

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021 年 7 月 1 日 (01.07.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/129775 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 39/395 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/139205

(22) 国际申请日: 2020 年 12 月 25 日 (25.12.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201911363904.X 2019 年 12 月 25 日 (25.12.2019) CN
202010430026.5 2020 年 5 月 20 日 (20.05.2020) CN

(71) 申请人: 百奥泰生物制药股份有限公司 (**BIO-THERA SOLUTIONS, LTD.**) [CN/CN]; 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。

(72) 发明人: 苏紫琪 (**SU, Ziqi**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。 秦超 (**QIN, Chao**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。 俞金泉 (**YU, Jin-Chen**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。 黄丹丹 (**HUANG, Dandan**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。 吴用 (**WU, Yong**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。 曹迪 (**CAO, Di**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。 刘翠华 (**LIU, Cuihua**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。 宋述强 (**SONG, Shuqiang**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层, Guangdong

510530 (CN)。 李胜峰 (**LI, Shengfeng**); 中国广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道 11 号 A6 栋第五层, Guangdong 510530 (CN)。

(74) 代理人: 北京信诺创成知识产权代理有限公司 (**SINO-CREATIVITY INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 中国北京市朝阳区光华路 7 号汉威大厦东区 25A3-1 室, Beijing 100020 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2 (a))。

(54) **Title:** ANTI-CTLA-4 MONOCLONAL ANTIBODY, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND APPLICATION THERE-OF

(54) 发明名称: 抗 CTLA-4 单克隆抗体及其制备方法与应用

(57) **Abstract:** An anti-CTLA-4 monoclonal antibody and the preparation and use of said antibody, the anti-CTLA-4 antibody having the advantages of lower toxicity and better activity; in addition, the anti-CTLA-4 antibody also has low content of high mannose glycoforms and/or low content of sialylated glycoforms, being beneficial for extending the half-life of the antibody and/or reducing immunogenicity. In particular, a preparation comprising said antibody has good stability.

(57) 摘要: 抗 CTLA-4 单克隆抗体及该抗体的制备和用途, 抗 CTLA-4 抗体具有毒性更低和活性更佳的优点; 另外, 抗 CTLA-4 抗体还具有低含量的高甘露糖糖型和/或低含量的唾液酸化糖型, 有助于延长抗体的半衰期和/或降低免疫原性。特别地, 含有该抗体的制剂具有良好的稳定性。



WO 2021/129775 A1

抗 CTLA-4 单克隆抗体及其制备方法与应用

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，涉及一种抗 CTLA-4 单克隆抗体及其制备方法与应用。

背景技术

免疫系统是防止癌症发展和进展（progression）的重要防御手段。免疫疗法，如 IL-2 和自体肿瘤浸润淋巴细胞的过继转移，可以诱导患者亚组持续的肿瘤反应，从而使得预后不良的患者获得长期存活（Atkins MB, et al. (1999), J Clin Oncol. 17(7):2105–2116）。随着对于抗肿瘤免疫的启动和效应阶段的重要性的进一步理解，基于检查点阻断的治疗方法最近开始为患者提供持久的益处，并似乎适用于广泛的恶性肿瘤。

免疫系统受到严格的调节，以响应适当的抗原，而不会对自身产生反应（Bretscher P, Cohn M. (1970), Science. 169(3950):1042-1049）。T 细胞是免疫反应的关键介质之一，需要共刺激才能激活，并且可以通过抑制信号使其失活（Sharpe AH, Abbas AK. (2006), N Engl J Med. 355(10):973-975）。细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4（CTLA-4）就是这样一种影响 T 细胞功能的关键抑制性受体，在免疫应答的启动阶段发挥关键作用（Scalapino KJ1, Daikh DI. (2008), Immunol Rev. 223:143-155）。当抗原被 MHC-I 类或 II 类抗原提呈细胞运输到 T 细胞受体（TCR）时，TCR 上的信号就会放大，并被共刺激分子抵消。T 细胞上的 CD28 与抗原提呈细胞上的 B7-1（CD80）和 B7-2（CD86）结合后，会发出一种需要 T 细胞全激活的信号。这种 CD28/B7 的结合导致白介素 2 及其他刺激性的细胞因子产生的增加，提高代谢，促进细胞周期进程，上调细胞存活基因，最终使 T 细胞得到增殖和分化。当 CD28 结合并引起 T 细胞增殖后，CTLA-4 被运送并表达在 T 细胞表面（Linsley PS, et al. (1996), Immunity. 4(6):535-543）。通过 TCR 的激活信号越强烈，就越多 CTLA-4 运送并表达。当在细胞表面上时，CTLA-4 的抑制信号就被传播（Egen JG, Allison JP. (2002), Immunity. 16(1):23-25）。与 CD28 相比，CTLA-4 与 B7 有更高的亲和力，并能阻碍更进一步的共激活（Krummel MF, Allison JP. (1995), J Exp Med. 182(2):458-465）。并且，CTLA-4 表达的细胞能通过内吞作用捕获和降解 B7-1 和 B7-2（Qureshi OS, et al. (2011), Science. 332(6029):600-603）。

除了 CTLA-4，目前已经报道了其他一些可以调节 T 细胞应答的刺激性或抑制性的受体和配体。刺激性受体包括诱导性 T 细胞共刺激子（ICOS）（Tremble LF, et al. (2018), Cancer Lett. 420:109-115）、糖皮质激素诱导的 TNF 受体（GITR）（Schaer DA, et al. (2013), Cancer Immunol Res. 1(5):320-331）、CD27（Buchan SL, et al. (2018), Blood. 131(1):39-48）、4-1BB（Eun SY, et al. (2015), J Immunol. 194(1):134-141）、CD40（Richman LP, Vonderheide RH. (2014), Cancer Immunol Res. 2(1):19-26）、DNAX 配件分子-1（DNAM-1）（Kearney CJ, et al. (2016), Oncoimmunology. 5(8):e1196308），抑制性受体包括细胞程序性死亡受体-1（PD-1）（Dong H, et al. (1999), Nat Med. 5(12):1365-1369）、淋巴细胞激活基因-3（LAG-3）（Di CE, et al. (2005), J Pathol. 205:82–91）、T 细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域 3（TIM3）（Sánchez-Fueyo A, et al. (2003), Nat Immunol. 4(11):1093-1101）、T 细胞活化的 V 结构域 Ig 抑制剂（VISTA）（Lines JL, et al. (2014), Cancer Res. 74(7):1924-1932）、CD47（Liu X, et al. (2015), Nat Med. 21(10):1209-1215）、吡啶胺-2,3-双加氧酶（IDO）（Friberg M, et al. (2002), Cancer. 101:151–155）、CD94/NKG2A

(Muntasell A, et al. (2017), Curr Opin Immunol. 45:73-81)、杀伤性免疫球蛋白样受体 (KIR) (Tu MM, et al. (2016), Front Immunol. 7: 116)、T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域 (TIGIT) (Johnston RJ, et al. (2014), Cancer Cell. 26:923-937)。这些刺激性的受体和配体, 即目前研究领域热论的“免疫检查点”, 在免疫系统的自我调节中起到至关重要的作用, 使免疫系统的功能保持在正常范围内而不至于过度活化。在癌症机体中, 利用激动剂靶向刺激性受体或利用抑制剂阻断抑制性受体, 就能调节免疫应答, 使免疫系统识别和攻击肿瘤细胞, 达到治疗的效果。对于上述免疫检查点, 目前有一部分已开发出临床中或上市的治疗性药物 (Elad S, et al. (2014), Chin J Cancer. 33(9): 434-444), 其中 CTLA-4 阻断剂就是第一个应用于临床癌症治疗的单克隆抗体药物。

目前较为人所知的抗 CTLA-4 单克隆抗体是百时美施贵宝公司的伊匹单抗 (Yervoy®), 以及阿斯利康公司尚处于临床阶段的曲美母单抗 (Tremelimumab)。它们的机理都是通过阻断 CTLA-4 与 B7 的结合, 解放 B7 蛋白使其能跟 CD28 结合, 从而增强 T 细胞的增殖反应。在临床前几种已建立的小鼠模型中阻断 CTLA-4 / B7 相互作用, 已经显示出对可移植肿瘤的排斥, 包括结肠癌, 前列腺癌, 淋巴瘤和肾癌 (Korman AJ, et al. (2006), Adv Immunol. 90:297-339)。然而, 这种作用机制推广到人体上, 仅对一小部分治疗患者提供了有限的临床益处。因此, 人们认为应该存在与宿主依赖因子相关的未知机制 (Romano E, et al. (2015), Proc Natl Acad Sci USA. 112(19):6140-6145)。

发明内容

基于此, 有必要提供一种毒性更低、活性更佳的新型抗 CTLA-4 单克隆抗体药物。本发明的上述目的通过以下技术手段实现:

本发明提供一种低含量的高甘露糖糖型和/或低含量的唾液酸化糖型的抗 CTLA-4 抗体, 有助于延长抗体的半衰期和/或降低免疫原性。在一些实施方案中, 所述抗体为 ADCC 增强的抗 CTLA-4 抗体, 用于靶向病患细胞或组织, 增大药物的抗肿瘤效果。

具体地, 一方面, 本发明提供了针对 CTLA-4 的单克隆抗体, 所述单克隆抗体包含

(1) 重链 CDR1 (HCDR1), 其包含 SEQ ID NO:12 所示的序列, 与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99% (或任何两个数值之间的范围 (包括端点) 或其中任何值) 序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个 (优选约 1 个、约 2 个或约 3 个) 保守氨基酸突变 (优选置换、插入或缺失) 的氨基酸序列, 或由其组成,

重链 CDR2 (HCDR2), 其包含 SEQ ID NO:13 所示的序列, 与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99% (或任何两个数值之间的范围 (包括端点) 或其中任何值) 序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个 (优选约 1 个、约 2 个或约 3 个) 保守氨基酸突变 (优选置换、插入或缺失) 的氨基酸序列, 或由其组成,

重链 CDR3 (HCDR3), 其包含 SEQ ID NO:14 所示的序列, 与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99% (或任何两个数值之间的范围 (包括端点) 或其中任何值) 序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个 (优选约 1 个、约 2 个或约 3 个) 保守氨基酸突变 (优选置换、插入或缺失) 的氨基酸序列, 或由其组成,

轻链 CDR1(LCDR1), 其包含 SEQ ID NO:15 所示的序列, 与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% (或任何两个数值之间的范围 (包括端点) 或其中任何值) 序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个 (优选 1 个、2 个或 3 个) 保守氨基酸突变 (优选置换、插入或缺失) 的氨基酸序列, 或由其组成,

轻链 CDR2(LCDR2), 其包含 SEQ ID NO:16 所示的序列, 与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% (或任何两个数值之间的范围 (包括端点) 或其中任何值) 序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个 (优选约 1 个、约 2 个或约 3 个) 保守氨基酸突变 (优选置换、插入或缺失) 的氨基酸序列, 或由其组成, 和

轻链 CDR3(LCDR3), 其包含 SEQ ID NO:17 所示的序列, 与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% (或任何两个数值之间的范围 (包括端点) 或其中任何值) 序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个 (优选约 1 个、约 2 个或约 3 个) 保守氨基酸突变 (优选置换、插入或缺失) 的氨基酸序列, 或由其组成;

或

(2) 重链可变区(VH), 其包含 SEQ ID NO:18 所示的序列, 与所述序列具有至少约 80%, 优选至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99% (或任何两个数值之间的范围 (包括端点) 或其中任何值) 序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个 (优选约 1 个、约 2 个或约 3 个) 保守氨基酸突变 (优选置换、插入或缺失) 的氨基酸序列, 或由其组成, 和

轻链可变区(VL), 其包含 SEQ ID NO:19 所示的序列, 与所述序列具有至少约 80%, 优选至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99% (或任何两个数值之间的范围 (包括端点) 或其中任何值) 序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个 (优选约 1 个、约 2 个或约 3 个) 保守氨基酸突变 (优选置换、插入或缺失) 的氨基酸序列, 或由其组成;

所述单克隆抗体具有降低的岩藻糖基化水平。

在具体的实施方案中, 所述单克隆抗体包含重链和轻链, 所述重链包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列, 与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少约 80%, 优选至少约 81%、约 82%、约 83%、约 84%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99% (或任何两个数值之间的范围 (包括端点) 或其中任何值) 同源性的序列, 或由其组成;

所述轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列, 与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有至少约 80%, 优选至少约 81%、约 82%、约 83%、约 84%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% (或任何两个数值之间的范围 (包括端点) 或其中任何值) 同源性的序列, 或由其组成。

在具体的实施方案中, 所述重链由 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列或与 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列具有至少约 80%, 优选至少约 81%、约 82%、约 83%、约 84%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、

约 97%、约 98%或约 99%（或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值）同源性的核苷酸序列编码，所述轻链由 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列或与 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列具有至少约 80%，优选至少约 81%、约 82%、约 83%、约 84%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%（或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值）同源性的核苷酸序列编码。

在具体的实施方案中，所述岩藻糖基化水平为 0%-20%，比如约 0%，约 1%，约 2%，约 3%，约 4%，约 5%，约 6%，约 7%，约 8%，约 9%，约 10%，约 11%，约 12%，约 13%，约 14%，约 15%，约 16%，约 17%，约 18%，约 19% 或 约 20%，或在其中任意两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的高甘露糖糖型总量<5%和/或唾液酸化糖型总量<3%。在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的高甘露糖糖型总量为约 0.1%、约 0.3%、约 0.9%、约 1.18%、约 1.7%、约 2.6%、约 3.3%、约 4.1%、约 4.9%、约 4.99%，或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述抗单克隆抗体 Fc 区的唾液酸化糖型总量为约 0.1%、约 0.2%、约 0.36%、约 0.8%、约 1.5%、约 2.2%、约 2.7%、约 2.9%、2.99%，或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体为 IgG1，所述单克隆抗体 CH2 区的高甘露糖糖型总量<5%和/或唾液酸化糖型总量<3%。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的高甘露糖糖型总量<3%和/或唾液酸化糖型总量<2%。在一些实施方案中，所述单克隆抗体为 IgG1，所述单克隆抗体 CH2 区的高甘露糖糖型总量<3%和/或唾液酸化糖型总量<2%。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的高甘露糖糖型总量<2%和/或唾液酸化糖型总量<1%。在一些实施方案中，所述单克隆抗体为 IgG1，所述单克隆抗体 CH2 区的高甘露糖糖型总量<2%和/或唾液酸化糖型总量<1%。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的岩藻糖基化水平为 0%-10%。在一些实施方案中，所述单克隆抗体为 IgG1，所述单克隆抗体 CH2 区的岩藻糖基化水平为 0%-10%。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的岩藻糖基化水平为 0%-5%。在一些实施方案中，所述抗单克隆抗体 Fc 区的岩藻糖基化水平为约 0、约 0.1%、约 0.3%、约 0.4%、约 0.6%、约 1.3%、约 1.9%、约 2.2%、约 2.8%、约 3.3%、约 3.7%、约 4.1%、约 4.5%、约 5%，或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述单克隆抗体为 IgG1，所述单克隆抗体 CH2 区的岩藻糖基化水平为 0%-5%。

在一些实施方案中，所述糖化水平是通过以下方式实现的：

(1) 将包含 SEQ ID NO:12 的重链 CDR1，SEQ ID NO:13 的重链 CDR2，SEQ ID NO:14 的重链 CDR3，SEQ ID NO:15 的轻链 CDR1，SEQ ID NO:16 的轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:17 的轻链 CDR3 的单克隆抗体在敲降或敲除 FUT8 基因（ α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因）的 CHO 宿主细胞中表达，所述单克隆抗体的高甘露糖糖型、唾液酸化糖型和/或岩藻糖型含量相比于在正常 CHO 宿主细胞中表达的单克隆抗体的含量低；

(2) 将包含 SEQ ID NO:12 的重链 CDR1，SEQ ID NO:13 的重链 CDR2，SEQ ID NO:14 的重链 CDR3，SEQ ID NO:15 的轻链 CDR1，SEQ ID NO:16 的轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:17 的轻链 CDR3 的单克隆抗体在敲降 GDP-岩藻糖 4,6-脱水酶（GMD）的 CHO-DG44 细胞中表

达，所述单克隆抗体的高甘露糖糖型、唾液酸化糖型和/或岩藻糖型含量相比于在正常 CHO-DG44 宿主细胞中表达的单克隆抗体的含量低；或

(3) 将包含 SEQ ID NO:12 的重链 CDR1，SEQ ID NO:13 的重链 CDR2，SEQ ID NO:14 的重链 CDR3，SEQ ID NO:15 的轻链 CDR1，SEQ ID NO:16 的轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:17 的轻链 CDR3 的单克隆抗体在 CHO 细胞中表达，然后用糖基转移酶抑制剂如 2F-过乙酰基-岩藻糖去岩藻糖基化，所述单克隆抗体的高甘露糖糖型、唾液酸化糖型和/或岩藻糖型含量相比于未用糖基转移酶抑制剂如 2F-过乙酰基-岩藻糖去岩藻糖基化的单克隆抗体的含量低。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达，如 PCT/CN2018/100008 公开的 CHO-BAT-KF 细胞系。

另一方面，本发明提供了药物组合物或融合蛋白，其包含本发明所述的单克隆抗体。

在一些实施方案中，所述药物组合物为适于通过口服、注射、输液、肠外、静脉、黏膜、舌下、肌肉、皮内、鼻腔、腹腔、动脉内、皮下吸收给药的形式。在一些实施方案中，所述药物组合物为适于全身给药的形式。

另一方面，本发明提供了抗体偶联物，其包括本发明所述的单克隆抗体，以及与所述单克隆抗体偶联的偶联部分，所述偶联部分为纯化标签（如 His 标签）、细胞毒性剂，延长所述单克隆抗体半衰期的结构部分，或可检测的标记，优选地，所述偶联部分为放射性同位素、化学发光剂、酶、血清白蛋白（例如人或鼠血清白蛋白）、或聚乙二醇。

在一些实施方案中，本发明抗 CTLA-4 抗体为单价抗体或多价抗体。在另一方面，本发明提供了多特异性抗体（例如双特异性抗体），其包含本发明所述的单克隆抗体，以及针对其他抗原和/或其他抗原表位的抗体或抗原结合片段。

在又一个方面，本发明提供了试剂盒，其包括本发明所述的单克隆抗体，抗体偶联物、多特异性抗体或融合蛋白。

在具体的实施方案中，所述试剂盒还包括第二抗体，细胞毒性剂，化疗剂，放疗剂，所述第二抗体特异性识别所述单克隆抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如荧光素、金属离子、生物素、放射性同位素、化学发光物质、酶或聚乙二醇。

在又一个方面，本发明提供了所述的单克隆抗体，融合蛋白，抗体偶联物或多特异性抗体，其用于治疗癌症或用于排斥可移植的肿瘤，例如黑色素瘤，非小细胞肺癌，膀胱癌，肝癌，结肠癌，前列腺癌，淋巴瘤或肾癌。

在又一个方面，本发明提供了制备具有提高 ADCC 活性的单克隆抗体的方法，包含：

(1) 将包含 SEQ ID NO:12 的重链 CDR1，SEQ ID NO:13 的重链 CDR2，SEQ ID NO:14 的重链 CDR3，SEQ ID NO:15 的轻链 CDR1，SEQ ID NO:16 的轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:17 的轻链 CDR3 的单克隆抗体在敲降或敲除 FUT8 基因（ α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因）的 CHO 宿主细胞（例如 CHO-BAT-KF 细胞）中表达；

(2) 将包含 SEQ ID NO:12 的重链 CDR1，SEQ ID NO:13 的重链 CDR2，SEQ ID NO:14 的重链 CDR3，SEQ ID NO:15 的轻链 CDR1，SEQ ID NO:16 的轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:17 的轻链 CDR3 的单克隆抗体在敲降 GDP-岩藻糖 4,6-脱水酶（GMD）的 CHO-DG44 细胞中表达；或

(3) 将包含 SEQ ID NO:12 的重链 CDR1，SEQ ID NO:13 的重链 CDR2，SEQ ID NO:14 的重链 CDR3，SEQ ID NO:15 的轻链 CDR1，SEQ ID NO:16 的轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:17 的轻链 CDR3 的单克隆抗体在 CHO 细胞中表达，然后用糖基转移酶抑制剂（如 2F-过乙酰基

-岩藻糖)去岩藻糖化。

在又一个方面,本发明提供了治疗癌症或用于排斥可移植的肿瘤,例如黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、淋巴瘤或肾癌的方法,包括给患者给予有效量的所述的单克隆抗体、融合蛋白、抗体偶联物或多特异性抗体。

在又一个方面,本发明提供了增强 T 细胞的增殖反应的方法,其包含利用本发明所述的单克隆抗体、融合蛋白、抗体偶联物或多特异性抗体阻断 CTLA-4 与 B7 的结合。

在又一个方面,本发明提供了降低患者体内肿瘤浸润表达 CTLA-4 的 Treg 细胞的方法,包括给患者给予治疗有效量的所述的单克隆抗体、融合蛋白、抗体偶联物或多特异性抗体。

在又一个方面,本发明提供了所述的单克隆抗体、融合蛋白、抗体偶联物或多特异性抗体在制备用于治疗癌症或用于排斥可移植的肿瘤,例如黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、淋巴瘤或肾癌的药物中的应用。

在又一个方面,本发明提供了抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段用于治疗肿瘤或癌症的方法或用途。在一些实施方案中,抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段用于治疗肿瘤或癌症。

在一些实施方案中,所述抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段至少包含 SEQ ID NO:12 所示的 HCDR1、SEQ ID NO:13 所示的 HCDR2、SEQ ID NO:14 所示的 HCDR3、SEQ ID NO:15 所示的 LCDR1、SEQ ID NO:16 所示的 LCDR2、SEQ ID NO:17 所示的 LCDR3 中一个或多个。

在一些实施方案中,所述抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段包含 SEQ ID NO:12 所示的 HCDR1、SEQ ID NO:13 所示的 HCDR2、SEQ ID NO:14 所示的 HCDR3、SEQ ID NO:15 所示的 LCDR1、SEQ ID NO:16 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO:17 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中,所述抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段的重链可变区包含 SEQ ID NO:18 所示的序列,与 SEQ ID NO:18 所示序列具有至少 80%同一性的序列,或与 SEQ ID NO:18 所示序列相比具有一或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;和/或

所述抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含 SEQ ID NO:19 所示的序列,与 SEQ ID NO:19 所示序列具有至少 80%同一性的序列,或与 SEQ ID NO:19 所示序列相比具有一或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

在一些实施方案中,所述抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段的重链可变区包含 SEQ ID NO:18 所示的序列,所述抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含 SEQ ID NO:19 所示的序列。

在一些实施方案中,所述抗 CTLA-4 抗体的重链包含 SEQ ID NO:1 所示的序列,与 SEQ ID NO:1 所示序列具有至少 80%同一性的序列,或与 SEQ ID NO:1 所示序列相比具有一或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;和/或

所述抗 CTLA-4 抗体的轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的序列,与 SEQ ID NO:2 所示序列具有至少 80%同一性的序列,或与 SEQ ID NO:2 所示序列相比具有一或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

在一些实施方案中,所述抗 CTLA-4 抗体为抗体 1 或抗体 2,抗体 1 和抗体 2 的重链均包含如 SEQ ID NO:1 所示序列,所述抗体 1 和抗体 2 的轻链均包含如 SEQ ID NO:2 所示序列;抗体 1 和抗体 2 含有两条序列相同的重链和两条序列相同的轻链。

在一些实施方案中,所述抗 CTLA-4 抗体(例如抗体 1 或 2)中 Fc 区的高甘露糖糖型总量<5%和/或唾液酸化糖型总量<3%。在一些实施方案中,所述抗 CTLA-4 抗体(例如抗体 1 或 2)中 Fc 区的高甘露糖糖型总量为约 0.1%、约 0.3%、约 0.9%、约 1.18%、约 1.7%、约

2.6%、约 3.3%、约 4.1%、约 4.9%、约 4.99%，或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 1 或 2）中 Fc 区的唾液酸化糖型总量为约 0.1%、约 0.2%、约 0.36%、约 0.8%、约 1.5%、约 2.2%、约 2.7%、约 2.9%、2.99%，或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 1 或 2）中 Fc 区的高甘露糖糖型总量<3%和/或唾液酸化糖型总量<2%。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 1 或 2）中 Fc 区的高甘露糖糖型总量<2%和/或唾液酸化糖型总量<1%。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 2）或抗原结合片段的岩藻糖基化水平为 0%-20%，比如约 0%、约 1%、约 2%、约 3%、约 4%、约 5%、约 6%、约 7%、约 8%、约 9%、约 10%、约 11%、约 12%、约 13%、约 14%、约 15%、约 16%、约 17%、约 18%、约 19% 或 约 20%，或在其中任意两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 2）或抗原结合片段的岩藻糖基化水平为 0-10%。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 2）或抗原结合片段的岩藻糖基化水平为 0-5%。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 2）或抗原结合片段的岩藻糖基化水平为 0-1%。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 2）或抗原结合片段的岩藻糖基化水平为约 0、约 0.1%、约 0.3%、约 0.4%、约 0.5%、约 0.6%、约 0.8%、约 1%、约 1.3%、约 1.6%、约 2.1%、约 2.2%、约 2.8%、约 2.9%、约 3%、约 3.3%、3.8%、约 4%、约 4.1%、约 4.2%、4.3%、约 4.6%、约 5%，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 2）或抗原结合片段没有结合岩藻糖。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 2）或抗原结合片段具有增强的 ADCC 效应（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）。

抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段可以通过基因工程在 CHO 细胞或 293 细胞中表达，并通过纯化获得；纯化可以采用常规方法进行，例如先离心细胞悬液并收集上清液，再次离心进一步去除杂质。Protein A 亲和柱和离子交换柱等方法可以用于纯化抗体蛋白。

在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 2）或抗原结合片段由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达，如 PCT/CN2018/100008 公开的 CHO-BAT-KF 细胞系。在一些实施方案中，抗体 2 由 CHO-BAT-KF 细胞系表达。

在一些实施方案中，所述方法或用途包括：向有需要的患者施用有效量的抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体为抗体 1 或抗体 2。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体（例如抗体 2）由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效剂量为每剂约 7 mg 至 180 mg。

在一些实施方案中，患者患有肿瘤或癌症。在一些实施方案中，肿瘤和癌症包括但不限于血液癌症、实体瘤。在一些实施方案中，血液癌症包括但不限于白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。在一些实施方案中，白血病包括急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)和骨髓性增生疾病/肿瘤(MPDS)。在一些实施方案中，淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤、无痛性和侵袭性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤(小细胞和大细胞)。在一些实施方案中，骨髓瘤包括多发性骨髓瘤(MM)、巨细胞骨髓瘤、重链骨髓瘤和轻链或本斯-琼斯骨髓瘤。在一些实施方案中，实体瘤包括乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、黑素瘤、结直肠癌、肺癌、头颈癌、膀胱癌、食道癌、肝癌和肾癌。在一些实施方案中，肿瘤和癌症为尚无有效治疗手段的经病理学确诊的局部晚

期或转移性恶性实体肿瘤。

在一些实施方案中，本发明公开了一种用于治疗有需要患者的肿瘤或癌症的方法，其包括施用有效量的抗 CTLA-4 抗体，其中抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 7 mg 至 180 mg 每个治疗周期。在一些实施方案中，一个治疗周期为 1 周、2 周、3 周、4 周、1 个月、5 周、6 周、7 周，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体为抗体 1、抗体 2。在一些实施方案中，抗体 2 由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达。

在一些实施方案中，可以将抗 CTLA-4 抗体配制成药物组合物，并以适合于所选给药途径的多种形式向患者给药，给药途径例如肠胃外、静脉内（iv）、肌肉内、局部或皮下。在一些实施方案中，可以将抗 CTLA-4 抗体静脉输注。抗 CTLA-4 抗体的给药量将取决于药物的性质、细胞表面触发药物的内在化、运输和释放的程度，以及所治疗的疾病和患者的状况（如年龄、性别、体重等）。

在一些实施方案中，每次施用的抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）约 0.1 mg/kg 至 16 mg/kg 或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，每次施用的抗 CTLA-4 抗体为约 0.1 mg/kg、约 0.2 mg/kg、约 0.3 mg/kg、约 0.4 mg/kg、约 0.5 mg/kg、约 0.9 mg/kg、约 1 mg/kg、约 1.3 mg/kg、约 1.5 mg/kg、约 1.8 mg/kg、约 2 mg/kg、约 2.5 mg/kg、约 3 mg/kg、约 4 mg/kg、约 5 mg/kg、约 6 mg/kg、约 7 mg/kg、约 8 mg/kg、约 9 mg/kg、约 10 mg/kg、约 11 mg/kg、约 12 mg/kg、约 13 mg/kg、约 14 mg/kg、约 15 mg/kg、约 16 mg/kg，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，每次施用的抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）约 0.1 mg/kg 至 2.5 mg/kg 或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，每次施用的抗 CTLA-4 抗体为约 0.1 mg/kg、约 0.2 mg/kg、约 0.3 mg/kg、约 0.4 mg/kg、约 0.5 mg/kg、约 0.6 mg/kg、约 0.7 mg/kg、约 0.8 mg/kg、约 0.9 mg/kg、约 1 mg/kg、约 1.1 mg/kg、约 1.2 mg/kg、约 1.3 mg/kg、约 1.4 mg/kg、约 1.5 mg/kg、约 1.6 mg/kg、约 1.7 mg/kg、约 1.8 mg/kg、约 1.9 mg/kg、约 2 mg/kg、约 2.1 mg/kg、约 2.2 mg/kg、约 2.3 mg/kg、约 2.4 mg/kg、约 2.5 mg/kg，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次。在一些实施方案中，治疗周期为 1 个周期、2 个周期、3 个周期、4 个周期、5 个周期、6 个周期、7 个周期、8 个周期、9 个周期、10 个周期，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，约 3 周给药 1 次，治疗周期为 1 个周期、2 个周期、3 个周期、4 个周期、5 个周期、6 个周期、7 个周期、8 个周期、9 个周期或 10 个周期。在一些实施方案中，约 4 周给药 1 次，治疗周期为 1 个周期、2 个周期、3 个周期、4 个周期、5 个周期、6 个周期、7 个周期、8 个周期、9 个周期或 10 个周期。在一些实施方案中，约 5 周给药 1 次，治疗周期为 1 个周期、2 个周期、3 个周期、4 个周期、5 个周期、6 个周期、7 个周期、8 个周期、9 个周期或 10 个周期。

在一些实施方案中，本发明公开了一种用于治疗肿瘤或癌症的方法，所述方法包括：每 3 周向有需要的患者给予约 0.1 mg/kg、约 0.2 mg/kg、约 0.3 mg/kg、约 0.4 mg/kg、约 0.5 mg/kg、约 0.6 mg/kg、约 0.7 mg/kg、约 0.8 mg/kg、约 0.9 mg/kg、约 1 mg/kg、约 1.1 mg/kg、约 1.2 mg/kg、约 1.3 mg/kg、约 1.4 mg/kg、约 1.5 mg/kg、约 1.6 mg/kg、约 1.7 mg/kg、约 1.8 mg/kg、约 1.9 mg/kg、约 2 mg/kg、约 2.1 mg/kg、约 2.2 mg/kg、约 2.3 mg/kg、约 2.4 mg/kg、约 2.5 mg/kg 的抗 CTLA-4 抗体，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。

