



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116172947 A

(43) 申请公布日 2023.05.30

(21) 申请号	202211514256.5	A61K 47/26 (2006.01)
(22) 申请日	2022.11.29	A61K 47/20 (2006.01)
(66) 本国优先权数据		A61K 47/18 (2017.01)
	202111431129.4 2021.11.29 CN	A61P 35/00 (2006.01)
		A61P 9/10 (2006.01)
(71) 申请人	江苏恒瑞医药股份有限公司	A61P 27/02 (2006.01)
地址	222047 江苏省连云港市经济技术开 发区昆仑山路7号	A61P 27/06 (2006.01)
申请人	上海恒瑞医药有限公司	
(72) 发明人	李小菲 田晨敏	
(51) Int. Cl.		
	A61K 9/08 (2006.01)	
	A61K 39/395 (2006.01)	
	A61K 9/19 (2006.01)	
	A61K 9/00 (2006.01)	
	A61K 47/10 (2017.01)	

权利要求书2页 说明书11页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

一种含特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体的药物组合物

(57) 摘要

本披露涉及一种含特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体的药物组合物。具体而言,本披露涉及含特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体的药物组合物及其作为药物的用途。

1. 一种药物组合物,其包含

i) 1mg/mL至120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;

ii) 0.1mg/mL至10mg/mL的泊洛沙姆;

iii) 10mg/mL至100mg/mL的糖;

iv) 5mM至100mM的甲硫氨酸或精氨酸盐酸盐;和

v) 5mM至50mM的缓冲剂;所述组合物的pH为6.0至7.0。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体包含抗VEGF抗体和抗ANG2单域抗体;所述抗VEGF抗体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HCDR1、HCDR2和HCDR3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LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述抗ANG2单域抗体包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9所示的CDR1、CDR2和CDR3;

优选地,所述抗VEGF抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO:11所示,所述抗ANG2单域抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示;

更优选地,所述特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体包含两条氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示的第一链和两条氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示的第二链。

3. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含100mg/mL至120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;

优选地,所述药物组合物包含100mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体。

4. 根据权利要求1至3任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含0.2mg/mL至0.8mg/mL的泊洛沙姆;

优选地,所述药物组合物包含0.2mg/mL至0.8mg/mL的泊洛沙姆188;

更优选地,所述药物组合物包含0.8mg/mL的泊洛沙姆188。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含10mg/mL至100mg/mL的蔗糖;

优选地,所述药物组合物包含30mg/mL至80mg/mL的蔗糖;

更优选地,所述药物组合物包含80mg/mL的蔗糖。

6. 根据权利要求1至5任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含10mM至100mM的甲硫氨酸或精氨酸盐酸盐;

优选地,所述药物组合物包含80mg/mL的蔗糖和10mM的甲硫氨酸,或所述药物组合物包含33mg/mL的蔗糖和100mM的精氨酸盐酸盐。

7. 根据权利要求1至6任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含10mM至30mM的缓冲剂,所述组合物的pH为6.5至7.0;

优选地,所述药物组合物包含10mM至30mM的组氨酸缓冲剂,所述药物组合物的pH为6.5至7.0;

更优选地,所述药物组合物包含20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂,所述药物组合物的pH为6.5至6.7。

8. 根据权利要求1至7任一项所述的药物组合物,其包含:

i) 100mg/mL至120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;

ii) 0.2mg/mL至0.8mg/mL的泊洛沙姆;

- iii) 30mg/mL至80mg/mL的蔗糖;
- iv) 10mM至100mM的甲硫氨酸或精氨酸盐酸盐;和
- v) 10mM至30mM的缓冲剂;所述组合物的pH为6.5至7.0;

所述特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体包含两条氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示的第一链和两条氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示的第二链;

优选地,所述药物组合物包含:

- i) 100mg/mL至120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;
- ii) 0.2mg/mL至0.8mg/mL的泊洛沙姆188;
- iii) 80mg/mL的蔗糖和10mM的甲硫氨酸,或33mg/mL的蔗糖和100mM的精氨酸盐酸盐;和
- iv) 10mM至30mM的组氨酸缓冲剂;所述药物组合物的pH为6.5至7.0;

