(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120282984 A
(43)申请公布日 2025.07.08

(21)申请号 202380082183.3
(22)申请日 2023.11.29
(30)优先权数据
63/428,802 2022.11.30 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.05.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/081653 2023.11.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/118814 EN 2024.06.06
(71)申请人 财团法人生物技术开发中心
地址 中国台湾新北市汐止区
(72)发明人 叶舒平 游成州 骆育壎 王金玉 詹美琦 黄朝旸 赖思良
(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
专利代理师 陈甜甜
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

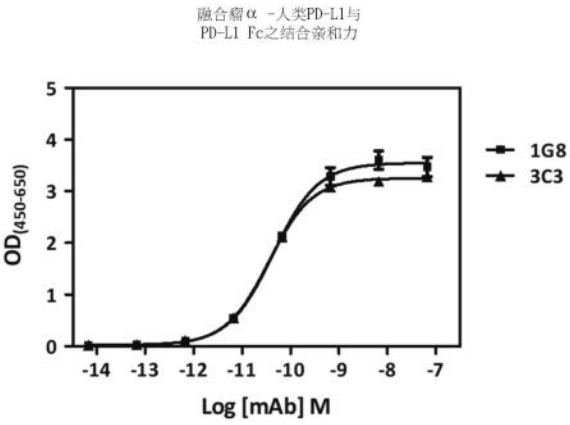
权利要求书2页 说明书16页
序列表（电子公布） 附图17页

(54)发明名称

抗人类PD-L1抗体及其用途

(57)摘要

本发明关于一种抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其包含:重链可变区序列,其包含具有SEQ ID NO:2至4、或6至8之序列之三个CDR;及轻链可变区序列,其包含具有SEQ ID NO:10至12、或14至16之序列之三个CDR。本揭示亦关于一种医药组合物及一种侦测样品中之PD-L1之表现的方法。



CN 120282984 A

1.一种抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区之互补决定区(CDR)及轻链可变区之互补决定区,其中

该重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:2之序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:3之序列的HCDR2及具有SEQ ID NO:4之序列的HCDR3,及该轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:10之序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:11之序列的LCDR2及具有SEQ ID NO:12之序列的LCDR3;或

该重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:6之序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:7之序列的HCDR2及具有SEQ ID NO:8之序列的HCDR3,及该轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:14之序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:15之序列的LCDR2及具有SEQ ID NO:16之序列的LCDR3。

2.如权利要求1所述的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中该抗体为嵌合、人源化、复合或人类抗体。

3.如权利要求1所述的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中

该重链可变区包含SEQ ID NO:1、5、25、27、28、31或35之序列或与SEQID NO:1、5、25、27、28、31或35之序列具有至少约95%同源性的序列;及/或

该轻链可变区包含SEQ ID NO:9、13、26、29、30、32、33或34之序列或与SEQ ID NO:9、13、26、29或30、32、33或34之序列具有至少约95%同源性的序列。

4.如权利要求1所述的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中

该重链可变区包含SEQ ID NO:1之序列或与该序列具有至少约95%同源性之序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:9之序列或与该序列具有至少约95%同源性之序列;

该重链可变区包含SEQ ID NO:5之序列或与该序列具有至少约95%同源性之序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:13之序列或与该序列具有至少约95%同源性之序列;

该重链可变区包含SEQ ID NO:25、27或28之序列或与该等序列具有至少约95%同源性之序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:26、29或30之序列或与该等序列具有至少约95%同源性之序列;或

该重链可变区包含SEQ ID NO:31或35之序列或与该等序列具有至少约95%同源性之序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:32、33或34之序列或与该等序列具有至少约95%同源性之序列。

5.如权利要求1所述的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其与治疗剂结合。

6.如权利要求1所述的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其共价连接至治疗剂。

7.如权利要求1所述的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其连接至第二目标之第二特异性结合域。

8.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其系在细胞之表面上表现。

9.如权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中该细胞系免疫细胞。

10.如权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中该细胞为T细胞。

11.一种载体,其编码如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段。

12.如权利要求11所述的载体,其包含SEQ ID NO:1、5、25、27、28、31或35之序列或与SEQ ID NO:1、5、25、27、28、31或35之序列具有至少约95%同源性的序列;及/或该轻链可变区包含SEQ ID NO:9、13、26、29、30、32、33或34之序列或与SEQ ID NO:9、13、26、29、30、32、33或34之序列具有至少约95%同源性的序列。

13.一种经基因工程化之细胞,其表现如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段。

14.一种经基因工程化之细胞,其含有如权利要求11所述的载体。

15.如权利要求14所述的经基因工程化之细胞,其为免疫细胞。

16.如权利要求14所述的经基因工程化之细胞,其为T细胞。

17.一种用于制备如权利要求1至10中任一项所述的抗体或其抗原结合片段之方法,其包含:(a)将编码该抗体或抗原结合片段之一或多种聚核苷酸引入至宿主细胞中;(b)在有利于表现该一或多种聚核苷酸之条件下培养该宿主细胞;及(c)视情况自该宿主细胞及/或生长该宿主细胞之培养基中分离该抗体或抗原结合片段。

18.一种用于抑制有需要之个体之PD-L1介导之讯号的方法,其包含向该个体投与有效量之医药组合物,其中该医药组合物包含如权利要求1至10中任一项所述的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,或如权利要求14所述的经基因工程化之细胞及医药学上可接受之载剂。

19.一种用于治疗有需要之个体之PD-L1介导之疾病的方法,其包含向该个体投与有效量之医药组合物,其中该医药组合物包含如权利要求1至10中任一项所述的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,或如权利要求14所述的经基因工程化之细胞及医药学上可接受之载剂。

20.如权利要求19所述的方法,其中该疾病为癌症。

21.如权利要求19所述的方法,其中该疾病为肺癌、乳癌、前列腺癌、结肠直肠癌、胃癌、肝细胞癌、肾细胞癌、睾丸癌、黑素瘤、白血病或乳头状甲状腺癌。

22.一种用于侦测PD-L1之表现的方法,其包含使样品与如权利要求1至10中任一项所述的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段接触。

抗人类PD-L1抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明关于新颖人类抗体,特定言之关于对具有较高亲和力之PD-L1具有特异性之人类单克隆抗体。此外,本发明关于此类抗体用于治疗及诊断人类疾病之用途。

背景技术

[0002] 程序性死亡蛋白质1(PD-1)为受体之CD28家族的抑制性成员,该家族亦包括CD28、CTLA-4、ICOS及BTLA。PD-1表现于经活化B细胞、T细胞及骨髓细胞(Bennett,Luxenberg等人.2003,J Immunol 15 January 2003;170(2):711-718)上。其配位体,程序化细胞死亡配位体1(PD-L1)表现于一些肿瘤细胞上,且藉由经活化B细胞及T细胞、树突状细胞、巨噬细胞及成纤维细胞表现(Hansen,Du Pasquier等人.2009,Mol Immunol.2009 Jan;46(3):457-72)。PD-L1结合PD-1以藉由诱导T细胞细胞凋亡或耗竭而减弱细胞免疫反应。使用单克隆抗体阻断PD-1/PD-L1路径(抗PD-1或PD-L1)为一种正在对许多类型之人类癌症之研究中探索的有前景之治疗方法(Sanmamed and Chen 2014,Cancer J.2014 Jul-Aug;20(4):256-61)。此等研究之结果表明,藉由促进PD-1/PD-L1路径活化,PD-L1在帮助肿瘤逃出免疫系统起重要作用。

[0003] 已在各种实体肿瘤中观测到PD-L1表现,该等实体肿瘤包括乳癌、肺癌、胃癌、结肠直肠癌、肝细胞癌、肾细胞癌、睾丸癌及乳头状甲状腺癌。此外,若干统合分析已显示,PD-L1过度表现表示许多癌症类型之不良预后(Wang,Wang等人.2015,J Intern Med.2015 Oct;278(4):369-95;Xu,Xu等人.2015,Int J Clin Exp Med.2015 Sep 15;8(9):14595-603;Zhang,Kang等人.2015,Medicine 94:e515,Iacovelli,Nole等人.2016,Target Oncol.2016;11:143-148)。因此,需要针对PD-L1之优选抗体来治疗或诊断由PD-L1介导之疾病或病况

发明内容

[0004] 在一个态样中,本揭示关于对人类PD-L1具有特异性之抗体。

[0005] 因此,本揭示提供本揭示之抗体或其抗原结合片段,其包含包括HCDR1、HCDR2及HCDR3之重链可变区,其中

[0006] 该HCDR1序列为GYSITSDYWN(SEQ ID NO:2)、该HCDR2序列为YISYTGSTYYNPSLKS(SEQ ID NO:3)且该HCDR3序列为RGEWLSPFAY(SEQ ID NO:4);或

[0007] 该HCDR1序列为GYSITSDYWD(SEQ ID NO:6)、该HCDR2序列为YISYTGSTYYNPSLRS(SEQ ID NO:7)且该HCDR3序列为RGGWLSPFVY(SEQ ID NO:8);

[0008] 其中该等HCDR序列根据Kabat命名法之方法定义。

[0009] 根据本揭示之实施例,对人类PD-L1具有特异性之抗体的重链可变区序列中之互补决定区(CDR)具有SEQ ID NO:2、3、4、6、7或8之序列,如图1A至1B中所示。

[0010] 因此,本揭示提供本揭示之抗体或其抗原结合片段,其包含包括LCDR1、LCDR2及LCDR3之轻链可变区,其中

[0011] 该LCDR1序列为KSSQSLLYSSNQKNSLA(SEQ ID NO:10)、该LCDR2序列为WASTRES(SEQ ID NO:11),且该LCDR3序列为QQYYTYPFT(SEQ ID NO:12);或

[0012] 该LCDR1序列为KSRQSLLFSSNQKNSLA(SEQ ID NO:14)、该LCDR2序列为WASTRES(SEQ ID NO:15),且该LCDR3序列为QQYYTYPFT(SEQ ID NO:16);

[0013] 其中该等LCDR序列根据Kabat命名法之方法定义。

[0014] 根据本揭示之实施例,对人类PD-L1具有特异性之抗体的轻链可变区中之互补决定区具有SEQ ID NO:10、11、12、14、15或16之序列,如图2A至2B中所示。

[0015] 在另一态样中,本揭示关于对人类PD-L1或其抗原结合片段具有特异性之抗体,其包含具有HCDR1、HCDR2及HCDR3之重链可变区及具有LCDR1、LCDR2及LCDR3之轻链可变区,其中

[0016] 该重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:2之序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:3之序列的HCDR2及具有SEQ ID NO:4之序列的HCDR3,及该轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:10之序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:11之序列的LCDR2及具有SEQ ID NO:12之序列的LCDR3;或

[0017] 该重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:6之序列的HCDR1、具有SEQ ID NO:7之序列的HCDR2及具有SEQ ID NO:8之序列的HCDR3,及该轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:14之序列的LCDR1、具有SEQ ID NO:15之序列的LCDR2及具有SEQ ID NO:16之序列的LCDR3。

[0018] 在本揭示之一些实施例中,抗体为嵌合、人源化、复合或人类抗体。

[0019] 在本揭示之一些实施例中,抗体为多特异性的。

[0020] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段之重链可变区包含SEQ ID NO:1之序列或与SEQ ID NO:1之序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列;及该轻链可变区包含SEQ ID NO:9之序列或与SEQ ID NO:9之序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列。

[0021] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段之重链可变区包含SEQ ID NO:5之序列或与SEQ ID NO:5之序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列;及该轻链可变区包含SEQ ID NO:13之序列或与SEQ ID NO:13之序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列。

[0022] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段之重链可变区包含SEQ ID NO:25、27或28之序列或与SEQ ID NO:25、27或28之序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性之序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:26、29或30之序列或与SEQ ID NO:26、29或30之序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性之序列。

[0023] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段之重链可变区包含SEQ ID NO:31或35之序列或与SEQ ID NO:31或35之序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性之序列,且该轻链可变区包含SEQ ID NO:32、33或34之序列或与SEQ ID NO:32、33或34之序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性之序列。

[0024] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段为全抗体、Fab片段、F

$(ab')_2$片段或ScFv片段。

[0025] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段为全人类抗体。

[0026] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含选自IgG1、IgG2或IgG4同功型之重链恒定区及选自κ亚型或λ同功型之轻链恒定区。

[0027] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段藉由与第二目标之第二特异性结合域结合而形成双特异性或多特异性抗体之一部分。第二目标之第二特异性结合域例如可为抗CD3、抗ICOS或抗TIM3等。

[0028] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段与治疗剂(有效负载)结合以形成抗体-药物结合物(ADC)。在一些实施例中,治疗剂或有效负载可针对其调节表现PD-L1之细胞或表现PD-1之细胞之功能的能力加以选择。此类治疗剂或有效负载可包括例如DM1、MMAE或MMAF。

[0029] 在本揭示之一些实施例中,该抗体或其抗原结合片段表现于细胞之表面上。细胞可为免疫细胞。在本揭示之一个实施例中,该免疫细胞为T细胞。

[0030] 本揭示亦提供一种编码抗体或其抗原结合片段之载体。

[0031] 在本揭示之一些实施例中,载体包含SEQ ID NO:1、5、25、27、28、31或35之序列或与SEQ ID NO:1、5、25、27、28、31或35之序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列;及/或该轻链可变区包含SEQ ID NO:9、13、26、29、30、32、33或34之序列或与SEQ ID NO:9、13、26、29、30、32、33或34之序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的序列。

