



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107973854 B

(45) 授权公告日 2021.05.04

(21) 申请号 201711303454.6

C12N 15/13 (2006.01)

(22) 申请日 2017.12.11

A61K 39/395 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00 (2006.01)

申请公布号 CN 107973854 A

A61P 31/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.05.01

(56) 对比文件

(73) 专利权人 苏州银河生物医药有限公司

CN 107151269A ,2017.09.12

地址 215024 江苏省苏州市吴中区苏州工

WO 2013/173223A1 ,2013.11.21

业园区星湖街218号生物纳米园C19幢
4楼

Suzanne L Topalian等.Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity.《Current Opinion in Immunology》.2012,第207-212页.

(72) 发明人 周宏林 蔡斌 刘杰 陈罡 董欣

陈娇等.鼠抗人PD-L1单克隆抗体的制备及鉴定.《四川大学学报(医学版)》.2011,第42卷(第1期),第5-9页.

(74) 专利代理机构 北京观韬中茂律师事务所

11553

代理人 吴华

审查员 谭小飞

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

序列表32页 附图11页

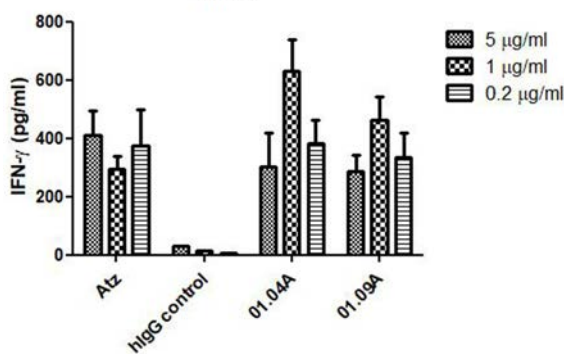
(54) 发明名称

PDL1单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及PDL1单抗及其应用,属于免疫学技术领域。本发明提供一种分离的人特异性结合分子,包含a)和b);a)三个轻链CDR:轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;b)三个重链CDR:重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;所述分离的人PDL1特异性结合分子为分离的抗体或抗原结合片段。本发明提供的PDL1单克隆抗体能有效抑制局部肿瘤生长;阻断PD1/PDL1信号可以促进肿瘤抗原特异性T细胞的增殖,发挥杀伤肿瘤细胞的作用;阻断肿瘤细胞上相关PDL1信号可上调浸润CD8⁺T细胞IFN- γ 的分泌。

MLR



1. 分离的人PDL1特异性结合分子,其特征在于:所述的特异性结合分子包含轻链可变区和重链可变区,其中:

- (i) 所述重链可变区为SEQ ID NO:19且所述轻链可变区为SEQ ID NO:20;或
- (ii) 所述重链可变区为SEQ ID NO:21且所述轻链可变区为SEQ ID NO:22;或
- (iii) 所述重链可变区为SEQ ID NO:23且所述轻链可变区为SEQ ID NO:24;或
- (iv) 所述重链可变区为SEQ ID NO:25且所述轻链可变区为SEQ ID NO:26;或
- (v) 所述重链可变区为SEQ ID NO:27且所述轻链可变区为SEQ ID NO:28;或
- (vi) 所述重链可变区为SEQ ID NO:29且所述轻链可变区为SEQ ID NO:30;或
- (vii) 所述重链可变区为SEQ ID NO:31且所述轻链可变区为SEQ ID NO:32;或
- (viii) 所述重链可变区为SEQ ID NO:33且所述轻链可变区为SEQ ID NO:34;或
- (ix) 所述重链可变区为SEQ ID NO:35且所述轻链可变区为SEQ ID NO:36。

2. 根据权利要求1所述的分离的人PDL1特异性结合分子,其特征在于:所述特异性结合分子至少表现出如下一种性质:

- (i) 阻断PDL1与PD1或CD80的结合;
- (ii) 结合人T细胞表面的PDL1;
- (iii) 以 3.89×10^{-10} M或更低的 K_D 与人PDL1结合;
- (iv) 在混合淋巴细胞反应 (MLR) 试验中提高IFN- γ 产生。

3. 分离的核酸,编码抗体轻链可变区和抗体重链可变区,其特征在于:

(i) 编码所述抗体重链可变区的片段为SEQ ID NO:1,且编码所述抗体轻链可变区的片段为SEQ ID NO:2;或

(ii) 编码所述抗体重链可变区的片段为SEQ ID NO:3,且编码所述抗体轻链可变区的片段为SEQ ID NO:4;或

(iii) 编码所述抗体重链可变区的片段为SEQ ID NO:5,且编码所述抗体轻链可变区的片段为SEQ ID NO:6;或

(iv) 编码所述抗体重链可变区的片段为SEQ ID NO:7,且编码所述抗体轻链可变区的片段为SEQ ID NO:8;或

(v) 编码所述抗体重链可变区的片段为SEQ ID NO:9,且编码所述抗体轻链可变区的片段为SEQ ID NO:10;或

(vi) 编码所述抗体重链可变区的片段为SEQ ID NO:11,且编码所述抗体轻链可变区的片段为SEQ ID NO:12;或

(vii) 编码所述抗体重链可变区的片段为SEQ ID NO:13,且编码所述抗体轻链可变区的片段为SEQ ID NO:14;或

(viii) 编码所述抗体重链可变区的片段为SEQ ID NO:15,且编码所述抗体轻链可变区的片段为SEQ ID NO:16;或

(ix) 编码所述抗体重链可变区的片段为SEQ ID NO:17,且编码所述抗体轻链可变区的片段为SEQ ID NO:18。

4. 一种载体,其特征在于:所述载体含有如权利要求3所述的核酸分子。

5. 一种宿主细胞,其特征在于:所述宿主细胞含有如权利要求3所述的核酸分子,或含有如权利要求4所述的载体。

6. 一种结合物,其特征在于:所述结合物包含与同位素、免疫毒素和/或化学药物共价连接的抗人PDL1单克隆抗体;所述抗人PDL1单克隆抗体为如权利要求1-2任一项所述的分离的人PDL1特异性结合分子。

7. 根据权利要求1-2任一项所述的分离的人PDL1特异性结合分子在制备治疗疾病的药物中的应用;所述的分离的人PDL1特异性结合分子为抗PDL1单克隆抗体;所述疾病为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、食管癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、神经胶质瘤或黑素瘤。

8. 根据权利要求6所述的结合物在制备治疗疾病的药物中的应用;所述疾病为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、食管癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、神经胶质瘤或黑素瘤。

9. 一种组合物,其特征在于:所述组合物含有主要物质(M)和辅助物质(N);所述主要物质(M)选自权利要求1-2任一项所述的分离的人PDL1特异性结合分子、权利要求3所述的分离的核酸、权利要求4所述的载体、权利要求5所述的宿主细胞、权利要求6所述的结合物中的一种或多种;所述辅助物质(N)选自药学上可接受的载体或赋形剂,以及任选的其它生物活性物质。

10. 一种试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包含如权利要求1-2任一项所述的分离的人PDL1特异性结合分子和用于检测与该分子特异性结合后形成的免疫复合物的试剂。

PDL1单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤治疗和分子免疫学领域,涉及多种抗PDL1抗体、其药物组合物及用途。具体的,本发明涉及多种抗PDL1的单克隆抗体。

背景技术

[0002] T细胞介导的细胞免疫在识别和杀伤肿瘤细胞中起着重要的作用,T细胞通过T细胞受体(T cell receptor,TCR)与肿瘤细胞表面的带有特异性抗原的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)结合,从而识别肿瘤细胞。TCR和MHC分子的相互作用受到一系列免疫检查点的控制,其中有共刺激信号和共抑制信号,可以使T细胞激活或抑制。其中PD1和其配体PDL1通路是抑制性免疫检查点,它们结合传达共抑制性信号,可以使T细胞的免疫活性受到抑制,在免疫耐受中发挥重要作用,同时也是肿瘤细胞免疫逃逸的重要原因。

[0003] 程序性死亡受体1(programmed death 1,PD1),是一种重要的免疫抑制分子。为CD28超家族成员的I型跨膜蛋白,其最初是从凋亡的小鼠T细胞杂交瘤2B4.11克隆出来。以PD1为靶点的免疫调节对抗肿瘤、抗感染、抗自身免疫性疾病及器官移植存活等均有重要的意义。PD1有两种结合配体,PDL1(B7-H1)和PDL2(B7-DC),两者的表达有所不同,PDL2表达比较局限,主要表达在活化的巨噬细胞、树突细胞和少数肿瘤上;PDL1则在活化的T细胞、B细胞、巨噬细胞、树突细胞和肿瘤细胞广泛表达,同时在机体一些免疫屏蔽部分如胎盘、眼及其上皮、肌肉、肝和血管内皮等组织表达,因此PDL1在体内的作用要远远超过PDL2。

[0004] 细胞程式死亡配体1(Programmed cell death 1 ligand 1,PDL1)也称为表面抗原分化簇274(cluster of differentiation 274,CD274)或B7同源体(B7 homolog 1,B7-H1),是人类体内的一种蛋白质,由CD274基因编码。

[0005] PDL1具有IgV和IgC样区、跨膜区及细胞质尾部,其中细胞质尾区与细胞内的信号转导相关,IgV和IgC则参与细胞间的信号转导。研究发现,TNF、IFN- γ 、IL-4、粒细胞刺激因子和IL-10等多种细胞因子可以上调PDL1在不同细胞中的表达。

[0006] PDL1与其T细胞上的受体PD1相互作用,在免疫应答的负性调控方面发挥着重要作用;该分子具有广泛的组织表达谱,在一些肿瘤细胞系上有较高的表达,许多研究均表明其与肿瘤的免疫逃逸机制相关。肿瘤部分的微环境可诱导肿瘤细胞上的PDL1的表达,且表达广泛,表达的PDL1有利于肿瘤的发生和生长,诱导抗肿瘤T细胞的凋亡。

[0007] PD1与PDL1结合后,传递抑制性信号,能够抑制淋巴细胞的增殖和活性、抑制CD4⁺T细胞向Th1和Th17细胞分化、抑制炎性细胞因子的释放,这些都起到了免疫负调控的作用。在正常情况下,PDL1和PD1的结合能够通过上述的作用,维持外周淋巴细胞对自身抗原的免疫耐受,从而防止自身免疫性疾病的发生。但在肿瘤的发生发展中,肿瘤细胞表达的PDL1与PD1结合后却能通过对淋巴细胞的抑制性作用,从而促进肿瘤的免疫逃逸。

[0008] 肿瘤免疫逃逸的机制包括:肿瘤细胞膜表面相容性复合物(MHC)类分子的表达下调,缺少免疫共刺激分子,分泌免疫抑制性细胞因子,表达死亡配体或表达抑制性配体等。

许多肿瘤细胞系及肿瘤细胞高表达PDL1分子,其与淋巴细胞表面的PD1分子结合后,削弱了机体的抗肿瘤免疫应答,从而导致肿瘤免疫逃逸的发生。另外,肿瘤微环境由肿瘤细胞、血管、组织液、间质细胞和少量浸润的淋巴细胞构成。肿瘤微环境还存在一些炎性细胞因子,如IFN- α 和IFN- γ 等,这些细胞因子可促进肿瘤细胞表面PDL1的表达,在肿瘤的免疫逃逸过程中发挥了重要作用。

[0009] 目前虽然PDL1与PD1在肿瘤免疫逃逸中的调控机制尚未完全阐明,但针对PDL1和PD1的阻断抗体已在临床试验中取得了较好的治疗效果。随着研究的不断深入,PDL1和PD1在肿瘤免疫逃逸中的作用以及调控机制会更加明确,PDL1和PD1也将成为有效的抗肿瘤治疗靶点。

发明内容

[0010] 本发明利用哺乳动物细胞表达系统表达出重组的PDL1作为抗原免疫小鼠,经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。本发明通过对大量的样本进行筛选,得到了数个杂交瘤细胞株,能够分泌产生与PDL1特异性结合的特异性单克隆抗体,并且该单克隆抗体通过分子克隆等手段进一步得到了嵌合抗体,制备得到的嵌合抗体能够结合人T细胞表面的PDL1(图1,表III),具有高亲和力(表II)。并进行了一系列表征和功能实验研究,表明这些嵌合抗体能与激活的T细胞和DC细胞结合(图2、3),并且能够十分有效地阻断PDL1与PD1或CD80之间的结合(图4、表IV)。物种交叉反应实验表明,嵌合抗体与食蟹猴和小鼠没有或有较小交叉反应(图5,表V)。体外功能试验结果显示,这些嵌合抗体能够促进T细胞系或原代T细胞的免疫功能(图6、7);动物实验结果表明,这些成药性抗体能够有效抑制肿瘤在人源化PDL1敲入小鼠体内的生长(图8)。最后,对这些抗体进行了人源化以降低免疫原性和获得治疗性抗体。由此提供了下述发明:

[0011] 本发明提供了特异性结合人PDL1的抗体,该抗体生产自杂交瘤细胞系。本发明提供的杂交瘤细胞系来源于小鼠免疫,细胞融合,通过筛选等一系列操作,可以生产特异性阻断PDL1和PD1/CD80的结合的单克隆抗体。(参见实施例1)

[0012] 本发明还提供了特异性结合人PDL1的嵌合抗体,其中通过将鼠源PDL1抗体的可变区连接至人的IgG1和 κ 恒定区,构建了嵌合抗体的重链和轻链。(参见实施例2)

[0013] 本发明提供的嵌合抗体在动力学检测中具有高亲和力,其中平衡结合常数 K_D 为 $\leq 3.89 \times 10^{-10}$,本发明一方面提供的动力学参数使用生物分子相互作用系统Octet-96(Pall Life Sciences, S-000959)测定。(参见实施例3)

[0014] 本发明一方面提供的嵌合抗体,与细胞表面抗原结合,EC50在62.6 ng/mL和437.7 ng/mL范围内;其中,术语EC50是指半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect)。(参见实施例4)

[0015] 本发明一方面提供的嵌合抗体,与激活的T细胞和DC细胞结合。(参见实施例5)

[0016] 本发明另一方面提供的嵌合抗体,阻断PDL1与PD1或CD80的结合,IC50分别在119.8 ng/mL和178.5 ng/mL范围内以及608.5 ng/mL和1867 ng/mL范围内。其中,IC50(half maximal inhibitory concentration)是指被测量的拮抗剂的半抑制浓度。(参见实施例6)

[0017] 本发明中,如果没有特别说明,所述CD80为B7-1;其具体蛋白序列为现有技术中已

知序列,可以参考现有文献或者GenBank中公开的序列。例如,B7-1 (CD80, NCBI Gene ID: 941)。

[0018] 本发明一方面提供的嵌合抗体,与小鼠无物种交叉反应,与食蟹猴有物种交叉反应。(参见实施例7)

