包含抗 PD-1/HER2 双特异性抗体的制剂及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及抗体制剂领域。更具体而言，本发明涉及包含重组的抗程序性死亡受体 1（PD-1）和抗人表皮生长因子受体 2（HER2）双特异性抗体（也称为抗 PD-1/HER2 双特异性抗体）的药物制剂，尤其是稳定的液体制剂，以及用于制备所述药物制剂的方法，以及所述药物制剂的治疗和／或预防用途。

背景技术

人表皮生长因子受体2(HER2)(也称为NEU、ERBB-2、CD340或p185)的过量表达与多种癌症相关联，这些癌症包括乳腺癌、卵巢癌、胃癌、子宫癌、黑色素瘤以及胆管癌等。例如，在侵袭性、转移性乳腺癌中、在具有高复发率和/或患者预后不良的乳腺癌中，均观察到了HER2过量表达。

治疗 HER2 过量表达癌症的一种方法是使用抑制 HER2 信号传导的抗 HER2 抗体。例如，曲妥珠单抗(trastuzumab)是阻断由 HER2 介导的细胞内信号传导的一种治疗性抗 HER2 抗体，并且被广泛用来治疗 HER2 过表达肿瘤。遗憾的是，其在临床应用中的抗肿瘤效果往往没有临床前实验那么好。在现有技术中，通常将抗 HER2 抗体与化疗药等联合用药 (Slamon DJ 等人，N Engl J Med, 344:783-792, 2001)。

近年来，随着对免疫检查点（immune checkpoint）分子的研究，发现免疫检查点的抑制性信号通路活化导致 T 淋巴细胞不能有效发挥对肿瘤的杀伤效应(Yao S, Zhu Y 和 Chen L., Advances in targeting cell surface signaling molecules for immune modulation. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(2):130-146)，这从一个方面导致了仅靶向肿瘤细胞上的靶点的药物（例如曲妥珠单抗）的抗肿瘤效果不佳。

程序性死亡蛋白-1（PD-1）是一种重要的免疫检查点蛋白，为 55 kDa I 型跨膜蛋白，主要诱导性表达于活化的 T 细胞表面，也表达于 B 细胞、NK 细胞、单核细胞、DC 细胞等细胞上。已鉴定到 PD-1 的两种细胞表面糖蛋白配体，分别为程序性死亡蛋白配体 1 (PD-L1)和程序性死亡蛋白配体 2 (PD-L2)。PD-1 的配体在许多癌细胞上高表达。PD-1 与 PD-1 的配体结合后可导致 T 细胞凋亡、免疫无应答、T 细胞“耗竭”和分泌 IL-10 等，因此，阻断 PD1 途径能在癌症患者中恢复 T 细胞功能(Sheridan, Nature Biotechnology 30(2012),729-730)。针对 PD-1 的单克隆抗体已有记载，例如，百时美施贵宝(BMS)公司的纳武单抗(Nivolumab)和默克(Merck)公司的派姆单抗(Pembrolizumab)。纳武单抗（商品名 OPDIVO®）为完全人源化的 IgG4 抗体分子，派姆单抗（商品名 KEYTRUDA®）为人源化 IgG4 抗体分子。所述抗 PD-1 单克隆抗体与 T 淋巴细胞上的 PD-1 结合后能够抑制 PD-1 与其配体 PD-L1 和 PD-L2 的结合，由此促进 T 淋巴细胞活化、增殖和产生免疫活化型细胞因子如 IL-2，并解除 PD-1 对具有抗肿瘤活性的 T 淋巴细胞免疫监视的抑制。

鉴于免疫检查点分子PD-1在调节免疫应答中的重要性，本发明人通过锐意研究，已获得了一种靶向PD-1且靶向HER2的抗PD-1/HER2双特异性抗体，它能够同时靶向肿瘤细胞上的

HER2且活化T淋巴细胞，具有在增强抗肿瘤作用的同时减少副作用的优势。所述抗PD-1/HER2双特异性抗体的专利申请号是PCT/CN2018/075851（申请日：2018年2月8日），其中构建并表达了由抗PD-1半抗体和抗HER2半抗体组成的抗PD-1/HER2双特异性抗体。对使用HCC1954人乳腺癌细胞接种免疫缺陷NCG小鼠产生的荷瘤小鼠施用抗PD-1/HER2双特异性抗体，结果表明，与施用抗HER2单克隆抗体或抗PD-1单克隆抗体相比较，抗PD-1/HER2双特异性抗体具有显著提高的抗肿瘤活性，能够显著缩小肿瘤体积。

本领域需要能够用来治疗、预防或延缓各种与HER2信号传导通路和PD-1信号传导通路相关的疾病的抗PD-1/HER2双特异性抗体制剂，且所述制剂的稳定性好，当在液体中调配时，液体溶液中的抗PD-1/HER2双特异性抗体不易分解、聚集或发生不希望的化学修饰等。

发明概述

本发明通过提供含有特异结合 PD-1 和 HER2 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的药物制剂来满足上述需求。本发明的抗体制剂除了能够使抗体以适于施用给受试者的方式调配之外，还能在储存以及后续使用期间维持其稳定性。

在一个方面，本发明提供了一种液体抗体制剂，其包含（i）抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白；（ii）缓冲剂，（iii）稳定剂，和（iv）表面活性剂。

本发明抗体制剂中的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含第一半抗体和第二半抗体，其中第一半抗体包含特异性结合 PD-1 的第一 VH/VL 单元并且第二半抗体包含特异性结合 HER2 的第二 VH/VL 单元。在一些实施方案中，所述抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白能够以至少约 $10^7\ M^{-1}$、优选地约 $10^8\ M^{-1}$ 和更优选地约 $10^9\ M^{-1}$ 或更强的亲和力常数与 T 淋巴细胞表面的 PD-1 结合，由此阻断 PD-1 与其配体的结合，促进 T 淋巴细胞活化、增殖和产生免疫活化型细胞因子如 IL-2；并以至少约 $10^7\ M^{-1}$、优选地约 $10^8\ M^{-1}$ 和更优选地约 $10^9\ M^{-1}$ 或更强的亲和力常数与肿瘤细胞表面的 HER2 结合，由此阻断由 HER2 介导的细胞内信号传导并发挥抗肿瘤作用。

在一个实施方案中，所述抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白为 PCT 申请号 PCT/CN2018/075851（申请日：2018 年 2 月 8 日）中公开的重组抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白。为了本申请的目的，该 PCT 申请的全部内容特此并入本文作为参考。在一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含第一半抗体和第二半抗体，其中第一半抗体包含特异性结合 PD-1 的第一 VH/VL 单元并且第二半抗体包含特异性结合 HER2 的第二 VH/VL 单元，其中所述第一 VH/VL 单元包含 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 10 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部重链 CDR 与轻链 CDR，并且其中所述第二 VH/VL 单元包含 SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 2 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部重链 CDR 与轻链 CDR。

在一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含第一半抗体和第二半抗体，其中第一半抗体包含特异性结合 PD-1 的第一 VH/VL 单元并且第二半抗体包含特异性结合 HER2 的第二 VH/VL 单元，其中所述第一 VH/VL 单元包含 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 10 的

成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列，并且其中所述第二 VH/VL 单元包含 SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 2 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列。

在一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含第一半抗体和第二半抗体，其中第一半抗体包含从 N 至 C 方向的 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 14 的重链序列或与之具有至少 90%, 95%, 98%或 99%同一性的重链序列，和从 N 至 C 方向的 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 4 的轻链序列或与之具有至少 90%, 95%, 98%或 99%同一性的轻链序列，并且其中第二半抗体包含从 N 至 C 方向的 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 8 的重链序列或与之具有至少 90%, 95%, 98%或 99%同一性的重链序列，和从 N 至 C 方向的 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4 的轻链序列或与之具有至少 90%, 95%, 98%或 99%同一性的轻链序列。

在一个实施方案中，所述抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白是在HEK293细胞或以HEK293细胞为基础改造而得到的 HEK293T、HEK293F、HEK293E 细胞；CHO 细胞或以 CHO 细胞为基础改造而得到的 CHO-S、CHO-dhfr$^-$、CHO/DG44、ExpiCHO 中重组表达的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的浓度为约 1-150 mg/ml。在另一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的浓度为约 10-100 mg/mL。在其他实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的浓度为约 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 mg/ml。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的缓冲剂的浓度为约5-50 mM。在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的缓冲剂的浓度为约10-30 mM，例如，约10、15、20、25、30 mM。

在一个实施方案中，所述缓冲剂选自组氨酸、盐酸组氨酸和它们的组合。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的稳定剂的浓度为约50-500 mM。在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的稳定剂的浓度为约100-400 mM，例如，约100、150、200、250、300、350、400 mM。

在一个实施方案中，所述稳定剂选自多元醇（例如，山梨醇）、糖类（例如，蔗糖、海藻糖）和它们的任意组合。

在又一个实施方案中，所述稳定剂选自多元醇（例如，山梨醇）、糖类（例如，蔗糖、海藻糖）和它们的任意组合与抗氧化剂的组合。在一个实施方案中，所述液体抗体制剂中稳定剂的总浓度为约50-500 mM，优选地总浓度为约100-400 mM，例如，约100、150、200、250、300、350、400 mM，其中抗氧化剂的浓度为约1-50 mM，优选地约5-40 mM，例如约5、10、20、30、40 mM。在一个实施方案中，所述抗氧化剂是甲硫氨酸。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的表面活性剂的浓度为约0.1-1 mg/ml。在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的表面活性剂的浓度为约0.2-0.8 mg/ml，例如约

0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mg/ml。

在一个实施方案中，所述表面活性剂是非离子型表面活性剂。在一个实施方案中，所述表面活性剂选自聚山梨酯类表面活性剂。在一个具体实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的表面活性剂是聚山梨酯-80。

在一个实施方案中，所述液体制剂的pH值为约5.0-6.5。在一些实施方案中，所述液体制剂的pH值为约5.0-6.5中的任意值，例如约5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4。

在一个实施方案中，所述液体制剂为药物制剂，优选为注射剂，更优选为皮下注射剂或静脉内注射剂。在一个实施方案中，所述液体制剂为静脉输注剂。

在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含:

（i）约 1-150 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;

（ii）约 5-50 mM 的组氨酸和／或盐酸组氨酸;

（iii）约 50-500 mM 的山梨醇、蔗糖、海藻糖和它们的任意组合; 或者

总浓度为约 50-500 mM 的山梨醇、蔗糖、海藻糖和它们的任意组合与甲硫氨酸的组合，其中甲硫氨酸的浓度为约 1-50 mM，和

（iv）约 0.1-1 mg/ml 聚山梨醇酯 80;

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5。

在一个优选的实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含:

（i）约 10-100 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;

（ii）约 10-30 mM 的组氨酸和／或盐酸组氨酸;

（iii）约 100-400 mM 的山梨醇、蔗糖、和／或海藻糖; 或者

总浓度为约 100-400 mM 的山梨醇、蔗糖、和／或海藻糖与甲硫氨酸的组合，其中甲硫氨酸的浓度为约 5-40 mM，和

（iv）约 0.2-0.8 mg/ml 聚山梨醇酯 80;

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5。

在一个优选的实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含

（i）约 20 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;

（ii）约 10 mM 组氨酸;

（iii）约 50 mg/ml 山梨醇，和

（iv）约 0.3 mg/ml 聚山梨醇酯 80;

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5。

在一个优选的实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含

（i）约 50 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;

（ii）约 20 mM 组氨酸;

（iii）约 50 mg/ml 山梨醇，和

（iv）约 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 80;

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5。

在一个优选的实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含

（i）约 50 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白；

（ii）约 20 mM 组氨酸；

（iii）约 80 mg/ml 蔗糖，和

（iv）约 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 80；

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5。

在一个优选的实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含

（i）约 50 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白；

（ii）约 20 mM 组氨酸；

（iii）约 80 mg/ml 海藻糖，和

（iv）约 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 80；

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5

在一个优选的实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含

（i）约 50 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白；

（ii）约 20 mM 组氨酸；

（iii）约 80 mg/ml 蔗糖和约 1.49 mg/ml 甲硫氨酸，和

（iv）约 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 80；

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5

在一个优选的实施方案中，本发明的液体抗体制剂包含

（i）约 42 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白；

（ii）约 0.85 mg/ml 组氨酸和约 3.17 mg/ml 盐酸组氨酸；

（iii）约 80 mg/ml 蔗糖，和

（iv）约 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 80；

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5

另一方面，本发明提供了一种固体抗体制剂，其是通过将本发明的液体抗体制剂经固化处理而获得的。所述固化处理是通过例如结晶法、喷雾干燥法、冷冻干燥法实施的。在一个优选的实施方案中，所述固体抗体制剂例如是冻干粉针剂形式。固体抗体制剂可在使用前，通过重构于适当的溶媒中，形成本发明的重构制剂。所述重构制剂也是一种本发明的液体抗体制剂。在一个实施方案中，所述适当的溶媒选自注射用水、注射用有机溶剂，包括但不限于注射用油、乙醇、丙二醇等，或其组合。

