



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117942409 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 30

(21) 申请号	202311417926.6	C07K 16/28 (2006.01)
(22) 申请日	2023.10.27	A61K 47/54 (2017.01)
(66) 本国优先权数据		A61K 47/60 (2017.01)
	202211341423.0 2022.10.28 CN	A61K 9/08 (2006.01)
(71) 申请人	江苏迈威康新药研发有限公司	A61K 9/107 (2006.01)
地址	225300 江苏省泰州市中国医药城药城大道1号国家新药创制基地三楼	A61K 9/10 (2006.01)
申请人	迈威(上海)生物科技股份有限公司	A61K 47/02 (2006.01)
(72) 发明人	陈坤 吴伶俐 季荣钰 梅菲 谭小钉	A61K 47/26 (2006.01)
(74) 专利代理机构	北京瑞恒信达知识产权代理事务所(普通合伙) 11382	A61K 9/19 (2006.01)
专利代理师	张伟	A61P 35/00 (2006.01)
(51) Int. Cl.	A61K 47/68 (2017.01)	

权利要求书4页 说明书20页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种包含抗Nectin-4抗体药物偶联物的制剂及其应用

(57) 摘要

本发明提供了提供一种含抗Nectin-4抗体药物偶联物(ADC)的制剂及其应用,所述制剂包含抗体药物偶联物(ADC)、缓冲剂和辅料。所述制剂中的抗Nectin-4抗体药物偶联物稳定存在,长期储存后蛋白不聚集,小分子药物不易脱落,且制剂的渗透压接近等渗,有助于Nectin-4相关疾病的靶向治疗。

1. 一种液体制剂,其包含抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐,以及缓冲剂和辅料;其特征在于,所述抗体药物偶联物或其盐具有分子式 $Ab-[L-CTD]_m$,其中:

Ab表示所述抗Nectin-4的抗体或其片段,所述抗Nectin-4抗体或其片段包含三个重链CDR序列即H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3,和三个轻链CDR序列即L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3,其中:所述H-CDR1包含SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列(DYGVS),所述H-CDR2包含SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列(VIWGGGKIYYNSVLKS),所述H-CDR3包含SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列(QGGLLFYAMDY);和,所述L-CDR1包含SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列(KSSQSLLNTYSQKNYLA),所述L-CDR2包含SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列(FASTRES),所述L-CDR3包含SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列(QQHYNTPFPT);

L表示接头;

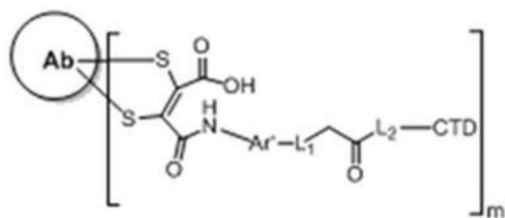
CTD表示药物;

m表示相对于每一分子Ab的药物平均连接数(平均DAR)。

2. 根据权利要求1所述的液体制剂,其特征在于,在所述抗体药物偶联物或其盐中,CTD为细胞毒药物;优选地,CTD为选自以下的一种或多种:微管抑制剂类MMAE、DM1、DM4、Tublysin、鹅膏蕈碱、卡奇霉素、艾日布林及所述药物的衍生物;拓扑异构酶抑制剂类SN38、依喜替康及所述药物的衍生物;以及DNA结合剂PBD、多柔比星及所述药物的衍生物;

m为1.0-5.0,优选为3.0-4.2,更优选为3.5-4.5,进一步优选为3.8-4.2,又优选为3.9-4.1,特别优选为4.0。

3. 根据权利要求1或2所述的液体制剂,其特征在于,所述抗体药物偶联物或其盐具有如下式I所示的结构:



I

其中,

Ab是所述抗Nectin-4的抗体或其片段;

Ar' 为选自如下的任一个:取代或未取代的C6-C10亚芳基和取代或未取代的5-12元亚杂芳基,其中所述取代指基团上的氢原子被一个或多个取代基所取代,所述取代基选自如下的任一个:卤素(F、Cl、Br或I)、卤代烷基(例如卤代C1-C6烷基、优选卤代C1-C4烷基,例如三氟甲基)和烷氧基(例如C1-C6烷氧基、优选C1-C4烷氧基,例如甲氧基);

L₁为连接于Ar'基团上的-O(CH₂CH₂O)_n-,其中n选自1-24中任一整数,优选为1-10、更优选3-5中的任意整数;

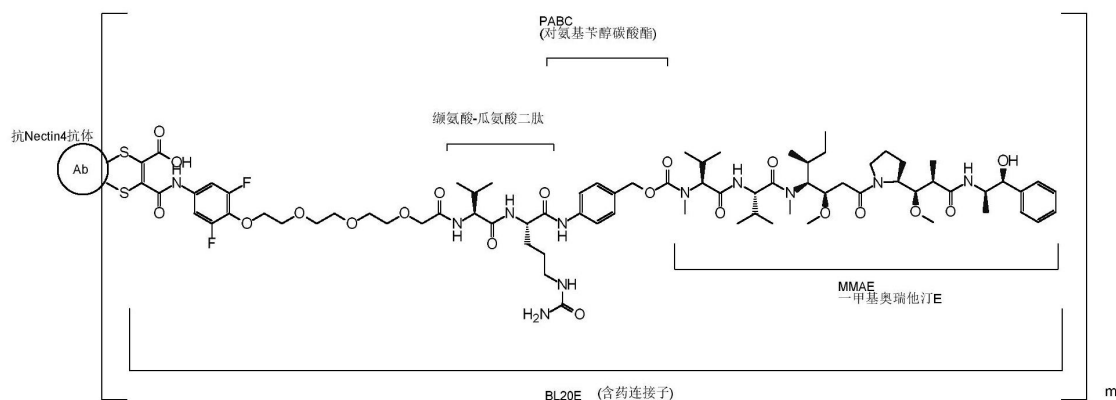
L₂为酶切片段,选自二肽或三肽或四肽或其与自释放结构片段的组合,如Val-Ala、Val-Ala-PAB、Val-Cit、Val-Cit-PAB、Phe-Lys-PAB、Ala-Ala-Ala、Gly-Gly-Phe-Gly(GGFG)、MAC glucuronide phenol;

优选地,L₂-CTD为VcMMAE、GGFG-Dxd或VC-seco-DUBA;

优选地,在Ar'取代或未取代的5-12元亚杂芳基时,杂原子为N;

优选地,Ar'为取代或未取代的C6亚芳基或取代或未取代的6元亚杂芳基。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的液体制剂,其特征在于,所述抗体药物偶联物或其盐具有如下结构:



5. 根据权利要求1至4中任一项所述的液体制剂,其特征在于,所述抗Nectin-4抗体或其片段包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列或其变体;和,所述抗Nectin-4抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列或其变体;

优选地,所述抗Nectin-4抗体或其片段包含抗体的重链(HC)和轻链(LC),所述重链包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或其变体;和,所述轻链包含SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列或其变体。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的液体制剂,其特征在于,所述液体制剂为溶液、乳液或悬浮液的形式;

优选地,所述液体制剂为经肠胃外施用的液体制剂;

优选地,所述液体制剂为静脉内施用的液体制剂,例如用于静脉滴注。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的液体制剂,其特征在于,在所述液体制剂中,所述缓冲液为选自磷酸盐缓冲剂、醋酸缓冲剂和Tris-HCl缓冲剂中的一种或多种;优选地,磷酸盐缓冲剂包含磷酸二氢钠/磷酸氢二钠混合物;优选地,醋酸缓冲液包含醋酸/醋酸钠混合物;

优选地,所述液体制剂还包含辅料;

优选地,所述辅料包含糖,优选为海藻糖;

优选地,所述辅料包含表面活性剂,优选为聚山梨酯20或聚山梨酯80;

优选地,所述液体制剂的pH为5.0-8.0,优选7.0-8.0,更优选7.0-7.8,例如7.2、7.4、7.6、7.8。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的液体制剂,其特征在于,所述液体制剂包含浓度为5-40mg/mL、优选8-30mg/mL、更优选10-20mg/mL的所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

优选地,所述液体制剂包含所述磷酸盐缓冲剂作为缓冲体系;优选地,所述液体制剂包含浓度为5-20mmol/L、优选8-15mmol/L、更优选8-10mmol/L的所述磷酸盐缓冲剂;

优选地,所述液体制剂包含海藻糖;优选地,所述液体制剂包含浓度为5%-9% (w/v)、

优选6% - 8% (w/v)、更优选7% (w/v) 的海藻糖;

优选地,所述液体制剂包含聚山梨酯20或聚山梨酯80,例如0.0003% - 0.3% (w/v) 的聚山梨酯20或聚山梨酯80;优选地,所述液体制剂包含浓度为0.0003% - 0.3% (w/v)、优选0.01% - 0.03% (w/v)、更优选0.02% - 0.03% (w/v) 的聚山梨酯20。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的液体制剂,其特征在于,所述液体制剂包含:

5-40mg/mL所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

5-20mmol/L所述磷酸盐缓冲剂;

5% - 9% (w/v) 所述糖,例如海藻糖;以及

0.0003% - 0.3% (w/v) 所述表面活性剂,例如聚山梨酯20,

并且,所述液体制剂的pH为5.0-8.0;

或者,所述液体制剂包含:

8-30mg/mL所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

5-20mmol/L所述磷酸盐缓冲剂;

6% - 9% (w/v) 所述糖,例如海藻糖;以及

0.01% - 0.03% (w/v) 所述表面活性剂,例如聚山梨酯20,

并且,所述液体制剂的pH为7.0-8.0,例如7.2-7.8;

或者,所述液体制剂包含:

10-30mg/mL所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

8-15mmol/L所述磷酸盐缓冲剂;

6% - 8% (w/v) 所述糖,例如海藻糖;以及

0.02% - 0.03% (w/v) 所述表面活性剂,例如聚山梨酯20,

并且,所述液体制剂的pH为7.2-7.8;

或者,所述液体制剂包含:

10-20mg/mL所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

8-10mmol/L所述磷酸盐缓冲剂;

6% - 8% (w/v) 所述糖,例如海藻糖;以及

0.02% - 0.03% (w/v) 所述表面活性剂,例如聚山梨酯20,

并且,所述液体制剂的pH为7.2-7.6;