[0032] 在另一态样中,本揭示提供表现抗体或其抗原结合片段或含有载体之经基因工程化之细胞。经基因工程化之细胞可为免疫细胞。

[0033] 本揭示亦提供一种用于制备如本文所揭示之抗体或其抗原结合片段之方法,其包含:(a)将编码该抗体或抗原结合片段之一或多种聚核苷酸引入至宿主细胞中;(b)在有利于表现该一或多种聚核苷酸之条件下培养该宿主细胞;及(c)视情况自该宿主细胞及/或生长该宿主细胞之培养基中分离该抗体或抗原结合片段。

[0034] 本揭示提供一种医药组合物,其包含有效量之抗体或其抗原结合片段或经基因工程化之细胞或免疫细胞及医药学上可接受之载剂。

[0035] 在本揭示之一些实施例中,医药组合物用于抑制PD-L1介导之讯号。

[0036] 在本揭示之一些实施例中,医药组合物用于治疗由PD-L1介导之疾病。

[0037] 在本揭示之一些实施例中,PD-L1介导之疾病可为癌症。癌症可包括(但不限于):肺癌、乳癌、前列腺癌、结肠直肠癌、胃癌、肝细胞癌、肾细胞癌、睾丸癌、黑素瘤、白血病或乳头状甲状腺癌及其他晚期实体肿瘤。

[0038] 本揭示提供一种侦测PD-L1表现之方法,其包含使样品与本文所描述之抗PD-L1抗体或其抗原结合片段接触。

[0039] 图式简单说明

[0040] 图1A至图1B展示经设计以对应于小鼠抗人类PD-L1抗体之复合人类重链(图1A,1G8;图1B,3C3)可变区序列。

[0041] 图2A至图2B展示经设计以对应于小鼠抗人类PD-L1抗体之复合人类轻链(图2A,1G8;图2B,3C3)可变区序列。

[0042] 图3绘示使用ELISA,抗PD-L1抗体与人类PD-L1结合。

[0043] 图4展示用流式细胞分析术分析之结合至HCC827细胞的抗PD-L1抗体。

[0044] 图5绘示各种抗体诱导PD-1/PD-L1阻断之能力。

[0045] 图6展示在鼠类同基因型MC38结肠癌模型中,抗PD-L1 mAb处理之活体内功效。

[0046] 图7展示关于人类PD-L1 mAb 3C3及IMGT之VL及VH序列之人源化进行的序列分析。在根据Kabat方案在残基编号下展示之第一行中,回复突变位点用下划线展示。

[0047] 图8展示关于人类PD-L1 mAb 1G8及IMGT之VL及VH序列之人源化进行的序列分析。在根据Kabat方案在残基编号下展示之第一行中,回复突变位点用下划线展示。

[0048] 图9展示用于产生小鼠-人类嵌合体及PD-L1(3C3)mAb之人源化版本的表现载体。用于纯化抗体之不同PD-L1(3C3)mAb版本之详细程序描述于本揭示中。

[0049] 图10描绘使用小鼠-人类嵌合体3C3 MM及人源化3C3 HuB2Hu0、3C3 HuB2Hu及3C3 HuB2Hu2抗体以确定人源化PD-L1 mAb之结合亲和力的结果。嵌合体抗体表现、纯化及Kd分析之详细程序如本揭示中所描述进行。

[0050] 图11描绘使用小鼠-人类嵌合体1G8 MM及人源化1G8 HuHu、1G8 HuB2Hu0、1G8 HuHu2、1G8 HuB2Hu、1G8 HuHu2及1G8 HuB2Hu2抗体以确定人源化PD-L1mAb之结合亲和力的结果。嵌合体抗体表现、纯化及Kd分析之详细程序如本揭示中所描述进行。

[0051] 图12绘示各种人源化PD-L1 3C3抗体诱导PD-1/PD-L1阻断之能力。

[0052] 图13展示在鼠类同基因型MC38结肠癌模型中,人源化PD-L1 3C3抗体处理之活体内功效。

[0053] 实施方式

[0054] 应了解,本揭示不限于本文所描述之特定材料及方法。亦应了解,本文所用之术语仅出于描述特定实施例之目的且不意欲限制本揭示之范畴,本揭示之范畴将仅由所附权利要求限制。

[0055] 必须指出,除非上下文另外明确规定,否则如本说明书及所附权利要求中所使用,单数形式“一(a/an)”及“该/该等(the)”包括多数个参考物。

[0056] 如本文所用,术语“抗体”意谓包含至少一个特异性结合至特定抗原(PD-L1)或与其相互作用之互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包括免疫球蛋白分子以及其多聚体(例如IgM),该等免疫球蛋白分子包含四个多肽链,即通过二硫键互连的两个重(H)链和两个轻(L)链。各重链包含重链可变区(本文中缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个域,CH1、CH2及CH3。各轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或VL)及轻链恒定区。轻链恒定区包括一个域(CL1)。VH及VL区可进一步再分成高变区,称为互补决定区(CDR),穿插称为构架区(FR)之更保守区。每个VH及VL由自氨基端至羧基端按以下顺序排列之三个CDR及四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本揭示之不同实施例中,抗PD-L1抗体(或其抗原结合部分)之FR可与人类生殖系序列一致,或可经天然或人工修饰。氨基酸共有序列可以基于两个或更多个CDR之并列分析来确定。

[0057] 如本文所使用,术语“特异性结合”意谓抗体不与其他抗原决定基发生明显程度的交叉反应。

[0058] 如本文所用,术语“抗原决定基”指抗体结合至抗原之位点。

[0059] 如本文所使用,术语“互补决定区”(CDR)指在重链及轻链多肽之可变区内发现的

不连续抗原组合位点。Kabat等人,J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977);Kabat等人,美国卫生及人类服务部(U.S.Dept.of Health and Human Services),“Sequences of proteins of immunological interest”(1991);Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);及MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)已经描述CDR,其中定义包括彼此对照比较时氨基酸残基的重迭或子集。

[0060] 如本文所用之术语“单克隆抗体”不限于经由融合瘤技术产生之抗体。单克隆抗体藉由任何可用或此项技术中已知的手段,自单一纯系得到,该纯系包括任何真核、原核或噬菌体纯系。

[0061] 如本文所用,术语“嵌合”抗体指具有衍生自非人类免疫球蛋白及人类免疫球蛋白恒定区之可变序列的抗体,通常选自人类免疫球蛋白模板。

[0062] 非人类抗体之“人源化”形式为含有极少衍生自非人类免疫球蛋白之序列的嵌合免疫球蛋白。一般而言,人源化抗体将包含实质上所有的至少一个且通常两个可变域,其中所有或实质上所有的CDR区对应于非人类免疫球蛋白之CDR区且所有或实质上所有的FR区为人类免疫球蛋白序列之FR区。

[0063] 如本文所用,术语“复合抗体”指具有包含生殖系或非生殖系免疫球蛋白序列之可变区的抗体,其来自两个或更多个不相关可变区。

[0064] 如本文所用,术语抗体之“抗原结合部分”、抗体之“抗原结合片段”及其类似术语包括特异性结合抗原以形成复合物之任何天然存在、以酶方式可获得、合成或基因工程化之多肽或醣蛋白。

[0065] 如本揭示中所用,术语“治疗剂”意谓适合于向哺乳动物(例如,人类)投与之具有治疗性或药理学作用的任何化合物、物质、药物或活性成分。

[0066] 如本文所使用,术语“免疫细胞”指在免疫反应中起作用之细胞。免疫细胞为造血来源的,且包括淋巴球,诸如B细胞及T细胞;自然杀手细胞;骨髓细胞,诸如单核球、巨噬细胞、嗜伊红血球、肥大细胞、嗜碱性球及颗粒球。

[0067] 如本文所使用,术语“T细胞”包括$CD4^+$T细胞及$CD8^+$T细胞。术语T细胞亦包括T辅助1型T细胞、T辅助2型T细胞、T辅助17型T细胞及抑制性T细胞。

[0068] 如本文所用,术语“载体”意指能够转运其已连接之另一核酸的核酸分子。载体之一种类型为“质体”,其指可接合额外DNA片段之环形双股DNA环。载体之另一类型为病毒载体,其中额外DNA区段可接合至病毒基因体。某些载体能够在其被引入之宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点之细菌载体及附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加型哺乳动物载体)在引入至宿主细胞中时可整合至宿主细胞之基因体中,且藉此与宿主基因体一起复制。此外,某些载体能够引起其以可操作方式连接的基因之表现。此类载体在本文中被称作“重组表现载体”(或简言之,“表现载体”)。一般而言,用于重组DNA技术中之表现载体常常呈质体形式。由于质体为载体之最常用形式,因而在本说明书中,“质体”及“载体”可互换使用。然而,本揭示意欲包括发挥相等功能之该等其他形式之表现载体,诸如病毒载体(例如复制缺陷反转录病毒、腺病毒以及腺相关病毒)。

[0069] 细胞之术语“基因工程化(genetically engineered/genetic engineering)”意指使用基因材料操纵基因以改变细胞中之基因复本及/或基因表现量。基因材料可呈DNA或RNA形式。基因材料可藉由包括病毒转导及非病毒转染之各种方式转移至细胞中。在经基因

工程化之后,细胞中某些基因之表现量可永久或暂时改变。

[0070] 如本揭示中所使用,术语“医药组合物”意谓含有向哺乳动物,例如人类投与以预防、治疗或消除哺乳动物所患之特定疾病或病理病况之治疗剂的混合物。

[0071] 如本文中所使用,术语“治疗有效量”或“灵验量”指当投与哺乳动物或其他个体用于治疗疾病时,足以实现对该疾病之该治疗的抗体之量。

[0072] 如本文所用,术语“治疗(treatment/treating)”及其类似者涵盖哺乳动物(特定言之人类)之疾病的任何治疗,且包括:(a)预防可能易患疾病但尚未诊断出患有该疾病的个体出现该疾病;(b)抑制疾病,亦即,遏制其发展;及(c)缓解疾病,亦即,使疾病消退。

[0073] 如本文中可互换地所用,术语“个人”、“个体”、“主体”及“患者”指代哺乳动物,其包括(但不限于)鼠(大鼠、小鼠)、非人类灵长类、人类、犬科动物、猫科动物、有蹄动物(例如,马科动物、牛科动物、绵羊、猪科动物、山羊)等。

[0074] 如本文中所使用,术语“需要治疗”指由照护者(例如在人类之情况下,为医师、护士、护理从业者或个人;在动物(包括非人类之哺乳动物)之情况下,为兽医)作出的判断,该判断为个体需要治疗或将受益于治疗。此判断基于多种因素作出,该等因素在照护者之专业知识领域内,且包括个体由于可用本揭示之化合物治疗之病况而患病或将患病的知识。

[0075] “癌症”、“肿瘤”及类似术语包括癌变前、赘生性、转型及癌细胞,且可指实体肿瘤,或非实体癌(参见例如Edge等人.AJCC Cancer Staging Manual(第7版2009);Cibas and Ducatman Cytology:Diagnostic principles and clinicalcorrelates(第3版2009))。癌症包括良性赘瘤及恶性赘瘤(异常生长)两者。“转型”系指自发的或诱导的表型变化,例如,细胞之不朽化、形态变化、异常细胞生长、减少的接触抑制及固着及/或恶性病(参见Freshney,Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique(第3版,1994))。尽管转型可由经转型病毒之感染及新基因体DNA之并入或外源DNA之摄入引起,其亦可以自发方式或在暴露于诱癌物之后产生。

[0076] 如本文所用,术语“样品”涵盖获自个人、个体或患者之多种样品类型,且可用于诊断性或监测分析。该定义涵盖血液及生物来源之其他液体样品;固体组织样品,诸如活组织检查样品或组织培养物或源自其之细胞,及其后代。

[0077] 本揭示关于一种新颖抗体,其对PD-L1具有特异性且对其具有较高亲和力。抗PD-L1抗体或其抗原结合片段可向个体递送治疗益处。本揭示之抗PD-L1抗体或其抗原结合片段(其可为人类或人源化)可用作用于治疗及/或诊断由PD-L1介导之多种病症的治疗剂,该等病症更充分地描述于本文中。

[0078] 特定言之,根据本揭示之实施例的抗体或其抗原结合片段对人类PD-L1或其片段中之抗原决定基具有特异性。

[0079] 根据本揭示实施例之抗体或其抗原结合片段可为全长(例如,IgG1或IgG4抗体),或可仅包含抗原结合部分(例如,Fab、F(ab')$_2$或scFv片段),且可视需要经修饰以影响功能性。

[0080] 根据本揭示之实施例的抗体或其抗原结合片段对人类PD-L1具有特异性。PD-L1,亦称为CD274或B7同源物1,为40kDa 1型跨膜蛋白,其经推测在特定事件期间在抑制免疫系统中起主要作用,特定事件诸如怀孕、组织同种异体移植、自体免疫性疾病及其他疾病病况,诸如肝炎。通常,免疫系统与外源性或内源性危险讯号相关之外来抗原反应,其触发抗

原特异性CD8+T细胞及/或CD4+辅助细胞之增殖。PD-L1与PD-1或B7.1之结合传输抑制性讯号,其降低此等T细胞之增殖且亦可诱导细胞凋亡,该细胞凋亡进一步由基因Bcl-2之较低调节介导。

[0081] 抗原结合片段之非限制性实例包括:(i)Fab片段;(ii)$F(ab')_2$片段;(iii)Fd片段;(iv)Fv片段;(v)单链Fv(scFv)分子;(vi)dAb片段;及(vii)由氨基酸残基组成的模拟抗体高变区之最小识别单元(例如,经分离之互补决定区(CDR),诸如CDR3肽),或受限之FR3-CDR3-FR4肽。其他经工程化之分子,诸如域特异性抗体、单域抗体、域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、微型抗体、奈米抗体(例如单价奈米抗体、二价奈米抗体等)、小模块免疫药物(SMIP)及鲨鱼可变IgNAR域亦涵盖在如本文所用之表述“抗原结合片段”内。

