

包含抗 Claudin18.2 和 CD3 双特异性抗体的制剂及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及抗 Claudin18.2 和 CD3 双特异性抗体制剂领域。更具体而言，本发明涉及包含双特异性抗体的药物制剂，尤其是稳定的液体制剂、冻干制剂和重构的稳定液体制剂，以及用于制备所述药物制剂的方法，以及所述药物制剂的治疗和 / 或预防用途。

背景技术

药品稳定性是保证药品有效性和安全性的重要指标之一。获得良好的制剂处方是保证药品在货架期内保持其有效性和安全性的关键条件。然而，由于双特异性抗体本身及其降解途径的复杂性，目前尚不可能对优化抗体稳定性所需的制剂条件作出预测。尤其是考虑到，不同抗体通常具有十分不同的结构以及 CDR 序列，而这些序列差异会导致不同抗体在溶液中具有不同的稳定性性质。因此，基于对人用抗体在安全性和有效性上的严格要求，有必要针对每个抗体单独进行最佳制剂配方的优化。

Claudin-18 的同种型 2 (Claudin 18.2 或 CLDN18.2) 是高度选择性的细胞谱系标记物，其在正常组织中的表达严格限于胃粘膜分化的上皮细胞，但不表达于胃干细胞区。CLDN18.2 在相当一部分原发性胃癌中表达，并且在胃转移的癌组织中保留了其表达水平。除胃癌以外，在胰腺癌中也发现有 CLDN18.2 的表达，是治疗这些癌症的理想靶标分子 (Singh, P., Toom, S. & Huang, Y. Anti-CLDN18.2 antibody as new targeted therapy for advanced gastric cancer. J Hematol Oncol 10, 105 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0473-4>)。

CD3 是与 T 细胞受体复合物 (TCR) 结合的在 T 细胞上表达的同型二聚体或异二聚体抗原，并且是 T 细胞活化所需要的。功能性 CD3 由以下四种不同链中的两种的二聚体形成： ϵ 、 ζ 、 δ 和 γ 。CD3 二聚体排列包含 γ/ϵ 、 δ/ϵ 和 ζ/ζ 。已显示针对 CD3 的抗体在 T 细胞上聚集 CD3，从而以类似于通过肽负载的 MHC 分子参与 TCR 的方式引起 T 细胞活化。因此，已提出抗 CD3 抗体用于涉及 T 细胞活化的治疗目的。此外，已提出能够结合 CD3 和靶向肿瘤表面抗原的双特异性抗体能够将肿瘤细胞和 T 细胞衔接，从而直接活化 T 细胞，释放颗粒酶、穿孔素及细胞因子杀伤肿瘤，从而达到抑制肿瘤的治疗目的。CLDN18.2 在胃癌、胰腺癌、胃食管交界癌等高表达，因此可以通过开发同时结合 CD3 和 Claudin18.2 的双特异性抗体来实现治疗目的。

尽管一些双特异性抗体制剂已经被提出，但在本领域中对于含有足够稳定且适于施用给人受试者的新药物制剂仍存在需要。此外，对于这样的双特异性抗体制剂，寻找制剂处方的简单和易用性，也是有利的。

发明概述

本发明通过提供包含抗 Claudin18.2 和 CD3 双特异性抗体的药物制剂来满足上述需求。本发明的抗体制剂针对多种稳定性影响因素 (诸如温度、PH)，均表现出了优良稳定性。

在一个方面，因此，本发明提供了一种液体抗体制剂，其包含 (i) 抗 Claudin18.2 和 CD3 双特异性抗体；(ii) 缓冲剂，(iii) 稳定剂，和 (iv) 表面活性剂。优选的，进一步包含整合剂。

在一些方面，本发明提供了双特异性抗体，其中所述抗体包含两个结合结构域，其中所述第一结合结构域特异性结合 CLDN18.2，且所述第二结合结构域特异性结合 CD3。

在优选的实施方案中，本发明的特异性结合 CLDN18.2 的第一结合结构域是全人源的，和/或第二结合结构域是人源化的。

在一些方面，本发明的双特异性抗体是 IgG 样结构的双特异性抗体。

在一方面，本发明涉及以下实施方案：

1、双特异性抗体，其包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域，其中第一抗原结合结构域特异性结合 CLDN18.2，第二抗原结合结构域特异性结合 CD3，其中第一抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO:4 所示的 A1-VH 中所含的三个互补决定区域 A1-HCDR1、A1-HCDR2 和 A1-HCDR3，和如 SEQ ID NO:9 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 A1-LCDR1、A1-LCDR2 和 A1-LCDR3；第二抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO: 30、22 或 32 所示的 A2-VH 中所含的三个互补决定区域 A2-HCDR1、A2-HCDR2 和 A2-HCDR3，和如 SEQ ID NO:27 所示的 A2-VL 中所含的三个互补决定区域 A2-LCDR1、A2-LCDR2 和 A2-LCDR3。

2、实施方案 1 的双特异性抗体，其中

第一抗原结合结构域包含分别如以下氨基酸序列所示的 A1-HCDR1、A1-HCDR2、A1-HCDR3: SEQ ID NO:1、2 和 3，以及分别如以下氨基酸序列所示的 A1-LCDR1、A1-LCDR2 和 A1-LCDR3: SEQ ID NO:6、7 和 8；以及

第二抗原结合结构域包含

(i)分别如以下氨基酸序列所示的 A2-HCDR1、A2-HCDR2、A2-HCDR3: SEQ ID NO:19、20 和 29，以及分别如以下氨基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:24、25 和 26；或

(ii) 分别如以下氨基酸序列所示的 A2-HCDR1、A2-HCDR2、A2-HCDR3: SEQ ID NO:19、20 和 21，以及分别如以下氨基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:24、25 和 26；或

(iii)分别如以下氨基酸序列所示的 A2-HCDR1、A2-HCDR2、A2-HCDR3: SEQ ID NO:19、31 和 21，以及分别如以下氨基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:24、25 和 26。。

3、实施方案 1 或 2 的抗体，其中第一抗原结合结构域包含重链可变区和/或轻链可变区，其中重链可变区

(i)包含与选自 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与选自 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中；和/或轻链可变区

(i)包含与选自 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与选自 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

4、实施方案 1-3 中任一项的抗体，其中第二抗原结合结构域包含重链可变区和/或轻链可变区，其中重链可变区

(i)包含与选自 SEQ ID NO: 30、22 或 32 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者
(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 30、22 或 32 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者
(iii)包含与选自 SEQ ID NO: 30、22 或 32 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中;

和/或

轻链可变区

(i)包含与选自 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii)包含与选自 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

5、实施方案 1-4 中任一项的抗体, 其还包含重链恒定区和/或轻链恒定区。

6、实施方案 1-5 中任一项的抗体, 其为 IgG 样结构的双特异性抗体。

7、实施方案 1-6 中任一项的抗体, 其中所述抗体的重链恒定区来自 IgG1 或 IgG2 或 IgG3 或 IgG4, 优选的 IgG1。

8、实施方案 1-6 中任一项的抗体, 其包含 2 个重链恒定区, 其中一个重链恒定区 A1-HC 与第一抗原结构域的重链可变区 A1-VH 相连构成与 CDLN18.2 结合部分的重链, 且另一个重链恒定区 A2-HC 与第二抗原结合结构域的重链可变区 A2-VH 相连构成与 CD3 结合部分的重链, 且包含 2 个轻链恒定区, 其中一个轻链恒定区 A1-LC 与第一抗原结构域的轻链可变区 A1-VL 相连构成与 CLDN18.8 结合部分的轻链, 且另一个轻链恒定区 A2-LC 与第二抗原结合结构域的轻链可变区 A2-VL 相连构成与 CD3 结合部分的轻链。

9、实施方案 8 的抗体, 其中 A1-HC 可以与 A2-HC 相同或不同, 和/或 A1-LC 与 A2-LC 相同或不同。

10、实施方案 8 的抗体, 其中与 CLDN18.2 结合部分的 A1-VH 和 A1-VL 是全人源的, 且与 CD3 结合部分的 A2-VH 和 A2-VL 是人源化的。

11、实施方案 8 的抗体, 其中与 CLDN18.2 结合部分的重链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 和/或

与 CLDN18.2 结合部分的轻链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

12. 实施方案 8 或 11 的抗体, 其中

与 CD3 结合部分的重链

- (i) 包含与选自 SEQ ID NO: 41、39 或 42 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (ii) 包含选自 SEQ ID NO: 41、39 或 42 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者
- (iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 41、39 或 42 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 和/或

与 CD3 结合部分的轻链

- (i) 包含与选自 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- (ii) 包含选自 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者
- (iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中, 本发明的抗 CLDN18.2/CD3 双特异性抗体以高亲和力结合 CLDN18.2 (例如人 CLDN18.2)。在一些实施方案中, 本发明的抗体特异性结合 CLDN18.2 (例如人 CLDN18.2), 而不结合 CLDN18.1 (例如人 CLDN18.1)。在一些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段与人 CLDN18.2 的结合亲和力高于已知的 CLDN18.2 抗体, 例如 Zolbetuximab (简称 Zmab) 抗体。在一些实施方案中, 本发明的抗 CLDN18.2/CD3 双特异性抗体以所需的亲和力 (例如较低) 结合 CD3 (例如人 CD3 或食蟹猴 CD3)。在一些实施方案中, 本发明的抗体能够既结合人 CD3, 又结合食蟹猴 CD3。在一些实施方案中, 通过生物膜薄层干涉测定技术或表面等离子共振法测定抗体的亲和力。

在一些实施方案中, 本发明的抗 CLDN18.2/CD3 双特异性抗体能够结合肿瘤细胞表面的 CLDN18.2, 以及效应细胞表面的 CD3。在一些实施方案中, 利用流式细胞术检测所述结合。

在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的抗 CLDN18.2/CD3 蛋白的浓度为约 0.1-100mg/ml, 优选为约 0.1-10mg/ml, 更优选为约 0.1-1mg/ml 在其他实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的抗 CLDN18.2/CD3 的浓度为约 0.5、1、2、3、4、5mg/ml。

在一些实施方案中, 用于本发明制剂中的缓冲剂为组氨酸缓冲剂, 尤其是由组氨酸和盐酸组氨酸组成的缓冲体系。在一些实施方案中, 本发明的组氨酸缓冲剂中组氨酸的浓度为约 0.01-10mg/ml, 尤其是约 0.1-1mg/ml, 例如, 约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1mg/ml。在一个实施方案中, 本发明制剂包含约 0.18mg/ml 组氨酸。在另一个实施方案中, 用于本发明制剂的组氨酸缓冲剂由约 0.18 mg/ml 的组氨酸和约 1.84 mg/ml 的盐酸组氨酸组成。

在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的稳定剂的浓度为约 10-100 mg/ml。在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的稳定剂的浓度为约 20-60 mg/ml, 例如, 约 20、30、40、50、60 mg/ml。

在一个实施方案中, 所述稳定剂选自多元醇 (例如, 山梨醇、甘露醇、或其组合)、糖类 (例如, 蔗糖、海藻糖、麦芽糖、或其组合)、氨基酸 (例如, 盐酸精氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、脯氨酸及组合或其盐) 和它们的任意组合。在一个实施方案中, 所述稳定剂包含约 20-80mg/ml 的山梨醇, 例如 20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80mg/ml 的山梨醇。在另一个实施方案中, 所述稳定剂包含约 20-60mg/ml 的蔗糖, 例如, 20、30、40、50、60mg/ml 的蔗糖。在一个优选实施方案中, 所述稳定剂还包含精氨酸, 优选为盐酸精氨酸, 其浓度为约 25-200mM, 优选为约 50-150mM, 更优选为约 50-120mM, 最优选地为约 60-100 mM, 例

如, 约 60、65、70、75、80、85、90 mM。

在一个优选实施方案中, 所述稳定剂包含山梨醇和精氨酸的组合, 或蔗糖和精氨酸的组合。例如, 可以使用约 20-40mg/ml 的山梨醇和约 50-100 mM 的精氨酸的组合, 或约 30-60 mg/ml 的蔗糖和约 50-100 mM 的精氨酸。

在优选的实施方案中, 本发明的液体抗体制剂包含约 30-60mg/ml (如约 50mg/ml) 的山梨醇、或约 20-30mg/ml (如约 25mg/ml) 山梨醇与 80-90mM (约 85mM) 精氨酸。

在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的表面活性剂的浓度为约 0.1-1 mg/ml。在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的表面活性剂的浓度为约 0.2-0.8 mg/ml, 例如, 约 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mg/ml。

在一个实施方案中, 所述表面活性剂是非离子型表面活性剂。在一个实施方案中, 所述表面活性剂选自聚山梨酯类表面活性剂、泊洛沙姆、聚乙二醇。在一个实施方案中, 所述表面活性剂选自聚山梨酯类表面活性剂。在一个具体实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的表面活性剂是聚山梨酯-80。

螯合剂浓度及种类:

在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的螯合剂的浓度为约 0.005-0.05 mg/ml。在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的螯合剂的浓度为约 0.008-0.018 mg/ml, 例如, 约 0.008、0.009、0.010、0.012、0.014、0.018 mg/ml。

在一个实施方案中, 所述的螯合剂是羧酸型螯合剂。在一个实施方案中, 所述的螯合剂选自依地酸二钠、氨基三乙酸、二亚乙基三胺五乙酸、柠檬酸、酒石酸、葡萄糖酸、羟乙基二胺三乙酸、二羟乙基甘氨酸。在一个实施方案中, 所述螯合剂选自依地酸二钠。

在一个实施方案中, 所述液体制剂的 pH 值为约 5.0-6.0。在一些实施方案中, 所述液体制剂的 pH 值为约 5.0-6.0 中的任意值, 例如, 约 5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0。优选地, 所述制剂的 pH 为 5.2 ± 0.2 或 5.5 ± 0.2 , 优选地 pH 为 5.2。

在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂包含:

(i) 约 0.1-100 mg/ml 的抗 CLDN18.2/CD3 蛋白;

(ii) 约 0.1-2mg/ml 的组氨酸;

(iii) 约 30-70mg/ml 的山梨醇;

(iv) 约 0.1-1 mg/ml 聚山梨酯 80; 和

(v) 任选地, 约 0.008-0.018mg/ml 的依地酸二钠,

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-5.5, 例如, 约 5.2;

例如, 所述液体抗体制剂包含

(i) 约 0.1-10 mg/ml, 例如 0.1-1mg/ml 的抗 CLDN18.2/CD3 蛋白;

(ii) 约 1.55 mg/ml 的组氨酸;

(iii) 约 40-60mg/ml 山梨醇或蔗糖, 优选 50mg/ml 山梨醇或 30-50mg/ml 蔗糖;

(iv) 约 0.2-0.8 mg/ml, 例如 0.2-0.6 mg/ml 聚山梨酯 80; 和

(v) 任选地, 约 0.008-0.018 mg/ml, 例如 0.01 mg/ml 的依地酸二钠,

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-5.5, 例如, 约 5.2;

或者, 所述液体抗体制剂包含

(i) 约 1mg/ml 的抗 CLDN18.2/CD3 蛋白, 约 1.55 mg/ml 组氨酸, 约 50.00 mg/ml 山梨醇, 约 0.2 mg/ml 聚山梨酯 80, pH 约 5.2; 或

(ii) 约 50mg/ml 的抗 CLDN18.2/CD3 蛋白, 约 1.55 mg/ml 组氨酸, 约 50.00 mg/ml 山梨醇, 约 0.01 mg/ml 依地酸二钠, 约 0.2 mg/ml 聚山梨酯 80, pH 约 5.2; 或

(iii) 约 50mg/ml 的抗 CLDN18.2/CD3 蛋白, 约 0.82 mg/ml 醋酸钠, 约 50.00 mg/ml 山梨醇, 约 0.2 mg/ml 聚山梨酯 80, pH 5.2。

本发明的液体制剂可以长期稳定储存, 例如至少 24 个月或更长时间。在一个实施方案中, 本发明的液体制剂可以在约 -80°C 至约 45°C, 例如, 约 -80°C、约 -30°C、约 -20°C、约 0°C、约 5°C、约 25°C、约 35°C、约 38°C、约 40°C、约 42°C 或约 45°C 的条件下, 储存至少 10 天、至少 20 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, 至少 36 个月, 或更长时间, 且是稳定的。

在一个实施方案中, 本发明的液体制剂可以稳定储存至少 24 个月。在再一实施方案中, 本发明的液体制剂在至少 40°C 是稳定的。在再一实施方案中, 本发明的液体制剂在约 2°C-8°C 保持稳定至少 3 个月, 优选至少 12 个月, 更优选至少 24 个月。在一个实施方案中, 本发明的液体制剂在室温或约 25°C 保持稳定至少 2 个月, 优选至少 3 个月, 更优选至少 6 个月。在再一实施方案中, 本发明的液体制剂在约 40°C 保持稳定至少 2 周、优选至少 1 个月。