更优选地,所述药物组合物包含:

- i) 100mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;
- ii) 0.8mg/mL的泊洛沙姆188;
- iii) 80mg/mL的蔗糖和10mM的甲硫氨酸;和
- iv) 20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;所述药物组合物的pH为6.5至6.7。

9. 根据权利要求1至8任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物是液体制剂;

优选地,所述药物组合物的施用途径为眼部给药、皮下注射、皮内注射、静脉注射或肌肉注射;

更优选地,所述药物组合物的施用途径为玻璃体注射。

10. 一种冻干制剂,所述冻干制剂复溶后可形成权利要求1至9任一项所述的药物组合物。

11. 一种制备冻干制剂的方法,其中包括将权利要求1至9中任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

12. 一种冻干制剂,所述制剂通过将权利要求1至9中任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。

13. 一种复溶溶液,所述复溶溶液是通过将权利要求10或12所述的冻干制剂复溶制备的。

14. 一种制品,其包括容器,该容器中装有如权利要求1至9任一项所述的药物组合物、权利要求10或12所述的冻干制剂或权利要求13所述的复溶溶液。

15. 一种治疗血管生成性眼病或癌症的方法,所述方法包括给予受试者有效量的权利要求1至9任一项所述的药物组合物、权利要求10或12所述的冻干制剂、权利要求13所述的复溶溶液或权利要求14所述的制品;

优选地,其中所述的血管生成性眼病选自新生血管性青光眼、年龄相关的黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、角膜新血管生成、角膜移植新血管生成、角膜移植排斥、视网膜/脉络膜新血管生成、房角的新血管生成、眼部新生血管性疾病、血管再狭窄和动静脉畸形;其中所述的癌症选自乳腺癌、肾上腺肿瘤、输卵管癌、鳞状细胞癌、卵巢癌、胃癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、胆管癌、膀胱癌、胰腺癌、皮肤癌和肝癌。

一种含特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体的药物组合物

技术领域

[0001] 本披露属于药物制剂领域,具体涉及一种含特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体的药物组合物,以及其作为药物的用途。

背景技术

[0002] 这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息,而不必然地构成现有技术。

[0003] 新血管的生成为肿瘤细胞提供氧气和养料,使得肿瘤细胞获得生长优势,从无血管的慢速生长期到有血管的快速生长期。因此,通过抑制血管生成来抑制肿瘤的生长是一个较有潜力的有效策略。在众多促进血管生成的相关因子中,血管内皮生长因子VEGF是非常关键和重要的促进血管生成的因子。VEGF可以通过与VEGF受体结合来促进细胞的增殖、迁移、增加血管通透性等来促进肿瘤细胞的新生血管生成。因此通过阻断VEGF可抑制肿瘤血管的生成,进而达到抑制肿瘤生长和转移的目的。临床上有很多通过不同策略阻断VEGF的生物制剂,诸如针对VEGF的单抗阿瓦斯汀(Avastin),中和VEGF的可溶性VEGF受体,针对VEGF受体的单抗等都显示出较好的活性。但肿瘤血管的生成是由众多分子、多信号通路参与的复杂过程,通过阻断一条通路仍不能达到完全抑制肿瘤的目的,需要同时阻断其他血管生成相关因子。

[0004] Tie2是第二个被鉴定出的血管内皮细胞特异的酪氨酸激酶受体,其与配体血管生成素-1(ANG1)和血管生成素-2(ANG2)的结合对于血管生成也起着重要作用。ANG1与ANG2都结合Tie2,其中ANG1支持内皮细胞(EC)存活并促进血管的完整性和稳定性,而ANG2具有相反效应,可以使周边细胞从内皮细胞脱落下来,导致内皮细胞通透性提高,使VEGF发挥促进新生血管形成的作用。ANG2和VEGF在肿瘤的血管形成过程中互补协调,共同作用。因此,同时阻断VEGF和ANG2可以更有效地抑制血管的生成,促进血管的正常化,达到抑制肿瘤生长和转移的目的。

[0005] 制备特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体是一种可行的策略。由于双特异性抗体结构复杂,对制剂的开发形成了挑战。

