



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202128131 A

(43) 公開日：中華民國 110 (2021) 年 08 月 01 日

(21) 申請案號：110101684

(22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 01 月 15 日

(51) Int. Cl. : A61K9/08 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61K47/18 (2006.01)

A61K47/26 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2020/01/17 中國大陸

202010055492.X

(71) 申請人：大陸商信達生物制藥(蘇州)有限公司(中國大陸) INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72) 發明人：張海桃 (CN)；馬麗強 (CN)；汪音爵 (CN)

(74) 代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：15 共 169 頁

(54) 名稱

重組抗程式性細胞死亡受體 1 和抗分化抗原簇 137 雙特異性抗體製劑及其用途

(57) 摘要

本發明公開了一種重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體製劑及其用途。本發明的抗體製劑可以用於多種癌症的治療，具有穩定性高、可以長期儲存的優點。

指定代表圖：

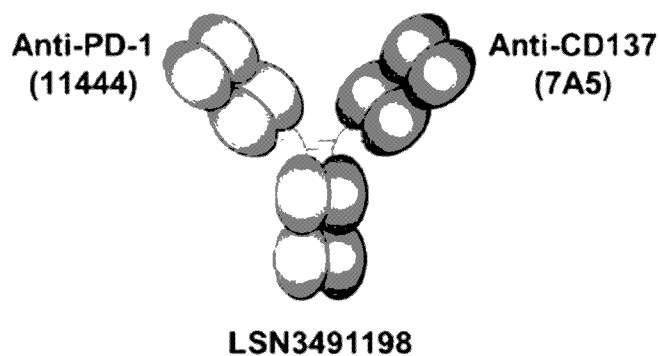


圖 1



202128131

【發明摘要】

【中文發明名稱】 重組抗程式性細胞死亡受體1和抗分化抗原簇137
雙特異性抗體製劑及其用途

【中文】

本發明公開了一種重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體製劑及其用途。本發明的抗體製劑可以用於多種癌症的治療，具有穩定性高、可以長期儲存的優點。

【指定代表圖】 圖1

【發明說明書】

【中文發明名稱】 重組抗程式性細胞死亡受體1和抗分化抗原簇137雙特異性抗體製劑及其用途

【技術領域】

【0001】 本發明屬於生物技術領域，涉及重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體製劑及其用途。

【先前技術】

【0002】 免疫檢查點是在免疫細胞(例如T細胞和樹突狀細胞)上表現的一組膜蛋白，包括多種共抑制和共刺激受體，它們在調節適應性免疫反應中起重要作用。精心研究的檢查點包括PD-1和CD137。PD-1及其配體，程式性細胞死亡配體1 (PD-L1)和程式性細胞死亡配體2 (PD-L2)之間的相互作用提供了抑制訊息，該訊息已被證明在腫瘤免疫逃逸和在腫瘤微環境中發生的免疫抑制中起到重要作用。

【0003】 雖然抗PD-1抗體和/或抗PD-L1抗體對PD-1抑制訊息的阻斷已在臨床上得到驗證，並已在治療某些癌症方面取得了重大的臨床進展，但仍有許多患者對此無反應，復發，獲得對PD-1或PD-L1抗體治療的耐藥性，或者對治療不耐受。CD137，也稱為

4-1BB，在活化T細胞驅動的免疫反應中起作用，例如透過促進T細胞增殖和效應物功能，增強免疫記憶並抑制活化誘導的細胞死亡。

【0004】 標靶CD137的激動性抗體已在鼠腫瘤模型中顯示出作為單藥治療和聯合治療的前景，但是，由於毒性和/或缺乏療效，標靶人CD137的激動劑在人癌症患者中無論作為單藥治療還是聯合治療均未顯示出足夠的反應。實際上，還沒有批准標靶人CD137的激動性抗體用於人的治療用途。因此，需要針對免疫檢查點途徑的其他治療方法。

【0005】 已經研究了激動CD137和拮抗PD-1的抗體的組合，例如urelumab (即抗CD137激動劑單克隆抗體)和nivolumab (即抗PD-1拮抗劑單克隆抗體)的組合，在臨床試驗用於治療實體瘤(Tolcher等，Clin Cancer Res 23 (18) 2017)。然而，較高的潛在有效劑量的urelumab顯示與轉胺酶升高(transaminitis)和其他不良事件有關。將CD137激動抗體特異性標靶表現PD-1的那些細胞可能會限制與激動CD137抗體全身給藥相關的不良事件。因此，需要設計本發明的雙特異性抗體，以透過優先結合表現PD-1的細胞來提供免疫增強作用，且潛在地限制CD137激動作用對那些也表現PD-1的細胞的影響。

【0006】 WO2018/045110 公開了幾種雙特異性抗體(Fab-scFv-Fc形式)，其與共抑制受體和共刺激受體結合以活化T細胞

胞來治療癌症，包括[ICOS x PD-1]和[CD137 x PD-1]。似乎在WO2018/045110中公開的CD137 Fab衍生自BMS20H4.9，其可能與嚴重的轉胺酶升高的發展有關(Segal等人，Clinical Cancer Research (2016) 1-8)。與WO2018/045110中公開的雙特異性抗體相比，IgG樣雙特異性抗體具有許多與天然IgG抗體相關的有利特性，例如高穩定性，長血清半衰期和低免疫原性(Ha等人，Frontiers in Immunology (2016)第394條)。由於與BMS20H4.9相關的已知毒性以及由於WO2018/045110中描述的雙特異性抗體的不合需要的結構形式，因此需要另外的雙特異性抗體，它們是拮抗人PD-1且激動人CD137的IgG樣雙特異性抗體，其促進強大的抗癌免疫反應，並顯示出可接受的毒性譜。

【0007】 同時，在本領域中對於含有足夠穩定且適於施用給人受試者的拮抗人PD-1且激動人CD137的雙抗的新藥物製劑也仍存在需要。此外，對於這樣的抗體製劑，尋找製劑處方的簡單和易用性，也是有利的。

【發明內容】

發明概要

【0008】 針對上述所述雙特異性抗體及相應的穩定的抗體製劑的需求，本發明開發了一種重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)(SEQ ID NO:25)和抗分化抗原簇137 (CD137)(SEQ ID

NO:26)雙特異性抗體(代碼IBI319)以及含有所述抗體或其功能性片段的穩定的製劑。

【0009】 一方面，本發明涉及一種液體抗體製劑，包含重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段以及緩衝劑，優選地所述製劑的pH值為約5.0-7.0；更優選，所述製劑的pH值為約5.5-6.0；進一步優選地，所述pH值為約5.7。

【0010】 在某些方案中，液體抗體製劑中所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段的含量為約1 mg/mL-150 mg/mL，優選為約10 mg/mL-100 mg/mL，例如，約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90 mg/mL，更優選地為約50.0 mg/ml。

【0011】 在某些方案中，所述緩衝劑選自組胺酸、鹽酸組胺酸或它們的組合，或者所述緩衝劑選自枸橼酸鹽、枸橼酸鹽溶劑合物(例如，檸檬酸鹽水合物)或它們的組合，例如，枸橼酸鈉、二水枸橼酸鈉或它們的組合，或者所述緩衝劑選自醋酸鹽、醋酸鹽溶劑合物(例如，醋酸鹽水合物)或它們的組合，或者所述緩衝劑選自磷酸鹽、磷酸鹽溶劑合物(例如，磷酸鹽水合物)或它們的組合；優選地，所述緩衝劑的濃度為約5-100 mM，更優選地為約5-60 mM，例如，約5、10、15、20、25、30、40、50、60 mM；

優選地，所述緩衝劑為組胺酸，所述組胺酸的含量為約0.775 mg/mL-15.5 mg/mL；更優選地，所述組胺酸的含量為約0.775 mg/mL-9.3 mg/mL，例如約1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9 mg/mL；進一步優選地，所述組胺酸的含量為約1.55 mg/ml；

優選地，所述緩衝劑為組胺酸和鹽酸組胺酸的組合，其中所述組胺酸的含量為約0.270 mg/mL-5.4 mg/mL，所述鹽酸組胺酸的含量為約0.660 mg/mL-13.33 mg/mL；更優選地，所述組胺酸的含量為約0.270 mg/mL-3.24 mg/mL，例如約0.5、1.0、1.5、2、2.5、3 mg/mL，所述鹽酸組胺酸的含量為約0.660 mg/mL-8 mg/mL，例如約1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 mg/mL；更優選地，所述組胺酸的含量為約0.57 mg/ml，所述鹽酸組胺酸的含量為約1.33 mg/ml。

【0012】 在某些方案中，所述製劑還包含穩定劑；優選地，所述製劑還包含穩定劑，所述穩定劑包括多元醇和/或胺基酸；所述多元醇選自山梨醇、甘露醇、蔗糖、海藻糖、麥芽糖及組合，所述胺基酸包括精胺酸、鹽酸精胺酸、甲硫胺酸、甘胺酸、脯胺酸或其組合；優選地，所述穩定劑選自山梨醇和/或鹽酸精胺酸、山梨醇和/或精胺酸，更優選地，所述穩定劑為山梨醇和鹽酸精胺酸的組合、或山梨醇和精胺酸的組合，優選地，所述精胺酸或鹽酸精胺酸的含

量為約20 mM-200 mM，進一步優選地，所述精胺酸或鹽酸精胺酸的含量為約40 mM-150 mM，例如約40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150 mM；更優選地，所述精胺酸或鹽酸精胺酸的含量為約85 mM；

優選地，所述山梨醇的含量為約10 mg/mL-100 mg/mL，所述鹽酸精胺酸的含量為約4 mg/mL-42.0 mg/mL；進一步優選地，所述山梨醇的含量為約20 mg/mL-60 mg/mL，例如約30、40、50 mg/mL，所述鹽酸精胺酸的含量為約8.4 mg/mL-33.7 mg/mL，例如約15、20、25、30 mg/mL；更優選地，所述山梨醇的含量為約25.00 mg/ml，所述鹽酸精胺酸的含量為約16.85 mg/ml。

【0013】 在某些方案中，所述製劑還包含表面活性劑；

優選地，所述表面活性劑選自非離子型表面活性劑，例如聚山梨酯80、聚山梨酯20、泊洛沙姆和聚乙二醇聚山梨酯80中的一種或多種，更優選聚山梨酯80；

更優選地，所述表面活性劑的含量為約0.1 mg/mL-1 mg/mL；進一步優選為約0.3 mg/mL-0.7 mg/mL，例如0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL；進一步優選地為約0.50 mg/ml。

【0014】 在某些方案中，所述製劑還包含螯合劑；

優選地，所述螯合劑選自依地酸二鈉、二乙基三胺五乙酸和/或EDTA，更優選依地酸二鈉；

更優選地，所述螯合劑的含量為約0.005 mg/mL-0.1 mg/mL；進一步優選為約0.01 mg/mL-0.05 mg/mL, 例如約0.02、0.03、0.04 mg/mL；進一步優選地為約0.01 mg/ml。

【0015】 在某些方案中，提供一種液體抗體製劑，所述製劑含有以下組分：約50.0 mg/ml重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1) 和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體、約0.57 mg/ml組胺酸、約1.33 mg/ml鹽酸組胺酸、約25.00 mg/ml山梨醇、約16.85 mg/ml鹽酸精胺酸、約0.01 mg/ml依地酸二鈉、約0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH約5.7，餘量為水。

【0016】 在某些方案中，所述液體抗體製劑中，

所述抗體或其抗原結合片段包含第一重鏈(HC1)，其包含第一重鏈可變區(HCVR1)和恆定區；第一輕鏈(LC1)，其包含第一輕鏈可變區(LCVR1)和恆定區；第二重鏈(HC2)，其包含第二重鏈可變區(HCVR2)和恆定區；以及第二輕鏈(LC2)，其包含第二輕鏈可變區(LCVR2)和恆定區，其中：

所述HCVR1包含SEQ ID NO: 4所示的重鏈可變區所含的三個互補決定區域HCDR1、HCDR2和HCDR3，並且所述LCVR1包含SEQ ID NO:10所示的輕鏈可變區所含的LCDR1、LCDR2和LCDR3；以及

所述HCVR2包含SEQ ID NO: 16所示的重鏈可變區中所含的三個互補決定區域(CDR) HCDR1、HCDR2和HCDR3，並且所述LCVR2包含SEQ ID NO: 22所示的輕鏈可變區所含的三個互補決定區域LCDR1、LCDR2和LCDR3；優選地

a) 抗體第一重鏈包含：具有胺基酸序列SEQ ID NO:1的互補決定區1 (HCDR1)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:2的互補決定區2 (HCDR2)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:3的互補決定區3(HCDR3)；

b) 抗體第一輕鏈包含：具有胺基酸序列SEQ ID NO:7的互補決定區1 (LCDR1)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:8的互補決定區2 (LCDR2)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:9的互補決定區3(LCDR3)；

c) 抗體第二重鏈包含：具有胺基酸序列SEQ ID NO:13的互補決定區1 (HCDR1)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:14的互補決定區2 (HCDR2)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:15的互補決定區3(HCDR3)；

d) 抗體第二輕鏈包含：具有胺基酸序列SEQ ID NO:19的互補決定區1 (LCDR1)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:20的互補決定區2 (LCDR2)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:21的互補決定區3 (LCDR3)。

【0017】 在某些方案中，所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1)和抗分化抗原簇 137 (CD137)雙特異性抗體包含：第一重鏈、第二重鏈以及第一輕鏈和第二輕鏈，其中每條鏈包含可變區和恆定區，其中：

e)抗體第一重鏈可變區(HCVR)包含SEQ ID NO: 4的序列或與其具有至少90%95%，98%或99%同源性的序列；

f)抗體第一輕鏈可變區(LCVR)包含SEQ ID NO: 10的序列或與其具有至少90%，95%，98%或99%同源性的序列；

g)抗體第二重鏈可變區(HCVR)包含SEQ ID NO: 16的序列或與其具有至少90%，95%，98%或99%同源性的序列；

h)抗體第二輕鏈可變區(LCVR)包含SEQ ID NO: 22的序列或與其具有至少90%，95%，98%或99%同源性的序列；

優選地，

e)抗體第一重鏈可變區(HCVR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:4；

f)抗體第一輕鏈可變區(LCVR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:10；

g)抗體第二重鏈可變區(HCVR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:16；

h) 抗體第二輕鏈可變區(LCVR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:22。

【0018】 在某些方案中，所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體包含：第一重鏈、第二重鏈以及第一輕鏈和第二輕鏈，其中每條鏈包含可變區和恆定區，其中：第一重鏈恆定區序列(HCCR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:30，第一輕鏈恆定區序(LCCR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:31，第二重鏈恆定區(HCCR)序列具有胺基酸序列SEQ ID NO:32，第二輕鏈恆定區(LCCR)序列具有胺基酸序列SEQ ID NO:33。

【0019】 在某些方案中，所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體包含：第一重鏈、第二重鏈以及第一輕鏈和第二輕鏈，其中：

i) 抗體第一重鏈包含SEQ ID NO: 5的序列或與其具有至少90%，95%，98%或99%同源性的序列；

j) 抗體第一輕鏈包含SEQ ID NO: 11的序列或與其具有至少90%，95%，98%或99%同源性的序列；

k) 抗體第二重鏈包含SEQ ID NO: 17的序列或與其具有至少90%，95%，98%或99%同源性的序列；以及

l) 抗體第二輕鏈包含SEQ ID NO: 23的序列或與其具有至少90%，95%，98%或99%同源性的序列；

優選地，

i) 抗體第一重鏈具有胺基酸序列SEQ ID NO:5；

j) 抗體第一輕鏈具有胺基酸序列SEQ ID NO:11；

k) 抗體第二重鏈具有胺基酸序列SEQ ID NO:17；以及

l) 抗體第二輕鏈具有胺基酸序列SEQ ID NO:23。

【0020】 在某些方案中，所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體包含：第一重鏈、第二重鏈以及第一輕鏈和第二輕鏈，其中，第一重鏈與第一輕鏈之間形成至少一個二硫鍵，第二重鏈與第二輕鏈之間形成至少一個二硫鍵，以及第一重鏈和第二重鏈之間形成至少一個二硫鍵；優選地所述雙特異性抗體是修飾的人IgG1。

【0021】 在某些方案中，本發明提供一種液體抗體製劑，其包含：

(i) 約1 mg/mL-150 mg/mL的所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段；

(ii) 約5-100 mM的組胺酸；

(iii) 約 10 mg/mL-100 mg/mL 的山梨醇以及約 20 mM-200 mM 精胺酸或鹽酸精胺酸；

(iv) 約 0.1 mg/mL-1 mg/mL 聚山梨酯 80；和

(v) 任選地，約 0.005 mg/mL-0.1 mg/mL 的依地酸二鈉，

其中所述液體製劑的 pH 為約 5.0-7.0，例如，約 5.5、6.0、6.5；

例如，所述液體抗體製劑包含

(i) 約 10 mg/mL-100 mg/mL 的所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段；

(ii) 約 5-60 mM 的組胺酸；

(iii) 約 20 mg/mL-60 mg/mL 的山梨醇以及約 8.4 mg/mL-33.7 mg/mL 鹽酸精胺酸；

(iv) 約 0.3 mg/mL-0.7 mg/mL 聚山梨酯 80；和

(v) 任選地，約 0.01 mg/mL-0.05 mg/mL 的依地酸二鈉，

其中所述液體製劑的 pH 為約 5.5-6.0，例如，約 5.7；

或者，所述液體抗體製劑包含

(i) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、1.55 mg/ml 組胺酸，50.00 mg/ml 山梨醇，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；或

(ii) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、1.55 mg/ml 組胺酸，25.00 mg/ml 山梨醇，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；

(iii) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、1.55 mg/ml 組胺酸，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；

(iv) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、2.94 mg/ml 枸橼酸鈉(二水)，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；

(v) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、2.94 mg/ml 枸橼酸鈉(二水)，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；或

(ii) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、0.57 mg/ml 組胺酸、1.33 mg/ml 鹽酸組胺酸，25.00 mg/ml 山梨醇，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；

(iii) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1) 和抗分化抗原簇137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、0.57 mg/ml 組胺酸、1.33 mg/ml 鹽酸組胺酸，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯80，pH 5.7；

(iv) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1) 和抗分化抗原簇137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、2.94 mg/ml 枸橼酸鈉(二水)，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯80，pH 5.7；或

(v) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1) 和抗分化抗原簇137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、0.57 mg/ml 組胺酸、1.33 mg/ml 鹽酸組胺酸、25.00 mg/ml 山梨醇，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.01 mg/ml 依地酸二鈉，0.50 mg/ml 聚山梨酯80，pH 5.7。

【0022】 在某些方案中，提供一種製備本發明所述抗體液體製劑的方法，包括以下步驟：

(1) 將除所述表面活性劑之外的成分配製成溶液；

(2) 透過超濾，採用步驟(1)製備的溶液對所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1) 和抗分化抗原簇137 (CD137) 雙特異性抗體或其片段進行換液，然後濃縮至目標濃度；

(3) 添加所述表面活性劑到步驟(2)製備的液體中。

【0023】 在某些方案中，提供一種固體抗體製劑，其透過固化本發明所述的液體抗體製劑而獲得，所述固化是透過例如結晶法、噴霧乾燥法、冷凍乾燥法實施的，所述固體抗體製劑例如是凍乾粉針劑形式。

【0024】 在某些方案中，提供一種遞送裝置，其包含本發明所述的液體抗體製劑或固體抗體製劑。

【0025】 在某些方案中，提供一種預填裝注射器，其包含本發明所述的液體抗體製劑或固體抗體製劑，用於靜脈內注射或者肌內注射。

【0026】 在某些方案中，提供本發明所述液體抗體製劑或固體抗體製劑在製備用於預防或治療癌症的遞送裝置或預填裝注射器或藥物中的用途，優選的所述癌症選自黑色素瘤、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、頭頸癌、肝癌、結直腸癌、胰腺癌、胃癌、腎癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宮內膜癌、食道癌、軟組織肉瘤、膽管癌、甲狀腺癌、肝細胞癌或間皮瘤；其中所述藥物可以與電離輻射同時、分開或者依次向癌症患者施用；或者可以與一種或多種化療藥物同時、分開或者依次向癌症患者施用；或者可以與電離輻射以及一種或多種化療藥物同時、分開或者依次向癌症患者施用；優選地所述化療藥物選自5-氟尿嘧啶、羥基脲、吉西他濱、甲胺蝶呤、阿黴素、足葉乙甙卡鉑、順鉑、環磷醯胺、美法侖、達卡

巴嗪、紫杉醇、喜樹城、FOLFIRI、FOLFOX、多西紫杉醇、柔紅黴素、紫杉酚、奧沙利鉑或其組合。

【0027】 在某些方案中，本發明所述液體抗體製劑或固體抗體製劑用於預防或治療疾病，所述疾病優選為癌症，更優選為選自黑色素瘤、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、頭頸癌、肝癌、結直腸癌、胰腺癌、胃癌、腎癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宮內膜癌、食道癌、軟組織肉瘤、膽管癌、甲狀腺癌、肝細胞癌或間皮瘤；其中所述液體抗體製劑或固體抗體製劑可以與電離輻射同時、分開或者依次向癌症患者施用；或者可以與一種或多種化療藥物同時、分開或者依次向癌症患者施用；或者可以與電離輻射以及一種或多種化療藥物同時、分開或者依次向癌症患者施用；優選地所述化療藥物選自5-氟尿嘧啶、羥基脲、吉西他濱、甲胺蝶呤、阿黴素、足葉乙甙卡鉑、順鉑、環磷醯胺、美法侖、達卡巴嗪、紫杉醇、喜樹城、FOLFIRI、FOLFOX、多西紫杉醇、柔紅黴素、紫杉酚、奧沙利鉑或其組合。

【0028】 在某些方案中，本發明提供一種預防或治療患者癌症的方法，包括向患者施用有效劑量的本發明所述液體抗體製劑或固體抗體製劑，或者透過本發明的遞送裝置或預填裝注射器向患者施用有效劑量的液體抗體製劑或固體抗體製劑；癌症優選為選自黑色素瘤、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、頭頸癌、肝癌、結直腸癌、胰

腺癌、胃癌、腎癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宮內膜癌、食道癌、軟組織肉瘤、膽管癌、甲狀腺癌、肝細胞癌或間皮瘤；其中所述液體抗體製劑或固體抗體製劑可以與電離輻射同時、分開或者依次向癌症患者施用；或者可以與一種或多種化療藥物同時、分開或者依次向癌症患者施用；或者可以與電離輻射以及一種或多種化療藥物同時、分開或者依次向癌症患者施用；優選地所述化療藥物選自5-氟尿嘧啶、羥基脲、吉西他濱、甲胺蝶呤、阿黴素、足葉乙甙卡鉑、順鉑、環磷醯胺、美法侖、達卡巴嗪、紫杉醇、喜樹碱、FOLFIRI、FOLFOX、多西紫杉醇、柔紅黴素、紫杉酚、奧沙利鉑或其組合。可以透過腸胃外施用給藥，例如注射或輸液方式。

