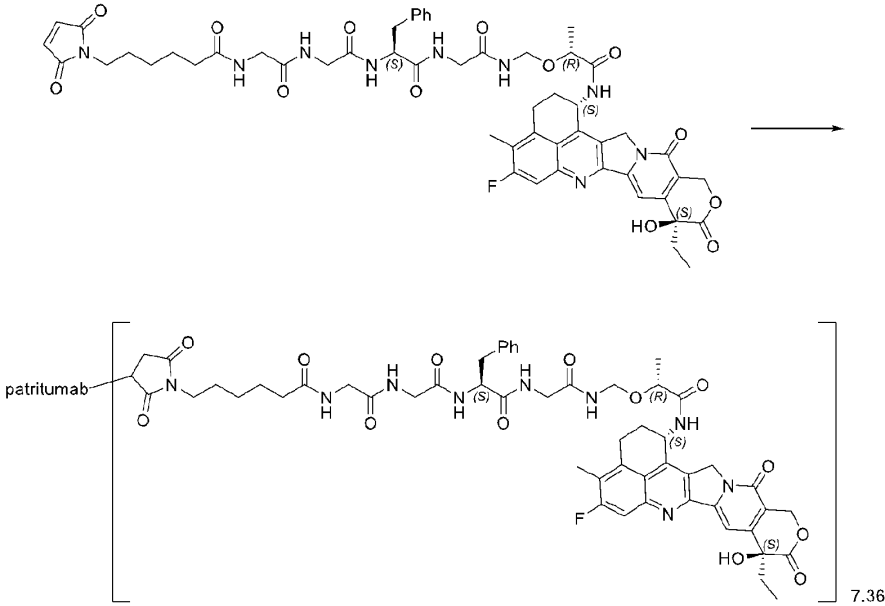
第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加实施例 1 得到的化合物 JSSW-001 10mM 的二甲基亚砜溶液 (87 μ L；相对于一分子抗体为 13 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将药物接头连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

使用超滤离心管 (Merck, MLtracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume) 对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为纯化缓冲液的 25mM 2-(N-吗啉)乙磺酸 (MES)，pH=6.5，将溶液浓缩至 1-2 mL，再次加入纯化缓冲液，置换倍数大于 1000 倍，由此，将未偶联的接头-药物化合物及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物 (DP001-JSSW-001 ADC, DAR=7.32)。DAR 值测定方法同实施例 2 第四步，DAR 值结果如图 2 所示。

实施例 4 抗体-药物偶联物 (patritumab-JSSW-001 ADC, DAR=7.36)



第一步 抗体的还原：

通过公知技术将编码轻、重链基因的质粒瞬时转染 HEK293 细胞表达后纯化后得到的 patritumab 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0mL) 放入到 1.5mL 聚丙烯制管 (tube) 中，向其中添加 100mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (6.66 μ L；相对于一分子抗体为 10 当量) 及 1M 磷酸氢二钾水溶液 (天津市光复科技发展有限公司，18 μ L)。确认了该溶液的 pH 为 7.0 $\pm$ 0.1 内后，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时，由此将抗体内的二硫键还原。

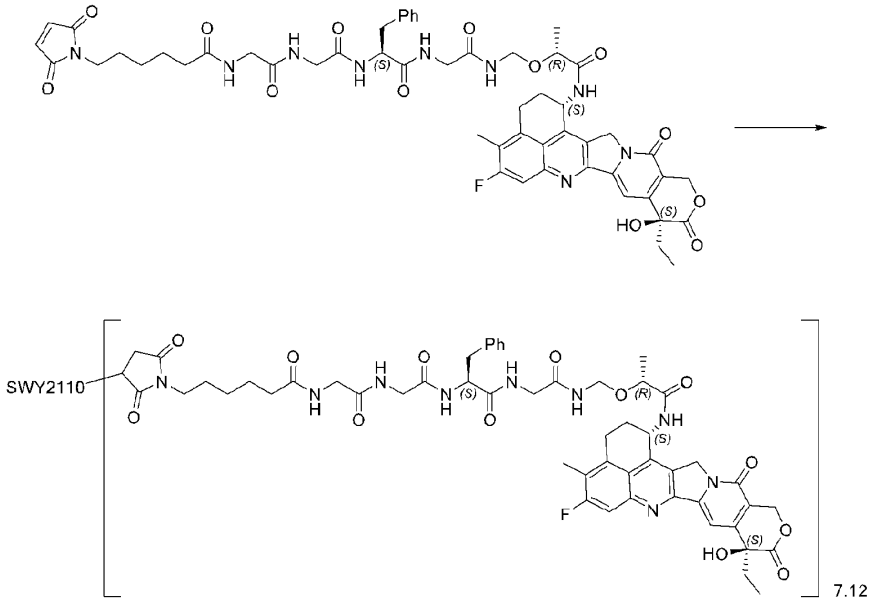
第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加实施例 1 得到的化合物 JSSW-001 10mM 的二甲基亚砜溶液(87μL；相对于一分子抗体为 13 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将药物接头连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC(百灵威科技有限公司)水溶液(10.2μL)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

使用超滤离心管(Merck, MLtracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume)对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为纯化缓冲液的 25mM 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES), pH=6.5，将溶液浓缩至 1-2 mL，再次加入纯化缓冲液，置换倍数大于 1000 倍，由此，将未偶联的接头-药物化合物及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物(patritumab-JSSW-001 ADC, DAR=7.36)。DAR 值测定方法同实施例 2 第四步，DAR 值结果如图 3 所示。

实施例 5 抗体-药物偶联物(SWY2110-JSSW-001 ADC, DAR=7.12)



第一步 抗体的还原：

通过公知技术将编码轻、重链基因的质粒瞬时转染 HEK293 细胞表达后纯化后得到的 SWY2110 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液(1.0mL)放入到 1.5mL 聚丙烯制管(tube)中，向其中添加 10mM TCEP(百灵威科技有限公司)水溶液(66.6uL；相对于一分子抗体为 10 当量)及 1M 磷酸氢二钾水溶液(天津市光复科技发展有限公司)。确认了该溶液的 pH 为 7.0±0.1 内后，于 37℃孵育 3 小时，由此将抗体内二硫键还原。

第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加实施例 1 得到的化合物 JSSW-001 10mM 的二甲基亚砜溶液(87uL；相对于一分子抗体为 13 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将药物接头连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC(百灵威科技有限公司)水溶液(10.2uL)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

超滤离心管(Merck, Ultracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume)对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为缓冲液 L-组氨酸 0.89mg/ml, L-组氨酸盐酸盐 4.04mg/ml, Tween80 0.03%, 蔗糖 90mg/ml, pH=5.5, 将未偶联的药物接头及其他低分子量试剂除去, 得到纯化的抗体-药物偶联物(SWY2110-JSSW-001 ADC, DAR=7.12)。DAR 值测定方法同实施例 2 第四步, DAR 值结果如图 4 所示。

实施例 6 pH 依赖抗体的制备

通过计算机模拟辅助技术, 将 SWY2110 与 EGFR 蛋白进行建模和对接, 获得抗原-抗体复合体, 将复合体 3Å 以内的氨基酸进行 D、E、H 扫描, 获得数条在 pH 7.4 的亲合力降低, 在 pH 6.0 条件下亲和力基本保持不变或亲和力下降程度较低的 pH 依赖性抗体。将获得的数条抗体序列基因克隆到哺乳动物表达载体, 并通过 HEK-293 细胞转染的方式进行抗体的表达, 表达完成后收集表达上清, 使用 AKTA 系统搭载 Protein A 预装柱进行抗体纯化, 获得目的抗体。

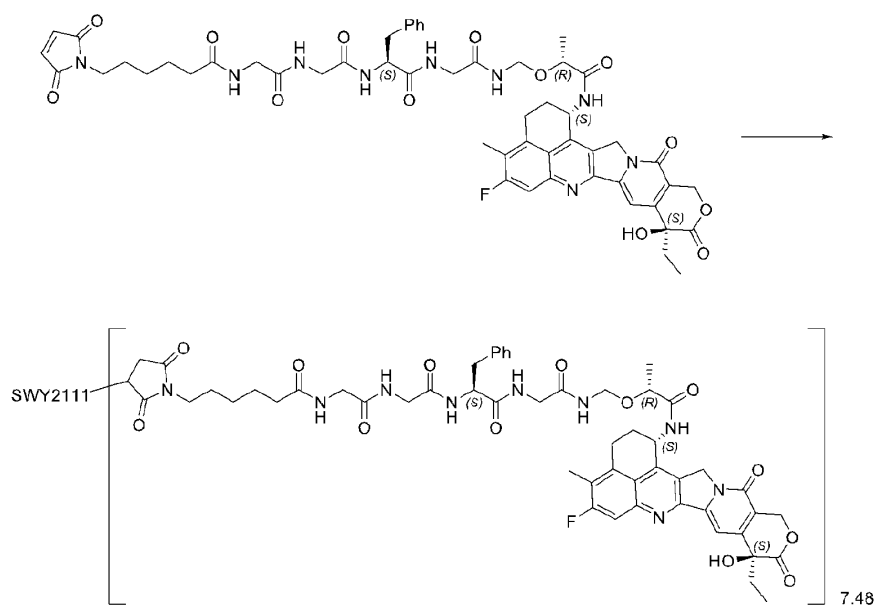
实施例 7 抗体亲和力测定

使用 0.25%胰酶-EDTA 将 MDA-MB-468 细胞消化成单细胞, 并平均分成多份, 每份细胞数大于 10⁶ 个。向细胞中加入 300 μL 连续 5 倍梯度稀释的 SWY2110(对照)及实施例 9 得到的抗体(抗体分别用 pH7.4 和 pH6.0 的 PBS 缓冲溶液稀释), 4 °C 孵育 1 h, 1000 rpm 离心 4 min 去掉上清。使用 PBS 溶液洗两遍, 之后加入 200 μL 1: 200 稀释的 FITC 标记的鼠抗人 Fc 的二抗, 4 °C 孵育 1 h, 孵育结束后 1000 rpm 离心 4 min 去掉上清。使用流式细胞仪检测荧光强度, 并保存数据, 通过相关软件进行数据分析。筛选后的抗体亲和力测定结果见表 1。经 pH 依赖性优化后抗体在与靶抗原进行亲和力测定结果显示, 在 pH7.4 的条件下, pH 优化后抗体 SWY2111、SWY2112、SWY2113 相对于 SWY2110 亲和力在较大程度上降低(约 3.0~9.7 倍), 在 pH6.0 条件下, SWY2111 和 SWY2112 相对于 SWY2110 亲和力基本保持不变(1.2~1.3 倍), SWY2113 抗体亲和力下降程度为 6.6 倍。

表 1、抗体亲和力测定结果

FACS (EC ₅₀)	SWY2110	SWY2111	SWY2112	SWY2113
pH7.4(nM)	0.49	1.45	2.35	4.76
pH6.0(nM)	0.51	0.60	0.67	3.39

实施例 8 抗体-药物偶联物(SWY2111-JSSW-001 ADC, DAR=7.48)



第一步 抗体的还原：

将得到的 SWY2111 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液(1.0mL)放入到 1.5mL 聚丙烯制管(tube)中，向其中添加 10mM TCEP(百灵威科技有限公司)水溶液(66.6uL；相对于一分子抗体为 10 当量)及 1M 磷酸氢二钾水溶液(天津市光复科技发展有限公司)。确认了该溶液的 pH 为 7.0 ± 0.1 内后，于 37°C 孵育 3 小时，由此将抗体内二硫键还原。

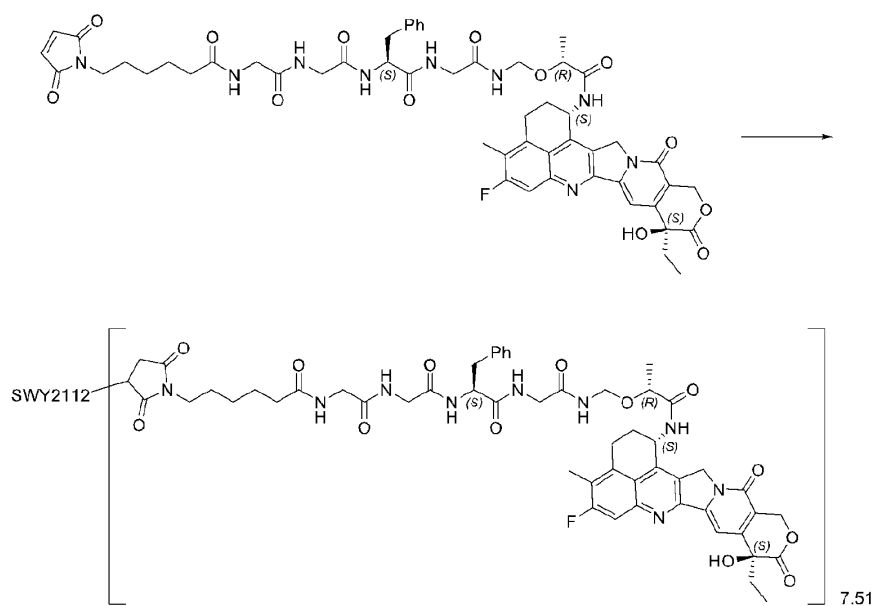
第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加实施例 1 得到的化合物 JSSW-001 10mM 的二甲基亚砜溶液(87uL；相对于一分子抗体为 13 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将药物接头连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC(百灵威科技有限公司)水溶液(10.2uL)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

超滤离心管(Merck, Ultracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume)对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为缓冲液 L-组氨酸 0.89mg/ml，L-组氨酸盐酸盐 4.04mg/ml，Tween80 0.03%，蔗糖 90mg/ml，pH=5.5，将未偶联的药物接头及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物(SWY2111-JSSW-001 ADC, DAR=7.48)。DAR 值测定方法同实施例 2 第四步，DAR 值结果如图 5 所示。

实施例 9 抗体-药物偶联物(SWY2112-JSSW-001 ADC, DAR=7.51)



第一步 抗体的还原：

将得到的 SWY2112 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液(1.0mL)放入到 1.5mL 聚丙烯制管(tube)中，向其中添加 10mM TCEP(百灵威科技有限公司)水溶液(66.6uL；相对于一分子抗体为 10 当量)及 1M 磷酸氢二钾水溶液(天津市光复科技发展有限公司)。确认了该溶液的 pH 为 7.0 ± 0.1 内后，于 37°C 孵育 3 小时，由此将抗体内二硫键还原。

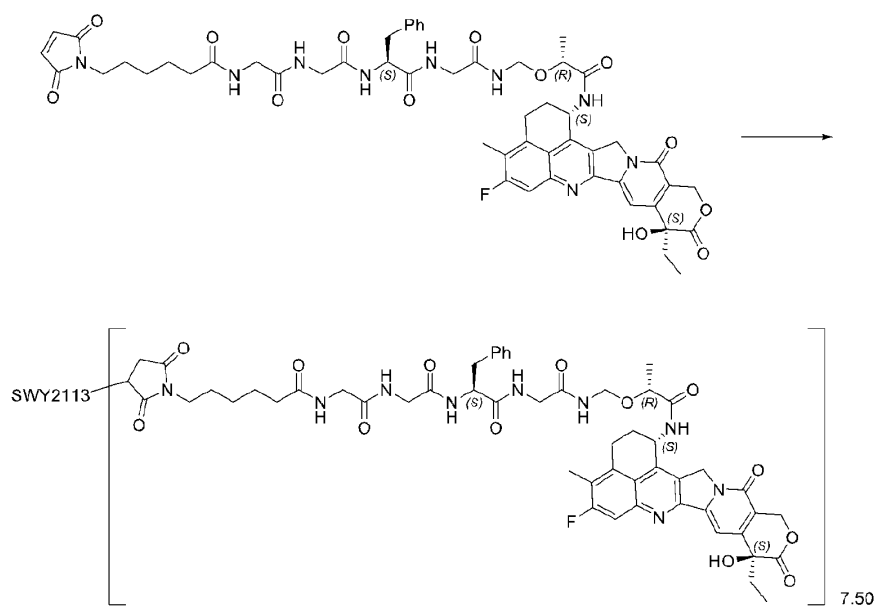
第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加实施例 1 得到的化合物 JSSW-001 10mM 的二甲基亚砜溶液(87uL；相对于一分子抗体为 13 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将药物接头连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC(百灵威科技有限公司)水溶液(10.2uL)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

超滤离心管(Merck, Ultracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume)对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为缓冲液 L-组氨酸 0.89mg/ml，L-组氨酸盐酸盐 4.04mg/ml，Tween80 0.03%，蔗糖 90mg/ml，pH=5.5，将未偶联的药物接头及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物(SWY2112-JSSW-001 ADC, DAR=7.51)。DAR 值测定方法同实施例 2 第四步，DAR 值结果如图 6 所示。

实施例 10 抗体-药物偶联物(SWY2113-JSSW-001 ADC, DAR=7.50)



第一步 抗体的还原：

将得到的 SWY2113 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液(1.0mL)放入到 1.5mL 聚丙烯制管(tube)中，向其中添加 10mM TCEP(百灵威科技有限公司)水溶液(66.6uL；相对于一分子抗体为 10 当量)及 1M 磷酸氢二钾水溶液(天津市光复科技发展有限公司)。确认了该溶液的 pH 为 7.0 ± 0.1 内后，于 37°C 孵育 3 小时，由此将抗体内二硫键还原。

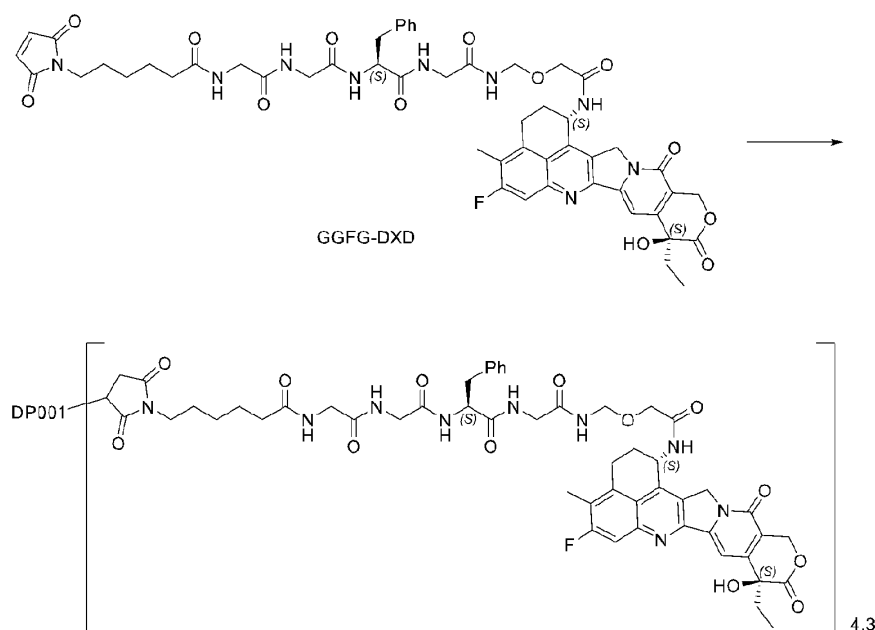
第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加实施例 1 得到的化合物 JSSW-001 10mM 的二甲基亚砜溶液(87uL；相对于一分子抗体为 13 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将药物接头连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC(百灵威科技有限公司)水溶液(10.2uL)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

超滤离心管(Merck, Ultracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume)对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为缓冲液 L-组氨酸 0.89mg/ml，L-组氨酸盐酸盐 4.04mg/ml，Tween80 0.03%，蔗糖 90mg/ml，pH=5.5，将未偶联的药物接头及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物(SWY2113-JSSW-001 ADC, DAR=7.50)。DAR 值测定方法同实施例 2 第四步，DAR 值结果如图 7 所示。

参考例 1 抗体-药物偶联物(DP001-DXD ADC, DAR=4.3)



第一步 抗体的还原：

通过公开技术将编码轻、重链基因的质粒瞬时转染 HEK293 细胞表达后纯化后得到的 DP001 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液 (1.0mL) 放入到 1.5mL 聚丙烯制管 (tube) 中，向其中添加 10mM TCEP (百灵威科技有限公司) 水溶液 (17 μ L；相对于一分子抗体为 2.5 当量) 及 1M 磷酸氢二钾水溶液 (天津市光复科技发展有限公司，50 μ L)。确认了该溶液的 pH 为 7.4 ± 0.1 内后，于 37°C 孵育 1 小时，由此将抗体内二硫键还原。

