



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111225926 B

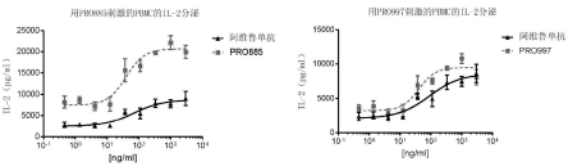
(45) 授权公告日 2025. 03. 14

(21) 申请号 201880065379.0
(22) 申请日 2018.10.09
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111225926 A
(43) 申请公布日 2020.06.02
(30) 优先权数据
 17195781.4 2017.10.10 EP
 18167094.4 2018.04.12 EP
 18180816.3 2018.06.29 EP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.04.07
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2018/077511 2018.10.09
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/072869 EN 2019.04.18
(73) 专利权人 努玛治疗有限公司
 地址 瑞士瓦登韦尔

(72) 发明人 迪·贡德 马蒂亚斯·布洛克
 克里斯蒂安·赫斯
 亚历山大·西莫南
(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
 11332
 专利代理师 刘明海 宁涛
(51) Int.Cl.
 C07K 16/28 (2006.01)
 C07K 16/18 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
(56) 对比文件
 CN 105408356 A, 2016.03.16
 CN 1753912 A, 2006.03.29
 审查员 王康

(54) 发明名称
 靶向PDL1的抗体及其使用方法

(57) 摘要
 本发明涉及一种特异性结合人PDL1的分离的抗体,及其药物组合物和使用方法。本发明还涉及编码所述抗体的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述核酸或所述载体的宿主细胞以及生产所述抗体的方法。



1. 对人PDL1具有结合特异性的抗体,其包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2, HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

其中所述抗体包含:

(a) 重链可变区,其由与选自SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列组成;

(b) 重链可变区,其由与SEQ ID NO:15组成的组的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列组成;或

(c) 重链可变区,其由与SEQ ID NO:16组成的组的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列组成。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含:重链可变区,其由与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列组成。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其包含:(a) SEQ ID NO:14的VH序列和SEQ ID NO:26的VL序列;或(b) SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:26的VL序列;或(c) SEQ ID NO:16的VH序列和SEQ ID NO:27的VL序列。

4. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体:

(i) 与人PDL1结合的解离常数通过表面等离子体共振测量小于100pM;

(ii) 与人PDL1结合的 K_{off} 速率通过表面等离子体共振测量为 $10^{-4}s^{-1}$ 或更低;

(iii) 与人PDL1结合的 K_{on} 速率通过表面等离子体共振测量为至少 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 或更高;

(iv) 与食蟹猴PDL1交叉反应,并且与食蟹猴PDL1结合的解离常数通过表面等离子体共振测量小于50pM;

(v) 不与小鼠PDL1交叉反应,通过表面等离子体共振测量;

(vi) 不与人PDL2结合,通过表面等离子体共振测量;

(vii) 具有中和PDL1/PD-1相互作用的能力,相对于阿维鲁单抗效力的效力在ELISA测定法中测量大于2;并且其中所述效力是在ELISA测定法中测量的以ng/mL为单位的阿维鲁单抗的 IC_{50} 值与在ELISA测定法中测量的以ng/mL为单位的所述抗体的 IC_{50} 值的比,其中所述抗体是scFv; (viii) 具有中和PDL1/PD-1相互作用的能力,相对于阿维鲁单抗效力的效力在NFAT报告基因测定法中测量大于2;并且其中所述效力是在NFAT报告基因测定法中测量的以ng/mL为单位的阿维鲁单抗的 IC_{50} 值与在NFAT报告基因测定法中测量的以ng/mL为单位的所述抗体的 IC_{50} 值的比,其中所述抗体是scFv;和

(ix) 具有中和PDL1/B7-1相互作用的能力,相对于阿维鲁单抗效力的效力在ELISA测定法中测量大于2;并且其中所述效力是在ELISA测定法中测量的以ng/mL为单位的阿维鲁单抗的 IC_{50} 值与在ELISA测定法中测量的以ng/mL为单位的所述抗体的 IC_{50} 值的比,其中所述抗体是scFv。

5. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体:

(i) 当为scFv形式时,其通过差示扫描荧光法测定的解链温度为至少60°C,其中将所述抗体配制在pH 6.4的具有150mM NaCl的50mM磷酸柠檬酸盐缓冲液中;

(ii) 当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在5个连续的冻融循环后,所述抗体的单体含量损失小于3%,其中将本发明的所述抗体配制在pH 6.4的具有150mM NaCl的50mM柠檬酸磷酸缓冲液中;和

(iii) 当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,在4℃下储存至少2周后,所述抗体的单体含量损失小于5%,其中将所述抗体配制在pH 6.4的具有150mM NaCl的50mM柠檬酸磷酸缓冲液中。

6. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体选自由以下组成的组:单克隆抗体、嵌合抗体、Fab、Fv、scFv、dsFv和scAb。

7. 根据权利要求6所述的抗体,其中所述抗体是scFv。

8. 根据权利要求7所述的抗体,其中所述scFv由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31。

9. 根据权利要求8所述的抗体,其中所述scFv由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成。

10. 一种药物组合物,其包含权利要求1至9中任一项所述的抗体,和药学上可接受的载体。

11. 根据权利要求1至9中任一项所述的抗体在制备用于治疗肺癌的药物中的用途。

12. 根据权利要求10所述的药物组合物在制备用于治疗肺癌的药物中的用途。

13. 一种核酸,其编码根据权利要求1至9中任一项所述的抗体。

14. 一种在体外生产根据权利要求1至9中任一项所述的抗体的方法,所述方法包括以下步骤:培养包含权利要求13所述的核酸的宿主细胞。

靶向PDL1的抗体及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种特异性结合人PDL1的分离的抗体,及其药物组合物和使用方法。本发明还涉及编码所述抗体的核酸、包含所述核酸的载体、包含所述核酸或所述载体的宿主细胞以及生产所述抗体的方法。

背景技术

[0002] PDL1 (CD274, B7-H1) 是40kDa的I型跨膜蛋白。PDL1是PD-1的表面糖蛋白配体,PD-1是由活化的T细胞和B细胞表达的关键免疫检查点受体,并介导免疫抑制。PDL1与慢性感染、妊娠、同种异体移植、自身免疫性疾病和癌症期间的免疫系统反应的抑制有关。在抗原呈递细胞和人类癌细胞,例如头颈部鳞状细胞癌、黑色素瘤和脑瘤、甲状腺、胸腺、食道、肺、乳腺、胃肠道、结肠直肠、肝脏、胰腺、肾脏、肾上腺皮质、膀胱、尿路上皮、卵巢和皮肤上,都发现了PDL1(Katsuya Y等人,Lung Cancer.88(2):154-159(2015);Nakanishi J等人,Cancer Immunol Immunother.56(8):1173-1182(2007);Nomi T等人,Clin Cancer Res.13(7):2151-2157(2007);Fay AP等人,J Immunother Cancer.3:3(2015);Strome SE等人,Cancer Res.63(19):6501-6505(2003);Jacobs JF等人Neuro Oncol.11(4):394-402(2009);Wilmotte R等人Neuroreport.16(10):1081-1085(2005))。PDL1在正常组织中很少表达,但在肿瘤部位可诱导表达(Dong H等人,Nat Med.8(8):793-800(2002);Wang等人,Onco Targets Ther.9:5023-5039(2016))。PDL1通过与PD-1结合而下调T细胞活化和细胞因子分泌(Freeman等人,2000;Latchman等人,2001)。由PDL1激活的PD-1可能为肿瘤的发展和生长提供免疫耐受的环境。PDL1还通过与另一种受体B7.1 (B7-1, CD80) 相互作用来负调节T细胞功能。

[0003] PDL1/PD-1相互作用的抑制能够提供有效的抗肿瘤活性。已知多种抗PDL1的抗体(例如,参见WO 2013/079174和WO 2017/118321),并且许多破坏PD-1信号传导的抗体已进入临床开发阶段。这些抗体属于以下两个主要类别:靶向PD-1的抗体(nivolumab, Bristol-Myers Squibb; pembrolizumab, Merck, Whitehouse Station, NJ; pidilizumab, CureTech, Yavne, Israel)和靶向PDL1的抗体(MPDL3280A, Genentech, South San Francisco, CA; MEDI4736, MedImmune/AstraZeneca; BMS-936559, Bristol-Myers Squibb; MSB0010718C, EMD Serono, Rockland, MA) (参见Postow MA等人,J Clin Oncol. Jun 10;33(17):1974-82(2015))。靶向PDL1与靶向PD-1可能导致不同的生物学效应。PD-1抗体可防止PD-1与它的两个配体PDL1和PDL2相互作用。尽管PD-1与PDL2相互作用的影响仍然未知,但PDL1抗体不会阻止PD-1与PDL2相互作用。然而,PDL1抗体不仅会阻止PDL1与PD-1的相互作用,还会阻止与B7-1的相互作用(Butte MJ等人,Immunity 27:111-122, (2007)),这被认为会对T细胞产生负信号。阻断PDL1已显示出令人鼓舞的早期数据,目前正在测试四种临床抗PDL1 mAb: atezolizumab和MEDI4736(均为IgG1的Fc空变体)、MSB001078C (IgG1) 和BMS-936559 (IgG4) (Chester C.等人,Cancer Immunol Immunother Oct;65(10):1243-8(2016))。

[0004] 迄今为止,还没有证明令人满意的方法能够在癌症患者中诱导有效的免疫反应。

在该领域中需要创造改善的PDL1/PD-1相互作用的治疗调节剂和方法以克服癌症患者中观察到的免疫抑制机制。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种抗体,其与人PDL1蛋白特异性结合,并且具有用于治疗的有益性质,例如更高的亲和力、改善的功效和改善的生物物理性质,例如溶解性、可开发性(developability)和稳定性。

[0006] 一方面,本发明涉及一种新型PDL1抗体。

[0007] 一方面,本发明涉及一种药物组合物,其包含本发明的抗体和药学上可接受的载体。

[0008] 另一方面,本发明涉及用作药物的本发明的抗体或本发明的组合物。

[0009] 一方面,本发明涉及用于治疗有此需要的受试者的癌症的本发明的抗体或本发明的组合物。

[0010] 一方面,本发明涉及本发明的抗体或本发明的组合物在制备用于治疗有此需要的受试者中的癌症的药物中的用途。

[0011] 另一方面,本发明涉及一种治疗有此需要的受试者中的癌症的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本发明的抗体或本发明的组合物。

[0012] 另一方面,本发明涉及编码本发明的抗体的核酸。另一方面,本发明涉及包含所述核酸的载体。另一方面,本发明涉及包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。

[0013] 另一方面,本发明涉及一种生产本发明的抗体的方法,该方法包括以下步骤:培养包含本发明的核酸或载体的宿主细胞。

[0014] 分别单独地或组合地在以下各项中概述的本发明的方面、有利特征和优选实施方案进一步有助于解决本发明的目的:

[0015] 1. 对人PDL1具有结合特异性的分离的抗体,其包含: (a) 重链可变区CDR1,其包含选自SEQ ID NO:1、4、5、8、11、32、35、36、39和42中任意之一,优选SEQ ID NO:1或32,更优选SEQ ID NO:1的氨基酸序列,优选由其组成; (b) 重链可变区CDR2,其包含选自SEQ ID NO:2、6、9、12、33、37、40和43中任意之一,优选SEQ ID NO:2或33,更优选SEQ ID NO:2的氨基酸序列,优选由其组成; (c) 重链可变区CDR3,其包含选自SEQ ID NO:3、7、10、13、34、38、41和44中任意之一,优选SEQ ID NO:3或34,更优选SEQ ID NO:3的氨基酸序列,优选由其组成; (d) 轻链可变区CDR1,其包含选自SEQ ID NO:17、20、23、48、51和54中任意之一,优选SEQ ID NO:17或48,更优选SEQ ID NO:17的氨基酸序列,优选由其组成; (e) 轻链可变区CDR2,其包含选自SEQ ID NO:18、21、24、49、52和55中任意之一,优选SEQ ID NO:18或49,更优选SEQ ID NO:18的氨基酸序列,优选由其组成; 和 (f) 轻链可变区CDR3,其包含选自SEQ ID NO:19、22、25、50、53和56中任意之一,优选SEQ ID NO:19或50,更优选SEQ ID NO:19的氨基酸序列,优选由其组成。

[0016] 2. 根据项目1所述的抗体,其中所述抗体包含: (a) 分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; (b) 分别为SEQ ID NO:4、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; (c) 分别为SEQ ID NO:5、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,

以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; (d) 分别为SEQ ID NO:8、9和10的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; (e) 分别为SEQ ID NO:11、12和13的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:23、24和25的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; (f) 分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; (g) 分别为SEQ ID NO:35、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; (h) 分别为SEQ ID NO:36、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; (f) 分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列; (j) 分别为SEQ ID NO:42、43和44的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:54、55和56的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0017] 3. 根据项目1所述的抗体,包含: (a) HCDR1, 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列, 优选由其组成; (b) HCDR2, 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列, 优选由其组成; (c) HCDR3, 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列, 优选由其组成; (d) LCDR1, 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列, 优选由其组成; (e) LCDR2, 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列, 优选由其组成; 和 (f) LCDR3, 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列, 优选由其组成。

[0018] 4. 根据项目1所述的抗体, 包含: (a) HCDR1, 包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列, 优选由其组成; (b) HCDR2, 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列, 优选由其组成; (c) HCDR3, 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列, 优选由其组成; (d) LCDR1, 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列, 优选由其组成; (e) LCDR2, 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列, 优选由其组成; 和 (f) LCDR3, 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列, 优选由其组成。

[0019] 5. 根据项目1所述的抗体, 包含: (a) HCDR1, 包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列, 优选由其组成; (b) HCDR2, 包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列, 优选由其组成; (c) HCDR3, 包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列, 优选由其组成; (d) LCDR1, 包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列, 优选由其组成; (e) LCDR2, 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列, 优选由其组成; 和 (f) LCDR3, 包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列, 优选由其组成。

[0020] 6. 根据项目1所述的抗体, 包含: (a) HCDR1, 包含SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36的氨基酸序列, 优选由其组成; (b) HCDR2, 包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列, 优选由其组成; (c) HCDR3, 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列, 优选由其组成; (d) LCDR1, 包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列, 优选由其组成; (e) LCDR2, 包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列, 优选由其组成; 和 (f) LCDR3, 包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列, 优选由其组成。

[0021] 7. 根据前述项目中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含: 重链可变区 (VH), 其中所述VH为VH1、VH3或VH4, 优选VH3或VH4, 更优选VH3。

[0022] 8. 根据前述项目中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含: 轻链可变区 (VL), 其中所述VL包含V κ 框架FR1、FR2和FR3, 特别是V κ 1或V κ 3 FR1至FR3, 优选V κ 1 FR1至FR3, 以及框架FR4, 所述框架FR4选自V κ FR4, 特别是V κ 1 FR4、V κ 3 FR4和V λ FR4, 特别是包含与选自SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70中任意之一的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4, 优选如SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70中任意之一所示的V λ FR4, 优选如SEQ ID NO:64或65所示的V λ FR4, 更优选如SEQ ID NO:64所示的V λ FR4。

[0023] 9. 根据前述项目中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含: 重链可变区, 其包含与选自SEQ ID NO: 14、15、16、45、46和47组成的组, 优选SEQ ID NO: 14或16, 更优选SEQ ID NO: 16的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与选自SEQ ID NO: 126、27、57和58组成的组, 优选SEQ ID NO: 26或27, 更优选SEQ ID NO: 27的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0024] 10. 根据前述项目中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含: (a) 重链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 14至少90%相同的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 26至少90%相同的氨基酸序列; (b) 重链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 15至少90%相同的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 26至少90%相同的氨基酸序列; (c) 重链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 16至少90%相同的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 27至少90%相同的氨基酸序列; (d) 重链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 45至少90%相同的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 57至少90%相同的氨基酸序列; (f) 重链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 46至少90%相同的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 58至少90%相同的氨基酸序列; (g) 重链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 47至少90%相同的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 57至少90%相同的氨基酸序列;

[0025] 11. 根据前述项目中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含: 重链可变区, 其包含选自SEQ ID NO: 14、15、16、45、46和47中任意之一, 优选SEQ ID NO: 14或16, 更优选SEQ ID NO: 16的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含选自SEQ ID NO: 26、27、57和58中任意之一, 优选SEQ ID NO: 26或27, 更优选SEQ ID NO: 27的氨基酸序列。

[0026] 12. 根据前述项目中任一项所述的抗体, 其包含: (a) SEQ ID NO: 14的VH序列和SEQ ID NO: 26的VL序列; (b) SEQ ID NO: 15的VH序列和SEQ ID NO: 26的VL序列; (c) SEQ ID NO: 16的VH序列和SEQ ID NO: 27的VL; (d) SEQ ID NO: 45的VH序列和SEQ ID NO: 57的VL序列; (f) SEQ ID NO: 46的VH序列和SEQ ID NO: 58的VL序列; 或 (g) SEQ ID NO: 47的VH序列和SEQ ID NO: 57的VL序列。

[0027] 13. 根据前述项目中任一项所述的抗体, 其中所述抗体:

[0028] (i) 与人PDL1结合的解离常数 (KD) 小于5nM, 特别是小于1nM, 特别是小于500pM, 更特别是小于100pM, 优选小于50pM, 更优选小于10pM, 如通过表面等离子体共振 (SPR) 所测量的, 特别地, 其中所述抗体是scFv (单价亲和力);

[0029] (ii) 与人PDL1结合的 K_{off} 速率为 $10^{-3}s^{-1}$ 或更低, 或 $10^{-4}s^{-1}$ 或更低, 或 $10^{-5}s^{-1}$ 或更低, 如通过SPR所测量的, 特别地, 其中所述抗体是scFv;

[0030] (iii) 与人PDL1结合的 K_{on} 速率为至少 $10^3M^{-1}s^{-1}$ 或更高, 至少 $10^4M^{-1}s^{-1}$ 或更高, 至少 $10^5M^{-1}s^{-1}$ 或更高, 至少 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 或更高, 如通过SPR所测量的, 特别地, 其中所述抗体是scFv;

[0031] (iv) 与食蟹猴 (食蟹猴) PDL1交叉反应, 特别是与食蟹猴PDL1结合的KD小于5nM, 特别是小于1nM, 特别是小于500pM, 更特别是小于100pM, 优选小于10pM, 如通过SPR所测量的, 特别地, 其中所述抗体是scFv;

[0032] (v) 不与小家鼠PDL1交叉反应, 特别是如通过SPR所测量的; 和/或

[0033] (vi) 不与人PDL2结合, 特别是如通过SPR所测量的。

[0034] 14. 根据前述项目中任一项所述的抗体,其中所述抗体具有以下特征:

[0035] (i) 具有中和PDL1/PD-1相互作用的能力,相对于阿维鲁单抗(avelumab)效力的效力(相对效力)(在ELISA测定法中测量的)大于1.5,例如大于2,大于2.5,优选大于3,更优选大于4;并且其中所述相对效力是阿维鲁单抗的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在ELISA测定法中所测量的)与所述抗体的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在ELISA测定法中所测量的)的比,特别地,其中所述抗体是scFv;和/或

[0036] (ii) 任选地,具有中和PDL1/PD-1相互作用的能力,相对于阿维鲁单抗效力的效力(相对效力)(在NFAT报告基因测定法中测量的)大于1.5,例如大于2,大于2.5,优选大于3,更优选大于4;并且其中所述相对效力是阿维鲁单抗的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在NFAT报告基因测定法中所测量的)与所述抗体的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在NFAT报告基因测定法中所测量的)的比,特别地,其中所述抗体是scFv;和/或

[0037] (iii) 具有中和PDL1/B7-1相互作用的能力,相对于阿维鲁单抗效力的效力(相对效力)(在ELISA测定法中测量的)大于1.5,例如大于2,大于2.5,优选大于3,更优选大于4;并且其中所述相对效力是阿维鲁单抗的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在ELISA测定法中所测量的)与所述抗体的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在ELISA测定法中所测量的)的比,特别地,其中所述抗体是scFv。

[0038] 15. 根据前述项目中任一项所述的抗体,其中所述抗体:

[0039] (i) 当为scFv形式时,其解链温度(T_m)(通过差示扫描荧光法测定)为至少60°C,优选至少65°C,更优选至少70°C,特别地,其中将所述抗体配制在pH 6.4、150mM NaCl的50mM磷酸柠檬酸盐缓冲液中;

[0040] (ii) 当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,并且特别地,其中将所述抗体配制在pH 6.4的具有150mM NaCl的50mM柠檬酸磷酸缓冲液中,在5个连续的冻融循环后,所述抗体的单体含量损失小于5%,优选小于3%,更优选小于1%;和/或

[0041] (iii) 当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,并且特别地,其中将所述抗体配制在pH 6.4的具有150mM NaCl的50mM柠檬酸磷酸缓冲液中,在4°C下储存至少2周,特别是至少4周后,所述抗体的单体含量损失小于15%,例如小于12%,小于10%,小于7%,小于5%,小于4%,小于3%,小于2%,优选小于1%。

[0042] 16. 根据前述项目中任一项所述的抗体,其中所述抗体选自由以下组成的组:单克隆抗体、嵌合抗体、Fab、Fv、scFv、dsFv、scAb和基于其他支架的结合结构域,包括但不限于基于锚蛋白的结构域、fynomer、avimer、anticalin、纤连蛋白和构建在抗体恒定区中的结合位点(例如F-star的Modular Antibody Technology™)。

[0043] 17. 根据前述项目中任一项所述的抗体,其中所述抗体是单链可变片段(scFv)或Fv。

[0044] 18. 根据项目17所述的抗体,其中所述scFv具有选自由SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62组成的组,优选SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:31,更优选SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

[0045] 19. 根据项目16所述的抗体,其中所述抗体是选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的IgG,优选地,其中所述抗体是IgG1。

[0046] 20. 根据前述项目中任一项所述的抗体,其中所述抗体是嵌合的或人源化的。

- [0047] 21.一种抗体,其结合与项目1至20中任一项所述的抗体基本相同的表位。
- [0048] 22.根据前述项目中任一项所述的抗体,其是多特异性分子,特别是具有至少第二功能分子的多特异性分子。
- [0049] 23.项目22所述的抗体,其中所述抗体的形式选自由以下组成的组:单链双抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚体scDb(LD-scDb)、环状二聚体scDb(CD-scDb)、双特异性T细胞接合子(BiTE;串联双-scFv)、串联三-scFv、三抗体(Fab-(scFv)₂)或双抗体(Fab-(scFv)₁)、Fab、Fab-Fv2、Morrison(IgG-CH3-scFv融合体(Morrison L)或IgG-CL-scFv融合体(Morrison H))、三抗体、scDb-scFv、双特异性Fab2、双微抗体、四抗体、scFv-Fc-scFv融合体、scFv-HSA-scFv融合体、双双抗体、DVD-Ig、COVD、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv2-Fc、IgG-scFv融合体例如bsAb(与轻链的C-末端连接的scFv)、Bs1Ab(与轻链的N-末端连接的scFv)、Bs2Ab(与重链的N-末端连接的scFv)、Bs3Ab(与重链的C-末端连接的scFv)、Ts1Ab(与重链和轻链的N-末端连接的scFv)、Ts2Ab(与重链的C-末端连接的dsscFv)、基于异二聚体Fc结构域的双特异性抗体例如Knob-into-Hole抗体(KiH);与异二聚体Fc结构域或任何其他异二聚体结构域的任意一条链的N-和/或C-末端融合的Fv、scFv、scDb、串联双-scFv、串联三-scFv、Fab-(scFv)₂、Fab-(scFv)₁、Fab、Fab-Fv2、COVD;MATCH和DuoBody。
- [0050] 24.一种药物组合物,其包含项目1至23中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。
- [0051] 25.项目1至23中任一项所述的抗体,或项目24所述的组合物,其用作药物。
- [0052] 26.项目1至23中任一项所述的抗体,或项目24所述的组合物,其用于治疗有此需要的受试者的癌症。
- [0053] 27.项目1至23中任一项所述的抗体或项目24所述的组合物治疗有此需要的受试者的癌症的用途。
- [0054] 28.项目1至23中任一项所述的抗体或项目24所述的组合物在制备用于治疗有此需要的受试者的癌症的药物中的用途。
- [0055] 29.一种治疗有此需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1至23中任一项所述的抗体或项目24所述的组合物。
- [0056] 30.一种核酸,其编码项目1至23中任一项所述的抗体。
- [0057] 31.一种载体,其包含项目31的核酸。
- [0058] 32.一种宿主细胞,其包含项目31所述的核酸或项目32所述的载体。
- [0059] 33.一种生产项目1至23中任一项所述的抗体的方法,所述方法包括以下步骤:培养包含项目31所述的核酸或项目31所述的载体的宿主细胞。
- [0060] 34.一种试剂盒,其包含项目1至23中任一项所述的抗体,或项目24所述的组合物。

附图说明

[0061] 图1与PDL1具有最佳亲和力的兔IgG克隆对PDL1/PD-1相互作用的中和。通过ELISA测量的吸光度表示为33-03-G02(A)或37-20-B03(B)分子浓度(单位为ng/ml)的函数。阿维鲁单抗用作参考。

[0062] 图2与PDL1具有最佳亲和力的选择的兔IgG克隆33-03-G02(A)和37-20-B03(B)对

PDL1/PD-1相互作用的中和。通过ELISA测量的吸光度表示为分子浓度(单位为ng/ml)的函数。阿维鲁单抗用作参考。

[0063] 图3基于细胞的报告基因测定中,与PDL1具有最佳亲和力的选择的兔IgG克隆对PDL1/PD-1相互作用的中和。与测定中获得的发光信号成比例的%抑制表示为分子浓度(单位为ng/ml)的函数。阿维鲁单抗用作参考。

[0064] 图4图4A示出了在NFAT-荧光素酶报告基因测定中,CDR集和框架选择对PDL1/PD-1相互作用的中和的影响。与测定中获得的发光信号成比例的%抑制表示为scFvs浓度(单位为ng/ml)的函数。阿维鲁单抗用作参考。图4B示出了在NFAT-荧光素酶报道基因测定中,结构域优化对PDL1/PD-1相互作用的中和效力的影响。与测定中获得的发光信号成比例的%抑制表示为scDbs浓度(单位为ng/ml)的函数。阿维鲁单抗用作参考。

[0065] 图5在报告基因分析中,在重组人血清白蛋白的存在下,scDb-scFvs PR0963和PR01057 (A)、PR01186和PR01430 (B)、PR01431和PR01432 (C)、PR01473 (D)、PR01476 (E)、PR01479 (F)和PR01482 (G)对PDL1/PD-1相互作用的中和效力。与测定中获得的发光信号成比例的%抑制表示为分子浓度(单位为ng/ml)的函数。阿维鲁单抗用作参考。

[0066] 图6在NFAT-荧光素酶报告基因测定中,二价分子的效力以及Morrison形式的LC或HC scFv融合体对PDL1/PD-1相互作用的中和效力的影响。与测定中获得的发光信号成比例的%抑制表示为分子浓度(单位为ng/ml)的函数。阿维鲁单抗用作参考。

[0067] 图7PD-1/PDL1竞争ELISA。所有分子均有效地阻断PD-1与PDL1之间的相互作用,IC₅₀值与参考IgG阿维鲁单抗相似或更小。

[0068] 图8 B7-1/PDL1竞争ELISA。与阿维鲁单抗相似,所有分子均有效地阻断B7-1与PDL1之间的相互作用。

[0069] 图9离体T细胞活化测定。将PBMC用10ng/ml SEA刺激,并用连续稀释的scFv PR0997或scDb PR0885处理96小时。通过ELISA定量收获的上清液中的IL-2来评估T细胞的活化。用PR0885和PR0997处理导致明显的IL-2分泌。PR0997显示出比阿维鲁单抗更高的效力。与阿维鲁单抗相比,PR0885的效应量(effect size)大大增加。使用S形曲线4PL拟合(GraphPad Prism)拟合数据。

[0070] 图10使用免疫缺陷型NOG小鼠品系和同种异体人外周血单核细胞(hPBMC)在人HCC827 NSCLC异种移植中进行抗PDL1 IgG1 (PR01137)治疗的抗肿瘤活性。在第0、3、7和10天用抗PDL1 IgG1 (PR01137)或溶媒静脉注射处理小鼠。每周两次测量肿瘤体积,直到在第17和18天处死小鼠。将肿瘤体积相对于治疗开始时的肿瘤体积标准化(相对肿瘤体积)。(A)用来自两个供体的PBMC重建的小鼠的平均相对肿瘤体积(每组n=8只小鼠)。虚线表示治疗时间。(B)用来自供体B的PBMC重建的小鼠的平均相对肿瘤体积(每组n=4只小鼠)。(C)用来自两个供体的PBMC重建的小鼠的个体相对肿瘤体积。每个符号代表同一治疗组内的单个动物。(D)用来自供体B的PBMC重建的小鼠的个体相对肿瘤体积。每个符号代表同一治疗组内的单个动物。

[0071] 图11hPBMC替代的NOG小鼠中的HCC827异种移植。用抗PDL1 IgG1 (PR01137)治疗后,HCC827攻击的NOG小鼠的体重。每周两次测量体重,直到在第17和18天处死小鼠。将体重相对于治疗开始时的体重标准化(相对体重)。

[0072] 图12抗PDL1 IgG1 (PR01196)在NOG小鼠的人HCC827 NSCLC异种移植中的抗肿瘤

功效的评估,其中该NOG小鼠植入了人脐带血来源的CD34+造血干细胞(UCB HSC)。将PR01196(0.1mg)的抗肿瘤活性与阿维鲁单抗(0.1mg)或溶媒治疗(palivizumab,0.1mg)进行了比较。在第0、5、10、15和20天(虚线)治疗小鼠。每周两次记录肿瘤生长和体重。将肿瘤体积相对于治疗开始时的肿瘤体积标准化(相对肿瘤体积)。

具体实施方式

[0073] 本发明提供了与人PDL1蛋白特异性结合的抗体,以及药物组合物、生产方法以及使用此类抗体和组合物的方法。

[0074] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0075] 除非另有说明,否则术语“包括”和“包含”在本文中以开放式且非限制性的含义使用。关于这些后面的实施方案,术语“包含”因此包括范围较窄的术语“由……组成”。

[0076] 除非本文另外指出或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的背景下(特别是在以下权利要求的背景下),术语“一”和“一个”以及“该”和类似的引用应被解释为涵盖单数和复数。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括其混合物。当化合物、盐等使用复数形式时,这也被认为是指单一化合物、盐等。

[0077] 在第一方面,本发明涉及与人PDL1特异性结合的抗体。

[0078] 如本文所用,术语“抗体”等包括:完全抗体或其单链;及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链;以及包含抗体CDR、VH区或VL区的分子(包括但不限于多特异性抗体)。天然存在的“完全抗体”是糖蛋白,其包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链都由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链都由轻链可变区(在本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着更为保守的区,称为框架区(FR)。每个VH和VL都由三个CDR和四个FR组成,它们从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0079] 如本文所用,术语“抗原结合片段”、“其抗原结合片段”、“抗原结合部分”等是指完整的完全抗体的一个或多个片段,其保留了与给定的抗原(例如PDL1)特异性结合的能力。抗体的术语“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括:Fab片段,其是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)2片段,其是包含两个Fab片段的二价片段,这两个Fab片段通过铰链区的二硫键连接;Fd片段,其由VH和CH1结构域组成;Fv片段,其由抗体单臂的VL和VH结构域组成;以及基于其他支架的结合结构域,包括但不限于基于锚蛋白的结构域、fynomer、avimer、anticalin、纤连蛋白和构建在抗体恒定区中的结合位点(例如F-star的Modular Antibody Technology™)。

[0080] 术语“互补决定区”(“CDR”)是具有边界的氨基酸序列,所述边界使用许多公知方案中的任何一种确定,包括以下描述的那些:Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”5th Ed.Public Health Service,National Institutes

of Health, Bethesda, MD (“Kabat”编号方案); Al-Lazikani等人, (1997) JMB 273, 927-948 (“Chothia”编号方案); ImMunoGenTics (IMGT) 编号 (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P.等人, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) (“IMGT”编号方案), 以及 Honegger & Plückthun, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670 (“AHO”编号方案) 描述的编号方案。例如, 对于经典形式, 在 Kabat 下, 重链可变结构域 (VH) 中的 CDR 氨基酸残基编号为 31-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3); 轻链可变结构域 (VL) 中的 CDR 氨基酸残基编号为 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3)。在 Chothia 下, VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32 (HCDR1)、52-56 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3); VL 中的氨基酸残基编号为 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3)。通过结合 Kabat 和 Chothia 的 CDR 定义, CDR 由人 VH 中的氨基酸残基 26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3) 以及人 VL 中的氨基酸残基 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3) 组成。在 IMGT 下, VH 中的 CDR 氨基酸残基编号大约为 26-35 (HCDR1)、51-57 (HCDR2) 和 93-102 (HCDR3), VL 中的 CDR 氨基酸残基编号大约为 27-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3) (根据 “Kabat” 编号)。在 IMGT 下, 可以使用程序 IMGT/DomainGap Align 确定抗体的 CDR。在本发明的背景下, 除非另外特别指出, 否则使用由 Honegger & Plückthun (“AHO”) 建议的编号系统 (Honegger & Plückthun, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670)。此外, 根据 AHO 编号方案, 将以下残基定义为 CDR: LCDR1 (也称为 CDR-L1): L24-L42; LCDR2 (也称为 CDR-L2): L58-L72; LCDR3 (也称为 CDR-L3): L107-L138; HCDR1 (也称为 CDR-H1): H27-H42; HCDR2 (也称为 CDR-H2): H57-H76; HCDR3 (也称为 CDR-H3): H108-H138。为了清楚起见, 根据 Honegger & Plückthun 的编号系统考虑了在天然存在的抗体中在不同 VH 和 VL 亚家族两者中特别是在 CDR 中发现的长度多样性, 并提供了序列中的缺口。因此, 在给定的抗体可变结构域中, 通常并非所有位置 1 至 149 都被氨基酸残基占据。

