



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109929037 B

(45) 授权公告日 2023.03.17

(21) 申请号 201910258182.5	A61K 47/68 (2017.01)
(22) 申请日 2019.04.01	A61K 35/17 (2015.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A61P 35/00 (2006.01)
申请公布号 CN 109929037 A	A61P 31/00 (2006.01)
(43) 申请公布日 2019.06.25	A61P 37/02 (2006.01)
(73) 专利权人 华博生物医药技术(上海)有限公司	(56) 对比文件
地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)	CN 104749372 A, 2015.07.01
自由贸易试验区蔡伦路538号1幢1楼	CN 108359011 A, 2018.08.03
(72) 发明人 于海佳 俞玲 蔡明清 朱向阳	CN 101248089 A, 2008.08.20
(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266	CN 108752476 A, 2018.11.06
专利代理师 华珊 徐迅	CN 104356236 A, 2015.02.18
(51) Int. Cl.	CN 108341871 A, 2018.07.31
C07K 16/28 (2006.01)	CN 106519034 A, 2017.03.22
C07K 19/00 (2006.01)	US 2015274835 A1, 2015.10.01
G01N 33/68 (2006.01)	US 2018162944 A1, 2018.06.14
G01N 33/577 (2006.01)	李鹰飞等. 针对PD-1和PD-L1通路的肿瘤免疫治疗.《江西医药》.2015,第50卷(第12期),
G01N 33/574 (2006.01)	审查员 白婧
A61K 39/395 (2006.01)	权利要求书2页 说明书25页
	序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

针对程序性死亡配体的结合物及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种针对程序性死亡配体(PD-L1)的结合物及其应用。具体地,本发明提供了一种新的抗PD-L1单克隆抗体。本发明的抗体能够高特异性地结合PD-L1抗原,具有很高的亲和力和生物活性,以及很低的免疫原性,并且用于制备预防或治疗PD-L1相关的疾病的药物。

1. 一种抗PD-L1抗体,其特征在于,所述抗体的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

SEQ ID NO.: 3所示的CDR1,

SEQ ID NO.: 4所示的CDR2,和

SEQ ID NO.: 5所示的CDR3;

并且,所述抗体的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

SEQ ID NO.: 6所示的CDR1',

氨基酸序列为GIS的CDR2',和

SEQ ID NO.: 7所示的CDR3'。

2. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体选自:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合。

3. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.: 1所示;和

所述抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.: 2所示。

4. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.: 8所示;和

所述抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.: 9所示。

5. 一种重组蛋白,其特征在于,所述的重组蛋白具有:

(i) 如权利要求1所述的抗体;以及

(ii) 协助表达和/或纯化的标签序列。

6. 一种CAR构建物,其特征在于,所述的CAR构建物的抗原结合区域包括特异性结合于PD-L1的scFv,并且所述scFv具有如权利要求1所述抗体的重链可变区和轻链可变区。

7. 一种重组的免疫细胞,其特征在于,所述的免疫细胞表达外源的如权利要求6所述的CAR构建物。

8. 一种抗体药物偶联物,其特征在于,所述的抗体药物偶联物含有:

(a) 抗体部分,所述抗体部分为如权利要求1所述的抗体;和

(b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分,所述偶联部分选自下组:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

9. 一种活性成分的用途,所述活性成分选自下组:如权利要求1所述的抗体、如权利要求5所述的重组蛋白、或其组合,其特征在于,所述活性成分用于

(a) 制备检测试剂或试剂盒;

和/或

(b) 制备治疗高表达PD-L1的癌症或肿瘤的药物或制剂。

10. 一种药物组合物,其特征在于,所述的药物组合物含有:

(i) 活性成分,所述活性成分选自下组:如权利要求1所述的抗体、如权利要求5所述的重组蛋白、如权利要求7所述的免疫细胞、如权利要求8所述的抗体药物偶联物、或其组合;以及

(ii) 药学上可接受的载体。

11. 如权利要求10所述的药物组合物,其特征在于,所述的药物组合物用于增强免疫。

12. 如权利要求11所述的药物组合物,其特征在于,所述增强免疫是指刺激免疫细胞的活化、增殖、分泌细胞因子。

13. 一种检测板,其特征在于,所述的检测板包括:基片和测试条,所述的测试条含有如权利要求1所述的抗体或如权利要求8所述的抗体药物偶联物。

## 针对程序性死亡配体的结合物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,具体地涉及针对程序性死亡配体(PD-L1)的结合物及其应用。

### 背景技术

[0002] 程序性死亡1(PD-1)是CD28受体家族的成员,该家族包括CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1和BTLA。该家族的最初成员CD28和ICOS通过添加单克隆抗体后增强T细胞增殖的功能而发现(Hutloff等(1999),*Nature* 397:263-266;Hansen等(1980),*Immunogenetics*10:247-260)。已经鉴定了PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体PD-L1和PD-L2,已经表明它们在与PD-1结合后下调T细胞活化和细胞因子分泌(Freeman等(2000),*J Exp Med*192:1027-34;Latchman等(2001),*Nat Immunol* 2:261-8;Cater等(2002),*Eur J Immunol*32:634-43;Ohigashi等(2000),*Cl in Cancer Res* 11:2947-53)。PD-L1(B7-H1)和PD-L2(B7-DC)都是可与PD-1结合但是不与其他CD28家族成员结合的B7同源物(Blank等2004)。

[0003] PD-L1的表达已经在几种人类癌症中发现,包括人肺癌、卵巢癌、结肠癌、黑色素瘤和各种骨髓瘤(Iwai等(2002),*PNAS* 99:12293-7;Ohigashi等(2000,*Cl in Cancer Res* 11:2947-53)。已有的结果显示,肿瘤细胞高表达的PD-L1通过增加T细胞的凋亡从而在肿瘤的免疫逃逸中起着重要的作用。研究者发现,转染PD-L1基因的P815肿瘤细胞系在体外可抵制特异性CTL的裂解,将其接种小鼠体内后具有更强的致瘤性和侵袭性。这些生物学特性均可通过阻断PD-L1而逆转。敲除PD-1基因的小鼠,阻断PD-L1/PD-1通路,则接种肿瘤细胞不能形成肿瘤(Dong等(2002),*Nat Med* 8:793-800)。也已经提示PD-L1可能与肠粘膜炎症有关,并且PD-L1的抑制防止了与结肠炎有关的萎缩病(Kanai等(2003),*J Immunol* 171:4156-63)。PD-1是首先在激活的T细胞和B细胞上表达的免疫抑制性受体。该受体与其配体的相互作用在体外和体内一直显示减弱的T细胞应答。阻断PD-1与其配体之一PD-L1间的相互作用显示提高肿瘤特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的免疫性,因此,可有助于免疫系统清除肿瘤细胞。

[0004] PD-1/PD-L1途径是开发癌症治疗的抗体疗法的被充分证实的靶标。抗PD-1抗体还可用于慢性病毒性感染。在急性病毒性感染后产生的记忆CD8<sup>+</sup>T细胞具有很高功能,并构成保护性免疫的重要组分。与此相反,慢性感染的特征常常在于病毒特异性T细胞应答的不同程度的功能受损(衰竭),这种缺陷是宿主不能消除持续的病原体的主要原因。

[0005] 尽管在感染的早期阶段最初产生功能效应T细胞,但它们在慢性感染期间逐渐失去功能。Barber等(Barber等,*Nature* 439:682-687(2006))显示,用LCMV实验室毒株感染的小鼠发展为导致血液和其它组织均有高水平病毒的慢性感染。这些小鼠最初会产生较强的T细胞应答,但随着T细胞衰竭而最终受到感染。作者发现在慢性感染小鼠中的效应T细胞的数量和功能下降可通过注射阻断PD-1和PD-L1之间相互作用的抗体来逆转。

[0006] 最近,有研究显示PD-1在来自HIV感染的个体的T细胞中高度表达,并且受体表达与T细胞功能损伤和疾病进展相关(D町等,*Nature*443:350-4(2006);Trautmann L.等,*Nat.Med.*12:1198-202(2006))。在两项研究中,对配体PD-L1的阻断都显著增加了HIV特异

性产IFN  $\gamma$  细胞的体外增殖。

[0007] 总之,本领域仍需要能够与PD-L1高亲和力结合,并且能够阻断PD-1与PD-L1结合的抗PD-L1抗体。

### 发明内容

[0008] 本发明目的是提供一种高亲和力高生物活性的PD-L1抗体及其应用,能够与PD-L1高亲和力结合,并且能够阻断PD-1与PD-L1结合。

[0009] 本发明另一目的是提供一种程序性死亡配体1 (PD-L1) 结合分子及其用途,特别是在治疗 and/或预防、或诊断PD-L1相关疾病例如肿瘤中的用途。

[0010] 本发明的第一方面,提供了一种抗体的重链可变区,所述的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

[0011] SEQ ID NO.:3所示的CDR1,

[0012] SEQ ID NO.:4所示的CDR2,和

[0013] SEQ ID NO.:5所示的CDR3。

[0014] 在另一优选例中,上述氨基酸序列中任何一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)氨基酸并能够保留PD-L1结合亲和力的衍生序列。

[0015] 在另一优选例中,所述重链可变区还包括人源的FR区或鼠源的FR区。

[0016] 在另一优选例中,所述重链可变区具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。

[0017] 在另一优选例中,所述重链可变区具有SEQ ID NO.:8所示的氨基酸序列。

[0018] 本发明的第二方面,提供了一种抗体的重链,所述的重链具有如本发明第一方面所述的重链可变区。

[0019] 在另一优选例中,所述的抗体的重链还包括重链恒定区。

[0020] 在另一优选例中,所述的重链恒定区为人源、鼠源或兔源的。

[0021] 本发明的第三方面,提供了一种抗体的轻链可变区,所述的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

[0022] SEQ ID NO.:6所示的CDR1',

[0023] 氨基酸序列为GIS的CDR2',和

[0024] SEQ ID NO.:7所示的CDR3'。

[0025] 在另一优选例中,上述氨基酸序列中任何一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)氨基酸并能够保留PD-L1结合亲和力的衍生序列。