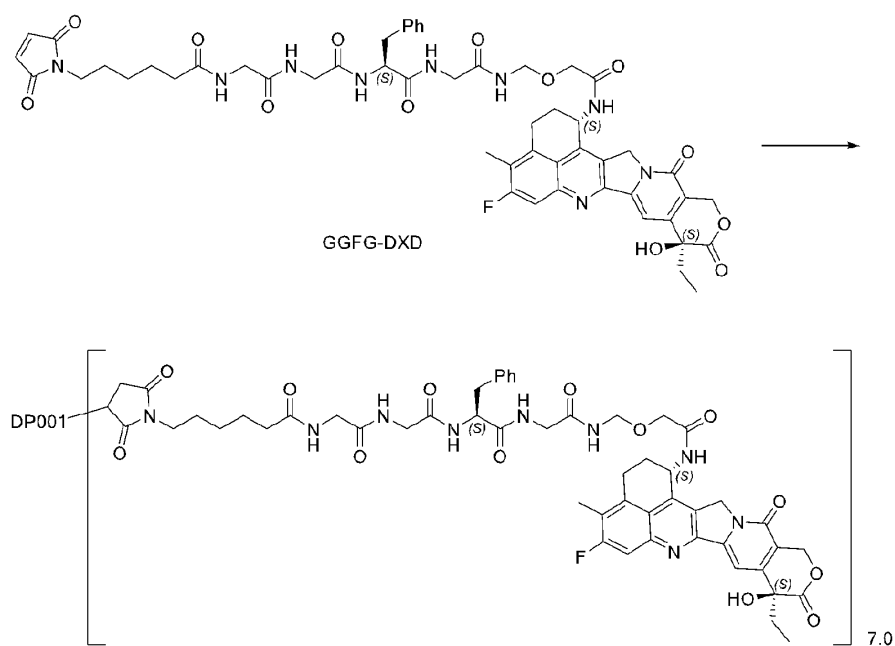
第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加购买的 Deruxtecan (CAS No. :1599440-13-7) 10mM 的二甲基亚砜溶液 (31.28 μ L；相对于一分子抗体为 4.6 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将接头-药物化合物连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC (百灵威科技有限公司) 水溶液 (10.2 μ L)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

使用超滤离心管 (Merck, MLtracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume) 对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为纯化缓冲液的 25mM 2-(N-吗啉)乙磺酸 (MES)，pH=6.5，将溶液浓缩至 1-2 mL，再次加入纯化缓冲液，置换倍数大于 1000 倍，由此，将未偶联的接头-药物化合物及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物 (DP001-DXD ADC, DAR=4.3)。抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比 (DAR) 的测定方法同实施例 2 第四步。

参考例 2 抗体-药物偶联物 (DP001-DXD ADC, DAR=7.0)



第一步 抗体的还原：

通过公开技术将编码轻、重链基因的质粒瞬时转染 HEK293 细胞表达后纯化后得到的 DP001 抗体将介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液(1.0mL)放入到 1.5mL 聚丙烯制管(tube)中，向其中添加 100mM TCEP(百灵威科技有限公司)水溶液(6.66 μ L；相对于一分子抗体为 10 当量)及 1M 磷酸氢二钾水溶液(天津市光复科技发展有限公司，18 μ L)。确认了该溶液的 pH 为 7.0 $\pm$ 0.1 内后，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时，由此将抗体内的二硫键还原。

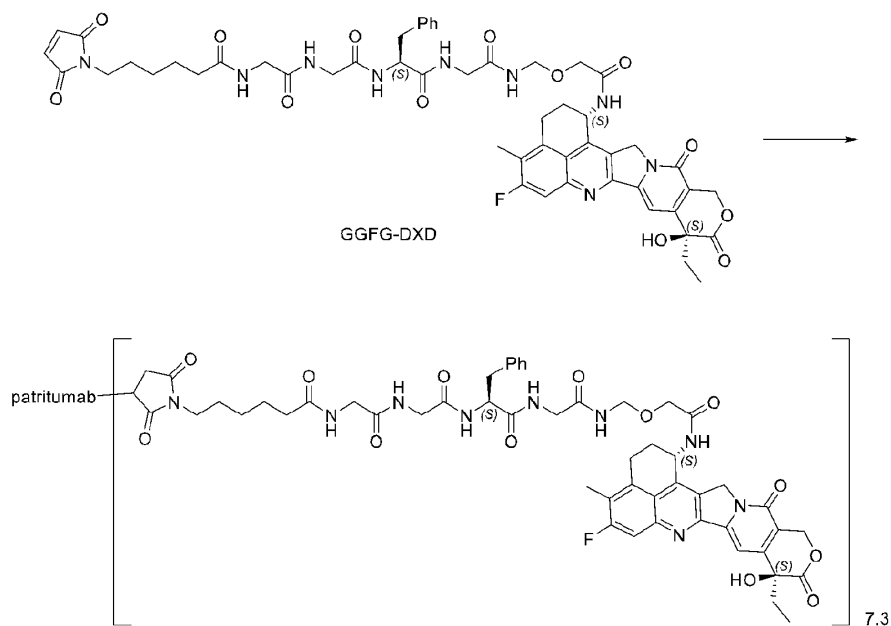
第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加购买的 Deruxtecen(CAS No. :1599440-13-7)10mM 的二甲基亚砜溶液(87 μ L；相对于一分子抗体为 13 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将接头-药物化合物连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC(百灵威科技有限公司)水溶液(10.2 μ L)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

使用超滤离心管(Merck, MLtracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume)对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为纯化缓冲液的 25mM 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)，pH=6.5，将溶液浓缩至 1-2 mL，再次加入纯化缓冲液，置换倍数大于 1000 倍，由此，将未偶联的接头-药物化合物及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物(DP001-DXD ADC, DAR=7.0)。抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比(DAR)的测定方法同实施例 2 第四步。

参考例 3 抗体-药物偶联物(patritumab-DXD ADC, DAR=7.3)



第一步 抗体的还原：

通过公开技术将编码轻、重链基因的质粒瞬时转染 HEK293 细胞表达后纯化后得到的 patritumab 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液(1.0mL)放入到 1.5mL 聚丙烯制管(tube)中，向其中添加 100mM TCEP(百灵威科技有限公司)水溶液(6.66 μ L；相对于一分子抗体为 10 当量)及 1M 磷酸氢二钾水溶液(天津市光复科技发展有限公司，18 μ L)。确认了该溶液的 pH 为 7.0 $\pm$ 0.1 内后，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时，由此将抗体内的二硫键还原。

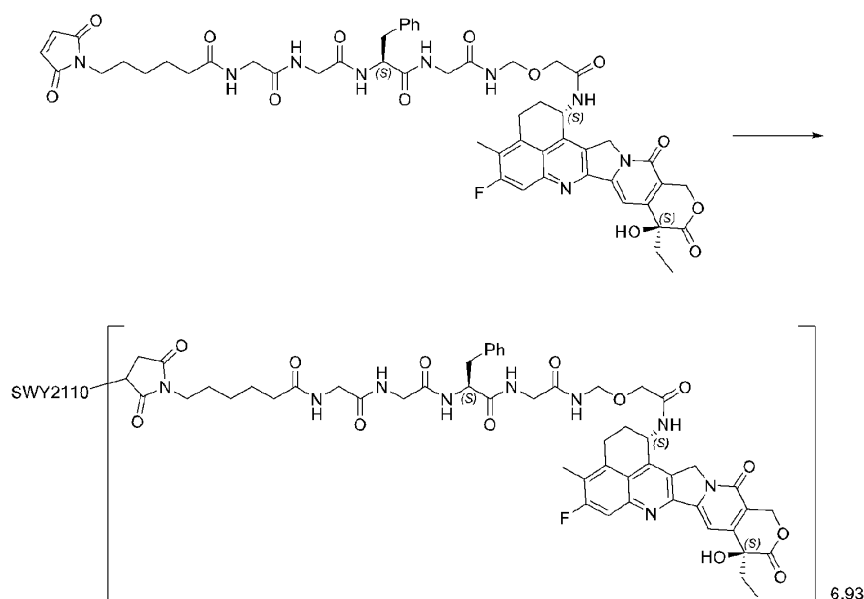
第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加购买的 Deruxtecane(CAS No. :1599440-13-7)10mM 的二甲基亚砜溶液(87 μ L；相对于一分子抗体为 13 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将接头-药物化合物连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC(百灵威科技有限公司)水溶液(10.2 μ L)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

使用超滤离心管(Merck, MLtracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume)对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为纯化缓冲液的 25mM 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)，pH=6.5，将溶液浓缩至 1-2 mL，再次加入纯化缓冲液，置换倍数大于 1000 倍，由此，将未偶联的接头-药物化合物及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物(patritumab-DXD ADC, DAR=7.3)。DAR 值测定方法同实施例 2 第四步，DAR 值结果如图 8 所示。

参考例 4 抗体-药物偶联物(SWY2110-DXD ADC, DAR=6.93)



第一步 抗体的还原：

通过公开技术将编码轻、重链基因的质粒瞬时转染 HEK293 细胞表达后纯化后得到的 SWY2110 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液(1.0mL)放入到 1.5mL 聚丙烯制管(tube)中，向其中添加 10mM TCEP(百灵威科技有限公司)水溶液(66.6uL；相对于一分子抗体为 10 当量)及 1M 磷酸氢二钾水溶液(天津市光复科技发展有限公司)。确认了该溶液的 pH 为 7.0 ± 0.1 内后，于 37°C 孵育 3 小时，由此将抗体二硫键还原。

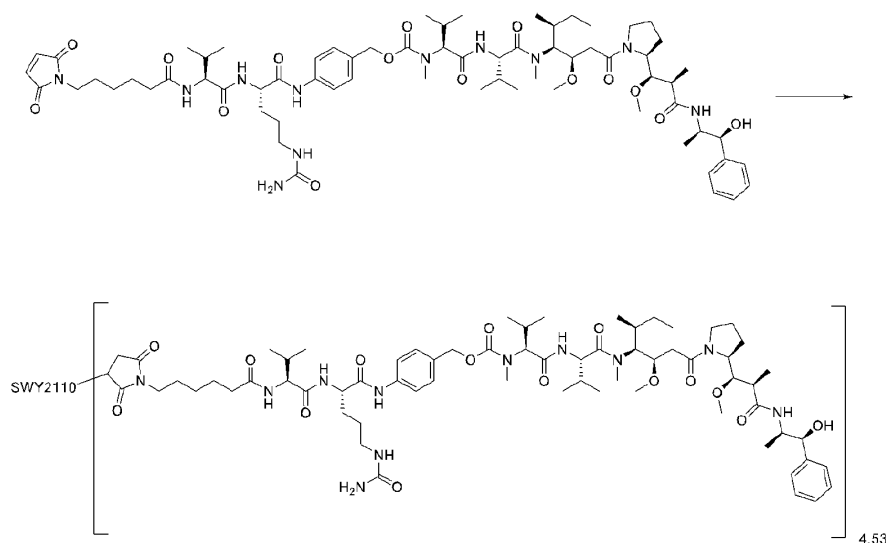
第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加购买的 Deruxtecen(CAS No. :1599440-13-7)化合物 10mM 的二甲基亚砜溶液(87uL；相对于一分子抗体为 13 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将接头-药物化合物连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC(百灵威科技有限公司)水溶液(10.2uL)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

使用超滤离心管(Merck, Ultracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume)对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为纯化缓冲液的 25mM 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)，pH=6.5，将溶液浓缩至 1-2 mL，再次加入纯化缓冲液，置换倍数大于 1000 倍，由此，将未偶联的接头-药物化合物及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物(SWY2110-DXD ADC, DAR=6.93)。DAR 值测定方法同实施例 2 第四步，DAR 值结果如图 9 所示。

参考例 5 抗体-药物偶联物(SWY2110-VC MMAE ADC, DAR=4.53)



第一步 抗体的还原：

通过公开技术将编码轻、重链基因的质粒瞬时转染 HEK293 细胞表达后纯化后得到的 SWY2110 抗体介质替换为 PBS6.0/EDTA，制备成 10mg/mL 的抗体浓度。将该溶液(1.0mL)放入到 1.5mL 聚丙烯制管(tube)中，向其中添加 10mM TCEP(百灵威科技有限公司)水溶液(17uL；相对于一分子抗体为 2.5 当量)及 1M 磷酸氢二钾水溶液(天津市光复科技发展有限公司)。确认了该溶液的 pH 为 7.4 ± 0.1 内后，于 37°C 孵育 1 小时，由此将抗体二硫键还原。

第二步 抗体与接头-药物化合物的偶联：

在室温下向上述溶液中添加购买的 mc-vc-PAB-MMAE,(CAS No.:646502-53-6, 简称 Vc MMAE)得到的化合物 10mM 的二甲基亚砜溶液(31.28uL；相对于一分子抗体为 4.6 当量)，混匀，在室温下反应 30 分钟，将接头-药物化合物连接于抗体。接下来，添加 100mM NAC(百灵威科技有限公司)水溶液(10.2uL)，进而在室温下搅拌 20 分钟，终止反应。

第三步 抗体-药物偶联物的纯化：

使用超滤离心管(Merck, Ultracel® Regenerated Cellulose (30kDa MWCO), 15 mL sample volume)对反应液进行超滤纯化。向反应液中加入作为纯化缓冲液的 25mM 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)，pH=6.5，将溶液浓缩至 1-2 mL，再次加入纯化缓冲液，置换倍数大于 1000 倍，由此，将未偶联的接头-药物化合物及其他低分子量试剂除去，得到纯化的抗体-药物偶联物抗体-药物偶联物(SWY2110-VC MMAE ADC, DAR=4.53)。

第四步 抗体-药物偶联物的药物抗体偶联比(DAR)的测定：

取 10 μ g SWY2110-Vc MMAE ADC 样品上色谱柱(2.5 μ m 粒径;4.6mm $\times$ 10 cm; TSKgel Butyl-NPR)，洗脱流动相 A 液为 20mM PB, pH7.0, 1.5M(NH₄)₂SO₄ 水溶液，流动相 B 液为 20mM PB, pH7.0, 25%异丙醇溶液，控制流速为 0.8mL/min，柱温为 30°C，检测波长为 280 nm，梯度程序为 0-20 分钟，流动相 B 由 0-100%，20-25 分钟，100%流动相 B，25-30 分钟，100%流动相 A。未连接的为 DAR0，连接 2 个小分子为 DAR2，连接 4 个小分子为 DAR4，连接 6 个小分子为 DAR6，连接 8 个小分子为 DAR8。因此按照 DAR0、DAR2、DAR4、DAR6、DAR8 的顺序洗脱。根据 280nm 下的峰面积计算 DAR 值，其中 A 代表各峰面积的百分数。DAR 值结果如图 10 所示。

DAR=2×ADAR₂+4×ADAR₄+6×ADAR₆+8×ADAR₈

生物实施例

试验一 抗体-药物体外细胞活性

1、试验目的：

本试验的目的是为了检测本发明抗体-药物偶联物对 SK-BR-3(ATCC/HTB-30)肿瘤细胞、人结直肠癌细胞 DiFi、人肺癌吉非替尼耐药细胞 PC9-GR、人肺癌突变细胞 PC-9(Dell19-T790M-C797S)肿瘤细胞体外增值的抑制活性，以不同浓度的化合物体外处理细胞，经培养后，然后加入 Resazurin(刃天青)读 ex550nm/em610nm 的荧光值，四参数拟合处理数据得出 IC50 值，从而计算出化合物的生物活性。

2、试验材料与设备：

材料

产品名称	厂家/货号
SK-BR-3 细胞系	ATCC/HTB-30
DiFi 细胞系	上海津曼特生物科技有限公司
PC9-GR 细胞系	南京科佰生物科技有限公司
MTT Assay Kit	Abcam
DMEM，高糖	Hyclone/SH30022.01
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco/25200-072
胎牛血清 (FBS)	Gibco/16000-044
100×双抗	Gibco/15240-062
黑壁，透明底的组织培养板	Corning/3603
刃天青钠	Sigma Aldrich/199303-25G

设备

名称	型号	厂家
生物安全柜	1300 系列 A2 型	Thermo Fisher Scientific
CO ₂ 培养箱	3111 型	Thermo Fisher Scientific
倒置显微镜	CKX31	奥林巴斯
酶标仪	Infinite M200	Tecan 公司
微量振荡器	MM-I 型	上海亚荣生化仪器厂

3、试验操作方法 1：

3.1 培养基：DMEM，10%FBS，1×双抗

3.2 细胞培养：从液氮中取出一支冷冻的 SK-BR-3/MDA-MB-468 细胞，复苏至 75cm² 培养瓶中培养。生长到细胞的汇合度达到>75%，并且已经进行至少 3 次传代。

3.2.1 如果不进行细胞传代，每 3~4 天更换一次培养基。

3.2.2 如果需要扩增细胞，将细胞传代接种到更大的培养瓶中，并且在测定使用之前使细胞的汇合度达到>75%。

3.3 收集细胞：培养瓶接近长满时收集 SK-BR-3/MDA-MB-468 细胞。

3.3.1 弃除培养基，并用 PBS 清洗去除死细胞和残留培养基。

3.3.2 加入 2-3mL0.25%Trypsin-EDTA，轻轻摇晃培养瓶然后 37℃孵育 2-3 分钟消化细胞。

3.3.3 立即向培养瓶中加入 5mL 培养基，并用移液管轻轻上下吸打使细胞分散开。

3.3.4 将细胞悬液转移到无菌离心管中 200×g 离心 3 分钟。

3.3.5 弃除管中培养基，加入 5~10mL 新鲜培养基重悬细胞。

3.4 细胞密度测定：显微镜下细胞计数板计数。

3.5 分析板接种

3.5.1 用培养基将细胞稀释至 1×10^5 个细胞/mL，100 μ L/孔接种至分析板中(A 和 H 行除外)。

3.5.2 向 A 和 H 行中每孔加入 120 μ L 培养基作为空白对照。

3.5.3 37°C，5%CO₂ 孵育 4-6h 使细胞贴壁。

3.6 准备稀释化合物样品

将化合物稀释至起始浓度为 18 μ g/ml，再进行 3 倍稀释，共获得 11 个梯度溶液，第 12 列为空白对照。

3.7 加药处理

3.7.1 将稀释板中 1~11 列中的药物稀释液各取 20 μ L 分别加入到分析板中的 1~11 列中。

3.7.2 第 12 列和第 A、H 行中各加入 20 μ L 新鲜培养基。

3.7.4 在平板震荡器上轻轻震荡 10-15 秒钟，然后将培养板 37°C 孵育 3 天。

3.8 分析

3.8.1 孵育结束后，每孔加入 0.03%刃天青(1 $\times$ PBS 稀释)20 μ L 并轻轻震荡 10~15 秒。

3.8.2 37°C 孵育 3~4 小时后酶标仪读数，参数设置如下：

激发光：550nm

发射光：610nm

积分时间：50

震荡：15 秒，涡旋

读数：顶读

读次数/孔：1

增益：设置优化(应在 35~42 之间)

如果要读多块板，确保所有板子所用的增益设置一致。

3.8.3 利用 EXCEL 数据作图拟合出参考标准品和样品的 IC₅₀。

3.8.3.1 使用模型 201 进行数据点绘图。

3.8.3.2 对于 Fit 参数，请使用以下命令：

a. A: 预配

b. B: 预配

c. C: 预配

d. D: 预配

e. 没有为所有约束

3.8.3.3 输出参数 C 为 IC₅₀，单位为 ng/mL。

结果见表 2。

试验操作方法 2:

本试验验证 SWY2110 单克隆抗体(SWY2110 mAb)、SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)和 SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)对 DiFi(人结直肠癌细胞)、PC9-GR(人肺癌吉非替尼耐药细胞)2 株细胞增殖抑制试验，具体浓度设置如下：

DiFi: SWY2110mAb、SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)和 SWY2110-JSSW-001

ADC (DAR=7.12)以 3000ng/ml 为起始浓度，药物 3×递减稀释共设 10 个浓度，分别为 3000、1000、333.33、111.11、37.04、12.35、4.12、1.37、0.46、0.15 ng/ml，药物作用 144h。

PC9-GR: SWY2110mAb、SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)、SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)以 1000 ng/ml 为起始浓度，5×递减稀释共设 8 个浓度，分别为 1000、200、40、8、1.6、0.32、0.64、0.013 ng/ml，药物作用 144h。