发明内容

[0006] 本披露提供一种含特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体的药物组合物。该组合物具有治疗活性。此外,该组合物还可具有稳定性好、不溶性颗粒含量低、适于眼部给药等优势。

[0007] 在一些实施方案中,本披露提供一种药物组合物,其包含

[0008] i) 1mg/mL至120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;

[0009] ii) 0.1mg/mL至10mg/mL的泊洛沙姆;

[0010] iii) 10mg/mL至100mg/mL的糖;

[0011] iv) 5mM至100mM的甲硫氨酸或精氨酸盐酸盐;和

[0012] v) 5mM至50mM的缓冲剂;所述组合物的pH为6.0至7.0。

[0013] 在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体包含抗VEGF抗体和抗ANG2单域抗体;所述抗VEGF抗体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HCDR1、HCDR2和HCDR3和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4、SEQ IDNO:5和SEQ ID NO:6所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述抗ANG2单域抗体包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9所示的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方式中,所述抗VEGF抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11所示,所述抗ANG2单域抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示。在一些实施方式中,所述特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体包含两条氨基酸序列如SEQ IDNO:13所示的第一链和两条氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示的第二链。

[0014] 在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL、100mg/mL、110mg/mL或120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体。在一些实施方案中,所述药物组合物包含100mg/mL至120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体。在一些实施方案中,所述药物组合物包含100mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体。

[0015] 在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含0.2mg/mL至0.8mg/mL的泊洛沙姆。在一些实施方案中,所述药物组合物包含0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL或0.8mg/mL的泊洛沙姆。在一些实施方案中,所述的泊洛沙姆是泊洛沙姆188。在一些实施方案中,所述药物组合物包含0.2mg/mL至0.8mg/mL的泊洛沙姆188。在一些实施方案中,所述药物组合物包含0.8mg/mL的泊洛沙姆188。

[0016] 在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,所述糖选自常规组合物 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物,包括单糖,二糖,三糖,多糖,糖醇,还原性糖,非还原性糖等等。所述的糖可选自葡萄糖,蔗糖,海藻糖,乳糖,果糖,麦芽糖,右旋糖苷,甘油,赤藻糖醇,丙三醇,阿拉伯糖醇,sylitol,山梨糖醇,甘露醇,密里二糖,松三糖,蜜三糖,甘露三糖,水苏糖,麦芽糖,乳果糖,麦芽酮糖,山梨醇,麦芽糖醇,乳糖醇,异-麦芽酮糖等。在一些实施方案中,所述药物组合物包含10mg/mL至100mg/mL的蔗糖。在一些实施方案中,所述药物组合物包含10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL或100mg/mL的蔗糖。在一些实施方案中,所述药物组合物包含30mg/mL至80mg/mL的蔗糖。在一些实施方案中,所述药物组合物包含80mg/mL的蔗糖。

[0017] 在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含10mM至100mM的甲硫氨酸或精氨酸盐酸盐。在一些实施方案中,所述药物组合物包含10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM或100mM的甲硫氨酸或精氨酸盐酸盐。在一些实施方案中,所述药物组合物包含80mg/mL的蔗糖和10mM的甲硫氨酸。在一些实施方案中,所述药物组合物包含33mg/mL的蔗糖和100mM的精氨酸盐酸盐。

[0018] 在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含10mM至30mM的缓冲剂,所述组合物的pH为6.5至7.0。在一些实施方案中,所述药物组合物包含10mM、20mM或30mM的缓冲剂。在一些实施方案中,所述药物组合物pH为6.5、6.6、6.7、6.8、6.9或7.0。在一些实施方案中,所述药物组合物pH为6.5至6.7。在一些实施方案中,所述药

物组合物包含10mM至30mM的组氨酸缓冲剂,所述组合物的pH为6.5至7.0。在一些实施方案中,所述药物组合物包含20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂,所述组合物的pH为6.5至7.0。在一些实施方案中,所述药物组合物包含20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂,所述组合物的pH为6.5至6.7。

[0019] 在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物的渗透压为200mOsm/kg至400mOsm/kg或250mOsm/kg至350mOsm/kg。在一些实施方案中,所述的渗透压为200mOsm/kg、250mOsm/kg、300mOsm/kg、350mOsm/kg或400mOsm/kg。