本发明的液体制剂可以长期稳定储存，例如至少 24 个月或更长时间。在一个实施方案中，本发明的液体制剂可以在约-80℃至约 45℃，例如-80℃、约-30℃、约-20℃、约 0℃、约 5℃、约 25℃、约 35℃、约 38℃、约 40℃、约 42℃或约 45℃的条件下，储存至少 10 天、至少 20 天、至少 1 个月、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 4 个月、至少 5 个月、至少 6 个月、至少 7 个月、至少 8 个月、至少 9 个月、至少 10 个月、至少 11 个月、至少 12 个月、至少 18 个月、至少 24 个月，至少 36 个月，或更长时间，且是稳定的。

在一个实施方案中，本发明的液体制剂可以稳定储存至少 24 个月。在再一实施方案中，本发明的液体制剂在至少 40℃是稳定的。在再一实施方案中，本发明的液体制剂在约 2℃-8℃保持稳定至少 3 个月，优选至少 12 个月，更优选至少 24 个月。在一个实施方案中，本发明的液体制剂在室温或例如约 25℃保持稳定至少 2 个月，优选至少 3 个月，更优选至少 6 个月。在再一实施方案中，本发明的液体制剂在约 40℃保持稳定至少 2 周、优选至少 1 个月。

在一个实施方案中，可以通过检测制剂的外观、可见异物、蛋白含量、浊度、纯度、和/或电荷变异体的变化，来指示储存后制剂的稳定性。在一个实施方案中，可以在高温胁迫的强制实验中，例如在 40℃±2℃储存至少 1 周、2 周或优选地 1 个月后，或在加速实验中，例如在 25℃±2℃储存至少 1 个月或 2 个月后，或在长期实验中，例如在 5℃±3℃储存至少 2 个月或 3 个月后，检测本发明液体制剂的稳定性。

在一个实施方案中，在储存后，通过目视检查本发明液体制剂的稳定性，其中本发明液体制剂在外观上保持为澄明至微乳光，为无色至淡黄色液体，且无异物。在一个实施方案中，在澄明度检测仪下目视检查，制剂中无可见异物存在。在一个实施方案中，在储存后，通过测定蛋白含量变化，检查本发明液体制剂的稳定性，其中例如通过紫外分光光度(UV)法，相对于储存第 0 天的初始值，蛋白含量变化率不超过 20%，优选不超过 10%，例如 7-8%，更优选不超过 5%。在一个实施方案中，在储存后，通过测定本发明液体制剂的浊度变化，检查本发明液体制剂的稳定性，其中例如通过 OD_{350mm} 法检测，相对于储存第 0 天的初始值，变化值不超过 0.06，优选地不超过 0.05，更优选地不超过 0.04。在一个实施方案中，在储存后，通过测定本发明液体制剂的纯度变化，检查本发明液体制剂的稳定性，其中通过尺寸排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC)，相对于储存第 0 天的初始值，单体纯度的变化值不超过 10%，例如不超过 5%、4%、3%、例如变化值不超过 1-2%，优选不超过 1%。在一个实施方案中，在储存后，通过测定本发明液体制剂的纯度变化，检查本发明液体制剂的稳定性，其中通过非还原型和／或还原型十二烷基硫酸钠毛细管电泳(CE-SDS)法，单体纯度的变化值下降不超过 10%，例如不超过 5%、4%、3%。在一个实施方案中，在储存后，通过成像毛细管等电聚焦电泳（iCIEF）检测本发明液体制剂的稳定性，其中相对于储存第 0 天的初始值，抗体的电荷变异体（主成分、酸性组分和碱性组分）的变化值总和不超过 50%，例如不超过 40%、30%、20%、10%、5%。在一个实施方案中，在储存后，通过阳离子交换高效液相色谱法（CEX-HPLC 法）检测本发明液体制剂的稳定性，其中相对于储存第 0 天的初始值，抗体的电荷变异体（主成分、酸性组分和碱性组分）的变化值总和不超过 40%，例如不超过 38%、36%、34%、32%、30%。

在一个实施方案中，制剂在储存后，例如在2-8℃储存至少24个月后，或在室温储存至少3个月后，或在40℃±2℃储存1个月后，是稳定的，优选地具有如下特征之一或多项：

(i) 通过SEC-HPLC法测量，制剂具有大于90%的纯度，优选大于95%、96%、97%、98%、99%的纯度；

(ii) 通过还原型或非还原型CE-SDS法测量，制剂具有大于90%的纯度，优选大于92%、94%、96%、98%的纯度；

(iii) 通过 iCIEF 法测量，相对于储存第 0 天的初始值，制剂中抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的各组分(主成分、酸性组分和碱性组分)的变化值总和不超过 50%，例如不超过 40%、30%、20%、10%、5%;

(iv) 通过 ELISA 法测量，相对于储存第 0 天的初始值，制剂中抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的相对结合活性为 70％-130％，例如，为 70％、80％、90％、100％、110％、120％、130％。

在一个方面，本发明提供了一种递送装置，其包含本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂。在一个实施方案中，本发明的递送装置以包含本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂的预填装注射器形式提供，例如用于静脉内、皮下、皮内或者肌内注射、静脉内输注。

在又一方面，本发明提供向受试者，例如哺乳动物递送抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的方法，包括给予所述受试者本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂的步骤，所述递送是例如通过使用预填装注射器的递送装置实施的。

在又一方面，本发明提供本发明的液体抗体制剂或固体抗体制剂的用途，用于制备在受试者中治疗、预防或延缓与 HER2 信号传导通路和 PD-1 信号传导通路相关的病症的递送装置（如，预填装注射器）或药物，所述病症例如各种血液病和实体瘤，包括但不限于白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、脑肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、黑色素瘤。

本发明的其它实施方案将通过参阅此后的详细说明而清楚明了。

附图简述

结合以下附图一起阅读时，将更好地理解以下详细描述的本发明的优选实施方案。出于说明本发明的目的，图中显示了目前优选的实施方案。然而，应当理解本发明不限于图中所示实施方案的精确安排和手段。

图1例示了一种抗PD-1/HER2双特异性抗体的结构，包含抗PD-1半抗体分子和抗HER2半抗体分子。

图2显示了抗PD-1/HER2双特异性抗体制剂在pH 5.0、5.5、6.0、6.5于40℃±2℃放置不同时间后，通过OD_{350nm}法测定的各样品浊度变化趋势图。图中横坐标上的T0表示0天；1W表示1周；2W表示2周；1M表示1个月。

图3显示了抗PD-1/HER2双特异性抗体制剂在pH 5.0、5.5、6.0、6.5于40℃±2℃放置不同时间后，通过SEC-HPLC法测定的各样品中蛋白纯度变化趋势图。图中横坐标上的T0表示0天；1W表示1周；2W表示2周；1M表示1个月。

图4显示了抗PD-1/HER2双特异性抗体制剂在pH 5.0、5.5、6.0、6.5于40℃±2℃放置不同时间后，通过非还原型CE-SDS法测定的各样品中蛋白纯度变化趋势图。图中横坐标上的T0表示0天；1W表示1周；2W表示2周；1M表示1个月。

图5显示了抗PD-1/HER2双特异性抗体制剂在pH 5.0、5.5、6.0、6.5于40℃±2℃放置不同时间后，通过还原型CE-SDS法测定的各样品中蛋白纯度变化趋势图。图中横坐标上的T0表示0天；1W表示1周；2W表示2周；1M表示1个月。

图6显示了抗PD-1/HER2双特异性抗体制剂在pH 5.0、5.5、6.0、6.5于40℃±2℃放置不同时间后，通过iCIEF法测定的各样品中电荷变异体主成分的变化趋势图。图中横坐标上的T0表示0天；1W表示1周；2W表示2周；1M表示1个月。

图7显示了将具有不同稳定剂的抗PD-1/HER2双特异性抗体制剂（处方1-4）置于约40℃储存0天、1周、2周和4周后，通过iCIEF法测定的电荷变异体主成分随时间的变化图。图中横坐标上的T0表示0天；1W表示1周；2W表示2周；4W表示4周；F1表示处方1，F2表示处方2，F3表示处方3，F4表示处方4。

图8显示了将具有不同稳定剂的抗PD-1/HER2双特异性抗体制剂（处方1-4）置于25℃±2℃储存0天、1周、2周和4周后，通过iCIEF法测定的电荷变异体主成分随时间的变化图。图中横坐标上的T0表示0天；1M表示1个月；2M表示2个月；F1表示处方1，F2表示处方2，F3表示处方3，F4表示处方4。

发明详述

在详细描述本发明之前，应了解，本发明不受限于本说明书中的特定方法及实验条件，因为所述方法以及条件是可以改变的。另外，本文所用术语仅是供说明特定实施方案之用，而不意欲为限制性的。

定义

除非另有定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域一般技术人员通常所理解的含义相同的含义。为了本发明的目的，下文定义了以下术语。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小5%的下限和比指定数字数值大5%的上限的范围内的数字数值。

术语“和/或”当用于连接两个或多个可选项时，应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或多项。

如本文中所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

在本文中，术语“抗体”以最广意义使用，指包含抗原结合位点的蛋白质，涵盖各种结构的天然抗体和人工抗体，包括但不限于完整抗体和抗体的抗原结合片段。

术语“全抗体”、“全长抗体”、“完全抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地用来指包含由二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链

由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 区和 VL 区可以进一步再划分为超变区（为互补决定区(CDR)，其间插有较保守的区域（为构架区(FR)）。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和 4 个 FR 组成，从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是显示出多种效应子功能。

术语“人源化”抗体指包含来自非人类 HVR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的嵌合抗体。在一些实施方案中，人源化抗体包含全部或基本上全部的 HVR(例如，CDR)与非人抗体的那些 HVR 对应并且全部或基本上全部的 FR 区与人抗体的那些 FR 对应。人源化抗体任选地可以包含从人抗体衍生的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”指已经历过人源化的抗体。

术语“半抗体”或“半聚物”指单价抗原结合多肽。在一些实施方案中，半抗体或半聚物包含 VH/VL 单元和任选地免疫球蛋白恒定结构域的至少一部分。在一些实施方案中，半抗体或半聚物包含与一条免疫球蛋白轻链缔合的一条免疫球蛋白重链，或其抗原结合片段。在一些实施方案中，半抗体或半聚物是单特异的，即，与单个抗原或表位结合。在一些具体的实施方案中，半抗体与 HER2 结合并且不与 PD-1 结合。在一些具体的实施方案中，半抗体与 PD-1 结合并且不与 HER2 结合。本领域技术人员将会轻易地理解，半抗体可以具有由单一可变结构域组成(例如，源自骆驼属(Camelidae))的抗原结合结构域。

术语“VH/VL 单元”指抗体中包含至少一个 VH CDR 和至少一个 VL CDR 的抗原结合区。在一些实施方案中，VH/VL 单元包含至少一个、至少两个或全部三个 VH CDR 和至少一个、至少两个或全部三个 VL CDR。在某些实施方案中，VH/VL 单元还包含构架区(FR)的至少一部分。在一些实施方案中，VH/VL 单元包含三个 VH CDR 和三个 VL CDR。在一些实施方案中，VH/VL 单元包含至少一个、至少两个、至少三个或全部四个 VH FR 和至少一个、至少两个、至少三个或全部四个 VL FR。

在本文中，术语“双特异性抗体”包含与两种不同生物分子上的表位特异性结合的抗原结合结构域。除非另外说明，否则列出的双特异性抗体名称中双特异性抗体结合的抗原的顺序是任意的。即，在一些实施方案中，术语“抗 PD-1/HER2 双特异性抗体”和“抗 HER2/PD-1 双特异性抗体”可以互换使用。在一些实施方案中，双特异性抗体包含两个半抗体，其中每个半抗体包含单个重链可变区和任选地重链恒定区的至少一部分以及单个轻链可变区和任选地轻链恒定区的至少一部分。在一些实施方案中，双特异性抗体包含两个半抗体，其中每个半抗体包含单个重链可变区和单个轻链可变区并且不包含多于一个单个重链可变区且不包含多于一个单个轻链可变区。在一些实施方案中，双特异性抗体包含两个半抗体，其中每个半抗体包含单个重链可变区和单个轻链可变区，并且其中第一半抗体与第一抗原结合且不与第二抗原结合并且第二半抗体与第二抗原结合且不与第一抗原结合。

术语“抗体制剂”指一种制备物，所述制备物处于允许作为活性成分的抗体的生物活性可以有效发挥的形式，并且不含有对于待施用该制剂的受试者而言具有不可接受毒性的其它组分。这类抗体制剂通常是无菌的。通常，抗体制剂中包含可药用赋形剂。“可药用”赋形剂是

