



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119032099 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 26

|                                                   |                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) 申请号 202380033420.7                           | (74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司<br>11332<br>专利代理师 刘明海 胡彬                                                                                                                                                            |
| (22) 申请日 2023.02.09                               |                                                                                                                                                                                                              |
| (30) 优先权数据<br>63/267,810 2022.02.10 US            | (51) Int.Cl.<br>C07K 1/22 (2006.01)<br>A61K 47/59 (2017.01)<br>A61K 47/60 (2017.01)<br>A61K 47/61 (2017.01)<br>A61K 39/395 (2006.01)<br>B01D 15/38 (2006.01)<br>C07K 16/22 (2006.01)<br>C07K 16/24 (2006.01) |
| (85) PCT国际申请进入国家阶段日<br>2024.10.10                 |                                                                                                                                                                                                              |
| (86) PCT国际申请的申请数据<br>PCT/US2023/062322 2023.02.09 |                                                                                                                                                                                                              |
| (87) PCT国际申请的公布数据<br>W02023/154822 EN 2023.08.17  |                                                                                                                                                                                                              |
| (71) 申请人 科达制药股份有限公司<br>地址 美国                      |                                                                                                                                                                                                              |
| (72) 发明人 安德里亚斯·塞巴斯蒂安·楚尔布<br>里根<br>卡罗尔·印-阿尔本       | 权利要求书7页 说明书159页<br>序列表(电子公布) 附图19页                                                                                                                                                                           |

(54) 发明名称

纯化产品的方法

(57) 摘要

本文提供的实施方案涉及亲和层析纯化和分离来自所需的分子和化学种类的污染物种类,包括HCP(宿主细胞蛋白质)。可以在目的产品与亲和层析基质结合的方法中生产或处理该产品。还提供了蛋白质纯化系统。



1. 一种使用亲和层析纯化产品的方法,所述方法包括:将洗脱液上样到亲和层析基质中,其中所述亲和层析基质与目的蛋白质结合;和用包含离液剂的缓冲溶液洗涤所述亲和层析基质。

2. 一种从包含蛋白质和一种或多种杂质的上样流体中纯化产品和减少杂质的方法,所述方法通过使上样流体经过亲和层析基质,随后通过至少一种包含离液盐的洗涤溶液,并使用洗脱溶液收集蛋白质。

3. 一种分离包含目的蛋白质的洗出液中的杂质的方法,所述方法包括:

将包含目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上;并用一种或多种包含镁或镁盐的缓冲溶液洗涤所述亲和层析基质。

4. 一种使用亲和层析生产产品的方法,所述方法包括:

将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,  
用包含磷酸钠和盐的第一缓冲液对所述亲和层析基质进行第一洗涤,和  
用包含离液剂的第二缓冲液对所述亲和层析基质进行第二洗涤。

5. 一种使用亲和层析生产产品的方法,所述方法包括:

将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,  
用含有Tris和盐的第一缓冲液进行第一洗涤,  
用含有Tris和离液剂的第二缓冲液进行第二洗涤,其中第二缓冲液离液剂与第一缓冲液中含有的盐不同。

6. 一种生产产品的方法,所述方法包括:

(i) 收集上样流体,其中所述上样流体包含目的蛋白质,  
(ii) 将所述上样流体上样到亲和层析基质上,其中所述亲和层析基质与目的蛋白质结合,  
(iii) 用包含离液盐的缓冲溶液洗涤所述亲和层析基质,  
(iv) 洗脱结合的目的蛋白质;和  
(v) 收集洗出液,其中所述洗出液含有目的蛋白质。

7. 一种生产产品的方法,所述方法包括:

收集上样流体,其中所述上样流体包含目的蛋白质,  
将所述上样流体上样到亲和层析基质上,  
其中所述亲和层析基质与目的蛋白质结合,  
向所述亲和层析基质供给包含离液盐的缓冲溶液,  
洗脱结合的目的蛋白质;和  
收集洗出液,其中所述洗出液含有目的蛋白质。

8. 一种生产产品的方法,所述方法包括:

收集缀合蛋白质,其中所述缀合蛋白质包含与缀合聚合物结合的抗体,将所述缀合蛋白质上样到亲和层析基质上,其中所述亲和层析基质与所述缀合蛋白质结合,  
用包含离液盐的缓冲溶液洗涤所述亲和层析基质,  
洗脱缀合蛋白质,和  
收集洗出液,其中所述洗出液含有缀合蛋白质。

9. 一种生产产品的方法,所述方法包括:

用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,

其中所述洗出液含有目的靶蛋白质,  
并从洗出液中去除病毒污染物。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中从洗出液中去除病毒污染物包括:

低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)和/或渗滤(DF)中的一种或多种。

11. 一种生产产品的方法,所述方法包括:

用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,  
去除离液盐,洗脱并收集洗出液,其中所述洗出液含有目的靶蛋白质。

12. 根据11所述的方法,其中所述洗出液进一步与可接受的药物赋形剂组合以形成药物组合物。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中向所述药物组合物中加入缓冲溶液。

14. 根据权利要求12所述的方法,其中向所述药物组合物中加入防腐溶液。

15. 根据权利要求12所述的方法,其中进一步精制所述药物组合物用于玻璃体内注射。

16. 一种生产产品的方法,所述方法包括:

收集上样流体,其中所述上样流体包含目的蛋白质,将所述上样流体上样到亲和层析基质中,其中所述亲和层析基质与目的蛋白质结合,

用包含离液盐的缓冲溶液洗涤所述亲和层析基质,  
洗脱并收集洗出液,其中所述洗出液含有目的靶蛋白质,和  
从洗出液中去除病毒污染物。

17. 一种生产产品的方法,所述方法包括:

将洗脱液上样到亲和层析基质中,

用第一洗涤缓冲液洗涤,

用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤,

用第三洗涤缓冲液洗涤,其中所述第三洗涤缓冲液去除离液盐,

用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中所述洗出液包含蛋白质产品。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第一洗涤缓冲液包含50mM磷酸钠。

19. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第一洗涤缓冲液还包含250mM NaCl。

20. 根据权利要求17所述的方法,其中所述第一洗涤缓冲液包含Tris和盐。

21. 根据权利要求17所述的方法,还包括从洗出液中去除病毒污染物。

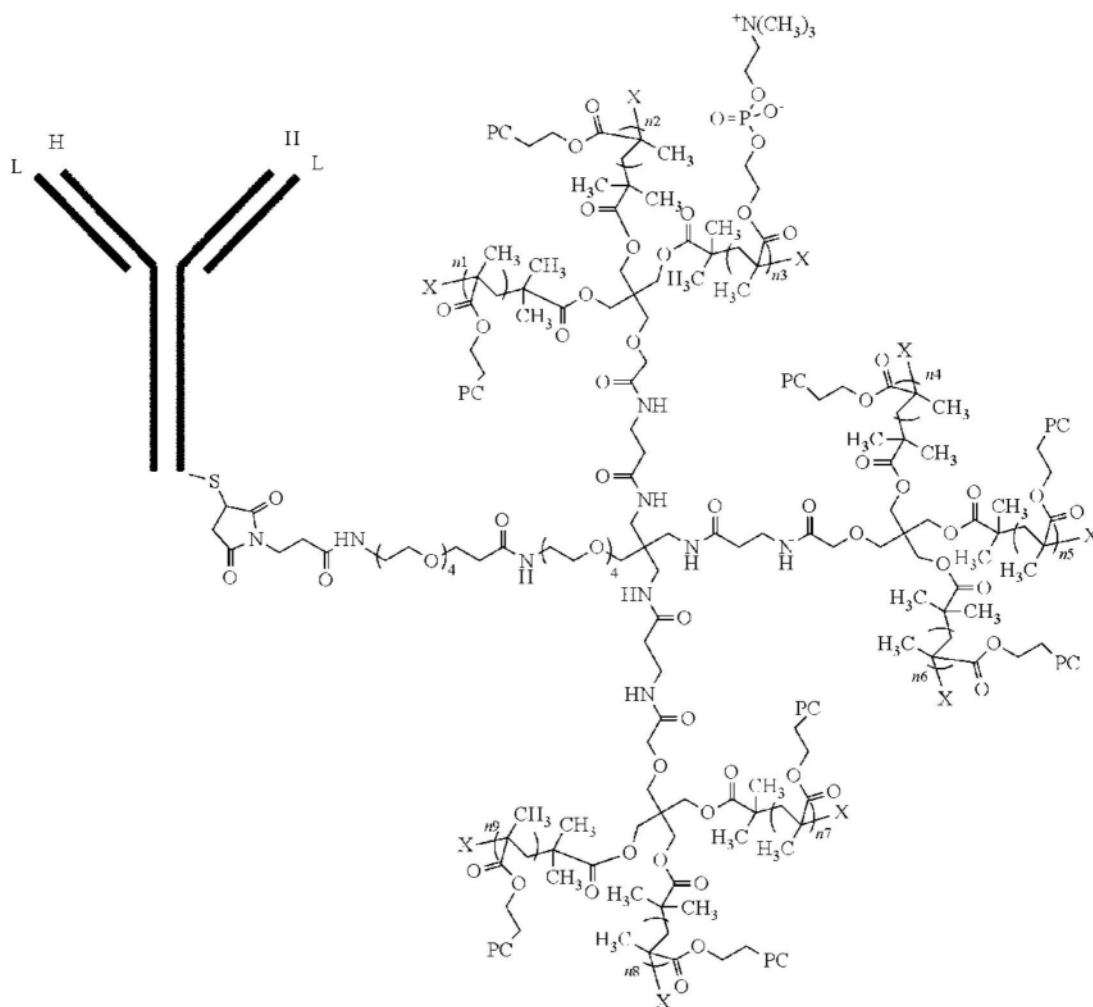
22. 根据权利要求21所述的方法,其中去除病毒污染物包括:低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)或渗滤(DF)中的一种或多种。

23. 根据权利要求17所述的方法,其中所述洗脱液包含目的蛋白质。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述目的蛋白质是抗体。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述抗体进一步与聚合物缀合以形成抗体缀合物。

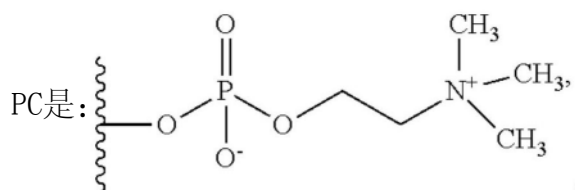
26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述抗体缀合物具有式(I)的结构:



其中：

抗VEGF-A抗体的每条重链由字母H表示，抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示；

聚合物通过C443 (EU编号) 的巯基与抗VEGF-A抗体结合，所述结合描绘在重链之一上；



其中曲线表示与聚合物其余部分的连接点，其中X为a) —OR，其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基，b) —H，c) 任何卤素，包括—Br、—Cl或—I，d) —SCN，或e) —NCS；和

i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数；或ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同，使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

27. 根据权利要求25所述的方法，其中所述抗体缀合物包含双特异性抗体。

28. 根据权利要求24所述的方法，其中所述双特异性抗体包括抗VEGF和抗IL-6结合部分。

29. 一种生产产品的方法，所述方法包括：

回收细胞培养物上清液，其中所述细胞培养物上清液包含目的蛋白质，

将所述细胞培养物上清液处理成洗脱液,其中所述洗脱液包含目的蛋白质,  
将所述洗脱液上样到亲和层析基质中,  
用包含Tris或磷酸钠的第一洗涤缓冲液洗涤,  
用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤,  
用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中所述洗出液包含蛋白质产品,  
用低pH病毒缓冲液灭活所述洗出液中存在的病毒污染物以得到病毒灭活的洗出液,  
过滤所述病毒灭活的洗出液,  
对所述病毒灭活的洗出液进行至少一轮离子交换层析,和  
过滤所述病毒灭活的洗出液以得到渗余物,其中所述渗余物包含目的蛋白质。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述细胞培养物上清液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。

31. 根据权利要求29所述的方法,其中处理所述细胞培养物上清液包括从细胞培养物中收获细胞产品。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中澄清细胞培养物以去除细胞和细胞碎片。

33. 根据权利要求29所述的方法,其中所述洗脱液包含澄清的细胞培养物上清液。

34. 一种使用亲和层析纯化蛋白质的方法,所述方法包括:

使上样流体与介质接触,其中所述介质是结合目的蛋白质的亲和层析基质,用包含离液剂的缓冲溶液洗涤所述介质,其中所述离液剂是盐,并在适于洗脱目的蛋白质的条件下使洗涤过的介质与洗脱溶液接触。

35. 一种生产产品的方法,所述方法包括:

将含有目的蛋白质的溶液施加到亲和层析基质上,  
用第一缓冲液洗涤所述亲和层析基质,  
用含有离液剂的第二缓冲液洗涤所述亲和层析基质,  
用第三缓冲液洗涤所述亲和层析基质以去除所述离液剂,  
用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中所述洗出液包含蛋白质产品。

36. 一种蛋白质纯化系统,所述系统包括:

柱,所述柱具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白,  
包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液,  
包含tris的中间洗涤缓冲液,  
包含氯化镁的第二洗涤缓冲液,和  
包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

37. 一种蛋白质纯化系统,所述系统包括:

柱,所述柱具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白,  
包含tris和盐的第一tris洗涤缓冲液,  
中间tris洗涤缓冲液,  
包含氯化镁的第二洗涤缓冲液,和  
包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

38. 根据权利要求36所述的系统,其中所述柱包含用于亲和层析的配体。

39. 根据权利要求36所述的系统,其中所述配体包括蛋白A或蛋白G。

40. 根据权利要求36所述的系统,其中包含磷酸钠和盐的第一洗涤缓冲液具有5.5至9.5之间的pH。

41. 根据权利要求36所述的系统,其中包含磷酸钠和盐的所述磷酸盐洗涤缓冲液包含约50mM磷酸钠。

42. 根据权利要求36所述的系统,其中包含磷酸钠和盐的所述磷酸盐洗涤缓冲液包含约250mM NaCl。

43. 根据权利要求36所述的系统,其中所述第一tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。

44. 根据权利要求43所述的系统,其中所述第一tris洗涤缓冲液还包含约250mM NaCl。

45. 根据权利要求36所述的系统,其中所述中间tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。

46. 根据权利要求36所述的系统,其中所述第一tris洗涤缓冲液的pH为约7.2。

47. 根据权利要求36所述的系统,其中所述第二洗涤缓冲液的pH为约7.8。

48. 根据权利要求36所述的系统,其中所述第二洗涤缓冲液中氯化镁的浓度为约2.8M。

49. 根据权利要求36所述的系统,其中所述洗脱缓冲液中甲酸钠的浓度包含10mM。

50. 一种抗体纯化系统,其包括:

具有与抗体结合的蛋白A树脂的柱,其中所述抗体包括分别为SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个和SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个的轻链和重链,和包含离液盐的离液洗涤缓冲液,和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

51. 根据权利要求1所述的方法,其中所述目的蛋白质是双特异性抗体。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述双特异性抗体对VEGF和IL-6具有特异性。

53. 根据权利要求51所述的方法,其中所述双特异性抗体是OG2072。

54. 根据权利要求1所述的方法,其中所述目的蛋白质是抗体缀合物。

55. 根据权利要求1所述的方法,其中所述亲和层析基质是蛋白A层析基质。

56. 根据权利要求1所述的方法,其中所述缓冲溶液中的离液剂包含锂、锂盐、镁、镁盐、钙、钙盐、胍和/或胍盐中的一种或多种。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中锂、锂盐、镁、镁盐、钙、钙盐、胍和/或胍盐中的一种或多种的浓度分别在0.05-3.5M之间。

58. 根据权利要求1所述的方法,其中所述缓冲溶液还包含tris。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述缓冲溶液中tris的浓度至少为5mM。

60. 根据权利要求1所述的方法,其中所述缓冲溶液的pH大于5.5。

61. 根据权利要求3所述的方法,其中所述洗出液还含有病毒杂质。

62. 根据权利要求61所述的方法,还包括去除所述病毒杂质。

63. 根据权利要求62所述的方法,还包括灭活所述病毒杂质。

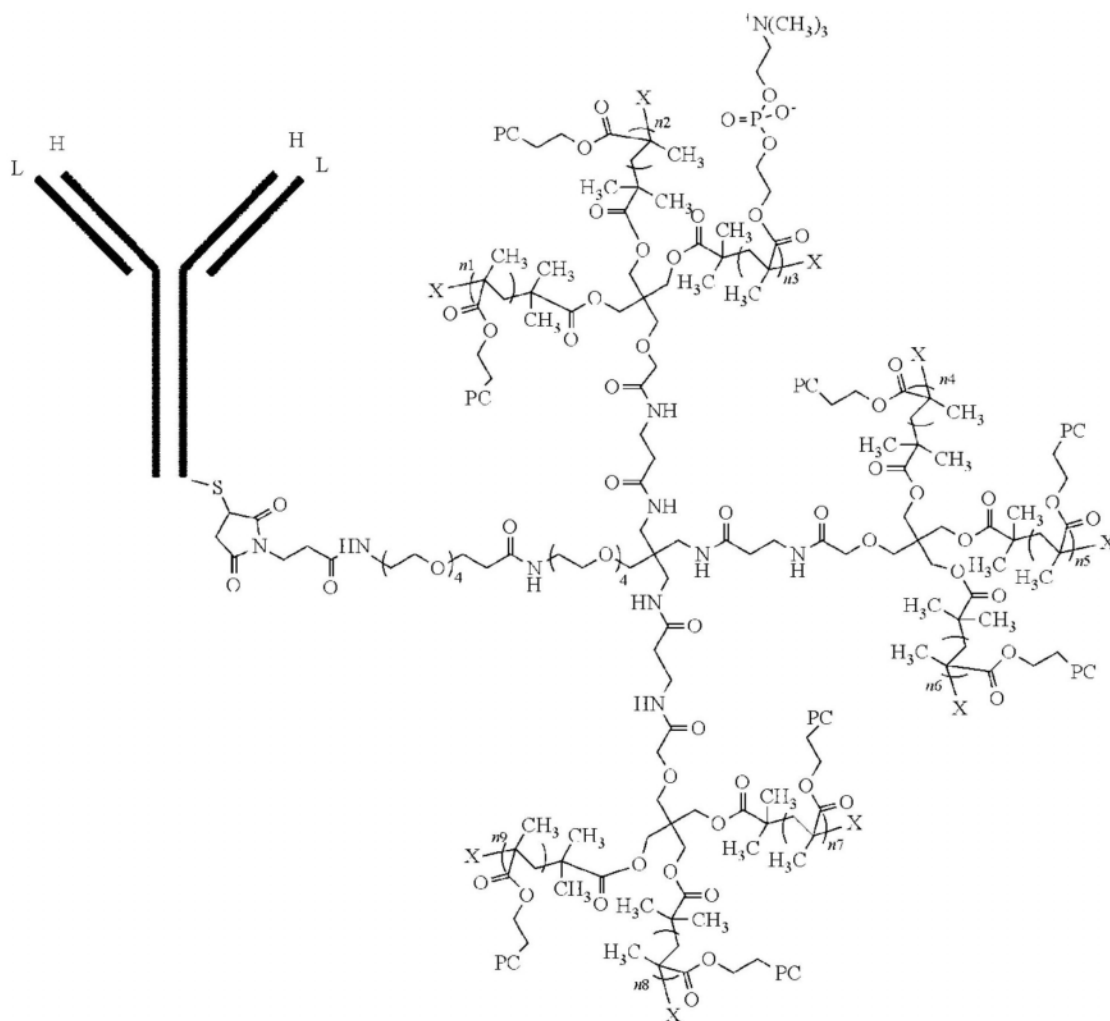
64. 根据权利要求3所述的方法,还包括在用缓冲溶液洗涤之前,用预洗涤缓冲溶液洗涤上样有上样流体的亲和层析基质的步骤。

65. 根据权利要求64所述的方法,还包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。

66. 根据权利要求64所述的方法,其中所述预洗涤缓冲溶液包含磷酸钠。

67. 根据权利要求64所述的方法,其中所述预洗缓冲溶液包含Tris和盐。

68. 根据权利要求25所述的方法,其中所述抗体缀合物具有式(I)的结构,

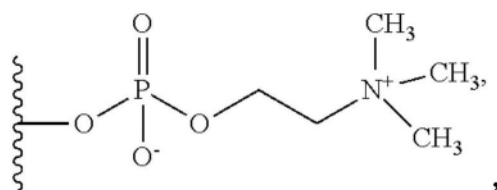


其中：

抗VEGF-A抗体的每条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示;

聚合物通过C443(EU编号)的巯基与抗VEGF-A抗体结合,所述结合描绘在重链之一上;

PC是：



其中曲线表示与聚合物其余部分的连接点,其中X为a)  $-\text{OR}$ ,其中R为 $-\text{H}$ 、甲基、乙基、丙基、异丙基,b)  $-\text{H}$ ,c) 任何卤素,包括 $-\text{Br}$ 、 $-\text{Cl}$ 或 $-\text{I}$ ,d)  $-\text{SCN}$ ,或e)  $-\text{NCS}$ ;和

其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数。

69. 根据权利要求68所述的方法,其中所述抗体缀合物包含抗VEGF抗体缀合物,所述抗VEGF抗体缀合物包含抗VEGF-A轻链和抗VEGF-A重链,其中抗VEGF-A抗体重链包含CDRH1:即SEQ ID NO:172中的CDRH1,CDRH2:即SEQ ID NO:173中的CDRH2,和CDRH3:即SEQ ID NO:174中的CDRH3,抗VEGF-A抗体轻链包含CDRL1:即SEQ ID NO:199中的CDRL1,CDRL2:即SEQ ID NO:200中的CDRL2,和CDRL3:即SEQ ID NO:201中的CDRL3。

70. 根据权利要求69所述的方法, 其中所述抗VEGF抗体缀合物包含: 包含与聚合物结合

的抗VEGF-A免疫球蛋白G(IgG)的抗体缀合物,所述聚合物包含MPC单体,其中抗VEGF-A抗体重链的序列为SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个,抗VEGF-A抗体轻链的序列为SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个,并且其中所述抗体在C449处与所述聚合物结合。

71.根据权利要求1所述的方法,其中所述目的靶蛋白质通过细胞培养物产生。

72.根据权利要求71所述的方法,其中所述细胞培养物包含CHO细胞。

73.根据权利要求3所述的方法,还包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。

74.根据权利要求3所述的方法,其中用缓冲溶液洗涤所述亲和层析基质去除核酸、内毒素、消泡剂或除所述目的靶蛋白质之外的其他小分子。

75.根据权利要求3所述的方法,其中用缓冲溶液洗涤所述亲和层析基质去除杂质,同时保持所述目的靶蛋白质与所述亲和层析基质结合。

76.根据权利要求3所述的方法,其中用缓冲溶液洗涤所述亲和层析基质去除除所述目的靶蛋白质之外的宿主细胞蛋白质。

77.根据权利要求4所述的方法,其中在缓冲溶液中添加离液剂不会洗脱所述目的靶蛋白质。

78.根据权利要求3所述的方法,还包括病毒灭活、切向流过滤、渗滤、超滤、离子交换层析或病毒减少过滤中的一种或多种。

79.根据权利要求3所述的方法,其中所述洗脱液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。

80.根据权利要求3所述的方法,其中所述产品是目的蛋白质。

81.根据权利要求3所述的方法,其中杂质包括宿主细胞蛋白质杂质。

82.根据权利要求17所述的方法,其中所述第一洗涤缓冲液包含10mM磷酸钠。

83.根据权利要求17所述的方法,其中所述第一洗涤缓冲液包含基于磷酸盐的种类。

84.根据权利要求17所述的方法,其中所述第一洗涤缓冲液还包含50mM NaCl。

85.一种处理产品的方法,所述方法包括:

将洗脱液上样到亲和层析基质中;和

用包含离液盐的洗涤缓冲液洗涤以收集洗出液,其中所述离液盐的浓度从第一浓度增加至第二浓度,其中在至少一个级分中收集洗出液,其中所述至少一个级分包含目的产品。

86.根据权利要求85所述的方法,其中所述第一浓度的离液盐的浓度是0M,其中所述第二浓度的离液盐的浓度是4.0M。

87.根据权利要求85所述的方法,其中所述离液盐是锂、锂盐、镁、镁盐、钙、钙盐、胍和/或胍盐中的一种或多种。

88.根据权利要求87所述的方法,其中所述离液盐选自氯化镁、氯化钙、氯化锂和盐酸胍。

89.根据权利要求1所述的方法,其中所述缓冲溶液还包含以下中的一种或多种:醋酸盐、柠檬酸盐、ACES、BES、Bicine、HEPES、MES、MOPS、MOPSO、TAPS、Tricine、Bis-Tris、Bis-Tris丙烷、甲次砷酸盐、CAPS、CAPSO、CHES、甘氨酸、双甘肽、咪唑、PIPES、TEA或TES。

## 纯化产品的方法

[0001] 序列表

[0002] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表以标题为KDI AK.141W0.xml的文件提供,创建于2023年2月8日,大小为843,266字节。序列表电子格式的信息通过引用整体并入本文。

[0003] 通过引用任何优先权申请而并入

[0004] 本申请要求2022年2月10日提交的美国临时申请号63/267810的优先权。

[0005] 与本申请一起提交的申请数据表中标明的外国或国内优先权要求的任何和所有申请均根据37CFR 1.57通过引用并入本文。

### 技术领域

[0006] 本公开涉及纯化抗体和其他细胞产品的方法。

### 背景技术

[0007] 处理和纯化来自细胞培养物的分子种类所涉及的单元操作包括优先分离所需和不需要的分子种类。具体来说,与任何给定的洗涤或流通缓冲溶液相比,层析和蛋白A层析可以基于各种分子结合的相互作用优先分离某些种类。此步骤中单元操作的优化可以提高所需分子种类的总体纯度和百分比产率,同时减少杂质。

### 发明内容

[0008] 本文提供了通过施用离液剂来纯化产品的方法。

[0009] 本文提供的一些实施方案允许通过提供用于产品纯化所涉及的处理步骤中的新的纯化方法,改善产品纯度和组成。在一些实施方案中,产品可以是蛋白质产品。在一些实施方案中,纯化包括层析。在一些实施方案中,层析可以是蛋白A或蛋白G。在一些实施方案中,离液剂可以包括锂和锂盐、镁和镁盐、钙和钙盐以及胍和胍盐中的一种或多种。

[0010] 本文提供了使用亲和层析纯化蛋白质产品的方法。本文提供的一些实施方案允许通过提供在收获细胞培养物后纯化蛋白质产品的新方法,克服现有技术中的某些限制。在一些实施方案中,蛋白质产品是抗体。在一些实施方案中,蛋白质产品是抗VEGF抗体。在一些实施方案中,本公开的抗VEGF抗体可以是抗VEGF抗体缀合物(例如,KSI-301、KSI-501)或抗VEGF蛋白缀合物,其包括聚合物部分,当施用于受试者时,该聚合物部分可延长抗体或蛋白质的半衰期(例如,眼部半衰期(ocular half-life)等)。在一些实施方案中,本文提供了可用于纯化蛋白质产品的缓冲剂组合物。

[0011] 在一些实施方案中,本文提供了一种从包含蛋白质和一种或多种杂质的上样流体(load fluid)中纯化产品和减少杂质的方法,该方法通过使上样流体经过亲和层析基质,随后通过至少一种包含离液盐的洗涤溶液,并使用洗脱溶液收集蛋白质。

[0012] 在一些实施方案中,本文提供了一种分离包含目的蛋白质的洗出液中的杂质的方法,该方法包括将包含目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上;并用一种或多种缓冲

溶液洗涤亲和层析基质,缓冲溶液包括锂和锂盐、镁和镁盐、钙和钙盐以及胍和胍盐中的一种或多种。

[0013] 在一些实施方案中,本文提供了一种使用亲和层析生产产品的方法。该方法包括将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,然后用包含磷酸钠和盐的第一缓冲液对亲和层析基质进行第一洗涤,然后用包含离液剂的第二缓冲液对亲和层析基质进行第二洗涤。

[0014] 在一些实施方案中,本文提供了一种使用亲和层析生产产品的方法。该方法包括将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,用含有Tris和盐的第一缓冲液进行第一洗涤,用含有Tris和离液剂的第二缓冲液进行第二洗涤,其中第二缓冲液离液剂与第一缓冲液中含有的盐不同。

[0015] 在一些实施方案中,本文提供了一种生产产品的方法。该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱结合的目的蛋白质;和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

[0016] 在一些实施方案中,本文提供了一种生产产品的方法。该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,向亲和层析基质供给包含离液盐的缓冲溶液,洗脱结合的目的蛋白质;和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

[0017] 在一些实施方案中,本文提供了一种生产产品的方法,该方法包括收集缀合蛋白质,其中缀合蛋白质包含与缀合聚合物结合的抗体,将缀合蛋白质上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与缀合蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱缀合蛋白质,和收集洗出液,其中洗出液含有缀合蛋白质。

[0018] 在一些实施方案中,本文提供了一种生产产品的方法,该方法包括用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,然后洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,并从洗出液中去除病毒污染物。在本文提供的方法的一些实施方案中,从洗出液中去除病毒污染物包括低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)和/或渗滤(DF)中的一种或多种。

[0019] 在本文提供的方法的一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法,该方法包括用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,去除离液盐,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质。在本文提供的方法的一些实施方案中,洗出液进一步与可接受的药物赋形剂组合以形成药物组合物。在本文提供的方法的一些实施方案中,向药物组合物中加入缓冲溶液。在本文提供的方法的一些实施方案中,向药物组合物中加入防腐溶液。在本文提供的方法的一些实施方案中,进一步精制药物组合物用于玻璃体内注射。

[0020] 在一些实施方案中,本文提供了一种处理产品的方法。该方法包括将洗脱液上样到亲和层析基质中。该方法还包括用包含离液盐的洗涤缓冲液洗涤以收集洗出液,其中离液盐的浓度从第一浓度增加至第二浓度,其中在至少一个级分中收集洗出液,其中该至少一个级分包含目的产品。

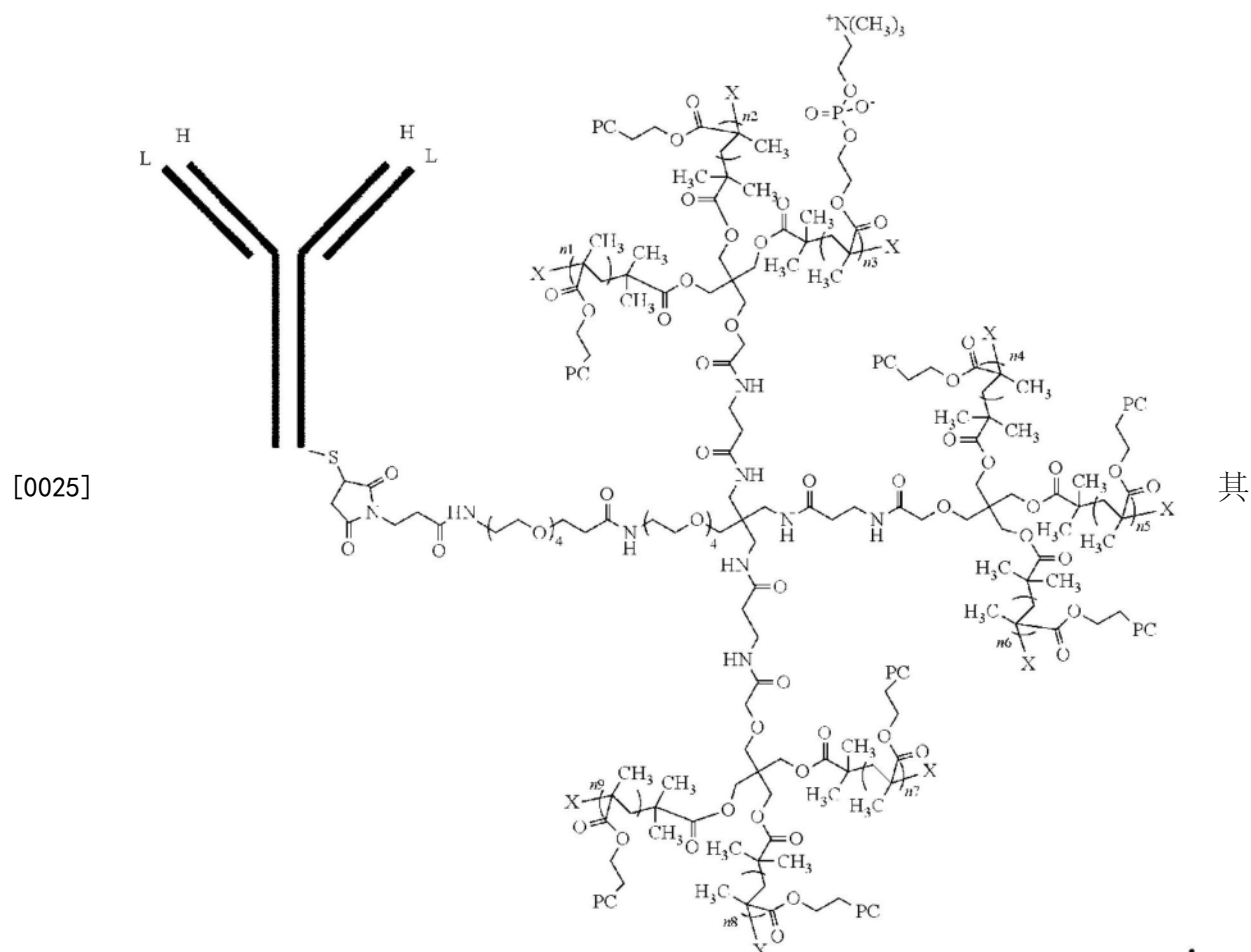
[0021] 在一些实施方案中,本文提供了一种生产产品的方法,该方法包括收集上样流体,

其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,并从洗出液中去除病毒污染物。

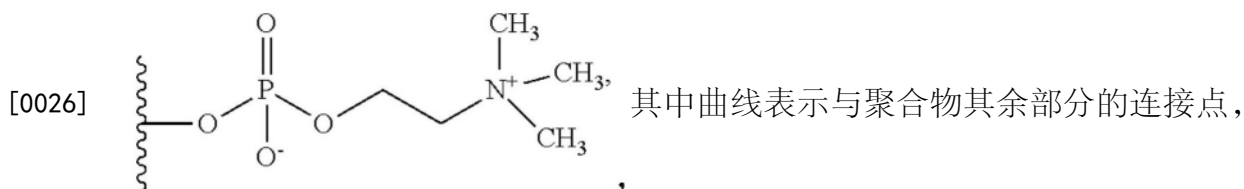
[0022] 在一些实施方案中,本文提供了一种生产产品的方法,该方法包括将洗脱液上样到亲和层析基质中,用第一洗涤缓冲液洗涤,用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤,用第三洗涤缓冲液洗涤,其中第三洗涤缓冲液去除离液盐,用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。在一些实施方案中,第一洗涤缓冲液包含50mM磷酸钠。在一些实施方案中,第一洗涤缓冲液还包含250mM NaCl。在一些实施方案中,本文提供了一种方法,其中第一洗涤缓冲液包含Tris和盐。在一些实施方案中,本文提供了一种方法,该方法还包括从洗出液中去除病毒污染物。

[0023] 在一些实施方案中,本文提供了一种方法,其中去除病毒污染物包括低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)或渗滤(DF)中的一种或多种。在一些实施方案中,洗脱液包含目的蛋白质。在一些实施方案中,目的蛋白质是抗体。在一些实施方案中,抗体进一步与聚合物缀合以形成抗体缀合物。在一些实施方案中,抗体缀合物包含双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体包括抗VEGF和抗IL-6结合部分。

[0024] 在一些实施方案中,抗体缀合物具有式(I)的结构:



中抗VEGF-A抗体的每条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示,并且聚合物通过C443(EU编号)的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上。为了上述结构的目的,PC是指具有以下结构的结构:



其中X为a) —OR, 其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基, b) —H, c) 任何卤素, 包括—Br、—Cl或—I, d) —SCN, 或e) —NCS; 并且i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数; 或ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同, 使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

[0027] 在一些实施方案中, 本文提供了一种生产产品的方法, 该方法包括回收细胞培养物上清液, 其中细胞培养物上清液包含目的蛋白质, 然后将细胞培养物上清液处理成洗脱液, 其中洗脱液包含目的蛋白质, 然后将洗脱液上样到亲和层析基质中并用包含Tris或磷酸钠的第一洗涤缓冲液洗涤, 然后用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤, 用洗脱缓冲液洗脱, 其中收集洗出液, 其中洗出液包含蛋白质产品, 然后用低pH病毒缓冲液灭活洗出液中存在的病毒污染物以得到病毒灭活的洗出液, 过滤病毒灭活的洗出液, 对病毒灭活的洗出液进行至少一轮离子交换层析, 并过滤病毒灭活的洗出液以得到渗余物, 其中渗余物包含目的蛋白质。

[0028] 在一些实施方案中, 细胞培养物上清液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。在一些实施方案中, 细胞培养物上清液包括从细胞培养物中收获细胞产品。在一些实施方案中, 澄清细胞培养物以去除细胞和细胞碎片。在一些实施方案中, 洗脱液包含澄清的细胞培养物上清液。

[0029] 在一些实施方案中, 本文提供了一种使用亲和层析纯化蛋白质的方法, 该方法包括使上样流体与介质接触, 其中介质是结合目的蛋白质的亲和层析基质, 然后用包含离液剂的缓冲溶液洗涤介质, 其中离液剂是盐, 并在适于洗脱目的蛋白质的条件下使洗涤过的介质与洗脱溶液接触。

[0030] 在一些实施方案中, 本文提供了一种用于生产产品的方法, 该方法包括将含有目的蛋白质的溶液施加到亲和层析基质上, 用第一缓冲液洗涤亲和层析基质, 然后用含有离液剂的第二缓冲液洗涤亲和层析基质, 然后用第三缓冲液洗涤亲和层析基质以去除离液剂。然后用洗脱缓冲液洗脱, 其中收集洗出液, 其中洗出液包含蛋白质产品。

[0031] 在一些实施方案中, 本文提供了一种蛋白质纯化系统, 该系统包括: 柱, 其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白; 包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液; 包含tris的中间洗涤缓冲液; 包含氯化镁的第二洗涤缓冲液; 和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

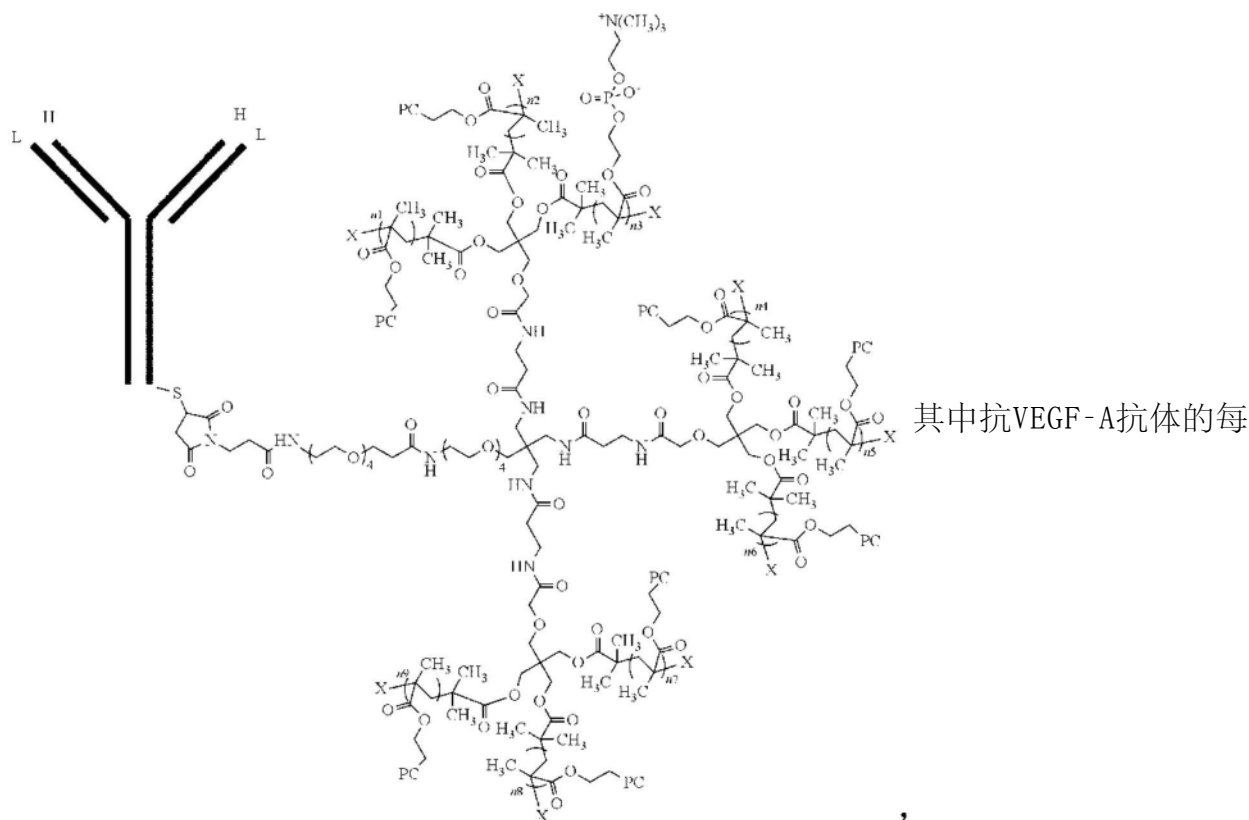
[0032] 在一些实施方案中, 本文提供了一种蛋白质纯化系统, 该系统包括: 柱, 其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白; 包含tris和盐的第一tris洗涤缓冲液, 中间tris洗涤缓冲液; 包含氯化镁的第二洗涤缓冲液; 和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。在一些实施方案中, 柱包含用于亲和层析的配体。在一些实施方案中, 配体包括蛋白A或蛋白G。在一些实施方案中, 包含磷酸钠和盐的第一洗涤缓冲液具有5.5至9.5之间的pH。在一些实施方案中, 包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液包含约50mM磷酸钠。在一些实施方案中, 包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液包含约250mM NaCl。在一些实施方案中, 第一tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。在一些实施方案中, 第一tris洗涤缓冲液还包含约250mM NaCl。在一些实施方

案中,中间tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。在一些实施方案中,第一tris洗涤缓冲液的pH为约7.2。在一些实施方案中,第二洗涤缓冲液的pH为约7.8。在一些实施方案中,第二洗涤缓冲液中氯化镁的浓度为约2.8M。在一些实施方案中,洗脱缓冲液中甲酸钠的浓度包含10mM。

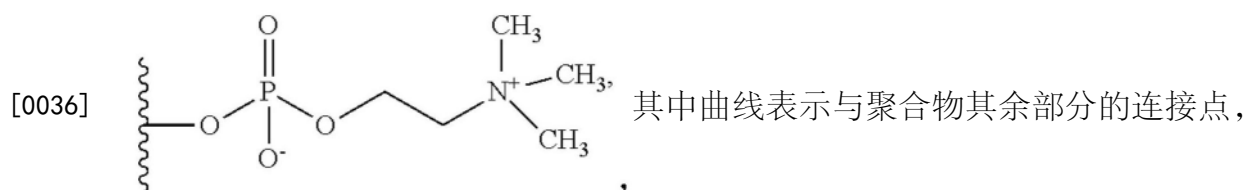
[0033] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体纯化系统,其包括:具有与抗体结合的蛋白A树脂的柱,其中抗体包括分别为SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个和SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个的轻链和重链;包含离液盐的离液洗涤缓冲液;和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

[0034] 在一些实施方案中,目的蛋白质是双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体对VEGF和IL-6具有特异性。在一些实施方案中,目的蛋白质是抗体缀合物。在一些实施方案中,亲和层析基质是蛋白A层析基质。在一些实施方案中,缓冲溶液中的离液剂包含锂和锂盐、镁和镁盐、钙和钙盐以及胍和胍盐中的一种或多种。在一些实施方案中,锂和锂盐、镁和镁盐、钙和钙盐以及胍和胍盐中的一种或多种的浓度在0.05-3.5M之间。在一些实施方案中,缓冲溶液还包含tris。在一些实施方案中,缓冲溶液中tris的浓度至少为5mM。在一些实施方案中,缓冲溶液的pH大于5.5。在一些实施方案中,洗出液还含有病毒杂质。

[0035] 在本文所述方法的一些实施方案中,这些方法还包括去除病毒杂质。在本文所述方法的一些实施方案中,这些方法还包括灭活病毒杂质。在本文所述方法的一些实施方案中,这些方法还包括在用缓冲溶液洗涤之前,用预洗涤缓冲溶液洗涤上样有上样流体的亲和层析基质的步骤。在本文所述方法的一些实施方案中,这些方法还包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。在一些实施方案中,预洗涤缓冲溶液包含磷酸钠。在一些实施方案中,预洗缓冲溶液包含Tris和盐。在一些实施方案中,抗体缀合物具有式(I)的结构,



条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示,并且聚合物通过C443 (EU编号)的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上,并且其中PC具有以下结构:



其中X为a) —OR,其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基,b) —H,c) 任何卤素,包括—Br、—Cl或—I,d) —SCN,或e) —NCS;并且i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数;或ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同,使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

[0037] 在一些实施方案中,抗体缀合物包含抗VEGF抗体缀合物,该抗VEGF抗体缀合物包含抗VEGF-A轻链和抗VEGF-A重链,其中抗VEGF-A抗体重链包含CDRH1:即SEQ ID NO:172中的CDRH1,CDRH2:即SEQ ID NO:173中的CDRH2,和CDRH3:即SEQ ID NO:174中的CDRH3,抗VEGF-A抗体轻链包含CDRL1:即SEQ ID NO:199中的CDRL1,CDRL2:即SEQ ID NO:200中的CDRL2,和CDRL3:即SEQ ID NO:201中的CDRL3。

[0038] 在一些实施方案中,抗VEGF抗体缀合物包含:包含与聚合物结合的抗VEGF-A免疫球蛋白G (IgG) 的抗体缀合物,该聚合物包含MPC单体,其中抗VEGF-A抗体重链的序列为SEQ ID No:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个,抗VEGF-A抗体轻链的序列为SEQ ID No:91-93、28-30中的至少一个,并且其中抗体在C449处与聚合物结合。

[0039] 在一些实施方案中,目的靶蛋白质通过细胞培养物产生。在一些实施方案中,细胞培养物包含CHO细胞。在一些实施方案中,本文所述的方法还包括在用缓冲溶液洗涤之后,

用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。在一些实施方案中,用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除核酸、内毒素、消泡剂或除目的靶蛋白质之外的其他小分子。在一些实施方案中,用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除杂质,同时保持目的靶蛋白质与亲和层析基质结合。在一些实施方案中,用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除除目的靶蛋白质之外的宿主细胞蛋白质。在一些实施方案中,在缓冲溶液中添加离液剂不会洗脱目的靶蛋白质。在本文所述方法的一些实施方案中,这些方法还包括病毒灭活、切向流过滤、渗滤、超滤、离子交换层析或病毒减少过滤中的一种或多种。在一些实施方案中,洗脱液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。在一些实施方案中,产品是目的蛋白质。在一些实施方案中,杂质包括宿主细胞蛋白质杂质。

## 附图说明

- [0040] 图1描述了一些收集和纯化目的蛋白质的实施方案的一般方案。
- [0041] 图2描述了收集和纯化目的蛋白质的一般方案。
- [0042] 图3描述了根据本公开实施方案的柱层析的一般方案。
- [0043] 图4描述了在不同洗涤缓冲溶液中运行的一组层析曲线。
- [0044] 图5描述了在不同洗涤缓冲溶液中运行的一组层析曲线。
- [0045] 图6描述了在不同洗涤缓冲溶液中运行的一组层析曲线。
- [0046] 图7描述了在不同洗涤缓冲溶液中运行的一组层析曲线。
- [0047] 图8是抗VEGF抗体的一些实施方案的氨基酸序列。
- [0048] 图9描绘了IL-6-VEGF Trap融合蛋白的一些实施方案。VEGF Trap结构域位于紧邻可变结构域之前的N-末端(左),或者位于抗体的Fab区和铰链区之间(右)。
- [0049] 图10描绘了VEGF\_trap\_变体\_1、VEGF\_trap\_变体\_2和VEGF\_trap\_变体\_3的序列表。
- [0050] 图11示出了抗IL-6重链可变区序列的实施方案。CDR带有下划线。
- [0051] 图12示出了VEGF trap序列的各种实施方案。序列之间不同的部分用粗体和下划线表示。图12进一步示出了接头(GS)序列实施方案的一些实施方案。它可以作为双重复Gly-Gly-Gly-Gly-Ser接头(GS)存在。
- [0052] 图13-14示出了抗IL-6分子的重链序列的一些实施方案。CDR带有下划线。图15示出了抗IL-6分子的轻链序列的一些实施方案。CDR带有下划线。图16示出了抗IL-6分子的重链序列的一些实施方案。CDR带有下划线。图17A-17B示出了CDR组合的一些实施方案。
- [0053] 图18示出了VEGFR-Fc序列变体的一些实施方案。序列之间不同的部分用粗体和下划线表示。

## 具体实施方式

- [0054] 在一些实施方案中,本文提供了通过使用层析优先分离所需和不需要的分子种类来减少杂质的方法和系统。
- [0055] 在一些实施方案中是一种使用亲和层析纯化产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括:将洗脱液上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合;和用包含离液剂的缓冲溶液洗涤亲和层析基质。

[0056] 在一些实施方案中是一种从包含蛋白质和一种或多种杂质的上样流体中纯化产品和减少杂质的方法,该方法通过使上样流体经过亲和层析基质,随后通过至少一种包含离液盐的洗涤溶液,并使用洗脱溶液收集蛋白质。

[0057] 在一些实施方案中是一种用于分离包含目的蛋白质的洗出液中的杂质的方法。在一些实施方案中,该方法包括将包含目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上;并用一种或多种包含镁或镁盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质。

[0058] 在一些实施方案中是一种使用亲和层析生产产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,用包含磷酸钠和盐的第一缓冲液对亲和层析基质进行第一洗涤,并用包含离液剂的第二缓冲液对亲和层析基质进行第二洗涤。

[0059] 在一些实施方案中是一种使用亲和层析生产产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,用含有Tris和盐的第一缓冲液进行第一洗涤,用含有Tris和离液剂的第二缓冲液进行第二洗涤,其中第二缓冲液离液剂与第一缓冲液中含有的盐不同。

[0060] 在一些实施方案中是一种生产产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括(i)收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,(ii)将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,(iii)用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,(iv)洗脱结合的目的蛋白质;和(v)收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

[0061] 在一些实施方案中是一种生产产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,向亲和层析基质供给包含离液盐的缓冲溶液,洗脱结合的目的蛋白质;和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

[0062] 在一些实施方案中是一种生产产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括收集缀合蛋白质,其中缀合蛋白质包含与缀合聚合物结合的抗体,将缀合蛋白质上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与缀合蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱缀合蛋白质,和收集洗出液,其中洗出液含有缀合蛋白质。

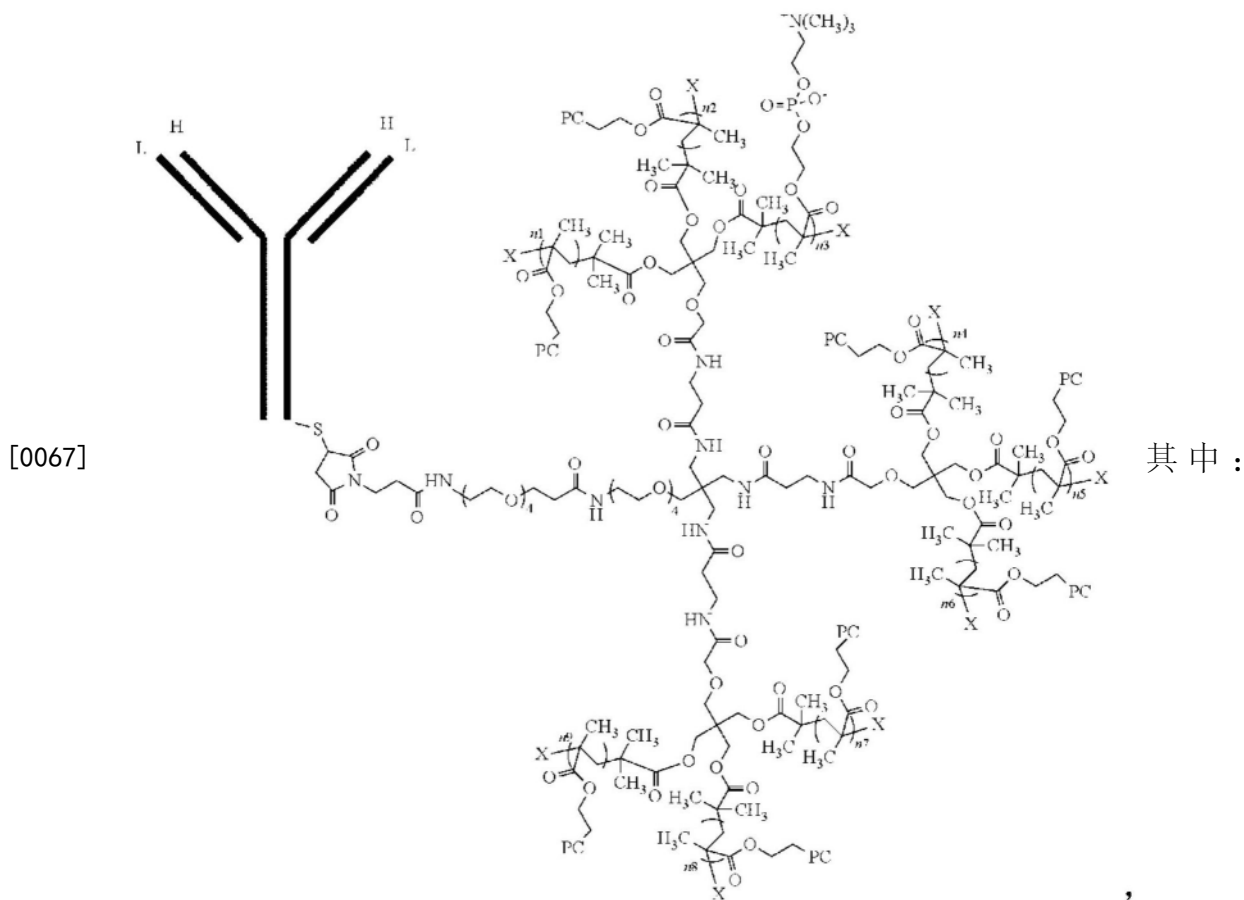
[0063] 在一些实施方案中是一种生产产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,并从洗出液中去除病毒污染物。在一些实施方案中,从洗出液中去除病毒污染物包括:低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)和/或渗滤(DF)中的一种或多种。

[0064] 在一些实施方案中是一种生产产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,去除离液盐,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质。在一些实施方案中,洗出液进一步与可接受的药物赋形剂组合以形成药物组合物。在一些实施方案中,向药物组合物中加入缓冲溶液。在一些实施方案中,向药物组合物中加入防腐溶液。在一些实施方案中,进一步精制药物组合物用于玻璃体内注射。

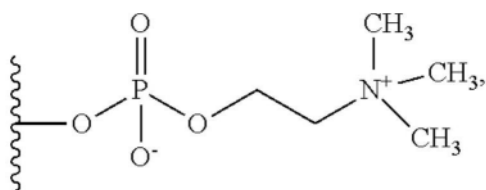
[0065] 在一些实施方案中是一种生产产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质中,其中亲和层

析基质与目的蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,并从洗出液中去除病毒污染物。

[0066] 在一些实施方案中是一种生产产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括将洗脱液上样到亲和层析基质中,用第一洗涤缓冲液洗涤,用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤,用第三洗涤缓冲液洗涤,其中第三洗涤缓冲液去除离液盐,用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。在一些实施方案中,第一洗涤缓冲液包含50mM磷酸钠。在一些实施方案中,第一洗涤缓冲液还包含250mM NaCl。在一些实施方案中,第一洗涤缓冲液包含Tris和盐。在一些实施方案中,该方法还包括从洗出液中去除病毒污染物。在一些实施方案中,去除病毒污染物包括:低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)或渗滤(DF)中的一种或多种。在一些实施方案中,洗脱液包含目的蛋白质。在一些实施方案中,目的蛋白质是抗体。在一些实施方案中,抗体进一步与聚合物缀合以形成抗体缀合物。在一些实施方案中,抗体缀合物具有式(I)的结构:



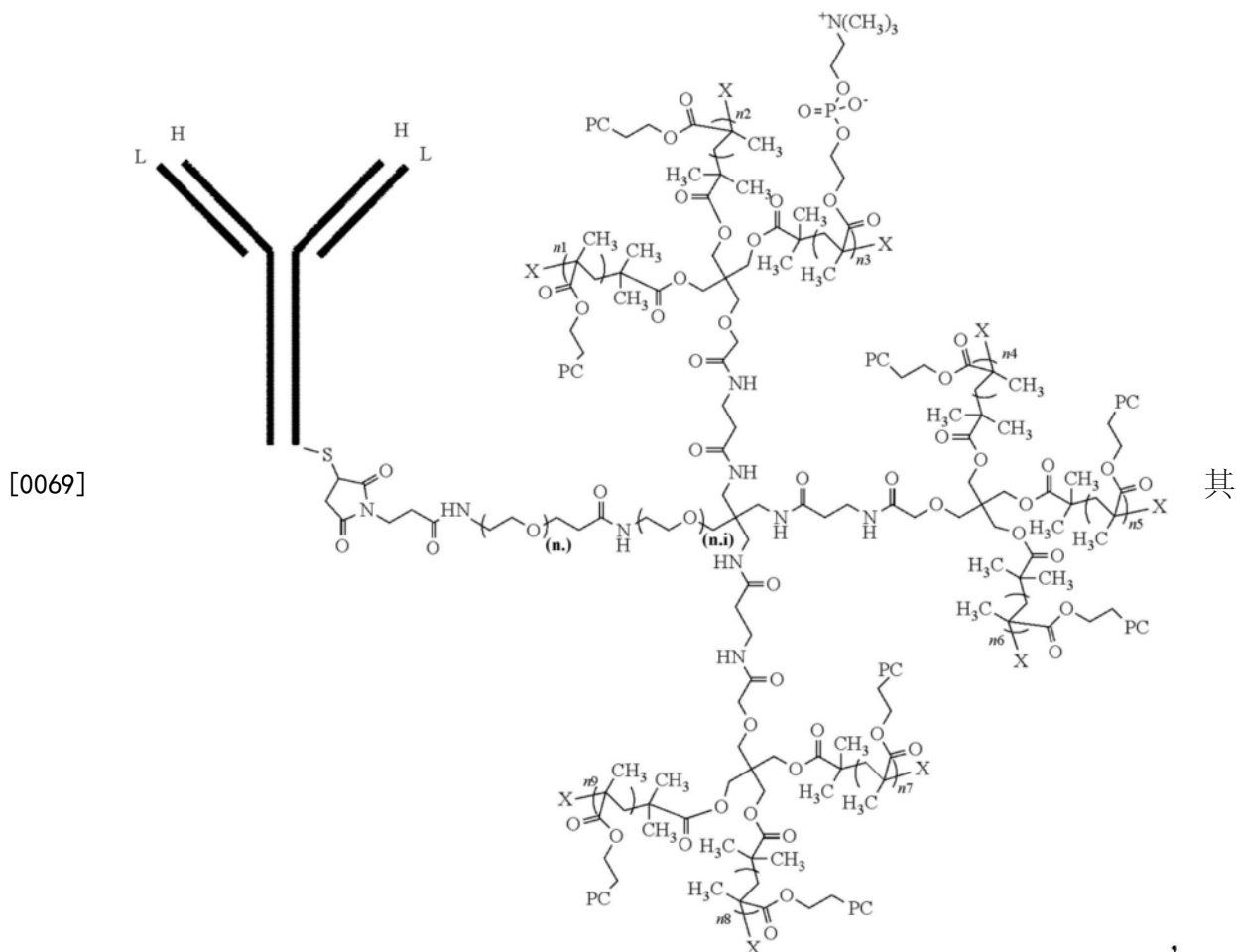
抗VEGF-A抗体的每条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示;聚合物通过C443 (EU编号) 的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上;PC是:



a) —OR, 其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基, b) —H, c) 任何卤素, 包括—Br、—Cl或—I,

d) —SCN, 或e) —NCS; 并且i) 其中 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、 $n_4$ 、 $n_5$ 、 $n_6$ 、 $n_7$ 、 $n_8$ 和 $n_9$ 相同或不同并且为0至3000的整数; 或ii) 其中 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、 $n_4$ 、 $n_5$ 、 $n_6$ 、 $n_7$ 、 $n_8$ 和 $n_9$ 相同或不同, 使得 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、 $n_4$ 、 $n_5$ 、 $n_6$ 、 $n_7$ 、 $n_8$ 和 $n_9$ 之和为2500加或减15%。在一些实施方案中, 抗体缀合物包含双特异性抗体。在一些实施方案中, 双特异性抗体包括抗VEGF和抗IL-6结合部分。

[0068] 在一些实施方案中, 抗体缀合物具有式(II)的结构:



中: 其中“n.”为1至50的整数, “n.i”为1至50的整数; 抗VEGF-A抗体的每条重链由字母H表示, 抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示; 聚合物通过C443 (EU编号) 的巯基与抗VEGF-A抗

体结合, 该结合描绘在重链之一上; PC是: 其中曲线表

示与聚合物其余部分的连接点, 其中X为a) —OR, 其中R为一H、甲基、乙基、丙基、异丙基, b) —H, c) 任何卤素, 包括—Br、—Cl或—I, d) —SCN, 或e) —NCS; 并且i) 其中 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、 $n_4$ 、 $n_5$ 、 $n_6$ 、 $n_7$ 、 $n_8$ 和 $n_9$ 相同或不同并且为0至3000的整数; 或ii) 其中 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、 $n_4$ 、 $n_5$ 、 $n_6$ 、 $n_7$ 、 $n_8$ 和 $n_9$ 相同或不同, 使得 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、 $n_4$ 、 $n_5$ 、 $n_6$ 、 $n_7$ 、 $n_8$ 和 $n_9$ 之和为2500加或减15%。在一些实施方案中, 抗体缀合物包含双特异性抗体。在一些实施方案中, 双特异性抗体包括抗VEGF和抗IL-6结合部分。

[0070] 在一些实施方案中是一种生产产品的方法。在一些实施方案中, 该方法包括回收

细胞培养物上清液,其中细胞培养物上清液包含目的蛋白质,将细胞培养物上清液处理成洗脱液,其中洗脱液包含目的蛋白质,将洗脱液上样到亲和层析基质中,用包含Tris或磷酸钠的第一洗涤缓冲液洗涤,用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤,用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品,用低pH病毒缓冲液灭活洗出液中存在的病毒污染物以得到病毒灭活的洗出液,过滤病毒灭活的洗出液,对病毒灭活的洗出液进行至少一轮离子交换层析,并过滤病毒灭活的洗出液以得到渗余物,其中渗余物包含目的蛋白质。在一些实施方案中,细胞培养物上清液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。在一些实施方案中,处理细胞培养物上清液包括从细胞培养物中收获细胞产品。在一些实施方案中,澄清细胞培养物以去除细胞和细胞碎片。在一些实施方案中,洗脱液包含澄清的细胞培养物上清液。

[0071] 在一些实施方案中是一种使用亲和层析纯化蛋白质的方法。在一些实施方案中,该方法包括使上样流体与介质接触,其中介质是结合目的蛋白质的亲和层析基质,用包含离液剂的缓冲溶液洗涤介质,其中离液剂是盐,并在适于洗脱目的蛋白质的条件下使洗涤过的介质与洗脱溶液接触。

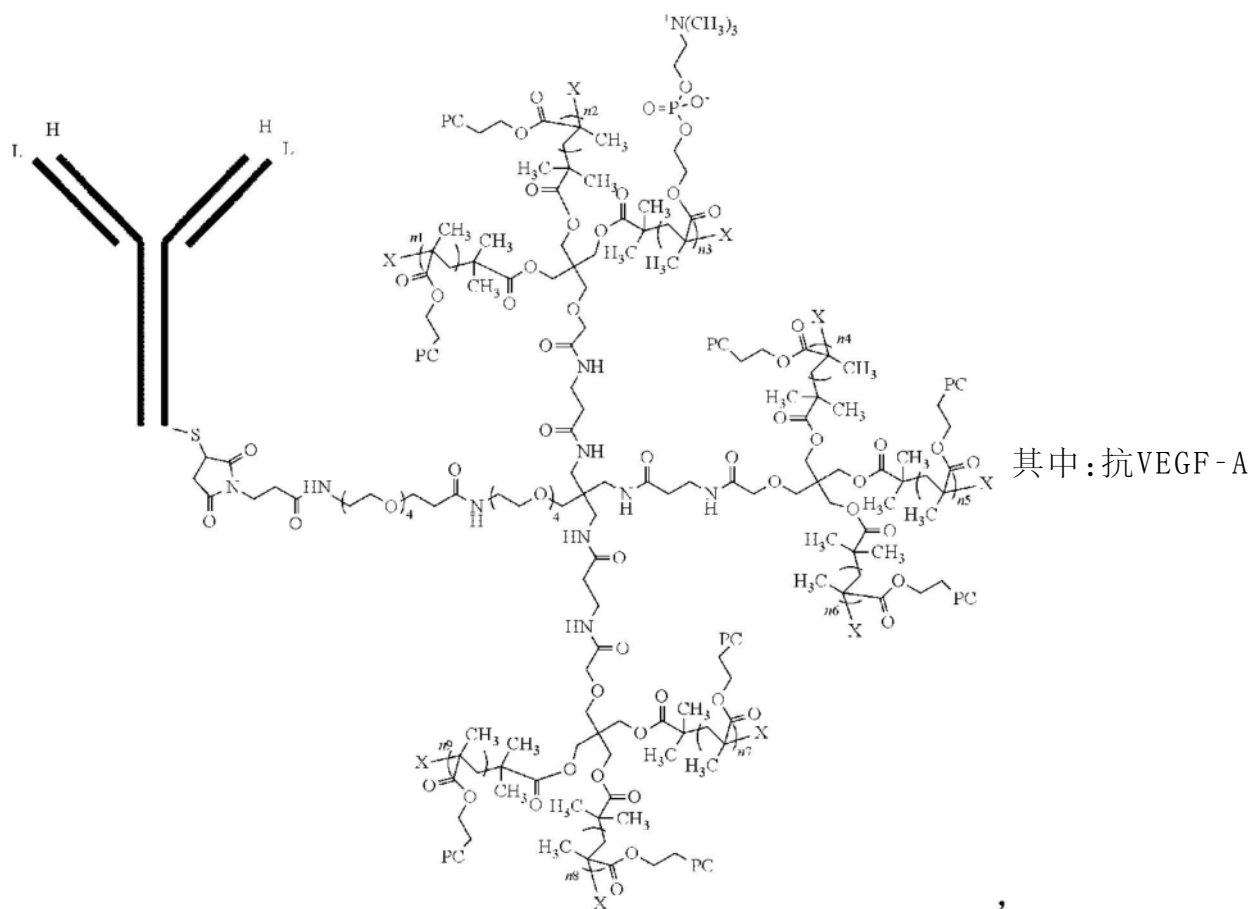
[0072] 在一些实施方案中是一种生产产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括将含有目的蛋白质的溶液施加到亲和层析基质上,用第一缓冲液洗涤亲和层析基质,用含有离液剂的第二缓冲液洗涤亲和层析基质,用第三缓冲液洗涤亲和层析基质以去除离液剂,用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。

[0073] 在一些实施方案中是一种蛋白质纯化系统。在一些实施方案中,该系统包括:柱,其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白;包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液;包含tris的中间洗涤缓冲液;包含氯化镁的第二洗涤缓冲液;和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

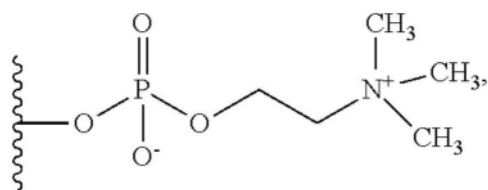
[0074] 在一些实施方案中是一种蛋白质纯化系统。在一些实施方案中,该系统包括:柱,其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白;包含tris和盐的第一tris洗涤缓冲液;中间tris洗涤缓冲液;包含氯化镁的第二洗涤缓冲液;和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。在一些实施方案中,柱包含用于亲和层析的配体。在一些实施方案中,配体包括蛋白A或蛋白G。在一些实施方案中,包含磷酸钠和盐的第一洗涤缓冲液具有5.5至9.5之间的pH。在一些实施方案中,包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液包含约50mM磷酸钠。在一些实施方案中,包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液包含约250mM NaCl。在一些实施方案中,第一tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。在一些实施方案中,第一tris洗涤缓冲液还包含约250mM NaCl。在一些实施方案中,中间tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。在一些实施方案中,第一tris洗涤缓冲液的pH为约7.2。在一些实施方案中,第二洗涤缓冲液的pH为约7.8。在一些实施方案中,第二洗涤缓冲液中氯化镁的浓度为约2.8M。在一些实施方案中,洗脱缓冲液中甲酸钠的浓度包含10mM。

[0075] 在一些实施方案中是一种抗体纯化系统。在一些实施方案中,该系统包括具有与抗体结合的蛋白A树脂的柱,其中抗体包括分别为SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个和SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个的轻链和重链;包含离液盐的离液洗涤缓冲液;和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。在一些实施方案中,目的蛋白质是双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体对VEGF和IL-6具有特异性。在一些实施方案中,双特异性抗体是OG2072。在一些实施方案中,目的蛋白质是抗体缀合物。在一些实施方案中,亲和层

析基质是蛋白A层析基质。在一些实施方案中,缓冲溶液中的离液剂包含锂、锂盐、镁、镁盐、钙、钙盐、胍和/或胍盐中的一种或多种。在一些实施方案中,锂、锂盐、镁、镁盐、钙、钙盐、胍和/或胍盐中的一种或多种的浓度分别在0.05-3.5M之间。在一些实施方案中,缓冲溶液还包含tris。在一些实施方案中,缓冲溶液中tris的浓度至少为5mM。在一些实施方案中,缓冲溶液的pH大于5.5。在一些实施方案中,洗出液还含有病毒杂质。在一些实施方案中,该方法还包括去除病毒杂质。在一些实施方案中,该方法还包括灭活病毒杂质。在一些实施方案中,该方法还包括在用缓冲溶液洗涤之前,用预洗涤缓冲溶液洗涤上样有上样流体的亲和层析基质的步骤。在一些实施方案中,该方法还包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。在一些实施方案中,预洗涤缓冲溶液包含磷酸钠。在一些实施方案中,预洗缓冲溶液包含Tris和盐。在一些实施方案中,抗体缀合物具有式(I)的结构,



抗体的每条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示;聚合物通过C443(EU编号)的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上;PC是:



其中曲线表示与聚合物其余部分的连接点,其中X为

- a) —OR, 其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基, b) —H, c) 任何卤素, 包括—Br、—Cl或—I, d) —SCN, 或e) —NCS; 并且i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至

