



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I788698 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：109129612

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 08 月 28 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/08/29

中國大陸

201910805440.7

(71)申請人：大陸商榮昌生物製藥（煙臺）股份有限公司（中國大陸）REMEGEN CO., LTD.

(CN)

中國大陸

(72)發明人：房健民 FANG, JIANMIN (CA)；姜靜 JIANG, JING (CN)；李慎軍 LI, SHENJUN

(CN)；趙國銳 ZHAO, GUORUI (CN)

(74)代理人：李錦招

(56)參考文獻：

TW 201620936A

CN 104470949A

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：5 共 42 頁

(54)名稱

抗 PD-L1 抗體及其應用

(57)摘要

本發明涉及一種 PD-L1 免疫抑制劑，具體涉及一種能夠靶向 PD-L1 的單克隆抗體以及編碼這些抗體的核苷酸、多核苷酸組合、表達載體以及表達載體組合。本發明還提供了包含上述抗 PD-L1 抗體的偶聯物或者藥物組合物。本發明還提供了上述抗 PD-L1 抗體核苷酸、多核苷酸組合、表達載體、表達載體組合、偶聯物或者藥物組合物在治療或預防癌症的藥物中的用途。本發明提供的抗 PD-L1 單克隆抗體與人 PD-L1 有著良好的親和力並表現出良好的特異性，並能夠極好的與人 PD-L1 競爭結合人 PD-L1。本發明提供的抗 PD-L1 單克隆抗體在非小細胞肺癌和結直腸癌的體外動物模型中均表現出良好的抑腫瘤效果。

The present invention provides a PD-L1 immunosuppressant, specifically, a monoclonal antibody capable of targeting PD-L1, nucleotides or polynucleotide combinations and expression vectors or expression vector combinations encoding the antibodies. The present invention also provides a conjugate or pharmaceutical composition comprising the anti-PD-L1 antibody. The present invention further provides uses of the aforementioned nucleotides, polynucleotide combinations, expression vectors, expression vector combinations encoding the anti-PD-L1 antibodies, conjugates or pharmaceutical compositions in the manufacture of a medicine for treating or preventing cancers. The anti-PD-L1 monoclonal antibodies provided by the present invention has good affinity with human PD-L1 and exhibits good specificity, and can compete with human PD-1 to bind to human PD-L1. The anti-PD-L1 monoclonal antibodies provided by the present invention shows a good tumor suppressing effect for non-small cell lung cancer and colorectal cancer in animal models.

指定代表圖：

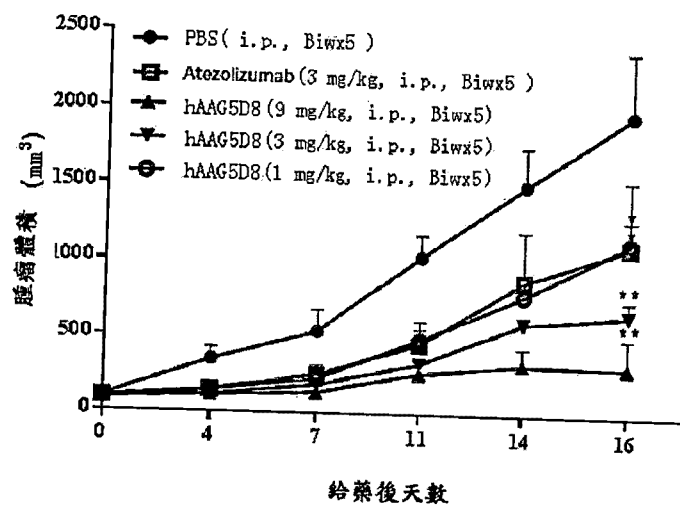


圖5

I788698

發明摘要

※ 申請案號：109129612

※ 申請日：109年8月28日

※IPC 分類：C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

抗PD-L1抗體及其應用 (ANTI-PD-L1 ANTIBODIES AND USES THEREOF)

【中文】

本發明涉及一種PD-L1免疫抑制劑，具體涉及一種能夠靶向PD-L1的單克隆抗體以及編碼這些抗體的核苷酸、多核苷酸組合、表達載體以及表達載體組合。本發明還提供了包含上述抗PD-L1抗體的偶聯物或者藥物組合物。本發明還提供了上述抗PD-L1抗體核苷酸、多核苷酸組合、表達載體、表達載體組合、偶聯物或者藥物組合物在治療或預防癌症的藥物中的用途。本發明提供的抗PD-L1單克隆抗體與人PD-L1有著良好的親和力並表現出良好的特異性，並能夠極好的與人PD-1競爭結合人PD-L1。本發明提供的抗PD-L1單克隆抗體在非小細胞肺癌和結直腸癌的體外動物模型中均表現出良好的抑腫瘤效果。

【英文】

The present invention provides a PD-L1 immunosuppressant, specifically, a monoclonal antibody capable of targeting PD-L1, nucleotides or polynucleotide combinations and expression vectors or expression vector combinations encoding the antibodies. The present invention also provides a conjugate or pharmaceutical composition comprising the anti-PD-L1 antibody. The present invention further provides uses of the aforementioned nucleotides, polynucleotide combinations, expression vectors, expression vector combinations encoding the anti-PD-L1 antibodies,

conjugates or pharmaceutical compositions in the manufacture of a medicine for treating or preventing cancers. The anti-PD-L1 monoclonal antibodies provided by the present invention has good affinity with human PD-L1 and exhibits good specificity, and can compete with human PD-1 to bind to human PD-L1. The anti-PD-L1 monoclonal antibodies provided by the present invention shows a good tumor suppressing effect for non-small cell lung cancer and colorectal cancer in animal models.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 圖5 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

抗PD-L1抗體及其應用 (ANTI-PD-L1 ANTIBODIES AND USES THEREOF)

【技術領域】

【0001】 本發明涉及生物醫藥領域，具體涉及一種抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段及其醫藥用途。

【先前技術】

【0002】 近年來，在腫瘤治療領域，越來越多地人們致力於利用自身免疫系統來抵禦腫瘤，這種通過調動機體免疫系統，抑制和殺傷腫瘤細胞的方法稱為腫瘤免疫治療。腫瘤免疫治療是當前腫瘤治療領域中最具前景的研究方向，其中包括細胞免疫療法、腫瘤疫苗、靶向腫瘤的被動免疫治療，以及免疫檢查點抑制劑等研究熱點，並已取得了很多具有應用前景的研究成果。

【0003】 免疫檢查點是指通過平衡共刺激和共抑制信號來控制 T 細胞免疫應答強度的信號通路（文獻 1）。機體在正常情況下，免疫檢查點可以通過調節自身免疫反應的強度來維持免疫耐受。然而，機體在受到腫瘤侵襲時，免疫檢查點的啟動可抑制自身免疫，有利於腫瘤細胞的生長和逃逸。CTLA-4、程式性死亡受體-1（programmed death receptor-1，PD-1）/程式性死亡配體-1（programmed death ligand-1，PD-L1）、TIM-3 等是免疫檢查點中關鍵負向調控分子，在腫瘤免疫逃逸中起重要作用。用特異性抗體阻斷免疫檢查點的負向調控通路，重建機體免疫系統對腫瘤細胞的識別和殺傷能力，在腫瘤免疫治療中取得了較好的療效。在已知的免疫檢查點中，PD-1 /PD-L1 在腫瘤免疫研究和治療中受到高度關注。

【0004】 PD-1（programmed death 1，程式性死亡受體 1，CD279）是一種重要的免疫抑制分子，CD28 超家族成員。PD-1 表達於活化的 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞以及部分腫瘤細胞，是由 PDCD1 基因編碼，288 個氨基酸組成的跨膜蛋白。PD-1 結構主要包括胞外區—免疫球蛋白可變區（IgV）樣結構域、跨膜區以及胞內區。胞內區包括 C 端和 N 端氨基酸殘基，含有 2 個獨立的磷酸化作用位點，分別為免疫

受體酪氨酸抑制基(immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif, ITIM)和免疫受體酪氨酸轉換基序 (immunoreceptor tyrosine based switch motif, ITSM)。PD-1 胞外 IgV 樣結構與其配體結合，ITSM 改變，募集 SHP2 信號，啟動下游通路 (文獻 2)。