在一个实施方案中, 可以通过检测制剂的外观、可见异物、蛋白含量、浊度、纯度和、和/或电荷变异体的变化, 来指示制剂的稳定性。在一个实施方案中, 可以在高温胁迫的强制实验中, 例如在 40°C $\pm$ 2°C 储存至少 1 周、2 周或优选地 1 个月, 或在加速实验中, 例如在 25°C $\pm$ 2°C 储存至少 1 个月或 2 个月, 或在长期实验中, 例如在 5°C $\pm$ 3°C 储存至少 2 个月或 3 个月, 或在振荡实验中 (例如在室温、避光 650 r/min 条件下振荡 5 天), 和/或在冻融实验中 (例如, 在 -30°C/室温反复冻融 6 次), 检测本发明液体制剂的稳定性。在一个实施方案中, 相对于初始值, 例如储存第 0 天的初始值、或振荡或冻融实验前的初始值, 检测本发明液体制剂的稳定性。

在一个实施方案中, 在储存后, 或在振荡实验后, 或在冻融实验后, 通过目视检查本发明液体制剂的稳定性, 其中本发明液体制剂在外观上保持为澄清至微乳光, 为无色至淡黄色液体, 且无异物。在一个实施方案中, 在澄明度检测仪下目视检查, 制剂中无可见异物存在。在一个实施方案中, 在储存后, 或在振荡实验后, 或在冻融实验后, 通过测定蛋白含量变化, 检查本发明液体制剂的稳定性, 其中例如通过紫外分光光度 (UV) 法, 相对于初始值, 蛋白含量变化率不超过 20%, 优选不超过 10%, 例如 7-8%, 更优选不超过 5%, 2% 或 1%。在一个实施方案中, 在储存后, 或在振荡实验后, 或在冻融实验后, 通过测定本发明液体制剂的浊度变化, 检查本发明液体制剂的稳定性, 其中例如通过 OD_{350nm} 法检测, 相对于初始值, 变化值不超过 0.06, 优选地不超过 0.05, 更优选地不超过 0.04, 不超过 0.02。在一个实施方案

中,在储存后,或在振荡实验后,或在冻融实验后,通过测定本发明液体制剂的纯度变化,检查本发明液体制剂的稳定性,其中通过体积排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC),相对于初始值,单体纯度的变化值(或主峰变化值)不超过10%,例如不超过5%、4%、3%、例如变化值不超过2%,优选不超过1%。在一个实施方案中,在储存后,或在振荡实验后,或在冻融实验后,通过测定本发明液体制剂的纯度变化,检查本发明液体制剂的稳定性,其中通过非还原型十二烷基硫酸钠毛细管电泳(CE-SDS)法,相对于初始值,单体纯度的变化值(或主峰变化值)下降不超过10%,例如不超过5%、4%、3%、2%或1%。在一个实施方案中,在储存后,或在振荡实验后,或在冻融实验后,通过阳离子交换高效液相色谱法(CEX-HPLC),检测本发明液体制剂的稳定性,其中相对于初始值,抗体的电荷变异性(主成分、酸性组分和碱性组分)的变化值总和不超过50%,例如不超过40%、30%、20%、10%、5%,和/或主成分的变化值不超过20%、15%、10%、8%、5%。在一个实施方案中,在储存后,或在振荡实验后,或在冻融实验后,通过直接ELISA法,检测本发明液体制剂的稳定性,其中相对于初始值,抗体的相对结合活性为70-130%,例如,70%、80%、90%、93%、95%、98%、100%、103%、105%、108%、110%、115%、120%、125%、130%,优选90-110%。

在一个实施方案中,本发明液体制剂在储存后,例如在25℃储存至少2个月后,或在40℃ $\pm$ 2℃储存1个月后,是稳定的,优选地具有如下特征之一或多项:相对于储存第0天的初始值,

(i) 通过SEC-HPLC法测量,主峰变化值小于1%,和/或制剂具有大于96%的纯度,优选大于97%、98%的纯度;

(ii) 通过非还原型CE-SDS法测量,主峰变化值小于2%,和/或制剂具有大于96%的纯度,优选大于97%、98%的纯度;

(iii) 通过CEX-HPLC法测量,制剂中抗CLDN18.2/CD3蛋白的各组分(主成分、酸性组分和碱性组分)的变化值总和不超过40%和/或主成分的变化值不超过20%,

例如在40℃ $\pm$ 2℃储存1个月后变化值总和不超过约40%(例如,不超过35%,30%,25%,20%,15%,10%)或主成分变化值不超过20%(例如,不超过15%,12%,10%,8%),或

例如在25℃储存2个月后变化值总和不超过约20%(例如,不超过15%,14%,13%,12%)或主成分变化值不超过约15%(例如,不超过10%,8%,7%,6%,5%);

(iv) 通过ELISA法测量,制剂中抗CLDN18.2/CD3蛋白的相对结合活性为70%-130%,例如,90,93,95,98,100,103,105,108,110,115,120%,例如90%-110%;

在优选的实施方案中,本发明液体制剂在振荡和/或反复冻融下是稳定的。

优选地,该制剂在振荡下或在反复冻融下是稳定的,例如,在室温避光650r/min条件下振荡5天或在-30℃/室温反复冻融6次后,具有如下特征之一或多项:

(i) 通过SEC-HPLC法测量,主峰变化值小于1%,和/或制剂具有大于96%的纯度,优选大于97%、98%、99%的纯度;

(ii) 通过非还原型CE-SDS法测量,主峰变化值小于2%,和/或制剂具有大于96%

的纯度，优选大于97%、98%的纯度；

(iii) 通过 CEX-HPLC 法测量，制剂中抗 CLDN18.2/CD3 蛋白的各组分（主成分、酸性组分和碱性组分）的变化值总和不超过 2%；

(iv) 通过 ELISA 法测量，制剂中抗 CLDN18.2/CD3 蛋白的相对结合活性为 70%-130%，例如，90%-110%；

在一个方面中，本发明的液体制剂为药物制剂，优选为注射剂，更优选为皮下注射剂或静脉内注射剂。在一个实施方案中，所述液体制剂为静脉输注剂。

另一方面，本发明提供了一种固体抗体制剂，其是通过将本发明的液体抗体制剂经固化处理而获得的。所述固化处理是通过例如结晶法、喷雾干燥法或冷冻干燥法实施的。在一个优选的实施方案中，所述固体抗体制剂例如是冻干粉针剂形式。固体抗体制剂可在使用前，通过重构于适当的溶媒中，形成本发明的重构制剂。所述重构制剂也是一种本发明的液体抗体制剂。在一个实施方案中，所述适当的溶媒选自注射用水、注射用有机溶剂，包括但不限于注射用油、乙醇、丙二醇等，或其组合。

在一个方面，本发明提供了一种递送装置，其包含本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂。在一个实施方案中，本发明的递送装置以包含本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂的预填充注射器形式提供，例如用于静脉内、皮下、皮内或者肌内注射、静脉内输注。

在又一方面，本发明提供向受试者，例如哺乳动物递送抗 CLDN18.2/CD3 蛋白的方法，包括给予所述受试者本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂的步骤，所述递送是例如通过使用预填充注射器的递送装置实施的。

在又一方面，本发明提供本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂的用途，用于制备在受试者中预防或治疗肿瘤(例如癌症)的方法，包括向受试者施用有效量的本发明的抗 CLDN18.2 x CD3 的双特异性抗体或其片段（优选的抗原结合片段）、药物组合物、药物组合或药盒。

本发明还提供了一种通过向受试者施用本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂或包含该液体抗体制剂或固体抗体制剂的递送装置（如，预填充注射器）或药物。

本发明的其它实施方案将通过参阅此后的详细说明而清楚明了。

附图简述

结合以下附图一起阅读时，将更好地理解以下详细描述的本发明的优选实施方案。出于说明本发明的目的，图中显示了目前优选的实施方案。然而，应当理解本发明不限于图中所示实施方案的精确安排和手段。

图 1 显示了实施例中使用的双特异性抗体结构示意图。

图 2 显示了本发明的双特异性抗体特异性杀伤 CLDN18.2 阳性的胃癌细胞 NUGC-4。

图 3 显示了双特异性抗体特异性杀伤 CLDN18.2 阳性的胰腺癌细胞 DAN-GCLDN18.2。

图 4 显示了双特异性抗体对 CLDN18.2 表达阴性的细胞没有非特异性的杀伤。

图 5 显示了双特异性抗体在 NUGC-4 胃癌人源化模型的体内药效结果。

图 6 显示了双特异性抗体在 DAN-G-CLDN18.2 胰腺癌人源化模型的体内药效结果。

图 7 显示了双特异性抗体在小鼠中的 PK。

图 8 显示了处方中 pH 值的变化的影响, (A) 蛋白含量 (UV 法) 变化趋势图; (B) 纯度 (SEC-HPLC 法) 变化趋势图; (C) 纯度 (nrCE-SDS 法) 变化趋势图; (D) 电荷变异体-酸性组分 (iCIEF 法) 变化趋势图; (E) 电荷变异体-主成分 (iCIEF 法) 变化趋势图; (F) 电荷变异体-碱性组分 (iCIEF 法) 变化趋势图。

图 9 显示了不同处方组成的影响, (A) 蛋白含量 (UV 法) 变化趋势图; (B) 纯度 (SEC-HPLC 法) 变化趋势图; (C) 纯度 (nrCE-SDS 法) 变化趋势图; (D) 电荷变异体-酸性组分 (iCIEF 法) 变化趋势图; (E) 电荷变异体-主成分 (iCIEF 法) 变化趋势图; (F) 聚山梨酯 80 含量 (HPLC-FLD 法) 变化趋势图。

发明详述

定义

除非另有定义, 否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域一般技术人员通常所理解的含义相同的含义。为了本发明的目的, 下文定义了以下术语。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小5%的下限和比指定数字数值大5%的上限的范围内的数字数值。

术语“和/或”当用于连接两个或多个可选项时, 应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或多项。

如本文中所用, 术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤, 但是不排除任何其他要素、整数或步骤。在本文中, 当使用术语“包含”或“包括”时, 除非另有指明, 否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如, 当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时, 也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

本文所用的术语“CLAUDIN”或“CLDN”是决定细胞间紧密连接结构的最重要的骨架蛋白, 其参与粘附连接, 并且在肿瘤细胞的转移和侵袭中起到重要作用。Claudin 蛋白广泛存在于哺乳动物上皮和内皮细胞中, 其分布主要是上皮细胞侧面以及基底细胞质膜上。不同的 Claudin 蛋白在不同组织中具有各自特异性表达, 其中 Claudin18(CLDN18)基因定位于 3q22.3, 分子量 24kDa, 包含 261 个氨基酸残基, 属 Claudins 超家族成员, 其蛋白结构包含 2 个细胞外环和 4 个穿膜区。人 CLDN18 或 Claudin18 蛋白的两个亚型分别是 Claudin18.1 或 CLDN18.1(UniProt ID:P56856-1), 和 Claudin18.2 或 CLDN18.2(UniProt ID:P56856-2), 在二者蛋白的一级结构序列中, 仅 N 端信号肽至细胞外环 1(Loop1)结构的某些位置的氨基酸残基上有所区别, 尤其是在细胞外环 1 上, CLDN18.1 和 CLDN18.2 仅 8 个氨基酸不同。CLDN18 的两种亚型蛋白的种属间序列同源性也非常高。其中 CLDN18.2 的细胞外环 1 在人、小鼠、猕猴等不同物种上序列完全一致, 而人与小鼠的 CLDN18.2 蛋白同源性达到 84%, 表明 CLDN18.2 蛋白序列极端保守性(O.Tureci 等人., Gene 481:83-92, 2011)。CLDN18.2 或其任何变体和同种型可以从天然表达它们的细胞或组织中分离, 或者使用本领域熟知的技术和/或本文所述的那些技术重组产生。在一个实施方案中, 本文所述的 CLDN18.2 是人 CLDN18.2。

本文所用的术语“抗 CLDN18.2 抗体”、“抗 CLDN18.2”、“CLDN18.2 抗体”或“结合 CLDN18.2 的抗体”是指这样的抗体, 所述抗体能够以足够的亲和力结合(人)CLDN18.2 以致所述抗体可以用作靶向(人)CLDN18.2 的治疗剂。在一个实施方案中, 所述(人)CLDN18.2 抗体在体外或体内以高亲和力结合(人)CLDN18.2。在一个实施方案中, 所述(人)CLDN18.2

抗体不结合 CLDN18.1。在一个实施方案中,所述(人)CLDN18.2 抗体与表达 CLDN18.2 的细胞结合而不结合表达 CLDN18.1 的细胞。在一些实施方案中,所述结合例如通过放射性免疫测定(RIA)、生物膜薄层干涉测定法(BLI)、MSD 测定法或表面等离子体共振法(SPR)或流式细胞术测量的。

本文所使用的术语“CD3”指表达在T细胞上作为多分子T细胞受体(TCR)的部分的抗原,且其是由下列四条受体链中的二条链所形成的同源二聚体或异源二聚体所组成:CD3- ϵ 、CD3- δ 、CD3- ζ 和CD3- γ 。人类CD3- ϵ (hCD3 ϵ)包含UniProtKB/Swiss-Prot: P07766.2中所述的氨基酸序列。人类CD3- δ (hCD3 δ)包含UniProtKB/Swiss-Prot: P04234.1中所述的氨基酸序列。在一些实施方案中,本发明所述的CD3是指来自人或食蟹猴的CD3。

本文所使用的术语“结合CD3的抗体”或“抗CD3抗体”包含特异性识别单一CD3亚单元(例如 ϵ 、 δ 、 γ 或 ζ)或与其结合的抗体和其抗原结合片段,以及特异性识别两个CD3亚单元的二聚复合物(例如, γ/ϵ 、 δ/ϵ 和 ζ/ζ CD3二聚体)以及与其连结的抗体和其抗原结合片段。本发明的抗体和抗原结合片段可与可溶性CD3、结合CD3和/或细胞表面表达的CD3结合。可溶性CD3包含天然的CD3蛋白以及重组的CD3蛋白变体,例如,缺乏跨膜区或另外不与细胞膜结合的单体和二聚体CD3结构。本发明提供以较低或不可检测的结合亲和力结合人类和食蟹猴CD3从而能够激活人类和食蟹猴的T细胞的抗体。在一些实施方案中,所述结合例如通过放射性免疫测定(RIA)、生物膜薄层干涉测定法(BLI)、MSD 测定法或表面等离子体共振法(SPR)或流式细胞术测量的。

“细胞表面表达的CD3”一词,指一个或多个CD3蛋白,其在活体内或活体外表达在细胞表面,使得至少一部分的CD3蛋白暴露于细胞膜的胞外侧且易接近抗体的抗原结合部分。“细胞表面表达的CD3”包含包括在细胞膜中的功能性T细胞受体环境内的CD3蛋白。“细胞表面表达的CD3”一词包含表达作为细胞表面上的同源二聚体或异源二聚体(例如, δ/ϵ 、 γ/ϵ 和 ζ/ζ CD3二聚体)部分的CD3蛋白。

效应细胞包含效应T细胞(T淋巴细胞),例如CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、Th1、Th2和调节T细胞(Tregs)。效应细胞还可以包含天然的杀手细胞、巨噬细胞、粒细胞、浆细胞或B细胞(淋巴细胞)。

在本文中,术语“抗体”以最广意义使用,指包含抗原结合位点的蛋白质,涵盖各种结构的天然抗体和人工抗体,包括但不限于完整抗体和抗体的抗原结合片段。

“双特异性”抗体指具有两个抗原结合位点的抗体,所述的两个抗原结合位点中的每一个抗原结合位点与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。在一个实施方案中,双特异性抗体,其具有针对第一抗原和第二抗原的结合特异性。

双特异性抗体形式包含IgG样和非IgG样抗体(Fan等人(2015) Journal of Hematology & Oncology . 8: 130)。最常见的IgG样抗体类型包含两个Fab区域和一个Fc区域,每个Fab的重链和轻链可以来自单独的单克隆抗体。非IgG样双特异性抗体缺乏Fc区域,其每一个抗原或靶标结合结构域可以是Fab,也可以是单链可变片段(scFv),还可以是模拟两种抗体的可变结构域的融合蛋白,不同的结合结构域通过肽接头、化学偶联、非共价键连接或者其他方式连接到一起。这些形式包含双特异性T-细胞衔接子(BiTE)。