[0020] 在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其包含:

[0021] i) 100mg/mL至120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;

[0022] ii) 0.2mg/mL至0.8mg/mL的泊洛沙姆;

[0023] iii) 30mg/mL至80mg/mL的蔗糖;

[0024] iv) 10mM至100mM的甲硫氨酸或精氨酸盐酸盐;和

[0025] v) 10mM至30mM的缓冲剂;所述组合物的pH为6.5至7.0;所述特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体包含两条氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示的第一链和两条氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示的第二链。

[0026] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含:

[0027] i) 100mg/mL至120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;

[0028] ii) 0.2mg/mL至0.8mg/mL的泊洛沙姆188;

[0029] iii) 80mg/mL的蔗糖和10mM的甲硫氨酸,或33mg/mL的蔗糖和100mM的精氨酸盐酸盐;和

[0030] iv) 10mM至30mM的组氨酸缓冲剂;所述药物组合物的pH为6.5至7.0。

[0031] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含:

[0032] i) 100mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;

[0033] ii) 0.8mg/mL的泊洛沙姆188;

[0034] iii) 80mg/mL的蔗糖和10mM的甲硫氨酸;和

[0035] iv) 20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;所述药物组合物的pH为6.5至6.7。

[0036] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含:

[0037] i) 120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;

[0038] ii) 0.8mg/mL的泊洛沙姆188;

[0039] iii) 33mg/mL的蔗糖和100mM的精氨酸盐酸盐;和

[0040] iv) 20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;所述组合物的pH为6.5至6.7。

[0041] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含:

[0042] i) 120mg/mL的特异性结合VEGF和ANG2的双特异性抗体;

[0043] ii) 0.2mg/mL、0.4mg/mL、0.6mg/mL或0.8mg/mL的泊洛沙姆188;

[0044] iii) 80mg/mL的蔗糖和10mM的甲硫氨酸;和

[0045] iv) 20mM的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂;所述组合物的pH为6.5至6.7。

[0046] 本披露的数值范围旨在包括该范围内的每个数字和数字子集,无论是否被明确地公开。

[0047] 在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,所述药物组合物是液体制剂。

在一些实施方案中,所述液体制剂的溶剂是水。在一些实施方案中,所述组合物的施用途径为眼部给药、皮下注射、皮内注射、静脉注射或肌肉注射。在一些实施方案中,所述组合物的施用途径为玻璃体注射。

[0048] 本披露还提供一种冻干制剂,其中所述冻干制剂复溶后可形成如上任一项所述的药物组合物。本披露还提供一种冻干制剂,其为如上任一项所述的药物组合物的冻干形式。

[0049] 本披露还提供一种制备冻干制剂的方法,其中包括将如上任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

[0050] 本披露还提供一种冻干制剂,所述制剂通过将如上任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。

[0051] 本披露还提供一种复溶溶液,其特征在于所述复溶溶液是通过将如上任一项所述的冻干制剂复溶制备的。

[0052] 本披露还提供一种制品,其包括容器,该容器中装有如上任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂或如上任一项所述的复溶溶液。

[0053] 在一些实施方案中,本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品在制备治疗癌症或血管生成性眼病的药物中的用途。

[0054] 本披露还提供一种治疗癌症或血管生成性眼病的方法,包括给予患者有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品。

[0055] 在一些实施方案中,本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品,其用于治疗血管生成性眼病或癌症。在一些实施方案中,所述癌症选自乳腺癌、肾上腺肿瘤、输卵管癌、鳞状细胞癌、卵巢癌、胃癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、胆管癌、膀胱癌、胰腺癌、皮肤癌和肝癌;其中所述的血管生成性眼病选自新生血管性青光眼、年龄相关的黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、角膜新生血管生成、角膜移植新生血管生成、角膜移植排斥、视网膜/脉络膜新生血管生成、房角的新生血管生成、眼部新生血管性疾病、血管再狭窄和动静脉畸形。

具体实施方式

[0056] 术语

[0057] 为了更容易理解本披露,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披露所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

