



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116459335 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 21

(21) 申请号 202310027457.0

(22) 申请日 2023.01.09

(66) 本国优先权数据

202210028230.3 2022.01.11 CN

(71) 申请人 上海君实生物医药科技股份有限公司

地址 201210 上海市浦东新区自由贸易试
验区海趣路36、58号2号楼13层

申请人 苏州君盟生物医药科技有限公司

(72) 发明人 刘沛想 刘洪川 张静 周岳华
吉丽文

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

专利代理师 韦东

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/10 (2017.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/18 (2017.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书33页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

抗CLDN-18.2抗体药物组合物及其用途

(57) 摘要

本发明提供抗CLDN-18.2抗体的药物组合物及其用途。该药物组合物含有抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段和缓冲液,其中所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3,和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。本发明还提供含有所述药物组合物的注射剂以及所述药物组合物和注射剂在制备通过消除、抑制或降低CLDN-18.2活性来治疗疾病或病症的药物中的用途。

1. 一种药物组合物, 包含:

(1) 缓冲液; 和

(2) 抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段;

其中所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3, 和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

2. 如权利要求1所述的药物组合物, 其中所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段的浓度为约2~200mg/mL, 优选为约10~100mg/mL, 更优选为约20~60mg/mL。

3. 如权利要求1所述的药物组合物, 其中该药物组合物的pH为约5.0~7.0, 优选为约5.0~6.0, 更优选为约5.4~5.6。

4. 如权利要求1所述的药物组合物, 其中该药物组合物的渗透压在250~350mOsm/kg的范围内。

5. 如权利要求1所述的药物组合物, 其中所述缓冲液选自醋酸缓冲液、组氨酸缓冲液、柠檬酸缓冲液和磷酸盐缓冲液中的一种或多种; 优选地, 所述缓冲液为组氨酸缓冲液, 所述组氨酸缓冲液选自组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液或组氨酸-组氨酸醋酸盐缓冲液; 优选地, 所述缓冲液的浓度为约5~50mM; 更优选地, 所述缓冲液的浓度为约10~30mM; 优选地, 所述缓冲液的pH为约5.0~7.0, 更优选为约5.0~6.0, 更优选为约5.4~5.6。

6. 如权利要求1-5任一项所述的药物组合物, 其中所述药物组合物还包括稳定剂, 所述稳定剂选自精氨酸、精氨酸盐、氯化钠、甘露醇、山梨醇、蔗糖、甘氨酸和海藻糖中的一种或多种; 优选地, 所述稳定剂的浓度为约100~300mM, 优选为约120~280mM, 更优选为约130~250mM。

7. 如权利要求6所述的药物组合物, 其中所述稳定剂为选自以下(1)至(6)中的任一项:

(1) 海藻糖, 浓度约120~280mM, 优选地, 其浓度为约200~260mM; 优选地, 所述海藻糖为二水海藻糖; 或

(2) 蔗糖, 浓度约120~280mM, 优选地, 其浓度为约200~260mM; 或

(3) 精氨酸或精氨酸盐, 浓度约120~280mM, 优选地, 其浓度为约120~160mM; 优选地, 所述精氨酸盐为盐酸精氨酸; 或

(4) 氯化钠和甘露醇的组合, 氯化钠的浓度约20~80mM, 甘露醇的浓度约100~180mM; 优选地, 氯化钠的浓度约30~70mM, 甘露醇的浓度约120~160mM; 或

(5) 氯化钠和蔗糖的组合, 氯化钠的浓度约20~80mM, 蔗糖的浓度约100~180mM; 优选地, 氯化钠的浓度约30~70mM, 蔗糖的浓度约120~160mM; 或

(6) 盐酸精氨酸和蔗糖的组合, 盐酸精氨酸的浓度约20~80mM, 蔗糖的浓度约100~180mM; 优选地, 氯化钠的浓度约30~70mM, 蔗糖的浓度约120~160mM。

8. 如权利要求6所述的药物组合物, 其中所述药物组合物还包括表面活性剂, 所述表面活性剂选自聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20和泊洛沙姆188中的一种或多种; 优选地, 以w/v计算, 所述表面活性剂浓度为约0.01%~0.1%, 更优选地, 所述表面活性剂浓度为约0.01%~0.04%。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示的轻链可变区, 和氨基酸序列如SEQ ID NO:8

所示的重链可变区。

10. 如权利要求9所述的药物组合物,其中,所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的轻链氨基酸序列,和如SEQ ID NO:10所示的重链氨基酸序列。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的药物组合物,其分别包含如下述(1)~(24)中任一项所示的组分:

(1) (a) 约10~100mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM醋酸缓冲液, pH为约5.0~7.0; (c) 约30~70mM的氯化钠, 约100~180mM的甘露醇; 以及 (d) 约0.01%~0.1%的聚山梨醇酯80; 或

(2) (a) 约10~100mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~7.0; (c) 约30~70mM的氯化钠, 约100~180mM的甘露醇; 以及 (d) 约0.01%~0.1%的聚山梨醇酯80; 或

(3) (a) 约10~100mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM枸橼酸缓冲液, pH为约5.0~7.0; (c) 约30~70mM的氯化钠, 约100~180mM的甘露醇; 以及 (d) 约0.01%~0.1%的聚山梨醇酯80; 或

(4) (a) 约20~60mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~6.0; (c) 约200~260mM的蔗糖; 以及 (d) 约0.01%~0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(5) (a) 约20~60mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~6.0; (c) 约200~260mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.01%~0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(6) (a) 约20~60mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~6.0; (c) 约30~70mM的氯化钠与120~160mM的蔗糖; 以及 (d) 约0.01%~0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(7) (a) 约20~60mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~6.0; (c) 约30~70mM的盐酸精氨酸与120~160mM的蔗糖; 以及 (d) 约0.01%~0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(8) (a) 约20~60mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~6.0; (c) 约120~160mM的盐酸精氨酸; 以及 (d) 约0.01%~0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(9) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或

(10) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或

(11) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(12) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(13) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或

(14) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或

(15) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(16) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(17) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或

(18) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或

(19) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(20) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(21) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或

(22) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或

(23) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或

(24) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的药物组合物的冻干制剂。

13. 由权利要求12所述的冻干制剂复溶获得的复溶制剂。

14. 一种液体制剂, 其特征在于, 所述液体制剂含有权利要求1-11中任一项所述的药物组合物, 或含有葡萄糖溶液或氯化钠溶液以及权利要求13所述的复溶制剂; 优选地, 所述氯化钠溶液浓度为约0.85~0.9% (w/v), 所述葡萄糖溶液浓度为约5~25% (w/v); 优选地, 所述液体制剂中, 所述抗CLDN-18.2抗体的浓度为约0.1~50mg/mL, 更优选为约0.2~20mg/mL; 优选地, 所述液体制剂的pH为约5.0~7.0; 优选地, 所述液体制剂是注射剂。

15. 如权利要求1-11中任一项所述的药物组合物、如权利要求12所述的冻干制剂、如权利要求13所述的复溶制剂或权利要求14所述的液体制剂在制备通过消除、抑制或降低CLDN-18.2活性来治疗疾病或病症的药物中的用途; 优选地, 所述疾病或病症选自癌症、感染性疾病或炎症性疾病; 更优选地, 所述疾病为癌症。

抗CLDN-18.2抗体药物组合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗性药物组合物领域,具体涉及抗CLDN-18.2抗体药物组合物及其用途。

背景技术

[0002] 胃癌是全世界范围内发病率最高的癌症之一。据世界卫生组织癌控项目的统计数据,全球每年死于癌症的患者高达700万,其中死于胃癌的患者占70万例。与常规的胃癌治疗方案相比,基于抗体的治疗方案由于具有高特异性和低副作用,具有深远的应用前景。

[0003] Claudin,又称CLDN,是一类建立细胞旁屏障并控制细胞间分子流动的细胞表面蛋白家族,目前已发现至少有26种。Claudin蛋白家族成员是紧密连接的重要结构成分,在保持上皮细胞极性、控制细胞旁扩散、以及调控细胞生长分化方面起到重要作用。Claudin分子跨细胞膜四次,N端和C端均落在细胞质中。不同的Claudin成员在不同组织中表达,且其功能的改变与癌症形成相关联。Claudin 1、Claudin 18和Claudin 10的表达水平变化分别与肠癌、胃癌和肝细胞癌相关。

[0004] Claudin 18 (CLDN18) 有两种选择性剪接变体CLDN-18.1和CLDN-18.2。Claudin 18.1 (CLDN-18.1) 选择性地正常肺和胃上皮中表达。Claudin 18.2 (CLDN-18.2) 在正常胃上皮短寿细胞中呈现微量表达,但在肿瘤细胞中,Claudin 18.2在多种癌症类型中均呈现强烈表达,如75%的胃癌患者高表达Claudin 18.2,50%的胰腺癌患者高表达Claudin 18.2,30%的食管癌患者高表达Claudin 18.2,在肺癌等中也有高表达。

[0005] 抗CLDN-18.2抗体在用于受试者之前必须预先制备成抗体制剂,并经过贮存及运输的过程。而抗体在贮存及运输过程中可能会发生多聚或修饰改变、活性降低等变化,这些变化会使受试者出现免疫毒性或效用降低,因此需要一种适合药物长期贮存和运输的稳定制剂,以保证抗体到达受试者体内前仍具有其治疗所需的生物活性,而目前市场上尚无最适合本文中所述抗CLDN-18.2抗体的稳定制剂。

发明内容

[0006] 本发明提供的药物组合物是一种含有与CLDN-18.2特异性结合的抗体的高稳定性药物组合物。特别地,本发明通过选择适当的缓冲体系和pH,优化稳定剂和表面活性剂,并进行了配伍稳定性研究以及抗体的体外结合活性、ADCC效应和CDC效应的研究,开发得到的高浓度抗体制剂长期稳定、无聚集、粘度低。

[0007] 在一个方面,本发明提供一种药物组合物,包含:

[0008] (1) 缓冲液;和

[0009] (2) 抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段;

[0010] 其中所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3,和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0011] 在一些实施方式中,如前文所述的药物组合物中,所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段的浓度为约2~200mg/mL,优选为约10~100mg/mL,更优选为约20~60mg/mL。

[0012] 在一些实施方式中,如前文所述的药物组合物的pH为约5.0~7.0,优选为约5.0~6.0,更优选为约5.4~5.6。

[0013] 在一些实施方式中,如前文所述的药物组合物的渗透压在250~350mOsm/kg的范围内。

[0014] 在一些实施方式中,如前文所述的药物组合物中,所述缓冲液选自醋酸缓冲液、组氨酸缓冲液、柠檬酸缓冲液和磷酸盐缓冲液中的一种或多种;优选地,所述缓冲液为组氨酸缓冲液,所述组氨酸缓冲液选自组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液或组氨酸-组氨酸醋酸盐缓冲液;优选地,所述缓冲液的浓度为约5~50mM;更优选地,所述缓冲液的浓度为约10~30mM;优选地,所述缓冲液的pH为约5.0~7.0,更优选为约5.0~6.0,更优选为约5.4~5.6。

[0015] 在一些实施方式中,如前文所述的药物组合物还包括稳定剂,所述稳定剂选自精氨酸、精氨酸盐、氯化钠、甘露醇、山梨醇、蔗糖、甘氨酸和海藻糖中的一种或多种;优选地,所述稳定剂的浓度为约100~300mM,优选为约120~280mM,更优选为约130~250mM。

[0016] 在一些实施方式中,如前文所述的药物组合物中,所述稳定剂为选自以下(1)至(6)中的任一项:

[0017] (1) 海藻糖,浓度约120~280mM,优选地,其浓度为约200~260mM;优选地,所述海藻糖为二水海藻糖;或

[0018] (2) 蔗糖,浓度约120~280mM,优选地,其浓度为约200~260mM;或

[0019] (3) 精氨酸或精氨酸盐,浓度约120~280mM,优选地,其浓度为约120~160mM;优选地,所述精氨酸盐为盐酸精氨酸;或

[0020] (4) 氯化钠和甘露醇的组合,氯化钠的浓度约20~80mM,甘露醇的浓度约100~180mM;优选地,氯化钠的浓度约30~70mM,甘露醇的浓度约120~160mM;或

[0021] (5) 氯化钠和蔗糖的组合,氯化钠的浓度约20~80mM,蔗糖的浓度约100~180mM;优选地,氯化钠的浓度约30~70mM,蔗糖的浓度约120~160mM;或

[0022] (6) 盐酸精氨酸和蔗糖的组合,盐酸精氨酸的浓度约20~80mM,蔗糖的浓度约100~180mM;优选地,盐酸精氨酸的浓度约30~70mM,蔗糖的浓度约120~160mM。

[0023] 在一些实施方式中,如前文所述的药物组合物还包括表面活性剂,所述表面活性剂选自聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20和泊洛沙姆188中的一种或多种;优选地,以w/v计算,所述表面活性剂浓度为约0.01%~0.1%,更优选地,所述表面活性剂浓度为约0.01%~0.04%。

