抗体药物偶联物制剂及其用途

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体涉及抗体药物偶联物制剂及其用途。

背景技术

表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor，EGFR，也称为 HER1，c-ErbB1）是表皮生长因子家族的细胞表面受体，是由 1186 个氨基酸残基构成，分子量为 170kD 的一种跨膜糖蛋白。EGFR 属于Ⅰ型酪氨酸激酶受体 ErbB 亚族 (ErbB 1-4)，具有酪氨酸激酶的活性。EGFR 稳定的表达于许多上皮组织，包括皮肤和毛囊。表皮生长因子受体异常表达或因受体突变而活化会导致癌变。有很多实体瘤发现过度表达表皮生长因子受体，如结直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌和食管癌等。转化生长因子 α 和表皮生长因子等生长因子是表皮生长因子受体的内源性配体。这些配体与表皮生长因子受体结合，激活受体胞内酪氨酸蛋白激酶的活性，启动下游多条信号转导途径，从而调节正常细胞的生长和分化，增加肿瘤细胞的侵袭力、促进血管生成、抑制肿瘤细胞的凋亡。表皮生长因子受体在肿瘤中的过表达及其在肿瘤细胞生长、分化中起重要作用的这些特点，使表皮生长因子受体成为具有良好前景的肿瘤治疗靶点。

目前市场上已有两个抗表皮生长因子受体的治疗性抗体，一个是人鼠嵌合抗体 C225 抗体 (爱必妥，Erbitux 或 Cetuximab，ImClone(现在 Eli Lilly) 公司)，与表皮生长因子受体有特异亲和性，可阻断 EGF 和 TGF 等配体与表皮生长因子受体的结合，抑制其磷酸化和下游信号传导，从而抑制肿瘤细胞的生长，诱导凋亡，减少基质金属蛋白酶和血管上皮生长因子的产生。2004 年美国 FDA 批准爱必妥治疗结直肠癌，2006 年批准其治疗头颈部癌，目前有更多临床试验用于其它肿瘤适应症。在临床上，爱必妥和伊立替康合用治疗结直肠癌的有效率（ORR）为 23%，与氟嘧啶等化疗药物合用治疗头颈癌的有效率为 13%-30%。 由于是人鼠嵌合抗体，爱必妥在临床试验中有 3.7%的病人产生了抗体反应。

另一个抗表皮生长因子受体的治疗性抗体是帕尼单抗 (Vectibix，panitumumab，Amgen 公司)， 是采用转基因小鼠技术制备的全人化单克隆抗体，无鼠源蛋白序列。该抗体靶向作用于表皮生长因子受体 (EGFR)，2006 年 9 月被 FDA 批准上市，与氟嘧啶、奥沙利铂和伊立替康合用或在化疗后用于治疗 EGFR 阳性的转移性结直肠癌。2006 年

FDA批准其单药治疗化疗耐受的转移性结直肠癌(mCRC)。然而帕尼单抗是IgG2亚型抗体，与 IgG1 相比，IgG2 的 CDC 活性及 ADCC 等生物学活性明显减低 ；另外，IgG2 亚型抗体稳定性较差，这可能是临床效果上全人抗体帕尼单抗与嵌合抗体爱必妥相比没有明显优势的主要原因。在临床上治疗结直肠癌的总体生存率（OR）才达到8%，非进展生存期只延长了3.6个月。

目前大量的临床数据显示爱必妥单抗和帕尼单抗只对 EGFR 表达的 KRAS 野生型（KRAS wild type）有疗效，而对KRAS突变体没有肿瘤生长抑制活性，因此， 美国临床肿瘤协会发表的指导原则中明确指出抗EGFR单抗药物只适用于KRAS野生型的结肠癌病人 （Allegra CJ, Jessup JM, Somerield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Soceitey of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor monoclonal antibody therapy. J. Clin Oncol. 2009; 27:2091-2096; Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2010; 28:1254-1261）。

因此，本领域亟需具有更高生物学活性的人源化抗表皮生长因子受体的抗体类药物，尤其是对KRAS突变体有疗效的抗体类药物，例如抗体药物偶联物，以进一步提高疗效，降低副作用。

发明内容

本申请的发明人通过大量实验和创造性劳动，提供了抗表皮生长因子受体的抗体药物偶联物制剂，该制剂对于与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病的疗效好，且相比于现有技术，制剂稳定性显著提高。

为此，在本发明的第一方面，本发明提供了抗体药物偶联物制剂，其包含：

抗体药物偶联物或其盐，所述抗体药物偶联物或其盐的浓度为1-20 mg/mL（如1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL、6 mg/mL、7 mg/mL、8 mg/mL、9 mg/mL、10 mg/mL、11 mg/mL、12 mg/mL、13 mg/mL、14 mg/mL、15 mg/mL、16 mg/mL、17 mg/mL、18 mg/mL、19 mg/mL或20 mg/mL，或者3-5 mg/mL、或者2-6 mg/mL、或者1-7 mg/mL、或者1-8 mg/mL、或者1-9 mg/mL，或者1-10 mg/mL）；

柠檬酸缓冲液，所述柠檬酸缓冲液的浓度为10-50 mM（如10 mM、15 mM、16 mM、

17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、21 mM、22 mM、23 mM、24 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM或50 mM，或者19-21 mM，或者18-22 mM，或者17-23 mM，或者16-24 mM），且所述柠檬酸缓冲液的pH为6.3-6.7（如6.3、6.4、6.5、6.6或6.7）；

海藻糖，所述海藻糖的浓度为1-10%（如1%、2%、3%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、8%、9%或10%，或者4-7%，或者4.5-6.5%，或者5-6%）；

氯化钠，所述氯化钠的浓度为0.1-2%（如0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%或2%，或者0.2-0.4%）；

吐温80，所述吐温80的浓度为0.01-0.2%（如0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.15%或0.2%，或者0.02-0.08%，或者0.03-0.07%，或者0.04-0.06%）；

所述抗体药物偶联物具有式I所示的结构，

$$Ab-(L-D)_p$$

式I

其中：

Ab代表抗表皮生长因子受体抗体，其中所述抗表皮生长因子受体抗体包括重链和轻链，其中重链可变区CDR1、CDR2、CDR3分别包含如SEQ ID NO：5～7所示的序列或其突变体，轻链可变区CDR1、CDR2、CDR3分别包含如SEQ ID NO：12～14所示的序列或其突变体；

L代表接头，所述接头为6-马来酰亚氨基已酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-vc-PAB)；

D代表细胞毒剂，所述细胞毒剂为MMAE；

p代表1-9（如1、2、3、4、5、6、7、8或9，或者如1-7），例如2-6，例如3-5，具体例如3.9、4.0或4.1。

需要说明的是，所述海藻糖、氯化钠或吐温80的浓度表示质量体积浓度（w/v%），指的是每100 mL的所述抗体药物偶联物制剂中，海藻糖、氯化钠或吐温80的质量（单位：g）。

