



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 109963872 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 11

| | |
|---|---|
| (21) 申请号 201780071407.5 | (74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002 专利代理师 区斌 |
| (22) 申请日 2017.09.20 | |
| (65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 109963872 A | (51) Int.Cl. C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) |
| (43) 申请公布日 2019.07.02 | |
| (30) 优先权数据 16189804.4 2016.09.20 EP | (56) 对比文件 CN 101248089 A,2008.08.20 CN 104470949 A,2015.03.25 CN 105579471 A,2016.05.11 WO 2016007235 A1,2016.01.14 US 2016084839 A1,2016.03.24 Jan Trøst Jørgensen.Companion diagnostic assays for PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors in NSCLC.《EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS》.2015,第 16卷(第2期), 审查员 王静 |
| (85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.05.17 | |
| (86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2017/073712 2017.09.20 | |
| (87) PCT国际申请的公布数据 W02018/054940 EN 2018.03.29 | |
| (73) 专利权人 默克专利股份有限公司 地址 德国达姆施塔特 专利权人 辉瑞公司 | |
| (72) 发明人 C·维尔姆 K·施奈德 H·达门 | 权利要求书3页 说明书37页 序列表31页 附图14页 |

(54) 发明名称
诊断抗PD-L1抗体及其用途

(57) 摘要
本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段，其以高特异性和可重复性结合人PD-L1内的表位。本发明的抗体或其抗原结合片段可用于评估组织样品中的PD-L1表达，以帮助患者分层。本发明进一步提供了产生本发明所述的抗体的方法。

1. 结合PD-L1的抗体或其抗原结合片段,其与包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位结合,其中所述抗体的轻链或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:4所示的轻链CDR1、SEQ ID NO:6所示的轻链CDR2、和SEQ ID NO:8所示的轻链CDR3,且所述抗体的重链或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:10所示的重链CDR1、SEQ ID NO:12所示的重链CDR2、和SEQ ID NO:14所示的重链CDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fab。

3. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是F(ab')₂。

4. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fab'。

5. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是scFv。

6. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是di-scFv。

7. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆抗体。

8. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体是IgG型单克隆抗体。

9. 根据权利要求2-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体的轻链或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:3所示的框架区1、SEQ ID NO:4所示的轻链CDR1、SEQ ID NO:5所示的框架区2、SEQ ID NO:6所示的轻链CDR2、SEQ ID NO:7所示的框架区3、和SEQ ID NO:8所示的轻链CDR3。

10. 根据权利要求2-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体的重链或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的框架区1、SEQ ID NO:10所示的重链CDR1、SEQ ID NO:11所示的框架区2、SEQ ID NO:12所示的重链CDR2、SEQ ID NO:13所示的框架区3、和SEQ ID NO:14所示的重链CDR3。

11. 根据权利要求1-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体的重链或其抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:110的氨基酸序列,且所述抗体的轻链或抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:111的氨基酸序列。

12. 根据权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体的轻链包含根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列,并且所述抗体的重链包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

13. 根据权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体的轻链包含根据SEQ ID NO:114的氨基酸序列,并且所述抗体的重链包含根据SEQ ID NO:115的氨基酸序列。

14. 根据权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是兔抗体。

15. 根据权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是兔源的抗体。

16. 根据权利要求1-8和12-15中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段进一步与可检测标记偶联。

17. 根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段进一步与可检测标记偶联。

18. 根据权利要求10所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段进一步与可检测标记偶联。

19. 根据权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段进一步与可检测标记偶联。

20. 根据权利要求16所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可检测标记是酶。

21. 根据权利要求17-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可检测标记是酶。

22. 根据权利要求16所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可检测标记是荧光团。

23. 根据权利要求17-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可检测标记是荧光团。

24. 根据权利要求16所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可检测标记是放射性同位素。

25. 根据权利要求17-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述可检测标记是放射性同位素。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于检测样品中包含在SEQ ID NO: 1中的表位的存在或表达的检测试剂中的用途。

27. 根据权利要求26所述的用途,其中所述样品是生物学样品。

28. 根据权利要求27所述的用途,其中所述生物学样品是组织样品。

29. 根据权利要求27所述的用途,其中所述样品是固定的组织样品。

30. 根据权利要求27所述的用途,其中所述样品是甲醛固定的石蜡包埋的组织。

31. 根据权利要求28所述的用途,其中所述组织样品源自肿瘤组织。

32. 根据权利要求26-31中任一项所述的用途,其中所述检测通过流式细胞术进行。

33. 根据权利要求26-31中任一项所述的用途,其中所述检测通过ELISA进行。

34. 根据权利要求26-31中任一项所述的用途,其中所述检测通过蛋白质印迹进行。

35. 根据权利要求26-31中任一项所述的用途,其中所述检测通过免疫组织化学进行。

36. 根据权利要求1-25中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于通过以下方法检测样品中存在或表达包含根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列的人PD-L1或其任何片段的试剂盒中的用途,其中所述方法包括以下步骤:用根据权利要求1-25中任一项所述的抗体或其抗原结合片段接触所述样品,并检测结合的抗体或其抗原结合片段的存在。

37. 根据权利要求36所述的用途,其中所述样品是生物学样品。

38. 根据权利要求37所述的用途,其中所述生物学样品是组织样品。

39. 根据权利要求37所述的用途,其中所述生物学样品是固定的组织样品。

40. 根据权利要求39所述的用途,其中所述固定的组织样品是甲醛固定的石蜡包埋的组织样品。

41. 根据权利要求39所述的用途,其中所述固定的组织样品是甲醛固定的石蜡包埋的肿瘤组织样品。

42. 根据权利要求36-41中任一项的用途,其中所述样品源自患有癌症的对象或具有癌症风险的对象。

43. 根据权利要求36-41中任一项的用途,其中所述样品源自患有T细胞功能障碍的对象。

44. 根据权利要求36-41中任一项的用途,其中所述样品源自患有急性感染的对象或慢性感染的对象。

45. 根据权利要求36-41中任一项的用途,其中所述样品源自具有肿瘤免疫性风险的对象或显示肿瘤免疫性的对象。

46. 分离的多核苷酸,其编码权利要求1-25中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
47. 表达载体,其包含权利要求46的多核苷酸。
48. 根据权利要求47所述的表达载体在制备权利要求11-15中任一项所述的抗体中的用途,其中所述抗体包含根据SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的氨基酸序列。
49. 宿主细胞,其包含至少一种根据权利要求47的表达载体。
50. 根据权利要求49的宿主细胞在制备权利要求12所述的抗体中的用途。

诊断抗PD-L1抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及癌症诊断领域,具体来说涉及用于体外诊断的以检测肿瘤样品中PD-L1表位的存在的诊断抗体的用途。

[0002] 背景

[0003] 程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) (也称为分化簇 (CD274) 或B7同系物1 (B7-H1)) 是人类中由CD274基因编码的蛋白质,并且紧邻PD-L2 (CD273) (PD-1 (CD279) 的配体之一)。PD-L1是40kDa的1型跨膜蛋白,其在许多造血细胞上表达,包括树突细胞、巨噬细胞、间充质干细胞和骨髓源的肥大细胞。发现通过干扰素的作用在上皮细胞和内皮细胞上诱导表达PD-L1。发现免疫赦免的位点如胎盘和视网膜中的合胞体滋养层组成性地表达PD-L1。

[0004] 胎盘中PD-L1的表达在妊娠第二期开始时增加,通过增加的氧上调,并且在低氧浓度下迅速丧失。实验表明,PD-1-PD-L途径分别调节对微生物的有效免疫应答和维持自身耐受所需的刺激和抑制信号之间的平衡。许多引起慢性感染的微生物利用PD-1-PD-L1途径逃避宿主免疫效应物机制。基于小鼠模型的肝脏感染,PD-PD-L1途径也被认为在病毒感染期间调节免疫介导的组织损伤,因为与野生型小鼠相比,PD-1缺失小鼠在腺病毒清除后显示肝损伤增加,这被认为是由高度活跃和侵略性的T细胞引起的。

[0005] 通过IFN γ 释放的免疫攻击导致可通过粘膜诱导的PD-L1上调,从而在慢性炎症或感染的情况下产生“免疫屏障”以防止自身免疫攻击。这些细胞上调的PD-L1与T细胞上的PD-1结合,导致T细胞耗竭的发展。

[0006] 肿瘤细胞已经适应了这种在正常生理环境下保护粘膜免受自身免疫攻击的PD-1-PD-L1调节机制,且相反通过过表达PD-L1以避免免疫监视从而促进癌症生长。

[0007] 这种免疫抑制机制可被PD-L1阳性肿瘤细胞劫持,最终导致肿瘤逃脱免疫系统的清除。通过单克隆抗体抑制PD-1/PD-L1相互作用为治疗具有PD-L1表达的肿瘤提供了有希望的概念。阻断PD-1和PD-L1的单克隆抗体的临床试验目前正在患有各种恶性肿瘤的患者中进行。

[0008] 发表的比较PD-L1阳性或PD-L1阴性患者的临床应答率的抗PD-L1临床试验数据的统计分析表明PD-L1表达是对某些癌症类型的临床应答的预测标记和其他的相关生物标记 (Gandini et al., Crit Rev Oncol Hematol. 2016 Apr; 100:88-98)。例如,在转移性黑素瘤中,肿瘤组织中的PD-L1表达与显著更好的预后相关,因为接受抗PD-L1治疗的PD-L1阳性患者显示死亡率降低53%。

[0009] 研究还表明,在多种癌症类型中,在具有表达高水平PD-L1的肿瘤的患者中观察到对抗PD-L1治疗的应答,特别是当PD-L1在肿瘤浸润性免疫细胞上表达时 (参见例如Herbst et al., Nature. 2014 Nov 27; 515 (7528): 563-7; Ilie et al., Annals of Oncology 27: 147-153, 2016)。在乳头状甲状腺癌中,发现PD-L1表达与复发和缩短的无病存活相关,支持了在该肿瘤类型中使用PD-L1表达作为预后标记 (Chowdhury et al., Oncotarget. 2016 Apr 12)。

[0010] 肿瘤组织样品中PD-L1表达的检测和评分通常通过在冷冻或福尔马林固定的石蜡

包埋 (FFPE) 肿瘤组织切片上的免疫组织化学进行。PD-L1 表达的评分可以使用不同的方法进行:例如,一种方法采用样本对PD-L1表达呈阳性或阴性的二元终点评分,其中阳性结果根据表现出细胞表面膜染色的组织学证据的肿瘤细胞的百分比来定义。已经使用两种不同的截止值,总肿瘤细胞的1%和5%,在这两个截止值肿瘤样本被评分为PD-L1阳性 (Cancer.2011 May 15;117(10):2192-201;N Engl J Med 2012;366:2443-54.)。与显示膜和突出细胞质染色的肿瘤细胞相比,肿瘤样本中的PD-L1表达也通过对显示膜染色的肿瘤细胞和肿瘤浸润性免疫细胞进行评分来定量。随后进行基于PD-L1表达的样本评分,由此给出IHC评分0、1、2或3。如果小于1%的细胞是PD-L1阳性,则样本评分为“0”,“1”是大于1%但小于5%的细胞是PD-L1阳性、“2”是如果大于5%但小于10%的细胞是PD-L1阳性,或者“3”是如果超过10%的细胞是PD-L1阳性 (Herbst et al.Nature.2014 Nov 27;515(7528):563-7)。肿瘤浸润性单个核细胞 (TIMC) 中的PD-L1表达已经使用半定量方法根据三个类别进行评估,取决于样本中TIMC的数量分别得分为0、1或2:0%=0、<5%=1、≥5%=2。

[0011] 大多数商购的抗PD-L1抗体的特异性和可重复性尚未得到彻底评估,并且已经报道了一些广泛使用的抗体的局限 (参见例如Cancer 2011;117:2192-201;Carvajal-Hausorff et al.,Laboratory Investigation(2015) 95,385-396)。例如,WO 2014/165422 A1、WO 2016/007235 A1公开了抗PD-L1抗体和使用相应抗体评估PD-L1表达的评分指南。

[0012] 因此,继续需要扩展对PD-L1具有高度特异性并且产生可重复的结果的可用的抗PD-L1抗体的汇集(repertoire),以帮助适合基于抗PD-L1治疗的肿瘤患者的分层。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明人惊奇地发现,针对包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位的抗体或其抗原结合片段以高特异性和可重复性结合人PD-L1。

[0015] 在第一实施方案中,本发明提供了抗体或其抗原结合片段,其与包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位以高特异性结合并产生可重复的结果,由此抗体或其抗原结合片段在其轻链序列中包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8中的至少三个氨基酸序列,在其重链序列中包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14中的至少三个氨基酸序列。

[0016] 根据一个实施方案,本发明的抗体或其抗原结合片段可以是Fab片段。

[0017] 根据一个实施方案,本发明的抗原结合片段是F(ab')₂片段。

[0018] 根据一个实施方案,本发明的抗原结合片段是Fab'片段。

[0019] 在一个实施方案中,本发明的抗体是scFv。

[0020] 根据一个实施方案,本发明的抗体是di-scFv。

[0021] 根据一个实施方案,本发明的抗体是单克隆抗体。

[0022] 根据一个实施方案,本发明的抗体是IgG型抗体。

[0023] 根据一个实施方案,本发明的抗体轻链或其抗原结合片段包含所有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8。

[0024] 根据一个实施方案,本发明的抗体重链或其抗原结合片段包含所有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14。

[0025] 在一个实施方案中,本发明的抗体包含包含根据SEQ ID NO:110的氨基酸序列的

重链或其抗原结合片段和包含根据SEQ ID NO:111的氨基酸序列的轻链或其抗原结合片段。

[0026] 根据优选的实施方案,本发明的抗体轻链包含根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列,并且重链包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0027] 在优选的实施方案中,本发明的抗体轻链包含根据SEQ ID NO:114的氨基酸序列,并且抗体重链包含根据SEQ ID NO:115的氨基酸序列。

[0028] 在优选的实施方案中,本发明的抗体是兔抗体或兔源的抗体。

[0029] 根据一个实施方案,如上公开的本发明的抗体或其抗原结合片段进一步与可检测标记偶联。

[0030] 根据一个实施方案,本发明的抗体或其抗原结合片段的可检测标记是酶或荧光团或酶底物之一。

[0031] 根据一个实施方案,如上公开的本发明的抗体或其抗原结合片段用于检测样品中包含在SEQ ID NO:1中的表位的存在或表达,所述样品根据一个实施方案是生物学样品,优选为组织样品、固定的组织样品或甲醛固定的石蜡包埋 (FFPE) 的组织,更优选为肿瘤源的甲醛固定的石蜡包埋 (FFPE) 的组织。

[0032] 在一个实施方案中,使用如上公开的本发明的抗体或其抗原结合片段,通过流式细胞术、ELISA或蛋白质印迹检测如上公开的包含在SEQ ID NO:1中的表位的存在或不存在。

[0033] 根据优选的实施方案,使用如上公开的本发明的抗体或其抗原结合片段,通过免疫组织化学 (IHC) 检测包含在SEQ ID NO:1中的表位的存在或表达。

[0034] 在一个实施方案中,本发明提供了检测样品中包含根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列的人PD-L1或其任何片段的存在或表达的方法,其中本发明的方法包括以下步骤:用本发明的抗体或其抗原结合片段接触样品,并检测结合抗体或其抗原结合片段的存在。

[0035] 在一个实施方案中,如上公开的本发明的体外方法用在生物样品、组织样品、固定的组织样品,优选甲醛固定的石蜡包埋 (FFPE) 的组织样品,更优选甲醛固定的石蜡包埋 (FFPE) 的肿瘤组织样品上。

[0036] 根据一个实施方案,如上公开的本发明的体外方法中使用的样品源自患有以下或具有以下风险的对象:癌症、T细胞功能障碍、急性或慢性感染或肿瘤免疫。

[0037] 在一个实施方案中,本发明涉及如上公开的本发明的抗体或抗原结合片段在样品中的包含在SEQ ID NO:1中的表位的存在或表达的用途。

[0038] 在一个实施方案中,本发明提供了编码如上公开的本发明的抗体或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。

[0039] 根据一个实施方案,本发明提供了表达载体,其包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

[0040] 在一个实施方案中,本发明提供如上公开的表达载体,其用于产生本发明的抗体。

[0041] 在一个实施方案中,本发明提供至少一种宿主细胞,其包含至少一种根据本发明的表达载体。

[0042] 在一个实施方案中,本发明提供至少一种根据本发明的宿主细胞,其用于制备本发明的抗体。

[0043] 根据一个实施方案,本发明提供治疗患者癌症的方法,其包括以下步骤:使用如上公开的本发明的抗PD-L1抗体检测来自所述患者的样品中人PD-L1的存在或表达,将患者样品中PD-L1的表达与参照样品比较,并且如果与参照样品比较患者样品中PD-L1表达增加,则向患者施用免疫检查点抑制剂(例如抗PD-L1或抗PD-1抗体)。

附图说明

[0044] 图1:本发明的抗体克隆MKP1A07310的ELISA结果,其使用50 μ l/孔的浓度为1 μ g/ml的免疫原包被ELISA板的孔。

[0045] 图2:使用稀释度为1:10000和1:25000的本发明的抗体克隆MKP1A07310和对照抗体(抗CD247,稀释度1:250),使用所示细胞裂解物的蛋白质印迹。使用PD-L1转染的HEK293、表达PD-L1的MDA-MB231、siRNA PDL1敲低的MDA-MB231和低PD-L1细胞系A549的细胞裂解物进行蛋白质印迹。

[0046] 图3:使用本发明的抗体(MKP1A07310)和针对siRNA PDL1敲低的MDA-MB231细胞中的人PD-L1的细胞外表位的不同抗PD-L1抗体的免疫组织化学染色。在siRNA敲低细胞中PD-L1染色减少。

[0047] 图4:在70个细胞系中的癌细胞系阵列上使用浓度为1 μ g/ml的MKP1A7310和三种不同浓度(2 μ g/ml、5 μ g/ml和10 μ g/ml)的MKP1B19610表征本发明的抗体(MKP1A07310)以及针对人PD-L1的细胞外表位的一种抗体(MKP1B19610),以评估和比较它们各自的结合特征并确定用于进一步研究的最佳工作浓度。癌细胞系阵列(CAX09_70_MB,由Multiblock GmbH和Zytomed Systems GmbH制造)用于评估IHC中的抗体性质。将用于制备定制癌细胞系阵列的癌细胞系在室温在磷酸盐中缓冲的4%多聚甲醛(pH7)中固定16至48小时,且随后包埋在石蜡中。

[0048] 图5:本发明的抗体(MKP1A07310)在组织阵列CAX08_60上的运行内可变性,不同载玻片之间的相关系数 $r=0.99$ 。

[0049] 图6:使用浓度为1 μ g/ml的MKP1A7310和浓度为10 μ g/ml的MKP1B19610测试本发明的抗体(MKP1A07310,标记为“#”)和在癌细胞系阵列CAX09_70上针对人PD-L1的细胞外表位的一种抗体(MKP1B19610)的表征。

[0050] 图7:(A)使用本发明的抗体以DAB作为色原的PD-L1阳性细胞的IHC检测(右图);用计算机软件检测色原(中图);检测细胞核和细胞质的蓝色染色(右图)。箭头指示阳性细胞。(B)使用浓度为1 μ g/ml的本发明的抗体MKP1A07310对阳性和阴性对照组织进行IHC染色。

[0051] 图8:(A)使用本发明的抗体MKP1A07310在异种移植组织微阵列TMA_Xenos_12的FFPE组织上以2 μ g/ml的浓度进行免疫组织化学。(B)使用浓度为10 μ g/ml的针对人PD-L1的细胞外表位的抗体(MKP1B19610)在异种移植组织微阵列TMA_Xenos_12的FFPE组织上进行免疫组织化学染色。示例性的PD-L1阳性细胞用箭头指示

[0052] 图9:(A)使用浓度为1 μ g/ml的本发明的抗体MKP1A07310在癌细胞系阵列CAX08_60的FFPE组织上进行免疫组织化学染色。(B)使用浓度为10 μ g/ml的针对人PD-L1的细胞外表位的抗体(MKP1B19610)在癌细胞系阵列CAX08_60的FFPE组织上进行免疫组织化学染色。箭头指示示例性PD-L1阳性细胞。

[0053] 图10:使用浓度为1 μ g/ml的本发明的抗体MKP1A07310以及浓度为10 μ g/ml的针对

PD-L1的细胞外表位的抗体MKP1B19610在discovery XT染色仪上在FFPE固定的细胞系NCI-H2009、Lox和A2780 (NCI-H2900、Lox癌细胞系表达高水平的PD-L1、癌细胞系A2780仅表达少量的PD-L1) 上进行免疫组织化学染色。

[0054] 图11:使用浓度为0.5 μ g/ml的本发明的抗体MKP1A07310以及浓度为1 μ g/ml的针对PD-L1的细胞外表位的抗体MKP1B19610在AutostainerLink染色仪上在FFPE固定的细胞系NCI-H2009、Lox和A2780上进行免疫组织化学染色。

[0055] 图12:使用MKP1B19610在使用Discovery XT®系统 (Ventana) 和AutostainerLink系统 (DAKO) 染色的FFPE癌细胞系上的IHC结果的相关性。(A) 使用MKP1B19610在低和高pH使用不同的IHC平台和浓度的IHC运行的结果,如图所示相对于彼此绘制。(B) 图的统计分析,其中Pearson相关系数为0.6186 (2 μ g/ml、高pH)、0.6969 (1 μ g/ml、高pH) 和低pH的0.4309 (5 μ g/ml)、0.6631 (2 μ g/ml)。

[0056] 图13: (A) 使用本发明的抗-PD-L1抗体MKP1A07310,在使用所示抗体浓度、高pH的Discovery XT®系统 (Ventana) 或AutostainerLink (DAKO) 在FFPE癌细胞系中染色的IHC结果的相关性。(B) IHC结果的相关性的统计学分析,其中相关系数为 $r=0.9474$ (1 μ g/ml) 和 $r=0.9695$ (2 μ g/ml)。

[0057] 图14: (A) 抗-PD-L1抗体MKP1B19610和本发明的抗体MKP1A07310在所示浓度用AutostainerLink (DAKO) 在FFPE癌细胞系上染色的IHC相关性 (菱形:1 μ g/ml;圆形:2 μ g/ml),如图所示,本发明的抗体以0.5 μ g/ml的浓度使用。(B) IHC结果的相关性的统计学分析,其中相关系数为 $r=0.6503$ (2 μ g/ml MKP1B19610) 和 $r=0.7088$ (1 μ g/ml MKP1B19610)。

[0058] 序列表

[0059]

| | |
|---------------|--|
| SEQ ID NO: 1 | RLRKGRMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET |
| SEQ ID NO: 2 | CGIQDTNSKKQSDTH |
| SEQ ID NO: 3 | AQVLTQTPSPVSASVGSTVTINCQAS |
| SEQ ID NO: 4 | QSLHRNNY |
| SEQ ID NO: 5 | LSWFQQKPGQPPKQLIY |
| SEQ ID NO: 6 | QAS |
| SEQ ID NO: 7 | TLASGVSSRFSGSGSGTQFTLTISDVVCDDAATYYC |
| SEQ ID NO: 8 | LGGVSGGPYP |
| SEQ ID NO: 9 | EQLVESGGGLVTPGGSLTLTCTVS |
| SEQ ID NO: 10 | TIDLSTFA |
| SEQ ID NO: 11 | ISWVRQAPGKGLEWIGT |
| SEQ ID NO: 12 | INTDLTT |
| SEQ ID NO: 13 | YYVNWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTGLTIEDTATYFC |
| SEQ ID NO: 14 | ARKLFGNGNV |
| SEQ ID NO: 15 | MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATVAQVLTQTPSPVSASVGSTVTINCQASQSLH RNNYLSWFQQKPGQPPKQLIYQASTLASGVSSRFSGSGSGTQFTLTISDVVC DDAATYYCLGGVSGGPYPFGGGTEVVVKGDVPVAPTVLIFPPAADQVATGTVT IVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTST QYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC |
| SEQ ID NO: 16 | METGLRWLLLVAVLKGVQCQEQLVESGGGLVTPGGSLTLTCTVSTIDLSTFA ISWVRQAPGKGLEWIGTINTDLTTYVNWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTGLT IEDTATYFCARKLFGNGNVWGPGLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPST VTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSPVRQSSGLYSLSSVSVTSS SQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSDQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRV |

[0060]

| | |
|---------------|---|
| | VSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPP REELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSYFL YSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK |
| SEQ ID NO: 17 | 5'-atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc acagttgccc aagtgtctgac ccagacccca tcccccggtg ctgcatctgt gggaagcaca gtcacatca attgccaggc cagtcaagat cttcatcgca acaactactt atcctgggtt cagcagaaac cagggcagcc tcccaagcaa ctgatctatc aggcattccac tctggcatct ggggtctcat cgcggttcag tggcagtga tctgggacac agttcactct caccatcagc gatgtggtgt gtgacgatgc tgccacttac tactgtctgg gcggtgttag tgggtggctc tatcctttcg gcggaggggac cgaggtggtc gtcaaagggtg atccagttgc acctactgtc ctcatcttcc caccagctgc tgatcaggtg gcaactggaa cagtcacat cgtgtgtgtg gcgaataaat actttcccga tgtcaccgtc acctgggagg tggatggcac cacccaaaca actggcatcg agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcagc agcactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac ctgcaagggtg acccagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg gtgactgtta g |
| SEQ ID NO: 18 | 5'-atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaagggtg ccagtgtcag gagcagctgg tggaatccgg aggaggcctg gtcacgcctg ggggatccct gacactcacc tgcacagtct ctacaatcga cctcagtacc tttgcaataa gctgggtccg ccagggtcca gggaaggggc tggagtggat cggaaccatt aatactgatc ttaccacata ctatgtgaat tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgtcga ccacgggtga tctgaaaatg accggtctga caatcgagga cacggccacc tatttctgtg ccagaaaatt atttgaaaat ggtaatgtct ggggcccagg caccctggtc accgtctctt cagggcaacc taaggctcca tcagtcttcc cactggcccc ctgctgcggg gacacacca gctccacgggt gacctgggc tgctgtgtca aagggtacct cccggagcca gtgaccgtga cctggaactc gggcaccctc accaatgggg tacgcacctt cccgtccgtc cggcagtcct caggcctcta ctgctgagc agcgtggtga gcgtgacctc aagcagccag cccgtcacct gcaacgtggc ccaccagcc accaacacca aagtggacaa gaccgttgcg ccctcgacat gcagcaagcc cacgtgcccacccccctgaac tcctgggggg accgtctgtc ttcatcttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cacgcacccc cgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggatgac cccgaggtgc agttcacatg gtacataaac aacgagcagg tgcgcaccgc ccggccgccc ctacgggagc agcagttcaa cagcacgatc cgcgtggtca gcacctccc catcgcgcac caggactggc tgaggggcaa ggagttcaag tgcaaagtcc acaacaaggc actcccggcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaga gggcagcccc tggagccgaa ggtctacacc atgggcctc cccgggagga gctgagcag aggtcggtca gcctgacctg catgatcaac ggcttctacc cttccgacat ctggtggag tgggagaaga acgggaaggc agaggacaac tacaagacca cgccggccgt gctggacagc gacggctcct acttctcta cagcaagctc tcagtgtcca cgagtgagtg gcagcggggc gacgtcttca cctgctccgt gatgcacgag gccttgacac accactacac gcagaagtcc |