[0024] 在一些实施方式中,如前文所述的药物组合物分别包含如下(1)~(24)中任一项目所示的组分:

[0025] (1) (a) 约10~100mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段;(b) 约10~30mM醋酸缓冲液,pH为约5.0~7.0;(c) 约30~70mM的氯化钠,约100~180mM的甘露醇;以及(d) 约0.01%~0.1%的聚山梨醇酯80;或

[0026] (2) (a) 约10~100mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段;(b) 约10~30mM组氨酸缓冲液,pH为约5.0~7.0;(c) 约30~70mM的氯化钠,约100~180mM的甘露醇;以及(d) 约0.01%~0.1%的聚山梨醇酯80;或

- [0027] (3) (a) 约10~100mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM枸橼酸缓冲液, pH为约5.0~7.0; (c) 约30~70mM的氯化钠, 约100~180mM的甘露醇; 以及 (d) 约0.01%~0.1%的聚山梨醇酯80; 或
- [0028] (4) (a) 约20~60mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~6.0; (c) 约200~260mM的蔗糖; 以及 (d) 约0.01%~0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0029] (5) (a) 约20~60mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~6.0; (c) 约200~260mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.01%~0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0030] (6) (a) 约20~60mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~6.0; (c) 约30~70mM的氯化钠与120~160mM的蔗糖; 以及 (d) 约0.01%~0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0031] (7) (a) 约20~60mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~6.0; (c) 约30~70mM的盐酸精氨酸与120~160mM的蔗糖; 以及 (d) 约0.01%~0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0032] (8) (a) 约20~60mg/mL的所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约10~30mM组氨酸缓冲液, pH为约5.0~6.0; (c) 约120~160mM的盐酸精氨酸; 以及 (d) 约0.01%~0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0033] (9) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或
- [0034] (10) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或
- [0035] (11) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0036] (12) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0037] (13) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或
- [0038] (14) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或
- [0039] (15) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0040] (16) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.4~5.6; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0041] (17) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或
- [0042] (18) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或
- [0043] (19) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲

- 液, pH为约5.5; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0044] (20) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约220mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0045] (21) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或
- [0046] (22) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.02%的聚山梨醇酯80; 或
- [0047] (23) (a) 约40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80; 或
- [0048] (24) (a) 约50mg/mL的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段; (b) 约20mM组氨酸缓冲液, pH为约5.5; (c) 约230mM的二水海藻糖; 以及 (d) 约0.04%的聚山梨醇酯80;
- [0049] 优选地, 所述抗CLDN-18.2抗体如本文任一实施方案所述。
- [0050] 在一些实施方式中, 本发明提供本文任一实施方式中所述的药物组合物的冻干制剂。
- [0051] 在另一个方面, 本发明提供一种复溶制剂, 其为本文任一实施方案所述的冻干制剂复溶所得的制剂。
- [0052] 在另一方面, 本发明提供一种液体制剂, 含有本文任一实施方案所述的药物组合物, 或其为前文所述的冻干制剂复溶后经氯化钠溶液或葡萄糖溶液重配获得的制剂; 优选地, 所述液体制剂是注射剂; 优选地, 所述氯化钠溶液浓度为约0.85~0.9% (w/v); 优选地, 所述葡萄糖溶液浓度为约5~25% (w/v); 优选地, 所述注射剂中, 所述抗CLDN-18.2抗体的浓度为约0.1~50mg/mL, 更优选为约0.2~20mg/mL; 优选地, 所述液体制剂的pH为约5.0~7.0。
- [0053] 在一些实施方式中, 如前文所述的液体制剂中, 所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示的轻链可变区, 和氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示的重链可变区。
- [0054] 在一些实施方式中, 如前文所述的液体制剂中, 所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的轻链氨基酸序列, 和氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示的重链氨基酸序列。
- [0055] 在一些实施方式中, 所述液体制剂的pH为约5.0~6.0。
- [0056] 在一些实施方式中, 如前文所述的药物组合物和液体制剂中, 所述药物组合物或液体制剂经静脉注射或皮下注射施用。
- [0057] 在另一个方面, 本文提供如前文所述的药物组合物、冻干制剂、复溶制剂或液体制剂在制备通过消除、抑制或降低CLDN-18.2活性来治疗疾病或病症的药物中的用途; 优选地, 所述疾病或病症选自癌症、感染性疾病或炎症性疾病; 更优选地, 所述疾病为癌症。
- [0058] 在一些实施方式中, 如前文所述的液体制剂或冻干制剂于2~8°C稳定至少3个月, 至少6个月, 至少12个月, 至少18个月或至少24个月。
- [0059] 在一些实施方式中, 上述液体制剂或冻干制剂于40°C稳定至少7天, 至少14天或至少28天。
- [0060] 在一些实施方式中, 上述液体制剂经静脉注射或皮下注射施用。

附图说明

- [0061] 图1:流式细胞术测定的含抗CLDN-18.2抗体的药物组合物的细胞水平亲和力。
- [0062] 图2:报告基因法测定的含抗CLDN-18.2抗体的药物组合物的ADCC活性。
- [0063] 图3:流式细胞术测定的含抗CLDN-18.2抗体的药物组合物的CDC活性。

具体实施方式

[0064] 定义和说明

[0065] 为了更容易理解本发明,以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义,本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。应理解本发明不限于具体的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,当然可以对以上进行变化。还应理解本申请所用术语仅为了描述具体的实施方式,并不旨在进行限制。本文所引用的所有参考文献,包括专利、专利申请、论文、教科书诸如此类,以及其中所引用的参考文献,就其尚未被引用的程度而言,在此其全文通过引用并入。如果所并入的文献和类似材料中的一个或多个与本申请不同或矛盾,包括但不限于所定义的术语、术语用法、所描述的技术诸如此类,则以本申请为准。

[0066] 除非该内容被另外明确说明,否则本说明书以及所附权利要求中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代。因此,例如,提及“一种多肽”包括了两种或更多种多肽等的组合。

[0067] 术语“药物组合物”或“制剂”表示含有一种或多种本文所述抗体与其他组分的混合物,所述其他组分例如生理学可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

[0068] 术语“液体制剂”是指处于液体状态下的制剂,且不意图指称重悬浮的冻干制剂。本发明的液体制剂在储存时稳定,并且其稳定性不依赖于冻干(或其他状态改变方法,例如喷雾干燥)。

[0069] 术语“水性液体制剂”是指使用水作为溶剂的液体制剂。在一些实施方式中,水性液体制剂是不需冻干、喷雾干燥和/或冷冻来维持稳定性(例如化学和/或物理稳定性和/或生物活性)的制剂。

[0070] 术语“赋形剂”是指可以向制剂添加以提供所需特性(例如稠度、提高的稳定性)和/或调节渗透压的试剂。常用赋形剂的实例包括但不限于糖类、多元醇、氨基酸、表面活性剂和聚合物。

[0071] 本申请所用的“约”在指代可测量数值(如量、持续时间等)时意在涵盖相对于具体数值 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 的变化,包括 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 和 $\pm 0.1\%$,因为这些变化适于进行所公开的方法。

[0072] 术语“缓冲液pH为约5.0~7.0”是指这样的试剂,通过其酸/碱共轭组分的作用使得包含该试剂的溶液能抵抗pH变化。本发明的制剂中使用的缓冲液可具有约5.0至约7.0范围内的pH、或约5.0至约6.5范围内的pH、或约5.5至约6.5范围内的pH、或约5.0至约6.0范围内的pH。

[0073] 在本文中,将pH控制在该范围内的“缓冲液”实例包括醋酸、醋酸盐(例如醋酸钠)、琥珀酸、琥珀酸盐(例如琥珀酸钠)、葡萄糖酸、组氨酸、组胺酸盐(例如组氨酸盐酸盐)、甲硫

氨酸、柠檬酸(枸橼酸)、柠檬酸盐(枸橼酸盐)、磷酸盐、柠檬酸盐/磷酸盐、咪唑、其组合和其他有机酸缓冲剂。

[0074] “组氨酸缓冲液”为包含组氨酸离子的缓冲液。组氨酸缓冲液的实例包括组氨酸和组氨酸的盐,如组氨酸盐酸盐、组氨酸乙酸盐、组氨酸磷酸盐和组氨酸硫酸盐等,如含有组氨酸与组氨酸盐酸盐的组氨酸缓冲液;本发明的组氨酸缓冲液也包括含有组氨酸和醋酸盐(如钠盐或钾盐)的组氨酸缓冲液。

[0075] “柠檬酸缓冲液”,又称“枸橼酸缓冲液”,是包括柠檬酸根离子的缓冲液。柠檬酸盐缓冲液的实例包括柠檬酸-柠檬酸钠、柠檬酸-柠檬酸钾、柠檬酸-柠檬酸钙、柠檬酸-柠檬酸镁等。优选的柠檬酸盐缓冲液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

[0076] “醋酸缓冲液”是包括醋酸根离子的缓冲液。醋酸盐缓冲液的实例包括醋酸-醋酸钠、醋酸-醋酸钾、醋酸-醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸盐缓冲液为醋酸-醋酸钠缓冲液。

[0077] “琥珀酸缓冲液”是包括琥珀酸根离子的缓冲液。琥珀酸盐缓冲液的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙、琥珀酸-琥珀酸镁等。优选的琥珀酸盐缓冲液为琥珀酸-琥珀酸钠缓冲液。

[0078] 术语“稳定剂”表示药学上可接受的赋形剂,其在制造,储存和应用过程中保护活性药物成分和/或制剂免受化学和/或物理降解。稳定剂包括但不限于如以下定义的糖,氨基酸,盐,多元醇和他们的代谢产物,例如氯化钠、氯化钙、氯化镁、甘露醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、精氨酸或其盐(如盐酸精氨酸)、甘氨酸、丙氨酸(α -丙氨酸、 β -丙氨酸)、甜菜碱、亮氨酸、赖氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、4-羟基脯氨酸、肌氨酸、 γ -氨基丁酸(GABA)、奥品类(opines)、丙氨奥品、章鱼碱、甘氨奥品(strombine)和三甲胺的N-氧化物(TMAO)、人血清白蛋白(hsa)、牛血清白蛋白(BSA)、 α -酪蛋白、球蛋白、 α -乳白蛋白、LDH、溶菌酶、肌红蛋白、卵清蛋白和RNAase A。部分稳定剂,如氯化钠、氯化钙、氯化镁、甘露醇、山梨醇、蔗糖等也可起到控制渗透压的作用。在本发明中具体地使用的稳定剂选自多元醇、氨基酸、盐、糖中的一种或一种以上。优选的盐为氯化钠,优选的糖为蔗糖和海藻糖,优选的多元醇为山梨醇和甘露醇。优选的氨基酸为精氨酸、甘氨酸、脯氨酸,氨基酸可以以其D-和/或L-型存在,但典型是L-型,氨基酸可以任何合适的盐存在,例如盐酸盐,如盐酸精氨酸。优选的稳定剂为氯化钠、甘露醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、盐酸精氨酸、甘氨酸、脯氨酸、氯化钠-山梨醇、氯化钠-甘露醇、氯化钠-蔗糖、氯化钠-海藻糖、盐酸精氨酸-甘露醇、盐酸精氨酸-蔗糖。

[0079] 术语“表面活性剂”一般包括保护蛋白质例如抗体免受空气/溶液界面诱导的应力、溶液/表面诱导的应力的影响以减少抗体的聚集或使制剂中颗粒物的形成最小化的试剂。示例性的表面活性剂包括但不限于非离子型表面活性剂例如聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯(如聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80)、聚乙烯-聚丙烯共聚物、聚乙烯-聚丙烯二醇、聚氧乙烯-硬脂酸酯、聚氧乙烯烷基醚、例如聚氧乙烯单月桂基醚、烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆,Pluronic)、十二烷基硫酸钠(SDS)。本文中,如无特别说明,术语“聚山梨醇酯20的浓度”和“聚山梨醇酯80的浓度”均是指质量体积浓度(w/v),如“约0.04%聚山梨醇酯80”中“0.04%”即指“100mL液体中含有0.04g的聚山梨醇酯80”。

[0080] 本文所用的术语“粘度”可以是“运动粘度”或“绝对粘度”。“运动粘度”是对流体在

重力影响下所产生的抵抗性流动的一种测量指标。“绝对粘度”，有时称为动态粘度或简单粘度，是运动粘度与流体密度的乘积（绝对粘度=运动粘度 \times 密度）。运动粘度的量纲是 L^2/T ，其中L是长度，T是时间。通常，运动粘度以厘沱（cSt）表示。运动粘度的国际单位制单位是 mm^2/s ，即1cSt。绝对粘度以厘泊（cP）单位表示。绝对粘度的国际单位制单位是毫帕斯卡·秒（mPa·s），其中1cP=1mPa·s。