将处于对数生长期的细胞以一定数量接种于 96 孔板(100 μL/孔)，贴壁细胞贴壁 24 h 后，当天每孔加入 100 μL 含不同浓度梯度 SWY2110 mAb、SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)或 SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)的培养液，每个药物浓度设 3 个复孔，并设相应的空白孔(只有培养基)及正常孔(药物浓度为 0)。药物作用 144 小时后，加入 MTT 工作液(5mg/ml)，每孔 20 μL；37℃ 作用 4 小时，甩板去除上清液，加入 DMSO(分析纯)150 μL；微孔振荡器震荡混匀，将板擦拭干净，酶标仪 550 nm 处检测光密度值(OD)。

采用下列公式计算细胞生长的抑制率：
抑制率 (%)=(OD 值_{正常孔}-OD 值_{给药孔})/(OD 值_{正常孔}-OD 值_{空白孔})×100 %

根据各浓度抑制率，用 SPSS19.0 计算药物半数抑制浓度 IC₅₀。结果见表 3 和图 15、图 16

试验数据：

表 2：DP001-ADC 对 SK-BR-3 细胞的 IC₅₀ 值

化合物编号	IC ₅₀ 值(ng/mL)
DP001-DXD ADC (DAR=7.0)	7.2481
DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)	5.1824

从表 2 记载的数据可以看出，本发明抗体-药物 DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)对 SK-BR-3 细胞，具有比 DP001-DXD ADC (DAR=7.0)更低的 IC₅₀ 值，表现出更好的抗细胞增殖效果。

表 3：SWY2110-ADC 对 2 株细胞的 IC₅₀ 值(ng/ml)

细胞	SWY2110 mAb	SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)	SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)
DiFi	43.94	14.85	15.84
PC9-GR	--	1.00	1.12

其中"--"表示未展现抗细胞增殖效果。

从表 3 数据可以看出，本发明的抗体-药物偶联物 SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)与 SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)对 EGFR 高表达细胞株 DiFi 以及吉非替尼耐药株 PC9-GR 具有相似的 IC₅₀ 值，相对于 SWY2110 mAb 表现出更好的抗细胞增殖效果。

试验二 抗体-药物偶联物对 NU/NU 小鼠 HER2-表达的人乳腺癌 JIMT-1 细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NU/NU 小鼠，5~6 周龄，24 只

2. 试验目的

采用 HER2-表达的人乳腺癌 JIMT-1 细胞 NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察抗体-药

物偶联物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 4 动物分组及剂量表

组别	动物数量(只)	剂量(mg/kg)	给药途径/频次
溶剂组(Vehicle)	6	0	i.v./1 次
DP001-DXD ADC (DAR=4.30)	6	3	i.v./1 次
DP001-JSSW-001 ADC (DAR=4.0)	6	3	i.v./1 次
DP001-ZW-002 ADC (DAR=5.78)	6	3	i.v./1 次

注：i.v.：静脉注射。

4. 试验方法

本试验选用人乳腺癌细胞 JIMT-1 构建裸小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 127 mm³ 时，按表 4 将动物按肿瘤体积均衡分为 4 组(d0)，每组 6 只动物，单次静脉给药，给药体积是 10 mL/kg，溶剂对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后观察 13 天，比较表中 3 个抗体-药物偶联物对 HER2 表达细胞系人乳腺癌 JIMT-1 裸小鼠移植瘤的抑制作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

- (1) 肿瘤体积： $V = 1/2 \times A \times B^2$
- (2) 相对肿瘤体积： $RTV = \frac{TV_{nd}}{TV_{0d}}$
- (3) 相对肿瘤体积增殖率： $\frac{T}{C} \% = \frac{\text{给药组 } RTV_{xnd}}{\text{溶剂组 } RTV_{xnd}} \times 100\%$
- (4) 肿瘤抑制率： $TGI\% = [1 - \frac{TV_{xn} - TV_{x0}}{TV_{Mn} - TV_{M0}}] \times 100\%$

注：V：肿瘤体积

A：肿瘤长

B：肿瘤宽

RTV：相对肿瘤体积

TVnd：第 n 天肿瘤体积

TV0d：第 0 天肿瘤体积

RTVxnd：第 n 天平均相对肿瘤体积

TV_{xn}：给药组第 n 天平均肿瘤体积

TV_{x0}：给药组第 0 天平均肿瘤体积

TV_{Mn}：溶剂组第 n 天平均肿瘤体积

TV_{M0}：溶剂组第 0 天平均肿瘤体积

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，与溶剂组相比，DP001-DXD ADC (DAR=4.3) ($P<0.05$)、DP001-JSSW-001 ADC (DAR=4.0) ($P<0.01$) 和 DP001-ZW-002 ADC (DAR=5.78) ($P<0.05$)均能显著抑制移植瘤的体积。详见图 11 和表 5。

表 5 抗体-药物偶联物给药 13 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day13
溶剂组(Vehicle)	6	0	322.7 ±82.2	---
DP001-DXD ADC (DAR=4.30)	6	3	192.7 ±70.2*	67.3
DP001-JSSW-001 ADC (DAR=4.0)	6	3	202.9 ±38.1**	61.4
DP001-ZW-002 ADC (DAR=5.78)	6	3	194.8 ±68.2*	65.3

*: 与溶剂组相比 P<0.05, **: 与溶剂组相比 P<0.01

试验三 抗体-药物偶联物对 NU/NU 小鼠人肺腺癌 PC9-GR(Gefitinib 耐药细胞)细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NU/NU 小鼠，5~6 周龄，16 只

2. 试验目的

采用人肺腺癌 PC-9/GR(Gefitinib 耐药细胞)细胞 NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察 2 个 patritumab-ADC 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 6 动物分组及剂量表

组别	动物数量 (只)	剂量(mg/kg)	给药途径/频次
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./qw*4w
patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)	5	3	i.v./qw*4w
patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)	5	3	i.v./qw*4w

注：i.v.：静脉注射，qw*4w：每周给药一次，给药四周。

4. 试验方法

本试验选用人肺腺癌 PC9-GR(Gefitinib 耐药细胞)细胞构建裸小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 110 mm³ 时，按表 6 将动物按肿瘤体积分为 3 组(d0)，溶媒组 6 只动物，patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)组与 patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36) 组各 5 只动物，静脉给药，每周给药一次，连续给药 4 周，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后 28 天结束试验，比较 patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)及 patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)对人肺腺癌 PC9-GR(Gefitinib 耐药细胞)裸小鼠移植瘤的抑制作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)组 (P<0.001)相对于 patritumab-DXD ADC (DAR=7.3) (P<0.01)组具有更优的抑制移植瘤的体积的效果。详见图 12 和表 7。

表 7 patritumab-ADC 给药 28 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(% Day28)
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./qw*4w	761.4±272.6	---
patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)	5	3	i.v./qw*4w	373.4±102.8**	59.5
patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)	5	3	i.v./qw*4w	312.7±86.7***	68.9

：与溶媒组相比 P<0.01，*：与溶剂组相比 P<0.001

试验四：SWY2110-ADC 对 NU/NU 小鼠人结直肠癌 DiFi 细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NU/NU 小鼠，5~6 周龄，14 只

2. 试验目的

采用人结直肠癌 DiFi 细胞 NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察 2 个 SWY2110-ADC 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 8 动物分组及剂量表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频次
溶媒组(Vehicle)	5	0	i.v./1 次
SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)	4	0.5	i.v./1 次
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	5	0.5	i.v./1 次

注：i.v.：静脉注射。

4. 试验方法

本试验选用人结直肠癌 DiFi 细胞构建裸小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 110 mm³ 时，按表 8 将动物按肿瘤体积均衡分为 3 组(d0)，溶媒组和 SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)各 5 只，SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)组 4 只，单次静脉给药，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后观察 27 天，比较表中 2 个 SWY2110-ADC 对人结直肠癌 DiFi 裸小鼠移植瘤的抑制作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，与溶媒组相比，SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)(P<0.05)和 SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)(P<0.05)均能显著抑制移植瘤的体积，SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)组 27 天肿瘤抑制率高达 74.6%，SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)肿瘤抑制率次之为 69.7%，由于 JSSW-001 小分子的毒性低于 Vc MMAE，预示 SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)能够实现更为高效低毒的作用效果。详见图 13 和表 9。

表 9 SWY2110-ADC 给药 27 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day27
溶媒组(Vehicle)	5	0	763.1±293.8	---
SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)	4	0.5	306.5±332.4*	69.7
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	5	0.5	275.5±297.5*	74.6

*: 与溶媒组相比 P<0.05

试验五 SWY2110-ADC 对 NU/NU 小鼠人肺腺癌 PC9-GR(Gefitinib 耐药细胞)细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NU/NU 小鼠，5~6 周龄，30 只

2. 试验目的

采用人肺腺癌 PC-9-GR(Gefitinib 耐药细胞)细胞 NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察 SWY2110 单抗和 3 个 SWY2110-ADC 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 10 动物分组及剂量表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频 次
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./qw*4w
SWY2110 mAb	6	1	i.v./qw*4w
SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)	6	1	i.v./qw*4w
SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)	6	1	i.v./qw*4w
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	6	1	i.v./qw*4w

注：i.v.：静脉注射，qw*4w：每周给药一次，给药四周。

4. 试验方法

本试验选用人肺腺癌 PC9-GR(Gefitinib 耐药细胞)细胞构建裸小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 110 mm³ 时，按表 10 将动物按肿瘤体积均衡分为 5 组(d0)，每组 6 只动物，静脉给药，每周给药一次，连续给药 4 周，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后 28 天结束试验，比较 SWY2110 单抗和 3 个 SWY2110-ADC 药物对人肺腺癌 PC-9-GR(Gefitinib 耐药细胞)裸小鼠移植瘤的抑制作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，与溶媒组相比，SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)(P<0.05)、SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93) (P<0.05) 和 SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)(P<0.001)均能抑制移植瘤的体积。抗体 SWY2110 对肿瘤的抑制效果不佳，

肿瘤抑制率仅为 20.3%，SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)组对 PC9-GR 的移植瘤体积抑制效果最显著，肿瘤抑制率高达 77.7%，SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53) 与 SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)的肿瘤抑制率分别为 40.4%、50.2%，SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)是 SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)对 PCR-GR 的肿瘤抑制效果的 154%，SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)是 SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)对 PCR-GR 的肿瘤抑制效果的 192%，预示 SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)对吉非替尼耐药的肿瘤细胞依然有显著抑制作用。详见图 14 和表 11。

表 11 SWY2110-ADC 给药 28 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day28
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./qw*4w	761.4±272.6	---
SWY2110 mAb	6	1	i.v./qw*4w	628.9±290.0	20.3
SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)	6	1	i.v./qw*4w	498.0±179.1*	40.4
SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)	6	1	i.v./qw*4w	434.6±136.3*	50.2
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	6	1	i.v./qw*4w	255.1±117.7***	77.7

*：与溶媒组相比 P<0.05，***：与溶媒组相比 P<0.001

试验六 抗体-药物体外血浆稳定性

DP001-DXD ADC (DAR=7.0)、DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)分别与 0.5% BSA-PBS 和 ICR 小鼠血浆进行孵育，孵育浓度分别为 DP001-DXD ADC (DAR=7.0)(91.7μg/mL)、DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)(80 μg/mL)分别在 37℃无菌条件下温孵 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、336 h 和 504h 后收集样品，采用 LC-MS/MS 法检测血浆样品中脱落分子的浓度，结果如下：

表 12 体外血浆稳定性

时间 (h)	DP001-DXD ADC (DAR=7.0)		DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)	
	0.5% BSA-PBS	ICR	0.5% BSA-PBS	ICR
	脱落率(%)	脱落率(%)	脱落率(%)	脱落率(%)
0	0.02	0.02	0.03	0.01
24	-	-	0.13	0.15
48	0.13	0.61	0.16	1.02
72	0.13	0.65	0.18	1.13
96	0.13	0.97	0.20	0.77
120	0.16	1.18	-	0.82
144	0.16	1.29	0.19	1.18
168	0.14	1.43	0.20	1.36
336	0.41	2.50	0.27	1.54
504	3.90	4.07	1.09	2.75

注：1. 脱落率的计算：根据 DAR 值，计算 DXD/ADC 的质量比，得到 DP001-DXD ADC (DAR=7.0)(91.7μg/mL)、DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)(80 μg/mL)。脱落率(%)= C_i/ C_{total}*100%，其中 C_{total} 为总的小分子浓度，C_i为每个时间点的游离的

小分子浓度。2.“-”表示未取样。

结果表明，ADC 在 37℃ 温孵 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、336 h 和 504h，0.5% 在 BSA-PBS 和 ICR 小鼠血浆中均有游离小分子生成。温孵 504 h 后，在 0.5% BSA-PBS 中脱落率分别为 DP001-DXD ADC (DAR=7.0)(3.90%)、DP001-JSSW-001ADC (DAR=7.32)(1.09%) 在 ICR 小鼠血浆中脱落率分别为 DP001-DXD ADC (DAR=7.0)(4.07%)、DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)(2.75%)。在 0.5% BSA-PBS 中，小分子从抗体上脱落率均不足 4.0%：DP001-DXD ADC (DAR=7.0) > DP001-JSSW-001ADC (DAR=7.32)，表明 DP001-JSSW-001ADC (DAR=7.32)在 0.5% BSA-PBS 中更稳定。在 ICR 小鼠血浆中，小分子从抗体上脱落率均不足 5.0%：DP001-DXD ADC (DAR=7.0)>DP001-JSSW-001ADC (DAR=7.32)，表明 DP001-JSSW-001ADC (DAR=7.32)比 DP001-DXD ADC (DAR=7.0)在 ICR 小鼠血浆中更较稳定。

试验七 抗体-药物体外旁观效应研究

对于旁观效应试验首先采用阳性细胞系 SK-BR-3 和阴性对照细胞 MDA-MB-468，分别与 DP001-DXD ADC (DAR=7.0)和 DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)共同孵育，释放的小分子毒素能够引起周围共培养的阴性细胞的凋亡，即旁观效应，本试验主要通过报告基因细胞 HEK293-Luc 分别与阳性细胞系 SK-BR-3 和阴性对照细胞 MDA-MB-468 共培养四天后，通过加入化学发光底物来判断释放的小分子毒素对 HEK293-Luc 的增长影响。研究结果显示：DP001-DXD ADC (DAR=7.0)和 DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)能够与肿瘤细胞表面的 HER2 受体结合后，通过内吞作用进入到细胞内释放小分子毒素；同时 DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)表现出对旁观细胞的增殖更强抑制作用。

2. 试验准备

2.1 试验设备

仪器设备	生产厂家	型号
二氧化碳培养箱	Thermo Fisher	3111 型
生物安全柜	ThermoFisher	1300 Series A2 6 英寸
台式高速冷冻离心机	Thermo Fisher	SORVALL Stratos
倒置显微镜	奥林巴斯	CKX31 倒置显微镜
移液器	Eppendorf	Research Plus
酶标仪	Tecan	M200

2.2 试验耗材

名称	生产厂家	货号
96 孔透明平底培养板	Corning	3599
细胞培养板	Corning	3917
50 mL 离心管	Corning	430828
15 mL 离心管	Corning	430790
T75 细胞培养瓶	Corning	430641
T25 细胞培养瓶	Corning	430639

2.3 试验试剂

名称	生产厂家	货号
DPBS	BBI	E607009-0500
Fetal Bovine Serum	Gibco	10099-141C
DMEM 培养基	HyClone	SH30243.01
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco	25200-072
Bright-Glo™ Luciferase assay system	Promega	E2620

2.4 细胞信息

名称	生产厂家	培养条件
SK-BR-3	ATCC	DMEM 培养基+10%
MDA-MB-468	南京科佰	DMEM 培养基+10%
HEK293-Luc	实验室自制	DMEM 培养基+10% FBS+400 µg/ml G418+100 µg/ml HygromycinB

3. 试验方法

3.1 试剂配制

3.1.1 细胞复苏培养基的制备

DMEM 完全培养基: DMEM 基础培养基中加入终体系为 10% 的 Fetal Bovine Serum、1% 的 Penicilin/Streptomycin, 充分混匀后于 2-8℃ 保存。

3.1.2 细胞培养基(含筛选剂)的制备

DMEM 基础培养基中加入终体系为 10% 的 Fetal Bovine Serum、1% 的 Penicilin/Streptomycin, 并添加 200 µg/ml 的 G418, 充分混匀后于 2-8℃ 保存。

3.2 细胞准备

3.2.1 细胞复苏

将细胞冻存管置于温度为 37℃ 的水浴锅中快速晃动至完全融化, 转移至超净工作台或生物安全柜中。将细胞悬液用细胞复苏培养基稀释后离心, 弃去离心上清, 并使用细胞复苏培养基重悬细胞, 测定细胞密度和活率。用细胞培养基调整细胞密度, 混合均匀后, 将细胞悬液转移至细胞培养瓶中, 显微镜镜检无误后, 转移至培养箱中, 37℃, 5%CO₂ 培养。

3.2.2 细胞传代

将细胞培养瓶从 CO₂ 培养箱中取出并转移至超净工作台或生物安全柜中, 细胞经过 PBS 洗涤, 胰酶消化, 细胞生长培养基终止消化后, 收集细胞悬液, 测定细胞密度和活率。取适量细胞悬液加入到适量新鲜培养基(含或者不含筛选剂)中, 根据细胞生长特性和试验需求进行传代扩增。传代后, 将细胞置于培养箱中继续培养。

3.3 旁观效应试验方法

3.3.1 待细胞融汇度达到 90% 时, 分别胰酶消化收集 SK-BR-3、MDA-MB-468, 以及 HEK293-Luc 细胞, 并使用相对应的培养基重悬细胞;

3.3.2 轻柔吹打重悬靶细胞数次至单细胞悬液, 使用台盼蓝染色法鉴定细胞活力和细胞计数; 调整细胞密度为 2.0×10⁵ cells/ml;

3.3.3 调整好密度的 SK-BR-3 和 MDA-MB-468 细胞分别与 HEK293-Luc 细胞悬液进行 1:1 混匀; 每孔 50 µl 加至 96 孔透明平底培养板; 阳性细胞组即 SK-BR-3 和 HEK293-Luc 的混合细胞; 阴性细胞组即 MDA-MB-468 和 HEK293-Luc 的混合细胞;

3.3.4 DP001-DXD ADC (DAR=7.0) 和 DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32) 给药组共

设 3 个浓度，终浓度分别为：100 ng/ml、500 ng /ml，以及 1000 ng/ml；每孔 50 μ l 加至已接种细胞的 96 孔透明平底培养板；放置于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中培养 4 天；

3.3.5 孵育结束后，从培养箱中取出培养板，平衡温度至室温；以 100 μ L/孔将 Bright-GloTM Luciferase Assay System 加入培养板中，避光 5-15 分钟读取化学发光。

4. 试验结果：DP001-DXD(DAR=7.0)和 DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)能够与肿瘤细胞表面的 HER2 受体结合后，通过内吞作用进入到细胞内释放小分子毒素；同时 DP001-JSSW-001 ADC (DAR=7.32)表现出比 DP001-DXD ADC (DAR=7.0)对旁观细胞的更强抑制作用。试验结果见表 13 和图 17

表 13：本发明抗体-药物对荧光细胞的抑制率

浓度/ ng/ml	SKBR3+HEK29 3-GLP1/DP001- DXD ADC((DAR=7.0)	MDA-MB- 468+HEK293- GLP1/DP001- DXD ADC (DAR=7.0)	SKBR3+HEK293 -GLP1/DP001- JSSW-001 ADC (DAR=7.32)	MDA-MB- 468+HEK293- GLP1/DP001- JSSW-001 ADC (DAR=7.32)
	抑制率			
1000	17.1%	2.7%	18.7%	3.1%
500	16.4%	2.6%	18.1%	-0.4%
100	10.0%	3.4%	16.8%	2.7%

试验八 接头-药物化合物稳定性研究

不同的接头-药物化合物如：Deruxtecan、JSSW-001 化合物分别在高温(40 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C)、高湿(25 $^{\circ}$ C/75% RH 和 25 $^{\circ}$ C/92.5% RH)、光照(照度 4500Lux，近紫外能量 90 μ w/cm²)或 0.5% BSA-PBS 进行研究，分别在不同条件下放置后收集不同时间样品，采用 LC-MS/MS 法检测样品中接头-药物化合物的浓度变化情况，试验结果表明 JSSW-001 化合物的稳定性更好。

试验九 SWY2110-ADC 对人肺腺癌 PC9-AR(PC9-Del19/T790M/C797S、Osimertinib 耐药细胞)细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

