

说明书

发明名称: 包含PD-L1结合分子与双特异性 性抗体-药物偶联物的组合物及其用途

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医药领域，具体涉及包含PD-L1结合分子与双特异性抗体-药物偶联物的组合物。

背景技术

[0002] 抗体药物在肿瘤治疗中被广泛应用，由于抗体可以选择性的结合抗原或者抗原阳性细胞，因此表现出较低的脱靶毒性；然而，单凭抗体药物通常不足以有效地对抗肿瘤。抗体-药物偶联物(Antibody-drug conjugate, ADC)结合了抗体和细胞毒素的优点，增强了肿瘤细胞杀伤的有效性和选择性。自2000年首款ADC药物Mylotarg获批以来，目前已有15款ADC药物被批准上市，另有更多针对不同靶标、采用不同偶联技术的ADC药物正处于临床研究阶段。

[0003] 在将临床有效的ADC作为产品推向市场的过程中，需要开发适于储存、运输及施用的药物制剂。然而，蛋白质容易发生化学和物理降解，小分子的缀合也给抗体带来了更多的复杂性和不稳定性。已上市的ADC药物浓度普遍低于20mg/mL，这与传统抗体疗法中高于50mg/mL的浓度形成鲜明的对比，较低的药物浓度可降低聚集的风险，尤其是对于携带疏水性有效荷载的药物。现有ADC药物通常以静脉输注的形式给药，在输液袋中，ADC浓度较低，增加了由于吸附到塑料上而导致药物损失的风险，药物的稀释也会降低稳定剂的水平，这可能会引起聚集和颗粒形成，此外，静脉输注通常需经历较长的用药时间。通常，相比冻干制剂，液体制剂的生产成本更低，且使用也更方便。但由于产品结构复杂性以及稳定性方面的原因，常仅能以较低浓度进行配制、使用，并需要制成冻干粉才能实现长时间保存。目前已批准上市的ADC药物均以冻干的形式保存和运输，待使用前再进行重构。

- [0004] HER受体酪氨酸激酶家族的成员是细胞生长、分化和存活的重要介导体。该受体家族包括四种独特的成员，包括表皮生长因子受体(EGFR、ErbB1、或HER1)、HER2(ErbB2或p185neu)、HER3(ErbB3)和HER4(ErbB4或tyro2)。该受体家族的成员已牵连于多种类型的人恶性肿瘤。现有技术已经开发了针对HER2的双特异性抗体-药物偶联物。
- [0005] 程序性死亡-1(PD-1)是CD28受体家族的成员，该家族包括CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1和BTLA。该家族的最初成员CD28和ICOS通过添加单克隆抗体后增强T细胞增殖的功能而发现。已经鉴定了PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体，PD-L1和PD-L2，已经表明它们在与PD-1结合后下调T细胞活化和细胞因子分泌。PD-L1(B7-H1)和PD-L2(B7-DC)都是可与PD-1结合但是不与其他CD28家族成员结合的B7同源物。也已经显示通过IFN- γ 刺激上调细胞表面上PD-L1的表达。
- [0006] PD-L1的表达已经在几种鼠和人类癌症中发现，包括人肺癌、卵巢癌、结肠癌、黑色素瘤和各种骨髓瘤。已有的结果显示，肿瘤细胞高表达的PD-L1通过增加T细胞的凋亡从而在肿瘤的免疫逃逸中起着重要的作用。研究者发现，转染PD-L1基因的P815肿瘤细胞系在体外可抵制特异性CTL的裂解，将其接种小鼠体内后具有更强的致瘤性和侵袭性。这些生物学特性均可通过阻断PD-L1而逆转。敲除PD-1基因的小鼠，阻断PD-L1/PD-1通路，则接种肿瘤细胞不能形成肿瘤。也已经提示PD-L1可能与肠粘膜炎症有关，并且PD-L1的抑制防止了与结肠炎有关的萎缩病。专利申请文件WO2017020801公开了一类针对PD-L1的单域抗体及其抗肿瘤用途。
- [0007] 鉴于现有技术中已开发ADC药物的结构和不稳定性，现有技术需要开发提升ADC药物稳定性的技术，和/或需要获得适用于长期稳定保存的包含ADC药物的制剂，例如高浓度的注射液。

发明内容

- [0008] 发明人意外发现，单域抗体分子，例如抗PD-L1单域抗体能够提高ADC药物的稳定性。例如，将单域抗体分子(如抗PD-L1单域抗体)与ADC药物组合后，ADC药物的稳定性获得显著提升，可以配制成高浓度的注射液，并且长期稳定保

存。高浓度注射液可用于皮下注射，极大方便了患者的临床用药，同时，也为ADC药物与免疫疗法的联用创造了便利。

[0009] 在第一方面，本发明涉及抗原(如PD-L1)结合分子在提高蛋白-药物偶联物制剂的稳定性中的用途。

[0010] 在第二方面，本发明还涉及一种组合物，所述组合物包含抗原(如PD-L1)结合分子以及蛋白-药物偶联物。所述组合物中可以是固体制剂如冻干制剂的形式，或者是液体制剂如注射液的形式，并且还可以包含合适的药用辅料，该组合物适合临床使用，例如用于皮下注射。

[0011] 在第三方面，本发明还涉及一种治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤的方法，包括向有需要的患者施用抗原(如PD-L1)结合分子与蛋白-药物偶联物的药物组合。

[0012] 本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。

附图说明

[0013] 对附图简要说明如下：

[0014] 图1的A、B和C显示的是JSKN003单独及其与KN035混合制剂的不溶性微粒情况。

[0015] 图2显示的是JSKN003单独及其与KN035混合制剂的聚体含量情况。

[0016] 图3显示的是静脉推注或皮下注射后，样本血清中JSKN003的药物浓度变化情况；其中◆代表静脉推注，▲代表皮下注射。

[0017] 图4显示的是LP1的MS图谱。

[0018] 图5显示的是制备抗体A-(N₃)₄的反应式以及UDP-GalNAz的结构。

[0019] 图6显示的是抗体A-(N₃)₄的质谱数据。

[0020] 图7显示的是制备JSKN003的反应式。

[0021] 图8显示的是JSKN003的质谱数据。

[0022] 图9显示的是JSKN003单独以及与KN035混合后，放置4周后的不溶性微粒情况。

- [0023] 图10A-图10C显示的是第一轮处方筛选中高温稳定性实验SEC-HPLC聚体(A)、nrCE-SDS片段(B)和抗体部分相对结合活性(C)的检测结果。
- [0024] 图11A-图11F显示的是第二轮处方筛选中高温稳定性实验不溶性微粒(A)、SEC-HPLC聚体(B, T0仅获得FS2-1SEC-HPLC检测结果, 以此数据为参考)、nrCE-SDS片段(C)、CEX-HPLC主峰(D)和抗体部分相对结合活性(E)检测结果, 以及第二轮处方筛选中粘度(F)的检测结果。
- [0025] 图12A-图12E显示的第三轮处方筛选中不溶性微粒(A)、SEC-HPLC聚体(B, T0未获得SEC-HPLC数据, 以换液前样品检测结果作为参考)、nrCE-SDS片段(C)、CEX-HPLC主峰(D)和抗体部分相对结合活性(E)检测结果。
- [0026] 图13显示的是辅料含量确认实验的不溶性微粒、SEC-HPLC和CEX-HPLC主峰检测结果。
- [0027] 图14A-图14D显示的是混合制剂长期稳定性实验结果, 包括: SEC-HPLC(A)、CEX-HPLC(B)、nrCE-SDS(C)和相对结合活性(D)。
- [0028] 图15A-图15D显示的是混合制剂加速稳定性实验结果, 包括: SEC-HPLC(A)、CEX-HPLC(B)、nrCE-SDS(C)和相对结合活性(D)。
- [0029] 图16的A、B、C、D、E和F显示的是DS8201单独及其与KN035混合制剂的不溶性微粒含量。
- [0030] 图17的A和B显示的是DS8201混合制剂SEC-HPLC聚体含量。
- [0031] 图18的A、B和C显示的是RC48单独及其与KN035混合制剂的不溶性微粒含量。
- [0032] 图19显示的是RC48混合制剂SEC-HPLC聚体含量。

具体实施方式

- [0033] 术语定义
- [0034] 除非另有指示或定义, 否则所有所用术语均具有本领域中的通常含义, 该含义将为本领域技术人员所了解。参考例如标准手册, 如Sambrook等人, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (第2版), 第1-3卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Lewin, “Genes IV”, Oxford University Press, New York, (1990); 及Roitt等人, “Immunology” (第2版), Gower Medical Publishing, London, New York (198

9), 以及本文中引用的一般现有技术; 此外, 除非另有说明, 否则未具体详述的所有方法、步骤、技术及操作均可以且已经以本身已知的方式进行, 该方式将为本领域技术人员所了解。亦参考例如标准手册、上述一般现有技术及其中引用的其他参考文献。

[0035] 术语“完全抗体”或“全长抗体”或“全抗体”在本文中可以互换使用, 通常是指由两对相同的多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ , 并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内, 可变区和恒定区可以通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接, 重链还可以包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。重链可以由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区可以由3个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。轻链可以由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区可以由一个结构域CL组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子, 包括免疫系统的各种细胞(例如, 效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)的结合。VH和VL区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)), 其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。例如, VH和VL可以分别包含或由从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成, 按下列顺序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。各重链/轻链对的可变区(VH和VL)分别形成抗体结合部位。

[0036] “互补决定区”或“CDR区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的CDR通常被称作CDR1、CDR2和CDR3, 从N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的CDR被称作HCDR1、HCDR2和HCDR3, 而位于抗体轻链可变结构域内的CDR被称作LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中, 各CDR的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体CDR指派系统的任一种或其组合确定, 所述指派系统包括例如: 基于抗体的三维结构和CDR环的拓扑学的Chothia(Chothia等人.(1989)Nature 342:877-883, Al-Lazikani等

人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins” Journal of Molecular Biology, 273, 927–948 (1997)), 基于抗体序列可变性的Kabat(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第4版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/ 上), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering) 的North CDR 定义 (North等, “A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations”, Journal of Molecular Biology, 406, 228–256 (2011))。

[0037] 在本发明中, 采用Kabat、AbM或IMGT方案定义的CDR的区域范围如下:

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	IMGT 方案	Chothia 方案
LCDR1 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L24-L34	L24-L34	L27-L32	L26-L32
LCDR2 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L50-L52
LCDR3 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L89-L97	L89-L97	L89-L96	L91-L96
HCDR1 (Kabat 编号系统)	H31-H35B	H26-H35B	H26-H35B	H26-H32
HCDR1 (Chothia 编号系统)	H31-H35	H26-H35	H26-H35	H26-H32
HCDR2 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H50-H65	H50-H58	H51-H57	H53-H55
HCDR3 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H95-H102	H95-H102	H93-H102	H96-H101

[0038] 除非另有说明, 否则在本发明中, 术语“CDR”或“CDR序列”涵盖以上述任一种方式确定的CDR序列。

[0039] 在本文中, 当提及“Kabat CDR”时, 是指基于Kabat方案确定的CDR。类似的, “Chothia CDR”是指基于Chothia方案确定的CDR, “Abm CDR”是指基于Abm方案确定的CDR, “IMGT CDR”是指基于IMGT方案确定的CDR。

[0040] 术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如, 其包括, 特别地, 重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG (例如, IgG1, IgG2, IgG3或IgG4亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE或IgM抗体。

[0041] 在本申请中, 术语“双特异性抗体”通常是指能够分别和两种抗原或抗原表位结合的抗体。在本发明的一些实施方案中, 所述双特异性抗体可以包括能够特异性结合第一抗原或抗原表位的抗体的轻链和重链, 以及能够特异性结合第二抗原或抗原表位的抗体的轻链和重链。在本申请的一个实施方案中, 所述双特异性抗体中能够特异性结合第一抗原或抗原表位的抗体的轻链和能够特异性结

合第二抗原或抗原表位的抗体的轻链具有相同的序列。在本申请的一个实施方案中，所述双特异性抗体中能够特异性结合第一抗原或抗原表位的抗体的重链和能够特异性结合第二抗原或抗原表位的抗体的重链具有不同的序列。

[0042] 术语“表位”或“抗原表位”通常是指，抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，表位通常以独特的空间构象包括至少3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14或15个连续或非连续的氨基酸，其可以是“线性的”或“构象的”。参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第66卷，G.E.Morris，Ed.(1996)。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

[0043] 术语“特异性”是指特定抗原结合分子或抗原结合蛋白可结合的不同类型抗原或表位的数目。可基于抗原结合蛋白的亲合力和/或亲合力确定其特异性。由抗原与抗原结合蛋白的解离平衡常数(KD)所表示的亲合力，是表位与抗原结合蛋白上抗原结合位点之间结合强度的量度：KD值越小，表位与抗原结合蛋白之间的结合强度越强(或者，亲合力也可表示为缔合常数(KA)，其为1/KD)。如本领域技术人员将了解，取决于具体感兴趣的抗原，可以以已知方式测定亲合力。亲合力为抗原结合蛋白(例如免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单一可变结构域或含有其的多肽)与相关抗原之间结合强度的量度。亲合力与以下两者有关：与其抗原结合蛋白上的抗原结合位点之间的亲合力，以及存在于抗原结合蛋白上的相关结合位点的数目。

[0044] 如本申请所用，术语(多肽或蛋白的)“结构域”是指折叠蛋白结构，其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言，结构域负责蛋白的单个的功能性质，并在许多情况下可添加、移除或转移至其他蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

- [0045] 如本申请所用的术语“免疫球蛋白结构域”是指抗体链(例如常规4链抗体的链或重链抗体的链)的球形区域,或是指基本上由这类球形区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于其维持抗体分子的免疫球蛋白折叠特征。
- [0046] 如本申请所用的术语“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由下述组成的免疫球蛋白结构域:本领域及下文中分别称为“框架区1”或“FR1”、“框架区2”或“FR2”、“框架区3”或“FR3”、及“框架区4”或“FR4”的四个“框架区”,以及间隔开所述框架区的本领域及下文中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”、“互补决定区2”或“CDR2”、及“互补决定区3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”。因此,免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可如下表示为:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予抗体对抗原的特异性。
- [0047] 如本申请所用的术语“免疫球蛋白单一可变结构域”是指能够在不与其他免疫球蛋白可变结构域配对的情况下特异性结合抗原表位的免疫球蛋白可变结构域。本申请含义中的免疫球蛋白单一可变结构域的一个实例为“结构域抗体”,例如免疫球蛋白单一可变结构域VH及VL(VH结构域及VL结构域)。免疫球蛋白单一可变结构域的另一实例为如下文定义的骆驼科的“VHH结构域”(或简称为“VHH”)。
- [0048] “VHH结构域”,亦称为单域抗体、VHH、VHH结构域、VHH抗体片段和VHH抗体,是称为“重链抗体”的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域(Hamers-Casterman C,Atarhouch T,Muyldermans S,Robinson G,Hamers C,Songa EB,Bendahman N,Hamers R.: “Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature 363,446-448(1993))。使用术语“VHH结构域”以将所述可变结构域与存在于常规4链抗体中的重链可变结构域(其在本申请中称为“VH结构域”)进行区分。VHH结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(此与常规4链抗体中的VH或VL结构域相反,在该情况下表位由VL结构域与VH结构域一起识别)。VHH结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。VHH例如来自骆驼科动物,例如羊驼,或是其人源化形式或序列优化形式(例如,以增加

结合亲和力的亲和力成熟形式)。在一些实施方案中，VHH为由或基本上由单个重链可变区(例如重链抗体的重链可变区)组成的单价单特异性多肽分子。

[0049] 在本申请的上下文中，术语“VHH结构域”、“VHH”、“VHH结构域”、“VHH抗体片段”、以及“VHH抗体”可互换使用。

[0050] 例如Riechmann及Muyldermans J.Immunol.Methods 231,25-38(1999)的图2中所示，对于骆驼科的VHH结构域所应用的氨基酸残基，可以根据Kabat等人给出的VH结构域的一般编号法来编号(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。

[0051] 本领域中已知对VH结构域的氨基酸残基进行编号的替代方法，所述替代方法还可以类似地应用于VHH结构域。例如，Chothia CDR指的是结构环的位置(Chothia and Lesk, J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM CDR代表的是Kabat超变区和Chothia结构环的折中，并且在Oxford Molecular's AbM抗体建模软件中使用。“接触(Contact)”CDR则基于对可获得的复合物晶体结构的分析。

[0052] 单域抗体或VHH也可以包含在更大的多肽/蛋白中。包含本发明VHH的多肽/蛋白例子包括但不限于，重链抗体(HcAb)。

[0053] 本发明所述的“重链抗体”是指不具有轻链的抗体，例如其从N段到C段可以包含VH-Fc或VH-CH2-CH3或VH-铰链区-CH2-CH3，或可以包含VH-CH1-CH2-CH3。本发明的重链抗体还可以涵盖同型二聚体，例如不具有轻链的重链二聚体抗体。重链抗体中可以包含来自标准抗体的VH或者来自单域抗体的VH。例如，重链抗体中的VH可以就是VHH。例如，重链抗体可以是具有源自骆驼科动物(美洲驼、骆驼，尤其是羊驼)的构架区和/或重链恒定区的重链抗体，其同源形式或其序列优化形式(亲和力成熟形式)、或其片段(例如包含至少部分恒定区的片段)。重链抗体还可以涵盖将重链可变区或VHH与Fc区(例如人IgG Fc区，例如人IgG1或IgG4Fc区)融合后形成的抗体。

[0054] 术语“Fc区”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。天然的免疫球蛋白“Fc结构域”包含两个或三个恒定结构域，即CH2结构域、CH3结构域和可选的CH4结

构域。例如，在天然抗体中，免疫球蛋白Fc结构域包含源自IgG、IgA和IgD类抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(CH2结构域和CH3结构域)；或者包含源自IgM和IgE类抗体的两条重链的第二、第三和第四恒定结构域(CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域)。除非本文中另外说明，否则Fc区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述的EU编号体系(也称作EU索引)进行编号。在本文中，术语“Fc区”不包括免疫球蛋白的重链可变区VH和轻链可变区VL以及重链恒定区CH1和轻链恒定区CL，但在一些情况下可以包括在重链恒定区N端的铰链区。在一些实施方案中，本发明的Fc区来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方案中，本发明的Fc区包含SEQ ID NO:2或3所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列。

[0055] 术语“蛋白-药物偶联物”通常是指与一个或多个化学药物连接的结合蛋白(例如抗体或其抗原结合片段)，例如抗体药物偶联物(ADC, Antibody-drug conjugates)。所述化学药物可以为任意的治疗剂和/或细胞毒性剂。所述抗体药物偶联物可以具有从1-16任何数目的与抗体偶联的药物，例如可以包括2、4、6或8的载药种类(drug loaded species)。在本发明中，所述药物可以包括有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、用于基因疗法的载体、烷化剂、抗血管生成剂、抗代谢物、含硼剂、化疗保护剂、激素、抗激素剂、皮质类固醇、光敏治疗剂、寡核苷酸、放射性核素剂、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和/或放射致敏剂等。

[0056] 在本申请中，术语“药物/抗体比率”或“DAR”通常是指与ADC的抗体(或蛋白)连接的药物的数目。ADC的DAR范围可以为1-8，也可以为更高载量(例如10)，DAR的范围可以取决于抗体上连接位点的数目。在本申请中，所述DAR可以为负载到单个抗体上的药物的数目。所述DAR也可以为一组ADC的平均或均值DAR。

- [0057] 术语“连接子”是指将药物(例如小分子药物)与抗体部分连接起来的结构片段。应当理解,连接子在连接至抗体或其抗原结合片段之前具有可与抗体或其抗原结合片段的官能团形成键的官能团。
- [0058] 在本申请中,术语“HER2”通常是指人表皮生长因子受体2(SwissProt P04626)。在本申请中,所述HER2也可以称为rbB-2、NEU、HER-2或CD340。所述HER2可以包括HER2的任何变体、同工型、和物种同源物,其由细胞-包括肿瘤细胞-天然地表达,或由以HER2基因或cDNA转染的细胞表达。
- [0059] 如本文所用,术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团,其为包含1至20个碳原子的直链或支链基团,优选含有1至12个碳原子的烷基,更优选含有1至10个碳原子的烷基,最优选含有1至6个碳原子的烷基。
- [0060] 术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基,环烷基环包含3至20个碳原子,优选包含3至12个碳原子,更优选包含3至10个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基、环庚基、环庚三烯基、环辛基等;多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。
- [0061] 术语“亚环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃基,从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。
- [0062] 术语“杂环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基,其包含3至20个环原子,其中一个或多个环原子为选自氮、氧或S(O)_m(其中m是整数0至2)的杂原子,但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分,其余环原子为碳。
- [0063] 术语“亚杂环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃基,其包含3至20个环原子,其中一个或多个环原子为选自氮、氧或S(O)_m(其中m是整数0至2)的杂原子,但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分,其余环原子为碳,在此基础上从母体烷的相同碳原子或两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。
- [0064] 术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基),其中烷基或环烷基的定义如上所述。

- [0065] 术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的6至14元全碳单环或稠合多环(也就是共享毗邻碳原子对的环)基团,优选为6至10元,例如苯基和萘基,优选苯基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环基或环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为芳基环。芳基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。
- [0066] 术语“亚芳基”指具有共轭的 π 电子体系的6至14元全碳单环或稠合多环,并从母体芳环的两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。
- [0067] 术语“杂芳基”指包含1至4个杂原子、5至14个环原子的杂芳族体系,其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为5至10元,更优选为5元或6元,例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环基或环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环。杂芳基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基。
- [0068] 术语“亚杂芳基”指包含1至4个杂原子、5至14个环原子的杂芳族多环,并从母体芳环的两个不同的碳原子上除去两个氢原子所衍生的残基。
- [0069] 术语“任选的”或“任选地”:意为随后描述的事件或情况发生或不发生,并且该描述包括所述事件或情况发生的实例以及所述事件或情况没有发生的实例。例如,当基团或结构是“任选被取代的”,所述基团或结构可以被取代,也可以是不被取代的。
- [0070] 术语“药学上可接受的盐”表示指保持本发明偶联物的生物学效应和性能的盐,并且该盐在生物学上或其它方面不是不被期望的。本发明偶联物可以以它们的药学上可接受的盐形式存在,包括酸加成盐和碱加成盐。在本发明中,药学上可接受的无毒的酸加成盐表示本发明中的偶联物与有机或无机酸形成的盐,有机或无机酸包括但不限于盐酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硝酸、

高氯酸、乙酸、草酸、马来酸、富马酸、酒石酸、苯磺酸、甲磺酸、水杨酸、琥珀酸、柠檬酸、乳酸、丙酸、苯甲酸、对甲苯磺酸、苹果酸等。药学上可接受的无毒的碱加成盐表示本发明中的偶联物与有机或无机碱所形成的盐，包括但不限于碱金属盐，例如锂、钠或钾盐；碱土金属盐，例如钙或镁盐；有机碱盐，例如通过与含N基团的有机碱形成的铵盐。

[0071] 在根据上下文无矛盾的情况下，本文中“药学上可接受的”和“药用”可互换使用。

[0072] 如本文所用，术语“和/或”是指可选项中的任一项或可选项的两项或更多项。

[0073] 如本文所用，术语“包含”或“包括”是指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组合的情形。

[0074] 术语“施用”通常是指向受试者(例如，患者)给予一定剂量的化合物或药物组合物的方法。施用可通过任何合适的方式进行，包括肠胃外、肺内和鼻内，以及(如果局部治疗需要)损伤内施用。胃肠外输注包括例如肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。

[0075] 在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下0.5%–10%的范围内变动，例如在指定数值以上或以下0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或10%的范围内变动。如无特别说明，本申请所提及的数值均视作经过“约”的修饰。如果有疑问，或者对于特定值或参数的误差范围没有被该领域承认的通常理解，则“约”意味着该值或参数的 $\pm 5\%$ 。

[0076] 术语“有效量”指本发明的抗体或片段或组合物或组合的这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。根据预期效果，可以包括“治疗有效量”和“预防有效量”。

[0077] “治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或抗体片段或组合物或组合的

任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量将小于治疗有效量。

- [0078] “个体”或“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于，家养动物(例如，牛，羊，猫，狗和马)，灵长类动物(例如，人和非人灵长类动物如猴)，兔，以及啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠)。在一些实施方案中，个体或受试者是人。
- [0079] 术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。
- [0080] 术语“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。“肿瘤”涵盖实体瘤和血液肿瘤以及转移性病灶术语“癌症”、“癌性”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。
- [0081] 术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。
- [0082] 术语“药物组合物”指这样的组合物，其以允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。
- [0083] 用于本文时，“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。
- [0084] 发明详述
- [0085] 提高蛋白-药物偶联物制剂的稳定性
- [0086] 第一方面，本申请提供了抗原结合分子在提高蛋白-药物偶联物制剂的稳定性中的用途。所述稳定性包括但不限于构象稳定性、胶体稳定性、高温稳定性、冻融稳定性、振摇稳定性、光照稳定性和长期储存稳定性等。
- [0087] 在一些实施方案中，所述制剂为固体制剂，优选为冻干制剂。
- [0088] 在一些实施方案中，所述制剂为液体制剂，优选为溶液剂，更优选为注射剂，例如皮下注射液、静脉注射液。

- [0089] 在一些实施方案中，所述抗原结合分子能够降低制剂中不溶性微粒的生成量。
- [0090] 在一些实施方案中，所述抗原结合分子能够降低制剂中聚体的生成量。
- [0091] 在一些实施方案中，所述抗原结合分子为程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子。
- [0092] 在一些实施方案中，本发明的PD-L1结合分子来自WO2017020801,所述专利以其整体并入本文。
- [0093] 在一些实施方案中，本发明的PD-L1结合分子包含WO2017020801中公开的VHH的CDR1、CDR2和CDR3，或包含其中公开的VHH，或包含其中公开的重链抗体，或由其组成。
- [0094] 在一些实施方案中，所述PD-L1结合分子包含免疫球蛋白单一可变结构域或由其组成，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含SEQ ID NO: 1所示VHH中的CDR1、CDR2和CDR3。所述CDR可以是Kabat CDR、AbM CDR、Chothia CDR或IMGT CDR。
- [0095] 在一些实施方案中，SEQ ID NO: 1所示VHH中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO: 5-7(Kabat)，SEQ ID NO: 8-10(AbM)，SEQ ID NO: 11-13(Chothia)和SEQ ID NO: 14-16(IMGT)。
- [0096] 在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列或与其具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。优选地，所述免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示。
- [0097] 在一些实施方案中，所述PD-L1结合分子是PD-L1重链抗体，其包含VHH，以及抗体的恒定区或其一部分例如Fc区，例如其为包含VHH-恒定区或VHH-CH1-Fc或VHH-Fc的重链抗体。
- [0098] 优选地，所述免疫球蛋白Fc区为人免疫球蛋白Fc区，例如人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4的Fc区，或它们的变体。
- [0099] 在一些具体的事实方案中，所述免疫球蛋白Fc区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3所示。
- [0100] 在一些实施方案中，所述VHH可以位于免疫球蛋白Fc区的N端，也可以位于免疫球蛋白Fc区的C端；两者直接相连，或通过肽接头相连。

- [0101] 在一些实施方案中, 前述肽链选自下述氨基酸序列中的一种或多种: $(GS)_n$ 、 $(GG)_n$ 、 $(GGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 、 $(GGSG)_n$ 、 $(GGGGS)_n$ 和 $(GAP)_n$, 其中 n 为1至10的整数。
- [0102] 在一些实施方案中, 所述PD-L1结合分子包含如SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列; 优选地, 所述PD-L1结合分子的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。
- [0103] 在一个实施方案中, 根据本发明的PD-L1重链抗体可以通过Fc区, 与包含Fc区的另一多肽链(例如相同或不同的另一重链抗体)二聚化。因此, 在一个实施方案中, 本发明也提供了包含本发明PD-L1重链抗体的同源或异源多聚体蛋白质。在一个优选的实施方案中, 优选所述蛋白包括两条相同PD-L1重链抗体链配对形成的PD-L1重链抗体。
- [0104] 在一些实施方案中, 所述蛋白-药物偶联物具有式I的结构:
$$P-(L-D)_n \text{ (I)},$$
- [0105] 其中, P为蛋白质, L为连接单元, D为具有生物学活性的物质; n 为1至20的整数。
- [0106] 在一些实施方案中, 所述蛋白质P具有期望的生理学特性, 优选地, 所述蛋白质P能够预防和/或治疗疾病或病症。具体地, 蛋白质P可以为抗体、融合蛋白、细胞因子、多肽等。
- [0107] 在一些实施方案中, 所述蛋白质P为抗体; 所述抗体靶向以下一种或多种的抗原: 4-1BB、4-1BBL、A33、腺苷A2a受体、Akt、ALK、雄激素受体、Ang-1、Ang-2、Annexin A3、Aurora A、Aurora B、B7-H3、B7-H4、Bcl-2、Bcr-Ab1、BRAF、BTK、BTLA、BTN2A1、CA-125、CAIX、CCR4、CD105/endoglin、CD109、CD123、CD155、CD16、CD160、CD19、CD20、CD200、CD200R、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD36、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD47、CD48、CD52、CD70、CD79b、CD80、CD86、CD96、CDK4、CDK6、CDK9、CEA、CEACAM1、ChK1、ChK2、c-KIT、c-Met、COX2、CSF-1R、CSF2、CTLA-4、CXCR2、CXCR4、DDR2、DLL3、DLL4、DNAM-1、DR5、EGFR、EpCAM、EPHA3、EphB4、ERK1、ERK2/p38MAPK、FAK、FAP、FGF-2、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、Flt-3、Gal-9、GITR、GITRL、Glypican-3、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDA

C4、HDAC5、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HER2、HER3、HER4/ERBB4、HGF、HLA2、HIF-1 α 、HSP27、HSP90、HVEM、ICOS、ICOS Ligand、IDO、IGF1R、IL-13、IL-6、JAK1、JAK2、JAK3、KRAS、LAG-3、LIGHT、MDM2、MEK1、MEK2、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-13、MMP-2、MMP-7、MMP-9、mTOR、Mucin 1、Myc、NF- κ B、NKG2A、NRAS、NTRK1、NTRK2、NTRK3、OX40、OX40L、p53、PAF、PARP1、PARP2、PD1、PDGFR- α 、PDGFR- β 、PD-L1、PD-L2、PI3K α 、PI3K β 、PI3K γ 、PI3K δ 、PIM1、PIM3、PSMA、PTEN、RAF-1、RANKL、RET、S100A4、SIRP α 、SLAMF7、SMO、Src、STAT3、STEAP-1、SYK、TDO、TGF β 、Tie-2、TIGIT、TIM-3、TLR8、TMIGD2、TNF- α 、Toll-like receptor 3、TRAIL、TRAILR1、TROP-2、VEGF、VEGF-C、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3和VISTA。

