

抗 PD-1 与突变 IL-2 免疫缀合物制剂

技术领域

本发明涉及免疫缀合物制剂领域。更具体而言，本发明涉及包含重组抗程序性死亡受体 1 (PD-1) 抗体与突变白细胞介素 2 (IL2) 的免疫缀合物（下文也称作“ α PD-1/IL2m”）的制剂，尤其是稳定的液体制剂，以及用于制备所述制剂的方法，以及所述制剂的疾病治疗和/或预防用途。

背景技术

白介素-2(IL-2)，也称作 T 细胞生长因子(TCGF)，是一种主要由活化的 T 细胞，尤其是 CD4+ T 辅助细胞产生的多功能细胞因子。通过与不同细胞上 IL-2 受体的结合，IL-2 在免疫反应中中介多重作用。一方面，IL-2 具有免疫系统刺激作用，可以刺激 T 细胞和天然杀伤(NK)细胞增殖和分化。因此，IL-2 已经被批准作为免疫治疗剂用于癌症和慢性病毒感染的治疗。而另一方面，IL-2 也可以促进免疫抑制性 CD4+CD25+ 调节性 T 细胞(即，Treg 细胞)的维持(Fontenot 等, Nature Immunol 6,1142-51(2005); D’Cruz 和 Klein, Nature Immunol 6,1152-59(2005); Maloy 和 Powrie, Nature Immunol 6,1171-72(2005))，在患者中引起由激活的 Treg 细胞导致的免疫抑制。

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，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 IL-2 和 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 IL-2 受体的抗 PD-1/IL-2 突变蛋白免疫缀合物(参见专利申请号 PCT/CN2022/120265，在此将其完整并入本文作为参考)。所述免疫缀合物在具有增强的抗肿瘤作用的同时，也表现出减少的副作用，因此是用于临床治疗肿瘤的良好候选药物。

对于临床用药，药品稳定性是保证药品有效性和安全性的重要指标之一。获得赋予药品良好稳定性的制剂处方是使药品在货架期内保持安全有效的关键条件。因此，为了满足药品稳定性的需求，本领域仍然需要进一步针对性地研发适用于抗 PD-1/IL-2 突变蛋白免疫缀合物的药物制剂。

发明概述

为了解决上述问题，本发明人针对重组表达的抗 PD-1/IL-2 突变蛋白免疫缀合物，设计了制剂处方筛选实验。通过高温实验，筛选缓冲液 pH 值、缓冲体系和辅料；并基于对外观、可见异物、蛋白含量、pH、纯度、电荷变异性、聚山梨酯-80 含量和生物学活性等指标的检测，对方剂进行评估和确认。最终研发获得了本发明液体制剂。本发明的制剂不仅能够确保产品在货架期内的质量可控，并能够通过稳定和易于实现的无菌制剂工艺予以制备。

因此，在第一方面，本发明提供了一种包含 α PD-1/IL2m 免疫缀合物的液体制剂。在一些实施方案中，本发明的液体制剂为注射剂，优选静脉输注的注射液。

在一些实施方案中，本发明液体制剂包含：

- (i) α PD-1/IL2m 免疫缀合物；

(ii) 缓冲剂;

(iii) 稳定剂; 和

(iv) 表面活性剂,

其中所述液体制剂的 pH 为大约 5.0 至大约 6.5, 例如大约 5.0 至大约 5.5, 优选地大约 5.0。

在一些实施方案中, 根据本发明的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物包含: (a) 抗 PD-1 半抗体和(b) 突变 IL2 融合多肽,

其中, 所述抗 PD-1 半抗体包含与 Fc 区融合的 Fab 片段, 且包含 SEQ ID NO: 8 的重链可变区序列中所含的三个重链 CDR 序列; 以及 SEQ ID NO: 15 的轻链可变区序列中所含的三个轻链 CDR 序列; 且

其中, 所述突变 IL2 融合多肽包含与 Fc 区融合的突变 IL-2 多肽, 且所述突变 IL-2 多肽包含 (i) N88R + S130R; 和 (ii)B' C' 环区序列 AGDASIH 或 AQSKNFH, 以及任选地 (iii) T3A。

在一些实施方案中, 所述液体制剂包含大约 0.5mg/ml 至大约 150mg/ml 的所述免疫缀合物, 优选地, 所述免疫缀合物的浓度为大约 0.5mg/ml 至大约 5mg/ml。

在一些实施方案中, 所述缓冲剂选自组氨酸缓冲剂、谷氨酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂和三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲剂和它们的组合。优选, 根据本发明的液体制剂包含组氨酸缓冲剂。在一些实施方案中, 根据本发明的液体制剂中, 缓冲剂的(总)浓度为大约 0.5mM 至大约 200 mM、大约 5mM 至大约 50 mM 或大约 5mM 至大约 20mM。

在一些实施方案中, 所述稳定剂选自糖类(例如, 蔗糖、右旋糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、环糊精、麦芽糖糊精、葡聚糖)、氨基酸(例如, 甲硫氨酸、精氨酸及其盐)或其组合。优选地, 所述稳定剂包含蔗糖、甲硫氨酸或其组合。在一些实施方案中, 稳定剂的(总)浓度为大约 1mM 至大约 1000mM、或大约 50mM 至大约 500mM。

在一些实施方案中, 所述表面活性剂选自聚山梨酯类表面活性剂, 例如聚山梨酯 80 和聚山梨酯 20, 优选地, 所述表面活性剂为聚山梨酯 80。在一些实施方案中, 表面活性剂的(总)浓度为大约 0.01mg/ml 至大约 10 mg/ml、约 0.05mg/ml 至大约 5 mg/ml、约 0.1mg/ml 至大约 5 mg/ml、或大约 0.1mg/ml 至大约 1 mg/ml。

在一些实施方案中, 本发明液体制剂包含:

(i) α PD-1/IL2m 免疫缀合物;

(ii) 组氨酸缓冲剂;

(iii) 蔗糖和甲硫氨酸; 和

(iv) 聚山梨酯-80,

以及任选地(v) EDTA,

其中所述液体制剂的 pH 为大约 5.0 至大约 6.5, 例如大约 5.0 至大约 5.5, 优选地大约 5.0。

在一些实施方案中, 本发明液体制剂包含:

(i) α PD-1/IL2m 免疫缀合物;

(ii) 组氨酸和盐酸组氨酸;

(iii) 蔗糖和甲硫氨酸; 和

(iv) 聚山梨酯-80,

以及任选地(v) EDTA,

其中所述液体制剂的 pH 为大约 5.0 至大约 6.5, 例如大约 5.0 至大约 5.5, 优选地大约 5.0。

优选地, 本发明液体制剂包含:

(i) 约 1mg/ml 至约 10 mg/ml 的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物;

(ii) 约 10mM 至约 30 mM 的组氨酸缓冲剂;

(iii) 约 70mg/ml 至约 90mg/ml 的蔗糖, 或者约 50mg/ml 至约 80 mg/ml 的蔗糖与约 40mM 至约 60mM 的甲硫氨酸的组合; 和

(iv) 约 0.2mg/ml 至约 0.4 mg/ml 的聚山梨酯 80;

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-5.5, 优选地大约 pH 5.0;

或者, 所述液体制剂包含

(i) 约 1.0 mg/ml 的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物;

(ii) 约 10 mM 组氨酸缓冲剂;

(iii) 约 80mg/ml 的蔗糖, 或者约 70 mg/ml 的蔗糖与约 50 mM 的甲硫氨酸的组合, 和

(iv) 约 0.3 mg/ml 聚山梨酯 80;

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-5.5, 优选地大约 pH 5.0。在上述任何实施方案中, 优选地, 组氨酸缓冲剂为包含组氨酸及其盐的缓冲体系, 尤其是包含组氨酸和盐酸组氨酸的组氨酸缓冲体系。

在一些更优选的实施方案中, 本发明液体制剂包含:

(i) 约 1.0 mg/ml 的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物;

(ii) 约 0.12 mg/ml 组氨酸和约 1.94 mg/ml 盐酸组氨酸;

(iii) 约 70 mg/ml 蔗糖和约 7.49 mg/ml 甲硫氨酸, 和

(iv) 约 0.3 mg/ml 聚山梨酯 80;

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-5.5, 优选地大约 pH 5.0。

在第二方面, 本发明提供了一种固体制剂, 其是通过将本发明的液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, 所述固体制剂例如是冻干粉针剂形式。固体制剂可在使用前, 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。

在第三方面, 本发明提供了包含本发明液体制剂的药用容器。在一些实施方案中, 所述容器为注射剂容器。

在第四方面, 本发明提供了一种递送装置, 其包含本发明的液体制剂或固体制剂。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制剂或固体制剂的预填充注射器形式提供, 例如用于静脉内、皮下、皮内或者肌肉注射、静脉内输注。

在第五方面, 本发明提供向受试者, 例如哺乳动物递送 α PD-1/IL2m 免疫缀合物的方法, 包括给予所述受试者本发明的液体制剂或固体制剂的步骤, 所述递送是通过使用预填充注射器的递送装置实施的。

在第六方面, 本发明提供本发明的液体制剂或固体制剂的用途, 用于在受试者中治疗或预防癌症; 或用于制备在受试者中治疗或预防癌症的药物或递送装置(如, 预填充注射器)。优选地, 所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤, 例如胃肠道肿瘤或黑色素瘤, 例如结肠直肠癌或结肠癌; 例如, 所述癌症是 PD-1 抗体治疗耐受性癌症。

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了。

附图说明

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 显示处方研究的结果变化趋势图。(A) 蛋白含量(UV 法)变化趋势图; (B) 纯度(SEC-HPLC 法)变化趋势图; (C) 纯度(nrCE-SDS 法)变化趋势图; (D) 电荷变异性-酸性组分(iCIEF 法)变化

趋势图；(E) 电荷变异体-主成分 (iCIEF 法) 变化趋势图；(F) 电荷变异体-碱性组分 (iCIEF 法) 变化趋势图。

图 2 显示处方确认研究的结果变化趋势图。(A) - (E) 为 40°C 稳定性研究结果，(F) - (J) 为 25°C 稳定性研究结果。(A) 和 (F) 为纯度 (SEC-HPLC 法) 变化趋势图；(B) 和 (G) 为纯度 (nrCE-SDS 法) 变化趋势图；(C) 和 (H) 为电荷变异体-酸性组分 (iCIEF 法) 变化趋势图；(D) 和 (I) 为电荷变异体-主成分 (iCIEF 法) 变化趋势图；(E) 和 (J) 为电荷变异体-碱性组分 (iCIEF 法) 变化趋势图。

图 3 显示免疫缀合物 2149 蛋白的体内药效。(A) 显示了反映 2149 对小鼠 MC38 肿瘤的抗肿瘤作用的肿瘤体积变化曲线；(B) 显示了反映 2149 对小鼠 MC38 肿瘤的抗肿瘤作用的生存曲线；(C) 显示了 2149 对小鼠体重的影响。

图 4 显示免疫缀合物 2149 蛋白的体内药效。(A) 显示了反映 2149 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的肿瘤体积变化曲线；(B) 显示了反映 2149 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的小鼠个体肿瘤体积变化曲线；(C) 显示了反映 2149 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的生存曲线；(D) 显示了 2149 对小鼠体重的影响。

图 5 显示对照分子 2061 和免疫缀合物 2149 蛋白的体内药效比较。(A) 显示了反映 2061 和 2149 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的小鼠个体肿瘤体积变化曲线；(B) 显示了反映 2061 和 2149 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的生存曲线图；(C) 显示了 2061 和 2149 对小鼠体重的影响。

图 6 显示本发明的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物的结构示意图。

图 7 显示序列比对示意图。

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。

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”是指，至少包含轻链和重链免疫球蛋白可变区的多肽，所述免疫球蛋白可变区特异性识别并结合抗原。该术语涵盖各种抗体结构，包括、但不限于单克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体、全长抗体和抗体片段，只要它们呈现期望的抗原结合活性即可。

