



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113121686 A

(43) 申请公布日 2021.07.16

(21) 申请号 201911419802.5

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2019.12.31

(71) 申请人 迈威(上海)生物科技股份有限公司

地址 201210 上海市浦东新区自由贸易试
验区蔡伦路230号2幢105室

(72) 发明人 王双 焦莎莎 王荣娟 张畅

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382

代理人 张伟

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/55 (2017.01)

权利要求书3页 说明书21页

序列表41页 附图9页

(54) 发明名称

抗PD-L1抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种针对PD-L1的抗体或其片段,抗体或其片段的编码核酸和包含抗体或其片段的组合物等,以及它们在治疗疾病中的用途。本发明提供的抗体或其片段能够特异性结合人PD-L1,阻断PD-L1和PD-1的结合,具有对靶细胞的强ADCC效应,并且显著抑制肿瘤生长。

1. 一种抗体或其片段,所述抗体或其片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),所述重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 分别包含选自以下 (I) 至 (VI) 中氨基酸序列所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3:

- (I) HCDR1: SEQ ID NO: 36、37、38、39、40;
- (II) HCDR2: SEQ ID NO: 41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51;
- (III) HCDR3: SEQ ID NO: 52、53、54、55、56;
- (IV) LCDR1: SEQ ID NO: 57、58、59、60;
- (V) LCDR2: SEQ ID NO: 61、62、63、64、65、66;
- (VI) LCDR3: SEQ ID NO: 67、68、69、70、71、72、73、74、75、76。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其片段,其特征在于,所述重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 分别包含选自以下 (1) 至 (13) 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3:

- (1) SEQ ID NO: 36、41、52 和 SEQ ID NO: 57、61、67;
- (2) SEQ ID NO: 36、44、52 和 SEQ ID NO: 57、61、71;
- (3) SEQ ID NO: 36、41、52 和 SEQ ID NO: 57、64、67;
- (4) SEQ ID NO: 36、41、52 和 SEQ ID NO: 57、61、70;
- (5) SEQ ID NO: 36、41、52 和 SEQ ID NO: 57、61、71;
- (6) SEQ ID NO: 36、44、52 和 SEQ ID NO: 57、61、70;
- (7) SEQ ID NO: 36、47、52 和 SEQ ID NO: 57、66、67;
- (8) SEQ ID NO: 36、47、52 和 SEQ ID NO: 57、61、70;
- (9) SEQ ID NO: 36、47、52 和 SEQ ID NO: 57、61、67;
- (10) SEQ ID NO: 36、47、52 和 SEQ ID NO: 57、61、71;
- (11) SEQ ID NO: 36、47、52 和 SEQ ID NO: 57、61、72;
- (12) SEQ ID NO: 36、43、52 和 SEQ ID NO: 57、61、70;
- (13) SEQ ID NO: 36、43、52 和 SEQ ID NO: 57、61、71。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段能够以 $K_D \leq 5\text{nM}$ 的亲和力结合 PD-L1, 优选哺乳动物 PD-L1, 更优选灵长类动物 PD-L1, 进一步优选人或食蟹猴 PD-L1, 特别是人 PD-L1。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段的重链可变区包含选自以下的序列:

SEQ ID NO: 2、10、18、32 和 35 中任一个所示的氨基酸序列或与所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和/或

所述抗体或其片段的轻链可变区包含选自以下的序列:

SEQ ID NO: 4、12、20、30、31、33 和 34 中任一个所示的氨基酸序列或与所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列;

更优选地,所述抗体或其片段的重链可变区和轻链可变区包含以下任一氨基酸序列组合:

(1) SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和, 如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或与如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列;

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段为单克隆抗体、单链抗体、双功能抗体、单域抗体、纳米抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体等任意形式,或者,所述抗体或其片段为半抗体或半抗体的抗原结合片段,例如 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv;

优选地,所述抗体或其片段还包含人或鼠的恒定区,优选包含人或鼠的恒定区,例如人或鼠的轻链恒定区(CL)和/或重链恒定区(CH)。

6. 一种缀合物或融合蛋白,所述缀合物或融合蛋白包含权利要求1至5中任一项所述的抗体或其片段。

7. 一种核酸分子,其编码权利要求1至5中任一项所述的抗体或其片段或者编码所述抗体或其片段中包含的重链CDR、轻链CDR、轻链可变区、重链可变区、重链或轻链。

8. 一种载体,其包含权利要求7所述的核酸分子。

9. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求7所述的核酸分子和/或权利要求8所述的载体,或者所述宿主细胞被权利要求7所述的核酸分子和/或权利要求8所述的载体转化或转染。

10. 一种组合物,其包含权利要求1至5中任一项所述的抗体或其片段、权利要求6所述的缀合物或融合蛋白、权利要求7所述的核酸分子、权利要求8所述的载体和/或权利要求9所述的宿主细胞。

11. 权利要求1至5中任一项所述的抗体或其片段、权利要求6所述的缀合物或融合蛋白、权利要求7所述的核酸分子、权利要求8所述的载体、权利要求9所述的宿主细胞和/或权利要求10所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗与PD-L1阳性表达相关的疾病,或者所述药物用于阻断PD-L1/PD-1相互作用。

12. 一种试剂盒,所述试剂盒包括权利要求1至5中任一项所述的抗体或其片段、权利要求6所述的缀合物或融合蛋白、权利要求7所述的核酸分子、权利要求8所述的载体、权利要求9所述的宿主细胞和/或权利要求10所述的组合物。

抗PD-L1抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种新的抗PD-L1抗体或其功能性片段。本发明还涉及所述抗体或其功能性片段的应用。

背景技术

[0002] 程序性死亡因子配体1 (PD-L1), 又称分化簇274 (CD274) 或B7同源蛋白1 (B7-H1), 属于B7家族成员, 由CD274基因编码。成熟的PD-L1蛋白大小为40kDa, 是由272个氨基酸组成的一型跨膜蛋白, 诱导表达于激活的T细胞、B细胞、树突细胞、巨噬细胞、间充质干细胞、骨髓来源的肥大细胞和非造血细胞的表面上, 并且在肿瘤组织上广泛表达, 如肺癌, 肝癌, 膀胱癌等 (Dong H, Strome S E, Salomao D R et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* 2002, 8 (8) : 793-800.), 在干扰素及其他炎症因子刺激应答的肿瘤组织和其他组织中都可能迅速上调。

[0003] PD-L1的受体为程序性死亡蛋白1 (PD-1), 也被称为CD279, 是T细胞受体CD28家族的成员, 表达于多种免疫细胞, 如激活的T细胞、B细胞及单核细胞等表面。成熟的人类PD-1蛋白是由268个氨基酸组成的I型跨膜蛋白, 其胞质尾区包含免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM) 和免疫受体酪氨酸转换基序 (ITSM)。抗原提呈细胞 (APC) 表面的PD-L1与T细胞表面的受体PD-1结合后, 促使PD-1的ITSM结构域中的酪氨酸发生磷酸化, 进而影响PI3K-AKT-mTOR和RAS-MEK-ERK通路的激活, 最终抑制抗原特异性T细胞的增殖, 并通过下调Bcl-2基因的表达而诱导调节性T细胞的凋亡, 从而降低T细胞参与的免疫应答。此外, PD-L1还能与另一种T细胞共刺激分子B7-1 (CD80) 结合, 在遇到PD-L1时CD80起受体和抑制T细胞激活信号传递的作用。另外, PD-L1还可作为受体“反”传递信号至T细胞和肿瘤细胞, 从而影响这些细胞的存活, 其机制尚不清楚。因此, PD-L1既可以作为配体又可以作为受体执行免疫调节功能。

[0004] PD-1的另一个配体为PD-L2 (CD273, B7-DC), 二者结合后同样会抑制T细胞的活化和增殖, 但与PD-L1相比, PD-L2的表达范围更窄, 主要表达于抗原提呈细胞 (如巨噬细胞, 树突细胞)、TH2细胞, PD-L2在不同肿瘤类型间的表达不像PD-L1那样普遍, 且PD-L2的基础表达水平较低。

[0005] 更重要的是, 在多项研究中显示患者肿瘤中PD-L1的表达水平与患者生存期呈负相关, 因此PD-1/PD-L1靶向治疗肿瘤疾病在临床上得到快速发展。此外针对PD-L1靶点的抑制剂较PD-1靶点抑制剂还有一个潜在的优势: PD-L2信号通路不受影响。由于PD-L2很少在肿瘤组织中高表达, 且PD-L2能与排斥性导向分子B (RGMb) 相互作用, Chen等发现 (Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest.* 2015, 125 (9) : 3384-3391.) 通过这种相互作用, 可以降低严重炎症性肺毒性疾病比如间质性肺疾病 (ILD) 的发生。

[0006] 另外, 亚型为IgG1的靶向PD-L1的抗体, 理论上除了能够阻断PD-1与肿瘤上的PD-

L1相互作用外,还可能介导肿瘤细胞的ADCC(抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用,antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)溶解。同时,因PD-L1在肿瘤上的高表达,使其成为双特异性抗体研制的潜在靶标。

[0007] 目前,在全球范围内已经有6种PD-1/PD-L1抑制剂上市,包括默沙东的Keytruda、百时美施贵宝的Opdivo、罗氏制药的Tecentriq、辉瑞/默克的Bavencio、阿斯利康的Imfinzi以及赛诺菲/再生元的Libtayo。其中,罗氏制药的抗人PD-L1的人源化抗体Tecentriq(Atezolizumab)采用弱ADCC、CDC活性的IgG1亚型,临床用于治疗局部晚期或转移性非小细胞肺癌(NSCLC)和局部晚期或转移性尿路上皮癌(mUC),且可联合化疗药物(卡铂和依托泊苷)用于一线治疗广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC),联合化疗药物(白蛋白紫杉醇)用于一线治疗PD-L1阳性无法切除的局部晚期或转移性三阴性乳腺癌(TNBC),联合贝伐珠单抗、紫杉醇和卡铂用于一线治疗成人转移性非鳞非小细胞肺癌(NSCLC);辉瑞/默克的抗人PD-L1的全人源抗体Bavencio(Avelumab)采用强ADCC活性的IgG1亚型,临床用于治疗转移性梅克尔细胞癌、尿路上皮癌;阿斯利康的抗人PD-L1的全人源抗体Imfinzi(Durvalumab)采用弱ADCC活性的IgG1亚型,临床用于治疗无法手术切除的III期非小细胞肺癌(NSCLC)和局部晚期或转移性尿路上皮癌(mUC)。国内处于临床阶段的抗人PD-L1的单抗就有10多种,适应症覆盖宫颈癌、骨肉瘤、尿路上皮癌、头颈部鳞状细胞癌、PD-L1高表达的既往未接受过化疗的IV期非鳞状或鳞状细胞非小细胞肺癌、广泛期小细胞肺癌III期、乳腺癌、原发性肝癌、胃癌、前列腺癌。

[0008] 就目前上市的靶向PD-L1抗体药物来看,其适应症范围小,用量大,且整体应答率不高。因此,这类抗体仍存在进一步优化空间,本领域仍然需要提供更多新型的抗PD-L1抗体。

发明内容

[0009] 本发明通过杂交瘤筛选、人源化技术以及亲和力成熟,提供一种抗PD-L1抗体,所述抗体对人PD-L1具有高亲和力,且具有高生物活性和强ADCC活性以及长体内半衰期。

[0010] 本发明的技术方案如下。

[0011] 一方面,本发明提供一种抗体或其片段,本发明所述的抗体的片段是指抗体的结合抗原PD-L1的功能性或活性片段。

[0012] 所述PD-L1是指程序性死亡因子配体1。优选地,所述PD-L1为灵长类哺乳动物的PD-L1,更优选为人或食蟹猴的PD-L1。

[0013] 在本发明中,抗体或其片段与抗原PD-L1结合的亲和力可通过本领域已知的方法测量,并且优选为通过测量 K_D 值(Dissociation constant,解离常数),该值表示为摩尔浓度。用于测量抗体与抗原之间结合亲和力的方法在本领域是众所周知的,包括例如ELISA、流式细胞术、表面等离子体共振、Biacore测量法等。取决于测量方法及其具体设置,所测得的结合亲和力可能稍有变化或者是在可接受的范围内。

[0014] 根据本发明的具体实施方式,所述 K_D 值采用Fortebio公司的Octet QKe system仪器测量。具体见实施例中的实验设置。

[0015] 在本发明中,优选地,所述抗体或其片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)分别包含选自以下(I)至(VI)中氨基酸序列所示的

HCDR1、HCDR2、HCDR3和LCDR1、LCDR2和LCDR3:

[0016] (I) HCDR1:SEQ ID NO:36 (DIYMH),SEQ ID NO:37 (SIYMH),SEQ ID NO:38 (SYMH),SEQ ID NO:39 (DIYIS),SEQ ID NO:40 (DYMH);

[0017] (II) HCDR2:SEQ ID NO:41 (RIDPANGNTKYDPKFQD),SEQ ID NO:42 (RIDAGNGNTKYDPKFQD),SEQ ID NO:43 (RIDPRNGNTKYDPKFQD),SEQ ID NO:44 (RIDPANANTKYDPKFQD),SEQ ID NO:45 (RIDVLNANTKYDPKFQD),SEQ ID NO:46 (RIDVRNGNTKYDPKFQD),SEQ ID NO:47 (RIDPAAGNTKYDPKFQD),SEQ ID NO:48 (RIDSNAGNTKYDPKFQD),SEQ ID NO:49 (RIDLANANTKYDPKFQD),SEQ ID NO:50 (RIDRAAGNTKYDPKFQD),SEQ ID NO:51 (RIDPRNGNTKYDPKFQD);

[0018] (III) HCDR3:SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY),SEQ ID NO:53 (GQAGSLGFDY),SEQ ID NO:54 (GQLASLGFDY),SEQ ID NO:55 (GQVGLGFDY),SEQ ID NO:56 (GRLGSLGFDY);

[0019] (IV) LCDR1:SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN),SEQ ID NO:58 (RASQDISAYLN),SEQ ID NO:59 (RASQISSYLN),SEQ ID NO:60 (RASQDISSYLN);

[0020] (V) LCDR2:SEQ ID NO:61 (YTSRLHS),SEQ ID NO:62 (YASRLQS),SEQ ID NO:63 (YASSLQS),SEQ ID NO:64 (YASNLHS),SEQ ID NO:65 (YTSSLQS),SEQ ID NO:66 (YTSNLHS);

[0021] (VI) LCDR3:SEQ ID NO:67 (QQGNTLPYT),SEQ ID NO:68 (QQGAAGPYT),SEQ ID NO:69 (QQGFGAPYT),SEQ ID NO:70 (QQGVGAPYT),SEQ ID NO:71 (QQGAGRPYT),SEQ ID NO:72 (QQGAGWPYT),SEQ ID NO:73 (QQGDLRPYT),SEQ ID NO:74 (QQGRLWPYT),SEQ ID NO:75 (QQGVLPYT),SEQ ID NO:76 (QQGLSSPYT)。