【0005】 PD-1 的天然配體有兩個，分別為 PD-L1 和 PD-L2 (文獻 3)。PD-L1(Programmed death ligand 1, CD274, B7-H1) 是 40 kDa 的跨膜蛋白，由 CD274 基因編碼，誘導表達於 T 細胞、B 細胞、樹突細胞、巨噬細胞、間充質幹細胞、骨髓來源的肥大細胞和非造血細胞，在干擾素及其他炎症因數刺激應答的腫瘤組織和其他組織中都可能迅速上調 (文獻 4)。PD-1/PD-L1 通路啟動後，在癌症、妊娠、組織移植以及自身免疫病中抑制免疫系統。PD-L2(Programmed death ligand 1, CD273, B7-DC)表達範圍較窄，主要在活化的巨噬細胞、樹突細胞、肥大細胞中表達上調 (文獻 5)。PD-L1 與 PD-L2 有 37% 的同源序列，但由於主要表達載體的不同，導致調節作用是不同的。PD-L1 不同於 PD-L2，表達在多種腫瘤細胞中，使 PD-L1 成為研究 PD-1/PD-L 通路在腫瘤免疫治療領域中的主要配體。

【0006】 由於 PD-L1 還可以與 CD80 (屬於免疫球蛋白超家族，其配體是 CD28 和 CTLA4，在自身免疫監控、體液免疫應答及移植反應中發揮重要作用) 結合 (文獻 6)，抑制 PD-L1 或可解除對 CD80 的干擾，從而增強 T 細胞活性；從藥物安全性方面考慮，由於 PD-1 還有另外一個受體 PD-L2，且 PD-L2 對 PD-1 的親和力是 PD-L1 的三倍 (文獻 7)，而 PD-L1 阻斷劑不與 PD-L2 結合。從理論上而言，PD-1 抗體同時阻斷了 PD-1 與 PD-L1、PD-L2 的關聯，而 PD-L1 抗體只阻斷 PD-1 與 PD-L1 的關聯，保留了 PD-1 與 PD-L2 的相互作用。而 PD-L2 對於維持肺部、胃腸道的免疫耐受非常重要。因此，PD-L1 抗體可能比 PD-1 抗體，在肺和胃腸道方面的副作用上，可能更小。相對 PD-1 阻斷劑，PD-L1 阻斷劑從有效性和安全性方面可能會有一個更好的表現 (文獻 8)。

【0007】 目前，美國 FDA 已批准上市了 3 種 PD-L1 抗體藥物 (如表 1 所示)。

表 1 FDA 批准的 PD-L1 免疫檢查點抑制劑

商品名	藥物名稱	上市時間	生產廠家	主要獲批適應症
Tecentriq	Atezolizumab	2016 年	羅氏	尿路上皮癌、非小細胞肺癌、Merkel 細胞癌
Bavencio	Avelumab	2017 年	默克/輝瑞	
Imfinzi	Durvalumab	2017 年	阿斯利康	

【0008】 其中，Atezolizumab 在 2016 年 5 月首次獲美國 FDA 批准，此後兩年又獲批多種適應症（如表 2 所示）。

表 2 Atezolizumab 獲批適應症

年份	獲批適應症
2016.05.18	(1) 治療含鉑化療期間或後有疾病進展，(2) 或用含鉑化療新輔助或輔助治療 12 個月內有疾病進展的局部晚期或轉移性尿路上皮癌患者
2016.10.18	治療鉑類藥物化療後進展的轉移性非小細胞肺癌（NSCLC）患者
2017.04.17	(1) 治療不適合含順鉑化療，(2) 或在任何含鉑化療期間或之後，或在新輔助或輔助化療後的 12 個月內出現疾病進展的局部晚期或轉移性尿路上皮癌患者
2018.06.19	(1) 治療不適合含順鉑化療，表達 PD-L1(PD-L1 彩色腫瘤浸潤免疫細胞(IC)覆蓋 $\geq 5\%$ 的腫瘤區域)，(2) 或表達 PD-L1 但不符合任何含鉑化療條件，(3) 或在任何含鉑化療期間或之後，或新輔助或輔助化療後 12 個月出現疾病進展的局部晚期或轉移性尿路上皮癌患者
2018.07.02	(1) 治療由 FDA 批准測試的不適合含順鉑化療，腫瘤表達 PD-L1(PD-L1 彩色腫瘤浸潤免疫細胞(IC)覆蓋 $\geq 5\%$ 的腫瘤區域)，(2) 或不符合任何含鉑化療條件，(3) 或任何含鉑化療期間或之後或新輔助或輔助化療後 12 個月內出現疾病進展的局部晚期或轉移性尿路上皮癌患者

【0009】 在 2019 年，Atezolizumab 又獲批了 3 大難治性晚期癌症一線治療的適應症，包括歐盟批准的 Atezolizumab + 貝伐+化療，用於晚期非鱗非小細胞肺癌一線治療；美國批准的 Atezolizumab 聯合化療，用於 PD-L1 陽性的晚期三陰性乳腺癌的一線治療以及用於晚期小細胞肺癌的一線治療。

【0010】 另外兩種上市的 PD-L1 抗體藥物 Avelumab 和 Durvalumab 也陸續被批准用於治療轉移性 MERKEL 細胞癌、局部晚期或轉移性尿路上皮癌或無法手術切除的 III 期非小細胞肺癌等，具體見表 3-4。

表 3 Avelumab 獲批適應症

年份	獲批適應症
2017.03.23	治療轉移性 MERKEL 細胞癌（MCC）患者
2017.05.09	含鉑化療期間或化療後病情進展的局部晚期或轉移性尿路上皮癌（mUC）患者
2017.05.09	手術前（新輔助治療，neoadjuvant treatment）或手術後（輔助治療，adjuvant treatment）接受含鉑化療 12 個月內病情進展的局部晚期或轉移性尿路上皮癌（mUC）患者

表 4 Durvalumab 獲批適應症

年份	獲批適應症
2017.05.01	治療鉑類藥物化療或輔助化療 12 個月後疾病進展的局部晚期或轉移性尿路上皮癌患者
2018.02.16	治療無法手術切除的 III 期非小細胞肺癌，且在鉑類化療和放療同時治療下病情沒有進展的患者

【0011】 專利申請 CN102245640A 中也公開了一種 PD-L1 抗體以及其用於增強 T 細胞功能從而上調細胞介導的免疫應答的用途和提供治療 T 細胞功能障礙病症，所述病症包括感染(例如急性 的和慢性的)和腫瘤免疫。腫瘤免疫針對的癌症包括：乳腺癌(breast cancer)、肺癌(lung cancer)、結腸癌 (colon cancer)、卵巢癌(ovarian cancer)、黑色素瘤(melanoma)、膀胱癌 (bladder cancer)、腎癌(kidney cancer)、肝癌(liver cancer)、唾液腺癌(salivary cancer)、胃癌(stomach cancer)、神經膠質瘤(gliomas)、甲狀腺癌(thyroid cancer)、胸腺癌(thymic cancer)、上皮癌(epithelial cancer)、頭和頸癌(head and neck cancers)、胃癌和胰腺癌(gastric and pancreatic cancer)。

【0012】 從目前各 PD-L1 抗體藥物批准的適應症及現有技術文獻來看，儘管同為 PD-L1 抗體，但所針對的適應症還存在各方面的差異，已上市的三種抗體藥物還存在多個三期臨床失敗進程，如 Bavencio 針對卵巢癌適應症的 3 項試驗：JAVELIN Ovarian 100、JAVELIN Ovarian 200 和 JAVELIN Ovarian PARP 100。這表明目前還存在大量的重大臨床需求未得到滿足。因此臨床上還亟需開發更多藥效更好且針對更多適應症有效的 PD-L1 類抑制劑，尤其是靶向 PD-L1 的單克隆抗體。

【發明內容】

【0013】 本發明提供了一種抗 PD-L1 抗體，以及編碼這些抗體的核苷酸、多核苷酸組合、表達載體以及表達載體組合。本發明還提供了包含上述抗 PD-L1 抗體的偶聯物或者藥物組合物。本發明還提供了上述抗 PD-L1 抗體核苷酸、多核苷酸組合、表達載體、表達載體組合、偶聯物或者藥物組合物在治療或預防癌症的藥物中的用途。

【0014】 本發明提供一種分離的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，所述的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段包括重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區的 CDR 和/或所述輕鏈可變區的 CDR 與如下序列限定的抗體