[0026] 在另一优选例中,所述轻链可变区还包括人源的FR区或鼠源的FR区。

[0027] 在另一优选例中,所述轻链可变区具有SEQ ID NO.:2所示的氨基酸序列。

[0028] 在另一优选例中,所述轻链可变区具有SEQ ID NO.:9所示的氨基酸序列。

[0029] 本发明的第四方面,提供了一种抗体的轻链,所述的轻链具有如本发明第三方面所述的轻链可变区。

[0030] 在另一优选例中,所述的抗体的轻链还包括轻链恒定区。

[0031] 在另一优选例中,所述的轻链恒定区为人源、鼠源或兔源的。

[0032] 本发明的第五方面,提供了一种抗体,所述抗体具有:

[0033] (1) 如本发明第一方面所述的重链可变区;和/或

[0034] (2) 如本发明第三方面所述的轻链可变区;

[0035] 或者,所述抗体具有:如本发明第二方面所述的重链;和/或如本发明第四方面所述的轻链。

[0036] 在另一优选例中,所述抗体对人PD-L1蛋白(优选野生型)的亲合力的 $EC_{50}$ 为30-80ng/ml。

[0037] 在另一优选例中,所述抗体对人PD-L1蛋白(优选野生型)的亲合力的 $EC_{50}$ 为40-50ng/ml。

[0038] 在另一优选例中,所述抗体选自:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合。

[0039] 在另一优选例中,所述的抗体为双链抗体、或单链抗体。

[0040] 在另一优选例中,所述的抗体为单克隆抗体。

[0041] 在另一优选例中,所述的抗体是部分或全人源化的单克隆抗体。

[0042] 在另一优选例中,所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.:1或8所示;和/或所述的抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.:2或9所示。

[0043] 在另一优选例中,所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.:1所示;并且所述的抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.:2所示。

[0044] 在另一优选例中,所述抗体的重链可变区序列如SEQ ID NO.:8所示;并且所述的抗体的轻链可变区序列如SEQ ID NO.:9所示。

[0045] 在另一优选例中,所述的抗体为药物偶联物形式。

[0046] 本发明的第六方面,提供了一种重组蛋白,所述的重组蛋白具有:

[0047] (i) 如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或本发明第五方面所述的抗体;以及

[0048] (ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

[0049] 在另一优选例中,所述的标签序列包括6His标签。

[0050] 在另一优选例中,所述的重组蛋白(或多肽)包括融合蛋白。

[0051] 在另一优选例中,所述的重组蛋白为单体、二聚体、或多聚体。

[0052] 本发明的第七方面,提供了一种CAR构建物,所述的CAR构建物的抗原结合区域包括特异性结合于PD-L1的scFv,并且所述scFv具有如本发明第一方面所述的重链可变区和如本发明第三方面所述的轻链可变区。

[0053] 本发明的第八方面,提供了一种重组的免疫细胞,所述的免疫细胞表达外源的如本发明第七方面所述的CAR构建物。

[0054] 在另一优选例中,所述的免疫细胞选自下组:NK细胞、T细胞、NKT细胞、或其组合。

[0055] 在另一优选例中,所述的免疫细胞来自人或非人哺乳动物(如鼠)。

[0056] 本发明的第九方面,提供了一种抗体药物偶联物,所述的抗体药物偶联物含有:

[0057] (a) 抗体部分,所述抗体部分选自下组:如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或本发明第五方面所述的抗体、或其组合;和

[0058] (b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分,所述偶联部分选自下组:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

[0059] 在另一优选例中,所述的抗体部分与所述的偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

[0060] 在另一优选例中,所述偶联物部分选自:荧光或发标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2等)、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶(例如,DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))、化疗剂(例如,顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

[0061] 本发明的第十方面,提供了一种活性成分的用途,所述活性成分选自下组:如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或本发明第五方面所述的抗体、如本发明第六方面所述的重组蛋白、如本发明第八方面所述的免疫细胞、如本发明第九方面所述的抗体药物偶联物、或其组合,所述活性成分用于

[0062] (a) 制备检测试剂或试剂盒;

[0063] (b) 制备预防和/或治疗PD-L1相关疾病的药物或制剂;和/或

[0064] (c) 制备预防和/或治疗癌症或肿瘤的药物或制剂。

[0065] 在另一优选例中,所述PD-L1相关疾病选自下组:肿瘤、炎症反应性疾病、或其组合。

[0066] 在另一优选例中,所述药物或制剂为PD-L1抑制剂。

[0067] 在另一优选例中,所述肿瘤选自下组:血液肿瘤、实体瘤、或其组合。

[0068] 在另一优选例中,所述肿瘤选自下组:卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤(例如转移的恶性黑色素瘤)、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤和骨肉瘤。可以用本发明的方法治疗的其他癌症的例子包括:骨癌、膜腺癌、皮肤癌、前列腺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、月工区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、何杰金病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病,包括急性髓细胞样白血病、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(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波因肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症,包括石棉诱发的癌症,以及所述癌症的组合。

[0069] 在另一优选例中,所述肿瘤为高表达PD-L1的肿瘤。

[0070] 在另一优选例中,所述药物或制剂用于制备预防和/或治疗与PD-L1(表达阳性的)相关的疾病的药物或制剂。

[0071] 在另一优选例中,所述的抗体为药物偶联物(ADC)形式。

[0072] 在另一优选例中,所述的检测试剂或试剂盒用于诊断PD-L1相关疾病。

[0073] 在另一优选例中,所述检测试剂或试剂盒用于检测样品中PD-L1蛋白。

[0074] 在另一优选例中,所述的检测试剂为检测片。

[0075] 本发明的第十一方面,提供了一种药物组合物,所述的药物组合物含有:

[0076] (i) 活性成分,所述活性成分选自下组:如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或本发明第五方面所述的抗体、如本发明第六方面所述的重组蛋白、如本发明第八方面所述的免疫细胞、如本发明第九方面所述的抗体药物偶联物、或其组合;以及

[0077] (ii) 药学上可接受的载体。

[0078] 在另一优选例中,所述的药物组合物为液态制剂。

[0079] 在另一优选例中,所述的药物组合物为注射剂。

[0080] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于抑制PD-L1,优选地下调或阻断PD-L1的免疫抑制作用。

[0081] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于增强免疫,优选地刺激免疫细胞(如T细胞)的活化、增殖、分泌细胞因子。

[0082] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于提高对肿瘤的免疫反应,优选地增强免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。

[0083] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于治疗肿瘤。

[0084] 在另一优选例中,所述肿瘤为高表达PD-L1的肿瘤。

[0085] 在另一优选例中,所述药物组合物中还含有额外的抗肿瘤剂。

[0086] 在另一优选例中,所述药物组合物为单元剂型。

[0087] 在另一优选例中,所述抗肿瘤剂包含紫杉醇、多柔比星、环磷酰胺、阿西替尼、乐伐替尼、或派姆单抗。

[0088] 在另一优选例中,所述的抗肿瘤剂可以与所述抗体单独存在于独立N:\2019年\2019-0295-华博\Other的包装内,或所述抗肿瘤剂可以与所述抗体偶联。

[0089] 在另一优选例中,所述药物组合物的剂型包括胃肠给药剂型或胃肠外给药剂型。

[0090] 在另一优选例中,所述的胃肠外给药剂型包括静脉注射、静脉滴注、皮下注射、局部注射、肌肉注射、瘤内注射、腹腔内注射、颅内注射、或腔内注射。

[0091] 本发明的第十二方面,提供了一种多核苷酸,所述的多核苷酸编码选自下组的多肽:

[0092] (1) 如本发明第一方面所述的重链可变区、如本发明第二方面所述的重链、如本发明第三方面所述的轻链可变区、如本发明第四方面所述的轻链、或本发明第五方面所述的抗体;或

[0093] (2) 如本发明第六方面所述的重组蛋白;

[0094] (3) 如本发明第七方面所述的CAR构建物。

[0095] 本发明的第十三方面,提供了一种载体,所述的载体含有如本发明第十二方面所述的多核苷酸。

[0096] 在另一优选例中,所述的载体包括:细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

[0097] 本发明的第十四方面,提供了一种遗传工程化的宿主细胞,所述的宿主细胞含有如本发明第十三方面所述的载体或基因组中整合有如本发明第十二方面所述的多核苷酸。

[0098] 本发明的第十五方面,提供了一种体外检测(包括诊断性或非诊断性)样品中PD-

L1蛋白的方法,所述方法包括步骤:

[0099] (1) 在体外,将所述样品与如本发明第五方面所述的抗体接触;和

[0100] (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在PD-L1蛋白。

[0101] 本发明的第十六方面,提供了一种检测板,所述的检测板包括:基片(支撑板)和测试条,所述的测试条含有如本发明第五方面所述的抗体或如本发明第九方面所述的免疫偶联物。

[0102] 本发明的第十七方面,提供了一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中包括:

[0103] (1) 第一容器,所述第一容器中含有如本发明第五方面所述的抗体;和/或

[0104] (2) 第二容器,所述第二容器中含有抗如本发明第五方面所述的抗体的二抗;

[0105] 或者,所述试剂盒含有如本发明第十六方面所述的检测板。

[0106] 本发明的第十八方面,提供了一种重组多肽的制备方法,其特征在于,所述方法包括:

[0107] (a) 在适合表达的条件下,培养如本发明第十四方面所述的宿主细胞;和

[0108] (b) 从培养物中分离出重组多肽,所述的重组多肽是如本发明第五方面所述的抗体或如本发明第六方面所述的重组蛋白。

[0109] 本发明的第十九方面,提供了一种PD-L1相关疾病的方法,其特征在于,所述方法包括:给需要的对象施用如本发明第五方面所述的抗体、所述抗体的抗体-药物偶联物、或表达所述抗体的CAR-T细胞、或其组合。