[0061]

| | |
|---------------|----------------------------|
| | atctcccgct ctccgggtaa atga |
| SEQ ID NO: 19 | RLRKGRMM |
| SEQ ID NO: 20 | LRKGRMMD |
| SEQ ID NO: 21 | RKGRMMDV |
| SEQ ID NO: 22 | KGRMMDVK |
| SEQ ID NO: 23 | GRMMDVKK |
| SEQ ID NO: 24 | RMMDVKKC |
| SEQ ID NO: 25 | MMDVKKCG |
| SEQ ID NO: 26 | MDVKKCGI |
| SEQ ID NO: 27 | DVKKCGIQ |
| SEQ ID NO: 28 | VKKCGIQD |
| SEQ ID NO: 29 | KKCGIQDT |
| SEQ ID NO: 30 | KCGIQDTN |
| SEQ ID NO: 31 | CGIQDTNS |
| SEQ ID NO: 32 | GIQDTNSK |
| SEQ ID NO: 33 | IQDTNSKK |
| SEQ ID NO: 34 | QDTNSKKQ |
| SEQ ID NO: 35 | DTNSKKQS |
| SEQ ID NO: 36 | TNSKKQSD |
| SEQ ID NO: 37 | NSKKQSDT |
| SEQ ID NO: 38 | SKKQSDTH |
| SEQ ID NO: 39 | KKQSDTHL |
| SEQ ID NO: 40 | KQSDTHLE |
| SEQ ID NO: 41 | QSDTHLEE |
| SEQ ID NO: 42 | SDTHLEET |
| SEQ ID NO: 43 | RLRKGRMMD |
| SEQ ID NO: 44 | LRKGRMMDV |
| SEQ ID NO: 45 | RKGRMMDVK |
| SEQ ID NO: 46 | KGRMMDVKK |
| SEQ ID NO: 47 | GRMMDVKKC |
| SEQ ID NO: 48 | RMMDVKKCG |
| SEQ ID NO: 49 | MMDVKKCGI |
| SEQ ID NO: 50 | MDVKKCGIQ |
| SEQ ID NO: 51 | DVKKCGIQD |
| SEQ ID NO: 52 | VKKCGIQDT |
| SEQ ID NO: 53 | KKCGIQDTN |

[0062]

| | |
|---------------|------------|
| SEQ ID NO: 54 | KCGIQDTNS |
| SEQ ID NO: 55 | CGIQDTNSK |
| SEQ ID NO: 56 | GIQDTNSKK |
| SEQ ID NO: 57 | IQDTNSKKQ |
| SEQ ID NO: 58 | QDTNSKKQS |
| SEQ ID NO: 59 | DTNSKKQSD |
| SEQ ID NO: 60 | TNSKKQSDT |
| SEQ ID NO: 61 | NSKKQSDTH |
| SEQ ID NO: 62 | SKKQSDTHL |
| SEQ ID NO: 63 | KKQSDTHLE |
| SEQ ID NO: 64 | KQSDTHLEE |
| SEQ ID NO: 65 | QSDTHLEET |
| SEQ ID NO: 66 | RLRKGRMDV |
| SEQ ID NO: 67 | LRKGRMDVK |
| SEQ ID NO: 68 | RKGRMDVKK |
| SEQ ID NO: 69 | KGRMDVKKC |
| SEQ ID NO: 70 | GRMDVKKCG |
| SEQ ID NO: 71 | RMMDVKKCGI |
| SEQ ID NO: 72 | MMDVKKCGIQ |
| SEQ ID NO: 73 | MDVKKCGIQD |
| SEQ ID NO: 74 | DVKKCGIQDT |
| SEQ ID NO: 75 | VKKCGIQDTN |
| SEQ ID NO: 76 | KKCGIQDTNS |
| SEQ ID NO: 77 | KCGIQDTNSK |
| SEQ ID NO: 78 | CGIQDTNSKK |
| SEQ ID NO: 79 | GIQDTNSKKQ |
| SEQ ID NO: 80 | IQDTNSKKQS |
| SEQ ID NO: 81 | QDTNSKKQSD |
| SEQ ID NO: 82 | DTNSKKQSDT |
| SEQ ID NO: 83 | TNSKKQSDTH |
| SEQ ID NO: 84 | NSKKQSDTHL |
| SEQ ID NO: 85 | SKKQSDTHLE |
| SEQ ID NO: 86 | KKQSDTHLEE |
| SEQ ID NO: 87 | KQSDTHLEET |
| SEQ ID NO: 88 | RLRKGRMDVK |
| SEQ ID NO: 89 | LRKGRMDVKK |

[0063]

| | |
|----------------|--|
| SEQ ID NO: 90 | RKGRMDVKKC |
| SEQ ID NO: 91 | KGRMDVKKCG |
| SEQ ID NO: 92 | GRMDVKKCGI |
| SEQ ID NO: 93 | RMMDVKKCGIQ |
| SEQ ID NO: 94 | MMDVKKCGIQD |
| SEQ ID NO: 95 | MDVKKCGIQDT |
| SEQ ID NO: 96 | DVKKCGIQDTN |
| SEQ ID NO: 97 | VKKCGIQDTNS |
| SEQ ID NO: 98 | KKCGIQDTNSK |
| SEQ ID NO: 99 | KCGIQDTNSKK |
| SEQ ID NO: 100 | CGIQDTNSKKQ |
| SEQ ID NO: 101 | GIQDTNSKKQS |
| SEQ ID NO: 102 | IQDTNSKKQSD |
| SEQ ID NO: 103 | QDTNSKKQSDT |
| SEQ ID NO: 104 | DTNSKKQSDTH |
| SEQ ID NO: 105 | TNSKKQSDTHL |
| SEQ ID NO: 106 | NSKKQSDTHLE |
| SEQ ID NO: 107 | SKKQSDTHLEE |
| SEQ ID NO: 108 | KKQSDTHLEET |
| SEQ ID NO: 109 | 5'-augauaauauggccacaaccaug |
| SEQ ID NO: 110 | EQLVESGGGLVTPGGSLTLTCTVSTIDLSTFAISWVRQAPGKGLEWIGTINT DLTTYVNWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTGLTIEDTATYFCARKLFGNGNVW GPGTLVTVSS |
| SEQ ID NO: 111 | AQVLTQTPSPVSASVGSTVTINCQASQSLHRNNYLSWFQQKPGQPPKQLIYQ ASTLASGVSSRFSGSGSGTQFTLTISDVVCDDAATYYCLGGVSGGPYPFGGG TEVVVK |
| SEQ ID NO: 112 | MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATVA |
| SEQ ID NO: 113 | METGLRWLLLVAVLKGVQC |
| SEQ ID NO: 114 | QVLTQTPSPVSASVGSTVTINCQASQSLHRNNYLSWFQQKPGQPPKQLIYQA STLASGVSSRFSGSGSGTQFTLTISDVVCDDAATYYCLGGVSGGPYPFGGGT EVVVKGDVPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQ TTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSF NRGDC |
| SEQ ID NO: 115 | QEQLVESGGGLVTPGGSLTLTCTVSTIDLSTFAISWVRQAPGKGLEWIGTIN TDLTTYVNWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTGLTIEDTATYFCARKLFGNGNV WPGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTW NSGTLTNGVRTFPVSRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTNCVAHPATNTKVDK TVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQD DPEVQFTWYINNEQVTRARPPLREQQFNSTIRVVSITLPIAHQDWLRGKEFKC KVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFY PSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLDSGYSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTC SVMHEALHNHYTQKSISRSPGK |
| SEQ ID NO: 116 | FGGGTEVVVK |

[0064]

| | |
|----------------|------------|
| SEQ ID NO: 117 | WPGTLVTVSS |
|----------------|------------|

具体实施方式

[0065] 尽管下面详细描述了本发明,但应理解本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂,因为这些可以变化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不意图限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求限制。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0066] 在下文中,将描述本发明的元素。这些元素与特定实施方案一起列出,然而,应该理解,它们可以以任何方式和任何数量组合以产生另外的实施方案。不应将各种描述的实例和优选实施方案解释为将本发明仅限于明确描述的实施方案。该描述应被理解为支持和包含将明确描述的实施方案与任何数量的所公开和/或优选元素组合的实施方案。此外,除非上下文另有说明,否则本申请中的所有描述的元素的任何排列和组合应该被认为由本申请的说明书公开。

[0067] 在整个说明书和随后的权利要求中,除非上下文另有要求,否则术语“包括”和变体诸如“含有”和“包含”将被理解为表示包括所述的成员、组成元件(integer)或步骤但不排除任何其他未声明的成员、组成元件或步骤。术语“由……组成”是术语“包括”的特定实施方案,其中排除任何其他未说明的成员、组成元件或步骤。在本发明的上下文中,术语“包括”包括术语“由……组成”。

[0068] 除非在本文中另有说明或明显与背景相矛盾,否则在描述本发明的上下文中使用的术语“一”和“一个”和“该”以及类似的指代(特别是在权利要求的上下文中)应被解释为涵盖单数和复数。本文中对数值范围的引用仅旨在用作单独提及落入该范围内的每个单独值的简写方法。除非本文另有说明,否则每个单独的值被并入说明书中,如同其在本文中单独引用一样。说明书中的任何语言都不应被解释为表示任何未要求保护的元素对于本发明的实践是必不可少的。

[0069] 在本说明书的全文中引用了若干文献。本文引用的每篇文献(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、说明书等),无论上文或下文,均通过引用整体并入本文。本文中的任何内容均不应被解释为承认本发明无权凭借在先发明而先于这些公开内容。

[0070] 所描述的目的通过本发明解决,优选地通过所附权利要求的主题解决。

[0071] 本发明人惊奇地发现,本发明的抗体或其抗原结合片段对PD-L1具有高度特异性,并且通过免疫组织化学在PD-L1检测中产生可重复的结果,以帮助适合基于抗PD-L1治疗的肿瘤患者的分层。

[0072] 根据第一实施方案,通过本发明的抗体或其抗原结合片段解决所描述的目的,所述抗体或其抗原结合片段结合包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位,其中抗体的轻链或其抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8的氨基酸序列中的至少一个,且抗体的重链或其抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14的氨基酸序列中的至少一个。例如,根据本发明的抗体或其抗原结合片段在其轻链中包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8中的至少一个,或例如SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8中的两个、三个、四个、五个或全部。例如,轻链可包含SEQ ID NO:3、SEQ

ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8,或例如SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8,或例如SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8,或例如SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:116,并且重链或其抗体抗原结合片段包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14中的至少一个,例如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14中的两个、三个、四个五个或全部,例如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14,或例如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11;SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、或例如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14;或例如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14,或例如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:117。如上公开的轻链和重链氨基酸序列元素可以例如以列出的SEQ ID数字的数字递增顺序展示,并且如果所有重链和轻链序列元素存在于本发明的抗体或抗原结合片段中,优选轻链序列元素以SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:116的顺序被包含,并且重链序列元素以SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:117的顺序被包含。如用于本发明的抗体,术语“抗体”是指包含来自免疫球蛋白基因的框架区或其特异性结合并识别抗原的片段的多肽。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及免疫球蛋白可变区基因。抗体轻链分类为 κ 或 λ 。抗体重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其又分别定义免疫球蛋白类别,IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。通常地,抗体的抗原结合区域在结合的特异性和亲和性方面是最关键的。示例性免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一个“轻”链(约25kD)和一个“重”链(约50-70kD)(参见例如J Allergy Clin Immunol.2010 February;125(2 0 2):S41-S52)。每条链的N-末端限定了约100-110或更多氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别指这些轻链和重链。

[0073] 根据一个实施方案,本发明的抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体、Fab、 $F(ab')_2$ 、Fab'、scFv或di-scFv。抗体作为完整的免疫球蛋白存在,或者例如作为通过用肽酶如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化产生的充分表征的抗原结合片段存在:胃蛋白酶将在二硫键下方导致蛋白水解切割并产生 $F(ab')_2$ 抗体片段,而木瓜蛋白酶的蛋白水解切割在二硫键连接上方切割,会产生两个Fab片段。因此, $F(ab')_2$ 片段是Fab的二聚体,其本身是通过二硫键连接 V_H - C_{H1} 的轻链。所述 $F(ab')_2$ 可以在温和条件下被还原以破坏铰链区中的二硫键,从而将 $F(ab')_2$ 二聚体转化为Fab'单体。上述抗体片段是根据用胃蛋白酶和木瓜蛋白酶消化完整抗体来定义的,然而,这些片段可以通过化学方法或通过使用重组DNA方法从头合成。

[0074] 根据本发明的术语“其抗原结合片段”是指(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段,(ii) $F(ab')_2$ 片段,包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段,(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段,(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(参见例如Ward et al (1989) Nature 341 544-46),其包含VH结构域,和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。本发明中使用的术语“scFv”是指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域(或区;VH)和抗体轻链可变结构域(或区;VL)的分子,并且缺少恒定结构域,例如,根据本发明的scFv片段可以例如包括由一个轻链可变结构域(VL)或其部分和一个重链可变结构域(VH)或其部分组成的结合分子,其中每个可变结构域(或其部分)源自相同或不同的抗体。scFv分子优选包含插入VH结构域和VL结构域之间的接头,其可以例如包括由氨基酸甘氨酸和丝氨酸组成的肽序列。例如,肽序列可以包含氨基酸序列 $(Gly_4Ser)_n$,其中n是1-6的整数,例如n可以是1、2、3、4、5或6,优选n=4。scFv分子和获得它们的方法是本领域已知的,并且描述于例如美国专利No.4,522,517、Ho et al.1989.Gene 77:51;Bird et al.1988 Science 242:423;Pantoliano et al.1991.Biochemistry 30:10117;Milenic et al.1991.Cancer Research 51:6363;Takkinen et al.1991.Protein Engineering 4:837。用于本发明的抗原结合片段的术语“di-scFv”是指两个scFv片段,它们通过接头彼此偶联,例如在Cancer Research 54,6176-618,.December 1,1994,or Chem Commun (Camb) .2007 Feb 21; (7):695-7中公开的。

[0075] 根据一个实施方案,根据本发明的抗体或抗原结合片段是单克隆抗体。用于本发明的抗体的术语“单克隆抗体”是指从大体上均质的抗体群体获得的抗体。除了可少量存在的可能天然发生的突变或其糖基化模式的微小差异以外,单克隆抗体是相同的。单克隆抗体,例如本发明的单克隆抗体,是高度特异性的,针对单个抗原位点并且特异性结合抗原内的单个表位,不像多克隆抗体制剂通常包括针对不同表位的不同抗体。单克隆抗体可以例如通过杂交瘤培养获得,例如Kohler et al.,(1975) Nature,256:495等描述的,或可以通过重组DNA方法制备(参见例如,美国专利号4,816,567)。

[0076] 根据一个实施方案,本发明的抗体是IgG型单克隆抗体,例如本发明的抗体可以是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4型单克隆抗体,或例如鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3或例如大鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c。例如,本发明的IgG型单克隆抗体可以是任何来源,例如鼠、山羊、绵羊、仓鼠、大鼠或兔来源。

[0077] 根据优选的实施方案,本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8的所有轻链氨基酸序列。

[0078] 在优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14的所有重链氨基酸序列。

[0079] 在一个实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含来自轻链可变区的三个CDR(所述轻链包含根据SEQ ID NO:111的氨基酸序列)和来自重链可变区的三个CDR(所述重链包含根据SEQ ID NO:110的氨基酸序列)。

[0080] 在一个优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含来自轻链可变区的三个CDR(所述轻链包含根据SEQ ID NO:111的氨基酸序列)和来自重链可变区的三个CDR

(所述重链包含根据SEQ ID NO:110的氨基酸序列),并且轻链的CDR包含或包含在根据SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的氨基酸序列中,并且重链的CDR包含或包含在根据SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:14的氨基酸序列中。

[0081] 在一个优选的实施方案中,如上公开的本发明的抗体或其抗原结合片段包含轻链和重链,其包含如上定义的CDR,其中根据SEQ ID NO:111的轻链可变区还包含四个框架区(FR),且根据SEQ ID NO:110的重链可变区还包含四个框架区,其中轻链可变区的框架区包含或包含在根据SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:116的氨基酸序列中,且重链可变区的框架区包含或包含在根据SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:117的氨基酸序列中。。

[0082] 根据优选的实施方案,本发明的抗体的重链(或例如其抗原结合片段)包含可变区,其包含根据SEQ ID NO:110的氨基酸序列,并且本发明的抗体的轻链(或例如其抗原结合片段)包含可变区,其包含根据SEQ ID NO:111的氨基酸序列。

[0083] 根据更优选的实施方案,本发明的抗体或其抗原结合片段包含轻链,其包含根据SEQ ID NO:114的氨基酸序列,其中已除去信号序列,例如通过蛋白水解切割例如根据SEQ ID NO:112的氨基酸序列,以及包含重链,其包含根据SEQ ID NO:115的氨基酸序列,其中已除去信号序列,例如通过蛋白水解切割例如根据SEQ ID NO:113的氨基酸序列。

[0084] 在一个实施例中,例如包括根据SEQ ID NO:110和SEQ ID NO:111的氨基酸序列的本发明的抗体的可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)可以被包括在scFv或例如Fab中,例如其可以进一步与GA-SEED或AG-SEED连接。术语“SEED”是指如WO 2007/110205 A2、Protein Engineering, Design&Selection vol.23 no.4pp.195-202,2010中所公开的链交换工程化结构域(SEED) C_H3 异二聚体。这些异二聚体分子是人IgG和IgA $CH3$ 结构域的衍生物,并产生互补的人SEED C_H3 异二聚体,其由人IgA和IgG C_H3 序列的交替片段组成。当在哺乳动物细胞中表达以形成“SEED体”(Sb)时,所得的SEED C_H3 结构域对优先结合以形成1:1比例的异二聚体。术语“GA-SEED”在此表示SEED分子以IgG序列开始,然后是IgA序列,而“AG-SEED”是指SEED分子以源自IgA的序列开始,然后是源自IgG的序列。包含根据SEQ ID NO:110和SEQ ID NO:110的氨基酸序列的本发明的scFv可以例如通过肽接头与GA-或AG-SEED连接,例如通过如上所述的氨基酸序列的甘氨酸-丝氨酸接头(Gly_4Ser)_n。

[0085] 根据更优选的实施方案,本发明的抗体轻链或其抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列,并且本发明的抗体重链或其抗原结合片段包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列。例如,本发明的抗体或其抗原结合片段可以在其轻链中包含根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和在其重链中包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列。例如,本发明的抗体或其抗原结合片段在其轻链可包含根据SEQ ID NO:15的氨基酸序列并在其重链可包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列。例如本发明的抗体或其抗原结合片段的重链和轻链序列均可包含不包含在轻链SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:111以及重链SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:110中任何氨基酸序列中的氨基酸取代,例如在不形成轻链或重链可变区的一部分的氨基酸中,或例如任何轻链或重链CDR或框架序列,例如本发明抗体的轻链SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或者例如SEQ ID NO:111或重链SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、

SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或者SEQ ID NO:110的氨基末端或羧基末端。氨基酸取代可以是例如非保守氨基酸取代或保守氨基酸取代。本发明中使用的术语“保守氨基酸取代”是指其中取代的氨基酸残基与被取代的残基具有相似的电荷，并且与被取代的残基具有相似或更小的尺寸的氨基酸取代。氨基酸的保守取代包括例如在以下组中的氨基酸中进行的取代：

| 类 | 氨基酸 |
|---------------|--------------------------------------|
| [0086] 脂肪族 | 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸 |
| [0087] | 含羟基或含硫/硒 丝氨酸、半胱氨酸、硒代半胱氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸 |
| | 成环 脯氨酸 |
| | 芳香族 苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸 |
| | 碱性 组氨酸、赖氨酸、精氨酸 |
| | 酸性 天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺 |

[0088] 根据优选的实施方案，本发明的单克隆IgG抗体是兔抗体，或例如兔源的抗体。本发明的兔IgG单克隆抗体可以用例如根据Antibodies: A Laboratory Manual, Second Edition, Chapter 7, Edited by Edward A. Greenfield, CSH Press, ISBN 978-1-936113-81-1中公开的方法产生，或者例如根据本领域中任何合适的方法产生，例如在Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, pp. 9348-9352, September 1995或例如美国专利7,732,168 B2中描述的那些。用于本发明的抗体的术语“兔源的”是指使用从产生相应抗体的兔杂交瘤获得的多核苷酸序列在异源表达系统（例如CHO细胞、HEK293细胞）中产生的抗体，例如本发明抗体。例如，本发明的兔源抗体包括可用包含编码由兔杂交瘤细胞产生的抗体的氨基酸序列（例如根据SEQ ID NO:15和/或SEQ ID NO:16）的多核苷酸的表达载体转染的CHO或HEK细胞中产生的抗体。例如，根据本发明的重组单克隆抗体可以通过PLOS One. 2016 Mar 29;11(3):e0152282公开的方法从产生本发明的抗体的兔杂交瘤细胞产生。例如，可以使用oligo(dT)引发的Superscript III逆转录酶(Invitrogen)制备来自单个B细胞的cDNA。然后可以使用KOD DNA聚合酶(EMD Millipore)或TaqPlus Precision DNA聚合酶(Agilent)通过两轮PCR回收抗体可变区基因。首次PCR可以例如在抗体可变区的5'和3'端使用基因特异性引物。5'寡核苷酸组可在例如前导序列的5'端结合，且3'反向引物组可以分别与CH1或Cκ区退火。在二次PCR中，与在初次PCR产物的5'端编码的“尾部”退火的单个5'正向寡核苷酸可以与在J区退火的3'引物组一起使用。第二寡核苷酸可以例如用于引入限制性位点以促进下游克隆。然后可以例如将重链和轻链PCR片段亚克隆到合适的表达载体（例如pCMV）中，并根据制造商的说明书使用Expi293-fectionamine(Life Technologies)转染到Expi293细胞(Life technologies)中。然后，转染的细胞可以使用生长培养基例如在37

℃、5%CO₂的环境中生长7天,以允许产生本发明的抗体。可以例如在5至7天后收获所得上清液。

[0089] 在一个实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段进一步与可检测标记偶联。如用于本发明的抗体或其抗原结合片段,术语“可检测标记”是指能够检测的分子,其可以例如包括放射性同位素、荧光探针、化学发光、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂、染料、金属离子或生物素。用于本发明的抗体或其抗原结合片段的术语“偶联”是指染料、放射性同位素可以例如非共价地通过例如离子或疏水相互作用,或共价地连接至本发明的抗体或其抗原结合片段。如上所公开的可检测标记(例如荧光探针、染料或酶)与如上公开的本发明的抗体或其抗原结合片段的偶联可以例如根据本领域已知的方法进行,例如Methods Cell Biol.2001;63:185-204;Methods Mol Biol.2010;588:43-8;Curr Protoc Mol Biol.2001 May;Chapter 11:Unit 11.1中公开的那些方法。

[0090] 根据一个实施方案,与本发明的抗体或其抗原结合片段偶联的可检测标记是酶或荧光团或酶底物之一。例如,与本发明的抗体或其抗原结合片段偶联的可检测标记可以是碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、烟草蚀纹病毒核包涵体-a内肽酶(“TEV蛋白酶”)。例如可以与如上所述的本发明的抗体偶联的荧光团可以是以下中的一种:1,8-ANS、4-甲基伞形酮、7-氨基-4-甲基香豆素(7-amino-4-methylcoumarin)、7-羟基-4-甲基香豆素、吖啶、Alexa Fluor 350TM、Alexa Fluor 405TM、AMCA、AMCA-X、ATTO Rho6G、ATTO Rho11、ATTO Rho12、ATTO Rho13、ATTO Rho14、ATTO Rho101、Pacific Blue、Alexa Fluor 430TM、Alexa Fluor 480TM、Alexa Fluor 488TM、BODIPY 492/515、Alexa Fluor 532TM、Alexa Fluor 546TM、Alexa Fluor 555TM、Alexa Fluor 594TM、BODIPY 505/515、Cy2、cyQUANT GR、FITC、Fluo-3、Fluo-4、GFP (EGFP)、mHoneydew、Oregon GreenTM488、Oregon GreenTM514、EYFP、DsRed、DsRed2、dTomato、Cy3.5、藻红蛋白(PE)、罗丹明红、mTangerine、mStrawberry、mOrange、mBanana、Tetramethylrhodamine (TRITC)、R-藻红蛋白、ROX、DyLight594、Calcium Crimson、Alexa Fluor 594TM、Alexa Fluor 610TM、Texas Red、mCherry、mKate、Alexa Fluor 660TM、Alexa Fluor 680TM别藻蓝蛋白、DRAQ-5、carboxynaphthofluorescein、C7、DyLight 750、Cellvue NIR780、DM-NERF、曙红、赤藓红、荧光素、FAM、羟基香豆素、IRDyes (IRD40、IRD700、IRD800)、JOE、丽丝胺罗丹明B、Marina Blue、甲氧基香豆素、Naphtho荧光素、PyMP0、5-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素、5-羧基-2',4',5',7'-四氯荧光素、5-羧基荧光素、5-羧基罗丹明、6-羧基罗丹明、6-羧基四甲基氨基、级联蓝、Cy2、Cy3、Cy5、6-FAM、丹磺酰氯、HEX、6-JOE、NBD (7-硝基苯-2-氧杂-1,3-二唑)、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、苯二甲酸、对苯二甲酸、间苯二甲酸、抗甲酚基紫、亮甲酚基紫、灿烂甲酚基紫、对氨基苯甲酸、赤藓红、酞菁、偶氮甲碱、青色素、黄嘌呤、琥珀酰荧光素、稀土金属穴状化合物、europium trisbipyridine diamine、铜穴状化合物或螯合物、二胺、双花青苷或La Jolla蓝色染料。可以与本发明的抗体或抗原结合片段偶联的荧光团可以例如还包括量子点。本发明中使用的术语量子点是指半导体材料的单个球形纳米晶体,其中纳米晶体的半径小于或等于该半导体材料的激子波尔半径的大小(激子波尔半径的值可以从包含半导体特性信息的手册中找到的数据中计算,例如CRC Handbook of Chemistry and Physics,83rd ed.,Lide,David R. (Editor),CRC Press, Boca Raton,Fla. (2002))。量子点在本领域中是已知的,它们在参考文献中有描述,例如

Weller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:41-53 (1993), Alivisatos, *J. Phys. Chem.* 100:13226-13239 (1996) 和 Alivisatos, *Science* 271:933-937 (1996)。量子点直径例如可以从约1nm至约1000nm, 例如10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm或500nm, 优选直径为至少约2nm至约50nm, 更优选QD的直径为至少约2nm至约20nm (例如约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20nm)。QD的特征在于它们基本上均匀的纳米尺寸, 通常表现出大约10%至15%的多分散性或尺寸范围。QD能够在激发时发射电磁辐射 (即QD是光致发光的), 并且包括一种或多种第一半导体材料的“核”, 并且可以被第二半导体材料的“壳”包围。被半导体壳包围的QD核被称为“核/壳”QD。周围的“壳”材料优选具有带隙能量, 该带隙能量大于核材料的带隙能量, 并且可以选择具有接近“核”基质的原子间距。核和/或壳可以是半导体材料, 包括但不限于II-VI族 (ZnS、ZnSe、ZnTe、US、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe、MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTe等) 和III-V族 (GaN、GaP、GaAs、GaSb、InN、InP、InAs、InSb等) 和IV族 (Ge、Si等) 材料、PbS、PbSe和它们的合金或混合物。优选的壳材料包括ZnS。量子点可以例如通过本领域已知的任何方法 (例如 *Nanotechnology*. 2011 Dec 9; 22 (49): 494006; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84 (2011) 360-368 中公开的方法) 与本发明的抗体或其抗原结合片段偶联。