具有相同的 CDR 序列或在如下序列限定的抗體的 CDR 上進行 1-2 個氨基酸替換，所述序列限定的抗體為：

- (1) 重鏈可變區氨基酸序列為 SEQ ID NO:31 所示；和/或
- (2) 輕鏈可變區氨基酸序列為 SEQ ID NO:32 所示。

【0015】 在特定實施方案中，根據採用不同的測定方法或系統認定，相應重鏈和輕鏈可變區的互補決定區 CDR 1-3 如表 5 所示。

表 5 重鏈和輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列

類別	系統	CDR1	CDR2	CDR3
重鏈	IMGT	SEQ ID NO : 1 GFSLSRYS	SEQ ID NO : 2 IWGVGTT	SEQ ID NO : 3 ARNWGTADYFDY
	Kabat	SEQ ID NO : 7 RYSVH	SEQ ID NO : 8 MIWGVGTTDYN SALKS	SEQ ID NO : 9 NWGTADYFDY
	Chothia	SEQ ID NO : 13 GFSLSRY	SEQ ID NO : 14 WGVGT	SEQ ID NO : 15 NWGTADYFDY
	AbM	SEQ ID NO : 19 GFSLSRYSVH	SEQ ID NO : 20 MIWGVGTTD	SEQ ID NO : 21 NWGTADYFDY
	Contact	SEQ ID NO : 25 SRYSVH	SEQ ID NO : 26 WLGMIWGVGTTD	SEQ ID NO : 27 ARNWGTADYFD
輕鏈	IMGT	SEQ ID NO : 4 KSVHTSGYSY	SEQ ID NO : 5 LAS	SEQ ID NO : 6 QHSGELPYT
	Kabat	SEQ ID NO : 10 RASKSVHTSGYSYMH	SEQ ID NO : 11 LASNLES	SEQ ID NO : 12 QHSGELPYT
	Chothia	SEQ ID NO : 16 RASKSVHTSGYSYMH	SEQ ID NO : 17 LASNLES	SEQ ID NO : 18 QHSGELPYT
	AbM	SEQ ID NO : 22 RASKSVHTSGYSYMH	SEQ ID NO : 23 LASNLES	SEQ ID NO : 24 QHSGELPYT
	Contact	SEQ ID NO : 28 HTSGYSYMHWY	SEQ ID NO : 29 LLIYLASNLE	SEQ ID NO : 30 QHSGELPY

【0016】 進一步的，本發明還提供了一種分離的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，在某些具體實施方案中，其包括重鏈和輕鏈可變區序列，其中：

(1) 重鏈可變區 CDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO:1、7、13、19 或 25 所示或對 SEQ ID NO:1、7、13、19 或 25 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列； CDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO:2、8、14、20 或 26 所示或對 SEQ ID NO: 2、8、14、20 或 26 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列； CDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO:3、9、15、21 或 27 所示或對 SEQ ID NO: 3、9、15、21 或 27 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列；和/或

(2) 輕鏈可變區 CDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO:4、10、16、22 或 28 所示或對 SEQ ID NO: 4、10、16、22 或 28 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列； CDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO:5、11、17、23 或 29 所示或對 SEQ ID NO: 5、11、17、23 或 29 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列； CDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO:6、12、18、24 或 30 所示或對 SEQ ID NO: 6、12、18、24 或 30 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列。

【0017】 進一步，本發明提供的分離的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，在某些具體實施方案中，其中：

(1) 重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO: 1-3 或對 SEQ ID NO: 1-3 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列；和/或輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO: 4-6 或對 SEQ ID NO: 4-6 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列；或

(2) 重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO: 7-9 或對 SEQ ID NO: 7-9 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列；和/或輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO: 10-12 或對 SEQ ID NO: 10-12 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列；或

(3) 重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO: 13-15 或對 SEQ ID NO: 13-15 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列；和/或輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO: 16-18 或對 SEQ ID NO: 16-18 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列；或

(4) 重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO: 19-21 或對 SEQ ID NO: 19-21 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列；和/或輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO: 22-24 或對 SEQ ID NO: 22-24 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列；或

(5) 重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO: 25-27 或對 SEQ ID NO: 25-27 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列；和/或輕鏈可變區 CDR1-3

氨基酸序列為 SEQ ID NO：28-30 或對 SEQ ID NO：28-30 進行 1 或 2 個氨基酸替換後的氨基酸序列。

【0018】 在某些具體實施方案中，本發明所提供的抗體或其抗原結合片段，其重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：1-3；輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：4-6。

【0019】 在某些具體實施方案中，本發明所提供的抗體或其抗原結合片段，其包括選自如下一組的可變區：

(1) 重鏈可變區的序列如 SEQ ID NO:31 所示，或與 SEQ ID NO:31 具有相同的 CDR1-3 且與 SEQ ID NO:31 相比同一性大於 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列；和/或

(2) 輕鏈可變區的序列如 SEQ ID NO:32 所示，或與 SEQ ID NO:32 具有相同的 CDR 1-3 且與 SEQ ID NO:32 相比同一性大於 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列。

【0020】 本發明涉及的抗 PD-L1 抗體重鏈可變區氨基酸序列 (SEQ ID NO:31)：

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGFSL S RYSVHWIRQP PGKGLEWLGM IWGVGTTDYN 60
SALKSRLTIS KDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARNWG TADYFDYWGQ GTTVTVSSAS 120

【0021】 本發明涉及的抗 PD-L1 抗體輕鏈可變區氨基酸序列 (SEQ ID NO:32)：

DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASKSVH TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60
GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCQHSSELGY TFGGGTKVEI KRT 113

【0022】 在某些具體實施方案中，本發明所提供的抗體或其抗原結合片段，其中：(1) 重鏈可變區的序列如 SEQ ID NO:31 所示；和/或 (2) 輕鏈可變區的序列分別 SEQ ID NO:32 所示。

【0023】 在某些具體實施方案中，本發明所提供的抗體或其抗原結合片段，其：(1) 重鏈的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示；和/或 (2) 輕鏈的氨基酸序列分別 SEQ ID NO:34 所示。

【0024】 本發明所提供的抗體可以是單克隆抗體、嵌合抗體、人源化抗體、雙特異性抗體、多特異性抗體或 Fab 片段、F(ab') 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、dAb、Fd、單鏈抗體(scFv)。進一步地，所述抗體是人源化單克隆抗體。

- 【0025】 本發明所提供的抗體進一步包括人或鼠恒定區，所述恒定區進一步可選自 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4。所述 IgG2 包括 IgG2A, IgG2B。
- 【0026】 本發明還提供分離的編碼上述抗體或其抗原結合片段的多核苷酸或編碼上述抗體或抗原結合片段重鏈或重鏈部分片段以及輕鏈或輕鏈部分片段的多核苷酸組合。
- 【0027】 本發明還提供一種核酸構建體或載體，其包含了上述編碼抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段的多核苷酸。
- 【0028】 本發明進一步提供了一種宿主細胞，其包含上述核酸構建體或載體。所述細胞可以是原核細胞、真核細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、大腸桿菌細胞或 CHO 細胞、NS0 細胞、Sp2/0 細胞、BHK 細胞。
- 【0029】 本發明進一步提供了一種抗體藥物偶聯物，其含有本發明中的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合部分及藥物毒素。所述藥物毒素可以選自可直接或間接抑制細胞生長或殺滅細胞、或通過啟動機體免疫反應從而抑制或殺死細胞，從而達到治療腫瘤的化學物質、毒素、多肽、酶、同位素、細胞因數、抗體或其他具有生物活性的但以物質或混合物質，優選白介素類、腫瘤壞死因數、趨化因數、納米顆粒、MMAE、MMAF、DM1、DM4、卡奇黴素(Calicheamicin)、duocarmycin、阿黴素(Doxorubicin)。
- 【0030】 本發明進一步提供了一種藥物組合物，包含了本發明中的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段和/或上述偶聯物，以及藥學上可接受的載體。
- 【0031】 本發明進一步提供了一種製備抗 PD-L1 抗體的方法，其包括在適合表達編碼抗 PD-L1 抗體或抗原結合片段的載體的條件下培養上述宿主細胞，並且回收所述抗體或片段。
- 【0032】 本發明進一步提供了一種增強 T 細胞功能的方法，其包括向功能障礙的 T 細胞施用有效量本發明中的上述藥用組合物。
- 【0033】 又一方面，本發明提供了一種治療或預防癌症的方法，其包括向有此需要的物件施用治療有效量的根據本發明的抗體、多核苷酸、多核苷酸組合、表達載體、偶聯物和/或藥物組合物。
- 【0034】 又一方面，本發明提供了本發明中抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段、其編碼多核苷酸、多核苷酸組合、相應的核酸構建體或載體、抗體藥物偶聯物、或藥物組合物在製備用於治療或預防癌症的藥物中的用途。

