



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106967172 B

(45)授权公告日 2019.01.08

(21)申请号 201610705624.2

(22)申请日 2016.08.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106967172 A

(43)申请公布日 2017.07.21

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C2015105 2015.06.16

CCTCC NO:C201587 2015.06.16

(73)专利权人 康方药业有限公司

地址 510530 广东省广州市中新广州知识

城九佛建设路333号自编364室

(72)发明人 李百勇 夏瑜 王忠民 张鹏

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘海罗

(51)Int.Cl.

C07K 16/46(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

A61P 7/06(2006.01)

审查员 李晨

权利要求书3页 说明书38页

序列表16页 附图28页

(54)发明名称

抗CTLA4-抗PD-1 双功能抗体、其药物组合
物及其用途

(57)摘要

本发明属于肿瘤治疗和分子免疫学领域,涉及抗CTLA4-抗PD-1双功能抗体、其药物组合物及其用途。具体地,所述的抗CTLA4和PD-1的双功能抗体,包括:靶向PD-1的第一蛋白功能区,和靶向CTLA4的第二蛋白功能区。本发明的双功能抗体能够很好地特异性地与CTLA4和PD-1结合,特异地解除CTLA4和PD-1对机体免疫抑制,激活T淋巴细胞,具有良好的应用前景。

1. 一种双特异性抗体,其包括:

靶向PD-1的第一蛋白功能区,和

靶向CTLA4的第二蛋白功能区;

其中,所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白,所述第二蛋白功能区为单链抗体;或者,所述第一蛋白功能区为单链抗体,所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白;

其中,

所述的免疫球蛋白,其重链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:29-31所示的HCDR1-HCDR3,其轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:32-34所示的LCDR1-LCDR3;和所述的单链抗体,其重链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:35-37所示的HCDR1-HCDR3并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:38-40所示的LCDR1-LCDR3,或者所述的单链抗体,其重链包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:37所示的HCDR1-HCDR3并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:38-40所示的LCDR1-LCDR3,或者所述的单链抗体,其重链包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:42-44所示的HCDR1-HCDR3并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:45-47所示的LCDR1-LCDR3;

或者,

所述的免疫球蛋白,其重链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:35-37所示的HCDR1-HCDR3并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:38-40所示的LCDR1-LCDR3,或者其重链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:37所示的HCDR1-HCDR3并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:38-40所示的LCDR1-LCDR3,或者其重链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:42-44所示的HCDR1-HCDR3并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:45-47所示的LCDR1-LCDR3;和所述的单链抗体,其重链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:29-31所示的HCDR1-HCDR3,其轻链可变区包含氨基酸序列分别如SEQ ID NO:32-34所示的LCDR1-LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接。

3. 根据权利要求2所述的双特异性抗体,其中,所述连接片段为(GGGGS)_n,n为正整数。

4. 根据权利要求3所述的双特异性抗体,其中,所述n为1、2、3、4、5或6。

5. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。

6. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述免疫球蛋白为IgG、IgA、IgD、IgE或IgM。

7. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的C末端。

8. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,或者所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ

ID NO:22所示;和

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,或者所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,或者所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,或者所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,或者所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示;

或者

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,或者所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,或者所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,或者所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,或者所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示;和

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,或者所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示。

9. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,

所述的免疫球蛋白包括非-CDR区,且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种。

10. 根据权利要求9所述的双特异性抗体,其中,

所述非-CDR区来自人抗体。

11. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述的双特异性抗体以小于 10^{-5} M的 K_D 结合CTLA4蛋白和/或PD-1蛋白。

12. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述的双特异性抗体以小于 10^{-6} M的 K_D 结合CTLA4蛋白和/或PD-1蛋白。

13. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述的双特异性抗体以小于 10^{-7} M的 K_D 结合CTLA4蛋白和/或PD-1蛋白。

14. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述的双特异性抗体以小于 10^{-8} M的 K_D 结合CTLA4蛋白和/或PD-1蛋白。

15. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述的双特异性抗体以小于 10^{-9} M的 K_D 结合CTLA4蛋白和/或PD-1蛋白。

16. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述的双特异性抗体以小于 10^{-10} M的 K_D 结合CTLA4蛋白和/或PD-1蛋白。

17. 一种载体,其包含分离的核酸分子,其中,所述分离的核酸分子编码权利要求1至16

中任一权利要求所述的双特异性抗体。

18. 一种宿主细胞,其包含权利要求17所述的载体。

19. 制备权利要求1至16中任一权利要求所述的双特异性抗体的方法,其包括在合适的条件下培养权利要求18的宿主细胞,以及从细胞培养物中回收所述双特异性抗体的步骤。

20. 偶联物,其包括双特异性抗体以及偶联部分,其中,所述双特异性抗体为权利要求1至16中任一权利要求所述的双特异性抗体,所述偶联部分为可检测的标记。

21. 根据权利要求20所述的偶联物,其中,所述偶联部分为放射性同位素、发光物质、有色物质或酶。

22. 根据权利要求20所述的偶联物,其中,所述偶联部分为荧光物质。

23. 试剂盒,其包括权利要求1至16中任一权利要求所述的双特异性抗体,或者包括权利要求20至22中任一权利要求所述的偶联物。

24. 根据权利要求23所述的试剂盒,其中,所述试剂盒还包括第二抗体,其特异性识别所述双特异性抗体。

25. 根据权利要求24所述的试剂盒,其中,所述第二抗体还包括可检测的标记。

26. 根据权利要求25所述的试剂盒,其中,所述可检测的标记为放射性同位素、发光物质、有色物质或酶。

27. 根据权利要求25所述的试剂盒,其中,可检测的标记为荧光物质。

28. 一种药物组合物,其包含权利要求1至16中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求20至22中任一权利要求所述的偶联物。

29. 根据权利要求28所述的药物组合物,其还包括药学上可接受的载体。

30. 根据权利要求28所述的药物组合物,其还包括药学上可接受的赋形剂。

31. 权利要求1至16中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求20至22中任一权利要求所述的偶联物在制备预防或治疗肿瘤的药物中的用途;其中,所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌和卵巢癌。

抗CTLA4-抗PD-1 双功能抗体、其药物组合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤治疗和分子免疫学领域,涉及一种抗CTLA4-抗PD-1双功能抗体、其药物组合物及其用途。具体地,本发明涉及一种抗CTLA4-抗PD-1的单克隆抗体。

背景技术

[0002] 细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte sociated antigen 4,亦简称为CTLA4)与CD28分子在基因结构、染色体定位、序列的同源性及其基因表达具有十分相近的关系,都是共刺激分子B7的受体,主要表达于被激活T细胞表面。CTLA4与B7结合后能抑制小鼠和人T细胞的激活,在T细胞活化中起负调节作用。

[0003] CTLA4mAb或CTLA4配体可以阻止CTLA4与其天然配体结合,从而封闭CTLA4对T细胞负性调节信号的传导,增强T细胞对各种抗原的反应性,在这方面体内与体外研究结果基本一致。目前已有CTLA4mAb处于临床试验阶段用于治疗前列腺癌,膀胱癌,结肠直肠癌,胃肠道癌,肝癌,恶性黑色素瘤等(Grosso JF.,Jure-Kunkel MN.,CTLA-4blockade in tumor models:an overview of preclinical and translational research.Cancer Immun.2013;13:5.Epub 2013Jan 22)。

[0004] 白细胞介素2(IL-2)由T细胞产生,是调节T细胞亚群的生长因子,也是调控免疫应答的重要因子,并可促进活化B细胞增殖,参与抗体反应、造血和肿瘤监视。重组的人IL-2已经被美国FDA批准用于治疗恶性肿瘤(包括黑色素瘤、肾肿瘤等),同时正在进行治疗慢性病毒感染临床研究(Chavez,A.R.,et al.,Pharmacologic administration of interleukin-2.Ann N Y Acad Sci,2009.1182:p.14-27)。体外实验中,CTLA4mAb可特异地解除CTLA4对机体免疫抑制,激活T细胞,诱导IL-2产生,在抗肿瘤及寄生虫等疾病的基因治疗中有广泛应用前景。

[0005] CTLA4及CTLA4mAb作为T细胞功能状况的重要影响因素,通过干预机体免疫微环境,可对疾病产生特异性治疗作用,并发挥较高疗效,补充传统用药的不足,由此开辟基因治疗的新途径。CTLA4及CTLA4mAb应用于试验及临床各阶段:如在自身免疫性疾病中有效抑制哮喘动物模型的气道高反应性、阻止风湿性疾病的发展以及在同种异体移植中介导机体免疫耐受等。但同时,尽管生物基因治疗在短期临床试验研究中未发现不良反应,我们亦应注意到其长期应用所存在的潜在影响,如CTLA4mAb过度阻断CTLA4-B7信号则可导致自身免疫性疾病的发生。由于抗体可以特异结合其配体并导致靶细胞溶解或阻断病理进程,所以抗体尤其人源性抗体药物的开发利用对人类恶性肿瘤及其他免疫性疾病临床治疗有重要意义。

[0006] 跨膜受体PD-1(程序性细胞死亡-1)是CD28基因家族成员之一,在活化的T细胞,B细胞以及骨髓系细胞都有表达。PD-1的受体PDL1和PDL2均属于B7超家族,其中PDL1多种细胞都有表达,包括T细胞,B细胞以及内皮细胞和上皮细胞,PDL2则仅表达于抗原呈递细胞如树突状细胞和巨噬细胞。

[0007] T细胞对清除病毒感染起着非常重要的作用,但T细胞抗病毒反应通常与免疫病理

相关。PD-1在负调节T细胞的活化过程中起着非常重要的作用,PD-1介导的对T细胞负调节作用可减少促感染过程引起的组织损伤,但是阻断或抑制PD-1的负调节作用可导致自身免疫性疾病,例如,PD-1基因敲除小鼠能更有效的清除胰腺病毒感染,但是却导致了更严重的肝脏损伤(Isai et al.,2003,J.Exp.Med.198:39-50)。另外,高表达PD-1的肿瘤伴随着很难被检测到的癌症(Hamanishi et al.,2007,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104:3360-5)。一种实施有效的方法是通过体内注射抗体对PD-1的表达进行调控。

[0008] 由于PD-1抗体的广谱抗肿瘤前景和惊人的药效,业界普遍认为针对PD-1通路的抗体将带来治疗多种肿瘤治疗的突破性的进展:用于治疗非小细胞性肺癌,肾细胞癌,卵巢癌,黑色素瘤(Homet M.B.,Parisi G.,et al.,Anti-PD-1Therapy in Melanoma.Semin Oncol.2015Jun;42(3):466-473),白血病以及贫血病(Held SA,Heine A,et al.,Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML.CurrCancer Drug Targets.2013Sep;13(7):768-74)。在2012年和2013年的美国癌症协会(AACR)年会以及美国临床肿瘤协会(ASCO)年会上揭晓的前所未有的临床药效数据后,既成为全球制药行业最炙手可热的在研新药。

[0009] 此外,干扰素 γ (IFN γ),主要由自然杀伤细胞(NK),自然杀伤T细胞(NKT)先天产生,和由CD4Th1细胞和CD8细胞毒性T淋巴细胞(CTL)这些效应T细胞经由特定抗原刺激后产生。IFN γ 作为一种重要的先天性和获得性免疫细胞因子在对抗或抑制肿瘤,病毒,某些细菌和原虫性疾病感染起着重要作用。同时,IFN γ 能激活巨噬细胞,诱导II类主要组织相容性复合体(MHC)的表达激活免疫反应控制肿瘤的发展(SchoenbornJR,Wilson CB.Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses.Advances in Immunology 2007;96:41-101)。

[0010] 单克隆抗体目前已被用于治疗癌症,炎症和感染性疾病和其它疾病,大部分是单特异性的,然而,有些疾病在成因上以及体内的影响因素通常是多方面的,包括在不同的信号通路中,不同的蛋白、细胞因子和受体等的上调或者下调,抑制或促进体内机能作用。因此,多种不同的因素阻断可以改善治疗效果。这可以通过组合不同的药物,或者使用替代合不同药物如采用多特异性抗体的多重靶向策略来实现。

[0011] 双功能抗体亦称为双特异性抗体(Bispecific Antibody),是同时靶向两种不同抗原的特异性药物,其可通过免疫分选纯化生产。另外,也可通过基因工程获得,基因工程在结合位点优化,合成形式的考量以及产量等方面都具有相应的灵活性,所以具有一定的优势。目前,其存在形式已被证明有超过45种(Müller D,Kontermann RE.Bispecific antibodies for cancer immunotherapy:Current perspectives.BioDrugs2010;24:89-98)。目前已开发的多种双特异性抗体为IgG-ScFv形式即Morrison模式(1997Coloma MJ,Morrison SL.Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies.Nat Biotechnol.Nature Biotechnology,1997;15:159-163),由于这种类似于天然存在的IgG形式,其在抗体工程、表达和纯化上所具有的优势,已被证明是双功能抗体的其中一种理想存在形式(Miller BR,Demarest SJ,et al.,Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies.Protein Eng Des Sel 2010;23:549-57;Fitzgerald J,Lugovskoy A.Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways.MAbs 2011;3:299-

309)。

[0012] 然而,目前市场上甚至还没有靶向同一类细胞上两个以上靶点的双功能抗体,目前世界上有的是针对两种不同细胞表面分子的抗体。需要开发同时抗PD-1和CTLA4的双功能抗体药物。

发明内容

[0013] 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动,利用哺乳动物细胞表达系统分别表达出重组的CTLA4和PD-1作为抗原免疫小鼠,经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。发明人通过进行对大量样本的筛选,分别得到了如下的杂交瘤细胞株:

[0014] 杂交瘤细胞株LT002 (CTLA4-4G10),其于2015年6月16日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C201587;以及

[0015] 杂交瘤细胞株LT003 (PD-1-14C12),其于2015年6月16日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C2015105。

[0016] 本发明人惊奇地发现:

[0017] 杂交瘤细胞株LT002能够分泌产生与CTLA4特异性结合的特异性单克隆抗体(命名为4G10),并且该单克隆抗体能够十分有效地阻断CTLA4与B7的结合;

[0018] 杂交瘤细胞株LT003能够分泌产生与PD-1特异性结合的特异性单克隆抗体(命名为14C12),并且该单克隆抗体能够十分有效地阻断PD-1与PDL1的结合。

[0019] 进一步地,本发明人创造性地制得了抗CTLA4的人源化抗体(分别命名为4G10H1L1、4G10H3L3、4G10H4L3和8D2H14L2)和抗PD-1的人源化抗体(命名为14C12H1L1)。

[0020] 进一步地,本发明人创造性地将两类人源化抗体进行蛋白重组融合成新的抗体,获得了能够结合CTLA4和PD-1,阻断CTLA4与B7、PD-1与PDL1的结合的人源化双功能抗体(分别命名为BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007和BiAb010),能有效地结合人T细胞,并且激活T细胞,诱导人淋巴细胞分泌IFN- γ 和IL-2;具有用于制备防治肺癌、黑色素瘤、肾肿瘤、卵巢癌、白血病等癌症的药物的潜力。

[0021] 由此提供了下述发明:

[0022] 本发明的一个方面涉及一种双特异性抗体,其包括:

[0023] 靶向PD-1的第一蛋白功能区,和

[0024] 靶向CTLA4的第二蛋白功能区。

[0025] 在本发明的一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接;优选地,所述连接片段为(GGGGS) n , n 为正整数,例如1、2、3、4、5或6。

[0026] 在本发明的一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中,

[0027] 所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为免疫球蛋白或其抗原结合片段,例如半抗体、Fab、F(ab')₂或单链抗体;

[0028] 优选地,所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白,所述第二蛋白功能区为单链抗体;或者

[0029] 优选地,所述第一蛋白功能区为单链抗体,所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白。

[0030] 在本发明的一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和

第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。

[0031] 在本发明的一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中,所述免疫球蛋白为IgG、IgA、IgD、IgE或IgM;优选为IgG,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0032] 在本发明的一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中,所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的C末端。由于免疫球蛋白由两条重链,因此,一个免疫球蛋白分子连接有两个单链抗体分子。优选地,两个单链抗体分子相同。

[0033] 在本发明的一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中:

[0034] 所述的免疫球蛋白,其重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:29-31的CDR,其轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:32-34的CDR;和/或

[0035] 所述的单链抗体,其重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:35-37的CDR或者包含氨基酸序列为SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:37的CDR或者包含氨基酸序列为SEQ ID NO:42-44的CDR,其轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:38-40的CDR或者包含氨基酸序列为SEQ ID NO:45-47的CDR;

[0036] 在本发明的另一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中:

[0037] 所述的免疫球蛋白,其重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:35-37的CDR或者包含氨基酸序列为SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:37的CDR或者包含氨基酸序列为SEQ ID NO:42-44的CDR,其轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:38-40的CDR或者包含氨基酸序列为SEQ ID NO:45-47的CDR;和/或

[0038] 所述的单链抗体,其重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:29-31的CDR,其轻链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:32-34的CDR。

[0039] 在本发明的一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中:

[0040] 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20;所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:22;和/或

[0041] 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:25;所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:27;

[0042] 在本发明的另一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中:

[0043] 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:25;所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:27;和/或

[0044] 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20;所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:22。

[0045] 在本发明的一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中,

[0046] 所述的免疫球蛋白包括非-CDR区,且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种,例如来自人抗体。

[0047] 在本发明的一个实施方案中,所述免疫球蛋白的恒定区是人源化的,例如,重链恒定区均采用Ig gamma-1chain C region,ACCESSION:P01857;轻链恒定区均采用Ig kappa chain C region,ACCESSION:P01834。

[0048] 在本发明的一个实施方案中,所述的双特异性抗体,其中,所述的双特异性抗体以

小于大约 10^{-5} M,例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的 K_D 结合CTLA4蛋白和/或PD-1蛋白。

[0049] 本发明还涉及一种双特异性抗体,其重链可变区包含:

[0050] 氨基酸序列为SEQ ID NO:29-31的CDR、

[0051] 氨基酸序列为SEQ ID NO:35-37的CDR或者氨基酸序列为SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:37的CDR或者氨基酸序列为SEQ ID NO:42-44的CDR,和

[0052] 氨基酸序列为SEQ ID NO:32-34的CDR或者氨基酸序列为SEQ ID NO:38-40的CDR或者氨基酸序列为SEQ ID NO:45-47的CDR;

[0053] 并且其轻链可变区包含:

[0054] 氨基酸序列为SEQ ID NO:32-34的CDR,

[0055] 氨基酸序列为SEQ ID NO:38-40的CDR,或者

[0056] 氨基酸序列为SEQ ID NO:45-47的CDR;

[0057] 优选地,轻链可变区的CDR与重链可变区包含的CDR不相同。

[0058] 本发明的另一方面涉及分离的核酸分子,其包含能够编码抗体重链可变区的核酸序列,其中,

[0059] 所述抗体的重链可变区包含:

[0060] 氨基酸序列为SEQ ID NO:29-31的CDR、

[0061] 氨基酸序列为SEQ ID NO:35-37的CDR或者氨基酸序列为SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:37的CDR或者氨基酸序列为SEQ ID NO:42-44的CDR,和

[0062] 氨基酸序列为SEQ ID NO:32-34的CDR或者氨基酸序列为SEQ ID NO:38-40的CDR或者氨基酸序列为SEQ ID NO:45-47的CDR。

[0063] 本发明还涉及分离的核酸分子,其包含能够编码抗体轻链可变区的核酸序列,其中,

[0064] 所述抗体轻链可变区包含:

[0065] 氨基酸序列为SEQ ID NO:32-34的CDR,

[0066] 氨基酸序列为SEQ ID NO:38-40的CDR,或者

[0067] 氨基酸序列为SEQ ID NO:45-47的CDR。

[0068] 本发明的再一方面涉及一种载体,其包含本发明的分离的核酸分子。

[0069] 本发明的再一方面涉及一种宿主细胞,其包含本发明的分离的核酸分子,或者本发明的载体。

[0070] 本发明的再一方面涉及制备本发明的双特异性抗体的方法,其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞,以及从细胞培养物中回收所述双特异性抗体的步骤。

[0071] 本发明的再一方面涉及偶联物,其包括双特异性抗体以及偶联部分,其中,所述双特异性抗体为本发明的双特异性抗体,所述偶联部分为可检测的标记;具体地,所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

[0072] 本发明的再一方面涉及试剂盒,其包括本发明的双特异性抗体,或者包括本发明的偶联物;

[0073] 具体地,所述试剂盒还包括第二抗体,其特异性识别所述双特异性抗体;任选地,所述第二抗体还包括可检测的标记,例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或

酶。

[0074] 本发明的再一方面涉及本发明的双特异性抗体在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测CTLA4和/PD-1在样品中的存在或其水平。

[0075] 本发明的再一方面涉及一种药物组合物,其包含本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物;可选地,其还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0076] 本发明的再一方面涉及本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗和/或诊断肿瘤或者贫血病的药物中的用途;具体地,所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

[0077] 本发明的再一方面涉及本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备如下药物中的用途:

[0078] 检测样品中的CTLA4水平的药物,

[0079] 阻断CTLA4与B7结合的药物,

[0080] 调节(例如下调)CTLA4活性或CTLA4水平的药物,

[0081] 解除CTLA4对机体免疫抑制的药物,

[0082] 激活T淋巴细胞的药物,或者

[0083] 提高T淋巴细胞中IL-2表达的药物;

[0084] 和/或

[0085] 阻断PD1与PDL1结合的药物,

[0086] 调节(例如下调)PD1活性或水平的药物,

[0087] 解除PD1对机体免疫抑制的药物,或者

[0088] 提高T淋巴细胞中IFN- γ 表达的药物。

[0089] 本发明的再一方面涉及一种在体内或体外方法,包括施加细胞以有效量的本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物的步骤,所述方法选自如下:

[0090] 检测样品中的CTLA4水平的方法,

[0091] 阻断CTLA4与B7结合的方法,

[0092] 调节(下调)CTLA4活性或CTLA4水平的方法物,

[0093] 解除CTLA4对机体免疫抑制的方法,

[0094] 激活T淋巴细胞的方法,或者

[0095] 提高T淋巴细胞中IL-2表达的方法;

[0096] 和/或

[0097] 阻断PD1与PDL1结合的方法,

[0098] 调节(例如下调)PD1活性或水平的方法,

[0099] 解除PD1对机体免疫抑制的方法,或者

[0100] 提高T淋巴细胞中IFN- γ 表达的方法。

[0101] 本发明的体外实验中,抗CTLA4抗体、抗PD1抗体及抗CTLA4-抗PD1双功能抗体均能诱导IFN γ 的分泌激活免疫反应。

[0102] 本发明的再一方面涉及一种预防和/或治疗和/或辅助治疗和/或诊断肿瘤的方法,包括给予受试者有效量的本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物的

步骤;具体地,所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

[0103] 根据本发明中任一项所述的双特异性抗或者偶联物,其用于预防和/治疗和/或辅助治疗和/或诊断肿瘤;具体地,所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

[0104] 根据本发明中任一项所述的双特异性抗体或者偶联物,其用于:

[0105] 阻断CTLA4与B7结合,

[0106] 调节(例如下调)CTLA4活性或CTLA4水平,

[0107] 解除CTLA4对机体免疫抑制的,或者

[0108] 激活T淋巴细胞的药物或者提高T淋巴细胞中IL-2表达;

[0109] 和/或

[0110] 阻断PD1与PDL1结合,

[0111] 调节(例如下调)PD1活性或水平,

[0112] 解除PD1对机体免疫抑制,或者

[0113] 提高T淋巴细胞中IFN- γ 表达。

[0114] 抗体治疗药物,特别是单克隆抗体(MAB)已在多种疾病的治疗中取得了良好的疗效。获取这些治疗性抗体的传统实验方法是采用抗原免疫动物,在免疫动物体内获取靶向抗原的抗体,或通过亲和力成熟的方法来改进那些与抗原的亲和力较低的抗体。然而,这些方法需要大量时间和精力,大多数时候也并不能针对抗原上的特定表位。

[0115] 轻链和重链的可变区决定抗原的结合;每条链的可变区均含有三个高变区,称互补决定区(CDR)(重链(H)的CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3,轻链(L)的CDR包含LCDR1、LCDR2、LCDR3;其由Kabat等人命名,见Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition(1991),第1-3卷,NIH Publication 91-3242,Bethesda Md)。

[0116] 通过本领域技术人员所熟知的技术手段,例如通过VBASE2数据库分析下面的(1)-(13)项中的单克隆抗体序列的CDR区的氨基酸序列,结果如下:

[0117] (1) 14C12

[0118] 重链可变区的氨基酸序如SEQ ID NO:16所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。

[0119] 其重链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0120] HCDR1:GFAFSSYD(SEQ ID NO:29)

[0121] HCDR2:ISGGGRYT(SEQ ID NO:30)

[0122] HCDR3:ANRYGEAWFAY(SEQ ID NO:31)

[0123] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0124] LCDR1:QDINTY(SEQ ID NO:32)

[0125] LCDR2:RAN(SEQ ID NO:33)

[0126] LCDR3:LQYDEFPLT(SEQ ID NO:34)

[0127] (2) 14C12H1L1

[0128] 重链可变区的氨基酸序如SEQ ID NO:20所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示。

[0129] 其重链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与14C12相同。

[0130] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与14C12相同。

[0131] (3) 4G10

[0132] 重链可变区的氨基酸序如SEQ ID NO:2所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;

[0133] 其重链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0134] HCDR1:GYSFTGYT (SEQ ID NO:35)

[0135] HCDR2:INPYNNIT (SEQ ID NO:36)

[0136] HCDR3:ARLDYRSY (SEQ ID NO:37)

[0137] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0138] LCDR1:TGAVTTSNF (SEQ ID NO:38)

[0139] LCDR2:GTN (SEQ ID NO:39)

[0140] LCDR3:ALWYSNHWV (SEQ ID NO:40)

[0141] (4) 4G10H1L1

[0142] 重链可变区的氨基酸序如SEQ ID NO:6所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示;

[0143] 其重链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与4G10相同。

[0144] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与4G10相同。

[0145] (5) 4G10H3L3

[0146] 重链可变区的氨基酸序如SEQ ID NO:10所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示;

[0147] 其重链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与4G10相同。

[0148] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与4G10相同。

[0149] (6) 4G10H4L3

[0150] 重链可变区的氨基酸序如SEQ ID NO:14所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示。

[0151] 其重链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0152] HCDR1:GYSFTGYT (SEQ ID NO:35)

[0153] HCDR2:INPYNDIT (SEQ ID NO:41)

[0154] HCDR3:ARLDYRSY (SEQ ID NO:37)

[0155] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与4G10相同。

[0156] (7) 8D2H14L2

[0157] 重链可变区的氨基酸序如SEQ ID NO:25所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示。

[0158] 其重链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

[0159] HCDR1:GFTFSDNW (SEQ ID NO:42)

[0160] HCDR2:IRNKPYNYET (SEQ ID NO:43)