可以使用任何双特异性抗体形式或技术来制备本发明的双特异性抗体。例如,具有第一抗原结合特异性的抗体或其片段可以与如具有第二抗原结合特异性的另一种抗体或抗体片段等一种或多种其它分子实体功能性连结(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或以其它方式),以产生双特异性抗体。可以在本发明的背景下使用的具体示例性双特异性形式包括但不限于以下:基于scFv的或双抗体双特异性形式、IgG-scFv融合、双可变域(DVD)-Ig、四杂交瘤(Quadroma)、杵臼(knobs-into-holes)、普通轻链(例如,具有旋钮入孔的普通轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)body、Duobody、IgG1/IgG2、双作用Fab(DAF)-IgG以及Mab²双特异性形式。

如本文所用的术语“接头”是指使得能够直接连接双特异性抗体的不同部分的任何分子。在不同抗体部分之间建立共价连接的接头的实例包括肽接头和非蛋白质聚合物，包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙二醇的共聚物。

根据本发明的术语“肽接头”是指氨基酸的序列，其中所述序列将抗体的第一部分的氨基酸序列连接至抗体的第二部分。例如，肽接头可以将抗体的第一(可变和/或结合)结构域连接至第二可变和/或结合)结构域。例如，肽接头也可以将抗体的一部分连接至抗体的另一部分，诸如将抗原结合结构域连接至 Fc 结构域或其片段。优选地，所述肽接头具有这样的长度，其足以连接两个实体，其方式使得它们维持它们相对于彼此的构象，使得不妨碍期望的活性。

肽接头可以主要包括或不主要包括以下氨基酸残基：Gly、Ser、Ala 或 Thr。有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸聚合物，包括例如(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGGS)_n、(GGGS)_n 和 (GGGGS)_nG，其中 n 是至少 1(且优选 2、3、4、5、6、7、8、9、10)的整数。有用的接头还包括甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其他柔性接头。

根据本发明的术语“价”表示在抗体分子中存在指定数目的结合位点。因此，术语二价、三价、四价分别表示在抗体构建物中存在两个、三个或四个结合位点。根据本发明的双特异性抗体是至少二价的并且可以是多价的，例如二价、三价、四价或六价的。

如本文所用的术语“结合结构域”是指双特异性抗体的结合特定靶标或抗原的任何部分。结合结构域是抗原结合位点。结合结构域可以是例如抗体或免疫球蛋白本身或抗体片段。这种结合结构域可以具有或不具有独立于 BsAB 的剩余部分的三级结构，并且可以作为单独实体结合或不结合其靶标。

在本发明的某些示例性实施例中，双特异性抗体的每个抗原结合域包括重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。在包括第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的双特异性抗体中，第一抗原结合结构域的 VH、VL 或 CDR 可以用前缀“A1”表示，并且第二抗原结合结构域的 VH、VL 或 CDR 可以用前缀“A2”表示。例如，第一抗原结合结构域的重链 CDR(HCDR) 在本文中可以为 A1-HCDR1、A1-HCDR2 和 A1-HCDR3；并且第二抗原结合结构域的重链 CDR 在本文中可以为 A2-HCDR1、A2-HCDR2 和 A2-HCDR3。类似的，第一抗原结合结构域的重链可变区 VH 在本文中称为 A1-VH，第二抗原结合结构域的重链可变区 VH 在本文中称为 A2-VH。第一抗原结合结构域的轻链 CDR(HCDR) 在本文中可以为 A1-LCDR1、A1-LCDR2 和 A1-LCDR3；并且第二抗原结合结构域的轻链 CDR 在本文中可以为 A2-LCDR1、A2-LCDR2 和 A2-LCDR3。类似的，第一抗原结合结构域的轻链可变区 VL 在本文中称为 A1-VL，第二抗原结合结构域的轻链可变区 VL 在本文中称为 A2-VL。

术语“抗体片段”包括完整抗体的一部分。在优选的实施方案中，抗体片段为抗原结合片段。

“抗原结合片段”指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于 Fv，Fab，Fab'，Fab'-SH，F(ab')₂；dAb(domain antibody)；线性抗体；单链抗体(例如 scFv)；单结构域抗体例如 VHH；双价抗体或其片段；或骆驼科抗体。

术语“抗原”是指引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫细胞的活化，或两者兼有。技术人员将理解，任何大分子，包括基本上所有的蛋白质或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以衍生自重组或基因组 DNA。如本文所用，术语“表位”指抗原(例如，CLDN18.2)中与抗体分子特异性相互作用的部分。

与参照抗体“结合相同或重叠表位的抗体”是指这样的抗体，其在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合，换言之，参照抗体在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。

与参照抗体竞争结合其抗原的抗体是指这样的抗体，其在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合。换言之，参照抗体在竞争测定

中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗体是否与另一种竞争，这些测定例如：固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定。

抑制(例如竞争性抑制)参照抗体与其抗原的结合的抗体是指这样的抗体，其抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合。换言之，参照抗体抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。抗体与其抗原的结合可以亲和力(例如平衡解离常数)衡量。测定亲和力的方法是本领域已知的。

与参照抗体显示相同或相似的结合亲和力和/或特异性的抗体是指这样的抗体，其能够具有参照抗体的至少 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的结合亲和力和/或特异性。这可以通过本领域已知的任何测定结合亲和力和/或特异性的方法进行测定。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3, 从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中, 各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派系统的任一种或其组合确定, 所述指派系统包括例如: 基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人, (1989) Nature 342: 877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)), 基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/上), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering) 的 North CDR 定义。

例如, 根据不同的 CDR 确定方案, 每一个 CDR 的残基如下所述。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案	IMGT 方案
LCDR1 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	L27-L32
LCDR2 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	L50-L52
LCDR3 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	L89-L96
HCDR1 (Kabat 编号系统)	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B	H26-H35B
HCDR1 (Chothia 编号系统)	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	H26-H35

HCDR2 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	H51-H57
HCDR3 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	H93-H102

CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。

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

除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区中的残基位置（包括重链可变区残基和轻链可变区残基）时，是指根据 Kabat 编号系统（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）的编号位置。

在一个实施方案中，本发明抗体的重链可变区 CDR 按照如下规则确定：

VH CDR1 按照 AbM 规则确定；并且 VH CDR2 和 3 均按照 Kabat 规则确定。

在一个实施方案中，本发明抗体的轻链可变区 CDR 按照 Kabat 规则确定。

在一个实施方案中，本发明抗体的重链可变区 CDR 按照如下规则确定：VH CDR1 按照 AbM 规则确定；并且 VH CDR2 和 3 均按照 Kabat 规则确定；且轻链可变区 CDR 按照 Kabat 规则确定。

应该注意，基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此，在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体，其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列，但是由于应用了不同的方案（例如不同的指派系统规则或组合）而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

具有不同特异性(即，针对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的 CDR(在同一指派系统下)。然而，尽管 CDR 在抗体与抗体之间是不同的，但是 CDR 内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用 Kabat, Chothia, AbM、Contact 和 North 方法中的至少两种，可以确定最小重叠区域，从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。最小结合单位可以是 CDR 的一个子部分。正如本领域技术人员明了，通过抗体的结构和蛋白折叠，可以确定 CDR 序列其余部分的残基。因此，本发明也考虑本文所给出的任何 CDR 的变体。例如，在一个 CDR 的变体中，最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变，而根据 Kabat 或 Chothia 定义的其余 CDR 残基可以被保守氨基酸残基替代。

术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 CH2 和 CH3 的恒定区域，该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然 Fc 区域能够和免疫细胞表面的不同的 Fc 受体结合，从而能够引起 CDC\ADCC\ADCP 效应功能。此类效应器功能一般要求 Fc 区与结合结构域(例如抗体可变域)联合。在一些实施方案中，Fc 区被突变以增强其 CDC\ADCC\ADCP 效应功能。在

一些实施方案中，Fc 区被突变以削弱或删除其 CDC\ADCC\ADCP 效应功能。

“IgG 形式的抗体”是指抗体的重链恒定区所属的 IgG 形式。所有同一型的抗体的重链恒定区都是相同的，不同型的抗体之间的重链恒定区不同。例如，IgG4 形式的抗体是指其重链恒定区来自 IgG4，或者 IgG1 形式的抗体是指其重链恒定区来自 IgG1。

“人源化”抗体是指包含来自非人 CDR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的抗体。在一些实施方案中，人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本上所有的 CDR(例如，CDR)对应于非人抗体的那些，并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。

“人抗体”或“全人抗体”或“全人源抗体”可以互换使用，其指具有这样的氨基酸序列的抗体，所述氨基酸序列对应于下述抗体的氨基酸序列，所述抗体由人或人细胞生成或来源于非人来源，其利用人抗体库或其它人抗体编码序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

如本文所用，术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗原结合位点与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法如通过放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法 (SPR) 测定。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗肿瘤，例如癌症中有效的任何物质，包括化疗剂、细胞因子、血管生成抑制剂、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂(例如免疫抑制剂)。

术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。

“化疗剂”包括在治疗癌症或免疫系统疾病中有用的化学化合物。

术语“小分子药物”是指低分子量的能够调节生物过程的有机化合物。“小分子”被定义为分子量小于 10kD、通常小于 2kD 和优选小于 1kD 的分子。小分子包括但不限于无机分子、有机分子、含无机组分的有机分子、含放射性原子的分子、合成分子、肽模拟物和抗体模拟物。作为治疗剂，小分子可以比大分子更能透过细胞、对降解更不易感和更不易于引发免疫应答。

本文使用的术语“免疫调节剂”指抑制或调节免疫应答的天然或合成活性剂或者药物。免疫应答可以是体液应答或细胞应答。免疫调节剂包含免疫抑制剂。在一些实施方案中，本发明的免疫调节剂包括免疫检查点抑制剂或免疫检查点激动剂。

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

“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的量，其中抗体或抗体片段或组合物或组合的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤体积)至少约 40%、甚至更优选地至少约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%甚至 100%。

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

如下进行序列之间序列同一性的计算。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数，将所述序列出于最佳比较目的

比对(例如,可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选实施方案中,为比较目的,所比对的参考序列的长度是至少 30%、优选地至少 40%、更优选地至少 50%、60%和甚至更优选地至少 70%、80%、90%、100%的参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在这个位置处是相同的。

可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。在一个优选实施方案中,使用已经集成至 GCG 软件包的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)算法(在 <http://www.gcg.com> 可获得),使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵和空位权重 16、14、12、10、8、6 或 4 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6,确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。在又一个优选的实施方案中,使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在 <http://www.gcg.com> 可获得),使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权重 40、50、60、70 或 80 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6,确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)是采用空位罚分 12、空位延伸罚分 4 和移码空位罚分 5 的 Blossum 62 评分矩阵。还可以使用 PAM120 加权余数表、空位长度罚分 12、空位罚分 4),利用已经并入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E. Meyers 和 W. Miller 算法, ((1989) CABIOS, 4:11-17)确定两个氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性百分数。额外地或备选地,可以进一步使用本文所述的核酸序列和蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库执行检索,以例如鉴定其他家族成员序列或相关序列。

如本文所用,术语“在严格条件下(例如在低严格性、中等严格性、高严格性或极高严格性条件下)杂交”描述了杂交和洗涤条件。进行杂交反应的指导可以在通过引用方式并入的 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 中找到。参考文献中描述了含水方法和非含水方法并且可以使用任一方法。本文中提及的优选的杂交条件如下: 1)低严格性杂交条件是在约 45°C 于 6X 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中,随后至少在 50°C (对于低严格性条件,可以增加洗涤的温度至 55°C)于 0.2X SSC, 0.1% SDS 中洗涤两次; 2)中等严格性杂交条件是在约 45°C 于 6 X SSC 中、随后在 60°C 在 0.2 X SSC、0.1% SDS 中洗涤一次或多次; 3)高严格性杂交条件是在约 45°C 在 6 X SSC 中、随后在 65°C 于 0.2X SSC、0.1% SDS 中洗涤一次或多次; 并且优选地 4)极高严格性杂交条件是在 65°C 于 0.5 M 磷酸钠、7%SDS 中、随后在 65°C 于 0.2X SSC、0.1% SDS 中洗涤一次或多次。极高严格性条件(4)是优选的条件和除非另外说明,否则应当使用的一个条件。

术语“抗肿瘤作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果,包括但不限于例如,肿瘤体积分减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。

术语“肿瘤”和“癌症”在本文中互换地使用,涵盖实体瘤和血液肿瘤。

术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。在某些实施方案中,适合于通过本发明的抗体来治疗的癌症包括胃癌、胰腺癌或胃食管交界癌,包括那些癌症的转移性形式。

术语“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

术语“抗体制剂”指一种制备物,所述制备物处于允许作为活性成分的抗体的生物活性可以以有效发挥的形式,并且不含有对于待施用该制剂的受试者而言具有不可接受毒性的其它组

分。这类抗体制剂通常是无菌的。通常，抗体制剂中包含可药用赋形剂。“可药用”赋形剂是可以合理地施用至受试哺乳动物以便制剂中所用活性成分的有效剂量可以递送至受试者的制剂。赋形剂的浓度与施用模式相适应，例如可以是注射可接受的。

术语“抗CLDN18.2/CD3制剂”在本文中也简称为“本发明的抗体制剂”，意指包含抗CLDN18.2/CD3蛋白作为活性成分并包含可药用赋形剂的制备物。将抗CLDN18.2/CD3蛋白与可药用赋形剂组合后，作为活性成分的抗CLDN18.2/CD3蛋白适于治疗性或预防性施与人类或非人类动物。本发明的抗体制剂可以例如制备成水性形式的液体制剂，例如，即用预填充式注射器，或者制备成冻干制剂，在即将使用前通过溶解和/或悬浮于生理可接受的溶液中进行重构（即，复溶）。在一些实施方案中，抗CLDN18.2/CD3蛋白制剂是液体制剂形式。

“稳定的”抗体制剂是指，制剂中的抗体在储存于特定条件下之后、或在振荡后、或在反复冻融后保有可接受程度的物理稳定性和/或化学稳定性。尽管抗体制剂中所含的抗体在储存、振荡或反复冻融之后可能不会100%维持其化学结构，但通常如果维持约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的抗体结构或功能，则认为抗体制剂是“稳定的”。在一些具体的实施方案中，本发明的抗CLDN18.2/CD3蛋白制剂在制造、制备、运输和长期储存过程中表现出低至检测不到的抗体聚集或降解或化学修饰，从而极少或甚至是没有抗CLDN18.2/CD3蛋白的生物活性损失，表现出高度稳定性。在一些实施方案中，本发明的抗CLDN18.2/CD3蛋白制剂在储存、振荡和/或反复冻融后，基本上保留其物理和化学稳定性。优选地，本发明液体制剂可以在室温或在40℃稳定至少2周，和/或在25℃稳定至少2个月，和/或在2-8℃稳定至少24个月。优选地，本发明液体制剂可以在室温避光650 r/min振荡5天后和/或在-30℃/室温反复冻融1-6次后是稳定的。

本领域已知多种分析技术可以用于测定蛋白质的稳定性，参见例如Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)。可以在选定的温度和选定的储存时间测量稳定性。例如，可以基于预期的制剂货架期来选择储存时间。备选地，可以使用加速稳定性试验。在一些实施方案中，通过对抗体制剂进行各种胁迫测试来进行稳定性测试。这些测试可以代表调配的抗体制剂在制造、储存或运输期间可能遭遇到的极端条件，也可以代表在非制造、储存或运输期间可能使抗体制剂中的抗体的不稳定性加速的条件。例如，可以将经调配的抗CLDN18.2/CD3蛋白制剂充填至玻璃小瓶中以检验在高温胁迫下的抗体稳定性。再例如，可以将经调配的抗CLDN18.2/CD3蛋白制剂充填至玻璃小瓶中并在室温避光650 r/min条件下振荡5天后，检查抗体的稳定性。再例如，将经调配的抗CLDN18.2/CD3蛋白制剂充填至玻璃小瓶中并在-30℃/室温反复冻融1-6次后，检查抗体的稳定性。在一个实施方案中，在-30℃以下冻存1天后室温解冻，为一个冻融循环。

经一段储存时间后、或经振荡一段时间后或经反复冻融多次后，制剂不显示聚集、沉淀、混浊和/或变性；或显示非常少的聚集、沉淀、混浊和/或变性，则可以认为抗体在制剂中“保持其物理稳定性”。由于制剂中抗体的聚集可以潜在地导致患者增加的免疫反应，从而导致安全性问题。因此，需要使在制剂中的抗体聚集最小化或防止聚集。光散射法可以用于测定制

剂中的可见聚集物。SEC-HPLC可以用于测定制剂中的可溶性聚集物。此外，可以通过目视检查制剂的外观、颜色和/或澄清度、或者通过OD350nm法检测制剂的浊度、或者通过非还原型CE-SDS法测定制剂的纯度，来指示制剂的稳定性。在一个实施方案中，通过测定在特定温度下储存特定时间之后或在振荡后或在反复冻融后制剂中的抗体单体的百分比来测量制剂的稳定性，其中制剂中的抗体单体的百分比越高，则制剂的稳定性越高。