[0058] 本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

[0059] 术语“ANG-2”指血管生成素-2(ANG-2)(或缩写为ANGPT2或ANG2)。术语“VEGF”指人血管内皮生长因子(VEGF/VEGF-A)。

[0060] “抗体”以最广义使用,涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体;单特异性抗体,多特异性抗体(例如双特异性抗体),全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段,或抗原结合部分),只要它们展现出期望的抗原结合活性。“天然抗体”指天然存在的

免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白,由二硫键结合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从N至C端,每条重链具有一个可变区(VH),又称作可变重域、重链可变区,接着是三个恒定域(CH1、CH2和CH3)。类似地,从N至C端,每条轻链具有一个可变区(VL),又称作可变轻域,或轻链可变域,接着是一个恒定轻域(轻链恒定区、CL)。术语“双特异性抗体”指能够对两个不同抗原或同一抗原的至少两个不同抗原表位特异性结合的抗体(包括抗体或其抗原结合片段,如单链抗体)。

[0061] 术语“互补决定区”或“CDR”指可变区内主要促成与抗原结合的区域;“框架”或“FR”是指除CDR残基之外的可变结构域残基。VH包含3个CDR区:HCDR1、HCDR2和HCDR3;VL包含3个CDR区:LCDR1、LCDR2和LCDR3。可以通过各种公知方案来确定CDR的氨基酸序列边界,例如:“Kabat”编号规则(参见Kabat等(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)、“Chothia”编号规则、“AbM”编号规则、“contact”编号规则(参见Martin,ACR.Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J].2001)和ImMunoGenTics(IMG T)编号规则(Lefranc,M.P.等,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003);Front Immunol.2018Oct 16;9:2278)等;各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的。本披露的编号规则如下表1中所示。

[0062] 表1.CDR编号系统之间的关系

[0063]

CDR	IMG T	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

[0064] 除非另有说明,本披露实施例中的可变区和CDR序列均适用“Kabat”编号规则。

[0065] “药物组合物”表示含有一种或多种本文所述双特异性抗体,以及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。本披露中,“药物组合物”和“制剂”并不互相排斥。

[0066] “有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定受试者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化:如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

[0067] “药学可接受的载体”或“药学可接受的赋形剂”包括当与活性成分组合时,允许该成分保留生物学活性并且不与受试者的免疫系统反应的任何材料。例子包括但不限于任何标准药物载体,例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂如油/水乳剂、和各种类型的润湿剂。在一些实施例中,用于气雾剂或肠胃外施用的稀释剂是磷酸盐缓冲盐水(PBS)或生理(0.9%)盐水。包含此类载体的组合物通过众所周知的常规方法配制。

[0068] “缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受pH变化的缓冲剂。将pH控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸、草酸盐、乳酸盐、磷

酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

[0069] “组氨酸缓冲剂”是包含组氨酸的缓冲剂。组氨酸缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸组氨酸,组氨酸-醋酸组氨酸,组氨酸-磷酸组氨酸,组氨酸-硫酸组氨酸等缓冲剂,优选组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂可由组氨酸与盐酸配制而成,或者由组氨酸与盐酸组氨酸配制而成。

[0070] “枸橼酸盐缓冲剂”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁等。优选的枸橼酸盐缓冲剂是枸橼酸-枸橼酸钠。

[0071] “琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸根离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠盐、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。优选的琥珀酸盐缓冲剂是琥珀酸-琥珀酸钠盐。示例性的,所述的琥珀酸-琥珀酸钠可由琥珀酸与氢氧化钠配制而成,或由琥珀酸与琥珀酸钠盐配制而成。

[0072] “磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾、磷酸氢二钠-枸橼酸等。优选的磷酸盐缓冲剂是磷酸氢二钠-磷酸二氢钠。

[0073] “醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、组氨酸-醋酸组氨酸、醋酸-醋酸钾、醋酸-醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸盐缓冲剂是醋酸-醋酸钠。

[0074] “泊洛沙姆(poloxamer)”是环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物,其是水溶性的并在药物制剂中用作表面活性剂。泊洛沙姆的实例包括泊洛沙姆188。

[0075] “冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

[0076] 本披露所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果:其中的抗体在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合物,优选地,药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术,可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