【圖式簡單說明】

【0029】 圖1為IBI319分子結構示意圖。

【0030】 圖2為pH篩選濁度變化趨勢圖。

【0031】 圖3為pH篩選純度(SEC-HPLC法)變化趨勢圖。

【0032】 圖4為pH篩選純度(非還原型CE-SDS法)變化趨勢圖。

【0033】 圖5為pH篩選電荷變異體-主成分變化趨勢圖。

【0034】 圖6為pH篩選電荷變異體-酸性組分變化趨勢圖。

【0035】 圖7為處方篩選純度變化趨勢圖。

【0036】 圖8為處方篩選電荷變異體-主成分變化趨勢圖(iCIEF法，40°C)。

【0037】 圖 9 為處方篩選電荷變異體 - 酸性組分變化趨勢圖 (iCIEF法，40℃)。

【0038】 圖 10 為處方篩選電荷變異體 - 主成分變化趨勢圖 (iCIEF法，25℃)。

【0039】 圖 11 為處方篩選電荷變異體 - 酸性組分變化趨勢圖 (iCIEF法，25℃)。

【0040】 圖 2-9 中，T0 表示 0 天，1W 表示 1 週，2W 表示 2 週，4W 表示 4 週。圖 10 和 11 中，T0 表示 0 天，1M 表示 1 月，2M 表示 2 月。圖 7-圖 11 中，F1、F2、F3、F4 和 F5 分別表示處方 1、處方 2、處方 3、處方 4 和處方 5。

【0041】 圖 12 為透過 NFAT-luc 報告系統驗證 IBI319 對 PD-1/PD-L1 結合的阻斷活性；注：誘導倍數 = $RLU (\text{induced} - \text{background}) / RLU (\text{no antibody control} - \text{background})$ 。

【0042】 圖 13 為透過 Jurkat/CD137-NFKB-luc 報告系統驗證 IBI319 對 CD137 結合的活化活性：與 CHO-S/PD-1 共培育。

【0043】 圖 14 為透過 Jurkat-CD137-NFKB-luc 報告系統驗證 IBI319 對 CD137 結合的活化活性：不加 CHO-S/PD-1 共培育。

【0044】 圖 15 透過 Jurkat-CD137-NFKB-luc 報告系統驗證 IBI319 對 CD137 結合的活化活性：與不同比例的 CHO-S/PD-1 共培

育；注：誘導倍數 = $RLU(\text{induced} - \text{background}) / RLU(\text{no antibody control} - \text{background})$ 。

【實施方式】

發明的詳細說明

【0045】 在詳細描述本發明之前，應瞭解，本發明不受限於本說明書中的特定方法及實驗條件，因為所述方法以及條件是可以改變的。另外，本文所用術語僅是供說明特定實施方案之用，而不意欲為限制性的。

定義

【0046】 除非另有定義，否則本文中使用的所有技術和科學術語均具有與本領域一般技術人員通常所理解的含義相同的含義。為了本發明的目的，下文定義了以下術語。

【0047】 術語“約”在與數字數值聯合使用時意為涵蓋具有比指定數字數值小5%的下限和比指定數字數值大5%的上限的範圍內的數字數值。

【0048】 術語“和/或”當用於連接兩個或多個可選項時，應理解為意指可選項中的任一項或可選項中的任意兩項或多項。

【0049】 如本文中所用，術語“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整數或步驟，但是不排除任意其他要素、整數或步驟。在本文中，當使用術語“包含”或“包括”時，除非另有指明，否則也涵蓋

由所述及的要素、整數或步驟組成的情形。例如，當提及“包含”某個具體序列的抗體可變區時，也旨在涵蓋由該具體序列組成的抗體可變區。

【0050】 術語“免疫檢查點分子”意指免疫系統中存在的一類抑制性訊息分子，透過調節外周組織中免疫反應的持續性和強度避免組織損傷，並參與維持對於自身抗原的耐受(Pardoll DM., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264)。研究發現，腫瘤細胞能夠逃避體內免疫系統而失控增殖的原因之一是利用了免疫檢查點分子的抑制性訊息途徑，由此抑制了T淋巴細胞活性，使得T淋巴細胞不能有效發揮對腫瘤的毒殺效應(Yao S, Zhu Y和Chen L., Advances in targeting cell surface signaling molecules for immune modulation. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(2):130-146)。免疫檢查點分子包括但不限於程式性細胞死亡1 (PD-1)、PD-L1、PD-L2、CD137、細胞毒T淋巴細胞抗原4 (CTLA-4)、LAG-3和TIM-3。

【0051】 術語“全抗體”、“全長抗體”、“完全抗體”和“完整抗體”在本文中可互換地用來指包含由二硫鍵相互連接的至少兩條重鏈(H)和兩條輕鏈(L)的糖蛋白。每條重鏈由重鏈可變區(本文中縮寫為VH)和重鏈恆定區組成。重鏈恆定區由3個結構域CH1、CH2和CH3

組成。每條輕鏈由輕鏈可變區(本文中縮寫為VL)和輕鏈恆定區組成。輕鏈恆定區由一個結構域CL組成。VH區和VL區可以進一步再劃分為超變區[為互補決定區(CDR)]，其間插有較保守的區域[為構架區(FR)]。每個VH和VL由三個CDR和4個FR組成，從胺基端到羧基端以如下順序排列：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。恆定區不直接參與抗體與抗原的結合，但是顯示出多種效應物功能。

【0052】 術語“抗原結合片段”指與完整抗體不同的分子，其包含完整抗體的一部分且結合完整抗體所結合的抗原。抗原結合片段的例子包括但不限於Fv，Fab，Fab'，Fab'-SH，F(ab')₂；雙抗體(diabodies, dAb)；線性抗體；單鏈抗體(例如scFv)；單結構域抗體(單域抗體)；雙價或雙特異性抗體的抗原結合片段；駱駝科抗體；和表現出所需的結合PD-1以及CD137能力的其它片段。

【0053】 如本文所用，術語“多特異性”抗體指具有至少兩個抗原結合位址的抗體，所述至少兩個抗原結合位址中的每一個抗原結合位址與相同抗原的不同表位或與不同抗原的不同表位結合。本文提供的抗體通常是多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體是對至少兩個不同抗原表位具有結合特異性的抗體。在一個實施方案中，本文提供了這樣的雙特異性抗體，其具有針對第一抗原和第二抗原的結合特異性。例如第一抗原為PD-1，第二抗原為CD137。

【0054】 術語“人源化”抗體指包含來自非人類HVR的胺基酸殘基和來自人FR的胺基酸殘基的嵌合抗體。在一些實施方案中，人源化抗體包含全部或基本上全部的HVR (例如，CDR)與非人抗體的那些HVR對應並且全部或基本上全部的FR區與人抗體的那些FR對應。人源化抗體任選地可以包含從人抗體衍生的抗體恆定區的至少一部分。抗體(例如非人抗體)的“人源化形式”指已經歷過人源化的抗體。

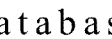
【0055】 術語“Fc區”在本文中用於定義免疫球蛋白重鏈的C端區域，所述區域包含至少一部分的恆定區。該術語包括天然序列Fc區和變體Fc區。在某些實施方案中，人IgG重鏈Fc區從Cys226或Pro230延伸至重鏈的羧基端。然而，Fc區的C端賴胺酸(Lys447)可以存在或者可以不存在。除非另外說明，Fc區或恆定區中的胺基酸殘基的編號是根據EU編號系統，其也被稱為EU索引，如在Kabat等，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述。

【0056】 術語“可變區”或“可變結構域”是指參與抗體與抗原結合的抗體重或輕鏈的結構域。天然抗體的重鏈和輕鏈的可變結構域通常具有相似的結構，其中每個結構域包含四個保守的框架區(FR)和三個互補決定區(參見，例如，Kindt等Kuby Immunology, 6th

ed. , W.H.Freeman and Co.91頁(2007))。單個VH或VL結構域可以足以給予抗原結合特異性。此外，可以使用來自與特定抗原結合的抗體的VH或VL結構域來分離結合所述抗原的抗體，以分別篩選互補VL或VH結構域的胜肽庫。參見，例如，Portolano等，J.Immunol.150：880-887 (1993)；Clarkson等，Nature 352：624-628 (1991)。

【0057】 可變區通常表現出由三個高度變異區連接的相對保守的構架區(FR)的相同的一般結構，所述高度變異區也被稱為互補決定區或CDR。通常透過構架區定位(align)來自每對的兩條鏈的CDR，所述CDR使得可結合特異性表位。兩條輕鏈和重鏈可變區從N-末端到C-末端通常包含結構域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

【0058】 “互補決定區”或“CDR區”或“CDR”或“高度變異區”(在本文中與超變區“HVR”可以互換使用)，是抗體可變結構域中在序列上高度變異並且形成在結構上確定的環(“超變環”)和/或含有抗原接觸殘基(“抗原接觸點”)的區域。CDR主要負責與抗原表位結合。重鏈和輕鏈的CDR通常被稱作CDR1、CDR2和CDR3，從N-端開始順序編號。位於抗體重鏈可變結構域內的CDR被稱作HCDR1、HCDR2和HCDR3，而位於抗體輕鏈可變結構域內的CDR被稱作LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一個給定的輕鏈可變區或重

鏈可變區胺基酸序列中，各CDR的精確胺基酸序列邊界可以使用許多公知的抗體CDR指派系統的任一種或其組合確定，所述指派系統包括例如：基於抗體的三維結構和CDR環的拓撲學的Chothia (Chothia等人,(1989) Nature 342: 877-883，Al-Lazikani等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))，基於抗體序列可變性的Kabat (Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第4版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath)，Contact (University College London)，國際ImMunoGeneTics database (IMGT)(萬維網)，以及基於利用大量晶體結構的近鄰傳播聚類(affinity propagation clustering)的North CDR定義(North等, “A new clustering of antibody CDR loop confirmations, Journal of Molecular Biology, 406, 228-256(2011)”)。本發明採用North CDR定義。

【0059】 術語“結合”或“特異性結合”意指結合作用對抗原是選擇性的，並且可以與不想要的或非特異的相互作用區別開。抗體與特定抗原結合的能力可以透過酵素結合免疫吸附測定法(ELISA)、表面等離子共振法(SPR)或生物膜層光學干涉技術(ForteBio)或本

領域已知的其它常規結合測定法測定。作為本發明的實施例，指抗體或抗原結合片段在體外測定法中，優選地在採用純化的野生型抗原的生物膜層光學干涉測量中與抗原表位結合。在某些實施方案中，在抗體或抗原結合片段優選地辨識蛋白質和/或大分子的複雜混合物中其標靶抗原時，將抗體或抗原結合片段稱作特異性結合抗原。

【0060】 術語“抗體製劑”指一種製備物，所述製備物處於允許作為活性成分的抗體的生物活性可以有效發揮的形式，並且不含有對於待施用該製劑的受試者而言具有不可接受毒性的其它組分。這類抗體製劑通常是無菌的。通常，抗體製劑中包含可藥用賦形劑。“可藥用”賦形劑是可以合理地施用至受試哺乳動物以便製劑中所用活性成分的有效劑量可以遞送至受試者的試劑。賦形劑的濃度與施用模式相適應，例如可以是注射可接受的。

【0061】 術語“重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體製劑”在本文中簡稱為“本發明的抗體製劑”，意指包含抗PD-1/CD137抗體蛋白作為活性成分並包含可藥用賦形劑的製備物。將抗PD-1/CD137抗體蛋白與可藥用賦形劑組合後，作為活性成分的抗PD-1/CD137抗體蛋白適於治療性或預防性施與人類或非人類動物。本發明的抗體製劑可以例如製備成水性形式的液體製劑，例如，即用式預填裝注射器，或者製備成凍乾製劑，在即將使用前透過溶解和/或懸浮於生理可接受的溶液中

進行重構(即，複溶)。在一些實施方案中，抗PD-1/CD137抗體蛋白製劑是液體製劑形式。

【0062】 “穩定的”抗體製劑是製劑中的抗體在儲存於特定條件下之後保有可接受程度的物理穩定性和/或化學穩定性。儘管抗體製劑中所含的抗體在儲存特定時間之後可能不會100%維持其化學結構，但通常在儲存特定時間之後維持約90%、約95%、約96%、約97%、約98%或約99%的抗體結構或功能，則認為抗體製劑是“穩定的”。在一些具體的實施方案中，本發明的抗PD-1/CD137抗體蛋白製劑在製造、製備、運輸和長期儲存過程中表現出低至檢測不到的抗體聚集或降解或化學修飾，從而極少或甚至是沒有抗PD-1/CD137抗體蛋白的生物活性損失，表現出高度穩定性。在一些實施方案中，本發明的抗PD-1/CD137抗體蛋白製劑在儲存後，基本上保留其物理和化學穩定性。優選地，本發明液體製劑可以在室溫穩定至少6個月或在 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 儲存1個月，和/或在 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 穩定至少3個月，和/或在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 穩定至少24個月。

【0063】 本領域已知多種分析技術可以用於測定蛋白質的穩定性，參見例如 *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs (1991) and Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)。可以在選定的溫度和選定的儲存時間測量穩定性。例如，

可以基於預期的製劑貨架期來選擇儲存時間。備選地，可以使用加速穩定性試驗。在一些實施方案中，透過對抗體製劑進行各種脅迫測試來進行穩定性測試。這些測試可以代表調配的抗體製劑在製造、儲存或運輸期間可能遭遇到的極端條件，也可以代表在非製造、儲存或運輸期間可能使抗體製劑中的抗體的不穩定性加速的條件。例如，可以將經調配的抗PD-1/CD137抗體蛋白製劑充填至玻璃小瓶中以檢驗在高溫脅迫下的抗體穩定性。

【0064】 經一段儲存時間後，製劑不顯示聚集、沉澱、混濁和/或變性；或顯示非常少的聚集、沉澱、混濁和/或變性，則可以認為抗體在製劑中“保持其物理穩定性”。由於製劑中抗體的聚集可以潛在地導致患者增加的免疫反應，從而導致安全性問題。因此，需要使在製劑中的抗體聚集最小化或防止聚集。光散射法可以用於測定製劑中的可見聚集物。SEC可以用於測定製劑中的可溶性聚集物。此外，可以透過目視檢查製劑的外觀、顏色和/或澄清度、或者透過OD_{350 nm}法檢測製劑的濁度、或者透過非還原型CE-SDS法測定製劑的純度，來指示製劑的穩定性。在一個實施方案中，透過測定在特定溫度下儲存特定時間之後製劑中的抗體單體的百分比來測量製劑的穩定性，其中製劑中的抗體單體的百分比越高，則製劑的穩定性越高。

【0065】 “可接受程度的”物理穩定性可以表示於特定溫度下儲存特定時間之後，在製劑中檢測到至少約90%的抗PD-1/CD137抗體蛋白單體。在一些實施方案中，在特定溫度儲存至少2週、至少28天、至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月、至少7個月、至少8個月、至少9個月、至少10個月、至少11個月、至少12個月、至少18個月、至少24個月或更久後，可接受程度的物理穩定性表示至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的抗PD-1/CD137抗體蛋白單體。當評估物理穩定性時，藥物製劑儲存的特定溫度可為約-80°C至約45°C的任一溫度，例如儲存於約-80°C、約-30°C、約-20°C、約0°C、約4°C-8°C、約5°C、約25°C、約35°C、約37°C、約40°C、約42°C或約45°C。例如，若儲存於約40°C±2°C 1個月之後，檢測到至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的抗PD-1/CD137抗體蛋白單體，則藥物製劑視為是穩定的；若儲存於約25°C 2個月之後，檢測到至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的抗PD-1/CD137抗體蛋白單體，則藥物製劑視為是穩定的；若儲存於約5°C 9個月之後，檢測到至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的抗PD-1/CD137抗體蛋白單體，則藥物製劑視為是穩定的。

【0066】 經一段儲存時間後，如果製劑中的抗體不顯示顯著的化學改變，則可以認為抗體在製劑中“保持其化學穩定性”。大多數化學不穩定性源自於形成了抗體的共價修飾形式(例如，抗體的電荷變異體)。例如由天冬胺酸異構化、N和C末端修飾，可以形成鹼性變異體；由脫醯胺化、唾液酸化和糖化，可以產生酸性變異體。化學穩定性可以透過檢測和/或定量抗體的化學改變形式來評估。例如，可以透過陽離子交換層析(CEX)或成像毛細管等電聚焦電泳(iCIEF)檢測製劑中抗體的電荷變異體。在一個實施方案中，透過測定在特定溫度下儲存特定時間之後製劑中抗體的電荷變異體百分比變化值來測量製劑的穩定性，其中該變化值越小，則製劑的穩定性越高。

【0067】 “可接受程度”的化學穩定性可以表示於特定溫度下儲存特定時間之後製劑中電荷變異體(例如主成分或酸性組分或鹼性組分)的百分比變化值不超過50%，例如不超過30%、不超過20%。在一些實施方案中，在特定溫度儲存至少2週、至少28天、至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月、至少7個月、至少8個月、至少9個月、至少10個月、至少11個月、至少12個月、至少18個月、至少24個月或更久後，可接受程度的化學穩定性可以表現為主成分電荷變異體的百分比變化值不超過約50%、40%、30%、20%、15%。當評估化學穩定性時，儲存藥物

製劑的溫度可為約-80℃至約45℃的任一溫度，例如儲存於約-80℃、約-30℃、約-20℃、約0℃、約4℃-8℃、約5℃、約25℃或約45℃。例如，若在儲存於5℃ 24個月之後，主成分電荷變異體的百分比變化值少於約25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%，則藥物製劑可被視為是穩定的；若在儲存於25℃ 2個月後，主成分電荷變異體的百分比變化值少於約20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%，則藥物製劑亦可被視為是穩定的；若在儲存於40℃ 1個月之後，主成分電荷變異體的百分比變化值少於約50%、40%、30%、20%、10%、5%或4%，則藥物製劑亦可被視為是穩定的。

【0068】 術語“凍乾製劑”是指透過液體製劑的冷凍乾燥處理得到或能夠得到的組成物。優選地，其為具有少於5%、優選少於3%水含量的固體組成物。

【0069】 術語“重構製劑”是指將固體製劑(例如凍乾製劑)溶解和/或懸浮於生理可接受的溶液中得到的液體製劑。

【0070】 文中使用的術語“室溫”是指15℃至30℃、優選20℃至27℃、更優選25℃的溫度。

【0071】 “脅迫條件”是指在化學和/或物理上不利於抗體蛋白的環境，所述環境可以導致不可接受的抗體蛋白失穩定，例如，高溫、振盪、凍融、光照。“高溫脅迫”是指，將抗體製劑置於室溫或甚至於更高溫度(例如 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)儲存一段時間。透過高溫脅迫加速試驗，可以檢查抗體製劑的穩定性。

【0072】 如本文所使用，術語“腸胃外施用”意指腸內和局部給藥以外的給藥方式，通常透過注射或輸液方式，並且包括但不限於，靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下(subcuticular)、關節內、囊下、蛛網膜下、脊柱內、硬膜外和胸骨內注射以及輸液。在一些實施方案中，本發明的穩定抗PD-1/CD137抗體蛋白製劑腸胃外施用於受試者。在一個實施方案中，本發明的抗PD-1/CD137抗體蛋白製劑以皮下、皮內、肌內或靜脈內注射方式施用於受試者。

1. 抗體

【0073】 本發明抗體序列：抗CD137臂(7A5*)、抗PD-1臂(11444*)，是分別基於親代抗體(7A5)、親代抗體(11444)以及野生型人IgG1恆定區、野生型人Lambda恆定區和野生型人Kappa恆定區進行突變設計完成。具體的本發明抗體CDR區、可變區、恆定區、全長重鏈和全長輕鏈以及編碼全長重鏈和輕鏈的核苷酸序號以及親代抗體可變區SEQ ID NO如下表1所示：

表1 本發明涉及的核苷酸序列編號

	抗CD137 臂(7A5*)	抗PD-1臂 (11444*)	親代抗體 7A5	親代抗體 11444
HCDR1	1	13		
HCDR2	2	14		
HCDR3	3	15		
LCDR1	7	19		
LCDR2	8	20		
LCDR3	9	21		
HCVR	4	16	34	36
LCVR	10	22	35	37
HCCR	30	32		
LCCR	31	33		
重鏈	5	17		
輕鏈	11	23		
重鏈DNA	6	18		
輕鏈DNA	12	24		

【0074】 **HCCR**:重鏈恆定區；**LCCR**:輕鏈恆定區

【0075】 具體胺基酸和核苷酸序列

【0076】 **7A5***的序列

【0077】 <SEQ ID NO:1; PRT1;人工序列>

【0078】 KASGGTFSSY AIS

【0079】 <SEQ ID NO:2; PRT1; 人工序列>

【0080】 GIPIFGTANYA QKFQG

【0081】 <SEQ ID NO:3; PRT1; 人工序列>

【0082】 ARDLATTAPATYFDL

【0083】 <SEQ ID NO:4 ; PRT1 ; 人工序列>

【0084】 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSY

AISWVRYAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADE

STSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDLATTAPATYFDLWGRG
TLVTVSS

【0085】 <SEQ ID NO:5 ; PRT1 ; 人工序列>

【0086】 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSY
AISWVRYAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADE
STSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDLATTAPATYFDLWGRG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPD SGDKTHTCPPCPAPEAA
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVV SVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRG
DMTKNQVQLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDS DGSFFLASKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

【0087】 <SEQ ID NO:6 ; DNA ; 人工序列>

【0088】 CAGGTT CAGTTGGTGCAATCAGGCGCAGAGGT
AAAAAAACCAGGGTCCAGCGTGAAAGTCTCATGTAAGGC
CTCCGGCGGAACATTCTCCTCCTACGCTATTTCTTGGGTGA
GATACGCCCTGGGCAGGGACTTGAGTGGATGGGAGGCAT
TATTCCCATATTCGGCACAGCCAATTACGCGCAAAAATTCC
AGGGGAGGGTTACTATAACAGCAGATGAGAGTACATCAAC
TGCGTACATGGA ACTGAGCTCCCTGAGGAGCGAAGACAC

CGCTGTTTACTACTGCGCTAGAGATCTTGCGACGACCGCA
CCTGCGACGTACTTTGATCTCTGGGGTAGAGGAACCCTCG
TAACAGTGTCTTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT
CCCCCTGGCACCCCTGCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGGCAC
AGCGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACACCTTCCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC
TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG
CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCGAT
TCTGGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCAC
CTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTG
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAG
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
AAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCGGGGGGACATGACCAAGAACCAAGT
CCAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT

CCTTCTTCCTCGCTTCCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGCAA

【0089】 <SEQ ID NO:7 ; PRT1 ; 人工序列>

【0090】 QASQDIGNSLG

【0091】 <SEQ ID NO:8 ; PRT1 ; 人工序列>

【0092】 FDASDLET

【0093】 <SEQ ID NO:9 ; PRT1 ; 人工序列>

【0094】 QQGNSFPLT

【0095】 <SEQ ID NO:10 ; PRT1 ; 人工序列>

【0096】 DIRMTQSPPSLSASVGDRVTITCQASQDIGNSLG
WYQRKPGDAPKLVIFDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFSLTIS
SLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIK

【0097】 <SEQ ID NO:11 ; PRT1 ; 人工序列>

【0098】 DIRMTQSPPSLSASVGDRVTITCQASQDIGNSLG
WYQRKPGDAPKLVIFDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFSLTIS
SLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFP
PSKEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

【0099】 <SEQ ID NO:12 ; DNA ; 人工序列>

【0100】 GACATTAGAATGACACAGTCACCTCCAAGTCT
GTCAGCCAGTGTTGGCGACCGGGTGACTATCACCTGCCAG
GCTTCCCAAGACATTGGTAATAGTTTGGGTTGGTACCAGC
GCAAACCAGGCGATGCTCCGAAACTGGTTATTTTTGACGC
CAGTGATTTGGAGACAGGTGTGCCTTCTCGGTTTAGCGGT
TCTGGGTCAGGAACTGATTTTTCACTGACAATATCTTCACT
GCAGCCGGAAGACTTCGCCACCTATTATTGCCAGCAGGGG
AACTCCTTCCCACCTTCGGTCAAGGGACCCGGCTTG
AGATTAAGCGGACGGTAGCTGCCCCCTCTGTGTTTCATTTT
CCCCCAAGCAAGGAGCAGCTGAAGAGCGGCACGGCCAG
CGTGGTATGTCTGCTGAATAACTTTTACCCTCGGGAGGCC
AAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAATGCTCTTCAATCCGGGA
ACTCACAGGAATCTGTCCACCGAACAAGACAGCAAGGATA
GCACGTACAGCCTGTCTAGCACTCTGACCCTTTCCAAAGC
AGACTACGAAAAACATAAAGTCTACGCGTGCGAAGTGAC
CCACCAGGGGCTCAGCTCACCGGTGACGAAATCCTTCAA
CCGCGGCGAATGC