- 【0035】 又一方面，本發明提供了根據本發明的抗體、多核苷酸、多核苷酸組合、表達載體、偶聯物和/或藥物組合物，其用於治療或預防癌症。
- 【0036】 進一步地，其中所述癌症為實體瘤。
- 【0037】 進一步地，其中所述實體瘤為肺癌、結直腸癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、膀胱癌、尿路上皮癌、腎癌、肝癌、唾液腺癌、胃癌、神經膠質瘤、甲狀腺癌、胸腺癌、上皮癌、頭和頸癌、胃癌和胰腺癌。
- 【0038】 進一步地，其中所述肺癌為非小細胞肺癌。
- 【0039】 進一步地，其中所述卵巢癌為三陰性乳腺癌。
- 【0040】 本發明又一方面提供了治療 T 細胞功能障礙的病症的方法，其包括向患有 T 細胞功能障礙的病症的患者施用治療有效量本發明中的上述藥用組合物，所述 T 細胞功能障礙的病症包括感染、腫瘤免疫。所述腫瘤免疫由選自下述各項癌症導致：乳腺癌，肺癌、結腸癌、卵巢癌、黑色素瘤、膀胱癌、腎癌、肝癌、唾液腺癌、胃癌、神經膠質瘤、甲狀腺癌、胸腺癌、上皮癌、頭和頸癌、胃癌和胰腺癌。
- 【0041】 本發明進一步提供了本發明中抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段、其編碼多核苷酸、多核苷酸組合、相應的核酸構建體或載體、抗體藥物偶聯物、或藥物組合物在製備用於治療或預防癌症的藥物中的用途。
- 【0042】 本發明提供的抗 PD-L1 單克隆抗體是一種全新的靶向 PD-L1 的單克隆抗體，其具有全新的 CDR 序列及氨基酸序列。本發明提供的抗 PD-L1 單克隆抗體與人 PD-L1 具有驚人的親和力和特異性，在與人 PD-1 競爭結合人 PD-L1 上具有顯著優勢。本發明提供的抗 PD-L1 單克隆抗體在非小細胞肺癌和結直腸癌的體外動物模型中均表現出意料不到的抑制腫瘤效果，為抑制腫瘤進程提供了更佳的選擇。
- 【圖式簡單說明】
- 【0043】 圖 1 顯示了 hAAG5D8 與人 PD-L1 的親和力結合解離曲線，其中編號為 1 的曲線表示 hAAG5D8 的濃度為 100nM，編號為 2 的曲線表示 hAAG5D8 的濃度為 50nM，編號為 3 的曲線表示 hAAG5D8 的濃度為 25nM。

【0044】 圖 2 顯示了 hAAG5D8 與人 PD-1 的競爭結合曲線。

【0045】 圖 3 顯示了 hAAG5D8 與多種 B7 家族蛋白(PD-L1、PD-L2、B7-H3、PD-1 及 CD80) 的結合能力。

【0046】 圖 4 顯示了在人非小細胞肺癌皮下異種移植腫瘤模型中，給藥 hAAG5D8 (5mg/kg)、MPDL3820A (5mg/kg，陽性對照)、Human IgG1 (5mg/kg，陰性對照) 後的腫瘤生長曲線圖。

【0047】 圖 5 顯示了在人結直腸癌皮下異種移植腫瘤模型中，給藥 hAAG5D8 (1mg/kg、3mg/kg、9mg/kg)、MPDL3820A (10mg/kg，陽性對照)、PBS (陰性對照) 後的腫瘤體積變化趨勢。

【實施方式】

定義

【0048】 除非另有定義，本文使用的所有科技術語具有本領域普通技術人員所理解的相同含義。關於本領域的定義及術語，專業人員具體可參考 Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel)。氨基酸殘基的縮寫是本領域中所用的指代 20 個常用 L-氨基酸之一的標準 3 字母和/或 1 字母代碼。

【0049】 在本發明中，抗體可變域的互補決定區(CDR)測定或編號方法包括本領域熟知的 IMGT、Kabat、Chothia、AbM 以及 Contact 法。

【0050】 對本發明來說，兩種核酸或者氨基酸序列間的“一致性”、“同一性”或“相似性”是指，在最佳比對(最優比對)後所獲得的、待比較的兩序列之間相同核苷酸或相同氨基酸殘基的百分數，該百分數是純粹統計學的並且兩種序列間的差異隨機分佈並覆蓋其全長。兩種核酸或者氨基酸序列之間的序列比較通常是在以最優方式使它們匹配以後，通過比較這些序列而進行，所述比較能夠通過區段或者通過“比較窗”實施。除了能夠手工實施外，用於比較序列的最優比對，還能夠通過 Smith 和 Waterman(1981)[Ad.App.Math.2 : 482] 的局部同源性演算法、通過 Needleman 和 Wunsch 的(1970)[J.Mol.Biol.48 : 443]局部同源性演算法、通過 Pearson 和 Lipman 的(1988)[Proc. Natl.Acad.Sci.USA 85 : 2444]相似性搜索方法、通過使用這些演算法的電腦軟體實施(GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package，Genetics Computer Group，575Science Dr.，Madison，WI，或者通過 BLAST N or BLAST P 比較軟體)。

- 【0051】** 本文所使用的“抗體”以最廣義使用，並且涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單克隆抗體、多克隆抗體、多特異性抗體（例如雙特異性抗體）；本文所使用的“抗原結合片段”是指抗體片段由其來源抗體的重或輕可變鏈的部分序列構成或者包含它們，所述部分序列足以保留與其來源抗體相同的結合特異性和充分的親和力，優選至少等於其來源抗體親和力的 1/100，在更優選方式中至少等於 1/10。這種功能片段將包含最少 5 個氨基酸，優選其來源的抗體序列的 10、15、25、50 和 100 個連續氨基酸。包括(特別是)Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fd、互補決定區(CDR)片段、單鏈抗體(scFv)、二價單鏈抗體，其含有至少一個足以使得特異性抗原結合於該多肽的免疫球蛋白片段。上述片段可經合成、或酶法、或通過對完整免疫球蛋白的化學切割而製備，或通過重組 DNA 技術進行遺傳工程改造。其生產的方法在本領域中眾所周知。一條重鏈包含一重鏈可變區(縮寫為 VH)和一重鏈恒定區。重鏈恒定區包含三個域(domain)，CH1、CH2 和 CH3。一條輕鏈包含一輕鏈可變區(縮寫為 VL)和一輕鏈恒定區。該輕鏈恒定區包含一個域，CL。VH 和 VL 區域還可再細分為具有高可變性的多個區，被稱為互補決定區(CDR)，其間散佈有更為保守的被稱為框架區(FR)的多個區域。每個 VH 和 VL 均由三個 CDR 和四個 FR 構成，按照以下順序從氨基端至羧基端排布：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈和輕鏈的這些可變區包含與抗原相互作用的結合域。抗體的恒定區可介導免疫球蛋白與宿主的組織或因數結合，包括免疫系統的各種細胞(如效應細胞)和經典補體系統的第一成分(C1q)。嵌合或人源化抗體也涵蓋在根據本發明的抗體中。
- 【0052】** 術語“人源化抗體”是指一種抗體，其包含來源於非人源抗體的 CDR 區、並且該抗體分子的其他部分來源於一種(或幾種)人抗體。而且，為了保留結合親和力，可以修飾骨架(稱為 FR)區段的一些殘基(Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332: 323-327, 1988)。通過本領域技術人員已知的技術可以製備根據本發明的人源化抗體或其片段(例如，描述於檔 Singer et al., J.Immun.150: 2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol.Genet.Eng.Rev., 10: 1-142, 1992; 或 Bebbington et al., Bio/Technology, 10: 169-175, 1992)。
- 【0053】** 術語“嵌合抗體”系指以下抗體，其中的可變區序列來自一物種而恒定區序列來自另一物種，例如可變區序列來自小鼠抗體而恒定區序列來自人抗體的抗體。通過使用基因重組技術可以製備根據本發明的嵌