[0081] 也可以将抗原结合部分纳入到大抗体 (maxibody)、微抗体 (minibody)、内抗体 (intrabody)、双抗体、三抗体、四抗体、scDb-scFv、v-NAR 和双-scFv 中 (参见, 例如 Holliger 和 Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 1126-36)。可以将抗体的抗原结合部分移植到基于多肽 (例如 III 型纤连蛋白 (Fn3)) 的支架中 (参见美国专利号 6,703,199, 其描述了纤连蛋白多肽单抗)。可以将抗原结合部分并入到包含一对串联 Fv 区段 (VH-CH1-VH-CH1) 的单链分子中, 其与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区 (Zapata 等人, 1995 Protein Eng. 8 (10): 1057-1062; 和美国专利号 5,641,870)。

[0082] 如本文所用, 术语 “结合特异性” 是指单个抗体与一种抗原决定簇反应而不与不同的抗原决定簇反应的能力。如本文所用, 术语 “与……特异性结合” 或 “特异于” 是指可测量且可再现的相互作用, 例如靶标与抗体之间的结合, 其是在存在分子 (包括生物分子) 的异质群体的情况下, 存在靶标的决定因素。例如, 与一个靶标 (可以是表位) 特异性结合的抗体是与该靶标结合比与其他靶标结合的亲和力更大、亲合力更大、更容易和/或持续时间更长的抗体。以其最一般的形式 (并且当未提及定义的标准时), “特异性结合” 是指抗体区分目标靶标和无关分子的能力, 例如根据本领域已知的特异性测定方法所确定的。此类方法包括但不限于蛋白质印迹、ELISA、RIA、ECL、IRMA、SPR (表面等离子体共振) 测试和肽扫描。例如, 可以进行标准 ELISA 测定。可以通过标准显色 (例如, 具有辣根过氧化物的二抗和具有过氧化氢的四甲基联苯胺) 进行评分。某些孔中的反应通过光密度 (例如在 450nm 下) 进行评分。典型背景 (= 阴性反应) 可能约为 0.10D; 典型的阳性反应可能约为 1.0D。这意味着阳性和

阴性分数之间的比可以是10倍或更高。在另一个实例中,可以进行SPR测定,其中背景和信号之间有至少10倍,优选至少100倍的差异表明特异性结合。通常,使用一组约三至五个不相关分子例如奶粉、转铁蛋白等,而非使用单一参照分子,来进行结合特异性的确定。本发明的抗体对人PDL1具有结合特异性。在一个具体的实施方案中,本发明的抗体对人PDL1具有结合特异性,并且不与人PDL2结合,特别是如通过SPR确定的。

[0083] 合适地,本发明的抗体是分离的抗体。如本文所用,术语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合PDL1的分离的抗体基本上不含特异性结合除PDL1以外的抗原的抗体)。但是,特异性结合PDL1的分离抗体可能与其他抗原(例如来自其他物种的PDL1分子)具有交叉反应性。因此,在一个实施方案中,本发明的抗体对人PDL1和食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*) (也称为食蟹猴(*Cynomolgus monkey*)或“食蟹猴(*Cynomolgus*)”)PDL1具有结合特异性。此外,分离的抗体可能基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0084] 合适地,本发明的抗体是单克隆抗体。如本文所用,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指氨基酸序列基本相同或源自相同遗传来源的抗体。单克隆抗体组合物对一个具体表位显示结合特异性和亲和力,或对多个特定表位显示结合特异性和亲和力。

[0085] 本发明的抗体包括但不限于嵌合的和人源化的。

[0086] 术语“嵌合抗体”是一种抗体分子,其中(a)恒定区或其一部分被改变、替换或交换,以使抗原结合位点(可变区)与不同的或改变的类别、效应功能和/或种类的恒定区相连,或与一个完全不同的分子相连,该分子赋予嵌合抗体新的特性,例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或者(b)可变区或其一部分被改变、替换或交换为具有不同的或改变的抗原特异性的可变区。例如,可以通过将小鼠抗体的恒定区替换为人免疫球蛋白的恒定区来对其进行修饰。由于被人恒定区替换,因此与原始小鼠抗体相比,嵌合抗体可以保留其识别抗原的特异性,同时对人类的抗原性降低。

[0087] 如本文所用,“人源化”抗体是保留了非人抗体的反应性,同时对人类的免疫原性较低的抗体。例如,这可以通过以下方法来实现:保留非人CDR区,并将抗体的其余部分替换为人类对应物(即恒定区和可变区的框架部分)。可以在人框架序列以及衍生自另一哺乳动物物种的种系的CDR序列内进行另外的框架区修饰。本发明的人源化抗体可包含非由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变,或保守取代以促进稳定性或制备)。参见,例如,Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855,1984;Morrison and Oi,Adv.Immunol.,44:65-92,1988;Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536,1988;Padlan,Molec.Immun.,28:489-498,1991;和Padlan,Molec.Immun.,31:169-217,1994。人体工程技术的其他实例包括但不限于美国专利号5,766,886中公开的Xoma技术。

[0088] 如本文所用,术语“重组人源化抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人类抗体,例如从转化为表达人源化抗体的宿主细胞中分离的抗体,例如从转染瘤(transfectoma)中分离的抗体,以及通过涉及将人类免疫球蛋白基因的全部或部分剪接至其他DNA序列的任何其他方式而制备、表达、产生或分离的抗体。

[0089] 术语“PDL1”特别是指具有UniProt ID号Q9NZQ7的人PDL1,在本文中以SEQ ID NO: 63再现。合适地,本发明的抗体靶向PDL1,特别是人PDL1,如UniProt ID号Q9NZQ7所示,其在

本文中以SEQ ID NO:63再现。合适地,本发明的抗体靶向人和食蟹猴(食蟹猕猴)PDL1,并且优选不与小鼠PDL1交叉反应,特别是如通过表面等离子体共振 (SPR) 所测量的。合适地,本发明的抗体对人PDL1具有结合特异性。特别地,本发明的抗体不与人PDL2结合,特别是如通过SPR测量的。

[0090] 本发明的抗体是PDL1抑制剂。术语“阻断剂”或“阻断抗体”或“抑制剂”或“抑制抗体”或“拮抗剂”或“拮抗剂抗体”是指抑制或降低与其结合的抗原的生物学活性的抗体。在一些实施方案中,阻断抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物学活性。本发明的抗体靶向、降低、抑制PDL1与其结合伴侣的结合能力,从而干扰PDL1的功能。特别地,本发明的抗体阻断PDL1与PD-1的相互作用。在一些实施方案中,本发明的抗体阻断PDL1与PD-1和B7-1的相互作用。

[0091] 本发明的抗体包括但不限于如本文(包括实施例中)所述的分离的人源化单克隆抗体。此类抗人PDL1抗体的实例是其序列列于表1中的抗体。实施例中提供了关于本文所述抗体的生成和表征的其他细节。

[0092] 对人PDL1具有结合特异性的本发明的分离的抗体包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),其中:(a)所述VH依次包含三个互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,并且(b)所述VL依次包含三个互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0093] 本发明提供了与PDL1蛋白特异性结合的抗体,所述抗体包含VH CDR,所述VH CDR具有表1所列的VH CDR中任意之一的氨基酸序列。特别地,本发明提供了与PDL1蛋白VH CDR的抗体,所述抗体包含一个、两个、三个或更多个VH CDR,所述VH CDR具有表1所列的VH CDR中任意之一的氨基酸序列。

[0094] 本发明还提供了与PDL1蛋白特异性结合的抗体,所述抗体包含VL CDR,所述VL CDR具有表1所列的VL CDR中任意之一的氨基酸序列。特别地,本发明提供了与PDL1蛋白VL CDR的抗体,所述抗体包含一个、两个、三个或更多个VL CDR,所述VL CDR具有表1所列的VL CDR中任意之一的氨基酸序列。

[0095] 本发明的其他抗体包括已突变、但仍与PDL1蛋白特异性结合,并且在CDR区中与表1中描述的序列中描述的CDR区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。一方面,本发明的其他抗体包括与PDL1蛋白特异性结合的突变氨基酸序列,其中当与表1中描述的序列中描述的CDR区相比时,CDR区中已经突变的氨基酸不超过1、2、3、4或5个。

[0096] 在两个或更多个核酸或多肽序列的背景下,术语“相同”或“同一性”是指相同的两个或更多个序列或子序列。关于核酸、肽、多肽或抗体序列的“序列同一性百分比(%)”和“同源性”定义为在比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后,并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分,候选序列中与特定核酸、肽或多肽序列中的核苷酸或氨基酸残基相同的核苷酸或氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域技术范围内的各种方式来实现,例如,使用公开的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2或ALIGN软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0097] 为了进行序列比较,通常将一个序列用作参考序列,将其与测试序列进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定

序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,也可以指定其他参数。然后,序列比较算法根据程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0098] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,这些算法分别在Altschul等人,Nucl.Acids Res.25:3389-3402,1977;和Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410,1990中描述。可通过国家生物技术信息中心公开获得进行BLAST分析的软件。也可以使用E.Meyers和W.Miller (Comput.Appl.Biosci.,4:11-17,1988)的算法确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比,该算法已被并入ALIGN程序(2.0版),其使用PAM120重量残留表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。另外,可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol,Biol.48:444-453,1970)算法确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比,该算法已并入GCG软件包的GAP程序中(可www.gcg.com上找到),其使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵,间隙权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0099] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。术语“多肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物,也适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另有说明,否则特定的多肽序列也隐含涵盖其保守修饰的变体。

[0100] 本发明提供了一种对人PDL1具有结合特异性的分离的抗体,包含(a)重链可变区CDR1(HCDR1),包含选自SEQ ID NO:1、4、5、8、11、32、35、36、39和42中任意之一,优选SEQ ID NO:1或32,更优选SEQ ID NO:1的氨基酸序列,优选由其组成;(b)重链可变区CDR2(HCDR2),包含选自SEQ ID NO:2、6、9、12、33、37、40和43中任意之一,优选SEQ ID NO:2或33,更优选SEQ ID NO:2的氨基酸序列,优选由其组成;(c)重链可变区CDR3(HCDR3),包含选自SEQ ID NO:3、7、10、13、34、38、41和44中任意之一,优选SEQ ID NO:3或34,更优选SEQ ID NO:3的氨基酸序列,优选由其组成;(d)轻链可变区CDR1(LCDR1),包含选自SEQ ID NO:17、20、23、48、51和54中任意之一,优选SEQ ID NO:17或48,更优选SEQ ID NO:17的氨基酸序列,优选由其组成;(e)轻链可变区CDR2(LCDR2),包含,选自SEQ ID NO:18、21、24、49、52和55中任意之一,优选SEQ ID NO:18或49,更优选SEQ ID NO:18的氨基酸序列优选由其组成;和(f)轻链可变区CDR3(LCDR3),包含选自SEQ ID NO:19、22、25、50、53和56中任意之一,优选SEQ ID NO:19或50,更优选SEQ ID NO:19的氨基酸序列,优选由其组成。

[0101] 合适地,对人PDL1具有结合特异性的本发明的分离的抗体包含:(a)重链可变区CDR1(HCDR1),包含与SEQ ID NO:1、4、5、8、11、32、35、36、39和42中任意之一,优选SEQ ID NO:1或32,更优选SEQ ID NO:1具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(b)重链可变区CDR2(HCDR2),包含与SEQ ID NO:2、6、9、12、33、37、40和43中任意之一,优选SEQ ID NO:2或33,更优选为SEQ ID NO:2具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(c)重链可变区CDR3(HCDR3),包含与SEQ ID NO:3、7、10、13、34、38、41和44中任意之一,优选SEQ ID NO:3或34,更优选SEQ ID NO:3具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(d)轻链可变区CDR1(LCDR1),包含与SEQ ID NO:17、20、

23、48、51和54中任意之一,优选SEQ ID NO:17或48,更优选SEQ ID NO:17具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(e)轻链可变区CDR2(LCDR2),包含与SEQ ID NO:18、21、24、49、52和55中任意之一,优选SEQ ID NO:18或49,更优选为SEQ ID NO:18具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;和(f)轻链可变区CDR3(LCDR3),包含与SEQ ID NO:9、22、25、50、53和56中任意之一,优选SEQ ID NO:19或50,更优选为SEQ ID NO:19具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成。

[0102] 在一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:(a)分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(b)分别为SEQ ID NO:4、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(c)分别为SEQ ID NO:5、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(d)分别为SEQ ID NO:8、9和10的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(e)分别为SEQ ID NO:11、12和13的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:23、24和25的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(f)分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(g)分别为SEQ ID NO:35、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(h)分别为SEQ ID NO:36、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(f)分别为SEQ ID NO:39、40和41的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(j)分别为SEQ ID NO:42、43和44的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:54、55和56的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。在一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。在另一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0103] 合适地,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:(a)分别与SEQ ID NO:1、2和3具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:17、18和19具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(b)分别与SEQ ID NO:4、6和7具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:20、21和22具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(c)分别与SEQ ID NO:5、6和7具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:20、21和22具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(d)分别与SEQ ID NO:8、9和10具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:17、18和19具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(e)分

别与SEQ ID NO:11、12和13具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:23、24和25具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(f)分别与SEQ ID NO:32、33和34具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:48、49和50具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(g)分别与SEQ ID NO:35、37和38具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:51、52和53具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(h)分别与SEQ ID NO:36、37和38具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:51、52和53具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(i)分别与SEQ ID NO:39、40和41具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:48、49和50具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;(j)分别与SEQ ID NO:42、43和44具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:54、55和56具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。在一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含分别与SEQ ID NO:1、2和3具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:17、18和19具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。在另一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含分别与SEQ ID NO:32、33和34具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,和分别与SEQ ID NO:48、49和50具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0104] 合适地,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:(a)HCDR1,包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,优选由其组成;(b)HCDR2,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,优选由其组成;(c)HCDR3,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,优选由其组成;(d)LCDR1,包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,优选由其组成;(e)LCDR2,包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,优选由其组成;和(f)LCDR3,包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,优选由其组成。合适地,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:(a)HCDR1,包含与SEQ ID NO:1具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(b)HCDR2,包含与SEQ ID NO:2具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(c)HCDR3,包含与SEQ ID NO:3具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(d)LCDR1,包含与SEQ ID NO:17具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(e)LCDR2,包含与SEQ ID NO:18具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;和(f)LCDR3,包含与SEQ ID NO:19具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成。

[0105] 在另一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:(a)HCDR1,

包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列,优选由其组成;(b)HCDR2,包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,优选由其组成;(c)HCDR3,包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,优选由其组成;(d)LCDR1,包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,优选由其组成;(e)LCDR2,包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,优选由其组成;和(f)LCDR3,包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列,优选由其组成。合适地,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:(a)HCDR1,包含与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(b)HCDR2,包含与SEQ ID NO:6具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(c)HCDR3,包含与SEQ ID NO:7具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(d)LCDR1,包含与SEQ ID NO:20具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(e)LCDR2,包含与SEQ ID NO:21具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;和(f)LCDR3,包含与SEQ ID NO:22具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成。

[0106] 合适地,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:(a)HCDR1,包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列,优选由其组成;(b)HCDR2,包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,优选由其组成;(c)HCDR3,包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,优选由其组成;(d)LCDR1,包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列,优选由其组成;(e)LCDR2,包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,优选由其组成;和(f)LCDR3,包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,优选由其组成。合适地,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:(a)HCDR1,包含与SEQ ID NO:32具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(b)HCDR2,包含与SEQ ID NO:33具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(c)HCDR3,包含与SEQ ID NO:34具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(d)LCDR1,包含与SEQ ID NO:48具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(e)LCDR2,包含与SEQ ID NO:49具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;和(f)LCDR3,包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,优选由其组成。

[0107] 在另一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:(a)HCDR1,包含SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36的氨基酸序列,优选由其组成;(b)HCDR2,包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,优选由其组成;(c)HCDR3,包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,优选由其组成;(d)LCDR1,包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列,优选由其组成;(e)LCDR2,包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列,优选由其组成;和(f)LCDR3,包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,优选由其组成。合适地,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:(a)HCDR1,包含与SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(b)HCDR2,包含与SEQ ID NO:37具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(c)HCDR3,包含与SEQ ID NO:38具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(d)LCDR1,包含与SEQ ID NO:51具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、

98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;(e)LCDR2,包含与SEQ ID NO:52具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列,优选由其组成;和(f)LCDR3,包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列,优选由其组成。

[0108] 在另一个实施方案中,本发明提供了特异性结合PDL1(例如人PDL1蛋白)的分离的抗体,其中所述抗体包含VH结构域和VL结构域。在本发明的背景下,术语“VH”(可变重链)、“VL”(可变轻链)、“V κ ”和“V λ ”是指根据序列同一性和同源性分组的抗体重链和轻链序列的家族。确定序列同源性的方法,例如通过使用同源性搜索矩阵例如BLOSUM(Henikoff, S. & Henikoff, J.G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(1992)10915-10919),以及根据同源性对序列进行分组的方法是本领域普通技术人员众所周知的。对于VH、V κ 和V λ ,可以鉴定出不同的亚家族,例如Knappik等人, J. Mol. Biol. 296(2000)57-86所示,其将VH1A、VH1B和VH2中的VH分组为VH6,将V κ 1中的V κ 分组为V κ 4,将V λ 1中的V λ 分组为V λ 3。在体内,抗体V κ 链、V λ 链和VH链分别是种系 κ 链V和J片段、种系 λ 链V和J片段以及重链V、D和J片段的随机重排的结果。给定的抗体可变链属于哪个亚家族由相应的V片段,特别是由框架区FR1至FR3确定。因此,在本申请中仅以特定的一组框架区HFR1至HFR3为特征的任何VH序列可以与任何HFR4序列结合,例如从重链种系J片段之一中取得的HFR4序列,或从重新排列的VH序列取得的HFR4序列。

[0109] 合适地,本发明提供了特异性结合PDL1(例如人PDL1蛋白)的分离的抗体,其中所述抗体包含VH1A、VH1B、VH3或VH4。

[0110] 属于VH1家族的VH的一个具体实例由SEQ ID NO:15表示。特别地,取自SEQ ID NO:15的框架区FR1至FR4属于VH1家族(表1,非粗体标记的区域)。合适地,本文所用的属于VH1家族的VH包含与SEQ ID NO:15的FR1至FR4具有至少85%,优选至少90%,更优选至少95%的序列同一性的FR1至FR4。

[0111] 属于VH3家族的VH的一个具体实例由SEQ ID NO:16表示。特别地,取自SEQ ID NO:16的框架区FR1至FR4属于VH3家族(表1,非粗体标记的区域)。合适地,本文所用的属于VH3家族的VH包含与SEQ ID NO:16的FR1至FR4具有至少85%,优选至少90%,更优选至少95%的序列同一性的FR1至FR4。

[0112] 属于VH4家族的VH的一个具体实例由SEQ ID NO:14表示。特别地,取自SEQ ID NO:14的框架区FR1至FR4属于VH4家族(表1,非粗体标记的区域)。合适地,本文所用的属于VH4家族的VH包含与SEQ ID NO:14的FR1至FR4具有至少85%,优选至少90%,更优选至少95%的序列同一性的FR1至FR4。

[0113] VH序列的其他实例可以在Knappik等人, J. Mol. Biol. 296(2000)57-86中找到。

[0114] 在一个实施方案中,本发明的分离的抗体包含VH4或VH3结构域。

[0115] 合适地,本发明提供了一种特异性结合PDL1(例如人PDL1蛋白)的分离的抗体,其中所述抗体包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3框架,优选V κ 1框架FR1至3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1 FR4、V κ 3 FR4和V λ FR4。合适的V κ 1框架FR1至3在SEQ ID NO:26中列出(表1,FR区以非粗体标记)。合适的V κ 1框架FR1至3包含与对应于FR1至3并选自SEQ ID NO:26(表1,FR区以非粗体标记)的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列。

[0116] V κ 1序列的其他实例,以及V κ 2、V κ 3或V κ 4序列的其他实例可以在Knappik等人,

J.Mol.Biol.296(2000)57-86中找到。

[0117] 合适的V λ FR4如SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70所示。在一个优选的实施方案中,V λ FR4如SEQ ID NO:64或65所示,更优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:64所示。在一个实施方案中,本发明提供了一种特异性结合PDL1(例如人PDL1蛋白)的分离的抗体,其中所述抗体包含V λ FR4,所述V λ FR4包含与选自SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70中任意之一的氨基酸序列,优选与SEQ ID NO:64或65,更优选与SEQ ID NO:64具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列。

[0118] 因此,在一个实施方案中,本发明因此提供了一种抗体,其包含:

[0119] (i) 以下的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列:

[0120] a. 分别为SEQ ID NO:4、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0121] b. 分别为SEQ ID NO:35、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;或

[0122] c. 分别为SEQ ID NO:36、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0123] (ii) VH3或VH4结构域框架序列;和

[0124] (iii) VL结构域,其包含VL框架,所述VL框架包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3 FR1至FR3,优选V κ 1 FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1 FR4、V κ 3 FR4和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70中任意之一的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70所示,更优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:64所示。

[0125] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供了对人PDL1具有结合特异性的抗体,包含:

[0126] (i) 分别为SEQ ID NO:5、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0127] (ii) VH1A、VH1B、VH3或VH4结构域框架序列,优选VH1A或VH1B结构域框架序列;和

[0128] (iii) VL结构域,其包含VL框架,所述VL框架包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3 FR1至FR3,优选V κ 1 FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1 FR4、V κ 3 FR4和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70中任意之一的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选包含选自SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70中任意之一的氨基酸序列的V λ FR4,更优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:64所示。

[0129] 因此,在一个具体的实施方案中,本发明提供了一种抗体,其包含:

[0130] (i) 分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0131] (ii) VH3或VH4结构域框架序列,优选VH4结构域框架序列;和

[0132] (iii) VL结构域,其包含VL框架,所述VL框架包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3 FR1至FR3,优选V κ 1 FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1 FR4、V κ 3 FR4和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70中任意之一的氨

氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70所示,更优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:64所示。

[0133] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明提供了一种抗体,其包含:

[0134] (i) 分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,

[0135] 以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;

[0136] (ii) VH3或VH4结构域框架序列,优选VH3结构域框架序列;和

[0137] (iii) VL结构域,其包含VL框架,所述VL框架包含V κ 框架FR1、FR2和FR3,特别是V κ 1或V κ 3 FR1至FR3,优选V κ 1 FR1至FR3,以及框架FR4,所述框架FR4选自V κ FR4,特别是V κ 1 FR4、V κ 3 FR4和V λ FR4,特别是包含与选自SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70中任意之一的氨基酸序列具有至少60、70、80、90%同一性的氨基酸序列的V λ FR4,优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70所示,更优选地,V λ FR4如SEQ ID NO:64所示。

[0138] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种抗体,所述抗体对人PDL1具有结合特异性并且包含VL,所述VL包含:

[0139] (i) CDR结构域CDR1、CDR2和CDR3;

[0140] (ii) 人V κ 框架区FR1至FR3,特别是人V κ 1框架区FR1至FR3;

[0141] (iii) FR4,其选自 (a) FR4的人V λ 种系序列,特别是选自以下组的V λ 种系序列:SEQ ID NO:64至70,优选SEQ ID NO:64;和 (b) 基于V λ 的序列,与最接近的FR4的人V λ 种系序列相比,所述基于V λ 的序列具有一个或两个突变,特别是一个突变,所述最接近的FR4的人V λ 种系序列包含选自SEQ ID NO:64至SEQ ID NO:70中任意之一,优选SEQ ID NO:64的氨基酸序列。

[0142] 本发明提供了特异性结合PDL1 (例如人PDL1蛋白) 的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中列出的VH结构域。

[0143] 本发明还提供了与PDL1特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中列出的VH氨基酸序列,其中框架序列 (例如,不是CDR的序列) 中已经突变 (其中,作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失) 的氨基酸不超过约10个。

[0144] 本发明还提供了与PDL1特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中列出的VH氨基酸序列,其中框架序列 (例如,不是CDR的序列) 中已经突变 (其中,作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失) 的氨基酸不超过约20个。

[0145] 本发明的其他抗体包括已突变、但仍与PDL1特异性结合,并且在VH区中与表1中描述的序列中描述的VH区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0146] 本发明提供了与PDL1蛋白特异性结合的分离的抗体,所述抗体包含表1中列出的VL结构域。

[0147] 本发明还提供了与PDL1特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中列出的VL氨基酸序列,其中框架序列 (例如,不是CDR的序列) 中已经突变 (其中,作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失) 的氨基酸不超过约10个。

[0148] 本发明还提供了与PDL1特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含表1中列出的VL氨基酸序列,其中框架序列 (例如,不是CDR的序列) 中已经突变 (其中,作为各种非限制性实例,突变是添加、取代或缺失) 的氨基酸不超过约20个。

[0149] 本发明的其他抗体包括已突变、但仍与PDL1特异性结合,并且在VL区中与表1中描述的序列中描述的VL区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸序列。

[0150] 本发明还提供了与PDL1特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含重链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:14、15、16、45、46和47组成的组,优选SEQ ID NO:14或16,更优选SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:126、27、57和58组成的组,优选SEQ ID NO:26或27,更优选SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列。

[0151] 在一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:重链可变区,其包含选自SEQ ID NO:14、15、16、45、46和47中任意之一,优选SEQ ID NO:14或16,更优选SEQ ID NO:16的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含选自SEQ ID NO:26、27、57和58中任意之一,优选SEQ ID NO:26或27,更优选SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0152] 在一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:

[0153] (a) 分别为SEQ ID NO:4、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:14至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:26至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;

[0154] (b) 分别为SEQ ID NO:5、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,VH序列,其包含与SEQ ID NO:15至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:26至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;

[0155] (c) 分别为SEQ ID NO:4、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:16至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:26至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列,优选地,其中所述VH包含G56A和Y105F突变(AHo编号),并且所述VL包含S9A和A51P突变(AHo编号);

[0156] (d) 分别为SEQ ID NO:35、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:45至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:57至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;

[0157] (e) 分别为SEQ ID NO:36、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:46至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:58至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选

至少90百分比相同的氨基酸序列;优选地,其中所述VH包含V2S、V25A、I44V、G56A、V82K、F89V和Y105F突变(AHo编号),并且所述VL包含I2F、M4L和A51P突变(AHo编号);或者

[0158] (f) 分别为SEQ ID NO:35、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;与SEQ ID NO:47至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同的VH序列;和与SEQ ID NO:57至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同的VL序列,优选地,其中所述VH包含V25A、I44V、G56A、V82K和F89V突变(AHo编号)。

[0159] 在一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含:

[0160] (a) 分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:14至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:26至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;

[0161] (b) 分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,VH序列,其包含与SEQ ID NO:15至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:26至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;

[0162] (c) 分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:16至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:27至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;优选地,其中所述VH包含G56A和Y105F突变(AHo编号),并且所述VL包含S9A和A51P突变(AHo编号);

[0163] (d) 分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:45至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:57至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;

[0164] (e) 分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:46至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:58至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;优选地,其中所述VH包含V2S、V25A、I44V、G56A、V82K、F89V和Y105F突变(AHo编号),并且所述VL包含I2F、M4L和A51P突变(AHo编号);或者

[0165] (f) 分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;与SEQ ID NO:47至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同的VH序列;和与SEQ ID NO:57至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%相同的VL序列,优选地,其中所述VH包含V25A、I44V、G56A、V82K和F89V

突变(AHo编号)。

[0166] 在一个优选的实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的抗体包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,VH序列,其包含与SEQ ID NO:16至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:26至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列,优选地,其中所述VH包含G56A和Y105F突变(AHo编号),并且所述VL包含S9A和A51P突变(AHo编号)。

[0167] 在另一个实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的分离的抗体包含:(a) SEQ ID NO:14的VH序列和SEQ ID NO:26的VL序列;(b) SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:26的VL序列;(c) SEQ ID NO:16的VH序列和SEQ ID NO:27的VL;(d) SEQ ID NO:45的VH序列和SEQ ID NO:57的VL序列;(e) SEQ ID NO:46的VH序列和SEQ ID NO:58的VL序列;或(f) SEQ ID NO:47的VH序列和SEQ ID NO:57的VL序列。在一个优选的实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的分离的抗体包含SEQ ID NO:14的VH序列和SEQ ID NO:26的VL序列。在一个更优选的实施方案中,对人PDL1具有结合特异性的本发明的分离的抗体包含SEQ ID NO:16的VH序列和SEQ ID NO:27的VL序列。

[0168] 在一个实施方案中,与PDL1特异性结合的抗体是表1中描述的抗体。在一个实施方案中,与PDL1特异性结合的抗体包含与选自以下组成的组的氨基酸序列至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%,优选至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62。在一个实施方案中,与PDL1特异性结合的抗体如SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31,优选SEQ ID NO:29,更优选SEQ ID NO:31所示。在一个实施方案中,与PDL1特异性结合的抗体如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62,优选SEQ ID NO:60,更优选SEQ ID NO:62所示。

[0169] 对人PDL1具有结合特异性的本发明的其他抗体包括其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已经突变,但与表1中所述的序列具有至少60、70、80、90或95%同一性的那些抗体。在一个实施方案中,包括当与表1中描述的序列中描述的可变区相比时,可变区中已经突变的氨基酸不超过1、2、3、4或5个,同时保留了基本上相同的活性的氨基酸序列。如本文所用,术语“基本上相同的活性”是指由基本上相同的活性表示的活性为针对亲本抗体(例如本发明的抗体,特别是表1中所述的本发明的抗体)确定的活性的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少100%或至少110%,或至少120%,或至少130%,或至少140%,或至少150%,或至少160%,或至少170%,或至少180%,或至少190%,例如高达200%。

[0170] 鉴于这些抗体中的每一种都可以与PDL1结合并且抗原结合特异性主要由CDR1、2和3区提供,因此可以将VH CDR1、2和3序列以及VL CDR1、2和3序列“混合并匹配”(即,可以将来自不同抗体的CDR混合并匹配,但是每种抗体必须包含VH CDR1、2和3以及VL CDR1、2和3)以产生本发明的其他的结合PDL1的结合分子。可以使用本领域已知的结合测定法和实施例中描述的结合测定法(例如ELISA)来测试这种“混合并匹配的”PDL1结合抗体。当混合并匹配VH CDR序列时,应当将特定VH序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列替换为结构相似的CDR

序列。同样,当混合并匹配VL CDR序列时,应当将特定VL序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列替换为结构相似的CDR序列。对于本领域普通技术人员而言显而易见的是,可以通过用来自本文所示的本发明的单克隆抗体的CDR序列的结构上相似的序列来突变一个或多个VH和/或VL CDR区序列来产生新的VH和VL序列。

[0171] 在又一个实施方案中,本发明提供了一种抗体,其包含与表1中描述的序列同源的氨基酸序列,并且所述抗体与PDL1结合,并保留了表1中描述的那些抗体的所需功能特性。

[0172] 例如,本发明提供了一种分离的单克隆抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与选自SEQ ID NO:14、15、16、45、46和47组成的组,优选SEQ ID NO:14或16,更优选SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少80%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:126、27、57和58组成的组,优选SEQ ID NO:26或27,更优选SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少80%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列;其中所述抗体与PDL1蛋白特异性结合。

[0173] 在一个实施方案中,VH和/或VL氨基酸序列可以与表1所示的序列50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。在一个实施方案中,除了在不超过1、2、3、4或5个氨基酸位置上的氨基酸取代之外,VH和/或VL氨基酸序列可以是相同的。

[0174] 在一个实施方案中,本发明的抗体具有重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3序列,所述轻链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3序列,其中这些CDR序列中的一个或多个具有基于本文所述的抗体或其保守修饰的指明的氨基酸序列,其中所述抗体保留了本发明的PDL1结合抗体的所需功能特性。

[0175] 术语“保守修饰的变体”或“保守变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于特定的核酸序列,保守修饰的变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或者当核酸不编码氨基酸序列时,是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在其中丙氨酸由一个密码子明确规定的每个位置上,可以将该密码子改变为所描述的相应密码子中任意之一,而不改变所编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,其是保守修饰的变异的一种。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每个可能的沉默变异。本领域技术人员将认识到,可以修饰核酸中的每个密码子(除了AUG和TGG,AUG通常是蛋氨酸的唯一密码子,TGG通常是色氨酸的唯一密码子)以产生功能上相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异都隐含在每个所述序列中。

[0176] 对于多肽序列,“保守修饰的变体”或“保守变体”包括对多肽序列的单个取代、缺失或添加,其导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能上相似的氨基酸的保守取代是本领域众所周知的。这些保守修饰的变体是以下的补充并且不排除以下:本发明的多态变体、种间同系物和等位基因。以下八个组包含彼此保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A), 甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D), 谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N), 谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R), 赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I), 亮氨酸(L), 蛋氨酸(M), 缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F), 酪氨酸(Y), 色氨酸(W);7) 丝氨酸(S), 苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C), 蛋氨酸(M)(参见,例如Creighton, Proteins(1984))。在一个实施方案中,术语“保守序列修饰”用于指不显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。

[0177] 因此,本发明提供了分离的单克隆抗体,包含以下或由其组成:包含CDR1、CDR2和

CDR3序列的重链可变区和包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中:

[0178] 所述重链可变区CDR1包含选自SEQ ID NO:1、4、5、8、11、32、35、36、39和42中任意之一,优选SEQ ID NO:1或32,更优选SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其保守变体,优选由其组成;所述重链可变区CDR2包含选自SEQ ID NO:2、6、9、12、33、37、40和43中任意之一,优选SEQ ID NO:2或33,更优选SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其保守变体,优选由其组成;所述重链可变区CDR3包含选自SEQ ID NO:3、7、10、13、34、38、41和44中任意之一,优选SEQ ID NO:3或34,更优选SEQ ID NO:3的氨基酸序列或其保守变体,优选由其组成;

[0179] 所述轻链可变区CDR1包含选自SEQ ID NO:17、20、23、48、51和54中任意之一,优选SEQ ID NO:17或48,更优选SEQ ID NO:17的氨基酸序列或其保守变体,优选由其组成;所述轻链可变区CDR2包含选自SEQ ID NO:18、21、24、49、52和55中任意之一,优选SEQ ID NO:18或49,更优选SEQ ID NO:18的氨基酸序列或其保守变体,优选由其组成;并且所述轻链可变区CDR3包含选自SEQ ID NO:19、22、25、50、53和56中任意之一,优选SEQ ID NO:19或50,更优选SEQ ID NO:19的氨基酸序列或其保守变体,优选由其组成;

[0180] 其中所述抗体与PDL1特异性结合并且能够阻断PD-1/PDL1相互作用。

[0181] 在一个实施方案中,本发明的抗体被优化用于在哺乳动物细胞中表达,所述抗体具有重链可变区和轻链可变区,其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述的抗体或其保守修饰的指定氨基酸序列,其中所述抗体保留了本发明的PDL1结合抗体的所需功能特性。因此,本发明提供了一种优化用于在哺乳动物细胞中表达的分离的单克隆抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:14、15、16、45、46和47中任意之一,优选SEQ ID NO:14或16,更优选SEQ ID NO:16的氨基酸序列,和其保守变体;并且所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:26、27、57和58中任意之一,优选SEQ ID NO:26或27,更优选SEQ ID NO:27的氨基酸序列,和其保守变体;其中所述抗体与PDL1特异性结合并且能够阻断PD-1/PDL1相互作用。

[0182] 在一个实施方案中,本发明的抗体被优化用于在哺乳动物细胞中表达,其具有全长重链序列和全长轻链序列,其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述的抗体或其保守修饰的指定氨基酸序列,其中所述抗体保留了本发明的PDL1结合抗体的所需功能特性。

[0183] 如本文所用,术语“优化的”是指将核苷酸序列改变为使用在生产细胞或生物(通常是真核细胞,例如毕赤酵母属细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人类细胞)中优选的密码子编码氨基酸。对优化的核苷酸序列进行工程改造,以完全或尽可能保留最初由起始核苷酸序列(也称为“亲本”序列)编码的氨基酸序列。已经对本文的优化序列进行了改造,使其具有在哺乳动物细胞中优选的密码子。然而,本文中还想设想了这些序列在其他真核细胞或原核细胞中的优化表达。由优化的核苷酸序列编码的氨基酸序列也称为被优化的。

[0184] 可变区修饰的另一种类型是使VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基突变,从而改善目标抗体的一种或多种结合特性(例如,亲和力),称为“亲和力成熟”。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变,并且可以如本文所述和实施例中提供的体外或体内测定中评估对抗体结合或其他目的功能的影响。可以引入保守修改(如上所述)。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。此外,CDR区中通常不超过1、2、3、4或5个残基被改变。

[0185] “亲和力成熟的”抗体是一种抗体,在其一个或多个可变结构域中具有一个或多个

改变,与不具有那些改变的亲本抗体相比,这导致抗体对抗原的亲合力得到改善。在一个实施方案中,亲合力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲合力。亲合力成熟的抗体通过本领域已知的方案产生。例如,Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992)描述了通过VH和VL结构域改组的亲合力成熟。高变区(“HVR”)和/或框架残基的随机诱变描述于例如:Barbas等人Proc Natl.Acad.Sci.USA 91:3809-3813(1994);Schier等人Gene 169:147-155(1995);Jackson等人,J.Immunol.154(7):3310-9(1995);和Hawkins等人,J.Mol.Biol.226:889-896(1992)。

[0186] 在一个实施方案中,本发明提供了一种分离的单克隆抗体,其包含VH3,所述VH3包含G56A和Y105F突变,特别是包含根据SEQ ID NO:16的氨基酸序列;并且优选地包含VL,所述VL包含S9A;A51P突变,特别是包含根据SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0187] 在一个实施方案中,本发明的“亲合力成熟的”抗体包含:VH4,所述VH4包含V25A;I44V;G56A;V82K;F89V突变,特别是包含根据SEQ ID NO:47的氨基酸序列;并且优选地包含VL,所述VL包含根据SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的“亲合力成熟的”抗体包含:VH4,所述VH4包含V2S;V25A;I44V;G56A;V82K;F89V;Y105F突变,特别是包含根据SEQ ID NO:46的氨基酸序列;并且优选地包含VL,所述VL包含I2F;M4L;A51P突变,特别是包含根据SEQ ID NO:58的氨基酸序列。

[0188] 本发明的抗体可以进一步通过如下方法制备:使用具有本文所示的一个或多个VH和/或VL序列的抗体作为起始材料来工程改造修饰的抗体,该修饰的抗体可能具有与起始抗体不同的特性。可以通过修饰一个或两个可变区(即VH和/或VL)内,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个残基来工程化抗体。另外地或可替代地,可以通过修饰恒定区内的残基来工程化抗体,例如以改变抗体的效应子功能。

[0189] 可以执行的一种类型的可变区工程化是CDR移植。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此,各个抗体之间CDR中的氨基酸序列比CDR之外的序列更具多样性。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,因此可以通过构建表达载体来表达模仿特定天然存在抗体的特性的重组抗体,该表达载体包含来自该特定天然存在抗体的CDR序列,并且该CDR序列被移植到来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上(参见,例如,Riechmann,L.等人,1998Nature 332:323-327;Jones,P.等人,1986Nature 321:522-525;Queen,C.等人,1989Proc.Natl.Acad.,U.S.A.86:10029-10033;美国专利号5,225,539(Winter),和美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370(Queen等人))。

[0190] 这样的框架序列可以从公共DNA数据库或包括种系抗体基因序列或重排的抗体序列的公开参考文献中获得。例如,人类重链和轻链可变区基因的种系DNA序列也可以在“VBase”人类种系序列数据库(可以在互联网上在www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase获得)以及Kabat,E.A.等人,1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;Tomlinson,I.M.等人,1992J.fol.Biol.227:776-798;和Cox,J.P.L.等人,1994Eur.J Immunol.24:827-836中找到;各自的内容通过引用明确地并入本文。例如,人类重链和轻链可变区基因的种系DNA序列和重排抗体序列可以在“IMGT”数据库中找到(可以在网上在www.imgt.org获得;参见Lefranc,M.P.等人,1999Nucleic Acids Res.27:209-212;其各自

的内容通过引用明确地并入本文)。

[0191] 用于本发明的抗体的框架序列的实例是与本发明的选择的抗体所使用的框架序列在结构上相似的那些,例如,本发明的单克隆抗体所使用的共有序列和/或框架序列。可以将VH CDR1、2和3序列以及VL CDR1、2和3序列移植到框架区上,该框架区具有与框架序列所源自的种系免疫球蛋白基因中发现的序列相同的序列,或者可以将CDR序列移植到与种系序列相比包含一个或多个突变的框架区上。例如,已经发现,在某些情况下,使框架区内的残基突变以维持或增强抗体的抗原结合能力是有益的(参见例如,美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370(Queen等人))。

[0192] 可以使用多种抗体/免疫球蛋白框架或支架,只要得到的多肽包括至少一个与PDL1特异性结合的结合区域即可。这样的框架或支架包括人免疫球蛋白的五种主要的个体基因型(idiotype),其抗原结合片段,并且包括其他动物物种的免疫球蛋白,优选具有人源化特征。

[0193] 一方面,本发明涉及一种使用非免疫球蛋白支架生产基于非免疫球蛋白的抗体的方法,可以将本发明的CDR移植到所述非免疫球蛋白支架上。可以使用已知的或将来的非免疫球蛋白框架和支架,只要它们包含对靶PDL1蛋白具有特异性的结合区即可。已知的非免疫球蛋白框架或支架包括但不限于纤连蛋白(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, Mass.)、锚蛋白(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、脂质运载蛋白(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小型模块化免疫药物(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, Wash.)、大抗体(Avidia, Inc., Mountain View, Calif)、蛋白质A(Affibody AG, Sweden)和affilin(γ -晶体蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)。

[0194] 合适地,本发明的抗体与PDL1特异性结合,并以下列参数中的一个或多个为特征:

[0195] (i) 与人PDL1结合的解离常数(KD)小于10nM,特别是小于5nM,特别是小于1nM,特别是小于500pM,更特别是小于100pM,优选小于50pM,更优选小于10pM,更优选小于5pM,特别是如通过表面等离子体共振(SPR)所测量的,特别地,其中所述抗体是scFv;

[0196] (ii) 与人PDL1结合的 K_{off} 速率为 $10^{-3}s^{-1}$ 或更低,或 $10^{-4}s^{-1}$ 或更低,或 $10^{-5}s^{-1}$ 或更低,如通过SPR所测量的,特别地,其中所述抗体是scFv;

[0197] (iii) 与人PDL1结合的 K_{on} 速率为至少 $10^3M^{-1}s^{-1}$ 或更高,至少 $10^4M^{-1}s^{-1}$ 或更高,至少 $10^5M^{-1}s^{-1}$ 或更高,至少 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 或更高,如通过SPR所测量的,特别地,其中所述抗体是scFv;

[0198] (iv) 与食蟹猴(食蟹猴)PDL1交叉反应,特别是与食蟹猴PDL1结合的KD小于5nM,特别是小于1nM,特别是小于500pM,更特别是小于100pM,优选小于10pM,如通过表面等离子体共振所测量的,特别地其中所述抗体是scFv;不与小鼠PDL1交叉反应,特别是如通过SPR所测量的;和/或

[0199] (v) 不与人PDL2结合,特别是如通过SPR所测量的。

[0200] 如本文所用,术语“亲和力”是指在单个抗原位点上抗体和抗原之间的相互作用的强度。在每个抗原性位点内,抗体“臂”的可变区通过弱的非共价力与抗原在许多位点相互作用;相互作用越大,亲和力越强。

[0201] “结合亲和力”通常是指分子的(例如,抗体的)单个结合位点与其结合伴侣(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”或“与……结合”是指反映结合对的成员(例如抗体片段和抗原)之间的1:1相互作用的

内在结合亲和力。分子X与其伴侣Y的亲和力通常可以用解离常数(KD)表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法来测量,包括本文所述的方法。低亲和力抗体通常会缓慢结合抗原并倾向于易于解离,而高亲和力抗体通常会更快地结合抗原并倾向于保持更长的结合时间。本领域已知测量结合亲和力的多种方法,其中任何一种方法均可用于本发明的目的。下面描述用于测量结合亲和力,即结合强度的具体说明性和示例性实施方案。

[0202] 本文所用的术语“ K_{assoc} ”、“ K_a ”或“ K_{on} ”是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而本文所用的术语“ K_{dis} ”、“ K_d ”或“ K_{off} ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。在一个实施方案中,本文所用的术语“KD”是指解离常数,其由 K_d 与 K_a 之比(即 K_d/K_a)获得,并表示为摩尔浓度(M)。在一个实施方案中,根据本发明的“KD”或“KD值”或“ K_D ”或“ K_D 值”通过使用MASS-1 SPR仪器(Sierra Sensors)使用表面等离子体共振测定法来测量。为了测量亲和力,使用标准的胺偶联方案将对兔IgG Fc区具有特异性的抗体(Bethyl Laboratories, Cat.No.A120-111A)固定在传感器芯片(SPR-2 Affinity Sensor, High Capacity Amine, Sierra Sensors)上。B-细胞上清液中的兔单克隆抗体被固定的抗兔IgG抗体捕获。B细胞上清液中的IgG最低浓度要求足以捕获。捕获单克隆抗体后,将人PDL1(Peprotech)以90nM的浓度注入流动池中3分钟,然后使蛋白质从传感器芯片上捕获的IgG中解离5分钟。每个注射循环后,两次注射10mM甘氨酸-HCl使表面再生。使用MASS-1分析软件(Analyzer, Sierra Sensors)使用一对一Langmuir结合模型计算表观解离速率常数(k_d)和缔合速率常数(k_a)以及表观解离平衡常数(KD),并根据相对 χ^2 (将 χ^2 标准化为分析物的外推最大结合水平)监控拟合质量,其中相对 χ^2 是对曲线拟合质量的度量。 χ^2 的值越小,对一对一Langmuir结合模型的拟合越准确。如果配体结合的反应单位(RU)为抗体捕获的RU的至少2%,则认为结果有效。配体结合的RU少于2%的抗体捕获的RU的样品被认为PDL1与捕获的抗体没有特异性结合。平衡解离常数(K_D)计算为比率 $K_{\text{off}}/K_{\text{on}}$ 。参见,例如,Chen等人, J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。

[0203] 合适地,本发明的抗体对PDL1的亲和力可以高于PDL1对PD-1的亲和力。应当理解,与PDL1对PD-1的亲和力相比,PDL1抗体的更高的亲和力对于解离或中和预先形成的PD-1/PDL1复合物可能是特别有用的。在一个实施方案中,本发明的PDL1抗体中和PD-1/PDL1相互作用。在另一个实施方案中,本发明的PDL1抗体中和B7-1/PDL1相互作用。合适地,本发明的PDL1抗体对PDL1的亲和力可以与阿维鲁单抗对PD-1的亲和力相当或更高。在一个实施方案中,本发明的PDL1抗体以等于或高于阿维鲁单抗的效力中和PD-1/PDL1相互作用。在另一个实施方案中,本发明的PDL1抗体以等于或高于阿维鲁单抗的效力中和B7-1/PDL1相互作用。抗体的结合亲和力可以例如通过解离常数(KD)确定。较低的KD表示较强的亲和力,而较高的KD表示较弱的亲和力。

[0204] 因此,在合适的实施方案中,本发明的抗体的KD可以为1至50,000pM、1至40,000pM、1至30,000pM、1至20,000pM、1至10,000pM、1至5,000pM、1至2,500pM、1至1,000pM、1至750pM、1至500pM、1至250pM、1至100pM、1至50pM、1至10pM。在合适的实施方案中,本发明的抗体的KD可以小于约50nM、小于约45nM、小于约40nM、小于约35nM、小于约30nM、小于约25nM、小于20nM、小于约15nM、小于约10nM、小于约9nM、小于约8nM、小于约7nM、小于约6nM、小于约5nM、小于约4nM、小于约3nM、小于2nM、小于1nM、小于0.5nM、小于0.25nM、小于100pM、小于10pM、或小于5pM,特别是如通过SPR测量的,特别是其中所述抗体是scFv。合适地,本发

明的抗体具有小于5nM的KD,特别是如通过SPR测量的。合适地,本发明的抗体具有小于1nM的KD,特别是如通过SPR测量的。合适地,本发明的抗体具有小于100pM的KD,特别是如通过SPR测量的。合适地,本发明的抗体具有小于50pM的KD,特别是如通过SPR测量的。优选地,本发明的PDL1-BD以小于10pM的KD与人PDL1结合,特别是如通过SPR测量的。更优选地,本发明的PDL1-BD以小于5pM的KD与人PDL1结合,特别是如通过SPR测量的。

[0205] 合适地,本发明的抗体与人PDL1结合的 K_{on} 率为至少 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 或更高、至少 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 或更高、至少 $5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 或更高、至少 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 或更高、至少 $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 或更高、至少 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 或更高、至少 $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 或更高、至少 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 或更高、至少 $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 或更高,如通过表面等离子体共振 (SPR) 测量的。优选地,本发明的抗体的 K_{on} 率为至少 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 或更高、特别是至少 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 或更高,如通过SPR所测量的。

[0206] 合适地,本发明的抗体与人PDL1结合的 K_{off} 率为 $10^{-3} s^{-1}$ 或更低、 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 或更低、 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 或更低、 $10^{-4} s^{-1}$ 或更低、 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更低、 $10^{-5} s^{-1}$ 或更低、 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 或更低、 $10^{-6} s^{-1}$ 或更低或 $10^{-7} s^{-1}$ 或更低,如通过表面等离子体共振 (SPR) 测量的。优选地,本发明的抗体的 K_{off} 率为 $10^{-3} s^{-1}$ 或更低、 $10^{-4} s^{-1}$ 或更低、特别是 $10^{-5} s^{-1}$ 或更低,如通过SPR所测量的。

[0207] 合适地,本发明的抗体特与PDL1异性结合,并以下列参数中的一个或多个为特征:

[0208] (i) 具有中和PDL1/PD-1相互作用的能力,相对于阿维鲁单抗效力的效力(相对效力)(在ELISA测定法中测量的)大于1.5,例如大于2,大于2.5,优选大于3,更优选大于4;并且其中所述相对效力是阿维鲁单抗的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在ELISA测定法中所测量的)与所述抗体的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在ELISA测定法中所测量的)的比,特别地,其中所述抗体是scFv;和

[0209] (ii) 任选地,具有中和PDL1/PD-1相互作用的能力,相对于阿维鲁单抗效力的效力(相对效力)(在NFAT报告基因测定法中测量的)大于1.5,例如大于2,大于2.5,优选大于3,更优选大于4;并且其中所述相对效力是阿维鲁单抗的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在NFAT报告基因测定法中所测量的)与所述抗体的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在NFAT报告基因测定法中所测量的)的比,特别地,其中所述抗体是scFv;和

[0210] (iii) 具有中和PDL1/B7.1相互作用的能力,相对于阿维鲁单抗效力的效力(相对效力)(在ELISA测定法中测量的)大于1.5,例如大于2,大于2.5,优选大于3,更优选大于4;并且其中所述相对效力是阿维鲁单抗的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在ELISA测定法中所测量的)与所述抗体的 IC_{50} 值(以ng/mL为单位,如在ELISA测定法中所测量的)的比,特别地,其中所述抗体是scFv。合适地,本发明的抗体具有有益的生物物理特征。

[0211] 合适地,当为scFv形式时,本发明的抗体的解链温度(T_m)(通过差示扫描荧光法测定)为至少55°C,例如至少60°C,优选至少65°C,更优选至少70°C,特别地,其中将所述抗体配制在pH 6.4、150mM NaCl的50mM磷酸柠檬酸盐缓冲液中。DSF已在前面进行了描述(Egan等人,MAbs,9(1)(2017),68-84;Niesen等人,Nature Protocols,2(9)(2007)2212-2221)。scFv构建体的热解折叠的转变中点是通过差示扫描荧光法使用荧光染料SYPRO® Orange确定的(参见Wong&Raleigh,Protein Science 25(2016)1834-1840)。在pH 6.4的柠檬酸磷酸盐缓冲液中的样品以50µg/mL的最终蛋白质浓度制备,并且含有5x SYPRO® Orange的终浓度,总体积为100µl。将25微升制备的样品一式三份添加到白壁AB基因PCR板中。该分析在用作热循环仪的qPCR机中进行,并使用该软件的自定义染料校准程序检测荧

光发射。将包含测试样品的PCR板以1℃的递增量进行从25℃到96℃的温度变化,在每次温度递增后,暂停30s。总测定时间为约两个小时。通过GraphPad Prism软件使用数学二阶导数方法计算曲线的拐点来计算 T_m 。报告的 T_m 是三个测量值的平均值。

[0212] 合适地,当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,并且特别地,其中将所述抗体配制在pH 6.4的具有150mM NaCl的50mM柠檬酸磷酸缓冲液中,在5个连续的冻融循环后,本发明的抗体的单体含量损失小于5%,优选小于3%,更优选小于1%。

[0213] 合适地,当为scFv形式时,当本发明的抗体的起始浓度为10mg/ml时,并且特别地,其中将所述抗体配制在pH 6.4的具有150mM NaCl的50mM柠檬酸磷酸缓冲液中,在4℃下储存至少2周,特别是至少4周后,本发明的抗体的单体含量损失小于15%,例如小于12%,小于10%,小于7%,小于5%,小于4%,小于3%,小于2%,优选小于1%。

[0214] 单体含量的损失由SE-HPLC色谱图的曲线下面积计算确定。SE-HPLC是一种基于固体固定相和液体流动相的分离技术,如USP第621章所述。该方法利用疏水固定相和水性流动相基于分子的大小和形状来分离分子。分子的分离发生在特定柱的空隙体积(V_0)和总渗透体积(V_T)之间。通过SE-HPLC测量Chromaster HPLC系统(Hitachi High-Technologies Corporation)上进行,该系统配备有自动样品注射和检测波长设定为280nm的UV检测器。该设备由软件EZChrom Elite(Agilent Technologies, Version 3.3.2SP2)控制,该软件还支持对所得色谱图进行分析。在注射前通过离心清除蛋白质样品,并在将自动进样器的温度保持在4-6℃。对于scFv样品的分析,使用Shodex KW403-4F柱(Showa Denko有限公司, #F6989202),标准缓冲盐水流动相(50mM磷酸钠pH 6.5, 300mM氯化钠),推荐流速为0.35mL/min。每次注射的目标样品加载量为5μg。在280nm的波长下通过UV检测器检测样品,并通过合适的软件套件记录数据。在 V_0 至 V_T 的范围内分析所得色谱图,从而排除洗脱时间>10分钟的基质相关的峰。

[0215] 如本文所用,术语“识别”是指发现其构象表位并与之相互作用(例如结合)的抗体。

[0216] 术语“竞争”或“交叉竞争”和相关术语在本文中可互换使用,是指在标准竞争性结合测定中一种抗体干扰其他抗体或结合剂与PDL1的结合的能力。

[0217] 可以使用标准竞争结合测定法来确定一种抗体能够干扰另一种抗体或结合分子与PDL1的结合的能力或程度,并因此确定是否可以说是根据本发明的交叉竞争。一种特别合适的定量交叉竞争测定法使用基于FACS或基于AlphaScreen的方法来测量标记的(例如His标记的、生物素化的或放射性标记的)抗体或其片段与另一种抗体或其片段在它们与靶标结合方面的竞争。通常,交叉竞争抗体或其片段,例如在交叉竞争测定中,将与靶标结合,使得在测定期间并且在存在第二抗体或其片段的情况下,所记录的本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽的位移高达以给定量存在的待测试潜在交叉阻断抗体或其片段的最大理论位移(例如,需要交叉阻断的冷(例如未标记)抗体或其片段置换)的100%(例如,在基于FACS的竞争测定中)。优选地,交叉竞争抗体或其片段的记录的位移在10%至100%之间,更优选在50%至100%之间。

[0218] 术语“表位”是指能够与抗体特异性结合的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面基团(例如氨基酸或糖侧链)组成,通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。“构象”表位和“线性”表位的区别在于,在存在变性溶剂的情况下,与前者的结合丧

失,而与后者的结合不丧失。如本文所用,术语“构象表位”是指,当多肽链折叠形成天然蛋白时,在表面上聚集在一起的抗原氨基酸残基,并且由于Fab结合,它们会显示出显著降低的HD交换速率。构象表位包含但不限于功能性表位。术语“线性表位”是指一种表位,其中蛋白质和相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用点均沿蛋白质的一级氨基酸序列线性发生(连续)。

[0219] 本发明还提供了与表1中列出的PDL1结合抗体结合相同表位的抗体。因此,可以基于它们在PDL1结合测定中与本发明的其他抗体交叉竞争(例如,以统计学上显著的方式竞争性地抑制其结合)的能力来鉴定其他抗体。

[0220] 合适地,本发明的分离的抗体选自由以下组成的组:单克隆抗体、嵌合抗体、IgG抗体、Fab、Fv、scFv、dsFv、scAb、STAB和基于其他支架的结合结构域,所述基于其他支架的结合结构域包括但不限于基于锚蛋白的结构域、fynomer、avimer、anticalin、纤连蛋白和构建在抗体恒定区中的结合位点(例如F-star的Modular Antibody Technology™)。

[0221] 合适地,本发明的分离的抗体是Fv。合适地,本发明的分离的抗体是scFv抗体片段。“单链Fv”或“scFv”或“sFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,Fv多肽进一步包含VH和VL结构域之间多肽接头,其使得sFv能够形成所需的靶标结合结构。“单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv多肽进一步包含VH和VL结构域之间多肽接头,其使得scFv能够形成所需的抗原结合结构(参见,例如,Plückthun, The pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg和Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315)。在特定实施方案中,所述功能片段是scFv形式,其包含根据SEQ ID NO:28的接头。在另一个实施方案中,本发明的分离的抗体是如SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:62所示的单链可变片段(scFv)。在一个优选的实施方案中,本发明的分离的抗体是如SEQ ID NO:31所示的单链可变片段(scFv)。

[0222] 合适地,本发明的分离的抗体是IgG抗体片段。术语“同种型”是指由重链恒定区基因提供的抗体类别(例如,IgM、IgE、IgG例如IgG1或IgG4)。同种型也包括这些类别之一的修饰形式,其中在Fc功能之后进行了修饰,例如以增强或降低效应子功能或与Fc受体的结合。在一个实施方案中,本发明的分离的抗体是选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组的IgG,优选IgG1。

[0223] 合适地,本发明的分离的抗体是IgG1,其包含分别为SEQ ID NO:4、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:14至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:26至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列。在一个更具体的实施方案中,本发明的抗体是IgG1,其包含分别为SEQ ID NO:4、6和7的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:20、21和22的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;重链序列,其包含与SEQ ID NO:93至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和轻链序列,其包含与SEQ ID NO:92至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列。合适地,本发明的

分离的抗体是IgG1,其包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:14至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:26至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列。在一个更具体的实施方案中,本发明的抗体是IgG1,其包含分别为SEQ ID NO:1、2和3的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:17、18和19的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:16至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:27至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列。

[0224] 合适地,本发明的分离的抗体是IgG1,其包含分别为SEQ ID NO:35、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:45至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:57至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列。在一个更具体的实施方案中,本发明的抗体是IgG1,其包含分别为SEQ ID NO:35、37和38的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:51、52和53的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;重链序列,其包含与SEQ ID NO:91至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和轻链序列,其包含与SEQ ID NO:90至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列。

[0225] 合适地,本发明的分离的抗体是IgG1,其包含分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:45至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:57至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列。在一个更具体的实施方案中,本发明的抗体是IgG1,其包含分别为SEQ ID NO:32、33和34的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列,以及分别为SEQ ID NO:48、49和50的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列;VH序列,其包含与SEQ ID NO:47至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列;和VL序列,其包含与SEQ ID NO:57至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99百分比,优选至少90百分比相同的氨基酸序列。

[0226] 在本发明的另一个具体实施方案中,本发明的分离的抗体是多特异性分子,特别是具有至少第二功能分子的多特异性分子,例如双特异性分子、三特异性分子、四特异性、五特异性、六特异性分子。

[0227] 如本文所用,术语“多特异性分子”或“多特异性抗体”是指与至少两个或更多个不同靶标(例如,PDL1和不同于PDL1的另一个靶标)上的两个或更多个不同表位结合的抗体,或与同一靶标的两个或更多个不同表位结合的抗体。术语“多特异性分子”包括双特异性、三特异性、四特异性、五特异性和六特异性抗体。如本文所用,术语“双特异性抗体”是指与两个不同靶标或相同靶标上的两个不同表位结合的抗体。如本文所用,术语“三特异性抗体”是指与三个不同靶标或相同靶标上的三个不同表位结合的抗体。

[0228] 可以将本发明的抗体衍生化或与另一种功能分子,例如另一种肽或蛋白质(例如,另一种抗体或受体的配体)连接,以产生与至少两个结合位点和/或不同靶标分子结合的多特异性分子。实际上,可将本发明的抗体衍生化或与不止一个其他功能分子连接,以产生与不止两个不同结合位点和/或靶标分子结合的多特异性分子。为了产生本发明的多特异性分子,可以将本发明的抗体与一个或多个其他结合分子,例如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物功能性地连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式),从而产生多特异性分子。

[0229] 因此,本发明包括多特异性分子,其包含至少一个对PDL1的第一结合特异性和对第二靶表位的第二结合特异性。例如,第二靶表位存在于不同于PDL1的另一种靶分子上。因此,本发明包括多特异性分子,其包含至少一个对PDL1的第一结合特异性和对第二靶表位的第二结合特异性。例如,第二靶表位是不同于第一靶表位的PDL1的另一表位。除了第一和第二靶表位之外,多特异性分子还可以包括第三结合特异性。

[0230] 在另一个实施方案中,本发明包括对PDL1特异性的单价、二价或多价的多特异性分子,优选单价。

[0231] 在本发明的另一个具体实施方案中,本发明的分离的抗体是PDL1特异性分子的单价或多价,例如二价,三价,四价,五价,六价。

[0232] 如本文所用,术语“单价分子”或“单价抗体”是指与靶分子(例如PDL1)上的单个表位结合的抗体。

[0233] 术语“多价抗体”是指具有不止一价(valency)的单个结合分子,其中“价”被描述为与相同靶分子上的表位结合的抗原结合部分的数目。这样,单个结合分子可以与不止一个靶分子结合,或者与一个靶分子(其包含多个拷贝的表位)上的不止一个结合位点结合。多价抗体的实例包括但不限于二价抗体、三价抗体、四价抗体、五价抗体等。如本文所用,术语“二价抗体”是指具有两个抗原结合部分的抗体,每个都与相同的表位结合。

[0234] 合适地,本发明的分离的抗体是多特异性分子,例如双特异性分子,和/或多价分子,例如对于PDL1特异性分子是单价的,对于PDL1特异性分子是二价的,其是选自本领域已知的任何合适的多特异性(例如双特异性)形式的抗体形式,包括但不限于基于以下的形式:单链双抗体(scDb)、串联scDb(Tandab)、线性二聚体scDb(LD-scDb)、环状二聚体scDb(CD-scDb)、双特异性T细胞接合子(BiTE;串联双-scFv)、串联三-scFv、三抗体(Fab-(scFv)₂)或双抗体(Fab-(scFv)₁)、Fab、Fab-Fv₂、Morrison(IgG CH₃-scFv融合体(Morrison L)或IgG CL-scFv融合体(Morrison H))、三抗体、scDb-scFv、双特异性Fab₂、双微抗体、四抗体、scFv-Fc-scFv融合体、scFv-HSA-scFv融合体、双双抗体、DVD-Ig、COVD、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv₂-Fc、IgG-scFv融合体例如bsAb(与轻链的C-末端连接的scFv)、Bs1Ab(与轻链的N-末端连接的scFv)、Bs2Ab(与重链的N-末端连接的scFv)、Bs3Ab(与重链的C-末端连接的scFv)、Ts1Ab(与重链和轻链的N-末端连接的scFv)、Ts2Ab(与重链的C-末端连接的dsscFv)、基于异二聚体Fc结构域的双特异性抗体例如Knob-into-Hole抗体(KiH)(通过KiH技术制备的双特异性IgG);与异二聚体Fc结构域或任何其他异二聚体结构域的任意一条链的N-和/或C-末端融合的Fv、scFv、scDb、串联双-scFv、串联三-scFv、Fab-(scFv)₂、Fab-(scFv)₁、Fab、Fab-Fv₂、COVD、MATCH(描述于W02016/0202457;Egan T.等人,mAbs 9(2017) 68-84)和Duobody(通过Duobody技术制备的双特异性IgG)(MAbs.2017Feb/Mar;9(2):182-

212.doi:10.1080/19420862.2016.1268307)。特别适用于本文的是单链双抗体(scDb)或scDb-scFv。

[0235] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,这些片段包含与同一条多肽链中的VL连接的VH(VH-VL)。通过使用接头,该接头太短以至于不允许同一条链上的两个结构域之间配对,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对,以产生两个抗原结合位点。在特定实施方案中,所述多肽接头包含一个或两个单元的四个(4)甘氨酸氨基酸残基和一个(1)丝氨酸氨基酸残基(GGGGS)_n,其中n=1或2,优选1。双抗体可以是二价或双特异性的。双抗体在例如EP 404097,WO 93/01161,Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)和Holliger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)中更充分地描述。三抗体和四抗体也描述于Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。

[0236] 双特异性scDb,特别是双特异性单体scDb,特别地包含两个可变重链结构域(VH)或其片段和两个可变轻链结构域(VL)或其片段,它们通过接头L1、L2和L3以以下顺序连接VHA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VLA、VHA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VLA、VLA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VHA、VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA、VHB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VLB、VHB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VLB、VLB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VHB或VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB,其中VLA和VHA结构域共同形成第一抗原的抗原结合位点,VLB和VHB共同形成第二抗原的抗原结合位点。

[0237] 接头L1特别是2-10个氨基酸,更特别是3-7个氨基酸,最特别是5个氨基酸的肽,并且接头L3特别是1-10个氨基酸,更特别是2-7个氨基酸,最特别是5个氨基酸的肽。在特定实施方案中,接头L1和/或L3包含一个或两个单元的四个(4)甘氨酸氨基酸残基和一个(1)丝氨酸氨基酸残基(GGGGS)_n,其中n=1或2,优选n=1。

[0238] 中间接头L2特别是10-40个氨基酸,更特别地15-30个氨基酸,最特别地20-25个氨基酸的肽。在特定实施方案中,所述接头L2包含一个或多个单元的四个(4)甘氨酸氨基酸残基和一个(1)丝氨酸氨基酸残基(GGGGS)_n,其中n=1、2、3、4、5、6、7或8,优选n=4。