3000的整数;或ii)其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同,使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。在一些实施方案中,抗体缀合物包含抗VEGF抗体缀合物,该抗VEGF抗体缀合物包含抗VEGF-A轻链和抗VEGF-A重链,其中抗VEGF-A抗体重链包含CDRH1:即SEQ ID NO:172中的CDRH1,CDRH2:即SEQ ID NO:173中的CDRH2,和CDRH3:即SEQ ID NO:174中的CDRH3,抗VEGF-A抗体轻链包含CDRL1:即SEQ ID NO:199中的CDRL1,CDRL2:即SEQ ID NO:200中的CDRL2,和CDRL3:即SEQ ID NO:201中的CDRL3。在一些实施方案中,抗VEGF抗体缀合物包含:包含与聚合物结合的抗VEGF-A免疫球蛋白G(IgG)的抗体缀合物,该聚合物包含MPC单体,其中抗VEGF-A抗体重链的序列为SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个,抗VEGF-A抗体轻链的序列为SEQ ID No:91-93、28-30中的至少一个,并且其中抗体在C449处与聚合物结合。

[0076] 在一些实施方案中,目的靶蛋白质通过细胞培养物产生。在一些实施方案中,细胞培养物包含CHO细胞。在一些实施方案中,该方法还包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。在一些实施方案中,用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除核酸、内毒素、消泡剂或除目的靶蛋白质之外的其他小分子。在一些实施方案中,用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除杂质,同时保持目的靶蛋白质与亲和层析基质结合。在一些实施方案中,用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除除目的靶蛋白质之外的宿主细胞蛋白质。在一些实施方案中,在缓冲溶液中添加离液剂不会洗脱目的靶蛋白质。在一些实施方案中,该方法还包括病毒灭活、切向流过滤、渗滤、超滤、离子交换层析或病毒减少过滤中的一种或多种。在一些实施方案中,洗脱液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。在一些实施方案中,产品是目的蛋白质。在一些实施方案中,杂质包括宿主细胞蛋白质杂质。在一些实施方案中,第一洗涤缓冲液包含10mM磷酸钠。在一些实施方案中,第一洗涤缓冲液包含基于磷酸盐的种类。在一些实施方案中,第一洗涤缓冲液还包含50mM NaCl。

[0077] 在一些实施方案中是一种处理产品的方法。在一些实施方案中,该方法包括将洗脱液上样到亲和层析基质中;和用包含离液盐的洗涤缓冲液洗涤以收集洗出液,其中离液盐的浓度从第一浓度增加至第二浓度,其中在至少一个级分中收集洗出液,其中该至少一个级分包含目的产品。在一些实施方案中,第一浓度的离液盐的浓度是0M,其中第二浓度的离液盐的浓度是4.0M。在一些实施方案中,离液盐是锂、锂盐、镁、镁盐、钙、钙盐、胍和/或胍盐中的一种或多种。在一些实施方案中,离液盐选自氯化镁、氯化钙、氯化锂和盐酸胍。

[0078] 在一些实施方案中,缓冲溶液还包含以下中的一种或多种:醋酸盐、柠檬酸盐、ACES、BES、Bicine、HEPES、MES、MOPS、MOPSO、TAPS、Tricine、Bis-Tris、Bis-Tris丙烷、甲次砷酸盐(Cacodylate)、CAPS、CAPSO、CHES、甘氨酸、双甘肽、咪唑、PIPES、TEA或TES。

[0079] 在一些实施方案中,使用包含离液剂以溶解非特异性相互作用的方法从溶液中去不需要的分子。在一些实施方案中,离液剂被用作亲和层析步骤的一部分。在一些实施方案中,离液剂被用作离子交换层析步骤的一部分。在一些实施方案中,用作离子交换层析的一部分的离液剂具有低电导率,如尿素、醇和去垢剂。在一些实施方案中,使用包含疏水相互作用树脂的方法从溶液中去不需要的分子,其中目的蛋白质用亲液(kosmotropic)剂结合到树脂上,并当对离液盐施加梯度时洗脱。

[0080] 虽然所需的分子种类可能以显著的浓度存在,但当从细胞培养物中收集时,也可

能存在其他不需要的分子种类,如宿主细胞蛋白质、细胞碎片、核酸、内毒素或可损害所需的分子种类的纯度的其他分子。基于与结合、形状、大小、电荷和其他物理性质相关的不同性质,分选和纯化各种上清液组合物成为可能。在一些实施方案中,由于施用所述所需的分子种类,所需的分子种类的纯化可以允许更好的患者结果和更少的并发症。在一些实施方案中,本发明的方法可以提高功效,或降低所需的分子种类的剂量。

[0081] 在一些实施方案中,从血液中收集所需的分子种类。在一些实施方案中,从血浆中收集所需的分子种类。在一些实施方案中,从细胞培养物中收集所需的分子种类。在一些实施方案中,从无动物成分的细胞培养物中收集所需的分子种类。在一些实施方案中,从澄清的细胞培养液(CCCF)中收集所需的分子种类。在一些实施方案中,从细胞上清液中收集所需的分子种类。

[0082] 在一些实施方案中,细胞培养物是细菌的。在一些实施方案中,细胞培养物是大肠杆菌(*E.coli*)。在一些实施方案中,细胞培养物是真核细胞的。在一些实施方案中,细胞培养物是酿酒酵母(*S.cerevisiae*)。在一些实施方案中,细胞培养物是哺乳动物的。在一些实施方案中,细胞培养物来自人类细胞。在一些实施方案中,细胞培养物是初生组织。在一些实施方案中,细胞培养物是已建立的细胞系。已建立的细胞系的非限制性示例包括CHO细胞、HeLa细胞、小鼠3T3成纤维细胞、HEK293细胞和KT-3细胞。在一些实施方案中,细胞培养物包含细胞类型的混合物。在一些实施方案中,细胞培养物包含单一细胞类型。在一些实施方案中,细胞培养物是免疫细胞。在一些实施方案中,细胞培养物是淋巴细胞。在一些实施方案中,细胞培养物是T细胞。

[0083] 在一些实施方案中,所需的分子种类可以包括抗VEGF抗体缀合物,该抗VEGF抗体缀合物包括在向受试者施用时长抗体的半衰期的聚合物部分(例如,KSI-301、KSI-501)。在一些实施方案中,不需要的分子种类可以包括宿主细胞蛋白质(HCP)。在一些实施方案中,可以使用蛋白A基质实现层析,其中施用某些离液剂可以有效洗脱不需要的分子种类,同时保持所需的分子种类与基质结合。因此,在一些实施方案中,本公开的方法和系统可以提供一种纯化从细胞培养物收获的细胞产品的方法。在一些实施方案中,随着细胞处理的进行,本发明的方法可以以较低的损失率获得较高纯度的所需的分子种类。在一些实施方案中,本发明的方法可以降低HCP的水平,从而减少施用最终药物产品时患者的并发症。在一些实施方案中,本发明的方法可以降低与纯化细胞产品相关的成本或时间。

[0084] 收获和处理细胞培养物可能涉及大量的纯化和收集工作,因为全细胞提取物通常不仅含有所需的分子种类,还含有不需要的杂质。收集的细胞培养物的多阶段处理允许有效去除杂质,包括宿主细胞蛋白质(HCP)、产物相关的杂质,如高分子量(HMW)种类和低分子量(LMW)种类。在目的蛋白质(例如,抗体)的多阶段纯化过程的第一阶段,一些过程使用亲和层析,其中所得目的蛋白质的效率和纯度影响所有下游纯化过程。此外,下游处理过程中的亲和层析可用于浓缩产品,允许在后续处理步骤中使用适当更小的设备,这可用于降低处理过程中花费的成本和时间。因此,在亲和层析过程中优化杂质的去除是有利的,而不会损失或包括后续处理步骤的浓缩产率。

[0085] 在一些实施方案中,该方法包括纯化抗体和/或蛋白质。在一些实施方案中,该方法包括优化的洗涤缓冲液。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液为pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5、pH 9.0、或pH 6.0至pH 9.0之间的任何整数。在一些实施方案

中,优化的洗涤缓冲液为pH 7.0。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液为pH 7.2。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液为pH 6.0。

[0086] 在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含5mM、10mM、25mM、50mM、100mM、150mM、200mM、或5mM至200mM之间的任何整数的磷酸钠(钠-磷酸盐)。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含5mM磷酸钠。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含50mM磷酸钠。

[0087] 在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含5mM、10mM、25mM、50mM、100mM、150mM、200mM、或5mM至200mM之间的任何整数的Tris。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含5mM Tris。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含50mM Tris。

[0088] 在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含5mM、10mM、25mM、50mM、100mM、150mM、200mM、或5mM至200mM之间的任何整数的Bis-Tris。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含5mM Bis-Tris。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含50mM Bis-Tris。

[0089] 在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含50mM、100mM、250mM、500mM、750mM、1M、1.5M、2M、3M、或50mM至3M之间的任何整数的NaCl。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含2M NaCl。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含50mM NaCl。

[0090] 在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含1M、1.5M、1.65M、2M、2.8M、3M、4M、5M、或1M至5M之间的任何整数的MgCl<sub>2</sub>。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含2.8M MgCl<sub>2</sub>。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含2M MgCl<sub>2</sub>。

[0091] 在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含离液剂。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含离液盐。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含离液阳离子。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含离液阴离子。离液阳离子的非限制性示例包括胍、镁、钙、钠和锂。离液阴离子的非限制性示例包括氯离子、硫酸根、醋酸根、柠檬酸根、硝酸根和亚硝酸根。在一些实施方案中,离液盐是CaCl<sub>2</sub>、氯化胍、醋酸锂、LiCl、MgCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、NaNO<sub>3</sub>或NaCl。在一些实施方案中,优化的洗涤缓冲液包含两种或更多种离液盐。在一些实施方案中,离液剂以0.05M、0.1M、0.2M、0.5M、1M、1.5M、1.65M、2M、2.8M、3M、4M、5M、6M、7M、10M、或0.05M至10M之间的任何整数存在于优化的洗涤缓冲液中。在一些实施方案中,离液剂以1M存在于优化的洗涤缓冲液中。在一些实施方案中,离液剂以2.8M存在于优化的洗涤缓冲液中。在一些实施方案中,存在于优化的洗涤缓冲液中的离液剂的浓度针对被纯化的蛋白质和/或抗体进行了优化。

[0092] 相关

[0093] 如本文所述,建立了减轻亲和层析步骤的洗出液中HCP水平的洗涤程序,还定义了缓冲液强度、电导率和缓冲液内pH的范围。确定了能够降低洗出液中HCP水平的盐。发现盐降低HCP水平的效率与其根据霍夫迈斯特序列(Hofmeister series)的离液强度相关。还发现该方法适用于不同的抗体类型和不同的Fc融合蛋白,因此本文公开的本发明的概念一般地可应用于任何抗体和/或蛋白质。该技术也显示出与两种不同的蛋白A亲和层析树脂一起工作。

[0094] 本文所述的工作使用源自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的不同抗体和抗体样构建体。CHO表达系统是生物药物生产工业中最常用的系统,因为它能够产生翻译后修饰的复杂蛋白质,类似于在人类中产生的蛋白质。迄今为止,已经确定了6000多种CHO HCP。

[0095] 哺乳动物细胞培养物的生物药物产品的下游处理目前占总生产成本的大部分。下

游处理中的一个主要挑战是去除宿主细胞蛋白质 (HCP)。HCP是与处理相关的杂质,可能会与生物药物产品共纯化。下游处理通常包括蛋白A亲和层析步骤,随后是额外的精制步骤以去除聚集物、产物变体、HCP和宿主细胞DNA。在蛋白A层析步骤之后,许多相同的HCP在生物药物工业中被发现。这是由于工业上几乎普遍使用CHO细胞来生产抗体和抗体样构建体,以及在非常类似的条件下使用蛋白A亲和层析步骤。对于后者,在生理条件下(中性pH和生理盐条件)将生物药物施加到树脂上,用生理条件以及高氯化钠浓度缓冲液洗涤树脂,然后进行洗脱步骤以收集产品。作为这种平台方法的结果,亲和层析洗出液含有许多相同的HCP和类似的水平。根据生物药物产品的类型,会有一些小的差异。在调查中,69%的公司表示,他们在药物生产过程中遇到过个体HCP的问题,这被认为是生物制造中最大的挑战之一。一些HCP具有高风险,可包括具有免疫原性、生物活性或酶促活性的HCP,该酶促活性可能会降解产品分子或制剂中使用的赋形剂。在过程开发中,去除HCP的需求容易识别,但尽可能降低HCP水平是困难的,但也是重要的。这些高风险HCP中的一些是脂肪酶,这是分解脂肪和脂质的酶。脂肪酶也能降解常用于制剂中的聚山梨醇酯,从而影响治疗产品的稳定性。类似地,发现水解酶是聚山梨醇酯降解的根本原因。这样的HCP则可能会损害稳定性并降低药物产品的保质期。聚山梨醇酯降解还会导致制剂中颗粒的形成,产生安全问题。然后,蛋白酶如丝氨酸蛋白酶、组织蛋白酶和金属蛋白酶可以降解抗体、抗体样构建体和其他蛋白质。总之,各种HCP种类会影响生物制剂中的活性成分和赋形剂。重要的是,HCP也有可能在人类中产生免疫反应。不需要的免疫应答可能是HCP造成的最严重的伤害,甚至可能是致命的。在lebrikizumab中发现了磷脂酶B样2蛋白,根据临床研究数据,该蛋白在约90%的受试者中引发免疫应答。表5A示出了高/风险HCP及其潜在影响的概述。出于所有这些原因,尽可能降低HCP水平至关重要。一些HCP与产品非特异性结合,然后被共纯化。这些HCP的去除是最具挑战性的。这项工作专注于分解产品和HCP的这些非特异性相互作用,从而降低HCP水平。通过该方法去除的HCP类型的表征超出了本工作的范围。这里,本发明人表明通过应用含有离液盐的洗涤步骤,HCP的水平可以显著降低。何种类型的HCP被去除仍有待观察。

#### [0096] 定义

[0097] 术语“细胞”包括原核生物和真核生物的细胞,并且还可以包括细菌细胞、分枝杆菌细胞、真菌细胞、酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞、非人类动物细胞、人类细胞或细胞融合体,例如杂交瘤。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,细胞来源于人类、猴子、猿、仓鼠、大鼠或小鼠细胞。在一些实施方案中,细胞是真核细胞并且选自以下细胞:CHO(例如CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO)、COS(例如COS-7)、视网膜细胞、Vero、CV1、肾脏(例如HEK293、293EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60(例如BHK21)、Jurkat、Daudi、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L细胞、C127细胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、Sertoli细胞、BRL 3A细胞、HT1080细胞、骨髓瘤细胞、肿瘤细胞和源自上述细胞的细胞系。在一些实施方案中,细胞包含一种或多种病毒基因。

[0098] 如本文所用,“亲和层析”是一种利用生物分子之间的特异性、可逆相互作用来实现层析分离的方法。

[0099] 如本文所用,“蛋白A层析”是指依赖于蛋白A的IgG结合结构域对免疫球蛋白分子的Fc部分的亲和力的特异性亲和层析方法。在免疫球蛋白中,Fc部分包含免疫球蛋白恒定结构域CH2和CH3或与这些结构域基本相似的免疫球蛋白结构域。蛋白A来源于来自金黄色

葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 细胞壁的天然蛋白质, 蛋白A通过重组或合成方法产生, 以及蛋白A的变体可以保留结合Fc区的能力。蛋白A层析通常固定在固体支持物上, 像蛋白A柱中的那些。蛋白G和蛋白L也可以以类似的方式使用。在一些实施方案中, 固体支持物是粘附于蛋白A的基质。

[0100] 如本文所用, 术语“亲和层析基质”或“AC基质”是指固相介质, 通常为凝胶或树脂, 其允许基于目的蛋白质与AC基质之间 (如受体与配体、酶与底物或抗原与抗体之间) 的高度特异性结合相互作用来分离生化混合物。因此, 根据缓冲液条件, 固相介质包含目的蛋白质能够可逆附着的靶标。可包含AC基质的固定化或固相介质的非限制性示例包括凝胶基质, 如琼脂糖珠 (如可商购的Sepharese基质), 和玻璃基质, 如多孔玻璃珠 (如可商购的ProSep基质)。

[0101] 在一些实施方案中, 用于分离目的蛋白质的方法包括柱层析。在该方法中, AC基质形成柱, 并且含有目的蛋白质的生化混物流过该柱。目的蛋白质与AC基质结合。然后通过使洗涤溶液流过柱来洗涤柱, 接着通过使洗脱缓冲液流过柱来从柱上洗脱目的蛋白质。

[0102] 在一些实施方案中, 用于分离目的蛋白质的方法包括膜层析。膜层析方法依赖于被设计以适合膜薄片的AC基质, 其中含有目的蛋白质的生化混物流过膜。膜层析的非限制性示例是Sartorius的Sartobind Rapid A。在一些实施方案中, 其中目的蛋白质为至少约500kDa, 膜层析是优选的层析方法。

[0103] 可用于本发明的其他亲和层析系统包括, 例如, 蛋白G、蛋白A/G和蛋白L柱, 它们中的每一种也是结合免疫球蛋白的细菌蛋白, 具有本领域中已确立的结合特性。因此, 作为蛋白G基质、蛋白A/G基质或蛋白L基质的AC基质可用于纯化抗体、抗体片段或包含Fc区的蛋白质 (例如, Fc融合蛋白)。

[0104] 尽管本公开特别关于使用蛋白A纯化抗体进行了描述, 但在本领域已知任何蛋白质 (包括融合蛋白) 选择性结合特定AC基质的情况下, 该蛋白质适于使用本文所述的洗涤方法进行纯化。

[0105] 如本文所用, “离液剂”是削弱或干扰非共价力并增加生物分子系统内熵的分子。在一些实施方案中, 氯化锂、氯化镁、氯化钙和/或氯化胍是离液剂。离液剂的非限制性示例包括丁醇、氯化钙、乙醇、氯化胍、高氯酸锂、醋酸锂、氯化镁、苯酚、丙醇、十二烷基硫酸钠、硫脲和尿素。离液剂包括影响蛋白质溶解度的盐。离液性较高 (more chaotropic) 的阴离子包括例如氯离子、硝酸根、溴离子、氯酸根、碘离子、高氯酸根和硫氰酸根。离液性较高的阳离子包括例如锂、镁、钙和胍。

[0106] 如本文所用, “洗脱液”或“洗提液”是指层析中流动相的载体部分。在液相色谱中, 洗脱液是进入柱的液体溶剂, 而在气相色谱中, 它是载气。在一些实施方案中, 洗脱液是指包含抗体、宿主细胞蛋白质 (HCP) 和其他目的分子的载液溶剂。

[0107] 如本文所用, “洗出液”是指从层析步骤中出现的分析物材料, 包括通过固相的分析物和溶质。在一些实施方案中, 洗出液特指被收集用于进一步处理的分析物材料。在一些实施方案中, 洗出液是指从收获的细胞中收集的抗体, 也称为“产品洗出液”。在一些实施方案中, 洗出液是指从收获的细胞中收集的HCP, 也称为“洗涤洗出液”。

[0108] “新生血管病症”是以改变的、失调的或不受控制的血管生成为特征的病症或疾病状态。新生血管病症的示例包括肿瘤转化 (例如癌症) 和眼新生血管病症, 包括糖尿病性视

网膜病、年龄相关性黄斑变性和视网膜静脉阻塞。

[0109] “眼新生血管”病症是一种以患者眼中的改变的、失调的或不受控制的血管生成为特征的病症。这样的病症包括视网膜静脉阻塞、视盘新生血管形成、虹膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、角膜新生血管形成、玻璃体新生血管形成、青光眼、血管翳、翼状胬肉、黄斑水肿、糖尿病性视网膜病、糖尿病性黄斑水肿、血管性视网膜病、视网膜变性、葡萄膜炎、视网膜炎性疾病和增生性玻璃体视网膜病变。

[0110] 术语抗体包括完整抗体及其结合片段。结合片段是指除完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的一部分,该部分结合完整抗体所结合的抗原。结合片段的示例包括Fv、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>;双体(diabody);线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。scFv抗体描述于Houston JS.1991.Methods in Enzymol.203:46-96。此外,抗体片段包含具有VH结构域特征的单链多肽,即能够与VL结构域装配在一起,或包含具有VL结构域特征的单链多肽,即能够与VH结构域装配在一起到功能性抗原结合位点,从而提供全长抗体的抗原结合特性。

[0111] 抗体与其靶抗原的特异性结合是指至少 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 或 $10^{10}\text{M}^{-1}$ 的亲和力。特异性结合在量级上可检测地更高,并且可与发生在至少一个不相关靶标上的非特异性结合相区分。特异性结合可以是特定官能团之间形成键或特定空间配合(例如锁钥类型)的结果,而非特异性结合通常是范德华力的结果。然而,特异性结合不一定意味着抗体或融合蛋白结合一个和仅一个靶标。

[0112] 基本抗体结构单元是亚单元的四聚体。每个四聚体包括两对相同的多肽链,每对具有一条“轻链”(约25kDa)和一条“重链”(约50-70kDa)。每条链的氨基末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。该可变区最初的表达与可裂解信号肽连接。没有信号肽的可变区有时被称为成熟可变区。因此,例如,轻链成熟可变区是指没有轻链信号肽的轻链可变区。然而,提及可变区并不意味着信号序列必然存在;事实上,一旦抗体或融合蛋白被表达和分泌,信号序列就被裂解。一对重链和轻链可变区定义了抗体的结合区。轻链和重链的羧基末端部分分别定义了轻链和重链恒定区。重链恒定区主要负责效应器功能。在IgG抗体中,重链恒定区分为CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。CH1区通过二硫键和非共价键与轻链恒定区结合。铰链区在抗体的结合区和效应区之间提供柔性,并且还在四聚体亚单元的两个重链恒定区之间提供分子间二硫键的位点。CH2区和CH3区是效应器功能和FcR结合的主要位点。

[0113] 轻链分为 $\kappa$ (kappa)或 $\lambda$ (lambda)。重链分为 $\gamma$ (gamma)、 $\mu$ (mu)、 $\alpha$ (alpha)、 $\delta$ (delta)或 $\epsilon$ (epsilon),并将抗体的同种型分别定义为IgG、IgM、IgA、IgD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”区段连接,重链还包括约10个或更多个氨基酸的“D”区段。(一般参见Fundamental Immunology (Paul,W.编,第二版,Raven Press, N.Y.,1989),第7章)(出于所有目的通过引用将其整体并入)。

[0114] 每个轻/重链对的成熟可变区形成抗体结合位点。因此,完整的抗体有两个结合位点,即是二价的。在天然抗体中,结合位点是相同的。然而,可以制备其中两个结合位点不同的双特异性抗体(参见,例如,Songsivilai S,Lachmann PC.1990.Bispecific antibody:a tool for diagnosis and treatment of disease.Clin Exp Immunol.79:315-321; Kostelny SA,Cole MS,Tso JY.1992.Formation of bispecific antibody by the use

of leucine zippers. *J Immunol.* 148:1547-1553)。可变区都表现出由三个高变区,也称为互补决定区或CDR连接的相对保守的框架区(FR)的相同一般结构。来自每对两条链的CDR通过框架区排列,能够结合特定的表位。从N-末端到C-末端,轻链和重链都包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。为方便起见,可变重链CDR可称为CDR<sub>H</sub>1、CDR<sub>H</sub>2和CDR<sub>H</sub>3;可变轻链CDR可称为CDR<sub>L</sub>1、CDR<sub>L</sub>2和CDR<sub>L</sub>3。每个结构域的氨基酸分配与Kabat EA等人.1987和1991. *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD) 或 Chothia C, Lesk AM. 1987. *Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins*. *J Mol Biol* 196:901-917; Chothia C等人. 1989. *Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions*. *Nature* 342:877-883中的定义一致。Kabat还提供了广泛使用的编号惯例(Kabat编号),其中不同重链可变区之间或不同轻链可变区之间的对应残基被指定相同的编号。尽管Kabat编号可用于抗体恒定区,但更常用的是EU编号,如本申请中的情况。尽管提供了本文公开的示例性抗体的特定序列,但是应当理解,在蛋白链表达后,轻链和/或重链的氨基或羧基末端的一个至几个氨基酸,特别是重链C-末端赖氨酸残基,可能在部分或全部分子中缺失或衍生。

[0115] 术语“表位”是指抗原上与抗体或细胞外trap区段结合的位点。蛋白质上的表位可以由连续氨基酸或一个或多个蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位(也称为线性表位)通常在暴露于变性溶剂时得以保留,而由三级折叠形成的表位(也称为构象表位)通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常在独特的空间构象中包含至少3个,更常见的是至少5个或8-10个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括,例如,x射线晶体学和二维核磁共振。参见,例如, *Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology*, 第66卷, Glenn E. Morris编辑(1996)。

[0116] 可在显示一种抗体与另一种抗体竞争结合靶抗原的能力的简单免疫测定中鉴定出识别相同或重叠表位的抗体。抗体的表位也可以通过与其抗原结合的抗体(或Fab片段)的X射线晶体学来确定,以确定接触残基。

[0117] 或者,如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的所有氨基酸突变会减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体的结合的一些氨基酸突变会减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有重叠的表位。

[0118] 抗体之间的竞争通过以下测定来确定,在该测定中,测试的抗体抑制参照抗体与共同抗原的特异性结合(参见,例如, Junghans等人, *Cancer Res.* 50:1495, 1990)。如果过量的测试抗体(例如,至少2x、5x、10x、20x或100x)对参照抗体的结合抑制至少50%,则测试抗体与参照抗体竞争。在一些实施方案中,如在竞争性结合测定中所测量的,测试抗体对参照抗体的结合抑制75%、90%或99%。通过竞争测定鉴定的抗体(竞争抗体)包括与参照抗体结合相同表位的抗体,以及与邻近表位结合的抗体,所述邻近表位与参照抗体结合的表位足够接近以产生空间位阻。

[0119] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人类和其他哺乳动物受试者。

[0120] 为了将氨基酸取代分类为保守或非保守的,氨基酸分组如下:组I(疏水侧链): met、ala、val、leu、ile;组II(中性亲水侧链): cys、ser、thr;组III(酸性侧链): asp、glu;组IV(碱性侧链): asn、gln、his、lys、arg;组V(影响链取向的残基): gly、pro;和组VI(芳族侧链): trp、tyr、phe。保守取代包括同类氨基酸之间的取代。非保守取代是将这些类中的一类

成员替换为另一类成员。

[0121] 百分比序列同一性是通过可变区的Kabat编码惯例或恒定区的EU编码最大化比对抗体序列来确定的。比对后,如果将受试抗体区域(例如,重链或轻链的整个成熟可变区)与参照抗体的相同区域进行比较,则受试抗体区域和参照抗体区域之间的百分比序列同一性是受试抗体区域和参照抗体区域中相同氨基酸占据的位置数除以两个区域比对位置总数(不计算间隙(gap)),乘以100以转换为百分比。可以通过使用算法(如Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0中的BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)用默认间隙参数比对序列,或通过检查和最佳比对(即,在比较窗口上产生最高的序列相似性百分比),来确定其他序列的序列同一性。通过在比较窗口比较两个最佳比对的序列,确定在两个序列中出现相同残基的位置的数量以产生匹配位置的数量,将匹配位置的数量除以比较窗口中位置的总数(即窗口大小),并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比,来计算序列同一性百分比。

[0122] “包含”一种或多种列举元素的组合物或方法可包括未具体列举的其他元素。例如,包含抗体的组合物可以包含单独的抗体或与其他成分组合的抗体。

[0123] 术语“抗体依赖性细胞毒性”或ADCC是一种诱导细胞死亡的机制,其依赖于抗体包覆的靶细胞(即具有结合抗体的细胞)与具有溶菌活性(lytic activity)的免疫细胞(也称为效应细胞)的相互作用。这样的效应细胞包括自然杀伤细胞、单核细胞/巨噬细胞和中性粒细胞。ADCC由与细胞结合的抗体的Fc区和免疫效应细胞(如中性粒细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞)上的Fc $\gamma$ 受体(特别是Fc $\gamma$ RI和Fc $\gamma$ RIII)之间的相互作用触发。根据介导效应细胞的类型,靶细胞通过吞噬作用或溶解作用被清除。抗体包覆的靶细胞的死亡是效应细胞活性的结果。

[0124] 术语调理作用也称为“抗体依赖性细胞吞噬作用”或ADCP,是指抗体包覆细胞被与免疫球蛋白Fc区结合的吞噬免疫细胞(例如巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞)全部或部分内化的过程。

[0125] 术语“补体依赖性细胞毒性”或CDC是指诱导细胞死亡的机制,其中靶标结合抗体的Fc效应结构域激活一系列酶促反应,最终在靶细胞膜上形成孔。通常,抗原-抗体复合物(例如抗体包覆的靶细胞上的复合物)结合并激活补体成分C1q,进而激活补体级联,导致靶细胞死亡。补体的激活还可能导致补体成分沉积在靶细胞表面,通过结合白细胞上的补体受体(例如CR3)促进ADCC。

[0126] 人源化抗体是基因工程抗体,其中来自非人“供体”抗体的CDR被移植到人“受体”抗体序列中(参见,例如,Queen, US 5,530,101和5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557)。受体抗体序列可以是例如成熟的人抗体序列、这样的序列的复合物、人抗体序列的共有序列或种系区序列。因此,人源化抗体是具有完全或基本上来自供体抗体的一些或所有CDR以及完全或基本上来自人抗体序列的可变区框架序列和恒定区(如果存在的话)的抗体。类似地,人源化重链具有至少一个、两个和通常所有三个完全或基本上来自供体抗体重链的CDR,以及基本上来自人重链可变区框架和恒定区序列的重链可变区框架序列和重链恒定区(如果存在的话)。类似地,人源化轻链具有至少一个、两个和通常所有三个完全或基本上来自供体抗体轻链的CDR,以及基本上来自人轻链可变区框架和恒定区序列的轻链可变区框架序列和

轻链恒定区(如果存在的话)。除了纳米抗体和dAbs,人源化抗体包含人源化重链和人源化轻链。当各自的CDR之间至少85%、90%、95%或100%的相应残基(由Kabat定义)相同时,人源化抗体中的CDR基本上来自非人抗体中的相应CDR。当由Kabat定义的相应残基的至少85、90、95或100%相同时,抗体链的可变区框架序列或抗体链的恒定区基本上分别来自人可变区框架序列或人恒定区。

[0127] 尽管人源化抗体通常整合了来自小鼠抗体的所有六个CDR(可由Kabat定义),但它们也可由少于所有CDR(例如,来自小鼠抗体的至少3、4或5个CDR)组成(例如,De Pascalis R,Iwahashi M,Tamura M等人2002.Grafting“Abbreviated”Complementary-Determining Regions Containing Specificity-Determining Residues Essential for Ligand Contact to Engineer a Less Immunogenic Humanized Monoclonal Antibody.J Immunol.169:3076-3084;Vajdos FF,Adams CW,Breece TN,Presta LG,de Vos AM,Sidhu, SS.2002.Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun scanning mutagenesis.J Mol Biol.320:415-428;Iwahashi M,Milenic DE,Padlan EA等人1999.CDR substitutions of a humanized monoclonal antibody(CC49):Contributions of individual CDRs to antigen binding and immunogenicity.Mol Immunol.36:1079-1091;Tamura M,Milenic DE,Iwahashi M等人2000.Structural correlates of an anticarcinoma antibody:Identification of specificity-determining regions(SDRs)and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only.J Immunol.164:1432-1441)。

[0128] 嵌合抗体是其中非人抗体(例如,小鼠)的轻链和重链的成熟可变区与人轻链和重链恒定区结合的抗体。此类抗体基本上或完全保留了小鼠抗体的结合特异性,并且约为人类序列的三分之二。

[0129] 饰面抗体是人源化抗体类型,其保留了非人抗体的一些并且通常是所有的CDR和一些非人可变区框架残基,但是取代了可能有助于B-或T-细胞表位的其他可变区框架残基,例如具有来自人抗体序列相应位置的残基的暴露残基(Padlan EA.1991.A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties.Mol Immunol.28:489-98)。结果是抗体中的CDR完全或基本上来自非人抗体,并且非人抗体的可变区框架通过取代变得更像人。人抗体可从人类中分离,或由人免疫球蛋白基因的表达产生(例如,在转基因小鼠中、在体外或通过噬菌体展示)。产生人抗体的方法包括Östberg L,Pursch E.1983.Human x(mouse x human)hybridomas stably producing human antibodies.Hybridoma 2:361-367;Östberg,美国专利号4,634,664;和Engleman等人,美国专利4,634,666的三源杂交瘤(trioma)方法;包含人免疫球蛋白基因的转基因小鼠的使用(参见,例如,Lonberg等人,W093/12227(1993);US 5,877,397,US 5,874,299,US 5,814,318,US 5,789,650,US 5,770,429,US 5,661,016,US 5,633,425,US 5,625,126,US 5,569,825,US 5,545,806,Nature 148,1547-1553(1994),Nature Biotechnology 14,826(1996),Kucherlapati,W091/10741(1991)和噬菌体展示方法(参见,例如Dower等人,W091/17271和McCafferty等

人, WO 92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743和US 5,565,332。

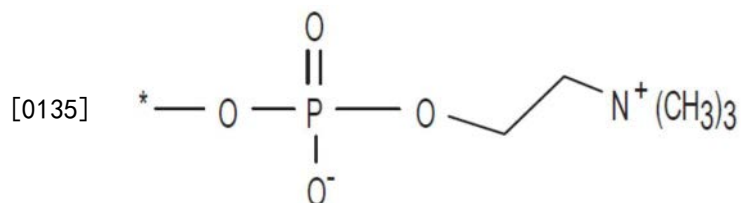
[0130] “聚合物”是指连接在一起的一系列单体基团。聚合物由单一单体(均聚物)或不同单体(杂聚物)的多个单元组成。高MW聚合物由包括但不限于丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、苯乙烯、乙烯基吡啶、乙烯基吡咯烷酮和乙烯基酯如乙酸乙烯酯的单体制备。额外的单体在高MW聚合物中是有用的。当使用两种不同的单体时,这两种单体被称为“共聚单体”,意味着不同的单体共聚形成单一的聚合物。该聚合物可以是线性的或支化的。当聚合物是支化的时,每个聚合物链被称为“聚合物臂”。连接到引发剂部分的聚合物臂的末端是近端,聚合物臂的生长链末端是远端。在聚合物臂的生长链末端,聚合物臂端基可以是自由基清除剂或另一个基团。

[0131] “引发剂”是指能够使用单体或共聚单体引发聚合的化合物。聚合可以是常规的自由基聚合或受控/“活性”自由基聚合,例如原子转移自由基聚合(ATRP)、可逆加成断裂终止(RAFT)聚合或氮氧化物介导的聚合(NMP)。聚合可以是“伪”受控聚合,如衰减转移。当引发剂适用于ATRP时,它含有不稳定键,该键可被均裂裂解以形成引发剂片段I,它是能引发自由基聚合的自由基,以及自由基清除剂I',它与生长的聚合物链的自由基反应来可逆地终止聚合。自由基清除剂I'通常是卤素,但也可以是有机部分,例如腈。在一些实施方案中,引发剂包含一个或多个2-溴异丁酸酯基团作为通过ATRP聚合的位点。

[0132] “化学接头”是指将两个基团连接在一起的化学部分,例如半衰期延长部分和蛋白质。接头可以是可裂解的或不可裂解的。可裂解接头可以是可水解的、可酶促裂解的、pH敏感的、光不稳定的或二硫化物接头等。其他接头包括同双功能和异双功能接头。“连接基团”是能够形成由一个或多个与生物活性剂连接的键组成的共价键的官能团。非限制性示例包括W02013059137(通过引用并入)的表1中示出的那些。

[0133] 术语“反应基团”是指能够与另一化学基团反应形成共价键的基团,即在合适的反应条件下具有共价反应性,并且通常代表另一种物质的连接点。反应基团是能够与不同部分上的官能团发生化学反应以形成共价键的部分,例如马来酰亚胺或琥珀酰亚胺酯。反应基团通常包括亲核体、亲电体和光活化基团。

[0134] “磷酸胆碱”,也称为“PC”,指以下内容:



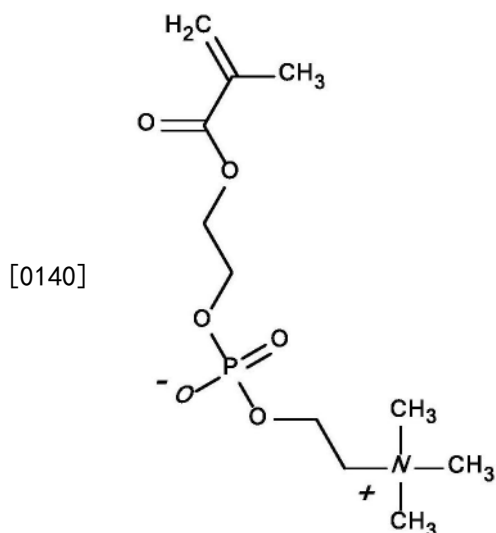
[0136] 其中\*表示连接点。磷酸胆碱是两性离子基团,包括盐(如内盐)及其质子化和去质子化形式。

[0137] “含磷酸胆碱聚合物”是含有磷酸胆碱的聚合物。“含两性离子聚合物”是指含有两性离子的聚合物。

[0138] 含聚(丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱)聚合物是指含有2-(丙烯酰氧基)乙基-2-(三甲基铵)乙基磷酸酯(HEA-PC,在下面的实施例6中示出)作为单体的聚合物。

[0139] 含聚(甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱)聚合物是指含有2-(甲基丙烯酰氧基)乙基-

2- (三甲基铵) 乙基磷酸酯 (HEMA-PC或MPC) 作为单体的聚合物 (见下文) :



[0141] 如本文所用,“MPC”和“HEMA-PC”可互换。

[0142] 聚合物上下文中的“分子量”可表示为数均分子量,或重均分子量或峰值分子量。除非另有说明,本文中所有提及的分子量都是指峰值分子量。这些分子量测定值,即数均分子量 ( $M_n$ )、重均分子量 ( $M_w$ ) 和峰值分子量 ( $M_p$ ),可以使用尺寸排阻色谱法或其他液相色谱技术来测量。也可以使用测量分子量值的其他方法,例如使用端基分析或测量依数性 (例如冰点下降、沸点升高或渗透压) 来确定数均分子量,或者使用光散射技术、超速离心或粘度测定法来确定重均分子量。在一些实施方案中,分子量通过SEC-MALS (尺寸排阻色谱法-多角度光散射) 测量。在一些实施方案中,聚合试剂通常是多分散的 (即,聚合物的数均分子量和重均分子量不相等),并且可以具有例如小于约1.5的低多分散性值,例如,通过由SEC-MALS测量得到的PDI值来判断。在一些实施方案中,多分散性 (PDI) 在约1.4至约1.2的范围内。在一些实施方案中,PDI小于约1.15、1.10、1.05或1.03。

[0143] 短语“一个/种 (a)”或“一个/种 (an)”实体是指该实体中的一个/种或多个/种;例如,一种化合物是指一种或多种化合物或至少一种化合物。因此,术语“一个 (a)” (或“一个 (an)”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可以互换使用。

[0144] “约”是指在不同仪器、样品和样品制备中进行的测量中可能看到的变化。

[0145] “受保护的”、“受保护的形式”、“保护基团”和“保护性基团”是指在某些反应条件下防止或阻断分子中特定化学反应性官能团反应的基团 (即保护基团) 的存在。保护基团根据被保护的化学反应基团的类型、所用的反应条件以及分子中其他反应或保护基团的存在 (如果有的话) 而不同。合适的保护基团例如包括在论文Greene等人,“Protective Groups In Organic Synthesis,”第3版,John Wiley and Sons,Inc.,纽约,1999中发现的那些。

[0146] “烷基”是指具有指示的碳原子数的直链或支链饱和脂肪族基团。例如, $C_1$ - $C_6$ 烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基等。其他烷基包括但不限于庚基、辛基、壬基、癸基等。烷基可以包括任意数量的碳,如1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、2-3、2-4、2-5、2-6、3-4、3-5、3-6、4-5、4-6和5-6。烷基通常是单价的,但也可以是二价的,如当烷基将两个部分连接在一起时。

[0147] 上文和下文中与有机自由基或化合物相关的术语“低级”分别定义为具有最多7个

并包括7个碳原子或最多4个并包括4个碳原子的化合物或自由基,其可以为支链的或非支链的,以及(作为非支链)具有一个或两个碳原子。

[0148] “亚烷基”是指如上定义的连接至少两个其他基团的烷基,即二价烃基。连接到亚烷基的两个部分可以连接到亚烷基的相同原子或不同原子上。例如,直链亚烷基可以是二价自由基- $(\text{CH}_2)_n$ ,其中n为1、2、3、4、5或6。亚烷基包括但不限于亚甲基、亚乙基、亚丙基、异亚丙基、亚丁基、异亚丁基、仲亚丁基、亚戊基和亚己基。

[0149] 烷基和杂烷基(包括通常称为亚烷基、烯基、杂亚烷基、杂烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环烯基和杂环烯基的那些基团)的取代基可以是选自下列的各种基团: $-\text{OR}'$ 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{NR}'$ 、 $=\text{N}-\text{OR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}'$ 、-卤素、 $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NR}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{CN}$ 和 $-\text{NO}_2$ ,数量范围从0到 $(2m'+1)$ ,其中 $m'$ 是该基团中碳原子的总数。 $\text{R}'$ 、 $\text{R}''$ 和 $\text{R}'''$ 各自独立地表示氢、未取代的 $(\text{C}_1-\text{C}_8)$ 烷基和杂烷基、未取代的芳基、被1-3个卤素取代的芳基、未取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基、或芳基- $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ 烷基。当 $\text{R}'$ 和 $\text{R}''$ 连接到相同氮原子上时,它们可以与氮原子结合形成5-、6-或7-元环。例如, $-\text{NR}'\text{R}''$ 意味着包括1-吡咯烷基和4-吗啉基。术语“烷基”包括诸如卤代烷基(例如, $-\text{CF}_3$ 和 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ )和酰基(例如, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 等)的基团。在一些实施方案中,取代的烷基和杂烷基具有1至4个取代基。在一些实施方案中,取代的烷基和杂烷基具有1、2或3个取代基。例外的是那些全卤代烷基(例如五氟乙基等)。

[0150] 烷基和杂烷基(包括通常称为亚烷基、烯基、杂亚烷基、杂烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环烯基和杂环烯基的那些基团)的取代基可以是选自但不限于以下的各种基团中的一种或多种: $-\text{OR}'$ 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{NR}'$ 、 $=\text{N}-\text{OR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}'$ 、-卤素、 $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''$ 、 $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NRSO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{CN}$ 和 $-\text{NO}_2$ ,数量范围从0到 $(2m'+1)$ ,其中 $m'$ 是该基团中碳原子的总数。 $\text{R}'$ 、 $\text{R}''$ 、 $\text{R}'''$ 和 $\text{R}''''$ 各自独立地表示氢、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的芳基(例如被1-3个卤素取代的芳基)、取代或未取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基、或芳基烷基。例如,当化合物包括一个以上的R基团时,每个R基团独立地选择,当存在一个以上的这些基团时,每个 $\text{R}'$ 、 $\text{R}''$ 、 $\text{R}'''$ 和 $\text{R}''''$ 基团也是如此。当 $\text{R}'$ 和 $\text{R}''$ 连接到相同氮原子上时,它们可以与氮原子结合形成5-、6-或7-元环。例如, $-\text{NR}'\text{R}''$ 意味着包括但不限于1-吡咯烷基和4-吗啉基。从上述取代基的讨论中,本领域技术人员将理解,术语“烷基”是指包括包含与除氢基团以外的基团结合的碳原子的基团,例如卤代烷基(例如, $-\text{CF}_3$ 和 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ )和酰基(例如, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 等)。

[0151] “烷氧基”是指具有氧原子的烷基,该氧原子将烷氧基连接到连接点,或者被连接到烷氧基的两个碳上。烷氧基包括例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、2-丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等。烷氧基可以进一步被本文所述的各种取代基取代。例如,烷氧基可以被卤素取代,形成“卤代烷氧基”基团。

[0152] “羧基烷基”是指被羧基取代的烷基(如本文所定义)。术语“羧基环烷基”是指被羧基取代的环烷基(如本文所定义)。术语烷氧基烷基是指被烷氧基取代的烷基(如本文所定义)。本文使用的术语“羧基”是指羧酸及其酯。

[0153] “卤代烷基”是指如上定义的烷基,其中部分或全部氢原子被卤素原子取代。卤素(卤代)表示氯代或氟代,但也可以是溴代或碘代。例如,卤代烷基包括三氟甲基、氟甲基、1,2,3,4,5-五氟-苯基等。术语“全氟”定义了所有可用的氢都被氟取代的化合物或基团。例如,全氟苯基是指1,2,3,4,5-五氟苯基,全氟甲基是指1,1,1-三氟甲基,全氟甲氧基是指1,1,1-三氟甲氧基。

[0154] “氟取代的烷基”是指其中一个、部分或所有氢原子被氟取代的烷基。

[0155] “细胞因子”是可参与免疫和炎症反应中细胞-细胞通讯的一组蛋白质信号传导分子的成员。细胞因子通常是小的水溶性糖蛋白,质量为约8-35kDa。

[0156] “环烷基”是指包含约3至12个、3至10个或3至7个环内碳原子的环状烃基。环烷基包括稠合、桥连和螺环结构。

[0157] “环内”是指构成环状结构的一部分的原子或原子团。

[0158] “环外”是指连接在一起但不限定环状结构的原子或原子团。

[0159] “环烷基醚”是指具有3或4个环内碳原子和1个环内氧或硫原子的4或5元环烷基(例如氧杂环丁烷、硫杂环丁烷、四氢呋喃、四氢噻吩);或具有1或2个环内氧或硫原子的6至7元环烷基(例如,四氢吡喃、1,3-二氧六环、1,4-二氧六环、四氢噻喃、1,3-二噻烷、1,4-二噻烷、1,4-噻恶烷)。

[0160] “烯基”是指具有至少一个双键的2至6个碳原子的直链或支链烃。烯基的示例包括但不限于乙烯基、丙烯基、异丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、异戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,3-己二烯基、1,4-己二烯基、1,5-己二烯基、2,4-己二烯基或1,3,5-己三烯基。烯基也可以具有2至3、2至4、2至5、3至4、3至5、3至6、4至5、4至6和5至6个碳。烯基通常是单价的,但也可以是二价的,例如当烯基将两个部分连接在一起时。

[0161] “亚烯基”是指如上定义的连接至少两个其他基团的烯基,即二价烃基。连接到亚烯基上的两个部分可以连接到亚烯基的相同原子或不同原子上。亚烯基包括但不限于亚乙烯基、亚丙烯基、亚异丙烯基、亚丁烯基、异亚丁烯基、仲亚丁烯基、亚戊烯基和亚己烯基。

[0162] “炔基”是指具有至少一个三键的2至6个碳原子的直链或支链烃。炔基的示例包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、异丁炔基、仲丁炔基、丁二炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、异戊炔基、1,3-戊二炔基、1,4-戊二炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、1,3-己二炔基、1,4-己二炔基、1,5-己二炔基、2,4-己二炔基或1,3,5-己三炔基。炔基也可以具有2至3、2至4、2至5、3至4、3至5、3至6、4至5、4至6和5至6个碳。炔基通常是单价的,但也可以是二价的,例如当炔基将两个部分连接在一起时。

[0163] “亚炔基”是指如上定义的连接至少两个其他基团的炔基,即二价烃基。连接到亚炔基的两个部分可以连接到亚炔基的相同原子或不同原子上。亚炔基包括但不限于亚乙炔基、亚丙炔基、亚丁炔基、仲亚丁炔基、亚戊炔基和亚己炔基。

[0164] “环烷基”是指饱和或部分不饱和的、单环的、稠合的双环或桥连的多环组合体,其包含3至12个环原子,或指示的原子数。单环包括例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环辛基。双环和多环包括例如降冰片烷、十氢萘和金刚烷。例如,C<sub>3-8</sub>环烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环辛基和降冰片烷。

[0165] “环亚烷基”是指如上定义的连接至少两个其他基团的环烷基,即二价烃基。连接

到环亚烷基上的两个部分可以连接到环亚烷基的相同原子或不同原子上。环亚烷基包括但不限于环亚丙基、环亚丁基、环亚戊基、环亚己基和环亚辛基。

[0166] “杂环烷基”是指具有3个环成员至约20个环成员和1个至约5个杂原子(如N、O和S)的环系统。额外的杂原子也可以是有用的,包括但不限于B、Al、Si和P。杂原子也可以被氧化,如但不限于-S(O)-和-S(O)<sub>2</sub>-。例如,杂环包括但不限于四氢呋喃基、四氢噻吩基、吗啉基、吡咯烷基、吡咯啉基、咪唑烷基、咪唑啉基、吡唑烷基、吡唑啉基、哌嗪基、哌啶基、吲哚啉基、奎宁环基和1,4-二氧杂-8-氮杂-螺[4.5]癸-8-基。

[0167] “杂环亚烷基(Heterocycloalkylene)”是指如上定义的连接至少两个其他基团的杂环烷基。连接到杂环亚烷基的两个部分可以连接到杂环亚烷基的相同原子或不同原子上。

[0168] “芳基”是指含有6至16个环碳原子的单环或稠合双环、三环或更大的芳环组合体。例如,芳基可以是苯基、苄基或萘基。“亚芳基”是指衍生自芳基的二价基团。芳基可以被一个、两个或三个选自烷基、烷氧基、芳基、羟基、卤素、氰基、氨基、氨基烷基、三氟甲基、亚烷二氧基和氧代C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-亚烷基的基团单、二或三取代;所有这些任选地被进一步取代,例如如上文所定义的;或1-或2-萘基;或1-或2-菲基。亚烷二氧基是连接到苯基的两个相邻碳原子上的二价取代基,例如亚甲二氧基或亚乙二氧基。氧代C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-亚烷基也是连接到苯基的两个相邻碳原子上的二价取代基,例如氧乙烯或氧丙烯。氧代C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-亚烷基苯基的示例是2,3-二氢苯并呋喃-5-基。

[0169] 在一些实施方案中,芳基是萘基、苯基或被烷氧基、苯基、卤素、烷基或三氟甲基单取代或二取代的苯基,尤其是苯基或被烷氧基、卤素或三氟甲基单取代或二取代的苯基,尤其是苯基。

[0170] 作为R的取代苯基的示例例如为:4-氯苯-1-基、3,4-二氯苯-1-基、4-甲氧基苯-1-基、4-甲基苯-1-基、4-氨基甲基苯-1-基、4-甲氧基乙基氨基甲基苯-1-基、4-羟乙基氨基甲基苯-1-基、4-羟乙基-(甲基)-氨基甲基苯-1-基、3-氨基甲基苯-1-基、4-N-乙酰氨基甲基苯-1-基、4-氨基苯-1-基、3-氨基苯-1-基、2-氨基苯-1-基、4-苯基-苯-1-基、4-(咪唑-1-基)-苯基、4-(咪唑-1-基甲基)-苯-1-基、4-(吗啉-1-基)-苯-1-基、4-(吗啉-1-基甲基)-苯-1-基、4-(2-甲氧基乙基氨基甲基)-苯-1-基和4-(吡咯烷-1-基甲基)-苯-1-基、4-(硫代苯基)-苯-1-基、4-(3-硫代苯基)-苯-1-基、4-(4-甲基哌嗪-1-基)-苯-1-基,和4-(哌啶基)-苯基和4-(吡啶基)-苯基任选地在杂环上取代。

[0171] “亚芳基”是指如上定义的连接至少两个其他基团的芳基。连接到亚芳基的两个部分连接到亚芳基的不同原子上。亚芳基包括但不限于亚苯基。

[0172] “亚芳氧基”是指如上定义的亚芳基,其中连接到亚芳基的一部分之一通过氧原子连接。亚芳氧基包括但不限于亚苯基氧基。

[0173] 类似地,芳基和杂芳基的取代基是不同的,并且选自:-卤素、-OR'、-OC(O)R'、-NR'R''、-SR'、-R'、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>R'、-CONR'R''、-C(O)R'、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、-NR''C(O)<sub>2</sub>R'、-NR'-C(O)NR'R''、-NH-C(NH<sub>2</sub>)=NH、-NR'C(NH<sub>2</sub>)=NH、-NH-C(NH<sub>2</sub>)=NR'、-S(O)R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>NR'R''、-N<sub>3</sub>、-CH(Ph)<sub>2</sub>、全氟(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷氧基和全氟(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基,数量范围从零至芳环体系上开放价数的总数;其中R'、R''和R'''独立地选自氢、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)烷基和杂烷基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基和(未取代的芳基)氧基-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基。

[0174] 芳基或杂芳基环相邻原子上的两个取代基可以任选地被式-T-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-U-取代基取代,其中T和U独立地为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或单键,并且q为0至2的整数。或者,芳基或杂芳基环相邻原子上的两个取代基可以任选地被式-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-B-的取代基取代,其中A和B独立地为-CH<sub>2</sub>-、-O-、-NH-、-S-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NR'-或单键,并且r为1至3的整数。这样形成的新环的单键之一可以任选地被双键取代。或者,芳基或杂芳基环相邻原子上的两个取代基可以任选地被式-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-的取代基取代,其中s和t独立地为0至3的整数,X为-O-、-NR'-、-S-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-或-S(O)<sub>2</sub>NR'-。-NR'-和-S(O)<sub>2</sub>NR'-中的取代基R'选自氢或未取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基。

[0175] “杂芳基”是指含有5至16个环原子的单环或稠合双环或三环芳环组合体,其中1至4个环原子为杂原子,每个杂原子为N、O或S。例如,杂芳基包括吡啶基、吡咯基、呋唑基、喹啉基、喹啉基、异喹啉基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、呋喃基、吡咯基、噻唑基、苯并噻唑基、恶唑基、异恶唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、咪唑基、噻吩基或任何其他被例如烷基、硝基或卤素取代的基团,尤其是单取代或二取代的基团。吡啶基代表2-、3-或4-吡啶基,有利的是2-或3-吡啶基。噻吩基代表2-或3-噻吩基。在一些实施方案中,喹啉基代表2-、3-或4-喹啉基。在一些实施方案中,异喹啉基代表1-、3-或4-异喹啉基。在一些实施方案中,苯并吡喃基、苯并噻喃基可以分别代表3-苯并吡喃基或3-苯并噻喃基。在一些实施方案中,噻唑基可以代表2-或4-噻唑基。在一些实施方案中,三唑基可以是1-、2-或5-(1,2,4-三唑基)。在一些实施方案中,四唑基可以是5-四唑基。

[0176] 在一些实施方案中,杂芳基是吡啶基、吡咯基、喹啉基、吡咯基、噻唑基、异恶唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、咪唑基、噻吩基、呋喃基、苯并噻唑基、苯并呋喃基、异喹啉基、苯并噻吩基、恶唑基、呋唑基或任何取代的基团,尤其是单取代或二取代的基团。

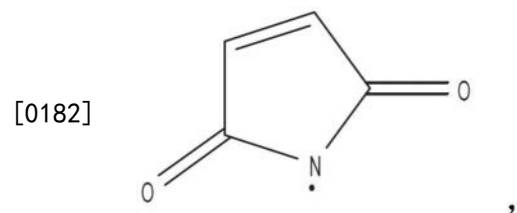
[0177] 术语“杂烷基”是指具有1至3个杂原子(如N、O和S)的烷基。其他杂原子也可以是有用的,包括但不限于B、Al、Si和P。杂原子也可以被氧化,例如但不限于-S(O)-和-S(O)<sub>2</sub>-。例如,杂烷基可以包括醚、硫醚、烷基胺和烷基硫醇。

[0178] 术语“杂亚烷基”是指如上定义的连接至少两个其他基团的杂烷基。连接到杂亚烷基的两个部分可以连接到杂亚烷基的相同原子或不同原子上。

[0179] “亲电体”是指离子或原子或原子的集合,其可以是离子的,具有亲电中心,即寻求电子的中心,能够与亲核体反应。亲电体(或亲电试剂)是通过接受来自反应伙伴的两个键合电子而与其反应伙伴(亲核体)形成键的试剂。

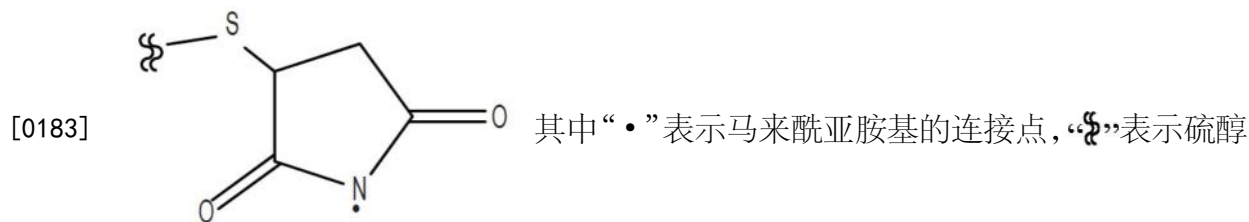
[0180] “亲核体”是指离子或原子或原子的集合,其可以是离子的,具有亲核中心,即寻求亲电中心或能够与亲电体反应的亲核中心。亲核体(或亲核试剂)是通过提供两个键合电子而与其反应伙伴(亲电体)形成键的试剂。“亲核基团”是指与反应基团反应后的亲核体。非限制性示例包括氨基、羟基、烷氧基、卤代烷氧基等。

[0181] “马来酰亚胺基”是指具有以下结构的吡咯-2,5-二酮-1-基:



其在与巯基(例如,硫代烷基)反应时形成具有以下结

构的-S-马来酰亚胺基：



的硫原子与原始含巯基的基团的剩余部分的连接点。

[0184] 出于本公开的目的,在蛋白质和多肽中发现的“天然存在的氨基酸”是L-丙氨酸、L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、L-甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和/或L-缬氨酸。在蛋白质中发现的“非天然存在的氨基酸”是除了那些被称为天然存在的氨基酸之外的任何氨基酸。非天然存在的氨基酸包括但不限于天然存在的氨基酸的D异构体,以及天然存在的氨基酸的D和L异构体的混合物。其他氨基酸,例如N- $\alpha$ -甲基氨基酸(例如肌氨酸)、4-羟基脯氨酸、锁链素、异锁链素、5-羟基赖氨酸、 $\epsilon$ -N-甲基赖氨酸、3-甲基组氨酸,尽管在天然存在的蛋白质中发现,但出于本公开的目的,被认为是在蛋白质中发现的非天然存在的氨基酸,因为它们通常通过mRNA的核糖体翻译以外的方式引入。

[0185] 就聚合物的几何形状、结构或整体结构而言,“线性”是指具有单个聚合物臂的聚合物。

[0186] 就聚合物的几何形状、结构或整体结构而言,“支化”是指具有从引发剂内所含核心结构延伸的2个或更多个聚合物“臂”的聚合物。引发剂可用于原子转移自由基聚合(ATRP)反应。支化聚合物可具有2个聚合物链(臂)、3个聚合物臂、4个聚合物臂、5个聚合物臂、6个聚合物臂、7个聚合物臂、8个聚合物臂、9个聚合物臂或更多。每个聚合物臂从聚合物起始位点延伸。每个聚合物起始位点都能够通过添加单体成为聚合物链生长的位点。例如但不限于,使用ATRP,引发剂上的聚合物引发位点通常是有机卤化物,该有机卤化物经历由过渡金属化合物(例如卤化亚铜)催化的可逆氧化还原过程。在一些实施方案中,卤化物是溴。

[0187] “药学上可接受的赋形剂”是指可以包含在组合物中并且不会对患者造成显著的有害毒理学影响并且经FDA批准或可批准用于治疗用途(特别是用于人类)的赋形剂。药学上可接受的赋形剂的非限制性示例包括水、NaCl、生理盐水溶液、乳酸林格氏液、标准蔗糖、标准葡萄糖等。

[0188] 治疗性蛋白质以有效方案施用,有效方案是指延迟发作、降低严重程度、抑制进一步恶化和/或改善疾病的至少一种体征或症状的剂量、施用途径和施用频率。如果患者已经患有疾病,则该方案可称为治疗有效方案。如果患者相对于一般群体处于疾病的高风险中但尚未出现症状,则该方案可称为预防有效方案。在某些情况下,可以观察到相对于相同患者的历史对照或过去经历而言,单个患者的治疗或预防效果。在其他情况下,可以在临床前或临床试验中,相对于未接受治疗的对照群体,在接受治疗的患者群体中证明治疗或预防效果。

[0189] 物质的“生物半衰期”是药代动力学参数,说明了引入该物质后,该物质从组织或

生物体中清除一半所需的时间。

[0190] “OG1786”是用于聚合物合成的9臂引发剂,其描述了具有三氟乙酸的OG1786的盐形式。OG1786可作为其他盐使用或作为游离碱使用。

[0191] “OG1801”是使用OG1786作为使用单体HEMA-PC的ATRP合成的引发剂制备的约(+/-15%)750kDa的聚合物(通过Mn或Mp)。

[0192] “OG1802”是添加了马来酰亚胺官能团的OG1801,其中 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、 $n_4$ 、 $n_5$ 、 $n_6$ 、 $n_7$ 、 $n_8$ 和 $n_9$ 中的每一个是整数(正)(从0至约3000),使得聚合物的总分子量为(Mw)750,000±15%道尔顿。

[0193] 多角度光散射(MALS)是一种分析大分子的技术,其中激光照射在分子上,光的振荡电场在分子内诱导振荡偶极子。振荡偶极子会重新辐射光,可以用MALS探测器测量,如Wyatt miniDawn TREOS。辐射光的强度取决于在大分子中诱导的偶极的大小,该大小又与大分子的极化性成比例,诱导的偶极越大,因此的散射光的强度越大。因此,为了分析这样的大分子溶液的散射,应该知道它们相对于周围介质(例如溶剂)的极化性。这可以通过使用Wyatt Optilab T-rEX示差折光仪测量 $dn/dc (= \Delta n / \Delta c)$ 值,测量溶液折射率 $n$ 随分子浓度变化 $\Delta c$ 的变化 $\Delta n$ 来确定。MALS测定使用的两个摩尔质量参数是数均分子量(Mn)和重均分子量(Mw),其中多分散性指数(PDI)等于Mw除以Mn。SEC还允许对峰值分子量Mp进行另一个平均分子量测定,峰值分子量Mp被定义为SEC中最高峰的分子量。

[0194] PDI用作聚合物和生物缀合物的分子量分布宽度的量度,生物缀合物源自离散蛋白质(例如OG1950)与多分散性生物聚合物(例如OG1802)的缀合。对于蛋白质样品,其多分散性接近1.0,因为它是翻译的产物,溶液中的每个蛋白质分子都预计具有几乎相同的长度和摩尔质量。相反,由于生物聚合物的多分散性,在聚合过程中会合成不同长度的聚合物链,因此测定样品的PDI作为其窄分子量分布的质量属性之一是非常重要的。

[0195] 尺寸排阻色谱法(SEC)是一种色谱技术,其中溶液中的分子按其尺寸分离。通常使用水溶液将样品输送通过填充有各种孔径的树脂的柱。预期树脂在分析物通过柱时对分析物是惰性的,并且分析物基于其独特的尺寸和所选柱的孔径特征而彼此分离。

[0196] 与依赖一组SEC校准标准相比,将SEC与MALS或SEC/MALS结合提供了摩尔质量和尺寸(均方根半径)的精确分布。与传统的色谱柱校准方法相比,这种方式有很多优点。由于对每个洗脱级分的光散射和浓度进行测量,因此可以独立于洗脱位置确定摩尔质量和大小。这与具有非球形大分子的物种特别相关,例如生物聚合物(OG1802)或生物缀合物(例如KSI-301、KSI-501);这些物质通常不会以一组柱校准标准所描述的方式洗脱。

[0197] 在一些实施方案中,SEC/MALS分析包括具有Alliance 2695溶剂递送模块的Waters HPLC系统和配备有Shodex SEC-HPLC柱(7.8x300 mm)的Waters 2996Photodiode阵列检测器。这与Wyatt miniDawn TREOS和Wyatt Optilab T-rEX差示折光仪在线连接。Waters的Empower软件可用于控制Waters HPLC系统,Wyatt的ASTRAV 6.1.7.16软件可用于从Wyatt miniDawn TREOS获得MALS数据,从T-rEX检测器获得 $dn/dc$ 数据,并使用Waters 2996Photodiode阵列检测器的A280吸光度信号获得质量回收数据。SEC可以在1xPBS pH 7.4中以1ml/min的速度进行,在样品注射后,可以通过ASTRA软件分析MALS和RI信号,以确定绝对摩尔质量(Mp、Mw、Mn)和多分散性指数(PDI)。此外,计算还包括聚合物和蛋白质的输入 $dn/dc$ 值,分别为0.142和0.183。对于KSI-301 $dn/dc$ 值, $dn/dc$ 基于聚合物和蛋白质的加权

MW计算,约为0.148,使用以下公式:

[0198] 缀合物 $dn/dc=0.142x[Mw聚合物/(Mw聚合物+Mw蛋白质)]+0.183x[Mw蛋白质/(Mw聚合物+Mw蛋白质)]$

[0199] 其中OG1802的Mw聚合物是800kDa,OG1950的Mw蛋白质是146kDa。

[0200] “KSI-301”是重组的哺乳动物细胞表达的全长人源化抗VEGF单克隆抗体的生物缀合物,其与基于磷酸胆碱的支化高分子量生物聚合物共价缀合。在一些实施方案中,KSI-301以不含防腐剂的无菌水溶液的形式在一次性玻璃瓶中提供,浓度为50mg/ml(基于抗体质量)。图8展示了KSI-301的抗体部分的氨基酸序列。KSI-301是一种抗血管内皮生长因子(VEGF)生物药物,具有延长的眼部半衰期。KSI-301是两种中间体的生物缀合物:(1)OG1950抗体中间体,一种重组的全长人源化抗huVEGF单克隆抗体,和(2)OG1802生物聚合物中间体,一种磷酸胆碱生物聚合物。OG1802(一种惰性生物聚合物)的加入增加了生物制剂的大小,从而延长了KSI-301的眼部药代动力学(PK),超过了目前批准的抗huVEGF-A治疗剂。对KSI-301的非临床研究表明,它以高亲和力与huVEGF-A适当结合,然后抑制huVEGF-A与huVEGF受体1和2(huVEGFR)的结合。这进而消除了huVEGF-A介导的功能。

[0201] 在一些实施方案中,将在本文提供的任何一种或多种方法中施用的分子是美国专利出版第2017/0190766号中公开的任何一种分子,通过引用将其整体并入本文。

[0202] 图8展示了去除了末端赖氨酸的KSI-301的抗体部分的氨基酸序列。末端赖氨酸去除是抗体中的翻译后修饰。重组IgG的重链C-末端的赖氨酸残基在细胞培养过程中被CHO宿主细胞内源性的羧肽酶去除(通常在很大程度上)。对于本文描述的所有抗体序列,尽管提供了本文公开的示例性抗体的特定序列(可能更长),但是应当理解,在蛋白链表达后,轻链和/或重链的氨基或羧基末端的一个至几个氨基酸,特别是重链C-末端赖氨酸残基,可能在部分或全部分子中缺失或衍生。因此,在一些实施方案中,本文提供的任何抗体序列都可以被该赖氨酸片段修饰,其可以包括如图8示出的修饰版本(一个或多个带下划线的残基被去除)。在一些实施方案中,图8的重链中的赖氨酸被去除。在一些实施方案中,GK被去除。在一些实施方案中,PGK被去除。在一些实施方案中,SPGK被去除。如本领域技术人员将会理解的,在分子群体中,赖氨酸片段可以变化并且不完整。因此,例如,90、95、98、99或100%的分子可以具有一种或多种片段版本,而10、5、2、1或低至0%可以是全长的(包括任何两个前述值之间限定的任何范围)。因此,如本文所用,KSI-301包括图8中的重链变体的任何一个和所有选项。

[0203] 如本文所用,每当提及“抗VEGF抗体”或“抗VEGF抗体缀合物”时,也考虑抗VEGF蛋白,如抗VEGF融合蛋白(例如阿柏西普(aflibercept))。因此,如本文所公开的,每当提及“抗VEGF抗体缀合物”时,也考虑共价结合到本文所公开的含有磷酸胆碱的生物聚合物(例如OG1802)上的抗VEGF蛋白(例如阿柏西普)。在本文公开的各种实施方案中,任何提及抗VEGF抗体缀合物疗法,也考虑抗VEGF蛋白(例如阿柏西普)缀合物疗法。在本文公开的治疗眼疾病的方法的各种实施方案中,任何提及抗VEGF抗体缀合物,也考虑阿柏西普生物聚合物缀合物。

[0204] 纯化方法

[0205] 在一些实施方案中,提供了一种纯化产品的方法。该方法包括用离液剂洗涤结合的蛋白质产品,然后收集结合的蛋白质。该方法还可以包括额外的上游和下游纯化过程。

[0206] 在一些实施方案中,提供了一种使用亲和层析纯化产品的方法。该方法包括将洗脱液上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合;和用包含离液剂的缓冲溶液洗涤亲和层析基质。

[0207] 在一些实施方案中,目的靶蛋白质通过细胞培养物产生。在一些实施方案中,细胞培养物是CHO细胞。在一些实施方案中,目的蛋白质是双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体对VEGF和IL-6具有特异性。在一些实施方案中,双特异性抗体是OG2072。在一些实施方案中,目的蛋白质是抗体缀合物。在一些实施方案中,亲和层析基质是蛋白A层析基质。

[0208] 在一些实施方案中,缓冲溶液中的离液剂包含锂和锂盐、镁和镁盐、钙和钙盐以及胍和胍盐中的一种或多种。

[0209] 在一些实施方案中,镁盐的浓度在2-3.5M之间。在一些实施方案中,浓度为约2.8M的 $MgCl_2$ 。

[0210] 在一些实施方案中,镁盐的浓度为:2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4或3.5M,或前述范围之间的任何值。

[0211] 在一些实施方案中,钙盐的浓度在1-3M之间。在一些实施方案中,浓度为约2.0M的 $CaCl_2$ 。

[0212] 在一些实施方案中,钙盐的浓度为:1、1.5、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.7或3M,或前述范围之间的任何值。

[0213] 在一些实施方案中,胍盐的浓度在0.05-3M之间。在一些实施方案中,浓度为约1.0M的盐酸胍。

[0214] 在一些实施方案中,胍盐的浓度为:0.05、0.075、0.1、0.2、0.25、0.5、0.75、1、1.5、1.75、2、2.5、2.75或3M,或前述范围之间的任何值。

[0215] 在一些实施方案中,缓冲溶液还包含tris。

[0216] 在一些实施方案中,缓冲溶液中tris的浓度至少为5mM。

[0217] 在一些实施方案中,缓冲溶液中tris的浓度至少为10mM。

[0218] 在一些实施方案中,缓冲溶液中tris的浓度至少为:25mM、30mM、35mM、40mM、50mM或大于50mM的值。

[0219] 在一些实施方案中,缓冲溶液的pH大于5.5。

[0220] 在一些实施方案中,本文提供了一种从包含蛋白质和一种或多种杂质的上样流体中纯化产品和减少杂质的方法。该方法包括使上样流体经过亲和层析基质,随后通过至少一种包含离液盐的洗涤溶液,并使用洗脱溶液收集蛋白质。

