



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111247166 B

(45) 授权公告日 2024.03.26

(21) 申请号 201880040390.1

(22) 申请日 2018.04.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111247166 A

(43) 申请公布日 2020.06.05

(30) 优先权数据
2017113141 2017.04.17 RU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/RU2018/050039 2018.04.11

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/194496 RU 2018.10.25

(73) 专利权人 拜奥卡德联合股份公司
地址 俄罗斯联邦圣彼得堡

(72) 发明人 A.B. 尤利丁 V.M. 埃基莫娃
E.V. 索夫罗诺娃 Y.S. 切尔尼克
S.A. 阿吉夫 A.K. 弗拉迪米洛娃
A.A. 亚历山大洛夫 P.A. 格列涅夫
V.V. 索罗耶夫 I.I. 乌斯蒂乌戈夫
P.A. 亚科夫列夫 T.A. 内曼金
D.V. 莫洛佐夫

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 初明明 黄登高

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

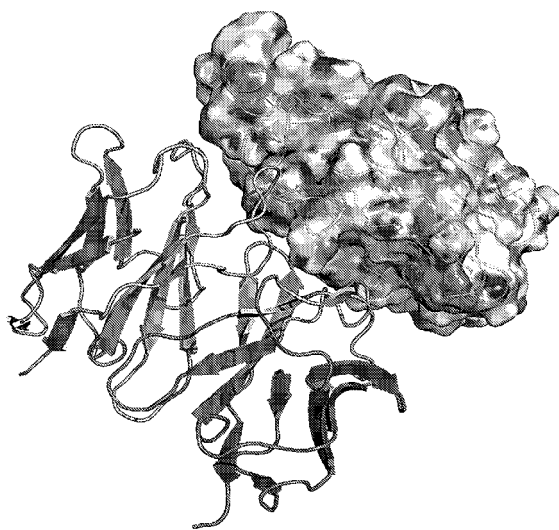
(56) 对比文件
CN 106103482 A, 2016.11.09
CN 104356236 A, 2015.02.18
CN 103987405 A, 2014.08.13
CN 101248089 A, 2008.08.20
US 2011280877 A1, 2011.11.17
WO 2017020291 A1, 2017.02.09
JP 2013511959 A, 2013.04.11
吴勇等. 抗PD-L1单抗的研制及其对乙型肝炎病毒的抑制效果初步研究. 中国免疫学杂志. 2016, 第32卷(第7期), 1004-1008. (续)

审查员 郝攀

权利要求书1页 说明书49页
序列表4页 附图14页

(54) 发明名称
针对PD-L1的单克隆抗体

(57) 摘要
本发明涉及生物技术领域, 并且提供与PD-L1特异性结合的抗体。本发明还涉及编码所述抗体的DNA, 涉及相应的表达载体和生产方法以及涉及使用所述抗体的治疗方法。



[接上页]

(56) 对比文件

Luan 等. A fully human monoclonal

antibody targeting PD-L1 with potent anti-tumor activity. International Immunopharmacology. 2016, 第31卷248-256.

1. 与PD-L1特异性结合的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含:
 - 包含分别如SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列的CDR1至CDR3的重链可变结构域;和
 - 包含分别如SEQ ID NO:5-7所示的氨基酸序列的CDR1至CDR3的轻链可变结构域。
2. 权利要求1的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中重链可变结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。
3. 权利要求1的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
4. 权利要求1的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中
 - 重链可变结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;
 - 轻链可变结构域包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
5. 权利要求1的单克隆抗体,其中:
 - 重链包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;
 - 轻链包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。
6. 权利要求1的单克隆抗体,其中与PD-L1特异性结合的抗体为全长IgG抗体。
7. 权利要求1的单克隆抗体,其中所述全长IgG抗体为人类抗体IgG1、IgG2、IgG3、IgG4的同种型。
8. 权利要求1的单克隆抗体,其中所述全长IgG抗体为人类抗体IgG1的同种型。
9. 编码权利要求1-8中任何一项的抗体或其抗原结合片段的核酸。
10. 权利要求9的核酸,其中所述核酸为DNA。
11. 包含权利要求9或权利要求10的核酸的表达载体。
12. 产生适合于产生权利要求1-8中任何一项的抗体或其抗原结合片段的宿主细胞的方法,其中所述方法包括用权利要求11的表达载体转化宿主细胞。
13. 用于产生权利要求1-8中任何一项的抗体或其抗原结合片段的宿主细胞,其包含权利要求9或权利要求10的核酸。
14. 用于产生权利要求1-8中任何一项的抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在足以获得所述抗体的条件下将权利要求13的宿主细胞在培养基中培养,并任选地随后分离和纯化所获得的抗体。
15. 一种药用组合物,所述组合物包含权利要求1-8中任何一项的抗体或抗原结合片段和一种或多种药学上可接受的赋形剂。
16. 一种药用组合,所述药用组合包含权利要求1-8中任何一项的抗体或抗原结合片段和至少一种治疗性抗肿瘤化合物。
17. 权利要求16的药用组合,其中所述治疗性抗肿瘤化合物选自化学治疗剂、抗体或抗激素剂。
18. 权利要求1-8中任何一项的抗体或抗原结合片段或权利要求15的药用组合物在制备用于治疗由PD-L1介导的癌症的药物中的用途,其中所述癌症为以下的一种:SCCHN(头颈部鳞状细胞癌)、子宫颈癌、成胶质细胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC(三阴性乳腺癌)、CRC(结直肠癌)、肝细胞癌、黑色素瘤、NSCLC(非小细胞肺癌)、肾癌、卵巢癌、霍奇金淋巴瘤。
19. 权利要求18的用途,其中所述癌症为MSI-H CRC(高微卫星不稳定性结直肠癌)。