Balb/c nude 小鼠，5~6 周龄，24 只

2. 试验目的

采用人肺腺癌 PC9-Del19/T790M/C797S(Osimertinib 耐药细胞,以下简称 PC9-AR)细胞 NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察 3 个 SWY2110-ADC 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 14 动物分组及剂量表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频 次
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./1 次
SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)	6	3	i.v./1 次
SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)	6	3	i.v./1 次
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	6	3	i.v./1 次

注：i.v.：静脉注射，i.v./1 次：给药一次。

4. 试验方法

本试验选用人肺腺癌 PC9-Del19/T790M/C797S(Osimertinib 耐药细胞)细胞构建裸小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 110 mm³ 时，按表 14 将动物按肿瘤体积均衡分为 4 组(d0)，每组 6 只动物，静脉给药，给药一次，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后 24 天结束试验，比较 3 个 SWY2110-ADC 药物对人肺腺癌 PC9-Del19/T790M/C797S(Osimertinib 耐药细胞)裸小鼠移植瘤的抑制作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，与溶媒组相比，SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)(P<0.001)、SWY2110-Dxd ADC (DAR=6.93) (P<0.001) 和 SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)(P<0.001)均能抑制移植瘤的体积。SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)组对 PC9-AR 的移植瘤体积抑制效果最显著，肿瘤抑制率高达 97.5%，SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)与 SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)的肿瘤抑制率分别为 89.7%、76.2%，SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)是 SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)肿瘤抑制效果的 128%，SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)是 SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)肿瘤抑制效果的 109%，预示 SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)对 Osimertinib 耐药的肿瘤细胞依然有显著抑制作用。详见图 18 和表 15。

表 15 SWY2110-ADC 给药 24 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day24
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./1 次	1138.3	---
SWY2110-Vc MMAE ADC (DAR=4.53)	6	3	i.v./1 次	212.3***	89.7
SWY2110-DXD ADC (DAR=6.93)	6	3	i.v./1 次	352.0***	76.2
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	6	3	i.v./1 次	131.3***	97.5

***：相对于溶媒组的统计学显著性 p<0.001

试验十 SWY2110-ADC、SWY2111-ADC、SWY2112-ADC、SWY2113-ADC 对人肺腺癌 NCI-H1975(人肺腺癌细胞)细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NU/NU 小鼠，5~6 周龄，30 只

2. 试验目的

采用人肺腺癌 NCI-H1975(人肺腺癌细胞)细胞 NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察 SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、SWY2112-JSSW-001、SWY2113-JSSW-001 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 16 动物分组及剂量表

组别	动物数量(只)	剂量(mg/kg)	给药途径/频次
溶媒组(Vehicle)	6	-	-
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	6	1	i.v./1 次
SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)	6	1	i.v./1 次
SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)	6	1	i.v./1 次
SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)	6	1	i.v./1 次

注：i.v.：静脉注射，i.v./1 次：给药一次；

4. 试验方法

本试验选用人肺腺癌 NCI-H1975(人肺腺癌细胞)细胞构建裸小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 110 mm³ 时，按表 16 将动物按肿瘤体积均衡分为 5 组(d0)，每组 6 只动物，每剂量组为单次给药 1mg/kg。

静脉给药，给药一次，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后 21 天结束试验，比较 SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、SWY2112-JSSW-001、SWY2113-JSSW-001 对人肺腺癌 NCI-H1975 裸小鼠移植瘤的抑制作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，与溶媒组相比，SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)、SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)、SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)、SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)(P<0.001)均具有很好的抑瘤效果，肿瘤抑制率达到 84.1%、83.0%、80.9%和 74.2%(P<0.001)，显示 4 种 ADC 均对人肺腺癌 NCI-H1975 肿瘤细胞有显著抑制作用。详见图 19 和表 17。

表 17 SWY2110~SWY2113-ADC 给药 21 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day21
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./1 次	852.4±97.8	---
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	6	1	i.v./1 次	223.3±71.7***	84.2
SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)	6	1	i.v./1 次	248.4±80.3***	80.9
SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)	6	1	i.v./1 次	231.8±106.5***	83.0

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day21
SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)	6	1	i.v./1 次	298.4±108.4***	74.2

***: 与溶媒组相比 P<0.001

试验十一 SWY2110-ADC、SWY2111-ADC、SWY2112-ADC、SWY2113-ADC 对人乳腺癌 MDA-MB-468(人乳腺癌细胞)细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NOD-SCID 小鼠，5~6 周龄，28 只

2. 试验目的

采用人乳腺癌 MDA-MB-468(人乳腺癌细胞)细胞 NOD-SCID 小鼠移植瘤模型，考察 SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、SWY2112-JSSW-001、SWY2113-JSSW-001 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 18 动物分组及剂量表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频 次
溶媒组(Vehicle)	8	0	i.v./1 次
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	5	2	i.v./1 次
SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)	5	2	i.v./1 次
SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)	5	2	i.v./1 次
SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)	5	2	i.v./1 次

注：i.v.：静脉注射，i.v./1 次：给药一次；

4. 试验方法

本试验选用人乳腺癌 MDA-MB-468(人乳腺癌细胞)细胞构建小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 150 mm³ 时，按表 18 将动物按肿瘤体积分为 5 组(d0)，对照组 8 只动物，实验组 5 只动物，静脉给药，给药一次，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后 28 天结束试验，考察 4 个 ADC 药物体内抗肿瘤作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，与溶媒组相比，SWY2110-JSSW-001(DAR=7.12)、SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)、SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51) 和 SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)给药肿瘤抑制率分别达 65.8%、65.1%、58.3%、47.1%(P<0.001)，均显示良

好的肿瘤抑制活性。预示 4 种 ADC 对人乳腺癌 MDA-MB-468 肿瘤细胞有显著抑制作用。详见图 20 和表 19。

表 19 SWY2110~SWY2113-ADC 给药 28 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day28
溶媒组(Vehicle)	8	-	-	525.0±28.4	---
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	5	2	i.v./1 次	275.9±50.6***	65.8
SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)	5	2	i.v./1 次	278.8±22.9***	65.1
SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)	5	2	i.v./1 次	304.3±40.6***	58.3
SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)	5	2	i.v./1 次	346.9±46.2***	47.1

***: 与溶媒组相比 P<0.001

试验十二 SWY2110-ADC、SWY2111-ADC、SWY2112-ADC、SWY2113-ADC 对人结直肠癌 DiFi(人结直肠癌细胞)细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NU/NU 小鼠，5~6 周龄，35 只

2. 试验目的

采用人结直肠癌 DiFi(人结直肠癌细胞)NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察 SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、SWY2112-JSSW-001、SWY2113-JSSW-001 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 20 动物分组及剂量表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频 次
溶媒组(Vehicle)	7	-	-
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	7	1	i.v./qw*2 次
SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)	7	1	i.v./qw*2 次
SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)	7	1	i.v./qw*2 次
SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)	7	1	i.v./qw*2 次

注：i.v.：静脉注射，i.v./qw*2 次：每周给药，给药两次；

4. 试验方法

本试验选用人结直肠癌 DiFi(人结直肠癌细胞)细胞构建小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 100 mm³ 时，按表 20 将动物按肿瘤体积分为 5 组(d0)，各组 7 只动物，

静脉给药，给药两次，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后 21 天结束试验，考察 4 个 ADC 药物体内抗肿瘤作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，与溶媒组相比，SWY2110-JSSW-001(DAR=7.12)、SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)、SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)、SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)给药肿瘤抑制率分别达 86.5%、82.3%、83.5%、76.8%(P<0.001)，均显示良好的肿瘤抑制活性。预示 4 种 ADC 对人结直肠癌 DiFi 肿瘤细胞有显著抑制作用。详见图 21 和表 21。

表 21 SWY2110~SWY2113-ADC 给药 21 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day28
溶媒组(Vehicle)	7	0	-	562.2±272.8	---
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	7	1	i.v./qw*2 次	161.9±41.2***	86.5
SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)	7	1	i.v./qw*2 次	180.3±98.8***	82.3
SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)	7	1	i.v./qw*2 次	175.3±36.7***	83.5
SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)	7	1	i.v./qw*2 次	205.3±155.6***	76.8

***：与溶媒组相比 P<0.001

试验十三 SWY2110-ADC、SWY2111-ADC、SWY2112-ADC、SWY2113-ADC 对人肺腺癌 PC9-GR(人肺腺癌吉非替尼获得性耐药株)细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NU/NU 小鼠，5~6 周龄，30 只

2. 试验目的

采用人肺腺癌细胞 PC9-GR NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察 SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、SWY2112-JSSW-001、SWY2113-JSSW-001 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 22 动物分组及剂量表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频次
溶媒组(Vehicle)	6	-	-
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	6	3	i.v./1 次
SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)	6	3	i.v./1 次

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频次
SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)	6	3	i.v./1 次
SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)	6	3	i.v./1 次

注：i.v.：静脉注射，i.v./1 次：给药一次；

4. 试验方法

本试验选用人肺腺癌细胞 PC9-GR 细胞构建小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 110 mm³ 时，按表 22 将动物按肿瘤体积分为 5 组(d0)，各组 6 只动物，静脉给药，给药一次，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后 28 天结束试验，考察 4 个 ADC 药物体内抗肿瘤作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，与溶媒组相比，SWY2110-JSSW-001(DAR=7.12)、SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)、SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)、SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)给药肿瘤抑制率分别为 99.0%、100.1%、92.4%、89.3%(P<0.001)，均显示良好的肿瘤抑制效果。预示 4 种 ADC 对人肺腺癌细胞 PC9-GR 肿瘤细胞有显著抑制作用。详见图 22 和表 23。

表 23 SWY2110~SWY2113-ADC 给药 28 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day28
溶媒组(Vehicle)	6	-	-	1159.3	---
SWY2110-JSSW-001 ADC (DAR=7.12)	6	3	i.v./1 次	124.3***	99.0
SWY2111-JSSW-001 ADC (DAR=7.48)	6	3	i.v./1 次	112.9***	100.1
SWY2112-JSSW-001 ADC (DAR=7.51)	6	3	i.v./1 次	193.0***	92.4
SWY2113-JSSW-001 ADC (DAR=7.50)	6	3	i.v./1 次	225.4***	89.3

***：与溶媒组相比 P<0.001

试验十四 抗体药物偶联物对 NOD-SCID 小鼠人肺腺癌 PC9-DTC(Del19/T790M/C797S, Osimertinib 耐药细胞)细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NOD-SCID 小鼠，5~6 周龄，18 只

2. 试验目的

采用人肺腺癌 PC9-DTC(Del19/T790M/C797S, Osimertinib 耐药细胞)细胞 NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察 2 个 patritumab-ADC 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 24 动物分组及剂量表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频次
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./qw*3w
patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)	6	10	i.v./qw*3w
patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)	6	10	i.v./qw*3w

注：i.v.：静脉注射，qw*3w：每周给药一次，给药三周。

4. 试验方法

本试验选用人肺腺癌 PC9-DTC(Del19/T790M/C797S，Osimertinib 耐药细胞)细胞构建裸小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 115 mm³ 时，按表 24 将动物按肿瘤体积分成 3 组(d0)，溶媒组、patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)组与 patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)组各 6 只动物，静脉给药，每周给药一次，连续给药 3 周，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后 26 天结束试验，比较 patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)及 patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)对人肺腺癌 PC9-DTC(Del19/T790M/C797S，Osimertinib 耐药细胞)裸小鼠移植瘤的抑制作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)组($P<0.001$)相对于 patritumab-DXD ADC (DAR=7.3) ($P<0.001$)组具有更优的抑制移植瘤的体积的效果。详见图 23 和表 25

表 25patritumab-ADC 给药 26 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day26
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./qw*3w	465.1±78.9	---
patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)	6	10	i.v./qw*3w	132.9±18.8***	71.3
patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)	6	10	i.v./qw*3w	82.9±14.4***	82.3

***：与溶媒组相比 $P<0.001$

试验十五 抗体-药物偶联物对 NU/NU 小鼠人结肠癌 SW620 细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NU/NU 小鼠，5~6 周龄，18 只

2. 试验目的

采用人结肠癌 SW620 细胞 NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察 2 个 patritumab-ADC 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 26 动物分组及剂量表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频 次
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./单次给药
patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)	6	7	i.v./单次给药
patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)	6	7	i.v./单次给药

4. 试验方法

本试验选用人结肠癌 SW620 细胞构建裸小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 110 mm³ 时，按表 26 将动物按肿瘤体积分为 3 组(d0)，溶媒组、patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)组与 patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)组各 6 只动物，静脉给药，单次给药，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后 26 天结束试验，比较 patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)及 patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)对人结肠癌 SW620 裸小鼠移植瘤的抑制作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)组(P<0.001)相对于 patritumab-DXD ADC (DAR=7.3) (P<0.001)组具有更优的抑制移植瘤的体积的效果。详见图 24 和表 27。

表 27 patritumab-ADC 给药 21 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(% Day21)
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./单次给药	1422.8±416.0	---
patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)	6	7	i.v./单次给药	461.3±278.1***	73.2
patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)	6	7	i.v./单次给药	187.5±91.6***	94.0

***：与溶剂对照组相比 P<0.001

试验十六 抗体-药物偶联物对 NU/NU 小鼠人结肠癌 DiFi 细胞移植瘤药效试验

1. 试验动物

NU/NU 小鼠，5~6 周龄，18 只

2. 试验目的

采用人结直肠癌 DiFi 细胞 NU/NU 小鼠移植瘤模型，考察 2 个 patritumab-ADC 药物体内抗肿瘤作用。

3. 药物剂量和分组

表 28 动物分组及剂量表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频 次
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./单次给药

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径/频 次
patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)	6	3	i.v./单次给药
patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)	6	3	i.v./单次给药

注：i.v.：静脉注射。

4. 试验方法

本试验选用人结直肠癌 DiFi 细胞构建裸小鼠肿瘤移植瘤模型，待肿瘤体积至约 110 mm³ 时，按表 28 将动物按肿瘤体积分为 3 组(d0)，溶媒组 6 只动物，patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)组与 patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)组各 5 只动物，静脉给药，单次给药，给药体积是 10 mL/kg，溶媒对照组(Vehicle)给予 0.9%氯化钠注射液，给药后 28 天结束试验，比较 patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)及 patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)对人结直肠癌 DiFi 裸小鼠移植瘤的抑制作用。

5. 观测指标

5.1 评价指标

参见试验二 5.1 评价指标部分

6 结果

6.1 肿瘤体积

试验终点，patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)组($P<0.01$)相对于 patritumab-DXD ADC (DAR=7.3) ($P<0.05$)组具有更优的抑制移植瘤的体积的效果。详见图 25 和表 29。

表 29 patritumab-ADC 给药 28 天各组肿瘤参数表

组别	动物数量 (只)	剂量 (mg/kg)	给药途径 /频次	肿瘤体积 (mm ³)	TGI(%) Day28
溶媒组(Vehicle)	6	0	i.v./qw*3w	989.8±317.6	---
patritumab-DXD ADC (DAR=7.3)	6	10	i.v./qw*3w	512.5±470.8*	54.0
patritumab-JSSW-001 ADC (DAR=7.36)	6	10	i.v./qw*3w	257.9±189.1**	82.9

*：与溶媒组相比 $P<0.05$ ，**：与溶媒组相比 $P<0.01$

试验十七：安评研究

本试验选用适龄食蟹猴 6 只，雌雄各半，通过静脉注射 SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、SWY2113-JSSW-001。剂量设计如下表所示，每三周静脉注射 1 次，连续注射 3 次，给药后连续观察 7 天，每天 2 次一般观察，每天 1 次详细观察。在给药前、给药后观察体重变化，并进行血液学检测。实验结果显示，pH 依赖性抗体制备的 ADC(SWY2111-JSSW-001 与 SWY2113-JSSW-001)相比 SWY2110-JSSW-001 在皮肤、胃肠道毒性方面下降，没有出现明显的靶点相关毒性(皮肤破溃、结痂，稀便等)，可见 pH 改造的 ADC 对正常组织的毒性降低，但三种 ADC 小分子造成的血液毒性并没有明显差异。

表 30 预毒理实验设计方案

给药频次	Q3W×3			
	组别	D1	D22	D43
给药剂量	组 1: SWY2110-JSSW-001	6mg/kg	30mg/kg	30mg/kg
	组 2: SWY2111-JSSW-001	6mg/kg	30mg/kg	30mg/kg
	组 3: SWY2113-JSSW-001	6mg/kg	30mg/kg	30mg/kg
动物数	1 只/性别/组			

表 31 预毒理试验结果

一般观察	组 1 可见稀便、四肢皮屑、破溃、结痂； 组 2 可见便软，轻微皮屑、未见破溃； 组 3 未见异常
体重	组 1 每次给药后 7 天内体重可见降低，并在下一次给药前部分恢复； 组 2 每次给药后 7 天内体重稍微降低，并在下次给药前完全恢复； 组 3 每次给药后 7 天内体重降低不明显。
血液学	组 1HGB、WBC、LYMP↓； 组 2HGB、WBC、LYMP↓； 组 3HGB、WBC、LYMP↓；

HGB：血红蛋白；WBC：白细胞计数；LYMP：淋巴细胞绝对数。

制剂实施例

制剂实施例 1

pH 值是影响生物制品稳定性的一个重要因素，其对蛋白质表面的电荷分布具有调节作用，从而影响蛋白质分子间及分子内作用力，并影响蛋白质的构象及胶体稳定性，同时影响蛋白质的化学稳定性如脱酰胺等降解反应。适量的缓冲盐具备维持溶液 pH 值稳定的作用，缓冲盐的种类对生物制品的理化性质和稳定性具有重要作用。选取组氨酸-盐酸组氨酸、柠檬酸-柠檬酸钠作为筛选缓冲盐，缓冲盐离子浓度为 25mM，调节组氨酸-盐酸组氨酸缓冲盐 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5，柠檬酸-柠檬酸钠缓冲盐 pH 值为 5.5、6.0、6.5、7.0，每组缓冲溶液中加入 5%蔗糖，制备 8 组不同 pH 值及缓冲盐的溶液，将抗体药物偶联物(SWY2110-JSSW-001)样品超滤置换至上述 8 组溶液中，抗体药物偶联物的终浓度约 5mg/ml。观察超滤置换后样品外观，组氨酸-盐酸组氨酸(pH6.0、6.5)组与柠檬酸-柠檬酸钠(pH5.5、6.0)组均出现明显浑浊，抗体药物偶联物发生沉淀，舍去上述 4 组样品。将剩余的 4 组样品置于高温(40±2℃)条件下，于 7d、14d 取样；置于光照(5±3℃，白光强度：5000Lux，紫外强度：90μw/cm²)条件下，于 10d 取样，采用紫外分光光度法检测抗体药物偶联物蛋白浓度，体积排阻色谱法(SEC-HPLC)检测抗体药物偶联物的分子大小变异物，考察经高温与光照处理后抗体药物偶联物在 4 组缓冲液中的稳定性。高温 7d，pH5.5 试验组出现蛋白沉淀，蛋白浓度显著下降，

SEC 单体显著下降。柠檬酸试验组光照 10 天出现白色沉淀，蛋白浓度显著下降，SEC 单体显著下降。综上所述，选择 pH5.0 25mM 组氨酸-盐酸组氨酸作为目标缓冲液。

检测方法：

蛋白浓度检测：根据抗体药物偶联物的消光系数 1.251，使用不含蛋白的安慰剂校零，采用 Nanodrop2000 微量分光光度计测定蛋白浓度。

SEC-HPLC：依据《中国药典》2020 版四部通则 0512 高效液相色谱法，以适合分离分子量为 10~500kD 蛋白质的色谱用凝胶为填充剂的色谱柱进行分析检测，按照面积归一法计算蛋白单体峰及高分子量物质(HMWS)峰与低分子量物质(HMWS)峰比例。

检测结果如下：

表 31 外观结果

缓冲盐 (含 5% 蔗糖)	pH 值	外观				
		0d	5℃避光 10d	5℃光照 10d	40℃高温 7d	40℃高温 14d
组氨酸- 盐酸组氨酸	5.0	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
	5.5	澄清	澄清	澄清	少量蛋白沉淀	较多蛋白沉淀
柠檬酸- 柠檬酸钠	6.5	澄清	澄清	少量蛋白沉淀	澄清	澄清
	7.0	澄清	澄清	少量蛋白沉淀	澄清	澄清

