



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 111356476 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 10

(21) 申请号 201880059038.2	专利权人 上海恒瑞医药有限公司
(22) 申请日 2018.12.21	(72) 发明人 吴婷婷 李皓 刘洵 付雅媛
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111356476 A	(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
(43) 申请公布日 2020.06.30	专利代理师 程伟
(66) 本国优先权数据 201711408330.4 2017.12.22 CN	(51) Int.Cl. A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.03.11	(56) 对比文件 WO 2017037203 A1,2017.03.09 WO 2017037203 A1,2017.03.09 CN 107474137 A,2017.12.15 US 2017022273 A1,2017.01.26 WO 2015198312 A1,2015.12.30
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/CN2018/122534 2018.12.21	审查员 肖愿
(87) PCT国际申请的公布数据 WO2019/120269 ZH 2019.06.27	权利要求书5页 说明书49页 序列表32页 附图5页
(73) 专利权人 江苏恒瑞医药股份有限公司 地址 222047 江苏省连云港市经济技术开 发区昆仑山路7号	

(54) 发明名称

LAG-3抗体药物组合物及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一种LAG-3抗体药物组合物及其用途。所述药物组合物包含在醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐缓冲剂中的LAG-3抗体或其抗原结合片段。该药物组合物还可以含有糖、非离子型表面活性剂和其他辅料。

1. 一种药物组合物,其包含LAG-3抗体或其抗原结合片段,以及缓冲剂,所述缓冲剂选自醋酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂或Tris缓冲剂;其中所述LAG-3抗体或其抗原结合片段选自:

1) 包含如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11所示的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3;和

如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3;和

2) 包含如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3;和

如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20所示的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3。

2. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述的醋酸盐缓冲剂选自醋酸-醋酸钠缓冲剂;所述的组氨酸缓冲剂选自组氨酸-盐酸缓冲剂、组氨酸-醋酸缓冲剂;所述的柠檬酸盐缓冲剂选自柠檬酸-柠檬酸钠缓冲剂;所述的琥珀酸盐缓冲剂选自琥珀酸-琥珀酸钠缓冲剂。

3. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述的缓冲剂为组氨酸-盐酸缓冲剂、醋酸-醋酸钠缓冲剂。

4. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体或其抗原结合片段的浓度为1mg/ml至90mg/ml。

5. 如权利要求4所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体或其抗原结合片段的浓度为40mg/ml至60mg/ml。

6. 如权利要求4所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体或其抗原结合片段的浓度为50mg/ml。

7. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述缓冲剂的pH为5.0至6.5。

8. 如权利要求7所述的药物组合物,其中所述缓冲剂的pH为5.0至6.0。

9. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述缓冲剂浓度为5mM至30mM。

10. 如权利要求9所述的药物组合物,其中所述缓冲剂浓度为10mM至30mM。

11. 如权利要求1所述的药物组合物,其中还包括辅料,所述辅料选自糖和表面活性剂中的一种或多种。

12. 如权利要求11所述的药物组合物,其中所述的糖为二糖。

13. 如权利要求12所述的药物组合物,其中所述的糖为海藻糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇。

14. 如权利要求12所述的药物组合物,其中所述的糖为蔗糖。

15. 如权利要求14所述的药物组合物,其中所述的蔗糖浓度为30mg/ml至90mg/ml。

16. 如权利要求15所述的药物组合物,其中所述的蔗糖浓度为60mg/ml至90mg/ml。

17. 如权利要求15所述的药物组合物,其中所述的蔗糖浓度为75mg/ml。

18. 如权利要求11所述的药物组合物,其中所述的表面活性剂为聚山梨酯。

19. 如权利要求18所述的药物组合物,其中所述的表面活性剂为聚山梨酯80或聚山梨酯20。

20. 如权利要求18所述的药物组合物,其中所述的表面活性剂为聚山梨酯80。

21. 如权利要求18所述的药物组合物,其中所述的表面活性剂的浓度为0.02mg/ml至0.8mg/ml。

22. 如权利要求21所述的药物组合物,其中所述的表面活性剂的浓度为0.2mg/ml至

0.6mg/ml。

23. 如权利要求21所述的药物组合物,其中所述的表面活性剂的浓度为0.3mg/ml至0.5mg/ml。

24. 如权利要求1所述的药物组合物,其包含:

i) (a) 1mg/ml至90mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (b) 5mM至30mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH为5.0-6.5, (c) 30mg/ml至90mg/ml的蔗糖和 (d) 0.02mg/ml至0.8mg/ml的聚山梨酯80; 或

ii) (a) 1mg/ml至90mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (b) 5mM至30mM的组氨酸-盐酸缓冲剂, pH为5.0-6.5, (c) 30mg/ml至90mg/ml的蔗糖或海藻糖和 (d) 0.05mg/ml至0.6mg/ml的聚山梨酯80。

25. 如权利要求24所述的药物组合物,其包含:

(e) 40mg/ml至80mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (f) 10mM至30mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH为5.2-5.8, (g) 70mg/ml至80mg/ml的蔗糖和 (h) 0.4mg/ml至0.5mg/ml的聚山梨酯80; 或所述药物组合物包含:

(e) 45mg/ml至60mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (f) 10mM至30mM的组氨酸-盐酸缓冲剂, pH为5.5-6.0, (g) 60mg/ml至90mg/ml的蔗糖或海藻糖和 (h) 0.2mg/ml至0.6mg/ml的聚山梨酯80。

26. 如权利要求1所述的药物组合物,其包含:

50mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (j) 10mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH为5.5, (k) 75mg/ml的蔗糖, (l) 0.4mg/ml的聚山梨醇酯80。

27. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25任一序列所示;

其中所述的轻链可变区如SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28任一所示。

28. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体包含选自如下所示的重链可变区和轻链可变区的组合:

- 1) SEQ ID NO:21的重链可变区和SEQ ID NO:22的轻链可变区;
- 2) SEQ ID NO:21的重链可变区和SEQ ID NO:26的轻链可变区;
- 3) SEQ ID NO:21的重链可变区和SEQ ID NO:27的轻链可变区;
- 4) SEQ ID NO:21的重链可变区和SEQ ID NO:28的轻链可变区;
- 5) SEQ ID NO:23的重链可变区和SEQ ID NO:22的轻链可变区;
- 6) SEQ ID NO:23的重链可变区和SEQ ID NO:26的轻链可变区;
- 7) SEQ ID NO:23的重链可变区和SEQ ID NO:27的轻链可变区;
- 8) SEQ ID NO:23的重链可变区和SEQ ID NO:28的轻链可变区;
- 9) SEQ ID NO:24的重链可变区和SEQ ID NO:22的轻链可变区;
- 10) SEQ ID NO:24的重链可变区和SEQ ID NO:26的轻链可变区;
- 11) SEQ ID NO:24的重链可变区和SEQ ID NO:27的轻链可变区;
- 12) SEQ ID NO:24的重链可变区和SEQ ID NO:28的轻链可变区;

- 13) SEQ ID NO:25的重链可变区和SEQ ID NO:22的轻链可变区;
- 14) SEQ ID NO:25的重链可变区和SEQ ID NO:26的轻链可变区;
- 15) SEQ ID NO:25的重链可变区和SEQ ID NO:27的轻链可变区;和
- 16) SEQ ID NO:25的重链可变区和SEQ ID NO:28的轻链可变区。

29. 如权利要求28所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体包含重链恒定区和轻链恒定区。

30. 如权利要求29所述的药物组合物,其中所述的重链恒定区如SEQ ID NO:38所示;其中所述的轻链恒定区如SEQ ID NO:39所示。

31. 如权利要求30所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示或与其具有至少95%的序列同一性,轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示或与其具有至少95%的序列同一性。

32. 如权利要求1所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区氨基酸序列选自SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:33任一所示的序列,和

其中所述的轻链可变区氨基酸序列选自SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37任一所示的序列。

33. 如权利要求32所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体包含选自以下的重链可变区和轻链可变区的组合:

- 1) SEQ ID NO:29的重链可变区和SEQ ID NO:30的轻链可变区;
- 2) SEQ ID NO:29的重链可变区和SEQ ID NO:34的轻链可变区;
- 3) SEQ ID NO:29的重链可变区和SEQ ID NO:35的轻链可变区;
- 4) SEQ ID NO:29的重链可变区和SEQ ID NO:36的轻链可变区;
- 5) SEQ ID NO:29的重链可变区和SEQ ID NO:37的轻链可变区;
- 6) SEQ ID NO:31的重链可变区和SEQ ID NO:30的轻链可变区;
- 7) SEQ ID NO:31的重链可变区和SEQ ID NO:34的轻链可变区;
- 8) SEQ ID NO:31的重链可变区和SEQ ID NO:35的轻链可变区;
- 9) SEQ ID NO:31的重链可变区和SEQ ID NO:36的轻链可变区;
- 10) SEQ ID NO:31的重链可变区和SEQ ID NO:37的轻链可变区;
- 11) SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:30的轻链可变区;
- 12) SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:34的轻链可变区;
- 13) SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:35的轻链可变区;
- 14) SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:36的轻链可变区;
- 15) SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:37的轻链可变区;
- 16) SEQ ID NO:33的重链可变区和SEQ ID NO:30的轻链可变区;
- 17) SEQ ID NO:33的重链可变区和SEQ ID NO:34的轻链可变区;
- 18) SEQ ID NO:33的重链可变区和SEQ ID NO:35的轻链可变区;
- 19) SEQ ID NO:33的重链可变区和SEQ ID NO:36的轻链可变区;和
- 20) SEQ ID NO:33的重链可变区和SEQ ID NO:37的轻链可变区。

34. 如权利要求33所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体包含重链恒定区和轻链恒定

区。

35. 如权利要求34所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体包含如SEQ ID NO:38所示的重链恒定区;和如SEQ ID NO:39所示的轻链恒定区。

36. 如权利要求35所述的药物组合物,其中所述LAG-3抗体的重链氨基酸序列选自SEQ ID NO:42所示的序列或与其具有至少95%的序列同一性序列,轻链氨基酸序列选自SEQ ID NO:43所示的序列或与其具有至少95%的序列同一性的序列。

37. 制备权利要求1至36任一项所述的药物组合物的方法,包括将LAG-3抗体或其抗原结合片段与缓冲剂混合,所述缓冲剂选自醋酸-醋酸钠缓冲剂、组氨酸-盐酸缓冲剂、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲剂、琥珀酸-琥珀酸钠缓冲剂或Tris缓冲剂。

38. 制备权利要求37所述的药物组合物的方法,包括将LAG-3抗体或其抗原结合片段与缓冲剂混合,所述缓冲剂选自醋酸-醋酸钠缓冲剂和组氨酸-盐酸缓冲剂。

39. 制备含LAG-3抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的方法,其包括将权利要求1至36任一项所述的药物组合物经冷冻干燥的步骤。

40. 如权利要求39所述制备含LAG-3抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的方法,其中所述冷冻干燥依次包括预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。

41. 如权利要求40所述制备含LAG-3抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的方法,其中所述的一次干燥温度为-5℃至-20℃。

42. 如权利要求40所述制备含LAG-3抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的方法,其中所述的一次干燥温度为-10℃。

43. 一种由权利要求39至41任一项所述的方法制备所得含LAG-3抗体或其抗原结合片段的冻干制剂。

44. 一种含LAG-3抗体或其抗原结合片段的冻干制剂,其特征在于所述冻干制剂复溶后可形成权利要求1至36任一项所述的药物组合物。

45. 制备含有LAG-3抗体或其抗原结合片段的复溶溶液的方法,其中包括将权利要求43或44所述的冻干制剂经复溶的步骤,其复溶所用溶剂为注射用水。

46. 一种由权利要求45所述的方法制备所得含有LAG-3抗体或其抗原结合片段的复溶溶液。

47. 如权利要求46所述的LAG-3抗体或其抗原结合片段的复溶溶液,其包含如下成分:

i) (a) 40mg/ml至80mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (b) 10mM至30mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH为5.2-5.8, (c) 70mg/ml至80mg/ml的蔗糖, 和 (d) 0.4mg/ml至0.5mg/ml的聚山梨酯80; 或

ii) (a) 45mg/ml至60mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (b) 10mM至30mM的组氨酸-盐酸缓冲剂, pH为5.5-6.0, (c) 60mg/ml至90mg/ml的蔗糖或海藻糖, 和 (d) 0.2mg/ml至0.6mg/ml的聚山梨酯80。

48. 权利要求1至36任一项所述的药物组合物或权利要求43或44所述的冻干制剂或权利要求46或47所述的复溶溶液在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

49. 权利要求48所述的用途,其中所述的癌症选自卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、肠癌、胃癌、食管癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌、肝癌、膀胱癌、子宫颈癌、口腔癌、脑癌、睾丸癌、皮肤癌、甲状腺癌、脑胶质瘤以及血液学恶性肿瘤。

50. 权利要求49所述的用途,其中所述的血液学恶性肿瘤选自骨髓瘤、慢性白血病和急性白血病。

51. 一种制品,其包括容器,该容器中装有权利要求1至36任一项所述的药物组合物或权利要求43或44所述的冻干制剂或权利要求46或47所述的复溶溶液。

LAG-3抗体药物组合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于药物制剂领域,具体地本发明涉及一种包含LAG-3抗体及其抗原结合片段的药物组合物,以及其作为药物的用途。

背景技术

[0002] 淋巴细胞活化基因3 (lymphocyte activation gene-3, 也称LAG-3, CD215) 是免疫球蛋白超家族的一员,可负性调节免疫细胞的各项功能和生存周期。已有研究表明,LAG-3在病毒感染、自身免疫疾病以及肿瘤所致的免疫系统功能紊乱中发挥着重要作用,通过影响LAG-3的功能可以改善这些疾病演进过程中免疫功能失常状态,从而改善疾病的预后。

[0003] LAG-3作为免疫球蛋白超家族的一员,由胞外区、跨膜区和胞质区3个部分组成。成熟的LAG-3分子包括470个氨基酸,相对分子量为70kDa,1990年由Triebel 等首次发现 (J Exp Med, 1990, 171 (5): 1393-405)。研究发现,LAG-3与CTLA-4、PD-1 一样,是一个负性共刺激分子,其激活可负向调控淋巴细胞功能。LAG-3在结构上与CD4密切相关,但却有着与CD4截然相反的功能,表现在LAG-3与CD4分子具有较高的相似性,可与MHC-II (主要组织相容性复合体) 类分子结合。但是,LAG-3与MHC-II类分子的结合更为紧密,从而干预CD4⁺T淋巴细胞TCR激活,抑制T淋巴细胞激活 (Curr Opin Immunol, 2009, 21 (2): 179-86; Eur J Immunol, 2003, 33 (4): 970-9)。体外研究显示,LAG-3可抑制抗原诱导的T淋巴细胞增殖反应,而阻断了LAG-3之后,T淋巴细胞的活化和增殖、1型辅助性T细胞 (type1 T helper cells, Th1) 分泌细胞因子的情况均有所改善;Huang等研究表明,活化的 CD4⁺Treg细胞表面LAG-3水平显著升高,且LAG-3是CD4⁺Tregs发挥最大免疫抑制作用的必需条件 (Immunity, 2004, 21 (4): 503-13)。此外,抗LAG-3抗体还可维持CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞稳态,阻断LAG-3后CD8⁺T淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的能力显著增强 (J Clin Invest, 2007, 117 (11): 3383-92)。一些疾病相关研究也发现,LAG-3在调控疾病发生发展中具有重要作用。Gandhi等证实人类淋巴瘤组织中T 淋巴细胞LAG-3的表达水平与T淋巴细胞功能障碍相关,清除LAG-3⁺T淋巴细胞可显著增强淋巴细胞的肿瘤清除能力 (Blood, 2006, 108 (7): 2280-9)。研究结果显示 LAG-3是免疫细胞表面重要的抑制性分子,并且对T淋巴细胞可产生显著的负向调控作用。

[0004] LAG-3主要表达在T淋巴细胞、B淋巴细胞、NK细胞、Treg细胞以及DC等细胞上 (Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94 (11): 5744-9. Eur J Immunol, 2005, 35 (7): 2081-8; J Immunol, 2009, 182 (4): 1885-91)。LAG-3是一类免疫抑制性分子,是 TCR的共受体组成部分之一,它干预T淋巴细胞TCR激活,在T淋巴细胞激活中发挥负性调控功能。在一些疾病中,LAG-3表达均会升高,并且会出现相应的免疫抑制。Gandhi等发现霍奇金淋巴瘤患者血液和肿瘤组织中,淋巴细胞高表达 LAG-3;肿瘤组织中特异性CD8⁺T细胞的功能明显受损,如果去除LAG-3阳性的 T细胞,其抗肿瘤功能可以恢复,细胞因子分泌增加。据此推测,LAG-3的表达与特异性T细胞的免疫负调节功能相关,抑制LAG-3分子功能可以增强T细胞的抗肿瘤作用,该分子有可能是一个潜在的肿瘤免疫治疗靶点 (Blood, 2006, 108 (7): 2280-9)。

[0005] 目前有多家跨国制药公司如BMS公司和Novartis公司在研发针对LAG-3的单克隆抗体,它通过刺激抗原特异性T细胞应答,增强T细胞的抗肿瘤作用,从而最大限度的提高患者自身对肿瘤的免疫系统反应,达到对肿瘤细胞进行杀伤的目的。

[0006] 但是,抗体药物由于分子量大、结构复杂,容易降解、聚合或发生不希望发生的化学修饰等而变得不稳定。为了使抗体适合于给药,并且在储存及随后使用过程中能保持稳定,发挥更好的效果,抗体药物的稳定制剂研究显得尤为重要。

[0007] 尽管,目前有多家公司在研发包含LAG3抗体及其制剂,如:W02018204374、W02010019570、W02014008218、W09530750、W02004078928、W02008132601、W02014140180、W02015138920等,但对于新的LAG3抗体制剂的研究并不多,因此仍需要研制更适于给药的包含LAG3的药物组合物(制剂)。

发明内容

[0008] 本发明提供一种药物组合物,其包含LAG3抗体或其抗原结合片段,以及缓冲剂,所述缓冲剂选自醋酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂或Tris缓冲剂。

[0009] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述的醋酸盐缓冲剂选自醋酸-醋酸钠缓冲剂、醋酸-醋酸钾缓冲剂,醋酸-组氨酸缓冲剂、醋酸-醋酸钙缓冲剂、醋酸-醋酸镁缓冲剂,优选醋酸-醋酸钠缓冲剂。

[0010] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述的组氨酸缓冲剂选自组氨酸-盐酸缓冲剂、组氨酸-醋酸缓冲剂、组氨酸-磷酸缓冲剂、组氨酸-硫酸缓冲剂,优选组氨酸-盐酸缓冲剂。

[0011] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述的柠檬酸盐缓冲剂选自柠檬酸-柠檬酸钠缓冲剂;所述的琥珀酸盐缓冲剂选自琥珀酸-琥珀酸钠缓冲剂。

[0012] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述LAG-3抗体或其抗原结合片段浓度为约1mg/ml至90mg/ml,优选约10mg/ml至90mg/ml,优选约20mg/ml至90mg/ml,优选约30mg/ml至90mg/ml,优选约40mg/ml至90mg/ml,优选约50mg/ml至90mg/ml,优选约60mg/ml至90mg/ml,优选约70mg/ml至90mg/ml,优选约80mg/ml至90mg/ml,优选约10mg/ml至80mg/ml,优选约20mg/ml至80mg/ml,优选约30mg/ml至80mg/ml,优选约40mg/ml至80mg/ml,优选约50mg/ml至80mg/ml,优选约60mg/ml至80mg/ml,优选约70mg/ml至80mg/ml,优选约10mg/ml至70mg/ml,优选约20mg/ml至70mg/ml,优选约30mg/ml至70mg/ml,优选约40mg/ml至70mg/ml,优选约50mg/ml至70mg/ml,优选约60mg/ml至70mg/ml,优选约10mg/ml至60mg/ml,优选约20mg/ml至60mg/ml,优选约30mg/ml至60mg/ml,优选约40mg/ml至60mg/ml,优选约50mg/ml至60mg/ml,优选约10mg/ml至50mg/ml,优选约20mg/ml至50mg/ml,优选约30mg/ml至50mg/ml,优选约40mg/ml至50mg/ml,优选约10mg/ml至40mg/ml,优选约20mg/ml至40mg/ml,优选约30mg/ml至40mg/ml,优选约10mg/ml至30mg/ml,优选约20mg/ml至30mg/ml。作为非限制性实施例,所述LAG-3抗体或其抗原结合片段浓度为约40mg/ml、41mg/ml、42mg/ml、43mg/ml、44mg/ml、45mg/ml、46mg/ml、47mg/ml、48mg/ml、49mg/ml、50mg/ml、51mg/ml、52mg/ml、53mg/ml、54mg/ml、55mg/ml、56mg/ml、57mg/ml、58mg/ml、59mg/ml或60mg/ml,最优选为50mg/ml。

[0013] 在可选的实施方案中,缓冲剂的浓度约为5mM至30mM,优选约为10mM至 30mM,优选约为15mM至30mM,优选约为20mM至30mM,优选约为25mM至 30mM,优选约为5mM至25mM,优选约为10mM至25mM,优选约为15mM至 25mM,优选约为20mM至25mM,优选约为5mM至20mM,优选约为10mM至 15mM;所述缓冲剂浓度的非限制性实施例为约10mM、12mM、14mM、16mM、18mM、20mM、22mM、24mM、26mM、28mM或30mM,最优选为10mM。

[0014] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述缓冲剂的pH值约为5.0到7.5,优选约为5.5到7.5,优选约为6.0到7.5,优选约为6.5到7.5,优选约为7.0到7.5,优选约5.0至7.0,优选约为5.5到7.0,优选约为6.0到7.0,优选约为6.5到7.0,优选约5.0至6.5,优选约为5.5到6.5,优选约为6.0到6.5,优选约5.0至6.0,优选约为5.5到6.0,优选约5.0至5.5,所述缓冲剂pH值的非限制性实施例还可选约为5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5,更优选为约5.5-6.0,更优选为5.5或6.0。