[0077] 稳定的制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂:在冷藏温度(2-8℃)保存至少3个月、优选6个月、更优选1年,且甚至更优选地多达2年。另外,稳定的液体制剂包括这样的液体制剂:其在包括25℃的温度保存包括1个月、3个月或6个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的例子:通过SEC-HPLC测得,通常不超过约10%、优选不超过约5%的抗体发生聚集或降解。通过视觉分析,制剂是淡黄色近无色澄明液体或者无色澄明液体,或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH和重量克分子渗透压浓度具有不超过±10%变化,优选不超过±5%的变化。所述制剂通常形成不超过约10%、优选不超过约5%的聚集。

[0078] 如果在目检颜色和/或澄清度后,或者通过UV光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)和动态光散射(DLS)测得,抗体没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性,那么所述抗体在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法(其确定蛋白三级结构)和通过FTIR光谱法(其确定蛋白二级结构)来评价。

[0079] 如果抗体没有显示出显著的化学改变,那么所述抗体在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白,可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短(通过诸如尺寸排阻色谱法和CE-SDS等方法来评价)、氧化(通过诸如与质谱法或MALDI/TOF/MS结合的肽谱法等方法来评价)、脱酰胺作用(通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价)和异构化(通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等方法来评价)。

[0080] 如果抗体在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内,那么所述抗体在药物制剂中“保留它的生物活性”。

[0081] “施用”、“给予”和“处理”,当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当其应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

[0082] “治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂,例如包含本披露的任一种的药物组合物,所述患者具有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂,以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床右测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如患者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本披露的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解每个目标疾病症状方面可能无效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如Student t检验、卡方检验、依据Mann和Whitney的U检验、Kruskal-Wallis检验(H检验)、Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon检验确定,其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

[0083] 在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露,但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书,本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中,除非上下文中有清楚的另外指明,单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围,本披露的范围由权利要求书限定。

[0084] 实施例

[0085] 以下结合实施例用于进一步描述,但这些实施例并非限制的范围。W02020187202A1通过援引完整收入本披露。

[0086] SEC分子排阻色谱法:

[0087] 根据凝胶孔隙的孔径大小与高分子样品分子的线团尺寸间的相对关系而对溶质

进行分离的分析的方法。

[0088] SEC% (SEC单体含量百分比) = A单体/A总 × 100% (A单体为样品中主峰单体的峰面积, A总为所有峰面积之和)。

[0089] Δ SEC% = 稳定性实验前制剂的SEC% - 稳定性实验后制剂的SEC%。

[0090] SEC测定用仪器: 安捷伦HPLC 1260;

[0091] 柱子: Waters, XBridge® BEH200ÅSEC 3.5μm 7.8 × 300mm Column。

[0092] NR-CE毛细管凝胶电泳:

[0093] 将凝胶移到毛细管中作为支持介质进行的一种电泳, 并在一定的电压下根据样品分子量的大小进行分离的方法。

[0094] NR-CE% = A主峰/A总 × 100% (A主峰为样品中主峰的峰面积, A总为所有峰面积之和。) Δ NR-CE% = 强制降解实验前制剂的NR-CE% - 强制降解实验后制剂的NR-CE%。

[0095] CE测定用仪器: Beckman毛细管电泳仪, 型号PA800 plus。

[0096] IEC离子交换色谱:

[0097] 以离子交换树脂或化学键合离子交换剂为固定相, 利用被分离组分离子交换能力的差别或选择性系数的差别而实现分离的色谱方法。

[0098] IEC% = A中性峰面积/A总面积 × 100% (A总面积为酸性峰、中性峰和碱性峰面积之和)。

[0099] Δ IEC% = 稳定性实验前制剂的IEC% - 稳定性实验后制剂的IEC%。

[0100] IEC测定用仪器: 安捷伦HPLC 1260。

[0101] 渗透压测定:

[0102] 冰点法测定渗透压, 以冰点下降值与溶液的摩尔浓度成正比例关系为基础, 采用高灵敏度感温元件, 测定溶液结冰点, 通过电量转化为渗透压。

[0103] 渗透压的测定仪器: 罗泽Loser, 型号OM815。

[0104] 双特异性抗体

[0105] 以下实施例所采用的双特异性抗体为W02020187202A1中的hu15.E-V1。该抗体的序列信息如下:

