



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106939049 B

(45)授权公告日 2019.10.01

(21)申请号 201710262053.4  
 (22)申请日 2017.04.20  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 106939049 A  
 (43)申请公布日 2017.07.11  
 (73)专利权人 苏州思坦维生物技术股份有限公司  
 地址 215100 江苏省苏州市苏州工业园区  
 星湖路218号生物纳米园C11楼201室  
 (72)发明人 胡红群 陈叢 宋晓琦 罗师平  
 蔡明文 范金玲 徐一清 周群敏  
 (74)专利代理机构 上海市汇业律师事务所  
 31325  
 代理人 王函

(51)Int.Cl.  
 C07K 16/28(2006.01)  
 C12N 15/13(2006.01)  
 A61K 39/395(2006.01)  
 A61P 35/00(2006.01)  
 (56)对比文件  
 CN 104558177 A,2015.04.29,全文.  
 CN 104560884 A,2015.04.29,全文.  
 WO 2014179664 A2,2014.11.06,全文.  
 审查员 马振莲

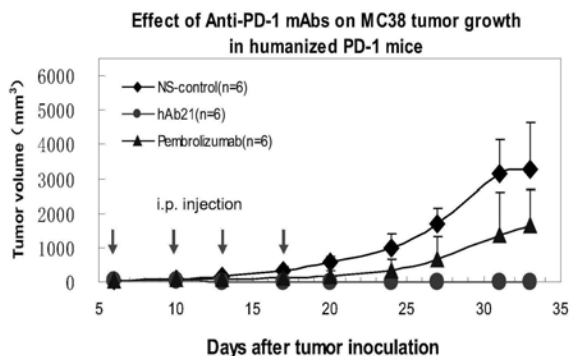
权利要求书1页 说明书26页  
 序列表3页 附图13页

(54)发明名称

拮抗抑制人PD-1抗原与其配体结合的单克隆抗体及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种拮抗抑制人PD-1抗原与其配体结合的单克隆抗体或其衍生体,其包含抗体轻链可变区的抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5的氨基酸序列;抗体重链可变区的抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10的氨基酸序列。本发明还公开了该抗体的人源化制备过程及该人源化抗体重链可变区与轻链可变区氨基酸序列。该抗体或其衍生体可作为药物组合物成分或制备成合适药物制剂,单独给药或与化疗药物等其他治疗手段合并使用,用于治疗如结肠癌等实体瘤。



1. 一种拮抗抑制人PD-1抗原与其配体结合的单克隆抗体或其衍生体,其特征在于,其包含第一可变区和第二可变区,其中所述第一可变区是抗体轻链可变区,其抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4 及SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列;其中所述第二可变区是抗体重链可变区,其抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9 及SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其衍生体,其特征在于,所述第一可变区是抗体轻链可变区,为SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;其所述第二可变区是抗体重链可变区,为SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其衍生体,其特征在于,其包含所述抗体轻链可变区和人抗体轻链恒定区,及包含所述抗体重链可变区和人抗体重链恒定区的铰链区,CH1区,CH 2区和CH3区。

4. 根据权利要求3所述的抗体或其衍生体,其特征在于,所述人抗体轻链恒定区来自人抗体kappa链或抗体lamda链,所述人抗体重链恒定区来自人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚型。

5. 一种编码权利要求2所述抗体或其衍生体的DNA分子或基因,其特征在于,编码抗体轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:13所示,编码抗体重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:14所示。

6. 一种表达载体,其特征在于,它含有权利要求5所述的DNA分子或基因以及与该DNA分子或基因操作性相连的表达调控序列。

7. 一种重组宿主细胞,其特征在于,它由权利要求6所述的表达载体转化而成。

8. 根据权利要求7所述的重组宿主细胞,其中所述重组宿主细胞表达权利要求2所述的抗体或其衍生体。

9. 一种药物或药物组合物,其特征在于,它含有药学上有效量的如权利要求1或2所述的抗体或其衍生体,以及药学上可接受的载体。

10. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其衍生体在制备治疗肿瘤的药物中的应用。

11. 根据权利要求10所述的应用,其特征在于,所述肿瘤为结肠癌。

12. 一种制备权利要求1所述的抗体或其衍生体的方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:

a) 提供一表达载体,该表达载体含有权利要求5所述的DNA分子或基因以及与该DNA分子或基因操作性相连的表达调控序列;

b) 用步骤a)所述的表达载体转化宿主细胞;

c) 在适合所述抗体表达的条件下培养步骤b)所得的宿主细胞;和

d) 采用亲和层析从宿主细胞培养液中分离纯化获得所述抗体。

## 拮抗抑制人PD-1抗原与其配体结合的单克隆抗体及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术-单克隆抗体领域。本发明涉及一种拮抗抑制程序性死亡受体PD-1(programmed death-1)与其配体结合的单克隆抗体及其编码序列与其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 长期以来,生物医学界一直认为肿瘤的发生发展与机体内的免疫功能状态息息相关。体内免疫系统在正常状态下发挥着监控(Immune surveillance)变异的肿瘤细胞增长及抑制肿瘤转移复发的功能。免疫系统如出现功能抑制或低下时,肿瘤增长或转移复发则会加快,严重时更危及生命。因此以通过调动机体自身免疫功能来直接攻击或杀灭肿瘤为目的的“肿瘤免疫疗法(Tumor Immunotherapy)”是肿瘤临床治疗领域追求的一大目标。自2011年以来,免疫疗法在肿瘤临床治疗领域取得了一系列具革命性变化(revolutionizing cancer treatment)的重大突破(见综述:Topalian SL等:Cancer immunotherapy comes of age.JCO 2011;29:4828-4836;Pardoll D和Drake C:Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy.J Exp Med 2012;209:201-209;Page DB,Postow MA,Callahan MK,Allison JP and Wolchok JD:Immune modulation in cancer with antibodies.Annu Rev Med 2014;65:185-202)。这些革命性突破则主要得益于免疫学基础研究领域的进展及以杂交瘤/基因工程抗体等为代表的现代生物技术的出现与发展。

[0003] 免疫学基础研究表明由胸腺发育而来的T淋巴细胞介导的细胞免疫在识别监控及/或直接攻击消灭肿瘤细胞的过程中起着非常致为关键的作用。T淋巴细胞在功能上大致可分为两大类:即以调控免疫功能为主的辅助T细胞(T helper cells)和直接参与识别靶抗原与攻击杀伤靶细胞的细胞毒性T细胞(cytotoxic T cells,CTL)。

[0004] 辅助T细胞或细胞毒性T细胞(CTL)的活化、增生及其在清除靶抗原与攻击杀伤靶细胞等免疫功效阶段一般都需要两个信号通路的协同作用:协同信号通路1是通过T细胞上的特异识别不同抗原的受体蛋白(T-cell receptor,TcR)与表达在肿瘤靶细胞或抗原提呈细胞(antigen-presenting cells,APC)上相应的特异抗原多肽(antigen peptide)-MHC(major histocompatibility)的结合而传导,该信号通路为抗原特异性的;协同信号通路2则是通过T细胞上的协同刺激因子(co-stimulatory molecules)或协同抑制因子(co-inhibitory molecules)与其相应表达在靶细胞或抗原提呈细胞(Antigen presenting cells,APC)上的配体结合而传导,该信号通路为抗原非特异性的。T淋巴细胞一般只有在协同信号通路1与协同信号通路2都同时存在的状态下才发生活化增生与清除靶抗原及杀灭靶细胞的作用。

[0005] 正向上调免疫功能的协同刺激因子主要包括CD28与其配体B7-1(CD80)、B7-2(CD86);CD40与其配体CD40L;CD137(又称为4-1BB)与其配体CD137-L;CD278(ICOS,Inducible T-cell costimulator)与其配体ICOS-L等。

[0006] 负向下调免疫功能的协同抑制因子(又称为免疫抑制检查点, inhibitory immune checkpoint molecules)则主要包括CTLA-4(Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4)与其配体B7-1(CD80)、B7-2(CD86);程序性死亡受体PD-1(programmed death-1)与其配体PD-L1和PD-L2;LAG-3(Lymphocyte activation gene-3)与其配体;TIM-3(T-cell Immunoglobulin domain and Mucin domain 3)与其配体;BTLA(B and T Lymphocyte Attenuator)与其配体等。这些协同刺激/协同抑制因子在分子结构上都很相似,均属于免疫球蛋白超家族成员(见综述:Chen LP:Co-inhibitory molecules of the B7-CD28family in the control of T cell immunity.Nature Immunol 2004,336-347)。

[0007] 理论上,至少可以通过两大不同途径达到上调或提高体内免疫功能的目的是:

[0008] 途径1是通过激活CD28等协同刺激因子而直接达到上调免疫功能的功效;

[0009] 途径2则是通过降低或阻断CTLA-4,PD-1/PD-L1,TIM-3,LAG-3或BTLA等因子介导的免疫抑制,从而间接达到上调免疫功能的功效。

[0010] 通过激活CD28等协同刺激因子尽管可以达到直接上调免疫功能的功效,但由于2006年在英国进行的一代号为TGN1412的抗CD28单克隆抗体药物的临床I期研究中,6位健康受试者在接受注射该抗体药物的当天即发生了极其严重的不良反应(Suntharalingam G等,N Engl J Med 2006;355:1018-1028),因此目前医学界普遍认为激动型抗CD28抗体类药物在临床应用上具有很高的安全风险,其未来开发上市的前景存在很多担忧与不确定性。

[0011] 相反的,目前以去除或降低CTLA-4,或PD-1/PD-L1等因子介导的免疫抑制作用的拮抗性单克隆抗体药物,由于其在国际上开展的多个临床研究中都表现出非常明显的抗肿瘤疗效及可接受的安全性,现反而已成为国际肿瘤药物研究与开发领域的最成功热点;其中靶向PD-1/PD-L1的单抗药物开发尤其引入注目(Quezada SA and Peggs KS:British Journal of Cancer 2013;108:1560-1565;Flemming A:Nat Rev Drug Discov.2012,11:601)。

[0012] PD-1基因最早是由日本科学家Tasuku Honjo及其同事在1992年发现与克隆的,其胞外区有1个IgV样区,与CTLA-4有23%的同源性(Ishida,Y.,Agata,Y.,Shibahara,K.and Honjo,T.:EMBO J.1992;11:3887)。

[0013] PD-1主要表达于活化的T淋巴细胞、B淋巴细胞、单核细胞等免疫细胞上(Yasutoshi Agata等,International Immunology 1996;8:675)。PD-1的受体或配体有两个:分别为PD-L1(Freeman GJ等,JEM 2000;192:1027-1034),或又称B7-H1(Dong H等,Nature Medicine 1999;5:1365-1369)和PD-L2(Latchman Y等,Nat.Immunol.2001;2:261-268),或又称B7-DC(Tseng SY等,JEM 2001;193:839-845)。PD-L1及PD-L2主要表达在肿瘤等靶细胞或抗原提呈细胞上(Thompson RH等,Cancer Res 2006;66:3881-3885)。

[0014] PD-1参与负向下调体内免疫功能的这一现象最早是由Tasuku Honjo及其同事在PD-1基因敲除小鼠中观察到的。他们发现PD-1基因敲除的小鼠在C57BL/6基因背景下,发生狼疮样肾小球肾炎和关节炎(Nishimura H等:Immunity 1999;11:141);而在Balb/c基因背景下,则产生高滴度的抗心肌组织抗体并由此引发严重的自身免疫性心肌病(Nishimura H.等:Science 2001;291:319)。

[0015] 体内正常组织细胞中因表达有PD-L1或PD-L2基因而使其免于受周围淋巴细胞无

故攻击或杀伤排斥(Keir M.E.等:J Exp Med 2006;203:883-895;Keir ME,Butte MJ, Freeman GJ,Sharpe AH:Annu Rev Immunol2008;26:677-704)。

[0016] 不幸的是,变异的肿瘤细胞也能够借调高PD-L1或PD-L2基因的表达而与淋巴细胞上的PD-1受体的结合,抑制淋巴细胞活性,从而逃避免疫攻击或免疫杀伤排斥反应而不断增长(Dong H等,Nature Medicine2002;8:793-800;Azuma T等,Blood 2008;111:3635-3643)。体内如给予中和性PD-1抗体或PD-L1抗体阻断淋巴细胞上的PD-1与肿瘤细胞上的PD-L1/PD-L2结合,则可恢复淋巴细胞免疫识别与杀伤变异的肿瘤细胞的能力,进而达到抑制肿瘤生长、甚至彻底消灭与排斥肿瘤的良好效果(Iwai Y等,PNAS 2002;99:1229;Hirano F等,Cancer Res 2005;65:1089-1096)。

[0017] 基于这些前期基础研究与令人鼓舞的临床前动物实验结果,国际上多家制药企业如美国Bristol-Myers Squibb (BMS) /Medarex (米德列斯) 公司,美国Merck公司,美国Genentech公司早在2003年前后就起动了以阻断PD-1与其配体(PD-L1)结合为目的抗体新药研制并开始申请了相关专利。

[0018] 例如,美国Medarex (米德列斯) 公司及日本小野药品工业株式会社(Ono Pharmaceutical) 在一项授权专利号为No 8,008,449的美国发明专利文件中公开了由转染CHO细胞及其表达的含全长或含胞膜外区人PD-1蛋白作为混合抗原,交叉免疫具人免疫球蛋白(Ig)转基因的工程小鼠(HuMAb Mouse)中筛选获得的多个抗人PD-1抗体的杂交瘤及其分泌的抗体蛋白、编码抗体蛋白的核苷酸序列,及该抗体用于PD-1蛋白检测及治疗肿瘤等疾病的应用。

[0019] 美国Merck Sharp&Dohme公司(以下简称Merck公司)在一项授权专利号为No 8,168,757美国发明专利文件中,也公开了其由含PD-1基因的DNA分子免疫小鼠后筛选获得的多个抗人PD-1抗体的杂交瘤及其抗体蛋白、其编码核苷酸序列,及该抗体用于通过增强机体内免疫功能而达到治疗肿瘤及感染性疾病的目的。

[0020] 美国Genentech公司在一项授权专利号为No 8,217,149的美国发明专利文件中,公开了从噬菌体抗体展示基因库(phage-display)中筛选扩增获得的多个抗人PD-L1抗体的抗体蛋白片段、其编码核苷酸序列及其用途。

[0021] 在中国,这些国际制药企业也已向国家知识产权局先后提交了有关PD-1抗体的发明专利申请,其中如美国Medarex (米德列斯) 公司通过国际PCT申请(PCT/US2006/026046)进入中国的名为“抗程序性死亡配体1(PD-L1)的人单克隆抗体。申请文件号:200680028238.9”专利申请文件中就披露了其从免疫小鼠中筛选获得的高亲和力特异结合人PD-L1的单克隆抗体、其编码DNA序列及其用该类抗体用于治疗包括癌症和传染病在内的各种疾病的方法。

[0022] 美国Weythe (惠氏) 公司及Medimmune (免疫医疗有限公司) 在其名为“抗PD-1抗体及其用途。专利申请号为201010170022.4”发明专利申请文件中披露了从噬菌粒scFv基因展示库筛选获得的抗人PD-1抗体的片段、其编码DNA序列及该类抗体作为药物成分,用于治疗包括自身免疫病、变态反应、癌症等免疫系统相关疾病的应用。

[0023] 除国外制药企业之外,自2013年起,国内也已经有多家研发机构与企业先后向国家知识产权局提交了有关PD-1抗体的PCT或中国发明专利申请。国内机构最早提出的有关PD-1单抗的专利申请为由郑州大学于2013年5月27日提交的文件名为“一种全人源化抗PD-

1单克隆抗体及其制备方法和应用”(专利申请号:CN201310199947.5,申请公开文件号:CN103242448B)。该专利申请文件公开了一种对PD-1有很高的亲和力和很低的免疫原性的全人源化抗PD-1单克隆抗体及其重链与轻链氨基酸序列。该文件还描述了该全人源化抗PD-1单克隆抗体特异性阻断PD-1/PD-L抑制信号,及其增强促进机体中失能的效应性细胞生物学功能恢复,增强淋巴细胞对肿瘤抗原、外来入侵的病毒等的杀伤力,提高机体免疫力,及时清除肿瘤细胞和病毒的应用。该专利法律状态为最初于2015年1月14日获授权,但在2016年7月20日因未缴年费专利权已被终止。

[0024] 国内申请靠前的其他研发机构与企业的几项有关PD-1单抗的发明专利申请依次如下:

[0025] 2013年6月26日由上海君实生物医药科技有限公司及苏州君盟生物医药科技有限公司共同申请的文件名为“抗PD-1抗体及其应用”(专利申请号:CN201310258289,专利申请公开文件号:CN104250302A)提供了一种新的PD-1抗体或其功能性片段。该文件还涉及所述抗体在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0026] 2013年9月13日由百济神州有限公司提交的申请文件名为“抗PD-1抗体及其作为治疗剂与诊断剂的用途”(申请号:CN201380079581.6,专利申请公开文件号:CN105531288A),该发明提供特异性结合程序性死亡-1(PD1、Pdc1或CD279)、抑制免疫细胞中PD1介导的细胞信号传导及活性,并结合PD1的配体所需要的一套氨基酸残基的抗体,及这些抗体治疗或诊断由PD-1介导的功能所调控的癌症、传染性疾病或其他病理病症的用途。