在一些实施方案中，本发明公开了一种用于治疗肿瘤或癌症的方法，所述方法包括：每3周向有需要的患者给予约0.1 mg/kg、约0.2 mg/kg、约0.3 mg/kg、约0.4 mg/kg、约0.5 mg/kg、约0.6 mg/kg、约0.7 mg/kg、约0.8 mg/kg、约0.9 mg/kg、约1 mg/kg、约1.1 mg/kg、约1.2 mg/kg、约1.3 mg/kg、约1.4 mg/kg、约1.5 mg/kg、约1.6 mg/kg、约1.7 mg/kg、约1.8 mg/kg、约1.9 mg/kg、约2 mg/kg、约2.1 mg/kg、约2.2 mg/kg、约2.3 mg/kg、约2.4 mg/kg、约2.5 mg/kg的抗体1或2，或含此剂量抗体1或2的制剂；治疗周期为4个周期。

在一些实施方案中，本发明公开了一种治疗肿瘤或癌症的方法，其包括向有需要的患者施用有效量的抗CTLA-4抗体（或制剂）；其中，抗CTLA-4抗体的有效量为单次给药约7 mg至180 mg（或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂）。剂量时间表和给药方式取决于某些患者群中的抗CTLA-4抗体（或制剂）的获益风险评估和一般临床实践指南。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内抗CTLA-4抗体施用的有效量为约7mg至180 mg（或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂）。在一些实施方案中，一个治疗周期为1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，治疗周期为1个周期、2个周期、3个周期、4个周期、5个周期或6个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗CTLA-4抗体（如抗体1或2）的有效量为约6 mg、约10 mg、约12 mg、约18 mg、约24 mg、约30 mg、约40 mg、约50 mg、约60 mg、约100 mg、约120 mg、约180 mg、约200 mg、约250 mg、约290 mg、约300 mg、约330 mg、约380 mg、约400 mg、约434 mg、约480 mg、约500 mg、约567 mg、约580 mg、约600 mg、约700 mg、约800 mg、约900 mg、约960 mg，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗CTLA-4抗体（如抗体1或2）的有效量为约7 mg、约8 mg、约10 mg、约12 mg、约18 mg、约24 mg、约30 mg、约40 mg、约50 mg、约60 mg、约68 mg、约70 mg、约80 mg、约90 mg、约100 mg、约110 mg、约120 mg、约130 mg、约140 mg、约150 mg、约160 mg、约170 mg、约180 mg，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂。在一些实施方案中，一个治疗周期为1周至7周给药1次。在一些实施方案中，治疗周期为1个周期、2个周期、3个周期、4个周期、5个周期、6个周期，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗CTLA-4抗体（如抗体1或2）的有效量为约7 mg至约120 mg，或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约1周、约2周、约3周、或约4周给药1次，治疗周期为2个周期、3个周期、4个周期或5个周期。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗CTLA-4抗体（如抗体1或2）的有效量为约7 mg、约10 mg、约12 mg、约18 mg、约20 mg、约24 mg、约28 mg、约30 mg、约40 mg、约50 mg、约60 mg、约70 mg、约80 mg、约90 mg、约100 mg、约120 mg，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约1周、约2周、约3周或约4周给药1次，治疗周期为2个周期、3个周期、4个周期或5个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗CTLA-4抗体（如抗体1或2）的有效量为约120 mg至180 mg，或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约1

周、约 2 周、约 3 周、或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 120 mg、约 130 mg、约 140 mg、约 150 mg、约 160 mg、约 170 mg、约 180 mg，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 6.9 mg 至 7.2 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 7 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 10 mg 至 13 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 12 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 20 mg 至 24 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 22 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 28 mg 至 33 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 30 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 59 mg 至 64 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 60 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 95 mg 至 113 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 100 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 110 mg 至 123 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 120 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，

治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 127 mg 至 133 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 130 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 132 mg 至 144 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 140 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 140 mg 至 155 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4（如抗体 1 或 2）抗体的有效量为约 150 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 177 mg 至 180mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 180 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 7 mg 至 120 mg 每 3 周一次，4 个治疗周期。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 7 mg、约 10 mg、约 12 mg、约 20 mg、约 26 mg、约 30 mg、约 35 mg、约 40 mg、约 44 mg、约 50 mg、约 58 mg、约 60 mg、约 69 mg、约 70 mg、约 77 mg、约 85 mg、约 99 mg、约 110 mg、约 114 mg 或约 120 mg 每 3 周一次，4 个治疗周期。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 7mg、约 12 mg、约 30 mg、约 60 mg 或约 120 mg 每 3 周一次，4 个治疗周期。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 120 mg 至 180 mg 每 3 周一次。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 120 mg、约 130 mg、约 134 mg、约 140 mg、约 146 mg、约 150 mg、约 154 mg、约 160 mg、约 164 mg、约 170 mg、约 173 mg、约 1760mg、约 180 mg 每 3 周一次，4 个治疗周期。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 130 mg、140 mg、约 160 mg 或约 180 mg 每 3 周一次，4 个治疗周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内给药一次抗 CTLA-4 抗体（或制剂）。在一些实施方案中，每个治疗周期内多次给药抗 CTLA-4 抗体（或制剂），例如 2 次、3 次、4 次或 5 次。在一些实施方案中，患者每个治疗周期只能给药 1 次或 4 次。

在一些实施方案中，患者接受一个治疗周期治疗。在一些实施方案中，患者接受多个（例如 2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个）治疗周期治疗。在一些实施方案中，患者接受 4 个治疗周期治疗。在一些实施方案中，患者接受治疗直至病症得到缓解而不再需要治疗。

在一些实施方案中，本发明公开了一种用于治疗肿瘤或癌症的方法，所述方法包括：每 3 周向有需要的患者给予约 7 mg 至 30 mg、约 30 mg 至 60 mg、约 60 mg 至 120 mg、约 120 mg

至 180 mg，比如约 7 mg、约 10 mg、约 12 mg、约 18 mg、约 30 mg、60 mg、约 80 mg、约 100 mg、约 120 mg、约 150 mg、约 160 mg、约 180 mg 的抗 CTLA-4 抗体，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体为抗体 1。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体为抗体 2。

在一些实施方案中，单剂量给药后，患者的症状得到缓解。在一些实施方案中，单剂量给药后，患者后的症状未得到预期缓解，再对患者给药约 7 mg 至 180 mg 抗 CTLA-4 抗体，直至患者的症状得到缓解。

在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体（或制剂）是通过皮下（s.c.）注射、腹膜内（i.p.）注射、肠胃外注射、动脉内注射或静脉内（i.v.）注射等方式进行给药。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体（或制剂）是输液方式进行给药。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体（或制剂）是推注方式进行给药。

在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体（或制剂）是通过静脉内（i.v.）输液方式（即静脉输注）进行给药。在一些实施方案中，静脉内输液持续时间为约 50 分钟、约 55 分钟、约 60 分钟、约 65 分钟、约 70 分钟、约 75 分钟、约 81 分钟、约 87 分钟、约 90 分钟、约 95 分钟，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，静脉输液持续时间 ≥ 60 分钟。

在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体（或制剂）与其他治疗方法联合用于治疗肿瘤或癌症，例如化疗、放疗、免疫治疗、激素治疗、靶向治疗、生物治疗和手术治疗等。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体（或制剂）与其他肿瘤或癌症治疗剂联合治疗肿瘤或癌症，如激素、治疗肿瘤或癌症的抗体等。

在又一方面，本发明提供了抗 CTLA-4 抗体在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的应用。在一些实施方案中，用于治疗肿瘤或癌症的药物包括抗 CTLA-4 抗体。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体为抗体 1 或 2。在一些实施方案中，抗体 2 由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达。

在又一方面，本发明还提供了一种试剂盒，试剂盒包含抗 CTLA-4 抗体（或制剂）和用于指导有需要患者给药抗 CTLA-4 抗体（或制剂）的说明书。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体为抗体 1 或 2。在一些实施方案中，抗体 2 由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达。

在又一方面，本发明还提供了包含抗 CTLA-4 抗体的适合注射用的药物组合物，如推注型药物组合物或输液（滴注）型药物组合物。适于注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液（在此是水溶性的）或分散体以及用于即时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水（PBS）、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等）的溶剂或分散介质，及其适宜的混合物。在一些实施方案中，药物组合物还包括药学可接受的载体。在一些实施方案中，药学上可接受的载体可以包含抗菌剂和/或抗真菌剂，如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在一些实施方案中，药学上可接受的载体可以包含等渗剂，如糖、多元醇（诸如甘露糖醇、山梨醇）、氯化钠。在一些实施方案中，药物组合物至少包含 0.1% 的抗 CTLA-4 抗体。抗体的百分比可以变化，并且为给定剂型重量的约 2% 至 90% 之间。这种治疗上有用的药物组合物中抗 CTLA-4 抗体的量可以为给药的有效量。

在又一方面，本发明还提供了上述药物组合物的制备方法：分别将本文所述的抗 CTLA-4

抗体与药学上可接受的适合注射用的载体(例如注射用水,生理盐水等)混合。上述抗 CTLA-4 抗体与药学上可接受的载体的混合方法是本领域通常已知的。

在又一方面,本发明还提供了一种储藏和递送中保持稳定的含抗 CTLA-4 抗体的液体制剂,其包含以下组分: 4-80 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段、缓冲剂、稳定剂、螯合剂、表面活性剂、水;液体制剂的 pH 值为 5-7。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:

- (1) 4-80 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,
- (2) 8-45 mM 缓冲剂,
- (3) 180-290 mM 稳定剂,
- (4) 0.01-0.3 mg/mL 螯合剂,
- (5) 0.1-0.5 mg/mL 表面活性剂,
- (6) 水;

液体制剂的 pH 值为 5.2-6.5。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:

- (1) 5-40 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,
- (2) 10-30 mM 缓冲剂,
- (3) 200-260 mM 稳定剂,
- (4) 0.02-0.2 mg/mL 螯合剂,
- (5) 0.1-0.4 mg/mL 表面活性剂,
- (6) 水;

液体制剂的 pH 值为 5.4-6.2。

在一些实施方案中,缓冲剂不包括 Tris 缓冲剂。

在一些实施方案中,所述缓冲剂选自组氨酸缓冲剂、醋酸缓冲剂或其组合。在一些实施方案中,所述组氨酸缓冲剂包含组氨酸和组氨酸盐酸盐(如 L-组氨酸和 L-组氨酸盐酸盐),所述醋酸缓冲剂包含醋酸和醋酸钠。在一些实施方案中,所述缓冲剂选自组氨酸缓冲剂或组氨酸缓冲剂与醋酸缓冲剂的组合物。在一些实施方案中,所述稳定剂选自海藻糖、蔗糖、甘露醇或其组合物。在一些实施方案中,所述稳定剂选自海藻糖或蔗糖。在一些实施方案中,所述螯合剂包含依地酸二钠。在一些实施方案中,所述螯合剂为依地酸二钠。在一些实施方案中,所述表面活性剂选自聚山梨酯 20、聚山梨酯 80 或其组合物。在一些实施方案中,所述表面活性剂为聚山梨酯 80。

在一些实施方案中,抗 CTLA-4 抗体或其片段的浓度为约 5 mg/mL、约 9 mg/mL、约 13 mg/mL、约 17 mg/mL、约 24 mg/mL、约 29 mg/mL、约 31 mg/mL、约 36 mg/mL、约 40 mg/mL,或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括终点)或其中任何值。在一些实施方案中,缓冲剂的浓度为约 10 mM、约 14 mM、约 17 mM、约 21 mM、约 25 mM、约 29 mM、约 30 mM,或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括终点)或其中任何值。在一些实施方案中,稳定剂的浓度为约 200 mM、约 210 mM、约 219 mM、约 227 mM、约 235 mM、约 244 mM、约 251 mM、约 260 mM,或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括终点)或其中任何值。在一些实施方案中,螯合剂的浓度为约 0.02 mg/mL、约 0.09 mg/mL、约 0.12 mg/mL、约 0.17 mg/mL、约 0.2 mg/mL,或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括终点)或其中任何值。在一些实施方案中,表面活性剂的浓度为约 0.1 mg/mL、约 0.18 mg/mL、约 0.24 mg/mL、约

0.3 mg/mL、约 0.36 mg/mL、约 0.4 mg/mL，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。在一些实施方案中，当缓冲剂为组氨酸缓冲剂或组氨酸缓冲剂与醋酸缓冲剂的组合物时，液体制剂的 pH 值为约 5.4、约 5.5、约 5.7、约 5.9、约 6.1、约 6.2，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。在一些实施方案中，当缓冲剂为醋酸缓冲剂、组氨酸缓冲剂、或组氨酸缓冲剂与醋酸缓冲剂的组合物时，液体制剂的 pH 值为约 5.7、约 5.74、约 5.81、约 5.86、约 5.9，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，液体制剂包含 7-15 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段。在一些实施方案中，液体制剂中抗 CTLA-4 抗体或其片段的浓度为约 7 mg/mL、约 8 mg/mL、约 9 mg/mL、约 10 mg/mL、约 11 mg/mL、约 12 mg/mL、约 13 mg/mL、约 14 mg/mL、约 15 mg/mL，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，液体制剂中包含 17-23 mM 组氨酸缓冲剂。在一些实施方案中，液体制剂中组氨酸缓冲剂的浓度为约 17 mM、约 18 mM、约 19 mM、约 20 mM、约 21 mM、约 22 mM、约 23 mM，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，液体制剂包含 220-250 mM 蔗糖。在一些实施方案中，液体制剂中蔗糖的浓度为约 220 mM、约 224 mM、约 228 mM、约 232 mM、约 237 mM、约 239 mM、约 241 mM、约 243 mM、约 247 mM、约 250 mM，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，液体制剂包含 0.02-0.05 mg/mL 依地酸二钠。在一些实施方案中，液体制剂中依地酸二钠的浓度为约 0.02 mg/mL、约 0.03 mg/mL、约 0.032 mg/mL、约 0.033 mg/mL、约 0.038 mg/mL、约 0.04 mg/mL、约 0.043 mg/mL、约 0.048 mg/mL、约 0.05 mg/mL，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，液体制剂包含 0.1-0.3 mg/mL 聚山梨酯 80。在一些实施方案中，液体制剂中聚山梨酯 80 的浓度为约 0.1 mg/mL、约 0.15 mg/mL、约 0.19 mg/mL、约 0.21 mg/mL、约 0.26 mg/mL、约 0.3 mg/mL，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，液体制剂的 pH 值为 5.7-5.9。在一些实施方案中，液体制剂的 pH 值为约 5.7、约 5.73、约 5.75、约 5.78、约 5.8、约 5.83、约 5.87、约 5.9，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，液体制剂包含以下组分：

- (1) 10 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段，
- (2) 20 mM 组氨酸缓冲剂，
- (3) 240 mM 蔗糖，
- (4) 0.033 mg/mL 依地酸二钠，
- (5) 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80，
- (6) 水；

液体制剂的 pH 值为 5.8。

在一些实施方案中，所述液体制剂含无菌水或注射用水。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段包含 SEQ ID NO:12 所示的 HCDR1、SEQ ID NO:13 所示的 HCDR2、SEQ ID NO:14 所示的 HCDR3、SEQ ID NO:15 所示的 LCDR1、

SEQ ID NO:16 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO:17 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的重链可变区包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与所述 SEQ ID NO:18 具有至少约 90% 同一性的氨基酸序列，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的轻链可变区包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或与所述 SEQ ID NO:19 具有至少约 90% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的重链可变区包含的序列与所述 SEQ ID NO:18 具有至少约 90%、约 92%、约 94%、约 95%、约 97%、约 99%、约 100% 同一性，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的轻链可变区包含的序列与所述 SEQ ID NO:19 具有至少约 90%、约 92%、约 94%、约 95%、约 97%、约 99%、约 100% 同一性，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的重链可变区包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的轻链可变区包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的重链包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或与所述 SEQ ID NO:1 具有至少约 90% 同一性的氨基酸序列，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或与所述 SEQ ID NO:2 具有至少约 90% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的重链包含的序列与所述 SEQ ID NO:1 具有至少约 90%、约 92%、约 94%、约 95%、约 97%、约 99%、约 100% 同一性，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的轻链包含的序列与所述 SEQ ID NO:2 具有至少约 90%、约 92%、约 94%、约 95%、约 97%、约 99%、约 100% 同一性，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的重链包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段为单克隆抗体。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段为全人源单克隆抗体。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段由 CHO 细胞表达。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段由敲除了 α -(1,6)-岩藻糖转移酶的 CHO 细胞表达。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段由 CHO-BAT-KF fut8(-/-) 细胞（WO2019029713A1 专利已公开上述细胞）表达。抗 CTLA-4 抗体或其片段通过常规方法进行纯化，如低速离心使细胞和培养基分离，高速离心上清液，并依次进行蛋白 A 亲和纯化和离子交换纯化。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中岩藻糖基化水平 $\leq 5\%$ 。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中岩藻糖基化水平为约 0%、约 0.1%、约 0.3%、约 0.4%、约 0.6%、约 1.3%、约 1.9%、约 2.2%、约 2.8%、约 3.3%、约 3.7%、约 4.1%、约 4.5%、约 5%，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中高甘露糖糖型总量 $< 5\%$ 。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中高甘露糖糖型总量为约 0.1%、约 0.3%、约 0.9%、约 1.18%、约 1.7%、约 2.6%、约 3.3%、约 4.1%、约 4.9%、约 4.99%，或这些数值中的任何

两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中唾液酸化糖型总量<3%。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中唾液酸化糖型总量为约 0.1%、约 0.2%、约 0.36%、约 0.8%、约 1.5%、约 2.2%、约 2.7%、约 2.9%、约 2.99%，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在又一方面，本发明还提供了所述液体制剂在制备用于治疗与 CTLA-4 相关疾病的药物中的应用。本发明另一方面提供了一种治疗与 CTLA-4 相关疾病的方法，所述方法包括对患者施用有效剂量的所述液体制剂。

在一些实施方案中，与 CTLA-4 相关疾病包括癌症，所述液体制剂可用于治疗癌症例如排斥可移植的肿瘤。在一些实施方案中，与 CTLA-4 相关疾病为黑色素瘤，非小细胞肺癌，膀胱癌，肝癌，结肠癌，前列腺癌，淋巴瘤或肾癌。

在一些实施方案中，所述液体制剂的给药方式可为注射或输液；给药的部位为肠外、静脉、黏膜、舌下、肌肉、皮内、鼻腔、腹腔、动脉内或皮下。

在一些实施方案中，所述患者是哺乳动物。在一些实施方案中，所述患者是人。

在又一方面，本发明还公开了所述液体制剂的制备方法，包括将各组分在溶剂中混合制成液体制剂。在一些实施方案中，所述方法包括以下步骤：

（1）配置缓冲液，无菌过滤；

（2）通过 UF/DF 超滤，采用步骤（1）制备的缓冲液对抗体溶液进行超滤换液，然后进行浓缩得到抗体浓缩物；

（3）配制含有缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、螯合剂的辅料母液，将无菌过滤后的辅料母液添加到步骤（2）制备的抗体浓缩物中，得到液体制剂。

为了保持抗 CTLA-4 抗体或其片段的稳定性，本发明通过选择适当的缓冲体系、优化稳定剂、螯合剂和添加表面活性剂，开发得到的液体制剂可以显著抑制冷冻/复融循环期间、长期存储和温度变化过程中酸峰、二聚物、多聚物、降解物和不溶性微粒的形成。本发明抗 CTLA-4 抗体或其片段在上述制剂中，经过至少 5 次反复冻融后稳定性良好，在室温可稳定保存至少 6 个月。本发明的液体制剂可用于稳定地保存临床治疗用的抗 CTLA-4 抗体或其片段，对于治疗与 CTLA-4 相关疾病有重大意义。

本发明抗 CTLA-4 抗体（或制剂）可用于肿瘤或癌症的治疗。

附图说明

图 1 显示了抗体 2 与抗体 1 糖型的对比图；其中三角形代表岩藻糖，抗体 2 中基本不含岩藻糖。

图 2 显示了抗体 2、抗体 1 与 CTLA-4 抗原的 ELISA 结合曲线；图中 sample 表示为抗体样品。

图 3 显示了 Yervoy®、抗体 2、抗体 1 与 CTLA-4 抗原在 Biacore 上的结合曲线。

图 4 显示了抗 CTLA-4 抗体的体外生物学活性模型示意图；图中 promotor 表示为启动子，luciferase 表示为荧光素酶基因。

图 5 显示了 pCMV2-OKT3 的质粒图谱。

图 6 显示了抗体 2、抗体 1 均在活性模型上表现出增强 T 细胞功能的活性作用；图中 sample 表示为抗体样品。

图 7 显示了抗体 2、抗体 1 与 FcγRIIIa 158V 的结合解离传感曲线。

图 8 显示了 pCDH-FcγRIIIa 158V FL-Puro 的质粒图谱。

图 9 显示了抗体 2 在 ADCC 报告基因模型上比抗体 1 有更高的体外 ADCC 活性；图中 sample 表示为抗体样品。

图 10A 和图 10B 分别显示了抗体 2、抗体 1 在 CTLA-4 人源化 MC38 荷瘤小鼠上给药后小鼠体重变化趋势和抑制肿瘤效果；图中箭头代表各次给药时间。

图 11A、图 11B、图 11C 和图 11D 分别显示了在 CTLA-4 人源化 MC38 荷瘤小鼠上，Yervoy®、抗体 1、抗体 2 给药后外周血单个核细胞中的 CD4⁺、CD8⁺、Treg 细胞占 CD45 细胞的比例以及 CD8⁺/Treg 的比值。

术语

除非另作说明，否则下列的每一个术语应当具有下文所述的含义。

“抗体” (Ab)，应包括但不限于免疫球蛋白，是主要由浆细胞产生的大的“Y”形蛋白，其被免疫系统用于中和病原体如病原细菌和病毒。抗体通过 Fab 的可变区识别病原体上的一种称为“抗原”的独特分子。抗体的“Y”结构的每个尖端含有对抗原上一个特定表位的互补位，允许这两个结构精确地结合在一起。使用这种结合机制，抗体可以标记微生物或受感染的细胞，使免疫系统对其进行攻击，或者直接中和目标。抗体与免疫系统的其他组分通信的能力是通过其 Fc 区介导的，Fc 区包含参与这些相互作用的保守糖基化位点。抗体的产生是体液免疫系统的主要功能。

“抗体片段”包括(comprise)全长抗体的一部分，通常包括其抗原结合区。抗体片段的实例包括 Fab，Fab'，F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体(diabodies)；线性抗体(linear antibody)；单链抗体分子；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

“同一性”和“同源性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可以通过比较每个序列中可以比对的位置来确定同源性。当被比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时，则分子在该位置是同源的。序列之间的同源程度是由序列共有的匹配或同源位置的数目组成的一个函数。

“至少 80%同一性”为约 80%同一性、约 81%同一性、约 82%同一性、约 83%同一性、约 85%同一性、约 86%同一性、约 87%同一性、约 88%同一性、约 90%同一性、约 91%同一性、约 92%同一性、约 94%同一性、约 95%同一性、约 98%同一性、约 99%同一性，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。

“氨基酸”是指既含氨基又含羧基的有机化合物，比如 α-氨基酸，其可直接或以前体的形式由核酸编码。单个氨基酸由三个核苷酸(所谓的密码子或碱基三联体)组成的核酸编码。每一个氨基酸由至少一个密码子编码。相同氨基酸由不同密码子编码称为“遗传密码的简并性”。氨基酸包括天然氨基酸和非天然氨基酸。天然氨基酸包括丙氨酸(三字母代码：ala，一字母代码：A)、精氨酸(arg, R)、天冬酰胺(asn, N)、天冬氨酸(asp, D)、半胱氨酸(cys, C)、谷氨酰胺(gln, Q)、谷氨酸(glu, E)、甘氨酸(gly, G)、组氨酸(his, H)、异亮氨酸(ile, I)、亮氨酸(leu, L)、赖氨酸(lys, K)、甲硫氨酸(met, M)、苯丙氨酸(phe, F)、脯氨酸(pro, P)、丝氨酸(ser, S)、苏氨酸(thr, T)、色氨酸(trp, W)、酪氨酸(tyr, Y)和缬氨酸(val, V)。

“保守氨基酸取代”是指一个氨基酸残基被另一个含有化学性质（例如电荷或疏水性）相似的侧链（R 基团）的氨基酸残基所取代。一般而言，保守氨基酸取代不大会在实质上改变蛋白质的功能性质。含有化学性质相似侧链的氨基酸类别的实例包括：1) 脂族侧链：甘氨酸、

丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；2) 脂族羟基侧链：丝氨酸和苏氨酸；3) 含酰胺的侧链：天冬酰胺和谷氨酰胺；4) 芳族侧链：苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；5) 碱性侧链：赖氨酸、精氨酸和组氨酸；6) 酸性侧链：天冬氨酸和谷氨酸。

“VL、VH 的保守氨基酸取代”的氨基酸数目可为约 1 个、约 2 个、约 3 个、约 4 个、约 5 个、约 6 个、约 8 个、约 9 个、约 10 个、约 11 个、约 13 个、约 14 个、约 15 个保守氨基酸取代，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。“重链或轻链的保守氨基酸取代”的氨基酸数目可为约 1 个、约 2 个、约 3 个、约 4 个、约 5 个、约 6 个、约 8 个、约 9 个、约 10 个、约 11 个、约 13 个、约 14 个、约 15 个、约 18 个、约 19 个、约 22 个、约 24 个、约 25 个、约 29 个、约 31 个、约 35 个、约 38 个、约 41 个、约 45 个保守氨基酸取代，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。

抗体可以有不同的种类，称为同种型或类别。在胎盘哺乳动物中，有五种抗体同种型，称为 IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM。它们各自以“Ig”前缀命名，代表免疫球蛋白（有时可与“抗体”互换使用），其生物学特性、功能位置和处理不同抗原的能力不同。抗体同种型的不同后缀表示抗体含有的不同类型的重链，每个重链类别按字母顺序命名： α 、 γ 、 δ 、 ϵ 、和 μ ，分别对应产生 IgA, IgG, IgD, IgE 和 IgM。而在哺乳动物中有两种类型的免疫球蛋白轻链，称为 λ (λ) 和 κ (κ)。一般来说，每种抗体含有两条相同的轻链；在哺乳动物中每种抗体仅存在一种类型的轻链 κ 或 λ 。

免疫球蛋白 G (IgG) 是抗体的一种。IgG 是人体中大约 75% 的血清抗体，是血液循环中最常见的抗体类型。人体中有四种 IgG 亚类 (IgG1、2、3 和 4)，按其在血清中的丰度顺序命名 (IgG1 是最丰富的)。

抗体的某些部分具有相同的功能。例如，“Y”的臂包含可以与抗原结合的位点以识别特定的外来物体。该抗体区域称为 Fab 区域。它由抗体的每条重链和轻链的一个恒定区和一个可变区组成。可变结构域也称为 FV 区，并且是结合抗原的最重要区域。具体而言，轻链可变区 (VL) 和重链可变区 (VH) 上的各三个区域负责与抗原结合，这些区域称为互补决定区 (CDR)。“Y”的基部在调节免疫细胞活性中起作用。该区域称为 Fc 区，由两条重链组成，根据抗体的类别，它们贡献两个或三个恒定区域。因此，Fc 区通过结合特定类别的 Fc 受体和其他免疫分子（例如补体蛋白）确保每种抗体对给定抗原产生适当的免疫应答。通过这样，它介导不同的生理效应，包括识别调理颗粒（与 Fc γ R 结合），细胞裂解（与补体结合），以及肥大细胞，嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞（与 Fc ϵ R 结合）的脱粒。

根据 Kabat 和 Chothia 定义的 CDR 包括相互比较时的氨基酸残基的重叠或子集。尽管如此，应用任一定义来指代抗体或其变体的 CDR 都在本发明范围内。包含特定 CDR 的确切残基编号将根据 CDR 的序列和大小而变化。本领域技术人员通常可以根据抗体的可变区氨基酸序列确定出 CDR 包含哪些特定的残基。

Kabat 等人还定义了适用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员可以不依赖于序列本身以外的其他实验数据将该“Kabat 编号”系统应用到任何可变区序列。“Kabat 编号”是指由 Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services 在“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)提出的编号系统。抗体还可以用 EU 或 Chothia 编号系统。

“抗原”在免疫学中，是指与抗体或 T 淋巴细胞抗原受体特异性结合的物质。它们是刺激抗体产生或被抗体识别的物质。有时抗原是自身免疫性疾病中宿主自身的一部分。术语抗原最初描述的是与抗体特异性结合的结构分子。后它被扩展为指可被适应性免疫系统的高度可

变抗原受体（B 细胞受体或 T 细胞受体）识别的任何分子或线性分子片段。

“单克隆抗体”（mAb）是由相同的免疫细胞制备的抗体，所述免疫细胞是单一亲本细胞的所有克隆。单克隆抗体可以具有单价亲和力，因为它们结合相同的表位（抗体识别的抗原部分）。相反，多克隆抗体与多个表位结合，并且通常由几种不同的浆细胞分泌。还可以通过将一种单一单克隆抗体的治疗靶标增加至两个表位来改造成双特异性单克隆抗体。单克隆抗体可以通过杂交瘤、重组、转基因或本领域技术人员已知的其他技术制造。

“人源化”抗体是指来自非人类物种的抗体，其蛋白质序列已被修饰以增加它们与人类天然产生的抗体变体的相似性。“人源化”过程通常应用于为人类施用而开发的单克隆抗体（例如，作为抗癌药物开发的抗体）。当开发特异性抗体的过程涉及在非人免疫系统（例如小鼠中）中产生时，也需要进行人源化。人源化小鼠是携带功能性人类基因、细胞、组织和/或器官的小鼠。人源化小鼠通常用作人类治疗的生物学和医学研究中的小动物模型。免疫缺陷小鼠通常用作人细胞或组织的接受者，因为它们由于缺乏宿主免疫力而可以相对容易地接受异源细胞。这种人源化小鼠模型可用于在健康和病理情况下模拟人体免疫系统，并且可以在与人体生理学相关的体内环境中评估治疗候选物。

“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”（ADCC）是细胞介导的免疫防御机制，其中免疫系统的效应细胞主动裂解靶细胞，其膜表面抗原被特异性抗体结合。它是抗体作为体液免疫反应的一部分，可以通过其作用来限制和控制感染。

ADCC 独立于免疫补体系统，该系统也溶解靶标但不需要任何其他细胞。ADCC 需要一种效应细胞，其已知是通常与 IgG 抗体相互作用的天然杀伤（NK）细胞。然而，巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞也可以介导 ADCC，例如嗜酸性粒细胞通过 IgE 抗体杀死某些被称为蠕虫的寄生虫。另外，ADCC 是适应性免疫应答的一部分，因为它依赖于先前的抗体应答。

“Fc 区”，是抗体的尾区，其与称为 Fc 受体的细胞表面受体和补体系统的一些蛋白质相互作用。该特性允许抗体激活免疫系统。在 IgG，IgA 和 IgD 抗体同种型中，Fc 区由两个相同的蛋白质片段组成，衍生自抗体的两条重链的第二和第三恒定区；IgM 和 IgE Fc 区在每条多肽链中含有三个重链恒定结构域（CH 结构域 2-4）。IgG 的 Fc 区具有高度保守的 N-糖基化位点。Fc 片段的糖基化对于 Fc 受体介导的活性是必需的，且不同的糖型对治疗性抗体的药理学性质有不同的影响。高甘露糖糖型会导致抗体在血液中快速清除，半衰期缩短；G0F 促进补体通路作用，加快清除速率；唾液酸修饰对静脉注射免疫球蛋白的炎症作用影响明显；岩藻糖基化的降低导致 ADCC 活性明显增强。因此，根据治疗性抗体的主要作用机制和药物用途，设计和优化抗体的糖链是有必要的。本专利中，“Fc”或“Fc 段”或“Fc 结构域”的含义等同于“Fc 区”。