[0091] 在一个实例中, 本发明的抗体或其抗原结合片段可以与放射性同位素偶联, 例如⁴⁷Ca、¹⁴C、¹³⁷Cs、¹⁵⁷Cr、⁵⁷Co、⁶⁰Co、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、¹²³I、¹²⁵I、¹²⁹I、¹³¹I、³²P、⁷⁵Se、⁸⁵Sr、³⁵S、²⁰¹Th、³H, 优选地, 将放射性同位素整合入另外的分子中, 例如螯合剂。可根据本发明使用的典型螯合剂是例如DPTA、EDTA (乙二胺四乙酸)、EGTA (乙二醇-0,0'-双(2-氨基乙基)-N,N,N',N'-四乙酸)、NTA (次氨基三乙酸)、HEDTA (N-(2-羟乙基)-乙二胺-N,N',N'-三乙酸)、DTPA (2-[双[2-[双(羧甲基)氨基]-乙基]氨基]乙酸)、或DOTA (1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)。

[0092] 在一个实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段用于检测样品中包含在SEQ ID NO:1中的表位的存在或表达。例如, 本发明的抗体或其抗原结合片段用于检测包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位的表达, 其中SEQ ID NO:1对应于GenBank登录号AAH69381的人PD-L1跨越氨基酸残基260-290的细胞内部分。包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位 (例如在人PD-L1的细胞内结构域内) 可以例如通过使用本发明的抗体或其抗原结合片段可靠地和可重复地对例如FFPE组织样品或肿瘤组织样品通过免疫组织化学的手段进行检测。包含在SEQ ID NO:1 (RLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET) 中的用于本发明的术语“表位”是指在动物, 优选哺乳动物, 最优选在兔中具有抗原性或免疫原性活性的SEQ ID NO:1的部分, 根据本发明的包含在SEQ ID NO:1中的表位可以是例如线性表位或构象表位。构象表位可以例如由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的不连续区段组成, 并且可以例如基于其三维表面特征和形状或SEQ ID NO:1的三级结构与上文公开的本发明的抗体或抗原结合片段的互补位相互作用。根据本发明的包含在SEQ ID NO:1中的表位还可以是例如由SEQ ID NO:1的连续氨基酸序列形成的线性表位, 其基于SEQ ID NO:1的一级氨基酸序列 (RLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET) 与本发明的抗体或其抗原结合片段的互补位相互作用。因此, 本发明的抗体或其抗原结合片段的互补位可以例如结合包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的线性表位, 并且可以例如具有约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10至约11、12、13、

14、15、16、17、18、19、20个长度的氨基酸,或约2至约3、4、5、6、7、8、9、10个氨基酸,或例如约8个氨基酸至约11个氨基酸。例如,与本发明的抗体或其抗原结合片段的互补位相互作用的线性表位可以包含根据以下的氨基酸序列,或者可以包含在根据以下的氨基酸序列中:SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108。例如,如上所公开的本发明的抗体或其抗原结合片段可用于检测样品中上述表位的存在或表达,所述样品可以是例如生物学样品,例如体液或血液样品。例如,可以使用本发明的抗体或其抗原结合片段对生物学样品(例如体液或血液样品)进行流式细胞术,或例如FACS,以检测包含在SEQ ID NO:1中或包含在例如根据本发明的SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:108的任何氨基酸序列中的表位的存在或不存在。例如,通过针吸活组织检查获得的细胞可以在室温用FcR阻断剂(例如TruStain FcX™ Biolegend, San Diego;或例如Human BD Fc Block™, BD Biosciences)以1:1000稀释度阻断10分钟,且然后与本发明的抗体或其抗原结合片段一起孵育,由此本发明的抗体或其抗原结合片段可以在PBS+2%血清中以约1:50至约1:500(例如,从约1:75、1:100、1:125、1:150、1:175、1:200到约1:250、1:275、1:300、1:350、1:400、1:450,或例如1:25、1:50、1:100、1:150、1:200、1:250、1:300、1:400、1:500)的稀释度在室温、黑暗中与荧光探针(例如藻红蛋白[PE])偶联15分钟。然后可以例如在Attune流式细胞仪(Life Technologies, Grand Island, NY)上分析细胞,并使用FlowJo 10.0软件(Tree Star, Inc., Ashland, OR)评估结果。例如,细胞可另外用羧基荧光素双乙酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE, Biolegend, San Diego, CA)以5μM的终浓度在37℃在黑暗中复染10分钟,然后用RPMI-1640培养基洗涤两次。

[0093] 根据一个优选的实施方案,本发明的抗体或其抗原结合片段可用于检测组织样品、固定的组织样品或甲醛固定的石蜡包埋(FFPE)组织中包含在SEQ ID NO:1中的表位(例如包含在根据SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:108的任何一个氨基酸序列中的线性表位中)的存在或表达。根据本发明的术语“组织样品”可以例如指源自肿瘤组织或疑似肿瘤组织的单细胞,或至少约 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 个或更多个源自肿瘤组织或疑似肿瘤组织的细胞,其可以例如还包含培养的肿瘤细胞,例如,如Trends Biotechnol. 2013 June; 31(6): 347-354;

Cancer Cell Culture:Methods and Protocols(Methods in Molecular Medicine); S.P.Langdon(Ed.),Humana Press,ISBN:978-1588290793所描述的。

[0094] 细胞或组织可以例如通过非侵入性手段获得,包括但不限于细针抽吸和针吸活组织检查,或者通过例如侵入性方法,包括但不限于手术活组织检查。获得组织样品的方法不构成本发明的一部分。根据本发明的术语“固定的组织样品”是指已经过化学组织固定的组织样品。例如,化学固定可包括用甲醇、乙醇、丙酮、甲醇-丙酮混合物、缓冲的福尔马林溶液、戊二醛或缓冲的多聚甲醛固定。例如,固定可以包括如上所述的组织样品的处理(固定),其中10%饱和的甲醛水溶液用100mM磷酸盐缓冲剂或10%中性缓冲福尔马林(NBF)缓冲至pH 6.8-7.2,采用不同时间,温度范围是从4°-45℃,例如室温(20-25℃),或例如对于不同的时间长度,从约5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃至约15℃、17.5℃、20℃,或从约12℃、15℃、17.5℃、20℃至约25℃、27℃、30℃、35℃、40℃、45℃。例如,如上所公开的组织样品可固定约5分钟至约24小时,或从约10min、15min、30min、45min、60min、90min、120min、180min至约15min、30min、45min、1h、4h、5h、6h、7h、8h、9h、10h、11h、12h、14h、16h、18h、20h、24h、48h。例如,固定的组织样品可包括通过用10%NBF浸没固定约18-24小时的固定的组织样品。例如,根据本发明的固定的组织样品可以包括如上所述的组织样品,其已经固定,或根据本领域可获得的标准方案进行处理,例如在www.ihcworld.com网站上提供的那些,例如,描述于Hopwood D.Fixatives and fixation:a review.Histochem J.1969;1(4):323-60,或例如描述于“Immunohistochemical Staining Methods”,5th edition(2009),published by DAKO North America,Inc.例如甲醛固定的石蜡包埋(FFPE)的组织可通过以下程序获得:

[0095] 如上所公开的肿瘤组织可以例如置于至少10体积的缓冲福尔马林(3.7%甲醛:10mM磷酸盐缓冲剂,pH-7.4)或缓冲的多聚甲醛(3.7%多聚甲醛:10mM磷酸盐缓冲剂,pH-7.4)中,然后根据如上所述的组织样品的厚度,在缓冲的福尔马林或NBF中孵育不同的时间,例如对于1-2mm组织样品,2-3h室温,对于5-10mm厚的组织样品-5h室温,或例如对于组织样品厚度>10mm 2-3h室温,或例如在4℃过夜。随后,组织可以例如用PBS漂洗1-2X,并在4℃下在70%乙醇的H₂O中储存,且然后置于组织处理组织学盒中并标记用于以后鉴定。然后可以例如使用商业组织处理器70%乙醇对组织学盒进行石蜡包埋1小时;95%乙醇(95%乙醇/5%甲醇)1小时;第一次无水乙醇1小时;第二次无水乙醇1¹/₂小时;第三次无水乙醇1¹/₂小时;第四次无水乙醇2小时;第一次清除剂(二甲苯或替代品)1小时;第二次清除剂(二甲苯或替代品)1小时;第一次蜡(Paraplast X-tra)在58℃1小时;第二次蜡(Paraplast X-tra)在58℃1小时。然后可将福尔马林固定的石蜡包埋的组织置于模具中用于进一步处理。

[0096] 在一个实施方案中,如上公开的本发明的抗体或其抗原结合片段用于检测如上所述的组织样品、固定的组织样品或源自肿瘤的FFPE组织样品(例如通过如上公开的活组织检查从肿瘤获得的组织)中包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位,例如包含在根据SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:108的任何氨基酸序列中的表位。根据本发明的术语“源自肿瘤”还可以例如包括通过针抽吸获得的肿瘤细胞,或者例如培养通过针抽吸的肿瘤细胞获得的细胞。

[0097] 根据一个实施方案,通过免疫组织化学(IHC)、流式细胞术、ELISA或蛋白质印迹检测包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位。例如,可以对根据本发明的组织样品或肿瘤组织样品进行免疫印迹,以使用根据本发明的抗体或其抗原结合片段检测包含在SEQ

ID NO:1中的表位,如Current Protocols in Molecular Biology 10.8.1-10.8.28, July 2008所描述的。

[0098] 例如,如果使用ELISA,使用本发明的抗体或其抗原结合片段检测包含在SEQ ID NO:1中的表位,则可以根据标准方案进行ELISA,例如,如Current Protocols in Molecular Biology (1991) 11.2.1-11.2.22所公开的。优选地,使用本发明的抗体或其抗原结合片段(例如作为一抗),通过FFPE组织样品上的免疫组织化学(IHC)检测包含在SEQ ID NO:1中的表位:例如,FFPE肿瘤组织样品可以通过将干燥的石蜡切片置于载玻片上在60°C的烘箱中1小时来脱石蜡。随后,可例如将载玻片置于Sakura染色架中并浸入含有以下溶液的Tissue-Tek®染色皿中:在二甲苯中三次,每次5min,在100%乙醇中两次,每次至少1min,在95%乙醇中两次,每次至少1min,在70%乙醇中一次,至少1分钟。然后可以用自来水轻轻冲洗载玻片约5分钟。取决于肿瘤组织,源自它的样品例如可能需要通过将载玻片在室温置于3%过氧化氢溶液中10分钟,然后用水冲洗来封闭内源性过氧化物酶活性。随后的抗原恢复可以例如在水浴中根据以下程序进行:可以将载玻片置于具有抗原恢复溶液(例如Target Retrieval Solution、增强的柠檬酸盐缓冲溶液(Dako, S1699或S1700)和Target Retrieval Solution,高pH(Dako, S3308)、或0.05M柠檬酸盐缓冲剂, pH 6,或例如Tris EDTA缓冲剂, pH8)的Coplín罐中。然后例如可以使载玻片在水浴中平衡至75°至95°C并孵育约40分钟。然后例如使载玻片在室温冷却20分钟,之后倾泻溶液,且然后将载玻片置于含有TBS/0.6%Tween 20的染色皿中至少5分钟。抗原恢复例如也可以使用PT link预处理模块(DAKO)使用Tris-EDTA缓冲剂pH 9在97°C下进行20分钟完成。在抗原恢复后,然后可以按照制造商的说明使用自动化仪器(例如Discovery XT®,或Autostainer Link48)对载玻片进行染色程序。例如,载玻片也可以如Current Protocols in Molecular Biology 14.6.1-14.6.23, January 2008中所述进行手动处理。例如,载玻片可以用400至500μl根据本发明的抗体覆盖,例如用市售抗体稀释剂(例如来自DAKO)稀释至浓度为约0.2μg/ml至约5μg/ml,例如从约0.2μg/ml、0.3μg/ml、0.4μg/ml、0.5μg/ml、0.6μg/ml、0.7μg/ml、0.8μg/ml、0.9μg/ml、1.0μg/ml、1.25μg/ml、1.5μg/ml、1.75μg/ml、2.0μg/ml至约3μg/ml、3.5μg/ml、4μg/ml、4.5μg/ml、5μg/ml、5.5μg/ml、6.0μg/ml、7.0μg/ml、8.0μg/ml、9.0μg/ml、10μg/ml,并在室温在潮湿室中孵育约30分钟。然后可以用TBS/0.6%Tween 20®冲洗掉一抗。然后可以例如轻轻地将载玻片排液并除去任何剩余的洗涤溶液。此后,可以立即加入用于检测本发明的抗体的二抗,并在室温孵育约30分钟。二抗稀释可以例如从约1:100至约1:10,000、e.g. 从约1:100、1:150、1:200、1:250、1:300、1:400、1:500、1:750、1:1000至约1:1500、1:2000、1:2500、1:3000、1:3500、1:4000、1:5000、1:5500、1:6000、1:7000、1:8000、1:9000、or e.g. 从约1:100、1:150、1:200、1:250、1:300、1:400、1:500、1:750至约1:1,000、1:2000。可以例如用于检测根据本发明的结合抗体的二抗可以包括稀释度为约1:50、1:175至约1:200的多克隆山羊抗兔HRP-缀合的免疫球蛋白,或例如稀释度为约1:20、1:50、1:100至约1:100、1:200、1:250山羊抗兔碱性磷酸酶(AP)缀合的免疫球蛋白,取决于检测方法和使用的底物的选择,例如,如果使用辣根过氧化物酶(HRP)-缀合的二抗,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)可以例如用于显色检测,或可以使用例如2,2'-连氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6)-磺酸(ABTS),或例如3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),或者如果使用例如AP-缀合的二抗,则可以使用氮蓝四唑氯化物(NBT)和5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸(BCIP)的底物组合。关于生色免疫组织化学的

一般原则和指南可以例如在Current Protocols in Immunology 21.4.21-21.4.26, November 2013中找到。

[0099] 然后通过用洗涤溶液覆盖载玻片约5min,用TBS/0.6%Tween20®洗涤载玻片两次,之后可以根据制造商推荐的方案加入色原溶液并孵育约4至5分钟。复染可以例如使用Harris' 苏木精进行约5分钟,之后可以在流动的自来水下漂洗载玻片,然后例如在TBS/0.6%Tween 20中另外漂洗约1分钟。然后可以例如通过在每种溶液中上下轻轻地浸没载玻片几秒钟使切片脱水,然后转移至:70%乙醇、90%乙醇、100%乙醇、二甲苯两次。然后可以例如使用封固剂和盖玻片来封固这些切片。

[0100] 在一个方面,本发明提供了检测样品中包含在SEQ ID NO:1中的表位的存在或表达的方法,例如包含在以下任一个中的表位:SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108,其中该方法包括使样品与根据本发明的抗体或抗原结合片段接触,并检测结合根据本发明的抗体或抗原结合片段的存在的步骤。例如,检测样品中包含在SEQ ID NO:1中的表位的存在或表达的本发明的方法可包括免疫组织化学检测,或使用市售IHC平台的自动化免疫组织化学检测,比如例如根据相应制造商的说明和/或方案的intelliPath FLX (Biocare Medical)、WAVE RPD (Celerus Diagnostics)、Omnis (DAKO)、Autostainer Link 48 (DAKO)、Benchmark XT (Ventana) 或Benchmark Ultra (Ventana)。因此,本发明的方法可用于检测根据本发明的样品中人PD-L1的表达。

[0101] 在一个实施方案中,本发明的方法可用于检测样品中包含的根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列的人PD-L1或其任何片段的存在,其中所述方法包括如上所述使所述样品与本发明的抗体或抗原结合片段接触,并检测结合根据本发明的抗体或抗原结合片段的步骤,例如通过免疫组织化学方法,或通过自动免疫组织化学方法。例如,根据本发明的人PD-L1的片段可以包含已经蛋白水解切割的人PD-L1,其中切割的PD-L1片段包含根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列。例如,根据本发明的人PD-L1的片段可以包含缺少细胞外结构域的人PD-L1,例如仅包含跨膜结构域和细胞内结构域(例如,GenBank登录号AAH69381的氨基酸239-

g/ml、8μg/ml、9μg/ml、10μg/ml。

[0105] 例如,在本发明的一个方面,样品(例如血液样品)中包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位的存在或表达,或例如包含在根据SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:108的任何氨基酸序列中的表位的存在或表达,可以通过ELISA使用本发明的抗体或抗原结合片段进行。例如,本发明的抗体可以以约0.25μg/ml、0.5μg/ml、0.75μg/ml、1μg/ml、1.50μg/ml、1.75μg/ml、2μg/ml、2.5μg/ml、3μg/ml、3.5μg/ml、4μg/ml、4.5μg/ml、5μg/ml、5.5μg/ml、6μg/ml、7μg/ml、8μg/ml、9μg/ml、10μg/ml的浓度使用,或对照抗体(例如PBS中2μg/ml的mIgG2a)在4℃将ELISA板包被过夜,然后用含有10%FBS的PBS封闭。血液样品(例如来自癌症患者和/或来自健康个体作为对照或参照样品的)可以例如在PBS中以1:1,000稀释,一式三份,然后加入到板中。随后,孔可以例如在含有0.1%Tween-20的PBS中洗涤六次。结合的本发明的抗体可以通过以1:2,000稀释的辣根过氧化物酶缀合的二抗兔IgG Ab在室温孵育1.5小时,并随后与四甲基联苯胺反应,然后使用读板仪在450nm波长下测量吸光度。血清与包被有对照Ig的平板的非特异性结合可以例如从每个样品的测量值中减去以背景校正。

[0106] 根据优选的实施方案,本发明的抗体或其抗原结合片段可用于检测如上所述的组织样品、固定的组织样品或甲醛固定的石蜡包埋(FFPE)的组织中包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位的存在或表达,或例如包含在根据SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:108的任何氨基酸序列中的表位的存在或表达。优选地,根据一个实施方案,甲醛固定的石蜡包埋(FFPE)的组织是肿瘤组织样品,或肿瘤组织来源的样品,例如肿瘤细胞、培养的肿瘤细胞系或如上所述培养的肿瘤组织。例如,在一个实施方案中,本发明的方法还可以包括对不表达或仅表达少量PD-L1的对照组织进行本发明的方法,优选与上文公开的组织样品平行处理。例如,对照组织可包括甲状腺组织或骨骼肌组织,或培养的PD-L1阴性癌细胞,例如A2780、Colo205或IGROV-1。上面使用的术语“少量”是指肿瘤细胞或肿瘤组织的PD-L1的表达,当通过半定量免疫印迹或例如qPCR比较时,其比PD-L1阳性肿瘤组织或肿瘤细胞(例如Hs746T、MDA-MB 231、NCI-H2009、人脾脏)少至少5倍、10倍、20倍、25倍、40倍、50倍或100倍,如Journal of Immunological Methods 345(2009)40-48;Journal of Immunological Methods 353(2010)148-150;Hematology.2016 Mar 31:1-6中所述。例如,可以对如上定义的组织样品或肿瘤组织样品进行RNA分离和cDNA合成,然后可以例如在qPCR中使用以确定PD-L1的相对表达水平。

[0107] 在一个方面,本发明的抗体可以例如用于封固在玻璃载玻片上的组织样品上,以形成组织阵列,其中不同的肿瘤组织样品可以彼此相邻放置。例如,组织阵列包括封固在不同位置的玻璃载玻片上的每个组织样品的至少一个、两个、三个或四个切片(例如,以避免检测假象)。例如,组织阵列可包括至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、16、18、20至约22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、55或60,或形成约22、24、28、30、36、40、44、48、52、56、60至约64、68、72、76、78、80、82、84、86、90、100种不同的组织样品。例如,在一个实施方案中,除如上所述的肿瘤组织样品外,组织阵列可包含至少一种或多种,例如5、10、20、30、40、50或更多,或例如所有以下癌细胞系:ZR-75-1、WM164、U-87MG、U-118MG、T47D、SW707、SW620、SNB-78、NCI-H69、NCI-H569、NCI-H460、NCI-H292、NCI-H2009、NCI-H1975、Mx-1、MeWo、PC-3、Raji、Ramos、suit7、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MDA-MB-231、MCF7、M24met、Lox、LoVo、Kyse 30、Jurkat、IGROV-1、HT29、Hs746T、Hs68、HL60、FaDu、EBC-1、DU 145、DLD-

1、COLO 205、Calu 6、Calu 3、BT474、AGS、A549、A-431、A2780、Pfeiffer、MiaPaCa-2、ME-SA。如上所公开的癌细胞系可以例如从ATCC或例如DSMZ (Leipzig Institute DSMZ) 获得,并根据每种相应细胞系的既定方法培养。包含至少一种如上公开的甲醛固定的石蜡包埋 (FFPE) 的组织样品或FFPE肿瘤组织样品的组织阵列或肿瘤组织阵列可以例如根据Nat Med.1998 Jul;4 (7) :844-7描述的方案制备。

[0108] 根据一个实施方案,甲醛固定的石蜡包埋 (FFPE) 的组织样品或甲醛固定的石蜡包埋的肿瘤组织样品源自具有癌症风险或患有癌症、T细胞功能障碍、急性或慢性感染或显示肿瘤免疫性的对象。用于本发明的方法的术语“癌症”是指或描述哺乳动物,优选人类的生理状况,其通常特征在于不受调节的细胞生长/增殖,具有侵入或扩散至身体其他部分的潜力。癌症的实例包括但不限于非小细胞肺癌 (NSCLC)、间皮瘤、不可切除的间皮瘤、乳腺癌、胃腺癌或GEJ、胃癌、胸腺瘤、卵巢癌、腺样囊性癌、转移性腺样囊性癌、膀胱癌、透明细胞肾癌、头颈部鳞状细胞癌、肺鳞状细胞癌、恶性黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、小细胞肺癌 (SCLC) 或三阴性乳腺癌、淋巴组织增生性疾病、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、急性髓样白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性髓样白血病 (CML)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、EBV阳性DLBCL、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤 (HL)、套细胞淋巴瘤 (MCL)、多发性骨髓瘤 (MM)、髓样细胞白血病-1蛋白 (Mcl-1)、骨髓增生异常综合征 (MDS)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 或小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、Merkel细胞癌 (MCC) 或鳞状头颈癌 (SHNC)。上述癌症类型也可以例如也称为恶性肿瘤。如上文所公开的用于本发明的方法的术语“T细胞功能障碍”是指CD8 T细胞的病理状态,例如,如果CD8阳性T细胞的严格控制的分化过程发生改变,则可引起CD8 T细胞的病理状态,比如例如抗原的性质、背景和持续时间的改变可导致T细胞活化和分化过程的实质性改变,其也可称为T细胞耗竭、耐受、无能或衰老。用于本发明的方法的术语“急性感染”是指由细菌、病毒或寄生虫引起的急性感染,且其例如在诊断前约一周、两周、三周或四周发生。用于本发明的方法的术语“慢性感染”是指病原体不能快速消除而是持续延长一段时间的情况,例如超过三、四、五、六、七、八、九或十周。持久性病原体暴露可导致慢性抗原刺激和持续性炎症,其可导致病原体特异性CD8 T细胞的耗竭和/或克隆耗尽。如果不及时治疗,慢性感染可以例如包括病毒感染,如甲型肝炎、丙型肝炎或丁型肝炎、HIV感染,或例如感染脑膜炎奈瑟球菌 (*neisseria meningitidis*)、淋病奈瑟球菌 (*neisseria gonorrhoeae*)、巴尔通体 (*bartonella henselae*)、博氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、沙门氏菌属物种、布鲁杆菌属物种、弯曲杆菌物种、分枝杆菌物种、苍白密螺旋体 (*treponema pallidum*) 或伯内特考克斯体 (*coxiella burnetii*)。在一个实施方案中,FFPE组织样品或FFPE肿瘤组织样品源自对象,例如人,其特征在于或具有肿瘤免疫性。用于本发明的方法的术语“肿瘤免疫性”是指肿瘤逃避免疫识别和清除的过程。据信源自肿瘤或肿瘤相关的因子影响树突细胞分化并阻止具有抗原呈递功能的细胞的发育,最终导致肿瘤免疫性。内源性逆转录病毒 (ERV),特别是肿瘤特异性的内源性逆转录病毒 (TERV) 的表达已经牵连肿瘤免疫性。可能有助于肿瘤免疫性的其他因素是例如基因扩增PD-L1 (CD274) 和 ALOX12B/15B,或例如导致抗原呈递 (例如肿瘤相关的新抗原) 的丧失或导致外源性细胞凋亡的封闭的任何以下基因B2M、HLA-A、HLA-B、HLA-C或CASP8中的突变。

[0109] 在一个方面,本发明提供了预测患有恶性肿瘤的哺乳动物,优选人,是用免疫检查

点抑制剂(例如抗PD-L1抗体,或抗PD-1抗体)治疗的可能候选者的方法,其包括检测在源自哺乳动物的样品(例如源自有需要的个体,例如患有癌症或具有癌症风险、T细胞功能障碍、急性或慢性感染或肿瘤免疫性的人,或例如患有恶性肿瘤的癌症患者)中存在或不存在包含在SEQ NO:1或例如包含在SEQ ID NO:19-SEQ ID NO:108中的任一中的表位,例如SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107,其中所述方法包括使用本发明的抗体进行例如流式细胞术、FACS或优选免疫组织化学,其中检测包含在SEQ ID NO:1中的表位,或例如包含在SEQ ID NO:19至SEQ ID NO:108中的任一中的表位,例如样品中大于约0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%或10.0%,或约0.5%、0.75%、1%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9%、9.5%、10%、10.5%、11%、12%、13%、14%、15%至小于约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,或例如从约20%、25%、30%、35%、40%、45%至小于65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,或从约0.25%、0.5%、0.75%、1%至小于约1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%或10.0%,或从约0.25%至小于约0.5%、0.75%、1%的细胞表明患者可能对用免疫检查点抑制剂的治疗(例如用抗PD-L1抗体的治疗,或用抗PD-1抗体的治疗)有应答。本文所用的术语“免疫检查点抑制剂”,具有其在本领域中的一般含义,且指的是通过T细胞表达的要么放大信号(刺激检查点的分子),要么调低信号(抑制检查点的分子)比如例如PD-1/PD-L1和CTLA-4/CD28信号传导途径(二者在本领域中都认为构成免疫检查点途径)(参见例如Pardoll, 2012. Nature Rev Cancer 12:252-264)的分子。可以例如向使用上文公开的本发明的方法已被鉴定为用免疫检查点抑制剂治疗的可能候选者的患者施用抗PD-L1抗体包括例如avelumab、durvalumab、atezolizumab,或例如抗-PD-1抗体如pembrolizumab、nivolumab或Pf-06801591。

[0110] 根据本发明的样品中的PD-L1阳性细胞可以例如包括肿瘤细胞或免疫细胞,例如肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)(例如CD8阳性T细胞、巨噬细胞、NK细胞或B细胞)。例如,取决于

获得或源自如上公开的FFPE肿瘤组织样品的肿瘤类型,可以使用确定样品中PD-L1阳性细胞的相对丰度的不同方法(评分方法)。例如,使用如上所公开的使用本发明的抗体检测PD-L1阳性细胞的免疫组织化学(IHC),PD-L1评分可以包括确定PD-L1阳性肿瘤细胞的相对丰度,或样品中PD-L1阳性TIL的相对丰度,或例如确定PD-L1阳性肿瘤细胞和TIL组合的相对丰度。用于确定样品中PD-L1阳性细胞数量的细胞总数或其任何亚组分可以例如通过使用苏木精复染样品以使细胞核和细胞质可视化来获得,或者例如如果使用荧光检测方法,使用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色以使细胞核可视化。用于本发明的方法的术语“PD-L1阳性细胞”是指可检测地表达包含在根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的表位的细胞,本发明的抗体特异性结合该表位,且然后可以用例如HRP-或AP-偶联的二抗(其特异性结合本发明的抗体并且当与相应的底物反应时允许发色或荧光检测)检测(例如,如上所述)。例如,可以使用HRP偶联的二抗与作为底物的DAB一起孵育以标记PD-L1阳性细胞。PD-L1阳性细胞的评分可以例如包括个体细胞或细胞核计数,以确定分析的FFPE肿瘤组织样品中的PD-L1阳性细胞的数量和总细胞数(或例如在其任何子部分中)。或者,PD-L1阳性细胞和苏木精染色细胞的表面区域可以例如用于确定PD-L1阳性细胞的相对丰度。

