



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110678199 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 28

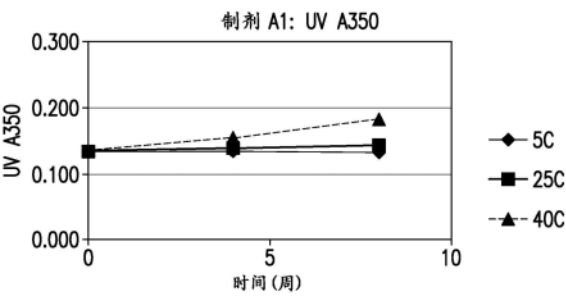
(21) 申请号 201880029175.1	(72) 发明人 S·巴塔查亚 A·德 C·N·纳拉西曼 M·K·沙玛 杨孝育 R·布拉格 J·K·张
(22) 申请日 2018.05.01	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110678199 A	(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256 专利代理师 陈文平 侯宝光
(43) 申请公布日 2020.01.10	
(30) 优先权数据 62/500,268 2017.05.02 US	(51) Int.Cl. A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.11.01	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2018/030420 2018.05.01	(56) 对比文件 CA 2956000 A1, 2016.02.04 US 2009130119 A1, 2009.05.21 WO 2016168716 A1, 2016.10.20
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/204343 EN 2018.11.08	
(73) 专利权人 默沙东有限责任公司 地址 美国新泽西州	审查员 周晶 权利要求书2页 说明书80页 序列表57页 附图24页

(54) 发明名称

单独的和与程序性死亡受体1 (PD-1) 抗体组合的抗CTLA4抗体的稳定制剂及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及包含与细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA4) 结合的抗体或其抗原结合片段的稳定制剂, 任选地进一步含有抗人程序性死亡受体1 (PD-1) 抗体或其抗原结合片段。还提供了用本发明的制剂治疗各种癌症和慢性感染的方法。



1. 一种制剂,其包含:

(i) 1mg/ml至100mg/ml的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段;其中所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段包含三个轻链CDR和三个重链CDR,所述三个轻链CDR是SEQ ID NO:38的CDRL1、SEQ ID NO:39的CDRL2和SEQ ID NO:40的CDRL3并且所述三个重链CDR是SEQ ID NO:35的CDRH1、SEQ ID NO:36的CDRH2和SEQ ID NO:37的CDRH3;

(ii) 1mg/ml至100mg/ml的抗PD1抗体或其抗原结合片段;其中所述抗PD1抗体或其抗原结合片段包含三个轻链CDR和三个重链CDR,所述三个轻链CDR是SEQ ID NO:1的CDRL1、SEQ ID NO:2的CDRL2和SEQ ID NO:3的CDRL3并且所述三个重链CDR是SEQ ID NO:6的CDRH1、SEQ ID NO:7的CDRH2和SEQ ID NO:8的CDRH3;

(iii) 5mM至20mM的L-组氨酸缓冲液;

(iv) 6%至8%重量/体积(w/v)的蔗糖;

(v) 0.01%至0.10%w/v的聚山梨酯80;和

(vi) 1mM至20mM的L-蛋氨酸,

其中所述制剂的pH在5.0和6.0之间。

2. 权利要求1所述的制剂,其中所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段包含包含SEQ ID NO:88的重链可变区和包含SEQ ID NO:48的轻链可变区。

3. 权利要求1所述的制剂,其包含8mM至12mM的L-组氨酸缓冲液。

4. 权利要求1所述的制剂,其包含5mM至10mM的L-蛋氨酸。

5. 权利要求1所述的制剂,其包含重量比为0.02%w/v的聚山梨酯80。

6. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为1-50mg/ml。

7. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其包含25mg/mL的抗PD1抗体和50mg/mL的抗CTLA4抗体、10mM的L-组氨酸缓冲液、7%w/v的蔗糖、0.02%的聚山梨酯80和10mM的L-蛋氨酸。

8. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其包含23.5mg/mL的抗PD1抗体和2.9mg/mL的抗CTLA4抗体、10mM的L-组氨酸缓冲液、7%w/v的蔗糖、0.02%的聚山梨酯80和10mM的L-蛋氨酸。

9. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中所述制剂的pH为5.3至5.8。

10. 权利要求9所述的制剂,其中所述制剂的pH为5.5至5.6。

11. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中在5°C下12个月后:

(i) 如通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述抗CTLA4抗体的%单体 $\geq 95\%$ ;

(ii) 如通过还原的CE-SDS所测定的,所述抗CTLA4抗体的%重链和轻链 $\geq 90\%$ ;

(iii) 如通过还原的CE-SDS所测定的,所述抗CTLA4抗体的%重链和轻链 $\geq 95\%$ ;

(iv) 如通过非还原的CE-SDS所测定的,所述抗CTLA4抗体的%完整IgG $\geq 90\%$ ;和/或

(v) 如通过非还原的CE-SDS所测定的,所述抗CTLA4抗体的%完整IgG $\geq 95\%$ 。

12. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中所述抗PD1抗体或其抗原结合片段包含V<sub>L</sub>区和V<sub>H</sub>区,所述V<sub>L</sub>区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,并且所述V<sub>H</sub>区包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。

13. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中所述抗PD1抗体为派姆单抗。

14. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中所述抗PD1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为1:2、1:1、2:1、10:1、1:10、8:3或8:1。

15. 权利要求14所述的制剂,其中所述抗PD1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为8:1。

16. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为1.25mg/ml、2.5mg/ml、2.9mg/ml、5mg/ml、7.9mg/ml、10mg/ml、12.5mg/ml、25mg/ml、50mg/ml、75mg/ml或100mg/ml。

17. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为1-25mg/ml。

18. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中所述抗PD1抗体或其抗原结合片段的浓度为25mg/mL、22.7mg/mL、2.27mg/mL、21.1mg/mL或23.5mg/mL。

19. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中所述抗PD1抗体或其抗原结合片段的浓度为1-25mg/mL。

20. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其包含23.5mg/mL的抗PD1抗体和2.9mg/mL的抗CTLA4抗体、10mM的L-组氨酸缓冲液、7%w/v的蔗糖、0.02%w/v的聚山梨酯80和10mM的L-蛋氨酸。

21. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其进一步包含螯合剂,其中所述螯合剂为二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)。

22. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其中所述制剂包含在玻璃小瓶或注射装置中。

23. 权利要求1-5中任一项所述的制剂,其为液体制剂,或者其被冷冻至至少低于-70℃,或者其为来自冻干制剂的重构溶液。

24. 权利要求1-23中任一项所述的制剂在制备用于治疗癌症或用于治疗慢性感染的药物中的用途,其中所述癌症是具有高水平的微卫星不稳定性(MSI-H)的实体瘤或具有高突变负担的实体瘤。

## 单独的和与程序性死亡受体1 (PD-1) 抗体组合的抗CTLA4抗体的稳定制剂及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及治疗性抗体的制剂及其在治疗各种病症中的用途。在一个方面,本发明涉及包含与细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA4) 结合的抗体或其抗原结合片段的制剂。在另一方面,这种制剂进一步包含抗人程序性死亡受体1 (PD-1) 抗体或其抗原结合片段。还提供了用本文所述的制剂治疗各种癌症和慢性感染的方法。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2017年5月2日提交的U.S.S.N.62/500,268的权益,其内容通过引用以其整体并入本文中。

[0004] 电子提交的序列表的引用

[0005] 本申请的序列表通过EFS-Web以ASCII格式的序列表电子提交,文件名为“24449WOPCT-SEQTXT-30APR2018.TXT”,创建日期为2018年4月30日,大小为96Kb。通过EFS-Web提交的此序列表是说明书的一部分并通过引用以其整体并入本文中。

### 背景技术

[0006] 用于人类的抗体药物的恒定域氨基酸序列或可变域内的框架序列可能有所不同,但通常在CDR序列中差异最大。甚至与相同蛋白质、相同多肽或甚至潜在地相同表位结合的抗体可以包含完全不同的CDR序列。也可从人种系抗体序列或非人(例如啮齿类)种系抗体序列(例如在人源化抗体中)获得用于人类的治疗性抗体,从而导致潜在的CDR序列的进一步多样性。这些序列差异导致溶液中的稳定性不同以及对溶液参数的响应度不同。另外,氨基酸排列的微小变化或一个或几个氨基酸残基的变化可导致抗体稳定性和对序列特异性降解途径的敏感性显著不同。结果,目前尚无法预测优化抗体稳定性所需的溶液条件。必须分别研究每种抗体,以确定最佳的溶液制剂。Bhambhani等人(2012) J.Pharm.Sci.101:1120。

[0007] 抗体也是相对较高分子量的蛋白质(~150,000Da),例如与其他治疗性蛋白质(诸如激素和细胞因子)相比。结果,常常需要相对高体重含量(weight amount)的抗体药物剂量以获得期望的药物摩尔浓度。另外,通常期望皮下施用抗体药物,因为这使得能够自我施用(self-administration)。自我施用避免了与访问医疗机构进行施用(例如静脉内)相关的时间和费用。皮下递送受单次注射中在注射部位可实际递送的溶液体积的限制,其通常为约1至1.5ml。通常使用预先填充的注射器,或充满药物的液体溶液制剂而不是冻干形式的自动注射器来完成皮下自我施用,以避免需要患者在注射之前重悬药物。抗体药物在储存期间必须是稳定的以确保功效和一致的剂量,因此至关重要的是,无论选择哪种制剂,均应支持所需的特性,例如高浓度、透明度和可接受的粘度,并且还应在典型的存储条件下在可接受的长保质期内保持这些特性和药物功效。

[0008] CTLA4在基因结构、染色体位置、序列同源性和基因表达方面与CD28分子有非常密切的关系。它们均是共刺激分子B7的受体,主要在活化T细胞的表面表达。与B7结合后,



CTLA4可以抑制小鼠和人T细胞的活化,在T细胞的活化中起负调控作用。

[0009] CTLA4 mAb或CTLA4配体可防止CTLA4与其天然配体结合,从而阻止CTLA4传导T细胞负调控信号,并增强T细胞对各种抗原的反应性。在这方面,体内和体外研究的结果基本一致。目前,存在一些正在临床试验中测试的CTLA4 mAb,其用于治疗前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、恶性黑素瘤等(Grosso等人,CTLA-4blockade in tumor models:an overview of preclinical and translational research.Cancer Immun.13:5(2013))。

[0010] 作为影响T细胞功能的重要因素,CTLA4和CTLA4 mAb可通过干扰人体的免疫微环境而对疾病产生特定的治疗作用。它们具有很高的功效,并且可以弥补传统药物的不足,为基因治疗开辟了一条新途径。CTLA4和CTLA4 mAb正在实验和临床试验的各个阶段进行测试。例如,在自身免疫性疾病中,它们有效地抑制了哮喘动物模型中的气道高反应性,防止了风湿性疾病的发展,介导了对体内同种异体移植物的免疫耐受性等。在另一方面,尽管生物基因疗法在短期临床试验中未显示任何不良反应,但应注意长期应用后的潜在作用。例如,CTLA4 mAb过度阻断CTLA4-B7信号传导可能导致自身免疫性疾病的发展。由于抗体可以特异性结合其抗原并诱导靶细胞裂解或阻止病理学进展,因此基于抗体的药物尤其是人源化抗体的开发和利用在人类恶性肿瘤和其他免疫性疾病的临床治疗中具有重要意义。

[0011] PD-1被认为是免疫调节和维持外周耐受的重要参与者。PD-1在初始(naive)T、B和NKT细胞上适度表达,并通过淋巴细胞、单核细胞和髓样细胞上的T/B细胞受体信号传导上调(Sharpe等人,The function of programmed cell death land its ligands in regulating autoimmunity and infection.Nature Immunology(2007);8:239-245)。已经提出,如果与其他批准的或实验的癌症疗法(例如,放疗、手术、化学治疗剂、靶向疗法、抑制在肿瘤中失调的其他信号传导途径的药剂和其他免疫增强剂)组合施用,抗PD-1抗体的功效可能会增强。一种已与PD-1拮抗剂组合测试的此类药物是细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(缩写为CTLA4)。

[0012] 存在用于药物用途例如用于治疗各种癌症和传染病的抗CTLA4抗体的稳定制剂,以及与抗人PD-1抗体共同配制的抗CTLA4抗体的稳定制剂的需求。优选地,这样的制剂将表现出长的保质期,在存储和运输时是稳定的,以及将优选地在用于自我施用的药物存储的典型条件下,即在注射器中在冰箱温度下,在数月至数年中表现出稳定性,从而导致相应药品的保质期长。

## 发明内容

[0013] 在一个方面,本发明包括抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的制剂,其包含(i)抗CTLA4抗体或其抗原结合片段;(ii)缓冲液;(iii)非还原性糖;(iv)非离子表面活性剂;和抗氧化剂。在另一实施方式中,所述制剂进一步包含抗PD-1抗体,例如,派姆单抗(pembrolizumab)或纳武单抗(nivolumab)。在一个实施方式中,所述制剂进一步包含螯合剂。

[0014] 在一个实施方式中,所述制剂包含(i)约10mg/ml至约200mg/ml的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段;(ii)约5mM至约20mM的缓冲液;(iii)约6%至约8%重量/体积(w/v)的非还原性糖;(iv)约0.01%至约0.10%的非离子表面活性剂;和(v)约1mM至约20mM的抗氧化

剂。在另一实施方式中,所述制剂进一步包含抗PD-1抗体,例如,派姆单抗或纳武单抗。在另一实施方式中,所述制剂进一步包含螯合剂。在一个实施方式中,所述螯合剂的存在量为约1 $\mu$ M至约50 $\mu$ M。螯合剂为DTPA。在一个实施方式中,所述制剂的pH在4.5-6.5之间。在特定的实施方式中,所述制剂的pH为约pH 5.0至约pH 6.0。在另一实施方式中,所述制剂的pH为约pH 5.3至约pH 5.8。在另一实施方式中,pH为5.3。在另一实施方式中,pH为5.4。在一个实施方式中,pH为5.5。在一个实施方式中,pH为5.6。在另一实施方式中,pH为5.7。在一个实施方式中,pH为5.8。

[0015] 在所述制剂的一个实施方式中,所述缓冲液为L-组氨酸缓冲液或乙酸钠缓冲液,所述非还原性糖为蔗糖,所述非离子表面活性剂为聚山梨酯80,并且所述抗氧化剂为蛋氨酸或其药学上可接受的盐。在一个实施方式中,所述抗氧化剂为L-蛋氨酸。在另一实施方式中,所述抗氧化剂为L-蛋氨酸的药学上可接受的盐,例如,蛋氨酸HCl。

[0016] 在另一实施方式中,所述制剂包含(i)约10mg/ml至约200mg/ml的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段;(ii)约5mM至约20mM的L-组氨酸或约5mM至约20mM的乙酸钠缓冲液;(iii)约6%至约8%w/v的蔗糖;(iv)约0.01%至约0.10%w/v的聚山梨酯80;和(v)约1mM至约20mM的L-蛋氨酸。在另一实施方式中,所述制剂进一步包含抗PD-1抗体,例如,派姆单抗或纳武单抗。在一个实施方式中,所述制剂进一步包含螯合剂。在一个实施方式中,所述螯合剂的存在量为约1 $\mu$ M至约50 $\mu$ M。在一个实施方式中,所述螯合剂为DTPA。在一个实施方式中,所述缓冲液为L-组氨酸缓冲液。在一个实施方式中,所述制剂包含约8mM至约12mM的L-组氨酸。在另一实施方式中,所述制剂包含约5mM至约10mM的L-蛋氨酸。在另一实施方式中,所述制剂包含重量比为约0.02%w/v的聚山梨酯80。在一个实施方式中,所述抗CTLA4制剂包含重量比为约7%(w/v)的蔗糖。

[0017] 在所述制剂的实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为约10mg/ml至约100mg/ml。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为约10mg/ml、12.5mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、50mg/ml、75mg/ml或100mg/ml。在一个实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为25mg/mL。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为约50mg/ml。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为约75mg/mL。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为100mg/mL。

[0018] 在一个方面,提供了一种制剂,其包含约25mg/mL的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋氨酸。

[0019] 在一个方面,提供了一种制剂,其包含约50mg/mL的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋氨酸。

[0020] 在一个方面,提供了一种制剂,其包含约75mg/mL的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋氨酸。

[0021] 在一个方面,提供了一种制剂,其包含约100mg/mL的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋

氨酸。

[0022] 在任何上述制剂的一个方面,所述制剂的pH为约5.3至5.8。在另一方面,所述制剂的pH为约5.5至约5.6。在另一方面,所述制剂的pH为约5.5。在另一方面,所述制剂的pH为约5.6。

[0023] 在任何上述制剂的一个方面,所述制剂包含抗PD1抗体或其抗原结合片段。在一个方面,所述抗PD1抗体为派姆单抗。在另一方面,所述抗PD1抗体为纳武单抗。

[0024] 在另一方面,所述制剂可进一步包含螯合剂。在一个实施方式中,所述螯合剂为DTPA。在一个实施方式中,所述螯合剂为EDTA。在一个方面,螯合剂以约1 $\mu$ M至约50 $\mu$ M的量存在。在一个实施方式中,所述制剂包含约5 $\mu$ M的螯合剂。在一个实施方式中,所述制剂包含约10 $\mu$ M的螯合剂。在一个实施方式中,所述制剂包含约15 $\mu$ M的螯合剂。在一个实施方式中,所述制剂包含约20 $\mu$ M的螯合剂。在一个实施方式中,所述制剂包含约25 $\mu$ M的螯合剂。在一个实施方式中,所述制剂包含约30 $\mu$ M的螯合剂。在一个实施方式中,所述制剂包含约35 $\mu$ M的螯合剂。在一个实施方式中,所述制剂包含约40 $\mu$ M的螯合剂。在一个实施方式中,所述制剂包含约45 $\mu$ M的螯合剂。在一个实施方式中,所述制剂包含约50 $\mu$ M的螯合剂。在一个实施方式中,所述螯合剂为DTPA,其以上述任何量存在。在另一实施方式中,所述螯合剂为EDTA,其以上述任何量存在。

[0025] 在一个实施方式中,所述制剂包含在玻璃小瓶中。在另一实施方式中,所述制剂包含在注射装置中。在另一实施方式中,所述制剂为液体制剂。在一个方面,将所述制剂冷冻至至少低于-70 $^{\circ}$ C。在另一实施方式中,所述制剂为来自冻干制剂的重构溶液。

[0026] 在某些实施方式中,所述制剂在冷藏温度(2-8 $^{\circ}$ C)下稳定至少3个月,优选6个月,更优选1年,甚至更优选直至2年。在所述制剂的一个实施方式中,在5 $^{\circ}$ C下12个月后,如通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述抗CTLA4抗体的%单体 $\geq$ 90%。在所述制剂的另一实施方式中,在5 $^{\circ}$ C下12个月后,如通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述抗CTLA4抗体的%单体 $\geq$ 95%。在所述制剂的另一实施方式中,在5 $^{\circ}$ C下12个月后,如通过还原的CE-SDS所确定的,所述抗CTLA4抗体的%重链和轻链 $\geq$ 90%。在所述制剂的另一实施方式中,在5 $^{\circ}$ C下12个月后,如通过还原的CE-SDS所确定的,所述抗CTLA4抗体的%重链和轻链 $\geq$ 95%。在所述制剂的另一实施方式中,在5 $^{\circ}$ C下12个月后,如通过非还原的CE-SDS所确定的,所述抗CTLA4抗体的%完整IgG $\geq$ 90%。在所述制剂的另一实施方式中,在5 $^{\circ}$ C下12个月后,如通过非还原的CE-SDS所确定的,所述抗CTLA4抗体的%完整IgG $\geq$ 95%。

[0027] 在任何上述制剂的一个方面,所述制剂包含抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,其包含三个轻链CDR和三个重链CDR,其中所述轻链CDR包括SEQ ID NO:38的CDRL1、SEQ ID NO:39的CDRL2、SEQ ID NO:40的CDRL3并且所述重链CDR包括SEQ ID NO:35的CDRH1、SEQ ID NO:36的CDRH2和SEQ ID NO:37的CDRH3。在另一个方面,所述制剂包含抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,其包含包含SEQ ID NO:88的重链可变区和包含SEQ ID NO:48的轻链可变区。在另一方面,所述制剂包含抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,其包含包含SEQ ID NO:99的重链和包含SEQ ID NO:100的轻链。

[0028] 在一个方面,本发明提供了抗CTLA4抗体或其抗原结合片段与抗人PD-1抗体或其抗原结合片段的共制剂,其包含(i)抗CTLA4抗体或其抗原结合片段;(ii)抗人PD-1抗体或其抗原结合片段,(iii)缓冲液,(iii)非

[0029] 还原性糖；(iv) 非离子表面活性剂；和抗氧化剂。在一个实施方式中，所述共制剂进一步包含螯合剂。在一个实施方式中，所述螯合剂为EDTA。在另一实施方式中，所述螯合剂为DTPA。在所述共制剂的一个实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为1:2。在共制剂的另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为1:1。在共制剂的另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为2:1。在共制剂的另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为10:1。在共制剂的另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为1:10。在另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为8:1。在另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为8:3。

[0030] 在本发明的一个实施方式中，所述共制剂包含 (i) 约1mg/ml至约100mg/ml的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段；(ii) 约1mg/ml至约100mg/ml的抗人PD-1抗体，(ii) 约5mM至约20mM的缓冲液；(iii) 约6%至约8%重量/体积(w/v)的非还原性糖；(iv) 约0.01%至约0.10%的非离子表面活性剂；和(v) 约1mM至约20mM的抗氧化剂。在一个实施方式中，所述共制剂进一步包含螯合剂。在一个实施方式中，所述螯合剂为DTPA。在所述共制剂的一个实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为1:2。在共制剂的另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为1:1。在共制剂的另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为2:1。在共制剂的另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为10:1。在共制剂的另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为1:10。在另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为8:1。在另一实施方式中，所述抗人PD-1抗体与所述抗CTLA4抗体的比例为8:3。在一个实施方式中，所述共制剂的pH为4.5至6.5。在其他实施方式中，所述制剂的pH为约pH 5.0至约pH 6.0。在另一实施方式中，所述制剂的pH为约pH 5.3至约pH 5.8。

[0031] 在所述共制剂的一个实施方式中，所述缓冲液为组氨酸缓冲液或乙酸钠缓冲液，所述非还原性糖为蔗糖，所述非离子表面活性剂为聚山梨酯80，并且所述抗氧化剂为蛋氨酸或其药学上可接受的盐。在一个实施方式中，所述抗氧化剂为L-蛋氨酸。在另一实施方式中，所述抗氧化剂为L-蛋氨酸的药学上可接受的盐，例如，蛋氨酸HCl。

[0032] 在另一方面，所述共制剂包含 (i) 约1mg/ml至约100mg/ml的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段；(ii) 约1mg/ml至约100mg/ml的抗人PD-1抗体或其抗原结合片段；(iii) 约5mM至约20mM的L-组氨酸缓冲液或约5mM至约20mM的乙酸钠缓冲液；(iv) 约6%至约8%w/v的蔗糖；(v) 约0.01%至约0.10%w/v的聚山梨酯80；和(vi) 约1mM至约20mM的L-蛋氨酸。在一个实施方式中，所述共制剂进一步包含螯合剂。在一个实施方式中，所述螯合剂为DTPA。在一个实施方式中，所述缓冲液为L-组氨酸缓冲液。在一个实施方式中，所述共制剂包含约8mM至约12mM的L-组氨酸缓冲液。在另一实施方式中，所述共制剂包含约5mM至约10mM的L-蛋氨酸。在另一实施方式中，所述共制剂包含重量比为约0.02%w/v的聚山梨酯80。在一个实施方式中，所述共制剂包含重量比为约7% (w/v) 的蔗糖。

[0033] 在所述共制剂的实施方式中，所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为约1mg/mL至约100mg/mL。在另一实施方式中，所述抗CTLA4抗体的浓度为约10mg/ml至约100mg/ml。在另一实施方式中，所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为约10mg/ml。在另一实施方式中，所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为1.25mg/ml。在另一实施方

式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为2.5mg/ml。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为5mg/ml。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为12.5mg/ml。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为25mg/ml。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为50mg/ml。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为75mg/ml。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为100mg/ml。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的浓度为约50mg/ml。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体的浓度为2.9mg/mL。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体的浓度为7.9mg/mL。

[0034] 在所述共制剂的实施方式中,所述抗人PD-1抗体的浓度为约1mg/mL至约100mg/mL。在另一实施方式中,所述抗人PD-1抗体的浓度为约10mg/ml至约100mg/ml。在另一实施方式中,所述抗人PD-1抗体的浓度为约25mg/ml。在另一实施方式中,所述抗人PD-1抗体的浓度为约22.7mg/ml。在另一实施方式中,所述抗人PD-1抗体的浓度为约2.27mg/ml。在另一实施方式中,所述抗人PD-1抗体的浓度为约21.1mg/ml。在另一实施方式中,所述抗人PD-1抗体的浓度为约23.5mg/ml。

[0035] 在一个实施方式中,所述共制剂包含约25mg/mL的抗PD1抗体、约12.5mg/mL的抗CTLA4抗体、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋氨酸。

[0036] 在一个实施方式中,所述共制剂包含约25mg/mL的抗PD1抗体、约25mg/mL的抗CTLA4抗体、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋氨酸。

[0037] 在一个实施方式中,所述共制剂包含约25mg/mL的抗PD1抗体、约50mg/mL的抗CTLA4抗体、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋氨酸。

[0038] 在一个实施方式中,所述共制剂包含约22.72mg/mL的抗PD1抗体、约2.3mg/mL的抗CTLA4抗体、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋氨酸。

[0039] 在一个实施方式中,所述共制剂包含约2.27mg/mL的抗PD1抗体、约22.7mg/mL的抗CTLA4抗体、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋氨酸。

[0040] 在一个实施方式中,所述共制剂包含约23.5mg/mL的抗PD1抗体、约2.9mg/mL的抗CTLA4抗体、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋氨酸。

[0041] 在一个实施方式中,所述共制剂包含约21.1mg/mL的抗PD1抗体、约7.9mg/mL的抗CTLA4抗体、10mM的L-组氨酸缓冲液、约7%w/v的蔗糖、约0.02%w/v的聚山梨酯80和约10mM的L-蛋氨酸。

[0042] 在任何上述制剂的一个方面,所述制剂包含抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,其包含三个轻链CDR和三个重链CDR,其中所述轻链CDR包括SEQ ID NO:38的CDRL1、SEQ ID NO:39的CDRL2、SEQ ID NO:40的CDRL3并且所述重链CDR包括SEQ ID NO:35的CDRH1、SEQ ID NO:36的CDRH2和SEQ ID NO:37的CDRH3。在另一方面,所述制剂包含抗CTLA4抗体或其抗原

结合片段,其包含包含SEQ ID NO:88的重链可变区和包含SEQ ID NO:48的轻链可变区。在另一方面,所述制剂包含抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,其包含包含SEQ ID NO:99的重链和包含SEQ ID NO:100的轻链。在任何上述制剂的一个方面,所述抗人PD-1抗体或其抗原结合片段包含三个轻链CDR和三个重链CDR,其中所述轻链CDR包括SEQ ID NO:1的CDRL1、SEQ ID NO:2的CDRL2、SEQ ID NO:3的CDRL3并且所述重链CDR包括SEQ ID NO:6的CDRH1、SEQ ID NO:7的CDRH2和SEQ ID NO:8的CDRH3。在另一方面,所述制剂包含抗人PD1抗体或其抗原结合片段,其包含包含SEQ ID NO:4的轻链可变区和包含SEQ ID NO:9的重链可变区。在另一方面,所述制剂包含抗人PD1抗体或其抗原结合片段,其包含包含SEQ ID NO:5的轻链和包含SEQ ID NO:10的重链。在任何上述制剂的一个方面,所述抗人PD-1抗体或其抗原结合片段为派姆单抗。在另一方面,所述抗人PD-1抗体或其抗原结合片段为纳武单抗。

[0043] 在任何上述共制剂的一个方面,所述制剂包含(i)抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,其包含三个轻链CDR和三个重链CDR,其中所述轻链CDR包括SEQ ID NO:38的CDRL1、SEQ ID NO:39的CDRL2、SEQ ID NO:40的CDRL3并且所述重链CDR包括SEQ ID NO:35的CDRH1、SEQ ID NO:36的CDRH2和SEQ ID NO:37的CDRH3以及(ii)抗人PD-1抗体或其抗原结合片段,其包含三个轻链CDR和三个重链CDR,其中所述轻链CDR包括SEQ ID NO:1的CDRL1、SEQ ID NO:2的CDRL2、SEQ ID NO:3的CDRL3并且所述重链CDR包括SEQ ID NO:6的CDRH1、SEQ ID NO:7的CDRH2和SEQ ID NO:8的CDRH3。

[0044] 在任何上述共制剂的一个方面,所述制剂包含(i)抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,其包含包含SEQ ID NO:88的重链可变区和包含SEQ ID NO:48的轻链可变区和(ii)抗人PD1抗体或其抗原结合片段,其包含包含SEQ ID NO:4的轻链可变区和包含SEQ ID NO:9的重链可变区。

[0045] 在任何上述共制剂的另一方面,所述制剂包含(i)抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,其包含包含SEQ ID NO:99的重链和包含SEQ ID NO:100的轻链和(ii)抗人PD1抗体或其抗原结合片段,其包含包含SEQ ID NO:5的轻链和包含SEQ ID NO:10的重链。

[0046] 在一个实施方式中,所述制剂包含在玻璃小瓶中。在另一实施方式中,所述制剂包含在注射装置中。在另一实施方式中,所述制剂为液体制剂。在一个方面,将所述制剂冷冻至至少低于-70℃。在另一实施方式中,所述制剂为来自冻干制剂的重构溶液。

[0047] 在一个方面,提供了在有需要的哺乳动物受试者(例如人)中治疗慢性感染或癌症的方法,该方法包括:施用有效量的本文所述的抗CTLA4制剂或共制剂。

## 附图说明

[0048] 图1A显示制剂A1在5℃、25℃和40℃下在8周内的UV A350吸收。图1B显示制剂A2在5℃、25℃和40℃下在8周内的UV A350吸收。

[0049] 图2显示用于冻融、搅拌和光应力(stress)研究的制剂A1和A2的UV A350吸收。

[0050] 图3A和3B分别显示制剂A1和A2在5℃、25℃和40℃储存条件下的通过UP-SEC确定的%HMW与时间数据。

[0051] 图4A和4B分别显示制剂A1和A2在5℃、25℃和40℃储存条件下的通过UP-SEC确定的%单体与时间数据。

[0052] 图5显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂A1和A2的通过UP-SEC确定的%HMW。

- [0053] 图6显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂A1和A2的通过UP-SEC确定的%单体。
- [0054] 图7A和7B分别显示制剂A1和A2在5℃、25℃和40℃储存条件下的通过HP-IEX确定的%酸性与时间数据。
- [0055] 图8A和8B分别显示制剂A1和A2在5℃、25℃和40℃储存条件下的通过HP-IEX确定的%碱性与时间数据。
- [0056] 图9A和9B分别显示制剂A1和A2在5℃、25℃和40℃储存条件下的通过HP-IEX确定的%主成分(%Main)与时间数据。
- [0057] 图10显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂A1和A2的通过HP-IEX确定的%酸性。
- [0058] 图11显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂A1和A2的通过HP-IEX确定的%碱性。
- [0059] 图12显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂A1和A2的通过HP-IEX确定的%主成分。
- [0060] 图13显示通过制剂A1和A2的肽谱确定的LC-M4(蛋氨酸氧化)的氧化百分比。
- [0061] 图14显示通过制剂A1和A2的肽谱确定的HC-M34(蛋氨酸氧化)的氧化百分比。
- [0062] 图15显示通过制剂A1和A2的肽谱确定的HC-M250(蛋氨酸氧化)的氧化百分比。
- [0063] 图16显示通过制剂A1和A2的肽谱确定的HC-M426(蛋氨酸氧化)的氧化百分比。
- [0064] 图17A显示制剂B1在5℃、25℃和40℃下在8周内的UV A350吸收。
- [0065] 图17B显示制剂B2在5℃、25℃和40℃下在8周内的UV A350吸收。
- [0066] 图18显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂B1和B2的UV A350吸收。
- [0067] 图19A和19B分别显示制剂B1和B2在5℃、25℃和40℃储存条件下的通过UP-SEC确定的%HMW与时间数据。
- [0068] 图20A和20B分别显示制剂B1和B2在5℃、25℃和40℃储存条件下的通过UP-SEC确定的%单体与时间数据。
- [0069] 图21显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂B1和B2的通过UP-SEC确定的%HMW。
- [0070] 图22显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂B1和B2的通过UP-SEC确定的%单体。
- [0071] 图23A和23B分别显示制剂B1和B2在5℃、25℃和40℃储存条件下的通过HP-IEX确定的%酸性与时间数据。
- [0072] 图24A和24B分别显示制剂B1和B2在5℃、25℃和40℃储存条件下的通过HP-IEX确定的%碱性与时间数据。
- [0073] 图25A和25B分别显示制剂B1和B2在5℃、25℃和40℃储存条件下的通过HP-IEX确定的%主成分与时间数据。
- [0074] 图26显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂B1和B2的通过HP-IEX确定的%酸性。
- [0075] 图27显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂B1和B2的通过HP-IEX确定的%碱性。
- [0076] 图28显示用于冻融、搅拌和光应力研究的制剂B1和B2的通过HP-IEX确定的%主成分。

- [0077] 图29显示通过制剂B1和B2的肽谱确定的LC-M4(蛋氨酸氧化)的氧化百分比。
- [0078] 图30显示通过制剂B1和B2的肽谱确定的HC-M34(蛋氨酸氧化)的氧化百分比。
- [0079] 图31显示通过制剂B1和B2的肽谱确定的HC-M250(蛋氨酸氧化)的氧化百分比。
- [0080] 图32显示通过制剂B1和B2的肽谱确定的HC-M426(蛋氨酸氧化)的氧化百分比。
- [0081] 图33显示共制剂的KD数据,表明所述制剂在三种不同的pH值(5.0、5.5和6.0)下是稳定的。
- [0082] 图34显示依匹单抗(ipilimumab)的重链和轻链的氨基酸序列(分别为SEQ ID NO: 84和85)。

## 具体实施方式

[0083] 在一个方面,本发明提供了包含抗CTLA4抗体及其抗原结合片段的制剂,其包含蛋氨酸。还提供了抗CTLA4抗体或其抗原结合片段与抗人PD-1抗体或其抗原结合片段的共制剂,其包含蛋氨酸。在每种情况下,所述制剂和共制剂任选地包含螯合剂。

### [0084] I. 定义与缩写

[0085] 如整个说明书和所附权利要求书所使用的,以下缩写适用:

[0086] API 活性药物成分

[0087] CDR 除非另有说明,否则使用Kabat编号系统定义的免疫球蛋白可变区中的互补决定区

[0088] CHO 中国仓鼠卵巢

[0089] CI 置信区间

[0090] CTLA4 细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4

[0091] DTPA 二亚乙基三胺五乙酸

[0092] EC50 导致50%功效或结合的程度

[0093] ELISA 酶联免疫吸附法

[0094] FFPE 福尔马林固定,石蜡包埋

[0095] FR 框架区

[0096] HRP 辣根过氧化物酶

[0097] HNSCC 头颈鳞状细胞癌

[0098] IC50 导致50%抑制的程度

[0099] IgG 免疫球蛋白G

[0100] ICH 国际协调会议

[0101] IHC 免疫组化(immunohistochemistry)或免疫组化的(immunohistochemical)

[0102] mAb 单克隆抗体

[0103] MES 2-(N-吗啉代)乙磺酸

[0104] NCBI 国家生物技术信息中心

[0105] NSCLC 非小细胞肺癌

[0106] PCR 聚合酶链反应

[0107] PD-1 程序性死亡1(又称程序性细胞死亡-1和程序性死亡受体1)

[0108] PD-L1 程序性细胞死亡1配体1



- [0109] PD-L2 程序性细胞死亡1配体2  
[0110] PS80 聚山梨酯80  
[0111] TNBC 三阴性乳腺癌  
[0112]  $V_H$  免疫球蛋白重链可变区  
[0113] VK 免疫球蛋白 $\kappa$ 轻链可变区  
[0114]  $V_L$  免疫球蛋白轻链可变区  
[0115] v/v 体积/体积  
[0116] WFI 注射用水  
[0117] w/v 重量/体积

[0118] 为了可以更容易地理解本发明,下面特别地定义了某些技术和科学术语。除非在本文件别处特别地定义,否则如本文所用的所有其他技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0119] 如在整个说明书中以及在所附权利要求书中所使用的,单数形式“一(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数引用,除非上下文另外清楚地指出。

[0120] 除非上下文清楚地指出了所指示的可能性之一,否则对“或”的提及指示一种或两种可能性。在一些情况下,使用“和/或”来突出一种或两种可能性。

[0121] 如本文所用,“治疗(Treat)”或“治疗(treating)”癌症意指将本发明的制剂施用于患有免疫状况或癌性状况或被诊断出患有癌症或病原性感染(例如病毒,细菌、真菌)的受试者,以达到至少一种积极的治疗效果,例如,减少癌细胞的数量、减少肿瘤的大小、减少癌细胞浸入周围器官的速率或降低肿瘤转移或肿瘤生长的速率。“治疗”可包括以下一项或多项:诱导/增加抗肿瘤免疫反应,刺激对病原体、毒素和/或自身抗原的免疫反应,刺激对病毒感染的免疫反应,减少一种或多种肿瘤标志物的数量,抑制肿瘤细胞的生长或存活,消除或减小一种或多种癌性病变或肿瘤的大小,降低一种或多种肿瘤标志物的水平,改善、降低癌症的严重程度或持续时间,相对于未治疗的类似患者的预期生存期,延长患者的生存期。

[0122] “免疫状况”或“免疫病症”涵盖例如病理性炎症、炎性病症和自身免疫病症或疾病。“免疫状况”还指感染、持续性感染和增生状况,诸如癌症、肿瘤和血管生成,包括抵抗免疫系统根除的感染、肿瘤和癌症。“癌性状况”包括例如癌症、癌细胞、肿瘤、血管生成和癌前性状况诸如发育不良。

[0123] 可以以许多方式测量癌症中的积极治疗效果(参见,W.A.Weber,J.Nucl.Med.50:1S-10S(2009))。例如,关于肿瘤生长抑制,根据NCI标准, $T/C \leq 42\%$ 为最小水平的抗肿瘤活性。 $T/C < 10\%$ 被认为是高抗肿瘤活性水平,其中 $T/C(\%) = \text{所治疗的中位肿瘤体积} / \text{对照的中位肿瘤体积} \times 100$ 。在一些实施方式中,通过施用本发明的制剂实现的治疗为无进展生存期(PFS)、无疾病生存期(DFS)或总生存期(OS)中的任何一种。PFS,也称为“肿瘤进展时间”,是指治疗期间和治疗后癌症不生长的时间长度,并且包括患者经历完全响应或部分响应的的时间量,以及患者经历稳定的疾病的时间量。DFS是指患者在治疗期间和治疗后保持无病的时间长度。OS是指与初始(naive)或未治疗的个体或患者相比预期寿命的延长。尽管本发明的制剂、治疗方法和用途的实施方式可能无法有效地在每位患者中获得积极的治疗效果,但它应在统计学上显著数量的受试者中实现,如通过本领域已知的任何统计检验所确定的