[0221] 在一些实施方案中,本文提供了一种分离包含目的蛋白质的洗出液中的杂质的方法。该方法包括将包含目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上;并用一种或多种缓冲溶液洗涤亲和层析基质,缓冲溶液包括锂和锂盐、镁和镁盐、钙和钙盐以及胍和胍盐中的一种或多种。

[0222] 在一些实施方案中,本文提供了一种分离包含目的蛋白质的洗出液中的杂质的方法。该方法包括将包含目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上;并用一种或多种缓冲溶液洗涤亲和层析基质,缓冲溶液包括锂和锂盐、镁和镁盐、钙和钙盐以及胍和胍盐中的一种或多种。在一些实施方案中,该方法还包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗

涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。在一些实施方案中,用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除核酸、内毒素、消泡剂、其他分子或除目的靶蛋白质之外的其他小分子。在一些实施方案中,用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除杂质,同时保持目的靶蛋白质与亲和层析基质结合。在一些实施方案中,用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除除目的靶蛋白质之外的宿主细胞蛋白质。在一些实施方案中,在缓冲溶液中添加离液剂不会洗脱目的靶蛋白质。在一些实施方案中,该方法还包括病毒灭活、切向流过滤、渗滤、超滤、离子交换层析或病毒减少过滤中的一种或多种。在一些实施方案中,洗脱液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。在一些实施方案中,产品是纯化的目的蛋白质。在一些实施方案中,杂质包括宿主细胞蛋白质(HCP)杂质。在一些实施方案中,洗出液还包含病毒杂质。在一些实施方案中,该方法还包括去除病毒杂质。在一些实施方案中,该方法还包括在用缓冲溶液洗涤之前,用预洗涤缓冲溶液洗涤上样有上样流体的亲和层析基质的步骤。在一些实施方案中,该方法还包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质。在一些实施方案中,预洗涤缓冲溶液包含磷酸钠。在一些实施方案中,预洗涤缓冲溶液包含tris和盐。在该方法的一些实施方案中,抗体缀合物包含抗VEGF抗体缀合物,该抗VEGF抗体缀合物包含抗VEGF-A轻链和抗VEGF-A重链,其中抗VEGF-A抗体重链包含CDRH1:即SEQ ID NO:172中的CDRH1,CDRH2:即SEQ ID NO:173中的CDRH2,和CDRH3:即SEQ ID NO:174中的CDRH3,抗VEGF-A抗体轻链包含CDRL1:即SEQ ID NO:199中的CDRL1,CDRL2:即SEQ ID NO:200中的CDRL2,和CDRL3:即SEQ ID NO:201中的CDRL3。在本文提供的方法的一些实施方案中,抗VEGF抗体缀合物包含:包含与聚合物结合的抗VEGF-A免疫球蛋白G(IgG)的抗体缀合物,该聚合物包含MPC单体,其中抗VEGF-A抗体重链的序列为SEQ ID No:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个,抗VEGF-A抗体轻链的序列为SEQ ID No:91-93、28-30中的至少一个,并且其中抗体在C449处与聚合物结合。

[0223] 在一些实施方案中,提供了一种使用亲和层析生产产品的方法,该方法包括将包含目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上;并用一种或多种缓冲溶液洗涤亲和层析基质,缓冲溶液包括锂和锂盐、镁和镁盐、钙和钙盐以及胍和胍盐中的一种或多种。

[0224] 在一些实施方案中,提供了一种处理产品的方法。该方法包括将洗脱液上样到亲和层析基质中。在一些实施方案中,该方法还包括用包含离液盐的洗涤缓冲液洗涤以收集洗出液,其中离液盐的浓度从第一浓度增加至第二浓度,其中在至少一个级分中收集洗出液,其中该至少一个级分包含目的产品。在一些实施方案中,该方法还包括其中第一浓度的离液盐的浓度是0M,其中第二浓度的离液盐的浓度是4.0M。在一些实施方案中,离液盐是基于镁的。在一些实施方案中,离液盐是MgCl<sub>2</sub>。

[0225] 在一些实施方案中,提供了一种使用亲和层析生产产品的方法。该方法包括将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,用包含磷酸钠和盐的第一缓冲液对亲和层析基质进行第一洗涤,并用包含离液剂的第二缓冲液对亲和层析基质进行第二洗涤。

[0226] 在一些实施方案中,提供了使用亲和层析生产产品的方法。该方法包括将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,用含有Tris和盐的第一缓冲液进行第一洗涤,用含有Tris和离液剂的第二缓冲液进行第二洗涤,其中第二缓冲液离液剂与第一缓冲液中含有的盐不同。

[0227] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括收集上样流体,其中

上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,然后用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱结合的目的蛋白质;和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

[0228] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,向亲和层析基质供给包含离液盐的缓冲溶液,洗脱结合的目的蛋白质;和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

[0229] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法,该方法包括收集缀合蛋白质,其中缀合蛋白质包含与缀合聚合物结合的抗体,将缀合蛋白质上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与缀合蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱缀合蛋白质,和收集洗出液,其中洗出液含有缀合蛋白质。

[0230] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,并从洗出液中去除病毒污染物。

[0231] 在一些实施方案中,从洗出液中去除病毒污染物包括低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤、超滤和/或渗滤中的一种或多种。

[0232] 在一些实施方案,提供了一种生产产品的方法。该方法包括用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,去除离液盐,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质。

[0233] 在一些实施方案中,洗出液进一步与可接受的药物赋形剂组合以形成药物组合物。在一些实施方案中,向药物组合物中加入缓冲溶液。在一些实施方案中,向药物组合物中加入防腐溶液。在一些实施方案中,进一步精制药物组合物用于玻璃体内注射。

[0234] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,并从洗出液中去除病毒污染物。

[0235] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱结合的目的蛋白质;和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

[0236] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,向亲和层析基质供给包含离液盐的缓冲溶液,洗脱结合的目的蛋白质;和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

[0237] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法,该方法包括收集缀合蛋白质,其中缀合蛋白质包含与缀合聚合物结合的抗体,将缀合蛋白质上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与缀合蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱缀合蛋白质,和收集洗出液,其中洗出液含有缀合蛋白质。

[0238] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括用包含离液盐的缓

冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,并从洗出液中去除病毒污染物。

[0239] 该方法还可以包括,其中从洗出液中去除病毒污染物包括低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)和/或渗滤(DF)中的一种或多种。该方法还可以包括,其中洗出液进一步与可接受的药物赋形剂组合以形成药物组合物。该方法还可以包括,其中向药物组合物中加入缓冲溶液。该方法还可以包括,其中向药物组合物中加入防腐溶液。该方法还可以包括,其中进一步精制药物组合物用于玻璃体内注射。

[0240] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,去除离液盐,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质。

[0241] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,并从洗出液中去除病毒污染物。

[0242] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法,该方法包括将洗脱液上样到亲和层析基质中,用第一洗涤缓冲液洗涤,用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤,用第三洗涤缓冲液洗涤,其中第三洗涤缓冲液去除离液盐,用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。

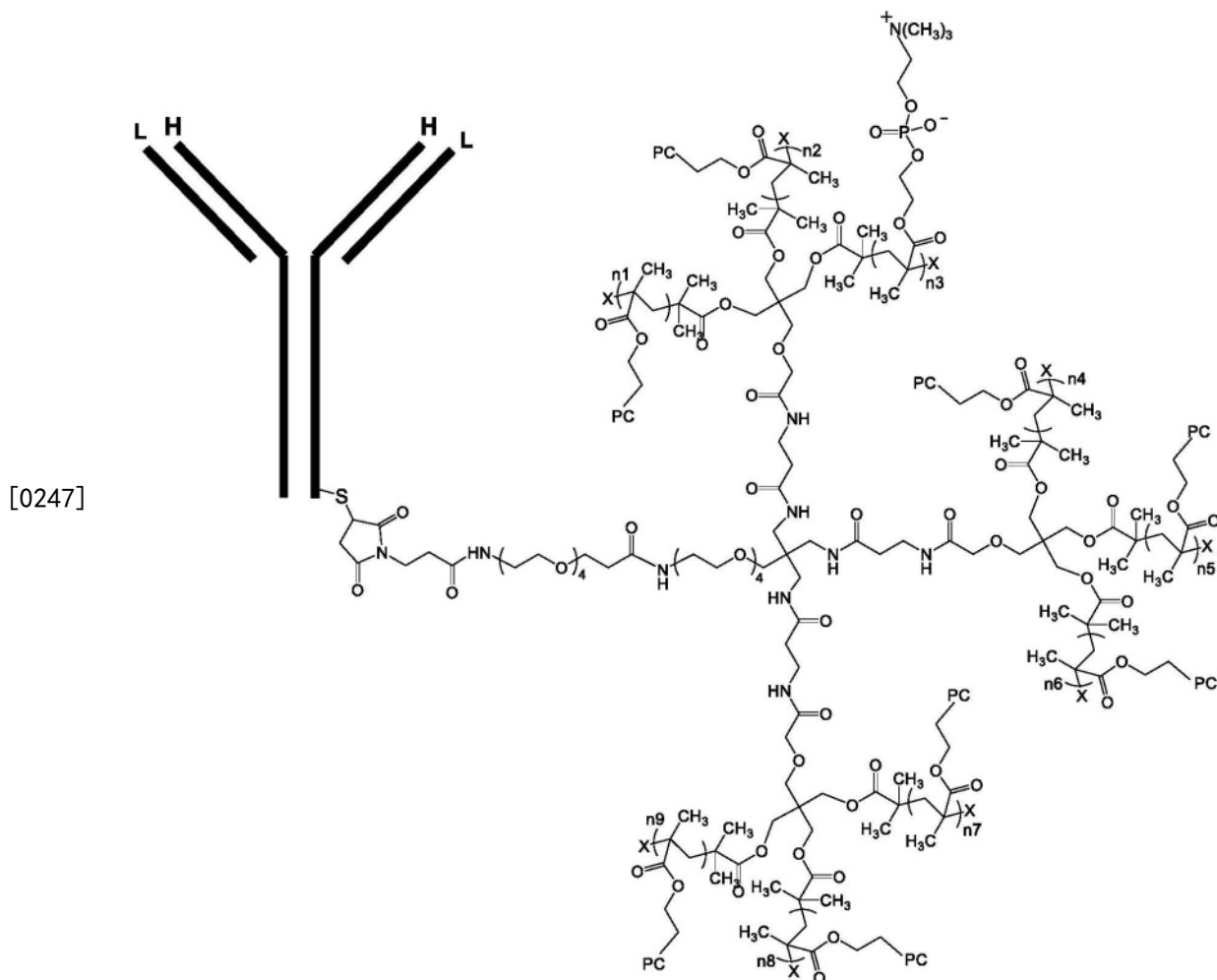
[0243] 该方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含50mM磷酸钠。该方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液还包含250mM NaCl。该方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含Tris和盐。该方法还可以包括从洗出液中去除病毒污染物。该方法还可以包括,其中去除病毒污染物包括:低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)或渗滤(DF)中的一种或多种。该方法还可以包括,其中洗脱液包含目的蛋白质。该方法还可以包括,其中目的蛋白质是抗体。该方法还可以包括,其中抗体进一步与聚合物缀合以形成抗体缀合物。该方法还可以包括,其中抗体缀合物包含双特异性抗体。该方法还可以包括,其中双特异性抗体包括抗VEGF和抗IL-6结合部分。

[0244] 该方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含10、50、100、150、200mM、或10至200mM之间的任何整数的磷酸钠。该方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含基于磷酸盐的种类。该方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液还包含25、50、100、150、200、或25至200mM之间的任何整数的NaCl。该方法还可以包括,其中第一浓度的离液盐的浓度是0M,其中第二浓度的离液盐的浓度是4.0M。该方法还可以包括,其中离液盐是基于镁的。该方法还可以包括,其中离液盐是MgCl<sub>2</sub>。

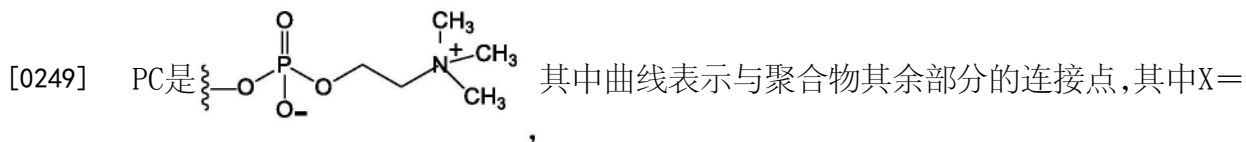
[0245] 在一些实施方案中,抗体缀合物包含蛋白质构建体,所述蛋白质构建体包含融合到VEGF trap的拮抗IL-6抗体,其中抗体包含分离的拮抗IL-6抗体或其片段。在一些实施方案中,双特异性抗体包含VEGF-抗IL-6双重抑制剂,其中VEGFR-抗IL-6双重抑制剂包含抗IL-6抗体或其片段和抗VEGF trap(VEGFR1/2)的trap抗体融合体,其中双重抑制剂包含至少一个具有VEGFR序列的点突变以减少VEGFR蛋白的裂解,其中抗体包含抗原结合片段(Fab)区、铰链区和可结晶片段(Fc)区,其中抗VEGF trap位于抗体重链的N末端,其中重链包含IL-6VH,或者位于Fab和铰链区之间。在一些实施方案中,抗体缀合物包括包含(1)抗

VEGF-A抗体和(2)含有磷酰胆碱的聚合物的抗体缀合物,其中所述聚合物在抗体可变区外的半胱氨酸处与抗体共价结合,其中所述半胱氨酸已经通过重组DNA技术添加。在一些实施方案中,抗体缀合物包含特异性结合补体因子D(CFD)并直接抑制CFD蛋白水解活性的分离的拮抗抗体。

[0246] 在一些实施方案中,抗体缀合物具有式(I)的结构:



[0248] 其中抗体的每条重链由字母H表示,抗CFD抗体的每条轻链由字母L表示;聚合物通过C443(EU编号)的巯基与抗体结合,该结合描绘在重链之一上;



a) OR, 其中R=H、甲基、乙基、丙基、异丙基, b) H, 或 c) 任何卤化物, 包括Br; 并且 i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数; 或 ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同, 使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。在一些实施方案中, n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为约1500至约3500加或减约10%至约20%。

[0250] 一些实施方案提供了任何下列物质或包含抗CFD抗体的组合物(包括药物组合物), 所述抗CFD抗体具有如可见于表1A、1B、1C、1D和/或1E中的部分轻链序列和部分重链序

列,或其变体。在表1A中,带下划线的序列是本文提供的CDR序列的一些实施方案。在一些实施方案中,本文公开的组合物包含抗体,所述抗体具有来自表1A、1B、1C、1D和/或1E中提供的任一选项的部分或完整轻链序列和部分或完整重链序列,或其变体。在一些实施方案中,抗体(或其结合片段)可以包括表1A、1B、1C、1D和/或1E中提供的任何一种或多种CDR。在一些实施方案中,抗体(或其结合片段)可以包括表1A、1B、1C、1D和/或1E中提供的任何三种或更多种CDR。在一些实施方案中,抗体(或其结合片段)可以包括表1A、1B、1C、1D和/或1E中提供的任何所有六种CDR。各种构建体的CDR序列也可见于表1A、1B、1C、1D和/或1E。

[0251] 表1A:抗CFD拮抗单克隆抗体的可变区序列(CDR带有下划线)。

[0252]

| mAb    | 重链                                                                                                                                                     | 轻链                                                                                                                                           |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KCD002 | EVKLVESEGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSDYY<br>MAWVRQVPEKGLEWVGNINYDGSSTYYLDSLK<br>SRFIISRDSAKNILYLQMSSLSKSEDATATYFCARGE<br>DFYLYAMDYWGQGTSTVTSS (SEQ ID NO: 276) | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIHSY<br>LAWYQQKQKGKSPQLIVYNTKTLAEGVPSRF<br>SGSGSGTQFSLKINSLPEDFGSYCYCQHYYGI<br>PPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 309)    |
| KCD003 | EVQLQQSRPELVKPGASVKIFCKASGYTFTDYY<br>MNWMRQRHGETLEWIGDINPNNGDPSYNQKFK<br>DKATLTVDKSSSTASMELRSLTSDDSAVYYCAR<br>EGPSFAYWGQGTSLTVSA (SEQ ID NO: 277)      | DVLMQTPLSLPVSLGEQASISCRSSQTIVHS<br>NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG<br>VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC<br>EQGSHVPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 310) |
| KCD005 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDHY<br>MNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSCNQKFK<br>GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSGDSAVYYCTR<br>EGASFAFWGQGTSLTVSA (SEQ ID NO: 278)      | DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHS<br>NGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG<br>VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC<br>EQGSHVPVTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 311) |
| KCD009 | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFRNYGM<br>NWVKQGPGLKWMGWINTYTGPTYADDFK<br>GRFAFSLETSASTAYLQISNLKNEDTATYFCVRD                                               | DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSLIIEHSD<br>GNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVP<br>DRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGVYYCFQ                                       |

[0253]

| mAb    | 重链                                                                                                                                                                                   | 轻链                                                                                                                                                                 |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | <u>GPGFAY</u> WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 279)                                                                                                                                           | <u>GSHVPVTF</u> GAGTNLELK (SEQ ID NO: 312)                                                                                                                         |
| KCD010 | EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTD <u>YD</u><br>MDWVKQSHGKSLEWIGHINPNNGGTIYNQKFK<br>GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED <sup>TA</sup> VYYCGT<br><u>GDFAY</u> WGHGTLTVTVSA (SEQ ID NO: 280)        | QIVLTQSPAIVMSVSPGEKVTLTCSASSSVSSS<br><u>YLYWYQ</u> KKPGSSPKLWIY <u>ST</u> NLASGVPAR<br>FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYFCHQWS<br><u>SYPPTF</u> GAGTKLELK (SEQ ID NO: 313) |
| KCD023 | EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTD <u>YNI</u><br>DWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGINYNQKFKG<br>KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED <sup>TA</sup> VYYCGT <u>G</u><br><u>DYAY</u> WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 281) | QIVLTQSPAFMSASPGKVTLTCSASSSVSSS<br><u>YLYWYQ</u> KKPGSSPKLWIY <u>ST</u> NLASGVPGR<br>FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYFCHQWT<br><u>SYPPTF</u> GAGTKLELK (SEQ ID NO: 314)   |
| KCD036 | EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYT<br>MTWVKQSHGKNLEWIGLINPNNGGTNYNPKFK<br>GKATFTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR<br><u>RHYGSSWDY</u> WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 282)                           | DIKLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINTY<br>LSWFQKPKGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFS<br>GSGSGQDYSLTISSEYEEMGIYYC <u>LQYDEFP</u><br><u>YTFGGG</u> TKLEIK (SEQ ID NO: 315)            |
| KCD040 | EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASDFNIKDTY<br>MHWVMQRPEQGLEWIGKIDPANGNTEFDPKFQ<br>GKATITADTSSNTAYLQLTSLTSED <sup>TA</sup> VYYCTR<br><u>AMDY</u> WGQGTSTTVSS (SEQ ID NO: 283)                  | QIVLTQSPAIVMSASPGKVTMTCSAGSSVSY<br>MYWYQKPKGSSPRVLIYD <u>TS</u> NLASGVPVRF<br>SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWS<br><u>NYPYTF</u> GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 316)           |
| KCD042 | EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTASGFNIKHTYI<br>HWVSQRPEQGLEWIGKIDPANGNTKYDPKFQ<br>KATITADTSSNTAYLQLSSLTSED <sup>TA</sup> VYYCVNA<br><u>MEY</u> WGQGTSTTVSS (SEQ ID NO: 284)                   | QSVLTQSPAIVMSASPGKVTMTCSANSSVSD<br><u>MYWFQR</u> PGSSPRLLIYD <u>TS</u> NLASGVPVRF<br>GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWST<br><u>YPWTF</u> GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 317)     |
| KCD044 | EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTASGFNIKHTY<br>MHWVSQRPERGLEWIGKIDPANGNTKYDPKFQ<br>GKATITADTSSNTVYLQLSSLTSED <sup>TA</sup> VYYCLN<br><u>AMEY</u> WGQGTSTTVSS (SEQ ID NO: 285)                  | QSVLTQSPAIVMSASPGKVTMTCSANSSVSD<br><u>MYWYQR</u> PGSSPRLLIYD <u>TS</u> NLASGVPVRF<br>GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWST<br><u>YPWTF</u> GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 318)     |
| KCD047 | EVQLQQSGAEFVKPGASVRLSCTASGFNIKDTY<br>MHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGYTKDDPKFKQ                                                                                                               | QIVLTQSPAVMSASPGKVTMTCSASSSVTY<br>MYWYQKPKGSSPRLLIYD <u>TS</u> NLASGVPVRF                                                                                          |

[0254]

| mAb    | 重链                                                                                                                                                                | 轻链                                                                                                                                                     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSED <del>TAVYYCASA</del><br><u>MDYWGQGTSVTVSS</u> (SEQ ID NO: 286)                                                                          | GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYC <u>QQWST</u><br><u>YPFPFGSGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 319)                                                                       |
| KCD048 | EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNIKATY<br>MHWVRQRPEKGLEWIGRIDPANGHTIYDPQFQG<br>KATITSDTSSNTAYLQLNSLTSED <del>TAVYYCAEA</del><br><u>MDYWGQGTSVTVSS</u> (SEQ ID NO: 287) | QIVLTQSPAISASPGEKVTLTCSATSSVSYM<br>YWYQQKPGSSPRLIYDTNLSAGVPVRFSG<br>SGSGTSYSLTISRMEAEDDATYYC <u>QQWSNY</u><br><u>PFTFGGGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 320)    |
| KCD070 | EIQLQQTGPPELVKPGASVKISCKASGYSTFYIL<br>WVKQSHGKSLEWIGNINPYDYTSYNLKFQK<br>ATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARSD<br><u>GYYGDDYWGQGTSVTVSS</u> (SEQ ID NO: 2788)          | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGT<br>AVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDR<br>FTGSGSGTDFTLTINNVSQEDLADYFC <u>QQYS</u><br><u>SYPWTFGGGTLEIK</u> (SEQ ID NO: 321) |
| KCD101 | QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSY<br>WMHWVKQRPQGQGLEWIGVIDPSDSYTNYNQKF<br>KGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCG<br><u>RNGYDGSMYWGQGTSVTVSS</u> (SEQ ID NO:<br>289)     | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNY<br>LNWYQQKPDGTVKLLIYPSRLHSGVPSRFS<br>GSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFC <u>QQGNTL</u><br><u>PYTFGGGTLEIK</u> (SEQ ID NO: 322)  |
| KCD102 | QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSY<br>WMHWVKQRPQGQGLEWIGVIDPSDSYTNYNQKF<br>KGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA<br><u>RNGYDGSMYWGQGTSVTVSS</u> (SEQ ID NO:<br>290)     | EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNY<br>LNWYQQKPDGTVKLLIYPSRLHSGVPSRFS<br>GSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFC <u>QQGNTL</u><br><u>PYTFGGGTLEIK</u> (SEQ ID NO: 323)  |
| KCD103 | QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSY<br>WMHWVKQRPQGQGLEWIGVIDPSDSYTKYNQKF<br>KDKATLTVETSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA<br><u>GNGYDGSMYWGQGTSVTVSS</u> (SEQ ID NO:<br>291)     | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNS<br>LNWYQQKPDGTVKLLIYYSRLHSRVPSRFS<br>GSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFC <u>QQANTLP</u><br><u>YTFGGGTLEIK</u> (SEQ ID NO: 324)  |
| KCD104 | QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSY<br>WMHWVKQRPQGQGLEWIGVIDPSDSYTYYNQKF                                                                                             | EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNY<br>LNWYQQKPDGTVKLLIYPSRLHSGVPSRFS                                                                                     |

[0255]

| mAb    | 重链                                                                                                                                                 | 轻链                                                                                                                                             |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | KGKATLTVDTSSTAYMQLSLTSEDSAVYYCA<br>RNGYDGAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 292)                                                                         | GSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTL<br>PYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 325)                                                                              |
| KCD118 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAFGYTFTDYY<br>KNWMRQRHGESLEWIGDINPNSGDANYNQKFK<br>GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR<br>EGPSFAYWGHGTLVTVSA (SEQ ID NO: 293)  | DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQTIVHS<br>NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG<br>VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCF<br>QGSHVPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 326) |
| KCD119 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYY<br>TNWMRQRHGESLEWIGDINPNTGDTSYNQKFR<br>VKATLTVDKSSGTAYMGLRSLTSEDSAVYYCT<br>REGPSFAYWGQGTTLVTVSA (SEQ ID NO: 294) | DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQTIVHS<br>NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG<br>VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC<br>EQGSHVPPTFGGGTTLEIK (SEQ ID NO: 327) |
| KCD121 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYY<br>KNWMRQRHGESLEWIGDINPNNGDTSYNQKFR<br>GKATLTVDKSSSTAFMELRSLTSEDSAVYYCAR<br>EGPSFAYWGQGTTLVTVSA (SEQ ID NO: 295) | DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSNQTIVHS<br>NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG<br>VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYC<br>EQGSHVPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 328) |
| KCD122 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYY<br>KNWMRQRHGESLEWIGDINPNNGDANYNQKFK<br>GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAR<br>EGPSFAYWGHGTLVTVSA (SEQ ID NO: 296)  | DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQTIVHS<br>NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG<br>VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC<br>EQGSHVPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 329) |
| KCD123 | EVHLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDFY<br>KNWMRQRHGESLEWIGDINPNNGGTNYNQKFK<br>GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR<br>EGPSFAYWGQGTTLVTVSA (SEQ ID NO: 297) | DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQTIVHS<br>NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG<br>VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC<br>EQGSHVPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 330) |
| KCD124 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDHY<br>MNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYNQKFK<br>GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSGDSAVYYCTR<br>EGASFAYWGQGTTLVTVSA (SEQ ID NO: 298) | DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHS<br>NGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG<br>VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC<br>EQGSHVPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 331) |

[0256]

| mAb    | 重链                                                                                                                                                         | 轻链                                                                                                                                          |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KCD131 | QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASAYTFTDYY<br>INWVKQRPQGPEWIGWIFPGSNSTYSNEKFEV<br>KATLTVDESSSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARL<br>GYFGSSYHALDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:<br>299) | DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSH<br>LAWFQQKQGKSPRLLYSATNLPDGVPSRF<br>SGSGSGTQYSLKINILQSEDFGSYYCQHFHWG<br>TPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 332)     |
| KCD136 | EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCSASGFNIKNTY<br>MHWVNQRPEQGLEWIGRIDPANGITKYAPNFQ<br>GKATITADTSSNTAYLQLSNLTSEDTAIYYCTRA<br>MDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 300)            | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSY<br>MYWYQQKPGSSPRLLIYDISNLASGVVPRFS<br>GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWDT<br>YPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 333)      |
| KCD200 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTSY<br>KNWMRQRHGESLEWIGDINPNSGDTAYNQKFK<br>GKATLTVDRSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR<br>EGPSFAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO: 301)           | DVLMTQTPLSLPVSLGDQVSISCRSSQTIVHS<br>NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG<br>VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC<br>FQGSHPPTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 334) |
| KCD208 | EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTVSGFNINNTY<br>MHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGDTTYAPKFQ<br>GKATITADTSSNSAYLHLSRLTSEDTAIYYCSLY<br>DYDGYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 302)           | EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSS<br>LHWYRQKSGTSPKPWIYGTSHLASGVVPRFS<br>GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWDT<br>YPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 335)    |
| KCD214 | EVQLQQSVAEFVRPGASVKLSCTASGFNIKNTY<br>MHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTEYAPKFQ<br>GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIYYCALY<br>DYDGYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 303)           | EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCRVSSSISSSS<br>LHWYQQKSGTSPKPWIYGTSNLASGVVPRF<br>SGSRSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSD<br>YPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 336)    |
| KCD220 | QVQLQQSGAELMEPGASVKLSCKATGYTFTGY<br>WIEWVKQRPBGHLEWIGETLPGSDSNNYNEKF<br>KGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTTEDSAIYYCA<br>RDYSNYWYFDVWGTGTTTVTVSS (SEQ ID NO:<br>304)   | DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNY<br>LNWYQQKPDGTVKLLIYYTSLHSGVPSRFS<br>GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQDSKH<br>RTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 337)        |
| KCD224 | QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGV                                                                                                                          | DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQVISNY                                                                                                             |

[0257]

| mAb                      | 重链                                                                                                                                                  | 轻链                                                                                                                                            |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          | DWIRQSPGKGLEWLGVIWGVGSTNYNSALKSR<br>LSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARSY<br>DGSYWYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 305)                                      | LNWYQQKPDGTVKLLIYYTSLHSGVPSRFS<br>GSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLP<br>YTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 338)                                           |
| 119_TA<br>F              | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYY<br>MNWVRQAPGKGLEWIGDINPNTGDTSYNADFK<br>RRFTSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTR<br>EGPSFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 306)    | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQTIVHSN<br>GDTYLEWYQQKPGKAPNLLIYKVSNRFSGV<br>PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQ<br>GSHVPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 339)  |
| 119_TA<br>F 来源<br>(Germ) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYY<br>MSWVRQAPGKGLEWIGDINPNTGDTSYNADSV<br>KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCT<br>REGPSFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 307) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQTIVHS<br>NGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIYKVSNRFSG<br>VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCF<br>QGSHVPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 340)  |
| 119_人<br>来源              | EVKKPGASVKVSCASGYTFTDYMHWVRQA<br>PGQGLEWIGDINPNTGDTSYNQKFQGRVTSTRD<br>TSISTAYMELSRLRSDDTVVYYCTREGPSFAYW<br>GQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 308)              | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQTIVHS<br>NGDTYLEWFQQRPGQSPNLLIYKVSNRFSGV<br>PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF<br>QGSHVPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 341) |

[0258]

表1B: 基于广泛CDR定义的抗CFD拮抗单克隆抗体的CDR

[0259]

|                | H1                                 | H2                                       | H3                                 | L1                                       | L2                             | L3                               |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| KC<br>D0<br>02 | GFTFSDYYMA<br>(SEQ ID NO:<br>342)  | INYDGSSTYYLDS<br>(SEQ ID NO:<br>372)     | ARGEDFYLYAM<br>(SEQ ID NO:<br>402) | RASENIHSYLA<br>(SEQ ID NO: 432)          | NTKTAE(SE<br>Q ID NO: 462)     | QHHYGIPPT<br>(SEQ ID NO:<br>492) |
| KC<br>D0<br>03 | GYTFTDYYM<br>N (SEQ ID NO:<br>343) | INPNNGDPSYNQK<br>FKD (SEQ ID NO:<br>373) | AREGPSFAY<br>(SEQ ID NO: 403)      | RSSQTIVHSNGDT<br>YLE (SEQ ID NO:<br>433) | KVSNRFS<br>(SEQ ID NO:<br>463) | FQGSHVPPT<br>(SEQ ID NO:<br>493) |
| KC<br>D0<br>05 | GYTFTDHYM<br>N (SEQ ID NO:<br>344) | INPNNGGTSCNQK<br>FKG (SEQ ID NO:<br>374) | TREGASFAF<br>(SEQ ID NO: 404)      | RSSQSIVHSNGDT<br>YLE (SEQ ID NO:<br>434) | KVSNRFS<br>(SEQ ID NO:<br>464) | FQGSHVPVT<br>(SEQ ID NO:<br>494) |

[0260]

|           | H1            | H2               | H3               | L1               | L2          | L3          |
|-----------|---------------|------------------|------------------|------------------|-------------|-------------|
| <b>KC</b> | GYIFRNYGMN    | INTYTGEPTYADD    | VRDGPGEFAY       | RSSLIEHSDGNT     | KVSNRFS     | FQGSHPVPT   |
| <b>D0</b> | (SEQ ID NO:   | FKG (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 405) | YLE (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>09</b> | 345)          | 375)             |                  | 435)             | 465)        | 495)        |
| <b>KC</b> | GYTFTDYDM     | INPNNGGTIYNQK    | GTGDFAY (SEQ     | SASSSVSSSYLY     | STSNLAS     | HQWSSYPPT   |
| <b>D0</b> | D (SEQ ID NO: | FKG (SEQ ID NO:  | ID NO: 406)      | (SEQ ID NO: 436) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>10</b> | 346)          | 376)             |                  |                  | 466)        | 496)        |
| <b>KC</b> | GYTFTDYNID    | INPNNGGINYNQK    | GTGDYAY (SEQ     | SASSSVSSSYLY     | STSNLAS     | HQWTSYPPT   |
| <b>D0</b> | (SEQ ID NO:   | FKG (SEQ ID NO:  | ID NO: 407)      | (SEQ ID NO: 437) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>23</b> | 347)          | 377)             |                  |                  | 467)        | 497)        |
| <b>KC</b> | GYSFTGYTMT    | INPYNGGTNYNQ     | ARRHYGSSWDY      | KASQDINTYLS      | RANRLVD     | LQYDEFPYT   |
| <b>D0</b> | (SEQ ID NO:   | KFKG (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: 408) | (SEQ ID NO: 438) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>36</b> | 348)          | 378)             |                  |                  | 468)        | 498)        |
| <b>KC</b> | DFNIKDTYMH    | IDPANGNTEFPK     | TRAMDY (SEQ ID   | SAGSSVSYMY       | DTSNLAS     | QQWSNYPYT   |
| <b>D0</b> | (SEQ ID NO:   | FQG (SEQ ID NO:  | NO: 409)         | (SEQ ID NO: 439) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>40</b> | 349)          | 379)             |                  |                  | 469)        | 499)        |
| <b>KC</b> | GFNIKHTYIH    | IDPANGNTKYDPK    | VNAMEY (SEQ      | SANSSVSDDMY      | DTSNLAS     | QQWSTYPWT   |
| <b>D0</b> | (SEQ ID NO:   | FQG (SEQ ID NO:  | ID NO: 410)      | (SEQ ID NO: 440) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>42</b> | 350)          | 380)             |                  |                  | 470)        | 500)        |
| <b>KC</b> | GFNIKHTYMH    | IDPANGNTKYDPK    | LNAMEY (SEQ ID   | SANSSVSDDMY      | DTSNLAS     | QQWSTYPWT   |
| <b>D0</b> | (SEQ ID NO:   | FQG (SEQ ID NO:  | NO: 411)         | (SEQ ID NO: 441) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>44</b> | 351)          | 381)             |                  |                  | 471)        | 501)        |
| <b>KC</b> | GFNIKDTYMH    | IDPANGYTKDDPK    | ASAMDY (SEQ ID   | SASSSVTYMY       | DTSNLAS     | QQWSNYPFT   |
| <b>D0</b> | (SEQ ID NO:   | FQG (SEQ ID NO:  | NO: 412)         | (SEQ ID NO: 442) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>47</b> | 352)          | 382)             |                  |                  | 472)        | 502)        |
| <b>KC</b> | GFNIKATYMH    | IDPANGHTIYDPQ    | AEAMDY (SEQ      | SATSSVSYMY       | DTSNLAS     | QQWSNYPFT   |
| <b>D0</b> | (SEQ ID NO:   | FQG (SEQ ID NO:  | ID NO: 413)      | (SEQ ID NO: 443) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>48</b> | 353)          | 383)             |                  |                  | 473)        | 503)        |

[0261]

|           | H1            | H2               | H3               | L1               | L2          | L3          |
|-----------|---------------|------------------|------------------|------------------|-------------|-------------|
| <b>KC</b> | GYSFTDYIIL    | INPYDYTSYNLK     | ARSDGYGGDY       | KASQDVGTAVA      | WASTRHT     | QQYSSYPWT   |
| <b>D0</b> | (SEQ ID NO:   | FKG (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 414) | (SEQ ID NO: 444) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>70</b> | 354)          | 384)             |                  |                  | 474)        | 504)        |
| <b>KC</b> | GYTFTSYWM     | IDPSDSYTNYNQK    | GRNGYDGSM DY     | RASQDISNYLN      | YPSRLHS     | QQGNTLPYT   |
| <b>D1</b> | H (SEQ ID NO: | FKG (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 415) | (SEQ ID NO: 445) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>01</b> | 355)          | 385)             |                  |                  | 475)        | 505)        |
| <b>KC</b> | GYTFTSYWM     | IDPSDSYTNYNQK    | ARNGYDGSM DY     | RASQDISNYLN      | YPSRLHS     | QQGNTLPYT   |
| <b>D1</b> | H (SEQ ID NO: | FKG (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 416) | (SEQ ID NO: 446) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>02</b> | 356)          | 386)             |                  |                  | 476)        | 506)        |
| <b>KC</b> | GYTFTSYWM     | IDPSDSYTKYNQK    | AGNGYDGSM DY     | RASQDISNSLN      | YTSRLHS     | QQANTLPYT   |
| <b>D1</b> | H (SEQ ID NO: | FKD (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 417) | (SEQ ID NO: 447) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>03</b> | 357)          | 387)             |                  |                  | 477)        | 507)        |
| <b>KC</b> | GYTFTSYWM     | IDPSDSYTYYNQK    | ARNGYDGAM DY     | RASQDISNYLN      | YPSRLHS     | QQGNTLPYT   |
| <b>D1</b> | H (SEQ ID NO: | FKG (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 418) | (SEQ ID NO: 448) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>04</b> | 358)          | 388)             |                  |                  | 478)        | 508)        |
| <b>KC</b> | GYTFTDYYK     | INPNSGDANYNQ     | AREGPSFAY        | RSSQTIVHSNGDT    | KVSNRFS     | FQGSHVPPT   |
| <b>D1</b> | N (SEQ ID NO: | KFKG (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: 419) | YLE (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>18</b> | 359)          | 389)             |                  | 449)             | 479)        | 509)        |
| <b>KC</b> | GYTFTDYYTN    | INPNTGDTSYNQK    | TREGPSFAY        | RSSQTIVHSNGDT    | KVSNRFS     | FQGSHVPPT   |
| <b>D1</b> | (SEQ ID NO:   | FRV (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 420) | YLE (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>19</b> | 360)          | 390)             |                  | 450)             | 480)        | 510)        |
| <b>KC</b> | GYTFTDYYK     | INPNNGDTSYNQK    | AREGPSFAY        | RSNQTIVHSNGD     | KVSNRFS     | FQGSHVPPT   |
| <b>D1</b> | N (SEQ ID NO: | FRG (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 421) | TYLE (SEQ ID     | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>21</b> | 361)          | 391)             |                  | NO: 451)         | 481)        | 511)        |
| <b>KC</b> | GYTFTDYYK     | INPNNGDANYNQ     | AREGPSFAY        | RSSQTIVHSNGDT    | KVSNRFS     | FQGSHVPPT   |
| <b>D1</b> | N (SEQ ID NO: | KFKG (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: 422) | YLE (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>22</b> | 362)          | 392)             |                  | 452)             | 482)        | 512)        |

[0262]

|           | H1            | H2               | H3               | L1               | L2          | L3          |
|-----------|---------------|------------------|------------------|------------------|-------------|-------------|
| <b>KC</b> | GYTFTDFYKN    | INPNNGGTNYNQ     | AREGPSFAY        | RSSQTIVHSNGDT    | KVSNRFS     | FQGSHVPPT   |
| <b>D1</b> | (SEQ ID NO:   | KFKG (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: 423) | YLE (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>23</b> | 363)          | 393)             |                  | 453)             | 483)        | 513)        |
| <b>KC</b> | GYTFTDHYM     | INPNNGGTSYNQK    | TREGASFAF        | RSSQSIVHSNGDT    | KVSNRFS     | FQGSHVPLT   |
| <b>D1</b> | N (SEQ ID NO: | FKG (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 424) | YLE (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>24</b> | 364)          | 394)             |                  | 454)             | 484)        | 514)        |
| <b>KC</b> | AYTFTDYYIN    | IFPGSNSTYSNEKF   | ARLG YFGSSYHA    | RASENIYSHLA      | SATNLPD     | QHFWDTPWT   |
| <b>D1</b> | (SEQ ID NO:   | EV (SEQ ID NO:   | LDY (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 455) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>31</b> | 365)          | 395)             | 425)             |                  | 485)        | 515)        |
| <b>KC</b> | GFNIKNTYMH    | RIDPANGITKYAP    | TRAMDY (SEQ ID   | SASSSVSYMY       | DISNLAS     | QQWDTPWT    |
| <b>D1</b> | (SEQ ID NO:   | NFQG (SEQ ID NO: | NO: 426)         | (SEQ ID NO: 456) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>36</b> | 366)          | 396)             |                  |                  | 486)        | 516)        |
| <b>KC</b> | GYTFTSYKYN    | INPNSGDTAYNQK    | AREGPSFAY        | RSSQTIVHSNGDT    | KVSNRFS     | FQGSHVPPT   |
| <b>D2</b> | (SEQ ID NO:   | FKG (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: 427) | YLE (SEQ ID NO:  | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>00</b> | 367)          | 397)             |                  | 457)             | 487)        | 517)        |
| <b>KC</b> | GFNIKNTYMH    | RIDPANGDTTYAP    | SLYDYDGY (SEQ    | SVSSSISSSLH      | GTSHLAS     | QQWDTPWT    |
| <b>D2</b> | (SEQ ID NO:   | KFQG (SEQ ID NO: | ID NO: 428)      | (SEQ ID NO: 458) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>08</b> | 368)          | 398)             |                  |                  | 488)        | 518)        |
| <b>KC</b> | GFNIKNTYMH    | RIDPANGDTTYAP    | ALYDYDGY (SEQ    | RVSSSISSSLH      | GTSNLAS     | QQWSDYPWT   |
| <b>D2</b> | (SEQ ID NO:   | KFQG (SEQ ID NO: | ID NO: 429)      | (SEQ ID NO: 459) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>14</b> | 369)          | 399)             |                  |                  | 489)        | 519)        |
| <b>KC</b> | GYTFTGYWIE    | ETLPGSDSNYNE     | ARDYSNYWYFD      | RASQDISNYLN      | YTSNLHS     | QQDSKHRT    |
| <b>D2</b> | (SEQ ID NO:   | KFKG (SEQ ID NO: | V (SEQ ID NO:    | (SEQ ID NO: 460) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>20</b> | 370)          | 400)             | 430)             |                  | 490)        | 520)        |
| <b>KC</b> | GFSLTSYGVD    | VIWGVGSTNYNS     | ARSYDGSYWF       | RASQVISNYLN      | YTSRLHS     | QQYSKLPYT   |
| <b>D2</b> | (SEQ ID NO:   | ALKS (SEQ ID NO: | DV (SEQ ID NO:   | (SEQ ID NO: 461) | (SEQ ID NO: | (SEQ ID NO: |
| <b>24</b> | 371)          | 401)             | 431)             |                  | 491)        | 521)        |

[0263] 表1C:带有下划线的CDR的88种小鼠抗CFD抗体的重链和轻链可变序列。

[0264]

| ID      | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                 | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                      |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FKCD001 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASDN<br>SFTGYMHWVKQSHGNLDWIGYIDP<br>YNGVSSYNQKFKGKATLTVDKSSSTA<br>YMEIRSLTSEDSAVYYCASYYGSSPYW<br>YFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:<br>522) | KCD001 | QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV<br>SYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASG<br>VPARFSGSGSGTSHFLTISRLEAEDAAT<br>YFCQQWSSNPYTFGGGKLEIK (SEQ ID<br>NO: 610)        |
| KCD002  | EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTASGF<br>TFSDYYMAWVRQVPEKGLEWVGNINY<br>DGSSTYYLDSLKSRIISRDSAKNILYLQ<br>MSSLKSEDTATYFCARGEDFYLYAMD<br>YWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 523)   | KCD002 | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENI<br>HSYLAWEYQQKQKSPQLIVYNTKTLAE<br>GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLPEDFGS<br>YYCQHHYGIPPTFGGGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 611)        |
| KCD003  | EVQLQQSRPELVKPGASVKIFCKASGY<br>TFTDYMNWVRQHRHGETLEWIGDINP<br>NNGDPSYNQKFKDKATLTVDKSSSTAS<br>MELRSLTSDSAVYYCAREGPSFAYW<br>GQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 524)        | KCD003 | DVLMTQTPLSLPVSLGEQASISCRSSQTI<br>VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV<br>SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA<br>EDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGKLEIK<br>(SEQ ID NO: 612) |
| KCD004  | EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSG<br>KTFTSHGINWVKQRPQGGLWIGYIYI<br>GNGYNEYNEKFKGKATLTSDTSSSTAY<br>MQLSSLTFEDSAIYFCVRKAYGNYGFD<br>DWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 525)    | KCD004 | DIQMTQSPTSLASLGESVSLTCRASQEI<br>SGYLNWLQKPKDGSIKRLIYAASLTDSG<br>VPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADY<br>YCLQYANYPTFGSGTKLEVK (SEQ ID<br>NO: 613)         |
| KCD005  | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>TFTDHYMNWVKQSHGKSLEWIGDINP<br>NNGGTSCNQKFKGKATLTVDKSSSTA<br>YMELRSLTSGDSAVYYCTREGASFAF                                       | KCD005 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI<br>VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV<br>SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA<br>EDLGVYYCFQGSHVPVTFGAGTKLELK                    |

[0265]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                                | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                            |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 526)                                                                                                                                                                               |        | (SEQ ID NO: 614)                                                                                                                                                                       |
| KCD006 | EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS <u>GF</u><br><u>KIKDTY</u> MHWVKERPEQGLEWIGRIDPA<br><u>NGNTKY</u> DPKFQGKATITADTSSNTAYL<br>QLSSLTSED <sup>T</sup> AVYYC <u>ANAMDY</u> WGQGT<br>SVTVSS (SEQ ID NO: 527)           | KCD006 | QIILTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAR <u>SSV</u><br><u>SNMYWY</u> QKPGSSPRLIYD <u>TS</u> NLASG<br>VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAAT<br>YYC <u>QQWSSYPWT</u> FGGGTKLEIK (SEQ<br>ID NO: 615)             |
| KCD007 | EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS <u>GF</u><br><u>KIKDTY</u> MHWVKERPEQGLEWIGRIDPA<br><u>NGNTKY</u> DPKFQGKATITADTSSNTAYL<br>QLSSLTSED <sup>T</sup> AVYYC <u>ANAMDY</u> WGQGT<br>SVTVSS (SEQ ID NO: 528)           | KCD007 | QIILTQSPAIMSASPGERVTMTCSA <u>SSSV</u><br><u>SNMYWY</u> QKPGSSPRLIYD <u>TS</u> NLASG<br>VPLRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAAT<br>YYC <u>QQWSSYPWT</u> FGGGTKLEIK (SEQ<br>ID NO: 616)             |
| KCD008 | EVQLQQSGPELVKAGASVKMSCTAS <u>G</u><br><u>FNIKDTY</u> MHWVKQRPEQGLAWIGRIDP<br><u>ANGNIKY</u> DPKFQGKATITADTSSNTAY<br>LQLSSLTSD <sup>T</sup> AVYYC <u>TSAMDY</u> WGQG<br>TSVTVSS (SEQ ID NO: 529)            | KCD008 | QIVLTQSPEIMSASPGEKVTMTCSAR <u>SS</u><br><u>VSYMYWY</u> QKPGSSPRLIYD <u>TS</u> NLAS<br>GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMETEDAA<br>TYYC <u>QQWSTYPFT</u> FGSGTKLEIK (SEQ<br>ID NO: 617)             |
| KCD009 | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS <u>G</u> <u>YI</u><br><u>FRNYGMN</u> WVKQPGKGLKWMGWIN<br><u>TYTGEPTYADDFKGR</u> FAFSLETSASTA<br>YLQISNLKNEDTATYFCVRDGP <u>G</u> FAYW<br>GQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 530)              | KCD009 | DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCR <u>SSLI</u><br><u>EHSDGNTYLE</u> WYLQKPGQSPKLLIY <u>KV</u><br><u>SNRFSGVPDR</u> FGSGSGTDFTLKISRVEA<br>DDLGVYYC <u>FQGS</u> HVPVTFGAGTNLELK<br>(SEQ ID NO: 618) |
| KCD010 | EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKAS <u>G</u> <u>Y</u><br><u>TFTDYDMD</u> WVKQSHGKSLEWIGHINP<br><u>NNGGTIYNQKFKG</u> KATLTVDKSSSTAY<br>MELRSLTSED <sup>T</sup> AVYYC <u>GTGDFAY</u> WGH<br>GTLTVTVSA (SEQ ID NO: 531) | KCD010 | QIVLTQSPAIMSVSPGEKVTLTCSA <u>SSSV</u><br><u>SSSYLYWY</u> QKPGSSPKLWIY <u>ST</u> NLAS<br>GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAA<br>SYFCH <u>QWSSYPPT</u> FGAGTKLELK (SEQ<br>ID NO: 619)           |
| KCD011 | EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS <u>G</u> <u>F</u>                                                                                                                                                                | KCD011 | DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDI                                                                                                                                                           |

[0266]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                   | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                      |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | <u>TFSSNTMSWVRQTPEKRLEWVAYITNG</u><br><u>GGSTYYPD</u> TVKGRFTISRDNARNTLYL<br>QMSSLKSEDTAMYYC <u>ARHDYYTMDY</u><br>WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 532)                                                |        | <u>NKYIAWYQH</u> KPGKGPRLLIHYTSLQP<br>GIPSRFSGSGSGRDISFSISNLEPEDIATY<br><u>YCLQYDNLLY</u> TFGGGKLEIK (SEQ ID<br>NO: 620)                                         |
| KCD013 | EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS <u>GF</u><br><u>KIKDTY</u> MHWVKERPDQGLEWIGRIDP<br><u>ANGNTKYDPKFQ</u> GKATITADTSSNTAY<br>LQLSSLTSEDTAVYYC <u>ANAMDY</u> WGQG<br>TSVTVSS (SEQ ID NO: 533)           | KCD013 | QIILTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSV<br><u>SNMYWYQQKPGSSPRLIYD</u> TSNLASG<br>VPVRFSGSGSGASYSLTISRMEAEDAAT<br>YYC <u>QQWSSYPWT</u> FGGGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 621)        |
| KCD014 | EVKLVESGGGLVQPGSLKLSCAAS <u>GF</u><br><u>TFSSYIMSWVRQTPEKRLEWVAYITNG</u><br><u>GGNTYYPD</u> TIKGRFTISRDNAKNTLYL<br>QMSSLKSEDTAMYYC <u>ARHGTGYAMD</u><br><u>YWGQGT</u> SVTVSS (SEQ ID NO: 534) | KCD014 | EIVLTQSPPTMAASPGEKITITCSASSIS<br><u>SNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTS</u> NLASG<br>VPARFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVAT<br>YYC <u>QQGSSIP</u> TFGAGTKLELK (SEQ<br>ID NO: 622)      |
| KCD015 | EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS <u>GF</u><br><u>NIKDTY</u> MHWVKRPEQGLEWIGRIDP<br><u>ANGYTEYDPKFQ</u> GKATITADTSSNTAY<br>LQLSSLTSEDSAAYYC <u>TSAMEFWGQGT</u><br>SVTVSS (SEQ ID NO: 535)             | KCD015 | QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCSASSSV<br><u>SYTYWYQQKPRSSPRLIYD</u> TSNLASGV<br>PVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATY<br>YC <u>QQWSSYP</u> TFGGGKLEVK (SEQ<br>ID NO: 623)         |
| KCD016 | QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASG<br><u>YTFTNFWMHWVKRPGQGLEWIGFFN</u><br><u>PSTAYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTA</u><br>YLHLSSLTSEDSAVYYC <u>ARRDYGSSYG</u><br><u>WYFDVWGAGTT</u> TVTVSS (SEQ ID NO:<br>536)  | KCD016 | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS <u>GNI</u><br><u>HNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLA</u><br>DGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSIQPEDF<br>GYYYC <u>QHFWSTPT</u> FGGGKLEIK<br>(SEQ ID NO: 624) |
| KCD017 | DVQLQESGPDLVKPSQSLTCTVTDY<br><u>SITSGYSWHWIRQFPGNKLEWLG</u> YIHS                                                                                                                              | KCD017 | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVYITCKASQ<br><u>DVGTAVAWYQQ</u> TSGQSPKLLIYWASTR                                                                                               |

[0267]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                        | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                      |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | <u>SGNTNYNPSLKS</u> RFSTRDTSKNQFFLQ<br>LNSVTSEDTATYYC <u>ALHYYGSS</u> FGWY<br><u>FDVWGAGTTVT</u> VSS (SEQ ID NO:<br>537)                                                                           |        | HTGVPDRFTGSGSGTDFLTLSNVQSED<br>LADYFCQYTSYPLTFGAGTKLELK<br>(SEQ ID NO: 625)                                                                                      |
| KCD018 | <u>QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASG</u><br><u>YTF</u> TSYTVHWVKRPGQGLEWIGYINP<br><u>SSGFTDYNQKFKDK</u> TTLTADISSSTAYI<br>QLSSLTSEDSAVYYC <u>ARRGVNWSWFA</u><br><u>YWGQGT</u> LVTVSA (SEQ ID NO: 538)     | KCD018 | NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQ<br><u>SVLYSSNQKNY</u> LAWYQQKPGQSPQLLI<br><u>YWAS</u> TRESGVPERFTGSGSGTDFLTISS<br>VQAEDLAVYYCHQYLSSWTFGGGTKL<br>EIK (SEQ ID NO: 626) |
| KCD019 | <u>QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASG</u><br><u>YTFATYTIH</u> WVKRPGQGLEWIGYLN<br><u>RNDYTHYNQKFRDKAALTADKSSSTA</u><br>YMQSSLTSEDSAVYNC <u>AFRLGNDRQ</u><br><u>GWYFDVWGAGTTVT</u> VSS (SEQ ID<br>NO: 539)  | KCD019 | DIVMTQAHRFMSTSVGDRVIISCKASQD<br><u>VGTA</u> VAWYQQTPGQSPKILYWTSTRH<br>TGVPDRFTGSRSGTDFLTISNVQSEDL<br>ADYFCQYTTYPLTFGGGTKLEIK (SEQ<br>ID NO: 627)                 |
| KCD022 | <u>DVQLQESGPD</u> LVKPSQSLTCTVTGY<br><u>SITSGYSWHWIRQFPGNTLEWMGYIHY</u><br><u>SGSTNYNPSLES</u> RFSTRDTSKNQFFLQ<br>LNSVTTEDTATYYC <u>ALHFGYNL</u> GWY<br><u>FDVWGAGTTVT</u> VSS (SEQ ID NO:<br>540) | KCD022 | DIVMTQSHKFMSTSIGDRVIITCKASQD<br><u>VGTTVAWYQQRPGQSPKLLIYWASTRH</u><br>TAVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDL<br>ADYFCQYTSYPLTFGAGTQLELK<br>(SEQ ID NO: 628)                 |
| KCD023 | <u>EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGY</u><br><u>TFTDYNIDWVKQSHGKSLEWIGDINPN</u><br><u>NGGINYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY</u><br>MELRSLTSEDATVYYC <u>GTGDYAYWGQ</u><br><u>GTLVT</u> VSA (SEQ ID NO: 541)           | KCD023 | QIVLTQSPAFMSASPGEKVTLTCSASSS<br><u>VSSSYLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSNL</u><br><u>ASGVPGRFSGSGSGTSYSLT</u> ISSMEAED<br>AASYFCHQWTSYPPTFGAGTKLELK<br>(SEQ ID NO: 629)      |
| KCD030 | <u>QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASG</u>                                                                                                                                                                  | KCD030 | DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNI                                                                                                                                    |

[0268]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                                | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                          |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | <u>YTFTNYWMHWVKQRPQG</u> <u>LEWIGYIN</u><br><u>PSIGYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTA</u><br><u>YMQLSLTS</u> <u>EDSAVFYCATFIYYAMDY</u><br>WGQGTSTTVSS (SEQ ID NO: 542)                                                |        | <u>NVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKAS</u> <u>NLHT</u><br>GVPSRFGSGSGTGFTLTISLQPEDIA<br>YYC <u>QQGQSY</u> <u>PYTFGGG</u> <u>TKLEIK</u> (SEQ<br>ID NO: 630)                                                       |
| KCD033 | <u>EVQLQQSGPELVKPGASMKISCTASGY</u><br><u>SFTGYTMTWVKQSHGKNLEWIGLINPY</u><br><u>NGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSIAY</u><br><u>MELLSLTS</u> <u>EDSAVYYCARRHYGSNWD</u><br><u>YWGQGTTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 543)         | KCD033 | <u>DIKLTQSPSSIYTS</u> <u>LGERTITCKASQDIN</u><br><u>TYLSWFQRP</u> <u>GKSPKTLIYRADRLVDG</u><br>VPSRVGSGSGQDYSLTISSEYEDMGI<br>YYC <u>LQYDEFPYTFGGG</u> <u>TKLEIK</u> (SEQ<br>ID NO: 631)                |
| KCD036 | <u>EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGY</u><br><u>SFTGYTMTWVKQSHGKNLEWIGLINPY</u><br><u>NGGTNYNQKFKGKATFTVDKSSSTAY</u><br><u>MELLSLTS</u> <u>EDSAVYYCARRHYGSSWD</u><br><u>YWGQGTTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 544)         | KCD036 | <u>DIKLTQSPSSMYAS</u> <u>LGERTITCKASQDI</u><br><u>NTYLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLVD</u><br>GVPSRFGSGSGQDYSLTISSEYEEMGI<br>YYC <u>LQYDEFPYTFGGG</u> <u>TKLEIK</u> (SEQ<br>ID NO: 632)                        |
| KCD038 | <u>EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGY</u><br><u>SFADYTMNWVKQSHGKSLEWIGLINP</u><br><u>YNGGTSYNQKFMGKATLTVDKSSSTA</u><br><u>YMELLSLTS</u> <u>EDSAVYYCARWGTYSHN</u><br><u>YDYAMDYWGQGTSTTVSS</u> (SEQ ID<br>NO: 545) | KCD038 | <u>DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQS</u><br><u>LVHSNGNTYLYWYFQKPGQSPKFLIYK</u><br><u>VSNRFGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVE</u><br><u>AEDLG</u> <u>VYFC</u> <u>SQSTHVP</u> <u>PFTFGSGTKLEI</u><br>K (SEQ ID NO: 633) |
| KCD039 | <u>EVQLQQSGPEMVKPGASMKISCKASG</u><br><u>YSFADYTLNWVKQSHGKSLEWIGLINP</u><br><u>YNGGTSYNQKFMGKATLTVDKSSSTA</u><br><u>YMELLSLTS</u> <u>EDSAVYYCTRWGTYSHN</u><br><u>YDYAMDYWGQGTSTTVSS</u> (SEQ ID<br>NO: 546) | KCD039 | <u>DVVMQTPLSLSVSLGDQASISCRSSQS</u><br><u>LVHSNGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYK</u><br><u>VSNRFGITDRFSGSGSGTDFTLKISRVE</u><br><u>AEDLG</u> <u>VYFC</u> <u>SQSTHVP</u> <u>PFTFGSGTKLEI</u><br>K (SEQ ID NO: 634) |
| KCD040 | <u>EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASDF</u>                                                                                                                                                                         | KCD040 | <u>QIVLTQSPA</u> <u>IMSASPG</u> <u>KEVTMTCSAGSS</u>                                                                                                                                                  |

[0269]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                      | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                             |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | <u>NIKDTYMHVWMQRPEQGLEWIGKIDP</u><br><u>ANGNTEFDPKFQ GKATITADTSSNTAY</u><br><u>LQLTSLTSED TAVYYCTRAMDYWGQG</u><br>TSVTVSS (SEQ ID NO: 547)                                       |        | <u>VSYMYWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLAS</u><br>GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAA<br>TYYCQQWSNYPYTFGGGKLEIK<br>(SEQ ID NO: 635)                                        |
| KCD042 | <u>EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTASGF</u><br><u>NIKHTYIHVWSQRPEQGLEWIGKIDPA</u><br><u>NGNTKYDPKFQ GKATITADTSSNTAYL</u><br><u>QLSSLTSED TAVYYCVNAMEYWGQGT</u><br>SVTVSS (SEQ ID NO: 548) | KCD042 | <u>QSVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSANSS</u><br><u>VSDMYWFQQRPGSSPRLLIYDTSNLAS</u><br>GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAA<br>TYYCQQWSTYPWTFGGGKLEIK<br>(SEQ ID NO: 636) |
| KCD044 | <u>EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTASGF</u><br><u>NIKHTYMHVWSQRPERGLEWIGKIDPA</u><br><u>NGNTKYDPKFQ GKATITADTSSNTVYL</u><br><u>QLSSLTSED TAVYYCLNAMEYWGQGT</u><br>SVTVSS (SEQ ID NO: 549) | KCD044 | <u>QSVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSANSS</u><br><u>VSDMYWYQQRPGSSPRLLIYDTSNLAS</u><br>GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAA<br>TYYCQQWSTYPWTFGGGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 637) |
| KCD047 | <u>EVQLQQSGAEFVKPGASVRLSCTASGF</u><br><u>NIKDTYMHVWKQRPEQGLEWIGRIDP</u><br><u>ANGYTKDDPKFQ GKATITADTSSNTAY</u><br><u>LQLSSLTSED TAVYYCASAMDYWGQG</u><br>TSVTVSS (SEQ ID NO: 550) | KCD047 | <u>QIVLTQSPAVMSAPGEKVAMTCSASSS</u><br><u>VTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAS</u><br>GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAA<br>TYYCQQWSTYPFTPGSGTKLEIK (SEQ<br>ID NO: 638) |
| KCD048 | <u>EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGF</u><br><u>NIKATYMHVVRQRPEKGLEWIGRIDPA</u><br><u>NGHTIYDPQFQ GKATITSDTSSNTAYLQ</u><br><u>LNSLTSED TAVYYCAEAMDYWGQGTS</u><br>VTVSS (SEQ ID NO: 551) | KCD048 | <u>QIVLTQSPAIMASAPGEKVTLTCSATSSV</u><br><u>SYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASG</u><br>VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDDAT<br>YYCQQWSNYPFTFGGGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 639) |
| KCD049 | <u>QVQLKESGGLVAPSQSLITCTVSGFS</u><br><u>LSSYGVQWVRQPPGQGLEWLVIWRD</u><br><u>GSITYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKM</u>                                                                     | KCD049 | <u>DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASES</u><br><u>VDKYGISFLNWFQKPGQPPLLIIYAAS</u><br>NQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEE                                               |

[0270]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                    | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                 |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | <u>NSLQTDDTAMYYCGRTSHYGNYY</u><br><u>VMDYWGQGTAVTVSS</u> (SEQ ID NO: 552)                                                                                                                      |        | <u>DDPAMYFCQQGKEVPWTFGGGTKLEIK</u><br>(SEQ ID NO: 640)                                                                                                      |
| KCD050 | <u>QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFS</u><br><u>LNSYGVQWVRQPPGQGLEWLVIWRD</u><br><u>GTITYNSALKSRLSINKDNSKSQVFLK</u><br><u>MNSLQTDDTAMYYCGRTSHYGNFNY</u><br><u>YVMDYWGQGTAVTVSS</u> (SEQ ID NO: 553) | KCD050 | <u>DIVMTQSPTSLAVSLGQRATISCRASES</u><br><u>VDKYGISFLNWFQKPGQPRLLIYAAS</u><br>NQSGVVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEE<br>DDPAVYFCQQGKEFPWTFGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 641) |
| KCD052 | <u>QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFS</u><br><u>LNSYGVQWVRQPPGQGLEWLGIWRD</u><br><u>GSITYNSALKSRLSIRKDNSKSQVFLKM</u><br><u>NSLQTDDTAMYYCGRTSHYGNYY</u><br><u>VMDYWGQGTAVTVSS</u> (SEQ ID NO: 554)   | KCD052 | <u>DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASES</u><br><u>VDKYGISFLNWFQKPGQPRLLIYAAS</u><br>NQSGVVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEE<br>DDPAIYFCQQGKEVPWTFGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 642) |
| KCD056 | <u>EVKLVESGGGLVQPGGSLKVS CAASGF</u><br><u>TFSTYIMSWVRQTPEKRLEWVAYITN</u><br><u>GGGSTYYPDTEKGRFTISRDN AKNTLY</u><br><u>LQMSSLKSEDTAMYYCVRHDYAMD</u><br><u>YWGQGTSTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 555)    | KCD056 | <u>DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDI</u><br><u>NKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSLQP</u><br>GIPSRFSGSGSGRDISFISNLEPEDIATY<br><u>YCLQYDNLLYTFGGGTTLEIK</u> (SEQ ID NO: 643)  |
| KCD057 | <u>EVKLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGF</u><br><u>TFSNYIMSWVRQTPEKRLEWVAYITNG</u><br><u>GGATYYPD TVKGQFTISRDN AKNTLYL</u><br><u>QMSSLKSEDTAIYYCARHDFYALDFW</u><br><u>GQGTSVTVSS</u> (SEQ ID NO: 556)   | KCD057 | <u>DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDI</u><br><u>NKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSLQP</u><br>GIPSRFSGSGSGRDISFISNLEPEDIATY<br><u>YCLKYDNLLYTFGGGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 644)  |
| KCD058 | <u>EVKLVESGGDLVQPGGSLKLS CAASGF</u><br><u>TFSRYIMSWVRLTPEKRLEWVAFITNG</u>                                                                                                                      | KCD058 | <u>DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDI</u><br><u>NKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSLQP</u>                                                                                    |

[0271]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                  | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                              |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | <u>GGNTYHPD</u> TVKGRTISRDNANNTLYL<br>QMSSLKSEDTAIYYC <u>ARHDYYALDYW</u><br>GQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 557)                                                                                      |        | GIPSRFSGSGSGRDYSFISISNLEPEDIATY<br><u>YCLQYDNLLYTF</u> GGGKLEIK (SEQ ID NO: 645)                                                                                         |
| KCD062 | EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS <u>GF</u><br><u>TFSTYIMSWVRQTPEKR</u> LEWVAYITSG<br><u>GSSTYYPD</u> TVKGRTISRDNASTLYL<br>QMSSLKSEDTAMYYC <u>ARHAHFYAMD</u><br><u>YWGQGS</u> TVTVSS (SEQ ID NO: 558) | KCD062 | DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKAS <u>QDI</u><br><u>NKYIAWYQHKPGK</u> PRLLIH <u>YTS</u> TLQP<br>GIPSRFSGSGSGRDYSFISISNLEPEDIATY<br><u>YCLQYDNLLYTF</u> GGGKLEIK (SEQ ID NO: 646)  |
| KCD063 | EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS <u>GF</u><br><u>IFSSYIMSWVRQTPEKR</u> LEWVAYITNG<br><u>GGSTYYPD</u> TVKGRLTISRDNANTLYL<br>QMSSLKSEDTAMYYC <u>VRHAHYAMD</u><br><u>YWGQGS</u> TVTVSS (SEQ ID NO: 559) | KCD063 | DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKAS <u>QDI</u><br><u>NKYITWYQHKPGK</u> PRLLIH <u>YTS</u> TLQPG<br>IPSRFSGSGSGRDYSFISISNLEPEDIATYY<br><u>CLQYDNLLYTF</u> GGGKLEIK (SEQ ID NO: 647)  |
| KCD064 | EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS <u>GF</u><br><u>TFSSYIMSWVRQTPEKRLG</u> WVAYITSG<br><u>GGSTYYPD</u> TVKGRTISRDNANTLYL<br>QMSSLKSEDTAMYYC <u>ARHGTGYAMD</u><br><u>YWGQGS</u> TVTVSS (SEQ ID NO: 560) | KCD064 | DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKAS <u>QDI</u><br><u>NKYIAWYQHKPGK</u> PRLLIH <u>YTS</u> TLQP<br>GIPSRFSGSGSGRDYSFISISNLEPEDIATY<br><u>YCLQYDNLLYTF</u> GGGTELEIK (SEQ ID NO: 648) |
| KCD065 | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASG<br><u>YTFTTYTIHWVKQRPGQGLEWIGYINP</u><br><u>SSDFTNYNQNFADKATLTADR</u> SSSTAY<br>MQLSSLTSEESAVYYC <u>AIRLG</u> YDRQG<br><u>WYFDVWGAGTT</u> TVTVSS (SEQ ID NO: 561) | KCD065 | DIVMTQSHKFLSTSLGDRVSITCKAS <u>QD</u><br><u>VGSAVAWYQQKPGQSPDLLIYWTF</u> TRH<br>TGVPDRFTGSRSGTDFLTISNVQSGDL<br>ADYFC <u>QQYSNYPLTF</u> GGGKLEIK<br>(SEQ ID NO: 649)       |
| KCD066 | QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASG<br><u>YTFTDYTMHWVKQRPGQGLEWIGYIN</u><br><u>PSGGYTDYNQKFKDKTALTADKSSSTA</u>                                                                                        | KCD066 | DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSS <u>QS</u><br><u>LLYSGNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY</u><br><u>WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLT</u> ISS                                                        |

[0272]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                                           | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                         |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | YMQLSSTSEDSAVYYCARRRDYWFA<br>YWGQGT <del>LV</del> TVSA (SEQ ID NO: 562)                                                                                                                                               |        | VKAEDLAVYYCHQYYSYLTFGAGTKL<br>ELK (SEQ ID NO: 650)                                                                                                                                  |
| KCD070 | EIQ <del>L</del> QQTGP <del>EL</del> VKPGASVKISCKASGY<br>FTDYIILWVKQSHGKSLEWIGNINPYPD<br>YTSYNLKF <del>G</del> KATLTVDKSSSTAYMQ<br>LNSLTSEDSAVYYCARSDGYG <del>GDY</del> W<br>GQGT <del>SV</del> TVSS (SEQ ID NO: 563) | KCD070 | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQ<br>DVGTA <del>VA</del> WYQKPGQSPKLLIYWAST<br>RHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNVSQSE<br>DLADYFCQ <del>QY</del> SSYPWTFGGGT <del>TT</del> LEIK<br>(SEQ ID NO: 651) |
| KCD075 | QVQLQPGAELVRPGTSVKLSCKASGY<br>TFSNYWINWVKQRPQG <del>LE</del> WIGNIYPS<br>DSSINYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYM<br>QLSSPTSEDSAVYYCTGTDWYFDVWG<br>AGTT <del>VT</del> VSS (SEQ ID NO: 564)                                         | KCD075 | DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSGGQGI<br>SNYLNWYQKPDGTFKLLIYYTSLHS<br>GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDVAT<br>YYCQ <del>QY</del> SKLPYTFGGGT <del>K</del> LEIK (SEQ<br>ID NO: 652)                  |
| KCD077 | EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGF<br>NIKDYIMHWVKQRPEQGLEWIGWIDP<br>ENGHTIYDPRFQGKATITADTSSNTAYL<br>QLSSLTSEDTAVYYCSRGLLGFA <del>Y</del> WG<br>QGTL <del>VT</del> VSA (SEQ ID NO: 565)                                       | KCD077 | DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQ<br>NVGTNVAWYQKPGQSPKALIYTASYR<br>YSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSED<br>LAEYFCQ <del>QY</del> NSYPHMYTFGGGT <del>K</del> LEIK<br>(SEQ ID NO: 653)              |
| KCD101 | QVQLQPGAELVRPGTSVKLSCKASG<br>YTFTSYWMHWVKQRPQG <del>LE</del> WIGVID<br>PSDSYTNYNQKFKGKATLTVDTSSTA<br>YMQLSSTSEDSAVYYCGRNGYDGSM<br>DYWGQGT <del>SV</del> TVSS (SEQ ID NO: 566)                                         | KCD101 | DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDI<br>SNYLNWYQKPDGTVKLLIYYPSRLHS<br>GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFAT<br>YFCQ <del>Q</del> GNTLPYTFGGGT <del>K</del> LEIK (SEQ<br>ID NO: 654)                 |
| KCD102 | QVQLQPGAELVRPGTSVKLSCKASG<br>YTFTSYWMHWVKQRPQG <del>LE</del> WIGVID<br>PSDSYTNYNQKFKGKATLTVDTSSTA<br>YMQLSSTSEDSAVYYCARNGYDGSM<br>DYWGQGT <del>SV</del> TVSS (SEQ ID NO: 567)                                         | KCD102 | EIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDI<br>SNYLNWYQKPDGTVKLLIYYPSRLHS<br>GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFAT<br>YFCQ <del>Q</del> GNTLPYTFGGGT <del>K</del> LEIK (SEQ<br>ID NO: 655)                 |