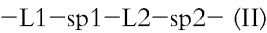
- [0108] 在一些实施方案中，所述抗体可以靶向HER2；优选地，所述抗体可以结合人HER2的不同表位，例如人HER2的胞外结构域II，和/或人HER2的胞外结构域IV；
- [0109] 在一些实施方案中，所述抗体为靶向HER2不同表位的双特异性抗体。在一些实施方案中，所述抗体可以特异性结合人HER2的胞外结构域II以及胞外结构域IV。
- [0110] 在一些实施方案中，所述双特异性抗体来源于WO2016110267，所述专利申请以其整体并入本文。
- [0111] 在一些实施方案中，所述双特异性抗体包含WO2016110267中所示的双特异性结构。
- [0112] 在一些实施方案中，所述双特异性抗体包含WO2016110267所述的双特异性抗体的第一重链的1-6个CDR、第二重链的1-6个CDR以及共同轻链的1-6个CDR。
- [0113] 在一些实施方案中，所述双特异性抗体包含WO2016110267所述的双特异性抗体的第一重链的重链可变区和/或轻链可变区、第二重链的重链可变区和/或轻链可变区以及共同轻链的重链可变区和/或轻链可变区。

- [0114] 在一些实施方案中，所述双特异性抗体包含WO2016110267所述的双特异性抗体的第一重链、第二重链以及共同轻链。
- [0115] 在一些实施方案中，所述抗体的结构如全长抗体，但是两条重链不同，即其具有第一重链、第二重链和两条共同的轻链。在一些实施方案中，第一重链包含第一重链可变区，第二重链包含第二重链可变区，和/或共同轻链包含共同轻链可变区。
- [0116] 在一些实施方案中，所述抗体具有第一重链、第二重链以及共同的轻链，其中，第一重链包含SEQ ID NO: 17所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3，第二重链包含SEQ ID NO: 18所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3，共同的轻链包含SEQ ID NO: 19所示轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3。所述CDR可以是Kabat CDR、AbM CDR、Chothia CDR或IMGT CDR。
- [0117] 在一些实施方案中，SEQ ID NO: 17所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO: 23-25(Kabat)，SEQ ID NO: 26-28(AbM)，SEQ ID NO: 29-31(Chothia)和SEQ ID NO: 32-34(IMGT)。
- [0118] 在一些实施方案中，SEQ ID NO: 18所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO: 35-37(Kabat)，SEQ ID NO: 38-40(AbM)，SEQ ID NO: 41-43(Chothia)和SEQ ID NO: 44-46(IMGT)。
- [0119] 在一些实施方案中，SEQ ID NO: 19所示轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO: 47-49(Kabat)，SEQ ID NO: 50-52(AbM)，SEQ ID NO: 53-55(Chothia)和SEQ ID NO: 56-58(IMGT)。
- [0120] 在一些实施方案中第一重链可变区包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，或与其具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。
- [0121] 在一些实施方案中，第二重链可变区包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列，或与其具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

- [0122] 在一些实施方案中，共同轻链可变区包含SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列，或与其具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。
- [0123] 在一些实施方案中，所述抗体包含第一重链、第二重链和两条共同的轻链，其中第一重链包含第一重链可变区，第二重链包含第二重链可变区，且共同轻链分别包含轻链可变区，其中
- [0124] 第一重链可变区包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列或由其组成；
- [0125] 第一重链可变区包含SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列或由其组成；且
- [0126] 轻链可变区包含SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0127] 在一些实施方案中，所述抗体的第一重链的氨基酸序列包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列，或与其具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。。
- [0128] 在一些实施方案中，所述抗体的第二重链的氨基酸序列包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列，或与其具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。
- [0129] 在一些实施方案中，所述抗体的共同的轻链的氨基酸序列包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列，或与其具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。
- [0130] 在一些实施方案中，所述抗体包含第一重链、第二重链和两条共同的轻链，其中
- [0131] 第一重链可变区包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列或由其组成；
- [0132] 第一重链可变区包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列或由其组成；且
- [0133] 轻链可变区包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0134] 在一些实施方案中，式I中的连接单元L具有式II所示的结构：
- L1-sp1-L2-sp2- (II)

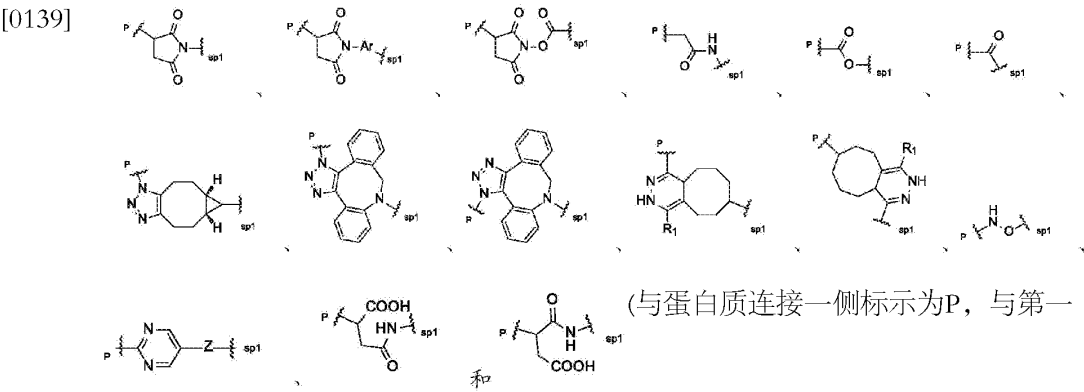
[0135] 其中，L1是用于与P连接的接头，sp1为第一间隔单元，L2为可切割的连接子，sp2为第二间隔单元且与D相连。

[0136] 在一些实施方案中，式I中的连接单元L具有式II所示的结构：



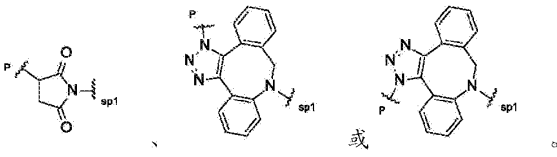
[0137] 其中，L1是用于与P连接的接头，sp1为第一间隔单元，L2不存在，sp2为第二间隔单元且与D相连。

[0138] 在一些实施方案中，式II中L1选自：



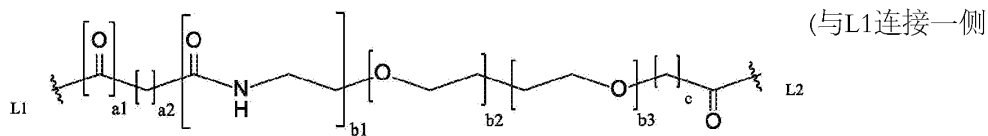
[0140] 其中，Ar代表C₆₋₁₀的亚芳基，其任选地被卤素、C₁₋₆烷基取代；R₁选自氢、卤素及C₁₋₆烷基；Z选自直键、C₂₋₆亚炔基、C₂₋₆亚烯基、C₆₋₁₀亚芳基、5-10元亚杂芳基、酰胺基、磺酰胺基、亚胺基和CF₂。

[0141] 在一些实施方案中，L1为



[0142] 在一些实施方案中，式II中第一间隔单元sp1的结构为：

[0143]



标示为L1，与L2连接一侧标示为L2)，其中， $a_1=0$ 或1， $a_2=0$ 至6的整数， $b_1=0$ 或1， $b_2=0$ 至16的整数， $b_3=0$ 至16的整数， $c=0$ 至6的整数，且 b_2 与 b_3 至少有一个为0。

- [0144] 在一些实施方案中，sp1的结构中， $a_1=1$ ；在另一些实施方案中， $a_1=0$ 。
- [0145] 在一些实施方案中， $a_2=0$ 、1、2、3、4、5或者6。
- [0146] 在一些实施方案中， $b_1=0$ 或1。
- [0147] 在一些实施方案中， $b_2=0$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或者16。
- [0148] 在一些实施方案中， $b_3=0$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或者16。
- [0149] 在一些实施方案中， $c=0$ 、1、2、3、4、5或者6。
- [0150] 以上 a_1 、 a_2 、 b_1 、 b_2 、 b_3 和 c 的可选方案之间能够进行任意的组合，前提是 b_2 与 b_3 至少有一个为0。
- [0151] 在一些具体的实施方案中，sp1的结构选自以下的组：
- [0152] (1) $a_1=0$ ， $a_2=2$ 、3、4、5或6， $b_1=0$ ， $b_2=0$ ， $b_3=0$ ， $c=0$ ；
- [0153] (2) $a_1=0$ ， $a_2=0$ ， $b_1=0$ ， $b_2=0$ ， $b_3=0$ ， $c=2$ 、3、4、5或6；
- [0154] (3) $a_1=1$ ， $a_2=2$ 、3、4、5或6， $b_1=1$ ， $b_2=2$ 、3、4、5、6、7或8， $b_3=0$ ， $c=0$ ；
- [0155] (4) $a_1=0$ ， $a_2=2$ 、3、4、5或6， $b_1=1$ ， $b_2=2$ 、3、4、5、6、7或8， $b_3=0$ ， $c=0$ ；和
- [0156] (5) $a_1=1$ ， $a_2=0$ ， $b_1=0$ ， $b_2=0$ ， $b_3=2$ 、3、4、5、6、7或8， $c=2$ 、3、4、5或6；
- [0157] 在一些实施方案中，式II中所述可切割的连接子L2为二肽、三肽或四肽残基。
- [0158] 在一些实施方案中，L2选自以下的二肽残基：-Phe-Lys-、-Val-Ala-、-Val-Lys-、-Val-Cit-、-Ala-Lys-、-Phe-Cit-、-Leu-Cit-、-Ile-Cit-、-Phe-A

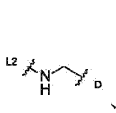
rg-、-Trp-Cit-、-Gly-Gly-、-Ala-Ala-、-Gly-Val-和-Gly-Glu-；所述二肽残基的左侧与sp1连接，右侧与sp2连接。优选地，L2选自-Val-Ala-、-Val-Lys-和-Val-Cit-。

[0159] 在一些实施方案中，L2选自以下的三肽残基：-Glu-Val-Ala-、-Glu-Val-Cit-、-α Glu-Val-Ala-、-α Glu-Val-Cit-、-Val-Lys-Gly和-Val-Cit-Gly-；所述三肽残基的左侧与sp1连接，右侧与sp2连接。

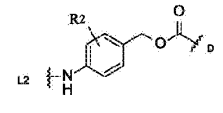
[0160] 在一些实施方案中，L2选自以下的四肽残基：-Gly-Gly-Phe-Gly-和-Gly-Phe-Gly-Gly-；所述四肽残基的左侧与sp1连接，右侧与sp2连接。

[0161] 在一些实施方案中，式II中的sp2不存在，或sp2选自：

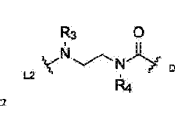
[0162]



、



和

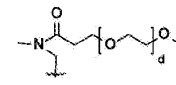


(与L2连接一侧标示为L2，与具有生物学活性的物质D连接一侧标示为D)，其中，

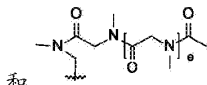
[0163] R₂独立地选自氢、C₁₋₆烷基、羟基、氨基、卤素、硝基、氰基、



、



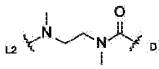
和



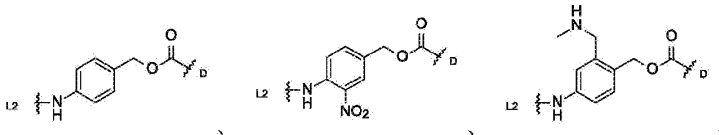
d为1至20的整数，e为1至20的整数；R₃、R₄各自独立地选自氢和C₁₋₆烷基；

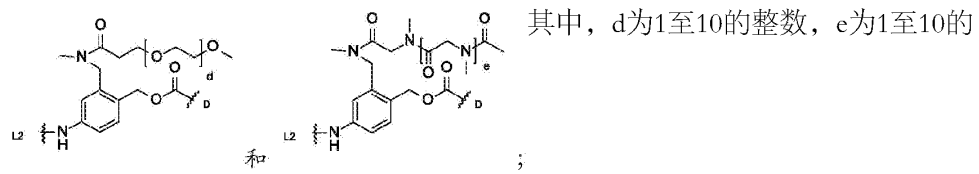
[0164] 所述烷基可任选地被羟基、氨基、卤素、硝基和氰基取代。

[0165] 在一些实施方案中，sp2为

[0166] 在一些实施方案中，sp2为

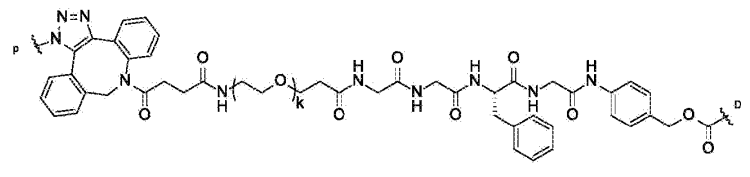
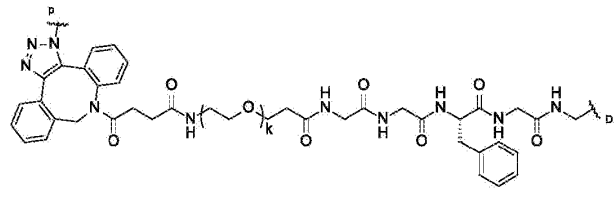
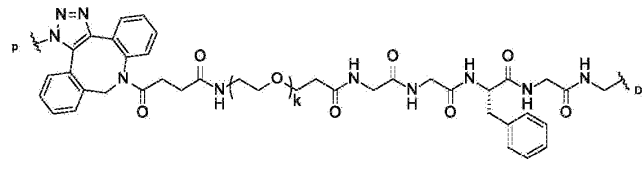
[0167] 在一些实施方案中，sp2选自：

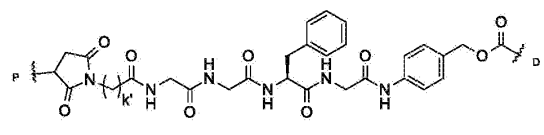
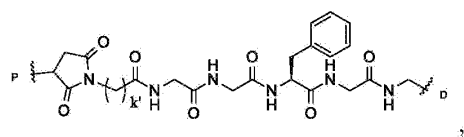
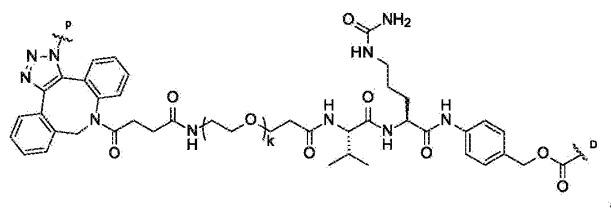
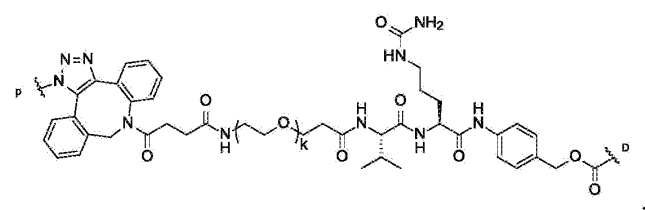
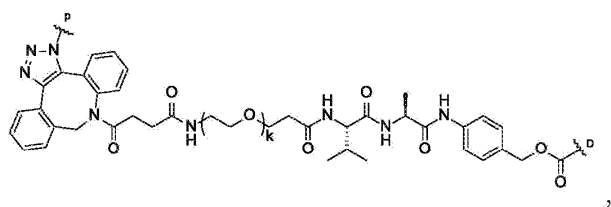
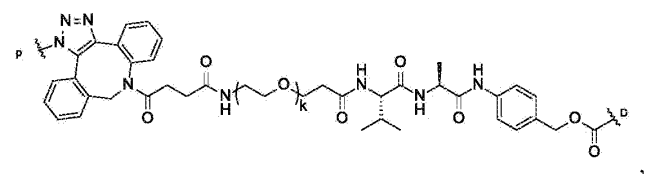
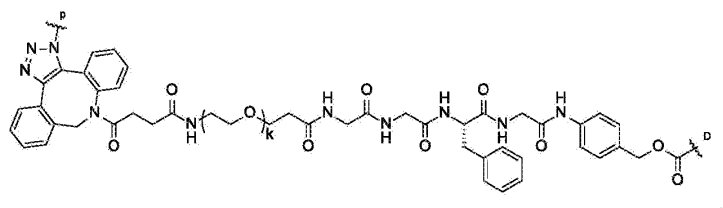


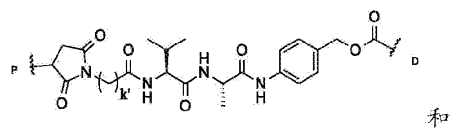


整数。

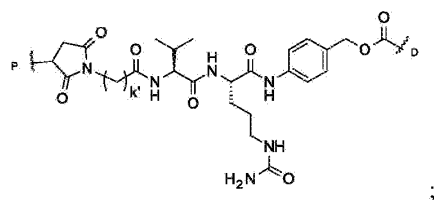
[0168] 在一些实施方案中，连接单元L可以选自以下结构：







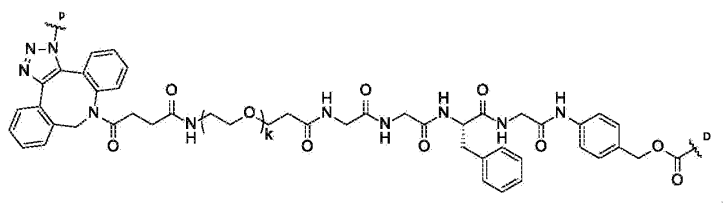
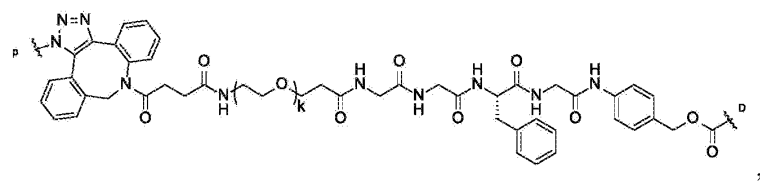
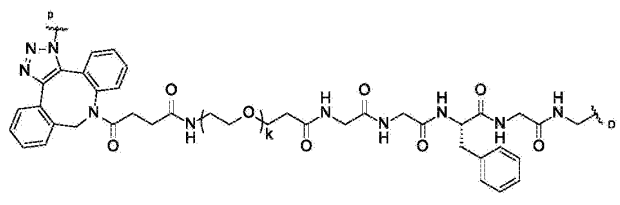
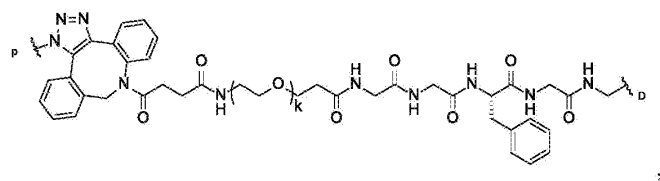
[0169] k 、 k' 各自独立地为1~20的整数，例如

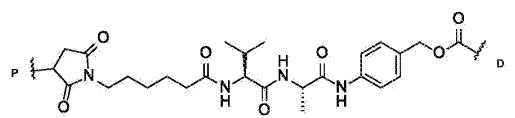
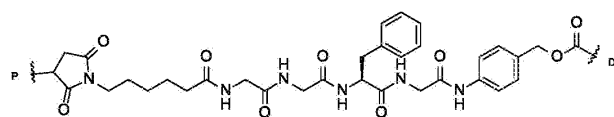
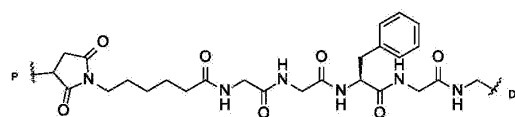
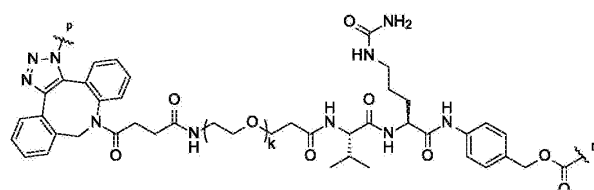
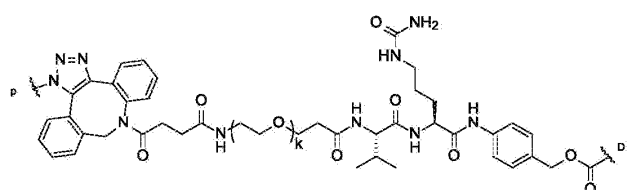
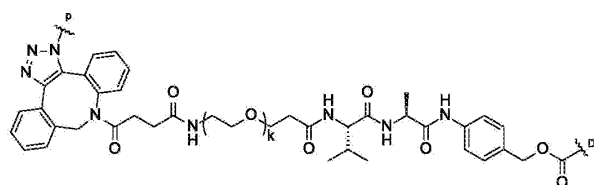
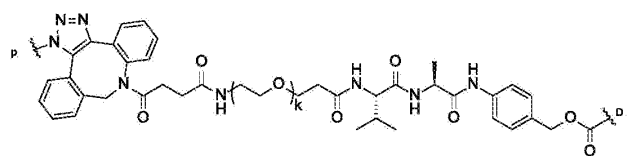


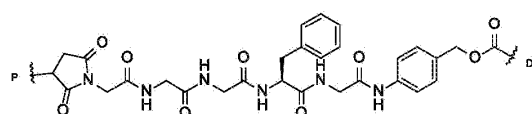
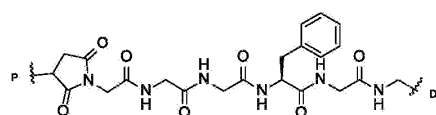
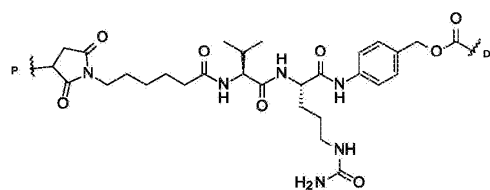
2、3、4、5、6、7、8、9或10(与蛋白质P连接一侧标示为P，与具有生物学活性的物质D连接一侧标示为D)。

[0170] 在一些实施方案中， $k=2$ 、4或8。在一些实施方案中， $k'=1$ 、2、3、4、5或6。

[0171] 在一些实施方案中，连接单元L可以选自以下结构：

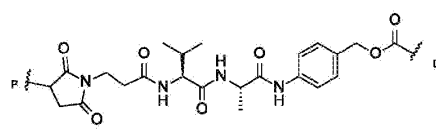






和

[0172]



k为1~20的整数,例如2、3、4、5、6、

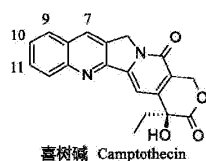
7、8、9或10(与蛋白质P连接一侧标示为P,与具有生物学活性的物质D连接一侧标示为D)。在一些实施方案中,k=2、4或8。

[0173] 对于式I中具有生物学活性的物质D,可以选自细胞毒素、蛋白激酶抑制剂、免疫激动剂、糖皮质激素、寡核苷酸、放射性同位素、多肽及其任意组合。

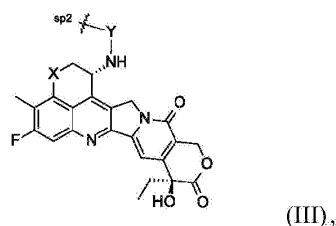
[0174] 在一些实施方案中,D为细胞毒素,其选自:DNA烷化剂、DNA解构剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、微管抑制剂、核糖体抑制剂及其任意组合。

[0175] 在一些具体的实施方案中,D选自:奥瑞他汀(Auristatin)衍生物、美登素(Maitansine)衍生物、艾日布林(Eribulin)衍生物、微管菌素(tubulysin)衍生物、吡咯苯二氮卓二聚体(Pyrrolobenzodiazepine,PDB)衍生物、杜卡霉素(Duocarmycin)衍生物、卡奇霉素(Calicheamicin)衍生物、PNU-159682及其衍生物、喜树碱(Camptothecin)衍生物、鹅膏毒素(Amatotoxin)衍生物及其任意组合。

[0176] 在一些实施方案中,D选自喜树碱衍生物,所述喜树碱衍生物指具有与天然来源喜树碱相同的5元骈合母核结构,并且在其7位、9位、10位和11位具有取代修饰的化合物,其具有与天然喜树碱同等或更强的拓扑异构酶I抑制活性。

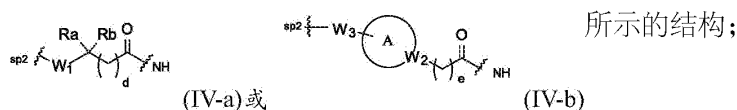


[0177] 在一些实施方案中，D具有式III所示的结构：



[0178] 其中，X选自CH₂、NH、O、S或SO₂；

[0179] Y不存在，或Y具有



[0180] 其中W₁、W₃各自独立地选自O、S和NH，W₂选自C、CH和N，

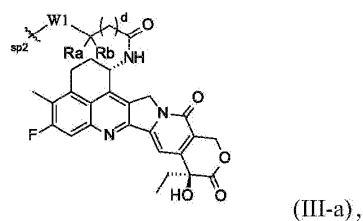
[0181] R_a、R_b各自独立地选自氢、氘、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₃₋₆环烷基、3-6元杂环烷基、羟基、氨基、氰基和硝基；或者，R_a和R_b与其相连接的碳原子一起形成3-6元环烷基、3-6元杂环烷基或羰基；或者，R_a与酰胺部分的N原子相连形成3-6元杂环烷基并且R_b为氢；

[0182] 环A选自以下的组：5-10元亚环烷基、5-10元亚杂环烷基、6-10元亚芳基和5-10元亚杂芳基；

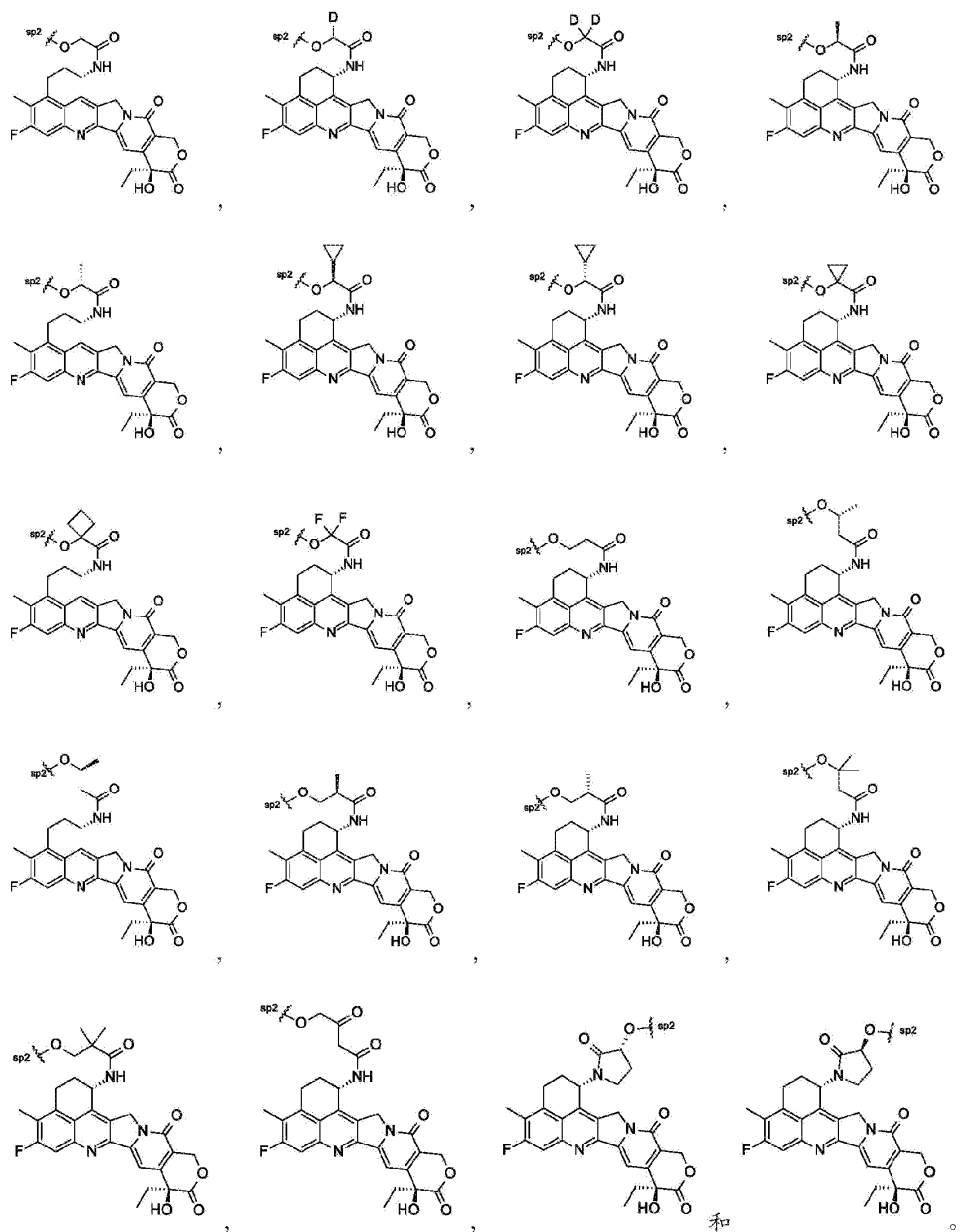
[0183] 所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基和亚杂芳基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代；

[0184] d、e各自独立地选自0至5的整数。

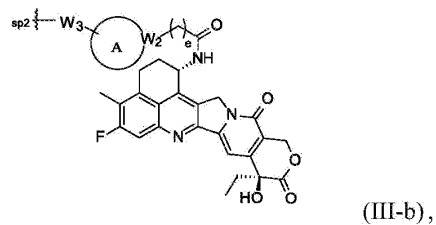
[0185] 在一些实施方案中，D具有式III-a所示的结构：



- [0186] 其中 W_1 为O或NH;
- [0187] R_a 、 R_b 各自独立地选自氢、氘、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 环烷基、3-6元杂环烷基、羟基、氨基、氰基和硝基;或者, R_a 和 R_b 与其相连接的碳原子一起形成3-6元环烷基、3-6元杂环烷基或羰基;或者, R_a 与酰胺部分的N原子相连形成3-6元杂环烷基并且 R_b 为氢;
- [0188] 所述烷基、烷氧基、环烷基和杂环烷基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基和硝基的基团取代;
- [0189] d 为0至5的整数。
- [0190] 在一些实施方案中, W_1 为O。
- [0191] 在一些实施方案中, d 为0、1或2。
- [0192] 在一些实施方案中,其中 R_a 选自氢、氘、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 环烷基、3-6元杂环烷基、羟基和氨基, R_b 为氢。所述烷基、烷氧基、环烷基和杂环烷基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基和硝基的基团取代。
- [0193] 在一些实施方案中,其中 R_a 和 R_b 与其相连接的碳原子一起形成3-6元环烷基或3-6元杂环烷基。所述环烷基和杂环烷基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基和硝基的基团取代。在一些实施方案中, D 可以选自以下的组:



[0194] 在另一些实施方案中，D具有式III-b所示的结构：



[0195] 其中 W_3 为O或NH, W_2 为C、CH或N,

[0196] 环A选自以下的组: 5-10元亚环烷基、5-10元亚杂环烷基、6-10元亚芳基和5-10元亚杂芳基;

[0197] 所述亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基和亚杂芳基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代;

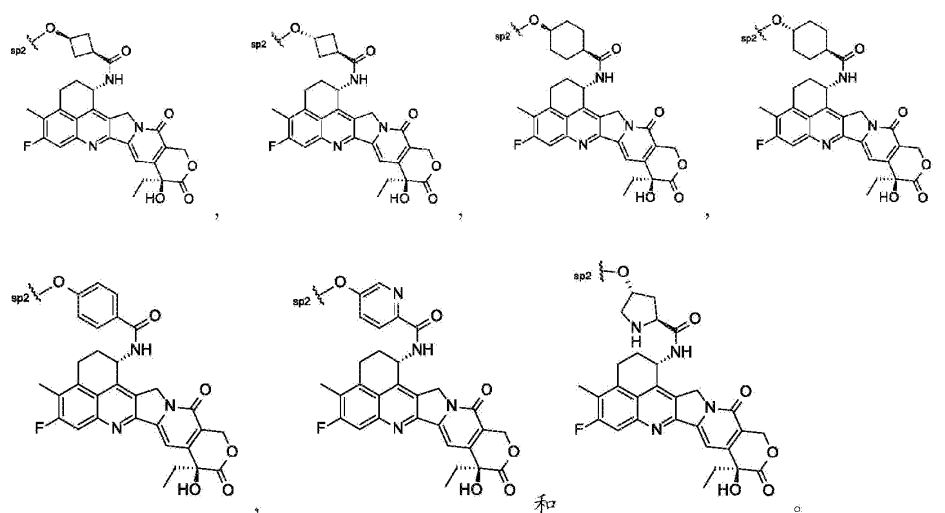
[0198] e 为0至5的整数。

[0199] 在一些实施方案中, W_3 为O; 在另一些实施方案中, W_2 为CH。

[0200] 在一些实施方案中, e 为0、1或2。

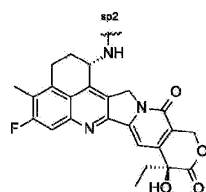
[0201] 在一些实施方案中, 环A为5-10元亚环烷基。所述亚环烷基可进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代。

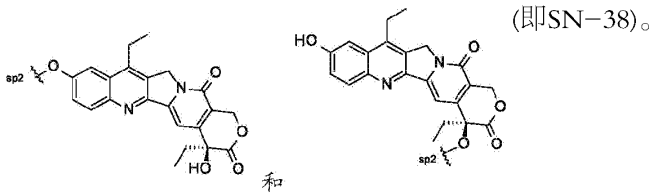
[0202] 在一些实施方案中, D可以选自以下的组:



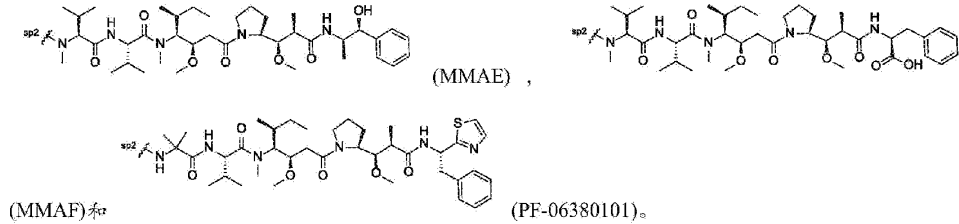
[0203] 在一些实施方案中, D作为喜树碱衍生物, 还可以选自以下的结构:

[0204] (即依喜替康, Exatecan),

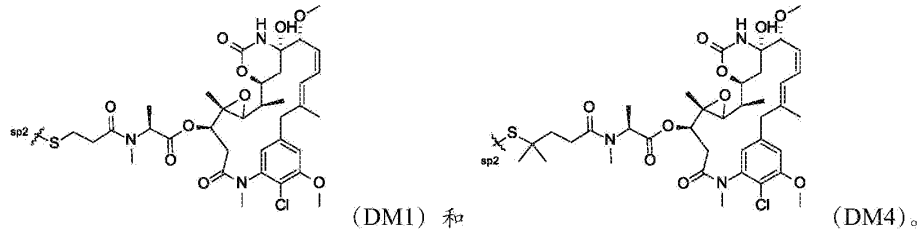




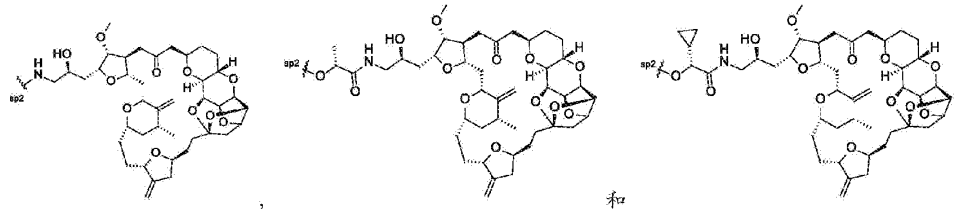
[0205] 在一些实施方案中，D可以为奥瑞他汀衍生物，优选选自以下的结构：



[0206] 在一些实施方案中，D可以为美登素衍生物，优选选自以下的结构：



[0207] 在一些实施方案中，D为艾日布林及其衍生物，优选选自以下的结构：



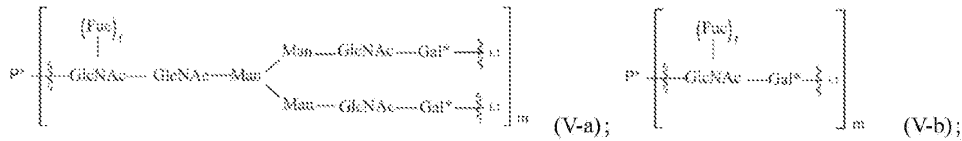
[0208] 在一些实施方案中，在式I中，连接单元L与抗体之间通过巯基连接；优选地，所述巯基来源于抗体；更优选地，所述巯基通过还原重链与重链之间的二硫键，和/或重链与轻链之间的二硫键得到。

[0209] 在另一些实施方案中，连接单元L与抗体之间通过寡糖连接；优选地，所述寡糖衍生自抗体的天然糖链。

[0210] 在一些实施方案中，所述寡糖衍生自抗体的N-糖链。

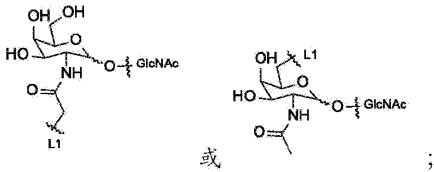
[0211] 在一些实施方案中，所述寡糖由2~15个单糖组成；优选地，所述寡糖由2~10个单糖组成。

[0212] 在一些实施方案中，所述寡糖具有式V-a或式V-b所示结构：



[0213] 其中，P*为抗体，GlcNAc为N-乙酰葡萄糖胺，Fuc为岩藻糖，Man为甘露糖，f为0或1，m为1至20；

[0214] Gal*为经修饰的半乳糖，选自以下的结构：

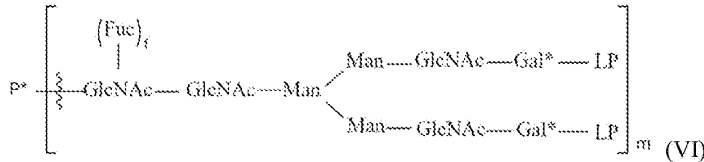


[0215] 所述寡糖通过核心GlcNAc与抗体连接。

[0216] 在一些实施方案中，经修饰的半乳糖通过β-1,4-糖苷键与GlcNAc连接。

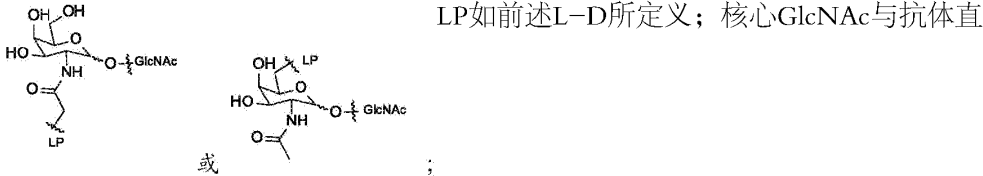
[0217] 在一些实施方案中，所述寡糖与抗体的Fc片段连接；优选与Fc片段的CH2结构域连接；更优选与Fc片段的Asn297(根据Kabat的EU索引编号)连接。

[0218] 在一些具体的实施方案中，本申请所述的蛋白-药物偶联物具有式VI所示的结构：



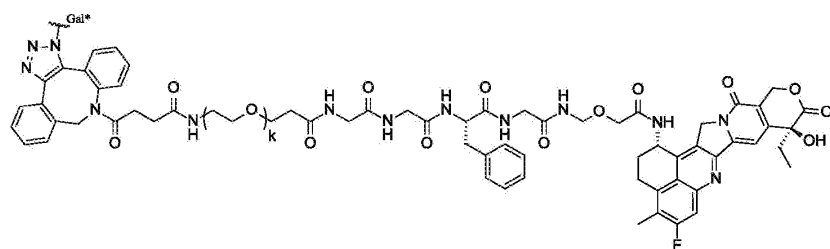
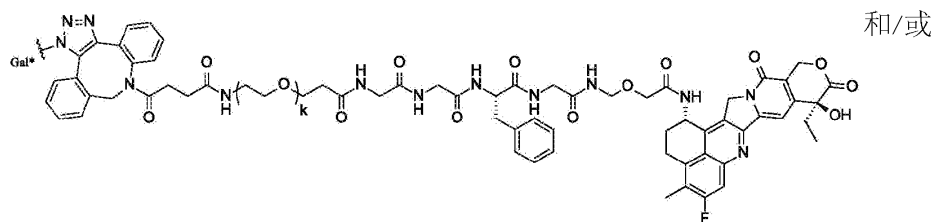
[0219] 其中，P*为抗体(所述抗体可如前所定义)，GlcNAc为N-乙酰葡萄糖胺，Fuc为岩藻糖，Man为甘露糖，f为0或1，m为1至10；

[0220] Gal*为经修饰的半乳糖，选自以下的结构：



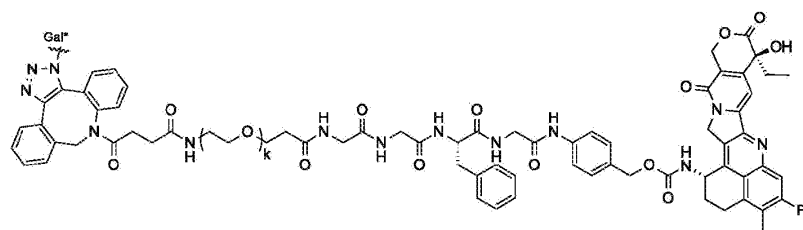
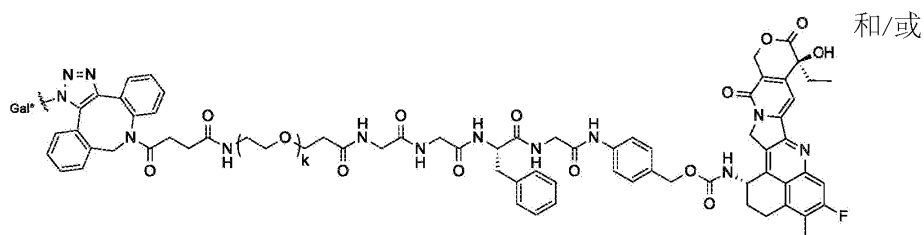
[0221] 在一些实施方案中，LP选自以下结构(a)至(g)之一：

[0222] (a)



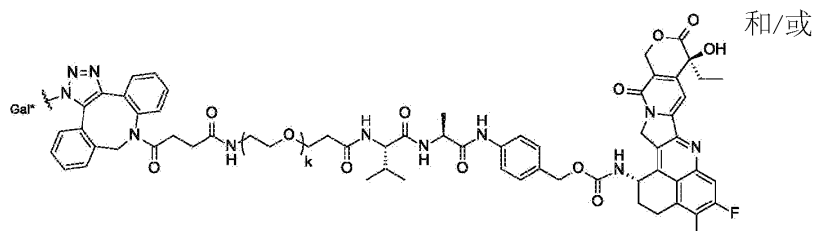
;

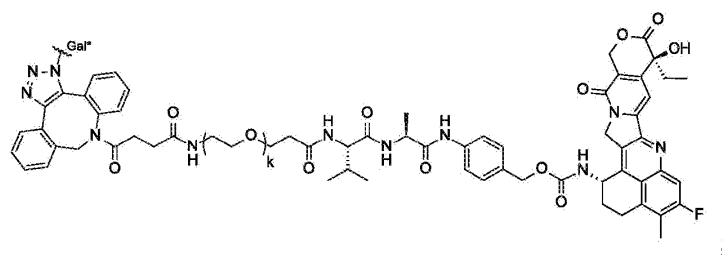
[0223] (b)



;

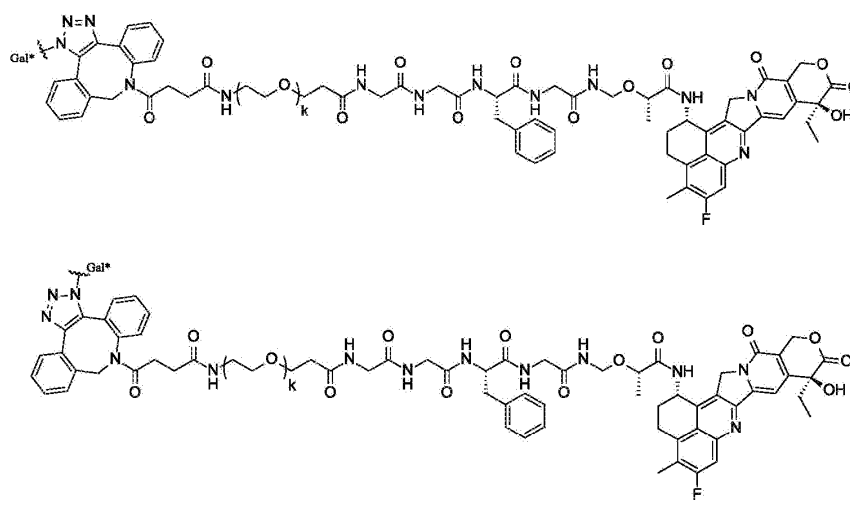
[0224] (c)





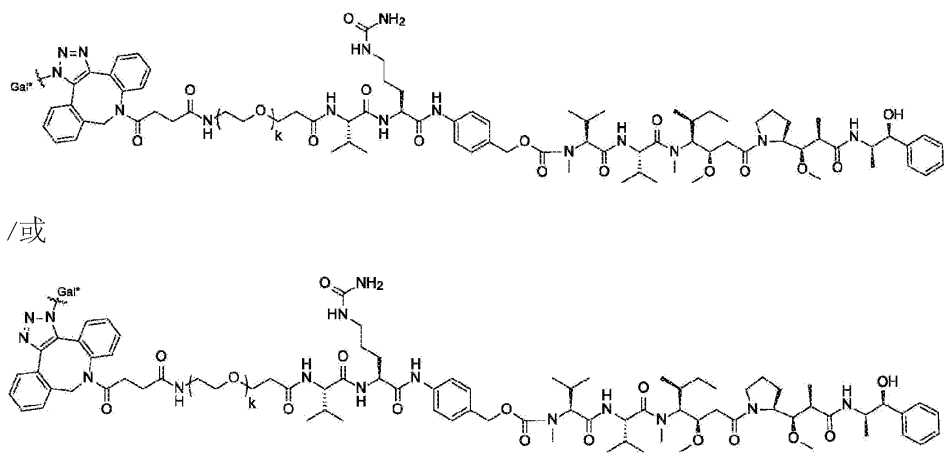
[0225] (d)

和/或

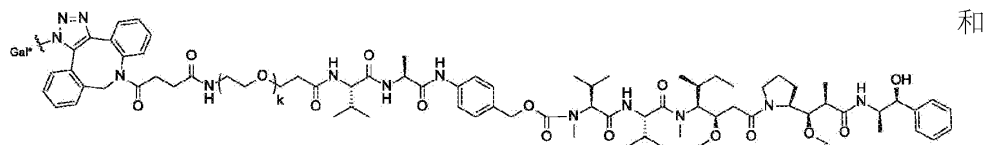


[0226] (e)

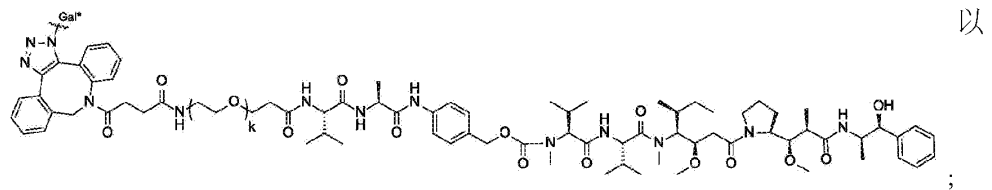
和



[0227] (f)

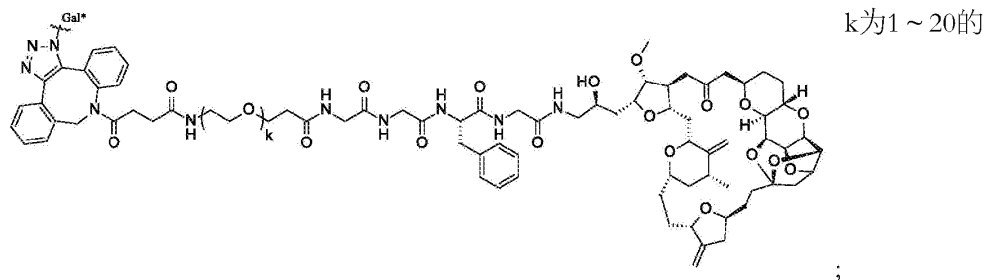
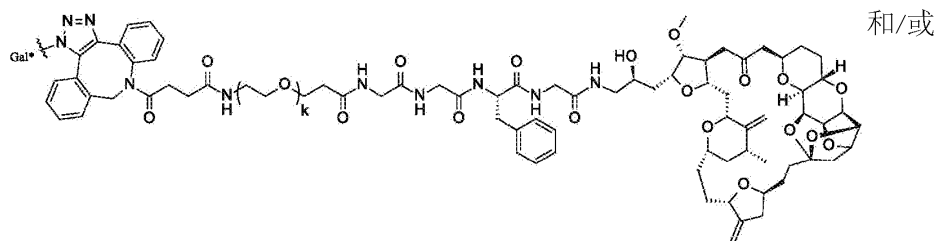


/或



及

[0228] (g)



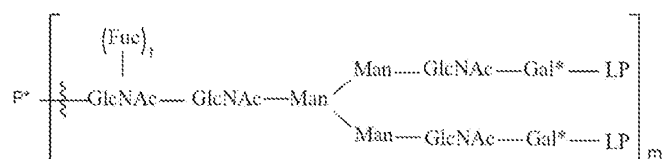
整数，例如2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0229] 在一些实施方案中，m为1至4；在一些实施方案中，偶联物整体的DAR值为1至8。

[0230] 在一些实施方案中，所述抗体包含如SEQ ID NO：20所示氨基酸序列的第一重链，如SEQ ID NO：21所示氨基酸序列的第二重链，以及如SEQ ID NO：22所示氨基酸序列的共同轻链。

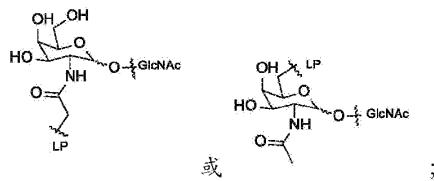
[0231] 组合物

- [0232] 第二方面，本申请还提供了一种组合物，包含抗原结合分子以及蛋白-药物偶联物。
- [0233] 在一些实施方案中，所述组合物为固体制剂，优选为冻干制剂。
- [0234] 在一些实施方案中，所述组合物为液体制剂，优选为溶液剂，更优选为注射剂，例如皮下注射液、静脉注射液。
- [0235] 组合物中有关抗原结合分子以及蛋白-药物偶联物的限定，可以参照第一方面所记载的技术特征。并且，可以做进一步如下的限定：
- [0236] 在一些实施方案中，所述抗原结合分子包含结合PD-L1的VHH，所述结合PD-L1的VHH包含SEQ ID NO：1所示氨基酸序列。
- [0237] 在一些实施方案中，所述PD-L1结合分子是包含免疫球蛋白Fc区的重链抗体。
- [0238] 在一些实施方案中，所述免疫球蛋白Fc区为人免疫球蛋白Fc区，优选人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4的Fc区，或它们的变体。
- [0239] 在一些实施方案中，所述免疫球蛋白Fc区的氨基酸序列为SEQ ID NO：2或SEQ ID NO：3。
- [0240] 在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域(例如VHH)位于免疫球蛋白Fc区的N端，两者直接相连，或通过肽链相连，所述肽链选自下述氨基酸序列中的一种或多种： $(GS)_n$ 、 $(GG)_n$ 、 $(GGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 、 $(GGSG)_n$ 、 $(GGGGS)_n$ 和 $(GAP)_n$ ，其中n为1至10的整数。
- [0241] 在一些实施方案中，所述PD-L1结合分子的氨基酸序列为SEQ ID NO：4。
- [0242] 在一些实施方案中，所述蛋白-药物偶联物具有如下的结构：

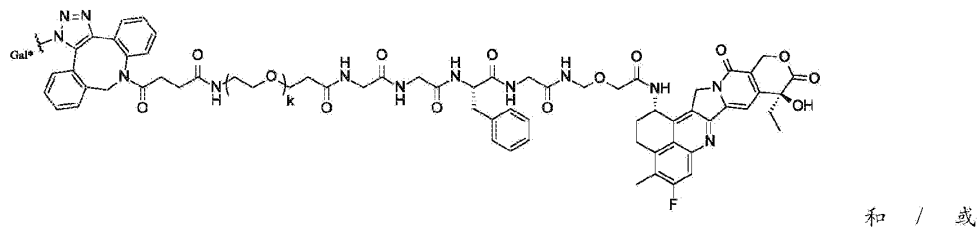


- [0243] 其中，P*为抗体(所述抗体可如前所定义)，GlcNAc为N-乙酰葡萄糖胺，Fuc为岩藻糖，Man为甘露糖，f为0或1，m为1至10；

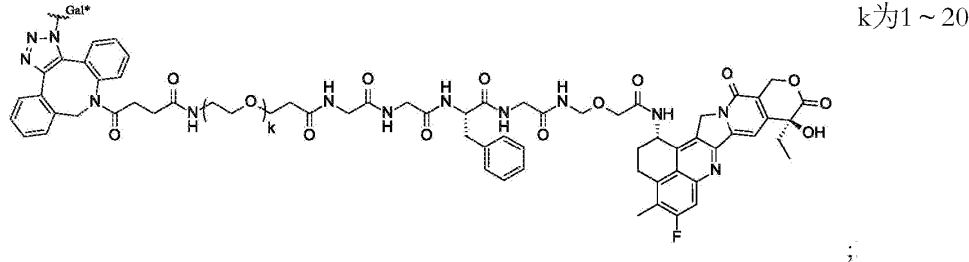
[0244] Gal★为经修饰的半乳糖，选自以下的结构：



[0245] LP为：



[0246]



的整数，例如2、3、4、5、6、7、8、9或10；

- [0247] 其中核心GlcNAc与抗体直接连接。
- [0248] 在一些实施方案中，k=2、4或8。
- [0249] 在一些实施方案中，所述经修饰的半乳糖通过β-1,4-糖苷键与GlcNAc连接。
- [0250] 在一些实施方案中，其中核心GlcNAc与抗体的Fc片段连接；优选与Fc片段的C H2结构域连接；更优选与Fc片段的Asn297(根据Kabat的EU索引编号)连接。
- [0251] 在一些实施方案中，所述抗体为靶向HER2不同表位的双特异性抗体。
- [0252] 在一些实施方案中，所述抗体具有第一重链、第二重链以及共同的轻链，其中，第一重链包含SEQ ID NO：17所示重链可变区，第二重链包含SEQ ID N O：18所示重链可变区，共同的轻链包含SEQ ID NO：19所示轻链可变区。

- [0253] 在一些实施方案中，所述抗体包含如SEQ ID NO：20所示氨基酸序列的第一重链，如SEQ ID NO：21所示氨基酸序列的第二重链，以及如SEQ ID NO：22所示氨基酸序列的共同轻链。
- [0254] 对于组合物中各成分的含量，组合物中所述蛋白-药物偶联物的浓度可以为20mg/mL-150mg/mL，优选为50mg/mL-120mg/mL，更优选为60mg/mL-100mg/mL；具体地，所述蛋白-药物偶联物的浓度可以是20mg/mL、25mg/mL、30mg/mL、35mg/mL、40mg/mL、45mg/mL、50mg/mL、55mg/mL、60mg/mL、65mg/mL、70mg/mL、75mg/mL、80mg/mL、85mg/mL、90mg/mL、95mg/mL、100mg/mL、105mg/mL、110mg/mL、115mg/mL、120mg/mL、125mg/mL、130mg/mL、135mg/mL、140mg/mL、145mg/mL或150mg/mL。
- [0255] 在一些实施方案中，组合物中所述抗原结合蛋白或是PD-L1结合蛋白的浓度为20mg/mL-180mg/mL，优选为50mg/mL-150mg/mL，更优选为80mg/mL-120mg/mL；具体地，所述抗原结合蛋白或是PD-L1结合蛋白的浓度可以是20mg/mL、25mg/mL、30mg/mL、35mg/mL、40mg/mL、45mg/mL、50mg/mL、55mg/mL、60mg/mL、65mg/mL、70mg/mL、75mg/mL、80mg/mL、85mg/mL、90mg/mL、95mg/mL、100mg/mL、105mg/mL、110mg/mL、115mg/mL、120mg/mL、125mg/mL、130mg/mL、135mg/mL、140mg/mL、145mg/mL、150mg/mL、155mg/mL、160mg/mL、165mg/mL、170mg/mL、175mg/mL或180mg/mL。
- [0256] 在一些实施方案中，所述组合物中蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的比例为1:0.5至1:2，优选比例为1:0.75至1:1.75，更优选比例为1:0.8至1:1.5，甚至更优选比例为1:1至1:1.25。
- [0257] 在一些实施方案中，所述组合物的pH为4.0至7.0，优选为4.5至6.5，更优选为5.0至6.0；具体地，所述组合物的pH可以为4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0。
- [0258] 本公开所述组合物的pH可以是将所述蛋白-药物偶联物、PD-L1结合分子与其他组分混合之后所测得的pH值，例如换液后所得组合物的pH值，和/或是组合物混合完毕后的实测pH值。

- [0259] 在一些实施方案中，本发明的组合物中可以包含缓冲成分，所述缓冲成分选自醋酸-醋酸钠、组氨酸-组氨酸盐酸盐、醋酸-组氨酸、磷酸-磷酸钠和柠檬酸-氢氧化钠；优选为醋酸-醋酸钠、组氨酸-组氨酸盐酸盐或醋酸-组氨酸。
- [0260] 在一些实施方案中，所述缓冲成分的浓度为2mM-50mM，优选为5mM-30mM或2mM-20mM，更优选为10mM-20mM或2mM-10mM；具体地，所述缓冲成分的浓度可以为2mM、3mM、4mM、5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM或50mM。
- [0261] 所述缓冲成分浓度可以为置换液和/或换液后的缓冲成分浓度；其可以相同或者略有不同。
- [0262] 在一些实施方案中，所述缓冲成分的浓度为置换液中的缓冲成分浓度。
- [0263] 在一些实施方案中，所述缓冲成分的浓度为换液后所述组合物中的缓冲成分浓度。
- [0264] 在一些实施方案中，所述组合物中还可以包含辅料，所述辅料包含稳定剂，所述稳定剂选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇、脯氨酸、甘氨酸、精氨酸盐酸盐及甘油中的一种或多种，优选选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇及脯氨酸中的一种或多种，更优选选自海藻糖、甘露醇、山梨醇及脯氨酸中的一种或多种，甚至更优选为脯氨酸。
- [0265] 在一些实施方案中，所述稳定剂的浓度为50mM-250mM，优选为80mM-200mM，更优选为100mM-150mM；具体地，所述稳定剂的浓度可以为50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM、100mM、105mM、110mM、115mM、120mM、125mM、130mM、135mM、140mM、145mM、150mM、155mM、160mM、165mM、170mM、175mM、180mM、185mM、190mM、195mM、200mM、205mM、210mM、215mM、220mM、225mM、230mM、235mM、240mM、245mM或250mM。
- [0266] 在一些具体的实施方案中，所选用的稳定剂为脯氨酸、海藻糖、甘露醇或山梨醇，前述稳定剂的浓度为50mM-250mM，优选为80mM-200mM，更优选为100mM-150mM。

- [0267] 在一些实施方案中，所述辅料还可以任选地进一步包含抗氧化剂，所述抗氧化剂可以选自甲硫氨酸、苯酚、苯甲酚、抗坏血酸、谷胱甘肽、硫代硫酸钠、柠檬酸和烟酰胺；优选为甲硫氨酸。
- [0268] 在一些实施方案中，所述抗氧化剂的浓度为10mM–100mM，优选为15mM–75mM，更优选为20mM–50mM，甚至更优选为30mM–40mM；具体地，所述抗氧化剂的浓度可以为10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM或100mM。
- [0269] 在一些实施方案中，所述组合物还包含表面活性剂，所述表面活性剂选自聚山梨酯20、聚山梨酯80和泊洛沙姆188。本申请使用mg/mL或%(w/v)来表示表面活性剂的浓度，本领域技术人员应当理解两者可以进行换算，例如，0.02%表面活性剂可换算为0.2mg/mL。
- [0270] 在一些实施方案中，所述表面活性剂的浓度为0mg/mL–0.8mg/mL，优选为0.05mg/mL–0.75mg/mL，更优选为0.1mg/mL–0.5mg/mL，甚至更优选为0.2mg/mL–0.4mg/mL或0.1mg/mL–0.3mg/mL；具体地，所述表面活性剂的浓度可以为0mg/mL、0.01mg/mL、0.02mg/mL、0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.15mg/mL、0.2mg/mL、0.25mg/mL、0.3mg/mL、0.35mg/mL、0.4mg/mL、0.45mg/mL、0.5mg/mL、0.55mg/mL、0.6mg/mL、0.65mg/mL、0.7mg/mL、0.75mg/mL或0.8mg/mL。
- [0271] 在一些具体的实施方案中，所述组合物可以包含选自以下的处方：
- [0272] (1)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD-L1结合蛋白，5mM–30mM组氨酸–组氨酸盐酸盐，80mM–200mM脯氨酸，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；
- [0273] (2)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD-L1结合蛋白，5mM–30mM组氨酸–组氨酸盐酸盐，80mM–200mM蔗糖，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；
- [0274] (3)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD-L1结合蛋白，5mM–30mM组氨酸–组氨酸盐酸盐，80mM–200mM海藻糖，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；