合抗體或其片段。例如，所述嵌合抗體可以通過克隆重組 DNA 來生產，所述重組 DNA 包含啟動子和編碼根據本發明的非人尤其是鼠單克隆抗體可變區的序列、以及編碼人抗體恒定區的序列。由這種重組基因編碼的本發明嵌合抗體將是，例如，鼠-人嵌合體，該抗體的特異性由來源於鼠 DNA 的可變區確定，並且其同種型由來源於人 DNA 的恒定區來確定。對於製備嵌合抗體的方法，例如，可以參考檔 Verhoeyn et al.(BioEssays, 8: 74, 1988)。

【0054】 術語“單克隆抗體”系指具有單一分子組成的抗體分子的製備物。單克隆抗體組合物顯示出對於特定表位元的單一結合特異性和親和性。

【0055】 術語“分離地”核酸分子是從至少一個污染物核酸分子中鑒別與分離的核酸分子，在抗體核酸的天然來源中其一般地與該污染物核酸分子有聯繫。分離的核酸分子在其形式或環境上與其在自然界中發現時不同。分離的核酸分子因此不同于其在自然細胞中存在的核酸分子。然而，分離的核酸分子包括在通常表達抗體的細胞中加以包含的核酸分子，在該細胞中例如核酸分子位於與自然細胞不同的染色體位置上。

【0056】 通常，為了製備單克隆抗體或其功能片段，尤其是鼠源的單克隆抗體或其功能片段，可以參考尤其描述在手冊“Antibodies”中的技術(Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp.726, 1988)或者參考 Kohler 和 Milstein 描述的從雜交瘤細胞製備的技術(Nature, 256: 495-497, 1975)。

【0057】 下面將結合實施例對本發明的實施方案進行詳細描述，但是本領域技術人員將會理解，下面實施例僅用於說明本發明，而不應視為限定本發明的範圍。

【0058】 實施例 1 抗 PD-L1 抗體的產生

【0059】 通過對免疫小鼠後獲得的抗 PD-L1 抗體的大量篩選，從中確定了一個候選鼠源抗體 mAAG5D8。通過進一步在抗體可變區資料庫中比對，我們確定了與鼠源 PD-L1 抗體 mAAG5D8 具有很高同源性的人 IgG1

框架區。針對 mAAG5D8，我們進一步設計了多種人源化抗體並進行親和力比較，最終確定候選的人源化抗 PD-L1 抗體 hAAG5D8。

表 6.抗 PD-L1 人源化抗體 hAAG5D8 重鏈可變區和輕鏈可變區 CDR 1-3 (IMGT 法測定) 的氨基酸序列

重鏈	CDR1	SEQ ID NO: 1	GFSLSRYS
	CDR2	SEQ ID NO: 2	IWGVGTT
	CDR3	SEQ ID NO: 3	ARNWGTADYFDY
輕鏈	CDR1	SEQ ID NO: 4	KSVHTSGYSY
	CDR2	SEQ ID NO: 5	LAS
	CDR3	SEQ ID NO: 6	QHSSELPTY

【0060】 抗 PD-L1 人源化抗體 hAAG5D8 重鏈可變區氨基酸序列 (SEQ ID NO:31) :

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGFSLS RYSVHWIRQP PGKGLEWLGM
IWGVGTTDYN 60
SALKSRLTIS KDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARNWG TADYFDYWGQ
GTTVTVSSAS 120

【0061】 抗 PD-L1 人源化抗體 hAAG5D8 輕鏈可變區氨基酸序列 (SEQ ID NO:32) :

DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASKSVH TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL
LIYLASNLES 60
GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCQHSSELPTY TFGGGTKVEI KRT
113

【0062】 抗 PD-L1 人源化抗體 hAAG5D8 重鏈和輕鏈氨基酸序列分別如序列 33 (SEQ ID NO:33) 和序列 34 (SEQ ID NO:34) 所示。

【0063】 實施例 2 hAAG5D8 與人 PD-L1 的親和力比較

【0064】 採用生物層干涉 (BLI) 法檢測 hAAG5D8 對人 PD-L1 的親和力。黑色 96 孔板 A-D 第 1、3、5 列分別加入 PBS 溶液分別作為基線 1、基線 2 和解離液，第 2 列加入 PD-L1 溶液(R&D 公司)，第 4 列加入 hAAG5D8 溶液(濃度依次為 100 nM-50 nM-25 nM-0 nM)，第 10 列加入咪唑溶液，第 11 列加入水，第 12 列加入硫酸鎳溶液。實驗採用 Ni-NTA 探針(Fortebio 公司)，首先將探針浸入 A-D 第 1 列，保持 180s，使基數穩定；將 Ni-NTA 探針浸入 A-D 第 2 列，保持 300s，使 PD-L1 固化到探針上；將 Ni-NTA 探針浸入 A-D 第 3 列，保持 120s，使基數穩定；將 Ni-NTA 探針浸入 A-D 第 4 列，保持 600s，使不同濃度的 hAAG5D8 與探針上固化的 PD-L1 蛋

白結合；將 Ni-NTA 探針浸入 A-D 第 5 列，保持 600s，使抗體自然解離；之後將 Ni-NTA 探針依次浸入 A-D 第 10、11、12 列，使固化在探針上的 PD-L1 從探針上強制解離。使用 Data analysis 7.0 進行資料分析獲得結合解離平衡常數 K_D 。

【0065】 結果及結論：hAAG5D8 與人 PD-L1 的結合解離平衡常數 K_D 值和親和力結合解離曲線分別如表 7 和圖 1 所示。實驗結果表明，hAAG5D8 親和力與人 PD-L1 親和力遠高於 PD-L1 與 PD-1 的親和力 $8.2 \mu M$ (Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology, Hyun Tae Lee 等, Molecules 2019, 24, 1190; doi:10.3390/molecules24061190, 2019 年 3 月 26 日, 第 4 頁最後 1 段)。

表 7 抗 PD-L1 抗體結合 PD-L1 的親和動力學常數

主要參數	$K_D(M)$
親和動力學常數	$7.62E-11 \pm 3.32E-11$

【0066】 實施例 3 hAAG5D8 與人 PD-1 的競爭結合

【0067】 採用 ELISA 法檢測 hAAG5D8 競爭 PD-1 結合 PD-L1 的能力。用包被緩衝液(6mM Na_2CO_3 , 14mM $NaHCO_3$)稀釋 PD-L1(Fc Tag)至 $1 \mu g/mL$ ，每孔加入 $100 \mu L$ ， $4^\circ C$ 孵育過夜。PBST 洗板，每孔加入 $250 \mu L$ 封閉液封閉(3%BSA/PBST) $25^\circ C$ 封閉 2h，PBST 洗板，每孔加入 $50 \mu L$ 濃度為 $6 \mu g/mL$ 的人 PD-1，同時加入 $50 \mu L$ 梯度稀釋的 hAAG5D8 溶液(濃度為 $8000 ng/mL$ 、 $2000 ng/mL$ 、 $500 ng/mL$ 、 $250 ng/mL$ 、 $125 ng/mL$ 、 $62.5 ng/mL$ 、 $31.25 ng/mL$ 、 $6.25 ng/mL$ 、 $1.25 ng/mL$)混勻後 $25^\circ C$ 孵育 2h，PBST 洗板，每孔加入 $100 \mu L$ 酶標二抗(1：5000 比例稀釋的羊抗人 IgG-Fc-HRP) $25^\circ C$ 孵育 1h，顯色，在 450 nm 處讀數，並用四參數方程進行曲線擬合，計算 EC_{50} 值。

【0068】 結果及結論：hAAG5D8 競爭結合人 PD-L1 的 EC_{50} 值和競爭結合曲線分別如表 8 和圖 2 所示。實驗結果表明，hAAG5D8 能夠有效阻斷 PD-1 與 PD-L1 的結合。

表 8 hAAG5D8 與人 PD-1 的競爭結合 (pM, Mean $\pm$ SD)