那样,诸如Student's t检验、 $\chi^2$ 检验、根据Mann和Whitney进行的U检验、Kruskal-Wallis检验(H检验)、Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon检验。

[0124] 术语“患者”(在本文中可替代地称为“受试者”或“个体”)是指能够用本发明的制剂治疗的哺乳动物(例如,大鼠、小鼠、狗、猫、兔子),最优选人。在一些实施方式中,患者为成年患者。在其他实施方式中,患者为儿科患者。

[0125] 术语“抗体”是指表现出期望的生物学活性的任何形式的抗体。因此,它以最广泛的意义使用,并且具体地涵盖但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、人源化的、完全人抗体和嵌合抗体。“亲本抗体”是为了预期用途修饰抗体之前将免疫系统暴露于抗原而获得的抗体,所述预期用途例如是用作人治疗性抗体的抗体的人源化。

[0126] 通常,基本抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体包括两个相同的多肽链对,每对具有一个“轻”链(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。每个轻/重链对的可变区形成抗体结合位点。因此,通常,完整的抗体具有两个结合位点。重链的羧基端部分可以限定主要负责效应子功能的恒定区。通常,将人轻链分类为 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链。此外,通常将人重链分类为 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 或 $\epsilon$ ,并且将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区由约12个或更多个氨基酸的“J”区相连,其中重链还包括约10个或更多个氨基酸的“D”区。一般参见,Fundamental Immunology Ch.7 (Paul, W. 编,第2版Raven Press, N.Y. (1989))。

[0127] 通常,重链和轻链的可变域均包含位于相对保守的框架区(FR)内的三个高变区,也称为互补决定区(CDR)。所述CDR通常由框架区对齐,从而能够结合至特定表位。通常,从N-端到C-端,轻链和重链可变域均包含FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。通常,根据Sequences of Proteins of Immunological Interest,Kabat等人;National Institutes of Health, Bethesda, Md.;第5版;NIH公开号91-3242期(1991);Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75;Kabat等人, (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616;Chothia等人, (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917或Chothia等人, (1989) Nature 342:878-883的定义,将氨基酸分配至每个结构域。

[0128] “特异性结合”特定靶蛋白的抗体是这样的抗体:与其他蛋白相比,其表现出优先结合该靶标,但该特异性不需要绝对结合特异性。如果抗体结合会确定靶蛋白在样品中的存在,例如不产生不希望的结果诸如假阳性,则该抗体被认为对其预定靶标是“特异性的”。可用于本发明的抗体或其结合片段将以比与非靶蛋白的亲和力大至少2倍、优选地大至少10倍、更优选地大至少20倍和最优选地大至少100倍的亲和力结合靶蛋白。如本文所用,抗体被说成特异性结合包含给定氨基酸序列(例如成熟的人CTLA4或人PD-1分子的氨基酸序列)的多肽,如果所述抗体结合包含该序列的多肽,但不结合缺乏该序列的蛋白。

[0129] “嵌合抗体”是指这样的抗体:其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种(例如,人)或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,同时所述链的其余部分与源自另一物种(例如,小鼠)或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这样抗体的片段中的对应序列相同或同源,只要它们表现出期望的生物活性即可。

[0130] 如本文所用,“共同配制的(Co-formulated)”或“共制剂(co-formulation)”或“共制剂(coformulation)”或“共同配制的(coformulated)”是指至少两种不同的抗体或其抗

原结合片段,其被配制在一起并作为组合产品存储在单个小瓶或容器(例如注射装置)中,而不是单独配制和储存,然后在施用前混合或分开施用。在一个实施方式中,所述共制剂含有两种不同的抗体或其抗原结合片段。

[0131] 术语“药学上有效的量”或“有效量”意指将足够的治疗组合物或制剂引入患者以治疗疾病或状况的量。本领域技术人员认识到,该水平可以根据患者的特征诸如年龄、体重等而变化。

[0132] 术语“约”,当修饰物质或组合物的量(例如,mM或M)、制剂组分的百分比(v/v或w/v),溶液/制剂的pH或表征方法中的步骤的参数的值等时,是指可能例如通过在物质或组合物的制备、表征和/或使用中涉及的典型测量、处理和取样程序;通过这些程序中的工具错误;通过用于制备或使用组合物或实施程序的成分的制造、来源或纯度中的差异;等等而发生的数值量的变化。在某些实施方式中,“约”可以意指 $\pm 0.1\%$ 、 $0.5\%$ 、 $1\%$ 、 $2\%$ 、 $3\%$ 、 $4\%$ 、 $5\%$ 或 $10\%$ 的变化。

[0133] 如本文所用,“x% (w/v)”等于x g/100ml(例如 $5\% w/v$ 等于50mg/ml)。

[0134] 本发明的制剂包括重构或呈液体形式时具有生物活性的抗体及其片段。

[0135] 术语“癌症”、“癌性(cancerous)”或“恶性”是指或描述哺乳动物中通常以细胞生长不受控制为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于癌(carcinoma)、淋巴瘤、白血病、母细胞瘤和肉瘤。此类癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、胃肠(道)癌(gastrointestinal (tract)cancer)、肾癌(renal cancer)、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、成淋巴细胞性白血病(lymphoblastic leukemia)、淋巴细胞性白血病(lymphocytic leukemia)、结直肠癌(colorectal cancer)、子宫内膜癌、肾癌(kidney cancer)、前列腺癌、甲状腺癌、黑色素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme)、宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞癌(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌和头颈癌。

[0136] “Chothia”意指在Al-Lazikani等人,JMB 273:927-948(1997)中描述的抗体编号系统。

[0137] 如本文所用,“Kabat”意指由Elvin A.Kabat((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.)开创的免疫球蛋白比对和编号系统。

[0138] “生长抑制剂”当在本文中使用时是指在体外或体内抑制细胞,尤其是过表达本文中所鉴定的任何基因的癌细胞的化合物或组合物。因此,生长抑制剂是显著降低在S期过表达此类基因的所述细胞的百分比的抑制剂。生长抑制剂的实例包括阻止细胞周期进程(在S期以外的地方)的药剂,例如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典的M期阻滞剂包括长春胺类(vincas)(长春新碱和长春碱)、紫杉烷类和topo II抑制剂诸如多柔比星、表柔比星、柔红霉素和依托泊苷。阻滞G1的那些试剂也会溢出到S期阻滞中,例如DNA烷化剂诸如达卡巴嗪、氮芥和顺铂。进一步的信息可以在The Molecular Basis of Cancer,Mendelsohn和Israel编,第1章,标题为“Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs”(Murakami等人)(WB Saunders:Philadelphia,1995)中找到。

[0139] 术语“CTLA4结合片段”、“其抗原结合片段”、“其结合片段”或“其片段”包括仍基本上保留其与抗原(人CTLA4)结合并抑制其活性(例如,阻断人CTLA4与其天然配体的结合)的

生物学活性的抗体的片段或衍生物。因此,术语“抗体片段”或CTLA4结合片段是指全长抗体的一部分,通常是其抗原结合区或可变区。CTLA4抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段。通常,结合片段或衍生物保留其CTLA4抑制活性的至少10%。在一些实施方式中,结合片段或衍生物保留其CTLA4抑制活性的至少25%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%(或更多),尽管具有足以发挥期望的生物学效应的亲和力的任何结合片段都将是有益的。在一些实施方式中,抗原结合片段以比与无关抗原的亲和力至少大两倍,优选至少大十倍,更优选至少大20倍,最优选至少大100倍的亲和力与其抗原结合。在一个实施方式中,抗体的亲和力大于约10<sup>9</sup>升/mol,例如通过Scatchard分析确定的。Munsen等人(1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239。还意图CTLA4结合片段可以包括具有基本上不改变其生物学活性的保守氨基酸取代的变体。

[0140] 术语“PD-1结合片段”、“其抗原结合片段”、“其结合片段”或“其片段”包括仍基本上保留其与抗原(人PD-1)结合并抑制其活性(例如,阻断PD-1与PDL1和PDL2的结合)的生物学活性的抗体的片段或衍生物。因此,术语“抗体片段”或PD-1结合片段是指全长抗体的一部分,通常是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段。通常,结合片段或衍生物保留其PD-1抑制活性的至少10%。在一些实施方式中,结合片段或衍生物保留其PD-1抑制活性的至少25%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%(或更多),尽管具有足以发挥期望的生物学效应的亲和力的任何结合片段都将是有益的。在一些实施方式中,抗原结合片段以比与无关抗原的亲和力至少大两倍,优选至少大十倍,更优选至少大20倍,最优选至少大100倍的亲和力与其抗原结合。在一个实施方式中,抗体的亲和力大于约10<sup>9</sup>升/mol,例如通过Scatchard分析确定的。Munsen等人(1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239。还意图PD-1结合片段可以包括具有基本上不改变其生物学活性的保守氨基酸取代的变体。

[0141] “人抗体”是指仅包含人免疫球蛋白蛋白序列的抗体。如果在小鼠中、在小鼠细胞中或在源自小鼠细胞的杂交瘤中产生的话,人抗体可能含有鼠碳水化合物链。类似地,“小鼠抗体”或“大鼠抗体”是指分别仅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白序列的抗体。

[0142] “人源化抗体”是指含有来自非人(例如,鼠)抗体以及人抗体的序列的抗体形式。此类抗体含有源自非人免疫球蛋白的最少序列。通常,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、并且通常两个可变结构域,其中所有的或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,并且所有的或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体还任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常为人免疫球蛋白的恒定区)的至少一部分。啮齿动物抗体的人源化形式通常包含亲本啮齿动物抗体的相同CDR序列,尽管为了增加亲和力、增加人源化抗体的稳定性或为了其他原因可以包括某些氨基酸取代。

[0143] 本发明的抗体还包括具有修饰的(或封闭的)Fc区以提供改变的效应子功能的抗体。参见,例如,美国专利号5,624,821;W02003/086310;W02005/120571;W02006/0057702;Presta(2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:640-656。这种修饰可用于增强或抑制免疫系统的各种反应,在诊断和治疗中可能具有有益作用。Fc区的改变包括氨基酸变化(取代、缺失和插入)、糖基化或去糖基化以及添加多个Fc。Fc的变化也可以改变治疗性抗体中抗体的半衰期,并且更长的半衰期将导致给药频率降低,同时增加了便利性并减少了材料的使用。参见Presta(2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731(734-35)。

[0144] “完全人抗体”是指仅包含人免疫球蛋白蛋白序列的抗体。如果在小鼠中、在小鼠细胞中或在衍生自小鼠细胞的杂交瘤中产生,则完全人抗体可能含有鼠类碳水化合物链。类似地,“小鼠抗体”是指仅包含小鼠免疫球蛋白蛋白序列的抗体。可以通过噬菌体展示或其他分子生物学方法,在人类中、在具有人免疫球蛋白种系序列的转基因动物中产生完全人抗体。

[0145] “高变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如通过Kabat编号系统(Kabat等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.)测定的轻链可变域中的残基24-34(CDRL1)、50-56(CDRL2)和89-97(CDRL3)和重链可变域中的残基31-35(CDRH1)、50-65(CDRH2)和95-102(CDRH3),和/或来自“高变环”的那些残基(即轻链可变域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3))和重链可变域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)) (Chothia和Lesk(1987) *J.Mol.Biol.*196:901-917)。如本文所用,术语“框架”或“FR”残基是指除本文中定义为CDR残基的高变区残基以外的那些可变域残基。CDR和FR残基根据Kabat的标准序列定义确定。Kabat等人(1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,National Institutes of Health,Bethesda Md。

[0146] “保守修饰的变体”或“保守取代”是指氨基酸的取代是本领域技术人员已知的,并且可以在通常不改变所得分子的生物学活性的情况下,甚至在多肽的必需区域中进行。这样的示例性取代优选根据表1所示的那些进行,如下所示:

[0147] 表1. 示例性的保守氨基酸取代

[0148]

原始残基	保守取代
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys、 His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala

[0149]

原始残基	保守取代
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

[0150] 另外,本领域技术人员认识到,通常,多肽的非必需区域中的单个氨基酸取代不会实质上改变生物活性。参见,例如,Watson等人(1987)Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224页(第4版)。

[0151] 如整个说明书和权利要求书所用,短语“基本上由……组成(consists essentially of)”或变体诸如“基本上由……组成(consist essentially of)”或“基本上由……组成(consisting essentially of)”指示包括任何列举的要素或要素集合,并任性地包括具有与列举的要素类似或不同的性质的其他要素,所述其他要素不会实质上改变指

定的剂量方案、方法或组合物的基本或新的特性。作为非限制性实例,基本上由列举的氨基酸序列组成的结合化合物还可以包括不会实质上影响结合化合物的特性的一个或多个氨基酸,包括一个或多个氨基酸残基的取代。

[0152] “包含(comprising)”或变体诸如“包含(comprise)”、“包含(comprises)”或包含(comprised of)在整个说明书和权利要求书中以包括性含义使用,即,指定所述特征的存在,但不排除可能实质上增强本发明的任何实施方式的操作或实用性的其他特征的存在或添加,除非由于表达语言或必要的暗示上下文另外要求。

[0153] “分离的抗体”和“分离的抗体片段”是指纯化状态,并且在这样的上下文中意指命名的分子基本上不含有其他生物学分子诸如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物,或其他物质诸如细胞碎片和生长培养基。通常,术语“分离的”无意是指完全不存在这种物质或不存在水、缓冲液或盐,除非它们以实质上干扰如本文中所述的结合化合物的实验或治疗用途的量存在。

[0154] 如本文所用,“单克隆抗体”或“mAb”或“Mab”是指基本上均一的抗体的群体,即,除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变外,包含所述群体的抗体分子在氨基酸序列上是相同的。相反,常规(多克隆)抗体制剂通常包括许多在它们的可变域(特别是它们的CDR)中具有不同氨基酸序列的不同抗体,它们经常对不同表位是特异性的。修饰词“单克隆的”指示获自基本上同源的抗体群体的抗体的特征,并且不应解释为需要通过任何特定方法生产所述抗体。例如,要根据本发明使用的单克隆抗体可以通过Kohler等人(1975)Nature 256:495首次描述的杂交瘤方法制备,或可以通过重组DNA方法(参见,例如,美国专利号4,816,567)制备。也可以使用在例如Clackson等人(1991)Nature 352:624-628和Marks等人(1991)J.Mol.Biol.222:581-597中描述的技术从噬菌体抗体文库分离“单克隆抗体”。也参见Presta(2005)J.Allergy Clin.Immunol.116:731。

[0155] “肿瘤”当它应用于诊断出癌症或疑似具有癌症的受试者时,是指恶性的或潜在恶性的任何大小的肿瘤或组织团块,并包括原发性肿瘤和继发性肿瘤。实体瘤是组织的异常生长或团块,通常不含有囊肿或液体区域。不同类型的实体瘤用形成它们的细胞的类型来命名。实体瘤的实例是肉瘤、癌和淋巴瘤。白血病(血液的癌症)通常不形成实体瘤(美国国立癌症研究所(National Cancer Institute),癌症术语词典(Dictionary of Cancer Terms))。

[0156] 术语“肿瘤大小”是指可以测量为肿瘤的长度和宽度的肿瘤的总大小。肿瘤大小可通过本领域已知的多种方法来确定,例如,通过在从受试者取出后测量肿瘤的尺寸(例如,使用测径器),或当在体内时使用成像技术,例如,骨扫描、超声、CT或MRI扫描。

[0157] 如本文所用,“可变区”或“V区”意指IgG链的片段,其不同抗体之间的序列是可变的。它延伸至轻链中的Kabat残基109和重链中的113。

[0158] 术语“缓冲液”涵盖那些将本发明制剂的溶液pH保持在可接受范围内的试剂,或者对于本发明的冻干制剂,在冻干之前提供可接受的溶液pH的试剂。

[0159] 术语“冻干(lyophilization)”、“冻干的(lyophilized)”和“冷冻干燥(freeze-dried)”是指如下方法,通过该方法首先将待干燥的材料冷冻,然后通过真空环境中通过升华来除去冰或冷冻的溶剂。冻干前的制剂中可包括赋形剂,以增强冻干产品在储存时的稳定性。

[0160] 术语“药物制剂”是指如下制剂,所述制剂为允许活性成分有效的形式,并且其不含有对要施用所述制剂的受试者有毒的其他组分。术语“制剂”和“药物制剂”在全文中可互换使用。

[0161] “药学上可接受的”是指可以合理地施用于受试者以提供有效剂量的所用活性成分的赋形剂(媒介物(vehicle)、添加剂)和组合物,并且其“通常被认为是安全的”,例如,其是生理学上可耐受的并且当施用于人时,通常不产生变态反应或类似的不适反应,诸如胃部不适等。在另一实施方式中,该术语是指由联邦或州政府的监管机构批准的或列在美国药典或另一种普遍认可的药典中的分子实体和组合物,其可用于动物,尤其是人类。

[0162] “重构”制剂为通过将冻干的蛋白质制剂溶解在稀释剂中以使蛋白质分散在重构制剂中而制备的制剂。所述重构制剂适于施用,例如肠胃外施用,并且可以任选地适于皮下施用。

[0163] “重构时间”为用溶液将冻干的制剂再水合为不含颗粒的澄清溶液所需的时间。

[0164] “稳定的”制剂是其中的蛋白质在储存时基本上保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的制剂。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本领域中是可用的,并且在Peptide and Protein Drug Delivery,247-301,Vincent Lee编,Marcel Dekker, Inc.,New York,N.Y.,Pubs.(1991)和Jones,A.Adv.Drug Delivery Rev.10:29-90(1993)中进行了综述。可以在选定的温度下选定的时间段内测量稳定性。例如,在一个实施方式中,稳定的制剂是在冷藏温度(2-8℃)下观察至少12个月没有显著变化的制剂。在另一实施方式中,稳定的制剂是在冷藏温度(2-8℃)下观察至少18个月没有显著变化的制剂。在另一实施方式中,稳定的制剂是在室温(23-27℃)下观察至少3个月没有显著变化的制剂。在另一实施方式中,稳定的制剂是在室温(23-27℃)下观察至少6个月没有显著变化的制剂。在另一实施方式中,稳定的制剂是在室温(23-27℃)下观察至少12个月没有显著变化的制剂。在另一实施方式中,稳定的制剂是在室温(23-27℃)下观察至少18个月没有显著变化的制剂。抗体制剂的稳定性标准如下。通常,如通过SEC-HPLC测量的,不超过10%,优选不超过5%的抗体单体发生降解。通常,所述制剂是无色的,或者通过目测分析是澄清至微乳白色的。通常,所述制剂的浓度、pH和重量摩尔渗透压浓度变化不超过 $\pm 10\%$ 。效力通常在对照或参考的60-140%以内,优选80-120%以内。通常,观察到不超过10%,优选不超过5%的抗体截短,即,例如通过HP-SEC确定的%低分子量种类。通常,观察到不超过10%,优选不超过5%的抗体聚集,即例如通过HP-SEC确定的%高分子量种类。

[0165] 如果在目检颜色和/或澄清度后,或者通过UV光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)和动态光散射测量,抗体没有显示出显著的聚集、沉淀和/或变性增加,则所述抗体在药物制剂中“保持其物理稳定性”。蛋白质构象的变化可以通过确定蛋白质三级结构的荧光光谱法和确定蛋白质二级结构的FTIR光谱法进行评估。

[0166] 如果抗体没有显示出显著的化学变化,则所述抗体在药物制剂中“保持其化学稳定性”。化学稳定性可以通过检测和定量蛋白质的化学变化形式来评估。经常改变蛋白质化学结构的降解过程包括水解或截短(通过诸如尺寸排阻色谱法和SDS-PAGE等方法进行评估)、氧化(通过诸如与质谱法或MALDI/TOF/MS结合的肽谱法等方法进行评估)、脱酰胺作用(通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法进行评估)和异构化(通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等进行评估)。



[0167] 如果抗体的生物活性在给定时间在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内,则所述抗体在药物制剂中“保留其生物活性”。抗体的生物活性可以例如通过抗原结合测定来确定。

[0168] 术语“等渗”意指目标制剂具有与人血液基本相同的渗透压。等渗制剂通常具有约270-328mOsm的渗透压。稍微低渗的压力为250-269mOsm,且稍微高渗的压力为328-350mOsm。渗透压可以例如使用蒸汽压或冰冻型渗透压计来测量。

[0169] II. 本发明的制剂和共制剂。

[0170] 在一个方面,本发明提供了稳定的生物制剂,其包含与人CTLA4特异性结合的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段作为活性药物成分。在这样的制剂中包括蛋氨酸减少抗CTLA4抗体的Fc区域中存在的蛋氨酸残基的氧化。

[0171] 在一个方面,本发明还提供了抗CTLA4抗体与抗PD-1抗体的共制剂。派姆单抗的主要降解途径包括在过氧化物应力下重链CDR3中蛋氨酸105 (Met105) (例如,SEQ ID NO:10的M105)的氧化以及当暴露于光时Met105和Fc蛋氨酸残基的氧化。对于测试的降解水平,派姆单抗在大多数应力条件下均保持其生物活性。然而,通过表面等离子共振 (SPR) 观察到过氧化物应力样品对PD-1的亲和力降低。暴露的蛋氨酸残基或抗体的CDR中的蛋氨酸残基可能会通过氧化影响抗体的生物学活性。蛋氨酸的添加能够减少派姆单抗重链CDR内的Met105的氧化。

[0172] 抗PD-1抗体及其抗原结合片段

[0173] 在一个方面,本发明提供了稳定的生物制剂,其包含与特异性结合人PD-1结合的作为活性药物成分 (PD-1API) 的抗人PD-1抗体或其抗原结合片段 (例如人或人源化抗PD-1抗体) 共同配制的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,以及使用本发明制剂的方法。任何抗PD-1抗体或其抗原结合片段可用于本发明的共制剂和方法中。在特定实施方式中,所述PD-1API为抗PD-1抗体,其选自派姆单抗和纳武单抗。在特定实施方式中,所述抗PD-1抗体为派姆单抗。在替代实施方式中,所述抗PD-1抗体为纳武单抗。表2提供了示例性抗人PD-1抗体派姆单抗和纳武单抗的氨基酸序列。表3显示了可用于本发明的共制剂和方法中的替代PD-1抗体和抗原结合片段。

[0174] 如本文所用,“派姆单抗” (以前称为MK-3475、SCH 900475和lambrolizumab) 或在本文中称为“pembro”,是一种人源化IgG4 mAb,其结构在WHO Drug Information,第27卷,第2期,第161-162页 (2013) 中描述,并且其包含表2中所述的重链和轻链氨基酸序列和CDR。派姆单抗已获美国FDA批准用于治疗不可切除或转移性黑素瘤的患者和用于治疗某些复发性或转移性头颈鳞状细胞癌 (HNSCC)、经典霍奇金淋巴瘤 (cHL)、尿路上皮癌、胃癌、高微卫星不稳定性 (MSI-H) 癌症和非小细胞肺癌的患者,如KEYTRUDA™ (Merck&Co., Inc., Whitehouse Station, NJ USA; 2014年美国初次批准,2017年9月更新) 的处方信息中所述。

[0175] 在一些实施方式中,用于本发明的共制剂的抗人PD-1抗体或其抗原结合片段包含CDRL1、CDRL2和CDRL3的三个轻链CDR和/或CDRH1、CDRH2和CDRH3的三个重链CDR。

[0176] 在本发明的一个实施方式中,CDRL1为SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:1的变体,CDRL2为SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:2的变体,并且CDRL3为SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:3的变体。

[0177] 在一个实施方式中,CDRH1为SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:6的变体,CDRH2为SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:7的变体,并且CDRH3为SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:8的变体。

[0178] 在一个实施方式中,三个轻链CDR为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3,并且三个重链CDR为SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8。

[0179] 在本发明的一个替代实施方式中,CDRL1为SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:11的变体,CDRL2为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:12的变体,并且CDRL3为SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:13的变体。

[0180] 在一个实施方式中,CDRH1为SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:16的变体,CDRH2为SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:17的变体,并且CDRH3为SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:18的变体。

[0181] 在一个实施方式中,三个轻链CDR为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3,并且三个重链CDR为SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8。

[0182] 在一个替代实施方式中,三个轻链CDR为SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,并且三个重链CDR为SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18。

[0183] 在本发明的另一实施方式中,CDRL1为SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:21的变体,CDRL2为SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:22的变体,并且CDRL3为SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:23的变体。

[0184] 在又一实施方式中,CDRH1为SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:24的变体,CDRH2为SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:25的变体,并且CDRH3为SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:26的变体。

[0185] 在另一实施方式中,三个轻链CDR为SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23,并且三个重链CDR为SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26。

[0186] 本发明的一些抗人PD-1抗体和抗原结合片段包含轻链可变区和重链可变区。在一些实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:4的变体,并且所述重链可变区包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:9的变体。在进一步的实施方式中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:14的变体,并且所述重链可变区包含SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:19的变体。在进一步的实施方式中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:27的变体,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:28的变体、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:29的变体、或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:30的变体。在这样的实施方式中,变体轻链或重链可变区序列与参考序列相同,除了具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代。在一些实施方式中,所述取代在构架区中(即,在CDR以外)。在一些实施方式中,一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代是保守取代。

[0187] 在本发明的共制剂的一个实施方式中,所述抗人PD-1抗体或抗原结合片段包含包含或由SEQ ID NO:4组成的轻链可变区和包含或由SEQ ID NO:9组成的重链可变区。在另一实施方式中,所述抗人PD-1抗体或抗原结合片段包含包含或由SEQ ID NO:14组成的轻链可变区和包含或由SEQ ID NO:19组成的重链可变区。在本发明制剂的一个实施方式中,所述抗人PD-1抗体或抗原结合片段包含包含或由SEQ ID NO:28组成的轻链可变区和包含或由SEQ ID NO:27组成的重链可变区。在另一实施方式中,所述抗人PD-1抗体或抗原结合片段包含包含或由SEQ ID NO:29组成的轻链可变区和包含或由SEQ ID NO:27组成的重链可变区。在另一实施方式中,所述抗体或抗原结合片段包含包含或由SEQ ID NO:30组成的轻链可变区和包含或由SEQ ID NO:27组成的重链可变区。

[0188] 在另一实施方式中,本发明的共制剂包含抗人PD-1抗体或抗原结合蛋白,其具有与上述V<sub>L</sub>结构域或V<sub>H</sub>结构域之一至少95%、90%、85%、80%、75%或50%的序列同源性的V<sub>L</sub>

结构域和/或V<sub>H</sub>结构域,并表现出与PD-1的特异性结合。在另一实施方式中,本发明的共制剂的抗人PD-1抗体或抗原结合蛋白包含具有至多1、2、3、4或5个或更多个氨基酸取代的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域,并表现出与PD-1的特异性结合。

[0189] 在以上任何实施方式中,所述PD-1API可以是特异性结合人PD-1的全长抗PD-1抗体或其抗原结合片段。在某些实施方式中,所述PD-1API为选自任何类别的免疫球蛋白(包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)的全长抗PD-1抗体。优选地,所述抗体为IgG抗体。可以使用任何同种型(isotype)的IgG,包括IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>和IgG<sub>4</sub>。可以将不同的恒定域附加至本文提供的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>区。例如,如果本发明的抗体(或片段)的特定预期用途是要求改变效应子(effector)功能,则可以使用除IgG1以外的重链恒定域。尽管IgG1抗体提供较长的半衰期和效应子功能,例如补体激活和抗体依赖性细胞的细胞毒性,但对于抗体的所有用途而言,此类活性可能并不是理想的。在这种情况下,例如可以使用IgG4恒定域。

[0190] 在本发明的实施方式中,所述PD-1API为抗PD-1抗体,其包含轻链和重链,所述轻链包含或由SEQ ID NO:5所示的氨基酸残基序列组成,所述重链包含或由SEQ ID NO:10所示的氨基酸残基序列组成。在替代实施方式中,所述PD-1API为抗PD-1抗体,其包含轻链和重链,所述轻链包含或由SEQ ID NO:15所示的氨基酸残基序列组成,所述重链包含或由SEQ ID NO:20所示的氨基酸残基序列组成。在进一步的实施方式中,所述PD-1API为抗PD-1抗体,其包含轻链和重链,所述轻链包含或由SEQ ID NO:32所示的氨基酸残基序列组成,所述重链包含或由SEQ ID NO:31所示的氨基酸残基序列组成。在另外的实施方式中,所述PD-1API为抗PD-1抗体,其包含轻链和重链,所述轻链包含或由SEQ ID NO:33所示的氨基酸残基序列组成,所述重链包含或由SEQ ID NO:31所示的氨基酸残基序列组成。在另外的实施方式中,所述PD-1API为抗PD-1抗体,其包含轻链和重链,所述轻链包含或由SEQ ID NO:34所示的氨基酸残基序列组成,所述重链包含或由SEQ ID NO:31所示的氨基酸残基序列组成。在本发明的一些共制剂中,所述PD-1API为派姆单抗或派姆单抗生物类似药。在本发明的一些共制剂中,PD-1API为纳武单抗或纳武单抗生物类似药。

[0191] 通常,本发明的抗PD-1抗体和抗原结合片段或本发明的抗CTLA4抗体和抗原结合片段的氨基酸序列变体将具有与参考抗体或抗原结合片段(例如重链、轻链、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>或人源化序列)的氨基酸序列至少75%的氨基酸序列同一性,更优选至少80%,更优选至少85%,更优选至少90%,最优选至少95%、98%或99%的氨基酸序列。相对于某一序列的同一性或同源性在本文中被定义为在序列对齐并如果必要的话引入空位以达到最大百分比的序列同一性之后,候选序列中与抗PD-1残基相同的氨基酸残基的百分比,不将任何保守取代作为序列同一性的一部分考虑。N端、C端或内部延伸、缺失或插入抗体序列均不得解释为影响序列同一性或同源性。

[0192] 序列同一性是指当两个序列最佳比对时,两个多肽的氨基酸在等效位置相同的程度。可以使用BLAST算法确定序列同一性,其中选择算法的参数以在各个参考序列的整个长度上给出各个序列之间的最大匹配。以下参考文献涉及经常用于序列分析的BLAST算法:BLAST ALGORITHMS:Altschul,S.F.等人,(1990)J.Mol.Biol.215:403-410;Gish,W.等人,(1993)Nature Genet.3:266-272;Madden,T.L.等人,(1996)Meth.Enzymol.266:131-141;Altschul,S.F.等人,(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-3402;Zhang,J.等人,(1997)Genome Res.7:649-656;Wootton,J.C.等人,(1993)Comput.Chem.17:149-163;Hancock,

J.M.等人,(1994)Comput.Appl.Biosci.10:67-70;ALIGNMENT SCORING SYSTEMS:Dayhoff, M.O.等人,"A model of evolutionary change in proteins."Atlas of Protein Sequence and Structure,(1978)第卷5,增刊3.M.O.Dayhoff(编),第345-352页,Natl.Biomed.Res.Found.,Washington,DC;Schwartz,R.M.等人,"Matrices for detecting distant relationships."Atlas of Protein Sequence and Structure,(1978)第卷5,增刊3."M.O.Dayhoff(编),第353-358页,Natl.Biomed.Res.Found., Washington,DC;Altschul,S.F.,(1991)J.Mol.Biol.219:555-565;States,D.J.等人,(1991)Methods3:66-70;Henikoff,S.等人,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10915-10919;Altschul,S.F.等人,(1993)J.Mol.Evol.36:290-300;ALIGNMENT STATISTICS: Karlin,S.等人,(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268;Karlin,S.等人,(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:5873-5877;Dembo,A.等人,(1994)Ann.Prob.22:2022-2039; 和Altschul,S.F."Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments."Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S.Suhai编),(1997)第1-14页,Plenum,New York。

[0193] 同样,任何类别的轻链都可以用于本文的组合物和方法中。具体地, $\kappa$ 、 $\lambda$ 或其变体可用于本发明的组合物和方法中。

[0194] 表2.示例性的PD-1抗体序列

[0195]

抗体特征	氨基酸序列	SEQ ID NO.
派姆单抗轻链		
CDR1	RASKGVSTSGYSYLH	1
CDR2	LASYLES	2
CDR3	QHSRDLPLT	3
可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSG YSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRD LPLTFGGGTKVEIK	4
轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSG YSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRD LPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	5
派姆单抗重链		
CDR1	NYYMY	6
CDR2	GINPSNGGTNFNEKFKN	7
CDR3	RDYRFDMGFDY	8
可变区	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTN FNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDT AVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS	9
重链	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTN FNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDT	10

[0196]

抗体特征	氨基酸序列	SEQ ID NO.
	AVYYCARRDYRFDMGFDYWQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	
纳武单抗轻链		
CDR1	RASQSVSSYLA	11
CDR2	DASNRAT	12
CDR3	QQSSNWPRT	13
可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFG QGTKVEIK	14
轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQSSNWPR TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	15

抗体特征	氨基酸序列	SEQ ID NO.
纳武单抗重链		
CDR1	NSGMH	16
CDR2	VIWYDGSKRYYADSVKG	17
CDR3	NDDY	18
可变区	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTA VYYCATNDDYWGQGTLVTVSS	19
重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK	20

[0197]

[0198] 表3. 在本发明的共制剂、方法和用途中有用的另外的PD-1抗体和抗原结合片段。

[0199]

A. 包含 WO2008/156712 中的 hPD-1.08A 的轻链和重链 CDR 的抗体和抗原结合片段	
CDRL1	SEQ ID NO:21
CDRL2	SEQ ID NO:22
CDRL3	SEQ ID NO:23
CDRH1	SEQ ID NO:24
CDRH2	SEQ ID NO:25
CDRH3	SEQ ID NO:26
C. 包含 WO 2008/156712 中的成熟 h109A 重链可变区和成熟 K09A 轻链可变区之一的抗体和抗原结合片段	
重链 VR	SEQ ID NO:27
轻链 VR	SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:30
D. 包含 WO 2008/156712 中的成熟 409 重链和成熟 K09A 轻链之一的抗体和抗原结合片段	
重链	SEQ ID NO:31
轻链	SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 或 SEQ ID NO:34

[0200] 在本发明的共制剂的一些实施方式中,PD-1API (即抗PD-1抗体或其抗原结合片段)以约25mg/mL至约100mg/mL的浓度存在。在替代实施方式中,API以约10mg/mL、约25mg/mL、约50mg/mL、约75mg/mL或约100mg/mL的浓度存在。

[0201] 抗CTLA4抗体及其抗原结合片段

[0202] 本发明提供了包含抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的稳定的生物制剂,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段特异性结合人CTLA4 (例如人或人源化的抗CTLA4抗体)作为活性药物成分 (CTLA4 API),以及使用本发明的制剂的方法。

[0203] 本发明还提供了稳定的生物共制剂,其包含 (i) 与人CTLA4特异性结合的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段 (例如人或人源化的抗CTLA4抗体) 和 (ii) 与人PD-1特异性结合的抗人PD-1抗体或其抗原结合片段。任何抗CTLA4抗体或其抗原结合片段可用于本发明的包括所述共制剂的制剂和方法中。表4-8和图34提供了可用于本发明的包括共制剂的制剂和方法中的示例性抗CTLA4抗体和抗原结合片段的氨基酸序列。



[0204] 在包括所述共制剂的制剂的一个实施方式中,所述抗CTLA-4抗体为人单克隆抗体10D1,现称为依匹单抗,并以Yervoy<sup>TM</sup>销售,其公开于美国专利号6,984,720和WHO Drug Information 19(4):61(2005)中。在另一实施方式中,所述抗CTLA-4抗体为曲美木单抗,也称为CP-675,206,其为IgG2单克隆抗体,其描述于美国专利申请公开号2012/263677或PCT国际申请公开号W0 2012/122444或2007/113648A2中。

[0205] 在一种包括所述共制剂的制剂中,抗CTLA-4抗体为单克隆抗体,其包含具有SEQ ID NO:84所示氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:85所示氨基酸序列的轻链。在一些实施方式中,所述CTLA4抗体为SEQ ID NO:84和/或SEQ ID NO:85的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段与CTLA4特异性结合。

[0206] 在本发明的包括所述共制剂的制剂的一个实施方式中,所述抗CTLA-4抗体为国际申请公开号W0 2016/015675A1中公开的任何抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,所述抗CTLA4抗体为单克隆抗体,其包含以下CDR:

[0207] 包含氨基酸序列GFTFSDNW (SEQ ID NO:35)的HCDR1

[0208] 包含氨基酸序列IRNKPYNYET (SEQ ID NO:36)的HCDR2

[0209] 包含氨基酸序列TAQFAY (SEQ ID NO:37)的HCDR3

[0210] 和/或

[0211] 包含氨基酸序列ENIYGG (SEQ ID NO:38)的LCDR1

[0212] 包含氨基酸序列GAT (SEQ ID NO:39)的LCDR2

[0213] 包含选自以下的氨基酸序列的LCDR3:QNVLRSPFT (SEQ ID NO:40);QNVLSRHPG (SEQ ID NO:41);或QNVLSSRPG (SEQ ID NO:42)

[0214] 在本发明的包括所述共制剂的制剂的一个实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段包含可变重链和可变轻链。在一个实施方式中,可变重链和可变轻链包含8D2/8D2 (RE) 或其变体的VH和VL序列。在另一实施方式中,可变重链和可变轻链包含8D2H1L1或其变体的VH和VL序列。在另一实施方式中,可变重链和可变轻链包含8D2H2L2或其变体的VH和VL序列。在另一实施方式中,可变重链和可变轻链包含8D2H2L15或其变体的VH和VL序列。在另一实施方式中,可变重链和可变轻链包含8D2H2L17或其变体的VH和VL序列。在一个实施方式中,在8D2/8D2 (RE)、8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H2L15或8D2H2L17中任一个的变体的第18位的蛋氨酸独立地被选自以下的氨基酸取代:亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和丙氨酸。在变体的另一实施方式中,将8D2/8D2 (RE)、8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H2L15或8D2H2L17中任一个的变体的第18位的蛋氨酸被亮氨酸取代。

[0215] 在包括所述共制剂的制剂的一个实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段为8D2H2L2或其变体,其中所述8D2H2L2变体的可变重 (VH) 链氨基酸序列中第18位的蛋氨酸独立地被选自以下的氨基酸取代:亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和丙氨酸。

[0216] 表4:抗CTLA4抗体的示例性序列

[0217]

抗体	V <sub>H</sub>	V <sub>L</sub>
8D2/8 D2 (RE)	EVKLDETGGGLVQPGRPMKL SCVASGFTFSDNWMNWVRQ SPEKGLEWLAQIRNKPYNYE TYYSDSVKGRFTISRDDSKSS VYLQMNNLRGEDMGIYYCT AQFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:43)	DIQMTQSPASLSASVGETV TITCGTSENIYGGLNWFYQR KQGKSPQLLIFGATNLADG MSSRFSGSGSGRQYSLKISS LHPDDVATYYCQNVLRSPF TFGSGTKLEI (SEQ ID NO:44)

[0218]