可以合理地施用至受试哺乳动物以便制剂中所用活性成分的有效剂量可以递送至受试者的试剂。赋形剂的浓度与施用模式相适应，例如可以是注射可接受的。

术语“抗PD-1/HER2双特异性抗体制剂”在本文中也简称为“本发明的抗体制剂”，意指包含抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白作为活性成分并包含可药用赋形剂的制备物。将抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白与可药用赋形剂组合后，作为活性成分的抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白适于治疗性或预防性施与人类或非人类动物。本发明的抗体制剂可以例如制备成水性形式的液体制剂，例如，即用式预填装注射器，或者制备成冻干制剂，在即将使用前通过溶解和/或悬浮于生理可接受的溶液中进行重构（即，复溶）。在一些实施方案中，抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白制剂是液体制剂形式。

“稳定的”抗体制剂是制剂中的抗体在储存于特定条件下之后保有可接受程度的物理稳定性和/或化学稳定性。尽管抗体制剂中所含的抗体在储存特定时间之后可能不会 100%维持其化学结构，但通常在储存特定时间之后维持约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%的抗体结构或功能，则认为抗体制剂是“稳定的”。在一些具体的实施方案中，本发明的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白制剂在制造、制备、运输和长期储存过程中表现出低至检测不到的抗体聚集或降解或化学修饰，从而极少或甚至是没有抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的生物活性损失，表现出高度稳定性。在一些实施方案中，本发明的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白制剂在储存后，基本上保留其物理和化学稳定性。优选地，本发明液体制剂可以在室温或在 40℃稳定至少 2 周，和/或在 25℃稳定至少 2 个月，和/或在 2-8℃稳定至少 24 个月。

本领域已知多种分析技术可以用于测定蛋白质的稳定性，参见例如 Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)。可以在选定的温度和选定的储存时间测量稳定性。例如，可以基于预期的制剂货架期来选择储存时间。备选地，可以使用加速稳定性试验。在一些实施方案中，通过对抗体制剂进行各种胁迫测试来进行稳定性测试。这些测试可以代表调配的抗体制剂在制造、储存或运输期间可能遭遇到的极端条件，也可以代表在非制造、储存或运输期间可能使抗体制剂中的抗体的不稳定性加速的条件。例如，可以将经调配的抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白制剂充填至玻璃小瓶中以检验在高温胁迫下的抗体稳定性。

经一段储存时间后，制剂不显示聚集、沉淀、混浊和/或变性；或显示非常少的聚集、沉淀、混浊和/或变性，则可以认为抗体在制剂中“保持其物理稳定性”。由于制剂中抗体的聚集可以潜在地导致患者增加的免疫反应，从而导致安全性问题。因此，需要使在制剂中的抗体聚集最小化或防止聚集。光散射法可以用于测定制剂中的可见聚集物。SEC可以用于测定制剂中的可溶性聚集物。此外，可以通过目视检查制剂的外观、颜色和/或澄清度、或者通过OD_{350nm}法检测制剂的浊度、或者通过非还原型CE-SDS法测定制剂的纯度，来指示制剂的稳定性。在一个实施方案中，通过测定在特定温度下储存特定时间之后制剂中的抗体单体的百分比来测量制剂的稳定性，其中制剂中的抗体单体的百分比越高，则制剂的稳定性越高。

“可接受程度的”物理稳定性可以表示于特定温度下储存特定时间之后，在制剂中检测到至少约92％的抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白单体。在一些实施方案中，在特定温度储存至少2周、至少28天、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月或更久后，可接受程度的物理稳定性表示至少约88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％的抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白单体。当评估物理稳定性时，药物制剂储存的特定温度可为约-80℃至约45℃的任一温度，例如储存于约-80℃、约-30℃、约-20℃、约0℃、约4℃-8℃、约5℃、约25℃、约35℃、约37℃、约40℃、约42℃或约45℃。例如，若储存于约40℃±2℃ 1个月或4周之后，检测到至少约88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％的抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白单体，则药物制剂视为是稳定的。若储存于约25℃ 2个月之后，检测到至少约88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％的抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白单体，则药物制剂视为是稳定的。若储存于约5℃ 9个月之后，检测到至少约88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％的抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白单体，则药物制剂视为是稳定的。

经一段储存时间后，如果制剂中的抗体不显示显著的化学改变，则可以认为抗体在制剂中“保持其化学稳定性”。大多数化学不稳定性源自于形成了抗体的共价修饰形式(例如，抗体的电荷变异体)。例如由天冬氨酸异构化、N和C末端修饰，可以形成碱性变异体；由脱酰胺化、唾液酸化和糖化，可以产生酸性变异体。化学稳定性可以通过检测和/或定量抗体的化学改变形式来评估。例如，可以通过阳离子交换色谱(CEX)或成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)检测制剂中抗体的电荷变异体。在一个实施方案中，通过测定在特定温度下储存特定时间之后制剂中抗体的电荷变异体百分比变化值来测量制剂的稳定性，其中该变化值越小，则制剂的稳定性越高。

“可接受程度”的化学稳定性可以表示于特定温度下储存特定时间之后制剂中电荷变异体（例如主成分或酸性组分或碱性组分）的百分比变化值不超过50%，例如不超过30%、不超过20%。在一些实施方案中，在特定温度储存至少2周、至少28天、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月或更久后，可接受程度的化学稳定性可以表现为主成分电荷变异体的百分比变化值不超过约50%、40%、30%、20%、15%。当评估化学稳定性时，储存药物制剂的温度可为约-80℃至约45℃的任一温度，例如储存于约-80℃、约-30℃、约-20℃、约0℃、约4℃-8℃、约5℃、约25℃或约45℃。例如，若在储存于5℃ 24个月之后，主成分电荷变异体的百分比变化值少于约25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%，则药物制剂可被视为是稳定的。若在储存于25℃ 2个月后，主成分电荷变异体的百分比变化值少于约20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%，则药物制剂亦可

被视为是稳定的。若在储存于40℃ 1个月之后，主成分电荷变异体的百分比变化值少于约50%、40%、30%、20%、10%、5%或4%，则药物制剂亦可被视为是稳定的。

术语“冻干制剂”是指通过液体制剂的冷冻干燥处理得到或能够得到的组合物。优选地，其为具有少于 5%、优选少于 3%水含量的固体组合物。

术语“重构制剂”是指将固体制剂（例如冻干制剂）溶解和/或悬浮于生理可接受的溶液中得到的液体制剂。

文中使用的术语“室温”是指 15℃至 30℃、优选 20℃至 27℃、更优选 25℃的温度。

“胁迫条件”是指在化学和/或物理上不利于抗体蛋白的环境，所述环境可以导致不可接受的抗体蛋白失稳定。“高温胁迫”是指，将抗体制剂置于室温或甚至于更高温度(例如 40℃±2℃) 储存一段时间。通过高温胁迫加速试验，可以检查抗体制剂的稳定性。

如本文所使用，术语“肠胃外施用”意指肠内和局部给药以外的给药方式，通常通过注射或输注方式，并且包括但不限于，静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下(subcuticular)、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射以及输注。在一些实施方案中，本发明的稳定抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白制剂肠胃外施用于受试者。在一个实施方案中，本发明的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白制剂以皮下、皮内、肌内或静脉内注射方式施用于受试者。

I. 抗体制剂

本发明提供稳定的液体抗体制剂，其包含（i）抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白，（ii）缓冲剂，（iii）稳定剂，和（iv）表面活性剂，所述抗体制剂的 pH 为约 5.0-6.5。在一个优选方案中，本发明的液体抗体制剂是注射制剂形式。

(i) 抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白

本发明抗体制剂中的“抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白”包含第一半抗体和第二半抗体，其中第一半抗体包含特异性结合 PD-1 的第一 VH/VL 单元并且第二半抗体包含特异性结合 HER2 的第二 VH/VL 单元。在一些实施方案中，所述抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白能够以至少约 10^7 M^{-1}、优选地约 10^8 M^{-1} 和更优选地约 10^9 M^{-1} 或更强的亲和力常数与 T 淋巴细胞表面的 PD-1 结合，且能够以至少约 10^7 M^{-1}、优选地约 10^8 M^{-1} 和更优选地约 10^9 M^{-1} 或更强的亲和力常数与肿瘤细胞表面的 HER2 结合，以致所述抗体可以用作双特异性靶向 PD-1 分子和 HER2 分子的治疗剂和/或预防剂。

对于所述特异性结合 PD-1 或 HER2 的 VH／VL 单元，其包含衍生自任何现有技术中报导的抗 PD-1 抗体和将来研发出的抗 PD-1 抗体 VH／VL 单元的 6 个 CDR 或与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列；或者包含衍生自任何现有技术中报导的抗 HER2 抗体和将来研发出的抗 HER2 抗体 VH／VL 单元的 6 个 CDR 或与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。

在一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的特异性结合 PD-1 的第一 VH/VL

单元包含衍生自抗PD-1半抗体的SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 10的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部6个重链CDR与轻链CDR，或与所述6个CDR中的一个或多个CDR具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。

在一个实施方案中，抗PD-1/HER2双特异性抗体蛋白的特异性结合HER2的第二VH/VL单元包含衍生自抗HER2半抗体的SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 2的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部6个重链CDR与轻链CDR，或与所述6个CDR中的一个或多个CDR具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。

术语“CDR”或“互补决定区”或“CDR 区”（在本文中与超变区“HVR”可以互换使用），是抗体可变区中主要负责与抗原表位结合的氨基酸区域。重链和轻链的CDR通常被称作CDR1、CDR2和CDR3，从N-端开始顺序编号。本领域公知多种用于在一个给定的VH或VL或VHH氨基酸序列中确定其CDR序列的方案。例如，Kabat互补决定区（CDR）是基于序列变异性确定的并且是最常用的（Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。而Chothia指的是结构环的位置（Chothia和Lesk，J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。AbM HVR是Kabat HVR和Chothia结构环之间的折中，并且由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。“接触性”(Contact) HVR基于对可获得的复杂晶体结构的分析。

所述氨基酸变化，例如，氨基酸置换优选地是保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是指导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸的氨基酸改变。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。在本发明任一实施方案中，在一个优选的方面，保守取代残基来自以下的保守替代表A，优选地为表A中所示优选置换残基。

表A

原始残基	示例性取代	优选的保守氨基酸取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu

Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

在一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含第一半抗体和第二半抗体，其中第一半抗体包含特异性结合 PD-1 的第一 VH/VL 单元并且第二半抗体包含特异性结合 HER2 的第二 VH/VL 单元，其中所述第一 VH/VL 单元包含 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 10 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列，并且其中所述第二 VH/VL 单元包含 SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 2 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列。

不特别地限制抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白中第一半抗体和第二半抗体的重链恒定区的类型，优选地是 IgG1、IgG2 或 IgG4 免疫球蛋白的重链恒定区，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。更优选地，所述重链恒定区是人 IgG1 免疫球蛋白的重链恒定区，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含 IgG1(例如，人 IgG1)中使用的重链恒定区。在又一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含用于 IgG4(例如，人 IgG4)的重链恒定区。例如，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体的两条重链的 Fc 结构域中分别包含具有“CPPC”氨基酸残基的铰链区，和／或分别包含 Y349C 和 S354C(根据 Kabat 的“EU 编号”)，由此，抗 PD-1 半抗体和抗 HER2 半抗体在 Fc 区形成链间二硫键，由此，稳定抗 PD-1 半抗体和抗 HER2 半抗体的正确配对。

在一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的抗 PD-1 半抗体和/或抗 HER2 半抗体在 Fc 结构域中包含影响抗体效应子功能的氨基酸突变。在一个具体实施方案中，所述效应子功能是抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一个实施方案中，所述氨基酸突变存在于 Fc 区的 CH2 结构域，例如，所述抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含在抗 PD-1 半抗体和/或抗 HER2 半抗体 Fc 区第 234 和 235 位置(EU 编号)处的氨基酸置换。在一个具体实施方案中，所述氨基酸置换是 L234A 和 L235A (也称为“LALA 突变”)。

在又一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的轻链包含 κ 轻链恒定区或者 λ 轻链恒定区，例如，人 κ 轻链恒定区或者人 λ 轻链恒定区。

在一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的两条重链各自的 Fc 结构域中分

别包含凸起(“结(knob)”)或空穴(“扣(hole)”)，并且一条重链 Fc 结构域中的所述凸起或空穴可分别置于另一条重链 Fc 结构域中的所述空穴或凸起中，由此所述两条重链彼此形成“结入扣(knob-in-hole)”的稳定缔合。在一个实施方案中，在所述两条重链之一条链中包含氨基酸置换 T366W，并且在所述两条重链之另一条链中包含氨基酸置换 T366S、L368A 和 Y407V(EU 编号)。由此一条链中的凸起能够置于另一条链中的空穴中，促进抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的两条重链的正确配对。