[0161] HCDR3:TAQFAY (SEQ ID NO:44)

[0162] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

- [0163] LCDR1:ENIYGG (SEQ ID NO:45)
- [0164] LCDR2:GAT (SEQ ID NO:46)
- [0165] LCDR3:QNVLRSPFTF (SEQ ID NO:47)
- [0166] (8) BiAb001
- [0167] 其重链可变区的9个CDR区的氨基酸序列如下:
- [0168] HCDR1:GFAFSSYD (SEQ ID NO:29)
- [0169] HCDR2:ISGGGRYT (SEQ ID NO:30)
- [0170] HCDR3:ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO:31)
- [0171] HCDR4:GYSFTGYT (SEQ ID NO:35)
- [0172] HCDR5:INPYNNIT (SEQ ID NO:36)
- [0173] HCDR6:ARLDYRSY (SEQ ID NO:37)
- [0174] HCDR7:TGAVTTSNF (SEQ ID NO:38)
- [0175] HCDR8:GTN (SEQ ID NO:39)
- [0176] HCDR9:ALWYSNHWV (SEQ ID NO:40)
- [0177] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:
- [0178] LCDR1:QDINTY (SEQ ID NO:32)
- [0179] LCDR2:RAN (SEQ ID NO:33)
- [0180] LCDR3:LQYDEFPLT (SEQ ID NO:34)
- [0181] (9) BiAb002
- [0182] 其重链可变区的9个CDR区的氨基酸序列与BiAb001相同。
- [0183] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与BiAb001相同。
- [0184] (10) BiAb003
- [0185] 其重链可变区的9个CDR区的氨基酸序列与BiAb001相同。
- [0186] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与BiAb001相同。
- [0187] (11) BiAb004
- [0188] 其重链可变区的9个CDR区的氨基酸序列与BiAb001相同。
- [0189] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与BiAb001相同。
- [0190] (12) BiAb007
- [0191] 其重链可变区的9个CDR区的氨基酸序列如下:
- [0192] HCDR1:GFAFSSYD (SEQ ID NO:29)
- [0193] HCDR2:ISGGGRYT (SEQ ID NO:30)
- [0194] HCDR3:ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO:31)
- [0195] HCDR4:GYSFTGYT (SEQ ID NO:35)
- [0196] HCDR5:INPYNDIT (SEQ ID NO:41)
- [0197] HCDR6:ARLDYRSY (SEQ ID NO:37)
- [0198] HCDR7:TGAVTTSNF (SEQ ID NO:38)
- [0199] HCDR8:GTN (SEQ ID NO:39)
- [0200] HCDR9:ALWYSNHWV (SEQ ID NO:40)
- [0201] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与BiAb001相同。

[0202] (13) BiAb010

[0203] 其重链可变区的9个CDR区的氨基酸序列如下：

[0204] HCDR1:GFAFSSYD (SEQ ID NO:29)

[0205] HCDR2:ISGGGRYT (SEQ ID NO:30)

[0206] HCDR3:ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO:31)

[0207] HCDR4:GFTFSDNW (SEQ ID NO:42)

[0208] HCDR5:IRNKPYNYET (SEQ ID NO:43)

[0209] HCDR6:TAQFAY (SEQ ID NO:44)

[0210] HCDR7:ENIYGG (SEQ ID NO:45)

[0211] HCDR8:GAT (SEQ ID NO:46)

[0212] HCDR9:QNVLRSPFTF (SEQ ID NO:47)

[0213] 其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列与BiAb001相同。

[0214] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0215] 如本文中所使用的,当提及CTLA4蛋白 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) 的氨基酸序列时,其包括CTLA4蛋白的全长,或者CTLA4的胞外片段CTLA4ECD或者包含CTLA4ECD的片段;还包括CTLA4ECD的融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段 (mFc或hFc) 进行融合的片段。然而,本领域技术人员理解,在CTLA4蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异 (包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“CTLA4蛋白”应包括所有此类序列,包括其天然或人工的变体。并且,当描述CTLA4蛋白的序列片段时,其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

[0216] 如本文中所使用的,当提及PD-1蛋白 (Programmed cell death protein 1,NCBI GenBank:NM_005018) 的氨基酸序列时,其包括PD-1蛋白的全长,或者PD-1的胞外片段PD-1ECD或者包含PD-1ECD的片段;还包括PD-1ECD的融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段 (mFc或hFc) 进行融合的片段。然而,本领域技术人员理解,在PD-1蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异 (包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“PD-1蛋白”应包括所有此类序列,包括其天然或人工的变体。并且,当描述PD-1蛋白的序列片段时,其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

[0217] 如本文中所使用的,如果没有特别说明,所述B7为B7-1和/或B7-2; 其具体蛋白序列为现有技术中已知序列,可以参考现有文献或者GenBank中公开的序列。例如,B7-1 (CD80,NCBI Gene ID:941);B7-2 (CD86,NCBI Gene ID:942)。

[0218] 如本文中所使用的,术语EC₅₀是指半最大效应浓度 (concentration for 50% of maximal effect),是指能引起50%最大效应的浓度。

[0219] 如本文中所使用的,术语“抗体”是指,是指通常由两对多肽链 (每对具有一条“轻” (L) 链和一条“重” (H) 链) 组成的免疫球蛋白分子。从一般意义上,重链可以理解为抗体中分子量较大的多肽链,轻链是指抗体中分子量较小的多肽链。轻链可分为κ和λ轻链。重链通常可分为μ、δ、γ、α或ε,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链

和重链内,可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由3个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,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($C1q$)的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987and 1991)),或Chothia& Lesk(1987) J.Mol.Biol.196:901-917;Chothia等人(1989) Nature 342:878-883的定义。特别地,重链还可以包含3个以上CDR,例如6、9、或12个。例如在本发明的双功能抗体中,重链可以是IgG抗体的重链的C端连接另一个抗体的ScFv,这种情况下重链含有9个CDR。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如,其包括,特别地,重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体,例如,IgG(例如,IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚型),IgA1,IgA2,IgD,IgE或IgM抗体。

[0220] 如本文中所使用的,术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽,其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力,和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合,其也被称为“抗原结合部分”。通常参见,Fundamental Immunology,Ch.7 (Paul,W.,ed.,第2版,Raven Press,N.Y.(1989),其以其全文通过引用合并入本文,用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下,抗原结合片段包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fd、Fv、dAb和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如,scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽,其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

[0221] 如本文中所使用的,术语“Fd片段”意指由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段;术语“Fv片段”意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段;术语“dAb片段”意指由 V_H 结构域组成的抗体片段(Ward等人,Nature 341:544-546(1989));术语“Fab片段”意指由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段;术语“ $F(ab')_2$ 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的抗体片段。

[0222] 在一些情况下,抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如,scFv),其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见,例如,Bird等人,Science 242:423-426(1988)和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988))。此类scFv分子可具有一般结构: NH_2 - V_L -接头- V_H - $COOH$ 或 NH_2 - V_H -接头- V_L - $COOH$ 。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄的接头,但也可使用其变体(Holliger等人(1993),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448)。可用于本发明的其他接头由Alfthan等人(1995),Protein Eng.8:725-731,Choi等人(2001),Eur.J.Immunol.31:94-106,Hu等人(1996),Cancer Res.56:3055-3061,Kipriyanov等人(1999),J.Mol.Biol.293:41-56和Roovers等人(2001),Cancer Immunol.描述。

[0223] 在一些情况下,抗体的抗原结合片段是双抗体,即,双价抗体,其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见,例如,Holliger P.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993),和Poljak R.J.等人,Structure 2:1121-1123(1994))。

[0224] 可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如,重组DNA技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体获得抗体的抗原结合片段(例如,上述抗体片段),并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

[0225] 在本文中,除非上下文明确指出,否则当提及术语“抗体”时,其不仅包括完整抗体,而且包括抗体的抗原结合片段。

[0226] 如本文中所使用的,术语“单抗”和“单克隆抗体”是指,来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片断,也即除可能自发出现的自然突变外,一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的,其通常包含至少2种或更多种的不同抗体,这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用Kohler等首次报道的杂交瘤技术获得(Nature,256:495,1975),但也可采用重组DNA技术获得(如参见U.S.P.4,816,567)。

[0227] 如本文中所使用的,术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体(其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类),且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体(其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类),但无论如何,其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S.P.4,816,567to Cabilly et al.;Morrison et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。

[0228] 如本文中所使用的,术语“人源化抗体”是指,人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分CDR区被一非人源抗体(供体抗体)的CDR区替换后得到的抗体或抗体片段,其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如,小鼠、大鼠或兔)抗体。此外,受体抗体的构架区(FR)的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换,或被其他抗体的氨基酸残基替换,以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容,可参见例如,Jones et al.,Nature,321:522-525(1986);Reichmann et al.,Nature,332:323-329(1988);Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596(1992);和Clark,Immunol.Today 21:397-402(2000)。

[0229] 如本文中所使用的,术语“表位”是指,抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如,表位通常以独特的空间构象包括至少3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14或15个连续或非连续的氨基酸,其可以是“线性的”或“构象的”。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,Ed.(1996)。在线性表位中,蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中,相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

[0230] 如本文中所使用的,术语“分离的”或“被分离的”指的是,从天然状态下经人工手

段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分,那么可能是其所处的天然环境发生了改变,或从天然环境下分离出该物质,或二者情况均有发生。例如,某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽,而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质,也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

[0231] 如本文中所使用的,术语“大肠杆菌表达系统”是指由大肠杆菌(菌株)与载体组成的表达系统,其中大肠杆菌(菌株)来源于市场上可得到的菌株,例如但不限于:GI698, ER2566, BL21 (DE3), B834 (DE3), BLR (DE3)。

[0232] 如本文中所使用的,术语“载体(vector)”是指,可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时,载体称为表达载体。载体可以通过转化,转导或者转染导入宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的,包括但不限于:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色体,例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于,逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件,包括但不限于,启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,载体还可含有复制起始位点。

[0233] 如本文中所使用的,术语“宿主细胞”是指,可用于导入载体的细胞,其包括但不限于,如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞,如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞,如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞,或者如纤维原细胞,CHO细胞,COS细胞,NS0细胞,HeLa细胞,BHK细胞,HEK 293细胞或人细胞等的动物细胞。

[0234] 如本文中所使用的,术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如,两个DNA分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据,或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据),那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如,如果两个序列的10个位置中有6个匹配,那么这两个序列具有60%的同一性。例如,DNA序列CTGACT和CAGGTT共有50%的同一性(总共6个位置中有3个位置匹配)。通常,在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用,例如,可通过计算机程序例如Align程序(DNAstar, Inc.)方便地进行的Needleman等人(1970) J. Mol. Biol. 48:443-453的方法来实现。还可使用已整合入ALIGN程序(版本2.0)的E. Meyers和W. Miller (Comput. Appl Biosci., 4:11-17 (1988))的算法,使用PAM120权重残基表(weight residue table)、12的缺口长度罚分和4的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外,可使用已整合入GCG软件包(可在www.gcg.com上获得)的GAP程序中的Needleman和Wunsch (J Mol Biol. 48:444-453 (1970))算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及16、14、12、10、8、6或4的缺口权重(gap weight)和1、2、3、4、5或6的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

[0235] 如本文中使用的,术语“特异性结合”是指,两分子间的非随机的结合反应,如抗体

和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中,特异性结合某抗原的抗体(或对某抗原具有特异性的抗体)是指,抗体以小于大约 10^{-5}M ,例如小于大约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的亲和力(K_D)结合该抗原。在本发明的一些实施方案中,术语“靶向”是指特异性结合。

[0236] 如本文中所使用的,术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小,抗体-抗原结合越紧密,抗体与抗原之间的亲和力越高。通常,抗体以小于大约 10^{-5}M ,例如小于大约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的解离平衡常数(K_D)结合抗原,例如,如使用表面等离子体共振术(SPR)在BIACORE仪中测定的。

[0237] 如本文中所使用的,术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用;术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用;术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中,氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如,丙氨酸可用A或Ala表示。

[0238] 如本文中所使用的,术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”可互换使用,并且当提及术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”时,其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。例如,当提及杂交瘤细胞株LT002或LT003时,其还指杂交瘤细胞株LT002或LT003的亚克隆和后代细胞。

[0239] 如本文中所使用的,术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂,其是本领域公知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995),并且包括但不限于:pH调节剂,表面活性剂,佐剂,离子强度增强剂。例如,pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液;表面活性剂包括但不限于阳离子,阴离子或者非离子型表面活性剂,例如Tween-80;离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

[0240] 如本文中所使用的,术语“佐剂”是指非特异性免疫增强剂,当其与抗原一起或预先递送入机体时,其可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。佐剂有很多种,包括但不限于铝佐剂(例如氢氧化铝)、弗氏佐剂(例如完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂)、短小棒状杆菌、脂多糖、细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物试验中最常用的佐剂。氢氧化铝佐剂则在临床实验中使用较多。

[0241] 如本文中所使用的,术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如,预防疾病(例如CTLA4与B7结合或者CTLA4活性过高相关的疾病如肿瘤)有效量是指,足以预防,阻止,或延迟疾病(例如CTLA4与B7结合或者CTLA4活性过高相关的疾病如肿瘤)的发生的量;治疗疾病有效量是指,足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如,对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄,体重和性别,药物的施用方式,以及同时施用的其他治疗等等。

[0242] 发明的有益效果

[0243] 本发明的单克隆抗体4G10H1L1、4G10H3L3能够很好地特异性与CTLA4结合,并且能够十分有效地阻断CTLA4与B7的结合,特异地解除CTLA4对机体免疫抑制,激活T淋巴细胞。

[0244] 单克隆抗体14C12H1L1能够很好地特异性与CTLA4结合,并且能够十分有效地阻断

CTLA4与B7的结合,特异地解除CTLA4对机体免疫抑制,激活T淋巴细胞。

附图说明

[0245] 图1:单克隆鼠源抗体4G10的SDS-PAGE检测结果。从左至右的4个泳道的样品及其上样量依次为:非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体,1 μ g;还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体,1 μ g;Marker,5 μ l;BSA,1 μ g。

[0246] 图2:单克隆人源化抗体4G10H1L1的SDS-PAGE检测结果。从左至右的3个泳道的样品及其上样量依次为:非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体,1 μ g;还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体,1 μ g;Marker,5 μ l。

[0247] 图3:单克隆人源化抗体4G10H3L3的SDS-PAGE检测结果。

[0248] 从左至右的2个泳道的样品及其上样量依次为:还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体,1 μ g;Marker,5 μ l。

[0249] 图4:单克隆人源化抗体14C12H1L1的SDS-PAGE检测结果。从左至右的4个泳道的样品及其上样量依次为:非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体,1 μ g;还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体,1 μ g;Marker,5 μ l;BSA,1 μ g。

[0250] 图5:双功能抗体BiAb001的SDS-PAGE检测结果。泳道样品及其上样量为:Marker,5 μ l;1,Non-reduced:非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;2,Reduced:还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;3,BSA,1 μ g。

[0251] 图6:双功能抗体BiAb002的SDS-PAGE检测结果。泳道样品及其上样量为:Marker,5 μ l;1,Non-reduced:非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;2,Reduced:还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;3,BSA,1 μ g。

[0252] 图7:双功能抗体BiAb003的SDS-PAGE检测结果。泳道样品及其上样量为:Marker,5 μ l;1,Non-reduced:非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;2,Reduced:还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;3,BSA,1 μ g。

[0253] 图8:双功能抗体BiAb004的SDS-PAGE检测结果。泳道样品及其上样量为:Marker,5 μ l;1,Non-reduced:非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;2,Reduced:还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;3,BSA,1 μ g。

[0254] 图9:双功能抗体BiAb007的SDS-PAGE检测结果。泳道样品及其上样量为:Marker,5 μ l;1,Non-reduced:非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;2,Reduced:还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;3,BSA,1 μ g。

[0255] 图10:双功能抗体BiAb0010的SDS-PAGE检测结果。泳道样品及其上样量为:Marker,5 μ l;1,Non-reduced:非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;2,Reduced:还原型蛋白电泳上样缓冲液样品,1 μ g;3,BSA,1 μ g。

[0256] 图11:抗体4G10的动力学特征参数检测结果。

[0257] 图12:抗体4G10H1L1的动力学特征参数检测结果。

[0258] 图13:抗体4G10H3L3的动力学特征参数检测结果。

[0259] 图14:抗体4G10H4L3的动力学特征参数检测结果。

[0260] 图15:抗体14C12的动力学特征参数检测结果。

[0261] 图16:抗体14C12H1L1的动力学特征参数检测结果。

- [0262] 图17:CTLA4和抗体BIAb001的动力学特征参数检测结果。
- [0263] 图18:CTLA4和抗体BIAb002的动力学特征参数检测结果。
- [0264] 图19:CTLA4和抗体BIAb003的动力学特征参数检测结果。
- [0265] 图20:CTLA4和抗体BIAb004的动力学特征参数检测结果。
- [0266] 图21:CTLA4和抗体BIAb007的动力学特征参数检测结果。
- [0267] 图22:PD-1和抗体BIAb001的动力学特征参数检测结果。
- [0268] 图23:PD-1和抗体BIAb002的动力学特征参数检测结果。
- [0269] 图24:PD-1和抗体BIAb003的动力学特征参数检测结果。
- [0270] 图25:PD-1和抗体BIAb004的动力学特征参数检测结果。
- [0271] 图26:PD-1和抗体BIAb007的动力学特征参数检测结果。
- [0272] 图27:PD-1和抗体BIAb010的动力学特征参数检测结果。
- [0273] 图28:采用间接ELISA方法检测抗体4G10H1L1和4G10H3L3与抗原CTLA4的结合。
- [0274] 图29:采用竞争ELISA方法检测抗体4G10H1L1和4G10H3L3与B7竞争结合抗原CTLA4的结合活性。
- [0275] 图30:采用间接ELISA方法检测抗体14C12、14C12H1L1与PD-1的结合。
- [0276] 图31:采用竞争ELISA方法检测抗体14C12、14C12H1L1与PDL1的竞争结合PD-1。
- [0277] 图32:采用间接ELISA方法检测抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与CTLA4的结合。
- [0278] 图33:采用间接ELISA方法检测抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与PD-1的结合。
- [0279] 图34:采用竞争ELISA方法检测抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与B7竞争结合CTLA4。
- [0280] 图35:采用竞争ELISA方法检测抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与PDL1竞争结合PD-1。
- [0281] 图36:抗体4G10H1L1与293T-CTLA4细胞表面蛋白CTLA4的结合 EC_{50} 。
- [0282] 图37:抗体4G10H3L3与293T-CTLA4细胞表面蛋白CTLA4的结合 EC_{50} 。
- [0283] 图38:抗体14C12H1L1与293T-PD-1细胞表面蛋白PD-1结合 EC_{50} 。
- [0284] 图39:抗体BiAb001与293T-CTLA4细胞表面蛋白CTLA4结合 EC_{50} 。
- [0285] 图40:抗体BiAb002与293T-CTLA4细胞表面蛋白CTLA4结合 EC_{50} 。
- [0286] 图41:抗体BiAb003与293T-CTLA4细胞的表面蛋白CTLA4结合 EC_{50} 。
- [0287] 图42:抗体BiAb004与293T-CTLA4细胞的表面蛋白CTLA4结合 EC_{50} 。
- [0288] 图43:抗体BiAb001与293T-PD-1细胞的表面蛋白PD-1结合 EC_{50} 。
- [0289] 图44:抗体BiAb002与293T-PD-1细胞的表面蛋白PD-1结合 EC_{50} 。
- [0290] 图45:抗体BiAb003与293T-PD-1细胞的表面蛋白PD-1结合 EC_{50} 。
- [0291] 图46:抗体BiAb004与293T-PD-1细胞的表面蛋白PD-1结合 EC_{50} 。
- [0292] 图47:抗体4G10H3L3与T细胞表面抗原CTLA4的结合活性。
- [0293] 图48:抗体14C12H1L1与T细胞表面抗原PD-1的结合活性。
- [0294] 图49:抗体BiAb003和BiAb004与T细胞的结合活性,并与抗体14C12H1L1和4G10H3L3进行对比。

- [0295] 图50:抗体4G10H1L1、4G10H3L3对混合淋巴细胞的细胞因子IFN- γ 分泌的影响。
- [0296] 图51:抗体14C12H1L1对混合淋巴细胞的细胞因子IFN- γ 分泌的影响。
- [0297] 图52:抗体BiAb001、BiAb002对混合淋巴细胞的细胞因子IFN- γ 分泌的影响,并与抗体14C12H1L1、4G10H1L1进行对比。
- [0298] 图53:抗体BiAb003、BiAb004对混合淋巴细胞的细胞因子IFN- γ 分泌的影响,并与抗体14C12H1L1、4G10H3L3进行对比。
- [0299] 图54:抗体4G10H3L3对混合淋巴细胞细胞因子IL-2分泌的影响。
- [0300] 图55:抗体14C12H1L1对混合淋巴细胞的IL-2分泌的影响。
- [0301] 图56:抗体BiAb003、BiAb004对混合淋巴细胞的细胞因子IL-2分泌的影响,并与抗体14C12H1L1、4G10H3L3进行对比。
- [0302] 图57:抗体4G10H1L1和4G10H3L3对混合PBMC、MDA-MB-231和Raji细胞共培养所诱导的细胞因子IL-2的分泌的影响。
- [0303] 图58:抗体14C12H1L1对混合PBMC、MDA-MB-231和Raji细胞共培养所诱导的细胞因子IL-2的分泌的影响。
- [0304] 图59:抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004对混合PBMC、MDA-MB-231和Raji细胞共培养所诱导的细胞因子IL-2的分泌的影响,并与抗体4G10H1L1、4G10H3L3和14C12H1L1进行比较。
- [0305] 关于生物材料保藏的说明:
- [0306] 杂交瘤细胞株LT002 (CTLA4-4G10),其于2015年6月16日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C201587,保藏地址为中国.武汉.武汉大学,邮编:430072。
- [0307] 杂交瘤细胞株LT003 (PD-1-14C12),其于2015年6月16日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:C2015105,保藏地址为中国.武汉.武汉大学,邮编:430072。

具体实施方式

[0308] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市场购买获得的常规产品。

[0309] 在下面的实施例中,使用的T细胞来自中山康方生物医药有限公司;使用的BALB/C小鼠购自广东省医学实验动物中心。

[0310] 实施例1:抗CTLA4的抗体4G10的制备

[0311] 1. 杂交瘤细胞株LT002的制备

[0312] 制备抗CTLA4抗体所用的抗原CTLA4-mFc是人CTLA4 (GenbankID:NP_005205.2) 胞外区与鼠IgG1Fc的融合蛋白。取免疫BALB/C小鼠(购自广东医学实验动物中心)的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞,参考目前已确立的方法(例如,Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and

Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000)。

[0313] 用TEV蛋白酶酶切融合蛋白CTLA4-mFc, 并过柱纯化获得CTLA4蛋白。用CTLA4蛋白作为抗原包被酶标板, 进行间接ELISA法筛选, 得到分泌与CTLA4特异性结合的新的抗体的杂交瘤细胞。对间接ELISA筛选得到的杂交瘤细胞, 通过竞争ELISA筛选出能够分泌与配体B7-1 (CD80, NCBI Gene ID: 941)、B7-2 (CD86, NCBI Gene ID: 942) 竞争结合CTLA4的单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 并经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株。将该杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株LT002 (CTLA4-4G10), 其分泌的单克隆抗体命名为4G10。

[0314] 杂交瘤细胞株LT002 (CTLA4-4G10), 其于2015年6月16日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为CCTCC NO: C201587, 保藏地址为中国. 武汉. 武汉大学, 邮编: 430072。

[0315] 2. 抗CTLA4的抗体4G10的制备

[0316] 用含10%的低IgG胎牛血清的IMDM培养基对上面制得的LT002 细胞株进行培养 (IMDM培养基, 内含1%青链霉素, 于5% CO₂, 37℃细胞培养箱中进行培养), 7天后收集细胞培养上清, 通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤以及HiTrap protein A HP柱进行纯化, 制得抗体4G10。纯化后4G10样品进行SDS-PAGE电泳检测, 结果如图1所示。

[0317] 实施例2: 抗CTLA4的抗体4G10的序列分析

[0318] 抗体4G10的序列分析

[0319] 按照培养细胞细菌总RNA提取试剂盒 (Tiangen, 货号DP430) 的方法, 从实施例1中培养的LT002细胞株中提取mRNA。

[0320] 按照Invitrogen **SuperScript®** III First-Strand Synthesis System for RT-PCR试剂盒说明书合成cDNA, 并进行PCR扩增。

[0321] PCR扩增产物直接进行TA克隆, 具体操作参考pEASY-T1Cloning Kit (Transgen CT101) 试剂盒说明书进行。

[0322] 将TA克隆的产物直接进行测序, 测序结果如下:

[0323] 重链可变区的核酸序列: (372bp)

[0324]

CAGGTCAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGG
TTACTCATTCACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAATGGATTGGACTTATTA
ATCCTTACAATAATATTACTAACTACAACCAGAAGTTCATGGGCAAGGCCACATTTACTGTAGACAAGTCATCCAGC
ACAGCCTACATGGAACCTCCTCAGACTGACATCTGAAGACTCTGGAGTCTATTTCTGTGCAAGACTCGACTATAGGTC
TTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT (SEQ ID NO: 1)

[0325] 其编码的氨基酸序列: (124aa)

[0326]

QVKLQESGPVLVKGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNITNYNQKFMGKATFTVDKSSS
TAYMELLRLTSEDSGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTVSAAKTTPPSVY (SEQ ID NO: 2)

[0327] 轻链可变区的核酸序列: (378bp)

[0328] CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACTTGTCGC
TCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAACTTTGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTCACTAGTCT
AATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCC

TCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCATTGGGTGTTC
GGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTTCAAGGGCAATTCTG
C

[0329] (SEQ ID NO:3)

[0330] 其编码的氨基酸序列: (126aa)

[0331]

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNFANWVQEKPDHLFTSLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI
TGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFQQQFC (SEQ IDNO:4)

[0332] 实施例3:抗CTLA4的人源化抗体4G10H1L1、4G10H3L3和4G10H4L3的设计和制备

[0333] 1.抗CTLA4人源化抗体4G10H1L1、4G10H3L3和4G10H4L3的轻链和重链序列的设计

[0334] 根据CTLA4蛋白的三维晶体结构(Nat.Struct.Biol.(1997)4p.527)以及实施例2
获得的抗体4G10的序列,通过计算机模拟抗体模型,根据模型设计突变,得到抗体
44G10H1L1、4G10H3L3和4G10H4L3的可变区序列(抗体恒定区序列,来自NCBI的数据库,重链
恒定区为Iggamma-1chain C region,ACCESSION:P01857,轻链恒定区为Ig kappa chain C
region,ACCESSION:P01834)。

[0335] 设计的可变区序列如下:

[0336] (1)人源化单克隆抗体4G10H1L1的重链和轻链序列

[0337] 重链可变区的核酸序列: (345bp)

[0338]

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCCGAGCTGGTGAAGCCCGCGCCTCCATGAAGATCTCTTGCAAGGCCAGCGG
ATACAGTTTCACTGGCTATACCATGAACTGGGTCAAACAGGCTCCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGGCTGATTA
ATCCTTACAACAACATCACCAACTACAACCAGAAGTTCATGGGAAAAGCAACCTTTACAGTGGACAAGAGCATTTCC
ACAGCCTACATGGAAGTGAAGCCGGCTGACTTCAGACGATAGCGGGTCTATTTTTGTGCAAGGCTGGATTATCGCTC
TTACTGGGGGCAGGGAAGTCTGGTCACTGTCTCCGCT (SEQ ID NO:5)

[0339] 其编码的氨基酸序列: (115aa)

[0340]

QVQLVESGAELVKPGASKISKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQGLEWIGLINPYNNITNYNQKFMGKATFTVDKSI
TAYMELSRITSDSGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:6)

[0341] 轻链可变区的核酸序列: (327bp)

[0342]

CAGGCTGTGCTCACTCAGGAACCTTCACTGACTGTGAGCCCAGGAGGAAGTGTACCCTGACATGCGGAAGCTCCAC
CGGAGCAGTGACCACATCCAATTTCGCAATTGGGTCCAGGAAAAGCCAGGCCAGGCATTTTCGATCCCTGATCGGAG
GCACAAACAATCGGGCTTCTTGGGTGCCCAGAGATTCTCAGGAAGCCTGCTGGGGGGAAAAGCCGCTCTGACCATT
AGTGGCGCTCAGCCTGAGGACGAAGCCGAGTACTTCTGCGCTCTGTGGTATAGCAACCACTGGGTGTTTGGCGGGGG
AACAAAGCTGACTGTGCTG (SEQ IDNO:7)

[0343] 其编码的氨基酸序列: (109aa)

[0344]

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFANWVQEKPGQAFRSLIGGTNNRASWVPARFSGSLGGAALTI
SGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:8)

[0345] (2) 人源化单克隆抗体4G10H3L3的重链和轻链序列

[0346] 重链可变区的核酸序列: (345bp)

[0347]

CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCGCCTCAGTGAAGGTCAGCTGCAAGGCCAGCGG
GTACAGTTTCACTGGATATAACCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCCAGGGGCTGGAGTGGATCGGCCTGATTA
ACCCTTACAACAACATCACTAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGGAGAGTGACCTTTACAGTGGACACCAGCATTTC
ACAGCCTACATGGAAGTGTCCCGGCTGAGATCTGACGATACAGGCGTGACTTCTGCGCTAGGCTGGATTACCGCAG
CTATTGGGGACAGGGCACACTGGTGACTGTCAGCGCA (SEQ ID NO:9)

[0348] 其编码的氨基酸序列: (115aa)

[0349]

QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLINPYNITNYAQKFQGRVFTVDTSSIS
TAYMELSRISDDTGVIYFCARLDYRSYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:10)

[0350] 轻链可变区的核酸序列: (327bp)

[0351]

CAGGCTGTGCTCACTCAGGAACCTTCACTGACCGTGTCTCCTGGCGGGACTGTCACCCTGACATGCGGCAGCTCCAC
AGGGGCCGTGACCACAAGTAACCTCCCAAATTGGGTCCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCCCGGAGTCTGATCGGAG
GCACCAACAACAAGGCCAGCTGGACACCCGCACGGTTCAGCGGCAGCCTGCTGGGCGGCAAGGCCGCTCTGACAATT
AGCGGAGCCCAGCCTGAGG ACGAAGCCGAGTACTATTGCGCTCTGTGGTACTCCAACCACTGGGTGTTTCGGCGGCG
GCACCAAGCTGACTGTGCTG (SEQ ID NO:11)

[0352] 其编码的氨基酸序列: (109aa)

[0353]

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFSGSLLGKKAALTI
SGAQPEDEAEIYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:12)

[0354] (3) 人源化单克隆抗体4G10H4L3的重链和轻链序列

[0355] 重链可变区的核酸序列: (345bp)

[0356]

CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCGCCTCAGTGAAGGTCAGCTGCAAGGCCAGCGG
GTACAGTTTCACTGGATATAACCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCCAGGGGCTGGAGTGGATCGGCCTGATTA
ACCCTTACAACGACATCACTAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGGAGAGTGACCTTTACAGTGGACACCAGCATTTC
ACAGCCTACATGGAAGTGTCCCGGCTGAGATCTGACGATACAGGCGTGACTTCTGCGCTAGGCTGGATTACCGCAG
CTATTGGGGACAGGGCACACTGGTGACTGTCAGCGCA (SEQ ID NO:13)

[0357] 其编码的氨基酸序列: (115aa)

[0358]

QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLINPYNDITNYAQKFQGRVFTVDTSSIS
TAYMELSRISDDTGVIYFCARLDYRSYWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO:14)

[0359] 轻链可变区的核酸序列同4G10H3L3的轻链可变区序列。

[0360] 2. 人源化抗体4G10H1L1、4G10H3L3和4G10H4L3的制备

[0361] 重链恒定区均采用Ig gamma-1chain C region, ACCESSION:P01857; 轻链恒定区均采用Ig kappa chain C region, ACCESSION:P01834。

[0362] 将4G10H1L1重链cDNA和轻链的cDNA、4G10H3L3的重链cDNA和轻链的cDNA、以及

4G10H4L3重链cDNA和轻链的cDNA,分别克隆到pUC57simple(金斯瑞公司提供)载体中,分别获得pUC57simple-4G10H1、pUC57simple-4G10L1;pUC57simple-4G10H3、pUC57simple-4G10L3;和pUC57simple-4G10H4、pUC57simple-4G10L3。并分别亚克隆到pcDNA3.1载体中。将重组质粒转染293F细胞后收集培养液进行纯化获得人源化抗体4G10H1L1、4G10H3L3和4G10H4L3。纯化后4G10H1L1样品进行SDS-PAGE电泳检测,结果如图2所示。纯化后4G10H3L3样品进行SDS-PAGE电泳检测,结果如图3所示。

[0363] 实施例4:抗PD-1的抗体14C12的制备

[0364] 1. 杂交瘤细胞株LT003的制备

[0365] 用PD-1-mFc融合蛋白作为抗原,取免疫BALB/C小鼠(购自广东医学实验动物中心)的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞,参考目前已确立的方法(例如,Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000)。

[0366] 用PD-1-mFc作为抗原包被酶标板,进行间接ELISA法筛选,得到分泌与PD-1特异性结合的新的抗体的杂交瘤细胞。

[0367] 通过竞争ELISA筛选出能够分泌与配体PDL1-hFc (PDL1 Genbank ID: NP_054862.1) 竞争结合PD-1的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株,并经过有限稀释法得到LT003稳定细胞株(PD-1-14C12),其分泌的单克隆抗体命名为14C12。

[0368] 杂交瘤细胞株LT003(PD-1-14C12),其于2015年6月16日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO: C2015105,保藏地址为中国.武汉.武汉大学,邮编: 430072。

[0369] 2. 抗PD-1的抗体14C12的制备

[0370] 用含10%的低IgG胎牛血清的IMDM培养基对上面制得的LT003细胞株进行培养(IMDM培养基,内含1%青链霉素,于5%CO₂, 37℃细胞培养箱中进行培养),7天后收集细胞培养上清进行纯化,制得抗体14C12。

[0371] 实施例5:抗体14C12的序列的获得

[0372] 抗体14C12的序列的获得

[0373] 按照培养细胞细菌总RNA提取试剂盒(Tiagen, 货号DP430)的方法,从实施例4制得的杂交瘤细胞株LT003中提取mRNA。

[0374] 按照Invitrogen **SuperScript®** III First-Strand Synthesis System for RT-PCR试剂盒说明书合成cDNA,并进行PCR扩增。

[0375] PCR扩增产物直接进行TA克隆,具体操作参考pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101)试剂盒说明书进行。

[0376] 将TA克隆的产物直接进行测序,测序结果如下:

[0377] 重链可变区的核酸序列: (354bp)

[0378]

GAGGTCAAACCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCGGCGGGTCACTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGG
CTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCATGGGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTCGCTACTATCA

GCGGAGGCGGGCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGATTCACAATTAGTCGGGATAACGCCAGAAAT
ACTCTGTATCTGCAGATGTCTAGTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGC
ATGTTTGCCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCTGCC (SEQ ID NO:15)

[0379] 其编码的氨基酸序列: (118aa)

[0380]

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNARN
TLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:16)

[0381] 轻链可变区的核酸序列: (318bp)

[0382]

GACATTAAGATGACACAGTCCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGAGCGAGTGACCTTCACATGCAAAGCATC
CCAGGACATCAACACATACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCA
ATAGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGGGCAGGATTACTCCCTGACCATCAGCTCC
CTGGAGTATGAAGACATGGGCATCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAAA
ACTGGAAGT (SEQ ID NO:17)

[0383] 其编码的氨基酸序列: (106aa)

[0384]

DIKMTQSPSSMYASLGERVFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISS
LEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL (SEQ ID NO:18)

[0385] 实施例6:抗PD-1的人源化抗体14C12H1L1的设计、制备和检测

[0386] 1. 人源化抗体14C12H1L1的轻链和重链序列的设计

[0387] 根据PD-1蛋白的三维晶体结构 (Shinohara T, et al., Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). Genomics 1995, 23 (3): 704-6) 以及实施例5获得的抗体14C12的序列, 通过计算机模拟抗体模型, 根据模型设计突变, 得到抗体14C12H1L1的可变区序列。

[0388] 设计的可变区序列如下:

[0389] 重链可变区的核酸序列: (354bp)

[0390]

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGG
ATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCT
CAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTTCA
ATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTA
TTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID
NO:19)

[0391] 其编码的氨基酸序列: (118aa)

[0392]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKN
NLYLQMNSLR AEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:20)

[0393] 轻链可变区的核酸序列: (321bp)

[0394]

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAG

TCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTA
 ATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCC
 CTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCTCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAA
 ACTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO:21)

[0395] 其编码的氨基酸序列: (107aa)

[0396]

DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISS
 LQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:22)

[0397] 2. 人源化抗体14C12H1L1的制备和SDS-PAGE电泳检测

[0398] 重链恒定区采用Ig gamma-1chain C region, ACCESSION: P01857; 轻链恒定区采用Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834。

[0399] 将14C12H1L1的重链cDNA和轻链的cDNA分别克隆到pcDNA3.1载体中, 获得抗体14C12H1L1的重组表达质粒。将重组质粒转染293F细胞。将293F细胞培养液纯化后进行检测。结果如图4所示, 还原型蛋白样品目标蛋白大约在24.5kD和49kD处, 非还原型蛋白样品目标蛋白大约在147kD处。

[0400] 实施例7: 双功能抗体BiAb001、BiAb02、BiAb03、BiAb04、BiAb007及BiAb010的重链和轻链的序列设计、表达和检测

[0401] 1. 序列设计

[0402] 本发明中之双功能抗体BiAb001、BiAb02、BiAb03、BiAb04、BiAb007以及BiAb010的结构模式属于Morrison模式 (IgG-scFv), 即在一个IgG抗体的两条重链的C端均连接另一个抗体的scFv片段, 其重链和轻链的主要组成设计如下面的表1。

[0403] 表1: BiAb001、BiAb02、BiAb03、BiAb04、BiAb007及BiAb010的重链和轻链的组成设计

[0404]

双功能抗体编号	重链			轻链
	IgG 部分	连接片段	scFv 部分	
BiAb001	14C12H1	Linker 1	4G10H1_v- Linker 2 -4G10L1_v	14C12L1
BiAb002	14C12H1	Linker 2	4G10H1_v- Linker 2 -4G10L1_v	14C12L1
BiAb003	14C12H1	Linker 1	4G10H3_v- Linker 2 -4G10L3_v	14C12L1
BiAb004	14C12H1	Linker 2	4G10H3_v- Linker 2 -4G10L3_v	14C12L1
BiAb007	14C12H1	Linker 2	4G10H4_v- Linker 2 -4G10L3_v	14C12L1
BiAb010	14C12H1	Linker 2	8D2H14_v- Linker 2 -8D2L2_v	14C12L1

[0405] 上面的表1中:

[0406] (1) 右下角标注“v”的, 是指相应重链的可变区或者相应轻链的可变区。没有标注“v”的, 相应重链或者轻链为包含恒定区的全长。这些可变区或者全长的氨基酸序列及其编码核酸序列均参照上面的实施例中记载的相应序列。

[0407] (2) Linker1的氨基酸序列为(GGGGS) 3 (SEQ ID NO:23)

[0408] Linker2的氨基酸序列为(GGGGS) 4 (SEQ ID NO:24)

[0409] (3) 8D2H14L2的重链可变区(8D2H14_v)的氨基酸序列:

[0410]

EVQLVESGGGLVQPGGSSRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAPGKGLEWLAQIRNKPYNYETIYYSASVKGRFTISRDDS
KNSVYLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:25)

[0411] 编码8D2H14_v的核酸序列:

[0412]

GAGGTGCAGCTGGTCTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGAAGCTCCCGGCTGTCATGTGCCGCTAGCGG
CTTCACCTTTTCCGACAACTGGATGAATTGGGTGCGACAGGCACCAGGCAAAGGACTGGAGTGGCTGGCTCAGATCC
GGAACAAGCCCTACAATTATGAAACATACTATAGCGCTCCGTGAAAGGCCGGTTCCTATTAGTAGAGACGATTCT
AAGAACAGCGTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAGACAGAGGATACTGGCGTCTACTATTGCACAGCACAGTTTGC
CTATTGGGGACAGGGCACCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO:26)

[0413] (4) 8D2H14L2的轻链可变区(8D2L2_v)的氨基酸序列:

[0414]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYGGGLNWYQRKPGKSPKLLIYGATNLASGVSSRFSGSGSGTDYTLTISS
LQPEDVATYYCQNVLRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:27)

[0415] 编码8D2L2_v的核酸序列:

[0416]

GACATCCAGATGACTCAGAGCCCCTCAAGCCTGTCTGCAAGTGTGGGCGATAGGGTCACCATCACATGTCGCACCTC
CGAAAACATCTACGGGGGACTGAATTGGTATCAGCGCAAGCCCGGCAAATCCCCTAAGCTGCTGATCTACGGCGCTA
CCAACCTGGCATCTGGGGTGTCTCTCGATTTTCAGGGAGCGGCAGCGCACCGACTATACTCTGACCATTAGTTCA
CTGCAGCCTGAGGATGTGGCCACATACTATTGCCAGAATGTCCTGAGATCACCATTCACTTTTGGGAGCGGAACCAA
ACTGGAAATTAAG (SEQ ID NO:28)

[0417] 2. 抗体BiAb001的表达和纯化

[0418] 分别将BiAb001的重链cDNA序列和轻链的cDNA序列克隆到 pUC57simple (金斯瑞公司提供) 载体中, 分别获得pUC57simple-BiAb001H和pUC57simple-BiAb001L质粒。

[0419] 分别将质粒pUC57simple-BiAb001H和pUC57simple-BiAb001L进行酶切(HindIII&EcoRI), 电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到pcDNA3.1载体中, 提取重组质粒共转染293F细胞。细胞培养7天后, 将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至HiTrap MabSelect SuRe柱, 用Elution Buffer一步洗脱蛋白并回收目标样品并换液至PBS。

[0420] 将纯化后的样品分别加入还原型蛋白电泳上样缓冲液和非还原型蛋白电泳上样缓冲液, 煮沸后进行SDS-PAGE电泳检测。BiAb001的电泳图如图5所示, 还原型蛋白样品目标蛋白在23.6kD和75.8kD处, 非还原型蛋白样品(单个抗体)目标蛋白在199kD处。

[0421] 3. 抗体BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007和BiAb010的表达和纯化

[0422] 按照上述BiAb001的表达和纯化方法获得纯化的抗体BiAb002, BiAb003、BiAb004、BiAb007和BiAb010。

[0423] 将纯化后的样品分别加入还原型蛋白电泳上样缓冲液和非还原型蛋白电泳上样缓冲液, 煮沸后进行SDS-PAGE电泳检测。BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007和BiAb010的

电泳图分别如图6、图7、图8、图9和图10所示,还原型蛋白样品目标蛋白在23.6kD和75.8kD处,非还原型蛋白样品(单个抗体)目标蛋白在199kD处。

[0424] 实施例8:抗体的动力学参数测定

[0425] 使用Fortebio分子相互作用仪测定抗原抗体结合的动力学参数。

[0426] 1.抗体4G10及其人源化抗体4G10H1L1、4G10H3L3、4G10H4L3与抗原CTLA4结合的动力学参数测定

[0427] 1.1.用TEV蛋白酶酶切CTLA4-mFc蛋白,并过柱纯化获得CTLA4抗原。

[0428] 1.2.抗体4G10采用氨基偶联的方式固定于AR2G传感器表面,经乙醇胺封闭,于PBST中平衡后,与抗原CTLA4结合,CTLA4用PBST两倍稀释,浓度为268.1,134.1,67,33.5,16.8,8.38,4.19,0nM,于PBST中解离。人源化4G10H1L1、4G10H3L3、4G10H4L3的检测方法与4G10类似,抗原浓度为180、90、45、22.5、11.25、5.625、2.813、0nM。

[0429] 1.3抗体4G10及其人源化抗体4G10H1L1、4G10H3L3、4G10H4L3与抗原结合的动力学参数检测结果如下表1,动力学特征参数检测结果分别如图11、图12、图13和图14所示。

[0430] 2.抗体14C12及其人源化抗体14C12H1L1与抗原PD-1结合的动力学参数测定

[0431] 2.1.用TEV蛋白酶酶切PD-1-mFc蛋白,并过柱纯化获得PD-1抗原。

[0432] 2.2.抗原PD-1(抗原浓度为1 μ g/ml)经生物素标记后固定于SA传感器表面,于PBST中平衡后,分别与抗体14C12和14C12H1L1结合,抗体用PBST从200nM往下三倍稀释,于PBST中解离。

[0433] 2.3抗体14C12和14C12H1L1与抗原结合的动力学参数检测结果如下表1,动力学特征参数检测结果分别如图15,图16所示。

[0434] 3.抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007和BiAb010与抗原CTLA4结合的动力学参数测定

[0435] 3.1使用抗原CTLA4(抗原浓度为1 μ g/ml)经生物素标记后固定于SA传感器表面,于PBST中平衡后,分别与抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007和BiAb010结合,抗体用PBST从200nM往下三倍稀释,于PBST中解离。

[0436] 3.2抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007和BiAb010与抗原CTLA4结合的动力学参数检测结果如下表1,动力学特征参数检测结果分别如图17—图21所示。

[0437] 4.抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007和BiAb010与抗原PD-1结合的动力学参数测定

[0438] 4.1使用抗原PD-1(抗原浓度为1 μ g/ml)经生物素标记后固定于SA传感器表面,于PBST中平衡后,分别与抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007和BiAb010结合,抗体用PBST从200nM往下三倍稀释,于PBST中解离。

[0439] 4.2抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007和BiAb010与抗原PD-1结合的动力学参数检测结果如下表2,动力学特征参数检测结果分别如图22—图27所示。

[0440] 表2:抗原抗体结合动力学参数

[0441]

抗体	抗原	K_D (M)	$K_{on}(1/Ms)$	K_o 误差	$K_{dis}(1/s)$	K_{dis} 误差
4G10	CTLA4 1 $\mu g/ml$	3.01E-10	3.78E+05	4.36E+03	1.14E-04	5.33E-06
4G10 H1L1		1.52E-09	1.86E+05	3.26E+03	2.82E-04	9.23E-06
4G10 H3L3		4.14E-09	2.09E+05	3.81E+03	8.64E-04	1.11E-05
4G10H4L3		9.67E-10	1.37E+05	2.22E+03	1.32E-04	8.69E-06
14C12	PD-1 1 $\mu g/ml$	1.81E-11	3.38E+05	8.23E+03	6.12E-06	1.04E-05
14C12H1L1		2.42E-11	3.17E+05	5.90E+03	7.66E-06	8.70E-06
BIAb001	CTLA4 1 $\mu g/ml$	1.67E-10	2.33E+05	4.45E+03	3.89E-05	8.75E-06
BIAb002		9.69E-11	2.37E+05	5.32E+03	2.30E-05	9.97E-06
BIAb003		3.95E-10	3.60E+05	7.10E+03	1.42E-04	9.99E-06
BIAb004		5.66E-10	2.20E+05	3.89E+03	1.24E-04	8.27E-06
BiAb007		2.72E-10	1.58E+06	5.17E+04	4.28E-04	1.12E-05
BiAb010		3.22E-10	1.08E+06	1.99E+04	3.47E-04	7.28E-06
BIAb001	PD-1 1 $\mu g/ml$	4.16E-11	2.97E+05	4.96E+03	1.24E-05	8.36E-06
BIAb002		3.33E-11	2.20E+05	5.93E+03	7.32E-06	1.15E-05
BIAb003		4.12E-11	2.64E+05	5.49E+03	1.09E-05	9.82E-06
BIAb004		4.82E-11	2.47E+05	5.45E+03	1.19E-05	9.61E-06
BiAb007		1.40E-11	4.52E+05	9.23E+03	6.30E-06	7.85E-06

[0442]

BiAb010		2.97E-11	2.28E+05	4.40E+03	6.79E-06	8.70E-06
---------	--	----------	----------	----------	----------	----------

[0443] K_D 为亲和力常数; k_{on} 为抗原抗体结合速率; k_{dis} 为抗原抗体解离速率; $K_D=k_{dis}/k_{on}$ 。

[0444] 结果表明:

[0445] 抗体4G10及其人源化抗体均与抗原有很好的亲和力。14C12和14C12H1L1与抗原PD-1均有较好的亲和力。

[0446] 双功能抗体均具有与抗原CTLA4和PD-1较好的亲和力。

[0447] 实施例9:ELISA方法检测抗体与抗原的结合活性

[0448] 1. 人源化抗体4G10H1L1、4G10H3L3与抗原CTLA4的结合活性

[0449] 1.1采用间接ELISA方法分别测定人源化抗体4G10H1L1、4G10H3L3与CTLA4的结合活性。

[0450] 酶标板中加入抗原孵育,4℃过夜,用1%的BSA 37℃封闭2h后,分别加入抗体,37℃孵育30min,加入HRP标记羊抗人IgG (H+L) 二抗 (Jackson,109-035-088),用TMB (Neogen,308177) 进行显色反应5min,并在酶标仪中检测450nm波长吸光度。

[0451] 检测结果如图28所示。由图可见,人源化抗体4G10H1L1、4G10H3L3能有效地结合CTLA4蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系,各剂量的荧光强度见表3。通过对结合的抗体进行荧光定量分析,曲线模拟计算获得抗体4G10H1L1、4G10H3L3的结合效率EC₅₀分别为0.048和0.067nM。

[0452] 表3:间接ELISA检测4G10H1L1、4G10H3L3与CTLA4的结合

[0453]

抗原包被 CTLA4 0.5 µg/ml				
抗体梯度稀释	4G10 H1L1		4G10 H3L3	
6 µg/ml	2.926	2.946	2.809	2.764
1:5	2.784	2.732	2.729	2.739
1:25	2.729	2.688	2.668	2.617

[0454]

1:125	2.490	2.469	2.367	2.309
1:625	1.736	1.709	1.498	1.357
1:3126	0.607	0.663	0.513	0.432
1:16525	0.198	0.225	0.175	0.149
1:78125	0.096	0.115	0.089	0.087
1:390625	0.075	0.087	0.075	0.072
1:1953125	0.071	0.090	0.066	0.077
1:9765625	0.066	0.087	0.078	0.089
0	0.073	0.079	0.079	0.068
二抗	羊抗人 IgG, HRP(1:5000)			

[0455] 1.2.采用竞争ELISA方法分别检测人源化抗体4G10H1L1,4G10H3L3与B7竞争结合抗原CTLA4的结合活性

[0456] 用B7/1-hFc (B7/1Genbank ID:NP_005182.1) 包被酶标板4℃过夜,1%BSA封闭2h

后加入抗体分别和CTLA4-mFc的抗原抗体混合液(稀释浓度见表4),37℃孵育30min后加入酶标二抗孵育1h,37℃孵育30min。在酶标仪上检测450nm的吸光值(见表4)。

[0457] 检测抗体与与B7-1竞争结合抗原CTLA4的结果如图29所示。由图可见,抗体4G10H1L1和4G10H3L3能有效地与B7-1竞争结合CTLA4蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系,各剂量的荧光强度见表4。通过对结合的抗体4G10H1L1和4G10H3L3进行荧光定量分析,曲线模拟结合效率 EC_{50} 分别为1.297nM和1.229nM。

[0458] 表4:竞争ELISA检测4G10H1L1、4G10H3L3与B7竞争结合人CTLA4的结合效率

[0459]

抗原包被: B7/1-hFc 0.5 µg/ml					
抗体梯度稀释	4G10H1L1		4G10H3L3		受体
3 µg/ml	0.132	0.121	0.146	0.185	CTLA4-mFc
[0460]					
1:3	0.120	0.170	0.159	0.182	0.3µg/ml
1:9	0.260	0.343	0.382	0.340	
1:27	0.399	0.593	0.570	0.507	
1:81	0.565	0.614	0.642	0.642	
1:243	0.628	0.753	0.784	0.773	
1:729	0.573	0.760	0.768	0.702	
1:2187	0.553	0.824	0.741	0.788	
1:6561	0.661	0.844	0.824	0.679	
1:19683	0.555	0.834	0.742	0.699	
1:59049	0.552	0.725	0.773	0.770	
0	0.610	0.665	0.822	0.717	
二抗	羊抗鼠 IgG, HRP(1:5000)				

[0461] 2.ELISA方法检测单克隆抗体14C12及其人源化抗体14C12H1L1与抗原PD-1的结合活性

[0462] 2.1.采用间接ELISA方法分别测定单克隆重组抗体14C12和14C12H1L1分别与PD-1的结合活性,方法具体如下:

[0463] 酶标板中加入PD-1-mFc孵育,4℃过夜,用1%的BSA 37℃封闭2h后,分别加入抗体,37℃孵育30min,加入HRP标记羊抗人IgG(H+L)二抗(Jackson,109-035-088),用TMB(Neogen,308177)进行显色反应5min,并在酶标仪中检测450nm波长吸光度。

[0464] 检测抗体14C12,14C12H1L1与抗原PD-1结合结果如图30所示。由图可见,抗体14C12和14C12H1L1均能有效地结合PD-1蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系,各剂量的荧光强度见表5。通过对结合的抗体14C12和14C12H1L1进行荧光定量分析,曲线模拟14C12和14C12H1L1抗体的结合效率 EC_{50} 分别为0.175nM和0.043nM。