另外，“柠檬酸缓冲液”是由柠檬酸和柠檬酸钠配置得到的，不同的pH是通过调整不同的柠檬酸和柠檬酸钠比例实现的。所述“柠檬酸缓冲液”的浓度指的是柠檬酸和柠檬酸钠的总浓度。

另外，需要说明的是，上述“抗体药物偶联物” 指的是含有相同或不同 DAR 值

的 ADC 分子的组合物。

具体地，本发明提供了包含多个抗表皮生长因子受体（EGFR） ADC 分子的组合物。在某些情况下，本文所述的组合物中的每个 ADC 包含相同数目的一个或多个细胞毒剂。在其他情况下，本文所述的组合物中的每个 ADC 包含不同数目的一个或多个细胞毒剂。

本文所述的抗体药物偶联物中，每个抗表皮生长因子受体（EGFR）抗体可以偶联有 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个或更多细胞毒剂。

上述药物抗体比（DAR）是指偶联到抗表皮生长因子受体（EGFR）抗体的细胞毒剂的分子数。本文所述的ADC中包含的细胞毒剂的分子数通常是整数，当本文所述的ADC中包含的细胞毒剂的分子数（例如，式I中的p）是分数时，该分数指的是包含多个ADC分子的组合物中，每个抗表皮生长因子受体（EGFR）抗体偶联的细胞毒剂的平均数量。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物或其盐的浓度为2-6 mg/mL。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物或其盐的浓度为4 mg/mL。

在一些实施方案中，所述柠檬酸缓冲液的浓度为 15-25 mM。

在一些实施方案中，所述柠檬酸缓冲液的浓度为 20 mM。

在一些实施方案中，所述柠檬酸缓冲液的 pH 为 6.3-6.5。

在一些实施方案中，所述柠檬酸缓冲液的 pH 为 6.3。

在一些实施方案中，所述海藻糖的浓度为 4-7%。

在一些实施方案中，所述海藻糖的浓度为 5.5%。

在一些实施方案中，所述氯化钠的浓度为 0.1-0.5%。

在一些实施方案中，所述氯化钠的浓度为 0.3%。

在一些实施方案中，所述吐温 80 的浓度为 0.01-0.1%。

在一些实施方案中，所述吐温 80 的浓度为 0.05%。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的重链可变区的 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO：8～11 所示的序列或其突变体。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体轻链可变区的 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO：15～18 所示的序列或其突变体。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的重链恒定区选自人源性 IgG、IgM、IgA、IgD、IgA 恒定区或上述恒定区的突变体。

在一些实施方案中，所述 IgG 选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链恒定区为人源性 lambda 恒定区、kappa 恒定区、或上述恒定区的突变体。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的重链可变区的序列包含如 SEQ ID NO：1 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO：1 所示序列的同一性大于 70%，优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的重链可变区的序列如 SEQ ID NO：1 所示。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链可变区的序列包含如 SEQ ID NO：2 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO：2 所示序列的同一性大于 70%，优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链可变区的序列如 SEQ ID NO：2 所示。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的重链恒定区的序列包含如 SEQ ID NO：3 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO：3 所示序列的同一性大于 70%，优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的重链恒定区的序列如 SEQ ID NO：3 所示。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链恒定区的序列包含如 SEQ ID NO：4 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO：4 所示序列的同一性大于 70%，优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

在一些实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链恒定区的序列如 SEQ ID NO：4 所示。

在一些实施方案中，所述海藻糖为二水合海藻糖。

在一些实施方案中，所述柠檬酸缓冲液是由柠檬酸和柠檬酸钠配置得到的。

在一些实施方案中，所述柠檬酸为一水合柠檬酸。

在一些实施方案中，所述柠檬酸钠为二水合柠檬酸钠。

在本发明的第二方面，本发明提供了制备前述的制剂的方法，其包括：

1）将抗表皮生长因子受体抗体与还原剂进行还原反应，获得还原后的抗表皮生长因子受体抗体，所述抗表皮生长因子受体抗体如前所述；

2）将所述还原后的抗表皮生长因子受体抗体和 vcMMAE 进行偶联反应；

3）淬灭所述偶联反应，并将偶联反应产物进行缓冲液置换，获得所述抗体药物偶联物制剂，所述抗体药物偶联物制剂如前所述。

在一些实施方案中，所述方法包括：

（1）将前述的抗表皮生长因子受体抗体（优选10毫克）置换（优选置换三次）到还原缓冲液（优选包含25mM 硼酸钠，pH8.0，25mM NaCl，5 mM EDTA)中，检测蛋白质的浓度，计算蛋白质的含量；

（2）向步骤（1）的产物中加入DTT，在室温条件下反应1-5小时（优选2小时），获得还原后的抗表皮生长因子受体抗体，所述DTT的物质的量是所述蛋白质的物质的量的2.0-3.0倍，优选2.5倍；

（3）将步骤（2）的产物置换（优选置换三次）到偶联缓冲液（优选包含50mM Tris，pH7.2，150 mM NaCl，5 mM EDTA）中，并计算自由巯基的物质的量；

（4）向步骤（3）的产物中加入vc-MMAE（即MC-vc-PAB-MMAE），在室温条件下反应1-5小时（优选2小时），所述vc-MMAE的物质的量是所述还原后的抗表皮生长因子受体抗体的1.0-1.5倍，优选1.1倍；

（5）向步骤（4）的产物中加入N-乙酰半胱氨酸，静置（优选5分钟），获得包含前述的抗体药物偶联物的混合液，所述N-乙酰半胱氨酸的物质的量是所述vc-MMAE的15-25倍，优选20倍；

（6）将步骤（5）的混合液置换（优选置换三次）到偶联物储存液中，获得所述抗体药物偶联物制剂；

所述偶联储存液包含：

柠檬酸缓冲液，所述柠檬酸缓冲液的浓度为 10-50 mM（如 10 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、21 mM、22 mM、23 mM、24 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM 或 50 mM，或者 19-21 mM，或者 18-22 mM，或者 17-23 mM，或者 16-24 mM），且所述柠檬酸缓冲液的 pH 为 6.3-6.7（如 6.3、6.4、6.5、6.6 或 6.7）；

海藻糖，所述海藻糖的浓度为 1-10%（如 1%、2%、3%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、8%、9%或 10%，或者 4-7%，或者 4.5-6.5%，或者 5-6%）；

氯化钠，所述氯化钠的浓度为 0.1-2%（如 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%或 2%，或者 0.2-0.4%）；和

吐温 80，所述吐温 80 的浓度为 0.01-0.2%（如 0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.15%或 0.2%，或者 0.02-0.08%，或

者 0.03-0.07%，或者 0.04-0.06%）；

所述抗体药物偶联物制剂中，所述抗体药物偶联物的浓度为 1-20 mg/mL（如 1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL、5 mg/mL、6 mg/mL、7 mg/mL、8 mg/mL、9 mg/mL、10 mg/mL、11 mg/mL、12 mg/mL、13 mg/mL、14 mg/mL、15 mg/mL、16 mg/mL、17 mg/mL、18 mg/mL、19 mg/mL 或 20 mg/mL，或者 3-5 mg/mL、或者 2-6 mg/mL、或者 1-7 mg/mL、或者 1-8 mg/mL、或者 1-9 mg/mL，或者 1-10 mg/mL）。