“Fc 受体”或“FcR”是在某些细胞表面发现的蛋白质，这些细胞包括 B 淋巴细胞、滤泡树突细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、人血小板和肥大细胞等，它们都有助于保护免疫系统的功能。Fc 受体的名称来源于其对抗体的 Fc 区域的结合特异性。Fc 受体与附着于受感染细胞或入侵病原体的抗体结合。它们的活性通过吞噬细胞和细胞毒性细胞破坏微生物、或通过抗体介导的吞噬作用去感染细胞、或通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性去发挥作用。一些病毒如黄病毒通过称为抗体依赖性感染增强的机制使用 Fc 受体来帮助它们感染细胞。

有几种不同类型的 Fc 受体，其基于它们识别的抗体类型进行分类。用于识别抗体类型的

拉丁字母被转换为相应的希腊字母，该字母位于名称的“Fc”部分之后。例如，结合最常见类别的抗体 IgG 的那些称为 Fc- γ 受体 (Fc γ R)，结合 IgA 的那些称为 Fc- α 受体 (Fc α R)，结合 IgE 的那些称为 Fc- ϵ 受体 (Fc ϵ R)。FcR 的类别还通过表达它们的细胞（巨噬细胞、粒细胞、天然杀伤细胞、T 细胞和 B 细胞）和每种受体的信号传导特性来区分。

所有 Fc γ 受体 (Fc γ R) 都属于免疫球蛋白超家族，是诱导微生物吞噬作用的最重要的 Fc 受体。该家族包括几个成员，Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32)、Fc γ RIIB (CD32)、Fc γ RIIIA (CD16a)、Fc γ RIIIB (CD16b)，由于它们的分子结构不同，它们的抗体亲和力不同。例如，Fc γ RI 比 Fc γ RII 或 Fc γ RIII 更强地结合 IgG。Fc γ RI 还具有由三个免疫球蛋白 (Ig) 样结构域组成的细胞外部分，比 Fc γ RII 或 Fc γ RIII 具有更多的结构域。这种性质允许 Fc γ RI 结合唯一的 IgG 分子（或单体），但所有 Fc γ 受体必须结合免疫复合物中的多个 IgG 分子才能被激活。Fc- γ 受体对 IgG 的亲和力不同，而不同的 IgG 亚类对每种 Fc γ 受体具有独特的亲和力。这些相互作用通过 IgG 的位置 CH2-84.4 处的聚糖（寡糖）进一步调节。例如，通过产生空间位阻，含有 CH2-84.4 聚糖的岩藻糖降低了对 Fc γ RIIIA 的 IgG 亲和力。

“癌症”是指一组涉及异常细胞生长的疾病，有可能侵入或扩散到身体的其他部位。癌症与良性肿瘤形成对比，良性肿瘤不会扩散到身体的其他部位。可能的体征和症状包括肿块，异常出血，长期咳嗽，原因不明的体重减轻和排便改变。

“荷瘤小鼠”分为原发模型和移植瘤模型。研究中最常使用的是移植瘤模型，主要包括原位移植瘤和皮下移植瘤。简而言之，就是将相关的肿瘤细胞通过原位注射或者通过皮下注射入小鼠体内，使其致瘤。

“给药”指的是药物可能通过口服、注射、输液、肠外、静脉、黏膜、舌下、肌肉、皮内、鼻腔、腹腔、动脉内、皮下吸收或通过任意其他与现有技术相结合的给药方式完成。在本发明的一个实施方案中，给药是全身性的。

“有效量”指达到治疗目标所需的量。有效量与抗体对其特异抗原的结合亲和力，疾病、紊乱或病症的严重程度、给药途径、在接受给药对象中给予的抗体从自由体积耗尽的速率等有关。作为非限制性示例，本发明的抗体的治疗有效量的可以为从约 0.01mg/kg 到约 15mg/kg 患者体重，从约 0.1mg/kg 到约 10mg/kg 患者体重，或从约 1mg/kg 到约 5mg/kg 患者体重，比如约 0.3mg/kg，约 1mg/kg，或约 3mg/kg 患者体重。给药频率可以是例如每周一次到每月一次，比如每三周一次。

“患者”通常指需要诊断、预后或治疗的任何患者，特别是哺乳动物患者，包括人类、猫、豚鼠、兔子、大鼠、小鼠、马、牛等。

“糖型”是蛋白质的同种型，其仅在附着的聚糖的数量或类型方面不同。糖蛋白通常由许多不同的糖形式组成，其中附着的糖或寡糖发生改变。这些修饰可能是由于糖基化过程中生物合成的差异，或者是由于糖苷酶或糖基转移酶的作用。可以通过对分离的糖型的详细化学分析或通过凝集素亲和层析和凝集素亲和电泳等来检测糖型。

“糖基化”是碳水化合物（即糖基供体）与另一分子（糖基受体）的羟基或其他官能团连接的反应。在生物学中，糖基化主要特别指将聚糖附着到蛋白质或其他有机分子上的酶促过程。这种酶促过程产生了一种在细胞中发现的基本生物聚合物（以及 DNA，RNA 和蛋白质）。糖基化是共翻译和翻译后修饰的一种形式。聚糖在膜和分泌蛋白中起着多种结构和功能作用。在粗面内质网中合成的大多数蛋白质经历糖基化。它是一种酶导向的位点特异性过程，与糖化的非酶促化学反应相反。糖基化也作为 O-GlcNAc 修饰存在于细胞质和细胞核中。常见的

糖基化类型包括 O-糖基化和 N-糖基化。

如本文所用，术语“有需要”是指已将患者鉴定为需要特定方法或治疗。在一些实施例中，可以通过任何诊断方式进行识别。在本文描述的任何方法和治疗中，患者可能需要。

“约”指相关技术领域技术人员容易知道的相应数值的常规误差范围。在一些实施方式中，本文中提到的“约”指所描述的数值及其 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 的范围。

本发明中缓冲剂的量，是指组成缓冲剂的缓冲体系中缓冲对的总量。在一些实施方式中，采用摩尔浓度作为缓冲剂的量的单位，其数值指缓冲剂的缓冲体系中缓冲对的摩尔浓度。如，由组氨酸和组氨酸盐酸盐组成的组氨酸缓冲剂作为缓冲剂时，给定浓度的组氨酸缓冲剂（如 20 mM）是组氨酸和组氨酸盐酸盐的组合浓度（如组氨酸为 8 mM，组氨酸盐酸盐为 12 mM；或者组氨酸为 6 mM，组氨酸盐酸盐为 14 mM；或者组氨酸为 8.46 mM，组氨酸盐酸盐为 11.54 mM 等）。

本发明所述的制剂可以用所述辅料或其水合物或盐类配制。比如组氨酸盐酸盐，又称盐酸组氨酸，可以是无水组氨酸盐酸盐，也可以是组氨酸盐酸盐水合物，如组氨酸盐酸盐一水合物；如，“12 mM 组氨酸盐酸盐”可以为 1 L 液体制剂中含有 12 mmol 组氨酸盐酸盐或 12 mmol 组氨酸盐酸盐一水合物；如，制剂中加入“2.52 g 组氨酸盐酸盐一水合物”等同于制剂中加入 2.3 g 组氨酸盐酸盐。又比如，制剂中既可以加入海藻糖，又可以加入对应量的海藻糖二水合物；如，“225 mM 海藻糖”可以为 1 L 液体制剂中含有 225 mmol 海藻糖或 225 mmol 海藻糖二水合物；如，制剂中加入“85 g 海藻糖二水合物”等同于制剂中加入 76.9 g 海藻糖。又比如，制剂中既可以加入依地酸（EDTA）二钠，又可以加入对应量的依地酸二钠二水合物或依地酸；如，“0.033 mg/mL 依地酸二钠”可以为 1 L 液体制剂中加入 0.037 g 依地酸二钠二水合物或 0.033 g 依地酸二钠或 0.029 g 依地酸。

患者疾病“治疗”指的是（1）阻止疾病在有倾向性或还没表现疾病症状的患者中出现；（2）抑制疾病或症状或阻止其发展；或（3）减轻或消除疾病或症状或致其退化。

“稳定性”是指包含抗体的液体制剂中，抗体或其片段在给定的生产、制备、运输和/或贮存条件下不发生、或仅极少地发生聚集、降解或片段化。“稳定”制剂在给定的生产、制备、运输和/或贮存条件下保持生物学活性。可通过例如 SEC-HPLC、IEC-HPLC、CE-SDS（NR）、灯检及浑浊度、不溶性颗粒、DLS 检测粒子粒径等技术测量的所述制剂的聚集、降解或片段化程度等，从而评估所述抗体的稳定性。在一些实施方案中，“稳定”制剂指制剂在室温可稳定保存至少 3 个月、至少 6 个月或至少 12 个月。

具体实施方式

以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案，具体实施例不代表对本发明保护范围的限制。其他人根据本发明理念所做出的一些非本质的修改和调整仍属于本发明的保护范围。

一方面，本发明提供了针对 CTLA-4 的单克隆抗体，所述单克隆抗体包含

（1）重链 CDR1（HCDR1），其包含 SEQ ID NO:12 所示的序列，与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%（或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值）序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选约 1 个、约 2 个或约 3 个）保守氨基酸突变（优选置换、插入或缺失）的氨基酸序列，或由其组成，

重链 CDR2(HCDR2),其包含 SEQ ID NO:13 所示的序列,与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% (或任何两个数值之间的范围(包括端点)或其中任何值)序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选约 1 个、约 2 个或约 3 个)保守氨基酸突变(优选置换、插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,

重链 CDR3(HCDR3),其包含 SEQ ID NO:14 所示的序列,与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% (或任何两个数值之间的范围(包括端点)或其中任何值)序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选约 1 个、约 2 个或约 3 个)保守氨基酸突变(优选置换、插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,

轻链 CDR1(LCDR1),其包含 SEQ ID NO:15 所示的序列,与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% (或任何两个数值之间的范围(包括端点)或其中任何值)序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选 1 个、2 个或 3 个)保守氨基酸突变(优选置换、插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,

轻链 CDR2(LCDR2),其包含 SEQ ID NO:16 所示的序列,与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% (或任何两个数值之间的范围(包括端点)或其中任何值)序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选约 1 个、约 2 个或约 3 个)保守氨基酸突变(优选置换、插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,和

轻链 CDR3(LCDR3),其包含 SEQ ID NO:17 所示的序列,与所述序列具有至少约 80%、约 90%、优选至少约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98% 或约 99% (或任何两个数值之间的范围(包括端点)或其中任何值)序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选约 1 个、约 2 个或约 3 个)保守氨基酸突变(优选置换、插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;

或

(2) 重链可变区(VH),其包含 SEQ ID NO:18 所示的序列,与所述序列具有至少约 80%,优选至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99% (或任何两个数值之间的范围(包括端点)或其中任何值)序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选约 1 个、约 2 个或约 3 个)保守氨基酸突变(优选置换、插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成,和

轻链可变区(VL),其包含 SEQ ID NO:19 所示的序列,与所述序列具有至少约 80%,优选至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99% (或任何两个数值之间的范围(包括端点)或其中任何值)序列同一性的序列,或与所述序列相比具有一个或多个(优选约 1 个、约 2 个或约 3 个)保守氨基酸突变(优选置换、插入或缺失)的氨基酸序列,或由其组成;

所述单克隆抗体具有降低的岩藻糖基化水平。

在具体的实施方案中,所述单克隆抗体包含重链和轻链,所述重链包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少约 80%,优选至少约 81%、约 82%、约 83%、约 84%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约

93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%（或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值）同源性的序列，或由其组成；

所述轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有至少约 80%，优选至少约 81%、约 82%、约 83%、约 84%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%（或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值）同源性的序列，或由其组成。

在具体的实施方案中，所述重链由 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列或与 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列具有至少约 80%，优选至少约 81%、约 82%、约 83%、约 84%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%（或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值）同源性的核苷酸序列编码，所述轻链由 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列或与 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列具有至少约 80%，优选至少约 81%、约 82%、约 83%、约 84%、约 85%、约 86%、约 87%、约 88%、约 89%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%（或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值）同源性的核苷酸序列编码。

在具体的实施方案中，所述岩藻糖基化水平为 0%-20%，比如约 0%，约 1%，约 2%，约 3%，约 4%，约 5%，约 6%，约 7%，约 8%，约 9%，约 10%，约 11%，约 12%，约 13%，约 14%，约 15%，约 16%，约 17%，约 18%，约 19% 或 约 20%，或在其中任意两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的高甘露糖糖型总量<5%和/或唾液酸化糖型总量<3%。在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的高甘露糖糖型总量为约 0.1%、约 0.3%、约 0.9%、约 1.18%、约 1.7%、约 2.6%、约 3.3%、约 4.1%、约 4.9%、约 4.99%，或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述抗单克隆抗体 Fc 区的唾液酸化糖型总量为约 0.1%、约 0.2%、约 0.36%、约 0.8%、约 1.5%、约 2.2%、约 2.7%、约 2.9%、2.99%，或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体为 IgG1，所述单克隆抗体 CH2 区的高甘露糖糖型总量<5%和/或唾液酸化糖型总量<3%。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的高甘露糖糖型总量<3%和/或唾液酸化糖型总量<2%。在一些实施方案中，所述单克隆抗体为 IgG1，所述单克隆抗体 CH2 区的高甘露糖糖型总量<3%和/或唾液酸化糖型总量<2%。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的高甘露糖糖型总量<2%和/或唾液酸化糖型总量<1%。在一些实施方案中，所述单克隆抗体为 IgG1，所述单克隆抗体 CH2 区的高甘露糖糖型总量<2%和/或唾液酸化糖型总量<1%。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的岩藻糖基化水平为 0%-10%。在一些实施方案中，所述单克隆抗体为 IgG1，所述单克隆抗体 CH2 区的岩藻糖基化水平为 0%-10%。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体 Fc 区的岩藻糖基化水平为 0%-5%。在一些实施方案中，所述抗单克隆抗体 Fc 区的岩藻糖基化水平为约 0、约 0.1%、约 0.3%、约 0.4%、约 0.6%、约 1.3%、约 1.9%、约 2.2%、约 2.8%、约 3.3%、约 3.7%、约 4.1%、约 4.5%、约 5%，或任何两个数值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述单克隆抗体为

IgG1, 所述单克隆抗体 CH2 区的岩藻糖基化水平为 0%-5%。

在一些实施方案中, 所述单克隆抗体由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达, 如 PCT/CN2018/100008 公开的 CHO-BAT-KF 细胞系。

另一方面, 本发明提供了药物组合物或融合蛋白, 其包含本发明所述的单克隆抗体。

在一些实施方案中, 所述药物组合物为适于通过口服、注射、输液、肠外、静脉、黏膜、舌下、肌肉、皮内、鼻腔、腹腔、动脉内、皮下吸收给药的形式。在一些实施方案中, 所述药物组合物为适于全身给药的形式。

另一方面, 本发明提供了抗体偶联物, 其包括本发明所述的单克隆抗体, 以及与所述单克隆抗体偶联的偶联部分, 所述偶联部分为纯化标签 (如 His 标签)、细胞毒性剂, 延长所述单克隆抗体半衰期的结构部分, 或可检测的标记, 优选地, 所述偶联部分为放射性同位素、化学发光剂、酶、血清白蛋白 (例如人或鼠血清白蛋白)、或聚乙二醇。

在一些实施方案中, 本发明抗 CTLA-4 抗体为单价抗体或多价抗体。在另一方面, 本发明提供了多特异性抗体 (例如双特异性抗体), 其包含本发明所述的单克隆抗体, 以及针对其他抗原和/或其他抗原表位的抗体或抗原结合片段。

在又一个方面, 本发明提供了试剂盒, 其包括本发明所述的单克隆抗体, 抗体偶联物、多特异性抗体或融合蛋白。

在具体的实施方案中, 所述试剂盒还包括第二抗体, 细胞毒性剂, 化疗剂, 放疗剂, 所述第二抗体特异性识别所述单克隆抗体; 任选地, 所述第二抗体还包括可检测的标记, 例如荧光素、金属离子、生物素、放射性同位素、化学发光物质、酶或聚乙二醇。

在又一个方面, 本发明提供了所述的单克隆抗体, 融合蛋白, 抗体偶联物或多特异性抗体, 其用于治疗癌症或用于排斥可移植的肿瘤, 例如黑色素瘤, 非小细胞肺癌, 膀胱癌, 肝癌, 结肠癌, 前列腺癌, 淋巴瘤或肾癌。

在又一个方面, 本发明提供了治疗癌症或用于排斥可移植的肿瘤, 例如黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、淋巴瘤或肾癌的方法, 包括给患者给予有效量的所述的单克隆抗体、融合蛋白、抗体偶联物或多特异性抗体。

在又一个方面, 本发明提供了增强 T 细胞的增殖反应的方法, 其包含利用本发明所述的单克隆抗体、融合蛋白、抗体偶联物或多特异性抗体阻断 CTLA-4 与 B7 的结合。

在又一个方面, 本发明提供了降低患者体内肿瘤浸润表达 CTLA-4 的 Treg 细胞的方法, 包括给患者给予治疗有效量的所述的单克隆抗体、融合蛋白、抗体偶联物或多特异性抗体。

在又一个方面, 本发明提供了所述的单克隆抗体、融合蛋白、抗体偶联物或多特异性抗体在制备用于治疗癌症或用于排斥可移植的肿瘤, 例如黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、淋巴瘤或肾癌的药物中的应用。

在又一个方面, 本发明公开了抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段用于治疗肿瘤或癌症的方法或用途。在一些实施方案中, 抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段剂用于治疗肿瘤或癌症。

在一些实施方案中, 抗 CTLA-4 抗体 (例如抗体 2) 或抗原结合片段由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达, 如 PCT/CN2018/100008 公开的 CHO-BAT-KF 细胞系。在一些实施方案中, 抗体 2 由 CHO-BAT-KF 细胞系表达。

在一些实施方案中, 所述方法或用途包括: 向有需要的患者施用有效量的抗 CTLA-4 抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中, 所述抗 CTLA-4 抗体为抗体 1 或抗体 2。在一些实施方案中, 抗 CTLA-4 抗体 (例如抗体 2) 由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达。

在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效剂量为每剂约 7 mg 至 180 mg。

在一些实施方案中，患者患有肿瘤或癌症。在一些实施方案中，肿瘤和癌症包括但不限于血液癌症、实体瘤。在一些实施方案中，血液癌症包括但不限于白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。在一些实施方案中，白血病包括急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)和骨髓性增生疾病/肿瘤(MPDS)。在一些实施方案中，淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤、无痛性和侵袭性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤(小细胞和大细胞)。在一些实施方案中，骨髓瘤包括多发性骨髓瘤(MM)、巨细胞骨髓瘤、重链骨髓瘤和轻链或本斯-琼斯骨髓瘤。在一些实施方案中，实体瘤包括乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、黑素瘤、结直肠癌、肺癌、头颈癌、膀胱癌、食道癌、肝癌和肾癌。在一些实施方案中，肿瘤和癌症为尚无有效治疗手段的经病理学确诊的局部晚期或转移性恶性实体肿瘤。

在一些实施方案中，本发明公开了一种用于治疗有需要患者的肿瘤或癌症的方法，其包括施用有效量的抗 CTLA-4 抗体，其中抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 7 mg 至 180 mg 每个治疗周期。在一些实施方案中，一个治疗周期为 1 周、2 周、3 周、4 周、1 个月、5 周、6 周、7 周，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体为抗体 1、抗体 2。在一些实施方案中，抗体 2 由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达。

在一些实施方案中，可以将抗 CTLA-4 抗体配制成药物组合物，并以适合于所选给药途径的多种形式向患者给药，给药途径例如肠胃外、静脉内 (iv)、肌肉内、局部或皮下。在一些实施方案中，可以将抗 CTLA-4 抗体静脉输注。抗 CTLA-4 抗体的给药量将取决于药物的性质、细胞表面触发药物的内在化、运输和释放的程度，以及所治疗的疾病和患者的状况（如年龄、性别、体重等）。

在一些实施方案中，每次施用的抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）约 0.1 mg/kg 至 16 mg/kg 或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，每次施用的抗 CTLA-4 抗体为约 0.1 mg/kg、约 0.2 mg/kg、约 0.3 mg/kg、约 0.4 mg/kg、约 0.5 mg/kg、约 0.9 mg/kg、约 1 mg/kg、约 1.3 mg/kg、约 1.5 mg/kg、约 1.8 mg/kg、约 2 mg/kg、约 2.5 mg/kg、约 3 mg/kg、约 4 mg/kg、约 5 mg/kg、约 6 mg/kg、约 7 mg/kg、约 8 mg/kg、约 9 mg/kg、约 10 mg/kg、约 11 mg/kg、约 12 mg/kg、约 13 mg/kg、约 14 mg/kg、约 15 mg/kg、约 16 mg/kg，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，每次施用的抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）约 0.1 mg/kg 至 2.5 mg/kg 或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，每次施用的抗 CTLA-4 抗体为约 0.1 mg/kg、约 0.2 mg/kg、约 0.3 mg/kg、约 0.4 mg/kg、约 0.5 mg/kg、约 0.6 mg/kg、约 0.7 mg/kg、约 0.8 mg/kg、约 0.9mg/kg、约 1 mg/kg、约 1.1 mg/kg、约 1.2 mg/kg、约 1.3 mg/kg、约 1.4 mg/kg、约 1.5 mg/kg、约 1.6 mg/kg、约 1.7 mg/kg、约 1.8 mg/kg、约 1.9 mg/kg、约 2 mg/kg、约 2.1 mg/kg、约 2.2 mg/kg、约 2.3 mg/kg、约 2.4mg/kg、约 2.5 mg/kg，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次。在一些实施方案中，治疗周期为 1 个周期、2 个周期、3 个周期、4 个周期、5 个周期、6 个周期、7 个周期、8 个周期、9 个周期、10 个周期，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，约 3 周给药 1 次，治疗周期为 1 个周期、2 个周期、3 个周期、4 个周期、5 个周期、6 个周期、7 个周期、8 个

周期、9个周期或10个周期。在一些实施方案中，约4周给药1次，治疗周期为1个周期、2个周期、3个周期、4个周期、5个周期、6个周期、7个周期、8个周期、9个周期或10个周期。在一些实施方案中，约5周给药1次，治疗周期为1个周期、2个周期、3个周期、4个周期、5个周期、6个周期、7个周期、8个周期、9个周期或10个周期。

在一些实施方案中，本发明公开了一种用于治疗肿瘤或癌症的方法，所述方法包括：每3周向有需要的患者给予约0.1 mg/kg、约0.2 mg/kg、约0.3 mg/kg、约0.4 mg/kg、约0.5 mg/kg、约0.6 mg/kg、约0.7 mg/kg、约0.8 mg/kg、约0.9 mg/kg、约1 mg/kg、约1.1 mg/kg、约1.2 mg/kg、约1.3 mg/kg、约1.4 mg/kg、约1.5 mg/kg、约1.6 mg/kg、约1.7 mg/kg、约1.8 mg/kg、约1.9 mg/kg、约2 mg/kg、约2.1 mg/kg、约2.2 mg/kg、约2.3 mg/kg、约2.4 mg/kg、约2.5 mg/kg的抗CTLA-4抗体，或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂。

在一些实施方案中，本发明公开了一种用于治疗肿瘤或癌症的方法，所述方法包括：每3周向有需要的患者给予约0.1 mg/kg、约0.2 mg/kg、约0.3 mg/kg、约0.4 mg/kg、约0.5 mg/kg、约0.6 mg/kg、约0.7 mg/kg、约0.8 mg/kg、约0.9 mg/kg、约1 mg/kg、约1.1 mg/kg、约1.2 mg/kg、约1.3 mg/kg、约1.4 mg/kg、约1.5 mg/kg、约1.6 mg/kg、约1.7 mg/kg、约1.8 mg/kg、约1.9 mg/kg、约2 mg/kg、约2.1 mg/kg、约2.2 mg/kg、约2.3 mg/kg、约2.4 mg/kg、约2.5 mg/kg的抗体1或2，或含此剂量抗体1或2的制剂；治疗周期为4个周期。

在一些实施方案中，本发明公开了一种治疗肿瘤或癌症的方法，其包括向有需要的患者施用有效量的抗CTLA-4抗体（或制剂）；其中，抗CTLA-4抗体的有效量为单次给药约7 mg至180 mg（或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂）。剂量时间表和给药方式取决于某些患者群中的抗CTLA-4抗体（或制剂）的获益风险评估和一般临床实践指南。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内抗CTLA-4抗体施用的有效量为约7mg至180 mg（或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂）。在一些实施方案中，一个治疗周期为1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，治疗周期为1个周期、2个周期、3个周期、4个周期、5个周期或6个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗CTLA-4抗体（如抗体1或2）的有效量为约6 mg、约10 mg、约12 mg、约18 mg、约24 mg、约30 mg、约40 mg、约50 mg、约60 mg、约100 mg、约120 mg、约180 mg、约200 mg、约250 mg、约290 mg、约300 mg、约330 mg、约380 mg、约400 mg、约434 mg、约480 mg、约500 mg、约567 mg、约580 mg、约600 mg、约700 mg、约800 mg、约900 mg、约960 mg，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗CTLA-4抗体（如抗体1或2）的有效量为约7 mg、约8 mg、约10 mg、约12 mg、约18 mg、约24 mg、约30 mg、约40 mg、约50 mg、约60 mg、约68 mg、约70 mg、约80 mg、约90 mg、约100 mg、约110 mg、约120 mg、约130 mg、约140 mg、约150 mg、约160 mg、约170 mg、约180 mg，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂。在一些实施方案中，一个治疗周期为1周至7周给药1次。在一些实施方案中，治疗周期为1个周期、2个周期、3个周期、4个周期、5个周期、6个周期，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗CTLA-4抗体（如抗体1或2）的有效

量为约 7 mg 至约 120 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周、或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 7 mg、约 10 mg、约 12 mg、约 18 mg、约 20 mg、约 24 mg、约 28 mg、约 30 mg、约 40 mg、约 50 mg、约 60 mg、约 70 mg、约 80 mg、约 90 mg、约 100 mg、约 120 mg，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 120 mg 至 180 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周、或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 120 mg、约 130 mg、约 140 mg、约 150 mg、约 160 mg、约 170 mg、约 180 mg，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 6.9 mg 至 7.2 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 7 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 10 mg 至 13 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 12 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 20 mg 至 24 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 22 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 28 mg 至 33 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 30 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 59 mg 至 64 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 60 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期

为2个周期、3个周期、4个周期或5个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 95 mg 至 113 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 100 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 110 mg 至 123 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 120 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 127 mg 至 133 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 130 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 132 mg 至 144 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 140 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 140 mg 至 155 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4（如抗体 1 或 2）抗体的有效量为约 150 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 177 mg 至 180mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂。在一些实施方案中，患者每个治疗周期内施用抗 CTLA-4 抗体（如抗体 1 或 2）的有效量为约 180 mg，或含此剂量抗 CTLA-4 抗体的制剂；其中，一个治疗周期为约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周给药 1 次，治疗周期为 2 个周期、3 个周期、4 个周期或 5 个周期。

在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 7 mg 至 120 mg 每 3 周一次，4 个治疗周期。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 7 mg、约 10 mg、约 12 mg、约 20 mg、约 26 mg、约 30 mg、约 35 mg、约 40 mg、约 44 mg、约 50 mg、约 58 mg、约 60 mg、约 69 mg、约 70 mg、约 77 mg、约 85 mg、约 99 mg、约 110 mg、约 114 mg 或约 120 mg 每 3 周一次，4 个治疗周期。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 7mg、约 12 mg、约 30 mg、约 60 mg 或约 120 mg 每 3 周一次，4 个治疗周期。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 120 mg 至 180 mg 每 3 周一次。在一些实施方案中，抗 CTLA-4 抗体施用的有效量为约 120 mg、约 130 mg、约 134 mg、约 140 mg、约 146 mg、约 150 mg、约 154 mg、约 160 mg、约 164 mg、约 170 mg、约 173 mg、约 1760mg、约 180 mg

每3周一次，4个治疗周期。在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体施用的有效量为约130 mg、140 mg、约160 mg或约180 mg每3周一次，4个治疗周期。

在一些实施方案中，患者每个治疗周期内给药一次抗CTLA-4抗体（或制剂）。在一些实施方案中，每个治疗周期内多次给药抗CTLA-4抗体（或制剂），例如2次、3次、4次或5次。在一些实施方案中，患者每个治疗周期只能给药1次或4次。

在一些实施方案中，患者接受一个治疗周期治疗。在一些实施方案中，患者接受多个（例如2个、3个、4个、5个或6个）治疗周期治疗。在一些实施方案中，患者接受4个治疗周期治疗。在一些实施方案中，患者接受治疗直至病症得到缓解而不再需要治疗。

在一些实施方案中，本发明公开了一种用于治疗肿瘤或癌症的方法，所述方法包括：每3周向有需要的患者给予约7 mg至30 mg、约30 mg至60 mg、约60 mg至120 mg、约120 mg至180 mg，比如约7 mg、约10 mg、约12 mg、约18 mg、约30 mg、60 mg、约80 mg、约100 mg、约120 mg、约150 mg、约160 mg、约180 mg的抗CTLA-4抗体，或含此剂量抗CTLA-4抗体的制剂。在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体为抗体1。在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体为抗体2。

在一些实施方案中，单剂量给药后，患者的症状得到缓解。在一些实施方案中，单剂量给药后，患者后的症状未得到预期缓解，再对患者给药约7 mg至180 mg抗CTLA-4抗体，直至患者的症状得到缓解。

在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体（或制剂）是通过皮下（s.c.）注射、腹膜内（i.p.）注射、肠胃外注射、动脉内注射或静脉内（i.v.）注射等方式进行给药。在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体（或制剂）是输液方式进行给药。在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体（或制剂）是推注方式进行给药。

在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体（或制剂）是通过静脉内（i.v.）输液方式（即静脉输注）进行给药。在一些实施方案中，静脉内输液持续时间为约50分钟、约55分钟、约60分钟、约65分钟、约70分钟、约75分钟、约81分钟、约87分钟、约90分钟、约95分钟，或这些数值中任何两个值之间的范围（包括端点）或其中任何值。在一些实施方案中，静脉输液持续时间 ≥ 60 分钟。

在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体（或制剂）与其他治疗方法联合用于治疗肿瘤或癌症，例如化疗、放疗、免疫治疗、激素治疗、靶向治疗、生物治疗和手术治疗等。在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体（或制剂）与其他肿瘤或癌症治疗剂联合治疗肿瘤或癌症，如激素、治疗肿瘤或癌症的抗体等。

在又一方面，本发明公开了抗CTLA-4抗体在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的应用。在一些实施方案中，用于治疗肿瘤或癌症的药物包括抗CTLA-4抗体。在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体为抗体1或2。在一些实施方案中，抗体2由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达。

在又一方面，本发明还公开了一种试剂盒，试剂盒包含抗CTLA-4抗体（或制剂）和用于指导有需要患者给药抗CTLA-4抗体（或制剂）的说明书。在一些实施方案中，抗CTLA-4抗体为抗体1或2。在一些实施方案中，抗体2由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞系表达。

在又一方面，本发明提供一种含抗CTLA-4抗体或其片段的液体制剂。在一些实施方案中，液体制剂包含以下组分：4-80 mg/mL抗CTLA-4抗体或其片段，缓冲剂，稳定剂，螯合