[0022] 进一步优选地,所述重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 分别包含选自以下 (1) 至 (13) 所示的HCDR1、HCDR2、HCDR3和LCDR1、LCDR2和LCDR3:

[0023] (1) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:41 (RIDPANGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:67 (QQGNTLPYT);

[0024] (2) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:44 (RIDPANANTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:71 (QQGAGRPYT);

[0025] (3) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:41 (RIDPANGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:64 (YASNLHS)、SEQ ID NO:67 (QQGNTLPYT);

[0026] (4) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:41 (RIDPANGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:70 (QQGVGAPYT);

[0027] (5) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:41 (RIDPANGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:71 (QQGAGRPYT);

[0028] (6) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:44 (RIDPANANTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:70 (QQGVGAPYT);

[0029] (7) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:47 (RIDPAAGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:66 (YTSNLHS)、SEQ ID NO:67 (QQGNTLPYT)；

[0030] (8) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:47 (RIDPAAGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:70 (QQGVGAPYT)；

[0031] (9) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:47 (RIDPAAGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:67 (QQGNTLPYT)；

[0032] (10) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:47 (RIDPAAGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:71 (QQGAGRPYT)；

[0033] (11) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:47 (RIDPAAGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:72 (QQGAGWPYT)；

[0034] (12) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:43 (RIDPRNGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:70 (QQGVGAPYT)；

[0035] (13) SEQ ID NO:36 (DIYMH)、SEQ ID NO:43 (RIDPRNGNTKYDPKFQD)、SEQ ID NO:52 (GQLGPLGFDY)、SEQ ID NO:57 (RASQDISNYLN)、SEQ ID NO:61 (YTSRLHS)、SEQ ID NO:71 (QQGAGRPYT)。

[0036] 上述重链和轻链CDR组合来自本发明提供的鼠源抗体、人源化抗体、乃至亲和力成熟抗体。本发明提供的抗体或其片段能够以 $K_D \leq 5nM$ 的亲和力结合PD-L1，优选哺乳动物PD-L1，更优选灵长类动物PD-L1，进一步优选人或食蟹猴PD-L1，特别是人PD-L1。

[0037] 根据本发明的具体实施方式，本发明的抗体或其片段的轻链可变区包含选自以下的序列：

[0038] SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:35中任一个所示的氨基酸序列或与所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和/或

[0039] 所述抗体或其片段的轻链可变区包含选自以下的序列：

[0040] SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34中任一个所示的氨基酸序列或与所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。

[0041] 更优选地，本发明提供的抗体或其片段的轻链可变区和重链可变区包含以下任一氨基酸序列组合：

[0042] (1) SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0043] (2) SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:

12所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0044] (3) SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0045] (4) SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0046] (5) SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0047] (6) SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0048] (7) SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0049] (8) SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0050] (9) SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0051] (10) SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0052] (11) SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0053] (12) SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0054] (13) SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；

[0055] (14) SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列；和，如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列或与如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。

[0056] 一般而言，本发明提供的抗体或其片段为单克隆抗体、单链抗体、双功能抗体、单域抗体、纳米抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体等任意形式，或者，所述抗体或

其片段为半抗体或半抗体的抗原结合片段,例如scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv;

[0057] 优选地,所述抗体或其片段还包含人或鼠的恒定区,优选包含人或鼠的恒定区,例如人或鼠的轻链恒定区(CL)和/或重链恒定区(CH);

[0058] 更优选地,所述抗体或其片段包含选自IgG、IgA、IgM、IgD或IgE的重链恒定区和/或κ或λ型轻链恒定区。

[0059] 根据本发明的具体实施方式,本发明提供的抗体为单克隆抗体,优选为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体;优选地,所述单克隆抗体的重链恒定区为IgG1或IgG4亚型,轻链恒定区为κ型;

[0060] 优选地,所述单克隆抗体的重链恒定区包含如SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列或者与所述氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列;优选地,所述单克隆抗体的轻链恒定区包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或者与所述氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列。

[0061] 本发明上文所述的至少75%同一性为至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、进一步优选至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或甚至99%同一性等≥75%的任何百分比的同一性。

[0062] 根据本发明的具体实施方式,本发明提供如下抗体:所述抗体包含SEQ ID NO:18所示的重链可变区,SEQ ID NO:20所示的轻链可变区,SEQ ID NO:22所示的重链恒定区,SEQ ID NO:16所示的轻链恒定区,本发明中命名为H182-MUT4。或者,所述抗体包含SEQ ID NO:10所示的重链可变区,SEQ ID NO:12所示的轻链可变区,SEQ ID NO:14所示的重链恒定区,SEQ ID NO:16所示的轻链恒定区,本发明中命名为h182。

[0063] 基于本发明的抗体或其片段,本发明还提供包含本发明的抗体或其片段的缀合物或融合蛋白。该缀合物或融合蛋白可包含通过化学或物理方法结合于本发明所述抗体或其片段的其他部分,例如细胞表面受体、小分子化合物如氨基酸和糖类、小分子聚合物或对本发明所述抗体进行修饰的任何其它部分,或者甚至是活性蛋白或多肽。例如,该缀合物或融合蛋白可以是包含本发明所述抗体或其片段的双特异性抗体或双功能蛋白。

[0064] 更优选地,所述双特异性抗体/双功能蛋白为本发明的抗体与TGFβII型受体胞外区形成的融合蛋白。例如,该TGFβII型受体胞外区融合至本发明的抗体例如h182或H182-MUT4的重链C端,例如可经由连接序列融合至所述C端。所述连接序列可以为柔性连接肽,例如包含一个或多个(GGGGS)的柔性连接肽。

[0065] 根据本发明的具体实施方式,所述融合蛋白为双功能蛋白,其包含具有重链和轻链的抗体和融合至所述重链恒定区C端的TGFβII型受体胞外区序列,其中所述抗体的重链示于SEQ ID NO:77,轻链示于SEQ ID NO:78,所述TGFβII型受体胞外区序列为人TGFβII型受体胞外区序列,例如示于SEQ ID NO:29的氨基酸序列。优选地,所述TGFβII型受体胞外区序列经由柔性连接肽融合至所述C端。根据本发明的具体实施方式,所述柔性连接肽示于SEQ ID NO:79。

[0066] 根据本发明的具体实施方式,所述双功能蛋白中的抗体具有两条重链和两条轻链。

[0067] 另一方面,基于本发明的抗体或其片段,本发明还提供一种核酸分子,其编码本发

明的任意抗体或其片段或者编码所述抗体或其片段中包含的重链CDR、轻链CDR、轻链可变区、重链可变区、重链或轻链；

[0068] 优选地,所述核酸分子包含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:17或SEQ ID NO:19所示核苷酸序列。

[0069] 还一方面,本发明提供一种载体,其包含本发明的核酸分子。所述载体可以为真核表达载体、原核表达载体、人工染色体及噬菌体载体等。

[0070] 本发明的载体或核酸分子可以用于转化或转染宿主细胞或以任何方式进入宿主细胞内,用于保存或表达抗体等目的。

[0071] 因此,另一方面,本发明提供一种宿主细胞,所述宿主细胞包含本发明的核酸分子和/或载体,或者所述宿主细胞被本发明的核酸分子和/或载体转化或转染。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞,例如细菌或昆虫、真菌、植物或动物细胞。

[0072] 基于本发明的公开内容,本发明提供的抗体或其片段以及相应的缀合物或融合蛋白、核酸分子、载体和/或宿主细胞可以通过使用本领域已知的任何常规技术方法获得。所述抗体或其片段、缀合物或融合蛋白、核酸分子、载体和/或宿主细胞可以被包含在组合物、例如药物组合物中,更特别地被包含在药物制剂中,从而根据实际需要用于各种目的。

[0073] 因此,在又一方面,本发明还提供一种组合物,所述组合物包含本发明所述的抗体或其片段、缀合物或融合蛋白、核酸分子、载体和/或宿主细胞。优选地,所述组合物为药物组合物,其任选地还包含药学上可接受的辅料。

[0074] 作为结合PD-L1或其任何部分的抗体,本发明还提供上述主题的相关应用。

[0075] 具体而言,再一方面,发明提供所述的抗体或其片段、缀合物或融合蛋白、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗与PD-L1阳性表达相关的疾病,或者用于阻断PD-L1/PD-1相互作用；

[0076] 优选地,所述疾病为癌症或肿瘤,优选为PD-L1阳性表达的癌症或肿瘤;更优选地,所述疾病选自宫颈癌、骨肉瘤、尿路上皮癌、肺癌如非小细胞肺癌或小细胞肺癌、鳞状细胞癌、卵巢癌、结肠癌、黑色素瘤、膀胱癌、前列腺癌、肝癌如原发性肝癌、胃癌、肾癌、乳腺癌如三阴性乳腺癌、头颈癌、淋巴瘤、转移性梅克尔细胞癌。

[0077] 另外,本发明提供一种治疗与PD-L1阳性表达相关的疾病的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用所述抗体或其片段、缀合物或融合蛋白、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物,以及任选的其他药物或治疗手段。优选地,所述疾病为癌症或肿瘤,优选为PD-L1阳性表达的癌症或肿瘤;更优选地,所述疾病选自宫颈癌、骨肉瘤、尿路上皮癌、肺癌如非小细胞肺癌或小细胞肺癌、鳞状细胞癌、卵巢癌、结肠癌、黑色素瘤、膀胱癌、前列腺癌、肝癌如原发性肝癌、胃癌、肾癌、乳腺癌如三阴性乳腺癌、头颈癌、淋巴瘤、转移性梅克尔细胞癌。该任选的其他药物或治疗手段是指可以与本发明抗体或其片段、缀合物或融合蛋白、核酸分子、载体、宿主细胞或组合物联合施用的其他免疫增强药物或手段,例如小分子化药、靶向药、抗体等重组蛋白药,疫苗、ADC、溶瘤病毒、基因和核酸治疗药物和放射疗法。二者的联合施用可以采取任意形式进行,例如同时、连续或间隔一段时间进行。所述受试者为哺乳动物,优选灵长类动物,进一步优选人或食蟹猴,特别是人。

[0078] 又一方面,本发明提供一种试剂盒,所述试剂盒包括本发明所述的抗体或其片段、缀合物或融合蛋白、核酸分子、载体、宿主细胞和/或组合物。所述试剂盒可用于检测或诊断

目的。

[0079] 抗PD-L1抗体通过阻断PD-1与其配体PD-L1的结合发挥激活T细胞的作用。目前已报道的抗体虽然都能阻断PD-1与PD-L1的相互作用,但临床用量大,且大部分为弱ADCC活性的抗体亚型,相对于强ADCC活性的抗体亚型,对高表达PD-L1的肿瘤组织的杀伤作用较弱。

[0080] 与此相对地,本发明通过杂交瘤筛选、人源化技术以及亲和力成熟,提供一种抗PD-L1抗体,所述抗体对人PD-L1具有高亲和力,且具有高生物活性和强ADCC活性以及长体内半衰期。

[0081] 与现有技术相比,本发明的抗体具有以下有益之处:

[0082] 1. 本发明抗体为具有高亲和力的抗PD-L1人源化抗体。

[0083] 以本发明的人源化抗PD-L1抗体H182-MUT4为例,该抗体可以特异性结合人PD-L1蛋白,其亲和力(KD)为 $4.65E-10M$,而对照抗体Atezolizumab亲和力(KD)为 $7.19E-10M$,Durvalumab亲和力(KD)为 $8.24E-10M$,表明H182-MUT4与人PD-L1具有高亲和力。

[0084] 2. 本发明抗体具有良好的生物学活性。

[0085] 以H182-MUT4为例,该抗体可以有效结合细胞表面的重组人PD-L1,与CHO-PD-L1-CD3L细胞的结合的EC50为 $0.658nM$,优于对照抗体Atezolizumab (EC50: $0.908nM$) 和Durvalumab (EC50: $1.022nM$) 的结合活性;可以有效阻断重组人PD-L1与其受体PD-1的结合作用,IC50为 $6.236nM$,与对照抗体Atezolizumab (IC50: $7.432nM$) 和Durvalumab (IC50: $7.64nM$) 的阻断活性相近;且通过PD-1/PD-L1抗体生物活性检测系统,检测H182-MUT4的生物学活性明显优于对照抗体Atezolizumab和Durvalumab。此外,本发明的抗体具有良好的ADCC活性,可以有效杀伤高表达human PD-L1的MDA-MB-231细胞;并且具有良好的体内稳定性,小鼠体内半衰期为150小时左右,符合单抗药物的基本特征。

附图说明

[0086] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0087] 图1:第一轮ELISA检测阳性杂交瘤上清与人PD-L1胞外区结构域重组蛋白的结合情况。

[0088] 图2:第二轮ELISA检测阳性杂交瘤上清与人PD-L1胞外区结构域重组蛋白的结合情况。

[0089] 图3:ELISA检测阳性杂交瘤克隆上清与不同种属重组PD-L1之间的交叉反应结果。

[0090] 图4:ELISA检测阳性杂交瘤克隆上清对人PD-L1与其受体PD-1结合的抑制结果。

[0091] 图5:FACS检测从阳性杂交瘤克隆上清纯化的抗体与293细胞表面PD-L1结合筛选结果。

[0092] 图6:ELISA检测来自182号阳性杂交瘤克隆上清的鼠抗体与B7家族和CD28家族成员的结合情况。

[0093] 图7:抗体H182-MUT4与同靶点已知抗体的亲和力比较结果。

[0094] 图8:ELISA检测抗体H182-MUT4对人PD-L1与其受体PD-1结合的抑制作用结果。

[0095] 图9:抗体H182-MUT4与CHO细胞表面PD-L1结合活性检测结果。

[0096] 图10:抗体体外ADCC毒性作用剂量效应曲线,其中10A:Atezolizumab;10B:Avelumab;10C:H182-MUT4;10D:Durvalumab;10E:同型对照抗体。

[0097] 图11:抗体在裸小鼠体内单次给药药-时曲线(PD-L1检测),其中11A:Avelumab;11B:Atezolizumab;11C:Durvalumab;11D:H182-MUT4。

[0098] 图12:H182-MUT4给药后MC38-hPD-L1荷瘤小鼠模型高剂量组的肿瘤体积变化。

[0099] 图13:H182-MUT4-TGFBR111给药后PD-1和PD-L1人源化小鼠荷瘤hPD-L1-MC38皮下瘤模型的肿瘤体积变化。

具体实施方式

[0100] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0101] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的药材原料、试剂材料等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

[0102] 对照抗体Atezolizumab氨基酸序列来源于WHO Drug Information (Vol.29, No.3, 2015),重链氨基酸序列见SEQ ID NO:23,轻链氨基酸序列见SEQ ID NO:24;