8D2/8 D2 RE  变体 1	EVKLDETGGGLVQPGRPIKLS CVASGFTFSDNWMNWVRQS PEKGLEWLAQIRNKPYN YET YYSDSVKGRFTISRDDSKSSV YLQMNNLRGEDMGIYYCTA QFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:86)	DIQMTQSPASLSASVGETV TITCGTSENIYGGLN WYQR KQ GKSPQLLIFGATNLADG MSSRFSGSGSGRQYSLKISS LHPDDVATYYCQNVLRSPF TFGSGTKLEI (SEQ ID NO:44)
8D2H1 L1	EVQLVESGGGLVQPGGSMRL SCAASGFTFSDNWMNWVRQ APGKGLEWLAQIRNKPYN YE TYSDSVKGRFTISRDDSKNS VYLQMNSLKTEDTGVYYCT AQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45)	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRTSENIYGGLN WYQR KQ GKSPKLLIYGATNLASG MSSRFSGSGSGTDYTLKISS LHPDDVATYYCQNVLRSPF TFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:46)
8D2H1 L1  变体 1	EVQLVESGGGLVQPGGSIRLS CAASGFTFSDNWMNWVRQA PGKGLEWLAQIRNKPYN YET YYSDSVKGRFTISRDDSKNSV YLQMNSLKTEDTGVYYCTA QFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 87)	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRTSENIYGGLN WYQR KQ GKSPKLLIYGATNLASG MSSRFSGSGSGTDYTLKISS LHPDDVATYYCQNVLRSPF TFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:46)
8D2H2 L2	EVQLVESGGGLVQPGGSMRL SCAASGFTFSDNWMNWVRQ APGKGLEWLAQIRNKPYN YE TYYSASVKGRFTISRDDSKNS VYLQMNSLKTEDTGVYYCT	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRTSENIYGGLN WYQR KPGKSPKLLIYGATNLASG VSSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDVATYYCQNVLRSPF

[0219]

	AQFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:47)	TFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:48)
8D2H2 L2  变体 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSDNWMNWVRQ APGKGLEWLAQIRNKPYNYE TYYSASVKGRFTISRDDSKNS VYLQMNSLKTEDTGVYYCT AQFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 88)	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRTSENIYGGLNWFYQR KPGKSPKLLIYGATNLASG VSSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDVATYYCQNVLRSPF TFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:48)
8D3H3 L3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSDNWMNWVRQ APGKGLEWVAQIRNKPYNYE TEYAASVKGRFTISRDDSKNS AYLQMNSLKTEDTAVYYCT AQFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:49)	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASENIYGGLNWFYQQ KPGKAPKLLIYGATSLASG VPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYCQNVLRSPF TFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:50)
8D2H2 L15	EVQLVESGGGLVQPGGSMRL SCAASGFTFSDNWMNWVRQ APGKGLEWLAQIRNKPYNYE TYYSASVKGRFTISRDDSKNS VYLQMNSLKTEDTGVYYCT AQFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:51)	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRTSENIYGGLNWFYQR KPGKSPKLLIYGATNLASG VSSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDVATYYCQNVLSRHP GFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:52)
8D2H2	EVQLVESGGGLVQPGGSIRLS	DIQMTQSPSSLSASVGDRV

[0220]

L15 变体 1	CAASGFTFSDNWMNWVRQA PGKGLEWLAQIRNKPYN YET YYASVKGRFTISRDDSKNSV YLQMNSLKTEDTGVYYCTA QFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 89)	TITCRTSENIYGGLN WYQR KPGKSPKLLIYGATNLASG VSSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDVATYYCQNVLSRHP GFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:52)
8D2H2 L17	EVQLVESGGGLVQPGGSMRL SCAASGFTFSDNWMNWVRQ APGKGLEWLAQIRNKPYN YE TYYSASVKGRFTISRDDSKNS VYLQMNSLKTEDTGVYYCT AQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:53)	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRTSENIYGGLN WYQR KPGKSPKLLIYGATNLASG VSSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDVATYYCQNVLSSRP GFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:54)
8D2H2 L17 变体 1	EVQLVESGGGLVQPGGSIRLS CAASGFTFSDNWMNWVRQA PGKGLEWLAQIRNKPYN YET YYASVKGRFTISRDDSKNSV YLQMNSLKTEDTGVYYCTA QFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 90)	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRTSENIYGGLN WYQR KPGKSPKLLIYGATNLASG VSSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDVATYYCQNVLSSRP GFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:54)
抗体	全重链	全轻链
8D2H2 L2 变体 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSDNWMNWVRQ APGKGLEWLAQIRNKPYN YE TYYSASVKGRFTISRDDSKNS VYLQMNSLKTEDTGVYYCT	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRTSENIYGGLN WYQR KPGKSPKLLIYGATNLASG VSSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDVATYYCQNVLRSPF

[0221]

AQFAYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:99)	TFGSGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 100)
---	--

[0222] 在本发明的包括所述共制剂的制剂的另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段包含8D2/8D2(RE)变体1的VH和VL链序列。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段包含8D2H1L1变体1的VH和VL链序列。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段包含8D2H2L2变体1的VH和VL链序列。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段包含8D2H2L15变体的VH和VL链序列。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体或其抗原结合片段包含8D2H2117变体的VH和VL链序列。

[0223] 在本发明的包括所述共制剂的制剂的一个实施方式中,所述抗CTLA4抗体为在2016年8月23日提交的PCT国际申请号PCT/CN2016/096357中描述的任何抗CTLA4抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,所述抗CTLA4抗体为小鼠抗体4G10,其包含以下VH链和VL链氨基酸序列以及该抗体的人源化形式。

[0224] 表5:鼠抗CTLA4抗体

抗体	V <sub>H</sub>	V <sub>L</sub>
[0225] 4G10 鼠	QVKLQESGPELVKPGASMKI SCKASGYSFTGYTMNWVKQ SHGKNLEWIGLINPYNNITNY NQKFMGKATFTVDKSSSTAY MELLRLTSEDSGVYFCARLD YRSYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 55)	QAVVTQESALTTSPGETVT LTCRSSTGAVTTSNFANWV QEKPDHLFTSLIGGTNNRA PGVPARFSGLIGDKAALTI TGAQTEDEAIYFCALWYSN HWVFGGGTKLTVLGQPKS SPSVTLFQGGQFC (SEQ ID NO:56)

[0226] 在本发明的包括所述共制剂的制剂的一个实施方式中,所述抗CTLA4抗体是包含以下CDR的单克隆抗体:

[0227] HCDR1,其包含选自GYSFTGYT (SEQ ID NO:57) 或GYTX<sub>1</sub>N (SEQ ID NO:58) 的氨基酸序列,其中X<sub>1</sub>为M、V、L、I、G、A、S、T。

[0228] HCDR2,其包含选自INPYNX<sub>1</sub>IX<sub>2</sub> (SEQ ID NO:59) 的氨基酸序列,其中X<sub>1</sub>为N、D或E,并且X<sub>2</sub>为T、D、E、G或A;或LINPYNX<sub>1</sub>IX<sub>2</sub>NYX<sub>3</sub>QKFX<sub>4</sub>G (SEQ ID NO:60) 的氨基酸序列,其中X<sub>1</sub>为N、D;X<sub>2</sub>为T、D、E、G或A;X<sub>3</sub>为A或N;并且X<sub>4</sub>为Q或M。

[0229] HCDR3,其包含选自LDYRSY (SEQ ID NO:61) 或ARLDYRSY (SEQ ID NO:62) 的氨基酸序列

[0230] 和/或

[0231] LCDR1,其包含选自TGAVTTSNF (SEQ ID NO:63) 或GSTSGAVTTSNFX<sub>1</sub>N (SEQ ID NO:64) 的氨基酸序列,其中X<sub>1</sub>为P或A;

[0232] LCDR2,其包含选自GTN或GTNNX<sub>1</sub>AX<sub>2</sub> (SEQ ID NO:65) 的氨基酸序列,其中X<sub>1</sub>为K、R或者除M或C以外的任何氨基酸;并且X<sub>2</sub>为S或P;

[0233] LCDR3,其包含选自ALX<sub>1</sub>YSNHX<sub>2</sub> (SEQ ID NO:66) 的氨基酸序列,其中X<sub>1</sub>为W或者除M或C以外的任何氨基酸,并且X<sub>2</sub>为W或者除M或C以外的任何氨基酸;或ALX<sub>1</sub>YSNHX<sub>2</sub>V (SEQ ID NO:67) 的氨基酸序列,其中X<sub>1</sub>为W或者除M或C以外的任何氨基酸,并且X<sub>2</sub>为W或者除M或C以外的任何氨基酸。

[0234] 在另一实施方式中,4G10抗体的人源化VH序列包含以下任何VH序列:

[0235] 表6:示例性抗CTLA4抗体序列

[0236]

抗体	V <sub>H</sub>
4G10H1 人源化	QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQ APGQGLEWIGLINPYNNITNYNQKFMGKATFTVDKSISTA YMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:68)
4G10H3 人源化	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVR QAPGQGLEWIGLINPYNNITNYAQKFQGRVTFTVDTSISTA YMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:69)
4G10H4 人源化	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVR QAPGQGLEWIGLINPYNDITNYAQKFQGRVTFTVDTSISTA YMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:70)
4G10H5	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVR



[0237]

人源化	QAPGQGLEWIGLINPYNNIDNYAQKFQGRVTFTVDTSISTA YMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:71)
4G10H 共有 人源化	QVQLVESGAEX <sub>1</sub> KKPGASX <sub>2</sub> KX <sub>3</sub> SCKASGYSFTGYTX <sub>4</sub> NWV X <sub>5</sub> QAPGQGLEWIGLINPYNX <sub>6</sub> IX <sub>7</sub> NYX <sub>8</sub> QKFX <sub>9</sub> GX <sub>10</sub> X <sub>11</sub> TFTV DX <sub>12</sub> SISTAYMELSRLX <sub>13</sub> SDDX <sub>14</sub> GVYFCARLDYRSYWGQG TLVTVSA (SEQ ID NO:72)  X <sub>1</sub> = V 或 L X <sub>2</sub> = V 或 M X <sub>3</sub> = V 或 I X <sub>4</sub> = M、V、L、I、G、A、S、T X <sub>5</sub> = R 或 K X <sub>6</sub> = N 或 D 或 E X <sub>7</sub> = T 或 D 或 E 或 G 或 A X <sub>8</sub> = A 或 N X <sub>9</sub> = Q 或 M X <sub>10</sub> = R 或 K X <sub>11</sub> = V 或 A X <sub>12</sub> = T 或 K X <sub>13</sub> = R 或 T X <sub>14</sub> = T 或 S

[0238] 在本发明的包括所述共制剂的制剂的其他实施方式中,4G10抗体的人源化VL序列包含以下任何VL序列:

[0239] 表7:示例性抗CTLA4抗体序列

[0240]	抗体	V <sub>L</sub>
--------	----	----------------

[0241]	4G10L1 人源化	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFWANW VQEKPGQAFRSLIGGTNNRASWVPARFSGSLLGGKAA LTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFSGGGTKLTVL (SEQ ID NO:73)
	4G10L3 人源化	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNW VQQKPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFSGSLLGGKAA LTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFSGGGTKLTVL (SEQ ID NO:74)
	4G10L 共有 人源化	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFX <sub>1</sub> NW VQ X <sub>2</sub> KPGQAX <sub>3</sub> RSLIGGTNNX <sub>4</sub> AX <sub>5</sub> WX <sub>6</sub> PARFSGSLLGGKA ALTISGAQPEDEAEYX <sub>7</sub> CALX <sub>8</sub> YSNHX <sub>9</sub> VFSGGGTKLTVL (SEQ ID NO:75) X <sub>1</sub> = P 或 A X <sub>2</sub> = Q 或 E X <sub>3</sub> = P 或 F X <sub>4</sub> = K 或 R 或者 M 或 C 以外的任何其他氨基酸 X <sub>5</sub> = S 或 P X <sub>6</sub> = T 或 V X <sub>7</sub> = Y 或 F X <sub>8</sub> = W 或者 M 或 C 以外的任何氨基酸 X <sub>9</sub> = W 或者 M 或 C 以外的任何氨基酸

[0242] 在一些实施方式中,所述抗CTLA4抗体包含对应于4G10H1L1的VH和VL序列的可变重链和可变轻链序列。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体包含对应于4G10H3L3的VH和VL序列的可变重链和可变轻链序列。在一个实施方式中,所述抗CTLA4抗体包含对应于4G10H3L3的VH和VL序列的可变重链和可变轻链序列。在另一实施方式中,所述抗CTLA4抗体包含对应于4G10H5L3的VH和VL序列的可变重链和可变轻链序列。

[0243] 表8:示例性抗CTLA4抗体序列

[0244]

抗体	V <sub>H</sub>	V <sub>L</sub>
4G10H1L 1	QVQLVESGAELVKPGASM KISCKASGYSFTGYTMNW VKQAPGQGLEWIGLINPYN NITNYNQKFMGKATFTVD KSISTAYMELSRLTSDDSG VYFCARLDYRSYWGQGTL VTVSA (SEQ ID NO:76)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCGSSTGAVTTSNFWANWV QEKPGQAFRSLIGGTNNRA SWVPARFSGSLLGGKAALT ISGAQPEDEAEYFCALWYS NHWVFSGGGTKLTVL (SEQ ID NO:77)
4G10H3L 3	QVQLVESGAELVKKPGASV KVSCASGYSFTGYTMNW VRQAPGQGLEWIGLINPYN NITNYAQKFQGRVTFTVDT SISTAYMELSRLRSDDTGV YFCARLDYRSYWGQGTLV TVSA (SEQ ID NO:78)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCGSSTGAVTTSNFWPNWV QQKPGQAPRSLIGGTNNKA SWTPARFSGSLLGGKAALT ISGAQPEDEAEYYCALWYS NHWVFSGGGTKLTVL (SEQ ID NO:79)
4G10H4L 3	QVQLVESGAELVKKPGASV KVSCASGYSFTGYTMNW VRQAPGQGLEWIGLINPYN DITNYAQKFQGRVTFTVDT SISTAYMELSRLRSDDTGV YFCARLDYRSYWGQGTLV	QAVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCGSSTGAVTTSNFWPNWV QQKPGQAPRSLIGGTNNKA SWTPARFSGSLLGGKAALT ISGAQPEDEAEYYCALWYS NHWVFSGGGTKLTVL

[0245]

	TVSA (SEQ ID NO:80)	(SEQ ID NO:81)
4G10H5L 3	QVQLVESGAEVKKPGASV KVSCKASGYSFTGYTMNW VRQAPGQGLEWIGLINPYN NIDNYAQKFQGRVTFTVDT SISTAYMELSRLRSDDTGV YFCARLDYRSYWGQGTLV TVSA (SEQ ID NO:82)	QAVVTQEPSLTVSPGGT VT LTCGSSTGAVTTSNFPNWV QQKPGQAPRSLIGGTNNKA SWTPARFSGSLLGGKAALT ISGAQPEDEAEYYCALWYS NHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:83)

[0246]

表 9. 其他抗人 CTLA4 抗体	
A. 包含伊匹木单抗的轻链和重链 CDR	
CDRL1	RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO: 91)
CDRL2	GAFSRAT (SEQ ID NO: 92)
CDRL3	QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 93)
CDRH1	SYTMH (SEQ ID NO: 94)
CDRH2	FISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 95)
CDRH3	TGWLGPFDY (SEQ ID NO: 96)
C. 包含伊匹木单抗的成熟重链可变区和成熟轻链可变区	
重链 VR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYT MHWVRQA PGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLY LQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 97)
轻链 VR	EIVLTQSPGT LSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLA WYQQK

[0247]

	PGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO: 98)
D. 包含伊匹木单抗的成熟重链和成熟轻链	
重链	SEQ ID NO:84
轻链	SEQ ID NO:85

[0248] 在本发明的包括所述共制剂的制剂的另一实施方式中,所述抗CTLA-4抗体为与伊匹木单抗、曲美木单抗或任一上述抗体交叉竞争结合人CTLA-4的抗体或其抗原结合片段,或者为与伊匹木单抗、曲美木单抗或任一上述抗体那样结合至人CTLA-4的相同表位区域的抗体或其抗原结合片段,包括8D2/8D2 (RE) 或8D2/8D2 (RE) 变体1、8D2H1L1或8D2H1L1变体1、8D2H2L2或8D2H2L2变体1、8D3H3L3、8D2H2L15或8D2H2L15变体1、8D2H2L17或8D2H2L17变体1、4G10H1L1或其变体、4G10H3L3或其变体、4G10H3L3或其变体以及4G10H5L3或其变体。

[0249] 制剂

[0250] 在本发明的一些方面,本文所述的制剂使抗体聚集体(高分子量种类)和微粒,高和低分子量种类,的形成最小化,使蛋氨酸残基的氧化最小化,并确保抗体随时间保持生物学活性。

[0251] 在一个方面,本发明包括抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的各种制剂。例如,本发明包括包含以下成分的制剂:(i) 抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,(ii) 缓冲液(例如,L-组氨酸或乙酸盐),(iii) 非还原性糖(例如,蔗糖);(iv) 非离子表面活性剂(例如,聚山梨酯80);和(v) 抗氧化剂(例如,L-蛋氨酸)。在一个方面,所述制剂进一步包含抗PD-1抗体。在一个方面,所述制剂可进一步包含螯合剂。在一个实施方式中,所述螯合剂为二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)。

[0252] 在一个方面,本发明还包括抗CTLA4抗体或其抗原结合片段与抗人PD-1抗体或其抗原结合片段的各种共制剂。在一个实施方式中,本发明包括包含以下成分的制剂:(i) 抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,(ii) 抗人PD-1抗体或其抗原结合片段,(iii) 缓冲液(例如,L-组氨酸或乙酸盐),(iv) 非还原性糖(例如,蔗糖),(v) 非离子表面活性剂(例如,聚山梨酯80)和(vi) 抗氧化剂(例如,L-蛋氨酸)。在一个实施方式中,所述制剂可进一步包含螯合剂(例如,DTPA)。

[0253] 本文所述的药物制剂可包括缓冲液。术语“缓冲液”涵盖将本文所述的液体制剂的溶液pH保持在可接受范围内的那些试剂,或者对于本文所述的冻干制剂,在冻干之前和/或重构之后提供可接受的溶液pH的那些试剂。

[0254] 可用于本发明的药物制剂和方法的缓冲液包括琥珀酸盐(钠或钾)、L-组氨酸、磷酸盐(钠或钾)、Tris(三(羟甲基)氨基甲烷)、二乙醇胺、柠檬酸盐(钠)、乙酸盐(钠)等。在本发明的一个实施方式中,缓冲液以约1-20mM(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20mM)的浓度存在于所述制剂中。在本发明的特定实施方式中,所述缓冲液为组氨酸缓冲液。在另一实施方式中,所述缓冲液为L-组氨酸缓冲液。

[0255] 在一个实施方式中,所述缓冲液的pH在约4.5至约6.5的范围内。在另一实施方式中,pH在约5.0-6.0的范围内。在另一实施方式中,pH范围为约5.3-5.8。在另一实施方式中,pH为约5.5。为了获得示例性制剂,探索了pH范围为5.0-6.0的组氨酸和乙酸盐缓冲液的适用性。当描述pH值的范围,例如“在pH 5.5和6.0之间的pH”时,所述范围意图包括所描述的值。例如,约5.0至约6.0的范围包括5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9和6.0。对于冻干制剂,除非另有说明,否则pH是指重构后的pH。通常使用标准玻璃泡(glass bulb)pH计在25℃下测量pH。如本文所用,包含“在pH X的组氨酸缓冲液”的溶液是指pH为X且包含组氨酸缓冲液的溶液,即,所述pH旨在是指溶液的pH。在其中与抗CTLA4抗体相比,共制剂含有更高浓度的抗人PD-1抗体的共制剂的一些实施方式中,所述共制剂的pH为约5.0。

[0256] 在本发明的一个实施方式中,所述抗CTLA4制剂以及抗CTLA4和抗人PD-1的共制剂包含非还原性糖。如本文所用,“非还原性糖”为不能用作还原剂的糖,因为它不含有或不能转化为含有游离醛基或游离酮基。非还原性糖的实例包括但不限于二糖类,例如蔗糖和海藻糖。在一个实施方式中,所述非还原性糖的存在量为约1-10% (w/v) (1、2、3、4、5、6、7、8、9或10%)。在另一实施方式中,所述非还原性糖的存在量为约6%至约8% (w/v) (6、7或8%)。在另一实施方式中,所述非还原性糖的存在量为约6% (w/v)。在另一实施方式中,所述非还原性糖的存在量为约7% (w/v)。在另一实施方式中,所述非还原性糖的存在量为约8% (w/v)。在一个实施方式中,所述非还原性糖为蔗糖、海藻糖或棉子糖。在另一实施方式中,所述非还原性糖为蔗糖。在另一实施方式中,所述蔗糖以6-8%w/v存在。在一个实施方式中,所述蔗糖以6% (w/v)存在。在一个实施方式中,所述蔗糖以7% (w/v)存在。在一个实施方式中,所述蔗糖以8% (w/v)存在。

[0257] 本文所述的制剂还包含表面活性剂。如本文所用,表面活性剂为本质上是两亲性的表面活性剂。可以将表面活性剂添加到本文的制剂中,以在加工条件例如纯化、过滤、冷冻干燥、运输、储存和递送期间提供稳定性,减少和/或防止聚集或者防止和/或抑制蛋白质损伤。在本发明的一个方面,表面活性剂可用于为一种或多种活性成分提供额外的稳定性。

[0258] 可用于本文所述的制剂和共制剂的非离子表面活性剂包括但不限于聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯(聚山梨酯,以商品名**Tween®** (Uniquema Americas LLC, Wilmington, DE) 出售), 包括聚山梨酯-20 (聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯)、聚山梨酯-40 (聚氧乙烯山梨醇单棕榈酸酯)、聚山梨酯-60 (聚氧乙烯山梨醇单硬脂酸酯) 和聚山梨酯-80 (聚氧乙烯山梨醇单油酸酯); 聚氧乙烯烷基醚, 例如**Brij®** 58 (Uniquema Americas LLC, Wilmington, DE) 和**Brij®** 35; 泊洛沙姆 (例如, 泊洛沙姆188); **Triton®** X-100 (Union Carbide Corp., Houston, TX) 和**Triton®** X-114; NP40; 司盘20、司盘40、司盘60、司盘65、司盘80和司盘85; 乙二醇和丙二醇的共聚物 (例如, **普朗尼克®** 系列的非离子表面活性剂, 例如**普朗尼克®** F68、**普朗尼克®** 10R5、**普朗尼克®** F108、**普朗尼克®** F127、**普朗尼克®** F38、**普朗尼克®** L44、**普朗尼克®** L62 (BASF Corp., Ludwigshafen, 德国); 和十二烷基硫酸钠(SDS)。在一个实施方式中,所述非离子表面活性剂为聚山梨酯80或聚山梨酯20。在一个实施方式中,所述非离子表面活性剂为聚山梨酯20。在另一实施方式中,所述表面活性剂为聚山梨酯80。

[0259] 本发明制剂中包括的非离子表面活性剂的量为足以执行期望的功能的量,即稳定制剂中所述活性药物成分(即抗CTLA4抗体或其抗原结合片段,或抗CTLA4抗体或其抗原结合片段和抗人PD-1抗体或其抗原结合片段二者)所需的最小量。列出的聚山梨酯80的所有百分比均为%w/v。通常,所述表面活性剂以约0.008%至约0.1%w/v的浓度存在。在本发明这一方面的一些实施方式中,所述表面活性剂在制剂中的存在量为约0.01%至约0.1%;约0.01%至约0.09%;约0.01%至约0.08%;约0.01%至约0.07%;约0.01%至约0.06%;约0.01%至约0.05%;约0.01%至约0.04%;约0.01%至约0.03%、约0.01%至约0.02%、约0.015%至约0.04%;约0.015%至约0.03%、约0.015%至约0.02%、约0.02%至约0.04%、约0.02%至约0.035%或约0.02%至约0.03%。在特定的实施方式中,所述表面活性剂的存在量为约0.02%。在替代实施方式中,所述表面活性剂的存在量为约0.01%、约0.015%、约0.025%、约0.03%、约0.035%或约0.04%。

[0260] 在本发明的示例性实施方式中,所述表面活性剂为选自以下的非离子表面活性剂:聚山梨酯20和聚山梨酯80。在优选的实施方式中,所述表面活性剂为聚山梨酯80。

[0261] 在特定的实施方式中,本发明的包括所述共制剂的制剂包含约0.01%至约0.04%w/v的聚山梨酯80。在进一步的实施方式中,本文所述的制剂包含约0.008%w/v、约0.01%w/v的量的聚山梨酯80。在一个实施方式中,聚山梨酯80的量为约0.015w/v%。在另一实施方式中,聚山梨酯80的量为约0.02%w/v。在另一实施方式中,聚山梨酯80的量为约0.025%w/v。在另一实施方式中,聚山梨酯80的量为约0.03%w/v。在另一实施方式中,聚山梨酯80的量为约0.035%w/v。在另一实施方式中,聚山梨酯80的量为约0.04%w/v。在另一实施方式中,聚山梨酯80的量为约0.045%w/v。在特定的实施方式中,本发明的制剂包含约0.02%w/v的聚山梨酯80。

[0262] 本发明的包括所述共制剂的制剂还包含蛋氨酸或其药学上可接受的盐。在一个实施方式中,所述蛋氨酸为L-蛋氨酸。在另一实施方式中,所述蛋氨酸为L-蛋氨酸的药学上可接受的盐,例如,蛋氨酸HCl。在一个实施方式中,蛋氨酸以约1-20mM(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 16、17、18、19和20mM)的浓度存在于制剂中。在另一实施方式中,所述蛋氨酸以约5mM至约10mM(5、6、7、8、9和10mM)存在。在另一实施方式中,所述蛋氨酸以约10mM存在。

[0263] 本文所述的制剂和共制剂可进一步包含螯合剂。在本发明的一个实施方式中,螯合剂以约1-50 $\mu$ M(例如,1、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50 $\mu$ M)的浓度存在于制剂中。在一个实施方式中,所述螯合剂为DTPA。在另一实施方式中,所述螯合剂为EDTA。在一些另外的实施方式中,所述DTPA为抗氧化剂,其可以在本文所述的任何制剂中以以下任何一种量存在:1、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50 $\mu$ M。

#### [0264] 冻干组合物

[0265] 治疗性蛋白质的冻干制剂提供几个优点。冻干制剂通常比溶液制剂具有更好的化学稳定性,因此增加了半衰期。冻干制剂也可以根据临床因素,例如施用途或剂量(dosing),以不同的浓度重构。例如,如果需要皮下施用,可以以高浓度(即以小体积)重构冻干制剂,或者如果是静脉内施用,则可以以较低浓度重构。如果对特定受试者需要高剂量,特别是如果必须将注射量降至最低的皮下施用,则也可能需要高浓度。一种这样的冻干抗体制剂公开于美国专利号6,267,958中,其通过引用整体并入本文。另一种治疗性蛋白质

的冻干制剂公开于美国专利号7,247,707中,其通过引用整体并入本文。

[0266] 通常,在重构高浓度药物产品(DP,在一个示例性实施方式中,为人源化抗PD-1抗体派姆单抗或其抗原结合片段)的预期下,即在小体积水中重构的预期下,制备冻干制剂。然后用水或等渗缓冲液随后稀释可以容易地用于将DP稀释至较低浓度。通常,本发明的冻干制剂中所包括的赋形剂的含量在以高DP浓度重构时将导致大致等渗的制剂,例如用于皮下施用。在更大体积的水中进行重构以产生较低的DP浓度将必定会降低重构溶液的张度,但这种降低在非皮下(例如静脉内)施用的意义不大。如果在较低DP浓度下期望等渗性,可在标准的小体积水中重构冻干的粉末,然后用等渗稀释液(例如0.9%氯化钠)进一步稀释。

[0267] 本发明的冻干制剂是通过将预冻干溶液冻干(冷冻干燥)而形成的。冷冻干燥是通过将制剂冷冻并随后在适合于初次干燥的温度下使水升华来完成的。在这种条件下,产品温度低于制剂的共晶点(eutectic point)或塌陷温度(collapse temperature)。通常,在通常约50至250mTorr的范围的合适压力下,初次干燥的存放温度(shelf temperature)将在约-30至25℃的范围内(假设产品在初次干燥期间保持冷冻)。制剂、容纳样品的容器(例如,玻璃小瓶)的大小和类型以及液体的体积决定了干燥所需的时间,所述时间的范围可为数小时至几天(例如40-60hrs)。二次干燥阶段可以在约0-40℃下进行,这主要取决于容器的类型和大小以及所用蛋白质的类型。二次干燥时间取决于产品中期望的残留湿度水平,并且通常需要至少约5小时。通常,冻干制剂的含湿量小于约5%,并且优选小于约3%。压力可以与初次干燥步骤中所用的压力相同。冷冻干燥条件可根据制剂和小瓶大小而变化。

[0268] 在一些情况下,可能希望在要进行蛋白质重构的容器中冻干蛋白质制剂,以避免转移步骤。在这种情况下,所述容器可以是例如3、5、10、20、50或100cc的小瓶。

[0269] 在施用之前将本发明的冻干制剂重构。所述蛋白质可以约10、15、20、25、30、40、50、60、75、80、90或100mg/mL或更高浓度例如150mg/mL、200mg/mL、250mg/mL或300mg/mL至多约500mg/mL的浓度重构。在一个实施方式中,重构后的蛋白质浓度为约10-300mg/mL。在一个实施方式中,重构后的蛋白质浓度为约20-250mg/mL。在一个实施方式中,重构后的蛋白质浓度为约150-250mg/mL。在一个实施方式中,重构后的蛋白质浓度为约180-220mg/mL。在一个实施方式中,重构后的蛋白质浓度为约50-150mg/mL。在一个实施方式中,重构后的蛋白质浓度为约100mg/mL。在一个实施方式中,重构后的蛋白质浓度为约75mg/mL。在一个实施方式中,重构后的蛋白质浓度为约50mg/mL。在一个实施方式中,重构后的蛋白质浓度为约25mg/mL。在意图皮下递送重构的制剂的情况下,高蛋白质浓度特别有用。然而,对于其他施用途径,例如静脉内施用,较低浓度的蛋白质(例如约5-50mg/mL)可能是期望的。

[0270] 重构通常在约25℃的温度下进行以确保完全水合,尽管根据需要可以采用其他温度。重构所需的时间将取决于例如稀释剂的类型、赋形剂和蛋白质的量。示例性稀释剂包括无菌水、抑菌性注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或葡萄糖溶液。

#### [0271] 液体组合物

[0272] 通过取液体形式的药用物质(例如,抗人源化的PD-1)(例如,在水性制剂中的派姆单抗)并用缓冲液将它交换到期望的缓冲液中(作为纯化过程的最后一步),可以制备液体抗体制剂。在该实施方式中不存在冻干步骤。将最终缓冲液中的药用物质浓缩至期望的浓度。将诸如蔗糖和聚山梨酯80等赋形剂加入到药用物质中,并使用适当的缓冲液将它稀释



至最终的蛋白质浓度。使用0.22 $\mu$ m过滤器过滤最终配制的药用物质,并填充到最终的容器(例如玻璃小瓶)中。

### [0273] III. 使用方法

[0274] 本发明还涉及一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本发明的任何制剂,即本文所述的任何制剂。在该方法的一些特定的实施方式中,通过静脉内施用将所述制剂施用于所述受试者。在其他实施方式中,通过皮下施用将所述制剂施用于所述受试者。在一个实施方式中,本发明包括一种在人患者中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用本发明的任何制剂。

[0275] 在本发明的任何方法中,所述癌症可以选自:黑素瘤、肺癌、头颈癌、膀胱癌、乳腺癌、胃肠道癌、多发性骨髓瘤、肝细胞癌、淋巴瘤、肾癌、间皮瘤、卵巢癌、食道癌、肛门癌、胆道癌、结肠直肠癌、宫颈癌、甲状腺癌、唾液癌、前列腺癌(例如激素难治性前列腺腺癌)、胰腺癌、结肠癌、食道癌、肝癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤和其他肿瘤性恶性肿瘤。

[0276] 在一些实施方式中,所述肺癌为非小细胞肺癌。

[0277] 在替代实施方式中,所述肺癌为小细胞肺癌。

[0278] 在一些实施方式中,所述淋巴瘤为霍奇金淋巴瘤。

[0279] 在其他实施方式中,所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤。在特定的实施方式中,所述淋巴瘤为纵隔大B细胞淋巴瘤。

[0280] 在一些实施方式中,所述乳腺癌为三阴性乳腺癌。

[0281] 在进一步的实施方式中,所述乳腺癌为ER+/HER2-乳腺癌。

[0282] 在一些实施方式中,所述膀胱癌为尿路上皮癌。

[0283] 在一些实施方式中,所述头颈癌为鼻咽癌。在一些实施方式中,所述癌症为甲状腺癌。在其他实施方式中,所述癌症为唾液癌。在其他实施方式中,所述癌症为头部和颈部的鳞状细胞癌。

[0284] 在一个实施方式中,本发明包括一种在人患者中治疗转移性非小细胞肺癌(NSCLC)的方法,所述方法包括向所述患者施用本发明的制剂。在特定的实施方式中,所述患者患有PD-L1表达高的肿瘤[肿瘤比例评分(TPS)  $\geq 50\%$ ],并且先前未用含铂化学疗法治疗过。在其他实施方式中,所述患者患有PD-L1表达的肿瘤(TPS  $\geq 1\%$ ),并且先前用含铂化学疗法治疗过。在其他实施方式中,所述患者患有PD-L1表达(TPS  $\geq 1\%$ )的肿瘤,并且先前未用含铂化学疗法治疗过。在特定的实施方式中,所述患者在接受含铂化学疗法时或之后疾病发展。在某些实施方式中,PD-L1 TPS通过FDA批准的测试确定。在某些实施方式中,所述患者的肿瘤没有EGFR或ALK基因组畸变。在某些实施方式中,所述患者的肿瘤具有EGFR或ALK基因组畸变,并且在接受抗PD-1抗体或其抗原结合片段之前,在接受EGFR或ALK畸变(一种或多种)治疗时或之后疾病发展。

[0285] 在一些实施方式中,所述癌症为具有高水平的微卫星不稳定性(MSI-H)的转移性结直肠癌。

[0286] 在一些实施方式中,所述癌症为具有高水平的微卫星不稳定性(MSI-H)的转移性结直肠癌。

[0287] 在一些实施方式中,所述癌症为具有高水平的微卫星不稳定性(MSI-H)的实体瘤。

[0288] 在一些实施方式中,所述癌症为具有高突变负担的实体瘤。

[0289] 在一些实施方式中,所述癌症选自:黑素瘤、非小细胞肺癌、复发性或难治性经典霍奇金淋巴瘤、头颈鳞状细胞癌、尿路上皮癌、食道癌、胃癌和肝细胞癌。

[0290] 在上述治疗方法的其他实施方式中,所述癌症为血红素恶性肿瘤。在某些实施方式中,所述血红素恶性肿瘤为急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、EBV阳性DLBCL、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(HL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、多发性骨髓瘤(MM)、髓样细胞白血病1蛋白(Mc1-1)、骨髓增生异常综合症(MDS)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)。

[0291] 在本文所述的方法和治疗中涵盖表现出改善的无疾病存活和总存活的恶性肿瘤(其与肿瘤浸润性淋巴细胞在活组织检查或外科手术材料中的存在有关),例如黑素瘤、结肠直肠癌、肝癌、肾癌、胃癌/食管癌、乳腺癌、胰腺癌和卵巢癌。已知这样的癌症亚型易受T淋巴细胞的免疫控制。另外,包括使用本文所述的抗体可以抑制其生长的难治性或复发性恶性肿瘤。

[0292] 可以从用本文所述的制剂治疗中受益的其他癌症包括与病毒持续感染相关的那些癌症,所述病毒例如人免疫缺陷病毒、甲型、乙型和丙型肝炎病毒、EB病毒、已知在病因上与例如卡波西氏肉瘤、肝癌、鼻咽癌、淋巴瘤、宫颈癌、外阴癌、肛门癌、阴茎癌和口癌有关的人乳头瘤病毒。

[0293] 所述制剂还可用于预防或治疗感染和传染病。因此,本发明提供了一种在哺乳动物受试者中治疗慢性感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本发明的制剂。在该方法的一些特定的实施方式中,通过静脉内施用将所述制剂施用于所述受试者。在其他实施方式中,通过皮下施用将所述制剂施用于所述受试者。

[0294] 这些试剂可单独使用或与疫苗组合使用,以刺激对病原体、毒素和自身抗原的免疫应答。所述抗体或其抗原结合片段可用于刺激对人类感染的病毒的免疫应答,所述病毒包括但不限于:人免疫缺陷病毒、甲型、乙型和丙型肝炎病毒、EB病毒、人巨细胞病毒、人乳头瘤病毒和疱疹病毒。拮抗剂抗PD-1抗体或抗体片段可用于刺激对细菌或真菌寄生虫以及其他病原体感染的免疫应答。乙型和丙型肝炎以及HIV的病毒感染属于被认为是慢性病毒感染的感染。

[0295] 本发明的制剂可以与一种或多种“另外的治疗剂”组合施用于患者。另外的治疗剂可以是生物治疗剂(包括但不限于针对下列物质的抗体:VEGF、EGFR、Her2/neu、VEGF受体、其他生长因子受体、CD20、CD40、CD-40L、OX-40、4-1BB和ICOS)、免疫原性剂(例如,减毒癌细胞、肿瘤抗原、抗原呈递细胞(诸如以肿瘤衍生抗原或核酸脉冲刺激的树突细胞)、免疫刺激性细胞因子(例如,IL-2、IFN $\alpha$ 2、GM-CSF),以及转染有编码免疫刺激细胞因子(诸如但不限于GM-CSF)的基因的细胞。

[0296] 如上所述,在本发明方法的一些实施方式中,所述方法进一步包括施用另外的治疗剂。在特定的实施方式中,所述另外的治疗剂为抗LAG3抗体或其抗原结合片段、抗GITR抗体或其抗原结合片段、抗TIGIT抗体或其抗原结合片段、抗CD27抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中,所述另外的治疗剂为表达IL-12的新城疫病毒载体。在另一实施方式中,所述另外的治疗剂为迪那昔布(dinaciclib)。在更进一步的实施方式中,所述另外的治疗剂为STING激动剂。

[0297] 合适的施用途径可例如包括肠胃外递送,包括肌肉内、皮下以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内。药物可以多种常规方式施用,例如腹膜内、肠胃外、动脉内或静脉内注射。必须限制溶液体积的施用方式(例如皮下施用)需要冻干制剂以能够以高浓度重构。

[0298] 选择另外的治疗剂的剂量取决于几个因素,包括实体的血清或组织更新率,症状水平,实体的免疫原性以及所治疗的个体中靶细胞、组织或器官的可及性。另外的治疗剂的剂量应为提供可接受水平的副作用的量。因此,每种另外的治疗剂(例如生物治疗剂或化学治疗剂)的剂量和给药频率将部分取决于特定的治疗剂、所治疗的癌症的严重程度以及患者特征。选择适当剂量的抗体、细胞因子和小分子的指南是可得到的。参见,例如,Wawrzynczak(1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub.Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina(编)(1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach(编)(1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert等人(2003) *New Engl.J.Med.* 348:601-608; Milgrom等人(1999) *New Engl.J.Med.* 341:1966-1973; Slamon等人(2001) *New Engl.J.Med.* 344:783-792; Beniaminovitz等人(2000) *New Engl.J.Med.* 342:613-619; Ghosh等人(2003) *New Engl.J.Med.* 348:24-32; Lipsky等人(2000) *New Engl.J.Med.* 343:1594-1602; *Physicians' Desk Reference 2003* (Physicians' Desk Reference, 第57版); Medical Economics Company; ISBN:1563634457; 第57版(2002年11月)。临床医师可以例如使用本领域已知或怀疑会影响治疗或预计影响治疗的参数或因素来确定适当的剂量方案,并且将取决于例如患者的临床病史(例如,先前的疗法)、要治疗的癌症的类型和阶段以及在联合疗法中对一种或多种治疗剂产生反应的生物标志物。