[0111] 在一个方面,如上公开的本发明的方法可用于鉴定用抗PD-L1抗体治疗的可能候选者,由此根据本发明的恶性肿瘤可以是以下的一种或多种:非小细胞肺癌(NSCLC)、间皮瘤、不可切除的间皮瘤、乳腺癌、胃腺癌或GEJ、胃癌、胸腺瘤、卵巢癌、腺样囊性癌、转移性腺样囊性癌、膀胱癌、透明细胞肾癌、头颈部鳞状细胞癌、肺鳞状细胞癌、恶性黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、小细胞肺癌(SCLC)或三阴性乳腺癌、淋巴组织增生性疾病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓样白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓样白血病(CML)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、EBV阳性DLBCL、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(HL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、多发性骨髓瘤(MM)、髓样细胞白血病-1蛋白(Mcl-1)、骨髓增生异常综合征(MDS)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、Merkel细胞癌(MCC)或鳞状头颈癌(SHNC)。

[0112] 根据本发明的一个方面,本发明的方法可以用于鉴定或预测对免疫检查点抑制剂治疗有应答的可能的候选者(例如,癌症患者),所述免疫检查点抑制剂例如抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体与下列抗体之一:抗PD-L1抗体avelumab、atezolizumab、durvalumab、LY300054、BMS-936559,或抗PD-1抗体pembrolizumab、nivolumab或Pf-06801591。例如,如果通过应用上述发明方法,有需要的个体,例如人类癌症患者,或例如患有如上所公开的恶性肿瘤的人类患者,或具有患癌症风险的人,被发现是用抗PD-L1抗体(例如avelumab、atezolizumab、durvalumab、LY300054、BMS-936559之一)或用抗PD-1抗体(例如pembrolizumab、nivolumab、或PF-06801591之一)的治疗的可能候选者,则可单独施用或与其他抗癌剂联合施用,剂量为约0.1mg/kg至约50mg/kg,从约0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg至约12.5mg/kg、15mg/kg、17.5mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、27.5mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、37.5mg/kg、40mg/kg、42.5mg/kg、45mg/kg、或例如1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、12.5mg/kg、15mg/kg、17.5mg/kg、20mg/kg、22.5mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体avelumab、atezolizumab、durvalumab、或例如抗PD-1抗体pembrolizumab、nivolumab或Pf-06801591可以例如以固定剂量方案施用于已经通过应用以上所公开的方法鉴定的可能候

选者,例如,avelumab可以每周500-800mg的固定给药方案施用,例如每周约600mg-750mg,或例如每周约650-850mg,或例如每周约700-900mg,或例如每周525mg、每周550mg、每周600mg、每周600mg、每周650mg、每周700mg、每周700mg、每周725mg、每周750mg,或例如每两周约900至约1600mg,例如每两周约1000mg至约1500mg (q2w),或约1250mg至约1400mg q2w,或约1000mg q2w至约1250mg q2w,例如925mg q2w、950mg q2w、1000mg q2w、1125mg q2w、1200mg q2w、1250mg q2w、1300mg q2w、1350mg q2w、1400mg q2w、1450mg q2w、1500mg q2w、1550mg q2w,或例如每三周约1250-2400mg (q3w),或约1500mg至约2250mg q3w,或约1750mg至约2000mg q3w,或来自约1800mg至约2300mg q3w,或约1250mg至约1750mg q3w,或约1300mg至约1500mg q3w,或例如150mg q3w、1350mg q3w、1450mg q3w、1550mg q3w、1650mg q3w、1750mg q3w、1800mg q3w、1850mg q3w、1900mg q3w、1950mg q3w、2000mg q3w、2125mg q3w、2250mg q3w、2350mg q3w。如上所用的术语“mg/kg”是指将用各个抗体治疗的患者的每千克体重抗PD-L1或抗PD-1抗体的毫克数。本文所用的术语“q2w”和“q3w”表示每两周或每三周施用一次。上文使用的术语“mg/kg”是指每千克体重的抗PD-L1 (或例如抗PD-1) 的抗体毫克数。

[0113] 根据一个方面,本发明涉及本发明的抗体或其抗原结合片段在本发明的方法中用于预测患有恶性肿瘤的患者是用抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体治疗的可能候选者的用途。例如,本发明的抗体或抗原结合片段可用于免疫组织化学以检测FFPE肿瘤组织样品中的PD-L1表达,且随后对样品进行PD-L1表达的视觉评估(评分)以确定PD-L1阳性细胞(例如肿瘤细胞,或如上所述的TIL)的数量。本发明的抗体或其抗原结合片段也可以例如用于双色免疫荧光以标记TIL。例如,双色荧光可包括本发明的抗体和以下之一:抗CD8抗体、抗CD163抗体、抗CD3抗体、抗CD11c抗体、抗CD56抗体、抗CD68抗体、抗粒酶B抗体或抗FoxP3抗体,其中抗体源自不同物种以允许检测本发明的抗体和TIL特异性抗体二者。双免疫荧光可以例如使用商业试剂盒进行,例如根据制造商的说明书使用Novocastra PowerVision Poly-HRP IHC检测系统和随后使用Alexa Fluor 594-或Alexa Fluor 488 Tyramide Signal Amplification (TSA) 试剂盒进行。PD-L1阳性细胞的评分可以例如通过如上所述进行,或者可以例如包括基于PD-L1阳性肿瘤细胞、PD-L1阳性免疫细胞(例如TIL、巨噬细胞)或者PD-L1阳性肿瘤和免疫细胞的总体评分来指定IHC评分,例如IHC评分为0、1、2或3,对应<1% PD-L1阳性细胞(IHC评分为0), >1%但<5% (IHC评分为1), >5%但<10% (IHC评分为2), 或>10% (IHC评分为3)。例如,如果使用如上公开的本发明的抗PD-L1抗体对给定患者的多于一个样品进行如上所公开的本发明的体外方法,则IHC评分可以是所分析的样品的平均评分,或者例如,IHC评分可以对应于具有最高IHC评分的样品的IHC评分。IHC评分还可以例如通过使用本发明的抗体或其抗原结合片段对表达PD-L1的两种肿瘤细胞占总肿瘤细胞的百分比和表达PD-L1的肿瘤浸润性免疫细胞占肿瘤面积的百分比进行评分来确定。如果≥50%的肿瘤细胞是PD-L1阳性,则样品可以例如评分为3;如果≥5%但<50%的肿瘤细胞是PD-L1阳性则评分为2;如果≥1%但<5%的肿瘤细胞是PD-L1阳性则评分为1;且如果<1%肿瘤细胞表达PD-L1,则评分为0。

[0114] 在一个实施方案中,本发明提供了一种治疗患者的癌症的方法,该患者已通过以下方法被鉴定为对免疫检查点抑制剂治疗有应答的可能候选者,所述方法为通过将如上公开的本发明方法应用于从所述患者获得的或源自所述患者的样品并确定该样品中的PD-L1

表达,并在第二步中比较该样品中PD-L1的表达与参照样品中的PD-L1表达,并且在第三步中如果发现所述患者的样品中PD-L1的表达增加或高于某一阈值,则将免疫检查点抑制剂,例如抗PD-L1或抗PD-1抗体施用给所述患者。本发明治疗方法中使用的术语“阈值”是指例如通过上文公开的本发明方法测定的患者来源的样品相对于参照样品的PD-L1表达的相对丰度。例如,阈值可以定义为患者样品中PD-L1阳性细胞与参照样品相比的相对增加,或者例如可以定义为所述样品中PD-L1阳性细胞的绝对或相对数量,例如样品中0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、75%、80%、>1%、>5%、>10%、>20%、>50%、>75%、>80%的细胞,或例如阈值可以基于如上公开的IHC评分或评分方法。用于本发明治疗方法的参照样品可以例如源自未患有癌症的健康供体,并且如上所述使用本发明的抗体或抗原结合片段进行的检测PD-L1表达的相同方法,比如例如FFPE组织样品上的IHC。例如,参照样品可以从与从患者获得的样品相应的组织和位置获得,并且优选与来自所述患者的样品平行处理。如果它是从未患病的区域或位置获得的,参照样品可以例如也可以源自与肿瘤组织样品相同的组织或器官,或者例如参照样品可以源自对侧健康器官。可以例如根据本发明的治疗方法施用给患者的抗PD-L1包括avelumab、atezolizumab、durvalumab,或例如抗-PD-1抗体,例如pembrolizumab、nivolumab或Pf-06801591。在本发明的治疗方法中,如上所述施用抗PD-L1或抗PD-1抗体(比如例如avelumab),例如以约5mg/kg至约30mg/kg的剂量施用,或例如剂量是5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、至约12.5mg/kg、15mg/kg、17.5mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、27.5mg/kg、30mg/kg,其中抗体每周施用一次(q1w)。如上所述,抗PD-L1抗体(例如,avelumab)也可以每周,或每两周,或每三周以固定剂量施用,例如每周500-800mg,或每两周900-1600mg,或每三周1250-2400mg的固定剂量。

[0115] 在一个实施方案中,本发明提供了编码抗体或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。用于本发明的术语“分离的多核苷酸”是指至少70%、75%、80%、85%、90%,优选95%、96%、97%、98%、99%纯净且不含污染物的多核苷酸,比如例如蛋白质和/或脂质。本发明的抗体或其抗原结合片段可以例如是编码本发明的抗体的轻链和重链的两种分离的多核苷酸编码的。分离的多核苷酸可以例如包含编码本发明的抗体的轻链的根据SEQ ID NO:17的多核苷酸序列和包含编码本发明的抗体的重链的根据SEQ ID NO:18的多核苷酸序列。取决于所用的表达系统,可以对根据SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的多核苷酸序列进行密码子优化以允许更好地表达本发明的多核苷酸,从而在相应的表达系统中产生更高的本发明的抗体产量。密码子优化可以例如使用Nucleic Acids Res.1988 Mar 11;16(5):1715-28, Nucleic Acids Res.1988 Sep 12;16(17):8207-11;Methods Cell Biol.1991;36:675-7中公布的可用密码子使用表来进行;或者例如可用的计算机嵌入式密码子优化工具,例如在例如Bioinformatics.2014 Aug 1;30(15):2210-2发表的那些。可以考虑所使用的相应表达系统,例如鼠或人细胞系、酵母或昆虫细胞系,来进行至少一种本发明的多核苷酸的密码子优化。

[0116] 在一个实施方案中,本发明提供了包含如上公开的本发明的多核苷酸的表达载体。根据本发明的术语“表达载体”是指包含基因表达控制序列(例如启动子或启动子组分,以5'至3'方向与编码至少一种多肽,例如SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:18的核苷酸序列可操作地连接)的核酸载体。例如,根据本发明的表达载体可以包含根据SEQ ID NO:17或

SEQ ID NO:18的多核苷酸,或者可以包含根据SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的多核苷酸。在原核生物中表达所必需的核酸序列包括启动子、核糖体结合位点,任选的操纵子序列和可能的其他序列。真核细胞利用启动子,例如CMV启动子、SV40启动子、EF1a或CAG启动子,并且通常是增强子和多聚腺苷酸化信号。示例性哺乳动物表达载体是pCMV、pCMV-SPORT、pcDNA,或例如Nat Commun.2010 Nov 16;1:120中描述的基于质粒的多基因表达系统,或者例如如果预期病毒表达本发明的抗体或其抗原结合片段,则是pLK0.1-hygro、pBABE-hygro、pBABE-puro、pBABE-zeo、pLenti CMV/T0 zeo DEST、pCW57.1。任选地,真核生物中的表达载体可以在本发明的多核苷酸序列之间包含内部核糖体进入位点(IRES),其提供双顺反子表达构建体以允许从一个表达载体中表达根据SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的两种多核苷酸。例如可以使用的IRES序列可以包括在PLoS One.2013Dec 9;8(12):e82100中公布的那些序列,例如5' AUGAUAAUAUGGCCACAACCAUG。例如可用于表达本发明的多核苷酸的合适的表达载体可包含基于pCMV的表达载体、或基于pD912的载体和它们的变体、Gateway®表达载体、基于的pcDNA的表达载体、或P Ω 载体(见例如,Nucleic Acids Research,Vol.18, No.4),或可用于逆转录病毒或慢病毒产生的载体(参见例如Front Biosci.1999 Jun 1;4:D481-96.)。合适的酵母表达载体可以例如利用GAL4、PGK、ADH1、ADE2或TRP1启动子表达本发明的多核苷酸,例如表达载体pRS420、pLEX、pACT2.2、pTEF1/zeo、pAG425GDP-ccdb、pBEVY-T、pAG300、pGBK T7、pEZY202、pCETT、pRG201、pXP120、pXP320、p2GLex、或p426 GAL。例如,如上公开的本发明的多核苷酸也可以例如在昆虫细胞中使用包含多角体蛋白启动子的表达载体表达,比如例如pFastBac、pFastBac DUAL、pVL 1392、pVL 1393或AcNPV,用于本发明的多核苷酸在杆状病毒的表达。在一个优选的方面,包含本发明的多核苷酸的表达载体是哺乳动物表达载体。

[0117] 在一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的表达载体在产生包含根据SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的本发明的抗体中的用途。例如,根据本发明的至少一种载体,其包含编码根据SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的多核苷酸,可用在瞬时表达系统中以表达本发明的抗体。例如,可使用Methods.2014 Jan 1;65(1):5-10中公开的瞬时表达系统。本发明的表达载体或根据本发明的至少一种表达载体也可以例如用于产生表达本发明的抗体的稳定细胞系。例如,用于开发稳定细胞系的方法可以例如开始于用本发明的表达载体转染合适的宿主细胞,或用本发明的至少一种表达载体转染,例如两种表达载体转染合适的宿主细胞,其中第一载体包含根据SEQ ID NO:17的多核苷酸和第二表达载体包含根据SEQ ID NO:18的多核苷酸。在用包含编码抗体轻链和重链的多核苷酸以及至少一种选择标记的表达载体转染后,可以在合适的生长条件孵育转染的细胞24小时-72小时,以允许表达本发明的抗体,并在生长恢复、无血清悬浮适应和扩增以及克隆选择后筛选具有本发明抗体的高生产力的细胞。

[0118] 例如,本发明的表达载体,或例如包含根据SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:18的多核苷酸的本发明的至少一种表达载体可用于产生或制备如上所述的本发明的抗体。例如,包含含有根据SEQ ID NO:17和/或SEQ ID NO:18的序列的本发明的多核苷酸的表达载体可用于转染至少一种合适的宿主细胞,用于表达如上所述的本发明的抗体。例如,根据SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的本发明的多核苷酸可以包含在一个表达载体中,或者例如可以包含在两个单独的表达载体中,它们一起用于产生本发明的抗体。

[0119] 包含根据SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的核苷酸序列的多核苷酸可以例如用在逆转录病毒或慢病毒载体中,以转导至少一种合适的宿主细胞用于表达本发明的多核苷酸。

[0120] 例如,为了制备或产生本发明的抗体,编码根据SEQ ID NO:15的轻链氨基酸序列的多核苷酸和编码根据SEQ ID NO:16的重链氨基酸序列的多核苷酸可以包含在两个单独的表达载体上,使得两种表达载体必须被转染到合适的宿主细胞中以产生或制备本发明的抗体。所用的转染方法可以例如取决于所用的宿主细胞系。多种转染方法已经被开发以稳定地将载体DNA引入哺乳动物细胞,方法包括例如磷酸钙、电穿孔、基于阳离子脂质的脂质体转染、和基于聚合物或dendrimre的方法。在一个实例中,本发明的表达载体或根据本发明的至少一种表达载体可以用于重组酶介导的盒交换(RMCE),使用CHOK1SV细胞产生用于制备本发明的抗体的稳定细胞系,例如根据Biotechnol Prog.2015 Nov-Dec;31(6):1645-56描述的方法。

[0121] 根据实施方案,本发明提供了宿主细胞,其包含至少一种如上所述的表达载体。例如,根据本发明的宿主细胞可以包含至少一种如上所述的表达载体,其编码包含根据SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的本发明的抗体,例如宿主细胞可以包含如上所述的编码根据SEQ ID NO:17的氨基酸序列的一种表达载体和如上所述的编码根据SEQ ID NO:18的氨基酸序列的第二表达载体。表达载体可包含选择标记,例如抗生素抗性基因,例如G418、zeocin、杀稻瘟素、潮霉素B、霉酚酸或嘌呤霉素。本发明的抗体还可以例如由本发明的一种以上表达载体编码,每种表达载体可以包含不同的选择标记,以允许选择已经用每种表达载体中的至少一种转染的宿主细胞。例如,如果包含根据SEQ ID NO:17的多核苷酸的本发明的第一表达载体可包含neoR基因,且本发明的第二表达载体可包含赋予对杀稻瘟素抗性的bsd基因。因此,包含本发明的两种表达载体的宿主细胞将赋予对G418和杀稻瘟菌素的抗性,并且可以在含有两种抗生素的生长培养基中进行选择。在一个方面,根据本发明的宿主细胞可包含稳定整合到宿主细胞基因组中的如上公开的本发明的多核苷酸,例如通过病毒转导包括至少一个、两个或多个选择标记的根据SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的多核苷酸。例如,在一个方面,根据本发明的宿主细胞可以包含根据SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的本发明的多核苷酸作为附加体,例如具有至少一种、两种不同的选择标记。

[0122] 例如,根据本发明的宿主细胞可以是细菌细胞、昆虫细胞、酵母细胞或哺乳动物细胞。例如,根据本发明的包含至少一种本发明的多核苷酸或如上公开的根据本发明的表达载体的宿主细胞是指可以含有本发明的载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞,例如植物、动物、真菌或藻类(例如Phaeodactylum tricornutum,Chlamydomonas reinhardtii)或可以是原核细胞,例如细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养细胞或原代细胞,即直接从生物体(例如人)分离的。宿主细胞可以是例如贴壁细胞或悬浮细胞,即悬浮生长的细胞。根据本发明的宿主细胞可以例如包括酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、多形汉逊酵母(Hansenula polymorpha)、粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)、Schwanniomycetes occidentalis、乳霜克鲁维酵母(Kluyveromyces lactis)、解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)和巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris),或例如Sf9、Sf21、S2、Hi5或BTI-TN-5B1-4细胞,或者例如DH5α大肠杆菌。优选地,根据本发明的宿主细胞是以下之一:HEK293、HEK293T、HEK293E、HEK 293F、NS0、

per.C6、MCF-7、HeLa、Cos-1、Cos-7、PC-12、3T3、Vero、vero-76、PC3、U87、SAOS-2、LNCAP、DU145、A431、A549、B35、H1299、HUVEC、Jurkat、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、Caco-2、CHO、CHO-K1、CHO-B11、CHO-DG44、BHK、AGE1.HN、Namalwa、WI-38、MRC-5、HepG2、L-929、RAB-9、SIRC、RK13、11B11、1D3、2.4G2、A-10、B-35、C-6、F4/80、IEC-18、L2、MH1C1、NRK、NRK-49F、NRK-52E、RMC、CV-1、BT、MDBK、CPAE、MDCK.1、或MDCK.2、D-17。

[0123] 根据一个实施方案,本发明提供如上公开的本发明的宿主细胞在制备本发明的抗体中的用途,例如本发明的抗体包含根据SEQ ID NO:15(轻链)和SEQ ID NO:16(重链)的氨基酸序列。例如,根据本发明的宿主细胞在制备本发明的抗体中的用途可包括培养至少一种宿主细胞,所述宿主细胞包含至少一种本发明的表达载体或多核苷酸,其在允许表达本发明的抗体的合适条件下包含根据SEQ ID NO:15和/或SEQ ID NO:16的多核苷酸序列。在一个实例中,本发明的至少一种宿主细胞包含根据SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的多核苷酸,其包括表达多核苷酸所需的调节序列,其稳定整合到宿主细胞的基因组中。

[0124] 例如,本发明的至少一种宿主细胞,例如至少 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 个细胞,可被允许在含有10%FBS的DEME中在37℃、10%CO₂大气中或例如在无血清培养基中生长,以帮助随后的分离和纯化,例如FreeStyle™293表达培养基或OptiCHO™培养基。例如,如果本发明的至少一种宿主细胞是如上所述的昆虫细胞,则可以使用Grace的昆虫培养基、express Five® SFM(Life Technologies)或High Five®培养基(Life Technologies)或如果本发明的至少一种宿主细胞是酵母细胞,则为YNM培养基、YPD肉汤,或例如PichiaPink(Life technologies)。例如,合适的生长条件可包括允许本发明的至少一种宿主细胞在12-408h之间生长,例如约12至约400h,例如14h、16h、18h、20h、24h、36h、48h、72h、96h至约120h、144h、168h、192、216h、240h、264h、288h、312h、336h、360h、384h、408h之间。随后,可以分离和纯化如上公开的本发明的抗体或抗原结合片段。例如,本发明的抗体或抗原结合片段可以通过色谱法纯化和分离,例如离子交换色谱、尺寸排阻色谱、硫酸铵沉淀、超滤、或使用蛋白A琼脂糖纯化,例如如Current Protocols in Molecular Biology(1997)11.11.1-11.11.5中所述。

[0125] 实施例

[0126] 以下实施例旨在进一步说明本发明。它们不旨在限制本发明的主题或范围。

[0127] 实施例1-抗体产生

[0128] 使用与制备鼠单克隆抗体相同的单克隆抗体基本原理产生针对PD-L1的KLH偶联的羧基末端肽(SEQ ID NO:1,RLRKGRMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET)的本发明的单克隆兔抗体。简而言之,本发明的兔单克隆抗体的产生遵循四步程序:

[0129] 1) 免疫兔并筛选多克隆血清,

[0130] 2) 融合以产生杂交瘤细胞并筛选上清液中的多克隆。

[0131] 3) 亚克隆和筛选上清液中的亚克隆。

[0132] 4) 在HEK-293细胞中克隆并产生重组抗体。

[0133] 通过酶联免疫吸附测定法筛选与PD-L1抗原结合的具有根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多克隆、亚克隆和重组抗体的上清液(图1)。初始筛选导致鉴定一个抗体克隆MKP1A07310,然后通过蛋白质印迹和FFPE组织切片上的免疫组织化学进一步表征。

[0134] 实施例2:通过蛋白质印迹表征抗体

[0135] 通过蛋白质印迹对细胞系A549、MDA-MB231、PD-L1敲低MDA-MB231和人PD-L1转染的HEK293(=HEK293_PDL1)细胞系的裂解物分析抗体克隆MKP1A07310以评估其特异性。从Merck KGaA,Darmstadt的细胞库中取得A549和MDA-MB231细胞系。使用针对PD-L1的siRNA (siGENOME SMART pool,Dharmacon)在Merck,Darmstadt进行MDA-MB231细胞中人PD-L1的敲低。多克隆抗体抗-CD274(Abcam,目录号58810)用作阳性对照抗体,用于检测PD-L1(=CD274)。用Alexa Fluor缀合的山羊抗兔抗体(Invitrogen,目录号21076)检测一抗兔抗体。使用Odyssey扫描仪(LI-COR,USA)扫描蛋白质印迹。

[0136] 对PD-L1转染的HEK293、表达PD-L1的MDA-MB231、siRNA PDL1敲低的MDA-MB231和低PD-L1细胞系A549的细胞裂解物进行蛋白质印迹。蛋白质印迹显示PD-L1的特异性标记,其在siRNA PD-L1敲低的MDA-MB231中降低(参见图2)。PD-L1蛋白的MW约为40kDa。由于高度糖基化,糖基化的PD-L1的MW为~52kDa。多克隆阳性对照抗体(抗CD274,以1:250稀释)显示在除特定的52kDa之外的几个带,其表明该抗体对PD-L1的低选择性。与多克隆抗体相比,单克隆重组抗体具有高选择性。

[0137] 实施例3:抗体克隆

[0138] 使用TurboCapture试剂盒(Qiagen:目录号#72232)按照制造商的推荐分离本发明的克隆MKP1A07310的杂交瘤细胞的mRNA,并使用oligo-dT引物逆转录成cDNA。使用专有的Epitomics引物OYZ64-2和OYZvh3对重链可变区(VH)进行PCR扩增。使用专有引物OYZ62和OYZ71 PCR扩增整个轻链(LC)。使用限制酶HindIII和KpnI消化PCR片段的VH区。使用HindIII和NotI消化PCR片段的LC。在限制性消化后,使用Qiagen PCR清理试剂盒(目录号#28016)纯化所得片段,并将所得纯化的VH和LC片段连接到相应的专有的pTT表达载体的重链或轻链中,并转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞(MC Lab,目录号#DA-100)中。挑取所得的细菌菌落并使用相应的限制酶确认插入物(通过预期的大小:VH约440bp,LC约740bp)。使用TT5特异性测序引物对具有预期大小插入物的质粒进行测序。在测序验证后,用HindIII和NotI从相应的载体中切下整个轻链和重链片段,并随后使用Qiagen PCR清理试剂盒纯化。

[0139] 实施例4:评估抗体特异性

[0140] 为了确定本发明的抗体MKP1A07310以及抗体MKP1B19610特异性结合人PD-L1,使用MDA-MB231细胞进行siRNA实验。对于MDA-MB231细胞,已显示该细胞系具有高基线PD-L1表达(参见例如Cancer Immunol Res.2014 April;2(4):361-370)。siRNA转染的MDA-MB231细胞的免疫组织化学染色显示,所测试的两种抗体均特异性识别并结合PD-L1(参见图3):转染siRNA1或siRNA2后,PD-L1的抗体染色显著降低(参见图3,“PDL1_SP+”,“PDL1_SP”)。这两种抗体的结合特异性的初步测定已经表明MKP1B19610似乎敏感度较低,因为需要更高的抗体浓度(5 μ g/ml或更高)以产生与本发明的抗体MKP1A07310(例如在浓度为0.2 μ g/ml)所观察到的相当的染色强度。

[0141] 为了通过免疫组织化学评估本发明的抗体克隆MKP1A07310的特异性,使用具有已知PD-L1蛋白表达的阳性和阴性对照组织产生的组织微阵列(TMA)。为了构建组织微阵列,选择具有不同PD-L1表达水平的人正常组织和肿瘤组织。先前使用本发明的抗PD-L1抗体在人器官的冷冻组织微阵列(BioChip,Indivumed GmbH)和冷冻的人肿瘤上分析PD-L1的表达。PD-L1阳性和阴性正常人组织的石蜡块购自provitro GmbH(Germany)。来自具有高或低PD-L1表达的选定患者的,相应的非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤的石蜡块购自Indivumed GmbH