或者,所述液体制剂包含:

10mg/mL所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

10mmol/L所述磷酸盐缓冲剂;

7% 海藻糖;

0.02% 聚山梨酯20;

并且,所述液体制剂的pH为7.4。

10. 一种固体制剂,所述固体制剂通过固化权利要求1至9中任一项所述的液体制剂而得到;

优选地,所述固体制剂为冻干制剂,例如冻干粉针剂。

11. 根据权利要求10所述的固体制剂,其特征在于,所述冻干制剂的含水量不大于3.0%,优选地不大于1.5%,更优选地不大于1.0%。

12.一种重构制剂,所述重构制剂通过用溶剂溶解根据权利要求10或11的固体制剂而得到。

13.权利要求1至12中任一项所述的制剂在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

14.一种试剂盒,其包括权利要求1至12中任一项所述的制剂,或由所述制剂进一步配制得到的制剂。

一种包含抗Nectin-4抗体药物偶联物的制剂及其应用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2022年10月28日提交的申请号为CN202211341423.0的中国发明专利申请的优先权权益,在此将其全部内容引入作为参考。

技术领域

[0003] 本发明属于生物制剂领域,具体而言,本发明涉及一种含抗体药物偶联物的制剂。

背景技术

[0004] 抗体药物偶联物(Antibody-Drug Conjugate, ADC)是由抗体或抗体类配体、小分子药物以及将该配体与药物偶联起来的连接子共同组成的一种新型肿瘤治疗药物,其结合了小分子药物的抗肿瘤活性和抗体或抗体类配体的高选择性,是目前肿瘤治疗领域的关注热点。

[0005] Nectins(脊髓灰质炎病毒受体样分子)是一类新颖的细胞粘附蛋白,与钙粘蛋白共同或单独调节细胞连接,家族成员包括Nectin-1、-2、-3、-4,它们都由具有3个Ig的环状结构、1个跨膜区、胞质尾区组成。在这些成员中,Nectin-4特异性表达于胚胎、胎盘以及肿瘤细胞中,已有研究发现其与多种肿瘤细胞的发生、发展有着密切联系。例如,对2394例肿瘤患者进行病理切片分析,发现Nectin-4广泛表达于膀胱癌、乳腺癌以及胰腺癌患者人群中。因此,Nectin-4已成为许多肿瘤或癌症的诊断和治疗的一个重要靶点。

[0006] 已经制备了抗Nectin-4抗体药物偶联物,即将抗Nectin-4抗体经由连接子与小分子药物化学交联形成ADC。利用抗体对Nectin-4表达细胞的靶向性和经由靶点的强的内吞效应,结合小分子药物的作用,能够达到优异的肿瘤杀伤效果。

[0007] ADC在液体制剂中稳定性较差,例如,在储存过程中会出现小分子脱落和聚集体增加的现象,因此通常将其优先制成冻干制剂。但是,无论是液体制剂还是冻干制剂,都需要为所含ADC药物提供一种使其稳定存在的制剂组成。

发明内容

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种特定组成的包含抗Nectin-4抗体药物偶联物的制剂。

[0009] 本发明的技术方案如下。

[0010] 一方面,本发明提供一种液体制剂,其包含抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐,以及缓冲剂和辅料。

[0011] 在本发明提供的液体制剂中,本发明的抗体药物偶联物或其盐可通过中国专利申请CN202210475286.3中所记载的方法获得;结构证明与性质表征均可参见中国专利申请CN202210475286.3。

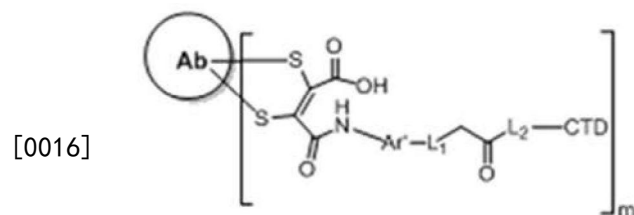
[0012] 具体而言,所述抗体药物偶联物或其盐具有分子式 $Ab-[L-CTD]_m$,其中Ab表示所述抗Nectin-4的抗体或其片段,L表示接头,CTD表示药物,m表示相对于每一分子Ab的药物平

均连接数(平均DAR)。

[0013] 优选地,在所述抗体药物偶联物或其盐中,CTD为细胞毒药物;优选地,CTD为选自以下的一种或多种:微管抑制剂类MMAE、DM1、DM4、Tublysin、鹅膏蕈碱、卡奇霉素、艾日布林及所述药物的衍生物;拓扑异构酶抑制剂类SN38、依喜替康及所述药物的衍生物;以及DNA结合剂PBD、多柔比星及所述药物的衍生物。

[0014] m为1.0-5.0,优选为3.0-4.2,更优选为3.5-4.5,进一步优选为3.8-4.2,又优选为3.9-4.1,特别优选为4.0。

[0015] 在本发明提供的液体制剂中,所述抗体药物偶联物或其盐具有如下式I所示的结构:



I

[0017] 其中,

[0018] Ab是抗Nectin-4的抗体或其片段;

[0019] Ar' 为选自如下的任一个:取代或未取代的C6-C10亚芳基和取代或未取代的5-12元亚杂芳基,其中所述取代指基团上的氢原子被一个或多个取代基所取代,所述取代基选自如下的任一个:卤素(F、Cl、Br或I)、卤代烷基(例如卤代C1-C6烷基、优选卤代C1-C4烷基,例如三氟甲基)和烷氧基(例如C1-C6烷氧基、优选C1-C4烷氧基,例如甲氧基);

[0020] L₁为连接于Ar' 基团上的-O(CH₂CH₂O)_n-,其中n选自1-24中任一整数,优选为1-10、更优选3-5中的任意整数;

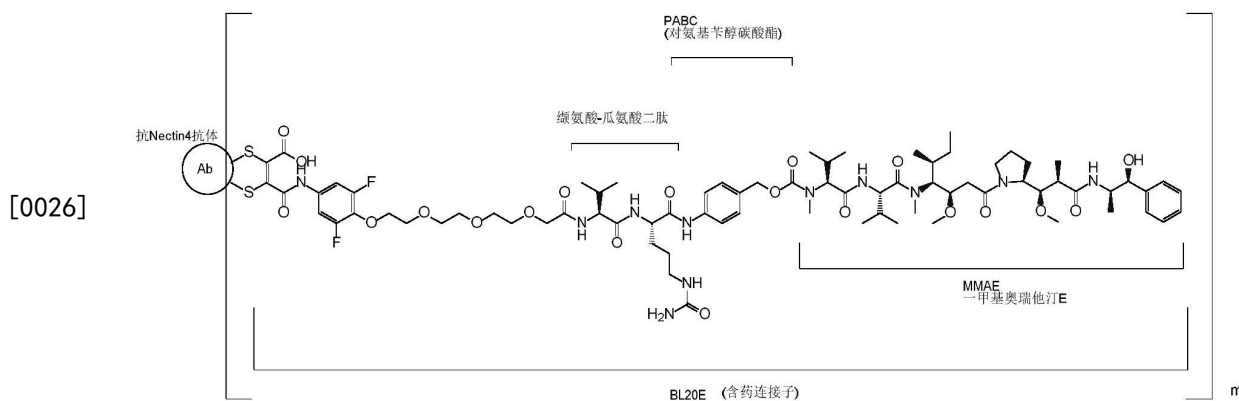
[0021] L₂为酶切片段,如二肽或三肽或四肽或与其与自释放结构片段的组合(即2-4个氨基酸组成的多肽片段或与其与自释放结构片段的组合),如Val-Ala、Val-Ala-PAB、Val-Cit、Val-Cit-PAB、Phe-Lys-PAB、Ala-Ala-Ala、Gly-Gly-Phe-Gly(GGFG)、MAC glucuronide phenol。

[0022] 优选地,L₂-CTD为VcMMAE、GGFG-Dxd或VC-seco-DUBA。

[0023] 优选地,在Ar' 取代或未取代的5-12元亚杂芳基时,杂原子为N。

[0024] 优选地,Ar' 为取代或未取代的C6亚芳基或取代或未取代的6元亚杂芳基。

[0025] 根据本发明的具体实施方式,所述抗体药物偶联物或其盐具有如下结构:



[0027] 优选地,所示结构的ADC的平均DAR为3.8-4.2,又优选为3.9-4.1,特别优选为4.0。

[0028] 在根据本发明的液体制剂中,所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐包含抗Nectin-4抗体或其片段,即如上所示结构中的“Ab”。所述抗体的片段涵盖抗体的各种功能性片段,例如其抗原结合部分,如Fab、F(ab')₂或scFv片段。

[0029] 具体而言,所述抗Nectin-4抗体或其片段包含三个重链CDR序列,即H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3和三个轻链CDR序列,即L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3,其中:

[0030] 所述H-CDR1包含SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列(DYGVS),所述H-CDR2包含SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列(VIWGGKIYYNSVLKS),所述H-CDR3包含SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列(QGGLLFYAMDY);和,所述L-CDR1包含SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列(KSSQSLLNTYSQKNYLA),所述L-CDR2包含SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列(FASTRES),所述L-CDR3包含SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列(QQHYNTPTF)。

[0031] 优选地,所述抗Nectin-4抗体或其片段包含重链可变区(VH),所述重链可变区包含SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列或其变体;和,所述抗Nectin-4抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列或其变体。

[0032] 本发明的上下文中,“氨基酸序列的变体”是指与所述氨基酸序列具有至少75%序列同一性(例如至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、进一步优选至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或甚至99%同一性等≥75%的任何百分比的同一性)的氨基酸序列。

[0033] 特别地,本发明中所限定的抗Nectin-4的抗体或其片段至少包含重链可变区和轻链可变区,二者均包括上述CDR以及间隔的框架区(framework region,FR),各个结构域的排列方式为:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。因此,就本发明抗Nectin-4的抗体或其片段所包含的重链可变区和轻链可变区而言,所述“至少75%序列同一性”导致的氨基酸序列的至多25%差异可存在于重链可变区或轻链可变区中的任意框架区中。或者,就本发明抗Nectin-4的抗体或其片段的整体而言,所述至多25%差异可存在于本发明的抗体或其片段中重链可变区和轻链可变区以外的任意结构域或序列中。所述差异可以由任何位置的氨基酸缺失、添加或置换产生,其中置换可以是保守置换或非保守置换。

