

抗 BTLA 抗体药物组合物及其用途

技术领域

本发明涉及治疗性药物组合物领域。尤其是，本发明涉及医药制剂领域，该药物组合物含有一种与 B 和 T 淋巴细胞弱化子(BTLA)特异性结合的人源化抗体。

背景技术

正性和负性共刺激信号在 B 细胞和 T 细胞活性的调节中起决定性作用，而且已证实介导这些信号的分子是免疫调节剂的有效靶标。除 T 细胞受体(TCR)参与外，幼稚 T 细胞的最佳活化也需要正性共刺激，而负性共刺激则被认为是自身免疫耐受性的获得以及效应 T 细胞功能的终止所需要的。与抗原呈递细胞(APC)表面上的 B7.1 或 B7.2 相互作用时，原型 T 细胞共刺激分子 CD28 响应 TCR 参与而发出促进 T 细胞增殖和分化的信号，但是 CD28 同源物细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)介导 T 细胞增殖和效应子功能的抑制(Chambers 等, Ann.Rev.Immunol., 19: 565-594, 2001; Egen 等, Nature Immunol, 3: 611-618, 2002)。已发现与 B7 家族同源的若干新分子(Abbas 等, Nat.Med., 5: 1345-6, 1999 ; Coyle 等, Nat.Immunol., 2: 203-9, 2001; Carreno 等, Annu. Rev. Immunol., 20: 29-53, 2002; Liang 等, Curr. Opin. Immunol., 14: 384-90, 2002)，并且刚开始阐明它们在 T 细胞活化中的作用。

B 和 T 淋巴细胞弱化子 (BTLA) 是 CD28 家族的成员，该家族还包括 CD28、ICOS、CTLA-4 和 PD-1。根据加入单抗后对提高 T 细胞增殖的功能作用，发现了该家族最初的成员 CD28 和 ICOS 具有免疫激活作用(Hutloff 等, 1999)。而 BTLA、CTLA-4 和 PD-1 等被描述为负性调节蛋白。若干体内研究证实了 BTLA 在淋巴细胞应答中的抑制作用。由 Murphy 与同事(Washington University St.Louis)制备的 BTLA 缺陷型小鼠在响应 T 依赖性抗原产生的 IgG 方面表现出 3 倍增加。另外，自 BTLA^{-/-}小鼠分离的 T 细胞和 B 细胞对分别使用 CD3-和抗 IgM 进行抗原-受体刺激显示较大的增殖应答 (Watanabe, 2003)。在过量表达研究中，发现 BTLA 与 B 细胞受体复合物以及与 T 细胞受体缔合。与该研究结果一致，在 BTLA 缺陷型淋

巴细胞中, 使用 ConA (T 细胞) 或 LPS(B 细胞) 进行抗原-受体非依赖性刺激不受影响, 而且使用抗 BTLA 抗体也不能被调节。已经表明 BTLA 敲除小鼠随时间推移发生自发性自身免疫病, 且寿命缩短 (Oya, 2008)。BTLA 敲除小鼠显示在自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 和变应性气道炎症模型中疾病严重程度加剧, 这两种模型均有赖于 T 细胞活性 (Watanabe, 2005; Deppong, 2006)。

已经表明疱疹病毒进入介体(HVEM)是 BTLA 的配体(Scully 等, 2005)。HVEM 是 I 型跨膜糖蛋白, 属于 TNF 受体超家族的成员, 带有 4 个胞外半胱氨酸富含区域 (CDRs), 包含 6 个假性重复的半胱氨酸。BTLA 及 HVEM 主要通过细胞表面的动态表达来调节 T 细胞和 APC 的功能。BTLA 与配体结合不仅抑制 T 细胞增殖, 下调 T 细胞活化标志 CD25, 还可以抑制 IFN- γ , IL-2, IL-4, 和 IL-10 等的产生, 但不能诱导细胞凋亡。HVEM 与 BTLA 结合导致 T 细胞活化和增殖的下调 (Sedy, 2005)。这些研究结果表明, BTLA 的表达或 BTLA-HVEM 结合情况与 T 细胞的活化与增殖密切相关。

抗体可用作治疗药物。某些抗体在体内用作治疗药物时可引起不需要的抗体免疫原性。因为大多数单克隆抗体来源于啮齿动物, 所以在人中重复使用导致产生针对治疗性抗体(例如, 人抗小鼠抗体或 HAMA)的免疫应答。这类免疫应答至少导致丧失治疗功效, 而最高则导致潜在致死过敏反应。降低啮齿动物抗体的免疫原性的一种方法包括嵌合抗体的产生, 其中将小鼠可变区(Fv)与人恒定区融合(Liu 等 (1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84: 3439-43)。然而, 用人可变区和小鼠恒定区的杂合体注射的小鼠发生针对人可变区的强抗体应答, 这就表明这种嵌合抗体中的完整啮齿动物 Fv 区的保留仍可在患者中引起有害的免疫原性。

另外, 将啮齿动物可变结构域的互补决定区(CDR)环移植到人构架上(即人源化)已被用于进一步将啮齿动物序列减至最低。Jones 等(1986)Nature 321: 522; Verhoeyen 等(1988)Science 239: 1534。然而, CDR 环交换仍不能均匀产生具有与起始抗体相同的结合性质的抗体。在人源化抗体中, 常常还需要构架残基(FR)(参与 CDR 环支持的残基)改变以保持抗原结合亲和力。Kabat 等(1991)J.Immunol.147 : 1709。虽然已经报道了许多人源化抗体构建体中 CDR 移植和构架残基保持的使用, 但是难以预测特定序列是否可产生具有所需结合性质以及间或具有生物学性质的抗体。参见例如 Queen 等, (1989) Proc. Natl.Acad.Sci.USA 86: 10029; Gorman 等,

(1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88: 4181; 及 Hodgson, (1991) Biotechnology (NY), 9: 421-5。此外, 大部分现有研究对动物轻链和重链可变序列使用不同人序列, 致使这种研究的预测性成问题。已在使用已知抗体的序列, 或者更通常使用具有已知 X 射线晶体结构的抗体例如抗体 NEW 和 KOL 的序列。参见例如 Jones 等, 同上; Verhoeyen 等, 同上; 以及 Gorman 等, 同上。已经报道了少数人源化构建体的确切序列信息。

存在对用于治疗人病症(例如炎症病症、自身免疫病症和增殖性病症)的抗 BTLA 抗体、特别是抗 BTLA 单克隆抗体的需要。这种抗体可优选在人受试者中具有低免疫原性, 允许重复给予而无不良免疫应答。

因此, 本领域存在着对于高稳定性的蛋白质制剂的需求。

发明内容

本发明所述的药物组合物是一种含有与 BTLA 特异性结合的人源抗体的高稳定性药物组合物。特别地, 本发明发现海藻糖与氯化钠的组合能明显提高药物组合物的稳定性。

本发明提供了一种药物组合物, 包含: (1) 缓冲液; 和 (2) 抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段。

在一些方案中, 上述抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段具有氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些方案中, 所述药物组合物中抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段的浓度约为 1-200mg/mL, 优选约为 5-100mg/mL, 优选约为 10-50mg/mL; 更优选地, 上述抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段浓度约为 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 25mg/mL, 30mg/mL, 35 mg/mL, 40 mg/mL, 45 mg/mL 或 50 mg/mL 优选约为 10 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL。

在一些方案中, 上述缓冲液选自醋酸缓冲液、柠檬酸缓冲液和组氨酸缓冲液中一种或两种以上。

在一些方案中, 上述缓冲液为组氨酸缓冲液, 优选地, 所述组氨酸缓冲液选自

组氨酸-盐酸盐缓冲液或组氨酸-醋酸盐缓冲液，优选组氨酸-盐酸盐缓冲液。

在一些方案中，上述组氨酸-盐酸盐缓冲液由组氨酸和组氨酸盐酸盐组成，优选 L-组氨酸和 L-组氨酸单盐酸盐。在一些方案中，组氨酸缓冲液由 1-20mM 的 L-组氨酸和 1-20mM 的 L-组氨酸单盐酸盐制成。在一些方案中，组氨酸缓冲液由摩尔比为 1:1 到 1:4 的组氨酸和组氨酸盐酸盐组成。在一些方案中，组氨酸缓冲液由摩尔比为 1:1 组氨酸和组氨酸盐酸盐组成。在一些方案中，组氨酸缓冲液由摩尔比为 1:3 的组氨酸和组氨酸盐酸盐组成。在一些方案中，组氨酸制剂为：由 4.5mM 的 L-组氨酸和 15.5mM 的 L-组氨酸单盐酸盐制成的 pH 为 5.5 的组氨酸缓冲剂。在一些方案中，组氨酸制剂为：由 15mM 的组氨酸和 15mM 的组氨酸盐酸盐制成的 pH 为 6.0 的组氨酸缓冲液。

在一些方案中，上述组氨酸缓冲液为组氨酸-醋酸缓冲液，优选地，两者的摩尔比为 1:1 到 1.5:1，优选地，此类缓冲液的 pH 为 5.5 ± 0.3 ，优选约为 5.5，优选地，这类缓冲液含有 15-20mM 的组氨酸和 12-15mM 的醋酸。

在一些方案中，上述缓冲液为醋酸缓冲液，优选地，所述醋酸缓冲液为醋酸-醋酸钠缓冲液或醋酸-醋酸钾缓冲液，优选醋酸-醋酸钠缓冲液。

在一些方案中，上述缓冲液为柠檬酸缓冲液，优选地，所述柠檬酸缓冲液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

在一些方案中，上述缓冲液的浓度约为 1-100mM，优选约为 5-50mM，优选约为 10-30mM，优选约为 20-30mM；优选约为 10-20mM，上述缓冲液浓度非限制性实施例约为 5mM，10mM，15mM，20mM，25mM，30mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM 或 100mM 或这些范围内任意两个数值作为端点形成的范围，优选为 10mM、20mM 或 30mM。

在一些方案中，上述缓冲液的 pH 约为 5.0-6.5，优选约为 5.0-6.0，优选约为 5.5-6.5，优选约为 5.0-5.5，优选约为 5.5-6.0，优选约为 6.0-6.5，上述缓冲液的 pH 非限制性实施例约为 5.0，5.1，5.2，5.3，5.4，5.5，5.6，5.7，5.8，5.9，6.0，6.1，6.2，6.3，6.4，6.5，优选约为 5.0，5.5 或 6.0。

在一些方案中，上述的药物组合物还包括稳定剂，所述稳定剂选自氯化钠、甘露醇、山梨醇、蔗糖、麦芽糖、木糖醇和海藻糖中的一种或两种以上。优选地，所述稳定剂为海藻糖和氯化钠的组合。

在一些方案中,上述稳定剂的浓度为约 20mM~300 mM,优选 50mM~300 mM,更优选 120mM~250 mM。

在一些方案中,上述稳定剂为浓度约 50-200mM 的氯化钠;或所述稳定剂为浓度约 100-300mM 的甘露醇;或所述稳定剂为浓度约 100-300mM 的山梨醇;或所述稳定剂为浓度约 100-300mM 的蔗糖;或所述稳定剂为浓度约 100-300mM 的海藻糖;或所述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的甘露醇的组合;所述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的山梨醇的组合;所述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的蔗糖的组合;所述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的海藻糖的组合。

在一些方案中,上述稳定剂为氯化钠。在一些方案中,上述稳定剂为浓度约 50-200mM 的氯化钠,上述氯化钠的浓度优选约为 100-190mM,优选约为 120-180mM,优选约为 130-170mM,优选约为 130-150mM,上述氯化钠浓度的非限制性实施例为约 100mM, 110mM, 120 mM, 125 mM, 130 mM, 135 mM, 140 mM, 145 mM, 150 mM, 155 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 优选 135 mM 或 140 mM。