[0015] 进一步地,在可选的实施方案中,药物组合物还包括辅料,所述辅料选自糖和表面活性剂中的一种或多种。

[0016] 在可选实施方案中,其中所述的糖为二糖,优选为海藻糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇,更优选为蔗糖。在可选的实施方案中,药物组合物中糖的浓度约为30mg/ml 至90mg/ml,优选约为60mg/ml至90mg/ml,35mg/ml至90mg/ml,优选约为40mg/ml 至90mg/ml,优选约为45mg/ml至90mg/ml,优选约为50mg/ml至90mg/ml,优选约为55mg/ml至90mg/ml,优选约为60mg/ml至90mg/ml,优选约为65mg/ml至 90mg/ml,优选约为70mg/ml至90mg/ml,优选约为75mg/ml至90mg/ml,优选约为80mg/ml至90mg/ml,优选约为85mg/ml至90mg/ml,优选约为30mg/ml至 85mg/ml,优选约为35mg/ml至85mg/ml,优选约为40mg/ml至85mg/ml,优选约为45mg/ml至85mg/ml,优选约为50mg/ml至85mg/ml,优选约为55mg/ml至 85mg/ml,优选约为60mg/ml至85mg/ml,优选约为65mg/ml至85mg/ml,优选约为70mg/ml至85mg/ml,优选约为75mg/ml至85mg/ml,优选约为80mg/ml至 85mg/ml,优选约为30mg/ml至80mg/ml,优选约为35mg/ml至80mg/ml,优选约为40mg/ml至80mg/ml,优选约为45mg/ml至80mg/ml,优选约为50mg/ml至 80mg/ml,优选约为55mg/ml至80mg/ml,优选约为60mg/ml至80mg/ml,优选约为65mg/ml至80mg/ml,优选约为70mg/ml至80mg/ml,优选约为75mg/ml至 80mg/ml,优选约为30mg/ml至75mg/ml,优选约为35mg/ml至75mg/ml,优选约为40mg/ml至75mg/ml,优选约为45mg/ml至75mg/ml,优选约为50mg/ml至 75mg/ml,优选约为55mg/ml至75mg/ml,优选约为60mg/ml至75mg/ml,优选约为65mg/ml至75mg/ml,优选约为70mg/ml至75mg/ml,优选约为30mg/ml至 70mg/ml,优选约为35mg/ml至70mg/ml,优选约为40mg/ml至70mg/ml,优选约为45mg/ml至70mg/ml,优选约为50mg/ml至70mg/ml,优选约为55mg/ml至 70mg/ml,优选约为60mg/ml至70mg/ml,优选约为65mg/ml至70mg/ml,优选约为30mg/ml至65mg/ml,优选约为35mg/ml至65mg/ml,优选约为40mg/ml至 65mg/ml,优选约为45mg/ml至65mg/ml,优选约为50mg/ml至65mg/ml,优选约为55mg/ml至65mg/ml,优选约为60mg/ml至65mg/ml,优选约为30mg/ml至 60mg/ml,优选约为35mg/ml至60mg/ml,优选约为40mg/ml至60mg/ml,优选约为45mg/ml至60mg/ml,优选约为50mg/ml至60mg/ml,优选约为55mg/ml至 60mg/ml,优选约为30mg/ml至55mg/ml,优选约为35mg/ml至55mg/ml,优选约为40mg/ml至55mg/ml,优选约为45mg/ml至55mg/ml,优选约为50mg/ml至 55mg/ml,优选约为30mg/ml至50mg/ml,优选约为35mg/ml至50mg/ml,优选约为40mg/ml至50mg/ml,优选约为45mg/ml至50mg/ml,优选约为

30mg/ml至 45mg/ml,优选约为35mg/ml至45mg/ml,优选约为40mg/ml至45mg/ml,优选约为30mg/ml至40mg/ml,优选约为35mg/ml至40mg/ml,优选约为30mg/ml至 35mg/ml;作为非限制性实施例,药物组合物中糖的浓度约为包括60mg/ml、65mg/ml、70mg/ml、75mg/ml、80mg/ml、85mg/ml或90mg/ml,更优选约为 70mg/ml-80mg/ml,最优选75mg/ml。

[0017] 在可选的实施方案中,药物组合物还包含表面活性剂。所述表面活性剂可选自聚山梨酯20、聚山梨酯80、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲基胺、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等等。优选的表面活性剂为聚山梨酯80或聚山梨酯20,更优选为聚山梨酯80。

[0018] 在可选的实施方案中,药物组合物中表面活性剂的浓度约为0.02mg/ml至 0.8mg/ml,优选约0.1mg/ml至0.8mg/ml,优选约0.2mg/ml至0.8mg/ml,优选约 0.3mg/ml至0.8mg/ml,优选约0.4mg/ml至0.8mg/ml,优选约0.5mg/ml至0.8mg/ml,优选约0.6mg/ml至0.8mg/ml,优选约0.7mg/ml至0.8mg/ml,优选约为0.02mg/ml 至0.7mg/ml,优选约0.1mg/ml至0.7mg/ml,优选约0.2mg/ml至0.7mg/ml,优选约0.3mg/ml至0.7mg/ml,优选约0.4mg/ml至0.7mg/ml,优选约0.5mg/ml至0.7mg/ml,优选约0.6mg/ml至0.7mg/ml,优选约为0.02mg/ml至0.6mg/ml,优选约0.1mg/ml 至0.6mg/ml,优选约0.2mg/ml至0.6mg/ml,优选约0.3mg/ml至0.6mg/ml,优选约0.4mg/ml至0.6mg/ml,优选约0.5mg/ml至0.6mg/ml,优选约为0.02mg/ml至 0.5mg/ml,优选约0.1mg/ml至0.5mg/ml,优选约0.2mg/ml至0.5mg/ml,优选约 0.3mg/ml至0.5mg/ml,优选约0.4mg/ml至0.5mg/ml,优选约为0.02mg/ml至 0.4mg/ml,优选约0.1mg/ml至0.4mg/ml,优选约0.2mg/ml至0.4mg/ml,优选约 0.3mg/ml至0.4mg/ml,优选约为0.02mg/ml至0.3mg/ml,优选约0.1mg/ml至 0.3mg/ml,优选约0.2mg/ml至0.3mg/ml,优选约为0.02mg/ml至0.2mg/ml,优选约0.1mg/ml至0.2mg/ml,优选约为0.02mg/ml至0.1mg/ml,作为非限制性实施例,所述药物组合物中表面活性剂的浓度约为0.2mg/ml、0.25mg/ml、0.3mg/ml、0.35mg/ml、0.4mg/ml、0.45mg/ml或0.5mg/ml,更优选约为0.3mg/ml-0.5mg/ml。

[0019] 在一种实施方案中,所述的药物组合物包含如下i)或ii)所示的组分:

[0020] i) (a) 1mg/ml至90mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(b) 5mM至30mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH约为5.0-6.5,(c) 30mg/ml至90mg/ml的蔗糖,和(d) 0.02mg/ml至0.8mg/ml的聚山梨酯80;优选的,所述药物组合物包含:

[0021] (e) 40mg/ml至80mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(f) 10mM至30mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH约为5.2-5.8,(g) 70mg/ml至80mg/ml的蔗糖,和(h) 0.4mg/ml至0.5mg/ml的聚山梨酯80;或

[0022] ii) (a) 1mg/ml至90mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(b) 5mM至30mM 的组氨酸-盐酸缓冲剂,pH约为5.0-6.5,(c) 30mg/ml至90mg/ml的蔗糖或海藻糖,和(d) 0.05mg/ml至0.6mg/ml的聚山梨酯80,优选的,所述药物组合物包含:

[0023] (e) 45mg/ml至60mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(f) 10mM至30mM 的组氨

酸-盐酸缓冲剂,pH约为5.5-6.0,(g) 60mg/ml至90mg/ml的蔗糖,和(h) 0.2 mg/ml至0.6mg/ml的聚山梨酯80。

[0024] 在一种实施方案中,药物组合物中所述的LAG3抗体或其抗原结合片段包含分别如SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11所示的重链HCDR1、HCDR2和HCDR3和分别如SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示的轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0025] 在可选的实施方案中,所述药物组合物包含:

[0026] (a) 1mg/ml至90mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(b) 5mM至30mM 的醋酸盐缓冲剂,pH优选约为5.0至6.5,(c) 30mg/ml至90mg/ml的蔗糖,和(d) 0.02mg/ml至0.8mg/ml的聚山梨酯80。

[0027] 在可选的实施方案中,所述药物组合物包含:

[0028] (a) 40mg/ml至80mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(b) 10mM至30mM 的醋酸盐缓冲剂,pH为约5.0-6.0,(c) 60mg/ml至90mg/ml的蔗糖,和(d) 0.1mg/ml 至0.5mg/ml的聚山梨酯80。

[0029] 在可选的实施方案中,所述药物组合物包含:

[0030] (a) 50mg/ml至60mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(b) 10mM至30mM 的醋酸-醋酸钠缓冲剂,且pH约为5.2-5.8。(c) 70mg至80mg/ml的蔗糖,和(d) 0.4 mg/ml至0.5mg/ml的聚山梨酯80。

[0031] 在可选的实施方案中,所述药物组合物包含:

[0032] (a) 约50mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(b) 10mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH约为5.5,(c) 约75mg/ml的蔗糖,和(d) 约0.4mg/ml的聚山梨酯80。

[0033] 在可选的实施方案中,上述药物组合物中所述LAG-3抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、人源化抗体或其抗原结合片段。

[0034] 在可选的实施方案中,上述药物组合物中所述的LAG3鼠源抗体包含如SEQ ID NO:5所示的重链可变区和如SEQ ID NO:6所示的轻链可变区。

[0035] 在可选的实施方案中,上述药物组合物中所述的LAG-3人源化抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25任一序列所示或与其具有至少85%序列同一性的氨基酸序列;

[0036] 其中所述的轻链可变区如SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27或 SEQ ID NO:28任一所示或与其具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0037] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述LAG-3抗体的轻链可变区与SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28所示的轻链氨基酸可变区序列具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%, 95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性,所述LAG-3抗体的重链氨基酸可变区序列与SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO: 25所示的抗体重链可变区具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%, 92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性。

[0038] 在可选的实施方案中,上述药物组合物中所述的LAG3人源化抗体包含选自以下的重链可变区和轻链可变区的组合:

[0039] 1) SEQ ID NO:21的重链可变区和SEQ ID NO:22的轻链可变区;

- [0040] 2) SEQ ID NO:21的重链可变区和SEQ ID NO:26的轻链可变区；
[0041] 3) SEQ ID NO:21的重链可变区和SEQ ID NO:27的轻链可变区；
[0042] 4) SEQ ID NO:21的重链可变区和SEQ ID NO:28的轻链可变区；
[0043] 5) SEQ ID NO:23的重链可变区和SEQ ID NO:22的轻链可变区；
[0044] 6) SEQ ID NO:23的重链可变区和SEQ ID NO:26的轻链可变区；
[0045] 7) SEQ ID NO:23的重链可变区和SEQ ID NO:27的轻链可变区；
[0046] 8) SEQ ID NO:23的重链可变区和SEQ ID NO:28的轻链可变区；
[0047] 9) SEQ ID NO:24的重链可变区和SEQ ID NO:22的轻链可变区；
[0048] 10) SEQ ID NO:24的重链可变区和SEQ ID NO:26的轻链可变区；
[0049] 11) SEQ ID NO:24的重链可变区和SEQ ID NO:27的轻链可变区；
[0050] 12) SEQ ID NO:24的重链可变区和SEQ ID NO:28的轻链可变区；
[0051] 13) SEQ ID NO:25的重链可变区和SEQ ID NO:22的轻链可变区；
[0052] 14) SEQ ID NO:25的重链可变区和SEQ ID NO:26的轻链可变区；
[0053] 15) SEQ ID NO:25的重链可变区和SEQ ID NO:27的轻链可变区；和
[0054] 16) SEQ ID NO:25的重链可变区和SEQ ID NO:28的轻链可变区。

[0055] 在可选的实施方案中，上述药物组合物中所述的LAG-3人源化抗体包含重链恒定区和轻链恒定区，其中所述的重链恒定区优选如SEQ ID NO:38所示；其中所述的轻链恒定区优选如SEQ ID NO:39所示。

[0056] 在可选的实施方案中，上述药物组合物中所述的LAG-3人源化抗体的重链选自SEQ ID NO:40所示的序列或与其具有至少95%的序列同一性氨基酸序列，轻链选自SEQ ID NO:41所示的序列或与其具有至少95%的序列同一性氨基酸序列。

[0057] 在可选的实施方案中，药物组合物中所述LAG-3抗体的重链与SEQ ID NO:40所示的重链氨基酸序列具有至少95%，96%，97%，98%，99%或100%的序列同一性，所述LAG-3抗体的轻链氨基酸序列与SEQ ID NO:41所示的抗体轻链具有至少95%，96%，97%，98%，99%或100%的序列同一性。

[0058] 在一种实施方案中，药物组合物包含：50mg/ml的LAG3抗体Hu229-013，10mM 醋酸-醋酸钠缓冲液，pH 5.5。

[0059] 在又一种实施方案中，药物组合物包含：50mg/ml的LAG3抗体Hu229-013，10mM琥珀酸-琥珀酸钠缓冲液，pH 6.0。

[0060] 在又一种实施方案中，药物组合物包含：50mg/ml的LAG3抗体Hu229-013，10mM组氨酸-盐酸缓冲液，pH 6.0。

[0061] 在又一种实施方案中，药物组合物包含：50mg/ml的LAG3抗体Hu229-013，10mM琥珀酸-琥珀酸钠，pH6.0和0.1mg/ml聚山梨酯80。

[0062] 在又一种实施方案中，药物组合物包含：50mg/ml的LAG3抗体Hu229-013，10mM琥珀酸-琥珀酸钠，pH6.0，和70mg/ml蔗糖。

[0063] 在又一种实施方案中，药物组合物包含：50mg/ml的LAG3抗体Hu229-013，10mM醋酸-醋酸钠，pH 5.5，60mg/ml蔗糖和0.4mg/mL聚山梨酯80。

[0064] 在又一种实施方案中，药物组合物包含：50mg/ml的LAG3抗体Hu229-013，10mM组氨酸-醋酸，pH 6.0，60mg/ml蔗糖和0.4mg/mL聚山梨酯80。

[0065] 在一些实施方案中,药物组合物包含:1mg/ml的LAG3抗体Hu229-013, 10-30mM组氨酸-醋酸,pH5.5,75mg/ml蔗糖和0.2mg/mL聚山梨酯80。

[0066] 在又一些实施方案中,药物组合物包含:50mg/ml的LAG3抗体Hu229-013, 10-30mM醋酸-醋酸钠,pH5.2-5.8,75mg/ml蔗糖和0.2mg/mL聚山梨酯80。

[0067] 在又一种实施方案中,药物组合物包含:60mg/ml的LAG3抗体Hu229-013, 10mM醋酸-醋酸钠,pH 5.5,60mg/ml蔗糖和0.4mg/mL聚山梨酯80。

[0068] 在又一些实施方案中,药物组合物包含:50-60mg/ml的LAG3抗体Hu229-013, 10mM醋酸-醋酸钠,pH 5.5,30-90mg/ml蔗糖和0.4-0.5mg/mL聚山梨酯80。

[0069] 在又一种实施方案中,药物组合物包含:50mg/ml的LAG3抗体Hu229-013, 10mM醋酸-醋酸钠,pH 5.5,75mg/ml蔗糖和0.4mg/mL聚山梨酯80。

[0070] 在另一些实施方案中,药物组合物中所述的LAG-3抗体或其抗原结合片段具包含分别如SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区和分别如SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20 所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区。

[0071] 在可选实施方案中,所述的药物组合物包含:

[0072] (a) 1mg/ml至90mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(b) 5mM至30mM 的组氨酸-盐酸缓冲剂,pH约为5.0-6.5,(c) 30mg/ml至90mg/ml的蔗糖或海藻糖,和(d) 0.05mg/ml至0.6mg/ml的聚山梨酯80。

[0073] 在可选实施方案中,所述的药物组合物包含:

[0074] (a) 45mg/ml至60mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(b) 约10mM至 30mM的组氨酸-盐酸钠缓冲剂,pH约为5.0-6.0,(c) 60mg至90mg/ml的蔗糖或海藻糖,和(d) 0.2mg/ml至0.6mg/ml的聚山梨酯80。

[0075] 在可选的实施方案中,所述的药物组合物包含:

[0076] (a) 约50mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段,(b) 10mM的组氨酸-盐酸缓冲剂,pH约为5.0,(c) 约75mg/ml的蔗糖或海藻糖,和(d) 约0.3mg/ml的聚山梨酯80。

[0077] 在可选的实施方案中,上述药物组合物中所述的LAG-3抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体或其片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、人源化抗体或其抗原结合片段。

[0078] 在可选的实施方案中,上述药物组合物中所述的LAG3鼠源抗体包含如SEQ ID NO:7所示的重链可变区和如SEQ ID NO:8所示的轻链可变区。

[0079] 在可选的实施方案中,上述药物组合物中所述的LAG-3人源化抗体包含:

[0080] 选自SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:33任意一个所示的重链可变区序列或与其具有至少85%序列同一性的氨基酸序列和选自 SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO: 37任意一个所示的轻链可变区序列或与其具有至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0081] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述LAG-3抗体的轻链可变区与SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36或SEQ ID 37所示的轻链氨基酸可变区序列具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%, 93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性,所述LAG-3抗体的重链氨基酸可变区序列与SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32或 SEQ ID NO:33所示的抗体重链可变区具有至少85%,86%,87%,88%,89%, 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%

的序列同一性。

[0082] 在可选的实施方案中,上述药物组合物中所述的LAG3人源化抗体包含选自以下的重链可变区和轻链可变区的组合:

- [0083] 1) SEQ ID NO:29的重链可变区和SEQ ID NO:30的轻链可变区;
- [0084] 2) SEQ ID NO:29的重链可变区和SEQ ID NO:34的轻链可变区;
- [0085] 3) SEQ ID NO:29的重链可变区和SEQ ID NO:35的轻链可变区;
- [0086] 4) SEQ ID NO:29的重链可变区和SEQ ID NO:36的轻链可变区;
- [0087] 5) SEQ ID NO:29的重链可变区和SEQ ID NO:37的轻链可变区;
- [0088] 6) SEQ ID NO:31的重链可变区和SEQ ID NO:30的轻链可变区;
- [0089] 7) SEQ ID NO:31的重链可变区和SEQ ID NO:34的轻链可变区;
- [0090] 8) SEQ ID NO:31的重链可变区和SEQ ID NO:35的轻链可变区;
- [0091] 9) SEQ ID NO:31的重链可变区和SEQ ID NO:36的轻链可变区;
- [0092] 10) SEQ ID NO:31的重链可变区和SEQ ID NO:37的轻链可变区;
- [0093] 11) SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:30的轻链可变区;
- [0094] 12) SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:34的轻链可变区;
- [0095] 13) SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:35的轻链可变区;
- [0096] 14) SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:36的轻链可变区;
- [0097] 15) SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:37的轻链可变区;
- [0098] 16) SEQ ID NO:33的重链可变区和SEQ ID NO:30的轻链可变区;
- [0099] 17) SEQ ID NO:33的重链可变区和SEQ ID NO:34的轻链可变区;
- [0100] 18) SEQ ID NO:33的重链可变区和SEQ ID NO:35的轻链可变区;
- [0101] 19) SEQ ID NO:33的重链可变区和SEQ ID NO:36的轻链可变区;和
- [0102] 20) SEQ ID NO:33的重链可变区和SEQ ID NO:37的轻链可变区。

[0103] 在可选的实施方案中,上述药物组合物中所述嵌合抗体或人源化抗体重链进一步包含人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其变体的重链恒定区,优选包含人源IgG4或其变体的重链恒定区,最优选如SEQ ID NO:38所示的重链恒定区;所述嵌合抗体或人源化抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区,优选如SEQ ID NO:39所示的轻链恒定区。

[0104] 在可选的实施方案中,上述药物组合物中所述的LAG-3人源化抗体的重链选自SEQ ID NO:42所示的序列或与其具有至少95%的序列同一性氨基酸序列,轻链选自SEQ ID NO:43所示的序列或与其具有至少95%的序列同一性氨基酸序列。

[0105] 在可选的实施方案中,药物组合物中所述LAG-3抗体的重链与SEQ ID NO:42所示的重链氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性,所述LAG-3抗体的轻链氨基酸序列与SEQ ID NO:43所示的抗体轻链具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性。

[0106] 在一种实施方案中,药物组合物包含:50mg/ml的LAG3抗体Hu303-005,10mM 组氨酸-盐酸缓冲液,pH6.0。

[0107] 在一种实施方案中,药物组合物包含:50mg/ml的LAG3抗体Hu303-005,10mM 组氨酸-盐酸缓冲液,pH5.0。

[0108] 在一种实施方案中,药物组合物包含:50mg/ml的LAG3抗体Hu303-005,10mM 组氨酸

酸-盐酸缓冲液, pH6.5。

[0109] 在又一种实施方案中, 药物组合物包含: 50mg/ml 的LAG3抗体Hu303-005, 10mM醋酸-醋酸钠缓冲液, pH5.5。

[0110] 在又一种实施方案中, 药物组合物包含: 50mg/ml 的LAG3抗体Hu303-005, 10mM醋酸-醋酸钠缓冲液, pH5.5, 75mg/ml 蔗糖和0.2mg/ml 聚山梨酯80。

[0111] 在又一种实施方案中, 药物组合物包含: 50mg/ml 的LAG3抗体Hu303-005, 10mM醋酸-醋酸钠缓冲液, pH5.5, 75mg/ml 海藻糖和0.2mg/ml 聚山梨酯80。

[0112] 在又一种实施方案中, 药物组合物包含: 50mg/ml 的LAG3抗体Hu303-005, 10mM醋酸-醋酸钠缓冲液, pH5.5, 和0.4mg/ml 聚山梨酯80。

[0113] 在又一种实施方案中, 药物组合物包含: 50mg/ml 的LAG3抗体Hu303-005, 10mM组氨酸-盐酸缓冲液, pH6.0, 75mg/ml 蔗糖和0.4mg/ml 聚山梨酯80。

[0114] 在又一种实施方案中, 药物组合物包含: 50mg/ml 的LAG3抗体Hu303-005, 10mM组氨酸-盐酸缓冲液, pH6.5, 75mg/ml 蔗糖和0.4mg/ml 聚山梨酯80。

[0115] 在又一种实施方案中, 药物组合物包含: 50mg/ml 的LAG3抗体Hu303-005, 10mM组氨酸-盐酸缓冲液, pH5.5, 75mg/ml 蔗糖和0.4mg/ml 聚山梨酯80。

[0116] 在一些实施方案中, 药物组合物包含: 45-60mg/ml 的LAG3抗体Hu303-005, 10mM组氨酸-盐酸缓冲液, pH5.5, 75mg/ml 蔗糖和0.2-0.6mg/ml 聚山梨酯80。

[0117] 在又一种实施方案中, 药物组合物包含: 约50mg/ml 的LAG3抗体Hu303-005, 约10mM组氨酸-盐酸缓冲液, 约pH6.0, 约75mg/ml 蔗糖和约0.3mg/ml 聚山梨酯80。

[0118] 本发明还提供一种制备含LAG-3抗体的药物组合物的方法, 包括将LAG-3 抗体或抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂混合。

[0119] 本发明还提供一种制备含LAG-3抗体的冻干制剂的方法, 其中包括将前述药物组合物经冷冻干燥的步骤。

[0120] 在可选的实施方案中, 制备含LAG-3抗体的冻干制剂的方法中所述冷冻干燥依次包括预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。

[0121] 在可选的实施方案中, 制备含LAG-3抗体的冻干制剂的方法中所述一次干燥温度为-5℃至-20℃, 优选为-10℃。

[0122] 本发明还提供一种经前述制备含LAG-3抗体的冻干制剂的方法制备所得含 LAG-3抗体的冻干制剂。

[0123] 在一些实施方案中, 该冻干制剂于2-8℃稳定至少3个月, 至少6个月, 至少 12个月, 至少18个月或至少24个月。在一些实施方案中, 该冻干制剂于40℃稳定至少7天, 至少14天或至少28天。

[0124] 本发明还提供一种由上述冻干方法制备所得含LAG-3抗体的冻干制剂。

[0125] 本发明还提供一种含LAG3抗体的冻干制剂, 其特征在于所述制剂复溶后可形成上述药物组合物。

[0126] 本发明还提供制备含有LAG-3抗体的冻干制剂的复溶溶液的方法, 其中包括将前述冻干制剂经复溶的步骤, 其复溶所用溶液选自但不限于注射用水、生理盐水或葡萄糖溶液。

[0127] 本发明还提供一种经前述含有LAG-3抗体的冻干制剂的复溶溶液的方法制备所得

含有LAG-3抗体的冻干制剂的复溶溶液。

[0128] 本发明还提供一种包含LAG3抗体的复溶溶液,其还含有如下成分:

[0129] (a) 1至90mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (b) 5至30mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH约为5.0-6.5, (c) 30至90mg/ml的蔗糖, (d) 0.02至0.8mg/ml的聚山梨酯80。