针对PD-L1的单克隆抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及抗体或其抗原结合片段及其用途。更具体地讲,本发明涉及与PD-L1(CD274,B7-H1,程序性死亡配体-1)特异性结合的单克隆抗体。本发明还涉及编码该抗体或其抗原结合片段的核酸、表达载体、用于产生该抗体的方法以及该抗体用于增强T细胞功能以上调细胞介导的免疫反应和治疗T细胞功能障碍相关的病症(例如肿瘤免疫)和治疗癌症的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 淋巴细胞发育与活化

[0004] 人类的两种主要淋巴细胞类型为T(胸腺细胞)和B(骨髓源性)。这些细胞源自骨髓和胎儿肝脏中的造血干细胞,被程序化至淋巴发育途径。这些干细胞的后代遵循不同的途径以成熟为B或T淋巴细胞。人类B淋巴细胞的发育全部发生于骨髓内。另一方面,T细胞从不成熟的前体发育而来,这种前体离开骨髓并通过血流到达胸腺,在胸腺处增殖并分化为成熟的T淋巴细胞。

[0005] 从胸腺或骨髓出现的成熟淋巴细胞处于休眠或“静止”状态,即它们为有丝分裂非活性的。当这些“处女型”或“幼稚型”淋巴细胞散布到血流中时,它们进入各种次级或外周淋巴器官,比如脾脏、淋巴结或扁桃体。大多数处女型淋巴细胞的特征为固有短寿命,并且在离开骨髓或胸腺之后没几天就死亡。然而,如果这种细胞接收到表明存在抗原的信号,其可被活化并经历连续几轮细胞分裂。然后,产生的后代的一些细胞恢复到静止状态,并成为记忆淋巴细胞-基本上准备好与刺激性变应原的下一次相遇的B细胞和T细胞。活化的幼稚型淋巴细胞的其它后代为效应细胞,其仅存活几天,但进行特定的防御活动。

[0006] 淋巴细胞活化为一旦静止的淋巴细胞受到刺激以分裂并产生后代,所述静止的淋巴细胞通过的一系列有序事件,一些所述后代变为效应细胞。完全反应包括诱导细胞增殖(有丝分裂发生)和表达免疫功能两者。当特定的配体与淋巴细胞表面上的受体结合时,淋巴细胞变为被活化。配体不同于T细胞和B细胞,但是所得的细胞内生理机制类似。

[0007] 一些外源性抗原本身可诱导淋巴细胞活化,特别是能使B细胞上的表面免疫球蛋白或T细胞上的其他糖蛋白交联的大型聚合抗原。然而,大多数抗原不是聚合的,并且即使与B细胞直接大量结合也无法导致活化。当与附近活化的辅助性T淋巴细胞共刺激时,这些较常见的抗原活化B细胞。这种刺激可能来自T细胞分泌的淋巴因子,但通过B细胞与T细胞表面蛋白直接接触而最有效地传递,所述T细胞表面蛋白与某些B细胞表面受体相互作用以产生次级信号。

[0008] T细胞

[0009] T淋巴细胞不表达免疫球蛋白,而是通过称为T细胞受体(TCR)的表面蛋白检测外源性物质的存在。这些受体通过直接接触或通过影响其他免疫细胞的活性来识别抗原。T细胞与巨噬细胞一起为参与细胞介导的免疫的主要细胞类型。

[0010] 与B细胞不同,T细胞仅能在特定条件下检测外源性物质。特别是,T淋巴细胞仅在外源性蛋白首先被切成小肽,然后将其展示在称为抗原呈递细胞(APC)的第二宿主细胞的

表面上时才能识别外源性蛋白。许多类型的宿主细胞可在一些条件下呈递抗原,但某些类型更加特别适合于此,并且对于调节T细胞活性(包括巨噬细胞和其他B细胞)特别重要。抗原呈递部分地取决于呈递细胞表面上称为主要组织相容性复合体(MHC)蛋白的特定蛋白。因此,为了刺激细胞介导的免疫,必须将外源性肽与MHC肽组合呈递给T细胞,并且这种组合必须被T细胞受体识别。