[0019] 本发明提供的嵌合抗体能增强Jurkat细胞的免疫功能。(参见实施例8)

[0020] 本发明提供的嵌合抗体具有较强的体外生物学活性。在异体混和淋巴细胞反应中(Mixed Lymphocyte Reaction, MLR),本发明抗体可以增强IFN- γ 的分泌(参见实施例9)。

[0021] 本发明提供的成药性抗体具有较强的体内药理学活性。在肿瘤动物模型中,本发明的抗体可以有效抑制肿瘤生长并减小肿瘤体积。(参见实施例10)

[0022] 本发明一方面提供了分离的人特异性结合分子,包含a)和b), a)三个轻链CDR:轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3,

[0023] b)三个重链CDR:重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;

[0024] 所述分离的人PDL1特异性结合分子为分离的抗体或抗原结合片段;

[0025] (i)重链CDR1选自:SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 79、或SEQ ID NO: 85;

[0026] (ii)重链CDR2选自:SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 80、或SEQ ID NO: 86;

[0027] (iii)重链CDR3选自:SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 81、或SEQ ID NO: 87;

[0028] (iv)轻链CDR1选自:SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 82、或SEQ ID NO: 88;

[0029] (v)轻链CDR2选自:SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 89;和

[0030] (vi)轻链CDR3选自:SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 84、或SEQ ID NO: 90。

[0031] 本发明另一方面提供的分离的人特异性结合分子,所述特异性结合分子包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0032] (i)重链可变区包含如SEQ ID NO:37所示的重链 CDR1、如SEQ ID NO:38 所示的重链CDR2、以及如SEQ ID NO:39 所示的重链CDR3;和/或轻链可变区包含如SEQ ID NO:40 所示的轻链CDR1、如SEQ ID NO:41 所示的轻链CDR2、以及如SEQ ID NO:42 所示的轻链CDR3;或者

[0033] (ii)重链可变区包含如SEQ ID NO:43所示的重链 CDR1、如 SEQ ID NO:44 所示的重链CDR2、以及如SEQ ID NO:45 所示的重链CDR3;和/或轻链可变区包含如SEQ ID NO: 46 所示的轻链CDR1、如SEQ ID NO:47 所示的轻链CDR2、以及如SEQ ID NO:48 所示的轻链CDR3;或者

[0034] (iii)重链可变区包含如SEQ ID NO:49所示的重链 CDR1、如 SEQ ID NO:50 所示的重链CDR2、以及如SEQ ID NO:51 所示的重链CDR3;和/或轻链可变区包含如SEQ ID NO:

52 所示的轻链CDR1、如SEQ ID NO:53 所示的轻链CDR2、以及如SEQ ID NO:54 所示的轻链CDR3;或者

[0035] (iv) 重链可变区包含如SEQ ID NO:55所示的重链 CDR1、如 SEQ ID NO:56 所示的重链CDR2、以及如SEQ ID NO:57 所示的重链CDR3;和/或轻链可变区包含如SEQ ID NO:58 所示的轻链CDR1、如SEQ ID NO:593 所示的轻链CDR2、以及如SEQ ID NO:60 所示的轻链CDR3;或者

[0036] (v) 重链可变区包含如SEQ ID NO:61所示的重链 CDR1、如 SEQ ID NO:62 所示的重链CDR2、以及如SEQ ID NO:63 所示的重链CDR3;和/或轻链可变区包含如SEQ ID NO:64 所示的轻链CDR1、如SEQ ID NO:65 所示的轻链CDR2、以及如SEQ ID NO:66 所示的轻链CDR3;或者

[0037] (vi) 重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的重链 CDR1、如 SEQ ID NO:68 所示的重链CDR2、以及如SEQ ID NO:69 所示的重链CDR3;和/或轻链可变区包含如SEQ ID NO:70 所示的轻链CDR1、如SEQ ID NO:71 所示的轻链CDR2、以及如SEQ ID NO:72 所示的轻链CDR3;或者

[0038] (vii) 重链可变区包含如SEQ ID NO:73所示的重链 CDR1、如 SEQ ID NO:74 所示的重链CDR2、以及如SEQ ID NO:75 所示的重链CDR3;和/或轻链可变区包含如SEQ ID NO:76 所示的轻链CDR1、如SEQ ID NO:77 所示的轻链CDR2、以及如SEQ ID NO:78 所示的轻链CDR3;或者

[0039] (viii) 重链可变区包含如SEQ ID NO:79所示的重链 CDR1、如 SEQ ID NO:80 所示的重链CDR2、以及如SEQ ID NO:81 所示的重链CDR3;和/或轻链可变区包含如SEQ ID NO:82 所示的轻链CDR1、如SEQ ID NO:83 所示的轻链CDR2、以及如SEQ ID NO:84 所示的轻链CDR3;或者

[0040] (ix) 重链可变区包含如SEQ ID NO:85所示的重链 CDR1、如 SEQ ID NO:86 所示的重链CDR2、以及如SEQ ID NO:87 所示的重链CDR3;和/或轻链可变区包含如SEQ ID NO:88 所示的轻链CDR1、如SEQ ID NO:89 所示的轻链CDR2、以及如SEQ ID NO:90 所示的轻链CDR3。

[0041] 在本发明的一些具体实施例中,所述抗体是全长抗体。

[0042] 在本发明的一些具体实施例中,所述抗原结合片段是Fab 或F(ab)'₂ 或scFv。

[0043] 本发明一方面提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包含轻链可变区和重链可变区,其中:

[0044] (i) 所述重链可变区选自:SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25;SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33、和SEQ ID NO: 35;

[0045] (ii) 所述轻链可变区选自:SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26;SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、和SEQ ID NO: 36;

[0046] (iii) 与(i)、(ii)所述的序列至少有80%同源性的序列。

[0047] 本发明一方面提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包含轻链可变区和重链可变区,其中:

- [0048] (i)所述重链可变区为SEQ ID NO: 19 且所述轻链可变区为SEQ ID NO: 20;
- [0049] (ii)所述重链可变区为SEQ ID NO: 21 且所述轻链可变区为SEQ ID NO: 22;
- [0050] (iii)所述重链可变区为SEQ ID NO: 23 且所述轻链可变区为SEQ ID NO: 24;
- [0051] (iv)所述重链可变区为SEQ ID NO: 25 且所述轻链可变区为SEQ ID NO: 26;
- [0052] (v)所述重链可变区为SEQ ID NO: 27 且所述轻链可变区为SEQ ID NO: 28;
- [0053] (vi)所述重链可变区为SEQ ID NO: 29 且所述轻链可变区为SEQ ID NO: 30;
- [0054] (vii)所述重链可变区为SEQ ID NO: 31 且所述轻链可变区为SEQ ID NO: 32;
- [0055] (viii)所述重链可变区为SEQ ID NO: 33 且所述轻链可变区为SEQ ID NO: 34;
- 和
- [0056] (ix)所述重链可变区为SEQ ID NO: 35 且所述轻链可变区为SEQ ID NO: 36。
- [0057] 本发明的一些具体实施例中,所述的抗体或其抗原结合片段,特异性地结合人PDL1且表现出至少一种以下性质:
- [0058] (i)阻断PDL1与PD1或CD80的结合;
- [0059] (ii)结合人T细胞表面的PDL1;
- [0060] (iii)以 3.89×10^{-10} M或更低的 K_D 与人PDL1结合;
- [0061] (iv)在混合淋巴细胞反应(MLR)试验中提高IFN- γ 产生。
- [0062] 在一些具体实施例中,所述单克隆抗体或其抗原结合部分在制备用于抑制病体内肿瘤细胞生长的药物中的用途。
- [0063] 在一些具体实施例中,所述单克隆抗体或其抗原结合部分在制备用于治疗传染病药物中的用途。
- [0064] 本发明一方面提供了分离的核酸,其编码抗体轻链可变区和抗体重链可变区中的一者或两者,其中
- [0065] (i)编码所述抗体重链可变区的片段选自:SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、和SEQ ID NO: 17;
- [0066] (ii)编码所述抗体轻链可变区的片段选自:SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、和SEQ ID NO: 18;
- [0067] (iii)与(i)、(ii)所述的序列至少有80%同源性的序列。
- [0068] 本发明还提供了一种载体,其含有所述的核酸分子。
- [0069] 本发明还提供了一种宿主细胞,其含有所述的核酸分子或载体。
- [0070] 本发明还提供了一种结合物,其包含与同位素、免疫毒素和/或化学药物共价连接的抗人PDL1单克隆抗体;该抗人PDL1单克隆抗体为所述的分离的人PDL1特异性结合分子。
- [0071] 本发明还提供了一种偶联物,其由所述的分离的人PDL1特异性结合分子和/或所述的结合物与固体介质或半固体介质偶联形成。
- [0072] 本发明还涉及所述的抗PDL1单克隆抗体和/或结合物和/或偶联物在制备治疗疾病的药物中的应用;
- [0073] 所述疾病为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、食管癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、神经胶质瘤或黑素瘤。

[0074] 本发明提供一种组合物,其含有抗人PDL1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分、核酸分子、载体、宿主细胞、结合物、或者偶联物,以及任选的药学上可接受的载体或赋形剂,以及任选的其它生物活性物质。

[0075] 本发明还涉及了试剂盒,其包含所述的分离的抗体或其抗原结合片段和一组用于检测结合于人PDL1的所述抗体或所述抗原结合片段的复合物的试剂。

[0076] 以下对本发明做进一步描述:在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所述的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0077] 这里提到的术语“抗体”包括完整抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。“抗体”是指包含通过二硫键互相连接在一起的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(在此缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(在此缩写为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区可进一步再分为高变区,称为互补决定区(CDR),CDR散布在被称为构架区(FR)的更加保守的区域中。每个VH和VL均由三个CDR和四个FR组成,它们从氨基端向羧基端以如下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区含有可与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,该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成分(C1q)。

[0078] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指保留与抗原(例如PDL1)特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。已证明抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来行使。术语抗体的“抗原结合部分”中所包括的结合片段的例子包括:(i) Fab片段,即由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,即包含在铰链区处通过二硫键连接的两个Fab片段的双价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH结构域组成的dAb片段;和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但是它们可以利用重组方法通过合成连接体连接在一起,该连接体使它们能够制成一条蛋白质链,其中VL和VH区配对构成单价分子称为单链Fv(scFv)。这种单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段用本领域技术人员公知的常规技术获得,并用与完整抗体相同的方法对这些片段的实用性进行筛选。

[0079] 本文使用的“分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与PDL1特异性结合的分离的抗体基本不含与除PDL1以外的抗原特异性结合的抗体)。但是,与PDL1特异性结合的分离的抗体与诸如来自其他物种的PDL1分子等其他抗原可能具有交叉反应性。而且,分离的抗体可基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0080] 本文使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和性。

[0081] 本文使用的术语“人抗体”包括具有如下可变区的抗体,在该可变区中,构架区和CDR区都源自人种系免疫球蛋白序列。而且,如果该抗体含有恒定区,则恒定区也源自人种

系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包含并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。但是,本文使用的术语“人抗体”不包括其中源自另一哺乳动物种如小鼠的种系的CDR序列已被移植到人构架序列上的抗体。

[0082] 术语“人单克隆抗体”是指表现单一结合特异性的抗体,其具有其中构架区和CDR区均源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。在一个实施方案中,人单克隆抗体由杂交瘤产生,该杂交瘤包括与无限增殖化细胞融合的B细胞,该B细胞从具有含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人动物(例如转基因小鼠)中获得。

[0083] 本文使用的术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如:(a)从对于人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤(下文进一步描述)中分离的抗体,(b)从经转化表达人抗体的宿主细胞如转染瘤中分离的抗体,(c)从重组组合人抗体文库中分离的抗体,和(d)通过包括将人免疫球蛋白基因序列剪接为其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组人抗体具有其中构架区和CDR区均源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。但是在某些实施方案中,这些重组人抗体可以经历体外诱变(或者,当使用人Ig序列的转基因动物时,经历体内体细胞诱变),因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列尽管是源自人种系VH和VL序列并与之相关的序列,但可能不是在体内天然存在于人抗体种系的所有组成成分(repertoire)中。

[0084] 术语“人源化抗体”是指其中来源于另外一种哺乳动物种如小鼠的种系的CDR序列已经被移植到人构架序列上的抗体。在人构架序列内也可以进行其它的构架区修饰。

[0085] 术语“嵌合抗体”是指其中可变区序列来源于一个物种而恒定区序列来源于另一个物种的抗体,例如其中可变区序列来源于小鼠抗体而恒定区序列来源于人抗体的抗体。

[0086] 本文使用的术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而本文使用的术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。本文使用的术语“ K_D ”是指解离常数,它是由 K_d 与 K_a 的比值获得的(即 K_d/K_a),并且表示为摩尔浓度(M)。抗体的 K_D 值可能用本领域建立的方法测定。测定抗体 K_D 的一种优选方法是使用表面等离子共振法,优选使用生物传感器系统。

[0087] “同源性”是指在最优比时两个多核苷酸序列之间或两个多肽序列之间的序列相似性。

[0088] “分离的核酸分子”意指未与所有或一部分多核苷酸缔合的基因组的DNA或RNA、mRNA、cDNA或其合成来源或一些组合,其中分离的多核苷酸在自然界中可见或连接至在自然界中未连接的多核苷酸。

[0089] 本发明提供的PDL1单克隆抗体能有效抑制局部肿瘤生长;阻断PD1/PDL1信号可以促进肿瘤抗原特异性T细胞的增殖,发挥杀伤肿瘤细胞的作用;阻断肿瘤细胞上相关PDL1信号可上调浸润CD8⁺ T细胞IFN- γ 的分泌,表明PD1/PDL1信号通路的阻断在以诱导免疫应答为目的的肿瘤免疫应答中发挥作用;选择抗PDL1单克隆抗体配合肿瘤疫苗进行肿瘤免疫治疗可有效加强肿瘤疫苗的免疫激活。目前,抗PD1/PDL1治疗以其良好的疗效和安全性走在了免疫治疗的前列,成为近两年肺癌治疗领域的热门靶点。