[0130] 本发明还提供一种包含LAG3抗体的复溶溶液,其还含有如下成分:

[0131] (a) 40至80mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (b) 10至30mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH约为5.2-5.8, (c) 70至80mg/ml的蔗糖, (d) 0.4至0.5mg/ml的聚山梨酯80。

[0132] 本发明还提供一种包含LAG3抗体的复溶溶液,其还含有如下成分:

[0133] (a) 50mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (b) 10mM的醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH约为5.5, (c) 75mg/ml的蔗糖, (d) 0.4mg/ml的聚山梨酯80。

[0134] (a) 1至90mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (b) 5至30mM的组氨酸-盐酸缓冲剂, pH约为5.0-6.5, (c) 30至90mg/ml的蔗糖, (d) 0.05至0.6mg/ml的聚山梨酯80。

[0135] 本发明还提供一种包含LAG3抗体的复溶溶液,其还含有如下成分:

[0136] (a) 45至60mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (b) 10至30mM的组氨酸-盐酸缓冲剂, pH约为5.5-6.0, (c) 60至80mg/ml的蔗糖, (d) 0.2至0.6mg/ml的聚山梨酯80。

[0137] 本发明还提供一种包含LAG3抗体的复溶溶液,其还含有如下成分:

[0138] (a) 50mg/ml的LAG-3抗体或其抗原结合片段, (b) 10mM的组氨酸-盐酸缓冲剂, pH约为6.0, (c) 75mg/ml的蔗糖, (d) 0.3mg/ml的聚山梨酯80。

[0139] 本发明进一步提供一种制品或试剂盒,其包含装有本文所述任何稳定的药物组合物的容器。在一些实施方案中,该玻璃瓶为中性硼硅玻璃管制注射剂瓶。

[0140] 本发明前述的药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液可用作药物。

[0141] 本发明还提供前述的药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液在制备用于治疗LAG-3相关的疾病或病症的药物中的用途,其中所述的疾病或病症为致病性T细胞参与的相关疾病或病症,优选为癌症;所述癌症包括,但不限于卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、肠癌、胃癌、食管癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌、肝癌、膀胱癌、子宫颈癌、口腔癌、脑癌、睾丸癌、皮肤癌、甲状腺癌以及血液学恶性肿瘤,其中所述的血液学恶性肿瘤包括骨髓瘤和慢性和急性白血病。

[0142] 本发明还提供一种治疗和预防LAG-3相关的疾病或病症的方法,包括给予所需患者治疗有效量的前述的药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液,其中所述的疾病或病症为致病性T细胞参与的相关疾病或病症,优选为癌症;所述癌症包括,但不限于卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、肠癌、胃癌、食管癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌、肝癌、膀胱癌、子宫颈癌、口腔癌、脑癌、睾丸癌、皮肤癌、甲状腺癌以及血液学恶性肿瘤,其中所述的血液学恶性肿瘤包括骨髓瘤和慢性和急性白血病。

[0143] 本发明还提供一种制品,其包括容器,该容器中装有前述的药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液。

[0144] 如本领域技术人员所熟知的,本公开中所述各个实施方案的一项、一些或所有特性可以进一步组合以形成本发明的其它实施方案。本发明的以上实施方案和通过组合得到的其他实施方案通过下面的详述进一步说明。

附图说明

[0145] 图1:人源化抗LAG-3抗体样品增强对SEB刺激激活的T淋巴细胞分泌IL-2 细胞因子的作用。数据结果显示,LAG-3人源化候选抗体Hu229-013和Hu303-005 能够不同程度增强激活的T淋巴细胞分泌细胞因子IL-2,并且有药物浓度剂量效应。

[0146] 图2:人源化抗LAG-3抗体对U-87MG荷瘤小鼠肿瘤体积的影响。结果显示,给药14天后,LAG-3抗体Hu229-013 6mpk和Hu303-005 6mpk均有一定的抑瘤效果,抑瘤率分别为27.25% ($p < 0.05$) 及34.94% ($p < 0.01$);与对照组有显著差异 ($p < 0.001$ vs hIGg)

[0147] 图3:Hu229-013抗体40℃CE纯度趋势图。

[0148] 图4:Hu229-013抗体40℃IEC中性峰趋势图。

[0149] 图5:Hu303-005抗体40℃非还原CE趋势图。

[0150] 图6:Hu303-005抗体40℃iCE主峰趋势图。

[0151] 图7:Hu303-005振摇SEC结果趋势图。

[0152] 图8:Hu303-005抗体IEC 0℃时与40℃数据差值拟合结果。

[0153] 图9:Hu303-005抗体CE纯度0℃时与40℃数据差值拟合图。

[0154] 图10:Hu303-005抗体制剂25℃和40℃iCE/CE/DLS拟合结果。

[0155] 术语

[0156] 为了更容易理解本发明,以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义,本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

[0157] “缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受pH变化的缓冲剂。将pH 控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

[0158] “组氨酸缓冲剂”是包含组氨酸离子的缓冲剂。组氨酸缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸盐,组氨酸-醋酸盐,组氨酸-磷酸盐,组氨酸-硫酸盐等缓冲剂,优选组氨酸-盐酸盐缓冲剂。组氨酸-盐酸盐缓冲剂是组氨酸与盐酸或组氨酸与组氨酸盐酸盐配制而成。

[0159] “柠檬酸盐缓冲剂”是包括柠檬酸根离子的缓冲剂。柠檬酸盐缓冲剂的实例包括柠檬酸-柠檬酸钠、柠檬酸-柠檬酸钾、柠檬酸-柠檬酸钙、柠檬酸-柠檬酸镁等。优选的柠檬酸盐缓冲剂为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲剂。

[0160] “琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。优选的琥珀酸盐缓冲剂为琥珀酸-琥珀酸钠缓冲剂。

[0161] “磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠酸-磷酸二氢钾等。优选的磷酸盐缓冲剂为磷酸氢二钠酸-磷酸二氢钠缓冲剂。

[0162] “醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、醋酸-组氨酸盐、醋酸-醋酸钾、醋酸-醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸盐缓冲剂为醋酸-醋酸钠缓冲剂。

[0163] “Tris缓冲剂”是指包含三(羟甲基)氨基甲烷的缓冲溶液,Tris缓冲剂也被称为Tris碱、Trizma、Trisamine、THAM、氨丁三醇、氨基丁三醇和缓血酸胺。Tris缓冲剂的有效

缓冲范围在pH7.0到9.2之间,Tris碱的水溶液pH在10.5左右,一般加入盐酸以调节pH值至所需值,即可获得该pH值的缓冲剂。

[0164] 本发明的“糖”包含常规组合物 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物,包括单糖,二糖,三糖,多糖,糖醇,还原性糖,非还原性糖等。可选自葡萄糖,蔗糖,海藻糖,乳糖,果糖,麦芽糖,右旋糖苷,甘油,赤藻糖醇,丙三醇,阿拉伯糖醇,sylitol,山梨糖醇,甘露醇,密里二糖,松三糖,蜜三糖,甘露三糖,水苏糖,麦芽糖,乳果糖,麦芽酮糖,山梨醇,麦芽糖醇,乳糖醇,异-麦芽酮糖等。优选的糖为非还原性二糖,更优选为蔗糖。

[0165] “粘度调节剂”是为调节制剂的粘度而加入的常规药用物料,此处所指的粘度调节剂主要是指无机盐和氨基酸盐,其中无机盐优选自氯化钠、氯化钙、氯化镁、醋酸钙,所述氨基酸盐优选自精氨酸盐酸盐,组氨酸盐酸盐,甘氨酸盐酸盐,组氨酸醋酸盐等。

[0166] “药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物,所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。本文中,“药物组合物”和“制剂”并不互相排斥。

[0167] 本发明中所述药物组合物的溶液形式,若无特殊说明,其中的溶剂均为水。

[0168] “冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或溶液制剂经过真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

[0169] 本公开的冷冻干燥包括预冻,一次干燥,二次干燥。预冻目的是冷冻产品,获得结晶固体。预冻温度和预冻速度是两个重要工艺参数,本发明中将预冻温度设定为 -45°C ,预冻速度设定为 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。一次干燥也称为主干燥,是样品冷冻干燥的主要阶段。目的是移除产品里冰的同时,保持产品形状,最小程度的减少对产品的破坏。若一次干燥的温度和真空度选择不当,会导致制品的塌陷。较高的温度和真空度均会加快冻干效率,但同时也会增加制品塌陷的风险。本发明所述一次干燥的温度可为本领域常规的温度,例如 -30°C - 0°C 。二次干燥也称为解析干燥,是通过抽极限真空(0.01mbar)和升高温度(20 - 40°C)除去制品中结合水的主要步骤。由于大多数生物制品对温度比较敏感,所以二次干燥温度选择在温度范围的低点,即 25°C 。冷冻干燥的时间与冷冻机,冻干制剂剂量,冻干药剂的容器有关。这种时间的调整是在本领域技术人员所熟知的。

[0170] 本文所用术语“约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内,所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如,在本领域每一次实行中“约”可意味着在1内或超过1的标准差。或者,“约”或“基本上包含”可意味着至多20%的范围,例如,约5.5的pH意指 $\text{pH}5.5 \pm 1.1$ 。此外,特别对于生物学系统或过程而言,该术语可意味着至多一个数量级或数值的至多5倍。除非另外说明,否则当具体值在本申请和权利要求中出现时,“约”或“基本上包含”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

[0171] 本发明所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果:其中的抗体在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性,优选地,药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术,可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

[0172] 稳定的药物抗体制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂：在冷藏温度(2-8℃)保存至少3个月、优选6个月、更优选1年，且甚至更优选地最多达2年。另外，稳定的液体制剂包括这样的液体制剂：其在包括25℃保存包括1个月、3个月、6个月或在40℃保存1个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的可接受的标准如下：通过SEC-HPLC测得，通常不超过约5%、优选不超过约5%的抗体单体发生降解。通过视觉分析，药物抗体制剂是无色的，或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH和重量克分子渗透压浓度具有不超过±5%变化。通常观察到不超过约5%、优选不超过约5%的截短，通常形成不超过约5%、优选不超过约5%的聚集。

[0173] 如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过UV光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)和动态光散射(DLS)测得，抗体没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法(其确定蛋白三级结构)和通过FTIR光谱法(其确定蛋白二级结构)来评价。

[0174] 如果抗体没有显示出显著的化学改变，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白，可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短(通过诸如尺寸排阻色谱法和SDS-PAGE等方法来评价)、氧化(通过诸如与质谱法或MALDI/TOF/MS结合的肽谱法等方法来评价)、脱酰胺作用(通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价)和异构化(通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等来评价)。

[0175] 如果抗体在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的生物活性”。抗体的生物活性可以例如通过抗原结合测定来确定。

[0176] 术语“LAG-3”是指淋巴细胞活化基因3。术语“LAG-3”包含变体、同等型(isoform)、同源物、直系同源体(ortholog)及旁系同源体(paralog)。术语“人LAG-3”指人序列LAG-3，例如具有Uniprot号:P18627的人LAG-3的完整氨基酸序列。本领域中亦已知LAG-3，例如CD215。人LAG-3序列与Uniprot号:P18627的人LAG-3的不同之处可在于具有例如保守突变或在非保守区中的突变，且LAG-3与Uniprot号:P18627的人LAG-3具有实质上相同的生物功能。举例而言，人LAG-3的生物功能是在LAG-3的胞外域中具有表位，该表位被本公开的抗体特异性结合，或人LAG-3的生物功能是结合MHCII类分子。

[0177] 特定人LAG-3序列在氨基酸序列中通常与Uniprot号:P18627的人LAG-3至少90%相同，且含有在与其他物种(例如鼠类)的LAG-3氨基酸序列相比时鉴别为人氨基酸序列的氨基酸残基。在某些情形下，人LAG-3在氨基酸序列中可与Uniprot号:P18627的LAG-3至少85%或甚至至少95%、96%、97%、98%或99%相同。在某些实施方案中，人LAG-3序列较Uniprot号:P18627的LAG-3序列显示不超过10个氨基酸差异。在某些实施方案中，人LAG-3可较Uniprot号:P18627的LAG-3序列显示不超过5或甚至不超过4、3、2或1个氨基酸差异。可如本文所阐述的测定百分比同一性。

[0178] 本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

[0179] 本发明所述的“抗体”指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。

[0180] 在本发明中,本发明所述的抗体轻链可进一步包含轻链恒定区,所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ 、 λ 链或其变体。

[0181] 在本发明中,本发明所述的抗体重链可进一步包含重链恒定区,所述的重链恒定区包含人源或鼠源的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。

[0182] 抗体重链和轻链靠近N端的约15个氨基酸的序列变化很大,为可变区(Fv 区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR区4个FR区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1、LCDR2、和LCDR3;重链的3个CDR区指HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0183] 本发明的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,优选人源化抗体。

[0184] 术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的对人LAG-3的单克隆抗体。制备时用LAG-3抗原注射试验对象,然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。

[0185] 术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”,是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体,可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体,要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤,然后从小鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因,再根据需要克隆人抗体的恒定区基因,将小鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入人载体中,最后在真核工业系统或原核工业系统中表达嵌合抗体分子。在本发明一个优选的实施方案中,所述的LAG-3嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的LAG-3嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒定区。

[0186] 术语“人源化抗体(humanized antibody)”,也称为CDR移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将小鼠的CDR序列移植到人的抗体可变区框架,即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量小鼠蛋白成分,从而诱导的强烈的抗体可变抗体反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库(在因特网www.mrccpe.com.ac.uk/vbase可获得),以及在Kabat,EA.等人,1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版中找到。为避免免疫原性下降的同时,引起的活性下降,可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变,以保持活性。本发明的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对CDR进行亲和力成熟后的人源化抗体。

[0187] 本发明中术语“抗LAG-3抗体”、“抗LAG-3”、“LAG-3抗体”或“结合LAG-3的抗体”是指这样的抗体,所述抗体能够以足够的亲合力结合LAG-3抗体以致所述抗体可以用作靶向LAG-3中的诊断剂和/或治疗剂。

[0188] 本发明中术语“与LAG-3结合”,指能与LAG-3相互作用。

[0189] 术语“特异性结合”指如通过本领域可用的技术,例如竞争ELISA、BIACORE[®]测定或KINEXA[®]测定所测定的。该术语还适用于当例如本发明抗体的抗原结合结构域对许多抗原携带的特定表位特异的情况,在该情况下携带抗原结合结构域的抗体能够特异性结合

携带该表位的多种抗原。

[0190] 术语“竞争结合”是指与本发明的单克隆抗体识别人LAG-3的胞外区上的相同表位(也称为抗原决定簇)或相同表位的一部分并与所述抗原结合的抗体。与本发明的单克隆抗体结合相同表位的抗体是指识别并结合于本发明的单克隆抗体所识别的人LAG-3的氨基酸序列的抗体。

[0191] 术语“KD”或“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常,本发明的抗体以小于大约 10^{-7} M,例如小于大约 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的解离平衡常数(KD)结合LAG-3,例如,如使用表面等离子体共振(SPR)技术在BIACORE仪中测定的。

[0192] 本发明中所述的“抗原结合片段”,指具有抗原结合活性的Fab片段,Fab'片段,F(ab')₂片段,以及与人LAG-3结合的scFv片段及其他利用了能与人LAG-3结合的抗体的VH和VL区形成的可结合人LAG-3的片段;其包含本发明所述抗体的选自SEQ ID NO:9、10、11、15、16、17和12、13、14、18、19和20中的一个或多个CDR区。Fv片段含有抗体重链可变区和轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般地,Fv抗体还包含在VH和VL结构域之间的多肽接头,且能够形成抗原结合所需的结构。也可以用不同的连接物将两个抗体可变区连接成一条多肽链,称为单链抗体(single chain antibody)或单链Fv(sFv)。

[0193] 术语“表位”指在一个或更多个抗体的抗原结合区中能够被抗体识别并结合的分子部分。

[0194] “保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸,使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓,一般而言,多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性(参见例如Watson等(1987)Molecular Biology of the Gene,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224页,(第4版))。另外,结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。

[0195] 氨基酸序列“同一性”是指两个蛋白或多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同氨基酸残基占据时,例如如果两个多肽的一个位置都被同一个氨基酸残基占据时,那么所述分子在该位置是一致的。适于确定序列同一性百分比和序列相似性百分比的算法的实例是BLAST和BLAST2.0算法,它们分别描述于Altschul et al.(1990)J.Mol.Biol.215:403-45和Altschul et al.(1977)Nucleic Acids Res.25:3389-3402。用于执行BLAST分析的软件可在美国国家生物技术信息中心公开获取(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

[0196] 现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8章和15章。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个来源FR区。人FR种系序列可以通过比对IMGT人类抗体可变区种系基因数据库和MOE软件,从ImMunoGeneTics(IMGT)的网站<http://imgt.cines.fr>得到,或者从免疫球蛋白杂志,2001ISBN012441351上获得。

[0197] 本发明工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如,编码重链和轻链的cDNA序列,可以克隆并重组至GS表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染CHO细胞。作为一种更推荐的现有技术,哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化,

特别是在Fc区的高度保守N端位点。通过表达与人LAG-3特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如,用含调整过的缓冲剂的A或G Sepharose FF柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用pH梯度法洗脱结合的抗体,用SDS-PAGE检测抗体片段,收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃,或者冻干。

[0198] “给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中所述流体与细胞接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

[0199] “治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂,例如包含本发明的任一种结合化合物的组合物,所述患者具有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂,以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如患者的疾病状态、年龄和体重,患者的健康状况、患者的行为、患者的饮食、给药时间、给药方式、排泄的速率、药物的组合等以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本发明的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解每个目标疾病症状方面可能无效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如Student t检验、卡方检验、依据Mann和Whitney的U检验、Kruskal-Wallis检验(H检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和Wilcoxon检验确定,其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

[0200] “有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化:例如,待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

[0201] “T_m值”是指蛋白质热变性温度,即一半蛋白去折叠时的温度,此时蛋白的空间结构被破坏,所以T_m值越高,蛋白热稳定性越高。

[0202] 发明详述:

[0203] 本发明获得了一种稳定包含LAG3抗体或其抗原结合片段、醋酸盐缓冲剂或组氨酸盐、蔗糖和聚山梨酯80的药物组合物(制剂),该药物组合物(制剂)更适于给药。

具体实施方式

[0204] 实施例

[0205] 通过以下实施例进一步详细说明本发明。这些实施例仅用于说明性目的,而并不用于限制本发明的范围。

[0206] 本发明实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件;或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

[0207] 实施例1.LAG-3抗原抗体的制备

[0208] 1、蛋白设计及表达

[0209] 以UniProt Lymphocyte activation gene 3 protein(人LAG-3,Uniprot号:P18627) 作为本发明LAG-3的模板,设计本发明涉及的抗原及检测用蛋白的氨基酸序列,可选的在LAG-3蛋白基础上融合不同的标签,分别克隆到pHr载体上(自产)或 pTT5载体上(Biovector,Cat#:102762)或pTarget载体上(promega,A1410),在293细胞瞬转表达或CHO-S稳定表达纯化,获得编码本发明抗原及检测用蛋白。以下LAG-3抗原未特殊说明的均指人LAG-3。

[0210] 带Flag标签的LAG-3胞外区:LAG-3-Flag,用于免疫小鼠

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGA EVPVW AQEGAPAQLPC SPTIPLQD
LSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSV
GPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDR
ALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQG
RVPVRESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGL
EPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGD
FTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQQLNATVTLAIITVTPKSFGSPGSLGKLLC
EVTVPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLG
AAVYFTELSSPGDYKDDDDK

SEQ ID NO:1

[0212] 注释:划横线部分为信号肽,斜体部分为Flag-tag标签。

[0213] 全长LAG-3:用于构建LAG-3过表达细胞株,免疫小鼠和检测

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGA EVPVW AQEGAPAQLPC SPTIPLQD
LSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSV
GPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDR
ALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQG
RVPVRESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGL
EPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGD
FTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQQLNATVTLAIITVTPKSFGSPGSLGKLLC
EVTVPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLG
AAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLEFLILGVLSLLLLVTGA~~FGFHLWRR~~
~~QWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL~~

SEQ ID NO:2

[0215] 注释:信号肽+胞外区+跨膜区与胞内区

[0216] LAG-3胞外区和hIgG1 Fc的融合蛋白:LAG-3-Fc,用于检测

[0217] MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVWVAQEGAPQLPCSPTIPLQD
 LSLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVG
 PGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRA
 LSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGR
 VPVRESPIHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEP
 PTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFILTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTL
 RLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQLNATVTLAIITVTPKSFGSPGSLGKLLCEVT
 PVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAV
 YFTELSSPGDDDDKGSSGSGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:3

[0218] 注释:划横线部分为信号肽,双划线部分为接头,斜体部分为Fc。

[0219] LAG-3胞外区和mIgG2a Fc的融合蛋白:LAG-3-mFc,用于检测

[0220] MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVWVAQEGAPQLPCSPTIPLQD
 LSLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVG
 PGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRA
 LSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGR
 VPVRESPIHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEP
 PTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFILTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTL
 RLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQLNATVTLAIITVTPKSFGSPGSLGKLLCEVT
 PVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAV
 YFTELSSPGDDDDKGSSGSGEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL
MISLSPIVTCVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ
HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTL
TCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVER
NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO:4

[0221] 注释:划横线部分为信号肽,双划线部分为接头,斜体部分为mFc。

[0222] 2、LAG-3相关重组蛋白的纯化,以及杂交瘤抗体、重组抗体的纯化

[0223] 1) 带Flag标签的LAG-3-Flag重组蛋白的纯化步骤:

[0224] 将样品高速离心去除杂质,并浓缩至适当体积。利用0.5×PBS平衡flag亲和柱,冲洗2-5倍柱体积。将除杂后的细胞表达上清样品上柱。用0.5×PBS冲洗柱子,至 A280读数降至基线。用PBS冲洗柱子,冲洗杂蛋白,并收集。用100mM甘氨酸, pH 3.0.洗脱目的蛋白,并收集,以备后续体外激活和进一步纯化。

[0225] 2) 杂交瘤、重组抗体、Fc融合蛋白的纯化

[0226] 将细胞表达上清样品高速离心去除杂质,杂交瘤表达上清用Protein G柱,重组抗体、Fc融合蛋白表达上清用Protein A柱进行纯化。用PBS冲洗柱子,至A280 读数降至基线。用100mM乙酸pH3.0洗脱目的蛋白,用1M Tris-HCl,pH8.0中和。洗脱样品适当浓缩后利用PBS平衡好的凝胶层析Superdex200 (GE) 进一步纯化,去聚体的峰收集好后分装备用。

[0227] 实施例2. 抗人LAG-3杂交瘤单克隆抗体的制备

[0228] 1. 免疫

[0229] 抗人LAG-3单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用SJL白小鼠,雌性,6周龄(北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号: SCXK(京)2012-0001)。饲养环境:SPF级。小鼠购进后,实验室环境饲养1周,12/12小时光/暗周期调节,温度20-25℃;湿度40-60%。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。免疫抗原为带Flag标签的人LAG-3胞外区(SEQ ID NO:1)。

[0230] 免疫方案A: 用TiterMax®Gold Adjuvant (Sigma Cat No.T2684) 与Thermo Imject® Alum (Thermo Cat No.77161) 交叉免疫。抗原与佐剂(TiterMax®Gold Adjuvant) 比例为1:1,抗原与佐剂(Thermo Imject® Alum) 比例为3:1,50μg/ 只/次(首免),25μg/只/次(加强免疫)。抗原乳化后进行接种,时间为第0、7、14、21、28、35、42天。第0天皮下(SC) 多点注射50μg/只的乳化后抗原。第7天腹膜内(IP) 注射25μg/只。第14、28、35、42天根据背部结块和腹部肿胀情况,选择背部或腹膜内注射抗原。于第21、35、49天取血,用ELISA方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在7免以后,选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前3天加强免疫,腹膜内(IP) 注射50μg/只的生理盐水配制的抗原溶液。