[0103] 对照抗体Avelumab氨基酸序列来源于WHO Drug Information (Vol.30, No.1, 2016),重链氨基酸序列见SEQ ID NO:25,轻链氨基酸序列见SEQ ID NO:26;

[0104] 对照抗体Durvalumab氨基酸序列来源于WHO Drug Information (Vol.29, No.3, 2015),重链氨基酸序列见SEQ ID NO:27,轻链氨基酸序列见SEQ ID NO:28;

[0105] 人PD-L1,序列号:NP_054862.1,19aa-238aa;

[0106] 人PD-1,序列号:NP_005009.2,21aa-167aa。

[0107] 实施例1:抗人PD-L1抗体杂交瘤细胞制备

[0108] 免疫:采用人PD-L1/mFc重组蛋白免疫Balb/c小鼠,用包被人PD-L1-His重组蛋白的96孔酶标板以ELISA法检测血清滴度;血清滴度达到融合要求的小鼠用于下一步的细胞融合。

[0109] 细胞融合及杂交瘤制备:初次免疫后第67天,选取滴度达到要求的小鼠,无菌取小鼠脾脏,制备B淋巴细胞悬液,与F0骨髓瘤细胞以5:1的比例混合,在PEG4000作用下使两种细胞融合。融合后的细胞用HAT培养基重悬后,分装96孔细胞培养板。置37℃,5%CO₂培养箱内培养。

[0110] 实施例2:抗人PD-L1抗体阳性杂交瘤细胞株的筛选

[0111] 1. 阳性杂交瘤ELISA结合筛选

[0112] 融合后10-14天,以人PD-L1-His重组蛋白(10ug/ml, pH 9.6, 0.1M NaHCO₃)包被酶标板,4℃,过夜;用4%脱脂奶粉-PBS封闭,37℃,2h;用PBST(0.05%Tween20-PBS)洗三遍,加入杂交瘤克隆培养上清,37℃,1h。设以下对照:(1)阳性对照(PC):免疫后小鼠血清(用PBS 1:1000稀释);(2)阴性对照(NC):免疫前小鼠血清(用PBS 1:1000稀释);(3)空白对照:PBS。经PBST(0.05%Tween20-PBS)洗三遍,加入HRP-羊抗小鼠IgG(Fcγ),1:20000稀释,37℃,1h;再经PBST(0.05%Tween20-PBS)洗五遍,加入OPD显色液,避光显色10-15min,加入2M H₂SO₄终止反应;酶标仪读A492值。检测孔A492值大于阴性对照孔A492值2.1倍以上判断为阳性。为确定阳性克隆的可靠性,在一次筛选换液后隔一天再进行第二轮筛选。经检测鉴定,共获得20个抗体分泌阳性细胞株,分别为细胞株57,92,143,152,162,182,189,234,244,267,301,315,369,403,453,492,504,564,582,651号(图1,图2),继续对这20株分泌的抗体

进行进一步筛选。

[0113] 2. 阳性杂交瘤克隆的种属交叉的ELISA筛选

[0114] 将人PD-L1-His重组蛋白、食蟹猴PD-L1-His重组蛋白 (Cat:90251-C08H, 北京义翘神州) 4℃包被过夜, 包被浓度0.5μg/mL; PBS洗板3次后, 加入5% BSA PBS, 37℃封闭60min, PBST洗板3次; 加入PBS稀释100倍的上述20株杂交瘤上清, 设以下对照: (1) 阳性对照 (PC): Atezolizumab的鼠IgG恒定区形式0.1μg/ml; (2) 阴性对照 (NC): 无关杂交瘤上清 (用PBS 1:100稀释); (3) 空白对照: PBS。37℃孵育60min, PBST洗板4次; 加入1:5000稀释的HRP-羊抗小鼠IgG (Fcr) (Cat:115-035-071, Jackson Immuno Research), 37℃孵育30min, PBST洗板4次; 加入TMB底物显色, 37℃孵育10min后, 加入2M HCl终止反应; 以630nm为参比波长, 读取并记录波长450nm下孔板的吸光度A450nm-630nm。除189号外, 其余杂交瘤上清均可以特异性的与重组人、食蟹猴PD-L1结合 (图3)。

[0115] 3. 阳性杂交瘤克隆抑制人PD-L1与其受体PD-1结合的ELISA筛选

[0116] 将人PD-1-His, 浓度0.5μg/mL, 4℃包被过夜, 用5% BSA于37℃恒温培养箱封闭60min。加入PBS稀释100倍的上述20株杂交瘤上清, 设以下对照: (1) 阳性对照 (PC): 人PD-L1/mFc 0.1μg/ml; (2) 阴性对照 (NC): 无关杂交瘤上清 (用PBS 1:100稀释); (3) 空白对照: PBS; (4) 对照抗体对照 (ref mAb): Atezolizumab的鼠IgG恒定区形式0.1μg/ml。37℃恒温培养箱反应120min, 同时加入1μg/mL的人PD-L1/mFc与抗体共孵育, 37℃恒温培养箱反应60min。然后加入1:5000稀释的HRP-anti-mouse Fc (Cat:115-035-071, Jackson Immuno Research), 反应45min, 加入TMB (Cat:ME142, 北京泰天河生物) 底物显色15min, 2M HCl终止后读板。以630nm为参比波长, 读取并记录波长450nm下孔板的吸光度值A450nm-630nm。ELISA结果显示92, 143, 182, 267, 453号杂交瘤上清均可以阻断人PD-L1与其受体PD-1的结合 (图4)。

[0117] 4. 阳性杂交瘤与293细胞表面PD-L1结合筛选

[0118] 利用人PD-L1全长表达质粒 (Cat.:HG10084-UT, 北京义翘神州), 并根据转染试剂293fectin (Cat:12347019, Gibco) 的操作说明, 将全长人PD-L1表达质粒转入HEK293细胞中重组表达, 构建重组表达人PD-L1的293细胞 (293/PD-L1)。细胞转染后48小时, 细胞用于流式细胞分析 (FACS)。

[0119] 根据上述ELISA结果, 挑选92, 143, 182, 267, 453, 492号克隆的杂交瘤上清通过亲和纯化, 获得的6个鼠抗体 (5ug/ml) 与重组表达人PD-L1的293细胞 (293/PD-L1) 悬液在37℃孵育30min, 设以下对照: (1) 阳性对照 (PC): Atezolizumab的鼠IgG恒定区形式5ug/ml; (2) 阴性对照 (NC): 无关鼠抗体5ug/ml。以PBS洗涤细胞3次后, 加入1:64稀释的羊抗鼠IgG-FITC (Cat:F9006, Sigma) 并孵育30min。PBS洗涤细胞3次后通过流式细胞仪 (型号B49007AD, SNAW31211, BECKMAN COULTER) 检测细胞的平均荧光强度 (MFI) 以验证杂交瘤分泌的抗体是否可以与293细胞表面的PD-L1结合, 如图5所示, 只有182号克隆与293细胞表面的PD-L1有很好的结合。选择182号作为候选克隆进行下一步筛选。

[0120] 5. 阳性杂交瘤克隆对PD-L1家族特异性的ELISA检测

[0121] 根据上述检测结果, 选择182号克隆进行特异性检测, 将重组人CD28 (Cat:11524-HCCH, 北京义翘神州)、CTLA4-His (Cat:11159-H08H, 北京义翘神州)、B7H3-His (序列号:NP_001019907.1, 29aa-239aa)、B7H4 (序列号:NP_078902.2, 29aa-257aa)、ICOS-His (序列号:

NP_036224.1,1aa-199aa)、PD-L2-hFc(序列号:NP_079515.2,20aa-220aa)、PD-1-His(序列号:NP_005009.2,21aa-167aa)、人PD-L1-His重组蛋白4℃包被过夜,包被浓度2μg/mL;PBS洗板3次后,加入5%BSA PBS,37℃封闭60min,PBST洗板3次;加入182号鼠抗体(1ug/ml),设以下对照:(1)空白对照:PBS.37℃孵育60min,PBST洗板4次;加入1:5000稀释的HRP-羊抗小鼠IgG(Fcr)(Cat:115-035-071,Jackson Immuno Research),37℃孵育30min,PBST洗板4次;加入TMB底物显色,37℃孵育10min后,加入2M HCl终止反应;以630nm为参比波长,读取并记录波长450nm下孔板的吸光度A450nm-630nm。实验结果表明182号鼠抗体可以特异性地与重组人PD-L1结合,与其他B7家族和CD28家族成员无结合活性,不产生交叉反应(图6)。

[0122] 实施例3:鼠源抗人PD-L1抗体的序列测定

[0123] 将分泌抗人PD-L1抗体的杂交瘤细胞182号扩大培养后,用Mouse Monoclonal Antibody IgG Subclass Test Card(Cat:A12403,VicNovo)及Mouse Monoclonal Antibody Light/Heavy Chain Test Card(Cat:A12401,VicNovo)按照试剂操作规程进行亚型检测,亚型鉴定为:重链为IgG1,轻链为Kappa链。

[0124] 将182号杂交瘤细胞按照TRIzol试剂盒(Cat:15596026,Invitrogen)说明书步骤提取细胞总RNA;利用M-MuLV反转录酶(Cat:M0253S,NEB)将杂交瘤细胞总RNA反转录成cDNA;使用简并引物(可参照图书[董志伟,王琰.抗体工程(第二版)。北京医科大学出版社,2001,313-314])和Phusion试剂盒(Cat:E0553L,NEB)扩增抗体轻链可变区IgVL(κ)和重链可变区V_H序列;利用胶回收试剂盒(Cat:AP-GX-250,Axygen)纯化PCR扩增产物;按照T载体克隆试剂盒(Cat:ZC205,庄盟生物)说明书将扩增PCR产物连接至T载体并转化大肠杆菌感受态细胞,菌株扩增、抽提质粒后进行DNA测序获得单克隆抗体可变区序列。测序结果显示,来自该杂交瘤细胞的182鼠抗体重链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO:1,由该DNA序列推测得到182鼠抗体重链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO:2;182鼠抗体轻链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO:3,由该DNA序列推测得到182鼠抗体轻链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO:4。

[0125] m182重链可变区(SEQ ID NO:2)

[0126] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTVSGFNKDIYMHWLKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFKDKATMIADTSSNTAYLQLSSLTSED~~TAVYYCASGQLGPLGFDYWGQGTTLTVSS~~

[0127] m182轻链可变区(SEQ ID NO:4)

[0128] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGT~~DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIK~~

[0129] 实施例4:抗人PD-L1嵌合抗体及对照抗体的制备

[0130] 将同靶点对照抗体(Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab)轻重链氨基酸序列的编码基因进行全合成,并分别克隆至真核瞬时重组表达载体中,获得对照抗体轻链和重链表达质粒,转入大肠杆菌扩增,分离获得大量含对照抗体轻链和重链的质粒,利用这些质粒,并根据转染试剂293fectin(Cat:12347019,Gibco)的操作说明,分别将对照抗体的轻、重链质粒转入HEK293细胞中重组表达。细胞转染后5-6天,取培养上清,利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化,获得对照抗体。

[0131] 将本发明克隆获得的鼠源抗体轻链可变区和重链可变区基因通过PCR引入酶切位点,分别克隆至装有人-kappa轻链恒定区和人IgG1重链恒定区编码基因上游的真核表达载

体中,获得人-鼠嵌合轻链(Ch182L)和人-鼠嵌合重链(Ch182H)表达质粒,转入大肠杆菌扩增,分离获得大量含人-鼠嵌合抗体轻链-Ch182L-和重链-Ch182H-的质粒,利用该质粒,并根据转染试剂293fectin (Cat:12347019,Gibco)的操作说明,将182嵌合抗体的轻、重链质粒转入HEK293细胞中重组表达。细胞转染后5-6天,取培养上清,利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化,获得的182嵌合抗体利用Fortebio公司的Octet QKe system仪器,采用抗人抗体Fc段的捕获抗体(AHC)生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲和力。测定时将182嵌合抗体用PBS缓冲液稀释至5ug/mL,流经AHC探针 (Cat:18-5060,PALL)表面,时间为120s。人PD-L1-His重组蛋白作为流动相,PD-L1-His重组蛋白浓度为50nM、20nM。结合时间为300s,解离时间为300s。实验完毕,扣除空白对照响应值,用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合,计算抗原抗体结合的动力学常数。结果表明,嵌合抗体Ch182与人PD-L1具有高亲和力,其亲和力(KD)约为2.02E-9M,提示182鼠抗体序列克隆正确。

[0132] 实施例5:抗人PD-L1单克隆抗体的人源化及重组表达

[0133] 1. 鼠源单克隆抗体182的人源化设计

[0134] 首先对鼠源抗体重链序列进行综合分析,确定抗体与抗原结合的抗原互补决定簇(CDR)区域及支撑抗体保守三维构象的框架区(framework)。随后根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体模版(template),结合全序列blast结果及HCDR3序列,进行CDR移植,实现了182重链可变区(VH)在框架区的高度人源化。根据同源性比对结果,在人抗体germline库(<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/alignments2.php#VHEX>)寻找最相似人源抗体模版(template),结合全序列blast结果及LCDR3序列,进行CDR移植,实现了轻链框架区的全人源化。182抗体CDR移植(CDR Grafted)的人源化重链可变区核苷酸序列见SEQ ID NO:5,氨基酸序列见SEQ ID NO:6;轻链可变区核苷酸序列见SEQ ID NO:7,氨基酸序列见SEQ ID NO:8。

[0135] 2. 人源化182的回复突变设计

[0136] 根据182鼠抗体的序列特点,对CDR移植的人源化轻重链可变区序列进行回复突变设计,回复突变位点见下表1,182人源化回复突变后重链可变区核苷酸序列见SEQ ID NO:9,氨基酸序列见SEQ ID NO:10;人源化回复突变后轻链可变区核苷酸序列见SEQ ID NO:11,氨基酸序列见SEQ ID NO:12。

[0137] 表1 182人源化序列设计

| h182_VL | | h182_VH | |
|----------|-------------|----------|-------------|
| h182_VL1 | CDR Grafted | h182_VH1 | CDR Grafted |
| h182_VL2 | Y87F | h182_VH2 | D77N, T98S |

[0139] 注:如Y87F标示依照Kabat编号系统,将87位氨基酸Y突变回F

[0140] h182_VH1 (SEQ ID NO:6)

[0141] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVSGFNKDIYMHVWVQQAPGKGLEWMGRIDPANGNTKYDPKFQDRVITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGQLGPLGFYWGQGTITVTVSS

[0142] h182_VL1 (SEQ ID NO:8)

[0143] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISNYLNWYQQKPKGAPKLLLYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGT

DYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPYTFGGGTKVEIK

[0144] h182_VH2 (SEQ ID NO:10)

[0145] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVSGFNKDIYMHVWVQAPGKGLEWMGRIDPANGNTKYDPKFQDRVT
ITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCASGQLGPLGFDYWGQGTITVTVSS

[0146] h182_VL2 (SEQ ID NO:12)