“可接受程度的”物理稳定性可以表示，于特定温度下储存特定时间之后，振荡后或反复冻融后，在制剂中检测到至少约90%的抗CLDN18.2/CD3蛋白单体。在一些实施方案中，在特定温度储存至少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个月或更久后，可接受程度的物理稳定性表示至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的抗CLDN18.2/CD3蛋白单体。当评估物理稳定性时，药物制剂储存的特定温度可为约-80℃至约45℃的任一温度，例如储存于约-80℃、约-30℃、约-20℃、约0℃、约4℃-8℃、约5℃、约25℃、约35℃、约37℃、约40℃、约42℃或约45℃。例如，若储存于约40℃±2℃ 1个月或4周之后，检测到至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的抗CLDN18.2/CD3蛋白单体，则药物制剂视为是稳定的。若储存于约25℃ 2个月之后，检测到至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的抗CLDN18.2/CD3蛋白单体，则药物制剂视为是稳定的。若储存于约5℃ 9个月之后，检测到至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的抗CLDN18.2/CD3蛋白单体，则药物制剂视为是稳定的。

经一段储存时间后、或经振荡一段时间后或经反复冻融多次后，如果制剂中的抗体不显示显著的化学改变，则可以认为抗体在制剂中“保持其化学稳定性”。大多数化学不稳定性源自于形成了抗体的共价修饰形式(例如，抗体的电荷变异体)。例如由天冬氨酸异构化、N和C末端修饰，可以形成碱性变异体；由脱酰胺化、唾液酸化和糖化，可以产生酸性变异体。化学稳定性可以通过检测和/或定量抗体的化学改变形式来评估。例如，可以通过阳离子交换色谱(CEX)或成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)检测制剂中抗体的电荷变异体。在一个实施方案中，通过测定在特定温度下储存特定时间之后或经振荡后或反复冻融多次后制剂中抗体的电荷变异体百分比变化值来测量制剂的稳定性，其中该变化值越小，则制剂的稳定性越高。

“可接受程度”的化学稳定性可以表示于特定温度下储存特定时间之后、或经振荡一段时间后或经反复冻融多次后，制剂中电荷变异体(例如主成分或酸性组分或碱性组分)的百分比变化值不超过40%，例如不超过30%、不超过20%；或电荷变异体(主成分、酸性组分和碱性组分)的百分比变化值总和不超过60%，例如不超过50%、不超过30%。在一些实施方案中，在特定温度储存至少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个月或更久后，可接受程度的化学稳定性可以表现为主成分电荷变异体的百分比变化值不超过约50%、40%、30%、20%、或15%；或电荷变异体的百分比变化值总和不超过约60%、50%、或30%。当评估化学稳定性时，储存药物制剂的温度可为约-80℃

至约45℃的任一温度，例如储存于约-80℃、约-30℃、约-20℃、约0℃、约4℃-8℃、约5℃、约25℃或约45℃。例如，若在储存于5℃ 24个月之后，主成分电荷变异体的百分比变化值少于约25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%，则药物制剂可被视为是稳定的。若在储存于25℃ 2个月之后，主成分电荷变异体的百分比变化值少于约20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%，则药物制剂亦可被视为是稳定的。若在储存于40℃ 1个月之后，主成分电荷变异体的百分比变化值少于约50%、40%、30%、20%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、5%或4%，则药物制剂亦可被视为是稳定的。

术语“冻干制剂”是指通过液体制剂的冷冻干燥处理得到或能够得到的组合物。优选地，其为具有少于5%、优选少于3%水含量的固体组合物。

术语“重构制剂”是指将固体制剂（例如冻干制剂）溶解和/或悬浮于生理可接受的溶液得到的液体制剂。

文中使用的术语“室温”是指15℃至30℃、优选20℃至27℃、更优选25℃的温度。

“胁迫条件”是指在化学和/或物理上不利于抗体蛋白的环境，所述环境可以导致不可接受的抗体蛋白失稳定，例如，高温、振荡、冻融。“高温胁迫”是指，将抗体制剂置于室温或甚至于更高温度（例如40℃±2℃）储存一段时间。通过高温胁迫加速试验，可以检查抗体制剂的稳定性。

如本文所使用，术语“肠胃外施用”意指肠内和局部给药以外的给药方式，通常通过注射或输注方式，并且包括但不限于，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(subcuticular)、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射以及输注。在一些实施方案中，本发明的稳定抗CLDN18.2/CD3蛋白制剂肠胃外施用于受试者。在一个实施方案中，本发明的抗CLDN18.2/CD3蛋白制剂以皮下、皮内、肌内或静脉内注射方式施用于受试者。

I. 抗体制剂

本发明提供稳定的液体抗体制剂，其包含(i)抗CLDN18.2/CD3抗体，(ii)缓冲剂，(iii)稳定剂，和(iv)表面活性剂，任选的包含螯合剂。所述抗体制剂的pH为约5.0-6.0。在一个优选方案中，本发明的液体抗体制剂是注射制剂形式。

(i) 抗CLDN18.2/CD3抗体

在一些实施方案中，本发明的抗CLDN18.2/CD3双特异性抗体以高亲和力结合CLDN18.2（例如人CLDN18.2）。在一些实施方案中，本发明的抗体特异性结合CLDN18.2（例如人CLDN18.2），而不结合CLDN18.1（例如人CLDN18.1）。在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段与人CLDN18.2的结合亲和力高于已知的CLDN18.2抗体，例如Zolbetuximab(简称Zmab)抗体。在一些实施方案中，本发明的抗CLDN18.2 x CD3双特异性抗体以所需的亲和力（例如较低）结合CD3（例如人CD3或食蟹猴CD3）。在一些实施方案中，本发明的抗体能够既结合人CD3，又结合食蟹猴CD3。在一些实施方案中，通过生物膜薄层干涉测定技术或表面等离子共振法测定抗体的亲和力。

在一些实施方案中，本发明的抗CLDN18.2/CD3双特异性抗体能够结合肿瘤细胞表面的

CLDN18.2, 以及效应细胞表面的 CD3。在一些实施方案中, 利用流式细胞术检测所述结合。

在一些实施方案中, 本发明的双特异性抗体包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域, 其中第一抗原结合结构域特异性结合 CLDN18.2, 第二抗原结合结构域特异性结合 CD3。

在本发明优选的实施方案中, 第一抗原结合结构域包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (A1-HCDR), A1-HCDR1、A1-HCDR2 和 A1-HCDR3。

在本发明优选的实施方案中, 第一抗原结合结构域包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (A1-LCDR), A1-LCDR1、A1-LCDR2 和 A1-LCDR3。

在一些实施方案中, 第一抗原结合结构域包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (A1-HCDR) 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (A1-LCDR)。

在一些方面中, 第一抗原结合结构域包含重链可变区 (A1-VH)。在一些方面中, 第一抗原结合结构域包含轻链可变区 (A1-VL)。在一些方面中, 第一抗原结合结构域包含重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中, 所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (A1-HCDR), HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中, 所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (A1-LCDR), LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, A1-VH

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中, A1-VL

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在本发明优选的实施方案中, 第二抗原结合结构域包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (A2-HCDR), A2-HCDR1、A2-HCDR2 和 A2-HCDR3。

在本发明优选的实施方案中, 第二抗原结合结构域包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (A2-LCDR), A2-LCDR1、A2-LCDR2 和 A2-LCDR3。

在一些实施方案中, 第二抗原结合结构域包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (A2-HCDR) 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (A2-LCDR)。

在一些方面中, 第二抗原结合结构域包含重链可变区 (A2-VH)。在一些方面中, 第二抗原结合结构域包含轻链可变区 (A2-VL)。在一些方面中, 第二抗原结合结构域包含重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中, 所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (A2-HCDR), HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中, 所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (A2-LCDR), LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, A2-VH

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 22、30 或 32 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 22、30 或 32 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 22、30 或 32 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸

保守置换)的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成,优选地,所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中, A2-VL

(i)包含与选自 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii)包含与选自 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 10 个,更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换,更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成,优选地,所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中,本发明的 3 个来自 A2-VH 的互补决定区(A2-HCDR), A2-HCDR1、A2-HCDR2 和 A2-HCDR3 为

(i) 如 SEQ ID NO: 22、30 或 32 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 A2-HCDR1、A2-HCDR2 和 A2-HCDR3, 或者

(ii)相对于(i)的序列,在所述三个 A2-HCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中,本发明的 3 个来自 A2-VL 的互补决定区(A2-LCDR), A2-LCDR1、A2-LCDR2 和 A2-LCDR3 为

(i) 如 SEQ ID NO:27 所示的 A2-VL 中所含的三个互补决定区域 A2-LCDR1、A2-LCDR2 和 A2-LCDR3,

(ii) 相对于(i)的序列,在所述三个 A2-LCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中, A2-HCDR1 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,或者 A2-HCDR1 包含与 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, A2-HCDR2 包含 SEQ ID NO:20 或 31 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,或者 A2-HCDR2 包含与 SEQ ID NO:20 或 31 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, A2-HCDR3 包含 SEQ ID NO:21 或 29 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,或者 A2-HCDR3 包含与 SEQ ID NO: 21 或 29 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, A2-LCDR1 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,或者 A2-LCDR1 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, A2-LCDR2 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,或者 A2-LCDR2 包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, A2-LCDR3 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,或者 A2-LCDR3 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换,优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体还包含重链恒定区。在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体还包含轻链恒定区。在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体还包含重链恒定区和轻链恒定区。在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体包含 2 个重链恒定区,其中一个重链恒定区 A1-HC 与第一抗原结构域的重链可变区 A1-VH 相连构成与 CDLN18.2 结合部分的重链,且另一个重链恒定区 A2-HC 与第二抗原结合结构域的重链可变区 A2-VH

相连构成与 CD3 结合部分的重链。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含 2 个轻链恒定区，其中一个轻链恒定区 A1-LC 与第一抗原结构域的轻链可变区 A1-VL 相连构成与 CLDN18.2 结合部分的轻链，且另一个轻链恒定区 A2-LC 与第二抗原结合结构域的轻链可变区 A2-VL 相连构成与 CD3 结合部分的轻链。在一个实施方案中，本发明的双特异性抗体包含 A1-HC、A1-LC、A2-HC 和 A2-LC。在一些实施方案中，A1-HC 可以与 A2-HC 相同或不同。在一些实施方案中，A1-LC 可以与 A2-LC 相同或不同。在一些实施方案中，A1-HC 与 A2-HC 不同，且 A1-LC 与 A2-LC 不同。

在一些实施方案中，本发明的重链恒定区 HC 为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区，优选的 IgG1 的重链恒定区，例如野生型 IgG1 重链恒定区或突变的 IgG1 重链恒定区（例如 IgG1LALA）。在一些实施方案中，本发明的抗体轻链恒定区 LC 为 lambda 或 Kappa 轻链恒定区。

在一些优选的实施方案中，本发明的重链恒定区 HC

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:5 或 23 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 5 或 23 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 5 或 23 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些优选的实施方案中，本发明的重链恒定区 HC

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:33 或 34 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 33 或 34 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 33 或 34 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗体轻链恒定区 LC

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:10 或 28 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:10 或 28 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 10 或 28 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的双特异性抗体包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域，其中

第一抗原结合结构域特异性结合 CLDN18.2，第二抗原结合结构域特异性结合 CD3，其中第一抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO:4 所示的 A1-VH 中所含的三个互补决定区域 A1-HCDR1、A1-HCDR2 和 A1-HCDR3，和如 SEQ ID NO:9 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 A1-LCDR1、A1-LCDR2 和 A1-LCDR3；

第二抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO: 22、30 或 32 所示的 A2-VH 中所含的三个互补决定区域 A2-HCDR1、A2-HCDR2 和 A2-HCDR3，和如 SEQ ID NO:27 所示的 A2-VL 中所含的三个互补决定区域 A2-LCDR1、A2-LCDR2 和 A2-LCDR3。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的双特异性抗体包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域，其中第一抗原结合结构域特异性结合 CLDN18.2，第二抗原结合结构域特异性结合 CD3，其中

第一抗原结合结构域包含分别如以下氨基酸序列所示的 A1-HCDR1、A1-HCDR2、A1-HCDR3: SEQ ID NO:1、2 和 3，以及分别如以下氨基酸序列所示的 A1-LCDR1、A1-LCDR2 和 A1-LCDR3: SEQ ID NO:6、7 和 8；以及

第二抗原结合结构域包含

(i)分别如以下氨基酸序列所示的 A2-HCDR1、A2-HCDR2、A2-HCDR3: SEQ ID NO:19、20 和 21，以及分别如以下氨基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:24、25 和 26；或

(ii) 分别如以下氨基酸序列所示的 A2-HCDR1、A2-HCDR2、A2-HCDR3: SEQ ID NO:19、20 和 29，以及分别如以下氨基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:24、25 和 26；或

(iii)分别如以下氨基酸序列所示的 A2-HCDR1、A2-HCDR2、A2-HCDR3: SEQ ID NO:19、31 和 21，以及分别如以下氨基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:24、25 和 26。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的双特异性抗体包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域，其中第一抗原结合结构域特异性结合 CLDN18.2，第二抗原结合结构域特异性结合 CD3，其中

第一抗原结合结构域包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 A1-VH，和包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 A1-VL；

第二抗原结合结构域包含 SEQ ID NO:22、30 或 32 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 A2-VH，和包含 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 A2-VL。

在本发明的一些具体的实施方案中，本发明的双特异性抗体是 IgG-样结构的双特异性抗体，即其包含与 CLDN18.2 结合部分的重链和轻链，以及与 CD3 结合部分的重链和轻链。在一些实施方案中，在两条重链的 CH3 区具有 Knob-into-Hole 的序列 (Shane Atwell 等, Journal of Molecular Biology, 1997; A.Margaret Merchant 等, Nature Biotechnology, 1998)，因此形成杵臼结构。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体的结构参见图 1。

在一些实施方案中，与 CLDN18.2 结合部分的重链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，与 CLDN18.2 结合部分的轻链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中, 与 CD3 结合部分的重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 39、41 或 42 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 39、41 或 42 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 39、41 或 42 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中, 与 CD3 结合部分的轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一个实施方案中, 本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。优选的, 本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换, 优选地保守置换。

在优选的实施方案中, 本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域 (例如在 FR 中)。更优选地, 本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。在一些实施方案中, 本发明所述的氨基酸改变发生在抗体重链恒定区的 Fc 区上, 在优选的实施方案中, 所述 Fc 区上的氨基酸改变削弱或删除了抗体的 ADCC 和/或 CDC 作用。

在一些实施方案中, 置换为保守性置换。保守置换是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸置换, 例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸置换, 一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸置换, 或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸置换。示例性的置换如下表所示:

原始残基	示例性置换	优选的保守氨基酸置换
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe

Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、正亮氨酸	Leu
---------	--------------------------	-----

在某些实施方案中，置换发生在抗体的 CDR 区。通常，获得的变体相对于亲本抗体在某些生物学特性方面(例如，增加的亲和力)具有修饰(例如，改善)和/或将具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体。

在某些实施方案中，可在本文中所提供抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸修饰，以此产生 Fc 区变体，以改变抗体的一种或多种功能特性，例如血清半衰期、补体结合、补体依赖性细胞毒性、Fc 受体结合和/或抗体依赖性细胞毒性。Fc 区变体可包括在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸改变(例如置换)的人 Fc 区序列(例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区)。

在某些实施方案中，可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体，例如“硫代 MAb”，其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基置换。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其他非蛋白质部分。适合抗体衍生作用的部分包括，但不限于，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二烷、聚-1,3,6-三烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中，与 CLDN18.2 特异性结合的第一抗原结合结构域，或重链和轻链组合是全人源的，且与 CD3 结合的第二抗原结合结构域或重链和轻链组合是人源化的。

在一个优选的实施方案中，本发明抗体制剂中抗 CLDN18.2/CD3 双特异性抗体是 PCT 中请号 PCT/CN2021/121286（国际申请日：2021 年 9 月 28 日）中公开的抗 CLDN18.2/CD3 双特异性抗体。

本发明的抗体制剂中所包含的抗体或其抗原结合片段的量可随着制剂的特定目的特性、特定环境、和使用制剂的特定目的而改变。在一些实施方案中，抗体制剂为液体制剂，其可含有约 0.1-100mg/ml，优选地约 0.1-10 mg/ml，例如约 0.5、1、2、3、4、5mg/ml 抗 CLDN18.2/CD3 双特异性抗体。

(ii) 缓冲剂

缓冲剂是可以将溶液的 pH 维持在可接受范围的试剂。在一些实施方案中，用于本发明制剂中的缓冲剂可以将本发明制剂的 pH 控制在大约 5.0-6.0 的 pH 范围，例如约 5.0-5.5 的 pH。在一些具体的实施方案中，本发明的抗体制剂具有约 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、或 5.8 的 pH。例如，本发明的抗体制剂具有 pH 为 5.2±0.2 或 5.5±0.2，优选地 pH 为 5.2。