表 32 蛋白浓度检测结果

缓冲盐(含 5%蔗糖)	pH 值	蛋白浓度(mg/ml)				
		0d	5℃避光 10d	5℃光照 10d	40℃高温 7d	40℃高温 14d
组氨酸-盐酸组氨酸	5.0	5.56	5.30	5.35	5.32	5.47
	5.5	4.72	4.57	4.61	3.24	2.49
柠檬酸-柠檬酸钠	6.5	5.58	5.39	3.49	5.48	5.44
	7.0	5.44	5.45	3.85	5.49	5.52

表 33 SEC-HPLC 检测结果

缓冲液 (含 5%蔗糖)	pH 值	SEC-HPLC 纯度(%)								
		0d			40℃高温 7d			5℃光照 10d		
		聚体	主峰	片段	聚体	主峰	片段	聚体	主峰	片段
组氨酸- 盐酸组氨酸	5.0	1.57	97.30	1.13	3.77	94.41	1.82	5.17	93.61	1.23
	5.5	1.33	97.55	1.12	12.72	85.10	2.18	8.63	89.87	1.51
柠檬酸- 柠檬酸钠	6.5	3.53	95.30	1.17	8.39	89.98	1.65	23.06	75.08	1.87
	7.0	4.5	94.41	1.10	9.13	89.06	1.81	47.66	50.89	1.47

用抗体药物偶联物 SWY2111-JSSW-001 和 SWY2113-JSSW-001 替换 SWY2110-JSSW-001 后，采用上述相同的方法，考察抗体药物偶联物在缓冲液中的稳定性，试验结果与 SWY2110-JSSW-001 基本相当，选择 pH5.0 25mM 组氨酸-盐酸组氨酸作为目标缓冲液。

制剂实施例 2

糖类作为单抗及 ADC 类产品中应用广泛的稳定剂，具有稳定单克隆抗体类药物的作用，亦可作为冻干产品的赋形剂，同时具备调节产品渗透压的作用。选择 pH5.0，25mM 组氨酸-盐酸组氨酸作为缓冲盐，分别添加 5%、9%的蔗糖或海藻糖，制备 4 组不同糖及糖浓度的溶液，将抗体药物偶联物(SWY2110-JSSW-001)样品超滤置换至上述 4 组溶液中，抗体药物偶联物终浓度约 10mg/ml。采用微量热差示扫描量热法(DSC)检测初始样品的热稳定性，将样品置于高温(40±2℃)条件下，于 7d、14d 取样；置于光照(5±3℃，白光照度：5000Lux，紫外强度：90μw/cm²)条件下，于 10d 取样，体积排阻色谱法(SEC-HPLC)检测抗体药物偶联物的分子大小变异体，离子交换色谱法(CEX-HPLC)检测抗体药物偶联物的电荷变异体，考察经高温与光照处理后抗体药物偶联物在 8 组溶液中的稳定性。另在同一冻干配方下，比较冻干 9%蔗糖和海藻糖的两种冻干粉的外观形态。

DSC 试验结果显示：添加 9%糖的试验组 T_{onset} 和 T_{m2} 显著高于 5%糖试验组。蔗糖和海藻糖之间无显著差异。SEC 试验结果显示：糖浓度由 5%升高至 9%，SEC-HPLC 单体显著升高；CEX 结果显示：高温试验中，添加糖类及其浓度对主峰纯度无显著影响，而光照试验，样品酸碱变异体发生显著变化，其色谱图已无法区分酸峰、主峰及碱峰，未统计 CEX 数据。对比不同稳定剂的冻干粉形态，蔗糖试验组冻干粉下部收缩明显较海藻糖试验组严重。综上所述，选择添加 9%海藻糖为稳定剂。

检测方法

DSC：将待测样品与其相同的缓冲液稀释至蛋白浓度为 1mg/ml，分别取供试品及对应的缓冲液 350μl 加至相应位置的 96 孔板中，将 96 孔板放入样品槽，样品槽温度设置 15℃。仪器参数设置：起始温度 20℃、终止温度 100℃，升温速率 90℃/min。

SEC-HPLC：检测方法见制剂实施例 1。

CEX-HPLC：依据《中国药典》2020 版四部通则 0512 高效液相色谱法，以阳离子交换柱为色谱柱进行分析检测，按照面积归一法计算供试品酸性峰、主峰及碱性峰比例。

检测结果：

表 34 DSC 检测结果

名称	T _{onset} (℃)	T _{m1} (℃)	T _{m2} (℃)	T _{m3} (℃)
pH5.0 5%蔗糖	48.87	58.45	70.24	79.17
pH5.0 9%蔗糖	49.61	59.55	70.82	79.70
pH5.0 5%海藻糖	48.77	58.19	70.24	79.18
pH5.0 9%海藻糖	49.22	59.09	70.82	79.76

表 35 SEC-HPLC 检测结果

名称	SEC-HPLC 纯度(%)											
	0d			40℃高温 7d			40℃高温 14d			5℃光照 10d		
	聚体	主峰	片段	聚体	主峰	片段	聚体	主峰	片段	聚体	主峰	片段
pH5.0 5%蔗糖	2.20	95.83	1.97	6.21	91.11	2.67	11.45	84.75	3.81	10.75	86.93	2.32
pH5.0 9%蔗糖	2.16	95.88	1.96	5.01	92.42	2.58	7.99	88.35	3.66	9.69	87.34	2.97
pH5.0 5%海藻糖	2.28	95.69	2.02	7.92	89.51	2.57	11.29	84.93	3.77	10.89	86.18	2.93
pH5.0 9%海藻糖	2.06	95.88	2.05	5.55	91.82	2.63	8.18	88.07	3.76	10.65	86.12	3.23

表 36 CEX-HPLC 检测结果

名称	CEX-HPLC 纯度(%)								
	0d			40℃高温 7d			40℃高温 14d		
	酸峰	主峰	碱峰	酸峰	主峰	碱峰	酸峰	主峰	碱峰
pH5.0 5%蔗糖	25.55	44.75	29.70	28.40	43.78	27.82	32.58	37.60	29.82
pH5.0 9%蔗糖	26.44	43.99	29.57	28.33	43.89	27.78	32.84	37.38	29.78
pH5.0 5%海藻糖	26.41	44.35	29.24	27.74	43.72	28.54	32.63	37.71	29.66
pH5.0 9%海藻糖	26.43	44.80	28.77	27.74	44.65	27.61	33.17	37.53	29.30

表 37 冻干粉基本评价指标检测结果

稳定剂	冻干粉外观	水分含量(%)	复溶时间
9%海藻糖	白色疏松体，底部轻微收缩	1.45	≤1min
9%蔗糖	白色疏松体，底部收缩略严重	1.85	≤1min

用抗体药物偶联物 SWY2111-JSSW-001 和 SWY2113-JSSW-001 替换 SWY2110-JSSW-001 后，采用上述相同的方法，考察稳定剂对抗体药物偶联物的影响，试验结果与 SWY2110-JSSW-001 基本相当，选择海藻糖作为表面活性剂。

制剂实施例 3

选择 pH5.0，25mM 组氨酸-盐酸组氨酸作为缓冲盐，添加 9%的海藻糖，将抗体药物偶联物(SWY2110-JSSW-001)样品超滤置换至上述溶液中，添加聚山梨酯 80，制备抗体药物偶联物浓度为 10mg/ml 的样品，将样品分装至注射剂瓶中，在冻融条件(-20℃冻结与室温融化，共 6 次)下进行稳定性研究，采用微流成像仪(Flowcam)检测不同条件下样品中的亚可见颗粒的变化。结果显示添加表面活性剂聚山梨酯 80 可有效控制微粒数的增长，添加 0.01%的聚山梨酯 80 即可对颗粒的形成有明显的抑制作用，优选添加 0.03%的聚山梨酯 80 作为表面活性剂。

表 38 冻融对不同聚山梨酯 80 添加量样品不溶性微粒的影响

微粒		0		0.01%		0.03%		0.05%	
		T0	冻融 6 次	T0	冻融 6 次	T0	冻融 6 次	T0	冻融 6 次
微粒数 (P/mL)	NSP 2-10μm	2481	15799	62	72	49	119	7	25
	NSP 10+μm	1008	15410	7	15	0	10	0	5

用抗体药物偶联物 SWY2111-JSSW-001 和 SWY2113-JSSW-001 替换 SWY2110-JSSW-001 后，采用上述相同的方法，考察表面活性剂对抗体药物偶联物稳定性的影响，试验结果与 SWY2110-JSSW-001 基本相当，选择聚山梨酯 80 作为表面活性剂。

制剂实施例 4

以 10mg/ml 抗体药物偶联物(SWY2110-JSSW-001)、25mmol/L 组氨酸-盐酸组氨酸、0.03%聚山梨酯 80、9%海藻糖，pH5.0 作为基础处方，对该处方组成样品进行玻璃态转化温度与塌陷温度检测，低温 DSC 检测显示该样品玻璃态转化温度为-29.28℃，冻干显微镜检测显示该样品塌陷温度为-25.7℃。

预冻：依据玻璃态转化温度设置预冻温度为-45℃，首先以较快速度将板层温度降至-5℃，该温度下维持 30min 后，分别对产品进行快速降温(2℃/min)或慢速降温(0.5℃/min)至预冻温度-45℃，维持预冻温度不少于 180min，相同一次干燥及解析干燥

条件下完成冻干工艺，两种预冻方式冻干粉水分含量未见显著差异，快冻过程形成小冰晶，但其水分含量较慢冻未见增加，因此优选快冻方式进行预冻。

表 39 不同位置快冻及慢冻对水分含量的影响

样品位置编号	水分含量(%)	
	快冻(2°C/min)	慢冻(0.5°C/min)
A	1.10	1.19
B	1.17	1.16
C	1.22	1.25
D	1.16	1.20
E	1.10	1.19
平均值	1.44	1.39

备注：C 为板层中心位置，A 为靠近门处板层一角，E 为 A 对角处靠近中隔阀位置，B、D 分别对应 AC、CE 中心

一次干燥：将板层温度设定到产品允许的崩解温度以上，保证未升华部分的产品温度不超过其崩解温度。优选预冻快冻工艺，一次干燥温度-20°C下，对比冻干箱真空值 0.20mbar 和 0.25mbar 的冻干效果，两批冻干粉均为白色蛋糕状疏松体，未见塌陷和显著收缩，且水分和复溶时间基本一致。在冻干粉水分值基本一致的情况下，-20°C 0.20mbar 一次干燥耗时较-20°C 0.25mbar 短 200min，优选-20°C 0.20mbar 进行一次干燥。

表 40 不同一次干燥压力下冻干粉形态、水分与复溶时间

批号	DP221	DP228
一次干燥条件	-20°C 0.25mbar 4000min	-20°C 0.20mbar 3800min
样品 A 水分含量	0.84%	1.10%
样品 B 水分含量	1.12%	1.17%
样品 C 水分含量	1.20%	1.22%
水分含量平均值	1.09%	1.16%
冻干粉形态	白色蛋糕状疏松体	白色蛋糕状疏松体
复溶时间	≤1min	≤1min

备注：C 为板层中心位置，A 为靠近门处板层一角， B 对应 AC 中心

解析干燥：一次干燥结束后，板层温度设定为产品允许的最高温度以下。选 30°C 作为解析干燥温度，前箱压力值设定为 0.20mbar，与一次干燥一致。

对冻干样品进行冻干前后关键质量进行比较，结果显示冻干后产品质量未发生显著变更，冻干工艺未对产品质量产生明显影响。

表 41 冻干工艺对产品质量的影响

考察项目	原液批号：DS218		原液批号：DS228	
	原液 (DS218)	冻干粉复溶液 (DP221)	原液 (DS228)	冻干粉复溶液 (DP228)
水分含量(%)	-	1.1	-	1.2
复溶时间(min)	-	<3min	-	<3min
pH 值	5.0	5.0	5.0	5.0
蛋白质含量(mg/ml)	10.1	9.8	9.9	10.2
SEC-HPLC	HMWS: 1.2%	1.1%	HMWS: 1.3%	1.3%

考察项目	原液批号：DS218		原液批号：DS228	
	原液 (DS218)	冻干粉复溶液 (DP221)	原液 (DS228)	冻干粉复溶液 (DP228)
	单体：97.4%	97.5%	单体：96.7%	96.6%
	LMWS：1.4%	1.4%	LMWS：2.0%	2.2%
CEX-HPLC	酸峰：24.2%	24.3%	酸峰：22.5%	22.5%
	主峰：47.5%	48.4%	主峰：47.2%	48.5%
	碱峰：28.3%	27.3%	碱峰：30.3%	29.0%
NR-CE-SDS	单体：97.2%	97.6%	单体：97.1%	96.5%
	LMWS：2.8%	2.4%	LMWS：2.9%	3.5%
DAR	DAR值：8.0	8.0	DAR值：8.0	8.0
抗原结合活性	86%	106%	100%	105%
生物活性	94%	96%	100%	114%

用抗体药物偶联物 SWY2111-JSSW-001 和 SWY2113-JSSW-001 替换 SWY2110-JSSW-001 后，采用上述相同的方法，考察冻干工艺对产品质量的影响，试验结果与 SWY2110-JSSW-001 基本相当，冻干工艺未对产品质量产生明显影响。

制剂实施例 5

对冻干前抗体药物偶联物(SWY2110-JSSW-001)原液及冻干后抗体药物偶联物(SWY2110-JSSW-001)成品分别进行 5±3℃稳定性研究。研究结果显示，冻干后产品质量较液体状态下更为稳定，液体状态下产品高分子量片段较冻干状态显著增加，且液体状态下更容易产生游离小分子毒素，其脱落速率较冻干粉更为明显，冻干剂型更有利于本品的长期储藏。

检测方法：

SEC-HPLC：依据《中国药典》2020 版四部通则 0512 高效液相色谱法，以适合分离分子量为 10~500kD 蛋白质的色谱用凝胶为填充剂(如：XBridge®BEH200Å，7.8×300mm，200Å，3.5μm 或其它适宜的色谱柱)的色谱柱，流动相为 100mmol/L 磷酸缓冲液，100mmol/L NaCl，10%异丙醇，pH6.7±0.1，流速为 0.8ml/min，检测波长为 280nm。取供试品溶液适量注入液相色谱仪，按照面积归一法计算蛋白单体峰及高分子量物质(HMWS)峰与低分子量物质(LMWS)峰比例。

CEX-HPLC：依据《中国药典》2020 版四部通则 0512 高效液相色谱法，以离子交换柱(如：BioPro IEX SF，4.6×100mm 或其它适宜色谱柱)为色谱柱，流动相 A 为 20mmol/L MES(吗啉乙磺酸)，pH 6.1，流动相 B 为 20mmol/L MES，500mmol/L NaCl，pH 6.1，流速为 1ml/min，检测波长为 280nm。取供试品溶液适量注入液相色谱仪进行梯度洗脱，按照面积归一法计算供试品酸性峰、主峰及碱性峰比例。

NR-CE-SDS：依据《中国药典》2020 版四部通则 3127 单抗分子大小变异体测定法进行检测，按照面积归一化法计算单体峰比例，低分子量物质(LMWS)峰比例。

icIEF：依据《中国药典》2020 版四部通则 3129 单抗电荷变异体测定法进行检测，依据不同电荷变异体的等电点(PI)特征，按毛细管电泳法(通则 0542)将其分离，测定电荷变异体的等电点并计算相对百分含量。

DAR 分布：依据《中国药典》2020 版四部通则 0512 高效液相色谱法，以疏水色谱柱(如：TSKgel Butyl-NPR，4.6×100mm 或其它适宜色谱柱)为色谱柱，流动相 A 为

1.0M 硫酸铵，25mM 磷酸缓冲液(pH7.0)，流动相 B：25%异丙醇，75% 25mM 磷酸缓冲液(pH7.0)，流速为 0.8ml/min，检测波长为 280nm。取供试品溶液适量注入液相色谱仪进行梯度洗脱，计算 DAR 值。

游离小分子毒素含量：依据《中国药典》2020 版四部通则 0512 高效液相色谱法与 0431 质谱法，以十八烷基键合硅胶为填充剂(如 Waters ACQUITY UPLC® BEH - C18，2.1×50mm，粒度 1.7μm 或其它适宜的色谱柱)的色谱柱，流动相 A 为含 0.1%FA 水溶液，流动相 B 为含 0.1%FA 乙腈溶液，柱温为 40℃，流速为 0.4ml/min。取供试品 50μL(10mg/mL)，加入内标工作液，与乙腈 1:3 进行沉淀处理，置于-20℃冰浴 30min 后离心取上清上样，以不同浓度小分子毒素作为对照品上样，对样品经液相色谱梯度洗脱后进入质谱检测器，设定质谱毛细管及锥孔电压、离子源温度、碰撞能量、雾化流速等参数后分析，按标准曲线计算供试品中游离小分子毒素含量。

游离小分子毒素含量(%)= 游离小分子毒素检测浓度/ADC 浓度×100%

抗原结合活性：依据酶联免疫法(ELISA)测定。

生物活性：依据细胞增值抑制法测定。

检测结果：

表 42 GMP 批次 1 关键质量指标稳定性结果

考察项目	GMP 批次 1			
	原液(5±3℃)		冻干粉(5±3℃)	
	0 月	6 月	0 月	6 月
SEC-HPLC	HMWS: 1.4%	2.1%	HMWS: 1.4%	1.1%
	单体: 97.4%	96.2%	单体: 97.4%	97.4%
	LMWS: 1.3%	1.7%	LMWS: 1.3%	1.5%
NR-CE-SDS	LC+HC: 97.0%	97.3%	HC+LC: 97.3%	97.5%
	其它峰: 3.0%	2.7%	其它峰: 2.7%	2.5%
CEX-HPLC	酸峰: 25.1%	20.6%	酸峰: 23.8%	19.9%
	主峰: 47.1%	46.2%	主峰: 49.1%	50.8%
	碱峰: 27.8%	33.2%	碱峰: 27.1%	29.3%
icIEF	酸峰: 35.4%	32.1%	酸峰: 35.1%	30.8%
	主峰: 40.9%	41.3%	主峰: 41.3%	41.7%
	碱峰: 23.6%	26.6%	碱峰: 23.6%	27.6%
DAR	DAR 值: 8.0	8.0	DAR 值: 8.0	8.0
游离小分子毒素	0.000037%	0.0010%	0.00018%	0.00050%
抗原结合活性	105%	103%	96%	97%
生物活性	102%	101%	93%	103%

表 43 GMP 批次 2 关键质量指标稳定性结果

考察项目	GMP 批次 2			
	原液(5±3℃)		冻干粉(5±3℃)	
	0 月	6 月	0 月	6 月
SEC-HPLC	HMWS: 0.9%	1.8%	HMWS: 0.9%	1.1%
	单体: 96.8%	96.5%	单体: 96.7%	97.3%
	LMWS: 2.3%	1.7%	LMWS: 2.3%	1.6%

考察项目	GMP 批次 2			
	原液(5±3℃)		冻干粉(5±3℃)	
	0 月	6 月	0 月	6 月
NR-CE-SDS	LC+HC: 97.0%	97.5%	HC+LC: 97.3%	97.2%
	其它峰: 3.0%	2.5%	其它峰: 2.7%	2.8%
CEX-HPLC	酸峰: 21.9%	19.6%	酸峰: 22.3%	20.0%
	主峰: 46.4%	46.9%	主峰: 46.6%	50.8%
	碱峰: 31.7%	33.5%	碱峰: 31.2%	29.2%
icIEF	酸峰: 33.0%	31.9%	酸峰: 34.0%	30.0%
	主峰: 42.8%	41.4%	主峰: 42.8%	43.4%
	碱峰: 24.3%	26.7%	碱峰: 23.2%	26.6%
DAR	DAR 值: 8.0	8.0	DAR 值: 8.0	8.0
游离小分子毒素	0.000048%	0.0012%	0.00078%	0.00059%
抗原结合活性	106%	104%	103%	100%
生物活性	94%	104%	98%	101%

用抗体药物偶联物 SWY2111-JSSW-001 和 SWY2113-JSSW-001 替换 SWY2110-JSSW-001 后,采用上述相同的方法,对冻干前抗体药物偶联物原液及冻干后抗体药物偶联物成品分别进行 5±3℃稳定性研究。试验结果及结论与 SWY2110-JSSW-001 基本相当,即冻干后产品质量较液体状态下更为稳定,液体状态下产品高分子量片段较冻干状态显著增加,且液体状态下更容易产生游离小分子毒素,其脱落速率较冻干粉更为明显,冻干剂型更有利于本品的长期储藏。