附图说明

- [0090] 图1:FACS检测PDL1嵌合抗体与B16-hPDL1细胞的结合;
- [0091] 图2:FACS检测PDL1嵌合抗体与激活T细胞的结合;
- [0092] 图3:FACS检测PDL1嵌合抗体与DC细胞的结合;
- [0093] 图4a:ELISA检测PDL1嵌合抗体阻断PD1与PDL1之间的相互作用;
- [0094] 图4b:ELISA检测PDL1嵌合抗体阻断CD80与PDL1之间的相互作用;
- [0095] 图5a:ELISA检测PDL1嵌合抗体与食蟹猴PDL1物种交叉反应;
- [0096] 图5b:FACS检测PDL1嵌合抗体与小鼠PDL1物种交叉反应;
- [0097] 图6:荧光素酶检测试剂盒检测PDL1嵌合抗体对Jurkat细胞免疫反应的影响;
- [0098] 图7:ELISA检测MLR实验中PDL1嵌合抗体增强IFN- γ 的分泌;
- [0099] 图8:PDL1成药性抗体抑制肿瘤在PDL1人源化转基因小鼠体内的生长。
- [0100] 图9a-图9c:表一,本发明抗PDL1抗体的序列编号表;
- [0101] 图10:表二,人鼠PDL1嵌合抗体动力学分析表;
- [0102] 图11:表三,人鼠PDL1嵌合抗体的细胞结合半数有效浓度表;
- [0103] 图12:表四,人鼠PDL1嵌合抗体的配体阻断实验表;
- [0104] 图13:表五,人鼠PDL1嵌合抗体的交叉反应表。

具体实施方式

[0105] 本发明公开了单克隆抗体及其应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0106] 本发明提供的单克隆抗体及其应用中所用原料及试剂均可由市场购得。

[0107] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0108] 实施例1:动物免疫和抗PDL1鼠抗体的筛选

[0109] 选用适宜年龄的Balb/c小鼠,进行免疫注射。用hPDL1-mFc融合蛋白作为抗原与完全弗氏佐剂(Sigma-Aldrich)混合后,通过皮下注射入免疫小鼠体内,刺激相应B淋巴细胞克隆。随后,大约每两至三周腹腔内注射100 μg 的1:1乳化于不完全弗氏佐剂(Sigma-Aldrich)中的hPDL1-mFc,从而对已免疫的小鼠进行加强免疫。通过无菌操作取出小鼠脾淋巴细胞,与准备好的SP2/0骨髓瘤细胞按一定比例(脾细胞 1×10^8 ,骨髓瘤细胞 2×10^7)混合,并加入聚乙二醇(Sigma,P7181)进行细胞融合。

[0110] 融合后,将融合细胞加入96孔板中,每孔加入0.1 mL HAT培养基,放入二氧化碳培养箱中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养;第4天,每孔中加入0.1 mL HT培养基;第7天时,将培养基完全换成HT培养基。第8-12天时进行筛选,阳性细胞通过有限稀释法进行亚克隆,扩大培养,并通过ELISA和FACS进行测试,具体方法如下:

[0111] 将2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的hPDL1-His包被在96孔板上(Corning, catalog #9018),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。用PBST(PBS含0.05%的Tween-20)洗板三次,使用5%脱脂奶粉(Oxoid, catalog #LP0031B)封闭。用PBST洗板三次后,加入杂交瘤上清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2小时。洗板后,加入1/5000

稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG二抗(BioLegend, catalog #405306), 37°C 孵育1小时。洗板后, 加入TMB(Tiagen, catalog # PA107-02) 显色。

[0112] 抗体与B16-hPDL1细胞(内源性小鼠PDL1基因敲除)的结合采用FACS进行检测。在96孔板(Corning, catalog #3799)中每孔加入胰酶消化后的 2.5×10^5 B16-hPDL1细胞, 与杂交瘤上清在4°C 孵育30分钟。用缓冲液(PBS含有1% BSA和5 mM EDTA)洗涤细胞两次后, 加入APC标记的羊抗鼠IgG二抗(BD, catalog #550826), 4°C 孵育30分钟。细胞经缓冲液洗涤后, 在Attune Nxt流式细胞仪(Thermo Fisher)上分析。

[0113] PDL1抗体能够阻断PDL1与PD1的结合, 因此采用配体阻断实验进一步筛选杂交瘤上清。将1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的hPD1-hFc包被96孔板, 4°C 过夜。洗板3次后, 使用5%脱脂奶粉在37°C 封闭2小时。洗板三次后, 加入预先混合的杂交瘤上清和200 ng/mL生物素化的hPDL1-hFc, 室温下孵育1小时。洗板后, 加入HRP标记的链霉亲和素, 室温孵育1小时。洗板后, 加入TMB显色。

[0114] PDL1抗体能够阻断PDL1与CD80的结合, 因此采用配体阻断实验进一步筛选杂交瘤上清。将2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的hCD80-hFc包被96孔板, 4°C 过夜。洗板3次后, 使用5%脱脂奶粉在37°C 封闭2小时。洗板三次后, 加入预先混合的杂交瘤上清和1000 ng/mL生物素化的hPDL1-hFc, 室温下孵育1小时。洗板后, 加入HRP标记的链霉亲和素, 室温孵育1小时。洗板后, 加入TMB显色。

[0115] 使用ELISA方法检验PDL1抗体与食蟹猴PDL1的交叉反应。将2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的anti-mouse IgG Fc抗体(Sigma, catalog #M4280)包被到96孔板上, 4°C 过夜。使用5%脱脂奶粉在37°C 封闭2小时。用PBST洗板后, 加入杂交瘤上清, 室温孵育30分钟。PBST洗板三次后, 将生物素标记的食蟹猴PDL1(SinoBiological, catalog #90251-C08H)加入板中, 室温孵育1小时。用PBST洗板三次, 加入1/1000稀释的HRP标记的链霉亲和素, 室温孵育1小时。洗板后, 加入TMB显色。

[0116] 实施例2: 鼠源抗体cDNA的克隆以及嵌合抗体的构建

[0117] 用简并引物PCR方法, 获得杂交瘤抗体重链和轻链的可变区基因序列。杂交瘤单克隆细胞使用Trizol(Invitrogen, catalog #15596-018)裂解后分离得到总RNA, 并使用SuperScript III First-Strand Synthesis System(Invitrogen, catalog #18080-051), 以RNA作为模板进行反转录, 得到cDNA库。以得到的cDNA库作为模板, 使用简并引物进行PCR (Zhou H, et al., Nucleic Acids Research 22: 888-889 (1994), Chardes T et al., FEBS Letters 452: 386-394 (1999))。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 重链和轻链可变区的PCR扩增产物预计大小为400碱基对。PCR产物克隆到pClone007 载体(Tsingke, catalog #TSV-007BS), 并且转化至大肠杆菌感受态Trans 5 α (Transgen, catalog# CD201-02), 并在琼脂板上挑选3-6个大肠杆菌单克隆进行基因测序。在某些情况下, PCR产物也可直接用于基因测序。通过以上方法, 最终得到抗体的重链和轻链的可变区全长基因序列。经NCBI Ig-BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/>)进一步分析后得到抗体重链和轻链的互补决定区(Complementarity Determining Region)和骨架区(Framework Region)的基因和氨基酸序列(Kabat E.A., et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest, in: NIH Publication No. 91-3242, US Department of Health and Human Services, Bethesda, MD)。具体信息见抗

体序列列表和图9a-图9c(表I)。

[0118] 通过将鼠源PDL1抗体的重链和轻链可变区分别连接至人的IgG1(或IgG1突变体N297A)和 κ 恒定区,构建了嵌合抗体的重链和轻链。通过PCR方法,在重链和轻链可变区引入合适的酶切位点,分别克隆到相应的嵌合抗体表达载体中。通过脂质体转染法,将嵌合抗体重链和轻链的质粒导入293F细胞,并继续培养6天。细胞培养上清中的抗体用Protein A柱(GE Healthcare, catalog #17549112)进行纯化。Protein A柱用1 mM PBS洗涤,然后用50 mM的PBS(pH3.0)将抗体从柱上洗脱。洗脱液用0.5M的氢氧化钠溶液调节pH至中性,并使用0.22 μ m滤膜过滤。抗体溶液经Ultra-15 centrifugal concentrators(Millipore, catalog #ACS500024)浓缩后,用Nanodrop分光光度计检测定量抗体浓度。纯化抗体溶液中的内毒素含量使用Gel Clot TAL kit(Xiamen Bioendo Technology, catalog #010250)检测,标准为含量低于1 EU/mL。

[0119] 实施例3:人鼠PDL1嵌合抗体动力学检测

[0120] 使用生物分子相互作用系统Octet-96(Pall Life Sciences, S-000959),测量抗体与抗原之间结合的动力学常数(k_{assoc} 和 k_{dissoc}),并进一步计算平衡结合常数 K_D 。将hPDL1-mFc抗原蛋白偶联至AMC传感器(Pall Life Sciences, PN18-5099)表面,并加入不同浓度抗体,测量PDL1嵌合抗体与传感器表面PDL1-mFc蛋白之间的结合和解离。具体来说,AMC传感器在缓冲液(含有0.02% Tween-20和0.1% BSA的PBS)中预湿润10分钟,然后在hPDL1-mFc的样品缓冲液中平衡5分钟,使得PDL1-mFc蛋白耦合至传感器表面。PDL1-mFc偶联的AMC传感器首先在缓冲液中平衡2分钟,然后置于含有不同浓度抗体(3-200 nM)的缓冲液中共孵育5分钟,以测量抗体与PDL1-mFc蛋白的结合;最后,将结合了抗原和抗体的传感器重新置于样品缓冲液,并等待10分钟,以测量抗体与hPDL1-mFc蛋白的解离。测量得到的数据采用1:1模型进行整体拟合,以获得结合与解离动力学常数,并在此基础上进一步得到平衡结合常数 K_D 。实验结果见图10(表II)。

[0121] 实施例4:人鼠PDL1嵌合抗体与B16-hPDL1细胞的结合

[0122] 人鼠嵌合抗体进一步采用FACS方法检测其与细胞表面hPDL1的结合。B16-hPDL1细胞(内源性小鼠PDL1基因敲除)用FACS缓冲液(PBS含1% BSA)重悬至 4×10^6 细胞/mL,50 μ L/孔加入96孔圆底板(Corning, catalog #3795)。将待测的纯化抗体按照一定浓度加入孔中(50 μ L/孔),4 $^{\circ}$ C孵育1小时。细胞经缓冲液洗涤三次后,加入PE标记的荧光二抗,4 $^{\circ}$ C孵育0.5小时。细胞用FACS缓冲液洗三次,重悬到200 μ L/孔,使用Attune Nxt流式细胞仪(Thermo Fisher)检测荧光信号。结果如图1所示,结合半数有效浓度见图11(表III)。

[0123] 实施例5:人鼠PDL1嵌合抗体与激活T细胞和DC细胞的结合

[0124] 人鼠嵌合抗体进一步采用FACS方法检测其与激活T细胞和树突状细胞表面hPDL1的结合。使用密度梯度离心法(Ficoll-Paque Premium, GE Healthcare, catalog #17-5442-02),从人外周血中分离外周血单核细胞(PBMC)。人CD3⁺ T细胞使用Pan T Cell Isolation Kit(Miltenyi, catalog #130-096-535)从PBMC中分离得到,并加入等量的CD3/CD28 Dynabeads(Invitrogen 11132D)激活48小时。激活的T细胞用FACS缓冲液(PBS含1% BSA)重悬至 4×10^6 细胞/mL,50 μ L/孔加入96孔圆底板(Corning, catalog #3795)。将待测的纯化抗体按照一定浓度加入孔中(50 μ L/孔),4 $^{\circ}$ C孵育1小时。细胞经缓冲液洗涤三次后,加入PE标记的荧光二抗,4 $^{\circ}$ C孵育0.5小时。细胞用FACS缓冲液洗三次,重悬到200 μ L/

孔,使用Attune Nxt流式细胞仪(Thermo Fisher)检测荧光信号。结果如图2所示。

[0125] 使用CD14 Cell Isolation Kit(Miltenyi, catalog #130-050-201)从PBMC中进一步分离纯化得到单核细胞(monocyte)。通过在培养基中加入细胞因子1000 U/mL GM-CSF(Prospect, catalog #CYT-221)和1000 U/mL IL-4(Prospect, catalog #CYT211),以诱导单核细胞分化成树突细胞(Dendritic cells)。细胞因子每2-3天补充一次,经过5-6天后收获未成熟的树突细胞。树突细胞用FACS缓冲液(PBS含1% BSA)重悬至 4×10^6 细胞/mL,50 μ L/孔加入96孔圆底板(Corning, catalog #3795)。将待测的纯化抗体按照一定浓度加入孔中(50 μ L/孔),4 $^{\circ}$ C孵育1小时。细胞经缓冲液洗涤三次后,加入PE标记的荧光二抗,4 $^{\circ}$ C孵育0.5小时。细胞用FACS缓冲液洗三次,重悬到200 μ L/孔,使用Attune Nxt流式细胞仪(Thermo Fisher)检测荧光信号。结果如图3所示。

[0126] 实施例6:人鼠PDL1嵌合抗体阻断PD1或CD80与PDL1之间的相互作用

[0127] 采用ELISA方法检测抗体能否阻断hPD1或CD80与hPDL1之间的结合。使用Biotin Labeling Kit-NH₂(Dojindo, catalog#LK03)试剂盒对hPDL1-hFc蛋白进行生物素标记。将hPD1-hFc或hCD80-hFc包被到96孔板上,4 $^{\circ}$ C过夜。使用5%脱脂奶粉在37 $^{\circ}$ C封闭2小时。洗板三次后,加入预先混合的生物素化的hPDL1-hFc和PDL1嵌合抗体,室温孵育1小时。用PBST洗板,加入HRP标记的链霉亲和素,室温孵育1小时。洗板后,加入TMB显色。结果如图4a和4b,结果总结见图12(表IV)。

[0128] 实施例7:人鼠PDL1嵌合抗体的物种交叉反应

[0129] 使用ELISA方法检测人鼠PDL1嵌合抗体与食蟹猴的物种交叉反应。将定量纯化抗体包被到96孔板上,4 $^{\circ}$ C过夜。使用5%脱脂奶粉在37 $^{\circ}$ C封闭2小时。将生物素标记的食蟹猴PDL1(SinoBiological, catalog # 90251-C08H-200)加入板中,室温孵育1小时。用PBST洗板三次,加入1/1000稀释的HRP标记的链霉亲和素,室温孵育1小时。洗板后,加入TMB显色。结果如图5a,以及图13(表V)中所示。

[0130] 使用FACS方法检测人鼠PDL1嵌合抗体与小鼠的物种交叉反应。将野生型B16细胞用胰酶消化后用FACS缓冲液(PBS含1% BSA)重悬至 1.25×10^6 细胞/mL。取80 μ L细胞悬液与80 μ L梯度稀释的抗体混合,室温放置30分钟。PBST洗涤三次后,加入荧光标记二抗(BioLegend, catalog #409304),4 $^{\circ}$ C孵育1小时。PBST洗涤后,使用Attune Nxt流式细胞仪(Thermo Fisher)检测荧光信号。结果如图5b,以及图13(表V)中所示。