[0034] 在本发明所限定的抗体药物偶联物或其盐中,所述抗Nectin-4的抗体或其片段可以为针对Nectin-4的单克隆抗体、单链抗体、双功能抗体、单域抗体、纳米抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体等任意形式,或者,所述抗体或其片段为针对Nectin-4的半抗体或半抗体的抗原结合片段,例如单链可变片段(single-chain variable fragment,

scFv)、二价单链可变片段(bivalent single-chain variable fragment, BsFv)、二硫键稳定的可变片段(disulfide-stabilized variable fragment, dsFv)、(二硫键稳定的可变片段)2((dsFv)2)、抗原结合片段(antigen-binding fragment, Fab)、Fab'片段(Fab')、(Fab'片段)2(F(ab')2)或可变片段(variable fragment, Fv)。关于本发明提供的抗体的片段,优选地,所述片段为抗体的能够特异性结合Nectin-4的任何片段。并且,所述Nectin-4为哺乳动物Nectin-4,优选灵长类动物Nectin-4,更优选人Nectin-4。

[0035] 优选地,在本发明所限定的抗体药物偶联物或其盐中,所述抗Nectin-4的抗体或其片段还可以包含恒定区。优选地,所述抗Nectin-4的抗体或其片段还包含人或鼠的重链恒定区(CH)和/或轻链恒定区(CL),更优选地包含选自IgG、IgA、IgM、IgD或IgE的重链恒定区和/或 κ 或 λ 型轻链恒定区。

[0036] 优选地,所述抗体为单克隆抗体,优选为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体;更优选地,所述单克隆抗体的重链恒定区为IgG1或IgG4亚型,轻链恒定区为 κ 型。或者,例如,所述抗体为免疫球蛋白,具体为IgA、IgD、IgE、IgG或IgM,例如IgA、IgD、IgE、IgG或IgM的人亚型,更优选为人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型。

[0037] 根据本发明的具体实施方式,所述抗体药物偶联物或其盐中的抗Nectin-4抗体或其片段包含抗体的重链(HC)和轻链(LC),所述重链包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或其变体;和,所述轻链包含SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列或其变体。

[0038] 在本发明的上下文中,所述抗Nectin-4抗体药物偶联物的“盐”是指其药学上可接受的盐,例如无机盐或有机盐,比如钠盐。

[0039] 根据本发明的制剂可以为液体制剂,例如为溶液、乳液或悬浮液的形式,例如在水中和/或所述缓冲剂中。优选地,所述液体制剂为经肠胃外施用的液体制剂。肠胃外施用可以为静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内、胸骨内施用。优选地,所述液体制剂为静脉内施用的液体制剂,例如用于静脉滴注。

[0040] 在根据本发明的液体制剂中,所述缓冲剂为选自磷酸盐缓冲剂、醋酸缓冲剂和Tris-HCl缓冲剂中的一种或多种。优选地,磷酸盐缓冲剂包含磷酸二氢钠/磷酸氢二钠混合物。优选地,醋酸缓冲剂包含醋酸/醋酸钠混合物。

[0041] 根据本发明的液体制剂还包含辅料,所述辅料可发挥赋形剂、渗透压调节剂、蛋白保护剂、助溶剂等作用。

[0042] 优选地,所述辅料包含表面活性剂。优选地,所述表面活性剂为聚山梨酯20或聚山梨酯80。

[0043] 优选地,所述辅料包含糖,优选海藻糖。任选地,所述辅料包含精氨酸。

[0044] 根据本发明的液体制剂的pH为5.0-8.0,优选7.0-8.0,更优选7.0-7.8,例如7.2、7.4、7.6、7.8。

[0045] 优选地,根据本发明的液体制剂包含浓度为5-40mg/mL、优选8-30mg/mL、更优选10-20mg/mL(例如10、15、20mg/mL)的所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐。

[0046] 优选地,根据本发明的液体制剂包含所述磷酸盐缓冲剂作为缓冲体系。优选地,所述液体制剂包含浓度为5-20mmol/L、优选8-15mmol/L、更优选8-10mmol/L的所述磷酸盐缓冲剂。

[0047] 优选地,根据本发明的液体制剂包含海藻糖。优选地,所述液体制剂包含浓度为5%-9% (w/v)、优选6%-8% (w/v)、更优选7% (w/v) 的海藻糖。

[0048] 优选地,根据本发明的液体制剂包含聚山梨酯20或聚山梨酯80作为表面活性剂,例如0.0003%-0.3% (w/v) 的聚山梨酯20或聚山梨酯80。优选地,所述液体制剂包含浓度为0.0003%-0.3% (w/v)、优选0.01%-0.03% (w/v)、更优选0.02%-0.03% (w/v) 的聚山梨酯20。

[0049] 本发明中,“w/v”是指以重量(mg)/体积(L)计。

[0050] 进一步优选地,本发明提供一种制剂,例如液体制剂,其包含:

[0051] 5-40mg/mL所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

[0052] 5-20mmol/L所述磷酸盐缓冲剂;

[0053] 5%-9% (w/v) 所述糖,例如海藻糖;以及

[0054] 0.0003%-0.3% (w/v) 所述表面活性剂,例如聚山梨酯20,

[0055] 并且,所述液体制剂的pH为5.0-8.0。

[0056] 进一步优选地,本发明提供一种制剂,例如液体制剂,其包含:

[0057] 8-30mg/mL所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

[0058] 5-20mmol/L所述磷酸盐缓冲剂;

[0059] 6%-9% (w/v) 所述糖,例如海藻糖;以及

[0060] 0.01%-0.03% (w/v) 所述表面活性剂,例如聚山梨酯20,

[0061] 并且,所述液体制剂的pH为7.0-8.0,例如7.2-7.8。

[0062] 进一步优选地,本发明提供一种制剂,例如液体制剂,其包含:

[0063] 10-30mg/mL所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

[0064] 8-15mmol/L所述磷酸盐缓冲剂;

[0065] 6%-8% (w/v) 所述糖,例如海藻糖;以及

[0066] 0.02%-0.03% (w/v) 所述表面活性剂,例如聚山梨酯20,

[0067] 并且,所述液体制剂的pH为7.2-7.8。

[0068] 进一步优选地,本发明提供一种制剂,例如液体制剂,其包含:

[0069] 10-20mg/mL所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

[0070] 8-10mmol/L所述磷酸盐缓冲剂;

[0071] 6%-8% (w/v) 所述糖,例如海藻糖;以及

[0072] 0.02%-0.03% (w/v) 所述表面活性剂,例如聚山梨酯20,

[0073] 并且,所述液体制剂的pH为7.2-7.6。

[0074] 根据本发明的具体实施方式,本发明提供一种制剂,例如液体制剂,其包含:

[0075] 10mg/mL所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

[0076] 10mmol/L所述磷酸盐缓冲剂;

[0077] 7%海藻糖;

[0078] 0.02%聚山梨酯20;

[0079] 并且,所述液体制剂的pH为7.4。

[0080] 根据本发明的制剂可以是一种固体制剂,其通过固化本发明的液体制剂而得到。优选地,所述固体制剂为冻干制剂,例如冻干粉针剂。

[0081] 根据本发明的具体实施方式,所述固体制剂为冻干制剂,所述冻干制剂的含水量不大于3.0%,优选地不大于1.5%,更优选地不大于1.0%。

[0082] 将本发明提供的冻干制剂在溶剂(例如药学上可接受的溶剂,例如注射用水)中重构时其包含:

[0083] 5-40mg/mL、优选8-30mg/mL、更优选10-20mg/mL(例如10、15、20mg/mL)的所述抗Nectin-4抗体药物偶联物或其盐;

[0084] 浓度为5-20mmol/L、优选8-15mmol/L、更优选8-10mmol/L的所述磷酸盐缓冲剂;

[0085] 浓度为5%-9%(w/v)、优选6%-8%(w/v)、更优选7%(w/v)的海藻糖;和/或

[0086] 浓度为0.0003%-0.3%(w/v)、优选0.01%-0.03%(w/v)、更优选0.02%-0.03%(w/v)的聚山梨酯20。

[0087] 将本发明提供的冻干制剂在药学上可接受的溶剂、例如注射用水中重构时pH为5.0-8.0,优选7.0-8.0,更优选7.0-7.8,例如7.2、7.4、7.6、7.8。

[0088] 或者,将本发明提供的冻干制剂在溶剂(例如药学上可接受的溶剂,例如注射用水)中重构时能够得到本发明的液体制剂。

[0089] 本发明提供的冻干制剂可通过将根据本发明的液体制剂冷冻干燥得到。

[0090] 优选地,所述冻干制剂由包括以下步骤的方法制得:

[0091] (1) 将所述液体制剂在 $\leq -40^{\circ}\text{C}$ 下预冻 $\geq 2\text{h}$;

[0092] (2) 将预冻产物升温至 $-20^{\circ}\text{C} \sim -35^{\circ}\text{C}$,退火 $\geq 2\text{h}$;

[0093] (3) 将退火产物降温至 $\leq -40^{\circ}\text{C}$,再次预冻 $\geq 2\text{h}$;

[0094] (4) 将预冻产物升温至 $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$,在 $\leq 0.2\text{mbar}$ 的压力下,干燥 $\geq 24\text{h}$;

[0095] (5) 将干燥产物升温至 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$,在 $\leq 0.2\text{mbar}$ 的压力下,干燥 $\geq 10\text{h}$ 。

[0096] 优选地,所述方法在冻干机中进行,所述温度为冻干机的板层温度。

[0097] 根据本发明的制剂还可以是一种重构制剂,其通过用溶剂(药学上可接受的溶剂,例如注射用水)溶解根据本发明的固体制剂而得到。优选地,所述药学上可接受的溶剂为水(例如注射用水)或等渗溶液(例如0.9%NaCl溶液和5%葡萄糖溶液)。