[0273]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                              | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                              |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KCD103 | <u>QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASG</u><br><u>YTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGVID</u><br>PSDSYTKYNQKFKDKATLTVETSSSTA<br>YMQLSSLTSEDSAVYYCAGNGYDGSM<br><u>DYWGQGTSTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 568)             | KCD103 | <u>DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDI</u><br><u>SNSLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHS</u><br>RVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIAT<br>YFCQQANTLPYTFGGGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 656)  |
| KCD104 | <u>QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASG</u><br><u>YTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGVID</u><br>PSDSYTYYNQKFKGKATLTVDTSSSTA<br>YMQLSSLTSEDSAVYYCARNGYDGAM<br><u>DYWGQGTSTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 569)             | KCD104 | <u>EIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDI</u><br><u>SNYLNWYQQKPDGTVKLLIYPSRLHS</u><br>GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFAT<br>YFCQQGNTLPYTFGGGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 657)   |
| KCD110 | <u>EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY</u><br><u>SFTGYMHWVKQSHGNILDWIGYIDP</u><br><u>DNGVSSKNQKFTGKATVTADKSSSTA</u><br>YMELRSLTSEDSAVYYCAGYYGSSWY<br><u>WYFDVWGTGTTVTVSS</u> (SEQ ID NO:<br>570) | KCD110 | <u>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV</u><br><u>SYMHWYQQKPGSSPKPWYATSNLASG</u><br>VPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAAT<br>YYCQQWSSNPYTFGGGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 658)   |
| KCD111 | <u>EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY</u><br><u>SFTDYMHWVKQSHGNILDWIGYIDP</u><br><u>YNGVSSYNQKFKGKATLSVDQSSSTA</u><br>YMELRSLTSEDSAVYYCSSYYGSSPYW<br><u>YFDVWGTGTRVTVSS</u> (SEQ ID NO:<br>571) | KCD111 | <u>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV</u><br><u>SYMHWYQQKPGSSPKPWYATSNLASG</u><br>VPTRFSGSGSGTSYSLTISKLEAEDAATY<br>YCQQWSSNPYTFGGGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 659)   |
| KCD112 | <u>EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY</u><br><u>SFTAYYMNWVKHSPEKSLEWIGDINPS</u><br><u>TGGTTYNQKFKARATLTVDKSSSTAY</u><br>MQLKSLTSEDSAVYYCATTYSGNSY<br><u>VGFAYWGQGLTVTVSA</u> (SEQ ID NO:        | KCD112 | <u>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQ</u><br><u>DVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIFWTSTR</u><br>HTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAED<br>LALYYCQQHYTTPWTFGGGKLEIK<br>(SEQ ID NO: 660) |

[0274]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                                       | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                 |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | 572)                                                                                                                                                                                                              |        |                                                                                                                                                             |
| KCD114 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>SFTAYYMNWVKQSPEKSLEWIGDINPS<br>TGGTTYNQNFKAATLTVDKSSSTAY<br>MHLKSLTSEDSAVYYCATTYYSGNSY<br>VGFA <del>Y</del> WGQGT <del>L</del> TVSA (SEQ ID<br>NO: 573)                            | KCD114 | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQ<br>DVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIFWASTR<br>HTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAED<br>LALYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 661)                 |
| KCD115 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>SFTGY <del>Y</del> MN <del>W</del> VKQSPEKSLEWIGDINPS<br>TGGTTYNQKFKAKATLTVDKSSSTAY<br>MQLKSLTSEDSAVYYCATPYYYGSSY<br>VGFA <del>Y</del> WGQGT <del>L</del> TVSA (SEQ ID NO:<br>574) | KCD115 | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQ<br>DVSTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTR<br>HTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAED<br>LALYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 662)                 |
| KCD118 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAFGY<br>TFTDYYKNWMRQRHGESLEWIGDINP<br>NSGDANYNQKFKGKATLTVDKSSSTA<br>YMELRSLTSEDSAVYYCAREGPSFAY<br>WGHGTLTVSA (SEQ ID NO: 575)                                                              | KCD118 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI<br>VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV<br>SNRFSGV <del>P</del> DRFSGSGTDFTLKISRVEA<br>EDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 663) |
| KCD119 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>TFTDYYTNWMRQRHGESLEWIGDINP<br>NTGDTSYNQKFRVKATLTVDKSSGTA<br>YMGLRSLTSEDSAVYYCTREGPSFAY<br>WGQGT <del>L</del> TVSA (SEQ ID NO: 576)                                                 | KCD119 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI<br>VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV<br>SNRFSGV <del>P</del> DRFSGSGTDFTLKISRVEA<br>EDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTTLEIK<br>(SEQ ID NO: 664) |
| KCD121 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>TFTDYYKNWMRQRHGESLEWIGDINP<br>NNGDTSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAF<br>MELRSLTSEDSAVYYCAREGPSFAYW                                                                                            | KCD121 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSNQTI<br>VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV<br>SNRFSGV <del>P</del> DRFSGSGTDFTLRISRVEA<br>EDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK                     |

[0275]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                     | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | GQGT <del>LT</del> TVSA (SEQ ID NO: 577)                                                                                                                                        |        | (SEQ ID NO: 665)                                                                                                                                                           |
| KCD122 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>TFTDYYKNWMRQRHGESLEWIGDINP<br>NNGDANYNQKFKGKATLTVDKSSSTA<br>YMERLSLTSEDSAVYFCAREGPSFAYW<br>GHGTLTVSA (SEQ ID NO: 578)                            | KCD122 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI<br>VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV<br>SNRFSGV <del>PDR</del> FSGSGSGTDFTLKISRVEA<br>EDLG <del>VYYC</del> FQGSHPPTFGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 666)  |
| KCD123 | EVHLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>TFTDFYKNWMRQRHGESLEWIGDINPN<br>NNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY<br>MELRSLTSEDSAVYYCAREGPSFAYW<br>GQGT <del>LT</del> TVSA (SEQ ID NO: 579)             | KCD123 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI<br>VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV<br>SNRFSGV <del>PDR</del> FSGSGSGTDFTLKISRVEA<br>EDLG <del>VYYC</del> FQGSHPPTFGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 667)  |
| KCD124 | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>TFTDHYMNWVKQSHGKSLEWIGDINP<br>NNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTA<br>YMERLSLTSGDSAVYYCTREGASFAF<br>WGQGT <del>LT</del> TVSA (SEQ ID NO: 580)              | KCD124 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI<br>VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV<br>SNRFSGV <del>PDR</del> FSGSGSGTDFTLKISRVEA<br>EDLG <del>VYYC</del> FQGSHPPLTFGAGTKLELK<br>(SEQ ID NO: 668) |
| KCD125 | EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSG<br>NTFTSYGINWVKQRPQG <del>LEWIGYIYI</del><br>GTGYTEYNEKFKGKATLSDTSSSTAY<br>MQLSSLTSEDSAIYFCVRKAYGNYGFD<br>YWGQGT <del>TL</del> TVSS (SEQ ID NO: 581) | KCD125 | DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEI<br>SGYLSWLQKQPDGTIKRLIYA <del>A</del> ASTLD SG<br>VPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADY<br>YCLQYASYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID<br>NO: 669)                  |
| KCD126 | EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSG<br>KTFTSHGINWVKQRPQG <del>LEWIGYIYI</del><br>GNGYNEYNEKFKGKATLSDTSSSTAY<br>MQLSSLTFEDSAIYFCVRKAYGNYGFD<br>DWGQGT <del>TL</del> TVSS (SEQ ID NO: 582) | KCD126 | DIQMTQSPTSLSASLGESVSLTCRASQEI<br>SGNLNWLQKQPDGSIKRLIYA <del>A</del> ASTLD SG<br>VPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADY<br>YCLQYANYPFTFGSGTKLEVK (SEQ<br>ID NO: 670)                  |
| KCD127 | QVQLQQPGAELVRPESSVKLSCKASGY                                                                                                                                                     | KCD127 | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQ                                                                                                                                                |

[0276]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                                                                   | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                                                         |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | <u>TFTNFWMDWVKQRPQG</u> <u>LEWIGNIYP</u><br><u>SGSE</u> <u>THYNQKFKDKATLTVDKS</u> <u>STTAY</u><br><u>MLSSLTSEDSAVYYC</u> <u>ARSGYYG</u> <u>SRYL</u><br><u>YYFDYWGQGTTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 583)                                               |        | <u>DVST</u> <u>AVAWYQQKPGQSPKLLIY</u> <u>SAS</u> <u>YR</u><br><u>STGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDL</u><br><u>AVYYCQ</u> <u>QHYSTPYTFGGG</u> <u>TKLEIR</u><br>(SEQ ID NO: 671)                                                           |
| KCD128 | <u>QVQLQQPGAELVRPESSVKLSCKASG</u> <u>Y</u><br><u>TFTSYWMDWVMQRPQG</u> <u>LEWIGNIYP</u><br><u>SGSE</u> <u>THYNQKFKDKATLTVDKS</u> <u>STTAY</u><br><u>MLSSLTFEDSAVYYC</u> <u>ARSGFIG</u> <u>SRYL</u><br><u>YYFDYWGQGTTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 584) | KCD128 | <u>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVTITCKASQ</u><br><u>DVSN</u> <u>AVAWYQLKPGQSPKLLIY</u> <u>SAS</u> <u>YR</u><br><u>YTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAAD</u><br><u>LAVYYCQ</u> <u>QHYITPYTFGGG</u> <u>TKLEIK</u><br>(SEQ ID NO: 672)                     |
| KCD129 | <u>EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASG</u> <u>F</u><br><u>SFNTYAMNWVRQAPKG</u> <u>LEWVARIR</u> <u>S</u><br><u>KSN</u> <u>NYATYYADSVKDRFTISRDDSESM</u><br><u>VYLQMNNLKTEDTAMYYC</u> <u>VRHGY</u> <u>YW</u><br><u>YFDVWGTGTTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 585)   | KCD129 | <u>DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQ</u> <u>SI</u><br><u>VHSDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY</u> <u>RV</u><br><u>SNR</u> <u>FGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRME</u><br><u>AEDLG</u> <u>VYYCFQGS</u> <u>HVPYTFGGG</u> <u>TKLEI</u><br><u>K</u> (SEQ ID NO: 673) |
| KCD131 | <u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS</u> <u>AY</u><br><u>TFTDYYINWVKQRPQG</u> <u>PEWIGWIFPG</u><br><u>SNSTYSNEKFEVKATLTVDESS</u> <u>TAYM</u><br><u>LLSSLTSEDSAVYFC</u> <u>ARLG</u> <u>YFGSS</u> <u>YHA</u><br><u>LDYWGQGTSTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 586) | KCD131 | <u>DIQMTQSPASLSVSVGETVTITC</u> <u>RASENI</u><br><u>YSHLAWFQQKQGKSPRLLVYS</u> <u>ATNLPD</u><br><u>GVPSR</u> <u>FGSGSGTQYSLKINILQSEDFGS</u><br><u>YYCQ</u> <u>HF</u> <u>WGTPWTFGGG</u> <u>TKLEIK</u> (SEQ ID NO: 674)                 |
| KCD132 | <u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG</u> <u>Y</u><br><u>SFTDYYINWVKQRPQG</u> <u>LEWIGWIFPG</u><br><u>SGSTYYNEKFKGKATLTVDKS</u> <u>SSTAY</u><br><u>MLSSLTSEDSAVYFC</u> <u>ARTGYY</u> <u>SNLYA</u>                                                     | KCD132 | <u>DIQMTQSPASLSVSVGETVTITC</u> <u>RASENI</u><br><u>YSN</u> <u>LAWYQQKQGKSPQLLVY</u> <u>VATNLA</u><br><u>DGVPSR</u> <u>FGSGSGTQYSLKINSLQSEDF</u><br><u>GNYCQ</u> <u>HF</u> <u>WGTPYTFGGG</u> <u>TKLEMR</u>                           |

[0277]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                                 | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                                     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | <u>VDY</u> WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 587)                                                                                                                                                                     |        | (SEQ ID NO: 675)                                                                                                                                                                                                |
| KCD133 | EVQLVESGGGLLQPKGSLKLSCAAS <u>GF</u><br><u>TFNTY</u> AMNWVRQAPKGLEWVAR <u>IRS</u><br><u>KSSNYATYY</u> ADSVKDRFTISRDDSQSM<br>FYLEMNNLKTEDTAMYYCVRDRGY <u>Y</u><br><u>YVMDY</u> WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 588)   | KCD133 | DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASE <u>SV</u><br><u>EYYGTSL</u> MQWYQQKPGQP <small>PKLL</small> <u>INAAS</u><br>NVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEE<br>DDIAMYFC <u>Q</u> SRKVPWTFGGG <small>TKLEIK</small><br>(SEQ ID NO: 676) |
| KCD134 | EVQLQQSGPEMVKPGASVKMSCQAS <u>G</u><br><u>YTFTDYY</u> MNVWKQSHGETLEWIGDI <u>Y</u><br><u>PHNGY</u> TAYNQKFKGKATLTVDKSSST<br>AYMELRSLTSEDSAVYYC <u>ARGGQ</u> LRL<br><u>PAWFAY</u> WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 589) | KCD134 | ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITSDI<br><u>DDDMN</u> WYQQKPGEP <small>PKLL</small> <u>ISEGNSLRP</u><br>GVPSRFSSSGYGTDFVFTIEDMFSEDVA<br>DYHCL <u>QSDNLPY</u> TFGGG <small>TKLEIK</small> (SEQ ID NO: 677)                |
| KCD135 | EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKAS <u>G</u><br><u>YIFTDYSI</u> HWVKQSHGKSLEWIGYIN <u>PN</u><br><u>NGGTSYN</u> QKFKGKATLTVNKSSTTAY<br>MELRSLTSEDSAVYFC <u>ARDTTIVG</u> DYW<br>GQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 590)            | KCD135 | DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQ<br><u>HVGTN</u> VVWYQQKPGQSPKALIY <u>SAS</u> YR<br>YSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISNVQSED<br>LAEYFC <u>Q</u> QFNSYPLTFGGG <small>TKLEIK</small><br>(SEQ ID NO: 678)                           |
| KCD136 | EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCSAS <u>GF</u><br><u>NIKNTYMH</u> WVNQRPEQGLEWIGRIDP<br><u>ANGITKY</u> APNFQGKATITADTSNTAY<br>LQLSNLTSEDTAIYYC <u>TRAMDY</u> WGQG<br>TSVTVSS (SEQ ID NO: 591)                          | KCD136 | QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCS <u>ASSS</u><br><u>VSYMYWY</u> QQKPGSSPRLLIYDISNLASG<br>VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEAAAT<br>YYC <u>Q</u> QWDYTPWTFGGG <small>TKLEIK</small> (SEQ ID NO: 679)                                |
| KCD137 | EVQLVESGGDLVKPGSLKLSCAAS <u>GF</u><br><u>TFSGYG</u> MSWVRQIPDKRLEWVAISSRD<br><u>NSFTYY</u> PDSVKGRFTISRDNAKNTLYL                                                                                            | KCD137 | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQ<br><u>DVGTA</u> VAWYQQRPGQSPKLLIY <u>WAST</u><br>RHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTVSNVQSE                                                                                                       |

[0278]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                                 | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                                                 |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | <u>QMSSLKSEDTALYFCTRHPYLPTGGYV</u><br><u>MDYWGQGTSTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 592)                                                                                                               |        | <u>DLADYFCQQYTSYPLTFGAGTKLELK</u><br>(SEQ ID NO: 680)                                                                                                                       |
| KCD139 | <u>EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSG</u><br><u>YTFTSYGINWVKQRPGQGLEWIGYIYI</u><br><u>ANGYTENNEKFKGKAKLTSDISSSTAY</u><br><u>MQLSSLTSEDAIYFCARRFDYAGALD</u><br><u>YWGQGTSTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 593) | KCD139 | <u>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESV</u><br><u>DSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIHRAS</u><br><u>NLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAD</u><br><u>DVAIYYCQQTNDDPYTFGGGTNLEIK</u><br>(SEQ ID NO: 681) |
| KCD200 | <u>EVQLQQSGPELVKPGASVKISKASGY</u><br><u>TFTSYKWNMRQRHGESLEWIGDINPN</u><br><u>SGDTAYNQKFKGKATLTVDSSSTAY</u><br><u>MELRSLTSEDAVYYCAREGPSFAYW</u><br><u>GQGTLVTVSA</u> (SEQ ID NO: 594)        | KCD200 | <u>DVLMQTPLSLPVSLGDQVSISSRSQTI</u><br><u>VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV</u><br><u>SNRFGVDPDRFSGSGSDFTLTKISRVEA</u><br><u>EDLGVYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIK</u><br>(SEQ ID NO: 682)    |
| KCD205 | <u>EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSG</u><br><u>NTFTSHGINWVKQRPGQGLEWIGYIYI</u><br><u>GNGYNEYNEKFKGKATLTSDTSSSTAY</u><br><u>MQLSSLTSEDAIYFCVRKAYGNYGFD</u><br><u>DWGQGTTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 595)  | KCD205 | <u>DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEI</u><br><u>SGYLSWLQKPKDGTIKRLIYAASLTDSG</u><br><u>VPKRFGSGSSGSDYSLTSSLESDDFADY</u><br><u>YCLQYASYPFTFGSGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 683)         |
| KCD207 | <u>AVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGF</u><br><u>SFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS</u><br><u>KSNNYATYYADSVKDRFTLSRDDSES</u><br><u>MLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRQGFY</u><br><u>WYFDVWGTGTTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 596) | KCD207 | <u>DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI</u><br><u>VHSNGNTYLEWYLQKSGQSPKLLIYNV</u><br><u>SNRFGVDPDRFRGSGSGDFTLTKISRVE</u><br><u>AEDLGVYYCFQGSHPYPTFGSGTKLEIK</u><br>(SEQ ID NO: 684) |
| KCD208 | <u>EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTVSGF</u><br><u>NIKNTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDP</u><br><u>ANGDTTYAPKFQGKATITADTSSNSAY</u>                                                                               | KCD208 | <u>EIVLTQSPALMAASPGKEKVTITCSVSSSI</u><br><u>SSSLHWYRQKSGTSPKPWIYGTSHLAS</u><br><u>GVPVRFSGSGSGTSYSLTSSMEAEADA</u>                                                           |

[0279]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                    | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | LHLSRLTSEDTAIYYCSLYDYDGYWGQ<br>GTTTLTVSS (SEQ ID NO: 597)                                                                                                      |        | TYYCQQWDTPWTFGGGKLEIK<br>(SEQ ID NO: 685)                                                                                                  |
| KCD210 | EVQLQQSGPVLVKPGASVTMSCKASG<br>YTFTEYYMNWVKQSHGKSLDWIGVIN<br>PYSGGTSYKQKFKDKATLTVDKSSSTA<br>YMEINGLTSEDSAVYFCVRGGLRRNY<br>FDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 598)      | KCD210 | EIVLTQSPALMTASPGKVTITCSVSSSIS<br>STNLHWYQQKSGTSPKPWIFGTSNLAS<br>GVPVRFSGSGSGTSYSLTISNMEAEDAA<br>TYYCQQWNSYPFTFGTGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 686) |
| KCD212 | EVHLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGF<br>TFSRYGMSWVRQTPDKRLEWVATISS<br>AGSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLF<br>LQMSSLKSEDTAMYYCARPLNYYGTS<br>SFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:<br>599)  | KCD212 | QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCRASS<br>VSSTYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTNL<br>ASGVPPRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDA<br>ATYYCQQYDSSPNTFGAGTKLELK<br>(SEQ ID NO: 687)  |
| KCD214 | EVQLQQSVAEFVRPGASVKLSCTASGF<br>NIKNTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDP<br>ANGNTEYAPKFQGKATITADTSSNTAY<br>LQLSSLTSEDTAIYYCALYDYDGYWGQ<br>GTTTLTVSS (SEQ ID NO: 600)          | KCD214 | EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCRVSSSI<br>SSSLHWYQQKSGTSPKPWIYGTSNLAS<br>GVPVRFSGSRSGTSYSLTISSMEAEDAA<br>TYYCQQWSDYPWTFGGGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 688) |
| KCD216 | QVHLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>TFIDYYINWVKQRPGQGLEWIGWIFPG<br>SDSTYYNEKFKGKATLTVDKSSSTAY<br>MLLSSLTSEDSAVYFCARYGYGSSFY<br>AMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:<br>601) | KCD216 | DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENI<br>YSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLA<br>DGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDF<br>GSYYCQHFWGTPPTFGGGKLEIK<br>(SEQ ID NO: 689) |
| KCD217 | QVQVQQPGAIEFVKTGASVKLSCKTSG<br>YTFIDYWIHWVKQRPGHGLEWIGRIDP<br>NTGGSKYYEKFGRKATLTVDKPSRTV                                                                       | KCD217 | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENI<br>YGALNWYQRKQKSPQLLIYGATNLA<br>DGMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDV                                                 |

[0280]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                   | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | YMLSSLTSEDSAVYYCTREYDYGWF<br>GYWGQGTTLVTVSE (SEQ ID NO: 602)                                                                                                  |        | ATYYCQNVLSTPWTFGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 690)                                                                                               |
| KCD219 | QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>TFTDYYINWVKQRPQGLEWIGWIFPG<br>SGSTYYNEKFKGKATLTVDKSSSTAY<br>MLLSSLSEDSAVYFCARYGYYGSSFY<br>AMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:<br>603) | KCD219 | DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENI<br>YSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLA<br>DGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDF<br>GSYYCQHFWSPTFGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 691)  |
| KCD220 | QVQLQQSGAELMEPGASVKLSCKATG<br>YTFTGYWIEWVKQRPGHGLEWIGETLP<br>GSDSNYYNEKFKGKATFTADTSSNTAY<br>MQLSSLTTEDSAIYYCARDYSNYWYF<br>DVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 604)      | KCD220 | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI<br>SNYLNWYQQKPDGTVKLLIYTSNLHS<br>GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT<br>YFCQQDSKHRTFGGGTKLEIK (SEQ ID<br>NO: 692)  |
| KCD224 | QVQLKESGGLVAPSQSLTCTVSGFS<br>LTSYGVDWIRQSPGKLEWLGVWGV<br>GSTNYSALKSRLSISKDNSKSQVFLK<br>MNSLQTDDTAMYYCARSYDGSYWYF<br>DVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 605)            | KCD224 | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQVI<br>SNYLNWYQQKPDGTVKLLIYTSRLHS<br>GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIAT<br>YYCQQYSKLPYTFGSGTKLEIK (SEQ<br>ID NO: 693) |
| KCD225 | QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY<br>TFTDYYINWMKQRPQGLEWIGWIFPG<br>SDSTYYNEKFKGKATLTVDKSSSTAY<br>MLLSSLTSEDSAVYFCARLGYSHSY<br>AMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:<br>606)  | KCD225 | DIQMTQSPASLSVSTGETVTITCRASENI<br>YSNLAWFQQKQKSPQLLVYAATNLA<br>DGVPSRFSGSGSGTQYSLKITSLSQSEDFG<br>SYYCQHFWSPTFGAGTKLDLK<br>(SEQ ID NO: 694)  |
| KCD229 | EVQLVESGGGLVQPGSLKLSCAASGF<br>SFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRS<br>KSNNYATYYADSVKDRFTIFRDDSESM                                                                        | KCD229 | DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI<br>VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPNLLIYNV<br>ENRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA                                              |

[0281]

| ID     | 重链可变区 AA 序列                                                                                                                                                  | ID     | 轻链可变区 AA 序列                                                                                                                                     |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | LYLQMNNLKTEDTAMYVCVRHGYYW<br>YFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:<br>607)                                                                                             |        | EDLGVYYCFQGSHPYTFGSGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 695)                                                                                                  |
| KCD230 | QVQLQQPGTELVKPGASVKLPCKASG<br>YTFTSYWMQWVKQRPQGGLWIGEID<br>PSDTYINYNQKFKGKATLTVDTSSSTA<br>YMQLSSTSEDSAVYYCARYTTIMASD<br>YWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 608)        | KCD230 | DIQMTQTSSLSVSLGDRVTISCRASQDI<br>TNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHS<br>GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIAT<br>YYCQQYSKLPWTFGGGKLEIK (SEQ<br>ID NO: 696)       |
| KCD232 | EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGF<br>SFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS<br>KSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESM<br>VYLQMNNLKTEDTAMYVCVRHGYYW<br>YFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:<br>609) | KCD232 | DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI<br>VHSDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRV<br>SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRME<br>AEDLGVYYCFQGSHPYTFGGGKLEI<br>K (SEQ ID NO: 697) |

[0282] 表1D: 基于CDR定义的变体人源化CFD拮抗抗体的可变区序列

[0283]

|    | CDR1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | CDR2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CDR3                                                                                                                                                                                         |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 轻链 | QX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> HX <sub>4</sub> NX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> YX <sub>8</sub> E, 其中 X <sub>1</sub> 是 T、D、G、H、I、N、Q、R、V 或 W; X <sub>2</sub> 是 I、A 或 V; X <sub>3</sub> 是 V、A、D、E、F、I、K、L、Q、R、S、W 或 Y; X <sub>4</sub> 是 S、A、D、F、G、I、R、T、V 或 W; X <sub>5</sub> 是 G、E、F 或 S; X <sub>6</sub> 是 D 或 E; X <sub>7</sub> 是 T、S 或 V; X <sub>8</sub> 是 L 或 I | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> LX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> KX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> RX <sub>8</sub> ; 其中 X <sub>1</sub> 是 N、D、E、R、S、V 或 Y; X <sub>2</sub> 是 L 或 I; X <sub>3</sub> 是 I 或 T; X <sub>4</sub> 是 Y、D、E、F、G、L、R、S、T 或 V; X <sub>5</sub> 是 V、A 或 I; X <sub>6</sub> 是 S、A、F、G、K、L、Q、R、T 或 Y; X <sub>7</sub> 是 N、E、G、H、I、L、Q、R、T 或 Y; X <sub>8</sub> 是 F、E、G、I、L、R 或 W | X <sub>1</sub> QGSX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> PX <sub>4</sub> T, 其中 X <sub>1</sub> 是 F 或 M; X <sub>2</sub> 是 H、A、E、F、G、L、N、Q、T、V、W 或 Y; X <sub>3</sub> 是 V、W、Q 或 N; X <sub>4</sub> 是 P 或 V |

[0284]

|    | CDR1                                                                                                                                                                                                                                     | CDR2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | CDR3                                                                                                                                                                             |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 重链 | <u>GYX<sub>1</sub>FTX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub></u> , 其中 X <sub>1</sub> 是 T、D、E、F、H、I、K、P、R、S、W 或 Y; X <sub>2</sub> 是 D、A、F、G、S、V 或 Y; X <sub>3</sub> 是 Y 或 F; X <sub>4</sub> 是 Y 或 P; X <sub>5</sub> 是 M、H 或 I | <u>WIGDX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub> X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub></u><br><u>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub></u> , 其中 X <sub>1</sub> 是 I、L 或 V; X <sub>2</sub> 是 N、A 或 G; X <sub>3</sub> 是 P 或 T; X <sub>4</sub> 是 N、A、D、G、H、I、L、R、T、V、W 或 Y; X <sub>5</sub> 是 T、I、K、L、Q、R、S 或 V, X <sub>6</sub> 是 G 或 V; X <sub>7</sub> 是任何氨基酸; X <sub>8</sub> 是除 I 之外的任何氨基酸; X <sub>9</sub> 是除 K 或 R 之外的任何氨基酸; X <sub>10</sub> 是除 I 或 W 之外的任何氨基酸 | X <sub>1</sub> REGPX <sub>2</sub> FX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> , 其中 X <sub>1</sub> 是 T、A 或 Q; X <sub>2</sub> 是 S 或 A; X <sub>3</sub> 是 A 或 R; X <sub>4</sub> 是 Y、A、H、F、V、Y 或 L |

[0285] 表1D(续):CDR(精简的CDR定义序列)

[0286]

|    | CDR1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | CDR2                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CDR3                                                                                                                                                                                         |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 轻链 | QX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> HX <sub>4</sub> NX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> Y, 其中 X <sub>1</sub> 是 T、D、G、H、I、N、Q、R、V 或 W; X <sub>2</sub> 是 I、A 或 V; X <sub>3</sub> 是 V、A、D、E、F、I、K、L、Q、R、S、W 或 Y; X <sub>4</sub> 是 S、A、D、F、G、I、R、T、V 或 W; X <sub>5</sub> 是 G、E、F 或 S; X <sub>6</sub> 是 D 或 E; X <sub>7</sub> 是 T、S 或 V | KX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> ; 其中 X <sub>1</sub> 是 V、A 或 I; X <sub>2</sub> 是 S、A、F、G、K、L、Q、R、T 或 Y                                                                                                                                                                                                 | X <sub>1</sub> QGSX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> PX <sub>4</sub> T, 其中 X <sub>1</sub> 是 F 或 M; X <sub>2</sub> 是 H、A、E、F、G、L、N、Q、T、V、W 或 Y; X <sub>3</sub> 是 V、W、Q 或 N; X <sub>4</sub> 是 P 或 V |
| 重链 | <u>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub></u> , 其中 X <sub>1</sub> 是 D、A、F、G、S、V 或 Y; X <sub>2</sub> 是 Y 或 F; X <sub>3</sub> 是 Y 或 P                                                                                                                                                                                                                   | <u>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub> X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub></u> , 其中 X <sub>1</sub> 是 I、L 或 V; X <sub>2</sub> 是 N、A 或 G; X <sub>3</sub> 是 P 或 T; X <sub>4</sub> 是 N、A、D、G、H、I、L、R、T、V、W 或 Y; X <sub>5</sub> 是 T、I、K、L、Q、R、S 或 V, X <sub>6</sub> 是 G | EGPX <sub>1</sub> FX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> , 其中 X <sub>1</sub> 是 S 或 A; X <sub>2</sub> 是 A 或 R; X <sub>3</sub> 是 Y、A、H、F、V、Y 或 L                                                       |

[0287]

|  |  |                                                          |  |
|--|--|----------------------------------------------------------|--|
|  |  | 或 V; X <sub>7</sub> 是任何氨基酸; X <sub>8</sub> 是除 I 之外的任何氨基酸 |  |
|--|--|----------------------------------------------------------|--|

[0288] 表1E:最终重链和轻链候选物及其变体的氨基酸序列(KCD119变体序列;CDR实施方案带有下划线。)

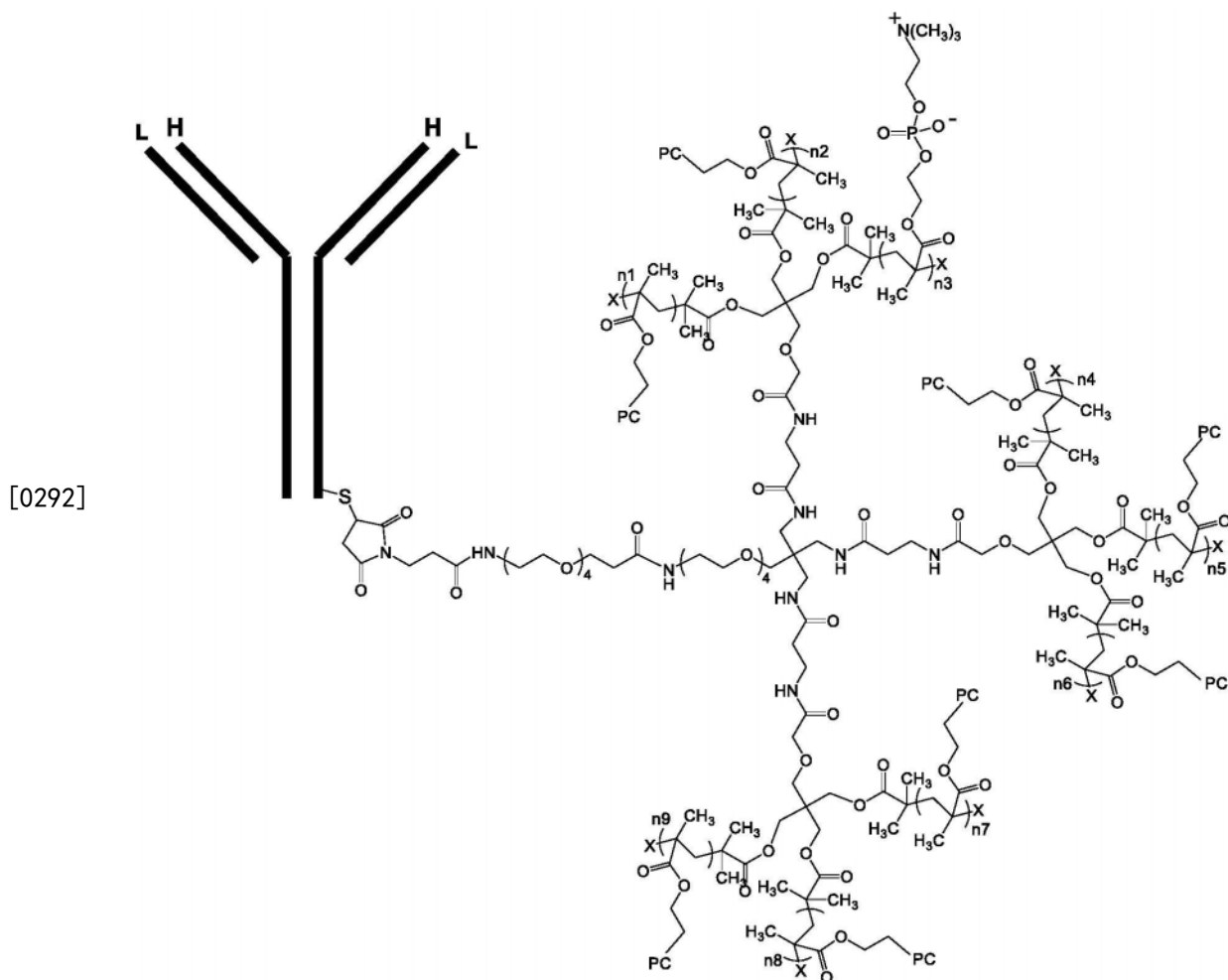
[0289]

| 重链               |                                                                                                                                              |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KCD119<br>TAF    | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPNTGDTSYNADF<br>KRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 698)    |
| 54V              | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPVTGDTSYNADF<br>KRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 699)    |
| 54I              | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTSYNADFK<br>RRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 700)    |
| 54V59D           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPVTGDTDYNADF<br>KRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 701)    |
| 54I59D           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTDYNADF<br>KRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGLTVTVSS<br>(SEQ ID NO: 702) |
| 34I54I59<br>D    | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTDYNADFK<br>RRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 703)    |
| 31S34I5<br>4I59D | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTDYNADFK<br>RRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 704)     |
| 34I54I59<br>D84S | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTDYNADFK<br>RRFTFSLDTSKSTAYLQMSSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 705)    |

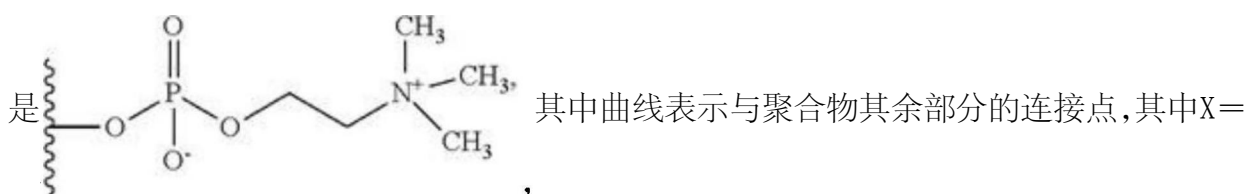
[0290]

|                         |                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 31S3415<br>4159D84<br>S | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY <sup>Y</sup> INWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTDYNADFK<br>RRFTFSLDTSKSTAYLQMSSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGT <sup>L</sup> LVTVSS (SEQ ID NO: 706)                        |
|                         |                                                                                                                                                                                             |
| 轻链                      |                                                                                                                                                                                             |
| KCD119<br>TAF           | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIYKV <sup>S</sup> NRFS <sup>G</sup> VP <sup>S</sup> SRF<br>SGSGSGTDFTLTIS <sup>S</sup> LQPEDFATYYCFQGSHVPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 707)  |
| 54R                     | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIRKV <sup>S</sup> NRFS <sup>G</sup> VP <sup>S</sup> SRFS<br>SGSGSGTDFTLTIS <sup>S</sup> LQPEDFATYYCFQGSHVPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 708) |
| 101V                    | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIYKV <sup>S</sup> NRFS <sup>G</sup> VP <sup>S</sup> SRF<br>SGSGSGTDFTLTIS <sup>S</sup> LQPEDFATYYCFQGSHVPVTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 709)  |
| 54R101<br>V             | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIRKV <sup>S</sup> NRFS <sup>G</sup> VP <sup>S</sup> SRFS<br>SGSGSGTDFTLTIS <sup>S</sup> LQPEDFATYYCFQGSHVPVTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 710) |
| 54G101<br>V             | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIGKV <sup>S</sup> NRFS <sup>G</sup> VP <sup>S</sup> SRF<br>SGSGSGTDFTLTIS <sup>S</sup> LQPEDFATYYCFQGSHVPVTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 711)  |

[0291] 本文描述的方法还可以包括,其中抗VEGF-A抗体缀合物具有以下结构:



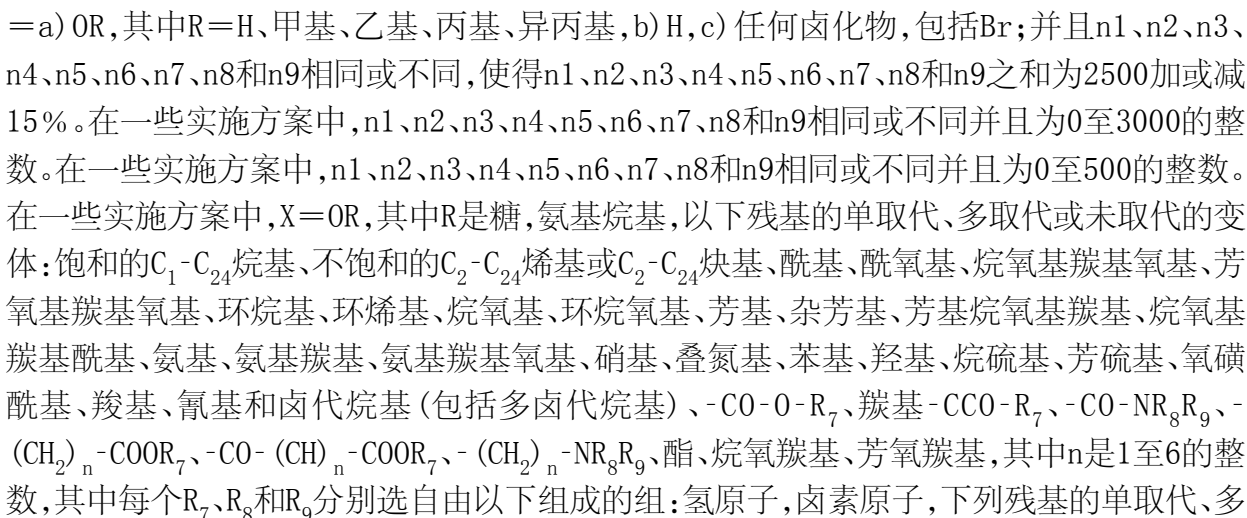
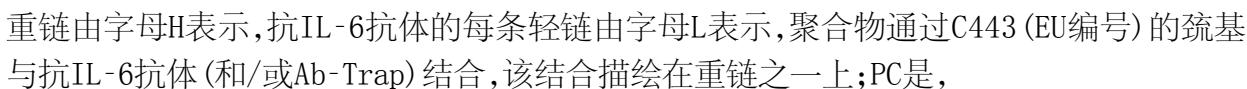
[0293] 其中:抗VEGF-A抗体的每条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示;聚合物通过C443(EU编号)的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上;PC



a) OR, 其中R=H、甲基、乙基、丙基、异丙基, b) H, 或c) 任何卤化物, 包括Br; 并且i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数; 或ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同, 使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

[0294] 在一些实施方案中, 抗VEGF A重链包含CDRH1: 即SEQ ID NO: 172中的CDRH1, CDRH2: 即SEQ ID NO: 173中的CDRH2, 和CDRH3: 即SEQ ID NO: 174中的CDRH3, 221位是T, 抗VEGF-A轻链包含CDRL1: 即SEQ ID NO: 199中的CDRL1, CDRL2: 即SEQ ID NO: 200中的CDRL2, 和CDRL3: 即SEQ ID NO: 201中的CDRL3, Kabat 4位是L。任选地, 抗VEGF A重链同种型是人IgG1。任选地, 抗VEGF-A重链的序列为SEQ ID NO: 7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个, 抗VEGF-A抗体轻链的序列为SEQ ID No: 91-93、28-30中的至少一个。在一些实施方案中, 与VEGF-A结合的抗体包含CDRH1, 即SEQ ID NO: 172中的CDRH1; CDRH2, 即SEQ ID NO: 173

[0295] 本文所述的方法还可以包括,其中抗IL-6抗体缀合物具有以下结构:



取代或未取代的变体:饱和的 $C_1$ - $C_{24}$ 烷基、不饱和的 $C_2$ - $C_{24}$ 烯基或 $C_2$ - $C_{24}$ 炔基、酰基、酰氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、杂芳基、芳基烷氧基羰基、烷氧基羰基酰基、氨基、氨基羰基、氨基羰基氧基、硝基、叠氮基、苯基、羟基、烷硫基、芳硫基、氧磺酰基、羧基、氰基和卤代烷基(包括多卤代烷基)、5元环和6元环。

[0297] 在一些实施方案中,抗IL-6抗体,或如本文中另外使用的,“IL-6抗体-VEGF Trap融合体”、“IL-6抗体-VEGF Trap”、“Ab IL-6-VEGF Trap”、“抗IL-6-VEGF Trap”、“VEGFR-抗IL6”、“VEGFR-抗IL-6”、“VEGF Trap-抗IL6抗体融合体(TAF)”、“VEGF Trap-IL6”、“VEGFR IL-6”、“IL6-VEGFR”或类似术语或反向术语(例如,“VEGF Trap-IL-6Ab”、“VEGF Trap-IL-6抗体融合体”等)表示IL-6抗体和VEGF Trap之间的融合体。图9中描绘了实施方案。当一般使用时,两个术语的顺序可以互换。当具体使用时,两个术语的顺序表示构建体中组件的相对位置。术语“Ab-Trap”、“IL-6Ab-VEGF Trap”、“Ab IL-6VEGF Trap”或“Ab IL-6-Trap”或“抗IL-6VEGF Trap”、“Trap-Ab”、抗IL-6-VEGFR、抗IL6-VEGFR或其他类似术语或反向术语(例如“VEGF Trap-IL-6Ab”、“VEGF Trap-IL-6抗体融合体”等)表示与VEGF结合蛋白的相关结构域融合的Ab的排列,从而提供VEGF trap。如上所述,VEGF结合蛋白的这一部分是阻止VEGF与VEGF受体结合的部分。如本文所述,Trap和抗体部分的排列(排序)可以变化。因此,除非另有明确说明或上下文另有说明,本文使用的关于Ab-Trap(或IL-6/VEGF Trap等)融合体的短语表示抗体和Trap定位的所有公开的实施方案。因此,除非另有说明,短语Ab-Trap(或IL-6/VEGF Trap等)表示图9中左侧的实施方案,和图9中右侧的实施方案,和图9中的两个实施方案。因此,为了方便起见,一般语言被表示为公开了所有三个选项。如果具体指明了方向,则可以通过例如陈述可以是以下之一的“排列”来指明:Trap-Ab、Trap IL-6Ab、VEGF Trap Ab IL-6、VEGF Trap Ab IL-6。类似地,将会理解,一些本公开实施例的上下文特定的分子取向或排列,其由实施例的上下文表示。对于本文提供的融合蛋白的所有讨论,两种排列(可选择的和组合的)都被明确考虑。此外,可以理解,当用于融合蛋白的上下文中时,由于排序,短语IL-6Ab包括两种选项,其中抗体是连续的(图9左手侧),以及其中TRAP位于Ab“内部”(图9右手侧)。同样,术语“Ab”或“抗体”,当用于融合蛋白的上下文中时(或其他类似术语),包括所有三个选项(图9左手侧,图9右手侧,和两个选项),除非另有说明。在一些实施方案中,VEGF Trap以下列方式之一与IL-6融合:与包含IL-6VH的重链的N-末端融合;或者在铰链区和包含IL-6VH的重链的CH1结构域之后的之间。在名称中使用Ab、抗体、“抗”或其他类似术语的命名来表示抗体或其片段时,这些命名之间没有区别。“IL-6”或“IL6”或“IL-6”的命名之间没有区别。如本文所用,当提及具有IL-6的融合构建体时,术语“VEGF”、“VEGFR”、“VEGF Trap”、“VEGFR Trap”可互换使用。当与IL-6融合排列分开使用时,这些术语可以具有不同的含义,这将取决于所讨论术语的上下文。

[0298] 在一些实施方案中,抗体可以与VEGF Trap序列连接或融合。在一些实施方案中,该Trap序列可以如表2A示出。在一些实施方案中,该序列与表2A中示出的序列至少80%相同,例如,与2A中示出的序列至少80、85、90、95、96、97、98、99%相同。在一些实施方案中,在美国公开号20150376271中的任何VEGF Trap分子都可以在本文使用。在一些实施方案中,VEGF Trap序列以下列方式之一与IL-6融合:与包含IL-6VH的重链的N末端融合(图9左侧),或者在铰链区和包含IL-6VH的重链的CH1结构域之后的之间(图9右侧)。除非另有说明,否则对于本文提供的其中讨论了任何Ab-Trap融合体的实施方案,考虑了两种可选择的选项

和两种选项一起。在一些实施方案中,术语“Trap”是指全长细胞外区或其任何部分,或来自不同VEGF受体的部分的组合,其可以拮抗至少一种VEGF和VEGFR之间的信号传导。优选地,细胞外trap区段包括至少一个来自VEGFR-1、-2或-3之一的结构域,更优选至少两个连续结构域,例如D2和D3。任选地,细胞外结构域包括来自至少两种不同VEGFRs的至少一个结构域。优选的细胞外结构域包含VEGFR-1的D2和VEGFR-2的D3或基本上由VEGFR-1的D2和VEGFR-2的D3组成。

[0299] 表2A: VEGFR1, 结构域2和VEGFR2, 结构域3融合序列。

[0300]

|                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------|
| SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHL |
| YKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL      |
| TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO: 114)                                     |

[0301] 在一些实施方案中,IL-6Ab VEGF Trap构建体可具有表2B或2B-1中提供的任何序列。在一些实施方案中,构建体可以至少与表2B或2B-1中的序列相同,例如80、85、90、95、96、97、98、99或更高。在一些实施方案中,融合蛋白可以符合那些百分比,除了抗体IL-6结构域不包含表1E中的一种或多种CDR。在一些实施方案中,融合蛋白是包含图5中一种或多种已鉴定序列的融合蛋白,例如一种或多种CDR(包括2、3、4、5或6种盒式(boxed)CDR)和/或整个重链和轻链可变区,以及VEGF Trap序列(例如,表2C)。在一些实施方案中,序列可以彼此直接融合。在一些实施方案中,可以使用一种或多种柔性连接序列或部分。连接序列可以位于Ab序列和VEGF Trap序列之间。这些序列的长度可以是5至30个氨基酸。在一些实施方案中,连接序列可以包括比例约为4:1的G和S。在一些实施方案中,接头包括以下序列:GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:748)。在一些实施方案中,可以使用任何柔性接头。在一些实施方案中,IL-6Ab的Fc部分是IgG1。

[0302] 表2B: 双重抑制剂分子的重链和轻链序列。在重链和轻链中CDR带有下划线, VEGFtrap序列用黑色粗体表示, Gly-Ser接头用斜体表示。

[0303]

| ID | 重链                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 轻链                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A  | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNI<br>TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEI<br>GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPS<br>HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK<br>HQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS<br>DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSG<br>GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP<br>FAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVT<br>DRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ<br>LWGYALDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPS<br>SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN<br>VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA<br>GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASISVSYLYW<br>YQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG<br>TDFLTISLQPEDFATYYCQQWSGYPTYFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 730) |

[0304]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSCSPGK (SEQ ID NO: 712)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| B | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNI<br>TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEI<br>GLLTCEATVNGHLYKTNLYTHRQTNTIIDVVLSPS<br>HGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK<br>HQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS<br>DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSG<br>GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP<br><u>FAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVT</u><br><u>DRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ</u><br><u>LWGYALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS</u><br>SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN<br>VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA<br>GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSCSPGK (SEQ ID NO: 713) | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>SASISVS</u> SYLYW<br>YQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG<br>TDFLTISLQPEDFATYYCQQWSGYPTYFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 731) |
| C | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNI<br>TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>SASISVS</u> SYLYW<br>YQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG                                                                                                                                                                                     |

[0305]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | <p>             GLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQNTNIIDVVLSPS<br/>             HGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK<br/>             HQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS<br/>             DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSG<br/>             GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP<br/> <u>FAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVT</u><br/> <u>DRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ</u><br/> <u>LWGYALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS</u><br/>             SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br/>             GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN<br/>             VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA<br/>             GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br/>             PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br/>             SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK<br/>             AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br/>             YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY<br/>             SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br/>             LSCSPGK (SEQ ID NO: 714)           </p> | <p>             TDFLTITSSLPEDFATYYCQOWSGYPYTFGQG<br/>             TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br/>             LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br/>             DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br/>             QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 732)           </p>                                                                                                       |
| D | <p>             SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNI<br/>             TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI<br/>             GLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQNTNIIDVVLSPS<br/>             HGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK<br/>             HQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS<br/>             DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSG<br/>             GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP<br/> <u>FAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV</u><br/> <u>TDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u><br/> <u>QLWGYALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP</u> </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <p>             DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASISVSYLW<br/>             YQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG<br/>             TDFLTITSSLPEDFATYYCQOWSGYPYTFGQG<br/>             TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br/>             LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br/>             DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br/>             QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 733)           </p> |

[0306]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN<br>VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA<br>GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKS<br>LSCSPGK (SEQ ID NO: 715)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| E | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNI<br>TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEI<br>GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPS<br>HGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK<br>HQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS<br>DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSG<br>GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP<br><u>FAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV</u><br><u>TDRFTSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u><br><u>QLWGYIALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP</u><br>SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN<br>VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA<br>GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>SASISVS</u> SYLYW<br>YQKPGKAPK <u>LLIYDASSLAS</u> GVPSRFSGSGSG<br>TDFLTISSLQPEDFATYYC <u>QQWSGYPYTF</u> GQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 734) |

[0307]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS<br>LSCSPGK (SEQ ID NO: 716)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| F | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNI<br>TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEI<br>GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPS<br>HGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK<br>HQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS<br>DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSG<br>GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP<br>FAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV<br>TDRFTSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<br>QLWGYALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP<br>SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN<br>VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA<br>GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKS<br>LSCSPGK (SEQ ID NO: 717) | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASISVSYLEW<br>YQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG<br>TDFLTITSLQPEDFATYYCQQWSGYPTYFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 735) |
| G | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNI<br>TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEI<br>GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPS<br>HGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK<br>HQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS<br>DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASISVSYLEW<br>YQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG<br>TDFLTITSLQPEDFATYYCQQWSGYPTYFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH                                      |

[0308]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | <p>GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP<br/> <u>FAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV</u><br/> <u>TDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u><br/> <u>QAWGYIALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP</u><br/> SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br/> GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN<br/> VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA<br/> GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br/> PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br/> SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK<br/> AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br/> YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY<br/> SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS<br/> LSCSPGK (SEQ ID NO: 718)</p>               | <p>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 736)</p>                                                                                                                                                                                                                                      |
| H | <p>SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNI<br/> TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFHISNATYKEI<br/> GLLTCEATVNGHLYKTNLYTHRQTNTIIDVVLSPS<br/> HGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK<br/> HQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS<br/> DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSG<br/> GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP<br/> <u>FAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV</u><br/> <u>TDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u><br/> <u>QAWGYIALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP</u><br/> SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br/> GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN<br/> VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA<br/> GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSILYW<br/> YQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG<br/> TDFLTISLQPEDFATYYCQWWSGYPYTFGQG<br/> TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br/> LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br/> DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br/> QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 737)</p> |

[0309]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSCSPGK (SEQ ID NO: 719)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| I | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNI<br>TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEI<br>GLLTCEATVNGHLYKTNLYTHRQTNTIIDVVLSPS<br>HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK<br>HQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS<br>DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSG<br>GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP<br><u>FAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV</u><br><u>TDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u><br><u>QAWGYIALDIWGQGT</u> LVTVSSASTKGPSVFPLAP<br>SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN<br>VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA<br>GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSCSPGK (SEQ ID NO: 720) | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>SASISVSYLYW</u><br>YQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG<br>TDFLTITSSLPEDFATYYCQQWSGYPTFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 738) |
| J | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAIS<br><u>WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>SASISVSYLYW</u><br>YQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG                                                                                                                                                                                     |

[0310]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | <p>TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC<u>ARQLWG</u><br/> <u>YYALDV</u>WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST<br/> SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHT<br/> FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br/> PSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGSSDTGRPFVE<br/> MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL<br/> DTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATV<br/> NGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK<br/> LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNR<br/> DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS<br/> SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGA<br/> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br/> KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL<br/> TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br/> GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS<br/> DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL<br/> TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC<br/> SPGK (SEQ ID NO: 721)</p> | <p>TDFLTITSSLPEDFATYYC<u>QQWSGYPYTFGQG</u><br/> TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br/> LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br/> DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br/> QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 739)</p>                                                                                     |
| K | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFPAIS<br/> WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF<br/> TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC<u>ARQLWG</u><br/> <u>YYALDV</u>WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST<br/> SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHT<br/> FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br/> PSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGSSDTGRPFVE<br/> MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL<br/> DTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATV<br/> NGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC<u>SASISVS</u>LYW<br/> YQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG<br/> TDFLTITSSLPEDFATYYC<u>QQWSGYPYTFGQG</u><br/> TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br/> LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br/> DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br/> QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 740)</p> |

[0311]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | <p>LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR</p> <p>DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS</p> <p>SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCAPEAAGA</p> <p>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</p> <p>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL</p> <p>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</p> <p>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS</p> <p>DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL</p> <p>TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSC</p> <p>SPGK (SEQ ID NO: 722)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| L | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAIS</p> <p>WVRQAPGKGLEWYAKISPGGSWYYSDTVTDRF</p> <p>TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWG</p> <p>YYALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</p> <p>SGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHT</p> <p>FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK</p> <p>PSNTKVDKKVEPKSCGGGSGGGGSSDTGRPFVE</p> <p>MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL</p> <p>DTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATV</p> <p>NGHLYKTNLYLTHRQNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK</p> <p>LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR</p> <p>DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS</p> <p>SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCAPEAAGA</p> <p>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</p> <p>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL</p> <p>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</p> <p>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS</p> <p>DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLEW</p> <p>YQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG</p> <p>TDFLTITSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG</p> <p>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL</p> <p>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</p> <p>DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH</p> <p>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 741)</p> |

[0312]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC<br>SPGK (SEQ ID NO: 723)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| M | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> TFSPFAWS<br>WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF<br>TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQLWG</u><br><u>YYALDV</u> WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST<br>SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br>PSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGSSDTGRPFVE<br>MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPL<br>DTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATV<br>NGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK<br>LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNR<br>DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS<br>SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGA<br>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS<br>DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC<br>SPGK (SEQ ID NO: 724) | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASISVSYLEW<br>YQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG<br>TDFLTITSSLPEDFATYYCQQWSGYPTYFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 742) |
| N | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> TFSPFAWS<br>WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF<br>TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQLWG</u><br><u>YYALDV</u> WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST<br>SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASISVSYLEW<br>YQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG<br>TDFLTITSSLPEDFATYYCQQWSGYPTYFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH                                      |

[0313]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | <p>PSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGSSDTGRPFVE</p> <p>MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL</p> <p>DTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATV</p> <p>NGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK</p> <p>LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNR</p> <p>DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS</p> <p>SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCAPEAAGA</p> <p>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</p> <p>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL</p> <p>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</p> <p>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS</p> <p>DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSKL</p> <p>TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL</p> <p>SPGK (SEQ ID NO: 725)</p>              | <p>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 743)</p>                                                                                                                                                                                                                                                      |
| O | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAWS</p> <p>WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF</p> <p>TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWG</p> <p>YYALDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</p> <p>SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHT</p> <p>FPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHK</p> <p>PSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGSSDTGRPFVE</p> <p>MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL</p> <p>DTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATV</p> <p>NGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK</p> <p>LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNR</p> <p>DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS</p> <p>SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCAPEAAGA</p> <p>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYYLYW</p> <p>YQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG</p> <p>TDFTLTISSLQPEDFATYYCQOWSGYPYTFGQG</p> <p>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL</p> <p>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</p> <p>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH</p> <p>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 744)</p> |

[0314]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | <p>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL</p> <p>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</p> <p>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS</p> <p>DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL</p> <p>TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS</p> <p>SPGK (SEQ ID NO: 726)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| P | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMH</p> <p>WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWYYSDTVTDRF</p> <p>TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQAW</p> <p>GYALDIWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS</p> <p>TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH</p> <p>TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH</p> <p>KPSNTKVDKKVEPKSCGGGSGGGGSSDTGRPFV</p> <p>EMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKFP</p> <p>LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEAT</p> <p>VNGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPSHGIELSVGE</p> <p>KLVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVN</p> <p>RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAA</p> <p>SSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAG</p> <p>APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE</p> <p>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV</p> <p>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</p> <p>KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP</p> <p>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK</p> <p>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS</p> <p>CSPGK (SEQ ID NO: 727)</p> | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASISVSYLEW</p> <p>YQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG</p> <p>TDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG</p> <p>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL</p> <p>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</p> <p>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH</p> <p>QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 745)</p> |
| Q | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMH</p> <p>WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWYYSDTVTDRF</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASISVSYLEW</p> <p>YQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG</p>                                                                                                                                                                                                          |

[0315]

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | <p>TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC<u>ARQAW</u><br/> <u>GYVALDI</u>WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS<br/> TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH<br/> TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br/> KPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGSSDTGRPFV<br/> EMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKFP<br/> LDTLIPDGKRRIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEAT<br/> VNGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPSHGIELSVGE<br/> KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVN<br/> RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAA<br/> SSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAG<br/> APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE<br/> VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV<br/> LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA<br/> KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP<br/> SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFLYSK<br/> LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br/> CSPGK (SEQ ID NO: 728)</p> | <p>TDFTLTISSLQPEDFATYYC<u>QQWSGYPYTFGQG</u><br/> TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br/> LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br/> DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br/> QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 746)</p>                                                                                        |
| R | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMH<br/> WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWYYSDTVTDRF<br/> TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC<u>ARQAW</u><br/> <u>GYVALDI</u>WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS<br/> TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH<br/> TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br/> KPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGSSDTGRPFV<br/> EMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKFP<br/> LDTLIPDGKRRIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEAT<br/> VNGHLYKTNYLTHRQNTIIDVVLSPSHGIELSVGE</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <p>DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC<u>SASISVS</u>SYLYW<br/> YQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG<br/> TDFTLTISSLQPEDFATYYC<u>QQWSGYPYTFGQG</u><br/> TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br/> LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br/> DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br/> QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 747)</p> |

[0316]

|                                      |
|--------------------------------------|
| KLVLNCTARTELVNVDGIDFNWEYPSSKHQHKLVN  |
| RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAA  |
| SSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAG   |
| APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE |
| VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV    |
| LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA   |
| KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  |
| SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK   |
| LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS    |
| CSPGK (SEQ ID NO: 729)               |

[0317] 表2B-1:

[0318]

| SEQ ID NO: | 序列                                                                                                                                                                                               |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENN<br>LNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFSSEEQARAVQMSTKV<br>LIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHILRSFKEFLQSSLRAL<br>RQM |
| 2          | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYY<br>SDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYYALDVWGQGLTVTVSS                                                                      |
| 3          | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSR<br>FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIK                                                                                   |

[0319] 表2C:抗IL-6重链可变区序列。CDR带有下列线。

[0320]

| ID | 序列                                                                                                                                          |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTFS<br>LDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYYALDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 89) |
| II | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF                                                                      |

[0321]

|     |                                                                                                                                                       |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQLWGYYALDV</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 90)                                                                            |
| Ila | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQAWGYYALDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 256) |
| Iib | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQSWGYYALDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 257) |
| Iic | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQGWGYYALDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 258) |
| Iid | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQTWGYYALDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 259) |
| Iie | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQVWGYYALDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 260) |
| Iif | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQQWGYYALDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 261) |
| Iig | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARQKWGYYALDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 262) |

[0322] 表2D: 抗IL-6轻链可变区序列。CDR带有下列线。

[0323]

| ID  | 序列                                                                                                                                     |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| III | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTTTCSASISVSYLEWYQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQPEDFATYYC <u>QQWSGYPYTF</u> GQGTKVEIK (SEQ ID NO: 91) |
| IV  | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTTTCSASISVSYLEWYQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQPEDFATYYC <u>QQWSGYPYTF</u> GQGTKVEIK (SEQ ID NO: 92) |
| V   | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTTTCSASISVSYLEWYQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQPEDFATYYC <u>QQWSGYPYTF</u> GQGTKVEIK (SEQ ID NO: 93) |

[0324] 在一些实施方案中, 抗体具有一种或多种(或任何)以下CDR: 表2E (其包括表2E1、表2E2和/或表2E3)。

[0325] 表2E1

[0326]

|    |      | 序列                                |
|----|------|-----------------------------------|
| 重链 | CDR1 | GFTFSPFAMS (SEQ ID NO: 94)        |
|    | CDR2 | KISPGGSWTYYSDTVTG (SEQ ID NO: 95) |
|    | CDR3 | QLWGYIALDI (SEQ ID NO: 171)       |
|    |      |                                   |
| 轻链 | CDR1 | SASISVSYMY (SEQ ID NO: 96)        |
|    | CDR2 | DMSNLAS (SEQ ID NO: 97)           |
|    | CDR3 | MQWSGYPYT (SEQ ID NO: 98)         |

[0327] 表2E2

[0328]

|    |      | 序列                                 |
|----|------|------------------------------------|
| 重链 | CDR1 | PFAMS (SEQ ID NO: 244)             |
|    | CDR2 | KISPGGSWTYYSDTVTG (SEQ ID NO: 245) |
|    | CDR3 | QLWGYIALDI (SEQ ID NO: 246)        |
|    |      |                                    |
| 轻链 | CDR1 | SASISVSYMY (SEQ ID NO: 247)        |
|    | CDR2 | DMSNLAS (SEQ ID NO: 248)           |
|    | CDR3 | MQWSGYPYT (SEQ ID NO: 249)         |

[0329] 表2E3

[0330]

|    |      | 序列                                    |
|----|------|---------------------------------------|
| 重链 | CDR1 | GFTFSPFAMS (SEQ ID NO: 250)           |
|    | CDR2 | WVAKISPGGSWTYYSDTVTG (SEQ ID NO: 251) |
|    | CDR3 | ARQLWGYIALDI (SEQ ID NO: 252)         |
|    |      |                                       |
| 轻链 | CDR1 | SASISVSYMY (SEQ ID NO: 253)           |
|    | CDR2 | LLIYDMSNLAS (SEQ ID NO: 254)          |

[0331]

|  |      |                            |
|--|------|----------------------------|
|  | CDR3 | MQWSGYPYT (SEQ ID NO: 255) |
|--|------|----------------------------|

[0332] 在一些实施方案中, IL-6拮抗抗体包含表2C、2D、2E1、2E2和/或2E3中示出的任何一个重链可变区的三种CDR。在一些实施方案中, 抗体包含表2C、2D、2E1、2E2和/或2E3中示出的任何一个轻链可变区的三种CDR。在一些实施方案中, 抗体包含表2C中示出的任何一个重链可变区的三种CDR, 和表2D中示出的任何一个轻链可变区的三种CDR。在一些实施方案中, CDR是下表3 (包括表3A和/或3B) 或表4 (包括表4A和/或4B) 中指定的一种或多种:

[0333] 表3A: 抗IL-6重链CDR序列。

| ID  | CDR1                        | CDR2                                 | CDR3                          |
|-----|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| I   | GFTFSPFAIS (SEQ ID NO: 99)  | VAKISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO: 100) | ARQLWGYYALDV (SEQ ID NO: 101) |
| II  | GFTFSPFAWS (SEQ ID NO: 102) | VAKISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO: 103) | ARQLWGYYALDV (SEQ ID NO: 104) |
| Ila | GFTFSPFAMH (SEQ ID NO: 49)  | VAKISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO: 50)  | ARQAWGYYALDI (SEQ ID NO: 51)  |
| Ilb | GFTFSPFAMH (SEQ ID NO: 52)  | VAKISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO: 53)  | ARQSWGYYALDI (SEQ ID NO: 54)  |
| Ilc | GFTFSPFAMH (SEQ ID NO: 55)  | VAKISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO: 56)  | ARQGWGYYALDI (SEQ ID NO: 57)  |
| IId | GFTFSPFAMH (SEQ ID NO: 58)  | VAKISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO: 59)  | ARQTWGYYALDI (SEQ ID NO: 60)  |
| Ile | GFTFSPFAMH (SEQ ID NO: 61)  | VAKISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO: 62)  | ARQVWGYYALDI (SEQ ID NO: 63)  |
| IIf | GFTFSPFAMH (SEQ ID NO: 64)  | VAKISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO: 65)  | ARQQWGYYALDI (SEQ ID NO: 66)  |
| IIg | GFTFSPFAMH (SEQ ID NO: 67)  | VAKISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO: 68)  | ARQKWGYYALDI (SEQ ID NO: 69)  |

[0335]

|  |     |                 |         |
|--|-----|-----------------|---------|
|  | 67) | (SEQ ID NO: 68) | NO: 69) |
|--|-----|-----------------|---------|

[0336] 表3B: 抗IL-6重链CDR序列。

[0337]

| CDR1                   | CDR2                               | CDR3                        |
|------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| PFAMH (SEQ ID NO. 172) | KISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO. 173) | QAWGYALDI (SEQ ID NO. 174)  |
| PFAMH (SEQ ID NO. 175) | KISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO. 176) | QSWGYYALDI (SEQ ID NO. 177) |
| PFAMH (SEQ ID NO. 178) | KISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO. 179) | QGWGYALDI (SEQ ID NO. 180)  |
| PFAMH (SEQ ID NO. 181) | KISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO. 182) | QTWGYALDI (SEQ ID NO. 183)  |
| PFAMH (SEQ ID NO. 184) | KISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO. 185) | QVWGYALDI (SEQ ID NO. 186)  |
| PFAMH (SEQ ID NO. 187) | KISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO. 188) | QQWGYALDI (SEQ ID NO. 189)  |
| PFAMH (SEQ ID NO. 190) | KISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO. 191) | QKWGYALDI (SEQ ID NO. 192)  |
| PFAIS (SEQ ID NO. 193) | KISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO. 194) | QLWGYALDV (SEQ ID NO. 195)  |
| PFAWS (SEQ ID NO. 196) | KISPGGSWTYYSDTVTD (SEQ ID NO. 197) | QLWGYALDV (SEQ ID NO. 198)  |

[0338] 表4A: 抗IL-6轻链CDR序列。

[0339]

| ID  | CDR1                        | CDR2                         | CDR3                       |
|-----|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| III | SASISVSYLY (SEQ ID NO: 105) | LLIYDDSSLAS (SEQ ID NO: 106) | QQWSGYPYT (SEQ ID NO: 107) |
| IV  | SASISVSYLY (SEQ ID NO: 108) | LLIYDASSLAS (SEQ ID NO: 109) | QQWSGYPYT (SEQ ID NO: 110) |

[0340]

|   |                             |                              |                            |
|---|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| V | SASISVSYLY (SEQ ID NO: 111) | LLIYDDSNLAS (SEQ ID NO: 112) | QQWSGYPYT (SEQ ID NO: 113) |
|---|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|