- [0275] (4)50mg/mL-120mg/mL蛋白-药物偶联物, 50mg/mL-150mg/mL PD-L1结合蛋白, 5mM-30mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 80mM-200mM甘露醇, 20mM-50mM甲硫氨酸, 0.1mg/mL-0.5mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0;
- [0276] (5)50mg/mL-120mg/mL蛋白-药物偶联物, 50mg/mL-150mg/mL PD-L1结合蛋白, 5mM-30mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 80mM-200mM山梨醇, 20mM-50mM甲硫氨酸, 0.1mg/mL-0.5mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0;
- [0277] (6)50mg/mL-120mg/mL蛋白-药物偶联物, 50mg/mL-150mg/mL PD-L1结合蛋白, 5mM-30mM醋酸-醋酸钠, 80mM-200mM脯氨酸, 20mM-50mM甲硫氨酸, 0.1mg/mL-0.5mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0;
- [0278] (7)50mg/mL-120mg/mL蛋白-药物偶联物, 50mg/mL-150mg/mL PD-L1结合蛋白, 5mM-30mM醋酸-醋酸钠, 80mM-200mM蔗糖, 20mM-50mM甲硫氨酸, 0.1mg/mL-0.5mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0;
- [0279] (8)50mg/mL-120mg/mL蛋白-药物偶联物, 50mg/mL-150mg/mL PD-L1结合蛋白, 5mM-30mM醋酸-醋酸钠, 80mM-200mM海藻糖, 20mM-50mM甲硫氨酸, 0.1mg/mL-0.5mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0;
- [0280] (9)50mg/mL-120mg/mL蛋白-药物偶联物, 50mg/mL-150mg/mL PD-L1结合蛋白, 5mM-30mM醋酸-醋酸钠, 80mM-200mM甘露醇, 20mM-50mM甲硫氨酸, 0.1mg/mL-0.5mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0;
- [0281] (10)50mg/mL-120mg/mL蛋白-药物偶联物, 50mg/mL-150mg/mL PD-L1结合蛋白, 5mM-30mM醋酸-醋酸钠, 80mM-200mM山梨醇, 20mM-50mM甲硫氨酸, 0.1mg/mL-0.5mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0;
- [0282] (11)50mg/mL-120mg/mL蛋白-药物偶联物, 50mg/mL-150mg/mL PD-L1结合蛋白, 5mM-30mM组氨酸-醋酸, 80mM-200mM脯氨酸, 20mM-50mM甲硫氨酸, 0.1mg/mL-0.5mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0;
- [0283] (12)50mg/mL-120mg/mL蛋白-药物偶联物, 50mg/mL-150mg/mL PD-L1结合蛋白, 2mM-20mM组氨酸-醋酸, 80mM-200mM脯氨酸, 20mM-50mM甲硫氨酸, 0.1mg/mL-0.5mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0; 或

- [0284] (13)50mg/mL-120mg/mL蛋白-药物偶联物, 50mg/mL-150mg/mL PD-L1结合蛋白, 2mM-20mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 80mM-200mM脯氨酸, 20mM-50mM甲硫氨酸, 0.1mg/mL-0.5mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0285] 其中, 所述缓冲成分浓度可以为换液前置换液中的浓度或换液后组合物中的浓度。
- [0286] 在一些具体的实施方案中, 所述组合物可以包含选自以下的处方:
- [0287] (a)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 10mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 140mM脯氨酸, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0288] (b)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 10mM组氨酸-醋酸, 140mM脯氨酸, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0289] (c)100mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 10mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM脯氨酸, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0290] (d)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 10mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM蔗糖, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0291] (e)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 10mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM海藻糖, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0292] (f)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 10mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM甘露醇, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0293] (g)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 10mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM山梨醇, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。

- [0294] (h)60mg/mL蛋白-药物偶联物, 90mg/mL PD-L1结合蛋白, 10mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM山梨醇, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0295] 在一些实施方案中, 所述缓冲成分浓度可以为换液前置换液中的浓度。
- [0296] 在另一些具体的实施方案中, 所述组合物可以包含选自以下的处方:
- [0297] (i)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 2mM-5mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 140mM脯氨酸, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0298] (j)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 2mM-5mM组氨酸-醋酸, 140mM脯氨酸, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0299] (k)100mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 2mM-5mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM脯氨酸, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0300] (l)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 2mM-5mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM蔗糖, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0301] (m)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 2mM-5mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM海藻糖, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0302] (n)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 2mM-5mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM甘露醇, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0303] (o)80mg/mL蛋白-药物偶联物, 100mg/mL PD-L1结合蛋白, 2mM-5mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM山梨醇, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。

- [0304] (p)60mg/mL蛋白-药物偶联物, 90mg/mL PD-L1结合蛋白, 2mM-5mM组氨酸-组氨酸盐酸盐, 180mM山梨醇, 30mM甲硫氨酸, 0.2mg/mL聚山梨酯80, pH值为5.0至6.0。
- [0305] 在一些实施方案中, 所述缓冲成分浓度可以为换液后组合物中的浓度。
- [0306] 在一些实施方案中, 本发明的组合物具有适合皮下注射的渗透压, 例如200mOsmo/kg-400mOsmo/kg, 优选为250mOsmo/kg-350mOsmo/kg, 更优选为280mOsmo/kg-320mOsmo/kg。
- [0307] 在一些实施方案中, 本发明的组合物具有适合皮下注射的粘度, 例如2cP-25cP, 优选为5cP-20cP, 更优选为8cP-15cP。
- [0308] 在一些实施方案中, 本发明的组合物中的PD-L1结合蛋白为KN035(恩沃利单抗)。
- [0309] 在一些实施方案中, 本发明的组合物中的蛋白-药物偶联物为JSKN003。
- [0310] 在一些实施方案中, 本发明的组合物中不含氯化钠。
- [0311] 药物组合
- [0312] 术语“药物组合”或“组合产品”是指非固定组合产品或固定组合产品, 包括但不限于药盒。术语“非固定组合”意指活性成分(例如, (i)本发明的程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子以及(ii)本发明的蛋白-药物偶联物)以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者, 其中这类施用在患者体内提供预防或治疗有效水平的两种或更多种活性剂。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的剂量和/或时间间隔进行选择, 从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式, 其制剂形式可以相同也可以不同。
- [0313] 因此, 第三方面, 本申请还提供了一种药物组合或组合产品, 其包含本发明的抗原结合分子以及蛋白-药物偶联物, 其中组合中有关抗原结合分子以及蛋白-药物偶联物的限定, 可以参照第一方面所记载的技术特征。在一些实施方案中, 所述药物组合或组合产品还可以包含一种或多种其他治疗剂, 例如化疗剂。

- [0314] 本申请还提供了包含所述药物组合的成套药盒，例如所述成套药盒在同一包装内包含：
- [0315] -含有本发明的抗原结合分子或包含所述抗原结合分子的药物组合物的第一容器；
- [0316] -含有本发明的蛋白-药物偶联物或包含所述蛋白-药物偶联物的药物组合物的第二容器；
- [0317] 其中有关抗原结合分子以及蛋白-药物偶联物的限定，可以参照第一方面所记载的技术特征。
- [0318] 在一些实施方案中，所述成套药盒在同一包装内还包含含有其他治疗剂或包含所述其他治疗剂的其他容器。在一些实施方案中，所述其他治疗剂是化疗剂。
- [0319] 治疗方法与用途
- [0320] 第四方面，本申请还提供了一种治疗肿瘤或癌症，例如晚期或转移性实体恶性肿瘤的方法，包括向有需要的患者施用程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子与蛋白-药物偶联物的药物组合。
- [0321] 在一些实施方案中，本申请还提供了一种治疗肿瘤或癌症，例如晚期或转移性实体恶性肿瘤的方法，包括向有需要的患者施用程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子联合蛋白-药物偶联物。
- [0322] 本申请“施用.....药物组合”、“.....联合.....”的描述既包括复数种药物同时施用的情形，也包括复数种药物先后施用的情形。当先后施用时，复数种药物之间施用的间隔不超过24h，例如不超过18h，不超过15h，不超过12h，不超过10h，不超过8h，不超过5h，不超过3h，不超过2h，不超过1h或不超过0.5h。
- [0323] 第五方面，本申请还提供了一种治疗肿瘤或癌症，例如晚期或转移性实体恶性肿瘤的方法，包括向有需要的患者施用本申请的药物组合。
- [0324] 所述治疗方法中有关PD-L1结合分子以及蛋白-药物偶联物的限定，可以参照第一方面所记载的技术特征。
- [0325] 在一些实施方案中，所述恶性肿瘤为晚期/不可切除或转移性实体恶性肿瘤，且HER2表达。HER2表达定义为免疫组织化学(IHC)≥1+，NSCLC患者中HER2突变被视为HER2表达。

- [0326] 在一些实施方案中，所述实体恶性肿瘤为胃肠道肿瘤或非小细胞肺癌。
- [0327] 在一些实施方案中，所述药物组合中蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的施用比例为1:0.5至1:2，优选比例为1:0.75至1:1.75，更优选比例为1:0.8至1:1.5，甚至更优选比例为1:1至1:1.25。
- [0328] 在一些实施方案中，所述药物组合中蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的比例为1:0.5至1:2，优选比例为1:0.75至1:1.75，更优选比例为1:0.8至1:1.5，甚至更优选比例为1:1至1:1.25。
- [0329] 在一些实施方案中，所述治疗方法包括向有需要的患者每周一次、每二周一次、每三周一次或每四周一次施用所述药物组合或药物组合物。
- [0330] 在一些实施方案中，通过皮下注射或静脉注射施用所述药物组合或药物组合物；优选通过皮下注射。
- [0331] 在一些实施方案中，所述药物组合的单次施用剂量，依患者体重计，可以为0.5 mg/kg-10.0mg/kg，优选为0.8mg/kg-7.5mg/kg，更优选为1.0mg/kg-7.0mg/kg，例如选自1.1mg/kg、2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg和6.7mg/kg，其中，所述剂量是指蛋白-药物偶联物和PD-L1结合分子的剂量之和。
- [0332] 例如，前述剂量的药物组合中，分别包含0.49mg/kg的蛋白-药物偶联物和0.61 mg/kg的PD-L1结合分子(剂量为1.1mg/kg)、1.02mg/kg的蛋白-药物偶联物和1.28的PD-L1结合分子(剂量为2.3mg/kg)、2.0mg/kg的蛋白-药物偶联物和2.5mg/kg的PD-L1结合分子(剂量为4.5mg/kg)，2.49mg/kg的蛋白-药物偶联物和3.11mg/kg的PD-L1结合分子(剂量为5.6mg/kg)，2.98mg/kg的蛋白-药物偶联物和3.72mg/kg的PD-L1结合分子(剂量为6.7mg/kg)。
- [0333] 在一些实施方案中，所述药物组合物的单次施用剂量，依患者体重计，可以为0.5mg/kg-10.0mg/kg，优选为0.8mg/kg-7.5mg/kg，更优选为1.0mg/kg-7.0mg/kg，例如选自1.1mg/kg、2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg和6.7mg/kg，其中，所述剂量是指组合物中蛋白-药物偶联物和PD-L1结合分子的剂量之和。
- [0334] 例如，前述剂量的药物组合物中，分别包含0.49mg/kg的蛋白-药物偶联物和0.61mg/kg的PD-L1结合分子(剂量为1.1mg/kg)、1.02mg/kg的蛋白-药物偶联物和1.28的PD-L1结合分子(剂量为2.3mg/kg)、2.0mg/kg的蛋白-药物偶联物和2.5mg/

kg的PD-L1结合分子(剂量为4.5mg/kg), 2.49mg/kg的蛋白-药物偶联物和3.11mg/kg的PD-L1结合分子(剂量为5.6mg/kg), 2.98mg/kg的蛋白-药物偶联物和3.72mg/kg的PD-L1结合分子(剂量为6.7mg/kg)。

- [0335] 在一些具体的实施方案中,所述治疗方法包括向有需要的患者每周一次皮下注射施用所述药物组合,单次施用剂量为1.1mg/kg、2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg或6.7mg/kg。优选地,所述药物组合中,蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的比例为1:1.25。
- [0336] 在一些具体的实施方案中,所述治疗方法包括向有需要的患者每周一次皮下注射施用所述药物组合物,所述药物组合物的单次施用剂量为1.1mg/kg、2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg或6.7mg/kg。优选地,所述药物组合物中,蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的比例为1:1.25。
- [0337] 第四方面,本申请还涉及程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子与蛋白-药物偶联物的药物组合或药物组合物,其能够用于治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤。
- [0338] 所述药物组合或药物组合物中有关PD-L1结合分子以及蛋白-药物偶联物的限定,可以参照第一方面所记载的技术特征。
- [0339] 在一些实施方案中,所述恶性肿瘤为晚期/不可切除或转移性实体恶性肿瘤,且HER2表达。HER2表达定义为免疫组织化学(IHC)≥1+, NSCLC患者中HER2突变被视为HER2表达。可选地,所述实体恶性肿瘤为胃肠道肿瘤或非小细胞肺癌。
- [0340] 在一些实施方案中,所述药物组合中蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的施用比例为1:0.5至1:2,优选比例为1:0.75至1:1.75,更优选比例为1:0.8至1:1.5,甚至更优选比例为1:1至1:1.25。
- [0341] 在一些实施方案中,所述药物组合物中蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的比例为1:0.5至1:2,优选比例为1:0.75至1:1.75,更优选比例为1:0.8至1:1.5,甚至更优选比例为1:1至1:1.25。
- [0342] 在一些实施方案中,所述治疗包括向有需要的患者每周一次、每二周一次、每三周一次或每四周一次施用所述药物组合或药物组合物。

- [0343] 在一些实施方案中，通过皮下注射或静脉注射施用所述药物组合或药物组合物；优选通过皮下注射。
- [0344] 在一些实施方案中，所述药物组合的单次施用剂量，依患者体重计，可以为0.5 mg/kg–10.0mg/kg，优选为0.8mg/kg–7.5mg/kg，更优选为1.0mg/kg–7.0mg/kg，例如选自1.1mg/kg、2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg和6.7mg/kg，其中，所述剂量是指蛋白–药物偶联物和PD–L1结合分子的剂量之和。
- [0345] 例如，前述剂量的药物组合中，分别包含0.49mg/kg的蛋白–药物偶联物和0.61 mg/kg的PD–L1结合分子(剂量为1.1mg/kg)、1.02mg/kg的蛋白–药物偶联物和1.28mg/kg的PD–L1结合分子(剂量为2.3mg/kg)、2.0mg/kg的蛋白–药物偶联物和2.5 mg/kg的PD–L1结合分子(剂量为4.5mg/kg)，2.49mg/kg的蛋白–药物偶联物和3.11mg/kg的PD–L1结合分子(剂量为5.6mg/kg)，2.98mg/kg的蛋白–药物偶联物和3.72mg/kg的PD–L1结合分子(剂量为6.7mg/kg)。
- [0346] 在一些实施方案中，所述药物组合物的单次施用剂量，依患者体重计，可以为0.5mg/kg–10.0mg/kg，优选为0.8mg/kg–7.5mg/kg，更优选为1.0mg/kg–7.0mg/kg，例如选自1.1mg/kg、2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg和6.7mg/kg，其中，所述剂量是指蛋白–药物偶联物和PD–L1结合分子的剂量之和。
- [0347] 例如，前述剂量的药物组合物中，分别包含0.49mg/kg的蛋白–药物偶联物和0.61mg/kg的PD–L1结合分子(剂量为1.1mg/kg)、1.02mg/kg的蛋白–药物偶联物和1.28的PD–L1结合分子(剂量为2.3mg/kg)、2.0mg/kg的蛋白–药物偶联物和2.5mg/kg的PD–L1结合分子(剂量为4.5mg/kg)，2.49mg/kg的蛋白–药物偶联物和3.11mg/kg的PD–L1结合分子(剂量为5.6mg/kg)，2.98mg/kg的蛋白–药物偶联物和3.72mg/kg的PD–L1结合分子(剂量为6.7mg/kg)。
- [0348] 在一些具体的实施方案中，所述治疗包括向有需要的患者每周一次皮下注射施用所述药物组合，单次施用剂量为1.1mg/kg、2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg或6.7mg/kg。优选地，所述药物组合中，蛋白–药物偶联物与PD–L1结合分子的比例为1:1.25。
- [0349] 在一些具体的实施方案中，所述治疗包括向有需要的患者每周一次皮下注射施用所述药物组合物，单次施用剂量为1.1mg/kg、2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg

或6.7mg/kg。优选地，所述药物组合物中，蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的比例为1:1.25。

[0350] 第五方面，本发明涉及程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子联合蛋白-药物偶联物在制备治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤药物中的用途。

[0351] 本发明还涉及程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子在制备联合蛋白-药物偶联物治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤药物中的用途。

[0352] 本发明还涉及蛋白-药物偶联物在制备联合程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤药物中的用途。

[0353] 本发明还涉及程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子与蛋白-药物偶联物的药物组合或药物组合物在制备治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤药物中的用途。

[0354] 所述药物组合或药物组合物中有关PD-L1结合分子以及蛋白-药物偶联物的限定，可以参照第一方面所记载的技术特征。

[0355] 在一些实施方案中，所述恶性肿瘤为晚期/不可切除或转移性实体恶性肿瘤，且HER2表达。HER2表达定义为免疫组织化学(IHC)≥1+，NSCLC患者中HER2突变被视为HER2表达。可选地，所述实体恶性肿瘤为胃肠道肿瘤或非小细胞肺癌。

[0356] 在一些实施方案中，所述药物组合中蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的施用比例为1:0.5至1:2，优选比例为1:0.75至1:1.75，更优选比例为1:0.8至1:1.5，甚至更优选比例为1:1至1:1.25。

[0357] 在一些实施方案中，所述药物组合物中蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的比例为1:0.5至1:2，优选比例为1:0.75至1:1.75，更优选比例为1:0.8至1:1.5，甚至更优选比例为1:1至1:1.25。

[0358] 抗原结合分子与蛋白-药物偶联物

[0359] 第六方面，对于第一至第五方面记载的抗原结合分子以及蛋白-药物偶联物，可进一步做如下的限定：

[0360] 在一些实施方案中，所述抗原结合分子为程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子。

[0361] 在一些实施方案中，所述PD-L1结合分子包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含SEQ ID NO: 1所示VHH中的CDR1、CDR2

和CDR3。所述CDR可以是Kabat CDR、AbM CDR、Chothia CDR或IMGT CDR。

- [0362] 在一些实施方案中，SEQ ID NO：1所示VHH中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO：5-7(Kabat)，SEQ ID NO：8-10(AbM)，SEQ ID NO：11-13(Chothia)和SEQ ID NO：14-16(IMGT)。
- [0363] 在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含SEQ ID NO：1所示氨基酸序列。优选地，所述免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO：1所示。
- [0364] 任选地，前述PD-L1结合分子还包含免疫球蛋白Fc区。优选地，所述免疫球蛋白Fc区为人免疫球蛋白Fc区，例如人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4的Fc区，或它们的变体。
- [0365] 在一些具体的事实方案中，所述免疫球蛋白Fc区的氨基酸序列如SEQ ID NO：2或SEQ ID NO：3所示。
- [0366] 在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域可以位于免疫球蛋白Fc区的N端，也可以位于免疫球蛋白Fc区的C端；两者直接相连，或通过肽链相连。
- [0367] 在一些实施方案中，前述肽链选自下述氨基酸序列中的一种或多种： $(GS)_n$ 、 $(G)_n$ 、 $(GGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 、 $(GGSG)_n$ 、 $(GGGGS)_n$ 和 $(GAP)_n$ ，其中n为1至10的整数。
- [0368] 在一些实施方案中，所述PD-L1结合分子包含如SEQ ID NO：4所示的氨基酸序列；优选地，所述PD-L1结合分子的氨基酸序列如SEQ ID NO：4所示。
- [0369] 在一些实施方案中，所述蛋白-药物偶联物具有式I的结构：
- [0370] $P-(L-D)_n(I)$ ，其中，P为蛋白质，L为连接单元，D为具有生物学活性的物质；n为1至20的整数。
- [0371] 在一些实施方案中，所述蛋白质P具有期望的生理学特性，优选地，所述蛋白质P能够预防和/或治疗疾病或病症。具体地，蛋白质P可以为抗体、融合蛋白、细胞因子、多肽等。
- [0372] 在一些实施方案中，所述蛋白质P为抗体；所述抗体靶向以下一种或多种的抗原：4-1BB、4-1BBL、A33、腺苷A2a受体、Akt、ALK、雄激素受体、Ang-1、Ang-2、Annexin A3、Aurora A、Aurora B、B7-H3、B7-H4、Bcl-2、Bcr-Ab

1、BRAF、BTK、BTLA、BTN2A1、CA-125、CAIX、CCR4、CD105/endoglin、CD109、CD123、CD155、CD16、CD160、CD19、CD20、CD200、CD200R、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD36、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD47、CD48、CD52、CD70、CD79b、CD80、CD86、CD96、CDK4、CDK6、CDK9、CEA、CEACAM1、ChK1、ChK2、c-KIT、c-Met、COX2、CSF-1R、CSF2、CTLA-4、CXCR2、CXCR4、DDR2、DLL3、DLL4、DNAM-1、DR5、EGFR、EpCAM、EPHA3、EphB4、ERK1、ERK2/p38MAPK、FAK、FAP、FGF-2、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、Flt-3、Gal-9、GITR、GITRL、Glypican-3、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HER2、HER3、HER4/ERBB4、HGF、HLA2、HIF-1 α 、HSP27、HSP90、HVEM、ICOS、ICOS Ligand、IDO、IGF1R、IL-13、IL-6、JAK1、JAK2、JAK3、KRAS、LAG-3、LIGHT、MDM2、MEK1、MEK2、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-13、MMP-2、MMP-7、MMP-9、mTOR、Mucin 1、Myc、NF- κ B、NKG2A、NRAS、NTRK1、NTRK2、NTRK3、OX40、OX40L、p53、PAF、PARP1、PARP2、PD1、PDGFR- α 、PDGFR- β 、PD-L1、PD-L2、PI3K α 、PI3K β 、PI3K γ 、PI3K δ 、PIM1、PIM3、PSMA、PTEN、RAF-1、RANKL、RET、S100A4、SIRP α 、SLAMF7、SMO、Src、STAT3、STEAP-1、SYK、TDO、TGF β 、Tie-2、TIGIT、TIM-3、TLR8、TMIGD2、TNF- α 、Toll-like receptor 3、TRAIL、TRAILR1、TROP-2、VEGF、VEGF-C、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3和VISTA。

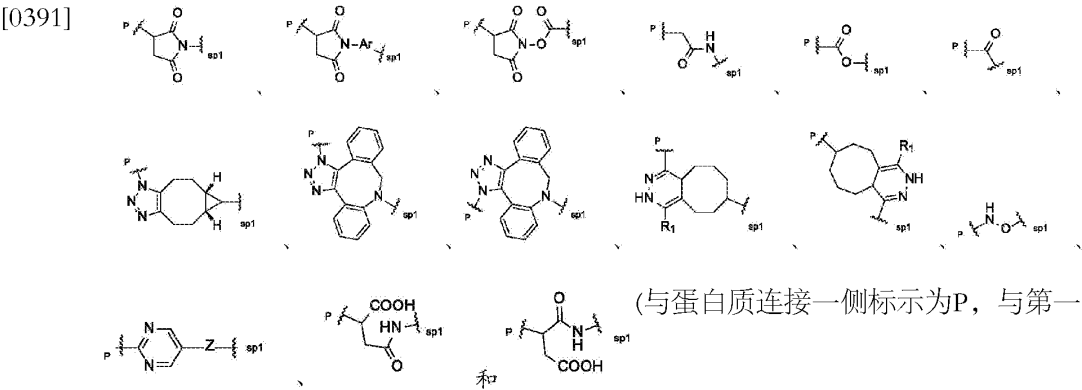
[0373] 在一些实施方案中，所述抗体可以靶向HER2；优选地，所述抗体可以结合人HER2的不同表位，例如人HER2的胞外结构域II，和/或人HER2的胞外结构域IV；

[0374] 在一些实施方案中，所述抗体为靶向HER2不同表位的双特异性抗体。在一些实施方案中，所述抗体可以特异性结合人HER2的胞外结构域II以及胞外结构域IV。

- [0375] 在一些实施方案中，所述抗体具有第一重链、第二重链以及共同的轻链，其中，第一重链包含SEQ ID NO：17所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3，第二重链包含SEQ ID NO：18所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3，共同的轻链包含SEQ ID NO：19所示轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3。所述CDR可以是Kabat CDR、AbM CDR、Chothia CDR或IMGT CDR。
- [0376] 其中，SEQ ID NO：17所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO：23-25(Kabat)，SEQ ID NO：26-28(AbM)，SEQ ID NO：29-31(Chothia)和SEQ ID NO：32-34(IMGT)。
- [0377] SEQ ID NO：18所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO：35-37(Kabat)，SEQ ID NO：38-40(AbM)，SEQ ID NO：41-43(Chothia)和SEQ ID NO：44-46(IMGT)。
- [0378] SEQ ID NO：19所示轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO：47-49(Kabat)，SEQ ID NO：50-52(AbM)，SEQ ID NO：53-55(Chothia)和SEQ ID NO：56-58(IMGT)。
- [0379] 在一些实施方案中，所述抗体包含SEQ ID NO：17所示的第一重链可变区。
- [0380] 在一些实施方案中，所述抗体包含SEQ ID NO：18所示的第二重链可变区。
- [0381] 在一些实施方案中，所述抗体包含SEQ ID NO：19所示的共同轻链可变区。
- [0382] 在一些实施方案中，所述抗体的第一重链的氨基酸序列如SEQ ID NO：20所示。
- [0383] 在一些实施方案中，所述抗体的第二重链的氨基酸序列如SEQ ID NO：21所示。
- [0384] 在一些实施方案中，所述抗体的共同的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO：22所示。
- [0385] 在一些实施方案中，式I中的连接单元L具有式II所示的结构：
- [0386] $-L1-sp1-L2-sp2-$ (II)
- [0387] 其中，L1是用于与P连接的接头，sp1为第一间隔单元，L2为可切割的连接子，sp2为第二间隔单元且与D相连。
- [0388] 在一些实施方案中，式I中的连接单元L具有式II所示的结构：

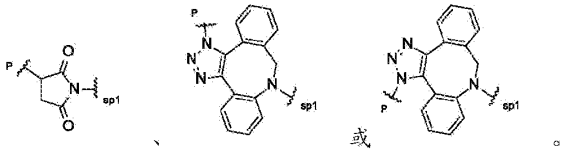
[0389] -L1-sp1-L2-sp2-(II)

[0390] 其中，L1是用于与P连接的接头，sp1为第一间隔单元，L2不存在，sp2为第二间隔单元且与D相连。在一些实施方案中，式II中L1选自：

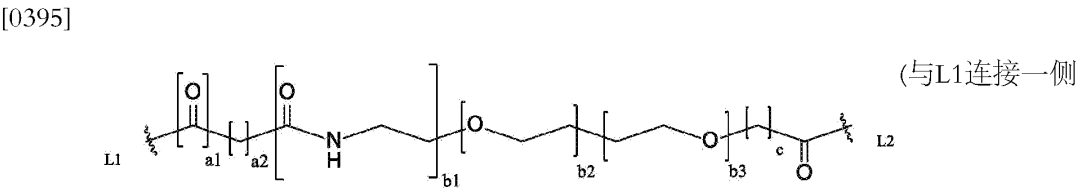


[0392] 其中，Ar代表C₆₋₁₀的亚芳基，其任选地被卤素、C₁₋₆烷基取代；R₁选自氢、卤素及C₁₋₆烷基；Z选自直键、C₂₋₆亚炔基、C₂₋₆亚烯基、C₆₋₁₀亚芳基、5-10元亚杂芳基、酰胺基、磺酰胺基、亚胺基和CF₂。

[0393] 在一些实施方案中，L1为



[0394] 在一些实施方案中，式II中第一间隔单元sp1的结构为：



其中，a₁=0或1，a₂=0至6的整数，b₁=0或1，b₂=0至16的整数，b₃=0至16的整数，c=0至6的整数，且b₂与b₃至少有一个为0。

[0396] 在一些实施方案中，sp1的结构中，a₁=1；在另一些实施方案中，a₁=0。

- [0397] 在一些实施方案中, $a_2=0$ 、1、2、3、4、5或者6。
- [0398] 在一些实施方案中, $b_1=0$ 或1。
- [0399] 在一些实施方案中, $b_2=0$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或者16。
- [0400] 在一些实施方案中, $b_3=0$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或者16。
- [0401] 在一些实施方案中, $c=0$ 、1、2、3、4、5或者6。
- [0402] 以上 a_1 、 a_2 、 b_1 、 b_2 、 b_3 和 c 的可选方案之间能够进行任意的组合, 前提是 b_2 与 b_3 至少有一个为0。
- [0403] 在一些具体的实施方案中, sp_1 的结构选自以下的组:
- [0404] (1) $a_1=0$, $a_2=2$ 、3、4、5或6, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=0$;
- [0405] (2) $a_1=0$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=2$ 、3、4、5或6;
- [0406] (3) $a_1=1$, $a_2=2$ 、3、4、5或6, $b_1=1$, $b_2=2$ 、3、4、5、6、7或8, $b_3=0$, $c=0$;
- [0407] (4) $a_1=0$, $a_2=2$ 、3、4、5或6, $b_1=1$, $b_2=2$ 、3、4、5、6、7或8, $b_3=0$, $c=0$; 和
- [0408] (5) $a_1=1$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=2$ 、3、4、5、6、7或8, $c=2$ 、3、4、5或6;
- [0409] 在一些实施方案中, sp_1 的结构具体选自以下的组:
- [0410] (1.1) $a_1=0$, $a_2=2$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=0$;
- [0411] (1.2) $a_1=0$, $a_2=3$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=0$;
- [0412] (1.3) $a_1=0$, $a_2=4$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=0$;
- [0413] (1.4) $a_1=0$, $a_2=5$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=0$;
- [0414] (1.5) $a_1=0$, $a_2=6$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=0$;
- [0415] (2.1) $a_1=0$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=2$;
- [0416] (2.2) $a_1=0$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=3$;
- [0417] (2.3) $a_1=0$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=4$;
- [0418] (2.4) $a_1=0$, $a_2=0$, $b_1=0$, $b_2=0$, $b_3=0$, $c=5$;