[0131] 实施例8:人鼠PDL1嵌合抗体增强Jurkat细胞的免疫功能

[0132] 使用含有荧光素酶报导基因的Jurkat-PD1细胞来检测人鼠PDL1嵌合抗体的细胞生物活性。在本细胞实验中,Raji/hPDL1细胞作为抗原呈递细胞,Jurkat/hPD1/NF κ B-luciferase细胞作为效应细胞。加入人鼠PDL1嵌合抗体阻断了细胞间PD1/PDL1的相互作用在,激活了Jurkat/hPD1/NF κ B-luciferase细胞表达Luciferase报导基因。具体来说,通过在Jurkat细胞中导入外源性表达的hPD1和含有NF κ B启动子的Luciferase报导基因;而在Raji细胞中导入外源性表达的hPDL1。Raji/hPDL1细胞和Jurkat/hPD1/NF κ B-luciferase细胞混合后,加入T细胞受体激活剂以及梯度稀释的待测抗体,6-16小时后使用荧光素酶检测试剂盒(Promega, G7940)检测。结果显示,人鼠PDL1嵌合抗体能够增强荧光信号,并呈现剂量依赖效应,结果见图6。

[0133] 实施例9:人鼠PDL1嵌合抗体的异体混合淋巴细胞实验(Mixed Lymphocyte

Reaction, MLR)

[0134] 使用混合淋巴细胞反应检测人鼠PDL1嵌合抗体的体外生物学活性。使用密度梯度离心法(Ficoll-Paque Premium, GE Healthcare, catalog #17-5442-02),从人外周血中分离外周血单核细胞(PBMC)。使用CD14 Cell Isolation Kit(Miltenyi, catalog #130-050-201)从PBMC中进一步分离纯化得到单核细胞(monocyte)。通过在培养基中加入细胞因子1000 U/mL GM-CSF (Prospec, catalog #CYT-221)和1000 U/mL IL-4(Prospec, catalog #CYT211),以诱导单核细胞分化成树突细胞(Dendritic cells)。细胞因子每2-3天补充一次,经过5-6天后收获树突细胞供后继实验使用。

[0135] 人CD3⁺T细胞使用Pan T Cell Isolation Kit(Miltenyi, catalog #130-096-535)从PBMC中分离得到。在96孔圆底板(Corning, catalog #3799)中加入CD3⁺T细胞和未成熟的树突细胞,以及不同浓度的PDL1抗体。细胞培养5-6天后,收获上清并用ELISA方法定量检测细胞因子含量。结果如图7显示,人鼠PDL1嵌合抗体能够增强MLR中IFN- γ 的分泌。

[0136] 实施例10:人鼠PDL1嵌合抗体抑制肿瘤生长

[0137] 本发明中所述的肿瘤动物模型,是通过在PDL1人源化转基因小鼠中接种经过基因改造的小鼠结肠癌细胞MC38/mPDL1^{KO}/hPDL1,而构建的用以在小鼠体内测试成药性PDL1抗体体内药效的特殊肿瘤动物模型。

[0138] 对PDL1人源化转基因小鼠(7-11周龄)身体侧面皮下注射0.1 mL体积的 5×10^5 个MC38/mPDL1^{KO}/hPDL1肿瘤细胞。接种肿瘤细胞7天之后,以10 mg/kg剂量(剂量体积10 mL/kg)每周两次注射所述PDL1抗体、参考抗体或对照PBS,共进行6次给药。在实验过程中,每周两次使用游标卡尺测量皮下肿瘤体积。如图8所示,经过6次给药后,待测抗体明显抑制肿瘤生长,部分肿瘤在药物处理后几乎消失。

[0139] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0001]		序列表
[0002]	<110>	苏州银河生物医药有限公司
[0003]	<120>	PDL1单克隆抗体及其应用
[0004]	<160>	90
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210>	1
[0007]	<211>	346
[0008]	<212>	DNA
[0009]	<213>	人工序列()
[0010]	<220>	
[0011]	<221>	V_region
[0012]	<222>	(1)..(.346)
[0013]	<223>	重链可变区DNA序列
[0014]	<400>	1
[0015]	caggttcagc	60
[0016]	tgcagcagtc	120
[0017]	tggagctgag	180
[0018]	ctgctgaagc	240
[0019]	ctggggcctc	300
[0020]	agtgaagata	360
[0021]	tcctgcaagg	420
[0022]	ctactggcta	480
[0023]	cacattcagt	540
[0024]	tcctactggc	600
[0025]	tagagtggtt	660
[0026]	aaagcagagg	720
[0027]	cctggacatg	780
[0028]	gccttgagtg	840
[0029]	gattggagag	900
[0030]	atcttacctg	960
[0031]	gaagtggtaa	1020
[0032]	tcctaactac	1080
[0033]	aatgagaact	1140
[0034]	tcaagggcaa	1200
[0035]	ggccacattc	1260
[0036]	actgcagata	1320
[0037]	catcctccaa	1380
[0038]	cacagtctac	1440

[0039]	atgcaactca	1500
[0040]	tcagcctgat	1560
[0041]	atctgaggac	1620
[0042]	tctgccgtct	1680
[0043]	attactgtgc	1740
[0044]	gagagagagg	1800
[0045]	gctatggact	1860
[0046]	actgggggtca	1920
[0047]	cggaacctca	1980
[0048]	gtcaccgtct	2040
[0049]	cctcag	
[0050]	<210> 2	
[0051]	<211> 321	
[0052]	<212> DNA	
[0053]	<213> 人工序列()	
[0054]	<220>	
[0055]	<221> V_region	
[0056]	<222> (1)..(.321)	
[0057]	<223> 轻链可变区DNA序列	
[0058]	<400> 2	
[0059]	gatatccaga	60
[0060]	tgacacagac	120
[0061]	tacatcctcc	180
[0062]	ctgtctgcct	240
[0063]	ctctgggaga	300
[0064]	cagagtcact	360
[0065]	atcagttgca	420
[0066]	gtgcaagtca	480
[0067]	gggcattagt	540
[0068]	aattatttaa	600
[0069]	actggtatca	660
[0070]	gcagaaacca	720
[0071]	gatggaactg	780
[0072]	ttaaactcct	840
[0073]	gatctattac	900
[0074]	acatcaaggt	960
[0075]	tacactcagg	1020
[0076]	agtcccatca	1080
[0077]	aggttcagtg	1140

381

[0078]	gcagtgggtc	1200
[0079]	tgggacagat	1260
[0080]	tattctctca	1320
[0081]	ccatcagcaa	1380
[0082]	cctggaacct	1440
[0083]	gaagatattg	1500
[0084]	ccacttacta	1560
[0085]	ttgtcagcag	1620
[0086]	tatagtaagc	1680
[0087]	ttccgtggac	1740
[0088]	gttcggtgga	1800
[0089]	ggcaccaagc	1860
[0090]	tggaaatcaa	1920
[0091]	a	
[0092]	<210>	3
[0093]	<211>	358
[0094]	<212>	DNA
[0095]	<213>	人工序列()
[0096]	<220>	
[0097]	<221>	V_region
[0098]	<222>	(1)..(.358)
[0099]	<223>	重链可变区DNA序列
[0100]	<400>	3
[0101]	gaggtgaagc	60
[0102]	ttctcgagtc	120
[0103]	tggaggtggc	180
[0104]	ctggtgcagc	240
[0105]	ctggaggatc	300
[0106]	cctgaaactc	360
[0107]	tcctgtgcag	420
[0108]	cctcaggatt	480
[0109]	cgattttagt	540
[0110]	agatactgga	600
[0111]	tgagttgggt	660
[0112]	ccggcaggct	720
[0113]	ccagggaaag	780
[0114]	ggctagaatg	840
[0115]	gattggacaa	900
[0116]	attaatccag	960

354

[0117]	atagcagtac	1020
[0118]	gataaactat	1080
[0119]	acgccatctc	1140
[0120]	taaaggatta	1200
[0121]	cttcatcatc	1260
[0122]	tccagagaca	1320
[0123]	acgccaaaaa	1380
[0124]	tacgctgtac	1440
[0125]	ctgcaaatga	1500
[0126]	ccaaattgag	1560
[0127]	atctgaggac	1620
[0128]	acagcccttt	1680
[0129]	attactgtgc	1740
[0130]	aagccctgat	1800
[0131]	tactacggta	1860
[0132]	gtagccttcc	1920
[0133]	ttactggggc	1980
[0134]	caagggactc	2040
[0135]	tggtcactgt	2100
[0136]	ctctgcag	
[0137]	<210>	4
[0138]	<211>	336
[0139]	<212>	DNA
[0140]	<213>	人工序列()
[0141]	<220>	
[0142]	<221>	V_region
[0143]	<222>	(1)..(.336)
[0144]	<223>	轻链可变区DNA序列
[0145]	<400>	4
[0146]	gatgttttga	60
[0147]	tgacccaaac	120
[0148]	tccactctcc	180
[0149]	ctgcctgtca	240
[0150]	gtcttggaga	300
[0151]	tcaggcctcc	360
[0152]	atctcttgca	420
[0153]	gatctagtca	480
[0154]	gaccattgta	540
[0155]	catagtaatg	600

394

[0156]	caaacaccta	660	
[0157]	tttagaatgg	720	
[0158]	tacctgcaga	780	
[0159]	aaccaggcca	840	
[0160]	gtctccaaag	900	
[0161]	ctcctgatct	960	
[0162]	tcaaagtttc	1020	
[0163]	caaccgattt	1080	
[0164]	gctgggggtcc	1140	
[0165]	cagacagggtt	1200	
[0166]	cagtggcagt	1260	
[0167]	ggatcaggga	1320	
[0168]	cagatttcac	1380	
[0169]	actcaagatc	1440	
[0170]	agcagagtgg	1500	
[0171]	aggctgagga	1560	
[0172]	tctgggagtt	1620	
[0173]	tattactgct	1680	
[0174]	ttcaaggttc	1740	
[0175]	acatgttccg	1800	
[0176]	tacacgttcg	1860	
[0177]	gaggggggac	1920	
[0178]	caagctggaa	1980	
[0179]	ataaaa		370
[0180]	<210>	5	
[0181]	<211>	358	
[0182]	<212>	DNA	
[0183]	<213>	人工序列()	
[0184]	<220>		
[0185]	<221>	V_region	
[0186]	<222>	(1)..(.358)	
[0187]	<223>	重链可变区DNA序列	
[0188]	<400>	5	
[0189]	gaggtgcagc	60	
[0190]	ttcaggagtc	120	
[0191]	aggacctagc	180	
[0192]	ctcgtgaaac	240	
[0193]	cttctcagac	300	
[0194]	tctgtccctc	360	

[0195]	acctgttctg	420
[0196]	tcactggcga	480
[0197]	ctccatcacc	540
[0198]	agtggttact	600
[0199]	ggaactggat	660
[0200]	ccggcaattc	720
[0201]	ccaggaata	780
[0202]	aacttgacta	840
[0203]	catgggtac	900
[0204]	ataagctaca	960
[0205]	ctggtagcac	1020
[0206]	ttactacaat	1080
[0207]	ccatctctca	1140
[0208]	aaagtcgaat	1200
[0209]	ctccatcact	1260
[0210]	cgagacacat	1320
[0211]	ccaagaacca	1380
[0212]	gtactacctg	1440
[0213]	cagttgaatt	1500
[0214]	ctgtgactac	1560
[0215]	tgaggactca	1620
[0216]	gccacatatt	1680
[0217]	actgtgcaag	1740
[0218]	aggaactaac	1800
[0219]	tgggacggga	1860
[0220]	ggtacttcga	1920
[0221]	tgtctggggc	1980
[0222]	gcagggacca	2040
[0223]	cggtcaccgt	2100
[0224]	ctcctcag	
[0225]	<210>	6
[0226]	<211>	339
[0227]	<212>	DNA
[0228]	<213>	人工序列()
[0229]	<220>	
[0230]	<221>	V_region
[0231]	<222>	(1)..(.339)
[0232]	<223>	轻链可变区DNA序列
[0233]	<400>	6

394

[0234]	gacattgtga	60
[0235]	tgtcacagtc	120
[0236]	tccatcctcc	180
[0237]	ctggctgtgt	240
[0238]	cagcaggaga	300
[0239]	gaaggtcact	360
[0240]	atgagctgca	420
[0241]	aatccagtca	480
[0242]	gagtctgttc	540
[0243]	aacagtggaa	600
[0244]	cccgaaagaa	660
[0245]	ctacttgget	720
[0246]	tggtacctgc	780
[0247]	agaaaccagg	840
[0248]	gcagtctcct	900
[0249]	aaactgctga	960
[0250]	tctactgggc	1020
[0251]	atccactagg	1080
[0252]	gaatctgggg	1140
[0253]	tccctgatcg	1200
[0254]	cttcacaggc	1260
[0255]	agtggatctg	1320
[0256]	ggacagactt	1380
[0257]	cactctcacc	1440
[0258]	atcagcagtg	1500
[0259]	tgcaggctga	1560
[0260]	agacctggca	1620
[0261]	gtttattact	1680
[0262]	gcaagcaatc	1740
[0263]	ttataatctc	1800
[0264]	atgttcacgt	1860
[0265]	tcggaggggg	1920
[0266]	gaccaagctg	1980
[0267]	gaaataaaa	
[0268]	<210> 7	
[0269]	<211> 355	
[0270]	<212> DNA	
[0271]	<213> 人工序列()	
[0272]	<220>	

[0273]	<221>	V_region	
[0274]	<222>	(1)..(.355)	
[0275]	<223>	重链可变区DNA序列	
[0276]	<400>	7	
[0277]		gaggtgcagc	60
[0278]		ttcaggagtc	120
[0279]		aggacctagc	180
[0280]		ctcgtgaaac	240
[0281]		cttctcagac	300
[0282]		tctgtccctc	360
[0283]		acctgttctg	420
[0284]		tcactggcga	480
[0285]		ctccatcacc	540
[0286]		agtggttact	600
[0287]		ggaactggat	660
[0288]		ccgaaattc	720
[0289]		ccagggaata	780
[0290]		aacttgagta	840
[0291]		catggggttc	900
[0292]		ataagctaca	960
[0293]		ctggtagcac	1020
[0294]		ttactacaat	1080
[0295]		ccatctctca	1140
[0296]		aaagtcgaat	1200
[0297]		ctccatcact	1260
[0298]		cgagacacat	1320
[0299]		ccaagaacca	1380
[0300]		gtactacctg	1440
[0301]		cagttgaatt	1500
[0302]		ctgtgactac	1560
[0303]		tgaggacaca	1620
[0304]		gccacatatt	1680
[0305]		actgtgcaag	1740
[0306]		catggcgggga	1800
[0307]		tggttagcct	1860
[0308]		ggtttgctta	1920
[0309]		ctggggccaa	1980
[0310]		gggactctgg	2040
[0311]		tcactgtctc	2100