主要參數	抗 PD-L1 抗體
與人 PD-1 競爭 EC_{50}	715.56 ± 61.58

【0069】 實施例 4 hAAG5D8 與多種其他 B7 家族蛋白的親和力

【0070】 採用 ELISA 法檢測了 hAAG5D8 與多種其他 B7 家族蛋白的親

和力 (PD-L1、PD-L2、B7-H3、PD-1 及 CD80)。用包被緩衝液 (6mM Na_2CO_3 , 14mM NaHCO_3) 稀釋 hAAG5D8 至 100 ng/mL, 每孔加入 100 μL , 4 $^\circ\text{C}$ 孵育過夜。PBST 洗板, 每孔加入 250 μL 封閉液封閉 (3%BSA/PBST) 25 $^\circ\text{C}$ 封閉 2h, PBST 洗板, 每孔加入 100 μL 濃度為 5 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白樣品 (rhPD-L1, rhPD-L2, rhB7-H3, rhPD-1 及 rhCD80) 25 $^\circ\text{C}$ 孵育 2h, PBST 洗板, 每孔加入 100 μL 酶標二抗 (1:5000 比例稀釋二抗 Anti-His-tag) 25 $^\circ\text{C}$ 孵育 1h, PBST 洗板, 顯色, 在 450 nm 處讀數。

【0071】 結果及結論：hAAG5D8 與 B7 家族蛋白 (PD-L1、PD-L2、B7-H3、PD-1 及 CD80) 的結合如圖 3 所示。結果表明, hAAG5D8 能夠特異性的結合 PD-L1 不結合 PD-L2, hAAG5D8 也不與同家族具有相關功能的其他蛋白結合 (B7-H3, PD-1, CD80), 由此可知 hAAG5D8 與 PD-L1 的結合具有極高的特異性。

【0072】 實施例 5 hAAG5D8 對人非小細胞肺癌 HCC827 NCG 小鼠皮下移植瘤的療效研究

【0073】 取 12 只周齡 4-5 周, 體重 20-26g, 高度免疫缺陷的雄性 NCG 小鼠 (購自南京大學模式動物研究中心), 分別自尾靜脈注射 100 μl 人外周血單個核細胞 PBMC (1×10^7 細胞/100 μl , 分離自健康捐獻者血液), 尾靜脈注射 3 天后於小鼠右側皮下接種人非小細胞肺癌 HCC827 細胞 (ATCC), 接種後 3 天 (平均瘤體積為 57 mm^3), 將小鼠隨機分為 3 個組 (A-1 組、A-2 組、A-3 組), 每組 4 只, 按照表 9 所示的給藥方案給藥。實驗同時設置陽性對照和陰性對照, 陽性對照為 MPDL3820A (即 Atezolizumab), 陰性對照為 Human IgG1 (中美冠科 (太倉) 有限公司, 批號為 AB160083)。第 4 次給藥後當天 (即腫瘤細胞接種後第 13 天), 將實驗小鼠 CO_2 安樂死後取瘤, 分別計算相對腫瘤抑制率 (TGI_{RTV}) 和腫瘤增長抑制率 ($\text{TGI}_{\Delta\text{TV}}$) 進行藥效評價。

【0074】 相對腫瘤抑制率的計算公式為： $\text{TGI}_{\text{RTV}} = 1 - \text{T}_{\text{RTV}} / \text{C}_{\text{RTV}}$ (%)。(其中, T_{RTV} 為陽性對照組或治療組在某一特定時間點的相對腫瘤體積 (TV); C_{RTV} 為陰性對照組在某一特定時間點的相對腫瘤體積; $\text{T}_{\text{RTV}} / \text{C}_{\text{RTV}}$ 為陽性對照組或治療組和陰性對照組相對腫瘤體積的百分比值; $\text{RTV} = \text{V}_t / \text{V}_0$, V_0 為分組時該動物的瘤體積, V_t 為治療後該動物的瘤體積。);

【0075】 腫瘤增長抑制率的計算公式為： $\text{TGI}_{\Delta\text{TV}}\% = (1 - \Delta\text{T} / \Delta\text{C}) \times 100\%$ 。(其中, ΔT = 陽性對照組或治療組某一特定時間點的平均腫瘤體積 - 陽性對照組或治療組給藥起始的平均腫瘤體積, ΔC = 陰性對照組某一特定

時間點的平均腫瘤體積-陰性對照組給藥起始的平均腫瘤體積。)

【0076】 結果及結論：hAAG5D8 對人非小細胞肺癌模型腫瘤抑制作用分別如表 10 和圖 4 所示，其中表 10 為 hAAG5D8 對人非小細胞肺癌細胞的相對腫瘤抑制率和腫瘤增長抑制率，圖 4 為給藥後的腫瘤生長曲線圖。實驗結果表明，hAAG5D8 對人非小細胞肺癌腫瘤有顯著的抑制作用。

表 9 hAAG5D8 對人非小細胞肺癌腫瘤抑制活性研究給藥方案

組別	給藥對象	給藥組	給藥劑量 (mg/kg)	給藥方式	給藥體積	給藥週期
1	A-1 組	Human IgG1	5	靜脈注射	10μl/g	BIW×4 次
2	A-2 組	MPDL3820A	5	靜脈注射	10μl/g	BIW×4 次
3	A-3 組	hAAG5D8	5	靜脈注射	10μl/g	BIW×4 次

注：第 1 組為陰性對照組，第 2 組為陽性對照組，第 3 組為治療組。

表 10 hAAG5D8 對人非小細胞肺癌腫瘤細胞的相對腫瘤抑制率和腫瘤增長抑制率

給藥組	TGI _{RTV} (%)	TGI _{ΔTV} (%)
Human IgG1(5mg/kg)	--	--
MPDL3820A(5mg/kg)	25.3	49.5
hAAG5D8 (5mg/kg)	35.9	63.3

【0077】 實施例 6 hAAG5D8 對小鼠結直腸癌 MC38 轉基因小鼠皮下移植瘤療效的研究

【0078】 人 PD-1 的轉基因雌性 C57 小鼠 30 只(同濟大學動物實驗中心)，每只小鼠在左側腹皮下植入 3×10⁶ 個表達人 PD-L1 的小鼠結直腸癌細胞(同濟大學，細胞代號 MC38-hPD-L1)，待腫瘤體積生長至約 100 mm³ 左右時，將上述小鼠隨機分為 5 組：C-1 組(陰性對照組、PBS，6 只)、C-2 組(陽性對照組、Atezolizumab、3mg/kg，6 只)、C-3 組(給藥組、hAAG5D8、1mg/kg，6 只)、C-4 組(給藥組、hAAG5D8、3mg/kg，6 只)、C-5 組(給藥組、hAAG5D8、9mg/kg，6 只)，每週腹腔給藥 2 次，共 5 次。每週測兩次腫瘤體積，直至給藥開始後第 16 天。

【0079】 計算公式：

【0080】 腫瘤體積： $TV=D1 \times D2^2/2$ ，其中 $D1$ 、 $D2$ 分別表示瘤長徑、瘤短徑；

【0081】 相對腫瘤體積： $RTV=T_{VT}/T_{V1}$ ，其中 T_{V1} 為給藥前腫瘤體積， T_{VT} 為每次測量時腫瘤體積；

【0082】 相對腫瘤增殖率： $T/C(\%)=T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ ， T_{RTV} 表示給藥組或陽性對照組 RTV ， C_{RTV} 表示 陰性對照組 RTV ；

【0083】 相對腫瘤抑制率： $TGI_{RTV}(\%)=(1-T_{RTV}/C_{RTV}) \times 100\%$ 。

【0084】 結果及結論：hAAG5D8 對小鼠結直腸癌腫瘤抑制作用分別如表 11 和圖 5 所示，結果表明，在濃度為 3mg/kg 及以上劑量 hAAG5D8 對小鼠結直腸癌皮下移植瘤具有顯著的抑瘤作用。在同樣 3mg/kg 劑量時，抗 PD-L1 抗體的抑瘤作用已經顯著優於 Atezolizumab 的抑瘤效果。

表 11 給藥後荷瘤鼠腫瘤體積變化

組別	劑量 (mg/kg)	腫瘤體積 TV (mm^3)		$T_{RTV}/C_{RTV}(\%)$	$TGI_{RTV}(\%)$
		D0	D16		
PBS	--	99.9±13.2	1974.2±413.2	--	--
Atezolizuma b	3	95.9±16.8	1111.6± 435.2*	53	47
hAAG5D8	1	95.5±9.8	1138.8± 144.9*	64	36
hAAG5D8	3	90.7±12.4	664.8±92.0**	39	61
hAAG5D8	9	91.2±15.9	319.1± 190.4**	14	86