[0465] 表5:抗体14C12和14C12H1L1分别与PD-1的结合(间接ELISA)

[0466]

	抗原包被: PD-1-mFc (0.5 μ g/mL)			
抗体浓度 (μ g/mL)	14C12		14C12H1L1	
1	2.463	2.439	2.643	2.557
0.3	2.572	2.380	2.734	2.586
0.1	2.118	2.126	2.633	2.535
0.03	1.607	1.438	2.384	2.335
0.01	0.930	0.809	1.892	1.839
0.003	0.407	0.346	1.115	1.011
0.001	0.167	0.150	0.503	0.455
0	0.062	0.047	0.068	0.064
二抗	HRP 标记羊抗鼠二抗			

[0467] 2.2.采用竞争ELISA方法分别测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体14C12及人源化抗体14C12H1L1与PDL1的竞争结合抗原PD-1,方法具体如下:

[0468] 用PD-1-hFc或PD-1-mFc包被酶标板4℃过夜,1%BSA封闭2h后,分别将不同浓度的抗体14C12和14C12H1L1与PDL1-hFc和PDL1-mFc混合10min(稀释浓度见表6),37℃孵育30min后加入酶标二抗37℃孵育30min。在酶标仪上检测450nm的吸光值(见表6)。

[0469] 检测抗体14C12及人源化抗体14C12H1L1与抗原PD-1结合结果如图31所示。由图可见,14C12及人源化抗体14C12H1L1均能有效地与PDL1竞争结合PD-1蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系,各剂量的荧光强度见表6。通过对结合的抗体14C12及人源化抗体14C12H1L1进行荧光定量分析,曲线模拟抗体14C12及14C12H1L1的结合效率 EC_{50} 分别为:0.853nM和0.37nM。

[0470] 表6:抗体14C12及14C12H1L1与PDL1竞争结合PD-1ELISA

[0471]

抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	抗原包被: PD-1-mFc 0.2 $\mu\text{g/mL}$			
	14C12		14C12H1L1	
1.5 $\mu\text{g/mL}$	0.111	0.088	0.135	0.113
1:3	0.100	0.116	0.130	0.131
1:9	0.645	0.643	0.260	0.185
1:27	1.463	1.614	0.257	0.218
1:81	1.841	1.686	0.355	0.350
1:243	1.983	1.769	0.399	0.364
1:729	1.789	1.770	0.417	0.411
0	1.791	1.790	0.430	0.402
PDL1-hFc 2 $\mu\text{g/mL}$				
二抗	HRP 标记羊抗鼠二抗			

[0472] 3. ELISA方法检测抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与抗原的结合活性

[0473] 3.1. 间接ELISA方法分别测定抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004分别与抗原CTLA4的结合活性,方法参照本实施例中1.1。

[0474] 检测抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与抗原PD-1结合结果如图32所示。由图可见,抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004均能有效地结合PD-1蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系,各剂量的荧光强度见表7。通过对结合的抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004进行荧光定量分析,曲线模拟抗体的结合效率 EC_{50} ,如下表7所示。

[0475] 表7:双功能抗体分别与CTLA4的结合(间接ELISA)

[0476]

抗体梯度 稀释	抗原: CTLA4 0.5 µg/ml							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
6µg/ml	2.425	2.098	2.334	2.120	2.179	2.076	2.243	2.251
1:3	2.299	2.234	2.204	2.257	2.141	2.138	2.198	2.319
1:9	2.265	2.188	2.168	2.186	2.012	2.086	2.207	2.254
1:27	2.245	2.215	2.174	2.043	1.814	1.811	1.982	1.907
1:81	1.859	1.856	1.717	1.609	1.438	1.410	1.534	1.640
1:243	1.494	1.511	1.221	1.136	0.933	0.899	1.070	1.108
1:729	0.818	0.922	0.644	0.610	0.451	0.414	0.567	0.548
0	0.048	0.048	0.048	0.047	0.047	0.045	0.049	0.050
二抗: 羊抗人 IgG, HRP(1:5000)								
EC ₅₀ (nM)	0.105		0.12		0.189		0.154	

[0477] 3.2. 间接ELISA方法分别测定抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004分别与抗原PD-1的结合活性,方法参照本实施例中2.1。

[0478] 检测抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与抗原PD-1结合结果如图33所示。由图可见,抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004均能有效地结合PD-1蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系,各剂量的荧光强度见表7。通过对结合的抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004进行荧光定量分析,曲线模拟抗体的结合效率EC₅₀,如下表8所示。

[0479] 表8:双功能抗体与CTLA4的结合(间接ELISA)

[0480]

抗体稀 释浓度	抗原包被: PD-1-mFc 0.5 µg/ml							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
6µg/ml	2.400	2.360	2.370	2.314	2.332	2.290	2.347	2.343

[0481]

1:3	2.450	2.426	2.290	2.388	2.271	2.326	2.410	2.458
1:9	2.402	2.457	2.372	2.346	2.279	2.351	2.390	2.505
1:27	2.409	2.467	2.332	2.348	2.350	2.243	2.414	2.396
1:81	2.375	2.254	2.084	1.990	1.996	1.928	2.197	2.175
1:243	1.871	1.725	1.627	1.544	1.414	1.419	1.573	1.560
1:729	1.067	1.047	0.954	0.814	0.746	0.719	0.920	0.865
0	0.085	0.067	0.065	0.068	0.055	0.055	0.056	0.058
二抗: 羊抗人 IgG, HRP(1:5000)								

[0482] 3.3竞争ELISA方法分别测定抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与B7/1-hFc的竞争结合抗原CTLA4,方法参照本实施例中1.2。

[0483] 检测结果如图34所示。由图可见,抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004均能有效地结合抗原CTLA4,抑制CTLA4结合B7/1,并且抗体抑制CTLA4结合B7/1的效率呈剂量依赖关系,各剂量的吸光强度见表9。通过对结合的抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004进行吸光强度定量分析,曲线模拟抗体的结合效率获得结合EC₅₀(表9)。

[0484] 表9:竞争ELISA检测抗体与B7/1-hFc竞争结合抗原CTLA4

[0485]

抗体稀 释浓度	抗原包被: B7/1-hFc 0.5 µg/ml							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
3µg/ml	0.076	0.072	0.078	0.095	0.074	0.080	0.095	0.076
1:3	0.081	0.076	0.079	0.079	0.095	0.086	0.097	0.100
1:9	0.748	0.706	1.040	1.031	1.029	1.049	0.907	0.973
1:27	1.153	1.129	1.076	1.152	1.125	1.361	1.010	1.056
1:81	1.121	1.241	1.153	1.315	1.241	1.198	1.121	1.206
1:243	1.261	1.236	1.047	1.266	1.333	1.335	1.231	1.235

[0486]

1:729	1.063	1.077	1.085	1.337	1.210	1.323	1.157	1.287
0	1.0476	0.9808	0.9131	1.0762	1.067	1.074	1.032	0.966
受体: CTLA4-mFc 0.3µg/ml								
二抗: 羊抗鼠 IgG, HRP 标记(1:5000)								
EC₅₀ (nM)	2.758		1.797		2.197		2.256	

[0487] 3.4.竞争ELISA方法分别测定抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与PDL1的

竞争结合抗原PD-1,方法同本实施例中2.2。

[0488] 检测结果如图35所示。由图可见,抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004均能有效地结合抗原PD-1,抑制PD-1结合其配体PDL1,并且抗体抑制PD-1结合其配体PDL1的效率呈剂量依赖关系,各剂量的吸光强度见表10。通过对结合的抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004进行吸光强度定量分析,曲线模拟抗体的结合效率获得结合EC₅₀(表10)。

[0489] 表10:竞争ELISA检测双功能抗体与PDL1的竞争结合PD-1

[0490]

抗体浓度	抗原包被: PD-1-hFc 0.5 µg/ml							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
3µg/ml	0.347	0.348	0.369	0.353	0.074	0.075	0.078	0.075
1:3	0.314	0.326	0.348	0.350	0.071	0.081	0.073	0.074
1:9	0.332	0.330	0.340	0.340	0.095	0.095	0.093	0.095
1:27	0.542	0.775	0.758	0.733	0.695	0.737	0.639	0.643
1:81	1.041	1.009	1.018	1.063	0.983	1.010	0.954	1.019
1:243	1.131	1.117	1.149	1.186	1.070	1.165	1.009	1.082
1:729	1.186	1.129	1.072	1.199	1.093	1.029	1.032	1.080
0	1.2345	1.1091	1.1243	1.1759	1.101	1.140	1.178	1.153

[0491]

受体: PDL1-mFc 0.3µg/ml				
二抗: 羊抗人 IgG, HRP (1:5000)				
EC ₅₀ (nM)	0.685	0.543	0.665	0.62

[0492] 实施例10:流式细胞仪方法检测抗体与细胞表面抗原的结合活性

[0493] 首先分别构建表达CTLA4、PD-1抗原的宿主细胞293T,用本发明中制备的人源化抗体分别对改宿主细胞进行标记。然后采用流式细胞术分析验证抗体对细胞表面天然构象的抗原特异性的结合能力。

[0494] 1.分别表达CTLA4、PD-1抗原的宿主细胞293T的构建

[0495] CTLA4或PD-1的载体pLenti6.3-CTLA4、pLenti6.3-PD-1(载体pLenti6.3购自Invitrogen公司)转染293T细胞,经筛选分别获得稳定表达CTLA4的克隆群体293T-CTLA4细胞和稳定表达PD-1的克隆群体293T-PD-1细胞。

[0496] 2.抗体对细胞表面抗原的结合检测方法

[0497] 采用常规胰酶消化方法上述步骤获得的表达抗原的宿主细胞,并使每个收集管细

胞数为 2×10^5 ,用PBS (1%BSA) 配制抗体浓度梯度稀释液,冰上与表达相应抗原的293T细胞孵育2小时,每管加入100 μ L FITC羊抗人IgG (1:500) 冰上孵育1小时用PBS洗3次后加入300 μ L PBS重悬细胞,在流式细胞仪上用FITC通道检测荧光信号。

[0498] 2.1抗体对细胞表面抗原的结合检测结果

[0499] 人源化抗体4G10H1L1和4G10H3L3与293T-CTLA4细胞的结合结果分别如图36、图37所示。由图可见,4G10H1L1和4G10H3L3抗体能有效地结合宿主细胞293T-CTLA4表面的靶标CTLA4蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系,各剂量的荧光强度见表11。通过对结合的4G10H1L1和4G10H3L3抗体进行荧光定量分析,曲线模拟4G10H1L1和4G10H3L3抗体的结合效率 EC_{50} 分别为7.58nM、10.54nM。

[0500] 表11:流式细胞仪检测4G10H1L1和4G10H3L3结合CTLA4宿主细胞293T-CTLA4表面抗原的荧光强度分析

	4G10H1L1	4G10H2L2
抗体浓度 (nM)	荧光强度	
0.01	14.93	15.13
0.1	24.79	47.05
[0501] 1	106.77	97.27
2.5	272.24	236.66
5	547.76	465.54
10	1080.91	788
20	1568.19	1296.95
50	1652.26	1539.24

[0502] 2.2人源化抗体14C12H1L1与293T-PD-1细胞的结合结果如图38所示。由图可见,14C12H1L1抗体能有效地结合宿主细胞293T-PD-1表面的靶标PD-1蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系,各剂量的荧光强度见表12。通过对结合的14C12H1L1抗体进行荧光定量分析,曲线模拟14C12H1L1抗体的结合效率 EC_{50} 为1.89nM。

[0503] 表12:流式细胞仪检测14C12H1L1结合PD-1宿主细胞293T-PD-1表面抗原的荧光强度分析

[0504]

浓度 (nM)	0.01	0.1	1	5	10	50
荧光强度	8.32	20.31	174.62	579.41	686.49	669.54

[0505] 2.3抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与293F-CTLA4细胞的结合结果分别如图39、图40、图41和图42所示。由图可见,抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004均能有效地结合宿主细胞293F-CTLA4表面的靶标CTLA4蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系,各剂量的荧光强度见表13。通过对结合的抗体进行荧光定量分析,曲线模拟抗体的结合

效率获得结合 EC_{50} (表13)。

[0506] 表13:流式细胞仪检测抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004结合293F-CTLA4细胞表面抗原的荧光强度分析及 EC_{50}

[0507]

	BIAb001	BIAb002	BIAb003	BIAb004
抗体浓度(nM)	MFI (荧光强度)			
0.0	-	-	12.9	13.0
0.1	10.5	10.5	14.2	15.6
1.0	21.2	20.4	28.7	34.8
2.5	46.8	43.8	49.6	77.4
5.0	92.9	93.5	101.0	129.6
10.0	181.9	171.2	245.3	313.0
20.0	312.8	282.1	487.4	608.6
50.0	469.5	466.5	899.8	1260.8
100.0	423.0	435.3	937.5	1020.6
200.0	381.6	408.2	-	-
EC_{50}(nM)	11.9	13.7	19.9	17.8

[0508] 2.4抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004与293T-PD-1细胞的结合结果分别如图43—图46所示。由图可见,抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004均能有效地结合宿主细胞293T-PD-1表面的靶标PD-1蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系,各剂量的荧光强度见表14。通过对结合的抗体进行荧光定量分析,曲线模拟抗体的结合效率获得结合 EC_{50} (表14)。

[0509] 表14:流式细胞仪检测抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004结合293T-PD-1细胞表面抗原的荧光强度分析

[0510]

	BIAb001	BIAb002		BIAb003	BIAb004
抗体浓度/nM	MFI (荧光强度)		抗体浓度/nM	MFI (荧光强度)	
0.01	10.18	11	0.01	8.56	8.89
0.08	13.92	14.09	0.1	14.57	13.46
0.75	36.44	36.11	1	70.76	50.8
1.88	74.27	70.97	2.5	143.24	100.83
3.75	148.28	142.37	5	332.5	204.83
7.5	223.29	204.22	10	632.57	378.31
15	337.03	302.05	20	1026.03	535.69
37.5	358.78	290.92	50	958.92	734.73
			100	943.77	682.25
EC ₅₀ (nM)	5.69	4.61		7.18	10

[0511] 3. 抗体与T细胞表面抗原CTLA4和PD-1的结合活性

[0512] 采用Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare LOT No.:171440-02) 分离PBMC,从PBMC中分离得到CD4⁺细胞,用PHA (50μl/ml) 刺激三天后用PBS洗一次,加入不同浓度的抗体,冰上孵育1.5h。孵育完成后,用PBS洗涤一次,加入FITC-标记抗人二抗IgG (Jackson immunoresearch lot.102155)。冰上避光孵育1h后,用PBS洗涤一次并用流式细胞仪检测。

[0513] 其中所用对照抗体Nilolumab为抗PD-1的抗体,可以商购得到,其信息亦可参考<http://www.drugbank.ca/drugs/DB09035>;

[0514] 对照抗体Ipilimumab为抗CTLA4的抗体,可以商购得到,其信息亦可参考<http://www.drugbank.ca/drugs/DB06186>。

[0515] 3.1人源化抗体4G10H3L3与T细胞的结合结果如图47所示。由图可见,4G10H3L3抗体能有效地结合T细胞表面的靶标CTLA4蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系。

[0516] 3.2人源化抗体14C12H1L1与T细胞的结合结果如图48所示。由图可见,14C12H1L1抗体能有效地结合T细胞表面的靶标PD-1蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系。

[0517] 3.3抗体BiAb003和BiAb004与T细胞的结合与14C12H1L1和4G10H3L3对比结果如图49。由图可见,抗体BiAb003、BiAb004和14C12H1L1、4G10H3L3抗体均能有效地结合T细胞表面的靶标PD-1蛋白,并且其结合效率呈剂量依赖关系。并且抗体BiAb003、BiAb004和14C12H1L1与T细胞的结合强于抗体4G10H3L3,Nilolumab和Ipilimumab。荧光强度检测结果如表15中。

[0518] 表15: 抗体14C12H1L1、4G10H3L3和BiAb003和BiAb004与T细胞的结合活性

[0519]

抗体浓度/nM	100	10	1
抗体名称	MFI (荧光强度)		
PBS	8.39	-	-
hIgG	10.15	-	-
Nilolumab	22.88	-	-
Ipilimumab	8.35	-	-
14C12H1L1	48.94	29.93	19.97
4G10H3L3	14.11	9.78	8.62
BIAb003	49.09	23.67	14.65
BIAb004	47.54	22.85	14.66

[0520] 实施例11:混合淋巴细胞反应:细胞因子IFN- γ , IL-2的分泌

[0521] 1.采用Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare LOT No.:171440-02) 分离PBMC,将分离出来的PBMC加入IL-4 (Peprotech K2513,1000U/ml) 和GM-CSF (Peprotech H1513,1000U/ml) 诱导6天后,加入TNF- α (Peprotech G1513,200U/ml) 诱导3天获得DC细胞。

[0522] PBMC中分离得到T细胞,将获得的DC细胞与T细胞按1:10的比例混合培养,同时加入不同比例的抗体(hIgG做为对照) 培养5-6天后,采用ELISA试剂盒检测IFN- γ (购自达科为公司) 和IL-2 (购自达科为公司) 的分泌量。

[0523] DC细胞和T细胞混合培养后的IFN- γ 的分泌检测结果分别如图50—图53所示。DC细胞和T细胞混合培养后的IL-2的分泌检测结果分别如图54—图56所示。

[0524] 由图可见,4G10H1L1、4G10H3L3、14C12H1L1、以及双功能抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004均能有效地诱导混合淋巴细胞分泌IFN- γ 和IL-2。其中,抗PD1抗体14C12H1L1在浓度为1nM和10nM时,对IFN- γ 分泌的诱导效果与对照抗体Nilolumab在100nM时相当。CTLA4抗体4G10H1L1和4G10H3L3在浓度为100nM时对IFN- γ 分泌的诱导效果强于对照抗体Ipilimumab (图52)。

[0525] 实施例12:IL-2的分泌

[0526] 将分离得到的PBMC (方法同实施例10) 用PHA (上海疾控生物科技有限公司,50 μ l/mL) 刺激3天后,96孔板中加入刺激成熟的PBMC (来源于志愿献血者,5 $\times 10^4$ cells/孔),Raji细胞 (来源于ATCC,5 $\times 10^4$ cells/孔) 和MDA-MB-231细胞 (来源于ATCC) (1 $\times 10^4$ cells/孔),同时加入抗体 (100nM) 混合均匀共培养。3天后,采用ELISA试剂盒检测IL-2 (购自达科为公司) 的分泌量,具体操作按照试剂盒说明书进行。

[0527] 细胞混合培养后的IL-2的分泌检测结果分别如图57、图58和图 59所示。由图可见,4G10H1L1、4G10H3L3、14C12H1L1、以及双功能抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004均能有效地诱导PBM分泌IL-2。其中,抗PD1抗体14C12H1L1对IL-2分泌的诱导效果强于对照抗体Nilololumab (图58),双功能抗体BiAb001、BiAb002、BiAb003和BiAb004对IL-2分泌的诱导效果与14C12H1L1+4G10H1L1或者14C12H1L1+4G10H3L3的效果相当(图59)。

[0528] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

SEQUENCE LISTING

<110> 中山康方生物医药有限公司
 <120> 抗 CTLA4-抗 PD-1 双功能抗体、其药物组合物及其用途
 <130> IDC130144
 <160> 47
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 4G10 重链可变区的核酸序列

<400> 1
 cagggtcaagc tgcaggagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcattcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaga accctgaatg gattggactt attaatacctt acaataatat tactaactac 180
 aaccagaagt tcatgggcaa ggccacattt actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240
 atggaactcc tcagactgac atctgaagac tctggagtct atttctgtgc aagactcgac 300
 tataggtctt attggggcca agggactctg gtcactgtct ctgcagccaa aacgacaccc 360
 ccatctgtct at 372

[0001]

<210> 2
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 4G10 重链可变区的氨基酸序列

<400> 2

Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asn Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Met Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

	100	105	110
	Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr 115 120		
<210>	3		
<211>	378		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	4G10 轻链可变区的核酸序列		
<400>	3		
	caggetgttg tgactcagga atctgcactc accacatcac ctggtgaaac agtcacactc 60		
	acttgctcgt caagtactgg ggtctgttaca actagtaact ttgccaactg ggtccaagaa 120		
	aaaccagatc atttattcac tagtctaata ggtggtacca acaaccgagc tccaggtgtt 180		
	cctgccagat tctcaggtc cctgattgga gacaaggctg ccctcaccat cacaggggca 240		
	cagactgagg atgaggcaat atatttctgt gctctatggt acagcaacca ttgggtgttc 300		
	ggtggaggaa ccaaaactgac tgccttaggc cageccaagt cttcgccatc agtcaccctg 360		
	tttcaagggc aattctgc 378		
<210>	4		
<211>	126		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	4G10 轻链可变区的氨基酸序列		
<400>	4		
	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu 1 5 10 15		
	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser 20 25 30		
	Asn Phe Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Ser 35 40 45		
	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe 50 55 60		
	Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala 65 70 75 80		
	Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn 85 90 95		
	His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro 100 105 110		
	Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Gln Gly Gln Phe Cys 115 120 125		

[0002]

<210> 5
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 4G10H1L1 重链可变区的核酸序列

<400> 5
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggccgag ctggtgaagc ccggcgccctc catgaagatc 60
 tcttgcaagg ccagcggata cagtttctact ggctatacca tgaactgggt caaacagget 120
 ccaggacagg gactggagtg gatcgggctg attaatcctt acaacaacat caccaactac 180
 aaccagaagt tcatgggaaa agcaaccttt acagtggaca agagcatttc cacagcctac 240
 atggaactga gccggctgac ttcagacgat agcggggtct attttgtgc aaggctggat 300
 tatcgctctt actgggggca gggaactctg gtcactgtct ccgct 345

<210> 6
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 4G10H1L1 重链可变区的氨基酸序列

<400> 6

[0003]

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asn Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Met Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ala
 115

<210> 7
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 4G10H1L1 轻链可变区的核酸序列

<400> 7
 caggctgtcg tcactcagga accttcactg actgtgagcc caggaggaac tgtcacccctg 60
 acatgcggaa gctccaccgg agcagtgacc acatccaact tcgccaattg ggtccaggaa 120
 aagccaggcc aggcatctcg atccctgatc ggaggcacia acaatcgggc ttcttgggtg 180
 cccgaagat tctcaggaag cctgctgggg ggaaaagccg ctctgaccat tagtggcgct 240
 cagcctgagg acgaagccga gtacttctgc gctctgtggt atagcaacca ctgggtgttt 300
 ggcgggggaa caaagctgac tgtctg 327

<210> 8
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 4G10H1L1 轻链可变区的氨基酸序列

<400> 8
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

[0004] Asn Phe Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Ser
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Ser Trp Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 9
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 4G10H3L3 重链可变区的核酸序列

<400> 9
 cagggtgcagc tggctgagtc tggggccgaa gtgaagaaac ccggcgccctc agtgaaggtc 60
 agctgcaagg ccagcgggta cagtttact ggatatacca tgaactgggt ccgacaggcc 120
 cctggccagg ggctggagtg gatcggcctg attaacctt acaacaacat cactaactac 180
 gcacagaagt tccaggggag agtgacctt acagtgagaca ccagcatttc cacagcctac 240

atggaactgt cccggctgag atctgacgat acaggcgtgt acttctgcgc taggctggat 300

taccgcagct attggggaca gggcacactg gtgactgtca gcgca 345

<210> 10
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 4G10H3L3 重链可变区的氨基酸序列

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asn Ile Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0005]

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 11
<211> 327
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 4G10H3L3 轻链可变区的核酸序列

<400> 11

caggctgtcg tcactcagga accttcactg accgtgtctc ctggcgggac tgtcaccctg 60

acatgcggca gctccacagg ggccgtgacc acaagtaact tcccaaattg ggtccagcag 120

aagccaggac aggtccccg gagtctgac ggaggcacca acaacaaggc cagctggaca 180

cccgcacggt tcagcggcag cctgctgggc ggcaaggccg ctctgacaat tagcggagcc 240

cagcctgagg acgaagccga gtactattgc gctctgtggt actccaacca ctgggtgttc 300

ggcggcggca ccaagctgac tgtgctg 327

<210> 12

<211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 4G10H3L3 轻链可变区的氨基酸序列

 <400> 12
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Phe Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ser
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Lys Ala Ser Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

[0006]

<210> 13
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 4G10H4L3 重链可变区的核酸序列

 <400> 13
 caggtgcagc tggctcgagtc tggggccgaa gtgaagaaac ccggcgccctc agtgaaggtc 60
 agctgcaagg ccagcgggta cagtttcact ggatatacca tgaactgggt ccgacaggcc 120
 cctggccagg ggctggagtg gatcgccctg attaacctt acaacgacat cactaactac 180
 gcacagaagt tccaggggag agtgacctt acagtgaca ccagcatttc cacagcctac 240
 atggaactgt cccggctgag atctgacgat acaggcgtgt acttctgcgc taggctggat 300
 taccgcagct attggggaca gggcacactg gtgactgtca gcgca 345

 <210> 14
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 4G10H4L3 重链可变区的氨基酸序列

 <400> 14
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Ile Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ala
 115

<210> 15
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial

[0007] <220>
 <223> 14C12 重链可变区的核酸序列

<400> 15
 gaggtcaaac tgggtggagag cggcggcggg ctggtgaagc cggcggggtc actgaaactg 60
 agctgcgccg cttccggtt cgccttttagc tctacgaca tgtcatgggt gaggcagacc 120
 cctgagaagc gcctggaatg ggctcgtact atcagcggag gcgggcgata cacctactat 180
 cctgactctg tcaaaggag attcacaatt agtcgggata acgccagaaa tactctgtat 240
 ctgcagatgt ctagtctgcg gtccgaggat acagctctgt actattgtgc aaaccggtac 300
 ggccaagcat ggtttgccta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtctc tgcc 354

<210> 16
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 14C12 重链可变区的氨基酸序列

<400> 16

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

	35	40	45
	Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr		
	65	70	75
	Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
		85	90
	Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105	110
	Leu Val Thr Val Ser Ala		
	115		
	<210> 17		
	<211> 318		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> 14C12 轻链可变区的核酸序列		
	<400> 17		
	gacattaaga tgacacagtc cccttcctca atgtacgcta gcctgggcga gcgagtgacc	60	
[0008]	ttcacatgca aagcatccca ggacatcaac acatacctgt cttggtttca gcagaagcca	120	
	ggcaaaagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaatagac tggtaggacgg ggtccccagc	180	
	agattctccg gatctggcag tgggcaggat tactccctga ccatcagctc cctggagtat	240	
	gaagacatgg gcacttacta ttgcctgcag tatgatgagt tcctctgac ctttgagca	300	
	ggcacaaaac tggaactg	318	
	<210> 18		
	<211> 106		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> 14C12 轻链可变区的氨基酸序列		
	<400> 18		
	Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly		
	1	5	10
	Glu Arg Val Thr Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr		
	20	25	30
	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile		
	35	40	45
	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105