[0299] 可获得各种文献参考以促进选择用于其他治疗剂的药学上可接受的载体或赋形剂。参见,例如, *Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA(1984); Hardman等人(2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro(2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis等人(编)(1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman等人(编)(1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman等人(编)(1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie(2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY。

[0300] 可以通过连续输注或以例如一天、每周1-7次、一周、两周、三周、每月、每两个月等的间隔的剂量来施用药物抗体制剂。优选的剂量方案为涉及避免显著不希望的副作用的最大剂量或剂量频率的剂量方案。总的每周剂量通常为至少0.05 $\mu$ g/kg、0.2 $\mu$ g/kg、0.5 $\mu$ g/kg、1 $\mu$ g/kg、10 $\mu$ g/kg、100 $\mu$ g/kg、0.2mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg体重或更高。参见,例如, Yang等人(2003) *New Engl.J.Med.* 349:427-434; Herold等人(2002) *New Engl.J.Med.* 346:1692-1698; Liu等人(1999) *J.Neurol.Neurosurg.Psych.* 67:451-456; Portielji等人(2000) *Cancer Immunol.Immunother.* 52:133-144。小分子治疗剂,例如肽模拟物、天然产物或有机化学试剂的期望剂量以moles/kg为基准与抗体或多肽基本相同。

[0301] 本发明的实施方式还包括一种或多种本文所述的生物制剂 (i) 用于、(ii) 用作用于以下的药物或组合物, 或 (iii) 用于制备用于以下的药物: (a) 疗法 (例如, 人体疗法); (b) 药物; (c) 诱导或增加抗肿瘤免疫反应; (d) 减少患者中一种或多种肿瘤标志物的数量; (e) 停止或延缓肿瘤或血液癌的生长; (f) 停止或延缓CTLA4或PD-1相关疾病的进展; (g) 阻止或延迟癌症进展; (h) 稳定CTLA4或PD-1相关疾病; (i) 抑制肿瘤细胞的生长或存活; (j) 消除或缩小一种或多种癌性病变或肿瘤的大小; (k) 减少CTLA4或PD-1相关疾病的进展、发作或严重程度; (l) 降低CTLA4或PD-1相关疾病诸如癌症的临床症状的严重程度或持续时间; (m) 相对于类似未治疗患者的预期生存期而言, 延长患者的生存期; (n) 诱导癌症状况或其他CTLA4或PD-1相关疾病的完全或部分缓解; (o) 治疗癌症; 或 (p) 治疗慢性感染。

[0302] 一般方法

[0303] 分子生物学中的标准方法描述于 Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982&1989 第2版, 2001 第3版) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) Recombinant DNA, 第217卷, Academic Press, San Diego, CA) 中。标准方法还出现在 Ausbel 等人 (2001) Current Protocols in Molecular Biology, 第1-4卷, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, 其描述了细菌细胞中的克隆和DNA诱变 (第1卷)、哺乳动物细胞和酵母中的克隆 (第2卷)、糖缀合物和蛋白质表达 (第3卷) 和生物信息学 (第4卷)。

[0304] 描述了用于蛋白质纯化的方法, 包括免疫沉淀、色谱、电泳、离心和结晶 (Coligan 等人 (2000) Current Protocols in Protein Science, 第1卷, John Wiley and Sons, Inc., New York)。描述了化学分析、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白的生产、蛋白质的糖基化 (参见, 例如, Coligan 等人 (2000) Current Protocols in Protein Science, 第2卷, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel 等人 (2001) Current Protocols in Molecular Biology, 第3卷, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, 第16.0.5-16.22.17页; Sigma-Aldrich, Co. (2001) Products for Life Science Research, St. Louis, MO; 第45-89页; Amersham Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N.J., 第384-391页)。描述了多克隆和单克隆抗体的生产、纯化和片段化 (Coligan 等人 (2001) Current Protocols in Immunology, 第1卷, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, 出处同上)。用于表征配体/受体相互作用的标准技术是可得到的 (参见, 例如, Coligan 等人 (2001) Current Protocols in Immunology, 第4卷, John Wiley, Inc., New York)。

[0305] 可以制备单克隆抗体、多克隆抗体和人源化抗体 (参见, 例如, Sheperd and Dean (编) (2000) Monoclonal Antibodies, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann and Dubel (编) (2001) Antibody Engineering, Springer-Verlag, New York; Harlow and Lane (1988) Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 第139-243页; Carpenter 等人 (2000) J. Immunol. 165:6205; He 等人 (1998) J. Immunol. 160:1029; Tang 等人 (1999) J. Biol. Chem. 274:27371-27378; Baca 等人 (1997) J. Biol. Chem. 272:10678-10684; Chothia 等人 (1989) Nature 342:877-883; Foote

and Winter(1992) J.Mol.Biol.224:487-499;美国专利号6,329,511)。

[0306] 人源化的一个替代方案是使用在噬菌体上展示的人抗体文库或在转基因小鼠中的人抗体文库(Vaughan等人(1996) Nature Biotechnol.14:309-314;Barbas(1995) Nature Medicine 1:837-839;Mendez等人(1997) Nature Genetics 15:146-156;Hoogenboom和Chames(2000) Immunol.Today 21:371-377;Barbas等人(2001) Phage Display:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York;Kay等人(1996) Phage Display of Peptides and Proteins:A Laboratory Manual, Academic Press,San Diego,CA;de Bruin等人(1999) Nature Biotechnol.17:397-399)。

[0307] 抗原的纯化对于产生抗体不是必需的。可以用带有目标抗原的细胞免疫动物。然后可以从经免疫的动物分离脾细胞,并且可以使所述脾细胞与骨髓瘤细胞系融合以产生杂交瘤(参见,例如,Meyaard等人(1997) Immunity 7:283-290;Wright等人(2000) Immunity 13:233-242;Preston等人,出处同上;Kaithamana等人(1999) J.Immunol.163:5157-5164)。

[0308] 抗体可以缀合至例如小药物分子、酶、脂质体、聚乙二醇(PEG)。抗体可用于治疗、诊断、试剂盒或其他目的,并且包括例如偶联至染料、放射性同位素、酶或金属(例如,胶体金)的抗体(参见,例如,Le Doussal等人(1991) J.Immunol.146:169-175;Gibellini等人(1998) J.Immunol.160:3891-3898;Hsing和Bishop(1999) J.Immunol.162:2804-2811;Everts等人(2002) J.Immunol.168:883-889)。

[0309] 用于流式细胞计量术的方法,包括荧光活化细胞分选(FACS),是可得到的(参见,例如,Owens等人(1994) Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice,John Wiley and Sons,Hoboken,NJ;Givan(2001) Flow Cytometry,第2版;Wiley-Liss,Hoboken,NJ;Shapiro(2003) Practical Flow Cytometry,John Wiley and Sons,Hoboken,NJ)。适合用于修饰核酸(包括用作例如诊断试剂的核酸引物和探针、多肽和抗体)的荧光试剂是可得到的(Molecular Probes(2003) Catalogue,Molecular Probes, Inc.,Eugene,OR;Sigma-Aldrich(2003) Catalogue,St.Louis,MO)。

[0310] 描述了免疫系统的组织学的标准方法(参见,例如,Muller-Harmelink(编)(1986) Human Thymus:Histopathology and Pathology,Springer Verlag,New York,NY;Hiatt等人(2000) Color Atlas of Histology,Lippincott,Williams,and Wilkins,Phila,PA;Louis等人(2002) Basic Histology:Text and Atlas,McGraw-Hill,New York,NY)。

[0311] 用于确定例如抗原片段、前导序列、蛋白质折叠、功能域、糖基化位点和序列比对的软件包和数据库是可得到的(例如,参见,GenBank,Vector **NTI®** Suite(Informax, Inc, Bethesda,MD);GCG Wisconsin Package(Accelrys, Inc.,San Diego,CA);**DeCypher®** (TimeLogic Corp.,Crystal Bay,Nevada);Menne等人(2000) Bioinformatics 16:741-742;Menne等人(2000) Bioinformatics Applications Note 16:741-742;Wren等人(2002) Comput.Methods Programs Biomed.68:177-181;von Heijne(1983) Eur.J.Biochem.133:17-21;von Heijne(1986) Nucleic Acids Res.14:4683-4690)。

[0312] 分析方法

[0313] 适用于评估产品稳定性的分析方法包括尺寸排阻色谱法(SEC)、动态光散射测试(DLS)、差示扫描量热法(DSC)、异天冬氨酸(iso-aspartate)定量、效力、340nm处的UV、UV光谱法和FTIR.SEC(J.Pharm.Sci.,83:1645-1650,(1994);Pharm.Res.,11:485(1994);

J.Pharm.Bio.Anal.,15:1928(1997);J.Pharm.Bio.Anal.,14:1133-1140(1986))测量产品中的单体百分比并给出可溶性聚集体的量的信息。DSC(Pharm.Res.,15:200(1998); Pharm.Res.,9:109(1982))给出蛋白质变性温度和玻璃化转变温度的信息。DLS(American Lab.,November(1991))测量平均扩散系数,并给出可溶性和不可溶性聚集体的量的信息。340nm处的UV测量340nm处的散射光强度并给出有关可溶性和不可溶性聚集体的量的信息。UV光谱法测量278nm处的吸光度并给出蛋白质浓度的信息。FTIR(Eur.J.Pharm.Biopharm.,45:231(1998);Pharm.Res.,12:1250(1995);J.Pharm.Sci.,85:1290(1996);J.Pharm.Sci.,87:1069(1998))测量酰胺一区(amide one region)的IR光谱,并给出蛋白质二级结构的信息。

[0314] 样品中的异天冬氨酸含量使用Isoquant异天冬氨酸检测系统(Isoquant Isoaspartate Detection System,Promega)进行测量。所述试剂盒使用酶蛋白异天冬氨酰基甲基转移酶(PIMT)特异性检测目标蛋白中异天冬氨酸残基的存在。PIMT催化在 $\alpha$ -羧基位置的甲基从S-腺苷-L-蛋氨酸向异天冬氨酸的转移,在此过程中产生S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)。这是相对较小的分子,并且通常可以使用试剂盒中提供的SAH HPLC标准品通过反相HPLC进行分离和定量。

[0315] 抗体的效力或生物同一性(bioidentity)可以通过其结合抗原的能力来测量。抗体与其抗原的特异性结合可以通过本领域技术人员已知的任何方法来定量,例如,免疫测定,诸如ELISA(酶联免疫吸附测定)。

[0316] 为了描述和公开可能使用的与本发明有关的方法和材料的目的,本文提及的所有出版物均通过引用并入本文。

[0317] 已经参考附图在本文中描述了本发明的不同实施方式,应当理解,本发明不限于那些精确的实施方式,并且在不脱离所附权利要求所限定的本发明的范围或精神的情况下,本领域技术人员可以在其中进行各种改变和修改。

[0318] 实施例实施例1

[0319] 含或不含蛋氨酸的抗CTLA4抗体制剂稳定性

[0320] 进行该研究以研究10mM的L-蛋氨酸对抗CTLA4抗体制剂的稳定性的影响。评估以下应力对含和不含L-蛋氨酸的抗CTLA4制剂的影响:

[0321] (1) 在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  (环境湿度)、 $25^{\circ}\text{C}$  (60%相对湿度)、 $40^{\circ}\text{C}$  (75%相对湿度)下-长达3个月的热应力。

[0322] (2) 处于水平位置(300rpm,持续3天)的搅拌应力

[0323] (3) 冻融应力(在 $-80^{\circ}\text{C}$ 至 $18-22^{\circ}\text{C}$ 下(室温下融化4小时)的五个冻融循环)。

[0324] (4) 光应力(在0.2x ICH、0.5x ICH、1x ICH下的ICH条件)。

[0325] 基于所述数据,含有L-蛋氨酸的制剂比不含L-蛋氨酸的相应制剂更稳定。

[0326] 材料和方法

[0327] 使用具有以下CDR的抗CTLA4抗体制备以下液体制剂: IgG1主链上的SEQ ID NO:35的CDRH1、SEQ ID NO:36的CDRH2、SEQ ID NO:37的CDRH3、SEQ ID NO:38的CDRL1、SEQ ID NO:39的CDRL2和SEQ ID NO:40的CDRL3。抗CTLA4抗体的可变重链和可变轻链序列分别在SEQ ID NO:88和48中列出。将每种制剂以1mL填充到2-mL的1型玻璃小瓶中。总共填充了36个用于制剂A1的小瓶和19个用于制剂A2的小瓶。每种制剂的目标pH为5.5。

[0328] 表10:抗CTLA4抗体制剂

制剂编号	说明				
A1	抗 CTLA4 抗体 (50mg/mL)	10mM 的 L-组氨酸缓冲液	7%蔗糖 (w/v)	0.02% PS80 (w/v)	10mM L-Met
A2	抗 CTLA4	10mM	7%蔗糖	0.02%	NA
	抗体 (50mg/mL)	的 L-组氨酸缓冲液	糖 (w/v)	PS80 (w/v)	

[0331] 然后将小瓶在三种不同的存储条件下孵育:5℃ (环境湿度)、25℃ (60%相对湿度)和40℃ (75%相对湿度)。数据收集如下:

[0332] 在室温下,在0.2X ICH;0.5X ICH;和1X ICH下,在玻璃小瓶中使用1mL A1和A2液体制剂进行光稳定性研究。

[0333] 通过使用280nm处的UV吸收来测量蛋白质浓度。

[0334] 将样品平衡至室温,并以分光光度法在350nm处的吸光度对样品进行浊度研究(A350)。

[0335] 通过尺寸排阻色谱法 (SEC) 评估样品的纯度,其中确定单体的百分比,以及确定高分子量种类 (HMW) 和晚洗脱峰 (LMW种类) 的百分比。通过在流动相 (50mM磷酸钠,450mM精氨酸单盐酸盐,pH 7.0) 中将样品稀释至5.0mg/mL,进行超高效-尺寸排阻色谱法 (UP-SEC)。将稀释后的样品注入 (6μL) 到装备有Waters BEH200柱和UV检测器的UPLC中。样品中的蛋白质按大小分离,并通过280nm处的UV吸收进行检测。

[0336] 进行离子交换色谱法以评估化学稳定性并监测电荷变化曲线随时间的变化。使用Dionex ProPac WCX-10柱和280nm处的UV检测器进行离子交换HPLC方法。将样品在纯净水中稀释,然后注入80μg进行分析。用于热稳定性样品的IEX分析的流动相为以下流动相的梯度(流动相A:20mM MOPS,pH 7.2;流动相B:50mM磷酸钠,60mM氯化钠pH 8.0)。使用从20mM MOPS(pH 7.2)到50mM磷酸钠,60mM NaCl,pH 8.0的流动相梯度进行测定。UV检测在280nm进行。这些方法被认为是等效的,结果以基于色谱图总面积的相对百分比呈现。

[0337] 通过Lys-C消化进行肽谱。样品以30u1/样品注入Q Exactive。数据分析由PinPoint软件完成。

[0338] 研究结果列于下表:

[0339] 表11

[0340]

储存条件	5°C			
制剂	<u>制剂 A1</u> (含 L-蛋氨酸)			
时间(周)	0	4	8	12
pH	5.7	5.7	5.7	NT
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	54.8	54.1	53.7	NT
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.135	0.135	0.133	NT
UPSEC				
高分子量种类 (%)	1.07	1.11	1.13	1.16
低分子量峰 (%)	0.06	0.10	0.07	0.01
单体 (%)	98.9	98.8	98.8	98.8
HP-IEX				
酸性变体 (%)	21.79	21.85	23.08	22.88
碱性变体 (%)	10.79	9.89	9.94	10.60
主成分 (%)	67.4	68.3	67.0	66.5
肽谱				
% LC-M4 氧化	0.1	NT	NT	NT
% HC-M34 氧化	0.3	NT	NT	NT
% HC-M250 氧化	2.3	NT	NT	NT
% HC-M426 氧化	0.8	NT	NT	NT

[0341] 表12

[0342]

储存条件	5°C			
制剂	<u>制剂 A2</u> 不含 L-蛋氨酸			
时间 (周)	0	4	8	12
pH	5.7	5.7	5.7	NT <sup>1</sup>
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	53.6	54.3	54.0	NT
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.132	0.135	0.132	NT



[0343]

储存条件	5°C			
制剂	制剂 A2 不含 L-蛋氨酸			
时间 (周)	0	4	8	12
UPSEC				
高分子量种类 (%)	1.06	1.13	1.8	NT
低分子量峰 (%)	0.05	0.06	0.07	NT
单体 (%)	98.9	98.8	98.8	NT
HP-IEX				
酸性变体 (%)	21.94	23.20	22.97	NT
碱性变体 (%)	8.67	8.94	11.95	NT
主成分(%)	69.4	67.8	65.1	NT
肽谱				
% LC-M4 氧化	0.1	NT	NT	NT
% HC-M34 氧化	0.3	NT	NT	NT
% HC-M250 氧化	2.3	NT	NT	NT
% HC-M426 氧化	1.1	NT	NT	NT

[0344] 表13:

[0345]

储存条件	25°C			
制剂	制剂 1 含 L-蛋氨酸			
时间 (周)	0	4	8	12
pH	5.7	5.7	5.7	NT
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	54.8	54.6	53.8	NT
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.135	0.139	0.143	NT
UPSEC				
高分子量种类 (%)	1.07	1.20	1.24	1.22
低分子量峰 (%)	0.06	0.14	0.23	0.18

[0346]

储存条件	25°C			
制剂	<u>制剂 1</u> 含 L-蛋氨酸			
时间 (周)	0	4	8	12
单体 (%)	98.9	98.7	98.5	98.6
<b>HP-IEX</b>				
酸性变体 (%)	21.79	23.48	26.53	28.85
碱性变体 (%)	10.79	8.95	11.94	11.79
主成分 (%)	67.4	67.6	61.5	59.4
<b>肽谱</b>				
% LC-M4 氧化	0.1	NT	NT	NT
% HC-M34 氧化	0.3	NT	NT	NT
% HC-M250 氧化	2.3	NT	NT	NT
% HC-M426 氧化	0.8	NT	NT	NT

[0347] 表14

[0348]

储存条件	25°C			
制剂	<u>制剂 A2</u> 不含 L-蛋氨酸			
时间 (周)	0	4	8	12
pH	5.7	5.8	5.8	NT
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	53.6	54.8	54.2	NT
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.132	0.142	0.142	NT
<b>UPSEC</b>				
高分子量种类 (%)	1.06	1.24	1.33	1.30
低分子量峰 (%)	0.05	0.14	0.25	0.17
单体 (%)	98.9	98.6	98.4	98.5
<b>HP-IEX</b>				
酸性变体 (%)	21.94	25.28	26.91	29.69
碱性变体 (%)	8.67	10.97	11.91	12.01

[0349]

储存条件	25°C			
制剂	制剂 A2 不含 L-蛋氨酸			
时间 (周)	0	4	8	12
主成分 (%)	69.4	63.8	61.2	58.3
肽谱				
% LC-M4 氧化	0.1	NT	NT	NT
% HC-M34 氧化	0.3	NT	NT	NT
% HC-M250 氧化	2.3	NT	NT	NT
% HC-M426 氧化	1.1	NT	NT	NT

[0350] 表15

[0351]

储存条件	40°C			
制剂	制剂 A1 含 L-蛋氨酸			
时间 (周)	0	4	8	12
pH	5.7	5.7	5.7	NT
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	54.8	54.8	54.2	NT
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.135	0.156	0.183	NT
UPSEC				
高分子量种类 (%)	1.07	1.22	1.29	1.64
低分子量峰 (%)	0.06	0.53	0.96	2.32
单体 (%)	98.9	98.2	97.7	96.0
HP-IEX				
酸性变体 (%)	21.79	36.96	49.35	61.09
碱性变体 (%)	10.79	11.74	13.82	12.51
主成分 (%)	67.4	51.3	36.8	26.4
肽谱				
% LC-M4 氧化	0.1	NT	0.2	NT

[0352]

储存条件	40°C			
制剂	制剂 A1 含 L-蛋氨酸			
时间 (周)	0	4	8	12
% HC-M34 氧化	0.3	NT	0.4	NT
% HC-M250 氧化	2.3	NT	2.6	NT
% HC-M426 氧化	0.8	NT	1.0	NT

[0353] 表16

[0354]

储存条件	40°C			
制剂	制剂 A2 不含 L-蛋氨酸			
时间 (周)	0	4	8	12
pH	5.7	5.8	5.8	NT
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	53.6	54.9	54.2	NT
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.132	0.168	0.212	NT
UPSEC				
高分子量种类 (%)	1.06	1.37	1.54	1.62
低分子量峰 (%)	0.05	0.58	1.04	2.27
单体 (%)	98.9	98.1	97.5	96.1
HP-IEX				
酸性变体 (%)	21.94	38.15	51.39	62.84
碱性变体 (%)	8.67	14.43	12.87	12.44
主成分 (%)	69.4	47.4	35.7	24.7
肽谱				
% LC-M4 氧化	0.1	NT	0.2	NT
% HC-M34 氧化	0.3	NT	0.3	NT
% HC-M250 氧化	2.3	NT	5.0	NT
% HC-M426 氧化	1.1	NT	2.0	NT

[0355] 表17

[0356]

制剂	制剂 A1 含 L-蛋氨酸						
	T0	温度	搅拌 <sup>1</sup>		光稳定性 (ICH)		
			1d	3d	0.2X	0.5X	1X
pH	5.7	5.8	5.8	5.8	5.7	5.7	5.7
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	54.8	54.8	54.3	53.2	54.5	55.2	53.8
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.13 5	0.13 3	0.132	0.13 3	0.181	0.248	0.412
UPSEC							
高分子量种类 (%)	1.07	1.10	1.08	1.11	1.58	2.13	3.06
低分子量峰 (%)	0.06	0.06	0.05	0.06	0.16	0.26	0.45
单体 (%)	98.9	98.8	98.9	98.8	98.3	97.6	96.5
HP-IEX							
酸性变体 (%)	21.7 9	22.6 5	23.08	22.7 3	26.19	25.89	37.26
碱性变体 (%)	10.7 9	11.5 0	10.84	11.1 5	20.75	20.48	30.92
主成分 (%)	67.4	65.9	66.1	66.1	53.1	53.6	31.8
肽谱							
% LC-M4 氧化	0.1	NT	NT	NT	0.3	0.4	0.8
% HC-M34 氧化	0.3	NT	NT	NT	0.4	0.4	0.4
% HC-M250 氧化	2.3	NT	NT	NT	10.7	18.8	31.6
% HC-M426 氧化	0.8	NT	NT	NT	7.2	13.7	25.8

[0357] 表18

[0358]

制剂	制剂 A1 含 L-蛋氨酸						
	T0	搅拌 <sup>1</sup>	光稳定性 (ICH)				
			1d	3d	0.2X	0.5X	1X
应力							
pH	5.7	NT	NT	NT	5.7	5.7	5.6
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	53.6	NT	NT	NT	53.9	53.8	54.3
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.13 2	NT	NT	NT	0.18 7	0.27 2	0.466
UPSEC							
高分子量种类 (%)	1.06	NT	NT	NT	1.77	2.48	3.72
低分子量峰 (%)	0.05	NT	NT	NT	0.16	0.28	0.61
单体 (%)	98.9	NT	NT	NT	98.1	97.3	95.9
HP-IEX							
酸性变体 (%)	21.9 4	NT	NT	NT	27.8 1	32.3 6	38.17
碱性变体 (%)	8.67	NT	NT	NT	22.0 5	29.0 6	34.19
主成分 (%)	69.4	NT	NT	NT	50.1	38.6	27.6
肽谱							
% LC-M4 氧化	0.1	NT	NT	NT	0.3	0.4	0.7
% HC-M34 氧化	0.3	NT	NT	NT	0.3	0.3	0.4
% HC-M250 氧化	2.3	NT	NT	NT	13.3	24.9	43.2
% HC-M426 氧化	1.1	NT	NT	NT	9.0	18.9	33.7

[0359] 结果

[0360] 对于研究的条件和持续时间,如280nm处的UV吸光度所测量的,制剂之间的蛋白质浓度没有可测量的变化。

[0361] 对于所测试的条件和研究的持续时间,制剂之间的pH没有可测量的变化。

[0362] 浊度 (A<sub>350</sub>) 数据如图1A和图1B所示。在40℃下,两种制剂在长达8周的时间点均显示出浊度增加的趋势。对于这两种制剂,在25℃和5℃下,浊度在长达8周的时间点均没有实质变化。如图2中所示,与制剂A1相比,在所有光应力条件下,制剂A2表现出稍微更多(但一

致)的浊度增加。与对照(T0)样品相比,将制剂A1样品进行冻融(高达5X)或搅拌应力(300rpm,长达3天)的处理均不会改变样品浊度。制剂A2没有经受冻融或搅拌应力。因此,基于浊度数据,含有L-蛋氨酸的制剂A1是稍微优选的。

[0363] 如图3A、3B、4A和4B所示,UP-SEC分析样品以确定HMW百分比和单体百分比表明,在40℃下,两种制剂在长达12周的时间点均显示出%HMW峰和%LMW峰增加(以及相应的%单体峰降低)的趋势。在25℃下,与40℃相比,两种制剂均显示出相似的趋势,但变化较小。在5℃下,未观察到实质变化。如图5所示,与制剂A1相比,在所研究的所有光应力条件下,制剂A2显示出%HMW的稍微更多但一致的增加(和相应地%单体的稍微更多但一致的减少)。与对照(T0)样品相比,将制剂A1样品进行冻融(高达5X)或搅拌应力(300rpm,长达3天)的处理均不会改变%HMW或%单体(参见图5和图6)。制剂A2没有经受冻融或搅拌应力。因此,基于UP-SEC数据,含有L-蛋氨酸的制剂A1是稍微优选的。

[0364] 如图7A、7B、8A、8B、9A和9B所示,HP-IEX数据表明,在40℃下,两种制剂在长达12周的时间点均显示出%酸性峰和%碱性峰增加的趋势,以及相应的%主峰降低的趋势。在25℃下,与40℃相比,两种制剂均显示出相似的趋势,但变化较小。在5℃下,除了制剂A2的8周的时间点外,没有观察到制剂1或制剂2有实质变化,其中观察到%碱性峰的小增加和相应的%主峰的小减少。由于未测试制剂A2样品,因此无法在12周/5℃时间点确认这一趋势。如图10-12所示,在所有光应力条件下,制剂A2显示出%酸性峰和%碱性峰的稍微更多但一致的增加(和相应地%主峰的稍微更多但一致的减少),以及%主峰的相应降低(与制剂A1相比)。也如图10-12所示,与对照(T0)样品相比(制剂2未经受冻融或搅拌应力),将制剂A1样品进行冻融(高达5X)或搅拌应力(300rpm,长达3天)的处理均不会改变%酸性峰、%碱性峰或%主峰。因此,基于HP-IEX数据,含有L-蛋氨酸的制剂A1是稍微优选的。

[0365] 单克隆抗体经常在CDR区和Fc区中具有蛋氨酸残基,其可能在光应力下易于氧化。对于抗CTLA4抗体,LC-M4、HC-M34、HC-M250和HC-M426可能在光应力下易于氧化。进行了肽谱研究以确定这些残基在40℃或.2X/0.5X/1X ICH光应力处理下暴露8周后氧化水平的变化。

[0366] 肽谱研究的结果显示了残基LC-M4、HC-M34、HC-M250和HC-M426的氧化百分比,分别呈现在图13、图14、图15和图16中。

[0367] 如图13-16所示,在光应力条件下,某些蛋氨酸残基的氧化增加。值得注意的是,两种制剂中的残基HC-M250和HC-M426在0.5X和1X ICH光应力处理后均显示出显著的氧化水平增加。然而,与不含L-蛋氨酸的制剂A2相比,在制剂A1中存在10mM L-蛋氨酸导致M250和M426的氧化水平增加较小。因此,基于肽谱数据,制剂1(含L-Met)似乎稍微优选。

[0368] 基于上述研究的分析数据的比较,与制剂A1相比,制剂A1表现出(i)所有光应力条件下的浊度增加,(ii)所有光应力条件下的聚集体水平(%HMW)增加较低,(iii)所有光应力条件下的%主峰降低稍微较小但一致,并且(iv)光应力后残基HC M250和HC M426的氧化水平增加较低。

[0369] 实施例2

[0370] 抗CTLA4抗体制剂缓冲液筛选

[0371] 这项研究比较了抗CTLA4抗体在两种不同的可行(viable)制剂缓冲液(L-组氨酸和乙酸盐)中在蔗糖、聚山梨酯80和L-蛋氨酸存在下的稳定性,该抗体包含SEQ ID NO:

88的重链可变区和包含SEQ ID NO:48的轻链可变区。测量了两种制剂的蛋白质间相互作用(指示胶体和热稳定性)(在L-组氨酸和乙酸盐缓冲液中,如下所示)。如正扩散相互作用参数( $K_D$ )值( $K_D > 0$ )所示,排斥性蛋白质间相互作用表明一种具有较低的聚集倾向的稳定制剂。对两种制剂在三种不同pH(pH 5、5.5和6)下的 $K_D$ 分别进行至少三次测量( $N=3$ )以获得标准偏差。基于蛋白质间相互作用(数据未显示或图Y),抗CTLA4抗体在5.0-6.0的pH范围内,在L-组氨酸和乙酸盐缓冲液中均是稳定的。因此,将这两种制剂分别在pH 5.5下在5℃、25℃和40℃下置于(placed)额外的热稳定性。

[0372] 为了评估所述制剂的稳定性,评估以下压力对两种抗CTLA4制剂(L-组氨酸缓冲液和乙酸盐缓冲液)的影响:

[0373] (1) 在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$  (环境湿度)、 $25^\circ\text{C}$  (60%相对湿度)、 $40^\circ\text{C}$  (75%相对湿度)下-长达3个月的热应力。

[0374] (2) 处于水平位置(300rpm,持续3天)的搅拌应力

[0375] (3) 冻融应力(在 $-80^\circ\text{C}$ 至 $18-22^\circ\text{C}$  (室温下融化4小时)的五个冻融循环)。

[0376] (4) 光应力(在 $0.2\times$  ICH、 $0.5\times$  ICH、 $1\times$  ICH下的ICH条件)。

[0377] 基于所述数据,抗CTLA4抗体在L-组氨酸缓冲液和乙酸盐缓冲液中均是稳定的。

[0378] 材料和方法

[0379] 使用具有以下CDR的抗CTLA4抗体制备以下液体制剂: IgG1主链上的SEQ ID NO:35的HCDR1、SEQ ID NO:36的HCDR2、SEQ ID NO:37的HCDR3、SEQ ID NO:38的LCDR1、SEQ ID NO:39的LCDR2和SEQ ID NO:40的LCDR3。将每种制剂以1mL填充到2mL的1型玻璃小瓶中。总共为两种制剂各自生产了72个批次。下表列出了两种制剂的组成。加入7% (w/v) 的蔗糖作为稳定剂;PS-80为具有抵抗搅拌引起的应力的稳定性的表面活性剂;并且L-蛋氨酸为抗氧化剂,因为它在光应力条件下减少蛋氨酸氧化(参见上述实施例1)。

[0380] 表19:制剂

[0381]	制剂编号	说明				
	B1	抗 CTLA4 抗体	10mM L-组氨	7% (w/v)	0.02% (w/v)	10mM L-蛋氨
[0382]	B2	(50mg/mL)	酸缓冲 液	蔗糖	聚山梨 酯 80	酸
		抗 CTLA4 抗体 (50mg/mL)	10mM 乙酸盐	7% (w/v) 蔗糖	0.02% (w/v) 聚山梨 酯 80	10mM L-蛋氨 酸

[0383] 然后将小瓶在三种不同的存储条件下孵育: $5^\circ\text{C}$  (环境湿度)、 $25^\circ\text{C}$  (60%相对湿度)



和40℃ (75%相对湿度)。数据收集如下:

[0384] 表20:制剂B1的时间表

							搅拌 (300 RPM)		光(ICH)		
	最初	2-周	4-周	6-周	8-周	冻融					
[0385]									X	X	X
5C	X		X		X	X	X	X	(0.2)	(0.5)	(1)
25C			X		X						
40C		X	X	X	X						

[0386] 表21:制剂B2的时间表

							搅拌 (300 RPM)		光 (ICH)		
	最初	2-周	4-周	6-周	8-周	冻融					
[0387]									X	X	X
5C	X		X		X				(0.2)	(0.5)	(1)
25C			X		X						
40C			X	X	X						

[0388] 在室温下,在0.2X ICH;0.5X ICH;和1X ICH下,在玻璃小瓶中使用1mL B1和B2液体制剂进行光稳定性研究。

[0389] 通过使用280nm处的UV吸收来测量蛋白质浓度。

[0390] 将样品平衡至室温,并以分光光度法在350nm处的吸光度对样品进行浊度研究(A350)。

[0391] 通过尺寸排阻色谱法 (SEC) 评估样品的纯度,其中确定单体的百分比,以及确定高分子量种类 (HMW) 和晚洗脱峰 (LMW种类) 的百分比。通过在流动相 (50mM磷酸钠,450mM精氨酸单盐酸盐,pH 7.0) 中将样品稀释至5.0mg/mL,进行超高效-尺寸排阻色谱法 (UP-SEC)。将稀释后的样品注入 (6μL) 到装备有Waters BEH200柱和UV检测器的UPLC中。样品中的蛋白质按大小分离,并通过280nm处的UV吸收进行检测。

[0392] 进行离子交换色谱法以评估化学稳定性并监测电荷变化曲线随时间的变化。使用Dionex ProPac WCX-10柱和280nm处的UV检测器进行离子交换HPLC方法。将样品在纯净水中稀释,然后注入80μg进行分析。用于热稳定性样品的IEX分析的流动相为以下流动相的梯度(流动相A:20mM MOPS,pH 7.2;流动相B:50mM磷酸钠,60mM氯化钠pH 8.0)。使用从20mM MOPS,pH 7.2到50mM磷酸钠,60mM NaCl,pH 8.0的流动相梯度进行测定。UV检测在280nm进行。这些方法被认为是等效的,结果以基于色谱图总面积的相对百分比呈现。

[0393] 通过Lys-C消化进行肽谱。样品以30u1/样品注入Q Exactive。数据分析由PinPoint软件完成。

[0394] 研究结果列于下表：

[0395] 表22

[0396]

储存条件	5°C					
制剂	<u>制剂 B1</u> (L-组氨酸缓冲液)			<u>制剂 B2</u> (乙酸盐缓冲液)		
时间 (周)	0	4	8	0	4	8
pH	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	48.5	48.9	49.5	49.2	48.9	49.5

[0397]

储存条件	5°C					
制剂	<u>制剂 B1</u> (L-组氨酸缓冲液)			<u>制剂 B2</u> (乙酸盐缓冲液)		
时间 (周)	0	4	8	0	4	8
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.071	0.069	0.068	0.068	0.07 1	0.067
HPSEC						
高分子量种类 (%)	1.17	1.20	1.24	1.15	1.19	1.17
低分子量峰 (%)	ND	ND	0.01	ND	ND	ND
单体 (%)	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8
HP-IEX						
酸性变体 (%)	13.15	13.11	13.25	13.05	13.0 7	13.12
碱性变体 (%)	12.65	12.75	12.71	12.74	12.8 1	12.79
主成分 (%)	74.2	74.1	74.0	74.2	74.1	74.1
肽谱						
% LC-M4 氧化	0.1	NT	NT	0.1	NT	NT
% HC-M34 氧化	0.2	NT	NT	0.2	NT	NT
% HC-M250 氧化	1.2	NT	NT	1.3	NT	NT
% HC-M426 氧化	0.6	NT	NT	0.6	NT	NT

[0398] 表23

[0399]

储存条件	25°C					
制剂	<u>制剂 B1</u> (L-组氨酸缓冲液)			<u>制剂 B2</u> (乙酸盐缓冲液)		
时间 (周)	0	4	8	0	4	8
pH	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	48.5	49.1	49.2	49.2	49.0	49.5

[0400]

储存条件	25°C					
制剂	<u>制剂 B1</u> (L-组氨酸缓冲液)			<u>制剂 B2</u> (乙酸盐缓冲液)		
时间 (周)	0	4	8	0	4	8
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.071	0.071	0.074	0.068	0.06 9	0.073
HPSEC						
高分子量种类 (%)	1.17	1.28	1.34	1.15	1.29	1.33
低分子量峰 (%)	ND	0.06	0.12	ND	0.06	0.11
单体 (%)	98.8	98.7	98.6	98.8	98.7	98.6
HP-IEX						
酸性变体 (%)	13.15	15.10	17.50	13.05	15.7 3	18.77
碱性变体 (%)	12.65	13.39	13.87	12.74	13.4 1	13.96
主成分 (%)	74.2	71.5	68.6	74.2	70.9	67.3
肽谱						
% LC-M4 氧化	0.1	NT	NT	0.1	NT	NT
% HC-M34 氧化	0.2	NT	NT	0.2	NT	NT
% HC-M250 氧化	1.2	NT	NT	1.3	NT	NT
% HC-M426 氧化	0.6	NT	NT	0.6	NT	NT

[0401] 表24

[0402]

储存条件	40°C					
制剂	制剂 B1 (L-组氨酸缓冲液)			制剂 B2 (乙酸盐缓冲液)		
时间 (周)	0	4	8	0	4	8
pH	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6

[0403]

储存条件	40°C					
制剂	制剂 B1 (L-组氨酸缓冲液)			制剂 B2 (乙酸盐缓冲液)		
时间 (周)	0	4	8	0	4	8
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	48.5	48.7	49.3	49.2	48.8	49.4
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.071	0.081	0.101	0.068	0.08 5	0.094
HPSEC						
高分子量种类 (%)	1.17	1.34	1.47	1.15	1.42	1.60
低分子量峰 (%)	ND	0.65	1.47	ND	0.58	1.38
单体 (%)	98.8	98.0	97.0	98.8	98.0	97.0
HP-IEX						
酸性变体 (%)	13.15	29.60	44.85	13.05	32.8 3	49.48
碱性变体 (%)	12.65	15.77	15.55	12.74	15.0 3	14.74
主成分 (%)	74.2	54.6	39.6	74.2	52.1	35.8
肽谱						
% LC-M4 氧化	0.1	NT	0.1	0.1	NT	0.1
% HC-M34 氧化	0.2	NT	0.2	0.2	NT	0.2
% HC-M250 氧化	1.2	NT	1.4	1.3	NT	1.7
% HC-M426 氧化	0.6	NT	0.7	0.6	NT	0.7

[0404] 表25

[0405]

制剂	制剂 B1 (L-组氨酸缓冲液)						
应力	T0	冻融	搅拌		光稳定性 (ICH)		
			1d	3d	0.2X	0.5X	1X

[0406]