[0098] 另一方面,本发明提供根据本发明的制剂(包括液体制剂、固体制剂或重构制剂)在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。所述药物可以用于经肠胃外施用所述制剂,或用于经肠胃外施用由所述制剂进一步配制得到的制剂。肠胃外施用可以为静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内、胸骨内施用。优选地,所述药物可以用于静脉内施用(例如静脉滴注)所述制剂,或用于静脉内施用(例如静脉滴注)由所述制剂进一步配制得到的制剂。

[0099] 或者,本发明提供一种用于治疗肿瘤的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用(例如治疗有效量的)根据本发明的制剂(包括液体制剂、固体制剂或重构制剂),或施用由所述制剂进一步配制得到的制剂。所述施用可以经肠胃外施用。肠胃外施用可以为静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内、胸骨内施用。优选地,所述施用为静脉内施用,例如静脉滴注。

[0100] 所述受试者为哺乳类动物,优选地为灵长类动物,更优选为人。

[0101] 优选地,所述肿瘤为与Nectin-4高表达相关的肿瘤或癌症。更优选地,所述肿瘤或癌症为选自如下的任一种:膀胱癌,乳腺癌,卵巢癌,胰腺癌,肝细胞癌,胃癌,非霍奇金淋巴

瘤,霍奇金淋巴瘤,急性淋巴细胞性白血病,间变性大细胞淋巴瘤,多发性骨髓瘤,前列腺癌,非小细胞肺癌,小细胞肺癌,恶性黑色素瘤,鳞状细胞癌,胶质母细胞瘤,肾细胞癌,胃肠道肿瘤,前列腺癌,直肠癌,神经胶质瘤,间皮瘤。

[0102] 本发明还提供一种试剂盒,其包括根据本发明的制剂(包括液体制剂、固体制剂或重构制剂),或由所述制剂进一步配制得到的制剂。所述试剂盒可以用于如上所述地施用所述制剂,或所述进一步配制得到的制剂。任选地,所述试剂盒还可包括用于如上所述施用的其他试剂或装置,例如水、等渗溶液、注射器等中的一种或多种。

[0103] 相对于现有技术,本发明提供了一种包含新型抗Nectin-4抗体药物偶联物的制剂。所述制剂中的抗Nectin-4抗体药物偶联物稳定存在,长期储存后蛋白不聚集,小分子药物不易脱落,且制剂的渗透压接近等渗,有助于Nectin-4相关疾病的靶向治疗。

附图说明

[0104] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0105] 图1A显示了第一轮筛选实验中不同pH时的制剂HIC主峰变化;

[0106] 图1B显示了第一轮筛选实验中不同pH时的制剂SEC主峰变化;

[0107] 图2A显示了第二轮筛选实验中不同pH和不同缓冲液时的制剂HIC主峰变化;

[0108] 图2B显示了第二轮筛选实验中不同pH和不同ADC浓度时的制剂HIC主峰变化;

[0109] 图2C显示了第二轮筛选实验中不同pH和不同ADC浓度时的制剂SEC主峰变化;

[0110] 图3A显示了第三轮筛选实验中不同浓度海藻糖时的制剂HIC主峰变化;

[0111] 图3B显示了第三轮筛选实验中不同ADC浓度和不同吐温时的制剂HIC主峰变化;

[0112] 图3C显示了第三轮筛选实验中不同种类和浓度辅料时的制剂SEC主峰变化。

[0113] 图4显示了本发明的冻干工艺确认曲线。

具体实施方式

[0114] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0115] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的原料、试剂材料等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

[0116] 本发明中涉及以下检测方法。

[0117] (一) SEC-HPLC检测

[0118] 高效液相色谱仪:Waters;

[0119] 色谱柱:TOSOH TSKgel G3000SWXL;

[0120] 流动相:100mmol/L磷酸盐(PB)+200mmol/L L-盐酸精氨酸,5%异丙醇(pH 6.8);

[0121] 样品制备与分析:用流动相将供试品稀释至约1.0mg/ml,12000rpm离心10min,取上清进行分析;

[0122] 分析条件:流速:0.6ml/min;柱温:30℃;检测波长:280nm。

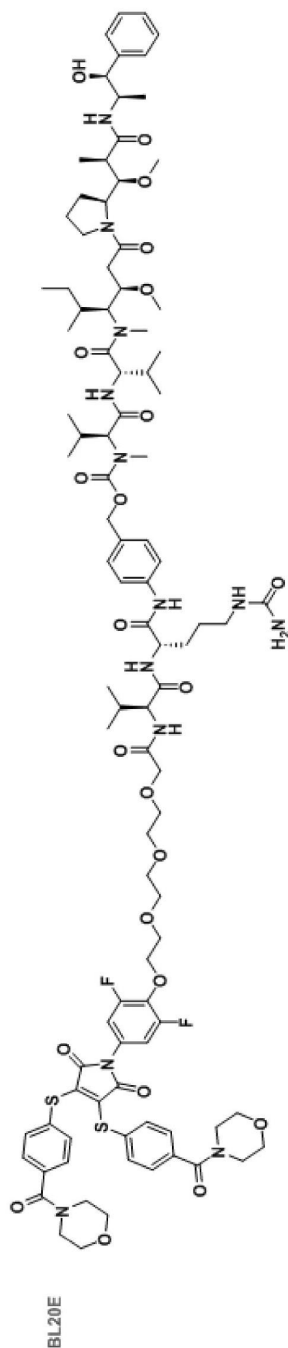
[0123] 系统适用性测试:取工作参考品进样20μL按分析条件进行分析,单体峰理论塔板数为:不小于5000。

[0124] (二) RP-HPLC检测

- [0125] 高效液相色谱仪:Waters;
- [0126] 色谱柱:Waters Acquity UPLC BEH-C18色谱柱 (1.7 μ m 2.1*50mm);
- [0127] 流动相A:0.1%磷酸水溶液;
- [0128] 流动相B:0.1%磷酸乙腈溶液;
- [0129] 空白稀释液:DMSO、纯化水和乙腈以1:1:2的体积比混合得到。
- [0130] 标准品制备:将小分子化合物MMAE、L20E、BL20E作为游离小分子药物含量检测的标准品。
- [0131] 精密称取MMAE、L20E、BL20E对照品各10mg,用已腈定容至100ml,作为游离小分子混合标准储备液。取400 μ L上述溶液加100 μ L流动相A混匀,再加3.5ml空白稀释液,混匀,得到MMAE、L20E、BL20E终浓度约为10 μ g/ml的游离小分子混合标准品溶液,并用空白稀释液进一步稀释为1 μ g/ml的游离小分子混合标准品溶液。如下所示,配制不同浓度的标准品溶液,用于绘制标准曲线。

[0132]	标准曲线 (μ g/ml)	溶液名称	标准品溶液体积 (μ l)	空白稀释液体积 (μ l)
[0133]	0.05	1 μ g/ml 标准品溶液	50	950
	0.10		100	900
	0.20		200	800
	0.50		500	500
	1.00		1000	0
	2.00	10 μ g/ml 标准品溶液	200	800
	5.00		500	500
	10.00		1000	0

[0134]



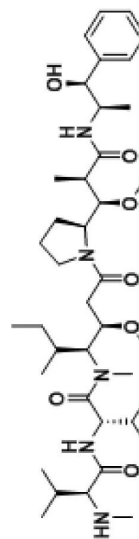
Chemical Formula: $C_{38}H_{43}F_2N_3O_{23}S_2$

Exact Mass: 1961.9047

Molecular Weight: 1963.3268

m/z: 1962.9080 (100.0%), 1961.9047 (94.3%), 1963.9114 (40.3%), 1963.9114 (12.1%), 1964.9147 (11.0%), 1964.9038 (9.0%), 1963.9005 (8.5%), 1964.9147 (6.4%), 1963.9051 (4.8%), 1964.9123 (4.7%), 1962.9017 (4.5%), 1965.9181 (4.2%), 1965.9072 (3.6%), 1963.9074 (1.6%), 1966.9105 (1.6%), 1963.9143 (1.5%), 1962.9041 (1.5%), 1962.9110 (1.4%), 1965.9072 (1.1%)

Elemental Analysis: C, 59.95; H, 6.83; F, 1.94; N, 9.27; O, 18.74; S, 3.27



MMAE

Chemical Formula: $C_{39}H_{67}N_5O_7$

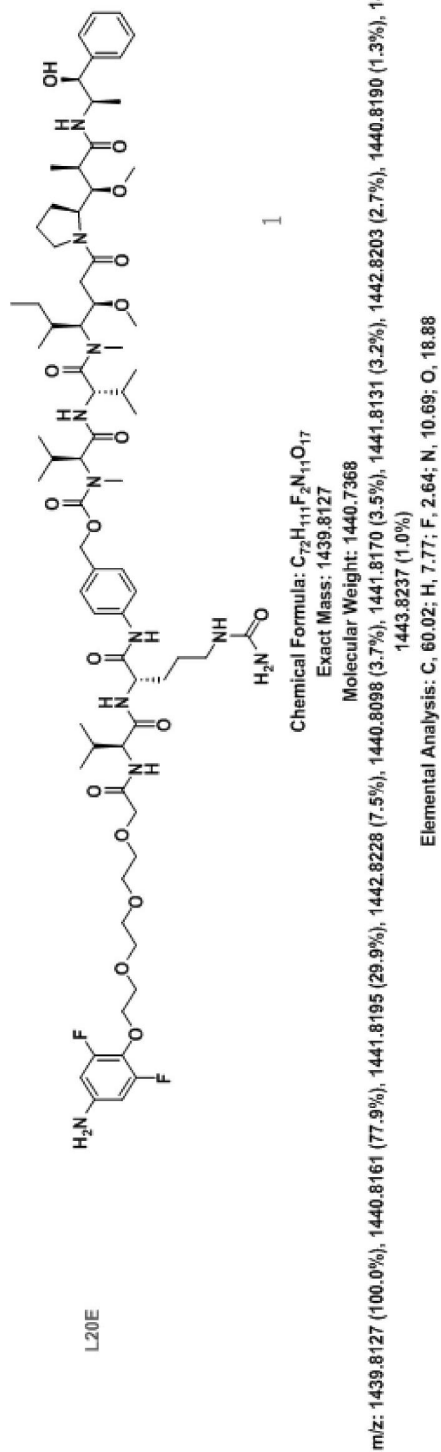
Exact Mass: 717.5040

Molecular Weight: 717.9930

m/z: 717.5040 (100.0%), 718.5074 (42.2%), 719.5108 (8.7%), 718.5011 (1.8%), 719.5083 (1.4%)