在一些方案中,上述稳定剂为甘露醇。在一些方案中,上述稳定剂为浓度约 100-300mM 的甘露醇,上述甘露醇的浓度优选约为 150-300 mM,优选约为 200-280 mM,上述甘露醇浓度的非限制性实施例为约 200mM, 210mM, 220mM, 230mM, 240mM, 250mM, 260mM, 270mM, 280mM, 优选为 240mM。

在一些方案中,上述稳定剂为山梨醇。在一些方案中,上述稳定剂为浓度约 100-300mM 的山梨醇,上述山梨醇的浓度优选约为 150-300 mM,优选约为 200-280 mM,上述山梨醇浓度的非限制性实施例为约 200mM, 210mM, 220mM, 230mM, 240mM, 250mM, 260mM, 270mM, 280mM, 优选为 240mM。

在一些方案中,上述稳定剂为蔗糖。在一些方案中,上述稳定剂为浓度约 100-300mM 的蔗糖,上述蔗糖的浓度优选约为 150-300 mM,优选约为 200-280 mM,上述蔗糖浓度的非限制性实施例为约 200mM, 210mM, 220mM, 230mM, 240mM, 250mM, 260mM, 270mM, 280mM, 优选为 220mM。

在一些方案中,上述稳定剂为海藻糖。在一些方案中,上述稳定剂为浓度约 100-300mM 的海藻糖,上述海藻糖的浓度优选约为 150-300 mM,优选约为 200-280

mM, 上述海藻糖浓度的非限制性实施例为约 180mM, 200mM, 210mM, 220mM, 230mM, 240mM, 250mM, 260mM, 270mM, 280mM, 优选为 220mM。

在一些方案中, 上述稳定剂为氯化钠与甘露醇的组合。在一些方案中, 上述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的甘露醇的组合, 优选约 40-80mM 的氯化钠与约 100-180mM 的甘露醇的组合, 优选约 40-60mM 的氯化钠与约 120-160mM 的甘露醇的组合, 上述稳定剂的非限制性实施例约为 54mM 的氯化钠与约 144mM 的甘露醇的组合, 约 50mM 的氯化钠与约 140mM 的甘露醇的组合。

在一些方案中, 上述稳定剂为氯化钠与山梨醇的组合。在一些方案中, 上述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的山梨醇的组合, 优选约 40-80mM 的氯化钠与约 100-180mM 的山梨醇的组合, 优选约 40-60mM 的氯化钠与约 120-160mM 的山梨醇的组合, 上述稳定剂的非限制性实施例约为 54mM 的氯化钠与约 144mM 的山梨醇的组合, 约 40mM 的氯化钠与约 160mM 的山梨醇的组合。

在一些方案中, 上述稳定剂为氯化钠与蔗糖的组合。在一些方案中, 上述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的蔗糖的组合, 优选约 40-80mM 的氯化钠与约 100-180mM 的蔗糖的组合, 优选约 40-60mM 的氯化钠与约 120-160mM 的蔗糖的组合, 上述稳定剂的非限制性实施例约为 54mM 的氯化钠与约 132mM 的蔗糖的组合, 约 50mM 的氯化钠与约 150mM 的蔗糖的组合。

在一些方案中, 上述稳定剂为氯化钠与海藻糖的组合。在一些方案中, 上述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的海藻糖的组合, 优选约 40-80mM 的氯化钠与约 100-180mM 的海藻糖的组合, 优选约 40-60mM 的氯化钠与约 120-160mM 的海藻糖的组合, 上述稳定剂的非限制性实施例约为 54mM 的氯化钠与约 132mM 的海藻糖的组合, 约 50mM 的氯化钠与约 140mM 的海藻糖的组合, 约 60mM 的氯化钠与约 120mM 的海藻糖的组合, 优选约 54mM 的氯化钠与约 132mM 的海藻糖的组合, 或约 50mM 的氯化钠与约 140mM 的海藻糖的组合。

在一些方案中, 上述药物组合物还包括表面活性剂, 所述表面活性剂选自聚山梨醇酯 80、聚山梨醇酯 20 或泊洛沙姆 188。

在一些方案中, 上述表面活性剂选自聚山梨醇酯 80。

在一些方案中, 上述表面活性剂选自聚山梨醇酯 20。

在一些方案中, 以 w/v 计算, 上述表面活性剂浓度约为 0.001%-0.1%, 优选约

为 0.01%-0.05%，优选约为 0.02%-0.04%；作为非限制性实施例，上述表面活性剂的浓度约为 0.02%，0.03%或 0.04%，优选 0.02%。

在一些方案中，上述抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，优选人源化抗体。

在一些方案中，上述抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区。

在一些方案中，上述抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示的轻链可变区。

在一些方案中，上述抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段具有氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的重链可变区，和氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的轻链可变区。

在一些方案中，上述抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段具有如 SEQ ID NO:11 所示的重链氨基酸序列，和如 SEQ ID NO:12 所示的轻链氨基酸序列。

在一些方案中，上述药物组合物，其包含如下（1）-（8）任一项所示的组分，或由如下（1）-（8）任一项所示的组分组成；其中，抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段如本发明任一实施方案所述：

（1）（a）约 10mg/mL-50mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 10-30mM 组氨酸缓冲液，pH 约为 5.0-6.0；（c）约 30mM 至约 100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的海藻糖的组合；（d）以及约 0.01%-0.05%的聚山梨醇酯 80；或

（2）（a）约 10mg/mL-50mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 10-30mM 组氨酸缓冲液，pH 约为 5.0-6.0；（c）约 30mM 至约 100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的甘露醇的组合；（d）以及约 0.01%-0.05%的聚山梨醇酯 80；或

（3）（a）约 10mg/mL-50mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 10-30mM 组氨酸缓冲液，pH 约为 5.0-6.0；（c）约 30mM 至约 100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的蔗糖的组合；（d）以及约 0.01%-0.05%的聚山梨醇酯 80；或

（4）（a）约 10mg/mL-50mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 10-30mM 组氨酸缓冲液，pH 约为 5.0-6.0；（c）约 30mM 至约 100mM 的氯化

钠与约 50-200mM 的山梨醇的组合；（d）以及约 0.01%-0.05%的聚山梨醇酯 80；
或

（5）（a）约 10mg/mL-50mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 10-30mM 组氨酸缓冲液，pH 约为 5.0-6.0；（c）约 100mM 至约 300mM 的海藻糖；（d）以及约 0.01%-0.05%的聚山梨醇酯 80；

（6）（a）约 10mg/mL-50mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 10-30mM 柠檬酸缓冲液，pH 约为 5.5-6.5；（c）约 100mM 至约 300mM 的海藻糖；（d）以及约 0.01%-0.05%的聚山梨醇酯 80。

（7）（a）约 10mg/mL-50mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 10-30mM 柠檬酸缓冲液，pH 约为 5.5-6.5；（c）约 30mM 至约 100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的甘露醇的组合；（d）以及约 0.01%-0.05%的聚山梨醇酯 80。

（8）（a）约 10mg/mL-50mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 10-30mM 醋酸缓冲液，pH 约为 5.0-6.0；（c）约 30mM 至约 100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的甘露醇的组合；（d）以及约 0.01%-0.05%的聚山梨醇酯 80。

在一些方案中，上述的药物组合物包含如下（9）-（13）任一项所示的组分，或由如下（9）-（13）任一项所示的组分组成；：

（9）（a）约 20mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 20mM 组氨酸缓冲液，pH 约为 6.0；（c）约 54mM 的氯化钠与约 132mM 的海藻糖的组合；（d）以及约 0.02%的聚山梨醇酯 80；或

（10）（a）约 20mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 20mM 组氨酸缓冲液，pH 约为 5.5；（c）约 220mM 的海藻糖的组合；（d）以及约 0.02%的聚山梨醇酯 80；或

（11）（a）约 20mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 20mM 组氨酸缓冲液，pH 约为 5.5；（c）约 50mM 的氯化钠与约 140mM 的甘露醇的组合；（d）以及约 0.02%的聚山梨醇酯 80；

（12）（a）约 20mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段；（b）约 20mM 组氨酸缓冲液，pH 约为 5.5；（c）约 50mM 的氯化钠与约 140mM 的海藻糖的组合；（d）以及约 0.02%的聚山梨醇酯 80；和

(13) (a) 约 20mg/mL 的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段; (b) 约 20mM 组氨酸缓冲液, pH 约为 5.0-6.0; (c) 约 50mM 的氯化钠与约 140mM 的海藻糖的组合; (d) 以及约 0.02%的聚山梨醇酯 80。

在一些方案中, 所述药物组合物为液体制剂或冻干制剂。

在一些方案中, 所述药物组合物为液体制剂, 如水溶液制剂。

在一些方案中, 上述液体制剂或冻干制剂于 2-8℃稳定至少 3 个月, 至少 6 个月, 至少 12 个月, 至少 18 个月或至少 24 个月。

在一些方案中, 上述水溶液或冻干制剂于 40℃稳定至少 7 天, 至少 14 天或至少 28 天。

本发明还提供了上述药物组合物在制备治疗或预防 BTLA 介导的疾病的药物中的用途。

在一些方案中, 上述疾病包括肿瘤、感染性疾病、炎性或自身免疫性疾病。所述的肿瘤包括黑色素瘤、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、骨癌、皮肤癌、头或颈癌、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、食道癌、小肠癌、宫颈癌、阴道癌、何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、肾上腺癌、软组织癌、尿道癌、慢性或急性白血病、慢性髓细胞样白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、儿童期实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统的赘生物、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症、其包括石棉所诱发的那些, 和所述癌症的组合。所述自身免疫性疾病包括器官特异性自身免疫病和系统性自身免疫病; 所述器官特异性自身免疫病包括慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症、急性特发性多神经炎等; 所述系统性自身免疫病包括系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、系统性血管炎、硬皮病、天疱疮、皮炎、混合性结缔组织病、自身免疫性溶血性贫血、溃疡性结肠炎等。

附图说明

图 1: 人源化抗体 hu 17 与不同种属 BTLA 结合的对比实验。

图 2: hu18 对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLA 小鼠肿瘤体积的影响。

图 3: 受试品对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLA 小鼠体重的影响。

定义和说明

为了更容易理解本发明,以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义,本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。应理解本发明不限于具体的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,当然可以对以上进行变化。还应理解本申请所用术语仅为了描述具体的实施方式,并不旨在进行限制。

除非该内容被另外明确说明,否则本说明书以及所附权利要求中所用的单数形式"一个"、"一种"和"该"包括复数指代。因此,例如,提及"一种多肽"包括了两种或更多种多肽等的组合。

术语"药物组合物"或"制剂"表示含有一种或多种本文所述化合物或其药学上可接受的盐或前体药物与其他组分的混合物,所述其他组分例如生理学可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

术语"液体制剂"是指处于液体状态下的制剂,且不意图指称重悬浮的冻干制剂。本发明的液体制剂在储存时稳定,并且其稳定性不依赖于冻干(或其他状态改变方法,例如喷雾干燥)。

术语"水性液体制剂"是指使用水作为溶剂的液体制剂。在一些方案中,水性液体制剂是不需冻干、喷雾干燥和/或冷冻来维持稳定性(例如化学和/或物理稳定性和/或生物活性)的制剂。

术语"赋形剂"是指可以向制剂添加以提供所需特性(例如稠度、提高的稳定性)和/或调节渗透压的试剂。常用赋形剂的实例包括但不限于糖类、多元醇、氨基酸、表面活性剂和聚合物。