在本文中，“全抗体”（在本文中可与“全长抗体”、“完全抗体”和“完整抗体”互换使用）是指，包含由二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的蛋白质分子。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。因此，一条抗体重链通常从 N 端到 C 端顺序包含：重链可变区、重链恒定结构域 CH1、CH2 和 CH3。在本文中，位于 CH1 结构域 C 端、包含 CH2 和 CH3 结构域的重链 C 端区域也称作 Fc 区或 Fc 片段。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。因此，一条抗体轻链通常从 N 端到 C 端顺序

包含：轻链可变区和轻链恒定结构域 CL。抗体重链和轻链的可变区配对形成负责与抗原结合的抗原结合结构域。重链和轻链的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。

在本文中，术语“抗 PD-1 半抗体”是指，包含完整抗 PD-1 抗体的一条重链和一条轻链的单价抗原结合多肽。在此类半抗体中，通常，重链的 VH-CH1 区与轻链的 VL-CL 区配对形成特异性结合 PD-1 抗原的 Fab 片段，并借助免疫球蛋白铰链区在 CH1 结构域的 C 端共价连接重链 Fc 区。因此，抗 PD-1 半抗体是包含与 Fc 区融合的、特异性结合 PD-1 的 Fab 片段的多肽。

在本文中，术语“突变 IL-2 融合多肽”是指，包含突变 IL-2 多肽的融合多肽，其中所述突变 IL-2 多肽在 C 端与 Fc 区融合。典型地，所述融合多肽从 N 端到 C 端包含突变 IL-2 多肽、任选的接头序列、铰链区和 Fc 区。

在本文中， α PD-1/IL2m 免疫缀合物是指，包含(i)抗 PD-1 半抗体和(ii)突变 IL-2 融合多肽、或基本由其组成、或由其组成的免疫缀合物。 α PD-1/IL2m 免疫缀合物的一个示例性结构显示在图 6 中。如图 6 所示，在 α PD-1/IL2m 免疫缀合物中，抗 PD-1 重链的 VH-CH1 区与轻链的 VL-CL 区配对形成特异性结合 PD-1 的 Fab 片段，且突变 IL-2 融合多肽的 Fc 区和抗 PD-1 重链的 Fc 区配对并二聚化。应当明了，包含在本发明免疫缀合物中的抗体恒定区可以基于其序列而归属于任何的类或亚类，并且可以为天然序列恒定区或变体序列恒定区。

在本文中，抗体恒定区（例如 Fc 区）的类和亚类是指，由恒定区序列决定的类别。一般，抗体轻链恒定区可以基于其氨基酸序列而划分为两种类型（称为 kappa (κ) 和 lambda (λ)）。抗体重链恒定区可以基于其氨基酸序列而划分为主要 5 种不同的类型：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，并且这些类型中的几种可以进一步划分成亚类，如，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4、IgA1 以及 IgA2。因此，当提及免疫缀合物具有 IgG 类的 Fc 区时，是指该免疫缀合物具有基于其氨基酸序列归属于 IgG 类型的 Fc 区。类似地，当提及免疫缀合物具有 kappa 轻链恒定区时，是指该免疫缀合物具有基于其氨基酸序列归属于 kappa 类型的轻链恒定区。

在本文中，术语“天然序列 Fc 区”涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 区序列，例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区序列(Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.)。在一些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区具有自 Cys226 或自 Pro230 延伸至重链羧基端的氨基酸序列。然而，Fc 区的 C 末端端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。在再一些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区在 N 端带有天然免疫球蛋白的铰链序列或部分铰链序列，例如根据 EU 编号，E216 到 T225 的序列或 D221 到 T225 的序列。

在本文中，术语“变体序列 Fc 区”是指，相对于天然序列 Fc 区多肽包含修饰的 Fc 区多肽。所述的修饰可以是氨基酸残基的添加，缺失或取代。取代可以包括天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸。修饰的目的可以是旨在改变由 Fc 区与其受体的结合及其由此引发的效应子功能。

在本文中，术语“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”或“高变区”可互换使用，是指抗体可变结构域中在序列上高度可变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。在本文中，抗体重链和轻链的 CDR 从 N-端开始顺序编号，通常称作 CDR1、CDR2 和 CDR3。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 也称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 则称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，可以采用本领域公知的多种方案确定其 CDR 序列。本领域公知多种可用于在一个给定的 VH 或 VL 氨基酸序列中确定其 CDR 序列的方案，包括例如：Chothia 定义 (Chothia 等人, (1989) Nature 342: 877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))，Kabat 定义(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM 定义(University of Bath), Contact 定义(University College London), IMGT 定义(<http://imgt.cines.fr>), 以及基

于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。此外, CDR 也可以基于与参考 CDR 序列具有相同的 Kabat 编号位置而确定。除非另有说明,否则在本发明中,当提及抗体重链/轻链可变区中的残基位置时,是指根据 Kabat 编号系统(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))的编号位置。

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比而进行的最佳比对,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。

在本文中,就抗体序列而言,氨基酸序列同一性百分比通过将候选抗体序列与给定抗体序列最佳比对的,在一个优选方案中按照 Kabat 编号规则进行最佳比对的,予以确定。在本文中,在不指定比较窗(即待比较的目标抗体区域)的情况下,将适用于在给定抗体序列的全长上进行比对。

如本文中使用的,术语“保守取代”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的生物学功能的氨基酸取代。例如,可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入保守取代。典型的保守型氨基酸取代是指将一种氨基酸取代为具有相似的化学性质(例如电荷或疏水性)的另一种氨基酸。功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。

在本文中,术语“免疫缀合物制剂”是指一种制备物,所述制备物处于允许作为活性成分的免疫缀合物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。这类制剂通常是无菌的。通常,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。

在本文中,“稳定的”免疫缀合物制剂是指制剂中的免疫缀合物在储存于特定条件之后保有可接受程度的物理稳定性和/或化学稳定性。尽管免疫缀合物制剂中所含的免疫缀合物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 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%的免疫缀合物结构或功能,则认为免疫缀合物制剂是“稳定的”。在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物在储存后,基本上保留其物理和化学稳定性。

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或高温胁迫强制实验。在一些实施方案中,通过对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制剂中的免疫缀合物的不稳定性加速的条件。例如,可以将经调配的免疫缀合物制剂充填至玻璃小瓶中以检验在高温胁迫下的免疫缀合物稳定性。

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,则可以认为免疫缀合物在制剂中“保持其物理稳定性”。由于制剂中免疫缀合物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,需要使在制剂中的免疫缀合物聚集最小化或防止

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 OD350nm 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免疫缀合物蛋白单体的百分比来测量制剂的稳定性，其中制剂中的免疫缀合物蛋白单体的百分比越高，则制剂的稳定性越高。

在本文中，与制剂稳定性相关的表述“免疫缀合物蛋白单体”（或“免疫缀合物单体”或“单体”）是指，单个完整的功能性免疫缀合物蛋白分子。免疫缀合物蛋白单体区别于由多个所述蛋白单体组成的蛋白聚集体，也有别于免疫缀合物蛋白片段，例如作为免疫缀合物蛋白一部分的半抗体部分或 IL-2 突变融合蛋白部分。可以通过 SEC-HPLC 分析，区分免疫缀合物蛋白的单体形式与免疫缀合物蛋白的聚集体形式。也可以通过非还原 CE-SDS 分析，区分免疫缀合物蛋白的单体形式与免疫缀合物蛋白的片段形式。

“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% 的免疫缀合物蛋白单体。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制剂中保持至少约 88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的免疫缀合物蛋白单体。当评估物理稳定性时，药物制剂储存的特定温度可为约 -80°C 至约 45°C 的任一温度，例如储存于约 -80°C、约 -30°C、约 -20°C、约 0°C、约 4°C-8°C、约 5°C、约 25°C、约 35°C、约 37°C、约 40°C、约 42°C 或约 45°C。例如，若储存于约 40°C $\pm$ 2°C 2 周或 4 周之后，检测到至少约 88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的免疫缀合物蛋白单体，则药物制剂视为是稳定的。若储存于约 25°C $\pm$ 2°C 4 周、2 个月或 3 个月之后，检测到至少约 88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的免疫缀合物蛋白单体，则药物制剂视为是稳定的。若储存于约 5°C $\pm$ 3°C 3 个月之后，检测到至少约 88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的免疫缀合物蛋白单体，则药物制剂视为是稳定的。

经一段储存时间后，如果制剂中的免疫缀合物蛋白不显示显著的化学改变，则可以认为免疫缀合物蛋白在制剂中“保持其化学稳定性”。大多数化学不稳定性源自于形成了免疫缀合物蛋白的共价修饰形式（例如，免疫缀合物蛋白的电荷变异体）。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/或定量免疫缀合物蛋白的化学改变形式来评估。例如，可以通过成像毛细管等电聚焦电泳 (iCIEF) 检测制剂中免疫缀合物蛋白的电荷变异体。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免疫缀合物蛋白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免疫缀合物蛋白电荷变异体（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°C 至约 45°C 的任一温度，例如储存于约 -80°C、约 -30°C、约 -20°C、约 0°C、约 4°C-8°C、约 5°C、约 25°C 或约 45°C。例如，若在储存于 5°C 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°C 2 个月，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°C 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的液体制剂。

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

“胁迫条件”是指在化学和/或物理上不利于免疫缀合物的环境，所述环境可以导致不可接受的免疫缀合物蛋白失稳定。“高温胁迫”是指，将免疫缀合物制剂置于室温或甚至于更高温度（例如40°C±2°C）储存一段时间。通过室温加速实验或高温胁迫强制试验，可以检查免疫缀合物制剂的稳定性。

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、肌肉内、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，本发明的免疫缀合物制剂肠胃外施用于受试者。在一个实施方案中，本发明的免疫缀合物制剂以皮下、皮内、肌肉内或静脉内注射方式施用于受试者。

I. 本发明的免疫缀合物制剂

在本文中，根据本发明的 α PD-1/IL2m免疫缀合物的制剂，也简称为“本发明的免疫缀合物制剂”或“本发明的制剂”，意指包含根据本发明的 α PD-1/IL2m免疫缀合物作为活性成分并包含可药用赋形剂的制备物。本发明的制剂除了能够使作为活性成分的 α PD-1/IL2m免疫缀合物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。

因此，在第一方面，本发明提供了一种包含 α PD-1/IL2m免疫缀合物的液体制剂，其包含：

- (i) α PD-1/IL2m免疫缀合物；
- (ii) 缓冲剂；
- (iii) 稳定剂；和
- (iv) 表面活性剂。

本发明的制剂可以制备成水性形式的液体制剂，用于例如即用式预填充注射器，或者可以制备成冻干制剂，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，本发明的制剂是液体制剂形式。

本发明液体制剂的性质

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°C至约45°C，例如-80°C、约-30°C、约-20°C、约0°C、约5°C、约25°C、约35°C、约38°C、约40°C、约42°C或约45°C的条件下，储存至少5天、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。

在一些实施方案中，本发明的液体制剂在约2°C-8°C保持稳定至少3个月，至少12个月，或至少24个月。在一些实施方案中，本发明的液体制剂在室温或例如约25°C保持稳定至少1个月、至少2个月，或至少3个月。在一些实施方案中，本发明的液体制剂在约40°C保持稳定至少1周、至少2周、至少3周，或至少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、pH 值、纯度、电荷变异体和/或聚山梨酯表面活性剂含量的变化,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 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存至少 1 周、2 周或 1 个月,或在加速实验中,例如在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存至少 1 个月、2 个月或 3 个月,或在长期实验中,例如在 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存至少 2 个月或 3 个月,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清至微乳光,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 pH 值变化,检查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,变化值不超过 0.3,优选地不超过 0.2,更优选地不超过 0.1。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,其中通过体积排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC),相对于储存第 0 天的初始值,免疫缀合物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,其中通过非还原型十二烷基硫酸钠毛细管电泳(mrCE-SDS)法,免疫缀合物单体纯度的变化值下降不超过 10%,例如不超过 5%、4%、3%,优选不超过 2%。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,免疫缀合物的电荷变异体(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,通过高效液相色谱荧光检测法(HPLC-FLD 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,聚山梨酯表面活性剂含量变化不超过 0.3mg/ml,例如不超过 0.2mg/ml,或不超过 0.1mg/ml,优选地,制剂储存后,聚山梨酯 80 表面活性剂含量在 0.1mg/ml 至 0.5mg/ml 之间,例如 0.2mg/ml 至 0.4mg/ml 之间,优选地大约 0.3mg/ml。