在一些实施方案中，所述柠檬酸缓冲液的浓度为 15-25 mM。

在一些实施方案中，所述柠檬酸缓冲液的浓度为 20 mM。

在一些实施方案中，所述柠檬酸缓冲液的 pH 为 6.3-6.5。

在一些实施方案中，所述柠檬酸缓冲液的 pH 为 6.3。

在一些实施方案中，所述海藻糖的浓度为 4-7%。

在一些实施方案中，所述海藻糖的浓度为 5.5%。

在一些实施方案中，所述氯化钠的浓度为 0.1-0.5%。

在一些实施方案中，所述氯化钠的浓度为 0.3%。

在一些实施方案中，所述吐温 80 的浓度为 0.01-0.1%。

在一些实施方案中，所述吐温 80 的浓度为 0.05%。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的浓度为 2-6 mg/mL。

在一些实施方案中，所述抗体药物偶联物的浓度为 4 mg/mL。

在一些实施方案中，所述海藻糖为二水合海藻糖。

在一些实施方案中，所述柠檬酸缓冲液是由柠檬酸和柠檬酸钠配置得到的。

在一些实施方案中，所述柠檬酸为一水合柠檬酸。

在一些实施方案中，所述柠檬酸钠为二水合柠檬酸钠。

在本发明的第三方面，本发明提供了前述方法制备的抗体药物偶联物制剂。

在本发明的第四方面，本发明提供了组合物，其包含前述的制剂。

在一些实施方案中，所述组合物还包含已知的用于治疗肿瘤的化疗药物，所述化疗药物例如为阿霉素(Adriamycin)、环磷酰胺、紫杉烷类【如紫杉醇(Taxol)、多西他赛(Taxotere)】、卡培他滨(Xeloda)、吉西他滨(Gemzar)、长春瑞滨(Navelbine)、他莫昔芬、芳香酶抑制剂（ 瑞宁得、弗隆、阿诺新）、5-FU 加亚叶酸、伊立替康(camptosar)、奥沙利铂、顺铂、卡铂、雌莫司汀、米托蒽醌(Novantrone)、泼尼松、长春新碱(Oncovin)、多柔比星、强的松等，或它们的组合。

在一些实施方案中，所述组合物还包含已知的用于治疗肿瘤的免疫治疗药物，所述免疫治疗药物例如为PD-1单抗（例如帕博利珠单抗、纳武利尤单抗）、PD-L1单抗（例如Atezolizumab）、TIGIT单抗，4-1BB单抗，VEGFR2单抗（例如Ramucirumab、阿帕替尼）、HER2单抗（例如曲妥珠单抗、Trastuzumab biosimilar、Trastuzumab-dkst）等，或它们的组合。

在一些实施方案中，所述组合物还包含免疫抑制剂，所述免疫抑制剂选自：（1）糖皮质激素类，如可的松和强的松；（2）微生物代谢产物，如环孢菌素和藤霉素等；（3）抗代谢物，如硫唑嘌呤和6-巯基嘌呤等；（4）多克隆和单克隆抗淋巴细胞抗体，如抗淋巴细胞球蛋白和OKT3等；（5）烷化剂类，如环磷酰胺。具体地，所述免疫抑制剂例如为甲基强的松龙，强的松，硫唑嘌呤，普乐可复，赛尼哌，舒莱，环孢菌素，他克莫司，雷帕霉素，霉酚酸酯，咪唑立宾，环磷酰胺，芬戈莫德等。

在一些实施方案中，所述组合物还包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在本发明的第五方面，本发明提供了前述的制剂或者前述的组合物的在制备预防和/或治疗与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病的药物中的用途。

在本发明的第六方面，本发明提供了前述的制剂或者前述的组合物，其用于预防和/或治疗与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病。

在本发明的第七方面，本发明提供了预防和/或治疗与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病的方法，其包括给予有需要的受试者预防和/或治疗有效量的前述的制剂或者前述的组合物。

在一些实施方案中，所述与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病为与EGFR相关的肿瘤，例如与EGFR过表达相关的肿瘤，进一步地，例如选自结肠癌、直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

在一些实施方案中，所述的肿瘤为KRAS基因突变的肿瘤，进一步地，例如为KRAS基因突变的结肠癌、直肠癌、肺癌或胰腺癌。

在一些实施方案中，所述的肿瘤为BRAF基因突变的肿瘤，进一步地，例如选自BRAF基因突变的结肠癌、直肠癌和肺癌。

在本发明的第八方面，本发明提供了前述的制剂或者前述的组合物在制备抑制肿瘤血管生成、延缓肿瘤进展、抑制肿瘤生长、抑制肿瘤细胞增殖的试剂或药物中的用途。

在本发明的第九方面，本发明提供了前述的制剂或者前述的组合物，其用于抑制肿瘤血管生成、延缓肿瘤进展、抑制肿瘤生长、抑制肿瘤细胞增殖。

在本发明的第十方面，本发明提供了抑制肿瘤血管生成、延缓肿瘤进展、抑制肿瘤生长、抑制肿瘤细胞增殖的方法，其包括给予有需要的受试者有效量的前述的制剂或者前述的组合物。

在一些实施方案中，所述肿瘤选自结肠癌、直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

在一些实施方案中，所述的肿瘤为KRAS基因突变的肿瘤，进一步地，例如为KRAS基因突变的结肠癌、直肠癌、肺癌或胰腺癌。

在一些实施方案中，所述的肿瘤为BRAF基因突变的肿瘤，进一步地，例如选自BRAF基因突变的结肠癌、直肠癌和肺癌。

有益效果：

本发明的抗体药物偶联物制剂在不同的温度条件下外观上保持澄清，DAR值基本保持不变，且高聚体%（HMW%）和酸性峰%含量适中，其制剂稳定性相比于现有技术显著提高。

附图说明

图 1 测定抗体药物偶联物的药物/抗体比例的 HIC-HPLC 图。

图 2 单抗及抗体药物偶联物的体外细胞活性测定，其中○代表 BA03 单克隆抗体，▲代表 MYK-3 抗体药物偶联物。

图 3 MYK-3 对结肠癌细胞 HT-29 的生长抑制活性，其中○代表 BA03 单克隆抗体，▲代表 MYK-3 抗体药物偶联物。

图 4 MYK-3 对脑胶质瘤癌细胞 U87-MG 的生长抑制活性，其中○代表 BA03 单克隆抗体，▲代表 MYK-3 抗体药物偶联物。

图 5 MYK-3 对肺癌细胞 A549 的生长抑制活性，其中○代表 BA03 单克隆抗体，▲代表 MYK-3 抗体药物偶联物。

图 6 MYK-3 对 KRAS 突变体结肠癌细胞 LoVo 的生长抑制活性，其中◇代表爱必妥单克隆抗体，▲代表 MYK-3 抗体药物偶联物。

图 7 单抗及抗体药物偶联物对小鼠 HT-29 结肠癌移植瘤体积的影响。图中数据用平

均值±标准差表示；与缓冲液对照组相比，*表示 P＜0.05，**表示 P＜0.01，***表示 P＜0.001。

图 8 单抗及抗体药物偶联物对小鼠 HT-29 结肠癌移植瘤模型的体重的影响。

图 9 MYK-3 对裸鼠中 KRAS 突变体结肠癌细胞 LoVo 的移植瘤生长抑制活性。

图 10 MYK-3 在不同 pH 的柠檬酸缓冲溶液中质量属性变化比较。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