本申请所用的"约"在指代可测量数值(如量、持续时间等)时意在涵盖相对于具体数值 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 的变化,包括 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 和 $\pm 0.1\%$,因为这些变化适于进行所公开的方法。

术语“缓冲液 pH 约为 5.0-6.5”是指这样的试剂, 通过其酸/碱共轭组分的作用使得包含该试剂的溶液能抵抗 pH 变化。本发明的制剂中使用的缓冲液可具有约 5.0 至约 6.5 范围内的 pH、或约 5.5 至约 6.5 范围内的 pH、或约 5.0 至约 6.0 范围内的 pH。

在本文中, 将 pH 控制在该范围内的“缓冲液”实例包括乙酸盐 (例如乙酸钠)、琥珀酸盐(例如琥珀酸钠)、葡萄糖酸、组氨酸、组氨酸盐酸盐、甲硫氨酸、柠檬酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐/磷酸盐、咪唑、醋酸、醋酸盐、枸橼酸盐、其组合和其他有机酸缓冲剂。

“组氨酸缓冲液”为包含组氨酸离子的缓冲液。组氨酸缓冲液的实例包括组氨酸和组氨酸的盐, 如组氨酸盐酸盐、组氨酸乙酸盐、组氨酸磷酸盐和组氨酸硫酸盐等, 如含有组氨酸与组氨酸盐酸盐的组氨酸缓冲液; 本发明的组氨酸缓冲液也包括含有组氨酸和醋酸盐 (如钠盐或钾盐) 的组氨酸缓冲液。

“柠檬酸盐缓冲液”是包括柠檬酸根离子的缓冲液。柠檬酸盐缓冲液的实例包括柠檬酸-柠檬酸钠、柠檬酸-柠檬酸钾、柠檬酸-柠檬酸钙、柠檬酸-柠檬酸镁等。优选的柠檬酸盐缓冲液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

“醋酸盐缓冲液”是包括醋酸根离子的缓冲液。醋酸盐缓冲液的实例包括醋酸-醋酸钠、醋酸-醋酸钾、醋酸-醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸盐缓冲液为醋酸-醋酸钠缓冲液。

术语“稳定剂”表示药学上可接受的赋形剂, 其在制造, 储存和应用过程中保护活性药物成分和/或制剂免受化学和/或物理降解。稳定剂包括但不限于如以下定义的糖, 氨基酸, 盐, 多元醇和他们的代谢产物, 例如氯化钠、氯化钙、氯化镁、甘露醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、盐酸精氨酸、精氨酸、甘氨酸、丙氨酸(α -丙氨酸、 β -丙氨酸)、甜菜碱、亮氨酸、赖氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、4-羟基脯氨酸、肌氨酸、 γ -氨基丁酸(GABA)、奥品类(opines)、丙氨奥品、章鱼碱、甘氨奥品(strombine))和三甲胺的 N-氧化物(TMAO)、人血清白蛋白(hsa)、牛血清白蛋白(bsa)、 α -酪蛋白、球蛋白、 α -乳白蛋白、LDH、溶菌酶、肌红蛋白、卵清蛋白和 RNAaseA。部分稳定剂, 如氯化钠、氯化钙、氯化镁、甘露醇、山梨醇、蔗糖等也可起到控制渗透压的作用。在本发明中具体地使用的稳定剂选自多元醇、盐、糖中的一种或两种以上。优选的盐为氯化钠, 优选的糖为蔗糖和海藻糖, 优选的多元醇为山梨醇和

甘露醇。优选的稳定剂为氯化钠、甘露醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、氯化钠-山梨醇、氯化钠-甘露醇、氯化钠-蔗糖和氯化钠-海藻糖，更优选为氯化钠-山梨醇、氯化钠-甘露醇、氯化钠-蔗糖和氯化钠-海藻糖，更优选为氯化钠-海藻糖。

术语“表面活性剂”一般包括保护蛋白质例如抗体免受空气/溶液界面诱导的应力、溶液/表面诱导的应力的影响以减少抗体的聚集或使制剂中颗粒物的形成最小化的试剂。示例性的表面活性剂包括但不限于非离子型表面活性剂例如聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯(如聚山梨醇酯 20 和聚山梨醇酯 80)、聚乙烯-聚丙烯共聚物、聚乙烯-聚丙烯二醇、聚氧乙烯-硬脂酸酯、聚氧乙烯烷基醚、例如聚氧乙烯单月桂基醚、烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆, Pluronic)、十二烷基硫酸钠(SDS)。

术语“等渗”是指该制剂具有与人血液基本相同的渗透压。等渗制剂一般具有约 250 至 350mOsm 的渗透压。可使用蒸汽压或冰点下降式的渗透压计测量等渗性。

术语“稳定的”制剂是其中的抗体在制造过程期间和/或储存时基本上保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的制剂。即使所含的抗体在经过一定时间储存之后未能保持其 100%的化学结构或生物功能，医药制剂也可以是稳定的。在某些情况下，在经过一定时间储存之后，能维持约 90%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%或约 99%的抗体结构或功能，也可被认为是“稳定的”。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本技术领域是可得的，并综述在《肽和蛋白质药物递送》(Peptide and Protein Drug Delivery) 247-301, Vincent Lee 主编, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)), 和 Jones, A.(1993) Adv. Drug Delivery Rev.10: 29-90 中(二者引入作为参考)。

制剂在一定温度下经过一定时间的储存之后，通过测定其中剩余的天然抗体的百分比(及其它方法)，可以测量其稳定性。除其它方法外，天然抗体的百分比可以通过尺寸排阻色谱法(例如尺寸排阻高效液相色谱法[SEC-HPLC])来测量，“天然的”指未聚集的和未降解的。在一些方案中，蛋白质的稳定性按照具有低百分比的降解(例如片段化)和/或聚集蛋白质的溶液中单体蛋白质的百分数来确定。在一些方案中，制剂可以在室温、约 25-30℃或 40℃下稳定储存至少 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，或更长，最多不超过约 6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%，或 0.1% 聚集形式的抗体。

通过测定在离子交换期间在此抗体主馏分（“主要荷电形式”）较为酸性的馏分中迁移的抗体（“酸性形式”）的百分比（及其它方法），可以测量稳定性，其中稳定性与酸性形式抗体的百分比成反比。除其它方法外，“酸化”抗体的百分比可以通过离子交换色谱法（例如阳离子交换高效液相色谱法[CEX-HPLC]）来测量。在一些实施方式中，可接受程度的稳定性意为当制剂在一定温度下经过一定时间的储存之后，其中可检测出的酸性形式的抗体最多不超过约 49%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5% 或 0.1%。在测量稳定性之前储存的一定时间可以是至少 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，或更长。当评估稳定性时，容许储存医药制剂的一定温度可以是约 -80°C 至约 45°C 范围内的任何温度，例如储存于约 -80°C、约 -30°C、约 -20°C、约 0°C、约 2-8°C、约 5°C、约 25°C，或约 40°C。

如果抗体在颜色和/或澄清度目测检查时或通过 UV 光散射或通过孔径排阻层析测量时基本上不显示出例如聚集、沉淀和/或变性的迹象，则所述抗体在该药物组合物中“保持其物理稳定性”。聚集是单个分子或复合物共价或非共价缔合以形成聚集体的过程。聚集可以进行到形成可见沉淀物的程度。

制剂的稳定性例如物理稳定性可以通过本技术领域中公知的方法来评估，包括测量样品的表观消光度(吸光度或光密度)。这样的消光测量与制剂的浊度相关。制剂的浊度部分地是溶解在溶液中的蛋白质的固有性质，并且通常通过比浊法来测量，并用比浊法浊度单位(NTU)来量度。

随着例如溶液中一种或多种组分的浓度(例如蛋白质和/或盐浓度)而变化的浊度水平也被称为制剂的“乳浊”或“乳浊外观”。浊度水平可以参照使用已知浊度的悬液产生的标准曲线来计算。用于测定药物组合物的浊度水平的参比标准品可以基于《欧洲药典》标准（《欧洲药典》(European Pharmacopoeia)，第四版，“欧洲药品质量委员会指令”(Directorate for the Quality of Medicine of the Council of Europe)(EDQM)，Strasbourg, France)。根据《欧洲药典》标准，澄清溶液被定义

为浊度低于或等于按照《欧洲药典》标准具有约 3 的参比悬液的浊度的溶液。比浊法的浊度测量可以检测在不存在缔合或非理想效应的情况下的瑞利散射,其通常随浓度线性变化。用于评估物理稳定性的其他方法在本技术领域中公知。

如果抗体在给定时间点的化学稳定性使得抗体被认为仍保持如下文中所定义的其生物活性,则所述抗体在药物组合物中“保持其化学稳定性”。可以通过例如检测或定量抗体的化学改变的形式来评估化学稳定性。化学改变可以包括尺寸改变(例如剪短),其可以使用例如孔径排阻层析、SDS-PAGE 和/或基质辅助的激光解吸电离/飞行时间质谱(MALDI/TOF MS)来评估。其他类型的化学改变包括电荷改变(例如作为脱酰胺或氧化的结果而发生),其可以通过例如离子交换层析来评估。

如果药物组合物中的抗体对于其预期目的来说是生物活性的,则所述抗体在药物组合物中“保持其生物活性”。例如,如果制剂于例如 5°C、25°C、45°C 等温度下储存一定时间(例如 1 至 12 个月)之后,该制剂所含抗 BTLA 抗体与 BTLA 结合的亲和力为所述储存之前抗体结合亲和力的至少 90%、95%或以上,则可认为本发明之制剂是稳定的。结合亲和力也可用例如 ELISA 或等离子共振技术测定。

在本发明的情形中,在药理学意义上,抗体的“治疗有效量”或“有效量”是指在抗体可以有效治疗的障碍的症状的预防或治疗或减轻方面有效的量。本发明中,药物的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是当单独使用或与另一种治疗剂组合使用时保护受试者免于疾病发作或促进疾病消退的任何量的药物,所述疾病消退通过疾病症状的严重性的降低,疾病无症状期的频率和持续时间的增加,或由疾病痛苦引起的损伤或失能的预防来证明。药物促进疾病消退的能力可以使用本领域技术人员已知的多种方法来评价,比如在临床试验期间的人受试者中,在预测人类功效的动物模型系统中,或通过体外测定法中测定所述药剂的活性。药物治疗有效量包括“预防有效量”,即当单独或如与其它治疗药物组合给与处于患病风险的受试者或患病复发的受试者时,抑制疾病的发展或复发的任何量的药物。

术语“受试者”或“患者”意图包括哺乳动物生物体。受试者/患者的实例包括人类和非人类哺乳动物,例如非人类灵长动物、狗、奶牛、马、猪、绵羊、山羊、猫、小鼠、兔、大鼠和转基因非人类动物。在本发明的特定实施方式中,受试者是人类。

术语“施用”、“给与”及“处理”是指采用本领域技术人员已知的各种方法或递送系统中的任何一种将包含治疗剂的组合物引入受试者。抗 PD-1 抗体的给药

途径包括静脉内、肌内、皮下、腹膜、脊髓或其他胃肠外给药途径，比如注射或输注。“胃肠外给药”是指除了肠内或局部给药以外的通常通过注射的给药方式，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴内、损伤内、囊内、框内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜内和胸骨内注射和输注以及经体内电穿孔。

抗 BTLA 抗体

本文所用的术语“抗体”应被理解为包括完整抗体分子及其抗原结合片段。本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”（或简称为“抗体部分”或“抗体片段”）是指抗体中保持了与人 BTLA（B 和 T 淋巴细胞弱化子）或其表位特异性结合能力的一个或多个片段。