制剂实施例 6

将抗体药物偶联物(patritumab-JSSW-001)分别置换至 pH5.0、5.5、6.0、6.5 的 25mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液及琥珀酸-氢氧化钠缓冲液中,蛋白浓度稀释至约 20mg/ml。进行高温(40±2℃, 75%±5%RH)与光照(5±3℃, 白光: 5000±500Lux, UV: 90μW/cm²)筛选试验。表 44 为高温、光照试验中抗体药物偶联物外观变化。光照 3d 12 个试验组外观均发生显著变化,其中柠檬酸钠试验组和 pH5.5、6.0、6.5 的琥珀酸钠试验组出现分相或浑浊现象。组氨酸试验组以及 pH5.0 的琥珀酸钠试验组呈微黄色。高温 5d,除 pH6.0、6.5 柠檬酸钠试验组出现浑浊外,其他试验组外观澄清。选择 pH5.0、5.5、6.0 组氨酸试验组及 pH5.0 琥珀酸钠试验组测定光照、高温试验的 SEC 数据。表 45 为 pH 与缓冲盐种类筛选 SEC 变化。高温 5d,四个试验组的 SEC 主峰未见显著区别,而光照 3d, pH5.0 组氨酸试验组的 SEC 主峰显著高于其他试验组。相比高温,抗体药物偶联物对光敏感性较强。pH5.0 组氨酸-盐酸组氨酸为最优缓冲体系。

检测方法:

SEC-HPLC: 依据《中国药典》2020 版四部通则 0512 高效液相色谱法,以适合分离分子量为 10~500kD 蛋白质的色谱用凝胶为填充剂的色谱柱进行分析检测,按照面积归一法计算蛋白单体峰及高分子量物质(HMWS)峰与低分子量物质(HMWS)峰比例。

检测结果:

表 44 外观结果

缓冲液	0d	光照 3d	高温 5d
pH5.0H	澄清	微黄色	澄清
pH5.5H	澄清	微黄色	澄清
pH6.0H	澄清	微黄色	澄清
pH6.5H	澄清	浑浊	澄清
pH5.0C	澄清	上层无色，下层黄色	澄清
pH5.5C	澄清	上层无色，下层黄色	澄清
pH6.0C	澄清	上层浑浊，下层黄色	轻微浑浊
pH6.5C	澄清	上层浑浊，下层黄色	浑浊
pH5.0S	澄清	微黄色	澄清
pH5.5S	澄清	浑浊	澄清
pH6.0S	澄清	浑浊	澄清
pH6.5S	澄清	浑浊	澄清

注：H:组氨酸，C:柠檬酸钠，S:琥珀酸钠

表 45 SEC-HPLC 检测结果

缓冲液	SEC-HPLC 纯度(%)								
	0d			5℃光照 3d			40℃高温 5d		
	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)
pH5.0H	1.11	98.17	0.72	28.96	70.15	0.89	3.29	95.81	0.9
pH5.5H	1.41	97.89	0.7	42.91	56.22	0.87	3.26	96.02	0.72
pH6.0H	1.37	97.99	0.64	55.91	42.92	1.17	7.51	91.44	1.05
pH5.0S	1.59	97.69	0.72	32.95	63.63	3.42	3.94	95.43	0.63

注：H:组氨酸，S:琥珀酸钠

制剂实施例 7

将抗体药物偶联物(patritumab-JSSW-001)分别置换至含有 6%蔗糖的 pH5.0 不同浓度(15mM、25mM、35mM)的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲液中，蛋白浓度稀释至约 20mg/ml，进行高温与光照筛选试验，测定 SEC 和 CEX，筛选出最优组氨酸浓度。表 46 为组氨酸浓度筛选的 DSC 数据。表 47 为组氨酸浓度筛选的 SEC 数据。光照试验，SEC 主峰随着组氨酸浓度的升高而显著降低；高温试验，SEC 主峰随着组氨酸浓度的升高略微降低；由于抗体药物偶联物的光敏性较强，光照试验 CEX 色谱图已经无法区分酸性峰、碱性峰和主峰，因此，只统计了高温试验的 CEX 数据。表 48 为组氨酸浓度筛选高温试验的 CEX 主峰数据，结果表明组氨酸浓度对 CEX 主峰的影响较小。综合 SEC 和 CEX 数据，15mM 为组氨酸的最优浓度。

检测方法

DSC：将待测样品与其相同的缓冲液稀释至蛋白浓度为 1mg/ml，分别取供试品及对应的缓冲液 350μl 加至相应位置的 96 孔板中，将 96 孔板放入样品槽，样品槽温度设置 15℃。仪器参数设置：起始温度 20℃、终止温度 100℃，升温速率 90℃/min。

SEC-HPLC：检测方法见制剂实施例 6。

CEX-HPLC：依据《中国药典》2020 版四部通则 0512 高效液相色谱法，以阳离子交换柱为色谱柱进行分析检测，按照面积归一法计算供试品酸性峰、主峰及碱性峰比例。

检测结果：

表 46 DSC 检测结果

组氨酸浓度	T _{onset} (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
15mM	51.3	58.3	78.5
25mM	50.2	58.7	77.2
35mM	49.7	60.7	77.2

表 47 SEC-HPLC 检测结果

组氨酸浓度	0d SEC			光照 5d SEC			光照 10d SEC		
	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)
15mM	0.96	98.48	0.56	12.50	85.21	2.29	13.14	84.08	2.78
25mM	1.03	98.39	0.58	14.89	83.14	1.97	15.61	81.89	2.50
35mM	1.09	98.33	0.58	18.63	79.33	2.04	19.43	78.00	2.57
组氨酸浓度	0d SEC			高温 7d SEC			高温 14d SEC		
	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)
15mM	0.96	98.48	0.56	1.37	97.61	1.02	1.55	97.24	1.21
25mM	1.03	98.39	0.58	1.81	97.10	1.09	2.58	96.05	1.37
35mM	1.09	98.33	0.58	2.08	96.82	1.10	2.97	95.67	1.36

表 48 CEX-HPLC 检测结果

组氨酸浓度	0d CEX			高温 7d CEX			高温 14d CEX		
	酸峰 (%)	主峰 (%)	碱峰 (%)	酸峰 (%)	主峰 (%)	碱峰 (%)	酸峰 (%)	主峰 (%)	碱峰 (%)
15mM	38.35	58.3	3.35	44.26	52.13	3.61	51.64	44.42	3.94
25mM	37.79	58.97	3.24	44.15	51.94	3.91	51.62	43.59	4.79
35mM	38.05	57.07	4.88	43.19	53.4	3.41	49.25	46.03	4.72

制剂实施例 8

配制 pH5.0 15mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲液，分别加入 4%、6%、8%和 10% 的蔗糖或海藻糖。将抗体药物偶联物(patritumab-JSSW-001)超滤置换至上述 8 种缓冲液中，蛋白浓度稀释至约 20mg/ml。经 0.22μm 微孔滤膜过滤后，采用 DSC 检测抗体药物偶联物的热稳定性，并进行高温与光照稳定性试验。

表 49 为抗体药物偶联物在不同浓度的蔗糖和海藻糖缓冲体系中的热稳定性数据。稳定剂的种类和添加量对热变性起始温度 T_{onset}(°C)未见显著影响，而 T_{m1} 数值最高试验组为 8%蔗糖。表 50 为抗体药物偶联物在不同种类和浓度稳定剂缓冲体系中 SEC 单体受高温和光照的影响。高温 14d，4%试验组 SEC 单体显著低于其他试验组。糖浓度相同的情况下，高温试验蔗糖组和海藻糖组 SEC 无显著差异。表 51 为抗体药物偶联物在不同种类和浓度稳定剂缓冲体系中 CEX 主峰受高温的影响，高温试验后，8 个试验组的 CEX 主峰无显著差异。综上所述，可添加 8%的蔗糖或海藻糖作为稳定剂。考虑到海藻糖的成本高于蔗糖，本品选择添加 8%的蔗糖。

表 49 DSC 检测结果

稳定剂	T _{onset} (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
4%蔗糖	51.3	59.0	77.8
6%蔗糖	51.7	59.4	78.0
8%蔗糖	51.5	61.4	78.2
10%蔗糖	52.5	59.0	78.7

稳定剂	T _{onset} (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
4%海藻糖	50.8	59.0	77.8
6%海藻糖	51.1	59.2	78.0
8%海藻糖	52.5	58.4	78.6
10%海藻糖	51.7	60.0	78.5

表 50 SEC 检测结果

稳定剂	0d SEC			高温 7d SEC			高温 14d SEC		
	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)
4%蔗糖	1.00	98.22	0.78	1.31	97.50	1.19	2.26	95.87	1.87
6%蔗糖	1.02	98.26	0.72	1.18	97.63	1.19	2.04	96.18	1.78
8%蔗糖	0.99	98.26	0.75	1.13	97.60	1.27	1.97	96.26	1.77
10%蔗糖	1.01	98.27	0.72	1.18	97.60	1.22	1.84	96.41	1.75
4%海藻糖	1.08	98.11	0.81	1.32	97.51	1.17	2.38	95.82	1.80
6%海藻糖	1.05	98.18	0.77	1.21	97.71	1.08	2.07	96.24	1.69
8%海藻糖	1.06	98.12	0.82	1.29	97.51	1.20	2.04	96.29	1.67
10%海藻糖	1.06	98.08	0.86	1.24	97.58	1.18	1.98	96.23	1.79
稳定剂	0d SEC			光照 5d SEC			光照 10d SEC		
	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)	聚体 (%)	主峰 (%)	片段 (%)
4%蔗糖	1.00	98.22	0.78	13.05	84.07	2.89	17.27	78.62	4.12
6%蔗糖	1.02	98.26	0.72	12.02	85.23	2.76	15.49	80.53	3.99
8%蔗糖	0.99	98.26	0.75	11.16	86.10	2.75	14.36	81.75	3.89
10%蔗糖	1.01	98.27	0.72	11.18	86.11	2.71	14.32	81.76	3.93
4%海藻糖	1.08	98.11	0.81	13.93	83.40	2.67	17.86	78.24	3.90
6%海藻糖	1.05	98.18	0.77	11.79	85.52	2.70	14.96	81.18	3.87
8%海藻糖	1.06	98.12	0.82	12.46	84.81	2.74	15.97	80.13	3.91
10%海藻糖	1.06	98.08	0.86	11.61	85.78	2.61	14.91	81.28	3.81

表 51 CEX 检测结果

稳定剂	0d			高温 7d CEX			高温 14d CEX		
	酸峰 (%)	主峰 (%)	碱峰 (%)	酸峰 (%)	主峰 (%)	碱峰 (%)	酸峰 (%)	主峰 (%)	碱峰 (%)
4%蔗糖	35.03	61.54	3.43	47.22	51.18	1.6	52.09	45.85	2.06
6%蔗糖	37.48	59.32	3.2	46.92	51.74	1.34	53.74	44.28	1.98
8%蔗糖	36.05	59.81	4.14	47.09	51.37	1.54	53.09	45.06	1.85
10%蔗糖	37.62	59.46	2.92	47.24	51.11	1.65	53.16	44.91	1.93
4%海藻糖	36.71	59.66	3.63	45.85	52.37	1.78	53.36	44.44	2.20
6%海藻糖	37.82	58.85	3.33	46.34	51.89	1.77	52.68	45.52	1.80
8%海藻糖	37.97	58.52	3.51	45.37	52.95	1.68	52.94	45.29	1.77
10%海藻糖	35.85	60.6	3.55	46.52	51.74	1.74	53.47	44.81	1.72

制剂实施例 9

配制 pH5.0 15mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲液，加入 8%的蔗糖，将抗体药物偶联物(patritumab-JSSW-001)样品超滤置换至上述溶液中，添加不同浓度的聚山梨酯 80，制备抗体药物偶联物浓度为 20mg/ml 的样品，将样品分装至注射剂瓶中，在冻融条件 (-20℃冻结与室温融化，共 6 次)和振摇(5℃，200rpm 10d)进行稳定性研究，采用微流成像仪(Flowcam)检测不同条件下样品中的亚可见颗粒的变化。表 52 为冻融和振摇对不同聚山梨酯 80 添加量样品不溶性微粒的影响。显示添加 0.005%的聚山梨酯 80 即可对颗粒的形成有显著的抑制作用，优选 0.02%聚山梨酯 80 抑制抗体药物偶联物在长期储藏过程中形成聚集体。

表 52 冻融和振摇对不同聚山梨酯 80 添加量样品不溶性微粒的影响

PS80 浓度	微粒数(P/mL)					
	T0		冻融 6 次		振摇 10d	
	NSP(2-10μm)	NSP(≥10μm)	NSP(2-10μm)	NSP(≥10μm)	NSP(2-10μm)	NSP(≥10μm)
0%	197	15	2306	254	5381	580
0.005%	8	1	29	0	438	2
0.02%	35	2	42	2	556	0
0.04%	66	2	88	1	1225	0
0.06%	38	1	86	0	416	0

制剂实施例 10：冻干工艺开发

以 20mg/ml 抗体药物偶联物(patritumab-JSSW-001)、15mmol/L 组氨酸-盐酸组氨酸、0.02%聚山梨酯 80、8%蔗糖，pH5.0 作为基础处方，对该处方组成样品进行玻璃态转化温度与塌陷温度检测，低温 DSC 检测显示该样品玻璃态转化温度为-28.79℃，冻干显微镜检测显示该样品塌陷温度为-28.1℃。

拟定预冻温度为-40℃。预冻温度达到-40℃前，首先利用 30min 使板层达到 5℃，并在 5℃下维持 30min，以便所有样品均能以 5℃为起点进行降温。分别以 0.5℃/min、2℃/min 和 1℃/min 三个降温速率进行预冻。不同预冻降温速率得到的冻干粉均为白色蛋糕状疏松体，注入 5.0ml 注射水，三批冻干粉均能在 3min 内复溶得到澄清液体。表 53 为 5 支不同位置含抗体药物偶联物的冻干粉水分含量，其中 0.5℃/min 降温速率所得冻干粉的水分平均值最低。

表 53 不同预冻降温速率冻干粉水分含量对比

样品位置编号	水分测定值(%)		
	降温速率：0.5℃/min	降温速率：1℃/min	降温速率：2℃/min
A	1.19	1.15	1.13
B	1.25	1.37	1.34
C	1.15	1.43	1.29
D	1.21	1.37	1.39
E	1.18	1.15	1.09
平均值	1.19	1.28	1.24

备注：C 为板层中心位置，A 为靠近门处板层一角，E 为 A 对角处靠近中隔阀位置，B、D 分别对应 AC、CE 中心

一次干燥：将板层温度设定到产品允许的崩解温度以上，但应保证未升华部分的产品温度不超过其崩解温度。采用 0.5℃/min 的降温速率预冻，35℃ 0.2mbar 900min 进行解析干燥，进行了五批不同板层温度(-15℃、-12℃、-8℃、-5℃及 0℃)的冻干试验。观察添加探头样品一次干燥初期(温度出现上升拐点之前)样品温度曲线，此时探头接触样品冻结部分温度位于-28~-30℃区间，均不高于崩解温度(Tc: -28.1℃)，且五批冻干最终均可得到白色疏松冻干粉，未见严重塌陷。注入 5.0ml 注射水，五批冻干粉均能在 3min 内复溶得到澄清液体。表 54 为不同一次干燥条件下的一次干燥时间和冻干粉水分值。一次干燥时间随着板层温度设定值的升高而缩短，板层设定为 0℃时一次干燥时间最短。在解析干燥条件相同情况下(35℃ 0.2mbar 900min)，比较不同一次干燥工艺所得的冻干粉的水分值，一次干燥为 0℃所得冻干粉的水分值(1.52%)显著高于-5℃(1.26%)，因此，设定板层温度为-5℃进行一次干燥。一次干燥设定-5℃下，比较 0.15mbar、0.20mbar 和 0.25mbar 的冻干效果。设定一次干燥真空值 0.25mbar 批次冻干粉的水分值最低，因此，一次干燥冻干箱真空值设定为 0.25mbar。

表 54 不同一次干燥条件下一次干燥时间和冻干粉水分值

一次干燥条件	一次干燥时间(min)	水分值(%)
-15℃, 0.2mbar	2500	1.19
-12℃, 0.2mbar	2300	1.26
-8℃, 0.2mbar	2000	1.17
-5℃, 0.2mbar	1800	1.26
0℃, 0.2mbar	1600	1.52
-5℃, 0.15mbar	1800	1.44
-5℃, 0.25mbar	1800	1.22

解析干燥：板层温度根据产品的热稳定来设定。由差示扫描量热法测定的抗体药物偶联物原液的热变性起始温度(T_{onset})位于 50℃左右，解析干燥板层温度设定值需要低于 50℃，预冻采用 0.5℃/min 的降温速率，一次干燥采用-5℃，真空值 0.25mbar。表 55 为两个解析干燥方式所得冻干粉水分和纯度比对数据，与原液相比，两个解析干

燥温度所得冻干粉的抗体药物偶联物纯度均未见显著差异，但 35℃900min 解析干燥冻干粉的水分含量更低。综上所述，解析干燥工艺定为 35℃，真空值 0.25mbar。

表 55 两个解析干燥方式所得冻干粉水分和纯度比对数据

批号	解析干燥条件	SEC			CEX			水分 (%)
		聚体 (%)	单体 (%)	片段 (%)	酸峰 (%)	主峰 (%)	碱峰 (%)	
DS113 (原液)	N/A	0.61	99.39	0.00	27.46	66.41	6.13	N/A
DP116 (冻干粉复溶液)	30℃, 0.25mbar, 1200min	0.66	99.34	0.00	29.09	64.77	6.14	1.52
DP129 (冻干粉复溶液)	35℃, 0.25mbar, 900min	0.66	99.34	0.00	27.28	66.87	5.85	1.34

冻干中试工艺转移：

冻干中试转移根据产品的温度曲线和压力升测试确定一次干燥时间(一次干燥结束压力升标准为<0.01mbar/min)，解析干燥条件与小试一致。共进行了四批冻干工艺转移试验，第一批中试采用小试优化冻干配方，位于板层中间位置冻干粉侧壁有严重凹坑，板层边缘样品该现象不严重。第二批中试设定板层温度为-20℃进行一次干燥，板层中间冻干粉侧壁凹坑未见显著改善，第三批冻干在预冻过程中增加-10℃退火过程，使预冻过程中未完全结晶的部分重新结晶，从而晶形和大小分布均匀，减小水分逸出干燥层的阻力，板层中间冻干粉侧壁凹坑略改善。第四批冻干在预冻过程中增加-10℃退火过程基础上，将一次干燥的真空值降低为 0.06mbar，增强升华后的水蒸气的逸出能力，减少水分在干燥层的聚集，避免聚集的水分使干燥层融化，位于板层中间样品的凹坑现象得到显著改善。表 56 为冻干中试试验数据汇总。表 57 为中试冻干粉复溶液与冻干前原液的纯度比对数据，冻干粉复溶液纯度与冻干前原液无显著变化。

表 56 冻干中试转移数据汇总

批次	预冻降温速率 (°C/min)	一次干燥条件	解析干燥条件	水分 (%)	冻干粉形态
1	0.5	-5℃, 0.25mbar	35℃, 0.25mbar	1.22	严重凹坑
2	0.5	-20℃, 0.25mbar		0.77	严重凹坑
3	0.5 (-10℃退火)	-5℃, 0.25mbar		0.90	凹坑现象改善
4	0.5 (-10℃退火)	-5℃, 0.06mbar		0.69	无显著凹坑

表 57 中试冻干粉复溶液与冻干前原液的纯度比对数据

批次	SEC			CEX			DAR
	聚体 (%)	单体 (%)	片段 (%)	酸峰 (%)	主峰 (%)	碱峰 (%)	
冻干前原液	0.65	99.35	0	26.81	66.77	6.42	8
1	0.71	99.29	0	27.51	65.84	6.65	8
2	0.70	99.30	0	29.03	64.56	6.41	8
3	0.67	99.33	0	27.77	65.94	6.29	8
4	0.67	99.30	0	28.18	65.73	6.09	8

检测方法：SEC 和 CEX 同制剂实施例 7。

DAR 分布：依据《中国药典》2020 版四部通则 0512 高效液相色谱法，以疏水色谱柱(如：TSKgel Butyl-NPR，4.6×100mm 或其它适宜色谱柱)为色谱柱，流动相 A 为 1.0M 硫酸铵，25mM 磷酸缓冲液(pH7.0)，流动相 B：25% 异丙醇，75% 25mM 磷酸缓冲液(pH7.0)。柱温为 30℃，流速为 0.5ml/min，检测波长为 280nm。取供试品溶液适量注入液相色谱仪进行梯度洗脱，计算 DAR 值。