Elemental Analysis: C, 65.24; H, 9.41; N, 9.75; O, 15.60

[0135]



[0136] 样品制备与分析:取供试品200 μ l,加入乙腈800 μ l,充分混匀后,12000rpm离心10分钟,取上清液进行分析。

[0137] 分析条件:流速:0.5ml/min;柱温:60℃;MMAE检测波长:210nm,L20E、BL20E检测波长:241nm。

[0138] 系统适用性测试:

[0139] 空白基质的色谱图在游离小分子洗脱范围内应没有任何色谱峰;

[0140] 标准曲线的线性:以游离小分子浓度对峰面积作图,计算回归方程与相关系数,R2>0.99。

[0141] (三)HIC-HPLC检测

[0142] 高效液相色谱仪:Waters;

[0143] 色谱柱:Proteomix HIC Butyl-NP5色谱柱(4.6*35mm);

[0144] 流动相A:0.025mol/L磷酸钠+1.2mol/L硫酸铵(pH7.0);

[0145] 流动相B:0.025mol/L磷酸钠(pH7.0);

[0146] 流动相C:100% IPA;

[0147] 样品制备与分析:用流动相B将样品稀释至约1.0mg/ml,12000rpm离心5min,取上清进行分析;

[0148] 分析条件:流速:0.8ml/min;柱温:25℃;检测波长:280nm。

[0149] 系统适用性测试:系统平衡好后流动相B作为空白对照供试品,在积分范围内,空白样品中应无干扰峰。

[0150] 实施例1 ADC的制备

[0151] 制备包含抗Nectin-4人源化单克隆抗体的抗体药物偶联物。所述抗Nectin-4人源化单克隆抗体记载于中国专利申请CN202210475286.3,简称为“hH2L1”。该抗体的重链和轻链及其可变区、互补决定区(CDR)如下所示。

[0152] >重链H2氨基酸序列,可变区以斜体和下划线示出,CDR进一步以粗体示出,根据KABAT命名系统定义

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIDYGVSWIRPPGKGLEWIGVIWGGGKIYYNSVLKSRVTISK

[0153] DNSKSQVSLKLSSVTAAADTAVYYCAKQGGLLFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[0154] GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0155] HC:SEQ ID NO.1;

[0156] VH:SEQ ID NO.2;

[0157] H-CDR1:SEQ ID NO.3;H-CDR2:SEQ ID NO.4;H-CDR3:SEQ ID NO.5

[0158] >轻链L1氨基酸序列,可变区以斜体和下划线示出,CDR进一步以粗体示出,根据KABAT命名系统定义

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTYSQKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYFASTRESGVDPDRFSG
SGSGTDFTLTISSLOAEDVAVYYCQOHYNTPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL

[0159]

LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

[0160] LC:SEQ ID NO.6;

[0161] VL:SEQ ID NO.7;

[0162] L-CDR1:SEQ ID NO.8;L-CDR2:SEQ ID NO.9;L-CDR3:SEQ ID NO.10

[0163] (1) 抗体还原:

[0164] 用10mmol/L组氨酸,pH 6.0±0.1的缓冲液将蛋白稀释至10±2g/L。加入10±2g/L的还原剂TCEP水溶液,还原剂TCEP与抗体摩尔比为10。25±5℃条件下反应至少120分钟后,将样品浓缩至15g/L,用pH 7.0±0.2 50mmol/L PB+50mmol/L氯化钠+2mmol/L EDTA·Na2缓冲液超滤置换≥7倍体积。

[0165] (2) 偶联:

[0166] 向反应体系加入8.5%的DMA作为反应预溶剂。向反应体系中加入抗体摩尔比4.8±0.3的含药连接子BL20E的DMA溶液,25±5℃条件下搅拌至少60分钟。

[0167] (3) 超滤:

[0168] 反应后将反应体系用50mmol/L PB,pH 7.8±0.2超滤置换≥7倍体积,从而去除游离小分子及DMA残留。

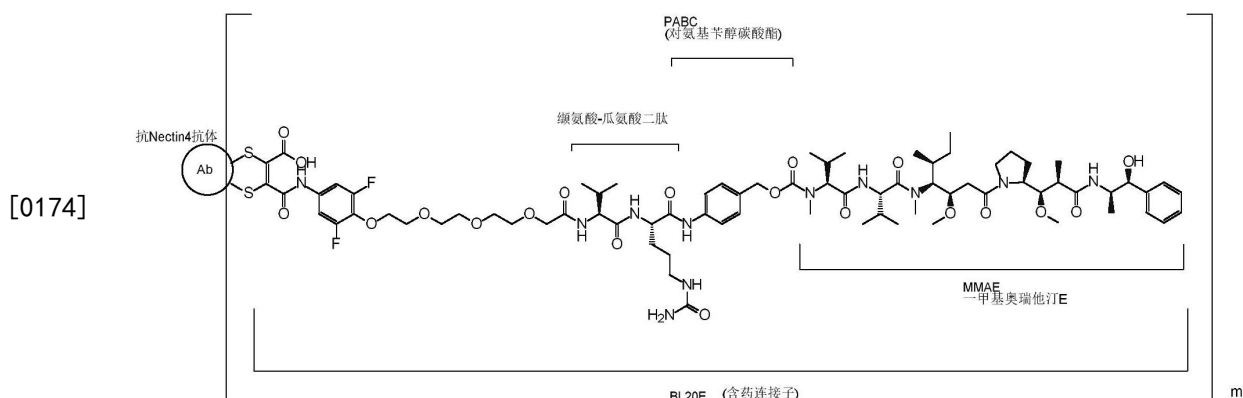
[0169] (4) 水解:

[0170] 将反应体系升温至35±2℃,孵育≥120分钟。

[0171] (5) 疏水层析:

[0172] 采用Butyl Sepharose 4FF填料或规格相近的其他填料,使用50mmol/L PB+3mol/L硫酸铵溶液调节水解液电导,混匀过滤后使用50mmol/L PB+0.45mol/L硫酸铵,pH 7.5±0.2进行上样平衡,使用梯度为0-80%的洗脱相50mmol/L PB,pH 7.5±0.2,线性长度为10-12CV。收集样品峰。

[0173] 得到如下结构所示的抗Nectin-4抗体药物偶联物。



[0175] 检测所得ADC的平均DAR值,结果见表1。

[0176] 表1.样品HIC-HPLC检测结果

[0177]	样品名	DAR 值=3 比例 (%)	DAR 值=4 比例 (%)	平均 DAR 值
	DS	0.9	99.1	4.0

[0178] 实施例2 ADC制剂的第一轮筛选 (pH)

[0179] 本实施例中通过考察在不同pH下制剂样品的加速稳定性,为实施例1的ADC的制剂筛选合适的pH范围。

[0180] 实验设计:pH范围:5.0~8.0;温度:25±2℃;检测项目:SEC-HPLC和HIC-HPLC。

[0181] 蛋白制剂的pH对于产品的稳定性和生物学活性至关重要。制剂的pH选择主要受蛋白分子理化性质的影响,在等电点附近的pH值条件下,易发生沉淀。经检测,该ADC等电点为8.0,在等电点附近的溶液pH容易引起蛋白沉淀,在等电点之上的pH碱性较强,不适合蛋白类物质的保存,需选择等电点之下的pH条件进行考察,同时过低的pH会导致蛋白不稳定,且小分子容易脱落,因此选择了pH 5.0~8.0进行pH筛选。参考ICH稳定性考察指导原则,选用25±2℃作为加速稳定性的考察温度。

[0182] 考察的各组制剂见表2。

[0183] 表2.pH筛选实验设计

[0184]	制剂编号	缓冲液	ADC 浓度	pH
	A	10mmol/L 醋酸	10mg/ml	5.0
	B	10mmol/L 醋酸		5.5
	C	10mmol/L PB		6.0
	D	10mmol/L PB		6.5
	E	10mmol/L PB		7.0
	F	10mmol/L PB		7.5
	G	10mmol/L PB		8.0

[0185] 注:PB为磷酸二氢钠/磷酸氢二钠缓冲剂

[0186] 在不同时间取样进行检测。实验结果表明:1) 加速考察至10天,随着pH值升高,HIC主峰比例的变化减小,说明小分子脱落逐渐减少,制剂样品更加稳定,见图1A和表3;2) SEC纯度会随着pH的升高而下降,见图1B和表3,但pH 7.0~8.0下变化不明显,均在可接受的范围内。

[0187] 抗体药物偶联物制剂组成的筛选不仅需要考虑大分子蛋白的pH稳定性,同时也要考虑小分子的pH稳定性。因此,通过pH筛选实验确定接下来第二轮筛选中采用pH 7.0~8.0。

[0188] 表3.pH筛选实验的检测结果

[0189]

制剂 编号	缓冲液	pH	主峰 (SEC) (%)			主峰 (HIC) * (%)		
			0 d	5 d	10 d	0 d	5 d	10 d
A	醋酸	5.0	98.6	99.3	98.6	96.46	83.87	70.05
B	醋酸	5.5	98.6	98.7	98.7	96.84	89.98	81.05
C	PB	6.0	98.5	98.3	98.7	97.07	92.98	87.24
D	PB	6.5	98.4	99.2	98.3	97.15	95.59	92.86
E	PB	7.0	98.5	98.2	97.6	97.09	96.15	93.54
F	PB	7.5	98.5	98.2	97.7	97.08	96.22	95.26
G	PB	8.0	98.5	98.8	97.9	97.12	96.57	95.60

[0190] *:表征小分子脱落情况,主峰越高,小分子的稳定性越好。

[0191] 实施例3 ADC制剂的第二轮筛选(ADC浓度、缓冲液和pH)

[0192] 本实施例中通过考察在不同ADC浓度、缓冲液类型和pH下制剂样品的加速稳定性,为实施例1的ADC的制剂筛选合适的浓度、缓冲液、pH范围。

[0193] 实验设计:pH范围:7.0~7.8;ADC浓度:10~20mg/ml;缓冲液:Tris和PB;温度:25±2℃;检测项目:SEC-HPLC、HIC-HPLC和RP-HPLC。