[0231] 免疫方案B: 用QuickAntibody-Mouse5W (KX0210041) 对小鼠进行免疫。抗原与佐剂比例为1:1,25μg/只/次(首免/加强免疫)。抗原与佐剂迅速充分混匀后接种,时间为第0、21、35天。第0天小鼠后小腿肌肉(IM) 注射25μg/只的抗原。第21、35天按同样方式注射25μg/只(根据滴度决定第3免是否进行)。于第28、42天取血,用ELISA方法确定小鼠血清中的抗体滴度。选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前3天加强免疫,腹膜内(IP) 注射50μg/只的生理盐水配制的抗原溶液。

[0232] 2. 脾细胞融合

[0233] 采用优化的PEG介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0细胞(ATCC® CRL-8287™) 进行融合得到杂交瘤细胞。融合好的杂交瘤细胞以 $0.5-1 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度用完全培养基(含20%FBS、 $1 \times \text{HAT}$ 、 $1 \times \text{OPI}$ 的DMEM培养基) 重悬,100μl/孔种于96孔板中,37℃,5%CO₂孵育3-4天后,补充HAT完全培养基100μl/孔,继续培养3-4天至形成针尖般克隆。去除上清,加入200μl/well 的HT完全培养基(含20%FBS、 $1 \times \text{HT}$ 和 $1 \times \text{OPI}$ 的RPMI-1640培养基),37℃,5%CO₂培养3天后进行ELISA检测。

[0234] 3. 杂交瘤细胞筛选

[0235] 根据杂交瘤细胞生长密度,用结合ELISA方法进行杂交瘤培养上清检测。并将结合ELISA检测的阳性孔细胞上清进行细胞阻断实验。结合和阻断均为阳性的孔细胞及时进行扩增冻存保种和二到三次亚克隆直至获得单细胞克隆。

[0236] 每次亚克隆细胞均需进行LAG-3结合ELISA、细胞阻断实验检测。通过以上实验筛选得到杂交瘤克隆,用无血清细胞培养法进一步制备抗体,按纯化实例纯化抗体,供在检测例中使用。

[0237] 4. 杂交瘤阳性克隆序列测定

[0238] 从阳性杂交瘤中克隆序列过程如下。收集对数生长期杂交瘤细胞,用Trizol (Invitrogen, Cat No.15596-018) 按照试剂盒说明书步骤提取RNA,用PrimeScript™ Reverse Transcriptase试剂盒反转录(Takara, Cat No.2680A)。将反转录得到的 cDNA采用mouse Ig-Primer Set (Novagen, TB326 Rev.B 0503) 进行PCR扩增后送测序公司测序。得到的杂交瘤克隆mAb229的重链、轻链的DNA序列对应的氨基酸序列SEQ ID NO:5、6和SEQ ID NO:7、8所示:

mAb229-VH

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTSGMSWVKQAPGKGLKWMGWIN
TYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIKNEEDTATYFCARDNYDARD
VYYYAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 5

mAb229-VL

[0239] DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNL
ADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYCQHFWITPWTFGGGKLEIK

SEQ ID NO: 6

mAb303-VH

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTLTDYYMNVVKQSHGKSLEWIGVI
NPYNGDTAYNQKFKGKATLTVDKSSNTAYMEINSLTSEDSAVYYCTRDDGYDD
YYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO: 7

mAb303-VL

[0240] DIQMTQSPSSLSASLGERVILTCRASQDIGSRLNWLQQGPDGTFKRLIYATSTLD
SGVPKRFSGRSGSDFSLTISSEDFVDYYCLQLASSPPTFGGGKLEIK

SEQ ID NO: 8

[0241] 表1. 各重链及轻链CDR区序列

[0242]

	重链		轻链	
mAb229	HCDR1	TSGMS SEQ ID NO: 9	LCDR1	RASENIYSNLA SEQ ID NO: 15
	HCDR2	WINTYSGVPTYADDF KG SEQ ID NO: 10	LCDR2	AATNLAD SEQ ID NO: 16
	HCDR3	DNYDARDVYYYAMD Y SEQ ID NO: 11	LCDR3	QHFWITPWT SEQ ID NO: 17
mAb303	HCDR1	DYYMN SEQ ID NO: 12	LCDR1	RASQDIGSRLN SEQ ID NO: 18
	HCDR2	VINPYNGDTAYNQKF KG SEQ ID NO: 13	LCDR2	ATSTLDS SEQ ID NO: 19
	HCDR3	DDGYDYDYFDV SEQ ID NO: 14	LCDR3	LQLASSPPT SEQ ID NO: 20

[0243] 对得到的阳性克隆进行结合人LAG-3的ELISA实验(结果见表2中蛋白水平结合活性EC50值)、结合人LAG-3过表达CHO-s细胞的ELISA实验(结果见表2 中细胞水平结合活性EC50值)和阻断LAG-3抗原与Daudi细胞结合实验(结果见表2中阻断活性EC50值),并检测其与人LAG-3蛋白的亲和力(结果见表3)。

[0244] 表2.LAG-3鼠源抗体体外活性

[0245]

候选抗体	蛋白水平结合活性 EC50(nM)	细胞水平结合活性 EC50(nM)	阻断活性 IC50 (nM)
mAb229	0.129	0.191	1.327
mAb303	0.172	0.279	0.596

[0246] 表3.LAG-3鼠源抗体的亲和力

[0247]

固定相	流动相	亲和力 (M)
mAb229	LAG-3-Flag	4.26E-10
mAb303	LAG-3-Flag	4.70E-10

[0248] 表2数据显示LAG-3抗体mAb229和mAb303与人LAG-3蛋白均有很好的结合活性。LAG-3抗体mAb229和mAb303与过表达人LAG-3全长蛋白的CHO-S 细胞均有很好的结合活性。LAG-3抗体mAb229和mAb303均可显著阻断人 LAG-3抗原与Daudi细胞的结合。

[0249] 表3数据表明,本发明LAG-3抗体mAb229和mAb303对人LAG-3蛋白有较强的结合活性和亲和力。

[0250] 实施例3.抗人LAG-3鼠杂交瘤单克隆抗体mAb229的人源化

[0251] 通过比对IMGT人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和MOE软件,分别挑选与mAb229同源性高的重链和轻链可变区种系基因作为模板,将鼠源抗体的 CDR分别移植到相应的人源模板中,形成次序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的可变区序列。其中氨基

酸残基由Kabat 编号系统确定并注释。

[0252] 1、杂交瘤克隆mAb229人源化构架选择

[0253] 鼠源抗体mAb229的人源化轻链模板为IGKV1-39*01和hjk4.1,人源化重链模板为IGHV7-4-1*02和hjh6.1,人源化可变区序列如下:

Hu229VH-CDR graft

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYFTTSGMSWVRQAPGQGLEWMGWINTY
SGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDNYDARDVYYA
MDYWGQGTTVTVSS

[0254]

SEQ ID NO: 21

Hu229VL-CDR graft

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLAD
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHFHWITPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 22

[0255] 注:顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,序列中斜体为FR序列,下划线为CDR序列。

[0256] 2、杂交瘤克隆mAb229的模板选择和回复突变设计,见下表4:

[0257] 表4.mAb229的模板选择和回复突变设计

Hu229_VL		Hu229_VH	
Hu229_VL.1	Grafted	Hu229_VH.1	Grafted
Hu229_VL.1A	I48V, F71Y	Hu229_VH.1A	E46K
Hu229_VL.1B	D70Q, F71Y, I48V	Hu229_VH.1B	E46K, R38K, V93T
Hu229_VL.1C	D70Q, F71Y, I48V, A43S	Hu229_VH.1C	E46K, R38K, V93T, Y95F

[0260] 注:如I48V表示依照Kabat编号系统,将48位I突变回V。Grafted代表鼠抗体CDR 植入人种系FR区序列。

[0261] 表5.鼠抗mAb229人源化序列组合

	Hu229_VL.1	Hu229_VL.1A	Hu229_VL.1B	Hu229_VL.1C
Hu229_VH.1	Hu229-004	LF 229-005	Hu229-006	Hu229-007
Hu229_VH.1A	Hu229-008	Hu229-009	Hu229-010	Hu229-011
Hu229_VH.1B	Hu229-012	Hu229-013	Hu229-014	Hu229-015
Hu229_VH.1C	Hu229-016	Hu229-017	Hu229-018	Hu229-019

[0263] 注:该表表示各种突变组合所得的序列。如Hu229-005表示,在人源化的鼠抗体Hu229-005上的有轻链HumAb229_VL.1A、重链HumAb229_VH.1两种突变。其它类推。

[0264] mAb229人源化具体序列如下:

[0265] Hu229VH.1 (同Hu229VH-CDR graft)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTSGMSWVRQAPGQGLEWMGWI
NTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDNYDAR
DVYYYAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 21

Hu229VH.1A

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTSGMSWVRQAPGQGLKWMGWI
NTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDNYDAR
DVYYYAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 23

[0266]

Hu229VH.1B

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTSGMSWVKQAPGQGLKWMGWI
NTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYYCARDNYDAR
DVYYYAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 24

Hu229VH.1C

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTSGMSWVKQAPGQGLKWMGWI
NTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCARDNYDARD
VYYYAMDYWGQGTTVTVSS

[0267]

SEQ ID NO: 25

[0268]

Hu229VL.1 (同Hu229VL-CDR graft)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 22

Hu229VL.1A

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLVYAATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 26

[0269]

Hu229VL.1B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLVYAATNL
ADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 27

Hu229VL.1C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYAATNL
ADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 28

[0270]

实施例4. 抗人LAG-3鼠杂交瘤单克隆抗体mAb303的人源化

[0271] 通过比对IMGT人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和MOE软件,分别挑选与mAb303同源性高的重链和轻链可变区种系基因作为模板,将鼠源抗体的 CDR分别移植到相应的人源模板中,形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的可变区序列。其中氨基酸残基由Kabat 编号系统确定并注释。

[0272] 1、杂交瘤克隆mAb303人源化构架选择

[0273] 鼠源抗体mAb303的人源化轻链模板为IGKV1-39*01和hjk4.1,人源化重链模板为IGHV1-3*01和hjh6.1,人源化可变区序列如下:

Hu303VH-CDR graft

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGVINP
YNGDTAYNQKF~~K~~GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD~~D~~DGYDYDFD
VWGQGTTVTVSS

[0274]

SEQ ID NO: 29

Hu303VL-CDR graft

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLN~~WY~~QQKPGKAPKLLIYATSTLDSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTIS~~SLQ~~PEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

[0275]

SEQ ID NO: 30

[0276] 注:顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,序列中斜体为FR序列,下划线为CDR序列。

[0277] 2、杂交瘤克隆mAb303的模板选择和回复突变设计,见下表6:

[0278] 表6. 杂交瘤克隆mAb303人源化回复突变

[0279]

Hu303_VL		Hu303_VH	
Hu303_VL.1	Grafted	Hu303_VH.1	Grafted
Hu303_VL.1A	L46R, G66R	Hu303_VH.1A	R72V, T74K, A97T
Hu303_VL.1B	L46R, G66R, S60K	Hu303_VH.1B	R72V, T74K, A97T, F29L
Hu303_VL.1C	L46R, G66R, S60K, P44F, Y36L	Hu303_VH.1C	R72V, T74K, F29L, A97T, M48I, V68A, I70L
Hu303_VL.1D	L46R, G66R, S60K, P44F, Y36L, K42G, I21L, T85D		

[0280] 注:如L46R表示依照Kabat编号系统,将46位L突变回R。Grafted代表鼠抗体CDR植入人种系FR区序列。

[0281] 各突变序列组合如下:

[0282] 表7. 鼠抗mAb303人源化序列组合

	Hu303_V L.1	Hu303_VL. 1A	Hu303_VL. 1B	Hu303_VL. 1C	Hu303_VL. 1D
	Hu303_VH.1 4	Hu303-005	Hu303-006	Hu303-007	Hu303-008
[0283]	Hu303_VH.1 A	Hu303-009	Hu303-010	Hu303-011	Hu303-012
	Hu303_VH.1 B	Hu303-014	Hu303-015	Hu303-016	Hu303-017
	Hu303_VH.1 C	Hu303-019	Hu303-020	Hu303-021	Hu303-022
					Hu303-023

[0284] 注：该表表示各种突变组合所得的序列。如Hu303-005表示，在人源化的鼠抗体Hu303-005 上的有轻链HumAb303_VL.1A、重链HumAb303_VH.1两种突变。其它类推。

[0285] mAb303人源化具体序列如下：

[0286] Hu303_VH.1 (同Hu303VH-CDR graft)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGV
INPYNGDTAYNQKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDGYY
DYYFDVWGQGTTTVTVSS

SEQ ID NO: 29

Hu303_VH.1A

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGV
INPYNGDTAYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRDDGYY
DYYFDVWGQGTTTVTVSS

SEQ ID NO: 31

[0287] Hu303_VH.1B

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGV
INPYNGDTAYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRDDGYY
DYYFDVWGQGTTTVTVSS

SEQ ID NO: 32

Hu303_VH.1C

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYYMNWVRQAPGQRLEWIGVI
NPYNGDTAYNQKFKGRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRDDGYY
DYYFDVWGQGTTTVTVSS

SEQ ID NO: 33

[0288] Hu303_VL.1 (同Hu303VL-CDR graft)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWFYQQKPGKAPKLLIYATSTL
DSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 30

Hu303_VL.1A

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWFYQQKPGKAPKRLIYATSTL
DSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

[0289]

SEQ ID NO: 34

Hu303_VL.1B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWFYQQKPGKAPKRLIYATSTL
DSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 35

Hu303_VL.1C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWLQQKPGKAFKRLIYATSTL
DSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 36

[0290] Hu303_VL.1D

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWLQQKPGGAFKRLIYATSTL
DSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFADYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 37

[0291] 实施例5. 重组以及人源化抗体的制备

[0292] 抗体选用人重链IgG4/轻链kappa的恒定区与各可变区组合,在Fc段做了 S228P突变来增加IgG4抗体的稳定性,也可选用本领域其它已知的突变来增加其性能。

[0293] 重链恒定区:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV

[0294] DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 38

[0295] 轻链恒定区:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

[0296]

SEQ ID NO: 39

[0297] Hu229-013的重链氨基酸序列为:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTSGMSWVKQAPGQGLKWM
GWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYYCARDNY
DARDVYYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC
[0298] NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK SEQ ID NO: 40

[0299] Hu229-013的轻链氨基酸序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLVYAA
TNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGTKVEI
[0300] KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC SEQ ID NO: 41

[0301] Hu303-005的重链氨基酸序列为:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQRLEW
MGVINPYNGDTAYNQKFGRVTITRDTASATAYMELSSLRSEDTAVYYCARD
GYDYDFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV
[0302] KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK SEQ ID NO: 42

[0303] Hu303-005的轻链氨基酸序列为:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNHWYQQKPGKAPKRLIYAT
STLD SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK
[0304] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 43

[0305] 1. 重组抗体的分子克隆

[0306] 杂交瘤筛选所获得的阳性抗体分子经过测序后,得到可变区编码基因序列。以测序所得序列设计首尾引物,以测序基因为模板,经过PCR搭建各抗体VH/VK 基因片段,再与表达载体pHr(带信号肽及hIgG4/hkappa恒定区基因(CH1-FC/CL) 片段)进行同源重组,构建重组抗体全长表达质粒VH-CH1-FC-pHr/VL-CL-pHr。

[0307] 2. 人源化抗体的分子克隆

[0308] 人源设计之后的抗体序列,经过密码子优化后产生人密码子偏好的编码基因序列,设计引物PCR搭建各抗体VH/VK基因片段,再与表达载体pHr(带信号肽及hIgG4/hkappa恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)进行同源重组,构建人源化抗体全长表达质粒VH-CH1-FC-pHr/VL-CL-pHr。

[0309] 3. 重组以及人源化抗体的表达与纯化

[0310] 分别表达抗体轻重链的质粒以1:1.2的比例转染HEK293E细胞,6天后收集表达上清,高速离心去除杂质,用Protein A柱进行纯化。用PBS冲洗柱子,至A280读数降至基线。用pH3.0-pH3.5的酸性洗脱液洗脱目的蛋白,用1M Tris-HCl,pH8.0-9.0中和。洗脱样品适当浓缩后,利用PBS平衡好的凝胶层析 Superdex200 (GE) 进一步纯化,以去除聚体,收集单体峰,分装备用。

[0311] 以下用生化测试方法验证本发明抗体性能及有益效果。

[0312] 实施例6:LAG-3抗体结合人LAG-3(human LAG-3)蛋白的ELISA实验

[0313] 抗LAG-3抗体的结合力通过抗体与human LAG-3蛋白的ELISA实验来检测。用带Fc或mFc标签的LAG-3融合蛋白通过与包被在酶标板中的抗Fc或mFc抗体结合从而固定到96孔酶标板中,抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和 LAG-3的结合活性,具体实验方法如下。

[0314] 用pH7.4的PBS(Sigma,Cat No.P4417-100TAB)缓冲液将羊抗人Fc抗体(Jackson Immuno Research,Cat No.109-005-008)或羊抗鼠Fc抗体(Sigma,Cat No.M3534-1ML)稀释至2 μ g/ml浓度,以50 μ l/孔的体积加入96孔酶标板中,于37 $^{\circ}$ C孵育箱中放置2小时。弃去液体后,加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶(光明脱脂奶粉)封闭液200 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育2.5小时或4 $^{\circ}$ C放置过夜(16-18小时)进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用PBST缓冲液(PH7.4 PBS含0.05% tween-20)洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液(PH7.4 PBS含1% BSA)稀释至1 μ g/ml的LAG-3-Fc融合蛋白(内部生产,SEQ ID NO:3)或LAG-3-mFc融合蛋白(内部生产,SEQ ID NO:4),置37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育1小时或4 $^{\circ}$ C放置过夜。孵育结束后,弃去酶标板中的反应液,用PBST洗板6次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体(杂交瘤纯化抗体或人源化抗体),放于37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育1小时。孵育结束后用PBST洗板5次,加入100 μ l/孔用样品稀释液稀释的HRP标记的羊抗鼠二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.115-035-003)或羊抗人二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.109-035-003),37 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PBST洗板6次后,加入50 μ l/孔TMB显色底物(KPL,Cat No.52-00-03),于室温孵育5-15min,加入50 μ l/孔1M H₂SO₄终止反应,用NOVOStar酶标仪在波长450nm处读取吸收值,计算LAG-3抗体对人LAG-3的结合EC50值。结果如表8所示,数据表明,本发明筛选得到的人源化抗体与人LAG-3蛋白均有较高的结合活性。

[0315] 表8. 候选抗体在结合实验中的EC50的测定

[0316]	候选抗体	结合 ELISA EC50(nM)
	mAb229	0.129
	Hu229-008	0.506
	Hu229-009	0.152
	Hu229-010	0.174

[0317]

Hu229-011	0.201
Hu229-012	0.268
Hu229-013	0.106
Hu229-014	0.153
Hu229-015	0.156
Hu229-016	0.154
Hu229-017	0.048
Hu229-019	0.068
mAb303	0.172
Hu303-004	0.278
Hu303-005	0.309
Hu303-006	0.288
Hu303-007	0.135
Hu303-008	0.140
Hu303-009	0.316
Hu303-010	0.137
Hu303-011	0.314
Hu303-012	0.164
Hu303-013	0.166
Hu303-014	0.232
Hu303-015	0.172
Hu303-016	0.161
Hu303-017	0.168
Hu303-018	0.244
Hu303-019	0.277
Hu303-020	0.140
Hu303-021	0.170
Hu303-022	0.145
Hu303-023	0.152

[0318] 实施例7:LAG-3抗体与human LAG-3过表达CHO-S细胞的结合实验

[0319] 抗LAG-3抗体的结合力通过抗体与过表达LAG-3蛋白的CHO-S细胞的结合实验来检测。通过电转染的方法将LAG-3全长质粒(内部生产,SEQ ID NO:2)转染进CHO-S细胞中后加压筛选两周后,检测LAG-3的表达量。将过表达细胞固定于96孔板底后,抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和LAG-3过表达CHO-S细胞的结合活性,具体实验方法如下。

[0320] 将细胞以 4×10^5 /ml密度,100 μ l/孔接种于96孔板中过夜培养。弃上清,用PBS洗

三遍后,加入100 μ l/孔4%PFA室温固定半小时,PBS洗三遍。弃去液体后,加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶(光明脱脂奶粉)封闭液200 μ l/孔,37℃孵育箱孵育2.5小时进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用PBST缓冲液(PH7.4 PBS含0.05% tween-20)洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体(杂交瘤纯化抗体或人源化抗体),放于37℃孵育箱孵育1小时。孵育结束后用PBST洗板5次,加入100 μ l/孔用样品稀释液稀释的HRP标记的羊抗鼠二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.115-035-003)或羊抗人二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.109-035-003),37℃孵育1小时。用PBST洗板6次后,加入50 μ l/孔TMB显色底物(KPL,Cat No.52-00-03),于室温孵育5-15min,加入50 μ l/孔1M H₂SO₄终止反应,用NOVOStar酶标仪在波长450nm处读取吸收值,计算LAG-3抗体对LAG-3过表达CHO-S细胞的结合EC50值。

[0321] 实施例8:抗LAG-3抗体阻断LAG-3抗原和Daudi细胞结合实验

[0322] Daudi细胞(人白血病细胞,购自中科院细胞库)以 3×10^5 /孔的数量接种于96孔培养板中,1000转离心后弃上清,加入4%PFA室温固定30分钟。弃去固定液后用PBS缓冲液洗4遍,加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶(光明脱脂奶粉)封闭液200 μ l/孔,37℃孵育箱孵育2.5小时进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用PBST缓冲液(PH7.4PBS含0.05% tween-20)洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液(pH7.4PBS含1%BSA)稀释的已预混合孵育1小时的终浓度为0.4 μ g/ml的生物素(生物素标记试剂盒,东仁化学,Cat No.LK03)标记的LAG-3-Fc融合蛋白(内部生产,SEQ ID NO:3)和梯度浓度的待测抗体的混合液,置37℃孵育箱孵育1小时。孵育结束后,弃去酶标板中的反应液,用PBST洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液稀释HRP标记的链霉亲和素(Sigma,Cat No.S2438),37℃孵育1小时。用PBST洗板5次后,加入50 μ l/孔TMB显色底物(KPL,Cat No.52-00-03),于室温孵育5-15min,加入50 μ l/孔1M H₂SO₄终止反应,用NOVOStar酶标仪在波长450nm处读取吸收值,计算LAG-3抗体对抗原与daudi细胞结合的阻断作用。结果如表9所示,数据表明,本发明筛选得到的人源化抗体均可显著阻断人LAG-3抗原与Daudi细胞的结合。

[0323] 表9. 候选抗体在结合阻断实验中的IC50的测定

	候选抗体	结合测定法 IC50 (nM)
[0324]	mAb229	1.327
	Hu229-009	0.559
	Hu229-010	0.453

[0325]