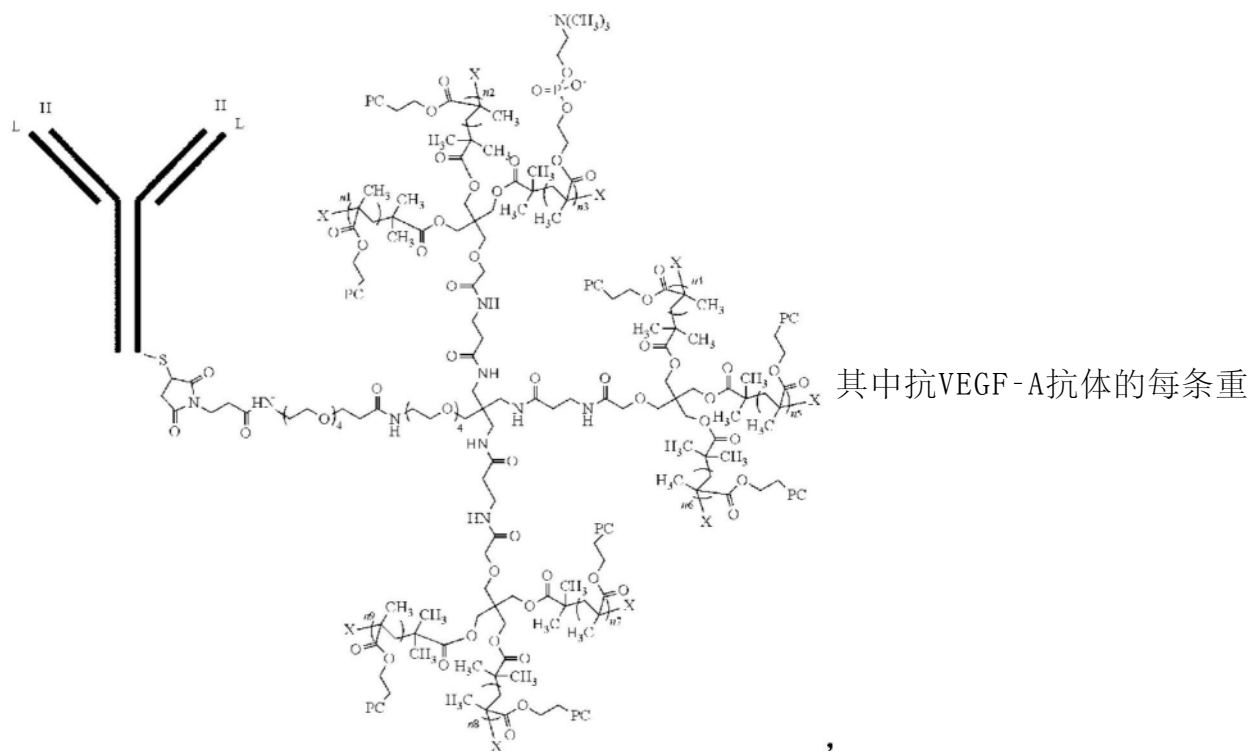
[0341] 表4B: 抗IL-6轻链CDR序列。

[0342]

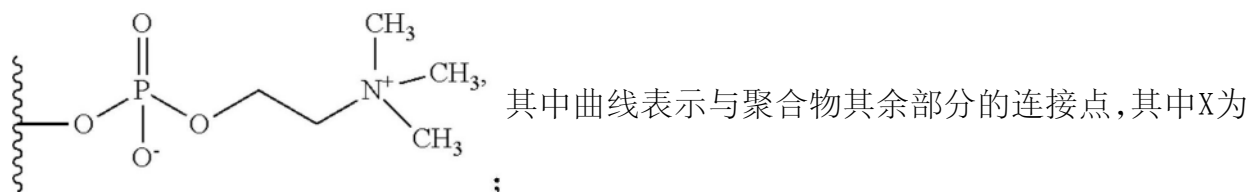
| CDR1                      | CDR2                   | CDR3                     |
|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| SASISVSYLY SEQ ID NO.199) | DDSSLAS SEQ ID NO.200) | QQWSGYPYT SEQ ID NO.201) |
| SASISVSYLY SEQ ID NO.202) | DASSLAS SEQ ID NO.203) | QQWSGYPYT SEQ ID NO.204) |
| SASISVSYLY SEQ ID NO.205) | DDSNLAS SEQ ID NO.206) | QQWSGYPYT SEQ ID NO.207) |

[0343] 在一些实施方案中,用于结合IL-6的抗体可以是包括表2C、2D、2E1、2E2、2E3、3A、3B、4A和/或4B中的一个或多个序列的抗体。在一些实施方案中,用于结合IL-6的抗体可以是包括表2C、2D、2E1、2E2、2E3、3A、3B、4A和/或4B中的三个或更多个序列的抗体。在一些实施方案中,用于结合IL-6的抗体可以是包括表2C、2D、2E1、2E2、2E3、3A、3B、4A和/或4B的任一个中的六个序列的抗体。在一些实施方案中,与IL-6结合的抗体可以是与包括表2C、2D、2E1、2E2、2E3、3A、3B、4A和/或4B的任一个中的6个指定CDR的抗体竞争结合的抗体。

[0344] 本文所述的方法还可以包括,其中抗体缀合物具有式(I)的结构,



链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示;聚合物通过C443(EU编号)的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上;PC是:



a) —OR, 其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基, b) —H, c) 任何卤素, 包括—Br、—Cl或—I, d) —SCN, 或e) —NCS; 并且i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数; 或ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同, 使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

[0345] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括回收细胞培养物上清液,其中细胞培养物上清液包含目的蛋白质,将细胞培养物上清液处理成洗脱液,其中洗脱液包含目的蛋白质,将洗脱液上样到亲和层析基质中,用包含Tris或磷酸钠的第一洗涤缓冲液洗涤,用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤,用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品,用低pH病毒缓冲液灭活洗出液中存在的病毒污染物以得到病毒灭活的洗出液,过滤病毒灭活的洗出液,对病毒灭活的洗出液进行至少一轮离子交换层

析,并过滤病毒灭活的洗出液以得到渗余物,其中渗余物包含目的蛋白质。

[0346] 在一些实施方案中,该方法还可以包括,其中细胞培养物上清液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。该方法还可以包括,其中处理细胞培养物上清液包括从细胞培养物中收获细胞产品。该方法还可以包括,其中澄清细胞培养物以去除细胞和细胞碎片。该方法还可以包括,其中洗脱液包含澄清的细胞培养物上清液。一种使用亲和层析纯化蛋白质的方法,该方法包括使上样流体与介质接触,其中介质是结合目的蛋白质的亲和层析基质,用包含离液剂的缓冲溶液洗涤介质,其中离液剂是盐,并在适于洗脱目的蛋白质的条件下使洗涤过的介质与洗脱溶液接触。

[0347] 在一些实施方案中,提供了一种生产产品的方法。该方法包括将含有目的蛋白质的溶液施加到亲和层析基质上,用第一缓冲液洗涤亲和层析基质,用含有离液剂的第二缓冲液洗涤亲和层析基质,用第三缓冲液洗涤亲和层析基质以去除离液剂,用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。

[0348] 在一些实施方案中,提供了一种蛋白质纯化系统。该系统包括:柱,其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白;包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液;包含tris的中间洗涤缓冲液;包含氯化镁的第二洗涤缓冲液;和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

[0349] 在一些实施方案中,提供了一种蛋白质纯化系统。该系统包括:柱,其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白;包含tris和盐的第一tris洗涤缓冲液;中间tris洗涤缓冲液;包含氯化镁的第二洗涤缓冲液;和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

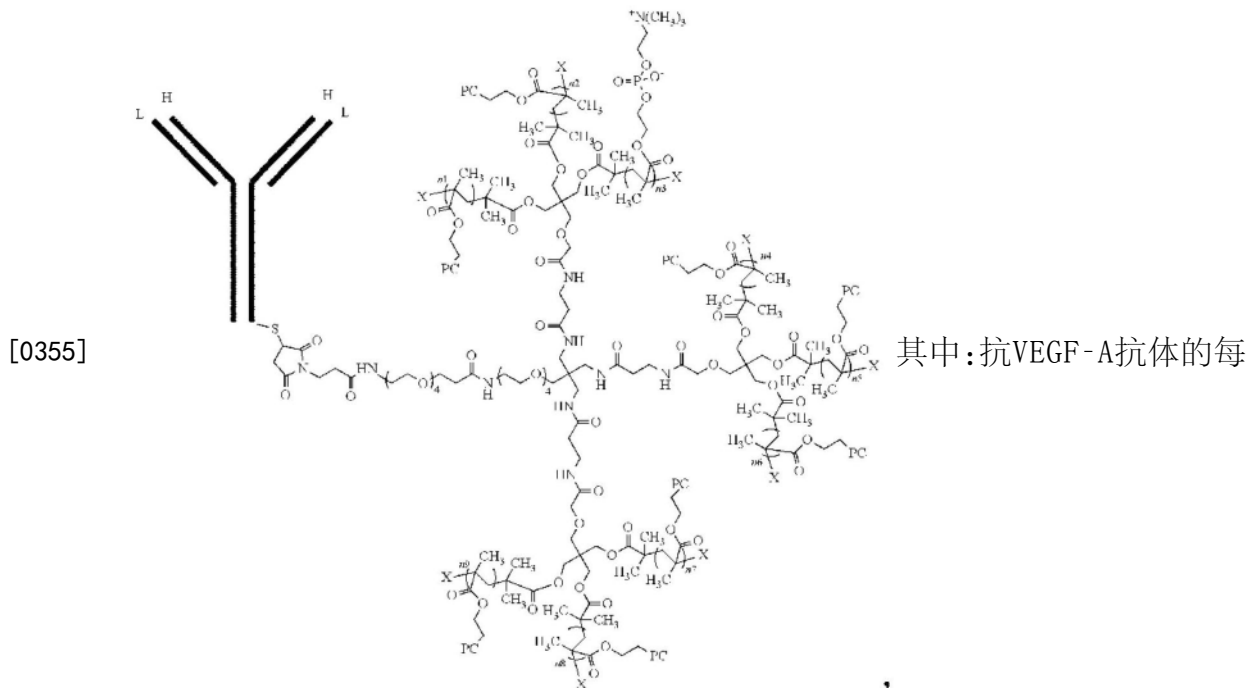
[0350] 在一些实施方案中,该系统还可以包括,其中柱包含用于亲和层析的配体。该系统还可以包括,其中配体包括蛋白A或蛋白G。该系统还可以包括,其中包含磷酸钠和盐的第一洗涤缓冲液具有5.5至9.5之间的pH。该系统还可以包括,其中包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液包含约50mM磷酸钠。该系统还可以包括,其中包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液包含约250mM NaCl。该系统还可以包括,其中第一tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。该系统还可以包括,其中第一tris洗涤缓冲液还包含约250mM NaCl。该系统还可以包括,其中中间tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。该系统还可以包括,其中第一tris洗涤缓冲液的pH为约7.2。该系统还可以包括,其中第二洗涤缓冲液的pH为约7.8。该系统还可以包括,其中第二洗涤缓冲液中氯化镁的浓度为约2.8M。该系统还可以包括,其中洗脱缓冲液中甲酸钠的浓度包含10mM。

[0351] 在一些实施方案中,提供了一种蛋白质纯化系统。该系统包括具有与抗体结合的蛋白A树脂的柱,其中抗体包括分别为SEQ ID:2和SEQ ID 1的轻链和重链,包含离液盐的离液洗涤缓冲液,和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

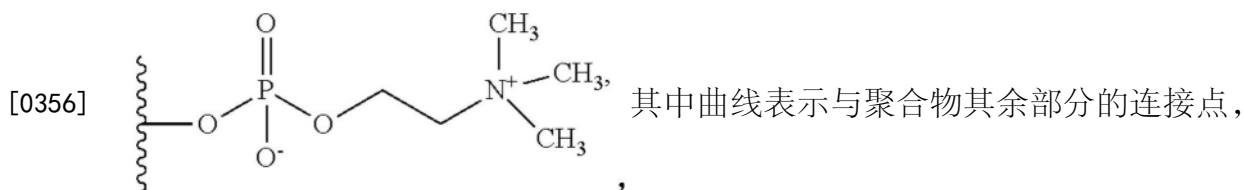
[0352] 本文所述的方法还可以包括,其中目的蛋白质是双特异性抗体。本文所述的方法还可以包括,其中双特异性抗体对VEGF和IL-6具有特异性。本文所述的方法还可以包括,其中目的蛋白质是抗体缀合物。本文所述的方法还可以包括,其中亲和层析基质是蛋白A层析基质。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液中的离液剂包含镁盐。本文所述的方法还可以包括,其中镁盐的浓度在1.5-3.5M之间。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液中的离液剂包含钙盐。本文所述的方法还可以包括,其中钙盐的浓度在1-3M之间。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液中的离液剂包含胍盐。本文所述的方法还可以包括,其中胍盐的浓度在0.05-3M之间。

[0353] 本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液还包含tris。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液中tris的浓度至少为5mM。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液的pH大于5.5。本文所述的方法还可以包括,其中洗出液还含有病毒杂质。本文所述的方法还可以包括去除病毒杂质。本文所述的方法还可以包括灭活病毒杂质。本文所述的方法还可以包括,在用缓冲溶液洗涤之前,用预洗涤缓冲溶液洗涤上样有上样流体的亲和层析基质。本文所述的方法还可以包括,在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。本文所述的方法还可以包括,其中预洗涤缓冲溶液包含磷酸钠。本文所述的方法还可以包括,其中预洗涤缓冲溶液包含Tris和盐。

[0354] 本文所述的方法还可以包括,其中抗体缀合物具有式(I)的结构,



条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示;聚合物通过C443 (EU编号) 的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上;PC是:



其中X为a) —OR,其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基,b) —H,c) 任何卤素,包括—Br、—Cl或—I,d) —SCN,或e) —NCS;并且i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数;或ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同,使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

[0357] 本文所述的方法还可以包括,其中抗体缀合物包含抗VEGF抗体缀合物,该抗VEGF抗体缀合物包含抗VEGF-A轻链和抗VEGF-A重链,其中抗VEGF-A抗体重链包含CDRH1:即SEQ ID NO:172中的CDRH1,CDRH2:即SEQ ID NO:173中的CDRH2,和CDRH3:即SEQ ID NO:174中的CDRH3,抗VEGF-A抗体轻链包含CDRL1:即SEQ ID NO:199中的CDRL1,CDRL2:即SEQ ID NO:200中的CDRL2,和CDRL3:即SEQ ID NO:201中的CDRL3。本文所述的方法还可以包括,其中抗

VEGF抗体缀合物包含：包含与聚合物结合的抗VEGF-A免疫球蛋白G (IgG) 的抗体缀合物，该聚合物包含MPC单体，其中抗VEGF-A抗体重链的序列为SEQ ID NO: 7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个，抗VEGF-A抗体轻链的序列为SEQ ID NO: 91-93、28-30中的至少一个，并且其中抗体在C449处与聚合物结合。本文所述的方法还可以包括，其中目的靶蛋白质通过细胞培养物产生。本文所述的方法还可以包括，其中细胞培养物包含CHO细胞。本文所述的方法还可以包括在用缓冲溶液洗涤之后，用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。本文所述的方法还可以包括用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除核酸、内毒素、消泡剂或除目的靶蛋白质之外的其他小分子。本文所述的方法还可以包括用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除杂质，同时保持目的靶蛋白质与亲和层析基质结合。本文所述的方法还可以包括用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除除目的靶蛋白质之外的宿主细胞蛋白质。本文所述的方法还可以包括，其中在缓冲溶液中添加离液剂不会洗脱目的靶蛋白质。本文所述的方法还可以包括病毒灭活、切向流过滤、渗滤、超滤、离子交换层析或病毒减少过滤中的一种或多种。本文所述的方法还可以包括，其中洗脱液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。本文所述的方法还可以包括，其中产品是目的蛋白质。本文所述的方法还可以包括，其中杂质包括宿主细胞蛋白质杂质。

[0358] 如本文所公开的，本公开的纯化方法有效地去除杂质，如宿主细胞蛋白质 (HCP)。如实施例中详细描述，该方法有效地减少了洗涤洗出液中的HCP，同时实现了目的蛋白质的高百分比产率和目的蛋白质的高浓度。例如，在各种实施方案中，本文所述的方法导致目的蛋白质的百分比产率大于80%、大于81%、大于82%、大于83%、大于84%、大于85%、大于86%、大于87%、大于88%、大于89%、大于90%、大于91%、大于92%、大于93%、大于94%、大于95%、大于96%、大于97%、大于98%或大于99%。

[0359] 如本文所公开的，本公开的纯化方法有效地从基于亲和层析的纯化方法中去除杂质。在一些实施方案中，基于层析的纯化方法包括基于流动相中的分析物和固定相中的配体之间的特异性大分子结合相互作用的方法。在一些实施方案中，该方法有效地减少了洗涤洗出液中的杂质，同时实现了目的种类的高百分比产率。在一些实施方案中，该方法有效地减少了洗涤洗出液中的杂质，同时实现了目的种类的高浓度。例如，在各种实施方案中，本文所述的方法导致目的种类的百分比产率大于80%、大于81%、大于82%、大于83%、大于84%、大于85%、大于86%、大于87%、大于88%、大于89%、大于90%、大于91%、大于92%、大于93%、大于94%、大于95%、大于96%、大于97%、大于98%或大于99%。

[0360] 如本文所公开的，本公开的纯化方法有效地从包含单克隆抗体 (mAb) 的样品中去除杂质。在一些实施方案中，包含mAb的残基可以被改变或工程改造以改变整体抗体形式或结构。在一些实施方案中，包含mAb的残基可以被改变或工程改造以调节对结合配偶体的结合效力。在一些实施方案中，包含mAb的残基可以被改变或工程改造以调节抗原结合位点的结合效力。在一些实施方案中，包含mAb的残基可以被改变或工程改造以调节缀合效力。在一些实施方案中，改变的残基可以是工程改造的半胱氨酸。在一些实施方案中，单克隆抗体包含特异性结合结构域，包括对VEGF具有特异性的结构域。在一些实施方案中，特异性结合结构域包含一种或多种VEGF受体的一种或多种细胞外组件。在一些实施方案中，结合结构域还包含Fc部分。

[0361] 表5列出了可能存在并可通过本方法去除的高风险HCP的常见种类。该表还包括对

制剂的药物产品的可能下游影响。没有本技术,一些HCP种类由于接近其他所需分子种类的物理化学性质而变得难以去除。在一些实施方案中,本文提供的任何一个或多个实施方案可用于去除表5的任何一种或多种物质。在一些实施方案中,目的产物选自表5的一种或多种物质。在一些实施方案中,目的蛋白质选自表5的一种或多种物质。难以去除的HCP可归类为分子量大于15kDa和/或pI在7.3至9.3之间的蛋白质。

[0362] 表5:HCP的常见种类A

[0363]

| 蛋白质名称                      | MW<br>(Da) | pI   | 功能                    | 影响            | 影响<br>类型             | 参考文献                                             |
|----------------------------|------------|------|-----------------------|---------------|----------------------|--------------------------------------------------|
| 78 kDa 葡萄糖调节蛋白(GRP78; BiP) | 72,379     | 5.07 | 内质网腔中的蛋白质折叠和质量控制      | 药物<br>质量      | 药物<br>聚集             | Farrell 等人, 2015; Liu 等人, 2019; Valente 等人, 2015 |
| $\alpha$ -烯醇酶              | 47,141     | 6.37 | 催化 2-磷酸甘油酸酯脱水为磷酸烯醇丙酮酸 | 药物<br>质量      | 药物<br>修饰             | Valente 等人, 2015; Zhang 等人, 2014                 |
| 膜联蛋白 A5 (ANXA5)            | 35,752     | 4.82 | 以高亲和力与磷脂结合并作为细胞凋亡的标志物 | 免疫<br>原性      | 免疫<br>应答             | Fukuda 等人, 2019; Gilgunn & Bones, 2018           |
| C-X-C 基序趋化因子 3 (CXCL3)     | 10,686     | 8.74 | 具有潜在致癌特性的细胞因子         | 生物<br>学功<br>能 | 免疫<br>应答             | Gilgunn & Bones, 2018; Gilgunn 等人, 2019          |
| 羧酸酯酶(CEB)a                 | 60,175     | 5.51 | 催化含酯或酰胺的底物裂解为醇和羧酸     | 制剂            | 聚山<br>梨醇<br>酯的<br>降解 | McShan 等人, 2016; Zhang 等人, 2020                  |
| 羧肽酶 D (Cpd)                | 152,406    | 5.77 | 释放 C-末端氨基酸的丝氨酸外肽酶     | 药物<br>质量      | 药物<br>修饰             | Hu 等人, 2016; Dick 等人, 2008; Park 等人, 2017        |

[0364]

|                   |        |      |                                  |      |          |                                                                   |
|-------------------|--------|------|----------------------------------|------|----------|-------------------------------------------------------------------|
| 组织蛋白酶(B, L, Z)a   | 37,280 | 5.57 | 负责细胞内蛋白水解的半胱氨酸蛋白酶                | 药物质量 | 药物碎片化    | Luo 等人, 2019; Migani 等人, 2017; Park 等人, 2017; Vanderlaan 等人, 2018 |
| 组织蛋白酶(D,E)a       | 43,021 | 4.67 | 在酸性和中性 pH 中均具有活性的天冬氨酸蛋白酶         | 药物质量 | 药物碎片化    | Bee 等人, 2017; Lima 等人, 2018; Robert 等人, 2009; Yang 等人, 2019       |
| 凝聚素(CLU)          | 51,656 | 5.45 | 多功能二硫键连接的异二聚体糖蛋白, 与细胞碎片清除和细胞凋亡相关 | 免疫原性 | 免疫应答     | Aboulaich 等人, 2014; Gilgunn & Bones, 2018; Goey 等人, 2018          |
| 谷胱甘肽 S 转移酶(GST)a  | 25,608 | 9.04 | 将还原型谷胱甘肽与外源性和内源性疏水亲电体缀合          | 免疫原性 | 免疫应答     | Goey 等人, 2018; Jawa 等人, 2016                                      |
| 脂蛋白脂肪酶(LPL)       | 53,109 | 7.95 | 催化 LDL 的三酰甘油水解并调节甘油三酯和 HDL 的血浆浓度 | 制剂   | 聚山梨醇酯的降解 | Chiu 等人, 2017; Levy 等人, 2014; Park 等人, 2017                       |
| 溶酶体酸性脂肪酶(LAL)     | 45,325 | 8.15 | 水解胆固醇酯和甘油三酯                      | 制剂   | 降解       | Levy 等人, 2014; McShan 等人, 2016                                    |
| 溶酶体磷脂酶 A2 (LPLA2) | 47,307 | 6.02 | 裂解甘油磷脂的酰基酯键以产生游离脂肪酸              | 制剂   | 聚山梨醇酯的降解 | Hall 等人, 2016; McShan 等人, 2016; Shayman 等人, 2011                  |
| 基质金属蛋白酶(MMP)a     | 70,460 | 9.25 | 负责细胞外基质蛋白降解的内肽                   | 药物质量 | 药物降解     | Gilgunn & Bones, 2018; Gilgunn 等人, 2019                           |

[0365]

|                                     |          |      |                             |         |        |                                                                                |
|-------------------------------------|----------|------|-----------------------------|---------|--------|--------------------------------------------------------------------------------|
|                                     |          |      | 酶类                          |         |        |                                                                                |
| 单核细胞趋化蛋白-1<br>(MCP-1)               | 16,326   | 9.81 | 作为 C-C 趋化因子受体的配体            | 人类的生物功能 | 细胞因子释放 | Leister 等人, 2019;<br>Vanderlaan 等人, 2018;<br>Yoshimura & Leonard, 1989         |
| 肽基-脯氨酰基顺反异构酶 A (PPIA)               | 18,012   | 7.68 | 催化肽键 N-末端顺反异构化为脯氨酸残基        | 药物质量    | 药物聚集   | Jawa 等人, 2013; Zhang 等人, 2016                                                  |
| 过氧化物酶<br>(Peroxiredoxin)<br>(PRDX)a | 22,263   | 8.22 | 调节细胞内过氧化氢的浓度                | 免疫原性    | 免疫应答   | Albrecht 等人, 2018;<br>Jawa 等人, 2016; Joucla 等人, 2013; Park 等人, 2017            |
| 磷脂酶 B 样 2<br>(PLBL2)                | 66,289   | 5.76 | 潜在催化磷脂水解为脂肪酸                | 免疫原性    | 免疫应答   | Fischer 等人, 2017; Jawa 等人, 2016; Tran 等人, 2016; Zhang 等人, 2020                 |
| 前胶原-赖氨酸-2-氧戊二酸-5-脱氧酶_1<br>(PLOD1)   | 83,595   | 6.08 | 催化胶原蛋白 $\alpha$ 链中赖氨酸残基的羟基化 | 免疫原性    | 免疫应答   | Hogwood 等人, 2016;<br>Jawa 等人, 2016                                             |
| 蛋白质二硫键异构酶<br>(PDI)                  | 57,010   | 4.78 | 催化二硫键的形成和断裂                 | 药物质量    | 药物聚集   | Aboulaich 等人, 2014;<br>Gilgunn & Bones, 2018;<br>Goey 等人, 2018; Maeda 等人, 2007 |
| 蛋白 S100a                            | 11,241   | 5.28 | 调节钙平衡、细胞凋亡、迁移、增殖、分化、能量代谢和炎症 | 免疫原性    | 免疫应答   | Gilgunn & Bones, 2018;<br>Gilgunn 等人, 2019                                     |
| 丙酮酸激酶(PK)                           | 62089.32 | 6.19 | 催化磷酸烯醇丙                     | 免疫      | 免疫     | Goey 等人, 2018; Jawa                                                            |

[0366]

|                                     |          |      |                         |                     |                      |                                                            |
|-------------------------------------|----------|------|-------------------------|---------------------|----------------------|------------------------------------------------------------|
|                                     | 58628.38 | 6.07 | 酮酸转化为丙酮酸,起到调节细胞代谢的作用    | 原性                  | 应答                   | 等人, 2016; Park 等人, 2017                                    |
| 丝氨酸蛋白酶<br>(HTRA1)                   | 51,214   | 7.82 | 降解蛋白聚糖并潜在地剪切(clip) N-末端 | 药物<br>质量            | 药物<br>修饰             | Dorai 等人, 2011;<br>Gilgunn & Bones, 2018;<br>Goey 等人, 2018 |
| 唾液酸 $\alpha$ -乙酰酯酶<br>(SIAE)        | 60,775   | 6.32 | 水解羧酸酯键                  | 制剂                  | 聚山<br>梨醇<br>酯的<br>降解 | Schauer 等人, 1988                                           |
| 转化生长因子- $\beta$<br>(TGF- $\beta$ 1) | 44,310   | 8.90 | 维持免疫稳态和免疫抑制             | 人类<br>的生<br>物功<br>能 | 细胞<br>因子<br>释放       | Beatson 等人, 2011;<br>Vanderlaan 等人, 2018                   |

[0367] 关于图1,公开了对来自无动物成分的细胞培养过程中的0G2072抗体进行纯化的过程100。该过程包括三个层析步骤,两个TFF(切向流过滤)步骤,以及低pH病毒灭活。首先,收集110澄清的细胞上清液。接下来,对澄清的细胞上清液进行亲和层析120。然后对亲和层析期间收集的输出洗出液进行低pH病毒灭活130,接着进行中间过滤140。然后进行进一步的几轮层析,包括阴离子交换层析150,然后是阳离子交换层析160。随后是病毒减少过滤170和最终超滤/渗滤180。

[0368] 低pH病毒灭活可包括将溶液在pH 3.5下保持240分钟,然后中和至pH 7。低pH病毒灭活可替代地包括在pH 3.5下保持60分钟,然后逐步中和至pH 5.5、6或6.5。MabSelect SuRe LX亲和层析(MSS LX)之后可以是病毒灭活/中和步骤,然后是第一TFF(TFF1)以调节抗体用于Sartobind Q阴离子交换层析(AEX层析)。然后进行POROS XS阳离子交换层析(CEX层析)和病毒减少过滤(Planova 20N)。POROS XS包括在10mM磷酸钠,pH 5,40mM NaCl,加上作为补充物的醋酸盐(<15mS/cm)下结合,随后从50mM醋酸钠,pH 6,10mM NaCl到50mM醋酸钠,pH 6,300mM NaCl梯度洗脱10CV。在包含50mM醋酸钠,pH 5,和150mM NaCl的POROS XS层析期间,可进行额外的洗涤,随后将NaCl递增至165、180、195或210mM。可以对POROS XS柱步骤施加梯度,从而提供在具有30cm床高的10CV中在pH 5下150mM NaCl到400mM NaCl的梯度,或者在具有30cm床高的12CV中在pH 6下50mM NaCl到350mM NaCl的梯度。在梯度洗脱之前,可以进行洗涤步骤,洗涤步骤包括:2CV的50mM醋酸钠,pH 5.0,10mM NaCl,接着是5CV的18.8mM磷酸钠,pH 7.0,22.5mM NaCl,接着是3CV的50mM醋酸钠,pH 5.0,10mM NaCl,接着是2CV的50mM醋酸钠,pH 6.0,10mM NaCl。最后,进行第二TFF(TFF2)以配制抗体并获得抗体中间体。

[0369] 图2示出了用于纯化生物分子的过程200。首先,使用发酵过程210生长和培养细胞

培养物。然后在收获220收集细胞培养物,以产生澄清的细胞浓缩物。然后使用亲和层析和病毒灭活/中和230纯化澄清的细胞浓缩物,该过程的输出是产品渗余物。然后对收集的产品渗余物进行切向流过滤240,随后依次进行阴离子交换层析250和阳离子交换层析260。然后将处理过的产品渗余物进行病毒减少过滤270,其中然后进行第二切向流过滤280以产生纯化的产品。

[0370] 关于图3,开发了一种评估可测量的HCP种类的减少倍数的方案,以评估所需的分子种类的产率和纯度。公开了对来自无动物成分的细胞培养过程中的OG2072抗体进行柱纯化的过程300。该过程包括平衡310,随后用澄清的细胞培养液(CCCF)上样320柱。然后用一系列洗涤处理该柱,该一系列洗涤包括洗涤1 330,接着是洗涤2 340、洗涤3 350和洗涤4 360。洗涤2 340可以包括子洗涤340A、340B和340C。在洗涤4 360之后,进行洗脱370,由此在柱上运行后洗脱缓冲液380以再生树脂。该过程包括用50mM磷酸钠和250mM NaCl在pH 7下平衡310蛋白A柱,然后是上样320步骤,其中该柱上样有澄清的细胞培养液(CCCF),接着是一系列洗涤330-360,包括用50mM磷酸钠和250mM NaCl在pH 7下的第一洗涤330。洗涤2 340可以包含如表6C中所述的各种洗涤缓冲液和条件。洗液3 350包含用50mM磷酸钠和2M NaCl在pH 7下的洗涤,而洗涤4 360包含50mM磷酸钠,250mM NaCl在pH 7下的洗涤。用10mM甲酸钠在pH 3.5下完成洗脱370,100mM柠檬酸在pH 2.1下通过柱进行后洗脱。

[0371] 在一些实施方案中,图8、11-16中的任何一个或多个中的特定氨基酸序列的任何一个或多个序列可以替换到本文提供的任何其他实施方案的相应结构中,或者与本文提供的任何其他序列交换。在一些实施方案中,构建体是VEGFR-抗IL-6构型,并且它包括连接到接头上(例如,图12,序列2A)、连接到重链IL-6序列(例如,图13,序列3A或3B)、连接到轻链序列(例如,图15,序列4A)的序列1A-1D(图12)之一的结合。在一些实施方案中,序列1A-1D中的任何一个(图12),可以与接头结合(图12和与重链抗IL-6序列(图13-14,序列3A-3I)结合,和与轻链抗IL-6序列(图15,序列4A-4C)结合。在一些实施方案中,本文提供的任何特定构建体单元的任何其他相应序列可以替换到这些单元中的任何一个中或代替这些单元中的任何一个。

[0372] 在一些实施方案中,预期任何抗IL-6抗体构建体用作组合物、组分或疗法,包括例如表2C、2D、2E、0.3和/或0.4中的那些,和本文提供的实施方案的图8、11-16中的那些。

[0373] 在一些实施方案中,融合蛋白包含VEGF Trap序列中的94位处、VEGF Trap序列中的95位处或VEGF Trap序列中的T94I和H951处的突变。

[0374] 在一些实施方案中,提供了VEGFR-抗IL-6双重抑制剂。VEGFR-抗IL-6双重抑制剂包含抗IL-6抗体和VEGF (VEGFR1/2) trap的trap抗体融合体,其中双重抑制剂在VEGFR序列内包含至少一个点突变以减少VEGFR序列的裂解。在一些实施方案中,VEGFR-抗IL-6双重抑制剂具有1.0MDa的分子量。

[0375] 在一些实施方案中,VEGR-抗IL-6双重抑制剂为炎性视网膜疾病提供治疗。

[0376] 在一些实施方案中,VEGFR-抗IL-6双重抑制剂包含恒定重区、恒定轻区、抗原结合片段区、可结晶片段(Fc)区、血管内皮生长因子受体(VEGFR)区、可变重区、可变轻区和CDR区。

[0377] 在一些实施方案中,抗IL-6重链可变区序列可选自图11的SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12或13。

[0378] 在一些实施方案中, VEGF trap序列可选自图12的SEQ ID NO:14、15、16或17中的至少一个。

[0379] 在VEGR-抗IL-6双重抑制剂的一些实施方案中, 抗IL-6分子的重链序列可选自图13-14的SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26或27中的至少一个。

[0380] 在VEGFR-抗IL-6双重抑制剂的一些实施方案中, 抗IL-6分子的轻链序列包含来自图15的SEQ ID NO:28、29或30中的至少一个的至少1、2或3个轻链CDR。

[0381] 在VEGFR-抗IL-6双重抑制剂的一些实施方案中, 抗IL-6分子的重链序列包含来自图16的5A、5B、5C、5D、5E、5F、5G、5H或5I中的至少一个的至少1、2或3个重链CDR。

[0382] 在一些实施方案中, VEGFR-抗IL-6双重抑制剂包含来自图18的SEQ ID NO:85、86、87或88中的至少一个的VEGFR-Fc序列。

[0383] 在一些实施方案中, VEGFR-抗IL-6双重抑制剂包含图11-18中的一个或多个序列。

[0384] 在一些实施方案中, VEGFR-抗IL-6双重抑制剂包含IL-6VH、IL-6VL、IL-6Fc、VEGF Trap和接头。在一些实施方案中, IL-6VH包含来自图16或13-14中的IL6 VH序列的序列。在一些实施方案中, IL-6VL包含来自图15中的IL6 VL序列的序列。在一些实施方案中, Fc包含来自图16中的Fc序列的序列。在一些实施方案中, VEGF Trap包含来自VEGF trap序列的序列。

[0385] 在一些实施方案中, 提供了一种蛋白质构建体, 其包含: 至少3个重链CDR; 至少3个轻链CDR; VEGF trap序列; 和接头序列, 其中每个序列选自图11-18中的序列。

[0386] 在一些实施方案中, 提供了一种融合蛋白, 其包含: IL-6VH、IL-6VL、IL-6Fc、VEGF Trap, 并且其中融合蛋白改变HUVEC增殖。在一些实施方案中, 每个序列选自图11-18中的序列。

[0387] 在其他实施方案中, 本发明的方法导致洗出液中HCP污染物的百分比减少为至少约2倍的减少、至少约3倍的减少、至少约4倍的减少、至少约5倍的减少、至少约6倍的减少、至少约7倍的减少、至少约8倍的减少、至少约9倍的减少、至少约10倍的减少、至少约15倍的减少或至少约20倍的减少。

[0388] 因此, 在一个方面, 本公开提供了一种使用与目的蛋白质与之结合的亲和层析(AC)基质产生纯化的蛋白质(例如, 抗体、抗体片段或包含Fc区的蛋白质(例如, Fc融合蛋白))的方法, 该方法包括用包含氯化镁或等效离液剂的洗涤溶液洗涤AC基质。在一些实施方案中, 在从AC基质中洗脱目的蛋白质之前, 包含氯化镁的洗涤溶液的pH为约7.8, pH为约6、约6.1、约6.2、约6.3、约6.4、约6.5、约6.6、约6.7、约6.8、约6.9、约7、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、约7.5、约7.6、约7.7、约7.9、约8、约8.1、约8.2、约8.3、约8.4、约8.5、约8.6、约8.7、约8.8、约8.9、约9。在一些实施方案中, 洗涤溶液包含约1M、约1.1M、约1.2M、约1.3M、约1.4M、约1.5M、约1.6M、约1.7M、约1.8M、约1.9M、约2M、约2.1M、约2.2M、约2.3M、约2.4M、约2.5M、约2.6M、约2.7M、约2.8M、约2.9M、约3M、约3.1M、约3.2M、约3.3M、约3.4M、约3.5M、约3.6M、约3.7M、约3.8M、约3.9M、约4M、约4.1M、约4.2M或高于4.2M的氯化镁。

[0389] 抗体缀合物

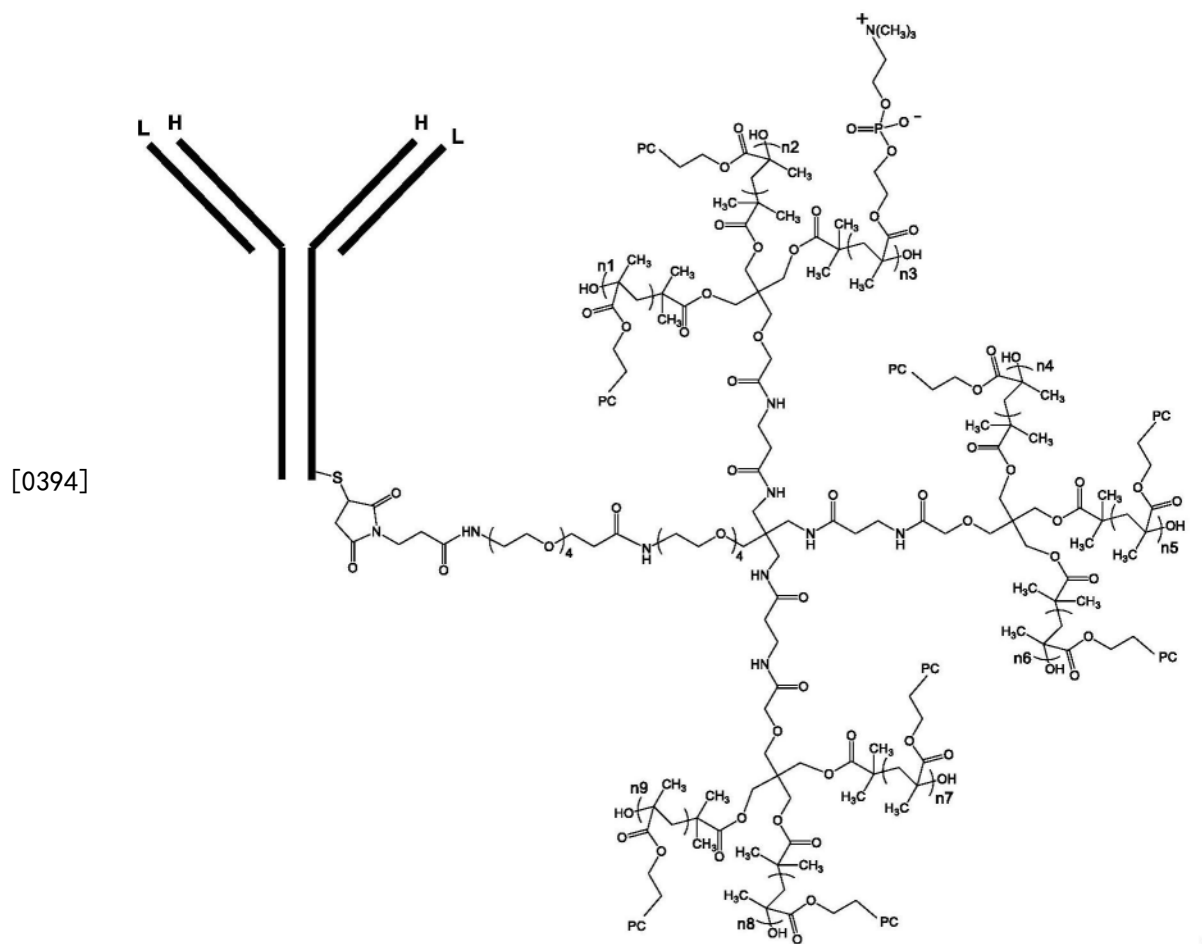
[0390] 本文提供了抗VEGF抗体(包括抗VEGF蛋白, 例如阿柏西普)及其缀合物。在一些实施方案中, 该抗体本身不同于其他抗VEGF剂, 并提供优于其他抗VEGF剂的结果。在一些实施方案中, 抗VEGF抗体缀合物显示出令人惊讶的优于其他抗体的优势和/或优于其他抗体缀

合物的预期活性。

[0391] 在一些实施方案中,抗VEGF抗体缀合物为KSI-301,其为包含以下的抗体缀合物:

[0392] (1) 抗VEGF-A抗体;和

[0393] (2) 含有磷酸胆碱的聚合物,其中该聚合物在抗VEGF-A抗体可变区外的半胱氨酸处与抗VEGF-A抗体共价结合,并且其中所述半胱氨酸替代序列中相同位置出现的非半胱氨酸氨基酸,其中抗VEGF-A抗体包含轻链和重链,所述重链包含Fc区,其中半胱氨酸在重链的Fc区,其中重链的序列是SEQ ID NO:270中的至少一个,并且其中轻链的序列包含SEQ ID NO:275中的至少一个(或其在图8中的任何变体),其中抗体缀合物具有式(I)的结构,



其中:抗VEGF-A抗体的每条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示;其中聚合物通过根据EU编号的C443处的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在上述重链之一

上;其中PC是  $\text{---O---P(=O)(O}^-\text{)O---CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  其中曲线表示与聚合物其余部分的连接点;并且i) 其

中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数;或ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同,使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

[0395] 历史上,将分子与蛋白质缀合通常会导致蛋白质与其预期靶标的结合相互作用降低。在本公开的一些实施方案中,当缀合至活性位点之外的位置时,不一定观察到与预期相

同水平的降低。本文提供的证据示出了与预期相反的效果。在一些实施方案中,不打算受理论的限制,缀合物可优于单独的抗体。例如,配体和其特异性受体的相互作用通常是通过配体和受体的立体特异性相互作用来驱动的,这是由配体上的亲水性氨基酸和受体上的亲水性氨基酸的相互作用来指导的,而水分子在这些相互作用中处于前沿和中心。同时,通过去加重(de-emphasizing)和/或抑制非特异性疏水相互作用进一步增强了这种亲水立体特异性,所述非特异性疏水相互作用通常可能由疏水-疏水氨基酸介导/产生。

[0396] 在一些实施方案中,提供了一种抗VEGF抗体缀合物,其能够阻断VEGF配体(“VEGFL”)和VEGF受体(“VEGFR”)之间至少90%的相互作用。例如,它可以阻断VEGFR和VEGFL之间至少90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或有效的所有相互作用。在一些实施方案中,所注意到的阻断发生在饱和浓度。在一些实施方案中,提供了一种抗VEGF抗体缀合物,其阻断VEGF配体和VEGF受体之间至少95%的相互作用。这种阻断优势的一个示例是抗VEGF抗体生物缀合物(本文提供的抗体缀合物,例如KSI-301)比 **Lucentis®** (雷尼珠单抗) 或 **Avastin®** (贝伐珠单抗) 或甚至抗体0G1950(未缀合)的阻断能力的程度更高。事实上,这一结果是出乎意料的,因为尽管向抗体中加入聚合物(以形成抗体缀合物)可以预期对抗体的结合/活性有一些或没有不利影响,但出乎意料的是,它实际上会以这种方式提高抗体的阻断能力。

[0397] 在一些实施方案中,抗体或其缀合物抑制VEGFR和VEGFL之间至少70、80、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%的活性和/或相互作用。在一些实施方案中,IC50值可以是0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100nM或小于任何一个或多个前述值。在一些实施方案中,KD可以是 $2 \times 10^{-13}$ 、 $1 \times 10^{-13}$ 、 $1 \times 10^{-12}$ 、 $1 \times 10^{-11}$ 、 $1 \times 10^{-10}$ M或小于任何一个前述值。在一些实施方案中,IC50值可以是1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300或小于任何一个前述值。

[0398] 在一些实施方案中,提供了一种抗VEGF抗体,其阻断VEGF配体和VEGF受体之间至少90%的相互作用。例如,它可以阻断VEGFR和VEGFL之间至少91、92、93、94、95、96、97、98、99或有效的所有相互作用。这种阻断优势的一个示例是0G1950(和本文提供的抗体)比 **Lucentis®** (雷尼珠单抗) 或 **Avastin®** (贝伐珠单抗) 的阻断能力的程度更高。

[0399] 在一些实施方案中,其他抗体,例如 **Lucentis®** (雷尼珠单抗) 或 **Avastin®** (贝伐珠单抗),可通过本文所述的一种或多种方法与本文所述的一种或多种聚合物缀合。在一些实施方案中,任何抗体或其片段可通过本文所述的一种或多种方法与本文所述的一种或多种聚合物缀合。

[0400] 在一些实施方案中,抗体包含重链氨基酸可变区和轻链氨基酸可变区,重链氨基酸可变区包含SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个,轻链氨基酸可变区包含SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个。在一些实施方案中,抗体与本文提供的一种或多种聚合物缀合。在一些实施方案中,缀合的抗体与SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个和/或SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个至少90%相同。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个和SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个内的6个CDR,以及L443C(EU编号,或449C)的点突变。在一些实施方案中,缀合的抗体与SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个和/或SEQ ID NO:

91-93、28-30中的至少一个至少90%相同,并且包括以下突变:L234A、L235A和G237A(EU编号),以及以下突变中的至少一个:Q347C(EU编号)或L443C(EU编号)。

[0401] 在一些实施方案中,提供了一种与VEGF-A结合的抗体。该抗体包含:CDRH1,即SEQ ID NO:172中的CDRH1;CDRH2,即SEQ ID NO:173中的CDRH2;CDRH3,即SEQ ID NO:174中的CDRH3;CDRL1,即SEQ ID NO:199中的CDRL1;CDRL2,即SEQ ID NO:200中的CDRL2;CDRL3,即SEQ ID NO:201中的CDRL3;以下突变(EU编号)中的至少一个:L234A、L235A和G237A;以及以下突变(EU编号)中的至少一个:Q347C或L443C。

[0402] 如本领域技术人员将理解的,根据本说明书,本文提供的任何抗体可与本文提供的任何聚合物缀合,和/或本文提供的任何抗体可具有添加的半胱氨酸,使得其允许与聚合物的位点特异性缀合。

[0403] “VEGF”或“血管内皮生长因子”是影响血管生成或血管生成过程的人血管内皮生长因子。特别地,术语VEGF是指生长因子类的任何成员,其(i)结合VEGF受体,例如VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(KDR/Flk-1)或VEGFR-3(FLT-4);(ii)激活与VEGF受体相关的酪氨酸激酶活性;和(iii)从而影响血管生成或血管生成过程。

[0404] VEGF因子家族由五种相关糖蛋白组成:VEGF-A(也称为VPE)、-B、-C、-D和PGF(胎盘生长因子)。其中,VEGF-A是研究得最充分的,并且是抗血管生成治疗的靶标。Ferrara等人,(2003)Nat. Med. 9:669-676。VEGF-A以多种不同的同种型存在,其通过选择性剪接和蛋白水解产生:VEGF-A<sub>206</sub>、VEGF-A<sub>189</sub>、VEGF-A<sub>165</sub>和VEGF-A<sub>121</sub>。同种型结合肝素和称为神经毡蛋白的非信号传导结合蛋白的能力不同。同种型都作为二聚体具有生物活性。

[0405] VEGF的各种效应由VEGF,例如VEGF-A(P15692)、-B(P49766)、-C(P49767)和-D(q43915)与受体酪氨酸激酶(RTK)的结合介导。VEGF家族受体属于V类RTK,每个受体在细胞外结构域(ECD)携带7个Ig样结构域。在人类中,VEGF结合三种类型的RTK:VEGFR-1(Flt-1)(P17948)、VEGFR-2(KDR,Flk-1)(P935968)和VEGFR-3(Flt-4)(P35916)。除非上下文中另有说明,否则提及的VEGF是指VEGF-A、-B、-C、-D和PGF中的任何一种,其以任何天然同种型或天然变体或与天然形式具有至少90、95、98或99%或100%序列同一性的诱导变体的形式。在一些实施方案中,这样的VEGF是人VEGF。同样,提及VEGFR是指VEGFR-1、-2或-3中任一种,包括任何天然同种型或天然变体或与天然序列具有至少90、95、98或99%或100%序列同一性的诱导变体。

[0406] VEGF拮抗疗法已被批准用于治疗某些癌症和湿性AMD。贝伐珠单抗(AVASTIN, Genentech/Roche)是一种人源化小鼠单克隆抗体,可结合并中和人类VEGF,特别是结合VEGF-A的所有同种型以及VEGF-A的生物活性蛋白水解片段。参见,例如Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov. 3(5):391-400。贝伐珠单抗已被批准用于治疗某些癌症。

[0407] 贝伐珠单抗可变轻链CDR为CDR<sub>L</sub>1:SASQDISNYLN(SEQ ID NO:749)、CDR<sub>L</sub>2:FTSSLHS(SEQ ID NO:750)和CDR<sub>L</sub>3:QQYSTVPWT(SEQ ID NO:751)。贝伐珠单抗可变重链CDR为CDR<sub>H</sub>1:GYTFTNYGMN(SEQ ID NO:752)、CDR<sub>H</sub>2:WINTYTGEPTYAADFQR(SEQ ID NO:753)和CDR<sub>H</sub>3:YPHYYGSSHWYFDV(SEQ ID NO:755)。CDR由Kabat定义,但CDRH1使用Kabat/Chothia复合定义。在一些实施方案中,可将半胱氨酸添加到贝伐珠单抗序列中,并且可将抗体(和/或包括

贝伐珠单抗的6种CDR的变体)缀合到本文提供的任何一种或多种聚合物上。在一些实施方案中,贝伐珠单抗或雷尼珠单抗CDR可用于本文提供的组合物和方法中。

[0408] 源自与贝伐珠单抗相同的小鼠单克隆抗体的另一种抗VEGF分子已被批准用于治疗湿性AMD:雷尼珠单抗(LUCENTIS®(雷尼珠单抗),Genentech/Roche)。雷尼珠单抗是一种抗体片段或Fab。通过贝伐珠单抗的可变重链和轻链的亲和力成熟产生雷尼珠单抗。在一些实施方案中,可将半胱氨酸添加到雷尼珠单抗序列中,并且可将抗体(和/或包括雷尼珠单抗的6种CDR的变体)缀合到本文提供的任何一种或多种聚合物上。

[0409] 雷尼珠单抗CDR与贝伐珠单抗相同,不同之处在于亲和力成熟后增加了改进:雷尼珠单抗可变轻链CDR为CDR<sub>L</sub>1:SASQDISNYLN(SEQ ID NO:749)、CDR<sub>L</sub>2:FTSSLHS(SEQ ID NO:750)和CDR<sub>L</sub>3:QQYSTVPWT(SEQ ID NO:751)。雷尼珠单抗可变重链CDR为CDR<sub>H</sub>1:GYDFTHYGMN(SEQ ID NO:754)、CDR<sub>H</sub>2:WINTYTGEPTYAADFQR(SEQ ID NO:753)和CDR<sub>H</sub>3:YPYYYGTSHWYFDV(SEQ ID NO:756)。

[0410] 在一些实施方案中,提供了具有抗VEGF-A抗体的抗体缀合物,抗VEGF-A抗体在抗体可变区外的半胱氨酸处与含有磷酸胆碱的聚合物结合,其中半胱氨酸已通过重组DNA技术添加。在一些实施方案中,聚合物结合到单个半胱氨酸上。在一些实施方案中,“通过重组DNA技术添加”意味着半胱氨酸残基取代了在已知或现有抗体或共有抗体序列中相同位置出现的非半胱氨酸氨基酸。因此,例如当抗体是IgG1并且重链在EU 443位具有亮氨酸时,亮氨酸通过重组DNA技术被半胱氨酸(L443C,EU编号,或449C)取代。相应地,天然IgG1序列在EU 347位是Q(谷氨酰胺),通过重组DNA技术用半胱氨酸取代Q,产生Q347C。

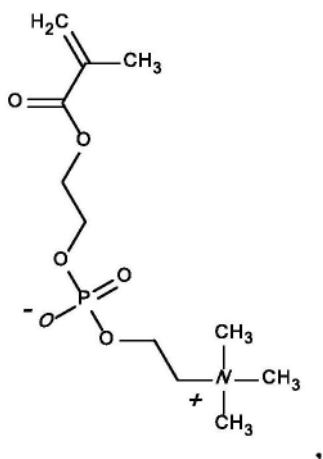
[0411] 在一些实施方案中,抗VEGF-A抗体包含轻链和重链,其中重链具有Fc区。在一些实施方案中,半胱氨酸在Fc区中,并且抗VEGF-A抗体是免疫球蛋白G(IgG)。在一些实施方案中,抗VEGF-A重链具有CDR<sub>H</sub>1:GYDFTHYGMN(SEQ ID NO:754)、CDR<sub>H</sub>2:WINTYTGEPTYAADFQR(SEQ ID NO:753)和CDR<sub>H</sub>3:YPYYYGTSHWYFDV(SEQ ID NO:756),并且221位为T,抗VEGF-A轻链具有CDR<sub>L</sub>1:SASQDISNYLN(SEQ ID NO:749)、CDR<sub>L</sub>2:FTSSLHS(SEQ ID NO:750)和CDR<sub>L</sub>3:QQYSTVPWT(SEQ ID NO:751),并且Kabat 4位为L。

[0412] 在一些实施方案中,抗VEGF-A重链同种型是IgG1。在一些实施方案中,IgG1恒定结构域相对于IgG1恒定结构域具有一个或多个突变以调节效应器功能。在一些实施方案中,效应器功能突变是以下中的一个或多个:(EU编号)E233X、L234X、L235X、G236X、G237X、A327X、A330X和P331X,其中X是任何天然或非天然氨基酸。在一些实施方案中,突变选自由以下组成的组(EU编号):E233P、L234V、L234A、L235A、G237A、A327G、A330S和P331S。在一些实施方案中,抗体缀合物具有以下突变(EU编号):L234A、L235A和G237A。

[0413] 在一些实施方案中,半胱氨酸残基在抗VEGF-A重链中并且是Q347C(EU编号)或L443C(EU编号)。在一些实施方案中,半胱氨酸残基是L443C(EU编号,或449C)。在一些实施方案中,抗VEGF-A重链的序列为SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262,轻链序列包括SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个。

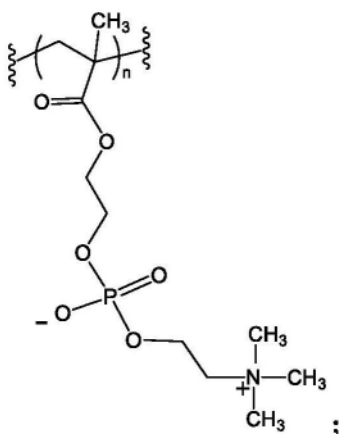
[0414] 在一些实施方案中,含有磷酸胆碱的聚合物包含如下所述的2-(甲基丙烯酰氧基乙基)-2'-(三甲基铵)乙基磷酸酯(MPC)单体:

[0415]



使得聚合物包含以下重复单元：

[0416]



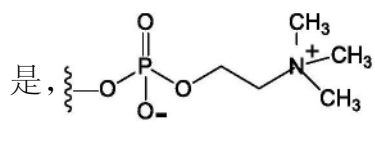
[0417] 其中n为1至3000的整数,波浪线表示聚合物中单体单元之间的连接点。

[0418] 在一些实施方案中,该聚合物具有三个或更多个臂,或用包含3个或更多个聚合物引发位点的引发剂合成。在一些实施方案中,聚合物具有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个臂,或者用包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个聚合物引发位点的引发剂合成。更优选地,聚合物具有3、6或9个臂,或者用包含3、6或9个聚合物引发位点的引发剂合成。在一些实施方案中,聚合物具有9个臂,或者用包含9个聚合物引发位点的引发剂合成。

[0419] 在一些实施方案中,加入的聚合物的分子量在约300,000至约1,750,000Da之间(SEC-MALS)。在一些实施方案中,聚合物的分子量在约500,000至约1,000,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物的分子量在约600,000至约900,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物的分子量在约750,000至约850,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物的分子量在约800,000至约850,000Da之间。在一些实施方案中,聚合物的分子量在约750,000至约800,000Da之间。

[0420] 在一些实施方案中,本文所述抗体中的任一个可进一步与聚合物缀合以形成生物缀合物。生物缀合物的分子量(总的来说,SEC-MALS)可以在约350,000至2,000,000道尔顿之间,例如,在约450,000至1,900,000道尔顿之间,在约550,000至1,800,000道尔顿之间,在约650,000至1,700,000道尔顿之间,在约750,000至1,600,000道尔顿之间,在约850,000至1,500,000道尔顿之间,在约900,000至1,400,000道尔顿之间,在约950,000至1,300,000道尔顿之间,在约900,000至1,000,000道尔顿之间,在约1,000,000至1,300,000道尔顿之间,在约850,000至1,300,000道尔顿之间,在约850,000至1,000,000道尔顿之间,以及在约

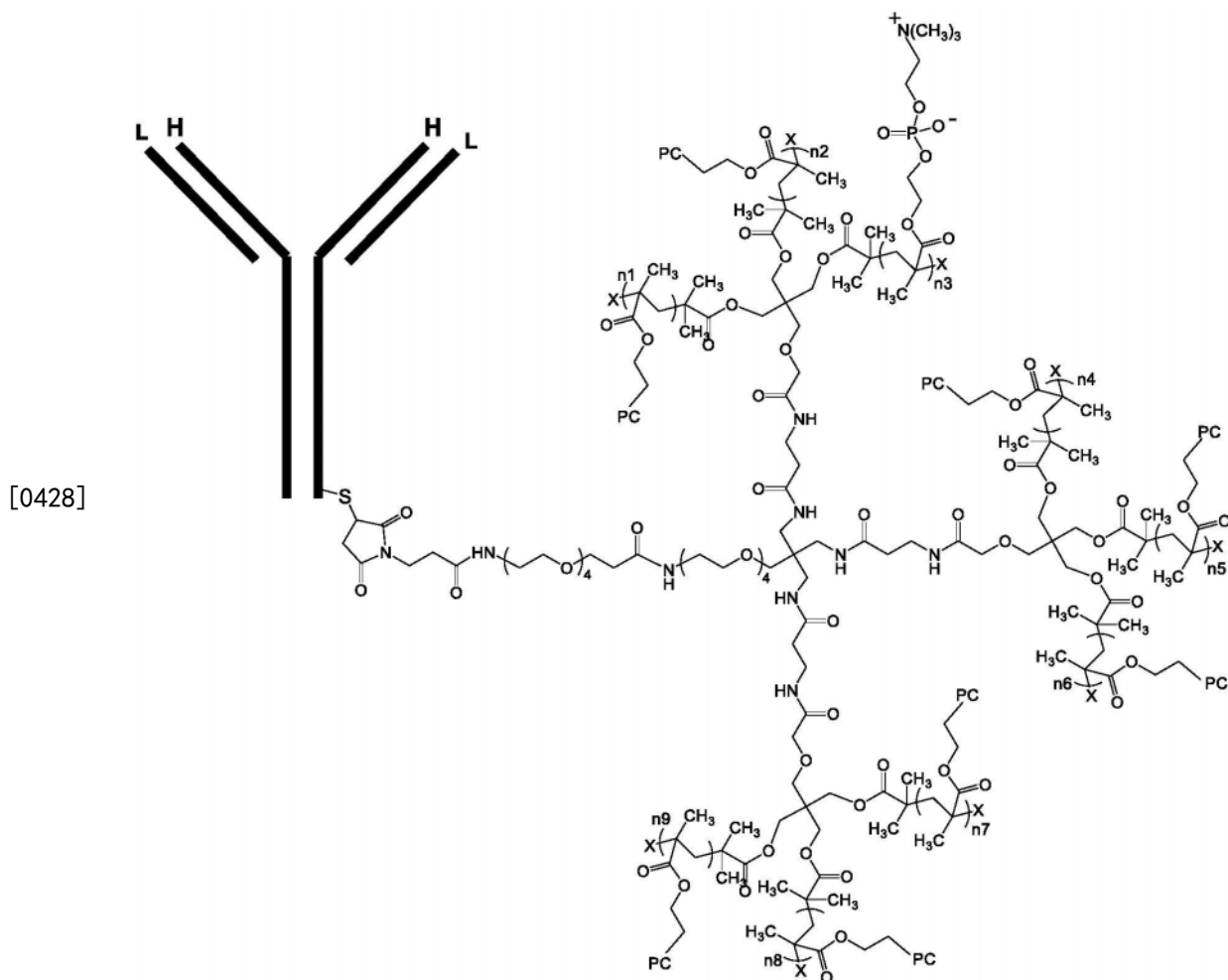




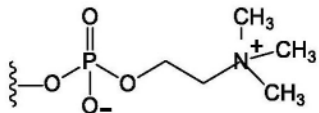
其中曲线表示与聚合物其余部分的连接点;其中X为a) -OR,其

中R为H、甲基、乙基、丙基或异丙基,b) -H,c) 任何卤素,包括-Br、-Cl或-I,d) -SCN,或e) -NCS;并且其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同,使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。在一些实施方案中,n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数。在一些实施方案中,n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至500的整数。在一些实施方案中,X为-OR,其中R是糖,氨基烷基,以下残基的单取代、多取代或未取代的变体:饱和的C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、不饱和的C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>烯基或C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>炔基、酰基、酰氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、杂芳基、芳基烷氧基羰基、烷氧基羰基酰基、氨基、氨基羰基、氨基羰基氧基、硝基、叠氮基、苯基、羟基、烷硫基、芳硫基、氧磺酰基、羧基、氰基和卤代烷基(包括多卤代烷基)、-CO-O-R<sub>7</sub>、羰基-CCO-R<sub>7</sub>、-CO-NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOR<sub>7</sub>、-CO-(CH)<sub>n</sub>-COOR<sub>7</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>、酯、烷氧羰基、芳氧羰基,其中n是1至6的整数,其中每个R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>和R<sub>9</sub>分别选自由以下组成的组:氢原子,卤素原子,下列残基的单取代、多取代或未取代的变体:饱和的C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、不饱和的C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>烯基或C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>炔基、酰基、酰氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、杂芳基、芳基烷氧基羰基、烷氧基羰基酰基、氨基、氨基羰基、氨基羰基氧基、硝基、叠氮基、苯基、羟基、烷硫基、芳硫基、氧磺酰基、羧基、氰基和卤代烷基(包括多卤代烷基)、5元环和6元环。

[0427] 在一些实施方案中,抗体缀合物具有式(I)的结构,



[0429] 其中：抗VEGF-A抗体的每条重链由字母H表示，抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示；其中聚合物通过C443 (EU编号，或449C) 的巯基与抗VEGF-A抗体结合，该结合描绘在重

链之一上；其中PC是， 其中曲线表示与聚合物其余部分的连接点；

其中X为a) -OR，其中R为H、甲基、乙基、丙基或异丙基，b) -H，c) 任何卤素，包括Br、-Cl或-I，d) -SCN，或e) -NCS；并且其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同，使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。在一些实施方案中，n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数。在一些实施方案中，n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至500的整数。在一些实施方案中，X为-OR，其中R是糖，氨基烷基，以下残基的单取代、多取代或未取代的变体：饱和的C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、不饱和的C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>烯基或C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>炔基、酰基、酰氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、杂芳基、芳基烷氧基羰基、烷氧基羰基酰基、氨基、氨基羰基、氨基羰基氧基、硝基、叠氮基、苯基、羟基、烷硫基、芳硫基、氧磺酰基、羧基、氰基和卤代烷基（包括多卤代烷基）、-CO-O-R<sub>7</sub>、羰基-CCO-R<sub>7</sub>、-CO-NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOR<sub>7</sub>、-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOR<sub>7</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>、酯、烷氧基羰基、芳氧基羰基，其中n是1至6的整数，其中每个R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>和R<sub>9</sub>分别选自自由以下组成的组：氢原子，卤素原子，下列残基的单取代、多取代或未取代的变体：饱和的C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、不饱和的C<sub>2</sub>-

C<sub>24</sub>烯基或C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>炔基、酰基、酰氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、杂芳基、芳基烷氧基羰基、烷氧基羰基酰基、氨基、氨基羰基、氨基羰基氧基、硝基、叠氮基、苯基、羟基、烷硫基、芳硫基、氧磺酰基、羧基、氰基和卤代烷基(包括多卤代烷基)、5元环和6元环。在一些实施方案中,该构建体被命名为KSI-301。

[0430] 在一些实施方案中,抗体缀合物存在于液体制剂中。在一些实施方案中,抗体缀合物与药学上可接受的载体结合。在一些实施方案中,本文提供的方法中的任一种可以使用以下药物制剂:a)含有0.025% (w/w) 聚山梨醇酯20的12.5mM磷酸钠缓冲液,pH 6.5,浓度为50mg/mL(基于抗体质量),相当于324mg/mL的抗体-生物聚合物缀合物总质量,包括50mg/mL OG1950抗体中间体和274mg/mL OG1802生物聚合物中间体,b)含有0.01-0.5% (w/w) 聚山梨醇酯20的10-15mM磷酸钠缓冲液,pH 6.5,浓度为约50mg/mL(基于抗体质量),相当于约324mg/mL的抗体-生物聚合物缀合物总质量,c)含有任选的0.025% (w/w) 聚山梨醇酯20的12.5mM磷酸钠缓冲液,pH 6.5,浓度为50mg/mL(基于抗体质量),相当于324mg/mL的抗体-生物聚合物缀合物总质量,包括50mg/mL OG1950抗体中间体和274mg/mL OG1802生物聚合物中间体,d)含有聚山梨醇酯20的磷酸钠缓冲液,pH 6.5,浓度为50mg/mL(基于抗体质量),相当于约324mg/mL的抗体-生物聚合物缀合物总质量,包括约50mg/mL OG1950抗体中间体和约274mg/mL OG1802生物聚合物中间体,e)含有0.01-0.5% (w/w) 聚山梨醇酯20的10-15mM磷酸钠缓冲液,pH 6.5,浓度为约40-55mg/mL(基于抗体质量),相当于约259-356mg/mL的抗体-生物聚合物缀合物总质量,f)含有0.01-0.5% (w/w) 聚山梨醇酯20的10-15mM磷酸钠缓冲液,pH 6.5,浓度为约45-52.5mg/mL(基于抗体质量),相当于约292-340mg/mL的抗体-生物聚合物缀合物总质量,或g)含有0.01-0.5% (w/w) 聚山梨醇酯20的10-15mM磷酸钠缓冲液,pH 6.5,浓度为约40-55mg/mL(基于抗体质量),相当于约259-356mg/mL的抗体-生物聚合物缀合物总质量。在这些制剂中的任何一个中,抗体可以使用图8中的VH和VL(或这些VH和/或VL序列中的1、2、3、4、5或全部6种CDR),例如OG1950(例如SEQ ID No:1、15-18和2)。

[0431] 在一些实施方案中,提供了一种抗VEGF-A抗体。抗VEGF-A抗体重链至少具有以下CDR序列:CDR<sub>H</sub>1:即SEQ ID NO:172中的CDRH1,CDR<sub>H</sub>2:即SEQ ID NO:173中的CDRH2,和CDR<sub>H</sub>3:即SEQ ID NO:174中的CDRH3。在一些实施方案中,抗VEGF-A重链具有那些CDR,并且另外在221位具有苏氨酸(T)。在一些实施方案中,抗VEGF-A轻链至少具有以下CDR:CDR<sub>L</sub>1:即SEQ ID NO:199中的CDRL1,CDR<sub>L</sub>2:即SEQ ID NO:200中的CDRL2,和CDR<sub>L</sub>3:即SEQ ID NO:201中的CDRL3。在一些实施方案中,抗VEGF-A抗体具有那些CDR,并且另外在Kabat 4位具有亮氨酸(L)。在一些实施方案中,抗VEGF-A抗体重链的同种型是IgG1,并且具有CH<sub>1</sub>、铰链、CH<sub>2</sub>和CH<sub>3</sub>结构域。在一些实施方案中,轻链同种型是κ。在一些实施方案中,抗VEGF抗体缀合物(例如,KSI-301)构建体将具有一种或多种这些CDR。

[0432] 在一些实施方案中,抗VEGF-A抗体的IgG1结构域具有一个或多个突变以调节效应器功能,例如ADCC、ADCP和CDC。在一些实施方案中,IgG1突变降低了效应器功能。在一些实施方案中,用于效应器功能突变的氨基酸包括(EU编号)E233X、L234X、L235X、G236X、G237X、G236X、D270X、K322X、A327X、P329X、A330X、A330X、P331X和P331X,其中X是任何天然或非天然氨基酸。在一些实施方案中,突变包括以下的一个或多个:E233P、L234V、L234A、L235A、G237A、A327G、A330S和P331S(EU编号)。在一些实施方案中,抗VEGF-A重链具有以下突变(EU编号):L234A、L235A和G237A。在一些实施方案中,相对于天然人IgG1序列,效应器功能突变

的数量不超过10。在一些实施方案中,相对于天然人IgG1序列,效应器功能突变的数量不超过5、4、3、2或1。在一些实施方案中,抗体具有降低的Fc  $\gamma$  结合和/或补体C1q结合,使得抗体产生效应器功能的能力降低。这对于眼适应症/病症尤其有利。

[0433] 在一些实施方案中,抗VEGF-A抗体包含以下氨基酸突变中的一个或多个:L234A、L235A、G237A (EU编号)和L443C (EU编号,或449C)。

[0434] 在一些实施方案中,抗VEGF-A抗体是人免疫球蛋白G (IgG1) 或其一部分。

[0435] 在一些实施方案中,VEGF-A抗体包含重链恒定结构域,该结构域包含一个或多个降低免疫介导的效应器功能的突变。

[0436] 在一些实施方案中,提供了一种抗VEGF-A抗体。抗VEGF抗体包含重链,该重链包含含有SEQ ID NO:172中CDRH1序列的CDR<sub>H</sub>1、含有SEQ ID NO:173中CDRH2序列的CDR<sub>H</sub>2、含有SEQ ID NO:174中CDRH3序列的CDR<sub>H</sub>3、含有SEQ ID NO:199中CDRL1序列的CDR<sub>L</sub>1、含有SEQ ID NO:200中CDRL2序列的CDR<sub>L</sub>2和含有SEQ ID NO:201中CDRL3序列的CDR<sub>L</sub>3。

[0437] 或者,IgG结构域可以是IgG2、IgG3或IgG4或其中恒定区由一种以上这些同种型形成的复合物(例如,来自IgG2或IgG4的CH1区、来自IgG1的铰链区、CH2区和CH3区)。这些结构域可以包含突变,以减少和/或调节IgG1中提到的一个或多个EU位置的效应器功能。相对于人IgG1和IgG3,人IgG2和IgG4的效应器功能降低。

[0438] 抗VEGF-A重链具有通过重组DNA技术作为突变添加的半胱氨酸残基,其可用于缀合半衰期延长部分。在一些实施方案中,突变是(EU编号)Q347C (EU编号)和/或L443C (EU编号,或449C)。在一些实施方案中,突变是L443C (EU编号,或449C)。在一些实施方案中,抗体与聚合物的化学计量比为1:1;换句话说,缀合物具有与一个聚合物分子缀合的一个抗体分子。

[0439] 抗VEGF-A抗体的半衰期可以通过连接“半衰期延长部分”或“半衰期延长基团”来延长。半衰期延长部分包括肽和蛋白质以及各种聚合物,肽和蛋白质可以与所研究的生物药物在框架内表达(或根据情况进行化学缀合),聚合物可以连接或缀合到一个或多个氨基酸侧链或末端官能团(例如-SH、-OH、-COOH、-CONH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>) 或一个或多个N-和/或O-聚糖结构。半衰期延长部分通常用于增加生物药物的体内循环半衰期。