(Germany)。从每个石蜡块中取出两个直径为1.5mm的穿孔并将其直立封固在胶带上并整合入液体石蜡中(参见例如图7)。

[0142] FFPE组织或组织/细胞系阵列的免疫组织化学

[0143] 将3 μ m FFPE组织或组织/细胞微阵列的切片封固在带正电荷的 SuperFrost®Plus载玻片 (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) 上。开始切片的脱石蜡,用染色仪Discovery™或 Discovery®XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA; 参见下图) 以进行免疫组织化学染色程序。脱石蜡后,加热切片以在pH 8的Tris-EDTA缓冲剂中恢复表位。通过在3%过氧化氢 (OmniMap™ Kit, Ventana Medical Systems的一部分) 中孵育来封闭内源性过氧化物酶。将切片与PBS稀释的抗体一起孵育,并随后与二抗 (OmniMap试剂盒的HRP缀合的聚合物) 一起在37℃孵育16分钟。辣根过氧化物酶 (HRP) 催化3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB) / H₂O₂反应,以产生可以观察到的不溶性深棕色沉淀物。单克隆兔IgG抗体用作阴性对照。切片用苏木精复染。将载玻片在自来水中洗涤、脱水、并用玻璃盖玻片封固在永久性封固介质 Entellan®Neu (VWR, Germany) 中。

[0144] Discovery™仪器上的免疫组织化学染色程序

[0145] 对于FFPE组织的免疫组织化学染色,使用以下Discovery™平台 (Ventana Medical Systems, Inc.): 目录号750-200、750-800, 目录号F-DISXT-750-000, 根据以下步骤:

[0146] 组织/探针: 人体组织, 体外癌细胞系,

[0147] 保存: FFPE (4%多聚甲醛pH7, 石蜡包埋)

[0148] 切片厚度: FFPE组织为3 μ m

[0149] 1. 切片的烘烤和脱石蜡

[0150] 在75℃烘烤载玻片8分钟

[0151] 在75℃对载玻片进行脱石蜡8分钟

[0152] 2. 封闭内源性过氧化物酶的封闭是在蛋白酶抗原恢复之前且在Discovery染色仪器中热恢复抗原后

[0153] 在37℃用3%H₂O₂封闭内源性过氧化物酶

[0154] 3. 用于抗原恢复的切片的预处理

[0155] 标准CC1 (Tris EDTA缓冲剂pH8) 在96℃进行48分钟

[0156] 4. 与一抗孵育

[0157] 一抗: PDL1 (本发明的抗体MKP1A07310)

[0158] 公司: Merck KGaA, Darmstadt

[0159] 产品编号: MKP-1A-73-10

[0160] 同种型: 兔单克隆重组体

[0161] 克隆: MKP1A07310

[0162] 稀释或浓度: 1-2 μ g/ml

[0163] 在37℃孵育32分钟

[0164] 一抗的阴性对照

[0165] 是: 兔mAb IgG同种型对照, 克隆DA1E (NEB, #3900)

[0166] 5. 与二抗孵育

- [0167] 二抗:来自OmniMap抗兔HRP的抗兔IgG
- [0168] 公司:Ventana
- [0169] 目录号:760-4311
- [0170] 稀释:VMSI分配器(未知)
- [0171] 在37℃孵育16分钟
- [0172] 6. 使用三抗或检测试剂盒孵育
- [0173] 抗体/试剂盒:
- [0174] OmniMap抗兔HRP (#760-4311, VMSI), ChromoMap (#760-159, VMSI)
- [0175] ChromoMap (DAB, copper) 的孵育持续时间、温度和洗涤步骤由Discovery仪器设置
- [0176] 7. 复染苏木精II (#790-2208, VMSI) 在37℃进行8分钟
- [0177] 通过仪器发蓝
- [0178] 洗涤步骤不包括在图表中。用于去石蜡、抗原恢复、洗涤载玻片的试剂来自VMSI (Ventana Medical Systems, Inc.)。将抗体在PBS中稀释。
- [0179] 图像分析
- [0180] 在MiraxSCAN (Zeiss, Germany) 的帮助下扫描免疫组织化学染色, 其分辨率 $x/y: 1$ 个像素 $= 0.23 \times 0.23 \mu\text{m}^2$ 。扫描之前MiraxScan仪器针对每张载玻片校准亮度。图像是在MiraxViewer软件的帮助下拍摄的。用图像分析软件Visiopharm Integrator System (VIS) 分析扫描。概述了活组织区域, 避免了明显的坏死区域和结缔组织。
- [0181] 为了确定存在的抗原量, 将阳性棕色染色面积计算为活组织区域的面积百分比。抗体染色(任意单位)计算为
- [0182] 抗体染色(AU) = 阳性面积(%) * 棕色的(255-强度) / 100, 其中阳性面积计算为阳性面积(%) = $100 * [\text{棕色面积} / (\text{棕色面积} + \text{蓝色面积})]$, 并将强度设定为棕色面积的平均灰度值(参见图7A, 最右侧图像中的箭头表示棕色细胞, 中间图像箭头表示基于软件的棕色色原检测, 右图:检测到细胞核和细胞质的蓝色染色)。
- [0183] 实施例5:MKP1A07310和MKP1B19610的运行内(intra-run)和运行间(inter-run)变化性
- [0184] 将本发明的抗体MKP1A07310和抗体MKP1B19610在70个细胞系中的癌细胞系阵列上分别以两种浓度表征, 以比较它们的结合特征并确定用于进一步研究的最佳浓度。癌细胞系阵列CAX09_70显示抗体结合的连续范围。在约50%的细胞系中, 信号为零或非常低。抗体的最高结合显示Hs746T细胞(Met扩增的细胞系)。抗体MKP1A07310在其浓度从 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 增加至 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时仅显示信号强度的轻微增加, 表明 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 已经接近饱和浓度。抗体MKP1B19610显示信号从5至 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 显著增加。没有测试更高的浓度, 因为抗体在浓度 $> 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时倾向于非特异性地结合到组织和玻璃上。在70个细胞系中的抗体MKP1A07310和MKP1B19610的结合相关, 其中Pearson相关系数 $r = 0.95$ 。
- [0185] 在60个细胞系的细胞系阵列CAX08_60上使用两种抗体在Discovery XT染色仪器上进行免疫组织化学染色的运行内和运行间变化性(图6)。以 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度测试抗体MKP1A07310, 且以 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 测试抗体MKP1B19610。在CAX08_60的细胞系上, MKP1A07310的染色与MKP1B19610相关, 其中Pearson相关系数 $r = 0.97$ 。在显示中等至低总染色信号的细胞系如A549、PC-3或U-87MG中, 显示高染色的细胞分散在阴性细胞之间(图9A:MKP1A07310;图

9B:MKP1B19610)。

[0186] 本发明的抗体MKP1A07310的运行内变化性低,不同载玻片之间的相关系数 $r=0.99$ (图5)。MKP1B19610显示出略高的运行内变化性,不同载玻片之间的相关系数为0.93至0.99。3次不同运行之间的运行间变化性较低,MKP1A07310的 $r=0.99$,且MKP1B19610的 $r>=0.98$ 。

[0187] 另外在由48种不同异种移植物组成的组织微阵列上测试重组抗体(TMA_Xenos_12,图8)。用MKP1A07310的染色与MKP1B19610相关,相关系数 $r=0.90$ 。高表达异种移植植物的是Hs746T、MDA-MB231、NCI-H2009和H1975。阴性的例子是A2780和Colo205。

[0188] 实施例6:使用不同IHC平台比较MKP1A07310和MKP1B19610

[0189] 该研究的目的是使用AutostainerLink48比较抗体的结合特征,用PTLink模块从Dako(Dako GmbH,Germany)恢复抗原,以及使用DiscoveryXT仪器染色。使用Dako或Ventana Medical Systems,Inc试剂(VMSI)用于脱石蜡、抗原恢复、载玻片上的抗体稀释、洗涤缓冲剂,并且检测系统不同并且可能影响抗体的“表位世界”

[0190] 底物

[0191] 将用于PD-L1的阳性和阴性对照组织中的组织微阵列TMA_PDL1_11和59种人癌细胞系和1种昆虫细胞系的细胞系微阵列CAX08_60用作测试基质。TMA_PDL1_11用于选择产生的抗体。将3 μ m甲醛固定的石蜡包埋(FFPE)的组织或组织/细胞微阵列的切片封固在带正电荷的SuperFrost®Plus载玻片(Menzel-Gläser,Braunschweig,Germany)上。

[0192] 使用的抗体:

[0193] 一抗:使用稀释到PBS中的本发明的抗体MKP1A07310(“7310mAb”)和MKP1B19610:使用浓度为1、2和5 μ g/ml的MKP1A07310;使用浓度为2、5和10 μ g/ml的抗体MKP1B19610;

[0194] 二抗

| [0195] | 抗原 | 抗体 | 供应商 | Conc./dilution | 孵育 |
|--------|-------|-----------------------------------|---------------------|----------------|--------------------|
| | 兔 IgG | 低聚物, HRP 偶联 (OmniMap) | VMSI # 760- 4311 | 分配器 | 在 37°C 进行 16 分钟 |
| | 兔 IgG | 低聚物, HRP 偶联 (EnVisionFlex/HRP) | Dako, # SM802 | 分配器 | 在 RT 进行 30 分钟 |

[0196] 染色程序

[0197] 抗原恢复

[0198] 如下进行抗原恢复:对于DiscoveryXT,使用“高pH”抗原恢复条件(Tris-EDTA pH8)进行抗原恢复,对于AutostainerLink,使用“高pH”开始测试(Tris-EDTA缓冲剂,pH9)进行抗原恢复。对于抗体PD-L1(MKP1B19610),另外使用“低pH”(柠檬酸盐缓冲剂,pH6.1)抗原恢复。

[0199] DiscoveryXT染色仪器的染色程序

[0200] 用染色仪器Discovery®XT(Ventana Medical Systems,Inc.,(“VMSI”)Tucson,USA)从切片的脱石蜡开始进行免疫组织化学染色程序,脱石蜡后切片在96°C在pH8的Tris-EDTA缓冲剂中加热恢复表位48分钟。通过在3%过氧化氢(OmniMap™ Kit,Ventana Medical

Systems的一部分)中孵育来封闭内源性过氧化物酶。将切片与PBS稀释的抗体一起孵育,并随后与二抗(OmniMap试剂盒的HRP缀合的聚合物)一起在37℃孵育16分钟。辣根过氧化物酶(HRP)催化3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)/H₂O₂反应,以产生可以观察到的不溶性深棕色沉淀物。切片用苏木精复染。本发明的抗PD-L1抗体以1、2和5μg/ml的浓度使用;抗体MKP1B19610以2、5和10μg/ml使用;对于两种抗体,使用OmniMap抗兔HRP(#760-4311, VMSI)和ChromoMap(#760-159)进行检测。

[0201] AutostainerLink48的染色程序

[0202] 在PT link预处理模块(Dako GmbH, Germany)中进行切片的脱石蜡和抗原恢复。在加热期间对载玻片进行脱石蜡,以在pH9的Tris-EDTA缓冲剂(高pH)或pH6.1的柠檬酸盐缓冲剂(低pH)中在97℃下恢复表位20分钟。在热抗原恢复后,将载玻片转移到AutostainerLink 48仪器中。通过在3%过氧化氢中孵育来封闭内源性过氧化物酶。将切片与PBS稀释的抗体一起孵育,然后与二抗(EnVision FLEX(SM802, Dako)的HRP缀合的聚合物)一起在室温孵育30分钟。辣根过氧化物酶(HRP)催化3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)/H₂O₂反应,产生可以观察到的不溶性深棕色沉淀物。切片用苏木精复染。随后将载玻片在自来水中洗涤,脱水,并用玻璃盖玻片封固在永久性封固介质 Entellan®Neu (VWR, Germany)中。MKP1A07310以0.5、1和2μg/ml的浓度使用;MKP1B19610以0.2、0.5、1、2和5μg/ml的浓度使用。

[0203] MKP1A07310和MKP1B19610在不同染色平台上的比较

[0204] 使用AutostainerLink,用抗PD-L1抗体MKP1B19610和本发明的抗PD-L1抗体MKP1A07310获得的IHC结果的相关性低, $r < 0.71$ (图11和14)。在某些细胞系中仍然存在染色强度的相关性,例如NCI-H2009和Lox(参见:图11),但是对于作为PD-L1表达的阴性对照的A2780细胞,抗PD-L1抗体MKP1B19610表明PD-L1的表达,而使用本发明的抗体,相同的细胞系对PD-L1表达是阴性的(参见:图11)。

[0205] 将DiscoveryXT系统上的本发明的抗PD-L1抗体(MKP1A07310)的染色特征与使用AutostainerLink的特征进行比较,揭示了使用的癌细胞系上的IHC染色强度的高度相关性,在0.5μg/ml时相关系数为 $r = 0.96$ (图13)。当与使用Ventana的DiscoveryXT平台和Ventana试剂的IHC染色的结果相比,基于目前的数据,根据Dako的指导使用的试剂与AutostainerLink一起用于去石蜡化、抗原恢复和染色,除了增加的IHC染色信号之外,并未通过例如揭示本发明的抗PD-L1抗体(MKP1A07310)的异常结合位点来改变IHC染色模式。

[0206] 比较在Discovery XT系统上的针对人PD-L1的细胞外表位的抗PD-L1抗体MKP1B19610的染色特征与使用AutostainerLink(Dako)的染色特征,发现在使用的癌细胞系中IHC染色强度的相关性低很多,其中相关系数 $r < 0.67$ (图12)。使用“低pH”抗原恢复,相关性甚至低于IHC染色条件“高pH”(参见例如图12B,“低pH”,MKP1B19610抗体浓度为5μg/ml时 $r = 0.43$,MKP1B19610抗体浓度为1μg/ml时 $r = 0.66$)。在评估的许多细胞系中仍然存在IHC染色强度的相关性,但是使用AutostainerLink对DiscoveryXT系统测定为PD-L1表达阴性的一组细胞测定,是阳性,如A2780所示(参见例如图11)。

[0207] 总之,使用来自Dako的试剂的AutostainerLink平台,针对PD-L1的细胞质结构域的本发明的抗体(MKP1A07310)确实在55个FFPE癌细胞系中显示与来自Ventana Medical Systems的DiscoveryXT染色平台相同的结合特征。相反,使用AutostainerLink而不是

DiscoveryXT揭示针对细胞外结构域产生的抗体MKP1B19610的额外结合位点。因此,本发明的抗体可令人惊讶地用于广泛使用的商业IHC平台、AutostainerLink平台(DAKO)以及Ventana Medical Systems的DiscoveryXT染色平台。

[0208] 另外,如图5所示,使用本发明的抗体获得的染色结果的运行间变化性令人惊讶地低,如相关系数 $r=0.99$ 所示,使得IHC染色和例如如本文所公开的在FFPE肿瘤组织中的PD-L1表达的衍生评分在不同染色运行之间是相当的。因此,本发明的抗体满足抗PD-L1抗体的未满足需求,其能够可靠地在两种常用IHC平台上(例如 **DiscoveryXT®** 系统,Ventana和AutostainerLink,Dako)检测常规用于病理学的FFPE肿瘤组织样品(例如源自活组织检查样品)中的PD-L1表达。

[0042] <213> Artificial Sequence
[0043] <220>
[0044] <223> light chain sequence element
[0045] <400> 4
[0046] Gln Ser Leu His Arg Asn Asn Tyr
[0047] 1 5
[0048] <210> 5
[0049] <211> 17
[0050] <212> PRT
[0051] <213> Artificial Sequence
[0052] <220>
[0053] <223> light chain sequence element
[0054] <400> 5
[0055] Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Gln Leu Ile
[0056] 1 5 10 15
[0057] Tyr
[0058] <210> 6
[0059] <211> 4
[0060] <212> PRT
[0061] <213> Artificial Sequence
[0062] <220>
[0063] <223> light chain sequence element with amino acid Xaa being absent
[0064] <400> 6
[0065] Gln Ala Ser Xaa
[0066] 1
[0067] <210> 7
[0068] <211> 36
[0069] <212> PRT
[0070] <213> Artificial Sequence
[0071] <220>
[0072] <223> light chain sequence element
[0073] <400> 7
[0074] Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[0075] 1 5 10 15
[0076] Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys Asp Asp Ala Ala
[0077] 20 25 30
[0078] Thr Tyr Tyr Cys
[0079] 35
[0080] <210> 8
[0081] <211> 10
[0082] <212> PRT
[0083] <213> Artificial Sequence

| | |
|--------|---|
| [0084] | <220> |
| [0085] | <223> light chain sequence element |
| [0086] | <400> 8 |
| [0087] | Leu Gly Gly Val Ser Gly Gly Pro Tyr Pro |
| [0088] | 1 5 10 |
| [0089] | <210> 9 |
| [0090] | <211> 24 |
| [0091] | <212> PRT |
| [0092] | <213> Artificial Sequence |
| [0093] | <220> |
| [0094] | <223> heavy chain sequence element |
| [0095] | <400> 9 |
| [0096] | Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser |
| [0097] | 1 5 10 15 |
| [0098] | Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser |
| [0099] | 20 |
| [0100] | <210> 10 |
| [0101] | <211> 8 |
| [0102] | <212> PRT |
| [0103] | <213> Artificial Sequence |
| [0104] | <220> |
| [0105] | <223> heavy chain sequence element |
| [0106] | <400> 10 |
| [0107] | Thr Ile Asp Leu Ser Thr Phe Ala |
| [0108] | 1 5 |
| [0109] | <210> 11 |
| [0110] | <211> 17 |
| [0111] | <212> PRT |
| [0112] | <213> Artificial Sequence |
| [0113] | <220> |
| [0114] | <223> heavy chain sequence element |
| [0115] | <400> 11 |
| [0116] | Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly |
| [0117] | 1 5 10 15 |
| [0118] | Thr |
| [0119] | <210> 12 |
| [0120] | <211> 7 |
| [0121] | <212> PRT |
| [0122] | <213> Artificial Sequence |
| [0123] | <220> |
| [0124] | <223> heavy chain sequence element |
| [0125] | <400> 12 |

| | |
|--------|---|
| [0126] | Ile Asn Thr Asp Leu Thr Thr |
| [0127] | 1 5 |
| [0128] | <210> 13 |
| [0129] | <211> 37 |
| [0130] | <212> PRT |
| [0131] | <213> Artificial Sequence |
| [0132] | <220> |
| [0133] | <223> heavy chain sequence element |
| [0134] | <400> 13 |
| [0135] | Tyr Tyr Val Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser |
| [0136] | 1 5 10 15 |
| [0137] | Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Gly Leu Thr Ile Glu Asp Thr |
| [0138] | 20 25 30 |
| [0139] | Ala Thr Tyr Phe Cys |
| [0140] | 35 |
| [0141] | <210> 14 |
| [0142] | <211> 10 |
| [0143] | <212> PRT |
| [0144] | <213> Artificial Sequence |
| [0145] | <220> |
| [0146] | <223> heavy chain sequence element |
| [0147] | <400> 14 |
| [0148] | Ala Arg Lys Leu Phe Gly Asn Gly Asn Val |
| [0149] | 1 5 10 |
| [0150] | <210> 15 |
| [0151] | <211> 236 |
| [0152] | <212> PRT |
| [0153] | <213> Artificial Sequence |
| [0154] | <220> |
| [0155] | <223> light chain sequence |
| [0156] | <400> 15 |
| [0157] | Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp |
| [0158] | 1 5 10 15 |
| [0159] | Leu Pro Gly Ala Thr Val Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro |
| [0160] | 20 25 30 |
| [0161] | Val Ser Ala Ser Val Gly Ser Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser |
| [0162] | 35 40 45 |
| [0163] | Gln Ser Leu His Arg Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro |
| [0164] | 50 55 60 |
| [0165] | Gly Gln Pro Pro Lys Gln Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser |
| [0166] | 65 70 75 80 |
| [0167] | Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr |

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| [0168] | 85 | 90 | 95 |
| [0169] | Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys | | |
| [0170] | 100 | 105 | 110 |
| [0171] | Leu Gly Gly Val Ser Gly Gly Pro Tyr Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu | | |
| [0172] | 115 | 120 | 125 |
| [0173] | Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro | | |
| [0174] | 130 | 135 | 140 |
| [0175] | Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val | | |
| [0176] | 145 | 150 | 155 |
| [0177] | Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly | | |
| [0178] | 165 | 170 | 175 |
| [0179] | Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser | | |
| [0180] | 180 | 185 | 190 |
| [0181] | Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr | | |
| [0182] | 195 | 200 | 205 |
| [0183] | Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr | | |
| [0184] | 210 | 215 | 220 |
| [0185] | Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys | | |
| [0186] | 225 | 230 | 235 |
| [0187] | <210> 16 | | |
| [0188] | <211> 457 | | |
| [0189] | <212> PRT | | |
| [0190] | <213> Artificial Sequence | | |
| [0191] | <220> | | |
| [0192] | <223> heavy chain sequence | | |
| [0193] | <400> 16 | | |
| [0194] | Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly | | |
| [0195] | 1 | 5 | 10 |
| [0196] | Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Thr | | |
| [0197] | 20 | 25 | 30 |
| [0198] | Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Thr Ile Asp Leu | | |
| [0199] | 35 | 40 | 45 |
| [0200] | Ser Thr Phe Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu | | |
| [0201] | 50 | 55 | 60 |
| [0202] | Glu Trp Ile Gly Thr Ile Asn Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Tyr Val Asn | | |
| [0203] | 65 | 70 | 75 |
| [0204] | Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val | | |
| [0205] | 85 | 90 | 95 |
| [0206] | Asp Leu Lys Met Thr Gly Leu Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe | | |
| [0207] | 100 | 105 | 110 |
| [0208] | Cys Ala Arg Lys Leu Phe Gly Asn Gly Asn Val Trp Gly Pro Gly Thr | | |
| [0209] | 115 | 120 | 125 |

| | | | |
|--------|---|-----|---------|
| [0210] | Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro | | |
| [0211] | 130 | 135 | 140 |
| [0212] | Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly | | |
| [0213] | 145 | 150 | 155 160 |
| [0214] | Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn | | |
| [0215] | 165 | 170 | 175 |
| [0216] | Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln | | |
| [0217] | 180 | 185 | 190 |
| [0218] | Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser | | |
| [0219] | 195 | 200 | 205 |
| [0220] | Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys | | |
| [0221] | 210 | 215 | 220 |
| [0222] | Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro | | |
| [0223] | 225 | 230 | 235 240 |
| [0224] | Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys | | |
| [0225] | 245 | 250 | 255 |
| [0226] | Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val | | |
| [0227] | 260 | 265 | 270 |
| [0228] | Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr | | |
| [0229] | 275 | 280 | 285 |
| [0230] | Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln | | |
| [0231] | 290 | 295 | 300 |
| [0232] | Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His | | |
| [0233] | 305 | 310 | 315 320 |
| [0234] | Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys | | |
| [0235] | 325 | 330 | 335 |
| [0236] | Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln | | |
| [0237] | 340 | 345 | 350 |
| [0238] | Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu | | |
| [0239] | 355 | 360 | 365 |
| [0240] | Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro | | |
| [0241] | 370 | 375 | 380 |
| [0242] | Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn | | |
| [0243] | 385 | 390 | 395 400 |
| [0244] | Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu | | |
| [0245] | 405 | 410 | 415 |
| [0246] | Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val | | |
| [0247] | 420 | 425 | 430 |
| [0248] | Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln | | |
| [0249] | 435 | 440 | 445 |
| [0250] | Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys | | |
| [0251] | 450 | 455 | |

| | |
|--------|---|
| [0252] | <210> 17 |
| [0253] | <211> 711 |
| [0254] | <212> DNA |
| [0255] | <213> Artificial Sequence |
| [0256] | <220> |
| [0257] | <223> light chain sequence |
| [0258] | <400> 17 |
| [0259] | atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60 |
| [0260] | acagttgccc aagtgtgac ccagaccca tccccgtgt ctgcatctgt gggaagcaca 120 |
| [0261] | gtcaccatca attgccaggc cagtcagagt cttcatcgca acaactactt atcctggttt 180 |
| [0262] | cagcagaaac cagggcagcc tccaagcaa ctgatctatc aggcattcac tctggcatct 240 |
| [0263] | ggggtctcat cgcggttcag tggcagtga tctgggacac agttcactct caccatcagc 300 |
| [0264] | gatgtggtgt gtgacgatgc tgccacttac tactgtctgg gcggtgtag tgggtggtcct 360 |
| [0265] | tatcctttcg gcggaggagc cgaggtggtc gtcaaagggt atccagttgc acctactgtc 420 |
| [0266] | ctcatcttcc caccagctgc tgatcaggtg gcaactggaa cagtcacat cgtgtgtgtg 480 |
| [0267] | gcgaataaat actttccga tgtaccgtc acctgggagg tggatggcac caccacaaaca 540 |
| [0268] | actggcatcg agaacagtaa aacaccgag aattctgcag attgtaccta caacctcagc 600 |
| [0269] | agcactctga cactgaccag cacacgtac aacagccaca aagagtacac ctgcaagggtg 660 |
| [0270] | accagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg gtgactgtta g 711 |
| [0271] | <210> 18 |
| [0272] | <211> 1374 |
| [0273] | <212> DNA |
| [0274] | <213> Artificial Sequence |
| [0275] | <220> |
| [0276] | <223> heavy chain sequence |
| [0277] | <400> 18 |
| [0278] | atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaagggtg ccagtgtcag 60 |
| [0279] | gagcagctgg tggaatccgg aggaggcctg gtcacgcctg ggggatccct gacactcacc 120 |
| [0280] | tgcacagtct ctacaatga cctcagtacc tttgcaataa gctgggtccg ccaggctcca 180 |
| [0281] | gggaaggggc tggagtggat cggaaccatt aatactgata ttaccacata ctatgtgaat 240 |
| [0282] | tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgtcga ccacggtgga tctgaaaatg 300 |
| [0283] | accggtctga caatcgagga cacggccacc tatttctgtg ccagaaaatt atttggaat 360 |
| [0284] | ggtaatgtct ggggccagg caccctggtc accgtctctt cagggaacc taaggctcca 420 |
| [0285] | tcagtcttcc cactggcccc ctgctgcggg gacacacca gctccacggt gacctgggc 480 |
| [0286] | tgctgtgtca aagggtacct cccggagcca gtgaccgtga cctggaactc gggcacctc 540 |
| [0287] | accaatgggg tacgcacctt cccgtccgtc cggcagtcct caggcctcta ctgctgagc 600 |
| [0288] | agcgtggtga gcgtgacctc aagcagccag cccgtcacct gcaacgtggc ccaccagcc 660 |
| [0289] | accaacacca aagtggacaa gaccgttgcg cctcgcacat gcagcaagcc cacgtgccc 720 |
| [0290] | ccccctgaac tcttggggg accgtctgtc ttcatcttcc ccccaaaacc caaggacacc 780 |
| [0291] | ctcatgatct cagcaccccc cgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggatgac 840 |
| [0292] | cccaggtgac agttcacatg gtacataaac aacgagcagg tgcgcaccgc ccggccgccg 900 |
| [0293] | ctacgggagc agcagttcaa cagcacgatc cgcgtggtca gcacctccc catcgcgcac 960 |