[0027] 2013年10月25日苏州思坦维生物技术有限责任公司提交的文件名为“拮抗抑制程序性死亡受体PD-1与其配体结合的单克隆抗体及其编码序列与用途”(申请号:CN201310512512.1;专利申请公开文件号:CN104558177A)。该发明公开了一种拮抗抑制PD-1与其配体结合的小鼠单克隆抗体及其重链可变区与轻链可变区氨基酸序列。该发明还公开了编码该抗体重链可变区与轻链可变区的DNA分子核苷酸序列。该发明还公开了该抗体的人-鼠嵌合抗体及其衍生体的制备方法,以及其在PD-1蛋白检测上的应用。

[0028] 2013年11月14日上海恒瑞医药有限公司及江苏恒瑞医药股份有限公司提交了文件名为“PD-1抗体、其抗原结合片段及其医药用途”(专利申请号:CN201480011008.6,专利申请公开文件号:CN105026428A)专利申请。

[0029] 上述专利申请及其后的PD-1抗体专利申请目前大都均处于文件公开或实质审查阶段。

[0030] 2015年10月28日小野药品工业株式会社(Ono Pharmaceutical)/美国Medarex(梅达雷克斯)公司递交的一项名为“程序性死亡-1(PD-1)的人单克隆抗体及使用抗PD-1抗体来治疗癌症的方法”的专利申请正式获得中国国家知识产权局授权(授权专利号:CN103059138B)。该授权专利保护的是限定了CDR序列的具体抗体结构程序性死亡-1(PD-1)的人单克隆抗体及使用该PD-1抗体来治疗癌症的方法。

[0031] 而在PD-1/PD-L1药物全球开发领域,到目前为止还仅只有以下三个抗体药物先后获美国FDA批准上市:

[0032] 1) Opdivo(通用名为Nivolumab,曾用代号BMS-936558,MDX-1106),是一全人源PD-1单抗(IgG4-kappa型),由美国Bristol-Myers Squibb/Medarex公司和日本小野制药公司

共同开发的,于2014年7月率先在日本获批准上市用于治疗晚期黑色素瘤,成为全球首个批准上市PD-1抑制剂药物。其后Opdivo (Nivolumab) 于2014年12月12首次获美国FDA批准上市用于一线治疗对其它药物没有应答的手术不可切除的或转移性黑色素瘤患者。

[0033] 2) 抗-PD1单抗药物Keytruda (通用名为Pembrolizumab;曾用代号MK3475, lambrolizumab),是一种人源化PD-1单抗(IgG4-kappa型),由美国Merck公司开发,于2014年9月4日首次获美国FDA快速审批通道批准用于那些晚期黑素瘤患者在已经Ipilimumab (伊匹单抗,抗人CTLA4单抗) 治疗后,或因携带BRAF基因突变而使用过BRAF抑制剂治疗后使用。Keytruda也因此成为首个在美国获批上市的抗PD-1药物。

[0034] 3) Tecentriq (通用名Atezolizumab;曾用代号MPDL3280A),是一种人源化PD-L1单抗(IgG1-kappa型),由美国Genentech/Roche公司开发,2016年5月19日首次获美国FDA批准上市,作为二线药物用于治疗晚期膀胱癌。

[0035] 在欧盟,Opdivo (Nivolumab) 和Keytruda (Pembrolizumab) 相继分别在2015年6月及2015年7月获批准上市。

[0036] 在中国,目前还无PD-1单抗药物或PD-L1单抗药物获批上市。

[0037] 获美国/欧盟/日本等国家和地区批准上市的上述两个PD-1单抗药物和一个PD-L1单抗药物,在其各自的早期临床试验(I期)中就业已表现有抑制肿瘤生长、甚至彻底消灭与排斥肿瘤及显著延长患者生存期的客观疗效,而且其长期使用的安全性也可接受(Brahmer JR等, JCO 2010;28:3167-3175;Topalian S等, NEJM 2012;366:2443-2454;Brahmer JR等, NEJM 2012;366:2455-2465;Hamid O等, NEJM2013;369:134-144)。其中最早公开报道的及最具轰动效果的大型临床试验结果是由Topalian等于2012年6月在国际著名医学杂志N Engl J Med发表(Topalian S等: N Engl J Med 2012,366:2443-2454)。该文章中报道:在一项有296例晚期恶性肿瘤患者参与的I期临床研究中,患者每2周接受静脉注射美国BMS公司的PD-1单抗药物Nivolumab (代号BMS-93655) 后,结果有高达28%的黑色素瘤患者、27%的肾细胞癌患者及出乎意料之高的18%非小细胞肺癌(NSCLC)患者,其肿瘤出现抑制或缩小;Nivolumab在临床上治疗肿瘤的疗效上还表现出长期持久的特点:如在已随访1年以上的31位患者中,有20位(64.5%)临床上依然有效。

[0038] 其后研究进一步证实Nivolumab在临床上治疗晚期恶性肿瘤的疗效甚至好于化疗药物:如Robert等于2015年1月在N Engl J Med杂志发表的文章中报道(Robert C et al: N Engl J Med.2015;372:320-30):在一项由BMS公司发起与资助的名为CheckMate066的临床研究中,418例未经治疗过的、BRAF基因无突变的转移性黑色素瘤晚期患者随机分组,分别接受Nivolumab (每2周一次) 治疗或化疗药物dacarbazine治疗,结果在入组治疗1年后,与dacarbazine治疗组相比,Nivolumab治疗组患者的总生存期和无进展生存期均显著改善。其中Nivolumab组的总生存率达到72.9%,而dacarbazine组的总生存率为42.1% (P<0.001);Nivolumab组的中位无进展生存期为5.1个月,而dacarbazine组为2.2个月(P<0.001);Nivolumab组客观缓解率为40.0%,而dacarbazine组为13.9% (P<0.001)。

[0039] 与Nivolumab的多项临床研究结果相类似,Pembrolizumab的临床研究结果也同样惊艳与令人振奋。如Hamid等于2013年7月在N Engl J Med杂志发表的文章中报道(Hamid O等, N Engl J Med 2013,369:134-144):在一国际多中心I期试验中,之前至少接受过两次以上的Ipilimumab治疗后病情发生进展的晚期黑素瘤的患者随机分配至接受每3周静脉给

予Pembrolizumab(剂量:2mg/kg)或每3周静脉给予Pembrolizumab(剂量:10mg/kg),直到疾病进展或发生不可耐受的毒性或患者志愿同意退出研究。研究结果分析发现:Pembrolizumab治疗后有高达38%的患者肿瘤出现抑制或缩小;在随访中位数时间为11个月的52位肿瘤患者中,有42位(81%)依然有效,还在继续接受Pembrolizumab治疗。

[0040] Robert C等于2014年9月在国际杂志Lancet发表的文章中报道(Robert C et al: Lancet.2014Sept.20;384:1109-17):173名之前曾接受过Ipilimumab治疗但无效的晚期黑素瘤患者,随机入组分别接受每三周静脉给予Pembrolizumab(剂量:2mg/kg,n=89)或每三周静脉给予Pembrolizumab(剂量:10mg/kg,n=84),直到疾病进展或发生不可耐受的毒性或患者志愿同意退出研究。结果显示中位随访时间为8个月,Pembrolizumab单抗俩剂量组的总生存率(ORR)为26%,其中2mg/kg剂量组81位患者中有21位存活,10mg/kg组中76位患者中有20位存活。

[0041] Opdivo(Nivolumab)及Keytruda(Pembrolizumab)单抗药物虽已在肿瘤治疗领域带来革命性变化(revolutionizing cancer treatment),但其在临床上也还有不少缺陷与不足,这些缺陷与不足至少包括以下几方面:

[0042] 1) Opdivo(Nivolumab)及Keytruda(Pembrolizumab)单抗药物目前临床上还只获批用于治疗晚期黑素瘤、肾癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、膀胱癌等少数瘤种,对其他常见及多发恶性肿瘤临床治疗上的安全性及有效性还有待研究与确证。

[0043] 2) 对于已获批肿瘤,Opdivo(Nivolumab)及Keytruda(Pembrolizumab)单抗药物的治疗有效率一般也仅在15-50%之间,患者中位PFS也仅有几个月。这意味着对大多数肿瘤患者来说,即使接受了现有的PD-1单抗药物,也不能确保可以获益或显著延长其生存时间。

[0044] 3) Opdivo(Nivolumab)及Keytruda(Pembrolizumab)药物的长期使用可导致患者发生包括如免疫介导性肺炎(Immune-Mediated Pneumonitis)等免疫相关不良事件(immune-related adverse events);这些免疫相关不良事件有时还涉及皮肤、胃肠道、肝脏、内分泌等其他多个组织器官(Naidoo J et al:Ann Oncol.2015;26:2375-91)。

[0045] 要克服上述这些缺陷与不足,除需加强对已有Opdivo(Nivolumab)及Keytruda(Pembrolizumab)药物的具体靶向位点(epitope)、作用机制、药物不良反应产生的原因等作进一步的基础及临床研究之外,临床上用也还需推出具独特抗原结合区域/结合位点(epitop)且体内外生物活性/抗肿瘤疗效优于现有的Opdivo(Nivolumab)及Keytruda(Pembrolizumab)的、全新的抗PD-1的单克隆抗体药,以满足国内外众多肿瘤患者药的迫切需求。

[0046] 鉴于PD-1与其受体(PD-L1或PD-L2)的结合具有结合区域广泛、参与结合的氨基酸位点数目多达几十个以上等特点;同时再考虑到人PD-1蛋白与小鼠PD-1蛋白在氨基酸序列上的同源性仅有60%左右,因此理论上推测,如采用传统的抗原蛋白免疫小鼠及杂交瘤技术,应可以制造或开发出针对不同结合区域/或结合位点的各种全新的抗PD-1单克隆抗体。这些具新的、独特抗原结合区域/结合位点(epitop)的单克隆抗体,有望取得比现已上市的PD-1单抗Opdivo(Nivolumab)或Keytruda(Pembrolizumab)更强的体内外生物活性或更安全、更优良的疗效。这些新的单抗作为药物成分,一方面可与目前已上市的PD-1单抗药物或

PD-L1单抗药物联合或序贯使用,达到进一步增强机体免疫功能及增强抗肿瘤疗效的作用;另一方面,也有望独立开发成为单独使用的新型免疫功能增强剂或抗肿瘤药物制剂。

### 发明内容

[0047] 本发明要解决的技术问题之一是提供一种抗原结合区域/结合位点(epitop)不同于现有的Opdivo (Nivolumab)或Keytruda (Pembrolizumab)的、全新的抗PD-1的单克隆抗体或其衍生体如抗体Fab片段、单链抗体等。该单克隆抗体或其衍生体可拮抗抑制PD-1抗原与其配体(PD-L1及PD-L2)结合。

[0048] 本发明要解决的技术问题之二是提供编码上述抗体的DNA分子或基因。

[0049] 本发明要解决的技术问题之三是提供含有上述抗体的药物或药物组合物。

[0050] 本发明要解决的技术问题之四是提供含有上述抗体的药物或药物组合物在治疗肿瘤上的应用。

[0051] 本发明要解决的技术问题之五是提供制备上述抗体的方法。

[0052] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:

[0053] 在本发明第一方面,提供了一种抗原结合区域/结合位点(epitop)不同于现有的Opdivo (Nivolumab)或Keytruda (Pembrolizumab)的、全新的抗PD-1的单克隆抗体或其衍生体,其包含第一可变区和第二可变区,其中所述第一可变区是抗体轻链可变区,其抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列;其中所述第二可变区是抗体重链可变区,其抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

[0054] 所述抗体包括人源化单克隆抗体,所述衍生体包括抗体Fab片段、单链抗体、双特异抗体(bi-specific)等。

[0055] 作为本发明优选的技术方案,所述第一可变区是抗体轻链可变区,为SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;其所述第二可变区是抗体重链可变区,为SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

[0056] 作为本发明优选的技术方案,其包含所述抗体轻链可变区和人抗体轻链恒定区,及包含所述抗体重链可变区和人抗体重链恒定区的铰链区,CH1区,CH 2区和CH3区。

[0057] 作为本发明优选的技术方案,所述人抗体轻链恒定区来自人抗体kappa链或抗体lamda链,所述人抗体重链恒定区来自人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4等亚型,其中优选的为IgG4亚型。

[0058] 在本发明第二方面,提供了一种编码上述抗体或其衍生体的DNA分子或基因核苷酸序列,其抗体轻链可变区基因核苷酸序列为SEQ ID NO:13所示,抗体重链可变区可变区基因核苷酸序列为SEQ ID NO:14。

[0059] 本发明的第三方面是提供了一种表达载体,它含有编码上述抗体或其衍生体的DNA分子/基因核苷酸序列以及与该序列操作性相连的表达调控序列。

[0060] 本发明的第四方面提供了一种重组宿主细胞,它由上述表达载体转化而成。该重组宿主细胞或其子代细胞表达上述抗体或其衍生体。该抗体包括人源化单克隆抗体,衍生体包括抗体Fab片段、单链抗体、双特异抗体(bi-specific)等等。

[0061] 本发明的第五方面是提供一种药物或药物组合物,它含有药学上有效量的上述抗

体或其衍生体,以及药学上可接受的载体。

[0062] 本发明的第六方面是提供上述抗体的药物或药物组合物在制备治疗肿瘤的药物中的应用。所述肿瘤优选为结肠癌。在本发明的具体实施实例中,本发明描述了该人源化抗体在体内抑制结肠癌生长的应用。

[0063] 本发明第七方面是提供制备上述抗体或其衍生体的方法,该方法包括:

[0064] a) 提供一表达载体,该表达载体含有上述DNA序列以及与该序列操作性相连的表达调控序列;

[0065] b) 用步骤a)所述的表达载体转化宿主细胞;

[0066] c) 在适合所述抗体表达的条件下培养步骤b)所得的宿主细胞;和

[0067] d) 从该宿主细胞培养液中分离纯化获得所述抗体。

[0068] 本文所采用的术语“单克隆抗体(单抗)”指从一纯系细胞得到的免疫球蛋白,具有相同的结构和化学特性,对单一抗原决定簇有特异性。单克隆抗体与常规多克隆抗体制剂(通常是具有针对不同决定簇的不同抗体)不同,各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤或重组工程细胞培养获得,不会混杂有其它免疫球蛋白。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性,是从均一的抗体群中获得的,这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

[0069] 本文所采用的术语“人源化单克隆抗体”系将鼠源单克隆抗体的氨基酸序列除保留互补决定区(complementarity-determining regions,CDR)外,其它序列(包括可变区中的框架区序列)全部或大部分替换成人免疫球蛋白的氨基酸序列,以达到通过基因工程手段最大限度地降低鼠源性单克隆抗体的免疫原性。

[0070] 本文所用的术语“抗体”和“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区( $V_H$ )。其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区( $V_L$ ),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0071] 本文所用的术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中成为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(Framework regions,FR)。抗体重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 $\beta$ -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 $\beta$ 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷1,647-669页(1991))。抗体恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity,ADCC)或补体介导毒性(complement-dependent cytotoxicity,CDC)。

[0072] 本发明的抗体通常可以通过以下方法来制备:

[0073] 首先,将含有编码本发明的抗体的基因插入到含有合适的表达调控序列的表达载

体中。

[0074] 本文所用的术语“表达调控序列”通常指参与控制基因表达的序列。表达调控序列包括与目标基因操作性相连的启动子和终止信号。编码本发明抗体的基因(DNA)序列可用本领域技术人员熟知的常规手段,如根据本发明公开的蛋白质序列人工合成或用PCR法扩增得到。其后可用本领域熟知的各种方法将合成或PCR扩增得到的DNA片段插入到合适的表达载体中。本发明中所用的表达载体可以是本领域技术人员已知的市售表达载体,如Invitrogen公司的pCDNA3.1表达载体。

[0075] 用于接纳表达载体转化的合适宿主细胞一般包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞等。在本发明中,较佳的宿主细胞是哺乳动物细胞,尤其是中华仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0076] 表达载体转化的宿主细胞在合适的条件下(如以无血清培养基在细胞培养瓶或生物反应器中贴壁或悬浮培养)培养后,收获培养上清液,然后用包括protein-A亲和层析、离子交换层析、过滤除菌等本领域技术人员熟知的常规分离步骤或手段纯化得到本发明的抗体。

[0077] 纯化得到的本发明抗体可以溶于适当的溶剂如无菌生理盐水液体中,溶度可以制备成0.01至100mg/ml之间,理想的最终溶度可以制备成1至20mg/ml之间。

[0078] 为获得一种拮抗抑制PD-1(programmed death-1)与其配体结合的鼠源单克隆抗体及分泌它的杂交瘤细胞系,本发明选取哺乳动物表达的重组人PD-1胞膜外蛋白为免疫抗原,通过反复多次小剂量的小鼠皮下免疫,获得分泌抗PD-1蛋白的多克隆抗体;再从中挑取含高效价抗体的小鼠,取其脾脏细胞,通过体外与小鼠骨髓瘤细胞融合、再经药物筛选及亚克隆等步骤而建立了多株稳定分泌抗人PD-1蛋白的抗体的杂交瘤单克隆细胞。其中一代号为Ab21的小鼠杂交瘤细胞株,经ELISA、免疫印迹、免疫组化等多种方法鉴定,证实其所分泌的单克隆抗体不但能够特异结合人PD-1蛋白,而且可阻断抑制PD-1蛋白与其配体(PD-L1, PD-L2)的结合。