本文所用的术语“全长抗体”或“完整抗体分子”指包含四条肽链的免疫球蛋白分子，两条重(H)链(全长时约 50-70kDa)和两条轻(L)链(全长时约 25kDa)通过二硫键互相连接。每一条重链由重链可变区（在本文中缩写为 VH）和重链恒定区（在本文中缩写为 CH）组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每一条轻链由轻链可变区（在本文中缩写为 VL）和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区可被进一步细分为具有高可变性的互补决定区（CDR）和其间隔以更保守的称为框架区（FR）的区域。每一个 VH 或 VL 区由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白对宿主组织或因子（包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一组分（C1q））的结合。

当在本文中使用时，术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区。在重链和轻链的各个可变区中存在 3 个 CDR，其对于各个重链和轻链可变区被命名为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 或 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。这些 CDR 的准确边界按照不同的系统有不同的定义。

本发明的所述抗体的可变区 CDR 的精确氨基酸序列边界可使用许多公知的方案的任何方案来确定，包括基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia(Chothia 等人.(1989)Nature 342:877-883，Al-Lazikani 等人，“Standard

conformations for the canonical structures of immunoglobulins” , Journal of Molecular Biology, 273, 927-948(1997))基于抗体序列可变性的 Kabat(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM(University of Bath) , Contact(University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT)(1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212), 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。本发明抗体的 CDR 可以由本领域的技术人员根据本领域的任何方案(例如不同的指派系统或组合)确定边界。

本文所使用的“抗原结合片段”包括抗体的片段或其衍生物,通常包括亲代抗体的抗原结合区或可变区(例如一个或多个 CDR)的至少一个片段,其保持亲代抗体的至少一些结合特异性。抗原结合片段的实例包括但不限于 Fab, Fab', F(ab')₂ 和 Fv 片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子,例如 sc-Fv;由抗体片段形成的纳米抗体 (nanobody)和多特异性抗体。当抗体的结合活性在摩尔浓度基础上表示时,结合片段或其衍生物通常保持亲代抗体抗原结合活性的至少 10%。优选结合片段或其衍生物保持亲代抗体的抗原结合亲和力的至少 20%、50%、70%、80%、90%、95%或 100%或更高。还预期抗体的抗原结合片段可包括不明显改变其生物活性的保守或非保守氨基酸取代(称为抗体的“保守变体”或“功能保守变体”)。

本发明所述的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段包括申请号为 CN201810870514.0 中描述的任意一个抗 BTLA 抗体,本文将其所公开的全部内容以引入的方式纳入本文。在一些方案中,在本发明的方法和组合物中使用的抗体的 CDR 序列包括来自于 CN201810870514.0 中描述的抗体 hu18 的 CDR 序列。在一些方案中,在本发明的方法和组合物中使用的抗体的 CDR 序列包括来自于 CN201810870514.0 中描述的抗体 hu17 的 CDR 序列。在一些方案中,在本发明的方法和组合物中使用的抗体的 CDR 序列包括来自于 CN201810870514.0 中描述的抗体 hu19 的 CDR 序列。

在本文实施例中所用的非限制性、示范性抗体选自 CN201810870514.0 中描述的 hu17、hu18 和 hu19,均是与人 BTLA 特异性结合的人源化完全抗体,其中,抗体 hu17、hu18 和 hu19 均具有氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,和氨基酸序列分别如 SEQ ID

NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；优选地，抗体 hu17 具有分别氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区；抗体 hu18 具有氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示的轻链可变区；抗体 hu19 具有氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区和氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示的轻链可变区；优选地，抗体 hu18 具有分别如 SEQ ID NO:11 所示的重链氨基酸序列和如 SEQ ID NO:12 所示的轻链氨基酸序列。其中，上述人源化抗体的 CDR 氨基酸序列由 IMGT 系统定义。

医药制剂

本发明所述的药物组合物是一种含有与 BTLA 特异性结合的人源抗体的高稳定性药物组合物。特别地，本发明发现海藻糖与氯化钠的组合能明显提高药物组合物的稳定性。

本发明提供了一种药物组合物，包含：（1）缓冲液；和（2）抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段。

本发明药物组合物中的抗体可以是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，优选人源化抗体，可具有分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。优选地，本发明药物组合物中的抗体具有如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区；或具有分别如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO:9 所示的轻链可变区；或具有分别如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO:10 所示的轻链可变区；更优选地，本发明药物组合物中的抗体具有分别如 SEQ ID NO:11 所示的重链氨基酸序列和如 SEQ ID NO:12 所示的轻链氨基酸序列。

本发明的药物组合物中，抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段浓度约为 1-200mg/mL，优选约为 5-100mg/mL，优选约为 10-50mg/mL，更优选 15-25mg/mL。作为非限制性实施例；抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段浓度约为 10 mg/mL，15 mg/mL，20 mg/mL，25mg/mL，30mg/mL，35 mg/mL，40 mg/mL，45 mg/mL 或 50 mg/mL；优选约为 10 mg/mL，20 mg/mL 或 40 mg/mL。

本发明药物组合物中的缓冲液可选自醋酸缓冲液、柠檬酸缓冲液和组氨酸缓冲液，用以为本发明的药物组合物提供 5.0 到 6.5、优选 5.0 到 6.0 的 pH。另一方面，用于本发明药物组合物中的缓冲液的 pH 可为 5.0-6.5，优选为 5.0-6.0。

本发明药物组合物中特别优选的缓冲液是组氨酸缓冲液。优选地，本发明使用的组氨酸缓冲液的 pH 为 5.0-6.0，更优选为 5.5 ± 0.3 ，优选约为 5.5。优选，所述组氨酸缓冲液包括组氨酸-盐酸盐缓冲液或组氨酸-醋酸盐缓冲液，优选组氨酸-盐酸盐缓冲液。更优选地，所述组氨酸-盐酸盐缓冲液由组氨酸和组氨酸盐酸盐组成，优选 L-组氨酸和 L-组氨酸单盐酸盐。在一些方案中，组氨酸缓冲液由 1-20mM 的 L-组氨酸和 1-20mM 的 L-组氨酸单盐酸盐制成。在一些方案中，组氨酸缓冲液由摩尔比为 1:1 到 1:4 的组氨酸和组氨酸盐酸盐组成。在一些方案中，组氨酸缓冲液由摩尔比为 1:1 组氨酸和组氨酸盐酸盐组成。在一些方案中，组氨酸缓冲液由摩尔比为 1:3 的组氨酸和组氨酸盐酸盐组成。在一些方案中，组氨酸制剂为：由 4.5mM 的 L-组氨酸和 15.5mM 的 L-组氨酸单盐酸盐制成的 pH 为 5.5 的组氨酸缓冲剂。在一些方案中，组氨酸制剂为：由 15mM 的组氨酸和 15mM 的组氨酸盐酸盐制成的 pH 为 6.0 的组氨酸缓冲液。

本发明药物组合物中的组氨酸缓冲液可为组氨酸-醋酸盐缓冲液，优选地，两者的摩尔比为 1:1 到 1.5:1，优选地，此类缓冲液的 pH 为 5.5 ± 0.3 ，优选约为 5.5，优选地，这类缓冲液含有 15-20mM 的组氨酸和 12-15mM 的醋酸。

因此，本发明的药物组合物可含有：pH 为 5.0-6.0 的组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液，其在药物组合物中的浓度为 10-30mM；和 15-25mg/mL 的前文任一实施方案所述的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段，尤其是本文所述的 hu17、hu18 或 hu19 或其抗原结合片段。

在一些方案中，本发明的药物组合物还含有稳定剂。优选地，所述稳定剂选自氯化钠、甘露醇、山梨醇、蔗糖、麦芽糖、木糖醇和海藻糖中的一种或两种以上。优选地，药物组合物中的稳定剂中至少含有氯化钠，任选含有甘露醇、山梨醇、蔗糖和海藻糖中的一种或多种。例如，药物组合物中可含有氯化钠与甘露醇、氯化钠与山梨醇、氯化钠与蔗糖、或者氯化钠与海藻糖。含有时，药物组合物中稳定剂的浓度为约 20mM-300mM，优选 50mM-300mM，更优选 120mM-250mM。在一些方案中，稳定剂为浓度约 50-200mM 的氯化钠；或所述稳定剂为浓度约 100-300mM

的甘露醇；或所述稳定剂为浓度约 100-300mM 的山梨醇；或所述稳定剂为浓度约 100-300mM 的蔗糖；或所述稳定剂为浓度约 100-300mM 的海藻糖；或所述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的甘露醇的组合；所述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的山梨醇的组合；所述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的蔗糖的组合；所述稳定剂为约 30-100mM 的氯化钠与约 50-200mM 的海藻糖的组合。

因此，在一些实施方案中，本发明的药物组合物含有：pH 为 5.0-6.0 的组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液，其在药物组合物中的浓度为 10-30mM；15-25mg/mL 的前文任一实施方案所述的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段，尤其是本文所述的 hu17、hu18 或 hu19 或其抗原结合片段；以及 20mM-300 mM 的稳定剂，优选地，所述稳定剂至少包括氯化钠，任选包括甘露醇、山梨醇、蔗糖和海藻糖中的一种，优选为 50-150mM 的氯化钠，或 40-80mM 的氯化钠与 120-150mM 的甘露醇，或 40-80mM 的氯化钠与 120-150mM 的山梨醇，或 40-80mM 的氯化钠与 120-150mM 的蔗糖，或 40-80mM 的氯化钠与 120-150mM 的海藻糖。在一些实施方案中，所述稳定剂为 200-300mM 的海藻糖。

在一些方案中，本发明的药物组合物还包括表面活性剂。优选的表面活性剂选自聚山梨醇酯 80、聚山梨醇酯 20 和泊洛沙姆 188。最优选的表面活性剂是聚山梨醇酯 80。以 w/v 计，本发明药物组合物中表面活性剂的浓度约为 0.001%-0.1%，优选约为 0.01%-0.05%，优选约为 0.02%-0.04%。作为非限制性实施例，本发明药物组合物中表面活性剂的浓度约为 0.02%，0.03%或 0.04%，优选 0.02%。

因此，在一些实施方案中，本发明的药物组合物含有：pH 为 5.0-6.0 的组氨酸-组氨酸盐酸盐缓冲液，其在药物组合物中的浓度为 10-30mM；15-25mg/mL 的前文任一实施方案所述的抗 BTLA 抗体或其抗原结合片段，尤其是本文所述的 hu17、hu18 或 hu19 或其抗原结合片段；20mM-300 mM 的稳定剂，优选地，所述稳定剂为海藻糖，或至少包括氯化钠，任选包括甘露醇、山梨醇、蔗糖和海藻糖中的一种，优选为 200-300mM 的海藻糖，或 50-150mM 的氯化钠，或 40-80mM 的氯化钠与 120-150mM 的甘露醇，或 40-80mM 的氯化钠与 120-150mM 的山梨醇，或 40-80mM 的氯化钠与 120-150mM 的蔗糖，或 40-80mM 的氯化钠与 120-150mM 的海藻糖；以及以 w/v 计 0.02%-0.04% 的聚山梨醇酯 80。在特别优选的实施方案中，本发明的

药物组合物含有以下组分，或由以下组分组成：pH 为 5.5 ± 0.3 的组氨酸-组氨酸盐缓冲液，其浓度为 $20 \pm 5\text{mM}$ ； $40\text{-}80\text{mM}$ 的氯化钠； $120\text{-}150\text{mM}$ 的海藻糖，以 w/v 计 $0.02\text{-}0.04\%$ 的聚山梨酯 80； $15\text{-}25\text{mg/mL}$ 的抗体 hu18 或其抗原结合片段。