[0082] 抗体之抗原结合片段典型地包含至少一个可变域。可变域可为任何尺寸或氨基酸组合物且一般将包括与一或多个构架序列相邻或同框之至少一个CDR。在具有与VL域相关联的VH域的抗原结合片段中,VH和VL域可以任何适合的配置相对于彼此定位。举例来说,可变区可以是二聚体并且含有VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚体。或者,抗体的抗原结合片段可以含有单体VH或VL域。

[0083] 与完整抗体分子一样,抗原结合片段可为单特异性或多特异性的(例如双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段将通常包含至少两个不同的可变域,其中各可变域能够特异性结合于独立抗原或相同抗原上的不同抗原决定基。任何多特异性抗体型式,包括本文所揭示之例示性双特异性抗体型式可使用此项技术中可用之常规技术而适用于本揭示抗体之抗原结合片段的情况下。

[0084] 在本揭示之一个实施例中,抗体或其抗原结合片段与治疗剂结合。本揭示抗体可用作抗体-药物结合物(ADC),其可特异性靶向PD-L1。ADC上之结合物可调节表现PD-L1之免疫细胞或与表现PD-L1之细胞(例如,表现PD-1之细胞)相互作用的细胞。此等ADC可使用本揭示之任何抗体或其抗原结合片段。与抗体(或结合片段)结合之药物(有效负载)可为ADC中常用之任何药物。用于结合之方法可为此项技术中已知之彼等方法。

[0085] 如应用于多肽,术语“同源性”意谓两个肽序列在最佳比对时,诸如使用预设空位权重藉由程序GAP或BESTFIT比对时,具有至少95%序列一致性,甚至更优选至少98%或99%序列一致性。根据本揭示之实施例,GCG软件中之GAP及Best fit程序与默认参数一起使用以测定密切相关之多肽之间的序列同源性或序列一致性。

[0086] 在本揭示之实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含重链可变区及轻链可变区,其中该重链可变区包含3个CDR区,CDRH1(或HCDR1)、CDRH2(或HCDR2)及CDRH3(或HCDR3)区,且该轻链可变区包含3个CDR区,CDRL1(或LCDR1)、CDRL2(或LCDR2)及CDRL3(或CDRL3)区。

[0087] 参考图1A至2B,在本揭示之一些实施例中,CDRH1区包含SEQ ID NO:2之氨基酸序列,CDRH2区包含SEQ ID NO:3之氨基酸序列,CDRH3区包含SEQ ID NO:4之氨基酸序列,CDRL1区包含SEQ ID NO:10之氨基酸序列,CDRL2区包含SEQ ID NO:11之氨基酸序列,且CDRL3区包含SEQ ID NO:12之氨基酸序列。

[0088] 在本揭示之一些实施例中,CDRH1区包含SEQ ID NO:6之氨基酸序列,CDRH2区包含SEQ ID NO:7之氨基酸序列,CDRH3区包含SEQ ID NO:8之氨基酸序列,CDRL1区包含SEQ ID

NO:14之氨基酸序列,CDRL2区包含SEQ ID NO:15之氨基酸序列,且CDRL3区包含SEQ ID NO:16之氨基酸序列。

[0089] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:1之氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:9之氨基酸序列的轻链可变区。在本揭示之一些实施例中,重链可变区由SEQ ID NO:17之核酸序列编码,且轻链可变区由SEQ ID NO:19之核酸序列编码。

[0090] 在本揭示之一些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:5之氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:13之氨基酸序列的轻链可变区。在本揭示之一些实施例中,重链可变区由SEQ ID NO:18之核酸序列编码,且轻链可变区由SEQ ID NO:20之核酸序列编码。

[0091] 与产生抗体之对应生殖系序列相比,本文所揭示之抗PD-L1抗体可在重链及轻链可变域之构架及/或CDR区中包含一或多个氨基酸取代、插入及/或缺失。此等突变可容易地藉由比较本文所揭示之氨基酸序列与购自例如公共抗体序列数据库之生殖系序列来确定。本揭示包括一种抗体及其抗原结合片段,其衍生自本文所揭示之氨基酸序列中之任一者,其中一或多个构架区及/或CDR区内之一或多个氨基酸突变为产生该抗体之生殖系序列的相应残基,或另一哺乳动物生殖系序列的相应残基,或相应生殖系残基之保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“生殖系突变”)。以本文所公开的重链和轻链可变区序列为起始物质,所属领域中的普通技术人员可以容易地产生许多包含一或多个个别生殖系突变或其组合的抗体和抗原结合片段。在某些实施例中,VH及/或VL域内的所有构架及/或CDR残基全部突变回在衍生抗体的初始生殖系序列中发现的残基。在其他实施例中,仅某些残基突变回原始生殖系序列,例如仅FR1之前8个氨基酸内或FR4之最后8个氨基酸内发现之突变残基,或仅CDR1、CDR2或CDR3内发现之突变残基。在其他实施例中,构架区及/或CDR残基中之一或多者突变成不同生殖系序列(亦即,不同于最初衍生出抗体之生殖系序列的生殖系序列)之对应残基。此外,本揭示之抗体可含有构架区及/或CDR区内两个或更多个生殖系突变之任何组合,例如其中某些个别残基突变为特定生殖系序列之相应残基,而与原始生殖系序列不同之某些其他残基维持不变或突变为不同生殖系序列之相应残基。一旦获得,即可容易地测试含有一或多个生殖系突变之抗体及抗原结合片段的一或多种所需特性,诸如改良之结合特异性、增加之结合亲和力、改良或增强之拮抗或促效生物特性(视具体情况而定)、降低之免疫原性等。本揭示内涵盖以此一般方式获得的抗体及抗原结合片段。

[0092] 在本揭示之一些实施例中,根据本揭示之抗体为人源化抗体。为改良根据本揭示之人源化抗体之结合亲和力,人类构架区中之一些氨基酸残基经CDR之物种(例如啮齿动物)中的相应氨基酸残基置换。

[0093] 在本揭示之一些实施例中,人源化抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:25、27或28之氨基酸序列的重链可变区及含有SEQ ID NO:26、29或30之氨基酸序列的轻链可变区。

[0094] 在本揭示之一些实施例中,人源化抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:31或35之氨基酸序列的重链可变区及含有SEQ ID NO:32、33或34之氨基酸序列的轻链可变区。

[0095] 本揭示之抗体可为单特异性、双特异性或多特异性。多特异性抗体可对一种靶多

肽之不同抗原决定基具有特异性或可含有对多于一种靶多肽具有特异性之抗原结合域。本揭示之抗PD-L1抗体可连接至另一功能性分子(例如,另一肽或蛋白质)或与另一功能性分子共表现。举例而言,抗体或其片段可与一或多个其他分子实体,诸如另一抗体或抗体片段进行功能连接(例如藉由化学偶合、基因融合、非共价缔合或其他方式),以产生具有第二结合特异性之双特异性或多特异性抗体。举例而言,本揭示包括双特异性抗体,其中免疫球蛋白之一个臂对PD-L1或其片段具有特异性,且免疫球蛋白之另一个臂对第二目标具有特异性或与治疗剂结合。

[0096] 在本揭示之一些实施例中,抗体或其抗原结合片段呈嵌合抗原受体形式。

[0097] 术语“嵌合抗原受体”或替代地“CAR”指包含至少胞外抗原结合域、跨膜域及包含衍生自如下所定义之刺激分子之功能性传讯域之细胞质传讯域(在本文中亦称为“胞内传讯域”)的重组多肽构筑体。在一些实施例中,CAR多肽构筑体中的区域处于同一多肽链中,例如构成嵌合融合蛋白。在一些实施例中,CAR多肽构筑体中各域彼此不相邻,例如在不同多肽链中。

[0098] 编码所关注之抗体之重链及轻链的基因可选殖于细胞,例如编码单克隆抗体之基因可选殖于融合瘤且用于产生重组单克隆抗体。编码单克隆抗体之重链及轻链的基因库亦可由融合瘤或浆细胞制得。重链及轻链基因产物之随机组合产生具有不同抗原特异性之大抗体池(参见例如Kuby,Immunology(第3版1997))。

[0099] 用于制造抗体或抗原结合片段之方法的实例包含:(a)将编码该抗体或抗原结合片段之一或多种聚核苷酸引入至宿主细胞中;(b)在有利于表现该一或多种聚核苷酸之条件下培养该宿主细胞;及(c)视情况自该宿主细胞及/或生长该宿主细胞之培养基中分离该抗体或抗原结合片段。

[0100] 载体可用于将编码本揭示之抗体或抗原结合片段的聚核苷酸引入宿主细胞。在一个实施例中,一种类型之载体为“质体”,其指可与额外DNA片段连接之环形双股DNA环。载体之另一类型为病毒载体,其中额外DNA区段可接合至病毒基因体。某些载体能够在其被引入之宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点之细菌载体及附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加型哺乳动物载体)在引入至宿主细胞中时可整合至宿主细胞之基因体中,且藉此与宿主基因体一起复制。此外,某些载体能够引起其以可操作方式连接的基因之表现。此类载体在本文中被称作“重组表现载体”(或简言之,“表现载体”)。一般而言,用于重组DNA技术中之表现载体常常呈质体形式。由于质体为载体之最常用形式,因而在本说明书中,“质体”及“载体”可互换使用。然而,本揭示意欲包括发挥相等功能之该等其他形式之表现载体,诸如病毒载体(例如复制缺陷反转录病毒、腺病毒以及腺相关病毒)。

[0101] 在另一态样中,本揭示提供表现抗体或其抗原结合片段或含有载体之经基因工程化之细胞。该经基因工程化之细胞可为免疫细胞或干细胞。

[0102] 本揭示提供医药组合物,其包含本揭示之抗体或其抗原结合片段、经基因工程化之细胞或免疫细胞。本揭示之医药组合物用适合之稀释剂、载剂、赋形剂及提供改良之转移、递送、耐受性及其类似性质之其他药剂调配。组合物可调配用于特定用途,诸如用于兽医学用途或人类医药用途。所用组合物及赋形剂、稀释剂及/或载剂之形式将视抗体之预期用途及用于治疗性用途之投与模式而定。许多适合的调配物可以发现于所有医药化学家已知的处方集:Remington’s Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,

Easton,Pa中。此等调配物包括例如散剂、糊剂、软膏、胶冻、蜡、油、脂质、含有脂质(阳离子或阴离子)之囊泡(诸如LIPOFECTIN.TM.,Life Technologies,Carlsbad,Calif.)、DNA结合物、无水吸收糊剂、水包油及油包水乳液、乳液碳蜡(各种分子量之聚乙二醇)、半固体凝胶及含有碳蜡之半固体混合物。亦参见Powell等人"Compendium of excipients for parenteralformulations"PDA(1998)J Pharm SciTechnol 52:238-311。

[0103] 向患者投与之抗体的剂量可视患者之年龄及体型、目标疾病、病状、投药途径及其类似者而变化。较优选剂量典型地根据体重或体表面积计算。当本揭示之抗体用于治疗成年患者之与PD-L1相关之病况或疾病时,静脉内投与本揭示之抗体可为有利的。视病状之严重程度而定,可调整治疗之频率及持续时间。用于投与抗体之有效剂量及时程可以凭经验确定;举例而言,可藉由周期性评估来监测患者进展,且相应地调整剂量。此外,可使用本领域中之熟知方法(例如Mordenti等人,1991,Pharmaceut.Res.8:1351)进行剂量之种间比例调整。

[0104] 各种递送系统为吾人所知且可用于投与本揭示之医药组合物,例如囊封于脂质体中、微粒、微胶囊、能够表现突变病毒之重组细胞、受体介导之内饮作用(见例如Wu等人,1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432)。引入方法包括(但不限于)皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外及经口途径。组合物可藉由任何便利的途径投与,例如藉由输注或推注注射、藉由经由上皮或黏膜皮肤内层(例如口腔黏膜、直肠黏膜及肠黏膜等)吸收,且可与其他生物活性剂一起投与。投药可为全身性或局部的。

[0105] 可使用标准针及注射器经皮下或静脉内递送本揭示之医药组合物。另外,关于皮下递送,笔式递送装置易于在递送本揭示之医药组合物时应用。此类笔式递送装置可为可再用的或抛弃式的。可再用的笔式递送装置通常利用含有医药组合物之可替换套筒。在已投与套筒内之所有医药组合物且套筒为空的后,可容易地丢弃空套筒且用含有医药组合物之新套筒替换。随后可再使用笔式递送装置。在抛弃式笔式递送装置中,不存在可替换套筒。实际上,抛弃式笔式递送装置用容纳在该装置内之储集器中的医药组合物预填充。一旦清空储集器之医药组合物,即弃去整个装置。

[0106] 在某些情况中,该医药组合物可在控制释放系统中递送。在一个实施例中,可使用泵(参见Langer,见上文;Sefton 1987CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201)。在另一实施例中,可使用聚合材料;参见《受控释放之医药应用(Medical Applications of Controlled Release)》,Langer及Wise(编),1974,CRC Pres.,Boca Raton,Fla。在又另一实施例中,可将控制释放系统置于组合物之目标附近,因此仅需要全身性剂量之一部分(参见例如Goodson,1984,Medical Applications of Controlled Release中,见上文,第2卷,第115-138页)。其他受控释放系统论述于Langer,1990,Science 249:1527-1533之综述中。