剂，表面活性剂，水；液体制剂的 pH 值为 5-7。

在一些实施方案中，缓冲剂不包括 Tris 缓冲剂。在一些实施方案中，所述缓冲剂选自组氨酸缓冲剂、醋酸缓冲剂或其组合。在一些实施方案中，所述稳定剂选自海藻糖、蔗糖或甘露醇。在一些实施方案中，所述螯合剂包含依地酸二钠。在一些实施方案中，所述螯合剂为依地酸二钠。在一些实施方案中，所述表面活性剂选自聚山梨酯 20、聚山梨酯 80 或其组合物。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段包含 SEQ ID NO:12 所示的 HCDR1、SEQ ID NO:13 所示的 HCDR2、SEQ ID NO:14 所示的 HCDR3、SEQ ID NO:15 所示的 LCDR1、SEQ ID NO:16 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO:17 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的重链可变区包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与所述 SEQ ID NO:18 具有至少约 90% 同一性的氨基酸序列，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的轻链可变区包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或与所述 SEQ ID NO:19 具有至少约 90% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的重链包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段为全人源单克隆抗体。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段由 CHO 细胞表达。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段由敲除了 α -(1,6)-岩藻糖转移酶基因的中国仓鼠卵巢细胞(CHO fut8(-/-)，如 CHO-BAT-KF)表达。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中岩藻糖基化水平 $\leq 5\%$ ，高甘露糖糖型总量 $< 5\%$ ，唾液酸化糖型总量 $< 3\%$ 。

在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中岩藻糖基化水平为约 0、约 0.1%、约 0.3%、约 0.4%、约 0.6%、约 1.3%、约 1.9%、约 2.2%、约 2.8%、约 3.3%、约 3.7%、约 4.1%、约 4.5%、约 5%，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中高甘露糖糖型总量为约 0.1%、约 0.3%、约 0.9%、约 1.18%、约 1.7%、约 2.6%、约 3.3%、约 4.1%、约 4.9%、约 4.99%，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。在一些实施方案中，所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中唾液酸化糖型总量为约 0.1%、约 0.2%、约 0.36%、约 0.8%、约 1.5%、约 2.2%、约 2.7%、约 2.9%、约 2.99%，或这些数值中的任何两个值之间的范围（包括终点）或其中任何值。

在一些实施方案中，所述液体制剂包含以下组分：5-40 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段，10-30 mM 缓冲剂，200-260 mM 稳定剂，0.02-0.2 mg/mL 螯合剂，0.1-0.4 mg/mL 表面活性剂，水；液体制剂的 pH 值为 5.4-6.2。

在一些实施方案中，所述液体制剂包含以下组分：5-40 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段，10-30 mM 醋酸缓冲剂，200-260 mM 海藻糖，0.02-0.2 mg/mL 依地酸二钠，0.1-0.4 mg/mL 聚山梨酯 80，水；液体制剂的 pH 值为 5.7-5.9。在一些实施方案中，所述稳定剂为蔗糖或甘露醇。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 20。

在一些实施方案中，所述液体制剂包含以下组分：5-40 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段，10-30 mM 组氨酸缓冲剂，200-260 mM 蔗糖，0.02-0.2 mg/mL 依地酸二钠，0.1-0.4 mg/mL 聚山梨酯 80，水；液体制剂的 pH 值为 5.4-6.2。在一些实施方案中，所述稳定剂为海藻糖或甘露醇。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 20。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:5-40 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,10-30 mM 组氨酸缓冲剂和醋酸缓冲剂的组合物,200-260 mM 蔗糖,0.02-0.2 mg/mL 依地酸二钠,0.1-0.4 mg/mL 聚山梨酯 20,水;液体制剂的 pH 值为 5.7-5.9。在一些实施方案中,所述稳定剂为海藻糖或甘露醇。在一些实施方案中,所述表面活性剂为聚山梨酯 80。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:约 5 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 10 mM 组氨酸缓冲剂,约 200 mM 海藻糖,约 0.02 mg/mL 依地酸二钠,约 0.1 mg/mL 聚山梨酯 20,水;液体制剂的 pH 值为约 5.4。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:约 9 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 14 mM 醋酸缓冲剂,约 219 mM 海藻糖,约 0.09 mg/mL 依地酸二钠,约 0.24 mg/mL 聚山梨酯 20,水;液体制剂的 pH 值为约 5.7。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:约 24 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 17 mM 醋酸缓冲剂,约 227 mM 蔗糖,约 0.12 mg/mL 依地酸二钠,约 0.3 mg/mL 聚山梨酯 20,水;液体制剂的 pH 值为约 5.81。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:约 29 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 21 mM 组氨酸缓冲剂,约 235 mM 蔗糖,约 0.17 mg/mL 依地酸二钠,约 0.3 mg/mL 聚山梨酯 80,水;液体制剂的 pH 值为约 5.7。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:约 31 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 25 mM 组氨酸缓冲剂,约 244 mM 蔗糖,约 0.11 mg/mL 依地酸二钠,约 0.3 mg/mL 聚山梨酯 80 与聚山梨酯 20 的组合物,水;液体制剂的 pH 值为约 5.9。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:约 36 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 29 mM 组氨酸缓冲剂,约 251 mM 甘露醇,约 0.16 mg/mL 依地酸二钠,约 0.36 mg/mL 聚山梨酯 80,水;液体制剂的 pH 值为约 6.1。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:约 40 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 30 mM 组氨酸缓冲剂与醋酸缓冲剂的组合物,约 260 mM 甘露醇,约 0.2 mg/mL 依地酸二钠,约 0.4 mg/mL 聚山梨酯 80,水;液体制剂的 pH 值为约 5.9。

在一些实施方案中,所述液体制剂包含以下组分:约 40 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 30 mM 醋酸缓冲剂,约 248 mM 甘露醇,约 0.2 mg/mL 依地酸二钠,约 0.3 mg/mL 聚山梨酯 80,水;液体制剂的 pH 值为约 5.9。

在一些实施方案中,液体制剂包含以下组分:7-15 mg/mL 的抗 CTLA-4 抗体或其片段,17-23 mM 的组氨酸缓冲剂,220-250 mM 蔗糖,0.02-0.05 mg/mL 的依地酸二钠,0.1-0.3 mg/mL 的聚山梨酯 80,水;液体制剂的 pH 值为 5.7-5.9。

在一些实施方案中,液体制剂包含以下组分:约 7 mg/mL 的抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 17 mM 的组氨酸缓冲剂,约 220 mM 蔗糖,约 0.02 mg/mL 依地酸二钠,约 0.1 mg/mL 聚山梨酯 80,水;液体制剂的 pH 值为约 5.7。

在一些实施方案中,液体制剂包含以下组分:约 9 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 20 mM 组氨酸缓冲剂,约 228 mM 蔗糖,约 0.032 mg/mL 依地酸二钠,约 0.19 mg/mL 聚山梨酯 80,水;液体制剂的 pH 值为约 5.75。

在一些实施方案中,液体制剂包含以下组分:约 10 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段,约 20 mM 组氨酸缓冲剂,约 240 mM 蔗糖,约 0.033 mg/mL 依地酸二钠,约 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80,水;液体制剂的 pH 值为约 5.8。

在一些实施方案中，液体制剂包含以下组分：约 14 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段，约 22 mM 的组氨酸缓冲剂，约 243 mM 蔗糖，约 0.043 mg/mL 依地酸二钠，约 0.26 mg/mL 聚山梨酯 80，水；液体制剂的 pH 值为约 5.87。

在一些实施方案中，液体制剂包含以下组分：约 15 mg/mL 的抗 CTLA-4 抗体或其片段，约 23 mM 组氨酸缓冲剂，约 250 mM 蔗糖，约 0.05 mg/mL 的依地酸二钠，约 0.3 mg/mL 聚山梨酯 80，水；液体制剂的 pH 值为约 5.9。

在一些实施方案中，所述液体制剂含的水为无菌水或注射用水。

本发明另一面提供了所述液体制剂在制备用于治疗与 CTLA-4 相关疾病的药物中的应用。本发明另一方面提供了一种治疗与 CTLA-4 相关疾病的方法，所述方法包括对患者施用有效剂量的所述液体制剂。

在一些实施方案中，与 CTLA-4 相关疾病包括癌症或用于排斥可移植的肿瘤。在一些实施方案中，与 CTLA-4 相关疾病为黑色素瘤，非小细胞肺癌，膀胱癌，肝癌，结肠癌，前列腺癌，淋巴瘤或肾癌。

在一些实施方案中，所述液体制剂的给药方式可以为注射、输液；给药的部位为肠外、静脉、黏膜、舌下、肌肉、皮内、鼻腔、腹腔、动脉内或皮下。

在一些实施方案中，采用等渗溶液（如 0.9% 注射用 NaCl 溶液）对所述含抗 CTLA-4 抗体的溶液进行稀释，经稀释后随即以静脉输注的方式给药。在一些实施方案中，采用等渗溶液（如 0.9% 注射用 NaCl 溶液）对所述含 10 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体的溶液进行稀释，经稀释后随即以静脉输注的方式给药。在一些实施方案中，稀释后抗 CTLA-4 抗体的浓度为约 0.05 mg/mL-约 5 mg/mL 或约 0.5 mg/mL-约 1 mg/mL。在一些实施方案中，稀释后抗 CTLA-4 抗体的浓度为约 0.05 mg/mL、约 0.07 mg/mL、约 0.09 mg/mL、约 0.1 mg/mL、约 0.2 mg/mL、约 0.3 mg/mL、约 0.5 mg/mL、约 0.7 mg/mL、约 0.8 mg/mL、约 0.9 mg/mL、约 1 mg/mL、约 1.7 mg/mL、约 2.4 mg/mL、约 2.9 mg/mL、约 3.1 mg/mL、约 3.8 mg/mL、4.1 mg/mL、约 4.6 mg/mL 或约 5 mg/mL。

在一些实施方案中，有效量为本文所述剂量。

在一些实施方案中，有效量可为 0.1-100 mg/每 kg 患者体重。在一些实施方案中，有效量为 0.1-20 mg/每 kg 患者体重。在另一些实施方案中，有效量为约 2 mg/每 kg 患者体重。在另一些实施方案中，有效量为约 3 mg/每 kg 患者体重。在另一些实施方案中，有效量为约 10 mg/每 kg 患者体重。在另一些实施方案中，有效量为约 20 mg/每 kg 患者体重。在另一些实施方案中，有效量为约 30 mg/每 kg 患者体重。在另一些实施方案中，有效量为约 50 mg/每 kg 患者体重。在另一些实施方案中，有效量为约 100 mg/每 kg 患者体重。在一些实施方案中，可根据需要每日、每周、每月和/或每年以每小时/天/周/月单次或多次给予患者有效量的抗 CTLA-4 抗体或其片段。

本发明另一方面提供了所述液体制剂的制备方法，其包括以下步骤：

- (1) 配置缓冲液，无菌过滤；
- (2) 通过 UF/DF 超滤，采用步骤 (1) 制备的缓冲液对抗体进行超滤换液，然后进行浓缩，得到抗体浓缩物；
- (3) 配制含有缓冲剂、稳定剂、表面活性剂和螯合剂的辅料母液，调节到合适的 pH 值；将无菌过滤后的辅料母液添加到步骤 (2) 制备的抗体浓缩物中，得到液体制剂。

实施例 1. 抗体 1、抗体 2 的制备

准备 CHO 细胞（如，由 CHO-K1 细胞株经培养适应悬浮生长的中国仓鼠卵巢细胞）和 CHO-BAT-KF，发明专利 CN109096399A 已公开上述细胞，通过电穿孔方法将含有编码抗 CTLA-4 抗体的轻链/重链的核苷酸序列的线性化后的质粒分别转染两株细胞，该抗 CTLA-4 抗体重链 CDR1 为 SEQ ID NO:12，重链 CDR2 为 SEQ ID NO:13，重链 CDR3 为 SEQ ID NO:14，轻链 CDR1 为 SEQ ID NO:15，轻链 CDR2 为 SEQ ID NO:16，轻链 CDR3 为 SEQ ID NO:17，重链可变区序列为 SEQ ID NO:18，轻链可变区序列为 SEQ ID NO:19，重链序列为 SEQ ID NO:1，轻链序列为 SEQ ID NO:2，重链的编码序列为 SEQ ID NO:3，轻链的编码序列为 SEQ ID NO:4。电转条件为：电压 300 V，1500 μ F，4 mm 电转杯，40 μ g 线性化质粒，1000 万细胞。转染 CHO 细胞的，命名为 BAT1（其为表达本文中“抗体 1”的细胞）；转染 CHO-BAT-KF 细胞的，命名为 BAT2（其为表达本文中“抗体 2”的细胞）。电转染之后分别将两种细胞重悬入含有 1 $\times$ GS（Specialty Media，货号：GSS1016-C）的 CHO-AGT（Gibco，货号：12490025）培养基，以每孔 1500 个细胞的密度均匀分到 40 块 96 孔板中，每孔体积为 100 μ L。将细胞培养板放入 8% CO₂，37°C 培养箱培养。48 小时后补加 100 μ L CHO-AGT 培养基（1 $\times$ GS 和 50 μ M 终浓度 MSX（甲硫氨酸亚砷胺））继续培养。

提前准备好筛选阳性克隆用的 ELISA 板（Corning，货号：9018）。将 Sigma 公司的羊抗人 Fc 抗体（Sigma，货号：I2136）用 PBS 稀释至浓度为 2 μ g/mL，每孔 100 μ L 加入 ELISA 板中，37°C 孵育 2h 后，甩掉板中液体并拍干，每孔加入 200 μ L 封闭液（含有 5% BSA 的 PBS），37°C 孵育 2h 后，直接放进 -20°C 保存备用。96 孔细胞培养板中的细胞约 16-20 天后形成肉眼可见的细胞克隆团。BAT1 共挑出 1389 个克隆，BAT2 共挑出 852 个克隆。检测步骤为解冻包被好羊抗人 Fc 抗体的 ELISA 板，用 PBST 洗板 3 次，敷上稀释 40 倍的 96 孔细胞培养上清，37°C 孵育 2 小时，用 PBST 洗板 5 次，加入 1:10000 倍稀释的耦联过氧化物酶的山羊抗人 Kappa 轻链-二抗（Sigma，货号：A7164），37°C 孵育 0.5 小时，用 PBST 洗板 7 次，加入 TMB 单组分显色液（湖州英创生物，货号：TMB-S-001）避光显色 10-15 分钟，用 0.1M 硫酸终止反应，在 450nm 波长下读数，标记出表达量较高的阳性克隆。阳性克隆转移到 24 孔板中培养 5-7 天，培养上清稀释 1000 倍进行上述 ELISA 检测。表达量较高且细胞状态良好的阳性克隆转移到 6 孔板中培养 5-7 天，培养上清稀释 2000 倍进行上述 ELISA 检测。表达量较高且细胞状态良好的阳性克隆转移到 125mL 小摇瓶，在摇床中培养。待细胞生长状态稳定良好，活力 95% 以上，且细胞达到一定数量时，以 30-50 $\times 10^5$ 细胞/mL 密度、30mL 体积接种到 CHO-AGT 培养基中，进行 12 天的摇瓶培养。培养过程中在第 3、6、9 天分别取 0.5ml 培养物测细胞密度及活力，取样后分别加入 3ml Feed C（CD Efficient Feed C AGT，生产商：Gibco），其中第 6、9 天的培养物离心取上清冻存，取第 10、11、12 天的培养物测细胞密度及活力，培养物离心取上清冻存。第 12 天收集所有细胞上清，Protein A 纯化。从 BAT1 细胞纯化得到的抗体为抗体 1，从 BAT2 细胞纯化得到的抗体为抗体 2。对抗体 1 和抗体 2 进行测序，抗体 1 和抗体 2 的重链序列为 SEQ ID NO:1（每条重链含有 448 个氨基酸，分子量为 51 kDa），轻链序列为 SEQ ID NO:2（每条轻链含有 215 个氨基酸，分子量为 23 kDa）。得到的蛋白进行各项质量分析，其中在蛋白糖型的分析上，由于抗体 2 在敲除了 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶的细胞系 CHO-BAT-KF 中表达，因此糖型与抗体 1 有差异（如图 1 和表 1），抗体 2 主要糖型为去岩藻糖基化糖型：岩藻糖糖基化水平约为 0。前面所述冻存的第 6、9、10、11、12 天上清则进行 HPLC 检测蛋白表达量。

另外，测定 Yervoy®（伊匹单抗，购自百时美施贵宝公司，在本发明中，Yervoy®也表示为_930395）、抗体 1 和抗体 2 的 CH2 区中糖型含量，结果是高甘露糖糖型总量<5%，唾液酸化糖型总量<3%；其中，一组高甘露糖糖型、唾液酸化糖型的测定结果如表 1 所示（表 1 中，/表示未检测到或含量约为 0）：

表 1. 部分糖型百分含量

糖型分类		Yervoy®	抗体 1	抗体 2
唾液酸化糖型	G1S1	/	/	0.04
	G1FS1	0.54	0.4	/
	G2S1	/	/	0.17
	G2S1’	/	/	0.1
	G2FS1	0.65	0.42	/
	G2FS1’	0.56	0.14	/
	G2S2	/	/	0.14
	G2FS2	0.84	0.19	/
高甘露糖糖型	Man5	2.48	0.56	1.08
	Man6	0.91	0.14	/
	Man8	0.11	0.14	0.1
岩藻糖基化水平	G0F-GN	3.34	0.44	/
	G0F	59.35	53.34	/
	G1F	16.53	25.18	/
	G1F’	6.2	9.07	/
	G1FS1	0.54	0.4	/
	G2F	4.17	4.16	/
	G2FS1	0.65	0.42	/
	G2FS1’	0.56	0.14	/

影响抗体免疫原性风险的糖型有唾液酸化糖型：唾液酸化糖型含量从高到低依次是 Yervoy®、抗体 1、抗体 2，本发明抗体 2 中低含量的唾液酸化糖型有利于降低免疫原性的风险；高甘露糖糖型含量从高到低依次是 Yervoy®、抗体 2、抗体 1，本发明抗体 2 中低含量的高甘露糖糖型有利于延长抗体的半衰期。

实施例 2. 抗体 2 蛋白与 CTLA-4 抗原在体外的结合活性

把用于表达 CTLA-4 抗原的胞外区和人类 IgG1 抗体重链 Fc 段的序列（SEQ ID NO: 5，其氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6）的质粒瞬时转染到 293F 细胞中。

293F 细胞用 CD 293 TGE Medium（BPM Cell Culture，货号：CM-1156）培养，待细胞活力在 95%以上时，用新鲜培养基将细胞传代到 80-100×10⁵ 细胞/mL，24h 后细胞密度大概在 150-200×10⁵ 细胞/mL 时，可进行转染。先将质粒在 65℃水浴 30 分钟，每 100×10⁵ 细胞用 1μg 质粒，每 1μg 质粒用 3μL 的 PEI（Polysciences，货号：24765-2）。分别将质粒和 PEI 用培养基稀释（两个溶液的体积加起来是总体积的 5%），室温静置 5 分钟。然后把 PEI 溶液加到质粒溶液中，混匀，室温静置 20 分钟。将复合物溶液加入到细胞中，37℃摇床培养 24 小时后，

加入总体积比为 10%的 CD Feed X Supplement (BPM Cell Culture, 货号: CF-1116) 到细胞中。5 天后收获细胞上清, 上清用 Protein A 进行纯化, 得到 CTLA-4-ECD-Fc 抗原蛋白。

CTLA-4-ECD-Fc 抗原蛋白包被 ELISA 板, 4°C过夜。第二天用 5% BSA 封闭液于 37°C封闭 2 小时。洗板后分别加上从 1 μg/mL 开始 3 倍梯度稀释的抗体 2、抗体 1 蛋白, 一共稀释 12 个浓度 (最后一个为空白 0 浓度), 每个浓度做 3 个复孔, 37°C孵育 2 小时。洗板后加入 1:10000 倍稀释的耦联过氧化物酶的山羊抗人 Kappa 轻链二抗 (Sigma, 货号 A7164), 37°C孵育 0.5 小时。洗板后加入 TMB 单组分显色液避光显色 10-15 分钟, 用 0.1 M 硫酸终止反应, 在 450nm 波长下读数, 抗体 2、抗体 1 与 CTLA-4 抗原的 ELISA 结合曲线如图 2。

同时在 BIAcore (T200, GE Healthcare) 上也进行了抗体 2、抗体 1 蛋白与 CTLA-4-His (义翘神州, 11159-H08H) 抗原在体外的结合活性检测。将待测抗体: 抗体 2、抗体 1、Yervoy® 用 HBS-EP (0.01 M HEPES, 0.15M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20,pH 7.4) 稀释至 5μg/mL, 抗原 CTLA-4-His 用 HBS-EP 稀释至 100 nM, 并以此为起始浓度作 2 倍梯度稀释, 得 100、50、25、12.5、6.25、3.125nM 的 CTLA-4-His 稀释液。用 Protein A 芯片 (GE Healthcare) 进行检测, 5μg/ml 药物稀释液以 10μl/min 的流速通过实验流路 (Fc2、Fc4), 捕获 15s 使捕获量约为 600RU; 之后流速调为 30 μL/min, 依次进分析物不同浓度的 CTLA-4-His 稀释液(0、3.125、6.25、12.5、25、50、100nM), 同时经过实验流路(Fc2、Fc4)和参比流路(Fc1、Fc3)表面, 结合时间 180s, 解离时间 600s, 最后进 Glycine 1.5 缓冲液 60s 对芯片进行再生并进入下一个循环。用数据分析软件 Evaluation Software3.1 对试验结果进行分析, 将样品试验流路采集所得传感信号进行参比流路、样品空白双扣减, 并选用动力学“1:1”模型进行拟合, 得出各抗体样品对 CTLA-4 亲和结合的动力学参数, 见表 2。Biacore 曲线拟合见图 3 (其中 Yervoy_930395 为 Yervoy®, Y20180901 为抗体 1, 181110-B14-2-CEX 为抗体 2)。

表 2. 抗体 2、抗体 1、Yervoy® 对 CTLA-4 亲和结合的动力学参数

样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Yervoy®	1.08e+05	9.54e-04	8.82e-09
抗体1	1.04e+05	1.03e-03	9.89e-09
抗体2	7.61e+04	8.9e-04	1.17e-08

注: ka: 结合速率; kd: 解离速率; KD: 结合解离平衡常数, 也即亲和力。

结论: 抗体 2、抗体 1 蛋白与 CTLA-4 抗原的结合, 在 ELISA 和 BIAcore 上均显示出相似的结合活性。说明在抗 CTLA-4 抗体上进行 ADCC 的增强并没有改变其与 CTLA-4 抗原的结合能力。

实施例 3. 抗体 2 和抗体 1 蛋白在体外的生物学活性

抗 CTLA-4 抗体的体外生物学活性模型示意图如图 4。

构建 pCMV2-OKT3 (其中 OKT3 部分为抗体的 ScFv 形式, 其核苷酸序列为 SEQ ID NO: 7 所示, OKT3 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8 所示, 轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 9 所示) 质粒, 质粒图谱如图 5。

通过电转的方法, 把 pCMV2-OKT3 转染到 Raji 细胞中, 用潮霉素加压筛选, 通过与 Jurkat-IL2-luciferase 细胞相互混合并刺激 6 个小时, 加入荧光素酶底物用酶标仪检测自发荧光的方法, 筛选出能刺激 Jurkat-IL2-luciferase 细胞 (Promega, JA3005) 产生自发荧光的阳性单克隆, 命名为 Raji-OKT3 细胞。

用含有 1% FBS 的 1640 培养基作为该实施例中的 Buffer, 把 Raji-OKT3 细胞与

Jurkat-IL2-luciferase-CTLA4FL 细胞（Promega，JA3005）分别稀释成 400×10^5 细胞/mL 的密度，于 96 孔白板（Corning，货号：3917）每孔各加入 25 μ L 的 Raji-OKT3 与 25 μ L 的 Jurkat-IL2-luciferase-CTLA4FL。把抗体 2 和抗体 1 分别用 Buffer 分别稀释到 100 μ g/mL，以此为起始浓度，3 倍梯度稀释，一共稀释 10 个浓度（最后一个为空白 0 浓度）。往上述已加入两种细胞的孔中，分别加入不同浓度的抗体溶液，每孔加入 25 μ L，每个浓度做 3 个复孔。此时每孔中共有 75 μ L 的细胞抗体混合液。把白板放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 6 个小时后，取出白板，于室温放置 10 分钟。每孔加入 75 μ L 已平衡至室温的萤火虫荧光素酶底物（Promega），将白板放入酶标仪，震荡 5 s，10 分钟后读取荧光值。结果见图 6。

结论：抗体 2、抗体 1 在活性模型上均表现出相似的增强 T 细胞功能的活性作用。说明在抗 CTLA-4 抗体上进行 ADCC 的增强并没有改变其与 CTLA-4 抗原在体外的生物学活性。

实施例 4. 抗体 2 和抗体 1 蛋白与 Fc γ RIIIa 的结合

SA 传感器(Fertebio)置于 PBS 中预湿 10 分钟备用，将生物素标记的 Fc γ RIIIa 158V(ACRO Biosystems)、Fc γ RIIIa 158F（ACRO Biosystems）用 pH 为 6.8 的含有 0.5% BSA 的 PBST（以下简称稀释缓冲液）稀释至 1 μ g/mL，将 SA 传感器在 Fc γ RIIIa 158-Biotin 中固化至信号约为 0.6 nm。将待测抗体 2、抗体 1 用稀释缓冲液稀释至 500 nM，并以此为起始浓度作 2 倍梯度稀释，一共准备 7 个浓度点（500、250、125、62.5、31.25、15.62、7.812nM）。将稀释缓冲液、梯度浓度的药物抗体稀释液、再生缓冲液（pH 为 8.4 的 1M MgCl₂）、中和缓冲液（PBST）依次加入 96 孔板相应列中，运行如下步骤：①Baseline：在稀释缓冲液中检测基线 60 秒；②Association：在抗体梯度稀释液及样品空白（稀释缓冲液）中结合 90 秒；③Dissociation：在稀释缓冲液中解离 90 秒；④Regeneration：在再生缓冲液中再生 5 秒；⑤Neutralization：在中和缓冲液中中和 5 秒；⑥Regeneration 和 Neutralization 循环进行 3 次。

用 Data Analysis 8.2 对数据进行处理分析，样品数据经参比（样品空白）信号扣减后进行拟合，得到亲和常数 KD。与 Fc γ RIIIa 158F 的亲和力结果统计见表 3，与 Fc γ RIIIa 158V 的亲和力结果统计见表 4，其中抗体 2、抗体 1 与 Fc γ RIIIa 158V 的结合解离传感图见图 7（0-240s 为抗体 1 与 Fc γ RIIIa 158V 的结合解离，270-510s 为抗体 2 与 Fc γ RIIIa 158V 的结合解离）。

表 3. 抗体 2、抗体 1 对 Fc γ RIIIa 158F 亲和结合的动力学参数

组别	Fc γ RIIIa 158F		
	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (M)
抗体1	1.19e+05	3.06e-02	2.58e-07
抗体2	2.95e+05	1.97e-02	6.68e-08

注：kon：结合速率；kdis：解离速率；KD：结合解离平衡常数，也即亲和力。

表 4. 抗体 2、抗体 1 对 Fc γ RIIIa 158V 亲和结合的动力学参数

组别	Fc γ RIIIa 158V		
	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (M)
抗体1	3.63e+05	1.36e-02	3.73e-08
抗体2	4.93e+05	8.98e-03	1.82e-08

注：kon：结合速率；kdis：解离速率；KD：结合解离平衡常数，也即亲和力。

结论：结果表明，经过 ADCC 增强的抗体 2，其与 Fc γ RIIIa 的亲和力比抗体 1 的更强。

实施例 5. 抗体 2 和抗体 1 蛋白在 ADCC 报告基因模型上的体外生物学活性

构建 pCDH-FcγRIIIa 158V FL-Puro 质粒，质粒图谱如图 8。构建过程如下：合成 SEQ ID NO:10 所示 FcγRIIIa 158V FL cDNA 序列，氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示，放于 pUC-57 载体中，命名为 Puc-57-FcγRIIIa 158V FL cDNA。合成 SEQ ID NO:20 和 SEQ ID NO:21 所示的正反向 PCR 引物（用于扩增 FcγRIIIa 158V FL cDNA 片段并在片段两端带上 EcoRI 和 NotI 酶切位点）。以 Puc-57-FcγRIIIa 158V FL cDNA 为模板，用上述正反向引物进行 PCR，得到扩增后的 FcγRIIIa 158V FL cDNA 片段。用 EcoRI 和 NotI 分别对 pCDH-EF1-MCS-T2A-Puro 质粒（常规质粒，例如可以购自优宝生物编号 VT1482）和引物扩增后的 FcγRIIIa 158V FL cDNA 进行双酶切，酶切产物进行胶回收，胶回收的产物进行连接、转化大肠杆菌、测序，正确克隆命名为 pCDH-FcγRIIIa 158V FL-Puro。

用慢病毒包装系统 pLP1、pLP2、pLP/VSV-G（例如可以购自 invitrogen）及 pCDH-FcγRIIIa 158V FL-Puro 进行病毒的包装，然后感染 Jurkat 细胞。48h 后加入 0.3 μg/mL 嘌呤霉素作为筛选压。转染两周后待细胞长起来，用 FITC 标记的抗 FcγRIIIa 抗体（Invitrogen，货号：MHCD1601）通过流式细胞仪检测 FcγRIIIa 158V 的表达情况，筛选出阳性单克隆。

通过电转的方法，把 pGL4.30-luc2P-NFAT-RE-Hygro 质粒（购自 Promega）转染到上述 FcγRIIIa 158V 表达阳性的 Jurkat 单克隆细胞中，用潮霉素加压筛选。通过 PMA（50 μg/mL）和离子霉素（1 μg/mL）刺激 6 个小时并加入荧光素酶底物，采用酶标仪检测自发荧光的方法筛选出能被 PMA 和离子霉素刺激而发出自发荧光的阳性单克隆，命名为 Jurkat-NFAT-luciferase-FcγRIIIa 158V 细胞。

用含有 1% FBS 的 1640 培养基作为该实施例中的缓冲液，把 Jurkat-NFAT-luciferase-FcγRIIIa 158V 细胞与 Jurkat-IL2-luciferase-CTLA4FL 细胞分别稀释成 200×10^5 细胞/mL 的密度，于 96 孔白板（Corning，货号：3917）每孔各加入 25 μL 的 Jurkat-NFAT-luciferase-FcγRIIIa 158V 与 25 μL 的 Jurkat-IL2-luciferase-CTLA4FL。把抗体 2 和抗体 1 用缓冲液分别稀释到 100 ng/mL，以此为起始浓度，3 倍梯度稀释，一共稀释 10 个浓度（最后一个为空白 0 浓度）。往上述已加入两种细胞的孔中，加入不同浓度的抗体溶液，每孔加入 25 μL，每个浓度做 3 个复孔。此时每孔中共有 75 μL 的细胞抗体混合液。把白板放入 37°C 培养箱孵育 6 个小时后，取出白板，于室温放置 10 分钟。每孔加入 75 μL 已平衡至室温的萤火虫荧光素酶底物，将白板放入酶标仪，震荡 5 s，10 分钟后读取荧光值。结果见图 9。

结论：在 ADCC 报告基因模型上，抗体 2 比抗体 1 显示出更强的体外 ADCC 活性，从 EC50 值上看，抗体 2 在体外模型上的 ADCC 活性约为抗体 1 的 12 倍。

实施例 6. 抗体 2 和抗体 1 蛋白在小鼠体内的抗肿瘤药效

将 MC38 细胞以 5×10^5 个/0.1 mL 浓度接种于 B-hCTLA4 人源化雌性小鼠的右侧皮下，待肿瘤生长到约 125 mm³ 时按肿瘤体积随机分组，每组 8 只，共 8 组，分别为：G1 对照组（0.9% 氯化钠注射液溶剂）、G2 组（Yervoy®，1mg/kg）、G3 组（抗体 1，0.3 mg/kg）、G4 组（抗体 1，1 mg/kg）、G5 组（抗体 1，3 mg/kg）、G6 组（抗体 2，0.3 mg/kg）、G7 组（抗体 2，1 mg/kg）组和 G8 组（抗体 2，3 mg/kg）。所有组给药途径均为腹腔注射，每 3 天给药 1 次，连续给药 6 次，末次给药 12 天后结束实验。每周测量肿瘤体积及体重 2 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，动物安乐死，剥取肿瘤称重、拍照，计算相对肿瘤抑制率（TGI%）。