【0101】 11444*的序列

【0102】 <SEQ ID NO:13 ; PRT1 ; 人工序列>

【0103】 KASGGTFSSY AIS

【0104】 <SEQ ID NO:14 ; PRT1 ; 人工序列>

【0105】 LIIPSFDTAGYAQEFQG

【0106】 <SEQ ID NO:15 ; PRT1 ; 人工序列>

【0107】 ARAEHSSTGTFDY

【0108】 <SEQ ID NO:16 ; PRT1 ; 人工序列>

【0109】 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY
AISWVRKAPGQGLEWMGLIIPSFDTAGYAQEFQGRVAITVD
ESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARAEHSSTGTFDYWGQGT
LVTVSS

【0110】 <SEQ ID NO:17 ; PRT1 ; 人工序列>

【0111】 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY
AISWVRKAPGQGLEWMGLIIPSFDTAGYAQEFQGRVAITVD
ESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARAEHSSTGTFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVATGPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVSTLPPSREEM
TKNQVSLMCLVYGFYPSTIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSVLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

【0112】 <SEQ ID NO:18 ; DNA ; 人工序列>

【0113】 CAAGTGCAACTGGTGCAATCAGGGGCTGAGG
TGAAGAAGCCTGGAAGTAGCGTTAAAGTCAGTTGCAAAG
CGTCCGGTGGGACATTTAGCAGCTATGCCATCAGCTGGGT

TCGGAAGGCACCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATGGGACT
CATAATCCCGAGCTTTGACACTGCTGGTTACGCACAGGAG
TTTCAAGGGAGGGTGGCGATCACAGTGGACGAATCAACC
AGCACCGCGTATATGGAGCTGTCATCTCTGAGGTCAGAAG
ACACCGCTGTTTACTATTGTGCCCGCGCTGAGCATTCTTCC
ACCGGGACCTTCGATTACTGGGGACAAGGAACCCTGGTC
ACAGTATCATCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGGCACAG
CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
GGTGACGGTGTTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGGCCACCGGCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT
TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATC
TTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCT
GAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA
AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGC
ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAG
ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTCCACCCT

GCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTCAG
 CCTGATGTGCCTGGTCTATGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT
 ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
 CTCCTCTATTCCGTGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
 CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
 TCCGGGCAA

【0114】 <SEQ ID NO:19 ; PRT1 ; 人工序列>

【0115】 RASQGISSWLA

【0116】 <SEQ ID NO:20 ; PRT1 ; 人工序列>

【0117】 SAASSLQS

【0118】 <SEQ ID NO:21 ; PRT1 ; 人工序列>

【0119】 QQANHLPFT

【0120】 <SEQ ID NO:22 ; PRT1 ; 人工序列>

【0121】 RIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLA
 WYQDKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
 SLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGGTKVEIK

【0122】 <SEQ ID NO:23 ; PRT1 ; 人工序列>

【0123】 RIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLA
 WYQDKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
 SLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGGTKVEIKGQPKAAPSVT
 LFPPSSEELQANKATLVCYISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA

GVETTTPSKQSNNKYAAWSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE
GSTVEKTVAPTEC

【0124】 <SEQ ID NO:24 ; DNA ; 人工序列>

【0125】 CGCATCCAGATGACACAGTCACCTTCAAGCGT
CTCCGCCTCCGTGGGAGACAGGGTTACTATTACATGTAGG
GCCAGCCAGGGGATCTCTTCATGGCTGGCGTGGTACCAAG
ACAAGCCAGGCAAAGCCCCCAAGCTCCTTATCTCCGCTGC
CTCCTCTCTGCAGTCCGGAGTTCCCTCCCGCTTCAGCGGT
AGCGGGTCAGGCACTGACTTCACCCTTACAATCTCTTCTC
TGCAACCTGAGGACTTCGCCACATATTATTGCCAGCAGGC
AAACCATTTGCCATTTACTTTTTGGCGGAGGTACTAAGGTT
GAGATTAAAGGCCAGCCTAAAGCTGCCCCTAGCGTTACCC
TTTTCCCACCGAGCTCCGAGGAGCTGCAGGCCAATAAAGC
AACCTTGGTCTGCTACATATCAGATTTTTTACCCTGGCGCCG
TGACCGTAGCATGGAAAGCTGATTCATCCCCTGTGAAGGC
CGGTGTTGAAACTACAACCCCTTCCAAACAATCTAACAAT
AAATACGCGGCATGGTCCTACCTGTCCTTGACACCCGAGC
AGTGGAAATCTCACAGATCTTACAGCTGCCAGGTCACCCA
CGAGGGGAGCACTGTGGAGAAGACCGTCGCGCCCACTGA
GTGC

【0126】 人PD-1和人CD137序列

【0127】 <SEQ ID NO:25 ; PRT1 ; 人類>

【0128】 MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRP
WNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSP
SNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVR
ARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPT
AHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSR
AARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTP
EPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPL
RPEDGHCSWPL

【0129】 <SEQ ID NO:26 ; PRT1 ; 人類>

【0130】 MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPA
GTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTR
KECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKK
GCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERD
VVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTA
LLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG
CSCRFPEEEEGGCEL

【0131】 野生型人IgG1恆定區序列

【0132】 <SEQ ID NO:27 ; PRT1 ; 人類>

【0133】 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL

NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

【0134】 野生型人 **Lambda** 恆定區序列

【0135】 <SEQ ID NO:28 ; PRT1 ; 人類>

【0136】 GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY
PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT
PEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC

【0137】 野生型人 **Kappa** 恆定區序列

【0138】 <SEQ ID NO:29 ; PRT1 ; 人類>

【0139】 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0140】 本發明抗體恆定區序列

【0141】 7A5*

【0142】 <SEQ ID NO:30 ; PRT1 ; 人工序列>

【0143】 ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPDSDGDKTHTCPPCPAPE
AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW

LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
GDMTKNQVQLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

【0144】 <SEQ ID NO:31 ; PRT1 ; 人工序列>

【0145】 RTVAAPSVFIFPPSKEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0146】 11444*

【0147】 <SEQ ID NO:32 ; PRT1 ; 人工序列>

【0148】 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVATGPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPE
AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVSTLPPSR
EEMTKNQVSLMCLVYGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSVLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

【0149】 <SEQ ID NO:33 ; PRT1 ; 人工序列>

【0150】 GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCIYISDFY
PGAFTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAAWSYLSLT
PEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC

【0151】 親代7A5可變區序列

【0152】 <SEQ ID NO:34 ; PRT1 ; 人工序列>

【0153】 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY
AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD
ESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDLMTTAPGTYFDLWGR
GTLVTVSS

【0154】 <SEQ ID NO:35 ; PRT1 ; 人工序列>

【0155】 AIRMTQSPPSLSASVGDRVTITCQASQDIGNSLG
WYQQKPGKAPKLVIFDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFSLTIS
SLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIK

【0156】 親代11444可變區序列

【0157】 <SEQ ID NO:36 ; PRT1 ; 人工序列>

【0158】 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY
AISWVRQAPGQGLEWMGLIIPMFD TAGYAQKFQGRVAITVD
ESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARAEHSSTGTFDYWGQGT
LVTVSS

【0159】 <SEQ ID NO:37 ; PRT1 ; 人工序列>

【0160】 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWL
AWYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGGTKVEIK

【0161】 >11444_HC_protein SEQ ID NO:38

【0162】 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY
AISWVRQAPGQGLEWMGLIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVD
ESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAEHSSTGTFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
KTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGK

【0163】 >11444_LC_protein SEQ ID NO:39

【0164】 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWL
AWYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQANHLPTFTGGGKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTH
Q

【0165】 >7A5_HC_protein SEQ ID NO:40

【0166】 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY
AISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITAD
ESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDLMTTAPGTYFDLWGR
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

第 45 頁，共 104 頁(發明說明書)

EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

【0167】 >7A5_LC_protein SEQ ID NO:41

IRMTQSPPSLSASVGDRVTITCQASQDIGNSLGWYQQKPGK
 APKLVIFDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFSLTISLQPEDFAT
 YYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV

【0168】 具體地，本發明重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1，
 SEQ ID NO:25)和抗分化抗原簇137 (CD137，SEQ ID NO:26)
 雙特異性抗體包含：第一重鏈、第二重鏈以及第一輕鏈和第二輕鏈，
 其中每條鏈包含可變區和恆定區，其中：

a) 抗體第一重鏈包含：具有胺基酸序列SEQ ID NO:1的互補決定區1 (HCDR1)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:2的互補決定區2 (HCDR2)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:3的互補決定區3 (HCDR3)；

b) 抗體第一輕鏈包含：具有胺基酸序列SEQ ID NO:7的互補決定區1 (LCDR1)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:8的互補決定區2 (LCDR2)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:9的互補決定區3 (LCDR3)；

c) 抗體第二重鏈包含：具有胺基酸序列SEQ ID NO:13的互補決定區1 (HCDR1)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:14的互補決定區2 (HCDR2)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:15的互補決定區3 (HCDR3)；

d) 抗體第二輕鏈包含：具有胺基酸序列SEQ ID NO:19的互補決定區1 (LCDR1)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:20的互補決定區2 (LCDR2)、具有胺基酸序列SEQ ID NO:21的互補決定區3 (LCDR3)。

【0169】 優選地，e) 抗體第一重鏈可變區(HCVR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:4；

f) 抗體第一輕鏈可變區(LCVR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:10；

g) 抗體第二重鏈可變區(HCVR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:16；

h) 抗體第二輕鏈可變區(LCVR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:22。

【0170】 更優選地，第一重鏈恆定區序列(HCCR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:30，第一輕鏈恆定區序(LCCR)具有胺基酸序列SEQ ID NO:31，第二重鏈恆定區(HCCR)序列具有胺基酸序列SEQ ID NO:32，第二輕鏈恆定區(LCCR)序列具有胺基酸序列SEQ ID NO:33。

【0171】 更優選地，i)抗體第一重鏈具有胺基酸序列SEQ ID NO:5；

j)抗體第一輕鏈具有胺基酸序列SEQ ID NO:11；

k)抗體第二重鏈具有胺基酸序列SEQ ID NO:17；以及

l)抗體第二輕鏈具有胺基酸序列SEQ ID NO:23。

【0172】 進一步地，抗體第一重鏈與第一輕鏈之間形成至少一個二硫鍵，第二重鏈與第二輕鏈之間形成至少一個二硫鍵，以及第一重鏈和第二重鏈之間形成至少一個二硫鍵。

【0173】 本發明抗體是修飾的人IgG1以減少抗體與Fc γ 受體的結合。

【0174】 本發明抗體與人PD-1的結合親和力比抗體與人CD137的結合親和力高10倍以上，優選高100倍以上，因此本發明抗體展現出有利的藥學特性。本發明抗體選擇性地標靶表現PD-1的細胞並潛在地限制CD137對那些共表現PD-1的細胞的激動作用。

【0175】 另外，本發明還提供編碼本發明抗體第一重鏈、第一輕鏈、第二重鏈以及第二輕鏈的核苷酸序列，優選地，所述核苷酸序列分別為SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:24所示的核苷酸序列。

【0176】 本發明的抗體透過培養能夠表現本發明抗體的哺乳動物細胞(非限制性的例子包括CHO、NS0、HEK293或COS細胞)並回收所述抗體獲得。例如，選擇合適的宿主細胞如HEK293或CHO細胞，透過預設最佳重鏈：輕鏈載體比例的分泌抗體的表現系統，或者透過同時表現重鏈和輕鏈的單載體系統，暫態或穩定轉染所述宿主細胞。具體的，例如可以使用編碼具有SEQ ID NO:5所示胺基酸序列的第一重鏈、編碼具有SEQ ID NO:11所示胺基酸序列的第一輕鏈、編碼具有SEQ ID NO:17所示胺基酸序列的第二重鏈、編碼具有SEQ ID NO:23所示胺基酸序列的第二輕鏈的一個或多個DNA分子，透過分泌蛋白的表現系統暫態或者穩定轉染宿主細胞獲得本發明的抗體。

【0177】 抗體回收和純化透過本領域常規技術實現。抗體作為藥物的活性成分的應用現在已經很廣泛。用於將治療性抗體純化至藥用級的技术是本領域公知的。例如，Tugcu等(Maximizing productivity of chromatography steps for purification of monoclonal antibodies, Biotechnology and Bioengineering 99

(2008) 599 - 613.) 描述在蛋白 A 捕獲步驟後使用離子交換層析(陰離子 IEX 和 / 或陽離子 CEX 層析) 的單克隆抗體三管柱純化方法。Kelley 等 (Weak partitioning chromatography for anion exchange purification of monoclonal antibodies, *Biotechnology and Bioengineering* 101 (2008) 553 - 566) 描述了兩管柱純化法，其中在蛋白 A 親和層析後使用弱分配陰離子交換樹脂。

【0178】 一般，重組產生的單克隆抗體可以利用常規的純化方法純化，以提供具有足夠的可重複性和適度純度的藥物物質用於抗體製劑的配製。例如，在抗體從重組表現細胞分泌至培養基中後，可以使用商業可得的蛋白濃縮過濾器例如 Amicon 的超濾裝置，濃縮來自該表現系統的上清液。之後，可以使用例如層析、透析和親和純化等方式進行抗體的純化。蛋白 A 適應於作為親和配體用於純化 IgG1、IgG2 和 IgG4 型抗體。也可以使用其它抗體純化方法，例如離子交換層析。在獲得足夠純度的抗體後，可以按照本領域已知的方法，製備包含抗體的製劑。

【0179】 例如，可以採用如下步驟進行製備：(1) 在發酵結束後將發酵液離心澄清去除細胞等雜質以獲得上清；(2) 使用親和層析(例如對 IgG1、IgG2 和 IgG4 型抗體具有特異親和力的蛋白 A 管柱) 捕獲抗體；(3) 進行病毒滅活；(4) 精製純化(一般可以採用 CEX 陽離

子交換層析)，以去除蛋白中的雜質；(5)病毒過濾(使病毒效價降低例如4 log₁₀以上)；(6)超濾/滲濾(可以用於將蛋白置換於利於其穩定的製劑緩衝液中並濃縮至合適的濃度供注射用)。參見例如，B. Minow, P. Rogge, K. Thompson, BioProcess International, Vol. 10, No. 6, 2012, pp. 48 - 57。

2. 抗體製劑

【0180】 一方面，本發明涉及一種液體抗體製劑，包含重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段以及緩衝劑，優選地所述製劑的pH值為約5.0-7.0；更優選，所述製劑的pH值為約5.5-6.0；進一步優選地，所述pH值為約5.7。

【0181】 在某些方案中，液體抗體製劑中所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段的含量為約1 mg/mL-150 mg/mL，優選為約10 mg/mL-100 mg/mL，例如，約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90 mg/mL，更優選地為約50.0 mg/ml。

【0182】 在某些方案中，所述緩衝劑選自組胺酸、鹽酸組胺酸或它們的組合，或者所述緩衝劑選自枸橼酸鹽、枸橼酸鹽溶劑合物(例如，檸檬酸鹽水合物)或它們的組合，例如，枸橼酸鈉、二水枸橼酸鈉或它們的組合，或者所述緩衝劑選自醋酸鹽、醋酸鹽溶劑合

物(例如，醋酸鹽水合物)或它們的組合，或者所述緩衝劑選自磷酸鹽、磷酸鹽溶劑合物(例如，磷酸鹽水合物)或它們的組合；優選地，所述緩衝劑的濃度為約5-100 mM，更優選地為約5-60 mM，例如，約5、10、15、20、25、30、40、50、60 mM；

【0183】 優選地，所述緩衝劑為組胺酸，所述組胺酸的含量為約0.775 mg/mL-15.5 mg/mL；更優選地，所述組胺酸的含量為約0.775 mg/mL-9.3 mg/mL，例如約1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9 mg/mL；進一步優選地，所述組胺酸的含量為約1.55 mg/ml；

【0184】 優選地，所述緩衝劑為組胺酸和鹽酸組胺酸的組合，其中所述組胺酸的含量為約0.270 mg/mL-5.4 mg/mL，所述鹽酸組胺酸的含量為約0.660 mg/mL-13.33 mg/mL；更優選地，所述組胺酸的含量為約0.270 mg/mL-3.24 mg/mL，例如約0.5、1.0、1.5、2、2.5、3 mg/mL，所述鹽酸組胺酸的含量為約0.660 mg/mL-8 mg/mL，例如約1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 mg/mL；更優選地，所述組胺酸的含量為約0.57 mg/ml，所述鹽酸組胺酸的含量為約1.33 mg/ml。

【0185】 在某些方案中，所述製劑還包含穩定劑；

【0186】 優選地，所述穩定劑包括多元醇和/或胺基酸；所述多元醇選自山梨醇、甘露醇、蔗糖、海藻糖、麥芽糖及組合，所述胺

基酸包括精胺酸、鹽酸精胺酸、甲硫胺酸、甘胺酸、脯胺酸或其組合；優選地，所述穩定劑選自山梨醇和/或鹽酸精胺酸、山梨醇和/或精胺酸，更優選地，所述穩定劑為山梨醇和鹽酸精胺酸的組合、或山梨醇和精胺酸的組合，優選地，所述精胺酸或鹽酸精胺酸的含量為約20 mM-200 mM，進一步優選地，所述精胺酸或鹽酸精胺酸的含量為約40 mM-150 mM，例如約40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150 mM；更優選地，所述精胺酸或鹽酸精胺酸的含量為約85 mM；

【0187】 優選地，所述山梨醇的含量為約10 mg/mL-100 mg/mL，所述鹽酸精胺酸的含量為約4 mg/mL-42.0 mg/mL；進一步優選地，所述山梨醇的含量為約20 mg/mL-60 mg/mL，例如約30、40、50 mg/mL，所述鹽酸精胺酸的含量為約8.4 mg/mL-33.7 mg/mL，例如約15、20、25、30 mg/mL；更優選地，所述山梨醇的含量為約25.00 mg/ml，所述鹽酸精胺酸的含量為約16.85 mg/ml。

【0188】 在某些方案中，所述製劑還包含表面活性劑；

【0189】 優選地，所述表面活性劑選自非離子型表面活性劑，例如聚山梨酯80、聚山梨酯20、泊洛沙姆和聚乙二醇聚山梨酯80中的一種或多種，更優選聚山梨酯80；

【0190】 更優選地，所述表面活性劑的含量為約0.1 mg/mL-1 mg/mL；進一步優選為約0.3 mg/mL-0.7 mg/mL，例如0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL；進一步優選地為約0.50 mg/ml。

【0191】 在某些方案中，所述製劑還包含螯合劑；

【0192】 優選地，所述螯合劑選自依地酸二鈉、二乙基三胺五乙酸和/或EDTA，更優選依地酸二鈉；

【0193】 更優選地，所述螯合劑的含量為約0.005 mg/mL-0.1 mg/mL；進一步優選為約0.01 mg/mL-0.05 mg/mL，例如約0.02、0.03、0.04 mg/mL；進一步優選地為約0.01 mg/ml。

【0194】 在某些方案中，提供一種液體抗體製劑，所述製劑含有以下組分：約50.0 mg/ml重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體、約0.57 mg/ml組胺酸、約1.33 mg/ml鹽酸組胺酸、約25.00 mg/ml山梨醇、約16.85 mg/ml鹽酸精胺酸、約0.01 mg/ml依地酸二鈉、約0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 約5.7，餘量為水。

【0195】 在某些方案中，提供一種所述的液體抗體製劑，其包含：

(i)約1 mg/mL-150 mg/mL的所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段；

(ii)約5-100 mM的組胺酸；

(iii)約10 mg/mL-100 mg/mL的山梨醇以及約20 mM-200 mM精胺酸或鹽酸精胺酸；

(iv)約0.1 mg/mL-1 mg/mL聚山梨酯80；和

(v)任選地，約0.005 mg/mL-0.1 mg/mL的依地酸二鈉，

其中所述液體製劑的pH為約5.0-7.0，例如，約5.5、6.0、6.5；

例如，所述液體抗體製劑包含

(i)約10 mg/mL-100 mg/mL的所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段；

(ii)約5-60 mM的組胺酸；

(iii)約20 mg/mL-60 mg/mL的山梨醇以及約8.4 mg/mL-33.7 mg/mL鹽酸精胺酸；

(iv)約0.3 mg/mL-0.7 mg/mL聚山梨酯80；和

(v)任選地，約0.01 mg/mL-0.05 mg/mL的依地酸二鈉，

其中所述液體製劑的pH為約5.5-6.0，例如，約5.7；

或者，所述液體抗體製劑包含

(i)50.0 mg/ml所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、1.55

mg/ml組胺酸，50.00 mg/ml山梨醇，0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7；或

(ii)50.0 mg/ml所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、1.55 mg/ml組胺酸，25.00 mg/ml山梨醇，16.85 mg/ml鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7；

(iii)50.0 mg/ml所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、1.55 mg/ml組胺酸，16.85 mg/ml鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7；

(iv)50.0 mg/ml所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、2.94 mg/ml枸橼酸鈉(二水)，16.85 mg/ml鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7；

(v)50.0 mg/ml所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、2.94 mg/ml枸橼酸鈉(二水)，16.85 mg/ml鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7；或

(ii)50.0 mg/ml所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、0.57

mg/ml組胺酸、1.33 mg/ml鹽酸組胺酸，25.00 mg/ml山梨醇，
16.85 mg/ml鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7；

(iii)50.0 mg/ml所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和
抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、0.57
mg/ml組胺酸、1.33 mg/ml鹽酸組胺酸，16.85 mg/ml鹽酸精胺酸，
0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7；

(iv)50.0 mg/ml所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗
分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、2.94
mg/ml枸橼酸鈉(二水)，16.85 mg/ml鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml聚
山梨酯80，pH 5.7；或

(v)50.0 mg/ml所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗
分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、0.57
mg/ml組胺酸、1.33 mg/ml鹽酸組胺酸、25.00 mg/ml山梨醇，
16.85 mg/ml鹽酸精胺酸，0.01 mg/ml依地酸二鈉，0.50 mg/ml
聚山梨酯80，pH 5.7。

【0196】 在某些方案中，提供一種固體抗體製劑，其透過固化
本發明所述的液體抗體製劑而獲得，所述固化是透過例如結晶法、
噴霧乾燥法、冷凍乾燥法實施的，所述固體抗體製劑例如是凍乾粉
針劑形式。

【0197】 對於製劑中抗體，上文已經進行了詳細描述，在此需要強調的是所述抗體及其抗原結合片段可以進一步涵蓋如下雙特异性抗體或其抗原結合片段：

包含與胺基酸序列SEQ ID NO:4具有至少90%、95%、98%或99%或更高同源性的第一重鏈可變區(HCVR)；和/或與胺基酸序列SEQ ID NO:10具有至少90%、95%、98%或99%或更高同源性的第一輕鏈可變區(LCVR)；和/或與胺基酸序列SEQ ID NO:16具有至少90%、95%、98%或99%或更高同源性的第二重鏈可變區(HCVR)；和/或與胺基酸序列SEQ ID NO:22具有至少90%、95%、98%或99%或更高同源性的第二輕鏈可變區(LCVR)。在本文中，“序列同源性”是指在比較窗中以逐個核苷酸或逐個胺基酸為基礎的序列相同的程度。可以透過以下方式計算“序列同源性百分比”：將兩條最佳比對的序列在比較窗中進行比較，確定兩條序列中存在相同核酸域基(例如，A、T、C、G、I)或相同胺基酸殘基(例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置的數目以得到匹配位置的數目，將匹配位置的數目除以比較窗中的總位置數(即，窗大小)，並且將結果乘以100，以產生序列同源性百分比。為了確定序列同源性百分數而進行的最佳比對，可以按本領域已知的多種方式實現，例如，使用可公開獲得的電腦軟體如BLAST、

BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。本領域技術人員可以確定用於比對序列的適宜參數，包括為實現正在比較的全長序列範圍內或目標序列區域內最大比對所需要的任何演算法。

【0198】 在一些實施方案中，本發明製劑中的抗PD-1/CD137抗體的第一重鏈可變區(HCVR)與SEQ ID NO：4相比具有不超過10個，優選地不超過5個、4個或3個不同殘基，優選地所述不同殘基為保守胺基酸替代。在一些實施方案中，本發明製劑中的抗PD-1/CD137抗體的第一輕鏈可變區(LCVR)與SEQ ID NO：10相比具有不超過10個，優選地不超過5個、4個或3個不同殘基，優選地所述不同殘基為保守胺基酸替代。在一些實施方案中，本發明製劑中的抗PD-1/CD137抗體的第二重鏈可變區(HCVR)與SEQ ID NO：16相比具有不超過10個，優選地不超過5個、4個或3個不同殘基，優選地所述不同殘基為保守胺基酸替代。在一些實施方案中，本發明製劑中的抗PD-1/CD137抗體的第二輕鏈可變區(LCVR)與SEQ ID NO：22相比具有不超過10個，優選地不超過5個、4個或3個不同殘基，優選地所述不同殘基為保守胺基酸替代。“保守性取代”是指導致某個胺基酸置換為化學上相似的胺基酸的胺基酸改變。提供功能上相似胺基酸的保守性置換表是本領域熟知的。在本發明任一實施方案中，在一個優選的方面，保守取代殘基來自以下的保守替代，優選地為表2中所示優選置換殘基。

表2 胺基酸保守取代示例表

原始殘基	示例性取代	優選的保守胺基酸取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮胺酸	Leu
Leu (L)	正亮胺酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮胺酸	Leu

其它賦形劑

【0199】 在一些實施方案中，本發明的抗體液體製劑中任選地包含其它賦形劑。所述其它賦形劑包括，例如，抗微生物劑、抗靜電劑、抗氧化劑、明膠等等。這些和另外已知的藥物賦形劑和/或適用於本發明製劑的添加劑是本領域公知的，例如，列出於“*The Handbook of Pharmaceutical Excipients*，第4版，Rowe等人編，

American Pharmaceuticals Association (2003)；和Remington: the Science and Practice of Pharmacy，第21版，Gennaro編，Lippincott Williams & Wilkins (2005)”。

製劑的分析

【0200】 在抗體製劑的儲存過程中，抗體可能會發生聚集、降解或化學修飾，導致抗體異質性(包括大小異質性和電荷異質性)以及聚集物和片段等，從而影響抗體製劑的品質。因此，有必要進行抗體製劑穩定性的監測。

【0201】 在本領域中已知多種方法可以用於檢測抗體製劑的穩定性。例如，可以透過還原型CE-SDS、非還原型CE-SDS和SEC-HPLC等方法，分析抗體製劑的純度和評估抗體的聚集位準；可以透過毛細管等電聚焦電泳(cIEF)、成像毛細管等電聚焦電泳(iCIEF)和離子交換層析(IEX)等，分析抗體製劑中的電荷變異體。此外，可以透過目視檢測製劑外觀，快速地判斷製劑的穩定性。也可以使用OD350nm法檢測製劑的濁度改變，該方法可以給出有關可溶性和不溶性聚集物量的資訊。此外，可以使用紫外分光光度法(UV法)檢測製劑中的蛋白質含量變化。

【0202】 非還原型CE-SDS法是一種以毛細管為分離通道進行的抗體純度測定方法。在CE-SDS中，蛋白遷移由SDS結合引起的表面電荷來驅動，而該表面電荷與蛋白質的分子量成正比。由於所

有的SDS-蛋白質複合物都具有相似的品質-電荷比，故可以在毛細管的分子篩凝膠基質中，實現基於分子的大小或流體動力學半徑的電泳分離。該方法已經被廣泛地用於監測變性的完整抗體的純度。一般，在非還原型CE-SDS法中，供試樣品與SDS樣品緩衝液和碘乙醯胺混合。之後，混合物可以於68-72°C培育約10-15分鐘，冷卻至室溫後離心的上清液用於分析。採用紫外檢測器檢測蛋白的遷移，獲得電泳譜圖。抗體製劑純度可以計算為IgG主峰的峰面積占所有峰面積之和的百分比。關於CE-SDS法的進一步描述，可以參見例如 Richard R. 等，Application of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products, Electrophoresis, 2008, 29, 3612-3620。

【0203】 尺寸排阻高效液相層析法，即SEC-HPLC法，是用於抗體標準和質控的另一重要方法。該方法主要依據分子的尺寸大小或流體動力學半徑差異來進行分子的分離。透過SEC-HPLC，抗體可以分離出三種主要形式：高分子量形式(HMMS)、主峰(主要是抗體單體)、和低分子量形式(LMMS)。抗體純度可以計算為層析圖上主峰面積占所有峰面積之和的百分比。透過SEC-HPLC法，可以測量製劑產品中抗體單體的百分數，給出可溶性聚集物和剪切物的含量資訊。關於SEC-HPLC法的進一步描述，可以參見例如，J. Pharm. Scien., 83:1645-1650, (1994); Pharm. Res., 11:485 (1994); J.

Pharm. Bio. Anal., 15:1928 (1997); J. Pharm. Bio. Anal., 14:1133-1140 (1986)。此外，也可以參見例如，R. Yang等，High resolution separation of recombinant monoclonal antibodies by size exclusion ultra-high performance liquid chromatography (SE-UHPLC), Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.032> ; 和 Alexandre Goyon等，Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. I - Non-denaturing chromatographic techniques, Journal of Chromatography , <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.05.010> 。

【0204】 成像毛細管等電聚焦電泳(iCIEF)可以用於分析抗體的電荷異質性。該方法可以提供電荷變異體的定量分佈情況。iCIEF基於分子在pH梯度中的電荷差異(表觀pI值)來實現分子分離的目的。在iCIEF中，分離管柱通常是短毛細管(例如，5 cm長，100 μm內徑的二氧化矽毛細管)，蛋白質在高電壓下在毛細管管柱中聚焦，並透過在280 nm操作的全管柱成像檢測系統對聚焦進行即時線上監測。該技術的一個優點是，可以透過該全管柱檢測系統同時記錄抗體樣品的各種電荷變異體。一般而言，在icIEF中，將樣品與尿素和icIEF緩衝液混合，其中所述緩衝液含有甲基纖維素、pI分子量標準和兩性電解質。然後，可以在iCIEF分析儀例如iCE280分析儀

(Protein Simple, Santa Clara, CA) 上，使用 iCIEF 管柱例如 ProtionSimple 組裝的 iCIEF 管柱，在樣品聚焦一定時間後，測定 280 nm 的吸光度，獲得聚焦抗體電荷變異體的譜圖。在 iCEIF 譜圖中，在主峰(即主成分)之前洗提的蛋白相關峰被分類為酸性組分；相對地，在主峰之後洗提的蛋白相關峰被分類為鹼性組分。主成分、酸性組分和鹼性組分的相對量可以表示為占總峰面積的百分數。關於 iCIEF 的進一步描述，可以參見例如，Salas-Solano O 等，Robustness of iCIEF methodology for the analysis of monoclonal antibodies: an interlaboratory study, J Sep Sci. 2012 Nov;35(22):3124-9. doi: 10.1002/jssc.201200633. Epub 2012 Oct 15；和 Dada OO 等，Characterization of acidic and basic variants of IgG1 therapeutic monoclonal antibodies based on non-denaturing IEF fractionation, Electrophoresis. 2015 Nov;36(21-22):2695-2702. doi: 10.1002/elps.201500219. Epub 2015 Sep 18。

【0205】 也可以透過陽離子交換高效液相層析法(CEX-HPLC) 測定抗體製劑中抗體的電荷變異體。在該測定法中，以比主峰的保留時間更早從 CEX-HPLC 管柱洗提出的峰被標記為“酸性峰”，而那些以比主峰的保留時間更晚從 CEX-HPLC 管柱洗提出的峰被標記為“鹼性峰”。

【0206】 加速穩定性研究可以用於檢查產品的穩定性性質，有利於篩選穩定藥物製劑形式。例如，可以將製劑樣品放置於升高的溫度，例如約 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 條件下進行加速穩定性研究。檢測指標可以包括外觀、可見異物、蛋白含量、濁度、純度(SEC-HPLC法、非還原型CE-SDS法)和電荷變異體(iCIEF法、CEX-HPLC法)。

【0207】 本發明的製劑透過 40°C 強制和 25°C 等加速穩定性實驗，考察不同pH值和不同輔料對蛋白質量的影響，對各製劑處方進行評估。研究過程中檢測項目主要包括外觀、可見異物、蛋白含量、濁度、純度(SEC-HPLC法和非還原型CE-SDS法)和電荷變異體(iCIEF法)等。由此獲得了本發明要保護的穩定的抗體製劑。

3. 製劑的用途

【0208】 本發明所述液體抗體製劑、固體抗體製劑、遞送裝置或預填裝注射器可以預防或治療患者癌症，包括向患者施用有效劑量的本發明所述液體抗體製劑或固體抗體製劑，或者透過本發明的遞送裝置或預填裝注射器向患者施用有效劑量的液體抗體製劑或固體抗體製劑。

【0209】 癌症優選為選自黑色素瘤、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、頭頸癌、肝癌、結直腸癌、胰腺癌、胃癌、腎癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宮內膜癌、食道癌、軟組織肉瘤、膽管癌、甲狀腺癌、肝細胞癌或間皮瘤。

【0210】 其中所述液體抗體製劑或固體抗體製劑可以與電離輻射同時、分開或者依次向癌症患者施用；或者可以與一種或多種化療藥物同時、分開或者依次向癌症患者施用；或者可以與電離輻射以及一種或多種化療藥物同時、分開或者依次向癌症患者施用；優選地所述化療藥物選自5-氟尿嘧啶、羥基脲、吉西他濱、甲胺蝶呤、阿黴素、足葉乙甙卡鉑、順鉑、環磷醯胺、美法侖、達卡巴嗪、紫杉醇、喜樹碱、FOLFIRI、FOLFOX、多西紫杉醇、柔紅黴素、紫杉酚、奧沙利鉑或其組合。

【0211】 治療效果可包括減少生理症狀。用於任何特定受試者的抗體的最佳有效量和濃度將取決於多種因素，包括患者的年齡、體重、健康狀況和/或性別、疾病的性質和程度、特定抗體的活性，身體對其清除率，並且也包括與所述抗體製劑組合施用的任何可能的其它治療。對於具體的情況，所遞送的有效量可以在臨床醫師的判斷範圍內來確定。在這方面，已知的基於抗體的藥物的應用可以提供一定的指導。劑量可以是單劑量方案或多劑量方案。

【0212】 用於本文時，“治療”指減緩、中斷、阻滯、緩解、停止、降低、或逆轉已存在的症狀、病症、病況或疾病的進展或嚴重性。想要的治療效果包括但不限於防止疾病出現或復發、減輕症狀、減小疾病的任何直接或間接病理學後果、防止轉移、降低病情進展

速率、改善或緩和疾病狀態，以及緩解或改善預後。在一些實施方案中，本發明的抗體分子用來延緩疾病發展或用來減慢疾病的進展。

【0213】 用於本文時，“預防”包括對疾病或病症或特定疾病或病症的症狀的發生或發展的抑制。在一些實施方式中，具有癌症家族病史的受試者是預防性方案的候選。通常，在癌症的背景中，術語“預防”是指在癌症的病徵或症狀發生前，特別是在具有癌症風險的受試者中發生前的藥物施用。

【0214】 “治療有效量”指以需要的劑量並持續需要的時間段，有效實現所需治療結果的量。抗體或抗體片段或其綴合物或組成物的治療有效量可以根據多種因素如疾病狀態、個體的年齡、性別和重量和抗體或抗體部分在個體中激發所需反應的能力而變動。治療有效量也是這樣的一個量，其中抗體或抗體片段或其綴合物或組成物的任何有毒或有害作用不及治療有益作用。相對於未治療的物件，“治療有效量”優選地抑制可度量參數(例如腫瘤生長率)至少約20%、更優選地至少約40%、甚至更優選地至少約50%、60%或70%和仍更優選地至少約80%。可以在預示人腫瘤中的功效的動物模型系統中評價化合物抑制可度量參數(例如，癌症)的能力。可選地，可以透過檢驗化合物抑制的能力評價組成物的這種特性，所述抑制在體外透過熟練技術人員已知的測定法。

【0215】 “預防有效量”指以需要的劑量並持續需要的時間段，有效實現所需預防結果的量。通常，由於預防性劑量在物件中在疾病較早階段之前或在疾病較早階段使用，故預防有效量將小於治療有效量。

較佳實施例之詳細說明

實施例

【0216】 下述實施例中所使用的實驗方法如無特殊說明，均為常規方法。

【0217】 下述實施例中所用的材料、試劑等，如無特殊說明，均可從商業途徑得到。

【0218】 以下結合具體實施例，對本發明作進一步說明。應理解，以下實施例僅用於說明本發明而非用於限定本發明的範圍。

【0219】 組胺酸為上海味之素胺基酸有限公司產品，藥用級。

【0220】 鹽酸組胺酸為上海味之素胺基酸有限公司產品，藥用級。

【0221】 山梨醇為法國羅蓋特產品，貨號為H20110265，藥用級。

【0222】 鹽酸精胺酸為上海味之素胺基酸有限公司產品，藥用級。

【0223】 枸橼酸鈉(二水)為德國Merck產品，貨號為1.37042.5000，藥用級。

【0224】 枸橼酸鈉(一水)為德國Merck產品，貨號為1.00242.5000，藥用級。

【0225】 依地酸二鈉為南京化學試劑股份有限公司產品，蘇藥准字F15431201，藥用級。

【0226】 聚山梨酯80為南京威爾化工有限公司產品，蘇藥准字F15423203，藥用級。

【0227】 鹽酸為德國Merck產品，貨號為1.00314.2508，藥用級。

【0228】 蛋白含量(UV法)：使用紫外分光光度計(日本島津生產，型號UV-1800)測定樣品中的蛋白質含量。

【0229】 聚山梨酯80含量高效液相層析-螢光檢測法(HPLC-FLD法)：

使用高效液相層析(Agilent，1260或等效)分離，層析管柱為Knitted Reactor Coil 5 m x 0.50mm ID，SUPELCO，流動相為0.15 mol/L氯化鈉，0.05 mol/L Tris, pH 8.0, 5%乙腈，5.0 umol/L NPN (N-苯基-1-萘胺)，15 ppm Brij，層析管柱保護液為0.05% (w/v) NaN₃，進樣量50 μl，流速0.5 ml/分鐘，採集時間30分鐘，柱溫25℃，檢測波長280 nm。取待測樣品用超純水稀釋至2

mg/ml，作為供試品溶液。取製劑緩衝液用上述相同處理方式稀釋後做為空白溶液。取空白溶液、供試品溶液各10 µl注入液相層析儀，開始檢測。

【0230】 濁度(OD350 nm法)：使用紫外分光光度計(日本島津生產，型號UV-1800)，測定樣品在350 nm的吸光度，確定樣品濁度。

【0231】 純度(SEC-HPLC法)：

使用體積排阻層析管柱分離，流動相為磷酸鹽緩衝液(秤取3.12 g二水合磷酸二氫鈉，8.77 g氯化鈉和34.84 g精胺酸，超純水溶解後用鹽酸調節pH至6.8並定容至1000 ml)，層析管柱保護液為0.05% (w/v) NaN₃，進樣量50 µl，流速0.5 ml/分鐘，採集時間30分鐘，柱溫25℃，檢測波長280 nm。取待測樣品用超純水稀釋至2 mg/ml，作為供試品溶液。取製劑緩衝液用上述相同處理方式稀釋後做為空白溶液。取空白溶液、供試品溶液各50 µl注入液相層析儀，開始檢測。

【0232】 純度(非還原型CE-SDS法)：

採用毛細管凝膠電泳法檢測。毛細管為無塗層毛細管，內徑50 µm，總長30.2 cm，有效長度20.2 cm。電泳前分別使用0.1 mol/L氫氧化鈉、0.1 mol/L鹽酸、超純水、電泳膠70 psi沖洗毛細管管柱。將待測樣品用適量超純水稀釋至2.0 mg/ml，取以上稀釋後的樣品

50 μ l於1.5 ml離心管中，分別向其中加入45 μ l pH 6.5的樣品緩衝液(秤取一水檸檬酸0.32 g，十二水合磷酸氫二鈉2.45 g，溶於45 ml超純水中，定容至50 ml，製得檸檬酸-磷酸鹽緩衝液，精密量取該緩衝液200 μ l，加10% (w/v)十二烷基硫酸鈉溶液80 μ l，加水至1 ml，混勻，即得)、1 μ l內部標準(10 kDa蛋白質，5 mg/mL)(Beckman Coulter，貨號：390953)和5 μ l 250 mmol/L NEM溶液(秤取N-乙基順丁稀二醯亞胺62 mg，溶於2 ml超純水中)，充分混勻後 $70\pm 2^\circ\text{C}$ 加熱 10 ± 2 分鐘，冷卻至室溫後轉移至樣品瓶作為供試品溶液。取與供試品相同體積的製劑緩衝液，按上述方法同樣操作，製得空白溶液。樣品進樣條件：-5 kV 20秒；分離電壓：-15 kV 35分鐘。毛細管管柱溫控制在 25°C ，檢測波長為220 nm。

【0233】 電荷變異體(iCIEF法)：

採用成像毛細管等電聚焦電泳(iCIEF法)檢測。毛細管內徑100 μm ，總長5 cm。樣品電泳前需分別使用0.5%甲基纖維素溶液(下文中也縮寫為MC溶液)、超純水沖洗毛細管管柱。採用真空進樣方式，預聚焦電壓及時間為1.5 kV 1分鐘，聚焦電壓及時間為3 kV 8分鐘，進樣時間55秒，樣品盤溫度為 10°C ，檢測波長為280 nm。陰極穩定劑(Cathodic Stabilizer)為500 mmol/L精胺酸溶液，0.5% MC溶液降低蛋白與毛細管之間的粘附。將供試品用水稀釋至1.0

mg/ml，取稀釋後的供試品溶液20 μ l，向其中加入78 μ l預混液(預混液配比如下：70 μ l pI 0.5% MC溶液，4 μ l兩性電解質(pH 3-10)，2 μ l陰極穩定劑，1 μ l pI 5.85標記物，1 μ l pI 9.99標記物)，充分混勻製得待測樣品溶液。進樣分析，根據面積歸一化法，計算主成分、酸性組分及鹼性組分含量。

實施例1. IBI319蛋白的製備

【0234】 根據美國臨時申請號US62/700525和US62/799274以及其後續PCT申請號PCT/US2019/041517所述，獲得本發明所述的抗體，代號為IBI319，該抗體具有如表1種記載的SEQ ID NO：5和17的重鏈序列和SEQ ID NO：11和23的輕鏈序列，為人源化抗體。

【0235】 舉例：

本發明的抗體可以基本上如下表現和純化。可以使用合適的預定重鏈：輕鏈載體比例或編碼重鏈和輕鏈的單個載體系統，用分泌抗體的表現系統暫態或穩定轉染適當的宿主細胞，例如HEK 293或CHO。透過使用一種或多種DNA分子，本發明的抗體A可以被分泌抗體的表現系統暫態或穩定地轉染，所述DNA分子編碼具有SEQ ID NO：5的胺基酸序列的第一重鏈，具有SEQ ID NO：11的胺基酸序列的第一輕鏈，具有SEQ ID NO：17的胺基酸序列的第二重鏈，具有SEQ ID NO：23的胺基酸序列的第二輕鏈。可例如藉由UV 吸收

或SDS-PAGE檢測抗體片段，且隨後可匯集。可使用常見技術濃縮及/或無菌過濾抗體。可溶性聚集體及多聚體可藉由常見技術有效移除，該等技術包括尺寸排除、疏水相互作用、離子交換、多峰或羥磷灰石層析。可將純化的產物立即於-70°C下冷凍或可經凍乾。可以使用許多常用技術之一來純化抗體。例如，可將介質方便地應用於已用相容緩衝液[例如磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)]平衡的MabSelect層析管柱(GE Healthcare)或KappaSelect層析管柱(GE Healthcare)。可以洗滌管柱以去除非特異性結合組分。結合的抗體可以例如透過pH梯度(例如pH 7至10mM的20mM Tris緩衝液至pH 3.0的10mM檸檬酸鈉，pH 7.4至100mM的甘胺酸緩衝液pH 7.4的磷酸鹽緩衝鹽水)洗提。可以例如透過UV吸收或SDS-PAGE檢測抗體級分，然後可以將其合併。根據預期用途，進一步純化是可選的。純化的抗體可以使用常規技術濃縮和/或無菌過濾。可溶性聚集體和多聚體可透過常規技術進行有效去除，包括尺寸排阻層析，疏水相互作用層析，離子交換層析，多峰(multimodal)層析或羥磷灰石層析。純化的抗體可立即冷凍在-70°C或凍乾。

【0236】 以下示例性地示出本發明所述的抗體，代號為IBI319的培養過程，採用CHO Gs細胞(LONZA)轉染，基礎培養基Dynamis AGT Medium (Gibco)；流加試劑Cell Boost 7a、Cell Boost 7b (HyClone)。在細胞培養試驗中，第0天在細胞培養實驗

中，按密度 1.0×10^6 個/ml接種細胞至2 L細胞反應器中，DO設置為40%，pH控制為 7.05 ± 0.20 ，前期培養溫度 36.5°C ，培養至第6天降溫到 33.0°C 。培養至第3、5、7、9、11天分別流加6.0% (w/w) 初始培養重量的流加試劑A (購自HyClone)，0.6% (w/w) 初始培養重量的流加試劑B (購自HyClone)。每天根據葡萄糖濃度檢測結果，在葡萄糖低於 3.0 g/L 時，補加葡萄糖濃縮液使細胞液中葡萄糖濃度提高到 4.0 g/L 。根據通氣產生的泡沫情況，泡沫高於液面5 cm時手動加入10% ADCF Antifoam Solution，總量不能超過50 ppm。每天監測細胞密度、活率以及細胞生化代謝情況。連續培養至第15天或者細胞活力 $\leq 60\%$ 時，收集細胞上清進行純化。

【0237】 將純化使用的重力管柱使用0.5 M NaOH過夜處理，玻璃瓶等用蒸餾水洗淨後在 180°C 乾烤4h，獲得純化管柱。純化前將收集的培養基4500 rpm離心30 min，棄掉細胞。再將上清使用0.22 μl 的濾器過濾。每管裝填1 ml Protein A，並使用10 ml 結合緩衝液(磷酸鈉20mM NaCl 150mM, PH7.0)平衡。將過濾後的上清加入純化管柱後使用15 ml結合緩衝液再平衡。加5 ml洗提緩衝液(檸檬酸+檸檬酸鈉0.1 M, PH3.5)，收集洗提液，每1 ml的洗提液加入80 μl Tris-HCl將pH調至7.0。收集的抗體用1 ml S型強陽離子交換層析純化，層析管柱先用10 ml平衡緩衝液(20 mM檸檬酸+檸檬酸鈉，pH5.0)平衡，將親和收集的樣品加入純化管柱後使用