[0147] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLLYYTSRLLHSGVPSRFSGSGSGT
DYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPYTFGGGTKVEIK

[0148] 3. 人源化单克隆抗体182的重组表达

[0149] 将人源化设计的182抗体轻重链可变区 (h182_VL1、h182_VH2) 序列进行全合成, 将人源化的h182_VH2通过酶切克隆入真核表达载体pKN041的人IgG1的重链恒定区编码基因的上游, 重链恒定区核苷酸序列见SEQ ID NO:13, 氨基酸序列见SEQ ID NO:14; 将人源化的h182_VL1通过酶切克隆入真核表达载体pKN019的人轻链C κ 的编码基因的上游, 轻链恒定区核苷酸序列见SEQ ID NO:15, 氨基酸序列见SEQ ID NO:16, 构建人源化182轻、重链表达载体, 获得轻链 (pKN019-h182L1) 和重链 (pKN041-h182H2) 表达质粒, 转入大肠杆菌扩增, 分离获得h182抗体轻链和重链的质粒h182L1, h182H2; 根据回复突变设计, 利用StarMut基因定点突变试剂盒 (Cat: T111-01, GenStar), 分别在轻链 (pKN019-h182L1) 和重链 (pKN041-h182H2) 表达质粒上进行定点突变, 转入大肠杆菌扩增, 获得h182抗体轻、重链表达质粒h182L2, h182H1; 利用182的人源化质粒和嵌合抗体质粒, 并根据转染试剂293fectin (Cat: 12347019, Gibco) 的操作说明, 将182抗体的轻、重链质粒进行组合, 组合见表2, 转入HEK293细胞中重组表达。细胞转染后5-6天, 取培养上清, 利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化, 获得的182的不同人源化抗体, 利用ForteBio公司的Octet QKe system仪器, 采用抗人抗体Fc段的捕获抗体 (AHC) 生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲和力。测定时将182抗体用PBS缓冲液稀释至5ug/mL, 流经AHC探针 (Cat: 18-5060, PALL) 表面, 时间为120s。人PD-L1-His重组蛋白作为流动相, PD-L1-His重组蛋白浓度为100nM。结合时间为300s, 解离时间为300s。实验完毕, 扣除空白对照响应值, 用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合, 计算抗原抗体结合的动力学常数。

[0150] 表2 182抗体的轻、重链序列组合

[0151]

| | | | |
|--------|--------|--------|--------|
| | Ch182H | h182H1 | h182H2 |
| Ch182L | Ch182 | 182-1 | 182-2 |
| h182L1 | 182-3 | 182-4 | 182-5 |
| h182L2 | 182-6 | 182-7 | 182-8 |

[0152] 注: 该表表示各种182轻重链组合所得序列 (链命名与对应的质粒相同), 如182-1表示, 该抗体由182嵌合抗体轻链Ch182L和人源化重链h182H1组成, 其他类推。

[0153] 通过ForteBio测定182组合抗体及对照抗体Atezolizumab与人PD-L1-His重组蛋白的亲和力如表3所示, 筛选得到的最优人源化序列组合为182-8, 该组合抗体亲和力 (KD) 为3.64E-9M, 较Ch182的亲和力 (KD: 2.14E-09M) 无明显下降, 将该组合作为人源化后优选序列, 命名为h182, 进行进一步功能验证。

[0154] 表3表2的抗体与人PD-L1胞外区结构域重组蛋白的亲和力测定结果

[0155]

| | |
|------|---------|
| 抗体组合 | KD值 (M) |
|------|---------|

| | |
|--------------|----------|
| Atezolizumab | 1.93E-10 |
| Ch182 | 2.14E-09 |
| 182-1 | 5.82E-09 |
| 182-2 | 1.93E-09 |
| 182-3 | 4.77E-09 |
| 182-4 | 8.19E-09 |
| 182-5 | 3.43E-09 |
| 182-6 | 4.64E-09 |
| 182-7 | 5.68E-09 |
| 182-8 | 3.64E-09 |

[0156] 实施例6:人源化抗体h182的亲合力成熟

[0157] 为了获得更高亲合力抗体,对h182进行亲合力成熟,通过PCR的方法对轻重链所有的CDR区引入突变,构建突变文库,用于h182的亲合力成熟。

[0158] 1.h182重链CDR区以及轻链CDR区噬菌体展示突变库的构建

[0159] 采用常规的克隆技术,将合成的亲本h182-Fab的编码基因片段和6个含有stuffer区的不完整亲本h182-Fab的编码基因片段分别连入噬菌粒BBTN中,分别构建亲本表达载体BBTN-h182-Fab和六个工具载体:BBTN-h182-HCDR1, BBTN-h182-HCDR2, BBTN-h182-HCDR3, BBTN-h182-LCDR1, BBTN-h182-LCDR2, BBTN-h182-LCDR3。将合成的单链突变单元h182-HCDR1-NNK, h182-HCDR2-NNK, h182-HCDR3-NNK, h182-LCDR1-NNK, h182-LCDR2-NNK, h182-LCDR3-NNK, 采用PCR的方法,形成双链NNK片段,将每个双链NNK片段,和对应的工具载体质粒,按照一定比例混合,同时加入IIS型内切酶和T4 DNA连接酶,进行切连反应,通过电转化TG1感受态细胞,完成六个(HCDR1、HCDR2、HCDR3以及LCDR1、LCDR2、LCDR3)突变文库的构建。

[0160] 2.文库淘选

[0161] 文库经过拯救包装出淘筛用的噬菌体颗粒后,利用人PD-L1-His重组蛋白进行固相淘筛,并且每一轮筛选相对于上一轮降低抗原浓度,经过三轮淘筛之后,分别挑取多个克隆进行噬菌体ELISA,检测结合活性,并将阳性克隆进行测序。

[0162] 3.Fortebio检测亲合力

[0163] 测序并进行过序列分析,去除冗余序列之后,将非冗余序列(表4)转换成与h182相同IgG($\gamma 1, \kappa$)形式,并进行哺乳动物细胞(293)表达;或将轻重链重新组合,并进行哺乳动物细胞(293)表达,用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化,获得的抗体利用Fortebio公司的Octet QKe system仪器,采用抗人抗体Fc段的捕获抗体(AHC)生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲合力。测定时将抗体用PBS缓冲液稀释至4ug/mL,流经AHC探针(Cat:18-5060, PALL)表面,时间为120s。人PD-L1-His重组蛋白作为流动相,浓度为60nM。结合时间为300s,解离时间为300s。实验完毕,扣除空白对照响应值,用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合,计算抗原抗体结合的动力学常数。亲合力结果见表5,选择其中包含组合h182-LCDR3-4+h182-HCDR2-3的亲合力成熟抗体进行进一步验证,将该抗体分子命名为H182-MUT4, H182-MUT4其重链可变区核苷酸序列见SEQ ID NO:17,氨基酸序列见SEQ ID NO:18;轻链可变区核苷酸序列见SEQ ID NO:19,氨基酸序列见SEQ ID NO:20。

[0164] H182-MUT4, VH (SEQ ID NO:18)

[0165] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVSGFNKDIYMHVWQQAPGKGLEWMGRIDPANANTKYDPKFQDRVITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCASGQLGPLGFDYWGQGTTVTVSS

[0166] H182-MUT4,VL (SEQ ID NO:18)

[0167] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGAPKLLLYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGAGRPYTFGGGTKVEIK

[0168] 表4 h182 CDR区噬菌体展示突变库中筛选出的阳性的CDR区序列

| 轻链 CDR | | | | | |
|---------------------|-------------|----------------------|-----------------------|---------------------|-------------|
| h182-LCDR1-1 | RASQDISAYLN | h182-LCDR2-1 | YASRLQS | h182-LCDR3-1 | QQGAAGPYT |
| h182-LCDR1-2 | RASQSISSYLN | h182-LCDR2-2 | YASSLQS | h182-LCDR3-2 | QQFGAPYT |
| h182-LCDR1-3 | RASQDISSYLN | h182-LCDR2-3 | YASNLHS | h182-LCDR3-3 | QQGVGAPYT |
| | | h182-LCDR2-4 | YTSSLQS | h182-LCDR3-4 | QQGAGRPYT |
| | | h182-LCDR2-5 | YTSNLHS | h182-LCDR3-5 | QQGAGWPYT |
| | | | | h182-LCDR3-6 | QQGDLRPYT |
| | | | | h182-LCDR3-7 | QQGRLWPYT |
| | | | | h182-LCDR3-8 | QQGVLFPYT |
| | | | | h182-LCDR3-9 | QQGLSSPYT |
| 重链 CDR | | | | | |
| h182-HCDR1-1 | SIYMH | h182-HCDR2-1 | RIDAGNGNTK YDPKFQD | h182-HCDR3-1 | GQAGSLGFDY |
| h182-HCDR1-2 | SYMH | h182-HCDR2-2 | RIDPRNGNTK YDPKFQD | h182-HCDR3-2 | GQLASLGFDY |
| h182-HCDR1-3 | DIYIS | h182-HCDR2-3 | RIDPANANTK YDPKFQD | h182-HCDR3-3 | GQVGM LGFDY |
| h182-HCDR1-4 | DYYMH | h182-HCDR2-4 | RIDVLNANTK YDPKFQD | h182-HCDR3-4 | GRLGSLGFDY |
| | | h182-HCDR2-5 | RIDVRNGNTK YDPKFQD | | |
| | | h182-HCDR2-6 | RIDPAAGNTK YDPKFQD | | |
| | | h182-HCDR2-7 | RIDSNAGNTK YDPKFQD | | |
| | | h182-HCDR2-8 | RIDLANANTK YDPKFQD | | |
| | | h182-HCDR2-9 | RIDRAAGNTK YDPKFQD | | |
| | | h182-HCDR2-10 | RIDPRNGNTK | | |

[0169]

[0170]

YDPKFQD

[0171] 注:如h182-LCDR1-1表示,CDR1区亲和力成熟后的序列为RASQDISAYLN,包含该轻链CDR(LCDR1)的亲和力成熟抗体轻链的其余序列同h182,其他类推。

[0172] 表5 h182 CDR区亲和力成熟后的抗体的亲和力测定结果

[0173]

| 抗体 | 区别于 h182 的 CDR | KD 值(M) | 抗体 | 区别于 h182 的 CDR | KD 值(M) |
|------------|------------------------------|----------|------------|-------------------------------|----------|
| h182 | | 2.52E-09 | 亲和力成熟抗体 26 | h182-HCDR1-1 | 4.18E-09 |
| 亲和力成熟抗体 1 | h182-LCDR1-1 | 3.62E-09 | 亲和力成熟抗体 27 | h182-HCDR1-2 | 6.46E-09 |
| 亲和力成熟抗体 2 | h182-LCDR1-2 | 3.58E-09 | 亲和力成熟抗体 28 | h182-HCDR1-3 | 7.44E-09 |
| 亲和力成熟抗体 3 | h182-LCDR1-3 | 3.58E-09 | 亲和力成熟抗体 29 | h182-HCDR1-4 | 2.6E-09 |
| 亲和力成熟抗体 4 | h182-LCDR2-1 | 4.49E-09 | 亲和力成熟抗体 30 | h182-HCDR2-1 | 5.53E-09 |
| 亲和力成熟抗体 5 | h182-LCDR2-2 | 2.17E-09 | 亲和力成熟抗体 31 | h182-HCDR2-2 | 2.5E-09 |
| 亲和力成熟抗体 6 | h182-LCDR2-3 | 8.3E-10 | 亲和力成熟抗体 32 | h182-HCDR2-3 | 1.01E-09 |
| 亲和力成熟抗体 7 | h182-LCDR2-4 | 4.6E-09 | 亲和力成熟抗体 33 | h182-HCDR2-4 | 6.81E-09 |
| 亲和力成熟抗体 8 | h182-LCDR2-5 | 1.56E-09 | 亲和力成熟抗体 34 | h182-HCDR2-5 | 4.92E-09 |
| 亲和力成熟抗体 9 | h182-LCDR3-1 | 5.12E-09 | 亲和力成熟抗体 35 | h182-HCDR2-6 | 8.7E-10 |
| 亲和力成熟抗体 10 | h182-LCDR3-2 | 4.76E-09 | 亲和力成熟抗体 36 | h182-HCDR2-7 | 6.53E-09 |
| 亲和力成熟抗体 11 | h182-LCDR3-3 | 5.3E-10 | 亲和力成熟抗体 37 | h182-HCDR2-8 | 3.89E-09 |
| 亲和力成熟抗体 12 | h182-LCDR3-4 | 9.7E-10 | 亲和力成熟抗体 38 | h182-HCDR2-9 | 7.01E-09 |
| 亲和力成熟抗体 13 | h182-LCDR3-5 | 1.43E-09 | 亲和力成熟抗体 39 | h182-HCDR2-10 | 1.03E-09 |
| 亲和力成熟抗体 14 | h182-LCDR3-6 | 5.81E-09 | 亲和力成熟抗体 40 | h182-HCDR3-1 | 4.56E-09 |
| 亲和力成熟抗体 15 | h182-LCDR3-7 | 6.46E-09 | 亲和力成熟抗体 41 | h182-HCDR3-2 | 5.21E-09 |
| 亲和力成熟抗体 16 | h182-LCDR3-8 | 6.14E-09 | 亲和力成熟抗体 42 | h182-HCDR3-3 | 3.79E-09 |
| 亲和力成熟抗体 17 | h182-LCDR3-9 | 5.88E-09 | 亲和力成熟抗体 43 | h182-HCDR3-4 | 6.64E-09 |
| 亲和力成熟抗体 18 | h182-LCDR2-2 h182-HCDR2-3 | 1.52E-09 | 亲和力成熟抗体 44 | h182-LCDR3-4 h182-HCDR2-6 | 6.72E-10 |
| 亲和力成熟抗体 19 | h182-LCDR2-5 h182-HCDR2-3 | 1.08E-09 | 亲和力成熟抗体 45 | h182-LCDR3-5 h182-HCDR2-6 | 9.18E-10 |
| 亲和力成熟抗体 20 | h182-LCDR3-3 h182-HCDR2-3 | 4.12E-10 | 亲和力成熟抗体 46 | h182-LCDR2-2 h182-HCDR2-10 | 1.31E-09 |

| | | | | | | |
|--------|---------------------------|------------------------------|----------|------------|-------------------------------|----------|
| [0174] | 亲和力成熟抗体 21 (H182-MUT4) | h182-LCDR3-4 h182-HCDR2-3 | 6.01E-10 | 亲和力成熟抗体 47 | h182-LCDR2-5 h182-HCDR2-10 | 1.41E-09 |
| | 亲和力成熟抗体 22 | h182-LCDR3-5 h182-HCDR2-3 | 1.38E-09 | 亲和力成熟抗体 48 | h182-LCDR3-3 h182-HCDR2-10 | 6.67E-10 |
| | 亲和力成熟抗体 23 | h182-LCDR2-2 h182-HCDR2-6 | 1.33E-09 | 亲和力成熟抗体 49 | h182-LCDR3-4 h182-HCDR2-10 | 8.32E-10 |
| | 亲和力成熟抗体 24 | h182-LCDR2-5 h182-HCDR2-6 | 9.98E-10 | 亲和力成熟抗体 50 | h182-LCDR3-5 h182-HCDR2-10 | 2.01E-09 |
| | 亲和力成熟抗体 25 | h182-LCDR3-3 h182-HCDR2-6 | 4.97E-10 | | | |