Hu229-011	0.566
Hu229-013	0.39
Hu229-014	0.718
Hu229-015	0.808
Hu229-016	0.875
Hu229-017	0.239
Hu229-019	0.289
mAb303	0.596
Hu303-004	0.502
Hu303-005	0.622
Hu303-006	0.821
Hu303-007	0.343
Hu303-008	0.346
Hu303-009	0.417
Hu303-010	0.346
Hu303-011	0.728
Hu303-012	0.361
Hu303-013	0.347
Hu303-014	0.467
Hu303-015	0.398
Hu303-016	0.395
Hu303-017	0.398
Hu303-018	0.608
Hu303-019	0.471
Hu303-020	0.345
Hu303-021	0.456
Hu303-022	0.360
Hu303-023	0.369

[0326] 实施例9:BIACore检测LAG-3抗体亲和力实验

[0327] 1、按照鼠抗捕获试剂盒 (Cat.#BR-1008-38,GE) 说明书中所述的方法将鼠抗捕获抗体共价偶联于CM5生物传感芯片 (Cat.#BR-1000-12,GE) 上,从而亲和捕获待测抗体,然后于芯片表面流经LAG-3-Flag (内部生产,SEQ ID NO:1) 抗原,利用Biacore仪器实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线,通过拟合得到亲和力数值,见上表2。在实验中每个循环解离完成后,用鼠抗捕获试剂盒里配置的再生溶液将生物芯片洗净再生。结果表明,LAG-3抗体mAb229和mAb303对人LAG-3蛋白有较强的结合活性和亲和力。

[0328] 2、按照人抗捕获试剂盒 (Cat.#BR-1008-39,GE) 说明书中所述的方法将人抗捕获抗体共价偶联于CM5生物传感芯片 (Cat.#BR-1000-12,GE) 上,从而亲和捕获待测抗体,然后于芯片表面流经LAG-3-Flag (内部生产,SEQ ID NO:1) 抗原,利用Biacore仪器实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线,通过拟合得到亲和力数值,见下表10。在实验中每个循环解离完成后,用人抗捕获试剂盒里配置的再生溶液将生物芯片洗净再生。结果表明,本发明筛选得到的人源化抗体对人LAG-3蛋白有较强的结合活性和亲和力。

[0329] 表10. 抗LAG-3抗体的亲和力

	固定相	流动相	亲和力 (M)
	mAb229	LAG-3-Flag	1.72E-11
[0330]	Hu229-009		4.88E-11
	Hu229-010		3.82E-11
	Hu229-013		2.81E-11
	Hu229-014		3.74E-11
	Hu229-015		4.59E-11
	Hu229-017		6.71E-11
	Hu229-019		7.29E-11
	mAb303		7.49E-11
	Hu303-004		1.06E-09
	Hu303-005		7.15E-11
	Hu303-006		7.53E-11
	Hu303-009		9.43E-10
	Hu303-010		1.47E-10
	Hu303-014		4.91E-10
	Hu303-016		7.48E-11

[0331] 实施例10:PBMC-T淋巴细胞激活实验

[0332] 为了研究LAG-3抗体对T淋巴细胞激活,收集和纯化人外周血单核细胞 (PBMC),采用超抗原金黄色葡萄球菌肠毒素B (SEB) 体外刺激72小时,检测 IL-2细胞因子的分泌水平。实验过程简单描述如下:

[0333] 新鲜分离纯化的PBMC,接种至96孔细胞培养板,细胞密度约为 1×10^5 /孔,加入100ng/mL SEB超抗原刺激,同时加入梯度稀释的抗体样品(用培养基稀释) 或培养基作为空白对照。37℃,5%CO₂,培养箱培养72h后,收集细胞培养上清。采用ELISA (BD,CAT#550611) 方法检测细胞培养上清内IL-2分泌水平。具体操作参考试剂说明书。

[0334] 结果如图1所示,LAG-3人源化候选抗体Hu229-013,Hu303-005能够不同程度增强激活的T淋巴细胞分泌细胞因子IL-2,并且有药物浓度剂量效应。

[0335] 实施例11:LAG-3抗体对U-87MG皮下移植瘤抑制的影响

[0336] 本实验用于人源化抗LAG-3抗体对U-87MG荷瘤小鼠肿瘤体积的影响。

[0337] 将人脑胶质瘤U-87 MG细胞 (3.5×10^6 个) 100 μ l接种于NOD-SCID(购自常州卡文斯实验动物有限公司)小鼠右肋部皮下,待10-14d肿瘤长至约40mm³后,去除体重、肿瘤过大和过小的,按肿瘤体积将小鼠随机分为对照组Isotype matched hIgG,LAG-3人源化候选抗体Hu229-013组,Hu303-005组共3组(分组及剂量见表11),每组8只(D0)。将经CD3抗体刺激的PBMC以 5×10^5 cells/60 μ l量注射到肿瘤组织中,并开始腹腔注射抗体,一周三次,共给药6次。每周测2次瘤体积,记录数据。肿瘤体积(V)计算公式为:

[0338] 肿瘤体积(TV) = $1/2 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$

[0339] 各组动物肿瘤体积均用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SEM)表示,并用Graphpad Prism 5软件作图,使用two way ANOVA统计分析,并计算抑瘤率,公式为:

[0340] 肿瘤增殖率(T/C%) = $(T - T_0 / C - C_0) \times 100\%$

[0341] 抑瘤率%TGI = $1 - T/C\%$

[0342] 实验结果如表11及图2所示,给药14天后,LAG-3抗体Hu229-013 6mpk, Hu303-005 6mpk均有一定的抑瘤效果,抑瘤率分别为27.25% ($p < 0.05$)及34.94% ($p < 0.01$);与对照组有显著差异($p < 0.001$ vs hIgG)。

[0343] 表11. 人源化抗LAG-3抗体对U-87MG小鼠皮下移植瘤的疗效

组	剂量 (mpk)	第 0 天 Mean $\pm$ SEM (mm ³)	第 14 天 Mean $\pm$ SEM(mm ³)	P(vs hIgG)	在第 14 天的%TGI
hIgG 对照	6	37.9 $\pm$ 2.6	247.1 $\pm$ 26.5	-	-
Hu229-013	6	37.9 $\pm$ 2.5	190.1 $\pm$ 26.2*	<0.05	27.25%
Hu303-005	6	37.7 $\pm$ 2.4	173.5 $\pm$ 26.5**	<0.01	34.94%

[0345] 注:D0:第一次给药时间;* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$ vs hIgG,通过two way ANOVA 分析。

[0346] 实施例12. 抗LAG-3人源化抗体,Hu229-013和Hu303-005的小鼠PK测定

[0347] ICR小鼠18只,雄性,体重18-22g,购自西普尔-必凯实验动物有限公司。饲养期间自由摄取饲料和水,实验室环境适应性饲养不小于3天,12/12小时光/暗周期调节,温度16-26 $^{\circ}$ C,相对湿度40-70%。实验开始前一天,对ICR小鼠进行编号,随机分组,每组各3只。实验当天,两组小鼠分别静脉注射人源化候选抗体(Hu229-013),给药剂量为3mg/kg和10mg/kg;两组每只小鼠分别静脉注射人源化候选抗体(Hu303-005),给药剂量为3mg/kg和10mg/kg。静脉注射体积为20ml/kg。

[0348] 给药后采血时间点为15min,8h,1d,2d,4d,7d,10d,14d,21d,28d,35d。每次约取全血0.1ml,不加抗凝剂,取血后在4 $^{\circ}$ C放置30min,1000g离心15min,取上清置于EP管中,-80 $^{\circ}$ C保存。

[0349] 用ELISA方法检测血清中的血药浓度,用Winnolin软件来计算受试药物的 T1/2及其主要参数。所得主要药动学参数见表12:

[0350] 表12. Hu229-013和Hu303-005在小鼠体内的主要药动学参数表

[0351]		Hu229-013		Hu303-005	
	剂量(mg/kg)	3mg/kg	10mg/kg	3mg/kg	10mg/kg
	t _{max} (hour)	0.25	0.25	0.25	0.25
	C _{max} (ug/ml)	51.6±1.2	130±20.2	68.2±8.4	243.2±19.9
	AUC _{0-t} (ug/ml*h)	5556±891	17120±4177	6386±453	22609±1567
	AUC _{0-∞} (ug/ml*h)	5871±1036	19736±6142	7124±581	27061±5154
	t _{1/2} (h)	183±54	276±193	232±24	330±194
	CLz/F(ml/min/kg)	0.0087±0.0015	0.0092±0.0034	0.007±0.0006	0.0063±0.0011
	Vz/F(ml/kg)	134±16	186±107	141±14	168±66
	MRT _{0-∞} (h)	241±59	353±191	324±37	411±181

[0352] LAG-3人源化抗体Hu229-013和Hu303-005在小鼠体内的暴露量相近,且2个抗体在3,10mg/kg剂量下的暴露量、达峰浓度与剂量增长基本呈线性关系,具有线性动力学特征。

[0353] 示例性抗体药物组合物(制剂)制备工艺

[0354] 第一步:处方组成LAG-3抗体原液过0.22μm PVDF滤芯,过滤后中控取样检测无菌,收集滤液。

[0355] 第二步:调节装量至5.3ml,将滤液灌装于6ml西林瓶中,加塞,分别于灌装开始、灌装中间、灌装结束时取样中控检测装量差异。

[0356] 第三步:开启轧盖机,加铝盖,进行轧盖。

[0357] 第四步:目检,确认产品无装量不准等缺陷。打印、粘贴西林瓶标签;打印纸盒标签,折叠纸盒,装盒,贴纸盒标签。

[0358] 示例性的抗体药物组合物制备工艺:

[0359] 第一步:处方组成Hu303-005原液过0.22μm PVDF滤芯,滤后中控取样检测无菌,收集滤液。

[0360] 第二步:调节装量至5.3ml,将滤液灌装于20ml西林瓶中,半加冻干塞,将西林瓶中原液冻干,密封胶塞。

[0361] 第三步:开启轧盖机,加铝盖,进行轧盖。

[0362] 第四步:目检,确认产品无冻干塌陷等缺陷。打印、粘贴西林瓶标签;打印纸盒标签,折叠纸盒,装盒,贴纸盒标签。

[0363] 实施例13.LAG-3抗体制剂缓冲体系的筛选

[0364] 在10mM pH5.0-7.5一系列缓冲剂中,配制蛋白浓度为50mg/mL的LAG-3抗体Hu229-013或Hu303-005制剂,将每种制剂过滤灌装,加塞,轧盖,封口。将样品进行40℃高温、振摇等强制降解实验,以外观、分子排阻色谱法(SEC)、非还原十二烷基硫酸钠(CE-SDS)-毛细管电泳和离子交换色谱法(IEC)或全柱成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)为评价指标。结果见表13-1和表13-2,统计分析结果见图3-图6。

[0365] 表13-1.Hu229-013缓冲体系筛选结果

[0366]

缓冲剂 /pH	条件	外观	SEC% 单体	非还原 CE%	IEC%		
					酸	中	碱
醋酸-醋 酸钠 (AA)/ 5.0	0 时	澄清, 含有少量颗粒	99.3	97.1	10.4	78.2	11.4
	40℃D12	澄清, 含有少量丝状颗粒	99.1	94.9	13.9	63.4	22.8
	40℃D31	N/A	98.5	87.2	20.6	50.5	28.9
	振摇 D6	浑浊	99.0	96.7	10.9	75.8	13.3
	振摇 D12	澄清, 含有少量小颗粒	98.8	97.0	11.0	75.0	13.9
醋酸-醋 酸钠/ 5.5	0 时	澄清, 含有少量颗粒	99.3	97.2	10.5	78.4	11.1
	40℃D12	澄清, 含有少量丝状颗粒	99.1	95.5	15.4	66.5	18.1
	40℃D31	N/A	98.6	91.7	24.6	55.0	20.4
	振摇 D6	浑浊	99.0	96.6	10.9	76.2	12.8
	振摇 D12	乳光, 含有少量小颗粒	99.0	97.0	11.2	75.7	13.1
琥 珀 酸 - 琥珀酸钠 (SA)/ 5.5	0 时	澄清, 含有少量颗粒	99.3	97.1	12.6	76.3	11.2
	40℃D12	较多丝状颗粒	99.0	95.5	15.5	65.2	19.3
	40℃D31	N/A	98.5	86.6	24.1	53.4	22.5
	振摇 D6	浑浊, 含丝状大颗粒或沉淀	99.1	96.6	11.0	76.1	12.8

[0367]

	振摇 D12	澄清, 含有少量小颗粒	99.1	97.0	11.3	75.1	13.7
琥珀酸- 琥珀酸钠 / 6.0	0 时	澄清, 含有少量颗粒	99.3	97.2	13.0	76.2	10.8
	40°C D12	澄清, 含有少量丝状颗粒	99.0	96.0	15.6	70.2	14.3
	40°C D31	N/A	98.4	92.4	27.5	57.2	15.3
	振摇 D6	浑浊, 含丝状大颗粒或沉淀	99.0	96.6	11.2	76.3	12.6
	振摇 D12	较多小颗粒	99.2	97.0	11.3	76.4	12.3
柠檬酸- 柠檬酸钠 (CA)/ 5.5	0 时	澄清, 含有少量颗粒	99.3	97.1	13.1	76.3	10.6
	40°C D12	较多丝状颗粒	99.0	95.2	15.4	64.9	19.7
	40°C D31	N/A	98.2	90.4	24.2	51.7	24.1
	振摇 D6	浑浊, 含丝状大颗粒或沉淀	99.2	96.7	11.0	76.0	13.0
	振摇 D12	浑浊, 小颗粒沉淀	99.2	96.9	11.2	75.1	13.7
柠檬酸- 柠檬酸钠 / 6.0	0 时	澄清, 含有少量颗粒	99.3	97.3	12.8	76.8	10.4
	40°C D12	较多丝状颗粒	99.0	95.9	14.6	63.0	22.3
	40°C D31	N/A	98.7	92.1	25.7	58.2	16.0
	振摇 D6	浑浊, 含丝状大颗粒或沉淀	99.0	96.8	11.1	76.3	12.5
	振摇 D12	浑浊, 小颗粒沉淀	99.0	97.0	14.0	73.8	12.1
组氨酸- 盐酸 (His-HCl) / 5.5	0 时	澄清, 含有少量颗粒	99.3	96.7	10.5	78.3	11.1
	40°C D12	较多丝状颗粒	99.1	95.1	16.9	66.6	16.5
	40°C D31	N/A	98.7	90.2	21.7	51.4	26.9
	振摇 D6	浑浊	99.0	96.7	10.7	76.3	12.9
	振摇 D12	较多小颗粒	99.2	96.9	11.0	75.7	13.3
组氨酸- 盐酸/ 6.0	0 时	澄清, 含有少量颗粒	99.3	96.4	10.3	79.2	10.5
	40°C D12	较多丝状颗粒	99.1	95.7	16.6	65.8	17.6
	40°C D31	N/A	98.8	92.0	25.7	57.0	17.3
	振摇 D6	浑浊, 含丝状大颗粒或沉淀	99.1	96.8	10.9	77.2	11.9
	振摇 D12	较多小颗粒	99.2	96.9	11.5	76.3	12.2
Tris 7.5	0 时	澄清, 含有少量颗粒	99.1	96.4	11.0	79.8	9.2
	40°C D12	较多丝状颗粒	98.8	95.6	27.9	62.0	10.1
	40°C D31	N/A	98.0	92.0	45.9	45.9	8.3
	振摇 D6	浑浊, 含丝状大颗粒或沉淀	99.1	96.7	12.7	77.6	9.7
[0368]		沉淀					
	振摇 D12	浑浊, 小颗粒沉淀	99.0	97.0	14.0	76.7	9.3

[0369] 注：振摇D12样品制备时加入0.01mg/ml聚山梨酯80，其他样品不含聚山梨酯80；D表示天数。

[0370] 表13-2.Hu303-005抗体缓冲体系筛选结果

[0371]

缓冲剂/pH	条件	外观	iCIEF 中性峰%	非还原CE-SDS%
醋酸-醋酸钠(AA) 5.0	D0	澄明	55.7	97.28
	40℃ D11	N/A	26.0	92.57
	振摇 D3	澄清	N/A	N/A
醋酸-醋酸钠 5.5	D0	澄明	57.0	97.63
	40℃ D11	N/A	32.9	94.27
	振摇 D3	少量颗粒	N/A	N/A
琥珀酸-琥珀酸钠(SA) 5.0	D0	澄明	56.9	97.48
	40℃ D11	N/A	19.6	90.11
	振摇 D3	澄清，有乳光	N/A	N/A
琥珀酸-琥珀酸钠 5.5	D0	澄明，有乳光	55.2	97.23
	40℃ D11	N/A	29.0	92.11
	振摇 D3	大量颗粒	N/A	N/A
琥珀酸-琥珀酸钠 6.0	D0	澄明	59.1	97.41
	40℃ D11	N/A	37.7	94.55
	振摇 D3	大量颗粒	N/A	N/A
组氨酸-盐酸(His-HCl) 5.5	D0	澄明	55.8	97.11
	40℃ D11	N/A	25.5	91.31
	振摇 D3	澄清	N/A	N/A
组氨酸-盐酸 6.0	D0	澄明	59.9	97.41
	40℃ D11	N/A	37.3	95.38
	振摇 D3	大量细小颗粒	N/A	N/A
组氨酸-盐酸 6.5	D0	澄明	57.0	97.63
	40℃ D11	N/A	45.9	94.38
	振摇 D3	大量细小颗粒	N/A	N/A
柠檬酸-柠檬酸钠(CA) 5.5	D0	澄明，有乳光	55.2	97.64
	40℃ D11	N/A	24.5	90.57
	振摇 D3	透明丝状物，蛋白析出	N/A	N/A
柠檬酸-柠檬酸钠 6.0	D0	澄明，有乳光	56.6	97.05
	40℃ D11	N/A	36.4	93.53
	振摇 D3	少量颗粒	N/A	N/A
柠檬酸-柠檬酸钠 6.5	D0	澄明，有乳光	55.4	97.48
	40℃ D11	N/A	43.3	94.64
	振摇 D3	少量颗粒	N/A	N/A
磷酸氢钠-	D0	大量颗粒	54.9	97.30

[0372]	缓冲剂/pH	条件	外观	iCIEF 中性峰%	非还原CE-SDS%
	磷酸氢二钠 (PB) 6.0	40℃ D11	N/A	36.8	95.16
		振摇 D3	大量细小颗粒	N/A	N/A
	磷酸氢钠-磷酸氢二钠 6.5	D0	大量颗粒	55.2	97.28
		40℃ D11	N/A	47.0	94.07
		振摇 D3	大量细小颗粒	N/A	N/A
	磷酸氢钠-磷酸氢二钠 7.0	D0	大量颗粒	56.4	97.69
		40℃ D11	N/A	46.5	93.71
		振摇 D3	大量细小颗粒	N/A	N/A

[0373] 备注:D表示天;N/A表示未检测。

[0374] 结果表明:

[0375] (1) Hu229-013抗体在醋酸-醋酸钠 (AA) 体系外观最佳,其次为琥珀酸-琥珀酸钠 (SA) 和组氨酸-盐酸 (His-HCl) 体系,醋酸-醋酸钠 (AA), pH5.5、琥珀酸-琥珀酸钠 (SA), pH6.0、柠檬酸-柠檬酸钠 (CA), pH6.0、组氨酸-盐酸 (His), pH6.0体系40℃CE、IEC纯度较高,综合考虑外观及CE、IEC结果,LAG-3抗体 Hu229-013在AA (pH5.5)、SA (pH6.0)、His-HCl (pH6.0) 体系中较为稳定,见图3和图4。

[0376] (2) Hu303-005抗体的振摇外观数据显示,pH较低时外观较好,缓冲体系组氨酸-盐酸盐 (His-HCl) 和醋酸-醋酸钠 (AA) 较优。在40℃加速条件下CE-SDS (非还原) 及iCIEF出现明显下降,其中CE-SDS数据显示,pH 6.0较优,缓冲体系醋酸-醋酸钠、组氨酸-盐酸 (His-HCl) 和磷酸盐体系较优。iCE数据显示,pH较高时中性峰下降较少,见图5和图6。综合考虑优选缓冲体系为10mM His-HCl pH6.0。

[0377] 实施例14.LAG-3抗体制剂中辅料的筛选

[0378] (1) 在含下列不同浓度表面活性剂及糖的缓冲剂中,制备蛋白浓度为 50mg/mL,含10mM琥珀酸-琥珀酸钠,pH6.0的LAG-3 Hu229-013制剂,结果见表14-1。具体如下:

[0379] 1) 0.1mg/mL聚山梨酯20 (PS20)

[0380] 2) 0.1mg/mL聚山梨酯80 (PS80)

[0381] 3) 70mg/mL蔗糖

[0382] 4) 70mg/mL海藻糖

[0383] 5) 50mg/mL甘露醇

[0384] 6) 50mg/mL山梨醇

[0385] (2) 在含下列不同浓度表面活性剂及糖的缓冲液中,制备Hu303-005抗体浓度为50mg/mL,含10mM醋酸(钠),pH5.5的Hu303-005制剂,结果见图7 和表14-2。

[0386] 1) 75mg/mL蔗糖+0.2mg/mL PS80

[0387] 2) 75mg/mL海藻糖+0.2mg/mL PS80

[0388] 3) 0.05mg/mL聚山梨酯20 (PS20)

[0389] 4) 0.05mg/mL聚山梨酯80 (PS80)

[0390] 5) 0.2mg/mL PS20

[0391] 6) 0.2mg/mL PS80

[0392] 7) 0.4mg/mL PS20

[0393] 8) 0.4mg/mL PS80

[0394] 将每种制剂过滤灌装,加塞,轧盖,封口。将样品进行40℃高温、反复冻融、振摇等强制降解实验,结果见表14和图7。

[0395] 表14-1.不同辅料对Hu229-013稳定性影响

[0396]

制剂辅料	条件	外观	SEC%	IEC%	非还原
			单体	中性	CE-SDS%
0.1 mg/ml PS 20	0 时	澄明	99.2	73.5	97.0
	冻融 1 次	澄明	N/A	N/A	N/A
	40℃D14	澄明, 少量小颗粒	98.9	68.3	95.2
	振摇 D9	乳光, 含大量颗粒	98.9	74.6	96.2
0.1 mg/ml PS 80	0 时	澄明	99.2	74.1	96.9
	冻融 1 次	澄明	N/A	N/A	N/A
	40℃D14	澄明, 少量小颗粒	99.0	68.7	95.4
	振摇 D9	澄明	99.2	74.3	96.5
70mg/ml 蔗糖	0 时	澄明, 含少量颗粒	99.2	74.9	96.7
	冻融 1 次	少量颗粒	N/A	N/A	N/A
	40℃D14	澄明, 大量小颗粒	98.9	68.9	95.2
	振摇 D9	乳光, 大块絮状物	98.9	74.0	96.6
70mg/ml 海藻糖	0 时	澄明, 含少量颗粒	99.2	74.0	96.5
	冻融 1 次	大量颗粒	N/A	N/A	N/A
	40℃D14	澄明, 大量小颗粒	98.9	69.1	95.3
	振摇 D9	乳光, 大块絮状物	99.1	73.9	96.7
50mg/ml 甘露醇	0 时	澄明, 含少量颗粒	99.2	74.3	96.3
	冻融 1 次	含有颗粒	N/A	N/A	N/A
	40℃D14	澄明, 大量小颗粒	98.9	68.3	95.1
	振摇 D9	大块絮状物	99.1	74.5	96.6
50mg/ml 山梨醇	0 时	澄明, 含少量颗粒	99.1	74.1	95.9
	冻融 1 次	含有颗粒	N/A	N/A	N/A
	40℃D14	澄明, 大量小颗粒	99.0	67.7	94.6
[0397]	振摇 D9	大块絮状物	99.2	74.1	96.7