在一些实施方案中，本发明制剂包含选自以下的缓冲体系：组氨酸-盐酸组氨酸缓冲体系，枸橼酸-枸橼酸钠缓冲体系，醋酸-醋酸钠缓冲体系，磷酸盐缓冲体系，优选组氨酸-盐酸组氨酸缓冲体系。

在一些实施方案中，用于本发明制剂中的缓冲剂为组氨酸缓冲剂，尤其是由组氨酸和盐酸组氨酸组成的缓冲体系。在一些实施方案中，本发明的组氨酸缓冲剂中组氨酸的浓度为约

0.01-10mg/ml mM, 尤其是约0.1-1 mg/ml, 例如, 约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1 mg/ml。在一个实施方案中, 本发明制剂包含约0.18 mg/ml组氨酸。在另一个实施方案中, 用于本发明制剂的组氨酸缓冲剂由例如约0.18 mg/ml的组氨酸和约1.84 mg/ml的盐酸组氨酸组成。

(iii) 稳定剂

用于本发明的合适的稳定剂可以选自糖、多元醇和氨基酸及其组合。对于作为稳定剂的糖包括但不限于蔗糖, 海藻糖、麦芽糖及组合。对于作为稳定剂的多元醇包括但不限于山梨醇、甘露醇、或其组合。对于作为稳定剂的氨基酸包括但不限于精氨酸、盐酸精氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、脯氨酸及组合。

例如, 在一些实施方案中, 稳定剂包含选自以下之一或多项:

-选自山梨醇、甘露醇、或其组合的多元醇, 约10-100 mg/ml, 优选地20-40 mg/ml, 例如25 mg/ml; 或40-60 mg/ml, 例如50 mg/ml;

-选自蔗糖、海藻糖、麦芽糖、或其组合的糖类, 例如约10-100 mg/ml, 优选地30-60 mg/ml, 例如40 mg/ml;

-选自盐酸精氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、脯氨酸及组合的氨基酸, 例如, 20-200mM, 如约50-110mM, 例如, 70-100mM, 尤其是约80-90mM。

在一个实施方案中, 本发明液体制剂包含蔗糖作为稳定剂。蔗糖在本发明液体制剂中的量可以是约 10-100 mg/ml, 优选地 30-60 mg/ml, 例如 40 mg/ml。

在一个实施方案中, 本发明液体制剂包含山梨醇作为稳定剂。山梨醇在本发明液体制剂中的量可以是约 10-100 mg/ml, 优选地 20-40 mg/ml, 例如 25mg/ml; 或 40-60 mg/ml, 例如 50 mg/ml。

在一个实施方案中, 本发明液体制剂包含精氨酸作为稳定剂。精氨酸在本发明液体制剂中的量可以是约 50-110mM, 例如, 70-100mM, 尤其是约 80-90mM, 例如约 17.91 mg/ml 盐酸精氨酸。

在一个实施方案中, 本发明液体制剂包含山梨醇和精氨酸的组合作为稳定剂。该组合中, 山梨醇可以以约 10-60mg/ml, 优选地 15-40 mg/ml, 例如 20-35mg/ml 的量存在, 例如可以为大约 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30mg/ml。在该组合中, 精氨酸可以以约 70-100mM, 尤其是约 85mM 的量存在。优选地, 本发明液体制剂包含约 20-30 mg/ml 的山梨醇和约 15-20 mg/ml 的盐酸精氨酸。更优选地, 本发明液体制剂包含约 25 mg/ml 的山梨醇和约 17.91 mg/ml 的盐酸精氨酸。

在一个实施方案中, 本发明液体制剂包含蔗糖和精氨酸的组合作为稳定剂。该组合中, 蔗糖可以以约 10-60 mg/ml, 优选地 20-50 mg/ml, 例如 30-40 mg/ml 的量存在, 例如可以为大约 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 mg/ml。在该组合中, 精氨酸可以以约 70-100mM, 尤其是约 85mM 的量存在。优选地, 本发明液体制剂包含约 30-50 mg/ml 的蔗糖和约 15-20 mg/ml 的盐酸精氨酸。更优选地, 本发明液体制剂包含约 40mg/ml 的蔗糖和约 17.91 mg/ml 的盐酸精氨酸。

在一个实施方案中, 本发明液体制剂包含山梨醇作为单一稳定剂。在此实施方案中, 山

梨醇在本发明液体制剂中的量可以是约 30-70mg/ml, 例如 40-60 mg/ml。例如, 山梨醇可以以约 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 或 70 mg/ml 的量存在, 优选地以约 50 mg/ml 的量存在。

(iv) 表面活性剂

如本文所使用的, 术语“表面活性剂”是指具有两亲结构的有机物质; 即, 它们由相反的溶解性倾向的基团所组成, 通常是油溶性的烃链和水溶性的离子基团。

在一个实施方案中, 本发明的液体制剂中的表面活性剂是非离子型表面活性剂, 例如, 烷基聚(环氧乙烯)。可包括在本发明制剂中的特定非离子型表面活性剂包括, 例如聚山梨酯, 诸如聚山梨酯-20、聚山梨酯-80、聚山梨酯-60、或聚山梨酯-40; 泊洛沙姆等。在一个优选实施方案中, 本发明的液体制剂中包含聚山梨酯-80 作为表面活性剂。

在一些实施方案中, 可以用于本发明液体制剂中的表面活性剂包括但不限于, 聚山梨酯类表面活性剂(例如聚山梨酯 80, 聚山梨酯 20)、泊洛沙姆和聚乙二醇。

本发明抗体制剂中所含的表面活性剂的量可随制剂的特定目的特性、特定环境、和使用制剂的特定目的而改变。在优选的一些实施方案中, 制剂可含有约 0.01-5 mg/ml, 优选地为约 0.1-1 mg/ml, 例如约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mg/ml 的表面活性剂, 尤其是聚山梨酯-80, 优选地约 0.2mg/ml 的聚山梨酯-80。

(v) 螯合剂

如本文所使用的, 术语“螯合剂”是指能与中心原子形成螯合物, 由于螯合物的生成而是配合物的稳定性大大增加。

在一个实施方案中, 本发明的液体制剂中的螯合物是羧酸型螯合剂。在一个实施方案中, 所述的螯合剂选自依地酸二钠、氨基三乙酸、二亚乙基三胺五乙酸、柠檬酸、酒石酸、葡萄糖酸、羟乙基二胺三乙酸、二羟乙基甘氨酸。在一个实施方案中, 所述螯合剂选自依地酸二钠。

在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的螯合剂的浓度为约0.005-0.05 mg/ml。在一个实施方案中, 本发明的液体抗体制剂中的螯合剂的浓度为约0.008-0.018 mg/ml, 例如约 0.008、0.009、0.010、0.012、0.014、0.018 mg/ml, 优选0.01 mg/ml。

(vi) 其它赋形剂

本发明的抗体液体制剂中任选地包含其它赋形剂。所述其它赋形剂包括, 例如, 抗微生物剂、抗静电剂、抗氧化剂、螯合剂、明胶等等。这些和另外已知的药物赋形剂和/或适用于本发明制剂的添加剂是本领域公知的, 例如, 列出于“The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第 4 版, Rowe 等人编, American Pharmaceuticals Association (2003); 和 Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 第 21 版, Gennaro 编, Lippincott Williams & Wilkins (2005)”。

II. 制剂的制备

本发明提供了包含抗 CLDN18.2/CD3 抗体的稳定制剂。在本发明制剂中使用的抗

CLDN18.2/CD3 抗体可以使用本领域已知的用于生产抗体的技术进行制备。例如，可以重组制备抗体。在一个优选的实施方案中，本发明的抗体在 293 细胞或 CHO 细胞中重组制备。

抗体作为药物的活性成分的应用现在已经很广泛。用于将治疗性抗体纯化至药用级的技术是本领域公知的。例如，Tugcu 等(Maximizing productivity of chromatography steps for purification of monoclonal antibodies, *Biotechnology and Bioengineering* 99 (2008) 599–613.)描述在蛋白 A 捕获步骤后使用离子交换色谱(阴离子 IEX 和/或阳离子 CEX 色谱)的单克隆抗体三柱纯化方法。Kelley 等(Weak partitioning chromatography for anion exchange purification of monoclonal antibodies, *Biotechnology and Bioengineering* 101 (2008) 553–566)描述了两柱纯化法，其中在蛋白 A 亲和色谱后使用弱分配阴离子交换树脂。

一般，重组产生的抗体可以利用常规的纯化方法纯化，以提供具有足够的可重复性和适度纯度的药物物质用于抗体制剂的配制。例如，在抗体从重组表达细胞分泌至培养基中后，可以使用商业可得的蛋白浓缩过滤器例如 Amicon 的超滤装置，浓缩来自该表达系统的上清液。之后，可以使用例如色谱、透析和亲和纯化等方式进行抗体的纯化。蛋白 A 适应于作为亲和配体用于纯化 IgG1、IgG2 和 IgG4 型抗体。也可以使用其它抗体纯化方法，例如离子交换色谱。在获得足够纯度的抗体后，可以按照本领域已知的方法，制备包含抗体的制剂。

例如，可以采用如下步骤进行制备：(1)在发酵结束后将发酵液离心澄清去除细胞等杂质以获得上清；(2)使用亲和层析(例如对 IgG1、IgG2 和 IgG4 型抗体具有特异亲和力的蛋白 A 柱)捕获抗体；(3)进行病毒灭活；(4)精制纯化(一般可以采用 CEX 阳离子交换层析)，以去除蛋白中的杂质；(5)病毒过滤(使病毒滴度降低例如 4 log₁₀ 以上)；(6)超滤/渗滤(可以用于将蛋白置换于利于其稳定的制剂缓冲液中并浓缩至合适的浓度供注射用)。参见例如，B. Minow, P. Rogge, K. Thompson, *BioProcess International*, Vol. 10, No. 6, 2012, pp. 48–57。

III. 制剂的分析方法

生物制品稳定性研究一般包括实际贮存条件下的实时稳定性研究(长期稳定性研究)、加速稳定性研究和强制条件试验研究。稳定性研究应根据研究目的和产品自身特性对研究条件进行摸索和优化；针对各种影响因素(如温度、反复冻融、振动等)，制定长期、加速和/或强制条件试验等稳定性研究方案。加速和强制条件试验有利于了解产品在短期偏离保存条件和极端情况下产品的稳定性情况，并为有效期和保存条件的确定提供支持性数据。

在抗体制剂的储存、振荡或反复冻融过程中，抗体可能会发生聚集、降解或化学修饰，导致抗体异质性(包括大小异质性和电荷异质性)以及聚集物和片段等，从而影响抗体制剂的质量。因此，有必要进行抗体制剂稳定性的监测。

在本领域中已知多种方法可以用于检测抗体制剂的稳定性。例如，可以通过还原型 CE-SDS、非还原型 CE-SDS 和 SEC-HPLC 等方法，分析抗体制剂的纯度和评估抗体的聚集水平；可以通过离子交换色谱(IEX)等，分析抗体制剂中的电荷变体。此外，可以通过目视检测制剂外观，快速地判断制剂的稳定性。也可以使用 OD_{350nm} 法检测制剂的浊度改变，该方法可以给出有关可溶性和不溶性聚集物量的信息。此外，可以使用紫外分光光度法(UV

法)检测制剂中的蛋白质含量变化。

非还原型 CE-SDS 法是一种以毛细管为分离通道进行的抗体纯度测定方法。在 CE-SDS 中，蛋白迁移由 SDS 结合引起的表面电荷来驱动，而该表面电荷与蛋白质的分子量成正比。由于所有的 SDS-蛋白质复合物都具有相似的质量-电荷比，故可以在毛细管的分子筛凝胶基质中，实现基于分子的大小或流体动力学半径的电泳分离。该方法已经被广泛地用于监测变性的完整抗体的纯度。一般，在非还原型 CE-SDS 法中，供试样品与 SDS 样品缓冲液和碘乙酰胺混合。之后，混合物可以于 68-72℃ 孵育约 10-15 分钟，冷却至室温后离心的上清液用于分析。采用紫外检测器检测蛋白的迁移，获得电泳谱图。抗体制剂纯度可以计算为 IgG 主峰的峰面积占有所有峰面积之和的百分比。关于 CE-SDS 法的进一步描述，可以参见例如 Richard R. 等, Application of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products, Electrophoresis, 2008, 29, 3612-3620。

体积排阻高效液相色谱法，即 SEC-HPLC 法，是用于抗体标准和质控的另一重要方法。该方法主要依据分子的尺寸大小或流体动力学半径差异来进行分子的分离。通过 SEC-HPLC，抗体可以分离出三种主要形式：高分子量形式(HMMS)、主峰(主要是抗体单体)、和低分子量形式(LMMS)。抗体纯度可以计算为色谱图上主峰面积占有所有峰面积之和的百分比。通过 SEC-HPLC 法，可以测量制剂产品中抗体单体的百分数，给出可溶性聚集物和剪切物的含量信息。关于 SEC-HPLC 法的进一步描述，可以参见例如，J. Pharm. Scien., 83:1645-1650, (1994); Pharm. Res., 11:485 (1994); J. Pharm. Bio. Anal., 15:1928 (1997); J. Pharm. Bio. Anal., 14:1133-1140 (1986)。此外，也可以参见例如，R. Yang 等，High resolution separation of recombinant monoclonal antibodies by size exclusion ultra-high performance liquid chromatography (SE-UHPLC), Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.032>；和 Alexandre Goyon 等, Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. I- Non-denaturing chromatographic techniques, Journal of Chromatography, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.05.010>。

加速稳定性研究可以用于检查产品的稳定性性质，有利于筛选稳定药物制剂形式。例如，可以将制剂样品放置于升高的温度，例如约 40℃±2℃、25℃±2℃ 条件下进行加速稳定性研究。此外，可以进行振荡实验或反复冻融实验来检测产品的稳定性性质。例如，在室温避光 650r/min 振荡 1-5 天，进行振荡实验。例如，可以将产品在-30℃ 以下冻存产品一天后室温融化作为一个冻融循环，进行反复冻融实验，其中可以实施 1-6 次反复冻融循环。产品稳定性的检测指标可以包括外观、可见异物、蛋白含量、浊度、纯度（SEC-HPLC 法、非还原型 CE-SDS 法）和电荷变异体（iCIEF 法、CEX-HPLC 法）。此外，可以检测抗体的功效或生物活性。例如，可以检测制剂中抗体与其抗原分子（TIGIT）的结合能力。本领域技术人员已知多种方法可以用于定量抗体与抗原的特异性结合，例如免疫测定试验，ELISA 等。

缩略词描述

缩略词	全称
-----	----

缩略词	全称
CE-SDS	十二烷基硫酸钠毛细管凝胶电泳
ELISA	酶联免疫吸附测定
SEC-HPLC	体积排阻高效液相色谱
HPLC-FLD	高效液相色谱-荧光检测
CEX-HPLC	阳离子交换色谱法

实施例

抗 CLDN18.2/CD3 双特异性抗体，是信达生物制药（苏州）有限公司自主研发的抗体，在 PCT 申请号 PCT/CN2021/121286 中公开。

为了开发出适用于该全人源抗体的长期稳定储存且简单易用的注射剂制剂处方，通过 40℃ 强制和 25℃ 加速稳定性实验，考察了不同 pH 值、不同稳定剂及表面活性剂的含量对于该抗体蛋白质量的影响，最终筛选出有利于其稳定的制剂处方。整个研究过程中所用的材料和方法如下：

材料和方法

1.1. 本发明的制剂研究中使用的材料

名称	级别	产地及品牌	货号
组氨酸	药用级	上海味之素	N/A
盐酸精氨酸	药用级	上海味之素	N/A
山梨醇	药用级	法国罗盖特	H20110265
醋酸钠	药用级	德国默克	1.37046.5000
依地酸二钠	药用级	德国默克	1.370041000
聚山梨酯 80	药用级	南京威尔	N/A
盐酸	药用级	南京化学试剂	C0680885024

注：N/A 表示不适用。

1.2. 本发明的制剂研究中使用的仪器设备

名称	产地及品牌	货号
超滤离心管	美国 Millipore	UFC901096
囊式过滤器 H4	德国 Sartorius	5441307H4--OO--B
白金硅胶管	美国 Nalgene	8600-0080
2 R 中硼硅玻璃管制注射剂瓶	苏州肖特	1142144
13mm 注射液用覆乙烯-四氟乙烯共聚物膜溴化丁基橡胶塞	德国 West	7002-4373