[0081] 术语“等渗”是指该制剂具有与人血液基本相同的渗透压。等渗制剂一般具有约250至350mOsm/kg的渗透压。可使用蒸汽压或冰点下降式的渗透压计测量等渗性。

[0082] 术语“稳定的”制剂是其中的抗体在制造过程期间和/或储存时基本上保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的制剂。即使所含的抗体在经过一定时间储存之后未能保持其100%的化学结构或生物功能，医药制剂也可以是稳定的。在某些情况下，在经过一定时间储存之后，能维持约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的抗体结构或功能，也可被认为是“稳定的”。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本技术领域是可得，并综述在《肽和蛋白质药物递送》(Peptide and Protein Drug Delivery) 247~301, Vincent Lee主编, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991), 和 Jones, A. (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29~90中(二者引入作为参考)。

[0083] 制剂在一定温度下经过一定时间的储存之后，通过测定其中剩余的天然抗体的百分比(及其它方法)，可以测量其稳定性。除其它方法外，天然抗体的百分比可以通过尺寸排阻色谱法(例如尺寸排阻高效液相色谱法[SEC-HPLC])来测量，“天然的”指未聚集的和未降解的。在一些实施方式中，蛋白质的稳定性按照具有低百分比的降解(例如片段化)和/或聚集蛋白质的溶液中单体蛋白质的百分数来确定。在一些实施方式中，制剂可以在室温、约25~30℃或40℃下稳定储存至少2周、至少28天、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月，或更长，最多不超过约6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%，或0.1%聚集形式的抗体。

[0084] 通过测定在离子交换期间在此抗体主馏分(“主要荷电形式”)较为酸性的馏分中迁移的抗体(“酸性形式”)的百分比(及其它方法)，可以测量稳定性，其中稳定性与酸性形式抗体的百分比成反比。除其它方法外，“酸化”抗体的百分比可以通过离子交换色谱法(例如阳离子交换高效液相色谱法[CEX-HPLC])来测量。在一些实施方式中，可接受程度的稳定性意为当制剂在一定温度下经过一定时间的储存之后，其中可检测出的酸性形式的抗体最多不超过约49%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%。在测量稳定性之前储存的一定时间可以是至少2周、至少28天、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月，或更长。当评估稳定性时，容许储存医药制剂的一定温度可以是约-80℃至约45℃范围内的任何温度，例如储存于约-80℃、约-30℃、约-20℃、约0℃、约2~8℃、约5℃、约25℃，或约40℃。

[0085] 如果抗体在颜色和/或澄清度目测检查时或通过UV光散射或通过孔径排阻层析测量时基本上不显示出例如聚集、沉淀和/或变性的迹象，则所述抗体在该药物组合物中“保持其物理稳定性”。聚集是单个分子或复合物共价或非共价缔合以形成聚集体的过程。聚集可以进行到形成可见沉淀物的程度。

[0086] 制剂的稳定性例如物理稳定性可以通过本技术领域中公知的方法来评估,包括测量样品的表观消光度(吸光度或光密度)。这样的消光测量与制剂的浊度相关。制剂的浊度部分是溶解在溶液中的蛋白质的固有性质,并且通常通过比浊法来测量,并用比浊法浊度单位(NTU)来量度。

[0087] 随着例如溶液中一种或多种组分的浓度(例如蛋白质和/或盐浓度)而变化的浊度水平也被称为制剂的“乳浊”或“乳浊外观”。浊度水平可以参照使用已知浊度的悬液产生的标准曲线来计算。用于测定药物组合物的浊度水平的参比标准品可以基于《欧洲药典》标准(《欧洲药典》(European Pharmacopoeia),第四版,“欧洲药品质量委员会指令”(Directorate for the Quality of Medicine of the Council of Europe)(EDQM),Strasbourg,France)。根据《欧洲药典》标准,澄清溶液被定义为浊度低于或等于按照《欧洲药典》标准具有约3的参比悬液的浊度的溶液。比浊法的浊度测量可以检测在不存在缔合或非理想效应的情况下的瑞利散射,其通常随浓度线性变化。用于评估物理稳定性的其他方法在本技术领域中公知。

[0088] 如果抗体在给定时间点的化学稳定性使得抗体被认为仍保持如下文中所定义其生物活性,则所述抗体在药物组合物中“保持其化学稳定性”。可以通过例如检测或定量抗体的化学改变的形式来评估化学稳定性。化学改变可以包括尺寸改变(例如剪短),其可以使用例如孔径排阻层析、SDS-PAGE和/或基质辅助的激光解吸电离/飞行时间质谱(MALDI/TOF MS)来评估。其他类型的化学改变包括电荷改变(例如作为脱酰胺或氧化的结果而发生),其可以通过例如离子交换层析来评估。

[0089] 如果药物组合物中的抗体对于其预期目的来说是生物活性的,则所述抗体在药物组合物中“保持其生物活性”。例如,如果制剂于例如5°C、25°C、45°C等温度下储存一定时间(例如1至12个月)之后,该制剂所含抗CLDN-18.2抗体与CLDN-18.2结合的亲和力为所述储存之前抗体结合亲和力的至少90%、95%或以上,则可认为本发明之制剂是稳定的。结合亲和力也可用例如ELISA或等离子共振技术测定。

[0090] 在本发明的情形中,在药理学意义上,抗体的“治疗有效量”或“有效量”是指在抗体可以有效治疗的障碍的症状的预防或治疗或减轻方面有效的量。本发明中,药物的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是当单独使用或与另一种治疗剂组合使用时保护受试者免于疾病发作或促进疾病消退的任何量的药物,所述疾病消退通过疾病症状的严重性的降低,疾病无症状期的频率和持续时间的增加,或由疾病痛苦引起的损伤或失能的预防来证明。药物促进疾病消退的能力可以使用本领域技术人员已知的多种方法来评价,比如在临床试验期间的人受试者中,在预测人类功效的动物模型系统中,或通过在外测定法中测定所述药剂的活性。药物治疗有效量包括“预防有效量”,即当单独或如与其它治疗药物组合给与处于患病风险的受试者或患病复发的受试者时,抑制疾病的发展或复发的任何量的药物。

[0091] 术语“受试者”或“患者”意图包括哺乳动物生物体。受试者/患者的实例包括人类和非人类哺乳动物,例如非人灵长动物、狗、奶牛、马、猪、绵羊、山羊、猫、小鼠、兔、大鼠和转基因非人类动物。在本发明的特定实施方式中,受试者是人类。

[0092] 术语“施用”、“给与”及“处理”是指采用本领域技术人员已知的各种方法或递送系统中的任意一种将包含治疗剂的组合物引入受试者。抗CLDN-18.2抗体的给药途径包括静脉内、肌内、皮下、腹膜、脊髓或其他胃肠外给药途径,比如注射或输注。“胃肠外给药”是指

除了肠内或局部给药以外的通常通过注射的给药方式,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴内、损伤内、囊内、框内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜内和胸骨内注射和输注以及经体内电穿孔。

[0093] 抗CLDN-18.2抗体

[0094] 本文所用的术语“抗体”应被理解为包括完整抗体分子及其抗原结合片段。本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”(或简称为“抗体部分”或“抗体片段”)是指抗体中保持了与人CLDN-18.2或其表位特异性结合能力的一个或多个片段。因此,其以最广义使用,具体包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人源化抗体、全人抗体、嵌合抗体和单结构域抗体。

[0095] 术语“分离的抗体”是指结合化合物的纯化状态,且在这种情况下意指该分子基本不含其它生物分子,例如核酸、蛋白质、脂质、糖或其它物质例如细胞碎片和生长培养基。术语“分离(的)”并非意指完全不存在这类物质或不存在水、缓冲液或盐,除非它们以明显干扰本文所述结合化合物的实验或治疗应用的量存在。

[0096] 术语“单克隆抗体”是指获自基本均质抗体群的抗体,即组成该群的各个抗体除可少量存在的可能天然存在的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原表位。相比之下,常规(多克隆)抗体制备物通常包括大量针对不同表位(或对不同表位有特异性)的抗体。修饰语“单克隆”表明获自基本均质抗体群的抗体的特征,且不得解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

[0097] 术语“鼠源抗体”或“杂交瘤抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能制备的抗人CLDN-18.2的单克隆抗体。制备时用CLDN-18.2抗原注射试验对象,然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。

[0098] 术语“嵌合抗体”是具有第一抗体的可变结构域和第二抗体的恒定结构域的抗体,其中第一抗体和第二抗体来自不同物种。通常,可变结构域获自啮齿动物等的抗体(“亲代抗体”),而恒定结构域序列获自人抗体,使得与亲代啮齿动物抗体相比,所得嵌合抗体在人受试者中诱导不良免疫应答的可能性较低。

[0099] 术语“人源化抗体”是指含有来自人和非人(例如小鼠、大鼠)抗体的序列的抗体形式。一般而言,人源化抗体包含基本所有的至少一个、通常两个可变结构域,其中所有或基本所有的超变环相当于非人免疫球蛋白的超变环,而所有或基本所有的构架(FR)区是人免疫球蛋白序列的构架区。人源化抗体任选可包含至少一部分的人免疫球蛋白恒定区(Fc)。

[0100] 术语“全长抗体”或“完整抗体分子”指包含四条肽链的免疫球蛋白分子,两条重(H)链(全长时约50~70kDa)和两条轻(L)链(全长时约25kDa)通过二硫键互相连接。每一条重链由重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区(在本文中缩写为CH)组成。重链恒定区由3个结构域CH1、CH2和CH3组成。每一条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可被进一步细分为具有高可变性的互补决定区(CDR)和其间隔以更保守的称为框架区(FR)的区域。每一个VH或VL区由按下列顺序: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。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白对宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。

[0101] 术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区。在重链和轻链的各个可变区中存在3个CDR,其对于各个重链和轻链可变区被命名为HCDR1、HCDR2和HCDR3或LCDR1、LCDR2和LCDR3。这些CDR的准确边界按照不同的系统有不同的定义。

[0102] 本发明的所述抗体的可变区CDR的精确氨基酸序列边界可使用许多公知的方案的任何方案来确定,包括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) (1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212), 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。本发明抗体的CDR可以由本领域的技术人员根据本领域的任何方案(例如不同的指派系统或组合)确定边界。

[0103] 本文所使用的“抗原结合片段”包括抗体的片段或其衍生物,通常包括亲代抗体的抗原结合区或可变区(例如一个或多个CDR)的至少一个片段,其保持亲代抗体的至少一些结合特异性。抗原结合片段的实例包括但不限于Fab, Fab', F(ab')²和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子,例如sc-Fv;由抗体片段形成的纳米抗体(nanobody)和多特异性抗体。当抗体的结合活性在摩尔浓度基础上表示时,结合片段或其衍生物通常保持亲代抗体抗原结合活性的至少10%。优选结合片段或其衍生物保持亲代抗体的抗原结合亲和力的至少20%、50%、70%、80%、90%、95%或100%或更高。还预期抗体的抗原结合片段可包括不明显改变其生物活性的保守或非保守氨基酸取代(称为抗体的“保守变体”或“功能保守变体”)。

[0104] 本发明所述的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段所包含的CDR序列优选来自申请号为PCT/CN2021/106125(本文将其所公开的全部内容以引入的方式纳入本文)中描述的任意一个CDR序列或任意一个CDR序列组合(即LCDR1-LCDR3和HCDR1-HCDR3的组合)。在一些实施方式中,在本发明的方法和组合物中使用的抗体或其抗原结合片段为PCT/CN2021/106125中描述的任意一个抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段,优选为PCT/CN2021/106125中描述的任意一个抗CLDN-18.2人源化抗体或其抗原结合片段。

[0105] 在一些实施方式中,在本发明的方法和组合物中使用的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3,和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。优选地,所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示的轻链可变区,和氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示的重链可变区。进一步优选地,所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的轻链氨基酸序列,和氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示的重链氨基酸序列。

[0106] SEQ ID NO:1-10的氨基酸序列如下表所示。

SEQ ID NO:	序列
1	KSSQSLLNSGNQKNYLT
2	WASTRES
3	QNVYSYPLT
4	NFGMH
5	SISSGSGTIYYADSVKG
6	AYYGNGFSF
7	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNVYSYPL TFGQGTKLEIK
[0107] 8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLNNFGMHWVRQAPGKGLEWVSSI SSGSGTIYYADSVKGRFTISRDNPKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYYG NGFSFWGQGTLVTVSS
9	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNVYSYPL TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLNNFGMHWVRQAPGKGLEWVSSI SSGSGTIYYADSVKGRFTISRDNPKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYYG NGFSFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
[0108]	RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0109] 在一些实施方式中,在本发明的方法和组合物中使用的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段选自鼠源抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、人源化抗体或其抗原结合片段,优选为人源化抗体或其抗原结合片段。