本发明的药物组合物可以是液体制剂，或者是冻干制剂。应理解，对于液体制剂，除本文所述的缓冲液、稳定剂、抗体或其抗原结合片段和表面活性剂外，还含有用来配制该药物组合物的水。

医药用途和方法

本发明还提供了用于治疗或预防 BTLA 介导的疾病的本发明任一实施方案所述的药物组合物，本发明任一实施方案所述的药物组合物在制备治疗或预防 BTLA 介导的疾病的药物中的用途，以及给予需要的个体或患者治疗有效量的本发明任一实施方案所述的药物组合物以治疗或预防 BTLA 介导的疾病的方法。

本发明中，BTLA 介导的疾病指在 BTLA 参与了疾病的发生和发展的疾病，包括但不限于肿瘤、感染性疾病、和炎性或自身免疫性疾病。本发明中，适用于本发明药物组合物进行治疗和预防的肿瘤包括黑色素瘤、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、骨癌、皮肤癌、头或颈癌、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、食道癌、小肠癌、宫颈癌、阴道癌、何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、肾上腺癌、软组织癌、尿道癌、慢性或急性白血病、慢性髓细胞样白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、儿童期实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统的赘生物、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症、其包括石棉所诱发的那些，和所述癌症的组合。适用于本发明药物组合物进行治疗和预防的自身免疫性疾病包括器官特异性自身免疫病和系统性自身免疫病；所述器官特异性自身免疫病包括慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、寻常天疱疮、类天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症、急性特发性多神经炎等；所述系统性自身免疫病包括系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、系统性血管炎、硬皮病、天疱疮、皮炎、混合性结缔组织

病、自身免疫性溶血性贫血、溃疡性结肠炎等。

具体实施方式

下文将以具体实施例的方式阐述本发明。应理解，这些实施例仅仅是阐述性的，并非意图限制本发明的范围。实施例中所用到的方法和材料，除非另有说明，否则为本领域的常规方法和材料。

实施例 1：缓冲液体系和 pH 筛选实验

液体型药物组合物中，缓冲液体系和 pH 密切影响抗体的稳定性，每种具有独特理化性质的抗体都具有最适宜的缓冲液的种类和 pH。本实施例旨在筛选一种最佳缓冲液体系和 pH，使本发明公开的抗 BTLA 抗体具有最佳的稳定性以适宜临床应用。

本实施例以约 10mg/mL、20mg/mL 和 40mg/mL 浓度的抗体 hu18 进行。样品使用 VIVAFlow200 进行超滤浓缩换液，换液后样品处于相应的处方中，样品放置在密闭的离心管中进行缓冲液筛选。筛选了醋酸缓冲液、柠檬酸缓冲液和组氨酸缓冲液，pH 从 5.0 到 6.5（如表 1 所示）。将样品放置在 40℃ 环境下，分别在第 0 周、第 2 周和第 4 周取出进行分析检测。蛋白降解的主要途径是聚集物、裂解产品和带电变体的形成。采用尺寸排阻色谱法(SEC-HPLC)测定天然形式（蛋白单体）与聚集形式所占的百分比，采用阳离子交换色谱法(CEX-HPLC)测定酸性与碱性形式抗体所占的百分比。以试验起始（0W）、放置两周（2W）和放置四周（4W）的 SEC-HPLC 单体含量和 CEX-HPLC 主峰含量，拟合直线并计算下降斜率（%/周）考察不同缓冲液体系和 pH 对抗体 hu18 抗体稳定性的影响，结果汇总见表 2 和表 3 所示。

表 1：缓冲液体系和 pH 筛选实验中的处方信息

处方 编号	pH	缓冲体系	辅料 1	辅料 2
1	5.0	20mM 醋酸缓冲液（醋酸-醋酸钠）	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇
2	5.0	20mM 醋酸缓冲液（醋酸-醋酸钠）	140 mM 氯化钠	-

3	5.5	20mM 组氨酸缓冲液 (组氨酸-醋酸)	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇
4	5.5	20mM 组氨酸缓冲液 (组氨酸-醋酸)	140 mM 氯化钠	-
5	5.5	20mM 醋酸缓冲液 (醋酸-醋酸钠)	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇
6	5.5	20mM 醋酸缓冲液 (醋酸-醋酸钠)	140 mM 氯化钠	-
7	6.0	20mM 组氨酸缓冲液 (组氨酸-组氨酸盐酸盐)	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇
8	6.0	20mM 组氨酸缓冲液 (组氨酸-组氨酸盐酸盐)	140 mM 氯化钠	-
9	6.0	20mM 柠檬酸缓冲液 (柠檬酸-柠檬酸钠)	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇
10	6.0	20mM 柠檬酸缓冲液 (柠檬酸-柠檬酸钠)	140 mM 氯化钠	-
11	6.5	20mM 柠檬酸缓冲液 (柠檬酸-柠檬酸钠)	50 mM 氯化钠	140 mM 甘露醇
12	6.5	20mM 柠檬酸缓冲液 (柠檬酸-柠檬酸钠)	140 mM 氯化钠	-

注：“-”表示未添加。

表 2：缓冲液体系和 pH 筛选实验中 SEC-HPLC 单体含量降解速率

处方编号	10mg/ml 蛋白 单体下降速率 (%/ 周)	20mg/ml 蛋白 单体下降速率 (%/ 周)	40mg/ml 蛋白 单体下降速率 (%/ 周)	单体平均下降速率 (%/周)
1	0.27	0.38	0.52	0.39
2	0.46	0.53	0.71	0.57

3	0.17	0.27	0.38	0.27
4	0.23	0.36	0.48	0.36
5	0.22	0.32	0.46	0.34
6	0.36	0.45	0.58	0.46
7	0.16	0.21	0.35	0.24
8	0.14	0.24	0.37	0.25
9	0.23	0.33	0.44	0.33
10	0.21	0.31	0.41	0.31
11	0.27	0.37	0.52	0.38
12	0.24	0.35	0.46	0.35

表 3: 缓冲液体系和 pH 筛选实验中 CEX-HPLC 电荷异质体含量降解速率

处方编号	10mg/ml 蛋白 主峰下降速率 (%/ 周)	20mg/ml 蛋白 主峰下降速率 (%/ 周)	40mg/ml 蛋白 主峰下降速率 (%/ 周)	主峰下降平均速率 (%/周)
1	5.82	5.44	5.38	5.54
2	5.48	4.67	4.89	5.01
3	6.08	4.65	4.45	5.06
4	7.75	5.89	5.87	6.51
5	6.46	5.00	4.57	5.34
6	6.88	4.75	3.51	5.05
7	6.67	6.35	5.50	6.17
8	6.58	6.85	5.53	6.32
9	7.11	5.27	6.69	6.36
10	7.06	5.11	5.67	5.95
11	8.46	8.23	7.11	7.93
12	6.52	5.64	4.84	5.67

由表 2 和表 3 所示, SEC-HPLC 实验检测中, 高温 40℃放置 4 周后, 单体含

量随蛋白浓度的增高下降速率增快,但是在 pH 5.5~6.0 组氨酸缓冲体系下不同蛋白浓度的单体含量下降速率均较低,平均下降速率 $\leq 0.27\%$ /周; CEX-HPLC 实验检测中,可以看出 CEX-HPLC 主峰含量降解速率与 pH 有一定的相关性, pH 越高主峰含量降解速率越快,在 pH 5.0~6.0 的缓冲体系中,主峰含量降解速度相对较低,主峰含量降解速率与蛋白浓度的相关性不明显。

综合考虑产品规格以及产品的目标质量属性(聚体含量水平),选择蛋白浓度 20mg/ml, pH 为 5.5 或 6.0 的组氨酸缓冲液进行辅料(稳定剂)的处方筛选。

实施例 2: 稳定剂筛选实验

为了进一步探究不同辅料对抗体稳定性的影响,我们选取氯化钠、甘露醇、山梨醇、蔗糖或海藻糖之一或其组合的制剂进行了比较测试。即将上述不同的辅料或其组合分别加入含约 20mg/mL 抗体 hu18 的 20mM 组氨酸缓冲液或者柠檬酸缓冲液中,具体处方信息如表 4 所示。各处方制剂分装后放置于 40℃ 条件下,分别在第 0 周、第 2 周、第 4 周取出进行分析检测。通过分子排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC)检测抗体 hu18 单体含量变化、弱阳离子高效液相色谱法(CEX-HPLC)检测抗体 hu18 电荷主峰含量。结果如表 5 所示。

根据稳定性考察结果,不同辅料的制剂处方样品在 40℃ 高温条件下放置 2 周后,抗体均有较强的热稳定性。

综合各项数据分析,对比 F13~F17 与 F18~F21 发现,甘露醇、山梨醇、蔗糖和海藻糖与氯化钠的辅料组合优于甘露醇、山梨醇、蔗糖和海藻糖的单一辅料,表现在 SEC-HPLC 的单体含量与 CEX-HPLC 的主峰含量的降解速率更低。在含海藻糖辅料中, pH5.5 的组氨酸缓冲体系条件下最为稳定,抗体单体纯度的下降速率低至 0.11%/周,抗体主要电荷的下降速率仅为 3.72%/周,明显低于 pH6.0。

因此,选用 pH5.5、海藻糖与氯化钠的辅料组合更有利于产品的稳定性。同时可以看到,对于 SEC-HPLC 的单体含量的降解, pH6.0 的组氨酸缓冲体系(F17)明显优于 pH6.0 的柠檬酸缓冲体系(F23)。

表 4: 辅料筛选实验中的处方信息

处方编号	缓冲液	PH	辅料 1	辅料 2	聚山梨酯 80

13	20mM 组氨酸缓冲液 (组氨酸-组氨酸盐酸盐)	6.0	135mM 氯化钠	-	0.02%
14			240mM 甘露醇	-	0.02%
15			240mM 山梨醇	-	0.02%
16			220mM 蔗糖	-	0.02%
17			220mM 海藻糖	-	0.02%
18			54mM 氯化钠	144mM 甘露醇	0.02%
19			54mM 氯化钠	144mM 山梨醇	0.02%
20			54mM 氯化钠	132mM 蔗糖	0.02%
21			54mM 氯化钠	132mM 海藻糖	0.02%
22	20mM 组氨酸缓冲液 (组氨酸-醋酸)	5.5	220mM 海藻糖	-	0.02%
23	20mM 柠檬酸缓冲液 (柠檬酸-柠檬酸钠)	6.0	220mM 海藻糖	-	0.02%

注：“-”表示未添加。

表 5：辅料筛选实验结果汇总

处方编号	SEC-HPLC	CEX-HPLC
	单体下降速率（%/周）	主峰下降速率（%/周）
13	0.13	4.66
14	0.12	5.11
15	0.12	5.13
16	0.12	5.08
17	0.13	5.27
18	0.12	4.98

19	0.11	4.92
20	0.12	4.99
21	0.12	4.81
22	0.11	3.72
23	0.19	4.99

实施例 3：表面活性剂筛选实验

液体制剂中添加表面活性剂常用于保护蛋白质例如抗体在储存过程中免受空气/溶液界面诱导的应力、溶液/表面诱导的应力的影响以减少抗体的聚集或使制剂中颗粒物的形成最小化的试剂，其利于抗体理化性质的稳定。在含有 20mM 组氨酸缓冲液（组氨酸与组氨酸盐酸盐的摩尔比为 1:1，pH 为 6.0）和 20mg/ml 的抗体 hu18 的制剂中分别加入不同浓度的聚山梨酯 20 或聚山梨酯 80，40℃放置 4 周后分析检测。结果如表 6 所示。