10 ml平衡緩衝液再平衡，之後用洗提緩衝液(20 mM檸檬酸+檸檬酸鈉+1 M氯化鈉，pH5.0)進行梯度洗提，洗提體積20 ml，收集樣品超濾濃縮交換到PBS (Gibco，70011-044)中，並檢測濃度。

實施例2. 上述製備並純化的本發明抗體進行如下功能驗證

IBI319親和特異性和親和力測定(BLI測定法)

【0238】 運用Fortebio Octet平臺(美國 Fortebio)，採用生物膜層干涉(BLI)測定法測定本發明示例抗體IBI319與不同種屬蛋白：人4-1BB (Human 4-1BB)、食蟹猴4-1BB (Cyno 4-1BB)、人PD-1 (Human PD-1)、食蟹猴PD-1 (Cyno PD-1)蛋白的親和力，判斷IBI319的親和特異性，同時比較IBI319和親代抗體7A5抗體與4-1BB的親和力差異以及IBI319和親代抗體11444抗體與4-1BB的親和力差異。

表3 實驗樣品

名稱	批號	來源	濃度
IBI319	GG20191001	自製，信達生物	50 mg/ml
親代抗體 7A5	20190806B	自製，信達生物	12.8 mg/ml
親代抗體 11444	DP1901002	自製，信達生物	10 mg/ml

親代抗體**7A5**以及親本抗體**11444**抗體序列請見上文序列部分

38-41

其他關鍵材料

表4 試劑資訊

名稱	產地及品牌	貨號	批號
PBS	上海 生工生物	E607016-0500	F517FA0002
BSA	美國 Jackson Immuno	001-000162	144028
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	美國 Thermo Scientific	21327	S1254537
Human 4-1BB	美國 R&D Systems	9220-4B	DGCI0318011
Cyno 4-1BB	中國 novoprotein	CB18	0331280
Human PD-1	美國 ACRO Biosystems	PD1-H5221	C42bp1-958F1-P1
Cyno PD-1	美國 ACROBiosystems	PD1-C5223	643-7CTF1-HZ

表5 溶液配製方法

名稱	配製方法
SD 緩衝液	50 mL PBS (1x) 溶液加入 BSA IgG-Free 0.05 g，再加入 25 μ L 的 Tween-20
100 nM IBI319 溶液	取 100 μ L 50 mg/mL IBI319，加入 900 μ L PBS 緩衝液，混勻得 5 mg/mL，再取 200 μ L 5 mg/mL IBI319，加入 800 μ L PBS 緩衝液，混勻得 1 mg/mL，然後再取 30 μ L 加入 1970 μ L SD 緩衝液中，混勻，終濃度為 100 nM。
100 nM 親代抗體 7A5 抗體溶液	取 78 μ L 12.8 mg/mL 親本抗體 7A5 抗體，加入 922 μ L PBS 緩衝液，混勻得 1 mg/mL，然後取 30 μ L 加入 1970 μ L SD 緩衝液中，終濃度為 100 nM。
100 nM 親代抗體 11444 溶液	取 100 μ L 10 mg/mL 親本抗體 11444 抗體，加入 900 μ L PBS 緩衝液，混勻得 1 mg/mL，然後取 30 μ L 加入 1970 μ L SD 緩衝液中，終濃度為 100 nM。
1600 nM Human 4-1BB 溶液	將蛋白粉末溶解為 0.5 mg/mL 後，取 115 μ L Human 4-1BB 加入 1885 μ L SD 緩衝液中，終濃度為 1600 nM。
200 nM Cyno 4-1BB 溶液	將蛋白粉末溶解為 0.5 mg/mL 後，取 20 μ L 0.5 mg/mL 的 Cyno 4-1BB，加入 180 μ L PBS 緩衝液，混勻得 0.05 mg/mL，然後取 145 μ L 加入 1855 μ L

	SD 緩衝液中，終濃度為 200 nM。
50 nM Human PD-1 溶液	將蛋白粉末溶解為 0.5 mg/mL 後，取 20 μ L 0.5 mg/mL 的 Human PD-1，加入 180 μ L PBS 緩衝液，混勻得 0.05 mg/mL，然後取 33.6 μ L 0.05 mg/mL 的 Human PD-1，加入 1966 μ L SD 緩衝液中，終濃度為 50 nM。
100 nM Cyno PD-1 溶液	將蛋白粉末溶解為 0.5 mg/mL 後，取 20 μ L 0.5 mg/mL 的 Cyno PD-1，加入 180 μ L PBS 緩衝液，混勻得 0.05 mg/mL，然後取 67 μ L 加入 1933 μ L SD 緩衝液中，終濃度為 100 nM。

【0239】 注：以上每個配製的樣品為檢測的最大濃度樣品，根據實驗設計，抗原按2倍稀釋至所需檢測濃度梯度。

1. 生物素標記抗體(用於檢測抗體與帶Fc標籤抗原的結合)

【0240】 取 180 μ L 超純水加入 1 mg EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin中，溶解成10 mM的溶液，再稀釋100倍至 100 μ M。按摩爾濃度 1 : 1，將計算量的 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin與待標記蛋白混勻，室溫培育1小時後使用脫鹽管柱去除未標記的Biotin，並等體積回收Biotin標記的蛋白，保存於4 $^{\circ}$ C備用。

2. 實驗樣品分組

【0241】 將感測器置於200 μ L SD緩衝液中，浸泡30 min後使用。

【0242】 實驗分組資訊如表6所示，每孔加入200 μ L 對應樣品。

表6 實驗分組資訊

固定物	分析物	分析物濃度 (nM)
IBI319	Human 4-1BB	0, 100, 200, 400, 800, 1600 nM
IBI319	Cyno 4-1BB	0, 100, 200, 400, 800, 1600 nM
親代抗體 7A5	Human 4-1BB	0, 12.5, 25, 50, 100, 200 nM
親代抗體 7A5	Cyno 4-1BB	0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM
IBI319	Human PD-1	0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 nM
IBI319	Cyno PD-1	0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 nM
親代抗體 11444	Human PD-1	0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM
親代抗體 11444	Cyno PD-1	0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM

3. 檢測

【0243】 檢測分為5個步驟，每個迴圈依次為：平衡(Baseline) → 固定抗體(Loadings) → 平衡(Baseline) → 結合梯度稀釋的蛋白(Association) → 解離(Dissociation)。

判斷標準：

【0244】 透過 ForteBio Octet 儀器分析軟體 (Fortebio data analysis 11.0)，採用 1:1 binding (global fitting) 對曲線進行擬合。透過分析擬合曲線擬合程度、R² 值進行判斷結果的可靠性。擬合結果符合 R² > 0.95，透過結合和解離常數計算出 K_D 值。

實驗結果：

【0245】 IBI319 與不同種屬 PD-1、不同種屬 4-1BB 的親和力檢測結果

表7 IBI319 與不同種屬 PD-1、不同種屬 4-1BB 的親和力檢測結果

	Human PD-1 KD (nM)	Cyno PD-1 K _D 平均值(M)±SD	Human CD137 K _D 平均值(M)±SD	Cyno 4-1BB K _D 平均值(M)±SD
IBI319	6.32E-10± 5.94E-11	7.64E-10± 1.25E-10	7.19E-07± 2.14E-07	2.08E-08± 5.04E-09
親代抗體 11444	1.14E-09± 8.96E-11	1.66E-09± 1.48E-10	未檢測	未檢測
親代抗體 7A5	未檢測	未檢測	4.62E-07± 1.30E-07	6.58E-09± 4.19E-10

結論：

【0246】 IBI319 與人 PD-1、食蟹猴 PD-1 有很強的親和力，
IBI319 與人 4-1BB、食蟹猴 4-1BB 的親和力較弱。

IBI319 親和力研究測定(表面等離子共振,SPR法)：

【0247】 運用 Biacore 平臺(瑞典 GE Healthcare)，採用 SPR 法
檢測 IBI319 與人 PD-1、食蟹猴 PD-1、人 4-1BB (CD137)、食蟹猴
4-1BB 的親和力。

方法：

【0248】 採用 SPR 法，將抗人 Fc 抗體偶聯在 CM5 晶片表面之
後，透過偶聯的抗人 Fc 抗體捕獲 IBI319，梯度稀釋的人 PD-1、食
蟹猴 PD-1、人 4-1BB、食蟹猴 4-1BB 分別與被捕獲的 IBI319 結合。

IBI319 的親代抗體 11444 (抗 PD-1 抗體) 和親本抗體 7A5 (抗 4-1BB

抗體或抗CD137抗體)分別作為對照。最後透過對結合解離曲線的擬合，計算出親和力的數值。

親和力檢測：

【0249】 實驗所用緩衝液為 pH7.4 的 HBS-EP+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% P20) 溶液，檢測溫度 25 °C。實驗包括：1) 將抗人 Fc 抗體偶聯到 CM5 晶片表面；2) IBI319 及對照抗體與 Human PD-1、Cyno PD-1、Human 4-1BB、Cyno 4-1BB 親和力檢測。

實驗結果：

【0250】 實驗結果表明 IBI319 與 Human PD-1, Cyno PD-1 親和力分別約為 0.1 nM 和 0.04 nM，與 Human 4-1BB, Cyno 4-1BB 的親和力分別約為 394 nM 和 68.5 nM。親和力數據見下表 8。

表 8 IBI319 與 Human PD-1、Cyno PD-1、人 4-1BB、食蟹猴 4-1BB 親和力檢測結果

抗體	抗原	K_D 平均值 \pm SD (M)
IBI319	Human PD-1	1.02E-10 \pm 8.31E-12
親代抗體 11444	Human PD-1	1.37E-10 \pm 2.89E-11
IBI319	Cyno PD-1	4.09E-11 \pm 8.95E-12
親代抗體 11444	Cyno PD-1	1.51E-10 \pm 1.99E-11
IBI319	Human 4-1BB	3.94E-07 \pm 2.30E-08
親代抗體 7A5	Human 4-1BB	2.19E-07 \pm 1.87E-08
IBI319	Cyno 4-1BB	6.85E-08 \pm 1.44E-09
親代抗體 7A5	Cyno 4-1BB	5.25E-08 \pm 2.99E-09

結論：

【0251】 IBI319 與人 PD-1、食蟹猴 PD-1 有很強的親和力，IBI319 與人 4-1BB、食蟹猴 4-1BB 的親和力較弱。

討論：

【0252】 IBI319 與 PD-1 的強親和力，有利於發揮更強的 PD-1/PD-L1 阻斷作用。抗 4-1BB 的抗體存在 T 細胞活化能力與肝毒性的平衡，且兩者與其親和力有很大的相關性。IBI319 與 4-1BB 的親和力較弱，在保留 T 細胞活化功能的情況下，更有利於獲得更大的功能與安全窗口。IBI319 的雙特異性抗體設計，能將解除免疫抑制與 T 細胞活化功能在腫瘤微環境中發揮更好的協同作用。

IBI319 體外藥效 1：IBI319 PD-L1 結合的阻斷活性測定

實驗方案：

【0253】 將膜表面表現 PD-L1 和 TCR activator 的 CHO 細胞 (CHO-K1/PD-L1) 與表現 PD-1 和 NFAT-luc reporter 的 Jurkat 細胞 (Jurkat/PD1-NFAT-luc) 共培養，加入不同濃度的 IBI319、親代抗體 11444、親代抗體 7A5 和 hIgG1，透過測定體系中的 luciferase 酵素活性來反應藥物對 PD-1/PD-L1 的阻斷活性。

實驗步驟：

(一) CHO-K1/PD-L1 細胞鋪盤

(二) 抗體準備

【0254】 利用 Assay 緩衝液 (RPMI 1640+1% FBS) 配製 IBI319、親代抗體 11444、親代抗體 7A5、親代抗體 11444+親代抗體 7A5、IgG1，起始終濃度為 2000 nM，4 倍梯度稀釋，共 11 個梯度點，具體參見表 9。

表 9

Abs	初始濃度	配製濃度	200 μ l 加入量(μ l)
IBI319	50 mg/ml	4000 nM (0.6 mg/ml)	2.4
親代抗體 11444	10 mg/ml		12
親代抗體 7A5	12.8 mg/ml		9.4
親代抗體 11444+親代抗體 7A5	同上		6, 4.7
IgG1	7.3 mg/ml		16.4

(三) Jurkat 細胞準備

(四) 加樣

1. 將培養 CHO-K1/PD-L1 的 96 孔盤取出，每孔吸去 95 μ l 上清。
2. 按照盤佈局迅速加入 40 μ l/孔配製好的抗體，設置 medium control 組，即加入 40 μ l assay buffer。
3. 再加入 40 μ l/孔 Jurkat/PD1-NFAT-luc 細胞 (5×10^4 個/孔)。37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培育 6 h。

(五) 利用多功能酵素標示讀取儀 (MOLECULAR DEVICES) 測定 luciferase 酵素活性

實驗結果：

【0255】 透過Jurkat/NFAT-luc reporter system實驗，IBI319顯示了活化NFAT_Luciferase訊息的活性，其活性的EC₅₀為8.14 nM。對照抗體親代抗體11444活化NFAT_Luciferase的EC₅₀為1.08 nM；CD137單抗未顯示出活性。具體見圖12。

實驗結論：

【0256】 IBI319的抗PD-1端顯示了阻斷PD-1/PD-L1結合的活性。

IBI319體外藥效2：IBI319 CD137端的激動活性測定

實驗方案：

【0257】 將表現CD137和NFκB-luc reporter的Jurkat細胞(Jurkat/CD137-NFκB-luc)與CHO-S/hPD-1細胞(CHO-S表現hPD-1)共培養，或不加CHO-S/hPD-1細胞，再加入不同濃度的IBI319、親代抗體11444、親代抗體7A5和hIgG1，透過測定體系中的luciferase酵素活性來反應藥物對CD137途徑的激動活性以及與CD137-PD-1的cross-linking作用。

實驗步驟：

【0258】 表現CD137和NFκB-luc reporter的Jurkat細胞培養基：90% RPMI 1640 with l-glutamine, 10% FBS, 200μg/ml hygromycin B, 500μg/ml Geneticin, 1mM sodium pyruvate, 0.1mM MEM NEAA；

【0259】 表現 hPD-1 的 CHO-S 細胞培養基：CD Forti CHO+1mM MTX+1%ACA+1%GlutaMAX。

(一)抗體準備

【0260】 利用 Assay 緩衝液 (RPMI 1640+1% FBS) 配製 IBI319 (α PD1/CD137)、親代抗體 11444 (α PD-1)、親代抗體 7A5(pool3)、IgG1 終濃度：400、80、16、3.2、0.64、0.128、0.0256、0.00512、0.001024 nM (5倍梯度稀釋)。

(二)細胞準備

1. 培養 Jurkat/CD137-NF κ B-luc 至倍增時間穩定，細胞密度在 $3.5 \times 10^5 \sim 2.2 \times 10^6$ cells/ml。細胞計數後，利用 Assay 緩衝液調整細胞密度為 1.0×10^6 cells/ml，備用。
2. 培養 CHO-S/ hPD-1 細胞至對數期，細胞計數後，利用 Assay 緩衝液調整細胞密度為 2.0×10^6 cells/ml，備用。

(三)加樣、鋪盤

1. 按照盤佈局將配製好的抗體加入 96 孔平底白盤中，25 μ l/孔，設置 medium control 組，即加入 25 μ l assay buffer。
2. 將調整好密度的 CHOS/hPD-1 和 Jurkat/CD137-NF κ B-luc 等體積混合後，50 μ l/孔加入到細胞盤中(分別為 5.0×10^4 個/孔和 2.5×10^4 個/孔)。

【0261】 設置no CHO-S組，即加入25 μ l assay buffer和25 μ l Jurkat/CD137-NF κ B-luc。

【0262】 設置background組，只加入75 μ l assay buffer。

3. 置於37°C \pm 2°C，5% \pm 1% CO₂培養箱中培育6 h。

(四)多功能酵素標示讀取儀測定luciferase酵素活性

實驗結果：

【0263】 透過Jurkat/CD137-NF κ B-luc reporter system實驗，IBI319顯示了活化NF κ B_Luciferase訊息的活性，此活化活性在與Jurkat/CD137-NF κ B-luc細胞單獨培育的條件下很弱(圖14)，而在加入CHO-S/PD-1細胞共同培育時顯著增強(圖13)。其增強的程度與CHO-S/PD-1細胞的比例成正相關(圖15)。

實驗結論：

【0264】 IBI319的抗CD137端顯示了活化活性，此活化活性依賴於PD-分子的表現。

混合淋巴細胞反應(MLR)中IBI319可誘導T細胞活化

【0265】 透過人異體混合淋巴細胞反應檢測IBI319中PD1端阻斷PD-1/PD-L1結合的活性。具體方法如下：人周邊血液單個核細胞(PBMC)來源於凍存狀態(AllCells)，或從新鮮全血中利用Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)密度梯度離心分離獲得。利用人單核細胞分離套組II或CD14磁珠(Miltenyi Biotec)及

AutoMACS Pro separator (Miltenyi Biotec)從PBMC中分選出CD14+單核細胞。在1,000 IU/mL hGM-CSF (R & D Systems, 215-GM-050或Sanofi, NDC 0024-5843-01)和500 IU/mL hIL-4 (R & D Systems, 204-IL-050)存在情況下，在含10%FBS的RPMI-1640完全培養基中培養單核細胞2天 (Table 14) 或5天 (Table 16、17)獲得未成熟樹突細胞(DC)。使用人CD4+T細胞分離套組(Miltenyi Biotec)從不同健康供體的人PBMC (AllCells或Indiana Blood Center)中純化得到CD4+T細胞。之後在96孔V型盤中混合不同供體的兩種類型細胞，每孔含100 μ L AIM-V培養基 (Thermo Fisher Scientific)， 5×10^4 - 1×10^5 CD4+T細胞及 5×10^3 未成熟DC細胞。將待測抗體(人IgG1-EN、p-11444、p-7A5、IBI319)及對照抗體梯度稀釋，加至反應盤中，100 μ L/孔(共8個複孔)，37°C，5% CO₂培養67小時。或將待測抗體加至反應盤中，200 μ L/孔(共3個複孔)，培養4天。收集上清液，並根據說明書使用人IFN- γ ELISA套組(R & D Systems；SIF50或DY285)和人IL-2 ELISA套組(R & D Systems；S2050)分別檢測IFN- γ 和IL-2含量。利用9個不同的供體對進行測試。使用GraphPad Prism (GraphPad Software)計算三對不同的供體細胞的EC₅₀值。

【0266】 在MLR實驗中，利用同種異體人DC細胞和CD4+ T細胞，添加p-11444，p-11444+p-7A5、IBI319，與IgG1相比，增

強了T細胞活化，並呈現劑量依賴性。IFN- γ 和IL-2合成量的EC₅₀如表10所示。該實驗未檢測到CD137單抗的活性。

【0267】 綜上，同種異體混合淋巴細胞反應結果顯示，對於多組供體對，IBI319保留了與p-11444類似的PD-1端的阻斷活性，增加了細胞激素的釋放量。

表10 MLR實驗中IBI319的PD1阻斷活性[cytokine mean EC₅₀ (nM) values across 3 donors]

Abs	Control IgG1	p-11444	p-7A5	p-11444+ p-7A5	IBI319
IFN- γ	>32	0.088± 0.071	>32	0.038± 0.013	0.091± 0.074
IL-2	>32	0.238± 0.209	>32	0.158± 0.063	0.297± 0.305

IBI319在H292 NSCLC Winn腫瘤模型中可誘導獨特的免疫基因表現譜

【0268】 檢測了H292 Winn小鼠模型經IBI319、p-7A5、p-11444和/或對照人IgG1給藥處理後的腫瘤組織中人免疫相關基因的表現情況。大致方法為：在第0天，小鼠經腹腔注射H292腫瘤細胞和凍存的人周邊血液單個核細胞的混合液。待測抗體和對照人IgG1以10 mg/kg的劑量在第1、8、15天依次給藥。第16天收集腫瘤組織，速凍於液氮。利用MagMAX-96總RNA萃取套組(Life Technologies)裂解腫瘤組織，並用組織研磨機(Qiagen)將其勻漿化。使用MagMAX Express-96 Deep Well Magnetic Particle

Processor (Life Technologies) 萃取總RNA，用分光光度計測定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 用以定量。利用 QuantiGene 2.0 plex assay (Affymetrix) 和 FLEXMAP 3D Luminex 儀器 (ThermoFisher) 對總RNA (500 ng) 進行基因表現位準分析。利用一個質控腳本將 MFI 值轉化為相對基因表現量(歸一化淨 MFI 值)。各基因表現量與對照組相比的倍數變化透過公式計算得到(歸一化淨 MFI 值/平均歸一化淨 MFI 值)。各基因表現量與對照組相比的平均倍數變化透過單因數方差分析計算。

【0269】 基因表現分析顯示 IBI319 在體內模型 H292 腫瘤組織中誘導了特殊的基因表現譜，包括 T 細胞浸潤和活化相關基因(如 CD3E，CD4，CD8B，IFN- γ ，GZMB)、多個細胞激素和趨化激素，以及 MHC I 類和 II 類抗原(如 HLA-B，HLA-DRA)。如下表 11 所示，IBI319 誘導的這些基因變化與兩個親和抗體、組合抗體有所不同。

表 11

Gene	Fold Change				P-value			
	IBI319	p-7A5	p-11444	p-7A5 + p-11444	IBI319	p-7A5	p-11444	p-7A5 + p-11444
CD3E	7.26	2.11	0.81	1.76	0.00	0.20	0.72	0.36
CD4	5.12	1.73	0.7	1.07	0.01	0.34	0.53	0.91
CD8B	9.04	3.48	1.3	3.89	0.00	0.03	0.64	0.03

IFN γ	8.27	2.62	0.87	1.30	0.00	0.08	0.80	0.64
HLA-B	2.23	1.38	0.73	1.08	0.02	0.27	0.29	0.79
HLA-DR A	4.81	1.86	0.52	1.24	0.02	0.30	0.28	0.73
CCL5	9.56	2.39	1.06	3.30	0.00	0.16	0.92	0.07
CXCL10	11.05	2.95	0.54	1.58	0.01	0.20	0.46	0.60
GZMB	8.22	3.06	0.53	2.28	0.01	0.10	0.35	0.25
PRF1	11.59	3.45	0.65	2.48	0.00	0.08	0.52	0.22

IBI319在H292 NSCLC Winn腫瘤模型顯示出抗腫瘤活性

【0270】 檢測了H292腫瘤異種移植小鼠模型經IBI319、p-11444、p-7A5、p-11444+p-7A5給藥處理後的腫瘤生長抑制率。使用雌性NOD/SCID Gamma (NSG)小鼠(Jackson Laboratories)用於該實驗。將人NSCLC細胞株NCIH292(ATCC; CRL-1848)和人PBMC(Stem Cell Technologies)以4:1比例混合。離心後重新懸浮於HBSS，調整NCI-H292細胞密度為 10×10^6 個/ml，PBMC密度為 2.5×10^6 個/ml。在第0天，每隻小鼠在右側皮下注射0.2 ml細胞混合液，其中一個對照組只注射腫瘤細胞。第1天，將小鼠進行隨機分組，8隻/組，開始給藥。待測抗體包括對照IgG、p-7A5、p-11444、組合p-11444 + p-7A5和IBI319。以10 mg/kg的劑量腹腔注射，每週給藥一次，共4週。體重和腫瘤體積每週測量兩次。腫瘤體積(mm^3)根據公式 $\pi/6 * \text{長度} * \text{寬度}^2$ 計算，%T/C根據公式