除非另有说明，在本发明中，任何浓度范围，百分比范围，比例范围或数值范围应理解为包括所述范围内的任何整数数值，以及在适当时包括所述范围内的分数数值。

在本发明中，术语“抗体”是指通常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。抗体的轻链可分为 κ 和 λ 两类。重链可分为 μ、δ、γ、α 或 ε 五种，依据重链的不同可将抗体分为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE 五类。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由 3 个结构域(C_H1、C_H2 和 C_H3)组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 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)和补体系统的组分 C1q 的结合。V_H和 V_L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骨架区（FR）的区域。各 V_H和 V_L由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(V_H和 V_L)分别形成抗体结合部位。

氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。

本发明所述的单抗变异体可以通过传统的基因工程方法获得。本领域的技术人员完全知晓利用核酸突变改造 DNA 分子的方法。另外，编码重链和轻链变异体的核酸分子也可以通过化学合成获得。

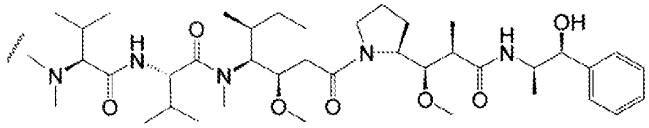
在本发明中，用于确定序列同一性（同源性）和序列相似性百分数的算法是例如 BLAST 和 BLAST 2.0 算法，它们分别描述在 Altschul 等（1977）Nucl. Acid. Res. 25：3389-3402 和 Altschul 等（1990）J. Mol. Biol. 215：403-410。采用例如文献中所述或者默认参数，BLAST 和 BLAST 2.0 可以用于确定本发明的氨基酸序列同一性百分数。执行 BLAST 分析的软件可以通过国立生物技术信息中心为公众所获得。

在本发明中，所述与氨基酸序列具有至少 70％的序列同一性的氨基酸序列包括与所述氨基酸序列基本同一的多肽序列，例如当采用本文所述方法（例如采用标准参数的 BLAST 分析）时，与本发明多肽序列相比含有至少 70％序列同一性、优选至少 75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99％或更高的序列同一性的那些序列。

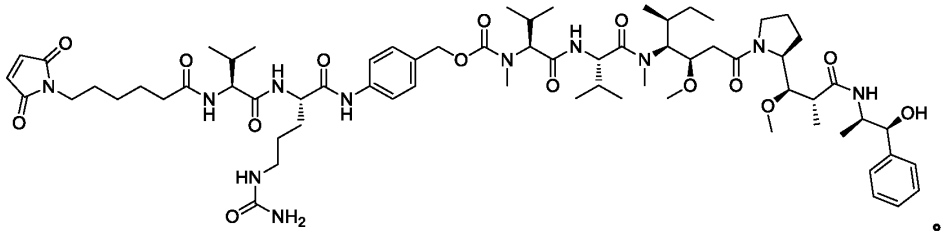
在本发明中，所述氨基酸序列的突变体指的是与所述氨基酸序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列，例如具有 3 个、2 个或 1 个取代、缺失或添加氨基酸的序列。优选的是，取代、添加或缺失的氨基酸不超过 3 个氨基酸。更优选的是，取代、添加或缺失的氨基酸不超过 2 个氨基酸。最优选的是，取代、添加或缺失的氨基酸不超过 1 个氨基酸。

“取代型”变体是天然序列中至少一个氨基酸残基被除去并被不同的氨基酸插入其相同位置的变体。所述取代可为单个的，其中该分子中仅有一个氨基酸被取代；或可为多个的，其中该相同分子有两个或更多的氨基酸被取代。多个取代可位于连续的位点。同样，一个氨基酸可被多个残基取代，其中这样的变体包括取代和插入二者。“插入型”（或“添加型”）变体是一个或多个氨基酸被插入到紧邻一段天然序列某个特定位置处的氨基酸的变体。紧邻氨基酸意指与该氨基酸的 α-羧基或 α-氨基官能团连接。“缺失型”变体是天然氨基酸序列中一个或多个氨基酸被除去的变体。通常情况下，缺失型变体在其分子的特定区域内有一个或两个氨基酸被缺失。

在本发明中，MMAE 的结构为：

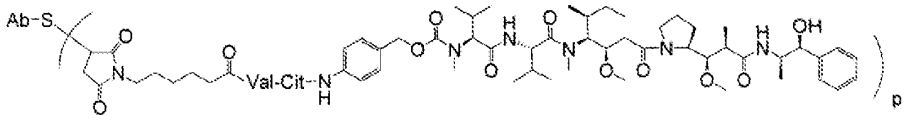


在本发明中，式 I 中的 L-D 为 MC-vc-PAB-MMAE，其结构如下式所示：



。

在本发明中，抗表皮生长因子受体抗体 Ab 是通过其自身的二硫键被还原后生成的巯基与 L-D 进行连接，即如下所示：



。

在本发明中，药物抗体比（drug：antibodyratio，DAR）或药物载荷(loading)由 p 表示，即式 I：Ab-$(L\text{-}D)_p$的分子中每个抗体的平均药物模块（即细胞毒剂）数，可以为整数，也可以为分数。通式 I 的 ADC 包括偶联有一定范围药物模块的抗体的集合。来自偶联反应的 ADC 制备物中每个抗体的平均药物模块数可以通过常规手段来验证，诸如质谱、ELISA 测定法、HIC 和 HPLC。还可以测定 ADC 在 p 方面的定量分布。在有些情况中，将 p 为某数值的同质 ADC 从具有其它药物载荷的 ADC 中分离、纯化和验证可以通过诸如反相 HPLC 或电泳的手段来实现。

在某些实施方案中，在偶联反应中少于理论最大值的药物模块偶联至抗体。一般而言，抗体不包含许多游离的和反应性的半胱氨酸硫醇基，其可连接药物模块；事实上，抗体中的大多数半胱氨酸硫醇基以二硫桥形式存在。在某些实施方案中，可以在部分或完全还原性条件下用还原剂诸如二硫苏糖醇(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP)还原抗体以产生反应性半胱氨酸硫醇基。

在本发明中，“治疗”指试图改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预，可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、减缓疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、及免除或改善预后。在有些实施方案中，本发明的抗体药物偶联