[0440] 肽/蛋白质半衰期延长部分的示例包括Fc融合体(Capon DJ,Chamow SM,Mordenti J等人.Designing CD4 immunoadhesions for AIDS therapy.Nature.1989.337:525-31)、人血清白蛋白(HAS)融合体(Yeh P,Landais D,Lemaitre M等人.Design of yeast-secreted albumin derivatives for human therapy:biological and antiviral properties of a serum albumin-CD4 genetic conjugate.Proc Natl Acad Sci USA.1992.89:1904-08)、羧基末端肽(CTP)融合体(Fares FA,Suganuma N.Nishimori K等人.Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit.Proc Natl Acad Sci USA.1992.89:4304-08)、非精确重复肽序列(XTEN)基因融合融合体(Schellenberger V,Wang CW,Geething NC等人.A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner.Nat Biotechnol.2009.27:1186-90)、弹性蛋白样肽(ELPylation)(MCpherson DT,Morrow C,Minehan DS等人.Production and purification of a recombinant

elastomeric polypeptide, G (VPGVG19-VPGV, from *Escherichia coli*. Biotechnol Prog. 1992.8:347-52)、人转铁蛋白融合体 (Prior CP, Lai C-H, Sadehghi H 等人. Modified transferrin fusion proteins. 专利 W02004/020405.2004), proline-alanine-serine (PASylation) (Skerra A, Theobald I, Schlapsky M. Biological active proteins having increased in vivo and/or vitro stability. 专利 W02008/155134A1.2008)、氨基酸均聚物 (HAPylation) (Schlapsky M, Theobald I, Mack H 等人. Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life. Protein Eng Des Sel. 2007.20:273-84) 和明胶样蛋白 (GLK) 融合体 (Huang Y-S, Wen X-F, Zaro JL 等人. Engineering a pharmacologically superior form of granulocyte-colony-stimulating-factor by fusion with gelatin-like protein polymer. Eur J. Pharm Biopharm. 2010.72:435-41)。

[0441] 聚合物半衰期延长部分的示例包括聚乙二醇 (PEG)、支化 PEG、聚 PEG® (Warwick Effect Polymers; 英国考文垂)、聚唾液酸 (PSA)、淀粉、羟乙基淀粉 (HES)、羟烷基淀粉 (HAS)、碳水化合物、多糖、普鲁兰多糖 (pullulane)、壳聚糖、透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、葡聚糖、羧甲基葡聚糖、聚亚烷基氧化物 (PAO)、聚亚烷基二醇 (PAG)、聚丙二醇 (PPG)、聚恶唑啉、聚丙烯酰吗啉、聚乙烯醇 (PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、聚磷腈、聚恶唑啉、聚乙烯-共聚马来酸酐、聚苯乙烯-共聚马来酸酐、聚(1-羟甲基乙烯羟甲基甲醛) (PHF)、两性离子聚合物、含有磷酸胆碱的聚合物和包含 MPC 的聚合物、聚(Gly<sub>x</sub>-Ser<sub>y</sub>)、透明质酸 (HA)、肝素前体聚合物 (Heparosan polymers) (HEP)、Fleximers、葡聚糖和聚唾液酸 (PSA)。

[0442] 在一个实施方案中, 半衰期延长部分可使用 N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 酯通过蛋白质的游离氨基与抗体缀合。靶向结合胺基的试剂可以随机地与赖氨酸的  $\epsilon$ -胺基、N-末端氨基酸的  $\alpha$ -胺基和组氨酸的  $\delta$ -胺基反应。

[0443] 然而, 本文公开的抗 VEGF-A 抗体具有许多可用于聚合物缀合的胺基。因此, 聚合物与游离氨基的缀合可能对抗体蛋白结合 VEGF 的能力产生负面影响。

[0444] 在一些实施方案中, 使用任何合适的硫醇反应性化学, 包括但不限于马来酰亚胺化学, 或者在预先氧化后将聚合物酰肼或聚合物胺缀合至抗体的碳水化合物部分, 将半衰期延长部分缀合至一个或多个游离 SH 基团。在一些实施方案中, 使用马来酰亚胺缀合。在一些实施方案中, 缀合发生在天然存在或通过基因工程引入的半胱氨酸上。

[0445] 在一些实施方案中, 聚合物共价连接至通过定点诱变引入到抗 VEGF-A 抗体中的半胱氨酸残基。在一些实施方案中, 半胱氨酸残基用于抗体的 Fc 部分。在一些实施方案中, 在 WO 2013/093809、US 7,521,541、WO 2008/020827、US 8,008,453、US 8,455,622 和 US2012/0213705 中提供了将半胱氨酸残基引入 Fc 区的位点, 这些文献以引用的方式并入本文用于所有目的。在一些实施方案中, 半胱氨酸突变是 Q347C (EU 编号) 和 L443C, 指按 EU 编号的人 IgG 重链。

[0446] 在一些实施方案中, 提供了抗体和用作半衰期延长剂的高 MW 聚合物的缀合物。在一些实施方案中, 提供了包含缀合至两性离子聚合物的抗体的缀合物, 其中聚合物由一种或多种单体单元形成, 并且其中至少一种单体单元具有两性离子基团。在一些实施方案中, 两性离子基团是磷酸胆碱。

[0447] 在一些实施方案中,单体单元之一是HEMA-PC。在一些实施方案中,聚合物由单一单体合成,该单体是HEMA-PC。

[0448] 在一些实施方案中,一些抗体缀合物具有2个、3个或更多个聚合物臂,其中单体为HEMA-PC。在一些实施方案中,缀合物具有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个聚合物臂,其中单体是HEMA-PC。在一些实施方案中,缀合物具有3、6或9个臂。在一些实施方案中,缀合物具有9个臂。

[0449] 在一些实施方案中,聚合物-抗体缀合物具有分子量在100,000至1,500,000Da之间的聚合物部分。在一些实施方案中,缀合物具有分子量在500,000和1,000,000Da之间的聚合物部分。在一些实施方案中,缀合物具有分子量在600,000至800,000Da之间的聚合物部分。在一些实施方案中,缀合物具有分子量在600,000和850,000Da之间的并且具有9个臂的聚合物部分。当给定与聚合物缀合的抗体的分子量时,该分子量将是蛋白质(包括与其相关的任何碳水化合物部分)的分子量和聚合物分子量之和。

[0450] 在一些实施方案中,提供了具有HEMA-PC聚合物的抗VEGF-A抗体,该聚合物具有按Mw测量的在约100kDa至1650kDa之间的分子量。在一些实施方案中,按Mw测量的聚合物的分子量在约500kDa至1000kDa之间。在一些实施方案中,按Mw测量的聚合物的分子量在约600kDa至约900kDa之间。在一些实施方案中,按Mw测量的聚合物分子量为750kDa加或减15%。

[0451] 在一些实施方案中,聚合物由适用于具有一个或多个聚合物引发位点的ATRP的引发剂制成。在一些实施方案中,聚合物引发位点具有2-溴异丁酸酯位点。在一些实施方案中,引发剂具有3个或更多个聚合物引发位点。在一些实施方案中,引发剂具有3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个聚合物引发位点。在一些实施方案中,引发剂具有3、6或9个聚合物引发位点。在一些实施方案中,引发剂具有9个聚合物引发位点。在一些实施方案中,引发剂是OG1786。

[0452] 抗VEGF-A抗体可通过重组表达产生,包括(i)通过基因工程产生重组DNA,(ii)通过例如但不限于转染、电穿孔或显微注射将重组DNA引入原核或真核细胞,(iii)培养转化的细胞,(iv)表达抗体,例如组成型或诱导型,和(v)分离抗体,例如从培养基中或通过收获转化的细胞,以便(vi)获得纯化的抗体。

[0453] 可通过在合适的原核或真核宿主系统中表达来产生抗VEGF-A抗体,所述宿主系统的特征在于产生药理学上可接受的抗体分子。真核细胞的示例是哺乳动物细胞,如CHO、COS、HEK 293、BHK、SK-Hip和HepG2。其他合适的表达系统是原核细胞(例如,具有pET/BL21表达系统的大肠杆菌)、酵母(酿酒酵母和/或毕赤酵母系统)和昆虫细胞。

[0454] 多种载体可用于制备本文公开的抗体,并且选自真核和原核表达载体。用于原核表达的载体的示例包括质粒,例如但不限于preset、pet和pad,其中用于原核表达载体的启动子包括但不限于lac、trc、trp、recA或araBAD中的一种或多种。用于真核表达的载体的示例包括:(i)对于在酵母中表达,载体例如但不限于pAO、pPIC、pYES或pMET,使用启动子例如但不限于AOX1、GAP、GAL1或AUG1;(ii)对于在昆虫细胞中表达,载体例如但不限于pMT、pAc5、pIB、pMIB或pBAC,使用启动子例如但不限于PH、p10、MT、Ac5、OpIE2、gp64或polh,以及(iii)对于在哺乳动物细胞中表达,载体例如但不限于pSVL、pCMV、pRc/RSV、pcDNA3或pBPV,以及在一方面,衍生自病毒系统的载体,病毒系统例如但不限于痘苗病毒、腺相关病毒、疱

疹病毒或逆转录酶病毒,使用启动子例如但不限于CMV、SV40、EF-1、UbC、RSV、ADV、BPV和 $\beta$ -肌动蛋白。

**[0455] 将蛋白质与聚合物结合的方法**

**[0456]** 在一些实施方案中,提供了一种制备治疗性蛋白质-半衰期延长部分缀合物的方法,该方法具有将治疗性蛋白质与半衰期延长部分缀合以提供治疗性蛋白质-半衰期延长部分缀合物的步骤,所述治疗性蛋白质具有通过重组DNA技术添加的半胱氨酸残基,所述半衰期延长部分具有选自马来酰亚胺、乙烯基砘、邻二硫吡啶化物和碘乙酰胺的组的巯基特异性反应基团。

**[0457]** 在一些实施方案中,提供了一种从OG1950制备抗VEGF抗体缀合物(例如,KSI-301)的方法。该方法包括用30x摩尔过量的TCEP还原剂还原OG1950蛋白。还原后,抗体被氧化以产生去封闭的OG1950抗体,其中形成了抗体中天然存在的轻链和重链间的和轻链和重链内的二硫键。然后通过添加赋形剂和添加3-10x摩尔过量的马来酰亚胺生物聚合物来缀合OG1950。生物聚合物通过共价硫醇醚键与OG1950抗体连接。缀合后,纯化抗VEGF抗体缀合物,例如KSI-301,去除未缀合的抗体和聚合物。

**[0458]** 上述蛋白质和方法也可以变化。因此,在一些实施方案中,提供了一种制备缀合蛋白质(其不必是抗体或抗VEGF抗体)的方法。该方法包括还原蛋白质中的一个或多个半胱氨酸以在溶液中形成去封闭的蛋白质。在还原一个或多个半胱氨酸后,去封闭的蛋白质被再氧化,以恢复还原的蛋白质中的至少一个二硫键,同时确保蛋白质中的工程改造的半胱氨酸残基保持游离硫醇形式,以在溶液中形成再氧化的去封闭的蛋白质。然后向溶液中加入至少一种赋形剂。赋形剂减少了聚合物诱导的蛋白质沉淀。加入赋形剂后,将聚合物加入到溶液中,该聚合物在工程改造的半胱氨酸残基处与再氧化的去封闭的蛋白质缀合,形成缀合蛋白质。

**[0459]** 在一些实施方案中,还原剂的摩尔过量可以改变为任何起作用的量。在一些实施方案中,可以使用10、20、30、40、50、60、70、80、90x摩尔过量的还原剂(在所有实施方案中其不必是TCEP)。在一些实施方案中,可以使用任何抗体(治疗性的或其他的)。在一些实施方案中,可以使用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15x摩尔过量的马来酰亚胺生物聚合物。在一些实施方案中,去封闭的蛋白质比聚合物过量。在一些实施方案中,再氧化的去封闭的蛋白质或去封闭的蛋白质的量少于聚合物的量。在一些实施方案中,再氧化的去封闭的蛋白质或去封闭的蛋白质的量是聚合物的量的90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%。在一些实施方案中,使用的聚合物是蛋白质的2.5-4.5倍,以摩尔过量测量。在一些实施方案中,使用的聚合物是蛋白质的10-20倍,按质量测量。在一些实施方案中,还原的抗体的量大于聚合物的量。在一些实施方案中,聚合物的量大于还原的抗体的量。

**[0460]** 在一些实施方案中,纯化步骤是任选的。

**[0461]** 在一些实施方案中,制备抗体缀合物的方法包括将抗VEGF-A抗体缀合到含有磷酸胆碱的聚合物上。在一些实施方案中,该方法包括将抗VEGF-A抗体缀合到含有磷酸胆碱的聚合物上的步骤。抗VEGF-A抗体包含通过重组DNA技术添加的氨基酸残基。在一些实施方案中,添加的氨基酸残基是半胱氨酸残基。在一些实施方案中,半胱氨酸残基被添加到抗体的可变区之外。半胱氨酸残基可以添加到抗体的重链或轻链上。

[0462] 在一些实施方案中,聚合物包括含有磷酰胆碱的聚合物或由其组成。在一些实施方案中,含有磷酰胆碱的聚合物包括选自马来酰亚胺、乙烯基砒、邻二硫吡啶和碘乙酰胺的组的巯基特异性反应基团。在一些实施方案中,含有磷酸胆碱的聚合物上的巯基特异性反应基团与抗VEGF-A抗体上的半胱氨酸残基反应以形成抗体缀合物。

[0463] 在一些实施方案中,待缀合的蛋白质可以是抗体、抗体蛋白质融合体或其结合片段。在一些实施方案中,蛋白质不是抗体,而是酶、配体、受体或其他蛋白质或其突变体或变体。在一些实施方案中,天然蛋白质含有至少一个二硫键和至少一个非天然半胱氨酸。

[0464] 在一些实施方案中,赋形剂可以是酸或碱。在一些实施方案中,赋形剂是去垢剂、糖或带电氨基酸。在一些实施方案中,赋形剂有助于在与聚合物缀合期间将蛋白质保持在溶液中。在一些实施方案中,在将聚合物添加到含有蛋白质的溶液之前,将赋形剂添加到含有蛋白质的溶液中。

[0465] 在一些实施方案中,反应在约pH 5至约pH 9之间的水性条件下发生。在一些实施方案中,反应在pH 6.0至pH 8.5之间、pH 6.5至pH 8.0之间或pH 7.0至pH 7.5之间发生。在一些实施方案中,反应在pH 8至pH 9之间发生。

[0466] 在一些实施方案中,聚合物在2-37摄氏度下与蛋白质缀合。在一些实施方案中,缀合在0-40摄氏度、5-35摄氏度、10-30摄氏度和15-25摄氏度下发生。在一些实施方案中,聚合物在5-10摄氏度下缀合。

[0467] 在一些实施方案中,本文所述的缀合蛋白质可以与离子交换介质或疏水相互作用层析或亲和层析介质接触以进行纯化(以从未缀合物中去除缀合物)。在一些实施方案中,离子交换介质、疏水相互作用层析和/或亲和层析介质将缀合蛋白质从游离聚合物和再氧化的去封闭的蛋白质中分离。

[0468] 在一些实施方案中,本文公开的聚合物可以包含以下中的一种或多种:两性离子、磷酰胆碱或将聚合物分支点的中心桥接至马来酰亚胺官能团的PEG接头。在一些实施方案中,本文提供的聚合物中的任一种都可以通过本文提供的方法添加到蛋白质中。

[0469] 在一些实施方案中,本文提供的蛋白质中的任一种都可以通过本文提供的方法中的一种或多种与本文提供的聚合物中的任一种缀合。

[0470] 在一些实施方案中,本文提供的方法允许更大规模的处理以制造和纯化蛋白质和/或抗体缀合物。在一些实施方案中,所采用的体积至少为1升,例如1、10、100、1,000、5,000、10,000升或更多。在一些实施方案中,产生和/或纯化的抗体缀合物的量可以是0.1、1、10、100、1000、2000、2500、3000或更多克。

[0471] 在一些实施方案中,治疗性蛋白质可以是本文所述的抗VEGF-A抗体中的任一种,其具有通过重组DNA技术添加的半胱氨酸残基。在一些实施方案中,抗VEGF抗体重链具有以下CDR:CDRH1:即SEQ ID NO:172中的CDRH1,CDRH2:即SEQ ID NO:173中的CDRH2,和CDRH3:即SEQ ID NO:174中的CDRH3。重链也可以在221位具有苏氨酸(T)。在一些实施方案中,抗VEGF轻链具有以下CDR:CDRL1:即SEQ ID NO:199中的CDRL1,CDRL2:即SEQ ID NO:200中的CDRL2,和CDRL3:即SEQ ID NO:201中的CDRL3。抗VEGF-A轻链也可以在Kabat 4位具有亮氨酸(L)。

[0472] 在一些实施方案中,抗VEGF-A抗体是IgG1。在一些实施方案中,重链具有一个或多个突变以调节效应器功能。在一些实施方案中,突变发生在以下氨基酸位置(EU编号)中的

一个或多个：E233、L234、L235、G236、G237、A327、A330和P331。在一些实施方案中，突变选自由以下组成的组：E233P、L234V、L234A、L235A、G237A、A327G、A330S和P331S (EU编号)。在一些实施方案中，突变是 (EU编号) L234A、L235A和G237A。

[0473] 在一些实施方案中，通过重组DNA技术添加至治疗性蛋白质的半胱氨酸残基不应参与Cys-Cys二硫键配对。在这方面，治疗性蛋白质可以是二聚的。例如，完整的抗VEGF-A抗体有两条轻链和两条重链。例如，如果将Cys残基引入到重链中，完整的抗体将在相同的位置具有两个这样引入的半胱氨酸，并且存在这些半胱氨酸残基将形成链内二硫键的可能性。如果引入的半胱氨酸残基形成Cys-Cys二硫键或有这样做的倾向，则引入的Cys残基对缀合没有用。本领域已知如何避免重链和轻链中会引起链内二硫键配对的位置。参见例如美国专利申请号2015/0158952。

[0474] 在一些实施方案中，通过重组DNA技术引入的半胱氨酸残基选自 (EU编号) Q347C和L443C组成的组。在一些实施方案中，半胱氨酸残基是L443C (EU编号，或449C)。在一些实施方案中，抗体的重链具有SEQ ID NO: 7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个氨基酸序列；轻链具有SEQ ID No: 91-93、28-30中的至少一个氨基酸序列。

[0475] 在一些实施方案中，巯基特异性反应基团是马来酰亚胺。

[0476] 在一些实施方案中，聚合物半衰期延长部分选自由以下组成的组：聚乙二醇 (PEG)、支化PEG、聚PEG® (Warwick Effect Polymers; 英国考文垂)、聚唾液酸 (PSA)、淀粉、羟乙基淀粉 (HES)、羟烷基淀粉 (HAS)、碳水化合物、多糖、普鲁兰多糖 (pullulane)、壳聚糖、透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、葡聚糖、羧甲基葡聚糖、聚亚烷基氧化物 (PAO)、聚亚烷基二醇 (PAG)、聚丙二醇 (PPG)、聚恶唑啉、聚丙烯酰吗啉、聚乙烯醇 (PVA)、聚羧酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、聚磷腈、聚恶唑啉、聚乙烯-共聚马来酸酐、聚苯乙烯-共聚马来酸酐、聚(1-羟甲基乙烯羟甲基甲醛) (PHF)、两性离子聚合物、含有磷酸胆碱的聚合物和包含2-甲基丙烯酰氧基-2'-乙基三甲基磷酸铵 (MPC) 的聚合物。

[0477] 在一些实施方案中，半衰期延长部分是两性离子聚合物。在一些实施方案中，两性离子是磷酸胆碱，即含有磷酸胆碱的聚合物。在一些实施方案中，聚合物由MPC单元组成。

[0478] 在一些实施方案中，MPC聚合物具有三个或更多个臂。在一些实施方案中，MPC聚合物具有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个臂。在一些实施方案中，MPC聚合物具有3、6或9个臂。在一些实施方案中，MPC聚合物具有9个臂。在一些实施方案中，聚合物用包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个聚合物引发位点的引发剂合成。

[0479] 在一些实施方案中，MPC聚合物的分子量在约300,000至1,750,000Da之间。在一些实施方案中，MPC聚合物的分子量在约500,000至1,000,000Da之间或约600,000至900,000Da之间。

[0480] 在一些实施方案中，制备治疗性蛋白质-半衰期延长部分缀合物的方法具有额外的步骤，即在产生还原半胱氨酸巯基的条件下使治疗性蛋白质与硫醇还原剂接触。如上所述，优选通过重组DNA技术添加的半胱氨酸残基不成对，即不参与Cys-Cys链内二硫键或基本不参与这样的键合。然而，已知不参与这样的Cys-Cys二硫键合且自由缀合的Cys残基与培养基中的游离半胱氨酸反应形成二硫加合物。参见，例如，WO 2009/052249。如此衍生的半胱氨酸将不可用于缀合。为了将新添加的半胱氨酸从二硫加合物中释放出来，纯化后的蛋白质用还原剂 (例如二硫苏糖醇) 处理。然而，这样用还原剂的处理将还原治疗性蛋白质

中的所有半胱氨酸残基,包括许多参与链间和链内Cys-Cys二硫键的天然半胱氨酸。天然Cys-Cys二硫化物通常对蛋白质的稳定性和活性至关重要,它们应该被重新形成。在一些实施方案中,所有天然(例如链间和链内)Cys-Cys二硫化物都被重新形成。

[0481] 为了重新形成天然链间和链内二硫化物残基,在还原以去除半胱氨酸二硫加合物后,将治疗性蛋白质暴露于氧化条件和/或氧化剂中一段规定的时间,例如过夜。在一些实施方案中,可以利用暴露于环境空气过夜来实现天然二硫键的重新形成。在一些实施方案中,使用氧化剂来恢复天然二硫化物。在一些实施方案中,氧化剂选自由含水CuSO<sub>4</sub>和脱氢抗坏血酸(DHAA)组成的组。在一些实施方案中,氧化剂是DHAA。在一些实施方案中,使用的DHAA的范围在5-30当量范围内。在一些实施方案中,范围是10-20当量。在一些实施方案中,范围是15当量。

[0482] 在一些实施方案中,硫醇还原剂选自由以下组成的组:三[2-羰基乙基]膦盐酸盐(TCEP)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、硼氢化钠(NaBH<sub>4</sub>)、氰基硼氢化钠(NaCNBH<sub>3</sub>)、β-巯基乙醇(BME)、半胱氨酸盐酸盐和半胱氨酸。在一些实施方案中,硫醇还原剂是TCEP。

[0483] 在一些实施方案中,硫醇还原剂浓度相对于治疗性蛋白质浓度为1至100倍摩尔过量。在一些实施方案中,硫醇还原剂浓度相对于治疗性蛋白质浓度为20至50倍摩尔过量。在一些实施方案中,在与治疗性蛋白质孵育后,在治疗性蛋白质氧化之前去除硫醇还原剂。

[0484] 在一些实施方案中,将治疗性蛋白质缀合至半衰期延长部分的方法具有在缀合后纯化治疗性蛋白质缀合物的进一步步骤。在一些实施方案中,使用选自离子交换层析、疏水相互作用层析、尺寸排阻色谱和亲和层析或其组合的技术纯化治疗性蛋白质缀合物。

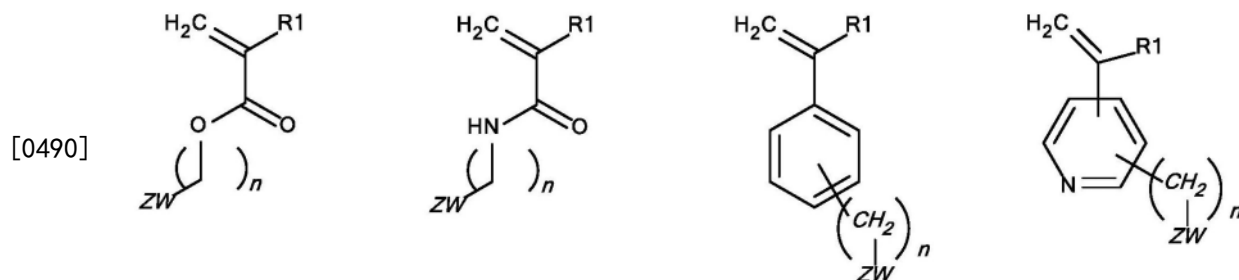
[0485] 在一些实施方案中,相对于未缀合的治疗性蛋白质,治疗性蛋白质缀合物保留了至少20%的生物活性。在一些实施方案中,相对于未缀合的治疗性蛋白质,治疗性蛋白质缀合物保留了至少50%的生物活性。在一些实施方案中,相对于天然治疗性蛋白质,治疗性蛋白质缀合物保留了至少90%的生物活性。

[0486] 在一些实施方案中,相对于未缀合的治疗性蛋白质,治疗性蛋白质缀合物具有增加的半衰期。在一些实施方案中,相对于未缀合的治疗性蛋白质,治疗性蛋白质缀合物的半衰期至少增加1.5倍。在一些实施方案中,相对于未缀合的治疗性蛋白质,治疗性蛋白质缀合物的半衰期至少增加5倍。

[0487] 在一些实施方案中,将治疗性蛋白质缀合至半衰期延长部分的方法的两性离子聚合物为具有两性离子基团的可自由基聚合单体,且该方法具有在聚合介质中聚合可自由基聚合的两性离子单体以提供聚合物的进一步步骤,所述介质包含:可自由基聚合的两性离子单体;过渡金属催化剂 $M_t^{(q-1)+}$ ,其中 $M_t$ 是过渡金属,q是金属的较高氧化态,q-1是金属的较低氧化态,其中金属催化剂以 $M_t^{(q-1)+}X'_{(q-1)}$ 形式的盐提供,其中 $X'$ 是抗衡离子或基团,或者通过提供处于其较高氧化态的非活性金属盐 $M_t^{q+}X'_q$ 以及还原剂来原位提供过渡金属催化剂,还原剂能够将过渡金属从氧化的非活性态还原成还原的活性态;配体;和引发剂。

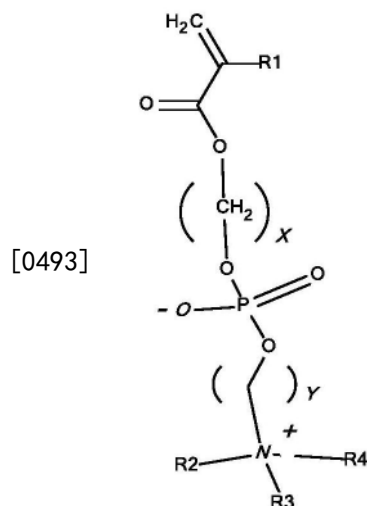
[0488] 为了起到ATRP过渡金属催化剂的作用,过渡金属应该具有至少两个被一个电子分开的容易接近的氧化态,即较高氧化态和较低氧化态。在ATRP中,可逆氧化还原反应导致过渡金属催化剂在较高氧化态和较低氧化态之间循环,而聚合物链在具有增长链端和休眠链端之间循环。参见例如美国专利号7,893,173。

[0489] 在一些实施方案中,可自由基聚合的两性离子单体选自以下组成的组:



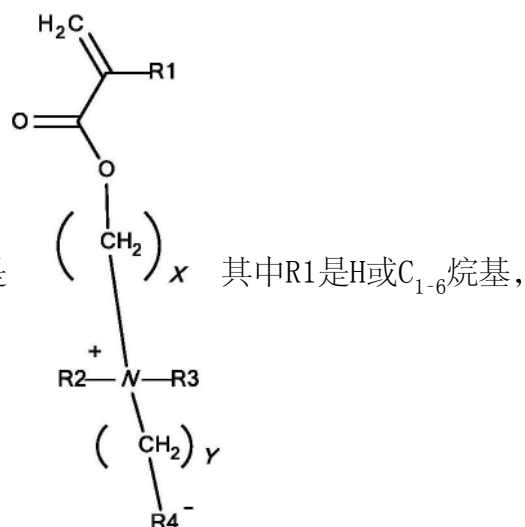
[0491] 其中R1是H或C<sub>1-6</sub>烷基,ZW是两性离子,n是1-6的整数。

[0492] 在一些实施方案中,可自由基聚合的单体是



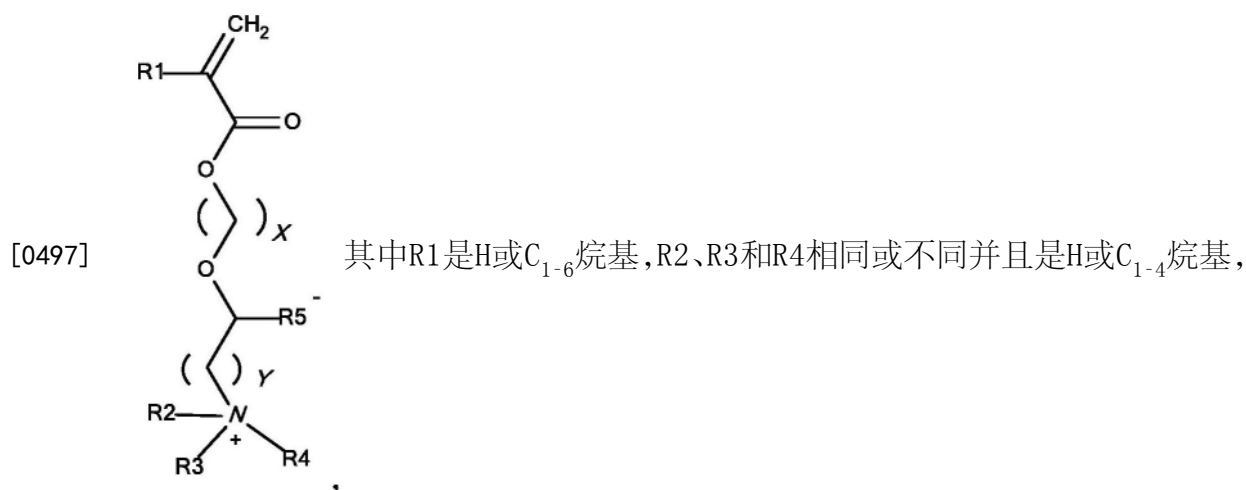
[0494] 其中R1是H或C<sub>1-6</sub>烷基,R2、R3、R4相同或不同并且是H或C<sub>1-4</sub>烷基,X和Y相同或不同并且是1-6的整数。在一些实施方案中,R1、R2、R3和R4各自是甲基,X和Y各自是2。

[0495] 在一些实施方案中,可自由基聚合的单体是



R2和R3相同或不同并且是H或C<sub>1-4</sub>烷基,R4是PO<sub>4</sub><sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>或CO<sub>2</sub><sup>-</sup>,X和Y相同或不同并且是1-6的整数。在一些实施方案中,R1、R2和R3是甲基,R4是PO<sub>4</sub><sup>-</sup>,X和Y各自是2。

[0496] 在一些实施方案中,单体是



R5是PO<sub>4</sub><sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>或CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, X和Y相同或不同并且是1-6的整数。在一些实施方案中, R1、R2、R3和R4是甲基, R5是PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, X和Y是2。

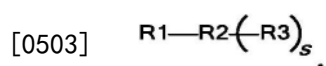
[0498] 在一些实施方案中, 过渡金属Mt选自Cu、Fe、Ru、Cr、Mo、W、Mn、Rh、Re、Co、V、Zn、Au和Ag组成的组。在一些实施方案中, 金属催化剂以Mt<sup>(q-1)+</sup>X<sub>(q-1)</sub><sup>-</sup>形式的盐提供。Mt<sup>(q-1)+</sup>选自自由以下组成的组: Cu<sup>1+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Ru<sup>2+</sup>、Cr<sup>2+</sup>、Mo<sup>2+</sup>、W<sup>2+</sup>、Mn<sup>3+</sup>、Rh<sup>3+</sup>、Re<sup>2+</sup>、Co<sup>+</sup>、V<sup>2+</sup>、Zn<sup>+</sup>、Au<sup>+</sup>和Ag<sup>+</sup>, X<sup>-</sup>选自自由以下组成的组: 卤素、C<sub>1-6</sub>烷氧基、(SO<sub>4</sub>)<sub>1/2</sub><sup>-</sup>、(PO<sub>4</sub>)<sub>1/3</sub><sup>-</sup>、(R7PO<sub>4</sub>)<sub>1/2</sub><sup>-</sup>、(R7<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>1/2</sub><sup>-</sup>、三氟甲磺酸盐、六氟磷酸盐、甲磺酸盐、芳基磺酸盐、CN和R7CO<sub>2</sub>, 其中R7是H或直链或支链C<sub>1-6</sub>烷基, 其可以被卤素取代1至5次。在一些实施方案中, Mt<sup>(q-1)+</sup>是Cu<sup>1+</sup>, X<sup>-</sup>是Br<sup>-</sup>。

[0499] 在一些实施方案中, Mt<sup>(q-1)+</sup>原位提供。在一些实施方案中, Mt<sup>q+</sup>X<sub>q</sub><sup>-</sup>是CuBr<sub>2</sub>。在一些实施方案中, 还原剂是无机化合物。在一些实施方案中, 还原剂选自自由以下组成的组: 低氧化水平的硫化物、亚硫酸氢钠、包含金属离子的无机盐、金属、水合肼和这些化合物的衍生物。在一些实施方案中, 还原剂是金属。在一些实施方案中, 还原剂是Cu<sup>0</sup>。

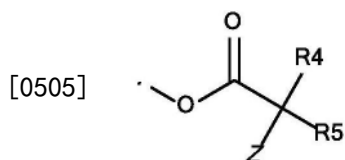
[0500] 在一些实施方案中, 还原剂是有机化合物。在一些实施方案中, 有机化合物选自自由以下组成的组: 烷基硫醇、巯基乙醇或可以容易烯醇化的羰基化合物、抗坏血酸、乙酰丙酮化物、樟脑磺酸、羟基丙酮、还原糖、单糖、葡萄糖、醛和这些有机化合物的衍生物。

[0501] 在一些实施方案中, 配体选自自由以下组成的组: 2,2'-联吡啶、4,4'-二-5-壬基-2,2'-联吡啶、4,4'-二壬基-2,2'-联吡啶、4,4',4''-三(5-壬基)-2,2':6',2''-三联吡啶、N,N,N',N',N''-五甲基二乙烯三胺、1,1,4,7,10,10-六甲基三乙烯四胺、三(2-二甲基氨基乙基)胺、N,N-双(2-吡啶基甲基)十八烷胺、N,N,N',N'-四[(2-吡啶基)甲基]乙二胺、三[(2-吡啶基)甲基]胺、三(2-氨基乙基)胺、三(2-双(3-丁氧基-3-氧代丙基)氨基乙基)胺、三(2-双(3-(2-乙基己氧基)-3-氧代丙基)氨基乙基)胺和三(2-双(3-十二烷氧基-3-氧代丙基)氨基乙基)胺。在一些实施方案中, 配体是2,2'-联吡啶。

[0502] 在一些实施方案中, 引发剂具有以下结构:



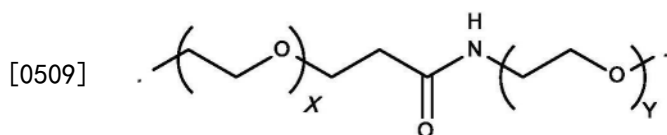
[0504] 其中R1是亲核反应基团, R2包括接头, R3包括具有以下结构的聚合物合成引发剂部分



[0506] 其中R4和R5相同或不同并且选自由以下组成的组：烷基、取代的烷基、亚烷基、烷氧基、羧基烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基醚、烯基、亚烯基、炔基、亚炔基、环亚烷基、杂环烷基、杂环亚烷基、芳基、亚芳基、亚芳氧基、杂芳基、氨基、酰氨基或其任意组合；Z是卤素、-OR(其中R是-H、甲基、乙基、丙基或异丙基)、-SCN或-NCS；并且s是1至20之间的整数。

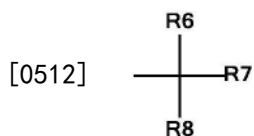
[0507] 在一些实施方案中，Z是Br，R4和R5各自是甲基。在一些实施方案中，R1选自由-NH<sub>2</sub>、-OH和-SH组成的组。

[0508] 在一些实施方案中，R2是烷基、取代的烷基、亚烷基、烷氧基、羧基烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基醚、烯基、亚烯基、炔基、亚炔基、环亚烷基、杂环烷基、杂环亚烷基、芳基、亚芳基、亚芳氧基、杂芳基、氨基、酰氨基或其任意组合。在一些实施方案中，R2是

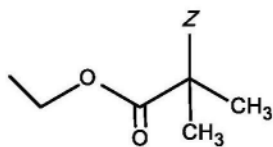


[0510] 其中X和Y相同或不同并且是1-20的整数。在一些实施方案中，X和Y各自是4。

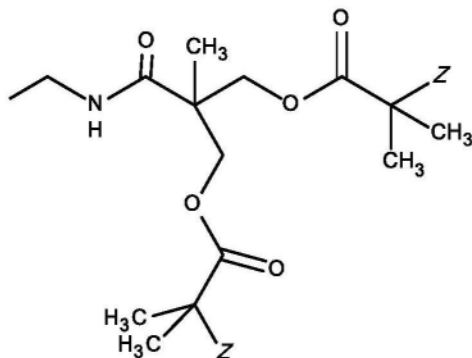
[0511] 在一些实施方案中，R3是



[0513] 其中R6、R7和R8相同或不同并且选自由以下组成的组

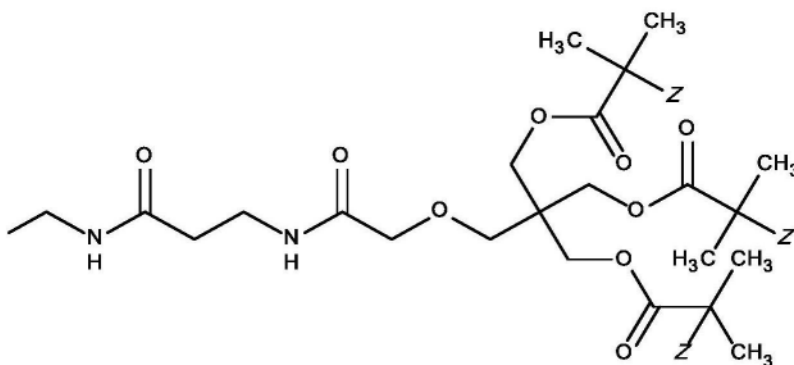


,



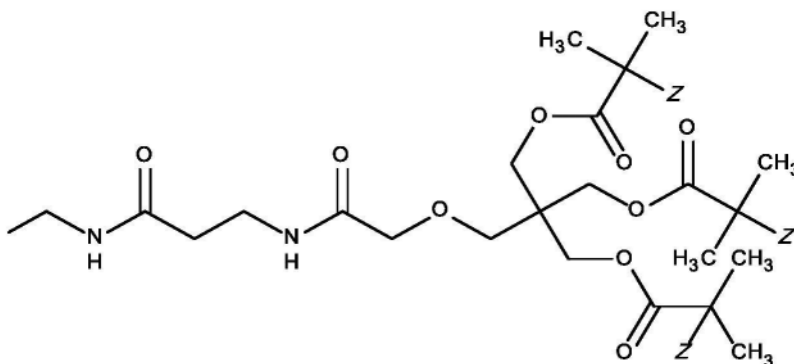
[0514]

, 和

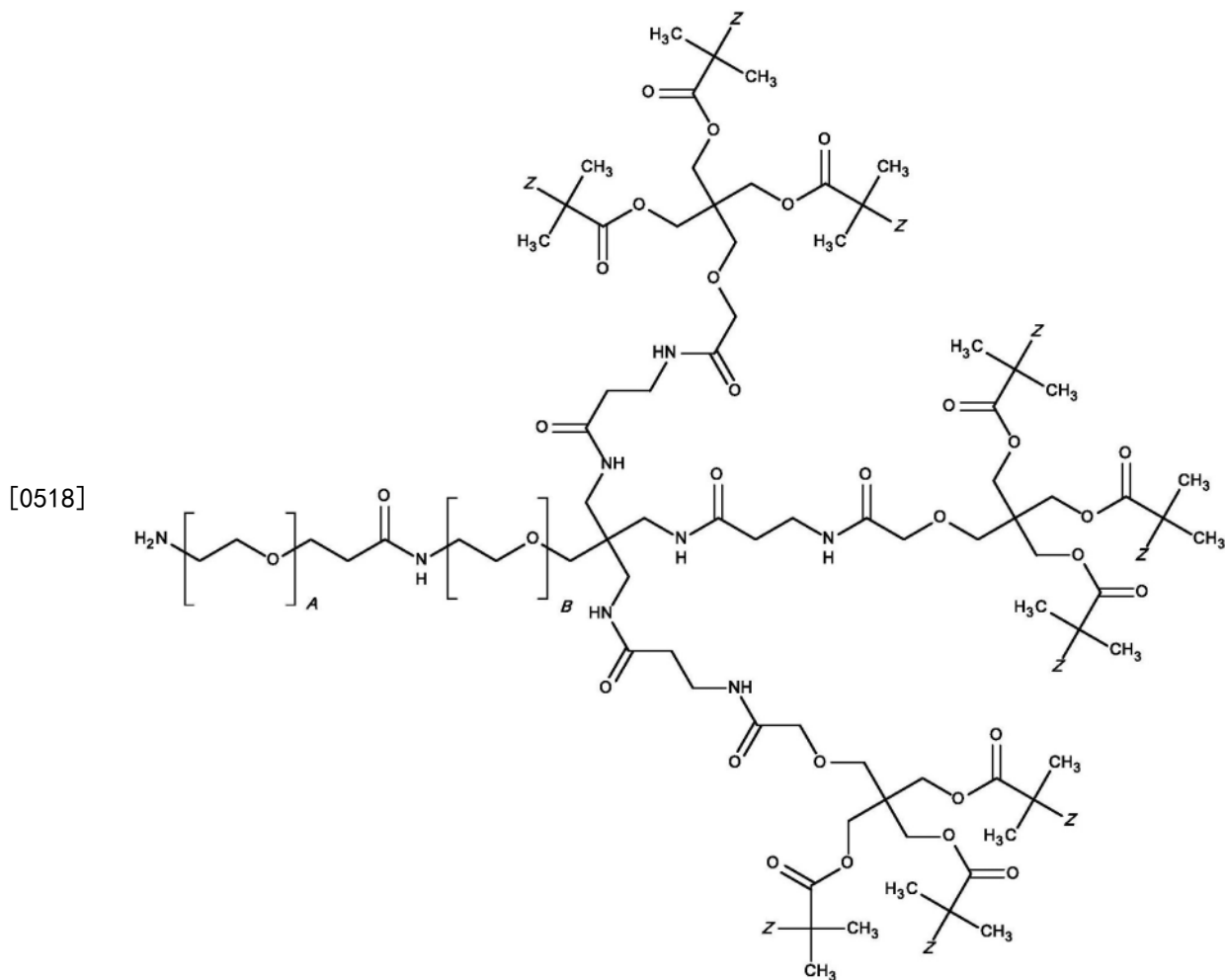


[0515] 其中Z是-OR (其中R是-H、甲基、乙基、丙基或异丙基)、-SCN、-NCS、-F、-Cl、-Br或-I。在一些实施方案中,Z是-Br,R6、R7和R8各自是

[0516]

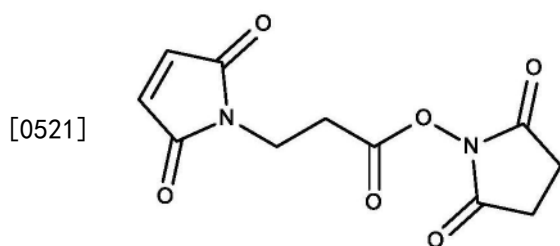


[0517] 在一些实施方案中,引发剂具有以下结构:



[0519] 其中A和B相同或不同并且是2至12的整数,Z是任何卤素,例如Br。在一些实施方案中,A和B各自是4。

[0520] 在一些实施方案中,该方法进一步具有使聚合物与马来酰亚胺试剂反应以提供具有末端马来酰亚胺的聚合物的步骤。在一些实施方案中,马来酰亚胺化合物是



[0522] 药物组合物

[0523] 可将治疗性蛋白质与药学上可接受的赋形剂掺入药物组合物中。适于口服给药的药物组合物可以以离散单元的形式存在,例如胶囊、溶液、糖浆或悬浮液(在水性或非水性液体中;或者作为可食用的泡沫或奶油状物(whips);或者作为乳液)。适用于片剂或硬胶质胶囊的赋形剂包括乳糖、玉米淀粉或其衍生物、硬脂酸或其盐。适用于软胶质胶囊的赋形剂包括例如植物油、蜡、脂肪、半固体或液体多元醇等。为了制备溶液和糖浆,可以使用的赋形剂包括例如水、多元醇和糖。为了制备悬浮液,可以使用油(例如植物油)来提供水包油或油包水悬浮液。

[0524] 药物组合物可适于鼻内给药,其中赋形剂为固体,包括粒度例如在20至500微米范围内的粗粉末,其以吸入鼻咽的方式给药,即通过鼻道从靠近鼻子的粉末容器中快速吸入。用于作为鼻喷雾剂或滴鼻剂给药的、其中赋形剂是液体的合适组合物包括活性成分的水溶液或油溶液。适于吸入给药的药物组合物包括细颗粒粉剂或薄雾,其可通过各种类型的计量剂量加压气雾剂、喷雾器或吹入器产生。

[0525] 适于肠胃外给药的药物组合物包括水性和非水性无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液基本等渗的溶质;以及水性和非水性无菌悬浮液,其可以包括悬浮剂和增稠剂。可用于注射溶液的赋形剂包括例如水、醇、多元醇、甘油和植物油。组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿和小瓶,并且可以在冷冻干燥(冻干)的条件下储存,仅需要在使用前立即加入所携带的无菌液体,例如注射用水。临时注射溶液和混悬液可以由无菌粉末、颗粒和片剂制备。药物组合物可以是基本等渗的,意味着渗透压为约250-400mOsm/kg水。

[0526] 药物组合物可含有防腐剂、增溶剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、增味剂、盐(物质本身可以以药学上可接受的盐的形式提供)、缓冲液、涂层剂或抗氧化剂。除该物质外,它们还可能含有治疗性活性剂。药物组合物可以与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合使用。这样的赋形剂可包括但不限于盐溶液、缓冲盐溶液(如磷酸盐缓冲盐溶液)、葡萄糖、脂质体、水、甘油、乙醇及其组合。

[0527] 抗体和含有它们的药物组合物可以以治疗或预防患者疾病的有效方案给药,包括例如通过口服、玻璃体内、静脉内、皮下、肌内、骨内、鼻内、局部、腹膜内和病灶内给药。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药或途径等。在治疗或预防中,活性剂可以作为可注射组合物,例如作为无菌水性分散体,施用于个体。在一些实施方案中,药剂是等渗的或基本等渗的。

[0528] 对于哺乳动物,尤其是人类的给药,预期活性剂的剂量为0.01mg/kg体重,通常约为1mg/kg。医生可以确定最适合个体的实际剂量,这取决于包括个体的年龄、体重、性别和反应、所治疗的疾病或障碍以及所治疗个体的年龄和状况在内的因素。上述剂量是示例性的平均情况。当然,也有需要更高或更低剂量的情况。在一些实施方案中,剂量可以是0.5至20mg/眼,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19mg。

[0529] 可以根据需要重复该剂量(例如,每周、每两周、每月、每两个月一次、每季度一次、每年两次、每年一次)。如果出现副作用,可以根据正常临床实践减少剂量和/或剂量频率。在一个实施方案中,可以每一至三十天施用一次药物组合物。在一个实施方案中,可以每三十天施用两次药物组合物。在一个实施方案中,可以每周施用一次药物组合物。

[0530] 抗体和药物组合物可以单独使用或与其他化合物(如治疗性化合物或分子,例如抗炎药、止痛药或抗生素)结合使用。这样的与其他化合物一起的施用可以是同时的、单独的或顺序的。可以将组合物制备成成套的形式,其可以包含适当的说明书。

[0531] 本文公开的抗体和药物组合物可用于治疗或预防疾病,特别是本文描述的眼部疾病或病症。

[0532] 抗VEGF抗体缀合物或抗VEGF蛋白缀合物以及含有它们的药物组合物可以以滴眼剂和/或软膏的形式配制,通过眼部、眼内和/或玻璃体内注射、和/或巩膜旁注射、和/或视网膜下注射和/或tenon囊下注射(subtenon injection)、和/或脉络膜上注射

(superchoroidal injection) 和/或结膜下和/或局部给药。这样的抗体和组合物可以通过多种方法递送,例如作为允许化合物缓慢释放到玻璃体中的装置和/或储库的玻璃体内递送,包括在参考文献如Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Ashton和Pearson, editors, Taylor&Francis (2006年3月)中描述的那些。在一个示例中,装置可以是微型泵和/或基质和/或被动扩散系统和/或胶囊化小室的形式,其长时间释放化合物(Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Ashton和Pearson, editors, Taylor&Francis (2006年3月))。

[0533] 用于眼部、眼内或玻璃体内给药的制剂可通过本领域已知的方法和使用的成分来制备。有效治疗的主要要求是适当的穿透眼睛。与可以局部递送药物的眼前部疾病不同,视网膜疾病需要更位点特定的方法。滴眼剂和软膏很少渗透到眼后部,并且血-眼屏障阻碍全身给药的药物渗透到眼组织中。因此,通常选择用于治疗视网膜疾病(如AMD和CNV)的药物递送方法是直接玻璃体内注射。玻璃体内注射通常是间隔重复是,这取决于患者的状况以及递送的药物的性质和半衰期。

[0534] 治疗性抗体和相关缀合物通常被放入具有无菌接入口的容器中,例如,具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉注射溶液袋或小瓶。这样的组合物还可以以预填充注射器的形式提供。

[0535] “稳定”制剂是其中的蛋白质或与其他半衰期延长部分的聚合物缀合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/或生物活性的制剂。“稳定”还指表现出很少或没有不稳定迹象(包括聚集和/或脱酰胺)的制剂。例如,当在指示的5-8°C的温度下储存时,所提供的制剂可以保持稳定至少两年。本公开的抗VEGF抗体缀合物的合适制剂描述于例如PCT公开号W02017117464中,其通过引用整体并入本文。

[0536] 本领域中有多种用于测量蛋白质稳定性的分析技术,例如在Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301 (Vincent Lee ed., New York, N.Y., 1991) and Jones, 1993 Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90中进行了综述。可以在选定的温度下在选定的时间段内测量稳定性。在一些实施方案中,制剂的储存稳定至少6个月、12个月、12-18个月或2年或更长时间。

[0537] 蛋白质,如抗体或其片段,如果在目测颜色和/或透明度时,或通过UV光散射或通过尺寸排阻色谱测量时,没有显示聚集、沉淀、脱酰胺和/或变性的迹象,则在药物制剂中“保持其物理稳定性”。

[0538] 如果给定时间下的化学稳定性使得蛋白质被认为仍保持其生物活性,则蛋白质在药物制剂中“保持其化学稳定性”。化学稳定性可以通过检测和量化蛋白质的化学变化形式来评估。化学变化可涉及大小改变(例如,剪切),其可使用例如尺寸排阻色谱、SDS-PAGE和/或基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱(MALDI/TOF MS)来评估。其他类型的化学变化包括电荷变化(例如,作为脱酰胺的结果发生的),其可以通过例如离子交换层析来评估。例如,如果给定时间下的抗体的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的约10%之内(在测定的误差之内),如在抗原结合测定中所确定的,则抗体在药物制剂中“保持其生物活性”。

[0539] 蛋白质和聚合物之间的化学键保持完整,例如,其未被水解或以其他方式破坏,蛋白质-聚合物缀合物“保持其化学稳定性”。如上所述,缀合物的蛋白质部分保持其化学稳定性。

[0540] “等渗”是指目的制剂具有与人血或玻璃体内注射的玻璃体基本相同的渗透压。等渗制剂的渗透压通常约为250至400mOsm。例如,可以使用蒸气压或冰冻型渗透计测量等渗性。

[0541] 如本文所用,“缓冲液”是指通过其酸碱结合组分的作用抵抗pH变化的缓冲溶液。在一些实施方案中,缓冲液的pH为约3.0至约8.0;例如约4.5至8;或约pH 6至约7.5;或约6.0至约7.0,或约6.5-7.0,或约pH 7.0至约7.5;或约7.1至约7.4。还考虑上述范围之间的任意点的pH值。

[0542] 在一些实施方案中,使用“PBS”磷酸盐缓冲盐溶液、基于Tris的缓冲液和基于组氨酸的缓冲液。在一些实施方案中,使用醋酸盐缓冲液。

[0543] 在一些实施方案中,PBS缓冲液由至少 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和NaCl组成,经调节以提供适当的pH。在一些实施方案中,缓冲液可以含有其他药物赋形剂,例如KCl和其他盐、去垢剂和/或防腐剂,以便提供稳定的储存溶液。

[0544] “防腐剂”是一种化合物,其可包含在制剂中,以基本上减少其中的细菌作用,从而促进例如多用途制剂的生产。潜在防腐剂的示例包括十八烷基二甲基苄基氯化铵、六甲基氯化铵、苄扎氯铵(烷基苄基二甲基氯化铵的混合物,其中烷基是长链化合物)和苄索氯铵。其他类型的防腐剂包括芳香醇如苯酚、丁醇和苯甲醇,羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯,儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚。

[0545] 在一些实施方案中,为了对人类使用或动物测试安全,制剂应具有足够低的内毒素水平。“内毒素”是来源于革兰氏阴性菌细胞膜的脂多糖(LPS)。内毒素由共价连接到疏水性脂质部分(脂质A)的亲水性多糖部分组成。Raetz CR,Ulevitch RJ,Wright SD,Sibley CH,Ding A,Nathan CF.1991.Gram-negative endotoxin:an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction.FASEB J.5(12):2652-2660。脂质A负责内毒素大部分生物活性,即其毒性。内毒素在细菌细胞死亡以及生长和分裂过程中大量脱落。它们具有高度的热稳定性,在常规灭菌条件下不会被破坏。必须用热量或pH进行极端处理,例如180-250℃和超过0.1M的酸或碱(Petsch D,Anspach F.2000.Endotoxin removal from protein solutions.J Biotechnol.76:97-119)。这样的条件当然对生物药物非常有害。

[0546] 在生物技术和制药工业中,可能在生产过程和最终产品中发现内毒素。由于细菌可以在营养不良的培养基(包括水、盐溶液和缓冲液)中生长,除非采取预防措施,否则内毒素是普遍存在的。将内毒素注射到动物或人体内会引起多种病理生理效应,包括内毒素休克、组织损伤甚至死亡。Ogikubo Y,Ogikubo Y,Norimatsu M,Noda K,Takahashi J,Inotsume M,Tsuchiya M,Tamura Y.2004.Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantifications of endotoxin contamination of porcine vaccines.Biologics 32:88-93.

[0547] 静脉内注射低浓度内毒素(1ng/mL)时,在哺乳动物中诱发发热反应和休克(Fiske JM,Ross A, VanDerMeid RK,McMichael JC,Arumugham.2001.Method for reducing endotoxin in Moraxella catarrhalis UspA2 protein preparations.J Chrom B.753:269-278)。所有药典将药物和生物制品静脉应用的内毒素的最大水平设定为每小时每kg体重5个内毒素单位(EU)(Daneshian M,Guenther A,Wendel A,Hartung T,Von Aulock

S.2006. In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs. *J Immunol Method* 313:169-175)。EU是内毒素生物活性的量度。例如,100pg标准内毒素EC-5和120pg大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 0111:B4的内毒素具有1EU的活性 (Hirayama C, Sakata M.2002. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. *J Chrom B* 781:419-432)。在生物研究和制药工业中,达到这一阈值水平一直是一个挑战 (Berthold W, Walter J.1994. *Protein Purification: Aspects of Processes for Pharmaceutical Products*. *Biologicals* 22:135-150; Petsch D, Anspach FB.2000. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotech* 76:97-119)。

[0548] 通过玻璃体内注射递送的药物中存在内毒素尤其令人担忧。Rycroft在1945年首次进行了玻璃体内注射药物(青霉素)。Rycroft BW.1945. Penicillin and the control of deep intra-ocular infection. *British J Ophthalmol* 29(2):57-87。玻璃体是一个腔室,其中可以引入高水平的药物并维持相对长的时间。通过玻璃体内注射可以获得的药物浓度远远超过通过局部给药或全身给药(例如静脉内)所产生的浓度。

[0549] 玻璃体内注射可能导致的最危险的并发症之一是眼内炎。眼内炎分为两类:感染性和无菌性。感染性眼内炎通常由细菌、真菌或寄生虫引起。感染性眼内炎的症状包括剧烈疼痛、视力丧失以及结膜和下层巩膜外层发红。感染性眼内炎需要紧急诊断和治疗。可能的治疗包括玻璃体内注射抗生素和在某些情况下进行平坦部玻璃体切除术。可能需要进行眼球摘除手术来摘除失明且疼痛的眼睛。参见,例如Christy NE, Sommer A.1979. Antibiotic prophylaxis of postoperative endophthalmitis. *Ann Ophthalmol* 11(8):1261-1265。

[0550] 相比之下,无菌性眼内炎不涉及感染剂,可定义为无需玻璃体内抗生素和/或玻璃体视网膜手术即可解决的玻璃体腔急性眼内炎症。如果已经进行了玻璃体微生物学研究,则需要证明其为阴性培养,以维持无菌性眼内炎的诊断。Marticorena J, Romano V, Gomez-Ulla F.2012 "Sterile Endophthalmitis after Intravitreal Injections" *Med Inflamm*. 928123。

[0551] 据观察,玻璃体内注射受内毒素污染的生物药物可导致无菌性眼内炎。Marticorena等人。食品药品监督管理局批准贝伐珠单抗 (Avastin) 用于治疗胶质母细胞瘤和转移性结肠直肠癌、晚期非鳞状非小细胞肺癌和转移性肾癌。贝伐珠单抗也广泛用于超适应症治疗湿性AMD。贝伐珠单抗由制造商以100mg/4ml提供。该溶液不能直接用于玻璃体内注射,应由药剂师配制。已经观察到无菌性眼内炎的集群,并且理论上认为是由配制的药剂师无意中通过内毒素污染贝伐珠单抗引起的。

[0552] 鉴于玻璃体内注射内毒素的可怕临床结果,可通过玻璃体内给药给予患者的内毒素总量非常有限。在一些实施方案中,提供了具有不超过5.0EU/ml内毒素水平的抗体或抗体缀合物的溶液。在一些实施方案中,内毒素水平不超过1.0EU/ml。在一些实施方案中,内毒素水平不超过0.5EU/ml。在一些实施方案中,内毒素水平不超过0.2EU/ml。在一些实施方案中,内毒素水平不超过2、1、0.5、0.2、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03、0.02或0.01EU/ml。

[0553] 两种经FDA批准的常用的存在内毒素的检测是兔热原测试和鲎试剂 (LAL) 测定 (Hoffman S等人2005. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells *J. Immunol. Methods* 298:161-173; Ding JL, Ho BA.2001. New

era in pyrogen testing. *Biotech.* 19:277-281)。兔热原检验是在20世纪20年代发展起来的,包括监测注射了测试溶液的兔子的温度升高。然而,由于费用和长的周转时间,兔热原测试的使用近年来已经大大减少。更常见的是LAL测试。LAL来源于马蹄蟹的血液,暴露于内毒素后会凝结。

[0554] 最简单的LAL测定之一是LAL凝胶-凝结测定。本质上,LAL凝结测定与相关样品的一系列稀释相结合。凝胶的形成与样品中内毒素的量成正比。从样品制备一系列稀释液,并测定每种稀释液形成LAL凝胶的能力。在某一点上,负面反应是包含在内的。原始样品中内毒素的量可以通过稀释测定来估算。

[0555] 还开发了其他LAL测试,包括浊度法LAL测定 (Ong KG, Lelan JM, Zeng KF, Barrett G, Aourob M, Grimes CA. 2006. A rapid highly-sensitive endotoxin detection system. *Biosensors and Bioelectronics* 21:2270-2274) 显色法LAL测定 (Haishima Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T, Matsuda R, Hayashi Y. 2003. Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxins. *J Pharm Biomed Analysis*. 32:495-503)。浊度法和显色法测定比简单的凝胶-凝结稀释测定灵敏和定量得多。

[0556] 在一些实施方案中,提供了一种减少具有本文公开的抗体的组合物中内毒素量的方法。该方法具有以下步骤:使组合物与结合抗体的亲和层析树脂接触;从亲和层析树脂中洗脱抗体以形成具有拮抗物的亲和层析洗脱液;使亲和层析洗脱液与结合抗体的离子交换树脂接触;以及从离子交换树脂中洗脱抗体,其中从离子交换树脂中洗脱的抗体基本上不含内毒素。

[0557] 上述减少内毒素量的方法或本文所述的其他方法或过程可以按照上述步骤中描述的顺序进行,或者可以任选地通过改变步骤的顺序或甚至重复一个或多个步骤来进行。在一个实施方案中,减少组合物中内毒素量的方法按照所述步骤的顺序进行。在一些实施方案中,在使亲和层析洗脱液与离子交换树脂接触之前,以相同顺序重复亲和层析树脂接触、洗涤和洗脱步骤一次以上。该方法还可以包括使用例如0.1微米、0.20微米或0.45微米过滤器的过滤步骤,该步骤可以对在每个树脂结合步骤之后在去除的一种或多种洗脱液中进行。

[0558] 在某些情况下,可以重复使组合物与亲和层析树脂接触、洗涤和从亲和层析树脂洗脱抗体的步骤一次以上,然后使第一洗脱液与离子交换树脂接触。在一个实施方案中,亲和层析树脂包括重组蛋白A (“r蛋白A”) 树脂。合适的重组蛋白A树脂的一个示例是MabSelect Sure和Mabselect Sure LX (Cytiva)。在另一个实施方案中,合适的亲和层析树脂将包括蛋白G层析树脂。在其他实施方案中,合适的亲和层析树脂包括混合的蛋白A/蛋白G树脂。在一些实施方案中,合适的亲和层析树脂包括蛋白L树脂。在其他实施方案中,合适的亲和层析树脂包括疏水性电荷诱导树脂,该树脂包含4-巯基乙基吡啶配体,例如MEP HyperCel®树脂 (BioSeptra, 法国圣克里斯托夫塞尔吉)。

[0559] 在一些实施方案中,离子交换树脂包括阴离子交换树脂。如本领域技术人员所知,离子交换剂可以基于与基质以及所附的带电基团相关的各种材料。例如,可以使用以下基质,其中所提及的材料可以或多或少地交联:POROS XS (ThermoFisher)、POROS XQ (ThermoFisher)、MacroCap Q (Cytiva, 新泽西州皮斯卡塔韦)、琼脂糖基 (例如Sepharese

CL-6B®、Sephacel®、Sephacel®、Sephacel®和Sephacel®)、纤维素基(例如DEAE Sephacel®)、葡聚糖基(例如Sephadex®)、二氧化硅基和合成聚合物基。对于阴离子交换树脂,共价附着于基质的带电基团可以是例如二乙氨基乙基、季氨基乙基和/或季铵。在一些实施方案中,阴离子交换树脂包含季胺基团。具有季胺基团用于结合抗M-CSF抗体的示例性阴离子交换树脂是Q Sepharose®树脂(Amersham,新泽西州皮斯卡塔韦)。

[0560] 在其他方面,如果在将组合物进行前述阴离子交换层析步骤后,内毒素水平高于所需水平,则可替代地使组合物进行阳离子交换树脂处理。在一些实施方案中,组合物中的任何内毒素应该与所讨论的蛋白质具有不同的与离子交换树脂的结合,以允许从内毒素中纯化蛋白质。在这方面,内毒素是带负电荷的,通常会与阴离子交换树脂结合。如果蛋白质和内毒素都与阴离子交换树脂结合,可以通过使用盐梯度将两者洗脱成不同的级分来实现一种与另一种的纯化。蛋白质与特定树脂的相关结合也可以通过改变相对于蛋白质pI的缓冲液的pH来改变。在一些实施方案中,阳离子交换层析是唯一使用的离子交换层析。

[0561] 在一些实施方案中,如果在阴离子交换树脂后内毒素水平过高,可对组合物进一步进行第二离子交换步骤,例如,通过使组合物与阳离子交换树脂接触,接着进行洗涤步骤,然后从离子交换树脂洗脱。在一些实施方案中,阳离子交换树脂包含用于结合的磺酸基团。示例性的阳离子交换树脂是SP Sepharose®树脂FF(Amersham,新泽西州皮斯卡塔韦)POROS XS(CEX)(ThermoFisher)。在一些实施方案中,内毒素的去除是使用疏水相互作用层析完成的。在一些实施方案中,当内毒素和mAb具有相同或相似的电荷时,使用疏水相互作用层析。在一些实施方案中,疏水相互作用层析可以通过示例性系统进行,如使用Sartobind Phenyl(Sartorius,德国哥廷根)。

[0562] 在一些实施方案中,在产生具有特定内毒素水平的抗体蛋白质溶液之后,在蛋白质最终制剂之前有许多步骤。在一些实施方案中,半衰期延长部分与蛋白质缀合。然后将缀合物配制成最终的注射到患者体内的药物制剂。在一些实施方案中,缀合物再次在离子交换树脂上纯化,该离子交换树脂可以是阳离子交换树脂。在其他实施方案中,配制蛋白质。在所有情况下,应采用正常的实验室程序来防止内毒素污染物引入蛋白质样品或蛋白质-聚合物缀合物中。

[0563] 在一些实施方案中,本文考虑了以下任何安排:

[0564] 一种使用亲和层析纯化产品的方法,该方法包括将洗脱液上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合;和用包含离液剂的缓冲溶液洗涤亲和层析基质。

[0565] 一种从包含蛋白质和一种或多种杂质的上样流体中纯化产品和减少杂质的方法,该方法通过使上样流体经过亲和层析基质,随后通过至少一种包含离液盐的洗涤溶液,并使用洗脱溶液收集蛋白质。

[0566] 一种分离包含目的蛋白质的洗出液中的杂质的方法,该方法包括将包含目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上;并用一种或多种缓冲溶液洗涤亲和层析基质,缓冲溶液包括锂和锂盐、镁和镁盐、钙和钙盐以及胍和胍盐中的一种或多种。

[0567] 一种使用亲和层析生产产品的方法,该方法包括将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,用包含磷酸钠和盐的第一缓冲液对亲和层析基质进行第一洗涤,并用包含离液剂的第二缓冲液对亲和层析基质进行第二洗涤。

[0568] 一种使用亲和层析生产产品的方法,该方法包括将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,用含有Tris和盐的第一缓冲液进行第一洗涤,用含有Tris和离液剂的第二缓冲液进行第二洗涤,其中第二缓冲液离液剂与第一缓冲液中含有的盐不同。

[0569] 一种生产产品的方法,该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱结合的目的蛋白质;和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

[0570] 一种生产产品的方法,该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,向亲和层析基质供给包含离液盐的缓冲溶液,洗脱结合的目的蛋白质;和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

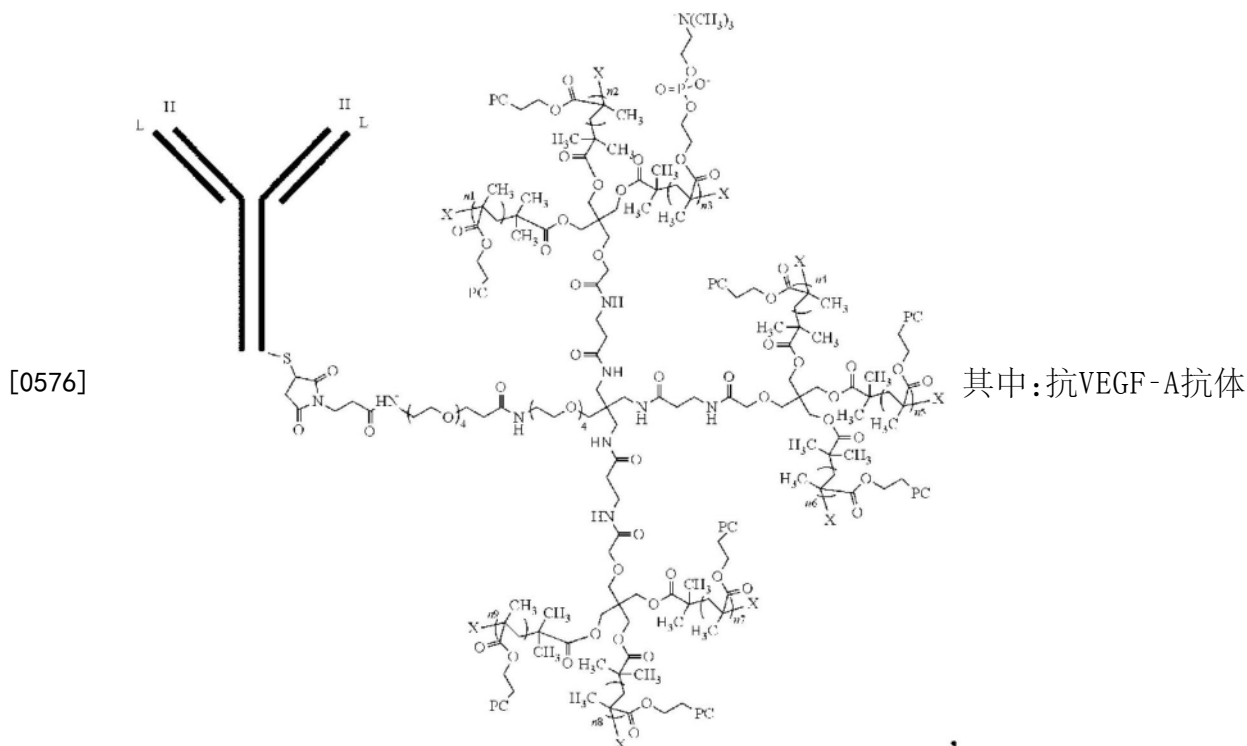
[0571] 一种生产产品的方法,该方法包括:收集缀合蛋白质,其中缀合蛋白质包含与缀合聚合物缀合的抗体,将缀合蛋白质上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与缀合蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱缀合蛋白质,和收集洗出液,其中洗出液含有缀合蛋白质。

[0572] 一种生产产品的方法,该方法包括用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,并从洗出液中去除病毒污染物。该方法还可以包括,其中从洗出液中去除病毒污染物包括低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)和/或渗滤(DF)中的一种或多种。该方法还可以包括,其中洗出液进一步与可接受的药物赋形剂组合以形成药物组合物。该方法还可以包括,其中向药物组合物中加入缓冲溶液。该方法还可以包括,其中向药物组合物中加入防腐溶液。该方法还可以包括,其中进一步精制药物组合物用于玻璃体内注射。

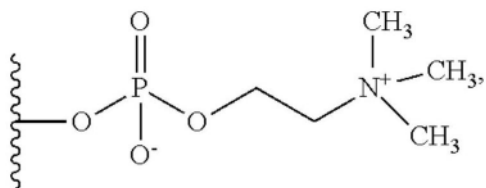
[0573] 一种生产产品的方法,该方法包括用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,去除离液盐,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质。

[0574] 一种生产产品的方法,该方法包括收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,并从洗出液中去除病毒污染物。