- [0419] (2.5) $a_1=0, a_2=0, b_1=0, b_2=0, b_3=0, c=6$;
- [0420] (3.1) $a_1=1, a_2=2, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- [0421] (3.2) $a_1=1, a_2=2, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- [0422] (3.3) $a_1=1, a_2=2, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;
- [0423] (3.4) $a_1=1, a_2=2, b_1=1, b_2=5, b_3=0, c=0$;
- [0424] (3.5) $a_1=1, a_2=2, b_1=1, b_2=6, b_3=0, c=0$;
- [0425] (3.6) $a_1=1, a_2=2, b_1=1, b_2=7, b_3=0, c=0$;
- [0426] (3.7) $a_1=1, a_2=2, b_1=1, b_2=8, b_3=0, c=0$;
- [0427] (3.8) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- [0428] (3.9) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- [0429] (3.10) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;
- [0430] (3.11) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=5, b_3=0, c=0$;
- [0431] (3.12) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=6, b_3=0, c=0$;
- [0432] (3.13) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=7, b_3=0, c=0$;
- [0433] (3.14) $a_1=1, a_2=3, b_1=1, b_2=8, b_3=0, c=0$;
- [0434] (3.15) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- [0435] (3.16) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- [0436] (3.17) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;
- [0437] (3.18) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=5, b_3=0, c=0$;
- [0438] (3.19) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=6, b_3=0, c=0$;
- [0439] (3.20) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=7, b_3=0, c=0$;
- [0440] (3.21) $a_1=1, a_2=4, b_1=1, b_2=8, b_3=0, c=0$;
- [0441] (4.1) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- [0442] (4.2) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- [0443] (4.3) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;
- [0444] (4.4) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=5, b_3=0, c=0$;
- [0445] (4.5) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=6, b_3=0, c=0$;
- [0446] (4.6) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=7, b_3=0, c=0$;

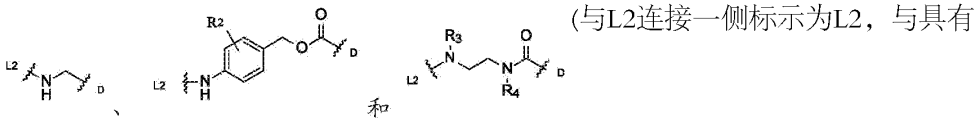
- [0447] (4.7) $a_1=0, a_2=2, b_1=1, b_2=8, b_3=0, c=0$;
- [0448] (4.8) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- [0449] (4.9) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- [0450] (4.10) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;
- [0451] (4.11) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=5, b_3=0, c=0$;
- [0452] (4.12) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=6, b_3=0, c=0$;
- [0453] (4.13) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=7, b_3=0, c=0$;
- [0454] (4.14) $a_1=0, a_2=3, b_1=1, b_2=8, b_3=0, c=0$;
- [0455] (4.15) $a_1=0, a_2=4, b_1=1, b_2=2, b_3=0, c=0$;
- [0456] (4.16) $a_1=0, a_2=4, b_1=1, b_2=3, b_3=0, c=0$;
- [0457] (4.17) $a_1=0, a_2=4, b_1=1, b_2=4, b_3=0, c=0$;
- [0458] (4.18) $a_1=0, a_2=4, b_1=1, b_2=5, b_3=0, c=0$;
- [0459] (4.19) $a_1=0, a_2=4, b_1=1, b_2=6, b_3=0, c=0$;
- [0460] (4.20) $a_1=0, a_2=4, b_1=1, b_2=7, b_3=0, c=0$;
- [0461] (4.21) $a_1=0, a_2=4, b_1=1, b_2=8, b_3=0, c=0$;
- [0462] (5.1) $a_1=1, a_2=0, b_1=0, b_2=0, b_3=2, c=2$;
- [0463] (5.2) $a_1=1, a_2=0, b_1=0, b_2=0, b_3=3, c=2$;
- [0464] (5.3) $a_1=1, a_2=0, b_1=0, b_2=0, b_3=4, c=2$;
- [0465] (5.4) $a_1=1, a_2=0, b_1=0, b_2=0, b_3=5, c=2$;
- [0466] (5.5) $a_1=1, a_2=0, b_1=0, b_2=0, b_3=6, c=2$;
- [0467] (5.6) $a_1=1, a_2=0, b_1=0, b_2=0, b_3=7, c=2$; 和
- [0468] (5.7) $a_1=1, a_2=0, b_1=0, b_2=0, b_3=8, c=2$ 。
- [0469] 在一些实施方案中, 式II中所述可切割的连接子L2为二肽、三肽或四肽残基。
- [0470] 在一些实施方案中, L2选自以下的二肽残基: -Phe-Lys-, -Val-Ala-, -Val-Lys-, -Val-Cit-, -Ala-Lys-, -Phe-Cit-, -Leu-Cit-, -Ile-Cit-, -Phe-Arg-, -Trp-Cit-, -Gly-Gly-, -Ala-Ala-, -Gly-Val-和-Gly-Glu-; 所述二肽残基的左侧与sp1连接, 右侧与sp2连接。优选地, L2选自-Val-Ala-, -Val-Lys-和-Val-Cit-。

[0471] 在一些实施方案中，L2选自以下的三肽残基：-Glu-Val-Ala-、-Glu-Val-Cit-、-α Glu-Val-Ala-、-α Glu-Val-Cit-、-Val-Lys-Gly和-Val-Cit-Gly-；所述三肽残基的左侧与sp1连接，右侧与sp2连接。

[0472] 在一些实施方案中，L2选自以下的四肽残基：-Gly-Gly-Phe-Gly-和-Gly-Phe-Gly-Gly-；所述四肽残基的左侧与sp1连接，右侧与sp2连接。

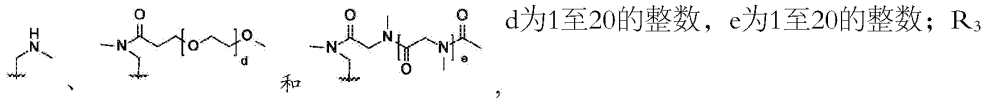
[0473] 在一些实施方案中，式II中的sp2不存在，或sp2选自：

[0474]



生物学活性的物质D连接一侧标示为D)，其中，

[0475] R₂独立地选自氢、C₁₋₆烷基、羟基、氨基、卤素、硝基、氰基、



d为1至20的整数，e为1至20的整数；R₃

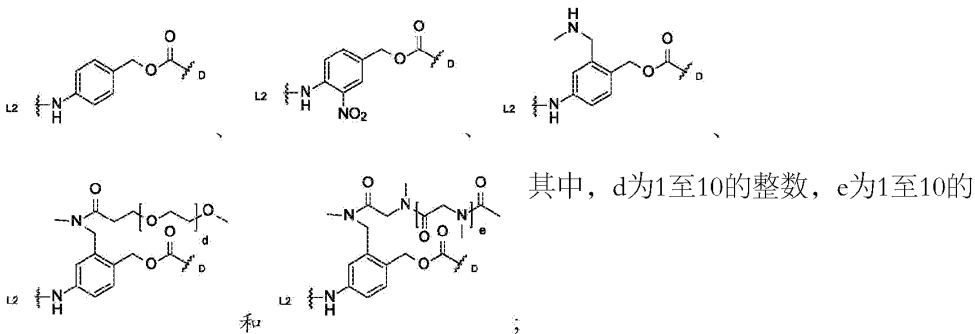
、R₄各自独立地选自氢和C₁₋₆烷基；

[0476] 所述烷基可任选地被羟基、氨基、卤素、硝基和氰基取代。

[0477] 在一些实施方案中，sp2为 L2-CH2-CH(R3)-CH2-C(=O)-D。

[0478] 在一些实施方案中，sp2为 L2-CH2-CH(R3)-CH2-C(=O)-D。

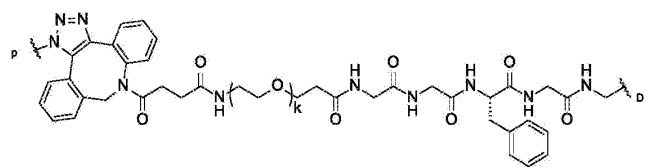
[0479] 在一些实施方案中，sp2选自：

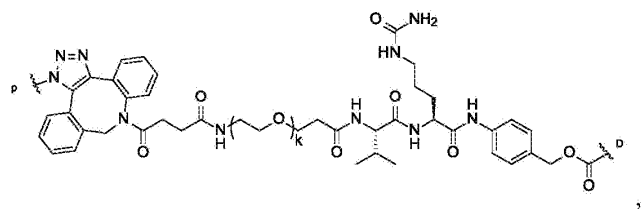
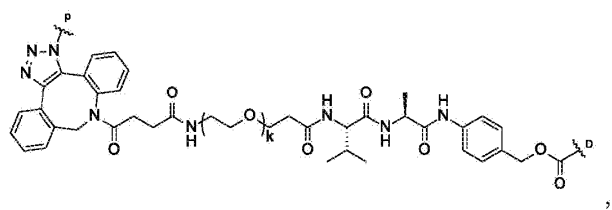
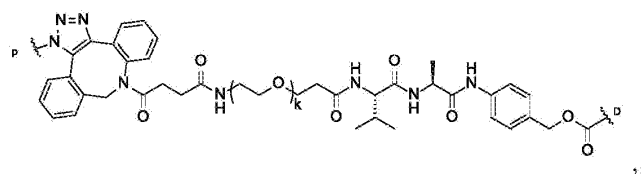
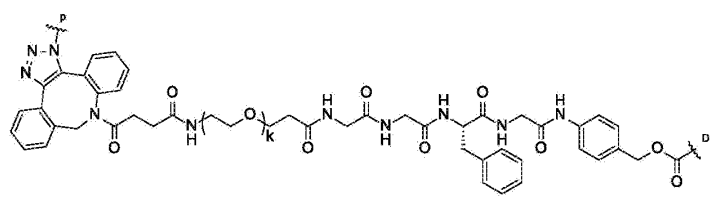
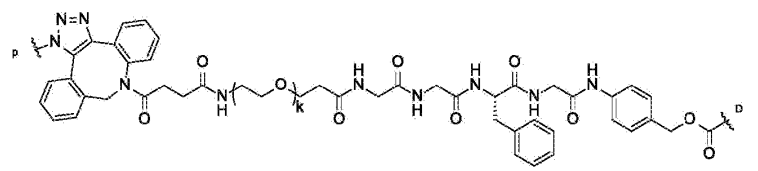
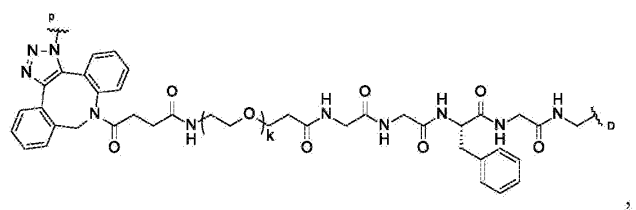


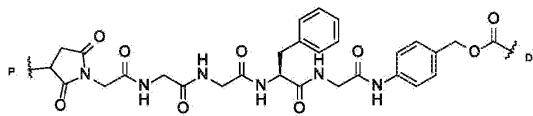
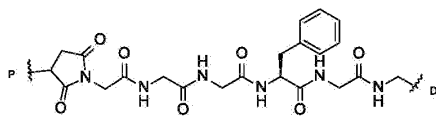
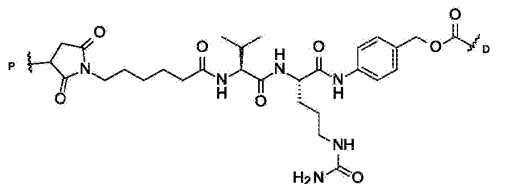
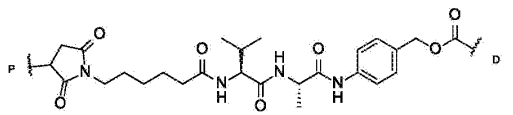
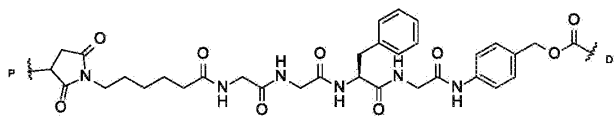
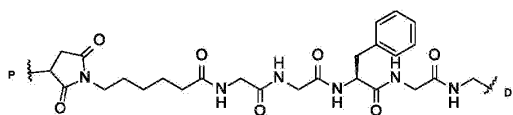
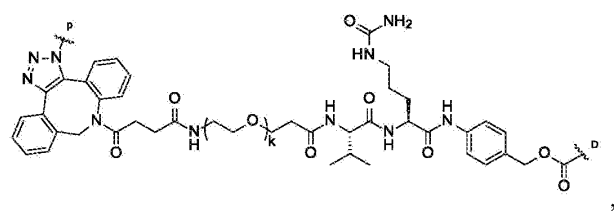
其中，d为1至10的整数，e为1至10的

整数。

[0480] 在一些实施方案中，连接单元L可以选自以下结构：

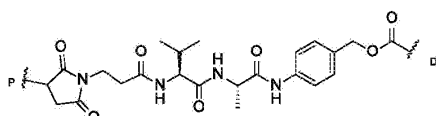






和

[0481]

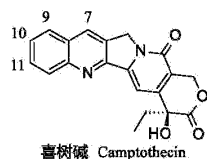


k为1~20的整数, 例如2、3、4、5、6、

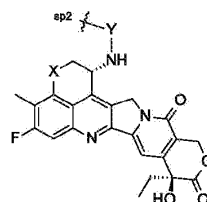
;

7、8、9或10。(与蛋白质P连接一侧标示为P, 与具有生物学活性的物质D连接一侧标示为D)。

- [0482] 在一些实施方案中, $k=2$ 、4或8。
- [0483] 对于式I中具有生物学活性的物质D, 可以选自细胞毒素、蛋白激酶抑制剂、免疫激动剂、糖皮质激素、寡核苷酸、放射性同位素、多肽及其任意组合。
- [0484] 在一些实施方案中, D为细胞毒素, 其选自: DNA烷化剂、DNA解构剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、微管抑制剂、核糖体抑制剂及其任意组合。
- [0485] 在一些具体的实施方案中, D选自: 奥瑞他汀(Auristatin)衍生物、美登素(Maitansine)衍生物、艾日布林(Eribulin)衍生物、微管菌素(tubulysin)衍生物、吡咯苯二氮卓二聚体(Pyrrolobenzodiazepine, PDB)衍生物、杜卡霉素(Duocarmycin)衍生物、卡奇霉素(Calicheamicin)衍生物、PNU-159682及其衍生物、喜树碱(Camptothecin)衍生物、鹅膏毒素(Amatotoxin)衍生物及其任意组合。
- [0486] 在一些实施方案中, D选自喜树碱衍生物, 所述喜树碱衍生物指具有与天然来源喜树碱相同的5元骈合母核结构, 并且在其7位、9位、10位和11位具有取代修饰的化合物, 其具有与天然喜树碱同等或更强的拓扑异构酶I抑制活性。



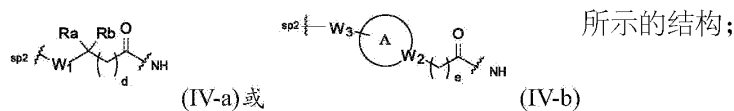
- [0487] 可选的喜树碱衍生物可来源于现有技术整体, 例如专利申请文件WO2014057687、WO2020063676、CN111689980A、WO2022068878、WO2022068878、WO2020259258、WO2020219287、WO2022121981、WO2021173773、WO2019195665、WO2021067861、WO2022170971、WO2020200880、WO2021148501、WO2023109965和WO2022015656, 以上专利的公开内容作为整体加入到本申请中。
- [0488] 在一些实施方案中, D具有式III所示的结构:



(III),

[0489] 其中, X选自CH₂、NH、O、S或SO₂;

[0490] Y不存在, 或Y具有



[0491] 其中W₁、W₃各自独立地选自O、S和NH, W₂选自C、CH和N,

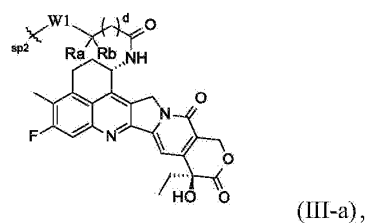
[0492] R_a、R_b各自独立地选自氢、氘、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₃₋₆环烷基、3-6元杂环烷基、羟基、氨基、氰基和硝基; 或者, R_a和R_b与其相连接的碳原子一起形成3-6元环烷基、3-6元杂环烷基或羰基; 或者, R_a与酰胺部分的N原子相连形成3-6元杂环烷基并且R_b为氢;

[0493] 环A选自以下的组: 5-10元亚环烷基、5-10元亚杂环烷基、6-10元亚芳基和5-10元亚杂芳基;

[0494] 所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基和亚杂芳基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代;

[0495] d、e各自独立地选自0至5的整数。

[0496] 在一些实施方案中, D具有式III-a所示的结构:

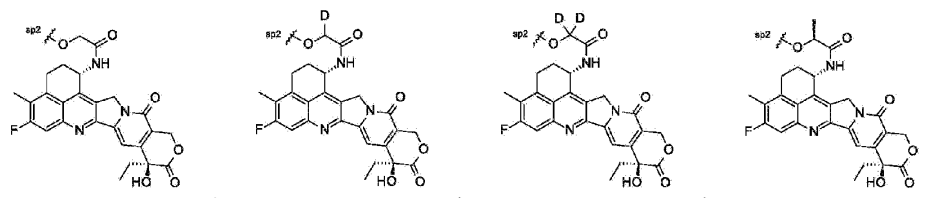


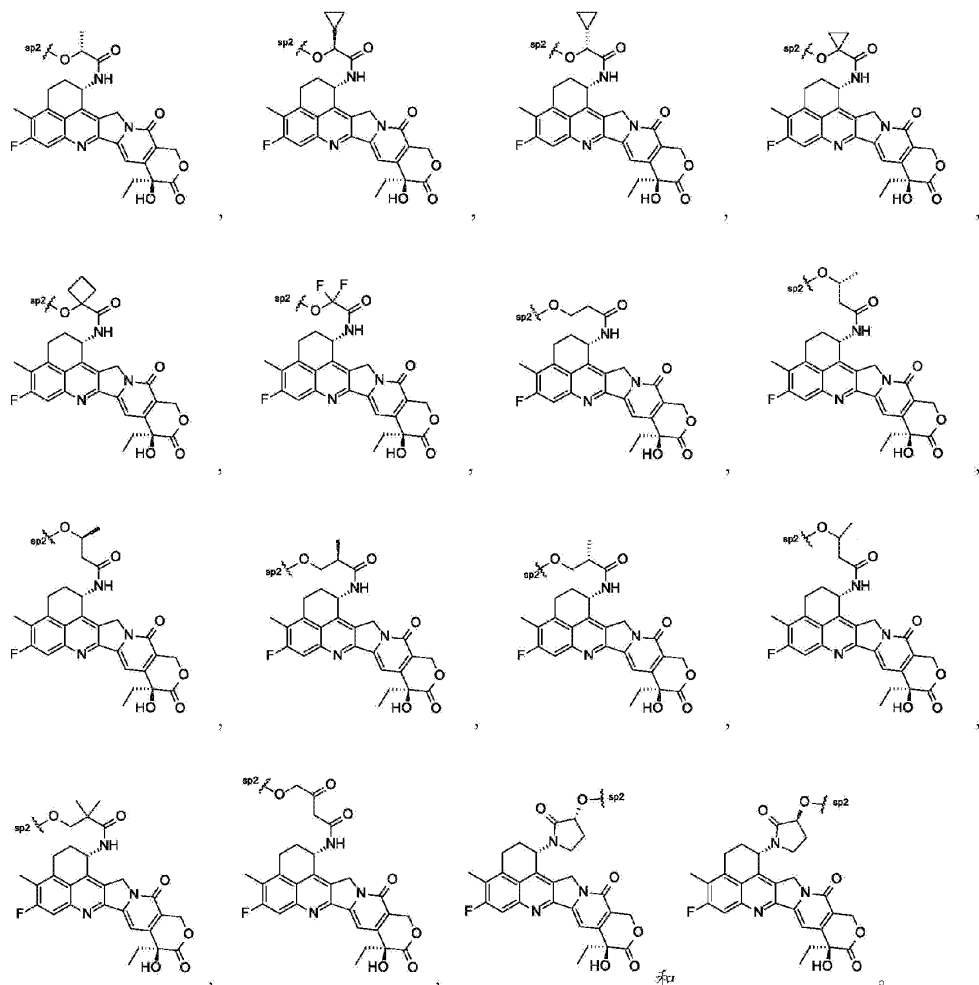
[0497] 其中W₁为O或NH;

[0498] R_a、R_b各自独立地选自氢、氘、卤素、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆环烷基、3-6元杂环烷基、羟基、氨基、氰基和硝基; 或者, R_a和R_b与其相连接的碳原子一起形成3-6元环烷基、3-6元杂环烷基或羰基; 或者, R_a与酰胺部分的N原子相连形成3-6元杂环烷基并且R_b为氢;

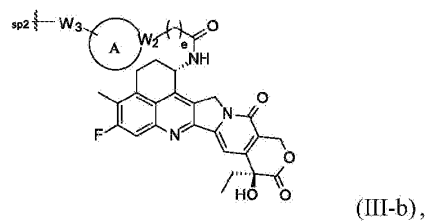
[0499] 所述烷基、烷氧基、环烷基和杂环烷基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基和硝基的基团取代;

- [0500] d为0至5的整数。
- [0501] 在一些实施方案中， W_1 为O。
- [0502] 在一些实施方案中，d为0、1或2。
- [0503] 在一些实施方案中，其中 R_a 选自氢、氘、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 环烷基、3-6元杂环烷基、羟基和氨基， R_b 为氢。所述烷基、烷氧基、环烷基和杂环烷基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基和硝基的基团取代。
- [0504] 在一些实施方案中，其中 R_a 和 R_b 与其相连接的碳原子一起形成3-6元环烷基或3-6元杂环烷基。所述环烷基和杂环烷基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基和硝基的基团取代。
- [0505] 在一些实施方案中，D可以选自以下的组：





[0506] 在另一些实施方案中，D具有式III-b所示的结构：



[0507] 其中 W_3 为O或NH， W_2 为C、CH或N，

[0508] 环A选自以下的组：5-10元亚环烷基、5-10元亚杂环烷基、6-10元亚芳基和5-10元亚杂芳基；

[0509] 所述亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基和亚杂芳基各自独立任选地进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代；

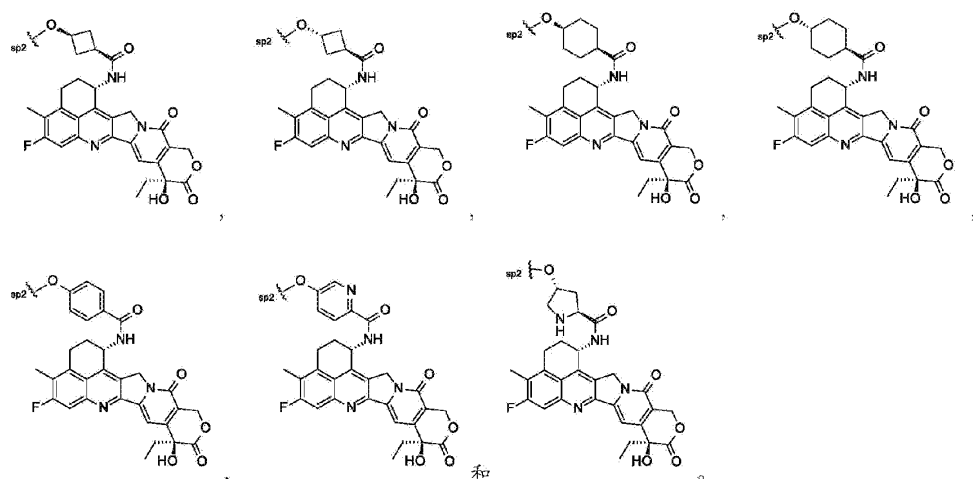
[0510] e为0至5的整数。

[0511] 在一些实施方案中，W₃为O；在另一些实施方案中，W₂为CH。

[0512] 在一些实施方案中，e为0、1或2。

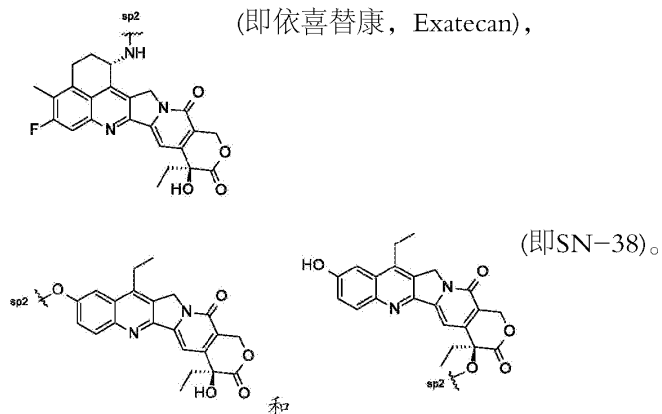
[0513] 在一些实施方案中，环A为5-10元亚环烷基。所述亚环烷基可进一步被选自氘、卤素、羟基、氨基、氰基、羰基和硝基的基团取代。

[0514] 在一些实施方案中，D可以选自以下的组：

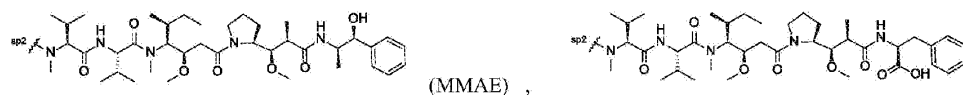


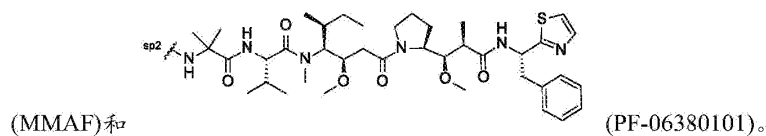
[0515] 在一些实施方案中，D作为喜树碱衍生物，还可以选自以下的结构：

[0516] (即依喜替康，Exatecan)，

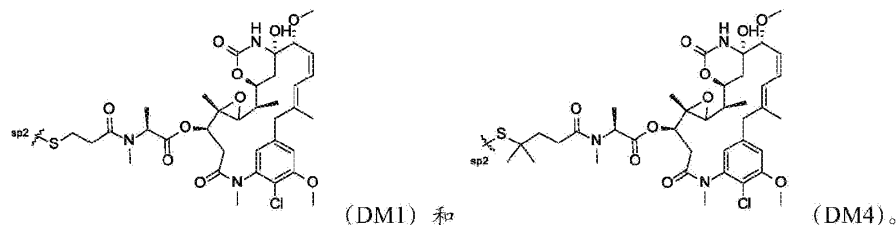


[0517] 在一些实施方案中，D可以为奥瑞他汀衍生物，优选选自以下的结构：

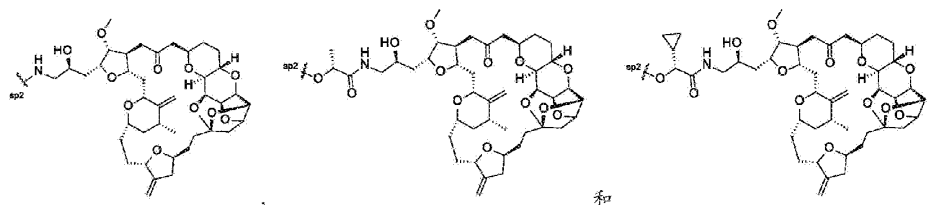




[0518] 在一些实施方案中，D可以为美登素衍生物，优选选自以下的结构：



[0519] 在一些实施方案中，D为艾日布林及其衍生物，优选选自以下的结构：



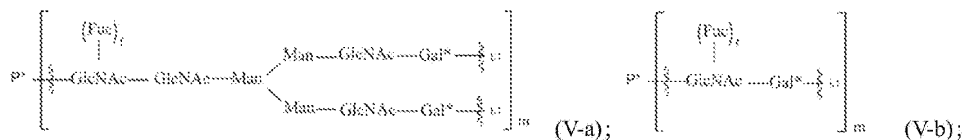
[0520] 在一些实施方案中，在式I中，连接单元L与抗体之间通过巯基连接；优选地，所述巯基来源于抗体；更优选地，所述巯基通过还原重链与重链之间的二硫键，和/或重链与轻链之间的二硫键得到。

[0521] 在另一些实施方案中，连接单元L与抗体之间通过寡糖连接；优选地，所述寡糖衍生自抗体的天然糖链。

[0522] 在一些实施方案中,所述寡糖衍生自抗体的N-糖链。

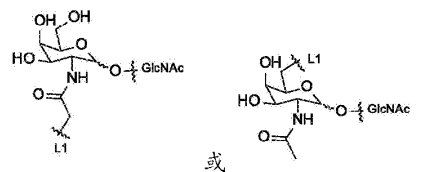
[0523] 在一些实施方案中，所述寡糖由2~15个单糖组成；优选地，所述寡糖由2~10个单糖组成。

[0524] 在一些实施方案中,所述寡糖具有式V-a或式V-b所示结构:



[0525] 其中, P★为抗体(所述抗体可如前所定义), GlcNAc为N-乙酰葡萄糖胺, Fuc为岩藻糖, Man为甘露糖, f为0或1, m为1至20;

[0526] Gal★为经修饰的半乳糖，选自以下的结构：



[0527] 所述寡糖通过核心GlcNAc与抗体连接。

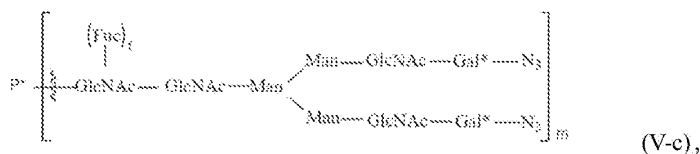
[0528] 在一些实施方案中，经修饰的半乳糖通过 β -1,4-糖苷键与GlcNAc连接。

[0529] 在一些实施方案中，所述寡糖与抗体的Fc片段连接；优选与Fc片段的CH2结构域连接；更优选与Fc片段的Asn297(根据Kabat的EU索引编号)连接。

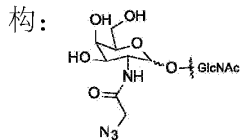
[0530] 如前所述，所述寡糖可衍生自抗体的天然糖链，具体地，所述寡糖的前体的制备方法包括以下步骤：将N糖糖型主要为G0F的抗体与UDP-GalNAz或其盐，于存在催化剂的情况下进行反应，从而得到前述寡糖的前体。

[0531] G0F糖型的抗体的获取方法是本领域所熟知的，例如，真核细胞表达的抗体经翻译后修饰，可通过半乳糖苷酶处理将糖链转化为G0F的形式，该酶处理去除任何末端的半乳糖残基并留下末端N-乙酰葡萄糖胺残基。