制剂	制剂 B1 (L-组氨酸缓冲液)						
应力	T0	冻融	搅拌		光稳定性 (ICH)		
			1d	3d	0.2X	0.5X	1X
pH	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5
浓度 (mg/mL) (A <sub>280</sub> nm)	48.5	49.6	49.0	49.4	49.2	49.2	49.6
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.07 1	0.069	0.06 7	0.07	0.08 1	0.13 7	0.193
HPSEC							
高分子量种类 (%)	1.17	1.19	1.20	1.20	1.62	2.00	3.01
低分子量峰 (%)	ND	ND	ND	0.01	0.02	0.07	0.16
单体 (%)	98.8	98.8	98.8	98.8	98.4	97.9	96.8
HP-IEX							
酸性变体 (%)	13.1 5	13.29	13.1 9	13.3 0	15.5 3	18.3 6	23.66
碱性变体 (%)	12.6 5	12.91	12.7 5	12.8 9	19.7 0	25.8 5	34.22
主成分 (%)	74.2	73.8	74.1	73.8	64.8	55.8	42.1
肽谱							
% LC-M4 氧化	0.1	NT	NT	NT	0.2	0.3	0.6
% HC-M34 氧化	0.2	NT	NT	NT	0.3	0.3	0.4
% HC-M250 氧化	1.2	NT	NT	NT	6.2	11.5	22.7
% HC-M426 氧化	0.6	NT	NT	NT	4.6	8.8	18.8

[0407] 表26

[0408]

制剂	制剂 B2 (乙酸盐缓冲液)						

[0409]

应力	T0	冻融	搅拌		光稳定性 (ICH)		
			1d	3d	0.2X	0.5X	1X
pH	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
浓度 (mg/mL)	49.1						
(A <sub>280</sub> nm)	8	49.4	49.1	48.8	49.0	49.1	49.6
浊度 (A <sub>350</sub> nm)	0.06		0.06	0.06	0.07	0.09	0.11
	8	0.066	6	9	5	5	0
HPSEC							
高分子量种类 (%)	1.15	1.18	1.16	1.16	2.00	3.12	4.69
低分子量峰 (%)	ND	ND	ND	ND	0.02	0.09	0.17
单体 (%)	98.8	98.8	98.8	98.8	98.0	96.8	95.1
HP-IEX							
酸性变体 (%)	13.0		13.1	13.1	14.3	16.3	18.3
	5	13.17	6	5	0	9	3
碱性变体 (%)	12.7		12.8	12.7	22.0	30.8	39.9
	4	13.12	9	0	7	7	3
主成分 (%)	74.2	73.7	74.0	74.1	63.6	52.7	41.7
肽谱							
% LC-M4 氧化	0.1	NT	NT	NT	0.3	0.5	0.8
% HC-M34 氧化	0.2	NT	NT	NT	0.3	0.4	0.5
% HC-M250 氧化	1.3	NT	NT	NT	7.9	16.0	29.1
% HC-M426 氧化	0.6	NT	NT	NT	6.2	12.5	26.1

[0410] 对于研究的条件和持续时间,如280nm处的UV吸光度所测量的,制剂之间的蛋白质浓度没有可测量的变化。

[0411] 对于所测试的条件和研究的持续时间,制剂之间的pH没有可测量的变化。

[0412] 浊度 (A350) 数据显示在图17A、图17B和图18中。比较数据后,发现在40℃下,两种

制剂在长达8周的时间点均显示出浊度增加的趋势。在25℃和5℃下,两种制剂在长达8周的时间点均没有显示出浊度的实质变化。如图14所示,还观察到与制剂B2相比,制剂B1在光应力条件(0.5X ICH和1X ICH)后显示出稍微更多但一致的浊度增加。与对照(T0)样品相比,将样品进行冻融(高达5X)或搅拌应力(300rpm,长达3天)的处理均不会改变样品浊度。

[0413] 如图19A、19B、20A和20B所示,UP-SEC分析样品以确定HMW百分比和单体百分比表明,在40℃下,两种制剂在长达8周的时间点均显示出%HMW峰和%LMW峰增加(以及相应的%单体峰降低)的趋势。在25℃下,与40℃相比,两种制剂均显示出相似的趋势,但变化较小。在5℃下,未观察到实质变化。如图21和22所示,与制剂B1相比,在所研究的所有光应力条件下,制剂B2显示出%HMW的稍微更多(但一致)的增加(和相应地%单体的稍微更多但一致的减少)。与对照(T0)样品相比,将样品进行冻融(高达5X)或搅拌应力(300rpm,长达3天)的处理均不会改变%HMW或%单体(图21和22)。

[0414] 如图23A、23B、24A、24B、25A和25B所示,HP- IEX数据表明在40℃下,两种制剂在长达8周的时间点均显示出%酸性峰和%碱性峰增加的趋势,以及相应的%主峰降低的趋势。然而,与制剂B1相比,制剂B2显示出%主峰的稍微更多但一致的降低。在25℃下,与40℃相比,两种制剂均显示出相似的趋势,但变化较小。如图26、27和28所示,在光应力条件(0.5X ICH和1X ICH)后,制剂B1显示出%酸性峰的稍微更多但一致的增加,而制剂B2则显示出%碱性峰的稍微更多(但一致)的增加。然而,两种制剂的%主峰的相应降低是可比较的。与对照(T0)样品相比,将样品进行冻融(高达5X)或搅拌应力(300rpm,长达3天)的处理均不会改变%酸性峰、%碱性峰或%主峰(图26-28)。

[0415] 进行了肽谱研究以确定这些残基在40℃或.2X/0.5X/1X ICH光应力处理下暴露8周后氧化水平的变化。

[0416] 肽谱研究的结果分别显示了残基LC-M4、HC-M34、HC-M250和HC-M426的氧化百分比,分别呈现在图29、图30、图31和图32中。

[0417] 如图29-32所示,在光应力条件下,某些蛋氨酸残基的氧化增加。值得注意的是,两种制剂中的残基HC-M250和HC-M426在0.5X和1X ICH光应力处理后显示出显著的氧化水平增加。然而,与制剂B2相比,制剂B1导致M250和M426的氧化水平的较小增加。

[0418] 基于上述研究的分析数据的比较,与制剂B2(乙酸盐缓冲液)相比,制剂B1(L-组氨酸缓冲液)表现出(i)所有光应力条件的聚集体水平(%HMW)增加较低,(ii)在40℃下%主峰降低稍微较小但一致,并且(iii)光应力后残基HC M250和HC M426的氧化水平增加较低。因此,基于蛋白质间相互作用数据和稳定性数据,显示出抗CTLA4抗体在L-组氨酸缓冲液和乙酸盐缓冲液中均是稳定的。

[0419] 实施例3

[0420] 抗CTLA4抗体和抗PD-1抗体的共制剂。

[0421] 将两种抗体共同配制为单一制剂对患者而言更为方便,并提高了患者的依从性。基于蛋白质间相互作用(如下所示),发现所有共制剂(如下所示)在pH 5.0-6.0范围内均是稳定的。因此,选择了三种pH为5.5的共制剂(P1C1、P1C2和P2C1),并与两种对照(抗PD1和抗CTLA4)一起在5℃、25℃和40℃下置于额外的热稳定性。

[0422] 这项研究评估了与派姆单抗以如下所示的不同浓度共同配制的IgG1骨架上具有以下CDR的抗CTLA4抗体的稳定性:SEQ ID NO:35的HCDR1,SEQ ID NO:36的HCDR2,SEQ ID

NO:37的HCDR3,SEQ ID NO:38的LCDR1,SEQ ID NO:39的LCDR2和SEQ ID NO:40的LCDR3:

[0423] 表27

[0424]	<u>共制剂</u>	<u>派姆单抗/</u> <u>抗 CTLA4 比例</u> <u>(w/w)</u>	<u>派姆单抗</u>	<u>抗 CTLA4</u> <u>抗体</u>	<u>总浓度</u>
--------	------------	---	-------------	-----------------------------	------------

	<b>P2C1</b>	2:1	25mg/mL	12.5mg/mL	37.5mg/mL
	<b>P1C1</b>	1:1	25mg/mL	25mg/mL	50mg/mL
	<b>P1C2</b>	1:2	25mg/mL	50mg/mL	75mg/mL
	<b>P1C10</b>	1:10	22.72mg/mL	2.3mg/mL	25mg/mL
[0425]	<b>P10C1</b>	1:10	2.27mg/mL	22.7mg/mL	25mg/mL
	<b>P1 (对照)</b>	1:0	25mg/mL	无	25mg/mL
	<b>C1 (对照)</b>	0:1	无	50mg/mL	50mg/mL
	<b>25/200</b>	8:1	23.5mg/mL	2.9mg/mL	26.4mg/mL
	<b>75/200</b>	8:3	21.1mg/mL	7.9mg/mL	29.0mg/mL

[0426] 如下将制剂制备为液体制剂:

[0427] 表28



[0428]

制剂	缓冲液	pH	抗冻剂/张力调节剂	表面活性剂	抗氧化剂
<b>P2C1</b>	L-组氨酸 (10mM)	5, 5.5, 6	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	10mM L-蛋氨酸
<b>P1C1</b>	L-组氨酸 (10mM)	5, 5.5, 6	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	10mM L-蛋氨酸
<b>P1C2</b>	L-组氨酸 (10mM)	5, 5.5, 6	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	10mM L-蛋氨酸

[0429]

	(10mM)				
<b>P1C10</b>	L-组氨酸 (10mM)	5, 5.5, 6	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	10mM L-蛋氨酸
<b>P10C1</b>	L-组氨酸 (10mM)	5, 5.5, 6	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	10mM L-蛋氨酸
<b>P1 (对照)</b>	L-组氨酸 (10mM)	5, 5.5, 6	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	10mM L-蛋氨酸
<b>C1 (对照)</b>	L-组氨酸 (10mM)	5, 5.5, 6	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	10mM L-蛋氨酸

[0430] 将每种制剂以1mL填充到2R小瓶中。通过肉眼检查、PD350的浊度、蛋白质浓度、微流成像(MFI)(颗粒评估)、混合模式尺寸排阻色谱法(SEC)(聚集评估)、cIEF(电荷变体评估)、IEX(电荷变体评估)和UP-SEC(聚集评估)来测量稳定性。由于抗CTLA4和抗PD1在UP-SEC中共洗脱,因此对于共制剂,抗PD1和抗CTLA4通过混合模式SEC分离以评估共制剂的稳定性。pH 5.5的共制剂用于热稳定性研究。热稳定性方案如下:

[0431] 表29

	T0	1 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	Extra
[0432]	5°C (环境湿度)	3 组合+ 2 单独	3 组合+ 2 单独	3 组合+ 2 单独	3 组合	3 组合+ 2 单独	9 组合+ 9 单独
[0433]	25°C (60%相对湿度)	3 组合+ 2 单独	3 组合+ 2 单独	3 组合+ 2 单独	3 组合	3 组合+ 2 单独	N/A
	40°C (75%相对湿度)	3 组合+ 2 单独	3 组合+ 2 单独	3 组合+ 2 单独	N/A	N/A	N/A

[0434] 测量不同共制剂的指示胶体和热稳定性的蛋白间相互作用(3种共制剂和2种对照)。如正扩散相互作用参数( $K_D$ )值 $K_D > 0$ 所示,排斥性蛋白质间相互作用表明一种具有较低的聚集倾向的稳定制剂。对所有制剂在此处的不同pH值(pH 5.0、5.5和6.0)下的 $K_D$ 进行至少三次测量以获得标准偏差。如图33所示,组合P1C1、P2C2和P1C2在三种pH值的每一个下均是稳定的,因为所有共制剂的 $K_D$ 值均为正。与富含CTLA4的组合(P1C2)相比,派姆单抗(PD1)和富含派姆单抗的组合(P2C1)在pH5.0下更稳定。富含CTLA4的组合(P1C2)在pH 5.0和pH 5.5下同样稳定。即,与具有更大比例的CTLA4的共制剂相比,具有更大比例的派姆单抗的共制剂在pH 5.0下更稳定,其在pH 5.0和5.5下同样稳定。

[0435] 12个月稳定性结果

[0436] 在十二个月时,在任何条件下均观察到总蛋白质浓度(由UV 280确定)没有太多变化(数据未显示)。

[0437] 浊度变化:按照以下顺序观察每种制剂长达12个月的浊度变化:5°C<25°C<40°C。在40°C下长达6个月数据的浊度变化率似乎与每种制剂中的总蛋白浓度成正比(数据未显示)。

[0438] 在所有条件下,所有制剂中的微粒数量(通过MFI测量)显得相当低(数据未显示)。微流(MFI)成像用于表征共同配制的样品。将一毫升样品吸到移液器吸头中,并轻轻地通过显微镜系统的流通池(景深为150微米)泵入(0.17mL/min),以通过数字相机进行颗粒计数和图像捕获。当样品通过流通池时,不间断地实时捕获亮场图像。分析结束时的输出为颗粒计数和颗粒浓度数据。还可以使用系统软件针对不同的形态参数(诸如大小、强度、透明度和形状)处理MFI图像。

[0439] 对于每种抗PD-1和抗CTLA4抗体,在较高温度(25℃和40℃)下观察到每种抗体的指示脱酰胺的%酸性电荷变体增加。使用Dionex ProPac WCX-10柱和280nm的UV检测器进行离子交换HPLC方法。将样品在纯净水中稀释,并注入80μg进行分析。用于热稳定性样品的IEX分析的流动相为以下流动相的梯度(流动相A:24mM MES pH 6,4%乙腈;流动相B:20mM NaPO<sub>4</sub>、95mM NaCl pH 8,4%乙腈)。下面列出了标准化的cIEF数据(初始、3个月和6个月)的概要:

[0440] 表30

[0441]

样品	aPD1 酸性	aPD1 主成分	aPD1 碱性	aCTL A 酸性	aCTLA 主成分	aCTL A 碱性
<b>P2C1</b> 最初	20.83	66.99	12.18	19.84	75.13	5.03
<b>P1C1</b> 最初	20.24	66.38	13.38	19.59	75.26	5.15
<b>P1C2</b> 最初	18.10	67.84	14.06	18.86	75.77	5.37
<b>P1</b> 最初	23.70	63.24	13.07			
<b>C1H</b> 最初				20.12	73.70	6.18
<b>P2C1</b> 3M5C	21.18	65.94	12.88	16.07	78.16	5.77
<b>P1C1</b> 3M5C	20.22	66.79	12.98	24.71	68.71	6.59
<b>P1C2</b> 3M5C	18.51	68.83	12.66	17.06	77.63	5.30
<b>P1</b> 3M5C	24.12	63.15	12.73			
<b>C1H</b> 3M5C				28.13	65.33	6.54
<b>P2C1</b> 3M25C	25.44	62.77	11.79	24.03	69.51	6.46
<b>P1C1</b> 3M25C	24.15	64.99	10.86	24.35	69.31	6.34

[0442]

<b>P1C2</b>	3M25C	24.63	65.60	9.77	29.18	64.52	6.30
<b>P1</b>	3M25C	28.97	60.41	10.62			
<b>C1H</b>	3M25C				27.23	65.63	7.14
<b>P2C1</b>	3M40C	59.56	36.14	4.30	23.94	39.68	36.38
<b>P1C1</b>	3M40C	59.24	36.22	4.54	62.92	31.53	5.55
<b>P1C2</b>	3M40C	56.68	39.25	4.07	63.29	31.17	5.55
<b>P1</b>	3M40C	43.81	50.20	5.99			
<b>C1H</b>	3M40C				60.31	34.14	5.55
<b>P2C1</b>	6M5C	21.57	35.69	7.08	7.29	25.82	2.55
<b>P1C1</b>	6M5C	15.98	38.73	9.64	10.69	22.35	2.6
<b>P1C2</b>	6M5C	16.62	26.47	7.65	14.02	31.67	3.59
<b>P1</b>	6M5C	36.84	49.21	13.94			
<b>C1H</b>	6M5C				27.56	67.01	5.45
<b>P2C1</b>	6M25C	20.09	29.69	6.34	13.71	27.5	2.67
<b>P1C1</b>	6M25C	28.35	29.98	8.46	13.17	18.09	1.95
<b>P1C2</b>	6M25C	21.9	21.66	5.41	21	26.15	3.87
<b>P1</b>	6M25C	45.43	46.07	8.52			
<b>C1H</b>	6M25C				35.46	57.47	7.05
<b>P2C1</b>	6M40C	56.37	7.93	2.3	27.97	5.44	0
<b>P1C1</b>	6M40C	38.81	16.47	9.93	9.039	10.94	9.37
<b>P1C2</b>	6M40C	28.56	4.33	2.74	55.77	6.7	1.93
<b>P1</b>	6M40C	83.33	12.15	4.53			
<b>C1H</b>	6M40C				89.15	8	2.86

[0443] 使用UPSEC和混合模式SEC测量聚集。尽管抗CTLA4和抗PD1抗体在UP-SEC中共洗脱,但它们通过混合模式SEC分离并可视化。HMW聚集体和LMW聚集体随温度增加。UP-SEC结果表明,在5℃和25℃下长达12个月检测到极低百分比的聚集体(%HMW)种类,与初始时间点相比没有重大变化。

[0444] 表31

[0445]

	HMW%			LMW%			主成分%		
样品	最初值 (T0)			最初值(T0)			最初值(T0)		
C1H	0.93			0			99.07		
P1	0.53			0			99.47		
P1C2	1.12			0			98.88		
P1C1	0.89			0			99.11		
P2C1	0.73			0			99.27		
样品	1M 5°C	1M 25°C	1M 40°C	1M 5°C	1M 25°C	1M 40°C	1M 5°C	1M 25°C	1M 40°C
C1H	0.93	1.21	0.80	0.00	0.08	0.47	99.1	99.1	98.7
P1	0.48	0.56	0.63	0.00	0.00	0.00	99.5	99.5	99.4
P1C2	0.95	0.99	1.68	0.00	0.00	0.32	98.9	99.1	99.0
P1C1	0.71	0.79	1.33	0.00	0.00	0.24	99.1	99.3	99.2
P2C1	0.65	0.61	1.20	0.00	0.00	0.16	99.3	99.4	99.4
样品	3M 5°C	3M 25°C	3M 40°C	3M 5°C	3M 25°C	3M 40°C	3M 5°C	3M 25°C	3M 40°C
C1H	0.82	0.84	1.32	0	0.15	1.21	99.18	99.01	97.46
P1	0.56	0.49	0.9	0	0	0.03	99.4	99.51	99.07
P1C2	0.84	1.2	2.04	0	0.16	0.95	99.16	98.64	97.07
P1C1	0.59	0.83	1.53	0	0	0.8	99.41	99.04	97.67
P2C1	0.52	0.52	0.98	0	0.02	0.37	99.48	99.45	98.65
样品	6M 5°C	6M 25°C	6M 40°C	6M 5°C	6M 25°C	6M 40°C	6M 5°C	6M 25°C	6M 40°C
C1H	0.68	0.71	0.77	0	0.3	1.5	99.32	99	97.74
P1	0.66	0.48	1.13	0	0	0	99.34	99.52	98.87
P1C2	0.66	0.9	1.87	0	0.15	1.29	99.34	98.95	96.83

[0446]

<b>P1C1</b>	0.62	0.72	1.58	0	0	1	99.38	99.28	97.41
<b>P2C1</b>	0.58	0.62	1.25	0	0	0.67	99.42	99.38	98.08
<b>样品</b>	<b>9M</b>	<b>9M</b>	<b>9M</b>	<b>9M</b>	<b>9M</b>	<b>9M</b>	<b>9M</b>	<b>9M</b>	<b>9M</b>
	<b>5°C</b>	<b>25°C</b>	<b>40°C</b>	<b>5°C</b>	<b>25°C</b>	<b>40°C</b>	<b>5°C</b>	<b>25°C</b>	<b>40°C</b>
<b>C1H</b>	1.31	1.35	ND	0.08	0.77	ND	98.62	97.88	ND
<b>P1</b>	0.7	0.86	ND	0	0.07	ND	99.3	99.07	ND
<b>P1C2</b>	1.28	1.63	ND	0.09	0.54	ND	98.63	97.83	ND
<b>P1C1</b>	1.04	1.3	ND	0.08	0.43	ND	98.88	98.28	ND
<b>P2C1</b>	0.91	1.14	ND	0.08	0.34	ND	99.01	98.52	ND
<b>样品</b>	<b>12M</b>	<b>12M</b>	<b>12M</b>	<b>12M</b>	<b>12M</b>	<b>12M</b>	<b>12M</b>	<b>12M</b>	<b>12M</b>
	<b>5°C</b>	<b>25°C</b>	<b>40°C</b>	<b>5°C</b>	<b>25°C</b>	<b>40°C</b>	<b>5°C</b>	<b>25°C</b>	<b>40°C</b>
<b>C1H</b>	1.34	1.38	ND	0.09	0.94	ND	98.57	97.69	ND
<b>P1</b>	0.68	0.98	ND	0	0.09	ND	99.32	98.92	ND
<b>P1C2</b>	1.31	1.75	ND	0.07	0.72	ND	98.62	97.54	ND
<b>P1C1</b>	1.05	1.39	ND	0.06	0.54	ND	98.9	98.06	ND
<b>P2C1</b>	0.9	1.23	ND	0.06	0.44	ND	99.04	98.34	ND

[0447] 混合模式SEC被用于分析共制剂中的两种抗体的聚集体和氧化种类。结果列在下表中。派姆单抗在高温下显示出氧化种类1和2的增加,分别反映了在一个臂和两个臂上的M105的氧化。M105在派姆单抗的CDR3中。暴露的蛋氨酸残基或抗体的CDR中的蛋氨酸残基可能会通过氧化影响抗体的生物学活性。蛋氨酸降低派姆单抗重链CDR内Met105的氧化。与最初的相比,氧化种类的微小变化表明,在5°C下,所述共制剂在长达12个月是稳定的。

[0448]

样品	抗 CTLA4 抗体			派姆单抗				
	% HMW	单 体	%LMW	%HMW	Met105 (2 只 臂)	Met105 (1 只 臂)	单 体	%LMW

[0449]

P2C1 最初	0.4	98.7	0.9	0.0	6.2	1.3	92.4	0.00
P1C1 最初	0.4	98.7	0.9	0.0	5.6	1.4	93.0	0.00
P1C2 最初	0.5	98.6	0.9	0.0	4.3	1.4	94.2	0.00
P1 最初	N/A	N/A	N/A	0.2	6.4	1.3	92.1	0.00
C1H 最初	0.6	98.5	1.0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
P2C1 12M/5C	0.9	99.1	0.0	0.0	8.6	4.6	86.8	0.00
P1C1 12M/5C	0.8	99.2	0.0	0.0	9.0	4.7	86.3	0.00
P1C2 12M/5C	0.9	99.1	0.0	0.0	9.6	4.8	85.6	0.00
P1 12M/5C	N/A	N/A	N/A	0.5	8.4	4.5	86.6	0.01
C1H 12M/5C	0.9	98.5	0.6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

[0450] 基于十二个月的数据,所述抗体在共配制时在溶液中表现良好,类似于单抗体制剂。如通过蛋白质扩散相互作用参数kD所测量的排斥性蛋白质间相互作用(胶体和热稳定性的指标)显示,所述共制剂在pH5.0-6.0下是稳定的。

[0451] 实施例4

[0452] 其他共制剂

[0453] 这项研究评估了与派姆单抗以如下所示的不同浓度共同配制的在IgG1骨架上具有以下CDR的抗CLTA4抗体的稳定性:SEQ ID NO:35的HCDR1,SEQ ID NO:36的HCDR2,SEQ ID NO:37的HCDR3,SEQ ID NO:38的LCDR1,SEQ ID NO:39的LCDR2和SEQ ID NO:40的LCDR3:

[0454] 表32

	<u>共制剂</u>	<u>派姆单抗/ 抗 CTLA4 比例</u> (w/w)	<u>派姆单抗</u>	<u>抗 CTLA4</u> <u>抗体</u>	<u>总浓度</u>
[0455]	<b>25/200</b>	8:1	23.5mg/mL	2.9mg/mL	26.4mg/mL
	<b>75/200</b>	8:3	21.1mg/mL	7.9mg/mL	29.0mg/mL

[0456] 如下将制剂制备为液体制剂：

[0457] 表33

	<b>制剂</b>	<b>缓冲液</b>	<b>pH</b>	<b>抗冻剂/张力 调节剂</b>	<b>表面活性 剂</b>	<b>抗氧化剂</b>
	<b>25/200 A</b>	L-组氨酸 (10mM)	5.5	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	0
	<b>25/200 B</b>	L-组氨酸 (10mM)	5.5	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	1.6mM
[0458]	<b>25/200 C</b>	L-组氨酸 (10mM)	5.5	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	10mM
	<b>75/200 A</b>	L-组氨酸 (10mM)	5.5	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	0
	<b>75/200 B</b>	L-组氨酸 (10mM)	5.5	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	1.6mM
[0459]	<b>75/200 C</b>	L-组氨酸 (10mM)	5.5	蔗糖(7%)	PS-80 (0.02%)	10mM

[0460] 将所述制剂置于三种不同的储存条件下：5℃（环境湿度）、25℃（60%相对湿度）和40℃（75%相对湿度）。75/200制剂也暴露于光应力（0ICH、0.5x ICH或1x ICH）下。

[0461] 结果

[0462] 结果表明，基于MFI的测量（数据未显示），增加蛋氨酸浓度在所有条件下降低亚可见颗粒（subvisible particulate）。如通过UP-SEC所观察的，在40℃下增加蛋氨酸浓度降低了%HMW种类。在40℃下增加蛋氨酸浓度稍微降低浊度。



[0463]

	制剂 75/200 A		制剂 75/200 B		制剂 75/200 C	
	3M, 5C	3M, 40C	3M 5C	3M 40C	3M 5C	3M 40C
<b>UPSEC纯度%</b>						
高分子量种类 (%)	1.10	2.70	1.07	2.41	1.07	2.25
单体 (%)	98.8	96.7	98.9	97.0	98.9	97.1
低分子量种类 (%)	0.07	0.63	0.07	0.62	0.07	0.62
<b>通过 HP-IEX 的电荷变体%</b>						
酸性变体抗PD1	20.5	59.1	20.3	58.4	19.9	58.1
总主成分抗PD1	56.4	29.3	56.6	29.6	56.6	29.6
碱性变体抗PD1	23.1	11.6	23.1	12.0	23.5	12.3
酸性变体抗 CTLA4	14.8	60.5	14.9	59.2	14.9	59.1
总主成分抗	75.5	30.2	75.2	30.8	75.4	31.0

[0464]

<b>CTLA4</b>						
碱性变体抗 CTLA4	9.8	9.3	9.9	10.0	9.7	9.9
<b>pH</b>	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
<b>UV A350</b>	0.065	0.105	0.067	0.097	0.065	0.090

[0465] 实施例5:

[0466] CTLA4单一制剂的长期稳定性

[0467] 使用具有以下CDR的抗CTLA4抗体制备以下液体制剂:100mg/mL的抗CTLA4抗体, 10mM的L-组氨酸缓冲液, 7%w/v的蔗糖, 0.02%w/v的聚山梨酯80, 在pH5.5下。将产品分配到带有弹性塞和铝密封的2R I型玻璃中。填充量为2.0mL, 过量填充为0.2mL。将样品在以下条件下置于稳定性:

[0468] (i) 5°C/环境湿度

[0469] (ii) 25°C/60%相对湿度

[0470] (iii) 40°C/75%相对湿度

[0471] 最初以及在第1、3、6、9和12个月对样品进行测试。结果列在下表中:

[0472] 表34

[0473]

5°C/环境湿度						
测量的属性	时间点 (月)					
	最初	1	3	6 <sup>c</sup>	9	12
结合ELISA的生物效力	95	96	94	106	97	101
UPSEC的纯度 %						
高分子量种类 (%)	1.11	1.16	1.24	1.31	1.33	1.39

[0474]

单体 (%)	98.9	98.8	98.7	98.7	98.6	98.6
低分子量种类 (%)	< QL	< QL	< QL	< QL	< QL	< QL
HP-IEX的电荷变体%						
酸性变体	15.42	15.46	15.00	15.71	15.79	15.96
总主成分	73.9	73.6	73.3	73.1	73.2	72.7
碱性变体	10.73	10.95	11.65	11.17	11.02	11.30
非还原的CE-SDS的纯度 %	97.6	97.5	97.5	97.6	97.5	97.5
还原的CE-SDS的纯度 %	96.7	96.7	96.8	96.0	97.2	96.2
pH	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
蛋白质浓度	52.3	52.7	53.2	53.3	52.0	52.3
UV A350	0.081	0.084	0.082	0.096	0.088	0.084
QL = 定量限(0.10%)						
6个月的样品比原定时间提前了2周。						

[0475] 表35

[0476]

25°C/60%相对湿度						
测量的属性	时间点 (月)					
	最初	1	3	6 <sup>c</sup>	9	12
结合ELISA的生物效力	95	92	92	95	99	96
UPSEC的纯度 %						

[0477]

高分子量种类 (%)	1.11	1.23	1.25	1.34	1.36	1.42
单体 (%)	98.9	98.7	98.5	98.3	98.0	97.5
低分子量种类 (%)	< QL	< QL	0.30	0.39	0.69	1.05
HP-IEX的电荷变体%						
酸性变体	15.42	16.92	20.74	26.70	33.41	38.97
总主成分	73.9	71.3	66.5	60.5	53.7	47.8
碱性变体	10.73	11.81	12.78	12.83	12.87	13.20
非还原的CE-SDS的纯度 %	97.6	97.2	96.7	96.2	94.6	94.3
还原的CE-SDS的纯度 %	96.7	96.6	96.2	95.5	94.9	94.7
pH	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
蛋白质浓度	52.3	52.8	53.4	52.8	52.3	51.9
UV A350	0.081	0.085	0.090	0.096	0.104	0.109
QL = 定量限(0.10%)						
6个月的样品比原定时间提前了2周。						

[0478] 表36

[0479]

40°C/75%相对湿度						
测量的属性	时间点 (月)					
	最初	1	3	6 <sup>c</sup>	9	12
结合ELISA的生物效力	95	89	100	91	95	89

[0480]

UPSEC的纯度 %						
高分子量种类 (%)	1.11	1.28	1.58	1.98	1.11	1.28
单体 (%)	98.9	98.1	95.7	93.9	98.9	98.1
低分子量种类 (%)	< QL	0.59	2.75	4.12	< QL	0.59
HP-IEX的电荷变体%						
酸性变体	15.42	33.50	60.13	79.20	15.42	33.50
总主成分	73.9	52.1	26.8	11.6	73.9	52.1
碱性变体	10.73	14.38	13.08	9.16	10.73	14.38
非还原的CE-SDS的纯度 %	97.6	95.5	91.4	86.1	97.6	95.5
还原的CE-SDS的纯度 %	96.7	94.8	91.8	86.3	96.7	94.8
pH	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
蛋白质浓度	52.3	52.9	53.4	53.0	52.3	52.9
UV A350	0.081	0.084	0.082	0.096	0.088	0.084
QL = 定量限(0.10%)						
6个月的样品比原定时间提前了2周。						

[0481] 结果:

[0482] 如以上数据所示,当将制剂储存在5°C下时,没有观察到显著变化。预期此类制剂将在5°C下稳定24个月。通过结合ELISA确定的制剂的生物学效力显示,在所有条件下,均未

观察到效力的显著变化。pH没有随存储时间或条件的变化而变化。

[0483] 在长达12个月的稳定性测试的所有三种条件下,在所有储存条件下样品的蛋白质浓度均未显示出显著变化。

[0484] 电荷变体(%酸性变体、%主成分和%碱性变体)通过HP- IEX确定。对于5℃条件,在12个月内未观察到显著变化。对于25℃条件,在12个月内%酸性变体增加,%总主峰降低,而%碱性变体保持不变。考虑到存储条件,这些结果并非意外。对于40℃条件,从初始时间点到6个月时间点%总主峰显示出显著降低,%酸性变体显著增加,而%碱性变体保持不变。考虑到存储条件,这些结果并非意外。

[0485] 纯度通过UP- SEC (%HMW种类、%单体和%LMW种类)确定。在5℃下长达12个月的稳定性时,%单体或%HMW种类没有变化。在12个月内,在5℃条件下未检测到LMW种类的峰。对于25℃的储存条件,在12个月内HMW种类无变化,%单体略有下降,LMW种类略有增加。在40℃条件下长达6个月,%HMW种类略有增加,而在6个月的时间点,%单体降低85%以下。考虑到存储条件,这些结果并非意外。

[0486] pH没有随存储时间或条件的变化而变化。

[0487] 实施例6

[0488] 添加螯合剂作为任选的赋形剂

[0489] 评估在存在或不存在螯合剂(DTPA)的情况下制剂的稳定性。为了评估制剂的稳定性,将两种制剂装入小瓶中,并在5℃(环境湿度)、25℃(60%相对湿度)和40℃(75%相对湿度)下-避光十二周进行稳定性分级。所述两种制剂如下:

制剂编号		说明				
[0490]	1	抗CTLA4 抗体 (50mg/ml)	10mM L-组氨酸缓冲液	7%蔗糖 (w/v)	10mM L-蛋氨酸 0.02% PS80 (w/v)	NA
			(pH=5.5)			
[0491]	2	抗CTLA4 抗体 (50mg/ml)	10mM L-组氨酸缓冲液	7%糖 (w/v)	10mM L-蛋氨酸 0.02% PS80 (w/v)	20 uM DTPA
			(pH=5.5)			

[0492] 通过尺寸排阻色谱法(SEC)评估样品的胶体稳定性以用于确定单体百分比的纯度,以及高分子量种类(HMW)和晚洗脱峰(LMW种类)的百分比。下表列出了用于评估高分子量种类(HMW或聚集体)、%单体和LMW(低分子量种类)水平的UPSEC数据。

[0493] 表37

	HMW%			LMW%			主成分%		
制剂	最初值 (T0)			最初值(T0)			最初值(T0)		
1	0.17			0.01			99.8		
2	0.16			0.03			99.8		
样品	2W 5°C	2W 25°C	2W 40°C	2W 5°C	2W 25°C	2W 40 °C	2W 5°C	2W 25°C	2W 40°C
1	ND	ND	0.30	ND	ND	0.18	ND	ND	99.5
2	ND	ND	0.28	ND	ND	0.17	ND	ND	99.5
样品	4W 5°C	4W 25°C	4W 40°C	4W 5°C	4W 25°C	4W 40 °C	4W 5°C	4W 25°C	4W 40°C
1	0.19	0.29	0.35	0.01	0.06	0.38	99.8	99.7	99.3
2	0.17	0.26	0.33	0.03	0.07	0.35	99.8	99.7	99.8
样品	8W 5°C	8W 25°C	8W 40°C	8W 5°C	8W 25°C	8W 40	8W 5°C	8W 25°C	8W 40°C
						°C			
1	0.21	0.33	0.44	0.01	0.11	0.76	99.8	99.6	98.8
2	0.19	0.30	0.41	0.02	0.12	0.68	99.8	99.6	98.9
样品	12W 5°C	12W 25°C	12W 40°C	12W 5°C	12W 25°C	12 W 40 °C	12W 5°C	12W 25°C	12W 40°C
1	0.28	0.44	0.82	0.5	0.25	2.12	99.7	99.3	97.1
2	0.29	0.42	0.68	0.04	0.23	1.79	99.7	99.3	97.5

[0496] 如上表所示,UP-SEC分析样品以确定HMW百分比和单体百分比表明,在5°C、25°C和40°C下,两种制剂在长达12周的时间点均显示%HMW峰和%LMW峰增加(以及%单体峰随之降低)的趋势。在25°C下,与40°C相比,两种制剂均显示出相似的趋势,但变化较小。在5°C下,未观察到实质变化。基于所述数据,与制剂2(含DTPA)相比,制剂1(无DTPA)显示出%HMW和%LMW略有增加。另外,与制剂2相比,制剂1显示出%单体降低较大。

[0497] HP- IEX分析样品以确定化学稳定性表明,在5°C、25°C和40°C下,两种制剂在长达12周的时间点均显示出%酸性峰增加的趋势,以及%单体峰随之降低的趋势。在25°C下,与40°C相比,两种制剂均显示出相似的趋势,但变化较小。在5°C下,未观察到实质变化(数据

未显示)。

[0498] 下表中的结果显示PS80浓度在长达8周的时间点随时间下降的趋势。在25℃下,与40℃相比,两种制剂均显示出相似的趋势,但变化较小。在5℃下,未观察到实质变化。在40℃下,与制剂1(不含DTPA的抗CTLA4抗体)相比,在制剂2(含DTPA的抗CTLA4抗体)中观察到PS80降解较少。

[0499]										
	聚山梨	制剂	T0	4W	8W	4W	8W	2W	4W	8W
[0500]	酯	1	0.19	0.18	0.18	0.17	0.15	0.17	0.16	0.13
	80 浓度									
	(mg/ml)	2	0.19	0.18	0.18	0.17	0.15	0.17	0.17	0.16

[0501] 因此,DTPA也可以为本文所述的制剂提供甚至更大的稳定性。

## 序列表

	<110>	Bhattacharya, Soumendu Narasimhan, Chakravarthy Nachu Sharma, Manoj K. Yang, Xiaoyu De, Arnab
	<120>	单独的和与程序性死亡受体 1 (PD-1) 抗体组合的抗 CTLA4 抗体的稳定制剂及其使用方法
	<130>	24449
	<150>	62/500,268
	<151>	2017-05-02
	<160>	100
	<170>	PatentIn version 3.5
[0001]	<210>	1
	<211>	15
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	CDR1
	<400>	1
		Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
		1                    5                    10                    15
	<210>	2
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	CDR2
	<400>	2
		Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser



1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 3

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变区

[0002]

<400> 4

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 5

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 轻链

&lt;400&gt; 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser  
                     20                      25                      30  
 Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
                     35                      40                      45  
 Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
                     50                      55                      60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65                      70                      75                      80  
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
                     85                      90                      95  
 Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
                     100                      105                      110  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
                     115                      120                      125  
 [0003] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
                     130                      135                      140  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 145                      150                      155                      160  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
                     165                      170                      175  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
                     180                      185                      190  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
                     195                      200                      205  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                     210                      215

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR1

&lt;400&gt; 6

Asn Tyr Tyr Met Tyr  
1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 7

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15  
Asn

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

[0004]

<220>

<223> CDR3

<400> 8

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变区

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20	25	30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe		
50	55	60
Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210> 10  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重链

[0005]

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr		
20	25	30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe		
50	55	60
Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
		160

[0006]

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
 210 215 220  
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 250 255  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
 260 265 270  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 290 295 300  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 340 345 350  
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 355 360 365  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 370 375 380  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415  
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR1

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 12

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0007] <220>

<223> CDR3

<400> 13

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr  
1 5

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变区

<400> 14

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 轻链

&lt;400&gt; 15

[0008]

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		

	195	200	205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
	<210> 16		
	<211> 5		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> CDR1		
	<400> 16		
	Asn Ser Gly Met His		
	1 5		
	<210> 17		
	<211> 17		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
[0009]	<223> CDR2		
	<400> 17		
	Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
	1 5 10 15		
	Gly		
	<210> 18		
	<211> 4		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> CDR3		
	<400> 18		
	Asn Asp Asp Tyr		
	1		
	<210> 19		
	<211> 113		
	<212> PRT		