注：給藥當天定義為 D0；* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs PBS

參考文獻：

1. CHEN L, FLIES D B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition [J]. Nature reviews Immunology, 2013, 13(4): 227-42.
2. OHAEGBULAM K C, ASSAL A, LAZAR-MOLNAR E, et al. Human cancer immunotherapy

- with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway [J]. Trends in molecular medicine, 2015, 21(1): 24-33.
- ISHIDA M, IWAI Y, TANAKA Y, et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues [J]. Immunology letters, 2002, 84(1): 57-62.
4. TAUBE J M, ANDERS R A, YOUNG G D, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape [J]. Science translational medicine, 2012, 4(127): 127ra37.
5. TSENG S Y, OTSUJI M, GORSKI K, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells [J]. The Journal of experimental medicine, 2001, 193(7): 839-46.
6. BUTTE M J, KEIR M E, PHAMDUY T B, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses [J]. Immunity, 2007, 27(1): 111-22.
7. CHENG X, VEVERKA V, RADHAKRISHNAN A, et al. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor [J]. The Journal of biological chemistry, 2013, 288(17): 11771-85.
8. 劉安, PD-1/PD-L1 通路小分子抑制劑的發現[D], 吉林: 吉林大學藥學院, 2016, 15.

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

【序列表】(請換頁單獨記載)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

序列表

<110> 榮昌生物製藥（煙臺）有限公司（RemeGen (Yantai) Co., Ltd.）

<120> 抗 PD-L1 抗體及其應用

<130> CP0020-TW-0398

<150> CN201910805440.7

<160> 34

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Ser
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Ile Trp Gly Val Gly Thr Thr
1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Ala Arg Asn Trp Gly Thr Ala Asp Tyr Phe Asp Tyr

1510

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 4

Lys Ser Val His Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr

1510

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 5

Leu Ala Ser

1

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 6

Gln His Ser Gly Glu Leu Pro Tyr Thr

15

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 7

Arg Tyr Ser Val His

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

15

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 12

Gln His Ser Gly Glu Leu Pro Tyr Thr
15

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 13

Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
15

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 14

Trp Gly Val Gly Thr
15

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 15

Asn Trp Gly Thr Ala Asp Tyr Phe Asp Tyr

1	5	10	
<210>	16		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<400>	16		
Arg Ala Ser Lys Ser Val His Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His			
1	5	10	15
<210>	17		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<400>	17		
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser			
1	5		
<210>	18		
<211>	9		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<400>	18		
Gln His Ser Gly Glu Leu Pro Tyr Thr			
1	5		
<210>	19		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<400>	19		
Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Ser Val His			

1510

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 20

Met Ile Trp Gly Val Gly Thr Thr Asp
15

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 21

Asn Trp Gly Thr Ala Asp Tyr Phe Asp Tyr
1510

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 22

Arg Ala Ser Lys Ser Val His Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
151015

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 23

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

15

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 24

Gln His Ser Gly Glu Leu Pro Tyr Thr
15

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 25

Ser Arg Tyr Ser Val His
15

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 26

Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Val Gly Thr Thr Asp
1510

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 27

Ala Arg Asn Trp Gly Thr Ala Asp Tyr Phe Asp

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

1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu
Thr	Cys	Thr	Val
Ser	Gly	Phe	Ser
Leu	Ser	Arg	Tyr
20	25	30	
Ser	Val	His	Trp
Ile	Arg	Gln	Pro
Pro	Gly	Lys	Gly
Leu	Glu	Trp	Leu
35	40	45	
Gly	Met	Ile	Trp
Gly	Val	Gly	Thr
Thr	Asp	Tyr	Asn
Ser	Ala	Leu	Lys
50	55	60	
Ser	Arg	Leu	Thr
Ile	Ser	Lys	Asp
Thr	Ser	Lys	Asn
Gln	Phe	Ser	Leu
65	70	75	80
Lys	Leu	Ser	Ser
Val	Thr	Ala	Ala
Asp	Thr	Ala	Val
Tyr	Tyr	Cys	Ala
85	90	95	
Arg	Asn	Trp	Gly
Thr	Ala	Asp	Tyr
Phe	Asp	Tyr	Trp
Gly	Gln	Gly	Thr
100	105	110	
Thr	Val	Thr	Val
Ser	Ser	Ala	Ser
115	120		
<210>	32		
<211>	113		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<400>	32		
Asp	Ile	Val	Leu
Thr	Gln	Ser	Pro
Ala	Ser	Leu	Ala
Val	Ser	Pro	Gly
1	5	10	15
Gln	Arg	Ala	Thr
Ile	Thr	Cys	Arg
Ala	Ser	Lys	Ser
Val	His	Thr	Ser
20	25	30	

Gly	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
		35						40						45		
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	
	50							55						60		
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	
65						70						75				80
Pro	Val	Glu	Ala	Asn	Asp	Thr	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Gly	
					85						90					95
Glu	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	
				100						105						110
Thr																
<210> 33																
<211> 450																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<400> 33																
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
1					5						10					15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Arg	Tyr	
			20							25						30
Ser	Val	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	
			35							40						45

Gly Met Ile Trp Gly Val Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys			
50	55	60	
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Arg Asn Trp Gly Thr Ala Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
	115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
130	135	140	
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210	215	220	

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
	290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

- <210> 34
- <211> 220
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <400> 34

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val His Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln His Ser Gly

	85	90	95
Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
100	105	110	
Thr Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
115	120	125	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
130	135	140	
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
145	150	155	160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
165	170	175	
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
180	185	190	
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
195	200	205	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215	220	

修正日期 111 年 3 月 24 日

申請專利範圍

1. 一種分離的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，所述抗體或其抗原結合片段包括重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

(1) 重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：1-3 的氨基酸序列；和輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：4-6 的氨基酸序列；或

(2) 重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：7-9 的氨基酸序列；和輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：10-12 的氨基酸序列；或

(3) 重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：13-15 的氨基酸序列；和輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：16-18 的氨基酸序列；或

(4) 重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：19-21 的氨基酸序列；和輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：22-24 的氨基酸序列；或

(5) 重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：25-27 的氨基酸序列；和輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：28-30 的氨基酸序列。

2. 根據請求項 1 所述的抗體或其抗原結合片段，其中重鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：1-3；和輕鏈可變區 CDR 1-3 氨基酸序列為 SEQ ID NO：4-6。

3. 根據請求項 1 所述的抗體或其抗原結合片段，其中：

(1) 重鏈可變區的氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示；和

(2) 輕鏈可變區的氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示。

4. 根據請求項 3 所述的抗體或其抗原結合片段，其中：

(1) 重鏈的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示；和

(2) 輕鏈的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。

5. 根據請求項 1-4 任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體是單克隆抗體、嵌合抗體、人源化抗體、雙特異性抗體、多特異性抗體或 Fab 片段、F(ab') 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、dAb、Fd、單鏈抗體(scFv)。

6. 根據請求項 1-4 任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體是人源化單克隆抗體。

7. 根據請求項 1-4 任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其進一步包括人或

修正日期 111 年 3 月 24 日

鼠恒定區。

8.根據請求項 7 所述的抗體或其抗原結合片段，所述恒定區選自 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4。

9.根據請求項 8 所述的抗體或其抗原結合片段，所述恒定區是 IgG1，IgG2A，IgG2B。

10. 一種分離的多核苷酸，其編碼根據請求項 1-9 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段。

11. 一種分離的多核苷酸的組合，其包括：編碼請求項 1-9 中任一項所述抗體或其抗原結合片段之重鏈的多核苷酸和編碼請求項 1-9 中任一項所述抗體或其抗原結合片段之輕鏈的多核苷酸。

12.一種核酸構建體，其包含根據請求項 10 的多核苷酸。

13. 根據請求項 12 所述的核酸構建體，所述核酸構建體為載體。

14.一種宿主細胞，其包含請求項 12 所述的核酸構建體或請求項 13 的載體。

15. 根據請求項 14 所述的宿主細胞，所述細胞是 CHO 細胞、NS0 細胞、Sp2/0 細胞或 BHK 細胞。

16.一種抗體藥物偶聯物，其含有請求項 1-9 任一項中所述的抗體或其抗原結合部分及藥物毒素。

17.根據請求項 16 所述的抗體藥物偶聯物，所述藥物毒素選自毒素、多肽、酶、同位素、細胞因數。

18. 一種藥物組合物，包含請求項 1-9 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段和/或請求項 16 或 17 中所述的偶聯物，以及藥學上可接受的載體。