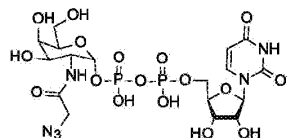
[0532] 所述寡糖的前体具有式V-c所示结构：



[0533] 其中，P★、GlcNAc、Fuc、Man、和m的定义如前所述，Gal★-N₃具有以下结构：

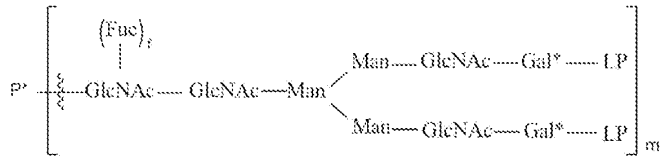


[0534] 所述UDP-GalNAz具有以下的结构：

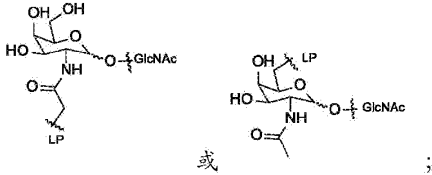


[0535] 在一些实施方案中，前述催化剂为半乳糖基转移酶或其功能变体或片段。

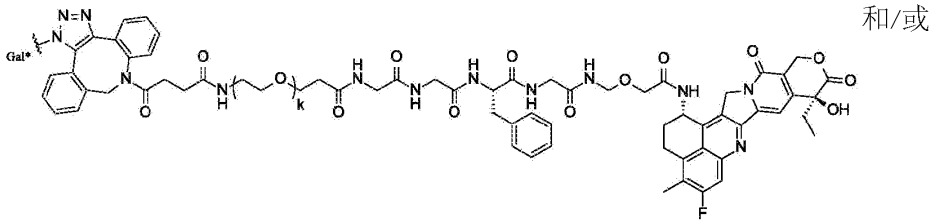
- [0536] 在一些实施方案中，所述催化剂是 β -1,4-半乳糖基转移酶或其功能变体或片段。
- [0537] 在一些实施方案中，所述催化剂是牛 β -1,4-半乳糖基转移酶、人 β -1,4-半乳糖基转移酶或其功能变体或片段。
- [0538] 在一些实施方案中，所述催化剂是具有Y285L突变的人 β -(1,4)-GalT1或具有Y289L突变的牛 β -(1,4)-GalT1。
- [0539] 在一些实施方案中，所述催化剂是专利申请WO2016170186中公开的 β -1,4-乙酰半乳糖转移酶。
- [0540] 在一些实施方案中，所述催化剂包含SEQ ID NO: 59-61任一所示的序列。
- [0541] 在一些具体的实施方案中，本申请所述的蛋白-药物偶联物具有式VI所示的结构：

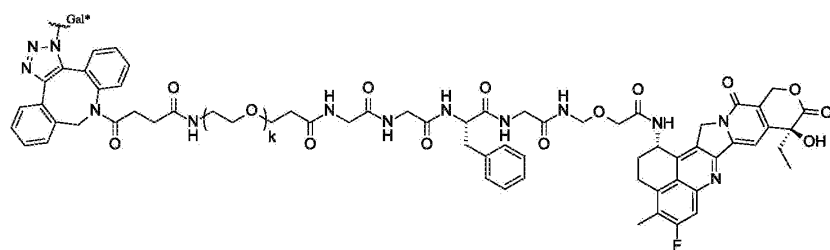


- [0542] 其中，P*为抗体(所述抗体可如前所定义)，GlcNAc为N-乙酰葡萄糖胺，Fuc为岩藻糖，Man为甘露糖，f为0或1，m为1至10；
- [0543] Gal*为经修饰的半乳糖，选自以下的结构：



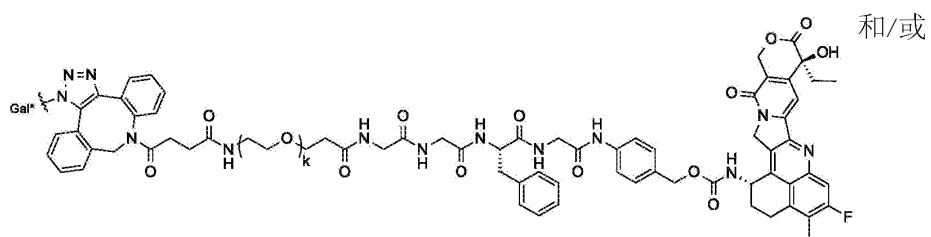
- [0544] LP选自以下结构(a)至(g)之一：
- [0545] (a)



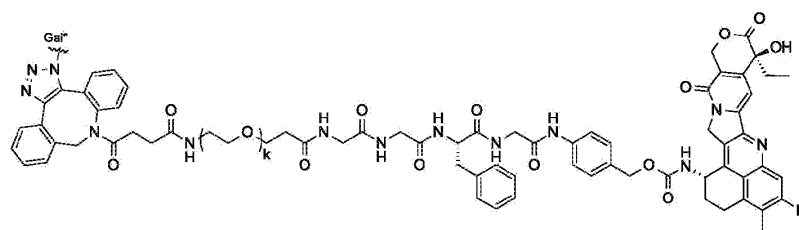


;

[0546] (b)

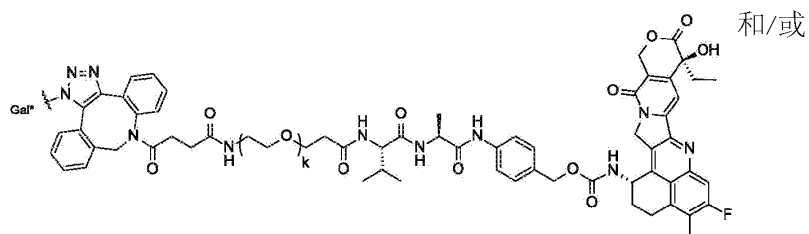


和/或

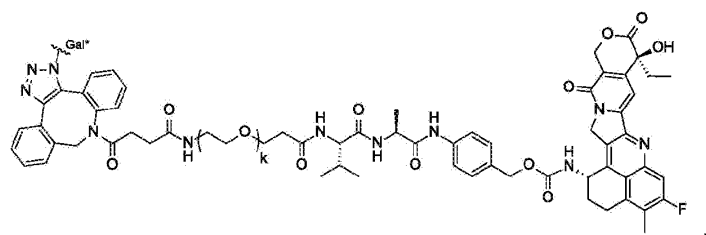


;

[0547] (c)

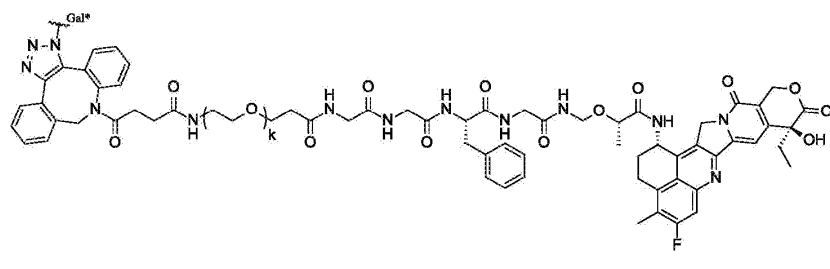
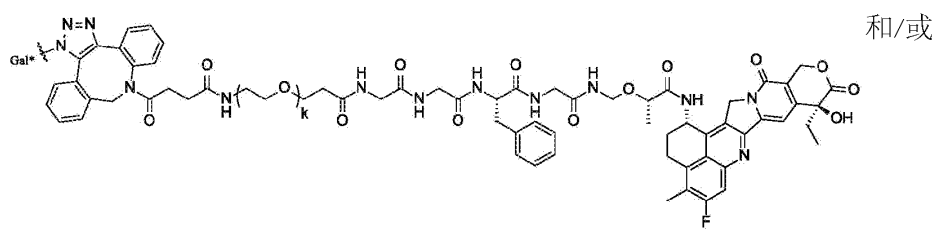


和/或

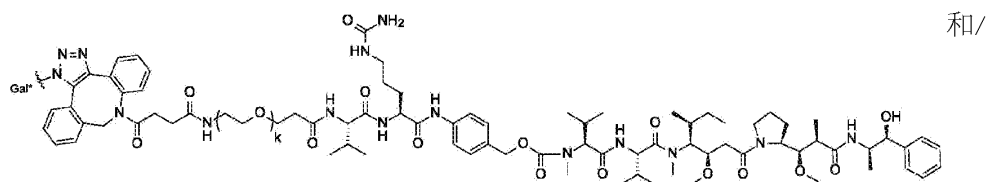


;

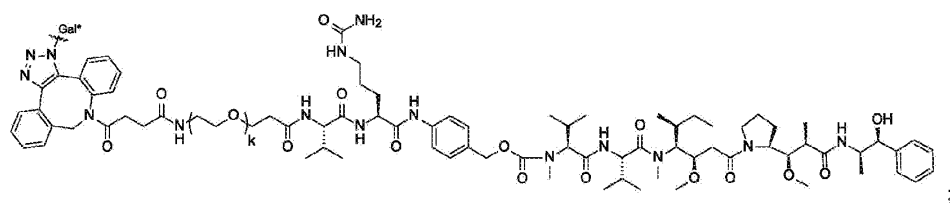
[0548] (d)



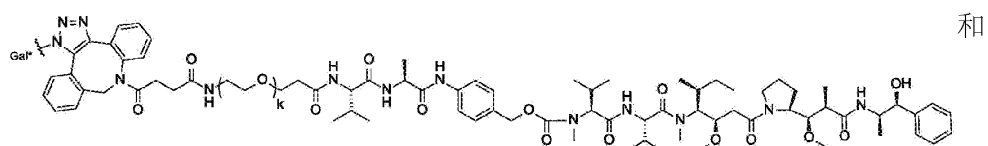
[0549] (e)



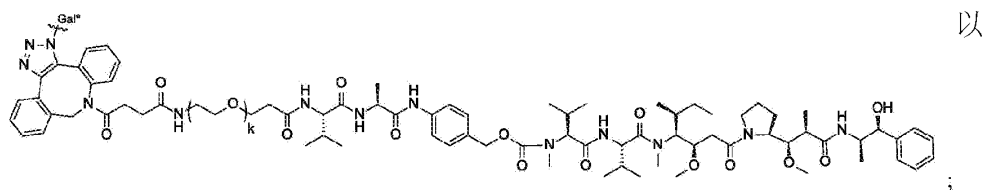
或



[0550] (f)

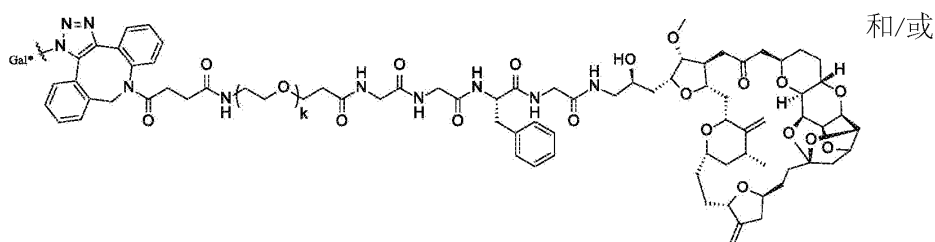


/或

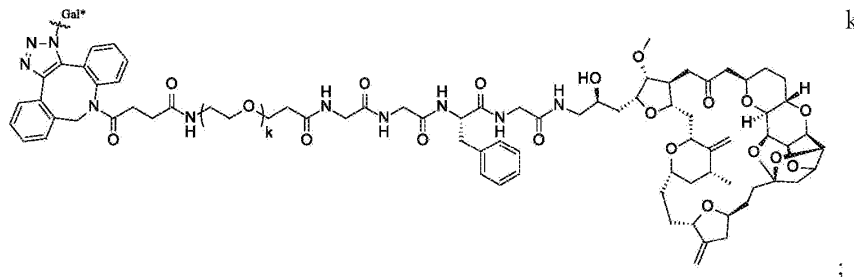


及

[0551] (g)



k为1 ~ 20的



整数, 例如2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[0552] 其中，核心GlcNAc与抗体直接连接。

[0553] 在一些实施方案中, $k=2$ 、4或8。

[0554] 在一些实施方案中，m为1至4；在一些实施方案中，偶联物整体的DAR值为1至8。

[0555] 在一些实施方案中，m约为1.2~3.5，例如1.2、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4或3.5。

[0556] 在一些实施方案中，偶联物整体的DAR值约为1.5至8，例如1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9、12.0、12.1、12.2、12.3、12.4、12.5、12.6、12.7、12.8、12.9、13.0、13.1、13.2、13.3、13.4、13.5、13.6、13.7、13.8、13.9、14.0、14.1、14.2、14.3、14.4、14.5、14.6、14.7、14.8、14.9、15.0、15.1、15.2、15.3、15.4、15.5、15.6、15.7、15.8、15.9、16.0、16.1、16.2、16.3、16.4、16.5、16.6、16.7、16.8、16.9、17.0、17.1、17.2、17.3、17.4、17.5、17.6、17.7、17.8、17.9、18.0、18.1、18.2、18.3、18.4、18.5、18.6、18.7、18.8、18.9、19.0、19.1、19.2、19.3、19.4、19.5、19.6、19.7、19.8、19.9、20.0、20.1、20.2、20.3、20.4、20.5、20.6、20.7、20.8、20.9、21.0、21.1、21.2、21.3、21.4、21.5、21.6、21.7、21.8、21.9、22.0、22.1、22.2、22.3、22.4、22.5、22.6、22.7、22.8、22.9、23.0、23.1、23.2、23.3、23.4、23.5、23.6、23.7、23.8、23.9、24.0、24.1、24.2、24.3、24.4、24.5、24.6、24.7、24.8、24.9、25.0、25.1、25.2、25.3、25.4、25.5、25.6、25.7、25.8、25.9、26.0、26.1、26.2、26.3、26.4、26.5、26.6、26.7、26.8、26.9、27.0、27.1、27.2、27.3、27.4、27.5、27.6、27.7、27.8、27.9、28.0、28.1、28.2、28.3、28.4、28.5、28.6、28.7、28.8、28.9、29.0、29.1、29.2、29.3、29.4、29.5、29.6、29.7、29.8、29.9、30.0、30.1、30.2、30.3、30.4、30.5、30.6、30.7、30.8、30.9、31.0、31.1、31.2、31.3、31.4、31.5、31.6、31.7、31.8、31.9、32.0、32.1、32.2、32.3、32.4、32.5、32.6、32.7、32.8、32.9、33.0、33.1、33.2、33.3、33.4、33.5、33.6、33.7、33.8、33.9、34.0、34.1、34.2、34.3、34.4、34.5、34.6、34.7、34.8、34.9、35.0、35.1、35.2、35.3、35.4、35.5、35.6、35.7、35.8、35.9、36.0、36.1、36.2、36.3、36.4、36.5、36.6、36.7、36.8、36.9、37.0、37.1、37.2、37.3、37.4、37.5、37.6、37.7、37.8、37.9、38.0、38.1、38.2、38.3、38.4、38.5、38.6、38.7、38.8、38.9、39.0、39.1、39.2、39.3、39.4、39.5、39.6、39.7、39.8、39.9、40.0、40.1、40.2、40.3、40.4、40.5、40.6、40.7、40.8、40.9、41.0、41.1、41.2、41.3、41.4、41.5、41.6、41.7、41.8、41.9、42.0、42.1、42.2、42.3、42.4、42.5、42.6、42.7、42.8、42.9、43.0、43.1、43.2、43.3、43.4、43.5、43.6、43.7、43.8、43.9、44.0、44.1、44.2、44.3、44.4、44.5、44.6、44.7、44.8、44.9、45.0、45.1、45.2、45.3、45.4、45.5、45.6、45.7、45.8、45.9、46.0、46.1、46.2、46.3、46.4、46.5、46.6、46.7、46.8、46.9、47.0、47.1、47.2、47.3、47.4、47.5、47.6、47.7、47.8、47.9、48.0、48.1、48.2、48.3、48.4、48.5、48.6、48.7、48.8、48.9、49.0、49.1、49.2、49.3、49.4、49.5、49.6、49.7、49.8、49.9、50.0、50.1、50.2、50.3、50.4、50.5、50.6、50.7、50.8、50.9、51.0、51.1、51.2、51.3、51.4、51.5、51.6、51.7、51.8、51.9、52.0、52.1、52.2、52.3、52.4、52.5、52.6、52.7、52.8、52.9、53.0、53.1、53.2、53.3、53.4、53.5、53.6、53.7、53.8、53.9、54.0、54.1、54.2、54.3、54.4、54.5、54.6、54.7、54.8、54.9、55.0、55.1、55.2、55.3、55.4、55.5、55.6、55.7、55.8、55.9、56.0、56.1、56.2、56.3、56.4、56.5、56.6、56.7、56.8、56.9、57.0、57.1、57.2、57.3、57.4、57.5、57.6、57.7、57.8、57.9、58.0、58.1、58.2、58.3、58.4、58.5、58.6、58.7、58.8、58.9、59.0、59.1、59.2、59.3、59.4、59.5、59.6、59.7、59.8、59.9、60.0、60.1、60.2、60.3、60.4、60.5、60.6、60.7、60.8、60.9、61.0、61.1、61.2、61.3、61.4、61.5、61.6、61.7、61.8、61.9、62.0、62.1、62.2、62.3、62.4、62.5、62.6、62.7、62.8、62.9、63.0、63.1、63.2、63.3、63.4、63.5、63.6、63.7、63.8、63.9、64.0、64.1、64.2、64.3、64.4、64.5、64.6、64.7、64.8、64.9、65.0、65.1、65.2、65.3、65.4、65.5、65.6、65.7、65.8、65.9、66.0、66.1、66.2、66.3、66.4、66.5、66.6、66.7、66.8、66.9、67.0、67.1、67.2、67.3、67.4、67.5、67.6、67.7、67.8、67.9、68.0、68.1、68.2、68.3、68.4、68.5、68.6、68.7、68.8、68.9、69.0、69.1、69.2、69.3、69.4、69.5、69.6、69.7、69.8、69.9、70.0、70.1、70.2、70.3、70.4、70.5、70.6、70.7、70.8、70.9、71.0、71.1、71.2、71.3、71.4、71.5、71.6、71.7、71.8、71.9、72.0、72.1、72.2、72.3、72.4、72.5、72.6、72.7、72.8、72.9、73.0、73.1、73.2、73.3、73.4、73.5、73.6、73.7、73.8、73.9、74.0、74.1、74.2、74.3、74.4、74.5、74.6、74.7、74.8、74.9、75.0、75.1、75.2、75.3、75.4、75.5、75.6、75.7、75.8、75.9、76.0、76.1、76.2、76.3、76.4、76.5、76.6、76.7、76.8、76.9、77.0、77.1、77.2、77.3、77.4、77.5、77.6、77.7、77.8、77.9、78.0、78.1、78.2、78.3、78.4、78.5、78.6、78.7、78.8、78.9、79.0、79.1、79.2、79.3、79.4、79.5、79.6、79.7、79.8、79.9、80.0、80.1、80.2、80.3、80.4、80.5、80.6、80.7、80.8、80.9、81.0、81.1、81.2、81.3、81.4、81.5、81.6、81.7、81.8、81.9、82.0、82.1、82.2、82.3、82.4、82.5、82.6、82.7、82.8、82.9、83.0、83.1、83.2、83.3、83.4、83.5、83.6、83.7、83.8、83.9、84.0、84.1、84.2、84.3、84.4、84.5

3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0。

[0557] 在一些实施方案中，所述抗体包含如SEQ ID NO：20所示氨基酸序列的第一重链，如SEQ ID NO：21所示氨基酸序列的第二重链，以及如SEQ ID NO：22所示氨基酸序列的共同轻链。

[0558] 应当理解，上文第六方面记载的任何技术特征与第一至第五方面中记载的技术方案的任何技术特征的任意组合得到的技术方案也包括在本申请中。

实施例

[0559] 以下结合实施例进一步说明本发明，下列实施例不应被理解为对本发明的限制。

[0560] 术语和缩略语

[0561] T_m: Melting Temperature, 解链温度

[0562] Tagg: Aggregation Temperature, 聚集温度

[0563] kD: Diffusion Interaction Parameter 扩散相互作用参数

[0564] rH: Hydrated Radius, 水化半径

[0565] PDI: Polymer Dispersity Index, 多分散性指数

[0566] Turbidity: 浊度

[0567] DSF: Differential Scanning Fluorimetry, 差式扫描荧光法

[0568] DLS: Dynamic Light Scattering, 动态光散射

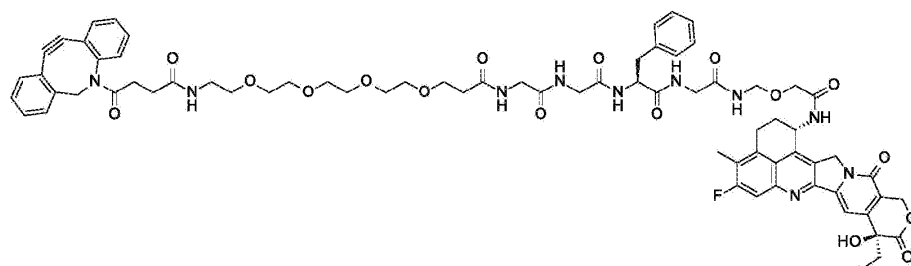
[0569] SEC-HPLC: Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography, 分子排阻高效液相色谱
nrCE-SDS: non-reduced Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate, 非还原十二烷基磺酸钠凝胶-毛细管电泳

[0570] CEX-HPLC: Cation Exchange High Performance Liquid Chromatography, 阳离子交换高效液相色谱
RH: Relative Humidity, 相对湿度

[0571] 实施例1、KN035与JSKN003的制备

[0572] 1.1、KN035的制备

- [0573] KN035是从骆驼免疫库中筛选得到的抗PD-L1单域抗体-Fc融合蛋白，其为2条完全相同的肽链形成的同二聚体，其中肽链的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。
- [0574] 将包含可以编码融合蛋白的核酸序列的载体转入细胞，表达纯化得到相应融合蛋白。具体制备过程可参照专利申请文件WO2017020801。
- [0575] 1.2、JSKN003的制备
- [0576] JSKN003是由靶向HER2的双特异性抗体(以下简称抗体A)与连接子-毒素构成的抗体偶联药物。
- [0577] 1.2.1抗体A的制备
- [0578] 抗体A包含第一重链、第二重链和共同轻链，其中第一重链的氨基酸序列如SEQ ID NO: 20所示，第二重链的氨基酸序列如SEQ ID NO: 21所示，共同的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO: 22所示。
- [0579] 将包含可编码上述第一重链、第二重链和共同轻链的核酸序列的载体转入细胞，表达纯化得到抗体A。具体制备过程可参照专利申请文件WO2016110267。
- [0580] 1.2.2连接子-毒素的制备
- [0581] 根据专利申请CN113264983A中记载的工艺制备下述连接子-毒素(LP1):



- [0582] 经检测，LP1MS m/z (ESI): 1375.77，MS图谱如图4所示。
- [0583] 1.2.3抗体A与连接子-毒素的偶联
- [0584] 步骤一 抗体A-(N₃)₄的合成: 取抗体A(主要为G0F)原液脱盐至HEPES缓冲液中备用。向离心管中加入超纯水、MnCl₂(10mM)、UDP-GalNAz(50mM)、Tris-HCl(10mM)、抗体A(10mg/mL)以及GalT1(0.125mg/mL, SEQ ID NO: 59)，室温400rpm反应12h。反应完全后，Protein A纯化，超滤浓缩，脱盐至DPBS中，得到

抗体A-(N₃)₄(148796Da)。该步骤反应式和UDP-GalNAz结构见图5，产物质谱见图6。

[0585] 步骤二 抗体偶联药物的合成：向离心管中加入LP1(950 μ M)、DMSO、抗体A-(N₃)₄(63 μ M)以及超纯水，室温400rpm反应12h。反应完全后，脱盐至DPBS中，得到JSKN003(DAR = 4, 154301Da)。该反应式见图7，产物质谱见图8。

[0586] 实施例2、JSKN003与KN035混合制剂的稳定性研究

[0587] (1)

[0588] FS0-1：取JSKN003样品(30.75mg/ml JSKN003，20mM组氨酸-醋酸，pH5.0)超滤浓缩至80mg/ml。

[0589] FS0-2：取JSKN003样品(30.75mg/ml JSKN003，20mM组氨酸-醋酸，pH5.0)超滤浓缩至150mg/ml，与KN035样品(200mg/ml KN035，20mM醋酸钠-醋酸，220 mM脯氨酸，0.02 % PS20，pH6.0)1：1混合。

[0590] 表1制剂处方

编号	JSKN003 含量	KN035 含量	pH	缓冲体系	脯氨酸浓度	表面活性剂
FS0-1	80mg/mL	/	5.0	20mM 组氨酸-醋酸	/	/
FS0-2	75mg/mL	100mg/mL	5.7	10mM 组氨酸-醋酸 10mM 醋酸钠-醋酸	110mM	0.01% PS80

[0591] 试验结果表明，JSKN003单独存在时，在40℃条件放置10天后，不溶性微粒以及聚体显著增加；而当存在KN035时，相同测试条件下，总不溶性微粒以及聚体的增加被显著减缓(表2、图1及图2)。

[0592] 表2混合制剂试验结果

编号	蛋白含量	不溶性微粒(粒/ml)	4℃ 10d	40℃ 10d	SEC-HPLC (%)	4℃ 10d	40℃ 10d
FS0-1	80 mg/ml JSKN003	≥1 μm	7515.09	79481.13	HMW	1.6	8.7
		≥10 μm	362.80	6114.79	Main	98.0	89.7
		≥25 μm	62.19	1184.95	LMW	0.4	1.6
FS0-2	75 mg/ml JSKN003 100 mg/ml KN035	≥1 μm	2529.22	40890.54	HMW	1.7	3.6
		≥10 μm	51.83	1568.23	Main	98.2	96.2
		≥25 μm	0	264.90	LMW	0.1	0.2

[0593] (2)

[0594] 将JSKN003和KN035样品按预期浓度进行混合，用透析卡盒进行换液，用超滤管进行浓缩，再加入缓冲体系调整至表3所示的处方。制备完成后，将各处方样品放置于恒温恒湿箱(40±2℃，70%RH)4周，检测各处方不溶性微粒的情况，结果如图9所示。

[0595] 试验结果表明，组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲体系中，高浓度的JSKN003单独存在时，40℃放置4周后，不溶性微粒显著增加，而当存在KN035时，不溶性微粒的增加被显著减缓；乙酸钠-乙酸缓冲体系中，当存在KN035时，不溶性微粒的增加也有减缓的趋势。

[0596] 表3 JSKN003与KN035混合物的处方

编号	JSKN003 含量	KN035 含量	缓冲体系	pH
1a	80 mg/mL	/	10mM 组氨酸-组氨酸盐酸盐	5.5
1b	80 mg/mL	100 mg/mL	10mM 组氨酸-组氨酸盐酸盐	5.5
1c	80 mg/mL	50 mg/mL	10mM 组氨酸-组氨酸盐酸盐	5.5
1d	120 mg/mL	80 mg/mL	10mM 组氨酸-组氨酸盐酸盐	5.5
2a	80 mg/mL	/	10mM 乙酸钠-乙酸	6.0
2b	80 mg/mL	100 mg/mL	10mM 乙酸钠-乙酸	6.0
2c	80 mg/mL	50 mg/mL	10mM 乙酸钠-乙酸	6.0
2d	120 mg/mL	80 mg/mL	10mM 乙酸钠-乙酸	6.0
3a	25 mg/mL	/	10mM 组氨酸-组氨酸盐酸盐	5.5
3b	25 mg/mL	25 mg/mL	10mM 组氨酸-组氨酸盐酸盐	5.5
3c	25 mg/ml	50 mg/mL	10mM 组氨酸-组氨酸盐酸盐	5.5

[0597] 实施例3、JSKN003与KN035混合制剂的处方研究

[0598] 将JSKN003和KN035样品按预期浓度进行混合，用透析卡盒进行换液，用超滤管进行浓缩，补加稳定剂和表面活性剂等调整至最终所需处方。

[0599] 3.1、第一轮处方筛选

[0600] 第一轮处方筛选目的是筛选合适pH、缓冲体系和离子强度。将JSKN003与KN035样品混合后分别置换至表4各处方中，考察胶体稳定性和高温稳定性(40±2℃，RH70±5%，11d)，检测外观、不溶性微粒、SEC-HPLC、nrCE-SDS、相对结合活性(HER2)。

[0601] 表4第一轮处方筛选方案

编号	JSKN003 含量	KN035 含量	pH*	缓冲体系	NaCl 浓度	表面活性 剂
FS1-1	60 mg/ml	90 mg/ml	5.0	20 mM 醋酸/醋酸钠	0	0.02%聚 山梨酯 80
FS1-1-L			5.0	20 mM 醋酸/醋酸钠	20 mM	
FS1-1-M			5.5	20 mM 醋酸/醋酸钠	60 mM	
FS1-2			5.5	20 mM 醋酸/醋酸钠	0	
FS1-3			6.0	20 mM 组氨酸/组氨酸盐酸盐	0	
FS1-3-L			6.0	20 mM 组氨酸/组氨酸盐酸盐	20 mM	
FS1-3-M			6.0	20 mM 组氨酸/组氨酸盐酸盐	60 mM	
FS1-4			6.5	20 mM 组氨酸/组氨酸盐酸盐	0	
FS1-5			7.0	20 mM 组氨酸/组氨酸盐酸盐	0	
FS1-5-L			7.0	20 mM 组氨酸/组氨酸盐酸盐	20 mM	
FS1-5-M			7.0	20 mM 组氨酸/组氨酸盐酸盐	60 mM	

[0602] ★：换液后所得样品的实测pH值，下同。

[0603] 3.1.1FS1–胶体稳定性

[0604] 将不同处方样品进行梯度稀释，样品浓度分别为1.25mg/ml、2.5mg/ml、5mg/ml、10mg/ml和20mg/ml，通过Panta的DLS模块检测kD值。kD>0表明蛋白倾向排斥，胶体稳定性好，kD<0表明蛋白倾向聚集，检测结果见表5。结果表明，NaCl浓度越高，kD值越小；FS1–5–L、FS1–5–M kD值<0，说明高pH处方胶体稳定性较差。

[0605] 表5 FS1–胶体稳定性检测结果

处方编号	kD (g/ml ⁻¹)
FS1-1	66.26
FS1-1-L	27.11
FS1-1-M	5.39
FS1-2	42.23
FS1-3	36.34

处方编号	kD (g/ml ⁻¹)
FS1-3-L	31.23
FS1-3-M	8.42
FS1-4	35.14
FS1-5	34.61
FS1-5-L	-24.17
FS1-5-M	-9.74

[0606] 3.1.2FS1–高温稳定性

[0607] 将各处方样品放置于恒温恒湿箱(40±2℃，70%RH)，检测外观、不溶性微粒、rH和PDI、SEC-HPLC、nrCE-SDS，检测结果见表6及图10A-10C。