[0110] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 附图说明

[0111] 图1显示了PD-L1抗体对PBMC的激活作用。

[0112] 图2显示了PD-L1抗体对MLR体系中CD4+T细胞的激活作用,上层细胞培养液中IL-2的分泌量。

[0113] 图3显示了PD-L1抗体对MLR体系中CD4+T细胞的激活作用,上层细胞培养液中IFN- $\gamma$ 的分泌量。

## 具体实施方式

[0114] 本发明人通过广泛而深入的研究,经过大量筛选,意外地获得一种具有极其优异的亲和力和特异性的抗PD-L1单克隆抗体,基于该抗体而获得的人源化抗体。本发明抗体能够高特异性地结合PD-L1抗原,其具有很高的亲和力和生物活性,并且显著抑制癌性肿瘤(尤其是PD-L1高表达的肿瘤)的生长,而对于哺乳动物本身没有可见的毒副作用。在此基础上完成了本发明。

[0115] 术语

[0116] 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。

[0117] 本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

[0118] 如本文所用,术语“给予”和“处理”是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物应用于动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体。“给予”和“处理”可以指治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触、以及试剂与流体的接触、流体与细胞的接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理。“处理”当应用于人、动物或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断;包括抗人PD-L1抗体与人或动物、受试者、细胞、组织、生理区室或生理流体的接触。如本文所用,术语“治疗”指给予患者内用或外用治疗剂,包含本发明的任何一种抗人PD-L1抗体及其组合物,所述患者具有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,以有效缓解一种或多种疾病症状的治疗剂的量(治疗有效量)给予患者。

[0119] 如本文所用,术语“任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或情况可以发生但不是必须发生。例如,“任选包含1-3个抗体重链可变区”是指特定序列的抗体重链可变区可以有但不是必须有,可以是1个、2个或3个。

[0120] 本发明所述的“序列同一性”表示当具有适当的替换、插入或缺失等突变的情况下最佳比对和比较时,两个核酸或两个氨基酸序列之间的同一性程度。本发明中所述的序列和其具有同一性的序列之间的序列同一性可以至少为85%、90%或95%,优选至少为95%。非限制性实施例包括85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,100%。

[0121] 本文所述的“结合物”是指能够与靶点结合的可溶性受体或其片段或其类似物,或抗体或其片段或其类似物。本发明所述的“PD-L1结合物”,是指能特异性识PD-L1并与PD-L1结合的抗体或其片段或其类似物。

[0122] 术语“PD-L1”一般是指天然的或重组的人PD-L1,以及人PD-L1的非人同源物。

[0123] PD-L1

[0124] 程序性死亡1(PD-1)是CD28受体家族的成员,该家族包括CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1和BTLA。该家族的最初成员CD28和ICOS通过添加单克隆抗体后增强T细胞增殖的功能而发现(Hutloff等(1999),Nature 397:263-266;Hansen等(1980),Immunogenics10:247-260)。已经鉴定了PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体PD-L1和PD-L2,已经表明它们在与PD-1结合后下调T细胞活化和细胞因子分泌(Freeman等(2000),J Exp Med192:1027-34;Latchman等(2001),Nat Immunol 2:261-8;Cater等(2002),Eur J Immunol32:634-43;Ohigashi等(2000),Cl in Cancer Res 11:2947-53)。PD-L1(B7-H1)和PD-L2(B7-DC)都是可与PD-1结合但是不与其他CD28家族成员结合的B7同源物(Blank等2004)。

[0125] PD-L1的表达已经在几种人类癌症中发现,包括人肺癌、卵巢癌、结肠癌、黑色素瘤和各种骨髓瘤(Iwai等(2002),PNAS 99:12293-7;Ohigashi等(2000),Cl in Cancer Res 11:2947-53)。已有的结果显示,肿瘤细胞高表达的PD-L1通过增加T细胞的凋亡从而在肿瘤的免疫逃逸中起着重要的作用。研究者发现,转染PD-L1基因的P815肿瘤细胞系在体外可抵制特异性CTL的裂解,将其接种小鼠体内后具有更强的致瘤性和侵袭性。这些生物学特性均

可通过阻断PD-L1而逆转。敲除PD-1基因的小鼠,阻断PD-L1/PD-1通路,则接种肿瘤细胞不能形成肿瘤(Dong等(2002),*Nat Med* 8:793-800)。也已经提示PD-L1可能与肠粘膜炎症有关,并且PD-L1的抑制防止了与结肠炎有关的萎缩病(Kanai等(2003),*J Immunol* 171:4156-63)。PD-1是首先在激活的T细胞和B细胞上表达的免疫抑制性受体。该受体与其配体的相互作用在体外和体内一直显示减弱的T细胞应答。阻断PD-1与其配体之一PD-L1间的相互作用显示提高肿瘤特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的免疫性,因此,可有助于免疫系统清除肿瘤细胞。

[0126] PD-1/PD-L1途径是开发癌症治疗的抗体疗法的被充分证实的靶标。抗PD-1抗体还可用于慢性病毒性感染。在急性病毒性感染后产生的记忆CD8<sup>+</sup>T细胞具有很高功能,并构成保护性免疫的重要组分。与此相反,慢性感染的特征常常在于病毒特异性T细胞应答的不同程度的功能受损(衰竭),这种缺陷是宿主不能消除持续的病原体的主要原因。

[0127] 尽管在感染的早期阶段最初产生功能效应T细胞,但它们在慢性感染期间逐渐失去功能。Barber等(Barber等,*Nature* 439:682-687(2006))显示,用LCMV实验室毒株感染的小鼠发展为导致血液和其它组织均有高水平病毒的慢性感染。这些小鼠最初会产生较强的T细胞应答,但随着T细胞衰竭而最终受到感染。作者发现在慢性感染小鼠中的效应T细胞的数量和功能下降可通过注射阻断PD-1和PD-L1之间相互作用的抗体来逆转。

[0128] 最近,有研究显示PD-1在来自HIV感染的个体的T细胞中高度表达,并且受体表达与T细胞功能损伤和疾病进展相关(D町等,*Nature*443:350-4(2006);Trautmann L.等,*Nat. Med.*12:1198-202(2006))。在两项研究中,对配体PD-L1的阻断都显著增加了HIV特异性产IFN  $\gamma$  细胞的体外增殖。

[0129] 抗体

[0130] 如本文所用,术语“抗体”指免疫球蛋白,是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,故其抗原性也不同。据此,可将免疫球蛋白分为五类,或称为免疫球蛋白的同种型,即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE,其相应的重链分别为 $\mu$ 链、 $\delta$ 链、 $\gamma$ 链、 $\alpha$ 链、和 $\epsilon$ 链。同一类Ig根据其较链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别,又可分为不同的亚类,如IgG可分为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链根据恒定区的不同分为 $\kappa$ 链或 $\lambda$ 链。五类Ig中每类Ig都可以有 $\kappa$ 链或 $\lambda$ 链。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。本发明所述的抗体轻链可进一步包含轻链恒定区,所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体。

[0131] 在本发明中,本发明所述的抗体重链可进一步包含重链恒定区,所述的重链恒定区包含人源或鼠源的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大,为可变区(Fv区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR区和4个FR区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3和FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1、LCDR2和LCDR3;重链的3个CDR区指HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0132] 本发明的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,优选人源化抗体。术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的抗人PD-L1的单克隆抗体。制备时用PD-L1抗原注射试验对象,然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本发明

一个优选的实施方案中,所述的鼠源PD-L1抗体或其抗原结合片段,可进一步包含鼠源 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体的轻链恒定区,或进一步包含鼠源IgG1、IgG2、IgG3或其变体的重链恒定区。

[0133] 术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体,可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。嵌合抗体是由鼠源性抗体的V区基因与人抗体的C区基因拼接为嵌合基因,然后插入载体,转染骨髓瘤组织表达的抗体分子。既保留了亲本鼠抗体的高特异性和亲和力,又使其人源Fc段能有效介导生物学效应功能。

[0134] 术语“人源化抗体(humanized antibody)”,也称为CDR移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将鼠的CDR序列移植到人的抗体可变区框架,即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。人源化抗体是本发明鼠抗的一种可变区改造形式,具有源自(或基本上源自)非人类抗体(优选小鼠单克隆抗体)的CDR区,和基本源自人源抗体序列的FR区和恒定区;即将鼠抗的CDR区序列嫁接到不同类型的人种系抗体构架序列上。因为CDR序列负责大部分的抗体-抗原相互作用,所以可以通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在的抗体性质的重组抗体。人源化抗体可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分,从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考文献获得。为避免免疫原性下降的同时,引起的活性下降,可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变,以保持活性。

[0135] 术语“抗体的抗原结合片段”(或简称“抗体片段”)是指抗体的保持特异性结合抗原(例如,PD-L1)的能力的一个或多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。术语“抗体的抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括

[0136] (i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;

[0137] (ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含通过较链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;

[0138] (iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;

[0139] (iv) 由抗体的单臂的VH和VL结构域组成的Fv片段。

[0140] Fv抗体含有抗体重链可变区、轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般的,Fv抗体还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,且能够形成抗原结合所需的结构。

[0141] 本发明的术语“抗原决定簇”指抗原上不连续的,由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

[0142] 术语“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的6个高变区之一。所述6个CDR的最常用的定义之一由Kabat E.A等人,(1991) Sequences of proteins of immunological interest.NIH Publication91-3242) 提供。

[0143] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位(例如,PD-L1分子上的特定部位)。表位通常以独特的空间构象包括至少3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14或15个连续或非连续的氨基酸。

[0144] 术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常,抗体以大约小于 $10^{-7}$ M,例如大约小于 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M或更小的亲和力(KD)结合。

[0145] 术语“竞争结合”是指与本发明的单克隆抗体识别人PD-L1的胞外区上的相同表位

(也称为抗原决定簇)或相同表位的一部分并与所述抗原结合的抗体。与本发明的单克隆抗体结合相同表位的抗体是指识别并结合于本发明的单克隆抗体所识别的人PD-L1的氨基酸序列的抗体。