在一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的各半抗体中的重链和轻链的免疫球蛋白 CH1 结构域和 CL 结构域中分别包含凸起或空穴，并且 CH1 结构域中的所述凸起或空穴可分别置于 CL 结构域中的所述空穴或凸起中，从而各半抗体中的重链和轻链彼此也形成“结入扣”的稳定缔合。

在一个实施方案中，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含包含第一半抗体和第二半抗体，其中第一半抗体包含从 N 至 C 方向的 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 14 的重链序列或与之具有至少 90%, 95%, 98%或 99%同一性的重链序列，和从 N 至 C 方向的 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 4 的轻链序列或与之具有至少 90%, 95%, 98%或 99%同一性的轻链序列，并且其中第二半抗体包含从 N 至 C 方向的 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 8 的重链序列或与之具有至少 90%, 95%, 98%或 99%同一性的重链序列，和从 N 至 C 方向的 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4 的轻链序列或与之具有至少 90%, 95%, 98%或 99%同一性的轻链序列。

在本文中，“序列同一性”是指在比较窗中以逐个核苷酸或逐个氨基酸为基础的序列相同的程度。可以通过以下方式计算“序列同一性百分比”：将两条最佳比对的序列在比较窗中进行比较，确定两条序列中存在相同核酸碱基(例如，A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met)的位置的数目以得到匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数(即，窗大小)，并且将结果乘以 100，以产生序列同一性百分比。为了确定序列同一性百分数而进行的最佳比对，可以按本领域已知的多种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数，包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。

本发明抗体制剂中的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白能够同时与 PD-1 和 HER2 蛋白结合，且维持了各亲本抗体的亲和力常数，由此，能够阻断 HER2 信号传导通路和阻断 PD-1 信号传导通路，从而用于治疗、预防或延缓各种与 HER2 信号传导通路和／或与 PD-1 信号传导通路相关的疾病或病症。

在一个优选的实施方案中，本发明的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白是 PCT 申请号 PCT/CN2018/075851（申请日：2018 年 2 月 8 日）中公开的重组抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白，其包含全人源抗 PD-1 半抗体和人源化抗 HER2 半抗体，其中全人源抗 PD-1 半抗体的重链序列从 N 至 C 方向为 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 14，轻链序列从 N 至 C 方向为 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 4，并且其中人源化抗 HER2 半抗体的重链序列从 N 至 C 方向为 SEQ

ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 8，轻链序列从 N 至 C 方向为 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4。

在一个实施方案中，该抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白由 HEK293 细胞或以 HEK293 细胞为基础改造而得到的 HEK293T、HEK293F、HEK293E 细胞；CHO 细胞或以 CHO 细胞为基础改造而得到的 CHO-S、CHO-dhfr⁻、CHO/DG44、ExpiCHO 重组表达产生并经纯化。优选地，在本发明液体制剂中的所述抗体表现出显著的抗肿瘤活性。对使用 HCC1954 人乳腺癌细胞接种免疫缺陷 NCG 小鼠产生的荷瘤小鼠施用抗 PD-1/HER2 双特异性抗体，结果表明，与施用抗 PD-1 单克隆抗体或抗 HER2 单克隆抗体相比较，施用抗 PD-1/HER2 双特异性抗体具有显著提高的抗肿瘤活性，可以导致肿瘤体积的显著缩小。

本发明的抗体制剂中所包含的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的量可随着制剂的特定目的特性、特定环境、和使用制剂的特定目的而改变。在一些实施方案中，抗体制剂为液体制剂，其可含有约 1-150 mg/ml，优选地为约 10-100 mg/mL，例如约 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白。

(ii) 缓冲剂

缓冲剂是可以将溶液的 pH 维持在可接受范围的试剂。在一些实施方案中，用于本发明制剂中的缓冲剂可以将本发明制剂的 pH 控制在大约 5.0-6.5 的 pH 范围，例如约 5.5 的 pH。在一些具体的实施方案中，本发明的抗体制剂具有约 5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4 的 pH。

在一些实施方案中，用于本发明制剂中的缓冲剂选自组氨酸、盐酸组氨酸和它们的组合。在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的缓冲剂的浓度为约5-50 mM。在一个实施方案中，本发明的液体抗体制剂中的缓冲剂的浓度为约10-30 mM，例如，约10、15、20、25、30 mM。

在一个实施方案中，用于本发明制剂中的缓冲剂是约10 mM组氨酸。在另一个实施方案中，用于本发明制剂中的缓冲剂是约20 mM组氨酸。

又在一个实施方案中，用于本发明制剂中的缓冲剂是约5.5 mM组氨酸和约15 mM盐酸组氨酸的组合。

（iii） 稳定剂

用于本发明的合适的稳定剂可以选自糖类、多元醇及其组合。进一步地，本发明的稳定剂还可以包含抗氧化剂。

作为稳定剂的糖类可以是二糖、三糖和多糖，而且糖类可以选自但不限于：蔗糖、右旋糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、环糊精、麦芽糖糊精和葡聚糖。在一个实施方案中，作为稳定剂的糖类是蔗糖和／或海藻糖。

作为稳定剂的多元醇可以选自但不限于：甘露醇、山梨醇和木糖醇。在一个实施方案中，作为稳定剂的多元醇是山梨醇。

在一些实施方案中，作为稳定剂的糖类和／或多元醇在本发明的液体制剂中以约 50-500 mM，优选地约 100-400 mM，例如，约 100、150、200、250、300、350、400 mM 的浓度存在。

本发明的稳定剂中还可以包含的抗氧化剂选自但不限于：同型半胱氨酸、半胱氨酸、胱硫醚、甲硫氨酸、谷胱甘肽、以及包含同型半胱氨酸、半胱氨酸、胱硫醚、甲硫氨酸和谷胱甘肽中任意一种的肽。在包含抗氧化剂的情形下，稳定剂的总浓度为约 50-500 mM，优选地总浓度为约 100-400 mM，例如，约 100、150、200、250、300、350、400 mM，其中抗氧化剂的浓度为约 1-50 mM，优选地约 5-40 mM，例如约 5、10、20、30、40 mM。

在一个实施方案中，本发明液体制剂包含山梨醇作为稳定剂。山梨醇在本发明液体制剂中的量可以是约 50-400 mM，例如，约 50、100、150、200、250、300、350、400 mM。

在一个实施方案中，本发明液体制剂包含蔗糖作为稳定剂。蔗糖在本发明液体制剂中的量可以是约 50-300 mM，例如，约 50、100、150、200、250、300 mM。

在一个实施方案中，本发明液体制剂包含海藻糖作为稳定剂。海藻糖在本发明液体制剂中的量可以是约 50-300 mM，例如，约 50、100、150、200、250、300 mM。

在一个实施方案中，本发明液体制剂包含蔗糖和甲硫氨酸的组合作为稳定剂。该组合中，稳定剂的总浓度为约50-500 mM，优选地总浓度为约100-400 mM，例如，约100、150、200、250、300、350、400 mM，其中甲硫氨酸的浓度为约1-50 mM，优选地约5-40 mM，例如约5、10、20、30、40 mM。

（iv）表面活性剂

如本文所使用的，术语“表面活性剂”是指具有两亲结构的有机物质；即，它们由相反的溶解性倾向的基团所组成，通常是油溶性的烃链和水溶性的离子基团。

在一个实施方案中，本发明的液体制剂中的表面活性剂是非离子型表面活性剂，例如，烷基聚(环氧乙烯)。可包括在本发明制剂中的特定非离子型表面活性剂包括，例如聚山梨酯，诸如聚山梨酯-20、聚山梨酯-80、聚山梨酯-60、或聚山梨酯-40；普洛尼克等。在一个优选实施方案中，本发明的液体制剂中包含聚山梨酯-80 作为表面活性剂。

本发明抗体制剂中所含的表面活性剂的量可随制剂的特定目的特性、特定环境、和使用制剂的特定目的而改变。在优选的一些实施方案中，制剂可含有约 0.1-1 mg/ml，优选地约 0.2-0.8 mg/ml，例如约 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mg/ml 的聚山梨酯类表面活性剂（例如，聚山梨酯-80）。

(v) 其它赋形剂

本发明的抗体液体制剂中可以包含或不包含其它赋形剂。例如，本发明的抗体液体制剂还包含张力调节剂。张力调节剂可以选自下组：醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾和氯化钙。

这些和另外已知的药物赋形剂和/或适用于本发明制剂的添加剂是本领域公知的，例如，列出于“The Handbook of Pharmaceutical Excipients，第 4 版，Rowe 等人编，American Pharmaceuticals Association (2003)；和 Remington: the Science and Practice of Pharmacy，第 21 版，Gennaro 编，Lippincott Williams & Wilkins (2005)”。

II. 制剂的制备

本发明提供了包含抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的稳定制剂。在本发明制剂中使用的抗PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白可以使用本领域已知的用于生产抗体的技术进行制备。例如，

可以重组制备抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白。在一个优选的实施方案中，本发明的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白通过在 HEK293 细胞或以 HEK293 细胞为基础改造而得到的 HEK293T、HEK293F、HEK293E 细胞；CHO 细胞或以 CHO 细胞为基础改造而得到的 CHO-S、CHO-dhfr$^-$、CHO/DG44、ExpiCHO 中重组表达而制备，例如，如 PCT 申请号 PCT/CN2018/075851 中所述，重组制备抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白。

抗体作为药物的活性成分的应用现在已经很广泛。用于将治疗性抗体纯化至药用级的技术是本领域公知的。例如，Tugcu 等(Maximizing productivity of chromatography steps for purification of monoclonal antibodies, Biotechnology and Bioengineering 99 (2008) 599–613)描述了在蛋白 A 捕获步骤后使用离子交换色谱(阴离子 IEX 和/或阳离子 CEX 色谱)的抗体三柱纯化方法。Kelley 等(Weak partitioning chromatography for anion exchange purification of monoclonal antibodies, Biotechnology and Bioengineering 101 (2008) 553–566)描述了两柱纯化法，其中在蛋白 A 亲和色谱后使用弱分配阴离子交换树脂。

一般地，重组产生的抗体可以利用常规的纯化方法纯化，以提供具有足够的可重复性和适度纯度的药物物质用于抗体制剂的配制。例如，在抗体从重组表达细胞分泌至培养基中后，可以使用商业可得的蛋白浓缩过滤器例如 Amicon 的超滤装置，浓缩来自该表达系统的上清液。之后，可以使用例如色谱、透析和亲和纯化等方式进行抗体的纯化。蛋白 A 适应于作为亲和配体用于纯化 IgG1、IgG2 和 IgG4 型抗体。也可以使用其它抗体纯化方法，例如离子交换色谱。在获得足够纯度的抗体后，可以按照本领域已知的方法，制备包含抗体的制剂。

例如，可以采用如下步骤进行制备：(1)在发酵结束后将发酵液离心澄清去除细胞等杂质以获得上清；(2) 使用亲和层析(例如对 IgG1、IgG2 和 IgG4 型抗体具有特异亲和力的蛋白 A 柱)捕获抗体；(3)进行病毒灭活；(4)精制纯化(一般可以采用 CEX 阳离子交换层析)，以去除蛋白中的杂质；(4)病毒过滤（使病毒滴度降低例如 4 log10 以上）；(5)超滤/渗滤（可以用于将蛋白置换于利于其稳定的制剂缓冲液中并浓缩至合适的浓度供注射用）。参见例如，B. Minow, P. Rogge, K. Thompson, BioProcess International, Vol. 10, No. 6, 2012, pp. 48–57。

III. 制剂的分析方法

在抗体制剂的储存过程中，抗体可能会发生聚集、降解或化学修饰，导致抗体异质性（包括大小异质性和电荷异质性）以及聚集物和片段等，从而影响抗体制剂的质量。因此，有必要进行抗体制剂稳定性的监测。

在本领域中已知多种方法可以用于检测抗体制剂的稳定性。例如，可以通过还原型 CE-SDS、非还原型 CE-SDS 和 SEC-HPLC 等方法，分析抗体制剂的纯度和评估抗体的聚集水平；可以通过毛细管等电聚焦电泳(cIEF)、成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)和离子交换色谱（IEX）等，分析抗体制剂中的电荷变异体。此外，可以通过目视检测制剂外观，快速地判断制剂的稳定性。也可以使用 OD_{350nm} 法检测制剂的浊度改变，该方法可以给出有关可溶性和不溶性聚集物量的信息。此外，可以使用紫外分光光度法(UV 法)检测制剂中的蛋白质含量变化。