<210> 19
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 14C12H1L1 重链可变区的核酸序列

<400> 19
gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggaggg ctggtgcagc ccggcgggctc actgcgactg 60
agctgcgcag cttccggatt cgccttttagc tcctacgaca tgtcctgggt gcgacaggca 120
ccaggaaagg gactggattg ggctcgtact atctcaggag gcgggagata cacctactat 180
cctgacagcg tcaagggccg gttcacaatc tctagagata acagtaagaa caatctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag ggctgaggac accgcactgt actattgtgc caaccgctac 300
ggggaagcat ggtttgccta ttgggggcag ggaaccctgg tgacagtctc tagt 354

[0009]

<210> 20
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 14C12H1L1 重链可变区的氨基酸序列

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 14C12H1L1 轻链可变区的核酸序列

<400> 21
gacattcaga tgactcagag cccctcctcc atgtccgcct ctgtgggcga cagggtcacc 60
ttcatatgcc gcgctagtca ggatatcaac acctacctga gctggtttca gcagaagcca 120
gggaaaagcc ccaagacact gatctaccgg gctaataagac tgggtgtctgg agtcccaagt 180
cggttcagtg gctcagggag cggacaggac tacactctga ccatcagctc cctgcagcct 240
gaggacatgg caacctacta ttgcctgcag tatgatgagt tcccactgac ctttggcgcc 300
gggacaaaac tggagctgaa g 321

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 14C12H1L1 轻链可变区的氨基酸序列

[0010]

<400> 22
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Linker 1

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Linker 2

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 25

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8D2H14L2 的重链可变区的氨基酸序列

<400> 25

[0011]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ser Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Ala
50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 26

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 8D2H14L2 的重链可变区的核酸序列

<400> 26

```
gaggtgcagc tggtcgaatc tggaggagga ctggtgcagc ctggaggaag ctcccggctg      60
tcatgtgccg ctagcggtt cactttttcc gacaactgga tgaattgggt gcgacaggca      120
ccaggcaaag gactggagtg gctggctcag atccggaaca agccctacaa ttatgaaaca      180
tactatagcg cctccgtgaa aggccggttc actattagta gagacgattc taagaacagc      240
gtgtacctgc agatgaatag cctgaagaca gaggatactg gcgtctacta ttgcacagca      300
cagtttgctt attggggaca gggcaccctg gtgacagtct ctagt                      345
```

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8D2H14L2 的轻链可变区的氨基酸序列

<400> 27

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

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
                20              25              30
```

```
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35              40              45
```

```
Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50              55              60
```

```
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80
```

```
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe
85              90              95
```

```
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100             105
```

<210> 28

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 8D2H14L2 的轻链可变区的核酸序列

<400> 28