[0107] 可注射制剂可包括用于静脉内、皮下、皮内及肌肉内注射、点滴等之剂型。此等可注射制剂可藉由公开已知之方法制备。举例而言,可注射制剂可例如藉由在习知用于注射之无菌水性介质或油性介质中溶解、悬浮或乳化上文所描述之抗体或其盐来制备。作为注射用水性介质,存在例如生理盐水、含有葡萄糖及其他助剂之等渗溶液等,其可与适当增溶剂,诸如醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子界面活性剂[例如聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油之聚氧乙烯(50mol)加合物)]等组合使用。采用例如芝麻油、大豆油等作为油性介质,其可与增溶剂(诸如苯甲酸苯甲酯、苯甲醇等)组合使用。较优选将由此

制备之注射液填充于适当安瓿中。

[0108] 上文所描述之用于经口或非经肠使用之医药组合物宜制备成呈适于配合活性成分之剂量之单位剂量的剂型。此类呈单位剂量之剂型包括例如锭剂、丸剂、胶囊、注射剂(安瓿)、栓剂等。

[0109] 在本揭示之一些实施例中,医药组合物用于抑制PD-L1介导之讯号。

[0110] 在本揭示之一些实施例中,医药组合物用于治疗由PD-L1介导之疾病。

[0111] 本揭示提供一种侦测PD-L1表现之方法,其包含使样品与本文所描述之抗PD-L1抗体或其抗原结合片段接触。

[0112] 本揭示之抗PD-L1抗体亦可用于侦测及/或量测样品中之表现PD-L1或PD-L1的细胞,例如出于诊断目的。举例而言,抗PD-L1抗体或其片段可用于诊断以PD-L1之异常表现(例如,过度表现、不足表现、缺乏表现等)为特征之病况或疾病。PD-L1之例示性诊断分析可包含例如使获自患者之样品与本揭示之抗PD-L1抗体接触,其中抗PD-L1抗体经可侦测标记或报导分子标记。替代地,未标记的抗PD-L1抗体可与自身以可侦测的方式标记的二级抗体组合用于诊断应用中。可侦测标记或报导分子可为放射性同位素,诸如^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{35}S或^{125}I;荧光或化学发光部分,诸如异硫氰酸荧光素或若丹明(rhodamine);或酶,诸如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化酶或荧光素酶。可用于侦测或量测样品中之PD-L1的具体例示性分析包括酶联结免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)及荧光活化细胞分选(FACS)。

[0113] 提供以下实例以帮助熟习此项技术者实施本揭示。

[0114] 实例

[0115] 本揭示之抗体经确认经由ELISA与PD-L1具有特异性结合。简言之,PD-L1涂布于96孔ELISA盘(0.1μg/孔)上。在结合抗PD-L1抗体之后,使用与辣根过氧化酶(HRP)结合之山羊抗小鼠IgG作为第二抗体,且使用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)作为受质以评估抗体-PD-L1结合。读取OD405以计算活性。如表1及图3中所示,若干小鼠融合瘤抗人类PD-L1抗体(mAbs 1G8及3C3)。所有均显示与PD-L1之特异性及紧密结合。

[0116] 表1.若干小鼠融合瘤抗人类PD-L1抗体之ELISA KD

[0117]

纯系	浓度 (mg/ml)	体积	内毒素 (EU/mg)	ELISA K_D	Luc报导子 EC_{50} (M)
1G8	4.66	5.0	<5	4.35×10^{-11}	6.2×10^{-10}
3C3	5.42	8.5	<5	3.56×10^{-11}	5.8×10^{-10}

[0118] 为了进一步验证本揭示之抗体在癌症治疗中之效用,评估此等抗体结合癌细胞上所表现之PD-L1的能力。举例而言,抗PD-L1抗体与表现PD-L1之细胞的结合藉由流式细胞分析术使用HCC827细胞(肺腺癌)分析,该等细胞表现高含量PD-L1。简言之,将HCC827细胞(PD-L1较高)与抗PD-L1抗体一起培育1小时,随后使用流式细胞分析术进行分析。如图4中所示,本揭示之mAb 1G8及3C3皆可结合HCC827细胞,指示此等抗体可识别癌细胞表面上之PD-L1。本揭示之其他抗体亦展现出类似活性。因此,本揭示之抗体可用于藉由结合至癌细胞上表现之PD-L1治疗癌症,且从而抑制PD-L1介导之免疫抑制或耗竭。

[0119] 尽管以上实验测试本揭示之抗体与活体外PD-L1分子之结合,但亦用分别表现于相互作用细胞上之PD-1及PD-L1测试此类结合。举例而言,PD-1/PD-L1阻断分析可使用任何

商业套组,诸如来自Promega(Maddison,WI,USA)之套组。Promega PD-1/PD-L1阻断生物分析为基于生物发光细胞之分析。该分析套组由两个基因工程化之细胞株组成:PD-1效应细胞,其为由NFAT反应组件(NFAT-RE)驱动表现人类PD-1及荧光素酶报导子之Jurkat T细胞,及PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞,其为经设计以抗原非依赖性方式活化TCR之表现人类PD-L1及经工程化之细胞表面蛋白质的CHO-K1细胞。

[0120] 当两种细胞类型共同培养时,PD-1/PD-L1之相互作用会抑制TCR传讯及NFAT-RE介导之发光。添加阻断PD-1/PD-L1相互作用之本揭示之抗PD-L1抗体可释放抑制讯号,引起TCR活化及NFAT-RE介导之发光。生物发光讯号可使用Bio-Glo™ 荧光素酶分析系统及标准亮度计,诸如来自PROMEGA® (Maddison,WI,USA)之GloMax®发现系统进行侦测及定量。

[0121] 如表2及图5中所示,本揭示之mAb 1G8及3C3皆展示阻断PD-1/PD-L1相互作用之特定及有效的活性。本揭示之其他抗体亦展现出类似活性。此等结果确认,本揭示之抗体将有效缓解由相互作用细胞上之PD-1及PD-L1相互作用介导之免疫抑制。因此,本揭示之抗体应适用作因PD-1及/或PD-L1传讯所致之免疫抑制或耗竭引起之疾病的治疗剂。该等疾病包括各种癌症。

[0122] 表2.PD1/PD-L1阻断报导分析

[0123]

	3C3	1G8
EC_{50}	5.821E-10	6.198E-10

[0124] 本揭示之一些实施例关于用于治疗或缓解由PD-1及/或PD-L1传讯介导之疾病之病况/症状的方法;此类疾病可包括癌症。为展示本揭示之抗体在治疗癌症方面之效用,使用鼠类同基因型模型。简言之,B-hPD-1/hPD-L1小鼠在右侧前腹中皮下注射悬浮于0.1mL PBS中之MC38-hPD-L1肿瘤细胞(5×10^5)以用于肿瘤发展。当平均肿瘤尺寸达到75±25mm^3时,携带肿瘤之动物随机入选七个研究组。G1组由6只小鼠组成。G2至G7组由8只小鼠组成。三个组为Mu IgG(5mg/kg)、3C3(5mg/kg)、1G8(5mg/kg)。所有测试物品以每周两次之频率腹膜内投与携带肿瘤之小鼠持续总共六次。量测肿瘤体积及体重且每周记录两次。研究在最后一次给药后七天终止。在此实验结束时,自安乐死之动物移除肿瘤,称重且拍照。

[0125] 如表3及图6中所示,在研究期间未发现计划外的动物死亡或明显的临床征象。所有组之体重在此研究期间逐渐增加,表明动物对测试物品之良好耐受性。在开始处理后第28天,Mu IgG(5mg/kg)组之平均肿瘤体积为2486±447mm^3。3C3(5mg/kg)处理组,平均肿瘤体积为415±155mm^3,其中TGITV为85.3%。1G8(5mg/kg)处理组,平均肿瘤体积为647±216mm^3,其中TGITV为75.8%。

[0126] 表3.αPD-L1 Ab在人源化B-hPD-1/hPD-L1小鼠之皮下MC38-hPD-L1结肠癌模型处理中的有效性评估

[0127]

	Mu IgG	3C3	1G8
$TGI_{28天}$(%)		85.3	75.8

[0128] 在此实验中,3C3及1G8在所测试之剂量下展现出显著抗肿瘤活性,且呈现不会对动物体重产生负面影响或诱发任何明显的临床征象。此等结果清楚地证明,本揭示之抗体将适用于治疗癌症之临床用途,诸如肺癌、乳癌、前列腺癌、结肠直肠癌等。

[0129] 小鼠单克隆抗体可在患者中诱导强免疫原性及抗药物抗体。因此,小鼠单克隆抗体之人源化为进一步药物开发之必需及关键步骤。藉由使用3C3及1G8小鼠单克隆抗体作为亲本抗体,基于Kabat定义之mAb CDR序列描述于图1及图2中(SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:20)。

[0130] 对于人源化mAb制备,自IMGT数据库(国际免疫遗传学信息系统®)鉴别与3C3及1G8 mAb构架区具有更高同源性程度之人类生殖系VL及VH序列。同源性搜寻可用序列BLAST或类似方法进行。将小鼠mAb可变区序列用作查询序列。此等研究分别将人类VH生殖系基因IGHV4-59*01(SEQ ID NO:21)及VL生殖系基因IGKV4-1*01(SEQ ID NO:22)、IGKV1-39*01(SEQ ID NO:23)及IGKV2-29*01(SEQ ID NO:24)鉴别为与小鼠mAb中之对应重链及轻链构架序列更同源的VH及VL序列。

[0131] 基于所选择人类重链及轻链可变区同源物,抗PD-L1抗体可藉由将已知CDR序列自已知抗PD-L1抗体(例如,mAb 3C3及1G8)接枝至同源人类重链及轻链可变序列中构筑。如图7及图8中所示,此等轻链及重链序列对用作构筑针对人类PD-L1之人源化抗体的实例。

[0132] CDR移植至构架上产生来自不同来源之可变域(VH及VL)。此类嵌合域可能不具有最佳序列。因此,抗体之亲和力可并非最佳。为提高结合亲和力,可将一些氨基酸回复突变成其他物种。此等关键氨基酸残基有时影响位于抗体上部核心区及界面区域之抗体结合(E.Stefan,H.Annemarie and P.Andreas Methods 34(2004)184-199)。在以下额外考虑因素中:(i)避免Fv b-筒状物之大多数结构上保守的股;(ii)藉由相对较高表面可接近性(例如,大于30%)对表面再塑位点(小鼠氨基酸)进行分级;及(iii)对通常报导之构架风险位点进行分类。根据上文所描述之原理,分别在构架区上设计人源化3C3 Hu-B1(VH)及3C3 Hu-B2(VH)六个及八个回复突变位点(图7及表4)。人源化1G8 Hu-B2(VH)经设计为构架区上之七个回复突变位点(图8及表5)。mAb 3C3之所得重链为HU 3C3 VH作为SEQ ID NO:25;HU 3C3 VHB2作为SEQ ID NO:27及HU 3C3 VHB1作为SEQ ID NO:28。mAb 3C3之所得轻链为HU0 3C3 VL作为SEQ ID NO:26;HU 3C3 VL作为SEQ ID NO:29及HU2 3C3 VL作为SEQ ID NO:30。mAb 1G8之所得重链为HU 1G8 VHB2作为SEQ ID NO:31且HU 1G8 VH作为SEQ ID NO:35。mAb 1G8之所得轻链为HU0 1G8 VL为SEQ ID NO:32;HU 1G8 VL为SEQ ID NO:33及HU2 1G8 VL为SEQ ID NO:34。

[0133] 表4:人源化3C3构架及回复突变位点之清单。

[0134]

3C3重链			
名称	构架	回复突变	回复
M	小鼠	所有小鼠	
Hu	lGH4-59*01F	16(E16Q)	1
Hu-B1		1,16,48,67,71,78	6
Hu-B2		1,16,39,47,48,67,71,78	8
3C3轻链			
Hu0	IGKV4-1*01	无回复突变	0
Hu	IGKV1-39*01	无回复突变	0
Hu2	IGKV2-29*01	无回复突变	0

[0135] 表4展示各种抗PD-L1(3C3)抗体之VH区段之构架区的一级序列比对:小鼠抗PD-L1

抗体(M)、人源化抗PD-L1抗体(Hu)、回复突变人源化抗PD-L1抗体(Hu-B1)、进一步改进之抗PD-L1抗体(Hu-B2)。各种抗PD-L1抗体之VL片段之构架区的一级序列比对:小鼠抗PD-L1抗体(M)、人源化抗PD-L1抗体(H)、无回复突变人源化抗PD-L1抗体(Hu0)、进一步改进之抗PD-L1抗体(Hu)及抗PD-L1抗体(Hu2)。

[0136] 表5:人源化1G8构架及回复突变位点之清单。

[0137]

1G8重链			
名称	构架	回复突变	回复
M	小鼠	所有小鼠	
Hu	IGH4-59*01F	16(E16Q)	1
Hu-B2		1,16,39,47,67,71,78	7
1G8轻链			
Hu0	lGKV4-1*01	无回复突变	0
Hu	IGKV1-39*01	无回复突变	0
Hu2	IGKV2-29*01	无回复突变	0

[0138] 表5展示各种抗PD-L1(1G8)抗体之VH区段之构架区的一级序列比对:小鼠抗PD-L1抗体(M)、人源化抗PD-L1抗体(Hu)、回复突变人源化抗PD-L1抗体、进一步改进之抗PD-L1抗体(Hu-B2)。各种抗PD-L1抗体之VL片段之构架区的一级序列比对:小鼠抗PD-L1抗体(M)、人源化抗PD-L1抗体(H)、无回复突变人源化抗PD-L1抗体(Hu0)、进一步改进之抗PD-L1抗体(Hu)及抗PD-L1抗体(Hu2)。