综合分析显示，表面活性剂筛选试验（F17、F24、F25 和 F26）结果显示添加不同浓度的聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20 对 SEC-HPLC 的单体含量和 CEX-HPLC 的主峰含量影响不明显。

表 6：表面活性剂筛选结果

处方编号	辅料	表面活性剂含量	SEC-HPLC(%) 单体(%)	CEX-HPLC(%) 主电荷(%)
17	220mM 海藻糖	0.02%聚山梨酯 80	0.13	5.27
24		0.04%聚山梨酯 80	0.13	4.95
25		0.02%聚山梨酯 20	0.12	4.98
26		0.04%聚山梨酯 20	0.13	4.99

综上所述，我们通过对不同缓冲体系，不同 pH 条件、不同抗体浓度以及不同辅料和表面活性剂组成进行考察，探索研究重组人源化抗 BTLA 单克隆抗体抗体 hu18 的稳定性，并确定最佳液体制剂配方。抗体 hu18 选择组氨酸缓冲液来调节 pH，

海藻糖和氯化钠来调节制剂渗透压，添加聚山梨酯 80 来增加制剂溶解性。

实施例 4：制剂长期稳定性研究

含有治疗性抗体的液体药物制品通常需要储存在 2-8°C 条件下，所以制剂能在长期储存中保持高稳定性非常重要。根据上述的筛选结果，我们在前期 26 个处方基础上设计了 27 号处方进行制剂的长期稳定性研究。

选用 4 批次原液，配制如表 7 所示的 27 号处方制剂分别储存于透明小瓶中，放置 2~8°C 条件下 6 个月后，对各样品进行分析测试。通过以下参数评估稳定性：(a) 目视外观；(b) 光阻法检测不溶性微粒 (OD405nm)；(c) pH；(d) CE-SDS (十二烷基硫酸钠毛细管电泳) 法检测抗体的分子量；(e) SEC-HPLC 测量抗体单体 (质量标准：≥97.0%)、聚体 (质量标准：≤3.0%) 或片段的含量 (质量标准：≤1.0%)；(f) CEX-HPLC 测量抗体主要电荷 (质量标准：≥70.0%)、酸性电荷 (质量标准：≤30.0%) 或碱性电荷含量 (质量标准：≤15.0%)；(g) ELISA 法检测抗体结合活性 (质量标准：参比品的 70%-130%)；(h) 蛋白质含量 (质量标准：18-22mg/ml)。

结果显示，4 批次原液在 27 号制剂处方的外观、pH 值、不溶性微粒、蛋白质含量、纯度 (SEC-HPLC (分子排阻高效液相色谱法)、CEX-HPLC (弱阳离子交换高效液相色谱法)、R-CE-SDS (还原电泳法)、NR-CE-SDS (非还原电泳法) 和生物学活性均无显著变化，具体见表 8。结果表明，上述 4 批次原液在 27 号制剂处方保存在 2-8°C 条件下，0-24 月储存过程具有非常好的稳定性。

表 7：制剂长期稳定性研究的制剂处方

处方编号	pH	处方组成
27	5.5	20mM 组氨酸缓冲液，50mM 氯化钠，140mM 海藻糖，0.02% 聚山梨酯 80；20mg/ml 抗体 hu18

注：组氨酸缓冲液由组氨酸与组氨酸盐酸盐的摩尔比为 1:3 配置。

表 8：制剂处方的长期稳定性数据

检测项目	时间 (月)	检测结果			
		批次 1	批次 2	批次 3	批次 4

外观	0	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光
	1	无色澄明液体, 带 轻微乳光	NA	NA	无色澄明液体, 带 轻微乳光
	2	无色澄明液体, 带 轻微乳光	NA	NA	NA
	3	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光
	6	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光
	9	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色, 澄清液体
	12	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色, 几乎澄清液 体
	18	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	NR
	24	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	NR
pH	0	5.6	5.6	5.6	5.7
	1	5.7	NA	NA	5.6
	2	5.6	NA	NA	NA
	3	5.6	5.4	5.4	5.6
	6	5.6	5.6	5.6	5.7
	9	5.6	5.6	5.6	5.9
	12	5.6	5.7	5.6	5.6
	18	5.6	5.6	5.6	NR
	24	5.6	5.6	5.6	NR
SEC-HPLC 单体含 量(%)	0	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%
	1	99.7%	NA	NA	99.7%
	2	99.7%	NA	NA	NA
	3	99.5%	99.6%	99.6%	99.7%
	6	99.7%	99.6%	99.6%	99.6%
	9	99.7%	99.6%	99.6%	99.6%
	12	99.7%	99.5%	99.5%	99.6%
	18	99.7%	99.6%	99.5%	NR
	24	99.6%	99.5%	99.5%	NR
SEC-HPLC 聚体含 量(%)	0	0.3%	0.3%	0.0%	0.3%
	1	0.3%	NA	NA	0.3%
	2	0.3%	NA	NA	NA
	3	0.5%	0.4%	0.0%	0.3%
	6	0.3%	0.4%	0.0%	0.4%
	9	0.3%	0.4%	0.4%	0.4%

	12	0.3%	0.4%	0.5%	0.4%
	18	0.3%	0.4%	0.5%	NR
	24	0.3%	0.4%	0.5%	NR
SEC-HPLC 片段含量(%)	0	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%
	1	0.0%	NA	NA	0.0%
	2	0.0%	NA	NA	NA
	3	0.0%	0.4%	0.0%	0%
	6	0.0%	0.4%	0.0%	0%
	9	0.0%	<0.1%	<0.1%	<0.1%
	12	0.0%	<0.1%	<0.1%	<0.1%
	18	0.0%	<0.1%	<0.1%	NR
	24	<0.1%	<0.1%	<0.1%	NR
CEX-HPLC 主峰含量(%)	0	63.7%	62.6%	61.7%	63.1%
	1	61.5%	NA	NA	62.6%
	2	61.7%	NA	NA	NA
	3	61.1%	65.4%	64.6%	64.3%
	6	65.8%	67.5%	66.8%	66.7%
	9	65.5%	68.8%	68.2%	68.5%
	12	68.1%	71.2%	70.7%	69.3%
	18	70.4%	70.8%	70.1%	NR
	24	69.9%	71.5%	71.1%	NR
CEX-HPLC 酸性峰含量(%)	0	10.0%	13.1%	12.6%	12.0%
	1	11.0%	NA	NA	13.0%
	2	10.9%	NA	NA	NA
	3	11.8%	13.9%	13.6%	13.3%
	6	12.4%	14.2%	13.7%	15.2%
	9	15.3%	14.5%	14.0%	15.7%
	12	13.1%	14.5%	14.1%	16.0%
	18	13.6%	17.3%	16.9%	NR
	24	15.3%	17.8%	17.6%	NR
CEX-HPLC 碱性峰含量(%)	0	26.3%	24.3%	25.7%	24.9%
	1	27.5%	NA	NA	24.4%
	2	27.4%	NA	NA	NA
	3	27.1%	20.6%	21.8%	22.3%
	6	21.8%	18.3%	20.0%	18.1%

	9	19.2%	16.7%	17.8%	15.9%
	12	18.7%	14.2%	15.2%	14.8%
	18	16.0%	11.8%	13.0%	NR
	24	14.8%	10.7%	11.3%	NR
R-CE-SDS 含量(%)	0	99.9%	99.8%	99.7%	99.6%
	1	99.8%	NA	NA	99.5%
	2	99.8%	NA	NA	NR
	3	99.9%	99.5%	99.5%	99.4%
	6	99.9%	99.4%	99.4%	99.6%
	9	99.7%	99.2%	99.3%	99.5%
	12	99.6%	99.2%	99.2%	NR
	18	99.6%	99.3%	99.2%	NR
	24	99.2%	99.4%	99.3%	NR
NR-CE-SDS 含量 (%)	0	99.1%	98.4%	99.3%	96.4%
	1	99.0%	NA	NA	97.5%
	2	99.1%	NA	NA	NR
	3	98.7%	98.7%	98.4%	97.4%
	6	98.0%	97.8%	97.8%	93.8%
	9	98.6%	97.5%	97.6%	97.2%
	12	98.2%	97.5%	97.2%	NR
	18	98.2%	98.2%	98.1%	NR
	24	98.4%	96.9%	96.8%	NR
生物学活性 (结合 ELISA 法), %	0	107.4%	101%	100%	98%
	1	NA	NA	NA	99%
	2	NA	NA	NA	NR
	3	NA	95%	100%	101%
	6	106.1%	100%	102%	105%
	9	NA	96%	99%	103%
	12	109.7%	95%	100%	NR
	18	NA	100%	98%	NR
	24	113%	103%	105%	NR
蛋白质含量 (紫外分光光度法)	0	21.3 mg/mL	20.9 mg/mL	20.9 mg/mL	20.3mg/mL
	1	21.8 mg/mL	NA	NA	20.5mg/mL
	2	21.6 mg/mL	NA	NA	NA
	3	21.3 mg/mL	21.0 mg/mL	21.0 mg/mL	20.7mg/mL

	6	21.1 mg/mL	20.7 mg/mL	20.8 mg/mL	20.6mg/mL
	9	21.7mg/mL	21.0 mg/mL	21.1 mg/mL	20.5mg/mL
	12	21.6mg/mL	20.9 mg/mL	21.1 mg/mL	20.1mg/mL
	18	21.9mg/mL	21.6 mg/mL	21.7 mg/mL	NR
	24	21.3mg/mL	20.0 mg/mL	19.9 mg/mL	NR
不溶性微粒	0	≥10 μm 微粒： 32 个/瓶 ≥25 μm 微粒： 2 个/瓶	≥10 μm 微粒：17 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：6 粒/瓶	≥10 μm 微粒：10 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：0 粒/瓶	≥10 μm 微粒：69 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：7 粒/瓶
	1	≥10 μm 微粒： 67 个/瓶 ≥25 μm 微粒： 1 个/瓶	NA	NA	≥10 μm 微粒：12 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：0 粒/瓶
	2	≥10 μm 微粒：3 个/瓶 ≥25 μm 微粒： 0 个/瓶	NA	NA	≥10 μm 微粒：71 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：3 粒/瓶
	3	≥10 μm 微粒： 14 个/瓶 ≥25 μm 微粒： 1 个/瓶	≥10 μm 微粒：3 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：2 粒/瓶	≥10 μm 微粒：4 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：1 粒/瓶	≥10 μm 微粒：55 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：3 粒/瓶
	6	≥10 μm 微粒： 27 个/瓶 ≥25 μm 微粒： 2 个/瓶	≥10 μm 微粒：2 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：0 粒/瓶	≥10 μm 微粒：11 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：2 粒/瓶	≥10 μm 微粒：27 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：4 粒/瓶
	9	≥10 μm 微粒： 39 个/瓶 ≥25 μm 微粒： 12 个/瓶	≥10 μm 微粒：7 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：2 粒/瓶	≥10 μm 微粒：4 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：1 粒/瓶	≥10 μm 微粒：38 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：1 粒/瓶
	12	≥10 μm 微粒： 408 个/瓶 ≥25 μm 微粒： 28 个/瓶	≥10 μm 微粒：13 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：5 粒/瓶	≥10 μm 微粒：8 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：2 粒/瓶	≥10 μm 微粒：69 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：7 粒/瓶
	18	≥10 μm 微粒： 71 个/瓶 ≥25 μm 微粒： 48 个/瓶	≥10 μm 微粒：41 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：34 粒/瓶	≥10 μm 微粒：12 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：5 粒/瓶	NR
	24	≥10 μm 微粒： 31 个/瓶 ≥25 μm 微粒： 20 个/瓶	≥10 μm 微粒：15 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：6 粒/瓶	≥10 μm 微粒：16 粒/瓶 ≥25 μm 微粒：2 粒/瓶	NR