[0608] 表6 FS1-高温稳定性检测结果

处方编号	外观		40℃ 11d 不溶性微粒 (粒/ml)		
	T0	40℃ 11d	总数	≥10μm	≥25μm
FS1-1	黄	黄	1369.00	62.94	0.00
FS1-1-L	黄	黄	1653.12	87.01	21.75
FS1-1-M	黄	黄	990.40	32.65	0.00
FS1-2	黄	黄	232.95	21.18	0.00
FS1-3	微黄	黄，微粉	763.98	106.11	10.61
FS1-3-L	微黄	黄，微粉	738.32	10.70	0.00
FS1-3-M	微黄，轻乳光	黄，微粉，乳光	717.42	0.00	0.00
FS1-4	微黄	黄	510.74	10.64	10.64
FS1-5	微黄	黄，较浅	13825.72	288.70	10.69
FS1-5-L	微黄	黄，较浅，乳光	3412.41	21.60	0.00
FS1-5-M	微黄，轻乳光	黄，较浅，乳光	2086.55	21.40	0.00
处方编号	rH (nm)		PDI		
	T0	40℃ 11d	T0	40℃ 11d	
FS1-1	2.04	3.36	0.15	0.59	
FS1-1-L	3.07	6.18	0.12	0.46	
FS1-1-M	4.21	10.53	0.16	0.36	
FS1-2	2.63	3.04	0.15	0.27	
FS1-3	2.60	2.94	0.12	0.21	
FS1-3-L	2.81	6.09	0.12	0.31	
FS1-3-M	3.76	4.13	0.15	0.24	
FS1-4	2.62	2.75	0.16	0.19	
FS1-5	2.61	2.79	0.21	0.24	
FS1-5-L	8.39	5.13	0.39	0.25	
FS1-5-M	5.49	9.65	0.26	0.40	
处方编号	SEC-聚体(%)	SEC-JSKN003 主峰 (%)	SEC-KN035 主峰 (%)	SEC-片段(%)	
FS1-1	4.6	41.8	52.7	0.8	
FS1-1-L	5.6	41.4	52.0	1.1	

FS1-1-M	6.0	41.8	51.1	1.1
FS1-2	4.4	42.2	52.7	0.7
FS1-3	3.5	43.2	52.9	0.3
FS1-3-L	4.0	43.7	51.9	0.3
FS1-3-M	4.7	43.1	51.9	0.4
FS1-4	4.3	42.4	53.0	0.3
FS1-5	4.9	42.0	52.8	0.3
FS1-5-L	5.1	41.9	52.7	0.3
FS1-5-M	5.5	41.7	52.4	0.3
处方编号	nrCE-聚体(%)	nrCE-JSKN003 主峰 (%)	nrCE-KN035 主峰 (%)	nrCE-片段(%)
FS1-1	2.3	41.8	53.8	2.2
FS1-1-L	2.6	41.2	53.1	3.2
FS1-1-M	2.9	40.3	52.8	4.0
FS1-2	2.6	41.9	53.4	2.2
FS1-3	3.4	41.8	52.6	2.1
FS1-3-L	3.7	41.8	52.3	2.2
FS1-3-M	4.0	41.5	52.2	2.3
FS1-4	5.0	40.2	52.9	2.0
FS1-5	8.0	39.3	50.8	1.9
FS1-5-L	7.5	39.3	51.4	1.8
FS1-5-M	7.1	39.5	51.5	1.9

- [0609] 3.1.3第一轮筛选结论
- [0610] 各处方外观正常，不溶性微粒良好，相对结合活性无明显变化。添加NaCl后，乳光增加，聚体含量高。随pH升高，SEC-HPLC聚体含量升高，nrCE-SDS片段含量降低。其中，FS1-3聚体含量最少，片段含量可接受。因此选择FS1-3，即pH 6.0组氨酸/组氨酸盐酸盐进行下一轮处方筛选。
- [0611] 3.2、第二轮处方筛选
- [0612] 第二轮处方筛选目的是筛选合适的稳定剂。将JSKN003与KN035样品混合后分别置换至表7各处方中，考察粘度和高温稳定性(40±2℃，70%RH，10d)，检测外观、不溶性微粒、SEC-HPLC、nrCE-SDS、CEX-HPLC、相对结合活性(HER2)。
- [0613] 表7第二轮处方筛选方案

处方编号	KN035含量	JSKN003含量	缓冲液	稳定剂	抗氧化剂	表面活性剂
FS2-1	100 mg/ml	80 mg/ml	10mM 组氨酸/组氨酸盐, pH6.0	180 mM 蔗糖	30mM 甲硫氨酸	0.02% 聚山梨酯 80
FS2-2				180 mM 海藻糖		
FS2-3				180 mM 甘露醇		
FS2-4				180 mM 山梨醇		
FS2-5				180 mM 脯氨酸		
FS2-6				180 mM 蔗糖	/	

[0614] 检测结果见表8及图11A-11F。高温放置后，FS2-5的SEC-HPLC聚体含量最低，CEX-HPLC主峰含量最高。各处方外观、粘度和相对结合活性正常。因此选择FS2-5，即脯氨酸和甲硫氨酸进行第三轮处方筛选。

[0615] 表8 FS2-高温稳定性检测结果

处方编号		外观			40℃ 10d 不溶性微粒 (粒/ml)			
		T0	40℃ 10d		总数	≥10μm	≥25μm	
FS2-1		轻乳光，微黄	轻乳光，微黄		22829.37	858.88	10.60	
FS2-2		轻乳光，微黄	轻乳光，微黄		6239.30	90.42	0.00	
FS2-3		轻乳光，微黄	轻乳光，微黄		2153.23	62.59	0.00	
FS2-4		轻乳光，微黄	轻乳光，微黄		2176.78	41.46	0.00	
FS2-5		轻乳光，微黄	轻乳光，微黄		876.81	32.08	21.39	
FS2-6		轻乳光，微黄	轻乳光，微黄略深		579.23	0.00	0.00	
处方编号	SEC-聚	SEC-	SEC-	SEC-片	nrCE-聚	nrCE-	nrCE-	nrCE-片
	体(%)	JSKN003	KN035			JSKN003	KN035	
		主峰(%)	主峰(%)	段(%)		主峰(%)	主峰(%)	
FS2-1	4.6	48.1	47.1	0.2	2.8	46.2	49.3	1.7
FS2-2	4.0	48.3	47.5	0.2	2.2	46.7	49.4	1.7
FS2-3	4.1	48.3	47.5	0.2	2.2	46.8	49.3	1.7
FS2-4	3.9	48.4	47.5	0.2	2.2	46.3	49.8	1.7
FS2-5	3.8	48.5	47.5	0.2	2.0	46.1	50.2	1.7
FS2-6	5.1	47.8	46.8	0.2	2.8	46.5	49.0	1.7

[0616] 3.3、第三轮处方筛选

[0617] 第三轮处方筛选目的是确定pH、蛋白质含量、甲硫氨酸含量和聚山梨酯80含量。将JSKN003与KN035样品分别置换至表9各处方中，样品制备完成后检测粘度，进行冻融、振摇、光照和高温稳定性，详见表10。各稳定性实验完成后，检测样品外观、不溶性微粒、rH和PDI、SEC-HPLC、nrCE-SDS、CEX-HPLC、Binding(HER2和PD-L1)、Free-Drug。各项稳定性实验的检测结果参见表11-表15。

[0618] 表9第三轮处方筛选方案

处方 编号	JSKN003 含量 (mg/ml)	KN035 含量 (mg/ml)	pH	缓冲体系	稳定剂	抗氧化剂	表面活性剂
FS3-1	80	100	6.0*	10 mM 组氨酸/ 组氨酸盐酸盐	180 mM 脯氨酸	15 mM 甲硫氨酸	0.02%聚山 梨酯 80
FS3-2	80	100				30 mM 甲硫氨酸	
FS3-3	100	100					
FS3-4	60	90					
FS3-6	80	100	5.5**			30 mM 甲硫氨酸	0.04%聚山 梨酯 80
FS3-5	80	100	6.0*				

[0619] ★：换液后所得样品的pH值为6.0，换液前置换液的pH为5.5；★★：换液后所得样品的pH值为5.5，换液前置换液的pH为5.0

[0620] 表10第三轮处方筛选稳定性方案

稳定性实验	处方	实验条件
冻融稳定性	FS3-1、3-2、3-3、3-4、3-6	-40℃冻，2~8℃融，共5轮
振摇稳定性	FS3-2、3-5	25±2℃，200 rpm，7天
光照稳定性	FS3-1、3-2、3-3、3-4	总照度 0.6 MLxh
高温稳定性	FS3-1、3-2、3-3、3-4、3-6	40±2℃，RH70±5%，20天

[0621] 表11 FS3—粘度检测结果

处方编号	粘度（cP）
FS3-1	12.44
FS3-2	11.41
FS3-3	15.41
FS3-4	6.621
FS3-6	9.873

[0622] 表12 FS3—冻融稳定性检测结果

处方 编号	外观				rH(nm)		PDI	
	T0		冻融		T0	冻融	T0	冻融
FS3-1	轻乳光，淡黄色		轻乳光，淡黄色		2.12	2.18	0.21	0.19
FS3-2	轻乳光，淡黄色		轻乳光，淡黄色		2.10	2.13	0.20	0.20
FS3-3	轻乳光，淡黄色		轻乳光，淡黄色		2.10	2.09	0.20	0.20
FS3-4	轻乳光，淡黄色		轻乳光，淡黄色		2.22	2.22	0.19	0.20
FS3-6	轻乳光，淡黄色		轻乳光，淡黄色		2.16	2.15	0.16	0.15

处方 编号	不溶性微粒-总数(粒/ml)		不溶性微粒 ≥10μm(粒/ml)		不溶性微粒 ≥25μm (粒/ml)	
	T0	冻融	T0	冻融	T0	冻融
FS3-1	773.27	1682.30	60.41	53.58	12.08	0.00
FS3-2	975.28	4509.34	0.00	52.43	0.00	10.49
FS3-3	476.28	1242.80	31.10	52.22	0.00	0.00
FS3-4	2795.27	9659.44	42.03	172.71	0.00	0.00
FS3-6	310.94	4844.79	10.37	161.11	0.00	11.51

处方 编号	SEC-主峰(%)	SEC-聚体(%)	SEC-片段(%)	CEX-JSKN003 主峰	CEX-KN035 主峰(%)
	冻融	冻融	冻融	(%)冻融	冻融
FS3-1	97.1	2.8	0.1	29.1	冻融
FS3-2	96.5	3.4	<0.1	28.3	42.8
FS3-3	97.4	2.5	<0.1	31.9	43.2
FS3-4	97.5	2.5	ND	26.0	38.6
FS3-6	99.0	0.9	0.1	29.8	46.8

处方 编号	nrCE-主峰(%)		nrCE-前峰(%)		nrCE-中峰(%)		nrCE-后峰(%)	
	T0	冻融	T0	冻融	T0	冻融	T0	冻融
FS3-1	97.8	97.0	0.4	0.5	0.8	0.8	1.0	1.7
FS3-2	97.8	96.9	0.4	0.4	0.8	0.7	1.0	2.1
FS3-3	97.6	97.2	0.4	0.4	0.9	0.8	1.1	1.6
FS3-4	98.1	97.5	0.4	0.4	0.7	0.6	0.9	1.5

FS3-6	98.6	98.3	0.4	0.4	0.8	0.7	0.1	0.5
-------	------	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

处方 编号	Linker-DXD(%)		DXD(%)		Binding-HER2(%)		Binding-PDL1(%)	
	T0	冻融	T0	冻融	T0	冻融	T0	冻融
FS3-1	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	90	88	99	99
FS3-2	0.007	0.007	<0.005	<0.005	85	87	103	103
FS3-3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	85	81	103	101
FS3-4	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	87	101	100	99
FS3-6	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	83	93	96	99

[0623] 表13 FS3—振摇稳定性检测结果

处方 编号	外观		rH(nm)		PDI		
	T0	振摇	T0	振摇	T0	振摇	
FS3-2	轻乳光，淡黄色	轻乳光，淡黄色	2.10	2.11	0.20	0.19	
FS3-5	轻乳光，淡黄色	轻乳光，淡黄色	/	2.13	/	0.19	
处方 编号	不溶性微粒-总数(粒/ml)		不溶性微粒 ≥10µm(粒/ml)		不溶性微粒 ≥25µm (粒/ml)		
	T0	振摇	T0	振摇	T0	振摇	
FS3-2	975.28	22013.00	0.00	70.11	0.00	0.00	
FS3-5	/	28124.34	/	423.87	/	57.28	
处方 编号	SEC-主峰 (%)	SEC-聚体 (%)	SEC-片段 (%)	nrCE-主峰 (%)	nrCE-前峰 (%)	nrCE-中峰 (%)	nrCE-后峰 (%)
	FS3-2	96.6	3.4	<0.1	96.6	0.5	0.8
FS3-5	96.6	3.3	<0.1	96.6	0.4	0.8	2.2
处方 编号	CEX- JSKN003 主 峰(%)	CEX-KN035 主峰(%)	Binding-HER2(%)		Binding-PDL1(%)		
	振摇	振摇	T0	振摇	T0	振摇	
FS3-2	27.9	43.7	85	88	103	100	
FS3-5	28.0	43.7	/	88	/	115	
处方 编号	Linker-DXD(%)			DXD(%)			
	T0	振摇		T0	振摇		
FS3-2	0.007	0.006		<0.005	<0.005		
FS3-5	/	0.006		/	<0.005		

[0624] 表14 FS3—光照稳定性检测结果

处方 编号	外观		rH(nm)		PDI	
	T0	光照	T0	光照	T0	光照
FS3-1	轻乳光 淡黄色	轻乳光 淡黄加深	2.12	2.13	0.21	0.22
FS3-2	轻乳光 淡黄色	轻乳光 淡黄色	2.10	2.13	0.20	0.21
FS3-3	轻乳光 淡黄色	轻乳光 淡黄色	2.10	2.11	0.20	0.21
FS3-4	轻乳光	轻乳光	2.22	2.24	0.19	0.19

	淡黄色	淡黄色					
处方 编号	不溶性微粒-总数(粒/ml)		不溶性微粒 ≥10µm(粒/ml)		不溶性微粒 ≥25µm(粒/ml)		
	T0	光照 1	T0	光照 1	T0	光照 1	
FS3-1	773.27	15090.50	60.41	1542.09	12.08	283.24	
FS3-2	975.28	7049.58	0.00	236.03	0.00	62.94	
FS3-3	476.28	4790.96	31.10	117.37	0.00	10.67	
FS3-4	2795.27	2379.10	42.03	32.44	0.00	0.00	
处方 编号	SEC-主峰 (%)	SEC-聚体 (%)	SEC-片段 (%)	nrCE-主峰 (%)	nrCE-前峰 (%)	nrCE-中峰 (%)	nrCE-后峰 (%)
FS3-1	92.4	7.6	0.1	93.4	0.2	0.8	5.5
FS3-2	92.2	7.7	<0.1	93.7	0.2	0.7	5.4
FS3-3	93.5	6.5	0.1	94.1	0.3	0.9	4.7
FS3-4	94.2	5.8	0.1	95.5	0.2	0.7	3.7
处方 编号	CEX- JSKN003 主 峰(%)	CEX-KN035 主峰(%)	Binding-HER2(%)		Binding-PDL1(%)		
	光照	光照	T0	光照	T0	光照	
FS3-1	24.6	38.8	90	96	99	102	
FS3-2	25.2	43.5	85	95	103	102	
FS3-3	28.3	38.5	85	83	103	106	
FS3-4	23.0	45.8	87	84	100	103	
处方 编号	Linker-DXD(%)			DXD(%)			
	T0	光照	T0	光照 1			
FS3-1	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005			
FS3-2	0.007	<0.005	<0.005	<0.005			
FS3-3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005			
FS3-4	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005			

[0625] 表15 FS3–高温稳定性检测结果

处方 编号	外观		rH(nm)		PDI	
	T0	高温	T0	高温	T0	高温
FS3-1	轻乳光，淡黄色	轻乳光，Y-3	2.12	2.27	0.21	0.34
FS3-2	轻乳光，淡黄色	轻乳光，Y-2	2.10	2.20	0.20	0.25
FS3-3	轻乳光，淡黄色	轻乳光，Y-3	2.10	2.25	0.20	0.36
FS3-4	轻乳光，淡黄色	轻乳光，Y-2	2.22	2.29	0.19	0.26
FS3-6	轻乳光，淡黄色	轻乳光，Y-3	2.16	3.15	0.16	0.58
处方 编号	不溶性微粒-总数(粒/ml)		不溶性微粒 ≥10µm(粒/ml)		不溶性微粒 ≥25µm(粒/ml)	
	T0	高温	T0	高温	T0	高温
FS3-1	773.27	1237.88	60.41	57.84	12.08	23.14
FS3-2	975.28	2176.76	0.00	84.53	0.00	10.57
FS3-3	476.28	5846.22	31.10	103.66	0.00	20.73
FS3-4	2795.27	2498.12	42.03	72.56	0.00	10.37
FS3-6	310.94	1821.74	10.37	21.06	0.00	10.53

处方 编号	SEC-主峰(%)	SEC-聚体 (%)	SEC-片段 (%)	nrCE-主峰 (%)	nrCE-前峰 (%)	nrCE-中峰 (%)	nrCE-后峰 (%)
FS3-1	96.8	2.8	0.4	95.9	0.9	0.9	1.9
FS3-2	96.9	2.6	0.4	96.1	0.9	0.9	1.7
FS3-3	96.7	2.8	0.5	95.7	1.0	1.0	2.0
FS3-4	97.4	2.2	0.4	96.5	0.9	0.9	1.5
FS3-6	97.7	1.7	0.7	95.4	1.9	1.9	1.0
处方 编号	CEX-JSKN003 主峰(%)	CEX-KN035 主峰(%)	Binding-HER2(%)		Binding-PDL1(%)		
	光照	光照	T0	光照	T0	光照	
FS3-1	17.3	42.5	90	91	99	94	
FS3-2	15.3	42.8	85	91	103	93	
FS3-3	19.0	38.3	85	93	103	89	
FS3-4	16.0	46.1	87	95	100	100	
FS3-6	18.6	42.2	83	92	96	95	
处方 编号	Linker-DXD(%)			DXD(%)			
	T0	光照	T0	光照 1			
FS3-1	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005			
FS3-2	0.007	<0.005	<0.005	<0.005			
FS3-3	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005			
FS3-4	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005			
FS3-6	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005			

[0626] 各检测项在不同稳定性实验中的检测结果汇总于图12A-12E。研究显示，FS3-6高温和冻融SEC-HPLC聚体含量低，因此pH优选5.5。光照后，FS3-1微粒数量显著增加，因此甲硫氨酸含量优选30mM。0.04%聚山梨酯80未见优势，因此选择0.02%聚山梨酯80。

[0627] 综合以上结果，优选处方FS3-6，即80mg/ml JSKN003，100mg/ml KN035，pH 5.5，10mM组氨酸/组氨酸盐酸盐(置换液含量，换液后实际组氨酸含量有所降低，见下文)，180mM脯氨酸，30mM甲硫氨酸，0.02%聚山梨酯80。其高温、冻融、振摇稳定性良好，粘度<10cP，有利于皮下注射。

[0628] 考虑到皮下注射合适的渗透压应为300mOsmo/kg左右，经计算，将脯氨酸浓度调整至140mM。最终优选的混合制剂(即JSKN033)处方为80mg/ml JSKN003，100mg/ml KN035，制剂处方：pH 5.5±0.5，10mM组氨酸/组氨酸盐酸盐，140mM脯氨酸，30mM甲硫氨酸，0.02%聚山梨酯80。缓冲体系也可采用组氨酸加冰醋酸调节pH的配制方式。

[0629] 3.4、辅料含量确认

[0630] 制备含3~30mM组氨酸/醋酸，140mM脯氨酸的样品，进行稳定性实验。检测结果见表16和图13。结果表明，15mM和30mM组氨酸后样品乳光较重，且不溶性微粒数量增多，其他检项没有差异，因此确认较适宜的组氨酸含量为3~5mM(置换液约为10mM)，脯氨酸含量140~180mM，缓冲体系组氨酸/组氨酸盐酸盐或组氨酸/醋酸缓冲体系。

[0631] 表16组氨酸含量确认的外观检测结果

处方编号	缓冲体系	外观	
		T0	40°C 4W
His 3 mM*	3~30 mM 组氨酸/醋酸，pH 5.5， 140 mM 脯氨酸，30 mM 甲硫氨酸，0.02%聚山梨酯 80	乳光最轻	淡黄色 乳光
His 15 mM**		乳光	淡黄色 乳光
His 30 mM**		乳光最重	淡黄色 乳光

[0632] *：置换缓冲液为10mM，用醋酸调节pH，换液后样品实测组氨酸含量约为3.3 mM。

[0633] **：在His 3mM换液后样品基础上分别补加缓冲液调整组氨酸含量至目标值。

[0634] 3.5、混合制剂长期稳定性和加速稳定性

[0635] 按照最终制剂处方：10mM组氨酸/醋酸(置换液组氨酸含量10mM，换液后实测组氨酸含量约为4.3mM)，pH 5.5(置换液pH 5.0，换液后pH 5.5)，140mM脯氨酸，30mM甲硫氨酸，0.02%聚山梨酯80，进行放大生产。长期稳定性(2~8℃，倒置，12M)和加速稳定性(25±2℃，RH60±5%，倒置，6M)结果如图14A~14D和图15A~15D所示，混合制剂长期和加速稳定性良好。

[0636] 实施例4、混合制剂的皮下给药

[0637] 4.1、雌性巴马小型猪单次静脉或皮下给药的药代动力学研究

[0638] 选取10只雌性巴马小型猪，分成2组，每组5只，分别按照以下方案静脉推注JS KN003或皮下注射JSKN033，并在特定时间采集血液样本：

组别	动物数	测试品	目标给药水平 (mg/kg)	目标给药体积 (mg/kg)	目标给药浓度 (mg/mL)	载体	给药途径	采血点时间
1	5 雌性	JSKN003	5	0.5	10	生理盐水	静脉推注	0h (pre-dose), 0.083h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 144h, 240h, 336h, 504h, 672h
2	5 雌性	JSKN033	JSKN033 (11.6) JSKN003 (5)	0.5	JSKN033 (23.2) JSKN003 (10)	生理盐水	皮下注射	0h (pre-dose), 1h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 144h, 192h, 240h, 288h, 336h, 504h, 672h

[0639] 测定样本血清中JSKN003的药物浓度，结果如图3所示。皮下注射11.6mg/kg JSKN033(相当于5mg/kg JSKN003)后，复方中的JSKN003吸收较快，在注射后24–48h达到最大血药浓度。平均C_{max}及AUC(0–last)值分别为30420ng/mL和7499765ng.h/mL。皮下注射的半衰期为164h，与静脉推注类似，JSKN033皮下注射的平均生物利用度为73.4%。

[0640] 4.2、兔子间歇性皮下注射刺激研究

[0641] 8只兔子随机分配至2组，每组雌雄各2只，通过每周一次(第1天和第8天)皮下注射施用试验品(左侧)或对照品(右侧)时比较同一动物背部区域不同侧的刺激反应，来确定JSKN033潜在的局部注射部位刺激。将不同剂量(0.25和0.5mL/位点)的试验品注射到背部区域的左侧，将对照品(氯化钠注射液)注射到背部区域的右侧。剂量浓度为186.1mg/mL。开始给药时，雄性和雌性兔子大约5个月大，体重范围为雄性3.2至3.4千克，雌性3.1至3.3千克。在第11天(1只动物/性别/组)和第15天(另外1只动物/性别/组)对动物进行尸检。评价标准包括死亡率、临床体征、体重、注射部位刺激反应评分、宏观和组织病理学检查结果。

[0642] 结果显示，没有意外死亡，也没有与测试品相关的临床症状或体重变化。在给药和恢复阶段结束时，没有观察到宏观或组织病理学变化。

[0643] 对于对照品(0.25mL/位点)、对照品(0.5mL/位点)、JSKN033(0.25mL/位点)和JSKN033(0.5mL/位点)，给药阶段和恢复阶段的给药部位的每日平均评分均为0。

[0644] 主要刺激指数(PII)源自给药阶段和恢复阶段的每日平均给药部位评分的结果。结果显示，在给药阶段和恢复阶段，施用对照品(0.25mL/位点)、对照品(0.5mL/

位点)、JSKN033(0.25mL/位点)和JSKN033(0.5mL/位点)的给药位点的PII都为0,表明在所有治疗组的给药部位均未观察到刺激。

[0645] 实施例5、评估JSKN033在晚期或转移性实体恶性肿瘤患者中的安全性、耐受性、药代动力学/药效学和疗效的I/II期临床研究

[0646] ➤研究目的及终点

[0647] 主要目的及终点:

阶段	主要目的	主要终点
I 期	- 评估 JSKN033 在符合条件的晚期或转移性实体恶性肿瘤患者中的安全性和耐受性 - 确定 JSKN033 的 II 期推荐剂量 (RP2D)	- 由 NCI CTCAE 5.0 版本评估的治疗引起的不良事件 (TEAEs)、治疗相关不良事件 (TRAEs)、严重不良事件 (SAEs) 的发生率和严重程度 - 剂量限制毒性 (DLTs)
II 期	评估 JSKN033 的疗效[基于客观缓解率 (ORR)]	ORR

[0648] 次要目的及终点:

阶段	次要目的	次要终点
I 期	表征 JSKN033 的药代动力学 (PK) 特征	药代动力学评价: 包括但不限于 Cmax, Tmax, AUC₀₋₄, AUC_{0-∞} (如适用), t_{1/2}, MRT, C_{ss, max}, C_{ss, min}, AUC_{ss}, CL, V_{ss}, Rac 等, 对于 JSKN003, 总抗体 (Tab) 和 JSKN003 的载荷, 以及恩沃利单抗
	评估 JSKN033 的免疫原性	抗 JSKN003 抗体、抗恩沃利单抗抗体的状态 (阳性或阴性) 和血清滴度, 以及中和能力 (如适用)
	评估 JSKN033 的初步疗效	根据实体瘤疗效评估标准 1.1 版本 (RECIST v1.1) 的 ORR、疾病控制率 (DCR)、缓解时间 (TTR)、缓解持续时间 (DOR) 和无进展生存期 (PFS); 总生存期 (OS) 和 12 个月 OS 率
II 期	表征 JSKN033 的药代动力学 (PK) 特征	药代动力学评价: 包括但不限于 Cmax, Tmax, AUC₀₋₄, AUC_{0-∞} (如适用), t_{1/2}, C_{ss, max}, C_{ss, min}, AUC_{ss}, CL, V_{ss}, Rac 等, 对于 JSKN003, 总抗体 (Tab) 和 JSKN003 的载荷, 以及恩沃利单抗

	评估 JSKN033 的免疫原性	抗 JSKN003 抗体、抗恩沃利单抗抗体的状态（阳性或阴性）和血清滴度，以及中和能力（如适用）
	评估 JSKN033 的安全性	由 NCI CTCAE 5.0 版本评估的 TEAEs、TRAEs、严重不良事件 SAEs 的发生率和严重程度
	评估 JSKN033 的疗效（基于其他疗效终点）	DCR、TTR、DOR、PFS、OS 以及 12 个月 OS 率

- [0649] ➤研究人群
- [0650] 该研究将招募患有晚期不可切除或转移性恶性实体肿瘤的**表达HER2**的患者，这些患者对标准治疗不耐受，或者在先前的标准全身治疗期间或之后复发，包括但不限于胃、结直肠、NSCLC和其他恶性实体瘤类型。**HER2**表达定义为免疫组织化学(IHC)≥1+。NSCLC患者中**HER2**突变被视为**HER2**表达。对于剂量扩展阶段，仅招募具有**HER2**表达的胃肠道肿瘤患者。
- [0651] ➤样本量
- [0652] 剂量递增阶段(I期)：样本量由“3+3”设计确定。
- [0653] 剂量递增阶段(II期)：SMC将选择1–2个剂量组进行扩展，每组增加10至30名患者，以进一步探索JSKN033的安全性和有效性。
- [0654] ➤研究药物
- [0655] JSKN033的规格为180mg/1mL/瓶，其中含有80mg JSKN003和100mg恩沃利单抗。JSKN033的给药途径是皮下注射，每周D1给药，从1.1mg/kg开始，然后是2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg和6.7mg/kg。
- [0656] ➤研究设计
- [0657] 本研究是一项开放标签、多中心、首次在人类中进行的I/II期(剂量递增和剂量扩展)研究，旨在评估JSKN033在预计为**HER2**表达(IHC≥1+)的晚期不可切除或转移性实体恶性肿瘤患者中的安全性、耐受性、PK、免疫原性和疗效。
- [0658] · 剂量递增阶段
- [0659] 计划的剂量递增方案如下：

剂量递增等级	JSKN033 剂量
剂量水平 1	1.1 mg/kg, SC, QW
剂量水平 2	2.3 mg/kg, SC, QW
剂量水平 3	4.5 mg/kg, SC, QW
剂量水平 4	5.6 mg/kg, SC, QW
剂量水平 5	6.7 mg/kg, SC, QW
SC: 皮下注射	

- [0660] 剂量递增阶段将针对剂量水平1(1.1mg/kg,SC,QW)和剂量水平2(2.3mg/kg,SC,QW)采用单个患者加速剂量滴定(ADT)，之后的剂量水平3(4.5mg/kg,SC,QW)、剂量水平4(5.6mg/kg,SC,QW)和剂量水平5(6.7mg/kg,SC,QW)将会采用“3+3”设计进行入组和监测，旨在确定JSKN033的MTD/RP2D。如果认为有必要，安全监测委员会(SMC)有权决定以其他剂量(更高剂量、中间剂量、或更低剂量，或其他剂量间隔)进行剂量递增。
- [0661] 入组患者将按照方案要求依次分配至计划剂量水平并接受JSKN033SC QW治疗，以观察治疗相关AE和剂量限制毒性(DLT)的发生情况。DLT观察期为自给予第一剂JSKN033起21天。
- [0662] 加速剂量滴定剂量递增：为了最大限度地减少剂量递增早期阶段潜在的治疗不足暴露，该研究将仅招募1名剂量水平1和剂量水平2的患者。如果这2名患者未经历DLT，则之后的患者将被纳入“3+3”设计的剂量水平3。如果患者在剂量水平1或剂量水平2经历DLT，SMC将决定是否招募更多该剂量水平的患者来评估JSKN033的安全性。当确认剂量水平2安全时，可将剂量水平1的患者提升至剂量水平2，当确认剂量水平3安全时，可将剂量水平1和剂量水平2的患者提升至剂量水平3。
- [0663] 如果一名患者在DLT观察期内接受的剂量低于计划的80%，则将招募另一名患者。如果患者因不良事件而无法接受足够剂量的JSKN033，则DLT评估资格将由SMC确定。
- [0664] · 剂量扩展阶段(II期)
- [0665] 在剂量递增之后或期间，SMC将选择1-2个剂量水平进行扩展，每个剂量水平额外招募10-30名具有HER2表达的胃肠道肿瘤患者，以进一步探索JSKN033的有效性和安全性。