[0139] 为确认小鼠抗体人源化之后的亲和力变化,分别藉由核苷酸合成方法直接产生人源化轻链及人源化重链之可变区。将小鼠或人源化可变区构筑至人类嵌合体抗体表现载体pTCAED重链及pTCAED轻链质体中(图9),且引入宿主细胞中以制备表现重组抗体之细胞。使用FreeStyle™293或Expi 293细胞(由INVITROGEN™制造)作为宿主细胞以进行表现。根据说明书手册(由INVITROGEN™制造),藉由聚乙烯亚胺(PEI)将载体引入至宿主细胞中,其中将约1.25微克比率之抗体表现载体引入至1x10^6个细胞中。

[0140] 藉由以下描述之方法制备含有人类IgG抗体之培养物上清液。使产生抗体之细胞适应Free Style™ 293表现培养基(GIBCO™)。在组织培养烧瓶中培养细胞,并且当活细胞比率达到90%时,收集培养物上清液。将收集之上清液经由10μm及0.2μm过滤器(由Millipore制造)过滤以移除污染物。含有抗体之培养物上清液使用蛋白质A(由MILLIPORE™制造)、PBS作为吸收缓冲液及200mM甘氨酸缓冲液(pH 2.5)作为溶离缓冲液进行亲和力纯化。藉由添加50mM Tris缓冲液(pH 9.0)将溶离份调节至约pH 6.0-7.0。使用透析膜(10,000MW截止值,由SPECTRUM™ Laboratories制造)用PBS替换所制备之抗体溶液,且经由孔径为0.22微米之膜过滤器(由MILLIPORE™制造)过滤灭菌,以产生经纯化抗体。藉由量测在280nm下之吸亮度并基于1.45最佳密度等于1mg/ml转化量测值,确定纯化抗体之浓度。

[0141] 人源化抗体之结合活性可藉由使用小规模抗体表现之重链及轻链的所有组合有效比较。培养物上清液中之抗体的浓度藉由抗人类IgG ELISA确定。对于PD-L1ELISA,盘用PD-L1-hFc 1μg/ml涂布且用5%milk-PBS阻断。将分析抗体调节至300ng/ml,100μl/孔。抗PD-L1讯号藉由二级山羊抗人类κHRP IgG 1:4000量测,且颜色经TMB受质(KPL)产生。藉由拜耳雷德ELISA读取器在OD450-655nm下量测光吸收值。

[0142] 3C3人源化抗体HuHu0、HuHu及HuHu2对于PDL1之结合讯号低得多(为了比较,mAb 3C3、HuB2Hu0、HuB2Hu及HuB2Hu2在结合ELISA中)(表6)。然而,3C3-HuB2Hu0、3C3-HuB2Hu及3C3-HuB2Hu2展现出与亲本小鼠纯系之更类似的结合讯号。与3C3 Hu(VH)之序列相比,3C3 HuB2(VH)中之彼等在重链构架区中含有八种有益突变(图7)。发现此等氨基酸已自3C3 Hu(VH)中之残基突变回至小鼠mAb中之对应残基(亦即,回复突变)。此等氨基酸全部在重链可变序列中,如图7中所示。回复突变产生较优选结合子之事实表明,构架区中之此等残基间接有助于结合于PDL1。其可能有助于维持CDR区中之适当构形。

[0143] 表6:人源化3C3表现量及PD-L1结合测试形式D6培养之自由式293细胞培养物.表现μg/ml

[0144]

		轻链			
重链		M	Hu0	Hu	Hu2
	M	2.80	4.99	1.65	3.66
	Hu	2.46	8.61	1.02	2.31
	Hu-B1	6.16	15.31	9.21	16.68
	Hu-B2	4.90	12.36	4.52	6.73

[0145]

300 ng/ml PDL1结合					
OD450-650 nM		轻链			
重链		M	Hu0	Hu	Hu2
	M	1.524	1.577	1.851	1.548
	Hu	0.25	0.15	0.148	0.081
	Hu-B1	0.61	0.539	0.455	0.349
	Hu-B2	1.204	1.128	1.352	1.053

[0146] 表6描绘使用嵌合体PD-L1及人类PD-L1 mAb 3C3抗体以确定PD-L1 mAb之结合亲和力的结果。嵌合体抗体表现、纯化及Kd分析之详细程序如本揭示中所描述进行。

[0147] 用PDL1-hFc 1ug/ml涂布ELISA盘且用5%milk-PBS阻断,随后添加分析抗体形式45nM至2.7x 10^{-3}nM稀释液(4×倍稀释)。将藉由添加山羊抗人类KAPPA HRP IgG 1:4000及结合曲线量测分析,且KD藉由GraphPad Prism软件使用针对非线性拟合方法之一个位点特异性结合确定。

[0148] 3C3人源化抗体HuB2Hu0、HuB2Hu及HuB2Hu2之结合亲和力分别为1.08x10^{-10}M、9.36x 10^{-11}M及1.01x 10^{-10}M。此等三种人源化抗体皆展示比亲本小鼠纯系3C3之亲和力损失少2倍(图10)。1G8人源化抗体HuHu0、HuHu及HuHu2之结合亲和力比小鼠纯系1G8低得多,分别为3.99x 10^{-9}M、3.24x 10^{-9}M及9.68x 10^{-9}M。然而,1G8人源化抗体HuB2Hu0、HuB2Hu及HuB2Hu2之结合亲和力分别为2.38x10^{-10}M、2.48x 10^{-10}M及1.08x 10^{-10}M。此等人源化1G8变异体展示与亲本小鼠纯系1G8类似之亲和力(图11)。与1G8 Hu(VH)之序列相比,1G8 HuB2(VH)中之彼等在重链构架区中含有七种有益突变(图8)。回复突变产生较优选结合子之事实表明,构架区中之此等残基间接有助于结合于PDL1。

[0149] 如表7及图12中所示,3C3人源化抗体HuB2Hu0、HuB2Hu及HuB2Hu2之mAb皆展示阻断PD-1/PD-L1相互作用之特定及有效的活性。本揭示之其他抗体亦展现出类似活性。此等结果确认,本揭示之抗体将有效缓解由相互作用细胞上之PD-1及PD-L1相互作用介导之免疫

抑制。因此,本揭示之抗体应适用作因PD-1及/或PD-L1传讯所致之免疫抑制或耗竭引起之疾病的治疗剂。该等疾病包括各种癌症。

[0150] 表7.3C3人源化抗体阻断报导分析

[0151]

	αPD-L1 3C3_B2Hu0	αPD-L1 3C3_B2Hu	αPD-L1 3C3_B2Hu2
EC_{50}	4.77E-10	4.41E-10	4.09E-10

[0152] 如表8及图13中所示,在研究期间未发现计划外的动物死亡或明显的临床征象。所有组之体重在此研究期间逐渐增加,表明动物对测试物品之良好耐受性。在此实验结束时,IgG组之平均肿瘤体积为2537±300mm^3。分别在阿特珠单抗(Atz)、αPD-L1 3C3 B2Hu0、αPD-L1 3C3 B2Hu组,Atz组,平均肿瘤体积为1926±436mm3,其中TGITV为24.9%,在αPD-L1 3C3 B2Hu2组,平均肿瘤体积为999±202mm^3,其中TGITV为62.7%,2035±191mm^3,其中TGITV为20.5%,1900±344mm3,其中TGITV为26.0%。在此实验中,αPD-L1 3C3 B2Hu0在5mg/kg之含量下展现出显著抗肿瘤活性,且未对动物体重产生负面影响或诱发任何明显临床症状。

[0153] 表8.在皮下处理中αPD-L1 Ab之有效性评估

[0154]

	Hu IgG	Atz	αPD-L1 3C3_B2Hu0	αPD-L1 3C3_B2Hu	αPD-L1 3C3_B2Hu2
$TGI_{28天}$(%)		24.9	62.7	20.5	26.0

[0155] 虽然本揭示之实施例已用有限数目之实例加以说明,但熟习此项技术者应了解,其他修改及变化为可能的。因此,本揭示之保护范畴应仅受所附权利要求限制。

抗PD-L1 1G8（蛋白质：SEQ ID NO: 1；核苷酸：SEQ ID NO: 17）
重链序列

```
cag gtg cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctg gca aaa cct tct cag act ctg tcc ctc
 Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  A  K  P  S  Q  T  L  S  L
acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt gat tac tgg aac tgg atc cgg aaa ttc
 T  C  S  V  T  G  Y  S  I  T  S  D  Y  W  N  W  I  R  K  F
```

(SEQ ID NO: 2) HCDR1

```
cca ggg aat aaa ctt gaa ttc atg gga tat ata agc tac act ggt agc act tac tac aat
 P  G  N  K  L  E  F  M  G  Y  I  S  Y  T  G  S  T  Y  Y  N
```

(SEQ ID NO: 3) HCDR2

```
cca tct ctc aaa agt cga atc tcc atc act cga gac aca tcc aag aac cag tat tac ctg
 P  S  L  K  S  R  I  S  I  T  R  D  T  S  K  N  Q  Y  Y  L
cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat tac tgt gcc aga aga ggg gaa
 Q  L  N  S  V  T  T  E  D  T  A  T  Y  Y  C  A  R  R  G  E
tgg tta tcc ccg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca
 W  L  S  P  F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  A
```

(SEQ ID NO: 4) HCDR3

图1A

抗PD-L1 3C3（蛋白质：SEQ ID NO: 5；核苷酸：SEQ ID NO: 18）
重链序列

```
gag gtg cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctg aca aaa cct tct cag act ctg tcc ctc
 E  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  T  K  P  S  Q  T  L  S  L
acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt gat tac tgg gac tgg atc cgg aaa ttc
 T  C  S  V  T  G  Y  S  I  T  S  D  Y  W  D  W  I  R  K  F
```

(SEQ ID NO: 6) HCDR1

```
cca ggg aat aaa ctt gaa tac atg gga tat ata agc tac act ggt agc act tac tac aat
 P  G  N  K  L  E  Y  M  G  Y  I  S  Y  T  G  S  T  Y  Y  N
```

(SEQ ID NO: 7) HCDR2

```
cca tct ctc aga agt cga atc tcc atc act cga gac aca tcc aag aac cag tat tac ctg
 P  S  L  R  S  R  I  S  I  T  R  D  T  S  K  N  Q  Y  Y  L
cag ttg agt tct gtg act tct gag gac tca gcc aca tat tac tgt gcc aga aga ggg gga
 Q  L  S  S  V  T  S  E  D  S  A  T  Y  Y  C  A  R  R  G  G
tgg tta tcc ccg ttt gtt tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca
 W  L  S  P  F  V  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  A
```

(SEQ ID NO: 8) HCDR3

图1B

抗PD-L1 1G8（蛋白质：SEQ ID NO: 9；核苷酸：SEQ ID NO: 19）
轻链序列

```
gac att gtg atg tca cag tct cca tcc tcc cta ggt gtg tca gtt gga gag aag att act
 D   I   V   M   S   Q   S   P   S   S   L   G   V   S   V   G   E   K   I   T

atg agc tgc aag tcc agt cag agc ctt tta tat agt agc aat caa aag aac tcc ttg gcc
 M   S   C   K   S   S   Q   S   L   L   Y   S   S   N   Q   K   N   S   L   A

                    (SEQ ID NO:10) LCDR1

tgg tac cag cag aaa cca ggg cag tct cct aaa ctg ctg att tac tgg gcg tcc act agg
 W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   S   P   K   L   L   I   Y   W   A   S   T   R

                                                    (SEQ ID NO:11) LCDR2

gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc
 E   S   G   V   P   D   R   F   T   G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   T

atc agc agt gtg aag tct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat acc tat
 I   S   S   V   K   S   E   D   L   A   V   Y   Y   C   Q   Q   Y   Y   T   Y

                                                    (SEQ ID NO:12) LCDR3

cct ttc acg ttc ggt gct ggg acc aat ctg gag ctg aaa
 P   F   T   F   G   A   G   T   N   L   E   L   K
```

图2A

抗PD-L1 3C3（蛋白质：SEQ ID NO: 13；核苷酸：SEQ ID NO: 20）
轻链序列

```
gac act gtg atg tca cag tct cca tcc tcc cta ggt gtg tca gtt gga gag agg gtt act
 D   T   V   M   S   Q   S   P   S   S   L   G   V   S   V   G   E   R   V   T
ttg acc tgc aag tcc cgt cag agc ctt tta ttt agt agc aat caa aaa aac tcc ttg gcc
 L   T   C   K   S   R   Q   S   L   L   F   S   S   N   Q   K   N   S   L   A
```

(SEQ ID NO: 14) LCDR1

```
tgg tac cag cag aaa cca ggg cag tct cct aaa ctg ctg att tac tgg gcg tcc act agg
 W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   S   P   K   L   L   L   I   Y   W   A   S   T   R
```

(SEQ ID NO: 15) LCDR2

```
gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc
 E   S   G   V   P   D   R   F   T   G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   T
atc agc agt gtg aag tct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat acc tat
 I   S   S   V   K   S   E   D   L   A   V   Y   Y   C   Q   Q   Y   Y   T   Y
```

(SEQ ID NO: 16) LCDR3

```
cct ttc acg ttc ggt gct ggg acc agt ctg gag ctg aaa
 P   F   T   F   G   A   G   T   S   L   E   L   K
```