注：表格中 NA 表示在此时间点为非重点检项，在该取样点不做检测，NR 表示未到该时间点，下同。

实施例 5：制剂的加速稳定性研究

选用 4 批次原液，配制如表 7 所示的 27 号处方制剂分别储存于透明小瓶中，放置 25±2℃，60±5%相对湿度（RH）条件下，0-12 个月后，对各样品进行分析测试。

如表 9 所示, 27 号处方制剂对抗蛋白质降解具有更高稳定性, 在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下测量的所得降解动力学参数满足室温环境储存长达 12 个月的要求。

表 9: 制剂处方的加速稳定性数据

检测项目	时间 (月)	检测结果			
		批次 1	批次 2	批次 3	批次 4
外观	0	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光
	1	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光
	2	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光
	3	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光
	6	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光
	9	无色澄明液体, 带 轻微乳光	NA	NA	无色澄明液体, 带 轻微乳光
	12	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光	无色澄明液体, 带 轻微乳光
pH	0	5.6	5.6	5.6	5.7
	1	5.6	5.6	5.6	5.7
	2	5.6	5.6	5.6	5.7
	3	5.6	5.4	5.4	5.6
	6	5.6	5.6	5.5	5.6
	9	5.6	NA	NA	NR
	12	5.7	5.7	5.6	NR
SEC-HPLC 单体含量(%)	0	99.7%	99.7%	99.7%	99.7%
	1	99.7%	99.6%	99.7%	99.6%
	2	99.7%	99.7%	99.7%	99.6%
	3	99.7%	99.6%	99.6%	99.5%
	6	99.6%	99.6%	99.5%	99.4%
	12	99.6%	99.4%	99.3%	NR
SEC-HPLC 聚体含量(%)	0	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
	1	0.3%	0.4%	0.3%	0.3%
	2	0.3%	0.3%	0.3%	0.4%
	3	0.3%	0.3%	0.3%	0.4%
	6	0.3%	0.4%	0.4%	0.5%
	12	0.3%	0.5%	0.6%	NR
SEC-HPLC 片段含	0	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

量(%)	1	0.0%	0.0%	0.0%	<0.1%
	2	0.0%	0.0%	0.0%	<0.1%
	3	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
	6	0.1%	0.0%	0.0%	<0.1%
	12	0.1%	0.1%	0.1%	NR
CEX-HPLC 主峰含量(%)	0	63.7%	62.6%	61.7%	63.1%
	1	68.2%	73.5%	72.9%	69.2%
	2	70.8%	71.6%	71.4%	69.6%
	3	69.2%	69.0%	69.1%	67.3%
	6	62.9%	63.8%	63.4%	58.4%
	12	50.4%	50.7%	50.2%	NR
CEX-HPLC 酸性峰含量(%)	0	10.0%	13.1%	12.6%	12.0%
	1	15.2%	15.6%	15.2%	16.0%
	2	16.9%	19.1%	18.6%	18.7%
	3	19.8%	21.7%	21.4%	21.4%
	6	26.9%	28.4%	28.2%	30.5%
	12	38.8%	40.0%	39.8%	NR
CEX-HPLC 碱性峰含量(%)	0	26.3%	24.3%	25.7%	24.9%
	1	16.6%	10.9%	11.8%	14.8%
	2	12.4%	9.3%	10.0%	11.6%
	3	11.0%	9.3%	9.5%	11.3%
	6	10.2%	7.8%	8.4%	11.1%
	12	10.8%	9.4%	10.0%	NR
R-CE-SDS 含量(%)	0	99.9%	99.8%	99.7%	99.6%
	1	99.8%	99.8%	99.8%	99.4%
	2	99.9%	99.6%	99.7%	99.3%
	3	99.6%	99.7%	99.6%	99.4%
	6	99.4%	99.1%	99.1%	99.0%
	12	98.1%	98.0%	97.8%	NR
NR-CE-SDS 含量(%)	0	99.1%	98.6%	99.4%	96.4%
	1	98.6%	97.7%	98.2%	97.4%
	2	98.5%	97.4%	98.3%	97.3%
	3	98.7%	98.3%	98.7%	96.6%
	6	98.0%	97.7%	97.8%	92.4%
	12	97.0%	96.2%	96.5%	NR

生物学活性（结合 ELISA 法），%	0	107.4%	101%	100%	98%
	1	NA	92%	92%	100%
	2	NA	98%	97%	100%
	3	NA	97%	98%	100%
	6	104.0%	94%	95%	92%
	12	97.4%	98%	94%	NR
蛋白质含量（紫外分光光度法）	0	21.3 mg/mL	20.9 mg/mL	20.9 mg/mL	20.3mg/mL
	1	21.5 mg/mL	20.8 mg/mL	20.6 mg/mL	20.5mg/mL
	2	21.9 mg/mL	20.8 mg/mL	20.7 mg/mL	20.5mg/mL
	3	21.7 mg/mL	20.9 mg/mL	20.8 mg/mL	20.6mg/mL
	6	21.9 mg/mL	20.8 mg/mL	20.6 mg/mL	20.7mg/mL
	12	21.2 mg/mL	20.3 mg/mL	21.0 mg/mL	NR
不溶性微粒	0	≥10 μm 微粒：32 个/瓶 ≥25 μm 微粒：2 个/瓶	≥10μm 微粒：17 粒/瓶 ≥25μm 微粒：6 粒/瓶	≥10μm 微粒：10 粒/瓶 ≥25μm 微粒：0 粒/瓶	≥10μm 微粒：69 粒/瓶 ≥25μm 微粒：7 粒/瓶
	1	≥10 μm 微粒：27 个/瓶 ≥25 μm 微粒：2 个/瓶	≥10μm 微粒：11 粒/瓶 ≥25μm 微粒：8 粒/瓶	≥10μm 微粒：8 粒/瓶 ≥25μm 微粒：1 粒/瓶	≥10μm 微粒：21 粒/瓶 ≥25μm 微粒：1 粒/瓶
	2	≥10 μm 微粒：108 个/瓶 ≥25 μm 微粒：88 个/瓶	≥10μm 微粒：2 粒/瓶 ≥25μm 微粒：0 粒/瓶	≥10μm 微粒：2 粒/瓶 ≥25μm 微粒：0 粒/瓶	≥10μm 微粒：26 粒/瓶 ≥25μm 微粒：7 粒/瓶
	3	≥10 μm 微粒：14 个/瓶 ≥25 μm 微粒：0 个/瓶	≥10μm 微粒：3 粒/瓶 ≥25μm 微粒：1 粒/瓶	≥10μm 微粒：3 粒/瓶 ≥25μm 微粒：0 粒/瓶	≥10μm 微粒：20 粒/瓶 ≥25μm 微粒：0 粒/瓶
	6	≥10 μm 微粒：109 个/瓶 ≥25 μm 微粒：66 个/瓶	≥10μm 微粒：11 粒/瓶 ≥25μm 微粒：4 粒/瓶	≥10μm 微粒：12 粒/瓶 ≥25μm 微粒：5 粒/瓶	≥10μm 微粒：25 粒/瓶 ≥25μm 微粒：7 粒/瓶
	12	≥10 μm 微粒：92 个/瓶 ≥25 μm 微粒：6 个/瓶	≥10μm 微粒：12 粒/瓶 ≥25μm 微粒：5 粒/瓶	≥10μm 微粒：25 粒/瓶 ≥25μm 微粒：7 粒/瓶	NR

注：表格中 NA 表示在此时间点为非重点检项，在该取样点不做检测，NR 表示未到该时间点。

实施例 6：ELISA 检测人源化抗体与 hBTLa 的结合

利用常规 ELISA 检测方法检测人源化抗体 hu17, hu18 和 hu19 与 hBTLa 结合特异性。用 0.5μg/ml 的 hBTLa 包被 96 孔酶标板，37 摄氏度恒温孵育 60 分钟。然后弃去孔内溶液，用洗涤缓冲液洗 3 次，加入含有 2% BSA 的 PBS 溶液封闭 60 分

钟。用洗涤缓冲液洗 3 次后加入梯度稀释的抗体溶液（溶液中除抗体外的其它成分与处方编号 27 相同），37 摄氏度孵育 60 分钟后用洗涤缓冲液冲洗 3 次，然后加入 1: 10000 倍稀释的 HRP 标记的小鼠抗人 IgG4 二抗，37 摄氏度孵育 1 小时，经洗涤缓冲液冲洗三次后，加入 100 μ l TMB 底物溶液显色，室温反应 30 分钟后，以 100 μ l 2M 的盐酸溶液终止反应并在 450nm 处读出吸光度。

其 EC₅₀ 值如下表 10 所示。结果显示，人源化抗体 hu17，hu18 和 hu19 可以与 hBTLa 特异性结合。

表 10：人源化抗体组合 hu17，hu18 和 hu19 与 hBTLa 特异性结合数据

人源化抗体	hu17	hu18	hu19
EC ₅₀ (ng/mL)	6.3	5.4	6.6

实施例 7：FACS 检测人源化抗体与 293F 细胞上 hBTLa 的结合

采用基于细胞的流式细胞(FACS)测定人源化抗 BTLa 抗体 hu17，hu18 和 hu19 与细胞上表达的 hBTLa 结合能力。将表达 hBTLa 的 293F 细胞消化后离心重悬到 FACS 缓冲液中，按细胞量为 2.5×10^4 ，体积为 50 μ l 加入到 96 孔圆底板孔中，加入 50 μ l 不同浓度的抗体稀释液(起始浓度 10 μ g/ml，3 倍滴定；稀释液中除抗体外的其它成分与处方编号 27 相同)混匀，室温孵育 30min；用 FACS 缓冲液洗涤细胞两次后加入 100 μ l 山羊抗人 IgG-PE 抗体，避光孵育 30min；用 FACS buffer 洗涤两次后进行 FACS 检测。将经洗涤的细胞重悬于含有碘化丙啶（PI）以及防止受体内化的 0.02%叠氮化钠的 4℃ 缓冲剂中后，通过流式细胞术分析。根据从 FSC/SSC 门排除 PI 阳性细胞，对活细胞进行门控，并测量其几何平均荧光。使用 Prism™ 软件内的 S 形剂量-响应模型进行分析数据。

各抗体的 EC₅₀ 值如下表 11 所示。结果显示，人源化抗体 hu17、hu18、hu19 能与 293F 细胞上的 hBTLa 有效结合。

表 11

	hu17	hu18	hu19
EC ₅₀ (ng/mL)	96.74	89.34	95.06

实施例 8: FACS 检测人源化抗体对阻断 BTLA 与 HVEM 结合的阻断作用

采用基于细胞的流式细胞(FACS)测定, 检测人源化抗体 hu17, hu18 和 hu19 阻断 hBTLA 结合表达于 293F 细胞上 hHVEM 的能力。将 hHVEM-293F 稳定表达细胞消化后离心重悬到 FACS 缓冲液中, 按细胞量为 2.5×10^4 个, 体积为 50ul 加入到 96 孔圆底板孔中, 加入预先生物素标记的 hBTLA (1ug/ml) 蛋白混合, 4°C 孵育 15 分钟; 再加入 50ul 不同浓度的人源化抗体稀释液 (起始 5ug/ml, 3 倍滴定; 稀释液中除抗体外的其它成分与处方编号 27 相同)混匀, 室温孵育 30min; 用 FACS 缓冲液洗涤细胞两次后加入 100ul 山羊抗人 IgG-PE 抗体, 避光孵育 30min; 用 FACS 缓冲液洗涤两次后进行 FACS 检测。将经洗涤的细胞重悬于含有碘化丙啶 (PI) 以及防止受体内化的 0.02%叠氮化钠的 4°C 缓冲剂中后, 通过流式细胞术分析。根据从 FSC/SSC 门排除 PI 阳性细胞, 对活细胞进行门控, 并测量其几何平均荧光。使用 Prism™ 软件内的 S 形剂量-响应模型进行分析数据。