[0146] 术语“KD”或“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常,本发明的抗体以小于大约 $10^{-7}$ M,例如小于大约 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M或更小的解离平衡常数(KD)结合PD-L1,由使用表面等离子体共振(SPR)技术在BIAcore仪中测定的。

[0147] 如本文所用,术语“抗原决定簇”指抗原上不连续的,由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

[0148] 本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0149] 在本发明中,抗体包括用本领域技术人员熟知技术所制备的鼠的、嵌合的、人源化的或者全人的抗体。重组抗体,例如嵌合的和人源化的单克隆抗体,包括人的和非人的部分,可以采用本领域熟知的DNA重组技术制备。

[0150] 如本文所用,术语“单克隆抗体”指得自单个细胞来源的克隆分泌的抗体。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原表位。所述的细胞可能是真核的、原核的或噬菌体的克隆细胞株。

[0151] 在本发明中,抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性、或者更多的多重特异性。

[0152] 在本发明中,本发明的抗体还包括其保守性变异体,指与本发明抗体的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0153] 表A

[0154]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro;Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe	Leu
Leu (L)	Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala	Leu

[0155] 人PD-L1特异性抗体

[0156] 本发明提供抗人PD-L1抗体(以下简称PD-L1抗体)。具体地,本发明提供一种针对PD-L1的高特异性和高亲和力的抗体,其包括重链和轻链,所述重链含有重链可变区(VH)氨基酸序列,所述轻链含有轻链可变区(VL)氨基酸序列。

[0157] 优选地,重链可变区(VH)氨基酸序列和轻链可变区(VL)氨基酸序列的各自CDR选自下组:

[0158] a1) SEQ ID NO.:3;

[0159] a2) SEQ ID NO.:4;

[0160] a3) SEQ ID NO.:5;

[0161] a4) SEQ ID NO.:6;

[0162] a5) GIS;

[0163] a6) SEQ ID NO.:7;

[0164] a7) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-5、1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)氨基酸的具有PD-L1结合亲和力的序列。

[0165] 在另一优选例中,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性为至少80%,较佳地至少85%,更佳地至少为90%,最佳地至少95%的氨基酸序列。

[0166] 本发明的抗体可以是双链或单链抗体,并且可以是选自动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,更优选为人源化抗体、人-动物嵌合抗体,更优选为全人源化抗体。

[0167] 本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段,如:Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、或该领域内其他已知的抗体衍生物等,以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗体中的任意一种或几种。

[0168] 其中,所述动物优选为哺乳动物,如鼠。

[0169] 本发明抗体可以是靶向人PD-L1的鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体。

[0170] 在本发明的一种优选实施例中,上述SEQ ID NO.:3、4和5中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有PD-L1结合亲和力的序列,位于重链可变区(VH)的CDR区。

[0171] 在本发明的一种优选实施例中,上述SEQ ID NO.:6、氨基酸序列:GIS和SEQ ID NO.:7中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有PD-L1结合亲和力的序列,位于轻链可变区(VL)的CDR区。

[0172] 在本发明的一种更优选实施例中,VH CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID NO.:3、4和5中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有PD-L1结合亲和力的序列;VL CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID NO.:6、氨基酸序列:GIS和SEQ ID NO.:7中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或

取代至少一个氨基酸的具有PD-L1结合亲和力的序列。

[0173] 本发明上述内容中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%,更优选为不超过35%,更优选为1-33%,更优选为5-30%,更优选为10-25%,更优选为15-20%。

[0174] 在本发明中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量通常是1、2、3、4或5个,较佳地为1-3个,更佳地为1-2个,最佳地为1个。

[0175] 根据本发明的一些实施方式,一种PD-L1抗体,其抗体重链可变区进一步包含鼠源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链FR区。在一些实施方式中,所述的抗体重链可变区序列为:SEQ ID NO:1或8。进一步地,所述PD-L1抗体包含鼠源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒定区。

[0176] 根据本发明的一些实施方式,一种PD-L1抗体,其抗体轻链可变区进一步包含鼠源 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体的轻链FR区。在一些实施方式中,所述的抗体轻链可变区序列为:SEQ ID NO:2或9。进一步地,所述的PD-L1抗体包含鼠源 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体的轻链恒定区。进一步地,所述的PD-L1抗体包含人源 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体的轻链恒定区。

[0177] 在另一优选例中,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.:1或8所示,其中双下划线标注的依次为重链可变区CDR1,CDR2,CDR3的氨基酸序列。

[0178] QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYAFTGTYIHVVVKQRSGLGLEWLGWFYPGSGTLKYNEKFKDKA  
TLTADKSSSTVYLELSRLTSEDSAVYFCARHGTGLMAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO.:1)

[0179] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTGTYIHVVVRQAPGQRLEWVGWFYPGSGTLKYSEKFQGRV  
TITRDKSLSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHGTGLMAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO.:8)

[0180] 在另一优选例中,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.:2或9所示,其中双下划线标注的依次为轻链可变区CDR1',CDR2',CDR3'的氨基酸序列。

[0181] DVVVTQTPLSLPVSPFGDQVSISSCRSSQLANSYGNLYLSWYLHKPGQSPQLLIYGISNRFSGVPDRFS  
GSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO.:2)

[0182] DVVMTQTPLSLSVTPGPASISCKSSQLANSYGNLYLSWYLHKPGQSPQLLIYGISNRFSGVPDRFS  
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO.:9)

[0183] 抗体的制备

[0184] 任何适于产生单克隆抗体的方法都可用于产生本发明的PD-L1抗体。例如,可以用连接或天然存在的PD-L1蛋白或其片段免疫动物。可以使用合适的免疫接种方法,包括佐剂、免疫刺激剂、重复加强免疫接种,可以使用一种或多种途径。

[0185] 任何合适形式的PD-L1都可以作为免疫原(抗原),用于产生对PD-L1特异的非人抗体,筛选所述抗体的生物学活性。免疫原可以单独使用,或与本领域已知的一种或多种免疫原性增强剂组合使用。免疫原可以由天然来源纯化,或者在遗传修饰的细胞中产生。编码免疫原的DNA在来源上可以是基因组或非基因组的(例如cDNA)。可以使用合适的遗传载体表达编码免疫原的DNA,所述载体包括但不限于腺病毒载体、杆状病毒载体、质粒和非病毒载体。

[0186] 生产本发明的PD-L1抗体的示例性方法描述于实施例1。

[0187] 人源化抗体可以选自任何种类的免疫球蛋白,包括IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在本发明中,抗体是IgG抗体,使用IgG1亚型。通过用下文实施例中描述的生物学测定筛选抗体

易于实现必需恒定结构域序列的最优化,以产生所需生物学活性。

[0188] 同样,任一类轻链都可以在本文的化合物和方法中使用。具体地说, $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体在本发明的化合物和方法中是可以用的。

[0189] 人源化本发明PD-L1抗体的示例性方法描述于实施例2。

[0190] 本发明提供了本发明所述PD-L1结合分子、核酸分子、宿主细胞、免疫缀合物及药物组合物在预防和/或治疗与PD-L1相关的疾病中用途和方法。可用本发明的PD-L1结合分子预防和/或治疗的PD-L1相关的疾病如下详述。

[0191] 编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括:只编码成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列;成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0192] 术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸,也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0193] 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%,更佳地至少70%,更佳地至少80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中,“严格条件”是指:(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,如 $0.2 \times \text{SSC}$ , $0.1\% \text{SDS}$ , $60^\circ\text{C}$ ;或(2)杂交时加有变性剂,如50%(v/v)甲酰胺, $0.1\%$ 小牛血清/ $0.1\% \text{Ficoll}$ , $42^\circ\text{C}$ 等;或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在90%以上,更好是95%以上时才发生杂交。并且,可杂交的多核苷酸编码的多肽与SEQ ID NO.:1、SEQ ID NO.:2、SEQ ID NO.:8和/或SEQ ID NO.:9所示的成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

[0194] 本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外,还可将轻链和重链的编码序列和表达标签(如6His)融合在一起,形成融合蛋白。

[0195] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0196] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。

[0197] 术语“核酸分子”是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

[0198] 术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中,载体是“质粒”,其是指可将另外的DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。

[0199] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0200] 术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如植物或动物细胞

(如哺乳动物细胞)。

[0201] 本发明中所述的用重组DNA转化宿主细胞的步骤可用本领域熟知的技术进行。获得的转化子可用常规方法培养,转化子表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,用常规培养基在合适的条件下培养。

[0202] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0203] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0204] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞;真菌细胞如酵母;果蝇S2或Sf9的昆虫细胞;CHO、COS7、293细胞的动物细胞等。

[0205] 用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获,用CaCl<sub>2</sub>法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl<sub>2</sub>。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的DNA转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔,脂质体包装等。

[0206] 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0207] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0208] 所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如,单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。

[0209] 本发明的抗体可以单独使用,也可与可检测标记物(为诊断目的)、治疗剂、PK(蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

[0210] 用于诊断目的的可检测标记物包括但不限于:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

[0211] 可偶联的治疗剂包括但不限于:胰岛素、IL-2、干扰素、降钙素、GHRH肽、肠肽类似物、白蛋白、抗体片段、细胞因子、和激素。

[0212] 此外还可与本发明抗体结合或偶联的治疗剂包括但不限于:1.放射性核素;2.生物毒;3.细胞因子如IL-2等;4.金纳米颗粒/纳米棒;5.病毒颗粒;6.脂质体;7.纳米磁粒;8.前药激活酶;10.化疗剂(例如,顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

[0213] 药物组合物

[0214] 本发明还提供了一种组合物。在优选例中,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白或其ADC或相应的CAR-T细胞,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0215] 本发明所述抗体也可以是由核苷酸序列在细胞内表达用于的细胞治疗,比如,所述抗体用于嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)等。