[0398] 注:D表示天。

[0399] 表14-2.不同辅料对Hu303-005稳定性影响

	制剂辅料	条件	外观	SEC 单体%
[0400]	75 mg/mL 蔗糖+0.2 mg/mL PS80	D0	澄明	99.2
		振摇 D9	极少量颗粒	96.0
	75 mg/mL 海藻糖+0.2 mg/mL PS80	D0	澄明	99.3
		振摇 D9	澄明	94.8
	0.05 mg/mL 聚山梨酯 20 (PS20)	D0	澄明	99.3
		振摇 D9	澄明, 深乳光	17.5
	0.05 mg/mL 聚山梨酯 80 (PS80)	D0	澄明	99.2
		振摇 D9	澄明, 浅乳光	19.7
	0.2mg/mL PS20	D0	澄明	99.1
		振摇 D9	澄明	89.3
	0.2 mg/mL PS80	D0	澄明	98.9
		振摇 D9	澄明	94.4
	0.4 mg/mL PS20	D0	澄明	99.1
		振摇 D9	澄明	98.4
	0.4mg/mL PS80	D0	澄明	99.2
		振摇 D9	澄明	98.3

[0401] 注:D表示天数。

[0402] 结果表明:

[0403] (1) Hu229-013抗体制剂经振摇PS80组外观优于PS20;冻融1次后,蔗糖组出现少量颗粒,海藻糖组出现大量颗粒;其他数据组间无差异;因此辅料优选聚山梨酯80和蔗糖。

[0404] (2) Hu303-005抗体制剂外观结果显示海藻糖略优,但SEC结果显示蔗糖略优,整体蔗糖与海藻糖差异不大。外观及SEC数据显示PS80优于PS20,增加聚山梨酯含量可明显改善外观及SEC稳定性,见图7。因此优选PS80,PS浓度应大于0.2mg/ml。

[0405] 实施例15.LAG-3抗体稳定性评价

[0406] (1).在下列不同缓冲剂中,制备蛋白浓度为50mg/mL,含60mg/ml蔗糖,0.4mg/mL聚山梨酯80的LAG-3抗体Hu229-013制剂:

[0407] 1) 10mM醋酸-醋酸钠(AA) pH5.5;

[0408] 2) 10mM组氨酸-醋酸(His-AA) pH6.0;

[0409] 3) 10mM组氨酸-盐酸(His-HCl) pH6.0;

[0410] 4) 10mM琥珀酸-琥珀酸钠(SA) pH6.0。

[0411] (2).在下列不同缓冲液中,制备蛋白含量50mg/ml,含75mg/ml蔗糖,0.4mg/ml PS80的Hu303-005制剂:

[0412] 1) 10mM醋酸-醋酸钠(AA) pH5.5

[0413] 2) 10mM组氨酸-盐酸(His-HCl) pH6.0

[0414] 3) 10mM组氨酸-盐酸(His-HCl) pH6.5

[0415] 将每种制剂过滤灌装,加塞,轧盖,封口。样品制备完成后将其分别放于25℃或4℃考察稳定性。检测项为外观、SEC、IEC或iCE、CE-SDS(非还原)。

[0416] 表15-1.Hu229-013稳定性结果

缓冲剂/pH	时间	外观	SEC 单体%	IEC 中性峰%	CE 纯度%
AA5.5	0 时	澄明	99.2	75.0	97.0
	4℃M3.5	澄清透明	99.2	75.1	96.7
	25℃M3.5	澄清透明	98.8	65.4	95.0
His-AA6.0	0 时	澄明	99.1	75.4	97.2
	4℃M3.5	澄清透明	99.2	76.9	96.9
	25℃M3.5	澄清透明	99.0	68.6	95.3
His-HCl 6.0	0 时	澄明	99.3	75.4	97.3
	4℃M3.5	澄清透明	99.2	75.7	96.7
	25℃M3.5	少量颗粒	99.0	67.9	95.2
SA6.0	0 时	澄明	99.2	74.9	97.2
	4℃M3.5	澄清透明	99.2	76.7	96.9
	25℃M3.5	少量颗粒	98.8	68.1	96.5

[0418] 注:M3.5表示3.5个月

[0419] 表15-2 Hu303-005 4℃稳定性结果

缓冲剂/pH	时间(M)	外观	SEC 单体%	非还原 CE-SDS%	iCIEF%		
					酸	中	碱
AA5.5	0	澄明	99.1	97.1	22.9	55.9	21.2
	1	澄明	99.1	97.0	23.6	59.6	16.8
	3	N/A	99.2	97.0	20.2	57.5	22.2
His-HCl 6.0	0	澄明	99.1	97.6	23.3	58.2	18.5
	1	澄明	99.1	97.1	23.4	60.7	15.9
	3	N/A	99.1	97.2	22.1	59.4	18.6
His-HCl6.5	0	澄明	99.2	97.5	22.9	57.8	19.3
	1	澄明	98.9	96.9	23.2	63.3	13.5
	3	N/A	99.1	96.3	23.8	61.4	14.9

[0421] 注:M表示月,N/A表示未检测。

[0422] 结果显示:

[0423] (1) LAG-3抗体Hu229-013在10mM AA pH5.5、10mM His-AA pH6.0体系中均较稳定。

[0424] (2) Hu303-005抗体在4℃放置3个月,His-HCl (pH6.5) 组CE略有下降,AA pH 5.5、His-HCl pH 6.5组iCE略有变化,His-HCl (pH6.0) 时最为稳定。

[0425] 实施例16.LAG-3抗体制剂的优化

[0426] 为了进一步对缓冲剂的种类、pH、离子强度进行优化,在过固定Hu229-013 抗体浓度为50mg/ml后,运用JMP软件进行DOE实验设计,应用RSM模型得到一系列处方,通过强制降解方法,以IEC、CE (非还原)、微流成像 (MFI) 为评价指标,采用最小二乘法对结果进行统计分析,DOE参数见表16,试验处方及结果见表17、表18。

[0427] 表16.DOE设计因子及水平

[0428]

因子	水平	考察项目
缓冲体系	AA/His-AA	高温 25/40℃、振摇、冻融#
pH	5.0 – 5.8	
离子强度	10 - 30 mM	

[0429]

表17.Hu229-013DOE设计处方

[0430]

批号	缓冲体系	离子强度	pH	其他辅料
1	组氨酸-醋酸 (His-AA)	20	5.5	75mg/ml 蔗糖、 0.2mg/ml PS80
2	His-AA	10	5.8	
3	醋酸-醋酸钠 (AA)	20	5.8	
4	His-AA	10	5.2	
5	His-AA	30	5.8	
6	AA	10	5.5	
7	AA	20	5.2	
8	AA	30	5.5	
9	His-AA	30	5.2	
10	His-AA	20	5.5	

[0431]

表18.DOE处方筛选结果

[0432]

批号	MFI(>2um 颗粒/ml)			IEC-中性峰%			非还原 CE-SDS%		
	0 时	冻融 5 次	振摇	0 时	25℃M1	40℃ D21	0 时	25℃M1	40℃ D21
1	7594	7589	264	72.7	70.9	57.2	96.8	96.8	93.0
2	9184	7213	2422	73.1	70.9	59.7	96.9	96.9	93.7
3	10136	11806	274	76.5	68.4	59.1	96.7	96.8	94.1
4	16711	8399	474	76.0	70.2	56.7	96.6	96.6	92.8
5	32780	2975	604	75.6	67.6	56.9	96.6	96.7	93.5
6	11503	4013	1751	75.5	67.7	57.4	96.6	96.5	93.8
7	5973	11522	790	75.9	67.4	55.6	96.6	96.5	92.5
8	29206	10532	159	74.9	67.6	57.4	96.5	96.5	93.2
9	5625	4878	660	75.9	67.9	53.8	96.8	96.6	91.6
10	12970	3588	1464	76.1	69.2	56.9	96.7	96.7	93.1

[0434]

注:M1表示一个月,D表示天。

[0435]

将各强制降解数据进行拟合,结果显示:在10-30mM醋酸-醋酸钠(AA)缓冲液或组

氨酸-醋酸缓冲液 (His-AA), pH5.2-5.8 体系中 LAG-3 抗体 Hu229-013 稳定性均较好, 优选缓冲体系为 10-30mM 醋酸-醋酸钠 (AA), pH5.5。

[0436] 实施例 17. LAG-3 抗体制剂稳定性测试

[0437] 在 10mM 醋酸-醋酸钠 pH5.5 缓冲剂中, 制备蛋白浓度为 60mg/mL, 含 60mg/ml 蔗糖, 0.4mg/mL 聚山梨酯 80 的 LAG-3 Hu229-013 制剂:

[0438] 将制剂过滤灌装, 加塞, 轧盖, 封口。样品制备完成后将其放于 4℃ 考察稳定性。检测项为外观、SEC、IEC、CE-SDS (非还原)。

[0439] 表 19. Hu229-013 稳定性结果

温度	时间 (M)	外观	SEC%			非还原 CE-SDS%	IEC%		
			聚体	单体	碎片		酸	中	碱
[0440] 4℃	0	澄明	1.1	98.9	0.0	97.6	14.4	72.0	13.6
	1	澄明	1.0	98.9	0.1	96.2	14.5	71.8	13.6
	3	澄明	1.0	98.8	0.1	96.8	16.2	68.4	15.5
	6	澄明	1.2	98.7	0.1	96.9	14.0	73.0	13.0
	9	澄明	1.2	98.8	0.1	97.3	13.8	71.4	14.9

[0441] 结果显示: 4℃ 时该 Hu229-013 制剂可稳定保持 9 个月。

[0442] 实施例 18. LAG-3 抗体制剂的优化

[0443] (1) Hu229-013 制剂成分的优化

[0444] 为了进一步对蛋白、蔗糖和聚山梨酯 80 浓度进行优化, 设定缓冲液为 10mM 醋酸-醋酸钠, pH5.5, 运用 JMP 软件进行 DOE 实验设计, 应用 RSM 模型得到一系列处方, 通过强制降解方法, 以 IEC、CE (非还原) 为评价指标, 采用最小二乘法对结果进行统计分析, DOE 参数见表 20, 试验结果见表 21, 统计分析结果见图 8、图 9 和表 21。

[0445] 表 20. DOE 设因子及水平

因子	水平	考察项目
蛋白浓度	40-80mg/ml	高温 40℃
蔗糖浓度	30-90mg/ml	
PS80 浓度	0.1-0.5mg/ml	

[0447] 表 21. DOE 处方设计及筛选结果

[0448]

编号	蛋白 浓度 mg/ml	蔗糖 浓度 mg/ml	PS80 浓度 mg/ml	IEC 中性峰%		非还原 CE-SDS 纯 度%	
				0 时	40℃ 16 天	0 时	40℃ 16 天
1	60	60	0.1	78.0	60.6	95.1	94.4
2	40	30	0.1	77.2	60.7	96.4	94.3
3	40	60	0.3	77.8	60.5	96.1	94.2
4	60	90	0.5	74.6	59.8	94.6	94.5
5	60	30	0.3	77.4	60.0	94.6	94.5
6	40	90	0.1	77.5	59.8	96.0	94.3
7	40	60	0.3	77.6	59.9	96.1	94.2
8	80	30	0.1	75.8	59.6	94.8	94.4
9	80	90	0.3	77.6	58.9	95.1	94.4
10	60	60	0.3	77.7	59.6	94.6	94.2
11	80	60	0.5	77.6	59.6	95.2	94.1
12	40	30	0.5	77.5	60.0	95.6	94.0

[0449] 将各强制降解数据进行拟合,结果如下:

[0450] 用IEC 0时与40℃数据的差值进行拟合, $R^2 > 0.98$ 、 $P < 0.06$,模型有效,结果见图8。用CE纯度0时与40℃数据的差值进行拟合, $R^2 > 0.99$ 、 $P < 0.05$,模型有效,结果见图9。40℃IEC拟合结果显示较优处方为:蛋白浓度40-60mg/ml,糖浓度30-90 mg/ml,PS80浓度0.4-0.5mg/ml;40℃CE拟合结果显示较优处方为:蛋白浓度50-80mg/ml,糖浓度30-90mg/ml,PS80浓度0.1-0.5mg/ml。因此最优范围为:蛋白浓度50-60mg/ml,蔗糖浓度30-90mg/ml,PS80浓度0.4-0.5mg/ml。

[0451] (2).Hu303-005抗体制剂成分的优化

[0452] 在固定蔗糖浓度为75mg/ml后,以10mM His缓冲液pH、蛋白浓度和聚山梨酯浓度为变量进行DOE实验设计,应用RSM模型得到一系列处方,处方见表22,通过强制降解方法,以iCIEF、CE(非还原)、DLS为评价指标,采用最小二乘法对结果进行统计分析,结果见表23和图10。

[0453] 表22.Hu303-005抗体制剂DOE处方筛选实验处方设计

[0454]

No.	pH	PS80 mg/mL	蛋白浓度 mg/mL
1	5.5	0.1	50
2	6.5	0.35	40
3	5.5	0.6	60
4	5.5	0.35	40
5	6	0.35	60
6	6.5	0.6	60
7	6	0.35	50
8	6.5	0.1	50
9	6	0.1	40
10	6	0.1	60
11	6	0.6	40
12	6	0.35	50

[0455] 表23.Hu303-005抗体制剂DOE处方筛选实验结果

[0456]

No.	条件	DLS	iCIEF 中性峰 (%)	非还原 CE-SDS %
		平均粒径 nm		
1	D0	N/A	58.3	97.60
	25°C-D13	N/A	46.8	97.46
	40°C-D13	11.5	22.4	96.55
2	D0	N/A	57.3	98.47
	25°C-D13	N/A	54.8	96.92
	40°C-D13	12.2	40.8	96.12
3	D0	N/A	57.5	97.54
	25°C-D13	N/A	47.1	97.35
	40°C-D13	11.6	23.5	96.79
4	D0	N/A	56.1	98.46
	25°C-D13	N/A	47.7	97.19
	40°C-D13	11.7	22.9	96.23
5	D0	N/A	59.3	97.82
	25°C-D13	N/A	51.9	97.58
	40°C-D13	12.0	32.7	96.86
6	D0	N/A	58.5	97.61
	25°C-D13	N/A	55.3	97.37
	40°C-D13	13.0	42.6	96.57
7	D0	N/A	59.1	97.65
	25°C-D13	N/A	51.4	97.51
	40°C-D13	11.9	32.3	96.69

[0457]

No.	条件	DLS	iCIEF 中性峰 (%)	非还原 CE-SDS%
		平均粒径 nm		
8	D0	N/A	57.0	97.43
	25℃-D13	N/A	55.0	97.38
	40℃-D13	12.5	42.1	95.89
9	D0	N/A	57.0	97.31
	25℃-D13	N/A	52.8	97.75
	40℃-D13	11.8	31.4	96.38
10	D0	N/A	56.4	97.30
	25℃-D13	N/A	50.5	97.56
	40℃-D13	12.1	32.3	96.88
11	D0	N/A	57.1	97.07
	25℃-D13	N/A	51.2	97.30
	40℃-D13	11.9	31.9	96.34
12	D0	N/A	58.7	97.36
	25℃-D13	N/A	50.7	97.09
	40℃-D13	12.1	32.3	96.88

[0458] 将各强制降解数据进行拟合,其中25度和40度iCIEF/CE/DLS拟合较好,模型有效,结果如图10所示。

[0459] 结果显示,高温条件下,pH升高粒径增加,中性峰也增加,iCIEF变化速度随温度降低而减缓,pH6.0时CE数据最优,同时结合前期实验结果(10mM His pH6.0较为稳定),确定最优pH为6.0;40度CE数据显示蛋白浓度45-60mg/ml 时较优,因此最优浓度定为50mg/ml;结合各条件下聚山梨酯浓度对蛋白稳定性的影响结果及其他测试例中的聚山梨酯浓度筛选结果(浓度大于0.2mg/ml时较优),PS80浓度定为0.3mg/ml;对于Hu303-005抗体液体制剂,在该实施例及其他实施例中,高位条件下iCIEF均出现明显下降,考虑开发为冻干制剂。为保证冻干制剂较好的成型性及适宜的渗透压,蔗糖浓度定为75mg/ml。

[0460] 实施例19.LAG-3抗体制剂的冻干

[0461] 制备蛋白含量50mg/ml,10mM组氨酸-盐酸,pH5.5或6.0,75mg/ml蔗糖,0.4mg/ml PS80的Hu303-005冻干制剂。冻干程序如下:

[0462] 表24.冻干程序

[0463]

步骤	设定温度℃	设定时间 (min)	保持时间	真空度(mBar)
预冻	5℃	10	60 min	N/A
	-45℃	50	120 min	N/A
一次干燥	-20℃	120	36 h	0.1
二次干燥	25℃	60	5 h	0.01

[0464] 将样品置于4℃及25℃条件考察稳定性,于不同时间点取样,用适量注射用水复溶检测,结果见表25和表26,结果显示,Hu303-005制剂25℃加速及4℃长期M3各项指标无显著变化,稳定性良好。

[0465] 表25.Hu303-005冻干制剂4℃稳定性结果

[0466]	批号	时间 (M)	复溶液外观	SEC 单体 %	非还原 CE-SDS %	iCIEF 中性峰 %
	pH 5.5	0	澄明	99.9	98.2	68.5
		3	澄明	99.8	97.5	69.0
	pH 6.0	0	澄明	99.9	98.1	69.8
		3	澄明	99.9	97.5	70.1

[0467] 表26.Hu303-005冻干制剂25℃稳定性结果

[0468]	批号	时间 (M)	复溶液外观	SEC 单体 %	非还原 CE-SDS %	iCIEF 中性峰 %
	pH 5.5	0	澄明	99.9	98.2	68.5
		1	澄明	99.8	97.8	68.1
		3	澄明	99.8	97.7	68.1
	pH 6.0	0	澄明	99.9	98.1	69.8
		1	澄明	99.8	97.7	69.4
		3	澄明	99.7	97.2	69.4

[0469] 同时测定了Hu229-013抗体的制剂冻干后复溶液的稳定性,用pH5.5的含 10mM醋酸-醋酸钠的缓冲剂,制备LAG-3抗体蛋白浓度为50mg/ml,含75mg/ml 蔗糖,0.4mg/ml聚山梨酯80的抗LAG-3抗体制剂。将抗体以1.1mL/瓶填充入2mL 西林瓶中,装入冻干箱中,冻干。对冻干样品进行冻干前后对比及稳定性考察。结果表明,Hu229-013抗体冻干前后质量无变化,且冻干制剂在储存过程中稳定性良好。

[0470] 实施例20.冻干工艺参数的优化

[0471] 制备Hu303-005抗体含量为50mg/ml,10mM组氨酸-盐酸,pH 6.0,75mg/ml 蔗糖,0.4mg/ml PS80的制剂进行冻干。通过冻干显微镜测得Hu303-005的塌陷温度约为-19℃,一次干燥温度是冻干工艺的重要参数,因此对一次干燥过程的隔板温度进行了细致优化,冻干参数见表27,结果见表28,各温度下冻干粉饼外观均符合要求,但-5℃组复溶后外观出现少量颗粒,因此一次干燥隔板温度定为 -10℃。

[0472] 表27.一次干燥隔板温度筛选的冻干工艺参数表

[0473]	筛选内容		一次干燥温度			
	参数		设定温度	设定时间	保持时间	真空度
[0474]	预冻		+5 °C	10 min	60 min	N/A
			-45 °C	50 min	120 min	N/A
	一次干燥	1	-20 °C	120 min	1000 - 3000 min	0.10mbar
		2	-10 °C			
		3	-5 °C			
	二次干燥		+25 °C	60 min	300 - 540 min	0.01 mbar

[0475] 表28.不同工艺所得冻干样品复溶前后外观对比结果

[0476]	组别	一次干燥温度	冻干粉饼外观	复溶后外观
	1	-20 °C	白色粉饼, 外观饱满, 无塌陷	澄明
	2	-10 °C	白色粉饼, 外观饱满, 无塌陷	澄明
	3	-5 °C	白色粉饼, 外观饱满, 无塌陷	少量颗粒

[0477] 最终冻干工艺如下:

[0478] 表29. 冻干工艺

[0479]		设定温度	设定时间(min)	保持时间(min)	真空度(mBar)
	预冻	5 °C	10	60	N/A
		-45 °C	50	120	N/A
	一次干燥	-10 °C	120	2000*	0.10
	二次干燥	25 °C	60	300*	0.01

[0480] *一次干燥及二次干燥时间根据具体批量及压力升测试而定。

[0481] 实施例21. 其它可选择制剂配方

[0482] 本发明提供的稳定的药物制剂还可以是任选自以下的稳定组合:

[0483] (1) LAG-3抗体Hu229-013 90mg/ml, 80mg/ml蔗糖, 0.4mg/ml的聚山梨酯 80, 15mM醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH5.5;

[0484] (2) LAG-3抗体Hu229-013 90mg/ml, 80mg/ml蔗糖, 0.4mg/ml的聚山梨酯 80, 15mM醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH 6.5;

[0485] (3) LAG-3抗体Hu229-013 90mg/ml, 50mg/ml蔗糖, 0.4mg/ml的聚山梨酯 80, 25mM醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH 5.5;

[0486] (4) LAG-3抗体Hu229-013 70mg/ml, 50mg/ml蔗糖, 0.3mg/ml的聚山梨酯 80, 10mM醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH 5.5;

[0487] (5) LAG-3抗体Hu229-013 70mg/ml, 80mg/ml蔗糖, 0.3mg/ml的聚山梨酯 80, 15mM醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH 5.2;

[0488] (6) LAG-3抗体Hu229-013 40mg/ml, 75mg/ml蔗糖, 0.4mg/ml的聚山梨酯80, 10mM醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH 6.0;

[0489] (7) LAG-3抗体Hu229-013 55mg/ml, 75mg/ml蔗糖, 0.4mg/ml的聚山梨酯 80, 10mM醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH5.7;

[0490] (8) LAG-3抗体Hu229-013 30mg/ml, 70mg/ml蔗糖, 0.5mg/ml的聚山梨酯 80, 10mM醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH 5.5;

[0491] (9) LAG-3抗体Hu229-013 20mg/ml, 70mg/ml蔗糖, 0.2mg/ml的聚山梨酯 80, 10mM醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH 5.4;

[0492] (5) LAG-3抗体Hu229-013 15mg/ml, 85mg/ml蔗糖, 0.1mg/ml的聚山梨酯 80, 25mM醋酸-醋酸钠缓冲剂, pH 5.6;

[0493] (11) LAG-3抗体Hu229-013 50mg/ml, 85mg/ml蔗糖, 0.3mg/ml的聚山梨酯 80, 25mM

醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH 5.8;

[0494] (12) LAG-3抗体Hu229-013 50mg/ml,75mg/ml蔗糖,0.4mg/ml的聚山梨酯 80,25mM

醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH 6.0;

[0495] (13) LAG-3抗体Hu229-013 55mg/ml,90mg/ml蔗糖,0.4mg/ml的聚山梨酯 80,10mM

醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH 5.3;

[0496] (14) LAG-3抗体Hu229-013 50mg/ml,90mg/ml蔗糖,0.4mg/ml的聚山梨酯 80,10mM

醋酸-醋酸钠缓冲剂,pH 5.0;

[0497] (15) LAG-3抗体Hu303-005 90mg/ml,75mg/ml蔗糖,0.3mg/ml聚山梨酯 80,30mM组

氨酸-盐酸缓冲剂,pH6.0;

[0498] (16) LAG-3抗体Hu303-005 90mg/ml,75mg/ml蔗糖,0.3mg/ml聚山梨酯 80,30mM组

氨酸-盐酸缓冲剂,pH5.5;