在一个实施方案中,制剂在储存后,例如在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 储存至少 24 个月,或在室温储存至少 3 个月,或在 $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 储存 1 个月,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%、或 97% 的纯度;
- (ii) 通过非还原型 CE-SDS 法测量,制剂具有大于 90% 的纯度,优选大于 92%、94%、96%、或 98% 的纯度;
- (iii) 通过 iCIEF 法测量,相对于储存第 0 天的初始值,制剂中免疫缀合物的各电荷变异体组分(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 HPLC-FLD 法测量,相对于储存第 0 天的初始值,制剂中聚山梨酯 80 含量的变化值不超过 0.3mg/ml,例如不超过 0.2mg/ml、0.10mg/ml、或 0.05mg/ml; 和
- (v) 通过 ELISA 法测量,相对于储存第 0 天的初始值,制剂中免疫缀合物与 IL-2 受体和 PD-1 的相对结合活性下降不超过 30%,例如为 80%-110%,例如,为大约 70%、大约 80%、大约 90%、大约 100%、或大约 110%。用于所述制剂稳定性测定的 SEC-HPLC 法、非还原型 CE-SDS 法、iCIEF 法、HPLC-FLD 法、和 ELISA 法,可以按照本领域已知的方式实施,也可以按照实施例描述的方式进行。

本发明的液体制剂可以在振荡和冻融条件下保持稳定。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、pH 值、纯度、电荷变异体和/或聚山梨酯表面活性剂含量的变化,来指示制剂在振荡和冻融条件下的稳定性。在一个实施方案中,可以在振荡实验中,例如,在室温避光以 650rpm 的转速振荡 1 天、2 天或 3 天后,检测本发明液体制剂的稳定性。在一个实施方案中,可以在冻融实验中,例如,在 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个由 -20°C 冻存和 $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 解冻组成的冻融循环后,检测本发明液体

制剂的稳定性。

用于检查本发明制剂的稳定性性质的室温加速实验、高温胁迫实验和长期实验，可以采用本领域已知的方式进行，或按照实施例中进行的方式进行。

本发明液体制剂的组分

(i) α PD-1/IL2m 免疫缀合物

包含在本发明制剂中的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物包含(i)抗 PD-1 半抗体和(ii)突变 IL-2 融合多肽。根据本发明的抗 PD-1 半抗体包含与 Fc 区融合的特异性结合 PD-1 的 Fab 片段，且根据本发明的突变 IL-2 融合多肽包含与 Fc 区融合的突变 IL-2 多肽。适用于本发明的突变 IL-2 多肽以及 α PD-1/IL2m 免疫缀合物公开在 PCT/CN2022/120265 中，在此将该文献完整并入作为参考。

以下就本发明 α PD-1/IL2m 免疫缀合物的组件，抗 PD-1 半抗体和突变 IL-2 融合多肽，以及示例性 α PD-1/IL2m 免疫缀合物分别进行了详述描述。本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，在这些部分中描述的任何技术特征的任何组合均在本发明考虑范畴之中，并且本发明的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物可以包含任何这样的组合特征。

突变 IL-2 多肽

根据本发明的突变 IL-2 融合多肽包含与 Fc 区融合的突变 IL-2 多肽。在一些实施方案中，根据本发明的突变 IL-2 多肽，相比野生型 IL-2，具有在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面上弱化对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合亲和力的突变；并具有改善蛋白表达量和/或纯度的缩短的 B'C' 环区。

在本文中，野生型“白介素-2”或“IL-2”是指作为引入本发明突变或突变组合的模板的亲本 IL-2 蛋白，优选天然存在的 IL-2 蛋白，例如来源于人或非人灵长类动物的天然 IL-2 蛋白，包括未经加工的(例如未去除信号肽)的形式和经加工的(例如去除了信号肽)的形式。包含信号肽的一个全长天然人 IL-2 序列显示于 SEQ ID NO: 1 中，其成熟蛋白的序列显示于 SEQ ID NO: 2 中。该表述也包括天然 IL-2 的变体，例如，在 125 位引入了突变 C125S 的天然人 IL-2 蛋白(uniprot:P60568)属于本发明的野生型 IL-2。一个包含 C125S 突变的野生型人 IL-2 蛋白的实例显示于 SEQ ID NO: 3 中。优选地，野生型 IL-2 序列与 SEQ ID NO: 1 或 2 或 3 的氨基酸序列具有至少 85%，95%，甚至至少 96%，97%，98%，或 99% 或更高的氨基酸序列同一性。

在本文中，当提及 IL-2 多肽或 IL-2 序列区段中的氨基酸位置时，通过参考野生型人 IL-2 蛋白(也称作 IL-2^{WT})的氨基酸序列 SEQ ID NO: 3，予以确定。可以通过与 SEQ ID NO: 3 进行氨基酸序列比对，鉴定在其它 IL-2 蛋白或多肽(包括全长序列或截短片段)上的对应氨基酸位置。因此，在本发明中，除非另有说明，否则 IL-2 蛋白或多肽的氨基酸位置为根据 SEQ ID NO: 3 编号的氨基酸位置。例如，当提及“F42”时，是指 SEQ ID NO: 3 的第 42 位苯丙氨酸残基 F，或经比对在其它 IL-2 多肽序列上的对应位置的氨基酸残基。同时，为了便于理解，当本发明的突变 IL-2 涉及某些特定区段(例如，B'C' 环区的序列，即 SEQ ID NO: 3 的第 73-83 位共 11 个氨基酸残基)的截短或缺失时，如有必要，可以目视检查该区域并引入空位，以保证在该突变 IL-2 与 SEQ ID NO: 3 比对时，加入空位的该缺失或截短区段与 SEQ ID NO: 3 中的相应区段，处于相应的位置区域，并具有相应的氨基酸残基编号。例如，对于包含截短为 7 个氨基酸残基的 B'C' 环区序列(AGDASIH)的突变 IL-2 多肽(SEQ ID NO: 4)，可以通过目视检查在所述截短的 B'C' 环区中引入 4 个空位，由此在所述突变 IL-2 多肽与 SEQ ID NO: 3 进行比对时，引入空位的该截短 B'C' 环区与 SEQ ID NO: 3 的 B'C' 环区序列处于相应的位置区段，并具有 73-83 位的氨基酸残基编号，如下图 7 所示。

为进行氨基酸位置确定而实施的序列比对, 可以使用可从 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 获得的 Basic Local Alignment Search Tool, 采用默认参数进行。

在本文中, 在 IL-2 突变体中的氨基酸突变可以是氨基酸取代、缺失、插入、和/或添加。可以进行取代、缺失、插入和添加的任意组合来获得具有期望性质(例如降低的 IL-2R α 结合亲和力、和/或改善的成药性和/或弱化的 IL-2R $\beta\gamma$)的最终突变蛋白构建体。例如, 可以在全长人 IL-2 位置 1 缺失丙氨酸残基, 或在 B'C' 环区缺失一个或数个氨基酸以缩短该环区的长度。再例如, 可以是将野生型 IL-2 的 B'C' 环区序列整体或部分替换为不同的序列(例如 IL-15 的 B'C' 环), 以获得长度缩短的 B'C' 环区序列。

在本文中, 在提及 IL-2 突变蛋白时, 以如下方式来描述单氨基酸取代: [原始氨基酸残基/位置/取代的氨基酸残基]。例如, 位置 35 的赖氨酸取代为谷氨酸, 可以表示为 K35E。当在一个给定位置(例如 K35 位)可以有多种可选氨基酸取代方式(例如 D,E)时, 该氨基酸取代可以表示为: K35D/E。相应地, 可以通过加号“+”或“-”将各单氨基酸取代连接起来, 以表示在多个给定位置的组合突变。例如 F42A、N88R 和 S127E 位置的组合突变, 可以表示为: F42A+N88R+S127E, 或 F42A-N88R-S127E。

在本文中, 根据本发明的 IL-2 突变多肽与野生型 IL-2 多肽之间的序列差异性可以用序列同一性表述, 也可以用两者之间差异氨基酸的数量来表达。在一个实施方案中, 根据本发明的 IL-2 突变多肽与野生型 IL-2 多肽之间具有至少 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 同一性, 优选 90% 以上同一性, 例如至少 95%、96% 或 97% 同一性。在另一些实施方案中, 除了特别规定的根据本发明的突变(IL-2R α 结合界面突变、IL-2 $\beta\gamma$ 结合界面和/或缩短的 B'C' 环区)外, IL-2 突变多肽与野生型多肽之间还可以具有不超过 15 个, 例如 1-10 个, 或 1-5 个突变, 例如, 0, 1, 2, 3, 4 个突变。在一个实施方案中, 所述其余突变可以是保守取代。

在本文中, 术语“B'C' Loop”或“B'C' 环区”或“B'C' 环序列”可互换使用, 是指 IL-2 蛋白的 B 螺旋和 C 螺旋之间的连接序列。通过 IL-2 的晶体结构分析(例如 PDB:2ERJ), 可以确定一个 IL-2 蛋白的 B'C' 环序列。为了本发明的目的, 根据 SEQ ID NO:3 的编号, 该 B'C' 环序列是指 IL-2 多肽中连接位置 72 的残基和位置 84 的残基的序列。在 SEQ ID NO: 1、2 和 3 的野生型 IL-2 蛋白中, 该连接序列包括 A73-R83 共 11 个氨基酸。相应地, 在本文中, 术语“缩短的环区”或“缩短的 B'C' 环区”是指相对于野生型 IL-2 蛋白, 突变蛋白具有长度减小的 B'C' 环序列, 即, 根据 SEQ ID NO: 3 的编号, 氨基酸残基 aa72 和 aa84 之间的连接序列长度缩短。“缩短的环区”可以通过环序列的替换或截短来实现。所述替换或截短可以发生在 B'C' 环序列的任何区域或部分。例如, 替换或截短可是环区 A73-R83 序列的替换(例如替换为 IL-15 B'C' 环区)或自该序列 C 端的一个或多个氨基酸残基截短, 以获得长度小于 10, 9, 8, 7, 6, 或 5 个氨基酸的 B'C' 环区序列。再例如, 替换或截短可以是环区 Q74-R83 序列的替换或自该序列 C 端的一个或多个氨基酸残基截短。在进行所述替换或截短后, 如果需要, 可以进一步在环区序列中引入单氨基酸替代, 例如用于消除糖基化的氨基酸替代, 和/或回复突变, 以进一步改善突变蛋白的性能, 例如成药性能。因此, 在本文中, 经突变后的缩短 B'C' 环区可以通过在引入突变后连接位置 72 的残基和位置 84 的残基之间的序列来描述。

在本文中, “IL-2R α 结合界面”突变是指, 发生在 IL-2 与 IL-2R α (即, CD25)相互作用的氨基酸位点上的突变。可以通过分析 IL-2 与其受体复合物的晶体结构(例如 PDB:1Z92), 确定这些相互作用位点。在一些实施方案中, 所述突变尤其是指 IL-2 的氨基酸残基 35-72 区域的突变。优选地, 与引入所述突变前的对应蛋白相比, 包含所述突变的 IL-2 蛋白具有降低或消除的 IL-2R α 结合。