[0216] 本发明的药物组合物可直接用于结合PD-L1蛋白分子,因而可用于预防和治疗PD-L1相关的疾病。此外,还可同时使用其他治疗剂。

[0217] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0218] 使用药物组合物时,是将安全有效量的药物组合物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约20毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围之内的。

[0219] 检测用途和试剂盒

[0220] 本发明的抗体可用于检测应用,例如用于检测样本,从而提供诊断信息。

[0221] 本发明中,所采用的样本(样品)包括细胞、组织样本和活检标本。本发明使用的术语“活检”应包括本领域技术人员已知的所有种类的活检。因此本发明中使用的活检可以包括例如通过内窥镜方法或器官的穿刺或针刺活检制备的组织样本。

[0222] 本发明中使用的样本包括固定的或保存的细胞或组织样本。

[0223] 本发明还提供了一种指含有本发明的抗体(或其片段)的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。在优选例中,本发明的抗体可以固定于检测板。

[0224] 癌症

[0225] 本发明的PD-L1结合分子对PD-L1的阻断可以增强患者中对癌细胞的免疫应答。PD-L1富含于多种人类癌中(Dong等(2002)Nat Med.8:78 7-9)。PD-1与PD-L1的相互作用导致浸润肿瘤的淋巴细胞减少,T细胞受体介导的增殖减少,以及癌细胞的免疫逃逸。CN 106397592 A说明书16/31页(Dong等(2003)J Mol Med 81:281-7;Konishi等(2004)Clin Cancer Res 10:5094-5100)。抑制PD-L1与PD-1的局部相互作用可以逆转免疫抑制,当PD-L2与PD-1的相互作用也被阻断时,效应是协同的(Iwai等(2002)PNAS 99:12293-7;Brown等(2003)J Immunol 170:1257-66)。本发明的PD-L1结合分子可以单独使用,以抑制癌性肿瘤的生长。或者如以下所述,本发明的PD-L1结合分子可以与其它抗肿瘤治疗手段联合使用,

例如与其他免疫原性剂、标准癌症疗法或其他抗体分子联使用。

[0226] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种预防和/或治疗癌症的方法,包括给该对象施用治疗有效量的本发明的PD-L1结合分子,抑制对象中的肿瘤细胞生长。

[0227] 使用本发明的PD-L1结合分子可以预防和/或治疗的优选的癌症包括一般对免疫治疗有应答的癌症。可治疗的优选癌症的非限制性的例子包括肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤(例如转移的恶性黑色素瘤)、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤和骨肉瘤。可以用本发明的方法治疗的其他癌症的例子包括:骨癌、膜腺癌、皮肤癌、前列腺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、月工区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、何杰金病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病,包括急性髓细胞样白血病、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(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波因肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症,包括石棉诱发的癌症,以及所述癌症的组合。本发明也可用于治疗转移性癌,特别是表PD-L1的转移性癌(Iwai等(2005) *Int Immunol* 17:133-144)。

[0228] 任选地,本发明的PD-L1结合分子可以与免疫原性剂如癌细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、用编码免疫刺激细胞因子的基因转染的细胞联用(He等(2004) *J. Immunol* 173:4919-28)。可以应用的免疫原性剂的非限制性实例包括黑色素瘤抗原的肽,如gp100的肽、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶,或转染后表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞。

[0229] 在人类中,已经表明一些肿瘤是具有免疫原性的,如黑色素瘤。预期通过使用本发明的PD-L1结合分子阻断PD-L1来促进T细胞活化,可以激活宿主中的肿瘤应答。当与肿瘤接种方案联合时,PD-L1阻断剂(如抗PD-L1抗体,例如本发明的PD-L1结合分子)可能最有效。已经设计了针对肿瘤接种的许多实验策略(参见Rosenberg, S, 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring:60-62; Logothetis, C, 2000, *ASCO Educational Book Spring*:300-302; Khayat, D, 2000, *ASCO Educational Book Spring*:414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*:730-738等)。在这些策略之一中,使用自体或异体肿瘤细胞制备疫苗。已经证明,当肿瘤细胞被转导且表达GM-CSF时,这些细胞疫苗最有效。已经表明GM-CSF是用于肿瘤接种的抗原呈递的强激活剂(Dranoff等(1993) *Proc Natl Acad. Sci U.S.A.* 90:3539-43)。

[0230] 各种肿瘤中基因表达和大规模基因表达模式的研究鉴定出许多所谓的肿瘤特异性抗原(Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10:281-7)。在许多情况下,这些肿瘤特异性抗原是在肿瘤和产生肿瘤的细胞中表达的分化抗原,例如gp100、MAGE抗原和Trp-2。更重要的是,证明这些抗原中的许多是在宿主中发现的肿瘤特异性T细胞的靶标。本发明的PD-L1结合分子可以与重组产生的肿瘤特异性蛋白和/或肽组合使用,以产生针对这些蛋白质的免疫应答。这些蛋白质在正常情况下被免疫系统看作自身抗原,因此对其耐受。肿瘤抗原也可以包括蛋白质端粒酶,该酶是染色体的端粒合成所必需的,并且在85%以上的人类癌中表达,而仅在有限数量的自身组织中表达(Kim, N等(1994) *Science* 266:2011-2013)。肿瘤抗原也可

以是癌细胞表达的“新抗原”，例如由于体细胞突变改变蛋白质序列或产生两种无关序列的融合蛋白(例如,Philadelphia染色体中的bcr-abl)。

[0231] 其他肿瘤疫苗可以包括来自与人类癌症有关的病毒的蛋白质,如人类乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV和HCV)和卡波因殖痊肉瘤病毒(KHSV)。可以与PD-L1阻断剂(如抗PD-L1抗体,例如本发明的PD-L1结合分子)联合应用的另外一种形式的肿瘤特异性抗原是从肿瘤组织本身中分离的纯化的热休克蛋白(HSP)。这些热休克蛋白含有来自肿瘤细胞的蛋白质的片段,这些HSP在向抗原呈递细胞递送以引发肿瘤免疫方面非常有效(Suot,R和Srivastava,P(1995)Science 269:1585-1588;Tamura,Y.等(1997)Science 278:117-120)。

[0232] 树突细胞(DC)是强抗原呈递细胞,可以用来引发抗原特异性应答。DC可以在体外产生,并且载有各种蛋白质和肽抗原以及肿瘤细胞提取物(Nestle,F.等(1998)Nature Medicine 4:328-332)。DC也可以通过遗传手段转导,从而也表达这些肿瘤抗原。已经为了免疫而直接将DC融合到肿瘤细胞上(Kugler,A.等(2000)Nature Medicine 6:332-336)。作为接种方法,DC免疫可以与PD-L1阻断剂(如抗PD-L1抗体,例如本发明的PD-L1结合分子)有效地组合,以激活更强的抗肿瘤应答。

[0233] CAR-T,全称是嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy)是另一种有效的恶性肿瘤的细胞治疗方法。嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)是将能识别某种肿瘤抗原的抗体的抗原结合部与CD3- $\zeta$ 链或Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 的胞内部分在体外偶联为一个嵌合蛋白,通过基因转导的方法转染患者的T细胞,使其表达嵌合抗原受体(CAR)。同时,还可以引入共刺激分子信号序列以提高T细胞的细胞毒性、增殖性与存活时间,促进细胞因子的释放。患者的T细胞被“重编码”后,可在体外扩增生成大量肿瘤特异性的CAR-T细胞并回输患者体内,实现肿瘤治疗的目的。PD-L1阻断剂(如抗PD-L1抗体,例如本发明的PD-L1结合分子)可以与CAR-T细胞疗法联合,激活更强的抗肿瘤应答。

[0234] 本发明的PD-L1结合分子也可以与标准癌症治疗组合。本发明的PD-L1结合分子可以与化疗方案有效地组合。在这些例子中,它可以减少施用的化疗剂的剂量(Mokyr,M.等(1998)Cancer Research 58:5301-5304)。这种组合的一个例子是抗PD-L1抗体与氨烯咪胺联用治疗黑素瘤。这种组合的另外一个实例是抗PD-L1抗体与自介素-2(IL-2)联用治疗黑素瘤。本发明的PD-L1结合分子和化学疗法联用的科学原理是细胞死亡,这是大多数化疗化合物的细胞毒性作用的结果,应会导致抗原呈递途径中的肿瘤抗原水平升高。可以通过细胞死亡与PD-L1阻断协同作用的其他联合治疗有放疗、手术和激素剥夺。这些方案都在宿主中产生肿瘤抗原的来源。血管发生抑制剂也可以与本发明的PD-L1结合分子组合。血管发生的抑制导致肿瘤细胞死亡,这可以将肿瘤抗原提供给宿主的抗原呈递途径。

[0235] 本发明的PD-L1结合分子还可以与靶向其它肿瘤特异性抗原的抗体联合使用。所述靶向其它肿瘤特异性抗原的抗体包括但不限于,抗EGFR抗体、抗EGFR变体的抗体、抗VEGF $\alpha$ 抗体、抗HER2抗体、或抗CMET抗体。优选所述抗体是单克隆抗体。

[0236] 本发明的PD-L1结合分子也可以与将Fc $\alpha$ 或Fc $\gamma$ 受体表达效应细胞靶向至肿瘤细胞的双特异性抗原联合应用(参见,例如US Patent Nos.5,922,845和5,837,243)。也可以利用双特异性抗体靶向两种不同的抗原。例如,已经利用抗-Fc受体/抗肿瘤抗原(例如Her-2/neu)双特异性抗体将巨噬细胞靶向肿瘤部位。这种靶向可以更有效地激活肿瘤特异性应答。利用PD-L1阻断剂可以加强这些应答的T细胞方面。或者可以利用结合肿瘤抗原和树突