[0294] caggactggc tgaggggcaa ggagttcaag tgcaaagtcc acaacaaggc actcccggcc 1020
[0295] cccatcgaga aaaccatctc caaagccaga gggcagcccc tggagccgaa ggtctacacc 1080
[0296] atgggccctc cccgggagga gctgagcagc aggtcgggtca gctgacctg catgatcaac 1140
[0297] ggcttctacc cttccgacat ctcggtggag tgggagaaga acgggaaggc agaggacaac 1200
[0298] tacaagacca cgccggccgt gctggacagc gacggctcct acttcctcta cagcaagctc 1260
[0299] tcagtgccca cgagtgagtg gcagcggggc gacgtcttca cctgctccgt gatgcacgag 1320
[0300] gccttgcaca accactacac gcagaagtcc atctcccgt ctccgggtaa atga 1374
[0301] <210> 19
[0302] <211> 8
[0303] <212> PRT
[0304] <213> Artificial Sequence
[0305] <220>
[0306] <223> epitope
[0307] <400> 19
[0308] Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met
[0309] 1 5
[0310] <210> 20
[0311] <211> 8
[0312] <212> PRT
[0313] <213> Artificial Sequence
[0314] <220>
[0315] <223> epitope
[0316] <400> 20
[0317] Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp
[0318] 1 5
[0319] <210> 21
[0320] <211> 8
[0321] <212> PRT
[0322] <213> Artificial Sequence
[0323] <220>
[0324] <223> epitope
[0325] <400> 21
[0326] Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val
[0327] 1 5
[0328] <210> 22
[0329] <211> 8
[0330] <212> PRT
[0331] <213> Artificial Sequence
[0332] <220>
[0333] <223> epitope
[0334] <400> 22
[0335] Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys

| | | |
|--------|---------------------------------|---------------------|
| [0336] | 1 | 5 |
| [0337] | <210> | 23 |
| [0338] | <211> | 8 |
| [0339] | <212> | PRT |
| [0340] | <213> | Artificial Sequence |
| [0341] | <220> | |
| [0342] | <223> | epitope |
| [0343] | <400> | 23 |
| [0344] | Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys | |
| [0345] | 1 | 5 |
| [0346] | <210> | 24 |
| [0347] | <211> | 8 |
| [0348] | <212> | PRT |
| [0349] | <213> | Artificial Sequence |
| [0350] | <220> | |
| [0351] | <223> | epitope |
| [0352] | <400> | 24 |
| [0353] | Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys | |
| [0354] | 1 | 5 |
| [0355] | <210> | 25 |
| [0356] | <211> | 8 |
| [0357] | <212> | PRT |
| [0358] | <213> | Artificial Sequence |
| [0359] | <220> | |
| [0360] | <223> | epitope |
| [0361] | <400> | 25 |
| [0362] | Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly | |
| [0363] | 1 | 5 |
| [0364] | <210> | 26 |
| [0365] | <211> | 8 |
| [0366] | <212> | PRT |
| [0367] | <213> | Artificial Sequence |
| [0368] | <220> | |
| [0369] | <223> | epitope |
| [0370] | <400> | 26 |
| [0371] | Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile | |
| [0372] | 1 | 5 |
| [0373] | <210> | 27 |
| [0374] | <211> | 8 |
| [0375] | <212> | PRT |
| [0376] | <213> | Artificial Sequence |
| [0377] | <220> | |

[0378] <223> epitope
[0379] <400> 27
[0380] Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln
[0381] 1 5
[0382] <210> 28
[0383] <211> 8
[0384] <212> PRT
[0385] <213> Artificial Sequence
[0386] <220>
[0387] <223> epitope
[0388] <400> 28
[0389] Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp
[0390] 1 5
[0391] <210> 29
[0392] <211> 8
[0393] <212> PRT
[0394] <213> Artificial Sequence
[0395] <220>
[0396] <223> epitope
[0397] <400> 29
[0398] Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr
[0399] 1 5
[0400] <210> 30
[0401] <211> 8
[0402] <212> PRT
[0403] <213> Artificial Sequence
[0404] <220>
[0405] <223> epitope
[0406] <400> 30
[0407] Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn
[0408] 1 5
[0409] <210> 31
[0410] <211> 8
[0411] <212> PRT
[0412] <213> Artificial Sequence
[0413] <220>
[0414] <223> epitope
[0415] <400> 31
[0416] Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser
[0417] 1 5
[0418] <210> 32
[0419] <211> 8

[0420] <212> PRT
[0421] <213> Artificial Sequence
[0422] <220>
[0423] <223> epitope
[0424] <400> 32
[0425] Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys
[0426] 1 5
[0427] <210> 33
[0428] <211> 8
[0429] <212> PRT
[0430] <213> Artificial Sequence
[0431] <220>
[0432] <223> epitope
[0433] <400> 33
[0434] Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys
[0435] 1 5
[0436] <210> 34
[0437] <211> 8
[0438] <212> PRT
[0439] <213> Artificial Sequence
[0440] <220>
[0441] <223> epitope
[0442] <400> 34
[0443] Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln
[0444] 1 5
[0445] <210> 35
[0446] <211> 8
[0447] <212> PRT
[0448] <213> Artificial Sequence
[0449] <220>
[0450] <223> epitope
[0451] <400> 35
[0452] Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser
[0453] 1 5
[0454] <210> 36
[0455] <211> 8
[0456] <212> PRT
[0457] <213> Artificial Sequence
[0458] <220>
[0459] <223> epitope
[0460] <400> 36
[0461] Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp

| | | |
|--------|---------------------------------|---------------------|
| [0462] | 1 | 5 |
| [0463] | <210> | 37 |
| [0464] | <211> | 8 |
| [0465] | <212> | PRT |
| [0466] | <213> | Artificial Sequence |
| [0467] | <220> | |
| [0468] | <223> | epitope |
| [0469] | <400> | 37 |
| [0470] | Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr | |
| [0471] | 1 | 5 |
| [0472] | <210> | 38 |
| [0473] | <211> | 8 |
| [0474] | <212> | PRT |
| [0475] | <213> | Artificial Sequence |
| [0476] | <220> | |
| [0477] | <223> | epitope |
| [0478] | <400> | 38 |
| [0479] | Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His | |
| [0480] | 1 | 5 |
| [0481] | <210> | 39 |
| [0482] | <211> | 8 |
| [0483] | <212> | PRT |
| [0484] | <213> | Artificial Sequence |
| [0485] | <220> | |
| [0486] | <223> | epitope |
| [0487] | <400> | 39 |
| [0488] | Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu | |
| [0489] | 1 | 5 |
| [0490] | <210> | 40 |
| [0491] | <211> | 8 |
| [0492] | <212> | PRT |
| [0493] | <213> | Artificial Sequence |
| [0494] | <220> | |
| [0495] | <223> | epitope |
| [0496] | <400> | 40 |
| [0497] | Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu | |
| [0498] | 1 | 5 |
| [0499] | <210> | 41 |
| [0500] | <211> | 8 |
| [0501] | <212> | PRT |
| [0502] | <213> | Artificial Sequence |
| [0503] | <220> | |

| | |
|--------|-------------------------------------|
| [0504] | <223> epitope |
| [0505] | <400> 41 |
| [0506] | Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu |
| [0507] | 1 5 |
| [0508] | <210> 42 |
| [0509] | <211> 8 |
| [0510] | <212> PRT |
| [0511] | <213> Artificial Sequence |
| [0512] | <220> |
| [0513] | <223> epitope |
| [0514] | <400> 42 |
| [0515] | Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr |
| [0516] | 1 5 |
| [0517] | <210> 43 |
| [0518] | <211> 9 |
| [0519] | <212> PRT |
| [0520] | <213> Artificial Sequence |
| [0521] | <220> |
| [0522] | <223> epitope |
| [0523] | <400> 43 |
| [0524] | Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp |
| [0525] | 1 5 |
| [0526] | <210> 44 |
| [0527] | <211> 9 |
| [0528] | <212> PRT |
| [0529] | <213> Artificial Sequence |
| [0530] | <220> |
| [0531] | <223> epitope |
| [0532] | <400> 44 |
| [0533] | Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val |
| [0534] | 1 5 |
| [0535] | <210> 45 |
| [0536] | <211> 9 |
| [0537] | <212> PRT |
| [0538] | <213> Artificial Sequence |
| [0539] | <220> |
| [0540] | <223> epitope |
| [0541] | <400> 45 |
| [0542] | Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys |
| [0543] | 1 5 |
| [0544] | <210> 46 |
| [0545] | <211> 9 |

[0546] <212> PRT
[0547] <213> Artificial Sequence
[0548] <220>
[0549] <223> epitope
[0550] <400> 46
[0551] Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys
[0552] 1 5
[0553] <210> 47
[0554] <211> 9
[0555] <212> PRT
[0556] <213> Artificial Sequence
[0557] <220>
[0558] <223> epioppe
[0559] <400> 47
[0560] Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
[0561] 1 5
[0562] <210> 48
[0563] <211> 9
[0564] <212> PRT
[0565] <213> Artificial Sequence
[0566] <220>
[0567] <223> epitope
[0568] <400> 48
[0569] Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly
[0570] 1 5
[0571] <210> 49
[0572] <211> 9
[0573] <212> PRT
[0574] <213> Artificial Sequence
[0575] <220>
[0576] <223> epitope
[0577] <400> 49
[0578] Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
[0579] 1 5
[0580] <210> 50
[0581] <211> 9
[0582] <212> PRT
[0583] <213> Artificial Sequence
[0584] <220>
[0585] <223> epitope
[0586] <400> 50
[0587] Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln

| | | |
|--------|-------------------------------------|---------------------|
| [0588] | 1 | 5 |
| [0589] | <210> | 51 |
| [0590] | <211> | 9 |
| [0591] | <212> | PRT |
| [0592] | <213> | Artificial Sequence |
| [0593] | <220> | |
| [0594] | <223> | epitope |
| [0595] | <400> | 51 |
| [0596] | Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp | |
| [0597] | 1 | 5 |
| [0598] | <210> | 52 |
| [0599] | <211> | 9 |
| [0600] | <212> | PRT |
| [0601] | <213> | Artificial Sequence |
| [0602] | <220> | |
| [0603] | <223> | epitope |
| [0604] | <400> | 52 |
| [0605] | Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr | |
| [0606] | 1 | 5 |
| [0607] | <210> | 53 |
| [0608] | <211> | 9 |
| [0609] | <212> | PRT |
| [0610] | <213> | Artificial Sequence |
| [0611] | <220> | |
| [0612] | <223> | epitope |
| [0613] | <400> | 53 |
| [0614] | Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn | |
| [0615] | 1 | 5 |
| [0616] | <210> | 54 |
| [0617] | <211> | 9 |
| [0618] | <212> | PRT |
| [0619] | <213> | Artificial Sequence |
| [0620] | <220> | |
| [0621] | <223> | epitope |
| [0622] | <400> | 54 |
| [0623] | Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser | |
| [0624] | 1 | 5 |
| [0625] | <210> | 55 |
| [0626] | <211> | 9 |
| [0627] | <212> | PRT |
| [0628] | <213> | Artificial Sequence |
| [0629] | <220> | |

[0630] <223> epitope
[0631] <400> 55
[0632] Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys
[0633] 1 5
[0634] <210> 56
[0635] <211> 9
[0636] <212> PRT
[0637] <213> Artificial Sequence
[0638] <220>
[0639] <223> epitope
[0640] <400> 56
[0641] Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys
[0642] 1 5
[0643] <210> 57
[0644] <211> 9
[0645] <212> PRT
[0646] <213> Artificial Sequence
[0647] <220>
[0648] <223> epitope
[0649] <400> 57
[0650] Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln
[0651] 1 5
[0652] <210> 58
[0653] <211> 9
[0654] <212> PRT
[0655] <213> Artificial Sequence
[0656] <220>
[0657] <223> epitope
[0658] <400> 58
[0659] Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser
[0660] 1 5
[0661] <210> 59
[0662] <211> 9
[0663] <212> PRT
[0664] <213> Artificial Sequence
[0665] <220>
[0666] <223> epitope
[0667] <400> 59
[0668] Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp
[0669] 1 5
[0670] <210> 60
[0671] <211> 9

[0672] <212> PRT
[0673] <213> Artificial Sequence
[0674] <220>
[0675] <223> epitope
[0676] <400> 60
[0677] Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr
[0678] 1 5
[0679] <210> 61
[0680] <211> 9
[0681] <212> PRT
[0682] <213> Artificial Sequence
[0683] <220>
[0684] <223> epitope
[0685] <400> 61
[0686] Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His
[0687] 1 5
[0688] <210> 62
[0689] <211> 9
[0690] <212> PRT
[0691] <213> Artificial Sequence
[0692] <220>
[0693] <223> epitope
[0694] <400> 62
[0695] Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu
[0696] 1 5
[0697] <210> 63
[0698] <211> 9
[0699] <212> PRT
[0700] <213> Artificial Sequence
[0701] <220>
[0702] <223> epitope
[0703] <400> 63
[0704] Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
[0705] 1 5
[0706] <210> 64
[0707] <211> 9
[0708] <212> PRT
[0709] <213> Artificial Sequence
[0710] <220>
[0711] <223> epitope
[0712] <400> 64
[0713] Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu

| | | | |
|--------|---|---------------------|----|
| [0714] | 1 | 5 | |
| [0715] | <210> | 65 | |
| [0716] | <211> | 9 | |
| [0717] | <212> | PRT | |
| [0718] | <213> | Artificial Sequence | |
| [0719] | <220> | | |
| [0720] | <223> | epitope | |
| [0721] | <400> | 65 | |
| [0722] | Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr | | |
| [0723] | 1 | 5 | |
| [0724] | <210> | 66 | |
| [0725] | <211> | 10 | |
| [0726] | <212> | PRT | |
| [0727] | <213> | Artificial Sequence | |
| [0728] | <220> | | |
| [0729] | <223> | epitope | |
| [0730] | <400> | 66 | |
| [0731] | Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val | | |
| [0732] | 1 | 5 | 10 |
| [0733] | <210> | 67 | |
| [0734] | <211> | 10 | |
| [0735] | <212> | PRT | |
| [0736] | <213> | Artificial Sequence | |
| [0737] | <220> | | |
| [0738] | <223> | epitope | |
| [0739] | <400> | 67 | |
| [0740] | Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys | | |
| [0741] | 1 | 5 | 10 |
| [0742] | <210> | 68 | |
| [0743] | <211> | 10 | |
| [0744] | <212> | PRT | |
| [0745] | <213> | Artificial Sequence | |
| [0746] | <220> | | |
| [0747] | <223> | epitope | |
| [0748] | <400> | 68 | |
| [0749] | Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys | | |
| [0750] | 1 | 5 | 10 |
| [0751] | <210> | 69 | |
| [0752] | <211> | 10 | |
| [0753] | <212> | PRT | |
| [0754] | <213> | Artificial Sequence | |
| [0755] | <220> | | |

| | |
|--------|---|
| [0756] | <223> epitope |
| [0757] | <400> 69 |
| [0758] | Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys |
| [0759] | 1 5 10 |
| [0760] | <210> 70 |
| [0761] | <211> 10 |
| [0762] | <212> PRT |
| [0763] | <213> Artificial Sequence |
| [0764] | <220> |
| [0765] | <223> epitope |
| [0766] | <400> 70 |
| [0767] | Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly |
| [0768] | 1 5 10 |
| [0769] | <210> 71 |
| [0770] | <211> 10 |
| [0771] | <212> PRT |
| [0772] | <213> Artificial Sequence |
| [0773] | <220> |
| [0774] | <223> epitope |
| [0775] | <400> 71 |
| [0776] | Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile |
| [0777] | 1 5 10 |
| [0778] | <210> 72 |
| [0779] | <211> 10 |
| [0780] | <212> PRT |
| [0781] | <213> Artificial Sequence |
| [0782] | <220> |
| [0783] | <223> epitope |
| [0784] | <400> 72 |
| [0785] | Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln |
| [0786] | 1 5 10 |
| [0787] | <210> 73 |
| [0788] | <211> 10 |
| [0789] | <212> PRT |
| [0790] | <213> Artificial Sequence |
| [0791] | <220> |
| [0792] | <223> epitope |
| [0793] | <400> 73 |
| [0794] | Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp |
| [0795] | 1 5 10 |
| [0796] | <210> 74 |
| [0797] | <211> 10 |

| | | |
|--------|---|---------------------|
| [0798] | <212> | PRT |
| [0799] | <213> | Artificial Sequence |
| [0800] | <220> | |
| [0801] | <223> | epitope |
| [0802] | <400> | 74 |
| [0803] | Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr | |
| [0804] | 1 | 5 10 |
| [0805] | <210> | 75 |
| [0806] | <211> | 10 |
| [0807] | <212> | PRT |
| [0808] | <213> | Artificial Sequence |
| [0809] | <220> | |
| [0810] | <223> | epitope |
| [0811] | <400> | 75 |
| [0812] | Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn | |
| [0813] | 1 | 5 10 |
| [0814] | <210> | 76 |
| [0815] | <211> | 10 |
| [0816] | <212> | PRT |
| [0817] | <213> | Artificial Sequence |
| [0818] | <220> | |
| [0819] | <223> | epitope |
| [0820] | <400> | 76 |
| [0821] | Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser | |
| [0822] | 1 | 5 10 |
| [0823] | <210> | 77 |
| [0824] | <211> | 10 |
| [0825] | <212> | PRT |
| [0826] | <213> | Artificial Sequence |
| [0827] | <220> | |
| [0828] | <223> | epitope |
| [0829] | <400> | 77 |
| [0830] | Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys | |
| [0831] | 1 | 5 10 |
| [0832] | <210> | 78 |
| [0833] | <211> | 10 |
| [0834] | <212> | PRT |
| [0835] | <213> | Artificial Sequence |
| [0836] | <220> | |
| [0837] | <223> | epitope |
| [0838] | <400> | 78 |
| [0839] | Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys | |

| | | | |
|--------|---|---|----|
| [0840] | 1 | 5 | 10 |
| [0841] | <210> 79 | | |
| [0842] | <211> 10 | | |
| [0843] | <212> PRT | | |
| [0844] | <213> Artificial Sequence | | |
| [0845] | <220> | | |
| [0846] | <223> epitope | | |
| [0847] | <400> 79 | | |
| [0848] | Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln | | |
| [0849] | 1 | 5 | 10 |
| [0850] | <210> 80 | | |
| [0851] | <211> 10 | | |
| [0852] | <212> PRT | | |
| [0853] | <213> Artificial Sequence | | |
| [0854] | <220> | | |
| [0855] | <223> epitope | | |
| [0856] | <400> 80 | | |
| [0857] | Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser | | |
| [0858] | 1 | 5 | 10 |
| [0859] | <210> 81 | | |
| [0860] | <211> 10 | | |
| [0861] | <212> PRT | | |
| [0862] | <213> Artificial Sequence | | |
| [0863] | <220> | | |
| [0864] | <223> epitope | | |
| [0865] | <400> 81 | | |
| [0866] | Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp | | |
| [0867] | 1 | 5 | 10 |
| [0868] | <210> 82 | | |
| [0869] | <211> 10 | | |
| [0870] | <212> PRT | | |
| [0871] | <213> Artificial Sequence | | |
| [0872] | <220> | | |
| [0873] | <223> epitope | | |
| [0874] | <400> 82 | | |
| [0875] | Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr | | |
| [0876] | 1 | 5 | 10 |
| [0877] | <210> 83 | | |
| [0878] | <211> 10 | | |
| [0879] | <212> PRT | | |
| [0880] | <213> Artificial Sequence | | |
| [0881] | <220> | | |

| | |
|--------|---|
| [0882] | <223> epitope |
| [0883] | <400> 83 |
| [0884] | Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His |
| [0885] | 1 5 10 |
| [0886] | <210> 84 |
| [0887] | <211> 10 |
| [0888] | <212> PRT |
| [0889] | <213> Artificial Sequence |
| [0890] | <220> |
| [0891] | <223> epitope |
| [0892] | <400> 84 |
| [0893] | Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu |
| [0894] | 1 5 10 |
| [0895] | <210> 85 |
| [0896] | <211> 10 |
| [0897] | <212> PRT |
| [0898] | <213> Artificial Sequence |
| [0899] | <220> |
| [0900] | <223> epitope |
| [0901] | <400> 85 |
| [0902] | Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu |
| [0903] | 1 5 10 |
| [0904] | <210> 86 |
| [0905] | <211> 10 |
| [0906] | <212> PRT |
| [0907] | <213> Artificial Sequence |
| [0908] | <220> |
| [0909] | <223> epitope |
| [0910] | <400> 86 |
| [0911] | Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu |
| [0912] | 1 5 10 |
| [0913] | <210> 87 |
| [0914] | <211> 10 |
| [0915] | <212> PRT |
| [0916] | <213> Artificial Sequence |
| [0917] | <220> |
| [0918] | <223> epitope |
| [0919] | <400> 87 |
| [0920] | Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr |
| [0921] | 1 5 10 |
| [0922] | <210> 88 |
| [0923] | <211> 11 |

[0924] <212> PRT
[0925] <213> Artificial Sequence
[0926] <220>
[0927] <223> epitope
[0928] <400> 88
[0929] Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys
[0930] 1 5 10
[0931] <210> 89
[0932] <211> 11
[0933] <212> PRT
[0934] <213> Artificial Sequence
[0935] <220>
[0936] <223> epitope
[0937] <400> 89
[0938] Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys
[0939] 1 5 10
[0940] <210> 90
[0941] <211> 11
[0942] <212> PRT
[0943] <213> Artificial Sequence
[0944] <220>
[0945] <223> epitope
[0946] <400> 90
[0947] Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
[0948] 1 5 10
[0949] <210> 91
[0950] <211> 11
[0951] <212> PRT
[0952] <213> Artificial Sequence
[0953] <220>
[0954] <223> epitope
[0955] <400> 91
[0956] Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly
[0957] 1 5 10
[0958] <210> 92
[0959] <211> 11
[0960] <212> PRT
[0961] <213> Artificial Sequence
[0962] <220>
[0963] <223> epitope
[0964] <400> 92
[0965] Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile

| | | | |
|--------|---|---|----|
| [0966] | 1 | 5 | 10 |
| [0967] | <210> 93 | | |
| [0968] | <211> 11 | | |
| [0969] | <212> PRT | | |
| [0970] | <213> Artificial Sequence | | |
| [0971] | <220> | | |
| [0972] | <223> epitope | | |
| [0973] | <400> 93 | | |
| [0974] | Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln | | |
| [0975] | 1 | 5 | 10 |
| [0976] | <210> 94 | | |
| [0977] | <211> 11 | | |
| [0978] | <212> PRT | | |
| [0979] | <213> Artificial Sequence | | |
| [0980] | <220> | | |
| [0981] | <223> epitope | | |
| [0982] | <400> 94 | | |
| [0983] | Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp | | |
| [0984] | 1 | 5 | 10 |
| [0985] | <210> 95 | | |
| [0986] | <211> 11 | | |
| [0987] | <212> PRT | | |
| [0988] | <213> Artificial Sequence | | |
| [0989] | <220> | | |
| [0990] | <223> epitope | | |
| [0991] | <400> 95 | | |
| [0992] | Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr | | |
| [0993] | 1 | 5 | 10 |
| [0994] | <210> 96 | | |
| [0995] | <211> 11 | | |
| [0996] | <212> PRT | | |
| [0997] | <213> Artificial Sequence | | |
| [0998] | <220> | | |
| [0999] | <223> epitope | | |
| [1000] | <400> 96 | | |
| [1001] | Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn | | |
| [1002] | 1 | 5 | 10 |
| [1003] | <210> 97 | | |
| [1004] | <211> 11 | | |
| [1005] | <212> PRT | | |
| [1006] | <213> Artificial Sequence | | |
| [1007] | <220> | | |

| | |
|--------|---|
| [1008] | <223> epitope |
| [1009] | <400> 97 |
| [1010] | Val Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser |
| [1011] | 1 5 10 |
| [1012] | <210> 98 |
| [1013] | <211> 11 |
| [1014] | <212> PRT |
| [1015] | <213> Artificial Sequence |
| [1016] | <220> |
| [1017] | <223> epitope |
| [1018] | <400> 98 |
| [1019] | Lys Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys |
| [1020] | 1 5 10 |
| [1021] | <210> 99 |
| [1022] | <211> 11 |
| [1023] | <212> PRT |
| [1024] | <213> Artificial Sequence |
| [1025] | <220> |
| [1026] | <223> epitope |
| [1027] | <400> 99 |
| [1028] | Lys Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys |
| [1029] | 1 5 10 |
| [1030] | <210> 100 |
| [1031] | <211> 11 |
| [1032] | <212> PRT |
| [1033] | <213> Artificial Sequence |
| [1034] | <220> |
| [1035] | <223> epitope |
| [1036] | <400> 100 |
| [1037] | Cys Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln |
| [1038] | 1 5 10 |
| [1039] | <210> 101 |
| [1040] | <211> 11 |
| [1041] | <212> PRT |
| [1042] | <213> Artificial Sequence |
| [1043] | <220> |
| [1044] | <223> epitope |
| [1045] | <400> 101 |
| [1046] | Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser |
| [1047] | 1 5 10 |
| [1048] | <210> 102 |
| [1049] | <211> 11 |

| | | |
|--------|---|---------------------|
| [1050] | <212> | PRT |
| [1051] | <213> | Artificial Sequence |
| [1052] | <220> | |
| [1053] | <223> | epitope |
| [1054] | <400> | 102 |
| [1055] | Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp | |
| [1056] | 1 | 5 10 |
| [1057] | <210> | 103 |
| [1058] | <211> | 11 |
| [1059] | <212> | PRT |
| [1060] | <213> | Artificial Sequence |
| [1061] | <220> | |
| [1062] | <223> | epitope |
| [1063] | <400> | 103 |
| [1064] | Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr | |
| [1065] | 1 | 5 10 |
| [1066] | <210> | 104 |
| [1067] | <211> | 11 |
| [1068] | <212> | PRT |
| [1069] | <213> | Artificial Sequence |
| [1070] | <220> | |
| [1071] | <223> | epitope |
| [1072] | <400> | 104 |
| [1073] | Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His | |
| [1074] | 1 | 5 10 |
| [1075] | <210> | 105 |
| [1076] | <211> | 11 |
| [1077] | <212> | PRT |
| [1078] | <213> | Artificial Sequence |
| [1079] | <220> | |
| [1080] | <223> | epitope |
| [1081] | <400> | 105 |
| [1082] | Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu | |
| [1083] | 1 | 5 10 |
| [1084] | <210> | 106 |
| [1085] | <211> | 11 |
| [1086] | <212> | PRT |
| [1087] | <213> | Artificial Sequence |
| [1088] | <220> | |
| [1089] | <223> | epitope |
| [1090] | <400> | 106 |
| [1091] | Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu | |

| | | | |
|--------|---|----|-------|
| [1092] | 1 | 5 | 10 |
| [1093] | <210> 107 | | |
| [1094] | <211> 11 | | |
| [1095] | <212> PRT | | |
| [1096] | <213> Artificial Sequence | | |
| [1097] | <220> | | |
| [1098] | <223> epitope | | |
| [1099] | <400> 107 | | |
| [1100] | Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu | | |
| [1101] | 1 | 5 | 10 |
| [1102] | <210> 108 | | |
| [1103] | <211> 11 | | |
| [1104] | <212> PRT | | |
| [1105] | <213> Artificial Sequence | | |
| [1106] | <220> | | |
| [1107] | <223> epitope | | |
| [1108] | <400> 108 | | |
| [1109] | Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr | | |
| [1110] | 1 | 5 | 10 |
| [1111] | <210> 109 | | |
| [1112] | <211> 23 | | |
| [1113] | <212> RNA | | |
| [1114] | <213> Artificial Sequence | | |
| [1115] | <220> | | |
| [1116] | <223> IRES | | |
| [1117] | <400> 109 | | |
| [1118] | augauaauau ggccacaacc aug 23 | | |
| [1119] | <210> 110 | | |
| [1120] | <211> 114 | | |
| [1121] | <212> PRT | | |
| [1122] | <213> Artificial Sequence | | |
| [1123] | <220> | | |
| [1124] | <223> heavy chain variable region | | |
| [1125] | <400> 110 | | |
| [1126] | Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser | | |
| [1127] | 1 | 5 | 10 15 |
| [1128] | Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Thr Ile Asp Leu Ser Thr Phe Ala | | |
| [1129] | 20 | 25 | 30 |
| [1130] | Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly | | |
| [1131] | 35 | 40 | 45 |
| [1132] | Thr Ile Asn Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Tyr Val Asn Trp Ala Lys Gly | | |
| [1133] | 50 | 55 | 60 |