在本文中, “IL-2 $\beta\gamma$ 结合界面”突变是指, 发生在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ (即, CD122 和 CD132)相互作用的氨基酸位点上的突变。可以通过 IL-2 与其受体复合物的晶体结构分析(例如 PDB:2ERJ), 确定这些相互作用氨基酸位点。在一些实施方案中, 所述突变尤其是指 IL-2 的氨基酸残基 12-20、氨基酸残基 84-95、和氨基酸残基 126-130 区域的突变。优选地, 与引入所述突变前的对应蛋白相比, 包含所述突变的 IL-2 蛋白具有减弱的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合。

在一些实施方案中, 根据本发明的突变 IL-2 多肽, 与野生型 IL-2(优选人 IL-2, 更优选包含 SEQ ID

NO: 3 序列的 IL-2)相比, 包含如下突变:

(i) 在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面上, 尤其是在选自位置 88、127 和/或 130 的至少一个位置上, 具有弱化对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合的突变;

以及

(ii) 缩短的 B'C' 环区 (即, 连接氨基酸残基 aa72 和 aa84 的序列), 优选地, 所述缩短的环区具有小于 10, 9, 8, 7, 6, 或 5 个的氨基酸长度, 且优选 7 个氨基酸长度; 优选地, 所述缩短的 B'C' 环区导致改善的蛋白表达量和/或纯度,

其中氨基酸位置根据 SEQ ID NO: 3 编号。

优选地, 所述 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变包含选自以下的突变中的一个或多个或以下突变的组合:

N88D, N88R, S127E, S130R, N88R+S130R, N88R+S127E。

优选地, 所述缩短的 B'C' 环区具有序列 A(Q/G)SKN(F/I)H, 或更优选地, 具有选自以下的 B' C' 环序列(即, 连接 aa72 至 aa84 的序列): AQSKNFH; AGSKNFH; AQSANFH; 和 AQSANIH。

可选地, 本发明的突变 IL-2 多肽还可以包含在 IL-2 与 IL-2R α 结合界面上, 尤其是在位置 35 和/或 42 上, 具有消除或降低对 IL-2R α 受体的结合亲和力的突变。优选地, 所述 IL-2R α 结合界面突变包含突变 K35E 和/或 F42A。

在一些实施方案中, 根据本发明的 IL-2 突变多肽, 相对于野生型 IL-2, 包含:

(i) N88R + S130R;

N88D;

N88R;

F42A+N88R + S127E; 或

K35E+N88R + S127E; 和

(ii) B'C' 环区序列 AGDASIH 或 AQSKNFH;

以及任选地 (iii) T3A。

在一个优选的实施方案中, 所述突变 IL-2 多肽包含: (i) T3A + N88R + S130R; 和 (ii) B'C' 环区序列 AGDASIH。优选地, 所述突变 IL-2 包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列或与其具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、或 96% 的氨基酸序列同一性。

抗 PD-1 半抗体

在一个实施方案中, 根据本发明的抗 PD-1 半抗体包含: SEQ ID NO: 8 的重链可变区序列中所含的三个重链 CDR 序列(即, HCDR1, HCDR2 和 HCDR3); 以及 SEQ ID NO: 15 的轻链可变区序列中所含的三个轻链 CDR 序列(即, LCDR1, LCDR2 和 LCDR3)。在一些实施方案中, 所述 CDR 根据 Chothia、AbM、Kabat、IMGT 或其任意组合进行定义, 例如, 根据 Kabat 或 Chothia 或其组合进行定义。在一些实施方案中, 所述 CDR 根据 North 方案定义的 CDR 序列。在一个优选的实施方案中, 轻链 CDR (LCDRs) 为根据 Kabat 方案定义的 CDR 序列; 重链 CDR (HCDRs) 为根据 Kabat 和 Chothia 方案组合定义的 CDR 序列。

在一个实施方案中, 根据本发明的抗 PD-1 半抗体包含:

-分别包含或由 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 以及

-分别包含或由 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一个实施方案中, 所述抗 PD-1 半抗体包含: SEQ ID NO: 8 的重链可变区序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、96%、或 96% 的氨基酸序列同一性的序列; 以及 SEQ ID NO: 15 的轻链可变区序

列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、96%、或 96% 的氨基酸序列同一性的序列。优选地，所述抗 PD-1 半抗体包含：SEQ ID NO: 8 的重链可变区和 SEQ ID NO: 15 的轻链可变区。

α PD-1/IL2m 免疫缀合物的 Fc 区

根据本发明的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物包含(i)抗 PD-1 半抗体和(ii)突变 IL-2 融合多肽。优选地，抗 PD-1 半抗体与突变 IL-2 融合多肽，通过其各自 Fc 区以及位于 Fc 区 N 端的铰链区，正确配对以形成根据本发明的免疫缀合物。

在一个实施方案中，突变 IL-2 融合多肽和抗 PD-1 重链的 Fc 区可以为 IgG 类的 Fc 区，或 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类的 Fc 区。在一个实施方案中，所述 Fc 区包含 knob-in-hole 突变以促进抗 PD-1 半抗体与突变 IL-2 融合多肽的正确配对。在一个实施方案中，突变 IL-2 融合多肽的 Fc 区包含 knob 突变，且抗 PD-1 重链的 Fc 区包含 hole 突变。在一个实施方案中，knob 突变包含突变 T366W 和 S354C (EU 编号)，且 hole 突变包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C (EU 编号)。

示例性 α PD-1/IL2m 免疫缀合物

在一些优选的实施方案中，根据本发明的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物包含或由(i)突变 IL-2 融合多肽、(ii)抗 PD-1 重链和(iii)抗 PD-1 轻链组成，其中：

-突变 IL-2 的融合多肽包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、96%、或 96% 的氨基酸序列同一性的序列；

-抗 PD-1 重链包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、96%、或 96% 的氨基酸序列同一性的序列；且

-抗 PD-1 轻链包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、96%、或 96% 的氨基酸序列同一性的序列。

在一些更优选的实施方案中，根据本发明的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物包含或由具有 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的突变 IL-2 融合多肽、具有 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列的抗 PD-1 重链和具有 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列的抗 PD-1 轻链组成。

在一些实施方案中，用于本发明制剂中的本发明 α PD-1/IL2m 免疫缀合物，由 HEK293 细胞（涵盖 HEK293 细胞以及以 HEK293 细胞为基础改造而得到的细胞，例如 HEK293T、HEK293F、HEK293E 细胞）；或由 CHO 细胞（包括 CHO 细胞以及以 CHO 细胞为基础改造而得到的细胞，例如 CHO-S、CHO-dhfr-、CHO/DG44、ExpiCHO 细胞），重组表达产生并经纯化获得。可以采用本领域熟知用于重组表达免疫缀合物蛋白的方法，或采用实施例所描述的方法，重组表达本发明的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物。用于将治疗性蛋白纯化至药用级的技术是本领域公知的，包括但不限于，蛋白 A 捕获、离子交换色谱、病毒灭活、病毒过滤、超滤/渗滤及其组合。可以使用此类纯化技术，以提供具有足够的可重复性和适度纯度的免疫缀合物药物物质用于制剂的配制。如实施例所示，用于本发明液体制剂中的所述免疫缀合物表现出显著的抗肿瘤活性，并同时具有减少的副作用。

本发明的抗体制剂中所包含的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物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，本发明的制剂为液体制剂，其可含有约 0.5-150 mg/ml，优选地为大约 0.5mg/ml 至大约 100 mg/mL，例如大约 0.5mg/ml 至大约 50mg/ml 或大约 1mg/ml 至大约 20mg/ml，例如，大约 0.5mg/ml、大约 1mg/ml、大约 2mg/ml、大约 3mg/ml、大约 4mg/ml、大约 5mg/ml、大约 6mg/ml、大约 7mg/ml、大约 8mg/ml、大约 9mg/ml、大约 10mg/ml、大约 11mg/ml、大约 12mg/ml、大约 13mg/ml、大约 14mg/ml、大约 15mg/ml、大约 16mg/ml、大约 17mg/ml、大约 18mg/ml、大约 19mg/ml 或大约 20 mg/ml 的本发明 α PD-1/IL2m 免疫缀合物。

(ii) 缓冲剂

缓冲液或缓冲溶液通常是由具有缓冲效应的「弱酸及其共轭碱」缓冲对或「弱碱及其共轭酸」缓冲对组成的溶液,例如,弱酸(例如乙酸)及其盐(例如乙酸钠)的混合溶液、或弱碱(例如组氨酸)及其盐(例如,组氨酸盐酸盐或组氨酸乙酸盐)的混合溶液。

在本文中,缓冲剂是指可以将溶液的 pH 维持在可接受范围的物质。在一些情况下,缓冲剂可以是构成缓冲液或缓冲溶液的弱酸或弱碱化合物,其能够在与合适量的其相应“共轭酸/碱”混合(所述量取决于预定的期望 pH 值)时,或者在添加强酸或强碱以原位提供所需量的相应“共轭酸/碱”时,实现期望的缓冲效果。在另一些情况下,缓冲剂可以是包含弱酸及其盐或弱碱及其盐的缓冲体系。例如,对于组氨酸缓冲液,可以通过用酸(例如,盐酸或乙酸)滴定组氨酸(固体),进行配制;也可以用合适量的组氨酸及其盐(例如,盐酸盐或乙酸盐)配制,以提供期望的 pH 值。因此,在本文中,当提及本发明的制剂包含特定的弱酸或弱碱缓冲剂时,应理解,这也涵盖了所述制剂包含由所述弱酸及其盐或由所述弱碱及其盐组成的缓冲体系的情况。例如,在提及制剂包含组氨酸或组氨酸缓冲剂时,应理解,这也涵盖了所述制剂包含由组氨酸及其盐(例如,但不限于,盐酸盐或乙酸盐)组成的缓冲体系的情况。

在本文中,当提及液体制剂包含一定浓度的某种缓冲剂时,是指该液体制剂中存在的作为缓冲剂的弱酸或弱碱及其相应的共轭酸/共轭碱的组合量。对于组氨酸缓冲液,本领域技术人员可以根据用于配制所述制剂的组氨酸和/或其盐的量,容易地计算该浓度。

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 至大约 6.5 的 pH 范围,例如约 5.0 至约 5.5 的 pH,优选地约 5.0 的 pH。在一些具体的实施方案中,本发明的制剂具有约 5.0、约 5.2、约 5.4、约 5.6、约 5.8、约 6.0、约 6.2、约 6.4 的 pH。在一些具体的实施方案中,本发明的制剂具有 5.0±0.2 的 pH。

在一个实施方案中,用于本发明制剂中的缓冲剂可以选自组氨酸缓冲剂、谷氨酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂和三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲剂和它们的组合。在一些实施方案中,本发明制剂中,缓冲剂的(总)浓度为约 0.5mM 至约 200mM、约 5mM 至约 50mM 或约 5mM 至约 20mM。

在一些实施方案中,用于本发明制剂的缓冲剂为组氨酸缓冲剂,或是包含组氨酸及其盐的组氨酸缓冲体系,尤其是包含组氨酸及盐酸组氨酸的组氨酸缓冲体系。在一些实施方案中,所述的液体制剂包含约 5mM 至约 50mM 组氨酸。在一个实施方案中,所述的液体制剂包含约 10mM 至约 30mM,例如,约 10mM、约 15mM、约 20mM、约 25mM、约 30mM 的组氨酸。在一个实施方案中,本发明液体制剂包含约 10mM 组氨酸。又在一个实施方案中,本发明液体制剂包含约 0.75mM 组氨酸和约 9.25mM 盐酸组氨酸的组合,或包含约 0.12mg/ml 组氨酸和约 1.94mg/ml 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、氨基酸及其组合。进一步地,本发明的稳定剂还可以包含整合剂,例如 EDTA。