非还原型 CE-SDS 法是一种以毛细管为分离通道进行的抗体纯度测定方法。在 CE-SDS

中，蛋白迁移由 SDS 结合引起的表面电荷来驱动，而该表面电荷与蛋白质的分子量成正比。由于所有的 SDS-蛋白质复合物都具有相似的质量-电荷比，故可以在毛细管的分子筛凝胶基质中，实现基于分子的大小或流体动力学半径的电泳分离。该方法已经被广泛地用于监测变性的完整抗体的纯度。一般，在非还原型 CE-SDS 法中，供试样品与 SDS 样品缓冲液和碘乙酰胺混合。之后，混合物可以于 68-72℃孵育约 10-15 分钟，冷却至室温后离心的上清液用于分析。采用紫外检测器检测蛋白的迁移，获得电泳谱图。抗体制剂纯度可以计算为 IgG 主峰的峰面积占所有峰面积之和的百分比。关于 CE-SDS 法的进一步描述，可以参见例如 Richard R.等, Application of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products, Electrophoresis, 2008, 29, 3612-3620。

尺寸排阻高效液相色谱法，即 SEC-HPLC 法，是用于抗体标准和质控的另一重要方法。该方法主要依据分子的尺寸大小或流体动力学半径差异来进行分子的分离。通过 SEC-HPLC，抗体可以分离出三种主要形式：高分子量形式(HMMS)、主峰(主要是抗体单体)、和低分子量形式（LMMS）。抗体纯度可以计算为色谱图上主峰面积占所有峰面积之和的百分比。通过 SEC-HPLC 法，可以测量制剂产品中抗体单体的百分数，给出可溶性聚集物和剪切物的含量信息。关于 SEC-HPLC 法的进一步描述，可以参见例如，J. Pharm. Scien., 83:1645-1650, (1994); Pharm. Res., 11:485 (1994); J. Pharm. Bio. Anal., 15:1928 (1997); J. Pharm. Bio. Anal., 14:1133-1140 (1986)。此外，也可以参见例如，R. Yang 等，High resolution separation of recombinant monoclonal antibodies by size exclusion ultra-high performance liquid chromatography (SE-UHPLC), Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.032；和 Alexandre Goyon 等，Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. I - Non-denaturing chromatographic techniques, Journal of Chromatography , http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.05.010。

成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)可以用于分析抗体的电荷异质性。该方法可以提供电荷变异体的定量分布情况。iCIEF 基于分子在 pH 梯度中的电荷差异(表观 pI 值)来实现分子分离的目的。在 iCIEF 中，分离柱通常是短毛细管(例如，5cm 长,100μm 内径的二氧化硅毛细管)，蛋白质在高电压下在毛细管柱中聚焦，并通过在 280nM 操作的全柱成像检测系统对聚焦进行实时在线监测。该技术的一个优点是，可以通过该全柱检测系统同时记录抗体样品的各种电荷变异体。一般而言，在 icIEF 中，将样品与尿素和 icIEF 缓冲液混合，其中所述缓冲液含有甲基纤维素、pI 分子量标准和两性电解质。然后，可以在 iCIEF 分析仪例如 iCE280 分析仪(Protein Simple, Santa Clara, CA)上，使用 iCIEF 柱例如 ProtionSimple 组装的 iCIEF 柱，在样品聚焦一定时间后，测定 280nm 的吸光度，获得聚焦抗体电荷变异体的谱图。在 iCEIF 谱图中，在主峰(即主成分)之前洗脱的蛋白相关峰被分类为酸性组分；相对地，在主峰之后洗脱的蛋白相关峰被分类为碱性组分。主成分、酸性组分和碱性组分的相对量可以表示为占总峰面积的百分数。关于 iCIEF 的进一步描述，可以参见例如，Salas-Solano O 等, Robustness of iCIEF methodology for the analysis of monoclonal antibodies: an interlaboratory study, J Sep Sci.

2012 Nov;35(22):3124-9. doi: 10.1002/jssc.201200633. Epub 2012 Oct 15; 和 Dada OO 等, Characterization of acidic and basic variants of IgG1 therapeutic monoclonal antibodies based on non-denaturing IEF fractionation, Electrophoresis. 2015 Nov;36(21-22):2695-2702. doi: 10.1002/elps.201500219. Epub 2015 Sep 18.

也可以通过阳离子交换高效液相色谱法（CEX-HPLC）测定抗体制剂中抗体的电荷变异体。在该测定法中，以比主峰的保留时间更早从CEX-HPLC柱洗脱出的峰被标记为“酸性峰”，而那些以比主峰的保留时间更晚从CEX-HPLC柱洗脱出的峰被标记为“碱性峰”。

加速稳定性研究可以用于检查产品的稳定性性质，有利于筛选稳定药物制剂形式。例如，可以将制剂样品放置于升高的温度，例如约40℃±2℃、25℃±2℃条件下进行加速稳定性研究。检测指标可以包括外观、可见异物、蛋白含量、浊度、纯度（SEC-HPLC 法、非还原型CE-SDS 法）和电荷变异体（iCIEF 法、CEX-HPLC 法）。

此外，可以检测抗体的功效或生物活性。例如，可以检测制剂中抗体与其抗原分子（HER2分子和 PD-1 分子）的结合能力。本领域技术人员已知多种方法可以用于定量抗体与抗原的特异性结合，例如免疫测定试验，ELISA 等。

本发明的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白制剂是稳定的。在一个实施方案中，于约 5℃、25℃、37℃、40℃、或 45℃储存至少 1 个月、2 个月或 3 个月后，例如，在 5℃±3℃储存 3 个月后，本发明的抗体制剂中的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白纯度是至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%以上，如通过尺寸排阻色谱法或通过非还原型CS-SDS 所测定。在一个实施方案中，于约 5℃、25℃、37℃、40℃、或 45℃储存至少 1 个月、2 个月或 3 个月后，例如，在 5℃±3℃储存 3 个月后，本发明的抗体制剂中抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的至少 60%，优选至少 65%是非碱性及非酸性形式(亦即，主峰或主要电荷形式)，如通过 iCIEF 法所测定。

IV. 制剂的用途

本发明的包含抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的本发明的抗体制剂可以用于治疗、预防或延缓各种与 HER2 信号传导通路和/或与 PD-1 信号传导通路相关的疾病或病症。“与 HER2 信号传导通路相关的疾病或病症”和/或“与 PD-1 信号传导通路相关的疾病或病症”在本文中指可以用本发明抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白制剂进行治疗(例如改善)或预防的疾病或病症。任何可以得益于本发明抗体制剂治疗的疾病或病症都适用于本发明。

包含抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的本发明制剂能够用于预防或治疗受试者的各种血液病和实体瘤，包括但不限于白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、脑肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、黑色素瘤。

本发明也提供本发明的制剂在制备药物中的用途，其中所述药物用于向哺乳动物递送抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白，或用于治疗、预防或改善上述疾病和病症中的一种或多种。优选地，哺乳动物是人。

可以以多种途径将本发明的抗体制剂施用于受试者或患者。例如，施用可以通过输注或

通过注射器进行。因此，在一个方面，本发明提供了一种递送装置（例如注射器），其包含本发明的抗体制剂（例如，预填装注射器）。患者将接受有效量的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白作为主要活性成分，即足以治疗、改善或预防目的疾病或病症的量。

治疗效果可包括减少生理症状。用于任何特定受试者的抗体的最佳有效量和浓度将取决于多种因素，包括患者的年龄、体重、健康状况和/或性别、疾病的性质和程度、特定抗体的活性，身体对其清除率，并且也包括与所述抗体制剂组合施用的任何可能的其它治疗。对于具体的情况，所递送的有效量可以在临床医师的判断范围内来确定。取决于待治疗的适应症，有效剂量可为约 0.005 mg/kg 体重至约 50 mg/kg 体重，或约 0.1mg/kg 体重至约 20 mg/kg 体重。在这方面，已知的基于抗体的药物的应用可以提供一定的指导。剂量可以是单剂量方案或多剂量方案。

描述以下实施例以辅助对本发明的理解。不意在且不应当以任何方式将实施例解释成限制本发明的保护范围。

缩略词描述

CE-SDS：十二烷基硫酸钠毛细管凝胶电泳

ELISA：酶联免疫吸附测定法

iCIEF：成像毛细管等电聚焦电泳

SEC-HPLC：尺寸排阻高效液相色谱法

实施例

为了开发出重组抗程序性死亡受体 1（PD-1）和抗人表皮生长因子受体 2（HER2）双特异性抗体注射液长期稳定储存的制剂处方，确保产品在有效期内（至少 24 个月）的质量可控，设计了处方筛选试验，考察了不同辅料对于抗 PD-1/HER2 双特异性抗体制剂稳定性的影响。试验所用材料和方法如下：

材料和方法

1.1. 本发明的制剂研究中使用的材料

名称	级别	产地及品牌	货号	符合标准
组氨酸	药用级	上海味之素	N/A	Ch.P（2015 年版）
盐酸组氨酸	药用级	上海味之素	N/A	Ch.P（2015 年版）
山梨醇	药用级	法国罗盖特	H20110265	EP、BP、 NF、 USP
蔗糖	药用级	德国 Merck	1.00892.9050	Ch.P（2015 年版）, USP
海藻糖	药用级	美国 Pfanstiehl	T-104-4	USP/NF、EP、JP
甲硫氨酸	药用级	湖北八峰	N/A	Ch.P（2015 年版）
聚山梨酯 80	药用级	南京威尔	苏药准字 F15423203	Ch.P（2015 年版）
盐酸	药用级	德国 Merck	1.00314.2508	Ph Eur、BP、JP、NF

注：N/A 表示“不适用”(Not applicable)。

1.2. 本发明的制剂研究中使用的仪器设备

设备名称	产地及品牌	型号	编号
恒温恒湿箱	德国 BINDER	KBF P 720	PD-A1-069
生化培养箱	上海 精宏	SHP-150	PD-A1-200
漩涡混合器	美国 VWR	DVX-2500	PD-A1-140
医用冷藏箱	青岛 海尔	HYC-360	PD-A1-166
超低温冰箱	美国 Thermo	907	PD-A1-175
澄明度检测仪	天津 天大天发	YB-2	PD-A1-033
紫外可见分光光度计	日本 岛津	UV-1800	AS-A1-037
pH 计	瑞士 梅特勒	S220/FE20	PD-A1-002
多通道微量分光光度计	美国 Thermo	Nanodrop8000	PD-A1-052
台式冷冻离心机	美国 Thermo	SL16R	PD-A1-082
洁净工作台	苏州 苏净安泰	SW-CJ-2FD	QC-A1-011
不溶性微粒检测仪	天津 天大天发	GWJ-8	QC-A1-094

1.3. 制剂稳定性的检测项目和检测方法

对抗体制剂检测了以下项目：（1）检测外观以及是否存在可见异物；（2）通过紫外法(UV法)测定制剂中的蛋白质含量；（3）通过检测在 350nm 处的吸光度，测定浊度；（4）通过尺寸排阻色谱法，例如，尺寸排阻高效液相色谱法（size-exclusion chromatography-HPLC; SEC-HPLC）测定抗体制剂的纯度，表示为单体的面积占所有峰面积之和的百分数；（5）通过还原型十二烷基硫酸钠毛细管电泳(还原型 CE-SDS)和／或非还原型十二烷基硫酸钠毛细管电泳(非还原型 CE-SDS)测定抗体制剂的纯度，表示为单体的面积占所有峰面积之和的百分数；（6）通过成像毛细管等电聚焦电泳法(iCIEF 法)测定抗体制剂中电荷变异体，表示为主成分、酸性组分和碱性组分的百分数；（7）通过免疫测定法，例如，直接 ELISA 法测定抗体制剂中抗 PD-1/HER2 双特异性抗体对 PD-1 抗原和 HER2 抗原的相对结合活性。

可见异物检测

按照国家药典委员会，中华人民共和国药典（2015 年版，四部通则 0904“可见异物检查法”，北京：中国医药科技出版社. 2015）中所记载的方法，采用澄明度检测仪(天津天大天发生产，型号 YB-2)，检查样品中的可见异物。

蛋白含量测定

使用紫外分光光度计(日本岛津生产，型号 UV-1800)测定样品中的蛋白质含量。

浊度测定

使用紫外分光光度计(日本岛津生产，型号 UV-1800)，测定样品在 350nm 的吸光度，确定样品浊度。

纯度（SEC-HPLC 法）

使用体积排阻色谱柱分离，流动相为磷酸盐缓冲液（称取 3.12 g 二水合磷酸二氢钠，8.77 g 氯化钠和 34.84 g 精氨酸，超纯水溶解后用盐酸调节 pH 至 6.8 并定容至 1000 ml），色谱柱保护液为 0.05%(w/v) NaN_3，进样量 50 μl，流速 0.5 ml/分钟，采集时间 30 分钟，柱温 25℃，检测波长 280 nm。取待测样品用超纯水稀释至 2mg/ml，作为供试品溶液。取制剂缓冲液用上述相同处理方式稀释后做为空白溶液。取空白溶液、供试品溶液各 50 μl 注入液相色谱仪，开始检测。