[0312]	tgcag	391
[0313]	<210> 8	
[0314]	<211> 339	
[0315]	<212> DNA	
[0316]	<213> 人工序列()	
[0317]	<220>	
[0318]	<221> V_region	
[0319]	<222> (1)..(.339)	
[0320]	<223> 轻链可变区DNA序列	
[0321]	<400> 8	
[0322]	gacattgtga	60
[0323]	tgtcacagtc	120
[0324]	tccatcctcc	180
[0325]	ctagctgtgt	240
[0326]	cagttggaga	300
[0327]	gaaggttact	360
[0328]	atgagctgca	420
[0329]	agtccagtca	480
[0330]	gagcctttta	540
[0331]	tatagtagca	600
[0332]	atcaaaagaa	660
[0333]	ctccttggcc	720
[0334]	tggtaccagc	780
[0335]	agaaaccagg	840
[0336]	gcagtctcct	900
[0337]	aaactgctga	960
[0338]	tttactgggc	1020
[0339]	atccactagg	1080
[0340]	gaatctgggg	1140
[0341]	tccctgatcg	1200
[0342]	cttcacaggc	1260
[0343]	agtggatctg	1320
[0344]	ggacagatth	1380
[0345]	cactctcacc	1440
[0346]	atcagcagtg	1500
[0347]	tgaaggctga	1560
[0348]	agacctggca	1620
[0349]	gtttattact	1680
[0350]	gtcagcaata	1740

[0351]	ttatagctat	1800	
[0352]	ccgtggacgt	1860	
[0353]	tcggtggagg	1920	
[0354]	caccaagctg	1980	
[0355]	gaaatcaaa		373
[0356]	<210>	9	
[0357]	<211>	355	
[0358]	<212>	DNA	
[0359]	<213>	人工序列()	
[0360]	<220>		
[0361]	<221>	V_region	
[0362]	<222>	(1)..(.355)	
[0363]	<223>	重链可变区DNA序列	
[0364]	<400>	9	
[0365]	gaggtgcagc	60	
[0366]	ttcaggagtc	120	
[0367]	aggacctagc	180	
[0368]	ctcgtgaaac	240	
[0369]	cttctcagac	300	
[0370]	tctgtccctc	360	
[0371]	acctgttctg	420	
[0372]	tcactggcga	480	
[0373]	ctccatcacc	540	
[0374]	agtggttact	600	
[0375]	ggcactggat	660	
[0376]	ccggaaattc	720	
[0377]	cccgggaata	780	
[0378]	aacttgagta	840	
[0379]	catggggtac	900	
[0380]	ataagctaca	960	
[0381]	gtgggagcac	1020	
[0382]	ttacttcatt	1080	
[0383]	ccatctctca	1140	
[0384]	aaagttegaat	1200	
[0385]	ctccatcact	1260	
[0386]	cgagacacat	1320	
[0387]	ccaagaacca	1380	
[0388]	gtactacctg	1440	
[0389]	cagttgaatt	1500	

[0390]	ctgtgactac	1560
[0391]	tgaggacaca	1620
[0392]	gccacatatt	1680
[0393]	actgtgcaag	1740
[0394]	atcaggggga	1800
[0395]	tggttactgc	1860
[0396]	atdddgctta	1920
[0397]	ctggggccaa	1980
[0398]	gggactctgg	2040
[0399]	tcactgtctc	2100
[0400]	tgacg	
[0401]	<210> 10	
[0402]	<211> 339	
[0403]	<212> DNA	
[0404]	<213> 人工序列()	
[0405]	<220>	
[0406]	<221> V_region	
[0407]	<222> (1)..(.339)	
[0408]	<223> 轻链可变区DNA序列	
[0409]	<400> 10	
[0410]	gacgttgtga	60
[0411]	tgtcacagtc	120
[0412]	tccatcctcc	180
[0413]	ctagctgtgt	240
[0414]	cagttggaga	300
[0415]	gaaggttact	360
[0416]	atgagctgca	420
[0417]	agtccagtca	480
[0418]	gagcctttta	540
[0419]	tatagtagca	600
[0420]	atcaaaagaa	660
[0421]	ctccttggcc	720
[0422]	tggtaccagc	780
[0423]	agaaaccagg	840
[0424]	gcagtctcct	900
[0425]	aaactgctga	960
[0426]	tttactgggc	1020
[0427]	atccactagg	1080
[0428]	gaatctgggg	1140

391

[0429]	tccctgatcg	1200
[0430]	cttcacaggc	1260
[0431]	agtggatctg	1320
[0432]	ggacagattt	1380
[0433]	cactctcacc	1440
[0434]	atcagcaatg	1500
[0435]	tgaagactga	1560
[0436]	agacctggca	1620
[0437]	gtttattact	1680
[0438]	gtcagcaata	1740
[0439]	ttatggctat	1800
[0440]	ccttacacgt	1860
[0441]	tcggaggggg	1920
[0442]	gaccaagctg	1980
[0443]	gaaataaaa	
[0444]	<210> 11	
[0445]	<211> 349	
[0446]	<212> DNA	
[0447]	<213> 人工序列()	
[0448]	<220>	
[0449]	<221> V_region	
[0450]	<222> (1)..(.349)	
[0451]	<223> 重链可变区DNA序列	
[0452]	<400> 11	
[0453]	gaagtgatgc	60
[0454]	tggtggagtc	120
[0455]	tggggcggc	180
[0456]	ttagtgaagc	240
[0457]	ctggagggtc	300
[0458]	cctgaaactc	360
[0459]	tcctgtgcag	420
[0460]	tctctggatt	480
[0461]	cactttcagt	540
[0462]	agctatgcca	600
[0463]	tgtcttggt	660
[0464]	tcgccagact	720
[0465]	ccgaaaaga	780
[0466]	ggctggagtg	840
[0467]	ggtcgcaacc	900

373

[0468]	attactagtg	960
[0469]	atggtcatta	1020
[0470]	cacctactat	1080
[0471]	ccagacaatg	1140
[0472]	tgaaggggcg	1200
[0473]	attcaccatc	1260
[0474]	tccagagaca	1320
[0475]	atgccaagaa	1380
[0476]	caccctctac	1440
[0477]	ctgcaaatga	1500
[0478]	gcagtctgag	1560
[0479]	gtctgaggac	1620
[0480]	acggccatgt	1680
[0481]	attactgtac	1740
[0482]	aagacgtacg	1800
[0483]	aactactttg	1860
[0484]	actactgggg	1920
[0485]	ccaaggcacc	1980
[0486]	actctcacag	2040
[0487]	tctcctcag	
[0488]	<210>	12
[0489]	<211>	315
[0490]	<212>	DNA
[0491]	<213>	人工序列()
[0492]	<220>	
[0493]	<221>	V_region
[0494]	<222>	(1)..(.315)
[0495]	<223>	轻链可变区DNA序列
[0496]	<400>	12
[0497]	caaattgttc	60
[0498]	tcaccagtc	120
[0499]	tccagcactc	180
[0500]	atgtctgcat	240
[0501]	atccagggga	300
[0502]	gaaggtcacc	360
[0503]	atgacctgca	420
[0504]	gtgccaactc	480
[0505]	aagtgttact	540
[0506]	tacatgtatt	600

384

[0507]	ggtaccagca	660
[0508]	gaagccaaga	720
[0509]	tcctccccc	780
[0510]	aaccctggat	840
[0511]	ttttctcaca	900
[0512]	tccaacctgg	960
[0513]	cttctggagt	1020
[0514]	ccctgctcgc	1080
[0515]	ttcagtggca	1140
[0516]	gtgggtctgg	1200
[0517]	gacctcttac	1260
[0518]	tctctcacia	1320
[0519]	tcagcagcat	1380
[0520]	ggaggctgaa	1440
[0521]	gatgctgcca	1500
[0522]	cttattactg	1560
[0523]	ccagcagtgg	1620
[0524]	agaagtaacc	1680
[0525]	cgacgttcgg	1740
[0526]	tggaggcacc	1800
[0527]	aagctgga	1860
[0528]	tcaaa	
[0529]	<210> 13	
[0530]	<211> 358	
[0531]	<212> DNA	
[0532]	<213> 人工序列()	
[0533]	<220>	
[0534]	<221> V_region	
[0535]	<222> (1)..(.358)	
[0536]	<223> 重链可变区DNA序列	
[0537]	<400> 13	
[0538]	gaggtgcagc	60
[0539]	ttcaggagtc	120
[0540]	aggacctagc	180
[0541]	ctcgtgaaac	240
[0542]	cttctcagac	300
[0543]	tctgtccctc	360
[0544]	acctgctctg	420
[0545]	tcactggcga	480

347

[0546]	ctccatcacc	540
[0547]	agtggttact	600
[0548]	ggaactggat	660
[0549]	ccggaattc	720
[0550]	ccaggaata	780
[0551]	aacttgagta	840
[0552]	catgggtac	900
[0553]	ataagctaca	960
[0554]	ctggtagcac	1020
[0555]	ttactacaat	1080
[0556]	ccatctctca	1140
[0557]	aaagtcgaat	1200
[0558]	ctccatcact	1260
[0559]	cgagacacat	1320
[0560]	ccaagaacca	1380
[0561]	gtactacctg	1440
[0562]	cagttgaatt	1500
[0563]	ctgtgactac	1560
[0564]	tgaggacaca	1620
[0565]	gccacatatt	1680
[0566]	actgtgcaag	1740
[0567]	atatagagac	1800
[0568]	tgggtcgtcg	1860
[0569]	gctactttga	1920
[0570]	ctactggggc	1980
[0571]	caaggcacca	2040
[0572]	ctctcacagt	2100
[0573]	ctcctcag	
[0574]	<210>	14
[0575]	<211>	321
[0576]	<212>	DNA
[0577]	<213>	人工序列()
[0578]	<220>	
[0579]	<221>	V_region
[0580]	<222>	(1)..(.321)
[0581]	<223>	轻链可变区DNA序列
[0582]	<400>	14
[0583]	gactttgtga	60
[0584]	tgaccagtc	120

394

[0585]	tcaaaaattc	180
[0586]	atgtccacat	240
[0587]	cagtgggaga	300
[0588]	cagggtcagc	360
[0589]	gtcacctgca	420
[0590]	aggccagtca	480
[0591]	gaatgtgggt	540
[0592]	actaatgtag	600
[0593]	cctggtatca	660
[0594]	acagaaacca	720
[0595]	ggacaatctc	780
[0596]	ctaaagcact	840
[0597]	gatttactcg	900
[0598]	gcatectacc	960
[0599]	ggtacagtgg	1020
[0600]	agtcctgat	1080
[0601]	cgcttcacag	1140
[0602]	gcagtggatc	1200
[0603]	tgggacagat	1260
[0604]	ttcactctca	1320
[0605]	ccatcagcaa	1380
[0606]	tgtgcagtct	1440
[0607]	gaagacttgg	1500
[0608]	cagaatattt	1560
[0609]	ctgtcagcaa	1620
[0610]	tataacagct	1680
[0611]	atcctctcac	1740
[0612]	gttcggctcg	1800
[0613]	gggacaaagt	1860
[0614]	tggaaataaa	1920
[0615]	a	
[0616]	<210>	15
[0617]	<211>	355
[0618]	<212>	DNA
[0619]	<213>	人工序列()
[0620]	<220>	
[0621]	<221>	V_region
[0622]	<222>	(1)..(.355)
[0623]	<223>	重链可变区DNA序列

354

[0624]	<400>	15	
[0625]	gaggtgcagc	60	
[0626]	ttcaggagtc	120	
[0627]	aggacctagc	180	
[0628]	ctcgtgaaac	240	
[0629]	cttctcagac	300	
[0630]	tctgtccctc	360	
[0631]	acctgttctg	420	
[0632]	tcactggcga	480	
[0633]	ctccatcacc	540	
[0634]	agtggttact	600	
[0635]	ggaactggat	660	
[0636]	ccggaaattc	720	
[0637]	ccaggaata	780	
[0638]	aacttgagta	840	
[0639]	catggggtac	900	
[0640]	ataagctaca	960	
[0641]	ctggtagtac	1020	
[0642]	ttactacaat	1080	
[0643]	ccatctctca	1140	
[0644]	aaagtcgaat	1200	
[0645]	ctccatcact	1260	
[0646]	cgagacactt	1320	
[0647]	ccaagaacca	1380	
[0648]	gtactacctg	1440	
[0649]	cagttgaatt	1500	
[0650]	ctgtgactgc	1560	
[0651]	tgaggacaca	1620	
[0652]	gccacatatt	1680	
[0653]	actgtgcaag	1740	
[0654]	aaggggggga	1800	
[0655]	tggttactgc	1860	
[0656]	cttttgacta	1920	
[0657]	ctggggccaa	1980	
[0658]	ggcaccactc	2040	
[0659]	tcacagtctc	2100	
[0660]	ctcag		
[0661]	<210>	16	
[0662]	<211>	339	

[0663]	<212>	DNA	
[0664]	<213>	人工序列()	
[0665]	<220>		
[0666]	<221>	V_region	
[0667]	<222>	(1)..(.339)	
[0668]	<223>	轻链可变区DNA序列	
[0669]	<400>	16	
[0670]	gacattgtga		60
[0671]	tgacacagtc		120
[0672]	tccatcctcc		180
[0673]	ctgactgtga		240
[0674]	cagcaggaga		300
[0675]	gaaggtcact		360
[0676]	atgagctgca		420
[0677]	agtccagtca		480
[0678]	gagtctgtta		540
[0679]	aacagtggaa		600
[0680]	atcaaaagaa		660
[0681]	ctgcttgacc		720
[0682]	tggtaccagc		780
[0683]	agaaaccagg		840
[0684]	gcagcctcct		900
[0685]	aaactgttga		960
[0686]	tctcctgggc		1020
[0687]	ttccactagg		1080
[0688]	gaatctgggg		1140
[0689]	tccctgatcg		1200
[0690]	cttcacaggc		1260
[0691]	agtggatctg		1320
[0692]	gaacagattt		1380
[0693]	cactctcacc		1440
[0694]	atcagcagtg		1500
[0695]	tgcaggctga		1560
[0696]	agacctggca		1620
[0697]	gtttattact		1680
[0698]	gtcagaatga		1740
[0699]	ttatggttat		1800
[0700]	ccgctcacgt		1860
[0701]	tcggtgctgg		1920