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。

在一些实施方案中,作为稳定剂的糖类在本发明的液体制剂中以约 50mM 至约 500mM,优选地约 100mM 至约 400mM,例如,约 100mM、约 150mM、约 200mM、约 250mM、约 300mM、约 350mM、约 400mM 的浓度存在。在一些实施方案中,作为稳定剂的糖类是蔗糖,优选地,其在本发明的液体制剂中的浓度为大约 30mg/ml 至大约 120mg/ml,例如,约 50mg/ml,约 60mg/ml,约 70mg/ml,约 80mg/ml,约 90mg/ml,约 100mg/ml,或约 120mg/ml。在一些实施方案中,可以结合液体制剂的渗透压,进一步调节糖

类（例如蔗糖）的含量。

在一些实施方案中，除糖类外，本发明制剂还包含氨基酸作为稳定剂。作为稳定剂的氨基酸可以选自但不限于：同型半胱氨酸、半胱氨酸、胱硫醚、甲硫氨酸、精氨酸，优选地，所述氨基酸为甲硫氨酸。在此情况下，作为稳定剂的糖类的浓度为约 50mM 至约 500 mM，优选地浓度为约 100mM 至约 400 mM，例如，约 100 mM、约 150 mM、约 200 mM、约 250 mM、约 300 mM、约 350 mM、约 400 mM，且作为稳定剂的氨基酸的浓度为约 10mM 至约 200 mM，优选地约 30mM 至约 100 mM，例如约 40 mM、约 50 mM、约 60 mM、约 70 mM、约 80 mM、约 90 mM、或约 100mM。

在一个实施方案中，本发明液体制剂包含蔗糖作为稳定剂。蔗糖在所述液体制剂中的浓度为大约 50mg/ml 至大约 120mg/ml，例如，约 50mg/ml，约 60mg/ml，约 70mg/ml，约 80mg/ml，约 90mg/ml，约 100mg/ml，或约 120mg/ml，优选地大约 80mg/ml。

在一个实施方案中，本发明液体制剂包含蔗糖和甲硫氨酸作为稳定剂。蔗糖在所述液体制剂中的浓度为约 30mg/ml 至约 100mg/ml，例如，大约 50mg/ml，大约 60mg/ml，大约 70mg/ml，或大约 80mg/ml。甲硫氨酸在所述液体制剂中的浓度为约 20mM 至约 80mM，例如大约 30mM、大约 40mM、大约 50mM、大约 60mM。优选地，蔗糖的浓度为大约 50mg/ml 至大约 80mg/ml，且甲硫氨酸的浓度为大约 30mM 至大约 60mM。更优选地，蔗糖的浓度为大约 70mg/ml，且甲硫氨酸的浓度为大约 50mM。在一个优选的实施方案中，本发明液体制剂包含大约 70 mg/ml 蔗糖和大约 7.49 mg/ml 甲硫氨酸。

(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，例如聚山梨酯类表面活性剂，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 0.1mg/l 至约 1 mg/ml，优选地约 0.2mg/ml 至约 0.8 mg/ml，例如约 0.2mg/ml、约 0.3mg/ml、约 0.4mg/ml、约 0.5mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.7mg/ml、约 0.8 mg/ml 的聚山梨酯类表面活性剂（例如，聚山梨酯-80）。优选地，制剂包含约 0.1mg/ml 至约 0.5mg/ml 的聚山梨酯-80，更优选地大约 0.3mg/ml 的聚山梨酯-80。

(v) 其它赋形剂

本发明的液体制剂中可以包含或不包含其它赋形剂。例如，本发明的液体制剂还可以包含螯合剂，例如 EDTA，优选地，EDTA 的浓度为约 0.01mg/ml 至约 0.1 mg/ml，优选地为约 0.01mg/ml 至约 0.05 mg/ml，例如约 0.01 mg/ml、约 0.02 mg/ml、约 0.03 mg/ml、约 0.04 mg/ml、或约 0.05 mg/ml。或者，本发明的液体制剂还可以包含张力调节剂。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. 制剂的用途

包含本发明免疫缀合物的本发明制剂可以用于在受试者中治疗或预防癌症。在一些实施方案中，癌症

可以是实体肿瘤或血液肿瘤。在一些实施方案中，所述癌症是胃肠道肿瘤或黑素瘤，例如结肠癌或结直肠癌。在一些实施方案中，所述肿瘤是对已知药物，例如已知抗 PD-1 抗体具有耐受性的肿瘤或癌症，例如难治性肿瘤或癌症。在一些实施方案中，所述癌症是表征为具有升高的 PD-1、PD-L1 和/或 PD-L2 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高）的癌症。

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根据本发明的免疫缀合物，或用于治疗、预防或改善上述癌症中的一种或多种。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，本发明提供了一种药用容器(例如注射剂容器)和一种递送装置（例如注射器，如预填充注射器），其包含本发明的制剂。通过所述施用，患者将接受有效量的本发明缀合物，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免疫缀合物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、特定免疫缀合物的活性，身体对其清除率，并且也包括与所述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。

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

表 1. 缩略词与全称

缩略词	全称
BP	英国药典
ChP	中国药典
Ph. Eur. , EP	欧洲药典
NF	美国国家处方集
DP	成品/制剂
DS	原液
ELISA	酶联免疫法
F	处方
HPLC-FLD	荧光检测器高效液相色谱仪
min	分钟
h	小时
w	周
m	月
iCIEF	成像毛细管等电聚焦电泳
IND	新药研究申请
JP	日本药典
nrCE-SDS	非还原型十二烷基硫酸钠毛细管凝胶电泳
SEC-HPLC	体积排阻高效液相色谱

缩略词	全称
USP	美国药典

实施例

为了提供可长期稳定储存的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物注射液制剂,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,考察了不同缓冲液 pH 值、缓冲体系和辅料,对于 α PD-1/IL2m 免疫缀合物制剂稳定性的影响。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免疫缀合物样品

根据 PCT 申请号 PCT/CN2022/120265 所述,制备和纯化 α PD-1/IL2mut 免疫缀合物蛋白 2149。

具体而言,将抗 PD-1 抗体的重链 (SEQ ID NO:1) 和轻链 (SEQ ID NO: 2) 以及 IL-2m-Fc 多肽链 (SEQ ID NO: 3, 通过接头将 IL-2m 多肽连接到 IgG1 Fc Knob 链的 N 末端构成), 分别构建到 pcDNA3.1 载体上。使用构建产生的三质粒载体与 3 倍质量的 PEI 的混合物,共转染 HEK293 细胞(例如,转染 3ml HEK293, 需要 1ug 重链+1ug 轻链+1ug IL-2m-Fc 多肽链+9ug PEI)。从转染细胞的培养物,收获包含表达的免疫缀合物蛋白的上清液并纯化。下表 2 列出了用于以下实施例中的免疫缀合物样品的信息。

表 2. 样品信息

样品名称	规模	来源	浓度	用途
2149-CEX 40HS 3A3-3B3	小试	纯化	12.02 mg/ml	处方研究
2149 UFDF 20210804	小试	纯化	9.49 mg/ml	处方确定实验
2149 UFDF 20210804	小试	纯化	9.49 mg/ml	制剂工艺参数研究

1.2. 本发明的制剂研究中使用的试剂和材料

表 3. 试剂信息

名称	级别	产地及品牌	货号	符合标准
组氨酸	药用级	Merck KGaA	1.04352.1000	Ph. Eur., JP, USP
L-组氨酸盐酸盐	药用级	Merck KGaA	1.04354.0500	Ph. Eur., BP, JP
蔗糖	药用级	Merck KGaA	1.00892.9050	Ph. Eur., BP, ChP, JP, NF
L-精氨酸	药用级	Merck KGaA	1.01587.1000	USP, Ph. Eur., JP
依地酸二钠 (EDTA)	药用级	Merck KGaA	1.37004.1000	Ph. Eur., BP, ChP, JP, USP, ACS
甲硫氨酸	药用级	湖北省八峰药化 股份有限公司	N/A	ChP
聚山梨酯-80	药用级	南京威尔药业集 团股份有限公司	N/A	ChP

注: N/A 表示不适用。

表 4. 材料信息

名称	产地及品牌	货号
15 ml 超滤离心管	美国 Merck	UFC903024
Minisart 高通量针头滤器	德国 Sartorius	16541-K
2R 中硼硅玻璃管制注射剂瓶	肖特玻璃科技（苏州）有限公司	1142144
13 mm 注射液用覆乙烯-四氟乙烯共聚物膜溴化丁基橡胶塞	西氏医药服务公司（德国）	7002-4373
13 mm 抗生素瓶用铝塑组合盖	西氏医药服务公司（印度）	5413-2147

1.3. 本发明的制剂研究中使用的仪器设备

表 5. 仪器设备信息

名称	产地及品牌	型号	设备编号
恒温恒湿箱	德国 Binder	KBFP720	PD-A1-069 QC-A1-086
生化培养箱	上海精宏	SHP-150	PD-A1-200
医用冷藏箱	青岛海尔	HYC-360	PD-A1-009
海尔冰箱(-20℃)	青岛 海尔	BCD-290W	PD-A1-014
低温冰箱 (-40℃)	青岛澳柯玛	DW-40L525	SZ-C14-SC-REF04 SZ-C14-SC-REF05
振荡仪	美国 VWR	DVX-2500	PD-A1-140
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	美国 Unchained Labs	Biglunatic	AS-A1-143
照度计	台湾泰仕	1330A	ENG-M1-295
SevenCompact pH 计	瑞士梅特勒	S220	AS-A1-029
台式冷冻离心机	美国 Thermo	SL16R	PD-A1-082
蠕动泵	英国 Watson Marlow	520S	PD-A1-225
灌装机	丹麦 Flexicon	FP50	PD-C14-115
液体颗粒计数系统	美国贝克曼	HIAC9703 ⁺	AS-A1-166

1.4. 制剂稳定性的检测项目和检测方法

对免疫缀合物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）测定制剂的不溶性微粒含量；（4）测定制剂的 pH 值；（5）通过体积排阻高效液相色谱法（SEC-HPLC）测定制剂的纯度，表示为免疫缀合物单体的面积占所有峰面积之和的百分数；（6）通过非还原型十二烷基硫酸钠毛细管电泳(nrCE-SDS)测定制剂的纯度，表示为免疫缀合物单体的面积占所有峰面积之和的百分数；（7）通过成像毛细管等电聚焦电泳法(iCIEF 法)测定制剂中电荷变异体，表示为主成分、酸性组分和碱性组分的百分数；（8）通过高效液相色谱荧光检测(HPLC-FLD)，测定制剂中的聚山梨酯-80 含量；（9）通过免疫测定法，例如，直接 ELISA 法测定制剂中免疫缀合物对 PD-1 抗原和 IL-2R 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。

不溶性微粒测定

采用光阻法, 测定样品中的不溶性微粒含量。

蛋白含量测定

使用紫外/可见分光光度计(美国 Unchained Labs, 型号 Biglunatic)测定样品中的蛋白质含量。

pH 值测定

使用 SevenCompact pH 计(瑞士梅特勒, 型号 S220)测定样品的 pH 值。

纯度测定 (SEC-HPLC 法)

使用体积排阻色谱柱检测, 其中色谱柱为 TSKgel G3000Swxl (7.8×300 mm, 5 μm) 型分析柱, 保护柱为 TSKgel guardcolumn Swxl (6.0×40 mm, 7 μm), 流动相为 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液+400 mmol/L NaClO₄, pH 6.8, 进样盘温度 10℃, 柱温 25℃, 进样量 50 μl, 流速 0.5 ml/min, 采集时间 30 分钟, 使用 FLD 荧光检测器, PMT 值 7, 激发波长 285 nm, 发射波长 340 nm。

取待测样品用流动相稀释至 1.0 mg/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。

纯度测定 (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 1.0 mg/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)、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: -10 kV 35 分钟。毛细管柱温控制在 25℃, 检测波长为 220 nm。

电荷变异体测定 (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。将供试品浓缩液用水稀释至 1.0 mg/ml, 取稀释后的供试品溶液 20 μl, 向其中加入 77 μl 预混液(预混液配比如下: 3M 尿素-0.5% MC、两性电解质、阴极稳定剂、pI Marker), 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。