[0575] 一种生产产品的方法,该方法包括将洗脱液上样到亲和层析基质中,用第一洗涤缓冲液洗涤,用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤,用第三洗涤缓冲液洗涤,其中第三洗涤缓冲液去除离液盐,用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。该方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含50mM磷酸钠。该方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液还包含250mM NaCl。该方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含Tris和盐。该方法还可以包括从洗出液中去除病毒污染物。该方法还可以包括,其中去除病毒污染物包括:低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)或渗滤(DF)中的一种或多种。该方法还可以包括,其中洗脱液包含目的蛋白质。该方法还可以包括,其中目的蛋白质是抗体。该方法还可以包括,其中抗体进一步与聚合物缀合以形成抗体缀合物。该方法还可以包括,其中抗体缀合物包含双特异性抗体。该方法还可以包括,其中双特异性抗体包括抗VEGF和抗IL-6结合部分。该方法还可以包括,其中抗体缀合物具有以下结构:



的每条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示;聚合物通过C443(EU编号)的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上;PC是:



其中曲线表示与聚合物其余部分的连接点,其中X为

a) —OR, 其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基, b) —H, c) 任何卤素, 包括—Br、—Cl或—I, d) —SCN, 或 e) —NCS; 并且 i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数; 或 ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同, 使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

[0577] 一种生产产品的方法, 该方法包括回收细胞培养物上清液, 其中细胞培养物上清液包含目的蛋白质, 将细胞培养物上清液处理成洗脱液, 其中洗脱液包含目的蛋白质, 将洗脱液上样到亲和层析基质中, 用包含Tris或磷酸钠的第一洗涤缓冲液洗涤, 用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤, 用洗脱缓冲液洗脱, 其中收集洗出液, 其中洗出液包含蛋白质产品, 用低pH病毒缓冲液灭活洗出液中存在的病毒污染物以得到病毒灭活的洗出液, 过滤病毒灭活的洗出液, 对病毒灭活的洗出液进行至少一轮离子交换层析, 并过滤病毒灭活的洗出液以得到渗余物, 其中渗余物包含目的蛋白质。该方法还可以包括, 其中细胞培养物上清液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。该方法还可以包括, 其中处理细胞培养物上清液包括从细胞培养物中收获细胞产品。该方法还可以包括, 其中净化细胞培养物以去除细胞和细胞碎片。该方法还可以包括, 其中洗脱液包含澄清的细胞培养物上清液。一种使用亲和层析纯化蛋白质的方法, 该方法包括使上样流体与介质接触, 其中介质是结合目的蛋白质的亲和层析基质, 用包含离液剂的缓冲溶液洗涤介质, 其中离液剂是盐, 并在适于洗脱目的蛋白质的条件下使洗涤过的介质与洗脱溶液接触。

[0578] 一种生产产品的方法,该方法包括将含有目的蛋白质的溶液施加到亲和层析基质上,用第一缓冲液洗涤亲和层析基质,用含有离液剂的第二缓冲液洗涤亲和层析基质,用第三缓冲液洗涤亲和层析基质以去除离液剂,用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。

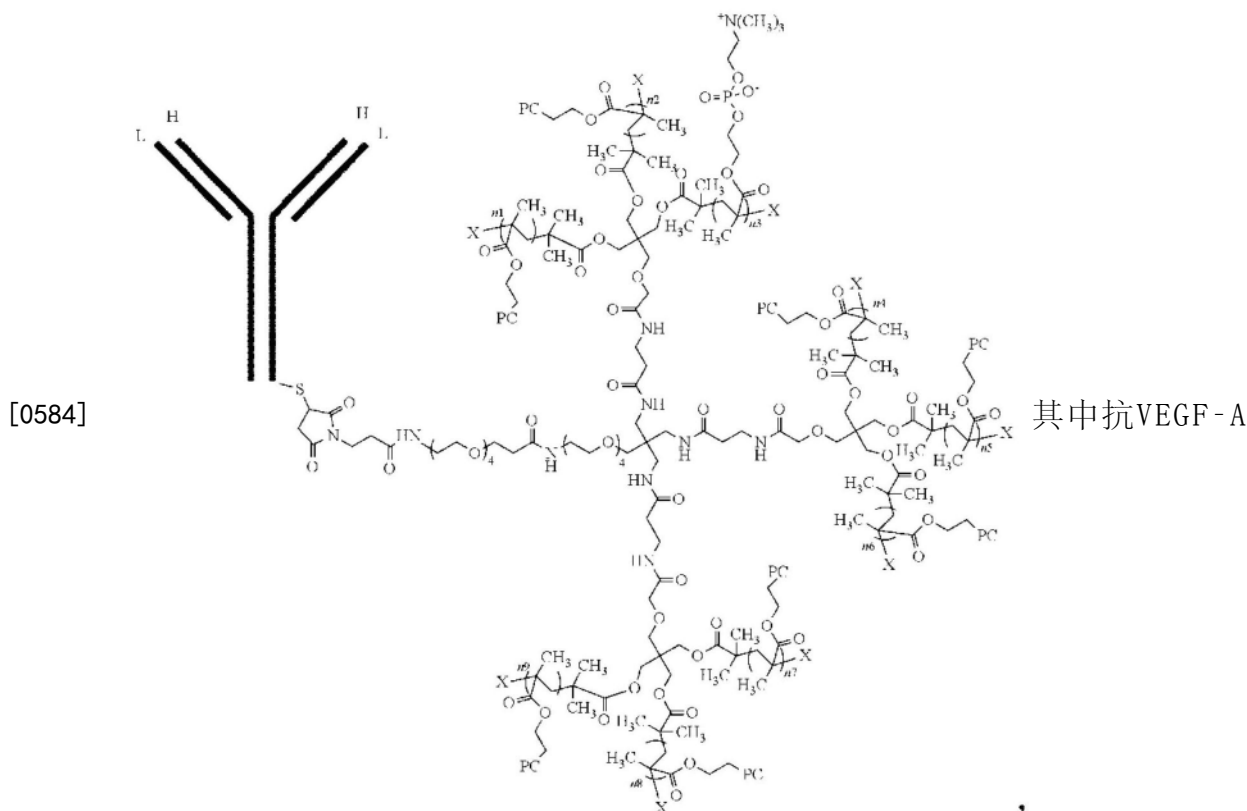
[0579] 一种蛋白质纯化系统,该系统包括:柱,其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白,包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液,包含tris的中间洗涤缓冲液,包含氯化镁的第二洗涤缓冲液和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

[0580] 一种蛋白质纯化系统,该系统包括:柱,其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白;包含tris和盐的第一tris洗涤缓冲液,中间tris洗涤缓冲液,包含氯化镁的第二洗涤缓冲液和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。该系统还可以包括,其中柱包含用于亲和层析的配体。该系统还可以包括,其中配体包括蛋白A或蛋白G。该系统还可以包括,其中包含磷酸钠和盐的第一洗涤缓冲液具有5.5至9.5之间的pH。该系统还可以包括,其中包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液包含约50mM磷酸钠。该系统还可以包括,其中包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液包含约250mM NaCl。该系统还可以包括,其中第一tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。该系统还可以包括,其中第一tris洗涤缓冲液还包含约250mM NaCl。该系统还可以包括,其中中间tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。该系统还可以包括,其中第一tris洗涤缓冲液的pH为约7.2。该系统还可以包括,其中第二洗涤缓冲液的pH为约7.8。该系统还可以包括,其中第二洗涤缓冲液中氯化镁的浓度为约2.8M。该系统还可以包括,其中洗脱缓冲液中甲酸钠的浓度包含10mM。

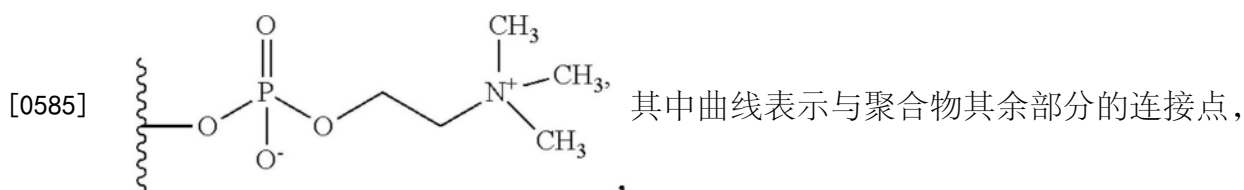
[0581] 一种抗体纯化系统,其包括具有与抗体结合的蛋白A树脂的柱,其中抗体包括分别为SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个和SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个的轻链和重链,包含离液盐的离液洗涤缓冲液,和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。

[0582] 本文所述的方法还可以包括,其中目的蛋白质是双特异性抗体。本文所述的方法还可以包括,其中双特异性抗体对VEGF和IL-6具有特异性。本文所述的方法还可以包括,其中双特异性抗体对VEGF和IL-6具有特异性。本文所述的方法还可以包括,其中目的蛋白质是抗体缀合物。本文所述的方法还可以包括,其中亲和层析基质是蛋白A层析基质。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液中的离液剂由镁盐组成。本文所述的方法还可以包括,其中镁盐的浓度在1.5-3.5M之间。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液中的离液剂由钙盐组成。本文所述的方法还可以包括,其中钙盐的浓度在1-3M之间。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液中的离液剂由胍盐组成。本文所述的方法还可以包括,其中胍盐的浓度在0.05-3M之间。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液还包含tris。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液中tris的浓度至少为5mM。本文所述的方法还可以包括,其中缓冲溶液的pH大于5.5。本文所述的方法还可以包括,其中洗出液还含有病毒杂质。本文所述的方法还可以包括去除病毒杂质。本文所述的方法还可以包括灭活病毒杂质。本文所述的方法还可以包括在用缓冲溶液洗涤之前,用预洗涤缓冲溶液洗涤上样有上样流体的亲和层析基质。本文所述的方法还可以包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。本文所述的方法还可以包括,其中预洗涤缓冲溶液包含磷酸钠。本文所述的方法还可以包括,其中预洗缓冲溶液包含Tris和盐。

[0583] 本文所述的方法还可以包括,其中抗体缀合物具有以下结构:



抗体的每条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示;聚合物通过C443(EU编号)的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上;PC是:



其中X为a) —OR,其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基,b) —H,c) 任何卤素,包括—Br、—Cl或—I,d) —SCN,或e) —NCS;并且i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数;或ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同,使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

[0586] 本文所述的方法还可以包括,其中抗体缀合物包含抗VEGF抗体缀合物,该抗VEGF抗体缀合物包含抗VEGF-A轻链和抗VEGF-A重链,其中抗VEGF-A抗体重链包含CDRH1:即SEQ ID NO:172中的CDRH1,CDRH2:即SEQ ID NO:173中的CDRH2,和CDRH3:即SEQ ID NO:174中的CDRH3,抗VEGF-A抗体轻链包含CDRL1:即SEQ ID NO:199中的CDRL1,CDRL2:即SEQ ID NO:200中的CDRL2,和CDRL3:即SEQ ID NO:201中的CDRL3。本文所述的方法还可以包括,其中抗VEGF抗体缀合物包含:包含与聚合物结合的抗VEGF-A免疫球蛋白G(IgG)的抗体缀合物,该聚合物包含MPC单体,其中抗VEGF-A抗体重链的序列为SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个,抗VEGF-A抗体轻链的序列为SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个,并且其中抗体在C449处与聚合物结合。本文所述的方法还可以包括,其中目的靶蛋白质通过细胞培养物产生。本文所述的方法还可以包括,其中细胞培养物包含CHO细胞。本文所述的方法还可以包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析

基质的步骤。本文所述的方法还可以包括用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除核酸、内毒素、消泡剂或除目的靶蛋白质之外的其他小分子。本文所述的方法还可以包括用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除杂质,同时保持目的靶蛋白质与亲和层析基质结合。本文所述的方法还可以包括用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除除目的靶蛋白质之外的宿主细胞蛋白质。本文所述的方法还可以包括,其中在缓冲溶液中添加离液剂不会洗脱目的靶蛋白质。本文所述的方法还可以包括病毒灭活、切向流过滤、渗滤、超滤、离子交换层析或病毒减少过滤中的一种或多种。本文所述的方法还可以包括,其中洗脱液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。本文所述的方法还可以包括,其中产品是目的蛋白质。本文所述的方法还可以包括,其中杂质包括宿主细胞蛋白质杂质。

[0587] 本文所述的方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含盐。本文所述的方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含基于磷酸盐的种类。本文所述的方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含磷酸钠。本文所述的方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含约0.1至约250mM之间的磷酸盐,包括约0.1mM、约1mM、约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约150mM、约200mM、约250mM,或0.1至250mM之间的任何整数。本文所述的方法还可以包括,其中第一洗涤缓冲液包含10mM磷酸钠。

[0588] 本文所述的方法还可以包括,其中第二洗涤缓冲液包含盐。本文所述的方法还可以包括,其中第二洗涤缓冲液包含基于磷酸盐的种类。本文所述的方法还可以包括,其中第二洗涤缓冲液包含磷酸钠。本文所述的方法还可以包括,其中第二洗涤缓冲液包含约0.1至约2500mM之间的磷酸盐,包括约0.1mM、约1mM、约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约150mM、约200mM、约250mM,或0.1至250mM之间的任何整数。本文所述的方法还可以包括,其中第二洗涤缓冲液包含10mM磷酸钠。

[0589] 本文所述的方法还可以包括,其中洗涤缓冲液包含盐。本文所述的方法还可以包括,其中洗涤缓冲液包含基于磷酸盐的种类。本文所述的方法还可以包括,其中洗涤缓冲液包含磷酸钠。本文所述的方法还可以包括,其中洗涤缓冲液包含约0.1至约250mM之间的磷酸盐,包括约0.1mM、约1mM、约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约150mM、约200mM、约250mM,或0.1至250mM之间的任何整数。本文所述的方法还可以包括,其中洗涤缓冲液包含10mM磷酸钠。

[0590] 在一些实施方案中,缓冲系统可采用除Tris以外的系统。在一些实施方案中,缓冲系统可采用除磷酸钠以外的系统。在一些实施方案中,缓冲液可以是以下中的一种或多种:醋酸盐、柠檬酸盐、ACES、BES、Bicine、HEPES、MES、MOPS、MOPSO、TAPS、Tricine、Bis-Tris、Bis-Tris丙烷、甲次砷酸盐、CAPS、CAPSO、CHES、甘氨酸、双甘肽、咪唑、PIPES、TEA或TES。在一些实施方案中,缓冲系统可采用除了所提供的pH值之外的pH值。在一些实施方案中,缓冲系统可采用2-13之间的pH值。在一些实施方案中,所用的洗脱缓冲液不是甲酸钠。在一些实施方案中,洗脱缓冲液是碱性的。在一些实施方案中,洗脱缓冲液是酸性的。

[0591] 安排

[0592] 在一些实施方案中,本文考虑了以下任何安排:

[0593] 1.一种使用亲和层析纯化产品的方法,该方法包括将洗脱液上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合;和用包含离液剂的缓冲溶液洗涤亲和层析基质。

[0594] 2.一种从包含蛋白质和一种或多种杂质的上样流体中纯化产品和减少杂质的方法,该方法通过使上样流体经过亲和层析基质,随后通过至少一种包含离液盐的洗涤溶液,并使用洗脱溶液收集蛋白质。

[0595] 3.一种分离包含目的蛋白质的洗出液中的杂质的方法,该方法包括:

[0596] 将包含目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上;并用一种或多种缓冲溶液洗涤亲和层析基质,缓冲溶液包括锂和锂盐、镁和镁盐、钙和钙盐以及胍和胍盐中的一种或多种。

[0597] 4.一种使用亲和层析生产产品的方法,该方法包括:

[0598] 将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,

[0599] 用包含磷酸钠和盐的第一缓冲液对亲和层析基质进行第一洗涤,和

[0600] 用包含离液剂的第二缓冲液对亲和层析基质进行第二洗涤。

[0601] 5.一种使用亲和层析生产产品的方法,该方法包括:

[0602] 将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上,

[0603] 用含有Tris和盐的第一缓冲液进行第一洗涤,

[0604] 用含有Tris和离液剂的第二缓冲液进行第二洗涤,其中第二缓冲液离液剂与第一缓冲液中含有的盐不同。

[0605] 6.一种生产产品的方法,该方法包括:

[0606] 收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,

[0607] 将上样流体上样到亲和层析基质上,

[0608] 其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,

[0609] 用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,

[0610] 洗脱结合的目的蛋白质;和收集洗出液,

[0611] 其中洗出液含有目的蛋白质。

[0612] 7.一种生产产品的方法,该方法包括:

[0613] 收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,

[0614] 将上样流体上样到亲和层析基质上,

[0615] 其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,

[0616] 向亲和层析基质供给包含离液盐的缓冲溶液,

[0617] 洗脱结合的目的蛋白质;和

[0618] 收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。

[0619] 8.一种生产产品的方法,该方法包括:

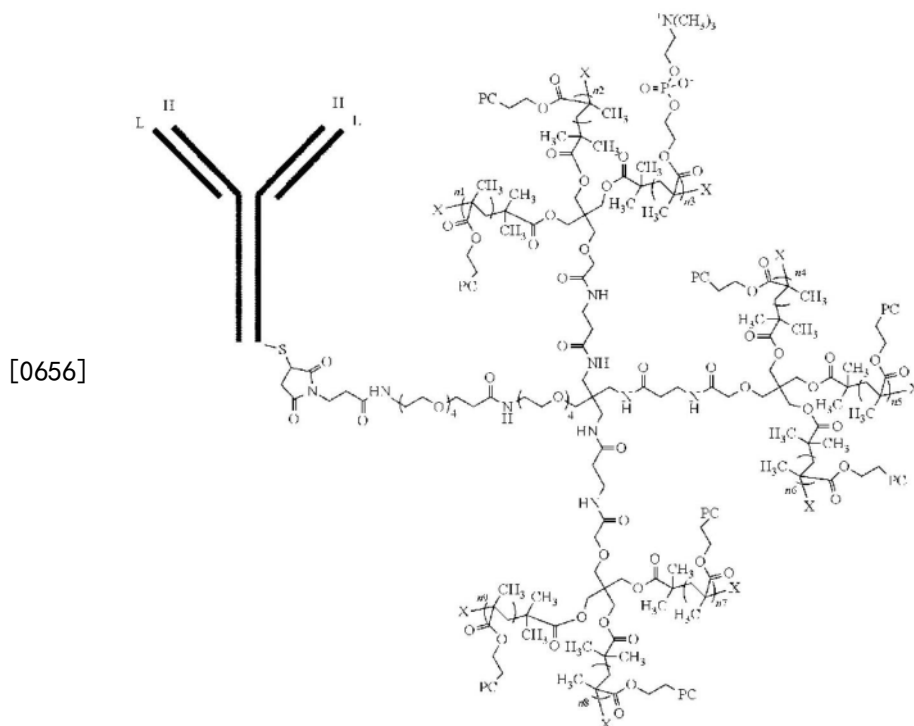
[0620] 收集缀合蛋白质,其中缀合蛋白质包含与缀合聚合物结合的抗体,将缀合蛋白质上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与缀合蛋白质结合,用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,

[0621] 洗脱缀合蛋白质,和

[0622] 收集洗出液,其中洗出液含有缀合蛋白质。

[0623] 9.一种生产产品的方法,该方法包括:

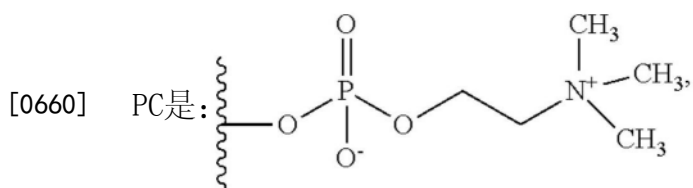
- [0624] 用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,洗脱并收集洗出液,
- [0625] 其中洗出液含有目的靶蛋白质,
- [0626] 并从洗出液中去除病毒污染物。
- [0627] 10.根据安排9所述的方法,其中从洗出液中去除病毒污染物包括:
- [0628] 低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)和/或渗滤(DF)中的一种或多种。
- [0629] 11.一种生产产品的方法,该方法包括:
- [0630] 用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,和去除离液盐,洗脱并收集洗出液,
- [0631] 其中洗出液含有目的靶蛋白质。
- [0632] 12.根据11所述的方法,其中洗出液进一步与可接受的药物赋形剂组合以形成药物组合物。
- [0633] 13.根据安排12所述的方法,其中向药物组合物中加入缓冲溶液。
- [0634] 14.根据安排12所述的方法,其中向药物组合物中加入防腐溶液。
- [0635] 15.根据安排12所述的方法,其中进一步精制药物组合物用于玻璃体内注射。
- [0636] 16.一种生产产品的方法,该方法包括:
- [0637] 收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质,将上样流体上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合,
- [0638] 用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质,
- [0639] 洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质,和
- [0640] 从洗出液中去除病毒污染物。
- [0641] 17.一种生产产品的方法,该方法包括:
- [0642] 将洗脱液上样到亲和层析基质中,
- [0643] 用第一洗涤缓冲液洗涤,
- [0644] 用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤,
- [0645] 用第三洗涤缓冲液洗涤,其中第三洗涤缓冲液去除离液盐,和
- [0646] 用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。
- [0647] 18.根据安排17所述的方法,其中第一洗涤缓冲液包含50mM磷酸钠。
- [0648] 19.根据安排17所述的方法,其中第一洗涤缓冲液还包含250mM NaCl。
- [0649] 20.根据安排17所述的方法,其中第一洗涤缓冲液包含Tris和盐。
- [0650] 21.根据安排17所述的方法,还包括从洗出液中去除病毒污染物。
- [0651] 22.根据安排21所述的方法,其中去除病毒污染物包括:低pH灭活、去垢剂灭活、精制层析步骤、病毒过滤(VF)、超滤(UF)或渗滤(DF)中的一种或多种。
- [0652] 23.根据安排17所述的方法,其中洗脱液包含目的蛋白质。
- [0653] 24.根据安排23所述的方法,其中目的蛋白质是抗体。
- [0654] 25.根据安排24所述的方法,其中抗体进一步与聚合物缀合以形成抗体缀合物。
- [0655] 26.根据安排24所述的方法,其中抗体缀合物具有以下结构:



[0657] 其中:

[0658] 抗VEGF-A抗体的每条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示;

[0659] 聚合物通过C443 (EU编号) 的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上;



[0661] 其中曲线表示与聚合物其余部分的连接点,其中X为a) —OR,其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基,b) —H,c) 任何卤素,包括—Br、—Cl或—I,d) —SCN,或e) —NCS;并且i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数;或ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同,使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

[0662] 27. 根据安排25所述的方法,其中抗体缀合物包含双特异性抗体。

[0663] 28. 根据安排24所述的方法,其中双特异性抗体包括抗VEGF和抗IL-6结合部分。

[0664] 29. 一种生产产品的方法,该方法包括:

[0665] 回收细胞培养物上清液,其中细胞培养物上清液包含目的蛋白质,

[0666] 将细胞培养物上清液处理成洗脱液,其中洗脱液包含目的蛋白质,

[0667] 将洗脱液上样到亲和层析基质中,

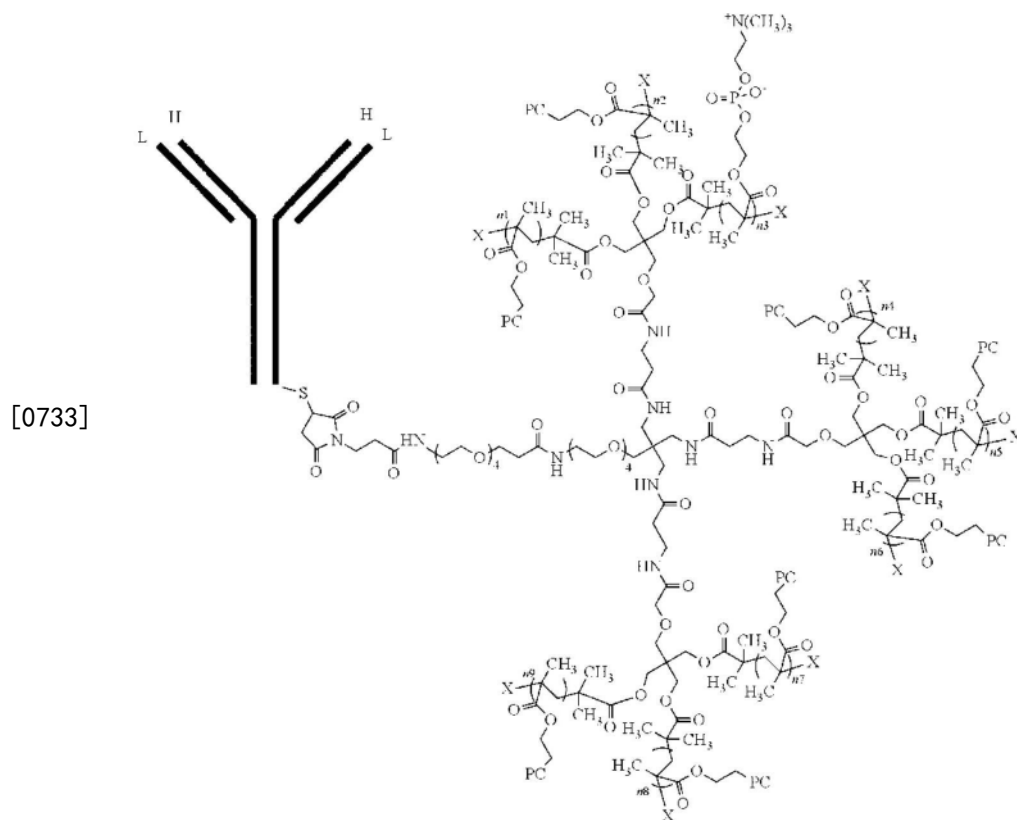
[0668] 用包含Tris或磷酸钠的第一洗涤缓冲液洗涤,

[0669] 用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤,

[0670] 用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品,用低pH病毒缓冲液灭活洗出液中存在的病毒污染物以得到病毒灭活的洗出液,

- [0671] 过滤病毒灭活的洗出液，
- [0672] 对病毒灭活的洗出液进行至少一轮离子交换层析，和
- [0673] 过滤病毒灭活的洗出液以得到渗余物，其中渗余物包含目的蛋白质。
- [0674] 30. 根据安排29所述的方法，其中细胞培养物上清液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。
- [0675] 31. 根据安排29所述的方法，其中处理细胞培养物上清液包括从细胞培养物中收获细胞产品。
- [0676] 32. 根据安排31所述的方法，其中澄清细胞培养物以去除细胞和细胞碎片。
- [0677] 33. 根据安排29所述的方法，其中洗脱液包含澄清的细胞培养物上清液。
- [0678] 34. 一种使用亲和层析纯化蛋白质的方法，该方法包括：
- [0679] 使上样流体与介质接触，其中介质是结合目的蛋白质的亲和层析基质，用包含离液剂的缓冲溶液洗涤介质，其中离液剂是盐，并在适于洗脱目的蛋白质的条件下使洗涤过的介质与洗脱溶液接触。
- [0680] 35. 一种生产产品的方法，该方法包括：
- [0681] 将含有目的蛋白质的溶液施加到亲和层析基质上，
- [0682] 用第一缓冲液洗涤亲和层析基质，
- [0683] 用含有离液剂的第二缓冲液洗涤亲和层析基质，
- [0684] 用第三缓冲液洗涤亲和层析基质以去除离液剂，和
- [0685] 用洗脱缓冲液洗脱，其中收集洗出液，其中洗出液包含蛋白质产品。
- [0686] 36. 一种蛋白质纯化系统，该系统包括：
- [0687] 柱，其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白，
- [0688] 包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液，
- [0689] 包含tris的中间洗涤缓冲液，
- [0690] 包含氯化镁的第二洗涤缓冲液，和
- [0691] 包含甲酸钠的洗脱缓冲液。
- [0692] 37. 一种蛋白质纯化系统，该系统包括：
- [0693] 柱，其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白，
- [0694] 包含tris和盐的第一tris洗涤缓冲液，
- [0695] 中间tris洗涤缓冲液，
- [0696] 包含氯化镁的第二洗涤缓冲液，和
- [0697] 包含甲酸钠的洗脱缓冲液。
- [0698] 38. 根据安排36所述的系统，其中柱包含用于亲和层析的配体。
- [0699] 39. 根据安排36所述的系统，其中配体包括蛋白A或蛋白G。
- [0700] 40. 根据安排36所述的系统，其中包含磷酸钠和盐的第一洗涤缓冲液具有5.5至9.5之间的pH。
- [0701] 41. 根据安排36所述的系统，其中包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液包含约50mM磷酸钠。
- [0702] 42. 根据安排36所述的系统，其中包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液包含约250mM NaCl。

- [0703] 43. 根据安排36所述的系统,其中第一tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。
- [0704] 44. 根据安排43所述的系统,其中第一tris洗涤缓冲液还包含约250mM NaCl。
- [0705] 45. 根据安排36所述的系统,其中中间tris洗涤缓冲液包含约50mM Tris。
- [0706] 46. 根据安排36所述的系统,其中第一tris洗涤缓冲液的pH为约7.2。
- [0707] 47. 根据安排36所述的系统,其中第二洗涤缓冲液的pH为约7.8。
- [0708] 48. 根据安排36所述的系统,其中第二洗涤缓冲液中氯化镁的浓度为约2.8M。
- [0709] 49. 根据安排36所述的系统,其中洗脱缓冲液中甲酸钠的浓度包含10mM。
- [0710] 50. 一种抗体纯化系统,其包括:
- [0711] 具有与抗体结合的蛋白A树脂的柱,其中抗体包括分别为SEQ ID NO:
- [0712] 91-93、28-30中的至少一个和SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个的轻链和重链,和
- [0713] 包含离液盐的离液洗涤缓冲液,和
- [0714] 包含甲酸钠的洗脱缓冲液。
- [0715] 51. 根据安排1所述的方法,其中目的蛋白质是双特异性抗体。
- [0716] 52. 根据安排51所述的方法,其中双特异性抗体对VEGF和IL-6具有特异性。
- [0717] 53. 根据安排51所述的方法,其中双特异性抗体是0G2072。
- [0718] 54. 根据安排1所述的方法,其中目的蛋白质是抗体缀合物。
- [0719] 55. 根据安排1所述的方法,其中亲和层析基质是蛋白A层析基质。
- [0720] 56. 根据安排1所述的方法,其中缓冲溶液中的离液剂由选自以下组成的组的盐组成:镁盐、钙盐和胍盐。
- [0721] 57. 根据安排56所述的方法,其中盐的浓度在0.05-3.5M之间。
- [0722] 58. 根据安排1所述的方法,其中缓冲溶液还包含tris。
- [0723] 59. 根据安排58所述的方法,其中缓冲溶液中tris的浓度至少为5mM。
- [0724] 60. 根据安排1所述的方法,其中缓冲溶液的pH大于5.5。
- [0725] 61. 根据安排3所述的方法,其中洗出液还含有病毒杂质。
- [0726] 62. 根据安排61所述的方法,还包括去除病毒杂质。
- [0727] 63. 根据安排62所述的方法,还包括灭活病毒杂质。
- [0728] 64. 根据安排3所述的方法,还包括在用缓冲溶液洗涤之前,用预洗涤缓冲溶液洗涤上样有上样流体的亲和层析基质的步骤。
- [0729] 65. 根据64所述的方法,还包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。
- [0730] 66. 根据64所述的方法,其中预洗涤缓冲溶液包含磷酸钠。
- [0731] 67. 根据安排64所述的方法,其中预洗缓冲溶液包含Tris和盐。
- [0732] 68. 根据安排25所述的方法,其中抗体缀合物具有以下结构:

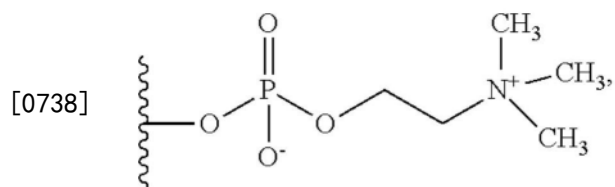


[0734] 其中：

[0735] 抗VEGF-A抗体的每条重链由字母H表示,抗VEGF-A抗体的每条轻链由字母L表示；

[0736] 聚合物通过C443 (EU编号) 的巯基与抗VEGF-A抗体结合,该结合描绘在重链之一上；

[0737] PC是：



[0739] 其中曲线表示与聚合物其余部分的连接点,其中X为a) —OR,其中R为—H、甲基、乙基、丙基、异丙基,b) —H,c) 任何卤素,包括—Br、—Cl或—I,d) —SCN,或e) —NCS;并且i) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同并且为0至3000的整数;或ii) 其中n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9相同或不同,使得n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8和n9之和为2500加或减15%。

[0740] 69. 根据安排68所述的方法,其中抗体缀合物包含抗VEGF抗体缀合物,该抗VEGF抗体缀合物包含抗VEGF-A轻链和抗VEGF-A重链,其中抗VEGF-A抗体重链包含CDRH1:即SEQ ID NO:172中的CDRH1,CDRH2:即SEQ ID NO:173中的CDRH2,和CDRH3:即SEQ ID NO:174中的CDRH3,抗VEGF-A抗体轻链包含CDRL1:即SEQ ID NO:199中的CDRL1,CDRL2:即SEQ ID NO:200中的CDRL2,和CDRL3:即SEQ ID NO:201中的CDRL3。

[0741] 70. 根据安排69所述的方法,其中抗VEGF抗体缀合物包含:包含与聚合物结合的抗VEGF-A免疫球蛋白G (IgG) 的抗体缀合物,该聚合物包含MPC单体,其中抗VEGF-A抗体重链的

序列为SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个,抗VEGF-A抗体轻链的序列为SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个,并且其中抗体在C449处与聚合物结合。

[0742] 71.根据安排1所述的方法,其中目的靶蛋白质通过细胞培养物产生。

[0743] 72.根据安排71所述的方法,其中细胞培养物包含CHO细胞。

[0744] 73.根据安排3所述的方法,还包括在用缓冲溶液洗涤之后,用后洗涤缓冲溶液洗涤上样有洗脱液的亲和层析基质的步骤。

[0745] 74.根据安排3所述的方法,其中用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除核酸、内毒素、消泡剂或除目的靶蛋白质之外的其他小分子。

[0746] 75.根据安排3所述的方法,其中用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除杂质,同时保持目的靶蛋白质与亲和层析基质结合。

[0747] 76.根据安排3所述的方法,其中用缓冲溶液洗涤亲和层析基质去除除目的靶蛋白质之外的宿主细胞蛋白质。

[0748] 77.根据安排4所述的方法,其中在缓冲溶液中添加离液剂不会洗脱目的靶蛋白质。

[0749] 78.根据安排3所述的方法,还包括病毒灭活、切向流过滤、渗滤、超滤、离子交换层析或病毒减少过滤中的一种或多种。

[0750] 79.根据安排3所述的方法,其中洗脱液是在生物反应器中使用无动物成分的细胞培养物产生的。

[0751] 80.根据安排3所述的方法,其中产品是目的蛋白质。

[0752] 81.根据安排3所述的方法,其中杂质包括宿主细胞蛋白质杂质。

[0753] 82.根据安排17所述的方法,其中第一洗涤缓冲液包含10mM磷酸钠。

[0754] 83.根据安排17所述的方法,其中第一洗涤缓冲液包含基于磷酸盐的种类。

[0755] 84.根据安排17所述的方法,其中第一洗涤缓冲液还包含50mM NaCl。

[0756] 85.一种处理产品的方法,该方法包括

[0757] 将洗脱液上样到亲和层析基质中;和

[0758] 用包含离液盐的洗涤缓冲液洗涤以收集洗出液,其中离液盐的浓度从第一浓度增加至第二浓度,其中在至少一个级分中收集洗出液,其中该至少一个级分包含目的产品。

[0759] 86.根据安排85所述的方法,其中第一浓度的离液盐的浓度是0M,其中第二浓度的离液盐的浓度是4.0M。

[0760] 87.根据安排85所述的方法,其中离液盐是基于镁的。

[0761] 88.根据安排86所述的方法,其中离液盐是MgCl<sub>2</sub>。

[0762] 89.根据安排1所述的方法,其中缓冲溶液还包含以下中的一种或多种:醋酸盐、柠檬酸盐、ACES、BES、Bicine、HEPES、MES、MOPS、MOPSO、TAPS、Tricine、Bis-Tris、Bis-Tris丙烷、甲次砷酸盐、CAPS、CAPSO、CHES、甘氨酸、双甘肽、咪唑、PIPES、TEA或TES。

[0763] 90.根据安排1所述的方法,其中目的分子是蛋白质。

[0764] 91.根据安排90所述的方法,其中蛋白质是抗体或抗体样构建体,例如Fc融合蛋白。

[0765] 实施例

[0766] 实施例1:OG2072整体纯化方案

[0767] 公开了对来自无动物成分的细胞培养过程的OG2072抗体进行纯化的过程100 (图1)。该过程包括三个层析步骤和两个TFF (切向流过滤) 步骤, 以及低pH病毒灭活。首先, 从CHO细胞系收集澄清的细胞上清液110。接下来, 对澄清的细胞上清液进行亲和层析120。然后对亲和层析期间收集的输出洗出液进行低pH病毒灭活130, 接着进行中间过滤140。然后进行进一步的几轮层析, 包括阴离子交换层析150, 然后是阳离子交换层析160。随后是病毒减少过滤170和最终超滤/渗滤180。

[0768] 低pH病毒灭活包括将溶液在pH 3.5下保持240分钟, 然后中和至pH 7。MabSelect SuRe LX亲和层析 (MSS LX) 之后是病毒灭活/中和步骤, 然后是第一TFF (TFF1) 以调节抗体用于Sartobind Q阴离子交换层析 (AEX层析)。然后进行POROS XS阳离子交换层析 (CEX层析) 和病毒减少过滤 (Planova 20N)。POROSXS包括在pH 5的10mM磷酸钠, 40mM NaCl, 加上作为补充的醋酸盐 (<15mS/cm) 下结合, 随后从pH 6的50mM醋酸钠, 10mM NaCl到pH 6的50mM醋酸钠, 300mM NaCl梯度洗脱10CV。在POROS XS层析期间进行额外的洗涤, 包括2CV的pH 5.0的50mM醋酸钠, 10mM NaCl, 然后是5CV的pH 7.0的18.8mM磷酸钠, 22.5mM NaCl, 然后是3CV的pH 5.0的50mM醋酸钠, 10mM NaCl, 接着是2CV的pH 6.0的50mM醋酸钠, 10mM NaCl。最后, 进行第二TFF (TFF2) 以配制抗体并获得抗体中间体。然而, 据指出, 对于眼科应用, HCP水平过高, 为27ng/mg。

[0769] 图2同样示出了用于纯化生物分子的过程200。首先, 使用发酵过程210生长和培养细胞培养物。然后在收获220收集细胞培养物, 以产生澄清的细胞浓缩物。然后使用亲和层析和病毒灭活/中和230纯化澄清的细胞浓缩物, 该过程的输出是产品渗余物。然后对收集的产品渗余物进行切向流过滤240, 随后依次进行阴离子交换层析250步骤和阳离子交换层析260步骤。然后将处理过的产品渗余物进行病毒减少过滤270, 其中然后进行第二切向流过滤280以产生纯化的产品。

#### [0770] 实施例2: 在柱层析过程中纯化OG2072的方案; 一般磷酸钠方案

[0771] 开发了一种评估可测量的HCP种类的减少倍数的方案, 以评估所需的分子种类的产率和纯度。公开了对来自无动物成分的细胞培养过程中的OG2072抗体进行柱纯化的过程300 (图3) (表6A)。该过程包括平衡310, 随后用澄清的细胞培养液 (CCCF) 上样320柱。然后用一系列洗涤处理该柱, 包括洗涤1 330, 接着是洗涤2 340、洗涤3 350和洗涤4 360。洗涤2 340可以包括子洗涤340A、340B和340C。在洗涤4 360之后, 进行洗脱370, 由此在柱上进行后洗脱380。该过程包括用50mM磷酸钠和250mM NaCl在pH 7下平衡310蛋白A柱, 然后是上样320步骤, 其中该柱上样有澄清的细胞培养液 (CCCF), 接着是一系列洗涤330-360, 包括用50mM磷酸钠和250mM NaCl在pH 7下进行的第一洗涤330。洗涤2 340可以包含如表6C中所述的各种洗涤缓冲液和条件。洗液3 350包含用50mM磷酸钠和2M NaCl在pH 7下的洗涤, 而洗涤4 360包含50mM磷酸钠, 250mM NaCl, pH 7。用10mM甲酸钠在pH 3.5下完成洗脱370, 在100mM柠檬酸下在pH 2.1下通过柱进行后洗脱。各种溶液的流速和柱体积 (CV) 公开在6A的右侧。表6A中公开了缓冲液组成。

#### [0772] 表6A: 一般层析纯化。

[0773]

| 步骤           | 缓冲液                          | CV | 流速(cm/h) |
|--------------|------------------------------|----|----------|
| 平衡           | 50 mM 磷酸钠, 250 mM NaCl, pH 7 | 5  | 400      |
| 上样           |                              |    | 200      |
| 洗涤 1         | 50 mM 磷酸钠, 250 mM NaCl, pH 7 | 2  | 200      |
| 洗涤 2-添加剂浓度 1 | 变化。如表 6C 所述。                 | 3  | 400      |
| 洗涤 2-添加剂浓度 2 |                              | 3  | 400      |
| 洗涤 2-添加剂浓度 3 |                              | 3  | 400      |
| 洗涤 3         | 50 mM 磷酸钠, 2 M NaCl, pH 7    | 3  | 400      |
| 洗涤 4         | 50 mM 磷酸钠, 250 mM NaCl, pH 7 | 3  | 400      |
| 洗脱           | 10 mM 甲酸钠, pH 3.5            | 4  | 400      |

[0774]

|     |                            |   |     |
|-----|----------------------------|---|-----|
| 后洗脱 | 100 mM 柠檬酸, pH 2.1         | 2 | 400 |
| CIP | 0.1 NaOH (2 CV 后保持 15 min) | 3 | 400 |

[0775] 实施例2.5:柱层析过程中OG2072的纯化

[0776] 柱层析的步骤如表6A中所述进行。用包含50mM磷酸钠和250mM NaCl的缓冲液在pH 7下平衡柱。平衡期间的柱体积 (CV) 为5,并以400cm/h的流速进料。随后以200cm/h的速度上样柱。如表6A中所述进行一系列洗涤。然后用pH 3.5的10mM甲酸钠洗脱柱。洗脱的CV为4,流速为400cm/h。

[0777] 实施例3:降低细胞提取物中宿主细胞蛋白质水平的方案

[0778] 公开了一种使用亲和层析纯化抗体的方法(表6B)。在柱纯化之前,在10L生物反应器中使用无动物成分的细胞培养过程和发酵来生产OG2072。从生物反应器收集的澄清的细胞培养液(CCCF;上清液SG01174/A1)通过蛋白A-HPLC测定为4.118mg/mL。将材料等分成280mL的份量,在蛋白A柱上以18g/L树脂的树脂负荷运行5次。蛋白质溶液的pH为7.4,电导率为13.9mS/cm。

[0779] 表6B:离液层析纯化(氯化镁)

| [0780] | 步骤           | 缓冲液                                  | CV  | 流速(cm/h) |
|--------|--------------|--------------------------------------|-----|----------|
|        | 平衡           | 50 mM 磷酸钠, 250 mM NaCl, pH 7         | 5   | 300      |
|        | 上样           |                                      |     | 200      |
|        | 洗涤 1         | 50 mM 磷酸钠, 250 mM NaCl, pH 7         | 2   | 200      |
|        | 洗涤 2-添加剂浓度 1 | 50 mM Tris, pH 8.8                   | 4   | 300      |
|        | 洗涤 2-添加剂浓度 2 | 100 mM Tris, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> | 4   | 100      |
|        | 洗涤 2-添加剂浓度 3 | 50 mM Tris, pH 8.8                   | 1.2 | 100      |
|        | 洗涤 3         | 50 mM Tris, pH 8.8                   | 2.8 | 300      |
|        | 洗涤 4         | 50 mM 磷酸钠, 250 mM NaCl, pH 7         | 2   | 300      |
|        | 洗脱           | 10 mM 甲酸钠, pH 3.5                    | 5   | 300      |
|        | 后洗脱          | 100 mM 柠檬酸, pH 2.1                   | 2   | 300      |
| [0781] | CIP          | 0.1 NaOH (2 CV 后保持 15 min)           | 3   | 300      |

[0782] 如表6B中所述进行柱层析的步骤。用包含50mM磷酸钠和250mM NaCl的缓冲液在pH 7下平衡柱。平衡期间的柱体积(CV)为5,并以400cm/h的流速进料。随后以200cm/h的速度上样柱。如表6B中所述进行一系列洗涤。描述了包含100mM Tris和2.8M MgCl<sub>2</sub>的洗涤。包含100mM Tris和2.8M MgCl<sub>2</sub>的洗涤还包括CV为4和流速为100cm/h。然后用pH 3.5的10mM甲酸钠洗脱柱。洗脱的CV为5,流速为300cm/h。

[0783] 使用50mM磷酸钠、250mM NaCl在pH 7下进行平衡,之后将CCCF上样到柱上。用50mM磷酸钠、250mM NaCl进行第一洗涤,然后用50mM Tris在pH 8.8下进行第二洗涤。接着用100mM Tris以及2.8M MgCl<sub>2</sub>进行第三洗涤。然后在不同流速下进行包含pH 8.8的50mM Tris的洗涤4和洗涤5(见图4)。然后用50mM磷酸钠,250mM氯化钠在pH 7下进行最后的洗涤6。洗涤后,用pH 3.5的10mM甲酸钠洗脱目的蛋白质,然后用pH 2.1的100mM柠檬酸作为后洗脱溶液。各种流体的流速在表6B的右侧公开。结果表明,与参照运行相比,HCP水平降低了8倍。可以想到,所述的洗涤步骤不仅有助于降低HCP的水平,还有助于降低其他杂质(例如内毒素和核酸)的水平。

[0784] 实施例4:降低宿主细胞蛋白质水平的实验变体

[0785] 除非另有说明,否则以下研究设计和方法遵循实施例2中列出的方案。改变洗涤程序后,宿主细胞蛋白质(HCP)水平降低。表6C示出了根据本公开的一些实施方案的洗涤2的变体。表6C还公开了参照运行的结果,该运行遵循实施例2中公开的方案,但没有洗涤2步骤。与参考文献(其公开了89.3%的步骤产率和1842.71ng/mg的HCP浓度)相比,Tris+2.8M MgCl<sub>2</sub>的运行产生了87.9%的步骤产率,HCP的浓度降低了八倍至226.27ng/mg。

[0786] 表6C:层析纯化结果。

[0787]

| 运行                                        | 样品 ID       | 步骤<br>产率<br>(%) | GP-HPL<br>C (%)<br>HMW2) | GP-HPL<br>C (%)<br>HMW1) | GP-HP<br>LC (%)<br>Purity) | HCP<br>(ng/mg) | 抗<br>VEGF<br>RP (%) | 抗 IL6<br>RP(%) | pH    |
|-------------------------------------------|-------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------|---------------------|----------------|-------|
| 洗涤 2:<br>Tris+1.2M<br>尿素                  | KV000<br>80 | 90.8            | 0.78                     | 4.71                     | 94.52                      | 1086.7         | 98.7                | 97.9           | 6.76  |
| 洗涤 2:<br>NaPO4 +<br>3.0M 尿素<br>+ IPA      | KV000<br>97 | 87.7            | 1.86                     | 6.15                     | 92                         | 438.9          | 99.6                | 96.9           | 6.71  |
| 洗涤 2: 柠<br>檬酸钠<br>+0.3M 尿<br>素            | KV000<br>82 | 88.3            | 1.14                     | 3.34                     | 95.53                      | 1198.3         | 93.5                | 95.2           | 4.81  |
| 洗涤 2:<br>Tris+精氨<br>酸                     | KV000<br>83 | 81.1            | 0.67                     | 4.48                     | 94.86                      | 531.4          | 96.1                | 101.8          | 7.07  |
| 参照运行                                      | KV000<br>84 | 89.3            | 1.07                     | 4.52                     | 94.42                      | 1842.7         | 100                 | 100            | 6.28  |
| Eshmun<br>A-参照运<br>行                      | KV000<br>87 | 82.9            | 0.24                     | 1.51                     | 98.26                      | 2427.3         | 102.3               | 99             | 4.121 |
| Eshmun<br>A- 洗涤<br>2:<br>Tris+3M<br>MgCl2 | KV000<br>88 | 85.3            | 0.34                     | 2.19                     | 97.47                      | 488.0          | 97.5                | 101.9          | 4.194 |
| Eshmun                                    | KV001       | 107.3           | 7.24                     | 15.48                    | 77.29                      | 230.9          | 97.2                | 88             | 6.92  |

[0788]

|                                                                               |              |      |      |      |      |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| A -洗涤<br>2: Tris +<br>3M<br>MgCl <sub>2</sub> ,<br>洗脱 4M<br>MgCl <sub>2</sub> | 01D          |      |      |      |      |       |       |       |       |
| 洗涤 2:<br>Tris + 2.8<br>M MgCl <sub>2</sub>                                    | KV001<br>03  | 87.9 | 1.14 | 4.58 | 94.3 | 226.3 | 105.3 | 100.6 | 6.15  |
| 洗涤 2:<br>Tris +<br>MgCl <sub>2</sub> ,<br>MgCl <sub>2</sub> 梯<br>度洗脱          | KV001<br>05D | 81   | 1    | 6.1  | 92.9 | 696.1 | 111.9 | 113   | 7.189 |
| 洗涤 2:<br>Tris +<br>MgCl <sub>2</sub> ,<br>MgCl <sub>2</sub> 梯<br>度洗脱          | KV001<br>06D |      | 0.92 | 5.88 | 93.2 | 670.0 | 110.2 | 111.9 |       |

[0789] 实施例5:使用各种洗涤缓冲液的实验运行

[0790] 测试了各种不同的洗涤条件,以评估纯化条件和缓冲液组成。表6D示出了各种洗涤缓冲液。运行1是研究性运行,以确定洗涤步骤可能的最低pH值。如图3所述,在洗涤1步骤后,进行从pH 6至pH 3的pH洗脱梯度。表6F示出了用每种描述的洗涤缓冲液洗脱后的HCP和产率水平,每种洗涤缓冲液对应于表6D中描述的运行。结果表明,不同的洗涤和柱组合产生不同的产品纯度和HCP浓度。

[0791] 表6D:层析纯化运行

[0792]

| 运行 | 实验    | 缓冲液                                                                                                                                                                                                                               |
|----|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | 0001  | MSS LX: 从 pH 6.0 至 pH 3.0 的洗脱梯度(50 mM 柠檬酸钠)                                                                                                                                                                                       |
| 2  | 0002  | MSS LX: 50 mM Tris, pH 8.8, 然后逐渐增加尿素(1、2、3 M)                                                                                                                                                                                     |
| 3  | 0003  | MSS LX: 50 mM Tris, pH 8.8, 1.2 M 尿素                                                                                                                                                                                              |
| 4  | 0004  | MSS LX: 用 50 mM 磷酸钠, pH 7 洗涤, 然后逐渐增加尿素(1、2 & 3 M)以及 50 mM 磷酸钠, pH 6.5, 3 M 尿素, 10% IPA                                                                                                                                            |
| 5  | 0005  | 没有进行后续运行                                                                                                                                                                                                                          |
| 6  | 0006  | MSS LX: 用 50 mM 柠檬酸盐 pH 4.7 洗涤, 然后逐渐增加尿素(1、2、3 M)以及 50 mM 柠檬酸钠, pH 4.6, 3 M 尿素, 10% IPA                                                                                                                                           |
| 7  | 0007  | MSS LX: 50 mM 柠檬酸盐, pH 4.7, 1.2 M 尿素                                                                                                                                                                                              |
| 8  | 0008  | MSS LX: 用 50 mM Tris pH 8.8 洗涤, 然后逐渐增加精氨酸(0.25、0.5、0.75 M); 未执行跟进运行                                                                                                                                                               |
| 9  | 0009  | MSS LX: 参照运行(如表 6B 所述, 但没有洗涤 2 步骤)                                                                                                                                                                                                |
| 10 | 0010  | MSS LX: 用 50 mM Tris pH 8.8 洗涤, 然后逐渐增加 MgCl <sub>2</sub> (1、2、3、4 M), 施加 100 mM Tris 碱, 4.0 M MgCl <sub>2</sub> , pH 6.6                                                                                                          |
| 11 | 0011  | MSS LX: 尝试了 50 mM Tris 碱, 3 M MgCl <sub>2</sub> , 但柱堵塞。层析上样材料在环境下放置 3 天并形成沉淀。容器是不透明的, 没有发现沉淀。此外, 之前的运行(0010)从 50 mM Tris 碱, 4 M MgCl <sub>2</sub> 更改为 50 mM 磷酸钠, 2.0 M NaCl, pH 7, 这可能会导致柱上沉淀, 因为磷酸镁容易结晶。已订购新柱。继续筛选 Eshmuno A 树脂。 |
| 12 | 0012  | Eshmuno A: 参照条件(如表 6B 所述, 但没有洗涤 2 步骤)                                                                                                                                                                                             |
| 13 | 0013  | Eshmuno A: 50 mM Tris 碱, 然后逐渐增加 MgCl <sub>2</sub> (1、2、3、3.6、0 M), 施加 100 mM Tris 碱, 4.0 M MgCl <sub>2</sub> , pH 6.6                                                                                                             |
| 14 | 0014  | Eshmuno A: 50 mM Tris, pH 8.8, 然后是 50 mM Tris 碱, 3 M MgCl <sub>2</sub> 和 50 mM Tris, pH 8.8                                                                                                                                       |
| 15 | 0014b | Eshmuno A: 50 mM Tris, pH 8.8, 然后是 50 mM Tris 碱, 3 M MgCl <sub>2</sub> 和用 100 mM Tris 碱, 4 M MgCl <sub>2</sub> , pH 6.6 洗脱                                                                                                        |

[0793]

|    |       |                                                                                                             |
|----|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16 | 0014c | Eshmuno A: 50 mM 柠檬酸钠, pH 4.7, 然后逐渐增加氯化镁(1、2、3、0 M)                                                         |
| 17 | 0014d | Eshmuno A: 树脂容量                                                                                             |
| 18 | 0015  | MSS LX: 50 mM Tris, pH 8.8, 然后是 50 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> 和 50 mM Tris, pH 8.8                  |
| 19 | 0016  | MSS LX: 50 mM Tris, pH 8.8, 然后是 50 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> 和 50 mM Tris, pH 8.8(重复运行)            |
| 20 | 0017  | MSS LX: 50 mM Tris, pH 8.8, 然后是 50 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> 和 2.8 M 至 4 M MgCl <sub>2</sub> 的梯度洗脱 |

[0794] 表6F:层析纯化结果。

[0795]

| # | 运行描述                                       | 产率(%) | GP-HPLC<br>(% HMW2) | GP-HPLC<br>(% HMW1) | GP-HPLC<br>(%纯度) | HCP<br>(ng/mg) | 抗 VEGF<br>RP (%) | 抗 IL6<br>RP (%) | pH   |
|---|--------------------------------------------|-------|---------------------|---------------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|------|
| 3 | MSS LX - 洗<br>涤 2:<br>Tris+1.2M 尿<br>素     | 90.8  | 0.78                | 4.71                | 94.52            | 1086.7         | 98.7             | 97.9            | 6.76 |
| 4 | MSS LX - 洗<br>涤 2:<br>NaPo4+3.0M<br>尿素+IPA | 87.7  | 1.86                | 6.15                | 92               | 438.9          | 99.6             | 96.9            | 6.71 |
| 7 | MSS LX - 洗<br>涤 2: 柠檬酸<br>钠+0.3M 尿素        | 88.3  | 1.14                | 3.34                | 95.53            | 1198.3         | 93.5             | 95.2            | 4.81 |
| 8 | MSS LX - 洗<br>涤 2: Tris+精<br>氨酸            | 81.1  | 0.67                | 4.48                | 94.86            | 531.4          | 96.1             | 101.8           | 7.07 |
| 9 | MSS LX - 参<br>照运行                          | 89.3  | 1.07                | 4.52                | 94.42            | 1842.7         | 100              | 100             | 6.28 |

[0796]

|    |                                                                                   |       |      |       |       |        |       |       |      |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|------|-------|-------|--------|-------|-------|------|
| 12 | Eshmuno A -<br>参照运行                                                               | 82.9  | 0.24 | 1.51  | 98.26 | 2427.3 | 102.3 | 99    | 4.12 |
| 14 | Eshmuno A -<br>洗涤 2:<br>Tris+3M<br>MgCl <sub>2</sub>                              | 85.3  | 0.34 | 2.19  | 97.47 | 488.0  | 97.5  | 101.9 | 4.19 |
| 15 | Eshmuno A -<br>洗涤 2:<br>Tris+3M<br>MgCl <sub>2</sub> , 洗脱<br>4M MgCl <sub>2</sub> | 107.3 | 7.24 | 15.48 | 77.29 | 230.9  | 97.2  | 88    | 6.92 |
| 18 | MSS LX - 洗<br>涤 2:<br>Tris+2.8M<br>MgCl <sub>2</sub>                              | 87.9  | 1.14 | 4.58  | 94.3  | 226.3  | 105.3 | 100.6 | 6.15 |
| 20 | MSS LX - 洗<br>涤 2:<br>Tris+MgCl <sub>2</sub> .<br>MgCl <sub>2</sub> 梯度<br>洗脱      | 81    | 1    | 6.1   | 92.9  | 696.1  | 111.9 | 113   | 7.19 |

[0797] 实施例6:使用各种洗涤缓冲液的实验运行

[0798] 图4示出了如表6D中所述的运行6的层析曲线。在50mM柠檬酸钠,pH 4.7,然后逐渐增加尿素(1、2&3M),以及50mM柠檬酸钠pH 4.6,3M尿素,10% IPA中的步骤2的尿素洗涤条件下进行MabSelect Sure LX。用50mM磷酸钠,pH 7,2.0M NaCl去除尿素和IPA。根据该图,在洗涤结束时尿素显示出一些A280活性。在pH 4.7,2M尿素和更多尿素导致OG2072的显著洗脱。在pH 7和pH 8.8,3M尿素不会导致OG2072的过早洗脱。如示出的,线用箭头标识和标记如下:正方形,A280;加号,%泵B活性;星形,pH。因此,该实施例展示了使用不同尿素洗涤条件的层析运行结果。

[0799] 实施例7:使用各种洗涤缓冲液的实验运行

[0800] 图5示出了如表6D中所述的运行7的层析曲线。在50mM柠檬酸钠,pH 4.7,0.3M尿素洗涤下进行MabSelect Sure LX。用50mM磷酸钠,pH 7,2.0M NaCl去除尿素和IPA。根据该图,在洗涤中没有发现太多的A280活性。如示出的,线用箭头标识和标记如下:正方形,A280;加号,%泵B活性;星形,pH。因此,该实施例展示了使用不同尿素洗涤条件的层析运行结果。

[0801] 实施例8:使用各种洗涤缓冲液的实验运行

[0802] 图6示出了如表6D中所述的运行10的层析曲线。具体来说,图6示出了层析曲线,其中施加了增加浓度的MgCl<sub>2</sub>,并且其中离液剂可用于洗脱目的蛋白质。用50mM Tris pH 8.8,然后是50mM Tris,逐渐增加MgCl<sub>2</sub> (1、2、3、4M) 进行MabSelect Sure LX。用50mM磷酸钠,pH 7,2.0M NaCl去除MgCl<sub>2</sub>。在洗脱之前,用50mM磷酸钠,pH 7,250mM NaCl平衡柱。在从50mM Tris碱,4.0M MgCl<sub>2</sub>和50mM磷酸钠转变的过程中,出现了晶体形成。磷酸根离子和镁离子不能同时存在,否则会形成磷酸镁晶体,导致柱堵塞。该曲线表明,3M MgCl<sub>2</sub>代表没有洗脱目的产品的离液剂浓度的上限,而至少4M MgCl<sub>2</sub>的存在导致目的产品的定量洗脱。如示出的,线用箭头标识和标记如下:正方形,A280;加号,%泵B活性;星形,pH。因此,该实施例展示了使用不同MgCl<sub>2</sub>浓度的层析运行结果。

[0803] 实施例9:使用各种洗涤缓冲液的实验运行

[0804] 图7示出了如图6中所述的运行18的层析曲线。用50mM Tris pH 8.8,然后是含2.8M MgCl<sub>2</sub>的50mM Tris进行MabSelect Sure LX。在施加50mM磷酸钠,pH 7,2M NaCl之前,用50mM Tris,pH 8.8去除MgCl<sub>2</sub>。在洗脱之前,用50mM磷酸钠,pH 7,250mM NaCl平衡柱。如示出的,线用箭头标识和标记如下:正方形,A280;加号,%泵B活性;星形,pH。因此,该实施例展示了使用设定MgCl<sub>2</sub>浓度的层析运行结果。

[0805] 实施例10:使用基于Tris的缓冲液的柱纯化方案

[0806] 在柱纯化过程中考虑并分析了替代缓冲液组成。表6G示出了对来自无动物成分的细胞培养过程中的OG2072抗体进行柱纯化的过程的实施方案。用于平衡和洗涤步骤的缓冲液包含单独的Tris或与NaCl或MgCl<sub>2</sub>组合的Tris。平衡是用50mM Tris,pH 7.2和250mM NaCl进行的。洗涤1涉及50mM Tris,pH 7.2,250mM NaCl,而洗涤2包括50mM Tris,pH 7.8,2.8M MgCl<sub>2</sub>,洗涤3是用50mM Tris,pH 8.8进行的。然后洗涤4用50mM Tris,pH 7.2,250mM NaCl进行。结果表明可以使用替代缓冲液实现柱方案的实施方案。在一些实施方案中,替代缓冲液主要由Tris组成。因此,该实施例展示了基于Tris的缓冲液的使用。

[0807] 表6G:使用替代缓冲液进行离液层析纯化。

[0808]

| 步骤  | 缓冲液                                     | CV | 流速 (cm/h) |
|-----|-----------------------------------------|----|-----------|
| 平衡  | 50mM Tris,250mM NaCl,pH 7.2             | 5  | 300       |
| 上样  |                                         |    | 200       |
| 洗涤1 | 50mM Tris,250mM NaCl,pH 7.2             | 2  | 200       |
| 洗涤2 | 50mM Tris,pH 7.8,2.8M MgCl <sub>2</sub> | 3  | 100       |
| 洗涤3 | 50mM Tris,pH 8.8                        | 3  | 100       |
| 洗涤4 | 50mM Tris,250mM NaCl,pH 7.2             | 3  | 300       |
| 洗脱  | 10mM甲酸钠,pH 3.5                          | 4  | 300       |
| 后洗脱 | 100mM柠檬酸,pH 2.1                         | 2  | 300       |
| CIP | 0.1NaOH                                 | 3  | 300       |

[0809] 实施例11

[0810] 本实施例说明了一种使用亲和层析纯化产品的方法。首先将洗脱液上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合。然后用包含离液剂的缓冲溶液洗涤亲和层析基质。从洗涤中收集的流体包含HCP种类。然后使用洗脱溶液收集蛋白质。因此,该实施例展示了一种纯化产品的方法。

**[0811] 实施例12**

[0812] 本实施例说明了一种纯化产品和减少上样流体中杂质的方法。上样流体包含蛋白质和一种或多种杂质,并且上样流体通过亲和层析基质。接下来,将至少一种包含离液盐的洗涤溶液施加到基质上。然后使用洗脱溶液收集蛋白质。因此,该实施例展示了一种纯化产品的方法。

**[0813] 实施例13**

[0814] 本实施例说明了一种分离包含目的蛋白质的洗出液中的杂质的方法。该方法包括将包含目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上。然后用一种或多种包含镁或镁盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质。从洗涤中收集的流体包含HCP种类。然后使用洗脱溶液收集蛋白质。因此,该实施例展示了一种分离包含目的蛋白质的洗出液中的杂质的方法。

**[0815] 实施例14**

[0816] 该实施例说明了一种使用亲和层析生产产品的方法。首先,将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上。然后用包含磷酸钠和盐的第一缓冲液对亲和层析基质进行第一洗涤。然后用包含离液剂的第二缓冲液对亲和层析基质进行第二洗涤。从洗涤中收集的流体包含HCP种类。然后使用洗脱溶液收集蛋白质。因此,该实施例展示了一种使用亲和层析生产产品的方法。

**[0817] 实施例15**

[0818] 该实施例说明了一种使用亲和层析生产产品的方法。首先将含有目的蛋白质的洗脱液上样到亲和层析基质上。然后用含有Tris和盐的第一缓冲液进行第一洗涤。然后,用含有Tris和离液剂的第二缓冲液进行第二洗涤,其中第二缓冲液离液剂与第一缓冲液中含有的盐不同。从洗涤中收集的流体包含HCP种类。然后使用洗脱溶液收集蛋白质。因此,该实施例展示了一种使用亲和层析生产产品的方法。

**[0819] 实施例16**

[0820] 该实施例说明了一种生产产品的方法。首先,收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质。然后将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合。然后用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质。然后洗脱结合的目的蛋白质,和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。因此,该实施例展示了一种生产产品的方法。

**[0821] 实施例17**

[0822] 该实施例说明了一种生产产品的方法。首先,收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质。然后将上样流体上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合。然后向亲和层析基质供给包含离液盐的缓冲溶液。然后洗脱结合的目的蛋白质,和收集洗出液,其中洗出液含有目的蛋白质。因此,该实施例展示了一种生产产品的方法。

**[0823] 实施例18**

[0824] 该实施例说明了一种生产产品的方法。首先,收集缀合蛋白质,其中缀合蛋白质包含与缀合聚合物结合的抗体。然后将缀合蛋白质上样到亲和层析基质上,其中亲和层析基质与缀合蛋白质结合,然后用包含离液盐的缓冲溶液洗涤亲和层析基质。然后,洗脱缀合蛋白质,和收集洗出液,其中洗出液含有缀合蛋白质。因此,该实施例展示了一种生产产品的方法。

**[0825] 实施例19**

[0826] 该实施例说明了一种生产产品的方法。首先,洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质,该洗涤是用包含离液盐的缓冲液进行的。然后洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质。然后从洗出液中去除病毒污染物。因此,该实施例展示了一种生产产品的方法。

[0827] 实施例20

[0828] 该实施例说明了一种生产产品的方法。首先用包含离液盐的缓冲液洗涤与目的靶蛋白质结合的亲和层析基质。然后去除离液盐,洗脱柱以收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质。因此,该实施例展示了一种生产产品的方法。

[0829] 实施例21

[0830] 该实施例说明了一种生产产品的方法。首先,收集上样流体,其中上样流体包含目的蛋白质。然后,将上样流体上样到亲和层析基质中,其中亲和层析基质与目的蛋白质结合。然后用缓冲溶液洗涤亲和层析基质,该缓冲溶液包含离液盐。然后洗脱并收集洗出液,其中洗出液含有目的靶蛋白质。然后从洗出液中去除病毒污染物。因此,该实施例展示了一种生产产品的方法。

[0831] 实施例22

[0832] 该实施例说明了一种生产产品的方法。首先,将洗脱液上样到亲和层析基质中。然后用第一洗涤缓冲液洗涤。然后用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤。然后用第三洗涤缓冲液洗涤,其中第三洗涤缓冲液去除离液盐。然后用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。因此,该实施例展示了一种生产产品的方法。

[0833] 实施例23

[0834] 该实施例说明了一种生产产品的方法。首先,回收细胞培养物上清液,其中细胞培养物上清液包含目的蛋白质。然后将细胞培养物上清液处理成洗脱液,其中洗脱液包含目的蛋白质。然后将洗脱液上样到亲和层析基质中。然后用包含Tris或磷酸钠的第一洗涤缓冲液洗涤。然后用包含离液盐的第二洗涤缓冲液洗涤。然后用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。然后用低pH病毒缓冲液灭活洗出液中存在的病毒污染物以得到病毒灭活的洗出液。然后过滤病毒灭活的洗出液,对病毒灭活的洗出液进行至少一轮离子交换层析,并过滤病毒灭活的洗出液以得到渗余物,其中渗余物包含目的蛋白质。因此,该实施例展示了一种生产产品的方法。

[0835] 实施例24

[0836] 该实施例说明了一种使用亲和层析纯化蛋白质的方法。首先使上样流体与介质接触,其中介质是结合目的蛋白质的亲和层析基质。然后用包含离液剂的缓冲溶液洗涤介质,其中离液剂是盐。然后在适于洗脱目的蛋白质的条件下使洗涤过的介质与洗脱溶液接触。因此,该实施例展示了一种纯化蛋白质的方法。

[0837] 实施例25

[0838] 该实施例说明了一种生产产品的方法。首先,将含有目的蛋白质的溶液施加到亲和层析基质上。然后用第一缓冲液洗涤亲和层析基质。然后用含有离液剂的第二缓冲液洗涤亲和层析基质。然后用第三缓冲液洗涤亲和层析基质以去除离液剂。然后用洗脱缓冲液洗脱,其中收集洗出液,其中洗出液包含蛋白质产品。因此,该实施例展示了一种生产产品的方法。

**[0839] 实施例26**

[0840] 该实施例说明了一种蛋白质纯化系统。该系统包括：柱，其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白；包含磷酸钠和盐的磷酸盐洗涤缓冲液；包含tris的中间洗涤缓冲液；包含氯化镁的第二洗涤缓冲液；和包含甲酸钠的洗脱缓冲液，该系统被配置为减少HCP种类并纯化蛋白质。收集蛋白质，其中在使用所述系统后HCP种类减少。因此，该实施例展示了一种蛋白质纯化系统。

**[0841] 实施例27**

[0842] 该实施例说明了一种蛋白质纯化系统。该系统包括：柱，其具有与所述柱结合的第一抗原结合蛋白；包含tris和盐的第一tris洗涤缓冲液；中间tris洗涤缓冲液；包含氯化镁的第二洗涤缓冲液；和包含甲酸钠的洗脱缓冲液，该系统被配置为减少HCP种类并纯化蛋白质。收集蛋白质，其中在使用所述系统后HCP种类减少。因此，该实施例展示了一种蛋白质纯化系统。

**[0843] 实施例28**

[0844] 该实施例说明了一种抗体纯化系统。该系统包括具有与抗体结合的蛋白A树脂的柱。其中抗体包括分别为SEQ ID NO:91-93、28-30中的至少一个和SEQ ID NO:7-13、19-27、89、90、256-262中的至少一个的轻链和重链，包含离液盐的离液洗涤缓冲液，和包含甲酸钠的洗脱缓冲液。该系统被配置为减少HCP种类并纯化蛋白质。收集蛋白质，其中在使用所述系统后HCP种类减少。因此，该实施例展示了一种抗体纯化系统。

**[0845] 实施例29**

[0846] 该实施例说明了一种处理产品的方法。首先，将洗脱液上样到亲和层析基质中。然后用包含离液盐的洗涤缓冲液洗涤以收集洗出液，其中离液盐的浓度从第一浓度增加至第二浓度，其中在至少一个级分中收集洗出液，其中该至少一个级分包含目的产品。因此，该实施例展示了一种洗脱并从洗出液的级分中收集目的产品的方法。