[0175] 实施例7:H182-MUT4与同靶点抗体亲和力比较

[0176] HEK293瞬时表达系统分别制备H182-MUT4及同靶点对照抗体Atezolizumab、Durvalumab,其中H182-MUT4重链恒定区核苷酸序列见SEQ ID NO:21,氨基酸序列见SEQ ID NO:22;H182-MUT4轻链恒定区核苷酸序列见SEQ ID NO:15,氨基酸序列见SEQ ID NO:16,利用Fortebio公司的Octet QKe system仪器,采用抗人抗体Fc段的捕获抗体(AHC)生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲和力。测定时将抗体(h182,H182-MUT4和对照抗体Atezolizumab,Durvalumab)用PBS缓冲液稀释至4ug/mL,流经AHC探针(Cat:18-5060,PALL)表面,时间为120s。人PD-L1-His重组蛋白作为流动相,浓度为60nM。结合时间为300s,解离时间为300s。实验完毕,扣除空白对照响应值,用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合,计算抗原抗体结合的动力学常数。

[0177] 结果显示H182-MUT4及对照抗体Atezolizumab、Durvalumab与人PD-L1重组蛋白的反应曲线如图7所示,拟合曲线并计算亲和力,H182-MUT4亲和力(KD)为4.65E-10M,Atezolizumab亲和力(KD)为7.19E-10M,Durvalumab亲和力(KD)为8.24E-10M。详细动力学参数如下表6所示。结果表明亲和力成熟后的H182-MUT4与人PD-L1具有高亲和力,且解离值较h182有明显降低。

[0178] 表6 H182-MUT4与同靶点上市抗体亲和力测定结果

| [0179] | | KD 值(M) | kon(1/Ms) | kdis(1/s) |
|--------|--------------|----------|-----------|-----------|
| | h182 | 2.22E-09 | 4.50E+05 | 1.00E-03 |
| [0180] | H182-MUT4 | 4.65E-10 | 4.27E+05 | 1.99E-04 |
| | Atezolizumab | 7.19E-10 | 4.28E+05 | 3.08E-04 |
| | Durvalumab | 8.24E-10 | 4.85E+05 | 3.99E-04 |

[0181] 实施例8:ELISA检测H182-MUT4对人PD-L1与其受体PD-1结合的抑制作用

[0182] 将人PD-1-hFc,浓度0.5μg/mL,4℃包被过夜,用5%BSA于37℃恒温培养箱封闭60min。将H182-MUT4和对照抗体Atezolizumab,Durvalumab,以及同型对照NC-hIgG1(起始浓度为4.5μg/mL,1.3倍连续稀释,12个梯度),37℃恒温培养箱反应60min后,加入1μg/mL的

PD-L1-mFc与抗体共孵育,37℃恒温培养箱反应60min。PBST洗板4次;然后加入1:5000稀释的HRP-anti-mouse Fc (Cat:115-035-071, Jackson Immuno Research),反应45min,加入TMB (Cat:ME142,北京泰天河生物)底物显色15min,2M HCl终止后读板。以630nm为参比波长,读取并记录波长450nm下孔板的吸光度值A450nm-630nm。

[0183] 结果显示H182-MUT4可以有效阻断重组人PD-L1与其受体PD-1的结合作用。通过ELISA测定了H182-MUT4,Atezolizumab和Durvalumab对人PD-L1与其受体PD-1结合的竞争抑制效应,其半数有效抑制浓度(IC50)值分别6.236nM,7.432nM和7.64nM(图8)。与Atezolizumab和Durvalumab相比,H182-MUT4阻断活性略好。

[0184] 实施例9:H182-MUT4与CHO-PD-L1-CD3L细胞结合活性分析

[0185] 将重组表达人PD-L1和anti-CD3-ScFv的CHO细胞(CHO-PD-L1-CD3L,江苏泰康生物医药有限公司)以 4×10^5 个细胞/孔接入96孔细胞培养板(Cat:3599,Corning),加入5%BSA PBS,4℃,30min封闭细胞表面受体。将H182-MUT4和对照抗体Atezolizumab,Durvalumab,以及同型对照NC-hIgG1(起始浓度为30μg/mL,3倍连续稀释,12个梯度)与CHO-PD-L1-CD3L细胞悬液在4℃孵育60min,以PBST洗涤细胞3次后,加入0.5ug/ml的山羊抗人IgG-FITC(Cat:F9512,Sigma)并4℃孵育60min。PBST洗涤细胞2次后通过流式细胞仪(型号B49007AD,SNAW31211,BECKMAN COULTER)检测细胞的平均荧光强度(MFI)以验证待测抗体是否可以与CHO细胞表面的PD-L1结合,如图9所示,H182-MUT4,Atezolizumab,Durvalumab与CHO-PD-L1-CD3L细胞的结合的EC50分别为0.658nM,0.908nM,1.022nM活性,较对照抗体Atezolizumab和Durvalumab,H182-MUT4与CHO-PD-L1-CD3L细胞的结合活性更好。

[0186] 实施例10:H182-MUT4阻断PD-L1与其受体PD1结合的细胞学活性观察

[0187] 取重组表达人PD-L1和anti-CD3-ScFv的CHO细胞(CHO-PD-L1-CD3L,江苏泰康生物医药有限公司),以 4×10^5 个细胞/孔接入96孔细胞培养板(Cat:3599,Corning),细胞培养箱中培养过夜后,弃上清,加入h182,H182-MUT4和对照抗体Atezolizumab,Durvalumab(起始浓度为2μg/mL,2倍连续稀释,10个梯度),50ul/孔,和50ul重组表达人PD-1和荧光素酶(luciferase)的Jurkat细胞(Jurkat-PD1-NFAT,江苏泰康生物医药有限公司)悬液,置于细胞培养箱孵育6h后。向细胞培养板中加入Bio-Glo™ Luciferase底物(Cat:7940,Promega),100ul/孔,将细胞板置于微孔板恒温振荡器中,800rpm避光孵育20min。设置多功能酶标仪为Luminescence模式,Integration选择500(仪器默认值),读取RLU。

[0188] 以Atezolizumab为对照品计算其他样品的相对活性,各样品EC50及相对活性如下表7所示。H182-MUT4的生物学活性优于对照抗体Atezolizumab,Durvalumab;h182的生物学活性优于对照抗体Atezolizumab。

[0189] 表7 H182-MUT4的生物学活性检测

| 实验板序号 | 名称 | EC50 ng/ml | 相对活性 |
|-------------|--------------|------------|--------|
| [0190] 1 | h182 | 516.9 | 137.6% |
| | Atezolizumab | 711.5 | N/A |
| | H182-MUT4 | 400.7 | 177.6% |
| 2 | Durvalumab | 518.2 | 140.3% |
| | Atezolizumab | 726.8 | N/A |

[0191] 实施例11:H182-mut4对PD-L1阳性细胞的ADCC效应

[0192] 选择处于对数生长期的表达人PD-L1的细胞MDA-MB-231,加入钙黄绿素(Calcein AM)对MDA-MB-231活细胞进行标记,将其与梯度稀释的H182-MUT4和对照抗体Atezolizumab,Durvalumab,Avelumab以及同型对照抗体(hIgG1)(起始浓度为100ng/mL,10倍连续稀释,5个梯度,每个浓度设置6个复孔)、效应细胞NK92细胞(效靶比5:1),并设以下对照:(1)阳性对照(PC):靶细胞最大释放孔;(2)阴性对照(NC):L15培养基(Cat:11415064,Gibco);(3)空白对照:DPBS(Cat:14190-144,Gibco)37℃共孵育6h后;在阳性对照中加入2%Triton X-100(Cat:X100-100ML,Sigma)后,37℃孵育30min,以单纯靶细胞自发释放孔作为空白对照,以靶细胞最大释放孔作为阳性对照,通过酶标仪(Cat:Synergy H1,Bio Tek)检测培养基中钙黄绿素(Calcein)的荧光强度,激发波长490nm,发射波长515nm,评价PD-L1抗体的ADCC杀伤活性:

[0193] 杀伤效率(%) = (实验组荧光值-自发释放组荧光值) / (最大释放组荧光值-自发释放组荧光值) × 100%

[0194] 结果显示(图10),抗体Atezolizumab无ADCC活性,抗体Avelumab、H182-MUT4、Durvalumab均有ADCC活性,EC50值分别为1.405ng/mL、0.9602ng/mL、0.8184ng/mL。

[0195] 实施例12:H182-MUT4在小鼠体内药代动力学特性观察

[0196] 将健康雌性5周龄Balb/C裸小鼠,3只分为一组,分别单次单剂量尾静脉给药H182-MUT4,Atezolizumab,Durvalumab,Avelumab,给药剂量为10mg/kg,分别于给药后0.5h、1h、2h、8h、24h、48h、96h、144h、216h、240h尾静脉采血,收集血样,室温放置30min以上,4000rpm,15min收集血清,-20℃保存,且最后一次收集血清至少于-20℃冻存24h,并设置三组对照组,分别尾静脉注射等同剂量(10mg/kg)的对照品Atezolizumab,Durvalumab,Avelumab进行比较,观察其药代动力学特性。采血全部完成后,包被PD-L1-His于96孔酶联板,0.5ug/ml,100ul/孔,4℃过夜,PBS洗板3次后,加入5%BSA PBS,37℃封闭60min,PBST洗板3次;加入待检测血清样本(10000,20000倍稀释),设置H182-MUT4和对照抗体Atezolizumab,Durvalumab,Avelumab标准曲线孔(起始浓度为0.05μg/mL,2倍连续稀释,12个梯度),并设以下对照:(1)阴性对照(NC):空白小鼠血清(10000倍稀释);(2)空白对照:PBS.37℃孵育60min,PBST洗板4次;加入1:5000稀释的HRP-羊抗人IgG(Fcr)(Cat:109-035-098,Jackson Immuno Research),37℃孵育40min,PBST洗板4次;加入TMB底物(Cat:ME142,北京泰天河生物技术有限公司)显色,37℃孵育10min后,加入2M HCl终止反应;以630nm为参比波长,读取并记录波长450nm下孔板的吸光度A450nm-630nm。以标准抗体的浓度为Y轴,OD值为X轴,拟合线性曲线,将检测血清的OD值带入公式可求得血清中抗体含量,并根据公

式 $T_{1/2} = |0.693/k|$, 计算药物半衰期 $T_{1/2}$ 。

[0197] 如图11, 表8所示, H182-MUT4与Durvalumab在Balb/c小鼠体内保持了良好的半衰期, $T_{1/2}$ 可达到130~150h左右, 提示H182-MUT4与Durvalumab抗体在体内没有明显的失活现象, 具有较好的结构稳定性。其代谢符合单抗药物的基本特征。但Atezolizumab与Avelumab在第144h时出现了明显的浓度下降。

[0198] 表8. H182-mut4在裸小鼠体内单次给药药代动力学参数

| 组别 (n=3) | $T_{1/2}$ |
|--------------|--------------|
| | PD-L1 检测 (h) |
| Avelumab | 65±5 |
| Atezolizumab | 60±3 |
| Durvalumab | 155±17 |
| H182-MUT4 | 152±19 |

[0200] 实施例13: H182-MUT4在MC38-hPD-L1荷瘤小鼠体内的抗肿瘤药效

[0201] 将表达人源PD-L1的小鼠结肠癌MC38细胞(MC38-hPD-L1)以 5×10^5 个/0.1mL浓度接种于5-8周龄雌性C57BL/6小鼠的右侧皮下, 待肿瘤生长到大约100mm³时将肿瘤体积符合要求的小鼠随机分组, 每组6只, 共分为4组, 分别给予抗PD-L1抗体H182-MUT4、Atezolizumab和Durvalumab和同型对照抗体hIgG1 10mg/kg, 给药频率BIW, 给药和观察期间每周测量2次小鼠体重和肿瘤体积, 并记录测量值。结果如图12所示, H182-MUT4明显抑制肿瘤生长, 抑瘤效果与对照抗体Atezolizumab基本相当。

[0202] 实施例14: H182-MUT4-TGFβRII双功能蛋白的制备

[0203] 将本发明获得的抗PD-L1人源化抗体H182-MUT4的重链C端经由连接肽(SEQ ID NO.79)连入TGFβRII胞外区序列(SEQ ID NO.29), 通过酶切位点, 克隆至真核表达载体中, 获得含H182-MUT4重链-TGFβRII编码序列的表达质粒, 转入大肠杆菌扩增, 分离获得大量质粒, 并根据转染试剂293fectin(Cat:12347019, Gibco)的操作说明, 将该质粒和H182-MUT4轻链质粒转入HEK293细胞中重组表达。细胞转染后5-6天, 取培养上清, 利用ProA亲和层析柱对表达上清进行纯化, 获得的双功能蛋白H182-MUT4-TGFβRII(其中重链示于SEQ ID NO:77, 轻链示于SEQ ID NO:78)。利用Fortebio公司的Octet QKe system仪器, 采用抗人抗体Fc段的捕获抗体(AHC)生物探针捕获抗体Fc段的方法测定抗体亲和力。测定时将双功能蛋白H182-MUT4-TGFβRII, H182-MUT4, TGFβRII-hFc(Cat:CC10, 近岸科技)用PBS缓冲液稀释至5ug/mL, 流经AHC探针(Cat:18-5060, PALL)表面, 时间为120s。分别以人PD-L1-His重组蛋白和人TGFβ1重组蛋白(Cat:CA59, 近岸科技)作为流动相, 浓度为60nM。结合时间为300s, 解离时间为300s。实验完毕, 扣除空白对照响应值, 用软件进行1:1Langmuir结合模式拟合, 计算抗原抗体结合的动力学常数。结果如表9所示, 与H182-MUT4-TGFβRII-hFc相比, 双功能蛋白H182-MUT4-TGFβRII对PD-L1、TGFβ1的亲和力无明显降低。

[0204] 表9双功能蛋白H182-MUT4-TGFβRII亲和力测定结果

| | KD 值(M) | |
|--------------------------|----------|----------|
| | PD-L1 | TGFβ1 |
| [0205] H182-MUT4-TGFβRII | 3.81E-10 | 1.45E-09 |
| H182-MUT4 | 4.33E-10 | |
| TGFβRII-hFc | | 1.24E-09 |