高效液相色谱荧光检测(HPLC-FLD)

采用 HPLC-FLD 法测定样品的聚山梨酯 80 含量。色谱柱为 SUPELCO 厂家 Knitted Reaction Coil 反应线圈 (5 m×0.50 mm ID), 流动相: 0.15 mol/L 的氯化钠、0.05 mol/L 的 Tris、5% 乙腈、5.0 μM NPN、15 ppm Brij23 的混合溶液, pH 为 8.0。检测条件: 柱温 30℃, 进样量 10 μl, 采集时间 3 分钟, 流速 1.5 ml/min, 激发波长 350 nm, 发射波长 420 nm。运行完成后用标准曲线法计算成品中聚山梨酯 80 的含量。

生物活性检测 (直接 ELISA 法)

采用以下抗原:

IL-2 受体：购自 KACTUS 的重组 Human CD25-His Avi，货号：CD5-HM425，

PD-1：购自 Sinobiological 的重组人 PD-1，货号：10377-H08H，

分别按照如下所述的 ELISA 测定程序，检测免疫缀合物蛋白的 IL-2 端和抗 PD-1 端的相对结合活性。

用 PBS 稀释抗原至 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 稀释免疫缀合物蛋白至 300 µg/ml（IL2 受体）或 10 µg/ml（PD-1），3 倍梯度稀释至第 11 个浓度。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（120000 倍（IL2 受体）或 100000 倍（PD-1）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 H₂SO₄ 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 OD_{450 nm}-OD_{620 nm} 值为纵坐标，应用 Prism 四参数拟合计算 EC₅₀ 反映免疫缀合物蛋白与抗原的结合活性。

实施例 1.处方研究

1.1 实验方案

配制含 1.55 mg/ml 组氨酸，80.00 mg/ml 蔗糖的缓冲液，分别用稀盐酸调节 pH 至 5.0、5.5、6.0 和 6.5，分别为 F1-F4。配制 1.55 mg/ml 组氨酸，50.00 mg/ml 蔗糖，7.49 mg/ml 甲硫氨酸，用稀盐酸调节 pH 至 5.0，为 F5。配制 1.55 mg/ml 组氨酸，30.00 mg/ml 蔗糖，17.42 mg/ml 精氨酸，用稀盐酸调节 pH 至 5.0，为 F6。配制 1.55 mg/ml 组氨酸，50.00 mg/ml 蔗糖，7.49 mg/ml 甲硫氨酸，用稀盐酸调节 pH 至 5.0，为 F7。将 2149 蛋白超滤置换至各缓冲液中，调节蛋白含量至约 1.0 mg/ml，加入终浓度为 0.3 mg/ml 的聚山梨酯-80。向 F7 中加入终浓度为 0.03 mg/ml 依地酸二钠，详细处方信息见表 6。过滤分装至西林瓶，加塞、轧盖。上述样品于 40℃±2℃ 条件下进行稳定性考察，具体方案见表 7。

表 6. 备选处方信息表

序号 No.	处方信息
处方 1 (F1)	10 mM 组氨酸，80.00 mg/ml 蔗糖，0.3 mg/ml 聚山梨酯-80，pH 5.0
处方 2 (F2)	10 mM 组氨酸，80.00 mg/ml 蔗糖，0.3 mg/ml 聚山梨酯-80，pH 5.5
处方 3 (F3)	10 mM 组氨酸，80.00 mg/ml 蔗糖，0.3 mg/ml 聚山梨酯-80，pH 6.0
处方 4 (F4)	10 mM 组氨酸，80.00 mg/ml 蔗糖，0.3 mg/ml 聚山梨酯-80，pH 6.5
处方 5 (F5)	10 mM 组氨酸，50.00 mg/ml 蔗糖，7.49 mg/ml 甲硫氨酸，0.3 mg/ml 聚山梨酯-80，pH 5.0
处方 6 (F6)	10 mM 组氨酸，30.00 mg/ml 蔗糖，17.42 mg/ml 精氨酸，0.3 mg/ml 聚山梨酯-80，pH 5.0
处方 7 (F7)	10 mM 组氨酸，50.00 mg/ml 蔗糖，7.49 mg/ml 甲硫氨酸，0.03 mg/ml 依地酸二钠，0.3 mg/ml 聚山梨酯-80，pH 5.0

注：用盐酸调节 pH。

表 7. 实验方案

实验条件	取样点				检测项目
	0 周	1 周	2 周	4 周	
40℃±2℃	√	√	√	√	外观、可见异物、蛋白含量、pH、纯度、电荷变异体和聚山梨酯-80 含量

注：(1) √表示该点取样。(2) 上述时间点取样后均先放入-40℃中冻存，按需化冻送检。

1.2 判断标准

根据对产品的认识以及仪器和方法的精密度，设定了样品检测值与初始值相比质量未发生变化的判断标准，具体见 表 8。

表 8. 质量未发生变化的判断标准

检测项目	质量未发生变化的判断标准
外观（观察法）	澄清至微乳光，无色至微黄色液体，无异物
可见异物（可见异物检测法）	无异物
蛋白含量（UV 法）	变化率≤10%
pH 值（pH 值测定法）	变化值≤0.3
纯度（SEC-HPLC 法）	单体纯度变化值≤1.0%
纯度（非还原型 CE-SDS 法）	单体纯度变化值≤2.0%
电荷变异体（iCIEF 法）	主成分及酸碱各组分变化值≤3.0%
聚山梨酯-80 含量（HPLC-FLD）	0.1 mg/ml-0.5 mg/ml
生物学活性*	70-130%

注：“*”表示该标准仅适用于处方确定实验。

1.3 实验结果

处方研究结果详见表 9，变化趋势见图 1。结果表明，40℃±2℃条件下放置 4 周，各处方的样品外观、可见异物均合格；蛋白含量和 pH 均未发生明显变化。随着处方 pH 的升高，SEC 聚合体的含量增多，主峰含量下降增多。随着处方 pH 的降低，非还原 CE 片段的含量增多，主峰含量下降略有增多。各样品电荷变异体-酸性组分均显著上升，主成分均显著下降，碱性组分均明显上升。F1-F4 中，F1 较优。F1、F5-F7 比较，F1 和 F6 的聚山梨酯-80 含量明显下降。F6 的纯度和电荷变异体变化明显。

结合纯度和电荷变异体稳定性的结果，选定 F5 展开处方确认实验。

表 9. 处方研究结果

检测项目	时间	样品名称						
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
外观（观察法）	0 周	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
	1 周	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
	2 周	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
	4 周	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
可见异物（可见异物检查法）	0 周	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
	1 周	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
	2 周	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
	4 周	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
蛋白含量（UV 法，mg/ml）	0 周	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	1 周	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	2 周	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	4 周	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
pH 值（pH 测定法）	0 周	5.1	5.7	6.1	6.6	5.0	5.0	5.0

检测项目		时间	样品名称						
			F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
		1 周	5.1	5.7	6.1	6.7	5.0	5.0	5.0
		2 周	5.1	5.7	6.1	6.7	5.1	5.0	5.1
		4 周	5.2	5.7	6.1	6.7	5.1	5.0	5.1
纯度 (SEC-HPLC, %)	单体	0 周	98.8	98.4	98.1	97.5	98.6	98.9	98.5
		1 周	98.1	97.9	97.8	96.4	99.3	99.1	99.2
		2 周	97.5	97.6	97.2	96.0	97.3	97.3	97.2
		4 周	96.5	96.8	96.3	94.8	95.1	66.0	95.2
	聚合物	0 周	1.2	1.5	1.9	2.5	1.4	0.9	1.5
		1 周	0.6	0.8	1.1	2.1	0.5	0.6	0.6
		2 周	0.5	0.7	1.1	2.3	1.1	0.7	1.2
		4 周	0.7	0.7	1.4	2.8	2.5	33.1	2.5
纯度 (nrCE-SDS, %)	单体	0 周	97.8	97.9	97.9	97.9	97.9	97.8	97.8
		1 周	96.9	97.3	97.0	97.1	97.0	95.6	97.1
		2 周	95.9	96.1	96.2	96.4	96.3	92.7	96.3
		4 周	95.6	96.5	96.7	97.2	97.5	84.2	97.6
	片段	0 周	2.1	2.0	2.0	2.0	2.0	2.1	2.0
		1 周	3.0	2.6	2.9	2.8	2.9	4.3	2.8
		2 周	4.1	3.9	3.8	3.5	3.6	7.2	3.6
		4 周	4.4	3.5	3.3	2.8	2.5	14.5	2.4
电荷变异体 (iCIEF, %)	酸性 组分	0 周	18.3	19.5	19.1	19.0	18.8	19.4	18.4
		1 周	23.6	24.1	23.9	26.9	23.8	22.6	24.9
		2 周	30.9	29.9	31.0	34.8	30.8	24.2	31.1
		4 周	37.8	35.8	39.1	38.9	36.7	46.7	37.0
	主成分	0 周	77.9	77.4	77.2	77.5	77.9	76.9	78.2
		1 周	72.0	72.0	72.9	70.6	71.6	72.4	70.9
		2 周	61.6	63.8	63.3	61.8	62.6	64.9	62.1
		4 周	53.3	56.8	54.7	55.2	52.7	36.0	52.6
	碱性 组分	0 周	3.8	3.2	3.7	3.6	3.3	3.8	3.3
		1 周	4.3	3.9	3.2	2.6	4.5	5.0	4.3
		2 周	7.5	6.3	5.7	3.4	6.6	10.9	6.8
		4 周	9.0	7.3	6.2	5.9	10.6	17.3	10.4
聚山梨酯-80 含量 (FLD-HPLC, mg/ml)		0 周	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
		1 周	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
		2 周	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	0.3
		4 周	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3	0.0	0.3

实施例 2. 处方确认研究

2.1 实验方案

基于处方研究实验选定的 F5 处方，本实验主要考察辅料（蔗糖、组氨酸、聚山梨酯-80 和甲硫氨酸）对 2149 蛋白稳定性的影响，详细处方信息见表 10，其中为调整制剂渗透压，适当增加蔗糖含量。

按照表 10 配制处方的缓冲液，将 2149 蛋白超滤置换至处方溶液中，并调节蛋白含量至 1.0 mg/ml；加入聚山梨酯-80，使其终浓度为 0.3 mg/ml；过滤分装至西林瓶，加塞、轧盖。上述样品于表 11 条件下进行稳定性考察。

表 10. 备选处方信息表

处方信息
10 mM 组氨酸，70 mg/ml 蔗糖，7.49 mg/ml 甲硫氨酸，0.3 mg/ml 聚山梨酯-80，pH 5.0

注：用盐酸调节 pH。

表 11. 稳定性考察方案

实验名称	实验方案及取样点
高温稳定性	40°C±2°C条件下放置，于 0 天、1 周、2 周和 4 周取样。
加速稳定性	25°C±2°C条件下放置，于 4 周、2 个月和 3 个月取样。
长期稳定性	5°C±3°C条件下放置，于 3 个月取样。
振荡实验	650 r/min，室温，避光，第 0 和 3 天取样。
冻融实验	-20°C冻存 1 天以及 5°C±3°C解冻为一个循环，第 0、3、6 个循环取样。

注：上述时间点取样后，样品均先放入-40°C冰箱中冻存待检，按需化冻送检。

2.2 判断标准

判断标准具体见表 8。

2.3 实验结果

处方确认稳定性研究结果详见表 12 和表 13，变化趋势见图 2。结果表明，所有时间点的样品外观、可见异物均合格，蛋白含量和 pH 值均未发生明显变化，SEC 主峰在高温条件下下降了 1.0%，电荷变异体酸性组分在加速和高温条件下有所上升，电荷变异体主成分在加速和高温条件下有所下降，电荷变异体碱性组分在高温条件下略有上升；聚山梨酯-80 含量未发生变化；IL2 端活性在高温 4 周时出现明显下降，PD-1 端活性没有明显变化。振荡和冻融条件下蛋白质量没有明显变化。