**[0847] 实施例30**

[0848] 根据表6H中列出的步骤进行纯化OG1950和病毒灭活的OG1950的参照运行，根据表6I中列出的步骤进行纯化OG1950和病毒灭活的OG1950的一组实验运行。

[0849] 对于参照运行，使用100mM NaOH进行原位清洗步骤，随后使用50mM磷酸钠，250mM NaCl在pH 7下进行平衡。然后将蛋白质样品上样到柱上。然后根据表6H顺序进行洗涤1-3。随后用pH 3.5的10mM甲酸钠进行洗脱，其中然后进行剥离和原位清洗过程。CV和流速条件见表6H。使用100mM NaOH进行原位清洗步骤，随后使用50mM磷酸钠，250mM NaCl在pH 7下进行平衡。然后将蛋白质样品上样到柱上。然后根据表6I顺序进行洗涤1-6。随后用pH 3.5的10mM甲酸钠进行洗脱，其中然后进行剥离和原位清洗过程。

[0850] 表6J描述了倍数HCP减少和收集的蛋白质浓度(OG1950浓度[mg/mL])。与参照运行条件相比，使用基于氯化镁的洗涤缓冲液的实验运行将HCP含量降低了大约5倍。

**[0851] 表6H: 参照运行****[0852]**

| 步骤    | 缓冲液                         | CV  | 流速 [cm/h] |
|-------|-----------------------------|-----|-----------|
| CIP 1 | 100mM NaOH (2CV后保持15min)    | 3   | 400       |
| 平衡    | 50mM磷酸钠, 250mM NaCl, pH 7.0 | 5   | 400       |
| 上样    |                             | n/a | 400       |

|       |                           |   |     |
|-------|---------------------------|---|-----|
| 洗涤1   | 50mM磷酸钠,250mM NaCl,pH 7.0 | 2 | 400 |
| 洗涤2   | 50mM磷酸钠,2M NaCl,pH 7.0    | 4 | 400 |
| 洗涤3   | 50mM磷酸钠,250mM NaCl,pH 7.0 | 2 | 400 |
| 洗脱    | 10mM甲酸钠,pH 3.5            | 5 | 400 |
| 剥离    | 100mM柠檬酸,pH 2.1           | 2 | 400 |
| CIP 2 | 100mM NaOH(2CV后保持15min)   | 3 | 400 |

[0853] 表6I:实验运行

|        |       |                                    |     |          |
|--------|-------|------------------------------------|-----|----------|
| [0854] | 步骤    | 缓冲液                                | CV  | 流速[cm/h] |
|        | CIP 1 | 100mM NaOH(2CV后保持15min)            | 3   | 400      |
|        | 平衡    | 50mM磷酸钠,250mM NaCl,pH 7.0          | 5   | 400      |
|        | 上样    |                                    | n/a | 400      |
|        | 洗涤1   | 50mM磷酸钠,250mM NaCl,pH 7.0          | 2   | 400      |
|        | 洗涤2   | 50mM Tris,pH 8.8                   | 4   | 400      |
|        | 洗涤3   | 100mM Tris碱,2.8M MgCl <sub>2</sub> | 4   | 100      |
|        | 洗涤4   | 50mM Tris,pH 8.8                   | 1.2 | 100      |
|        | 洗涤5   | 50mM Tris,pH 8.8                   | 2.8 | 400      |
|        | 洗涤6   | 50mM磷酸钠,250mM NaCl,pH 7.0          | 2   | 400      |
|        | 洗脱    | 10mM甲酸钠,pH 3.5                     | 5   | 400      |
|        | 剥离    | 100mM柠檬酸,pH 2.1                    | 2   | 400      |
|        | CIP 2 | 100mM NaOH(2CV后保持15min)            | 3   | 400      |

[0855] 表6J:HCP和蛋白质浓度结果

|        |                                         |                 |            |
|--------|-----------------------------------------|-----------------|------------|
| [0856] | 样品描述                                    | OG1950浓度[mg/mL] | HCP[ng/mg] |
|        | Mab Select Sure洗出液-参照运行                 | 13.42           | >1001      |
|        | 病毒灭活-参照运行                               | 11.76           | 1023       |
|        | Mab Select Sure洗出液-MgCl <sub>2</sub> 洗涤 | 13.24           | 266        |
|        | 病毒灭活-MgCl <sub>2</sub> 洗涤               | 11.57           | 215        |

[0857] 实施例31

[0858] 先前使用的平台过程如表7A示出。表7B中示出了本公开的其他实施方案。

[0859] 表7A:蛋白A亲和层析的平台过程

|        |      |    |             |         |    |          |    |
|--------|------|----|-------------|---------|----|----------|----|
| [0860] | 步骤   | 入口 | 缓冲液         | 泵 B [%] | CV | 流速[cm/h] | 出口 |
|        | 冲洗 1 | B4 | Milli Q H2O | 100%    | 2  | 200      | W  |

[0861]

|              |           |                                       |              |                |            |           |
|--------------|-----------|---------------------------------------|--------------|----------------|------------|-----------|
| <u>CIP 1</u> | <u>A3</u> | <u>0.1 M NaOH (2CV 后保持 15 min)</u>    | <u>0%</u>    | <u>3</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>平衡</u>    | <u>A1</u> | <u>50 mM 磷酸钠, 250 mM NaCl, pH 7.0</u> | <u>0%</u>    | <u>5</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>上样</u>    | <u>S3</u> |                                       | <u>186.2</u> | <u>mL (LV)</u> | <u>200</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗涤 1</u>  | <u>A1</u> | <u>50 mM 磷酸钠, 250 mM NaCl, pH 7.0</u> | <u>0%</u>    | <u>2</u>       | <u>200</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗涤 2</u>  | <u>A4</u> | <u>50 mM 磷酸钠, 2.0 M NaCl, pH 7.0</u>  | <u>0%</u>    | <u>4</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗涤 6</u>  | <u>A1</u> | <u>50 mM 磷酸钠, 250 mM NaCl, pH 7.0</u> | <u>0%</u>    | <u>2</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗脱</u>    | <u>B1</u> | <u>10 mM 甲酸钠, pH 3.5</u>              | <u>100%</u>  | <u>5</u>       | <u>300</u> | <u>O1</u> |
| <u>后洗脱</u>   | <u>B3</u> | <u>100 mM 柠檬酸, pH 2.1</u>             | <u>100%</u>  | <u>2</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>CIP 2</u> | <u>A3</u> | <u>0.1 M NaOH (2 CV 后保持 15 min)</u>   | <u>0%</u>    | <u>3</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |

[0862] 表7B: 蛋白A亲和层析的平台过程2

[0863]

| 步骤           | 入口        | 缓冲液                                    | 泵B[%]        | CV             | 流速[cm/h]   | 出口        |
|--------------|-----------|----------------------------------------|--------------|----------------|------------|-----------|
| <u>冲洗1</u>   | <u>B4</u> | <u>Milli Q H2O</u>                     | <u>100%</u>  | <u>2</u>       | <u>200</u> | <u>W</u>  |
| <u>CIP 1</u> | <u>A3</u> | <u>0.1M NaOH(2CV后保持15min)</u>          | <u>0%</u>    | <u>3</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>平衡</u>    | <u>A1</u> | <u>50mM磷酸钠, 250mM NaCl, pH 7.0</u>     | <u>0%</u>    | <u>5</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>上样</u>    | <u>S3</u> |                                        | <u>186.2</u> | <u>mL (LV)</u> | <u>200</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗涤1</u>   | <u>A1</u> | <u>50mM磷酸钠, 250mM NaCl, pH 7.0</u>     | <u>0%</u>    | <u>2</u>       | <u>200</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗涤2</u>   | <u>A4</u> | <u>50mM Tris, pH 8.8</u>               | <u>0%</u>    | <u>4</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗涤3</u>   | <u>A2</u> | <u>100mM Tris碱, pH 7.7; 2.8M MgCl2</u> | <u>0%</u>    | <u>4</u>       | <u>100</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗涤4</u>   | <u>A4</u> | <u>50mM Tris, pH 8.8</u>               | <u>0%</u>    | <u>1.2</u>     | <u>100</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗涤5</u>   | <u>A4</u> | <u>50mM Tris, pH 8.8</u>               | <u>0%</u>    | <u>2.8</u>     | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗涤6</u>   | <u>A1</u> | <u>50mM磷酸钠, 250mM NaCl, pH 7.0</u>     | <u>0%</u>    | <u>2</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>洗脱</u>    | <u>B1</u> | <u>10mM甲酸钠, pH 3.5</u>                 | <u>100%</u>  | <u>5</u>       | <u>300</u> | <u>O1</u> |
| <u>后洗脱</u>   | <u>B3</u> | <u>100mM柠檬酸, pH 2.1</u>                | <u>100%</u>  | <u>2</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |
| <u>CIP 2</u> | <u>A3</u> | <u>0.1M NaOH(2CV后保持15min)</u>          | <u>0%</u>    | <u>3</u>       | <u>300</u> | <u>W</u>  |

[0864] 然后如本文所述进一步改进表7B中概述的过程。对于结晶问题的解决方案, 表7B中列出的过程将是优选过程。例如, 当在溶液中使用氯化镁时, 洗涤步骤的数量更高, 以防止磷酸盐缓冲液和镁盐之间的相互作用导致快速结晶。当使用钙盐时, 为了防止磷酸盐缓冲液和钙盐之间的相互作用, 洗涤步骤的数量也高。然而, 对于胍盐, 没有观察到结晶是一个重要问题, 因此可以使用如表7A描述的过程, 其中用1M GuHCl代替第二洗涤步骤。

[0865] 建立平衡和洗涤缓冲液参数的范围

[0866] 通过在生理条件下将抗体构建体施加到蛋白A亲和树脂来进行平台过程, 如表8A示出。

[0867] 表8A:

[0868]

| 运行   | 蛋白质    | 树脂        | 纯化策略                                                                                              | 层析洗出液                 |                | 病毒灭活的蛋白质溶液            |                |            |                 |
|------|--------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|------------|-----------------|
|      |        |           |                                                                                                   | SEC-HPLC<br>纯度<br>(%) | HCP<br>(ng/mg) | SEC-HPLC<br>纯度<br>(%) | HCP<br>(ng/mg) | 效价<br>(pM) | 相对<br>效价<br>(%) |
| 1b   | OG2072 | MSS<br>LX | 平衡 + 洗涤 1: 50 mM 磷酸钠, pH 7.0, 250 mM NaCl<br>洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub>         | 98.4                  | 241            | 98.3                  | 193            | 304        | 121             |
| 2    | OG2072 | MSS<br>LX | 平衡 + 洗涤 1: 5 mM 磷酸钠, pH 7.0, 50 mM NaCl<br>洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub>           | 98.1                  | 386            | 98.1                  | 355            | n/a        | n/a             |
| 3    | OG2072 | MSS<br>LX | 平衡 + 洗涤 1: 200 mM 磷酸钠, pH 7.0, 2000 mM NaCl<br>洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub>       | 98.2                  | 410            | 98.1                  | 279            | n/a        | n/a             |
| 4    | OG2072 | MSS<br>LX | 平衡 + 洗涤 1: 50 mM 磷酸钠, pH 6.0, 250 mM NaCl<br>洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub>         | 98.2                  | 259            | 98.2                  | 254            | n/a        | n/a             |
| 5    | OG2072 | MSS<br>LX | 平衡 + 洗涤 1: 50 mM 磷酸钠, pH 9.0, 250 mM NaCl<br>洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub>         | 97.9                  | 327            | 98.2                  | 311            | n/a        | n/a             |
| 6    | OG2072 | MSS<br>LX | 平衡 + 洗涤(仅有 Tris): 50 mM Tris, pH 7.2, 250 mM NaCl<br>洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> | 97.9                  | 340            | 97.8                  | 296            | 336        | 110             |
| 22 b | OG2072 | MSS       | 平台过程: 用 50 mM 磷酸钠, pH 7.0, 2.0 M                                                                  | 98.4                  | 1285           | 98.5                  | 562            | 330        | 114             |

[0869]

|  |  |    |                                            |  |  |  |  |  |  |
|--|--|----|--------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|
|  |  | LX | NaCl 洗涤<br>(任何洗涤缓冲液中均无 MgCl <sub>2</sub> ) |  |  |  |  |  |  |
|--|--|----|--------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|

[0870] 平衡和洗涤1缓冲液由50mM磷酸钠, 250mM NaCl, pH 7.0组成。然后通过施加高盐洗涤缓冲液2 (50mM磷酸钠, 2.0M NaCl, pH 7.0) 洗涤树脂, 接着用第一缓冲液再平衡树脂, 然后洗脱抗体 (10mM甲酸钠, pH 3.5)。试图降低该平台过程的洗出液中的HCP水平。表明了氯化镁能有效地进一步去除HCP。由于镁在磷酸盐存在下形成晶体, 在施加含镁缓冲液之前, 引入洗涤 (50mM Tris, pH 8.8) 以除去磷酸盐。用含镁缓冲液洗涤完成后, 再次施加相同的洗涤以从柱中除去镁, 然后施加磷酸钠缓冲液。这一措施是必要的, 以在现有平台过程中引入镁洗涤。发现浓度为2.8M的MgCl<sub>2</sub>对此目的很有效 (运行1b)。在最初的一组实验中, 测

试了缓冲液浓度和盐浓度,以确定缓冲液系统和盐浓度的合适操作范围。

[0871] 在运行2和3中,测试5mM磷酸钠,50mM NaCl,pH 7.0和200mM磷酸钠,2.0M NaCl,pH 7.0的平衡和后上样洗涤,同时保持100mM Tris碱,2.8M MgCl<sub>2</sub>用于洗涤3步骤。较高和较低的缓冲液浓度以及NaCl浓度表明了亲和层析步骤的洗出液中有水平相当的HCP,并且HCP去除的效率不受影响。这表明5mM至200mM的范围适用于缓冲液系统,50mM至2.0M的范围适用于NaCl。

[0872] 在运行4和5中,测试50mM磷酸钠,250mM NaCl,pH 6.0和50mM磷酸钠,250mM NaCl,pH 9.0的平衡和后上样洗涤,同时保持100mM Tris碱,2.8M MgCl<sub>2</sub>用于洗涤3步骤。所施加的用于平衡和洗涤的具有较高和较低pH值的运行的洗脱液显示出相当的HCP水平。对HCP的效率没有影响,并且表明pH 6.0-9.0范围的缓冲系统工作良好。

[0873] 目前的平台使用50mM磷酸钠,250mM NaCl,pH 7.0用于平衡和后上样洗涤步骤。进行实验(运行6)以测试仅用Tris缓冲液的层析步骤的可行性。在该实验中,50mM Tris,250mM NaCl,pH 7.2用于平衡和洗涤(代替50mM磷酸钠,250mM NaCl,pH 7.0)。结果看起来是相当的,并且证明当亲和层析步骤仅用Tris缓冲液进行时,可以避免额外的洗涤(50mM Tris,pH 8.8)-在施加镁离子之前去除磷酸根离子。这简化了层析安排并减少了缓冲液体积。

[0874] 总之,对于平衡和洗涤步骤,较高和较低的缓冲液浓度和NaCl浓度以及较高和较低的pH值显示出相当的HCP去除效率。这为(1)5mM至200mM的缓冲液系统强度;(2)NaCl浓度为50mM至2.0M的NaCl;(3)6.0-9.0的pH和(4)可以使用的Tris和磷酸盐缓冲液建立了操作范围。洗涤3的额外实验:执行了0.1M Bis-Tris,pH 6.0,2.8M MgCl<sub>2</sub>,尽管步骤产率低,但效果良好。对于这种缓冲液系统,需要建立较低的MgCl<sub>2</sub>。

[0875] 建立氯化镁浓度的范围

[0876] 然后,发明人测试了洗涤3步骤中MgCl<sub>2</sub>浓度对洗出液中HCP含量的影响,如表8B示出。

[0877] 表8B:

[0878]

| 运行 | 蛋白质    | 树脂        | 纯化策略                                        | 层析洗出液    |         | 病毒灭活的蛋白质溶液 |         |      |       |
|----|--------|-----------|---------------------------------------------|----------|---------|------------|---------|------|-------|
|    |        |           |                                             | SEC-HPLC | HCP     | SEC-HPLC   | HCP     | 效价   | 相对效价  |
|    |        |           |                                             | 纯度 (%)   | (ng/mg) | 纯度 (%)     | (ng/mg) | (pM) | 价 (%) |
| 7  | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 1.5 M MgCl <sub>2</sub> | 97.8     | 415     | 97.8       | 368     | n/a  | n/a   |
| 9  | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 2.0 M MgCl <sub>2</sub> | 98.2     | 255     | 98.1       | 230     | n/a  | n/a   |
| 10 | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 2.5 M MgCl <sub>2</sub> | 98.3     | 276     | 98.2       | 221     | n/a  | n/a   |

[0879]

|      |        |           |                                              |      |      |      |     |     |     |
|------|--------|-----------|----------------------------------------------|------|------|------|-----|-----|-----|
| 1b   | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> | 98.4 | 241  | 98.3 | 193 | 304 | 121 |
| 11   | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 3.0 M MgCl <sub>2</sub>  | 98.5 | 158  | 98.3 | 136 | 314 | 117 |
| 22 b | OG2072 | MSS<br>LX | 平台过程: 用 50 mM 磷酸钠, pH 7.0, 2.0 M NaCl 洗涤     | 98.4 | 1285 | 98.5 | 562 | 330 | 114 |

[0880] 运行7至运行11显示,洗涤步骤中的MgCl<sub>2</sub>浓度与洗出液中的HCP含量呈负相关。除了运行11之外,所有运行的产率都是好的,因为3.0M MgCl<sub>2</sub>有点太高,亲和层析步骤的产率为66%。所有其他运行的产率>85%。所有运行的SEC-HPLC纯度相当。未示出的3.5M MgCl<sub>2</sub>的运行12数据太高,并且OG2072在洗涤级分中洗脱。从MgCl<sub>2</sub>和浓度影响的这些实验中,发明人观察到浓度有影响,但是镁(代替钠)的存在比浓度更重要。发明人得出结论,1.5M MgCl<sub>2</sub>在洗出液中显示出比2.0M NaCl更少的HCP。

[0881] 运行13使用补充到pH 6.0的Bis-Tris缓冲洗涤缓冲液中的2.8M MgCl<sub>2</sub>进行。分别对于洗出液池(eluate pool)和VI后,HCP含量为94和ng/mg。与平台条件相比,这减少了12倍和5倍。然而产率低,为48.4%,因为在洗涤步骤中洗脱了大量的OG2072。因此,这不是经济上可行的洗涤步骤。如果含镁的洗涤缓冲液的pH为6.0,则需要降低并微调MgCl<sub>2</sub>的含量。注意,运行8是用补充到pH 7.0的100mM Tris缓冲液中的2.8M MgCl<sub>2</sub>进行的,观察到良好的步骤产率。

[0882] 洗涤3缓冲液中的MgCl<sub>2</sub>浓度与洗出液中的HCP含量呈负相关。通过增加MgCl<sub>2</sub>浓度(超过2.0M MgCl<sub>2</sub>)去除HCP的额外效率相当适中。除了在洗涤3缓冲液中的运行3.0M MgCl<sub>2</sub>外(其中一些抗体在洗涤缓冲液中洗脱),所有运行的产率都是好的。所有运行的SEC-HPLC纯度相当。从MgCl<sub>2</sub>和浓度影响的这些实验中,发明人观察到浓度有影响,但是镁(代替钠)

的存在比浓度更重要。发明人得出结论,含有1.5M MgCl<sub>2</sub>的缓冲液在洗出液中显示出比2.0M NaCl更少的HCP。

[0883] 实施例32:不同离液强度的盐的筛选

[0884] 然后,运行测试以确定HCP的去除是否与霍夫迈斯特序列下的离液强度相关。

[0885] 离液阳离子的筛选

[0886] 实验条件如表9A示出。

[0887] 表9A:

| 运行     | 蛋白质  | 树脂     | 纯化策略      | 层析洗出液                                         |                | 病毒灭活的蛋白质溶液            |                |            |                 |     |
|--------|------|--------|-----------|-----------------------------------------------|----------------|-----------------------|----------------|------------|-----------------|-----|
|        |      |        |           | SEC-HPLC<br>纯度<br>(%)                         | HCP<br>(ng/mg) | SEC-HPLC<br>纯度<br>(%) | HCP<br>(ng/mg) | 效价<br>(pM) | 相对<br>效价<br>(%) |     |
| [0888] | 19   | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 2.8 M 醋酸锂                 | 98.1           | 444                   | 98.1           | 390        | 321             | 117 |
|        | 14   | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 2.8 M LiCl                | 98.1           | 408                   | 97.8           | 353        | n/a             | n/a |
|        | 1b   | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub>  | 98.4           | 241                   | 98.3           | 193        | 304             | 121 |
|        | 23   | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 2.0 M CaCl <sub>2</sub> ° | 97.6           | 157                   | 98.1           | 147        | 299             | 126 |
|        | 29   | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 1.0 M 氯化胍*                | 98.9           | 86                    | 98.7           | 86         | n/a             | n/a |
|        | 22 b | OG2072 | MSS<br>LX | 平台过程: 用 50 mM 磷酸钠, pH 7.0, 2.0 M NaCl 洗涤      | 98.4           | 1285                  | 98.5           | 562        | 330             | 114 |

[0889] 为此,进行了用补充到Tris碱的5.0M CaCl<sub>2</sub>进行的洗涤步骤(数据未示出),但该运行具有低产率,因为OG2072在洗涤级分中洗脱,证明离液效应在5.0M时太强。进行了后续运行,其中洗涤缓冲液补充有2.0M CaCl<sub>2</sub>。该运行显示亲和层析步骤中的良好产率。由于2.0M CaCl<sub>2</sub>的存在,没有聚集的迹象。与使用2.0M NaCl的洗涤步骤的平台过程相比,HCP含量低得多。这表明CaCl<sub>2</sub>洗涤的益处来自钙成分。钙是一种比钠离子性更高的阳离子。重要的是,在洗涤步骤中,用2.0M CaCl<sub>2</sub>运行的洗出液比用2.8M MgCl<sub>2</sub>运行的洗出液具有更低的HCP含量。这支持了这样的假设,即更强的离液剂对HCP的去除具有更有益的效果,因为根据霍夫迈斯特序列,钙是比镁更强的离液剂。

[0890] 工业中使用的最强的离液阳离子是胍。运行16表明3.0M氯化胍对于洗涤步骤来说

太高。它产率低并导致聚集水平升高。运行24表明,1.65M仍然是略高的氯化胍浓度,因为SEC-HPLC纯度为95.8%,相比之下,对于对SEC-HPLC没有影响且与平台过程相当的条件,约为98%。运行29表明1.0M氯化胍是合适的,因为该运行显示出良好的产率和纯度,如通过SEC-HPLC所测量的。洗出液的HCP含量为86ng/mg,比平台过程低约15倍。

[0891] 总之,在洗涤缓冲液中使用钠作为离液阳离子作为盐的一部分导致HCP含量为1285ng/mg,在洗涤缓冲液中使用锂作为离液阳离子作为盐的一部分导致HCP含量为408ng/mg,在洗涤缓冲液中使用镁作为离液阳离子作为盐的一部分导致HCP含量为241ng/mg,在洗涤缓冲液中使用钙作为离液阳离子作为盐的一部分导致HCP含量为157ng/mg,在洗涤缓冲液中使用胍作为离液阳离子作为盐的一部分导致HCP含量为86ng/mg。这符合霍夫迈斯特序列中描述的离液强度,并表明HCP的去除是作为洗涤缓冲液中所用盐的一部分的离液阳离子的强度的函数(function)。换句话说,更强的离液剂具有更高的HCP去除效率( $\text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{胍}^+$ )。注意,醋酸锂和LiCl在去除HCP方面表现出相当的效率,氯化物表现稍好,但阴离子的影响似乎不太明显。

[0892] 离液阴离子的筛选

[0893] 实验条件如表9B示出。

[0894] 表9B:

[0895]

| 运<br>行 | 蛋白质    | 树脂        | 纯化策略                                           | 层析洗出液                 |                | 病毒灭活的蛋白质溶液            |                |            |                         |
|--------|--------|-----------|------------------------------------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|------------|-------------------------|
|        |        |           |                                                | SEC-HPLC<br>纯度<br>(%) | HCP<br>(ng/mg) | SEC-HPLC<br>纯度<br>(%) | HCP<br>(ng/mg) | 效价<br>(pM) | 相<br>对<br>效<br>价<br>(%) |
| 19     | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 2.8 M 醋酸锂                  | 98.1                  | 444            | 98.1                  | 390            | 321        | 117                     |
| 14     | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 2.8 M LiCl                 | 98.1                  | 408            | 97.8                  | 353            | n/a        | n/a                     |
| 22 b   | OG2072 | MSS<br>LX | 平台过程: 用 50 mM 磷酸钠, pH 7.0, 2.0 M NaCl 洗涤       | 98.4                  | 1285           | 98.5                  | 562            | 330        | 114                     |
| 18     | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3 梯度: 0.1 M Tris 碱, 7.0 M NaNO <sub>3</sub> | 98.0                  | 471            | 98.0                  | 306            | 283        | 130                     |
| 17 b   | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 0.1 M Tris 碱, 2.8 M MgSO <sub>4</sub>    | 98.1                  | 412            | 97.9                  | 319            | 325        | 113                     |

[0896]

|    |        |           |                                              |      |     |      |     |     |     |
|----|--------|-----------|----------------------------------------------|------|-----|------|-----|-----|-----|
| 1b | OG2072 | MSS<br>LX | 洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> | 98.4 | 241 | 98.3 | 193 | 304 | 121 |
|----|--------|-----------|----------------------------------------------|------|-----|------|-----|-----|-----|

[0897] 然后,运行测试以确定阴离子对HCP去除的影响。为了阐明对HCP含量的有利影响是由镁还是由氯化物引起的,将MgSO<sub>4</sub>作为盐进行测试。硫酸根是一种强亲液(kosmotropic)阴离子,通常用作硫酸铵或硫酸钠来诱导更高级的寡聚结构,例如用于蛋白质的沉淀或结晶。相反,离液剂可用于将分子保持在溶液中,并防止不利的或非特异性的相互作用。在运行17b中,使用2.8M MgSO<sub>4</sub>进行洗涤步骤,洗出液含有OG2072,其HCP含量低于

平台过程,HCP含量与使用2.8M MgCl<sub>2</sub>的参照运行相当。通过SEC-HPLC测量,该运行也显示出良好的产率和纯度。这表明MgCl<sub>2</sub>洗涤的主要益处来自镁组分,而不是氯化物组分。镁是一种比钠更强的离液阳离子,这可能是这种洗涤策略优于平台策略的原因。重要的是,它表明主要的益处来自阳离子而不是阴离子。硫酸根阴离子的亲液性质不能逆转镁的离液效应。

[0898] 在运行18中,洗涤步骤包括作为盐的7.0M NaNO<sub>3</sub>,其中硝酸盐比平台过程中氯化物的离液性高。含有OG2072的洗出液的HCP含量比平台过程低,但与使用2.8M MgCl<sub>2</sub>的参照运行相比,其HCP含量较高,尽管使用了高得多的7.0M NaNO<sub>3</sub>浓度。这进一步证实了与阴离子相比,阳离子是HCP去除中更有效的参数的假设。为了进一步检验该假设,在运行19中,制备了包含2.8M醋酸锂的洗涤缓冲液。与钠相比,锂是离液性更高的阳离子,但醋酸根的离液性不如氯化物。含有OG2072的洗出液的HCP含量比使用NaCl的平台过程低。这表明阳离子的有益效果不会被存在的更具亲液性的阴离子逆转。

[0899] 总之,使用2.8M MgSO<sub>4</sub>作为洗涤缓冲液补充物导致洗出液具有比平台过程更低的HCP含量,并且当与使用2.8M MgCl<sub>2</sub>作为洗涤缓冲液补充物的运行相比时具有稍微更高的HCP含量。这表明HCP去除的主要益处来自阳离子而不是阴离子。硫酸根阴离子的亲液性质不能逆转镁的离液效应。当比较醋酸锂和LiCl时,也观察到类似的现象。此外,使用7.0M NaNO<sub>3</sub>作为洗涤缓冲液补充物(其中硝酸盐比氯化物离液性高)导致洗出液具有比平台过程更低的HCP含量,但是与使用2.8M MgCl<sub>2</sub>的参照运行相比,具有更高的HCP含量,尽管使用了高得多的7.0M NaNO<sub>3</sub>浓度。这进一步证实了与阴离子相比,阳离子是HCP去除中更有效的参数的假设。

[0900] 得出结论,在亲和层析步骤中包括离液盐有助于降低HCP水平,并且该效果主要由阳离子的性质驱动。发明人想评估这种观察是否也可以应用于其他分子和树脂。

[0901] 在运行25和26中,OG1950并将其应用于MabSelect Sure(注意,上述所有其他实验均使用MabSelect Sure LX进行)。OG1950是单价的更经典的抗体,而OG2072是二价的融合抗体。在运行26中,平台过程应用了包含2.0M NaCl的洗涤步骤,而在运行25中,应用了含有2.8M MgCl<sub>2</sub>的洗涤缓冲液。与在洗涤缓冲液中使用2.0M NaCl的运行(423ng/mg)相比,使用2.8M MgCl<sub>2</sub>的运行(100ng/mg)的洗出液显示低4倍的HCP。这两种运行显示了相当的SEC-HPLC纯度和效价(potency),证明MgCl<sub>2</sub>对OG1950抗体的结构和功能没有不利影响。为了进行比较,进行了高pH洗涤运行(使用50mM磷酸钠,2.0M NaCl,pH 9.0的运行),并且当与含有2.8M MgCl<sub>2</sub>的洗涤缓冲液相比时,没有观察到对HCP去除的相当效果(341ng/mg)。这表明HCP去除的效果与离液盐的性质有关,并且不能通过高pH来补偿。对于运行25,一些OG1950在洗涤步骤中洗脱,表明2.8M MgCl<sub>2</sub>有些太高。在运行28中,应用了2.0M MgCl<sub>2</sub>,并且显示2.0M MgCl<sub>2</sub>是OG1950的合适浓度,并且在2.0M MgCl<sub>2</sub>洗涤步骤中没有观察到A280。这表明MgCl<sub>2</sub>需要在每种分子的基础上进行优化。较低的氯化镁对洗出液中的HCP水平(138ng/mg)没有显著影响。与使用含有2.8M MgCl<sub>2</sub>的洗涤缓冲液的运行相比,该运行的SEC-HPLC纯度较低。这个结果出乎意料。

[0902] 在运行31和32中,将阿柏西普应用于MabSelect Sure LX树脂。阿柏西普是可溶性融合蛋白,它将VEGF受体的配体结合元件融合到IgG的Fc部分。在运行31中,平台过程应用了包括2.0M NaCl的洗涤步骤,而在运行32中,洗涤缓冲液补充有2.8M MgCl<sub>2</sub>。与洗涤缓冲

液中使用NaCl的运行相比,使用MgCl<sub>2</sub>的运行的洗出液显示出至少低三倍的HCP。这两种运行显示了相当的SEC-HPLC纯度,证明MgCl<sub>2</sub>对阿柏西普的结构没有不利影响。在2.8M MgCl<sub>2</sub>洗涤步骤中没有观察到A280活性,2.8M MgCl<sub>2</sub>适用于该分子。

[0903] 在运行33和34中,将OG2127应用于MabSelect Sure LX树脂。OG2127也是可溶性融合蛋白,它将VEGF受体的配体结合元件融合到Fc部分。在运行33中,平台过程应用了包括2.0M NaCl的洗涤步骤,而在运行34中,洗涤缓冲液补充有2.8M MgCl<sub>2</sub>。与洗涤缓冲液中使用NaCl的运行相比,使用MgCl<sub>2</sub>的运行的洗出液显示出至少低五倍的HCP。这两种运行显示了相当的SEC-HPLC纯度,证明MgCl<sub>2</sub>对OG2127的结构没有不利影响。在2.8M MgCl<sub>2</sub>洗涤步骤中也没有观察到A280活性,2.8M MgCl<sub>2</sub>适用于该分子。

[0904] 这些实验表明,该概念适用于不同的抗体类型和构建体,如单价和二价抗体构建体和Fc融合蛋白。还测试了两种不同类型的亲和树脂。这表明这一概念普遍适用并且不仅适用于OG2072。

[0905] 实施例33:不同蛋白质和树脂的筛选

[0906] 然后,用两种不同的亲和树脂和多种抗体和蛋白质运行测试以确定本文公开的亲和层析方法,如表10示出。

[0907] 表10:

| 运行     | 蛋白质 | 树脂 | 纯化策略 | 层析洗出液                 |                | 病毒灭活的蛋白质溶液            |                |            |          |
|--------|-----|----|------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|------------|----------|
|        |     |    |      | SEC-HPLC<br>纯度<br>(%) | HCP<br>(ng/mg) | SEC-HPLC<br>纯度<br>(%) | HCP<br>(ng/mg) | 效价<br>(pM) | 相对<br>效价 |
| [0908] |     |    |      |                       |                |                       |                |            |          |

[0909]

|      |         |           |                                              |       |      |      |              |      | (%) |
|------|---------|-----------|----------------------------------------------|-------|------|------|--------------|------|-----|
| 22 b | OG2072  | MSS<br>LX | 平台过程：用 50 mM 磷酸钠, pH 7.0, 2.0 M NaCl 洗涤      | 98.4  | 1285 | 98.5 | 562          | 330  | 114 |
| 1b   | OG2072  | MSS<br>LX | 洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> | 98.4  | 241  | 98.3 | 193          | 304  | 121 |
| 26   | OG1950  | MSS       | 平台过程：用 50 mM 磷酸钠, pH 7.0, 2.0 M NaCl 洗涤      | 96.2  | 423  | 96.5 | 281          | 1607 | 96  |
| 25   | OG1950  | MSS       | 洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> | 96.3  | 100  | 96.3 | 63           | 1755 | 88  |
| 28   | OG1950  | MSS       | 洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.0 M MgCl <sub>2</sub> | 93.9  | 138  | 93.9 | 94           | 1610 | 96  |
| 31   | 阿柏西普    | MSS<br>LX | 平台过程：用 50 mM 磷酸钠, pH 7.0, 2.0 M NaCl 洗涤      | 98.8  | n/a  | 98.7 | ><br>21,538° | n/a  | n/a |
| 32   | 阿柏西普    | MSS<br>LX | 洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> | 98.2  | n/a  | 98.1 | 7,611°       | n/a  | n/a |
| 33   | OG2127I | MSS<br>LX | 平台过程：用 50 mM 磷酸钠, pH 7.0, 2.0 M NaCl 洗涤      | 100.0 | n/a  | 99   | ><br>66,667° | n/a  | n/a |
| 34   | OG2127  | MSS<br>LX | 洗涤 3: 100 mM Tris 碱, 2.8 M MgCl <sub>2</sub> | 98.8  | n/a  | 98.8 | 12,482°      | n/a  | n/a |

[0910] 如上表10示出,本文公开的方法对各种抗体和蛋白质广泛有效。改进的洗涤策略适用于单价和二价抗体构建体,以及不同的Fc融合蛋白。因此,发明人预期该洗涤策略能够一般地应用于任何类型的抗体和/或蛋白质。



图1

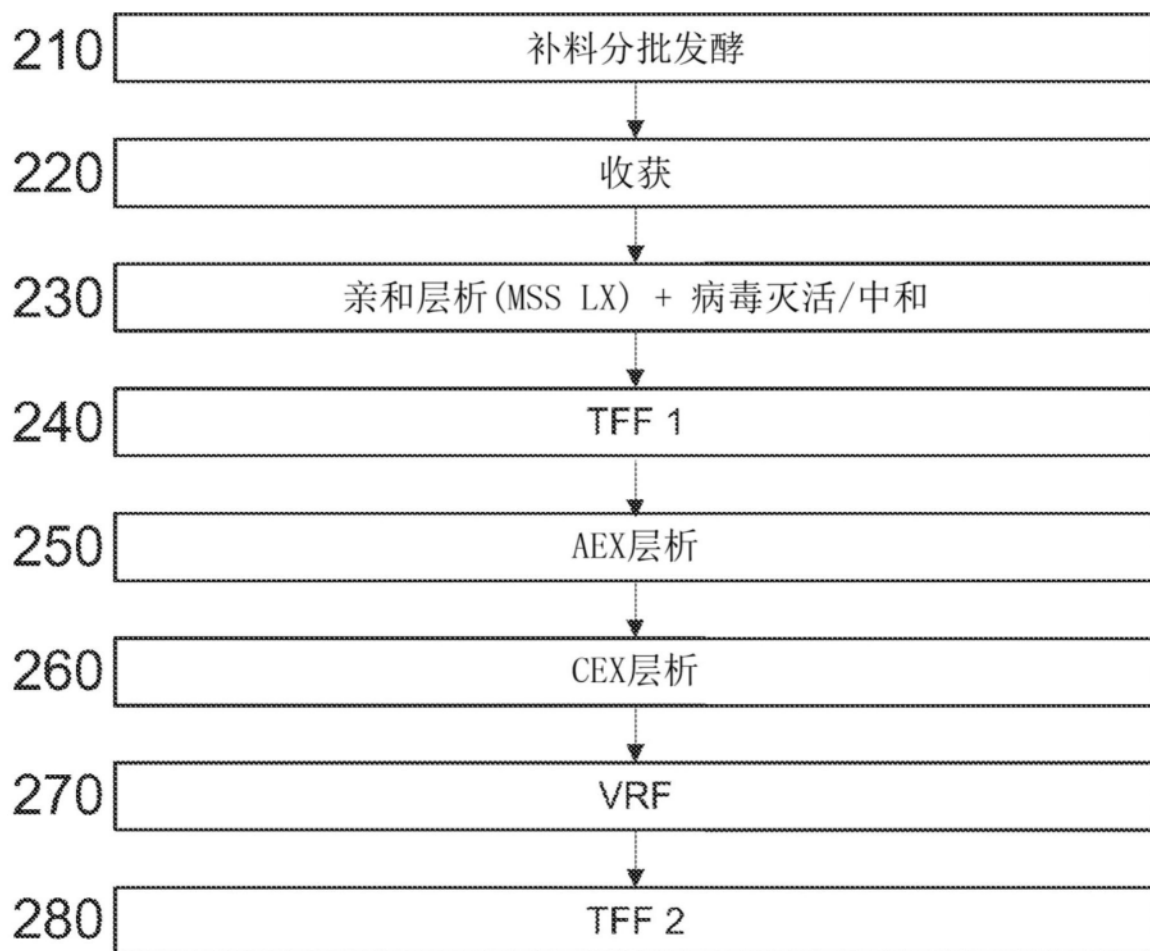


图2

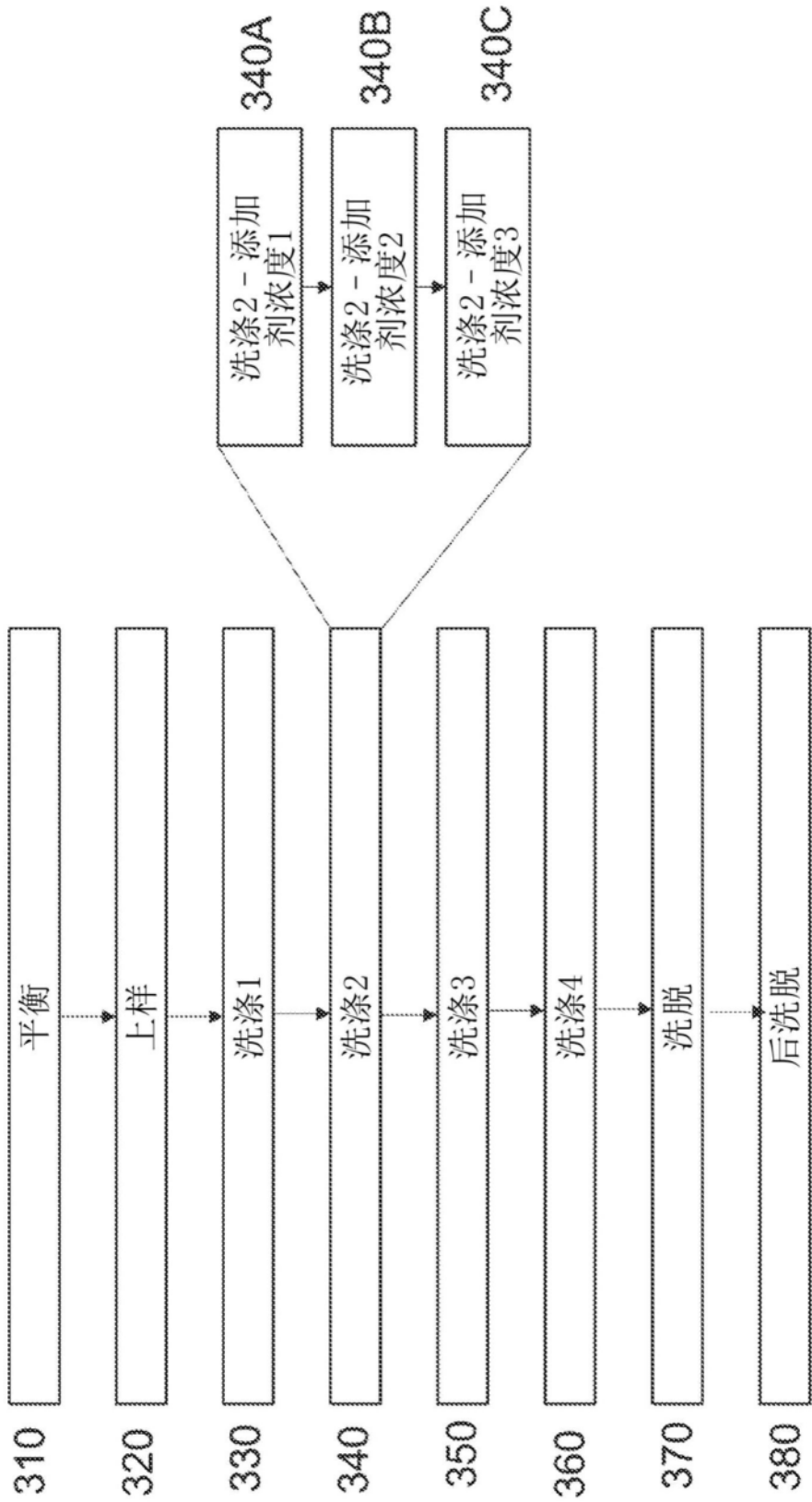


图3

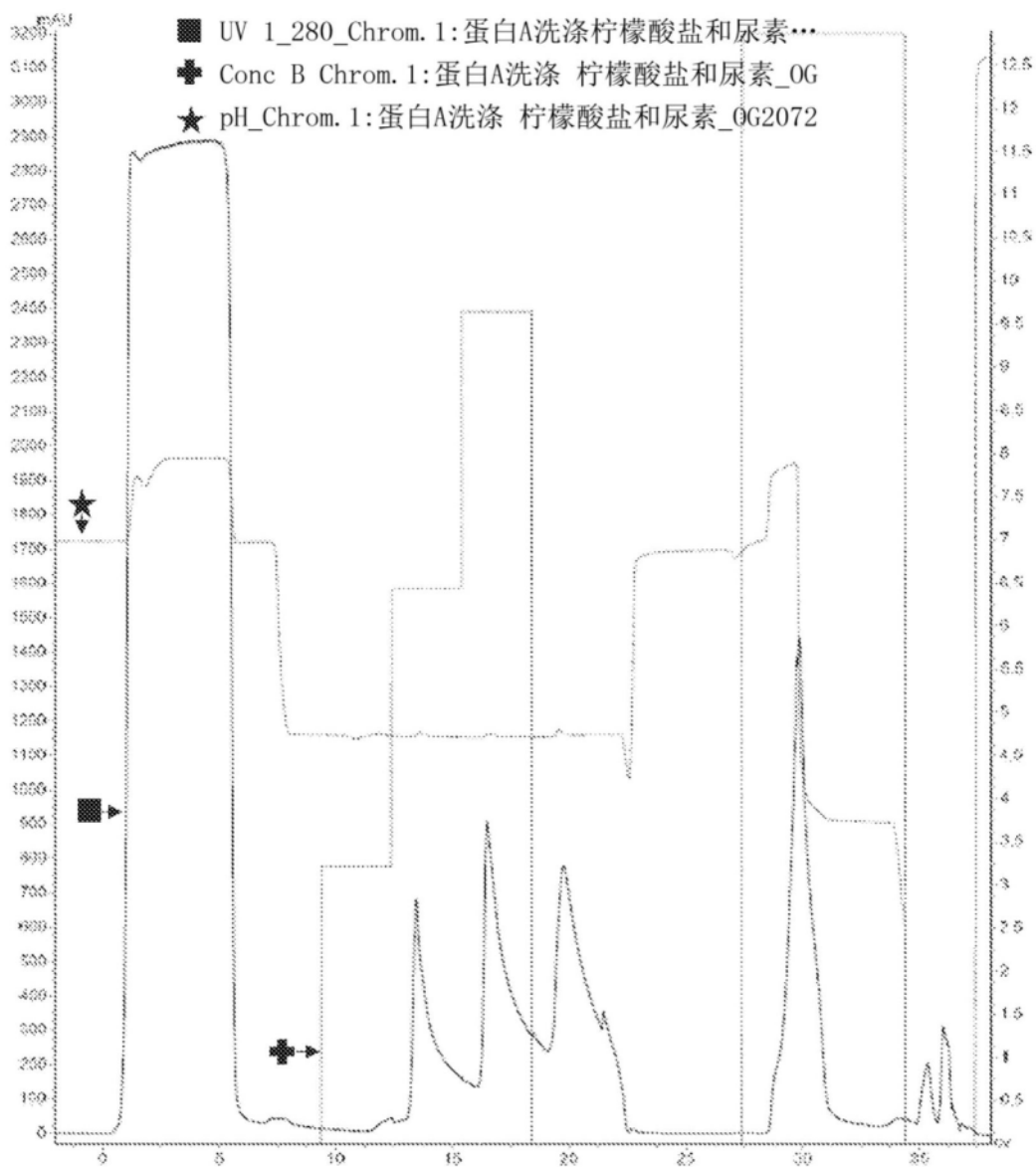


图4

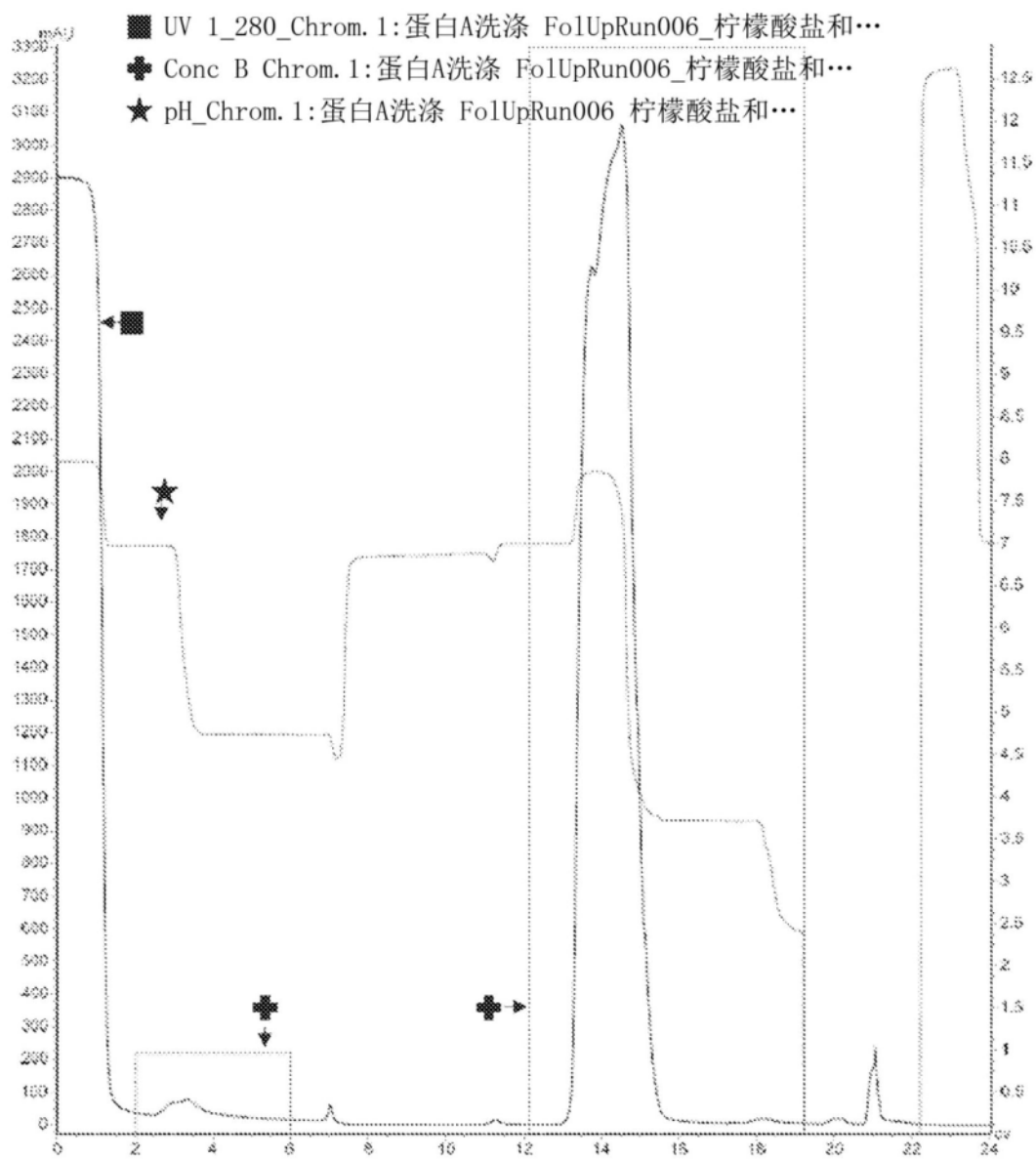


图5

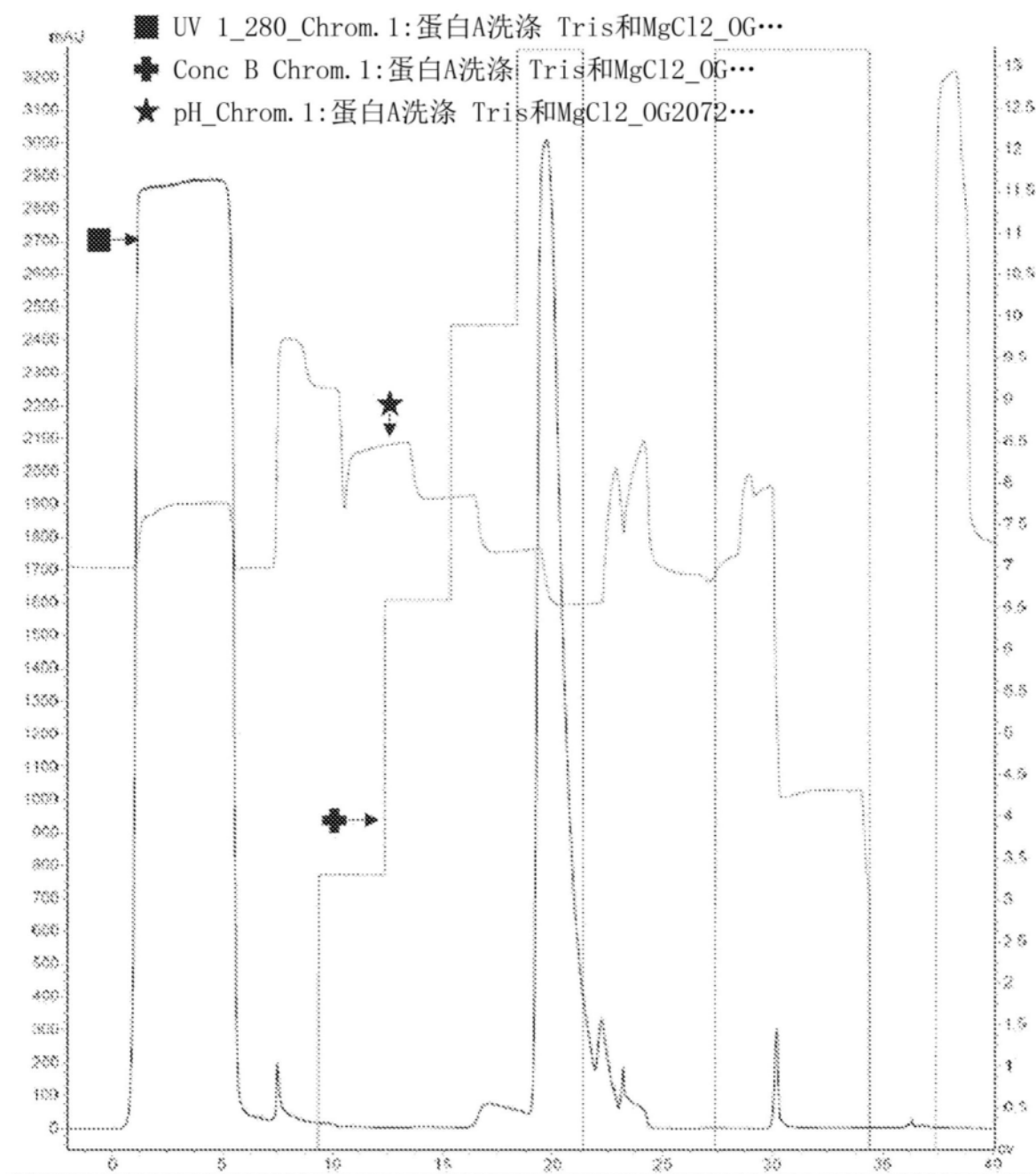


图6

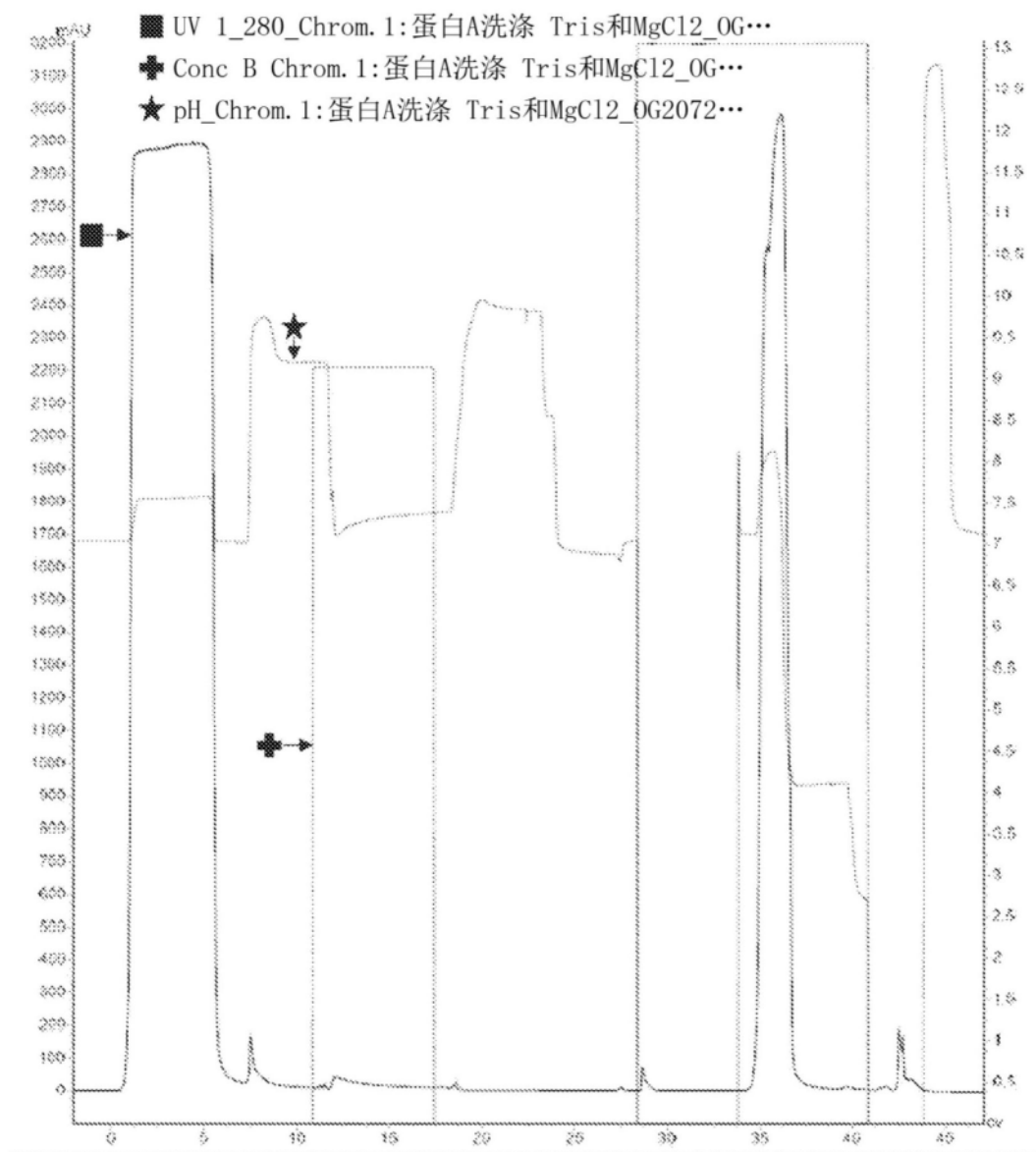


图7

### 抗VEGF抗体的重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTS  
SHWYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTISGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH  
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTIVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSGFFLYSKLTIVDK  
SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 270)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTS  
SHWYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTISGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH  
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTIVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSGFFLYSKLTIVDK  
SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 271)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTS  
SHWYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTISGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH  
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTIVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSGFFLYSKLTIVDK  
SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 272)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTS  
SHWYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTISGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH  
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTIVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSGFFLYSKLTIVDK  
SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSCS (SEQ ID NO: 273)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTS  
SHWYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTISGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH  
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTIVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGYFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSGFFLYSKLTIVDK  
SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS (SEQ ID NO: 274)

### 抗VEGF抗体的轻链

DIQLTQSPSSLSASVGRVITITCSASQDISNVLNMYQKPGKAPKVLIIYFTSSLSHGVPSPRFGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE  
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGE (SEQ ID NO: 275)

图8

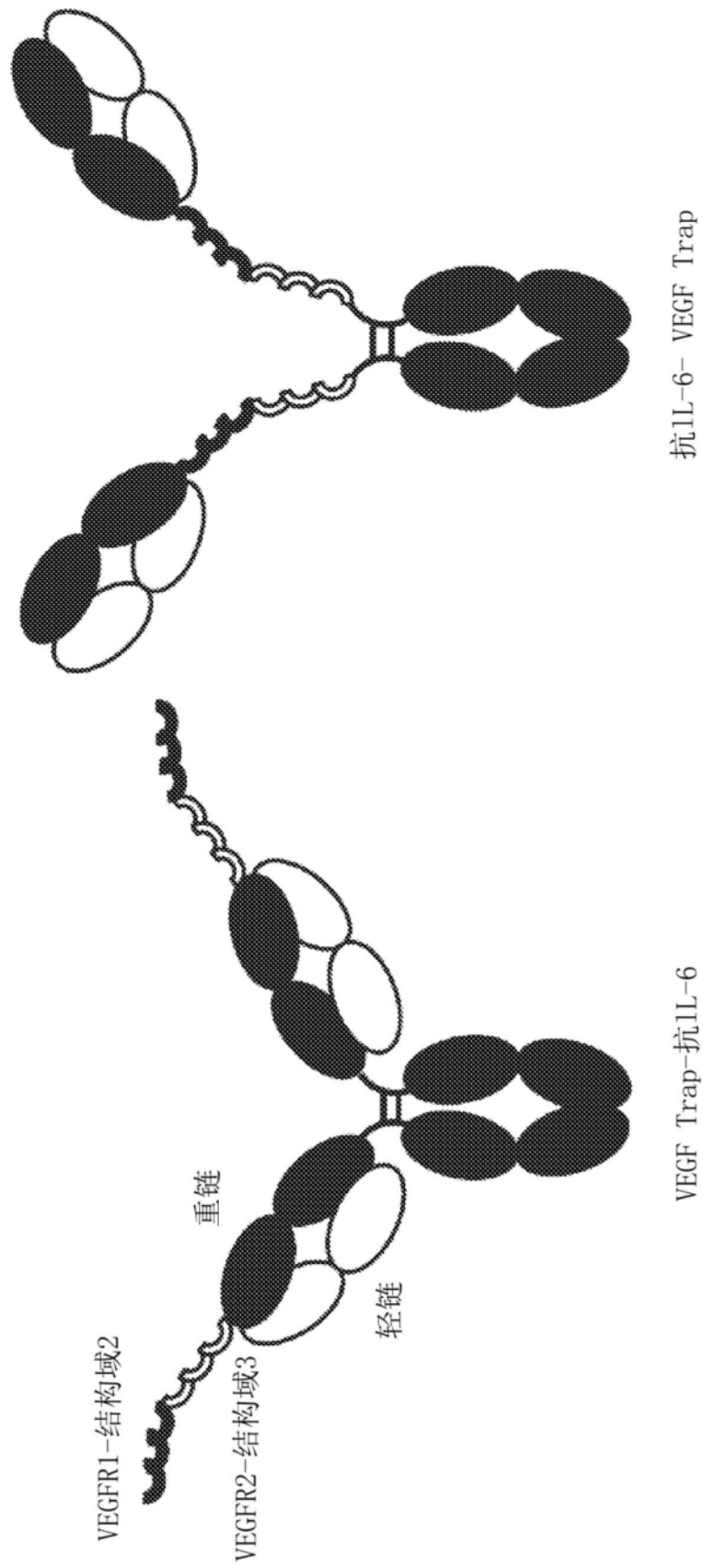


图9

> VEGF\_trap\_变体\_1 (SEQ ID NO: 4)  
SDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFHISN  
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIHRQTNTIHDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVNVI  
DFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS  
TFVRVHEK

> VEGF\_trap\_变体\_2 (SEQ ID NO: 5)  
SDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFHISN  
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTIRQTNTIHDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVNVI  
DFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS  
TFVRVHEK

> VEGF\_trap\_变体\_3 (SEQ ID NO: 6)  
SDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFHISN  
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIHRQTNTIHDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVNVI  
DFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS  
TFVRVHEK

图10

| SEQ ID NO: | 序列:                                                                                                                      |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7          | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYS<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQAWGYALDIWGQGLVTVSS |
| 8          | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYS<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQSWGYALDIWGQGLVTVSS |
| 9          | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYS<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGWGYALDIWGQGLVTVSS |
| 10         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYS<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQTWGYALDIWGQGLVTVSS |
| 11         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYS<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQVWGYALDIWGQGLVTVSS |
| 12         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYS<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQWGYALDIWGQGLVTVSS  |
| 13         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYS<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQKWGYALDIWGQGLVTVSS |

图11

| SEQ ID NO: | VEGF Trap序列:                                                                                                                                                                                                                     |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14         | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK<br>GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYL <u>THR</u> QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKVLNLC<br>TARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA<br>ASSGLMTKKNSTFVRVHEK |
| 15         | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK<br>GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYL <u>IHR</u> QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKVLNLC<br>TARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA<br>ASSGLMTKKNSTFVRVHEK |
| 16         | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK<br>GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYL <u>TI</u> RQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKVLNLC<br>TARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA<br>ASSGLMTKKNSTFVRVHEK |
| 17         | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK<br>GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYL <u>II</u> RQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKVLNLC<br>TARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA<br>ASSGLMTKKNSTFVRVHEK |

| SEQ ID NO: | VEGF Trap序列: |
|------------|--------------|
| 18         | GGGGSGGGGS   |

图12

| SEQ ID NO: | VEGF Trap序列:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 19         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSSWTTYSD<br>TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQAWGYIALDIWGQGTLLTVSSASTKG<br>PSVFEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK<br>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSCSPGK |
| 20         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSSWTTYSD<br>TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQSWGYIALDIWGQGTLLTVSSASTKG<br>PSVFEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK<br>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSCSPGK |
| 21         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSSWTTYSD<br>TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGWGYIALDIWGQGTLLTVSSASTKG<br>PSVFEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK<br>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSCSPGK |
| 22         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSSWTTYSD<br>TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQTWGYIALDIWGQGTLLTVSSASTKG<br>PSVFEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK<br>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSCSPGK |
| 23         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSSWTTYSD<br>TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAROVWGYIALDIWGQGTLLTVSSASTKG<br>PSVFEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK<br>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSCSPGK |

图13

| SEQ ID NO: | VEGF Trap序列:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 24         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSSWTYYSD<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQWGYIALDIWGQGTLLTVSSASTKG<br>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK<br>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSCSPGK |
| 25         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSSWTYYSD<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQKWGYIALDIWGQGTLLTVSSASTKG<br>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK<br>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSCSPGK |
| 26         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSSWTYYSD<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYIALDVWGQGTLLTVSSASTKG<br>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK<br>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSCSPGK |
| 27         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSSWTYYSD<br>TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYIALDVWGQGTLLTVSSASTKG<br>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK<br>PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSCSPGK |

图14

| SEQ ID NO: | 轻链序列:                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 28         | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCSASISVS <del>SYLYWY</del> QQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTIS <del>SLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL</del><br>KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS <del>TYSL</del> SSTLTLSKADYE<br>KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 29         | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCSASISVS <del>SYLYWY</del> QQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTIS <del>SLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL</del><br>KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS <del>TYSL</del> SSTLTLSKADYE<br>KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 30         | DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCSASISVS <del>SYLYWY</del> QQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFS<br>GSGSGTDFTLTIS <del>SLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL</del><br>KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS <del>TYSL</del> SSTLTLSKADYE<br>KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |

图15

| No. 重链 - Fab |                                                                                                                                                                                                                                                               | 重链 - Fc                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5A           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE<br>WVAKISPGGSWTYISDVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA<br>VYICARQAWGYALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>(SEQ ID NO: 31) | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 40) | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 41) |
| 5B           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE<br>WVAKISPGGSWTYISDVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA<br>VYICARQSWGYALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>(SEQ ID NO: 32) | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 42) | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 43) |
| 5C           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE<br>WVAKISPGGSWTYISDVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA<br>VYICARQGWGYALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>(SEQ ID NO: 33) | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 44) | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 45) |
| 5D           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE<br>WVAKISPGGSWTYISDVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA<br>VYICARQTWGYALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>(SEQ ID NO: 34) | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 46) | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 47) |
| 5E           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE<br>WVAKISPGGSWTYISDVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA<br>VYICARQVWGYALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>(SEQ ID NO: 35) | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 48) | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 49) |

图16

| 重链 - Fc             |                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>No. 重链 - Fab</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 5F                  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFAMHWVRQAPGKGLE<br>WVAKISPGGSWTYYS <del>DT</del> VDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRAEDTA<br>VYYCARQKWGYALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAAAGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>(SEQ ID NO: 36) |
| 5G                  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFAMHWVRQAPGKGLE<br>WVAKISPGGSWTYYS <del>DT</del> VDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRAEDTA<br>VYYCARQKWGYALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAAAGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>(SEQ ID NO: 37) |
| 5H                  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFAMHWVRQAPGKGLE<br>WVAKISPGGSWTYYS <del>DT</del> VDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRAEDTA<br>VYYCARQKWGYALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAAAGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>(SEQ ID NO: 38) |
| 5I                  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFAMHWVRQAPGKGLE<br>WVAKISPGGSWTYYS <del>DT</del> VDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRAEDTA<br>VYYCARQKWGYALDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAAAGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<br>(SEQ ID NO: 39) |
| 重链 - Fc             |                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                     | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 45)  |
|                     | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 46)  |
|                     | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 47)  |
|                     | DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK<br>(SEQ ID NO: 48)  |

图16(续)

| 编号   | CDR1                       | CDR2                                 | CDR3                         |
|------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| I    | (SEQ ID NO: 49) GFTFSPFAMH | (SEQ ID NO: 50) VAKISPGGSGWTYYSDTVTD | (SEQ ID NO: 51) ARQAWGYVALDI |
| II   | (SEQ ID NO: 52) GFTFSPFAMH | (SEQ ID NO: 53) VAKISPGGSGWTYYSDTVTD | (SEQ ID NO: 54) ARQSWGYVALDI |
| III  | (SEQ ID NO: 55) GFTFSPFAMH | (SEQ ID NO: 56) VAKISPGGSGWTYYSDTVTD | (SEQ ID NO: 57) ARQGWGYVALDI |
| IV   | (SEQ ID NO: 58) GFTFSPFAMH | (SEQ ID NO: 59) VAKISPGGSGWTYYSDTVTD | (SEQ ID NO: 60) ARQTWGYVALDI |
| V    | (SEQ ID NO: 61) GFTFSPFAMH | (SEQ ID NO: 62) VAKISPGGSGWTYYSDTVTD | (SEQ ID NO: 63) ARQVWGYVALDI |
| VI   | (SEQ ID NO: 64) GFTFSPFAMH | (SEQ ID NO: 65) VAKISPGGSGWTYYSDTVTD | (SEQ ID NO: 66) ARQQWGYVALDI |
| VII  | (SEQ ID NO: 67) GFTFSPFAMH | (SEQ ID NO: 68) VAKISPGGSGWTYYSDTVTD | (SEQ ID NO: 69) ARQKWGYVALDI |
| VIII | (SEQ ID NO: 70) GFTFSPFAIS | (SEQ ID NO: 71) VAKISPGGSGWTYYSDTVTD | (SEQ ID NO: 72) ARQLWGYVALDV |
| IX   | (SEQ ID NO: 73) GFTFSPFAWS | (SEQ ID NO: 74) VAKISPGGSGWTYYSDTVTD | (SEQ ID NO: 75) ARQLWGYVALDV |

图17A

| 编号 | CDR1<br>(SEQ ID NO: 76) SASISVSPLY | CDR2<br>(SEQ ID NO: 77) LLIYDDSSLAS | CDR3<br>(SEQ ID NO: 78) QQWSGYPYT |
|----|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| X  | (SEQ ID NO: 79) SASISVSPLY         | (SEQ ID NO: 80) LLIYDDSSLAS         | (SEQ ID NO: 81) QQWSGYPYT         |
| XI | (SEQ ID NO: 82) SASISVSPLY         | (SEQ ID NO: 83) LLIYDDSSLAS         | (SEQ ID NO: 84) QQWSGYPYT         |

图17B

| SEQ ID NO: | 序列:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 85         | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK<br>GFIIISNATYKEIGLLTCEATVNHGHLYKTNYL <b>THR</b> QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVN<br>CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTC<br>AASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTPLVDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 86         | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK<br>GFIIISNATYKEIGLLTCEATVNHGHLYKTNYL <b>THR</b> QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVN<br>CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTC<br>AASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTPLVDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 87         | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK<br>GFIIISNATYKEIGLLTCEATVNHGHLYKTNYL <b>LIR</b> QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVN<br>CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTC<br>AASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTPLVDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 88         | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK<br>GFIIISNATYKEIGLLTCEATVNHGHLYKTNYL <b>LIR</b> QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVN<br>CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTC<br>AASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTPLVDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

图18