[0239] 在本发明的一个实施方案中,分离的抗体是scDb-scFv形式的多特异性和/或多价抗体。术语“scDb-scFv”是指抗体形式,其中单链Fv(scFv)片段通过柔性Gly-Ser接头与单链双抗体(scDb)融合。在一个实施方案中,所述柔性Gly-Ser接头是2-40个氨基酸,例如2-35、2-30、2-25、2-20、2-15、2-10个氨基酸,特别是10个氨基酸的肽。在特定实施方案中,所述接头包含四个(4)甘氨酸氨基酸残基和一个(1)丝氨酸氨基酸残基(GGGGS)_n,其中n=1、2、3、4、5、6、7或8,优选n=2。

[0240] 在一个本发明的实施方案中,分离的抗体是WO 2016/0202457;Egan T.等人,mAbs 9(2017)68-84中描述的MATCH形式的多特异性和/或多价抗体。

[0241] 本发明的多特异性和/或多价分子可以使用本领域已知的任何方便的抗体制备方法来制备(关于双特异性构建体的生产,例如参见Fischer,N.&Leger,O.,Pathobiology 74(2007)3-14;关于双特异性双抗体和串联scFv的生产,例如参见Hornig,N.&Färber-Schwarz,A.,Methods Mol.Biol.907(2012)713-727和WO 99/57150)。用于制备本发明的双特异性构建体的合适方法的具体实例还包括Genmab技术(参见Labrijn等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 110(2013)5145-5150)和Merus技术(参见de Kruif等人,Biotechnol.Bioeng.106(2010)741-750)技术。用于生产包含功能性抗体Fc部分的双特异性抗体的方法在本领域中也是已知的(参见,例如,Zhu等人,Cancer Lett.86(1994)127-

134);和Suresh等人,Methods Enzymol.121(1986)210-228)。

[0242] 可以在本发明的多特异性和多价分子中使用的其他抗体是鼠、嵌合和人源化单克隆抗体。

[0243] 可以使用本领域已知的方法通过将组成结合特异性缀合来制备本发明的多特异性分子。例如,可以单独生成双特异性分子的每种结合特异性,然后将其彼此缀合。当结合特异性是蛋白质或肽时,可以使用多种偶联剂或交联剂进行共价结合。交联剂的实例包括蛋白质A、碳二亚胺(carbodiimide)、N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻苯二甲酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)(参见例如,Karpovsky等人,1984J.Exp.Med.160:1686;Liu,M A等人,1985 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648)。其他方法包括Paulus,1985Behring Ins.Mitt.No.78,118-132;Brennan等人,1985 Science 229:81-83和Glennie等人,1987J.Immunol.139:2367-2375中描述的方法。缀合剂是SATA和磺基-SMCC,两者均可从Pierce Chemical有限公司(Rockford,Ill.)获得。

[0244] 当结合特异性是抗体时,它们可以通过两条重链的C末端铰链区的巯基键缀合。在一个特别的实施方案中,在缀合之前,将铰链区修饰为包含奇数个巯基残基,例如一个。

[0245] 或者,可以在相同载体中编码两个或更多个结合特异性,并在相同宿主细胞中表达和装配。当双特异性分子是mAb X mAb、mAb X Fab、Fab X F(ab')₂或配体X Fab融合蛋白时,此方法特别有用。本发明的多特异性分子可以是包含一个单链抗体和结合决定簇的单链分子,或者可以是包含两个结合决定簇的单链多特异性分子。多特异性分子可以包含至少两个单链分子。制备多特异性分子的方法描述于例如美国专利号5,260,203;美国专利号5,455,030;美国专利号4,881,175;美国专利号5,132,405;美国专利号5,091,513;美国专利号5,476,786;美国专利号5,013,653;美国专利号5,258,498;和美国专利号5,482,858中。

[0246] 双特异性分子与其特异性靶标的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(REA)、FACS分析、生物测定(例如生长抑制)或蛋白质印迹测定来确认。这些测定中的每一种通常通过采用对目标复合物具有特异性的标记试剂(例如抗体)来检测特定目标蛋白质-抗体复合物的存在。

[0247] 在另一方面,本发明提供了一种核酸,其编码本发明的抗体。本发明还提供了一种核酸序列,其编码与PDL1蛋白特异性结合的抗体的CDR、VH、VL、全长重链和全长轻链。可以对此类核酸序列进行优化以在哺乳动物细胞中表达。

[0248] 术语“核酸”在本文中与术语“多核苷酸”互换使用,并且是指一种或多种单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接(linkage)的核酸,它们是合成的、天然存在的和非天然存在的,具有与参考核酸相似的结合特性,并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。除非另有说明,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如简并密码子取代)和互补序列,以及明确指出的序列。具体而言,如下所述,简并密码子取代可以通过生成这样的序列来实现,即在所述序列中一个或多个选定(或全部)密码子

的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷 (deoxyinosine) 残基取代 (Batzer等人, *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka等人, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; 和Rossolini等人, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994)。

[0249] 本发明提供了基本上纯化的核酸分子, 其编码多肽, 所述多肽包含上述PDL1结合抗体链的区段或结构域。当从合适的表达载体表达时, 由这些核酸分子编码的多肽能够表现出PDL1抗原结合能力。

[0250] 本发明还提供了多核苷酸, 其编码表1中列出的PDL1结合抗体的重链或轻链的至少一个CDR区并且通常编码所有三个CDR区。一些其他多核苷酸编码表1中列出的PDL1结合抗体的重链和/或轻链的所有或基本上所有可变区序列。由于密码子的简并性, 将有多核苷酸序列编码每种免疫球蛋白氨基酸序列。

[0251] 多核苷酸序列可以从头通过固相DNA合成或通过PCR诱变编码PDL1结合抗体的现有序列 (例如, 以下实施例中描述的序列) 来产生。核酸的直接化学合成可以通过本领域已知的方法来完成, 例如Narang等人, 1979, *Meth. Enzymol.* 68:90的磷酸三酯法; Brown等人, *Meth. Enzymol.* 68:109, 1979的磷酸二酯法; Beaucage等人, *Tetra. Lett.*, 22:1859, 1981的二乙基亚磷酰胺法; 和美国专利号4,458,066的固体支撑法。通过PCR将突变引入多核苷酸序列中可以通过例如如下文献中描述的方法来进行: *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis等人 (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif, 1990; Mattila等人, *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; 和Eckert等人, *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991。

[0252] 本发明还提供了用于生产上述PDL1结合抗体的表达载体和宿主细胞。

[0253] 术语“载体”旨在指能够转运已与其连接的另一种多核苷酸的多核苷酸分子。载体的一种类型是“质粒”, 其是指环状双链DNA环, 其中可以连接其他DNA区段。载体的另一种类型是病毒载体, 其中可以将其他DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们导入的宿主细胞中自主复制 (例如, 具有细菌复制起点的细菌载体和游离体 (episomal) 哺乳动物载体)。在导入宿主细胞后, 其他载体 (例如非游离体哺乳动物载体) 可以被整合到宿主细胞的基因组中, 从而与宿主基因组一起复制。

[0254] 此外, 某些载体能够指导与其可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体” (或简称为“表达载体”)。通常, 在重组DNA技术中有用的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中, “质粒”和“载体”可以互换使用, 因为质粒是最常用的载体形式。然而, 本发明旨在包括具有等同功能的此类其他形式的表达载体, 例如病毒载体 (例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0255] 术语“可操作地连接”是指两个或更多个多核苷酸 (例如, DNA) 片段之间的功能关系。通常, 它是指转录调节序列与转录序列的功能关系。例如, 如果在合适的宿主细胞或其他表达系统中, 启动子或增强子序列刺激或调节编码序列的转录, 则它与该编码序列可操作地连接。通常, 与转录序列可操作地连接的启动子转录调控序列与转录序列在物理上是连续的, 即, 它们是顺式的。但是, 某些转录调控序列, 例如增强子, 不必在物理上连续或位于其增强转录的编码序列的附近。

[0256] 可以使用各种表达载体来表达编码PDL1结合抗体链或结合片段的多核苷酸。基于

病毒的表达载体和非病毒表达载体均可用于在哺乳动物宿主细胞中生产抗体。非病毒载体和系统包括质粒、游离体载体(通常具有用于表达蛋白质或RNA的表达盒)和人工染色体(参见例如Harrington等人,Nat Genet.15:345,1997)。例如,可用于在哺乳动物(例如人)细胞中表达PDL1结合多核苷酸和多肽的非病毒载体包括pThioHis A、B和C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、B和C(Invitrogen, San Diego, Calif.)、MPS V载体和本领域已知的用于表达其他蛋白质的许多其他载体。有用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒的载体,基于SV40、乳头瘤病毒、HBP爱泼斯坦巴尔病毒(HBP Epstein Barr virus)、牛痘病毒载体和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus, SFV)的载体。参见Brent等人,同上;Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995;和Rosenfeld等人, Cell 68:143, 1992。

[0257] 表达载体的选择取决于要在其中表达载体的预期宿主细胞。通常,表达载体包含与编码PDL1结合抗体的多核苷酸可操作地连接的启动子和其他调控序列(例如,增强子)。在一个实施方案中,采用诱导型启动子来防止插入序列在非诱导条件下的表达。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。转化生物体的培养物可以在非诱导条件下扩增,而不会使群体偏向于表达产物被宿主细胞更好地耐受的编码序列。除启动子外,有效表达PDL1结合抗体还可能需要或期望其他调控元件。这些元件通常包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。另外,可以通过包含适合使用中的细胞系统的增强子来增强表达的效率(参见,例如,Scharf等人, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994;和Bittner等人, Meth. Enzymol., 153:516, 1987)。例如,可以使用SV40增强子或CMV增强子来增加在哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0258] 表达载体还可以提供分泌信号序列位置,从而与由插入的PDL1结合抗体序列编码的多肽形成融合蛋白。通常,在包含在载体中之前,将插入的PDL1结合抗体序列与信号序列连接。用于接收编码PDL1结合抗体轻链和重链可变结构域的序列的载体有时也编码恒定区或其部分。这种载体允许可变区表达为与恒定区的融合蛋白,从而导致产生完整的抗体及其抗原结合片段。通常,这样的恒定区是人的。

[0259] 术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)是指已将重组表达载体引入其中的细胞。应当理解,这些术语不仅旨在指特定的对象细胞,而且还指该细胞的后代。因为由于突变或环境影响,在后代中可能发生某些修饰,所以此类后代实际上可能与亲本细胞不同,但仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0260] 包含和表达PDL1结合抗体链的宿主细胞可以是原核的或真核的。大肠杆菌是一种可用于克隆和表达本发明的多核苷酸的原核宿主。其他适用的微生物宿主包括杆菌,例如枯草芽孢杆菌,以及其他肠杆菌科,例如沙门氏菌、沙雷氏菌和各种假单胞菌。在这些原核宿主中,还可以制备表达载体,其通常包含与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制起点)。另外,将存在任意数量的各种众所周知的启动子,例如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常控制表达(任选地与操纵子序列一起),并具有核糖体结合位点序列等,用于启动和完成转录和翻译。其他微生物,例如酵母,也可以用于表达本发明的PDL1结合多肽。还可以将昆虫细胞与杆状病毒载体结合使用。

[0261] 在一个实施方案中,使用哺乳动物宿主细胞来表达和生产本发明的PDL1结合多肽。例如,它们可以是表达内源性免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系,也可以是具有外源性表

达载体的哺乳动物细胞系。这些包括任何正常的终将死亡的(mortal)或者正常或异常的永生的动物或人类细胞。例如,已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。哺乳动物组织细胞培养物表达多肽的用途在Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987中大体地描述。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可以包括表达控制序列,例如复制起点、启动子和增强子(参见,例如,Queen等人, Immunol. Rev. 89: 49-68, 1986), 和必要的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有来源于哺乳动物基因或哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型、细胞类型特异性、阶段特异性和/或可调节的或可调控的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP polIII启动子、组成型MPS V启动子、四环素诱导型CMV启动子(例如人立即早期CMV启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0262] 引入包含目的多核苷酸序列的表达载体的方法取决于细胞宿主的类型。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主。(大体上参见Sambrook等人,同上)。其他方法包括,例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、弹道法(ballistic method)、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒体、与疱疹病毒结构蛋白VP22的融合体(Elliot和O'Hare, Cell 88:223, 1997)、试剂增强的DNA吸收和离体转导。为了长期、高产量的生产重组蛋白,通常需要稳定的表达。例如,可以使用本发明的表达载体制备稳定表达PDL1结合抗体链或结合片段的细胞系,所述表达载体包含病毒复制起点或内源性表达元件和选择标记基因。引入载体后,可以使细胞在丰富的培养基中生长1-2天,然后将其转换为选择性培养基。选择标记的目的是赋予对选择的抗性,并且其存在允许成功表达引入序列的细胞在选择培养基中生长。有抗性的、稳定转染的细胞可以使用适合细胞类型的组织培养技术增殖。因此,本发明提供了一种生产本发明的抗体的方法,其中所述方法包括以下步骤:培养宿主细胞,所述宿主细胞包括(特别是表达)编码本发明的抗体的核酸或载体,由此表达本发明的所述抗体或其片段。

[0263] 另一方面,本发明涉及一种药物组合物,其包含本发明的抗体和药学上可接受的载体。药学上可接受的载体增强或稳定组合物,或促进组合物的制备。药学上可接受的载体包括生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0264] 本发明的药物组合物可以通过本领域已知的多种方法来施用。施用途径和/或方式取决于所需结果。施用可以是静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下施用,或在靶部位附近施用。药学上可接受的载体应适合于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)。取决于施用途径,活性化合物即抗体和多特异性分子可以用一种材料包被,以保护该化合物免受酸和可能使该化合物失活的其他自然条件的影响。

[0265] 本发明的药物组合物可以根据本领域众所周知的和常规实践的方法制备。参见,例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; 和 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。药物组合物优选在GMP条件下制造。通常,在本发明的药物组合物中采用治疗有效剂量或有效剂量的PDL1结合抗体。通过本

领域技术人员已知的常规方法将PDL1结合抗体配制成药学上可接受的剂型。调整剂量方案以提供最佳的所需反应(例如治疗反应)。例如,可以施用单次推注,可以随时间施用数个分开的剂量,或者可以根据治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠胃外组合物以易于施用和剂量均匀是特别有利的。本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位包含经计算可与所需的药物载体一起产生所需的治疗效果的预定量的活性化合物。

[0266] 可以改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得可以针对特定患者、组合物和施用方式有效地实现所需治疗反应,而对病人无毒的活性成分的量。所选择的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括所使用的本发明的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、所使用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所使用的特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、所治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康状况和既往病史等因素。

[0267] 抗体通常被多次施用。单剂之间的间隔可以是每周、每月或每年。间隔也可以是不规则的,如通过测量患者中PDL1结合抗体的血液水平所指示的。或者,抗体可以作为缓释制剂施用,在这种情况下,需要较低频率的施用。剂量和频率取决于抗体在患者中的半衰期。通常,人源化抗体的半衰期比嵌合抗体和非人抗体的半衰期更长。施用的剂量和频率可以根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,在很长一段时间内以相对不频繁的间隔施用相对较低的剂量。一些患者终生持续接受治疗。在治疗应用中,有时需要以相对较短的间隔施用相对较高的剂量,直到疾病的进展减少或终止,并且优选直到患者显示出疾病症状的部分或完全缓解。此后,可以对患者施用预防方案。

[0268] 本发明的抗体具有体外和体内诊断和治疗用途。例如,可以将这些分子施用于培养的(例如体外或体内)或受试者(例如体内)的细胞中,以治疗、预防或诊断多种疾病。

[0269] 一方面,本发明涉及用作药物的本发明的抗体或本发明的组合物。

[0270] 一方面,本发明涉及用于治疗有此需要的受试者的增生性疾病(特别是癌症)的本发明的抗体或本发明的组合物。

[0271] 另一方面,本发明涉及本发明的抗体或本发明的组合物用于治疗有此需要的受试者的增生性疾病(特别是癌症)中的用途。

[0272] 另一方面,本发明涉及本发明的抗体或本发明的组合物在制备用于治疗有此需要的受试者的增生性疾病(特别是癌症)的药物中的用途。

[0273] 一方面,本发明提供了一种治疗有此需要的受试者的增生性疾病(特别是癌症)的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本发明的抗体或本发明的组合物。

[0274] 术语“受试者”包括人类和非人类动物。非人类动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人类灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非另有说明,否则术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。

[0275] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”、“治疗(treated)”等是指获得期望的药理和/或生理效果。就部分或完全治愈疾病和/或归因于该疾病的不良影响或延迟疾病进展而言,该作用可能是治疗性的。如本文所用,“治疗”涵盖对哺乳动物例如人类的疾病的任何治疗,并且包括:(a)抑制疾病,即阻止其发展;和(b)减轻疾病,即引起疾病消退。

[0276] 术语“治疗有效量”或“有效量”是指当施用于哺乳动物或其他受试者以治疗疾病时足以引起对疾病的这种治疗的剂的量。“治疗有效量”将根据剂、疾病及其严重程度以及被治疗受试者的年龄、体重等而变化。

[0277] 在一实施方案中,增生性疾病是癌症。术语“癌症”是指以异常细胞的快速且不受控制的生长为特征的疾病。癌细胞可以局部扩散,也可以通过血液和淋巴系统扩散到身体的其他部位。本文描述了多种癌症的实例,其包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。术语“肿瘤”和“癌症”在本文可互换使用,例如,两个术语均涵盖实体和液体(例如扩散或循环的)肿瘤。如本文所用,术语“癌”或“肿瘤”包括恶变前以及恶性癌症和肿瘤。本文使用的术语“癌症”是指广泛的肿瘤,包括所有实体和血液恶性肿瘤。此类肿瘤的例子包括但不限于:良性或特别是恶性肿瘤、实体瘤、脑癌、肾癌、肝癌、肾上腺癌、膀胱癌、乳腺癌、腹部癌(例如胃肿瘤)、食道癌、卵巢癌、子宫颈癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌(例如非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、阴道癌、甲状腺癌、黑素瘤(例如不可切除的或转移性黑素瘤)、肾细胞癌、肉瘤、胶质母细胞瘤、多发性骨髓瘤或胃肠道癌尤其是结肠癌或结直肠腺瘤、头颈部肿瘤、子宫内膜癌、Cowden综合征、Lhermitte-Duclos病、Bannayan-Zonana综合征、前列腺增生、赘生物尤其是上皮特征的赘生物优选乳癌癌或鳞状细胞癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病(例如费城染色体阳性慢性骨髓性白血病)、急性淋巴细胞性白血病(例如费城染色体阳性急性淋巴细胞性白血病)、非霍奇金淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病及其任意组合。在一个优选的实施方案中,癌症是肺癌,优选非小细胞肺癌(NSCLC)。在另一个实施方案中,所述癌症是结直肠癌。

[0278] 本发明的抗体或本发明的组合物抑制实体瘤的生长,但也抑制液体瘤的生长。在另一个实施方案中,增生性疾病是实体瘤。术语“实体瘤”尤其是指乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、腹部癌(尤其是胃癌)、子宫颈癌、肺癌(例如非小细胞肺癌和小细胞肺癌)和头颈部肿瘤。此外,取决于肿瘤类型和所使用的特定组合,可以获得肿瘤体积的减小。本发明的抗体或本发明的组合物还适合于预防患有癌症的受试者中的肿瘤的转移扩散和微转移瘤(micrometastases)的生长或发展。

[0279] 术语“预防(preven)”或“预防(prevention)”是指完全抑制疾病的发展或疾病的任何继发作用。如本文所用,术语“预防”包括预防疾病或病况发生在可能易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的个体中。

[0280] 一方面,本发明涉及一种试剂盒,其包含本发明的抗体或本发明的药物组合物。试剂盒可以包括一个或多个其他元件,包括:使用说明;其他试剂,例如标记,治疗剂或可用于使抗体与标记或治疗剂螯合或以其他方式偶联的试剂,或放射防护组合物;用于制备用于施用的抗体分子的装置或其他材料;药学上可接受的载体;以及用于向受试者施用的装置或其他材料。在一个具体的实施方案中,试剂盒包含药学有效量的本发明的抗体。在另一个实施方案中,试剂盒包含药学有效量的冻干形式的本发明的抗体和稀释剂,以及任选地包含使用说明。所述试剂盒还可以包括用于重构的过滤针和用于注射的针。

[0281] 表1:本发明的PDL1抗体的实例(CDR残基以粗体和斜体字母显示)。

[0282]

SEQ ID 编号	Ab 区	序列
37-20-B03		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (H27-H42; AHo 编号)	GFSFNSDYWIY
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (H57-H76; AHo 编号)	SIYGGSSGNTQYASWAQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (H108-H138; AHo 编号)	RGYVDYGGATDL
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (AHo 定义) (37-20-B03sc01)	VSGFSFNSDYW
SEQ ID NO: 5	HCDR1 (AHo 定义) (37-20-B03sc02) (37-20-B03 sc09.1)	ASGFSFNSDYW
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (AHo 定义)	IYGGSSGNTQYASWAQGR
SEQ ID NO: 7	HCDR3 (AHo 定义)	GYVDYGGATD
SEQ ID NO: 8)	HCDR1 (Kabat 定义)	SDYWIY
SEQ ID NO: 9	HCDR2 (Kabat 定义)	SIYGGSSGNTQYASWAQG
SEQ ID NO: 10	HCDR3 (Kabat 定义)	GYVDYGGATDL
SEQ ID NO: 11	HCDR1 (Chothia 定义)	GFSFNSDY

[0283]

SEQ ID NO: 12	HCDR2 (Chothia 定义)	GGSSG
SEQ ID NO: 13	HCDR3 (Chothia 定义)	YVDYGGATD
SEQ ID NO: 14	VH (VH4) (37-20-B03sc01)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSG <i>FSFN</i> SDYWIYWIRQPPGKGLEWIGSI <i>YGGSSGNTQYASWAQGR</i> VTISVDSSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYV <i>DYGGATDL</i> WGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 15	VH (VH1) (37-20-B03sc02)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <i>GFSFN</i> SDYWIYWVRQAPGQGLEWM <i>GSIYGGSSGNTQYASWAQGR</i> VTMTR DTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCAR <i>GYVDYGGATDL</i> WGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 16	VH (VH3) (37-20-B03 sc09.1) 突变: G56A; Y105F	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSFN</i> SDYWIYWVRQAPGKGLEWIA <i>SIYGGSSGNTQYASWAQGR</i> FTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARG <i>YVDYGGATDL</i> WGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 17	LCDR1 (L24-L42; AHo 编号) (Kabat 定义)	QASQSIGTYLA
SEQ ID NO: 18	LCDR2 (L58-L72; AHo 编号) (Kabat 定义)	RAFILAS
SEQ ID NO: 19	LCDR3 (L107-L138; AHo 编号)	QSNFYSDSTTIGPNA

[0284]

	(Kabat 定义)	
SEQ ID NO: 20	LCDR1 (AHo 定义)	ASQSIGTY
SEQ ID NO: 21	LCDR2 (AHo 定义)	RAFILASGVPSR
SEQ ID NO: 22	LCDR3 (AHo 定义)	NFYSDSTTIGPN
SEQ ID NO: 23 (Chothia)	LCDR1 (Chothia 定义)	SQSIGTY
SEQ ID NO: 24 (Chothia)	LCDR2 (Chothia 定义)	RAF
SEQ ID NO: 25 (Chothia)	LCDR3 (Chothia 定义)	NFYSDSTTIGPN
SEQ ID NO: 26	VL (Vk1-sk17) (37-20-B03sc01) (37-20-B03sc02)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC QAS QSIGTYLAWY QKPGKAPKLLIY RAF ILAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYC QSNFYSDSTTIGPNA FGT GTKVTVLG
SEQ ID NO: 27	VL (Vk1-sk17) (37-20-B03 sc09.1) 突变: S9A; A51P	DIQMTQSPASLSASVGDRVITITC QAS QSIGTYLAWY QKPGKPPKLLIY RAF ILAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYC QSNFYSDSTTIGPNA FGT GTKVTVLG
SEQ ID NO: 28	接头	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 29	scFv (VL-接头-VH) (37-20-B03sc01)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC QAS QSIGTYLAWY QKPGKAPKLLIY RAF ILAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYC QSNFYSDSTTIGPNA FGT

[0285]

		GTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC KVS GFSFNSDYWIY WIRQPPGKGLE WIG SIYGGSSGNTQYASWAQ GRVTIS VDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARGYVDYGGATDL WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 30	scFv (VL-接头-VH) (37-20-B03sc02)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QAS QSIGTYLAWY QKPGKAPKLLIY RAF ILAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYC QSNFYSDSTTIGPNA FGT GTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKAS GFSFNSDYWIY WVRQAPGQGL EWMG SIYGGSSGNTQYASWAQ GRVT MTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYY CARGYVDYGGATDL WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 31	scFv (VL-接头-VH) (37-20-B03 sc09.1)	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITC QAS QSIGTYLAWY QKPGKPPKLLIY RA FILAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC QSNFYSDSTTIGPNA FG TGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAAS GFSFNSDYWIY WVRQAPGK GLEWIAS SIYGGSSGNTQYASWAQ RFTISRDNKNTVYLQMNSLRRAEDTA VYFCARGYVDYGGATDLWGQGLTV TVSS
33-03-G02		

[0286]

SEQ ID NO: 32	HCDR1 (H27-H42; AHo 编号)	GFSFSSGYDMC
SEQ ID NO: 33	HCDR2 (H57-H76; AHo 编号)	CVVAGSVDITYYASWAKG
SEQ ID NO: 34	HCDR3 (H108-H138; AHo 编号)	RKDAYSDAFNL
SEQ ID NO: 35	HCDR1 (AHo 定义) (33-03-G02 sc01)	VSGFSFSSGYD
SEQ ID NO: 36	HCDR1 (AHo 定义) (33-03-G02 sc03 Full) (33-03-G02 sc18)	ASGFSFSSGYD
SEQ ID NO: 37	HCDR2 (AHo 定义)	VVAGSVDITYYASWAKGR
SEQ ID NO: 38	HCDR3 (AHo 定义)	KDAYSDAFN
SEQ ID NO: 39	HCDR1 (Kabat 定义)	SGYDMC
SEQ ID NO: 40	HCDR2 (Kabat 定义)	CVVAGSVDITYYASWAKG
SEQ ID NO: 41	HCDR3 (Kabat 定义)	KDAYSDAFNL
SEQ ID NO: 42	HCDR1 (Chothia 定义)	GFSFSSGY
SEQ ID NO: 43	HCDR2 (Chothia 定义)	AGSVD
SEQ ID NO: 44	HCDR3	DAYSDAFN

[0287]

	(Chothia 定义)	
SEQ ID NO: 45	VH (VH4) (33-03-G02 sc01)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSG <i>FSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGC</i> <i>VVAGSVDITYYASWAKGRVTISVDSS</i> KNQFSLKLSSVTAADTAVYYC <i>ARKD</i> <i>AYSDAFNLWGQGLTVTVSS</i>
SEQ ID NO: 46	VH (VH4) (33-03-G02 sc03 Full) (突变: V2S; V25A; I44V; G56A; V82K; F89V; Y105F)	QSQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASG <i>FSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWIA C</i> <i>VVAGSVDITYYASWAKGRVTISKDSS</i> KNQVSLKLSSVTAADTAVYFC <i>ARKD</i> <i>AYSDAFNLWGQGLTVTVSS</i>
SEQ ID NO: 47	VH (VH4) (33-03-G02 sc18) 突变 VH: V25A; I44; G56A; V82K; F89V (AHo 编号)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASG <i>FSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWIA C</i> <i>VVAGSVDITYYASWAKGRVTISKDSS</i> KNQVSLKLSSVTAADTAVYYC <i>ARKD</i> <i>AYSDAFNLWGQGLTVTVSS</i>
SEQ ID NO: 48	LCDR1 (L24-L42; AHo 编号) (Kabat 定义)	QASQSINDYLA
SEQ ID NO: 49	LCDR2 (L58-L72; AHo 编号) (Kabat 定义)	KASTLAS
SEQ ID NO: 50	LCDR3 (L107-L138; AHo 编号) (Kabat 定义)	QQGYIITDIDNV
SEQ ID NO: 51	LCDR1 (AHo 定义)	ASQSINDY
SEQ ID NO: 52	LCDR2	KASTLASGVPSR

[0288]

	(AHo 定义)	
SEQ ID NO: 53	LCDR3 (AHo 定义)	GYIITDIDN
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Chothia 定义)	SQSINDY
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Chothia 定义)	KAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Chothia 定义)	GYIITDIDN
SEQ ID NO: 57	VL (Vk1-sk17) (33_03_G02 sc01) (33-03-G02 sc18)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QAS QSINDYLAWY QQKPGKAPKLLIY KAS TLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC QQGYIITDIDN VFGTGT KVTVLG
SEQ ID NO: 58	VL (Vk1-sk17) (33_03_G02 sc03 Full) (突变 VL: I2F; M4L; A51P)	DFQLTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQ SINDYLAWY QQKPGKSPKLLIY KAST LAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYC QQGYIITDIDN VFGTGTK VTVLG
SEQ ID NO: 59	接头	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 60	scFv (VL-接头-VH) (33_03_G02 sc01)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QAS QSINDYLAWY QQKPGKAPKLLIY KAS TLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC QQGYIITDIDN VFGTGT KVTVLGGGGSGGGSGGGSGGGG GSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKV SGFSFSSGYDMC WIRQPPGKGLEWIG CVVAGSVDITYYASWAK GRVTISVDS

[0289]

		SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC <i>ARK</i> <i>DAYSDAFNLWGQGLVTVSS</i>
SEQ ID NO: 61	scFv (VL-接头-VH) (33_03_G02 sc03 Full)	DFQLTQSPSSLSASVGDRVITITC <i>QASQ</i> <i>SINDYLAWYQQKPGKSPKLLIYKAST</i> <i>LASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP</i> EDFATYYC <i>QQGYIITDIDNV</i> FGTGTK VTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQSQLQESGPGLVKPSETLSLTCKAS <i>GFSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWIA</i> <i>CVVAGSV DITYYASWAKGRVTISKDS</i> SKNQVSLKLSSVTAADTAVYFC <i>ARK</i> <i>DAYSDAFNLWGQGLVTVSS</i>
SEQ ID NO: 62	scFv (VL-接头-VH) (33-03-G02 sc18)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <i>QAS</i> <i>QSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS</i> <i>TLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ</i> PEDFATYYC <i>QQGYIITDIDNV</i> FGTGT KVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKA <i>SGFSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWI</i> <i>ACVVAGSV DITYYASWAKGRVTISKD</i> SSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYC <i>AR</i> <i>KDAYSDAFNLWGQGLVTVSS</i>

[0290] 表2. 与本发明有关的其他序列。

[0291]

SEQ ID 编号	Ab 区	序列
SEQ ID NO: 63	人 PDL1	MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDL YVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALI VYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSS

[0292]

		YRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKL QDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNA PYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEG YPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKR EEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRL DPEENHTAELVIPPLAHPNERTHLV ILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDV KKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
SEQ ID NO: 64	基于 Vλ 种系的 FR4 Sk17	FGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 65	基于 Vλ 种系的 FR4 Sk12	FGGGTKLTVLG
SEQ ID NO: 66	基于 Vλ 种系的 FR4	FGGGTQLILG
SEQ ID NO: 67	基于 Vλ 种系的 FR4	FGEGTELTVLG
SEQ ID NO: 68	基于 Vλ 种系的 FR4	FGSGTKVTVLG
SEQ ID NO: 69	基于 Vλ 种系的 FR4	FGGGTQLTVLG
SEQ ID NO: 70	基于 Vλ 种系的 FR4	FGGGTQLTALG

[0293] 表3. 包含本发明的抗体的多特异性分子的实例。

[0294]

SEQ ID 编号	Ab 形式	序列
PRO885 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o)		
SEQ ID NO: 71	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTV LGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTI

[0295]

		<p>SVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC</p> <p>ARHPSDAVYGYANNLWGQGLTVTS</p> <p>SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQM</p> <p>TQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSINN</p> <p>LAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGV</p> <p>PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY</p> <p>YCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGG</p> <p>GSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVS</p> <p>GFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGC</p> <p>VVAGSVDITYYASWAKGRVTISVDSS</p> <p>KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDA</p> <p>YSDAFNLWGQGLTVTVSS</p>
PRO951 (38-27-C05 sc02 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o)		
SEQ ID NO: 72	scDb	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQS</p> <p>INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL</p> <p>ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED</p> <p>FATYYCQQGYITDIDNVFGTGTKVTV</p> <p>LGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR</p> <p>LSCAASGFSFNNDYDMCWVRQAPGK</p> <p>GLEWIGCIDTGDGSTYYASWAKGRFTI</p> <p>SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC</p> <p>AREAASSSGYGMGYFDLWGQGLTVT</p> <p>VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQ</p> <p>MTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSVY</p> <p>DNNWLAWYQQKPGKAPKLLIYRASN</p> <p>LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE</p> <p>DFATYYCQGYLSSNWWYAFGTGTK</p> <p>VTVLGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSE</p>

[0296]

		TSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPG KGLEWIGCVVAGSVDITYYASWAKGR VTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARKDAYSDAFNLWGQGLTVTVSS
PRO1123 (38-02-A04 sc05 IF scDb-i/33_03_G02 sc01 scDb-o)		
SEQ ID NO: 73	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTV LGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCKVSGFSFSNSYWICWVRQPPGKGL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTI SVDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFC ARHPSDAVYGYANNLWGQGLTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQM TQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSINN LAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGG SQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSG FSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCV VAGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAY SDAFNLWGQGLTVTVSS
PRO1124 (38-02-A04 sc06 Full scDb-i/33_03_G02 sc01 scDb-o)		
SEQ ID NO: 74	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED

[0297]

		FATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTV LGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLS LTCKASGFSEFSNSYWICWVRQPPGKGL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTI SKDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFC ARHPSDAVYGYANNLWGQGLTVTVS SGGGGSGGGSGGGSGGGGSLQM TQSPSSLASVGDRVITITCQASQSINN LAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGG SQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSG FSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCV VAGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAY SDAFNLWGQGLTVTVSS
PRO1125 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33_03_G02 sc02 IF scDb-o)		
SEQ ID NO: 75	scDb	DIQMTQSPSSLASVGDRVITITCQASQS INDYLAWYQQKPGKSPKLLIYKASTLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCKVSGSEFSNSYWICWIRQPPGKGLE WIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTIS VDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RHPSDAVYGYANNLWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGSGGGGSIQMT QSPSSLASVGDRVITITCQASQSINNVL

[0298]

		AWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQSSYGNYGDFGTGKVTVLG GGGG SQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSG FSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWIACV VAGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSK NQFSLKLSSVTAADTAVYFCARKDAY SDAFNLWGQGLTVTVSS
PRO1126 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33_03_G02 sc03 Full scDb-o)		
SEQ ID NO: 76	scDb	DFQLTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQS INDYLAWYQQKPGKSPKLLIYKASTLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQGYIITDIDNVFGTGKVTVL GGGGGS QVQLQESGPGLVKPSETLSL TCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGLE WIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTIS VDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RHPSDAVYGYANNLWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMT QSPSSLSASVGDRVITITCQASQSINNVL AWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQSSYGNYGDFGTGKVTVLG GGGG SQSQLQESGPGLVKPSETLSLTCKASG FSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWIACV VAGSVDITYYASWAKGRVTISKDSSK NQVSLKLSSVTAADTAVYFCARKDAY SDAFNLWGQGLTVTVSS

[0299]

PRO1134 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33_03_G02 sc07 GL VH3 scDb-o)		
SEQ ID NO: 77	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDAVTITCQASQ SINDYLAWYQQKPGKSPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTV LGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTI SVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARHPSDAVYGYANNLWGQGLVTVS SGGGGS SGGGSGGGSGGGSGGGSIQM TQSPSSLSASVGDRVITCQASQSINN LAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGG GSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFSFSSGYDMCWVRQAPGKGLEWV GCVVAGSDITYYASWAKGRFTISR NSKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAR KDAYSDAFNLWGPGTLVTVSS
PRO963 (= PRO1051) (38_02_A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o/19-01-H04-sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 78	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTV LGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGL

[0300]

		EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTI SVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARHPSDAVYGYANNLWGQGLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQM TQSPSSLASVGDRVITITCQASQSINN LAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQSSYGNYGDFGTGKVTVL GGGG GSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVS GFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGC VVAGSVDITYYASWAKGRVTISVDSS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDA YSDAFNLWGQGLVTVSS GGGGSGG GGSIQMTQSPSSLASVGDRVITITCQSS ESVYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYD ASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCAGGFSSSDTAFGGGTK LTVL GGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSLSSNAMGWVRQAPGKLEYIGIISV GGFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSS GAFYLVWGQGLVTVSS
PRO966 (= PRO1052) (38_27_C05 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o/19-01-H04-sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 79	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLASVGDRVITITCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQGGYIITDIDNVFGTGTGVTV

[0301]

		LGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCKVSGFSFNNDYDMCWIRQPPGKG LEWIGCIDTGDGSTYYASWAKGRVTIS VDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA REAASSSGYGMGYFDLWGQGLTVTS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYD NNWLAWYQQKPGKAPKLLIYRASNL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQGTYLSSNWWAFGTGTKV TVLGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSET LSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGK GLEWIGCVVAGSVDITYYASWAKGRV TISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARSDAYSDAFNLWGQGLTVTVSSG GGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCQSSSESVYSNNQLSWYQQKPGQP PKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDF TLTISLQPEDFATYYCAGGFSSSDTA FGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKGL EYIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYQLQMNSLRAEDTATYFCARDR HGGDSSGAFYLVWGQGLTVTVSS
PRO1057 (38_02_A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o/mxr HSA (23-13-A01-sc03, sk17sh4))		
SEQ ID NO: 80	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL

[0302]

ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED
 FATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTV
 LGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLS
 LTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGL
 EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTI
 SVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
 ARHPSDAVYGYANNLWGQGLTVTVS
 SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQM
 TQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINN
 LAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGV
 PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY
 YCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGG
 GSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVS
 GFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGC
 VVAGSVDITYYASWAKGRVTISVDSS
 KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDA
 YSDAFNLWGQGLTVTVSSGGGGSGG
 GGSVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQA
 SQIISRSAWYQQKPGQPPKLLIYQASK
 LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
 DFATYYCQCTYIDSNFGAFGGGTKLT
 VLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE
 VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS
 FSSSYWICWVRQAPGKGLEWVGCVFT
 GDGTTYASWAKGRFTISRDNKNTV
 YLQMNSLRAEDTATYFCARPVSVYYY
 GMDLWGQGLTVTVSS

PRO1058 (38_27_C05 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o/mxr HSA (23-13-A01-sc03, sk17sh4))

[0303]

SEQ ID NO: 81	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTV LGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLS LTCKVSGFSFNNDYDMCWIRQPPGKG LEWIGCIDTGDGSTYYASWAKGRVTIS VDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA REAASSSGYGMGYFDLWGQGLTVTS SGGGGS SGGGGS SGGGGS SGGGSIQM TQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSVYD NNWLAWYQQKPGKAPKLLIYRASNL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQGTYLSSNWWAFGTGTKV TVLGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSET LSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGK GLEWIGCVVAGSVDITYYASWAKGRV TISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARKDAYSDAFNLWGQGLTVTVSSG GGGSGGGGS VVMTQSPSSLSASVGDR VTITCQASQIISRSAWYQQKPGQPPKL LIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQCTYIDSNFGAFGG GTKLTVLGGGGGS GGGGSGGGGS GGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSFSSSYWICWVRQAPGKGLEW VGCVFTGDGTTYASWAKGRFTISR D NSKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARP
---------------	-----------	---

[0304]

		VSVYYYGMDLWGQGLTVTVSS
PRO1059 (33-03-G02 IgG1 LC, 其具有 38_02_A04 sc01 scFv, PDL1/CD137(scFv) 沉默 Morrison)		
SEQ ID NO: 82	Morrison-L 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQGYITDIDNVFGTGTKVTV LGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRG ECGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASV GDRVITTCQASQSINNVLAWYQQKPG KAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGGT DFTLTISLQPEDFATYYCQSSYGNYG DFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLS LTCKVSGFSFSNSYWICWIRPPGKGL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTI SVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARHPSDAVYGYANNLWGQGLTVTVS S
SEQ ID NO: 83	Morrison-L 重链	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGF SFSSGYDMCWIRPPGKGLEWIGCVV AGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYS DAFNLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

[0305]

		SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
PRO1060 (33-03-G02 IgG1 HC, 其具有 38_02_A04 sc01 scFv, PDL1/CD137(scFv) 沉默 Morrison)		
SEQ ID NO: 84	Morrison-H 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPED FATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTV LGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 85	Morrison-H 重链	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGF SFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVV AGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYS DAFNLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

[0306]

		SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGS GGGSIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCASQSINNVLAWYQQKPGK APKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGD FGTGTKVTVLGGGGSGGGSGGG GSGGGGS QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTI SVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARHPSDAVYGYANNLWGQGLTVTS S
PRO1061 (33-03-G02 sc01 IgG1 LC, 其具有 38_27_C05 sc01 scFv, PDL1/CD137(scFv) 沉默 Morrison)		
SEQ ID NO: 86	Morrison-L 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQGGYITDIDNVFGTGTKVTV LGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC

[0307]

		LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG ECGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLASV GDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPG KAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQSSYGNYG DFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLS LTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTI SVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARHPSDAVYGYANNLWGQGLTVTS S
SEQ ID NO: 87	Morrison-L 重链	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGF SFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVV AGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYS DAFNLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL

[0308]

		VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
PRO1062 (33-03-G02 sc01 IgG1 HC, 其具有 38_27_C05 sc01 scFv, PDL1/CD137(scFv) 沉默 Morrison)		
SEQ ID NO: 88	Morrison-H 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQGYITDIDNVFGTGTKVTV LGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 89	Morrison-H 重链	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGF SFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVV AGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYS DAFNLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG

[0309]

		QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGS GGGSIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGK APKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYG FGTGTKVTVLGGGGSGGGSGGG GSGGGGS QVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTI SVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARHPSDAVYGYANNLWGQGTLVTVS S
PRO1137 (33-03-G02-sc01 IgG1)		
SEQ ID NO: 90	轻链 IgG	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQS INDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTV LGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 91	重链 IgG	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGF SFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVV AGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKN

[0310]

		<p>QFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYS</p> <p>DAFNLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL</p> <p>APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</p> <p>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</p> <p>SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT</p> <p>KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG</p> <p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV</p> <p>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</p> <p>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN</p> <p>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ</p> <p>PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV</p> <p>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP</p> <p>VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</p> <p>FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
PRO1196 (37-20-B03 sc01 IgG1)		
SEQ ID NO: 92	轻链 IgG	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQS</p> <p>IGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYRAFLA</p> <p>SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDF</p> <p>ATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTGTKV</p> <p>TVLGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV</p> <p>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG</p> <p>NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA</p> <p>DYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN</p> <p>RGEC</p>
SEQ ID NO: 93	重链 IgG	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGF</p> <p>SFNSDYWIYWIRQPPGKGLEWIGSIYG</p> <p>GSSGNTQYASWAQGRVTISVDSSKNQ</p> <p>FSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVDYG</p>

[0311]

GATDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
K

[0312] 在本申请的全文中,如果说明书的文本(例如,表1至表3)与序列表之间存在差异,则以说明书的文本为准。

[0313] 应当理解,为清楚起见在单独的实施方案的背景下描述的本发明的某些特征也可以在单个实施方式中组合提供。相反,为简洁起见在单个实施方案的背景下描述的本发明的各种特征也可以单独地或以任何合适的子组合的形式提供。与本发明有关的实施方案的所有组合都被本发明特别地涵盖,并且在本文中公开,就好像每个组合都被单独地明确地公开了一样。另外,各种实施方案及其元素的所有子组合也被本发明特别地涵盖,并且在本文中公开,就好像每个这样的子组合都在本文中被单独地明确地公开了一样。

[0314] 本发明不限于本文所述的具体实施方案的范围。实际上,除了本文描述的那些之外,根据前面的描述,本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见。这样的修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0315] 在各自的专利法允许的范围内,本文引用的所有专利、申请、出版物、测试方法、文献和其他材料均通过引用并入本文。

[0316] 下列实施例举例说明了上述发明,但并不意图以任何方式限制本发明的范围。相关领域技术人员已知的其他测试模型也可以确定所要求保护的发明的有益效果。

[0317] 实施例

[0318] 针对人PDL1的新型抗体。

[0319] 实施例1:针对人PDL1的兔抗体的生成

[0320] 已经用重组生产和纯化的人PDL1细胞外结构域对兔进行了免疫。在免疫过程中,通过确定多克隆血清抗体依旧能够与抗原产生可检测的结合的每只兔的血清的最大稀释度(滴度),定性评估了针对抗原的体液免疫应答的强度。使用酶联免疫吸附测定(ELISA)评

估了针对固定化抗原(重组人PDL1细胞外结构域)的血清抗体滴度。所有免疫的兔都显示出非常高的滴度,为至少 $1:2.64 \times 10^6$ 稀释的血清。第一次抗原注射前来自相同兔的血清用作背景对照。

[0321] 实施例2:命中物鉴定和选择。

[0322] 在命中物鉴定程序中,开发了基于流式细胞术的分选方案,其特异性地检测高亲和力和hPDL1结合B细胞,并将其分离。为了鉴定结合hPDL1的B细胞,用荧光染料R-藻红蛋白(R-PE)标记hPDL1 ECD。由于标记的PDL1上的PD-1结合位点和抗PDL1中和抗体的结合位点可能会被大体积的R-PE标记物阻断,因此通过流式细胞术证实了抗原决定簇的可及性。将与人IgG1或阿维鲁单抗的Fc部分融合的PD-1细胞外结构域捕获在蛋白G珠上,并通过流式细胞术确认了R-PE标记的PDL1的结合。荧光强度与固定在珠上的受体结合的标记PDL1的数量成正比。已经确认了PDL1与PD-1和中和抗体的结合,同时没有检测到无关细胞因子与抗PDL1抗体的结合。

[0323] 筛选:

[0324] 在筛选阶段获得的结果是基于用来自抗体分泌细胞(ASC)的培养物上清液的未纯化抗体进行的测定,因为高通量培养的规模不允许纯化单个兔抗体。这些上清液允许将大量抗体相对于彼此进行排序,但除了结合亲和力之外不提供绝对值。在至少四个星期的过程中,从每个单独培养的克隆中收集上清液。在培养期结束时,在高通量ELISA中表征每种细胞培养上清液中的兔单克隆抗体对重组人PDL1细胞外结构域的结合。进一步表征结合PDL1的上清液对人和食蟹猴PDL1的结合动力学。此外,通过竞争ELISA以及基于细胞的报告基因测定法确定PDL1/PD-1相互作用的中和潜力。还通过竞争ELISA测定了PDL1/B7-1相互作用的中和。除了结合动力学之外,高通量筛选的报告值应解释为答案“是”或“否”,这些答案基于单点测量(无剂量响应)。通过直接ELISA分析上清液的小鼠PDL1结合潜力,并且仅测定阳性上清液的结合动力学。

[0325] hPDL1结合的直接ELISA

[0326] 通过添加50 μ l含有500ng/ml PDL1的PBS将ELISA板在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。第二天,将板以溢流模式用每孔450 μ l洗涤缓冲液(PBS,0.005% Tween 20)洗涤3次,并向每个孔中加入300 μ l阻断缓冲液(PBS,1% BSA,0.2% Tween 20),在室温下在nutating混合器上放置1小时。然后,将板以溢流模式用450 μ l洗涤缓冲液洗涤3次,每种上清液加入50 μ l,将板在室温下轻轻搅拌孵育1.5小时。以溢流模式用450 μ l洗涤缓冲液洗涤3次后,向每个孔中添加50 μ l HRP偶联的山羊和兔IgG抗体。在室温下在nutating混合器上孵育1h后,将板用每孔450 μ l洗涤缓冲液洗涤,然后添加50 μ l TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺,KPL,Cat.No.53-00-00)。显影5至10分钟后,通过每孔加入50 μ l 1M HCl终止酶促反应,并以690nm为参考波长在450nm读板。

[0327] SPR测定的对hPDL1的亲和力

[0328] 使用MASS-1SPR仪器(Sierra Sensors)通过表面等离子体共振(SPR)测量抗体对人PDL1的结合亲和力。为了进行亲和力筛选,使用标准的胺偶联方案将对兔IgG Fc区具有特异性的抗体(Bethyl Laboratories,Cat.No.A120-111A)固定在传感器芯片(SPR-2Affinity Sensor,High Capacity Amine,Sierra Sensors)上。B-细胞上清液中的兔单克隆抗体被固定的抗兔IgG抗体捕获。B细胞上清液中的IgG最低浓度要求足以捕获。捕获单克

隆抗体后,将人PDL1 (Peprotech)以90nM的浓度注入流动池中3分钟,然后使蛋白质从传感器芯片上捕获的IgG中解离5分钟。每个注射循环后,两次注射10mM甘氨酸-HCl使表面再生。使用MASS-1分析软件 (Analyzer, Sierra Sensors) 使用一对一Langmuir结合模型计算表观解离速率常数(k_d)和缔合速率常数(k_a)以及表观解离平衡常数(K_D),并根据相对 χ^2 (将 χ^2 标准化为分析物的外推最大结合水平)监控拟合质量,其中相对 χ^2 是对曲线拟合质量的度量。 χ^2 的值越小,对一对一Langmuir结合模型的拟合越准确。对于大多数命中物,相对 χ^2 值低于10%。如果配体结合的反应单位(RU)为抗体捕获的RU的至少2%,则认为结果有效。配体结合的RU少于2%的抗体捕获的RU的样品被认为PDL1与捕获的抗体没有特异性结合。

[0329] PDL1/PD-1阻断ELISA

[0330] 通过添加50 μ l含有2 μ g/ml PD-1的PBS将ELISA板在4℃下包被过夜。第二天,将板以溢流模式用每孔450 μ l洗涤缓冲液洗涤3次,并向每个孔中加入300 μ l阻断缓冲液,在室温下在nutating混合器上放置1小时。然后,将PDL1在阻断缓冲液中稀释,浓度比所需最终浓度250ng/ml高20倍。进一步调整了测定灵敏度,并在40ng/ml PDL1的存在下分析了几个克隆。接着,在非结合板中,将114 μ l的每种上清液用6 μ l含有PDL1的阻断缓冲液稀释,将板在nutating混合器上在室温下孵育1小时。ELISA板以溢流模式用每孔450 μ l洗涤缓冲液洗涤3次,然后将每种稀释液向ELISA板上添加50 μ l。将板在室温下在温和搅拌下孵育1.5小时。每孔用450 μ l洗涤缓冲液洗涤3次后,向ELISA板的每个孔中添加50 μ l 10ng/ml链霉亲和素-polyHRP40。在室温孵育1小时后,将板用450 μ l洗涤缓冲液洗涤3次,并在添加50 μ l TMB后显影5至10分钟。最后,通过加入50 μ l 1M HCl终止酶促反应,并以690nm为参考波长在450nm读板。

[0331] PDL1/B7-1阻断ELISA

[0332] 通过添加50 μ l含有4 μ g/ml B7-1的PBS将ELISA板在4℃下包被过夜。第二天,将板以溢流模式用每孔450 μ l洗涤缓冲液洗涤3次,并向每个孔中加入300 μ l阻断缓冲液,在室温下在nutating混合器上放置1小时。然后,将PDL1在阻断缓冲液中稀释,浓度比所需最终浓度500ng/ml高20倍。接着,在非结合板中,将114 μ l的每种上清液用6 μ l含有PDL1的阻断缓冲液稀释,将板在nutating混合器上在室温下孵育1小时。ELISA板以溢流模式用每孔450 μ l洗涤缓冲液洗涤3次,然后将每种稀释液向ELISA板上添加50 μ l。将板在室温下在温和搅拌下孵育1.5小时。每孔用450 μ l洗涤缓冲液洗涤3次后,向ELISA板的每个孔中添加50 μ l 10ng/ml链霉亲和素-polyHRP40。在室温孵育1小时后,将板用450 μ l洗涤缓冲液洗涤3次,并在添加50 μ l TMB后显影5至10分钟。最后,通过加入50 μ l 1M HCl终止酶促反应,并以690nm为参考波长在450nm读板。

[0333] 在基于细胞的测定(报告基因)上的PDL1/PD-1阻断

[0334] 为了进一步表征命中物,使用CHO/PDL1/TCR激活细胞和Jurkat/PD-1细胞测试了当细胞表面上同时表达两种相互作用的分子时,它们中和PDL1/PD-1相互作用的能力。将100 μ l细胞培养基(DMEM/F12, 10%FCS)中的35,000个CHO/PDL1/TCR激活细胞添加到白细胞培养板的内孔中,并在37℃和5%CO₂下孵育16-20小时。第二天,从每个孔中移出95 μ l细胞培养基,并加入50 μ l筛选的B细胞上清液或阳性对照,其中阿维鲁单抗的浓度确定为产生最大信号的0%、50%和100%,并将平板在37℃下孵育30分钟。然后,将50 μ l以400,000细胞/

ml稀释在测定缓冲液(含10%FCS的RPMI1640)中的效应Jurkat细胞添加到每个孔中,并将板在37℃和5%CO₂下孵育6小时。最后,每孔加入50μl根据制造商方案制备的荧光素酶底物(BPS Bioscience),并将板在黑暗中孵育30分钟,使用Topcount测量发光。

[0335] 通过SPR测定的物种特异性:食蟹猴和小鼠

[0336] 还确定了与食蟹猴和小鼠PDL1的结合动力学,使用了与针对与人PDL1的结合所描述的相同的SPR设置,但是分别用食蟹猴或小鼠PDL1代替人PDL1。

[0337] 筛选命中的选择

[0338] 表4列出了B细胞上清液中最终克隆的单克隆抗体的药理特性。

[0339] 实施例3:命中物确认。

[0340] 克隆与生产

[0341] 在鉴定了命中物确认选择的克隆之后,将这些兔抗体克隆表达并纯化以进行进一步表征。相应的轻链和重链可变结构域的克隆需要将DNA片段体外连接到合适的哺乳动物表达载体中。这些表达载体含有兔IgG轻链和重链恒定结构域的共有序列,以允许在共表达时组装和分泌全功能的兔单克隆IgG。载体构建后,再次确认所得构建体的序列,并扩增和纯化质粒DNA用于哺乳动物细胞转染。

[0342] 将兔抗体重链和轻链的表达载体通过基于脂质的转染试剂转染至哺乳动物悬浮细胞系中,以进行瞬时异源表达。优化了诸如重链与轻链载体之比之类的条件,以得到分泌的单克隆IgG的稳定表达水平。将表达培养物在振荡培养箱中培养7天。在异源表达期结束时,通过离心收集细胞培养上清液。随后,通过蛋白A珠亲和纯化分泌的兔IgG。洗涤负载IgG的珠,并通过pH变化洗脱纯化的抗体。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、280nm的UV吸光度和尺寸排阻高效液相色谱(SE-HPLC)分析洗脱级分,以验证身份、含量和纯度。表5总结了rIgG的制备和表征。

[0343]

表 4. B 细胞上清液中单克隆抗体的药效特性： 33-03-G02 和 37-20-B03。

克隆 ID	对hPD-L1的亲合力 (SPR)				对小鼠PD-L1的亲合力 (SPR)				报告基因检测中PD-L1的中和抑制 (%)	PD-L1/PD-1抑制ELISA中的中和抑制 (%)		PD-L1/B7-1抑制ELISA中的中和抑制 (%)
	k_s [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [M]		k_s [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [M]			250 ng/mL hPD-L1 抑制 (%)	40 ng/mL hPD-L1 抑制 (%)	
33-03-G02	1.02E+05	3.41E-05	3.34E-10		1.31E+05	7.33E-06	5.60E-11		100	101		100
37-20-B03	5.98E+05	7.39E-04	1.24E-09		8.11E+05	3.23E-04	3.99E-10		51		100	58

[0344] 表5.兔单克隆抗体制备分析数据总结。

克隆ID	平均化浓度 [μg/μl]	等分试样体积 [mL]	量 [μg]	最终产量 [mg/L]	表达体积 [mL]	单体含量[%]
33-03-G02	0.816	0.75	612	15.3	40	98.4

构建体 ID	表达体积 [mL]	最终产量 [mg]	每 L 表达的 产量 [mg/L]	纯度 SE-HPLC [% 单体]	缓冲液
33-03-G02	40	0.61	15.3	98.4	PBS 1X, pH 7.4
37-20-B03	40	0.29	6.7	99.0	PBS 1X, pH 7.4

[0346] SPR测定的对hPDL1的亲合力

[0347] 使用MASS-1SPR仪器 (Sierra Sensors) 通过表面等离子体共振 (SPR) 确定纯化的单克隆兔抗体对人PDL1的结合动力学。由于大多数抗体显示出非常慢的脱落速率,因此在37℃的高盐浓度缓冲液中进行实验,以区分不同抗体的结合亲和力。使用标准的胺偶联方案将对兔IgG Fc区具有特异性的抗体 (Bethyl Laboratories, Cat.No. A120-111A) 固定在传感器芯片 (SPR-2Affinity Sensor, High Capacity Amine, Sierra Sensors) 上。兔单克隆抗体被固定的抗兔IgG抗体捕获。捕获单克隆抗体后,测试PDL1 (范围从90到0.35nM) 在含有150mM NaCl和150mM MgCl₂的HEPES缓冲液中的两倍系列稀释液与生物传感器芯片上捕获的IgG的结合,并使蛋白质从传感器芯片上捕获的IgG中解离5分钟。每个注射循环后,两次注射10mM甘氨酸-HCl使表面再生。使用MASS-1分析软件 (Analyzer, Sierra Sensors) 使用一对一Langmuir结合模型计算表观解离速率常数 (k_d) 和缔合速率常数 (k_a) 以及表观解离平衡常数 (K_D), 并根据相对Chi² (将Chi²标准化为分析物的外推最大结合水平) 监控拟合质量,其中相对Chi²是对曲线拟合质量的度量。Chi²的值越小,对一对一Langmuir结合模型的拟合越准确。对于大多数命中物,相对Chi²值低于10%。表6示出了选择用于进一步开发的兔IgG抗体。

[0348] 表6. 兔IgG 33-03-G02和37-20-B03对hPDL1的亲合力测量总结。

克隆 ID	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k _d [s ⁻¹]	K _D [M]	标准化为理论 Rmax 的结合水 平 (%)
3-03-G02	3.76E+05	1.99E-05	5.28E-11	70.00%
37-20-B03	5.26E+05	4.08E-05	7.76E-11	94.00%

[0350] PDL1/PD-1阻断ELISA的功效

[0351] 在竞争ELISA中评估了中和PDL1与PD-1结合的能力。通过添加50μl含有4μg/ml PD-1的PBS将ELISA板在4℃下包被过夜。第二天,将板以溢流模式用每孔450μl洗涤缓冲液

(PBS, 0.005 % Tween 20) 洗涤3次,并向每个孔中加入300μl阻断缓冲液 (PBS, 1 % BSA, 0.2 % Tween 20),在室温下在nutating混合器上放置1小时。然后,在阻断缓冲液中将PDL1稀释至1ng/ml的终浓度。接下来,在非结合板中,每孔制备120μl的测试rIgG在含PDL1的缓冲液 (范围从300至0.005ng/ml) 中的系列稀释液,并将板在室温下孵育30分钟。ELISA板以溢流模式用450μl洗涤缓冲液洗涤3次,并在ELISA板的相邻孔中添加50μl的每种稀释液,以得到重复样品。将板在室温下在温和搅拌下孵育90分钟。用450μl洗涤缓冲液洗涤3次后,向ELISA板的每个孔中添加50μl 10ng/ml链霉亲和素-polyHRP40。在室温孵育1小时后,将板用450μl洗涤缓冲液洗涤3次,并在添加50μl TMB后显影5至10分钟。最后,通过加入50μl 1M HCl终止酶促反应,并以690nm为参考波长在450nm读板。

[0352] 来自克隆33-03-G02和37-20-B03的兔IgG具有中和PDL1/PD-1相互作用的高效力。克隆37-20-B03的效力几乎是阿维鲁单抗的两倍 (表7)。选择的克隆获得的剂量响应曲线示于图1中。

[0353] 表7. 兔IgG 33-03-G02和37-20-B03的PDL1/PD-1竞争ELISA中中和效力的总结。

[0354]	PDL1 / PD-1 竞争 ELISA 中的效力			
	克隆 ID	IC ₅₀ [ng/ml]	相对 IC ₅₀	
			[IC ₅₀ , 阿维鲁单抗/ IC ₅₀ , IgG]	最大抑制率 (%)
	33-03-G02	2.13	0.85	100.0
	37-20-B03	1.44	2.03	99.9

[0355] PDL1/B7-1阻断ELISA的功效

[0356] 在竞争ELISA中评估了中和PDL1/B7-1相互作用的效力。通过添加50μl含有4μg/ml B7-1的PBS将ELISA板在4℃下包被过夜。第二天,将板以溢流模式用每孔450μl洗涤缓冲液 (PBS, 0.005 % Tween 20) 洗涤3次,并向每个孔中加入300μl阻断缓冲液 (PBS, 1 % BSA, 0.2 % Tween 20),在室温下在nutating混合器上放置1小时。然后,在阻断缓冲液中将PDL1稀释至40ng/ml。接下来,在非结合板中,每孔制备120μl的测试rIgG在含PDL1的缓冲液 (范围从900至0.015ng/ml) 中的系列稀释液,并将板在室温下孵育30分钟。ELISA板以溢流模式用450μl洗涤缓冲液洗涤3次,并在ELISA板的相邻孔中添加50μl的每种稀释液,以得到重复样品。将板在室温下在温和搅拌下孵育90分钟。用450μl洗涤缓冲液洗涤3次后,向ELISA板的每个孔中添加50μl链霉亲和素-polyHRP40。在室温孵育1小时后,将板用450μl洗涤缓冲液洗涤3次,并在添加50μl TMB后显影5至10分钟。最后,通过加入50μl 1M HCl终止酶促反应,并以690nm为参考波长在450nm读板。选择的兔IgG能够以与阿维鲁单抗相似的效力阻断PDL1/B7-1相互作用,如表8所示。选择的克隆获得的剂量响应曲线示于图2中。

[0357] 表8. 选择的rIgG在PDL1/B7-1竞争ELISA中的中和效力。

PDL1 / B7-1 竞争 ELISA 中的效力			
克隆 ID	IC ₅₀ [ng/ml]	相对 IC ₅₀	最大抑制率 (%)
		[IC ₅₀ , 阿维鲁单抗/ IC ₅₀ , IgG]	
33-03-G02	14.85	1.01	94.7
37-20-B03	14.82	1.02	95.0

[0359] 基于细胞的PDL1/PD-1阻断测定(报告基因)中的效力

[0360] 在基于细胞的报告基因测定中评估了中和PDL1与PD-1的结合的效力。将100μl细胞培养基(DMEM/F12, 10%FCS)中的35,000个CHO/PDL1/TCR激活细胞添加到白细胞培养板的内孔中,并在37℃和5%CO₂下孵育16-20小时。第二天,从每个孔中取出95μl细胞培养基,并加入50μl各个待测分子(包括参考阿维鲁单抗)的2倍浓缩系列稀释液(3,000至0.46ng/ml)。然后,将50μl以400,000细胞/ml稀释在测定缓冲液(含10%FCS的RPMI1640)中的效应Jurkat细胞添加到每个孔中,并将板在37℃和5%CO₂下孵育6小时。最后,每孔加入50μl根据制造商方案制备的荧光素酶底物(BPS Bioscience),并将板在黑暗中孵育30分钟,使用Topcount测量发光。选择的克隆能够在基于细胞的报告基因测定中阻断PDL1/PD-1相互作用(表9)。选择的克隆获得的剂量响应曲线示于图3中。

[0361] 表9. 报告基因检测中选择的rIgG的PDL1/PD-1相互作用的中和力总结。

NFAT报告基因检测			
克隆ID	EC ₅₀ [ng/ml]	相对 EC ₅₀	最大抑制率 (相对于Avelumab, 单位%)
		[EC ₅₀ , avelumab/ EC ₅₀ , IgG]	
33-03-G02	50.99	1.01	114.5

[0363] 通过FACS确定的对PDL1表达细胞的结合

[0364] 还确定了选择的IgG与PDL1表达细胞的结合效力。将50,000个CHO-PDL1表达细胞分配到圆底非组织培养处理的96孔板中。通过以400x g离心5分钟,将细胞用100μl PBS洗涤两次。将细胞重悬于100μl的测试rIgG以及对照IgG阿维鲁单抗的系列稀释液中,该系列稀释液是在染色缓冲液(PBS, 2%BCS热灭活, 2mM EDTA)中制备的,浓度范围为2,000至0.128ng/ml。在nutating混合器上于4℃孵育1小时后,将细胞用100μl染色缓冲液洗涤3次,并以400x g离心5分钟。然后,将用兔IgG处理过的细胞重悬于100μl含2μg/ml APC标记的山羊抗兔IgG的染色缓冲液中,并将用阿维鲁单抗(人IgG1)处理过的细胞重悬于100μl含2μg/ml APC标记的山羊抗人IgG的染色缓冲液中。将板在nutating混合器上于4℃孵育1小时。将板用100μl染色缓冲液洗涤3次,然后重悬于最终体积为50μl的染色缓冲液中。最后,使用Novocyte流式细胞仪系统(ACEA Bioscience)通过流式细胞术分析每孔20,000个事件的APC信号。对于所有评估的兔IgG,均可确认PDL1表达细胞的结合。表10示出了与选择的兔IgG的细胞PDL1的结合效力。

[0365] 表10.选择的兔IgG对细胞PDL1的结合效力。

与细胞PD-L1结合			
克隆ID	EC ₅₀ [ng/ml]	相对. EC ₅₀ [EC _{50, avelumab} / EC _{50, IgG}]	最大抑制率 (相对于Avelumab, 单位%)
33-03-G02	113.7	1.091	85%

[0367] 通过SPR确定的物种特异性:食蟹猴

[0368] 还确定了与食蟹猴PDL1的结合动力学,使用了与针对与人PDL1的结合所描述的同设置,但是在该种情况下,将人PDL1替换为食蟹猴PDL1。对于所有选择的IgG,均证实了与食蟹猴PDL1的结合(表11)。

[0369] 表11.选择的兔IgG对食蟹猴PDL1亲和力测量的总结。

克隆ID	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k _d [s ⁻¹]	K _D [M]	标准化为理论Rmax的结合水平(%)
33-03-G02	1.68E+05	3.91E-06	2.34E-11	39.59%

[0371] 通过SPR确定的物种特异性:小鼠

[0372] 还确定了与食蟹猴PDL1的结合动力学,使用了与针对与人PDL1的结合所描述的同设置,但是在该种情况下,将人PDL1替换为小鼠PDL1。对于来自克隆33-03-G02和37-20-B03的选择的兔IgG,未检测到与小鼠PDL1的结合。