[0079] 本发明通过基因工程等手段获得了编码该鼠源抗体重链可变区及轻链可变区的基因片断,在此基础上对该抗体进行了人源化改造及其表达载体(pCDNA3.1-hAb21)的构建。该表达载体经转染进入中华仓鼠卵巢(CHO)细胞,获得稳定高效分泌表达该人源化抗体的重组工程细胞,并从重组工程细胞培养液中分离纯化获得到具有生物活性的人源化hAb21抗体蛋白。

[0080] 竞争ELISA分析表明该人源化hAb21抗体结合PD-1的位点(epitope)既显著不同于Nivolumab单抗的结合位点,也不同于Pembrolizumab(MK3475单抗)的结合位点。人源化hAb21抗体体内给药后对肿瘤生长有明显的抑制作用,且疗效明显优于已上市的Pembrolizumab(MK3475单抗)药物。

## 附图说明

[0081] 图1为本发明实施例1中人PD-1与小鼠PD-1蛋白氨基酸序列比对分析示意图。

[0082] 图2为本发明实施例1中以ELISA法检测小鼠杂交瘤细胞培养上清液样品与包被在96-孔板上的重组人PD-1胞膜外蛋白结合的结果示意图。其中mAb21及mAb11为两株不同杂

交瘤的上清液样品,阴性对照样品为未融合的SP2/0骨髓瘤细胞培养上清液样品。

[0083] 图3为本发明实施例2中以流式细胞仪检测分析小鼠抗体样品中抗体与稳定转染人PD-1基因的CHO细胞(CHO/PD-1)的结合结果示意图;其中,图3A代表control-IgG,为阴性对照样品;图3B代表人PDL2-Fc融合蛋白,为阳性对照样品;图3C代表杂交瘤mAb7细胞上清液样品;图3D代表杂交瘤mAb21细胞上清液样品。

[0084] 图4为本发明实施例3中以免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)方法检测mAb21单抗样品与组织切片的特异结合的结果示意图;其中,图4A代表食蟹猴脾组织切片;图4B代表食蟹猴淋巴结组织切片。

[0085] 图5A为本发明实施例4中以体外竞争ELISA法检测分析mAb21单抗样品或MK3475单抗样品拮抗阻断生物素标记的人PDL2-Fc蛋白(biotin-PDL2)结合包被在96-孔板上人PD-1蛋白的结果示意图。其中的hPV19为非相关的单抗样品,为阴性对照。

[0086] 图5B为本发明实施例5中以体外竞争ELISA法检测分析mAb21单抗样品或MK3475单抗样品拮抗阻断生物素标记的MK3475单抗(biotin-MK3475)结合包被在96-孔板上人PD-1蛋白的结果示意图。其中的hPV19为非相关的单抗样品,为阴性对照。

[0087] 图6A为本发明实施例8中人源化hAb21单抗轻链可变区与Nivolumab单抗轻链可变区及MK3475单抗轻链可变区的氨基酸序列比对分析示意图。其中方框标识的为CDR1, CDR2及CDR3氨基酸序列。

[0088] 图6B为本发明实施例8中人源化hAb21单抗重链可变区与Nivolumab单抗(Nivo)重链可变区及MK3475单抗重链可变区的氨基酸序列比对分析示意图。其中方框标识的为CDR1, CDR2及CDR3的氨基酸序列。

[0089] 图7为本发明实施例10中ELISA法检测对比分析三种IgG4型单抗(hAb21单抗、Nivolumab及MK3475单抗)与三种IgG1型单抗(Avastin、hPV19及Eribitux)与包被在96-孔板上重组人FcR蛋白(CD64蛋白)的结合的结果示意图。

[0090] 图8为本发明实施例11中ELISA法检测对比分析人源化hAb21单抗、Nivolumab单抗(Nivo)及MK3475单抗与人PD-1-Fc及其他多个免疫相关蛋白-Fc融合蛋白结合的结果示意图。其中的hPV19为非相关的单抗样品,为阴性对照。

[0091] 图9A为本发明实施例12中以竞争ELISA法体外检测分析人源化hAb21单抗、Nivolumab单抗(Nivo)及MK3475单抗拮抗阻断生物素标记的MK3475单抗(biotin-MK3475)与包被在96-孔板上人PD-1蛋白结合的结果示意图。其中的hPV19为非相关的单抗样品,为阴性对照。

[0092] 图9B为本发明实施例12中以竞争ELISA法体外检测分析人源化hAb21单抗、Nivolumab单抗(Nivo)及MK3475单抗样品拮抗阻断生物素标记的Nivolumab单抗(biotin-Nivolumab)与包被在96-孔板上人PD-1蛋白结合的结果示意图。其中的hPV19为非相关的单抗样品,为阴性对照。

[0093] 图9C为本发明实施例12中以体外竞争ELISA法检测分析人源化hAb21单抗、Nivolumab单抗(Nivo)、MK3475单抗、Nivolumab单抗与MK3475单抗混合物(MK3475+Nivo)样品拮抗阻断生物素标记的hAb21单抗(biotin-hAb21)结合包被在96-孔板上人PD-1蛋白的结果示意图。其中的hPV19为非相关的单抗样品,为阴性对照。

[0094] 图10A为本发明实施例13中流式细胞仪检测分析不同溶度的Nivolumab与稳定转

染人PD-1基因的CHO细胞结合(CHO/PD-1)的结果示意图。其中虚线点图(Dot histograms)为阴性对照IgG结果。

[0095] 图10B为本发明实施例13中流式细胞仪检测分析不同溶度的hAb21单抗样品与转染人PD-1基因的CHO细胞结合(CHO/PD-1)的结果示意图。其中虚线点图(Dot histograms)为阴性对照IgG结果。

[0096] 图10C为本发明实施例13中根据流式细胞仪检测分析结果所作的平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI)与hAb21单抗或Nivolumab单抗的溶度曲线图。

[0097] 图11为本发明实施例14中流式细胞仪检测分析不同溶度的Nivolumab(Nivo, left)或hAb21单抗样品(hAb21,right)与PHA激活的人Jurkat T细胞结合的结果示意图;其中虚线点图(Dot histograms)为阴性对照IgG结果。

[0098] 图12为本发明实施例15中流式细胞仪检测分析不同溶度的hAb21单抗样品(hAb21,right),或不同溶度的Nivolumab(left)与PHA激活的人外周血单核细胞(hPBMC)结合的结果示意图;其中虚线点图(Dot histograms)为阴性对照IgG结果。

[0099] 图13A为本发明实施例16中hPD-1人源化小鼠皮下种植鼠源MC38结肠癌细胞肿瘤模型的第1阶段研究中,hAb21单抗或MK3475单抗(Pembrolizumab)给药后肿瘤增长曲线图。

[0100] 图13B为本发明实施例16中hPD-1人源化小鼠皮下种植鼠源MC38结肠癌细胞肿瘤模型的第1阶段研究中,hAb21单抗或MK3475单抗(Pembrolizumab)给药后小鼠体重增长曲线图。

[0101] 图14A为本发明实施例16中hPD-1人源化小鼠皮下种植鼠源MC38结肠癌细胞肿瘤模型的第1阶段研究中,生理盐水阴性对照组(A组)每只个体动物体内肿瘤增长体积趋势。

[0102] 图14B为本发明实施例16中hPD-1人源化小鼠皮下种植鼠源MC38结肠癌细胞肿瘤模型的第1阶段研究中,Pembrolizumab(MK3475)单抗治疗组(B组)每只个体动物体内肿瘤增长体积趋势。

[0103] 图14C为本发明实施例16中hPD-1人源化小鼠皮下种植鼠源MC38结肠癌细胞肿瘤模型的第1阶段研究中,hAb21单抗治疗组(C) (A组)每只个体动物体内肿瘤增长体积趋势。

[0104] 图15为本发明实施例16中hPD-1人源化小鼠皮下种植鼠源MC38结肠癌细胞肿瘤模型中的第2阶段研究中,重新种植的肿瘤增长曲线图,及其与种植在普通C57BL/6小鼠皮下的肿瘤增长曲线图对比。

[0105] 图16为本发明实施例17中普通C57BL/6小鼠皮下种植鼠源MC38结肠癌细胞模型研究中,hAb21单抗治疗组和生理盐水对照组动物体内肿瘤增长体积趋势。

[0106] 图17为本发明实施例18中食蟹猴单次静脉给予hAb21单抗后的药物溶度-时间曲线图。

## 具体实施方式

[0107] 下面将结合实施实例来进一步描述本发明,这些实施实例只是为了起说明作用,而不是用来限制本发明。

[0108] 实施例1:分泌抗PD-1抗体的小鼠杂交瘤细胞系的建立与筛选鉴定

[0109] 1)人PD-1蛋白的氨基酸序列与小鼠PD-1蛋白的氨基酸序列比对分析

[0110] 人PD-1蛋白的氨基酸序列与小鼠PD-1蛋白的氨基酸序列比对分析如图1(其中的

以方框斜体标注的氨基酸序列为引导细胞外分泌表达PD-1蛋白的信号肽(signal peptide),以方框粗体标注的氨基酸序列为PD-1蛋白的跨细胞膜区域(TM)。如图1所示:在氨基酸序列上,人PD-1与小鼠PD-1蛋白整体同源性仅有60%,而其中直接参与识别及结合其配体(PD-L1或PD-L2)的胞膜外区域(含IgV区域)在人和小鼠中的氨基酸差异位点数也有三十多个。因此推测,如采用传统的抗原蛋白免疫小鼠及杂交瘤制备技术,应可以制备出针对各种不同结合区域或氨基酸结合位点的鼠抗人PD-1单克隆抗体。这些抗人PD-1单克隆抗体,或因其抗原结合区域/结合位点(epitop)不同于已有PD-1单抗如Opdivo(Nivolumab)或Keytruda(Pembrolizumab),其体内外生物活性及疗效有望不同于或甚至更优于Opdivo(Nivolumab)或Keytruda(Pembrolizumab)。这类识别新位点的、全新的PD-1单抗作为药物成分,一方面可与目前已上市的PD-1单抗药物或PD-L1单抗药物联合或序贯使用,达到进一步增强机体免疫功能及增强抗肿瘤疗效的作用;另一方面,该类全新的抗体也有望独立开发成为单独使用的新型免疫功能增强剂或抗肿瘤药物制剂。

[0111] 为此,本发明开展了这类全新的PD-1单抗研发与制备,其具体制备步骤如下:

[0112] 2) 分泌抗PD-1抗体的小鼠杂交瘤细胞系的建立与筛选鉴定

[0113] 步骤1. 重组人PD-1蛋白(免疫抗原)的来源与动物免疫

[0114] 在本发明实施例中,用于免疫的抗原为由哺乳动物表达的重组人PD-1胞膜外蛋白(北京义翘神州公司产品)。该重组人PD-1蛋白与弗氏完全佐剂(美国Sigma公司产品)混合后,于皮下多点注射Balb/c小鼠(100 $\mu$ l/只,每次10 $\mu$ g PD-1蛋白)。首次免疫2-3周后,小鼠再给予皮下多点注射含人PD-1蛋白与弗氏不完全佐剂(美国Sigma公司产品)的混合物,加强免疫3-4次后,取少量小鼠血清,用包被重组人PD-1蛋白的96-板以ELISA法检测小鼠血清中抗PD-1抗体的效价,取效价高者小鼠的脾细胞用于下一步的细胞融合。

[0115] 步骤2、细胞融合

[0116] 在末次免疫后3-4天,无菌制备小鼠脾细胞悬液,与小鼠SP2/0骨髓瘤细胞(购自中国科学院上海生命科学院细胞保藏中心),以5:1或10:1的比例在50%PEG-1000(美国Sigma公司产品)作用下融合。融合按常规法(Kohler G.and Milstein C:Nature 1975;256:495-497),PEG用量1ml,60秒内缓慢加完。反应90秒后,以无血清的RPMI-1640培养基终止反应,1000rpm离心10min,去除上清液,再将离心沉淀下的细胞以含10%HAT(H为次黄嘌呤、A氨基碟呤、T胸腺嘧啶核苷,为美国Sigma公司产品)的RPMI1640-10%FCS培养基将细胞浓度调节至1 X 10<sup>6</sup>/ml,加入96孔平底细胞培养板(每孔200 $\mu$ l),于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中(美国Thermo公司产品)培养2-3周。

[0117] 步骤3、酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选抗体分泌阳性的小鼠杂交瘤细胞

[0118] 同样,以重组人PD-1蛋白(2 $\mu$ g/ml,pH 9.6,0.1M NaHCO<sub>3</sub>液)包被96-孔酶标板,37 $^{\circ}$ C包被2小时后,再加入2%牛血清白蛋白(BSA)4 $^{\circ}$ C封闭过夜。次日,包被板经PBS-0.1%Tween20液洗涤后,加入待检杂交瘤细胞培养上清液(以未融合的SP2/0骨髓瘤细胞培养上清为阴性对照)37 $^{\circ}$ C孵育2小时;经PBS-0.1%Tween20液洗涤后,加入辣根过氧化物酶HRP-标记的羊抗小鼠IgG(美国Sigma公司产品),37 $^{\circ}$ C孵育1小时;再经PBS-0.1%Tween20液充分洗涤后,加入邻苯二胺(OPD)-0.1%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>底物液显色10-15min后再加入0.1M HCl终止反应。其后在MK3-Multiskan酶标仪(美国Thermo Scientific公司产品)中读取492nm处OD值。测得的OD 492值比阴性对照值高5-10倍的杂交瘤细胞再克隆化,并进行扩增冻存。

[0119] 步骤4、阳性杂交瘤细胞的亚克隆-有限稀释法

[0120] 将初筛得到的阳性杂交瘤细胞以RPMI-1640-10%FCS培养基稀释至每孔1-10个细胞,铺于96-孔细胞培养板,于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养2-3周。待克隆长成,取上清液以ELISA再次检测鉴定抗PD-1抗体。图2为以ELISA法筛选检测杂交瘤细胞亚克隆上清液与重组人PD-1蛋白结合的结果示意图,其中一代号为mAB21的杂交瘤细胞株上清液含高滴度的抗PD-1抗体。

[0121] 实施例2流式细胞仪检测分析鼠源单克隆抗体mAB21与转染表达人PD-1基因的CHO细胞(CHO/PD-1)结合

[0122] 在本实施例中,以鼠源mAB21单抗上清,或已知的结合人PD-1蛋白的鼠源mAB7单抗上清(见中国专利申请公开文件CN104558177A)为一抗,以FITC荧光标记的羊抗小鼠IgG为二抗,采用流式细胞仪检测分析mAB21单抗样品与稳定表达人PD-1基因的CHO细胞(CHO/PD-1)结合。为此,将CHO-PD-1细胞分别与含小鼠IgG(阴性对照,A)、人PDL2-Fc融合蛋白(B)、鼠抗-PD-1阳性样品mAB7上清液(C,1:5稀释)或鼠mAB21上清液中(D,1:5稀释);4℃孵育1小时及经PBS-0.1%FCS液洗涤后,加入FITC-标记的羊抗小鼠IgG(Sigma公司产品)(对于人PDL2-Fc融合蛋白样品,则加入FITC-标记的羊抗人IgG-Fc);4℃孵育1小时及再经PBS-0.1%FCS液洗涤后,将样品上样至Cytomics FC500MCL)流式细胞仪检测(美国Beckman Coulter公司)。

[0123] 图3为该流式细胞仪检测代表性结果示意图。如图3所示:与小鼠IgG阴性对照样品(见图3A)相比,人PDL2-Fc融合蛋白样品(见图3B)、阳性样品鼠单抗mAB7单抗上清(见图3C)及测试样品mAB21单抗单抗上清(见图3D)均可与CHO/PD-1细胞特异结合;mAB21单抗样品的结合强度高于mAB7单抗。

[0124] 实施例3免疫组化(IHC)方法检测鼠源mAB21单抗与食蟹猴组织细胞结合

[0125] 在本实施例中,采用免疫组化(IHC)方法检测分析了mAb21单抗样品与来源于正常食蟹猴组织切片(由昭衍(苏州)新药研究中心有限公司提供)的结合,其检测步骤如下:

[0126] 食蟹猴(脾及淋巴结组织)石蜡切片复水及抗原回访处理后,加入mAb21单抗单抗上清作为一抗,常温下孵育1小时及经洗涤后,再加入稀释的HRP标记的羊抗小鼠IgG(二抗),常温下孵育1小时及经洗涤后,加入底物DAB显色,苏木素复染,封片,照相。该免疫组化代表性结果如图4:结果表明mAb21单抗样品可与猴的脾组织(见图4A)及淋巴结组织(见图4B)特异结合。

[0127] 实施例4竞争性ELISA法检测mAb21单抗拮抗阻断PD-1蛋白与其受体结合的生物活性。

[0128] 体外检测mAb21单抗的生物活性方法之一是采用竞争性ELISA法是检测其拮抗阻断PD-1蛋白与其受体(PD-L1及PD-L2)的结合。

[0129] 该竞争性ELISA法的基本原理与过程是:先将不同溶度的mAb21单抗样品或阳性对照样品如MK3475单抗与固定溶度的生物素标记的生物素标记的人PD-1受体蛋白(如PDL1-Fc或PDL2-Fc融合蛋白)混合,之后再将混合物转入预先包被有PD-1蛋白的96-孔板,经孵育及洗脱后,加入酶标记的Avidin(如辣根过氧化物酶标记的Avidin);再经孵育及洗脱后,加入底物显示并测定OD值。