[0206] 实施例15:双功能蛋白H182-MUT4-TGFβRII在PD-1和PD-L1人源化小鼠荷瘤hPD-L1-MC38皮下瘤模型体内的抗肿瘤药效

[0207] 将只表达人源PD-L1的小鼠结肠癌MC38细胞(MC38-hPD-L1, Cat: 3111C0001CCC000667, 中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心)以 5×10^5 个/0.1mL浓度接种于5-8周龄PD-1和PD-L1人源化小鼠(Cat:T004022, 集萃药康生物科技)的右侧皮下,待肿瘤生长到大约 100mm^3 时按肿瘤体积挑选18只符合要求的小鼠随机分组,每组6只,共分为3组,进行给药(D0),分别给予抗PD-L1抗体H182-MUT4(10mg/kg)、双功能蛋白H182-MUT4-TGFβRII(13.5mg/kg)和同型对照抗体hIgG1 10mg/kg,给药途径i.p,给药频率tiw \times 9,给药和观察期间每周测量2次小鼠体重和肿瘤体积,并记录测量值,当单个小鼠的肿瘤体积超过 3000mm^3 或者处理组平均肿瘤体积超过 2000mm^3 或动物体重降低超过20%,终止实验。

[0208] 如图13所示,抗PD-L1抗体H182-MUT4及双功能蛋白H182-MUT4-TGFβRII均有一定的肿瘤抑制效果,且H182-MUT4与TGFβRII组成的双功能蛋白具有更好的抑瘤作用。

[0209] 以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形,只要不脱离本发明的精神,均应属于本发明所附权利要求的范围。

序列表

<110> 迈威(上海)生物科技有限公司

北京科诺信诚科技有限公司

<120> 抗PD-L1抗体及其应用

<130> LC19110066

<160> 79

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> m182,VH

<400> 1

```
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgtacag tttctggctt caacattaaa gacatttata tgcactggct gaagcagagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180
gacccgaagt tccaggacaa ggccactatg atagcagaca catcctcaa cacagcctac 240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgcccgtct attactgtgc tagtggacag 300
ctcggcccc taggcttga ctactggggc caaggacca ctctcacagt ctctca 357
```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> m182,VH

<400> 2

```
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile
           20           25           30
Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
```

50 55 60
 Gln Asp Lys Ala Thr Met Ile Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Gln Leu Gly Pro Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 3
- <211> 321
- <212> DNA
- <213> 人工 (artificial)
- <220>
- <221> gene
- <222> () .. ()
- <223> m182,VL
- <400> 3

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctetca ccattagcaa cctggagcaa 240
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa a 321

- <210> 4
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> 人工 (artificial)
- <220>
- <221> PEPTIDE
- <222> () .. ()
- <223> m182,VL
- <400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> h182_VH1

<400> 5

gaggtgcagc tgggtgcagtc cggagccgag gtgaagaagc ctggagccac cgtgaagatc 60
 tcctgcaagg tgtccggctt caacatcaag gacatctaca tgcactgggt gcagcaggct 120
 cctggcaagg gcctggagtg gatgggacgg atcgaccctg ccaacggcaa caccaagtac 180
 gacccaagt tccaggaccg ggtgaccatc accgctgaca cctccaccga caccgcctac 240
 atggagctgt cctccctgcg gtccgaggac accgctgtgt actactgctc caccggccag 300
 ctgggacctc tgggcttcca ctactgggga caggcacca cegtgacctg gtctctcc 357

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> h182_VH1

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50 | 55 | 60 |
| Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | |
| | 85 | 90 |
| Ala Thr Gly Gln Leu Gly Pro Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly | | |
| | 100 | 105 |
| Thr Thr Val Thr Val Ser Ser | | |

115

<210> 7

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> h182_VL1

<400> 7

gacatccaga tgaccagtc tcctcctct ctgtctgct cctgtggcga cagagtgacc 60
 atcacctgca gagcctcca ggacatctcc aactacctga actggtacca gcagaagcct 120
 ggcaaggctc ccaagctgct gctgtactac acctccagge tgcactccgg agtgcctct 180
 cggttctctg gctccggctc tggcacgac tacacctga ccatctctc cctgcagccc 240
 gaggacttgc ccacctacta ctgccagcag ggcaacacce tgcctacac ctteggagga 300
 ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> h182_VL1

<400> 8

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|
| Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr | | |
| | 20 | 25 |
| Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu | | |
| | 35 | 40 |
| | | 45 |

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> h182_VH2

<400> 9

gaggtgcagc tgggtgcagtc cggagccgag gtgaagaagc ctggagccac cgtgaagatc 60
 tcctgcaagg tgtccggctt caacatcaag gacatctaca tgcactgggt gcagcaggct 120
 cctggcaagg gcctggagtg gatgggacgg atcgaccctg ccaacggcaa caccaagtac 180
 gacccaagt tccaggaccg ggtgaccatc accgctgaca cctccaccaa caccgcctac 240
 atggagctgt cctccctgcg gtccgaggac accgctgtgt actactgcgc ctctggccag 300
 ctgggacctc tgggcttcga ctactgggga caggcacca cegtgaccgt gtctctcc 357

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> h182_VH2

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 50 | 55 | 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gln | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Thr | Ser | Thr | Asn | Thr | Ala | Tyr | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | | | | | |
| Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | | | | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | 95 | | | | | | |
| Ala | Ser | Gly | Gln | Leu | Gly | Pro | Leu | Gly | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | | |
| Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | | | | | | | | | |

<210> 11

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> h182_VL2

<400> 11

gacatccaga tgaccagtc tcctcctct ctgtctgct cctgtggcga cagagtgacc 60
atcacctgca gagcctcca ggacatctcc aactacctga actggtacca gcagaagcct 120
ggcaaggctc ccaagctgct gctgtactac acctccagge tgcactccgg agtgcctct 180
cggttctctg gctccggctc tggcacgac tacacctga ccatctctc cctgcagccc 240
gaggacttgc ccacctactt ctgccagcag ggcaacacce tgccttacac ctteggagga 300
ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> h182_VL2

<400> 12

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | | | | |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | | | | |
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Asp | Ile | Ser | Asn | Tyr | | | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | | | |
| Leu | Asn | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Leu | | | | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | | |

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> h182,CH

<400> 13

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

- <210> 14
- <211> 990
- <212> DNA
- <213> 人工(artificial)
- <220>
- <221> gene
- <222> ()..()
- <223> h182,CH
- <400> 14

gctagcacca agggcccate ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacacttcc cggctgtcct acagtctctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacgcc 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 720
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 15

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> h182/H182-MUT4,CL

<400> 15

cggaccgtgg cggcgccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggtaccgcta gcgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> h182/H182-MUT4,CL

<400> 16

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Thr | Val | Ala | Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Ser | Asp | Glu |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| Gln | Leu | Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn | Phe |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn | Ala | Leu | Gln |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ser | Gly | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser |
| | | | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | |

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Ala Ser Gly Gln Leu Gly Pro Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Thr Thr Val Thr Val Ser Ser | | | |

115

<210> 19

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> H182-MUT4,CL

<400> 19

gacatccaga tgaccagtc tcctctctct ctgtctgctt cctgtggcga cagagtgacc 60
atcacctgca gagcctcca ggacatctcc aactacctga actggtacca gcagaagcct 120
ggcaaggctc ccaagctgct gctgtactac acctccaggc tgcactccgg agtgcctctt 180
cggttctctg gctccggctc tggcaccgac tacacctga ccatctctc cctgcagccc 240
gaggacttgc ccacctactt ctgccagcag ggcgctggac ggcctacac cttcgagga 300
ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> H182-MUT4,VL

<400> 20

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|----|
| Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly | | | |
| 50 | 55 | 60 | |

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ala Gly Arg Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 21

<211> 990

<212> DNA

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> H182-MUT4,CH

<400> 21

gctagcacca agggcccatt ggttttccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgttctt acagtctctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacce tcatgatctc ccggaccct 420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggaga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacct tgcctccatc tcgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcttt ctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgtccctg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaa 990

<210> 22

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> H182-MUT4,CH

<400> 22

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys |
| | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | 110 | | |
| Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | |
| Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys |
| | | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | |
| Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp |
| 145 | | | | | | 150 | | | | 155 | | | | | 160 |
| Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | 175 | |
| Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu |
| | | | 180 | | | | | | | 185 | | | | 190 | |
| His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | | 205 | | |
| Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | |
| Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu |
| 225 | | | | | 230 | | | | | | 235 | | | | 240 |
| Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | 255 | |
| Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn |
| | | | 260 | | | | | | | 265 | | | | 270 | |
| Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe |
| | | 275 | | | | | | 280 | | | | | | 285 | |
| Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn |

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------|
| 290 | 295 | 300 |
| Val Phe Ser Cys Ser | Val Met His Glu Ala | Leu His Asn His Tyr Thr |
| 305 | 310 | 315 |
| Gln Lys Ser Leu Ser | Leu Ser Pro Gly Lys | |
| | 325 | 330 |
| <210> 23 | | |
| <211> 448 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> 人工 (artificial) | | |
| <220> | | |
| <221> PEPTIDE | | |
| <222> ()..() | | |
| <223> atezolizumab,HC | | |
| <400> 23 | | |
| Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser | | |
| | 20 | 25 |
| Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | | |
| | 35 | 40 |
| Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val | | |
| | 50 | 55 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | |
| | 85 | 90 |
| Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr | | |
| | 100 | 105 |
| Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro | | |
| | 115 | 120 |
| Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly | | |
| | 130 | 135 |
| Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln | | |
| | 165 | 170 |
| Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser | | |
| | 180 | 185 |
| Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser | | |

| | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 |
| Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr | | |
| 210 | 215 | 220 |
| His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg | | |
| | 245 | 250 |
| Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro | | |
| | 260 | 265 |
| Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr | | |
| | 325 | 330 |
| Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu | | |
| | 340 | 345 |
| Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys | | |
| | 355 | 360 |
| Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser | | |
| | 405 | 410 |
| Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala | | |
| | 420 | 425 |
| Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | | |
| | 435 | 440 |
| | | 445 |

<210> 24

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> atezolizumab,LC

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 25

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> avelumab,HC

<400> 25

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala | | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg | | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 26
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工 (artificial)
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> () .. ()
 <223> avelumab,LC
 <400> 26
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215
 <210> 27
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工 (artificial)
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> ()..()
 <223> durvalumab,HC
 <400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

| | | | | | |
|-------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|
| | 420 | | 425 | | 430 |
| His | Glu Ala Leu | His Asn His | Tyr Thr Gln Lys | Ser Leu Ser | Leu Ser |
| | 435 | | 440 | | 445 |
| Pro | Gly Lys | | | | |
| | 450 | | | | |
| <210> | 28 | | | | |
| <211> | 215 | | | | |
| <212> | PRT | | | | |
| <213> | 人工 (artificial) | | | | |
| <220> | | | | | |
| <221> | PEPTIDE | | | | |
| <222> | () .. () | | | | |
| <223> | durvalumab,LC | | | | |
| <400> | 28 | | | | |
| Glu | Ile Val Leu | Thr Gln Ser | Pro Gly Thr | Leu Ser Leu | Ser Pro Gly |
| 1 | | 5 | | 10 | |
| Glu | Arg Ala Thr | Leu Ser Cys | Arg Ala Ser | Gln Arg Val | Ser Ser Ser |
| | | 20 | | 25 | |
| Tyr | Leu Ala Trp | Tyr Gln Gln | Lys Pro Gly | Gln Ala Pro | Arg Leu Leu |
| | | 35 | | 40 | |
| Ile | Tyr Asp Ala | Ser Ser Arg | Ala Thr Gly | Ile Pro Asp | Arg Phe Ser |
| | | 50 | | 55 | |
| Gly | Ser Gly Ser | Gly Thr Asp | Phe Thr Leu | Thr Ile Ser | Arg Leu Glu |
| 65 | | 70 | | 75 | |
| Pro | Glu Asp Phe | Ala Val Tyr | Tyr Cys Gln | Gln Tyr Gly | Ser Leu Pro |
| | | 85 | | 90 | |
| Trp | Thr Phe Gly | Gln Gly Thr | Lys Val Glu | Ile Lys Arg | Thr Val Ala |
| | | 100 | | 105 | |
| Ala | Pro Ser Val | Phe Ile Phe | Pro Pro Ser | Asp Glu Gln | Leu Lys Ser |
| | | 115 | | 120 | |
| Gly | Thr Ala Ser | Val Val Cys | Leu Leu Asn | Asn Phe Tyr | Pro Arg Glu |
| | | 130 | | 135 | |
| Ala | Lys Val Gln | Trp Lys Val | Asp Asn Ala | Leu Gln Ser | Gly Asn Ser |
| 145 | | 150 | | 155 | |
| Gln | Glu Ser Val | Thr Glu Gln | Asp Ser Lys | Asp Ser Thr | Tyr Ser Leu |
| | | 165 | | 170 | |
| Ser | Ser Thr Leu | Thr Leu Ser | Lys Ala Asp | Tyr Glu Lys | His Lys Val |
| | | 180 | | 185 | |
| Tyr | Ala Cys Glu | Val Thr His | Gln Gly Leu | Ser Ser Pro | Val Thr Lys |

| 195 | 200 | 205 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys | | |
| 210 | 215 | |
| <210> 29 | | |
| <211> 136 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Homo sapiens | | |
| <400> 29 | | |
| Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp | | |
| | 20 | 25 |
| | | 30 |
| Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys | | |
| | 35 | 40 |
| | | 45 |
| Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp | | |
| 65 | 70 | 75 |
| | | 80 |
| Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro | | |
| | 85 | 90 |
| | | 95 |
| Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met | | |
| | 100 | 105 |
| | | 110 |
| Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu | | |
| | 115 | 120 |
| | | 125 |
| Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp | | |
| 130 | 135 | |
| <210> 30 | | |
| <211> 107 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> 人工 (artificial) | | |
| <220> | | |
| <221> PEPTIDE | | |
| <222> ()..() | | |
| <223> VL | | |
| <400> 30 | | |
| Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly | | |
| 1 | 5 | 10 |
| | | 15 |
| Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr | | |
| | 20 | 25 |
| | | 30 |

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> VL

<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Val Gly Ala Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> VH

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ala Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Gln Leu Gly Pro Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> VL

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

| | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|----|
| | 85 | 90 | 95 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys | | | |
| | 100 | 105 | |
| <p><210> 34 <211> 107 <212> PRT <213> 人工 (artificial) <220> <221> PEPTIDE <222> ()..() <223> VL <400> 34</p> | | | |
| Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ala Gly Trp Pro Tyr | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys | | | |
| | 100 | 105 | |
| <p><210> 35 <211> 119 <212> PRT <213> 人工 (artificial) <220> <221> PEPTIDE <222> ()..() <223> VH <400> 35</p> | | | |
| Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile | | | |
| | 20 | 25 | 30 |

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR1

<400> 38

Ser Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR1

<400> 39

Asp Ile Tyr Ile Ser

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR1

<400> 40

Asp Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 41

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 42

Arg Ile Asp Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 43

Arg Ile Asp Pro Arg Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 44

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Ala Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 45

Arg Ile Asp Val Leu Asn Ala Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 46