[0110] 在一些实施方案中,在本发明的方法和组合物中使用的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或嵌合抗体,且可包括人恒定区。在一些实施方式中,恒定区是选自人IgG1、IgG2、IgG3及IgG4恒定区组成的组;优选地,适用于本发明所述的方法和组合物的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含人IgG1或IgG4同种型的重链恒定区,更优选为人IgG4恒定区。在一些实施方式中,可在本文中所提供的抗CLDN-18.2抗体的Fc区中引入一

个或多个氨基酸修饰,以此产生Fc区变体,如在抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段的IgG4重链恒定区的序列引入S228P突变,其用IgG1同种型抗体的相应位置处通常存在的脯氨酸残基替代铰链区中的丝氨酸残基。

[0111] 医药制剂

[0112] 本发明所述的药物组合物是一种含有与CLDN-18.2特异性结合的抗体的高稳定性药物组合物。本发明发现海藻糖能显著提高药物组合物的稳定性。

[0113] 本发明的药物组合物包含:(1)缓冲液;(2)抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段。

[0114] 本发明所述药物组合物中的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段如本申请“抗CLDN-18.2抗体”部分任一实施方案所述。

[0115] 例如,本发明所述药物组合物中的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3,和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3。优选地,上述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段选自鼠源抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、人源化抗体或其抗原结合片段,优选为人源化抗体或其抗原结合片段。优选地,所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示的轻链可变区,和氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示的重链可变区。进一步优选地,所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的轻链氨基酸序列,和氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示的重链氨基酸序列。

[0116] 本发明所述药物组合物中的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段的浓度为约2~200mg/mL,优选为约10~100mg/mL,更优选为约20~60mg/mL;优选地,上述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段的浓度约为15mg/mL,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,更优选为25mg/mL,30mg/mL,35mg/mL,40mg/mL,45mg/mL,50mg/mL,55mg/mL。

[0117] 本发明所述药物组合物中的缓冲液选自醋酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液和组氨酸缓冲液中的一种或多种;优选地,所述缓冲液为组氨酸缓冲液。优选地,组氨酸缓冲液选自组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液或组氨酸-组氨酸醋酸盐缓冲液,优选组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液。优选地,缓冲液的浓度为约5~100mM,优选为约5~50mM,更优选为约10~30mM;更优选为约15~25mM。优选地,缓冲液的pH为约5.0~7.0,优选为约5.0~6.0,更优选为约5.4~5.6。本文中,缓冲液的pH非限制性实施例为约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,优选为约5.4,5.5或5.6。

[0118] 在一些实施方式中,所述组氨酸缓冲液为组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液。在一些实施方式中,上述组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液由组氨酸和组氨酸盐酸盐制成,优选L-组氨酸和L-组氨酸单盐酸盐。在一些实施方式中,组氨酸缓冲液由1~30mM的L-组氨酸和1~30mM的L-组氨酸单盐酸盐制成。在一些实施方式中,组氨酸缓冲液由摩尔比为1:1到1:4的组氨酸和组氨酸盐酸盐制成。在一些实施方式中,组氨酸缓冲液由摩尔比为约1:1组氨酸和组氨酸盐酸盐制成。在一些实施方式中,组氨酸缓冲液由摩尔比为约1:3的组氨酸和组氨酸盐酸盐制成。在一些实施方式中,组氨酸制剂为:由约4.5mM的L-组氨酸和约15.5mM的L-组氨酸单盐酸盐制成的的组氨酸缓冲剂。在一些实施方式中,组氨酸制剂为:由约7.5mM的L-组氨

酸和约22.5mM的L-组氨酸单盐酸盐制成的组氨酸缓冲剂。在一些实施方式中,组氨酸制剂为:由约10mM的组氨酸和约10mM的组氨酸盐酸盐制成的pH为约6.0的组氨酸缓冲液。

[0119] 在一些实施方式中,所述醋酸缓冲液为醋酸-醋酸钠缓冲液或醋酸-醋酸钾缓冲液,优选醋酸-醋酸钠缓冲液。在一些实施方式中,醋酸缓冲液由1~30mM的醋酸和1~30mM的醋酸钠制成。在一些实施方式中,醋酸缓冲液由摩尔比为约1:2.1的醋酸和醋酸钠制成。在一些实施方式中,醋酸缓冲液由摩尔比为约1:5.7的醋酸和醋酸钠制成。在一些实施方式中,醋酸缓冲液为:由约6.5mM的醋酸和约13.5mM的醋酸钠制成的pH为约5.0的醋酸缓冲液。在一些实施方式中,醋酸缓冲液为:由约3mM的醋酸和约17mM的醋酸钠制成的醋酸缓冲液。

[0120] 在一些实施方式中,所述柠檬酸缓冲液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。在一些实施方式中,柠檬酸缓冲液由1~30mM的柠檬酸和1~30mM的柠檬酸钠制成。在一些实施方式中,柠檬酸缓冲液由摩尔比为约1:1到1:4的柠檬酸和柠檬酸钠制成。在一些实施方式中,柠檬酸缓冲液为:由约5.0mM的柠檬酸和约15.0mM的柠檬酸钠制成的pH为约6.5的柠檬酸缓冲液。在一些实施方式中,柠檬酸缓冲液为:由约10mM的柠檬酸和约10mM的柠檬酸钠制成的pH为约6.0的柠檬酸缓冲液。

[0121] 在一些方案中,所述磷酸盐缓冲液为磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液。在一些方案中,磷酸盐缓冲液由约1~20mM的磷酸氢二钠和约1~20mM的磷酸二氢钠制成。在一些方案中,磷酸盐缓冲液由摩尔比为约1:1到1:4的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠制成。在一些方案中,磷酸盐缓冲液为:由约10mM的磷酸氢二钠和约10mM的磷酸二氢钠制成的pH为约7.0的磷酸盐缓冲液。在一些实施方式中,如前文所述的药物组合物,其包含缓冲液,缓冲液的浓度为约5~100mM,优选为约10~50mM,优选为约10~30mM;优选为约15~25mM;上述缓冲液浓度非限制性实施例为约15mM,20mM,25mM,30mM,35mM,40mM,45mM或这些范围内任意两个数值作为端点形成的范围,优选为约15mM、20mM或25mM。

[0122] 因此,本发明的药物组合物可含有:pH约为5.0~7.0的组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液,其在药物组合物中的浓度约为10~30mM;和约10~100mg/mL的前文任一实施方案所述的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段。优选地,所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示、重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;更优选地,所述抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,重链氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0123] 在一些实施方式中,本发明所述药物组合物还包括稳定剂,所述稳定剂选自精氨酸、精氨酸盐、氯化钠、甘露醇、山梨醇、蔗糖、甘氨酸和海藻糖中的一种或多种。优选地,上述稳定剂的浓度为约10~400mM,优选为约100~300mM,优选为约120~280mM,优选为约130~250mM。上述稳定剂浓度的非限制性实施例为约100mM,110mM,120mM,130mM,140mM,150mM,160mM,170mM,180mM,190mM,200mM,210mM,220mM,230mM,240mM,250mM或这些范围内任意两个数值作为端点形成的范围,优选为约210mM,220mM,230mM或240mM。

[0124] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为海藻糖,优选为二水海藻糖。在一些实施方式中,上述稳定剂为浓度约100~300mM的海藻糖,优选为约120~280mM,更优选为约200~260mM。上述海藻糖浓度的非限制性实施例为约180mM,200mM,210mM,220mM,230mM,240mM,250mM,260mM,270mM,280mM,优选为约220mM,230mM,240mM。

[0125] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为蔗糖。在一些实施方式中,上述稳定剂为浓度约100~300mM的蔗糖,上述蔗糖的浓度优选为约120~280mM,更优选为200~260mM。上述蔗糖浓度的非限制性实施例为约180mM,200mM,210mM,220mM,230mM,240mM,250mM,260mM,270mM,280mM,优选为约220mM,230mM,240mM。

[0126] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为精氨酸或精氨酸盐;优选盐酸精氨酸。在一些实施方式中,上述稳定剂为浓度约100~300mM的精氨酸或精氨酸盐,优选为约120~280mM,更优选为约120~160mM。上述精氨酸或精氨酸盐浓度的非限制性实施例为约120mM,125mM,130mM,135mM,140mM,145mM,150mM,155mM,160mM,优选约135mM,140mM,145mM,150mM或155mM。

[0127] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为氯化钠。在一些实施方式中,上述稳定剂为浓度约100~300mM的氯化钠,优选为约100~200mM,更优选为约120~180mM,更优选为130~150mM。上述氯化钠浓度的非限制性实施例为约105mM,110mM,115mM,120mM,125mM,130mM,135mM,140mM,145mM,150mM,155mM,160mM,165mM,170mM,175mM,优选约135mM,140mM,145mM,150mM或155mM。

[0128] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为甘露醇。在一些实施方式中,上述稳定剂为浓度约100~300mM的甘露醇,优选为约200~300mM,优选为约220~250mM。上述甘露醇浓度的非限制性实施例为约205mM,210mM,215mM,220mM,225mM,230mM,235mM,240mM,245mM,250mM,255mM,260mM,265mM,270mM,275mM,优选约235mM,240mM,245mM,250mM或255mM。

[0129] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为山梨醇。在一些实施方式中,上述稳定剂为浓度约100~300mM的山梨醇,优选为约200~300mM,优选为约220~250mM。上述甘露醇浓度的非限制性实施例为约205mM,210mM,215mM,220mM,225mM,230mM,235mM,240mM,245mM,250mM,255mM,260mM,265mM,270mM,275mM,优选约235mM,240mM,245mM,250mM或255mM。

[0130] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为氯化钠与甘露醇的组合。在一些实施方式中,上述稳定剂为约20~200mM的氯化钠与约20~200mM的甘露醇的组合,优选约30~100mM的氯化钠与约100~180mM的甘露醇的组合,优选浓度约20~80mM的氯化钠与浓度约100~180mM的甘露醇的组合,进一步优选约30~70mM的氯化钠与约120~160mM的甘露醇的组合。上述稳定剂的非限制性实施例为约50mM的氯化钠与约140mM,145mM或150mM的甘露醇的组合。

[0131] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为盐酸精氨酸与蔗糖的组合。在一些实施方式中,上述稳定剂为约20~200mM盐酸精氨酸的与约20~200mM的蔗糖的组合,优选约20~80mM的盐酸精氨酸与约100~180mM的蔗糖的组合,优选约30~70mM的盐酸精氨酸与约100~160mM的蔗糖的组合,更优选为浓度约30~70mM的盐酸精氨酸与120~160mM的蔗糖的组合。上述稳定剂的非限制性实施例为约50mM的盐酸精氨酸与约120mM,125mM,130mM或135mM的蔗糖的组合。

[0132] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为盐酸精氨酸与甘氨酸的组合。在一些实施方式中,上述稳定剂为约20~200mM盐酸精氨酸的与约20~200mM的甘氨酸的组合,优选约20~80mM的盐酸精氨酸与浓度约80~180mM的甘氨酸的组合,更优选约

20~80mM的盐酸精氨酸与约100~180mM的甘氨酸的组合,更优选为浓度约30~70mM的盐酸精氨酸与浓度约80~140mM的甘氨酸的组合,进一步优选约30~70mM的盐酸精氨酸与约100~120mM的甘氨酸的组合。上述稳定剂的非限制性实施例为约50mM的盐酸精氨酸与约100mM,105mM,110mM或115mM的甘氨酸的组合。

[0133] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为氯化钠与蔗糖的组合。在一些实施方式中,上述稳定剂为约20~200mM的氯化钠与约20~200mM的蔗糖的组合,优选约20~100mM的氯化钠与约100~180mM的蔗糖的组合,优选约20~80mM的氯化钠与浓度约100~180mM的蔗糖的组合,更优选约30~70mM的氯化钠与约120~160mM的蔗糖的组合。上述稳定剂的非限制性实施例为约50mM的氯化钠与约120mM,125mM,130mM或135mM的蔗糖的组合。

[0134] 在一些实施方式中,本文所述的药物组合物包含的稳定剂为氯化钠与海藻糖的组合。在一些实施方式中,上述稳定剂为约20~200mM的氯化钠与约20~200mM的海藻糖的组合,优选约20~80mM的氯化钠与约100~180mM的海藻糖的组合,优选约30~70mM的氯化钠与约120~160mM的海藻糖的组合。上述稳定剂的非限制性实施例为约50mM的氯化钠与约120mM,130mM或140mM的海藻糖的组合。

[0135] 因此,本发明的药物组合物可含有:pH约为5.0~7.0的组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液,其在药物组合物中的浓度约为10~30mM;约10~100mg/mL的前文任一实施方案所述的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段;以及约100~300mM的稳定剂,优选地,所述稳定剂选自精氨酸、精氨酸盐、氯化钠、甘露醇、山梨醇、蔗糖、甘氨酸和海藻糖中的一种或多种。优选地,上述海藻糖为二水海藻糖。优选地,上述精氨酸盐为盐酸精氨酸。优选地,上述稳定剂为浓度约120~280mM的蔗糖;或上述稳定剂为浓度约120~280mM的二水海藻糖;或上述稳定剂为浓度约120~280mM的盐酸精氨酸;或上述稳定剂为浓度约20~80mM的氯化钠与浓度约100~180mM的甘露醇的组合;或上述稳定剂为浓度约20~80mM的氯化钠与浓度约100~180mM的蔗糖的组合;或上述稳定剂为浓度约20~80mM的盐酸精氨酸与浓度约100~180mM的蔗糖的组合。