[0130] 其中,该竞争性ELISA法检测的具体步骤如下:

[0131] 1) 用重组人PD-1胞膜外蛋白(北京义翘神州公司产品)包被96-孔板(包被溶度:2 $\mu$ g/ml,50 $\mu$ l/孔),4 $^{\circ}$ C过夜;

[0132] 2) 经PBS液漂洗及2%BSA(稀释在PBS-0.1% tween20液中)室温封闭后,分别加入含固定溶度的生物素标记的PDL1-Fc蛋白或PDL2-Fc蛋白(PDL1-Fc蛋白及PDL2-Fc蛋白均为北京义翘神州公司产品)与不同溶度的AB7抗体,或非相关的小鼠抗体(mouse IgG),37 $^{\circ}$ C孵育2h;

[0133] 3) 经PBS-T洗脱后,加入辣根过氧化物酶标记的Avidin(1:5000),37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0134] 4) 经PBS-T洗脱后,加入显色液(邻苯二胺)-3%双氧水,室温10min至显色;

[0135] 5) 加入HCL终止反应,以酶联免疫仪测定492nm波长处各孔的吸光值。

[0136] 图5A为测试样品mAb21单抗及阳性样品MK3475单抗体外与生物素标记的PDL2-Fc蛋白(Biotin-PDL2Fc)竞争结合PD-1蛋白的代表性结果。如图5A所示:在加入不同溶度的mAb21单抗或MK3475单抗与固定溶度的生物素标记的PDL2-Fc蛋白的样品中,各孔显色反应OD值与加入的抗体蛋白量成反比关系:即加入的mAb21单抗或MK3475单抗量越高,其显色OD值越低。而非相关单抗样品hPV19的加入量多少对各孔OD值影响不大。此结果清楚表明,与MK3475单抗一样,mAb21单抗具有体外竞争阻断PD-1与其受体结合的生物活性。

[0137] 实施例5ELISA法检测分析mAb21单抗与MK3475单抗竞争结合PD-1蛋白

[0138] 采用类似与实施例4的竞争性ELISA法检测分析mAb21单抗与MK3475单抗竞争结合PD-1蛋白,其基本原理与检测过程是:先将不同溶度的mAb21单抗或MK3475单抗与固定溶度的生物素标记的MK3475单抗(biotin-MK3475)与混合,之后再将混合物转入预先包被有PD-1蛋白的96-孔板,经孵育及洗脱后,加入酶标记的Avidin(如辣根过氧化物酶标记的Avidin);再经孵育及洗脱后,加入底物显示并测定OD值。

[0139] 图5B为竞争性ELISA法检测分析的代表性结果。如图5B所示:在加入不同溶度的mAb21单抗或MK3475单抗与固定溶度的生物素标记的biotin-MK3475样品中,各孔显色反应OD值与加入的维标记的单抗样品量成反比关系:即加入的mAb21单抗或MK3475单抗量越高,其显色OD值越低。而非相关单抗样品hPV19的加入量多少对各孔OD值影响不大。此结果表明,mAb21单抗体外可与MK3475竞争结合PD-1。

[0140] 实施例6.鼠源mAB21抗体可变区编码基因的克隆

[0141] 在此,先从小鼠mAB21杂交瘤细胞中提取出总RNA中,再以该RNA为模板,采用兼并引物(degenerate primers),以Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)法(Wang Y等:Degenerated primer design to amplify the heavy chain variable region from immunoglobulin cDNA.BMC Bioinformatics.2006;7Suppl(4):S9)分别克隆扩增获得mAB21抗体重链可变区及轻链可变区的cDNA基因片段。其中cDNA基因克隆步骤如下:

[0142] 步骤1、采用试剂盒(江苏海门碧云天公司产品)从小鼠AB21杂交瘤细胞中提取出mRNA;

[0143] 步骤2、采用逆转录PCR(RT-PCR)方法在eppendorf管获得cDNA模板。

[0144] 其中用于mAB21抗体轻链可变区逆转录PCR引物(AB21-L)序列为:TGT CGT TCA CTG CCA TCA AT

[0145] 用于mAB21抗体重链可变区逆转录PCR引物(AB21-H)序列为:GCA AGG CTT ACA

ACC ACA ATC;

[0146] RT-PCR反应体系如下:

[0147]	引物	2 $\mu$ l
[0148]	RNA模板	30 $\mu$ l
[0149]	72 $^{\circ}$ C 孵育10分钟,然后冰上放置2分钟。	
[0150]		

随后加入:

5 $\times$ RT-PCR 反应缓冲液	10 $\mu$ l
dNTPs	5 $\mu$ l
PrimeScript 逆转录酶	1.5 $\mu$ l
蒸馏水	1.5 $\mu$ l
总体积	50 $\mu$ l

[0151] 于42 $^{\circ}$ C 温度下反应1小时,随后温度升至75 $^{\circ}$ C,15分钟灭活后将获得的cDNA置于-20 $^{\circ}$ C,保存备用。

[0152] 步骤3、mAB21抗体轻链可变区及重链可变区基因的PCR克隆扩增

[0153] 用于兼并引物(degenerate primers)PCR法克隆扩增该AB21抗体轻链可变区基因的一对引物为:

[0154] 正向引物:GAC ATT GTG ATG WCM CA

[0155] 反向引物:CTG AGG CAC CTC CAG ATG TT

[0156] 其中W=A或T,M=A或C。

[0157] 而用于兼并引物(degenerate primers)PCR法克隆扩增AB21抗体重链可变区基因的一对引物为:

[0158] 正向引物:GTR CAG CTT CAG GAG TC

[0159] 其中R=A或G。

[0160] 反向引物:GTG CTG GAG GGG ACA GTC ACT

[0161] PCR扩增得到的DNA产物在1% agarose胶中电泳分析。电泳结束后,将分离的DNA条带切下并分别进行测序获得抗体轻链及重链可变区DNA的核苷酸序列。测得的该抗体轻链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO.:1,由该DNA核苷酸序列推测得到的抗体轻链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO.:2。该轻链抗原互补决定区(complementarity-determining regions,CDR)的CDR1、CDR2及CDR3的氨基酸序列分别见SEQ ID NO.:3、SEQ ID NO.:4和SEQ ID NO.:5。

[0162] 测得的该抗体重链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO.:6,由该DNA的核苷酸序列推测得到的抗体重链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO.:7。该重链抗原互补决定区的CDR1、CDR2及CDR3的氨基酸序列分别见SEQ ID NO.:8、SEQ ID NO.:9和SEQ ID NO.:10。

[0163] 实施例7鼠源mAb21抗体的人-鼠嵌合抗体(cAB21)的构建

[0164] 将实施例6中克隆扩增获得的AB21抗体轻链可变区基因和重链可变区基因分别与人-kappa轻链恒定区(C-domain)和人IgG1-重链恒定区基因片段融合,获得人-鼠嵌合轻链基因(cAB21L)及人-鼠嵌合重链基因(cAB21H)。其后将轻链嵌合基因与重链嵌合基因分别

克隆至pcDNA3.1表达质粒,转入大肠杆菌扩增,分离获得大量含人-鼠嵌合抗体基因的表达质粒。

[0165] 含人-鼠嵌合抗体基因的表达质粒再与Fugen-6脂质体 (Roche) 混合后共转染入CHO细胞。细胞转染后2-3天,取培养上清液,用包被人PD-1蛋白的96-孔板,用HRP酶标记的Goat-anti-human-IgG为二抗(购自上海西塘生物公司),为检测二抗,以ELISA法检测上清中的嵌合抗体(cAB21)与人PD-1蛋白结合。该ELISA代表性检测结果如下表1:

[0166] 表1 ELISA法检测嵌合抗体(cAB21)基因瞬时转染细胞培养上清与人PD-1蛋白的结合

[0167]

上清 稀释倍数	1	2	4	8	16	32	64	128
OD492 显色值	1.699	1.075	0.685	0.433	0.334	0.297	0.230	0.217

[0168] 表1结果表明,人-鼠嵌合抗体基因cAB21表达质粒转染的CHO细胞培养上清可与人PD-1的蛋白特异结合。

[0169] 上述转染细胞上清经离心及0.45 $\mu$ m滤膜过滤后,上样至Protein A亲和层析柱(proteinA-Sepharose Fast Flow,美国通用电气GE公司产品),经分离纯化,获得人-鼠嵌合抗体(cAB21)抗体蛋白。

[0170] 实施例8鼠源mAb21抗体的人源化基因工程改造

[0171] 在ELISA法检测初步证明人-鼠嵌合抗体(cAB21)保持有与人PD1蛋白高亲合力结合活性的基础上,采用PCR等系列基因工程克隆手段将该嵌合抗体轻链和重链中的抗原互补决定区(CDR)基因片段分别移植到对应人kappa-轻链和IgG4-重链可变区骨架/framework regions,FR)上,获得人源化hAB21抗体。

[0172] 1) mAb21抗体轻链的人源化

[0173] 通过氨基酸序列分析,确定人免疫球蛋白Kappa轻链第一V区胚系基因的表达产物(IgKV1-9,NCBI Gene ID:28941)与mAB21轻链可变区具有最高同源性。据此,将mAB21轻链骨架区(FR)用人IgKV1-9的同源序列替换,然后将替换后的可变区基因与人免疫球蛋白IgG-Kappa轻链的恒定区编码序列拼接,最后成功获得人源化的轻链编码基因(hAB21-L)。其中人源化hAB21抗体轻链可变区的氨基酸序列见SEQ ID NO.:11,其核苷酸序列为SEQ ID NO:13所示。

[0174] 图6A为人源化hAb21单抗轻链可变区与Nivolumab单抗轻链可变区及MK3475单抗轻链可变区的氨基酸序列比对分析结果:其中hAb21单抗轻链可变区氨基酸序列中不同于Nivolumab单抗或MK3475单抗之处均以“X”符号表示,各单抗轻链可变区的CDR1,CDR2及CDR3氨基酸序列则均以方框标识。如图6A所示,hAb21单抗轻链可变区及CDR序列既不同于Nivolumab单抗,也不同于MK3475单抗。

[0175] 2) mAb21抗体重链的人源化

[0176] 通过氨基酸序列分析,确定人免疫球蛋白重链第三V区胚系基因的表达产物(IgHV3-23,NCBI Gene ID:28442)与mAB21抗体重链具有最高同源性。据此,将mAB21重链骨架区(FR)用人IgHV3-23的同源序列替换,同时为了降低人源化抗体与机体内的免疫球蛋

白-Fc受体 (FcR) 结合及其介导的细胞毒性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 对PD-1表达阳性免疫细胞 (淋巴细胞) 的杀伤作用, 特意将人源化的mAB21抗体重链可变区基因与编码人免疫球蛋白-IgG4重链的恒定区序列拼接, 并将IgG4重链的恒定区中铰链区 (hinge region) 内处于第228点位的氨基酸由原有的serline替换成proline (S228P)。经此基因工程系列改造, 最后成功获得含人源化重链编码可变区、人IgG4-重链恒定区 (S228P) 的全长hAB21抗体重链。其中人源化hAB21抗体重链可变区的氨基酸序列见SEQ ID NO.:12, 其核苷酸序列为SEQ ID NO:14所示。

[0177] 图6B为人源化hAb21单抗重链可变区与Nivolumab单抗重链可变区及MK3475单抗重链可变区的氨基酸序列比对分析结果: 其中hAb21单抗重链可变区氨基酸序列中不同于Nivolumab单抗或MK3475单抗之处均以“X”符号表示, 各单抗重链可变区的CDR1, CDR2及CDR3氨基酸序列则均以方框标识。如图6B所示, hAb21单抗的重链可变区及CDR序列既不同于Nivolumab单抗, 也不同于MK3475单抗。

[0178] 实施例9稳定高效分泌表达人源化hAb21抗体的CHO细胞工程株的建立及抗体蛋白的分离纯化

[0179] 将含人源化重链基因 (hAB21H)、人源化轻链基因 (hAB21L) 分步克隆到pcDNA3.1-Hygro表达载体, 转入大肠杆菌后扩增分离获得人源化hAB21表达质粒。其后将表达嵌合抗体cAB21和人源化抗体hAB21的重组质粒分别瞬时转染CHO细胞。转染48小时后, 吸取孔内细胞培养上清, 以PD-1蛋白为包被抗原, HRP酶标记的Goat-anti-human-IgG为检测二抗 (购自上海西塘生物公司), OPD为显色底物, 以直接ELISA法检测转染细胞上清中抗体与人PD-1抗原结合的活性。

[0180] 下表2为该ELISA代表性检测结果。

[0181] 表2 ELISA分析瞬时转染细胞培养上清结合人PD-1蛋白活性

上清稀释 倍数	OD 显色值	
	cAB21	hAB21
2	1.968	1.923
4	1.346	1.382
8	0.905	0.891
[0182] 16	0.561	0.567
32	0.352	0.338
64	0.243	0.213
128	0.169	0.158
256	0.163	0.129

[0183] 如表2中结果所示: 与人-鼠嵌合型cAB21抗体一样, 人源化hAB21抗体 (IgG4-kappa) 保持与人PD-1蛋白结合的活性。

[0184] 上述转染细胞经克隆筛选及无血清培养基悬浮培养驯化后, 成功获得多个稳定高效分泌表达人源化hAB21抗体蛋白的CHO细胞工程株 (表达量达1g/L以上)。

[0185] 其后, 从中选取一细胞工程株再经无血清培养基放大扩增培养后, 收集培养上清液, 上清液经离心及0.45 $\mu$ m滤膜过滤后, 上样至包括含Protein A亲和层析柱 (proteinA-

Sepharose Fast Flow,美国通用电气GE公司)、离子交换析柱、病毒去除/灭活、及过滤除菌(0.22 $\mu$ m滤膜过滤)在内的多个分离纯化步骤后,最终获得高纯度(蛋白纯度达99%以上)的人源化hAb21抗体。纯化的hAb21抗体再溶于无菌生理盐水中(1-20mg/ml),低温(-20 $^{\circ}$ 以下)保存。

[0186] 实施例10ELISA法检测分析纯化的hAb21单抗与FcR受体蛋白结合

[0187] 采用直接ELISA法检测分析了纯化获得的hAb21(IgG4-kappa)单抗与包被在96-孔板上的重组FcR受体(如Fc $\gamma$ RI受体,CD64)蛋白的结合,其结果并与同类IgG4型单抗(Nivolumab及MK3475单抗)及三种IgG1型单抗(Avastin、hPV19及Eribitux)进行比较。

[0188] 该ELISA法检测基本步骤如下:将对倍系列稀释的含IgG4型单抗(hAb21、Nivolumab及MK3475单抗)或IgG1型单抗(Avastin、hPV19及Eribitux)样品加入预包被有重组人Fc $\gamma$ RI受体蛋白(CD64,北京义翘神州公司产品)的96孔板中,经37 $^{\circ}$ C孵育2h及洗涤后,各孔再加入HRP-标记的山羊抗人IgG-Fab抗体(Sigma公司产品),经37 $^{\circ}$ C孵育1h及洗涤后,各孔加入OPD底物显色。

[0189] 图7为该ELISA法检测分析的代表性结果。结果显示,与三种IgG1型单抗(Avastin、hPV19及Eribitux)相比,三种IgG4型单抗(hAb21、Nivolumab及MK3475)与Fc $\gamma$ RI受体(CD64)的结合活性明显降低(下降达95%以上),此结果也与预期的相符合。

[0190] 实施例11ELISA法检测分析mAb21单抗与PD-1及免疫相关其他蛋白的结合

[0191] 采用直接ELISA法比较分析了纯化的hAb21单抗,Nivolumab及MK3475单抗与PD-1及其他相关蛋白的结合活性。该ELISA法检测基本步骤如下:将对倍系列稀释的PD-1单抗(hAb21、Nivolumab及MK3475单抗)或非相关单抗hPV19样品分别加入预包被了重组PD1-Fc或免疫相关其他基因-Fc融合蛋白(包括CD28、B7、CTLA4、CD3、PD-L1、PD-L2、BTLA等)96孔板中,经37 $^{\circ}$ C孵育2h及洗涤后,96孔板各孔再加入HRP-标记的山羊抗人IgG-Fab抗体(美国Sigma公司产品),经37 $^{\circ}$ C孵育1h及洗涤后,各孔加入OPD底物显色。

[0192] 图8为该ELISA法检测分析的代表性结果。结果显示,与Nivolumab及MK3475一样,hAb21单抗仅与人PD-1蛋白特异结合,与免疫相关其他蛋白如CD28,CD28、B7、CTLA4、CD3、PD-L1、PD-L2、BTLA等都不结合。

[0193] 实施例12竞争性ELISA法对比分析mAb21单抗、Nivolumab及MK3475单抗与PD-1蛋白结合的位点

[0194] 为证明Ab21单抗与PD-1蛋白结合的位点是否与Nivolumab的结合位点或MK3475单抗的结合位点不同,本实施例中采用类似实施例5的竞争性ELISA法对比分析了mAb21单抗、Nivolumab及MK3475单抗与PD-1蛋白结合的位点