```
gacatccaga tgactcagag cccctcaagc ctgtctgcaa gtgtgggcga tagggtcacc      60
atcacatgtc gcacctccga aaacatctac gggggactga attggtatca gcgcaagccc      120
ggcaaatccc ctaagctgct gatctacggc gctaccaacc tggcatctgg ggtgtcctct      180
```

[0012]

cgattttcag ggagcggcag cggcaccgac tatactctga ccattagttc actgcagcct 240
gaggatgtgg ccacatacta ttgccagaat gtcctgagat caccattcac ttttgggagc 300
ggaaccaaac tggaaattaa g 321

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 14C12HCDR1

<400> 29

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 14C12HCDR2

<400> 30

Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr
1 5

[0013]

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 14C12HCDR3

<400> 31

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 14C12LCDR1

<400> 32

Gln Asp Ile Asn Thr Tyr
1 5

<210> 33
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 14C12LCDR2

<400> 33

Arg Ala Asn
1

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 14C12LCDR3

<400> 34

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 4G10HCDR1

<400> 35

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
1 5

[0014]

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 4G10HCR2

<400> 36

Ile Asn Pro Tyr Asn Asn Ile Thr
1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 4G10HCDR3

<400> 37

Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 4G10LCDR1

[0015]

<400> 38

Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Phe
1 5

<210> 39

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 4G10LCDR2

<400> 39

Gly Thr Asn
1

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 4G10LCDR3

<400> 40

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
1 5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 4G10H4L3HCDR2

<400> 41

Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Ile Thr