<213> 人工序列

<220>

<223> 可变区

<400> 19

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
          20           25           30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
          100          105          110

```

[0010]

Ser

<210> 20

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链

<400> 20

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
          20           25           30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```

[0011]

	85	90	95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
100	105	110	
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser			
115	120	125	
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
130	135	140	
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr			
145	150	155	160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
165	170	175	
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys			
180	185	190	
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp			
195	200	205	
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
210	215	220	
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
225	230	235	240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
245	250	255	
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val			
260	265	270	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
275	280	285	
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
290	295	300	
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly			
305	310	315	320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
325	330	335	
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr			
340	345	350	
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
355	360	365	
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
370	375	380	
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
385	390	395	400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe			
405	410	415	
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
420	425	430	
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			

	435	440
	<210> 21	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CDRL1	
	<400> 21	
	Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Leu His	
	1 5 10 15	
	<210> 22	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CDRL2	
[0012]	<400> 22	
	Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser	
	1 5	
	<210> 23	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CDRL3	
	<400> 23	
	Gln His Ser Trp Glu Leu Pro Leu Thr	
	1 5	
	<210> 24	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CDRH1	

<400> 24

Ser Tyr Tyr Leu Tyr

1 5

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH2

<400> 25

Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

[0013] <213> 人工序列

<220>

<223> CDRH3

<400> 26

Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链 VR

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20	25	30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe		
50	55	60
Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210>	28	
<211>	111	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	

<220>  
<223> 轻链 VR

[0014]

<400>	28
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1	5
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser	
20	25
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	
35	40
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala	
50	55
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
65	70
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg	
85	90
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100	105
<210>	29
<211>	111
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>  
<223> 轻链 VR

<400> 29

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
          20           25           30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
          35           40           45
Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
          50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65           70           75           80
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
          85           90           95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

<210> 30

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

[0015] <220>

<223> 轻链 VR

<400> 30

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
          20           25           30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
          35           40           45
Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
          50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65           70           75           80
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
          85           90           95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

<210> 31

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链

<400> 31

[0016]

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
          20           25           30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35           40           45
Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
          50           55           60
Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
          115          120          125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
          130          135          140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
          145          150          155          160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
          165          170          175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
          180          185          190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
          195          200          205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
          210          215          220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
          225          230          235          240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
          245          250          255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
          260          265          270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
          275          280          285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

```

```

      290              295              300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305              310              315              320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
      325              330              335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
      340              345              350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
      355              360              365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370              375              380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385              390              395              400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
      405              410              415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
      420              425              430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
      435              440              445

```

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 轻链

&lt;400&gt; 32

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1              5              10              15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
      20              25              30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
      35              40              45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
      50              55              60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65              70              75              80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
      85              90              95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      100             105             110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

```



```

          115              120              125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
          130              135              140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145              150              155              160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165              170              175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180              185              190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
          195              200              205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210              215
<210> 33
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 轻链

```

[0018] <400> 33

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1              5              10              15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
          20              25              30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
          35              40              45
Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
          50              55              60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65              70              75              80
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
          85              90              95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
          100             105             110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115             120             125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
          130             135             140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145             150             155             160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

```

	165	170	175
	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
	180	185	190
	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
	195	200	205
	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215	
<210>	34		
<211>	218		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	轻链		
<400>	34		
	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly		
1	5	10	15
	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser		
	20	25	30
[0019]	Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro		
	35	40	45
	Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp		
	50	55	60
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser		
65	70	75	80
	Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
	85	90	95
	Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
	100	105	110
	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
	115	120	125
	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
	130	135	140
	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
145	150	155	160
	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
	165	170	175
	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
	180	185	190
	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
	195	200	205
	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		

	210	215
	<210> 35	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> HCDR1	
	<400> 35	
	Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn Trp	
	1 5	
	<210> 36	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> HCDR2	
[0020]	<400> 36	
	Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr	
	1 5 10	
	<210> 37	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> HCDR3	
	<400> 37	
	Thr Ala Gln Phe Ala Tyr	
	1 5	
	<210> 38	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> LCDR1	

<400> 38

Glu Asn Ile Tyr Gly Gly

1 5

<210> 39

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR2

<400> 39

Gly Ala Thr

1

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0021] <220>

<223> LCDR3

<400> 40

Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe Thr

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3

<400> 41

Gln Asn Val Leu Ser Arg His Pro Gly

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR3

<400> 42

Gln Asn Val Leu Ser Ser Arg Pro Gly

1 5

<210> 43

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8D2/8D2 (RE) VH

<400> 43

Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

[0022]

Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Met Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 44

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8D2/8D2 (RE)

<400> 44

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Gly Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
           20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
           35           40           45
Phe Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro
65           70           75           80
Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe
           85           90           95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
           100          105

```

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 8D2H1L1 VH

[0023]

&lt;400&gt; 45

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
           20           25           30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
           35           40           45
Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
           50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65           70           75           80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
           85           90           95
Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
           100          105          110

```

Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8D2H1L1 VL

<400> 46

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
           20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro
65           70           75           80
Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe
           85           90           95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105

```

[0024]

<210> 47

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8D2H2L2 VH

<400> 47

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
           20           25           30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
           35           40           45
Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Ala
           50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65           70           75           80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
           85           90           95
Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

```

	100	105	110
	Val Ser Ser		
	115		
	<210> 48		
	<211> 107		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 8D2H2L2 VH		
	<400> 48		
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1 5 10 15		
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly		
	20 25 30		
	Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
	35 40 45		
	Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly		
	50 55 60		
[0025]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65 70 75 80		
	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe		
	85 90 95		
	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100 105		
	<210> 49		
	<211> 115		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 8D3H3L3 VH		
	<400> 49		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn		
	20 25 30		
	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Glu Tyr Ala Ala		



```

      50              55              60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65              70              75              80
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85              90              95
Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      100             105             110
Val Ser Ser

```

115

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8D3H3L3 VL

<400> 50

[0026]

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
      20              25              30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35              40              45
Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe
      85              90              95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100             105

```

<210> 51

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8D2H2L15 VH

<400> 51

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

```

1           5           10           15
Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
          20           25           30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
          35           40           45
Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Ala
          50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65           70           75           80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
          85           90           95
Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
          100          105          110
Val Ser Ser
          115
<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

```

[0027] <220>  
 <223> 8D2H2L15 VL

<400> 52

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
          20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Arg His Pro
          85           90           95
Gly Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105
<210> 53
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

```

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 8D2H2L17 VH

&lt;400&gt; 53

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn  
                   20                    25                    30  
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
                   35                    40                    45  
 Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Ala  
                   50                    55                    60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65                    70                    75                    80  
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr  
                   85                    90                    95  
 Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
                   100                    105                    110  
 Val Ser Ser  
                   115

[0028]

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 8D2H2L17 VL

&lt;400&gt; 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly  
                   20                    25                    30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                    40                    45  
 Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ser Arg Pro  
                   85                    90                    95  
 Gly Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

	100	105
<210>	55	
<211>	115	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	4G10 鼠	
<400>	55	
	Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
	1 5 10 15	
	Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr	
	20 25 30	
	Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile	
	35 40 45	
	Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asn Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
	50 55 60	
	Met Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
[0029]	Met Glu Leu Leu Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys	
	85 90 95	
	Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	
	100 105 110	
	Val Ser Ala	
	115	
<210>	56	
<211>	126	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	4G10 鼠	
<400>	56	
	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu	
	1 5 10 15	
	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser	
	20 25 30	
	Asn Phe Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Ser	
	35 40 45	
	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe	

50	55	60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala		
65	70	75
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn		
85	90	95
His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro		
100	105	110
Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Gln Gly Gln Phe Cys		
115	120	125

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HCDR1

&lt;400&gt; 57

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
1 5

[0030]

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HCDR2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; X为M、V、L、I、G、A、S、T

&lt;400&gt; 58

Gly Tyr Thr Xaa Asn
1 5

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

[0031]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HCDR

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (6)..(6)

&lt;223&gt; X 为 N、D 或 E

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (8)..(8)

&lt;223&gt; X 为 T、D、E、G 或 A

&lt;400&gt; 59

Ile Asn Pro Tyr Asn Xaa Ile Xaa

1 5

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HCDR

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (7)..(7)

&lt;223&gt; X 为 N、D

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (9)..(9)

&lt;223&gt; X 为 T、D、E、G 或 A

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (12)..(12)

&lt;223&gt; X 为 A 或 N

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> X 为 Q 或 M

<400> 60

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Xaa Ile Xaa Asn Tyr Xaa Gln Lys Phe Xaa

1 5 10 15

Gly

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR

<400> 61

Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR

<400> 62

Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR

<400> 63

Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Phe

[0032]

	1	5
	<210>	64
	<211>	14
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	LCDR
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(13).. (13)
	<223>	X 为 P 或 A
	<400>	64
	Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Phe Xaa Asn	
	1	5 10
	<210>	65
	<211>	7
	<212>	PRT
[0033]	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	LCDR
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(5).. (5)
	<223>	X 为 K、R 或者除 M 或 C 以外的任何氨基酸
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(7).. (7)
	<223>	X 为 S 或 P
	<400>	65
	Gly Thr Asn Asn Xaa Ala Xaa	
	1	5
	<210>	66
	<211>	8



[0034]

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> LCDR

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> X 为 W 或者除 M 或 C 以外的任何氨基酸

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> X 为 W 或者除 M 或 C 以外的任何氨基酸

<400> 66

Ala Leu Xaa Tyr Ser Asn His Xaa  
1 5

<210> 67  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> LCDR

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> X 为 W 或者除 M 或 C 以外的任何氨基酸

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> X 为 W 或者除 M 或 C 以外的任何氨基酸

<400> 67

Ala Leu Xaa Tyr Ser Asn His Xaa Val  
1 5

<210> 68  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 4G10H1 人源化 VH

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asn Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Met Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala  
 115

[0035]

<210> 69  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 4G10H3 人源化 VH

<400> 69

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asn Ile Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala  
 115  
 <210> 70  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 4G10H4 人源化 VH

<400> 70

[0036]

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Ile Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala  
 115  
 <210> 71  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 4G10H5 人源化 VH

<400> 71

[illegible]

[0037]      <220>  
             <223> 4G10H 共有人源化 VH

<220>	
<221>	MISC_FEATURE
<222>	(11)..(11)
<223>	X = V 或 L

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X = V 或 M

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> X = V 或 I

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34).. (34)
<223> X = M, V, L, I, G, A, S, T

```

	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (38).. (38)
	<223> X = R 或 K
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (56).. (56)
	<223> X = N 或 D 或 E
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (58).. (58)
	<223> X = T 或 D 或 E 或 G 或 A
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (61).. (61)
	<223> X = A 或 N
[0038]	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (65).. (65)
	<223> X = Q 或 M
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (67).. (67)
	<223> X = R 或 K
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (68).. (68)
	<223> X = V 或 A
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (74).. (74)
	<223> X = T 或 K
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (86).. (86)

<223> X = R 或 T

<220>

<221> misc\_feature

<222> (87).. (87)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (91).. (91)

<223> X =T 或 S

<400> 72

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Xaa Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Xaa Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
20 25 30  
Thr Xaa Asn Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Xaa Ile Xaa Asn Tyr Xaa Gln Lys Phe  
50 55 60  
Xaa Gly Xaa Xaa Thr Phe Thr Val Asp Xaa Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Arg Leu Xaa Ser Asp Asp Xaa Gly Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110  
Val Ser Ala  
115

[0039]

<210> 73

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G10L1 人源化 VL

<400> 73

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

Asn Phe Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Ser  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Ser Trp Val Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 74

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G10L3 人源化 VL

<400> 74

[0040]

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Phe Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ser  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Lys Ala Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 75

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G10L 共有人源化 VL

<220>

	<221> misc_feature
	<222> (35)..(35)
	<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (40)..(40)
	<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (46)..(46)
	<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (56)..(56)
	<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
[0041]	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (58)..(58)
	<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (60)..(60)
	<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (89)..(89)
	<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (93)..(93)
	<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (98)..(98)
	<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸



&lt;400&gt; 75

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Phe Xaa Asn Trp Val Gln Xaa Lys Pro Gly Gln Ala Xaa Arg Ser  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Xaa Ala Xaa Trp Xaa Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Xaa Cys Ala Leu Xaa Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 His Xaa Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

[0042]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 4G10H1L1 VH

&lt;400&gt; 76

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asn Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Met Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala  
 115  
 <210> 77  
 <211> 109

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 4G10H1L1 VL

<400> 77

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1                    5                    10                    15  
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
                  20                    25                    30  
Asn Phe Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Ser  
                  35                    40                    45  
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Ser Trp Val Pro Ala Arg Phe  
                  50                    55                    60  
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala  
65                    70                    75                    80  
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
                  85                    90                    95  
His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
                  100                    105

[0043]

<210> 78  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 4G10H3L3 VH

<400> 78

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1                    5                    10                    15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
                  20                    25                    30  
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                  35                    40                    45  
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asn Ile Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
                  50                    55                    60  
Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65                    70                    75                    80  
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
                  85                    90                    95

Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ala  
 115

<210> 79

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G10H3L3 VL

<400> 79

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30

Asn Phe Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ser  
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Lys Ala Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60

[0044]

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala  
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 80

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G10H4L3 VH

<400> 80

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Ile Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala  
 115  
 <210> 81  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 4G10H4L3 VL

<400> 81

[0045]

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Phe Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ser  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Lys Ala Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105  
 <210> 82  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 4G10H5L3 VH

<400> 82

[illegible]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重链

&lt;400&gt; 84

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                    25                    30  
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                    55                    60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                    105                    110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
                   115                    120                    125  
 [0047] Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
                   130                    135                    140  
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145                    150                    155                    160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
                   165                    170                    175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
                   180                    185                    190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
                   195                    200                    205  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
                   210                    215                    220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225                    230                    235                    240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
                   245                    250                    255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
                   260                    265                    270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
                   275                    280                    285  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
                   290                    295                    300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350  
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 85

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

[0048]

<220>

<223> 轻链

<400> 85

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85 90 95  
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
 100 105 110  
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
 130 135 140  
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 165 170 175  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
 180 185 190  
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
 195 200 205  
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 86

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8D2/8D2 RE 变体 1 VH

<400> 86

[0049]

Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Pro Ile Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Met Gly Ile Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ala  
 115

<210> 87

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>



<223> 8D2H1L1 变体 1 VH

<400> 87

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Ile Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
           20           25           30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
           35           40           45
Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
           50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65           70           75           80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
           85           90           95
Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
           100           105           110
Val Ser Ser
           115