整个实验过程中，所有实验动物在给药期间活动和进食状态良好，实验动物体重均有一定程度的上升。实验过程中无小鼠死亡。抗体 2、抗体 1 对 MC38 细胞移植 B-hCTLA4 小鼠体重的影响见表 5，给药后动物体重变化趋势图见图 10A。而抗体 2、抗体 1 对 MC38 细胞移

植 B-hCTLA4 小鼠肿瘤体积的影响见表 6，给药后肿瘤体积增长趋势图见图 10B。

表 5. 抗体 2、抗体 1 对 MC38 细胞移植 B-hCTLA4 小鼠体重的影响

组别	受试药物	体重 (g) ^a			给药 27 天后 体重变化 (g)
		给药前	首次给药27天后	<i>P</i> ^b	
G1	0.9%氯化钠注射液	18.4±0.3	22.3±0.2	-	+3.9
G2	Yervoy®	18.2±0.2	20.4±0.3	0.000	+2.2
G3	抗体1-低	18.3±0.2	20.9±0.4	0.009	+2.6
G4	抗体1-中	18.4±0.2	20.5±0.4	0.001	+2.1
G5	抗体1-高	18.3±0.3	20.2±0.5	0.001	+1.9
G6	抗体2-低	18.4±0.2	20.5±0.4	0.003	+2.1
G7	抗体2-中	18.2±0.3	20.3±0.4	0.001	+2.1
G8	抗体2-高	18.3±0.3	20.8±0.3	0.001	+2.5

注：a：平均数±标准误；b：给药组体重与溶剂对照组体重在给药 27 天后统计学比较，t-test。

表 6. 抗体 2、抗体 1 对 MC38 细胞移植 B-hCTLA4 小鼠肿瘤体积的影响

组别	受试药物	肿瘤体积 (mm ³) ^a			<i>P</i> ^b
		给药前	首次给药27后	TGI (%)	
G1	0.9%氯化钠注射液	125±6	1901±404	-	-
G2	Yervoy®	125±5	0±0	107.1	0.000
G3	抗体1-低	125±6	288±130	90.8	0.002
G4	抗体1-中	125±6	0±0	107.1	0.000
G5	抗体1-高	125±5	0±0	107.1	0.000
G6	抗体2-低	125±6	0±0	106.8	0.000
G7	抗体2-中	125±5	0±0	107.1	0.000
G8	抗体2-高	125±6	0±0	107.0	0.000

注：a：平均数±标准误；b：给药组体重与溶剂对照组体重在给药 27 天后统计学比较，t-test。

结论：在本实验药效模型上，受试抗体：抗体 2 和受试抗体：抗体 1 均有显著抑制肿瘤生长效果，且与阳性对照药品市售 CTLA-4 抗体 Yervoy®的抑瘤效果相当。并且在发挥抗肿瘤生长作用的同时受试药物未对动物产生明显毒性作用，安全性较好。值得注意的是，在相同剂量中、高剂量组，药效似已达到饱和，因此比较不出差异，但在低剂量组 0.3 mg/kg 下，经过 ADCC 增强的抗体 2 明显比未经 ADCC 增强的抗体 1 有更优的抑瘤效果。

实施例 7. 抗体 2 对小鼠血液中 CD4⁺、CD8⁺、Treg 细胞的影响

在实施例 6 提到的药效实验中，给药 21 天后，对每只小鼠通过眼眶内眦静脉丛采集 150 μL 抗凝血，流式检测其中 CD4、CD8 阳性细胞及 Treg 细胞，统计各自占 CD45 阳性细胞比例。其中用到的抗体包括 anti-CD45 (Biolegend, 货号: 103138)、anti-CD4 (Biolegend, 货

号：100438)、anti-CD8(Biolegend, 货号：100759)、anti-Foxp3(eBioscience, 货号：17-5773-82)抗体。

结果显示, 给药后 21 天, G4 组和 G5 组小鼠血液中 CD4 阳性细胞比例显著增加($P<0.05$, $P<0.01$), G6 组、G7 组和 G8 组小鼠血液中 CD4 阳性细胞比例极显著增加($P<0.01$); 抗体 1 各给药组小鼠血液中 CD8 阳性细胞比例无显著变化, 而 G6 组、G7 组和 G8 组小鼠血液中 CD8 阳性细胞比例极显著增加($P<0.01$); G3 组、G4 组、G5 组、G6 组、G7 组和 G8 组小鼠血液中 Treg 细胞比例显著降低($P<0.05$, $P<0.01$); G3 组、G4 组、G5 组小鼠血液中 CD8 细胞/Treg 细胞比值显著增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。各组比较的示意图见图 11A-11D。

结论: ADCC 增强后, 抗体 2 的 CD4、CD8 阳性细胞比例极显著增加, Treg 细胞比例显著降低, CD8 细胞/Treg 细胞比值显著增加。提示在 ADCC 增强后的 CTLA-4 抗体下, T 细胞得到更强的激活, 从而可对 CTLA-4 人源化荷瘤小鼠产生更强的抗肿瘤效力。

实施例 8. 药代动力学研究

1) 单次静脉输注

试验选用食蟹猴24只, 雌雄各半, 按性别随机分成3组: 低、中、高剂量组分别单次静脉输注给予1 mg/kg抗体2、3 mg/kg抗体2、10 mg/kg抗体2。于给药前、给药结束后即刻, 给药开始后1小时、6小时、24小时、48小时、3天、4天、5天、7天、9天、11天、14天、17天、21天、28天采集全血, 分离血清。经验证的ELISA法分析各样本中药物的浓度, 定量下限为15 ng/mL。

试验期间各动物均未见异常临床表现, 各组动物血清中药物代谢动力学参数见表7; 结果显示, 各组不同性别动物间血清药物浓度变化趋势基本一致, 低、中及高剂量组动物血清药物浓度与给药剂量正相关; 各组各药代动力学参数均无性别差异 ($p>0.05$)。

表 7. 单次给药的药代动力学参数

组别	性别		$t_{1/2}$ (h)	C_{max} (ug/mL)	AUC_{last} (h*mg/mL)	AUC_{INF_obs} (h*mg/mL)	Vz_{obs} (mL/kg)	Cl_{obs} (mL/h/kg)	MRT_{last} (h)
低剂量组	雄性	Mean	180.07	19.78	2.30	2.48	107.20	0.42	185.41
		SD	17.36	2.53	0.52	0.61	15.18	0.09	12.52
	雌性	Mean	237.92	16.63	2.37	2.74	125.50	0.37	209.69
		SD	35.88	1.25	0.20	0.29	14.37	0.04	9.30
	总体	Mean	209.00	18.21	2.33	2.61	116.35	0.39	197.55
		SD	40.49	2.48	0.36	0.45	16.59	0.07	16.56
中剂量组	雄性	Mean	173.10	62.01	7.75	8.39	86.09	0.37	178.99
		SD	78.59	7.35	1.05	1.54	28.73	0.07	26.62
	雌性	Mean	222.46	52.12	7.38	8.29	116.06	0.36	208.72
		SD	19.97	7.06	0.35	0.57	2.63	0.03	7.45
	总体	Mean	197.78	57.07	7.56	8.34	101.07	0.36	193.86
		SD	57.98	8.42	0.73	1.04	24.54	0.05	23.89
高剂量组	雄性	Mean	133.70	187.34	18.46	19.03	101.73	0.53	164.50
		SD	23.21	10.63	1.26	1.35	18.94	0.04	5.98
	雌性	Mean	150.76	170.38	21.27	22.62	95.20	0.46	185.18

总体	SD	50.44	17.40	4.06	5.03	22.51	0.10	22.39
	Mean	142.23	178.86	19.86	20.82	98.46	0.49	174.84
	SD	36.34	15.89	3.10	3.84	18.95	0.08	18.52

2) 多次静脉输注

试验选用食蟹猴 40 只，按性别随机分成 4 组，每组雌雄各 5 只，分别为溶媒对照组、低剂量组（抗体 2，0.2 mg/kg）、中剂量组（抗体 2，0.6 mg/kg）和高剂量组（抗体 2，2 mg/kg）；每 3 周静脉输注给予供试品或溶媒对照品 1 次，连续给药 13 周，即第 1 天、第 22 天、第 43 天、第 64 天、第 85 天共给药 5 次；给药速度约为 0.2 mL/min/kg。对照组采血时间点为：第 1 天和第 64 天药前及给药开始后 2 h，给药组采血时间点为：第 1 天和第 64 天药前、给药结束后即刻（±1 min）、给药开始后 2 h、6 h、24 h、72 h、120 h、168 h、336 h、504 h，采血并分离血清。采用经验证的 ELISA 分析方法检测血清中供试品浓度，方法的定量下限为 15 ng/mL。用 WinNonlin 8.0 非房室模型（NCA）计算供试品的毒代动力学参数。

在 0.2~2 mg/kg 范围内，血清药物暴露量随时间变化趋势基本一致；第 4 次给药后各剂量组的暴露量均有一定程度的增加。

表 8. 多次给药的药代动力学参数

剂量	性别		首次给药		第 4 次给药		AF
			C _{max}	AUC _{last}	C _{max}	AUC _{last}	
			(µg/mL)	(h·mg/mL)	(µg/mL)	(h·mg/mL)	
低剂量组	雄性	Mean	4.00	0.57	6.56	0.88	1.53
		SD	1.13	0.03	0.72	0.14	0.19
	雌性	Mean	4.62	0.55	6.53	0.86	1.57
		SD	0.80	0.07	0.50	0.09	0.19
	总体	Mean	4.31	0.56	6.54	0.87	1.55
		SD	0.98	0.05	0.58	0.11	0.18
中剂量组	雄性	Mean	13.28	1.82	18.81	3.09	1.69
		SD	1.24	0.13	1.74	0.46	0.14
	雌性	Mean	13.38	1.68	16.77	2.43	1.37
		SD	0.84	0.28	1.93	0.72	0.27
	总体	Mean	13.33	1.75	17.90	2.80	1.55
		SD	1.00	0.22	2.02	0.65	0.26
高剂量组	雄性	Mean	45.95	5.99	65.37	8.77	1.47
		SD	3.43	0.62	6.34	1.09	0.20
	雌性	Mean	42.42	4.99	60.87	7.93	1.53
		SD	5.23	0.89	4.52	1.19	0.19
	总体	Mean	44.19	5.49	63.37	8.40	1.50
		SD	4.57	0.90	5.78	1.15	0.19

实施例 9. 毒理学研究

1) 单次静脉输注的急性毒性试验

8 只食蟹猴随机分为 4 个组（1 只/性别/组），第 1 组为溶媒对照组，第 2、3、4 组分别为 10、30 和 60 mg/kg 供试品组（抗体 2）。动物于第 1 天单次静脉输注给药，给药容量为 6 mL/kg，输注速度为 0.5 mL/min/kg。

结果显示，试验期间各组动物均未见死亡或濒死现象，各组动物、体温、心电、血生化和尿液均未见明确与供试品（抗体 2）相关的异常改变。在本试验条件下，30 和 60 mg/kg 组动物可见胸腺轻度至重度萎缩，最大耐受剂量（MTD）为 60 mg/kg。

2) 重复静脉输注的毒性试验

本试验共使用 40 只食蟹猴（20 只/性别）随机分为 4 组，每组每性别 5 只动物；第 1 组为溶媒对照组，第 2、3、4 组动物分别给予 0.2、0.6、2 mg/kg 的供试品（抗体 2）；每 3 周给药 1 次，连续给药 13 周，共给药 5 次；静脉输注给药，给药容量为 2 mL/kg，给药速度约为 0.2 mL/min/kg；恢复期 4 周。

高剂量组动物可见胃肠道反应，停药后可见恢复或恢复趋势，各剂量组动物均未见毒性靶器官，未观察到临床不良反应的剂量水平（NOAEL）为 2 mg/kg。

3) 重复静脉输注的免疫毒性试验

本试验是结合重复静脉输注和恢复期 4 周的长期毒理研究进行，主要考察该试验条件下供试品（抗体 2）对食蟹猴的 T 淋巴细胞亚群、补体、细胞因子、免疫球蛋白的影响；其中，第 1 组为溶媒对照组，第 2、3、4 组动物分别给予 0.2、0.6、2 mg/kg 的供试品（抗体 2）；每 3 周给药 1 次，连续给药 13 周，共给药 5 次。

试验期间，3 种剂量组食蟹猴的细胞因子（TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6）均未见与抗体 2 相关的异常改变；与对照组相比，各剂量组动物免疫球蛋白（IgG、IgM、IgA）未见统计学意义的改变；食蟹猴重复静脉输注给予抗体 2 后，低、中、高剂量组分别有 0/10、1/10、3/10 的食蟹猴检测出 ADA（抗药抗体）呈阳性。

实施例 10. 体外溶血试验

将氯化钠注射液和供试品（抗体 2），分别加入到含有 2 % 兔红细胞混悬液的玻璃试管中，置于 37°C 电热恒温箱中温育 3 小时，观察红细胞的溶解或凝聚情况。

试验结果显示，浓度为 10.1 mg/mL 和 1 mg/mL 的供试品，在体外不引起兔红细胞溶血，无凝聚作用，适合临床安全注射。

实施例 11. 抗体 2 的临床研究

本研究是一项评价抗体 2 注射液治疗晚期实体瘤患者的安全性、耐受性和药代动力学特征的多中心、开放性、剂量递增的 I 期临床试验，探索最大耐受剂量（MTD），为后续临床试验提供推荐剂量；并初步评价抗体 2 注射液的免疫源性和抗肿瘤疗效。

第一阶段，采用“3+3”方式剂量递增规则探索安全剂量范围，剂量为 0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg 和 2 mg/kg；5 个剂量组依次入组给予抗体 2 注射液，只有当同一剂量组的所有受试者均已完成 DLT 评估，确定没有探索到最大耐受剂量（Maximum Tolerated Dose, MTD）后，才可以开展下一较高剂量组的探索，直至探索到 MTD 或直至完成最高剂量组的耐受性研究不再递增。第二阶段，剂量递增完成后，选择 1-2 个耐受剂量针对黑色素瘤（20-40 例）进行扩展研究，为后续临床试验提供推荐剂量。

每 3 周以静脉输注给药 1 次，治疗周期为 4 个周期，每周期第 1 天进行给药。研究期间，发生以下情况，慎用/可酌情使用：1) 预防输液反应：若第 n 个受试者出现输液反应，在后续的给药中，可酌情给予第 n、n+1、n+2……个受试者预防用药，仅限于类固醇激素、

镇痛药、抗组胺药的单用或组合方案；2) 治疗输液反应：若发生输液反应可以酌情使用类固醇激素及其他药物；3) 治疗不良反应：研究者可酌情使用英夫利昔单抗、甲氧咪唑、卡咪唑、左旋甲状腺素、类固醇激素等治疗研究期间发生的不良反应；4) 肿瘤的局部治疗，如骨痛的姑息放疗。**DLT 评估期**：21 天，即第 1 个治疗周期。当患者完成第 4 个治疗周期结束访视后，继续观察访视 6 周，即完成该研究，根据试验收集的数据，分析总结抗体 2 注射液的安全性、耐受性、药代动力学特征、免疫原性以及初步疗效。

安全性指标包括：生命体征、体格检查、实验室检查（血常规、血生化、甲状腺功能、凝血常规、尿常规、便常规（含隐血试验）、心电图、心脏彩超、不良事件（包括免疫相关不良事件）等。

所有剂量组的受试者在治疗期间的特定时间点需要收集血样，每个时间点计划采 2mL 血样，检测血清中抗体 2 的浓度水平，研究抗体 2 注射液的药代动力学（PK）特征。在第 1 至第 4 周期每次给药前和给药结束后对受试者采集 PK 血样。其中，第 1 周期和第 3 周期密集采样，分别研究单次给药和多次给药稳态研究的 PK 特征。具体 PK 参数包括：单次给药： C_{max} 、 T_{max} 、 $T_{1/2}$ 、CL、Vd、Ke、MRT、 $AUC_{(0-\tau)}$ 、 $AUC_{(0-\infty)}$ ；多次给药： $C_{max,ss}$ 、 $C_{avg,ss}$ 、 $C_{min,ss}$ 、 $AUC_{(0-\tau),ss}$ 、 $AUC_{(0-\infty),ss}$ 、 $T_{max,ss}$ 、 $T_{1/2,ss}$ 、CL、 V_{ss} 、Ke、MRT、蓄积指数（Rac）、波动指数 DF。

所有剂量组的受试者在治疗期间的特定时间点需要收集血样，每个时间点计划采集 3.5mL 血样，检测血清中抗药抗体与中和抗体，于第 1 至第 4 周期每次给药前及第 4 周期末次给药结束后 21 天采集免疫原性检测血样。免疫原性评价指标包括：抗药抗体（ADA）的样品阳性率和个体阳性率，ADA 阳性样品的滴度，ADA 阳性的样本是否为中和抗体（Nab）。

整个试验过程中，采用 RECIST1.1 和 iRECIST1.1 评估抗体 2 的抗肿瘤疗效。肿瘤影像学检查（进行胸、腹、骨盆等的 CT 或 MRI）在首次给药前 28 天内进行，在整个研究期间同一患者同一部位均采用同一种影像学检查技术。给药后的肿瘤评估将在第 6 周、第 12 周、第 18 周进行。临床有效性评价包括：

客观缓解率（Objective Response Rate, ORR）：为完全缓解（CR）和部分缓解（PR）的受试者的比例，第 6、12、18 周的 ORR 分别为 ORR6w、ORR12w、ORR18w；

最佳总体缓解率（Best Overall Response Rate, BORR）：为第 6、12、18 周肿瘤疗效评估中出现的最佳 ORR；

缓解持续时间（Duration of Response, DOR）：肿瘤第一次评估为客观缓解至第一次评估为 PD(Progressive Disease)或 PD 前任何原因死亡的时间，反映 ORR 的持续时间；

无进展生存期（Progression-Free Survival: PFS）：为从首次给药至出现肿瘤客观进展或全因死亡的时间（以先发生者为准）。

剂量限制性毒性（DLT）的定义如下：指患者在第 1 周期给药后第 1 天至第 21 天内出现以下与研究药物相关的以下事件：

■ ≥2 级的眼部 AE（不良事件），在接受局部治疗的 2 周内没有降低到 1 级的；或 ≥2 级的眼部 AE 需要全身治疗的；

■ ≥3 级的非血液学毒性（恶心、呕吐等进行支持治疗 3 天内能缓解，未预防给药发生的 ≥3 级的输液反应除外）；

■ ≥4 级的血液学毒性（包括 ≥3 级的中性粒细胞减少伴发热；但 4 级中性粒细胞减少需

持续时间≥7 天才可判断 DLT)；≥4 级血小板减少或 3 级血小板减少伴有出血。

实施例 12. 抗体 2 制剂的制备

配置缓冲液，通过 UF/DF 超滤采用过滤后的缓冲液对抗体溶液进行超滤换液，然后进行浓缩得到抗体浓缩物；按照配方比例配制适当的含有缓冲剂和/或稳定剂和/或表面活性剂和/或螯合剂的辅料母液，调节到合适的 pH 值；将适当量的无菌过滤后的辅料母液添加到适当量的抗体浓缩物中，得到液体制剂。实施例中采用的溶剂为注射用水。

1) 缓冲剂筛选

采用多种缓冲剂体系进行抗体稳定性研究。鉴于抗 CTLA-4 抗体的性质，本发明初步筛选后确定以下多种缓冲剂体系：His、HAc、CB、Sua、Tris。

上述各英文缩写的含义：

His：20 mM 组氨酸缓冲剂，pH 5.8；

HAc：20 mM 醋酸缓冲剂，pH 5.8；

CB：20 mM 柠檬酸缓冲剂，pH 5.8；

Sua：20 mM 琥珀酸缓冲剂，pH 5.8；

Tris：20 mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐，pH 7.0。

进行稳定性实验的抗体-缓冲剂体系中，His、HAc、CB、Sua 所含有的抗体 2 为 10 mg/mL，缓冲剂为 20 mM，缓冲液的 pH 值为 5.8。研究各种配方在高温 40℃的条件下放置 4 周，单体纯度（SEC-HPLC，简称 SEC）和电荷异构体（IEC-HPLC，简称 IEC）变化的趋势，见表 9。

表 9 缓冲剂筛选

缓冲剂种类	His	HAc	CB	Sua	Tris
缓冲剂浓度 (mM)	20	20	20	20	20
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	7.0
抗体 2 浓度 (mg/mL)	10	10	10	10	5
SEC 单体纯度(%) 第 0 天	99.67	99.64	99.59	99.64	99.57
SEC 单体纯度(%) 第 4 周	99.18	98.95	98.87	98.26	98.80
SEC 聚体(%) 第 0 天	0.29	0.33	0.38	0.36	0.39
SEC 聚体(%) 第 4 周	0.30	0.61	0.62	1.18	0.65
IEC 主峰含量(%) 第 0 天	67.30	67.32	67.23	67.15	66.78
IEC 主峰含量(%) 第 4 周	51.48	50.00	44.95	46.14	45.45
IEC 酸峰含量(%) 第 0 天	26.45	26.39	26.41	26.51	27.30

IEC 酸峰含量(%) 第 4 周	42.49	44.57	50.01	48.87	51.14
----------------------	-------	-------	-------	-------	-------

根据以上实验结果，组氨酸缓冲剂为最优缓冲剂，醋酸缓冲剂次之，Tris 缓冲剂较差：组氨酸缓冲液中 SEC-HPLC 单体纯度和 IEC-HPLC 主峰含量都高于其他缓冲体系。可见，组氨酸缓冲液对抗体 2 的保护作用最优。

2) pH 范围初步筛选

进行 pH 范围筛选的体系中，所含有的抗体、缓冲剂见表 10。

表 10 pH 范围筛选

分组	1	2	3	4	5	6	7
His 缓冲剂 (mM)	20	20	20	0	0	0	0
HAc 缓冲剂 (mM)	0	0	0	20	20	20	0
Tris 缓冲剂 (mM)	0	0	0	0	0	0	20
pH	5.5	6.0	6.5	4.5	5.0	5.5	7.0
抗体 2 浓度 (mg/mL)	10	10	10	10	10	10	10
SEC 单体纯度(%) 第 0 天	98.95	98.77	98.73	98.98	99.04	98.91	97.91
SEC 单体纯度(%) 第 4 周	95.43	95.65	95.50	94.38	94.93	94.77	94.75
SEC 聚体(%) 第 0 天	1.05	1.23	1.27	1.02	0.96	1.09	2.09
SEC 聚体(%) 第 4 周	1.17	1.22	1.25	1.29	1.57	2.10	2.41
IEC 主峰含量(%) 第 0 天	67.59	67.38	67.52	67.38	67.24	66.84	66.52
IEC 主峰含量(%) 第 4 周	49.18	49.40	44.17	43.41	44.56	46.69	46.51
IEC 酸峰含量(%) 第 0 天	25.01	25.06	25.38	24.96	25.01	24.97	25.39
IEC 酸峰含量(%) 第 4 周	41.60	43.02	49.94	44.89	46.19	45.26	47.19

根据以上结果，当抗体加入缓冲液高温（40℃）测试中（缓冲液中未加入其他成分），当缓冲体系是 pH 值为 5.5-6.5（不包括 6.5）的组氨酸缓冲液时，其 SEC-HPLC 聚体和 IEC-HPLC 酸峰含量相对较低，SEC-HPLC 单体纯度和 IEC-HPLC 主峰含量相对较高。

3) pH 精细筛选

在组氨酸缓冲体系中进行 pH 范围精细筛选，各体系中所含有的抗体、缓冲液、稳定剂、金属离子螯合剂、表面活性剂见表 11；82 mg/mL 蔗糖的摩尔浓度为 240 mM。

表 11 pH 精细筛选

分组	1	2	3	4	5	6	7
His 缓冲剂 (mM)	20	20	20	20	20	20	20
pH	5.2	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2	6.4
抗体 2 (mg/mL)	10	10	10	10	10	10	10
蔗糖 (mg/mL)	82	82	82	82	82	82	82
依地酸二钠二水 合物 (mg/mL)	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037
TW80 (mg/mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
SEC 单体纯度(%) 第 0 天	99.17	99.59	99.64	99.65	99.67	99.66	99.68
SEC 单体纯度(%) 第 4 周	99.10	99.19	99.23	99.27	99.27	99.26	99.24
SEC 聚体(%) 第 0 天	0.78	0.38	0.33	0.32	0.30	0.30	0.30
SEC 聚体(%) 第 4 周	0.27	0.28	0.28	0.28	0.28	0.29	0.31
IEC 主峰含量(%) 第 0 天	69.17	69.06	69.15	69.12	69.05	69.05	69.08
IEC 主峰含量(%) 第 4 周	49.16	50.06	50.73	51.26	51.08	50.53	47.75
IEC 酸峰含量(%) 第 0 天	23.17	23.22	23.30	23.32	23.41	23.33	23.51
IEC 酸峰含量(%) 第 4 周	41.66	41.82	41.66	42.09	42.76	43.74	47.37

根据以上结果，当抗体 2 中加入的缓冲液中还加入稳定剂、金属离子螯合剂、表面活性

剂时，当缓冲体系是 pH 值为 5.4-6.2 的组氨酸缓冲液时，其稳定性较好，以 pH 值为 5.8 更好。

4) 表面活性剂振荡稳定性研究

进行表面活性剂筛选的体系中，所含有的抗体、缓冲液、稳定剂、金属离子螯合剂、表面活性剂，见表 12。

在抗体制剂中，在剧烈的振荡下，容易发生聚集，产生不溶性颗粒，可以通过添加一定量的表面活性剂来防止。在本实验中，向含有缓冲液、稳定剂、金属离子螯合剂的配方中分别添加 0.1 mg/mL 聚山梨酯 20、0.2mg/mL 聚山梨酯 20、0.4mg/mL 聚山梨酯 20、0.1mg/mL 聚山梨酯 80、0.2mg/mL 聚山梨酯 80、0.4mg/mL 聚山梨酯 80，观察在振荡 72 h 后样品的质量与浊度。实验条件：把不同表面活性剂组合的制剂，在 200 rpm 下，平放，常温振荡 72 h，在振荡 0 h 及 72 h 检测溶液性状、SEC、IEC、浊度，结果见表 12。

表 12 表面活性剂筛选

分组	1	2	3	4	5	6	7
His 缓冲剂 (mM)	20	20	20	20	20	20	20
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
抗体 2 (mg/mL)	10	10	10	10	10	10	10
蔗糖(mg/mL)	82	82	82	82	82	82	82
依地酸二钠二 水合物 (mg/mL)	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037
聚山梨酯 80 (mg/mL)	0.1	0.2	0.4	0	0	0	0
聚山梨酯 20 (mg/mL)	0	0	0	0.1	0.2	0.4	0
溶液性状	澄明 无异物	澄明 无异物	澄明 无异物	澄明 无异物	澄明 无异物	澄明 无异物	澄明 无异物
SEC 单体纯度 (%) 第 0 h	99.18	99.17	99.16	99.14	99.11	99.10	99.11
SEC 单体纯度 (%) 第 72 h	99.03	99.10	99.05	99.01	99.04	99.04	98.72

SEC 聚体(%) 第 0 h	0.35	0.34	0.34	0.33	0.35	0.34	0.33
SEC 聚体(%) 第 72 h	0.44	0.38	0.40	0.41	0.35	0.39	0.65
IEC 主峰含量 (%) 第 0 h	64.43	64.51	64.80	64.87	64.93	64.93	64.79
IEC 主峰含量 (%) 第 72 h	65.23	65.39	65.34	65.37	65.21	65.24	65.86
IEC 酸峰含量 (%) 第 0 h	19.31	19.27	19.22	19.43	19.55	19.61	19.69
IEC 酸峰含量 (%) 第 72 h	20.02	20.11	20.17	20.21	20.33	20.39	20.11
浊度 OD340 第 0 h	0.037	0.038	0.038	0.036	0.032	0.038	0.040
浊度 OD340 第 72 h	0.042	0.042	0.039	0.040	0.040	0.040	0.901

结果显示，在振荡的过程中，加入的 0.1-0.4 mg/mL 聚山梨酯 20 或聚山梨酯 80 表面活性剂都能对抗体蛋白起到保护作用，浊度没有明显变化。

5) 液体制剂配方

本发明液体制剂能够稳定保存活性成分抗体 2，稳定性较好的制剂配方如本发明液体制剂 A、B、C、D、E、F、G、H、I；其中，J 制剂作为对比制剂，如下表。

表 13A 液体制剂 A 配方

成分	配方量	5 毫升制剂含量
抗体 2	10 mg/mL	50 mg
L-组氨酸	1.24 mg/mL （8mM）	6.2 mg
L-盐酸组氨酸一水合物	2.52 mg/mL （12 mM）	12.6 mg
海藻糖二水合物	85 mg/mL （225 mM）	425 mg
依地酸二钠二水合物	0.037 mg/mL	0.185 mg
聚山梨酯 80	0.2 mg/mL	1 mg
pH	5.8	

表 13B 液体制剂 B 配方

成分	配方量	5 毫升制剂含量
抗体 2	10 mg/mL	50 mg
L-组氨酸	1.24 mg/mL	6.2 mg
L-盐酸组氨酸一水合物	2.52 mg/mL	12.6 mg
蔗糖	82 mg/mL (240 mM)	410 mg
依地酸二钠二水合物	0.037 mg/mL	0.185 mg
聚山梨酯 80	0.2 mg/mL	1 mg
pH	5.8	

表 13C 液体制剂 C 配方

成分	配方量	5 毫升制剂含量
抗体 2	10 mg/mL	50 mg
L-组氨酸	1.24 mg/mL	6.2 mg
L-盐酸组氨酸一水合物	2.52 mg/mL	12.6 mg
甘露醇	45 mg/mL (247 mM)	225 mg
依地酸二钠二水合物	0.037 mg/mL	0.185 mg
聚山梨酯 80	0.2 mg/mL	1 mg
pH	5.8	

表 13D 液体制剂 D 配方

成分	配方量	5 毫升制剂含量
抗体 2	10 mg/mL	50 mg
醋酸缓冲剂	20 mM	0.1 mol
海藻糖二水合物	85 mg/mL (225 mM)	425 mg
依地酸二钠二水合物	0.037 mg/mL	0.185 mg
聚山梨酯 80	0.2 mg/mL	1 mg
pH	5.8	

表 13E 液体制剂 E 配方

成分	配方量	5 毫升制剂含量
抗体 2	10 mg/mL	50 mg
醋酸缓冲剂	20 mM	0.1 mol
蔗糖	82 mg/mL	410 mg
依地酸二钠二水合物	0.037 mg/mL	0.185 mg
聚山梨酯 80	0.2 mg/mL	1 mg
pH	5.8	

表 13F 液体制剂 F 配方

成分	配方量	5 毫升制剂含量
抗体 2	10 mg/mL	50 mg
醋酸缓冲剂	20 mM	0.1 mol
甘露醇	45 mg/mL (247 mM)	225 mg
依地酸二钠二水合物	0.037 mg/mL	0.185 mg
聚山梨酯 80	0.2 mg/mL	1 mg
pH	5.8	

表 13G 液体制剂 G 配方

成分	配方量	5 毫升制剂含量
抗体 2	10 mg/mL	50 mg
L-组氨酸	0.62 mg/mL (4 mM)	3.1 mg
L-盐酸组氨酸一水合物	1.26 mg/mL (6 mM)	6.3 mg
醋酸缓冲剂	10 mM	0.05 mol
海藻糖二水合物	85 mg/mL	425 mg
依地酸二钠二水合物	0.037 mg/mL	0.185 mg
聚山梨酯 80	0.2 mg/mL	1 mg
pH	5.8	