[0499] (17) LAG-3抗体Hu303-005 75mg/ml,75mg/ml蔗糖,0.3mg/ml聚山梨酯 80,30mM组

氨酸-盐酸缓冲剂,pH5.0;

[0500] (18) LAG-3抗体Hu303-005 1mg/ml,75mg/ml蔗糖,0.3mg/ml聚山梨酯80, 5mM组氨

酸-盐酸缓冲剂,pH6.0;

[0501] (19) LAG-3抗体Hu303-005 70mg/ml,30mg/ml蔗糖,0.3mg/ml聚山梨酯 80,5mM组

氨酸-盐酸缓冲剂,pH6.0;

[0502] (20) LAG-3抗体Hu303-005 50mg/ml,60mg/ml海藻糖,0.3mg/ml聚山梨酯 80,10mM

组氨酸-盐酸缓冲剂,pH6.0;

[0503] (21) LAG-3抗体Hu303-005 50mg/ml,90mg/ml海藻糖,0.3mg/ml聚山梨酯 80,10mM

组氨酸-盐酸缓冲剂,pH6.0。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 江苏恒瑞医药股份有限公司、上海恒瑞医药有限公司
[0003]	<120> 一种LAG3抗体药物组合物及其用途
[0004]	<160> 43
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 442
[0008]	<212> PRT
[0009]	<213> 人工序列
[0010]	<220>
[0011]	<221> 肽
[0012]	<223> 带Flag标签的LAG-3胞外区:LAG-3-Flag
[0013]	<400> 1
[0014]	Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
[0015]	1 5 10 15
[0016]	Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
[0017]	20 25 30
[0018]	Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
[0019]	35 40 45
[0020]	Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
[0021]	50 55 60
[0022]	His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
[0023]	65 70 75 80
[0024]	Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
[0025]	85 90 95
[0026]	Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
[0027]	100 105 110
[0028]	Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
[0029]	115 120 125
[0030]	Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
[0031]	130 135 140
[0032]	Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
[0033]	145 150 155 160
[0034]	Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
[0035]	165 170 175
[0036]	Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
[0037]	180 185 190
[0038]	Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln

[0039]	195	200	205
[0040]	Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser		
[0041]	210	215	220
[0042]	Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly		
[0043]	225	230	235
[0044]	Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn		
[0045]	245	250	255
[0046]	Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala		
[0047]	260	265	270
[0048]	Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val		
[0049]	275	280	285
[0050]	Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly		
[0051]	290	295	300
[0052]	Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu		
[0053]	305	310	315
[0054]	Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His		
[0055]	325	330	335
[0056]	Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr		
[0057]	340	345	350
[0058]	Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu		
[0059]	355	360	365
[0060]	Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser		
[0061]	370	375	380
[0062]	Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala		
[0063]	385	390	395
[0064]	Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln		
[0065]	405	410	415
[0066]	Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser		
[0067]	420	425	430
[0068]	Pro Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys		
[0069]	435	440	
[0070]	<210> 2		
[0071]	<211> 525		
[0072]	<212> PRT		
[0073]	<213> 智人		
[0074]	<220>		
[0075]	<221> 肽		
[0076]	<223> 全长LAG3		
[0077]	<400> 2		

[0078]	Met	Trp	Glu	Ala	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Leu	Gln	Pro	Leu	Trp
[0079]	1				5					10					15	
[0080]	Val	Ala	Pro	Val	Lys	Pro	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Val	Pro	Val	Val
[0081]					20					25					30	
[0082]	Trp	Ala	Gln	Glu	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Pro	Cys	Ser	Pro	Thr	Ile
[0083]					35					40					45	
[0084]	Pro	Leu	Gln	Asp	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Gly	Val	Thr	Trp	Gln
[0085]					50					55					60	
[0086]	His	Gln	Pro	Asp	Ser	Gly	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	His	Pro	Leu
[0087]	65									70					75	
[0088]	Ala	Pro	Gly	Pro	His	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser	Trp	Gly	Pro	Arg	Pro
[0089]										85					90	
[0090]	Arg	Arg	Tyr	Thr	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Ser	Gly
[0091]										100					105	
[0092]	Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Pro	Arg	Val	Gln	Leu	Asp	Glu	Arg	Gly	Arg	Gln
[0093]										115					120	
[0094]	Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala
[0095]										130					135	
[0096]	Gly	Glu	Tyr	Arg	Ala	Ala	Val	His	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Leu	Ser	Cys
[0097]	145									150					155	
[0098]	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Ser	Met	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro
[0099]										165					170	
[0100]	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	Cys	Ser	Phe	Ser
[0101]										180					185	
[0102]	Arg	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Ser	Val	His	Trp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Gln
[0103]										195					200	
[0104]	Gly	Arg	Val	Pro	Val	Arg	Glu	Ser	Pro	His	His	His	Leu	Ala	Glu	Ser
[0105]										210					215	
[0106]	Phe	Leu	Phe	Leu	Pro	Gln	Val	Ser	Pro	Met	Asp	Ser	Gly	Pro	Trp	Gly
[0107]	225									230					235	
[0108]	Cys	Ile	Leu	Thr	Tyr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Ile	Met	Tyr	Asn
[0109]										245					250	
[0110]	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala
[0111]										260					265	
[0112]	Gly	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Gly	Leu	Pro	Cys	Arg	Leu	Pro	Ala	Gly	Val
[0113]										275					280	
[0114]	Gly	Thr	Arg	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Lys	Trp	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly
[0115]										290					295	
[0116]	Pro	Asp	Leu	Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Leu

[0117]	305	310	315	320
[0118]	Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His			
[0119]	325	330	335	
[0120]	Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr			
[0121]	340	345	350	
[0122]	Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu			
[0123]	355	360	365	
[0124]	Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser			
[0125]	370	375	380	
[0126]	Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala			
[0127]	385	390	395	400
[0128]	Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln			
[0129]	405	410	415	
[0130]	Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser			
[0131]	420	425	430	
[0132]	Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly			
[0133]	435	440	445	
[0134]	His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu			
[0135]	450	455	460	
[0136]	Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro			
[0137]	465	470	475	480
[0138]	Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln			
[0139]	485	490	495	
[0140]	Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro			
[0141]	500	505	510	
[0142]	Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu			
[0143]	515	520	525	
[0144]	<210> 3			
[0145]	<211> 675			
[0146]	<212> PRT			
[0147]	<213> 人工序列			
[0148]	<220>			
[0149]	<221> 肽			
[0150]	<223> LAG-3胞外区和hIgG1 Fc的融合蛋白			
[0151]	<400> 3			
[0152]	Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp			
[0153]	1	5	10	15
[0154]	Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val			
[0155]	20	25	30	

[0156]	Trp	Ala	Gln	Glu	Gly	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Pro	Cys	Ser	Pro	Thr	Ile
[0157]			35					40					45			
[0158]	Pro	Leu	Gln	Asp	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Gly	Val	Thr	Trp	Gln
[0159]			50					55				60				
[0160]	His	Gln	Pro	Asp	Ser	Gly	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	His	Pro	Leu
[0161]	65						70				75					80
[0162]	Ala	Pro	Gly	Pro	His	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser	Trp	Gly	Pro	Arg	Pro
[0163]					85					90					95	
[0164]	Arg	Arg	Tyr	Thr	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Ser	Gly
[0165]					100					105					110	
[0166]	Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Pro	Arg	Val	Gln	Leu	Asp	Glu	Arg	Gly	Arg	Gln
[0167]					115					120					125	
[0168]	Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala
[0169]			130					135				140				
[0170]	Gly	Glu	Tyr	Arg	Ala	Ala	Val	His	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Leu	Ser	Cys
[0171]	145						150				155					160
[0172]	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Ser	Met	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro
[0173]					165					170					175	
[0174]	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	Cys	Ser	Phe	Ser
[0175]					180					185					190	
[0176]	Arg	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Ser	Val	His	Trp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Gln
[0177]			195					200				205				
[0178]	Gly	Arg	Val	Pro	Val	Arg	Glu	Ser	Pro	His	His	His	Leu	Ala	Glu	Ser
[0179]			210					215				220				
[0180]	Phe	Leu	Phe	Leu	Pro	Gln	Val	Ser	Pro	Met	Asp	Ser	Gly	Pro	Trp	Gly
[0181]	225					230					235					240
[0182]	Cys	Ile	Leu	Thr	Tyr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Ile	Met	Tyr	Asn
[0183]					245					250					255	
[0184]	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala
[0185]					260					265					270	
[0186]	Gly	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Gly	Leu	Pro	Cys	Arg	Leu	Pro	Ala	Gly	Val
[0187]			275					280				285				
[0188]	Gly	Thr	Arg	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Lys	Trp	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly
[0189]			290					295				300				
[0190]	Pro	Asp	Leu	Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Leu
[0191]	305						310				315					320
[0192]	Glu	Asp	Val	Ser	Gln	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Tyr	Thr	Cys	His	Ile	His
[0193]					325					330					335	
[0194]	Leu	Gln	Glu	Gln	Gln	Leu	Asn	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Ala	Ile	Ile	Thr

61

[0234]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[0235]	660 665 670
[0236]	Ser Pro Gly
[0237]	675
[0238]	<210> 4
[0239]	<211> 677
[0240]	<212> PRT
[0241]	<213> 人工序列
[0242]	<220>
[0243]	<221> 肽
[0244]	<223> LAG-3胞外区和mIgG2a Fc的融合蛋白
[0245]	<400> 4
[0246]	Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
[0247]	1 5 10 15
[0248]	Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
[0249]	20 25 30
[0250]	Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
[0251]	35 40 45
[0252]	Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
[0253]	50 55 60
[0254]	His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
[0255]	65 70 75 80
[0256]	Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
[0257]	85 90 95
[0258]	Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
[0259]	100 105 110
[0260]	Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
[0261]	115 120 125
[0262]	Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
[0263]	130 135 140
[0264]	Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
[0265]	145 150 155 160
[0266]	Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
[0267]	165 170 175
[0268]	Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
[0269]	180 185 190
[0270]	Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
[0271]	195 200 205
[0272]	Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser

[0273]	210	215	220
[0274]	Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly		
[0275]	225	230	235 240
[0276]	Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn		
[0277]	245	250	255
[0278]	Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala		
[0279]	260	265	270
[0280]	Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val		
[0281]	275	280	285
[0282]	Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly		
[0283]	290	295	300
[0284]	Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu		
[0285]	305	310	315 320
[0286]	Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His		
[0287]	325	330	335
[0288]	Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr		
[0289]	340	345	350
[0290]	Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu		
[0291]	355	360	365
[0292]	Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser		
[0293]	370	375	380
[0294]	Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala		
[0295]	385	390	395 400
[0296]	Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln		
[0297]	405	410	415
[0298]	Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser		
[0299]	420	425	430
[0300]	Pro Gly Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Ser Gly Glu Pro Arg Gly		
[0301]	435	440	445
[0302]	Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu		
[0303]	450	455	460
[0304]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val		
[0305]	465	470	475 480
[0306]	Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0307]	485	490	495
[0308]	Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val		
[0309]	500	505	510
[0310]	Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser		
[0311]	515	520	525

[0312]	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met
[0313]		530					535					540				
[0314]	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala
[0315]	545					550				555					560	
[0316]	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro
[0317]					565					570					575	
[0318]	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln
[0319]				580					585					590		
[0320]	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr
[0321]			595					600					605			
[0322]	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr
[0323]		610					615					620				
[0324]	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu
[0325]	625					630					635				640	
[0326]	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser
[0327]					645					650					655	
[0328]	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser
[0329]				660					665					670		
[0330]	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys											
[0331]			675													
[0332]	<210>	5														
[0333]	<211>	124														
[0334]	<212>	PRT														
[0335]	<213>	鼠														
[0336]	<220>															
[0337]	<221>	结构域														
[0338]	<223>	mAb229-VH														
[0339]	<400>	5														
[0340]	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
[0341]	1			5					10					15		
[0342]	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Ser
[0343]				20					25					30		
[0344]	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met
[0345]			35					40					45			
[0346]	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe
[0347]		50					55					60				
[0348]	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0349]	65					70					75				80	
[0350]	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys

[0351]	85	90	95
[0352]	Ala Arg Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp		
[0353]	100	105	110
[0354]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
[0355]	115	120	
[0356]	<210> 6		
[0357]	<211> 107		
[0358]	<212> PRT		
[0359]	<213> 鼠		
[0360]	<220>		
[0361]	<221> 结构域		
[0362]	<223> mAb229-VL		
[0363]	<400> 6		
[0364]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly		
[0365]	1 5 10 15		
[0366]	Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn		
[0367]	20 25 30		
[0368]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val		
[0369]	35 40 45		
[0370]	Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0371]	50 55 60		
[0372]	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser		
[0373]	65 70 75 80		
[0374]	Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp		
[0375]	85 90 95		
[0376]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0377]	100 105		
[0378]	<210> 7		
[0379]	<211> 120		
[0380]	<212> PRT		
[0381]	<213> 鼠		
[0382]	<220>		
[0383]	<221> 结构域		
[0384]	<223> mAb303-VH		
[0385]	<400> 7		
[0386]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0387]	1 5 10 15		
[0388]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr		
[0389]	20 25 30		

[0390]	Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
[0391]	35 40 45
[0392]	Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
[0393]	50 55 60
[0394]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
[0395]	65 70 75 80
[0396]	Met Glu Ile Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0397]	85 90 95
[0398]	Thr Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
[0399]	100 105 110
[0400]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0401]	115 120
[0402]	<210> 8
[0403]	<211> 107
[0404]	<212> PRT
[0405]	<213> 鼠
[0406]	<220>
[0407]	<221> 结构域
[0408]	<223> mAb303-VL
[0409]	<400> 8
[0410]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0411]	1 5 10 15
[0412]	Glu Arg Val Ile Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg
[0413]	20 25 30
[0414]	Leu Asn Trp Leu Gln Gln Gly Pro Asp Gly Thr Phe Lys Arg Leu Ile
[0415]	35 40 45
[0416]	Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
[0417]	50 55 60
[0418]	Ser Arg Ser Gly Ser Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
[0419]	65 70 75 80
[0420]	Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro
[0421]	85 90 95
[0422]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0423]	100 105
[0424]	<210> 9
[0425]	<211> 5
[0426]	<212> PRT
[0427]	<213> 鼠
[0428]	<220>

[0429] <221> 结构域
[0430] <223> mAb229 HCDR1
[0431] <400> 9
[0432] Thr Ser Gly Met Ser
[0433] 1 5
[0434] <210> 10
[0435] <211> 17
[0436] <212> PRT
[0437] <213> 鼠
[0438] <220>
[0439] <221> 结构域
[0440] <223> mAb229 HCDR2
[0441] <400> 10
[0442] Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
[0443] 1 5 10 15
[0444] Gly
[0445] <210> 11
[0446] <211> 15
[0447] <212> PRT
[0448] <213> 鼠
[0449] <220>
[0450] <221> 结构域
[0451] <223> mAb229 HCDR3
[0452] <400> 11
[0453] Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
[0454] 1 5 10 15
[0455] <210> 12
[0456] <211> 5
[0457] <212> PRT
[0458] <213> 鼠
[0459] <220>
[0460] <221> 结构域
[0461] <223> mAb303 HCDR1
[0462] <400> 12
[0463] Asp Tyr Tyr Met Asn
[0464] 1 5
[0465] <210> 13
[0466] <211> 17
[0467] <212> PRT

[0468] <213> 鼠
[0469] <220>
[0470] <221> 结构域
[0471] <223> mAb303 HCDR2
[0472] <400> 13
[0473] Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0474] 1 5 10 15
[0475] Gly
[0476] <210> 14
[0477] <211> 11
[0478] <212> PRT
[0479] <213> 鼠
[0480] <220>
[0481] <221> 结构域
[0482] <223> mAb303 HCD3
[0483] <400> 14
[0484] Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val
[0485] 1 5 10
[0486] <210> 15
[0487] <211> 11
[0488] <212> PRT
[0489] <213> 鼠
[0490] <220>
[0491] <221> 结构域
[0492] <223> mAb229 LCDR1
[0493] <400> 15
[0494] Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
[0495] 1 5 10
[0496] <210> 16
[0497] <211> 7
[0498] <212> PRT
[0499] <213> 鼠
[0500] <220>
[0501] <221> 结构域
[0502] <223> mAb229 LCDR2
[0503] <400> 16
[0504] Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
[0505] 1 5
[0506] <210> 17

[0507]	<211> 9
[0508]	<212> PRT
[0509]	<213> 鼠
[0510]	<220>
[0511]	<221> 结构域
[0512]	<223> mAb229 LCDR3
[0513]	<400> 17
[0514]	Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp Thr
[0515]	1 5
[0516]	<210> 18
[0517]	<211> 11
[0518]	<212> PRT
[0519]	<213> 鼠
[0520]	<220>
[0521]	<221> 结构域
[0522]	<223> mAb303 LCDR1
[0523]	<400> 18
[0524]	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg Leu Asn
[0525]	1 5 10
[0526]	<210> 19
[0527]	<211> 7
[0528]	<212> PRT
[0529]	<213> 鼠
[0530]	<220>
[0531]	<221> 结构域
[0532]	<223> mAb303 LCDR2
[0533]	<400> 19
[0534]	Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser
[0535]	1 5
[0536]	<210> 20
[0537]	<211> 9
[0538]	<212> PRT
[0539]	<213> 鼠
[0540]	<220>
[0541]	<221> 结构域
[0542]	<223> mAb303 LCDR3
[0543]	<400> 20
[0544]	Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro Thr
[0545]	1 5

70

[0585]	50	55	60
[0586]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0587]	65	70	75 80
[0588]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp		
[0589]	85	90	95
[0590]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0591]	100	105	
[0592]	<210> 23		
[0593]	<211> 124		
[0594]	<212> PRT		
[0595]	<213> 人工序列		
[0596]	<220>		
[0597]	<221> 结构域		
[0598]	<223> Hu229VH.1A		
[0599]	<400> 23		
[0600]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
[0601]	1	5	10 15
[0602]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ser		
[0603]	20	25	30
[0604]	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met		
[0605]	35	40	45
[0606]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe		
[0607]	50	55	60
[0608]	Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr		
[0609]	65	70	75 80
[0610]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0611]	85	90	95
[0612]	Ala Arg Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp		
[0613]	100	105	110
[0614]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0615]	115	120	
[0616]	<210> 24		
[0617]	<211> 124		
[0618]	<212> PRT		
[0619]	<213> 人工序列		
[0620]	<220>		
[0621]	<221> 结构域		
[0622]	<223> Hu229VH.1B		
[0623]	<400> 24		

[0624]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
[0625]	1 5 10 15
[0626]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ser
[0627]	20 25 30
[0628]	Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
[0629]	35 40 45
[0630]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
[0631]	50 55 60
[0632]	Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
[0633]	65 70 75 80
[0634]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
[0635]	85 90 95
[0636]	Ala Arg Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
[0637]	100 105 110
[0638]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0639]	115 120
[0640]	<210> 25
[0641]	<211> 124
[0642]	<212> PRT
[0643]	<213> 人工序列
[0644]	<220>
[0645]	<221> 结构域
[0646]	<223> Hu229VH.1C
[0647]	<400> 25
[0648]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
[0649]	1 5 10 15
[0650]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ser
[0651]	20 25 30
[0652]	Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
[0653]	35 40 45
[0654]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
[0655]	50 55 60
[0656]	Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
[0657]	65 70 75 80
[0658]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
[0659]	85 90 95
[0660]	Ala Arg Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Asp Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
[0661]	100 105 110
[0662]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[0663]	115	120
[0664]	<210> 26	
[0665]	<211> 107	
[0666]	<212> PRT	
[0667]	<213> 人工序列	
[0668]	<220>	
[0669]	<221> 结构域	
[0670]	<223> Hu229VL.1A	
[0671]	<400> 26	
[0672]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0673]	1 5 10 15	
[0674]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn	
[0675]	20 25 30	
[0676]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val	
[0677]	35 40 45	
[0678]	Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0679]	50 55 60	
[0680]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0681]	65 70 75 80	
[0682]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp	
[0683]	85 90 95	
[0684]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0685]	100 105	
[0686]	<210> 27	
[0687]	<211> 107	
[0688]	<212> PRT	
[0689]	<213> 人工序列	
[0690]	<220>	
[0691]	<221> 结构域	
[0692]	<223> Hu229VL.1B	
[0693]	<400> 27	
[0694]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0695]	1 5 10 15	
[0696]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn	
[0697]	20 25 30	
[0698]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val	
[0699]	35 40 45	
[0700]	Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0701]	50 55 60	

[0702]	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0703]	65 70 75 80
[0704]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp
[0705]	85 90 95
[0706]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0707]	100 105
[0708]	<210> 28
[0709]	<211> 107
[0710]	<212> PRT
[0711]	<213> 人工序列
[0712]	<220>
[0713]	<221> 结构域
[0714]	<223> Hu229VL.1C
[0715]	<400> 28
[0716]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0717]	1 5 10 15
[0718]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
[0719]	20 25 30
[0720]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
[0721]	35 40 45
[0722]	Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0723]	50 55 60
[0724]	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0725]	65 70 75 80
[0726]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp
[0727]	85 90 95
[0728]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0729]	100 105
[0730]	<210> 29
[0731]	<211> 120
[0732]	<212> PRT
[0733]	<213> 人工序列
[0734]	<220>
[0735]	<221> 结构域
[0736]	<223> Hu303_VH.1
[0737]	<400> 29
[0738]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0739]	1 5 10 15
[0740]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

[0741]	20	25	30
[0742]	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met		
[0743]	35	40	45
[0744]	Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0745]	50	55	60
[0746]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr		
[0747]	65	70	75
[0748]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0749]	85	90	95
[0750]	Ala Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln		
[0751]	100	105	110
[0752]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0753]	115	120	
[0754]	<210> 30		
[0755]	<211> 107		
[0756]	<212> PRT		
[0757]	<213> 人工序列		
[0758]	<220>		
[0759]	<221> 结构域		
[0760]	<223> Hu303_VL.1		
[0761]	<400> 30		
[0762]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0763]	1	5	10
[0764]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg		
[0765]	20	25	30
[0766]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[0767]	35	40	45
[0768]	Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0769]	50	55	60
[0770]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0771]	65	70	75
[0772]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro		
[0773]	85	90	95
[0774]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0775]	100	105	
[0776]	<210> 31		
[0777]	<211> 120		
[0778]	<212> PRT		
[0779]	<213> 人工序列		

[0780] <220>
 [0781] <221> 结构域
 [0782] <223> Hu303_VH.1A
 [0783] <400> 31
 [0784] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0785] 1 5 10 15
 [0786] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0787] 20 25 30
 [0788] Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 [0789] 35 40 45
 [0790] Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0791] 50 55 60
 [0792] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 [0793] 65 70 75 80
 [0794] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0795] 85 90 95
 [0796] Thr Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 [0797] 100 105 110
 [0798] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 [0799] 115 120
 [0800] <210> 32
 [0801] <211> 120
 [0802] <212> PRT
 [0803] <213> 人工序列
 [0804] <220>
 [0805] <221> 结构域
 [0806] <223> Hu303_VH.1B
 [0807] <400> 32
 [0808] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0809] 1 5 10 15
 [0810] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr
 [0811] 20 25 30
 [0812] Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 [0813] 35 40 45
 [0814] Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0815] 50 55 60
 [0816] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 [0817] 65 70 75 80
 [0818] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0819]		85		90		95
[0820]	Thr Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln					
[0821]		100		105		110
[0822]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
[0823]		115		120		
[0824]	<210> 33					
[0825]	<211> 120					
[0826]	<212> PRT					
[0827]	<213> 人工序列					
[0828]	<220>					
[0829]	<221> 结构域					
[0830]	<223> Hu303_VH.1C					
[0831]	<400> 33					
[0832]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
[0833]	1	5		10		15
[0834]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr					
[0835]		20		25		30
[0836]	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile					
[0837]		35		40		45
[0838]	Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe					
[0839]		50		55		60
[0840]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr					
[0841]	65	70		75		80
[0842]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
[0843]		85		90		95
[0844]	Thr Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln					
[0845]		100		105		110
[0846]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
[0847]		115		120		
[0848]	<210> 34					
[0849]	<211> 107					
[0850]	<212> PRT					
[0851]	<213> 人工序列					
[0852]	<220>					
[0853]	<221> 结构域					
[0854]	<223> Hu303_VL.1A					
[0855]	<400> 34					
[0856]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
[0857]	1	5		10		15