图2B

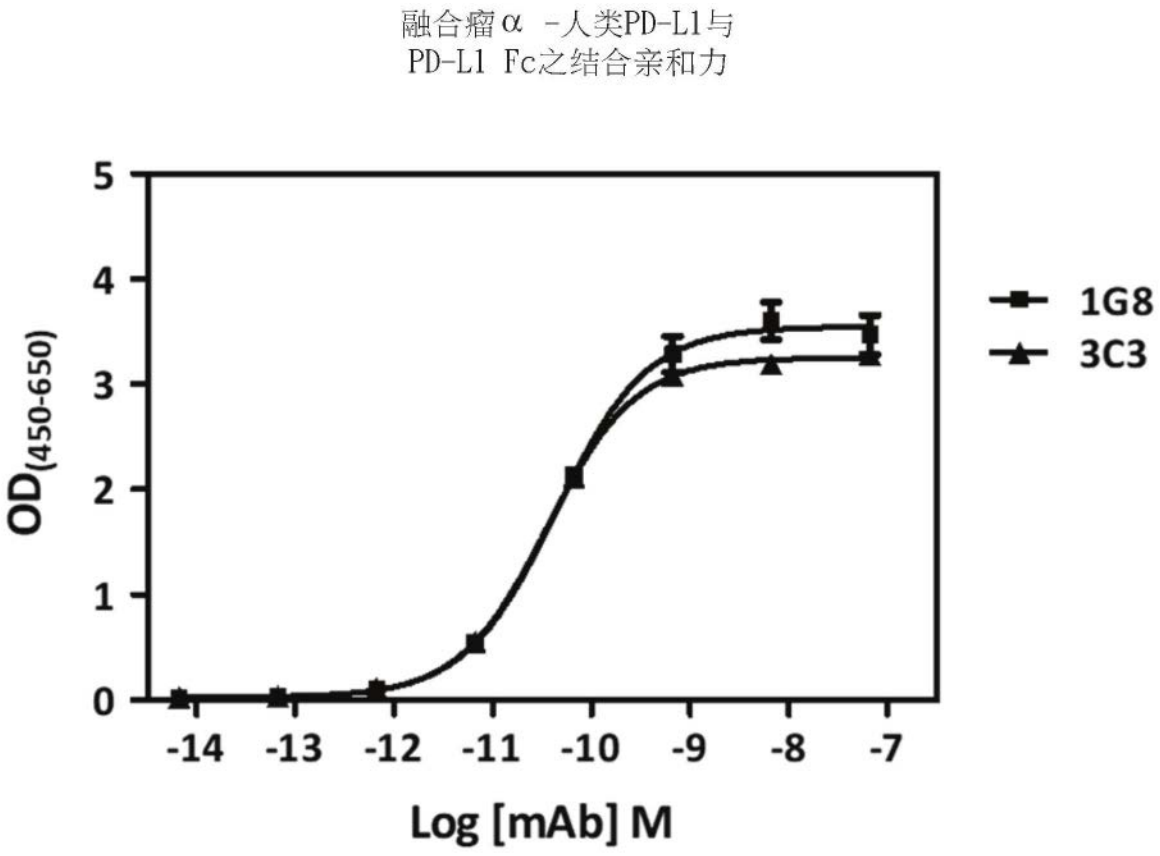

融合瘤α -人类PD-L1与
PD-L1 Fc之结合亲和力
5
4
3
2
1
0
OD(450-650)
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
Log [mAb] M
1G8
3C3

图3

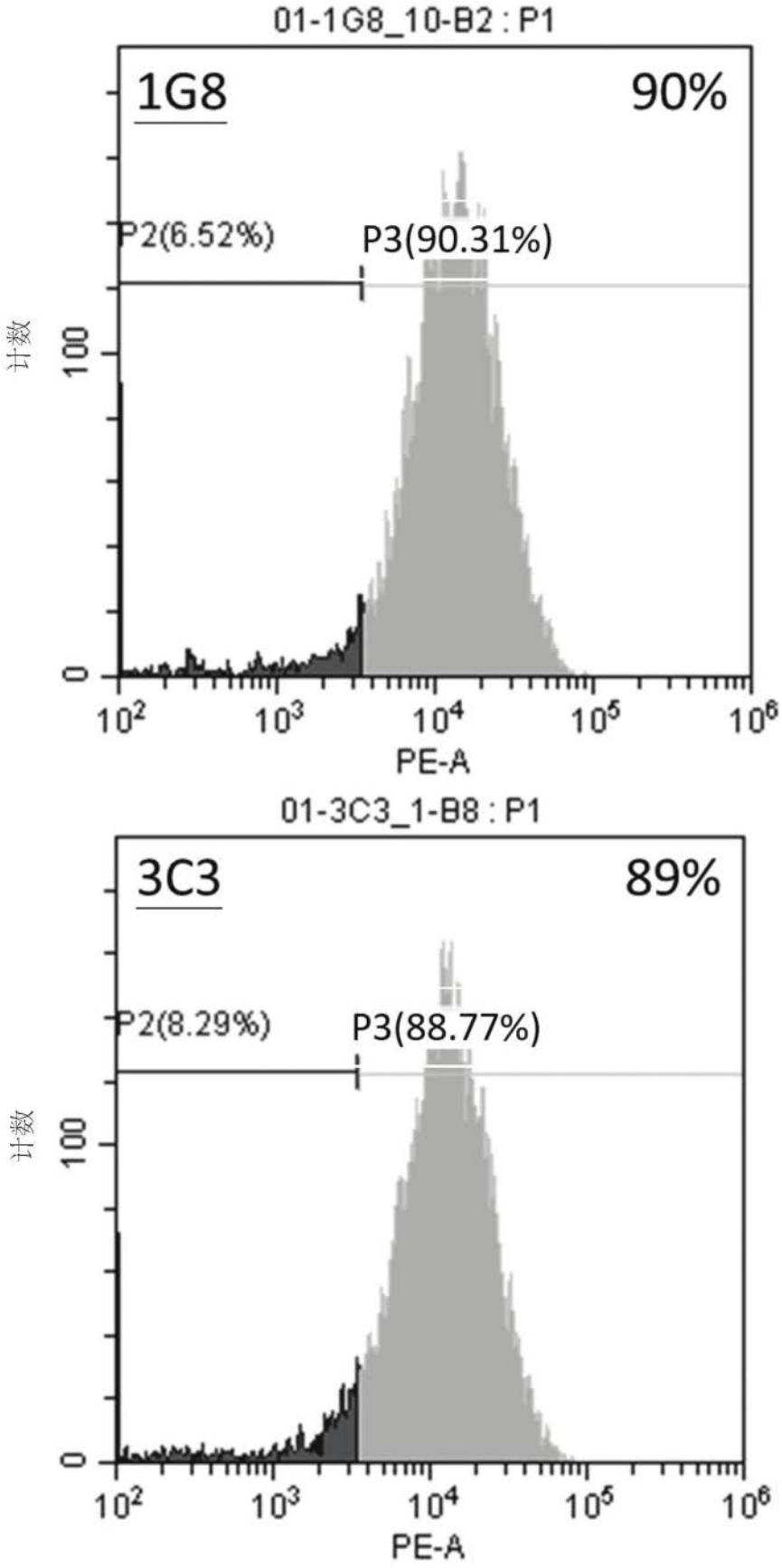

01-1G8_10-B2 : P1
1G8
90%
P2(6.52%)
P3(90.31%)
计数
100
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PE-A
01-3C3_1-B8 : P1
3C3
89%
P2(8.29%)
P3(88.77%)
计数
100
0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
PE-A

图4

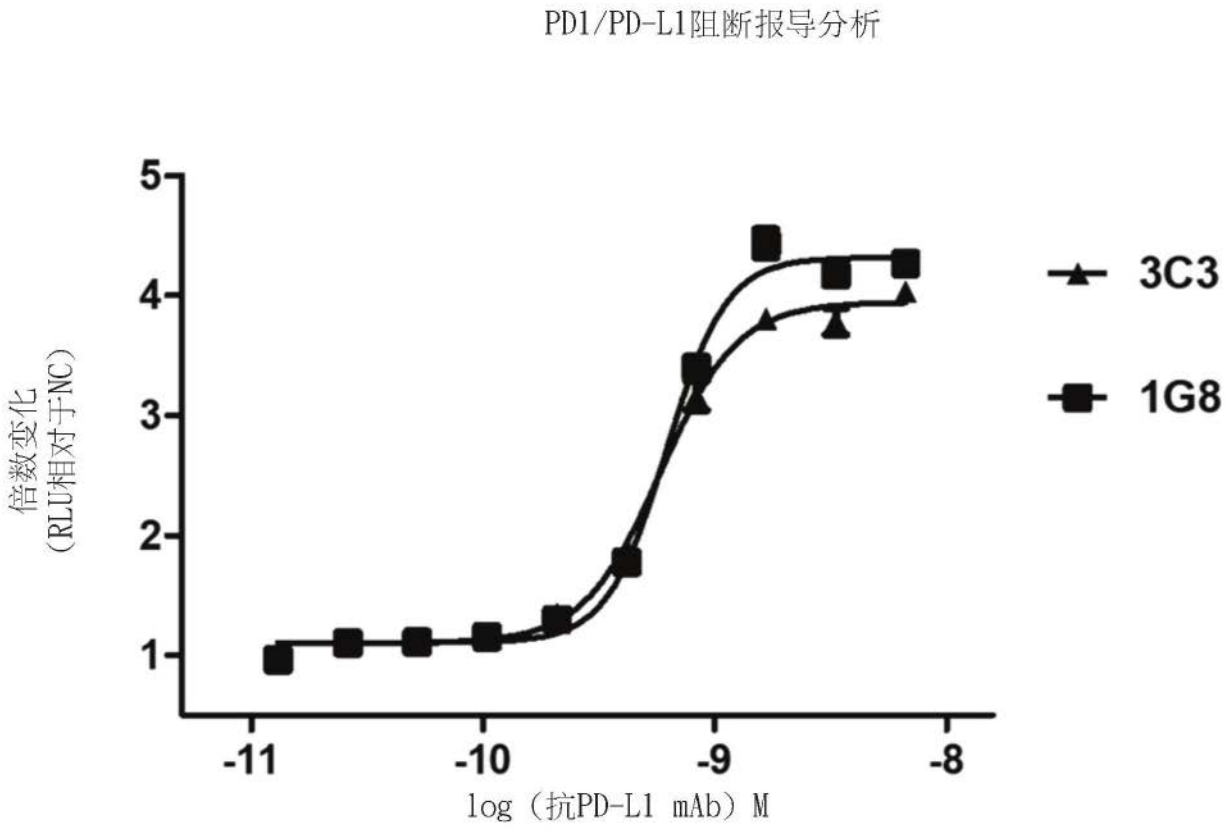

PD1/PD-L1阻断报导分析
倍数变化
(RLU相对于NC)
5
4
3
2
1
-11
-10
-9
-8
log（抗PD-L1 mAb）M
3C3
1G8

图5

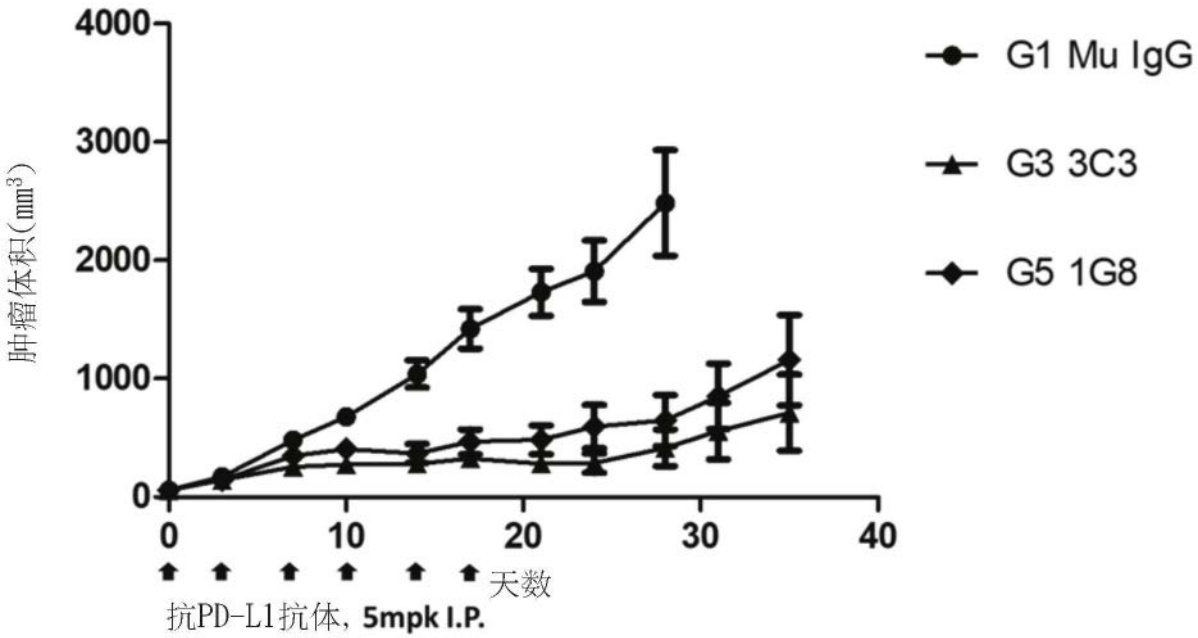

肿瘤体积(mm³)
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
天数
抗PD-L1抗体，5mpk I.P.
G1 Mu IgG
G3 3C3
G5 1G8

图6

抗PDL1（3C3）人源化设计

```
                    FR1                 CDR1          FR2          CDR2
Kabat编号     1          22                36          49
 小鼠  3C3 VH  EVQLQESGPGLTKPSQTLSLTCSVT  GYSITSDYWD  WIRKFPGNKLEYMG  YISYTGSTYYNPSLRS
(SEQ ID NO: 5)
IGHV4-59*01   QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS  GGSISSYYWS  WIRQPPGKGLEWIG  YIYYSGSTNYNPSLKS
(SEQ ID NO: 21)
HU 3C3 VH     QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS  GYSITSDYWD  WIRQPPGKGLEWIG  YISYTGSTYYNPSLRS
(SEQ ID NO: 25)
HU 3C3 VHB2   EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS  GYSITSDYWD  WIRKPPGKGLEYMG  YISYTGSTYYNPSLRS
(SEQ ID NO: 27)
HU 3C3 VHB1   EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS  GYSITSDYWD  WIRQPPGKGLEWMG  YISYTGSTYYNPSLRS
(SEQ ID NO: 28)
                    FR3                 CDR3          FR4
Kabat 编号    66         92                103
 小鼠  3C3 VH  RISITRDTSKNQYYLQLSSVTSEDSATYYCAR  RGGWLSPFVY  WGQGTLVTVSA
(SEQ ID NO: 5)
IGHV4-59*01   RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR              WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 21)
HU 3C3 VH     RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR  RGGWLSPFVY  WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 25)
HU 3C3 VHB2   RITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCAR  RGGWLSPFVY  WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 27)
HU 3C3 VHB1   RITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCAR  RGGWLSPFVY  WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 28)
```