细胞特异性细胞表面标记的双特异性抗体将抗原直接递送至DC。

[0237] 肿瘤通过多种机制逃避宿主的免疫监视。其中许多机制可以通过灭活肿瘤表达的免疫抑制性蛋白质来克服。尤其包括TGF- $\beta$  (KehrL.等(1986).Exp.Med.163:1037-1050), IL-10 (Howard,M.和Garra,A.(1992) Immunology Today 13:198-200)和Fas配体 (Hahne,M.等(1996) Science 274:1363-1365)。其中每种抗体可以与本发明的PD-L1结合分子联用,来抵抗免疫抑制剂的作用,并且有利于宿主的肿瘤免疫应答。

[0238] 可以用于激活宿主免疫应答的其他抗体可以与本发明的PD-L1结合分子联用。抗-CD40抗体能够有效地替代T细胞辅助活性 (Ridge.等(1998) Nature 393:474-478),并且可以与本发明的PD-L1结合分子联用。也可以为了提高T细胞活化的水平而联合对T细胞共刺激分子如OX-40和ICOS的活化抗体以及阻断阴性共刺激分子如CTLA-4的活性的抗体。

[0239] 骨髓移植当前用来治疗造血来源的多种肿瘤。移植物抗宿主疾病是这种治疗的一种后果,移植物对抗肿瘤的应答可以获得治疗性益处。可以利用PD-L1阻断剂提高肿瘤特异性T细胞的有效性。也有几种实验治疗方案涉及抗原特异性T细胞的离体激活和扩增以及这些细胞向受体内的过继转移,以用抗原特异性T细胞对抗肿瘤。这些方法也可以用来激活T细胞对传染原如CMV的应答。预期在本发明的PD-L1结合分子存在下离体激活可以提高过继转移的T细胞的频率和活性。因此,本发明还提供了一种离体激活免疫细胞(如PBMC或T细胞)的方法,包括使所述免疫细胞与本发明的PD-L1结合分子接触。

[0240] 感染性疾病

[0241] 本发明的其他方法用于治疗暴露于特定毒素或病原体的患者。因此,本发明的另一方面提供一种预防和/或治疗对象中的感染性疾病的方法,包括给该对象施用本发明的PD-L1结合分子,使得所述对象的感染性疾病得到预防和/或治疗。

[0242] 类似于对于如上所述的肿瘤的应用,PD-L1阻断剂可以单独使用,或者作为佐剂与疫苗组合使用来刺激对病原体、毒素和自身抗原的免疫应答。特别可以应用该治疗方法的病原体的实例包括当前没有有效疫苗的病原体,或常规疫苗不完全有效的病原体。其中包括但不限于HIV、肝炎病毒(甲、乙、丙)、流感病毒、痛疹病毒、贾第虫、疟疾、利什曼原虫、金黄色葡萄球菌、绿肤杆菌。PD-L1阻断剂特别可用于对抗诸如HIV等病原体已建立的感染,其在感染过程中呈现改变的抗原。在抗人PD-L1抗体给药时,这些新的表位被作为外源物识别,从而引起不受PD-L1的负信号影响的强T细胞应答。

[0243] 引起可用本发明的方法治疗的感染性疾病的病原体病毒的一些实例包括HIV、肝炎(甲、乙、丙)、痛疹病毒(例如VZV、HSV-L HAV-6,HSV-II和CMV、EB病毒)、腺病毒、流感病毒、虫媒病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、流行性腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV病毒、登革热病毒、军L头毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、]C病毒和虫媒病毒脑炎病毒。

[0244] 引起可用本发明的方法治疗的感染性疾病的病原体细菌的一些实例包括衣原体、立克次氏体菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌和淋球菌、克雷伯氏杆菌、变形菌、富氏菌、假单胞菌、军团杆菌、自喉杆菌、沙门氏菌、芽子包杆菌、霍乱菌、破伤风菌、肉毒杆菌、炭疽杆菌、鼠疫杆菌、钩端螺旋体、和莱姆病细菌。

[0245] 自身免疫反应

[0246] 抗PD-L1抗体可以激起和扩大自身免疫应答。因此,可以考虑利用抗PD-L1抗体联

合多种自身蛋白质来设计接种方案,以有效地产生对抗这些自身蛋白质的免疫应答,用于疾病治疗。

[0247] 慢性炎症性疾病

[0248] 抗PD-L1抗体也可以用来治疗如下疾病,如慢性炎症性疾病,如扁平苔藓、T细胞介导的慢性炎症性皮肤粘膜病。因此,在一个方面,本发明提供一种用T细胞消除慢性炎症性疾病的方法,包括给对象施用本发明的PD-L1结合分子。本发明提供抗PD-L1抗体及其治疗眼中疾病、自身免疫疾病的用途。所述的疾病包括但不限于银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、多发性硬化症,炎性肠病(如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎等)、骨关节炎、类风湿性关节炎(RA)、风湿性关节炎或骨质疏松症、炎症纤维化(例如硬皮病、肺纤维化和硬化)、哮喘(包括变应性哮喘)、变态反应以及癌症。

[0249] 本发明的主要优点

[0250] (a) 本发明抗体具有优异的生物活性和特异性。

[0251] (b) 与鼠源抗体和嵌合抗体相比,本发明人源化抗体在保留与PD-L1相当的亲合力的同时,具有更低的免疫原性。

[0252] (c) 本发明抗体对PD-L1的阻断可以显著增强患者中对癌细胞的免疫应答。

[0253] (d) 本发明抗体与某些非人哺乳动物(如猴)的PD-L1有与人PD-L1相当的亲和力,便于在动物模型中进行测试和进行质控检测。

[0254] (e) 本发明抗体通过解除PD-L1对免疫细胞(如T细胞)活性的抑制,能有效激活抗原特异性的T细胞的活性,显著增强T细胞的抗肿瘤作用,并且对人的IFN- $\gamma$ 和IL-2的分泌刺激更有效,从而提高患者自身对肿瘤的免疫系统反应,达到对肿瘤细胞进行杀伤的目的。

[0255] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0256] 本发明实施例或测试例中未注明具体条件的实验,通常按常规条件进行,或按照原料/商品制造商建议的条件;未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

[0257] 实施例1抗人PD-L1的小鼠单克隆抗体的制备方法

[0258] 制备鼠源单克隆抗体的方法采用Kohler和Milstein 1975年发明的杂交瘤制备技术(Nature, 1975, 256: 495-497)。首先将人PD-L1-His蛋白(Sino Biological, #10084-H08H)与弗氏佐剂乳化,然后对BALB/c、CD1、C57BL/6、SJL每个品系各5只小鼠进行多点皮下免疫。三轮免疫后取血清用ELISA法检测效价,滴度达到预定标准后取脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合。经过HAT筛选杂交瘤多克隆细胞,采用ELISA方法,筛选出特异性结合人PD-L1的多克隆细胞株后进行单克隆化,再次使用ELISA方法筛选特异性结合的单克隆细胞株,并检测了与猴PD-L1结合力,使用ES-2细胞进行FACS筛选,对筛选出的单克隆细胞株进行亲和力(SPR)筛选,最终得到表达人PD-L1抗体的单克隆杂交瘤细胞36C06/D8,筛选数据列举见表1。

[0259] 表1. 杂交瘤筛选数据

克隆编号	多克隆 OD 值(人)	多克隆 OD 值(猴)	单克隆 OD 值(人)	单克隆 OD 值(猴)	单克隆 FACS	单克隆 KD (M)
36C06-D8	1.269	1.077	1.386	0.6685	99697	2.74E-09
2C12-F2	1.845	1.488	1.886	1.131	76175	2.53E-09
3C12-H10	2.325	1.630	2.108	1.938	88596	5.73E-11
[0260] 3F08-G12	1.909	1.151	2.113	1.761	30400.5	4.46E-09
42-C02-F9	2.597	2.509	2.702	2.768	5229.5	6.73E-09
45-G11-E4	2.148	2.667	2.174	2.619	4621.5	4.27E-09
40-H10-B7	2.351	2.655	2.16	2.65	4681.5	7.40E-09
13H11-E7	1.927	1.776	2.428	1.791	79521	3.92E-10
9H05-C4	1.954	1.958	2.087	1.887	34077.5	4.47E-09
[0261] 6G05-D4	1.586	1.987	1.855	1.397	78737	2.40E-09

[0262] 由表1可以看出,经过筛选,在众多杂交瘤中,杂交瘤36C06/D8(或其产生的抗体)与人PD-L1蛋白以及猴PD-L1蛋白均有很高的结合活性,并且在细胞结合水平的亲和力活性最高。

[0263] 实施例2抗PD-L1抗体V-基因序列克隆以及人源化

[0264] 2.1克隆杂交瘤细胞中免疫球蛋白的cDNA序列

[0265] 用基于宝生物5' RACE技术原理,测定编码由杂交瘤36C06/D8表达的小鼠抗体可变区的DNA序列。简言之,用SMART 5' RACE合成试剂盒(TAKARA,#634859)按厂商用法说明制备重链和轻链的基因特异性cDNA。由琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物。重链和轻链二者的可变区扩增予的预期大小约为500个碱基对。将反应所得的条带大小合适的扩增PCR产物克隆到载体pEASY-Blunt Simple vector(北京全式金,#CB111-02)中,并转化到Stellar大肠杆菌感受态细胞(TAKARA,#636763)中。通过用通用的M13正向或反向引物的菌落PCR筛选克隆,从每个反应选择2-3个克隆用于DNA测序分析。用Expasy-translate tool(<http://web.expasy.org/translate/>)分析每个克隆的每个测序反应结果。测序结果显示36C06/D8表达的抗PD-L1抗体V区序列如下:

[0266] 900289-VH SEQ ID NO:1

[0267] QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYAFTGTYIH~~WVKQRSGLGLEWLGWFYPGSGTLKYNEKFKDKAT~~  
LTADKSSSTVYLELSRLTSEDSAVYFCARHGTGTL~~MAMDYWGQGTSTVTVSS~~

[0268] 900289-VL SEQ ID NO:2

[0269] DVVVTQTPLSLPVSFGDQVSI~~SCRSSQSLANSYGNTYLSWYLHKPGQSPQLLIYGISNRFSGVPDRFSG~~  
SGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCLQ~~GTHQPPTFGGGTKLEIK~~