制剂实施例 11

对冻干前抗体药物偶联物(patritumab-JSSW-001)原液及冻干后抗体药物偶联物(patritumab-JSSW-001)成品分别进行 5±3℃稳定性研究。研究结果显示，冻干后产品质量较液体状态下更为稳定，液体状态下产品高分子量片段较冻干状态显著增加，电荷变异体酸峰含量增加，且液体状态下更容易产生游离小分子毒素，其脱落速率较冻干粉更为明显，冻干剂型更有利于本品的长期储藏。

检测方法：

SEC-HPLC：同制剂实施例 6。

NR-CE-SDS：同制剂实施例 5。

CZE：参照毛细管电泳法(通则 0542)，采用毛细管区带电泳分离模式，供试品中各组份按各自的电泳速度和电渗速度进行分离，分离后按峰面积归一化法计算酸峰、主峰和碱峰的比例。

DAR 分布：同制剂实施例 10。

游离小分子毒素含量：依据《中国药典》2020 版四部通则 0512 高效液相色谱法与 0431 质谱法，以十八烷基键合硅胶为填充剂(如 Waters ACQUITY UPLC® BEH - C18，2.1×50mm，粒度 1.7μm 或其它适宜的色谱柱)的色谱柱，流动相 A 为含 0.1%FA 水溶液，流动相 B 为含 0.1%FA 乙腈溶液，柱温为 40℃，流速为 0.4ml/min。取供试品 50μL，加入内标工作液，与乙腈 1:3 进行沉淀处理，置于-20℃冰浴 30min 后离心取上清上样，以不同浓度小分子毒素作为对照品上样，对样品经液相色谱梯度洗脱后进入质谱检测器，设定质谱毛细管及锥孔电压、离子源温度、碰撞能量、雾化流速等参数后分析，按标准曲线计算供试品中游离小分子毒素含量。

游离小分子毒素含量(%)= 游离小分子毒素检测浓度/ADC 浓度×100%。

表 58 GMP 批次 1 关键质量指标稳定性结果

考察项目	GMP 批次 1			
	原液(5±3℃)		冻干粉(5±3℃)	
	0 月	6 月	0 月	6 月
SEC-HPLC	HMWS: 0.4%	1.1%	HMWS: 0.4%	0.4%
	单体: 99.6%	98.9%	单体: 99.6%	99.6%
NR-CE-SDS	LC+HC: 96.5%	95.7%	HC+LC: 96.4%	96.4%
	其它峰: 3.4%	4.3%	其它峰: 3.6%	3.6%
CZE	酸峰: 19.2%	25.1%	酸峰: 19.7%	20.8%
	主峰: 75.1%	68.4%	主峰: 74.8%	73.4%
	碱峰: 5.7%	6.5%	碱峰: 5.5%	5.9%
DAR	DAR 值: 8.0	8.0	DAR 值: 8.0	8.0
游离小分子毒素	0.00038%	0.00076%	0.00012%	0.00023%
抗原结合活性	96%	94%	93%	99%

考察项目	GMP 批次 1			
	原液(5±3℃)		冻干粉(5±3℃)	
	0 月	6 月	0 月	6 月
生物活性	103%	105%	107%	106%

表 59 GMP 批次 2 关键质量指标稳定性结果

考察项目	GMP 批次 2			
	原液(5±3℃)		冻干粉(5±3℃)	
	0 月	6 月	0 月	6 月
SEC-HPLC	HMWS: 0.5%	1.0%	HMWS: 0.6%	0.4%
	单体: 99.5%	99.0%	单体: 99.4%	99.6%
NR-CE-SDS	LC+HC: 95.9%	95.1%	HC+LC: 95.6%	96.3%
	其它峰: 4.1%	5.0%	其它峰: 4.4%	3.7%
CZE	酸峰: 18.6%	25.8%	酸峰: 18.1%	18.9%
	主峰: 75.0%	67.4%	主峰: 75.4%	74.6%
	碱峰: 6.4%	6.7%	碱峰: 6.4%	6.5%
DAR	DAR 值: 8.0	8.0	DAR 值: 8.0	8.0
游离小分子毒素	0.000031%	0.00067%	0.00018%	0.00025%
抗原结合活性	100%	95%	105%	92%
生物活性	102%	104%	105%	106%

制剂实施例 12.1：制剂制备的实例

(1) 超滤换液：配制 25mM 组氨酸-盐酸组氨酸、9%海藻糖，pH5.0 的溶液，采用 30kD 超滤膜包进行换液，将抗体偶联药物置换至 25mM 组氨酸-盐酸组氨酸、9%海藻糖，pH5.0 的溶液中，换液置换倍数不低于 100 倍，控制置换液中 ADC 浓度不低于目标浓度的 1.2 倍。

(2) 半成品配制：根据配方量，在超滤置换液中加入相应量的聚山梨酯 80，以 25mM 组氨酸-盐酸组氨酸、9%海藻糖，pH5.0 的溶液稀释 ADC 至目标浓度，搅拌均匀后获得目标为 10mg/ml ADC、25mM 组氨酸-盐酸组氨酸、9%海藻糖、0.03%聚山梨酯 80 的溶液，经两级 0.22μm 除菌过滤器过滤后即得 SWY2110-JSSW001 制剂的水溶液，其包含约 10mg/ml 的抗体药物偶联物 SWY2110-JSSW-001、约 0.33mg/ml 组氨酸、约 4.79mg/ml 盐酸组氨酸、约 0.3mg/ml 聚山梨酯 80、约 90mg/ml 海藻糖、和余量的水。

(3) 灌装冻干：依据本品灌装量，在全自动灌装线上进行样品灌装、半加塞，半加塞后的产品经自动轨道传输进冻干机进行冷冻干燥，控制预冻温度-45℃，维持时间不少于 180min；一次干燥温度-20℃，0.20mbar，维持时间不少于 4000min、二次干燥 30℃，0.20mbar，维持时间不少于 1200min。冷冻干燥结束后冻干机内加塞、通过自动轨道传递至轧盖工位完成轧盖，经灯检合格后获得成品——SWY2110-JSSW001 制剂，其包含约 10 重量份的抗体药物偶联物 SWY2110-JSSW-001、约 0.33 重量份的组氨酸、约 4.79 重量份的盐酸组氨酸、约 0.3 重量份的聚山梨酯 80、约 90 重量份的海藻糖。

制剂实施例 12.2：制剂制备的实例

(1) 超滤换液：配制 15mM 组氨酸-盐酸组氨酸、8%蔗糖，pH5.0 的溶液，采用 30kD 超滤膜包进行换液，将抗体偶联药物置换至 15mM 组氨酸-盐酸组氨酸、8%蔗糖，pH5.0 的溶液中，换液置换倍数不低于 100 倍，控制置换液中 ADC 浓度不低于目标浓度的 1.2 倍。

(2) 半成品配制：根据配方量，在超滤置换液中加入相应量的聚山梨酯 80，以 15mM 组氨酸-盐酸组氨酸、8%蔗糖，pH5.0 的溶液稀释 ADC 至目标浓度，搅拌混匀后获得目标为 20mg/ml ADC、15mM 组氨酸-盐酸组氨酸、8%蔗糖、0.02%聚山梨酯 80 的溶液，经两级 0.22 μ m 除菌过滤器过滤后即得 Patritumab-JSSW001 制剂的水溶液，其包含约 20mg/ml 的 patritumab-JSSW-001 抗体药物偶联物、约 0.21mg/ml 组氨酸、约 2.86mg/ml 盐酸组氨酸、约 0.2mg/ml 聚山梨酯 80、约 80mg/ml 蔗糖、和余量的水。

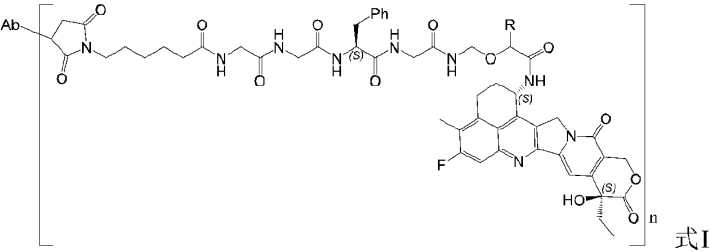
(3) 灌装冻干：依据本品灌装量，在全自动灌装线上进行样品灌装、半加塞，半加塞后的产品经自动轨道传输进冻干机进行冷冻干燥，控制预冻温度-40℃，维持时间不少于 180min；一次干燥温度-5℃，0.06mbar，维持时间不少于 3000min、二次干燥 35℃，0.25mbar，维持时间不少于 900min。冷冻干燥结束后冻干机内加塞、通过自动轨道传递至轧盖工位完成轧盖，经灯检合格后获得成品——Patritumab-JSSW001 制剂，其包含约 20 重量份的 patritumab-JSSW-001 抗体药物偶联物、约 0.21 重量份的组氨酸、约 2.86 重量份的盐酸组氨酸、约 0.2 重量份的聚山梨酯 80、约 80 重量份的蔗糖。

制剂实施例 13：生物活性测定

分别使用在制剂实施例 12.1 和 12.2 的步骤 (2) 中获得的 SWY2110-JSSW001 制剂的水溶液和 Patritumab-JSSW001 制剂的水溶液，按照前述生物实施例部分中所述的测定生物活性的方法测定两种制剂的生物活性，结果表明两种制剂的生物活性与单独的 ADC 的生物活性相当。

权 利 要 求

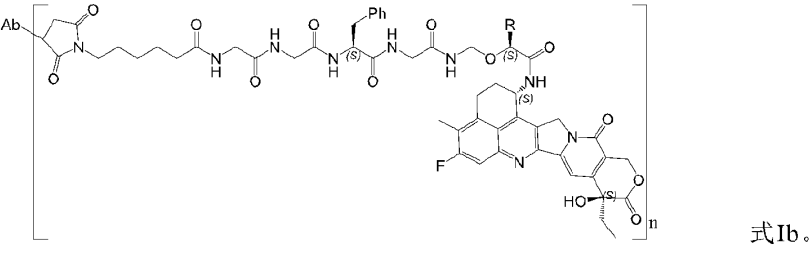
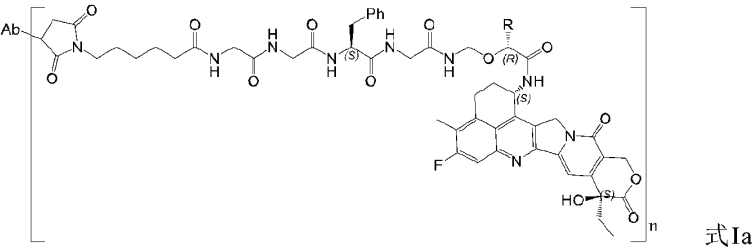
1. 一种药物组合物，其包含式I所示的抗体-药物偶联物：



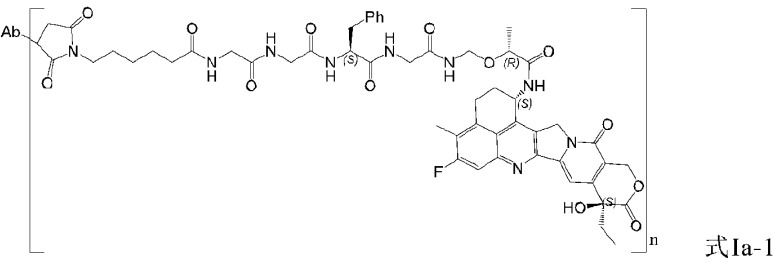
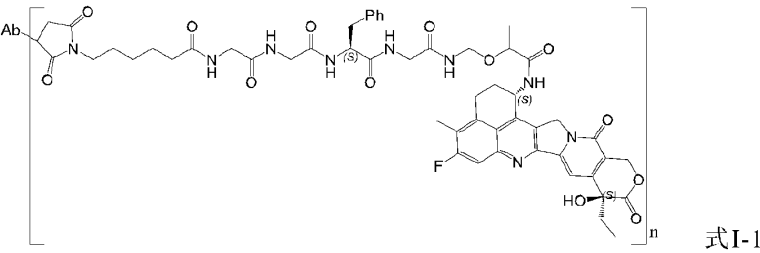
其中 Ab 为靶向 HER2、HER3 或 EGFR 的抗体或其抗原结合片段，R 选自 C₁₋₆ 烷基，n 选自 1-8 的整数或 1-8 的小数，优选地，n 为 8；

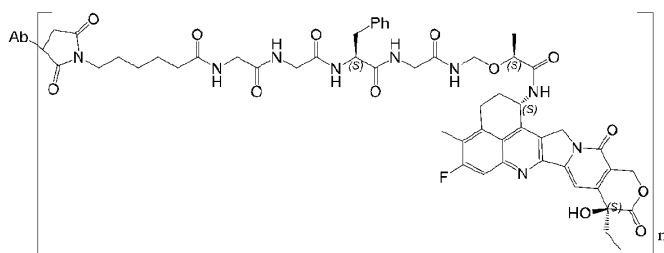
所述药物组合物为注射剂，优选注射液或冻干注射剂；

优选地，式 I 所示的抗体-药物偶联物具有式 Ia 和式 Ib 所示结构：



更优选地，式I所示的抗体药物偶联物具有式I-1、Ia-1和Ib-1所示结构：





式Ib-1。

2. 权利要求1所述的药物组合物，其中

Ab为靶向HER2的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV)，其中，重链可变区序列包括重链互补决定区1(HCDR1)、重链互补决定区2(HCDR2)和重链互补决定区3(HCDR3)，轻链可变区包括轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链互补决定区2(LCDR2)和轻链互补决定区3(LCDR3)，其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示，HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，和/或LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示，LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示，LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示；

进一步优选地，所述Ab为靶向HER2的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV)，其中HV的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示，LV的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示；

更优选地，所述Ab为靶向HER2的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链(HC)和轻链(LC)，其中HC的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，LC的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示；

所述Ab为靶向HER3的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV)，其中，重链可变区序列包括重链互补决定区1(HCDR1)、重链互补决定区2(HCDR2)和重链互补决定区3(HCDR3)，轻链可变区包括轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链互补决定区2(LCDR2)和轻链互补决定区3(LCDR3)，其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示，HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示，HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示，和/或LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示，LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示，LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示；

进一步优选地，所述Ab为靶向HER3的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV)，其中HV的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示，LV的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示；

更优选地，所述Ab为靶向HER3的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链(HC)和轻链(LC)，其中HC的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示，LC的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示；

所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV)，其中，重链可变区序列包括重链互补决定区1(HCDR1)、重链互补决定区2(HCDR2)和重链互补决定区3(HCDR3)，轻链可变区包括轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链互补决定区2(LCDR2)和轻链互补决定区3(LCDR3)，其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示，HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示，HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示，和/或LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示，LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示，LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示；

所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时，其包括重链可变区(HV)和轻链

可变区(LV), 其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:38所示, HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示, HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:32所示, 和/或LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示, LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示, LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示;

所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时, 其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV), 其中HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:38所示, HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示, HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示, 和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示, LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示, LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示;

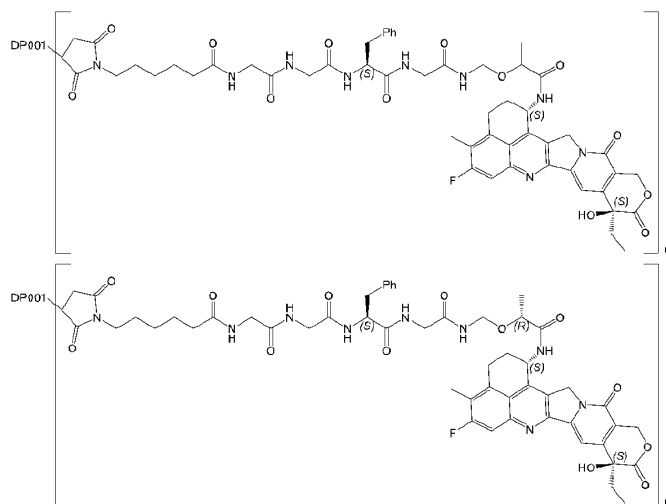
进一步优选地, 所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时, 其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV), 其中HV的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示, LV的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示;

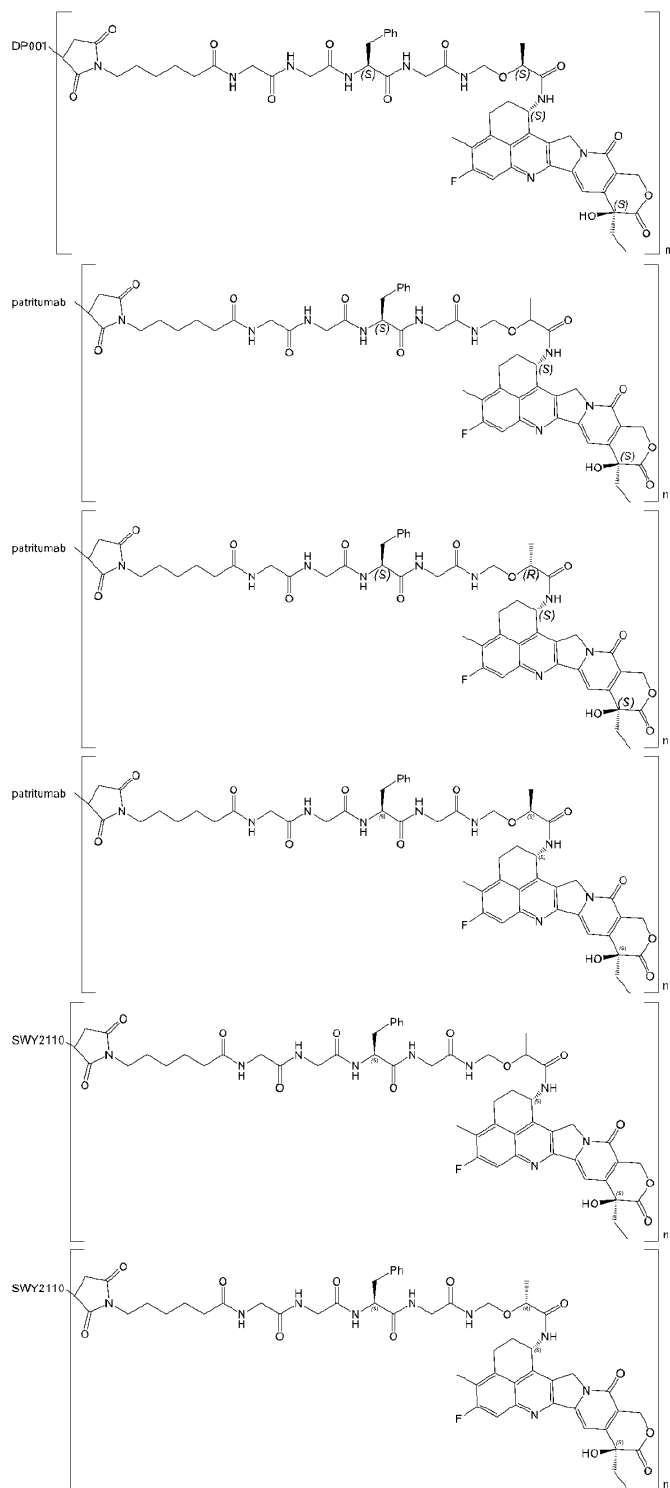
进一步优选地, 所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时, 其包括重链可变区(HV)和轻链可变区(LV), 其中HV的氨基酸序列如SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:39所示, LV的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示;