[0702]	gaccaagctg	1980	
[0703]	gagctgaaa		373
[0704]	<210> 17		
[0705]	<211> 367		
[0706]	<212> DNA		
[0707]	<213> 人工序列()		
[0708]	<220>		
[0709]	<221> V_region		
[0710]	<222> (1) .. (.367)		
[0711]	<223> 重链可变区DNA序列		
[0712]	<400> 17		
[0713]	gaggttcagc	60	
[0714]	tgcagcagtc	120	
[0715]	tggggcagag	180	
[0716]	cttgtgaagc	240	
[0717]	caggggcctc	300	
[0718]	agtcaaattg	360	
[0719]	tcctgcacag	420	
[0720]	cttctggctt	480	
[0721]	caacattaaa	540	
[0722]	gacacctata	600	
[0723]	tgtactgggt	660	
[0724]	gaagcagagg	720	
[0725]	cctgaacagg	780	
[0726]	gcctggagtg	840	
[0727]	gattggaagg	900	
[0728]	attgatcctg	960	
[0729]	cgaatggtaa	1020	
[0730]	tactaaatat	1080	
[0731]	gacccgaagt	1140	
[0732]	tccagggcaa	1200	
[0733]	ggccactata	1260	
[0734]	acagcagaca	1320	
[0735]	catcctccaa	1380	
[0736]	cacagccttc	1440	
[0737]	ttgcagctca	1500	
[0738]	gcagcctgac	1560	
[0739]	atctgaggac	1620	
[0740]	actgccgtct	1680	

[0741]	attactgtgc	1740	
[0742]	taggagggga	1800	
[0743]	ttatTTTTTA	1860	
[0744]	ctacggtaac	1920	
[0745]	agctattgac	1980	
[0746]	tactggggcc	2040	
[0747]	aaggcaccac	2100	
[0748]	tctcacagtc	2160	
[0749]	tcctcag		404
[0750]	<210> 18		
[0751]	<211> 321		
[0752]	<212> DNA		
[0753]	<213> 人工序列()		
[0754]	<220>		
[0755]	<221> V_region		
[0756]	<222> (1)..(.321)		
[0757]	<223> 轻链可变区DNA序列		
[0758]	<400> 18		
[0759]	gacattgtga	60	
[0760]	tgaccagtc	120	
[0761]	tcacaaattc	180	
[0762]	atgtccacat	240	
[0763]	cagtaggaga	300	
[0764]	cagggtcagc	360	
[0765]	attacctgca	420	
[0766]	aggccagtca	480	
[0767]	ggatgtgagt	540	
[0768]	actgctgtag	600	
[0769]	cctggtatca	660	
[0770]	acaaaaacca	720	
[0771]	gggcaatctc	780	
[0772]	ctaaactact	840	
[0773]	gatttactgg	900	
[0774]	gcatccaccc	960	
[0775]	ggcacactgg	1020	
[0776]	agtcctgat	1080	
[0777]	cgcttcacag	1140	
[0778]	gcagtggatc	1200	
[0779]	tgggacagat	1260	

[0780]	tattctctca	1320	
[0781]	ccatcagcag	1380	
[0782]	tgtgcagtct	1440	
[0783]	gaagacctga	1500	
[0784]	cactttatta	1560	
[0785]	ctgtcagcaa	1620	
[0786]	cattatgaca	1680	
[0787]	ctccgtggac	1740	
[0788]	gttcggtgga	1800	
[0789]	ggcaccaagc	1860	
[0790]	tggaaatcaa	1920	
[0791]	a		354
[0792]	<210>	19	
[0793]	<211>	115	
[0794]	<212>	PRT	
[0795]	<213>	人工序列()	
[0796]	<220>		
[0797]	<221>	V_region	
[0798]	<222>	(1)..(.115)	
[0799]	<223>	重链可变区氨基酸序列	
[0800]	<400>	19	
[0801]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Leu Lys Pro Gly Ala		
[0802]	1	5	10 15
[0803]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0804]		20	25 30
[0805]	Trp Leu Glu Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile		
[0806]		35	40 45
[0807]	Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Pro Asn Tyr Asn Glu Asn Phe		
[0808]		50	55 60
[0809]	Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr		
[0810]	65	70	75 80
[0811]	Met Gln Leu Ile Ser Leu Ile Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0812]		85	90 95
[0813]	Ala Arg Glu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Ser Val Thr		
[0814]		100	105 110
[0815]	Val Ser Ser		
[0816]		115	
[0817]	<210>	20	
[0818]	<211>	107	

[0819] <212> PRT
 [0820] <213> 人工序列()
 [0821] <220>
 [0822] <221> V_region
 [0823] <222> (1)..(.107)
 [0824] <223> 轻链可变区氨基酸序列
 [0825] <400> 20
 [0826] Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 [0827] 1 5 10 15
 [0828] Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 [0829] 20 25 30
 [0830] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 [0831] 35 40 45
 [0832] Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0833] 50 55 60
 [0834] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 [0835] 65 70 75 80
 [0836] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 [0837] 85 90 95
 [0838] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0839] 100 105
 [0840] <210> 21
 [0841] <211> 119
 [0842] <212> PRT
 [0843] <213> 人工序列()
 [0844] <220>
 [0845] <221> V_region
 [0846] <222> (1)..(.119)
 [0847] <223> 重链可变区氨基酸序列
 [0848] <400> 21
 [0849] Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0850] 1 5 10 15
 [0851] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 [0852] 20 25 30
 [0853] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 [0854] 35 40 45
 [0855] Gly Gln Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 [0856] 50 55 60
 [0857] Lys Asp Tyr Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

[0858] 65 70 75 80
 [0859] Leu Gln Met Thr Lys Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 [0860] 85 90 95
 [0861] Ala Ser Pro Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
 [0862] 100 105 110
 [0863] Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 [0864] 115
 [0865] <210> 22
 [0866] <211> 112
 [0867] <212> PRT
 [0868] <213> 人工序列()
 [0869] <220>
 [0870] <221> V_region
 [0871] <222> (1)..(.112)
 [0872] <223> 轻链可变区氨基酸序列
 [0873] <400> 22
 [0874] Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 [0875] 1 5 10 15
 [0876] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 [0877] 20 25 30
 [0878] Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 [0879] 35 40 45
 [0880] Pro Lys Leu Leu Ile Phe Lys Val Ser Asn Arg Phe Ala Gly Val Pro
 [0881] 50 55 60
 [0882] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [0883] 65 70 75 80
 [0884] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 [0885] 85 90 95
 [0886] Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0887] 100 105 110
 [0888] <210> 23
 [0889] <211> 119
 [0890] <212> PRT
 [0891] <213> 人工序列()
 [0892] <220>
 [0893] <221> V_region
 [0894] <222> (1)..(.119)
 [0895] <223> 重链可变区氨基酸序列
 [0896] <400> 23

[0936] Lys
 [0937] <210> 25
 [0938] <211> 118
 [0939] <212> PRT
 [0940] <213> 人工序列()
 [0941] <220>
 [0942] <221> V_region
 [0943] <222> (1)..(.118)
 [0944] <223> 重链可变区氨基酸序列
 [0945] <400> 25
 [0946] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 [0947] 1 5 10 15
 [0948] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 [0949] 20 25 30
 [0950] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 [0951] 35 40 45
 [0952] Gly Phe Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 [0953] 50 55 60
 [0954] Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 [0955] 65 70 75 80
 [0956] Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 [0957] 85 90 95
 [0958] Ser Met Ala Gly Trp Leu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 [0959] 100 105 110
 [0960] Leu Val Thr Val Ser Ala
 [0961] 115
 [0962] <210> 26
 [0963] <211> 113
 [0964] <212> PRT
 [0965] <213> 人工序列()
 [0966] <220>
 [0967] <221> V_region
 [0968] <222> (1)..(.113)
 [0969] <223> 轻链可变区氨基酸序列
 [0970] <400> 26
 [0971] Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 [0972] 1 5 10 15
 [0973] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 [0974] 20 25 30

[0975] Ser Asn Gln Lys Asn Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 [0976] 35 40 45
 [0977] Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 [0978] 50 55 60
 [0979] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 [0980] 65 70 75 80
 [0981] Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 [0982] 85 90 95
 [0983] Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 [0984] 100 105 110
 [0985] Lys
 [0986] <210> 27
 [0987] <211> 118
 [0988] <212> PRT
 [0989] <213> 人工序列()
 [0990] <220>
 [0991] <221> V_region
 [0992] <222> (1)..(.118)
 [0993] <223> 重链可变区氨基酸序列
 [0994] <400> 27
 [0995] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 [0996] 1 5 10 15
 [0997] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 [0998] 20 25 30
 [0999] Tyr Trp His Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 [1000] 35 40 45
 [1001] Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Phe Ile Pro Ser Leu Lys
 [1002] 50 55 60
 [1003] Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 [1004] 65 70 75 80
 [1005] Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 [1006] 85 90 95
 [1007] Arg Ser Gly Gly Trp Leu Leu His Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 [1008] 100 105 110
 [1009] Leu Val Thr Val Ser Ala
 [1010] 115
 [1011] <210> 28
 [1012] <211> 113
 [1013] <212> PRT

[1014] <213> 人工序列()
 [1015] <220>
 [1016] <221> V_region
 [1017] <222> (1)..(.113)
 [1018] <223> 轻链可变区氨基酸序列
 [1019] <400> 28
 [1020] Asp Val Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 [1021] 1 5 10 15
 [1022] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 [1023] 20 25 30
 [1024] Ser Asn Gln Lys Asn Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 [1025] 35 40 45
 [1026] Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 [1027] 50 55 60
 [1028] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 [1029] 65 70 75 80
 [1030] Ile Ser Asn Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 [1031] 85 90 95
 [1032] Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 [1033] 100 105 110
 [1034] Lys
 [1035] <210> 29
 [1036] <211> 116
 [1037] <212> PRT
 [1038] <213> 人工序列()
 [1039] <220>
 [1040] <221> V_region
 [1041] <222> (1)..(.116)
 [1042] <223> 重链可变区氨基酸序列
 [1043] <400> 29
 [1044] Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 [1045] 1 5 10 15
 [1046] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [1047] 20 25 30
 [1048] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 [1049] 35 40 45
 [1050] Ala Thr Ile Thr Ser Asp Gly His Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 [1051] 50 55 60
 [1052] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

[1053] 65 70 75 80
 [1054] Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 [1055] 85 90 95
 [1056] Thr Arg Arg Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 [1057] 100 105 110
 [1058] Thr Val Ser Ser
 [1059] 115
 [1060] <210> 30
 [1061] <211> 105
 [1062] <212> PRT
 [1063] <213> 人工序列()
 [1064] <220>
 [1065] <221> V_region
 [1066] <222> (1)..(.105)
 [1067] <223> 轻链可变区氨基酸序列
 [1068] <400> 30
 [1069] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Tyr Pro Gly
 [1070] 1 5 10 15
 [1071] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Thr Tyr Met
 [1072] 20 25 30
 [1073] Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 [1074] 35 40 45
 [1075] Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 [1076] 50 55 60
 [1077] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 [1078] 65 70 75 80
 [1079] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Asn Pro Thr Phe
 [1080] 85 90 95
 [1081] Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [1082] 100 105
 [1083] <210> 31
 [1084] <211> 119
 [1085] <212> PRT
 [1086] <213> 人工序列()
 [1087] <220>
 [1088] <221> V_region
 [1089] <222> (1)..(.119)
 [1090] <223> 重链可变区氨基酸序列
 [1091] <400> 31

[1092] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 [1093] 1 5 10 15
 [1094] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 [1095] 20 25 30
 [1096] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 [1097] 35 40 45
 [1098] Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 [1099] 50 55 60
 [1100] Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 [1101] 65 70 75 80
 [1102] Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 [1103] 85 90 95
 [1104] Arg Tyr Arg Asp Trp Val Val Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 [1105] 100 105 110
 [1106] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 [1107] 115
 [1108] <210> 32
 [1109] <211> 113
 [1110] <212> PRT
 [1111] <213> 人工序列()
 [1112] <220>
 [1113] <221> V_region
 [1114] <222> (1)..(.107)
 [1115] <223> 轻链可变区氨基酸序列
 [1116] <400> 32
 [1117] Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 [1118] 1 5 10 15
 [1119] Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 [1120] 20 25 30
 [1121] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 [1122] 35 40 45
 [1123] Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 [1124] 50 55 60
 [1125] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 [1126] 65 70 75 80
 [1127] Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 [1128] 85 90 95
 [1129] Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [1130] 100 105

[1131] <210> 33
 [1132] <211> 118
 [1133] <212> PRT
 [1134] <213> 人工序列()
 [1135] <220>
 [1136] <221> V_region
 [1137] <222> (1)..(.118)
 [1138] <223> 重链可变区氨基酸序列
 [1139] <400> 33
 [1140] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 [1141] 1 5 10 15
 [1142] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 [1143] 20 25 30
 [1144] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 [1145] 35 40 45
 [1146] Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 [1147] 50 55 60
 [1148] Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 [1149] 65 70 75 80
 [1150] Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 [1151] 85 90 95
 [1152] Arg Arg Gly Gly Trp Leu Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 [1153] 100 105 110
 [1154] Thr Leu Thr Val Ser Ser
 [1155] 115
 [1156] <210> 34
 [1157] <211> 164
 [1158] <212> PRT
 [1159] <213> 人工序列()
 [1160] <220>
 [1161] <221> V_region
 [1162] <222> (1)..(.164)
 [1163] <223> 轻链可变区氨基酸序列
 [1164] <400> 34
 [1165] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 [1166] 1 5 10 15
 [1167] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 [1168] 20 25 30
 [1169] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met

[1170] 35 40 45
 [1171] Gly Tyr Ile Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
 [1172] 50 55 60
 [1173] Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
 [1174] 65 70 75 80
 [1175] Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Cys Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
 [1176] 85 90 95
 [1177] Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Thr Arg Glu
 [1178] 100 105 110
 [1179] Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 [1180] 115 120 125
 [1181] Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
 [1182] 130 135 140
 [1183] Cys Gln Asn Asp Tyr Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 [1184] 145 150 155 160
 [1185] Leu Glu Leu Lys
 [1186] <210> 35
 [1187] <211> 122
 [1188] <212> PRT
 [1189] <213> 人工序列()
 [1190] <220>
 [1191] <221> V_region
 [1192] <222> (1)..(.122)
 [1193] <223> 重链可变区氨基酸序列
 [1194] <400> 35
 [1195] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [1196] 1 5 10 15
 [1197] Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 [1198] 20 25 30
 [1199] Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [1200] 35 40 45
 [1201] Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 [1202] 50 55 60
 [1203] Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Phe
 [1204] 65 70 75 80
 [1205] Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1206] 85 90 95
 [1207] Ala Arg Arg Gly Leu Phe Phe Thr Thr Val Thr Ala Ile Asp Tyr Trp
 [1208] 100 105 110

[1209] Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 [1210] 115 120
 [1211] <210> 36
 [1212] <211> 107
 [1213] <212> PRT
 [1214] <213> 人工序列()
 [1215] <220>
 [1216] <221> V_region
 [1217] <222> (1)..(.107)
 [1218] <223> 轻链可变区氨基酸序列
 [1219] <400> 36
 [1220] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 [1221] 1 5 10 15
 [1222] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 [1223] 20 25 30
 [1224] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 [1225] 35 40 45
 [1226] Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 [1227] 50 55 60
 [1228] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
 [1229] 65 70 75 80
 [1230] Glu Asp Leu Thr Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asp Thr Pro Trp
 [1231] 85 90 95
 [1232] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [1233] 100 105
 [1234] <210> 37
 [1235] <211> 10
 [1236] <212> PRT
 [1237] <213> 人工序列()
 [1238] <220>
 [1239] <221> misc_feature