纯度（还原型 CE-SDS 法）

采用毛细管凝胶电泳法检测。毛细管为无涂层毛细管，内径50 μm，总长30.2 cm，有效长度20.2 cm。电泳前分别使用0.1 mol/L氢氧化钠、0.1 mol/L盐酸、超纯水、电泳胶70 psi冲洗毛细管柱。将待测样品用适量超纯水稀释至2.0mg/ml，取以上稀释后的样品50 μl于1.5 ml离心管中，分别向其中加入45 μl pH 6.5的样品缓冲液（称取一水柠檬酸0.32 g，十二水合磷酸氢二钠2.45 g，溶于45 ml超纯水中，定容至50 ml，制得柠檬酸-磷酸盐缓冲液，精密量取该缓冲液200 μl，加10%(w/v)十二烷基硫酸钠溶液80 μl，加水至1 ml，混匀，即得）、1 μl内标(10 kDa蛋白质，5 mg/mL)（Beckman Coulter，货号：390953）和5 μl β-巯基乙醇，充分混匀后70±2℃加热10±2分钟，冷却至室温后转移至样品瓶作为供试品溶液。取与供试品相同体积的制剂缓冲液，按上述方法同样操作，制得空白溶液。样品进样条件：–5 kV 20秒；分离电压：–15 kV 35分钟。毛细管柱温控制在25℃，检测波长为220 nm。

纯度（非还原型 CE-SDS 法）

采用毛细管凝胶电泳法检测。毛细管为无涂层毛细管，内径 50 μm，总长 30.2 cm，有效长度 20.2 cm。电泳前分别使用 0.1 mol/L 氢氧化钠、0.1 mol/L 盐酸、超纯水、电泳胶 70 psi 冲洗毛细管柱。将待测样品用适量超纯水稀释至 2.0mg/ml，取以上稀释后的样品 50 μl 于 1.5 ml 离心管中，分别向其中加入 45 μl pH 6.5 的样品缓冲液（称取一水柠檬酸 0.32 g，十二水合磷酸氢二钠 2.45 g，溶于 45 ml 超纯水中，定容至 50 ml，制得柠檬酸-磷酸盐缓冲液，精密量取该缓冲液 200 μl，加 10%(w/v)十二烷基硫酸钠溶液 80 μl，加水至 1 ml，混匀，即得）、1 μl 内标(10 kDa 蛋白质，5 mg/mL)（Beckman Coulter，货号：390953）和 5 μl 250 mmol/L NEM 溶液（称取 N-乙基顺丁稀二酰亚胺 62 mg，溶于 2 ml 超纯水中），充分混匀后 70±2℃加热 10±2 分钟，冷却至室温后转移至样品瓶作为供试品溶液。取与供试品相同体积的制剂缓冲液，按上述方法同样操作，制得空白溶液。样品进样条件：–5 kV 20 秒；分离电压：–15 kV 35 分钟。毛细管柱温控制在 25℃，检测波长为 220 nm。

电荷变异体（iCIEF 法）

采用成像毛细管等电聚焦电泳（iCIEF法）检测。毛细管内径100 μm，总长5 cm。样品电泳前需分别使用0.5%甲基纤维素溶液（下文中也缩写为MC溶液）、超纯水冲洗毛细管柱。采用真空进样方式，预聚焦电压及时间为1.5 kV 1分钟，聚焦电压及时间为3 kV 8分钟，进样时间55秒，样品盘温度为10℃，检测波长为280 nm。阴极稳定剂（Cathodic Stabilizer）为500 mmol/L精氨酸溶液，0.5% MC溶液降低蛋白与毛细管之间的粘附。将供试品用水稀释至1.0

mg/ml，取稀释后的供试品溶液20 μl，向其中加入78 μl 预混液（预混液配比如下：70 μl pI 0.5% MC溶液，4 μl两性电解质（pH 3-10），2 μl 阴极稳定剂，1 μl pI 5.85标志物，1 μl pI 9.99标志物），充分混匀制得待测样品溶液。进样分析，根据面积归一化法，计算主成分、酸性组分及碱性组分含量。

相对结合活性（直接ELISA法）

用 CBS 稀释抗原（检测抗 PD-1/HER2 双特异性抗体的抗 PD-1 端对 PD-1 的相对结合活性时，使用购自 Sinobiological 的重组人 PD-1，货号：10377-H08H；检测抗 PD-1/HER2 双特异性抗体的抗 HER2 端对 HER2 的相对结合活性时，使用购自 Sinobiological 的 Human HER2/ErbB2 Protein（His Tag），货号：10004-H08H-100）至 0.5 μg/ml，100 μl/孔，4℃ 过夜包被于 96 孔酶标板上。洗板后加封闭液（2% BSA-PBST，300 μl/孔）37℃封闭 2 h。以 2% BSA-PBST 稀释抗 PD-1/HER2 双特异性抗体至 3 μg/ml，3 倍梯度稀释至第 11 个浓度（0.05 ~ 3000 ng/ml）。将梯度稀释的供试品以 100 μl/孔加入到弃去封闭液的酶标板中，设置阴性对照每孔只加 100 μl 稀释液（2% BSA-PBST），37℃恒温培养箱中孵育 60 min。洗板后加入以 2% BSA-PBST 稀释的 HRP 缀合山羊抗人 IgG-Fc 片段（美国 BETHYL，货号 A80-104P）作为二抗（100000 倍稀释，100 μl/孔），37℃反应 30 min。洗板后每孔加入 100 μl TMB 显色液，显色 10 min 后，每孔加入 100 μl 的 1 mol/L H_2SO_4 终止反应。以 620 nm 为参比波长，测 450 nm 处的 OD 值。以各浓度梯度样品的浓度值作为横坐标，各梯度样品的 OD450 nm-OD620 nm 值为纵坐标，应用 Prism 四参数拟合计算 EC_{50} 反映抗体与各抗原的结合活性。

实施例 1. 制备和纯化抗 PD-1/HER2 双特异性抗体

根据 PCT 申请号 PCT/CN2018/075851 所述，制备和纯化抗 PD-1/HER2 双特异性抗体。

具体而言，分别构建含抗人 PD-1 的抗体重链和轻链的 X0GC 表达载体（X0GC 表达载体的构建参见中国专利申请号 200780038403.3），其中轻链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示；轻链恒定区核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示；重链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示；重链恒定区核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示。

分别构建含抗人 HER2 的抗体重链和轻链的 X0GC 表达载体，其中轻链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示；轻链恒定区核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示；重链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示；重链恒定区核苷酸序列如 SEQ ID NO.7 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。

分别将所述含抗人 PD-1 抗体的重链和轻链的表达载体转染 293F 细胞（FreeStyle™ 293-F Cells, 货号 R79007, invitrogen），表达、纯化和通过还原过程，得到含有一条重链和一条轻链的抗人 PD-1 半抗体分子。

类似地，分别将所述含抗人 HER2 抗体的重链和轻链的表达载体转染 293F 细胞（FreeStyle™ 293-F Cells, 货号 R79007, invitrogen），表达、纯化和通过还原过程，得到含有

一条重链和一条轻链的抗人 HER2 半抗体分子。

将还原的抗 PD-1 半抗体分子以及还原的抗 HER2 半抗体分子以等摩尔比例混合，在 4℃条件下进行重组反应 24 小时，获得了含有抗 PD-1 半抗体分子以及抗 HER2 半抗体分子的异源二聚体的双特异性抗体的溶液。对所述溶液通过超滤浓缩管超滤浓缩后，采用 AKTA explorer 100 型蛋白纯化系统(GE Healthcare)以及离子色谱柱 Source 15S(16 mm I.D., 17 ml，GE Healthcare ）于 4℃纯化，获得了纯度为 99.96%的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体。

实施例 2. pH 对制剂的稳定性影响试验之一

本实施例考察了包含抗 PD-1/HER2 双特异性抗体的制剂在 pH 5.0 至 6.5 的稳定性。共设计了 4 个 pH 值，分别为 5.0、5.5、6.0 和 6.5。

2.1 实验步骤

配制 10 mM 组氨酸，5%（w/v）山梨醇缓冲液，用稀盐酸将 pH 分别调节为 5.0、5.5、6.0 和 6.5，将实施例 1 的经纯化的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体超滤置换到所述不同 pH 值的溶液中。置换完成后，调节样品中的双特异性抗体蛋白含量至约 20 mg/ml；然后加入聚山梨酯 80，使聚山梨酯 80 的终浓度为 0.30 mg/ml；过滤分装至西林瓶中，加塞、轧盖。将各样品于 40℃±2℃条件下进行稳定性考察，具体实验方案见表 1。

表 1. 实验方案

实验条件	取样点				检测项目
	0 天	1 周	2 周	1 个月	
40℃±2℃	X	X	X	X	外观、可见异物、蛋白含量、浊度、纯度(SEC-HPLC 法和 CE-SDS 法）、电荷变异体（iCIEF 法）和相对结合活性（直接 ELISA 法）

注：（1）x 表示在该时间点取样。（2）在所述时间点取样后，均将取得的样品先放入超低温冰箱中－80℃冻存待检，按需要化冻送检。

2.2 判断标准

根据对产品的认识以及仪器和方法的精密度，设定了样品检测指标数值与初始值相比质量未发生变化的判定标准，用以判断样品是否发生了变化，具体见表 2。

表 2. 质量未发生变化的判断标准

检测项目	未发生变化的判定标准
外观（观察法）	澄明至微乳光，无色至微黄色液体，无异物
可见异物（可见异物检查法）	符合《中华人民共和国药典》（2015 年版，四部）通则 0904
蛋白含量（UV 法）	变化率≤10%
浊度（OD350 nm 法）	变化值≤0.02
纯度（SEC-HPLC 法）	主峰纯度变化值≤1%

检测项目	未发生变化的判定标准
纯度（还原型 CE-SDS 法）	主峰纯度变化值≤2%
纯度（非还原型 CE-SDS 法）	主峰纯度变化值≤2%
电荷变异体（iCIEF 法）	主成分及酸碱性组分变化值≤2%
相对结合活性（直接 ELISA 法）	70~130%

2.3 处方筛选试验之一的实验结果

（1）外观和可见异物

在 40℃±2℃条件下放置一个月后，pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0 和 pH 6.5 样品外观和可见异物均合格。

（2）蛋白含量

在 pH 5.0、5.5、6.0 和 6.5 于 40℃±2℃ 放置不同时间后，各样品的蛋白含量检测结果见表 3。结果表明，在 40℃±2℃条件下放置 1 个月，各 pH 值样品均未发生显著变化。

表 3. 在 pH 5.0、5.5、6.0 和 6.5 于 40℃±2℃ 放置不同时间后，各样品的蛋白含量（UV 法，mg/ml）

样品名称	时间			
	0 天	1 周	2 周	1 个月
pH 5.0	20.7	20.4	20.1	20.5
pH 5.5	20.6	20.7	20.1	20.7
pH 6.0	20.8	20.7	20.6	20.7
pH 6.5	20.5	20.7	20.3	20.9

（3）浊度

在 pH 5.0、5.5、6.0 和 6.5 于 40℃±2℃ 放置不同时间后，各样品的浊度检测结果见表 4，其变化趋势见图 2。结果表明，在 40℃±2℃条件下放置 1 个月，各 pH 值样品的浊度均升高，且 pH 越高，浊度变化速率越快。

表 4. 在各 pH 下于 40℃±2℃ 放置不同时间后，各样品的浊度结果（$OD_{350\ nm}$ 法）

样品名称	时间			
	0 天	1 周	2 周	1 个月
pH 5.0	0.026	0.031	0.043	0.059
pH 5.5	0.025	0.042	0.049	0.068
pH 6.0	0.028	0.049	0.057	0.077
pH 6.5	0.034	0.054	0.065	0.093

（4）纯度

在 pH 5.0、5.5、6.0 和 6.5 于 40℃±2℃ 放置不同时间后，通过 SEC-HPLC 法测定各样品的蛋白纯度。结果见表 5，其变化趋势见图 3。结果表明，在 40℃ ± 2℃条件下考察 1 个月，不同 pH 值的样品纯度均未发生明显变化。

表 5. 通过 SEC-HPLC 法对各样品测定的蛋白纯度（%）

样品名称	时间			
	0 天	1 周	2 周	1 个月
pH 5.0	96.9	97.2	97.1	96.6
pH 5.5	96.9	97.1	97.3	96.8
pH 6.0	96.9	97.1	97.2	96.9
pH 6.5	96.8	97.0	97.0	96.8