Arg Ile Asp Val Arg Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 47

Arg Ile Asp Pro Ala Ala Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工(artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 48

Arg Ile Asp Ser Asn Ala Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 49

Arg Ile Asp Leu Ala Asn Ala Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 50

Arg Ile Asp Arg Ala Ala Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> HCDR2

<400> 51

Arg Ile Asp Pro Arg Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> HCDR3

<400> 52

Gly Gln Leu Gly Pro Leu Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> HCDR3

<400> 53

Gly Gln Ala Gly Ser Leu Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> HCDR3

<400> 54

Gly Gln Leu Ala Ser Leu Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT
<213> 人工(artificial)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> HCDR3
<400> 55
Gly Gln Val Gly Met Leu Gly Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工(artificial)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> HCDR3
<400> 56
Gly Arg Leu Gly Ser Leu Gly Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工(artificial)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> LCDR1
<400> 57
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工(artificial)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> LCDR1

<400> 58
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工 (artificial)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> () .. ()
<223> LCDR1

<400> 59
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工 (artificial)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> () .. ()
<223> LCDR1

<400> 60
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工 (artificial)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> () .. ()
<223> LCDR2

<400> 61
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT

Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> LCDR2

<400> 66

Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> LCDR3

<400> 67

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> LCDR3

<400> 68

Gln Gln Gly Ala Ala Gly Pro Tyr Thr

1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> LCDR3
<400> 69
Gln Gln Gly Phe Gly Ala Pro Tyr Thr
1 5
<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工 (artificial)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> LCDR3
<400> 70
Gln Gln Gly Val Gly Ala Pro Tyr Thr
1 5
<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工 (artificial)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> LCDR3
<400> 71
Gln Gln Gly Ala Gly Arg Pro Tyr Thr
1 5
<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工 (artificial)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> LCDR3
<400> 72
Gln Gln Gly Ala Gly Trp Pro Tyr Thr

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> LCDR3

<400> 76

Gln Gln Gly Leu Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 77

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> H182-MUT4-TGFβRII,HC

<400> 77

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Ala Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Gly Gln Leu Gly Pro Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 78

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工 (artificial)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