1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8D2H14L2HCDR1

<400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn Trp
1 5

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8D2H14L2HCDR2

<400> 43

Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr
1 5 10

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 8D2H14L2HCDR3

<400> 44

Thr Ala Gln Phe Ala Tyr
1 5

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 8D2H14L2LCDR1

<400> 45

[0016] Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
1 5

<210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 8D2H14L2LCDR2

<400> 46

Gly Ala Thr
1

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 8D2H14L2LCDR3

<400> 47

Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe Thr Phe
1 5 10

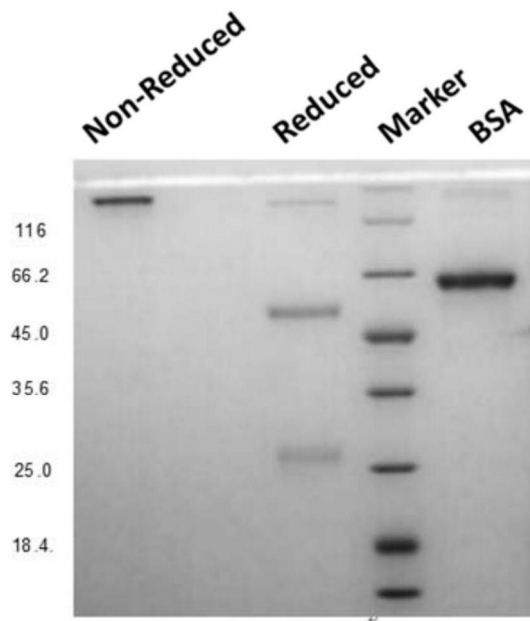


图1

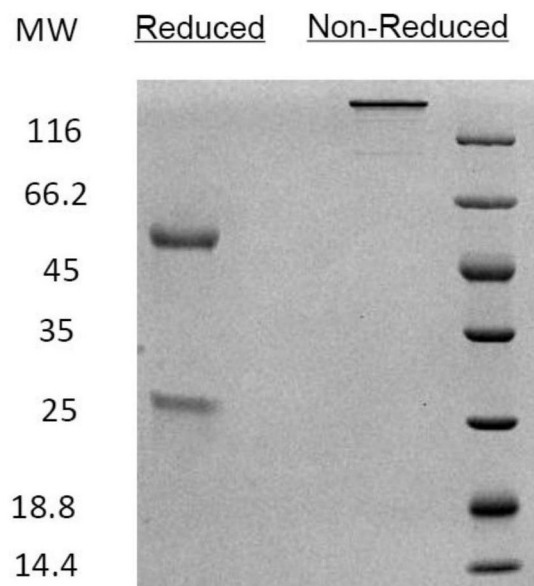


图2

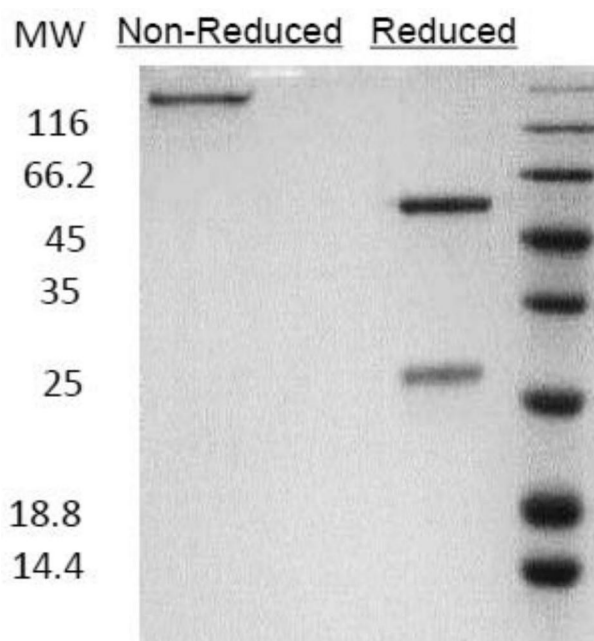


图3

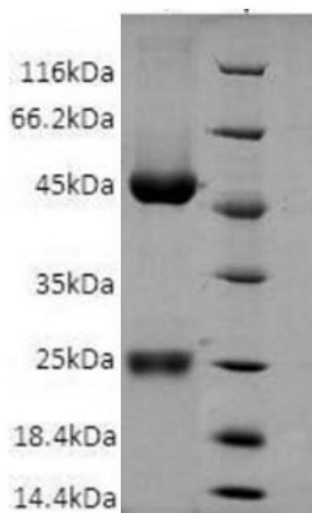


图4

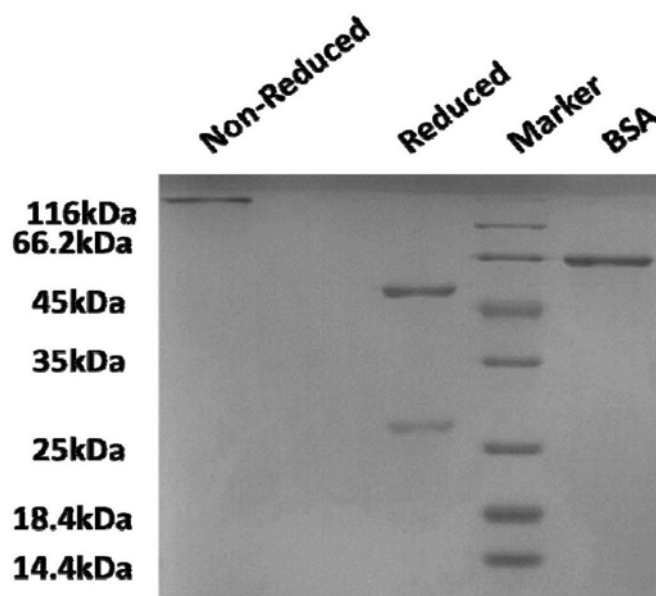


图5

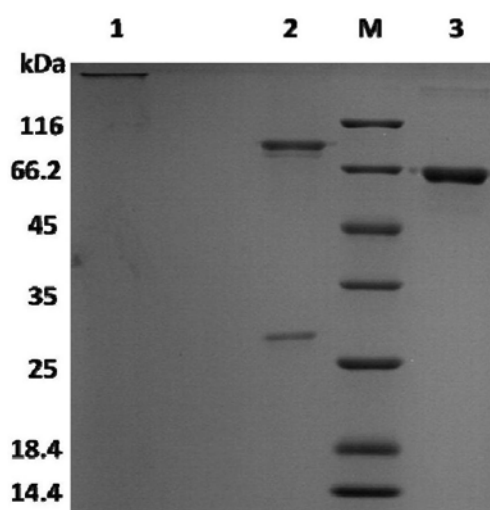


图6

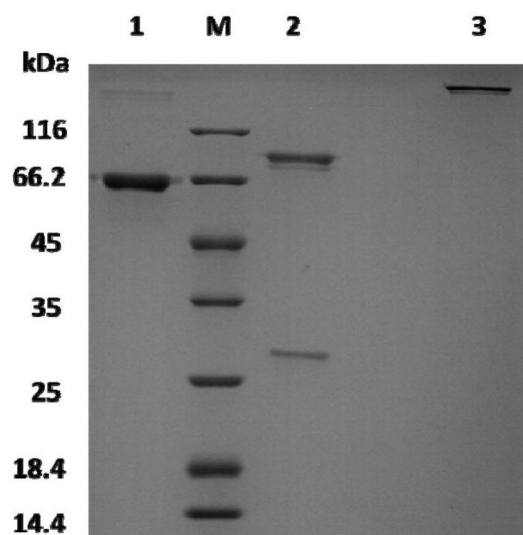


图7

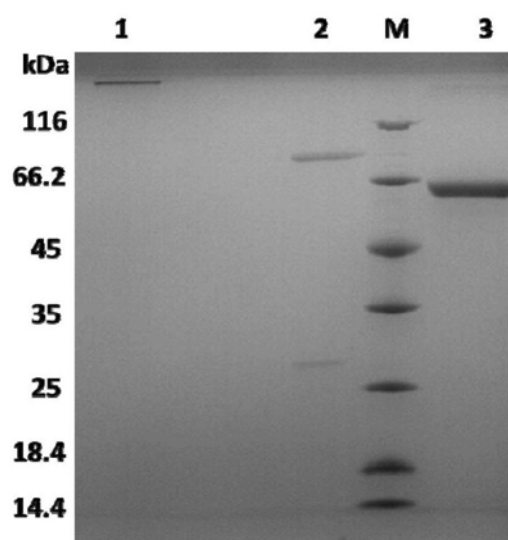


图8

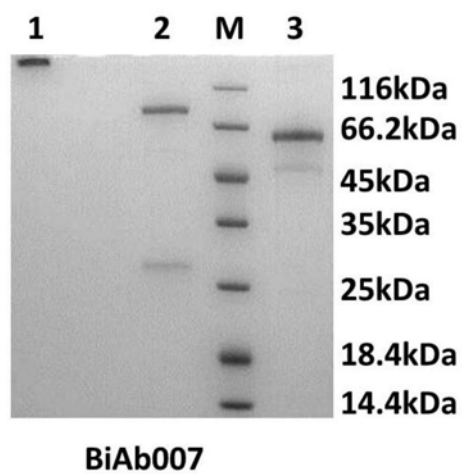


图9

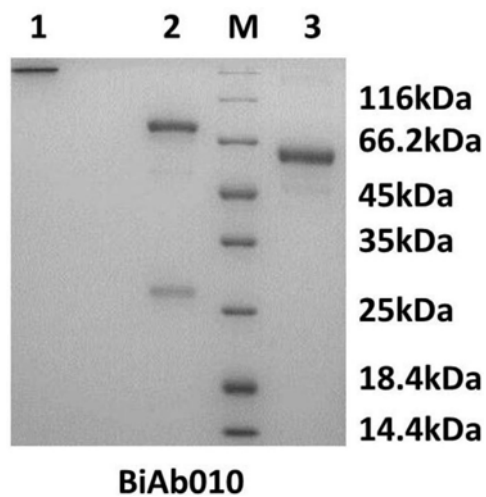


图10

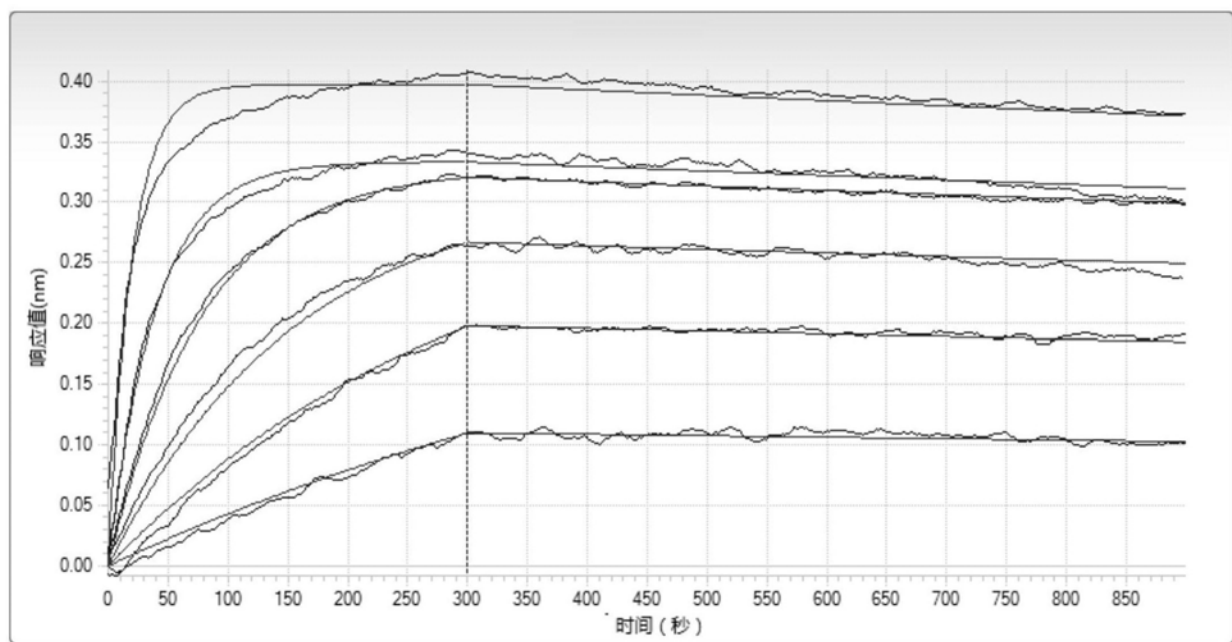


图11

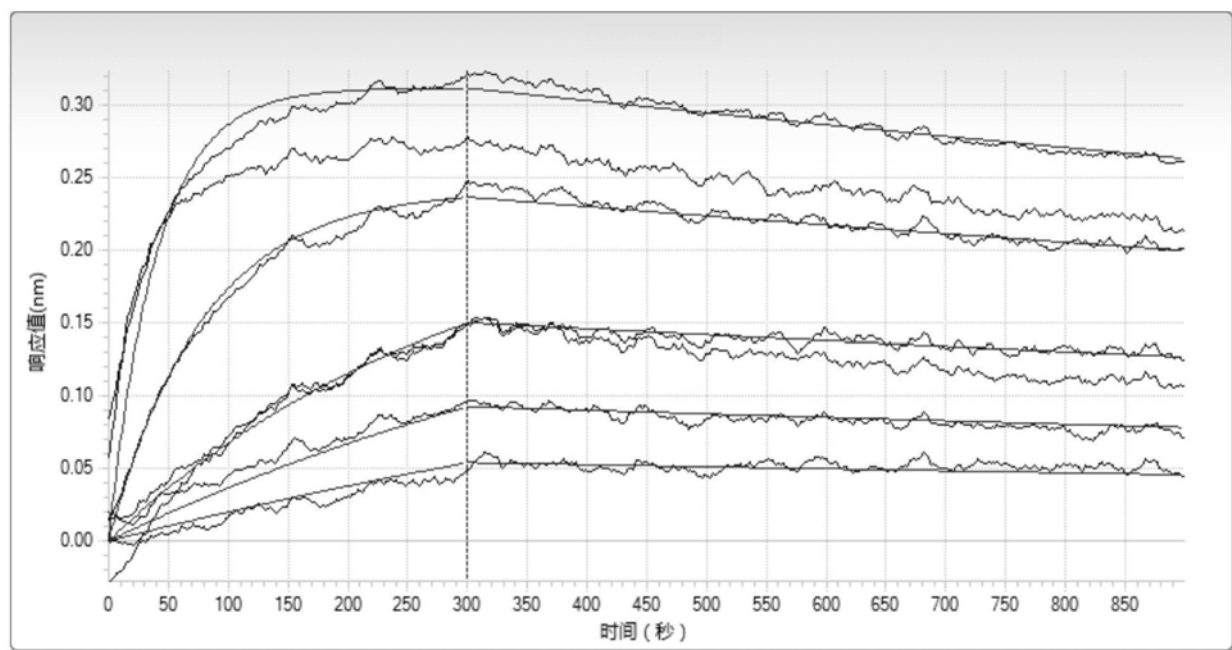


图12

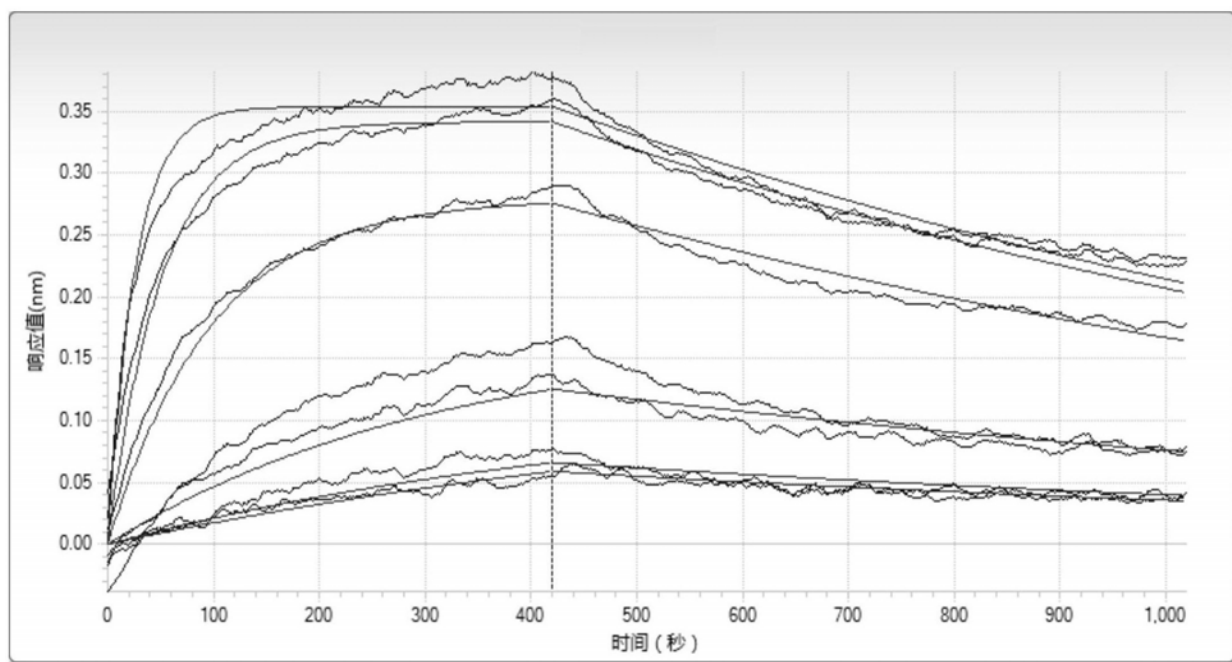


图13

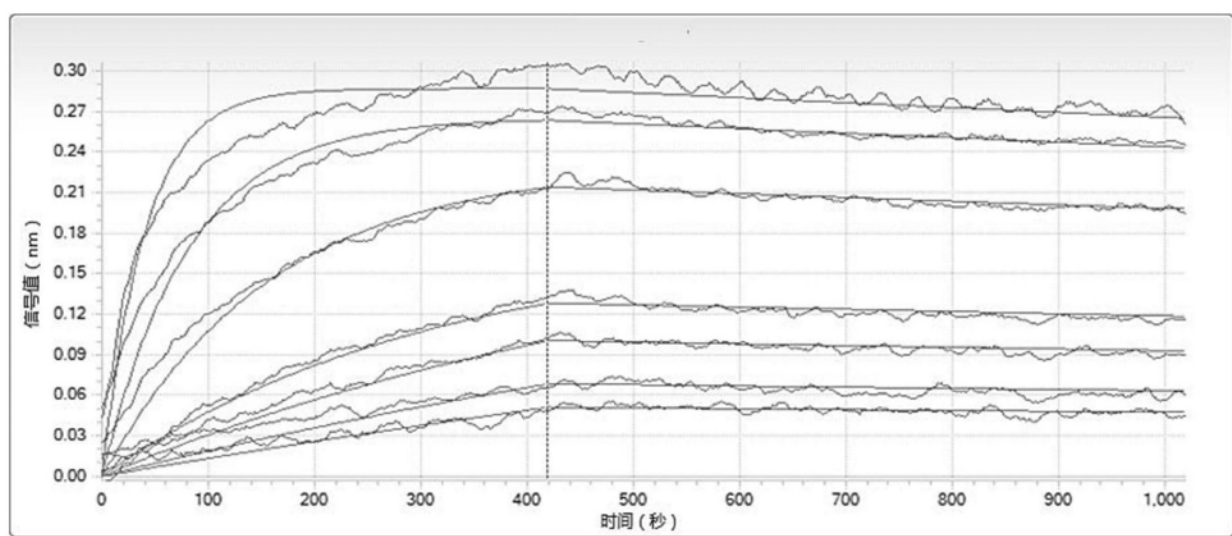


图14

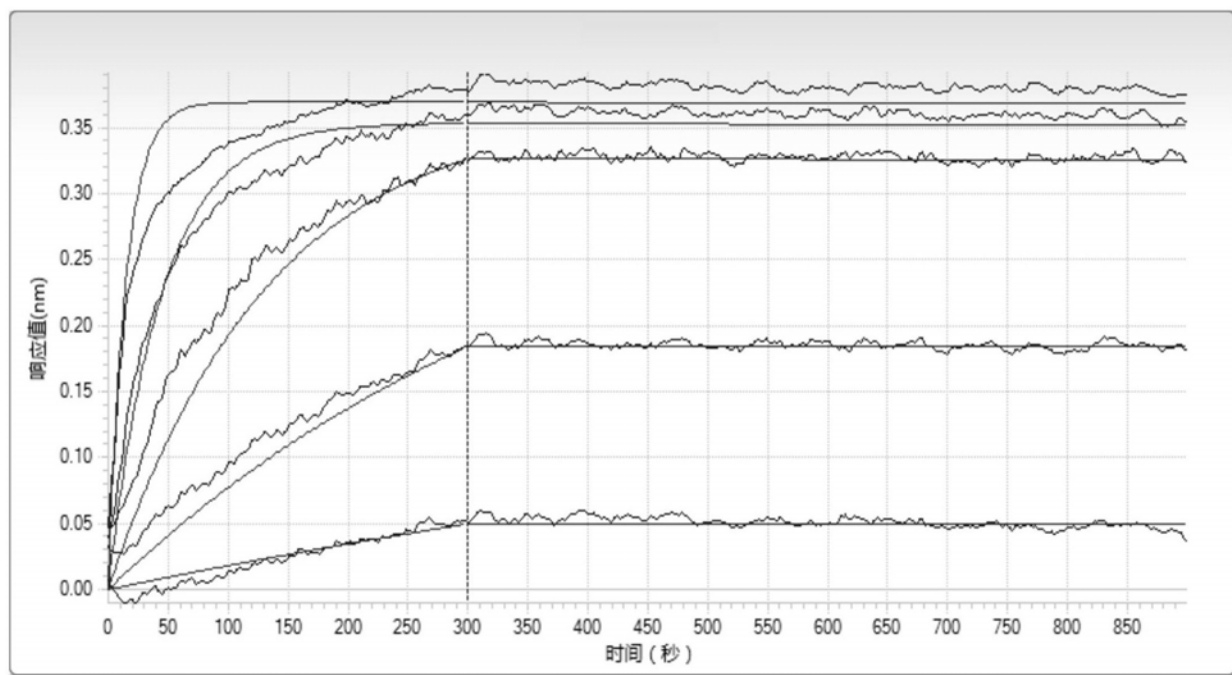


图15

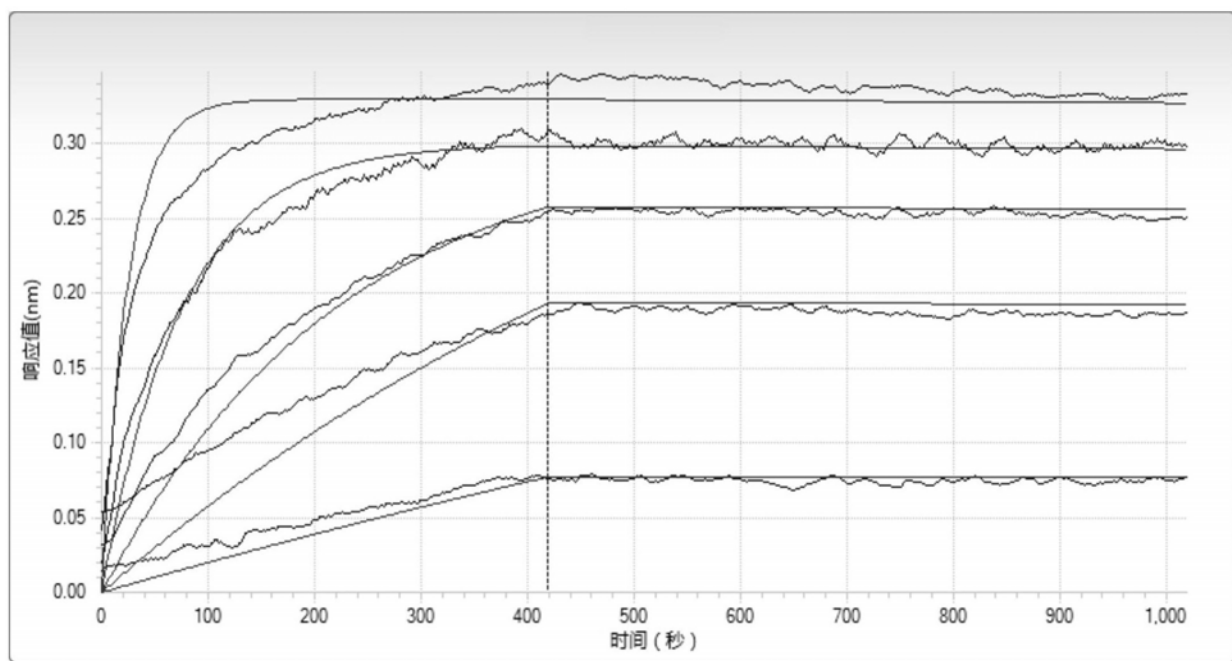


图16

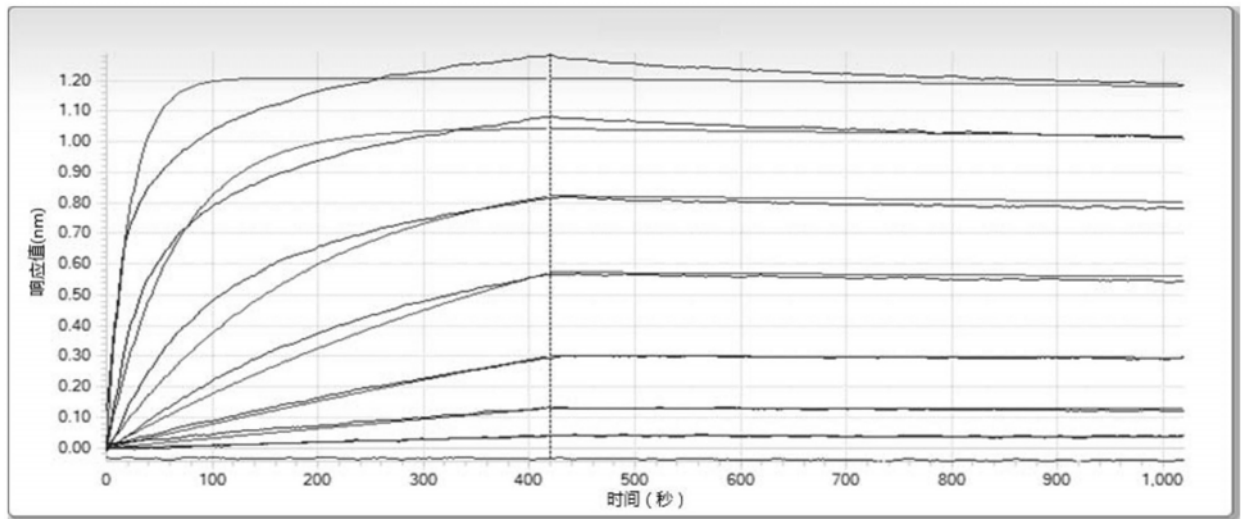


图17

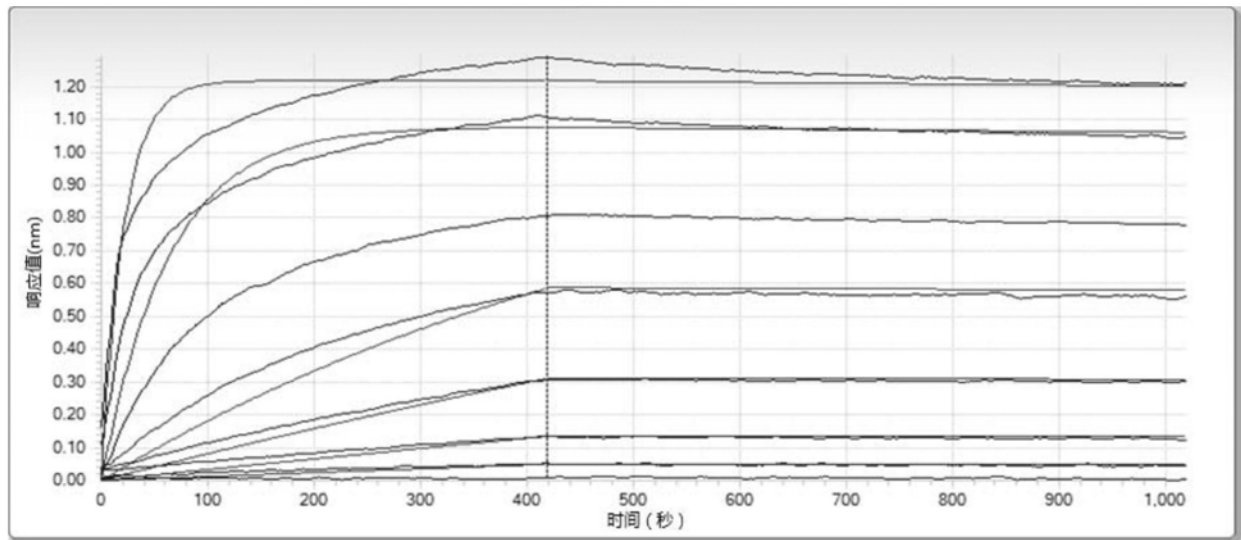


图18

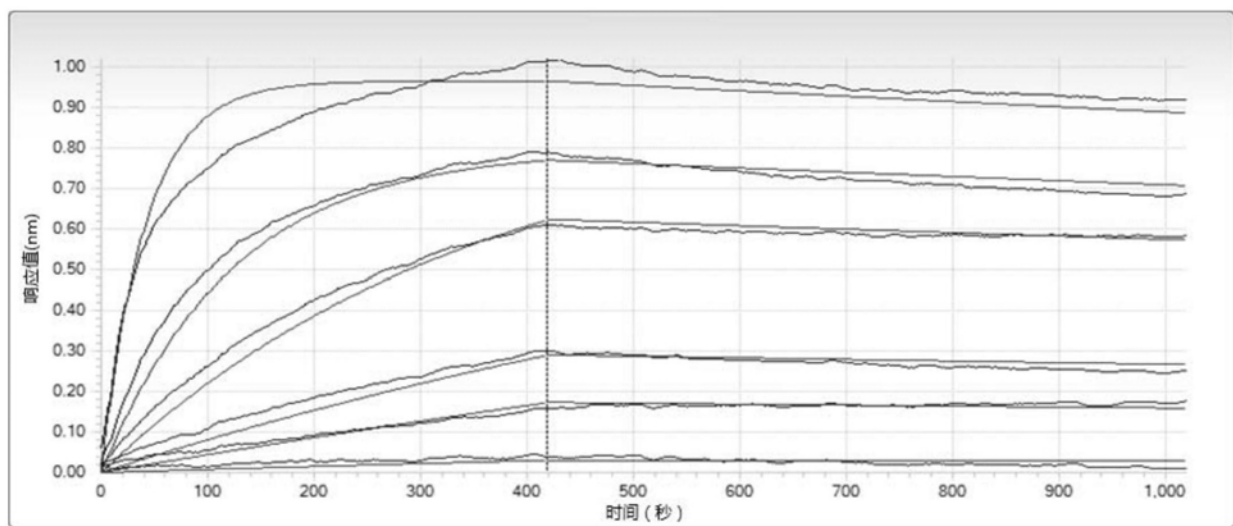


图19

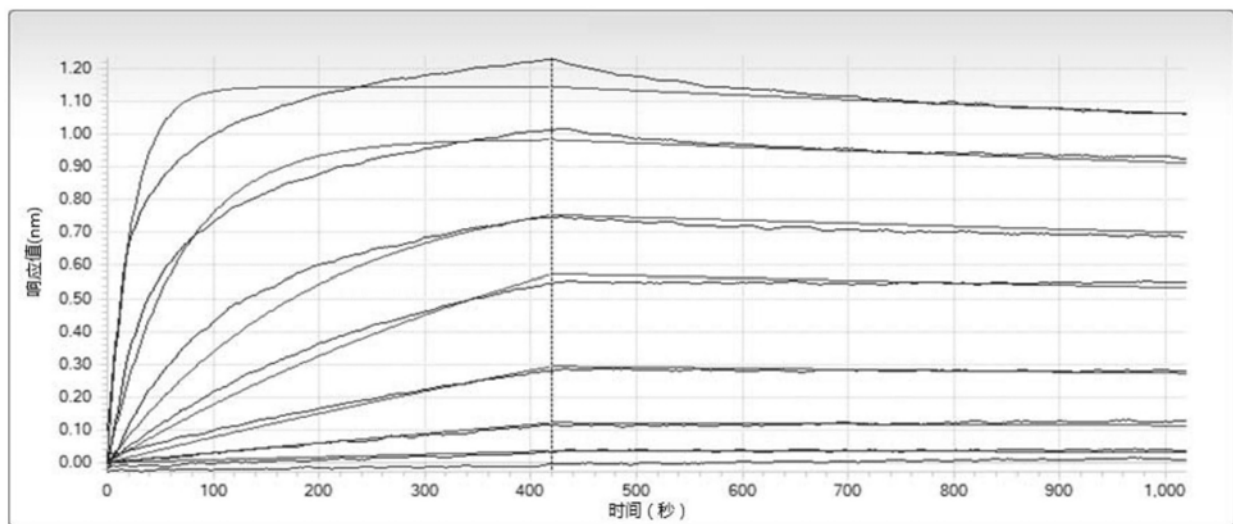


图20

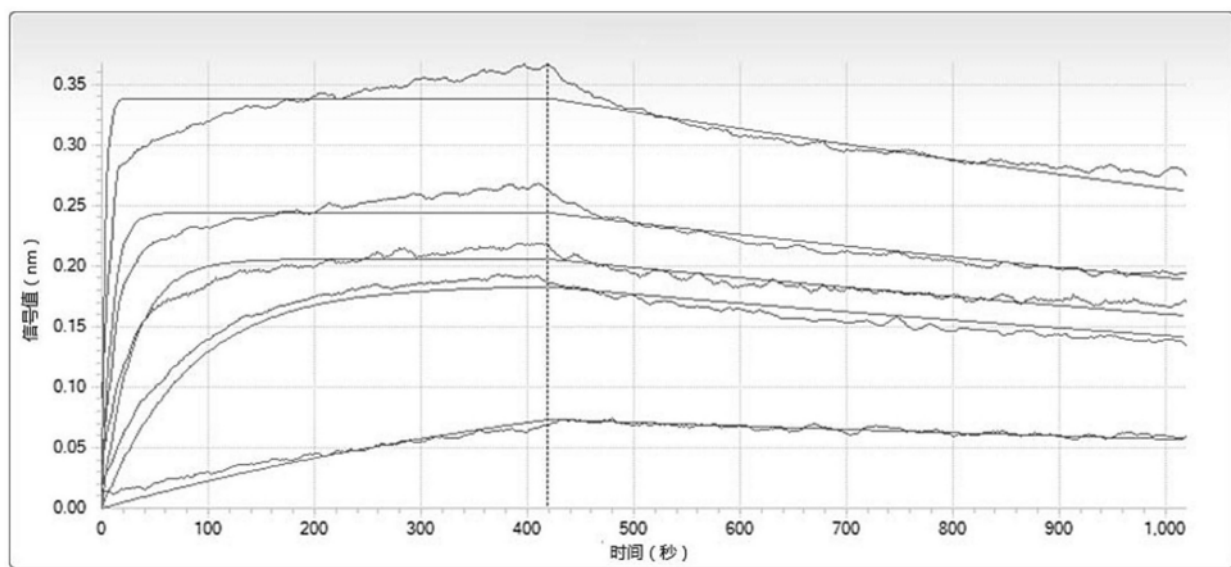


图21