表 12. 长期、加速和高温稳定性研究结果

检测项目		时间							
		0 周	40°C 1 周	40°C 2 周	40°C 4 周	25°C 4 周	25°C 2 月	25°C 3 月	2-8°C 3 月
外观		合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
可见异物		合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
蛋白含量(UV, mg/ml)		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1
pH 值		5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.0	5.0	5.0
纯度 (SEC-HPLC, %)	单体	97.1	97.1	96.8	96.1	96.8	97.8	97.4	97.8
	聚合体	1.3	1.3	1.4	1.6	1.2	0.8	0.9	0.9
纯度 (nrCE-SDS, %)	单体	98.9	98.5	97.0	96.1	97.7	96.9	96.7	98.3
	片段	1.0	1.4	2.9	3.7	2.0	2.6	2.6	1.3
电荷变异体 (iCIEF, %)	酸性组分	24.2	28.9	31.2	37.8	22.1	26.4	31.5	24.7
	主成分	73.0	67.2	63.9	55.3	73.9	69.8	63.6	71.7

检测项目		时间							
		0 周	40℃ 1 周	40℃ 2 周	40℃ 4 周	25℃ 4 周	25℃ 2 月	25℃ 3 月	2-8℃ 3 月
	碱性组分	2.8	3.9	5.0	6.9	4.0	3.8	5.0	3.6
聚山梨酯-80 含量(HPLC-FLD, mg/ml)		0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
生物学活性 (ELISA, %)	IL2	106	107	111	64	114	102	82	82
	PD-1	104	100	106	93	91	79	100	106

如表 12 所示, 在 40℃±2℃条件下 4 周, SEC 主峰下降了 1.0%, 非还原型 CE-SDS 主峰下降了 2.8%, 电荷变异体的酸性组分上升了 13.6%, 主成分下降了 17.7%, 碱性组分略有上升。25℃±2℃条件下 3 个月
后非还原型 CE-SDS 下降了 2.2%, 电荷变异体的酸性组分上升了 7.3%, 主成分下降了 9.4%。5℃±3℃条
件下长期 3 个月各检项未发生明显变化。

表 13. 振荡和冻融研究结果

检测项目		时间		
		0 周	冻融 6 次	振荡 3 天
外观		合格	合格	合格
可见异物		合格	合格	合格
不溶性微粒 (光阻法, 粒/ml)	≥2 μm	44	112	64
	≥5 μm	10	14	12
	≥10 μm	4	3	4
	≥25 μm	0	0	2
蛋白含量 (UV 法, mg/ml)		1.0	1.0	1.0
pH 值		5.1	5.1	5.1
纯度(SEC-HPLC, %)	单体	97.1	96.3	97.3
	聚合体	1.3	2.1	1.1
纯度(nrCE-SDS, %)	单体	98.9	98.9	99.0
	片段	1.0	1.0	0.9
电荷变异体(iCIEF, %)	酸性组分	24.2	22.3	23.4
	主成分	73.0	75.3	74.0
	碱性组分	2.8	2.4	2.7
聚山梨酯-80 含量 (HPLC-FLD, mg/ml)		0.3	0.3	0.3
生物学活性 (ELISA, %)	IL2	106	112	116
	PD-1	104	106	105

结论

结合处方研究结果和处方确认实验结果, 选定确认的处方作为 2149 最终制剂处方。为避免生产过程中
使用盐酸调节 pH, 将缓冲体系调整为组氨酸和盐酸组氨酸, 即 2149 制剂处方为: 1.0 mg/ml 重组 α PD-
1/IL2m 免疫缀合物蛋白分子, 0.12 mg/ml 组氨酸, 1.94 mg/ml 盐酸组氨酸, 70.00 mg/ml 蔗糖, 7.49 mg/ml
甲硫氨酸和 0.3 mg/ml 聚山梨酯-80, pH 5.0。

实施例 3. αPD-1/IL2m 免疫缀合物的体内药效实验

本发明的 αPD-1/IL2m 免疫缀合物, 在其 αPD-1 端可以特异性结合人 PD-1 以阻断 PD-1 与 PD-L1 的结

合从而解除免疫刹车机制，同时在其 IL-2m 端可以特异性结合 T 细胞或 NK 细胞上的 IL-2 受体进而起到激活并扩增 T 或 NK 细胞，以增强 PD-1 抗体免疫治疗的效果。

为了证明本发明的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物的体内药效，采用 MC38 细胞(小鼠结肠癌细胞系，上海和元生物)接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的免疫缀合物（2149）的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠小鼠（购自上海南方模式生物），合格证编号为 NO. 20170010006762。

将 MC38 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，以 PBS(1×)重悬 MC38 细胞，制备成细胞浓度为 5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 MC38 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 8 天后检测各只小鼠瘤体积，进行分组（每组 8 只小鼠），给药剂量和方式如表 14 所示。

表 14：体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG*	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 10 mg/kg	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 20 mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 40 mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*：h-IgG 为同种型对照抗体，购自 Equitech-Bio，批号 161206-0656。

h-IgG，2149, 10 mg/kg，2149, 20 mg/kg 和 2149, 40 mg/kg 的使用浓度分别为 4 mg/ml，1 mg/ml，2 mg/ml 和 4 mg/ml，每周给药一次，共 3 次(QWx3)。分别在 MC38 细胞接种后第 8、15 和 22 天给药，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重，如图 3A-B 所示。肿瘤超过 2000 mm³ 会对该小鼠进行安乐死处理，整个实验部分小鼠一直监测至 61 天后结束。因为部分组别小鼠肿瘤体积超过 2000 mm³ 被安乐死，因此按照接种后第 36 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下： $TGI\%=100\% \times (\text{对照组肿瘤体积}-\text{治疗组肿瘤体积})/(\text{对照组肿瘤体积}-\text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算： $V=L*W^2/2$ 。采用电子天平测定体重。

肿瘤生长曲线和生存曲线如图 3A 和 3B 所示，2149 分子不同剂量组抗肿瘤作用呈现剂量依赖性，并且在 20 mg/kg 以及 40 mg/kg 组别，小鼠肿瘤完全消退。并且这一优势在图 3B 的生存曲线中也有体现，该两组小鼠 100%肿瘤消退，而 10 mg/kg 组别中，8 只小鼠仅有 2 只肿瘤完全消退。肿瘤抑制率结果如表 15 所示：在接种后第 36 天,与 h-IgG 组对比，2149, 10 mg/kg, 2149, 20 mg/kg 和 2149,40 mg/kg 的肿瘤抑制率分别为 84%，103%和 103%。同时对小鼠体重进行检测的结果(图 3C)显示，在接种后第 36 天,小鼠体重无显著差异。

表 15. 抗肿瘤药效统计

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤抑制率(%) @ Day17	完全缓解率* @ Day36
h-IgG	2426.63	N/A	0/8
2149, 10 mg/kg	458.62	84	2/8
2149, 20 mg/kg	0	103	8/8
2149, 40 mg/kg	0	103	8/8

*完全缓解率：肿瘤完全消退，肿瘤体积为 0。

为了证明免疫缀合物 2149 的体内药效，采用 PD-1 抗体耐药的 B16F10 细胞(小鼠黑色素瘤细胞系，

ATCC CRL-6475)接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的双功能 PD-1 抗体和 IL-2 突变分子融合蛋白 (2149) 的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠小鼠 (购自上海南方模式生物), 合格证编号为 NO. 20170010007909。

将 B16F10 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 以 PBS(1×)重悬 B16F10 细胞, 制备成细胞浓度为 2.5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 B16F10 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 6 天后检测各只小鼠瘤体积, 进行分组 (每组 8 只小鼠), 给药剂量和方式如表 16 所示。

表 16: 体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG*	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
IBI308 [△] , 20 mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
IBI308, 40 mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 20mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 40mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*: h-IgG 为同种型对照抗体, 购自 Equitech-Bio, 批号 161206-0656;

[△]: IBI308 为亲本抗 PD-1 单抗 (Sintilimab)。

h-IgG, IBI308, 20mg/kg, IBI308, 40mg/kg, 2149-20mg/kg 和 2149, 40mg/kg 的使用浓度分别为 4 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml 和 4 mg/ml, 每周给药一次, 共 3 次(QWx3)。分别在 B16F10 细胞接种后第 8、15、22 天给药, 每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重, 如图 4A-B 所示, 监测至 22 天后结束。因为 B16F10 细胞容易转移诱导小鼠死亡, 因此按照接种后第 15 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%), 计算公式如下: $TGI\% = 100\% \times (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定: 采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W), 肿瘤体积按如下公式计算: $V = L \times W^2 / 2$ 。采用电子天平测定体重。肿瘤超过 2000 mm³ 会对该小鼠进行安乐死处理。

小鼠肿瘤生长曲线如图 4A 和 4B 所示, 在 PD1 耐药模型中, IBI308 几乎未显示出药效, 但是 2149 的 20 mg/kg 和 40 mg/kg 组别展现出一定的抗肿瘤作用, 且高剂量抗肿瘤作用优于低剂量, 该作用同时在小鼠生存曲线中得到一定体现, 高剂量组别在实验终点仍有 2 只小鼠肿瘤完全消退 (图 4C 和表 17)。

肿瘤抑制率结果如表 17 所示: 在接种后第 15 天, 与 h-IgG, 40 mg/kg 组对比, IBI308, 20 mg/kg, IBI308, 40 mg/kg, 2149, 20 mg/kg 和 2149, 40 mg/kg 的肿瘤抑制率分别为 29%, 27%, 82% 和 86%。同时对小鼠体重进行检测的结果 (图 4D) 显示, 在接种后第 22 天, 小鼠体重无显著差异。

表 17. 抗肿瘤药效统计

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤抑制率 (%) @Day15	完全缓解率 @Day22
h-IgG	1014.92	N/A	0/6
IBI308, 20 mg/kg	735.02	29	0/6
IBI308, 40 mg/kg	757.11	27	0/6
2149, 20 mg/kg	227.62	82	0/6
2149, 40 mg/kg	193.90	86	2/6

为了证明 αPD-1/IL2m 免疫缀合物 2149 的体内药效优于对照药物 PD-1-IL2v（分子编号 2061，序列来源 US20180326010A1，也参见序列表），采用 PD-1 抗体耐药的 B16F10 细胞(小鼠黑色素瘤细胞系，ATCC CRL-6475)接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的双功能 PD-1 抗体和 IL-2 突变分子融合蛋白（2149）的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠小鼠（购自上海南方模式生物），合格证编号为 NO. 20170010008942。

将 B16F10 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，以 PBS(1×)重悬 B16F10 细胞，制备成细胞浓度为 2.5×10⁶ 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 B16F10 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 8 天后检测各只小鼠瘤体积，进行分组（每组 7 只小鼠），给药剂量和方式如表 18 所示。

表 18. 体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG*	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
IBI308	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2061, 10mg/kg	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2061, 20mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2061, 40mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 10mg/kg	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 40mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 40mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*: h-IgG 为同种型对照抗体，购自 Equitech-Bio，批号 161206-0656。

h-IgG, IBI308, 40mg/kg, 2061, 10mg/kg, 2061, 20mg/kg, 2061, 40mg/kg, 2149, 10mg/kg, 2149, 20mg/kg 和 2149-40mg/kg 的使用浓度分别为 4 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml 和 4 mg/ml，每周给药一次，共 3 次(QWx3)。分别在 B16F10 细胞接种后第 8、15、22 天给药，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重，如图 5A 所示，监测至 33 天后结束。由于 B16F10 细胞容易转移造成小鼠死亡，因此按照接种后第 19 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：TGI%=100% * (对照组肿瘤体积-治疗组肿瘤体积)/(对照组肿瘤体积-对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：V=L*W²/2。采用电子天平测定体重。肿瘤超过 2000 mm³ 会对该小鼠进行安乐死处理。若组内超过半数死亡，整个组的肿瘤生长曲线在该时间点不显示。