图7

```
                          FR1                    CDR1              FR2          CDR2
Kabat 编号        1                      23            35              49        57
 小鼠  3C3 VL    DTVMSQSPSSLGVSVGERVTLTC KSRQSLLFSSNQKNSLA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRES
(SEQ ID NO: 13)
IGKV4-1*01      DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES
(SEQ ID NO: 22)
HU0 3C3 VL      DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSRQSLLFSSNQKNSLA WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES
(SEQ ID NO: 26)

                                FR3                    CDR3        FR4
Kabat 编号                                  88          98
 小鼠  3C3 VL    GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKSEDLAVYYC QQYYTYPFT FGAGTSLELK
(SEQ ID NO: 13)
IGKV4-1*01      GVPDRFSGSGSCTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYSTP   FGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 22)
HU0 3C3 VL      GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYTYPFT FGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 26)
```

图7(续)

抗PDL1（1G8)人源化设计

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
Kabat编号	1 22		36 49	
小鼠 **1G8 VH**	QVQLQESGPGLAKPSQTLSLTCSVT	GYSITSDYWN	WIRKFPGNKLEFMG	YISYTGSTYYNPSLKS
(SEQ ID NO: 1)				
IGHV4-59*01	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	GGSISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYYSGSTNYNPSLKS
(SEQ ID NO: 21)				
HU 1G8 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	GYSITSDYWN	WIRQPPGKGLEWIG	YISYTGSTYYNPSLKS
(SEQ ID NO: 35)				
HU 1G8 VHB2	EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	GYSITSDYWN	WIRKPPGKGLEYMG	YISYTGSTYYNPSLKS
(SEQ ID NO: 31)				

	FR3	CDR3	FR4
Kabat编号	66 92	103	
小鼠 **1G8 VH**	RISITRDTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCAR	RGEWLSPFAY	WGQGTLVTVSA
(SEQ ID NO: 1)			
IGHV4-59*01	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR		WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 21)			
HU 1G8 VH	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	RGEWLSPFAY	WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 35)			
HU 1G8 VHB2	RITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCAR	RGEWLSPFAY	WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 31)			

图8

```
                    FR1                 CDR1          FR2          CDR2
Kabat 编号          1                   23      35   49           57
  小鼠 1G8 VL       DIVMSQSPSSLGVSVGEKITMSC KSSQSLLYSSNQKNSLA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRES
 (SEQ ID NO: 9)
IGKV4-1*01          DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES
 (SEQ ID NO: 22)
IGKV1-39*01         DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDISNYLN       WYQQKPGKAPKLLIY DASNLET
 (SEQ ID NO: 23)
IGKV2-29*02         DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLLHSDGKTYLY  WYLQKPGQSPQLLIY EVSSRFS
 (SEQ ID NO: 24)
HU0 1G8 VL          DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLLYSSNQKNSLA WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES
 (SEQ ID NO: 32)
HU 1G8 VL           DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KSSQSLLYSSNQKNSLA WYQQKPGKAPKLLIY WASTRES
 (SEQ ID NO: 33)
HU2 1G8 VL          DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLLYSSNQKNSLA WYLQKPGQSPQLLIY
 (SEQ ID NO: 34)    WASTRES
                                FR3                 CDR3      FR4
Kabat编号
  小鼠 1G8 VL       GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKSEDLAVYYC QQYYTYPFT FGAGTNLELK
 (SEQ ID NO: 13)
IGKV4-1*01          GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYSTP  FGQGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 22)
IGKV1-39*01         GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYDNLP  FGQGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 23)
IGKV2-29*02         GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC QQYSGYPLT FGQGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 24)
HU0 1G8 VL          GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYTYPFT FGQGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 32)
HU 1G8 VL           GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYYTYPFT FGQGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 33)
HU2 1G8 VL          GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC QQYYTYPFT FGQGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 34)
```

图8(续)

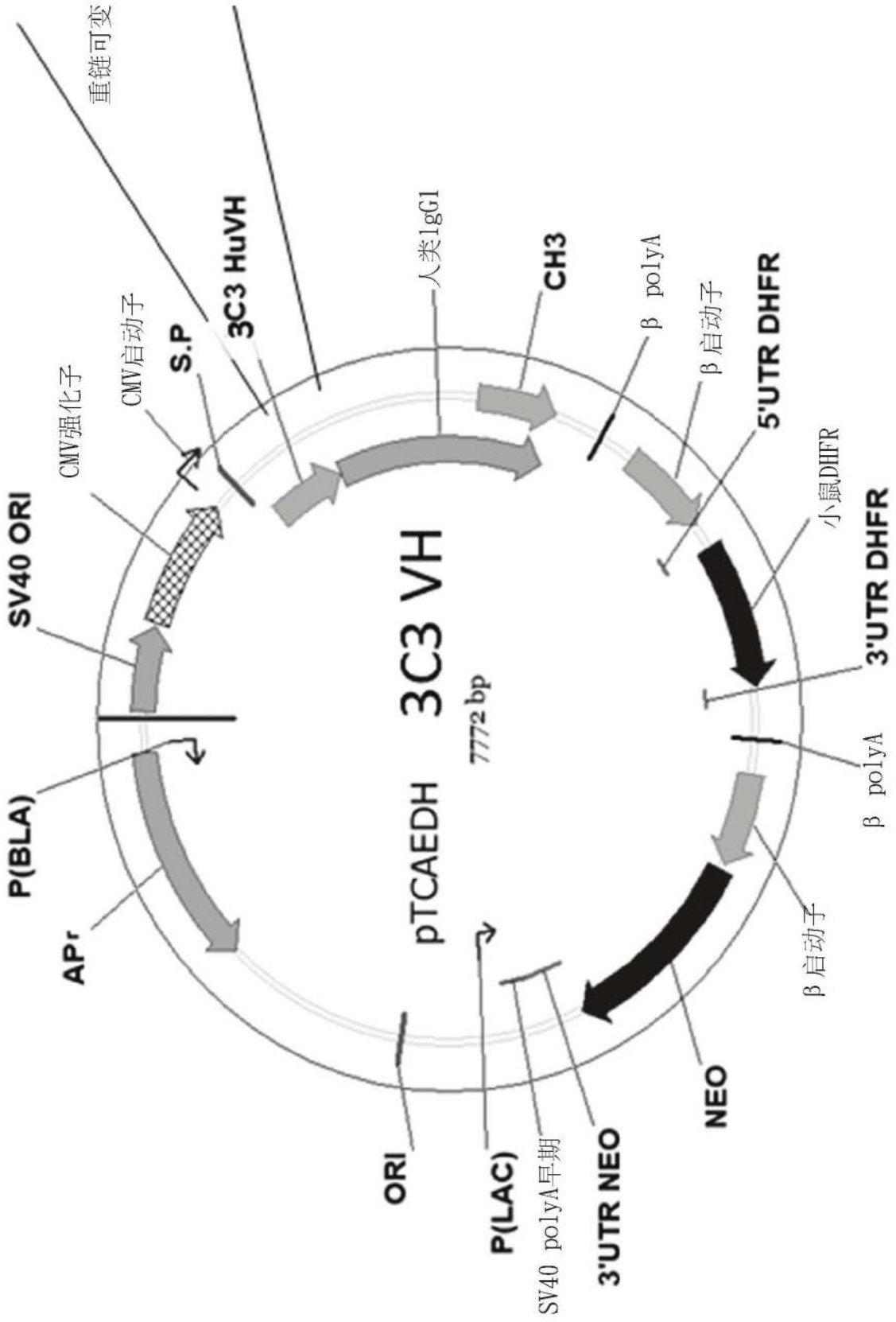

重链可变
3C3 HuVH
S.P
CMV启动子
CMV强化子
SV40 ORI
P(BLA)
APr
ORI
P(LAC)
SV40 polyA早期
3'UTR NEO
NEO
β 启动子
β polyA
3'UTR DHFR
小鼠DHFR
5'UTR DHFR
β 启动子
β polyA
CH3
人类1gG1
3C3 VH
7772 bp
pTCAEDH

图9

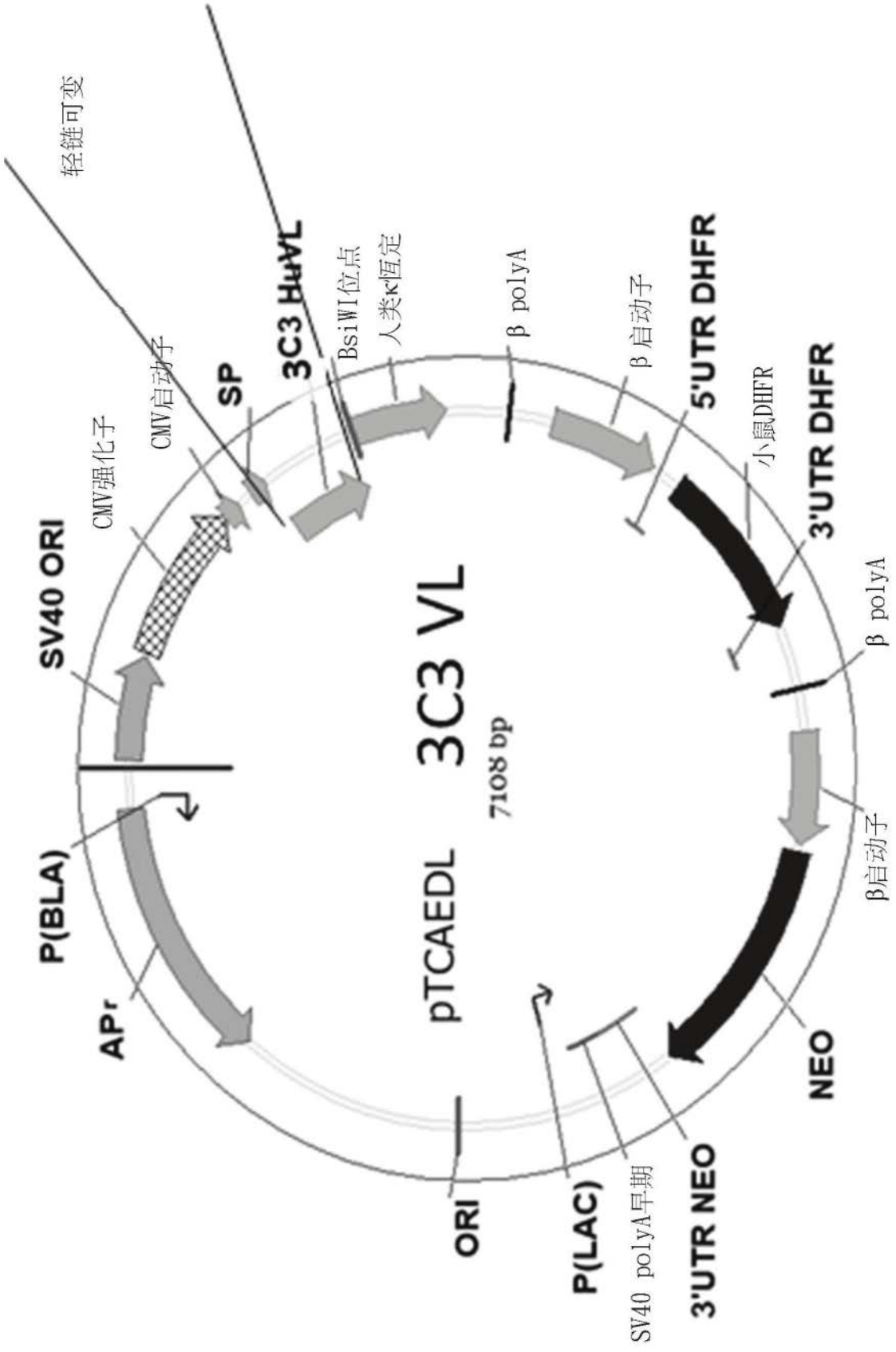

pTCAEDL
3C3 VL
7108 bp
轻链可变
CMV强化子
CMV启动子
SP
3C3 HuVL
BsiWI位点
人类κ恒定
β polyA
β 启动子
5'UTR DHFR
小鼠DHFR
3'UTR DHFR
β polyA
βl启动子
NEO
3'UTR NEO
SV40 polyA早期
P(LAC)
ORI
APr
P(BLA)
SV40 ORI

图9(续)