[0195] 图9A为竞争ELISA法检测hAb21单抗、Nivolumab单抗(Nivo)及MK3475单抗拮抗阻断生物素标记的MK3475单抗(biotin-MK3475)与包被在96-孔板上人PD-1蛋白结合的代表性结果。如图9A所示,hAb21单抗几乎达到与MK3475单抗一样的拮抗阻断biotin-MK3475与PD-1蛋白结合的效果;而Nivolumab拮抗阻断biotin-MK3475与PD-1蛋白结合的效率在50%左右;非相关单抗hPV19无拮抗作用。

[0196] 图9B为竞争ELISA法检测hAb21单抗、Nivolumab单抗(Nivo)及MK3475单抗拮抗阻断生物素标记的Nivolumab单抗(biotin-Nivolumab)与包被在96-孔板上人PD-1蛋白结合的代表性结果。如图9B所示,hAb21单抗几乎也达到与Nivolumab一样的拮抗阻断biotein-

Nivolumab与PD-1蛋白结合的效果;而MK3475拮抗阻断biotin-Nivolumab与PD-1蛋白结合的效率在70%左右;非相关单抗hPV19无作用。

[0197] 图9C则为以该体外竞争ELISA法检测hAb21单抗、Nivolumab单抗(Nivo)、MK3475单抗、Nivolumab单抗合并MK3475单抗(MK3475+Nivo)拮抗阻断生物素标记的hAb21单抗(biotin-hAb21)与包被在96-孔板上人PD-1蛋白结合的代表性结果。如图9C所示,Nivolumab单抗或MK3475单抗均只部分阻断biotin-hAb21与PD-1蛋白结合(拮抗抑制率:Nivolumab单抗为20%左右;MK3475单抗为50%左右);此外,即使合并同时加入Nivolumab单抗与MK3475单抗,其拮抗抑制biotin-hAb21与PD-1蛋白结合效率也仅达到70%左右。

[0198] 综合分析上述竞争ELISA结果可知:本发明中的hAb21单抗,其结合人PD-1蛋白的位点(epitope)既显著不同与Nivolumab单抗,也显著不同于MK3475单抗。

[0199] 实施例13流式细胞仪检测分析hAb21单抗及Nivolumab与表达人PD-1基因的CHO细胞(CHO/PD-1)结合

[0200] 在本实施例中,以hAb21单抗或Nivolumab单抗作为一抗,以FITC荧光标记的羊抗人IgG作为二抗,用流式细胞仪检测分析hAb21单抗或Nivolumab与表达人PD-1基因的CHO细胞结合。

[0201] 为此,将稳定表达人PD-1基因的CHO细胞株(CHO/PD-1)与普通CHO细胞株以(1:2)比例混合后,等量分别溶于含不同溶度(0.003-10 $\mu$ g/mL)的hAb21单抗或Nivolumab单抗溶液中;4 $^{\circ}$ C孵育1小时及经PBS-0.1%FCS液洗涤后,加入FITC-标记的羊抗人IgG(Sigma公司产品,1:200),4 $^{\circ}$ C孵育1小时;再经PBS-0.1%FCS液洗涤后,将样品至流式细胞仪检测(Cytomics FC500MCL,美国Beckman Coulter公司产品)。

[0202] 图10A为Nivolumab单抗的流式细胞仪检测分析代表性结果图谱。如图10A所示:溶度范围为0.03-10 $\mu$ g/mL的Nivolumab单抗均可与CHO/PD-1细胞结合,结合的荧光强度(MFI)与Nivolumab单抗溶度呈正相关。

[0203] 图10B为hAb21单抗的流式细胞仪检测分析代表性结果图谱。如图10B所示:溶度范围为0.03-10 $\mu$ g/mL的hAb21单抗也均可与(CHO/PD-1)细胞结合,结合荧光强度(MFI)与hAb21单抗溶度呈正相关。

[0204] 图10C则为根据该流式细胞仪检测分析结果所作的平均荧光强度(MFI)与hAb21单抗或Nivolumab单抗的溶度曲线图,如图10C所示:hAb21单抗组样品与CHO-PD-1细胞的结合荧光强度明显强于Nivolumab单抗组样品。

[0205] 实施例14流式细胞仪检测分析hAb21单抗及Nivolumab与PHA激活的人Jurkat T细胞株的结合

[0206] 在本实施例中,以hAb21单抗或Nivolumab作为一抗,以FITC荧光标记的羊抗人IgG作为二抗,用于检测分析并比较hAb21单抗或Nivolumab与PHA激活的人Jurkat T细胞株的结合。

[0207] 为此,先将人Jurkat T细胞株(购自于中国科学院上海生命科学院细胞保藏中心)置于含浓度为3 $\mu$ g/mL的淋巴细胞活化因子-植物血凝素PHA(Phytohaemagglutinin,美国Sigma公司产品)的RPMI-10%FCS培养液中培养,以激活Jurkat T细胞及诱导PD-1蛋白的表达。PHA激活诱导24-48小时后,细胞经离心分离后重溶于含不同溶度(0.1-3 $\mu$ g/mL)的hAb21单抗或Nivolumab单抗样品溶液中,同时以含终溶度为1 $\mu$ g/mL的人IgG作为阴性对照样品;4

℃孵育1小时及经PBS-0.1%FCS液洗涤后,加入FITC-标记的羊抗人IgG(美国Sigma公司产品,1:200);4℃孵育1小时及再经PBS-0.1%FCS液洗涤后,将样品至流式细胞仪检测(Cytomics FC500MCL,美国Beckman Coulter公司)。

[0208] 图11为hAb21单抗(right)及Nivolumab(left)的流式细胞仪检测分析结果图谱。如图所示:与阴性对照IgG样品相比,在1-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶度范围,hAb21单抗及Nivolumab均可检测到与PHA激活的Jurkat细胞结合;而在更低溶度范围下(0.1-0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )还可以检测hAb21单抗与Jurkat细胞结合,而Nivolumab单抗与Jurkat细胞结合不明显。

[0209] 实施例15流式细胞仪检测分析hAb21单抗及Nivolumab与PHA激活的人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)结合

[0210] 在本实施例中,以hAb21单抗或Nivolumab为一抗,FITC荧光标记的羊抗人IgG作为二抗,用于检测分析并比较hAb21单抗或Nivolumab与PHA激活的来源于人外周血的单核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)结合。

[0211] 为此,先将来源于健康志愿者外周全血经加入一定体积的Ficol液体,经常温离心后,分离其中的单核细胞,再溶于含终浓度为3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的淋巴细胞活化因子-植物血凝素PHA(Phytohaemagglutinin,美国Sigma公司产品)的RPMI-10%FCS培养液中培养,以激活淋巴细胞与诱导PD-1蛋白的表达。PHA激活诱导48-72小时后,细胞经离心分离后重溶于含不同溶度(0.015-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的hAb21单抗或Nivolumab,同时以含终溶度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人IgG样品(作为阴性对照);4℃孵育1小时及经PBS-0.1%FCS液洗涤后,加入FITC-标记的羊抗人IgG(Sigma公司产品,1:200);4℃孵育1小时及再经PBS-0.1%FCS液洗涤后,将样品至Cytomics FC500MCL流式细胞仪检测(美国Beckman Coulter公司)。

[0212] 图12为hAb21单抗(right)及Nivolumab单抗(left)的流式细胞仪检测分析结果图谱。如图12所示:与阴性对照IgG样品相比,在0.25-4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶度范围,hAb21单抗及Nivolumab单抗均可检测到与PHA激活的人PBMC细胞结合。

[0213] 实施例16PD-1人源化小鼠体内测试hAb21的抗肿瘤疗效

[0214] 由于hAb21单抗不识别小鼠PD-1,故无法在一般的普通小鼠体内直接测试hAb21单抗的疗效。为此,在本实施例中,特别选用经基因工程改造过的PD-1人源化小鼠进行体内测试hAb21单抗的抗肿瘤疗效的系列研究。

[0215] 该动物试验研究分两阶段,其中第一阶段的试验模型、给药分组及试验结果描述如下:

[0216] 第一阶段研究:

[0217] 动物试验模型及给药分组:

[0218] 将数量为 $1 \times 10^6$ 的来源于C57BL/6小鼠的MC38结肠癌细胞(上海南方模式生物科技股份有限公司提供)接种于基因背景同样为C57BL/6的PD-1人源化纯合子小鼠右侧背部皮下(上海南方模式生物科技股份有限公司提供,该PD-1人源化小鼠是通过Cas9方式利用基因同源重组,将人的PD-1基因替换到小鼠PD-1基因位置,从而表达人PD-1而非小鼠内源PD-1蛋白);待接种的肿瘤体积长至约米粒大小(约40-50 $\text{mm}^3$ ,肿瘤细胞接种后第6-7天左右)时将动物随机分为以下3组:

[0219] A:生理盐水阴性对照组(n=6,等体积生理盐水)

[0220] B:Pembrolizumab(MK3475)单抗治疗组(n=6,给药剂量10 $\text{mg}/\text{kg}$ 体重)

[0221] C:hAb21单抗治疗组 (n=6, 给药剂量10mg/kg体重)

[0222] 动物自分组当天起(即接种肿瘤后第6-7天),每周腹腔注射(i.p.)给药2次(每隔3-4天),连续给药4次(给药共2周)。期间每天观察动物一般临床症状,每隔3-4天测量肿瘤长径(mm)和短径(mm)及动物体重。肿瘤体积计算公式为:体积( $\text{mm}^3$ )=长径(mm)X短径(mm)X短径(mm)X0.5。如测量时肿瘤体积超过 $4000\text{mm}^3$ 则对测试动物实行安乐死(euthanized)。

[0223] 动物试验结果:

[0224] 图13A为各组试验动物肿瘤的平均增长体积趋势;图13B为各组试验动物平均体重增长趋势。

[0225] 图14A,图14B及图14C则分别为各给药组每只个体动物体内肿瘤增长体积趋势图。

[0226] 下表3-5则为各给药组中每只动物的肿瘤生长测量结果。

[0227] Table 3:Tumor Volume ( $\text{mm}^3$ ) in Mice Treated with NS-control group (n=6)

Day (*)	A01	A02	A03	A04	A05	A06	X±SD
	Male	Male	Male	Male	Female	Female	
6 (1)	41.43	0.00	38.44	12.41	48.09	42.49	<b>36.57±13.95</b>
10 (5)	118.61	77.18	101.82	51.47	120.54	118.38	<b>98.00±28.15</b>
13 (8)	160.43	215.27	133.71	57.95	221.13	171.34	<b>159.97±60.04</b>
17 (12)	424.24	289.95	259.86	184.88	517.78	348.34	<b>337.51±119.77</b>
20(15)	721.57	512.14	436.79	342.49	884.80	467.41	<b>560.87±202.46</b>
[0228] 24 (19)	1713.94	917.43	820.05	534.34	1172.97	860.01	<b>1003.12±403.78</b>
27(22)	2247.93	2181.73	1632.56	1502.21	1064.69	1507.39	<b>1689.42±450.78</b>
31(26)	2231.64	4633.67	3604.40	3323.73	1831.16	3228.38	<b>3142.17±1002.64</b>
33(28)	3008.70	euthanized	5114.15	died	1815.58	3111.68	<b>3262.53±1367.40</b>
36(30)	4012.72	-	euthanized	-	1649.23	4503.91	<b>5031.74±2773.09</b>
41(35)	euthanized	-	-	-	3680.48	euthanized	
43(37)	-	-	-	-	3978.30	-	
47(41)	-	-	-	-	4099.00	-	
50(44)	-	-	-	-	euthanized	-	

[0229] \*:Numbers in()are days after received 1<sup>st</sup> treatment

[0230] Table 4:Tumor Volume ( $\text{mm}^3$ ) in Mice Treated with Pembrolizumab (n=6)

Day (*)	B01		B02		B03		B04		B05		B06		X±SD
	Male	Male	Male	Male	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female		
6 (1)	30.56	22.79	29.32	24.18	30.70	41.16							29.78±6.50
10 (5)	23.33	128.52	63.63	47.67	103.59	70.55							72.88±38.00
13 (8)	51.16	105.06	41.73	23.81	167.18	23.80							68.79±56.72
17 (12)	22.77	241.38	59.74	26.19	255.82	0.00							121.18±117.32
20 (15)	50.06	430.81	113.29	84.15	died	0.00							169.58±176.06
[0231] 24(19)	107.61	840.71	218.00	223.65	-	0.00							347.49±333.12
27 (22)	136.26	1642.37	485.24	414.80	-	0.00							669.67±665.74
31 (26)	381.32	3217.38	982.94	871.32	-	0.00							1363.24±1263.41
33 (28)	452.82	2831.28	1991.67	1403.44	-	0.00							1669.80±1000.17
36 (30)	970.64	4294.38	2153.35	1903.74	-	0.00							2330.53±1404.70
41 (35)	2296.81	died	6356.19	4431.87	-	0.00							4361.62±2030.60
43 (37)	8852.36	-	died	euthanized	-	0.00							
47 (41)	euthanized	-	-	-	-	0.00							
50 (44)	euthanized	-	-	-	-	0.00							

[0232] \*:Numbers in()are days after received 1<sup>st</sup> treatment

[0233] Table 5:Tumor Volume (mm<sup>3</sup>) in Mice Treated with hAb21mAb (n=6)

Day (*)	C01		C02		C03		C04		C05		C06		X±SD
	Male	Male	Male	Male	Female	Female	Female	Female	Female	Female			
6 (1)	42.19	28.25	36.29	21.62	36.80	31.52							32.78±7.26
10 (5)	58.82	21.18	58.63	25.74	40.78	66.18							45.22±18.87
13 (8)	0.00	0.00	0.00	8.10	17.85	20.89							15.61±6.68
17 (12)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00
20 (15)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00
[0234] 24 (19)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00
27 (22)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00
31 (26)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00
33 (28)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00
36 (30)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00
41 (35)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00
43 (37)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00
47 (41)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00
50 (44)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							0.00±0.00

[0235] \*:Numbers in()are days after received 1<sup>st</sup> treatment

[0236] 结果如上图3-5,图13A,图14A,图14B及图14C所示:与生理盐水阴性对照组相比,hAb21单抗治疗组或Pembrolizumab治疗组在给药后5-8天后的肿瘤增长即受到抑制。

[0237] 更惊奇的及令人鼓舞的是hAb21单抗治疗MC38结肠癌移植瘤的疗效远远好于Pembrolizumab.hAb21单抗治疗组在仅给药两次后(即首次给药后第8天)所有测试动物(6/6)的肿瘤全部出现萎缩或彻底消失;在完成4次给药(也是最后一次给药)后停药,肿瘤也无恢复生长(该实验已观察至肿瘤接种后第50天,即最后一次给药后的第32天);而Pembrolizumab治疗组仅有一只动物(1/6)在给药三次后(即首次给药后第12天)肿瘤出现

萎缩消失,其他各动物在结束4次给药治疗后肿瘤均又都恢复生长(另有一只动物在首次给药后的第15天发现死亡),至肿瘤接种后第43天,这4只动物均死亡或安乐死。

[0238] 图13B为各组试验动物的平均体重增长趋势。如图13B所示,与生理盐水阴性对照组相比,hAb21单抗或Pembrolizumab给药后对测试动物体重增长无影响。

[0239] 第二阶段研究:

[0240] 研究目的、动物试验模型及分组

[0241] 该第二阶段研究的目的是评估上述经hAB21成功治疗过的PD-1人源化小鼠,在不再继续给药的情况下是否还排斥重新接种的MC38肿瘤(初步验证是否有免疫记忆功能)。

[0242] 动物试验模型及分组

[0243] 试验分以下C和D两组:

[0244] C: 试验组: 上述6只接受过hAB21单抗治疗并都彻底排斥了MC38肿瘤的PD-1人源化小鼠,在肿瘤排斥后的大约20天后(即hAB21单抗最后一次给药后第10天)在小鼠另一侧(左侧)皮下重新接种同数量的( $1 \times 10^6$ )MC38肿瘤细胞;

[0245] D: 对照组: 同时选取5只普通C57BL/6小鼠(周龄6-8周)左侧皮下接种同数量的( $1 \times 10^6$ )MC38肿瘤细胞。

[0246] 两组动物在研究期间均不接受任何给药或治疗。肿瘤后第6天起每天观察动物一般临床症状,每隔3-4天测量肿瘤长径(mm)和短径(mm)及动物体重。肿瘤体积计算公式为: 体积( $\text{mm}^3$ ) = 长径(mm) X 短径(mm) X 短径(mm) X 0.5。

[0247] 动物试验结果:

[0248] 图15为两组试验动物肿瘤的平均增长体积趋势。

[0249] 下表6则为各组中每只动物的肿瘤生长测量结果。

[0250] Table 6: MC38 Tumor Growth Volume ( $\text{mm}^3$ ) in Wild-type C57BL/6 Mice or in Humanized PD-1 Mice have been previously Treated with hAb21mAb

**Group C: Humanized PD-1 Mice have been treated with hAb21 mAb (n=6)**

Day ( *)	C01	C02	C03	C04	C05	A06	X±SD
	Male	Male	Male	Male	Female	Female	
6 (36)	41.52	4.96	4.00	0.00	123.66	51.68	<b>37.64±47.39</b>
8 (38)	4.90	0.50	0.00	0.00	66.32	60.67	<b>22.07±32.20</b>
13 (43)	0.00	0.00	0.00	0.00	55.05	8.94	<b>10.66±22.04</b>
15 (55)	0.00	0.00	0.00	0.00	36.34	0.00	<b>6.06±14.84</b>
19 (49)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<b>0.00±0.00</b>
22 (52)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<b>0.00±0.00</b>
26 (56)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<b>0.00±0.00</b>