物用于延迟疾病或病症的发生，或用于减缓疾病或病症的进展。用于评估疾病的成功治疗和改善的上述参数可以容易的通过内科医师所熟悉的常规规程来测量。对于癌症治疗，可通过例如评估疾病进展前时间 (TTP)和/或测定反应率(RR)来测量功效。

在本发明中，“受试者”指脊椎动物。在某些实施方案中，脊椎动物指哺乳动物。哺乳动物包括，但不限于，牲畜(诸如牛)、宠物(诸如猫、犬、和马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。在某些实施方案中，哺乳动物指人。

在本发明中，“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。本发明的物质/分子的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质/分子在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还涵盖该物质/分子的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。 “预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然，由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的，因此预防有效量会低于治疗有效量。在癌症的情况中，药物的治疗有效量可减少癌细胞数；缩小肿瘤体积；抑制(即一定程度的减缓，优选停止)癌细胞浸润到周围器官中；抑制(即一定程度的减缓，优选停止)肿瘤转移；一定程度的抑制肿瘤生长；和/或一定程度的减轻与癌症有关的一种或多种症状。

对于疾病的预防或治疗，本发明的抗体药物偶联物的适宜剂量(在单独地或联合一种或多种其它别的治疗剂诸如化疗剂地使用时)会取决于待治疗疾病的类型、抗体药物偶联物的类型、疾病的严重程度和进程、施用抗体药物偶联物是出于预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床病史和对抗体药物偶联物的反应性、及主治医师的判断。合适的是，一次性或通过一系列治疗将抗体药物偶联物施用于患者。

“药学上可接受的载体”在用于本发明时包括药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。通常，生理学可接受的载体是 pH 缓冲水溶液。生理学可接受载体的例子包括缓冲剂，诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸；低分子量(少于约 10 个残基)多肽；蛋白质，诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖，蔗糖，海藻糖或糊精；螯合剂，诸如 EDTA；糖醇，诸如甘露醇或山梨醇；成盐反荷离子，诸如钠；和/或非离子表面活性剂，诸如 TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和 PLURONICS™。

在一些实施方案中，所述药学上可接受的盐为无机酸盐或有机酸盐，其中，所述无

机酸盐为盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐、硫酸盐或磷酸盐，所述有机酸盐为甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、苯甲酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、抗坏血酸盐、α-酮戊二酸盐、α-甘油磷酸盐、烷基磺酸盐或芳基磺酸盐；优选地，所述烷基磺酸盐为甲基磺酸盐或乙基磺酸盐；所述芳基磺酸盐为苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。

药学上可以接受的盐可使用本领域熟知的标准程序获得，例如，通过将足量的碱性化合物和提供药学上可以接受的阴离子的合适的酸反应。

在本发明中，KRAS 基因与 K-RAS 基因具有相同的含义，其为 RAS 基因家族成员之一，编码 K-ras 蛋白，与多种肿瘤的生成、增殖、迁移、扩散以及血管生成有关。其常见的突变位点为 K-RAS 基因 2 号外显子的 12 号密码子和 13 号密码子，3 号外显子的 61 号密码子，其中有 7 个突变热点：G12C、G12R、G12S、G12V、G12D、G12A、G13V/D.这 7 种突变占到了 90%以上。在本发明的一个实施方案中，所述肿瘤为与 EGFR 过表达相关的 KRAS 基因突变的肿瘤。

在本发明中，BRAF（v-raf murine sarcoma viral oncogene homologB1）基因是一种原癌基因，是 RAF 家族成员之一。大约 8%的人类肿瘤发生 BRAF 突变，BRAF 基因突变的绝大部分突变形式为 BRAFV600E 突变，该突变导致下游 MEK / ERK 信号通路持续激活，对肿瘤的生长增殖和侵袭转移至关重要。在本发明的一个实施方案中，所述肿瘤为与 EGFR 过表达相关的 BRAF 基因突变的肿瘤。

在本发明中，20 种常规氨基酸和其缩写遵从常规用法。参见 Immunology-A Synthesis（第 2 版，E.S. Golub 和 D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)），其通过引用合并入本文。

本发明中的抗体 BA03 即中国发明专利申请 CN 103772504A 中的 BA03，其制备方法参考该专利申请中的实施例 3，该抗体各部分的序列如下：

重链可变区序列为：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSNYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDYYDYEFAYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO：1）。

其中下划线部分分别为 CDR1（SEQ ID NO：5）、CDR2（SEQ ID NO：6）、CDR3（SEQ ID NO：7）；

未下划线部分分别为 FR1（SEQ ID NO：8）、FR2（SEQ ID NO：9）、FR3（SEQ ID NO：10）、FR4（SEQ ID NO：11）。

轻链可变区序列为：

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSFGQGTKLEIK（SEQ ID NO：2）。

其中下划线部分分别为 CDR1（SEQ ID NO：12）、CDR2（SEQ ID NO：13）、CDR3（SEQ ID NO：14）；

未下划线部分分别为 FR1（SEQ ID NO：15）、FR2（SEQ ID NO：16）、FR3（SEQ ID NO：17）、FR4（SEQ ID NO：18）。

重链恒定区序列为：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：3）。

轻链恒定区序列为：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO：4）。

下面结合具体实施例对本发明进行进一步的解释说明。

实施例 1：抗体药物偶联物的制备方法

取 10 毫克的 BA03 抗体，使用 15mL 的 30KD 超滤装置置换到还原缓冲液（25mM 硼酸钠，pH8.0，25mM NaCl，5 mM EDTA)中，共置换三次；终体积约为 1mL,转移至新的 Eppendorf 离心管（称重）中，并称重;检测蛋白浓度，计算蛋白总量。向抗体中加入 2.5 倍摩尔数的 DTT，室温保温 2 小时，连续混匀；使用 15ml 的 30KD 超滤装置置换到偶联缓冲液（50mM Tris，pH7.2，150mM NaCl，5 mM EDTA）中，共置换三次。取浓缩液，以 A280 测定蛋白浓度，并称重，计算蛋白总量；取 10μl 样品，以 Ellman’s 方法测定自由巯基数;

并以下列公式计算其自由巯基的摩尔浓度：

$$C_{SH}=\frac{A412\times 112}{b\times 14150}(M)$$

b：比色皿光路长度（通常 1cm）。

根据自由巯基的摩尔浓度和总蛋白溶液体积计算自由巯基摩尔数。

向还原后的抗体中加入 1.1 倍于自由巯基摩尔数的 vc-MMAE（购上海皓元化学科技有限公司，货号 HY-15575）（溶于 DMSO），混匀后室温反应 2 小时，间断混匀。向反应体系中加入 20 倍于所投入之 vc-MMAE 摩尔数的 N-乙酰半胱氨酸于反应液中，混匀，静置 5 分钟。使用 15ml 的 30KD 超滤装置置换到偶联物储存液 （20mM 柠檬酸钠（Na-citrate），0.3% NaCl，5% 海藻糖（Trehalose），0.05% TWeen-80，pH6.0）中，共置换三次，即得到抗体药物偶联物 MYK-3；样品于 4℃保存。需要说明的是，用 N-乙酰半胱氨酸淬灭偶联反应后，已经制备得到了抗体药物偶联物 MYK-3。后续步骤（即使用 15ml 的 30KD 超滤装置置换到偶联物储存液）是为了将抗体药物偶联物 MYK-3 置于偶联储存液中，以便保存和备用。