表 13H 液体制剂 H 配方

成分	配方量	5 毫升制剂含量
抗体 2	10 mg/mL	50 mg
L-组氨酸	0.62 mg/mL	3.1 mg
L-盐酸组氨酸一水合物	1.26 mg/mL	6.3 mg
醋酸缓冲剂	10 mM	0.05 mol
蔗糖	82 mg/mL	410 mg
依地酸二钠二水合物	0.037 mg/mL	0.185 mg
聚山梨酯 80	0.2 mg/mL	1 mg
pH	5.8	

表 13I 液体制剂 I 配方

成分	配方量	5 毫升制剂含量
抗体 2	10 mg/mL	50 mg
L-组氨酸	0.62 mg/mL	3.1 mg
L-盐酸组氨酸一水合物	1.26 mg/mL	6.3 mg
醋酸缓冲剂	10 mM	0.05 mol
甘露醇	45 mg/mL	225 mg

依地酸二钠二水合物	0.037 mg/mL	0.185 mg
聚山梨酯 80	0.2 mg/mL	1 mg
pH	5.8	

表 13J 液体制剂 J 配方

成分	配方量	10 毫升制剂含量
抗体 2	5 mg/mL	50 mg
三羟甲基氨基甲烷盐酸盐	3.15 mg/mL	31.5 mg
甘露醇	10 mg/mL	100 mg
氯化钠	5.85 mg/mL	58.5 mg
DTPA	0.04 mg/mL	0.4 mg
聚山梨酯 80	0.1 mg/mL	1 mg
pH	7.0	

6) 冻融实验

在抗体制剂中，经过冷冻/复融循环时，容易产生不溶性颗粒，可以通过添加稳定剂、表面活性剂来稳定抗体。本发明液体制剂 B 的反复冻融结果见表 14。

表 14 液体制剂 B 的冻融实验结果

实验条件		-80℃冻结 24 h，37℃解冻放置 24 h 为一次冻融过程		
检测项目		第 0 次冻融	第 3 次冻融	第 5 次冻融
溶液性状		澄明 无异物	澄明 无异物	澄明 无异物
SEC-HPLC (%)	聚体	0.83	0.41	0.42
	单体纯度	95.22	95.75	95.66
	片段	3.95	3.84	3.92
IEC-HPLC (%)	酸区	26.83	27.50	27.66
	主峰	66.06	65.20	65.08
	碱区	7.11	7.30	7.27
不溶性微粒	≥10 μm	1.25	9.58	0.83
	≥25 μm	1.25	9.17	0.42

结果表明，本发明液体制剂 B 从-80℃冻结，37℃解冻，反复冻融五次，澄清度、颜色、不溶性微粒、SEC-HPLC、IEC-HPLC 均没有明显变化，说明该制剂在反复冻融实验中性质稳定，无析出物，不影响抗体 2 的性状。

7) 加速稳定性研究

将上述制剂 A、制剂 B、制剂 C、制剂 D、制剂 E、制剂 F、制剂 G、制剂 H、制剂 I 和制剂 J 放置于恒温箱中，在 25±2℃的条件下放置 6 个月，分别于第 0、2、3、6 个月末取样。按稳定性重点考察项目进行检测，考察抗体 2 的单体纯度（SEC-HPLC）、电荷异构体（IEC-HPLC）、非还原毛细管凝胶电泳（CE-SDS（NR）），见表 15、表 16。

表 15 加速稳定性研究的 SEC-HPLC 结果

SEC-HPLC 单体纯度%				
制剂	0 个月	2 个月	3 个月	6 个月
制剂 A	98.97	98.95	98.91	99.03
制剂 B	99.00	98.90	98.92	99.07
制剂 C	99.06	98.96	98.88	99.00
制剂 D	99.05	98.88	98.83	98.92
制剂 E	99.02	98.88	98.83	98.92
制剂 F	98.97	98.86	98.81	98.93
制剂 G	98.99	98.96	98.90	99.02
制剂 H	98.90	98.95	98.88	99.05
制剂 I	98.98	98.91	98.78	98.95
制剂 J	98.87	98.63	98.58	98.62
SEC-HPLC 聚体%				
制剂 A	1.03	0.90	0.87	0.97
制剂 B	1.00	0.94	0.87	0.93
制剂 C	0.94	0.88	0.91	1.00
制剂 D	0.95	0.96	0.96	1.08
制剂 E	0.99	0.96	0.96	1.08
制剂 F	1.02	0.98	0.99	1.07
制剂 G	1.01	0.88	0.91	0.98
制剂 H	1.10	0.89	0.91	0.95
制剂 I	1.02	0.93	0.99	1.05
制剂 J	1.13	1.20	1.20	1.38

表 16 加速稳定性研究的 IEC-HPLC 结果

IEC-HPLC 主峰含量%				
制剂	0 个月	2 个月	3 个月	6 个月
制剂 A	67.33	65.81	64.69	59.02
制剂 B	67.34	66.01	64.46	59.29
制剂 C	67.41	65.58	64.37	58.95
制剂 D	67.05	65.45	64.04	58.49
制剂 E	66.93	65.57	64.13	58.59
制剂 F	67.09	65.6	64.18	58.52
制剂 G	67.08	65.57	64.23	58.48
制剂 H	67.14	65.64	64.29	58.77
制剂 I	66.75	65.54	64.02	58.46
制剂 J	66.65	61.34	59.04	49.57
IEC-HPLC 酸区含量%				

制剂 A	25.00	28.80	30.30	34.45
制剂 B	24.99	28.53	30.43	34.09
制剂 C	25.03	28.99	30.62	34.53
制剂 D	25.32	29.11	30.93	34.92
制剂 E	25.34	29.02	30.84	34.74
制剂 F	25.28	29.05	30.75	34.93
制剂 G	25.26	29.26	30.96	35.10
制剂 H	25.19	29.16	30.93	34.80
制剂 I	25.42	29.31	31.22	35.20
制剂 J	25.96	34.29	37.19	45.84

结果表明,制剂J在 SEC-HPLC 中,单体下降较其他制剂快,表现为聚体的增加;IEC-HPLC 主峰下降迅速,表现为酸峰的快速增加;这意味着对比制剂 J 不能稳定地保存抗体 2,而本发明制剂 A-I 能稳定地保存抗体 2,尤其是本发明制剂 B。

8) 相容性检测

通过加速稳定性实验以及长期稳定性实验,得出本发明液体制剂与药瓶和胶塞具有良好的相容性,符合包装的要求。

SEQ ID NO: 1, 抗 CTLA-4 抗体重链氨基酸序列

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYW GQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 2, 抗 CTLA-4 抗体轻链氨基酸序列

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGAFSRATGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 3, 抗 CTLA-4 抗体重链核酸序列

CAGGTCCAGCTGGTCGAATCTGGCGGCGGCGTCGTCCAGCCTGGAAGATCTCTGAGACT
GTCTTGCGCTGCTTCTGGCTTTACCTTCTCTTCTTACACAATGCATTGGGTCAGACAGGC
TCCTGGTAAAGGTCTGGAGTGGGTCACATTCATCTCTTACGACGGCAACAACAAGTACT
ACGCCGATTCTGTCAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACA AACTCCAAGAACACCCTG
TACCTGCAGATGAACTCTCTGAGAGCTGAGGATACCGCTATCTACTATTGCGCTAGAAC A
GGCTGGCTGGGACCTTTTGATTACTGGGGACAGGGAACACTGGGTCACAGTCTCTTCTGC

TTCTACCAAAGGACCTTCTGTCTTTCCTCTGGCTCCTTCTTCTAAGTCTACCTCTGGCGG
AACAGCTGCTCTGGGTTGTCTGGTCAAGGATTACTTCCCTGAACCGGTGACAGTGTCTT
GGAATTCTGGAGCTCTGACCTCAGGAGTCCATACATTTCTGCTGTCCTGCAGTCTTCTG
GCCTGTATTCTCTGTCTCTGTGGTGACAGTCCCTTCTTCTTCTCTGGGAACACAGACCT
ACATCTGCAACGTCAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTCGACAAGAGAGTGGAGCC
TAAGTCTTGCGACAAGACACATACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA
TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 4, 抗 CTLA-4 抗体轻链核酸序列

GAAATTGTCCTGACACAGTCTCCTGGAACACTGTCTCTGTCTCCTGGAGAGAGAGCTAC
ACTGTCTTGTAGGGCTTCTCAGTCTGTGGGATCTTCTTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAA
ACCTGGACAGGCTCCTAGACTGCTGATCTACGGCGCTTTTTCTAGAGCTACCGGAATCCC
TGACAGATTCTCTGGATCTGGCTCTGGAACCGATTTCACCCTGACCATCTCTAGACTGGA
ACCTGAGGACTTTGCTGTCTACTACTGTCAGCAGTACGGCTCTTCTCCTTGGACATTTGG
ACAGGGAACCAAGGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC
TCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 5, CTLA-4-ECD-Fc 核酸序列

ATGCACGTGGCTCAGCCAGCAGTGGTCCTGGCTTCTTCTAGAGGAATCGCTTCTTTCGTC
TGCGAATACGCTTCTCCAGGAAAGGCTACAGAAGTGAGAGTGACAGTGCTGAGACAGG
CAGATTCTCAGGTGACAGAGGTCTGCGCAGCTACATACATGATGGGAAACGAGCTGACC
TTTCTGGACGATTCTATTTGTACCGGCACATCTTCCGGCAATCAGGTGAATCTGACCATTC
AGGGACTGAGAGCTATGGACACAGGCCTGTACATTTGCAAGGTGGAGCTGATGTACCCT
CCTCCTTATTACCTGGGAATCGGAAACGGAAACACAGATCTACGTGATCGACCCAGAACC
TTGTCCAGATTCCGATCAGGAACCTAAGTCTTCCGACAAGACCCATACATCTCCTCCTTC
TCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGATCTTCAGTGTTTCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGA

TACCCTGATGATCTCCAGAACACCAGAAGTGACTTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACG
AAGATCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAAGTGCATAACGCTAA
GACCAAGCCTAGAGAGGAGCAGTACAACCTCCACCTATAGAGTGGTGTCCGTGCTGACA
GTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAG
CTCTGCCAGCTCCTATCGAGAAGACAATCTCCAAGGCTAAGGGACAGCCTAGAGAACCT
CAGGTGTATACACTGCCTCCTTCTAGAGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCTCTGAC
TTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCTTCTGATATCGCCGTCGAGTGGGAATCTAACGGACA
GCCAGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGATTCAGACGGATCTTTCTTCC
TGTA CTCCAAGCTGACCGTGGACAAAAGTAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCTTGT
AGCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGTCTCTGTCTCC
AGGAAAA

SEQ ID NO: 6, CTLA-4-ECD-Fc 氨基酸序列

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFL
DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGLIGNGTQIYVIDPEPCPDSD
QEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 7, OKT3 ScFv 核酸序列

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGA
TGTCTTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAG
AGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAAT
TACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAG
CCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAT
ATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTGACCGTGAGCG
CCGGGGGAGGTGGCAGCGGGGGAGGTGGCAGCGGCGGGGAGCTCCCAAATTGTTC
TCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC
AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCC
CAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGG
GCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCT
GCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAA
GTTGGAAATAAACCGGGGCGGTGGGGATCCC

SEQ ID NO: 8, OKT3 重链氨基酸序列

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTN
YNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSA

SEQ ID NO: 9, OKT3 轻链氨基酸序列

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHF
RGS GSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRGGGDP

SEQ ID NO: 10, FcγRIIIa 158V FL cDNA 核酸序列

ATGTGGCAGCTGCTCCTCCCAACTGCTCTGCTACTTCTAGTTTCAGCTGGCATGCGGACT
GAAGATCTCCCAAAGGCTGTGGTGTTCCTGGAGCCTCAATGGTACAGGGTGCTCGAGAA
GGACAGTGTGACTCTGAAGTGCCAGGGAGCCTACTCCCCTGAGGACAATTCCACACAG
TGGTTTCACAATGAGAGCCTCATCTCAAGCCAGGCCTCGAGCTACTTCATTGACGCTGC
CACAGTCGACGACAGTGGAGAGTACAGGTGCCAGACAAACCTCTCCACCCTCAGTGAC
CCGGTGCAGCTAGAAGTCCATATCGGCTGGCTGTTGCTCCAGGCCCCTCGGTGGGTGTT
CAAGGAGGAAGACCCTATTCACCTGAGGTGTCACAGCTGGAAGAACACTGCTCTGCAT
AAGGTCACATATTTACAGAATGGCAAAGGCAGGAAGTATTTTCATCATAATTCTGACTTC
TACATTCCAAAAGCCACACTCAAAGACAGCGGCTCCTACTTCTGCAGGGGGGCTTGTTGG
GAGTAAAAATGTGTCTTCAGAGACTGTGAACATCACCATCACTCAAGGTTTGGCAGTGT
CAACCATCTCATCATTCTTTCCACCTGGGTACCAAGTCTCTTTCTGCTTGGTGATGGTACT
CCTTTTTGCAGTGGACACAGGACTATATTTCTCTGTGAAGACAAACATTCGAAGCTCAA
CAAGAGACTGGAAGGACCATAAATTTAAATGGAGAAAGGACCCTCAAGACAAATGA

SEQ ID NO:11, FcγRIIIa 158V FL 氨基酸序列

MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQW
FHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEED
PIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSS
ETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFK
WRKDPQDK

SEQ ID NO: 12, 抗 CTLA-4 抗体重链 CDR1 氨基酸序列
SYTMH

SEQ ID NO: 13, 抗 CTLA-4 抗体重链 CDR2 氨基酸序列
FISYDGNNKYYADSVKG

SEQ ID NO: 14, 抗 CTLA-4 抗体重链 CDR3 氨基酸序列
TGWLGPFDY

SEQ ID NO: 15, 抗 CTLA-4 抗体轻链 CDR1 氨基酸序列
RASQSVGSSYLA

SEQ ID NO: 16, 抗 CTLA-4 抗体轻链 CDR2 氨基酸序列
GAFSRAT

SEQ ID NO: 17, 抗 CTLA-4 抗体轻链 CDR3 氨基酸序列
QQYGSSPWT

SEQ ID NO: 18, 抗 CTLA-4 抗体重链可变区氨基酸序列
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 19, 抗 CTLA-4 抗体轻链可变区氨基酸序列
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 20, FcγRIIIa 158V FL cDNA 正向引物（下划线为限制性内切酶的酶切位点）
5'-GCGAATTCATGTGGCAGCTGCTCCTCCC-3'

SEQ ID NO: 21, FcγRIIIa 158V FL cDNA 反向引物（下划线为限制性内切酶的酶切位点）
5'-CAGCGGCCGCTCATTTGTCTTGAGGGTCCTTTCTC-3'

权利要求书

1. 针对 CTLA-4 的单克隆抗体，所述单克隆抗体包含

(1) 重链 HCDR1，其包含 SEQ ID NO:12 所示的序列，或由其组成，
重链 HCDR2，其包含 SEQ ID NO:13 所示的序列，或由其组成，
重链 HCDR3，其包含 SEQ ID NO:14 所示的序列，或由其组成，
轻链 LCDR1，其包含 SEQ ID NO:15 所示的序列，或由其组成，
轻链 LCDR2，其包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或由其组成，和
轻链 LCDR3，其包含 SEQ ID NO:17 所示的序列，或由其组成；

或

(2) 重链可变区，其包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，与所述序列具有至少 80%、90%、优选 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个保守氨基酸突变的氨基酸序列，或由其组成，和

轻链可变区，其包含 SEQ ID NO:19 所示的序列，与所述序列具有至少 80%、90%、优选 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个保守氨基酸突变的氨基酸序列，或由其组成；

其中，所述单克隆抗体 Fc 区的高甘露糖糖型总量<5%和/或唾液酸化糖型总量<3%。

2. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体，其包含重链和轻链，

所述重链包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列，与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 80%，至少 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同源性的序列，或由其组成；

所述轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有至少 80%，至少 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同源性的序列，或由其组成。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体，其中所述重链由 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列或与 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列具有至少 80%，至少 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同源性的核苷酸序列编码，所述轻链由 SEQ ID NO:4 所示的核苷酸序列或与 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列具有至少 80%，至少 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同源性的核苷酸序列编码。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的单克隆抗体，其中所述单克隆抗体 Fc 区的岩藻糖基化水平为 0%-5%。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的单克隆抗体，其由敲除 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因的细胞表达。

6. 药物组合物或融合蛋白，其包含权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体。
7. 多特异性抗体（例如双特异性抗体），其包含权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体，以及针对其他抗原和/或其他抗原表位的抗体或抗原结合片段。
8. 试剂盒，其包括权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体，权利要求 7 所述的多特异性抗体或权利要求 6 所述的融合蛋白。
9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒，其中所述试剂盒还包括第二抗体、细胞毒性剂、化疗剂或放疗剂，所述第二抗体特异性识别所述单克隆抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如荧光素、金属离子、生物素、放射性同位素、化学发光物质、酶或聚乙二醇。
10. 权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体，权利要求 6 所述的融合蛋白或权利要求 7 所述的多特异性抗体在制备用于治疗癌症或用于排斥可移植的肿瘤，例如黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、淋巴瘤或肾癌的药物中的应用。
11. 根据权利要求 10 所述的应用，其中所述药物配制成用于每个治疗周期内将抗 CTLA-4 抗体以 7 mg 至 180 mg 的剂量施用。
12. 根据权利要求 11 所述的应用，其中一个治疗周期为 1 周、2 周、3 周或 4 周。
13. 根据权利要求 10 所述的应用，其中所述药物配制成用于每次抗 CTLA-4 抗体给药量为 0.1 mg/kg-2.5 mg/kg。
14. 根据权利要求 13 所述的应用，其中每 1 周、2 周、3 周或 4 周给药 1 次。
15. 根据权利要求 10-14 任一项所述的应用，其中所述药物配制成用于静脉注射或皮下注射。
16. 一种液体制剂，其包含以下组分：
 - (1) 5-40 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段，
 - (2) 10-30 mM 缓冲剂，
 - (3) 200-260 mM 稳定剂，
 - (4) 0.02-0.2 mg/mL 螯合剂，

- (5) 0.1-0.4 mg/mL 表面活性剂,
 - (6) 水;
- 液体制剂的 pH 值为 5.4-6.2。

17. 根据权利要求 16 所述的制剂, 其中所述缓冲剂选自组氨酸缓冲剂、醋酸缓冲剂中的至少一种, 所述稳定剂选自海藻糖、蔗糖和甘露醇中的至少一种, 所述螯合剂包含依地酸二钠, 所述表面活性剂选自聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80 中的至少一种。

18. 根据权利要求 16 或 17 所述的液体制剂, 其中所述抗 CTLA-4 抗体或其片段包含 SEQ ID NO:12 所示的 HCDR1、SEQ ID NO:13 所示的 HCDR2、SEQ ID NO:14 所示的 HCDR3、SEQ ID NO:15 所示的 LCDR1、SEQ ID NO:16 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO:17 所示的 LCDR3; 或

其中所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的重链可变区包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或与所述 SEQ ID NO:18 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列, 所述抗 CTLA-4 抗体或其片段的轻链可变区包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或与所述 SEQ ID NO:19 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

19. 根据权利要求 16-18 任一项所述的制剂, 其中所述抗 CTLA-4 抗体的重链包含 SEQ ID NO:1 所示的序列, 与 SEQ ID NO:1 所示序列具有至少 80% 同一性的序列, 或与 SEQ ID NO:1 所示序列相比具有一或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列; 和/或,

所述抗 CTLA-4 抗体的轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的序列, 与 SEQ ID NO:2 所示序列具有至少 80% 同一性的序列, 或与 SEQ ID NO:2 所示序列相比具有一或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

20. 根据权利要求 16-19 任一项所述的制剂, 其中所述抗 CTLA-4 抗体或其片段为单克隆抗体, 所述抗 CTLA-4 抗体或其片段中岩藻糖基化水平 $\leq 5\%$, 高甘露糖糖型总量 $< 5\%$, 唾液酸化糖型总量 $< 3\%$ 。

21. 根据权利要求 16-20 任一项所述的制剂, 其中所述抗 CTLA-4 抗体由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞表达。

22. 根据权利要求 16-21 任一项所述的液体制剂, 其中所述液体制剂包含 7-15 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段。

23. 根据权利要求 16-22 任一项所述的液体制剂, 其中所述液体制剂包含 17-23 mM 组氨

酸缓冲剂。

24. 根据权利要求 16-23 任一项所述的液体制剂，其中所述液体制剂包含 220-250 mM 蔗糖。

25. 根据权利要求 16-24 任一项所述的液体制剂，其中所述液体制剂包含 0.02-0.05 mg/mL 依地酸二钠。

26. 根据权利要求 16-25 任一项所述的液体制剂，其中所述液体制剂包含 0.1-0.3 mg/mL 聚山梨酯 80。

27. 一种液体制剂，其包含以下组分：

- (1) 10 mg/mL 抗 CTLA-4 抗体或其片段，
- (2) 20 mM 组氨酸缓冲剂，
- (3) 240 mM 蔗糖，
- (4) 0.033 mg/mL 依地酸二钠，
- (5) 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80，
- (6) 水；

液体制剂的 pH 值为 5.8。

28. 一种用于治疗肿瘤或癌症的方法，所述方法包括：向有需要的患者给药有效量的抗 CTLA-4 抗体；

所述抗 CTLA-4 抗体包含 SEQ ID NO:12 所示的 HCDR1、SEQ ID NO:13 所示的 HCDR2、SEQ ID NO:14 所示的 HCDR3、SEQ ID NO:15 所示的 LCDR1、SEQ ID NO:16 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO:17 所示的 LCDR3。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中所述抗 CTLA-4 抗体的重链包含 SEQ ID NO:1 所示的序列，与 SEQ ID NO:1 所示序列具有至少 80% 同一性的序列，或与 SEQ ID NO:1 所示序列相比具有一或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列；和/或

所述抗 CTLA-4 抗体的轻链包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，与 SEQ ID NO:2 所示序列具有至少 80% 同一性的序列，或与 SEQ ID NO:2 所示序列相比具有一或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

30. 根据权利要求 28 或 29 所述的方法，其中所述抗 CTLA-4 抗体的岩藻糖基化水平为 0-10%。

31. 根据权利要求 28 或 29 所述的方法，其中所述抗 CTLA-4 抗体由 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶基因敲除的细胞表达。

32. 根据权利要求 28-31 任一项所述的方法，其中所述肿瘤或癌症包括急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓性增生疾病/肿瘤、霍奇金淋巴瘤、无痛性和侵袭性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、巨细胞骨髓瘤、重链骨髓瘤、轻链或本斯-琼斯骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、黑素瘤、结直肠癌、肺癌、头颈癌、膀胱癌、食道癌、肝癌和肾癌。

33. 根据权利要求 28-31 任一项所述的方法，其中每个治疗周期内抗 CTLA-4 抗体给药的有效量为 7 mg 至 180 mg。

34. 根据权利要求 28-31 任一项所述的方法，其中一个治疗周期为 1 周、2 周、3 周或 4 周。

35. 根据权利要求 28-31 任一项所述的方法，其中所述抗 CTLA-4 抗体的每次给药量为 0.1 mg/kg-2.5 mg/kg。

36. 根据权利要求 28-31 任一项所述的方法，其中给药方式为静脉注射或皮下注射。

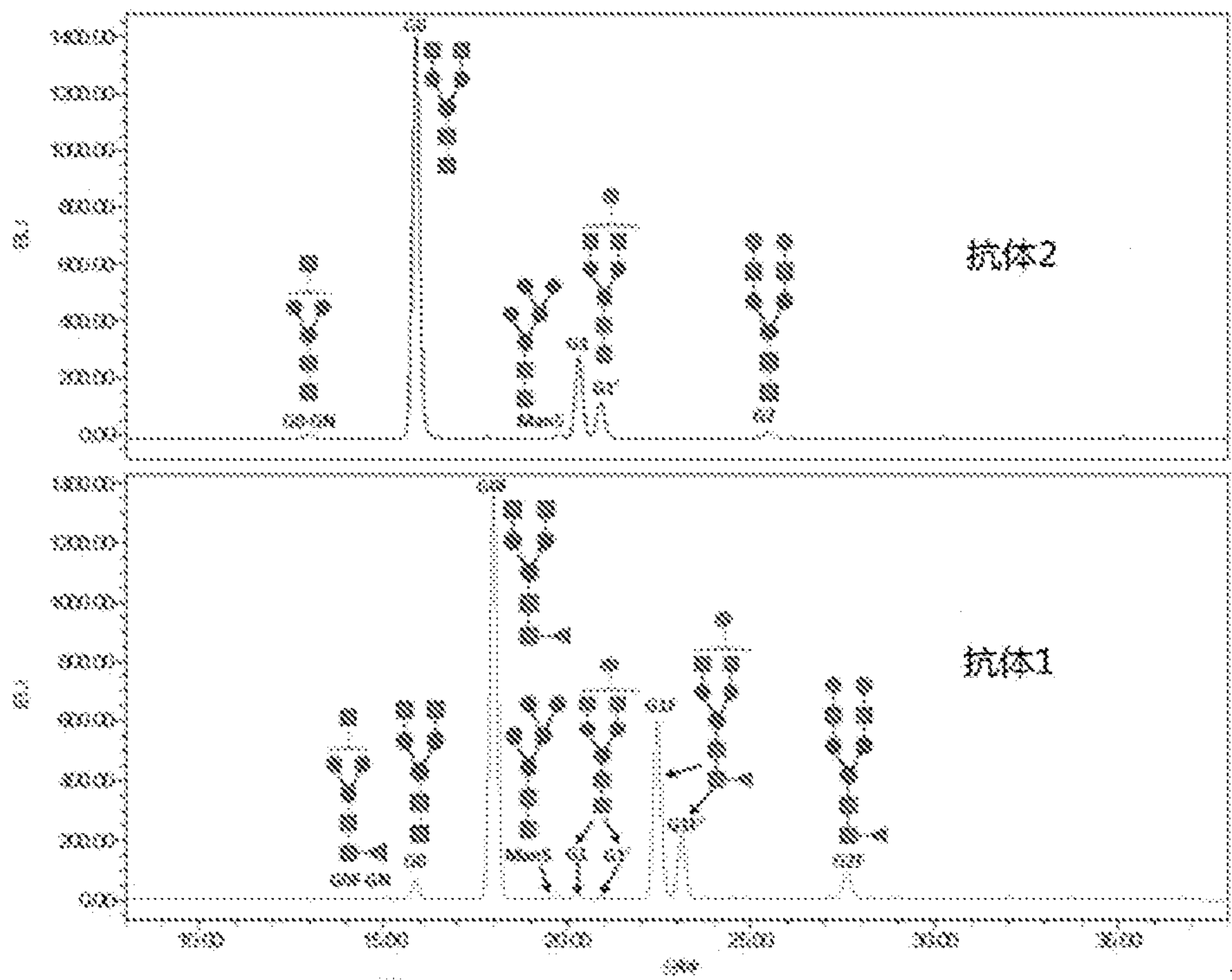
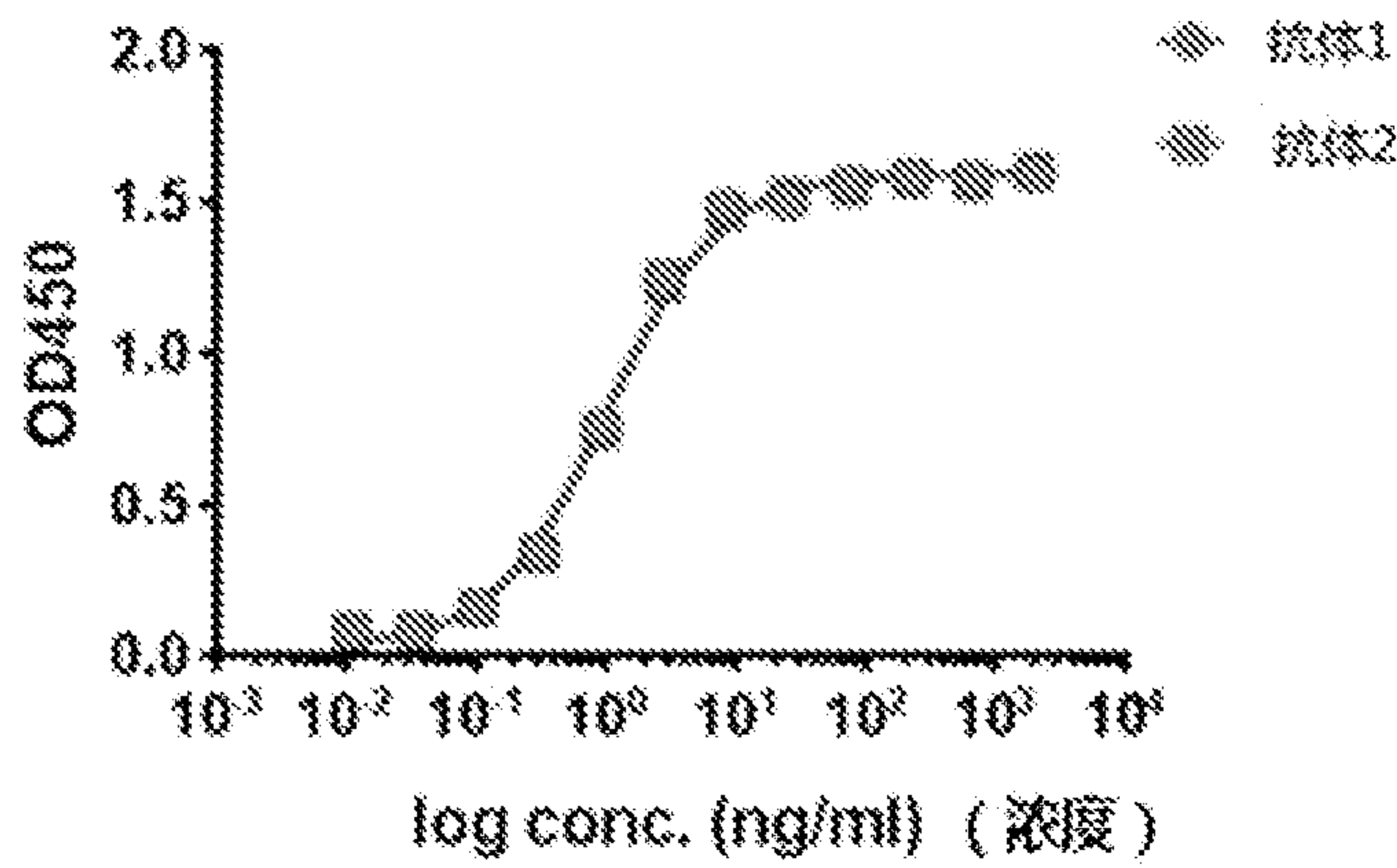