[0251]

**Group D: Wild-type C57BL/6 Mice (n=5)**

Day	D01	D02	D03	D04	D05	X±SD
	Female	Female	Female	Female	Female	
6	53.42	48.68	60.62	36.92	16.28	<b>43.18±17.33</b>
8	69.39	95.23	80.78	38.65	90.40	<b>74.89±22.54</b>
13	199.95	283.99	186.53	47.24	112.44	<b>166.03±90.09</b>
15	231.42	356.01	235.80	52.27	149.21	<b>204.94±112.80</b>
19	405.98	588.07	481.48	80.93	222.19	<b>355.73±203.51</b>
22	543.46	1204.30	693.60	143.40	247.52	<b>566.46±419.60</b>
26	1414.89	2142.11	1290.40	328.72	613.29	<b>1157.88±713.51</b>

[0252] ●:Numbers in() are days after 1<sup>st</sup> inoculation of MC38tumor in humanized PD-1mice

[0253] 结果如表6及图15所示:普通C57BL/6小鼠组接种的MC38肿瘤增长快速,而在hAb21单抗治疗过的PD-1人源化小鼠,再次接种的MC38肿瘤在观察期间无增长,且在接种后第8至第15天被彻底排斥。此结果初步表明hAB21成功治疗过的PD-1人源化小鼠具有免疫记忆,可在不再继续给药的情况下排斥重新接种的MC38肿瘤。

[0254] 实施例16普通C57BL/6小鼠体内测试hAb21的抗肿瘤活性

[0255] 研究目的:

[0256] 该研究目的是评估在不表达人PD-1基因的普通小鼠中,hAB21单抗给药后是否排斥肿瘤。

[0257] 动物试验模型及分组:

[0258] 选取普通C57BL/6小鼠(周龄6-8周)右侧皮下接种 $1 \times 10^6$ 数量的MC38肿瘤细胞,待接种的肿瘤体积长至约米粒大小(约 $40-50\text{mm}^3$ ,肿瘤细胞接种后第6天左右)时将动物随机分为以下2组:

[0259] A:生理盐水对照组(n=6,等体积生理盐水)

[0260] B:hAb21单抗治疗组(n=6,给药剂量10mg/kg体重)

[0261] 动物自分组当天起(即接种肿瘤后第6天),每周腹腔注射(i.p.)给药2次(每隔3-4天),连续给药4次(给药共2周)。期间每天观察动物一般临床症状,每隔3-4天测量肿瘤长径(mm)和短径(mm)及动物体重。肿瘤体积计算公式为:体积( $\text{mm}^3$ )=长径(mm)X短径(mm)X短径(mm)X0.5。

[0262] 试验结果:

[0263] 图16为两组试验动物肿瘤的平均增长体积趋势。

[0264] 下表7则为各组中每只动物的肿瘤生长测量结果。

[0265] Table 7:MC38Tumor Growth Volume (mm<sup>3</sup>) in C57BL/6WT Mice

<b>Group A: WT Mice treated with NS-control (n=6)</b>							
Day ( *)	A01	A02	A03	A04	A05	A06	X±SD
	Male	Male	Male	Male	Female	Female	
6 (1)	33.36	20.22	52.24	57.48	4.00	4.00	<b>28.55±23.22</b>
10 (5)	99.91	128.04	127.58	158.06	56.73	241.41	<b>135.29±62.15</b>
13 (8)	138.56	131.20	151.95	357.05	100.33	267.11	<b>191.03±99.44</b>
17 (12)	336.01	355.12	441.55	829.60	193.00	807.96	<b>493.87±264.12</b>

<b>Group B: WT Mice treated with hAb21 mAb (n=6)</b>							
Day ( *)	B01	B02	B03	B04	B05	B06	X±SD
	Male	Male	Male	Male	Female	Female	
6 (1)	98.18	93.25	49.80	36.65	0.00	0.00	<b>46.31±43.10</b>
10 (5)	286.47	205.51	114.13	147.57	44.74	113.91	<b>152.05±84.09</b>
13 (8)	383.45	216.66	178.88	204.04	95.37	152.77	<b>205.20±97.38</b>
17 (12)	833.31	392.57	389.95	390.62	229.95	559.44	<b>465.98±207.95</b>

[0266]

[0267] \*:Numbers in() are days after received 1<sup>st</sup> treatment

[0268] 结果如上图7及图16所示:hAb21单抗治疗组的MC38肿瘤体积增长趋势与生理盐水对照组的生长趋势基本相同。此结果表明在不表达人PD-1基因的普通小鼠中,hAB21单抗对肿瘤的增长无明显作用。

[0269] 实施例18hAb21单抗在食蟹猴体内的初步药物代谢及毒理/安全性实验评估

[0270] 由于已知mAB21单抗识别并结合食蟹猴的PD-1(见实施例3),为此在本实施例中,选取在正常食蟹猴进行静脉输注hAb21单抗的初步药代动力学及毒理/安全性实验评估(委托昭衍(苏州)新药研究中心有限公司完成)。

[0271] 试验选用2只雄性食蟹猴,静脉单次输注剂量为10mg/kg体重的hAB21单抗注射液,给药后不同时间采集血清,用经验证的ELISA法检测血清样本hAB21单克隆抗体注射液的含量。实验中2只食蟹猴单次静脉输注剂量为10mg/kg体重的hAB21单抗注射液后动物精神状态、行为活动等均未观察到可能影响实验结果的异常表现。采用WinNonlin非房式模型计算药后各动物hAB21单克隆抗体主要代谢动力学参数,结果见下表8及图17:

[0272] 表8食蟹猴单次静脉输注hAb21单抗的药代学参数

动物组别	动物号	$t_{1/2}^*$ (h)	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$AUC_{last}$ ( $\text{h}\cdot\text{mg}/\text{mL}$ )	$AUC_{inf}$ ( $\text{h}\cdot\text{mg}/\text{mL}$ )
[0273] 供试品 mAB21 (10 mg/kg)	1	402.56	8.00	234.06	55.25	76.81
	2	58.84	4.00	247.22	37.98	38.08

[0274] \*表示动物可能产生了抗药抗体并且影响了血药浓度检测

[0275] 如表8及图17所示:2只食蟹猴单次静脉输注给予10mg/kg的hAB21单抗后, $C_{max}$ 非常相近,分别为234.06及247.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;体内半衰期( $t_{1/2}$ )分别402.56h及58.84h,2号动物药后第28天血药浓度数值骤降,怀疑2号动物药后17天可能产生抗药抗体,影响了血药浓度检测及其参数如 $t_{1/2}$ 。

[0276] 由于人类免疫球蛋白的氨基酸序列与非人灵长类动物(如食蟹猴)抗体蛋白的不同,故食蟹猴在给予具免疫原性的人或人源化抗体药物后而产生抗药抗体(抗抗体)并不意外(vanMeer PJ, et al. Immunogenicity of mabs in non-human primates during nonclinical safety assessment. MAbs 2013;5:810-6)。实际上,BMS公司的全人化Nivolumab单抗药物在非人灵长类动物(食蟹猴)中进行的非临床研究中也发现1mg/kg剂量组6只动物中的5只,10mg/kg剂量组3只动物中的2只在给药后第28天均检测到抗-Nivolumab抗体(包括中和抗体阳性),但抗抗体的出现对动物没有产生不利影响(Wang C et al: Cancer Immunol Res. 2014;2:1-11)。

- [0001] 序列表
- [0002] <110>苏州思坦维生物技术有限责任公司
- [0003] <120>拮抗抑制人PD-1抗原与其配体结合的单克隆抗体及其制备方法与应用
- [0004] <130>HJ17-13150
- [0005] <160> 14
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 321
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 小鼠 (Mus musculus)
- [0011] <400> 1
- [0012] gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtgggaga cagggtcagc 60
- [0013] atcacctgca aggccagtc ggatgcggt tctgctgtag cctggtatca acagaaacca 120
- [0014] ggacaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccactc ggcacactgg agtccctggt 180
- [0015] cgcttcacag gcagtggatc tgggacagac ttcactctca ccattagcaa tgtgcagtct 240
- [0016] gaagacttgt cagattatct ctgtcagcaa tatagcagct atccgtggac gttcgggtgga 300
- [0017] ggcaccaagc tggaaatcaa g 321
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 107
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 小鼠 (Mus musculus)
- [0022] <400> 2
- [0023] DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDAG SAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPG 60
- [0024] RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLSDYFCQQ YSSYPWTFGG GTKLEIK 107
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 11
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> 智人 (Homo sapiens)
- [0029] <400> 3
- [0030] KASQDAGSAV A 11
- [0031] <210> 4
- [0032] <211> 7
- [0033] <212> PRT
- [0034] <213> 智人 (Homo sapiens)
- [0035] <400> 4
- [0036] WASTRHT 7
- [0037] <210> 5
- [0038] <211> 9

[0039] <212> PRT  
 [0040] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0041] <400> 5  
 [0042] SSYPWTFGG 9  
 [0043] <210> 6  
 [0044] <211> 357  
 [0045] <212> DNA  
 [0046] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0047] <400> 6  
 [0048] gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac tttgtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60  
 [0049] tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aggtatgata tgtcttgggt tcgccagact 120  
 [0050] ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtggctgta cacctactat 180  
 [0051] ccagacagtg tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240  
 [0052] ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagecattt atttctgtac aagtccctat 300  
 [0053] ggtaactacg gaatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcagecc 357  
 [0054] <210> 7  
 [0055] <211> 119  
 [0056] <212> PRT  
 [0057] <213> 小鼠 (Mus musculus)  
 [0058] <400> 7  
 [0059] EVQLVESGGD FVKPGGSLKL SCAASGFTFS RYDMSWVRQT PDKRLEWVAT ISGGGRYTTY 60  
 [0060] PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAIYFCTSPY GNYGMDYWGQ GTSVTVSSA 119  
 [0061] <210> 8  
 [0062] <211> 8  
 [0063] <212> PRT  
 [0064] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0065] <400> 8  
 [0066] GFTFSRYD 8  
 [0067] <210> 9  
 [0068] <211> 10  
 [0069] <212> PRT  
 [0070] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0071] <400> 9  
 [0072] ISGGGRYTTY 10  
 [0073] <210> 10  
 [0074] <211> 9  
 [0075] <212> PRT  
 [0076] <213> 智人 (Homo sapiens)  
 [0077] <400> 10

[0078] PYGNYGMDY 9  
 [0079] <210> 11  
 [0080] <211> 107  
 [0081] <212> PRT  
 [0082] <213> 人工序列  
 [0083] <400> 11  
 [0084] DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQDAG SAVAWYQQKP GKAPKLLIYW ASTRHTGVPS 60  
 [0085] RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSSYPWTFGG GTKLEIK 107  
 [0086] <210> 12  
 [0087] <211> 119  
 [0088] <212> PRT  
 [0089] <213> 人工序列  
 [0090] <400> 12  
 [0091] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYDMSWVRQA PGKGLEWVST ISGGGRYTTY 60  
 [0092] PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCTSPY GNYGMDYWGQ GTSVTVSSA 119  
 [0093] <210> 13  
 [0094] <211> 321  
 [0095] <212> DNA  
 [0096] <213> 人工序列  
 [0097] <400> 13  
 [0098] gacatccagc tgacccagtc ccccagcttc ctgtccgctt ccgtgggcga cagggtgacc 60  
 [0099] atcacctgca aggcctccca ggatgccgga tccgctgtgg cctggtacca gcagaagccc 120  
 [0100] ggcaaggccc ctaagctgct gatctactgg gcttccacca ggcacaccgg cgtgccttcc 180  
 [0101] aggttttccg gctccggctc cggcacagag ttcaccctga ccatctcctc cctgcagccc 240  
 [0102] gaggacttgc ccacctacta ctgccagcag tacagctcct acccttggac cttcggcggc 300  
 [0103] ggcaccaagc tggagatcaa g 321  
 [0104] <210> 14  
 [0105] <211> 357  
 [0106] <212> DNA  
 [0107] <213> 人工序列  
 [0108] <400> 14  
 [0109] gaggtgcagc tggtagagtc cggcggagga ctggtgcaac ctggcggaag cctgaggctg 60  
 [0110] tcctgtgccg cctccggctt caccttctcc aggtacgaca tgtcctgggt gaggcaggct 120  
 [0111] cctggcaagg gcctggagtg ggtgtccacc atttccggcg gcggcaggta cacctactac 180  
 [0112] cccgactccg tgaagggcag gttcaccatc tccagggaca actccaagaa caccctgtac 240  
 [0113] ctgcagatga actccctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcac cagcccctac 300  
 [0114] ggcaactacg gcatggacta ctggggccag ggcacctccg tgacagtgtc ctccgct 357

**Alignment of human and mouse PD-1: Identities: 172/288 (60%)**

		<i>Signal peptide</i>		<i>IgV domain (35-144)</i>	
hPD1	1	<b>MQIPQAPWPVVWAVLQLGWR</b>	PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVT	EGD <b>NATFT</b>	<b>C</b> SFS <b>N</b> TS 60
		M + Q PW WAVLQL W+ GW L+ P+ PW	TF PA L V+EG	NATFTCS	SN S
mPD1	1	<b>MWVRQVPWSFTWAVLQLSWQ</b>	SGWLLEVPNGPWRSLTFYPAWLTVSEGA	<b>NATFT</b>	<b>C</b> SLS <b>N</b> WS 60
hPD1	61	ESFVLNWRMSPS <b>N</b> QTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARR <b>N</b> DSGT 120	E +LNW R+SPSNQ <b>T</b> +K AAF SQP QD RF++ QLPN DFHM+++ RRNDSG		
mPD1	61	EDLMLNWNRLSPS <b>N</b> QTEKQAAF <b>C</b> NGLSQPVQDARFQIIQLPNRHFHNMNILDTRR <b>N</b> DSGI 120			
				<i>TM region</i>	
hPD1	121	YL <b>C</b> GAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRAGQF <b>QTLVVG</b> VV <b>G</b> LLGS 180	YLCCGAISL PKA+I+ES AEL VTER E T +PSPSP+P G+FQ +V+G++ L+G		
mPD1	121	YL <b>C</b> GAISLHPKAKIEESPGAELVVTERILETSTRYPSPSPKPEGRF <b>QGMVIGIMS</b> ALVGI 180			
hPD1	181	<b>LV--LLVWVLA</b> VIC <b>S</b> RAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSVDYGELDFQWREKTPEPP 238	V LL W LAV CS + GA LKE+PSA PV SV Y ELDFQ REKTPE P		
mPD1	181	<b>PVLLLLAWALAV</b> FC <b>S</b> TSMSEARGAGSKDDTLKEEPSAAPVPSVAYEELDFQGREKTPELP 240			
hPD1	239	VP <b>C</b> VP <b>E</b> QTEYATIVFPSCMGTTSSPARRG <b>S</b> ADGPRSAQPLRPEDGH <b>C</b> SWPL 288	CV TEYATIVF G+G S+ RRG <b>S</b> ADG + +P R EDGHCSWPL		
mPD1	241	TAC <b>V</b> --HTEYATIVFTEGLGASAMGRRG <b>S</b> ADGLQGPRPRRHEDGH <b>C</b> SWPL 288			