药物/抗体比例的测定：

将制备好的抗体药物偶联物 MYK-3 经过 HIC-HPLC 分析 （Jun Ouyang, Drug-To-Antibody(DAR) Ratio and Drug Distributionby Hydrophobic Interaction Chromatography and Reverse Phase High Performance Chromatography, Laurent Ducry(ed.), Antibody Drug Conjugates, Chapter 17, Methods in Molecular Biology, Vol 1045, p275-283）以测定药物/抗体比例 （drug antibody ratio， DAR），见图 1，根据图谱峰面积计算得到平均载药数 DAR 为 4.1。

实施例 2：抗体药物偶联物 MYK-3 体外细胞活性的测定

细胞活性检测方法：

1.1 复苏后的细胞株经过 3-4 代细胞传代之后，先倒去培养基，用 5mL DPBS 润洗一遍，再用 3mL 胰蛋白酶消化细胞，分别用培养基重悬，离心机离心，弃上清，再用培养基再次重悬，取出 0.5mL 用细胞计数仪计数。在 96 孔细胞培养板上进行铺板（DiFi 细胞以 10000 个细胞/孔，HT-29 细胞以 5000 个细胞/孔，A549 细胞以 2000 个细胞/孔，U87-MG 细胞以 3000 个细胞/孔， LoVo 细胞以 4000 个细胞/孔）， 培养 24 小时后，加入系列稀释浓度的单克隆抗体 BA03 以及抗体药物偶联物 MYK-3，保温 72 小时，之后每孔加入 20μl CCK8 显色试剂，在波长 450-650nm 用酶标仪检测 OD450-650，并进行四参数拟合。

体外细胞活性实验结果：

以下各细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

在 EGFR 高表达的 DiFi 细胞（人结直肠癌细胞）中的活性： MYK-3 比单抗 BA03 有

显著增高的细胞生长抑制活性，EC_{50} 降低了大约 10 倍(BA03 的 EC_{50} 是 51.9 ng/ml，MYK-3 的 EC_{50} 是 5.1 ng/ml)， 如图 2 所示。

在 EGFR 中度表达和低度表达的其它肿瘤细胞中的活性： MYK-3 相对于单抗本身对 EGFR 中度表达和低度表达的癌细胞（人结肠癌细胞 HT29、人肺癌细胞 A549、人脑星形胶质母细胞瘤细胞 U87-MG）也显示了明显的细胞生长抑制活性 （如图 3、图 4、图 5 所示)，其中 HT-29 的 EC_{50} 是 611 ng/ml，A549 的 EC_{50} 是 28.3 μg/ml， U87-MG 的 EC_{50} 是 5.3 μg/ml。

另外，我们还测试了在 EGFR 中度表达的 KRAS 突变体结肠癌细胞 LoVo (Dunn EF, Ilda M, Myers RA, Hintz KA, Campbell DA, Armstrong EA, Li C and Wheeler DL. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetruximab. Oncogene 2011; 30:561-574)中的活性，发现 MYK-3 对 KRAS 突变体结肠癌细胞 LoVo 显示了明显的肿瘤生长抑制活性（如图 6 所示，EC_{50} 是 3.2μg/ml)，而 BA03 单独使用时对该细胞株几乎没有抑制活性。

实施例 3：小鼠体内移植瘤实验

小鼠体内移植瘤实验方法：

HT-29 结肠癌细胞是 EGFR 低表达并带有 BRAF 突变的细胞株，目前已在市场上销售的治疗结直肠癌的 EGFR 靶向单抗爱必妥(Erbitux) 对 HT-29 细胞株没有生长抑制活性。

HT-29 细胞移植模型：收集对数生长期的肿瘤细胞，计数后重悬于 1×PBS，调整细胞悬液浓度至 3×10^7/ml。用 1ml 注射器（4 号针头）在裸鼠右侧背部皮下接种肿瘤细胞，3×10^6/0.1ml/鼠，当肿瘤体积达到 150-200mm^3 后用随机区组法分组，每组 8 只小鼠，保证各组间肿瘤体积和小鼠体重均一。各组肿瘤体积的均值与所有实验动物肿瘤体积的均值差异不超过±10%。 尾静脉给药，每四天给一次药（第 1、5、9、13 天），一共给药 4 次，定期测量肿瘤体积和小鼠体重。每一个给药组分别有 8 只小鼠。

小鼠移植瘤实验结果

小鼠 HT-29 结肠癌移植瘤实验：实验共分五组， 包括缓冲液组（20 mM 柠檬酸钠，0.3%氯化钠,5%海藻糖,0.05%吐温 80， pH6)， BA03 单抗组(5mg/kg)、MYK-3 组(1mg/kg)、MYK-3 组（5mg/kg）和非结合 ADC 组（5mg/kg）（人源 IgG-vcMMAE 偶联物，其中 IgG 是从健康人血清纯化的 IgG，该偶联物制备方法与 MYK-3 相同）。MYK-3 给药的小鼠移植肿瘤体积与对照组比较显著降低，显示了明显的抗肿瘤生长效应（图 7）。在第 18 天，

MYK-3 在 5mg/Kg 的给药剂量组与缓冲液组相比肿瘤生长抑制率达到 54%，与单抗 BA03 的同等剂量组相比肿瘤生长抑制率达到 46%， 与非结合 ADC 相比肿瘤生长抑制率达到 42%.

小鼠体重：MYK-3 给药的小鼠体重与对照组比较没有变化（见图 8），说明 MYK-3 没有使小鼠体重降低的毒性作用。

实施例 4：MYK-3 对裸鼠中 KRAS 突变体结肠癌细胞 LoVo 的移植瘤生长抑制活性

按照实施例 3 的模型构建（以 2×10^6/0.1ml/鼠接种肿瘤细胞）和给药方法检测 MYK-3 对裸鼠中 KRAS 突变体结肠癌细胞 LoVo 的移植瘤生长抑制活性，实验共分六组，包括稀释缓冲液组（20 mM 柠檬酸钠，0.3%氯化钠，5%海藻糖，0.05%吐温 80， pH6）， 爱必妥单抗组（3mg/kg）、MYK-3 组（0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg 三个剂量）和非结合对照 ADC 组（3mg/kg），其中非结合对照 ADC 代表非结合的同等载药量的 ADC 对照（non-binding ADC control,为 anti-CD20 mAb-vcMMAE），该偶联物制备方法与 MYK-3 相同。实验结果见图 9。