| | |
|--------|---|
| [1134] | Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met |
| [1135] | 65 70 75 80 |
| [1136] | Thr Gly Leu Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Lys |
| [1137] | 85 90 95 |
| [1138] | Leu Phe Gly Asn Gly Asn Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val |
| [1139] | 100 105 110 |
| [1140] | Ser Ser |
| [1141] | <210> 111 |
| [1142] | <211> 110 |
| [1143] | <212> PRT |
| [1144] | <213> Artificial Sequence |
| [1145] | <220> |
| [1146] | <223> light chain variable region |
| [1147] | <400> 111 |
| [1148] | Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ser Val Gly |
| [1149] | 1 5 10 15 |
| [1150] | Ser Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Leu His Arg Asn |
| [1151] | 20 25 30 |
| [1152] | Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Gln |
| [1153] | 35 40 45 |
| [1154] | Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe |
| [1155] | 50 55 60 |
| [1156] | Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val |
| [1157] | 65 70 75 80 |
| [1158] | Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Val Ser Gly |
| [1159] | 85 90 95 |
| [1160] | Gly Pro Tyr Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys |
| [1161] | 100 105 110 |
| [1162] | <210> 112 |
| [1163] | <211> 23 |
| [1164] | <212> PRT |
| [1165] | <213> Artificial Sequence |
| [1166] | <220> |
| [1167] | <223> light chain signal sequence |
| [1168] | <400> 112 |
| [1169] | Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp |
| [1170] | 1 5 10 15 |
| [1171] | Leu Pro Gly Ala Thr Val Ala |
| [1172] | 20 |
| [1173] | <210> 113 |
| [1174] | <211> 19 |
| [1175] | <212> PRT |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| [1176] | <213> Artificial Sequence | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1177] | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1178] | <223> heavy chain signal sequence | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1179] | <400> 113 | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1180] | Met | Glu | Thr | Gly | Leu | Arg | Trp | Leu | Leu | Leu | Val | Ala | Val | Leu | Lys | Gly |
| [1181] | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| [1182] | Val | Gln | Cys | | | | | | | | | | | | | |
| [1183] | <210> 114 | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1184] | <211> 213 | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1185] | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1186] | <213> Artificial Sequence | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1187] | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1188] | <223> MKP1A07310 light chain sequence with signal sequence removed | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1189] | <400> 114 | | | | | | | | | | | | | | | |
| [1190] | Gln | Val | Leu | Thr | Gln | Thr | Pro | Ser | Pro | Val | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | Ser |
| [1191] | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| [1192] | Thr | Val | Thr | Ile | Asn | Cys | Gln | Ala | Ser | Gln | Ser | Leu | His | Arg | Asn | Asn |
| [1193] | | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| [1194] | Tyr | Leu | Ser | Trp | Phe | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | Pro | Lys | Gln | Leu |
| [1195] | | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | |
| [1196] | Ile | Tyr | Gln | Ala | Ser | Thr | Leu | Ala | Ser | Gly | Val | Ser | Ser | Arg | Phe | Ser |
| [1197] | | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | |
| [1198] | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Gln | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Asp | Val | Val |
| [1199] | 65 | | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 |
| [1200] | Cys | Asp | Asp | Ala | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Leu | Gly | Gly | Val | Ser | Gly | Gly |
| [1201] | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| [1202] | Pro | Tyr | Pro | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Glu | Val | Val | Val | Lys | Gly | Asp | Pro |
| [1203] | | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| [1204] | Val | Ala | Pro | Thr | Val | Leu | Ile | Phe | Pro | Pro | Ala | Ala | Asp | Gln | Val | Ala |
| [1205] | | | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | |
| [1206] | Thr | Gly | Thr | Val | Thr | Ile | Val | Cys | Val | Ala | Asn | Lys | Tyr | Phe | Pro | Asp |
| [1207] | | | | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | |
| [1208] | Val | Thr | Val | Thr | Trp | Glu | Val | Asp | Gly | Thr | Thr | Gln | Thr | Thr | Gly | Ile |
| [1209] | 145 | | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | 160 |
| [1210] | Glu | Asn | Ser | Lys | Thr | Pro | Gln | Asn | Ser | Ala | Asp | Cys | Thr | Tyr | Asn | Leu |
| [1211] | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| [1212] | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Thr | Ser | Thr | Gln | Tyr | Asn | Ser | His | Lys | Glu |
| [1213] | | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | |
| [1214] | Tyr | Thr | Cys | Lys | Val | Thr | Gln | Gly | Thr | Thr | Ser | Val | Val | Gln | Ser | Phe |
| [1215] | | | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | |
| [1216] | Asn | Arg | Gly | Asp | Cys | | | | | | | | | | | |
| [1217] | | | | | 210 | | | | | | | | | | | |

| | | |
|--------|---|---|
| [1218] | <210> | 115 |
| [1219] | <211> | 438 |
| [1220] | <212> | PRT |
| [1221] | <213> | Artificial Sequence |
| [1222] | <220> | |
| [1223] | <223> | MKP1A07310 heavy chain sequence with signal peptide removed |
| [1224] | <400> | 115 |
| [1225] | Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Thr Pro Gly Gly | |
| [1226] | 1 | 5 10 15 |
| [1227] | Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Thr Ile Asp Leu Ser Thr Phe | |
| [1228] | 20 | 25 30 |
| [1229] | Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile | |
| [1230] | 35 | 40 45 |
| [1231] | Gly Thr Ile Asn Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Tyr Val Asn Trp Ala Lys | |
| [1232] | 50 | 55 60 |
| [1233] | Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys | |
| [1234] | 65 | 70 75 80 |
| [1235] | Met Thr Gly Leu Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg | |
| [1236] | 85 | 90 95 |
| [1237] | Lys Leu Phe Gly Asn Gly Asn Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr | |
| [1238] | 100 | 105 110 |
| [1239] | Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro | |
| [1240] | 115 | 120 125 |
| [1241] | Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val | |
| [1242] | 130 | 135 140 |
| [1243] | Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr | |
| [1244] | 145 | 150 155 160 |
| [1245] | Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly | |
| [1246] | 165 | 170 175 |
| [1247] | Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro | |
| [1248] | 180 | 185 190 |
| [1249] | Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys | |
| [1250] | 195 | 200 205 |
| [1251] | Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu | |
| [1252] | 210 | 215 220 |
| [1253] | Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp | |
| [1254] | 225 | 230 235 240 |
| [1255] | Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp | |
| [1256] | 245 | 250 255 |
| [1257] | Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn | |
| [1258] | 260 | 265 270 |
| [1259] | Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn | |

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| [1260] | 275 | 280 | 285 |
| [1261] | Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp | | |
| [1262] | 290 | 295 | 300 |
| [1263] | Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro | | |
| [1264] | 305 | 310 | 315 |
| [1265] | Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu | | |
| [1266] | 325 | 330 | 335 |
| [1267] | Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg | | |
| [1268] | 340 | 345 | 350 |
| [1269] | Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile | | |
| [1270] | 355 | 360 | 365 |
| [1271] | Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr | | |
| [1272] | 370 | 375 | 380 |
| [1273] | Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys | | |
| [1274] | 385 | 390 | 395 |
| [1275] | Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys | | |
| [1276] | 405 | 410 | 415 |
| [1277] | Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile | | |
| [1278] | 420 | 425 | 430 |
| [1279] | Ser Arg Ser Pro Gly Lys | | |
| [1280] | 435 | | |
| [1281] | <210> 116 | | |
| [1282] | <211> 10 | | |
| [1283] | <212> PRT | | |
| [1284] | <213> Artificial Sequence | | |
| [1285] | <220> | | |
| [1286] | <223> MKP1A-7310 Light chain FR4 | | |
| [1287] | <400> 116 | | |
| [1288] | Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys | | |
| [1289] | 1 | 5 | 10 |
| [1290] | <210> 117 | | |
| [1291] | <211> 11 | | |
| [1292] | <212> PRT | | |
| [1293] | <213> Artificial Sequence | | |
| [1294] | <220> | | |
| [1295] | <223> MKP1A-7310 heavy chain FR4 | | |
| [1296] | <400> 117 | | |
| [1297] | Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | |
| [1298] | 1 | 5 | 10 |

| 样品 O.D | 用MKP-1A 抗原包被 (1 ug/ml@50ul/ 孔) | | | | | | | | | |
|-----------|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | MKP-1A-73-10 | | | | | | | | | |
| 稀释 | 未经纯化的抗体 | | 经纯化的抗体 | | 流过物 | | N/A | | N/A | |
| | Test 1 | Test 2 | Test 1 | Test 2 | Test 1 | Test 2 | Test 1 | Test 2 | Test 1 | Test 2 |
| 1:250 | 1.20 | 1.24 | 1.82 | 2.00 | 0.13 | 0.10 | 0.07 | 0.08 | 0.07 | 0.08 |
| 1:750 | 0.99 | 0.90 | 1.79 | 1.81 | 0.10 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.07 |
| 1:2250 | 0.52 | 0.49 | 1.97 | 2.26 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | 0.06 | 0.06 | 0.08 |
| 1:6750 | 0.23 | 0.22 | 1.96 | 1.89 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.07 |
| 1:20250 | 0.13 | 0.12 | 1.30 | 1.31 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.08 | 0.08 | 0.06 |
| 1:60750 | 0.08 | 0.09 | 0.71 | 0.68 | 0.08 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| 1:182250 | 0.07 | 0.08 | 0.36 | 0.33 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.06 | 0.07 |
| 1xPBS | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.06 |

ELISA简要步骤:

- 1) MKP-1A抗原包被 (1 ug/ml, 50 ul/ 孔), 过夜
- 2) 系列稀释的样品 (50 ul/ 孔), RT, 1.5 hr.
- 3) AP Gt x Rb IgG (1:2500), 50 ul/ 孔 , RT, 1 hr.
- 4) AP底物, 50 ul/ 孔 , RT, 15 min
- 5) 终止溶液, 50 ul/ 孔 , OD405nm