- [0666] ➤纳入标准
- [0667] 患者必须满足以下纳入标准才能参加研究：
- [0668] 1.愿意并且能够提供试验的书面知情同意书(ICF)。
- [0669] 2.男性或女性，年满18周岁；愿意并且能够完成所有要求的研究过程。
- [0670] 3.东方肿瘤合作组织表现状态0或1，预期寿命 ≥ 12 周。
- [0671] 4.必须有病理记录的晚期/不可切除或转移性实体恶性肿瘤(剂量扩展阶段为胃肠道肿瘤)，且HER2表达(IHC $\geq 1+$)，且标准治疗难治或无法耐受，或者没有有效的标准治疗。NSCLC患者的HER2突变也被视为HER2表达。
- [0672] 5.根据RECIST 1.1的基线可测量疾病。如果已经证明位于先前照射区域的目标病灶有进展，则认为此类病灶是可测量的。
- [0673] 6.首次试验前7天内评估具有足够的器官功能[在研究产品给药前14天内未接受过输血、促红细胞生成素(EPO)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或其他相关医疗支持]：

系统	实验室值
血液学	
绝对中性粒细胞计数	$\geq 1.5 \times 10^9/L$
血小板	$\geq 100 \times 10^9/L$
血红蛋白	$\geq 9 \text{ g/dL}$
肾	
血清肌酐	$\leq 1.5 \times$ 正常上限 (ULN) 或计算的肌酐清除率 (CrCL) $> 60 \text{ mL/min}$ (Cockcroft-Gault 公式)
肝	
总胆红素	$\leq 1.5 \times$ ULN
AST/ALT	$\leq 3 \times$ ULN 或肝转移患者 $\leq 5 \times$ ULN
凝血	
国际标准化比率 (INR) 或凝血酶原时间 (PT)	$\leq 1.5 \times$ ULN
活化部分凝血活酶时间 (APTT)	$\leq 1.5 \times$ ULN

- [0674] 7.首次给药前有足够的治疗洗脱期，定义为：

治疗	洗脱期
大手术（诊断性活检除外）	≥ 4 周
放疗	≥ 4 周（如果姑息性立体定向放疗 ≥ 2 周）
激素治疗	≥ 1 周

化疗	≥3 周（对于口服 5-氟尿嘧啶类药物和/或单周紫杉醇化疗≥2 周）
免疫治疗	≥4 周
其他抗肿瘤和研究性药物	≥4 周或半衰期的 5 倍（不少于 2 周），以较短者为准
细胞色素 P450(CYP)3A4 强抑制剂	≥5 倍抑制剂清除半衰期

- [0675] 8.首次给药前28天内，通过超声心动图(ECHO)或多门控采集(MUGA)测得LVEF≥50%。
- [0676] 9.具有生育能力的女性或男性患者同意从首次给药开始至给药结束180天后采用高效避孕措施(年失败率低于1%)，具有生育能力的女性受试者在首次给药前7天内妊娠试验结果必须为阴性(有生育能力定义为未记录输卵管结扎或子宫切除术的绝经前女性，或绝经1年内的女性)。
- [0677] ➤结果
- [0678] 截至2024年8月20日，共有十名患者入组(n=4乳腺癌，n=2肺癌，n=2胆道癌，n=1结直肠癌，n=1唾液腺癌)，其HER2表达/突变情况见下表。患者接受SKN033治疗，剂量分别为1.1mg/kg(n=1)，2.3mg/kg(n=1)，4.5mg/kg(n=3)，5.6mg/kg(n=3)和6.7mg/kg(n=2)。最常见的治疗相关不良事件(TRAE)是轻度至中度的注射部位反应(1–2级)。未观察到3级或更高级别的TRAEs或严重不良事件，也没有TRAEs导致治疗中断。

癌症类型 (n)	HER2 状态			
	IHC1+	IHC2+	IHC3+	突变
乳腺癌	1	3	0	0
肺癌	0	0	0	2
胆道癌	0	1	1	0
结直肠癌	0	1	0	0
唾液腺癌	0	0	1	0

- [0679] 八名患者可评估疗效，其中两名显示部分反应，四名显示疾病稳定，疾病控制率达到75%。两名接受5.6mg/kg剂量治疗的患者，在首次基线后扫描时显示部分反应。其中一名患者患有HR阳性/HER2低表达(IHC 2+，FISH-)乳腺癌，已经接受了至少四线以上治疗，另一名患者患有HER2突变的非小细胞肺癌，曾在免疫治疗、化疗和抗HER2治疗后病情进展。

[0680] 在JSKN033的这项人体首次试验中，最常见的治疗相关不良事件(TRAЕ)是轻度至中度的注射部位反应，这表明了其良好的安全性。在5.6mg/kg剂量组，两名接受过大量前期治疗的患者实现了部分反应，这与临床药理学数据的估计一致。这些结果鼓励了对JSKN033的进一步临床开发。此外，这种制剂技术可能适用于其他抗体药物偶联(ADC)疗法。

[0681] 实施例6、其他ADC与KN035混合制剂的稳定性研究

[0682] (1)

[0683] 取DS8201(购自第一三共/阿斯利康，商品名优赫得®(Enhertu®),产品批号：397496)和KN035样品，用透析卡盒进行换液，用超滤管进行浓缩，按预期浓度混合，配制为表17所示的处方。

[0684] 表17 DS8201混合制剂处方

样品名称	DS8201 含量	KN035 含量	缓冲体系	表面活性剂
DS8201-25	25 mg/ml	/	10 mM 组氨酸-醋酸，pH5.5	0.02%聚山梨酯 80
DS8201EN-25	25 mg/ml	25 mg/ml	10 mM 组氨酸-醋酸，pH5.5	0.02%聚山梨酯 80
DS8201-50	50 mg/ml	/	10 mM 组氨酸-醋酸，pH5.5	0.02%聚山梨酯 80
DS8201EN-50	50 mg/ml	100 mg/ml	10 mM 组氨酸-醋酸，pH5.5	0.02%聚山梨酯 80

[0685] 制备完成后，将样品放置于恒温恒湿箱(40±2℃，70%RH)4周，检测各处方不溶性微粒含量和SEC-HPLC纯度。结果如表18、图16、图17所示。

[0686] 试验结果表明，DS8201在与不同浓度KN035混合后，高温稳定性均良好，样品无可见异物，不溶性微粒无显著差异，SEC-HPLC聚体(HMW)含量降低。

[0687] 表18 DS8201混合制剂试验结果

样品名称	不溶性微粒 (粒/ml)	T0	30℃ 1W	40℃ 1W	SEC-HPLC 纯度(%)	T0	30℃ 1W	40℃ 1W
DS8201-25	≥1 μm	15334.62	1645.04	3377.27	HMW	2.7	6.0	7.5
	≥10 μm	921.81	45.38	66.88	Main	97.1	93.7	92.0
	≥25 μm	173.52	11.35	0.00	LMW	0.2	0.3	0.5
DS8201EN-25	≥1 μm	5291.16	5193.19	1762.03	HMW	1.8	3.8	5.1
	≥10 μm	63.62	176.22	11.52	Main	98.1	95.9	94.5
	≥25 μm	0.00	10.37	0.00	LMW	0.1	0.3	0.4

样品名称	不溶性微粒 (粒/ml)	T0	40℃ 2W	40℃ 4W	SEC-HPLC 纯度(%)	T0	40℃ 2W	40℃ 4W
DS8201-50	≥1 μm	6047.17	12926.81	5806.09	HMW	7.9	14.4	16.5
	≥10 μm	196.95	333.17	105.96	Main	90.9	83.2	79.8
	≥25 μm	20.73	11.11	21.19	LMW	1.2	2.4	3.8
DS8201EN-50	≥1 μm	657.42	4867.01	8209.59	HMW	6.9	9.1	9.4
	≥10 μm	42.41	180.26	103.66	Main	92.9	90.5	89.8
	≥25 μm	21.21	31.81	41.46	LMW	0.2	0.4	0.8

[0688] (2)

[0689] 取RC48(购自荣昌生物, 商品名爱地希[®], 产品批号: RC48-X1-202206016/RC48-X1-202311012)和KN035样品, 用透析卡盒进行换液, 用超滤管进行浓缩, 按预期浓度混合, 配制为表19所示的处方。

[0690] 表19 RC48混合制剂处方

样品名称	RC48 含量	KN035 含量	缓冲体系	表面活性剂
RC48-80	80 mg/ml	/	10 mM 组氨酸-醋酸, pH5.5	0.02%聚山梨酯 80
RC48EN-80	80 mg/ml	100 mg/ml	10 mM 组氨酸-醋酸, pH5.5	0.02%聚山梨酯 80

[0691] 制备完成后, 将样品放置于恒温恒湿箱(40±2℃, 70%RH)4周, 检测各处方不溶性微粒含量和SEC-HPLC纯度。结果如表20、图18、图19所示。

[0692] 试验结果表明, RC48在与高浓度KN035混合后, 高温稳定性良好, 样品无可见异物, 不溶性微粒无显著差异, SEC-HPLC聚体(HMW)含量降低。

[0693] 表20 RC48混合制剂试验结果

样品名称	不溶性微粒 (粒/ml)	T0	40℃ 2W	40℃ 4W	SEC-HPLC 纯度(%)	T0	40℃ 2W	40℃ 4W
RC48-80	≥1 μm	551.38	7411.43	15292.28	HMW	0.3	6.9	10.2
	≥10 μm	0.00	269.51	310.95	Main	96.7	89.0	84.9
	≥25 μm	0.00	41.46	11.11	LMW	3.0	4.1	4.1
RC48EN-80	≥1 μm	466.88	6744.75	8482.81	HMW	0.3	6.2	8.7
	≥10 μm	0.00	367.42	222.67	Main	99.5	93.4	90.7
	≥25 μm	0.00	26.24	21.21	LMW	0.2	0.4	0.6

序列描述	序列编号	具体序列
PD-L1 VHH	SEQ ID NO: 1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERE RVAKLLTSGSTYLADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAV YYCAADSFEDPTCTLTSSGAFQYWGQGTLVTVSS
Fc 区	SEQ ID NO: 2	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Fc 区	SEQ ID NO: 3	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV AVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PD-L1 VHH-Fc	SEQ ID NO: 4	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERE RVAKLLTSGSTYLADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAV YYCAADSFEDPTCTLTSSGAFQYWGQGTLVTVSS EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV AVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Kabat CDR1	SEQ ID NO: 5	RRCMA
Kabat CDR2	SEQ ID NO: 6	KLLTSGSTYLADSVKG
Kabat CDR3	SEQ ID NO: 7	DSFEDPTCTLTSSGAFQY
AbM CDR1	SEQ ID NO: 8	GKMSSRRCMA
AbM CDR2	SEQ ID NO: 9	KLLTSGSTY
AbM CDR3	SEQ ID NO: 10	DSFEDPTCTLTSSGAFQY
Chothia CDR1	SEQ ID NO: 11	GKMSSRR
Chothia CDR2	SEQ ID NO: 12	LTTSGS
Chothia CDR3	SEQ ID NO: 13	DSFEDPTCTLTSSGAFQY
IMGT CDR1	SEQ ID NO: 14	GKMSSRRC
IMGT CDR2	SEQ ID NO: 15	LTTSGST

IMGT CDR3	SEQ ID NO: 16	AADSFEDPTCTLVTSSGAFQY
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区	SEQ ID NO: 17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSTFYFDYWQGGLTVTVSS
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区	SEQ ID NO: 18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区	SEQ ID NO: 19	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYHTPPTF GQGTKVEIK
HER2 双特异性 抗体第一重链	SEQ ID NO: 20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLE WVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNLGPSTFYFDYWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLVCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
HER2 双特异性 抗体第二重链	SEQ ID NO: 21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFELVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
HER2 双特异性 抗体轻链	SEQ ID NO: 22	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYHTPPTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 Kabat CDR1	SEQ ID NO: 23	DYTMD
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 Kabat CDR2	SEQ ID NO: 24	DVNPNSGGSIYNQRFKG

HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 Kabat CDR3	SEQ ID NO: 25	NLGPSFYFDY
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 AbM CDR1	SEQ ID NO: 26	GFTFTDYTMD
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 AbM CDR2	SEQ ID NO: 27	DVNPNSGGSI
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 AbM CDR3	SEQ ID NO: 28	NLGPSFYFDY
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 Chothia CDR1	SEQ ID NO: 29	GFTFTDY
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 Chothia CDR2	SEQ ID NO: 30	NPNSGG
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 Chothia CDR3	SEQ ID NO: 31	NLGPSFYFDY
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 IMGT CDR1	SEQ ID NO: 32	GFTFTDYT
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 IMGT CDR2	SEQ ID NO: 33	VNPNSGGS
HER2 双特异性 抗体第一重链 可变区 IMGT CDR3	SEQ ID NO: 34	ARNLGPSFYFDY
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 Kabat CDR1	SEQ ID NO: 35	DTYIH

HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 Kabat CDR2	SEQ ID NO: 36	RIYPTNGYTRYADSVKG
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 Kabat CDR3	SEQ ID NO: 37	WGGDGFYAMDY
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 AbM CDR1	SEQ ID NO: 38	GFNIKDTYIH
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 AbM CDR2	SEQ ID NO: 39	RIYPTNGYTR
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 AbM CDR3	SEQ ID NO: 40	WGGDGFYAMDY
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 Chothia CDR1	SEQ ID NO: 41	GFNIKDT
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 Chothia CDR2	SEQ ID NO: 42	YPTNGY
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 Chothia CDR3	SEQ ID NO: 43	WGGDGFYAMDY
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 IMGT CDR1	SEQ ID NO: 44	GFNIKDTY
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 IMGT CDR2	SEQ ID NO: 45	IYPTNGYT
HER2 双特异性 抗体第二重链 可变区 IMGT CDR3	SEQ ID NO: 46	SRWGGDGFYAMDY

HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 Kabat CDR1	SEQ ID NO: 47	RASQDVNTAVA
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 Kabat CDR2	SEQ ID NO: 48	SASFLYS
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 Kabat CDR3	SEQ ID NO: 49	QQHYTTPPT
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 AbM CDR1	SEQ ID NO: 50	RASQDVNTAVA
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 AbM CDR2	SEQ ID NO: 51	SASFLYS
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 AbM CDR3	SEQ ID NO: 52	QQHYTTPPT
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 Chothia CDR1	SEQ ID NO: 53	RASQDVNTAVA
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 Chothia CDR2	SEQ ID NO: 54	SASFLYS
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 Chothia CDR3	SEQ ID NO: 55	QQHYTTPPT
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 IMGT CDR1	SEQ ID NO: 56	QDVNTA
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 IMGT CDR2	SEQ ID NO: 57	SAS
HER2 双特异性 抗体轻链可变 区 IMGT CDR3	SEQ ID NO: 58	QQHYTTPPT
GalT1	SEQ ID NO: 59	GSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGGDSSPVVDSGPGP ASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLLVGPMLEFNMPVDLELVAKQNP NVKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLKYWLYLHPVLQRQQ LDYGIYVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEALKDYDYTCFVFSVDLIP MNDHNAYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQLFGGVSALSKQQFLTI

		NGFPNNYWGWWGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMIRHSRD KKNEPN PQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS
human GalT1 (Y285L)	SEQ ID NO : 60	MRLREPLLSGSAAMPGASLQACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRD LSRLPQLVGVSTPLQGGSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPLGASSQP RPGGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSPLACPEESPLLVGPMI EFNMPVDLELVAKQNPVVKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEH LKYWLYYLHPVLQRQQLDYGIVINQAGDTIFNRAKLLNVGFQEAL KDYDYTCFVFSVDLIPMNDHNAYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYV QLFGGVSALESKQQLTINGFPNNYWGWWGGEDDDIFNRLVFRGMSISR PNAVVGRCRMIRHSRDKKNEPNPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQ VLDVQRYPLYTQITVDIGTPS
bovine GalT1 (Y289L)	SEQ ID NO : 61	MKPREPLLGSAAMPGASLQACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRD LRRLPQLVGVHPPLQGGSHGAAAIGQPSGELRLRGVAPPPPLQNSSKP RSRAPSNLDAYSHPGPGPGPSNLTSAPVPSTTTTSLTACPEESPLLVG PMLIEFNIPVDLKLVEQQNPVKLGGRYTPMDCISPHKVAIIIPFRNRQ EHLKYWLYYLHPILQRQQLDYGIVINQAGESMFNRAKLLNVGFKE ALKDYDYNCFVFSVDLIPMNDHNTYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLP YVQLFGGVSALESKQQLSINGFPNNYWGWWGGEDDDIYNRLAFRGMS VSRPNAVIGKCRMIRHSRDKKNEPNPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLT YMVLEVQRYPLYTKITVDIGTPS

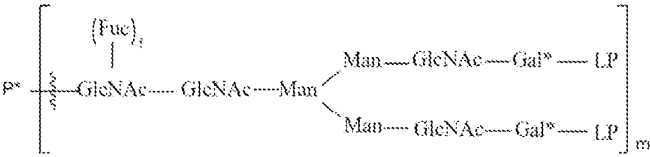
权利要求书

- [权利要求 1] 一种组合物，其特征在于，包含程序性死亡配体1(PD-L1)结合分子以及蛋白-药物偶联物。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的组合物，所述组合物为固体制剂，优选为冻干粉。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的组合物，所述组合物为液体制剂，优选为注射液。
- [权利要求 4] 根据权利要求1-3任一项所述的组合物，所述PD-L1结合分子包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含SEQ ID NO: 1所示VHH中的CDR1、CDR2和CDR3。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的组合物，所述CDR可以是Kabat CDR、AbM CDR、Chothia CDR或IMGT CDR。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的组合物，SEQ ID NO: 1所示VHH中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO: 5-7，SEQ ID NO: 8-10，SEQ ID NO: 11-13和SEQ ID NO: 14-16。
- [权利要求 7] 根据权利要求1-6任一项所述的组合物，所述PD-L1结合分子包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列。
- [权利要求 8] 根据权利要求4-7任一项所述的组合物，所述PD-L1结合分子还包含免疫球蛋白Fc区。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的组合物，所述免疫球蛋白Fc区为人免疫球蛋白Fc区，优选人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4的Fc区，或它们的变体。
- [权利要求 10] 根据权利要求9所述的组合物，所述免疫球蛋白Fc区的氨基酸序列为SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3。
- [权利要求 11] 根据权利要求8-10任一项所述的组合物，所述免疫球蛋白单一可变结构域位于免疫球蛋白Fc区的N端，两者直接相连，或通过肽链相连，所述肽链选自下述氨基酸序列中的一种或多种：(GS)_n、(G

G)_n、(GGS)_n、(GGGS)_n、(GGSG)_n、(GGGGS)_n和(GAP)_n，其中n为1至10的整数。

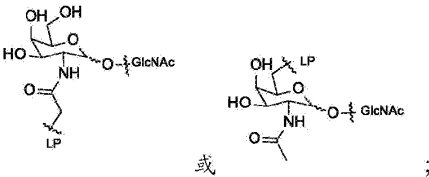
[权利要求 12] 根据权利要求1-11任一项所述的组合物，所述PD-L1结合分子的氨基酸序列为SEQ ID NO：4。

[权利要求 13] 根据权利要求1-12任一项所述的组合物，所述蛋白-药物偶联物具有如下的结构：

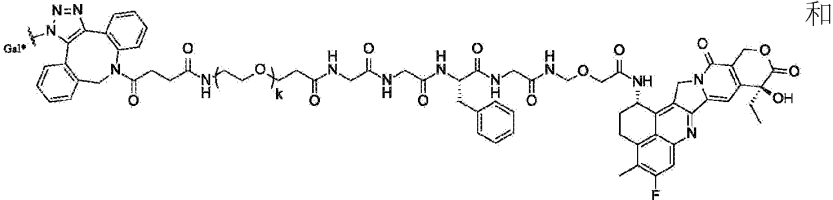


其中，P*为抗体，GlcNAc为N-乙酰葡萄糖胺，Fuc为岩藻糖，Man为甘露糖，f为0或1，m为1至10；

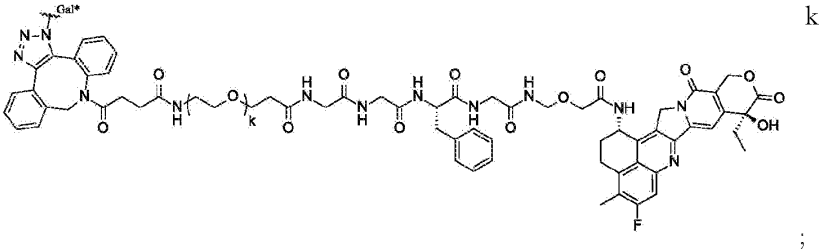
Gal*为经修饰的半乳糖，选自以下的结构：



LP为：



/或



为1~20的整数，例如2、3、4、5、6、7、8、9或10；

- 其中，核心GlcNAc与抗体直接连接。
- [权利要求 14] 根据权利要求13所述的组合物，所述经修饰的半乳糖通过 β -1,4-糖苷键与GlcNAc连接。
- [权利要求 15] 根据权利要求13或14所述的组合物，其中核心GlcNAc与抗体的Fc片段连接；优选与Fc片段的CH2结构域连接；更优选与Fc片段的Asn297(根据Kabat的EU索引编号)连接。
- [权利要求 16] 根据权利要求13-15任一所述的组合物，所述抗体为靶向HER2不同表位的双特异性抗体。
- [权利要求 17] 根据权利要求13-16任一项所述的组合物，所述抗体具有第一重链、第二重链以及共同的轻链，其中，第一重链包含SEQ ID NO: 17所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3，第二重链包含SEQ ID NO: 18所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3，共同的轻链包含SEQ ID NO: 19所示轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3。
- [权利要求 18] 根据权利要求17所述的组合物，其中SEQ ID NO: 17所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO: 23-25，SEQ ID NO: 26-28，SEQ ID NO: 29-31和SEQ ID NO: 32-34。
- [权利要求 19] 根据权利要求17或18所述的组合物，其中SEQ ID NO: 18所示重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO: 35-37，SEQ ID NO: 38-40，SEQ ID NO: 41-43和SEQ ID NO: 44-46。
- [权利要求 20] 根据权利要求17-19任一项所述的组合物，其中SEQ ID NO: 19所示轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3选自以下的任一组：SEQ ID NO: 47-49，SEQ ID NO: 50-52，SEQ ID NO: 53-55和SEQ ID NO: 56-58。
- [权利要求 21] 根据权利要求16-20任一项所述的组合物，所述抗体具有第一重链、第二重链以及共同的轻链，其中，第一重链包含SEQ ID N

- O: 17所示重链可变区, 第二重链包含SEQ ID NO: 18所示重链可变区, 共同的轻链包含SEQ ID NO: 19所示轻链可变区。
- [权利要求 22] 根据权利要求16-21任一项所述的组合物, 所述抗体包含如SEQ ID NO: 20所示氨基酸序列的第一重链, 如SEQ ID NO: 21所示氨基酸序列的第二重链, 以及如SEQ ID NO: 22所示氨基酸序列的共同轻链。
- [权利要求 23] 根据权利要求1-22任一项所述的组合物, 所述蛋白-药物偶联物的浓度为20mg/mL-150mg/mL, 优选为50mg/mL-120mg/mL, 更优选为60mg/mL-100mg/mL。
- [权利要求 24] 根据权利要求1-23任一项所述的组合物, 所述PD-L1结合蛋白的浓度为20mg/mL-180mg/mL, 优选为50mg/mL-150mg/mL, 更优选为80mg/mL-120mg/mL。
- [权利要求 25] 根据权利要求1-24任一项所述的组合物, 其中所述蛋白-药物偶联物与PD-L1结合分子的比例为1:0.5至1:2, 优选比例为1:0.75至1:1.75, 更优选比例为1:0.8至1:1.5, 甚至更优选比例为1:1至1:1.25。
- [权利要求 26] 根据权利要求1-25任一项所述的组合物, 所述组合物的pH为4.0至7.0, 优选为4.5至6.5, 更优选为5.0至6.0。
- [权利要求 27] 根据权利要求1-26任一项所述的组合物, 所述组合物还包含缓冲成分, 所述缓冲成分选自醋酸-醋酸钠、组氨酸-组氨酸盐酸盐和醋酸-组氨酸中的一种或几种。
- [权利要求 28] 根据权利要求27所述的组合物, 所述缓冲成分的浓度为2mM-50mM, 优选为5mM-30mM或2mM-20mM, 更优选为10mM-20mM或2mM-10mM。
- [权利要求 29] 根据权利要求1-28任一项所述的组合物, 所述组合物还包含辅料, 所述辅料包含稳定剂, 所述稳定剂选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇、脯氨酸、甘氨酸、精氨酸盐酸盐及甘油中的一种或多种, 优选选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇及脯氨酸中的一种或

多种，更优选选自海藻糖、甘露醇、山梨醇及脯氨酸中的一种或多种。

- [权利要求 30] 根据权利要求29所述的组合物，其中所述稳定剂的浓度为50mM–250mM，优选为80mM–200mM，更优选为100mM–150mM。
- [权利要求 31] 根据权利要求28或29所述的组合物，所述辅料还包含抗氧化剂，优选地，所述抗氧化剂为甲硫氨酸。
- [权利要求 32] 根据权利要求31所述的组合物，所述抗氧化剂的浓度为10mM–100mM，优选为15mM–75mM，更优选为20mM–50mM，甚至更优选为30mM–40mM。
- [权利要求 33] 根据权利要求28–32任一项所述的组合物，所述组合物还包含表面活性剂，所述表面活性剂选自聚山梨酯20、聚山梨酯80和泊洛沙姆188。
- [权利要求 34] 根据权利要求33所述的组合物，所述表面活性剂的浓度为0mg/mL–0.8mg/mL，优选为0.05mg/mL–0.75mg/mL，更优选为0.1mg/mL–0.5mg/mL，甚至更优选为0.2mg/mL–0.4mg/mL或0.1mg/mL–0.3mg/mL。
- [权利要求 35] 根据权利要求1–34任一项所述的组合物，所述组合物包含：
- (1)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL P D–L1结合蛋白，5mM–30mM组氨酸–组氨酸盐酸盐，80mM–200mM脯氨酸，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；
 - (2)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL P D–L1结合蛋白，5mM–30mM组氨酸–组氨酸盐酸盐，80mM–200mM蔗糖，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；
 - (3)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL P D–L1结合蛋白，5mM–30mM组氨酸–组氨酸盐酸盐，80mM–200

mM海藻糖，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；

(4)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD–L1结合蛋白，5mM–30mM组氨酸–组氨酸盐酸盐，80mM–200mM甘露醇，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；

(5)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD–L1结合蛋白，5mM–30mM组氨酸–组氨酸盐酸盐，80mM–200mM山梨醇，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；

(6)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD–L1结合蛋白，5mM–30mM醋酸–醋酸钠，80mM–200mM脯氨酸，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；

(7)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD–L1结合蛋白，5mM–30mM醋酸–醋酸钠，80mM–200mM蔗糖，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；

(8)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD–L1结合蛋白，5mM–30mM醋酸–醋酸钠，80mM–200mM海藻糖，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；

(9)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD–L1结合蛋白，5mM–30mM醋酸–醋酸钠，80mM–200mM甘露醇，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；

(10)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD–L1结合蛋白，5mM–30mM醋酸–醋酸钠，80mM–200mM山梨

醇，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；

(11)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD–L1结合蛋白，5mM–30mM组氨酸–醋酸，80mM–200mM脯氨酸，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；

(12)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD–L1结合蛋白，2mM–20mM组氨酸–醋酸，80mM–200mM脯氨酸，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0；或

(13)50mg/mL–120mg/mL蛋白–药物偶联物，50mg/mL–150mg/mL PD–L1结合蛋白，2mM–20mM组氨酸–组氨酸盐酸盐，80mM–200mM脯氨酸，20mM–50mM甲硫氨酸，0.1mg/mL–0.5mg/mL聚山梨酯80，pH值为5.0至6.0。

[权利要求 36] 一种治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤的方法，其特征在于，向有需要的患者施用权利要求1–35任一项所述的组合物。

[权利要求 37] 一种治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤的方法，其特征在于，向有需要的患者施用程序性死亡配体1(PD–L1)结合分子与蛋白–药物偶联物的药物组合，其中，程序性死亡配体1结合分子如权利要求4–12任一项所定义，蛋白–药物偶联物如权利要求13–22任一项所定义。

[权利要求 38] 根据权利要求36或37所述的方法，所述恶性肿瘤为晚期/不可切除或转移性实体恶性肿瘤，且HER2表达。

[权利要求 39] 根据权利要求36–38任一项所述的方法，所述实体恶性肿瘤为胃肠道肿瘤或非小细胞肺癌。

[权利要求 40] 根据权利要求36–39任一项所述的方法，所述组合物或药物组合中蛋白–药物偶联物与PD–L1结合分子的施用比例为1:0.5至1:2，优选

比例为1:0.75至1:1.75，更优选比例为1:0.8至1:1.5，甚至更优选比例为1:1至1:1.25。

- [权利要求 41] 根据权利要求36–40任一项所述的方法，其特征在于，向有需要的患者每周一次、每二周一次、每三周一次或每四周一次施用所述组合物或药物组合。
- [权利要求 42] 根据权利要求36–41任一项所述的方法，其特征在于，通过皮下注射施用所述组合物或药物组合。
- [权利要求 43] 根据权利要求36–42任一项所述的方法，所述组合物或药物组合的单次施用剂量为0.5mg/kg–10.0mg/kg，优选为0.8mg/kg–7.5mg/kg，更优选为1.0mg/kg–7.0mg/kg，例如选自1.1mg/kg、2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg和6.7mg/kg。
- [权利要求 44] 根据权利要求36–43任一项所述的方法，其特征在于，向有需要的患者每周一次皮下注射施用所述组合物或药物组合，单次施用剂量为1.1mg/kg、2.3mg/kg、4.5mg/kg、5.6mg/kg或6.7mg/kg。
- [权利要求 45] 根据权利要求1–35任一项所述的组合物，其能够用于治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤。
- [权利要求 46] 程序性死亡配体1(PD–L1)结合分子与蛋白–药物偶联物的药物组合，其能够用于治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤；其中，程序性死亡配体1结合分子如权利要求4–12任一项所定义，蛋白–药物偶联物如权利要求13–22任一项所定义。
- [权利要求 47] 程序性死亡配体1(PD–L1)结合分子联合蛋白–药物偶联物在制备治疗晚期或转移性实体恶性肿瘤药物中的用途；其中，程序性死亡配体1结合分子如权利要求4–12任一项所定义，蛋白–药物偶联物如权利要求13–22任一项所定义。