图 1



Sample	EC50 (ng/ml)
抗体1	1.04
抗体2	1.06

图 2

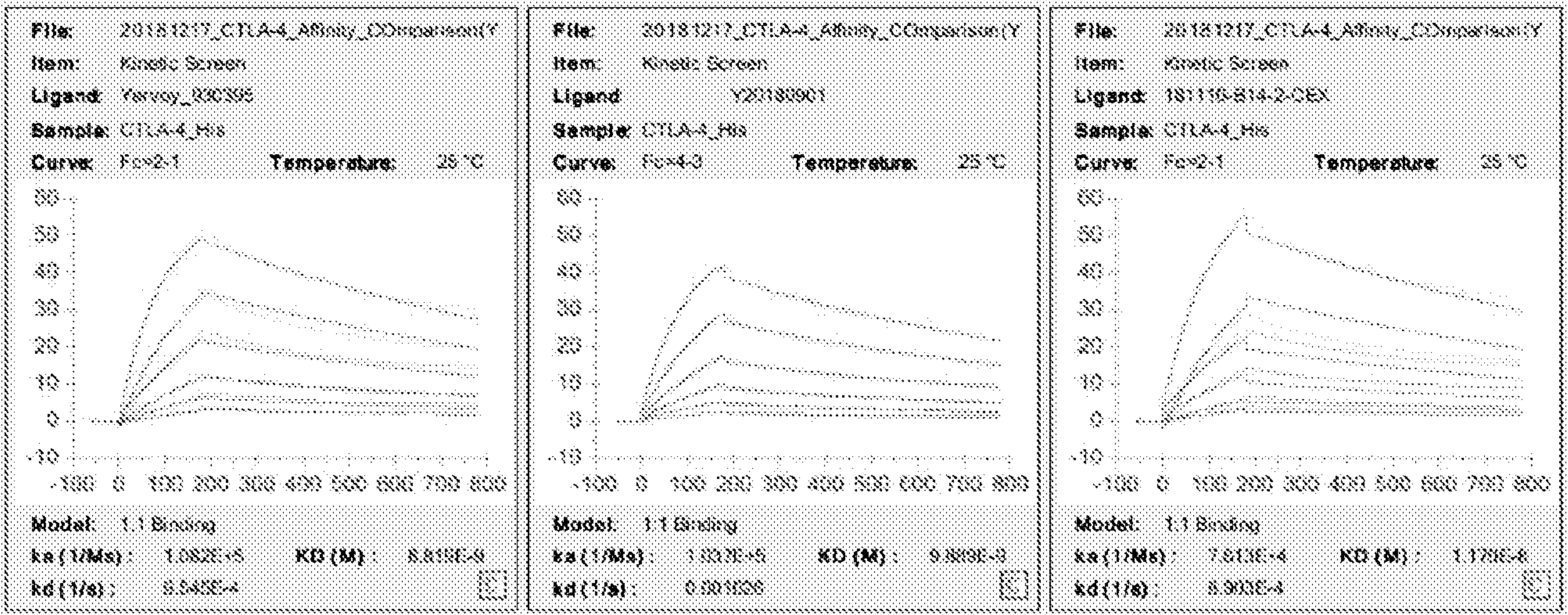


图 3

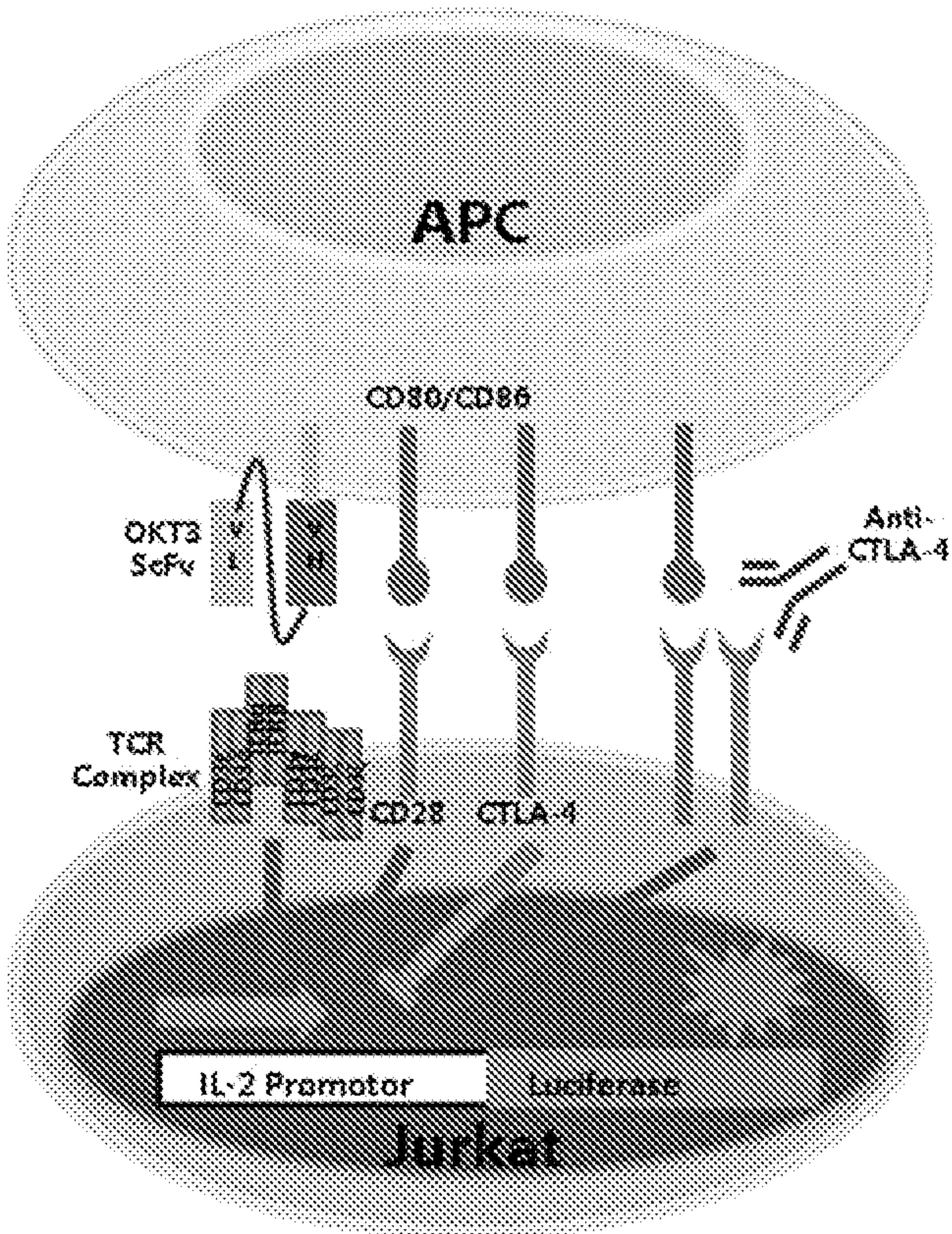


图 4

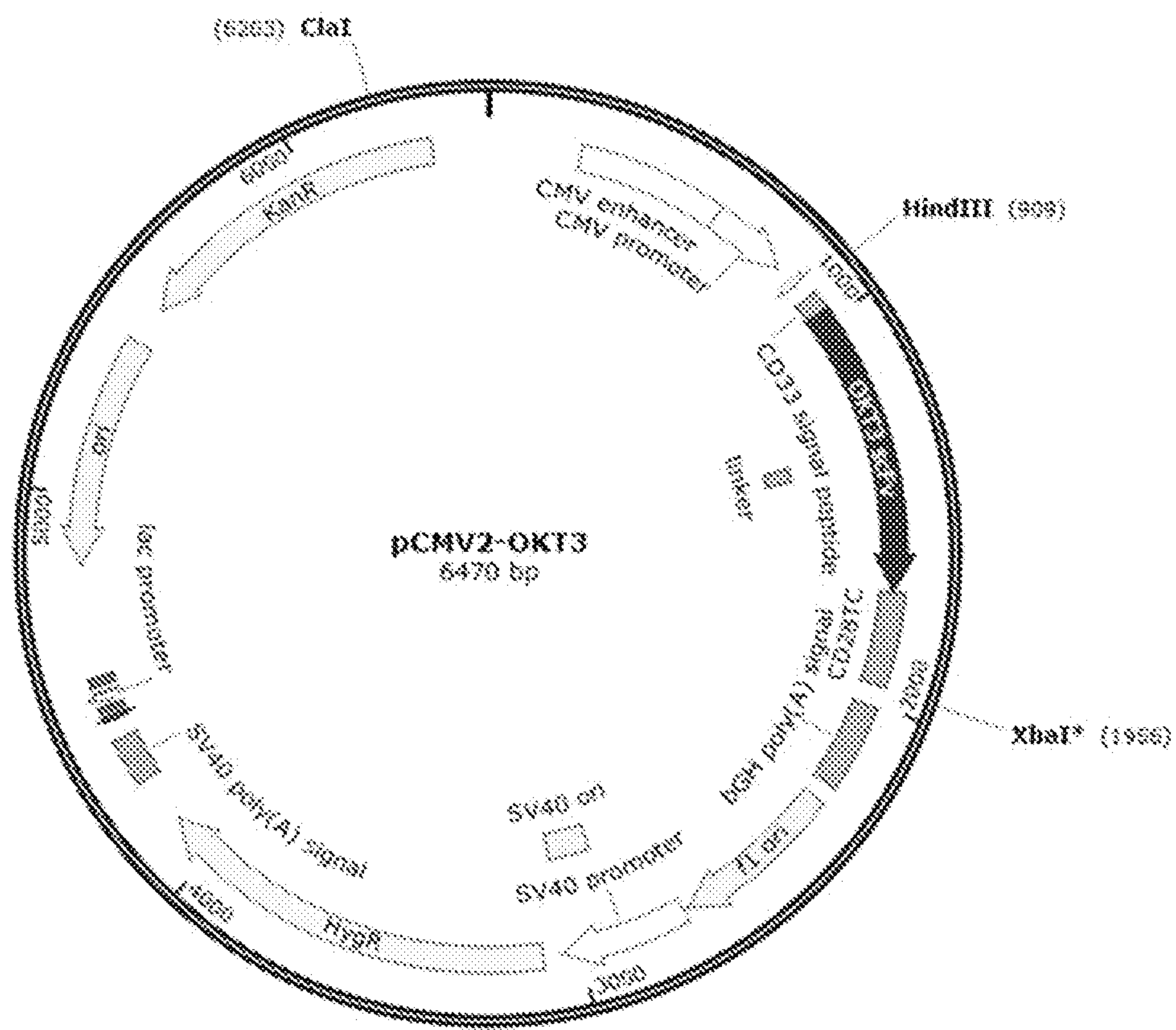
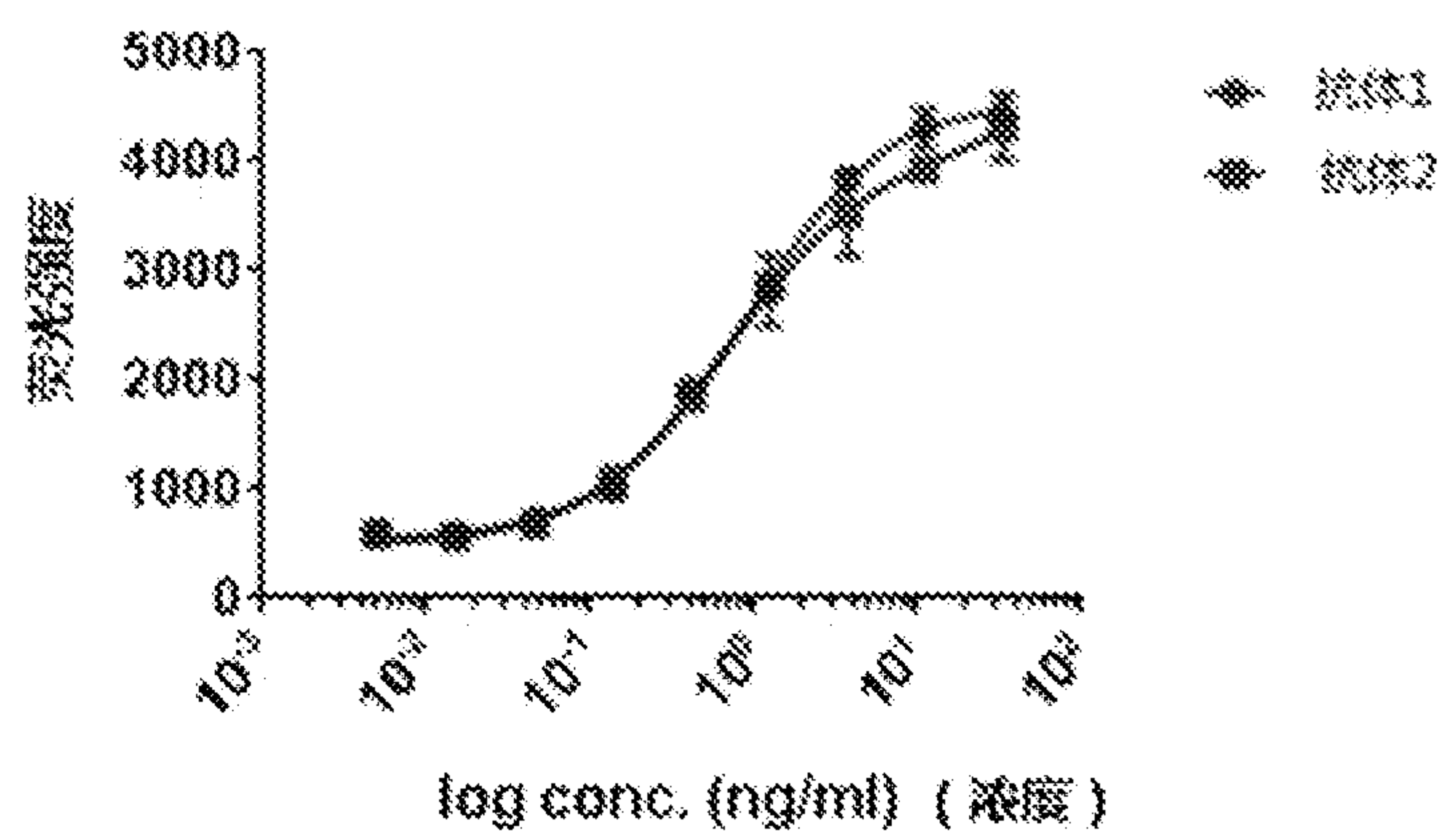