13 mm 抗生素瓶用铝塑组合盖	新加坡 West	5413-1065
------------------	----------	-----------

1.3. 制剂稳定性的检测项目和检测方法

整个研究过程中检测项目主要包括：(1) 检测外观以及是否存在可见异物；(2) 通过紫外法(UV 法)测定制剂中的蛋白质含量；(3) 通过 OD350nm 法检测制剂的浊度；(4) 通过体积排阻高效液相色谱法 (SEC-HPLC) 测定抗体制剂的纯度，表示为主峰的面积占有所有峰面积之和的百分数；(5) 通过非还原型十二烷基硫酸钠毛细管电泳(非还原型 CE-SDS)测定抗体制剂的纯度，表示为主峰的面积占有所有峰面积之和的百分数；(6) 通过 CEX-HPLC 法测定抗体制剂中电荷变异体，表示为主成分、酸性组分和碱性组分的百分数；(7) 通过直接 ELISA 法测定抗体制剂中抗 CLDN18.2/CD3 对抗原的相对结合活性；(8) 通过 HPLC-FLD 测定抗体制剂中聚山梨酯 80 含量。

可见异物检测

按照国家药典委员会，中华人民共和国药典（2015 年版，四部通则 0904“可见异物检查法”，北京：中国医药科技出版社. 2015）中所记载的方法，采用澄明度检测仪(天津天大天发生产，型号 YB-2)和不溶性微粒检测仪(天津天大天发生产，型号 GWJ-8)，检查样品中的可见异物。

蛋白含量测定

使用紫外分光光度计(日本岛津生产，型号 UV-1800)或多通道微量分光光度计(美国 Thermo 生产，型号 Nanodrop 8000)，测定样品中的蛋白质含量。

浊度测定

使用紫外分光光度计(日本岛津生产，型号 UV-1800)，测定样品在 350nm 的吸光度，确定样品浊度。

纯度 (SEC-HPLC 法)

使用体积排阻色谱柱分离，流动相为磷酸盐缓冲液（称取 3.12 g 二水合磷酸二氢钠，8.77 g 氯化钠和 34.84 g 精氨酸，超纯水溶解后用盐酸调节 pH 至 6.8 并定容至 1000 ml），色谱柱保护液为 0.05%(w/v) NaN_3 ，进样量 50 μl ，流速 0.5 ml/分钟，采集时间 30 分钟，柱温 25℃，检测波长 280 nm。取待测样品用超纯水稀释至 2mg/ml，作为供试品溶液。取制剂缓冲液用上述相同处理方式稀释后做为空白溶液。取空白溶液、供试品溶液各 50 μl 注入液相色谱仪，开始检测。

纯度 (非还原型 CE-SDS 法)

采用毛细管凝胶电泳法检测。毛细管为无涂层毛细管，内径 50 μm ，总长 30.2 cm，有效长度 20.2 cm。电泳前分别使用 0.1 mol/L 氢氧化钠、0.1 mol/L 盐酸、超纯水、电泳胶 70 psi 冲洗毛细管柱。将待测样品用适量超纯水稀释至 2.0mg/ml，取以上稀释后的样品 50 μl 于 1.5 ml 离心管中，分别向其中加入 45 μl pH 6.5 的样品缓冲液（称取一水柠檬酸 0.32 g，十二水合磷酸氢二钠 2.45 g，溶于 45 ml 超纯水中，定容至 50 ml，制得柠檬酸-磷酸盐缓冲液，精密量

取该缓冲液 200 μ l, 加 10%(w/v)十二烷基硫酸钠溶液 80 μ l, 加水至 1 ml, 混匀, 即得)、1 μ l 内标(10 kDa 蛋白质, 5 mg/mL) (Beckman Coulter, 货号: 390953) 和 5 μ l 250 mmol/L NEM 溶液(称取 N-乙基顺丁稀二酰亚胺 62 mg, 溶于 2 ml 超纯水中), 充分混匀后 70 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 加热 10 $\pm$ 2 分钟, 冷却至室温后转移至样品瓶作为供试品溶液。取与供试品相同体积的制剂缓冲液, 按上述方法同样操作, 制得空白溶液。样品进样条件: -5 kV 20 秒; 分离电压: -15 kV 35 分钟。毛细管柱温控制在 25 $^{\circ}$ C, 检测波长为 220 nm。

电荷变异性 (CEX-HPLC 法)

采用阳离子交换色谱法 (CEX-HPLC 法) 检测。使用 MabPac SCX-10 强阳离子交换色谱柱分离, 流动相 A 为 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (称取 NaH₂PO₄ 2H₂O 0.51 g, Na₂HPO₄ 12H₂O 2.40 g 溶解于 800 ml 超纯水中, 定容到 1000 ml, 使用 Φ 0.22 μ m 滤膜过滤), 流动相 B 为 10 mmol/L 磷酸盐+200 mmol/L 氯化钠缓冲液 (称取 NaH₂PO₄ 2H₂O 0.51 g, Na₂HPO₄ 12H₂O 2.40 g, NaCl 11.69 g 溶解于 800 ml 超纯水中, 定容到 1000 ml, 使用 Φ 0.22 μ m 滤膜过滤)。用超纯水将样品稀释至 2.0 mg/ml, 作为供试品溶液。取制剂缓冲液用上述相同处理方式稀释后作为空白溶液。取空白溶液、供试品溶液各 50 μ l 注入液相色谱仪, 流动相流速 1.0 ml/min, 采集时间 35 分钟, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 检测波长 280 nm, 样品盘温度 10 $^{\circ}$ C。进样分析, 根据面积归一化法, 计算主成分、酸性组分及碱性组分含量。

聚山梨酯 80 含量 (HPLC-FLD 法)

采用荧光检测色谱法 (HPLC-FLD 法) 检测。使用 0.15 mol/L 氯化钠, 0.05 mol/L 三羟甲基氨基甲烷, pH 8.0, 5%乙腈, 5.0 μ mol/L N-苯基-1-萘胺, 15 ppm 23 聚氧乙烯脂肪醇醚, 等度洗脱, 流速: 1.5 ml/min; 采集时间: 3 分钟; 压力上限: 100 bar; 进样量: 10 μ l; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 激发光 350 nm、发射光 420 nm。根据标准曲线法, 计算聚山梨酯 80 含量。

实施例 1、稳定表达细胞株的构建

人源 CLDN18.2 的过表达细胞株的制备

根据制造商的说明书, 使用 Freedom[®] CHO-S[®]试剂盒 (Invitrogen, A1369601) 构建稳定表达人源 Claudin18.2 (简称 CLDN18.2, 下同) 的细胞系。首先将人源 CLDN18.2 (UniProt ID: P56856-2) 的全长基因构建到载体 pCHO1.0 中, 形成质粒, 采用化学转染法和电转染法将构建好的质粒分别转入 CHO-S 细胞 (Invitrogen, A1369601) 和 HEK293 细胞 (Invitrogen, A14527) 中, 转染后的细胞经过两轮加压筛选得到分别表达 CLDN18.2 的细胞池 (pool)。然后利用流式细胞分选仪 (MoFlo XDP, Beckman Coulter) 将高表达 CLDN18.2 的细胞分选出来, 通过稀释法获得稳定表达 CLDN18.2 的单克隆细胞系 CHO-hCLDN18.2 和 HEK293-hCLDN18.2。

人源 CLDN18.1 的过表达细胞株的制备

根据制造商的说明书, 使用 Freedom[®] CHO-S[®]试剂盒 (Invitrogen, A1369601) 构建稳定表达人源 Claudin18.1 (简称 CLDN18.1, 下同) 的细胞系。首先将人源 CLDN18.1 (UniProt ID: P56856-1) 全长基因构建到载体 pCHO1.0 (Invitrogen, A1369601) 中, 形成质粒, 采用化学转染法将构建好的质粒转入 CHO-S 细胞 (Invitrogen, A1369601) 中, 转染后的细胞经过两

轮加压筛选得到分别表达 CLDN18.1 的细胞池(pool)。然后利用流式细胞分选仪(MoFlo XDP, Beckman Coulter)将高表达 CLDN18.1 的细胞分选出来,通过稀释法获得稳定表达 CLDN18.1 的单克隆细胞系 CHO-hCLDN18.1。

过表达 CLDN18.2 的肿瘤细胞系的构建

将人源 CLDN18.2 (UniProt ID: P56856-2) 的全长基因构建到载体 pWPT-GFP (Addgene, 12255) 中, 替换其中的 GFP 序列, 与慢病毒的包装载体 psPAX2 (Addgene, 12260) 和 pMD2.G (Addgene, 12259) 共同转染到 HEK293T (ATCC, CRL-3216) 细胞中, 进行病毒的包装。分别收集培养了 48 小时和 72 小时后的培养上清, 使用 PEG8000 进行慢病毒的浓缩。用浓缩后的病毒转染胰腺癌 DAN-G 细胞和胃癌 KATO III 细胞, 然后利用流式细胞分选仪(MoFlo XDP, Beckman Coulter)将表达 CLDN18.2 的细胞分选出来, 获得稳定转染 CLDN18.2 的肿瘤细胞系 DAN-G-hCLDN18.2 和 KATO III-hCLDN18.2。

实施例 2、CLDN18.2 单克隆的产生

本发明采用杂交瘤技术, 通过实施例 1 获得的细胞(CHO-hCLDN18.2)免疫小鼠 H2L2 全人源抗体转基因小鼠(购自 Harbour BioMed)。然后获取小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行电融合。之后收集上清液通过流式细胞仪(FACS)筛选出特异性表达抗 CLDN18.2 抗体的杂交瘤细胞, 且分泌的抗体不与 CLDN18.1 结合。将实施例 1 获得的待检测细胞(HEK293-hCLDN18.2)计数, 并稀释至 1×10^6 个细胞/ml, 向 U 型底 96 孔板中加入 100 μ l/孔。500 g 5 min, 离心, 去除细胞培养基。将杂交瘤 96 孔板培养上清加入 U 型板并重悬细胞, 每孔加 100 μ l, 冰上静置 30min。500g 5min 去除上清, PBS 洗细胞 1 遍。每孔加入 100 μ l 抗鼠 Fab 的 FITC 标记的二抗 (1:500 稀释于 PBS 中), 阳性对照抗体加入 100 μ l 抗人 Fab 的 FITC 标记的二抗。冰上避光孵育 30 min。500g 5min 去除上清, PBS 洗细胞 1 遍。用 50 μ l 1 $\times$ PBS 重悬细胞, FACS 上机检测。将阳性克隆, 再用上述同样方法进行 CHO-hCLDN18.1 的复筛。经过两轮筛选, 获得了全人源抗体克隆 HB37A6。

实施例 3、重组 CLDN18.2 单克隆抗体的制备

将抗 CLDN18.2 单克隆抗体 HB37A6(参见 CN202010570517.X)以及对照抗体 zolbetuximab(简称 Zmab, 序列来源于 INN117)以全长单克隆抗体的形式表达在 HEK293 细胞 (Invitrogen, A14527) 中。

首先构建表达载体, 分别将 HB37A6 和对照抗体的重链可变区和轻链可变区(参见序列信息)放置在人源 IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO:5) 和轻链 kappa 恒定区 (SEQ ID NO:10) 的 N 端。之后构建到带有 N 端信号肽的 pcDNA3.1 表达载体中, 获得轻重链表达载体。将所获得的轻、重链表达载体通过 PEI (Polysciences Inc, 23966)共转染到 HEK293 细胞中, 培养 7 天后收集培养基上清。上清通过 Protein A 柱 (Hitrap Mabselect Sure, GE 11-0034-95) 进行纯化, 之后超滤并换液到 PBS (Gibco, 70011-044) 中, 采用 A280 法检测浓度并用 SEC-HPLC 法测定纯度, 获得纯度大于 95% 的抗体溶液, 得到重组 CLDN18.2 单克隆抗体 HB37A6。

具体转染和纯化过程如下:

根据所需转染体积传代 Expi293 细胞 (Invitrogen, A14527), 转染前一天将细胞密度调整至 1.5×10^6 个细胞/ml。转染当天细胞密度约为 3×10^6 个细胞/ml。取终体积 1/10 的 Opti-MEM 培养基 (Gibco, 31985-070) 作为转染缓冲液, 按 1.0 μ g/ml 转染细胞加入适当的质粒, 混匀。

加合适的聚乙烯亚胺(PEI) (Polysciences, 23966) 到质粒中(质粒与 PEI 的比例在 293F 细胞中为 1:3), 混匀后室温孵育 20 min, 获得 DNA/PEI 混合物。将 DNA/PEI 混合物缓慢加入细胞中, 边加边轻轻晃动摇瓶, 然后置于 36.5℃, 8%的 CO₂ 培养箱中培养, 七天后获得细胞料液, 收集细胞上清进行纯化。

将纯化使用的 Protein A 柱 (Hitrap Mabselect Sure, GE, 11-0034-95) 使用 0.1 M NaOH 处理 2 h, 玻璃瓶等用蒸馏水洗净后在 180℃ 干烤 4h。纯化前将收集的细胞料液 4500 rpm 离心 30 min, 将上清使用 0.22 μm 的滤器过滤。使用 10 个柱体积的结合缓冲液 (磷酸钠 20mM, NaCl 150mM, PH7.0) 平衡 Protein A 柱。将过滤后的上清加入纯化柱后使用 10 个柱体积的结合缓冲液平衡。加 5 ml 洗脱缓冲液(柠檬酸+柠檬酸钠 0.1M, pH3.5), 收集洗脱液, 每 1 ml 的洗脱液加入 80 μl 浓度为 2M Tris-HCl。将收集的抗体超滤浓缩交换到 PBS (Gibco, 70011-044) 中, 并检测浓度。

实施例 4 抗 CD3 单克隆抗体的制备

将鼠源 CD3 抗体 sp34 (U.S. Pat. No. 8,236,308; J. Immunol. Methods., 1994, 178:195) 和 sp34 经过人源化和亲和力优化的抗 CD3 单克隆抗体 HzSP34.24、HzSP34.87、HzSP34.97 和以全长单克隆抗体的形式在 HEK293 细胞 (Invitrogen, A14527) 中表达。

将 HzSP34.24、HzSP34.87、HzSP34.97、sp34 的重链可变区重链可变区和轻链可变区 (参见序列信息) 放置在 IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO:23) 和轻链 lambda 恒定区 (SEQ ID NO:28) 的 N 端。之后构建到带有 N 端信号肽的 pcDNA3.1 表达载体中, 获得轻重链表达载体。将所获得的轻、重链表达载体通过 PEI (Polysciences Inc, 23966) 共转染到 HEK293 细胞中, 培养 7 天后收集培养基上清。上清通过 Protein A 柱 (Hitrap Mabselect Sure, GE 11-0034-95) 进行纯化, 之后超滤并换液到 PBS (Gibco, 70011-044) 中, 采用 A280 法检测浓度并用 SEC-HPLC 法测定纯度, 获得纯度大于 95% 的抗体溶液, 得到重组抗 CD3 单克隆抗体 HzSP34.24、HzSP34.87、HzSP34.97 和鼠源 CD3 抗体 sp34。具体转染和纯化过程参见实施例 3。

实施例 5. 双特异性抗体的构建与制备

按表 2 组合, 将抗 CLDN18.2 单克隆抗体 HB37A6 与 3 个不同抗人 CD3 单克隆抗体 HzSP34.24、HzSP34.87 和 HzSP34.97 的抗原结合区的序列分别构建靶向 CLDN18.2 × CD3 的 “1+1” 形式的双特异性抗体 030、032 和 033, 其抗体结构示意图参见图 1。具体而言, 特异性靶向 CLDN18.2 的抗原结合结构域的重链可变区序列为 SEQ ID NO:4, 轻链可变区序列为 SEQ ID NO:9; 特异性靶向 CD3 的抗原结合结构域的重链可变区序列为: SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:30 和 SEQ ID NO:32, 轻链可变区序列为 SEQ ID NO:27。抗体的 Fc 段选取柞白结构的 IgG1 LALA 序列 (A.Margaret Merchant 等, Nature Biotechnology, 1998)。因此, 双特异性抗体 CLDN18.2 端部分的重链为 SEQ ID NO:37, 轻链为 SEQ ID NO:38。双特异性抗体 CD3 端部分的重链分别为 SEQ ID NO:39、41 和 42, 轻链为 SEQ ID NO:40。