$100 \times \Delta T / \Delta C$ (如 $\Delta T > 0$) 計算。利用 SAS 軟體的 MIXED 程式進行統計分析。

【0271】 如下表 12 所示，IBI319 (10 mg/kg) 處理組與對照組 IgG 相比抑制了腫瘤生長 (%T/C = ~2%, $p < .001$)，8 隻小鼠中的 6 隻達到了完全緩解。組合 p-11444+p-7A5 和單抗 p-7A5、p-11444 未顯示出藥效。

表 12

Treatment/ Comparison	Xenograft	p-value for tumor volume	T/C%	CR
Control IgG 10 mg/kg	NCI-H292	p=.695	115.8	0/8
Control IgG 10 mg/kg	NCI-H292 + hPBMC	NA	NA	0/8
p-11444 10 mg/kg	NCI-H292 + hPBMC	p=.377	71.5	1/8
p-7A5 10 mg/kg	NCI-H292 + hPBMC	p=.702	115.4	1/8
p-11444 + p-7A5	NCI-H292 + hPBMC	p=.144	57.0	1/8
IBI319 10 mg/kg	NCI-H292 + hPBMC	p<.001	1.9	6/8

實施例 3. pH 篩選實驗

【0272】 本實驗主要考察不同pH值對IBI319蛋白穩定性的影響，共設計了5個pH值，分別為pH 5.0、5.5、6.0、6.5和7.0，透過pH篩選實驗，獲得較優的pH值範圍。

【0273】 具體實驗步驟如下：

一、配製含有10 mM組胺酸、5% (w/v)山梨醇緩衝液，用鹽酸分別將pH調節為5.0、5.5、6.0、6.5和7.0，將IBI319蛋白超濾置換到上述不同pH值的緩衝液中，調節蛋白含量至30 mg/ml，加入聚山梨酯80至0.2 mg/ml，得到pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5和pH 7.0樣品，分別過濾分裝至西林瓶，加塞，軋蓋。

二、將上述樣品在第0天、第1週、第2週和第4週分別取樣，於40°C±2°C條件下進行穩定性考察，觀察外觀和可見異物，並檢測蛋白含量、濁度、純度[體積排阻高效液相層析法(SEC-HPLC法)和非還原型十二烷基硫酸鈉毛細管電泳(非還原型CE-SDS法)]和電荷變異體[成像毛細管等電聚焦電泳(iCIEF法)]。

【0274】 品質未發生變化的判斷標準如表13所示。

表13 品質未發生變化的判斷標準

檢測項目	未發生變化的判斷標準
外觀(觀察法)	澄明至微乳光，無色至淡黃色液體，無異物
可見異物(可見異物檢查法)	符合《中華人民共和國藥典》(2015年版，四部)通則 0904

蛋白含量(UV 法)	變化率≤10%
聚山梨酯 80 含量(HPLC-FLD 法)	0.3~0.7mg/ml
濁度(OD350 nm 法)	變化值≤0.02
純度(SEC-HPLC 法)	主峰變化值≤1%
純度(非還原型 CE-SDS 法)	主峰變化值≤2%
電荷變異體(iCIEF 法)	主成分及酸堿組分變化值≤2%

【0275】 結果如下：

1. 外觀和可見異物

【0276】 pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5和pH 7.0樣品在40℃±2℃條件下放置4週，外觀、可見異物均合格。

2. 蛋白含量

【0277】 蛋白含量檢測結果如表14所示。

表14 pH篩選蛋白含量結果(UV法，mg/ml)

樣品名稱	時間			
	0 天	1 週	2 週	4 週
pH 5.0	29.5	29.0	29.0	29.3
pH 5.5	29.7	29.6	29.4	29.4
pH 6.0	29.4	29.3	29.4	29.2
pH 6.5	30.0	29.9	29.9	29.6
pH 7.0	28.6	28.4	28.3	28.2

【0278】 將表14表明，在40℃±2℃條件下放置4週，各樣品蛋白含量均未發生顯著變化。

3. 濁度

【0279】 濁度結果如表15所示，其變化趨勢如圖2所示。

表15 pH篩選濁度結果(OD350 nm法)

樣品名稱	時間			
	0 天	1 週	2 週	4 週
pH 5.0	0.040	0.049	0.051	0.054
pH 5.5	0.054	0.062	0.061	0.060
pH 6.0	0.056	0.062	0.060	0.068
pH 6.5	0.060	0.065	0.070	0.090
pH 7.0	0.069	0.081	0.085	0.108

【0280】 結果表明，在 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 條件下放置4週，pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5和pH 7.0樣品濁度分別上升0.014、0.006、0.012、0.03和0.039，樣品在pH 5.0~ pH 6.0之間濁度變化較小。

4. 純度

【0281】 純度(SEC-HPLC法和非還原型CE-SDS法)結果如表16所示，其變化趨勢如圖3和圖4所示。

表16 pH篩選純度結果

檢測項	樣品名稱	時間			
		0 天	1 週	2 週	4 週
純 度 (SEC-HPLC)	pH 5.0	99.9	96.5	95.6	94.8
	pH 5.5	99.9	99.5	99.3	98.9
	pH 6.0	99.8	99.5	99.3	98.9

法)	pH 6.5	99.8	99.3	99.0	98.5
	pH 7.0	99.8	99.1	98.9	98.4
純度(非還原型 CE-SDS 法)	pH 5.0	92.9	92.7	92.3	90.4
	pH 5.5	92.8	92.5	92.6	91.7
	pH 6.0	92.9	92.6	92.6	91.3
	pH 6.5	92.7	92.6	92.5	90.8
	pH 7.0	93.0	92.6	92.2	90.2

【0282】 結果表明，在 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 條件下放置4週，pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5和pH 7.0樣品純度(SEC-HPLC法)分別下降5.1%、1.0%、0.9%、1.3%和1.4%。pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5和pH 7.0樣品純度(非還原型CE-SDS法)分別下降2.5%、1.1%、1.6%、1.9%和2.8%。IBI319蛋白在pH 5.5和pH 6.0條件下較為穩定。

5. 電荷變異體

【0283】 電荷變異體(iCIEF法)結果如表17所示，其變化趨勢如圖5和圖6所示。

表17 pH篩選電荷變異體結果(iCIEF法，%)

樣品名稱		時間			
		0 天	1 週	2 週	4 週
pH 5.0	酸性組分	17.9	20.8	25.2	34.0
	主成分	76.3	72.3	67.4	59.4
	鹼性組分	5.9	6.9	7.5	6.6
pH 5.5	酸性組分	17.4	20.4	23.8	32.8

	主成分	77.4	72.7	69.3	60.7
	鹼性組分	5.1	6.8	6.9	6.5
pH 6.0	酸性組分	17.6	20.9	24.6	32.5
	主成分	76.9	72.7	68.6	61.3
	鹼性組分	5.5	6.5	6.8	6.3
pH 6.5	酸性組分	17.7	22.5	27.1	38.1
	主成分	76.8	71.6	67.3	57.3
	鹼性組分	5.5	5.9	5.6	4.6
pH 7.0	酸性組分	18.2	26.9	34.0	47.4
	主成分	76.5	67.8	60.9	48.4
	鹼性組分	5.4	5.3	5.1	4.2

【0284】 結果表明，在 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 條件下放置4週，所有樣品電荷變異體主成分和酸性組分均發生明顯變化。與第0天比較，第4週的pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5和pH 7.0樣品電荷變異體主成分分別下降16.9%、16.7%、15.6%、19.5%和28.1%，酸性組分分別上升16.1%、15.4%、14.9%、20.4%和29.2%。從該檢測結果分析，IBI319蛋白在pH 5.5和pH 6.0條件下更為穩定。

【0285】 綜上所述，pH篩選實驗結果表明，IBI319蛋白在pH 5.5~6.0時較為穩定，以pH 5.7為例進行後續處方篩選實驗。

實施例4. 處方篩選實驗

【0286】 本實驗考察緩衝體系(組胺酸和枸橼酸)和穩定劑(山梨醇和鹽酸精胺酸)對IBI319蛋白穩定性的影響。

【0287】 一、設計如下5個處方：

處方1的製備：秤取1.55克組胺酸，50.00 g山梨醇加純化水定容至980 mL，HCl調pH至5.7，定容至1 L。將IBI319蛋白超濾置換至上述溶液中。置換完成後，調節蛋白含量至約50 mg/ml，最後加入0.50 g聚山梨酯80，得到處方1，處方1的組成為：50.0 mg/ml IBI319、1.55 mg/ml組胺酸、50.00 mg/ml山梨醇、0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7，餘量為水。

【0288】 處方2的製備：秤取1.55克組胺酸、25.00 g山梨醇、16.85 g鹽酸精胺酸加純化水定容至980 mL，HCl調pH至5.7，定容至1L。將IBI319蛋白超濾置換至上述溶液中。蛋白含量至約50 mg/ml，最後加入0.50 g聚山梨酯80，得到處方2，處方2的組成為：50.0 mg/ml IBI319、1.55 mg/ml組胺酸，25.00 mg/ml山梨醇，16.85 mg/ml鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7，餘量為水。

【0289】 處方3的製備：秤取1.55克組胺酸、16.85 g鹽酸精胺酸加純化水定容至980 mL，HCl調pH至5.7，定容至1L。將IBI319蛋白超濾置換至上述溶液中。置換完成後，調節蛋白含量至約50 mg/ml，最後加入0.50 g聚山梨酯80，得到處方3，處方3的組成為：50.0 mg/ml IBI319、1.55 mg/ml組胺酸，16.85 mg/ml鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7，餘量為水。

【0290】 處方4的製備：秤取2.94 g 枸橼酸鈉(二水)，16.85 g 鹽酸精胺酸加純化水定容至980 mL 枸橼酸調pH至5.7，定容至1L。將IBI319蛋白超濾置換至上述溶液中。置換完成後，調節蛋白含量至約50 mg/ml，最後加入0.50 g 聚山梨酯80，得到處方4，處方4的組成為：50.0 mg/ml IBI319、2.94 mg/ml 枸橼酸鈉(二水)，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯80，pH 5.7，餘量為水。

【0291】 處方5的製備：秤取1.55克組胺酸，25.00 g 山梨醇、16.85 g 鹽酸精胺酸、0.01 g 依地酸二鈉加純化水定容至980 mL，HCl調pH至5.7，定容至1 L。將IBI319蛋白超濾置換至上述溶液中。置換完成後，調節蛋白含量至約50 mg/ml，最後加入0.50 g 聚山梨酯80，得到處方5，處方5的組成為：50.0 mg/ml IBI319、1.55 mg/ml 組胺酸，25.00 mg/ml 山梨醇，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.01 mg/ml 依地酸二鈉，0.50 mg/ml 聚山梨酯80，pH 5.7，餘量為水。

【0292】 處方1、處方2、處方3和處方5用鹽酸調節pH，處方4用枸橼酸調節pH。

【0293】 將各個處方樣品過濾分裝至西林瓶中，加塞，軋蓋。

【0294】 二、將上述處方樣品進行40℃、25℃、振盪和凍融穩定性考察。具體方案如表18所示。

表18 實驗條件及取樣

實驗名稱	處方	實驗條件及取樣計畫	檢測項目
40°C 穩定性實驗	處方 1~處方 5	在 40°C 條件下放置，於 0 天、1 週、2 週和 4 週取樣	外觀、可見異物、蛋白含量、純度(SEC-HPLC 法和非還原型 CE-SDS 法)、電荷變異體(iCIEF 法)
25°C 穩定性實驗	處方 1~處方 5	在 25°C 條件下放置，於 0 天、1 月和 2 個月取樣	
振盪實驗	處方 5	650 r/min，室溫，避光，於第 0 天、第 5 天取樣	
凍融實驗	處方 5	-30°C 以下凍存 1 天，室溫解凍為一個迴圈，於第 0 次、第 6 次迴圈取樣	

【0295】 品質未發生變化的判斷標準如表 13 所示。

【0296】 結果如下：

1. 外觀和可見異物

【0297】 處方 1~處方 5 樣品在 40°C 條件下放置 4 週和在 25°C 條件下放置 2 月，外觀、可見異物均合格。

2. 蛋白含量

【0298】 蛋白含量檢測結果如表19所示。

表19 處方篩選蛋白含量結果(UV法，mg/ml)

樣品名稱	0天	40°C			25°C	
		1週	2週	4週	1月	2月
處方1	51.8	51.5	51.4	51.5	50.8	51.7
處方2	52.5	52.7	52.7	52.3	52.5	52.1
處方3	52.3	52.3	52.0	51.8	52.7	52.3
處方4	52.3	52.3	52.0	51.8	52.7	52.3
處方5	53.4	53.2	52.8	52.5	52.7	52.1

【0299】 表19表明，在40°C條件下放置4週和在25°C條件下放置2月，各處方樣品蛋白含量均未發生顯著變化。

3. 純度

【0300】 純度(SEC-HPLC法和非還原型CE-SDS法)結果如表20所示。

表20 處方篩選純度結果

檢測項	樣品名稱	0天	40°C			25°C	
			1週	2週	4週	1月	2月
純度 (SEC-HP LC法)	處方1	99.6	99.1	98.8	98.2	99.3	98.9
	處方2	99.6	98.7	98.4	97.2	99.1	98.7
	處方3	99.6	98.5	98.0	96.6	99.0	98.4
	處方4	99.6	98.5	98.0	96.8	99.0	98.5
	處方5	99.5	98.9	98.6	97.9	99.2	98.9
純度(非	處方1	94.5	94.5	93.9	93.0	94.3	93.6
	處方2	94.4	94.4	93.7	92.8	94.0	93.3

還原型 CE-SDS 法)	處方3	94.5	94.3	93.7	92.6	94.1	93.1
	處方4	94.3	94.3	94.0	92.9	93.9	93.4
	處方5	94.4	94.4	94.0	93.0	94.3	93.8

【0301】 表20表明，在40℃條件下放置4週和在25℃條件下放置2月，各處方樣品純度(非還原型CE-SDS法)均未發生顯著變化。在40℃條件下放置4週，處方1~處方5樣品純度(SEC-HPLC法)均發生顯著變化，與0天比較，純度(SEC-HPLC法)分別下降1.4%、2.4%、3.0%、2.8%和1.6%。其變化趨勢見圖7。在25℃條件下放置2月，處方3和處方4純度(SEC-HPLC法)下降1.2%和1.1%，超出判斷標準。綜上所述，處方1和處方5優於其他處方。

4. 電荷變異體

【0302】 電荷變異體(iCIEF法)結果如表21所示，其變化趨勢如圖8至圖11所示。

表21 處方篩選電荷變異體結果

樣品名稱		0天	40℃			25℃	
			1週	2週	4週	1月	2月
處方1	酸性組分	20.9	24.2	29.2	35.8	23.4	27.7
	主成分	77.8	73.6	68.1	61.3	74.8	70.4
	鹼性組分	1.3	2.2	2.7	3.0	1.9	2.0
處方2	酸性組	21.6	24.4	28.2	34.8	22.9	27.2

	分						
	主成分	77.4	73.7	69.2	62.3	74.9	70.8
	鹼性組分	1.0	1.9	2.6	2.9	2.2	2.0
處方 3	酸性組分	21.8	23.9	27.6	34.2	22.9	26.5
	主成分	77.1	74.3	69.6	63.1	75.0	71.4
	鹼性組分	1.1	1.8	2.8	2.7	2.1	2.0
處方 4	酸性組分	21.8	24.3	29.1	35.4	23.3	27.9
	主成分	77.2	73.9	68.3	61.9	74.5	69.9
	鹼性組分	1.0	1.7	2.6	2.7	2.2	2.2
處方 5	酸性組分	21.6	24.0	26.9	32.4	22.3	26.1
	主成分	77.3	74.2	70.5	64.6	75.5	71.9
	鹼性組分	1.1	1.9	2.6	3.0	2.2	2.1

【0303】 結果表明，在 40℃ 條件下放置 4 週，各處方樣品電荷變異體主成分和酸性組分均發生明顯變化。與 0 天比較，處方 1、處方 2、處方 3、處方 4 和處方 5 樣品主成分分別下降 16.5%、15.1%、14%、15.3% 和 12.7%，酸性組分分別上升 14.9%、13.2%、12.4%、13.6% 和 10.8%。在 25℃ 條件下放置 2 月，各處方樣品主成分和酸性組分均發生明顯變化，與 0 天比較，各處方樣品主成分分別下降 7.4%、6.6%、5.7%、7.3% 和 5.4%，酸性組分分別上升 6.8%、5.6%、

4.7%、6.1%和4.5%。綜上所述，從電荷變異體檢測結果分析，處方5優於其他處方。

5. 聚山梨酯

【0304】 聚山梨酯結果如表22所示。

表22 處方篩選聚山梨酯80 (HPLC-FLD法)結果

樣品名稱	時間		
	0 天	2 週	4 週
處方 1	0.51	0.50	0.31
處方 2	0.50	0.50	0.31
處方 3	0.50	0.50	0.31
處方 4	0.50	0.53	0.49
處方 5	0.52	0.54	0.51

【0305】 表22表明，在40℃條件下放置4週，處方1、處方2和處方3聚山梨酯80均下降，處方4和處方5聚山梨酯80未發生下降。

【0306】 上述實驗結果表明，從純度(SEC-HPLC法)結果分析，可以排除處方2、處方3和處方4；從電荷變異體結果分析，處方5優於其他處方。選擇處方5開展後續振盪和凍融實驗。

6. 振盪實驗

【0307】 處方5樣品的振盪實驗結果如表23所示。

表23 處方篩選振盪結果

樣品名稱	檢測指標	時間(天)
------	------	-------

		0	5 天	
處方5	外觀(觀察法)	合格	合格	
	可見異物(可見異物檢查法)	合格	合格	
	蛋白含量(UV 法, mg/ml)	50.8	50.7	
	電荷變異體 (iCIEF法, %)	酸性組分	16.5	16.8
		主成分	82.2	82.0
		鹼性組分	1.3	1.2
	純度(SEC-HPLC 法, %)	99.6	99.6	
純度(非還原型 CE-SDS 法, %)	96.3	96.3		

【0308】 表23表明，在室溫、避光650 r/min條件下振盪5天，處方5外觀、可見異物均合格；蛋白含量、純度和電荷變異體均未發生明顯變化。

7. 凍融實驗

【0309】 凍融實驗結果如表24所示。

表24 處方篩選凍融結果

樣品名稱	檢測指標	凍融迴圈次數(次)		
		0	6	
處方5	外觀(觀察法)	合格	合格	
	可見異物(可見異物檢查法)	合格	合格	
	蛋白含量(UV 法, mg/ml)	50.8	50.7	
	電荷變異體 (iCIEF法, %)	酸性組分	16.5	16.0
		主成分	82.2	83.0
		鹼性組分	1.3	1.0
	純度(SEC-HPLC 法, %)	99.6	99.7	
純度(非還原型 CE-SDS 法, %)	96.3	96.3		

【0310】 表24表明，反復凍融6次後，處方5樣品外觀、可見異物均合格；蛋白含量、純度和電荷變異體均未發生明顯變化。

【0311】 綜合上述實驗結果及製劑處方開發平臺經驗，最終選定處方5為IBI319製劑處方。為獲得穩健並易於實現的生產工藝，選用固定配比的鹽酸組胺酸和組胺酸來實現pH 5.7。其組成：50.0 mg/ml IBI319、0.57 mg/ml組胺酸、1.33 mg/ml鹽酸組胺酸、25.00 mg/ml山梨醇、16.85 mg/ml鹽酸精胺酸、0.01 mg/ml依地酸二鈉、0.50 mg/ml聚山梨酯80，pH 5.7。

【序列表】

<110> 信達生物製藥(蘇州)有限公司

<120> 重組抗程式性細胞死亡受體1和抗分化抗原簇137雙特異性抗體製劑及其用途

<150> 202010055492.X

<151> 2020-01-17

<160> 41

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Ala Arg Asp Leu Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Tyr Phe Asp Leu

1 5 10 15

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Tyr Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

第 2 頁，共 44 頁(序列表)

	85	90	95
Ala Arg Asp Leu Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Tyr Phe Asp Leu Trp			
	100	105	110
Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
	115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr			
	130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
145	150	155	160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
	165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
	180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn			
	195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Asp Ser			
	210	215	220
Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala			
225	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
	245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
	260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			

第 4 頁，共 44 頁(序列表)

<210> 6

<211> 1356

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

caggttcagt tggtgcaatc aggcgcagag gtaaaaaaac caggggccag cgtgaaagtc 60
tcatgtaagg cctccggcgg aacattctcc tctacgcta tttcttgggt gagatacgcc 120
cctgggcagg gacttgagtg gatgggaggc attattccca tattcggcac agccaattac 180
gcgcaaaaat tccaggggag ggftactata acagcagatg agagtacatc aactgcgtac 240
atggaactga gctccctgag gagcgaagac accgctgttt actactgcgc tagagatctt 300
gagacgaccg cacctgcgac gtactttgat ctctggggta gaggaacct cgtaacagtg 360
tcttccgcta gcaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctgctc caagagcacc 420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag 540
tctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600
cagacctaca tctgcaactg gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660
gagccccgatt ctggtgacaa aactcacaca tgccccacct gccccagcacc tgaagccgcc 720
gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaaccaagg acacctcat gatctccccg 780
acctctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc 840
aactggtatg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
taccagagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccctcc tgcaccaaga ctggctgaat 960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1020
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acacctgcc cccateccgg 1080
ggggacatga ccaagaacca agtccagctg acctgcctgg tcaaaggctt ctateccagc 1140

第 6 頁，共 44 頁(序列表)

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
 cccgtgctgg actecgacgg ctctctcttc ctctcttcca agctcacctt ggacaagagc 1260
 aggtggcagc aggggaacgt ctctctatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggcaaa 1356

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser Leu Gly

1 5 10

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

Phe Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 9

Gln Gln Gly Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 10

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Phe Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

第 8 頁，共 44 頁(序列表)

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Phe Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Lys Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

第9頁，共44頁(序列表)

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 12

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12

gacattagaa tgacacagtc acctccaagt ctgtcagcca gtgtttggcga cggggtgact 60

atcacctgcc aggcttccca agacattggt aatagtttgg gttggtacca gcgcaaacca 120

ggcgatgctc cgaaactggt tatttttgac gccagtgatt tggagacagg tgtgccttct 180

cggtttagcg gttctgggtc aggaactgat ttttactga caatatcttc actgcagccg 240

gaagacttcg ccacctatta ttgccagcag gggaactcct tcccactcac cttegggtcaa 300

gggacccggc ttgagattaa gcggacggta gctgccccct ctgtgttcat tttccccca 360

agcaaggagc agctgaagag cggcacggcc agcgtggtat gtctgctgaa taacttttac 420

cctcgggagg ccaaagtgca gtggaaggtc gataatgctc ttcaatccgg gaactcacag 480

第 10 頁，共 44 頁(序列表)

gaatctgtca ccgaacaaga cagcaaggat agcacgtaca gcctgtctag cactctgacc 540
 ctttccaaag cagactacga aaaacataaa gtctacgcgt gcgaagtgac ccaccagggg 600
 ctcagctcac cggtgacgaa atccttcaac cgcggcgaat gc 642

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 13

Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5 10

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

Leu Ile Ile Pro Ser Phe Asp Thr Ala Gly Tyr Ala Gln Glu Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15

Ala Arg Ala Glu His Ser Ser Thr Gly Thr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Leu Ile Ile Pro Ser Phe Asp Thr Ala Gly Tyr Ala Gln Glu Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Glu His Ser Ser Thr Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