19. 一種製備抗 PD-L1 抗體的方法，其包括在適合表達編碼抗 PD-L1 抗體或抗原結合片段的載體的條件下培養請求項 14 或 15 所述的宿主細胞，並且回收所述抗體或片段。

20. 一種請求項 1-9 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段、請求項 10 的多核苷酸、請求項 11 的多核苷酸組合、請求項 12-13 的核酸構建體、請求項 16 或 17 的抗體藥物偶聯物、或請求項 18 的藥物組合物在製備用於治療 PD-L1 陽性癌症的藥物中的用途。

21. 根據請求項 20 所述的用途，其中所述癌症為實體瘤。

22. 根據請求項 21 所述的用途，其中所述實體瘤為肺癌、結直腸癌、乳腺

修正日期 111 年 3 月 24 日

癌、卵巢癌、黑色素瘤、膀胱癌、尿路上皮癌、腎癌、肝癌、唾液腺癌、胃癌、神經膠質瘤、甲狀腺癌、胸腺癌、上皮癌、頭和頸癌、胃癌、胰腺癌、Merkel 細胞癌。

23. 根據請求項 22 所述的用途，其中所述肺癌為非小細胞肺癌。

【發明圖式】

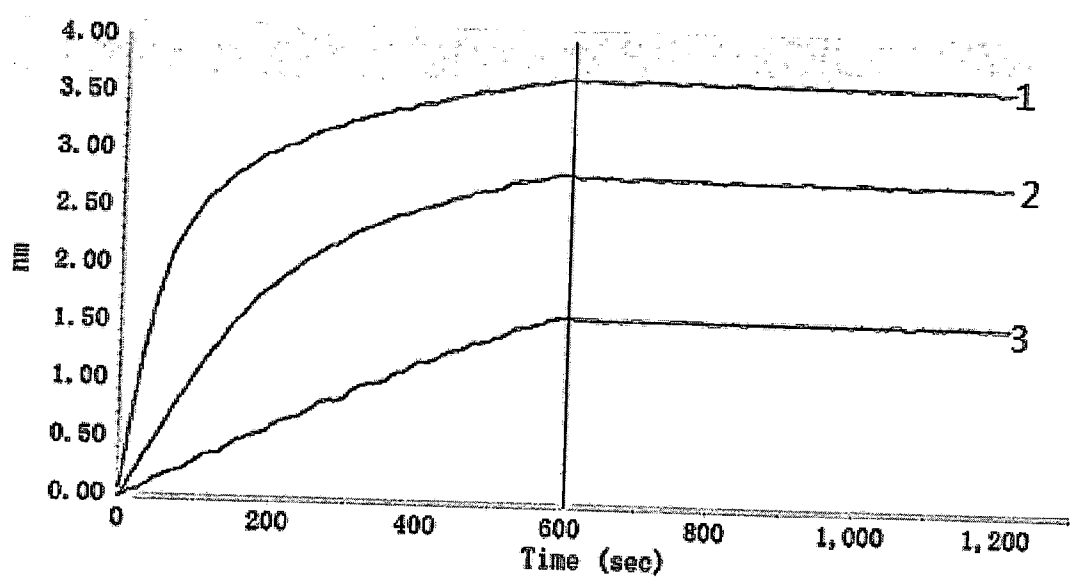


圖 1

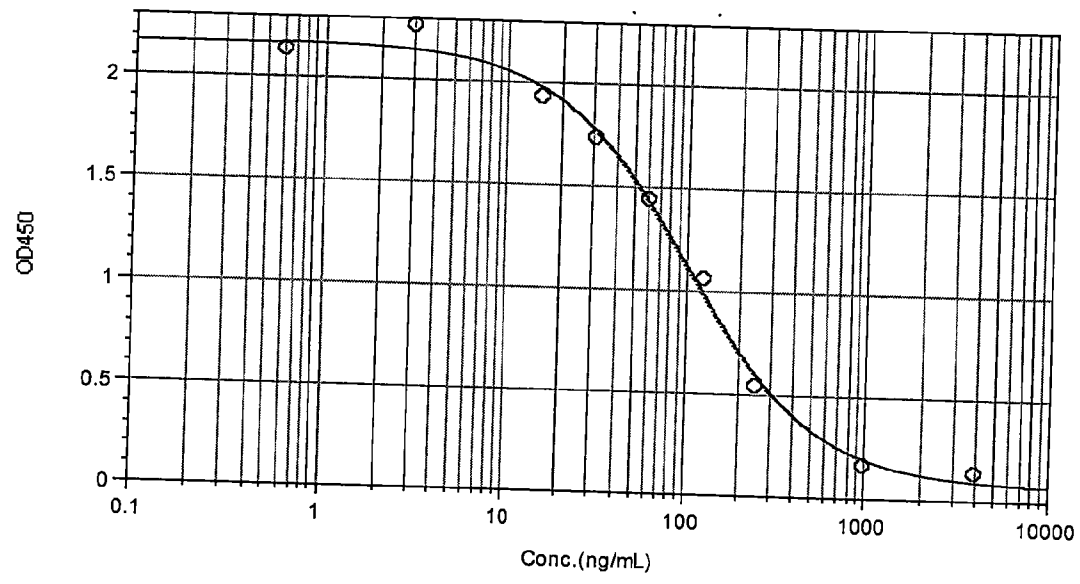


圖 2

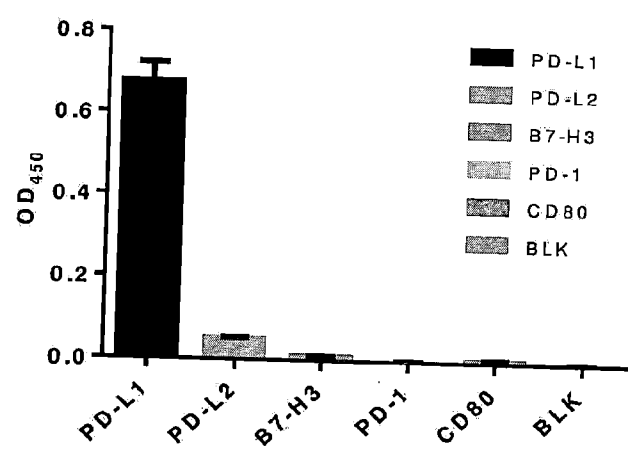


圖3

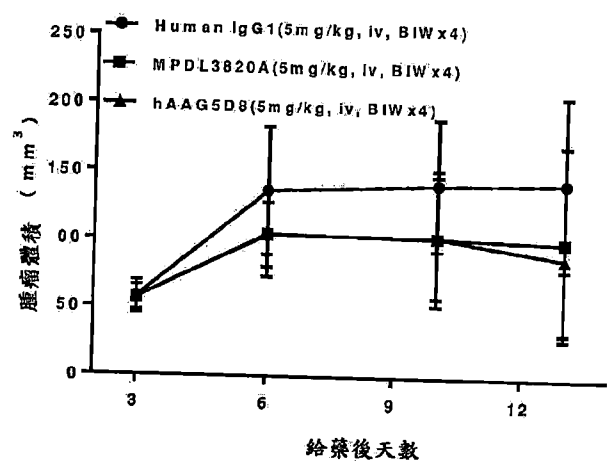


圖4

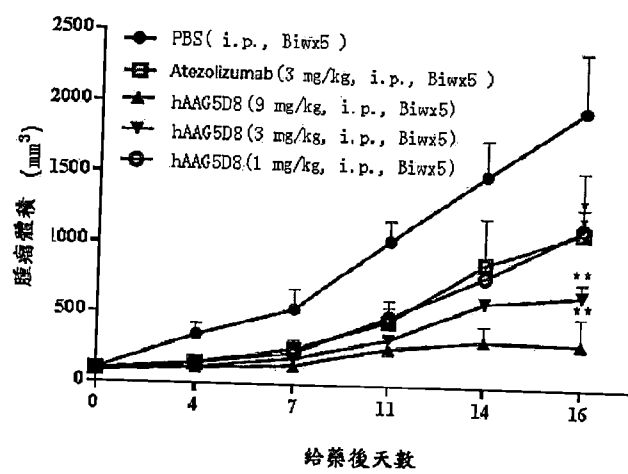


圖5