[0373] 实施例4:选择克隆进行人源化

[0374] 根据命中物确认过程中获得的数据,通过将CDR移植到基于VH3、VH4或VH1A或VH1B的框架上将所有克隆人源化。为了获得最佳的亲和力和效力,用不同结构移植物对两个克隆进行了进一步优化,这两个克隆作为rIgG显示出对人PDL1具有最佳亲和力,为33-03-G02和37-20-B03。将以下移植变体应用于克隆33-03-G02和37-20-B03:CDR移植-将兔CDR移植到人框架上;IF移植-CDR移植加上所有兔VL/VH界面(interface)残基的移植;完整移植-CDR移植加上遵循AHo人性化方案的框架残基(抗原界面(AIF)残基(可能与抗原接触的兔残基(根据AHo))仅限于界面形成后溶剂可及性变化>20%的残基,以减少突变总数(兔框架残疾))。

[0375] 通过小规模诱导过夜表达,蛋白质在大肠杆菌中异源表达为不溶性包涵体(PR0997除外,PR0997在哺乳动物CHO-S细胞中生产,与上述rIgG表达相似)。通过离心方案从均质化的细胞沉淀中分离包涵体,该离心方案包括几个洗涤步骤以去除细胞碎片和其他宿主细胞杂质。将纯化的包涵体溶解于变性缓冲液中,并通过可扩展的重折叠方案使scFv重折叠,产生毫克量的天然折叠的单体scFv。在这一点上,采用标准化方案纯化scFv。通过亲和层析捕获重折叠后的产物,得到纯化的scFv。仅使用具有所需纯度的主要馏分,因为可用量不允许对样品进行SEC润色。另外,通过差示扫描荧光法(DSF)测量来确定scFv的解链温度(将在后面更详细地描述)。表12总结了VH4CDR移植物scFv分子的制备。由于其中两个克隆的CDR环中包含未配对的半胱氨酸残基,因此在克隆37-20-B03中引入了C57S突变,如

表12所示。

[0376] 为某些选择的克隆设计了其他移植变体,并在表13(AHo编号)和表14中进行了描述,概述了它们的最初生产和表征。

[0377] 实施例5:人源化scFvs的药效学表征

[0378] 在下文中,使用与针对命中物确认阶段所描述的相同测定系统(但适应于scFv分子的不同形式进行了某些修改),对人源化的scFv进行了主要药效学特性表征。

[0379] 5.1对人PDL1的亲合力

[0380] 在T200设备(Biacore,GE Healthcare)上通过SPR分析确定了人源化scFv对人PDL1的亲合力。在该实验中,使用GE Healthcare的Human Antibody Capture试剂盒捕获了Fc标记的人PDL1。在每个分析物注入循环后,将CM5传感器芯片再生并捕获新抗原。使用剂量响应多循环动力学测定法将scFv作为分析物注入5分钟,分析物在运行缓冲液中稀释的浓度范围为0.12到30nM,然后使蛋白质解离12分钟。使用1:1结合模型拟合获得的传感图。如表15所示,对于测试的人源化scFv,证实了与人PDL1的结合。

[0381] 5.2通过竞争ELISA测定的PDL1/PD-1相互作用的中和

[0382] 通过竞争ELISA,使用与上述相同的方法评估了中和PDL1与PD-1的结合的效力。将每个板上的单个IC₅₀值用在每个板上一起采集的参考分子阿维鲁单抗的IC₅₀进行校准(相对IC₅₀:IC_{50,阿维鲁单抗}/IC_{50,测试scFv})。在表16中总结了效力,其表明在该测定中可以解决高达5倍的阿维鲁单抗的IC₅₀。所有测试的scFv均具有与阿维鲁单抗相似或更好的效力。

[0383] 5.3通过竞争ELISA测定的PDL1/B7-1相互作用的中和

[0384] 通过竞争ELISA,使用与上述相同的方法评估了中和PDL1与B7-1的结合的效力。将每个板上的单个IC₅₀值用在每个板上一起采集的参考分子阿维鲁单抗的IC₅₀进行校准(相对IC₅₀:IC_{50,阿维鲁单抗}/IC_{50,测试scFv})。在表17中总结了效力,其表明在该测定中可以解决高达10倍的阿维鲁单抗的IC₅₀。所有测试的scFv均具有与阿维鲁单抗相似或更好的效力。

[0385] 5.4在NFAT报告基因测定中的PDL1/PD-1相互作用的中和

[0386] 如上所述,在基于细胞的报告基因测定中评估了中和PDL1对PD-1的结合的效力。将要测试的各个分子的连续稀释液以及参考阿维鲁单抗加入到板中。将每个板上的单个IC₅₀值用在每个板上一起采集的参考分子阿维鲁单抗的IC₅₀进行校准(相对IC₅₀:IC_{50,阿维鲁单抗}/IC_{50,测试scFv})。在表18中总结了效力,其表明在该测定中可以解决高达5倍的阿维鲁单抗的IC₅₀。测试的scFv具有更好或相似的效力。

[0387] 表12.scFv制备和初始稳定性数据的总结。

[0388]

克隆 ID	PRO ID	框架	移植策略	表达体积 [mL]	Capto L 后的产量 [mg]	最终产量 [mg]	每 L 表达的产量 [mg/L]	纯度 SE-HPLC [% 单体]	Tm [°C]
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	300.00	2.00	2.00	6.67	100.0	80.00
37-20-B03-sc01	PRO997 (PRO908)	VH4	CDR	1,000.00	0.72	0.72	0.72	71.9	-

[0389] 表13.人源化scFv变体列表。

	VL 突变 (λ 加				VH	
	克隆 ID	蛋白 ID	帽的 Vk1)	VH 突变	框架	移植策略
[0390]	33-03-G02-sc02	PRO1066			VH3	CDR
	33-03-G02-sc03	PRO1183			VH4	FULL
	33-03-G02-sc18	PRO1392		V25A;I44V;G56A;V82K;F89V	VH4	PRO1183 优化的
	37-20-B03-sc09**	PRO1347	S9A;A51P	G56A;Y105F	VH3	IF

[0391] **CDRH2中第57位的未配对Cys (AHo编号)

[0392] 表14. 生产总结表。

	克隆 ID	蛋白 ID	VH	移植策略	表达体	Capto L	最终	每 L 表达	纯度	Tm
			框架		积 [mL]	后的产	产量	的产量	SE-HPLC	[°C]
						量 [mg]	[mg]	[mg/L]	[% 单体]	
[0393]	33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR	300.00	2.80	1.36	9.07	99.0	
	33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	FULL	1200.00	16.90	4.00	3.33	99.0	
	33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	PRO1183 优化的	200.00	46.70	7.44	37.18	97.0	66.19
	37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	200.00	38.90	2.30	11.50	98.1	74.85
	37-20-B03-sc10	PRO1355	VH3	GL	200.00	59.63	4.59	22.95	98.2	74.64

[0394] 表15. scFv对人PDL1的亲合力。

	克隆 ID	蛋白 ID	框架	移植策略	标准化为理论			
					k _a	k _d	K _D	Rmax 的结合
					[M ⁻¹ s ⁻¹]	[s ⁻¹]	[M]	水平
[0395]	33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	2.10E+06	1.59E-04	7.60E-11	68.7
	33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR	3.27E+06	6.95E-05	2.13E-11	127.8
	33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	FULL	4.77E+06	< 1.00E-05	< 2.10E-12	84.1
	33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	减少的突变	6.19E+06	6.16E-05	9.94E-12	91.0
[0396]	37-20-B03-sc01	PRO997/PRO908	VH4	CDR	6.76E+06	4.02E-05	5.94E-12	85.8
	37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	7.38E+06	6.64E-05	9.00E-12	90.7

[0397] 表16. scFvs抑制PDL1和PD-1之间相互作用的效力。

[0398]

克隆 ID	蛋白 ID	VH 框架	移植策略	IC ₅₀ [ng/ml]	相对 IC ₅₀ [IC ₅₀ , 阿能鲁单抗/ IC ₅₀ , scFv]	最大抑制 率 (%)
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	3.446	0.47	99.84
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR	2.073	0.93	99.90
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	FULL	0.36	3.57	99.80
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	减少的突变	0.4699	2.77	99.91
37-20-B03-sc01	PRO997/PRO908	VH4	CDR	0.33	3.81	100.00
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	0.29	5.16	100.10

[0399] 表17.scFvs抑制PDL1和B7-1之间相互作用的效力。

[0400]

克隆 ID	蛋白 ID	VH 框架	移植策略	IC ₅₀ [ng/ml]	相对 IC ₅₀ [IC ₅₀ , 阿能鲁单抗/ IC ₅₀ , scFv]	最大抑制 率 (%)
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	6.11	1.76	94.5
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR		未检测	
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	FULL	0.977	4.67	95.4
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	减少的突变	1.19	3.51	93.24
37-20-B03-sc01	PRO997/PRO908	VH4	CDR	1.212	3.77	93.08
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	0.541	8.04	91.8

[0401] 表18.在报告基因测定中,scFvs中和PDL1/PD-1相互作用的效力。

[0402]

克隆 ID	蛋白 ID	VH 框架	移植策略	IC ₅₀ [ng/ml]	相对 IC ₅₀ [IC ₅₀ , 阿能鲁单抗/ IC ₅₀ , scFv]	最大抑制 率 (%)
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	37.52	1.62	105%
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR		未检测	
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	FULL	9.98	3.84	102.40
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	减少的突变	11.98	4.13	96.68
37-20-B03-sc01	PRO997/PRO908	VH4	CDR	8.02	4.78	95.28
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	7.53	4.68	88.88

[0403] 5.5通过流式细胞术确定的与hPDL1表达细胞的结合

[0404] 对于某些分子,确定了与PDL1表达细胞的结合效力。使用与命中物确认期间相同

的细胞系 (CHO-PDL1和CHO-K1) ,但通过APC标记的蛋白L检测scFv。将要测试的各个分子的连续稀释液以及参考阿维鲁单抗加入到板中。将每个板上的单个IC₅₀值用在每个板上一起采集的参考分子阿维鲁单抗的IC₅₀进行校准 (相对IC₅₀: IC_{50,阿维鲁单抗}/IC_{50,测试scFv})。效力总结于表19中。

[0405] 表19. 测试scFv对细胞PDL1结合效力的总结。

克隆 ID	蛋白 ID	VH 框架	移植策略	EC ₅₀ [ng/ml]	相对 EC ₅₀ (EC _{50, 阿维鲁单抗} /EC _{50, scFv})	最大结合	相对最大结合
						(Δ MFI; (MFI 测试 – MFI 对照 ; (RFU)))	(Max _{scFv} /Max 阿维鲁单抗)
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	20.2	4.8	21455	0.48

[0407] 5.6物种交叉反应 (通过SPR测定的与食蟹猴和小鼠PDL1的结合)

[0408] 用测量与人PDL1的结合相似的方法,使用Sino Biological生产的重组PDL1,测定了与食蟹猴PDL1的交叉反应性。表20总结了所有测试的scFv的亲合力。显示与人PDL1结合的所有测试scFv也显示与食蟹猴PDL1结合。

[0409] 表20. scFv对食蟹猴PDL1的亲合力

克隆 ID	蛋白 ID	VH 框 架	移植策略	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k _d [s ⁻¹]	K _D [M]	标准化	
							K _D , cyno/	Rmax
							K _D , human	的结合 水平
								(%)
33-03-G02-sc 01	PRO830	VH4	CDR	2.46E+06	1.82E-04	7.40E-11	0.97	77.52
33-03-G02-sc 02	PRO1066	VH3	CDR			未检测		
33-03-G02-sc 03	PRO1183	VH4	FULL	1.55E+06	1.82E-05	1.17E-11	< 5.58	65.4%
33-03-G02-sc 18	PRO1392	VH4	减少的突变	4.45E+06	8.87E-05	1.99E-11	2.00	70.3%
33-03-G02-sc 19	PRO1393	VH4	减少的突变			未检测		
37-20-B03-sc 01	PRO997/PR O908	VH4	CDR	5.96E+06	< 1E-05	< 1.68E-12	< 0.28	79.4
37-20-B03-sc 09	PRO1347	VH3	IF	6.88E+06	8.77E-05	1.27E-11	1.41	71.2%

[0411] 5.7通过SPR测定的对PDL1与PDL2的选择性

[0412] 在T200设备 (Biacore, GE Healthcare) 上通过SPR分析,测试了人源化scFv与PDL2的结合。在该实验中,使用GE Healthcare的Human Antibody Capture试剂盒捕获了Fc标记的人PDL2。在每个分析物注入循环后,将CM5传感器芯片再生并捕获新抗原。将scFv作为分析物注入5分钟,分析物在运行缓冲液中稀释的浓度为180nM,然后使蛋白质解离12分钟。表21中列出的所有测试的人源化scFv均未观察到与PDL2的结合。

[0413] 表21. 通过SPR测定的ScFv与小鼠PDL1和PDL2的结合。

[0414]	克隆 ID	蛋白 ID	VH 框架	移植策略
	33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	FULL
	33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	reduced mut
	37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF

[0415] 实施例6:人源化scFv的生物物理表征

[0416] 以更大规模生产了亲和力比阿维鲁单抗更好的选择的结构域(0.2L-1.2L表达量)。另外,纯化后,使用分子量截留值为5kD的离心浓缩管将蛋白质样品浓缩至>10mg/mL。表22汇总了用于稳定性评估的材料制备。

[0417] 6.1储存稳定性研究

[0418] 对人源化的scFv进行稳定性研究,例如为期四周的稳定性研究,其中将scFv以10mg/ml配制在水性缓冲液(最终缓冲液,50mM NaCl,150mM NaCl,pH 6.4)中,并在<-80℃、4℃和40℃储存四周。至少在每次研究的一周、两周和结束后,通过SE-HPLC峰面积的积分来评估制剂中单体和低聚物的比例。对于一些分子,记录了其他时间点。表23比较了研究的第7天和第28天得出的终点测量值。

[0419]

表 22. 制备结构域用于稳定性研究。

克隆 ID	蛋白 ID	框架	表达体 积 [mL]	Capto L 后的产量 [mg]	捕获后的 产量 [mg/L]	SEC 纯化?	最终产 量[mg]	每 L 表达的 最终产量 [mg/L]	纯度 SE- HPLC [% 单体]	T _m [°C]	在 10 mg/mL 下的单体含量 [% 单体]	浓缩后单 体含量损 失 [%]
33-03-G02-sc01	PRO830*	VH4	300	2.0	6.7	NO	2.0	6.7	99.0	80.0	98.3	-0.7
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	300	0.8	2.8	NO	1.4	9.1	99.0	NA	92.7	-6.4
33-03-G02-sc03	PRO1183*	VH4	1200	16.9	14.1	YES	4.0	3.3	100.0	NA	99.7	-0.3
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	200	9.3	46.7	NO	7.4	37.2	97.0	72.4	97.4	0.4
37-20-B03-sc01	PRO908*	VH4	1200	18.6	15.5	YES	5.3	4.4	89.0	NA	75.4	-15.3
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	200	8.0	38.9	YES	2.3	11.5	98.1	74.8	98.5	0.4

* 细菌表达

[0420]

表 23. 选择的结构域的 4 周稳定性研究。

克隆 ID	蛋白 ID	温度 [°C]	单体含量[%]			单体含量损失[%]			蛋白质浓度[mg/mL]			蛋白质含量损失 [%]		
			d0	d7	d28	d7	d28		d0	d7	d28	d7	d28	
33-03-G02-sc01	PRO830	-80	98.3	98.5	98.4	-0.2	-0.1		10.5	12.0	11.4	-14.2	-9.2	
		4	98.3	97.9	96.8	0.4	1.6		10.5	12.4	12.0	-18.6	-14.5	
33-03-G02-sc02	PRO106 6	40	98.3	93.3	84.9	5.0	13.6		10.5	10.4	11.6	0.6	-10.6	
		-80	NA	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	NA	
33-03-G02-sc03	PRO118 3	4	92.7	81.7	77.7	11.9	16.2		10.7	10.9	11.7	-1.7	-9.2	
		40	92.7	84.5	NA	8.8	100.0		10.7	10.4	NA	2.7	100.0	
33-03-G02-sc18	PRO139 2	-80	99.7	NA	99.4	NA	0.3		20.6	20.8	21.1	NA	-2.6	
		4	99.7	NA	87.9	NA	11.8		20.6	20.8	21.0	NA	-1.9	
37-20-B03-sc01	PRO908	40	99.7	NA	71.0	NA	28.8		20.6	21.0	22.0	NA	-7.1	
		-80	97.4	97.4	97.2	0.0	0.2		10.6	9.4	11.0	11.7	-3.9	
37-20-B03-sc02	PRO101 3	4	97.4	97.1	96.9	0.2	0.5		10.6	10.7	10.7	-0.9	-1.3	
		40	97.4	94.2	84.7	3.2	13.0		10.6	10.7	11.2	-0.8	-5.9	
37-20-B03-sc09	PRO134 7	-80	75.4	74.4	73.5	1.4	2.5		10.4	10.3	9.9	1.1	4.8	
		4	75.4	74.1	73.8	1.7	2.1		10.4	9.9	9.9	4.9	4.7	
		40	75.4	75.4	73.2	0.0	3.0		10.4	11.5	11.4	-11.0	-9.6	
		-80	90.5	88.2	85.5	2.6	5.5		10.1	12.2	10.3	-21.0	-1.5	
		4	90.5	78.8	76.9	12.9	15.0		10.1	13.3	10.7	-31.3	-5.8	
		40	90.5	79.7	79.4	12.0	12.3		10.1	14.7	12.8	-45.1	-26.1	
		-80	NA	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA	NA	
		4	98.5	97.1	94.6	1.4	4.0		10.6	11.4	11.5	-7.6	-8.0	
		40	98.5	83.1	75.6	15.6	23.3		10.6	11.9	11.7	-12.1	-10.0	

NA: 不适用, 由于样本量有限, 无法记录任何数据点

[0421] 6.2冻融稳定性研究

[0422] 除上述存储稳定性研究外,还针对冷冻-融化 (F/T) 循环评估了性能最高的scFv分

子的相容性(胶体稳定性)。为了进行F/T稳定性评估,采用与存储稳定性研究(SE-HPLC, SDS-PAGE)相同的分析方法和参数(单体含量%和单体损失%)来监测分子随着五个F/T循环的质量。表24说明了随着五个重复F/T循环的单体含量损失%。由于未进行专门的冻融研究,在28天内从存储稳定性研究中获得的-80℃样品获得的冻融数据如下图所示。重复F/T循环后,没有一个分子的单体含量损失>4%。

[0423] 表24.F/T稳定性-反复冻融后单体损失%。

克隆 ID	移植策略	框架	PRO ID	F/T-1	F/T-2	F/T-3	F/T-4	F/T-5
				*	*	*	*	*
37-20-B03-sc01	CDR	VH4	PRO908	-0.8	-1.0	-1.1	-0.4	-1.9
[0424]	33-03-G02-sc03	FULL	VH4	PRO118	-0.1	-0.4	-0.3	-0.4
			3					
	33-03-G02-sc18	PRO1183	VH4	PRO139	-0.1	0.0	0.0	-0.2
	opt.		2					
	33-03-G02-sc01	CDR	VH4	PRO830	0.2	0.1	0.1	NA

[0425] *F/T循环X后的单体含量损失%

[0426] NA:不适用

[0427] 6.3.热解折叠

[0428] 表25示出了从选择的scFv构建体的DSF测量获得的热解折叠数据。通过将数据拟合到玻耳兹曼方程式,可以确定所得的T_m值。表25总结了通过DSF测得的熔融温度。

[0429] 表25.符合成功标准的结构域的DSF。

克隆 ID	蛋白 ID	T _m [°C]	Tonset [°C]
33-03-G02-sc02	PRO1066	NA	NA
[0430]	33-03-G02-sc18	PRO1392	72.40
	37-20-B03-sc01	PRO997	64.39
	37-20-B03-sc09	PRO1347	74.85

[0431] NA:不适用,ND:未确定

[0432] 包含本发明抗体的多特异性分子

[0433] 表3包括了包含本发明抗体的示例性多特异性分子。

[0434] 实施例7:对PDL1、CD137、HSA和MSA的亲和力。

[0435] 方法:

[0436] 使用Biacore T200设备(GE Healthcare)通过SPR测量确定了对不同物种的PDL1的亲和力。通过胺偶联将对人IgG的Fc区具有特异性的抗体固定在传感器芯片(CM5传感器芯片,GE Healthcare)上。对于所有形式,除了含有Fc的Morrison形式之外,固定抗体均捕

获了不同物种的PDL1-Fc嵌合蛋白。将对PDL1具有特异性的分子的三倍系列稀释液(0.12-90nM)注入流动池中三分钟,并监测解离10分钟。每个注射循环后,用一次注射3M $MgCl_2$ 溶液使表面再生。使用一对一的Langmuir结合模型计算表观解离常数(kd)和缔合速率常数(ka)以及表观解离平衡常数(KD)。使用与PDL1相同的设置(除了不同物种的CD137-Fc嵌合蛋白被固定抗体捕获)确定对不同物种的CD137的亲合力。

[0437] 含Fc的形式被对人IgG的Fc区具有特异性的抗体直接捕获。测试了PDL1细胞外结构域或CD137细胞外结构域(范围从90到0.35nM)的两倍系列稀释液与生物传感器芯片上捕获的IgG的结合。每个注射循环后,用一次注射3M $MgCl_2$ 溶液使表面再生。

[0438] 使用Biacore T200设备(GE Healthcare)通过SPR测量确定了分子与不同物种的血清白蛋白(SA)的亲合力。使用胺偶联化学试剂将SA直接偶联至CM5传感器芯片(GE Healthcare)。在执行再生搜索和表面性能测试以找到最佳测定条件后,测量剂量响应,并将获得的结合曲线进行双参考(空参考通道和零分析物进样)并使用1:1Langmuir模型拟合以获取动力学参数。该测定在pH 5.5的1X PBS-Tween缓冲液中进行。

[0439] 结果:

[0440] 人源化构建体的结合动力学测量结果显示对PDL1的结合亲合力有所不同,当比较克隆33-03-G02的CDR和结构移植物(STR)时,STR移植物的亲合力比相同克隆的CDR移植物提高了20倍(表26中的PR0885与PR01126)。与克隆33-03-G02的STR移植物相比,源自克隆37-20-B03(PR0997)的CDR移植物显示出大约两倍的亲合力。当33-03-G02的CDR移植物结合成不同的多特异性形式时,其结合亲合力与亲本scFv的结合亲合力相似(比较PR0830与PR0885、PR0951、PR01123、PR01124、PR0963、PR0966、PR01057、PR01058、PR01059和PR01060,表26)。源自两个克隆的scFv对人和食蟹猴PDL1的亲合力几乎相同(参见表26中的PR0977和PR0830)。

[0441]

表 26. 不同形式对不同物种的 PDL1、CD137 和血清白蛋白的亲合力

PRO ID	克隆 ID PDL1	克隆 ID CD137	克隆 ID sA	形式	对人 PD-L1 的亲合力			对食蟹猴 PD-L1 的亲合力			对人 CD137 的亲合力			对食蟹猴 CD137 的亲合力			对人 sA 的亲合力			对小鼠 sA 的亲合力		
					K_d [M ¹ s ⁻¹]	k_a [s ⁻¹]	KD [M]	K_d [M ¹ s ⁻¹]	k_a [s ⁻¹]	KD [M]	K_d [M ¹ s ⁻¹]	k_a [s ⁻¹]	KD [M]	K_d [M ¹ s ⁻¹]	k_a [s ⁻¹]	KD [M]	K_d [M ¹ s ⁻¹]	k_a [s ⁻¹]	KD [M]	K_d [M ¹ s ⁻¹]	k_a [s ⁻¹]	KD [M]
PRO885	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	sCDb	2.1E+05	1.4E-04	6.5E-11	ND	ND	ND	2.4E+05	7.6E-04	3.2E-09	3.4E+05	7.0E-04	2.1E-09	2.9E+05	1.8E-01	6.0E-07	NA	NA	NA
PRO951	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	sCDb	2.2E+06	1.5E-04	7.0E-11	ND	ND	ND	1.5E+06	6.3E-03	4.2E-09	1.5E+06	1.0E-02	6.9E-09	ND	NB	ND	NA	NA	NA
PRO1123	33-03-G02 CDR	38-02-A04 IF	NA	sCDb	2.3E+06	1.7E-04	7.5E-11	ND	ND	ND	3.1E+05	2.7E-04	8.8E-10	2.6E+05	3.3E-04	1.3E-09	6.5E+04	2.7E-02	4.1E-07	NA	NA	NA
PRO1124	33-03-G02 CDR	38-02-A04 STR	NA	sCDb	3.1E+06	2.0E-04	6.7E-11	ND	ND	ND	6.8E+05	4.10E-05	1.5E-11	5.6E+05	3.3E-04	5.9E-10	2.0E+05	2.2E-03	1.1E-08	NA	NA	NA
PRO1125	33-03-G02 IF	38-02-A04 CDR	NA	sCDb	1.7E+06	1.1E-04	6.7E-11	ND	ND	ND	2.0E+05	7.5E-04	3.7E-09	ND	ND	ND	5.4E+05	2.7E-01	5.1E-07	NA	NA	NA
PRO1126	33-03-G02 STR	38-02-A04 CDR	NA	sCDb	2.8E+06	1.10E-05	5.5E-12	ND	ND	ND	2.1E+05	7.5E-04	3.5E-09	ND	ND	ND	NB	NB	ND	NA	NA	NA
PRO1134	33-03-G02 STR2, V13	38-02-A04 CDR	NA	sCDb	2.8E+06	7.6E-05	2.8E-11	ND	ND	ND	2.5E+05	8.4E-04	3.4E-09	ND	ND	ND	4.5E+05	1.9E-01	4.2E-07	NA	NA	NA
PRO963	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	19-01-H04 STR	sCDb-scFv	2.0E+06	1.3E-04	6.6E-11	ND	ND	ND	2.0E+05	6.2E-04	3.0E-09	ND	ND	ND	NB	NB	ND	NB	NB	NB
PRO966	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	19-01-H04 STR	sCDb-scFv	1.6E+06	1.4E-04	8.3E-11	ND	ND	ND	1.0E+06	2.2E-03	2.2E-09	ND	ND	ND	5.1E+03	1.0E-03	2.0E-07	ND	ND	ND
PRO1057	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	23-13-A01 STR	sCDb-scFv	1.6E+06	1.7E-04	1.1E-10	ND	ND	ND	1.4E+05	7.0E-04	5.1E-09	1.6E+05	7.9E-04	4.8E-09	6.9E+04	8.5E-02	1.2E-06	2.4E+05	6.7E-04	2.8E-09
PRO1058	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	23-13-A01 STR	sCDb-scFv	1.2E+06	1.9E-04	1.6E-10	ND	ND	ND	1.7E+06	2.1E-03	1.2E-09	ND	ND	ND	1.1E+06	7.5E-04	7.0E-10	ND	ND	ND
PRO1059	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-L	1.2E+06	6.5E-05	5.6E-11	ND	ND	ND	1.8E+05	4.2E-04	2.3E-09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA
PRO1060	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-H	1.3E+06	4.6E-05	3.6E-11	ND	ND	ND	3.0E+05	3.9E-04	1.3E-09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA
PRO1061	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-L	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA
PRO1062	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-H	1.3E+06	5.0E-05	3.8E-11	ND	ND	ND	2.8E+05	3.7E-04	1.3E-09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA
PRO997	37-20-B03 CDR	NA	NA	scFv	5.9E+06	<1.0E-05	1.7E-12	6.0E+06	<1.0E-05	<1.67E-12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1013	37-20-B03 CDR, V11	NA	NA	scFv	6.0E+06	2.7E-04	4.5E-11	5.9E+06	3.2E-04	5.3E-11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO830	33-03-G02 CDR	NA	NA	scFv	2.1E+06	1.6E-04	7.6E-11	2.2E+06	2.0E-04	9.4E-11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1186	37-20-B03 scD1	38-02-A04 scD1	23-13-A01 scD3	sCDb-scFv	6.2E+06	2.3E-05	3.7E-12	TBD	TBD	TBD	1.9E+05	5.0E-04	2.6E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	2.5E+05	7.2E-04	2.9E-09
PRO1430	37-20-B03 scD1	38-02-A04 scD13	19-01-H04 scD3	sCDb-scFv	5.3E+06	2.4E-05	4.5E-12	TBD	TBD	TBD	4.6E+05	7.1E-04	1.5E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	TBD	TBD	TBD
PRO1470	37-20-B03 scD1	38-02-A04 scD13	19-01-H04 scD3	sCDb-scFv	4.2E+06	3.9E-05	9.2E-12	TBD	TBD	TBD	3.8E+05	5.4E-04	1.7E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	TBD	TBD	TBD
PRO1482	37-20-B03 scD1.1	38-02-A04 scD13	19-01-H04 scD3	sCDb-scFv	3.4E+06	3.3E-05	9.8E-12	TBD	TBD	TBD	3.3E+05	3.6E-04	1.1E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	TBD	TBD	TBD
PRO1491	33-03-G02 sc18	38-02-A04 scD13	19-01-H04 scD3	sCDb-scFv	3.3E+06	4.5E-05	1.4E-11	ND	ND	ND	4.5E+05	7.5E-04	1.7E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PRO1473	33-03-G02 scD3	38-02-A04 scD13	19-01-H04 scD3	sCDb-scFv	3.6E+06	2.9E-05	8.2E-12	ND	ND	ND	3.1E+05	6.0E-04	2.0E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PRO1476	33-03-G02 scD3	38-02-A04 scD13	19-01-H04 scD3	sCDb-scFv	3.4E+06	3.1E-05	9.0E-12	ND	ND	ND	3.5E+05	3.7E-04	1.1E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PRO1432	33-03-G02 sc18	38-02-A04 scD13	19-01-H04 scD3	sCDb-scFv	4.2E+06	4.4E-05	1.1E-11	ND	ND	ND	6.0E+05	4.5E-04	7.5E-10	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND

NA: 不适用
TBD: 待确定
NB: 无显著结合
ND: 未确定

[0442]

表 26（续）. 不同形式对不同物种的 PDL1、CD137 和血清白蛋白的亲合力

PRO ID	对食蟹猴CD137的亲合力				对小鼠CD137的亲合力				对人SA的亲合力 ¹				对小鼠SA的亲合力			
	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (M)		k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (M)		k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (M)		k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (M)	
PRO885	3.4E+05	7.0E-04	2.1E-09		2.9E+05	1.8E-01	6.0E-07		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO951	1.5E+06	1.0E-02	6.9E-09		NB	NB	NB		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO1123	2.6E+05	3.3E-04	1.3E-09		6.5E+04	2.7E-02	4.1E-07		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO1124	5.6E+05	3.3E-04	5.9E-10		2.0E+05	2.2E-03	1.1E-08		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO1125	ND	ND	ND		5.4E+05	2.7E-01	5.1E-07		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO1126	ND	ND	ND		NB	NB	NB		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO1134	ND	ND	ND		4.5E+05	1.9E-01	4.2E-07		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO963	ND	ND	ND		NB	NB	NB		1.1E+05	3.0E-04	2.8E-09		NB	NB	NB	
PRO966	ND	ND	ND		5.1E+03	1.0E-03	2.0E-07		ND	ND	ND		NA	NA	NA	
PRO1057	1.6E+05	7.9E-04	4.8E-09		6.9E+04	8.5E-02	1.2E-06		2.4E+05	6.7E-04	2.8E-09		1.3E+05	8.5E-03	6.6E-08	
PRO1058	ND	ND	ND		1.1E+06	7.5E-04	7.0E-10		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
PRO1059	ND	ND	ND		ND	ND	ND		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO1060	ND	ND	ND		ND	ND	ND		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO1061	ND	ND	ND		ND	ND	ND		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO1062	ND	ND	ND		ND	ND	ND		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO997	NA	NA	NA		NA	NA	NA		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO1013	NA	NA	NA		NA	NA	NA		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO830	NA	NA	NA		NA	NA	NA		NA	NA	NA		NA	NA	NA	
PRO1186	TBD	TBD	TBD		ND	ND	ND		2.5E+05	7.2E-04	2.9E-09		2.2E+05	9.5E-03	4.3E-08	
PRO1430	TBD	TBD	TBD		ND	ND	ND		TBD	TBD	TBD		NA	NA	NA	
PRO1479	TBD	TBD	TBD		ND	ND	ND		TBD	TBD	TBD		NA	NA	NA	
PRO1482	TBD	TBD	TBD		ND	ND	ND		TBD	TBD	TBD		NA	NA	NA	
PRO1431	TBD	TBD	TBD		ND	ND	ND		ND	ND	ND		NA	NA	NA	
PRO1473	TBD	TBD	TBD		ND	ND	ND		ND	ND	ND		NA	NA	NA	
PRO1476	TBD	TBD	TBD		ND	ND	ND		ND	ND	ND		NA	NA	NA	
PRO1432	TBD	TBD	TBD		ND	ND	ND		ND	ND	ND		NA	NA	NA	

[0443] 实施例8:使用CHO细胞和Jurkat细胞在基于细胞的报告基因分析中测定的PDL1/PD-1相互作用的阻断,其中CHO细胞表达PDL1和TCR激活分子,Jurkat细胞表达PD-1并含有处于NFAT应答元件下的荧光素酶基因。

[0444] 方法

[0445] 在生物发光报告基因分析中,稳定表达NFAT(活化T细胞的核因子)-荧光素酶报告基因和人PD-1的Jurkat T细胞充当效应T细胞。稳定表达人PDL1和T细胞受体(TCR)激活剂的细胞充当抗原呈递细胞。共培养两种细胞系通过TCR激活剂/TCR复合物的交联诱导Jurkat NFAT途径的激活。在PDL1表达细胞的参与后,PD-1效应T细胞中的PD-1信号传导抑制T细胞功能,并导致NFAT途径抑制。PD-1和PDL1受体相互作用的阻断导致NFAT途径的重新激活。

[0446] 将100μl细胞培养基(DMEM/F12,10%FCS)中的35,000个CHO/PDL1/TCR激活(BPS Bioscience)细胞添加到白细胞培养板的内孔中,并在37℃和5%CO₂下孵育16-20小时。第