[0270] 其中,下划线区为CDRs(IMG T定义,单列如下):

[0271] 表2.鼠源抗PD-L1抗体CDR序列

	结构域	序列	SEQ ID NO	
[0272]	VH	CDR1	GYAFTGYT	3
		CDR2	FYPGSGTL	4
		CDR3	ARHGTGTLMAMDY	5
	VL	CDR1	QSLANSYGNTY	6
		CDR2	GIS	-
		CDR3	LQGTHQPPT	7

[0273] 2.2构建和表达嵌合900289抗体

[0274] 通过将PCR克隆的小鼠36C06/D8VH和VL区cDNA分别与人IgG1和k恒定区连接,来构建嵌合重链和轻链。用PCR引物修饰小鼠cDNA序列的5'和3'端,所述引物设计成为各链增加合适的前导序列,并增加使得能克隆到现有重组抗体表达载体pHB-Fc上的限制性位点。pHB-Fc质粒载体的制法如下:以pcDNA/HA-FLAG (Accession,#FJ524378)载体为出发质粒,在内切酶EcoRI后面加上了人IgG1或k的恒定区序列,在内切酶HindIII前面加上了人类巨细胞病毒(HCMV)促进子序列(Accession,#X17403),在氨苄青霉素耐受基因后面、HCMV促进子前面加上了中国仓鼠谷氨酰胺合成酶基因(Accession,X03495)。

[0275] 蛋白表达所用的宿主细胞为CHO-S细胞(赛默飞,#R80007)。通过将表达嵌合抗体重轻链载体与聚醚酰亚胺(PEI)混合形成脂质体复合物后,转染CHO-S细胞。放入培养箱中培养3-5天。用间接ELISA测量来自CHO-S转染上清液的抗体浓度。这显示转染的CHO-S细胞分泌约60mg/L的嵌合IgG1-k抗体(后文也称为900289)。

[0276] 2.3鼠源抗人PD-L1抗体的人源化——人源化抗体的制备方法

[0277] 抗体的人源化采用以下方法。将抗体的可变区序列与NCBI蛋白质数据库中的可用序列比较,通过鉴定和分析,最终确定了适合在其上构建CDR移植重链和轻链的人构架区。

[0278] 改造时,根据人抗体FR区保守的氨基酸残基以及抗体FR区中重要的氨基酸残基,设计改造位点,对嵌合抗体的重轻链的可变区分别进行人源化突变设计,利用PCR技术扩增并构建人源化点突变抗体表达质粒。将人源化点突变抗体表达质粒分别经CHO-S细胞表达,纯化后得到人源化抗体蛋白。利用ELISA,受体结合抑制实验,Biacore和细胞活性检测等,获得了一种性能非常优异的人源化PD-L1单克隆抗体(后文也称为900339)。所获得人源化PD-L1抗体的VH和VL序列分别如SEQ ID NO.:8和9所示:

[0279] 900339-VH SEQ ID NO:8

[0280] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTGYTIHWVRQAPGQRLEWMGWFYYPGSGTLKYSEKFQGRVT  
ITRDKSLSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHGTGTLMAMDYWGQGTLLVTVSS

[0281] 900339-VL SEQ ID NO:9

[0282] DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLANSYGNTYLSWYLHKPGQSPQLLIYGISNRFSGVPDRFSG  
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQPPTFGQGTKLEIK

[0283] 实施例3:鉴定嵌合抗体以及人源化抗体的功能

[0284] 3.1测试PD-L1抗体对来自不同物种的PD-L1蛋白的结合特异性(ELISA)

[0285] 3.1.1嵌合抗体900289、人源化抗体900339以及对照huIgG1(900201)与人PD-L1蛋白结合活性测试

[0286] 具体地,将huPD-L1-his蛋白(购自Sino Biological,#10084-H08H)以1ug/ml 50ul/孔加入酶标板,2~8℃包被12小时以上弃去包板残液,加入3%牛奶,每孔200μL,室温封闭1小时。每孔加入不少于200μL的PBST洗1次,将待检测抗体样品稀释至100μg/ml,再5倍稀释11个梯度,100μL/孔加入酶标板。室温孵育1小时后,每孔加不少于200μL的PBST,洗涤4次后加入3%牛奶-PBST稀释25000倍的HRP-conjugated Rabbit Anti-Human IgG Fc Antibody(洛阳佰奥通实验材料中心,#C030222),100μL/孔加样。室温孵育1小时后,每孔加不少于200μL的PBST,洗涤6次,拍干。加入TMB显色液,每孔100μL。室温反应5分钟后加2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,50μL/孔。将中止反应的酶标板置酶标仪上,450nm波长下读取吸光度OD450值。

[0287] 结果(见表3)表明嵌合抗体900289和人源化抗体900339均与人源PD-L1蛋白有很好的结合力。

[0288] 表3. 抗PD-L1抗体对人PD-L1结合活性

	待测抗体	EC <sub>50</sub> (ug/ml)
[0289]	900201	NA
	900289	0.04326
[0290]	900339	0.04851

[0291] 注:NA表示没有结合活性

[0292] 3.1.2嵌合抗体900289、人源化抗体900339以及对照huIgG1与猴或鼠PD-L1蛋白结合活性测试

[0293] 实验方法与测试人PD-L1结合实验相似。将测试例中huPD-L1-his替换成rhPD-L1-his蛋白(Sino Biological,#90251-C08H)或moPD-L1-his蛋白(Sino Biological,#50010-M8H),其他步骤相同。

[0294] 结果(见表4)表明嵌合抗体900289和人源化抗体900339与猴PD-L1蛋白结合,但不与鼠PD-L1蛋白结合或结合力很微弱。

[0295] 表4. 抗PD-L1抗体对猴或鼠PD-L1结合活性

	待测抗体	EC <sub>50</sub> (ug/ml)	
		rhPD-L1	moPD-L1
[0296]	900201	NA	NA
	900289	0.1399	NA
	900339	0.1151	NA

[0297] 注:NA表示没有结合活性

[0298] 3.2嵌合抗体以及人源化抗体对人源PD-L1亲和力测定(Biacore)

[0299] 本试验使用SPR方法测定抗体-抗原结合动力学及亲和力。

[0300] 按照Human Antibody Captrue Kit(GE,#BR-1008-39)以及氨基偶联试剂盒(GE, BR-1000-50)偶联法准备Anti-Human Capture-CM5芯片(GE,#BR-1005-30)。将芯片置室温平衡20~30min,装入Biacore 8K仪器;用平衡缓冲液将B5D1稀释至实验工作浓度;抗原用平衡缓冲液稀释至50nM,再3倍稀释度7个浓度梯度,并设置2个零浓度(即平衡缓冲液)和一

个重复浓度(一般为最低浓度重复);按照抗体,抗原huPD-L1(Sino Biological,#10084-H08H),再生的次序,循环往复对10个抗原浓度(2个零浓度,7个梯度浓度及1个重复浓度)进行实验分析,抗原进样流速30 $\mu$ L/分钟,结合时间120秒,解离时间600秒;分析完成后,选用对应的分析程序分析数据,确认无明显reference binding,选用Kinetics,1:1binding model,拟合数据,获得人鼠嵌合抗体和人源化抗体的动力学相关参数Ka,Kd和KD值(表5)。

[0301] 结果表明人源化抗体900339与嵌合抗体900289均具有很强的亲和力,两者的结合力在同一水平。

[0302] 表5.人鼠嵌合抗体与人重组B7H1亲和力检测结果

[0303]

名称	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
900289	2.33E+05	3.12E-04	1.34E-09
900339	2.33E+05	2.19E-04	9.40E-10

[0304] 3.3测试PD-L1抗体阻断PD-L1抗原和PD-1分子结合的实验(竞争法)

[0305] 将抗原huPD-L1-moFc(800023,华博生物)用含1%BSA的PBS溶液(1%BSA/PBS)稀释至15 $\mu$ g/ml,每孔20 $\mu$ L加入96孔U型板中,与系列稀释的抗PD-L1抗体按体积比1:1混合均匀,室温反应15min,同步设定阴性对照(只加1%BSA/PBS),阳性对照(只加PD-L1-moFc)。取对数生长期表达人PD-1的细胞(3C2-huPD-1-6F4,华博生物)悬液,离心(1000rpm $\times$ 5min)弃培养液,用1%BSA/PBS重悬至活细胞密度为1 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL,每孔20 $\mu$ L(2 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞)加入PD-L1-moFc与抗PD-L1抗体预孵育的96孔U型板中室温反应15min。将反应后的96孔U型板用1%BSA/PBS重悬,离心(300g $\times$ 3min)弃上层液,如此洗涤2遍,加入1:300稀释的Alexa488-羊抗鼠-Fc(Jackson ImmunoResearch,#115-545-071),室温避光反应15min;将反应后的96孔U型板用1%BSA/PBS重悬,离心(300g $\times$ 3min)弃上层液,如此洗涤3遍,最终用每孔100 $\mu$ L 1%BSA/PBS重悬,用流式细胞仪(BD,#Accuri C6)检测第1通道的荧光强度。

[0306] 结果表明(见表6),嵌合抗体900289和人源化抗体900339对人的PD-L1/PD-1均具有显著的阻断作用,且阻断作用力相当。

[0307] 表6.PD-L1抗体的阻断活性

[0308]

待测抗体	huPD-L1-moFc/huPD-1 结合 IC <sub>50</sub> (ng/ml)	huPD-L1-moFc/huB7.1 结合 IC <sub>50</sub> (ng/ml)
900201	NA	NA
900289	1.995	NA
900339	2.424	NA

[0309] 注:NA表示没有阻断活性

[0310] 3.4鉴定嵌合抗体以及人源化抗体非特异性结合实验(SPR)