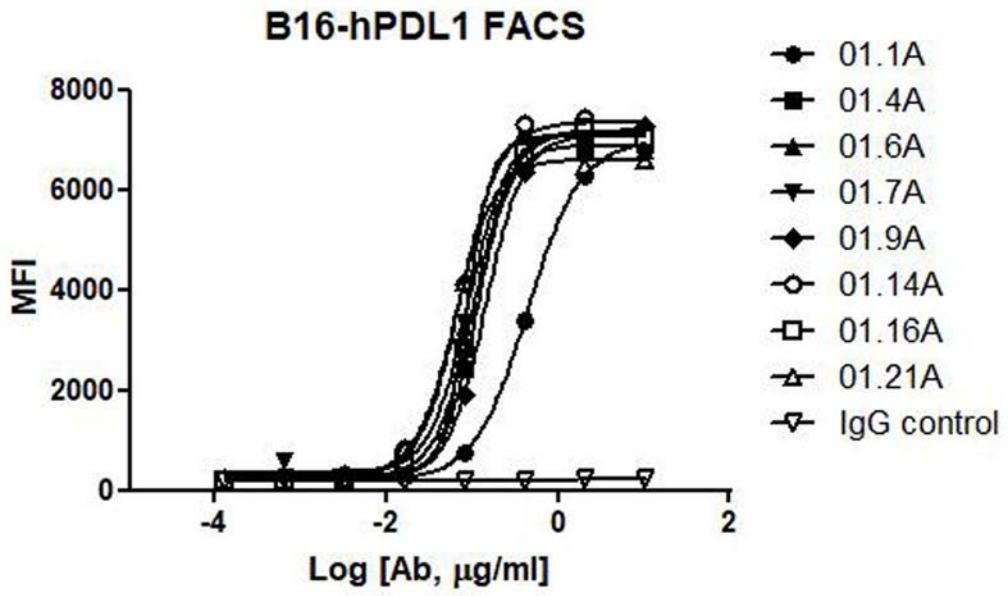


图1

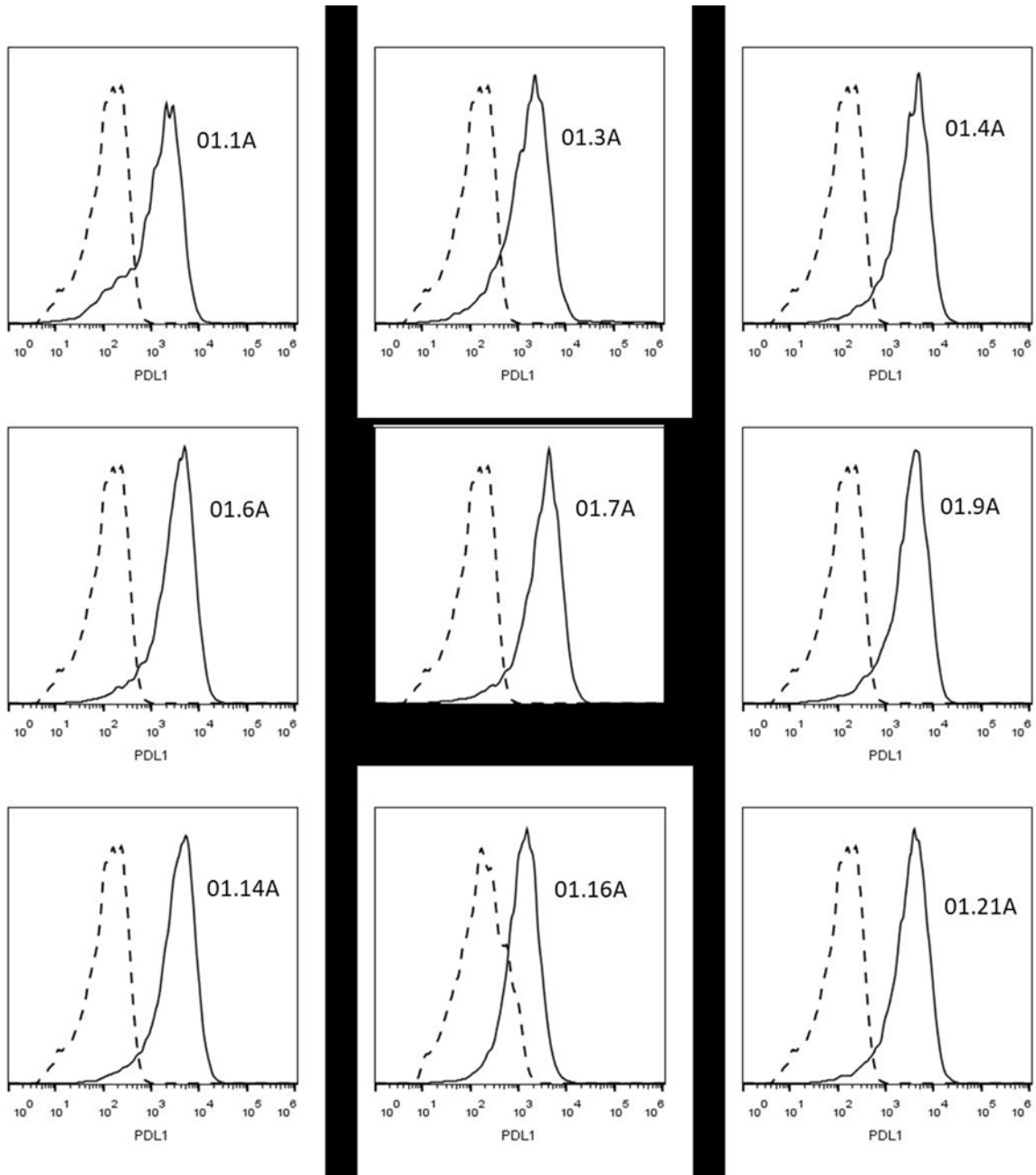


图2

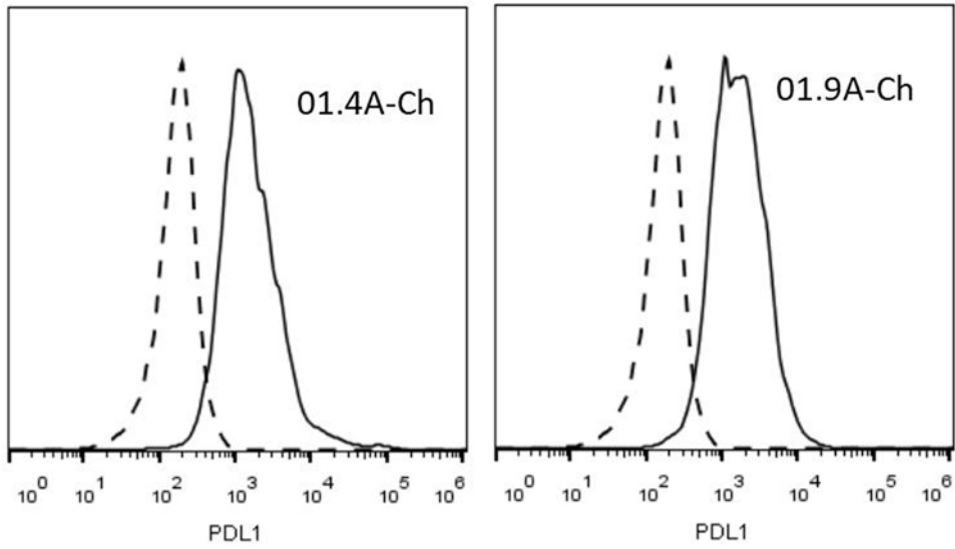


图3

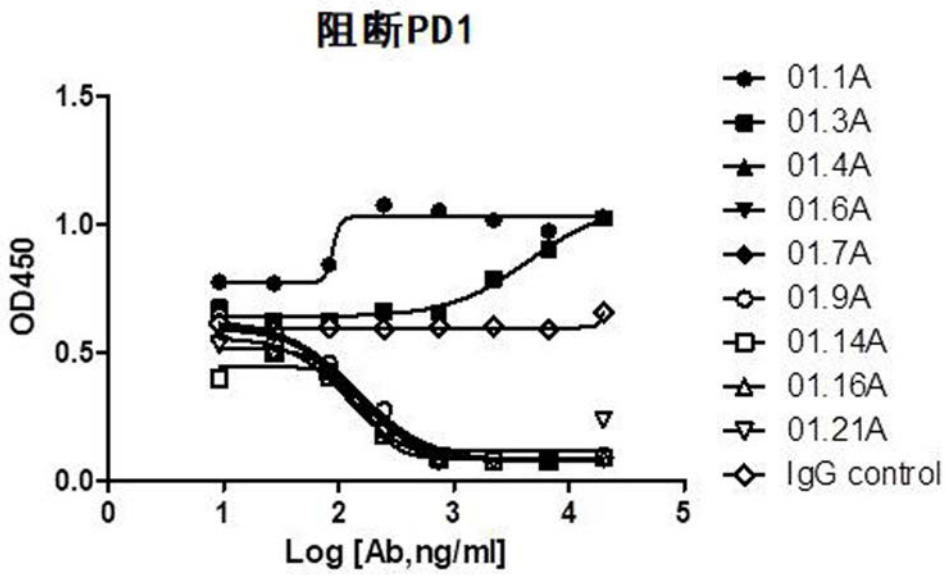


图4a

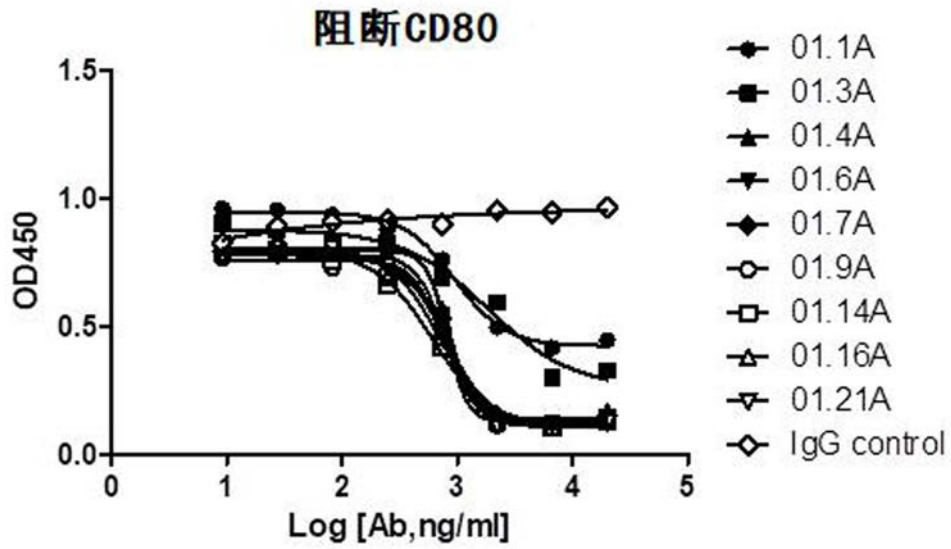


图4b

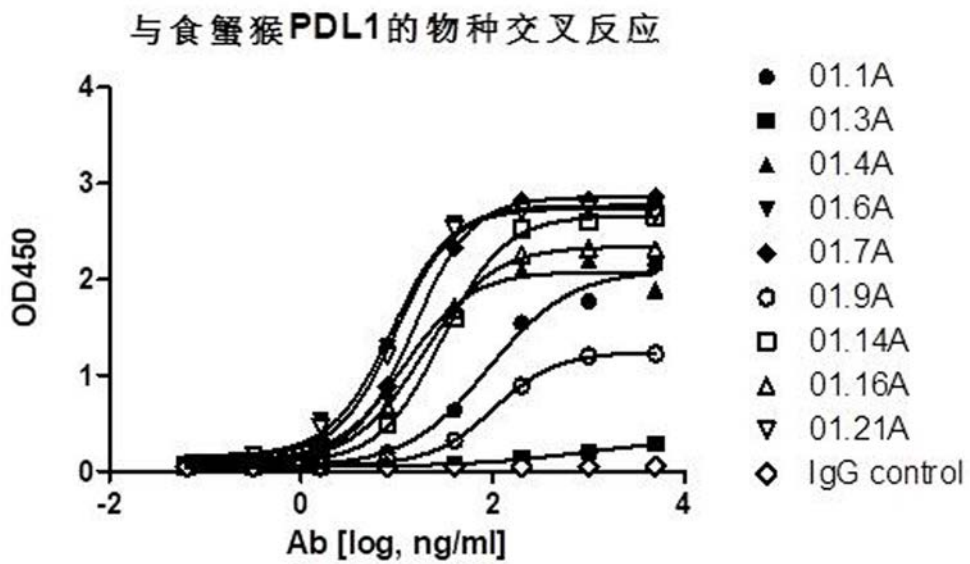


图5a

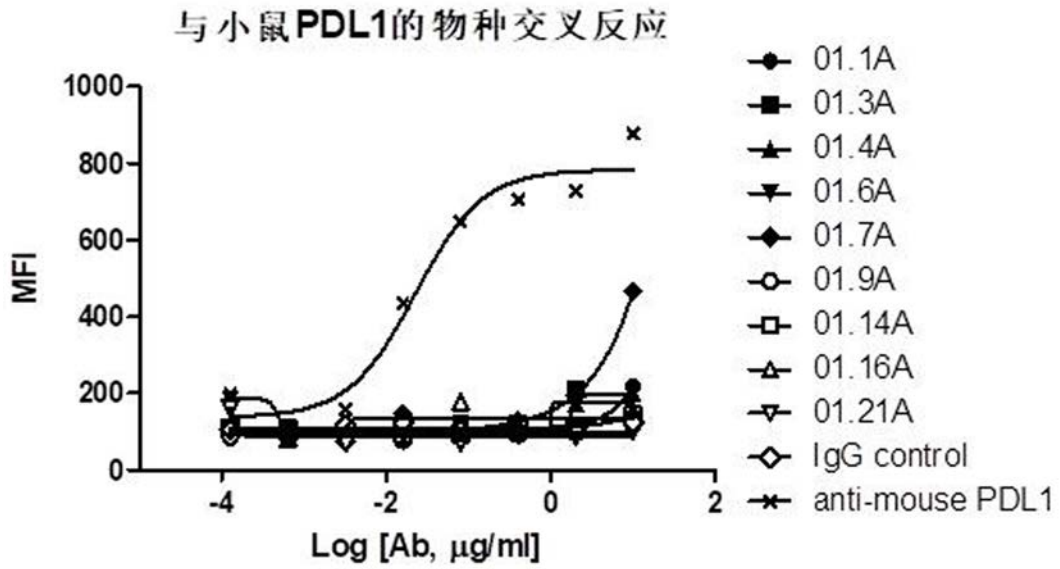


图5b

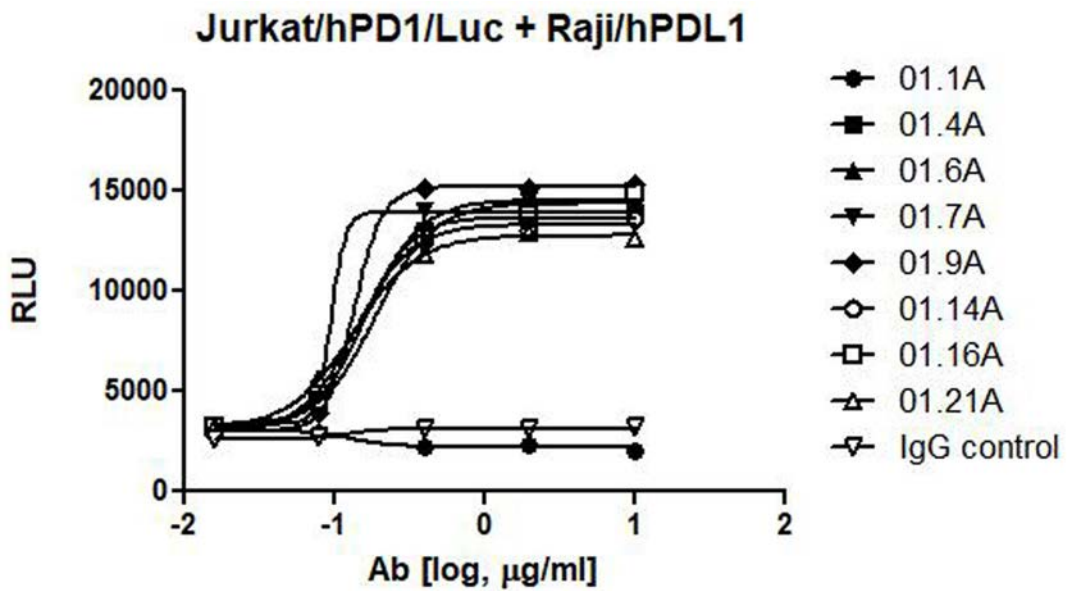


图6

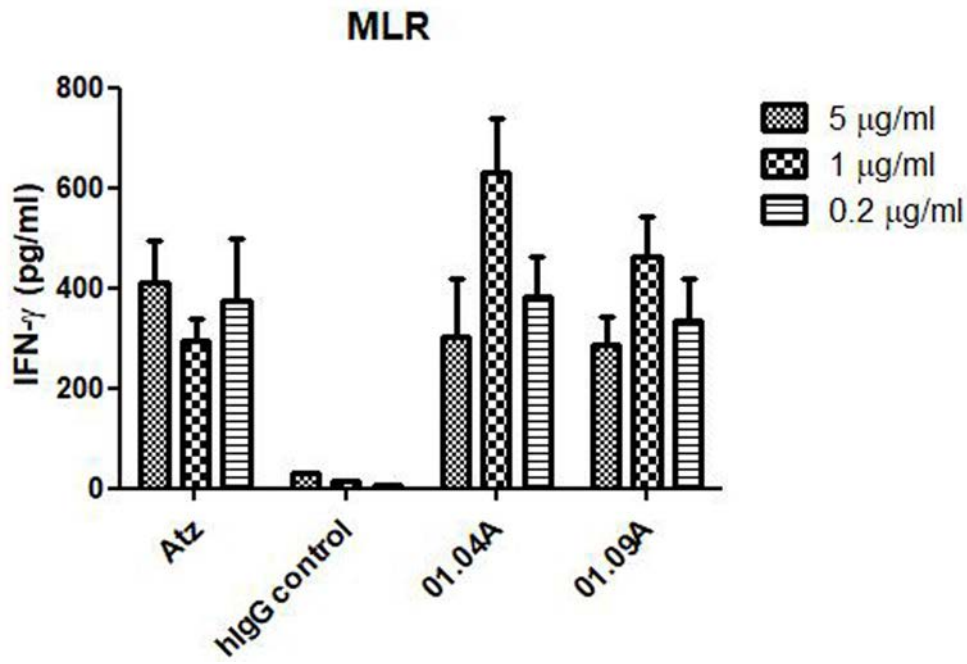


图7

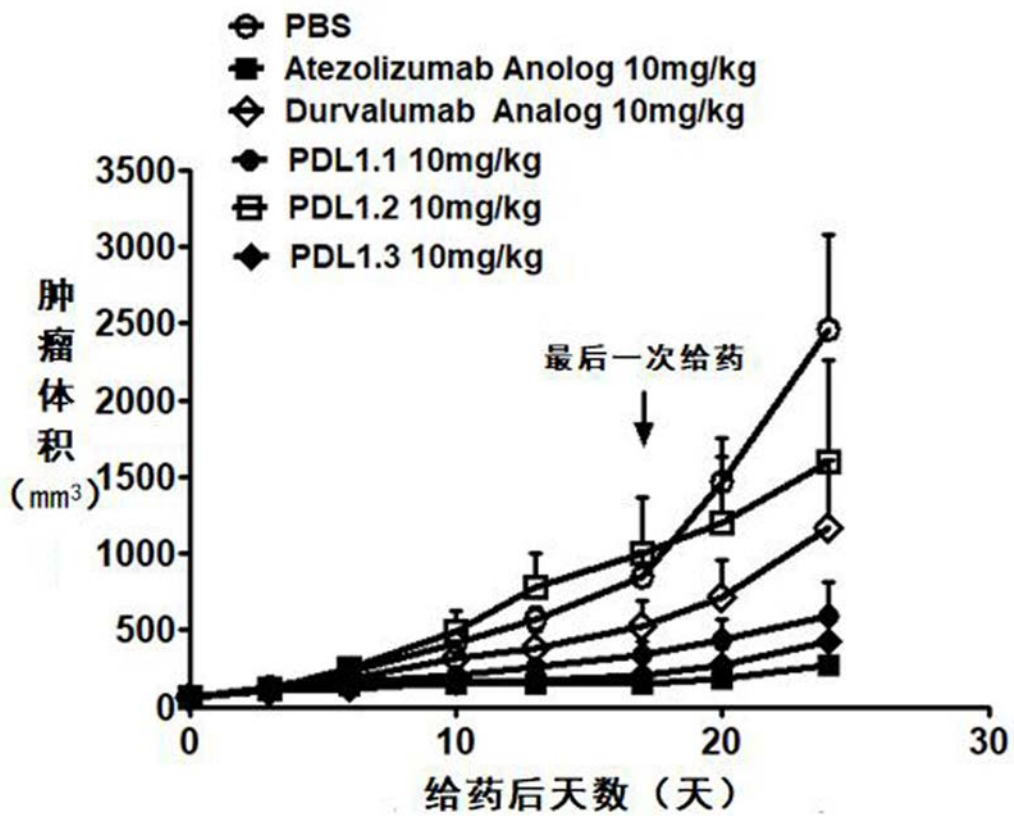


图8

表 1

本发明中抗 PDL1 抗体的序列编号	
SEQ ID NO:	描述
1	01.1A 重链可变区 (DNA)
2	01.1A 轻链可变区 (DNA)
3	01.3A 重链可变区 (DNA)
4	01.3A 轻链可变区 (DNA)
5	01.4A 重链可变区 (DNA)
6	01.4A 轻链可变区 (DNA)
7	01.6A 重链可变区 (DNA)
8	01.6A 轻链可变区 (DNA)
9	01.7A 重链可变区 (DNA)
10	01.7A 轻链可变区 (DNA)
11	01.9A 重链可变区 (DNA)
12	01.9A 轻链可变区 (DNA)
13	01.14A 重链可变区 (DNA)
14	01.14A 轻链可变区 (DNA)
15	01.16A 重链可变区 (DNA)
16	01.16A 轻链可变区 (DNA)
17	01.21A 重链可变区 (DNA)
18	01.21A 轻链可变区 (DNA)
19	01.1A 重链可变区 (AA)
20	01.1A 轻链可变区 (AA)
21	01.3A 重链可变区 (AA)
22	01.3A 轻链可变区 (AA)
23	01.4A 重链可变区 (AA)
24	01.4A 轻链可变区 (AA)
25	01.6A 重链可变区 (AA)
26	01.6A 轻链可变区 (AA)
27	01.7A 重链可变区 (AA)
28	01.7A 轻链可变区 (AA)
29	01.9A 重链可变区 (AA)
30	01.9A 轻链可变区 (AA)

图9-a

31	01.14A 重链可变区 (AA)
32	01.14A 轻链可变区 (AA)
33	01.16A 重链可变区 (AA)
34	01.16A 轻链可变区 (AA)
35	01.21A 重链可变区 (AA)
36	01.21A 轻链可变区 (AA)
37	01.1A 重链 CDR1 (AA)
38	01.1A 重链 CDR2 (AA)
39	01.1A 重链 CDR3 (AA)
40	01.1A 轻链 CDR1 (AA)
41	01.1A 轻链 CDR2 (AA)
42	01.1A 轻链 CDR3 (AA)
43	01.3A 重链 CDR1 (AA)
44	01.3A 重链 CDR2 (AA)
45	01.3A 重链 CDR3 (AA)
46	01.3A 轻链 CDR1 (AA)
47	01.3A 轻链 CDR2 (AA)
48	01.3A 轻链 CDR3 (AA)
49	01.4A 重链 CDR1 (AA)
50	01.4A 重链 CDR2 (AA)
51	01.4A 重链 CDR3 (AA)
52	01.4A 轻链 CDR1 (AA)
53	01.4A 轻链 CDR2 (AA)
54	01.4A 轻链 CDR3 (AA)
55	01.6A 重链 CDR1 (AA)
56	01.6A 重链 CDR2 (AA)
57	01.6A 重链 CDR3 (AA)
58	01.6A 轻链 CDR1 (AA)
59	01.6A 轻链 CDR2 (AA)
60	01.6A 轻链 CDR3 (AA)

图9-b

61 [□]	01.7A 重链 CDR1 (AA) [□]
62 [□]	01.7A 重链 CDR2 (AA) [□]
63 [□]	01.7A 重链 CDR3 (AA) [□]
64 [□]	01.7A 轻链 CDR1 (AA) [□]
65 [□]	01.7A 轻链 CDR2 (AA) [□]
66 [□]	01.7A 轻链 CDR3 (AA) [□]
67 [□]	01.9A 重链 CDR1 (AA) [□]