[0106] 表2. 双特异性抗体的CDR区序列

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
抗VEGF抗体 VH	HYGMN (SEQ ID NO: 1)	WINTYTGEPITYAADFQR (SEQ ID NO: 2)	YPYYYGTSHWYFDV (SEQ ID NO: 3)
抗VEGF抗体 VL	SASQDISNYLN (SEQ ID NO: 4)	FTSSLHS (SEQ ID NO: 5)	QQYSTVPWTF (SEQ ID NO: 6)
抗ANG2单域抗 体	SYAMS (SEQ ID NO: 7)	TINSGGGRTGYADSVKG (SEQ ID NO: 8)	DHPQGY (SEQ ID NO: 9)

[0108] >抗VEGF抗体VH (SEQ ID NO:10)

[0109] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPITYAADFQRRT
FSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSS

[0110] >抗VEGF抗体VL (SEQ ID NO:11)

[0111] DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKVLIIYFTS SLHSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK

[0112] >抗ANG2单域抗体 (SEQ ID NO:12)

[0113] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTINSGGGRTGYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCNADHPQGYWGQGT TTVTVSS

[0114] >第一链 (SEQ ID NO:13)

[0115] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFT
FSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLAQDQLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNAYTQKSLSLSPGGG
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTINSGGGRTGYADSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMN SLRPEDTAVYYCNADHPQGYWGQGT TTVTVSS

[0116] >第二链 (SEQ ID NO:14)

[0117] DIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVL IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0118] 双特异性抗体的蛋白浓度的测定仪器:紫外可见分光光度计,型号:Nano Drop
oneC,光程为1mm。

[0119] 实施例1.pH和缓冲体系的筛选

[0120] 制备含表3所示的缓冲体系、120mg/mL双特异性抗体、70mg/mL蔗糖、0.6mg/mL聚山
梨酯80 (PS80) 的制剂。对样品进行加速稳定性研究 (25℃放置50天),以SEC为评价指标,考
察不同缓冲体系对蛋白稳定性的影响。SEC数据显示,25℃放置50天后,含His-HCl (pH 6.5)
的制剂的单体纯度优于其他组。

[0121] 表3.pH和缓冲体系的筛选

组别	缓冲体系	放置条件	△SEC%
[0122]	1	20 mM AA pH 5.0	5.4
	2	20 mM AA pH 5.5	3.6
	3	20 mM His-AA pH 5.5	4.2
	4	20 mM CA pH 5.5	8.9
	5	20 mM SA pH 5.5	7.1
	6	20 mM His-HCl pH 5.5	4.8
	7	20 mM His-HCl pH 6.0	3.8
	8	20 mM His-HCl pH 6.5	2.4
	9	20 mM PB pH 6.5	3.3

[0123] 注:AA代表醋酸-醋酸钠盐;His-AA代表组氨酸-醋酸组氨酸;CA代表枸橼酸-枸橼
酸钠盐;SA代表琥珀酸-琥珀酸钠盐;His-HCl代表组氨酸-盐酸组氨酸;PB代表磷酸氢二钠-
磷酸二氢钠盐;25℃ D50:25℃放置50天。

[0124] 制备含表4所示的缓冲体系、120mg/mL双特异性抗体、80mg/mL蔗糖、0.8mg/mL泊洛
沙姆188 (PF68) 的制剂。对样品进行加速稳定性研究 (40℃放置一个月),以SEC和IEC为评价

指标,考察不同缓冲体系对蛋白稳定性的影响。SEC数据之间没有明显差异,IEC数据显示,His-HCl (pH 6.5)的制剂的单体纯度优于His-HCl (pH 7.0)。

[0125] 表4.pH的筛选

组别	缓冲体系	放置条件	Δ SEC%	Δ IEC%	
[0126]	1	20 mM His-HCl pH 6.5	40°C M1	21.6	33.0
	2	20 mM His-HCl pH 7.0		20.5	40.9