图 5



Sample	EC ₅₀ (ng/ml)
抗体 1	0.88
抗体 2	0.80

图 6

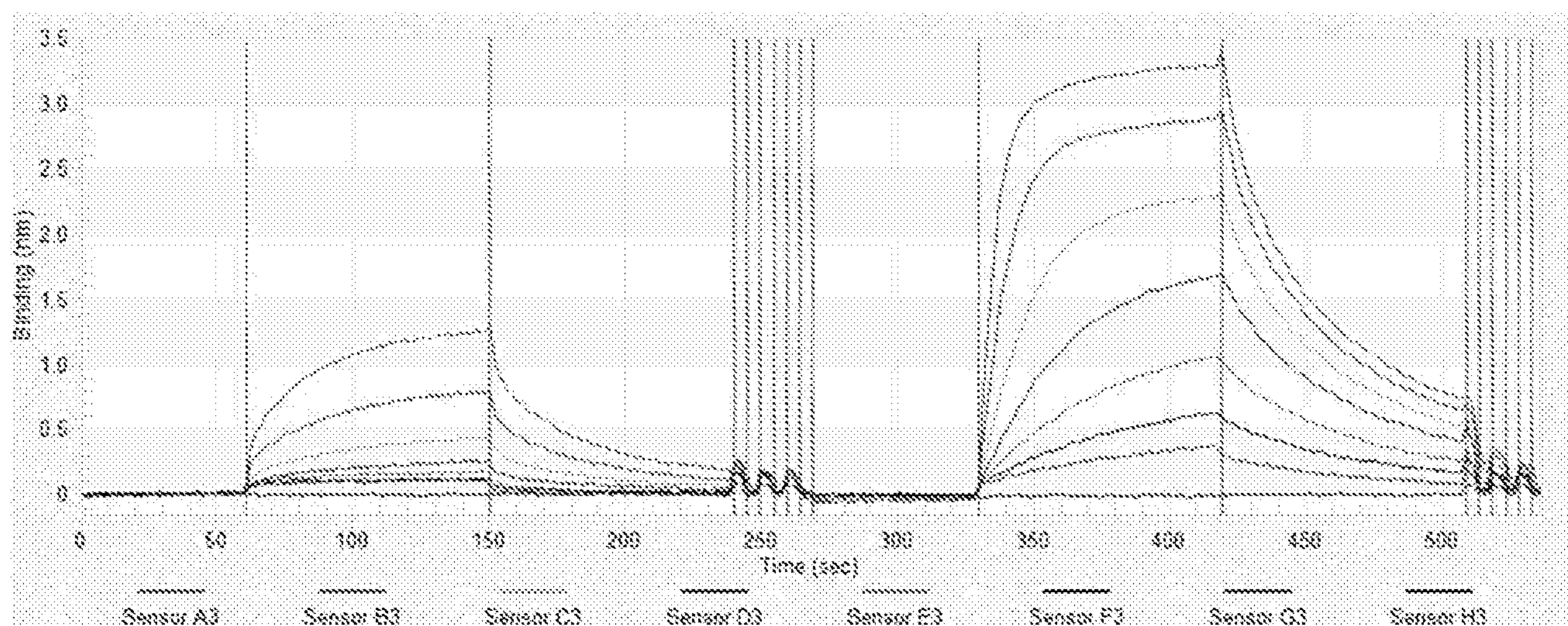


图 7

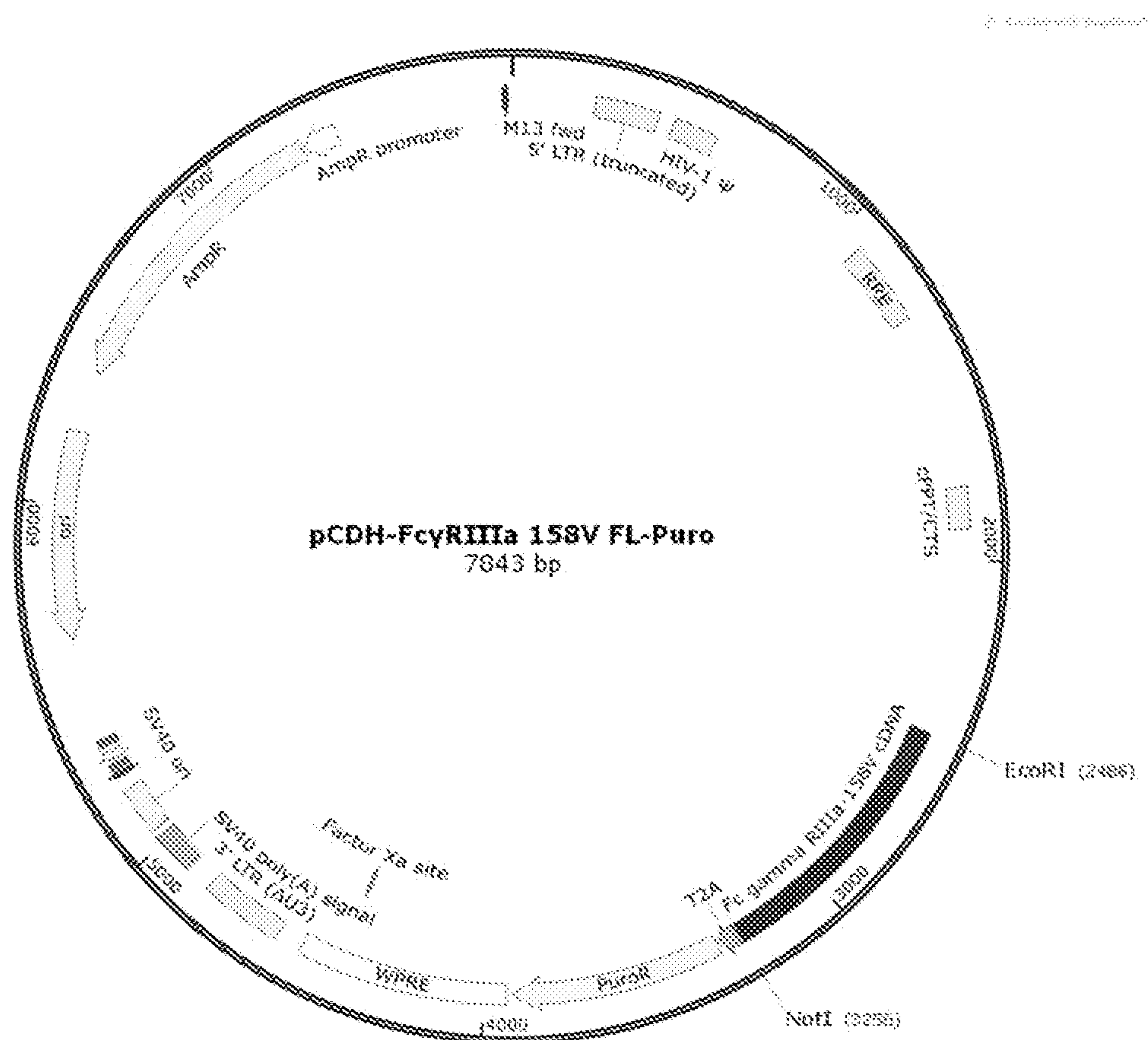


图 8

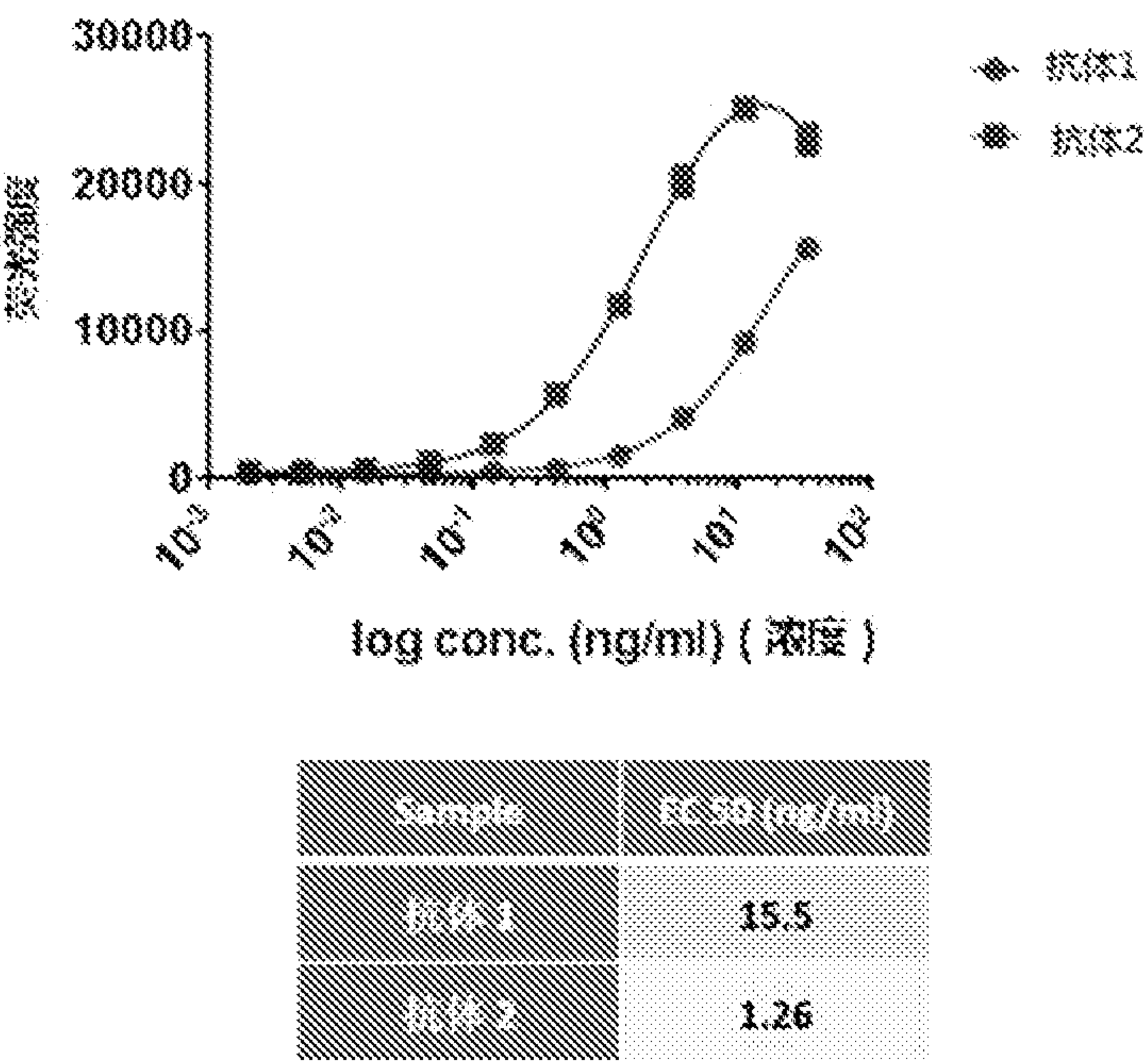


图 9

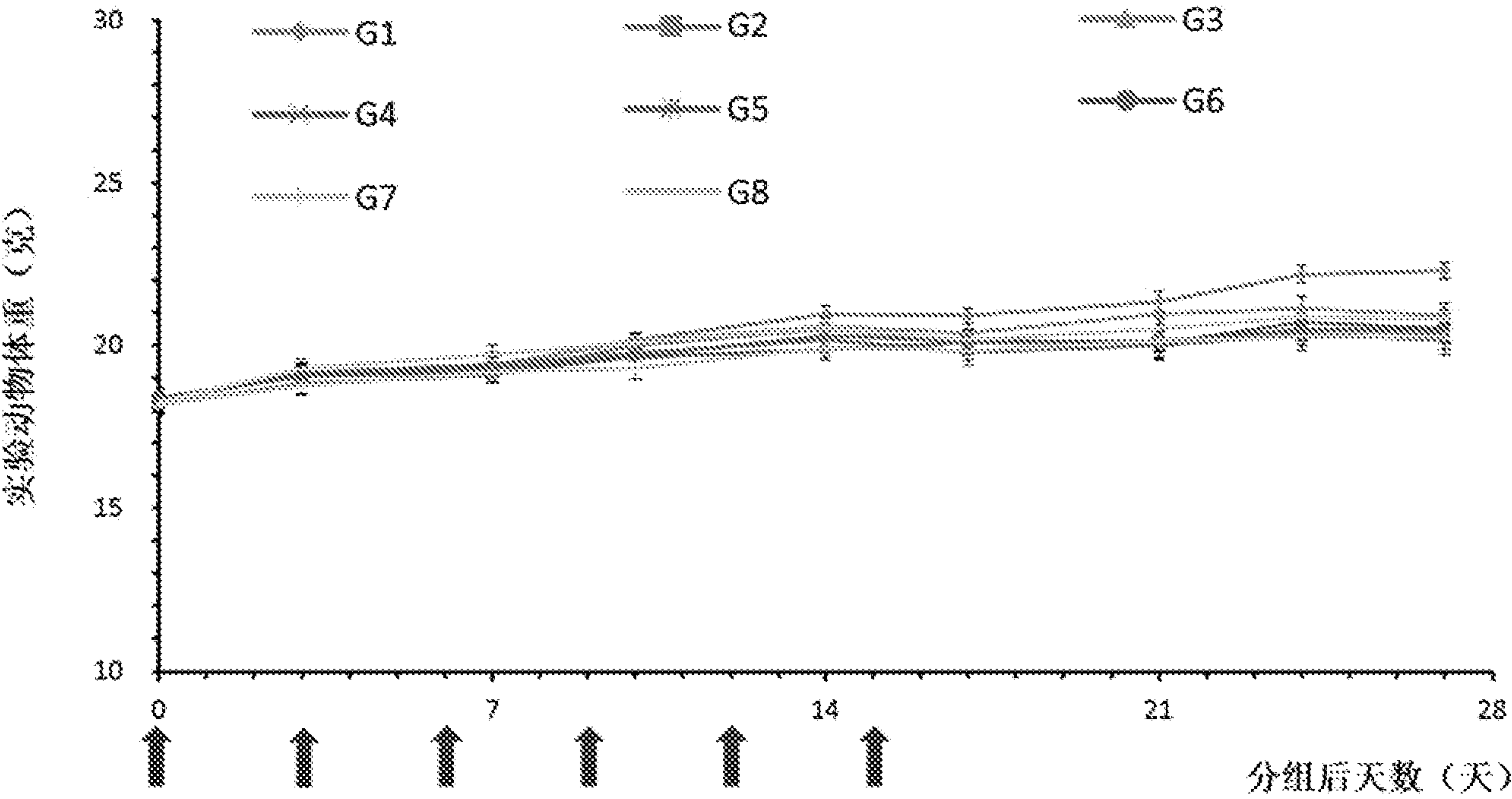


图 10A

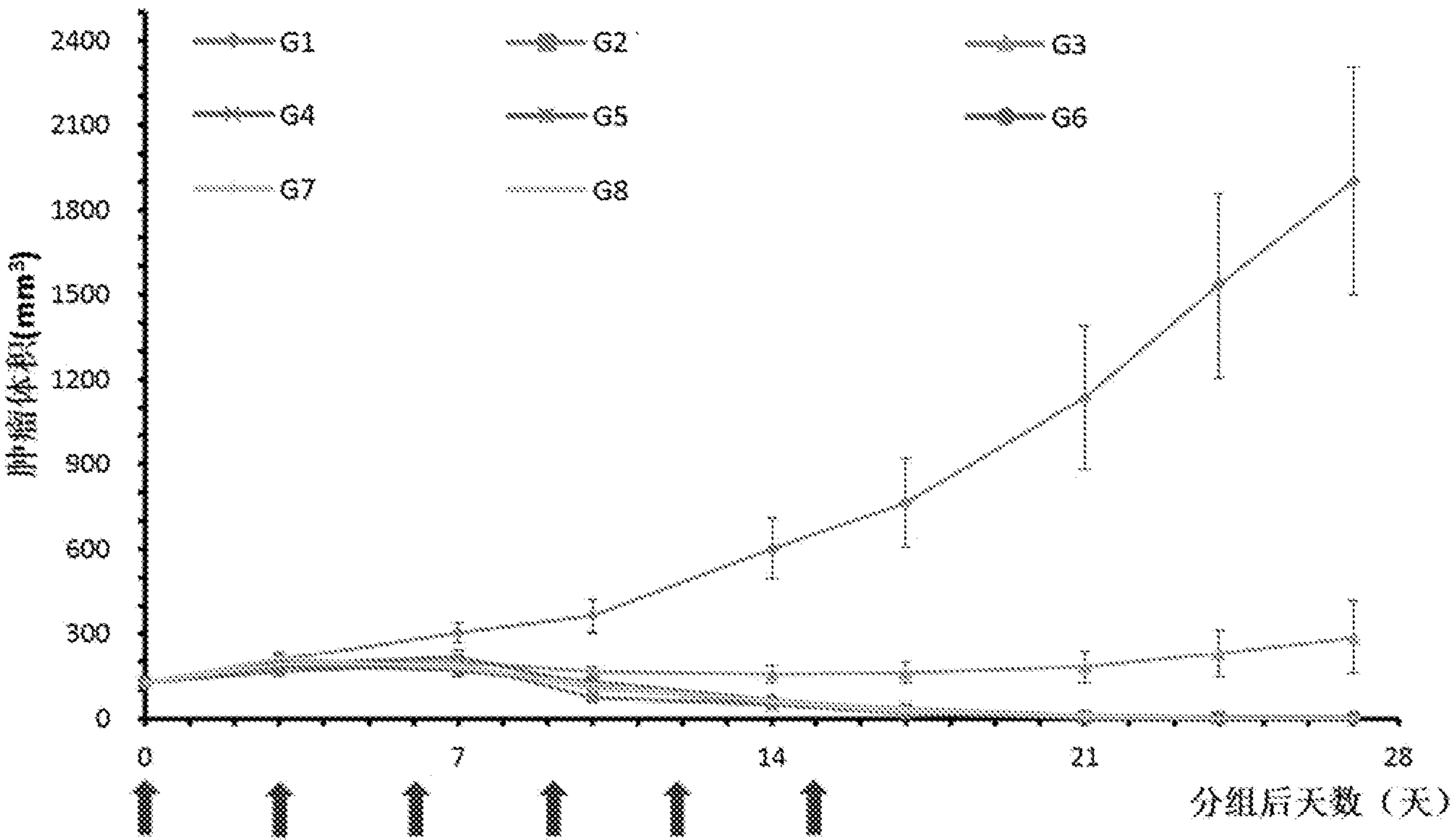


图 10B

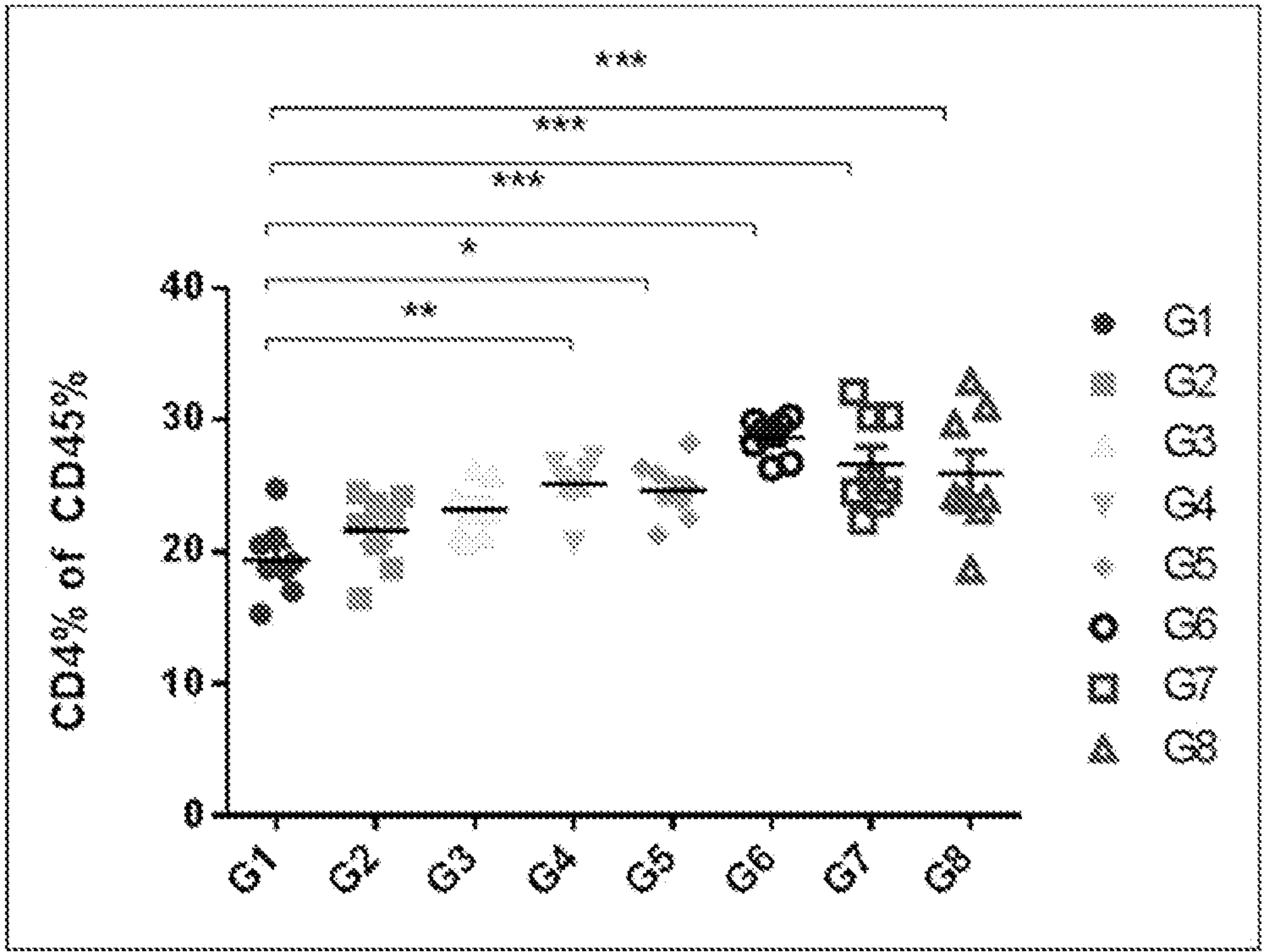


图 11A

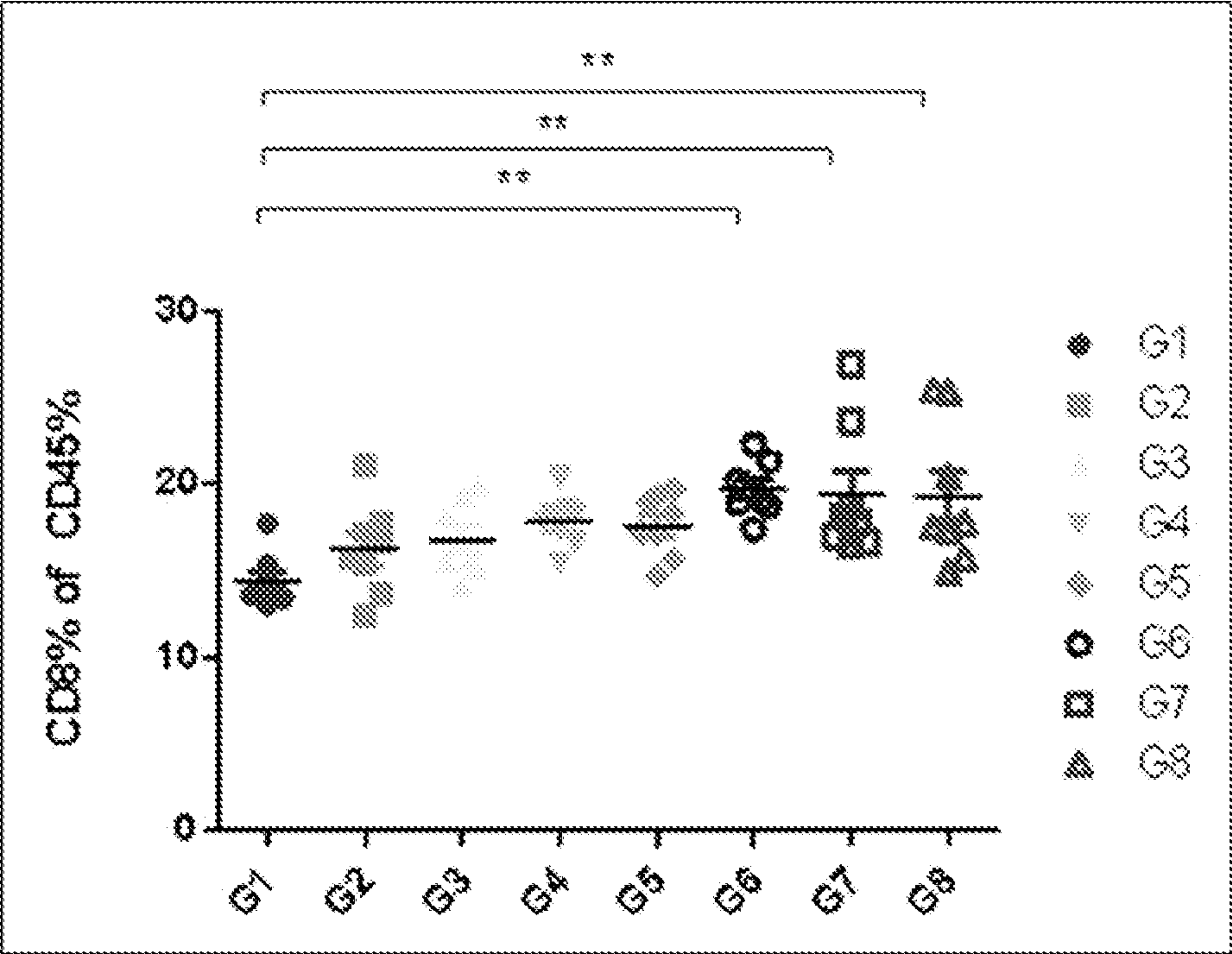


图 11B

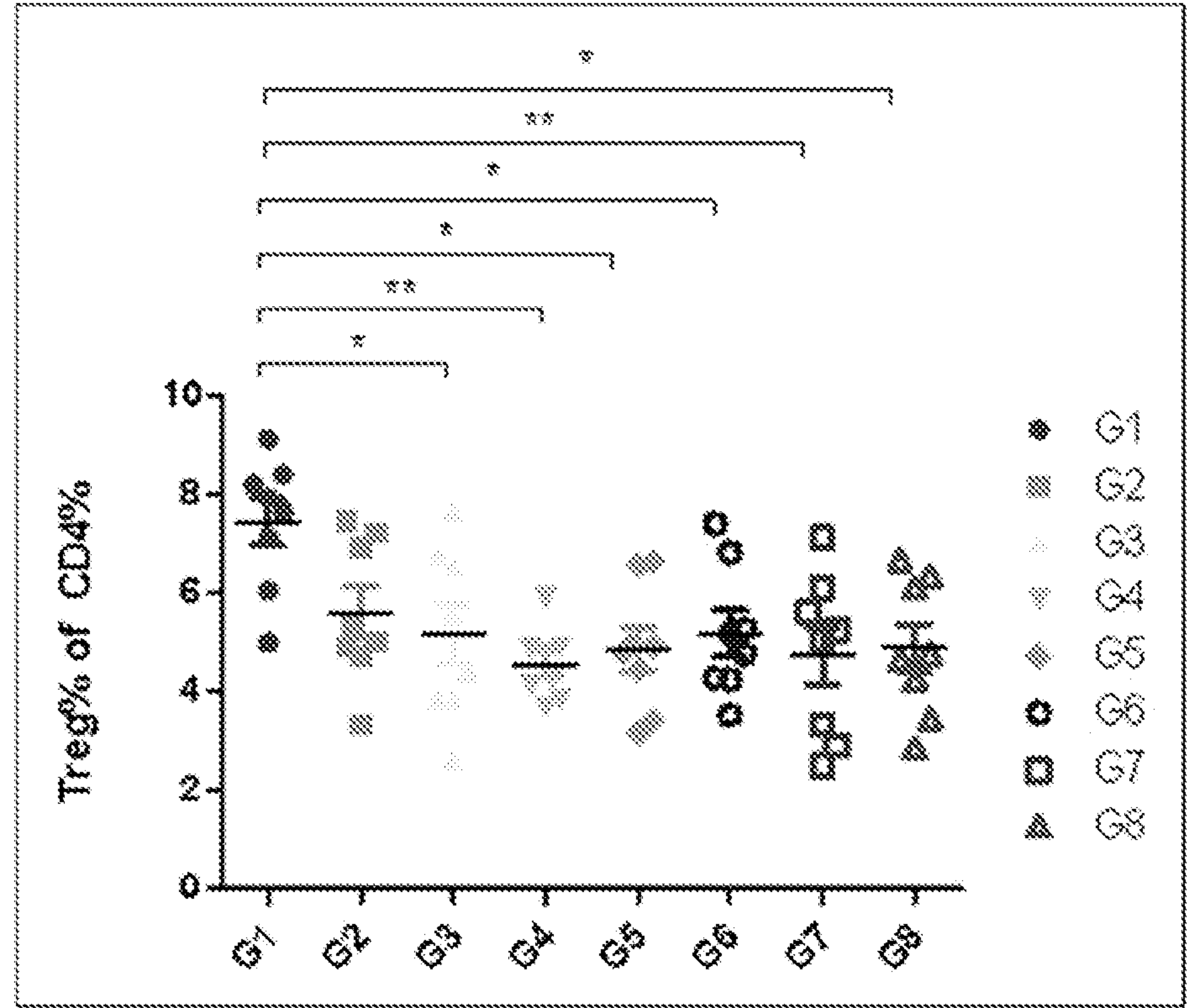


图 11C

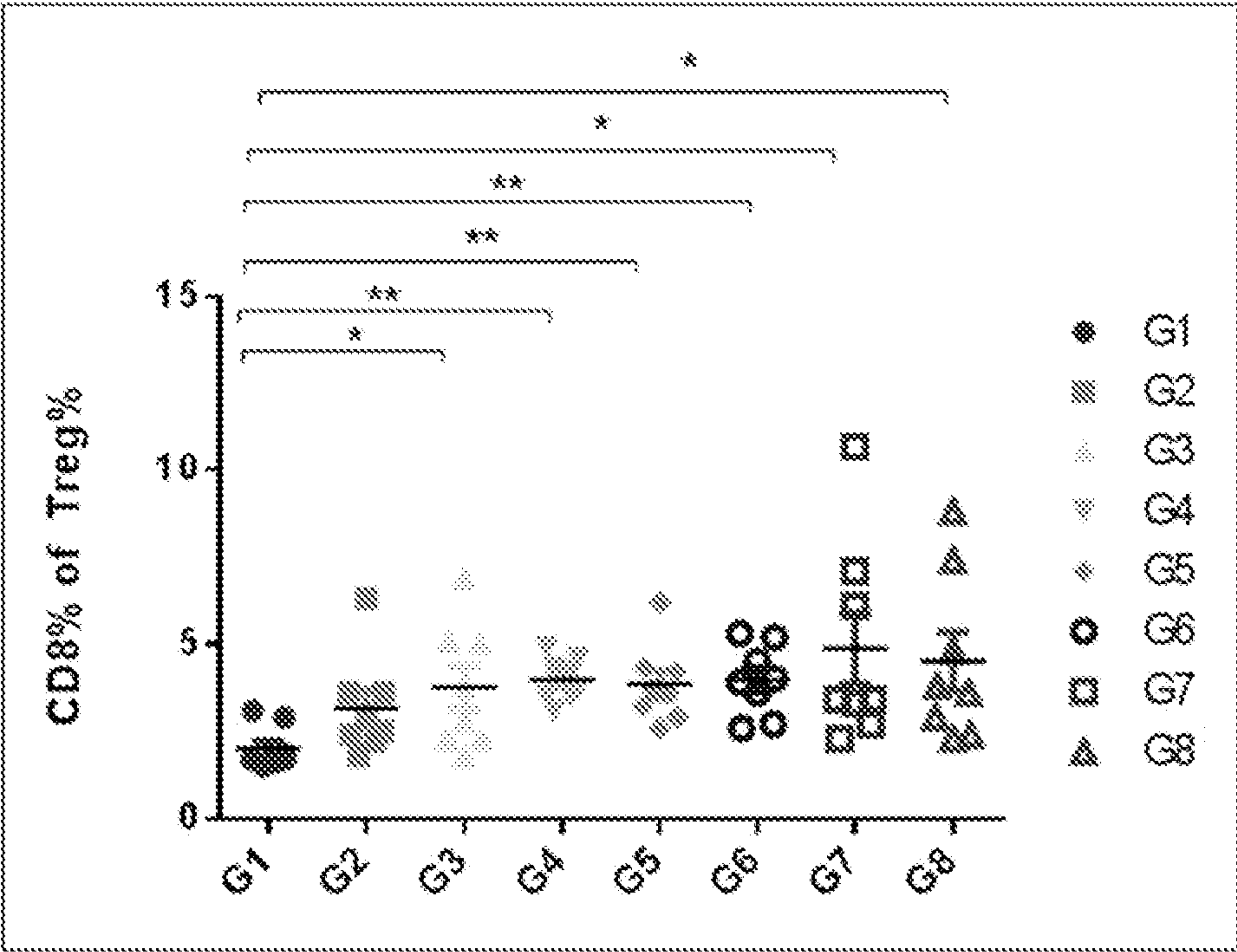


图 11D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/139205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, VEN, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATA, baidu学术, BAIDU XUESHU, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI web of knowledge, sciencedirect, NCBI, Genbank, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统, CHINESE PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE RETRIEVAL SYSTEM: CTLA-4, CTLA4, CTLA, 抗体, antibody+, 岩藻糖, 甘露糖, 唾液酸, fucosyl+, mannosyl, sialyl, FUT8, 2F-过乙酰基, 岩藻糖 s 转移酶, 岩藻糖 s 脱水酶, fucosyltransferase, CHO-BAT-KF, CHO-DG44, CHO-K1, 组氨酸, HIS, 醋酸, HAC, 缓冲, buffer, 海藻糖, 蔗糖, 甘露醇, trehalose, mannitol, sucrose, 依地酸二钠, 乙二胺四乙酸二钠, disodium edetate, EDTA, EDTA-2NA, EDTA-NA2, NA2EDTA, 聚山梨酯20, 聚山梨酯80, 聚山梨酯-20, 聚山梨酯-80, TW20, TW80, TW-20, TW-80, 吐温20, 吐温80, 吐温-20, 吐温-80, TWEEN-20, TWEEN-80, TWEEN20, TWEEN80, 百奥泰生物制药股份有限公司, bio-thera solutions, 苏紫琪, 秦超, 俞金泉, 黄丹丹, 吴用, 曹迪, 刘翠华, 宋述强, 李胜峰, SEQ ID NO:1-2/12-19

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110366565 A (BRISTOL- MYERS SQUIBB COMPANY) 22 October 2019 (2019-10-22) claims 5 and 16, description, paragraphs [0032], [0063], [0064], [0098]-[0101] and [0109], and table 3	28-36
Y	CN 110366565 A (BRISTOL- MYERS SQUIBB COMPANY) 22 October 2019 (2019-10-22) claims 5 and 16, description, paragraphs [0032], [0063], [0064], [0098]-[0101] and [0109], and table 3	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 March 2021	Date of mailing of the international search report 29 March 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	徐云霞 (XU, Yunxia). "N-糖基化修饰对人源化IgG抗体药物生产细胞株筛选的重要性 (N-Glycosylation Profiling Plays A Critical Role in Pharmaceutical Human IgG Producing Cell Line Development)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊)医药卫生科技辑 (Medicine & Public Health, Chinese Master's Theses Full-text Database (Electronic Journals)), No. 03, 15 March 2016 (2016-03-15), pages 5 and 8	1-15, 20-26
Y	CN 107881160 A (BIO-THERA SOLUTIONS, LTD.) 06 April 2018 (2018-04-06) claims 10, 11, 14 and 15, description, paragraphs [0038]-[0048], and embodiments 1-13	1-15, 20-26
Y	CN 107446050 A (BIO-THERA SOLUTIONS, LTD.) 08 December 2017 (2017-12-08) claims 1 and 2, and description, paragraph [0032]	1-15, 20-26
Y	CN 107899020 A (BIO-THERA SOLUTIONS, LTD.) 13 April 2018 (2018-04-13) claims 1 and 2	1-15, 20-26
Y	WO 2019/152413 A1 (ONCOIMMUNE, INC. et al.) 08 August 2019 (2019-08-08) description, paragraph [0082]	1-15, 20-26
X	CN 101325968 A (PHARMACIA & UPJOHN CO., LLC.) 17 December 2008 (2008-12-17) claims 17-20, and description, pages 6, 8-10, 33, 37 and 42-60, and embodiments 9 and 10	16-19, 22-27
Y	CN 101325968 A (PHARMACIA & UPJOHN CO., LLC.) 17 December 2008 (2008-12-17) claims 17-20, and description, pages 6, 8-10, 33, 37 and 42-60, and embodiments 9 and 10	20, 21
A	CN 102216452 A (EUREKA THERAPEUTICS INC.) 12 October 2011 (2011-10-12) entire document	1-36
PY	WO 2020/249063 A1 (BIO-THERA SOLUTIONS, LTD.) 17 December 2020 (2020-12-17) description, paragraphs [0013]-[0019], [0072], [0076]-[0079] and [0084]-[0092], and claim 20	1-15, 20-26
PY	WO 2020/214748 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 22 October 2020 (2020-10-22) description, pages 6, 7 and 30-32	1-15, 20-26
PY	WO 2020/139926 A2 (AKREVIA THERAPEUTICS INC.) 02 July 2020 (2020-07-02) claim 35 and 42-47, and description, paragraph [0023]	1-15, 20-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/139205

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **28-36**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 28-36 relate to a method for the treatment of tumors or cancer, i.e., claims 28-36 relate to a method of treatment of the human or animal body by surgery or therapy, and therefore do not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). An international search is made on the basis of the use of anti-CTLA-4 antibodies in the preparation of drugs for the treatment of tumors or cancer.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/139205

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110366565	A	22 October 2019	IL	268881	D0	31 October 2019
				AU	2018227428	A1	17 October 2019
				EP	3596122	A1	22 January 2020
				BR	112019017695	A2	07 April 2020
				WO	2018160536	A1	07 September 2018
				SG	11201907867T	A	27 September 2019
				MX	2019009660	A	02 October 2019
				US	2019382490	A1	19 December 2019
				KR	20190124256	A	04 November 2019
				JP	2020509037	A	26 March 2020
				CA	3054928	A1	07 September 2018
CN	107881160	A	06 April 2018	EP	3666891	A1	17 June 2020
				CN	110157694	A	23 August 2019
				US	2020199236	A1	25 June 2020
				JP	2020534862	A	03 December 2020
				CN	110157694	B	27 October 2020
				CA	3070741	A1	14 February 2019
				AU	2018315371	A1	13 February 2020
				WO	2019029713	A1	14 February 2019
				CN	109096399	A	28 December 2018
				SG	11202000679X	A	27 February 2020
CN	107446050	A	08 December 2017	AU	2018267660	C1	12 November 2020
				CN	111087471	A	01 May 2020
				JP	2020503243	A	30 January 2020
				EP	3464381	A1	10 April 2019
				AU	2018267660	A1	28 February 2019
				CN	110526978	A	03 December 2019
				CN	111018992	A	17 April 2020
				WO	2019029715	A1	14 February 2019
				AU	2018267660	B2	07 May 2020
				US	2019048095	A1	14 February 2019
				CN	109078181	A	25 December 2018
				CN	109078181	B	05 November 2019
				EP	3464381	A4	11 December 2019
				CA	3038423	A1	14 February 2019
CN	107899020	A	13 April 2018	WO	2019029628	A1	14 February 2019
WO	2019/152413	A1	08 August 2019	EP	3746122	A1	09 December 2020
				CN	112135632	A	25 December 2020
				CA	3089704	A1	08 August 2019
				AU	2019216228	A1	13 August 2020
				IL	276446	D0	30 September 2020
				SG	11202007018Q	A	28 August 2020
				TW	201945029	A	01 December 2019
CN	101325968	A	17 December 2008	ZA	200707293	A	29 April 2009
				ZA	200707194	A	30 July 2008
				ZA	200707293	B	29 April 2009
				ZA	200707194	B	30 July 2008
				AR	099084	A2	29 June 2016
				CN	101325968	B	23 April 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/139205

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				CN	101193917	A		04 June 2008	
CN	102216452	A	12 October 2011	EP	2340305	A1		06 July 2011	
				CN	102216452	B		21 August 2013	
				US	2010081794	A1		01 April 2010	
				US	8025879	B2		27 September 2011	
				JP	2012503656	A		09 February 2012	
				US	8080415	B2		20 December 2011	
				US	2010081150	A1		01 April 2010	
				KR	20110084196	A		21 July 2011	
				US	2010081195	A1		01 April 2010	
				US	2012107874	A1		03 May 2012	
				US	8084222	B2		27 December 2011	
				US	2010081172	A1		01 April 2010	
				WO	2010036443	A1		01 April 2010	
WO	2020/249063	A1	17 December 2020	None					
WO	2020/214748	A1	22 October 2020	None					
WO	2020/139926	A2	02 July 2020	WO	2020139920	A2		02 July 2020	
				WO	2020139920	A3		06 August 2020	
				WO	2020139926	A3		06 August 2020	

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2020/139205
A. 主题的分类 A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K A61P C07K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, VEN, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, baidu学术, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI web of knowledge, sciencedirect, NCBI, Genbank, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统: CTLA-4, CTLA4, CTLA, 抗体, antibody+, 岩藻糖, 甘露糖, 唾液酸, fucosyl+, mannosyl, sialyl, FUT8, 2F-过乙酰基, 岩藻糖 s 转移酶, 岩藻糖 s 脱水酶, fucosyltransferase, CHO-BAT-KF, CHO-DG44, CHO-K1, 组氨酸, HIS, 醋酸, HAC, 缓冲, buffer, 海藻糖, 蔗糖, 甘露醇, trehalose, mannitol, sucrose, 依地酸二钠, 乙二胺四乙酸二钠, disodium edetate, EDTA, EDTA-2NA, EDTA-NA2, NA2EDTA, 聚山梨酯20, 聚山梨酯80, 聚山梨酯-20, 聚山梨酯-80, TW20, TW80, TW-20, TW-80, 吐温20, 吐温80, 吐温-20, 吐温-80, TWEEN-20, TWEEN-80, TWEEN20, TWEEN80, 百奥泰生物制药股份有限公司, bio-thera solutions, 苏紫琪, 秦超, 俞金泉, 黄丹丹, 吴用, 曹迪, 刘翠华, 宋述强, 李胜峰, SEQ ID NO:1-2/12-19		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 110366565 A (百时美施贵宝公司) 2019年 10月 22日 (2019 - 10 - 22) 权利要求5, 16, 说明书第0032, 0063-0064, 0098-0101, 0109段, 表3	28-36
Y	CN 110366565 A (百时美施贵宝公司) 2019年 10月 22日 (2019 - 10 - 22) 权利要求5, 16, 说明书第0032, 0063-0064, 0098-0101, 0109段, 表3	1-15
Y	徐云霞. "N-糖基化修饰对人源化IgG抗体药物生产细胞株筛选的重要性" 中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊)医药卫生科技辑, 第03期, 2016年 3月 15日 (2016 - 03 - 15), 第5, 8页	1-15, 20-26
Y	CN 107881160 A (百奥泰生物科技广州有限公司) 2018年 4月 6日 (2018 - 04 - 06) 权利要求10, 11, 14-15, 说明书第0038-0048, 实施例1-13	1-15, 20-26
Y	CN 107446050 A (百奥泰生物科技广州有限公司) 2017年 12月 8日 (2017 - 12 - 08) 权利要求1-2, 说明书第0032段	1-15, 20-26
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年 3月 9日		国际检索报告邮寄日期 2021年 3月 29日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 郝佳 电话号码 86-(10)-53961967

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 107899020 A (百奥泰生物科技广州有限公司) 2018年 4月 13日 (2018 - 04 - 13) 权利要求1-2	1-15, 20-26
Y	WO 2019/152413 A1 (ONCOIMMUNE, INC. 等) 2019年 8月 8日 (2019 - 08 - 08) 说明书第[0082]段	1-15, 20-26
X	CN 101325968 A (法玛西雅厄普约翰有限责任公司) 2008年 12月 17日 (2008 - 12 - 17) 权利要求17-20, 说明书第6, 8-10, 33, 37, 42-60页, 实施例9-10	16-19, 22-27
Y	CN 101325968 A (法玛西雅厄普约翰有限责任公司) 2008年 12月 17日 (2008 - 12 - 17) 权利要求17-20, 说明书第6, 8-10, 33, 37, 42-60页, 实施例9-10	20-21
A	CN 102216452 A (尤里卡治疗公司) 2011年 10月 12日 (2011 - 10 - 12) 全文	1-36
PY	WO 2020/249063 A1 (BIO-THERA SOLUTIONS, LTD.) 2020年 12月 17日 (2020 - 12 - 17) 说明书第0013-0019, 0072, 0076-0079, 0084-0092段, 权利要求20	1-15, 20-26
PY	WO 2020/214748 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2020年 10月 22日 (2020 - 10 - 22) 说明书第6-7, 30-32页	1-15, 20-26
PY	WO 2020/139926 A2 (AKREVIA THERAPEUTICS INC.) 2020年 7月 2日 (2020 - 07 - 02) 权利要求35, 42-47, 说明书第0023段	1-15, 20-26

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式
- b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)
2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见 (续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 28-36
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求28-36涉及一种用于治疗肿瘤或癌症的方法，即权利要求28-36涉及PCT细则39.1定义的
不要求国际检索单位检索的主题：（iv）处置人体或动物体的外科手术方法或治疗方法。国
际检索基于抗CTLA-4抗体在制备用于治疗肿瘤或癌症的药物中的用途作出。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告 关于同族专利的信息						国际申请号 PCT/CN2020/139205	
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110366565	A	2019年 10月 22日	IL	268881	D0	2019年 10月 31日
				AU	2018227428	A1	2019年 10月 17日
				EP	3596122	A1	2020年 1月 22日
				BR	112019017695	A2	2020年 4月 7日
				WO	2018160536	A1	2018年 9月 7日
				SG	11201907867T	A	2019年 9月 27日
				MX	2019009660	A	2019年 10月 2日
				US	2019382490	A1	2019年 12月 19日
				KR	20190124256	A	2019年 11月 4日
				JP	2020509037	A	2020年 3月 26日
				CA	3054928	A1	2018年 9月 7日
CN	107881160	A	2018年 4月 6日	EP	3666891	A1	2020年 6月 17日
				CN	110157694	A	2019年 8月 23日
				US	2020199236	A1	2020年 6月 25日
				JP	2020534862	A	2020年 12月 3日
				CN	110157694	B	2020年 10月 27日
				CA	3070741	A1	2019年 2月 14日
				AU	2018315371	A1	2020年 2月 13日
				WO	2019029713	A1	2019年 2月 14日
				CN	109096399	A	2018年 12月 28日
				SG	11202000679X	A	2020年 2月 27日
CN	107446050	A	2017年 12月 8日	AU	2018267660	C1	2020年 11月 12日
				CN	111087471	A	2020年 5月 1日
				JP	2020503243	A	2020年 1月 30日
				EP	3464381	A1	2019年 4月 10日
				AU	2018267660	A1	2019年 2月 28日
				CN	110526978	A	2019年 12月 3日
				CN	111018992	A	2020年 4月 17日
				WO	2019029715	A1	2019年 2月 14日
				AU	2018267660	B2	2020年 5月 7日
				US	2019048095	A1	2019年 2月 14日
				CN	109078181	A	2018年 12月 25日
				CN	109078181	B	2019年 11月 5日
				EP	3464381	A4	2019年 12月 11日
				CA	3038423	A1	2019年 2月 14日
CN	107899020	A	2018年 4月 13日	WO	2019029628	A1	2019年 2月 14日
WO	2019/152413	A1	2019年 8月 8日	EP	3746122	A1	2020年 12月 9日
				CN	112135632	A	2020年 12月 25日
				CA	3089704	A1	2019年 8月 8日
				AU	2019216228	A1	2020年 8月 13日
				IL	276446	D0	2020年 9月 30日
				SG	11202007018Q	A	2020年 8月 28日
				TW	201945029	A	2019年 12月 1日
CN	101325968	A	2008年 12月 17日	ZA	200707293	A	2009年 4月 29日
				ZA	200707194	A	2008年 7月 30日
				ZA	200707293	B	2009年 4月 29日
				ZA	200707194	B	2008年 7月 30日
				AR	099084	A2	2016年 6月 29日
				CN	101325968	B	2014年 4月 23日

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2020/139205			
检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	
				CN	101193917	A	2008年 6月 4日
CN	102216452	A	2011年 10月 12日	EP	2340305	A1	2011年 7月 6日
				CN	102216452	B	2013年 8月 21日
				US	2010081794	A1	2010年 4月 1日
				US	8025879	B2	2011年 9月 27日
				JP	2012503656	A	2012年 2月 9日
				US	8080415	B2	2011年 12月 20日
				US	2010081150	A1	2010年 4月 1日
				KR	20110084196	A	2011年 7月 21日
				US	2010081195	A1	2010年 4月 1日
				US	2012107874	A1	2012年 5月 3日
				US	8084222	B2	2011年 12月 27日
				US	2010081172	A1	2010年 4月 1日
				WO	2010036443	A1	2010年 4月 1日
WO	2020/249063	A1	2020年 12月 17日	无			
WO	2020/214748	A1	2020年 10月 22日	无			
WO	2020/139926	A2	2020年 7月 2日	WO	2020139920	A2	2020年 7月 2日
				WO	2020139920	A3	2020年 8月 6日
				WO	2020139926	A3	2020年 8月 6日