从图中可以看出，MYK-3 在 3 mg/Kg 剂量下表现出对 LoVo 细胞肿瘤生长的完全抑制，并且 MYK-3 在 1 mg/Kg 已显示出比上市药品 Erbitux 在 3 mg/Kg 剂量下还更强的活性。

实施例 5 pH 对 MYK-3 稳定性的影响

发明人以实施例 1 得到的抗体药物偶联物为起点，对 pH 进行了更深入的研究。结果表明 MYK-3 最佳处方的 pH 为 6.3。即，最佳制剂处方为 20 mM 柠檬酸缓冲液，5.5%二水合海藻糖、0.3%氯化钠和 0.05% PS80，pH6.3，且抗体药物偶联物 MYK-3 的浓度为 4mg/mL。

为了考察 MYK-3 在 20 mM 柠檬酸缓冲溶液（内含 5.5%二水合海藻糖、0.3%氯化钠和 0.05% PS80）中不同的 pH 对其质量的影响，除了用 N-乙酰半胱氨酸淬灭偶联反应后，使用 15ml 的 30KD 超滤装置置换到的偶联储存液的处方（待考察处方 F1~F5）与实施例 1 不同之外，其余步骤均与实施例 1 相同。

待考察处方 F1~F5 除了柠檬酸缓冲液的 pH 不同之外，其余成分和浓度均相同。具体为：4mg/mL 的抗体药物偶联物 MYK-3，20 mM 柠檬酸缓冲液，pH 为 5.6（F1）、6.0（F2）、6.3（F3）、6.5（F4）或 6.7（F5），5.5%二水合海藻糖，0.3%氯化钠和 0.05% PS80。

具体地，将其换液至待考察处方 F1~F5（pH：5.6~6.7）中，置于 40±2℃/75%±5%RH

条件下考察 10 天，于设定的时间点取样分析，检测项包括外观、pH、蛋白浓度、SEC、iCIEF 和 HIC。如样品外观浑浊或出现较明显乳光，将不进行后续相关分析（如 SEC、iCIEF 和 HIC）。具体实验设计见表 1。

表 1. pH（5.6~6.7）对 MYK-3（20mM 柠檬酸缓冲液）稳定性影响实验设计

处方	pH	T0	40±2℃/75%±5%RH	
			3D	7D
F1	5.6	√	√	√
F2	6.0	√	√	√
F3	6.3	√	√	√
F4	6.5	√	√	√
F5	6.7	√	√	√

注：T0 表示起始点，D 表示天，√表示检测。

从外观上看，随着时间增加，F1 在 40 度放置 3 天样品浑浊，F2 在 40 度放置 7 天样品浑浊，且 F1 和 F2 在温度降低至室温和 2~8℃时可观察到明显乳光和沉淀，并且 pH 越低，沉淀越多；然而其他处方始终保持澄清，未观察到明显变化。

SEC，iCIEF 和 HIC 检测数据及变化趋势见表 2 和图 10。由于 F1 处方的样品在 40 度放置 3 天样品浑浊，因此，不再进行 F1 处方 3 天和 7 天时的 SEC、iCIEF 和 HIC 检测；同时，由于 F2 处方的样品在 40 度放置 7 天样品浑浊，因此，不再进行 F2 处方 7 天时的 SEC、iCIEF 和 HIC 检测。HIC 数据显示，pH 值不同，F3 处方和 F4 处方的载药量（DAR）值基本不变（如图 10c）；SEC 数据显示，随着 pH 的增加，F3 处方、F4 处方和 F5 处方的高聚体%（HMW%）增长速率呈下降趋势，且下降趋势基本相当（如图 10a）；iCIEF 数据显示，随着 pH 的增加，F3 处方、F4 处方和 F5 处方的酸性峰%呈上升趋势，但 F3 处方的上升趋势明显低于 F4 处方和 F5 处方（如图 10b）。依据以上试验数据，综合外观、SEC、iCIEF 和 HIC 等检测结果，确定 MYK-3 最佳处方为 F3，即处方的 pH 为 6.3。据此，调节处方中的柠檬酸和柠檬酸钠用量，最终配方得到 pH6.3 的 20 mM 柠檬酸缓冲液。

表 2. pH（5.6~6.7）对 MYK-3（20mM 柠檬酸缓冲液）稳定性影响实验数据

处方	SEC			iCIEF			HIC
	HMW (%)	Monomer (%)	LMW (%)	酸性峰(%)	主峰 (%)	碱性峰(%)	DAR

pH5.6	0d	2.2	97.8	0.1	23.3	49.5	27.3	4.0
	3d	样品浑浊						
pH6.0	0d	2.3	97.6	0.1	23.0	50.7	26.3	4.0
	3d	11.9	88.0	0.1	24.9	50.7	24.5	4.1
	7d	样品浑浊						
pH6.3	0d	2.3	97.7	0.1	24.0	48.0	27.9	4.0
	3d	8.6	91.3	0.1	29.9	51.6	18.5	4.0
	7d	10.8	89.1	0.1	34.0	46.7	19.2	4.0
pH6.5	0d	2.3	97.7	0.1	未检测			4.0
	3d	8.6	91.2	0.1	32.0	51.5	16.5	4.0
	7d	9.9	90.1	0.1	42.0	44.2	13.8	4.0
pH6.7	0d	2.3	97.7	0.1	21.2	52.2	26.5	4.0
	3d	8.9	91.0	0.1	35.7	45.7	18.6	4.0
	7d	9.8	90.1	0.1	48.1	39.4	12.5	3.9

基于以上最终确定 MYK-3 制剂的处方如下：

辅料名称	用途	用量（g/L）	生产厂家	质量标准
一水合柠檬酸	pH 调节剂	0.27	默克化工技术（上海）有限公司	ChP
二水合柠檬酸钠	pH 调节剂	5.50	J.T Baker	USP
二水合海藻糖	蛋白保护剂	55.26	Pfanstiehl	ChP
PS80	抗粘附剂，蛋白保护剂	0.50	南京威尔化工有限公司	ChP
氯化钠	盐	3.00	江苏省勤奋药业有限公司	ChP

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解，根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1、抗体药物偶联物制剂，其包含：

抗体药物偶联物或其盐，所述抗体药物偶联物或其盐的浓度为 1-20 mg/mL，优选为 2-6 mg/mL，更优选为 4 mg/mL；

柠檬酸缓冲液，所述柠檬酸缓冲液的浓度为 10-50 mM，优选为 15-25 mM，更优选为 20 mM，且所述柠檬酸缓冲液的 pH 为 6.3-6.7，优选为 6.3-6.5，更优选为 6.3；

海藻糖，所述海藻糖的浓度为 1-10%，优选为 4-7%，更优选为 5.5%；

氯化钠，所述氯化钠的浓度为 0.1-2%，优选为 0.1-0.5%，更优选为 0.3%；

吐温 80，所述吐温 80 的浓度为 0.01-0.2%，优选为 0.01-0.1%，更优选为 0.05%；

所述抗体药物偶联物具有式 I 所示的结构，

$$Ab-(L-D)_p$$

式 I

其中：

Ab 代表抗表皮生长因子受体抗体，其中所述抗表皮生长因子受体抗体包括重链和轻链，其中重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO：5～7 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO：12～14 所示的序列或其突变体；