双特异性抗体的质粒构建过程为: 分别将 CLDN18.2 的重链序列 (SEQ ID NO:37)、CLDN18.2 的轻链序列 (SEQ ID NO:38), CD3 的重链序列 (SEQ ID NO:39、41 和 42)、CD3 的轻链序列 (SEQ ID NO:40) 插入到载体 pcDNA3.1 (Invitrogen, V790-20) 中, 分别得到 CLDN18.2 端的重链质粒、轻链质粒, CD3 端的重链质粒、轻链质粒。然后利用 PEI (Polysciences, 23966) 分别将 CLDN18.2 端的重链质粒、轻链质粒和 CD3 端的重链质粒和轻链质粒瞬时转染到 Expi293 细胞 (Invitrogen, A14527) 中, 表达 CLDN18.2 端的和 CD3 端的 3 个抗体分子。7 天后获得细胞发酵液, 将其过滤澄清, 分别用 Hitrap Mabselect Sure 的 Protein A 柱 (GE Healthcare, 11-0034-95) 进行捕获, 得到 CLDN18.2 端和 CD3 端的抗体。采用 A280 法检测浓度之后, 两端的抗体按摩尔比例 1:1 混合。加入适量还原剂 GSH, 室温反应过夜。超滤去除还原剂, 终止反应。之后采用 MonoS 阳离子交换层析 (GE Healthcare, 17-5168-01) 进行精细纯化, A 液为 20 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.6), B 液为含有 1M 氯化钠的 20 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.6), 洗脱梯度为 0-50% (30 柱体积)。将洗脱得到的蛋白溶液超滤并换液到 PBS

(Gibco, 70011-044) 中, 用质谱进行分子量的测定, 并用 SEC-HPLC 进行纯度鉴定。获得的 030、032 和 033 双特异性抗体用于以下实施例。

表 2. CD3/CLDN18.2 双特异性抗体列表

	抗 CLDN18.2 端	抗 CD3 端
030	HB37A6	HzSP34.24
032	HB37A6	HzSP34.87
033	HB37A6	HzSP34.97

实施例 6. 双特异性抗体亲和力测定

采用生物膜薄层干涉测定 技术(BLI)测定本发明双特异性抗体结合人 CD3 蛋白的平衡解离常数(KD)。BLI 法亲和力测定按照现有的方法(Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 页) 进行。

实验开始前半个小时, 根据样品数量, 取合适数量的 AHC (18-5060, Fortebio)传感器浸泡于 SD 缓冲液 (1x PBS, BSA 0.1%, Tween-20 0.05%) 中。取 100 μ l 的 SD 缓冲液、各双特异性抗体、人 CD3 蛋白 (CT026H0323H, 北京义翘神州), 分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板 (Greiner, 675076) 中。使用 Fortebio Octet Red96 进行检测, 根据样品位置布板, 选择传感器位置。仪器设置参数如下: 运行步骤: Baseline、Loading $\sim$ 1 nm、Baseline、Association 和 Dissociation; 各个步骤运行时间取决于样品结合和解离速度, 转速为 1000 rpm, 温度为 30°C。使用 ForteBio Octet 分析软件分析 KD 值。

双特异性抗体的亲和力如表 3 所示。其中, 030 分子 CD3 端亲和力最高, 为 7.4nM。032 和 033 分子 CD3 端亲和力依次降低, 分别为 89nM 和 440nM。

表 3. 双特异性抗体 CD3 端亲和力

	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
030	6.927E+5	0.005164	7.455E-9
032	8.066E+5	0.07183	8.906E-8
033	3.788E+5	0.1689	4.459E-7

采用表面等离子共振法 (Surface plasmon resonance, SPR) 测定结合人 CLDN18.2 的平衡解离常数 (KD)。根据制造商的说明, 使用氨基偶联试剂盒 (GE Healthcare, BR-1006-33), 将抗原人 Claudin18.2 (GenScrip, P50251802) 偶联在 CM5 芯片 (GE Healthcare, 29-1496-03) 表面, 偶联后注入 1 M 乙醇胺, 对剩余的活化位点进行封闭。根据制造商的说明, 通过 Biacore (GE Healthcare, T200) 检测芯片表面抗原与流动相中的各个双特异性抗体之间的结合与解离获得亲和力及动力学常数。将梯度稀释后的抗体 (0-100 nM, 2 倍稀释), 由低浓度到高浓度的顺序流过芯片表面, 结合时间 180 s, 解离时间 600 s。最后使用 10 mM Glycine pH 1.5 (GE Healthcare, BR-1003-54) 对芯片进行再生。数据结果使用 Biacore T200 分析软件, 以 1:1 结合模型进行动力学的分析。结果如表 4 所示, 030、032 和 033 双特异性抗体在 CLDN18.2 端采用的是同一个克隆 HB37A6, CLDN18.2 端的亲和力一致, 具有非常强的亲和力, 为 0.57nM。

表 4. 双特异性抗体 CLDN18.2 端亲和力

	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	K _D (M)
--	----------	---------	--------------------

030	3.47E+05	2.00E-04	5.76E-10
032			
033			

实施例 7. 体外 T 细胞杀伤实验

将实施例 5 获得的 030,032 和 033 双特异性抗体进行体外 T 细胞杀伤实验。用完全培养基 RPMI-1640 (Hyclone, SH30809.01) + 10%胎牛血清 (FBS, Hyclone, SH30084.03) 重悬人外周血单个核细胞 (PBMC, Allcells or Sailly), 将 PBMC 调整为 2×10^6 个/ml。

将 NUGC-4 或过表达 Claudin18.2 的 DAN-G 肿瘤靶细胞 DAN-G-hCLDN18.2, 非靶细胞 L363 (DSMZ, ACC49) 用 Far-Red (Invitrogen) 标记 10min, 洗涤两次后重悬在完全培养基中, 细胞浓度调整为 2×10^5 个/ml。

将 PBMC 与双特异性抗体 030、032 和 033 分别混合 (其中 030、032 使用的初始浓度为 1nM, 033 使用的初始浓度为 400nM, 所有抗体均 5 倍稀释, 共 10 个浓度点), 37℃ 孵育 30min, 然后按照 10:1 的效靶比, 将 50μl 肿瘤靶细胞 (1×10^4 个) 加入到 50μl PBMC 效应细胞中。37℃ 孵育 24 小时, 离心, 用终浓度为 10μg/ml 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI, Invitrogen) 重悬细胞, 用流式细胞仪 (BD, FACSCelesta) 检测 Far-Red 和 PI 双阳的细胞。通过 FACSDiva software (BD, Celesta) 计算肿瘤靶细胞杀伤比例。

从图 2 结果显示, 030 和 032 分子在胃癌细胞 NUGC-4 上具有非常强的杀伤活性, EC50 值均小于 1pM。而从图 3 结果显示, 在 CLDN18.2 高表达的胰腺癌细胞 DAN-G-hCLDN18.2 上, 两者 EC50 值甚至小于 0.1pM。而 033 分子在两个肿瘤细胞系上的杀伤活性较弱, 弱于 030 和 032, 约低 1000 倍, 但是仍能达到最大杀伤 (接近 100% 裂解细胞)。但在 CLDN18.2 表达阴性的情况下, 030,032 和 033 分子均未显示非特异性的杀伤 (图 4)。这说明 030,032 和 033 分子均展示了依赖 CLDN18.2 表达的肿瘤细胞特异性杀伤。而且, 本发明的双特异性抗体的杀伤效果与 CLDN18.2 在细胞表面的丰度有关, 在一定的表达丰度范围内, 细胞表面的 CLDN18.2 表达量越高, 则杀伤效果越好。

实施例 8. 体内药效实验—胃癌模型

本实验研究在 NOG 雌性小鼠上双特异性抗体对 NUGC-4 荷瘤的抗肿瘤作用。选取 49 只 NOG 雌性小鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司)。

将 PBMC 细胞 (Allcells) 复苏, 离心细胞, 以 PBS(1×) 分散 PBMC 细胞, 获得细胞密度为 2×10^7 /ml 的细胞悬液。取 200 μl 细胞悬液对小鼠进行眼眶静脉注射 PBMC 细胞, 4×10^6 只。

将 NUGC-4 细胞进行常规复苏传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 以 PBS(1×) 分散 NUGC-4 细胞, 细胞密度为 6×10^7 个/ml 与 matrigel 胶 1:1 混合制备成细胞浓度为 3×10^7 个/ml 细胞悬液。在第 3 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 NOG 人源化小鼠右侧腹部区域中来建立 NUGC-4 荷瘤小鼠模型。

细胞接种后第 7 天用游标卡尺测量小鼠肿瘤的最大宽轴和最大长轴, 计算瘤体积, 挑选出瘤体积在 53.35 mm³~168.07 mm³ 内的小鼠, 根据小鼠瘤体积进行蛇形分组 (每组 6 只小鼠)。对每只小鼠静脉注射本发明的双特异性抗体 030、032 和 033, 以及阴性对照 h-IgG (Equitech-Bio, 批号 160308-02), 给药剂量为 0.3mg/kg 和 1mg/kg, 每周给药一次, 一共给药 4 次, 测量小鼠肿瘤体积频率为一周两次。同时计算肿瘤抑制率 (TGI%), 计算公式如下: $TGI\% = 100\% \times (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。

根据图 5 所示, 在人胃癌 NUGC-4 荷瘤小鼠模型上, 030 和 032 在 0.3mg/kg 的低剂量能达到 TGI 100%, 而在高剂量 1mg/kg 下更是达到 50% CR (complete remission, 完全缓解)

(6只小鼠中有3只达到肿瘤完全消失)。而033分子在低剂量下几乎没有药效,在1mg/kg剂量下,TGI能达到20%。整个实验过程,实验组和对照组小鼠体重没有下降。

实施例9. 体内药效实验—胰腺癌模型

本实验研究在NOG雌性小鼠上双特异性抗体对DAN-G-Claudin18.2荷瘤的抗肿瘤作用。将49只NOG小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)进行眼眶静脉注射PBMC细胞, 4×10^6 /只,接种体积200 μ l/只(如实施例18所示)。此时记为第0天。

将实施例1构建的人胰腺癌细胞DAN-G-CLDN18.2进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞,以PBS(1 $\times$)分散DAN-G-CLDN18.2,获得细胞密度为 10×10^6 个/ml的悬液。将细胞悬液与matrigel胶1:1混合制备成细胞浓度为 5×10^6 个/ml细胞悬液。在第0天取0.2ml细胞悬液皮下接种至NOD-SCID小鼠右侧腹部区域中来建立CLDN18.2过表达的DNA-G胰腺癌人源化模型。

肿瘤细胞接种7天后用游标卡尺测量小鼠肿瘤的最大宽轴和最大长轴,计算瘤体积,根据小鼠瘤体积进行蛇形分组,将瘤体积在46.42 mm³~120.64 mm³范围内的小鼠按瘤体积大小蛇形分组(每组6只小鼠)分组。

对每只小鼠静脉注射本发明的双特异性抗体030、032和033,以及阴性对照h-IgG(Equitech-Bio,批号160308-02),腹腔给药剂量为0.3mg/kg和1mg/kg,每周给药一次,一共给药4次,测量小鼠肿瘤体积频率为一周两次。同时计算肿瘤抑制率(TGI%),计算公式如下:

$$TGI\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$$
。如图6所示,在CLDN18.2过表达的DNA-G胰腺癌人源化模型中,030和032分子在两个剂量下均能达到TGI 100%。而033分子也分别达到TGI 42% (0.3mg/kg)和TGI 76% (1mg/kg),这可能与DAN-G-CLDN18.2胰腺癌细胞表达CLDN18.2表达量高有关。整个实验过程,实验组和对照组的小鼠体重没有下降。

实施例10. 小鼠PK实验

本研究利用尾静脉给药的方法,向雌性Balb/C小鼠(维通利华)注射10 mg/kg的030、032和033,从而研究其在小鼠体内的药代动力学性质。小鼠给药后分别在0.086hr、0.5hr、2hr、6hr、24hr、48hr、4day、7day、14day和21day时间点时经眼球取血,血液于4 $^{\circ}$ C 3000rpm离心10 min,收集血清。利用ELISA测定血清中抗体含量,计算获得030、032和033在小鼠体内的半衰期。

实验结果如图7所示,030、032和033在小鼠体内的半衰期均达到了与正常单抗类似的PK。进而说明本发明构建的双特异性抗体没有影响抗体的半衰期。

实施例11. pH筛选实验

1、实验步骤

配制含1.55 mg/ml组氨酸,50.00 mg/ml山梨醇的缓冲液,分别用盐酸调节pH至5.0、5.5、6.0、6.5和7.0,将CLDN18.2/CD3蛋白超滤置换至不同pH值的缓冲液中,调节蛋白含量至约1 mg/ml;加入终浓度为0.2 mg/ml的聚山梨酯80;过滤分装至西林瓶,加塞、轧盖。上述样品于40 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C条件下进行稳定性考察,具体方案见表。

表 5. 实验方案

实验条件	取样点				检测项目
	0 周	1 周	2 周	4 周	
40°C±2°C	√		√	√	外观、可见异物、蛋白含量、pH、纯度、电荷变异体和生物学活性

注：(1) √表示该点取样。(2) 上述时间点取样后均先放入-70°C中冻存，按需化冻送检。

2、判断标准

根据对产品的认识以及仪器和方法的精密度，设定了样品检测值与初始值相比质量未发生变化的判断标准。

表 6 质量未发生变化的判断标准

检测项目	未发生变化的判断标准
外观（观察法）	澄明至微乳光，无色至微黄色液体，无异物
可见异物（可见异物检测法）	无异物
蛋白含量（UV 法）	变化率≤10%
pH 值（pH 值测定法）	变化值≤0.3
纯度（SEC-HPLC 法）	主峰纯度变化值≤1%
纯度（非还原型 CE-SDS 法）	主峰纯度变化值≤2%
电荷变异体（CEX-HPLC 法）	主成分及酸碱各组分变化值≤2%
聚山梨酯 80 含量（HPLC-FLD）*	0.1 mg/ml-0.3 mg/ml
生物学活性	70-130%

结果表明(如图 8 所示)，40°C±2°C条件下放置 4 周，各 pH 条件下的样品外观、可见异物均合格；蛋白含量和 pH 均未发生明显变化。各 pH 条件下的样品纯度（nrCE-SDS 法）均未发生明显变化，纯度（SEC-HPLC 法）除 pH 5.0 样品无明显变化，其他样品均增加。各样品电荷变异体-酸性组分均显著上升，且随着 pH 值的增加，酸性组分上升的越快；各样品电荷变异体-主成分均显著下降，且随着 pH 值的增加，主成分下降的越快；电荷变异体-碱性组分除 pH 5.0 样品无明显变化，其他样品碱性组份均明显降低；抗 Claudin 18.2 生物学活性均符合标准；抗 CD3 端生物学活性，除 pH 5.0 样品符合标准，其他条件均已超出判断标准。

结合电荷变异体和抗 CD3 端生物学活性的结果，考虑到实际生产时 pH 会有波动，最终确定 pH 5.2 展开处方确定实验。

实施例 12.处方确定实验

本实施例主要考察缓冲体系（组氨酸体系和醋酸钠体系）和辅料（山梨醇、盐酸精氨酸和依地酸二钠）对双特异性抗体蛋白稳定性的影响，详细处方信息见 7。

按照表 7 配制各个处方的缓冲液，将双特异性蛋白超滤置换至各自的处方溶液中。置换完成后，调节各处方蛋白含量至 1 mg/ml；加入聚山梨酯 80，使其终浓度为 0.2 mg/ml；过滤分装至西林瓶，加塞、轧盖。上述样品于 40°C±2°C 条件下进行稳定性考察。

表 7 处方信息表

序号 No.	处方信息
处方 1	1.55 mg/ml 组氨酸，50.00 mg/ml 山梨醇，0.2 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.2
处方 2	1.55 mg/ml 组氨酸，50.00 mg/ml 山梨醇，0.01 mg/ml 依地酸二钠，0.2 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.2
处方 3	1.55 mg/ml 组氨酸，37.92 mg/ml 盐酸精氨酸，0.2 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.2
处方 4	1.55 mg/ml 组氨酸，25.00 mg/ml 山梨醇，16.85 mg/ml 盐酸精氨酸，0.2 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.2
处方 5	0.82 mg/ml 醋酸钠，50.00 mg/ml 山梨醇，0.2 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.2

注：用盐酸调节 pH

表 8. 稳定性考察方案

实验条件	取样点				检测项目
	0 周	1 周	2 周	4 周	
40°C±2°C	√	√	√	√	外观、可见异物、蛋白含量、pH、纯度、电荷变异体、聚山梨酯 80 含量和生物学活性

注：(1) √表示该点取样。(2) 上述时间点取样后均先放入-70°C冰箱中冻存待检，按需化冻送检。

判断标准参见表 6，结果表明（如图 9 所示），40°C±2°C 条件下放置 4 周，所有处方的样品外观、可见异物均合格；蛋白含量和 pH 值均未发生明显变化。除处方 2 和处方 5 样品的纯度（SEC-HPLC 法）未发生明显变化，其他处方变化均已超出判断标准。处方 3 和处方 4 样品的纯度（nrCE-SDS 法）变化已超出判断标准；处方 1 和处方 2 下降趋势一致，且下降趋势比处方 5 更慢。所有处方的样品电荷变异体变化均表现为酸性组分显著上升，主成分显著下降。所有处方的抗 Claudin18.2 端生物学活性均符合标准；处方 2 和处方 5 的抗 CD3 端生物学活性均符合标准，其他处方均超出判断标准。除处方 2 的聚山梨酯 80 含量未发生变化，其他处方均出现不同程度的下降。