[0194] 实施例2筛选得到pH范围7.0-8.0,在此pH范围内合适的缓冲体系有Tris和PB,考虑到缓冲液的pH缓冲能力和范围,将pH考察范围调整为7.0~7.8;同时为了进一步研究ADC浓度与产品质量的关系,将ADC浓度的范围设定为10-20mg/ml,此浓度范围可以满足将来临床使用的剂量而不造成体积过大的情况。

[0195] 考察的各组制剂见表4。

[0196] 表4.ADC浓度、缓冲液类型和pH筛选实验设计

[0197]

制剂编号	ADC浓度 (mg/ml)	缓冲液	pH
A	20	10mmol/L Tris	7.0
B	20	10mmol/L Tris	7.4
C	20	10mmol/L Tris	7.8
D	10	10mmol/L Tris	7.0
E	10	10mmol/L Tris	7.4
F	10	10mmol/L Tris	7.8
G	20	10mmol/L PB	7.0
H	20	10mmol/L PB	7.4
I	20	10mmol/L PB	7.8
J	10	10mmol/L PB	7.0
K	10	10mmol/L PB	7.4
L	10	10mmol/L PB	7.8

[0198] 注:Tris为三(羟甲基)氨基甲烷

[0199] 实验结果表明:1)在PB和Tris缓冲体系中,随着pH值升高,HIC主峰比例的变化减小,小分子脱落率逐渐减少;其中,pH 7.4和pH 7.8条件下差异较小,见图2A和表5。由于pH

7.8接近蛋白等电点,容易引起蛋白质沉淀,因此下一阶段研究选择pH 7.4;2) Tris和PB两种缓冲体系间的差异较小,Tris缓冲液的pH受温度影响较大,因此选择PB作为下一阶段筛选的缓冲盐;3) 根据图2B、图2C和表5,当ADC浓度为10~20mg/ml时,小分子脱落率变化较小,而SEC主峰随着ADC浓度的升高有下降的趋势。

[0200] 综合上述结果,筛选得到较好的制剂为:PB pH 7.4,ADC浓度10mg/ml,作为接下来第三轮筛选的基础。

[0201] 表5.ADC浓度、缓冲液类型和pH筛选实验的检测结果

制剂 编号	缓冲盐	ADC 浓度 (mg/ml)	主峰 (SEC) (%)			小分子脱落率 (RP) (%)		
			0 d	7 d	15 d	0 d	7 d	15 d
A	Tris pH7.0	20	99.3	97.5	95.7	ND	0.26	1.45
B	Tris pH 7.4	20	99.3	97.4	95.5	ND	0.24	0.96
C	Tris pH 7.8	20	99.3	97.3	95.6	ND	0.06	0.89
D	Tris pH 7.0	10	99.3	97.7	96.4	ND	0.23	0.60
E	Tris pH 7.4	10	99.2	97.8	96.6	ND	0.23	0.51
F	Tris pH 7.8	10	99.3	97.7	96.5	ND	0.13	0.54
G	PB pH 7.0	20	99.3	97.3	95.8	ND	0.32	0.96
H	PB pH 7.4	20	99.2	93.4	95.9	ND	0.28	0.83
I	PB pH 7.8	20	99.2	97.4	96.0	ND	0.18	0.51
J	PB pH 7.0	10	99.3	97.9	96.8	ND	0.45	1.30
K	PB pH 7.4	10	99.3	97.8	96.8	ND	0.20	0.70
L	PB pH 7.8	10	99.3	98.0	96.9	ND	0.13	0.43

[0203] 注:ND表示没有检测到小分子脱落。

[0204] 实施例4 ADC制剂的第三轮筛选(辅料)

[0205] 本实施例中通过考察在添加不同种类和量的辅料下制剂样品的加速稳定性,为实施例1的ADC的制剂筛选合适的辅料,包括保护剂与表面活性剂。

[0206] 实验设计:ADC浓度:10~20mg/ml;海藻糖浓度:5~9%;精氨酸浓度:1~5%;聚山梨酯20浓度:0.01~0.03%;温度:25±2℃,检测项目为SEC-HPLC、HIC-HPLC和RP-HPLC。

[0207] 海藻糖是注射剂常用的赋形剂和保护剂,用于渗透压调节以及冻干过程中的蛋白保护及赋形;聚山梨酯20是生物制品注射剂中的稳定剂,能够有效降低蛋白聚集,促进药物在长期储存中的稳定性;精氨酸是一种保护剂,能有效抑制蛋白质聚集。由于制剂需要维持在生理渗透压范围,同时冻干制剂需要对赋形剂浓度有一定要求,因此选择的海藻糖考察浓度范围为5~9%,精氨酸的考察浓度范围为1~5%。大部分药物制剂中使用的聚山梨酯20浓度范围为0.0003%~0.3%(w/v),参考已上市抗体药物的制剂组成,选择聚山梨酯20含量的考察范围为0.01~0.03%。

[0208] 考察的各组制剂见表6。

[0209] 表6.辅料筛选实验设计

[0210]	制剂编号	缓冲液	ADC 浓度 (mg/ml)	精氨酸浓度 (%)	海藻糖浓度 (%)	pH	吐温 20 浓度 (%)
	A	10mmol/L PB	10	1	5	7.4	
	B		10	1	7	7.4	
	C		10	1	9	7.4	
	D		10	3	7	7.4	
	E		15	3	7	7.4	
	F		20	3	7	7.4	
	G		10	1	7	7.4	
	H		10	3	7	7.4	
	I		10	5	7	7.4	
	J		10	3	7	7.4	0.01
	K		10	3	7	7.4	0.03

[0211] 实验结果表明:1)当海藻糖添加量为5~9%时,加速过程中,SEC纯度和小分子脱落率变化差异不大,见表7和图3A;根据辅料最小加入原则及渗透压需求,选择7%海藻糖;2)随着精氨酸浓度的增加,小分子脱落率提高,SEC结果显示精氨酸对聚体生成影响较小,根据辅料最少加入原则,在制剂中不加精氨酸,见表7和图3C;3)随着ADC浓度的升高,小分子脱落率增加,SEC纯度有下降的趋势,见表7和图3B、3C,因此选择ADC浓度为10mg/ml;4)聚山梨酯20含量在0.01~0.03%时,SEC纯度和小分子脱落率没有显著差异,见表7和图3B、3C,因此选择了适中的聚山梨酯20的浓度:0.02%。

[0212] 综上所述,最终确定的优选制剂的组成为:ADC浓度10mg/ml,10mmol/L PB,7%海藻糖,0.02%聚山梨酯20,pH 7.4。经检测,该制剂的渗透压为200~300mOsmol/kg;考虑到本产品通过等渗的配伍液静脉滴注,这一组成不会剧烈影响给药时的渗透压,因此该制剂组成的选择是科学可行的。

[0213] 表7.辅料筛选实验的检测结果

[0214]	制剂 编号	精氨酸浓 度 (%)	海藻糖浓 度 (%)	ADC 浓度 (mg/ml)	吐温 20 (%)	SEC 纯度 (%)			小分子脱落率 (%)		
						0 d	15 d	30 d	0 d	15 d	30 d
	A	1	5	10		98.4	95.7	93.2	ND	0.40	2.03
	B	1	7	10		98.6	95.6	93.7	ND	0.34	1.76
	C	1	9	10		98.5	95.7	93.6	ND	0.69	2.07
	D	3	7	10		98.5	95.1	92.2	ND	0.63	1.93
	E	3	7	15		98.5	94.2	92.0	ND	0.77	2.41
	F	3	7	20		98.5	94.5	91.8	ND	0.85	2.17
	G	1	7	10		98.5	95.9	94.0	ND	0.69	1.71
	H	3	7	10		98.5	94.8	91.5	ND	0.50	1.40
I	5	7	10		98.5	94.3	91.8	ND	0.72	2.33	
J	3	7	10	0.01	98.5	95.3	92.1	ND	1.33	2.87	
K	3	7	10	0.03	98.4	95.2	93.3	ND	1.55	3.23	

[0215] 注:ND表示没有检测到小分子脱落。

[0216] 以如下制剂组成:ADC浓度10mg/ml,10mmol/L PB,7%海藻糖,0.02%聚山梨酯20,pH 7.4,进行工艺确认批次原液的制备,并对该原液在储存温度($\leq -60^{\circ}\text{C}$)下进行长期稳定性考察。

[0217] 表8结果表明,在采用该组成时,将原液储存24个月仍能维持较好的稳定性,因此该制剂组成是稳定可行的。

[0218] 表8.工艺确认批次原液的长期稳定性考察

	考察时间（月）	主峰（SEC）（%）	主峰（HIC）*（%）
[0219]	0	98.7	96.9
	3	99.2	97.4
	6	99.0	97.1
[0220]	9	99.2	97.0
	12	99.1	97.2
	18	99.1	97.2
	24	99.3	97.2

[0221] *:表征小分子脱落情况,主峰越高,小分子的稳定性越好。

[0222] 实施例5冻干工艺的建立和冻干制剂的制备

[0223] (一)冻干工艺参数开发

[0224] a)关键温度测定

[0225] 冻干过程中几个关键温度(共晶点温度、玻璃态转化温度和崩解温度)对产品性质的影响较大,因此在建立冻干工艺前需对这几个关键温度进行测定。共晶点温度(T_e):当达到一定温度时,混合溶液中液态和所形成的固态中的组分完全相同,此时的温度为该溶液的共晶点温度。玻璃态转化温度(T_g):冻结过程中随着冰晶的析出,剩余浓度不断上升,当

达到某一浓度时,剩余水分不再结晶,此时溶液达到最大冻结浓缩状态对应的温度。崩解温度(T_c):冻干时,干燥层温度上升到一定的数值时,物料中冰晶消失,冻干层呈多孔蜂窝状海绵体结构,此结构与温度有关,当此结构体固体基质温度升高其刚性降低达零界值时,原先蒸气扩散通道被封闭,此时温度称崩解温度。

[0226] 使用冻干显微镜、低温DSC和共晶点探头对冻干的上述关键温度进行测定,测定得到本发明实施例4中筛选得到的液体制剂的共晶点温度为 -18.3°C ;玻璃态转化温度为 -31.2°C ;崩解温度为 -27.2°C 。结果见表9。