肿瘤抑制率结果如表 19 所示：在接种后第 19 天,与 h-IgG, 40 mg/kg 组对比，IBI308, 40 mg/kg, 2061, 10mg/kg, 2149, 10mg/kg, 2149, 20mg/kg 和 2149-40mg/kg 的肿瘤抑制率分别为 21%, 96%, 79%, 87%和 97%。2061 的 20 mg/kg 和 40 mg/kg 因为第一针给药后出现体重大幅下降且小鼠出现死亡，因此该组别的 TGI 并未计算。

并且我们对小鼠生存做了统计分析（图 5B），图示可见，对比 2061 和 2149 在本实验中最大给药/耐受剂量，我们可以看出，2149 在 40 mg/kg 剂量下、2061 分子 10 mg/kg 剂量下小鼠生存的更多，对于 2149，7 只小鼠中有 3 只肿瘤完全消退，而 2061 仅有 1 只小鼠肿瘤完全消退。同时对小鼠体重进行检测的结果(图 5C)显示，在接种后第 29 天,2149 各给药剂量组别小鼠体重均未出现下降，而 2061 组别的小鼠出现体重下降，在低剂量（10 mg/kg）情况下，小鼠体重平均下降超过 5%，中剂量（20 mg/kg）和高剂量（40 mg/kg）出现小鼠死亡，每组小鼠总共有 7 只，死亡 6 只，详细情况见表 12。而 2149 相对安全，

无论是低剂量，中剂量还是高剂量，体重下降均不明显，且仅在低剂量和中剂量死亡 1 只小鼠，而在高剂量小鼠未出现小鼠死亡，且有比 2061 更高的完全肿瘤缓解率（表 19）。因此 2149 比 2061 药效更优，且更为安全，具有更高的治疗窗口。

表 19. 抗肿瘤药效统计

组别	Day 19 肿瘤体积 (mm ³)	Day 19 小鼠死亡情况	Day 33 肿瘤完全缓解率
h-IgG	1934.73	3/7	0/7
IBI308, 40 mg/kg	1540.91	2/7	0/7
2061, 10 mg/kg	146.28	0/7	1/7
2061, 20 mg/kg	N/A	6/7	0/7
2061, 40 mg/kg	N/A	6/7	0/7
2149, 10 mg/kg	450.77	1/7	0/7
2149, 20 mg/kg	301.05	1/7	1/7
2149, 40 mg/kg	114.50	0/7	3/7

序列表

SEQ ID NO	描述	序列
1	全长天然 IL-2	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
2	成熟 IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
3	野生型 IL-2 (包含 C125S)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
分子 2149	具有 T3A+N88R + S130R 突变, 和 IL15B'C'环区替换	
4	IL-2 突变蛋白	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKAT ELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAGDASIHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
5	接头	GGGGSGGGGS
6	Fc-knob	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	IL-2m- 接头 - Fc-knob	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKAT ELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAGDASIHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
8	抗PD-1 重链可 变区	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG LIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAE HSSTGTFDYWGQGLTVTVSS
9	抗PD-1 重链可 变区 CDR1	GGTFSSYAIS
10	抗PD-1 重链可 变区 CDR2	LIIPMFDTAGYAQKFQG
11	抗PD-1 重链可 变区 CDR3	AEHSSTGTFDY
12	Fc-hole	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV

		FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	抗 PD-1 重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	抗 PD-1 重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGLIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAEHSSTGTFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	抗 PD-1 轻链可变区	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANHLPTFGGGGTKVEIK
16	抗 PD-1 轻链可变区 CDR1	RASQGISSWLA
17	抗 PD-1 轻链可变区 CDR2	AASSLQS
18	抗 PD-1 轻链可变区 CDR3	QQANHLPT
19	抗 PD-1 轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20	抗 PD-1 轻链	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANHLPTFGGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	Fc (无 Knob-hole 突变, 有 LALA 突变)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	Fc(无 Knob-hole 突变, 无 LALA 突变)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

分 子 2061	本研究的对照分子，来源于 US20180326010A1，由缀合了 IL-2 突变体的抗 PD-1 IgG 抗体组成	
23	重链 knob	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATI SGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGR VYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGG GGSAPASSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
24	重链 hole	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATI SGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGR VYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	轻链 LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIY RSSTLESQVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

权利要求

1. 一种免疫缀合物液体制剂，其包含：

- (i) 免疫缀合物，
- (ii) 缓冲剂，
- (iii) 稳定剂，和
- (iv) 表面活性剂，

其中所述免疫缀合物包含：(a) 抗 PD-1 半抗体和(b) 突变 IL2 融合多肽，

其中，所述抗 PD-1 半抗体包含与 Fc 区融合的 Fab 片段，且包含 SEQ ID NO: 8 的重链可变区序列中所含的三个重链 CDR 序列；以及 SEQ ID NO: 15 的轻链可变区序列中所含的三个轻链 CDR 序列；且

其中，所述突变 IL2 融合多肽包含与 Fc 区融合的突变 IL-2 多肽，且所述突变 IL-2 多肽包含 (i) N88R + S130R；和 (ii) B'C' 环区序列 AGDASIH 或 AQSKNFH，以及任选地 (iii) T3A；

其中，所述液体制剂的 pH 为大约 5.0 至大约 6.5，例如，pH 为大约 5.0、大约 5.5、大约 6.0、或大约 6.5，优选 pH 为大约 5.0。

2. 权利要求 1 的液体制剂，特征在于所述免疫缀合物的浓度为大约 0.5mg/ml 至大约 150 mg/ml，优选地为大约 0.5 至大约 10 mg/mL，例如大约 0.5 mg/ml、大约 1 mg/ml、大约 2 mg/ml、大约 3 mg/ml、大约 4 mg/ml、大约 5 mg/ml、大约 6 mg/ml、大约 7 mg/ml、大约 8 mg/ml、大约 9 mg/ml 或大约 10 mg/ml。

3. 根据权利要求1或2所述的液体制剂，特征在于所述缓冲剂包含组氨酸缓冲剂，优选地，所述缓冲剂包含大约5mM至大约50 mM的组氨酸，优选地大约10mM至大约30 mM组氨酸，例如，大约10 mM、大约15 mM、大约20 mM、大约25 mM、或大约30 mM组氨酸。

4. 根据权利要求1-3 中任何一项所述的液体制剂，特征在于所述稳定剂包含

-糖类，尤其是蔗糖，优选地蔗糖的浓度为大约50 mg/ml至大约120 mg/ml，例如大约80mg/ml；或

-糖类和氨基酸的组合，尤其是蔗糖与甲硫氨酸的组合，优选地，蔗糖的浓度为大约30mg/ml至大约100mg/ml，例如，大约50mg/ml，大约60mg/ml，大约70mg/ml，或大约80mg/ml，甲硫氨酸的浓度为约20mM至大约80mM，例如大约30mM、大约40mM、大约50mM、或大约60mM。

5. 根据权利要求1-4 中任何一项所述的液体制剂，特征在于所述液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。

6. 根据权利要求1-5中任何一项所述的液体制剂，特征在于所述表面活性剂的浓度为约0.1mg/ml至约1 mg/ml，优选地为约0.1mg/ml至约0.5 mg/ml，例如约0.1 mg/ml、约0.2 mg/ml、约0.3 mg/ml、约0.4 mg/ml、或约0.5 mg/ml。

7. 根据权利要求1-6中任何一项所述的液体制剂，特征在于所述液体制剂包含EDTA，优选地，EDTA的浓度为约0.01mg/ml至约0.1 mg/ml，优选地为约0.01mg/ml至约0.05 mg/ml，例如约0.01 mg/ml、约0.02 mg/ml、约0.03 mg/ml、约0.04 mg/ml、或约0.05 mg/ml。

8. 根据权利要求1-7中任何一项所述的液体制剂，其中所述免疫缀合物包含knob-in-hole突变，

优选地，所述融合多肽的Fc区包含knob突变，且所述半抗体的Fc包含hole突变。

9. 根据权利要求1-8中任何一项所述的液体制剂，其中所述抗PD-1半抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：重链可变区包含SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列；且轻链可变区包含SEQ ID NO: 15所示的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列，

优选地，所述抗PD-1单抗包含重链和轻链，其中所述重链包含SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列；且所述轻链包含SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。

10. 根据权利要求1-9中任何一项所述的液体制剂，其中所述突变IL2蛋白包含SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列；

优选地，所述突变IL-2融合多肽包含SEQ ID NO: 7所示的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的液体制剂，特征在于所述免疫缀合物在HEK293细胞或CHO细胞中重组表达。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的液体制剂，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。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的液体制剂，其包含：

(i) 约1-50 mg/ml的免疫缀合物；

(ii) 约5-50 mM的组氨酸；

(iii) 约50-120 mg/ml的蔗糖，或者约30-100 mg/ml的蔗糖与约20-80mM的甲硫氨酸的组合；和

(iv) 约0.1-0.5 mg/ml聚山梨酯80；

其中所述液体制剂的pH为约5.0-5.5，优选地大约pH 5.0；

例如，所述液体制剂包含

(i) 约1-10 mg/ml的免疫缀合物；

(ii) 约10-30 mM的组氨酸；

(iii) 约70-90mg/ml的蔗糖，或者约50-80 mg/ml的蔗糖与约40-60mM的甲硫氨酸的组合；和

(iv) 约0.2-0.4 mg/ml的聚山梨酯80；

其中所述液体制剂的pH为约5.0-5.5，优选地大约pH 5.0；

或者，所述液体制剂包含

(i) 约1.0 mg/ml的免疫缀合物；

(ii) 约10 mM组氨酸；

(iii) 约80mg/ml的蔗糖，或者约70 mg/ml的蔗糖与约50 mM的甲硫氨酸的组合，和

(iv) 约0.3 mg/ml聚山梨酯80；

其中所述液体制剂的pH为约5.0-5.5，优选地大约pH 5.0；

或者，所述液体制剂包含

(i) 约1.0 mg/ml的免疫缀合物；

(ii) 约0.12 mg/ml组氨酸和约1.94 mg/ml盐酸组氨酸；

(iii) 约 70 mg/ml 蔗糖和约 7.49 mg/ml 甲硫氨酸, 和

(iv) 约 0.3 mg/ml 聚山梨酯 80;

其中所述液体制剂的 pH 为约 5.0-5.5, 优选地大约 pH 5.0。

14. 根据权利要求 1-13 中任何一项所述的液体制剂, 其特征在于, 该制剂在储存后, 例如在 2-8°C 储存至少 3 个月后, 或在室温储存至少 3 个月后, 或在 40°C±2°C 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%、95%、96%、或 97% 的纯度;

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

(iii) 通过 iCIEF 法测量, 相对于储存第 0 天的初始值, 制剂中各电荷变异体组分 (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%、或 5%; 和

(iv) 通过 HPLC-FLD 法测量, 相对于储存第 0 天的初始值, 制剂中聚山梨酯 80 含量的变化值不超过 0.3mg/ml, 例如不超过 0.2mg/ml、0.10mg/ml、或 0.05mg/ml。

15. 一种固体制剂, 其通过固化权利要求 1-14 中任何一项所述的液体制剂而获得, 所述固体制剂例如是冻干粉针剂形式。

16. 一种药用注射剂容器, 其包含权利要求 1-14 中任何一项的液体制剂或权利要求 15 的固体制剂。

17. 一种预填充注射器, 其包含权利要求 1-14 中任何一项的液体制剂或权利要求 15 的固体制剂, 用于静脉内注射或者肌肉注射。

18. 根据权利要求 1-14 中任何一项的液体制剂或权利要求 15 的固体制剂的用途, 用于预防或治疗癌症的用途或用于制备预防或治疗癌症的药物的用途, 优选地, 所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤, 例如胃肠道肿瘤或黑色素瘤, 例如结肠直肠癌或结肠癌; 例如, 所述癌症是 PD-1 抗体治疗耐受性癌症。