二天,从每个孔中取出95 μ l细胞培养基,并加入50 μ l的各个待测分子(包括参考阿维鲁单抗)的2倍浓缩系列稀释液(3,000至0.46ng/ml)。然后,向每个孔中加入50 μ l以400,000个细胞/ml稀释在测定缓冲液(含10%FCS的RPMI1640)中的表达PD-1的效应Jurkat细胞(BPS Bioscience),然后将板在37°C和5%CO₂下孵育6小时。最后,每孔加入50 μ l根据制造商方案制备的荧光素酶底物(BPS Bioscience),并将板在黑暗中孵育30分钟,使用Topcount测量发光。

[0447] 结果

[0448] 为了评估CDR集和框架选择对中和PDL1与PD-1的结合的效力的影响,在基于NFAT报告基因细胞的分析中测试了三种抗PDL1 scFv。PR0830包含移植到VH4框架上的克隆33-03-G02的CDR集,PR0997和PR01013分别包含移植到VH4或VH1框架上的克隆37-20-B03的CDR组。PR0830在三种测试的scFv中具有最低的效力,IC₅₀值为42.88ng/ml,并具有与阿维鲁单抗相似的效力,阿维鲁单抗的IC₅₀值为34.09ng/ml。PR0997是最有效的分子。当移植到VH4框架上时,同一个CDR集的效力要比移植到VH1框架上高约2倍。IC₅₀值分别为11.12ng/ml和21.29ng/ml。(图4A和表27)

[0449] 对于具有33-03-G02 PDL1结构域的双特异性分子,在结构域优化前(CDR移植物)和后(结构移植物)后,测定了PDL1与PD-1结合的中和力。将CDR移植物(PR0885)与结构移植物(PR01126)进行了比较。结构域优化将中和效力提高了三倍,PR0885的IC₅₀值为137.2ng/ml,PR01126的IC₅₀值为48.15ng/ml。(图4B和表27)。

[0450] 还评估了两种三特异性分子中和PDL1/PD-1相互作用的效力,这两种三特异性分子具有克隆33-03-G02的CDR移植物的抗PDL1结构域和两种不同的人血清白蛋白结合结构域(用于延长半衰期)。PR01057的HSA结构域也与小鼠血清白蛋白结合。实验在25mg/ml HAS的存在下进行。中和效力(IC₅₀=665.1ng/ml)低于阿维鲁单抗。(图5和表27)。

[0451] 表27. 在NFAT报告基因测定中的PDL1 PD-1相互作用的中和。

PRO ID	克隆ID PD-L1	克隆ID CD137	克隆ID SA	形式	在NF-AT效力测定 中的PD-L1的中和		
					IC ₅₀ (ng/ml)	rel. IC ₅₀	HSA
PRO885	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	137.20	0.28	否
PRO951	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	scDb	88.50	0.47	否
PRO963	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	19-01-H04 STR	scDb-scFv	274.80	0.25	是
PRO1057	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	23-13-A01 STR	scDb-scFv	665.10	0.10	是
PRO1059	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-L	93.76	0.52	否
PRO1060	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-H	132.70	0.44	否
PRO1062	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-H	96.55	0.68	否
PRO997	37-20-B03 CDR	NA	NA	scFv	11.12	3.07	否
PRO1013	37-20-B03 CDR, VH1	NA	NA	scFv	21.29	1.60	否
PRO830	33-03-G02 CDR	NA	NA	scFv	42.88	0.73	否
PRO1186	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc01	23-13-A01 sc03	scDb-scFv	10.17	2.31	是
PRO1430	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	16.19	1.45	是
PRO1479	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	50.36	1.04	是
PRO1482	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	54.79	0.68	是
PRO1431	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	9.83	3.73	是
PRO1473	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	35.17	1.11	是
PRO1476	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	53.53	0.66	是
PRO1432	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	18.51	1.98	是

[0452] NA:不适用

[0454] *: IC_{50,阿维鲁单抗} (ng/ml) / IC_{50,测试分子} (ng/ml)

[0455] 在血清中,在基于细胞的效力报告基因测定中对所谓的Morrison形式进行了测试。在这种形式下,IgG部分带有一种特异性(双价),并且对第二靶标具有特异性的两个scFv通过柔性肽接头与IgG的重链(HC)或轻链(LC)连接。所有测试的Morrison分子在两个IgG臂上均携带克隆33-03-G02的CDR移植物的抗PDL1结构域。两种构建体PRO1059和PRO1060的区别在于在重链(HC)上或与(LC)上的两种抗CD137 scFv的融合。PRO1062具有与PRO1060相同的体系结构,但具有不同的CD137结构域。所有分子的中和效力相似(图6和表27)。

[0456] 实施例9:使用竞争ELISA阻断PDL1与PD-1和B7-1的相互作用。

[0457] 进行这些测定以评估PDL1抑制剂阻断PDL1与PD-1或PDL1与B.71之间相互作用的能力。在竞争ELISA中分析了不同的形式,包括scFvs、scDbs、scDb-scFv和Morrison,并与参考IgG阿维鲁单抗进行了比较。

[0458] PDL1/PD-1竞争ELISA

[0459] 将用4μg/ml人PD-1在4℃包被过夜的ELISA微孔板每孔用450μl洗涤缓冲液洗涤3次。通过在每个孔中加入300μl含1%BSA和0.2%吐温的PBS(稀释缓冲液),在室温下阻断板1小时。在含有1ng/ml生物素化人PDL1的稀释缓冲液中,将抑制剂以3倍步进连续稀释至300至0.005ng/ml的终浓度。将混合物在旋转搅拌器(21rpm)上缓慢搅拌下于室温下预孵育1小时,并在每孔用450μl洗涤缓冲液洗涤3个循环后,添加到微孔板中。将板在室温下在缓慢搅拌下孵育1.5小时,然后在每孔用450μl洗涤缓冲液洗涤3次后,向每个微孔板的孔中加入10ng/ml链霉亲和素-polyHRP40。在室温孵育1小时后,将板用450μl洗涤缓冲液洗涤3次,并加入TMB底物溶液。6分钟后,通过添加1M HCl终止酶促反应,并使用690nm作为参考波长在

450nm处测量吸光度。为了计算IC₅₀值,使用参考减去值在Graph Pad Prism中进行四参数逻辑(4PL)曲线拟合。

[0460] 如图7和表28所示,当在竞争ELISA中测试时,所有PDL1抑制剂均阻断PD-1与PDL1的相互作用。scFv PR0830以与阿维鲁单抗相似的效力阻断了相互作用,而PR0997和PR01013的IC₅₀值显著低于阿维鲁单抗,因此是更有效的抑制剂。当组合成多特异性形式即scDBs或Morrisons时,所有分子均保留了其抑制特性。PR0885的效力不如阿维鲁单抗,而对于包含改良的抗PDL1结构域的PR01126,IC₅₀值较低。与阿维鲁单抗相比,Morrison形式的效力略低。在人血清白蛋白存在下也显示出了PR01057的中和作用,其中IC₅₀值大约高两倍。

[0461] PDL1/B7-1竞争ELISA

[0462] 将用4μg/ml人B7-1在4℃包被过夜的ELISA微孔板每孔用450μl洗涤缓冲液洗涤3次。通过在每个孔中加入300μl含1%BSA和0.2%吐温的PBS(稀释缓冲液),在室温下阻断板1小时。在含有40ng/ml生物素化PDL1的稀释缓冲液中,将抑制剂以3倍步进连续稀释至900至0.015ng/ml的终浓度。将混合物在旋转搅拌器(21rpm)上缓慢搅拌下于室温下预孵育1小时,并在每孔用450μl洗涤缓冲液洗涤3个循环后,添加到微孔板中。将板在室温下在缓慢搅拌下孵育1.5小时,然后在每孔用450μl洗涤缓冲液洗涤3次后,向每个微孔板的孔中加入10ng/ml链霉亲和素-polyHRP40。在室温孵育1小时后,将板用450μl洗涤缓冲液洗涤3次,并加入TMB底物溶液。6分钟后,通过添加1M HCl终止酶促反应,并使用690nm作为参考波长在450nm处测量吸光度。为了计算IC₅₀值,使用减去参考的值在Graph Pad Prism中进行四参数逻辑(4PL)曲线拟合。

[0463] 除PR01126外,还测试了所有PDL1抑制剂阻断PD-1与B7-1相互作用的能力。PR0830显示出与阿维鲁单抗相似的效力,而PR0997和PR01013的IC₅₀值较低。所有scDBs和Morrisons也都抑制了PDL1和B.7-1之间的相互作用。scDb PR0885具有与阿维鲁单抗相似的效力,而Morrisons的IC₅₀值则降低了约2-3.4倍。数据示于图8和表28。

[0464] 表28. 使用竞争性ELISA阻断PDL1与PD-1和B7-1的相互作用

PRO ID	克隆ID PD-L1	克隆ID CD137	克隆ID SA	形式	PD-L1/PD-1相互作用的阻断		PD-L1/B7.1相互作用的阻断	
					IC ₅₀ (ng/ml)	相对IC ₅₀ ^a	IC ₅₀ (ng/ml)	相对IC ₅₀ ^a
PRO885	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	8.35	0.17	12.2	0.59
PRO951	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	scDb	9.50	0.15	9.30	0.78
PRO1126	33-03-G02 STR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	1.28	1.59	TBD	TBD
PRO1057	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	23-13-A01 STR	scDb-scFv	8.61	0.20	16.29	0.53
PRO1059	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-L	4.54	0.37	28.98	0.30
PRO1060	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-H	5.67	0.30	17.42	0.49
PRO1062	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-H	11.33	0.32	19.53	0.51
PRO997	37-20-B03 CDR	NA	NA	scFv	0.50	4.16	6.359	2.34
PRO1013	37-20-B03 CDR, VH1	NA	NA	scFv	0.57	3.67	4.05	3.68
PRO830	33-03-G02 CDR	NA	NA	scFv	3.40	0.61	12.87	1.16
PRO1186	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc01	23-13-A01 sc03	scDb-scFv	1.74	1.26	7.81	1.58
PRO1430	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	1.92	0.73	2.42	1.15
PRO1479	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.65	0.86	10.71	1.38
PRO1482	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	1.78	1.24	8.18	1.51
PRO1431	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.75	0.51	3.31	0.84
PRO1473	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	4.14	0.56	8.89	1.49
PRO1476	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.84	0.80	9.49	1.10
PRO1432	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	3.26	0.43	2.83	0.99

[0465]

[0466] NA:不适用

[0467] *: $IC_{50, \text{阿维鲁单抗}} (\text{ng/ml}) / IC_{50, \text{测试分子}} (\text{ng/ml})$

[0468] 实施例10:使用超抗原SEA刺激的人PBMC在基于细胞的测定中对同时发生的PDL1阻断和CD137刺激的刺激作用的评估。

[0469] 在该实验中,评估了PD-1/PDL1抑制和CD137激动的协同作用。该测定法使用了的外周血单核细胞(PBMC),该外周血单核细胞(PBMC)经超抗原葡萄球菌肠毒素A(Staphylococcal Enterotoxin A,SEA)刺激,以分别诱导PDL1在抗原呈递细胞(APC)和T细胞上的表达以及CD137在T细胞上的表达。通过应用抗PDL1xCD137分子,同时靶向两个T细胞调节信号转导途径:通过双特异性抗PDL1xCD137分子(PRO885)介导的免疫突触的形成来抑制抑制性PD-1/PDL1途径以及激活CD137途径。通过白介素2(IL-2)的分泌评估T细胞的活化,并与基准参考抗体阿维鲁单抗介导的PDL1抑制介导的效应进行比较。此外,在相同的实验设置中测试了抗PDL1 scFv PR0997,并将其与阿维鲁单抗进行了比较。

[0470] 通过密度梯度离心从新鲜的人全血中分离出外周血单核细胞(PBMC)。然后,使用抗CD56抗体和MACS细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)去除PBMC中的NK细胞。接下来,向96孔板中每孔添加100,000个PBMC,然后添加PRO885、PR0997和阿维鲁单抗在测定缓冲液(含有浓度为10ng/ml的SEA)中的系列稀释液。在37℃和5%CO₂下孵育96小时后,收集细胞上清液,并根据试剂盒说明,使用BioLegend的IL-2人ELISA MAX测定法定量培养上清液中的人白细胞介素2(IL-2)水平。从IL-2标准曲线内插IL-2浓度,反算并针对阿维鲁单抗和PRO885浓度作图以计算EC₅₀值。

[0471] 如图9所示,在通过加入双特异性分子PRO885而同时阻断PD-1/PDL1相互作用和刺激CD137之后,T细胞分泌IL-2。与阿维鲁单抗相比,PRO885显示出更高的T细胞活化和更好的效力(PRO885,EC₅₀=39.92ng/ml;阿维鲁单抗,EC₅₀=69.89ng/ml,表29)。该发现表明,与仅用阿维鲁单抗阻断PDL1相比,双特异性抗PDL1xCD137 scDb PRO885能够诱导更强的T细胞刺激。此外,发现高亲和力的抗PDL1 scFv PR0997在刺激T细胞方面比阿维鲁单抗更有效(PR0997,EC₅₀=40.86ng/ml;阿维鲁单抗,EC₅₀=90.18ng/ml,表29)。

[0472] 表29.使用SEA刺激在PBMC分析中测定PRO885和PR0997的EC₅₀值。

[0473]		阿维鲁单抗	PRO885		阿维鲁单抗	PR0997
	底部	2479	7463	底部	2117	3226
	顶部	8687	20663	顶部	8588	9480
	EC50 (ng/ml)	69.89	39.92	EC50 (ng/ml)	90.18	40.86
	R平方	0.8589	0.9052	R平方	0.8783	0.867

[0474] 实施例11:在人细胞系来源的肺癌异种移植模型HCC827中评估抗PDL1抗体的抗肿瘤功效。

[0475] 使用来自Taconic的免疫缺陷NOD小鼠品系和同种异体人外周血单核细胞,在人HCC827 NSCLC异种移植模型中评估了抗PDL1 IgG1抗体PR01137(SEQ ID No:90和91)的抗肿瘤活性。植入的人T淋巴细胞对外来的主要组织相容性(MHC)I和II类以及来自小鼠细胞的其他抗原显示出外来反应性(xeno-reactivity)。结果,T淋巴细胞在不同器官中引起炎症浸润,几周后导致动物死亡,这一过程被称为异种移植抗宿主病(xGVHD)。已证明用抗PDL1和抗CD137等免疫调节抗体治疗会加剧xGVHD(Sanmamed MF等人Nivolumab and urelumab enhance antitumor activity of human T lymphocytes engrafted in

Rag2-/-IL2Rgnull immunodeficient mice. Cancer Res 2015;75(17):3466-3478)。

[0476] **研究设置和治疗方案:**雌性NOG小鼠单侧注射 5×10^6 个HCC827细胞。细胞以50%的PBS中的细胞悬浮液和50%的matrigel的混合物注射,总注射量为 $100 \mu\text{l}$ 。将肿瘤细胞注射到NOG小鼠中并成功植入肿瘤后(中位肿瘤体积为 $80-100 \text{mm}^3$),通过静脉注射用 5×10^6 个人PBMC替代小鼠。随机分组当天,将每组四只小鼠用供体A的PBMC重建,另四只小鼠用供体B的PBMC重建。在注射PBMC后1-2小时开始治疗,并按如下方式进行。

[0477]

组 ID	化合物	每日总剂量 [mg]	相对单位 (r.U)	给药日期	途径	小鼠数量
1	溶媒	na	na	0,3,7,10	ip	8
2	PRO1137	0.2	1 r.U	0,3,7,10	ip	8

[0478] 根据NF-AT报告基因中抗体阻断PD-1/PDL1相互作用的体外活性,为PRO1137设定0.2mg剂量以达到0.1mg剂量的阿维鲁单抗(每只小鼠)所模拟的相同相对活性。因此,相对于0.1mg剂量的阿维鲁单抗,0.2mg的PRO1137剂量可以表示为一个相对单位(1r.U)。每周两次通过卡尺测量体重和肿瘤体积。根据研究结果,在规定的时间点处死动物。所有动物均在“相同”时间点(在第17天和第18天)处决。由于生产能力原因,在第一天进行每组的前一半的样品收集和处理,在第二天进行每组的后一半的样品收集和处理。用来自两个不同供体的PBMC重建的动物在两个采样组中均具有相同的代表。

[0479] **结果:**使用免疫缺陷性NOG小鼠品系和同种异体人外周血单核细胞(hPBMC),通过测量肿瘤体积评估了抗PDL1 PRO1137在人HCC827 NSCLC异种移植物中的抗肿瘤活性(图10)。每周两次测量肿瘤体积,直到在第17天或第18天处死小鼠。将肿瘤体积相对于治疗开始时的肿瘤体积标准化(相对肿瘤体积)。如图10所示,与溶媒对照组相比,用PRO1137单克隆抗体治疗显示出降低的肿瘤生长。值得注意的是,用PRO1137进行治疗并未导致中位体重降低,这暗示了该分子在所测试的剂量水平下被良好地耐受(图11)。

[0480] **实施例12:**PRO1137在移植有人脐带血来源的CD34+造血干细胞(UCB HSC)的NOG小鼠中的抗肿瘤功效的评估

[0481] 使用移植有人脐带血来源的CD34+造血干细胞(UCB HSC)的NOG小鼠品系,比较了PRO1196(抗PDL1 IgG1;SEQ ID NO:92和93)与溶媒治疗或与阿维鲁单抗在人HCC827 NSCLC异种移植物中的抗肿瘤活性。

[0482] **研究设置和治疗方案:**移植有人脐带血来源的CD34+造血干细胞(UCB HSCs)的雌性NOG小鼠皮下注射HCC827 NSCLC细胞。小鼠接受单侧注射 5×10^6 个HCC827细胞。细胞注射以50%的PBS中的细胞悬浮液和50%的基底胶()的混合物,总注射量为 $100 \mu\text{l}$ 。将肿瘤细胞注射到NOG小鼠中并成功植入肿瘤后(中位肿瘤体积为 $80-100 \text{mm}^3$),将小鼠($n=10$)随机分为治疗组:

[0483]

组 ID	化合物	每日总剂量 [mg]	给药日	途径	小鼠数量
1	溶媒 (palivizumab)	0.1 mg	0,5,10,15, 20	ip	10
2	抗-PDL1 IgG (PRO1196)	0.1 mg	0,5,10,15, 20	ip	10
3	阿维鲁单抗	0.1 mg	0,5,10,15, 20	ip	10

[0484] 每周两次通过卡尺测量体重和肿瘤体积。在治疗后第25、29和30天收获肿瘤。

[0485] 结果:使用移植有人脐带血来源的CD34+造血干细胞 (UCB HSC) 的免疫缺陷型NOG小鼠,通过测量肿瘤体积评估了PRO1196 (抗PDL1 IgG1;SEQ ID NO:92和93) 在人HCC827 NSCLC异种移植物中的抗肿瘤活性 (图12)。每周两次测量肿瘤体积,直到在第25、29或30天处死小鼠。将肿瘤体积相对于治疗开始时的肿瘤体积标准化 (相对肿瘤体积)。如图12中,与对照组相比,用PRO1196和阿维鲁单抗治疗导致肿瘤生长稳定化。

[0486] 实施例13:PDL1阻断和同时发生的CD137的局部刺激在同系MC38结肠癌模型中的抗肿瘤功效的评估。

[0487] 另外,将在具有完整免疫系统的同系C57BL/6小鼠的MC38结肠癌模型中测试包含本发明的PDL1结构域的多特异性抗体的抗肿瘤活性。其他人已经使用过该模型,通过用CD137激动剂和PD-1/PDL1拮抗剂进行联合治疗,显示出增强的抗肿瘤活性 (Chen S等人 Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a poorly immunogenic tumor model. Cancer Immunol Res 2014;3(2):149-160和Rodriguez-Ruiz ME等人 Abscopal effects of radiotherapy are enhanced by combined immunostimulatory mAbs and are dependent on CD8 T cells and crosspriming. Cancer Res 2016;76(20):5994-6005)。

[0488] 由于待测试的多特异性抗体的抗CD137结构域和抗PDL1结构域两者均不与小鼠PDL1和小鼠CD137不交叉反应,因此将使用CrownBio建立的工程化人CD137敲入模型。在该模型中,使用CRISPR/Cas9系统在C57BL/6小鼠背景中,将小鼠CD137的胞外和跨膜结构域替换为人CD137的相应序列。另外,将使用修改的MC38肿瘤细胞系,其表达处于CMV启动子控制之下的人PDL1而非小鼠PDL1。将所述多特异性抗体对肿瘤体积的作用与用人源化IgG1和人人源化IgG4进行的联合治疗进行比较,所述人源化IgG1含有与所述多特异性抗体相同的PDL1特异性可变结构域,所述人源化IgG4具有相同的CD137特异性可变结构域。为了提供局部抗肿瘤免疫反应的进一步证据,将通过流式细胞术分析肿瘤浸润淋巴细胞 (例如CD8+、CD4+和调节性T细胞) 的出现率。为了探索抗CD137/抗PDL1治疗后全身免疫系统的调节,将通过流式细胞术和可能的免疫组织化学方法分析肝脏和脾脏中CD4+和CD8+T细胞的出现率。此外,可以使用定量ELISA方法分析全身性IFN水平。为了进一步表征抗CD137/抗PDL1联合治疗的

安全性,可以评估主要与肝脏毒性相关的临床化学病理学参数(在临床上针对抗CD137治疗观察到的),例如丙氨酸转氨酶、谷氨酸脱氢酶和天冬氨酸转氨酶的升高水平。

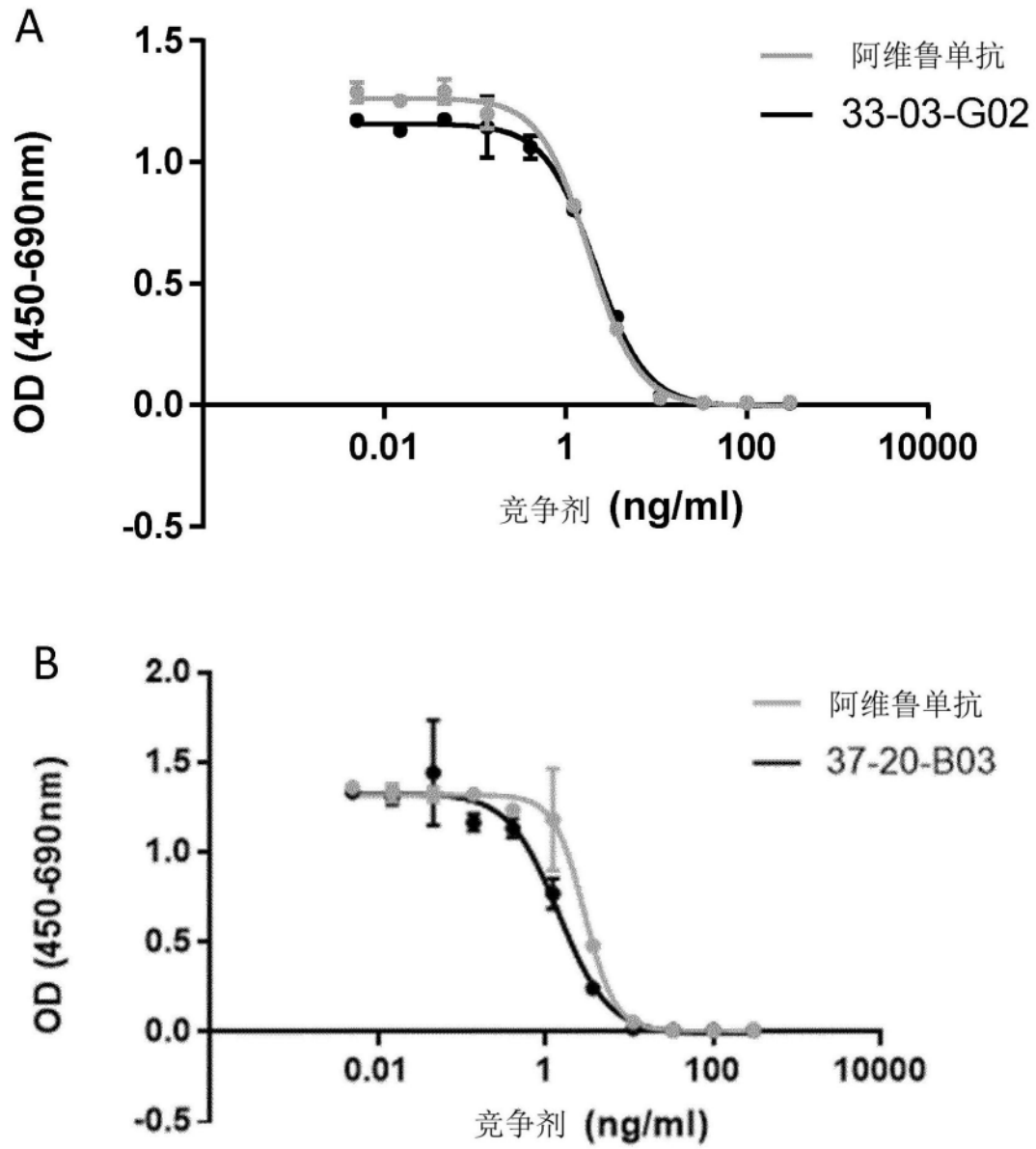


图1

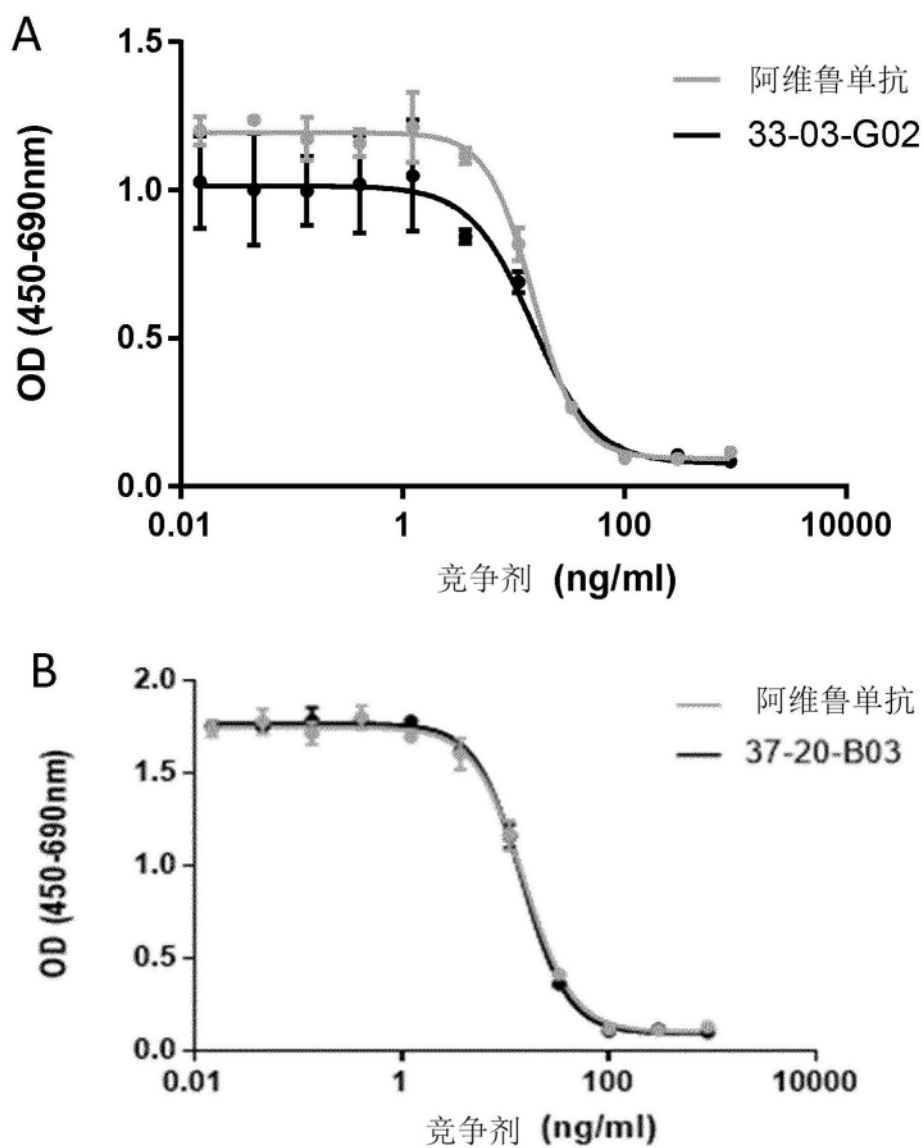


图2

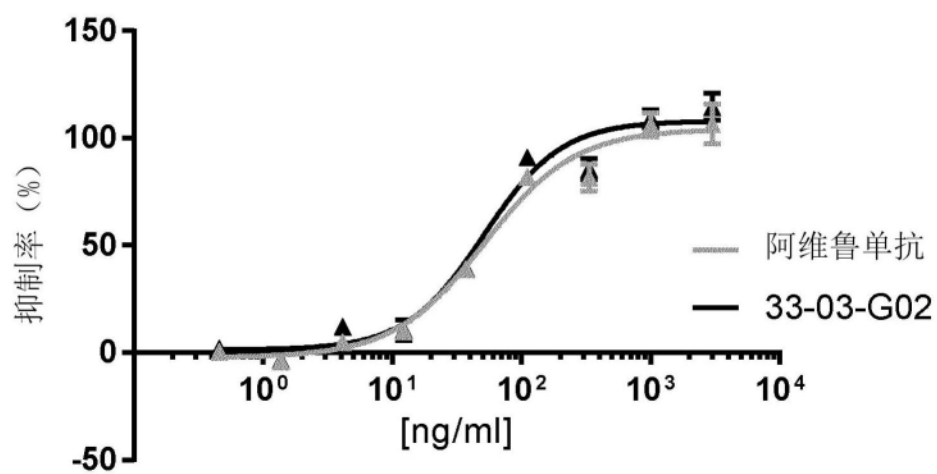
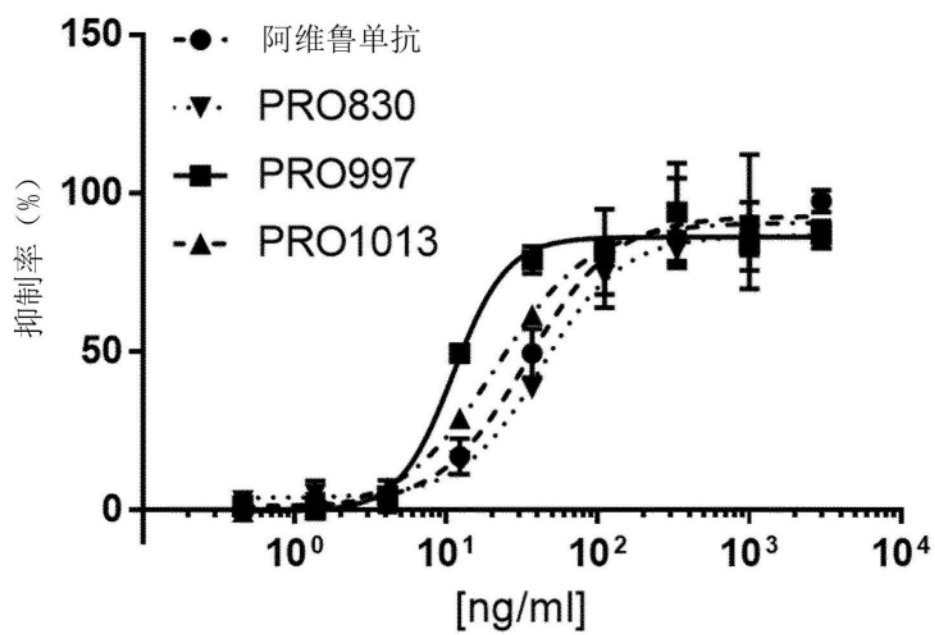