结合实施例 11 和实施例 12 结果，选定处方 2 作为抗 CLDN18.2/CD3 双特异性抗体最终制剂处方。为生产时避免使用盐酸调节 pH，将缓冲体系调整为组氨酸和盐酸组氨酸，即抗 CLDN18.2/CD3 双特异性抗体制剂处方为：1.0 mg/ml 重组抗分化抗原簇 3（CD3）和抗紧密连接蛋白 18.2（Claudin18.2）双特异性抗体，0.18 mg/ml 组氨酸，1.84 mg/ml 盐酸组氨酸，50.00 mg/ml 山梨醇，0.01 mg/ml 依地酸二钠和 0.2 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.2。

以上描述了本发明的示例性实施方案，本领域技术人员应当理解的是，这些公开内容仅

是示例性的，在本发明的范围内可以进行各种其它替换、适应和修改。因此，本发明不限于文中列举的具体实施方案。

序列信息

SEQ ID NO	抗体名称	HB37A6
1	HCDR1	GFTFSSYVMS
2	HCDR2	TISHSGGSTYYADSVKG
3	HCDR3	DAPYYDILTGYRY
4	重链可变区 (VH)	EVQLLDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQA PGKGLNWVSTISHSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAIDAPYYDILTGYRYWGQGTLLVTVSS
5	重链恒定区 (HC)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	LCDR1	RASQSISSWLA
7	LCDR2	KASSLES
8	LCDR3	QQYNSYSYT
9	轻链可变区 (VL)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYNSYSYTFGQGTKLEIK
10	轻链恒定区 (LC)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO	抗体名称	阳性对照抗体 Zmab
11	HCDR1	GYTFTSYWIN
12	HCDR2	NIYPSDSYTNYNQKFK
13	HCDR3	SWRGNSFDY
14	VH	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQR PGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYM QLSSPTSEDSAVYYCTRSWRGNSFDYWGQGTLLTVSS
5	HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	LCDR1	KSSQSLNLSGNQKNYLT
16	LCDR2	WASTRES
17	LCDR3	QNDYSYPFT
18	VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTIS VQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK
10	LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO	抗体名称	HzSP34.24
19	HCDR1	GFTFNTYAMN
20	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
21	HCDR3	HGNFGQSYVSWFAY
22	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA SGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTL YLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGT TVTVSS
23	HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
24	LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
25	LCDR2	GTNKRAP
26	LCDR3	ALWYSNLWV
27	VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVL
28	LC	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO	抗体名称	HzSP34.87
19	HCDR1	GFTFNTYAMN
20	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
29	HCDR3	HYNFGQSYVSWFAY
30	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA SGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTL YLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGT TVTVSS
23	HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
24	LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
25	LCDR2	GTNKRAP
26	LCDR3	ALWYSNLWV
27	VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVL
28	LC	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW

		KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO	抗体名称	HzSP34.97
19	HCDR1	GFTFNTYAMN
31	HCDR2	RIRSKAGGYATYYADSVKD
21	HCDR3	HGNFGQSYVSWFAY
32	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA SGKGLEWVGRIRSKAGGYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTL YLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGT TVTVSS
23	HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
24	LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
25	LCDR2	GTNKRAP
26	LCDR3	ALWYSNLWV
27	VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGQGKTLTVL
28	LC	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO		桦(CH1+CH2+CH3)
33		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO		白 (CH1+CH2+CH3)
34		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO		sp34 抗体
35	VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA

		PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILY LQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSS
23	HC	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVGVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPG K
36	VL	QAVVTQESALTTSGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
28	LC	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO		双特异性抗体中的 CLDN18.2 端 HB37A6
37	重链	EVQLLDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQA PGKGLNWVSTISHSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAIDAPYYDILTYGTRYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVGVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
38	轻链	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPD DFATYTCQQYNSYSYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO		双特异性抗体中的 CD3 端 HzSP34.24
39	重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA SGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTL YLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVGVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHREALHNHYTQKSLSLSPGK

40	轻链	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS
SEQ ID NO		双特异性抗体中的 CD3 端 HzSP34.87
41	重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQA SGKGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTL YLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQSYVSWFAYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
40	轻链	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS
SEQ ID NO		双特异性抗体中的 CD3 端 HzSP34.97
42	重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQA SGKGLEWVGRIIRSKAGGYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTL YLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQSYVSWFAYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
40	轻链	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS

权利要求

1. 一种液体抗体制剂, 包含
 - (i) 抗 CLDN18.2/CD3 蛋白;
 - (ii) 缓冲剂,
 - (iii) 稳定剂, 和
 - (iv) 表面活性剂,

其中所述抗 CLDN18.2/CD3 双特异性抗体蛋白包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域, 其中第一抗原结合结构域特异性结合 CLDN18.2, 第二抗原结合结构域特异性结合 CD3, 其中第一抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO:4 所示的 A1-VH 中所含的三个互补决定区域 A1-HCDR1、A1-HCDR2 和 A1-HCDR3, 和如 SEQ ID NO:9 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 A1-LCDR1、A1-LCDR2 和 A1-LCDR3; 第二抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO: 30、22 或 32 所示的 A2-VH 中所含的三个互补决定区域 A2-HCDR1、A2-HCDR2 和 A2-HCDR3, 和如 SEQ ID NO:27 所示的 A2-VL 中所含的三个互补决定区域 A2-LCDR1、A2-LCDR2 和 A2-LCDR3。

优选地, 所述液体抗体制剂的 pH 约为 5.0-6.0, 例如, pH 为 5.2 ± 0.2 或 5.5 ± 0.2 , 优选地 pH 为 5.2。

2. 根据权利要求 1 的液体抗体制剂, 特征在于所述液体抗体制剂中的抗 CLDN18.2/CD3 蛋白的浓度为约 0.1-100mg/ml, 优选地约 0.1-10 mg/mL, 例如约 0.5、1、2、3、4、5mg/ml。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的液体抗体制剂, 特征在于, 所述液体抗体制剂包含选自组氨酸-盐酸组氨酸缓冲体系, 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲体系, 醋酸-醋酸钠缓冲体系, 和磷酸盐缓冲体系的缓冲剂, 优选地, 所述液体抗体制剂中的缓冲剂选自组氨酸、盐酸组氨酸和它们的组合; 优选地, 所述缓冲剂的浓度为约 0.01-10mg/ml, 优选地为约 0.1-1mg/ml, 例如, 约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1mg/ml。
4. 根据权利要求 1-2 中任何一项所述的液体抗体制剂, 特征在于所述稳定剂选自多元醇 (例如, 山梨醇、甘露醇及其组合)、糖类 (例如, 蔗糖、海藻糖、麦芽糖及其组合)、氨基酸 (例如精氨酸、盐酸精氨酸 甲硫氨酸 甘氨酸 脯氨酸及组合)、和它们的任意组合,

例如, 所述稳定剂包含选自以下之一或多项:

- 选自山梨醇、甘露醇、或其组合的多元醇;
- 选自蔗糖、海藻糖、麦芽糖、或其组合的糖类;
- 选自盐酸精氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、脯氨酸及组合的氨基酸。

5. 根据权利要求 1-4 中任何一项所述的液体抗体制剂, 特征在于所述稳定剂选自:

- (i) 约 20-40mg/ml 的山梨醇和约 50-100 mM 的精氨酸的组合, 或
- (ii) 约 30-60 mg/ml 的蔗糖和约 50-100 mM 的精氨酸的组合, 或
- (iii) 约 30-70mg/ml 的山梨醇, 优选地以约 50mg/ml 的量存在。

6. 根据权利要求1-4中任何一项所述的液体抗体制剂，特征在于所述液体抗体制剂中的表面活性剂选自聚山梨酯类表面活性剂、泊洛沙姆、聚乙二醇或其组合，优选为聚山梨酯-80。
7. 根据权利要求1-5中任何一项所述的液体抗体制剂，特征在于所述表面活性剂的浓度为约0.01-5 mg/ml，优选地为约0.1-1 mg/ml，例如约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mg/ml。更优选地约0.2 mg/ml。
8. 根据权利要求7中任何一项所述的液体抗体制剂，特征在于进一步包含螯合剂，所述螯合剂选自依地酸二钠、氨基三乙酸、二亚乙基三胺五乙酸、柠檬酸、酒石酸、葡萄糖酸、羟乙基乙二胺三乙酸、二羟乙基甘氨酸，优选地，所述螯合剂选自依地酸二钠；优选地，螯合剂为约0.008-0.018 mg/ml，例如约0.008、0.009、0.010、0.012、0.014、0.018 mg/ml，优选0.01 mg/ml。
9. 权利要求1-8中任何一项所述的液体抗体制剂，其中抗CLDN18.2/CD3蛋白第一抗原结合结构域包含分别如以下氨基酸序列所示的A1-HCDR1、A1-HCDR2、A1-HCDR3：SEQ ID NO:1、2和3，以及分别如以下氨基酸序列所示的A1-LCDR1、A1-LCDR2和A1-LCDR3：SEQ ID NO:6、7和8；以及第二抗原结合结构域包含
- (i)分别如以下氨基酸序列所示的A2-HCDR1、A2-HCDR2、A2-HCDR3：SEQ ID NO:19、20和29，以及分别如以下氨基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3：SEQ ID NO:24、25和26；或
- (ii)分别如以下氨基酸序列所示的A2-HCDR1、A2-HCDR2、A2-HCDR3：SEQ ID NO:19、20和21，以及分别如以下氨基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3：SEQ ID NO:24、25和26；或
- (iii)分别如以下氨基酸序列所示的A2-HCDR1、A2-HCDR2、A2-HCDR3：SEQ ID NO:19、31和21，以及分别如以下氨基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3：SEQ ID NO:24、25和26。
10. 根据权利要求1-9中任何一项所述的液体抗体制剂，特征在于第一抗原结合结构域包含重链可变区和/或轻链可变区，其中重链可变区
- (i)包含与选自SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者
- (ii)包含选自SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者
- (iii)包含与选自SEQ ID NO:4的氨基酸序列相比具有1个或多个（优选不超过10个，更优选不超过5、4、3、2、1个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在CDR区中；和/或轻链可变区
- (i)包含与选自SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者
- (ii)包含选自SEQ ID NO:9的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与选自SEQ ID NO: 9的氨基酸序列相比具有1个或多个(优选不超过10个,更优选不超过5、4、3、2、1个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换,更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成,优选地,所述氨基酸改变不发生在CDR区中。

11. 根据权利要求1-8中任何一项所述的液体抗体制剂,特征在于所述抗

CLDN18.2/CD3是IgG型抗体(例如,IgG4亚型抗体),优选地包含SEQ ID NO:9或与之具有至少90%,95%,98%或99%同一性的重链序列以及SEQ ID NO: 10或与之具有至少90%,95%,98%或99%同一性的轻链序列。

12. 根据权利要求1-11中任何一项所述的液体抗体制剂,所述第二抗原结合结构域包含重链可变区和/或轻链可变区,其中重链可变区

(i)包含与选自SEQ ID NO: 30、22或32的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii)包含选自SEQ ID NO: 30、22或32的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(iii)包含与选自SEQ ID NO: 30、22或32的氨基酸序列相比具有1个或多个(优选不超过10个,更优选不超过5、4、3、2、1个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换,更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成,优选地,所述氨基酸改变不发生在CDR区中;

和/或

轻链可变区

(i)包含与选自SEQ ID NO: 27的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii)包含选自SEQ ID NO: 27的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(iii)包含与选自SEQ ID NO: 27的氨基酸序列相比具有1个或多个(优选不超过10个,更优选不超过5、4、3、2、1个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换,更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成,优选地,所述氨基酸改变不发生在CDR区中。

13. 权利要求1-11中任一项的液体抗体制剂,其还包含重链恒定区和/或轻链恒定区。

14. 权利要求1-12中任一项的液体抗体制剂,其为IgG样结构的双特异性抗体。

15. 权利要求1-13中任一项的液体抗体制剂,其中所述抗体的重链恒定区来自IgG1或IgG2或IgG3或IgG4,优选的IgG1。

16. 根据权利要求1-14中任何一项所述的液体抗体制剂,特征在于所述抗CLDN18.2/CD3在293细胞或CHO细胞中重组表达。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的液体抗体制剂,其包含:

(i)约0.1-100mg/ml的抗CLDN18.2/CD3蛋白;

(ii)约0.1-2mg/ml的组氨酸;

(iii)约30-70mg/ml的山梨醇;

(iv)约0.1-1mg/ml聚山梨酯80;和

(v)任选地,约0.008-0.018mg/ml的依地酸二钠,

其中所述液体试剂的pH为约5.0-5.5,例如,约5.2;

例如,所述液体抗体制剂包含

(i)约0.1-10mg/ml,例如0.1-1mg/ml的抗CLDN18.2/CD3蛋白;

- (ii) 约 1.55 mg/ml 的组氨酸;
 - (iii) 约 40-60mg/ml 山梨醇或蔗糖, 优选 50mg/ml 山梨醇, 或 30-50mg/ml 蔗糖;
 - (iv) 约 0.2-0.8 mg/ml, 例如 0.2-0.6mg/ml 聚山梨酯 80; 和
 - (v) 约 0.008-0.018 mg/ml, 例如 0.01 mg/ml 的依地酸二钠,
- 其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-5.5, 例如, 约 5.2;
- 或者, 所述液体抗体制剂包含
- (i) 约 1mg/ml 的抗 CLDN18.2/CD3 蛋白, 约 1.55 mg/ml 组氨酸, 约 50.00 mg/ml 山梨醇, 约 0.2 mg/ml 聚山梨酯 80, pH 约 5.2; 或
 - (ii) 约 50mg/ml 的抗 CLDN18.2/CD3 蛋白, 约 1.55 mg/ml 组氨酸, 约 50.00 mg/ml 山梨醇, 约 0.01 mg/ml 依地酸二钠, 约 0.2 mg/ml 聚山梨酯 80, pH 约 5.2; 或
 - (iii) 约 50mg/ml 的抗 CLDN18.2/CD3 蛋白, 约 0.82 mg/ml 醋酸钠, 约 50.00 mg/ml 山梨醇, 约 0.2 mg/ml 聚山梨酯 80, pH 5.2。
18. 根据权利要求 1-13 中任何一项所述的液体抗体制剂, 其特征在于, 该制剂在储存后, 例如在 25℃ 储存至少 2 个月后, 或在 40℃ $\pm$ 2℃ 储存 1 个月后, 是稳定的, 优选地具有如下特征之一或多项:
- (i) 通过 SEC-HPLC 法测量, 主峰变化值小于 1%, 和/或制剂具有大于 96% 的纯度, 优选大于 97%、98% 的纯度;
 - (ii) 通过非还原型 CE-SDS 法测量, 主峰变化值小于 2%, 和/或制剂具有大于 96% 的纯度, 优选大于 97%、98% 的纯度;
 - (iii) 通过 CEX-HPLC 法测量, 相对于储存第 0 天的初始值, 制剂中抗 CLDN18.2/CD3 蛋白的各组分 (主成分、酸性组分和碱性组分) 的变化值总和不超过 40% 和/或主成分的变化值不超过 20%, 例如在 40℃ $\pm$ 2℃ 储存 1 个月后变化值总和不超过约 40% (例如不超过 30%) 或主成分变化值不超过约 20% (例如不超过 15%), 或在 25℃ 储存 2 个月后变化值总和不超过约 20% (例如约 15%) 或主成分变化值不超过约 15% (例如不超过约 10%);
 - (iv) 通过 ELISA 法测量, 相对于储存第 0 天的初始值, 制剂中抗 CLDN18.2/CD3 蛋白的相对结合活性为 70%-130%, 例如, 90%-110%;
- 更优选地, 该制剂在振荡和/或反复冻融下是稳定的。
19. 根据权利要求 1-15 中任何一项所述的液体抗体制剂, 特征在于所述液体制剂为注射剂, 优选用于皮下注射或静脉内注射, 或者为输注剂, 例如用于静脉内输注。
20. 一种固体抗体制剂, 其通过固化权利要求 1-19 中任何一项所述的液体抗体制剂而获得, 所述固体抗体制剂例如是冻干粉针剂形式。
21. 递送装置, 其包含权利要求 1-19 中任何一项的液体抗体制剂或权利要求 15 的固体抗体制剂。
22. 预填充注射器, 其包含权利要求 1-19 中任何一项的液体抗体制剂或权利要求 15 的固体抗体制剂, 用于静脉内注射或者肌肉注射。
23. 根据权利要求 1-20 中任何一项的液体抗体制剂或权利要求 15 的固体抗体制剂的用途,

用于制备在受试者中治疗或预防肿瘤、病原体感染的递送装置或预填充注射器或药物。