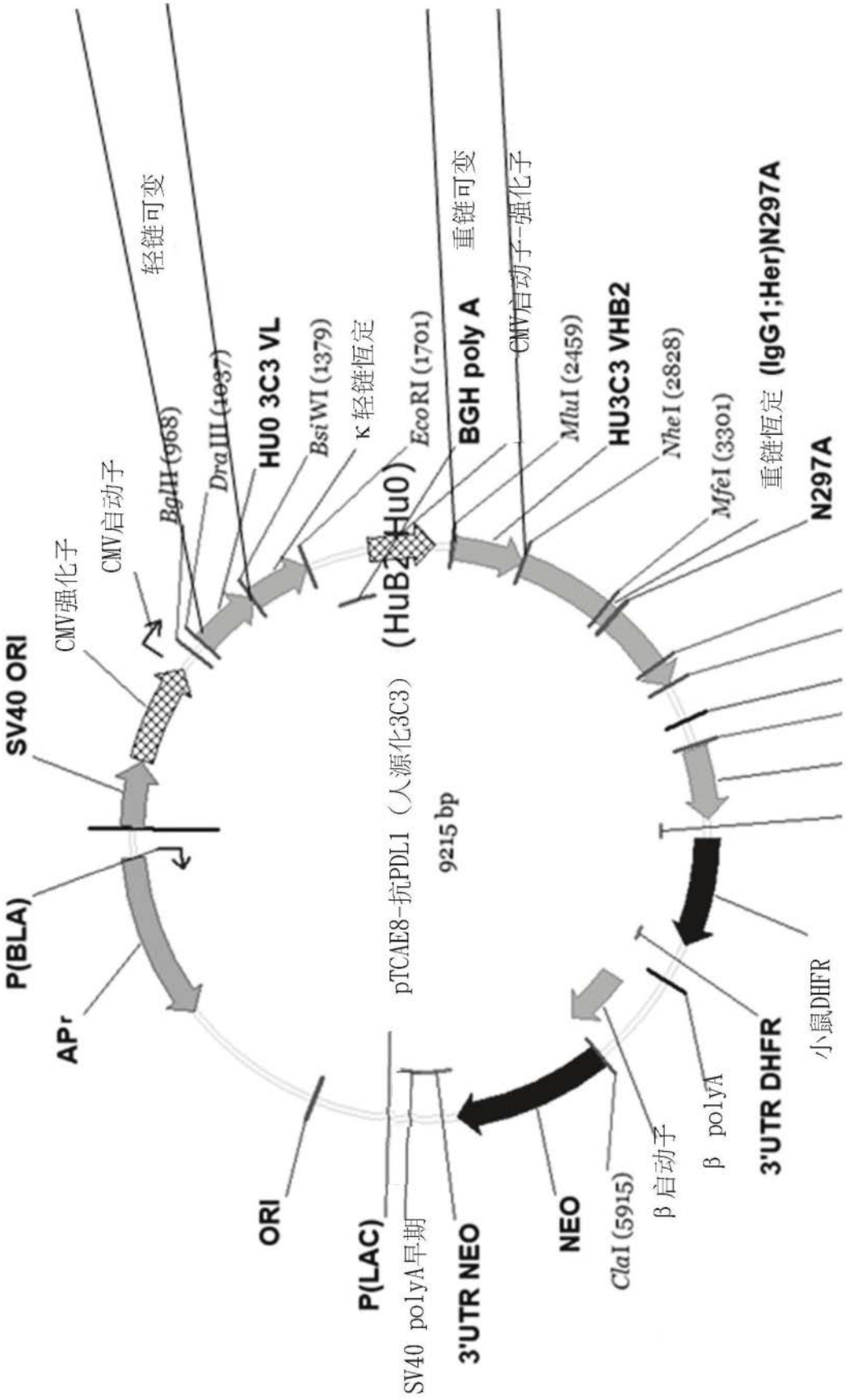
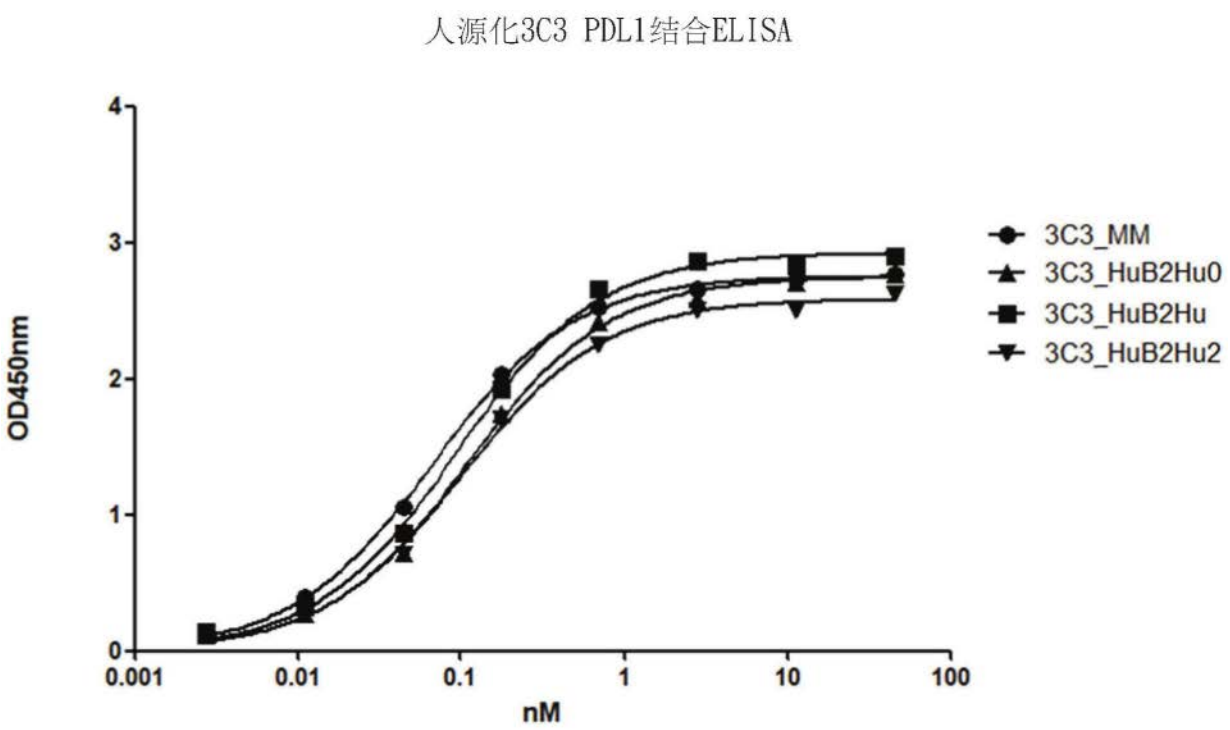
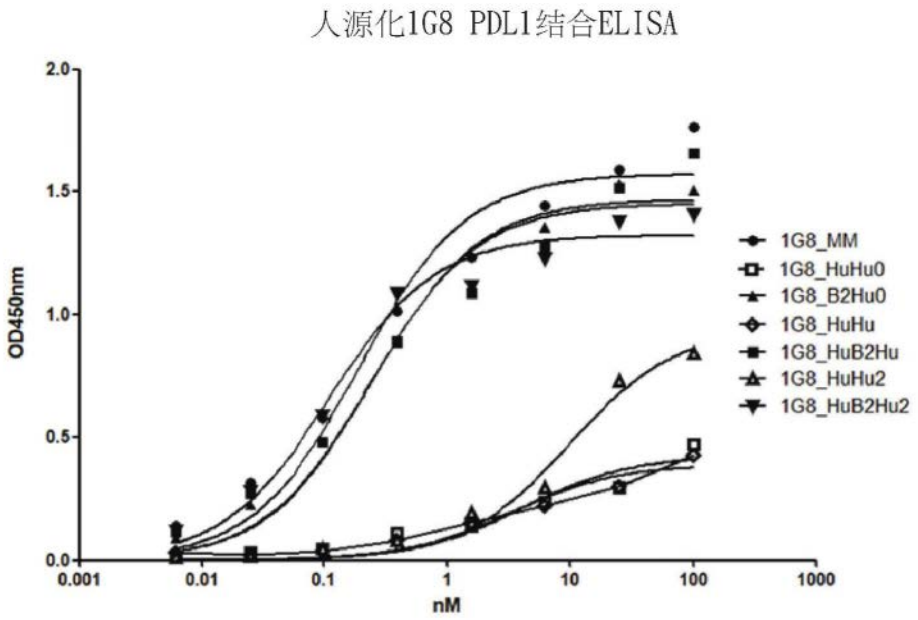

pTCAE8-抗PDL1（人源化3C3）
9215 bp
SV40 ORI
CMV强化子
CMV启动子
轻链可变
BglII (968)
DraIII (1037)
HU0 3C3 VL
BstWI (1379)
κ 轻链恒定
EcoRI (1701)
(HuB2-HuO)
BGH poly A
重链可变
CMV启动子-强化子
MluI (2459)
HU3C3 VHB2
NheI (2828)
MfeI (3301)
重链恒定 (IgG1;Her)N297A
N297A
P(BLA)
APr
ORI
P(LAC)
SV40 polyA早期
3'UTR NEO
NEO
ClaI (5915)
β 启动子
β polyA
3'UTR DHFR
小鼠DHFR

图9(续)



单位点特异性结合	MM	HuB2Hu0	HuB2Hu	HuB2Hu2
Kd	0.0666	0.1084	0.0936	0.1011

图10



单位点特异性结合	MM	HuHu0	HuB2Hu0	HuHu	HuB2Hu	HuHu2	HuB2Hu2
Kd(nM)	0.1917	3.993	0.2380	3.240	0.2480	9.687	0.1088

图11

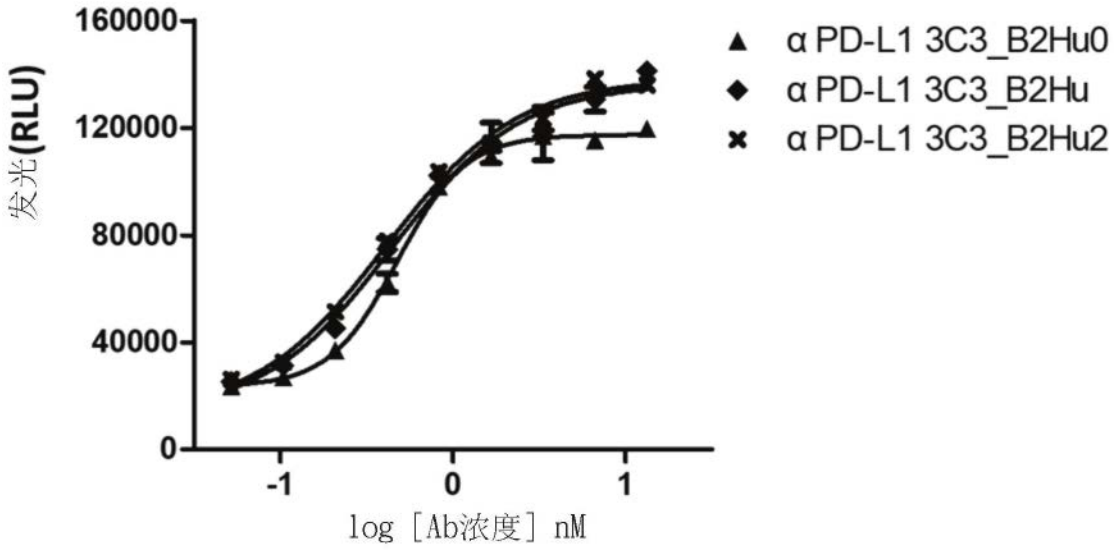


图12

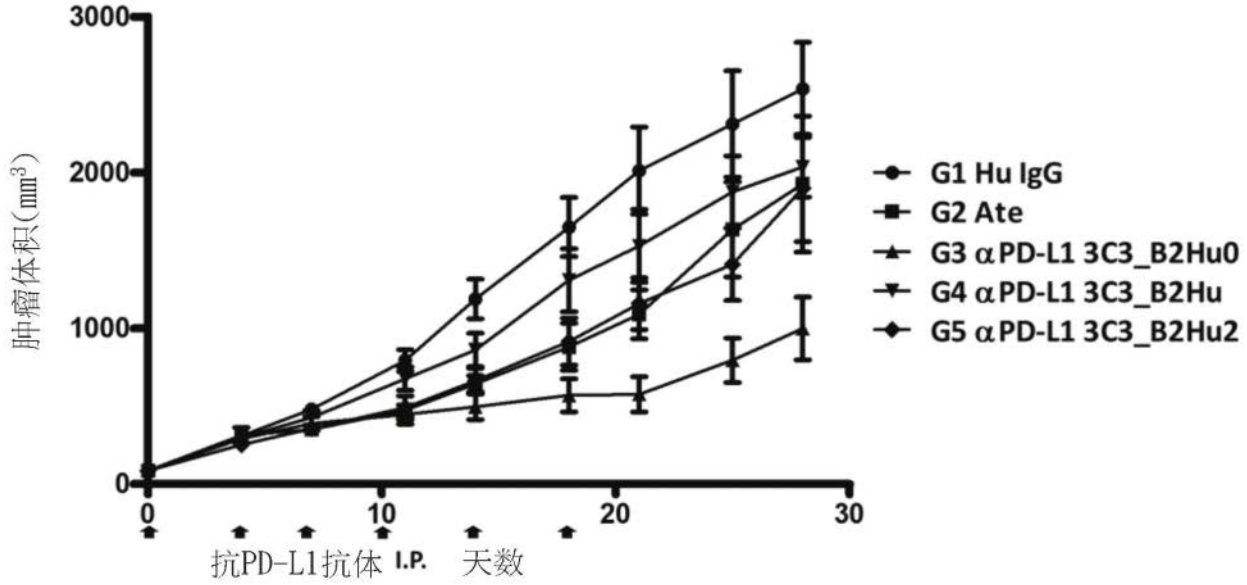

3000
2000
1000
0
肿瘤体积(mm³)
0
10
20
30
抗PD-L1抗体 I.P.
天数
G1 Hu IgG
G2 Ate
G3 αPD-L1 3C3_B2Hu0
G4 αPD-L1 3C3_B2Hu
G5 αPD-L1 3C3_B2Hu2

图13