```

<210> 88

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8D2H2L2 变体 1 VH

<400> 88

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
           20           25           30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
           35           40           45
Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Ala
           50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65           70           75           80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
           85           90           95
Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
           100           105           110

```

[0050]

Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 8D2H2L15 变体 1

&lt;400&gt; 89

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ile Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

[0051]

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 8D2H2L17 变体 1 VH

&lt;400&gt; 90

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ile Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Ala  
50 55 60  
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
65 70 75 80  
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110  
Val Ser Ser  
115

<210> 91

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRL1

<400> 91

[0052] Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRL2

<400> 92

Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRL3

<400> 93

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 94

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH1

<400> 94

Ser Tyr Thr Met His

1 5

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH2

[0053]

<400> 95

Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH3

<400> 96

Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr

1 5

<210> 97

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HC 可变的

&lt;400&gt; 97

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                     20                      25                      30  
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                     35                      40                      45  
 Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                     50                      55                      60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
                     85                      90                      95  
 Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                     100                      105                      110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     115

[0054]

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; LC 可变的

&lt;400&gt; 98

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser  
                     20                      25                      30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
                     35                      40                      45  
 Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
                     50                      55                      60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65                      70                      75                      80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
                     85                      90                      95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 99

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链

<400> 99

[0055]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn  
20 25 30  
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45  
Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Ala  
50 55 60  
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
65 70 75 80  
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110  
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
115 120 125  
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
130 135 140  
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
145 150 155 160  
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
165 170 175  
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
180 185 190  
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
195 200 205  
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
210 215 220  
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
225 230 235 240  
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys			