图1

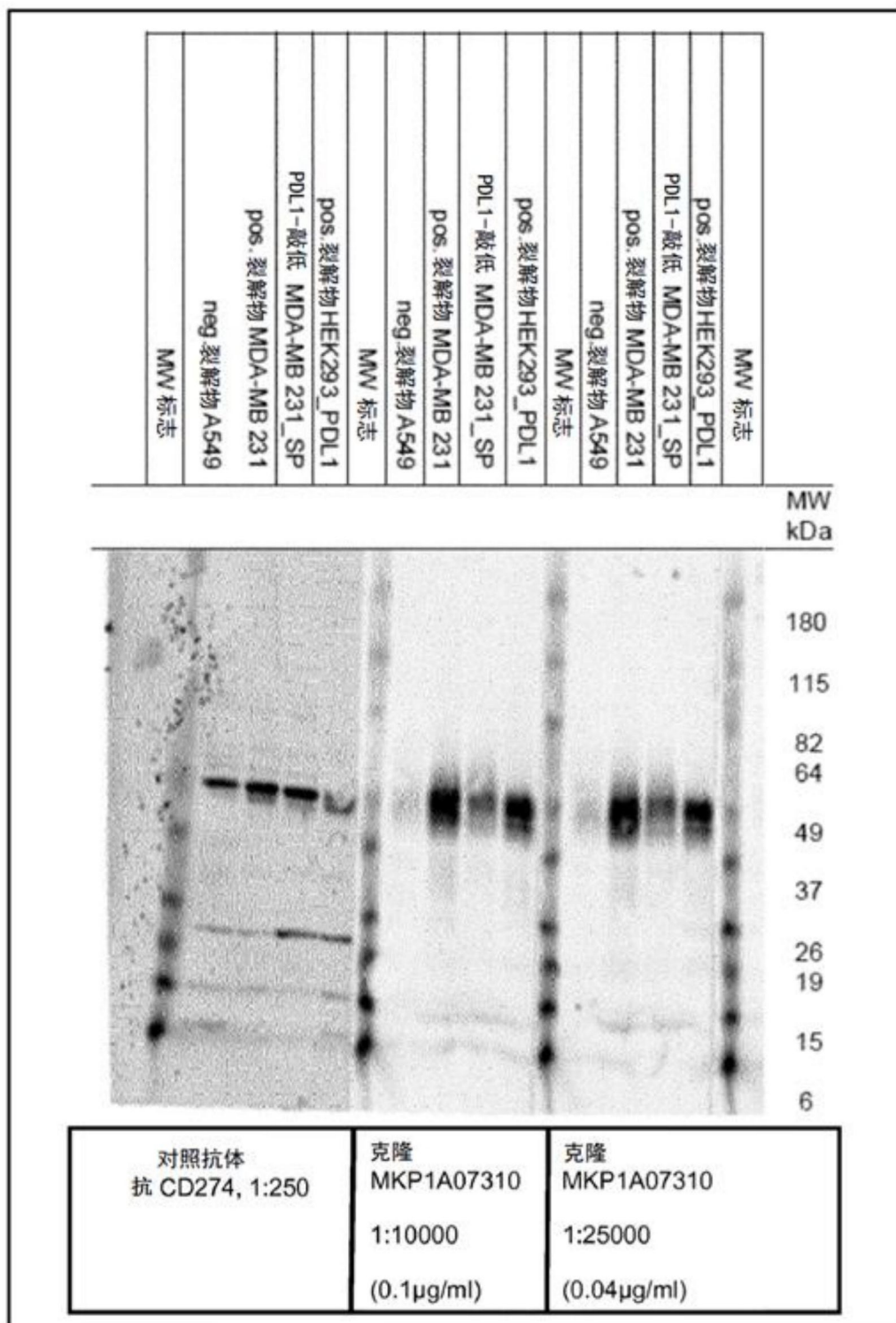


图2

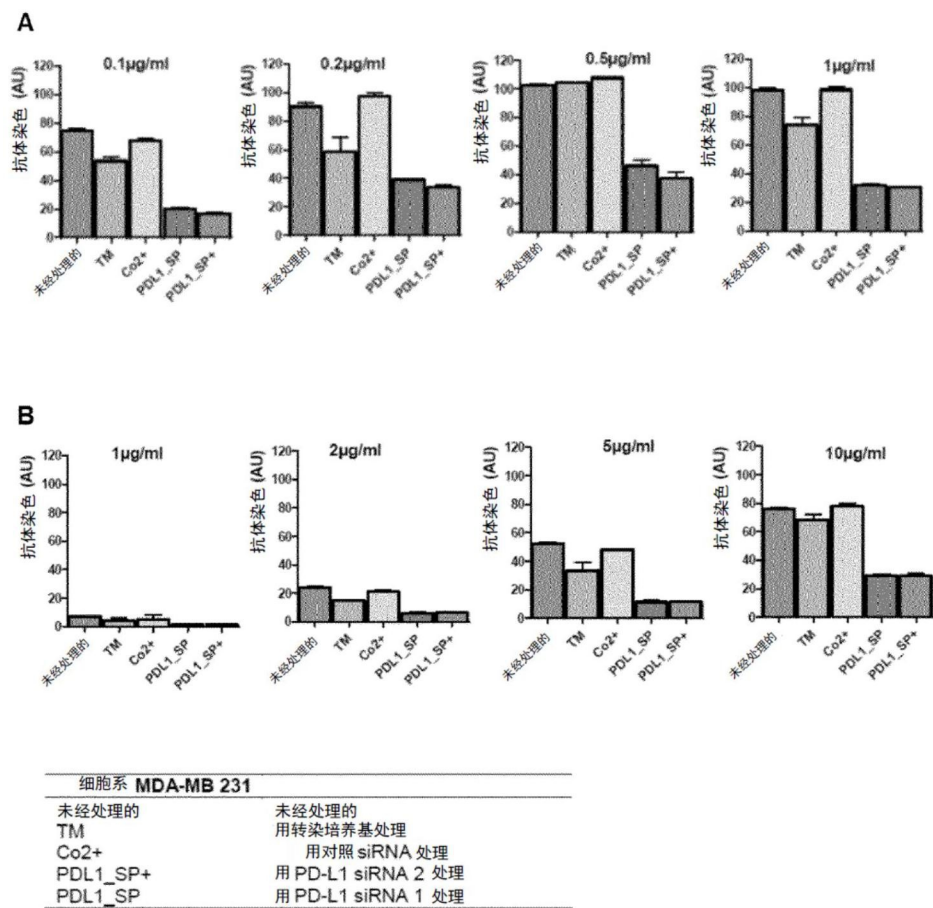


图3

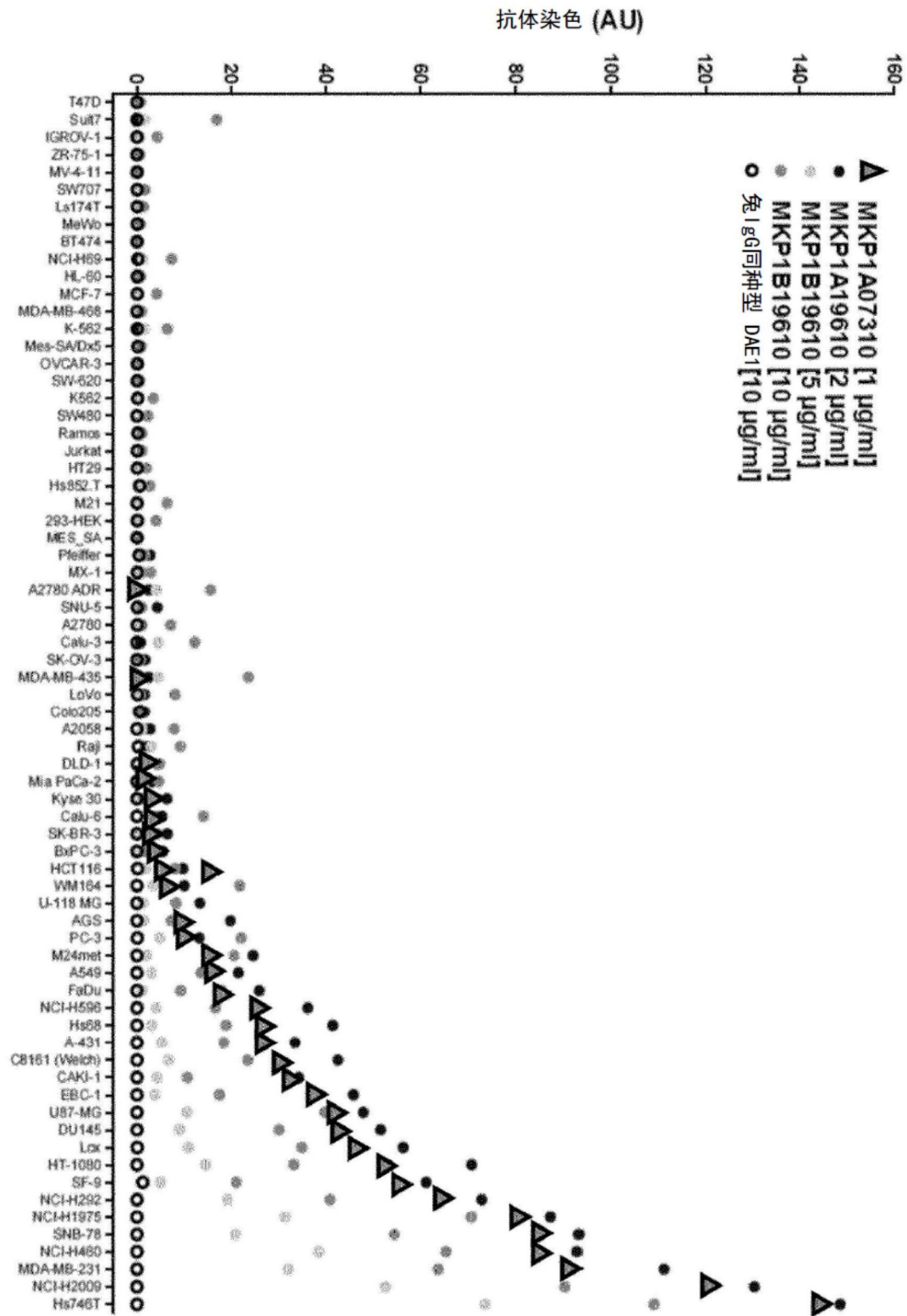


图4

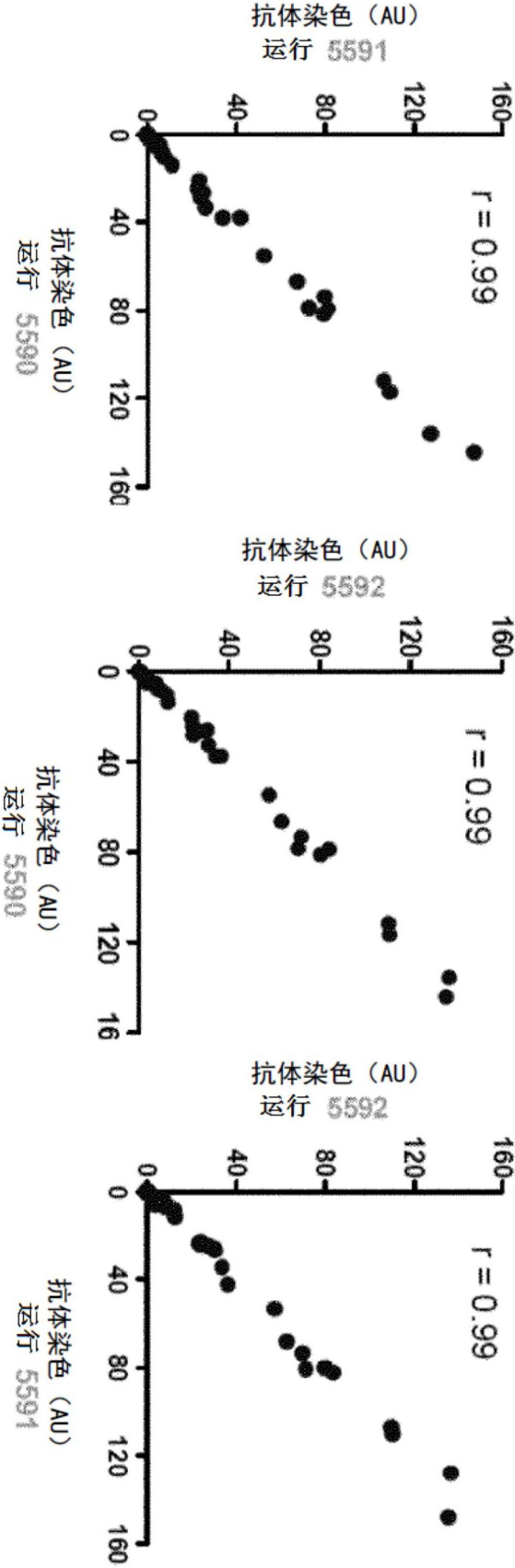


图5

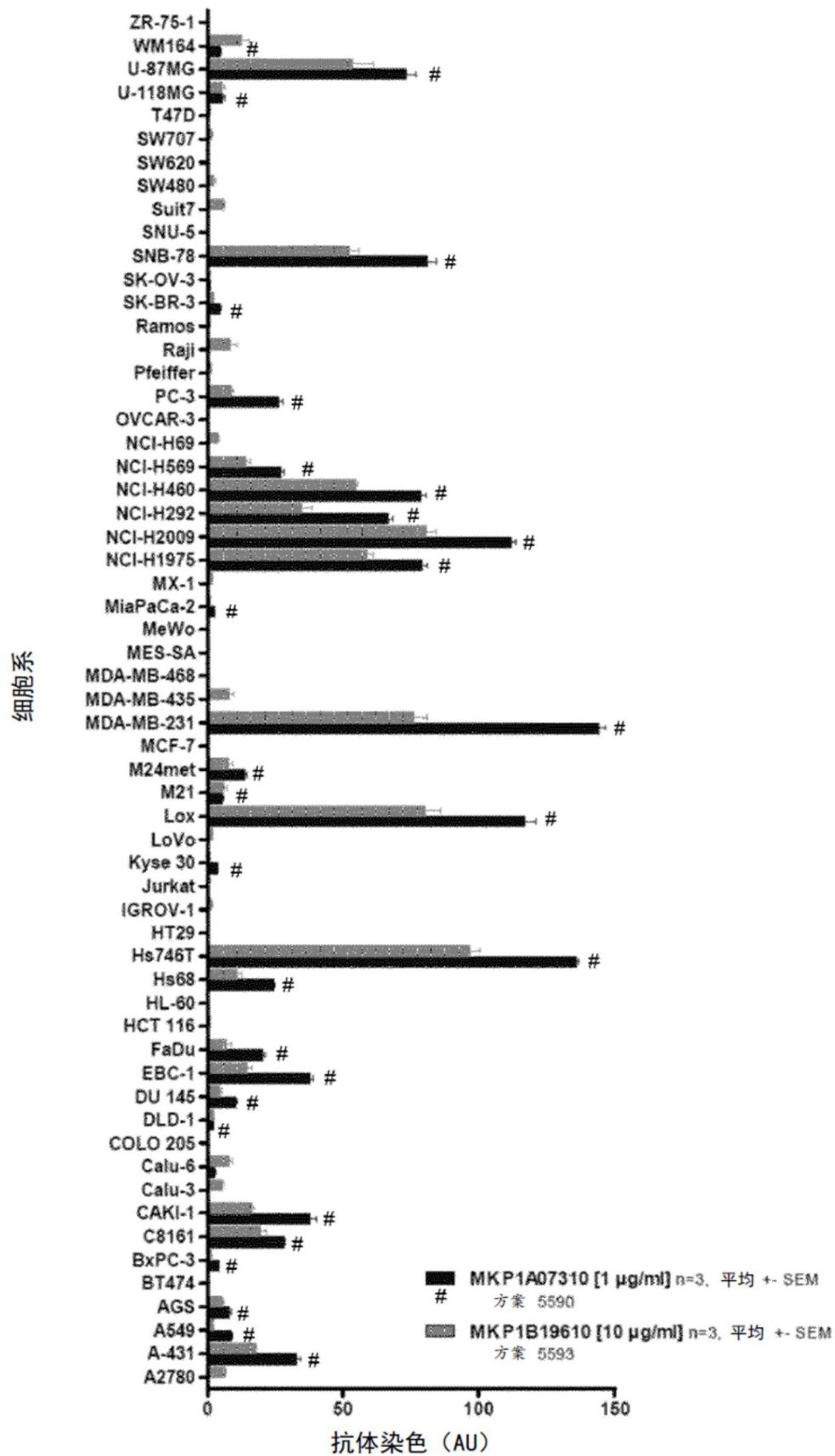


图6

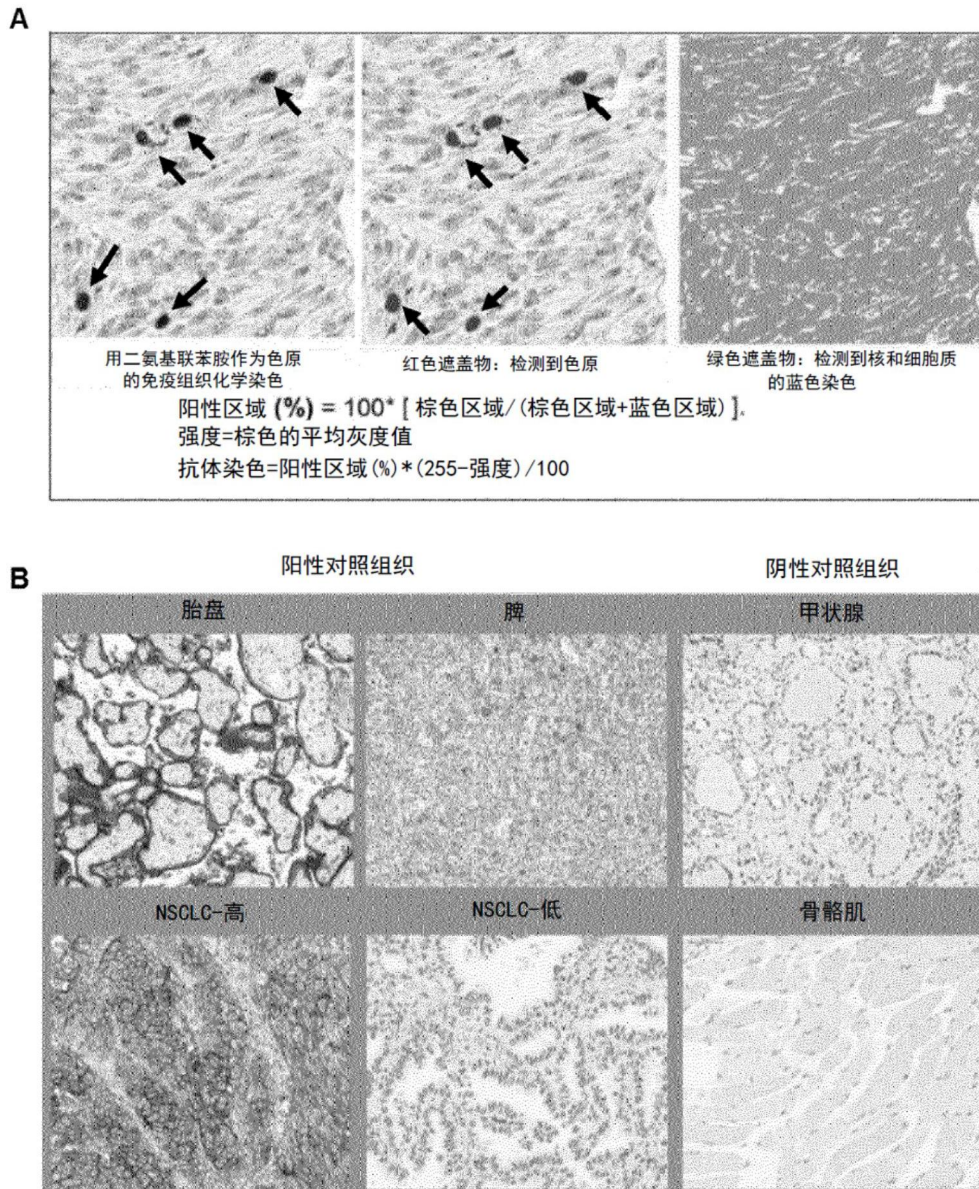


图7

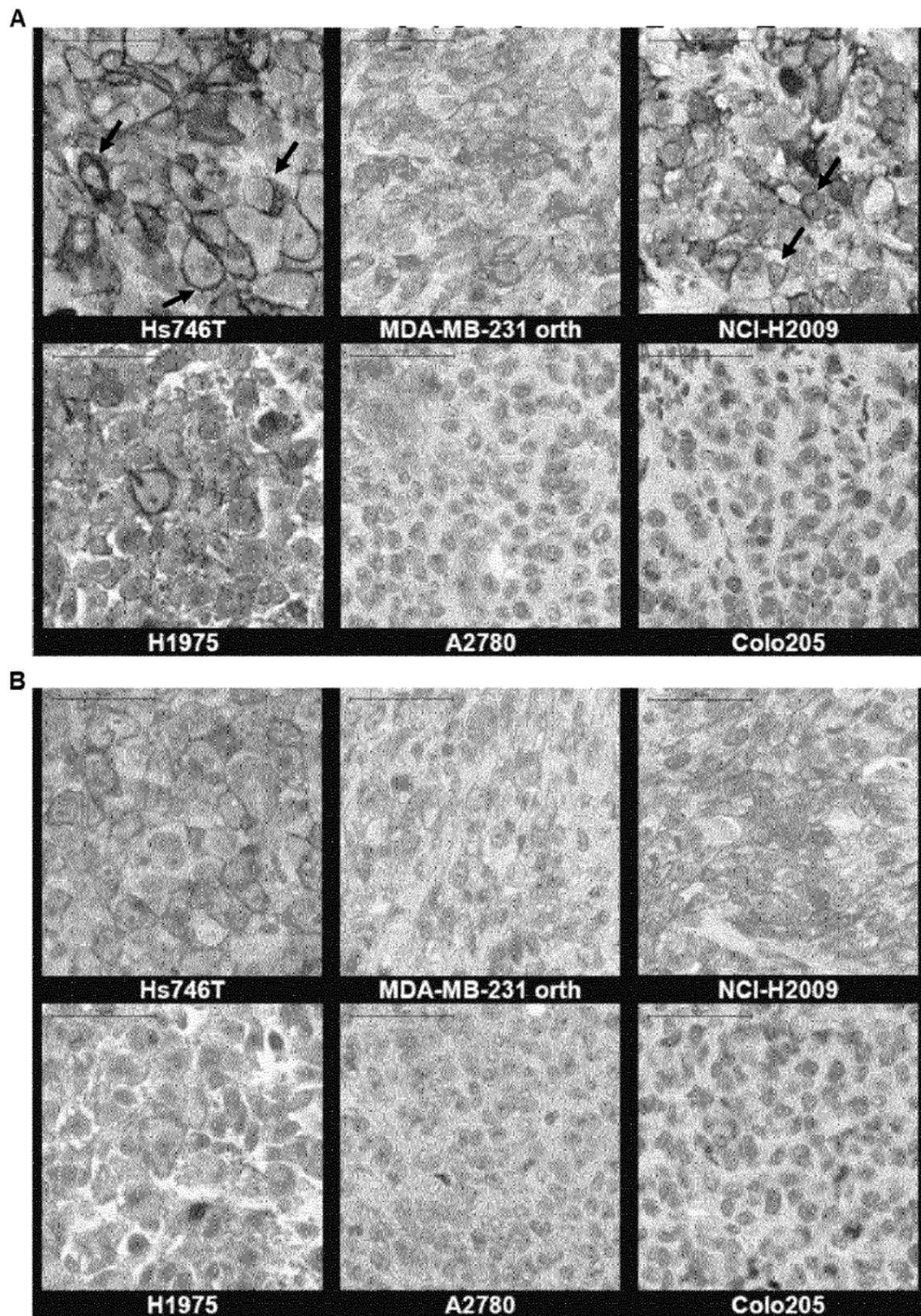


图8

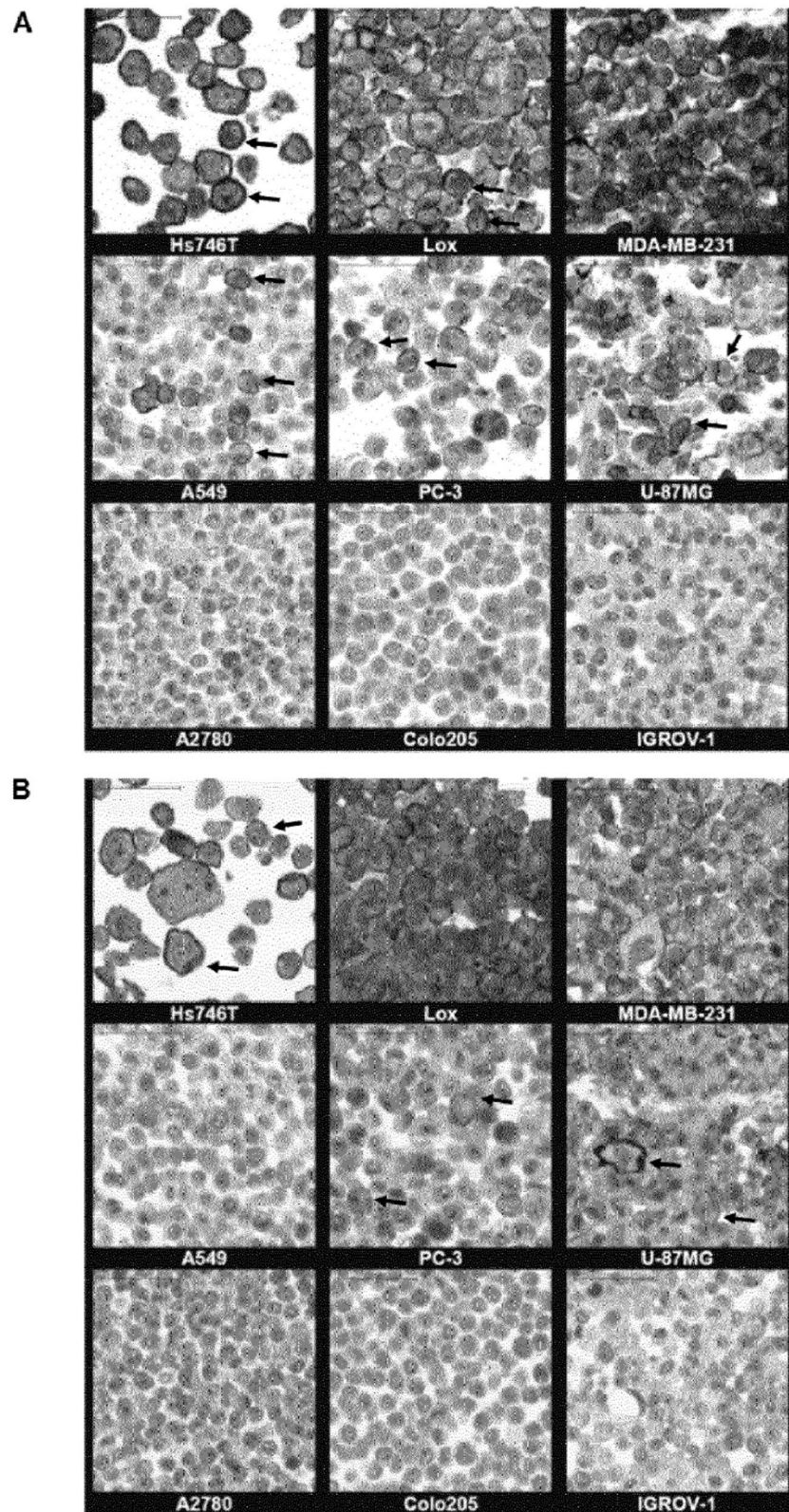


图9

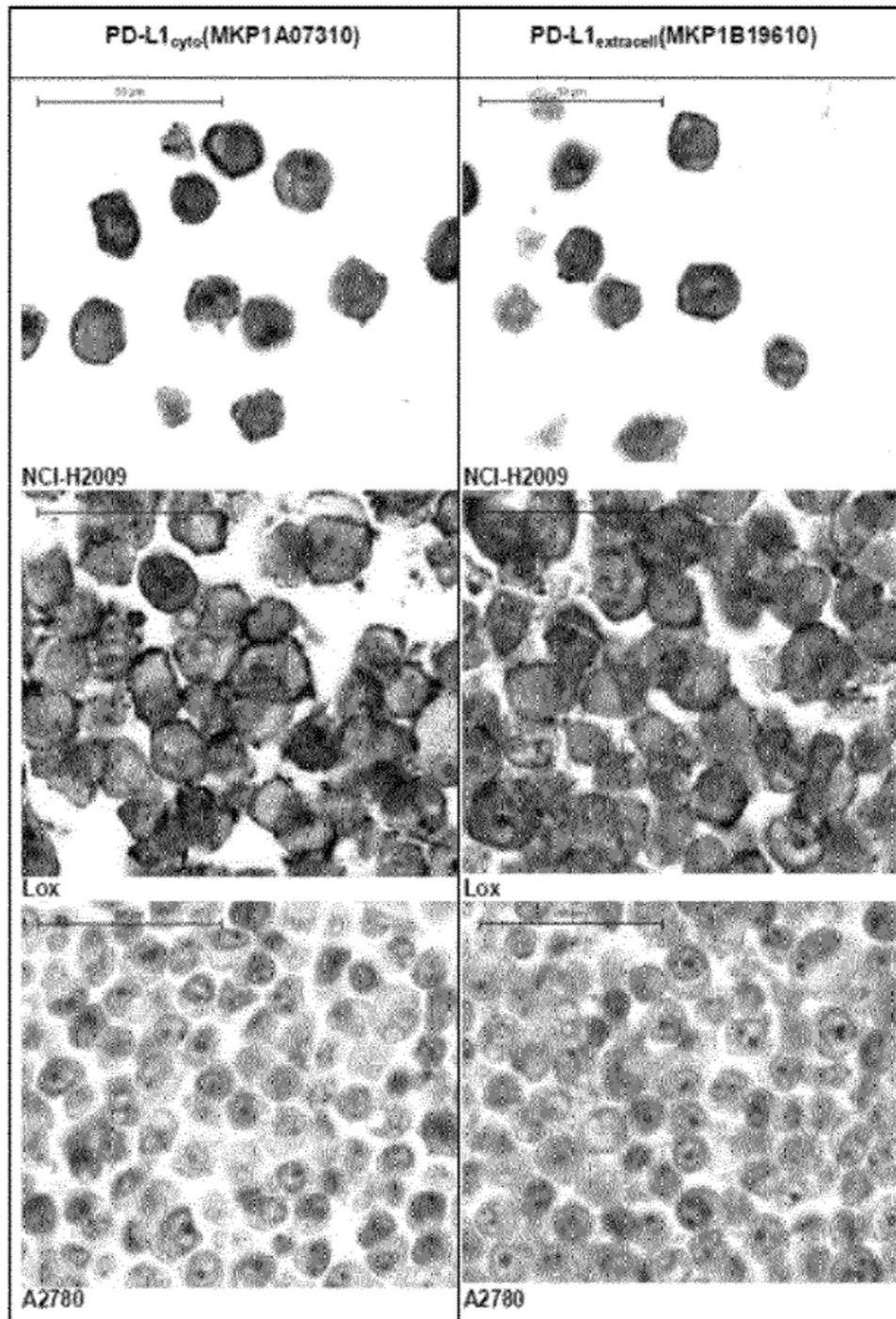


图10

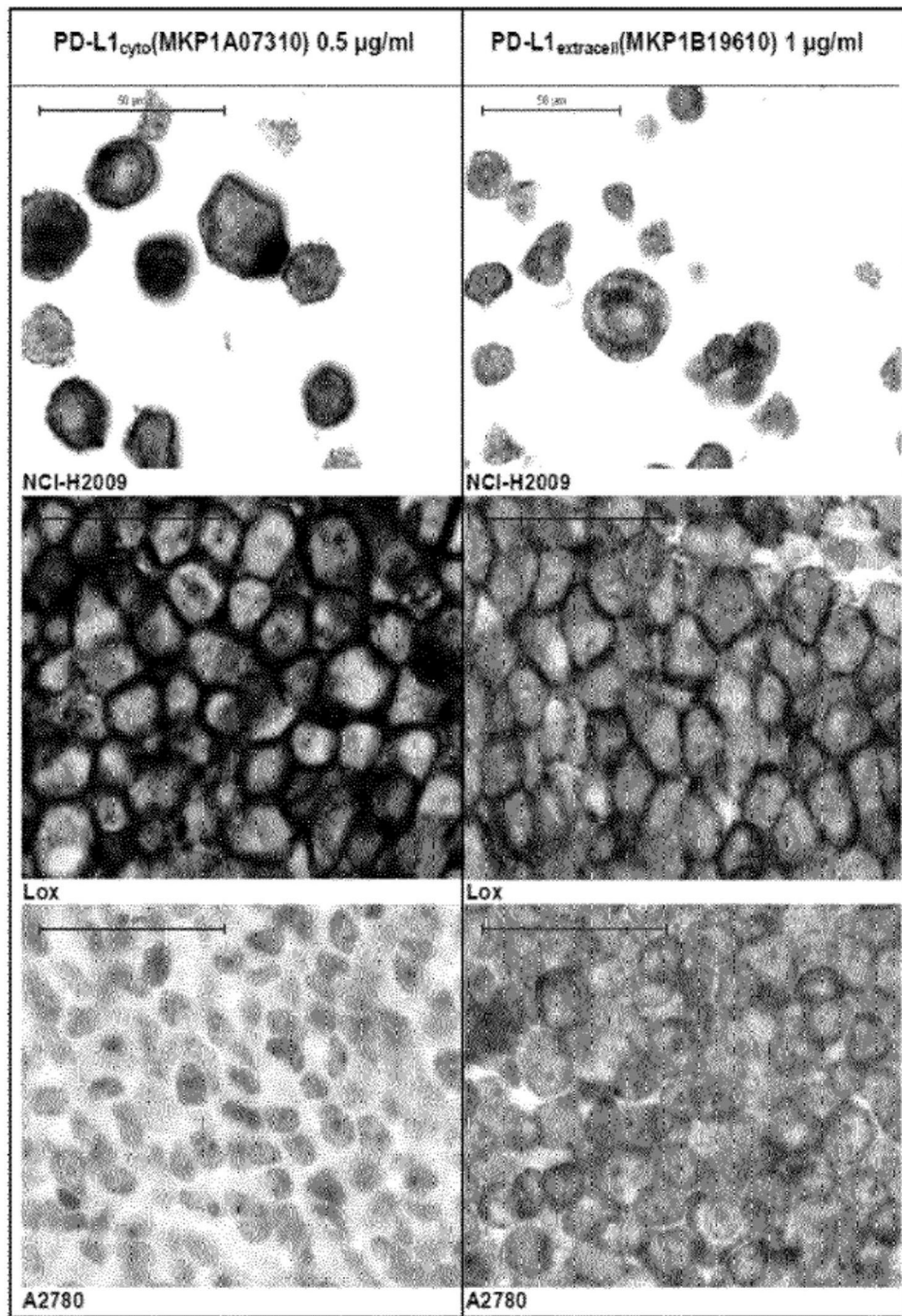


图11

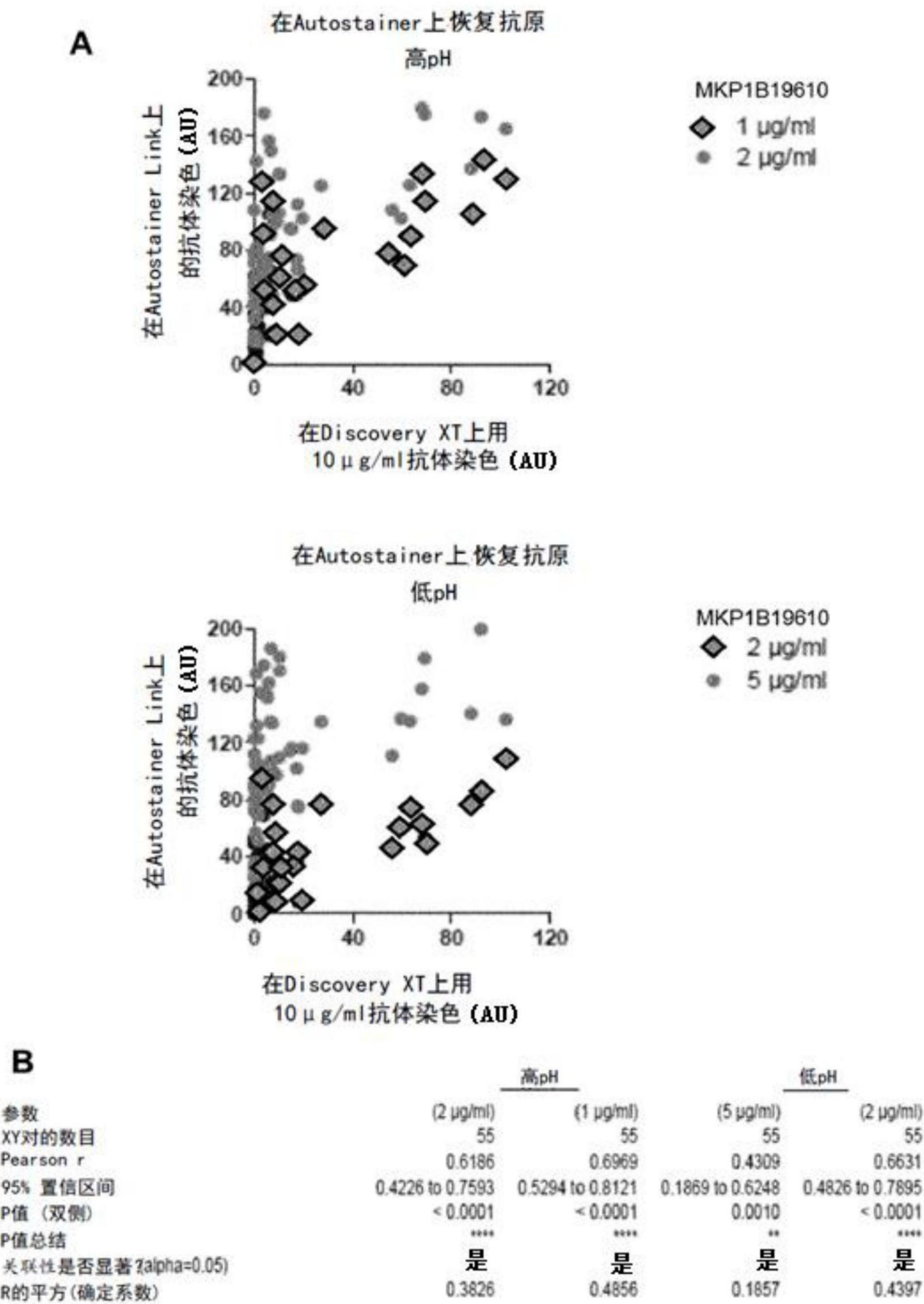


图12

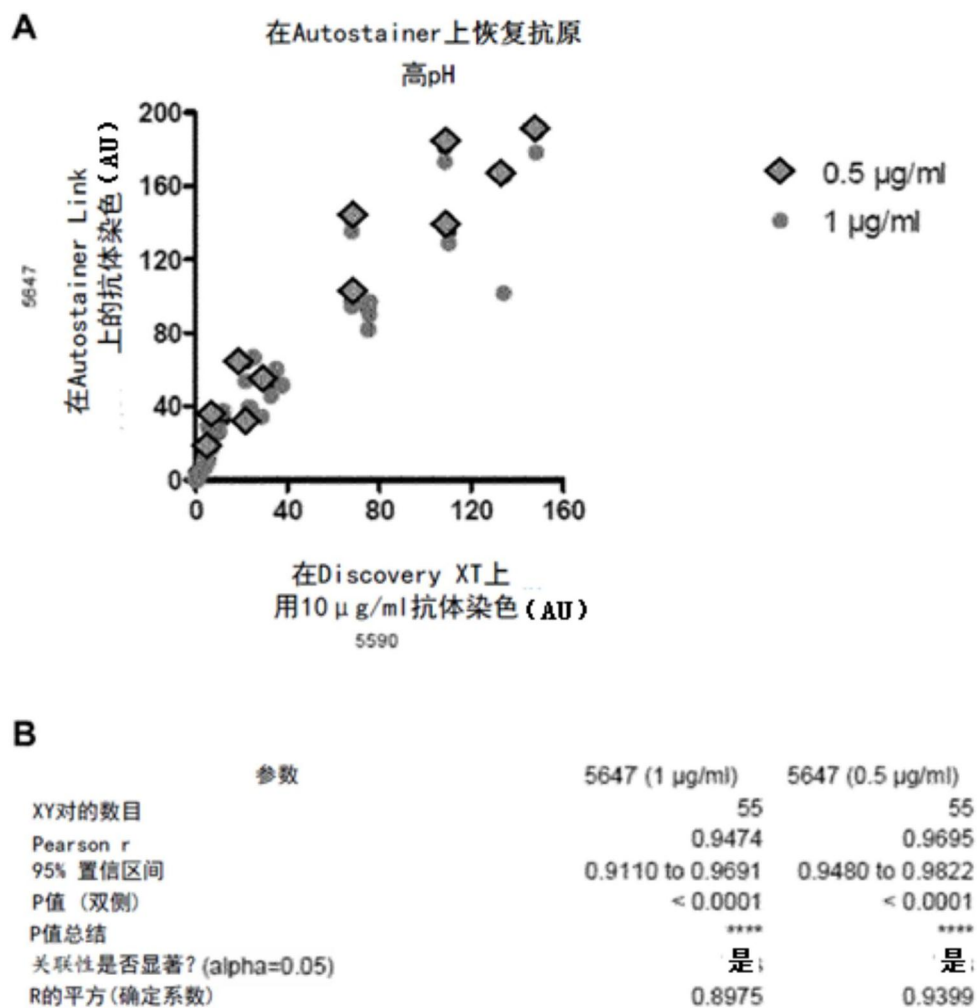


图13

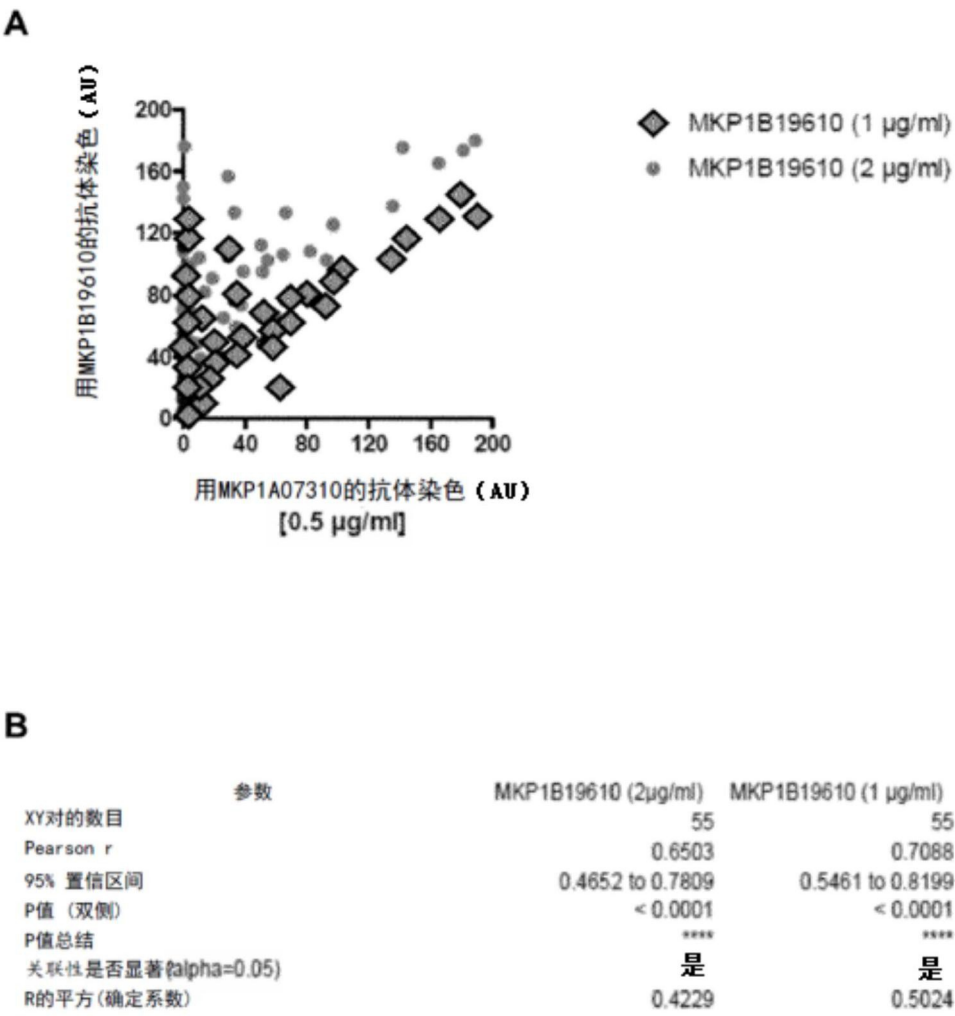


图14