[0136] 在一些实施方式中,上述药物组合物还包括表面活性剂,所述表面活性剂选自聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20和泊洛沙姆188中的一种或多种。优选地,以w/v计算,上述表面活性剂浓度为约0.001%~0.1%,优选为约0.01%~0.1%,更优选为约0.01%~0.08%,更优选为约0.01%~0.04%。作为非限制性实施例,上述表面活性剂的浓度为约0.01%,0.02%或0.04%,优选为约0.02%。

[0137] 因此,本发明的药物组合物可含有:pH约为5.0~7.0的组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液,其在药物组合物中的浓度约为10~30mM;约10~100mg/mL的前文任一实施方案所述的抗CLDN-18.2抗体或其抗原结合片段;约100~300mM的稳定剂,优选地,上述稳定剂为浓度约120~280mM的二水海藻糖;或上述稳定剂为浓度约120~280mM的蔗糖;或上述稳定剂为浓度约120~280mM的盐酸精氨酸;或上述稳定剂为浓度约20~80mM的盐酸精氨酸与浓度约100~180mM的蔗糖的组合;或上述稳定剂为浓度约20~80mM的氯化钠与浓度约100~180mM的蔗糖的组合;以及以w/v计,约0.01%~0.1%的聚山梨醇酯80。

[0138] 本发明的药物组合物的渗透压在250~350mOsm/kg,优选在260~320mOsm/kg的范围内,更优选在290~310mOsm/kg的范围内。

[0139] 本发明提供本发明药物组合物的冻干制剂,以及采用本发明药物组合物的除抗体或其抗原结合片段以外的成分复溶该冻干制剂获得的复溶制剂。该复溶制剂可进一步使用本领域常规使用的注射用赋形剂(如葡萄糖溶液或生理盐水)进行复配,获得液体制剂。在一些实施方案中,所述液体制剂是注射剂。

[0140] 因此,在一些实施方案中,本发明提供一种液体制剂,该液体制剂含有任一实施方案所述的药物组合物,或含有葡萄糖溶液或氯化钠溶液以及本文任一实施方案所述的复溶制剂;优选地,所述氯化钠溶液浓度为约0.85~0.9% (w/v),所述葡萄糖溶液浓度为约5~25% (w/v);优选地,所述液体制剂中,所述抗CLDN-18.2抗体的浓度为约0.1~50mg/mL,更优选为约0.2~20mg/mL;优选地,所述液体制剂的pH为约5.0~7.0。

[0141] 医药用途和方法

[0142] 本发明还提供了本文任一实施方式中所述的药物组合物或注射剂在制备通过消除、抑制或降低CLDN-18.2活性来治疗疾病或病症的药物中的用途。

[0143] 本发明还提供了用在通过消除、抑制或降低CLDN-18.2活性来治疗疾病或病症的方法中的本文任一实施方式中所述的药物组合物或注射剂。

[0144] 本发明还提供了一种通过消除、抑制或降低CLDN-18.2活性来治疗疾病或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用如本文任一实施方式中所述的药物组合物或注射剂。

[0145] 在一些实施方式中,上述疾病或病症选自癌症、感染性疾病或炎症性疾病。优选地,所述上述疾病或病症为癌症。

[0146] 本文中,“癌症”和“癌性”指或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调控的生理疾患。此定义中包括良性和恶性癌症以及休眠肿瘤或微转移。癌症的例子包括但不限于癌,淋巴瘤,母细胞瘤,肉瘤,和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌,肺癌(包括小细胞肺癌,非小细胞肺癌,肺的腺癌,和肺的鳞癌),腹膜癌,肝细胞癌,胃的癌或胃癌(包括胃肠癌),胰腺癌,成胶质细胞瘤,宫颈癌,卵巢癌,肝癌,膀胱癌,肝瘤(hepatoma),乳腺癌,结肠癌,结肠直肠癌,子宫内膜癌或子宫癌,唾液腺癌,肾癌或肾的癌,鼻咽癌,食管鳞状细胞癌,肝癌,前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,肝的癌,及各种类型的头颈癌,以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非何杰金氏淋巴瘤(NHL),小淋巴细胞性(SL)NHL,中级/滤泡性NHL,中级弥漫性NHL,高级成免疫细胞性NHL,高级成淋巴细胞性NHL,高级小无核裂细胞性NHL,贮积病(bulky disease)NHL,套细胞淋巴瘤,AIDS相关淋巴瘤,和瓦尔登斯特伦氏(Waldenstrom)巨球蛋白血症),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),急性成淋巴细胞性白血病(ALL),毛细胞性白血病,慢性成髓细胞性白血病,和移植后淋巴增殖性病症(PTLD),以及与癍痣病(phakomatoses),水肿(诸如与脑瘤有关的)和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖。

[0147] 在一些实施方式中,本发明提供了向受试者联合施用治疗有效量的本文任一实施方式所述的药物组合物和其他一种或多种疗法(例如治疗方式和/或其它治疗剂)来治疗疾病或病症。在一些实施方式中,所述疗法包括手术治疗和/或放射疗法。

[0148] 在一些实施方式中,本发明提供了向受试者联合施用治疗有效量的本文任一实施方式所述的药物组合物和其他一种或多种疗法其它治疗剂来治疗疾病或病症。在一些实施方式中,所述其他治疗剂包含化疗剂、免疫检查点抑制剂、微管蛋白抑制剂和抗血管生成剂等治疗剂中的至少一种共施用。在一些实施方式中,所述疾病或病症优选为癌症。

[0149] 实施例

[0150] 下文将以具体实施例的方式阐述本发明。应理解,这些实施例仅仅是阐述性的,并非意图限制本发明的范围。本文已经详细描述了本发明,其中也公开了其具体实施方式。对本领域的技术人员而言,在不脱离本发明精神和范围的情况下,针对本发明具体实施方式进行各种变化和改进行将是显而易见的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。实施例中所用到的方法和材料,除非另有说明,否则为本领域的常规方法和材料。

[0151] 本发明采用下述缩略词:

[0152] hr表示小时;

[0153] W表示周;

[0154] M表示月;

[0155] C表示冻融循环的次数;

[0156] FT表示冻融循环;

[0157] RT表示室温;

[0158] T0表示处方样品经放样处理前的起始测试。

[0159] 实施例1:缓冲液体系和稳定剂初步筛选实验

[0160] 液体型药物组合中,缓冲液体系和pH密切影响抗体的稳定性,每种具有独特理化性质的抗体都具有最适宜的缓冲液的种类和pH。本实施例旨在初步筛选出最佳缓冲液体系和稳定剂,使本发明公开的抗CLDN-18.2抗体具有最佳的稳定性以适宜临床应用。

[0161] 1.1实验步骤

[0162] 本实施例所用的抗CLDN-18.2抗体的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,重链氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。样品使用Millipore Pellicon3 0.11m²CASSETTE进行UF/DF换液约10倍体积至处方FS1-4中,浓缩至24.8mg/ml,蛋白平均分配透析至相应缓冲液(表1)最终浓度调至约20mg/ml,在超净台无菌灌装到2R西林瓶1.6ml/瓶,进行稳定性放样和检测。

[0163] 表1:第一轮处方筛选-缓冲液体系和稳定剂初步筛选实验方案

编号	缓冲体系	pH	稳定剂 1	稳定剂 2	表面活性剂	蛋白浓度	条件	T0	2W	4W
FS1-1	20 mM 醋酸缓冲液	5.0	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇	0.02% TW-80	20 mg/ml	高温(40 ± 2°C)	X,Y	X	X
FS1-2	20 mM 组氨酸缓冲液	5.5	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇						
FS1-3	20 mM 醋酸缓冲液	5.5	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇						
FS1-4	20 mM 组氨酸缓冲液	6.0	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇			长期(5 ± 3°C)		X	X
FS1-5	20 mM 枸橼酸缓冲液	6.0	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇						
FS1-6	20 mM 枸橼酸缓冲液	6.5	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇						
FS1-7	20 mM 磷酸盐缓冲液	7.0	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇						

X: 外观, 浓度, CEX-HPLC, R-CE-SDS, NR-CE-SDS, SEC-HPLC
Y: kD, Tagg, Tm

[0165] 1.2实验结果

[0166] 1.2.1蛋白质的胶体稳定性和热稳定性考察

[0167] 根据表2中的结果,处方FS1-1、FS1-2、FS1-3的kD大于零,分子间有排斥力,不容易形成聚体,有较好的胶体稳定性;蛋白Tagg的温度与Tm1的温度基本保持一致,FS1-3、FS1-5、FS1-6,FS1-7处方其蛋白热稳定性较好。

[0168] 表2:第一轮处方筛选—胶体稳定性和热稳定性考察

样品编号	kD (ml/g)	Tagg (°C)	Tm	
			Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
FS1-1	0.71	69.4	67.1	80.3
FS1-2	0.99	68.2	66.6	80.1

样品编号	kD (ml/g)	Tagg (°C)	Tm	
			Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
FS1-3	1.33	70.4	69.8	80.7
FS1-4	-1.04	67.4	69.0	80.6
FS1-5	-4.29	70.4	70.9	80.4
FS1-6	-4.78	70.5	71.6	80.4
FS1-7	-5.34	70.4	72.6	80.4

[0171] 1.2.2外观和浓度结果

[0172] 根据表3中的蛋白含量结果,经高温或长期条件放置4周,所有样品的蛋白含量均未出现明显变化。

[0173] 根据表4中的外观结果,经高温或者长期条件下放置4周,所有样品的外观均无明显变化。

[0174] 表3:第一轮处方筛选—蛋白含量数据

检测项	样品编号	T0	高温 (40±2℃)		长期 (5±3℃)	
			2W	4W	2W	4W
[0175] 蛋白浓度 (mg/ml)	FS1-1	19.0	19.7	19.6	19.6	19.7
	FS1-2	19.6	19.8	19.9	19.8	19.8
	FS1-3	19.6	19.8	19.9	19.8	19.8
	FS1-4	19.3	19.5	19.7	19.5	19.4
	FS1-5	20.5	20.8	20.8	20.8	20.8
	FS1-6	20.8	21.1	21.0	21.0	21.0
	FS1-7	20.0	20.3	20.5	20.4	20.3

[0176] 表4:第一轮处方筛选—外观数据

样品编号	T0	高温 (40±2℃)		长期 (5±3℃)	
		2W	4W	2W	4W
FS1-1	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS1-2	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS1-3	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS1-4	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS1-5	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS1-6	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常

样品编号	T0	高温 (40±2℃)		长期 (5±3℃)	
		2W	4W	2W	4W
FS1-7	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常

[0179] 1.2.3SEC-HPLC纯度结果

[0180] 根据表5中的SEC纯度结果,经高温条件下放置4周,磷酸盐体系(FS1-7)聚体数量有明显的升高;高温条件下所用样品的片段数量均有增加,样品单体的数量均出现下降。FS1-2处方中蛋白单体下降相对最为缓慢,由SEC的结果可以得出结论:FS1-2(组氨酸缓冲体系,pH 5.5为最优缓冲体系)。

[0181] 表5:第一轮处方筛选—SEC-HPLC数据

样品编号		T0	高温 (40 ± 2℃)		长期 (5 ± 3℃)	
			2W	4W	2W	4W
FS1-1	聚体%	0.2	0.6	0.5	0.4	0.3
	单体%	97.6	95.9	95.4	97.3	97.7
	片段%	2.2	3.6	4.0	2.3	2.0
FS1-2	聚体%	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3
	单体%	97.8	96.9	96.2	98.0	97.7
	片段%	2.0	2.8	3.4	1.7	2.1
FS1-3	聚体%	0.3	0.4	0.6	0.5	0.3
	单体%	97.5	96.7	95.9	97.3	97.4
	片段%	2.3	2.9	3.5	2.2	2.3
FS1-4	聚体%	0.2	0.3	0.8	0.2	0.3
	单体%	97.7	97.3	95.1	98.3	97.8
	片段%	2.1	2.4	4.0	1.5	1.9
FS1-5	聚体%	0.4	0.6	0.7	0.4	0.5
	单体%	97.6	96.6	96.1	98.1	97.5
	片段%	2.0	2.8	3.2	1.5	2.1
FS1-6	聚体%	0.5	0.7	0.9	0.5	0.6
	单体%	97.1	96.7	95.8	98.0	97.3
	片段%	2.4	2.6	3.2	1.5	2.1
FS1-7	聚体%	0.5	1.0	1.3	0.6	0.7
	单体%	97.0	96.4	94.5	97.9	97.1
	片段%	2.5	2.6	4.2	1.5	2.2