[0858]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg
[0859]	20 25 30
[0860]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
[0861]	35 40 45
[0862]	Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0863]	50 55 60
[0864]	Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0865]	65 70 75 80
[0866]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro
[0867]	85 90 95
[0868]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0869]	100 105
[0870]	<210> 35
[0871]	<211> 107
[0872]	<212> PRT
[0873]	<213> 人工序列
[0874]	<220>
[0875]	<221> 结构域
[0876]	<223> Hu303_VL.1B
[0877]	<400> 35
[0878]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0879]	1 5 10 15
[0880]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg
[0881]	20 25 30
[0882]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
[0883]	35 40 45
[0884]	Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
[0885]	50 55 60
[0886]	Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0887]	65 70 75 80
[0888]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro
[0889]	85 90 95
[0890]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0891]	100 105
[0892]	<210> 36
[0893]	<211> 107
[0894]	<212> PRT
[0895]	<213> 人工序列
[0896]	<220>

[0897]	<221>	结构域
[0898]	<223>	Hu303_VL.1C
[0899]	<400>	36
[0900]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0901]	1 5 10 15	
[0902]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg	
[0903]	20 25 30	
[0904]	Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Phe Lys Arg Leu Ile	
[0905]	35 40 45	
[0906]	Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly	
[0907]	50 55 60	
[0908]	Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0909]	65 70 75 80	
[0910]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro	
[0911]	85 90 95	
[0912]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0913]	100 105	
[0914]	<210>	37
[0915]	<211>	107
[0916]	<212>	PRT
[0917]	<213>	人工序列
[0918]	<220>	
[0919]	<221>	结构域
[0920]	<223>	Hu303_VL.1D
[0921]	<400>	37
[0922]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0923]	1 5 10 15	
[0924]	Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Arg	
[0925]	20 25 30	
[0926]	Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Phe Lys Arg Leu Ile	
[0927]	35 40 45	
[0928]	Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly	
[0929]	50 55 60	
[0930]	Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0931]	65 70 75 80	
[0932]	Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu Ala Ser Ser Pro Pro	
[0933]	85 90 95	
[0934]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0935]	100 105	

[0975]		245		250		255	
[0976]	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
[0977]		260		265		270	
[0978]	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
[0979]		275		280		285	
[0980]	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
[0981]		290		295		300	
[0982]	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
[0983]	305			310		315	
[0984]	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys
[0985]		325					
[0986]	<210>	39					
[0987]	<211>	107					
[0988]	<212>	PRT					
[0989]	<213>	人工序列					
[0990]	<220>						
[0991]	<221>	结构域					
[0992]	<223>	kappa轻链恒定区					
[0993]	<400>	39					
[0994]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser
[0995]	1		5			10	
[0996]	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
[0997]		20				25	
[0998]	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val
[0999]		35				40	
[1000]	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
[1001]		50				55	
[1002]	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr
[1003]	65					70	
[1004]	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys
[1005]						85	
[1006]	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
[1007]						90	
[1008]	<210>	40					
[1009]	<211>	451					
[1010]	<212>	PRT					
[1011]	<213>	人工序列					
[1012]	<220>						
[1013]	<221>	CHAIN					

[1014]	<223> Hu229-013的重链氨基酸序列															
[1015]	<400> 40															
[1016]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[1017]	1				5					10					15	
[1018]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Ser
[1019]				20					25					30		
[1020]	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Met
[1021]			35					40					45			
[1022]	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe
[1023]		50					55					60				
[1024]	Lys	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr
[1025]	65					70					75				80	
[1026]	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
[1027]				85					90					95		
[1028]	Ala	Arg	Asp	Asn	Tyr	Asp	Ala	Arg	Asp	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp
[1029]				100					105					110		
[1030]	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
[1031]			115					120						125		
[1032]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu
[1033]		130					135					140				
[1034]	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
[1035]	145					150					155				160	
[1036]	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
[1037]				165					170					175		
[1038]	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
[1039]				180					185					190		
[1040]	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
[1041]			195					200					205			
[1042]	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser
[1043]		210					215					220				
[1044]	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly
[1045]	225					230					235				240	
[1046]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
[1047]				245					250					255		
[1048]	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln
[1049]				260					265					270		
[1050]	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
[1051]			275					280					285			
[1052]	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr

[1053]	290	295	300
[1054]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[1055]	305	310	315
[1056]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile		320
[1057]		325	330
[1058]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		335
[1059]		340	345
[1060]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		350
[1061]		355	360
[1062]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		365
[1063]		370	375
[1064]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		380
[1065]	385	390	395
[1066]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val		400
[1067]		405	410
[1068]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		415
[1069]		420	425
[1070]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		430
[1071]		435	440
[1072]	Leu Gly Lys		445
[1073]	450		
[1074]	<210> 41		
[1075]	<211> 214		
[1076]	<212> PRT		
[1077]	<213> 人工序列		
[1078]	<220>		
[1079]	<221> CHAIN		
[1080]	<223> Hu229-013的轻链氨基酸序列		
[1081]	<400> 41		
[1082]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[1083]	1	5	10
[1084]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn		15
[1085]		20	25
[1086]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val		30
[1087]		35	40
[1088]	Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		45
[1089]	50	55	60
[1090]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[1091]	65	70	75
			80

[1092]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ile Thr Pro Trp
[1093]	85 90 95
[1094]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[1095]	100 105 110
[1096]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[1097]	115 120 125
[1098]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[1099]	130 135 140
[1100]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[1101]	145 150 155 160
[1102]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[1103]	165 170 175
[1104]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[1105]	180 185 190
[1106]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[1107]	195 200 205
[1108]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1109]	210
[1110]	<210> 42
[1111]	<211> 447
[1112]	<212> PRT
[1113]	<213> 人工序列
[1114]	<220>
[1115]	<221> CHAIN
[1116]	<223> Hu303-005的重链氨基酸序列
[1117]	<400> 42
[1118]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1119]	1 5 10 15
[1120]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[1121]	20 25 30
[1122]	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
[1123]	35 40 45
[1124]	Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
[1125]	50 55 60
[1126]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[1127]	65 70 75 80
[1128]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1129]	85 90 95
[1130]	Ala Arg Asp Asp Gly Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln

[1131]				100					105					110			
[1132]	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
[1133]				115					120					125			
[1134]	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	
[1135]				130					135					140			
[1136]	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
[1137]	145							150					155				160
[1138]	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
[1139]					165					170					175		
[1140]	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
[1141]					180					185					190		
[1142]	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	
[1143]				195					200					205			
[1144]	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	
[1145]				210					215					220			
[1146]	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
[1147]	225						230				235					240	
[1148]	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
[1149]					245					250					255		
[1150]	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	
[1151]				260						265					270		
[1152]	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
[1153]				275					280					285			
[1154]	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
[1155]		290						295					300				
[1156]	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
[1157]	305						310					315				320	
[1158]	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
[1159]					325					330					335		
[1160]	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
[1161]				340						345					350		
[1162]	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
[1163]				355					360					365			
[1164]	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
[1165]		370						375					380				
[1166]	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
[1167]	385						390					395				400	
[1168]	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
[1169]					405					410					415		

[1170]	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
[1171]				420					425					430		
[1172]	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	
[1173]				435					440					445		
[1174]	<210>	43														
[1175]	<211>	214														
[1176]	<212>	PRT														
[1177]	<213>	人工序列														
[1178]	<220>															
[1179]	<221>	CHAIN														
[1180]	<223>	Hu303-005的轻链氨基酸序列														
[1181]	<400>	43														
[1182]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[1183]	1			5					10					15		
[1184]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Gly	Ser	Arg
[1185]				20					25					30		
[1186]	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile
[1187]				35					40					45		
[1188]	Tyr	Ala	Thr	Ser	Thr	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[1189]				50					55					60		
[1190]	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
[1191]				65					70					75		80
[1192]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Leu	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro
[1193]									85					90		95
[1194]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
[1195]				100					105					110		
[1196]	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
[1197]				115					120					125		
[1198]	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
[1199]				130					135					140		
[1200]	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
[1201]				145					150					155		160
[1202]	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
[1203]									165					170		175
[1204]	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
[1205]				180					185					190		
[1206]	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
[1207]				195					200					205		
[1208]	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										

[1209] 210

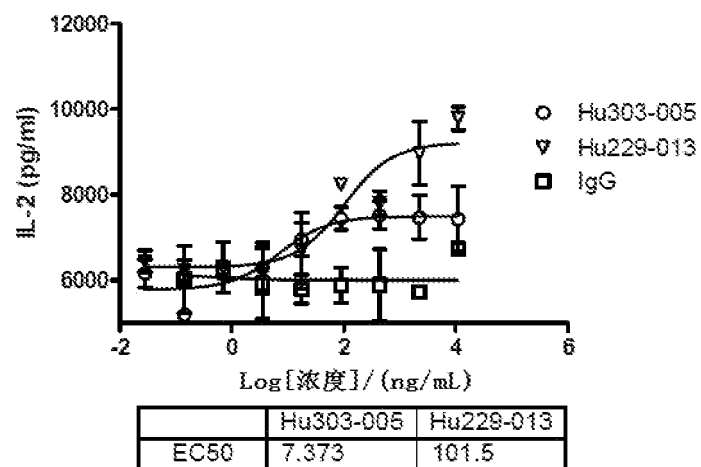


图1

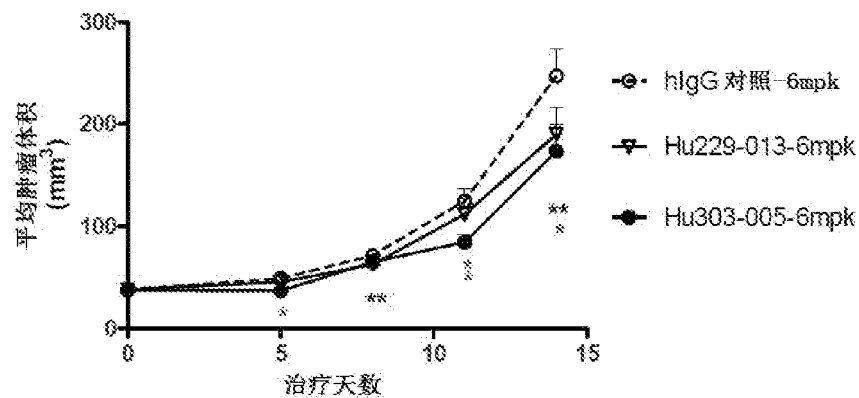


图2

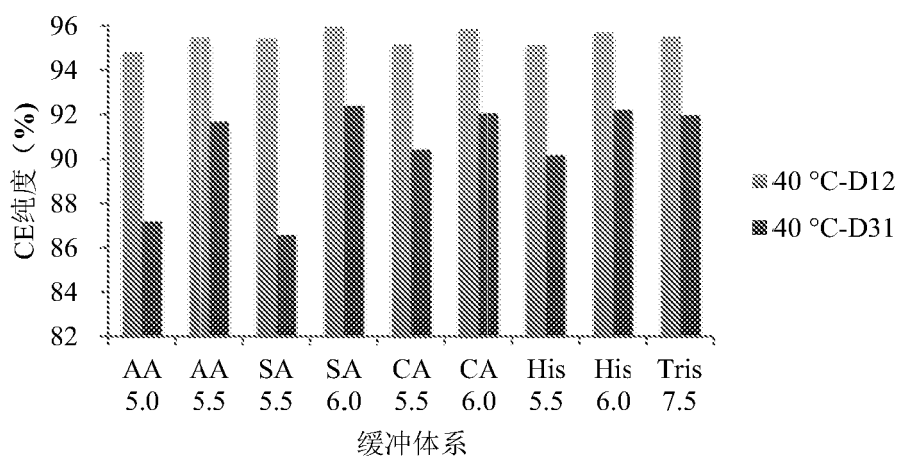


图3

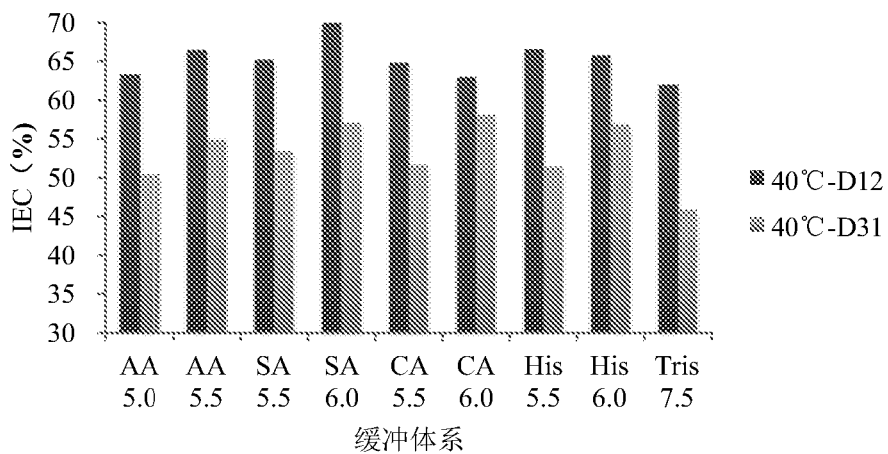


图4

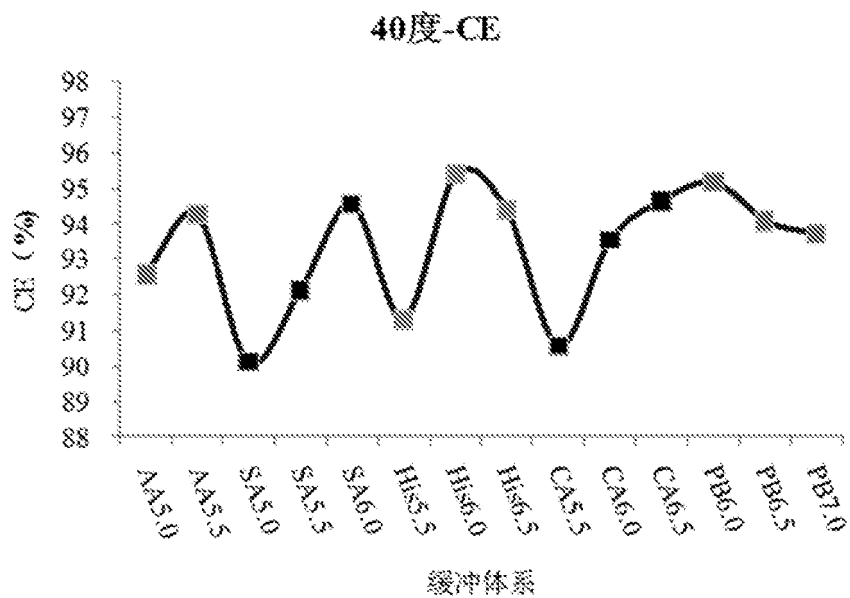


图5

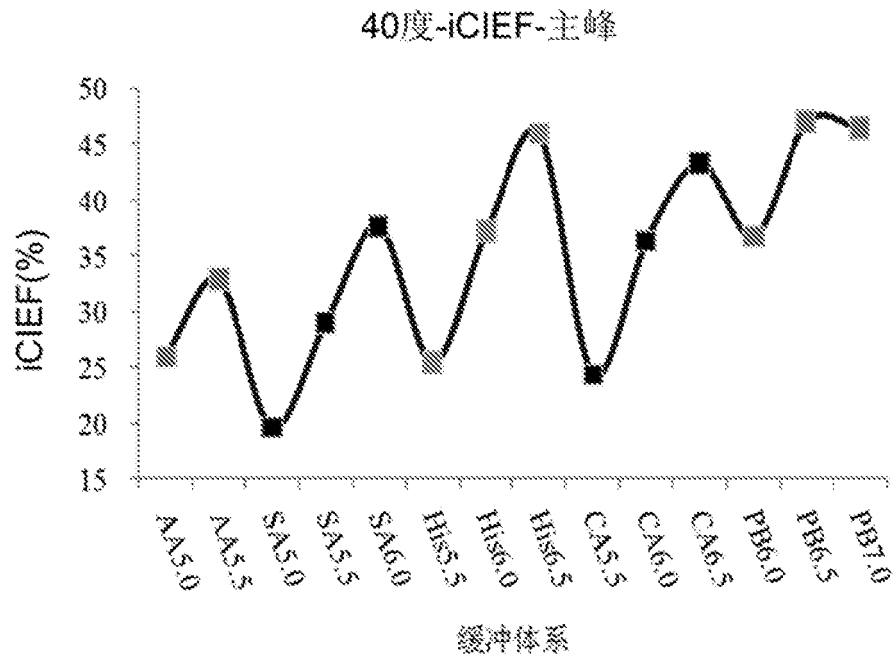


图6

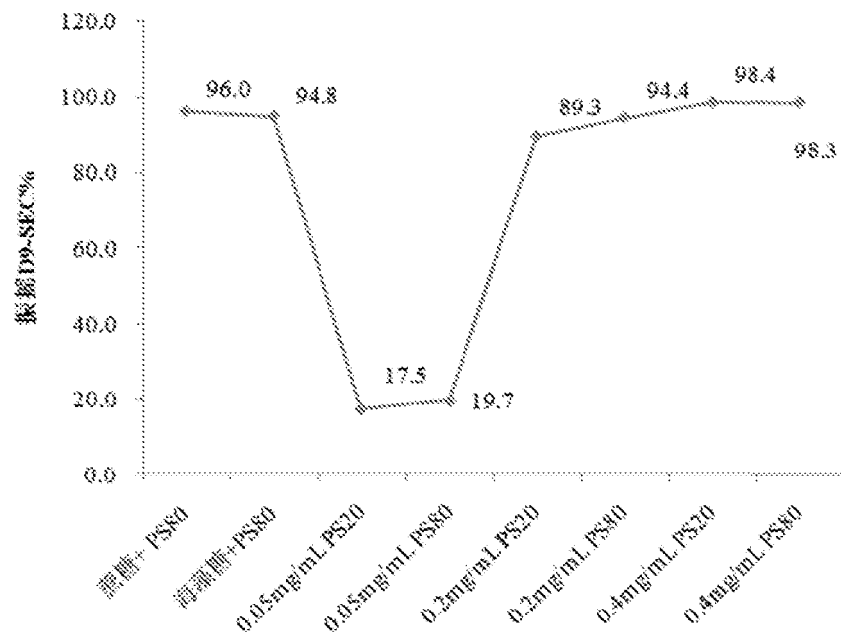


图7

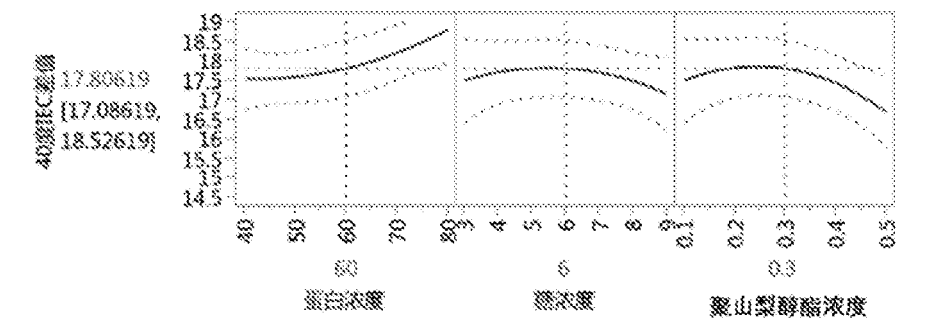


图8

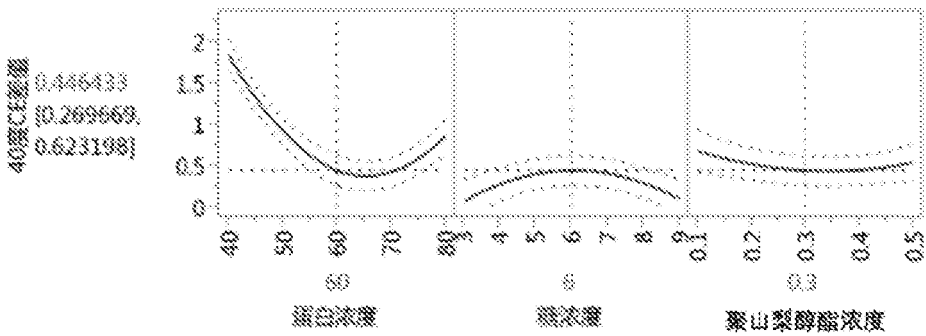


图9

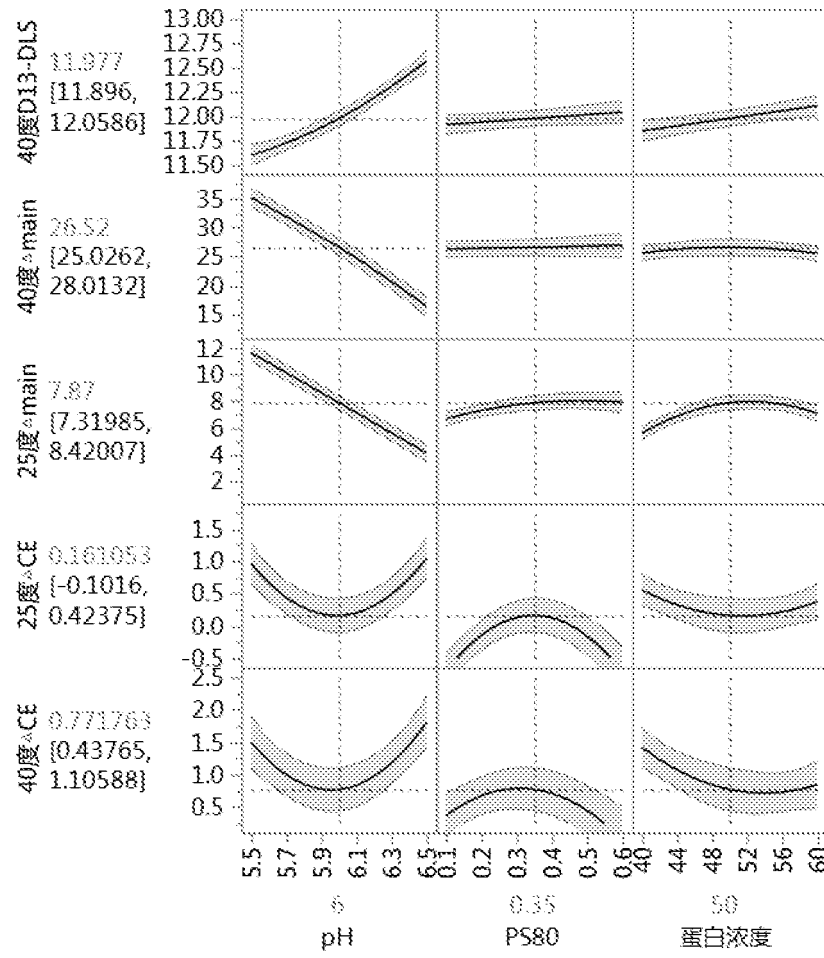


图10