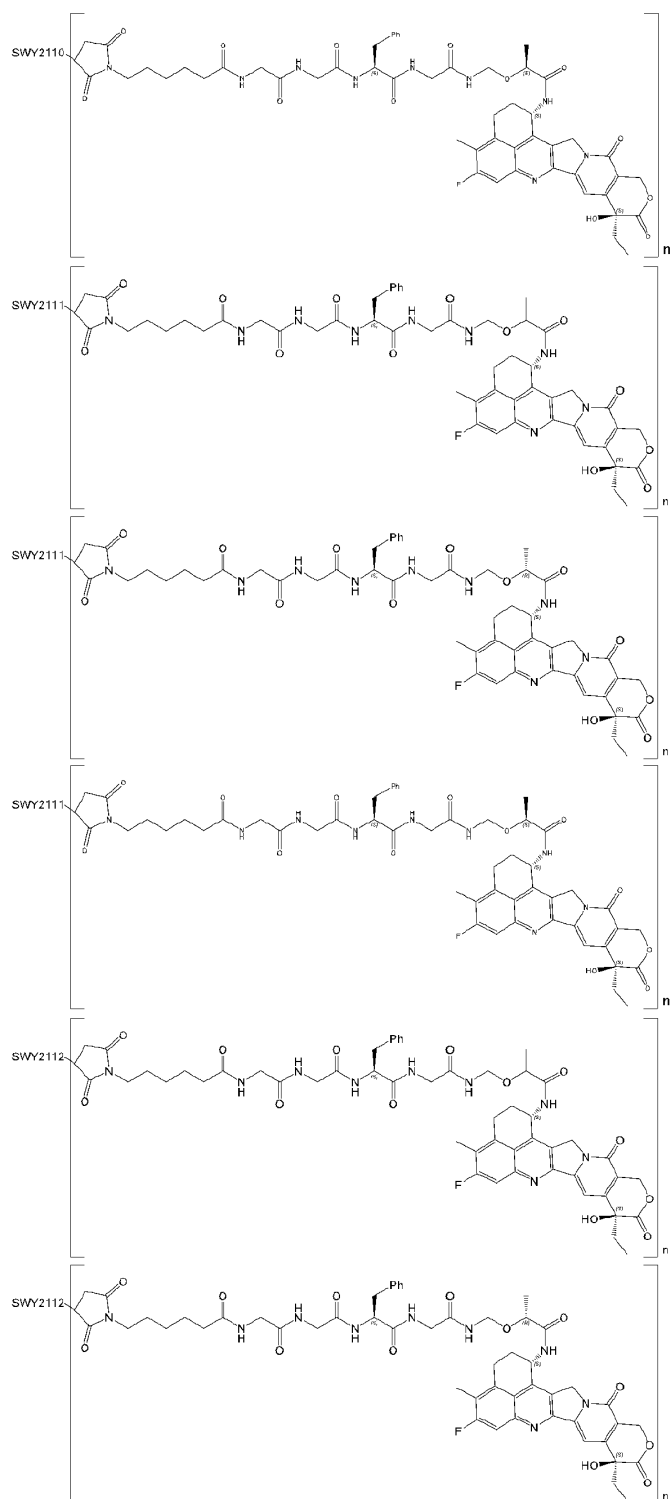
更优选地, 所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时, 其包括重链(HC)和轻链(LC), 其中HC的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示, LC的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示;

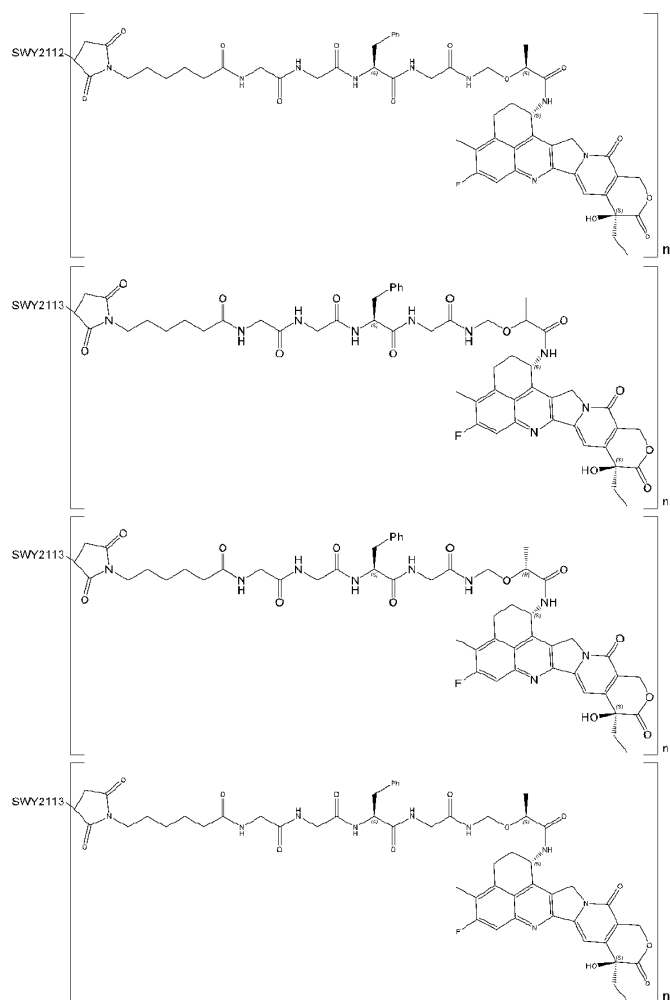
更优选地, 所述Ab为靶向EGFR的抗体或其抗原结合片段时, 其包括重链(HC)和轻链(LC), 其中HC的氨基酸序列如SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:40所示, LC的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示。

3. 权利要求 1-2 任一项所述的药物组合物, 其中式 I 所示的抗体药物偶联物具有如下所示结构:









其中：

DP001 为具有两条如 SEQ ID NO:9 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

Patritumab 为具有两条如 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

SWY2110 为具有两条如 SEQ ID NO:29 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

SWY2111 为具有两条如 SEQ ID NO:34 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

SWY2112 为具有两条如 SEQ ID NO:37 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

SWY2113 为具有两条如 SEQ ID NO:40 所示氨基酸序列的重链和两条如 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的轻链的抗体；

n 选自 1-8 的整数或 1-8 的小数，优选地，n 为 8。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的药物组合物，其中式 I 所示的抗体-药物偶联物的质量百分含量为 1-30%(如约 2%、约 3%、约 4%、约 5%、约 6%、约 7%、约 8%、约

8.5%、约 9%、约 9.5%、约 10%、约 10.5%、约 11%、约 12%、约 13%、约 14%、约 15%、约 16%、约 17%、约 18%、约 19%、约 20%、约 21%、约 22%、约 23%、约 24%、约 25%、约 26%、约 27%、约 28%、约 29%、约 30%)，优选 5-25%，8-20%，8-15%，8-10%，15-25%，其中以 100wt% 的所述的药物组合物为基准；

或者，其中式 I 所示的抗体-药物偶联物的含量为 1-30mg/ml(如约 1mg/ml、约 2mg/ml、约 3mg/ml、约 4mg/ml、约 5mg/ml、约 6mg/ml、约 7mg/ml、约 8mg/ml、约 8.5mg/ml、约 9mg/ml、约 9.5mg/ml、约 10mg/ml、约 10.5mg/ml、约 11mg/ml、约 12mg/ml、约 13mg/ml、约 14mg/ml、约 15mg/ml、约 16mg/ml、约 17mg/ml、约 18mg/ml、约 19mg/ml、约 20mg/ml、约 21mg/ml、约 22mg/ml、约 23mg/ml、约 24mg/ml、约 25mg/ml、约 26mg/ml、约 27mg/ml、约 28mg/ml、约 29mg/ml、约 30mg/ml)，优选 5-25mg/ml，进一步优选 5-20mg/ml，5-15mg/ml，15-25mg/ml。

5. 权利要求 1-4 任一项所述的药物组合物，其还包含缓冲剂；

优选地，所述缓冲剂选自醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸盐、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸、甘氨酸、氨丁三醇(Tris)、吗啉乙磺酸(MES)和其它有机酸缓冲剂，优选地为组氨酸盐缓冲剂，进一步优选地为组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲剂。

更优选地，所述缓冲剂的质量百分含量为 1-10%(如约 1%、约 2%、约 2.8%、约 2.9%、约 3%、约 3.1%、约 3.2%、约 4%、约 4.5%、约 4.6%、约 4.7%、约 4.8%、约 4.9%、约 5%、约 5.1%、约 5.2%、约 5.3%、约 5.4%、约 5.5%、约 6%、约 6.5%、约 7%、约 8%、约 9%、约 9.9%、约 10%)，优选 1-9.9%，2-6%，2-5%，4-6%，其中以 100wt% 的所述的药物组合物为基准；

或者，其中所述缓冲剂的含量为 1-10mg/ml(如约 1mg/ml、约 2mg/ml、约 3mg/ml、约 4mg/ml、约 4.5mg/ml、约 4.6mg/ml、约 4.7mg/ml、约 4.8mg/ml、约 4.9mg/ml、约 5mg/ml、约 5.1mg/ml、约 5.2mg/ml、约 5.3mg/ml、约 5.4mg/ml、约 5.5mg/ml、约 6mg/ml、约 6.5mg/ml、约 7mg/ml、约 8mg/ml、约 9mg/ml、约 10mg/ml)，优选 2-6mg/ml，2-4mg/ml，3-6mg/ml，4-6mg/ml；

最优选地，所述缓冲剂为组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲剂，

其中组氨酸的质量百分含量为 0.1-1%(如约 0.1%、约 0.2%、约 0.25%、约 0.26%、约 0.27%、约 0.28%、约 0.29%、约 0.3%、约 0.31%、约 0.32%、约 0.33%、约 0.34%、约 0.35%、约 0.4%、约 0.45%、约 0.5%、约 0.55%、约 0.6%、约 0.7%、约 0.8%、约 0.9%、约 1%)，优选 0.1-0.5%，0.2-0.4%，其中以 100wt% 的所述的药物组合物为基准；

或者，其中所述组氨酸的含量为 0.1-1mg/ml(如约 0.1mg/ml、约 0.2mg/ml、约 0.21mg/ml、约 0.22mg/ml、约 0.23mg/ml、约 0.24mg/ml、约 0.25mg/ml、约 0.26mg/ml、约 0.27mg/ml、约 0.28mg/ml、约 0.29mg/ml、约 0.3mg/ml、约 0.31mg/ml、约 0.32mg/ml、约 0.33mg/ml、约 0.34mg/ml、约 0.35mg/ml、约 0.4mg/ml、约 0.45mg/ml、约 0.5mg/ml、约 0.55mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.7mg/ml、约 0.8mg/ml、约 0.9mg/ml、约 1mg/ml)，优选 0.1-0.5mg/ml，0.1-0.3mg/ml，0.2-0.4mg/ml；

其中所述组氨酸盐酸盐的质量百分含量为 1-10%(如约 1%、约 2%、约 2.5%、约 2.6%、约 2.7%、约 2.8%、约 2.9%、约 3%、约 3.5%、约 4%、约 4.5%、约 4.6%、约 4.7%、约 4.8%、约 4.9%、约 5%、约 5.1%、约 5.2%、约 5.3%、约 5.4%、约 5.5%、约 6%、约 6.5%、约 7%、约 8%、约 9%、约 9.9%、约 10%)，优选 1-9.9%，2-6%，2-4%，3-6%，3.5-5.5%，4-5%，其中以 100wt% 的所述的药物组合物为基准；

或者, 其中所述组氨酸盐酸盐的含量为1-10mg/ml(如约1mg/ml、约2mg/ml、约2.5mg/ml、约2.6mg/ml、约2.7mg/ml、约2.8mg/ml、约2.9mg/ml、约3mg/ml、约3.5mg/ml、约4mg/ml、约4.5mg/ml、约4.6mg/ml、约4.7mg/ml、约4.8mg/ml、约4.9mg/ml、约5mg/ml、约5.1mg/ml、约5.2mg/ml、约5.3mg/ml、约5.4mg/ml、约5.5mg/ml、约6mg/ml、约6.5mg/ml、约7mg/ml、约8mg/ml、约9mg/ml、约10mg/ml), 优选2-6mg/ml, 2-4mg/ml, 3-6mg/ml、4-5.5mg/ml、4.5-5mg/ml。

6. 权利要求1-5任一项所述的药物组合物, 其还包含稳定剂;

优选地, 所述的稳定剂选自糖类(如蔗糖、海藻糖)、多元醇(如甘露醇、山梨醇)、氨基酸(L-丝氨酸、谷氨酸钠、丙氨酸、甘氨酸、肌氨酸等), 优选地为糖类, 进一步优选的为蔗糖、和/或海藻糖;

更优选地, 所述的稳定剂的质量百分含量为50-90%(如约50%、约60%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%), 优选60-90%, 70-90%, 80-90%, 其中以100wt%的所述的药物组合物为基准;

或者, 其中稳定剂的含量为50-110mg/ml(如约50mg/ml、约60mg/ml、约70mg/ml、约75mg/ml、约80mg/ml、约81mg/ml、约82mg/ml、约83mg/ml、约84mg/ml、约85mg/ml、约86mg/ml、约87mg/ml、约88mg/ml、约89mg/ml、约90mg/ml、约91mg/ml、约92mg/ml、约93mg/ml、约94mg/ml、约95mg/ml、约100mg/ml、约105mg/ml、约110mg/ml), 优选70-100mg/ml、80-100mg/ml、75-95mg/ml。

7. 权利要求1-6任一项所述的药物组合物, 其还包含表面活性剂;

优选地, 所述表面活性剂选自聚山梨酯类, 优选地为聚山梨酯20、和/或聚山梨酯80;

更优选地, 所述表面活性剂的质量百分含量为0.1-1%(如约0.1%、约0.15%、约0.16%、约0.17%、约0.18%、约0.19%、约0.2%、约0.25%、约0.26%、约0.27%、约0.28%、约0.29%、约0.3%、约0.31%、约0.32%、约0.33%、约0.34%、约0.35%、约0.4%、约0.45%、约0.5%、约0.55%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%), 优选0.2-0.4%, 进一步优选0.15-0.4%, 0.15-0.35%, 0.25-0.35%, 其中以100wt%的所述的药物组合物为基准;

或者, 其中所述表面活性剂的含量为0.1-1mg/ml(如约0.1mg/ml、约0.15mg/ml、约0.16mg/ml、约0.17mg/ml、约0.18mg/ml、约0.19mg/ml、约0.2mg/ml、约0.25mg/ml、约0.3mg/ml、约0.35mg/ml、约0.4mg/ml、约0.45mg/ml、约0.5mg/ml、约0.55mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1mg/ml), 优选0.1-0.4mg/ml, 0.15-0.25mg/ml, 0.2-0.4mg/ml, 0.25-0.35mg/ml。

8. 权利要求1-7任一项所述的药物组合物, 其中所述药物组合物的pH为4.0-7.5(如约4.0、约4.5、约4.6、约4.7、约4.8、约4.9、约5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5、约5.6、约5.7、约5.8、约5.9、约6.0、约6.5、约7.0), 优选4.5-7.0, 进一步优选4.5-5.5, 进一步优选5.0-5.5, 最优选约5.0。

9. 权利要求1-8任一项所述的药物组合物, 其中

所述药物组合物为冻干注射剂, 当冻干注射剂用注射用水稀释时, 使得稀释后的药物组合物包含约10mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.33mg/ml组氨酸、约4.79mg/ml盐酸组氨酸、约0.3mg/ml聚山梨酯80、约90mg/ml海藻糖, 以稀释后的药物组合物的总体积为基准, 稀释后的药物组合物的pH为约5.0, 优选地, 式I所示的抗体

药物偶联物选自：SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、和SWY2113-JSSW-001，优选地是SWY2110-JSSW-001；

或者

所述药物组合物为注射液，所述注射液包含约10mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.33mg/ml组氨酸、约4.79mg/ml盐酸组氨酸、约0.3mg/ml聚山梨酯80、约90mg/ml海藻糖，所述注射液的pH为约5.0，优选地，式I所示的抗体药物偶联物选自：SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、和SWY2113-JSSW-001，优选地是SWY2110-JSSW-001；

或者

所述的药物组合物包含约10mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.33mg/ml组氨酸、约4.79mg/ml盐酸组氨酸、约0.3mg/ml聚山梨酯80、约90mg/ml海藻糖、和余量的水，并且所述的药物组合物的pH为约5.0，优选地，式I所示的抗体药物偶联物选自：SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、和SWY2113-JSSW-001，优选地是SWY2110-JSSW-001；

或者

所述的药物组合物包含或由以下组成：约10重量份的式I所示的抗体药物偶联物、约0.33重量份的组氨酸、约4.79重量份的盐酸组氨酸、约0.3重量份的聚山梨酯80、约90重量份的海藻糖，优选地，式I所示的抗体药物偶联物选自：SWY2110-JSSW-001、SWY2111-JSSW-001、和SWY2113-JSSW-001，优选地是SWY2110-JSSW-001。

或者

所述药物组合物为冻干注射剂，当冻干注射剂用注射用水稀释时，使得稀释后的药物组合物包含约20mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.21mg/ml组氨酸、约2.86mg/ml盐酸组氨酸、约0.2mg/ml聚山梨酯80、约80mg/ml蔗糖，以稀释后的药物组合物的总体积为基准，稀释后的药物组合物的pH为约5.0，优选地，式I所示的抗体药物偶联物是patritumab-JSSW-001；

或者

所述药物组合物为注射液，所述注射液包含约20mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.21mg/ml组氨酸、约2.86mg/ml盐酸组氨酸、约0.2mg/ml聚山梨酯80、约80mg/ml蔗糖，所述注射液的pH为约5.0，优选地，式I所示的抗体药物偶联物是patritumab-JSSW-001；

或者

所述的药物组合物包含约20mg/ml的式I所示的抗体药物偶联物、约0.21mg/ml组氨酸、约2.86mg/ml盐酸组氨酸、约0.2mg/ml聚山梨酯80、约80mg/ml蔗糖、和余量的水，并且所述的药物组合物的pH为约5.0，优选地，式I所示的抗体药物偶联物是patritumab-JSSW-001；

或者

所述的药物组合物包含或由以下组成：约20重量份的式I所示的抗体药物偶联物、约0.21重量份的组氨酸、约2.86重量份的盐酸组氨酸、约0.2重量份的聚山梨酯80、约80重量份的蔗糖，优选地，式I所示的抗体药物偶联物是patritumab-JSSW-001。

10. 权利要求1-9任一项所述的药物组合物的制备方法，包括如下步骤：

S1)制备式I所示的抗体-药物偶联物；

S2)制备超滤置换缓冲液；

S3)将S1制得抗体-药物偶联物换液至S2)制得的缓冲液；

优选地，所述 S2)步骤包括按照处方量称取缓冲剂、稳定剂，加注射用水稀释至目标配制体积，搅拌混合均匀，得到超滤置换缓冲液；所述 S3)步骤包括采用超滤膜，按一定的体积，将 S1 制得抗体-药物偶联物超滤置换至 S2)制得的超滤置换缓冲液中，用注射用水将抗体-药物偶联物稀释至目标浓度，按质量分数或体积分数加入表面活性剂，得到原液；任选地，将原液冻干，优选地，冻干包括：（1）预冻、（2）一次干燥、和（3）二次干燥，其中

（1）预冻的条件为：-60 至-30℃，时间 18-1800 分钟，例如-45℃，时间 180 分钟；

（2）一次干燥的条件为：-25 至 0℃，压力 0.02-0.5mbar（绝对压力），时间 300 分钟至 40000 分钟，例如-5℃，0.06mbar，3000 分钟，或者-20℃，0.20mbar，4000 分钟；

（3）二次干燥的条件为：15-45℃，压力 0.1-0.5mbar（绝对压力），时间 90-12000 分钟，例如 30℃，0.20mbar，1200 分钟，或者 35℃，0.25mbar，900 分钟。

11. 权利要求1-9任一项所述的药物组合物在制备用于治疗增殖性疾病的药物中的用途，优选地，所述增殖性疾病优选为与HER2、HER3或EGFR异常表达相关的疾病，包括癌症，优选地，所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌(例如小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤)；任选地，所述癌症还包括三阴乳腺癌、食管癌、胰腺癌、胆道癌、HR阳性乳腺癌、肺鳞癌、非鳞非小细胞肺癌、头颈部鳞癌（包括鼻咽癌）、尿路上皮癌。

12. 权利要求1-9任一项所述的药物组合物在制备用于治疗产生耐药性的增殖性疾病的药物中的用途：优选地所述产生耐药性的增殖性疾病为产生耐药性的与HER2、HER3或EGFR异常表达相关的疾病，包括癌症；更优选地，所述产生耐药性的癌症为HER2、HER3或EGFR基因突变导致的耐药癌症，所述癌症优选地选自乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、前列腺癌、肾癌、尿道癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、食道癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤、肺癌(例如小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)骨癌、皮肤癌、甲状腺癌、胰腺癌或淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或复发性间变性大细胞淋巴瘤)，任选地，所述癌症还包括三阴乳腺癌、食管癌、胰腺癌、胆道癌、HR阳性乳腺癌、肺鳞癌、非鳞非小细胞肺癌、头颈部鳞癌（包括鼻咽癌）、尿路上皮癌；进一步优选地所述癌症为结肠癌、直肠癌、肺癌或胰腺癌；其中所述耐药性优选对受体酪氨酸激酶抑制剂耐药，进一步优选为对第一代、第二代或第三代EGFR抑制剂耐药，更进一步优选对吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、达克替尼、奥希替尼或阿美替尼耐药，特别是对吉非替尼、阿法替尼、奥希替尼或阿美替尼耐药，更优选为对吉非替尼或奥希替尼耐药。