[0182] 1.2.4 CEX-HPLC纯度结果

[0183] 根据表6中的CEX-HPLC纯度结果,经高温条件下放置4周,所有样品的酸峰均有所增加,组氨酸体系(FS1-2)酸碱峰的增加相对其他处方较缓慢,枸橼酸盐体系(FS1-5和FS1-6)和磷酸盐体系(FS1-7)的样品酸峰增加相对明显。醋酸盐体系(FS1-1)和磷酸盐体系(FS1-7)碱峰的增加较其他处方明显,综合评价组氨酸体系(FS1-2)整体稳定性相对较好,磷酸盐体系(FS1-7)整体稳定性最差。在长期条件下放置4周,CEX纯度无显著变化。

[0184] 表6:第一轮处方筛选—CEX-HPLC数据

样品编号		T0	高温 (40 ± 2°C)		长期 (5 ± 3°C)	
			2W	4W	2W	4W
FS1-1	酸峰%	23.2	33.3	43.6	22.4	22.9
	主峰%	72.6	52.9	37.6	72.6	72.3
	碱峰%	4.1	13.8	18.8	4.9	4.8
FS1-2	酸峰%	23.1	32.5	44.1	22.9	23.3
	主峰%	73.1	58.9	45.0	72.3	72.3
	碱峰%	3.9	8.6	10.9	4.7	4.5
FS1-3	酸峰%	23.4	33.3	44.7	22.8	23.2
	主峰%	72.5	57.6	42.8	72.5	72.2
	碱峰%	4.1	9.1	12.4	4.8	4.6
FS1-4	酸峰%	23.4	33.6	47.8	23.2	23.8
	主峰%	72.9	60.4	38.7	72.5	72.2
	碱峰%	3.7	6.0	13.5	4.4	4.0
FS1-5	酸峰%	23.5	35.9	49.6	22.9	23.5
	主峰%	72.5	55.3	41.3	72.4	72.3
	碱峰%	4.0	8.8	9.2	4.7	4.2
FS1-6	酸峰%	23.8	40.4	56.3	23.4	23.6
	主峰%	72.4	52.9	36.6	72.3	72.3
	碱峰%	3.8	6.7	7.0	4.4	4.1
FS1-7	酸峰%	24.6	64.1	84.4	24.5	25.2
	主峰%	71.7	30.3	11.6	71.8	70.9
	碱峰%	3.7	5.6	4.0	3.6	3.9

[0187] 1.2.5R-CE-SDS纯度结果

[0188] 根据表7中的R-CE-SDS结果,磷酸盐体系(FS1-7)在高温条件下放置4周出现了明显的降解,组氨酸盐体系(FS1-2与FS1-4)表现较优,其纯度下降速度比其他处方低;在长期条件下放置4周无显著变化。

[0189] 表7:第一轮处方筛选—R-CE-SDS数据

样品编号		T0	高温 (40±2℃)		长期 (5±3℃)		
			2W	4W	2W	4W	
[0190]	FS1-1	纯度%	99.6	99.3	98.6	99.6	99.5
	FS1-2	纯度%	99.6	99.4	98.9	99.6	99.5
	FS1-3	纯度%	99.6	99.4	98.8	99.4	99.5
	FS1-4	纯度%	99.6	99.4	99.1	99.5	99.5
	FS1-5	纯度%	99.6	99.3	98.7	99.2	99.5
	FS1-6	纯度%	99.6	99.5	98.4	99.7	99.5
	FS1-7	纯度%	99.6	98.8	97.0	99.7	99.5

[0191] 1.2.6NR-CE-SDS纯度结果

[0192] 根据表8中的NR-CE-SDS结果,在高温条件下放置4周,所有样品的纯度均有下降,磷酸盐体系(FS1-7)中的蛋白样品,降解速度最快。在长期条件下所有样品纯度无显著变化。

[0193] 表8:第一轮处方筛选—NR-CE-SDS数据

样品 编号	T0		高温 (40±2℃)				长期 (5±3℃)				
			2W		4W		2W		4W		
	纯度 %	HHL %	纯度 %	HHL%	纯度 %	HHL%	纯度 %	HHL %	纯度 %	HHL %	
[0194]	FS1-1	98.1	1.1	96.8	1.5	94.0	1.8	97.6	1.4	97.5	1.4
	FS1-2	98.2	1.0	97.2	1.3	94.9	1.6	97.7	1.4	97.6	1.4
	FS1-3	98.2	1.0	97.0	1.5	94.8	1.7	97.7	1.4	97.4	1.3
	FS1-4	98.2	1.0	97.1	1.5	94.2	1.9	97.6	1.4	97.5	1.3
	FS1-5	98.2	1.0	97.0	1.5	95.0	1.5	97.5	1.5	97.4	1.3
	FS1-6	98.3	0.9	97.1	1.4	94.5	1.6	97.3	1.6	97.6	1.3
[0195]	FS1-7	98.1	1.0	97.0	1.3	90.7	1.8	97.5	1.5	97.7	1.3

[0196] 1.3第一轮处方筛选结论

[0197] 在高温放置4周条件下蛋白含量和外观考察结果显示所有处方无显著差异。在高温条件下放置4周SEC-HPLC结果显示磷酸缓冲体系(FS1-7)表现较差,组氨酸盐缓冲体系pH 5.5(FS1-2)蛋白降解速度最慢。高温条件下放置4周从CEX-HPLC纯度结果显示所有样品的酸峰均有所增加磷酸缓冲体系FS1-7稳定性最差,组氨酸盐缓冲体系(FS1-2)表现最优。在高温条件下放置4周R-CE-SDS结果显示磷酸盐体系(FS1-7)出现明显纯度下降,其他组间无显著差异。在高温条件下放置4周NR-CE-SDS结果显示所有样品的纯度均有下降,磷酸盐体系(FS1-7)中的蛋白样品降解速度最快,其他组间无显著差异。

[0198] 组氨酸盐缓冲体系(FS1-2)表现相对较优。因此选择20mM组氨酸缓冲液(pH 5.5)作为缓冲体系进入下一轮筛选实验;并在下一轮实验中对蔗糖、海藻糖、氯化钠和盐酸精氨酸四种稳定剂进行进一步的评估。

[0199] 实施例2:稳定剂和表面活性剂筛选实验

[0200] 为了进一步探究不同辅料对抗体稳定性影响,我们选取氯化钠、蔗糖、盐酸精氨酸、二水海藻糖的辅料进行了比较测试。考察在pH5.5、20mM组氨酸缓冲体系中,抗CLDN-18.2抗体浓度40mg/mL条件下,上述不同辅料对稳定性的影响。本实施例所用的抗CLDN-18.2抗体的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,重链氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0201] 2.1实验步骤

[0202] 样品使用Millipore Pellicon3 0.11m²膜进行UF/DF换液至20mM组氨酸缓冲体系中,并浓缩至约50mg/ml,然后将蛋白平均分配至相应缓冲液(如表9)最终浓度调至约40mg/ml,在超净台无菌灌装到2R西林瓶1.0ml/瓶与2.0ml/瓶,进行稳定性放样和检测。

[0203] 表9:第二轮处方筛选-稳定剂进一步筛选实验方案

编号	缓冲体系	pH	稳定剂 1	稳定剂 2	表面活性剂	蛋白浓度	条件	T0	1W	2W	4W
FS2-1	20 mM 组氨酸 缓冲液	5.5	230 mM 蔗糖	/	0.02% TW-80	40 mg/ml	高温 (40±2 ℃)	X,Y,Z	X	X	X,Y
FS2-2			230 mM 二水海藻 糖	/			加速 (25±2 ℃)		/	X	X,Y
FS2-3			130 mM 蔗糖	50 mM 氯化钠			长期 (5±3 ℃)		/	/	X,Y
FS2-4			130 mM 蔗糖	50 mM 盐酸精氨 酸			反复冻融		3次		5次
FS2-5			/	140 mM 盐酸精氨 酸					X	X,Y	

X: 外观, 浓度, R-CE-SDS, NR-CE-SDS, SEC-HPLC, CEX-HPLC
Y: MFI, 细胞活性, A350
Z: DSF, kD

[0206] 2.2实验结果

[0207] 2.2.1蛋白质的胶体稳定性和热稳定性考察

[0208] 根据表10中的结果,FS2-1与FS2-2处方中蛋白的kD较高,表明其蛋白有较好胶体稳定性,且其Tm值也相对其他处方高,表明蛋白结构相对稳定。

[0209] 表10:第二轮处方筛选—物理学稳定性考察

样品编号	kD (ml/g)	Tm	
		Tm1(°C)	Tm2(°C)
FS2-1	2.80	69.0	81.5
FS2-2	-0.06	68.7	81.1
FS2-3	-5.61	67.3	80.5
FS2-4	-5.29	67.1	80.1
FS2-5	-2.68	65.6	79.2

[0211] 2.2.2外观和浓度结果

[0212] 根据表11中的结果,经过高温、加速、长期和冻融试验后所有样品均未发现可见异物,所有处方外观均正常。

[0213] 检查样品A350 nm波长下的吸光度,根据表12中的结果:经高温和加速条件下放置4周所有处方下的样品浊度均有增加,长期和反复冻融的条件下样品浊度无明显增加。

[0214] 表11:第二轮处方筛选一外观数据

样品编号	T0	高温 (40±2°C)			加速 (25±2°C)		长期 (5±3°C)	反复冻融	
		1W	2W	4W	2W	4W	4W	3次	5次
FS2-1	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS2-2	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS2-3	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS2-4	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS2-5	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常

[0216] 表12:第二轮处方筛选A350数据

样品编号	T0	高温 (40±2°C)	加速 (25±2°C)	长期 (5±3°C)	反复冻融
		4W	4W	4W	5次
FS2-1	0.108	0.128	0.119	0.113	0.110
FS2-2	0.107	0.119	0.122	0.114	0.112
FS2-3	0.117	0.132	0.128	0.120	0.120
FS2-4	0.119	0.126	0.120	0.118	0.117
FS2-5	0.118	0.134	0.124	0.121	0.118

[0218] 2.2.3 SEC-HPLC纯度结果

[0219] 根据表13的SEC纯度结果,所有样品经高温条件($40 \pm 2^\circ\text{C}$)放置4W,样品单体纯度均出现下降,主要是片段和少量聚体增加。处方FS2-1和FS2-2聚体和片段增加相对缓慢,含单一辅料的蔗糖和海藻糖处方优于糖与盐或者和氨基酸的组合。

[0220] 表13: 第二轮处方筛选—SEC-HPLC数据

样品名称		T0	高温 ($40 \pm 2^\circ\text{C}$)			加速 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$)		长期 ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)	反复冻融	
			1W	2W	4W	2W	4W	4W	3次	5次
FS2-1	聚体%	0.1	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
	单体%	99.3	98.7	98.2	97.2	99.1	99.1	99.4	99.5	99.4
	片段%	0.5	1.1	1.6	2.3	0.7	0.7	0.4	0.4	0.4
FS2-2	聚体%	0.1	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
	单体%	99.3	98.7	98.2	97.4	99.2	99.1	99.5	99.5	99.5
	片段%	0.6	1.1	1.5	2.2	0.6	0.7	0.4	0.4	0.4
FS2-3	聚体%	0.1	0.3	0.4	0.7	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1
	单体%	99.3	98.6	98.0	96.9	99.1	99.0	99.4	99.5	99.4
	片段%	0.5	1.1	1.7	2.5	0.7	0.7	0.4	0.4	0.5
FS2-4	聚体%	0.1	0.2	0.3	0.5	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
	单体%	99.4	98.6	98.0	97.1	99.1	99.2	99.4	99.4	99.5
	片段%	0.5	1.1	1.7	2.3	0.7	0.6	0.4	0.5	0.4
FS2-5	聚体%	0.1	0.3	0.4	0.7	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
	单体%	99.4	98.6	97.9	96.8	99.1	99.1	99.4	99.4	99.4
	片段%	0.5	1.1	1.7	2.5	0.7	0.7	0.4	0.4	0.4

[0221]

[0222] 2.2.4 CEX-HPLC纯度结果

[0223] 根据表14中的CEX-HPLC纯度结果,经长期条件下放置4周,所有样品的纯度均无明显变化。经高温条件下放置4周,所有样品纯度均有所下降,处方FS2-5碱峰较其他处方增加明显,处方FS2-1酸性峰增加较其他处方明显,其他组间未见明显差异。