[0227] 表9.关键温度测定结果

[0228]	样品名	崩解温度	玻璃态转化温度	共晶点
	液体制剂*	-27.2°C	-31.2°C	-18.3°C

[0229] *:制剂的组成为ADC浓度 10mg/ml , 10mmol/L PB, 7% 海藻糖, 0.02% 聚山梨酯20, $\text{pH } 7.4$ 。

[0230] b) 预冻条件确定

[0231] 预冻过程主要考虑预冻速率、预冻温度和预冻时间。预冻速率对晶体大小、升华速率及蛋白活性均有影响,例如,慢冻则晶体大,升华速度快,不容易损伤蛋白。本发明的液体制剂采用样品与板层一起降温的慢冻方式。因为制剂的共晶点温度为 -18.3°C ,而预冻温度一般要低于共晶点温度 20°C ,考虑到不同冻干机性能和过程中辐射热的影响,设定预冻板层 $\leq -40^{\circ}\text{C}$,预冻时间 $\geq 2\text{h}$ 。

[0232] 退火是以一定的升温速率把冻结制品温度升温至低于共晶点温度并保持一段时间,然后再以一定的降温速度,将温度降低至预冻温度的过程,预冻过程中增加退火工艺可以强化结晶,除去 T_g 值较低的结晶成分,从而提高整体的 T_g ,缩短一次干燥时间。因为制剂中含有海藻糖,而海藻糖崩解温度较低,其一次干燥时间较长,因此在预冻过程中加入退火工序,退火温度一般在玻璃态转化温度以上,共晶点温度以下进行,本制剂的玻璃态转化温度为 -31.2°C ,考虑到板层温度和样品实际温度差以及预冻过程中辐射热的影响,因此设定退火板层温度为 $-20 \sim -35^{\circ}\text{C}$,保温时间 $\geq 2\text{h}$,然后将温度降至 $\leq -40^{\circ}\text{C}$,保温时间 $\geq 2\text{h}$ 。

[0233] c) 升华条件确定

[0234] 升华过程包括一次干燥和二次干燥两个阶段。

[0235] 一次干燥的控制点主要为温度和压力,一次干燥会去除样品中大部分自由水,一次干燥速率会影响冻干工艺时间,可通过提高冻干温度和压力来提高一次干燥速率。本制剂的崩解温度为 -27.2°C ,冻干过程中需保证制品的实际温度需低于崩解温度,升华是吸热的过程,因此在升华起始过程制品的温度会低于隔板的温度,提高板层的温度会提高升华速率,因此设置板层温度高于制品的崩解温度,实际升华界面的温度低于制品的崩解温度,考虑到不同冻干机性能以及一次干燥过程中热辐射的影响,设定一次干燥板层温度为 $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$,通常一次干燥过程中压力需低于制品最高温度对应水的饱和蒸气压的一半,因此一次干燥压力需 $\leq 0.2\text{mbar}$ 。通过一次干燥过程中的压力升测试,确定一次干燥时间 $\geq 24\text{h}$ 。

[0236] 二次干燥是在较高的温度下对制品加热,从而进一步降低冻干制品水分含量,二次干燥需在制品变性温度以下,设定二次干燥板层温度为 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$,实际样品温度会略低于板层温度,时间 $\geq 10\text{h}$,二次干燥过程中真空度对制品质量影响较小,在合适的真空度进行该工序即可。

[0237] (二) 冻干工艺确认

[0238] 如上确定了相应的冻干工艺参数,见表10。

[0239] 表10.冻干工艺参数

[0240]	过程	参数(板层温度、压力)	时间
	预冻	$\leq -40^{\circ}\text{C}$	$\geq 2\text{h}$
	退火	$-20^{\circ}\text{C} \sim -35^{\circ}\text{C}$	$\geq 2\text{h}$
	预冻	$\leq -40^{\circ}\text{C}$	$\geq 2\text{h}$
	一次干燥(升华干燥)	$-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 压力 $\leq 0.2\text{mbar}$	$\geq 24\text{h}$
	二次干燥(解析干燥)	$20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 压力 $\leq 0.2\text{mbar}$	$\geq 10\text{h}$

[0241] 采用如下冻干工艺对实施例4中筛选得到的液体制剂进行冻干处理,以确认该冻干工艺,冻干曲线见图4:

[0242] 预冻阶段:将样品降至 $\leq -40^{\circ}\text{C}$,保温 $\geq 2\text{h}$ 后将样品温度升至高于玻璃态转化温度小于共晶点温度($-20^{\circ}\text{C} \sim -35^{\circ}\text{C}$)保温 $\geq 2\text{h}$,使样品重结晶,此步骤可以缩短一次干燥时间,退火后将温度进一步降至 $\leq -40^{\circ}\text{C}$,保温 $\geq 2\text{h}$,使样品进一步维持刚性结构。

[0243] 一次干燥:预冻完成后,控制箱体真空度为 $\leq 0.2\text{mbar}$ 后将样品温度升至 $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$,保温 $\geq 24\text{h}$,至箱体的压力升测试合格(无固定标准,各冻干机不一致)后停止一次干燥。

[0244] 二次干燥:一次干燥结束后,将温度升至 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$,保温 $\geq 10\text{h}$ 结束二次干燥。

[0245] 实验结果表明,三次冻干处理的冻干成品的水分含量均低于3%,外观良好,并且在注射用水中复溶迅速。复溶后得到的液体制剂无可见异物,不溶性微粒少;并且经检测,制品关键质量属性没有发生显著变化,一致性较好,证明了该冻干工艺的可行性。结果见表11。

[0246] 表11.冻干工艺确认结果

检测项目	测试名称		
	工艺确认批次 1	工艺确认批次 2	工艺确认批次 3
水分(%)	0.9	0.9	0.9
外观	为白色或微黄色疏松体,无融化迹象	为白色或微黄色疏松体,无融化迹象	为白色或微黄色疏松体,无融化迹象
复溶时间	15分钟内完全溶解	15分钟内完全溶解	15分钟内完全溶解
可见异物	无	无	无

[0248]

不溶性微粒	≥10 μm: 7 粒; ≥25 μm: 1 粒	≥10 μm: 16 粒; ≥25 μm: 1 粒	≥10 μm: 21 粒; ≥25 μm: 1 粒
pH	7.4	7.5	7.5
渗透压摩尔浓度	261 mOsmol/kg	242 mOsmol/kg	241 mOsmol/kg
SEC (%)	99.0	98.9	99.0
游离小分子药物含量	MMAE 含量<0.3%, L20E 含量<0.08%, BL20E 含量<0.07%, 含量之和<0.45%	MMAE 含量 < 0.31%; L20E 含量 < 0.07%; BL20E 含量 < 0.06%; 含量之和 < 0.44%	MMAE 含量 < 0.33%; L20E 含量 < 0.08%; BL20E 含量 < 0.06%; 含量之和 < 0.47%

[0249] 以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形,只要不脱离本发明的精神,均应属于本发明所附权利要求的范围。