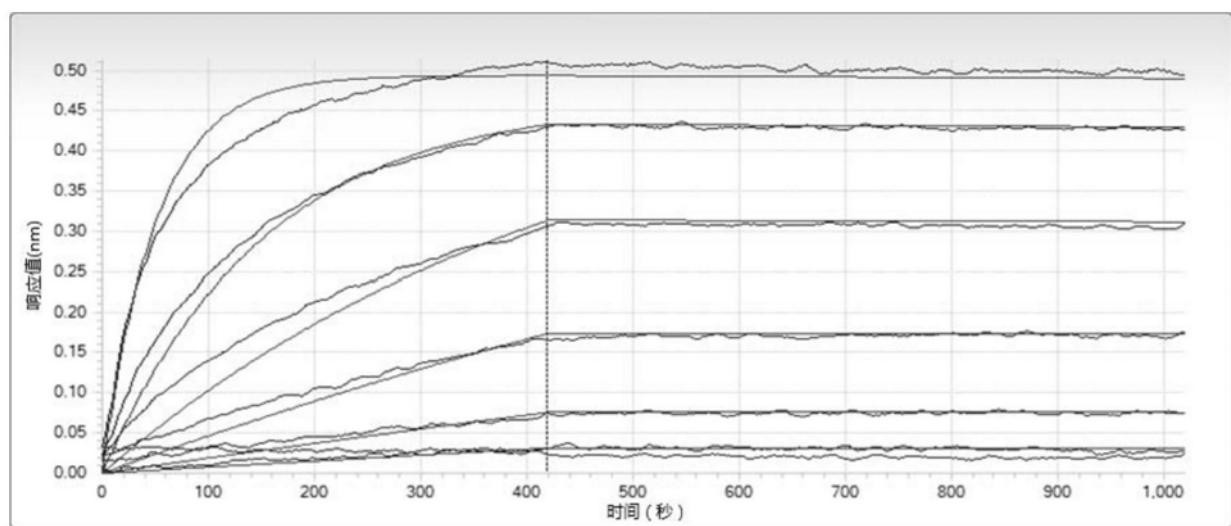


图22

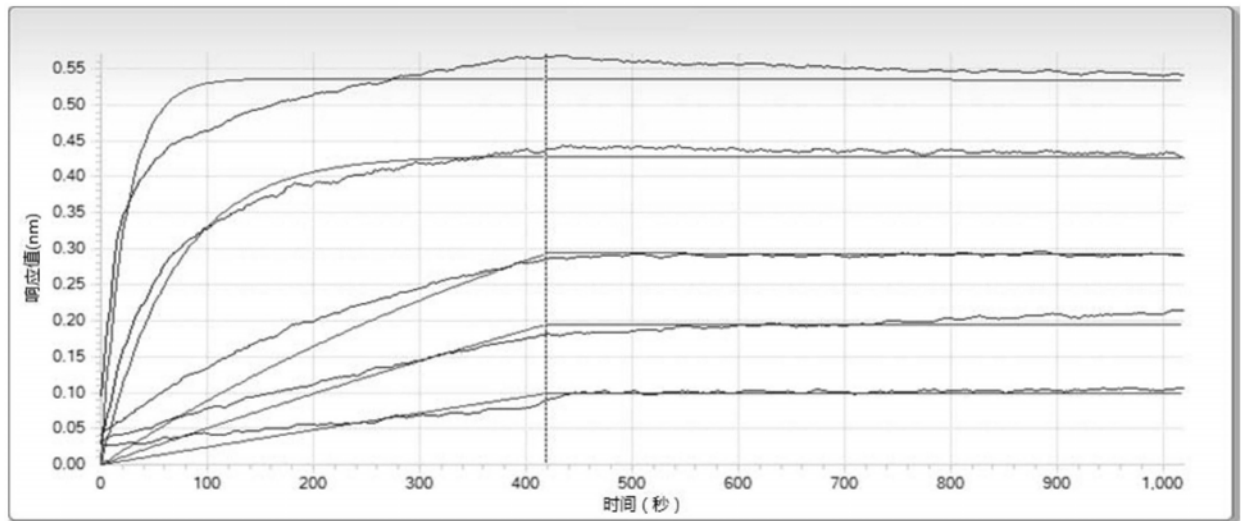


图23

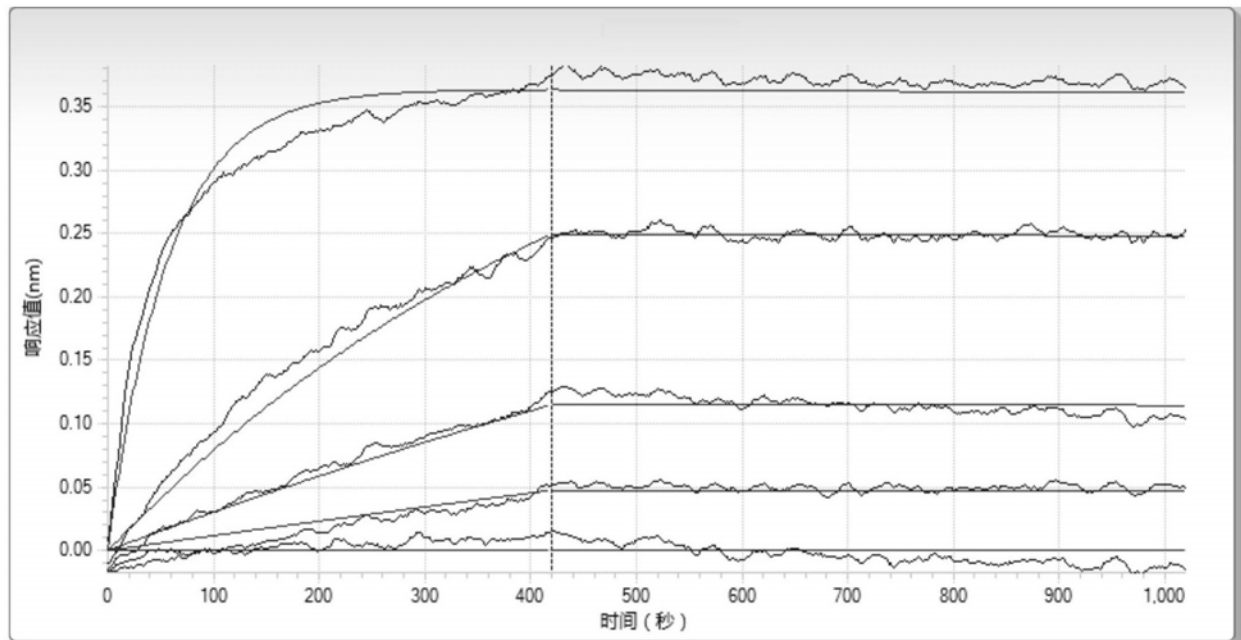


图24

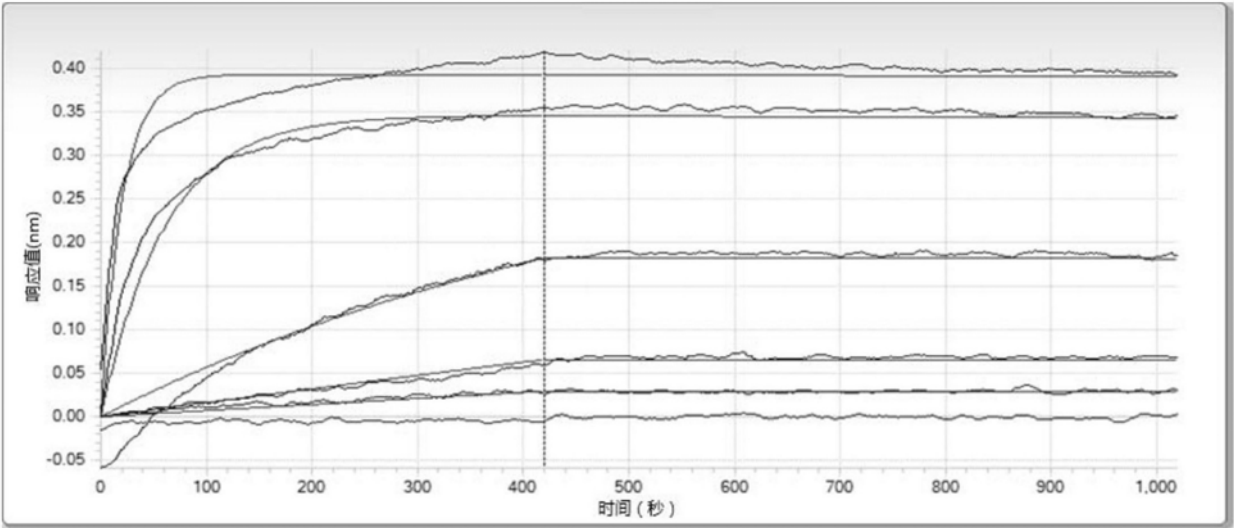


图25

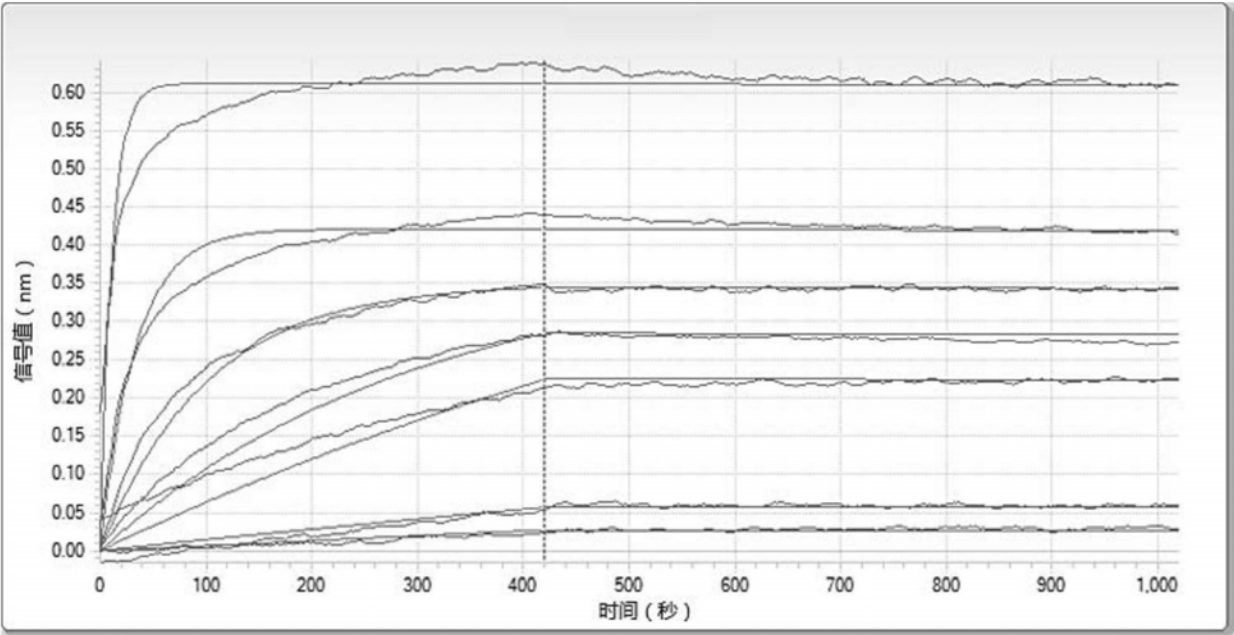


图26

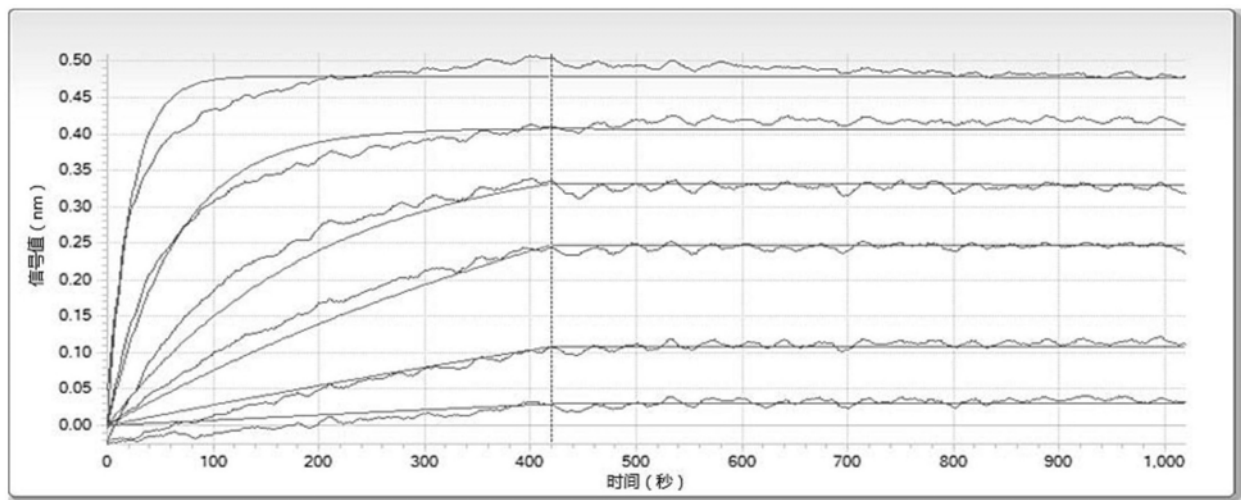


图27

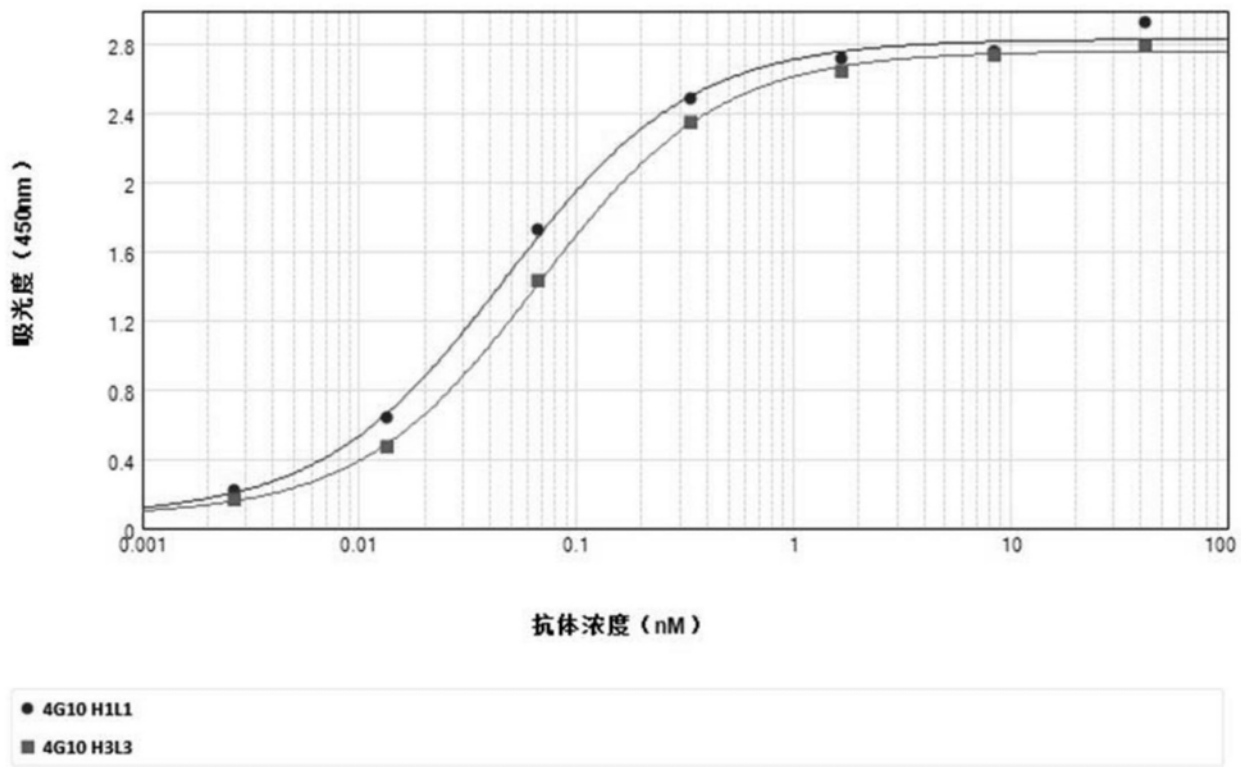


图28

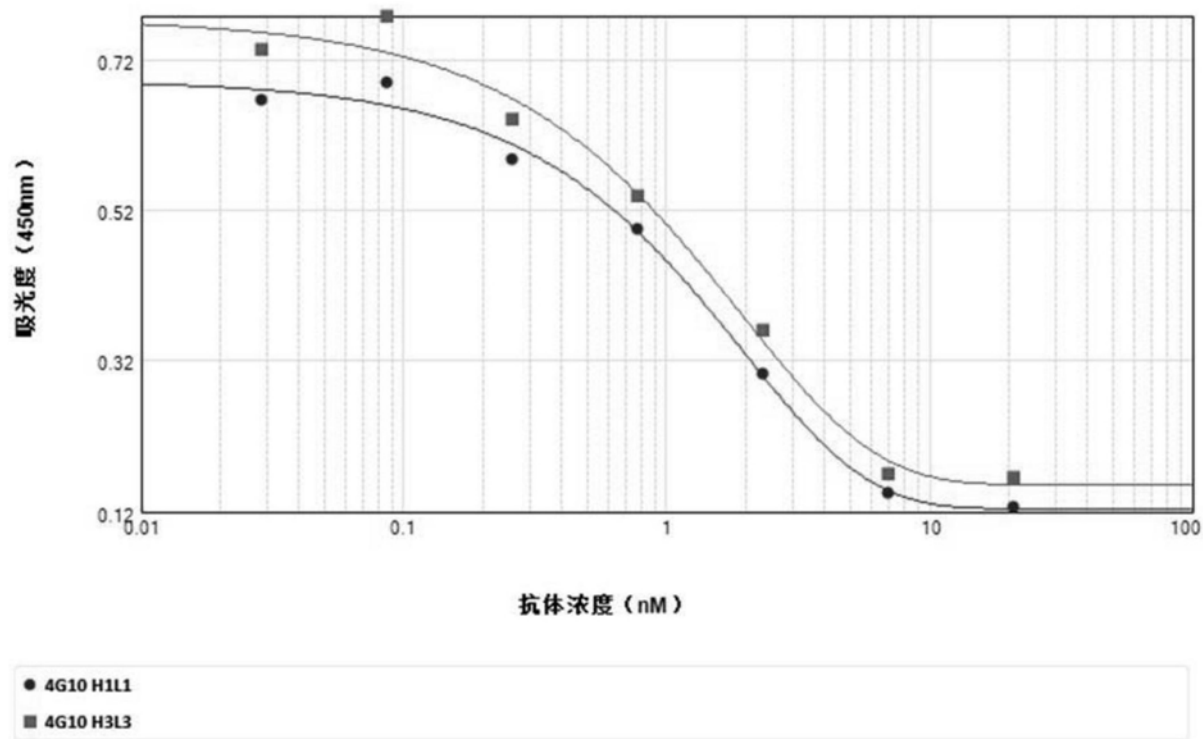


图29

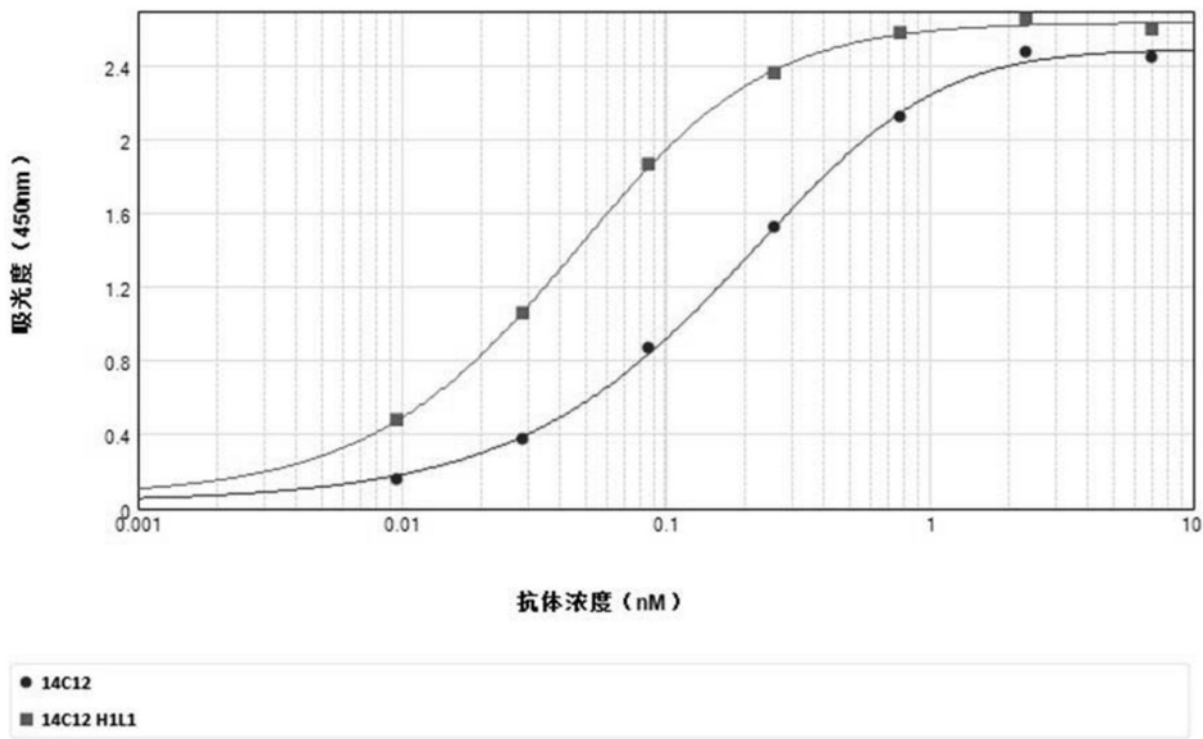


图30

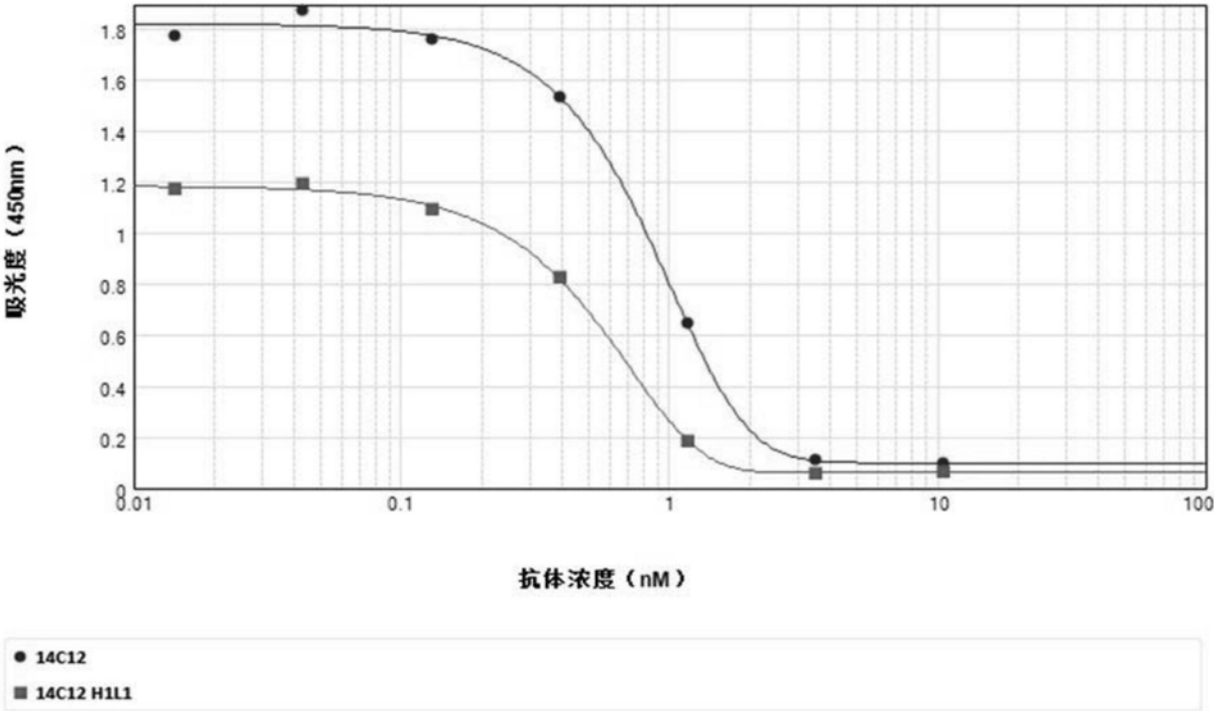


图31

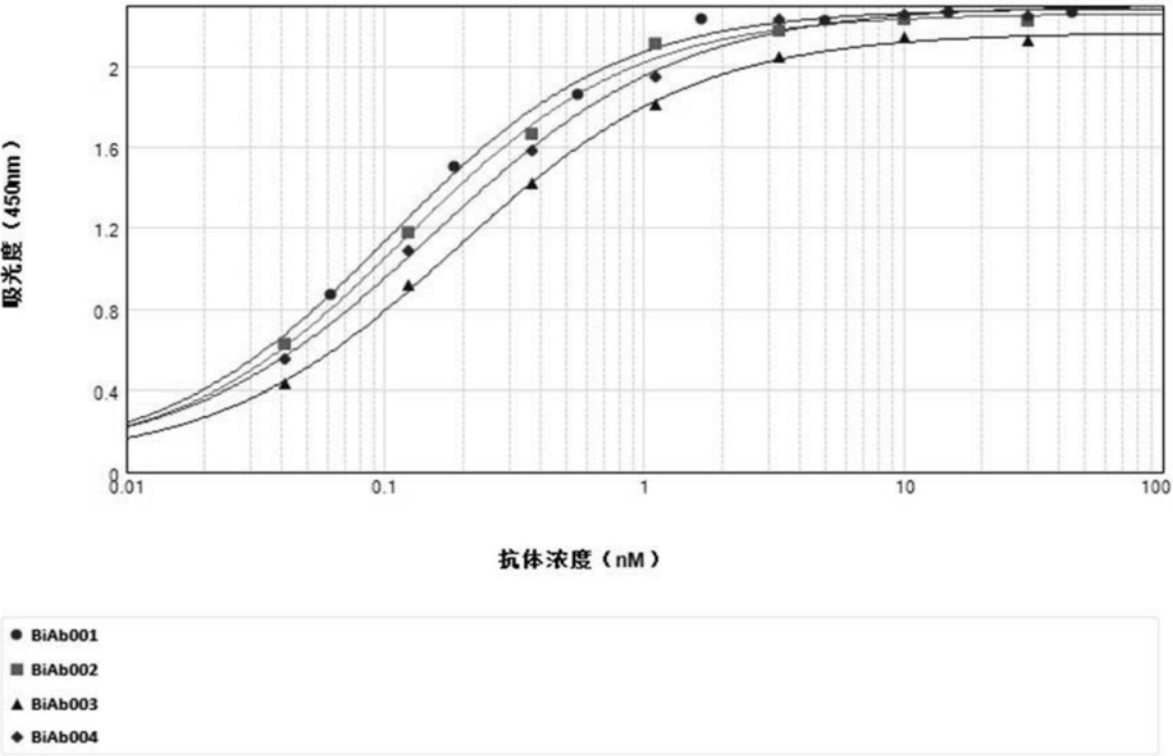


图32

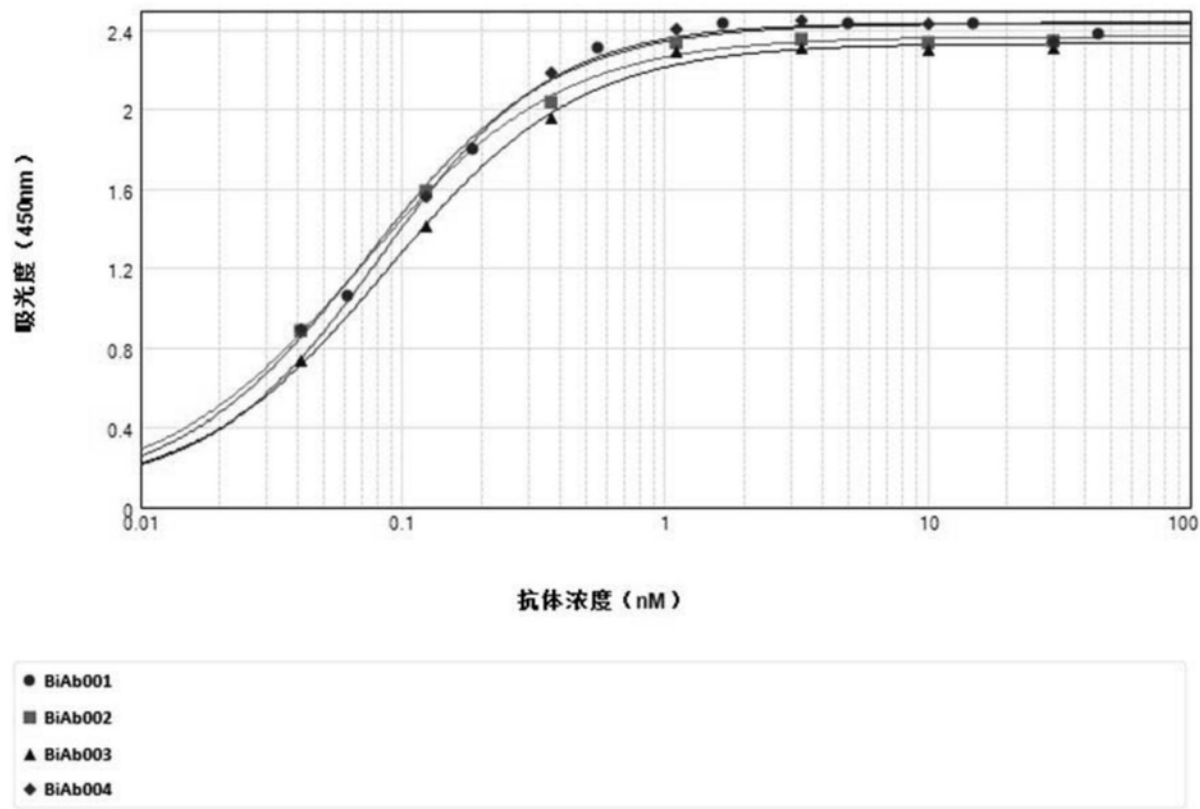


图33

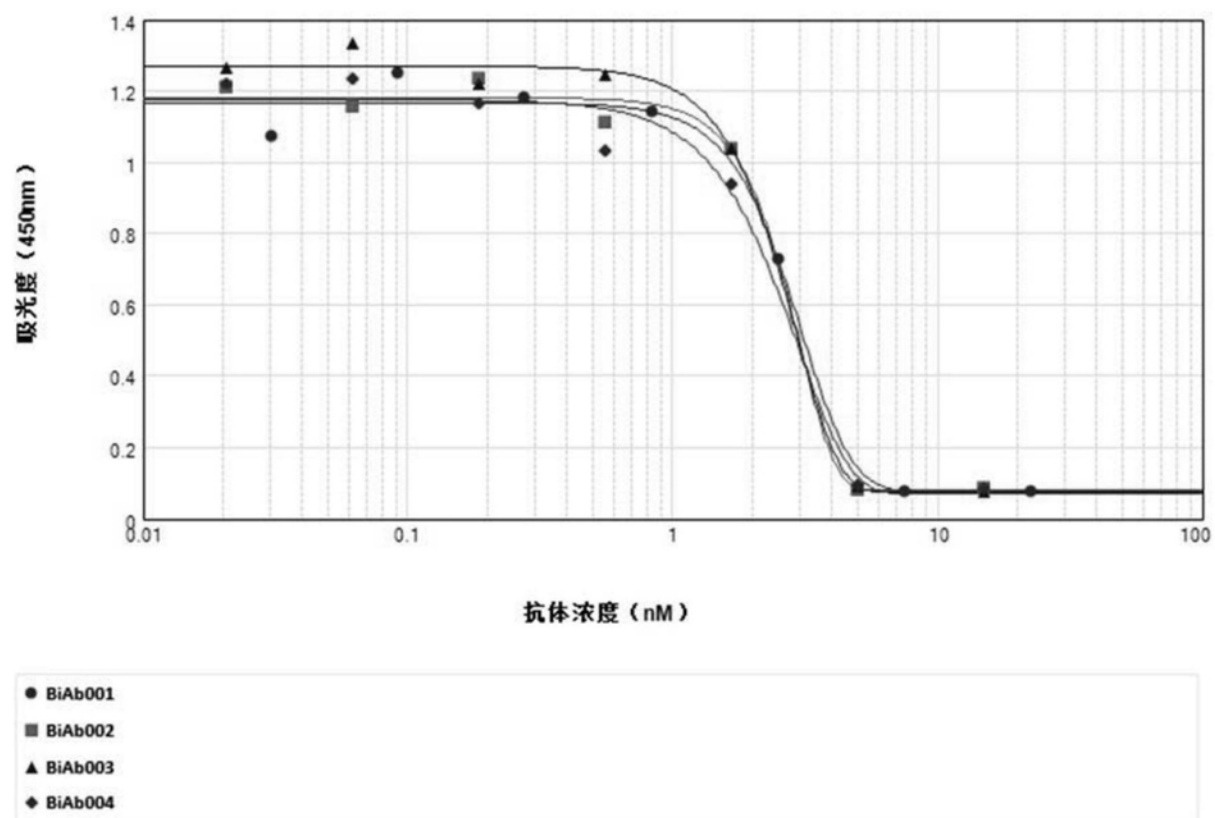


图34

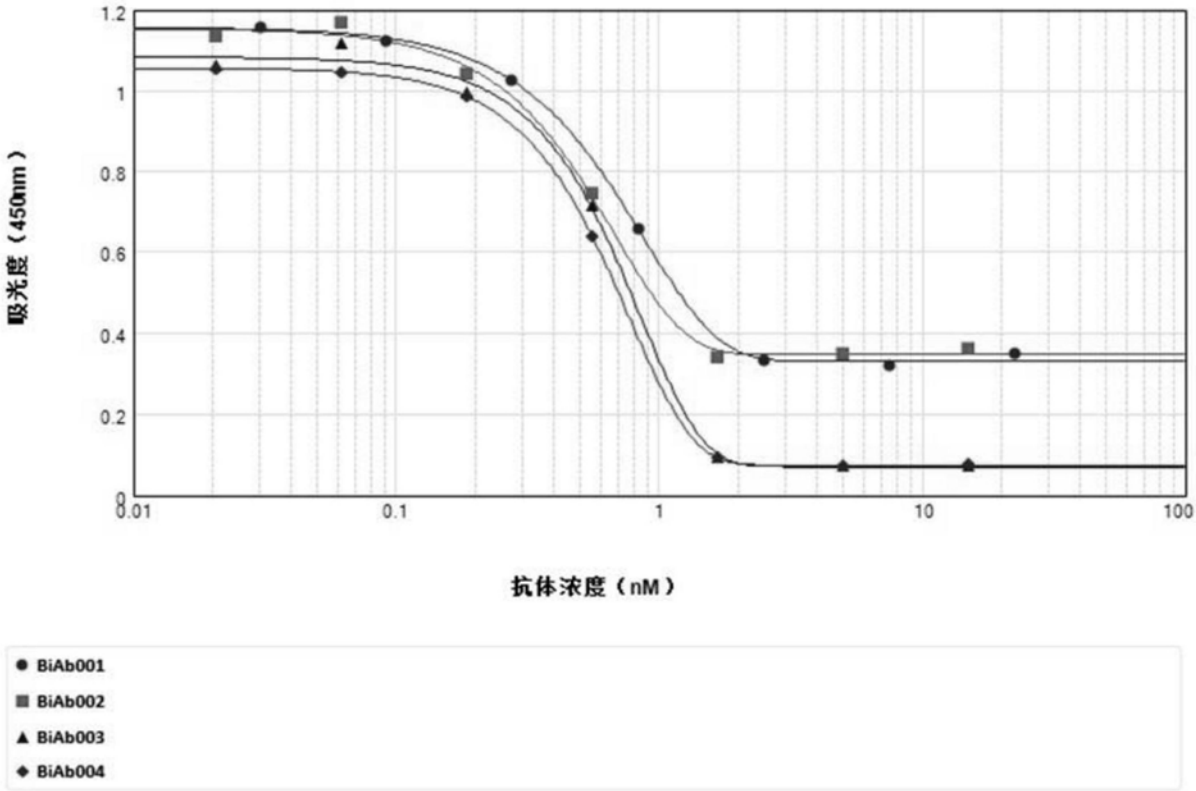


图35

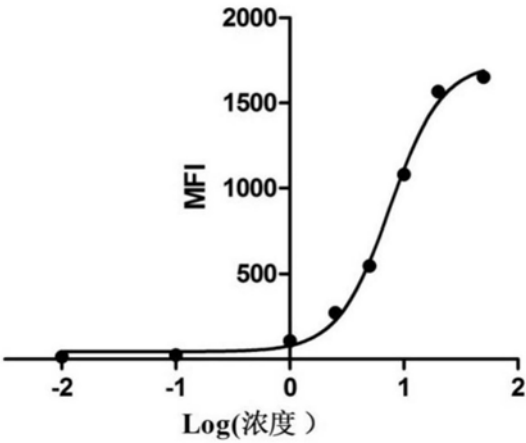


图36

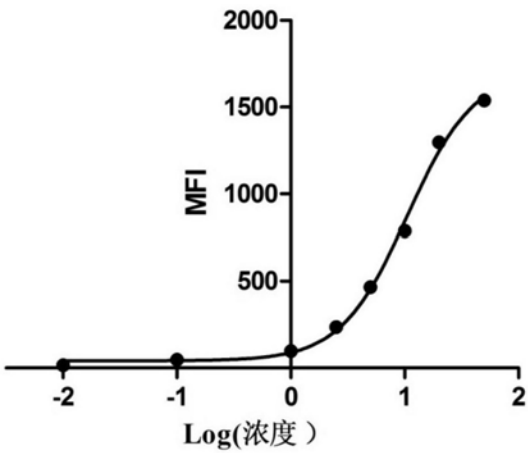


图37

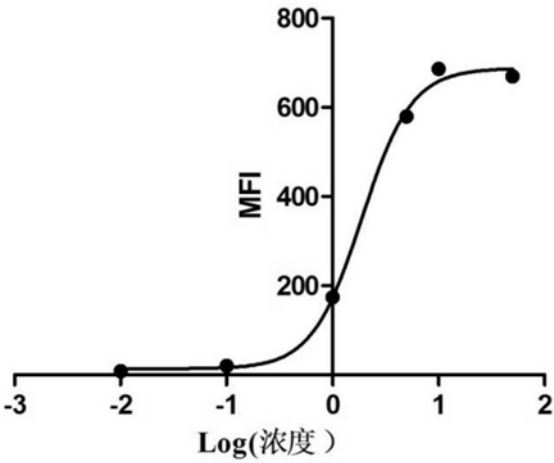


图38

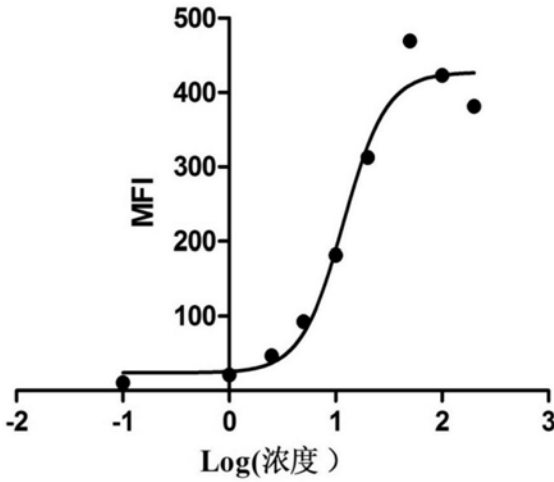


图39

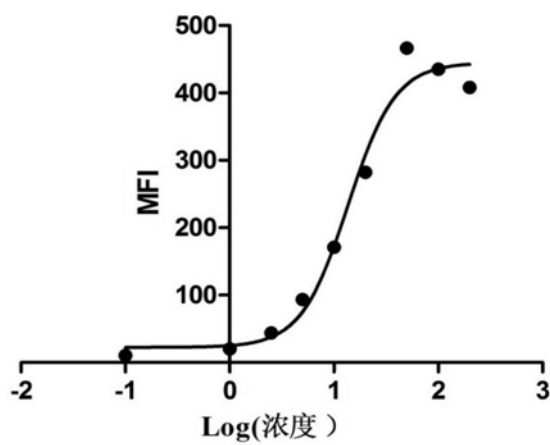


图40

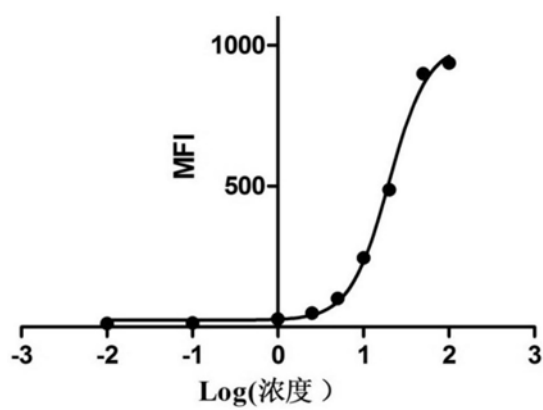


图41

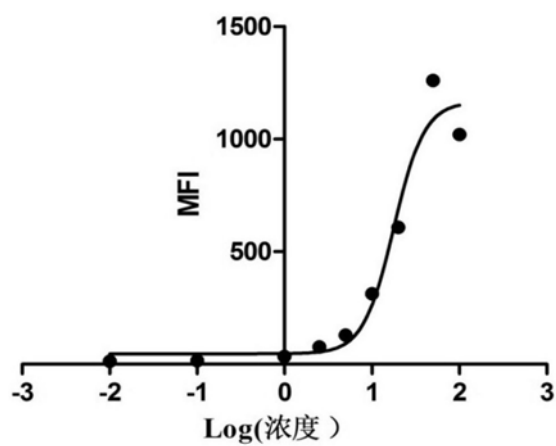


图42

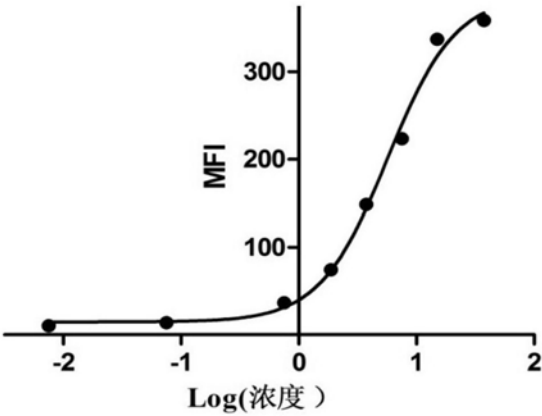


图43

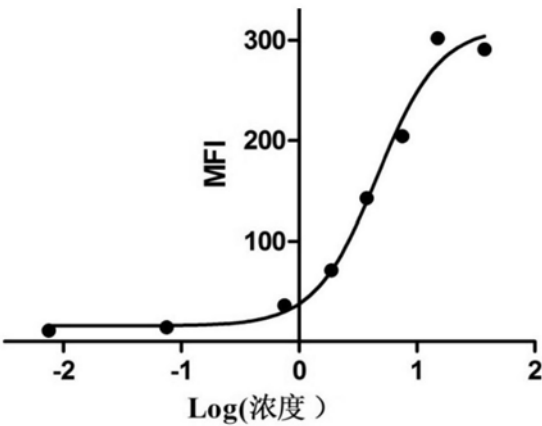


图44

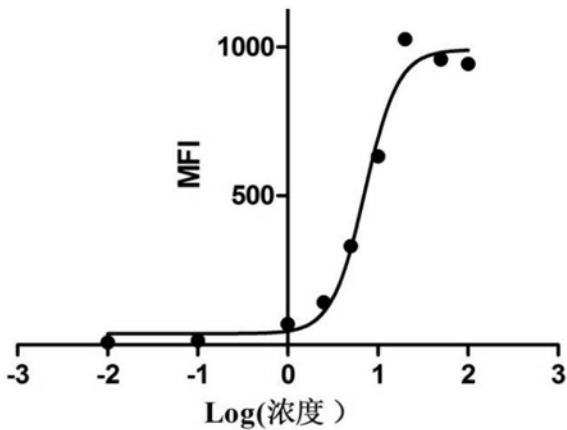


图45

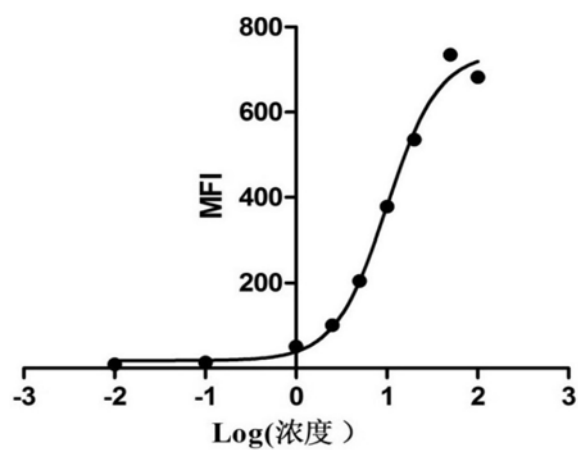


图46

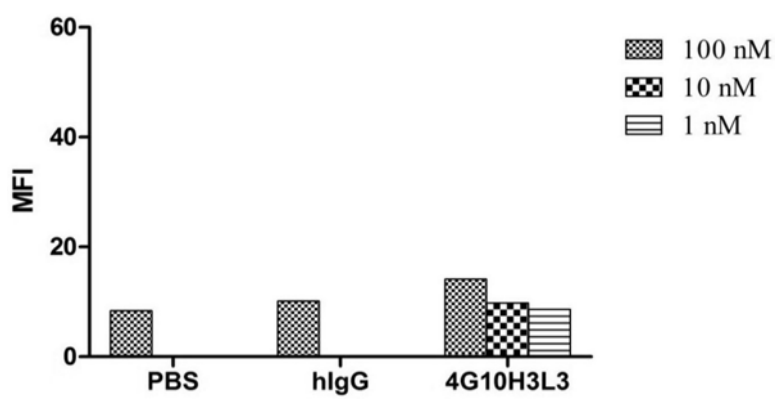


图47

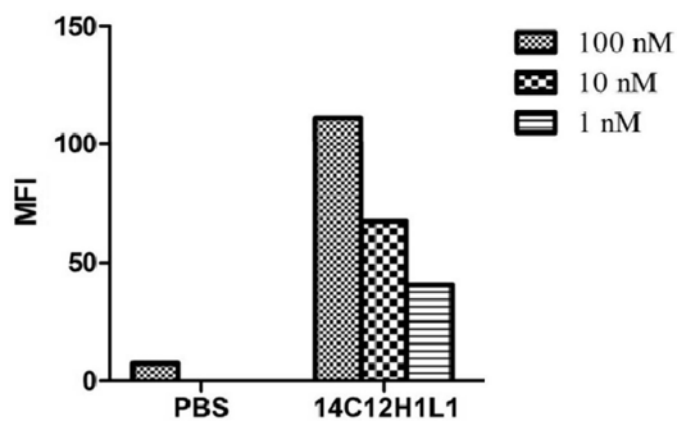


图48

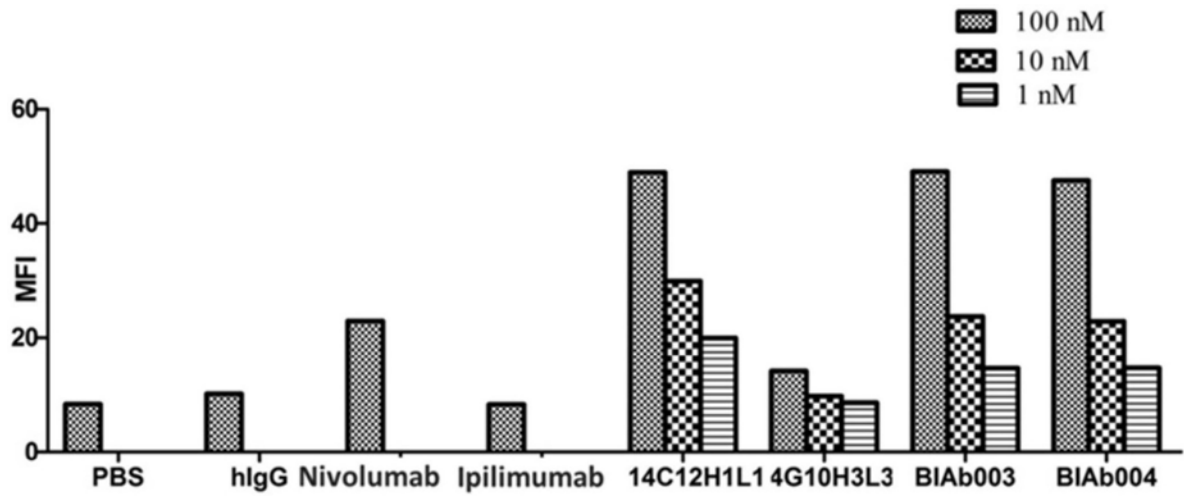


图49

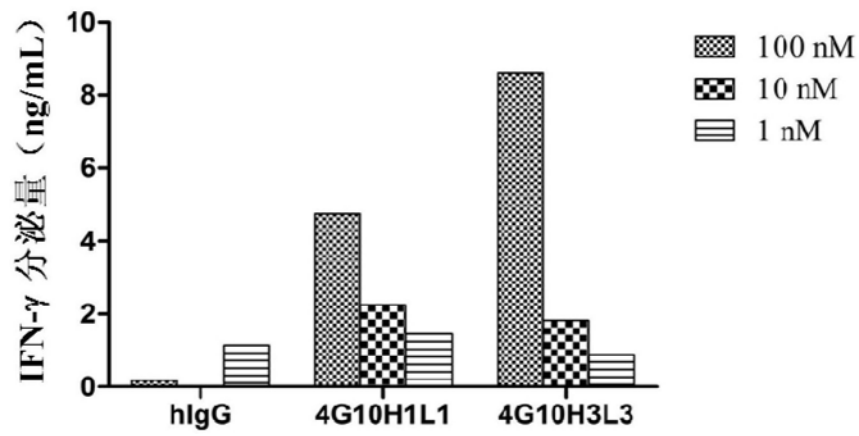


图50

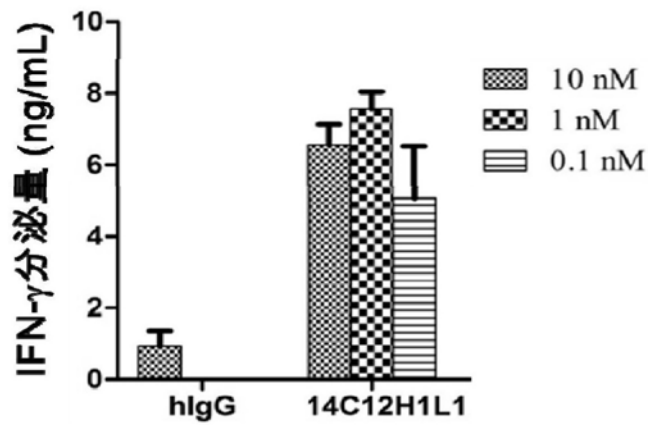


图51

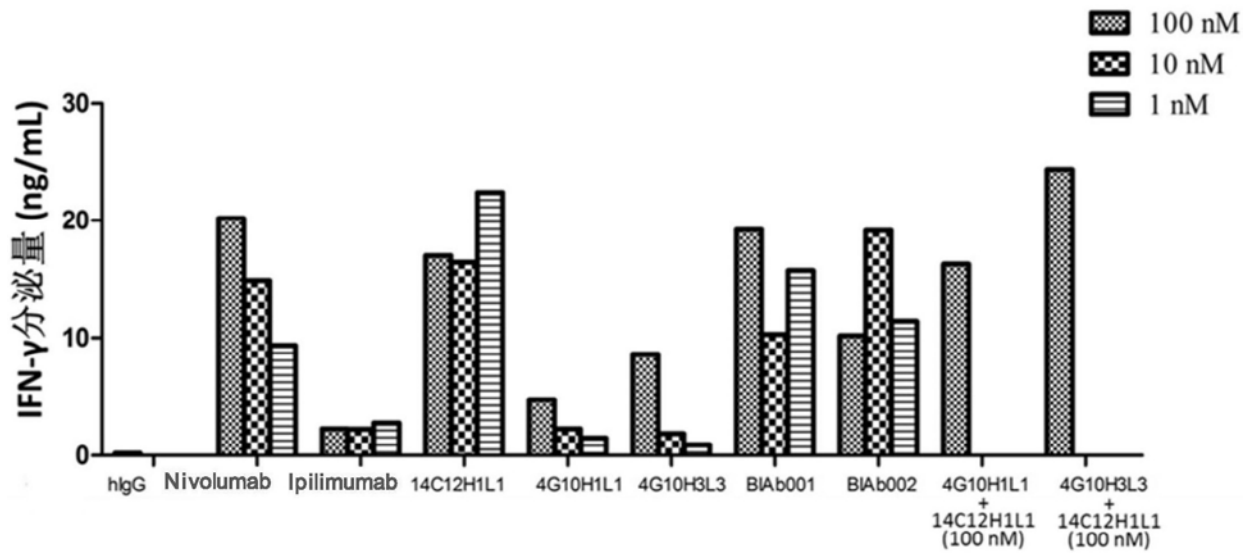


图52

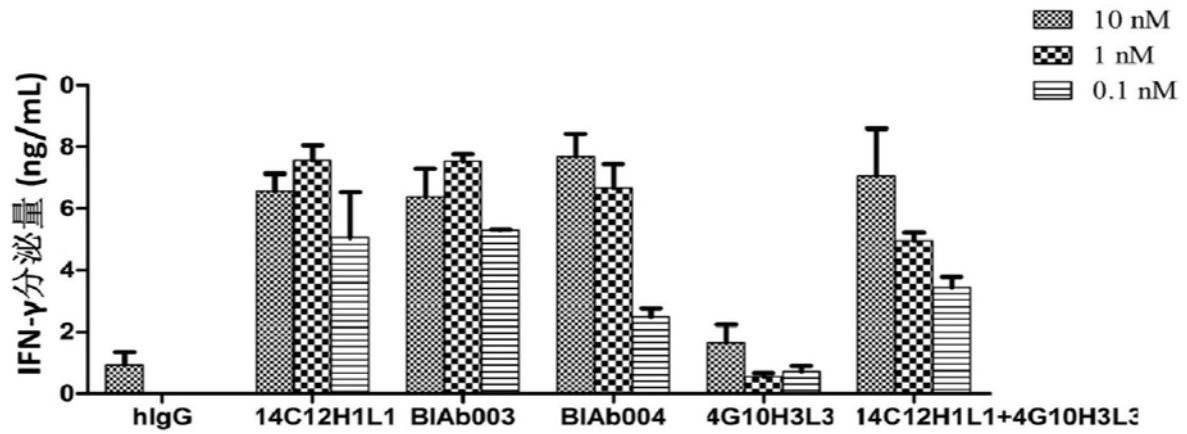


图53

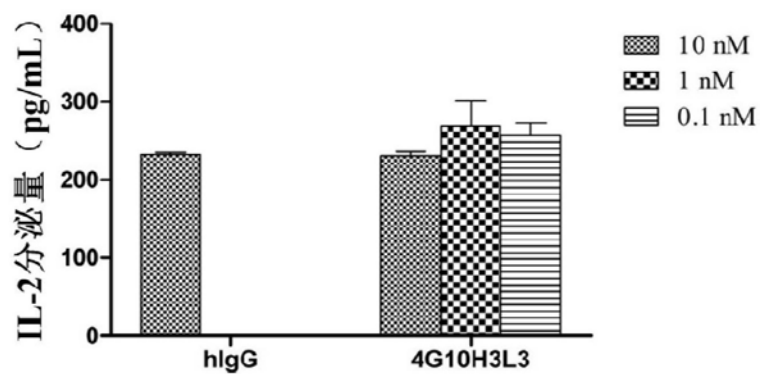


图54

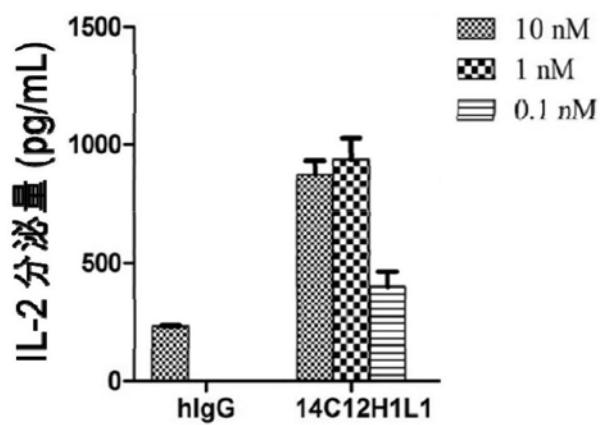


图55

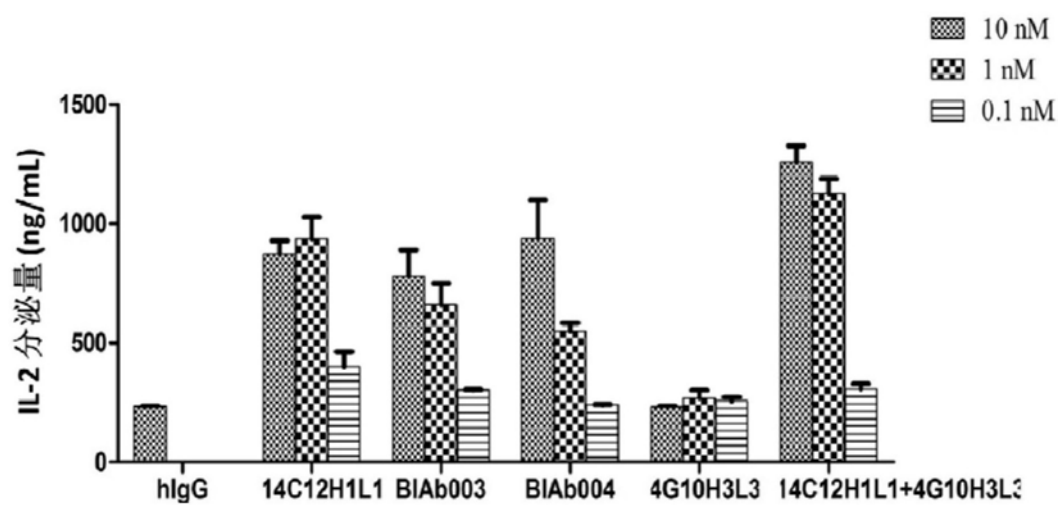


图56

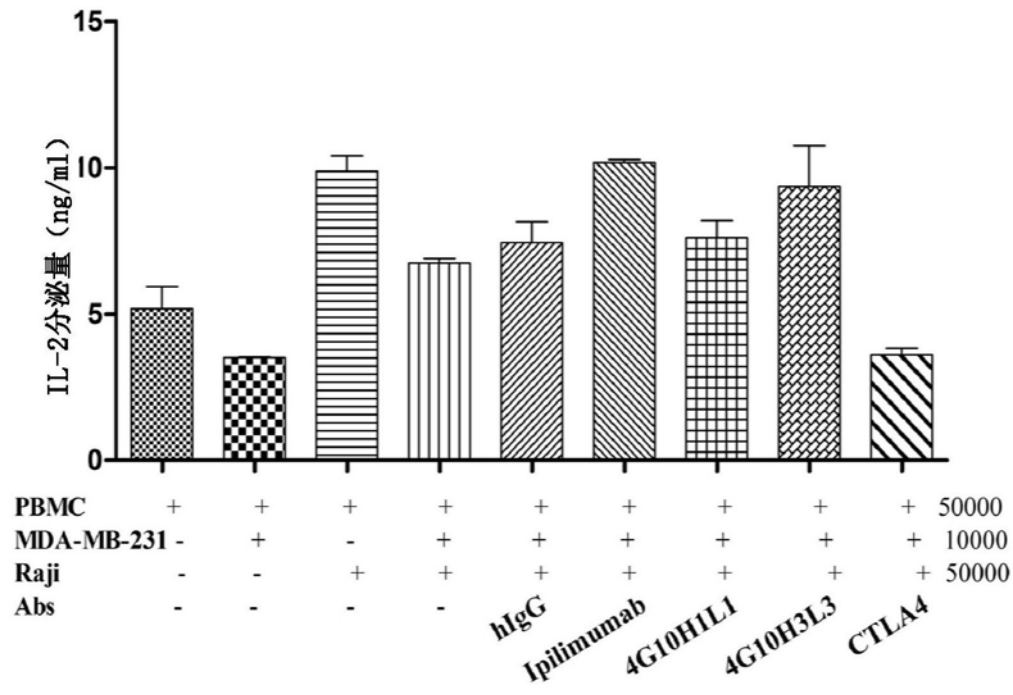


图57

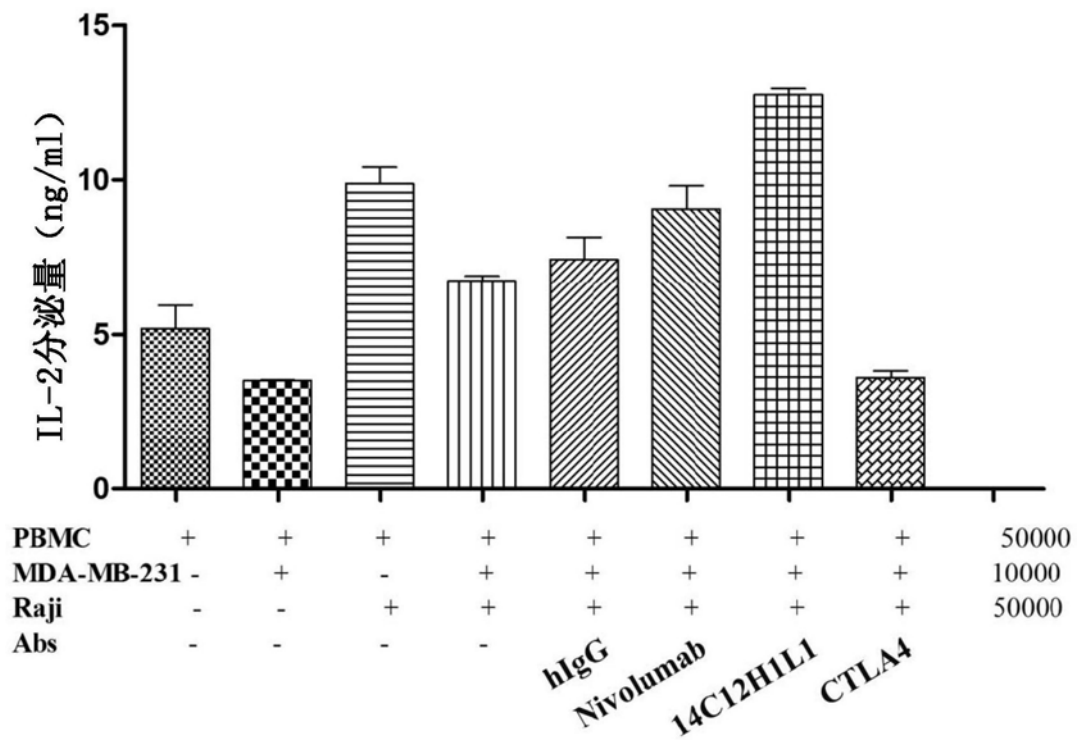


图58

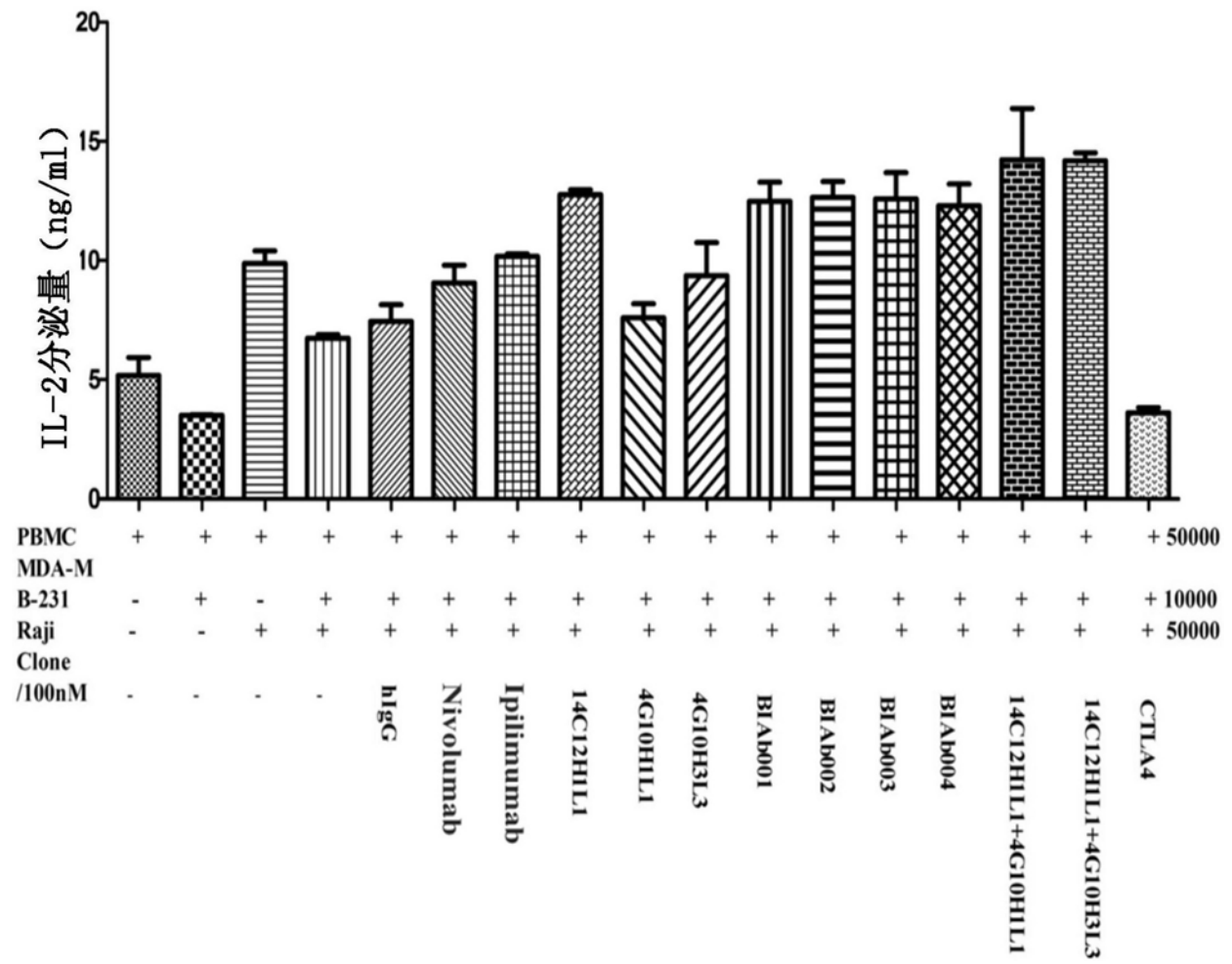


图59