[0224] 表14: 第二轮处方筛选—CEX-HPLC纯度数据

样品名称		T0	高温 (40±2℃)			加速 (25±2℃)		长期 (5±3℃)	反复冻融	
			1W	2W	4W	2W	4W	4W	3次	5次
FS2-1	酸峰%	19.3	28.1	34.1	45.8	21.2	22.6	19.9	19.9	19.9
	主峰%	74.0	62.9	56.1	43.4	71.1	70.0	73.5	72.9	72.6
	碱峰%	6.7	8.9	9.9	10.8	7.7	7.4	6.6	7.2	7.5
FS2-2	酸峰%	19.3	28.0	33.8	44.9	21.1	22.4	19.5	20.0	20.0
	主峰%	73.7	63.1	56.5	44.8	70.3	70.3	73.7	72.6	72.6
	碱峰%	6.9	8.9	9.7	10.3	8.6	7.3	6.7	7.4	7.4
FS2-3	酸峰%	19.3	27.6	33.2	44.1	20.9	22.1	19.9	19.8	19.8
	主峰%	73.7	63.1	56.1	44.2	71.2	70.3	73.5	72.7	73.0
	碱峰%	7.0	9.3	10.8	11.7	7.9	7.6	6.6	7.5	7.2
FS2-4	酸峰%	19.4	27.3	32.7	42.8	20.8	22.0	19.9	19.8	19.9
	主峰%	73.6	63.2	56.3	45.2	70.8	70.2	73.4	73.0	72.5
	碱峰%	7.1	9.5	11.0	12.1	8.4	7.8	6.7	7.2	7.6
FS2-5	酸峰%	19.3	26.4	31.4	41.2	20.6	21.5	19.8	19.7	19.8
	主峰%	73.5	63.7	57.0	45.2	70.6	70.4	73.4	72.9	72.4
	碱峰%	7.2	9.9	11.6	13.7	8.7	8.1	6.8	7.4	7.7

[0225] 2.2.5R-CE-SDS纯度结果

[0227] 根据表15中的R-CE-SDS纯度结果,经高温条件下放置4周,所有样品纯度均有下降,处方FS1-5纯度下降情况较其他处方更明显,其他组间未见明显差异。在加速和长期条件下纯度无明显变化。

[0228] 表15:第二轮处方筛选—R-CE-SDS纯度数据

样品编号	T0 (%)	高温 (40±2℃,%)			加速 (25±2℃,%)	长期 (5±3℃,%)
		1W	2W	4W	4W	4W
FS2-1	97.5	96.9	96.5	95.5	97.3	97.6
FS2-2	97.5	97.2	96.5	95.4	97.3	97.6
FS2-3	97.6	96.9	96.0	95.2	97.3	97.5
FS2-4	97.5	96.9	96.4	95.5	97.2	97.7
FS2-5	97.6	97.0	95.7	93.3	97.3	97.8

[0229] 2.2.6NR-CE-SDS纯度结果

[0231] 根据表16中的NR-CE-SDS纯度结果,经高温条件下放置4周,所有样品纯度均有下降,组间未见明显差异,在加速和长期条件下纯度无明显变化。

[0232] 表16:第二轮处方筛选—NR-CE-SDS纯度数据

样品编号	T0 (%)	高温 ($40 \pm 2^\circ\text{C}$, %)			加速 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, %)	长期 ($5 \pm 3^\circ\text{C}$, %)
		1W	2W	4W	4W	4W
[0233] FS2-1	97.4	97.4	96.4	94.7	97.2	97.3
FS2-2	97.3	96.8	96.2	95.0	97.2	97.3
FS2-3	97.3	96.6	96.0	94.6	97.1	97.3
FS2-4	97.2	96.7	95.9	94.7	97.1	97.4
FS2-5	97.4	96.8	95.9	94.5	97.1	97.3

[0234] 2.2.7细胞活性结果

[0235] 根据表17中的细胞活性结果,经高温条件或加速条件下放置4周,所有样品细胞活性均无显著变化。

[0236] 表17:第二轮处方筛选—细胞活性数据

样品编号	T0 (%)	高温 ($40 \pm 2^\circ\text{C}$, %)	加速 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, %)	长期 ($5 \pm 3^\circ\text{C}$, %)
		4W	4W	4W
[0237] FS2-1	89	105.1	109.2	105.0
FS2-2	91	82.5	95.8	106.6
FS2-3	96	77.0	85.0	84.0
FS2-4	124	70.0	103.0	129.0
FS2-5	115	80.0	116.0	118.0

[0238] 2.2.8结合活性结果

[0239] 根据表18中的MFI结果,FS2-4、FS2-5处方中的样品经过高温或加速实验 $2 \sim 25\mu\text{m}$ 粒径范围内的微粒数均有明显增加。FS2-2、FS2-4、FS2-5处方中的样品经过反复冻融5次,样品中的 $2 \sim 10\mu\text{m}$ 微粒明显增多。

[0240] 表18:第二轮处方筛选—MFI数据219250Z1

样品编号	T0	高温 (40 ± 2°C)	加速 (25 ± 2°C)	长期 (5 ± 3°C)	反复冻融	
		4W	4W	4W	5次	
FS2-1	10 μm ≤ x < 25 μm	9	8	12	65	8
	≥ 25 μm	2	2	3	11	3
FS2-2	10 μm ≤ x < 25 μm	7	38	132	38	62
	≥ 25 μm	0	7	13	12	9
FS2-3	10 μm ≤ x < 25 μm	9	57	14	3	40
	≥ 25 μm	2	0	3	0	0
FS2-4	10 μm ≤ x < 25 μm	8	71	28	0	52
	≥ 25 μm	3	0	3	2	11
FS2-5	10 μm ≤ x < 25 μm	3	11	83	4	19
	≥ 25 μm	0	0	11	0	3

[0242] 2.3第二轮处方筛选结论

[0243] FS2-1与FS2-2处方中蛋白的kD较高,表明其蛋白有较好胶体稳定性,且其T_m值也相对其他处方高,表明有较高结构稳定性。高温条件下SEC纯度结果表明:FS2-3和FS2-5体系下的样品表现相对较差,FS2-2相对其他处方其纯度下降最慢。

[0244] CEX-HPLC纯度结果表明:经高温条件下放置4周,所有样品均出现纯度下降,但未表现出显著的组间差异。R/NR-CE-SDS纯度结果表明:经高温条件下放置4周,FS1-5体系纯度下降情况较其他处方更明显,综合表现最差。MFI的结果显示FS2-4、FS2-5处方中的样品经过高温或加速实验2~25μm粒径范围内的微粒数均有明显增加。FS2-2、FS2-4、FS2-5处方中的样品经过反复冻融5次,样品中的2~10μm微粒也出现了明显增加。

[0245] 综合来看FS2-1与FS2-2处方表现较优,最后选择FS2-2处方即20mM组氨酸缓冲体系pH5.5加入海藻糖作为稳定剂开展第三轮处方筛选,主要考察吐温80 (II)的浓度对蛋白稳定性的影响。

[0246] 实施例3:表面活性剂筛选实验

[0247] 液体制剂中添加表面活性剂常用于保护蛋白质例如抗体在储存过程中免受空气/溶液界面诱导的应力、溶液/表面诱导的应力的影响以减少抗体的聚集或使制剂中颗粒物的形成最小化的试剂,其利于抗体理化性质的稳定。在含有20mM组氨酸缓冲液和40mg/mL的抗CLDN-18.2抗体的制剂中分别不同浓度的聚山梨醇酯80,考察上述不同浓度表面活性剂对稳定性的影响。本实施例所用的抗CLDN-18.2抗体的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,重链氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0248] 3.1实验步骤

[0249] 样品使用Millipore Pellicon3 0.11m²膜进行UF/DF换液至含有230mM海藻糖的20mM组氨酸缓冲体系中,并浓缩至约40mg/ml,然后将蛋白平均分配,并加入不同浓度的吐温80(II)(如表19)最终浓度调至约40mg/ml,在超净台无菌灌装到2R西林瓶1.0ml/瓶,进行稳定性放样和检测。

[0250] 表19:第三轮筛选-表面活性剂筛选实验方案

编号	缓冲体系	pH	稳定剂	表面活性剂	蛋白浓度	条件	T0	取样点		
								1W	2W	4W
FS3-1	20 mM 组氨酸 缓冲液	5.5	230 mM 二水海 藻糖	/	40 mg/ml	高温 (40± 2℃)	X,Y	X	X	X,Y
FS3-2						长期 (5±3℃)		1W	2W	4W
FS3-3						反复冻融		3次		5次
FS3-4						振摇 (250 rpm)		1天	3天	
X: 外观, 浓度, R-CE-SDS, NR-CE-SDS, SEC-HPLC, CEX-HPLC Y: MFI, 细胞活性, A350										

[0252] 3.2实验结果

[0253] 3.2.1外观和浓度结果

[0254] 根据表20中的结果,处方FS3-1和FS3-2在40℃放置4周后均出现了明显的蛋白颗粒沉淀,FS3-3在40℃放置4周后,样品的乳光增强,FS3-4样品未出现异常。在长期条件下放置4周外观均无明显变化,反复冻融3次和振摇3天外外观无明显变化。表21中的结果表明:所有样品经过4W的高温和长期放置浊度均有明显增加;反复冻融3次处方FS3-1未加吐温的浊度相对较高,振摇3天浊度无明显变化。

[0255] 表20:第三轮处方筛选—蛋白含量及外观数据

样品编号	T0	高温 (40±2℃)			长期 (5±3℃)			反复冻融		振摇	
		1W	2W	4W	1W	2W	4W	3次	5次	1天	3天
FS3-1	无异常	无异常	无异常	少量颗粒	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS3-2	无异常	无异常	无异常	大量颗粒	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS3-3	无异常	无异常	无异常	乳光增强	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常
FS3-4	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常	无异常

[0257] 表21:第三轮处方筛选—A350数据

样品编号	T0	高温 (40±2℃)	长期 (5±3℃)	反复冻融	振摇
		4W	4W	5次	3天
[0258] FS3-1	0.103	0.134	0.126	0.112	0.099
FS3-2	0.103	0.138	0.134	0.105	0.106
FS3-3	0.103	0.139	0.128	0.109	0.100
FS3-4	0.105	0.130	0.130	0.107	0.106

[0259] 3.2.2 SEC-HPLC纯度结果

[0260] 根据表22的SEC纯度结果,所有样品经高温和长期条件放置4W,所有样品单体纯度均未出现明显下降,各处方之间无显著性差异;反复冻融5次和振摇三天SEC单体纯度无明显变化。

[0261] 表22:第三轮处方筛选—SEC-HPLC纯度数据

样品名称		T0	高温 (40±2℃)			长期 (5±3℃)			反复冻融		振摇	
			1W	2W	4W	1W	2W	4W	3次	5次	1天	3天
FS3-1	聚体%	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

样品名称		T0	高温 (40±2℃)			长期 (5±3℃)			反复冻融		振摇	
			1W	2W	4W	1W	2W	4W	3次	5次	1天	3天
[0263] FS3-2	单体%	99.9	99.2	98.8	97.7	99.8	99.9	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9
	片段%	0.0	0.7	1.1	2.1	0.1	0.0	0.2	0.1	0.0	0.1	0.1
	聚体%	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	单体%	99.9	99.2	98.8	97.5	99.8	99.9	99.6	99.9	99.9	99.8	99.8
	片段%	0.0	0.7	1.1	2.3	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
	聚体%	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
FS3-3	单体%	99.9	99.3	98.7	97.5	99.8	99.9	99.6	99.9	99.9	99.9	99.9
	片段%	0.1	0.6	1.1	2.2	0.1	0.0	0.3	0.0	0.1	0.1	0.0
	聚体%	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
FS3-4	单体%	99.9	99.2	98.7	97.6	99.8	99.9	99.6	99.9	99.9	99.9	99.9
	片段%	0.1	0.7	1.1	2.1	0.1	0.0	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0
	聚体%	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

[0264] 3.2.3 CEX-HPLC结果

[0265] 根据表23中的R-CE-SDS纯度结果,所有样品均未出现显著变化。

[0266] 表23:第三轮处方筛选—R-CE-SDS纯度数据

样品名称	T0	高温 (40±2℃)			长期 (5±3℃)			反复冻融		振摇		
		1W	2W	4W	1W	2W	4W	3次	5次	1天	3天	
[0267] FS3-1	酸峰%	14.1	20.4	26.4	37.4	13.9	13.8	14.1	13.7	13.8	13.8	14.0
	主峰%	79.6	70.7	63.9	51.9	79.6	78.8	78.7	78.8	78.6	78.8	78.6
	碱峰%	6.3	8.9	9.6	10.8	6.5	7.4	7.2	7.5	7.6	7.4	7.5
FS3-2	酸峰%	14.1	20.4	26.3	37.2	14.1	13.7	14.2	13.8	13.8	13.8	14.0
	主峰%	79.6	70.4	64.3	51.9	79.4	78.9	78.8	78.5	78.6	79.0	78.6
	碱峰%	6.4	9.2	9.4	10.8	6.6	7.4	7.0	7.7	7.6	7.2	7.4
FS3-3	酸峰%	14.1	20.4	26.7	37.2	14.1	13.7	14.2	13.7	13.7	13.8	14.0
	主峰%	79.5	70.8	64.1	51.8	79.4	78.9	78.7	78.8	78.9	79.0	78.5
	碱峰%	6.4	8.8	9.3	11.0	6.5	7.4	7.0	7.6	7.4	7.2	7.5
FS3-4	酸峰%	14.2	20.5	26.5	37.0	14.1	13.7	14.1	13.6	13.7	13.9	14.0
	主峰%	79.4	70.6	64.1	52.4	79.4	79.0	78.8	79.0	78.8	78.8	78.6
	碱峰%	6.4	8.9	9.5	10.5	6.6	7.4	7.0	7.4	7.5	7.3	7.4