68 [□]	01.9A 重链 CDR2 (AA) [□]
69 [□]	01.9A 重链 CDR3 (AA) [□]
70 [□]	01.9A 轻链 CDR1 (AA) [□]
71 [□]	01.9A 轻链 CDR2 (AA) [□]
72 [□]	01.9A 轻链 CDR3 (AA) [□]
73 [□]	01.14A 重链 CDR1 (AA) [□]
74 [□]	01.14A 重链 CDR2 (AA) [□]
75 [□]	01.14A 重链 CDR3 (AA) [□]
76 [□]	01.14A 轻链 CDR1 (AA) [□]
77 [□]	01.14A 轻链 CDR2 (AA) [□]
78 [□]	01.14A 轻链 CDR3 (AA) [□]
79 [□]	01.16A 重链 CDR1 (AA) [□]
80 [□]	01.16A 重链 CDR2 (AA) [□]
81 [□]	01.16A 重链 CDR3 (AA) [□]
82 [□]	01.16A 轻链 CDR1 (AA) [□]
83 [□]	01.16A 轻链 CDR2 (AA) [□]
84 [□]	01.16A 轻链 CDR3 (AA) [□]
85 [□]	01.21A 重链 CDR1 (AA) [□]
86 [□]	01.21A 重链 CDR2 (AA) [□]
87 [□]	01.21A 重链 CDR3 (AA) [□]
88 [□]	01.21A 轻链 CDR1 (AA) [□]
89 [□]	01.21A 轻链 CDR2 (AA) [□]
90 [□]	01.21A 轻链 CDR3 (AA) [□]

图9-c

表 II

动力学分析 (ForteBio)			
抗体 ID	k_{assoc} (1/Ms)	k_{dissoc} (1/s)	K_D (M)
01.1A	2.82E+05	1.62E-05	5.74E-11
01.3A	1.71E+05	6.65E-05	3.89E-10
01.4A	8.72E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
01.6A	1.18E+06	<1.0E-07	<1.0E-12
01.7A	1.49E+06	6.27E-05	4.20E-11
01.9A	8.95E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
01.14A	1.55E+06	6.39E-05	4.12E-11
01.16A	1.03E+06	6.48E-06	6.30E-12
01.21A	2.29E+06	<1.0E-07	<1.0E-12

图10

表 III

人鼠 PDL1 嵌合抗体的细胞结合实验	
抗体 ID	FACS EC_{50} (ng/mL) B16-hPDL1
01.1A	437.7
01.3A	
01.4A	110.1
01.6A	86.7
01.7A	90.7
01.9A	141.4
01.14A	71.1
01.16A	103.2
01.21A	62.6

图11

表 IV[□]

人鼠 PDL1 嵌合抗体的配体阻断实验 [□]		
抗体 ID [□]	ELISA IC ₅₀ (ng/mL) [□]	
	hPD1 [□]	hCD80 [□]
01.1A [□]	None [□]	948.1 [□]
01.3A [□]	None [□]	1867 [□]
01.4A [□]	132.7 [□]	855.6 [□]
01.6A [□]	146.7 [□]	817.8 [□]
01.7A [□]	129.7 [□]	796.8 [□]
01.9A [□]	144.6 [□]	771 [□]
01.14A [□]	178.5 [□]	608.5 [□]
01.16A [□]	119.8 [□]	709.9 [□]
01.21A [□]	132.3 [□]	810.4 [□]

图12

表 V[□]

人鼠 PDL1 嵌合抗体的交叉反应 [□]		
抗体 ID [□]	EC ₅₀ (ng/ml) [□]	
	小鼠 (FACS) [□]	食蟹猴 (ELISA) [□]
01.1A [□]	No [□]	89.36 [□]
01.3A [□]	No [□]	1039 [□]
01.4A [□]	No [□]	13.57 [□]
01.6A [□]	No [□]	8.79 [□]
01.7A [□]	No [□]	15.08 [□]
01.9A [□]	No [□]	103.3 [□]
01.14A [□]	No [□]	29.66 [□]
01.16A [□]	No [□]	18.62 [□]
01.21A [□]	No [□]	9.65 [□]

图13