[0127] 注:40°C M1:40°C放置一个月。

[0128] 实施例2.糖和稳定剂的筛选

[0129] 制备含20mM His-HCl缓冲液 (pH 6.5)、120mg/mL双特异性抗体、表5所示的不同种类和浓度的稳定剂、不同浓度蔗糖和0.8mg/mL PF68的制剂,对样品进行强制降解研究(40°C放置1个月),以SEC为评价指标,考察不同辅料对蛋白稳定性的影响。数据显示,40°C放置一个月后,Gly、Pro、MSG、EDTA-2Na没有稳定双特异性抗体的效果,而含Arg-HCl和含Met的制剂的单体纯度优于对照组;且含Met的制剂较含Arg-HCl的制剂具有更好的澄明度。

[0130] 表5.辅料筛选结果

组别	稳定剂及其浓度	蔗糖浓度	放置条件	外观	Δ SEC%
[0131]	1	N/A	40°C M1	澄明	21.8
	2	100 mM Gly		澄明	24.5
	3	100 mM Pro		澄明	22.6
	4	100 mM Arg-HCl		微乳光	19.4
	5	50 mM MSG		微乳光	23.9
	6	0.02 mg/ml EDTA-2Na		澄明	25.7
	7	10 mM Met		澄明	18.9

[0132] 注:甘氨酸(Gly);脯氨酸(Pro);精氨酸盐酸盐(Arg-HCl);谷氨酸钠(MSG);乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na);甲硫氨酸(Met)。

[0133] 实施例3.表面活性剂的筛选

[0134] 制备含20mM His-HCl缓冲液 (pH 6.5)、100mg/mL双特异性抗体、67mg/mL蔗糖、10mM Met、表6所示表面活性剂的制剂。对样品进行强制降解研究(25°C,300rpm振摇7天),以SEC和IEC为评价指标,考察不同表面活性剂对蛋白稳定性的影响。数据显示,振摇7天后,含PF68的制剂的纯度优于含PS80的制剂。

[0135] 表6.表面活性剂筛选结果

组别	表面活性剂及其浓度	放置条件	外观	Δ SEC%	Δ IEC%
[0136]	1	振摇 D7	澄明	0.5	1.5
	2		澄明	0.5	2.5
	3		澄明	0.5	2.9
	4		澄明	20.3	17.7
	5		乳光	6.4	4.3

[0137] 实施例4.蛋白浓度的筛选

[0138] 制备含20mM His-HCl缓冲液(pH 6.5)、80mg/mL蔗糖、0.8mg/mL PF68、表7所示的双特异性抗体浓度的制剂。对样品进行加速稳定性研究(25℃放置3个月),以SEC和IEC为评价指标,考察不同表面活性剂对蛋白稳定性的影响。数据显示,25℃放置三个月后,含100mg/mL蛋白的制剂的纯度略优于含120mg/mL蛋白的制剂,且具有更好的澄明度。

[0139] 表7. 蛋白浓度筛选筛选结果

	组别	蛋白浓度 (mg/mL)	放置条件	外观	ΔSEC%	ΔIEC%
[0140]	1	100	25℃ M3	澄明	5.5	14.9
	2	120		乳光	6.1	16.1

[0141] 注:25℃ M3:25℃放置三个月

[0142] 实施例5. 处方的确认

[0143] 制备含20mM His-HCl缓冲液(pH 6.5)、80mg/mL蔗糖、10mM Met、0.8mg/mL PF68、100mg/mL双特异性抗体的制剂。对样品进行长期稳定性研究,以SEC和NR-CE为评价指标,考察长期稳定性。结果见表8。SEC和NR-CE数据显示,4℃放置三个月,蛋白有良好的稳定性。

[0144] 表8. 长期稳定性结果

	组别	放置条件	外观	SEC%	NR-CE%
[0145]	1	D0	澄明	99.7	96.8
		4℃ M3	澄明	99.5	96.3

[0146] 对样品进行强制降解研究(40℃放置1个月),以SEC为评价指标,考察稳定性。结果见表9,组1的处方具有良好的高温稳定性。

[0147] 表9. 处方对比结果

	组别	放置条件	外观	Δ SEC%
[0148]	1	40℃M1	澄明	11.0