图3

A



B

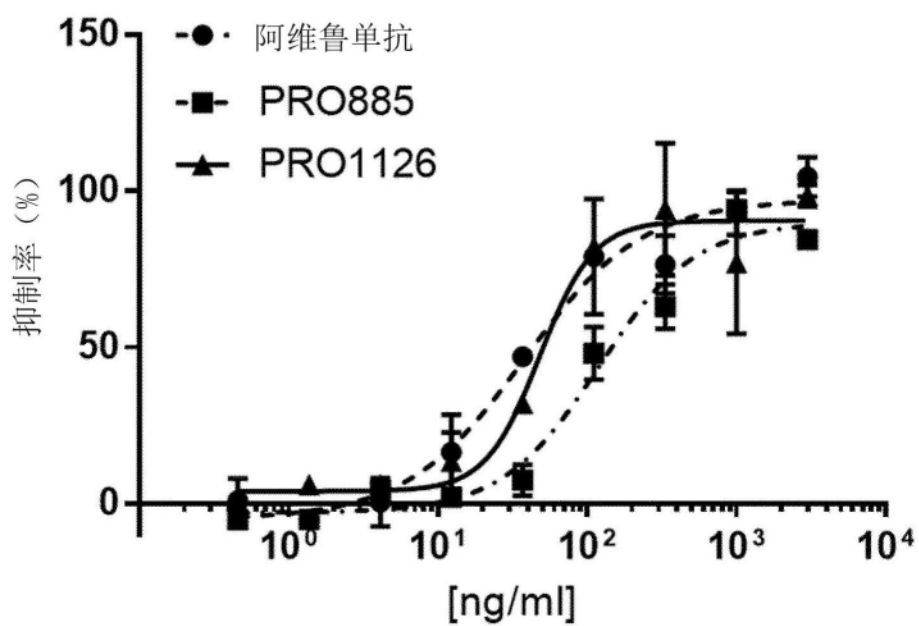


图4

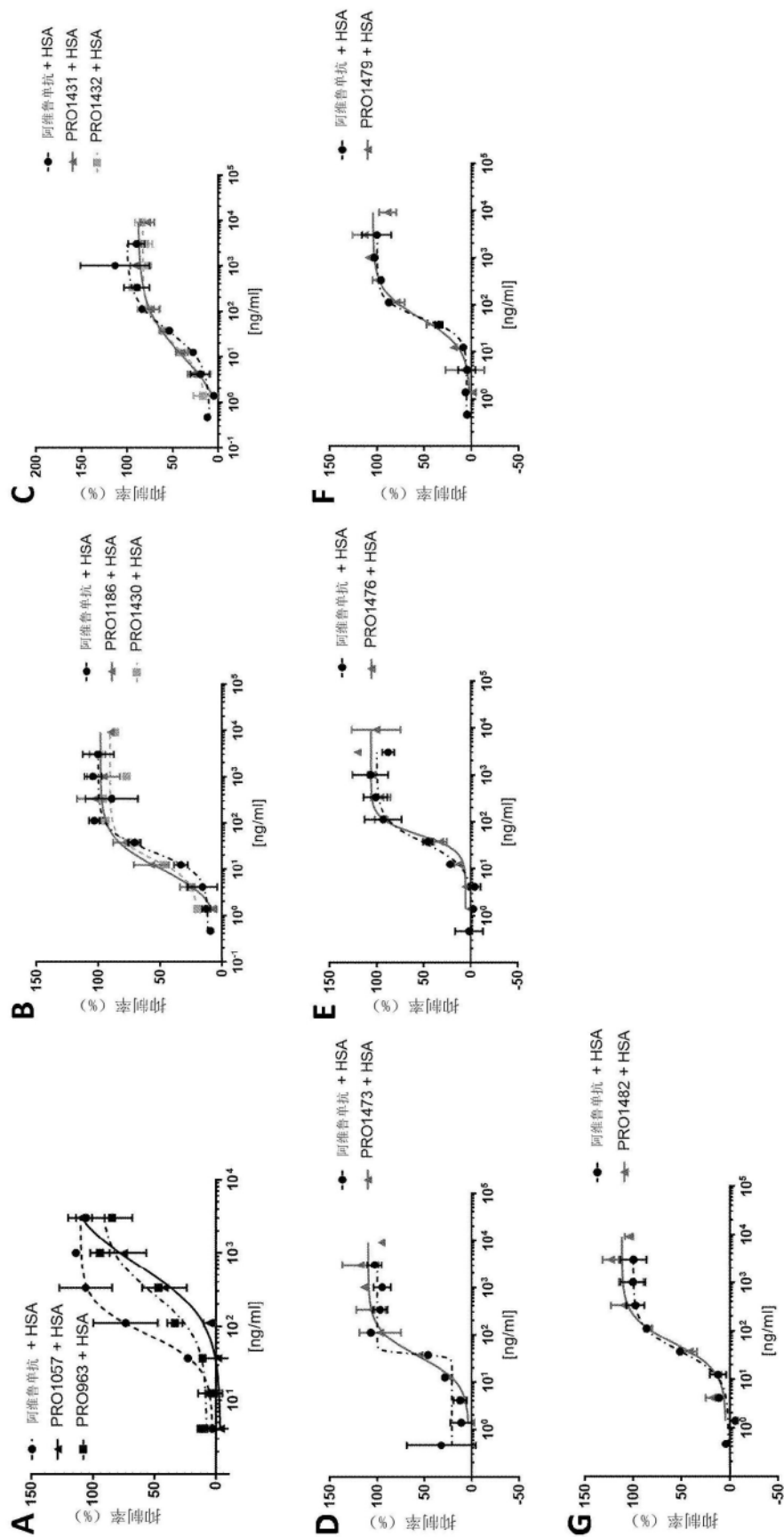


图5

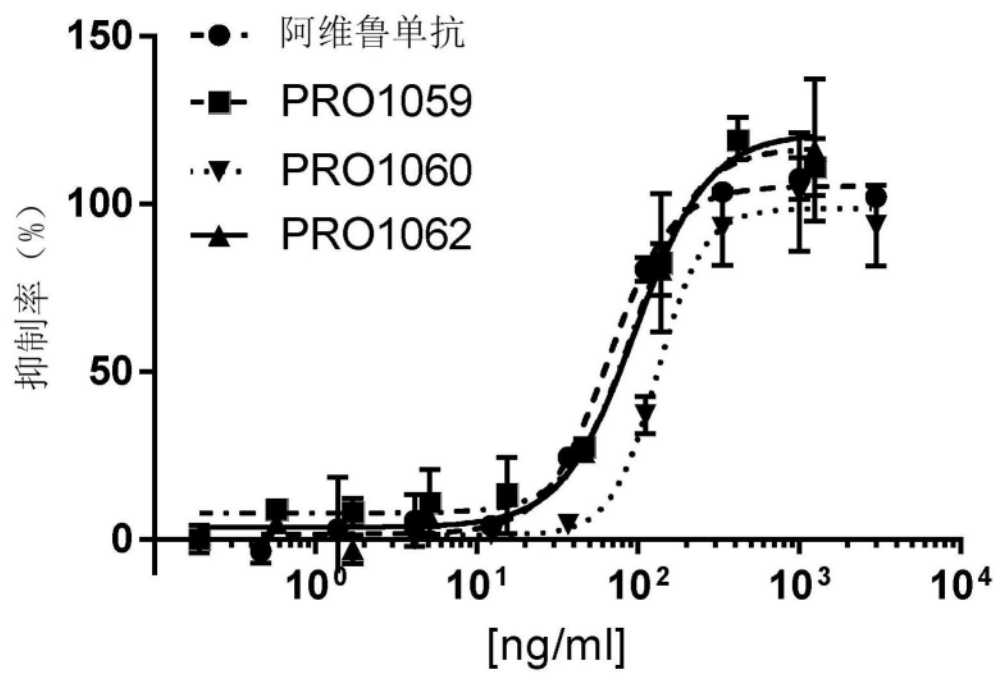


图6

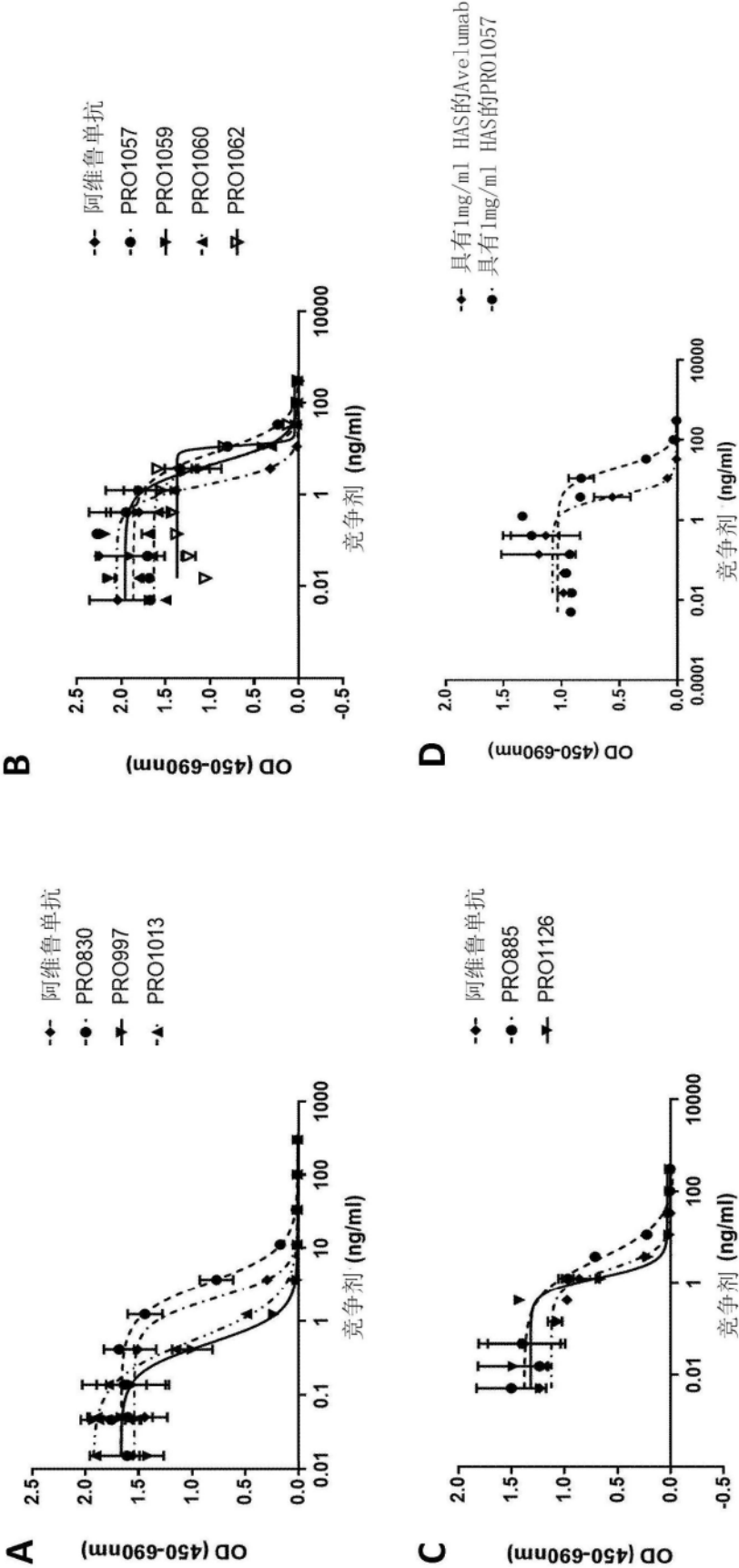


图7

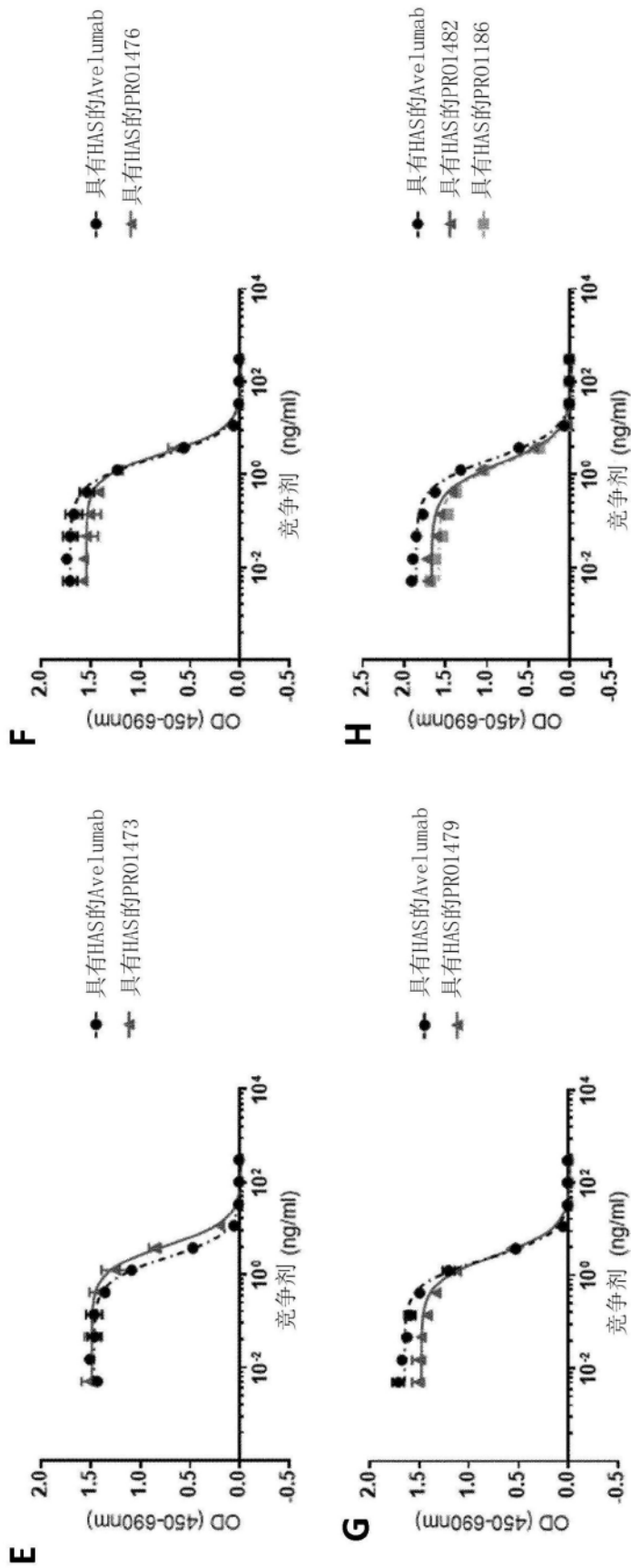


图7 (续)

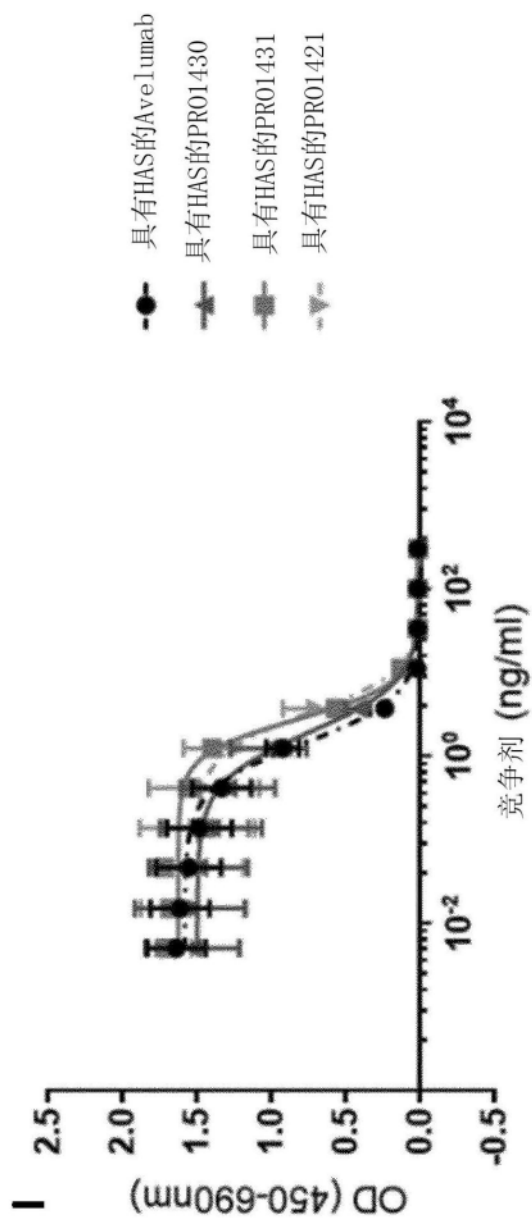


图7(续)

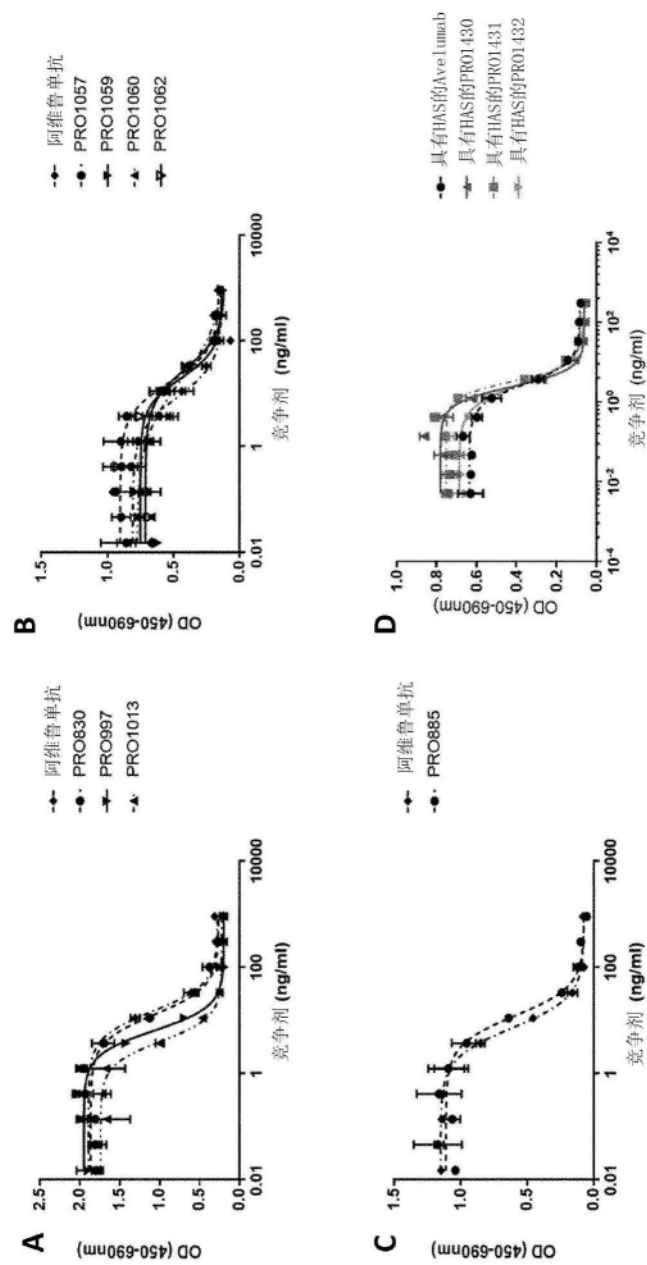


图8

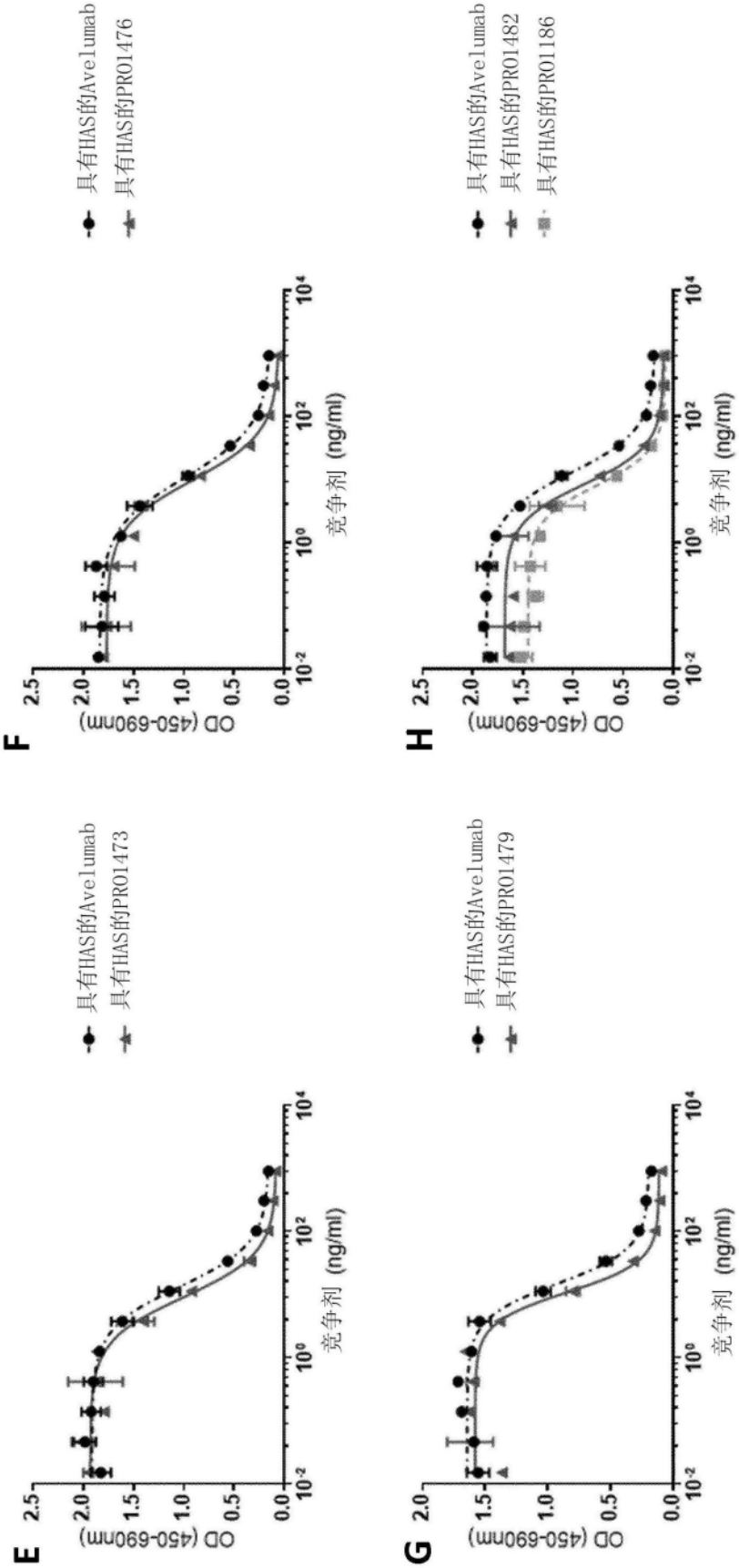


图8(续)

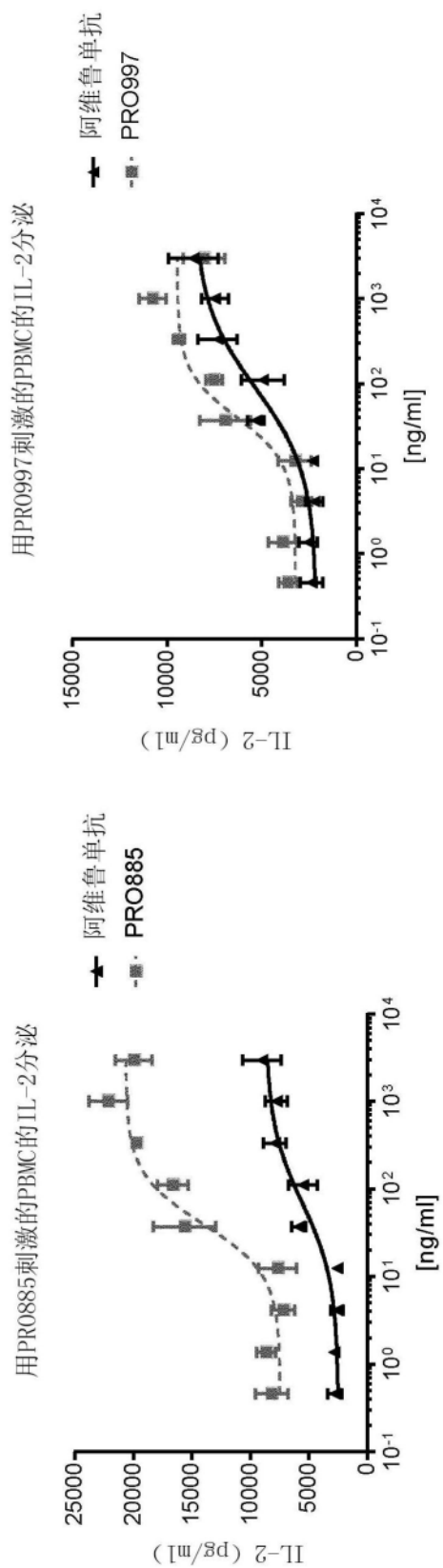


图9

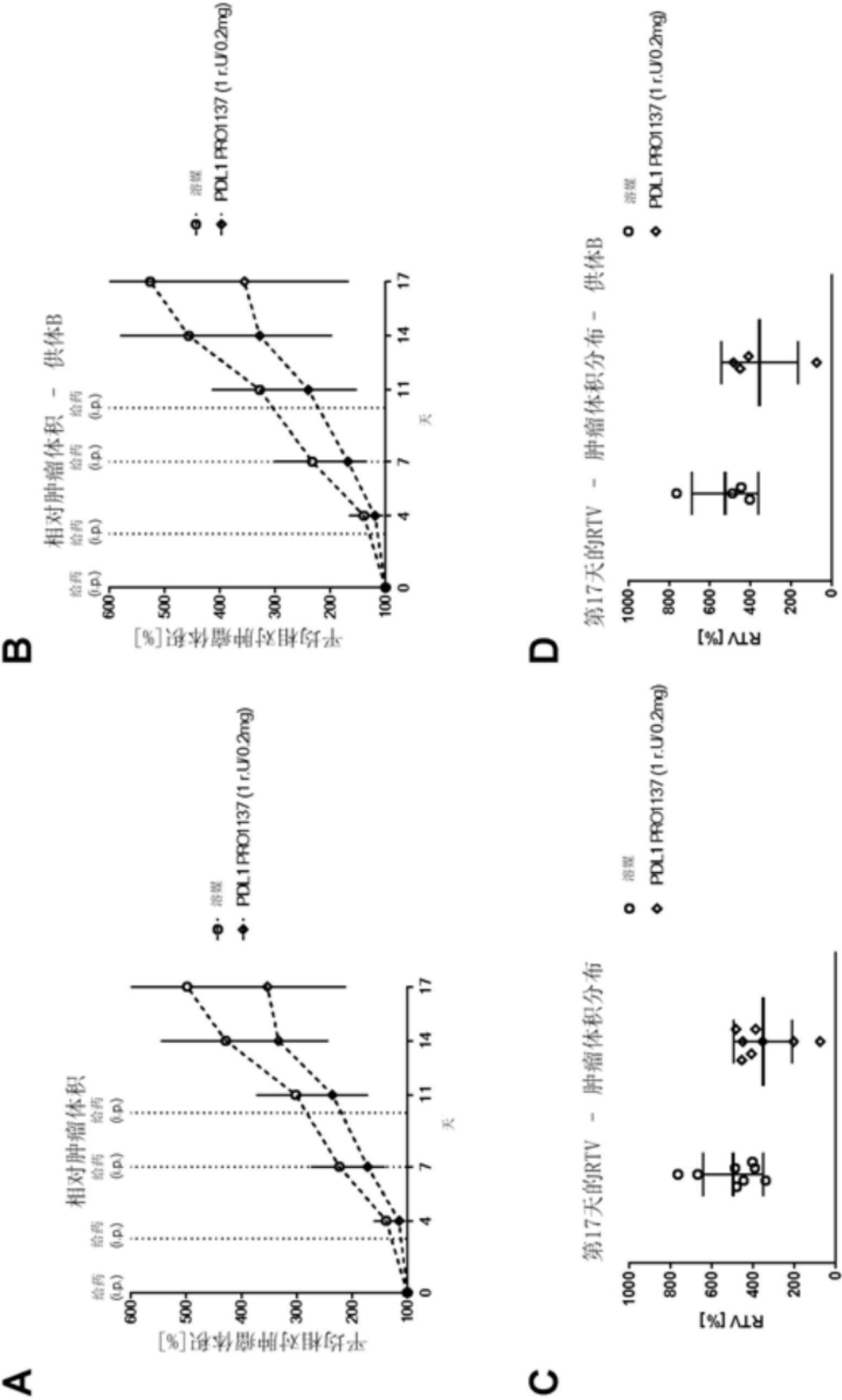


图10

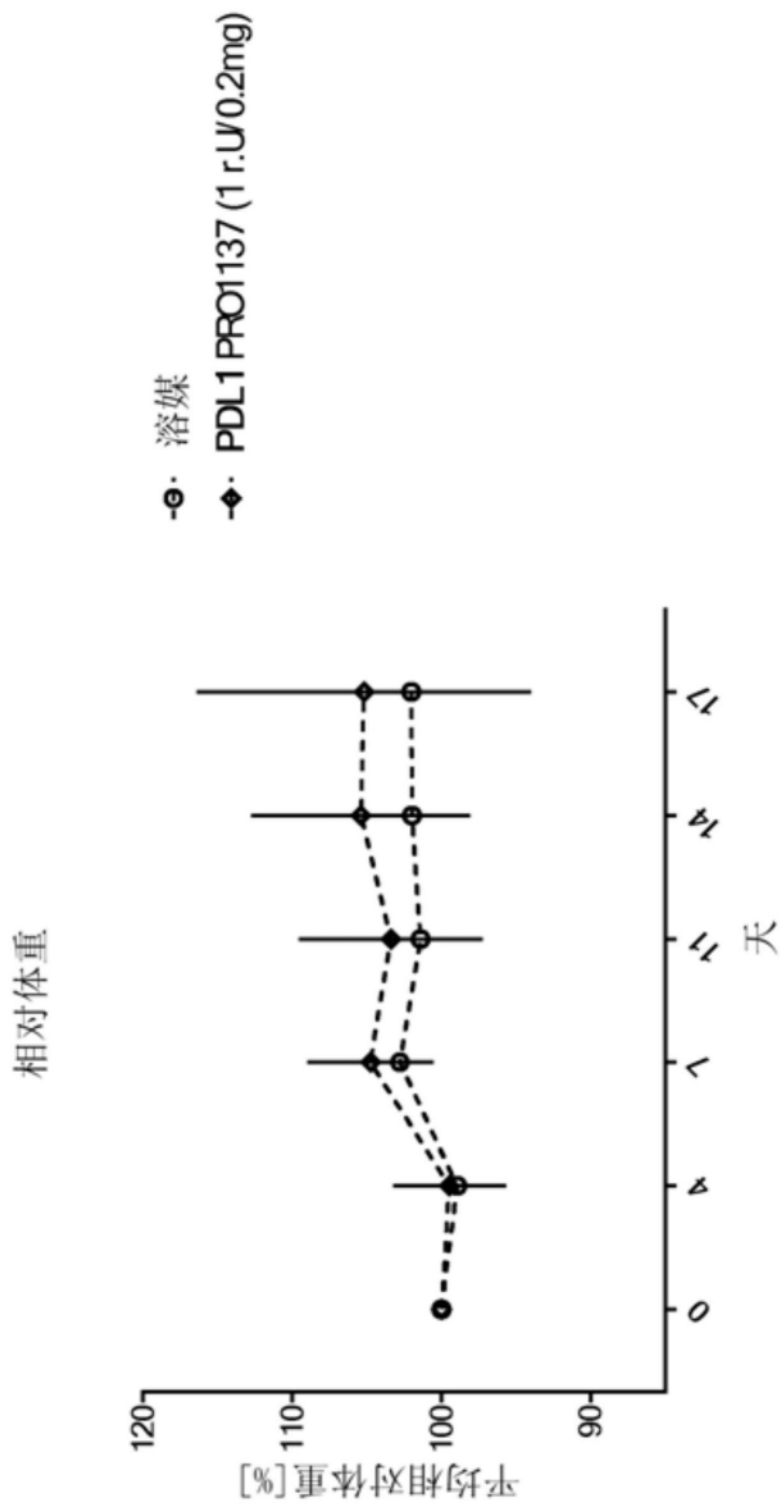


图11

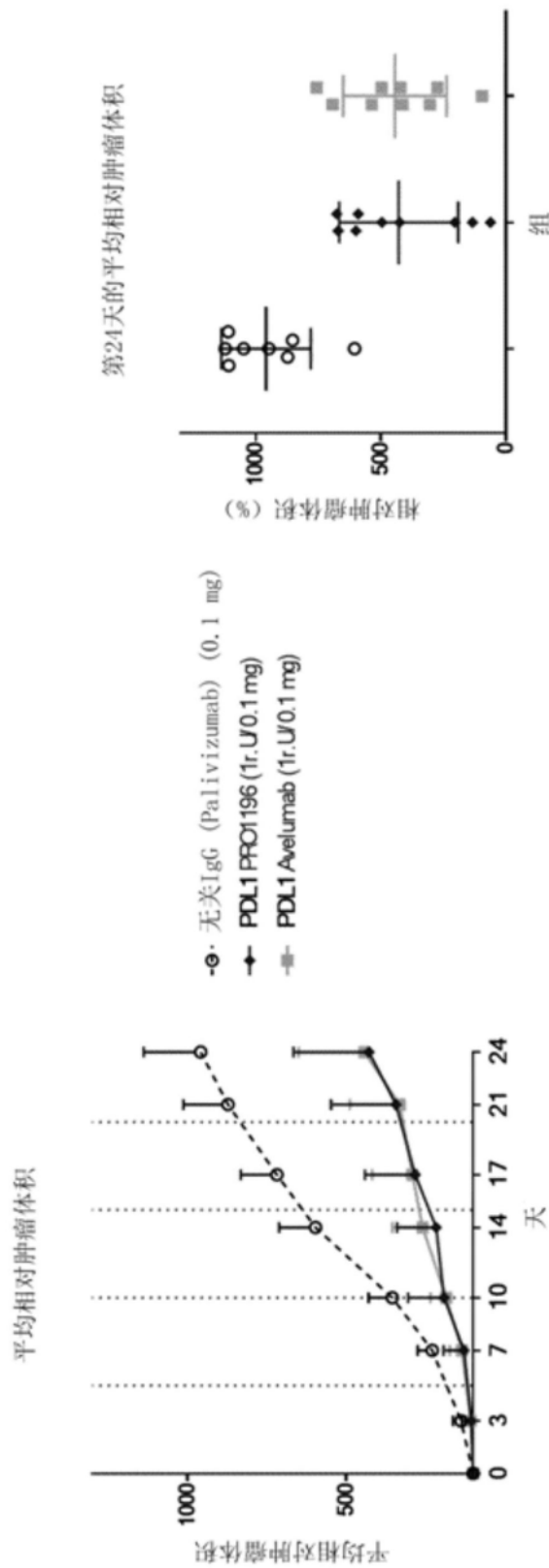


图12