在 pH 5.0、5.5、6.0 和 6.5 于 40℃±2℃ 放置不同时间后，通过非还原型 CE-SDS 法分别测定各样品的蛋白纯度。结果见表 6，其变化趋势见图 4。结果表明，在 40℃ ± 2℃条件下考察 1 个月，各 pH 值样品纯度均下降，与 0 天的样品纯度比较分别下降了 2.6%、2.5%、2.5% 和 3.2%。

表 6. 通过非还原型 CE-SDS 法对各样品测定的蛋白纯度（%）

样品名称	时间			
	0 天	1 周	2 周	1 个月
pH 5.0	97.3	96.6	96.2	94.7
pH 5.5	97.2	96.9	96.2	94.7
pH 6.0	97.2	96.9	96.2	94.7
pH 6.5	97.2	96.7	95.7	94.0

在 pH 5.0、5.5、6.0 和 6.5 于 40℃±2℃ 放置不同时间后，通过还原型 CE-SDS 法分别测定各样品的蛋白纯度。结果见表 7，其变化趋势见图 5。结果表明，在 40℃ ± 2℃条件下考察 1 个月，各 pH 值样品纯度与 0 天的样品纯度比较分别下降了 0.4%、0.7%、0.6%和 1.4%。

表 7. 通过还原型 CE-SDS 法对各样品测定的蛋白纯度（%）

样品名称	时间			
	0 天	1 周	2 周	1 个月
pH 5.0	98.5	98.2	97.8	98.1
pH 5.5	98.5	98.2	97.8	97.8
pH 6.0	98.2	98.1	97.8	97.6
pH 6.5	98.3	97.8	97.1	96.9

（5）电荷变异体

在 pH 5.0、5.5、6.0 和 6.5 于 40℃±2℃ 放置不同时间后，通过 iCIEF 法测定各样品的电荷变异体。结果见表 8，其变化趋势见图 6。结果表明，在 40℃±2℃条件下考察 1 个月，各 pH 值样品主成分和酸碱各组分均发生明显变化。pH 值越高，样品的主成分下降越快，酸性组分上升越快。

表 8. 通过 iCIEF 法测定的各样品的电荷变异体（%）

样品名称	时间

		0 天	1 周	2 周	1 个月
pH 5.0	酸性组分	24.7	28.1	33.0	44.1
	主成分	73.2	64.6	57.8	46.0
	碱性组分	2.1	7.3	9.2	9.9
pH 5.5	酸性组分	24.4	29.5	34.8	46.9
	主成分	73.8	65.4	58.8	46.5
	碱性组分	1.9	5.0	6.4	6.6
pH 6.0	酸性组分	24.5	33.0	39.6	54.9
	主成分	73.4	63.4	56.5	41.2
	碱性组分	2.1	3.6	4.0	4.0
pH 6.5	酸性组分	25.0	42.9	54.0	72.9
	主成分	73.0	54.3	42.9	24.5
	碱性组分	2.0	2.8	3.1	2.6

（6）相对结合活性

在 pH 5.0、5.5、6.0 和 6.5 于 40℃±2℃ 放置不同时间后，通过直接 ELISA 法测定各样品的相对结合活性。结果见表 9。结果表明，在 40℃±2℃条件下考察 2 周时，各样品结合 PD-1 抗原和 HER2 抗原的相对结合活性均高于 70%；pH 6.0 和 pH 6.5 的样品抗 HER2 端相对结合活性有明显下降，均低于 70%；在 40℃±2℃条件下考察 1 个月时，各样品结合 PD-1 抗原的相对结合活性仍高于 70%，仅 pH 6.0 和 pH 6.5 的样品结合 HER2 抗原的相对结合活性低于 70%，但仍高于 50%。

表 9. 通过直接 ELISA 法测定的样品的相对结合活性（%）

样品名称		时间			
		0 天	1 周	2 周	1 个月
pH 5.0	抗 PD-1 端	108	N/A	106	92
	抗 HER2 端	95	N/A	87	85
pH 5.5	抗 PD-1 端	112	N/A	102	93
	抗 HER2 端	98	N/A	85	81
pH 6.0	抗 PD-1 端	108	N/A	95	94
	抗 HER2 端	109	N/A	83	63
pH 6.5	抗 PD-1 端	100	N/A	104	88
	抗 HER2 端	98	N/A	86	50

注：N/A 表示未设置该检测项。

以上进行的 pH 对制剂的稳定性影响试验结果表明，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体在 pH 5.0－6.5 于 40℃±2℃ 放置 2 周，样品外观和可见异物均合格，蛋白含量未发生显著变化，且对

HER2 抗原和 PD-1 抗原的相对结合活性也未发生明显变化；另外，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体在 pH 5.0－6.5 于 40℃±2℃ 放置一个月，样品外观和可见异物均合格，蛋白含量未发生显著变化，且对 PD-1 抗原的相对结合活性也未发生明显变化，抗 PD-1/HER2 双特异性抗体仅在 pH 6.0 和 pH 6.5 的情形下，结合 HER2 抗原的相对结合活性下降，但仍高于 50％。在随后的实施例中，从 pH 5.0－6.5 中选择 pH 5.5 进行实验。

实施例 3. 处方筛选试验

3.1 稳定剂筛选试验

考察了不同稳定剂：作为多元醇的山梨醇；作为糖类的蔗糖、海藻糖；作为抗氧化剂的甲硫氨酸等对包含抗 PD-1/HER2 双特异性抗体制剂稳定性的影响。

3.1.1 稳定剂筛选试验步骤

共设计了 4 个处方，详细处方信息见表 10。按照表 10 配制各个处方的缓冲液，将抗 PD-1/HER2 双特异性抗体超滤置换至各自的处方溶液中。置换完成后，调节各处方的蛋白含量至约 50.0 mg/ml；加入聚山梨酯 80，使聚山梨酯 80 的终浓度为 0.20 mg/ml；过滤分装至西林瓶，加塞、轧盖。将各样品于 40℃、25℃、5℃条件下进行稳定性考察，具体方案见表 11。检测指标为外观、可见异物、蛋白含量、纯度（SEC-HPLC 法和 CE-SDS 法）和电荷变异体（iCIEF 法）。

表 10. 稳定剂筛选试验备选处方信息表

序号	处方信息	换算的以 mg/ml 作为单位的处方信息
处方 1	20 mM 组氨酸，5%山梨醇，0.02%聚山梨酯 80，pH 5.5	3.10 mg/ml 组氨酸，50.00 mg/ml 山梨醇，0.20 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.5
处方 2	20 mM 组氨酸，8%蔗糖，0.02%聚山梨酯 80，pH 5.5	3.10 mg/ml 组氨酸，80.00 mg/ml 蔗糖，0.20 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.5
处方 3	20 mM 组氨酸，8%海藻糖，0.02%聚山梨酯 80，pH 5.5	3.10 mg/ml 组氨酸，80.00 mg/ml 海藻糖，0.20 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.5
处方 4	20 mM 组氨酸，8%蔗糖，10 mM 甲硫氨酸，0.02%聚山梨酯 80，pH 5.5	3.10 mg/ml 组氨酸，80.00 mg/ml 蔗糖，1.49 mg/ml 甲硫氨酸，0.20 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.5

注：表中％是指％w/v，下同。

表 11. 稳定性考察方案

实验名称	实验条件及取样计划	检测项目
强制实验	在 40℃条件下放置 1 个月，分别于 0 天、1 周、2 周和 4 周取样	外观、可见异物、蛋白含量、纯度（SEC-HPLC 法和 CE-SDS 法）和电荷变异体（iCIEF 法）
加速实验	在 25℃±2℃条件下放置 2 个月，分别于 0 天、1 个月和 2 个月取样	
长期实验	在 5℃±3℃条件下放置 3 个月，分别于 0 天、3	

实验名称	实验条件及取样计划	检测项目
	个月取样	

3.1.2 判定标准

判定标准具体参见实施例 2 中的表 2。

3.1.3 稳定剂筛选试验

（1）外观、可见异物

在 40℃条件下观察至 1 个月，25℃±2℃条件下观察至 2 个月，5℃±3℃条件下观察至 3 个月，结果表明：各处方样品外观、可见异物均合格。

（2）蛋白含量

在 40℃条件下观察至 1 个月，25℃±2℃条件下观察至 2 个月，5℃±3℃条件下观察至 3 个月，各处方样品的蛋白含量测定结果见表 12。结果表明，在 40℃、25℃±2℃和 5℃±3℃这三个不同温度条件下，四个处方中的蛋白含量均未发生变化。

表 12. 稳定剂筛选试验蛋白含量结果（UV 法，mg/ml）

处方名称	0 天	40℃			25℃±2℃		5℃±3℃
		1 周	2 周	4 周	1 个月	2 个月	3 个月
处方 1	50.7	50.4	50.7	48.9	49.3	48.9	50.7
处方 2	50.6	50.3	50.9	50.2	49.5	49.3	51.3
处方 3	50.8	50.6	51.0	49.9	50.1	49.5	51.0
处方 4	51.4	51.1	51.3	50.5	51.1	50.9	51.9

（3）纯度

纯度（SEC-HPLC 法）：结果见表 13。结果表明，在 40℃条件下考察 4 周，各处方样品纯度均未发生显著变化；在 25℃±2℃条件下 2 个月，各处方样品纯度均未发生明显变化；在 5℃±3℃条件下 3 个月，各处方样品纯度也未发生明显变化。

表 13. 稳定剂筛选试验的纯度结果（SEC-HPLC 法，%）

处方名称	0 天	40℃			25℃±2℃		5℃±3℃
		1 周	2 周	4 周	1 个月	2 个月	3 个月
处方 1	99.0	99.0	98.7	98.3	99.0	98.9	99.0
处方 2	99.0	99.1	98.9	98.4	99.2	99.0	99.1
处方 3	99.0	99.0	98.8	98.2	99.1	98.9	99.0
处方 4	99.1	99.2	99.0	98.7	99.3	99.1	99.1

纯度（非还原型 CE-SDS 法）：结果见表 14。结果表明，在 40℃条件下考察 4 周，各处方样品纯度均未发生显著变化；在 25℃±2℃条件下 2 个月，各处方样品纯度均未发生明显变

化；在 5℃±3℃条件下 3 个月，各处方样品纯度均未发生显著变化。

表 14. 稳定剂筛选试验的纯度结果（非还原型 CE-SDS 法，%）

处方名称	0 天	40℃			25℃±2℃		5℃±3℃
		1 周	2 周	4 周	1 个月	2 个月	3 个月
处方 1	97.8	97.2	96.4	96.0	97.5	97.4	98.2
处方 2	97.8	97.2	96.2	95.7	97.5	97.3	98.1
处方 3	97.8	97.3	96.2	95.9	97.6	97.4	98.2
处方 4	97.9	97.1	96.4	96.0	97.6	97.4	98.3

纯度（还原型 CE-SDS 法）：结果见表 15。结果表明，在 40℃条件下考察 4 周，各处方样品纯度均未发生显著变化；在 25℃±2℃条件下 2 个月，各处方样品纯度均未发生明显变化；在 5℃±3℃条件下 3 个月，各处方样品纯度也均未发生显著变化。

表 15. 稳定剂筛选试验的纯度结果（还原型 CE-SDS 法，%）

处方名称	0 天	40℃			25℃±2℃		5℃±3℃
		1 周	2 周	4 周	1 个月	2 个月	3 个月
处方 1	98.7	98.5	98.0	96.7	98.4	98.1	98.7
处方 2	98.7	98.5	98.0	97.0	98.3	98.2	98.7
处方 3	98.8	98.6	98.0	96.8	98.2	98.1	98.8
处方 4	98.8	98.7	98.1	97.0	98.2	98.2	98.7

（4）电荷变异体（iCIEF 法）

电荷变异体（iCIEF 法）：结果见表 16。40℃和 25℃±2℃时，各处方电荷变异体主成分的变化趋势分别见图 7 和图 8。

结果表明，40℃条件下考察 4 周，各处方电荷变异体主成分及酸碱组分均发生明显变化，主成分下降，酸性组分上升，其变化趋势基本一致，处方 1－4 之间无明显差异。25℃±2℃条件下加速 2 个月，各处方电荷变异体主成分及酸碱组分均发生明显变化，主成分下降，酸性组分上升，其变化趋势基本一致，处方 1－4 之间无明显差异。5℃±3℃条件下考察 3 个月，各处方电荷变异体主成分及酸碱组分均无明显变化。

表 16. 稳定剂筛选试验的电荷变异体结果（iCIEF 法，%）

处方名称		0 天	40℃			25℃±2℃		5℃±3℃
			1 周	2 周	4 周	1 个月	2 个月	3 个月
处方 1	酸性组分	27.4	30.1	36.1	45.7	27.6	31.8	28.1
	主成分	70.0	63.7	57.3	47.8	68.4	64.3	69.2
	碱性组分	2.6	6.2	6.5	6.5	4.1	3.9	2.7
处方 2	酸性组分	26.8	29.4	35.8	46.3	27.0	30.9	27.6