260	265	270	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
275	280	285	
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
290	295	300	
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
305	310	315	320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
325	330	335	
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
340	345	350	
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
355	360	365	
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
370	375	380	
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
385	390	395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
405	410	415	
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
420	425	430	
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440	445	
<210>	100		
<211>	214		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	轻链		
<400>	100		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly			
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe  
85 90 95  
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110  
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125  
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140  
[0057] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160  
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175  
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190  
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205  
Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210



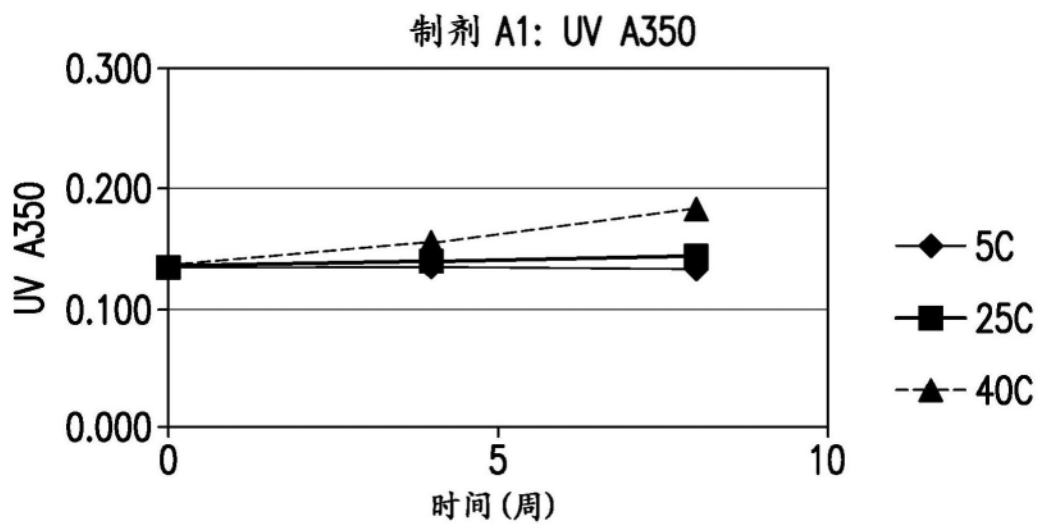


图1A

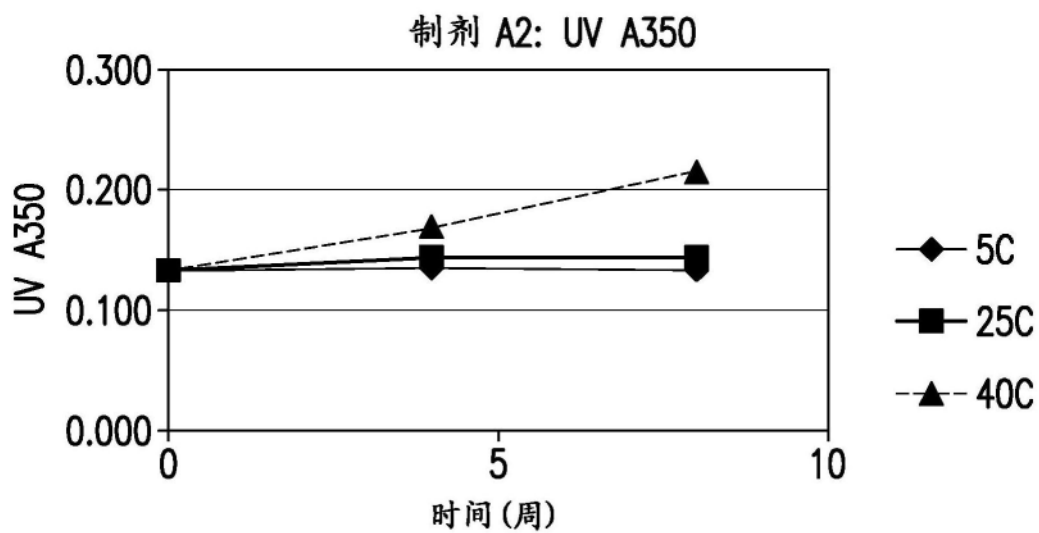


图1B

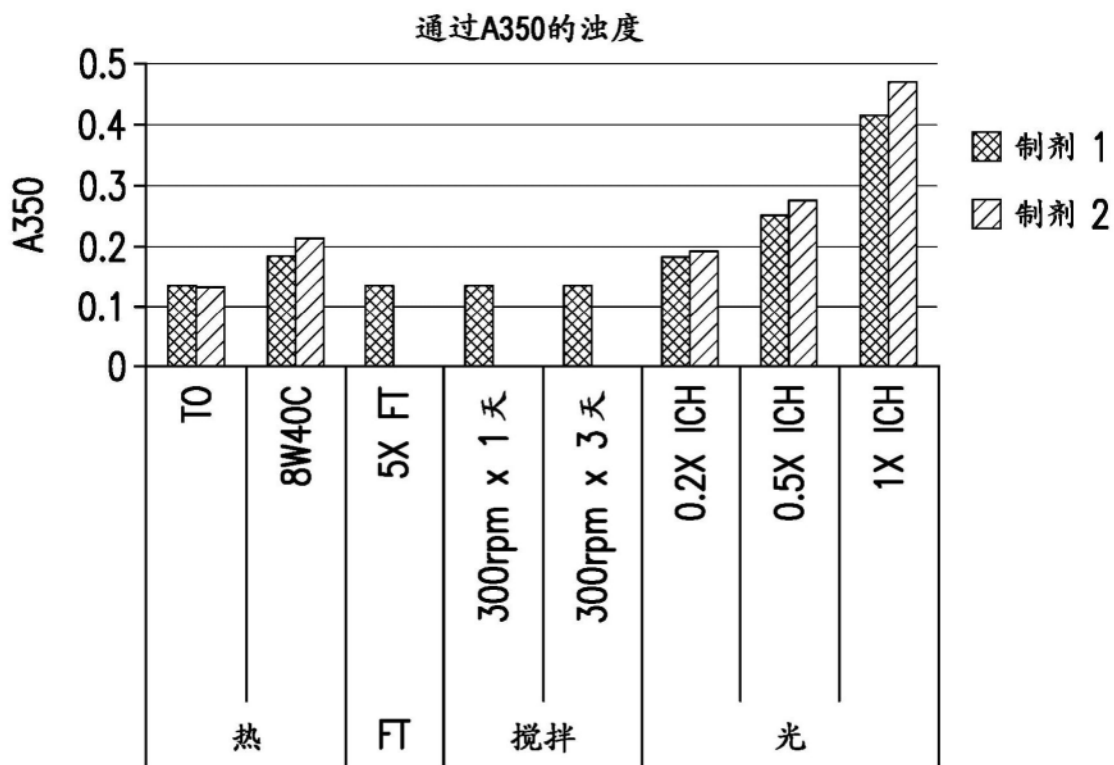


图2

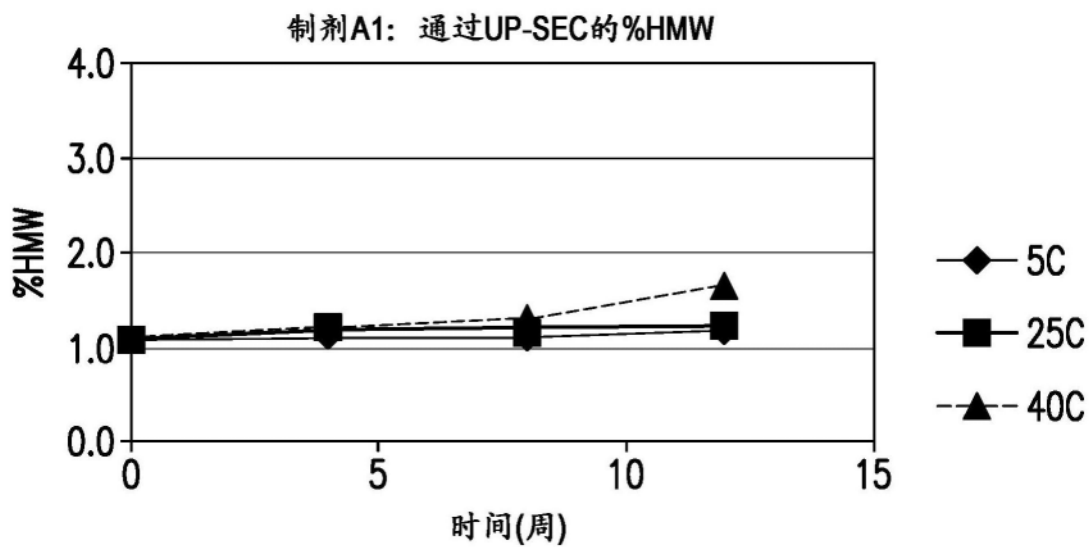


图3A

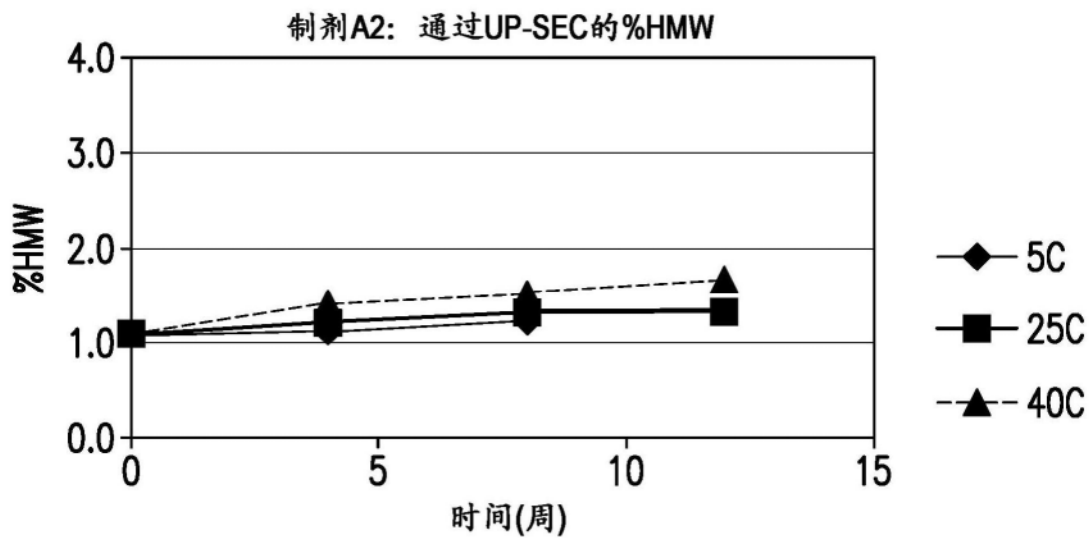


图3B

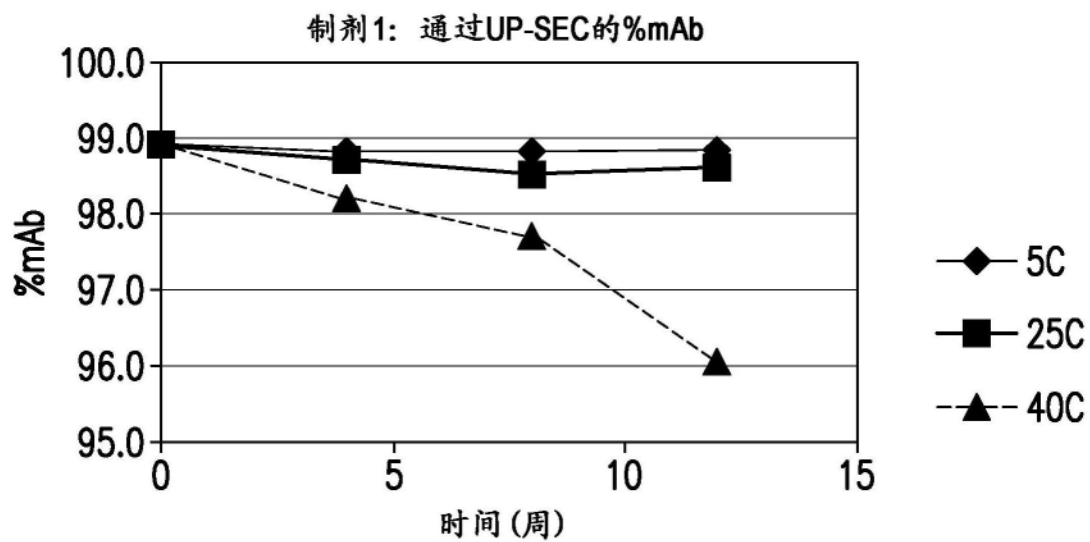


图4A

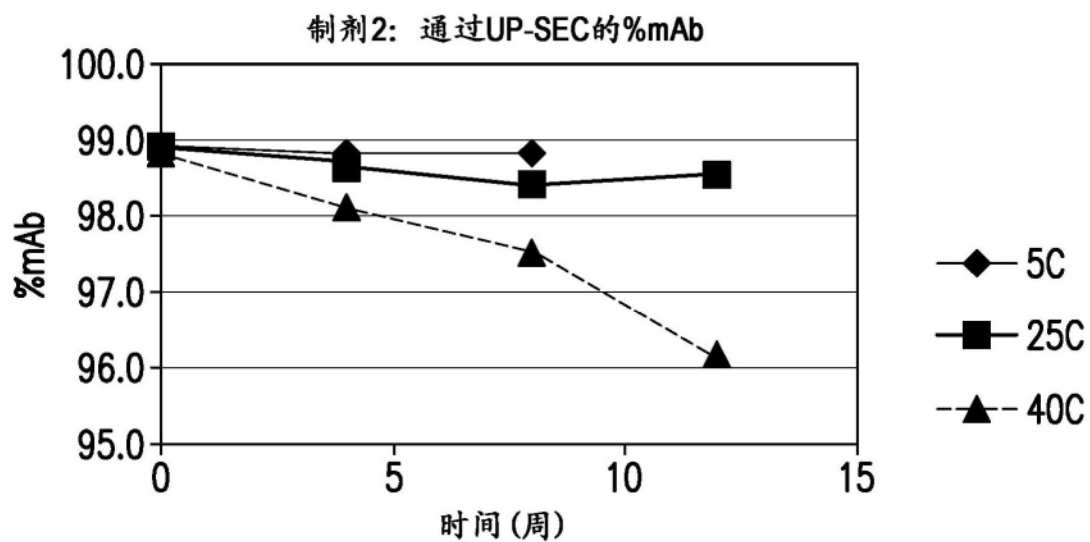


图4B

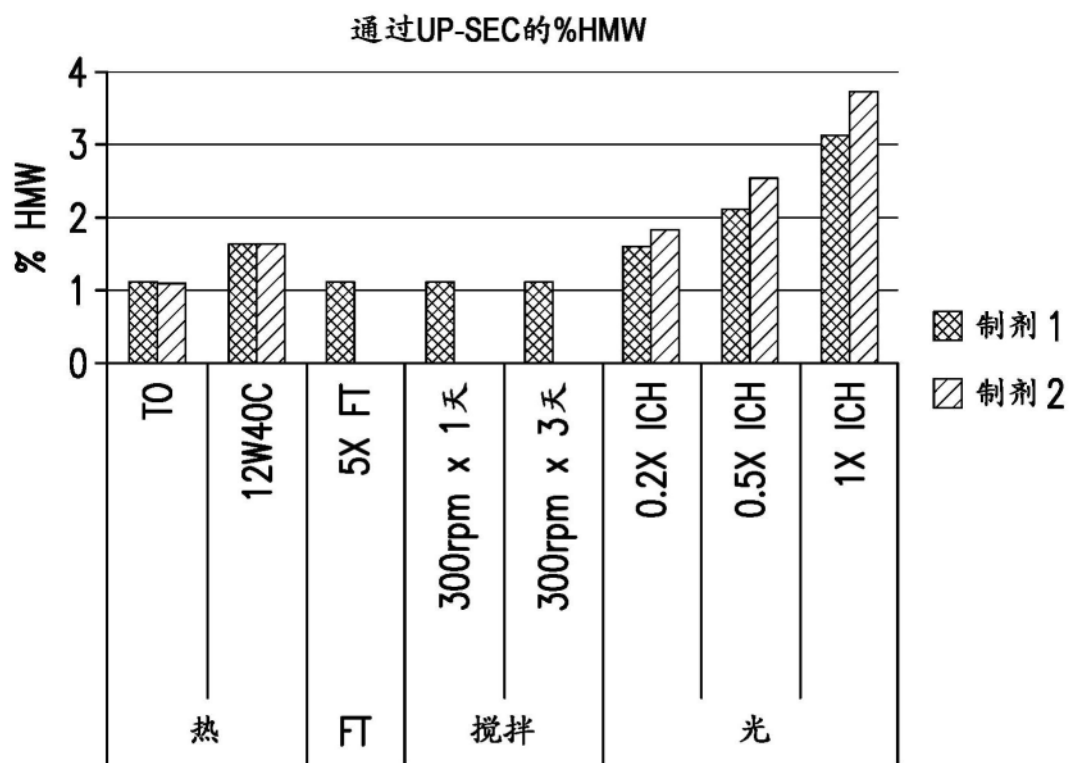


图5

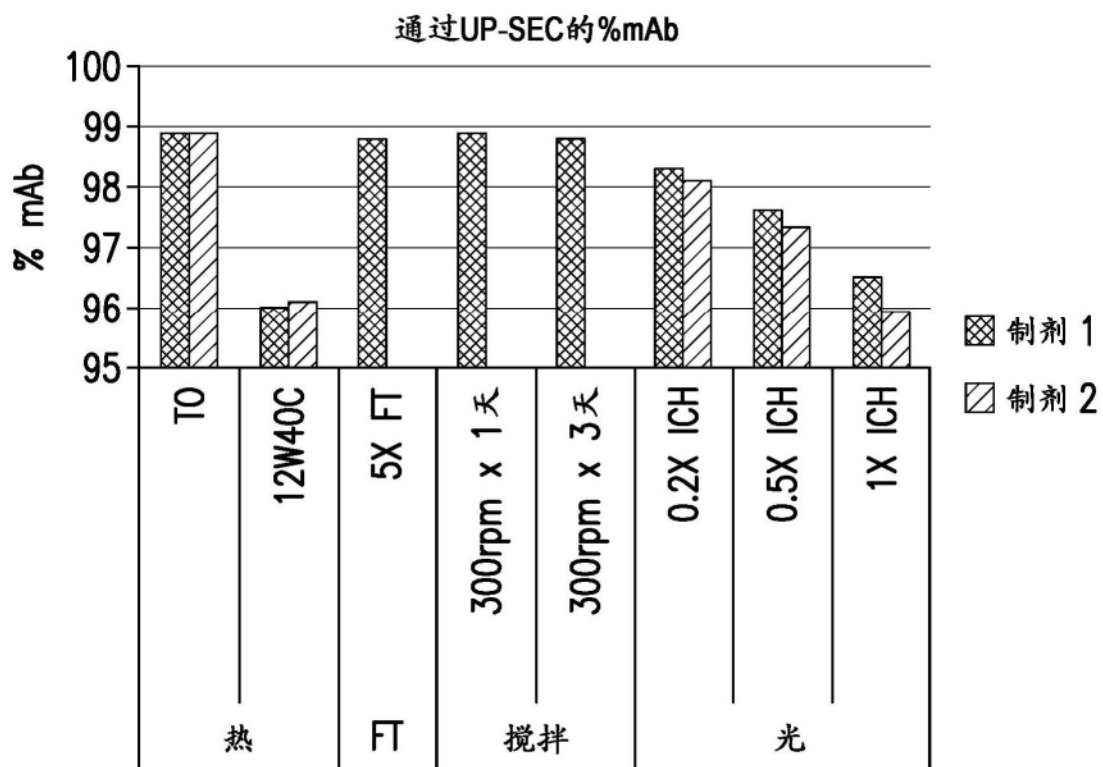


图6

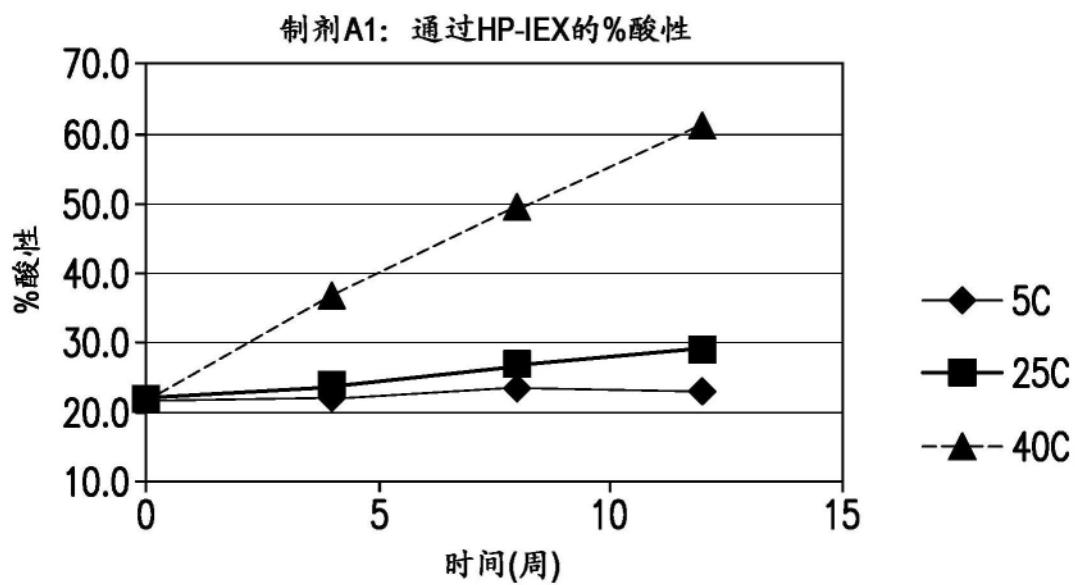


图7A

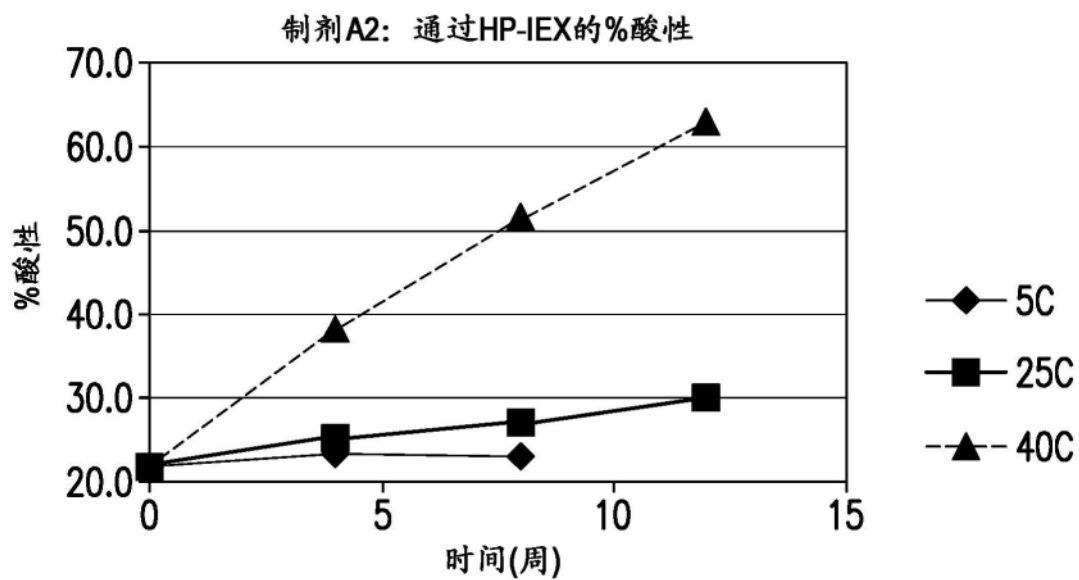


图7B

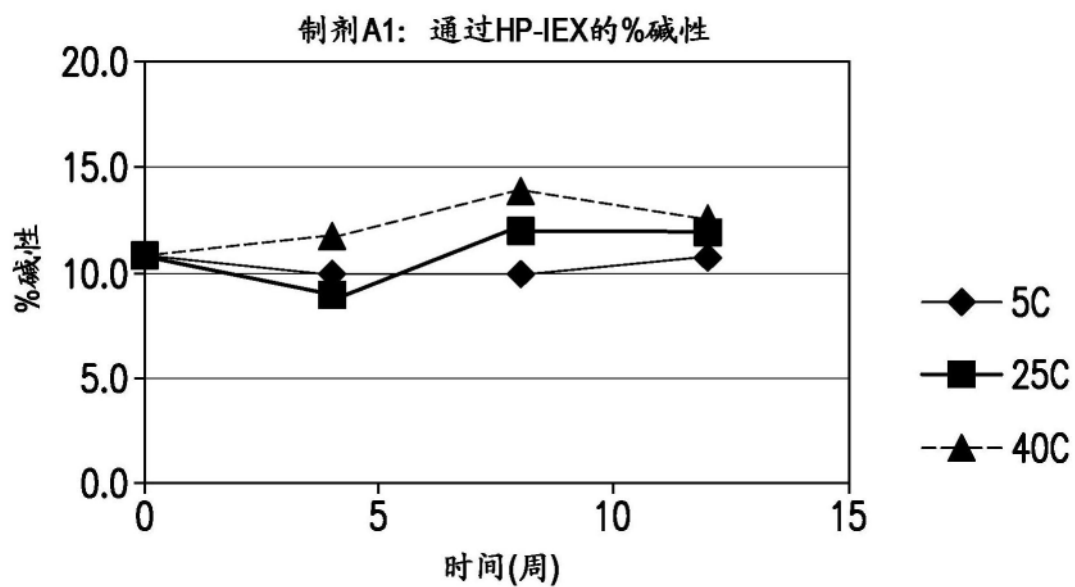


图8A

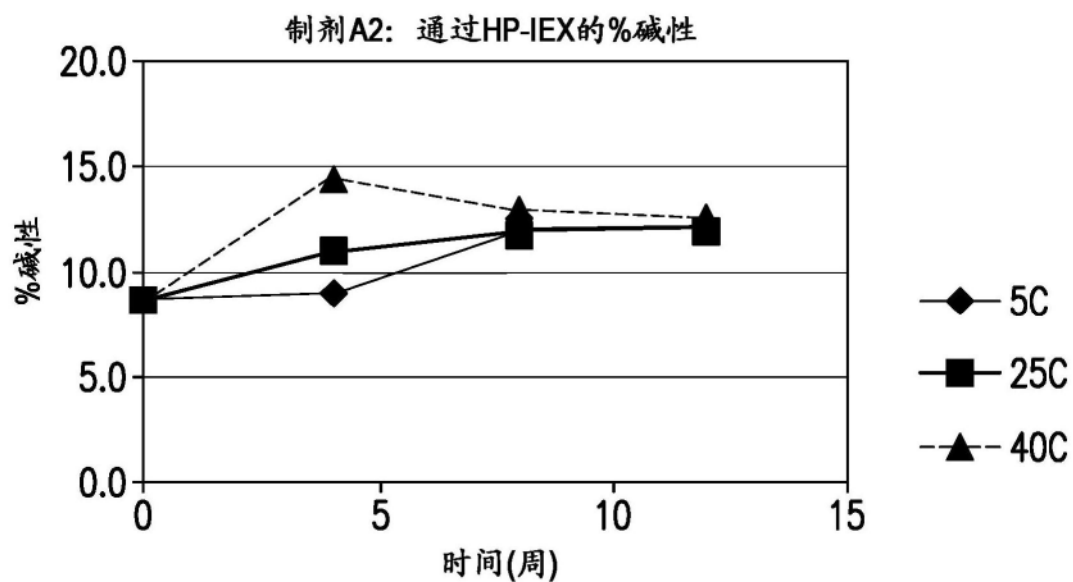


图8B

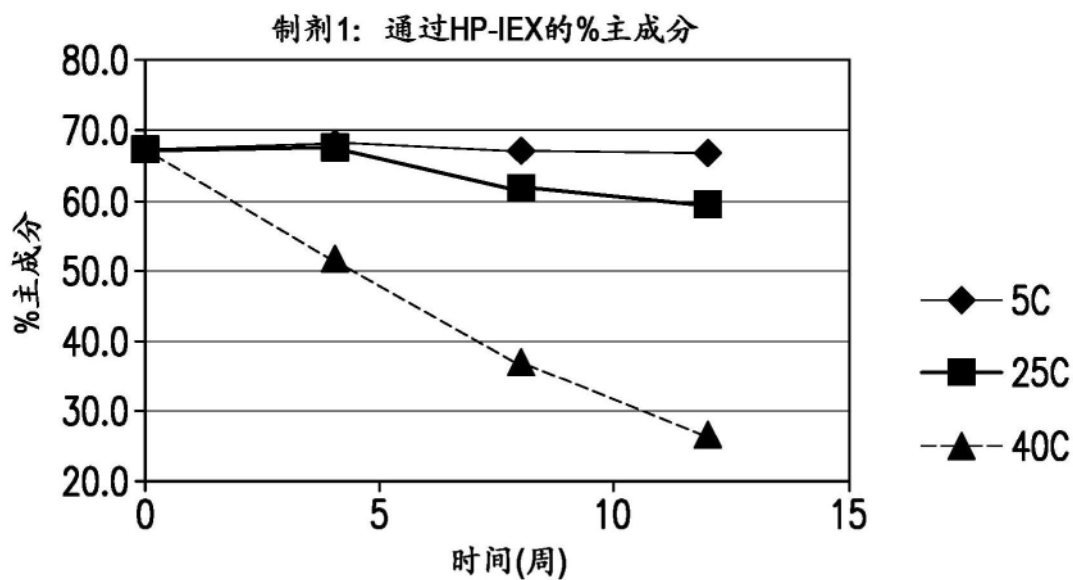


图9A

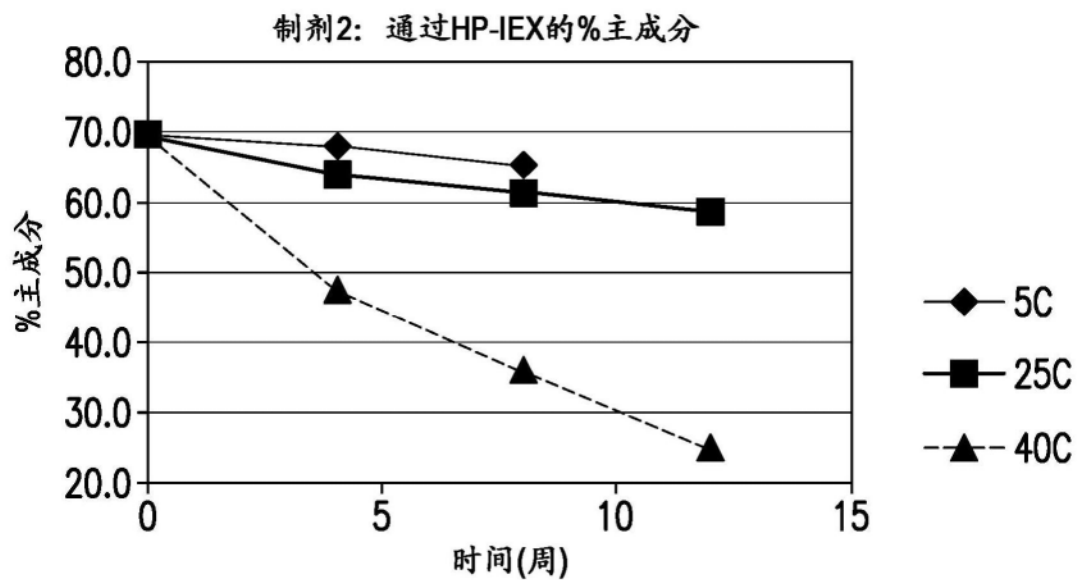


图9B

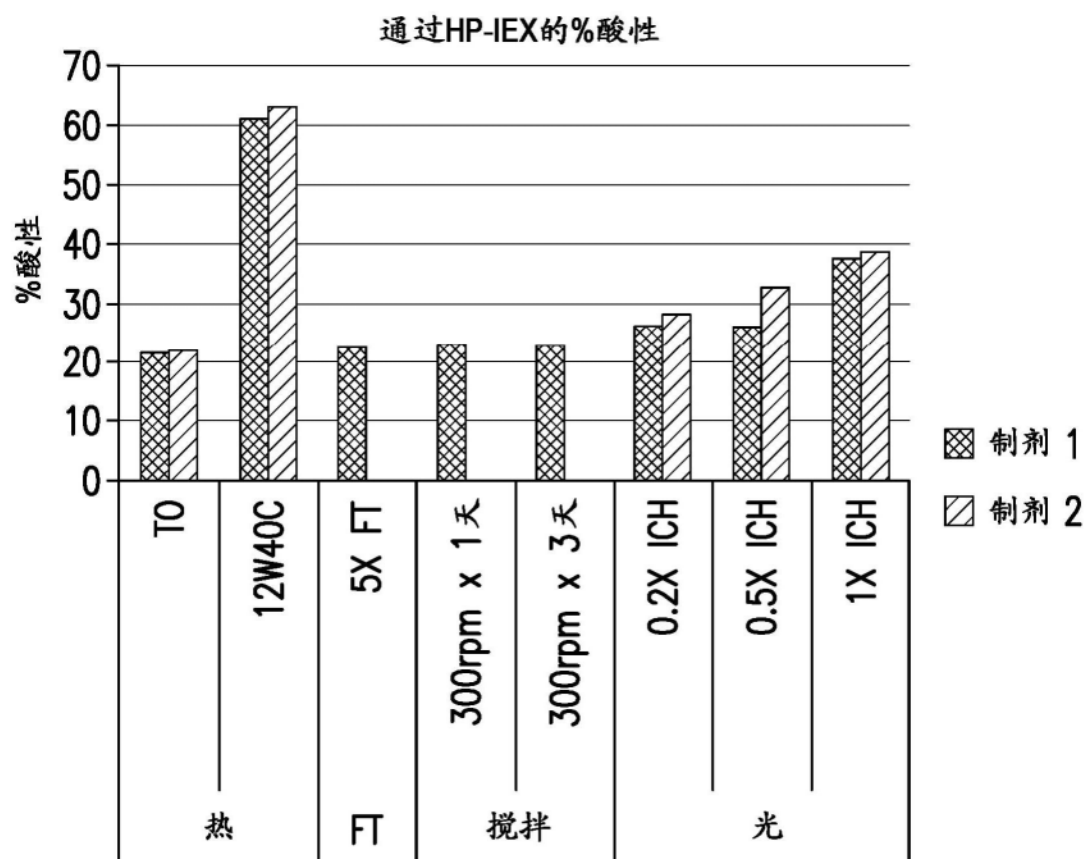


图10



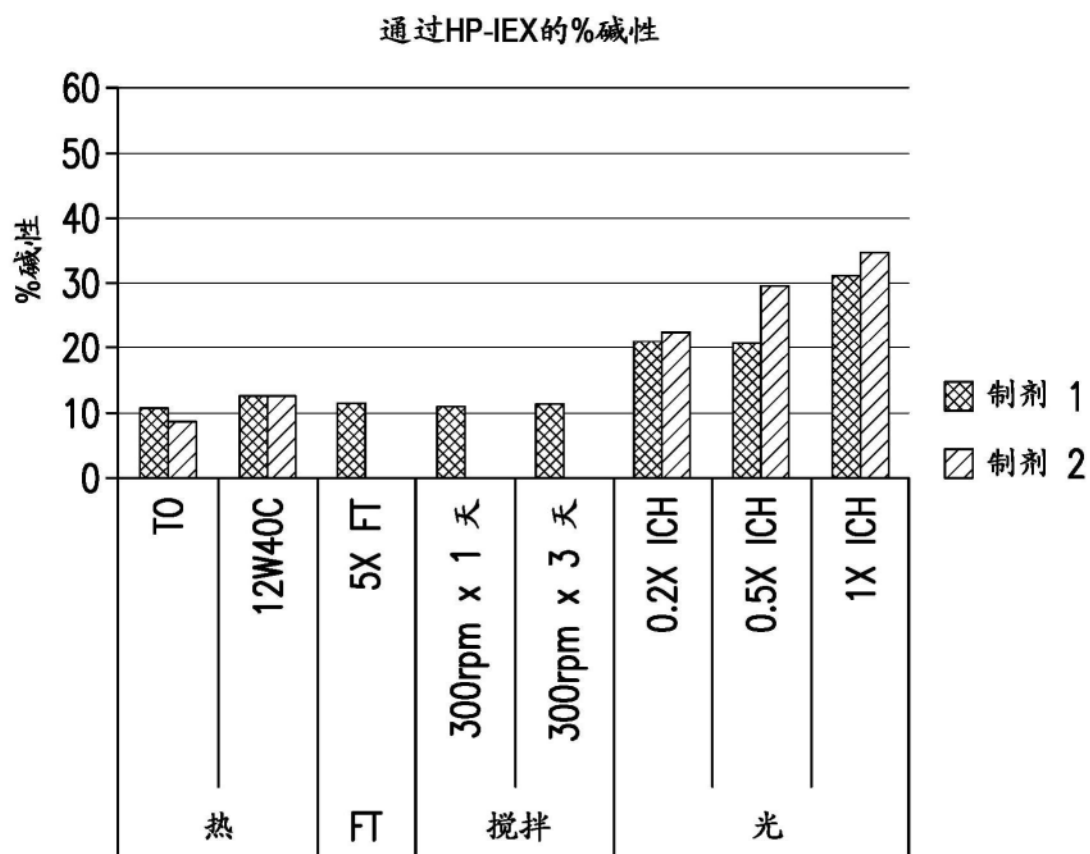


图11

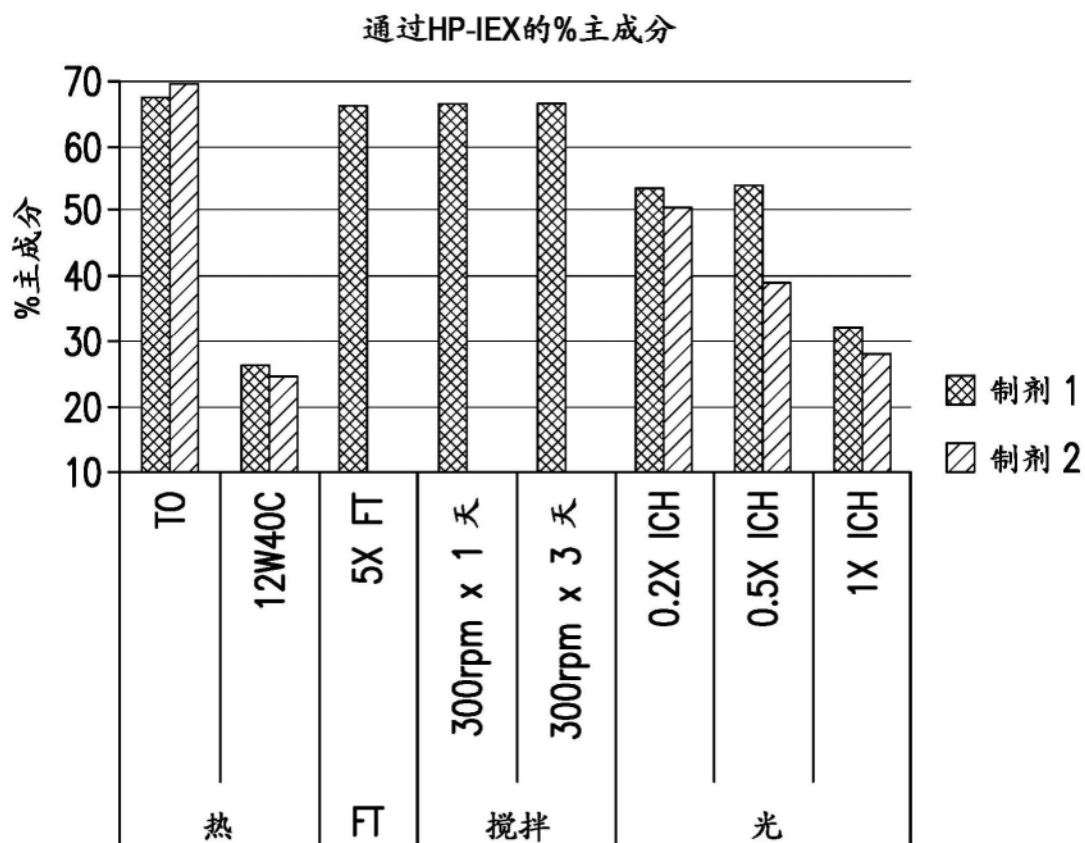


图12

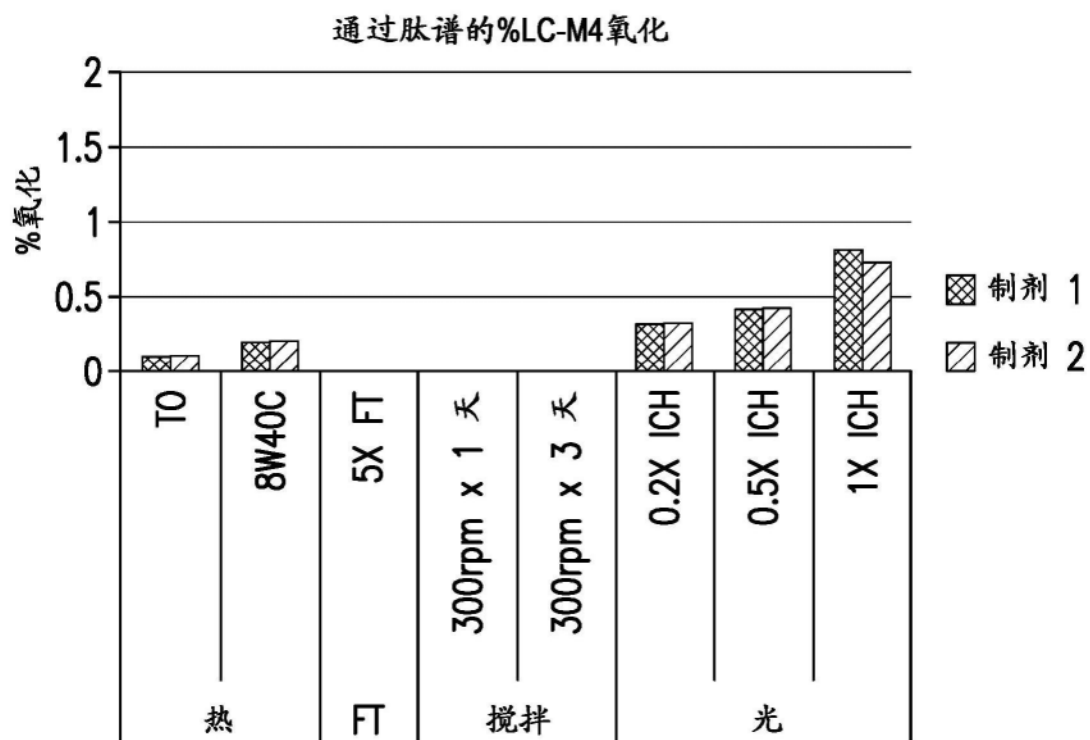


图13

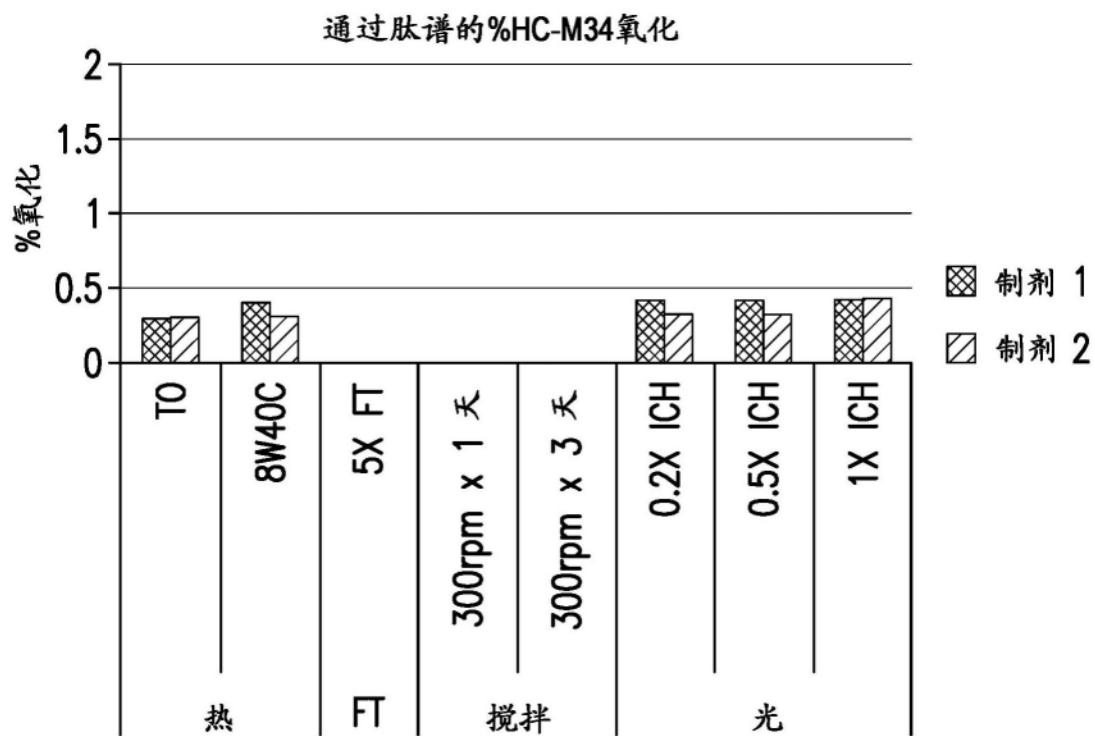


图14

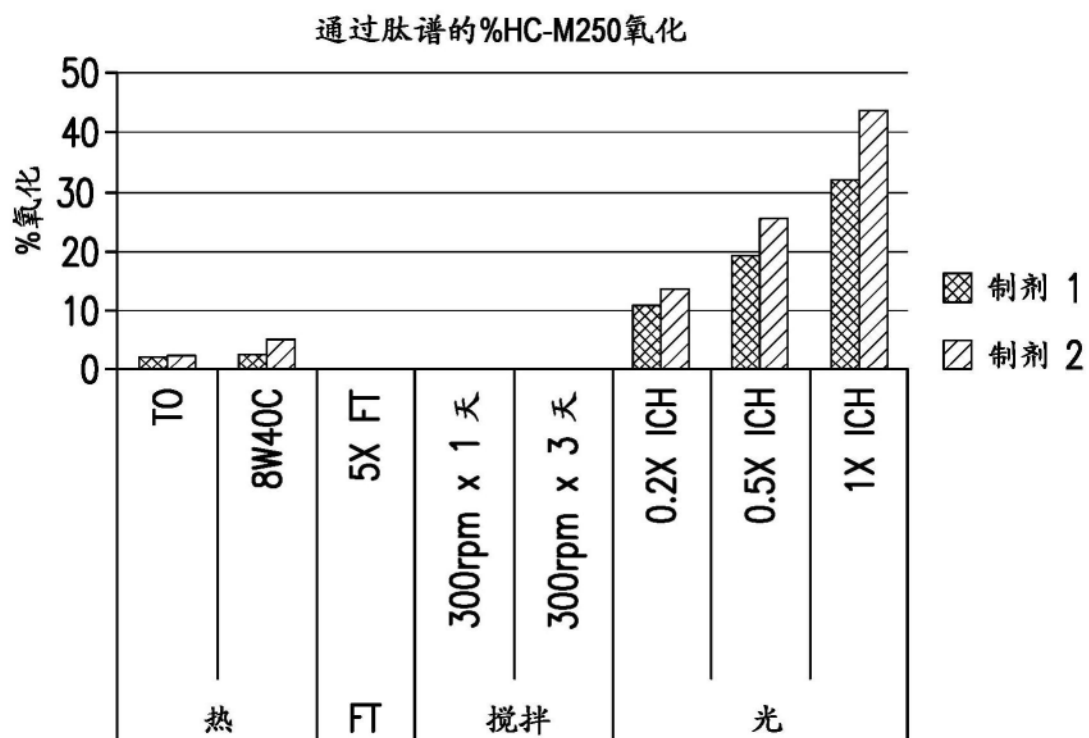


图15

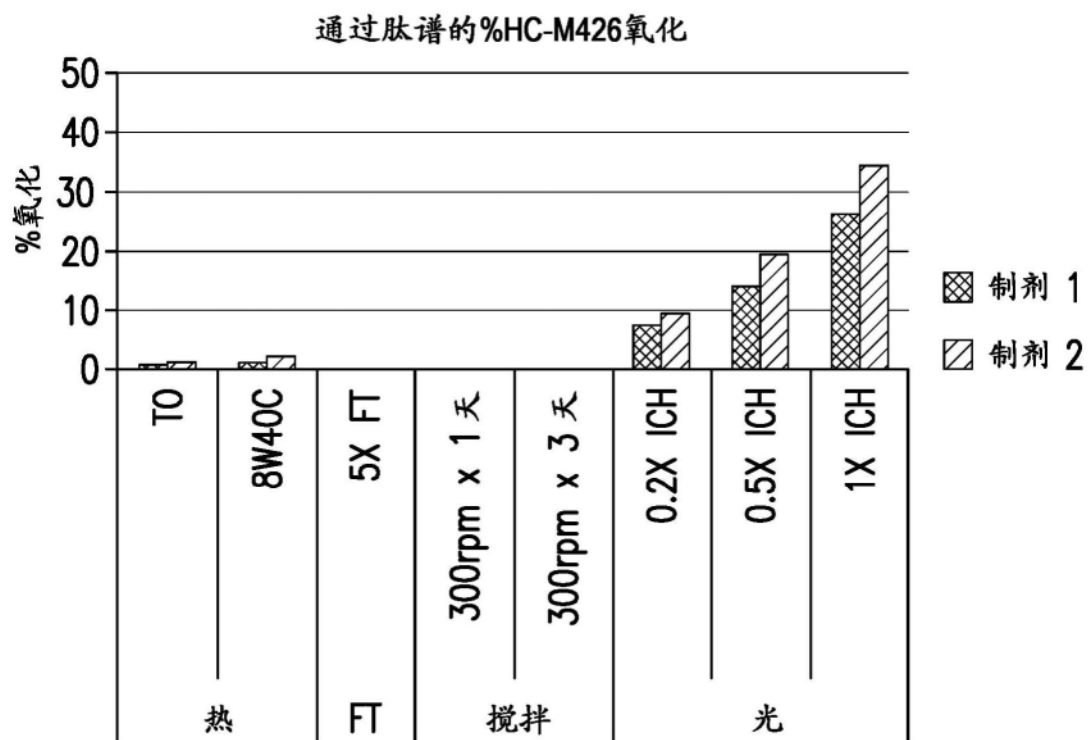


图16

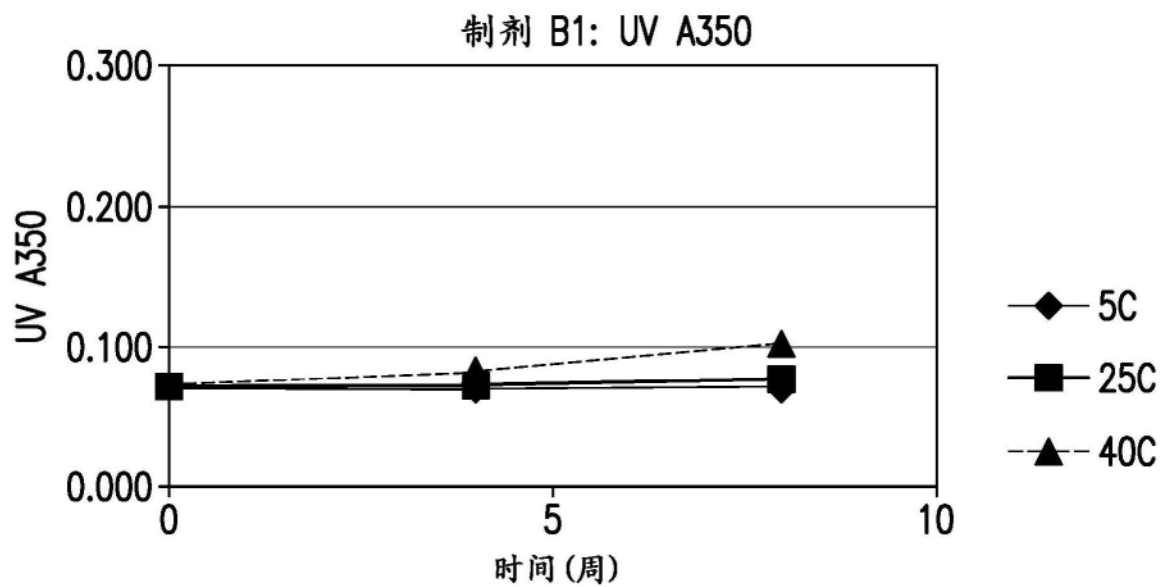


图17A

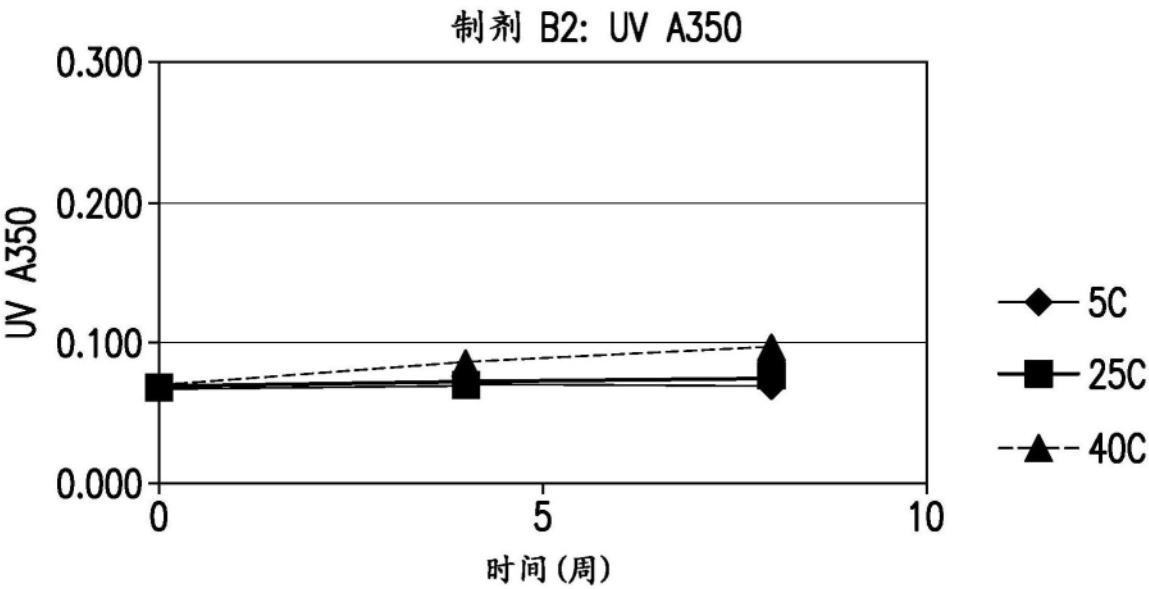


图17B

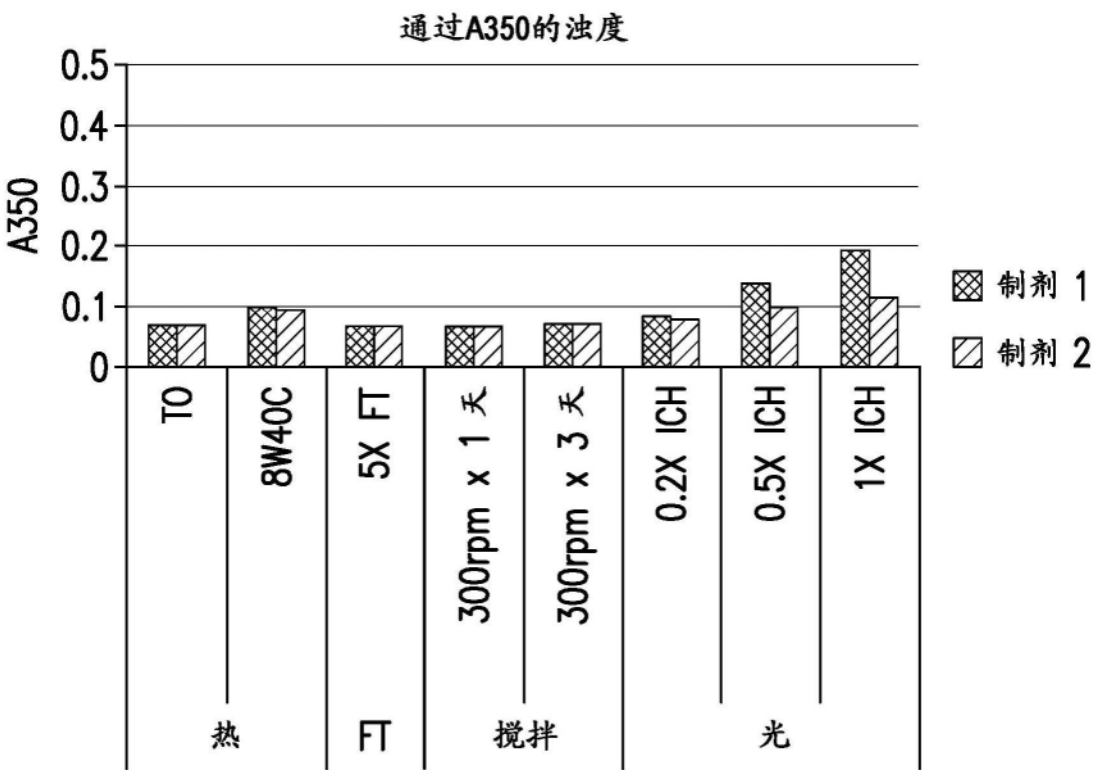


图18

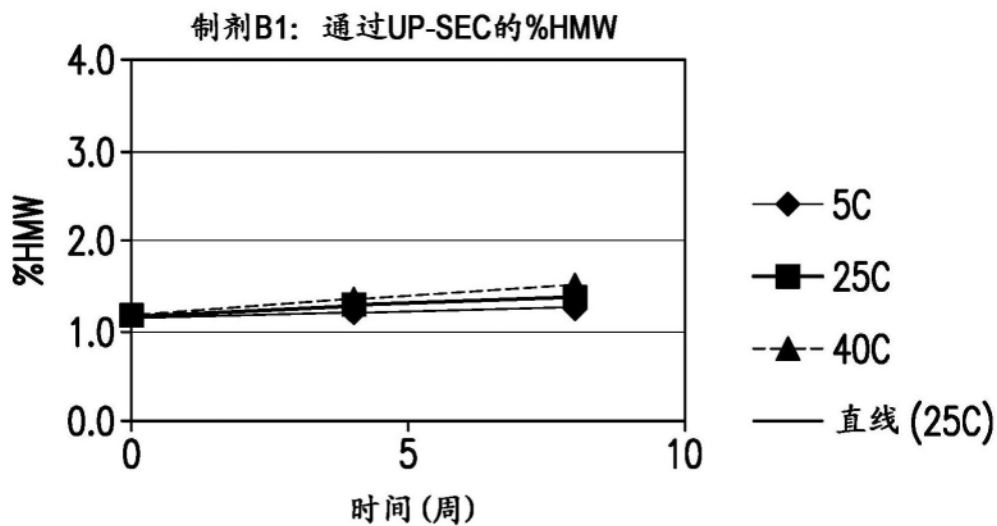


图19A

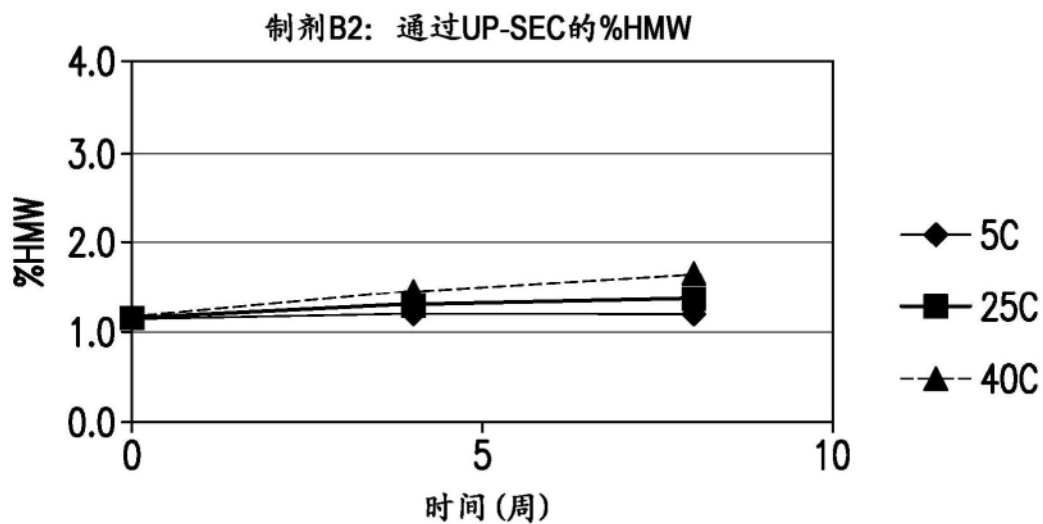


图19B

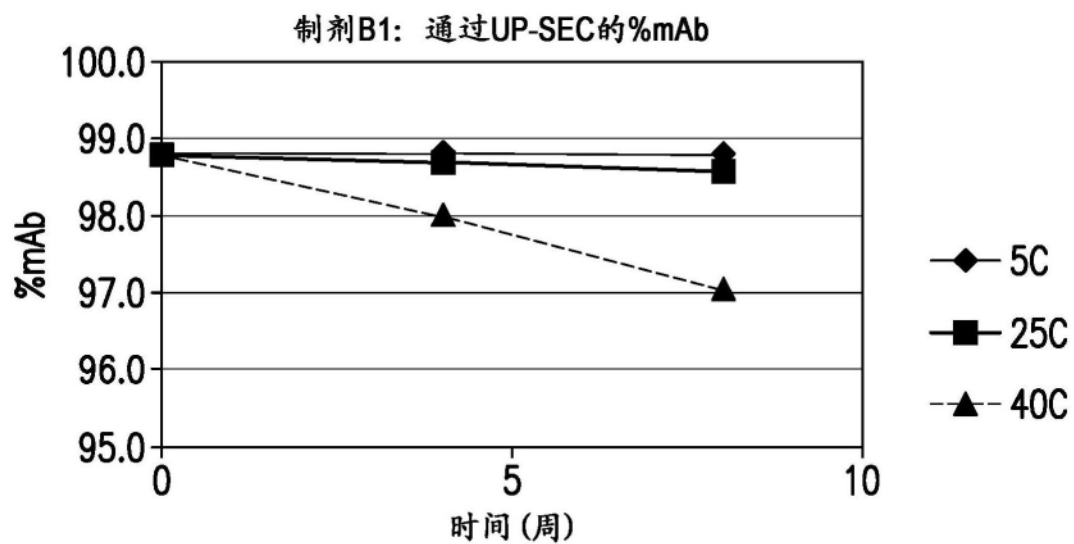


图20A

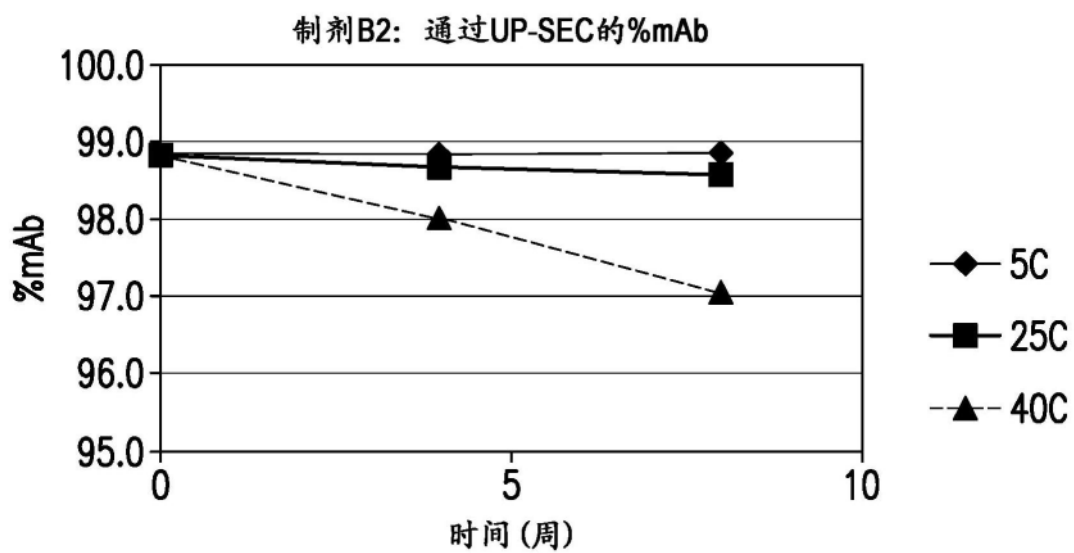


图20B

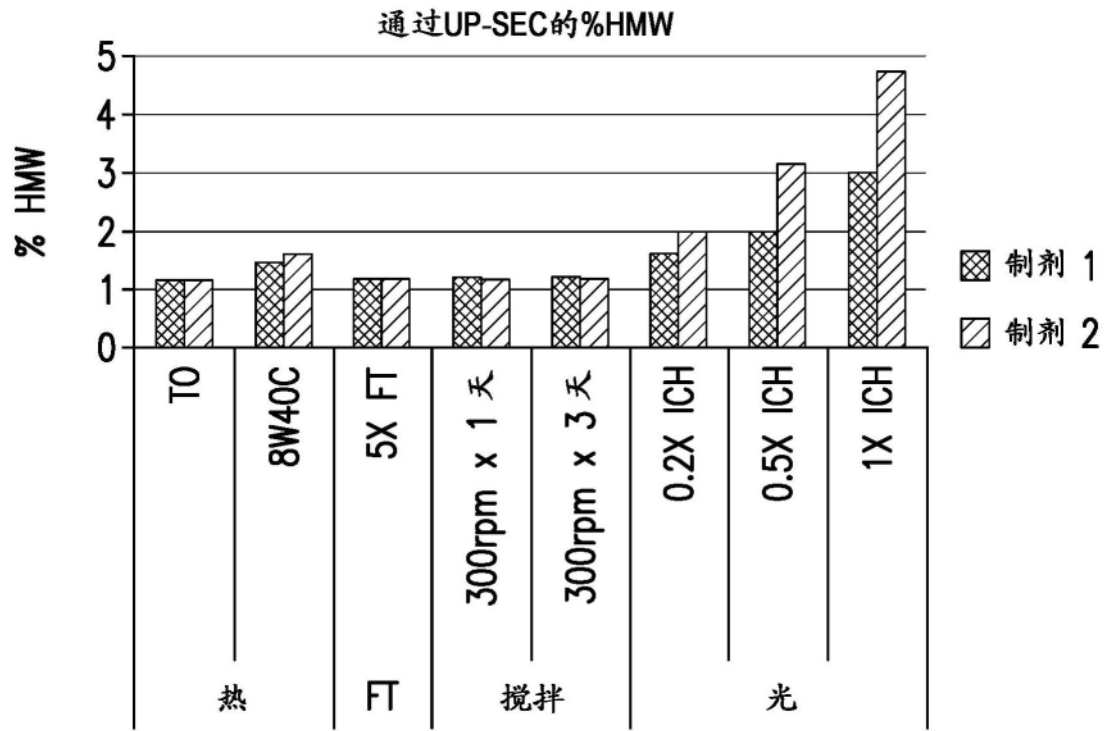


图21

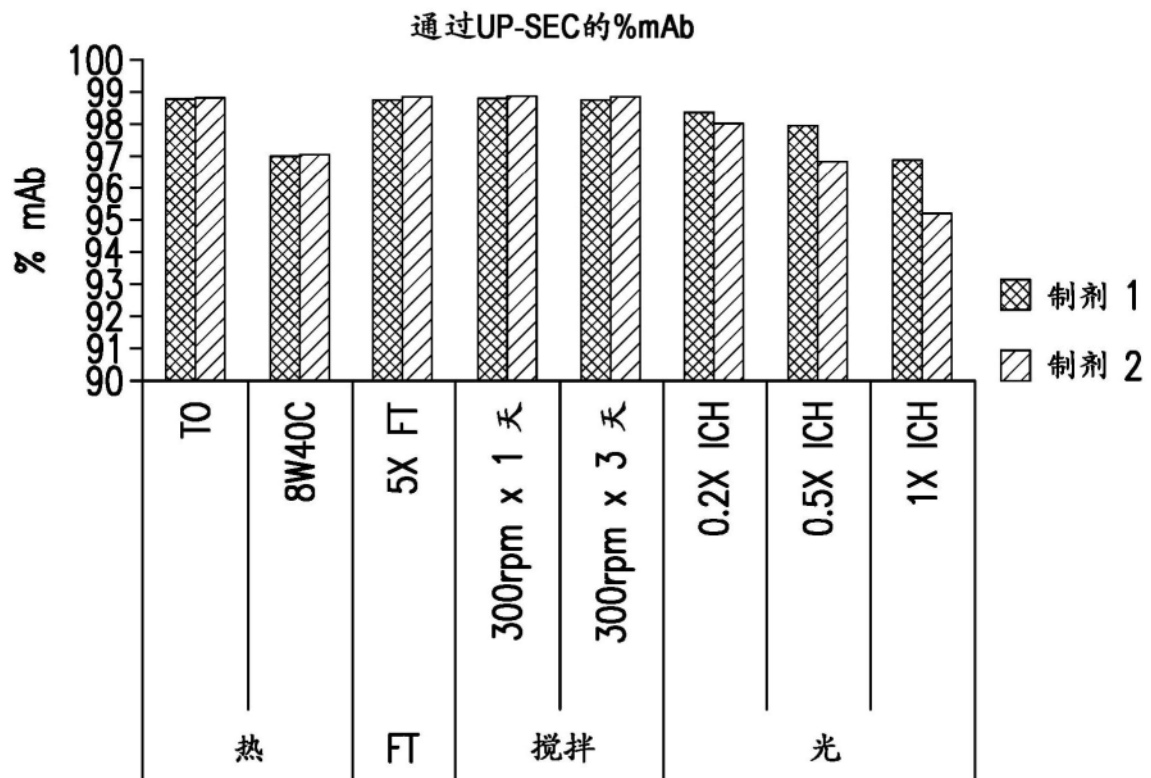


图22



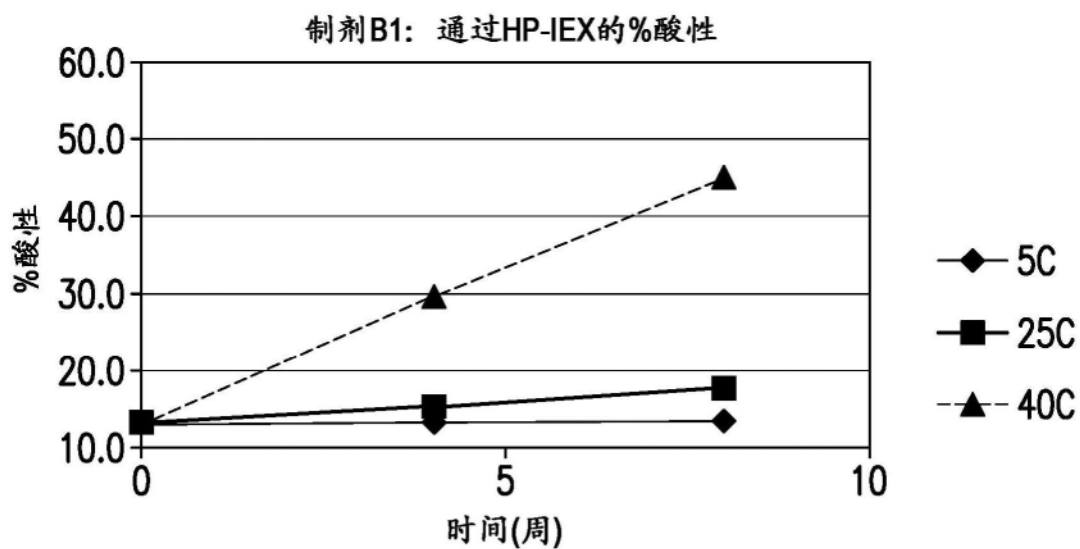


图23A

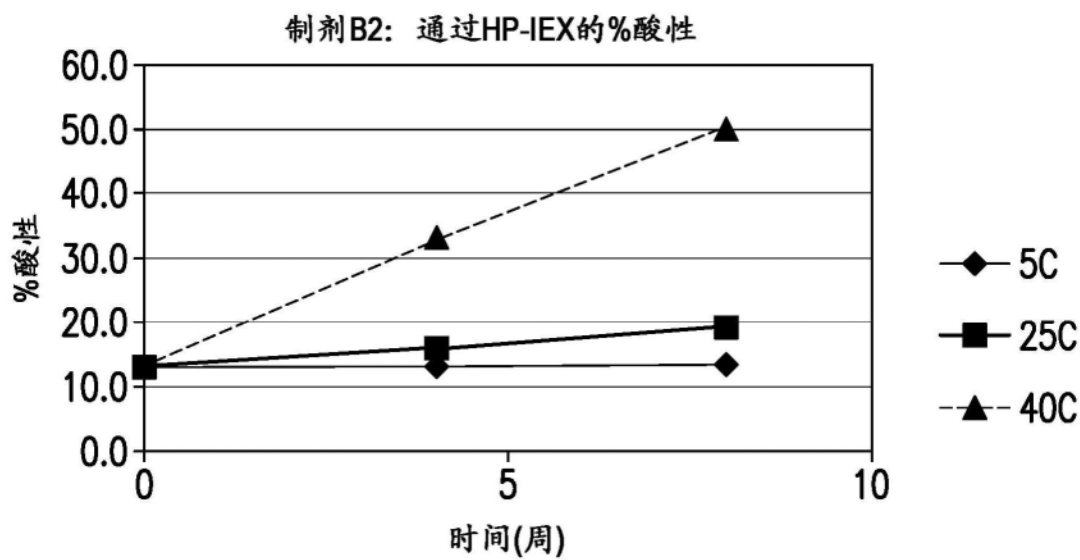


图23B

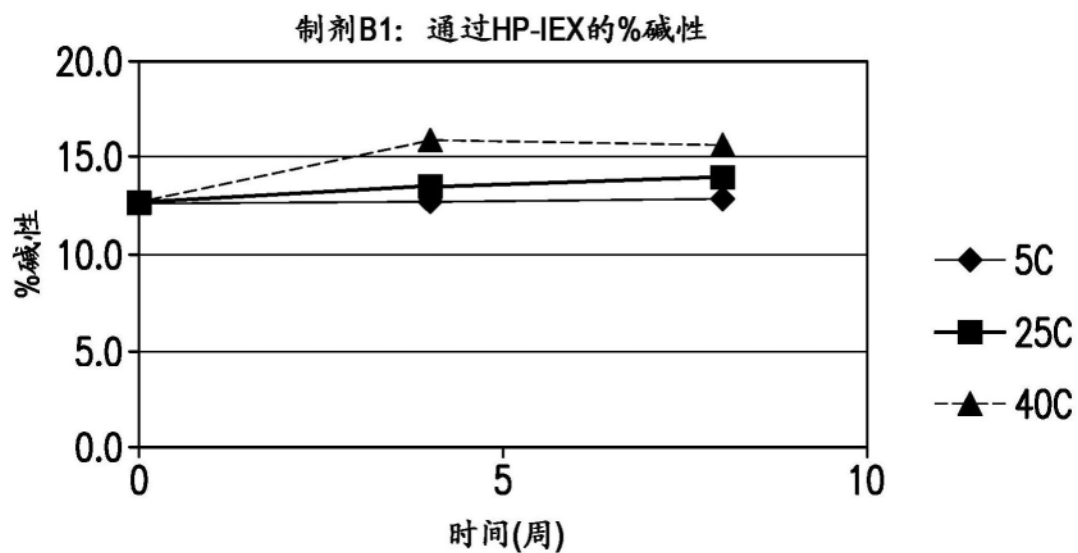


图24A

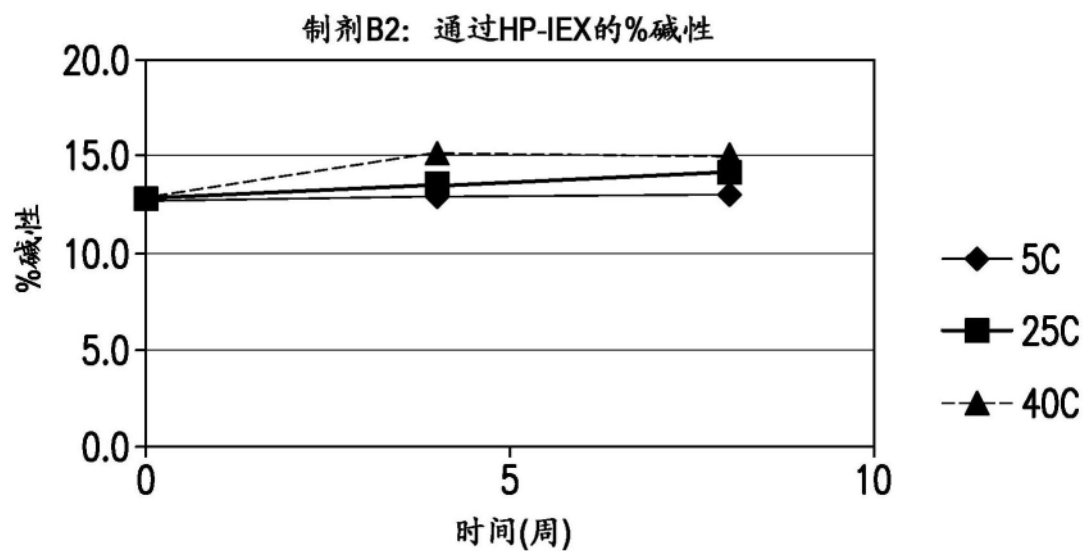


图24B

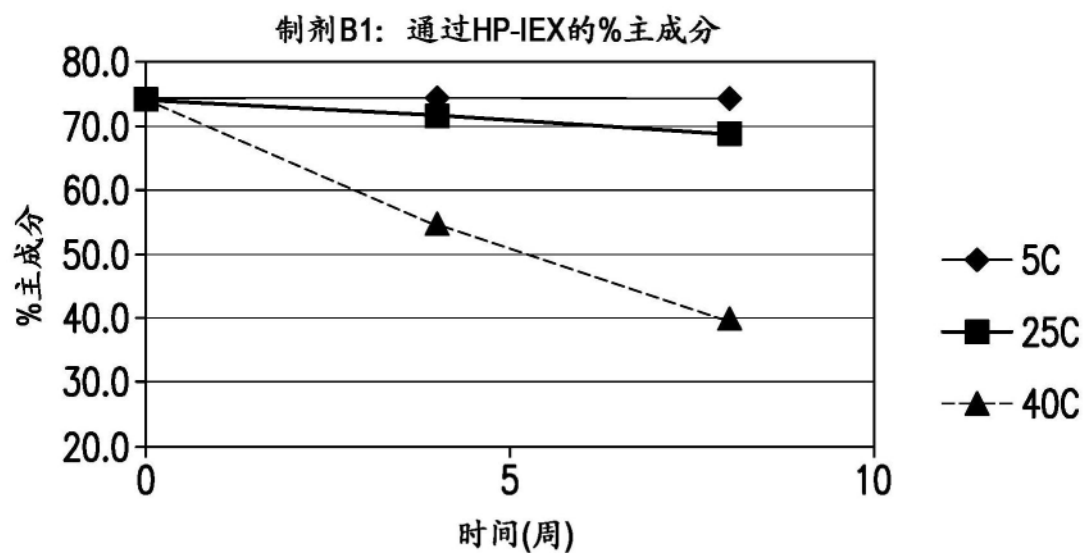


图25A

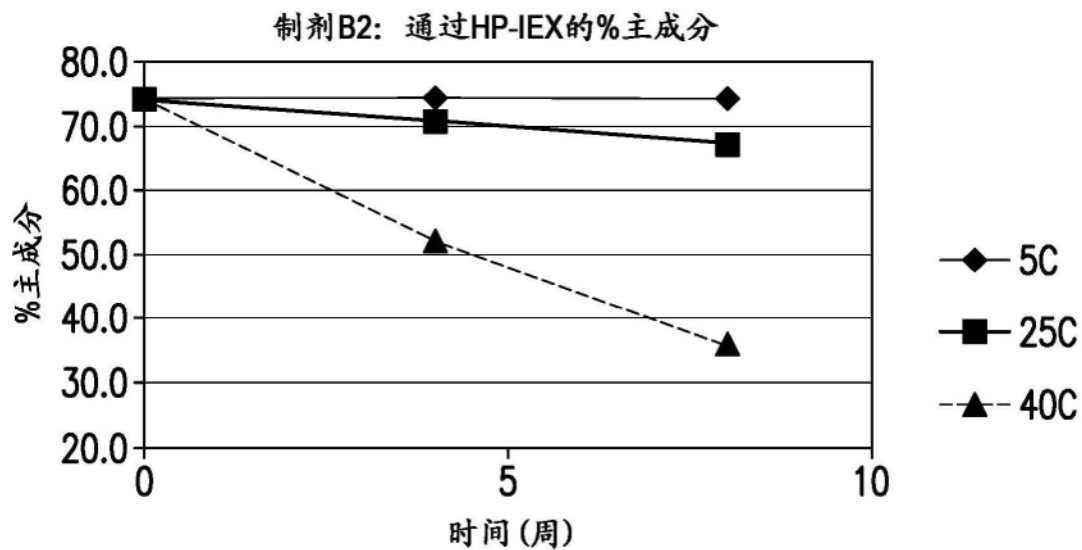


图25B

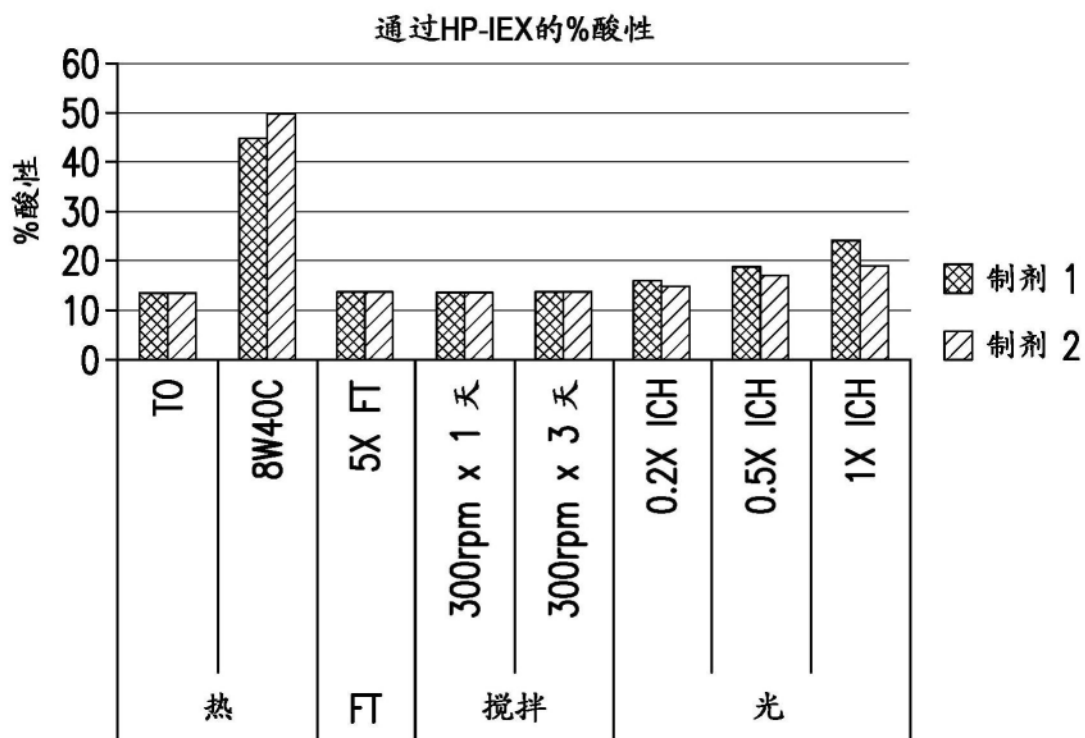


图26

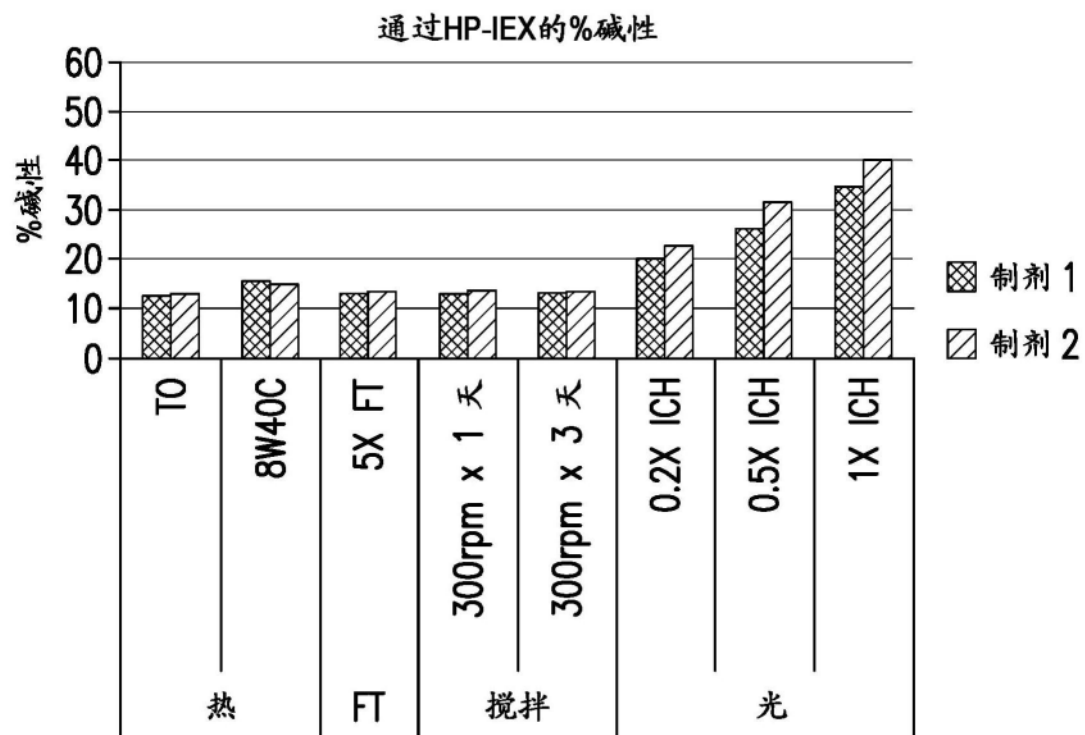


图27

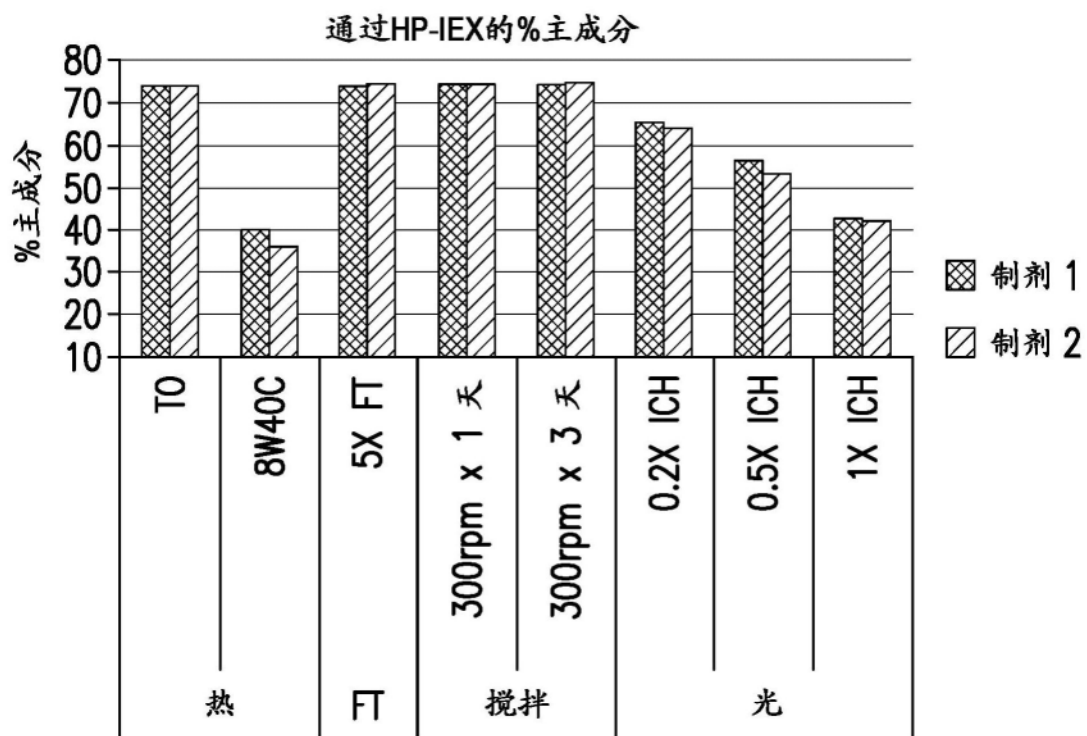


图28

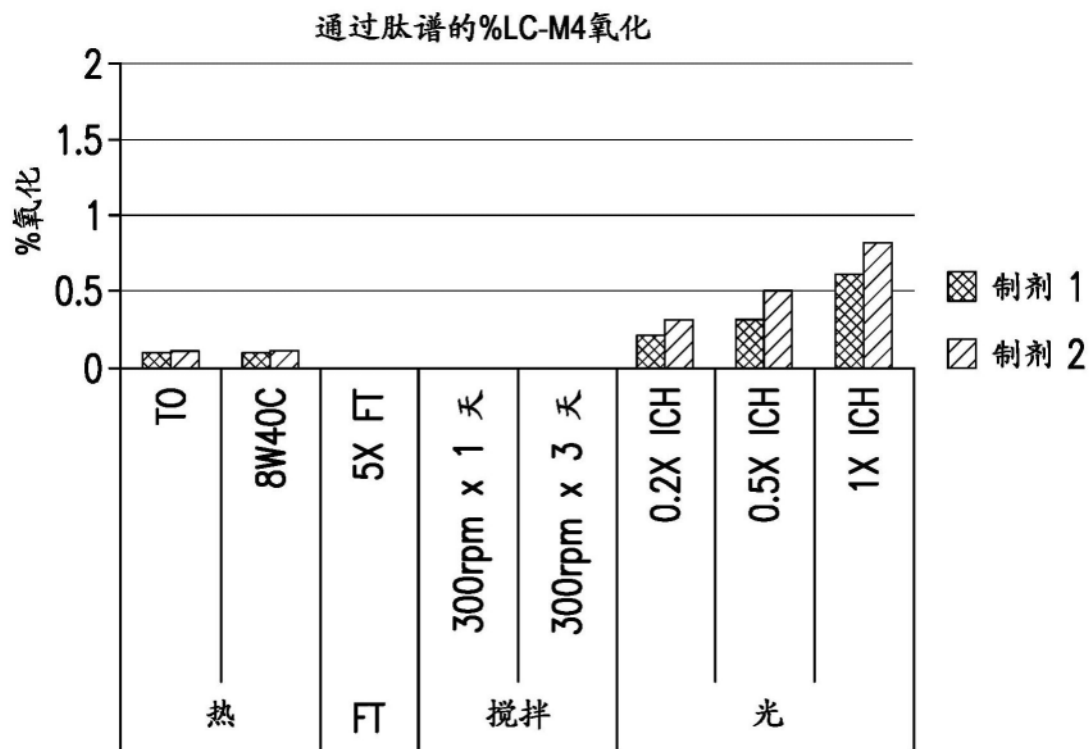


图29

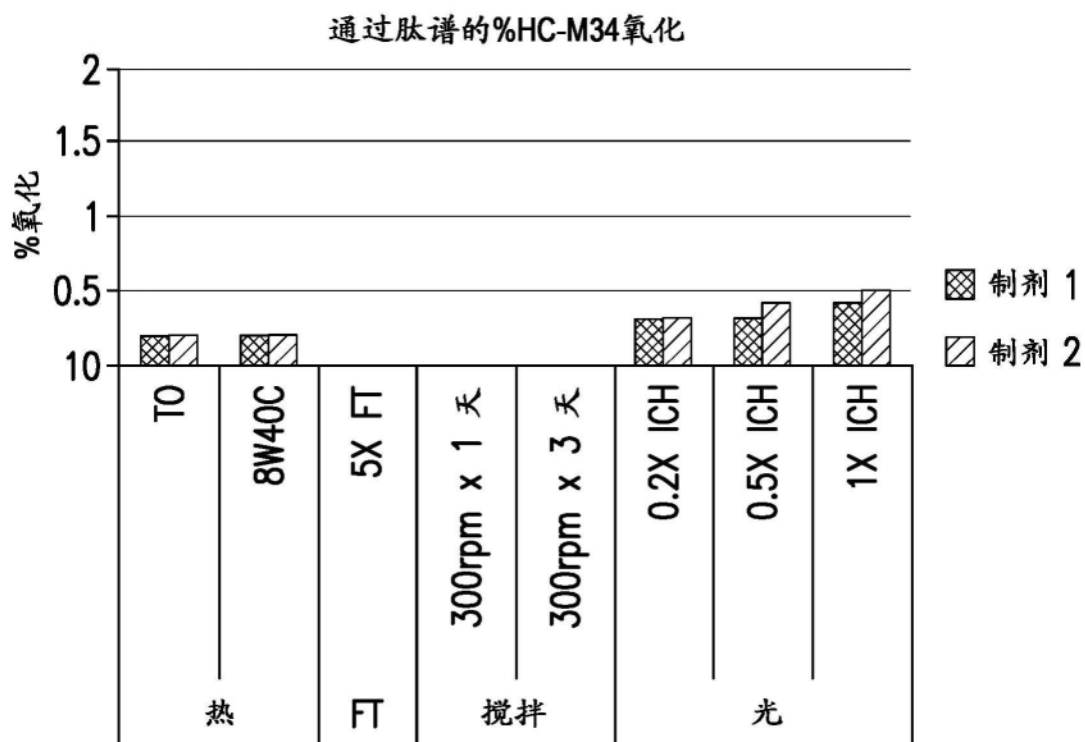


图30

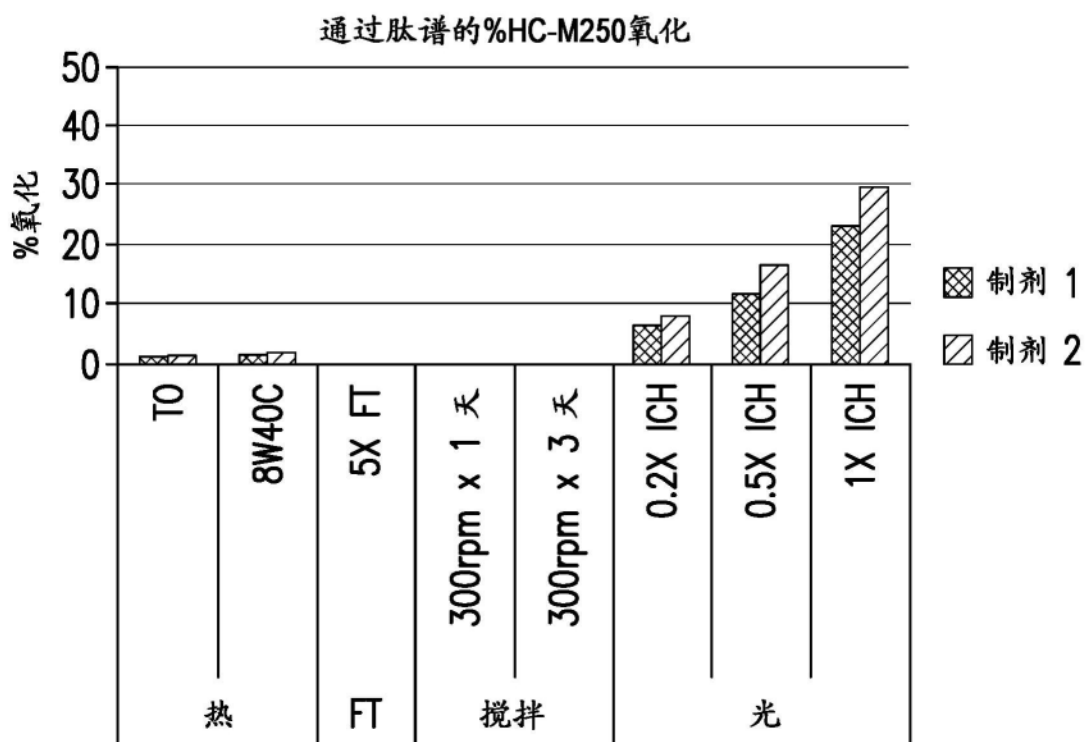


图31

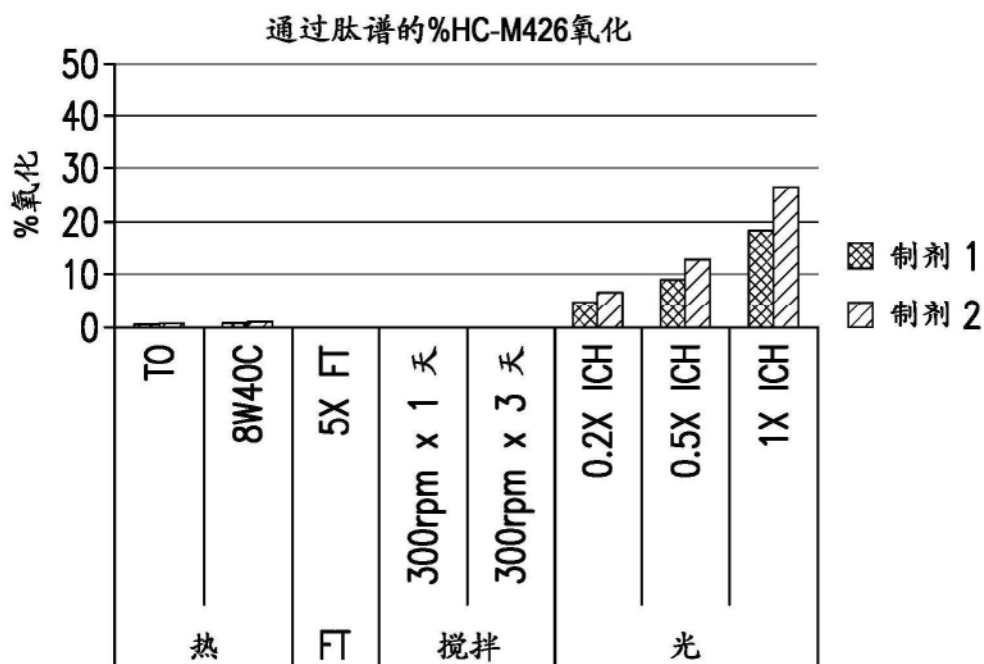


图32

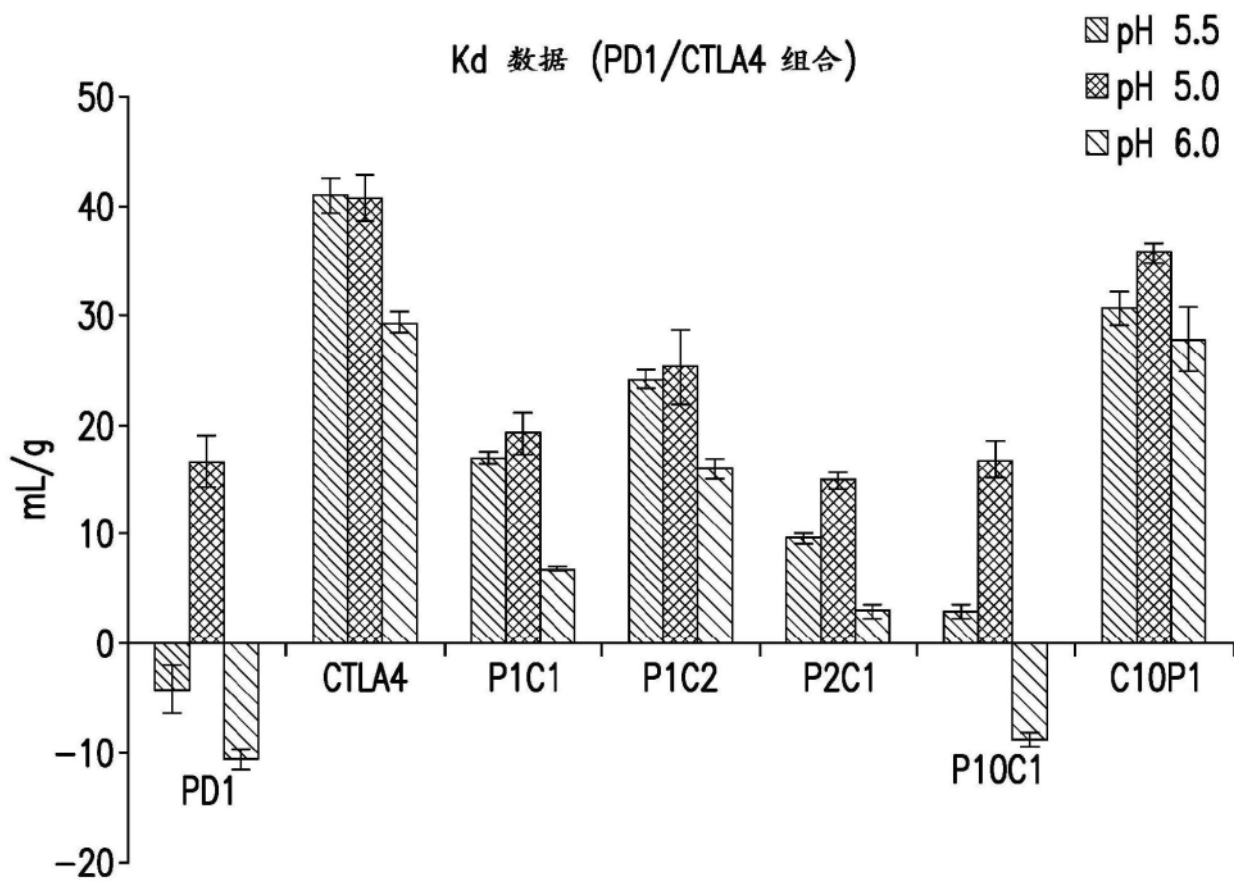


图33

## 依匹单抗

## 重链 (SEQ ID No:84)

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF  
ISYDGNNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG  
WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY  
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD  
TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST  
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY  
TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD  
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

## 轻链 (SEQ ID No:85)

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY  
GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG  
QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK  
VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSL TLSKADYEKH KUYACEVTHQ  
GLSSPVTKSF NRGEC

图34