图1

Screening of anti-PD1 hybridomas by ELISA

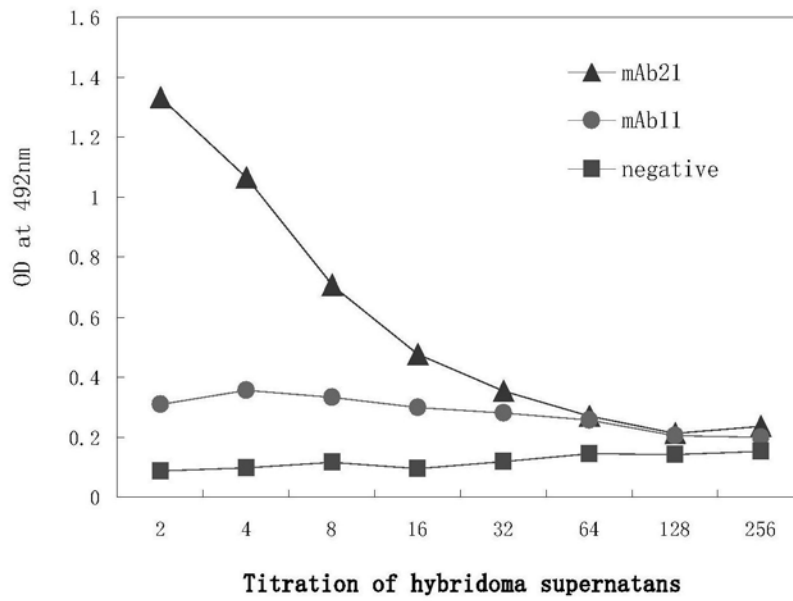


图2

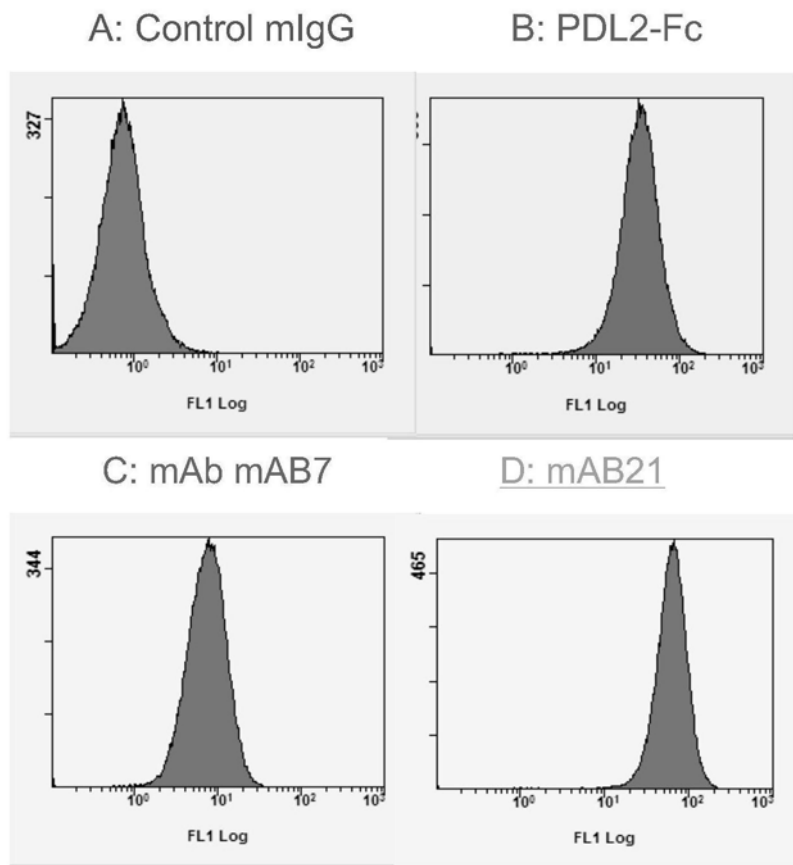
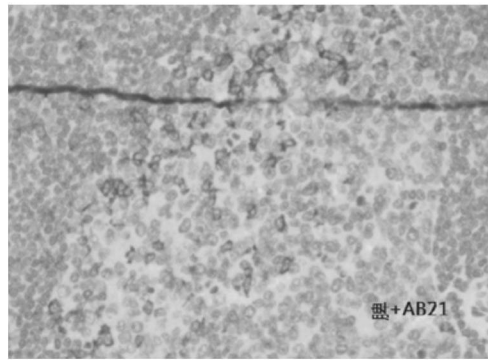
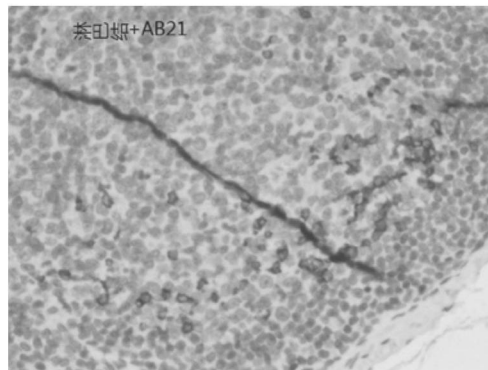


图3



A. IHC staining of monkey spleen section with mAB21



B. IHC staining of monkey lymph node with mAB21

图4

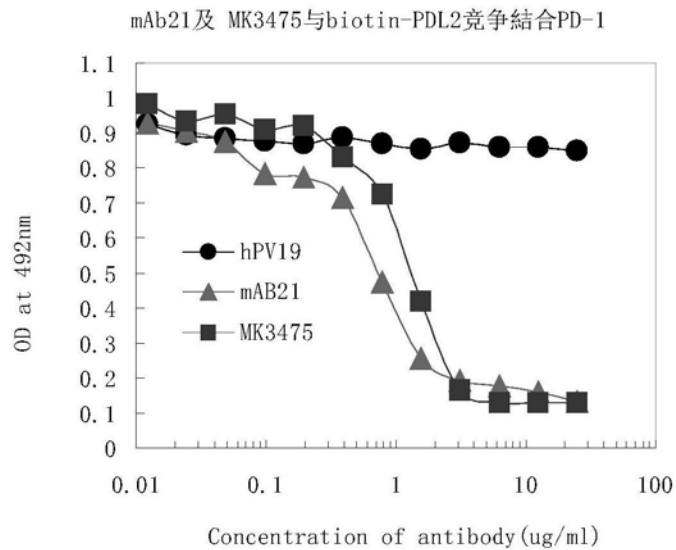


图5A

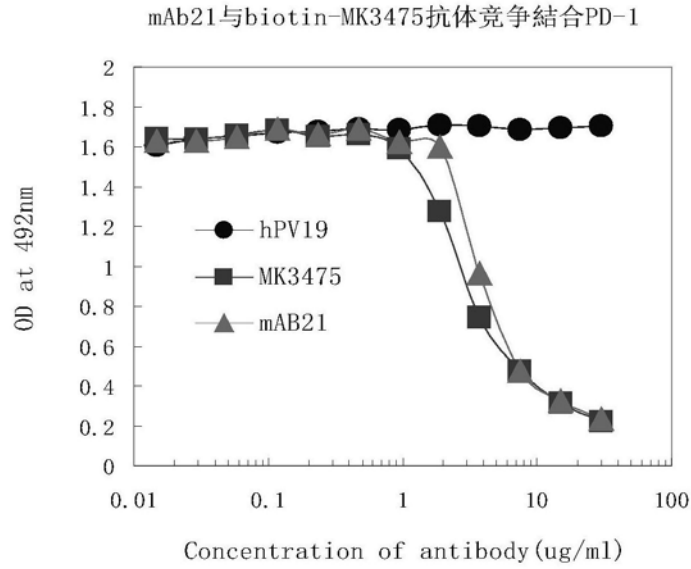


图5B

		CDR1	CDR2	
Nivo-L	1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVS----SYLAWYQQKPGQAPRLLIY	DASNRAT 56
Ab21-L	1	XIVXTQSXXXXXSXGXRXXXXXC	XASQXXXS XXAWYQQKPGQXPXLLIY	XASRXRT 56
MK3475L	1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIY	LASYLES 60
			CDR3	
Novo-L		GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQS	SNWPRTFGQ	GTKVEIK 107
Ab21-L		GXPXRFXGSGSGTDFTLTISXXXXXEXXXYFCQQX	SXXPXTFGX	GTKXEIK 107
MK3475L		GVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHS	RDLPLTFGG	GTKVEIK 111

**Alignment of hAb21L, MK3475L and Nivolumab-light chain-V domain**

hAb21-L and Nivolumab-L identities: 66/107 (62%)  
 hAb21-L and MK3475-L identities: 61/111 (55%)  
 MK3475-L and Nivolumab-L identities: 92/111 (83%)

图6A

		CDR1		CDR2			
Nivo-H	1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKAS	GITFSNSGM	MHWVRQAPGKGLEWVAV	IWYDGSKRYY	60	
hAb21-H	1	XVQLVESGGGLVQPGXSLRLSCTXAS	GXTFSXXX	MSWVRQAPGKGLEWVXX	LXXGXXXYY	60	
M3475-H	1	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCAS	GYTFTNYY	MYWVRQAPQGLEWMGG	INPSNGGTNF	60	
				CDR3			
Nivo-H		ADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT	-----NDDY	WGQGT	LVTVSS	113	
hAb21-H		XDSVKGRFTISRDN SKNTLXLQMNSLRAEDTAVYYCXX	XXXXXXXX	DY	WGQGT	XVTVSS	118
M3475-H		NEKFKNRVTLTTSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCAR	RDYRFDMGFDY	WGQGT	TTVTVSS	120	

Alignment of hAb21H, MK3475-H and Nivolumab-heavy chain-V domain

hAb21-H and Nivolumab-H identities: 88/118 (75%)  
 hAb21-H and MK3475-H identities: 60/120 (50%)  
 MK3475-H and Nivolumab-H identities: 60/120 (50%)