[0311] 本试验使用SPR方法测定抗体与非靶标分子的非特异吸附效应。

[0312] 将Series S Sensor Chip CM5(GE,#BR-1005-30)芯片置室温平衡20~30min,装入Biacore 8K(GE)仪器。采用氨基偶联试剂盒(GE,#BR-1000-50)将来自鸡蛋的溶菌酶溶液(Sigma,#L3790)和来自大豆的胰蛋白酶抑制剂1-S型(Sigma,#T-2327)分别固定到CM5芯片。进样缓冲液为HBS-EP(1X)(GE,#BR-1006-69),设置4个平衡循环。用平衡缓冲液将多克隆兔抗溶菌酶(ABCam,Ab391),Anti-trypsin inhibitor antibody(LifeSpan

Biosciences, #LS-C76609), 嵌合抗体和人源化抗体稀释至1000nM, 设置流速5 $\mu$ L/min, 进样通道1, 2和3, Flow Cell 1和2。结合时间10min, 解离时间15min。再生流速50 $\mu$ L/min, 先0.85%磷酸溶液(ProteOn, 176-2260)再生60s, 再用50mM氢氧化钠溶液再生30s。

[0313] 结果表明(见表7), 嵌合抗体900289和人源化抗体900339均没有明显的非特异性的静电和疏水结合作用。

[0314] 表7. 抗体与非靶分子非特异吸附检测结果

周期	名称	溶菌酶 (RU)	胰蛋白酶抑 制剂(RU)	去活的羧甲基 葡聚糖(RU)	羧甲基葡聚糖 (RU)	
4	缓冲液	0	-1.9	2.5	0.6	
[0315] 5	抗溶菌酶多 克隆抗体	7477.4	22.7	34.8	20.5	
6	抗胰蛋白酶 抑制剂	23.4	9594	23.9	18.1	
8	900339	9.2	11.5	10.9	9.4	
	10	900289	1.8	0	2.4	-2.5
[0316] 11	抗溶菌酶多 克隆抗体	6735.1	30.3	38.1	25.5	
12	抗胰蛋白酶 抑制剂	41.3	9286	35.9	29	

[0317] 注: 20RU以下相互作用较弱, 可以忽略; 超过20RU即认为有明显的相互作用; 100RU以上则是很强的相互作用。

[0318] 3.5嵌合抗体以及人源化抗体在对PBMC的激活作用

[0319] 在无菌状态下, 将1 $\mu$ g/ml待测试抗体与1 $\mu$ g/ml抗人CD3的抗体(BioLegend, #300314)联合包被在96孔细胞培养板中, 200 $\mu$ L/孔, 2-8 $^{\circ}$ C包被过夜。次日, 弃去包被液, 用PBS洗涤2次后用移液器吸干孔内残余液体。用培养基将PBMC稀释至活细胞密度为5 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL, 每孔200 $\mu$ L (1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞/孔), 加入到预包被的96孔细胞培养板, 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养5天。培养结束后, 离心96孔细胞培养板, 300g $\times$ 10min, 用人IFN- $\gamma$  ELISA MAX<sup>TM</sup>Standard试剂盒(BioLegend, #430101)检测上层细胞培养液中人IFN- $\gamma$ 的分泌量。

[0320] 结果如图1所示, 相较于阴性对照900201, 加入嵌合抗体900289或者人源抗体900339后, 对细胞因子IFN- $\gamma$ 的分泌的刺激更有效。

[0321] 3.6在混合淋巴反应中测定嵌合抗体以及人源化抗体对T细胞的激活作用

[0322] 用EasySep<sup>TM</sup>Human Monocyte Enrichment Kit without CD16Depletion试剂盒(STEMCELL<sup>TM</sup>, #19058)从PBMC中分离单核细胞, 按照ImmunoCult<sup>TM</sup>Dendritic Cell Culture Kit(STEMCELL<sup>TM</sup>, #10985)进行培养, 收获成熟的树突细胞备用。用EasySep<sup>TM</sup>Human CD4+T Cell Enrichment Kit(STEMCELL<sup>TM</sup>, #19052)从另一个体来源的PBMC中分离CD4+T淋巴细胞

备用。用培养基将成熟树突细胞重悬成活细胞密度为 $2 \times 10^5$ /mL的细胞悬液,每孔加50 $\mu$ L ( $1 \times 10^4$ 个细胞/孔)至96孔细胞培养板中;同时用培养基将CD4+T淋巴细胞重悬成活细胞密度为 $2 \times 10^6$ /mL的细胞悬液,每孔加50 $\mu$ L ( $1 \times 10^5$ 个细胞/孔)至含有树突细胞的96孔细胞培养板中充分混合,得到MLR反应体系。在MLR体系中加入终浓度为1 $\mu$ g/ml抗PD-L1的抗体充分混合于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养5天。培养结束后,离心96孔细胞培养板,300g $\times$ 10min,用Human IFN- $\gamma$  ELISA MAX<sup>TM</sup>Standard试剂盒 (BioLegend,#430101) 和Human IL-2ELISA MAX<sup>TM</sup>Standard试剂盒 (BioLegend,#431801) 分别检测上层细胞培养液中人IFN- $\gamma$  和IL-2的分泌量。

[0323] 结果如图2和图3所示,图中900233是作为阳性对照的Roche人源化PD-L1抗体,根据专利US20160319022提供的人源化序列进行克隆,并瞬时转染进行表达。结果表明,相较于阴性对照900201,嵌合抗体900289和人源化抗体900339对人的IFN- $\gamma$  和IL-2的分泌刺激更有效。

[0324] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。



[0039] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0040] 50 55 60  
 [0041] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0042] 65 70 75 80  
 [0043] Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly  
 [0044] 85 90 95  
 [0045] Thr His Gln Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0046] 100 105 110  
 [0047] <210> 3  
 [0048] <211> 8  
 [0049] <212> PRT  
 [0050] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0051] <400> 3  
 [0052] Gly Tyr Ala Phe Thr Gly Tyr Thr  
 [0053] 1 5  
 [0054] <210> 4  
 [0055] <211> 8  
 [0056] <212> PRT  
 [0057] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0058] <400> 4  
 [0059] Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Thr Leu  
 [0060] 1 5  
 [0061] <210> 5  
 [0062] <211> 13  
 [0063] <212> PRT  
 [0064] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0065] <400> 5  
 [0066] Ala Arg His Gly Thr Gly Thr Leu Met Ala Met Asp Tyr  
 [0067] 1 5 10  
 [0068] <210> 6  
 [0069] <211> 11  
 [0070] <212> PRT  
 [0071] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0072] <400> 6  
 [0073] Gln Ser Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr  
 [0074] 1 5 10  
 [0075] <210> 7  
 [0076] <211> 9  
 [0077] <212> PRT

[0078] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0079] <400> 7  
 [0080] Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Pro Thr  
 [0081] 1 5  
 [0082] <210> 8  
 [0083] <211> 120  
 [0084] <212> PRT  
 [0085] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
 [0086] <400> 8  
 [0087] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0088] 1 5 10 15  
 [0089] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Gly Tyr  
 [0090] 20 25 30  
 [0091] Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met  
 [0092] 35 40 45  
 [0093] Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Thr Leu Lys Tyr Ser Glu Lys Phe  
 [0094] 50 55 60  
 [0095] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Lys Ser Leu Ser Thr Ala Tyr  
 [0096] 65 70 75 80  
 [0097] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0098] 85 90 95  
 [0099] Ala Arg His Gly Thr Gly Thr Leu Met Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 [0100] 100 105 110  
 [0101] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0102] 115 120  
 [0103] <210> 9  
 [0104] <211> 112  
 [0105] <212> PRT  
 [0106] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
 [0107] <400> 9  
 [0108] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 [0109] 1 5 10 15  
 [0110] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser  
 [0111] 20 25 30  
 [0112] Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0113] 35 40 45  
 [0114] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0115] 50 55 60  
 [0116] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile



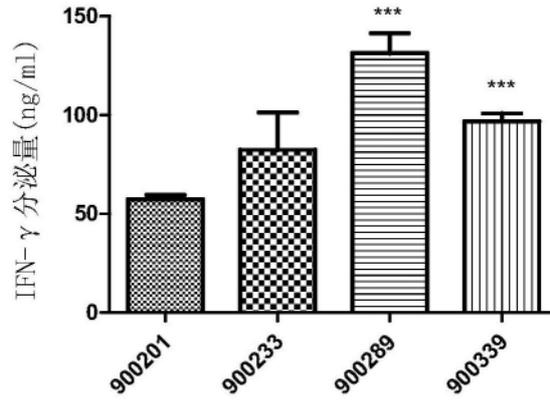


图1

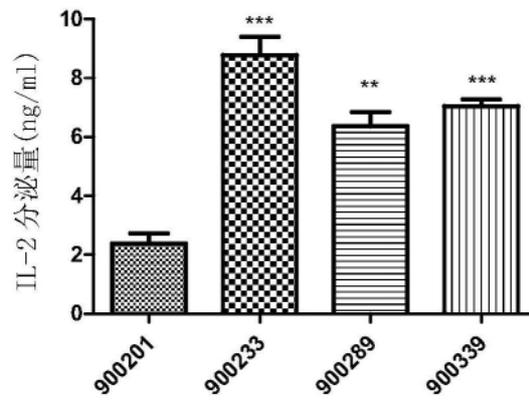


图2

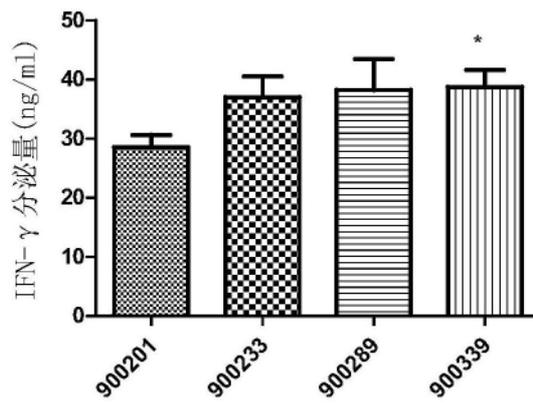


图3