第 12 頁，共 44 頁(序列表)

100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 17
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 17
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Leu Ile Ile Pro Ser Phe Asp Thr Ala Gly Tyr Ala Gln Glu Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Glu His Ser Ser Thr Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

第 13 頁，共 44 頁(序列表)

115	120	125	
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
130	135	140	
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val Ala Thr Gly Pro Ala Val			
165	170	175	
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
180	185	190	
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
195	200	205	
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			

第 14 頁，共 44 頁(序列表)

305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Ser
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Met Cys Leu Val Tyr Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Val Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 18

<211> 1350

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

第 15 頁，共 44 頁(序列表)

<400> 18

caagtgcaac tgggtgcaatc aggggctgag gtgaagaagc ctggaagtag cgttaaagtc	60
agttgcaaag cgtccgggtgg gacatttagc agctatgcc a tcagctgggt tcggaaggca	120
cccggccagg gactggagtg gatgggactc ataateccga gctttgacac tgctggttac	180
gcacaggagt ttcaaggag ggtggcgatc acagtggacg aatcaaccag caccgcgtat	240
atggagctgt catctctgag gtcagaagac accgctgttt actattgtgc ccgcgctgag	300
cattcttcca ccgggacctt cgattactgg ggacaaggaa ccttggteac agtatcatca	360
gctagcacea agggcccac cgtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg	420
ggcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg gccaccggcc cggtcttctt acagtcctca	540
ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	660
aatctttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaagc cgcgggggga	720
ccgtcagtet tectcttccc cccaaaacc aaggacacc tcattgatctc ccggaccctt	780
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	840
tatgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtaccag	900
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aagactggct gaatggcaag	960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtccacc tgcceccac cggggaggag	1080
atgaccaaga accaagtcag cctgatgtgc ctggctctat gcttctatcc cagcgacatc	1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gctcccgtg	1200
ctggactccg acggctcctt ctctctctat tccgtgtctc ccgtggacaa gacgaggtgg	1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa	1350

第 16 頁，共 44 頁(序列表)

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 20

Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 21

Gln Gln Ala Asn His Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 22

Arg Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn His Leu Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 212

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 23

Arg Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn His Leu Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gln Pro Lys Ala

100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala

115 120 125

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

130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val

145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Trp

165 170 175

第 19 頁，共 44 頁(序列表)

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr

180

185

190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala

195

200

205

Pro Thr Glu Cys

210

<210> 24

<211> 636

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 24

cgcatccaga tgacacagtc accttcaagc gtctccgcct ccgtgggaga cagggttact	60
attacatgta gggccagcca ggggatctct tcatggctgg cgtggtacca agacaagcca	120
ggcaaagecc ccaagctcct tatctccgct gcctcctctc tgcagtcegg agttccctcc	180
cgttcagcg gtagcgggtc aggcactgac ttcacctta caatctcttc tctgcaacct	240
gaggacttgc ccacatatta ttgccagcag gcaaaccatt tgccatttac ttttggcgga	300
ggtactaagg ttgagattaa aggccagcct aaagctgccc ctagegttac ccttttccca	360
ccgagctccg aggagctgca ggccaataaa gcaaccttgg tctgctacat atcagatctt	420
taccttggcg ccgtgaccgt agcatggaaa gctgattcat cccctgtgaa ggccggtggt	480
gaaactaaa ccccttccaa acaatctaac aataaatacg cggcatggtc ctacctgtcc	540
ttgacaccg agcagtggaa atctcacaga tcttacagct gccaggtcac ccacgagggg	600
agcactgtgg agaagaccgt cgcgcccact gactgc	636

<210> 25

<211> 288

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 25

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100 105 110

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

115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

第 21 頁，共 44 頁(序列表)

145 150 155 160
 Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175
 Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190
 Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205
 Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220
 Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240
 Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255
 Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270
 Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> 26

<211> 255

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 26

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

第 22 頁，共 44 頁(序列表)

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

第 23 頁，共 44 頁(序列表)

195	200	205	
Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe			
210	215	220	
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly			
225	230	235	240
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			
	245	250	255

<210> 27

<211> 330

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 27

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

第 24 頁，共 44 頁(序列表)

	85		90		95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys					
	100		105		110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro					
	115		120		125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys					
	130		135		140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp					
	145		150		155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu					
	165		170		175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu					
	180		185		190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn					
	195		200		205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly					
	210		215		220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu					
	225		230		235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr					
	245		250		255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn					
	260		265		270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe					

第 25 頁，共 44 頁(序列表)

85 90 95
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys
 100 105
 <210> 29
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)
 <400> 29
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 30

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Asp Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

第 28 頁，共 44 頁(序列表)

145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Gly Asp
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Gln Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Ala Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 31

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Lys Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 32

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

第 30 頁，共 44 頁(序列表)

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val Ala Thr Gly Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

第 31 頁，共 44 頁(序列表)

	180		185		190										
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
	195		200		205										
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210		215		220										
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225			230		235										240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Met	Cys	Leu	Val	Tyr	Gly	Phe	Tyr
			245		250										255
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260		265										270
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275		280										285
Leu	Tyr	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
			290		295										300
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305			310		315										320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325		330										

<210> 33

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

第 32 頁，共 44 頁(序列表)

<400> 33

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Tyr Ile Ser Asp

20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro

35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Trp Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys

100 105

<210> 34

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 34

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

1 5 10 15

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

第 33 頁，共 44 頁(序列表)

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

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 35

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Val Ile

第 34 頁，共 44 頁(序列表)

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Ala Glu His Ser Ser Thr Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 37

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

第 36 頁，共 44 頁(序列表)

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 38
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Leu Ile Ile Pro Met Phe Asp Thr Ala Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Glu His Ser Ser Thr Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

第 37 頁，共 44 頁(序列表)

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

<210> 39

<211> 199

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

第 39 頁，共 44 頁(序列表)

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

195

<210> 40

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Met Thr Thr Ala Pro Gly Thr Tyr Phe Asp Leu Trp

100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

第 41 頁，共 44 頁(序列表)

130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu
225 230 235 240
Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser

第 42 頁，共 44 頁(序列表)

325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 41

<211> 149

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 41

Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp

第 43 頁，共 44 頁(序列表)

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

【發明申請專利範圍】

- 【請求項1】** 一種液體抗體製劑，包含重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段以及緩衝劑，優選地所述製劑的pH值為約5.0-7.0；更優選，所述製劑的pH值為約5.5-6.0；進一步優選地，所述pH值為約5.7。
- 【請求項2】** 根據請求項1所述的液體抗體製劑，其特徵在於：所述重組抗程式性細胞死亡受體1 (PD-1)和抗分化抗原簇137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段的含量為約1 mg/mL-150 mg/mL，優選為約10 mg/mL-100 mg/mL，例如，約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90 mg/mL，更優選地為約50.0 mg/ml。
- 【請求項3】** 根據請求項1-2任一項所述的液體抗體製劑，其特徵在於：所述緩衝劑選自組胺酸、鹽酸組胺酸或它們的組合，或者所述緩衝劑選自枸橼酸鹽、枸橼酸鹽溶劑合物(例如，檸檬酸鹽水合物)或它們的組合，例如，枸橼酸鈉、二水枸橼酸鈉或它們的組合，或者所述緩衝劑選自醋酸鹽、醋酸鹽溶劑合物(例如，醋酸鹽水合物)或它們的組合，或者所述緩衝劑選自磷酸鹽、磷酸鹽溶劑合物(例如，磷酸鹽水合物)或它們的組合；優選地，所述緩衝劑的濃度為約5-100mM，更優選地為約5-60 mM，例如，約5、10、15、20、25、30、40、50、60 mM；優選地，所述緩衝劑為組胺酸，所述組胺酸的含量為約

0.775 mg/mL-15.5 mg/mL；更優選地，所述組胺酸的含量為約 0.775 mg/mL-9.3 mg/mL，例如約 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9 mg/mL；進一步優選地，所述組胺酸的含量為約 1.55 mg/ml；

優選地，所述緩衝劑為組胺酸和鹽酸組胺酸的組合，其中所述組胺酸的含量為約 0.270 mg/mL-5.4 mg/mL，所述鹽酸組胺酸的含量 0.660 mg/mL-13.33 mg/mL；更優選地，所述組胺酸的含量為約 0.270 mg/mL-3.24 mg/mL，例如約 0.5、1.0、1.5、2、2.5、3 mg/mL，所述鹽酸組胺酸的含量為約 0.660 mg/mL-8 mg/mL，例如約 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 mg/mL；更優選地，所述組胺酸的含量為約 0.57 mg/ml，所述鹽酸組胺酸的含量為約 1.33 mg/ml。

【請求項4】 根據請求項 1-3 任一項所述的液體抗體製劑，其特徵在於：所述製劑還包含穩定劑，所述穩定劑包括多元醇和/或胺基酸；所述多元醇選自山梨醇、甘露醇、蔗糖、海藻糖、麥芽糖及組合，所述胺基酸包括精胺酸、鹽酸精胺酸、甲硫胺酸、甘胺酸、脯胺酸或其組合；優選地，所述穩定劑選自山梨醇和/或鹽酸精胺酸、山梨醇和/或精胺酸，更優選地，所述穩定劑為山梨醇和鹽酸精胺酸的組合、或山梨醇和精胺酸的組合，優選地，所述精胺酸或鹽酸精胺酸的含量為約 20 mM-200 mM，進一步

第 2 頁，共 12 頁(發明申請專利範圍)

優選地，所述精胺酸或鹽酸精胺酸的含量為約 40 mM-150 mM，例如約 40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150 mM；更優選地，所述精胺酸或鹽酸精胺酸的含量為約 85 mM；

優選地，所述山梨醇的含量為約 10 mg/mL-100 mg/mL，所述鹽酸精胺酸的含量為約 4 mg/mL-42.0 mg/mL；進一步優選地，所述山梨醇的含量為約 20 mg/mL-60 mg/mL，例如約 30、40、50 mg/mL，所述鹽酸精胺酸的含量為約 8.4 mg/mL-33.7 mg/mL，例如約 15、20、25、30 mg/mL；更優選地，所述山梨醇的含量為約 25.00 mg/ml，所述鹽酸精胺酸的含量為約 16.85 mg/ml。

【請求項5】 根據請求項 1-4 任一項所述的液體抗體製劑，其特徵在於：所述製劑還包含表面活性劑；

優選地，所述表面活性劑選自非離子型表面活性劑，例如聚山梨酯 80、聚山梨酯 20、泊洛沙姆和聚乙二醇聚山梨酯 80 中的一種或多種，更優選聚山梨酯 80；

更優選地，所述表面活性劑的含量為約 0.1 mg/mL-1 mg/mL；進一步優選為約 0.3 mg/mL-0.7 mg/mL，例如 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL；進一步優選地為約 0.50 mg/ml。

【請求項6】 根據請求項 1-5 任一項所述的液體抗體製劑，其特徵在於：所述製劑還包含螯合劑；

優選地，所述螯合劑選自依地酸二鈉、二乙基三胺五乙酸和/或 EDTA，更優選依地酸二鈉；

更優選地，所述螯合劑的含量為約 0.005 mg/mL-0.1 mg/mL；進一步優選為約 0.01 mg/mL-0.05 mg/mL，例如約 0.02、0.03、0.04 mg/mL；進一步優選地為約 0.01 mg/ml。

【請求項7】 根據請求項 1-6 任一項所述的液體抗體製劑，其特徵在於：所述製劑含有以下組分：約 50.0 mg/ml 重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1)和抗分化抗原簇 137 (CD137)雙特異性抗體、約 0.57 mg/ml 組胺酸、約 1.33 mg/ml 鹽酸組胺酸、約 25.00 mg/ml 山梨醇、約 16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸、約 0.01 mg/ml 依地酸二鈉、約 0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 約 5.7，餘量為水。

【請求項8】 根據請求項 1-7 任一項所述的液體抗體製劑，其特徵在於，所述抗體或其抗原結合片段包含第一重鏈(HC1)，其包含第一重鏈可變區(HCVR1)和恆定區；第一輕鏈(LC1)，其包含第一輕鏈可變區(LCVR1)和恆定區；第二重鏈(HC2)，其包含第二重鏈可變區(HCVR2)和恆定區；以及第二輕鏈(LC2)，其包含第二輕鏈可變區(LCVR2)和恆定區，其中：

所述 HCVR1 包含 SEQ ID NO: 4 所示的重鏈可變區所含的三個互補決定區域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，並且所述 LCVR1 包含 SEQ ID NO:10 所示

第 4 頁，共 12 頁(發明申請專利範圍)

的輕鏈可變區所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；以及

所述 HCVR2 包含 SEQ ID NO: 16 所示的重鏈可變區中所含的三個互補決定區域(CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，並且所述 LCVR2 包含 SEQ ID NO: 22 所示的輕鏈可變區所含的三個互補決定區域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；優選地

a) 抗體第一重鏈包含：具有胺基酸序列 SEQ ID NO:1 的互補決定區 1 (HCDR1)、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:2 的互補決定區 2 (HCDR2)、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:3 的互補決定區 3 (HCDR3)；

b) 抗體第一輕鏈包含：具有胺基酸序列 SEQ ID NO:7 的互補決定區 1 (LCDR1)、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:8 的互補決定區 2 (LCDR2)、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:9 的互補決定區 3 (LCDR3)；

c) 抗體第二重鏈包含：具有胺基酸序列 SEQ ID NO:13 的互補決定區 1 (HCDR1)、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:14 的互補決定區 2 (HCDR2)、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:15 的互補決定區 3 (HCDR3)；

d) 抗體第二輕鏈包含：具有胺基酸序列 SEQ ID NO:19 的互補決定區 1 (LCDR1)、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:20 的互補決定區 2 (LCDR2)、具有胺基酸序列 SEQ ID NO:21 的互補決定區 3 (LCDR3)。

【請求項9】 根據請求項 1-8 任一項所述的液體抗體製劑，其特徵在於，所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1)和抗分化抗原簇 137 (CD137)雙特異性抗體包含：第一重鏈、第二重鏈以及第一輕鏈和第二輕鏈，其中每條鏈包含可變區和恆定區，其中：

e)抗體第一重鏈可變區(HCVR)包含 SEQ ID NO: 4 的序列或與其具有至少 90%，95%，98%或 99%同源性的序列；

f)抗體第一輕鏈可變區(LCVR)包含 SEQ ID NO: 10 的序列或與其具有至少 90%，95%，98%或 99%同源性的序列；

g)抗體第二重鏈可變區(HCVR)包含 SEQ ID NO: 16 的序列或與其具有至少 90%，95%，98%或 99%同源性的序列；

h)抗體第二輕鏈可變區(LCVR)包含 SEQ ID NO: 22 的序列或與其具有至少 90%，95%，98%或 99%同源性的序列；

優選地，

e)抗體第一重鏈可變區(HCVR)具有胺基酸序列 SEQ ID NO:4；

f)抗體第一輕鏈可變區(LCVR)具有胺基酸序列 SEQ ID NO:10；

g)抗體第二重鏈可變區(HCVR)具有胺基酸序列 SEQ ID NO:16；

第 6 頁，共 12 頁(發明申請專利範圍)

h) 抗體第二輕鏈可變區(LCVR)具有胺基酸序列 SEQ ID NO:22。

【請求項10】 根據請求項 1-9 任一項所述的液體抗體製劑，其特徵在於，所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1)和抗分化抗原簇 137 (CD137)雙特異性抗體包含：第一重鏈、第二重鏈以及第一輕鏈和第二輕鏈，其中每條鏈包含可變區和恆定區，其中：第一重鏈恆定區序列(HCCR)具有胺基酸序列 SEQ ID NO:30，第一輕鏈恆定區序(LCCR)具有胺基酸序列 SEQ ID NO:31，第二重鏈恆定區(HCCR)序列具有胺基酸序列 SEQ ID NO:32，第二輕鏈恆定區(LCCR)序列具有胺基酸序列 SEQ ID NO:33。

【請求項11】 根據請求項 1-10 任一項所述的液體抗體製劑，其特徵在於，所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1)和抗分化抗原簇 137 (CD137)雙特異性抗體包含：第一重鏈、第二重鏈以及第一輕鏈和第二輕鏈，其中：

i) 抗體第一重鏈包含 SEQ ID NO: 5 的序列或與其具有至少 90%，95%，98%或 99%同源性的序列；

j) 抗體第一輕鏈包含 SEQ ID NO: 11 的序列或與其具有至少 90%，95%，98%或 99%同源性的序列；

k) 抗體第二重鏈包含 SEQ ID NO: 17 的序列或與其具有至少 90%，95%，98%或 99%同源性的序列；以及

l) 抗體第二輕鏈包含 SEQ ID NO: 23 的序列或與其具有至少 90%，95%，98%或 99%同源性的序列；

第 7 頁，共 12 頁(發明申請專利範圍)

優選地，

i) 抗體第一重鏈具有胺基酸序列 SEQ ID NO:5；

j) 抗體第一輕鏈具有胺基酸序列 SEQ ID NO:11；

k) 抗體第二重鏈具有胺基酸序列 SEQ ID NO:17；以及

l) 抗體第二輕鏈具有胺基酸序列 SEQ ID NO:23。

【請求項12】 根據請求項 1-11 任一項所述的液體抗體製劑，其特徵在於，所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體包含：第一重鏈、第二重鏈以及第一輕鏈和第二輕鏈，其中，第一重鏈與第一輕鏈之間形成至少一個二硫鍵，第二重鏈與第二輕鏈之間形成至少一個二硫鍵，以及第一重鏈和第二重鏈之間形成至少一個二硫鍵；優選地所述雙特異性抗體是修飾的人 IgG1。

【請求項13】 根據請求項 1-12 中任一項所述的液體抗體製劑，其包含：

(i) 約 1 mg/mL-150 mg/mL 的所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段；

(ii) 約 5-100 mM 的組胺酸；

(iii) 約 10 mg/mL-100 mg/mL 的山梨醇以及約 20 mM-200 mM 精胺酸或鹽酸精胺酸；

(iv) 約 0.1 mg/mL-1 mg/mL 聚山梨酯 80；和

(v)任選地，約 0.005 mg/mL-0.1 mg/mL 的依地酸二鈉，

其中所述液體抗體製劑的 pH 為約 5.0-7.0，例如，約 5.5、6.0、6.5；

例如，所述液體抗體製劑包含

(i)約 10 mg/mL-100 mg/mL 的所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1)和抗分化抗原簇 137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段；

(ii)約 5-60 mM 的組胺酸；

(iii)約 20 mg/mL-60 mg/mL 的山梨醇以及約 8.4 mg/mL-33.7 mg/mL 鹽酸精胺酸；

(iv)約 0.3 mg/mL-0.7 mg/mL 聚山梨酯 80；和

(v)任選地，約 0.01 mg/mL-0.05 mg/mL 的依地酸二鈉，

其中所述液體抗體製劑的 pH 為約 5.5-6.0，例如，約 5.7；

或者，所述液體抗體製劑包含

(i)50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1)和抗分化抗原簇 137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、1.55 mg/ml 組胺酸，50.00 mg/ml 山梨醇，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；或

(ii)50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1)和抗分化抗原簇 137 (CD137)雙特異性抗體或其抗原結合片段、1.55 mg/ml 組胺酸，25.00 mg/ml

山梨醇，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；

(iii) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、1.55 mg/ml 組胺酸，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；

(iv) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、2.94 mg/ml 枸橼酸鈉(二水)，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；

(v) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、2.94 mg/ml 枸橼酸鈉(二水)，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；或

(ii) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、0.57 mg/ml 組胺酸、1.33 mg/ml 鹽酸組胺酸，25.00 mg/ml 山梨醇，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；

(iii) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、0.57 mg/ml 組胺酸、1.33 mg/ml

鹽酸組胺酸，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；

(iv) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、2.94 mg/ml 枸橼酸鈉(二水)，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7；或

(v) 50.0 mg/ml 所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其抗原結合片段、0.57 mg/ml 組胺酸、1.33 mg/ml 鹽酸組胺酸、25.00 mg/ml 山梨醇，16.85 mg/ml 鹽酸精胺酸，0.01 mg/ml 依地酸二鈉，0.50 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.7。

【請求項14】 一種製備請求項 1-13 任一項所述的製劑的方法，包括以下步驟：

- (1) 將除所述表面活性劑之外的成分配製成溶液；
- (2) 透過超濾，採用步驟(1)製備的溶液對所述重組抗程式性細胞死亡受體 1 (PD-1) 和抗分化抗原簇 137 (CD137) 雙特異性抗體或其片段進行換液，然後濃縮至目標濃度；
- (3) 添加所述表面活性劑到步驟(2)製備的液體中。

【請求項15】 一種固體抗體製劑，其透過固化請求項 1-13 中任何一項所述的液體抗體製劑而獲得，所述固化是透過例如結

晶法、噴霧乾燥法、冷凍乾燥法實施的，所述固體抗體製劑例如是凍乾粉針劑形式。

【請求項16】 一種遞送裝置，其包含請求項 1-13 中任何一項的液體抗體製劑或請求項 15 的固體抗體製劑。

【請求項17】 一種預填裝注射器，其包含請求項 1-13 中任何一項的液體抗體製劑或請求項 15 的固體抗體製劑，用於靜脈內注射或者肌內注射。

【請求項18】 請求項 1-13 任一項所述的液體抗體製劑或請求項 15 所述的固體抗體製劑在製備用於預防或治療癌症的遞送裝置或預填裝注射器或藥物中的用途，優選的所述癌症選自黑色素瘤、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、頭頸癌、肝癌、結直腸癌、胰腺癌、胃癌、腎癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宮內膜癌、食道癌、軟組織肉瘤、膽管癌、甲狀腺癌、肝細胞癌或間皮瘤。

【請求項19】 根據請求項 18 所述的用途，其中所述藥物與電離輻射同時、分開或者依次向癌症患者施用；或者與一種或多種化療藥物同時、分開或者依次向癌症患者施用；或者與電離輻射以及一種或多種化療藥物同時、分開或者依次向癌症患者施用，優選地所述化療藥物選自 5-氟尿嘧啶、羥基脲、吉西他濱、甲胺蝶呤、阿黴素、足葉乙甙卡鉑、順鉑、環磷醯胺、美法侖、達卡巴嗪、紫杉醇、喜樹碱、FOLFIRI、FOLFOX、多西紫杉醇、柔紅黴素、紫杉酚、奧沙利鉑或其組合。