图6B

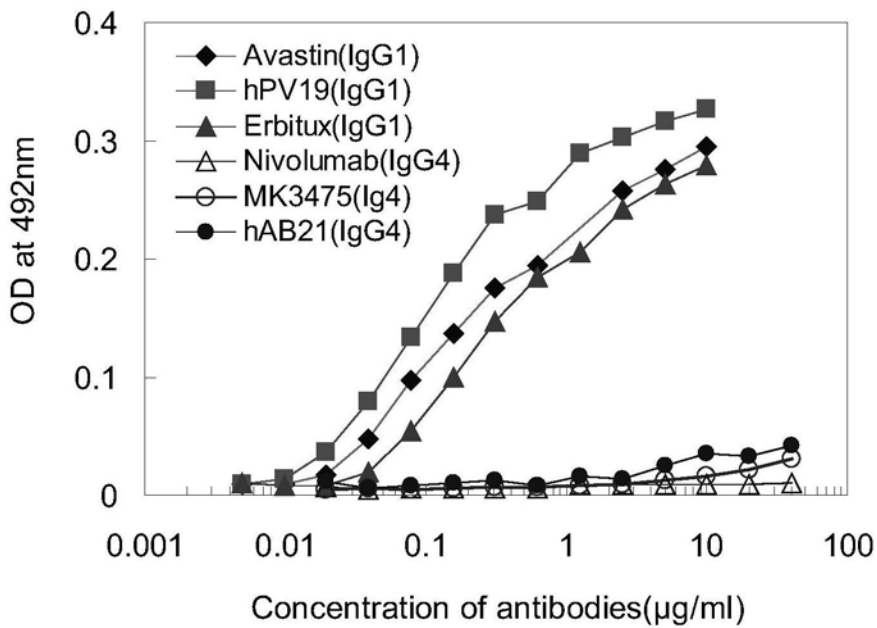


图7

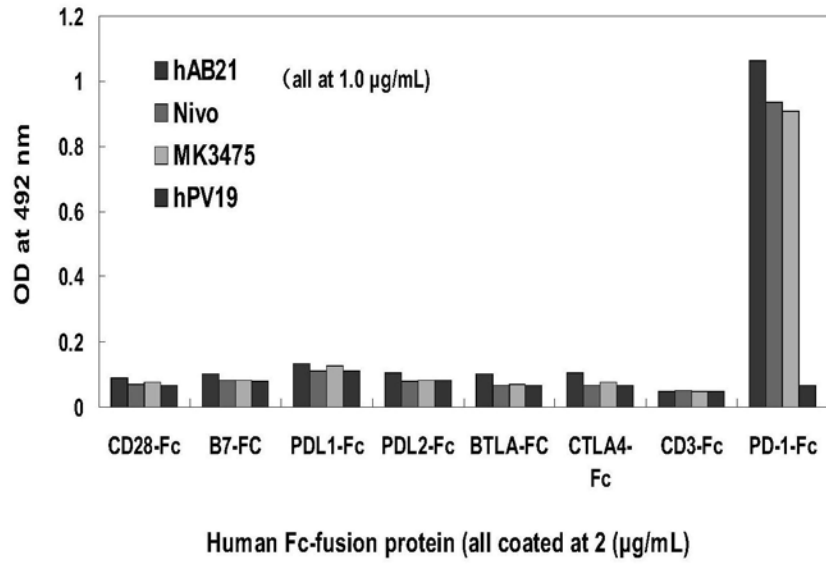


图8

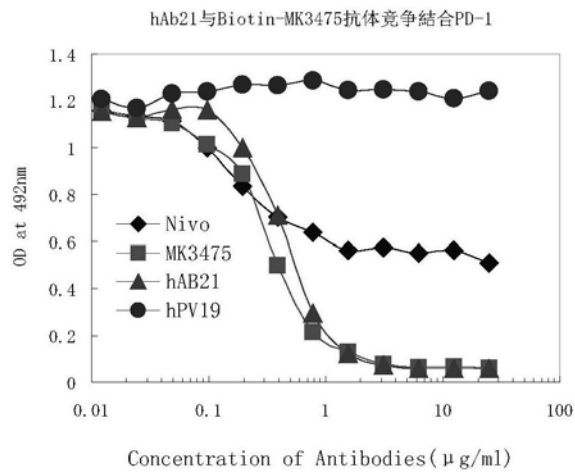


图9A

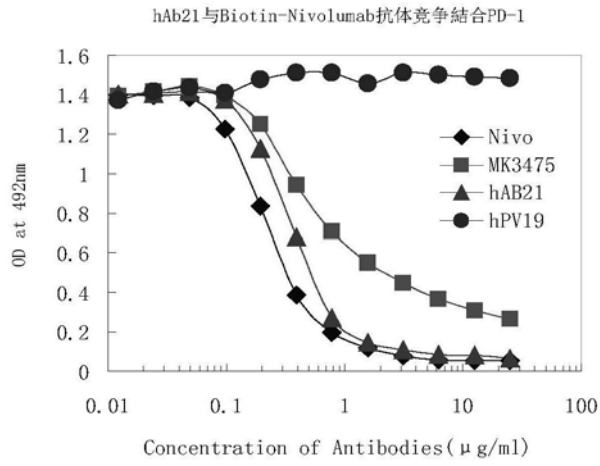


图9B

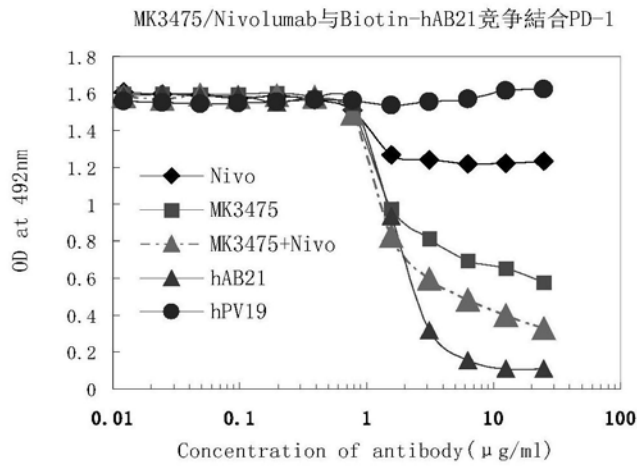


图9C

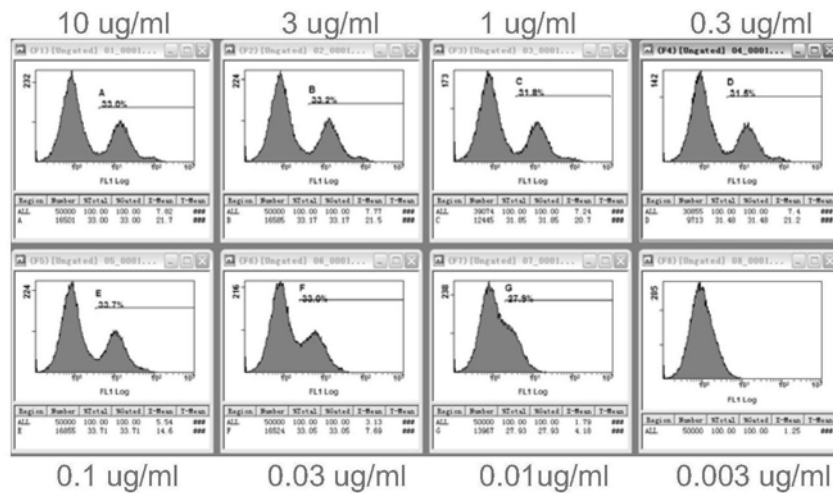


图10A

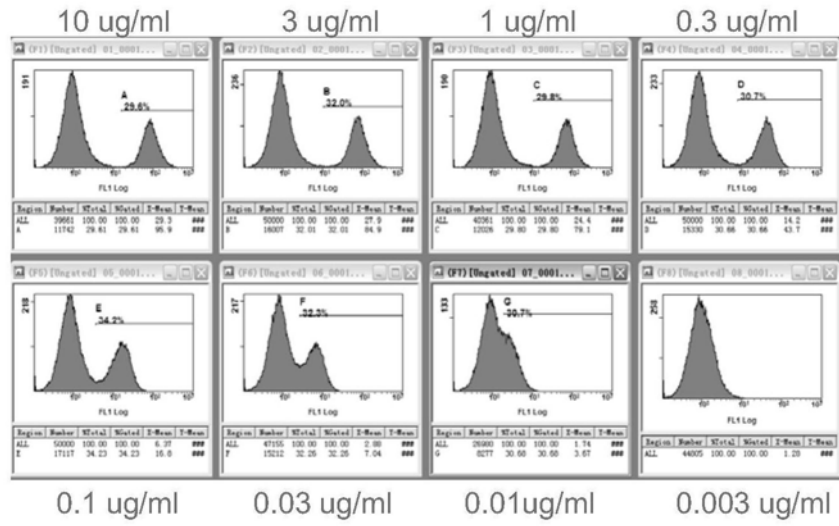


图10B

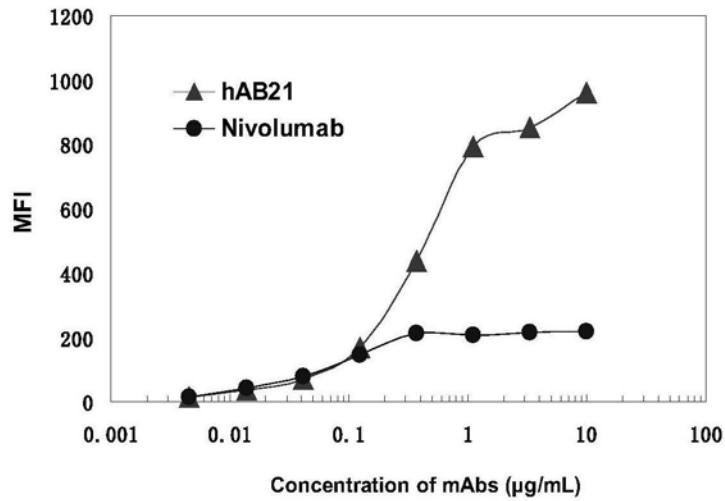


图10C

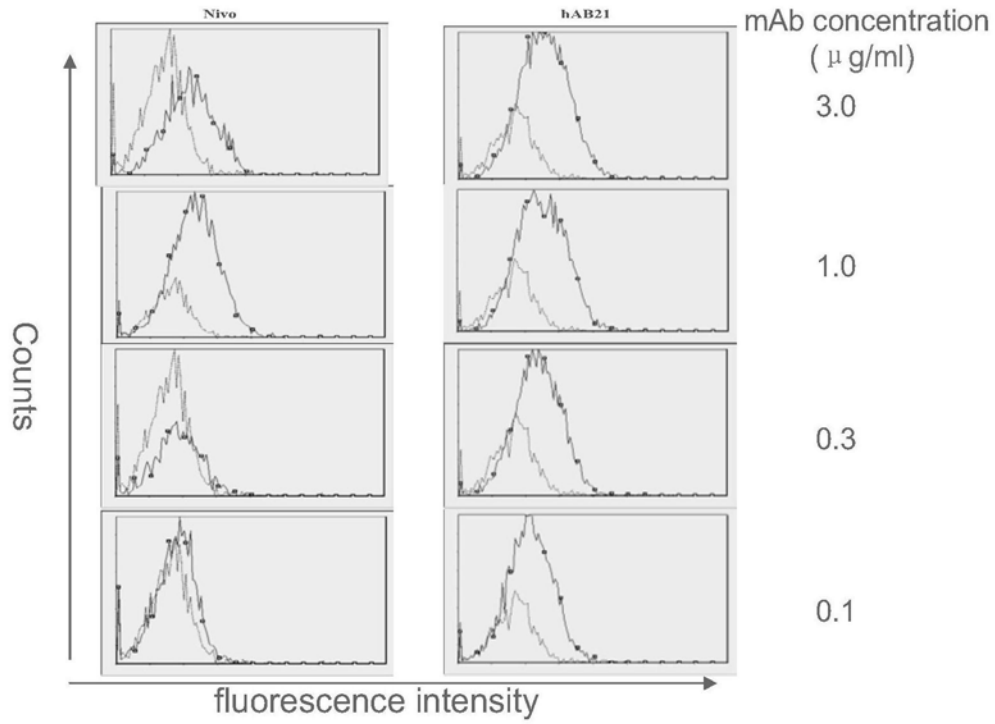


图11

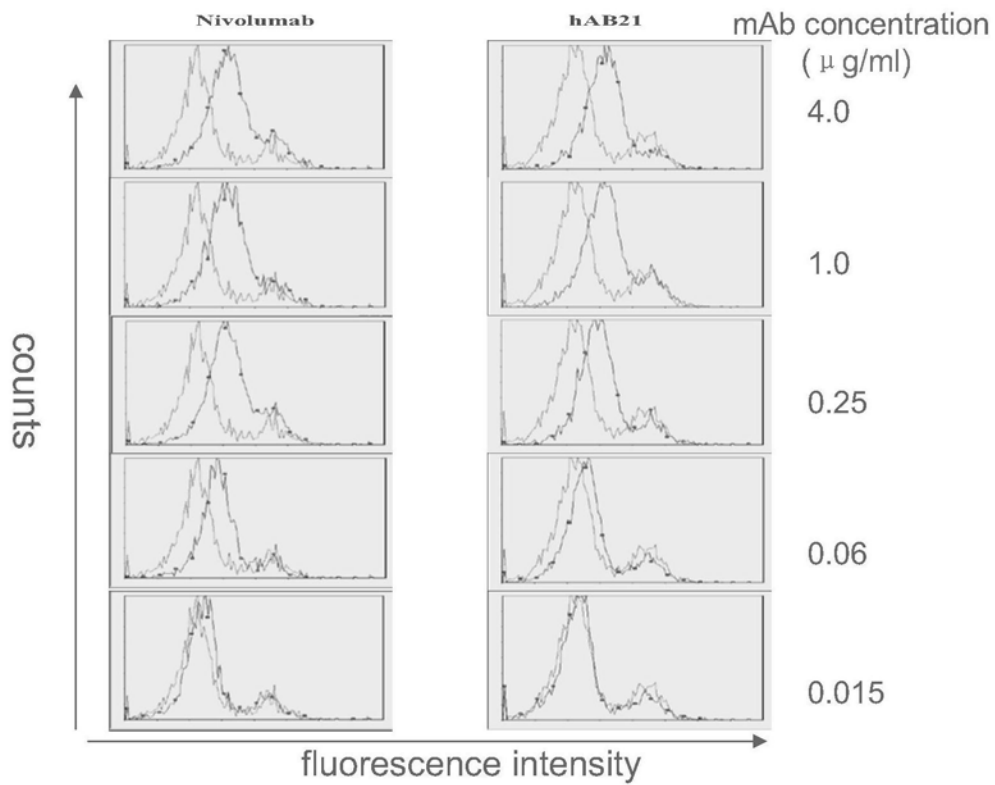


图12

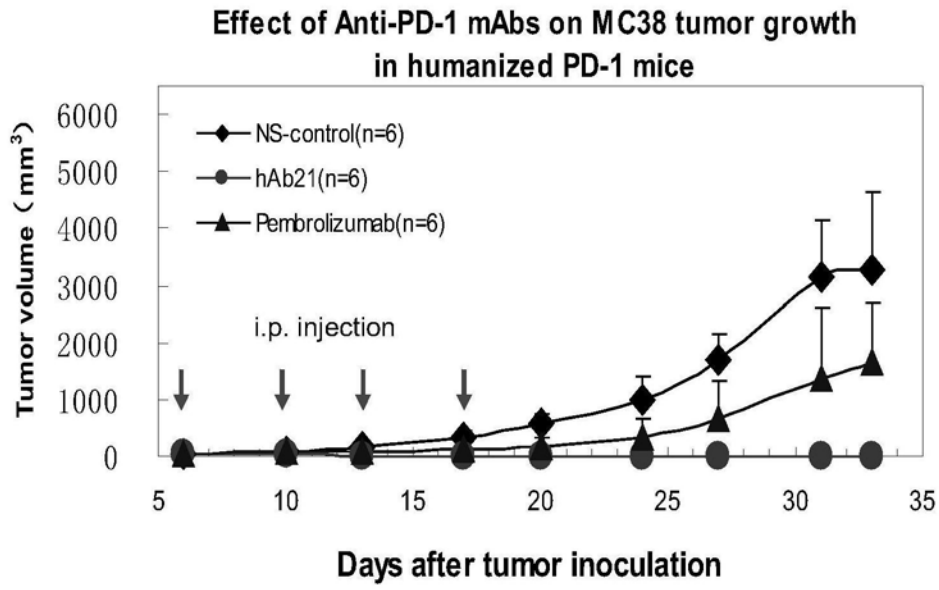


图13A

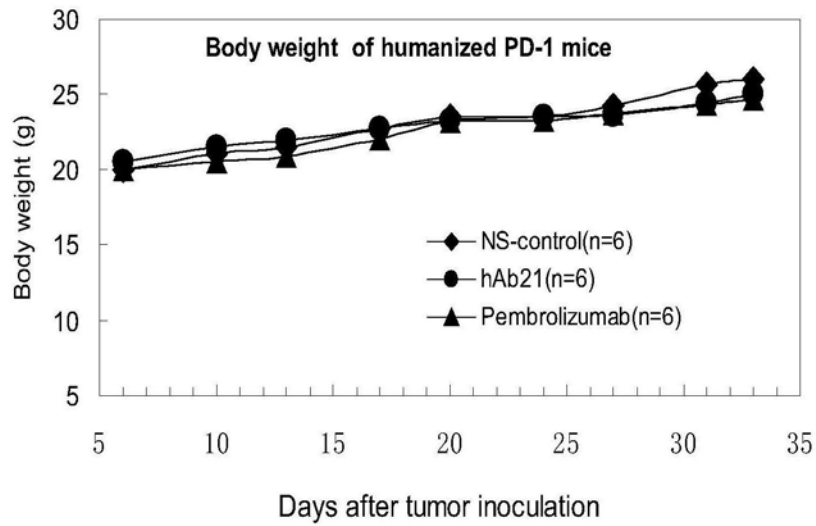


图13B

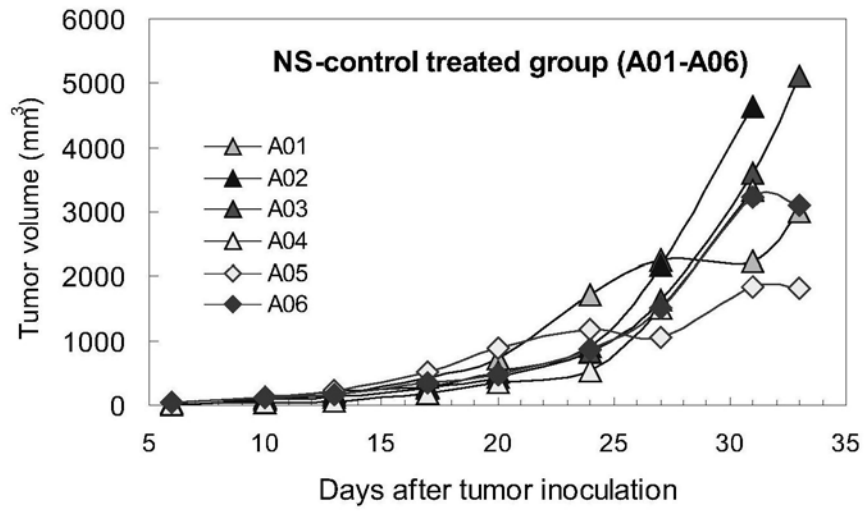


图14A

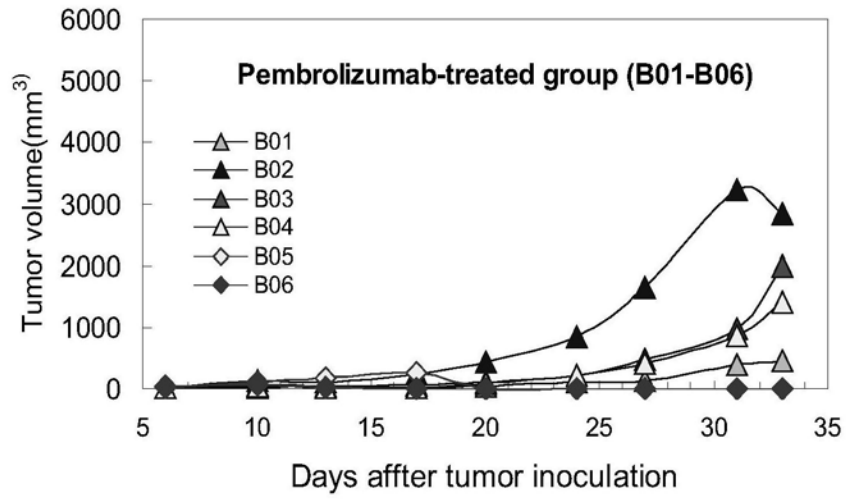


图14B

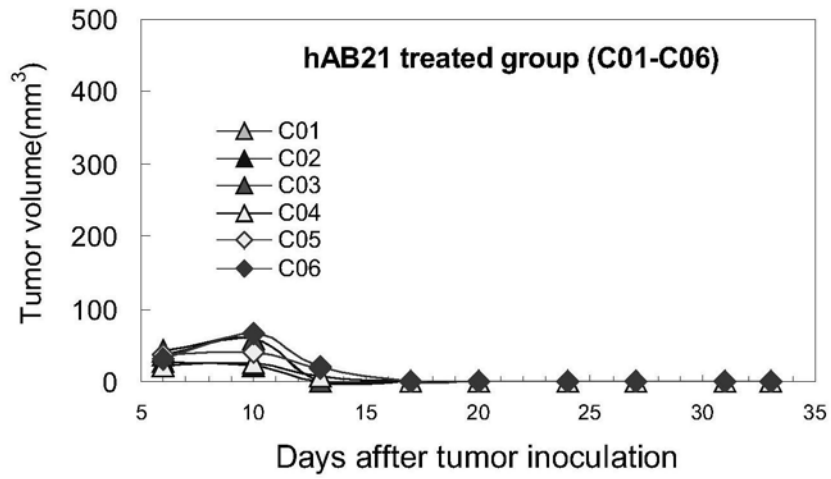


图14C

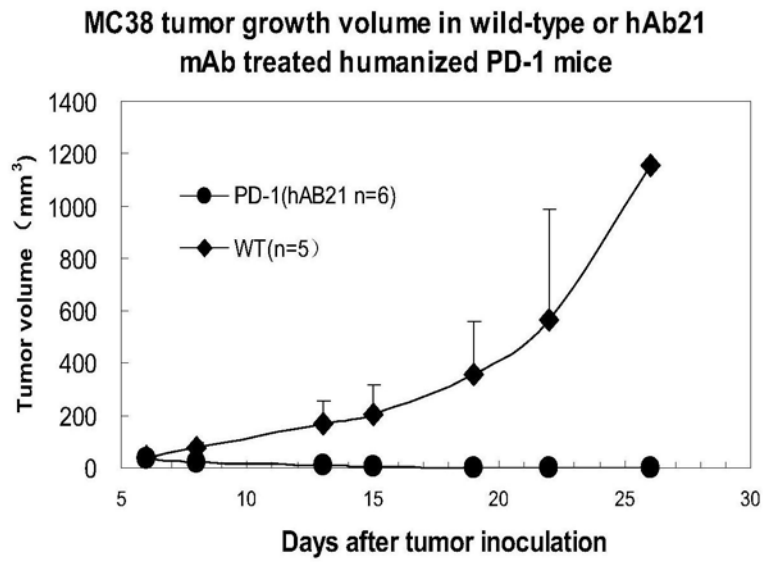


图15

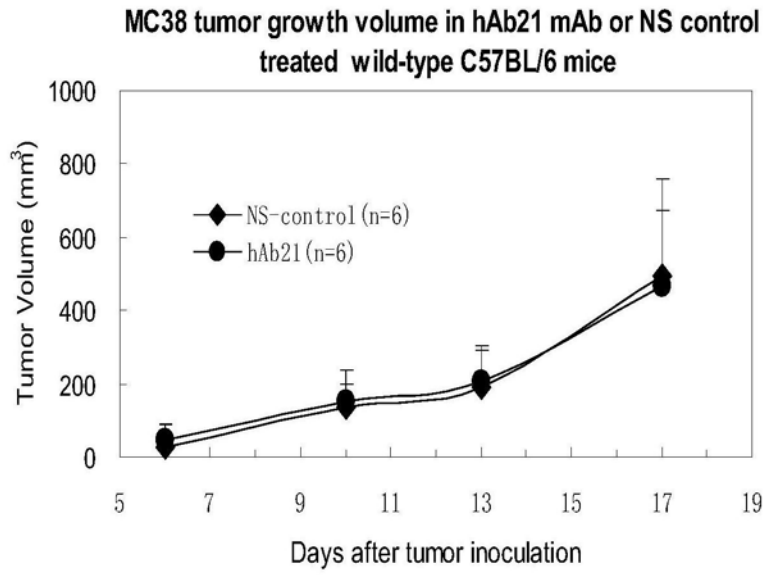


图16

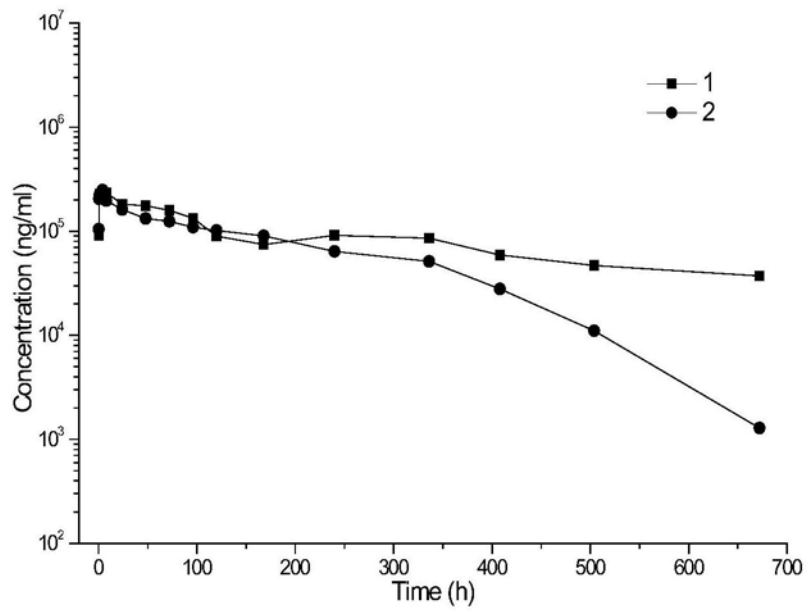


图17