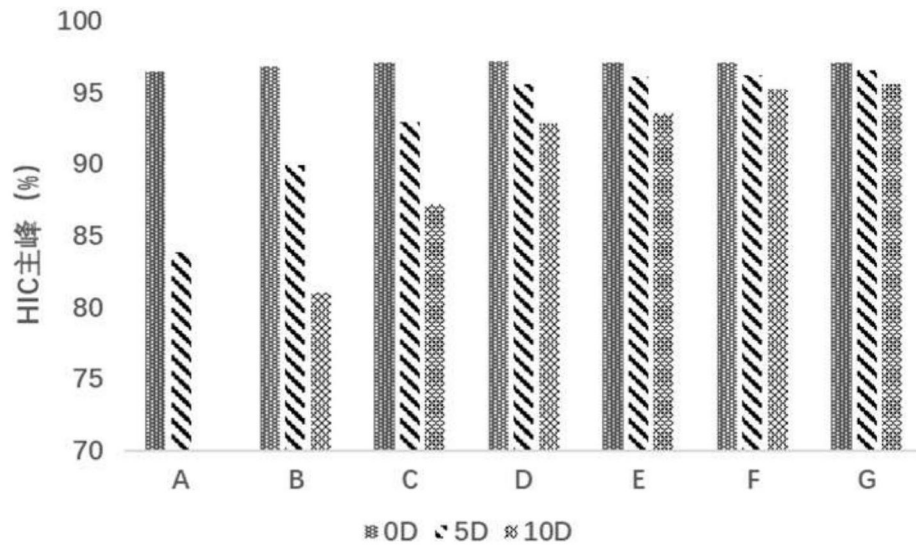


图1A

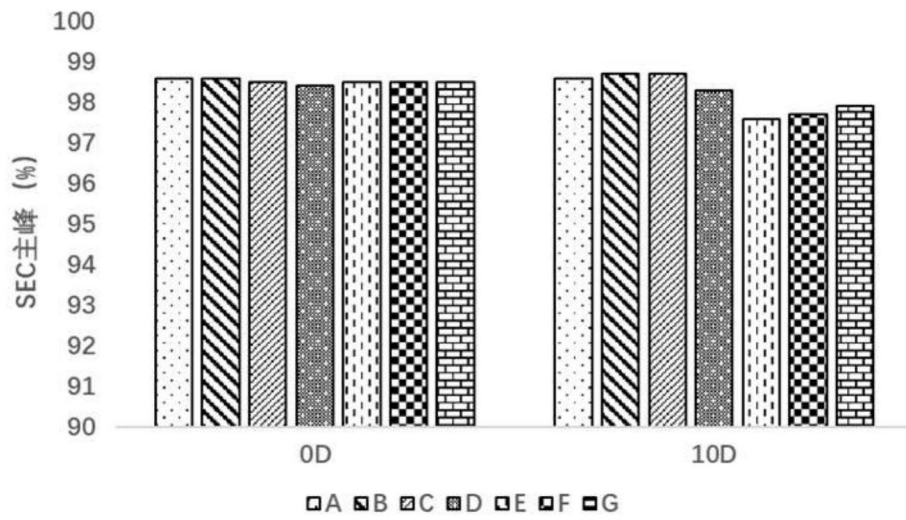


图1B

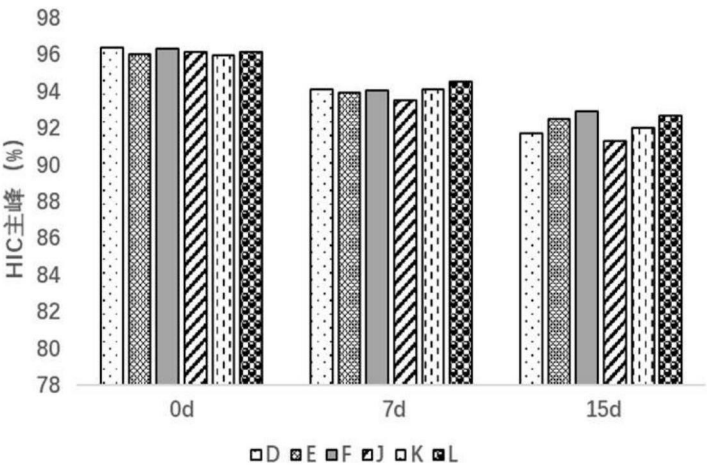


图2A

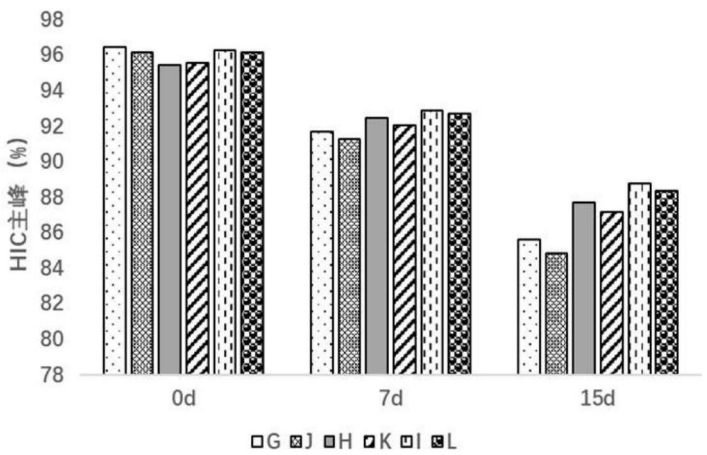


图2B

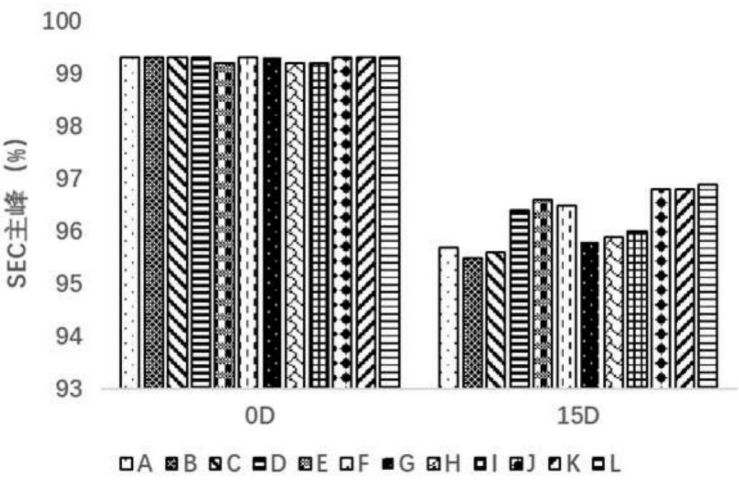


图2C

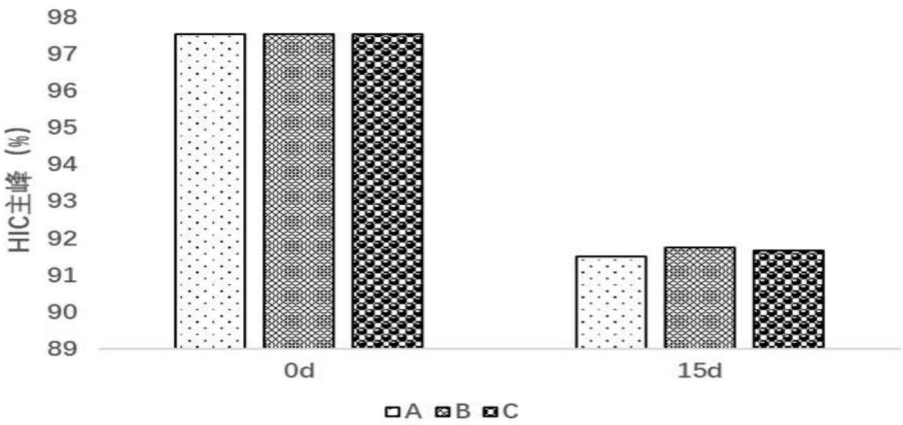


图3A

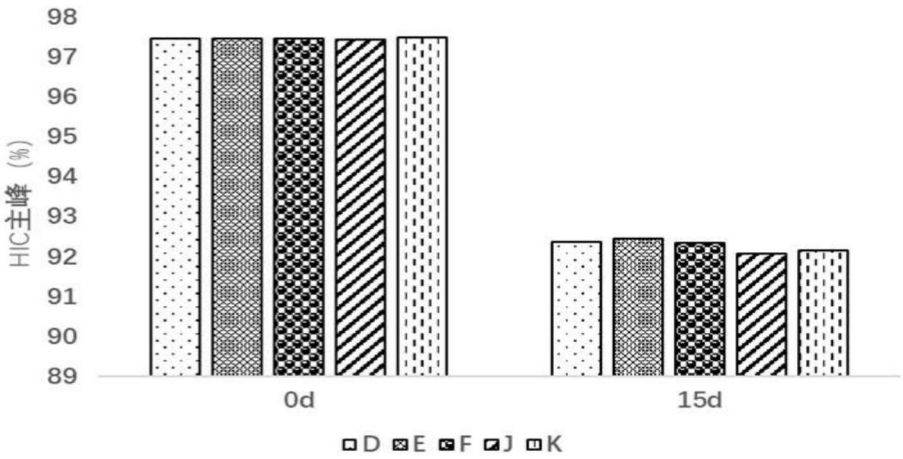


图3B

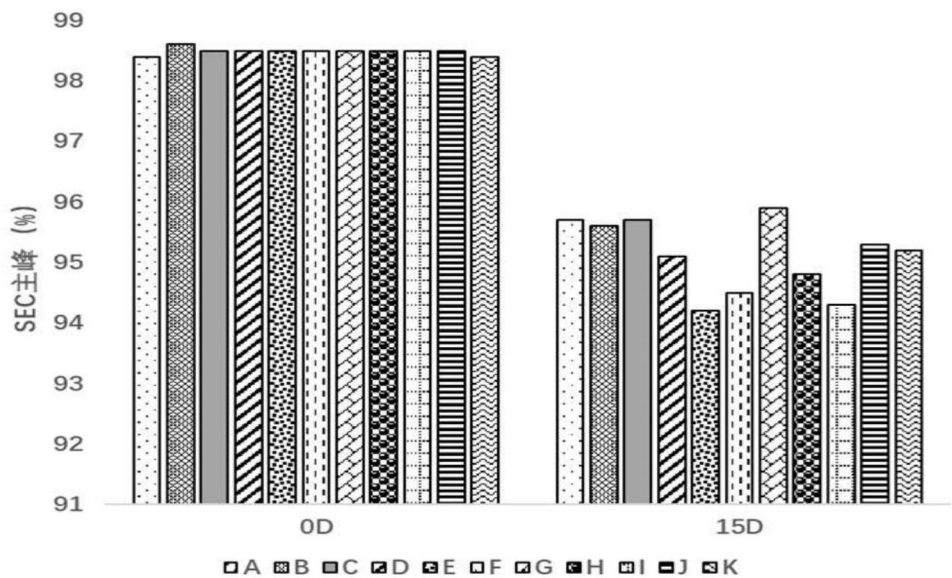


图3C

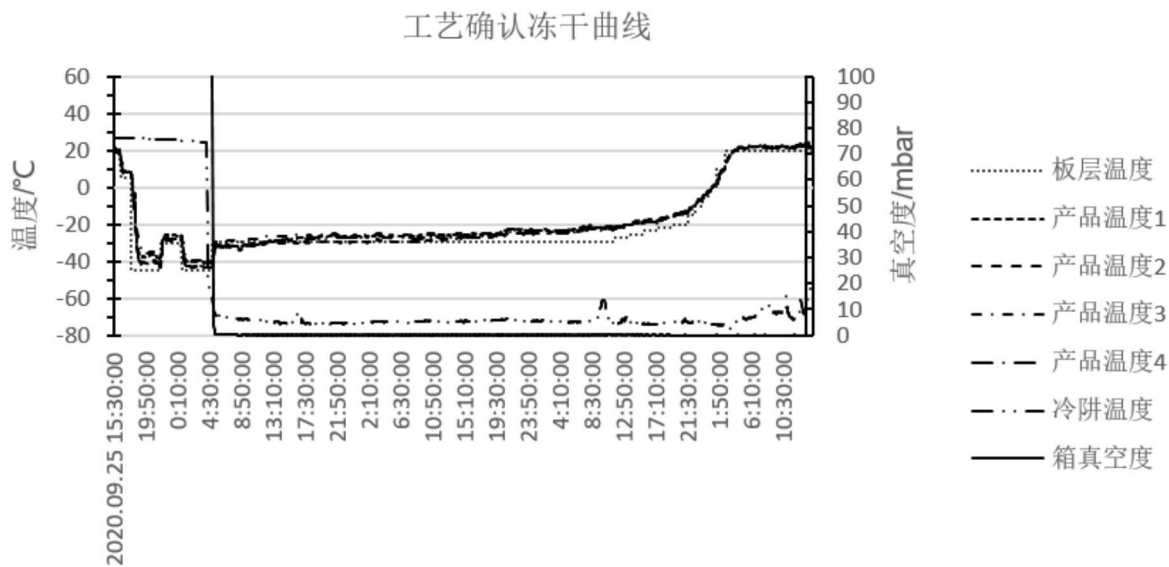


图4