[0268] 3.2.4CE-SDS纯度结果

[0269] 根据表24和25中的R/NR-CE-SDS纯度结果,经高温或长期条件下放置4周,所有样品纯度均未出现明显下降;反复冻融5次和振摇3天均无明显变化。

[0270] 表24:第二轮处方筛选—NR-CE-SDS纯度数据

样品编号	T0 (%)	高温 (40±2℃,%)			长期 (5±3℃,%)			反复冻融		振摇	
		1W	2W	4W	1W	2W	4W	3次	5次	1天	3天
[0271] FS3-1	97.8	97.3	97.1	96.0	97.8	97.8	97.7	97.9	97.8	97.6	97.9
FS3-2	97.9	97.2	97.0	96.1	97.9	97.9	97.8	97.5	97.9	97.9	97.9
FS3-3	97.9	97.3	97.0	96.1	97.7	98.0	97.8	97.9	97.9	98.0	97.7
FS3-4	97.9	97.3	97.1	96.2	97.6	97.9	97.7	97.9	97.9	97.9	97.7

[0272] 表25:第三轮处方筛选—NR-CE-SDS纯度数据

样品编号	T0 (%)	高温 (40±2℃,%)			长期 (5±3℃,%)			反复冻融		振摇	
		1W	2W	4W	1W	2W	4W	3次	5次	1天	3天
[0273] FS3-1	95.5	95.5	95.2	94.8	95.6	95.7	95.7	95.5	95.5	95.6	95.5
FS3-2	95.5	95.4	95.1	94.7	95.6	95.6	95.7	95.6	95.5	95.4	95.4
FS3-3	95.5	95.4	95.0	94.4	95.7	95.7	95.7	95.5	95.5	95.5	95.6
FS3-4	95.5	95.4	95.0	94.2	95.6	95.6	95.7	95.6	95.5	95.5	95.5

[0274] 3.2.5细胞活性结果

[0275] 根据表26中的细胞活性,经高温条件或长期条件下放置4周,所有样品活性结果均未出现显著变化;反复冻融5次和振摇3天均无明显变化。

[0276] 表26:第三轮处方筛选—细胞活性数据

样品编号	T0(%)	高温 (40 ± 2°C,%)	长期 (5 ± 3°C,%)	反复冻融	振摇
		4W	4W	5次	3天
[0277] FS3-1	120	102	106	92	93
FS3-2	100	104	117	100	82
FS3-3	90	113	82	81	93
FS3-4	92	113	114	87	93

[0278] 3.2.6MFI结果

[0279] 根据表27中的MFI结果,经过冻融5次和振摇3天后,处方FS3-1样品中2~25 μ m粒子数明显增多,其他含有吐温的处方颗粒含量相对较低。

[0280] 表27:第三轮处方筛选—MFI数据

样品编号		T0	反复冻融	振摇
			5次	3天
[0281] FS3-1	10 μ m ≤ x < 25 μ m	22	6795	165
	≥ 25 μ m	2	50	31
FS3-2	10 μ m ≤ x < 25 μ m	11	12	300
	≥ 25 μ m	3	7	4
FS3-3	10 μ m ≤ x < 25 μ m	24	13	1202
	≥ 25 μ m	7	3	30
FS3-4	10 μ m ≤ x < 25 μ m	11	24	1002
	≥ 25 μ m	6	6	14

[0282] 3.3第三轮处方筛选结论

[0283] 从SEC、CEX-HPLC、CE-SDS和细胞活性结果来看,所有处方未出现显著差异。MFI的数据表明不加吐温的样品经过振摇和冻融后其颗粒数会明显增加。通过观察样品的外观可以得出:处方FS3-4含有0.04%吐温80(II)的蛋白样品相对稳定,其它组样品均出现了不同程度的颗粒或者乳光增强。样品在A350 nm处的吸光度也验证了这一结论。

[0284] 实施例5:含抗CLDN-18.2抗体的药物组合物的结合活性的检测

[0285] 通过FACS检测药物组合物中抗CLDN-18.2抗体与细胞表面表达的CLDN-18.2结合的活性来检测抗CLDN-18.2抗体的结合活性。将NUGC4-CLDN-18.2细胞与梯度稀释的不同浓度的抗体抗CLDN-18.2抗体一起孵育,然后洗涤并与荧光标记二抗一起孵育。通过FACS检测荧光信号;检测的荧光信号越强,则抗体亲和力越高,即靶标结合活性越高。用GraphPad拟合抗体结合曲线,阳性对照和阴性对照分别是IMAB362和抗KLH hu-IgG1抗体。

[0286] 本实施例中的抗CLDN-18.2抗体按照处方FS3-4的配方配制。

[0287] 结果如图1所示。结果显示,含抗CLDN-18.2抗体的药物组合物能够结合在胃癌细胞株NUGC4细胞表面上高表达的人CLDN-18.2,其EC50与阳性对照相当。

[0288] 实施例6:含抗CLDN-18.2抗体的药物组合物的ADCC效应的检测

[0289] 药物组合中的抗CLDN-18.2抗体为人IgG1亚型,能够介导ADCC效应,抗体Fc端与NK细胞表面Fc γ IIIaR受体结合,激活NK细胞杀伤靶细胞。利用表达Fc γ IIIaR的NFAT通路荧光素酶系统,通过报告基因系统模拟体内ADCC效应。将含抗CLDN-18.2抗体的药物组合与靶细胞CHO-CLDN-18.2细胞以及Jurkat ADCC效应细胞共孵育,在加入底物one-glo后用酶标仪检测信号。用GraphPad分析数据,比较剂量依赖性的抗体ADCC效应。阳性对照和阴性对照分别是IMAB362和抗KLH hu-IgG1抗体。

[0290] 本实施例中的抗CLDN-18.2抗体按照处方FS3-4的配方配制。

[0291] 结果如图2所示。结果显示,含抗CLDN-18.2抗体的药物组合介导ADCC效应的EC50值为14.18ng/mL,明显优于阳性对照IMAB362。

[0292] 实施例7:含抗CLDN-18.2抗体的药物组合的CDC效应的检测

[0293] 抗CLDN18.2抗体还可以介导CDC效应,通过形成攻膜复合物的方式杀伤靶细胞。补体血清(1:10稀释)与含抗CLDN-18.2抗体的药物组合以及靶细胞CHO-CLDN-18.2(100000个细胞)于37 $^{\circ}$ C培养箱共孵育1h,通过碘化丙啶(PI)染色检测靶细胞存活杀伤情况,计算相对杀伤率。抗CLDN-18.2抗体的剂量依赖性CDC效应用相对杀伤率来反映。阳性对照和阴性对照分别是IMAB362和抗KLH hu-IgG1抗体。

[0294] 本实施例中的抗CLDN-18.2抗体按照处方FS3-4的配方配制。

[0295] 结果如图3所示。结果显示,含抗CLDN-18.2抗体的药物组合介导CDC效应的EC50值为166.5ng/mL,明显优于阳性对照IMAB362。

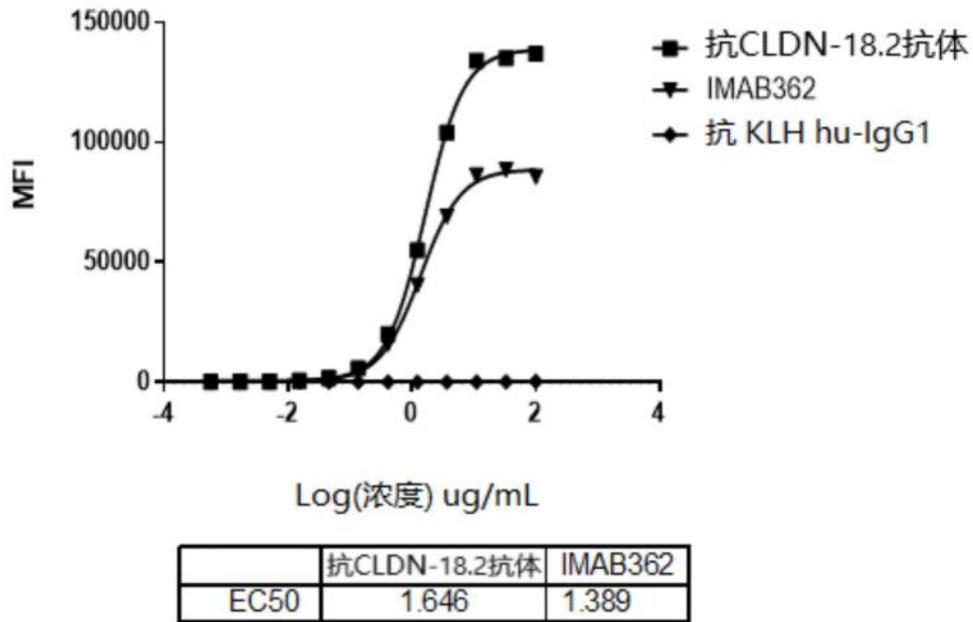


图1

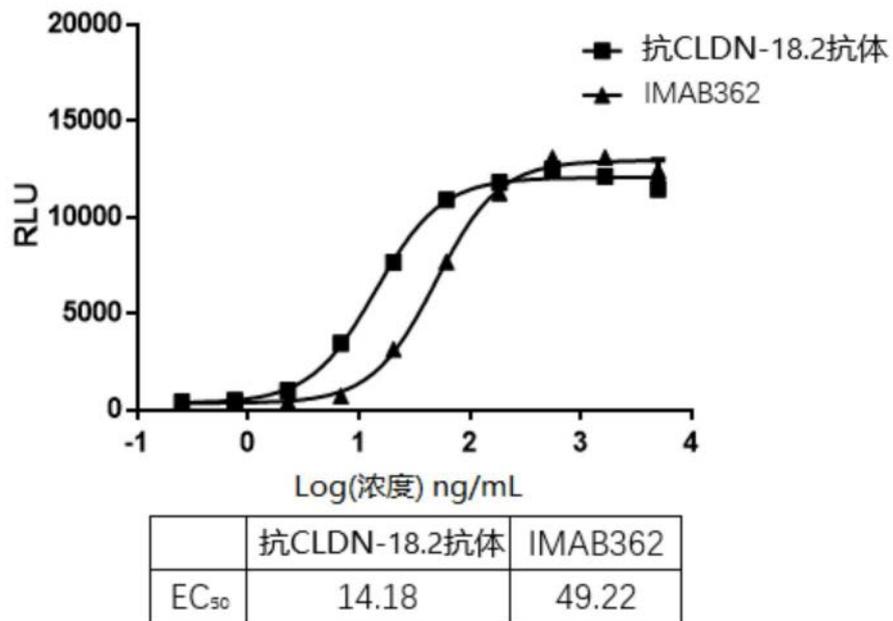
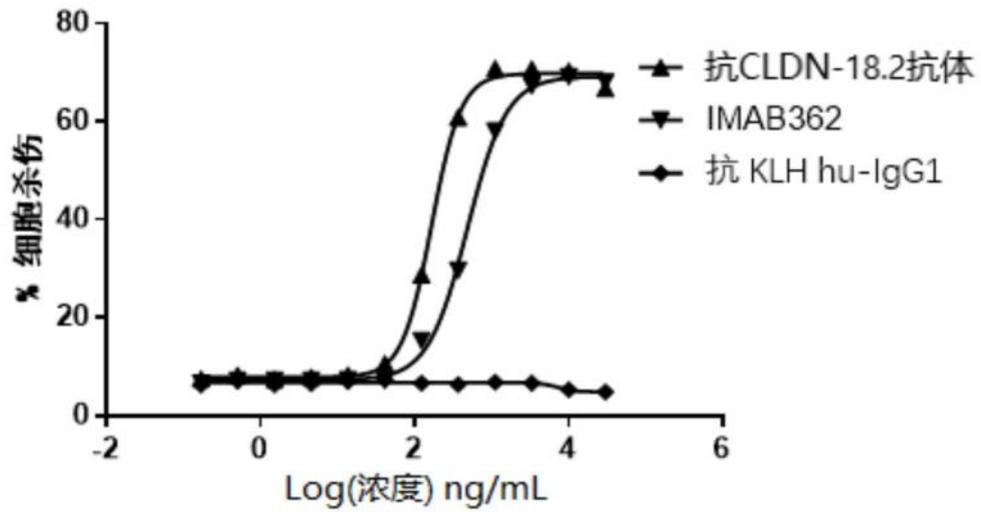


图2



	抗CLDN-18.2抗体	IMAB362
EC ₅₀	166.5	485.8

图3