【發明圖式】

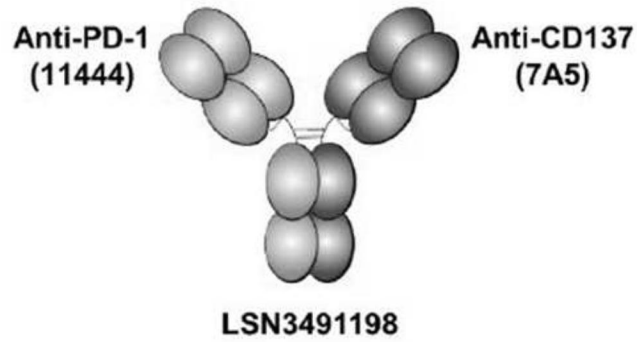


圖1

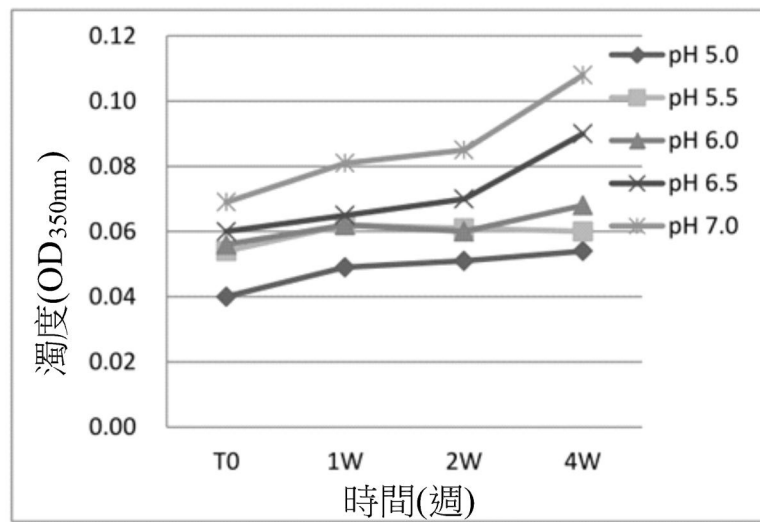


圖2

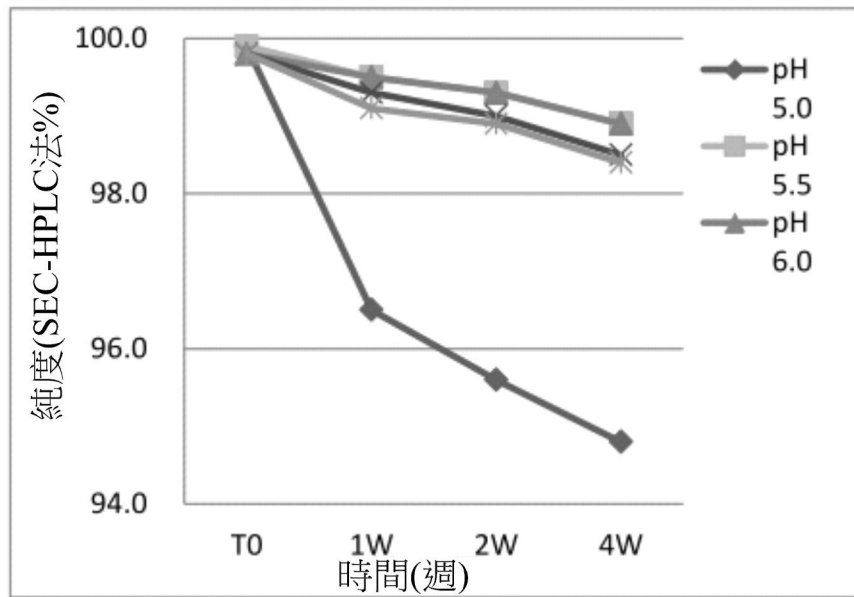


圖3

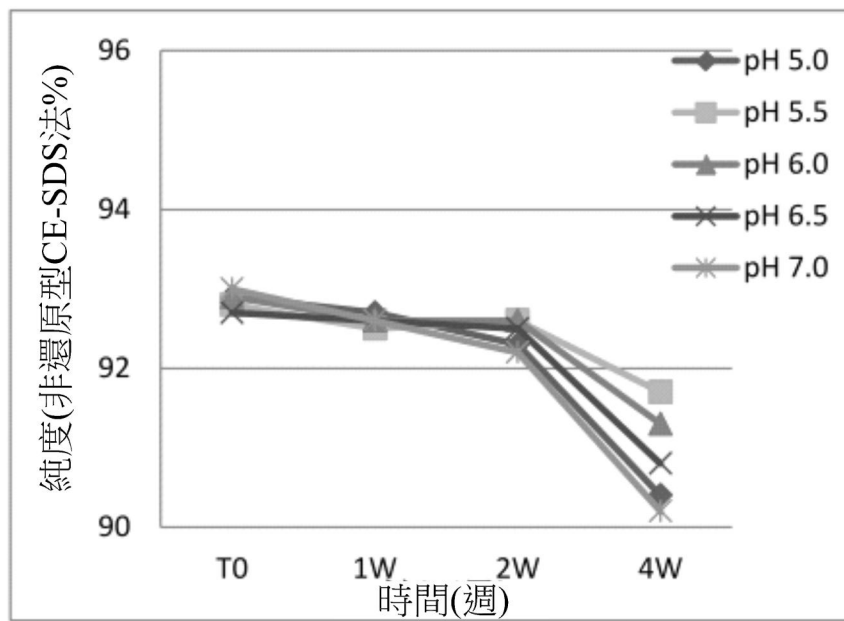


圖4

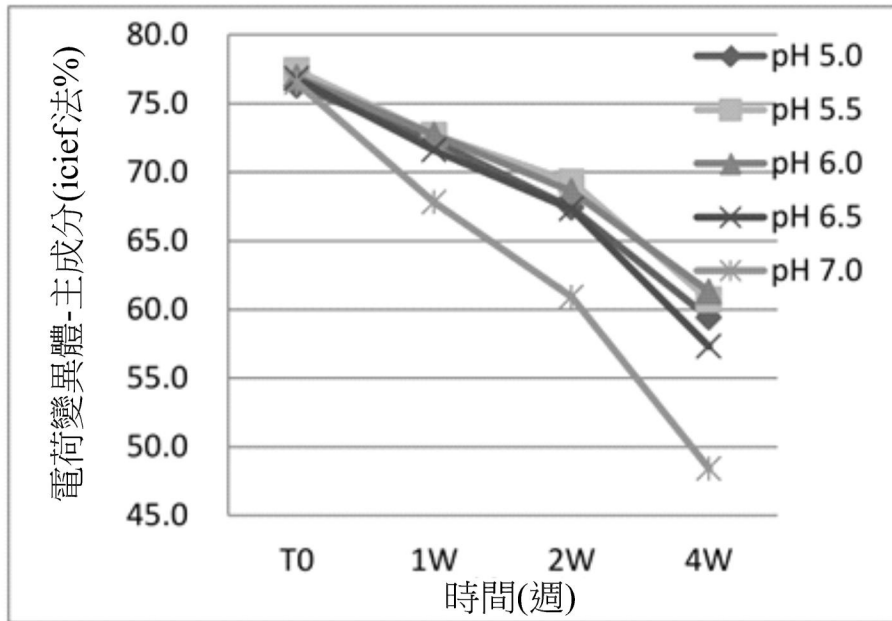


圖5

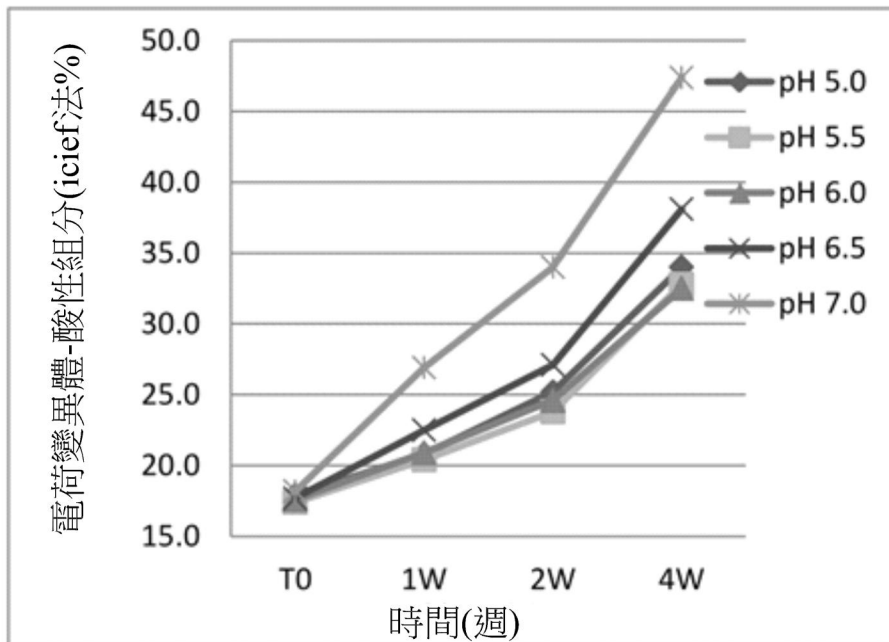


圖6

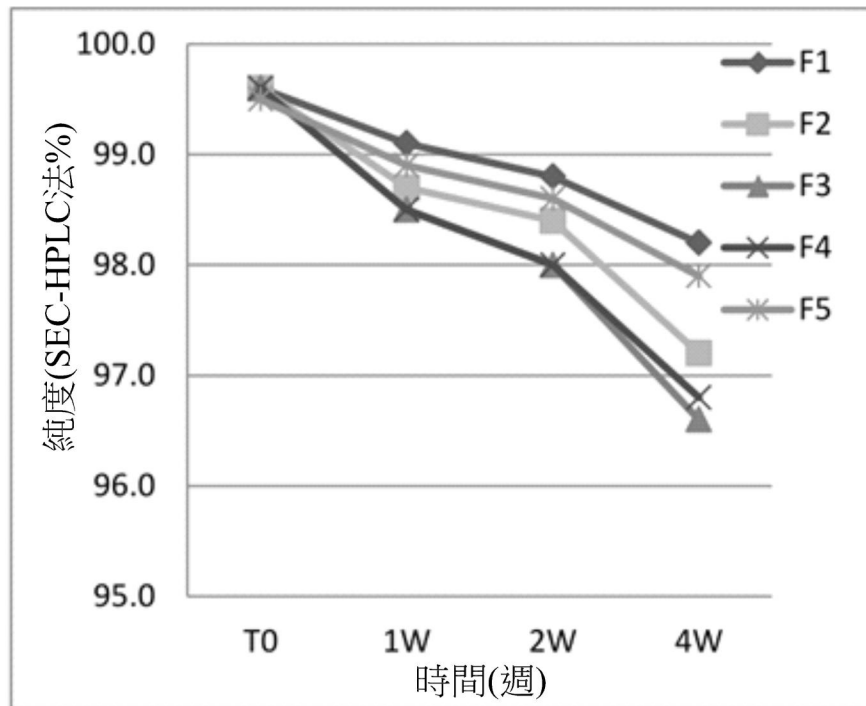


圖7

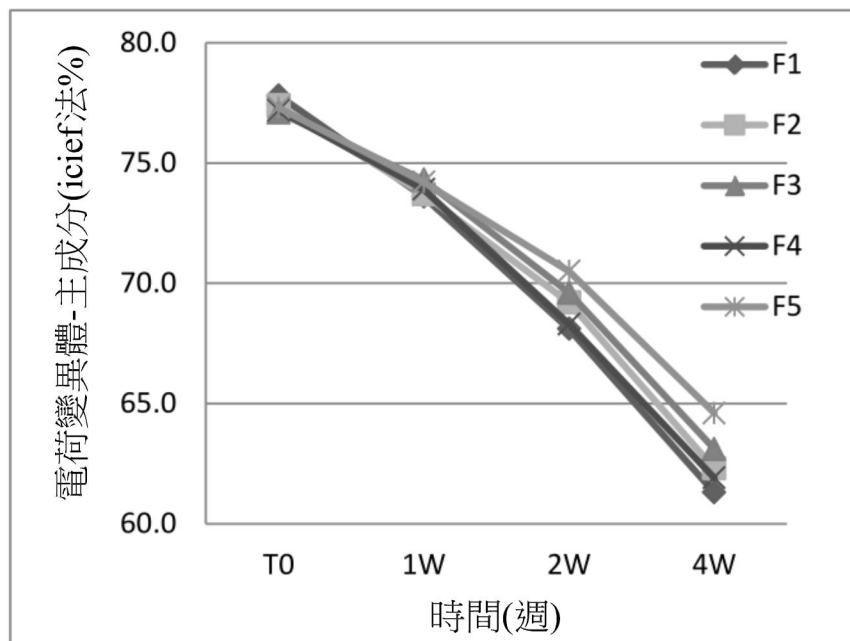


圖8

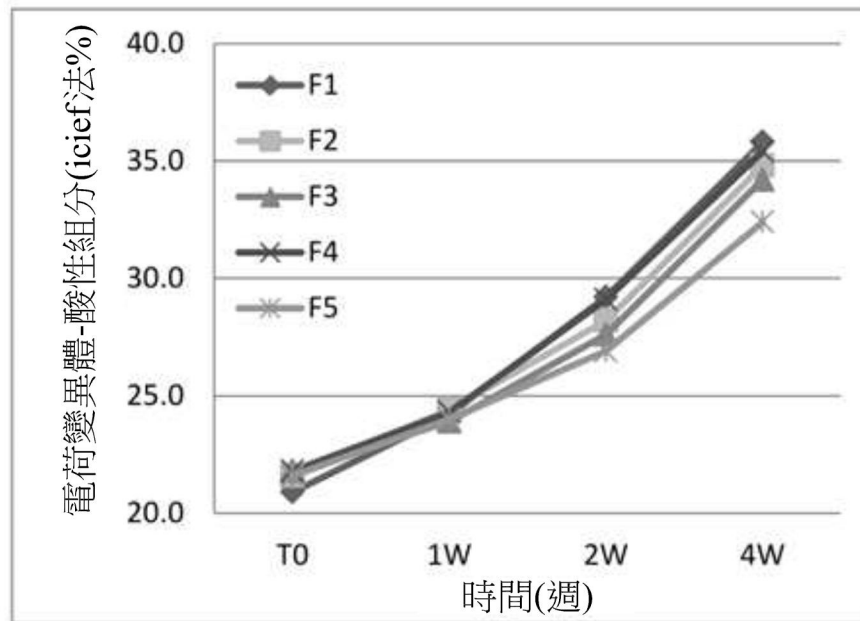


圖9

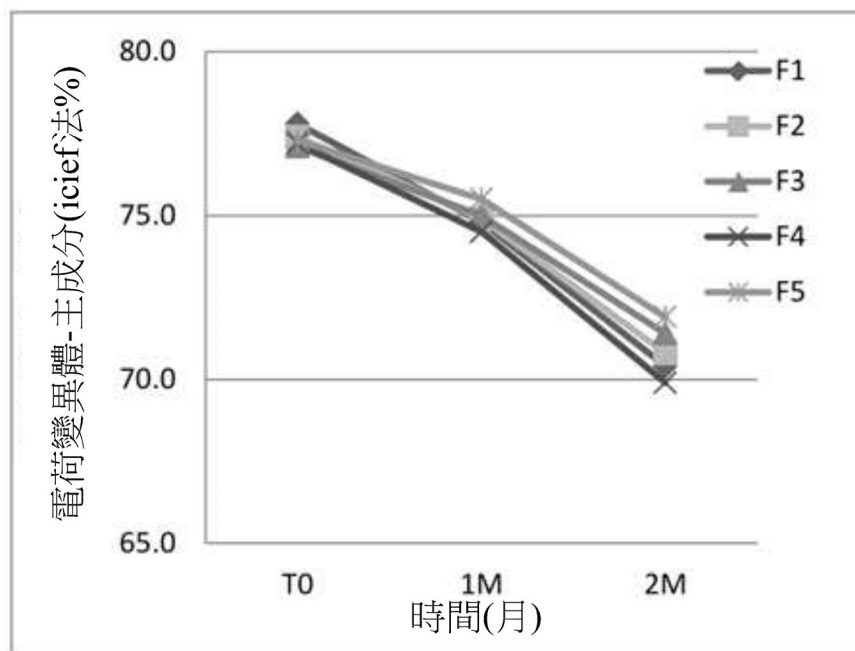


圖10

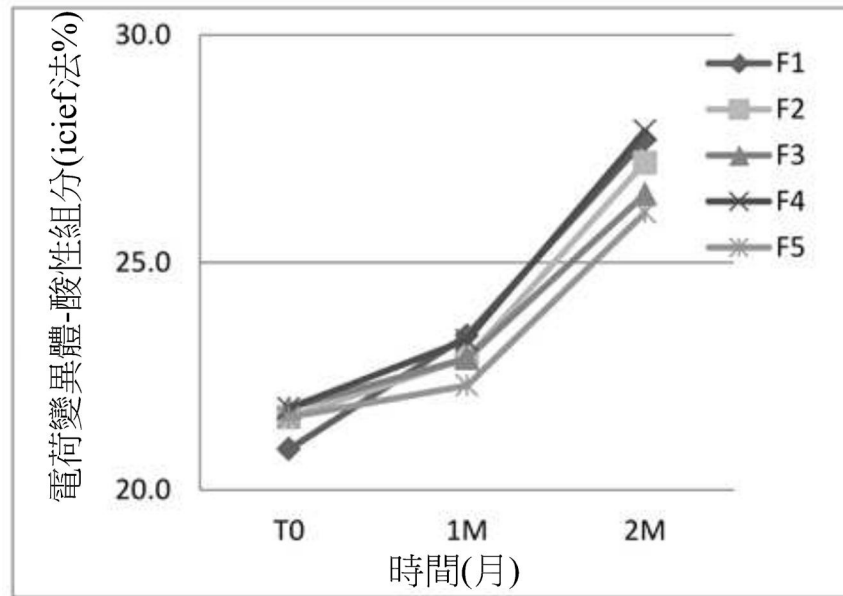


圖11

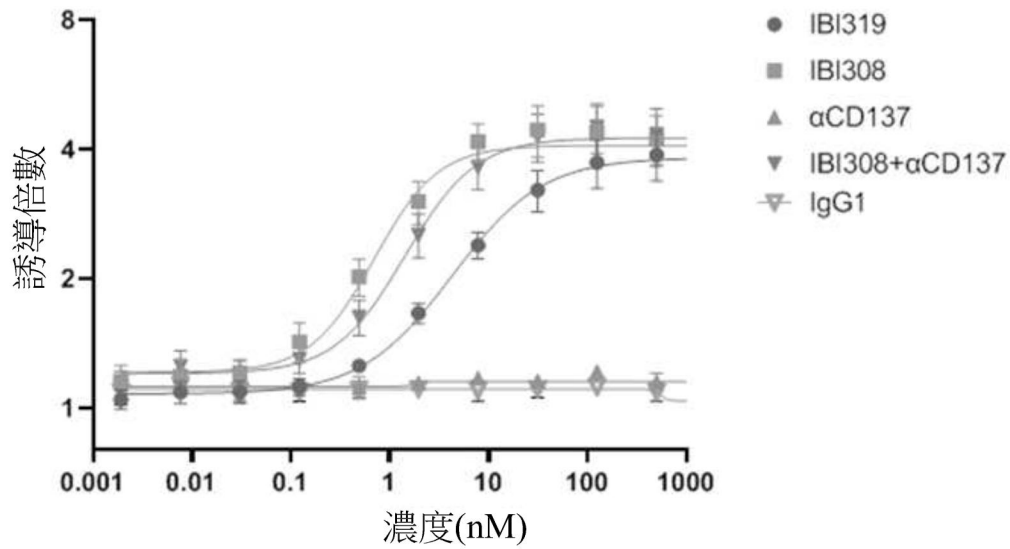


圖12

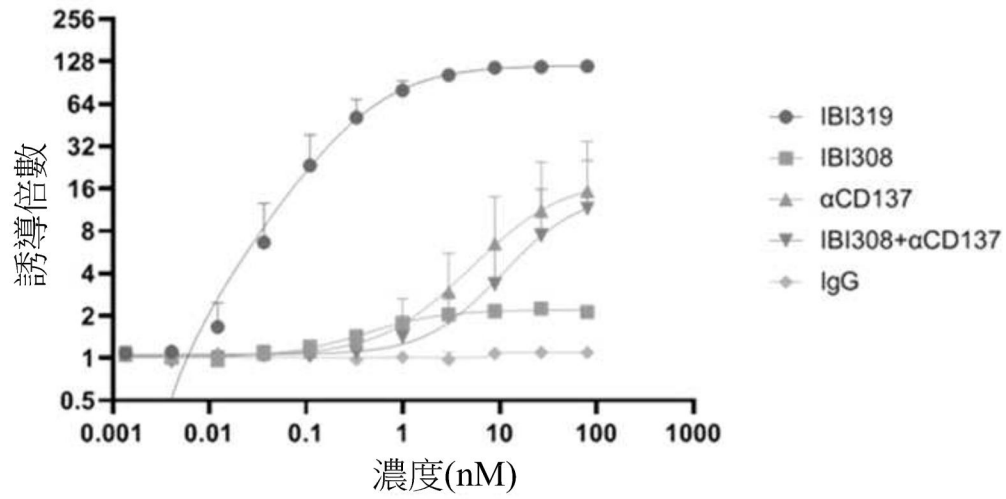


圖13

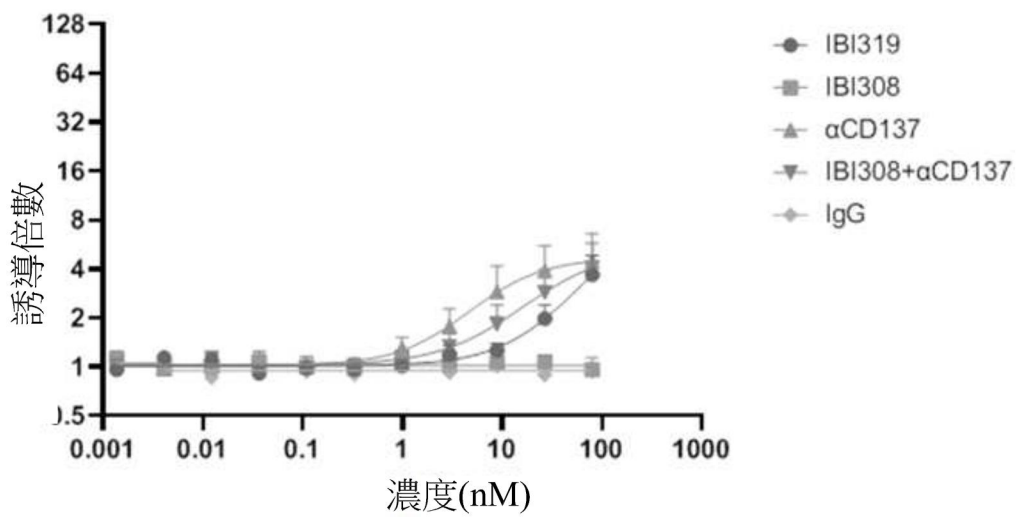


圖14

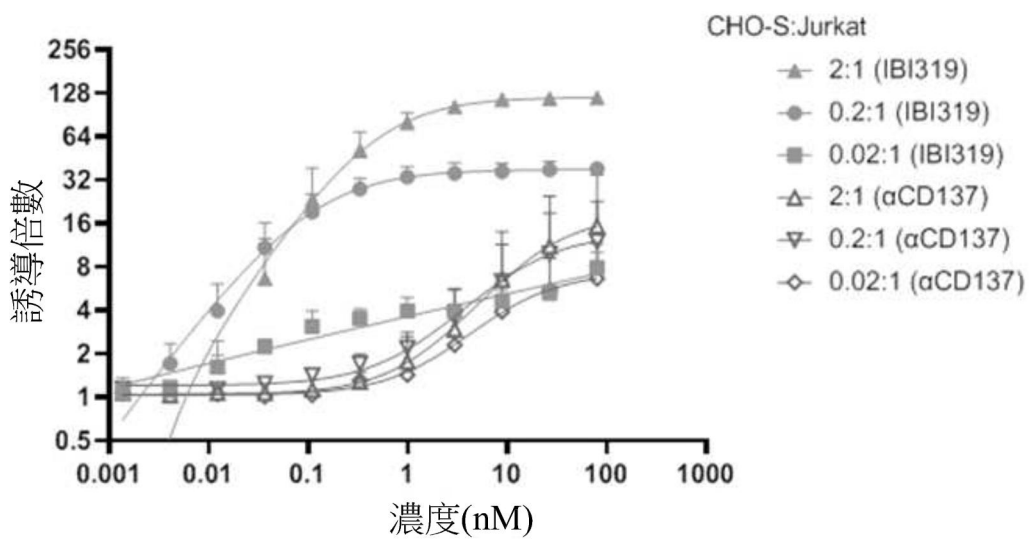


圖15