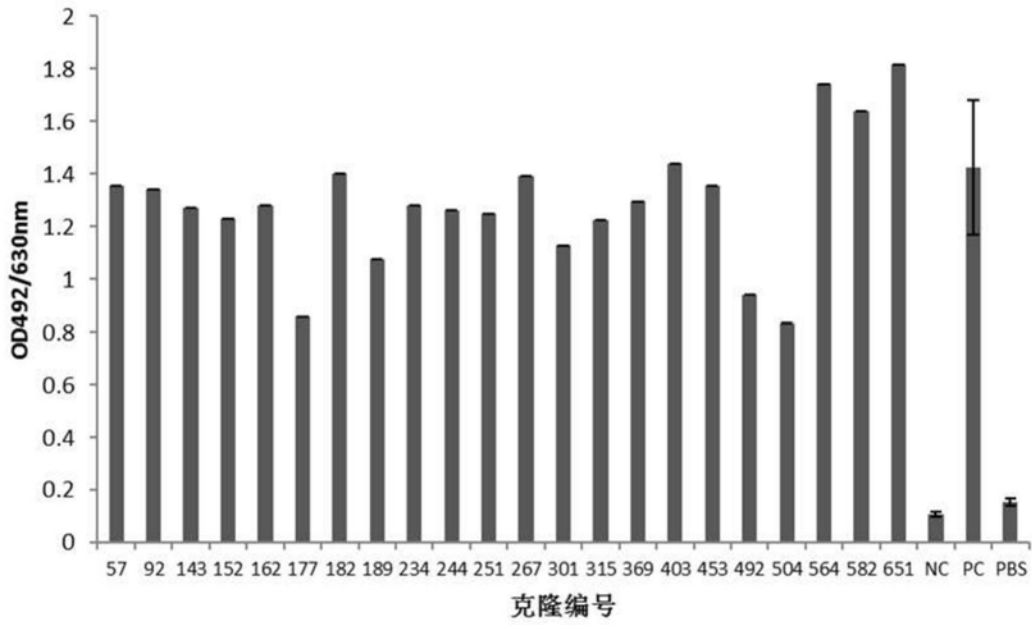


图1

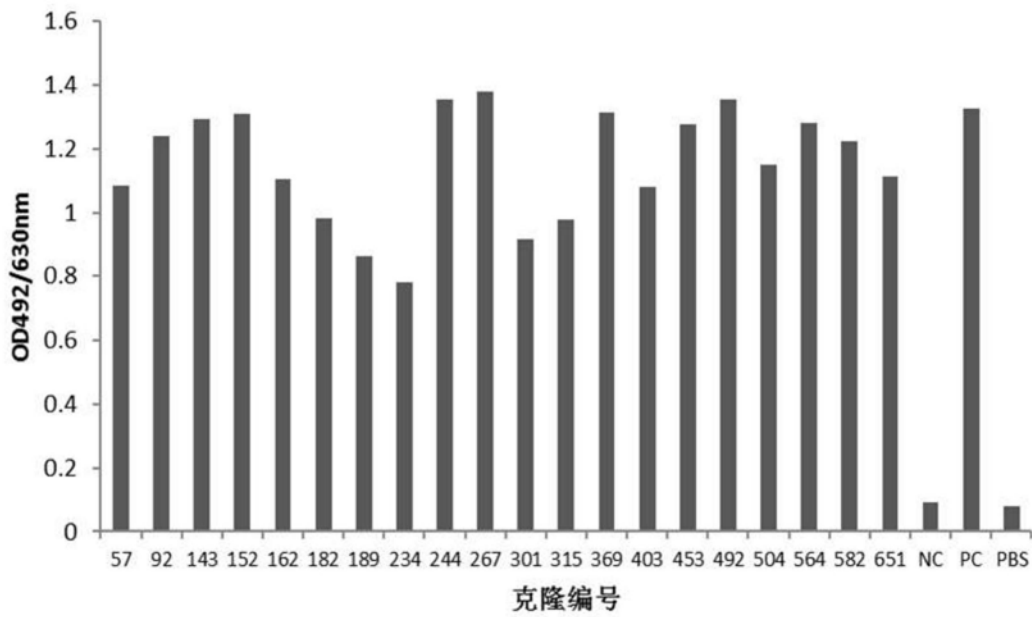


图2

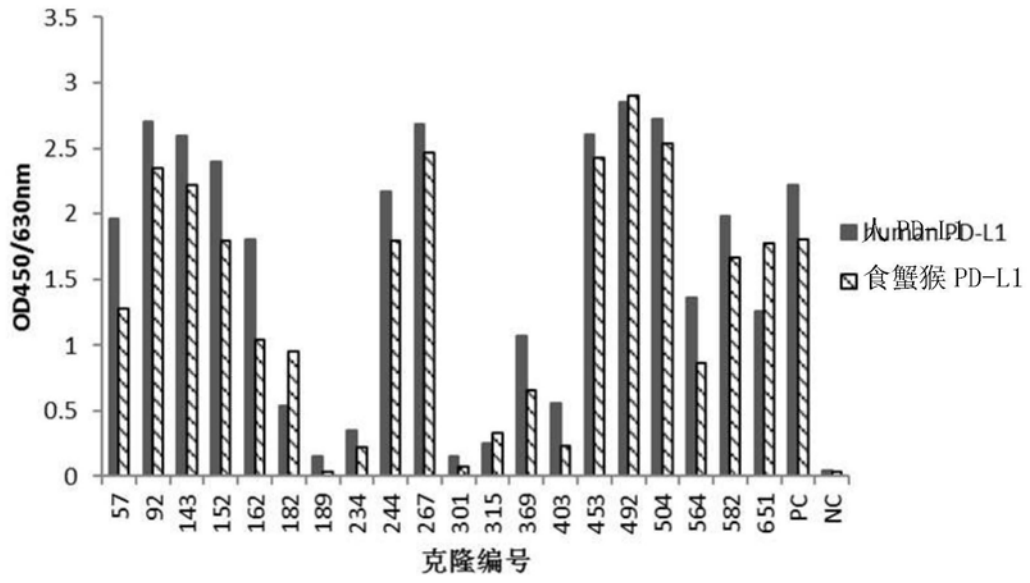


图3

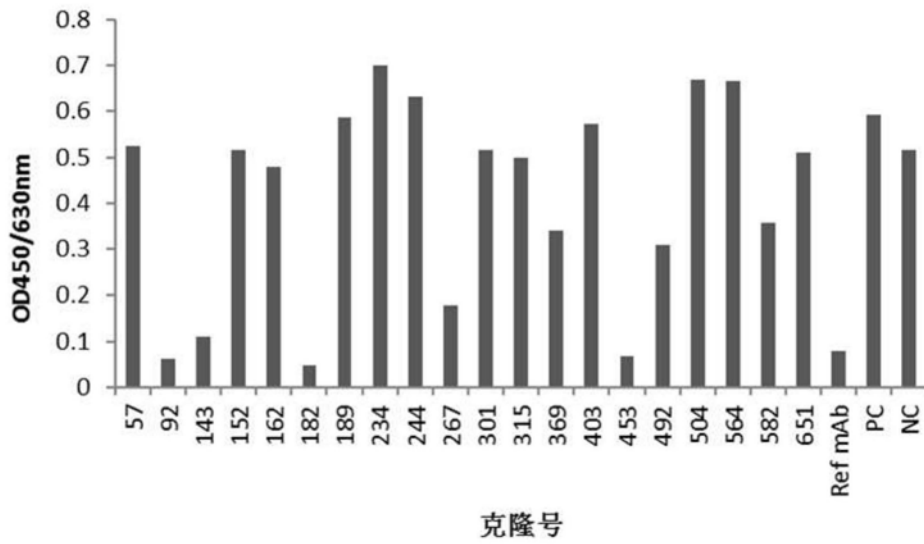


图4

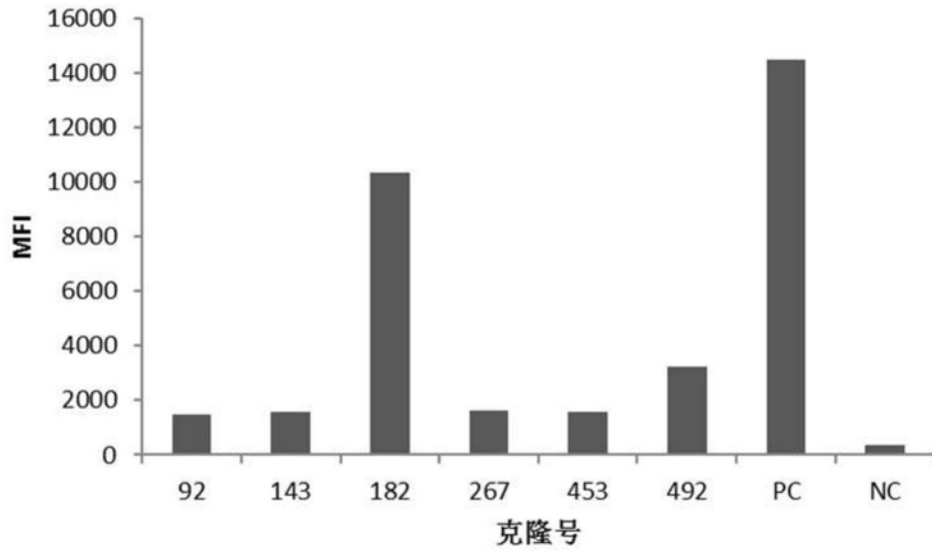


图5

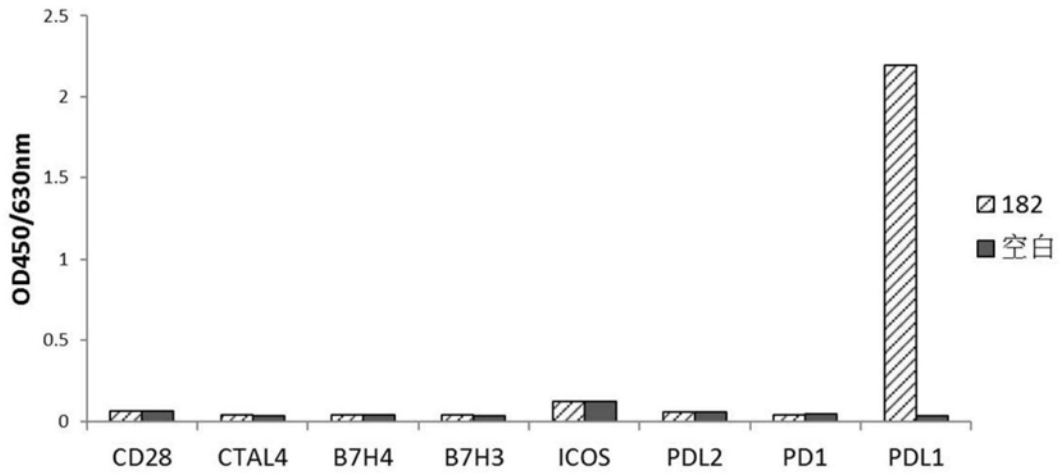


图6

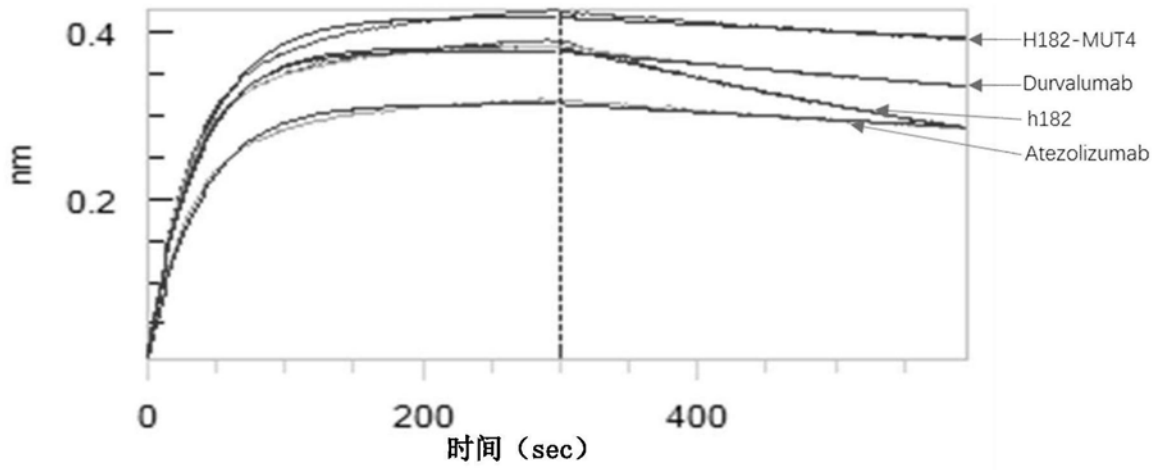


图7

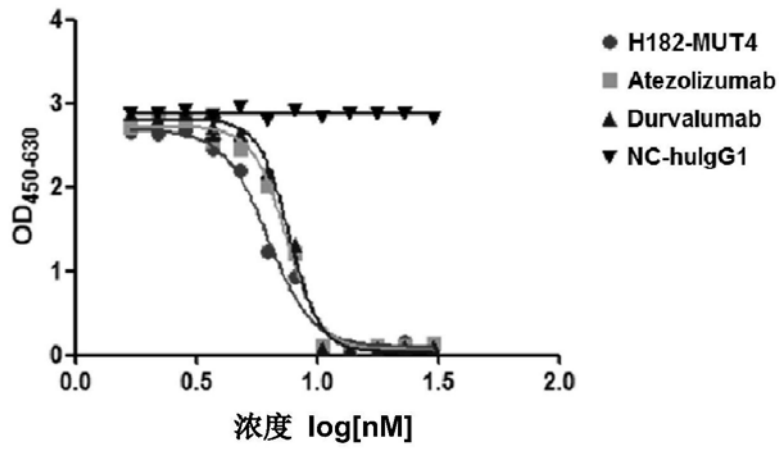


图8

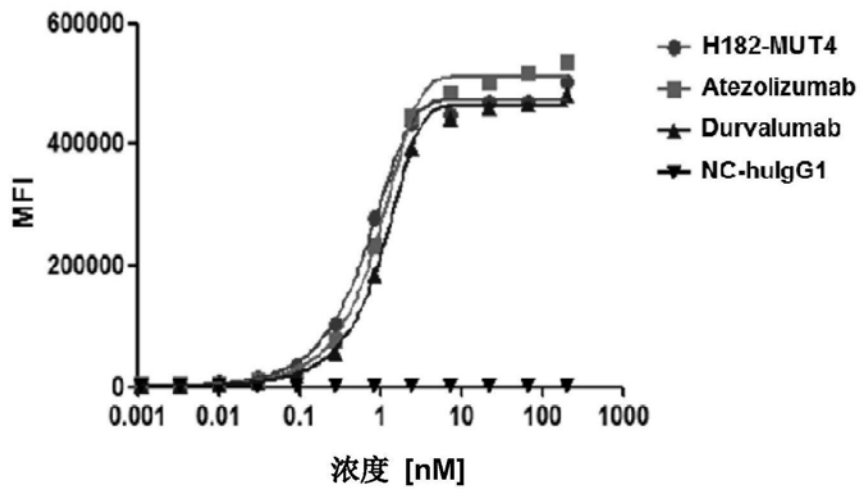
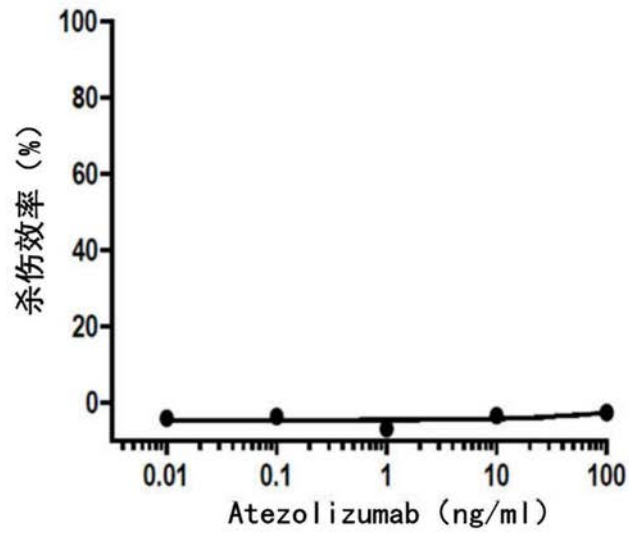
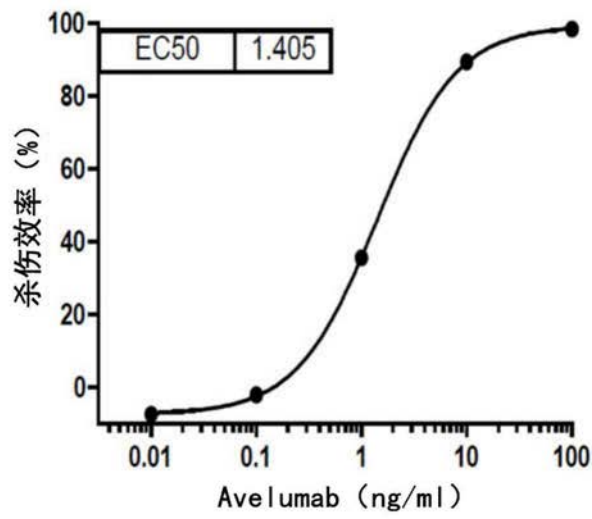


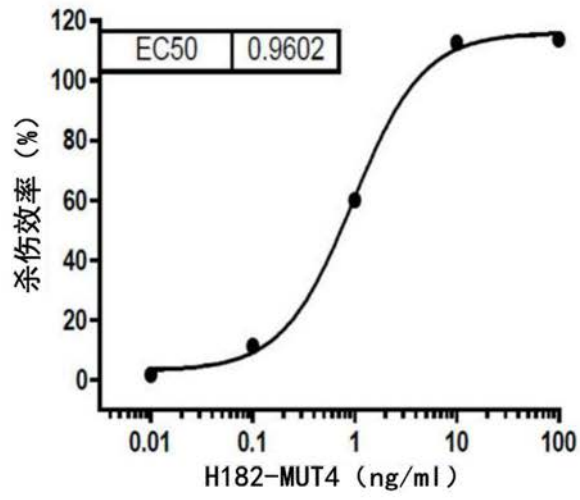
图9



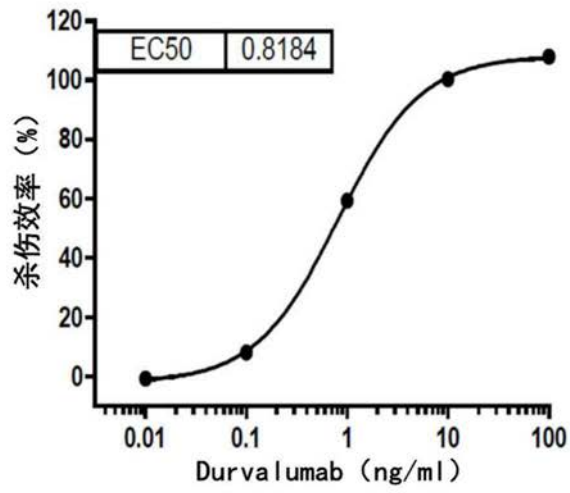
10A



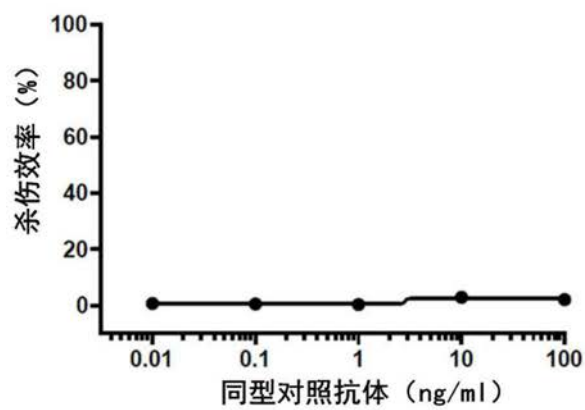
10B



10C

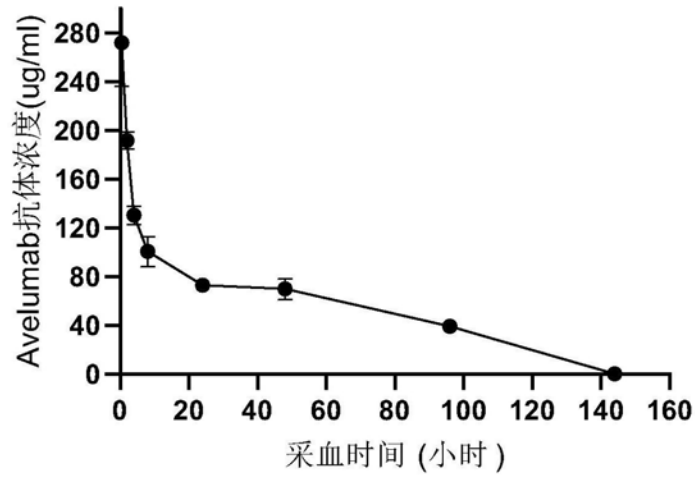


10D

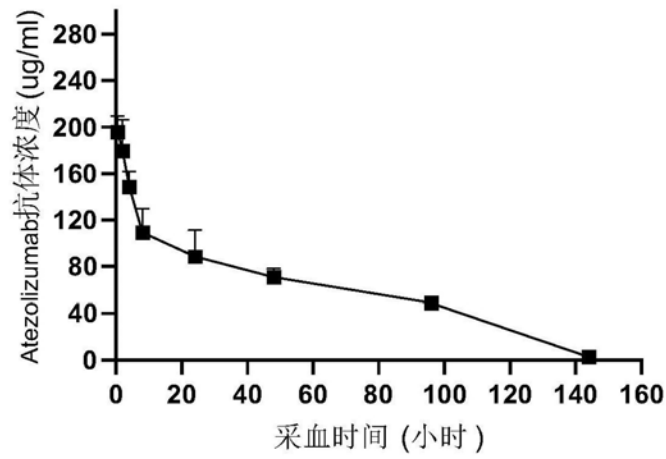


10E

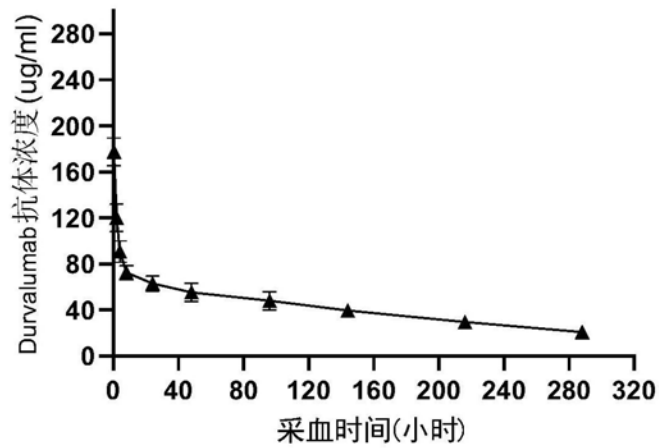
图10



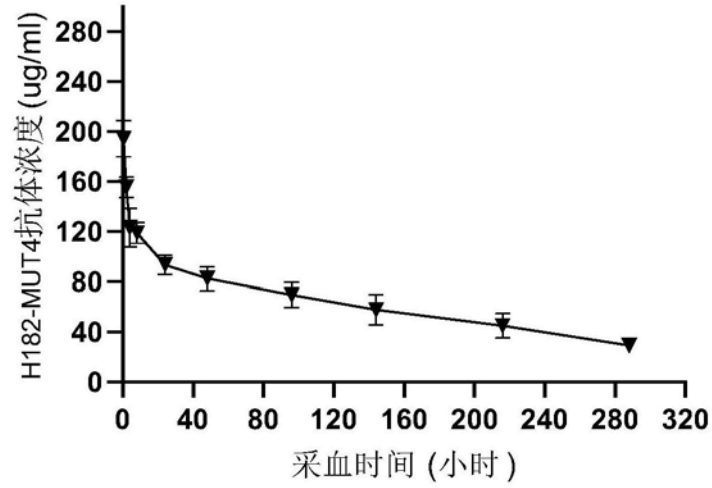
11A



11B



11C



11D

图11

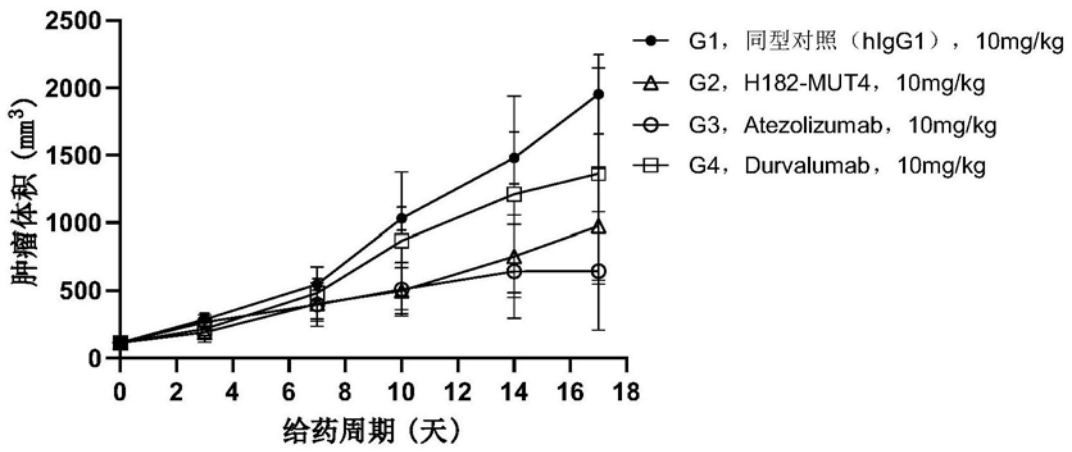


图12

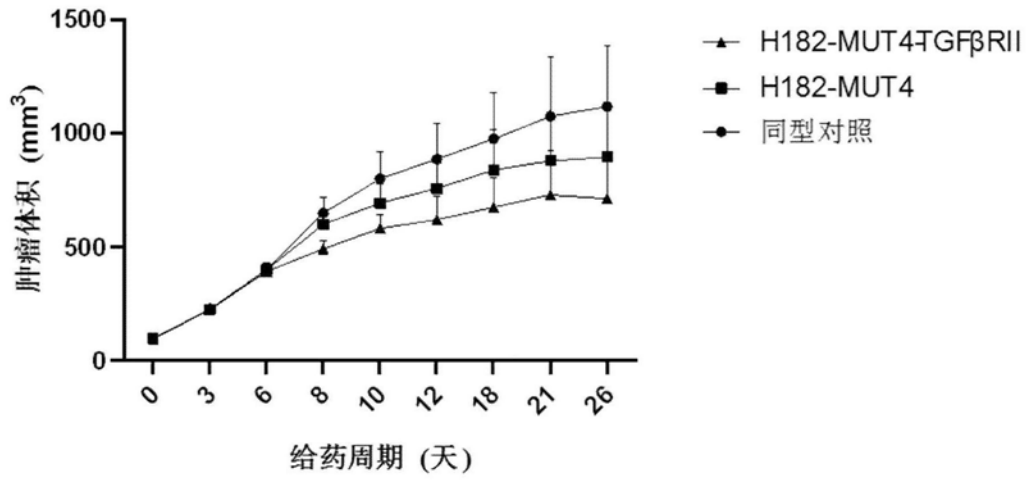


图13