L 代表接头，所述接头为 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-vc-PAB)；

D 代表细胞毒剂，所述细胞毒剂为 MMAE；

p 代表 1-9，优选为 2-6，更优选为 3-5。

2、根据权利要求 1 所述的制剂，其中，所述抗表皮生长因子受体抗体具有以下特征中的一种或多种：

1）所述抗表皮生长因子受体抗体的重链可变区的 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO：8～11 所示的序列或其突变体；

2）所述抗表皮生长因子受体抗体轻链可变区的 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO：15～18 所示的序列或其突变体；

3）所述抗表皮生长因子受体抗体的重链恒定区选自人源性 IgG、IgM、IgA、IgD、

IgA 恒定区或上述恒定区的突变体；

优选地，所述 IgG 选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4；

4）所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链恒定区为人源性 lambda 恒定区、kappa 恒定区、或上述恒定区的突变体。

3、根据权利要求 1-2 任一项所述的制剂，其中，所述抗表皮生长因子受体抗体具有以下特征中的一种或多种：

1）所述抗表皮生长因子受体抗体的重链可变区的序列包含如 SEQ ID NO：1 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO：1 所示序列的同一性大于 70%，优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99%的序列；

优选地，所述抗表皮生长因子受体抗体的重链可变区的序列如 SEQ ID NO：1 所示；

2）所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链可变区的序列包含如 SEQ ID NO：2 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO：2 所示序列的同一性大于 70%，优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99%的序列；

优选地，所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链可变区的序列如 SEQ ID NO：2 所示；

3）所述抗表皮生长因子受体抗体的重链恒定区的序列包含如 SEQ ID NO：3 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO：3 所示序列的同一性大于 70%，优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99%的序列；

优选地，所述抗表皮生长因子受体抗体的重链恒定区的序列如 SEQ ID NO：3 所示；

4）所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链恒定区的序列包含如 SEQ ID NO：4 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO：4 所示序列的同一性大于 70%，优选大于 75%、80%、85%、90%、95%、99%的序列；

优选地，所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链恒定区的序列如 SEQ ID NO：4 所示。

4、根据权利要求 1-3 任一项所述的制剂，其中，所述海藻糖为二水合海藻糖；

或者，所述柠檬酸缓冲液是由柠檬酸和柠檬酸钠配置得到的；

优选地，所述柠檬酸为一水合柠檬酸；

优选地，所述柠檬酸钠为二水合柠檬酸钠。

5、制备权利要求 1-4 任一项所述的制剂的方法，其包括：

1）将抗表皮生长因子受体抗体与还原剂进行还原反应，获得还原后的抗表皮生长因子受体抗体，所述抗表皮生长因子受体抗体如权利要求 1-3 任一项限定；

2）将所述还原后的抗表皮生长因子受体抗体和 vcMMAE 进行偶联反应；

3）淬灭所述偶联反应，并将偶联反应产物进行缓冲液置换，获得所述抗体药物偶联物制剂，所述抗体药物偶联物制剂如权利要求 1-4 任一项所限定。

6、根据权利要求5所述的方法，其中，所述方法包括：

（1）将权利要求1-3任一项所限定的抗表皮生长因子受体抗体（优选10毫克）置换（优选置换三次）到还原缓冲液（优选包含25mM 硼酸钠，pH8.0，25mM NaCl，5 mM EDTA)中，检测蛋白质的浓度，计算蛋白质的含量；

（2）向步骤（1）的产物中加入DTT，在室温条件下反应1-5小时（优选2小时），获得还原后的抗表皮生长因子受体抗体，所述DTT的物质的量是所述蛋白质的物质的量的2.0-3.0倍，优选2.5倍；

（3）将步骤（2）的产物置换（优选置换三次）到偶联缓冲液（优选包含50mM Tris，pH7.2，150 mM NaCl，5 mM EDTA）中，并计算自由巯基的物质的量；

（4）向步骤（3）的产物中加入vc-MMAE，在室温条件下反应1-5小时（优选2小时），所述vc-MMAE的物质的量是所述还原后的抗表皮生长因子受体抗体的1.0-1.5倍，优选1.1倍；

（5）向步骤（4）的产物中加入N-乙酰半胱氨酸，静置（优选5分钟），获得包含权利要求1所限定的抗体药物偶联物的混合液，所述N-乙酰半胱氨酸的物质的量是所述vc-MMAE的15-25倍，优选20倍；

（6）将步骤（5）的混合液置换（优选置换三次）到偶联物储存液中，获得所述抗体药物偶联物制剂；

所述偶联储存液包含：

柠檬酸缓冲液，所述柠檬酸缓冲液的浓度为 10-50 mM，优选为 15-25 mM，更优选为 20 mM，且所述柠檬酸缓冲液的 pH 为 6.3-6.7，优选为 6.3-6.5，更优选为 6.3；

海藻糖，所述海藻糖的浓度为 1-10%，优选为 4-7%，更优选为 5.5%；

氯化钠，所述氯化钠的浓度为 0.1-2%，优选为 0.1-0.5%，更优选为 0.3%；和

吐温 80，所述吐温 80 的浓度为 0.01-0.2%，优选为 0.01-0.1%，更优选为 0.05%；

所述抗体药物偶联物制剂中，所述抗体药物偶联物的浓度为 1-20 mg/mL，优选为 2-6 mg/mL，更优选为 4 mg/mL；

优选地，所述海藻糖为二水合海藻糖；

优选地，所述柠檬酸缓冲液是由柠檬酸和柠檬酸钠配置得到的；

优选地，所述柠檬酸为一水合柠檬酸；

优选地，所述柠檬酸钠为二水合柠檬酸钠。

7、权利要求 5-6 任一项所述的方法制备的抗体药物偶联物制剂。

8、组合物，其包含权利要求1-4或7任一项所述的制剂，任选地，还包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

9、权利要求1-4或7任一项所述的制剂或者权利要求8所述的组合物选自以下一种或多种的用途：

1）在制备预防和/或治疗与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病的药物中的用途；

2）在制备抑制肿瘤血管生成、延缓肿瘤进展、抑制肿瘤生长、抑制肿瘤细胞增殖的试剂或药物中的用途。

10、根据权利要求9所述的用途，其中，所述与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病为与EGFR相关的肿瘤，例如与EGFR过表达相关的肿瘤，进一步地，例如选自结肠癌、直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤；

或者，所述肿瘤选自结肠癌、直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤；

或者，所述的肿瘤为KRAS基因突变的肿瘤，进一步地，例如为KRAS基因突变的结肠癌、直肠癌、肺癌或胰腺癌；

或者，所述的肿瘤为BRAF基因突变的肿瘤，进一步地，例如选自BRAF基因突变的结肠癌、直肠癌和肺癌。