各抗体的 IC₅₀ 值如下表 12 所示。结果显示, 人源化抗体 hu17、hu18、hu19 能有效阻断 BTLA 与细胞表面的 HVEM 结合。

表 12

	hu17	hu18	hu19
IC ₅₀ (ng/mL)	142.7	172.2	161.5

实施例 9: 人源化抗 BTLA 抗体促进 T 细胞的激活

将稳定表达 hPD-L1/hHVEM 的 CHO 细胞铺到 96 孔板, 每孔细胞量为 5×10^4 , 37°C, 7%CO₂ 培养过夜, 去除细胞上清, 每孔中加入 40ul 人源化抗 BTLA 抗体稀释液 (起始浓度为 60ug/ml, 3 倍浓度梯度稀释; 稀释液中除抗体外的其它成分与处方编号 27 相同), 加入 40ul 可以持续表达 hPD-1/hBTLA/NFAT-荧光素酶的 Jurkat 报告细胞, 总细胞数为 1×10^5 细胞, 37°C, 7%CO₂ 培养 6 小时, 加入荧光素酶试剂, 酶标仪检测发光值。

各抗体的 EC₅₀ 值如下表 13 所示。结果显示, 人源化抗 BTLA 抗体 hu17、hu18 和 hu19 能有效促进 T 细胞活化。

表 13

	hu17	hu18	hu19
EC ₅₀ (ng/mL)	256.7	277.3	290.4

实施例 10：人源化抗 BTLA 抗体与 hBTLA 的亲和力

使用 GE 医疗生命科学公司的 Biacore T200 仪器进行检测实验, 将 Series S CM5 芯片装载到仪器上, 使用的系统缓冲液为 HBS-EP+(10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05%表面活性剂 P20)。进行 BTLA-Fc 抗原在芯片检测通道的偶联, 用 400 mM EDC 与 100 mM NHS 的混合液以 10 μ L/min 注入 420 s 活化芯片表面, 将 BTLA-Fc 抗原稀释在 10 mM 醋酸钠/醋酸(pH 5.5)缓冲液中至终浓度 20 μ g/mL, 并以 10 μ L/min 注入进行偶联, 将 1 M 乙醇胺-盐酸溶液 (pH 8.5)以 10 μ L/min 注入 420s 进行封闭。

用 Biacore 系统缓冲液将抗体进行 2 倍梯度稀释 (稀释液中除抗体外的其它成分与处方编号 27 相同), 共 6 个浓度点。浓度梯度为 24 nM、12 nM、6 nM、3 nM、1.5 nM 和 0.75 nM, 其中 24 nM 为重复测试。数据分析使用 GE 医疗生命科学公司的数据分析软件 Biacore T200 Evaluation Software 版本号 3.0。数据拟合使用模型为 1:1 Binding。拟合得到抗体与抗原间结合的动力学常数结合速率 k_a (1/Ms), 解离速率 k_d (1/s), 亲和力常数 K_D (M), 结果如表 14 所示。

表 14：人源化抗体的亲和力数据

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
hu17	6.24E+05	1.16E-04	1.86E-10
hu18	6.39E+05	8.67E-05	1.36E-10

实施例 11：人源化抗体与不同种属 BTLA 结合动力学的表征

为了检测嵌合抗体与食蟹猴源和鼠源 BTLA 之间的交叉反应, 使用 Fortebio 检定。简而言之, 将人 BTLA、食蟹猴 BTLA 或鼠 BTLA 偶联至已活化的 CM5 生物传感器芯片以实现大约 100-200 个响应单位(RU), 然后用 IM 乙醇胺封闭未反应

基团。以 30 次/分钟在 SPR 运行缓冲液中注射自 0.12nM 至 90nM 递增浓度的人源化抗体样品（样品中抗体为 hu17，其它成分与处方编号 27 相同），且藉由减去来自空白流动室的 RU 来计算在不同种源 BTLA 的结合响应。

结果如图 1 所示。hu17 与不同种属 BTLA 结合对比结果显示：其不仅与人 BTLA 具有高亲和力，并且与食蟹猴源 BTLA 有相近的亲和力，但其与鼠 BTLA 基本不发生结合。

实施例 12：人源化抗体（处方编号：27）对小鼠肿瘤生长的抑制作用

在小鼠结肠癌（MC38）细胞（ATCC）上通过电转 Hxp-hHVEM 质粒，构建 MC38-hHVME 细胞库，然后通过有限稀释法进行细胞亚克隆，通过流式筛选出单克隆，得到 MC38-HVEM 细胞；接着将 MC38-hHVEM 细胞以 1×10^6 个/0.1 mL 浓度接种于 B-hBTLA 人源化雌性小鼠的右侧皮下，待肿瘤生长到约 118 mm^3 时按肿瘤体积随机分组，每组 8 只，共 5 组，分别为：G1 0.9%氯化钠注射液溶剂对照组、G2KLH（抗钥孔血蓝蛋白抗体）（10 mg/kg）阴性对照组、G3 hu18（1 mg/kg）组、G4 hu18（3 mg/kg）组和 G5 hu18（10 mg/kg）组。所有组给药途径均为腹腔注射，每周给药 2 次，连续给药 7 次，末次给药 4 天后结束实验。每周测量肿瘤体积及体重 2 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，动物安乐死，剥取肿瘤称重、拍照，计算相对肿瘤抑制率（TGI%， $\text{TGI}\% = (1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)) \times 100\%$ ， T_i 治疗组给药结束时肿瘤体积， T_0 治疗组开始给药时肿瘤体积， V_i 空白组给药结束时肿瘤体积， V_0 空白组开始给药时肿瘤体积）。

各组受试品对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLA 小鼠肿瘤体积的影响结果如表 15 和图 2 所示。首次给药后 21 天，KLH（10mg/kg）阴性对照组平均肿瘤体积为 $1560 \pm 256 \text{ mm}^3$ ，其他给药组平均肿瘤体积分别为 $1073 \pm 224 \text{ mm}^3$ 、 $747 \pm 268 \text{ mm}^3$ 和 $868 \pm 211 \text{ mm}^3$ 。各给药组与 KLH 阴性对照组相比，TGI%分别为 33.7%、56.4%和 48.0%，P 值分别为 0.175、0.046 和 0.056，表明受试药物 hu18 对肿瘤生长有一定抑制作用。

表 15：hu18 对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLA 小鼠肿瘤体积的影响

组别	受试药物	肿瘤体积 (mm^3) ^a	P ^b
----	------	-------------------------------------	----------------

		给药前	首次给药 21 后	TGI (%)	
G1	0.9%氯化钠注射液	118±2	1029±155	-	-
G2	KLH (10 mg/kg)	118±2	1560±256	-	-
G3	抗体 hu18 (1 mg/kg)	118±3	1073±224	33.7	0.175
G4	抗体 hu18 (3 mg/kg)	118±2	747±268	56.4	0.046
G5	抗体 hu18 (10 mg/kg)	118±3	868±211	48.0	0.056

注：a：平均数±标准误；b：给药组肿瘤体积与 KLH 阴性对照组肿瘤体积在给药 21 天后统计学比较，t-test。

各组受试品对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLa 小鼠体重的影响结果如表 16 和图 3 所示。所有实验动物在给药期间活动和进食状态良好，各给药组动物体重均有一定程度的上升。实验期间未出现实验动物死亡情况。给药后 21 天，与 KLH 阴性对照组小鼠体重相比，各给药组小鼠体重无显著变化($P>0.05$)，表明实验动物对受试品耐受性良好。

表 16：受试品对 MC38-hHVEM 细胞移植 B-hBTLa 小鼠体重的影响

组别	受试药物	体重 (g) ^a			给药 21 天后 体重变化 (g)
		给药前	首次给药 21 天后	P^b	
G1	0.9%氯化钠注射液	18.4±0.4	20.7±0.4	-	+2.3
G2	KLH (10 mg/kg)	18.3±0.5	20.8±0.6	-	+2.5
G3	hu18 (1 mg/kg)	18.5±0.4	20.8±0.4	0.943	+2.3
G4	hu18 (3 mg/kg)	18.5±0.4	20.0±0.6	0.341	+1.5
G5	hu18 (10 mg/kg)	18.6±0.3	20.5±0.2	0.623	+1.9

注：a：平均数±标准误；b：给药组体重与 KLH 阴性对照组体重在给药 21 天后统计学比较，t-test。

实施例 13：人源化抗体 hu18（处方编号：27）没有 ADCC 效应功能

当抗体结合至细胞表面靶蛋白质，然后连接至效应细胞上所表达的 Fc γ 受体 (Fc γ R) 时，启动 ADCC。很清楚地记载了人类 IgG1 对 Fc γ R 具有比 IgG4 明显更高的结合亲和力，尤其是结合 Fc γ R-I 及 Fc γ R-IIIA，该亲和力与 IgG1 激活 ADCC 的强度相关联。联想到 ADCC，当抗体交联细胞表面靶点及 C1q 蛋白质，继之以补体复合物形成及靶细胞裂解的级联反应时，激活 CDC。作为 ADCC 和 CDC 的代理，抗体结合至 Fc γ R 及 C1q 的检测就可充当 ADCC 及 CDC 的基本指标。因此，本发明利用 biacore T200 (GE) 评估了单抗对主要 Fc γ R 结合的动力学亲和力。

GE 的抗-His 抗体固定在传感器晶片上。各种 Fc 受体，包括重组人 Fc γ RIIIA (CD16a) V176，重组人 Fc γ RIIA (CD32a) R167，重组人 Fc γ RI (CD64) 和重组人 FcRn 被捕获，然后注射一系列稀释的重组人抗-BTLA 抗体 (即 hu18)，检测并分析相互作用的结合性质。hu18 是 IgG4 亚型抗体，hu18-IgG1 是 IgG1 亚型，其与 hu18 共享相同的 Fab，并作为阳性对照。

结果如表 17 所示，相比于 IgG1 亚型的对照抗体，IgG4 亚型的重组人抗-BTLA 抗体与 Fc 受体的结合相对较弱，hu18 抗体与 IgG1 亚型对照抗体相比，其与 Fc γ RIIIA (CD16a) V176 的相互作用弱 400 倍。这显示 hu18 具有较弱或无 ADCC 效应。如表 17 所示，hu18 抗体不结合 C1q，而 hu18-IgG1 抗体能够结合 C1q。

表 17: 抗-BTLA 抗体与 Fc 受体之间相互作用的结合亲和性

Fc 受体名称	抗体名称	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
Fc γ RIIIA (CD16a) V176	hu18-IgG1	6.15E+04	8.85E-03	1.44E-07
	hu18	N/A	N/A	6.02E-05
Fc γ RIIA (CD32a) R167	hu18-IgG1	N/A	N/A	5.90E-06
	hu18	N/A	N/A	4.06E-05
Fc γ RI (CD64)	hu18-IgG1	2.99E+05	1.20E-03	4.00E-09
	hu18	2.10E+05	3.87E-03	1.84E-08
FcRn	hu18-IgG1	1.69E+06	3.88E-02	2.29E-08
	hu18	5.12E+05	7.08E-02	1.38E-07

表 18: 抗-BTLA 抗体与人 C1q 之间相互作用的结合亲和力

蛋白名称	抗体名称	结论
C1q	hu18-IgG1	特异性结合
	hu18	非特异性结合