处方名称		0 天	40℃			25℃±2℃		5℃±3℃
			1 周	2 周	4 周	1 个月	2 个月	3 个月
	主成分	70.7	64.3	58.1	47.1	68.8	65.2	69.7
	碱性组分	2.5	6.3	6.1	6.7	4.2	4.0	2.8
处方 3	酸性组分	26.7	29.9	35.4	45.8	26.2	31.4	28.1
	主成分	70.8	64.4	58.3	47.7	70.0	64.6	69.0
	碱性组分	2.5	5.8	6.3	6.5	3.9	4.1	2.9
处方 4	酸性组分	26.7	29.3	33.8	45.3	26.2	30.5	27.4
	主成分	70.8	64.6	59.7	48.0	69.5	65.3	69.8
	碱性组分	2.5	6.1	6.5	6.7	4.3	4.2	2.9

处方确定实验结果表明，处方 1－4 之间有比较一致的变化趋势，它们之间无明显差异。从处方简单性方面考虑，处方 1、处方 2 和处方 3 中使用单一稳定剂对蛋白的保护无明显差异，考虑到后期冻干制剂的开发，选用处方 2。从后期生产安全性考虑，将处方 2 的缓冲体系由浓盐酸调节 pH 调整为组氨酸和盐酸组氨酸。为确保调整后的制剂处方的稳定性，进一步实施以下实验。

实施例 4：处方确认实验

4.1 处方设计和实验方案

设计了处方 5，处方 5 的详细信息见表 17。

表 17. 处方信息表

序号	处方信息
处方 5	42.0 mg/ml 重组全人源抗程序性死亡受体 1（PD-1）和人源化抗人表皮生长因子受体 2（HER2）双特异性抗体、0.85 mg/ml 组氨酸，3.17 mg/ml 盐酸组氨酸，80.00 mg/ml 蔗糖，0.2 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.5

处方确认实验方案见表 18。

表 18. 处方确认实验方案

实验名称	实验条件及取样计划	检测项目
强制实验	在 40℃条件下放置 1 个月，分别于 0 天、2 周和 4 周取样	外观、可见异物、蛋白含量、纯度（SEC-HPLC 法和 CE-SDS 法）、电荷变异体（iCIEF 法）和相对结合活性（直接 ELISA 法）

4.2 实验结果

40℃强制实验结果见表 19。在 40℃条件下放置 4 周，外观、可见异物和生物学活性均合格，蛋白含量、纯度（SEC-HPLC 法和 CE-SDS 法）均未发生显著变化，仅电荷变异体（iCIEF 法）主成分下降 16.0%，酸性组分上升 14.0%，碱性组分上升 2.0%。

表 19.稳定性实验结果

样品名称			时间		
			0 天	2 周	4 周
处方 5	蛋白含量（mg/ml）		39.4	42.8	42.5
	纯度（SEC-HPLC 法，%）		97.0	97.0	96.6
	纯度（非还原型 CE-SDS 法，%）		95.8	95.8	93.9
	电荷变异体（iCIEF 法，%）	酸性组分	31.0	36.2	45.0
		主成分	65.8	58.6	49.8
		碱性组分	3.2	5.3	5.2
	抗 PD-1 端（直接 ELISA 法，%）		92	N/A	84
	抗 HER2 端（直接 ELISA 法，%）		91	N/A	78

结果表明，42.0 mg/ml 本发明的重组全人源抗程序性死亡受体 1（PD-1）和人源化抗人表皮生长因子受体 2（HER2）双特异性抗体在处方 5（0.85 mg/ml 组氨酸、3.17 mg/ml 盐酸组氨酸、80.00 mg/ml 蔗糖、0.2 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.5）中与实施例 3 中的处方 2 有比较一致的变化趋势。

由此，确定最优选的制剂方案为：约 42.0 mg/ml 重组全人源抗程序性死亡受体 1（PD-1）和人源化抗人表皮生长因子受体 2（HER2）双特异性抗体、0.85 mg/ml 组氨酸、3.17 mg/ml 盐酸组氨酸、80.00 mg/ml 蔗糖、0.2 mg/ml 聚山梨酯 80，pH 5.5。

以上描述了本发明的示例性实施方案，本领域技术人员应当理解的是，这些公开内容仅是示例性的，在本发明的范围内可以进行各种其它替换、适应和修改。因此，本发明不限于文中列举的具体实施方案。

权 利 要 求

1. 一种液体抗体制剂，包含

（i）抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白；

（ii）缓冲剂，

（iii）稳定剂，和

（iv）表面活性剂，

其中所述抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含第一半抗体和第二半抗体，其中第一半抗体包含特异性结合 PD-1 的第一 VH/VL 单元并且第二半抗体包含特异性结合 HER2 的第二 VH/VL 单元，其中所述第一 VH/VL 单元包含 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 10 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部重链 CDR 与轻链 CDR，并且其中所述第二 VH/VL 单元包含 SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 2 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部重链 CDR 与轻链 CDR，

优选地，所述液体抗体制剂的 pH 约为 5.0-6.5，例如，pH 约为 5.0、5.5、6.0、6.5。

2. 权利要求 1 的液体抗体制剂，特征在于所述液体抗体制剂中的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的浓度为约 1-150 mg/ml，优选地为约 10-100 mg/mL，例如约 10、20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 mg/ml。

3. 根据权利要求1或2所述的液体抗体制剂，特征在于所述液体抗体制剂中的缓冲剂选自组氨酸、盐酸组氨酸和它们的组合，优选地，所述缓冲剂的浓度为约5-50 mM，优选地为约10-30 mM，例如，约10、15、20、25、30 mM。

4. 根据权利要求1-3 中任何一项所述的液体抗体制剂，特征在于所述稳定剂选自多元醇（例如，山梨醇）、糖类（例如，蔗糖、海藻糖）和它们的任意组合；优选地，所述稳定剂的浓度为约50-500 mM，优选地为约100-400 mM，例如，约100、150、200、250、300、350、400 mM。

5. 根据权利要求1-3 中任何一项所述的液体抗体制剂，特征在于所述稳定剂选自多元醇（例如，山梨醇）、糖类（例如，蔗糖、海藻糖）和它们的任意组合与抗氧化剂的组合，优选地，所述稳定剂的总浓度为约50-500 mM，优选地总浓度为约100-400 mM，例如，约100、150、200、250、300、350、400 mM，其中抗氧化剂的浓度为约1-50 mM，优选地约5-40 mM，例如约5、10、20、30、40 mM，例如，所述抗氧化剂是甲硫氨酸。

6. 根据权利要求1-5中任何一项所述的液体抗体制剂，特征在于所述液体抗体制剂中的表面活性剂选自聚山梨酯类表面活性剂，优选为聚山梨酯-80。

7. 根据权利要求1-6中任何一项所述的液体抗体制剂，特征在于所述表面活性剂的浓度为约0.1-1 mg/ml，优选地为约0.2-0.8 mg/ml，例如约0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mg/ml。

8. 根据权利要求 1 所述的液体抗体制剂，特征在于所述抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白包含第一半抗体和第二半抗体，其中第一半抗体包含特异性结合 PD-1 的第一 VH/VL 单元并且第二半抗体包含特异性结合 HER2 的第二 VH/VL 单元，其中所述第一 VH/VL 单元包含 SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 10 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区

序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列，并且其中所述第二VH/VL单元包含SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 2 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列，

优选地，其中第一半抗体包含从N至C方向的SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 14的重链序列或与之具有至少90%, 95%, 98%或99%同一性的重链序列，和从N至C方向的SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 4的轻链序列或与之具有至少90%, 95%, 98%或99%同一性的轻链序列，并且其中第二半抗体包含从N至C方向的SEQ ID NO: 6和SEQ ID NO: 8的重链序列或与之具有至少90%, 95%, 98%或99%同一性的重链序列，和从N至C方向的SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 4的轻链序列或与之具有至少90%, 95%, 98%或99%同一性的轻链序列。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的液体抗体制剂，特征在于所述抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白在 HEK293 细胞或以 HEK293 细胞为基础改造而得到的 HEK293T、HEK293F、HEK293E 细胞; CHO 细胞或以 CHO 细胞为基础改造而得到的 CHO-S、CHO-dhfr$^-$、CHO/DG44、ExpiCHO 中重组表达。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的液体抗体制剂，特征在于所述液体制剂为注射剂，优选用于皮下注射或静脉内注射，或者为输注剂，例如用于静脉内输注。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的液体抗体制剂，其包含:

（i）约 1-150 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;

（ii）约 5-50 mM 的组氨酸和／或盐酸组氨酸;

（iii）约 50-500 mM 的山梨醇、蔗糖、海藻糖和它们的任意组合; 或者

总浓度为约 50-500 mM 的山梨醇、蔗糖、海藻糖和它们的任意组合与甲硫氨酸的组合，其中甲硫氨酸的浓度为约 1-50 mM，和

（iv）约 0.1-1 mg/ml 聚山梨醇酯 80;

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5;

例如，所述液体抗体制剂包含

（i）约 10-100 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;

（ii）约 10-30 mM 的组氨酸和／或盐酸组氨酸;

（iii）约 100-400 mM 的山梨醇、蔗糖、和／或海藻糖; 或者

总浓度为约 100-400 mM 的山梨醇、蔗糖、和／或海藻糖与甲硫氨酸的组合，其中甲硫氨酸的浓度为约 5-40 mM，和

（iv）约 0.2-0.8 mg/ml 聚山梨醇酯 80;

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5;

或者，所述液体抗体制剂包含

（i）约 20 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;

（ii）约 10 mM 组氨酸;

（iii）约 50 mg/ml 山梨醇，和
（iv）约 0.3 mg/ml 聚山梨醇酯 80;
其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5;
或者，所述液体抗体制剂包含
（i）约 50 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;
（ii）约 20 mM 组氨酸;
（iii）约 50 mg/ml 山梨醇，和
（iv）约 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 80;
其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5;
或者，所述液体抗体制剂包含
（i）约 50 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;
（ii）约 20 mM 组氨酸;
（iii）约 80 mg/ml 蔗糖，和
（iv）约 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 80;
其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5;
或者，所述液体抗体制剂包含
（i）约 50 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;
（ii）约 20 mM 组氨酸;
（iii）约 80 mg/ml 海藻糖，和
（iv）约 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 80;
其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5;
或者，所述液体抗体制剂包含
（i）约 50 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;
（ii）约 20 mM 组氨酸;
（iii）约 80 mg/ml 蔗糖和约 1.49 mg/ml 甲硫氨酸，和
（iv）约 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 80;
其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5;
或者，所述液体抗体制剂包含
（i）约 42 mg/ml 的抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白;
（ii）约 0.85 mg/ml 组氨酸和约 3.17 mg/ml 盐酸组氨酸;
（iii）约 80 mg/ml 蔗糖，和
（iv）约 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 80;
其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-6.5，优选地约 5.5。

12. 根据权利要求1-11中任何一项所述的液体抗体制剂，其特征在于，该制剂在储存后，例如在2-8℃储存至少24个月后，或在室温储存至少3个月后，或在40℃±2℃储存1个月后，是稳定的，优选地具有如下特征之一或多项：

(i) 通过SEC-HPLC法测量，制剂具有大于90%的纯度，优选大于95%、96%、97%、98%、99%的纯度；

(ii) 通过还原型或非还原型CE-SDS法测量，制剂具有大于90%的纯度，优选大于92%、94%、96%、98%的纯度；

(iii) 通过 iCIEF 法测量，相对于储存第 0 天的初始值，制剂中抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的各组分(主成分、酸性组分和碱性组分)的变化值总和不超过 50%，例如不超过 40%、30%、20%、10%、5%；

(iv) 通过 ELISA 法测量，相对于储存第 0 天的初始值，制剂中抗 PD-1/HER2 双特异性抗体蛋白的相对结合活性为 70％-130％，例如，为 70％、80％、90％、100％、110％、120％、130％。

13. 一种固体抗体制剂，其通过固化权利要求1-12中任何一项所述的液体抗体制剂而获得，所述固体抗体制剂例如是冻干粉针剂形式。

14. 递送装置，其包含权利要求 1-12 中任何一项的液体抗体制剂或权利要求 13 的固体抗体制剂。

15. 预填装注射器，其包含权利要求 1-12 中任何一项的液体抗体制剂或权利要求 13 的固体抗体制剂，用于静脉内注射或者肌内注射。

16. 根据权利要求 1-12 中任何一项的液体抗体制剂或权利要求 13 的固体抗体制剂的用途，用于制备治疗、预防或延缓与 HER2 信号传导通路和 PD-1 信号传导通路相关的病症的药物，所述病症例如各种血液病和实体瘤，包括但不限于白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、脑肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、黑色素瘤。