[0011] 有两个重要的T细胞子集:细胞毒性T淋巴细胞(Tc细胞或CTL)和辅助性T(T_H)细胞,其可基于标志物CD8和CD4的细胞表面表达大致鉴定。Tc细胞在病毒防御方面很重要,可通过识别某些细胞表面表达的病毒肽直接杀死病毒。 T_H 细胞促进其他细胞类型的增殖、成熟和免疫功能,例如淋巴因子分泌以控制B细胞、巨噬细胞和细胞毒性T细胞的活性。幼稚型和记忆T淋巴细胞两者通常保持在静止状态,并且在这种状态下,它们不呈现明显的辅助或细胞毒活性。在活化状态下,这些细胞经历几轮有丝分裂以产生子代细胞。这些子代细胞中的一些作为记忆细胞恢复到静止状态,而其他则变为主动呈现辅助或细胞毒活性的效应细胞。这些子代细胞与其亲代类似:CD4+细胞仅能产生CD4+后代,和CD8+细胞仅产生CD8+后代。效应T细胞表达在静止T细胞上不表达的细胞表面标志物,比如CD25、CD28、CD29、CD40L、转铁蛋白受体和II类MHC蛋白。在没有活化刺激的情况下,随着效应细胞死亡或恢复到静止状态,细胞毒性或辅助活性在几天内逐渐消退。

[0012] 与B细胞活化类似,T淋巴细胞对大多数抗原的反应也需要两种类型的同时刺激。第一种为抗原,其由抗原呈递细胞上的MHC蛋白适当展示,可被T细胞受体识别并结合。尽管这种抗原-MHC复合物不向细胞内部发送信号,但通常不足以导致T细胞活化。完全活化(比如与辅助性T细胞一起发生的活化)需要与在抗原呈递细胞表面上表达的称为共刺激分子的其他特定配体共刺激。另一方面,细胞毒性T细胞的活化通常需要IL-2(由活化的辅助性T细胞分泌的细胞因子)。

[0013] PD-1途径

[0014] 调控T细胞活化的重要负性共刺激信号由程序性死亡-1受体(PD-1,CD279)及其配体结合配偶体PD-L1(B7-H1,CD274)和PD-L2(B7-DC,CD273)提供。PD-1的负性调控作用通过PD-1敲除($Pdcd1^{-/-}$)揭示,这种敲除易于自身免疫(Nishimura et al,Immunity JJ:141-51(1999);Nishimura et al,Science 291:319-22(2001))。PD-1与CD28和CTLA-4相关,但缺少使得能够同源二聚化的膜近端半胱氨酸。PD-1的胞质结构域含有免疫受体酪氨酸结合抑制基序(ITIM,V/IxYxxL/V)。PD-1仅与PD-L1和PD-L2结合(Freeman et al,J.Exp.Med.192:1-9(2000);Dong et al,Nature Med.5:1365-1369(1999);Latchman et al,Nature Immunol 2:261-268(2001);Tseng et al,J.Exp.Med.193:839-846(2001))。

[0015] PD-1可在T细胞、B细胞、自然杀伤T细胞、活化的单核细胞和树突状细胞(DC)上表达。PD-1被活化的人类CD4+和CD8+T细胞、B细胞和骨髓细胞表达,但不被未刺激的人类CD4+和CD8+T细胞、B细胞和骨髓细胞表达。这将其与CD28和CTLA-4的更加限制性表达区分开来(Nishimura et al,Int.Immunol.8:773-80(1996);Boettler et al,J.Virol.80:3532-40(2006))。已从活化的人类T细胞克隆了至少4种PD-1变体,包括缺少(i)外显子2,(ii)外显子3,(iii)外显子2和3或(iv)外显子2-4的转录物(Nielsen et al,Cell.Immunol.235:109-16(2005))。除PD-1 Δ ex3之外,所有变体在静止的外周血单核细胞(PBMC)中以与全长PD-1类似的水平表达。用抗CD3和抗CD28抗体活化人类T细胞后,所有变体的表达均被显著

诱导。PD-1 Δ ex3变体缺少跨膜结构域,并且与可溶性CTLA-4类似,后者在自身免疫中起重要作用(Ueda et al, Nature 423:506-11(2003))。在类风湿性关节炎患者的滑液和血清中富含该变体(Wan et al, J. Immunol. 177:8844-50(2006))。两种PD-1配体的表达方式不同。PD-L1在小鼠T和B细胞、CD、巨噬细胞、间充质干细胞和骨髓来源的肥大细胞上组成型表达(Yamazaki et al, J. Immunol. 169:5538-45(2002))。PD-L1在多种非造血细胞(例如角膜、肺、血管上皮、肝脏非实质细胞、间充质干细胞、胰岛、胎盘合体滋养层、角质形成细胞等)上表达[Keir et al, Annu. Rev. Immunol. 26:677-704(2008)],并且在活化之后在多种细胞类型中上调。I型和II型干扰素IFN两者均上调PD-L1(Eppihimer et al, Microcirculation 9:133-45(2002); Schreiner et al, J. Neuroimmunol 155:172-82(2004))。当MyD88、TRAF6和MEK被抑制时,细胞系中的PD-L1表达降低(Liu et al, Blood H0:296-304(2007))。JAK2也参与PD-L1诱导(Lee et al, FEBS Lett, 580:755-62(2006); Liu et al, Blood H0:296-304(2007))。磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN,一种修饰磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)和Akt信号传导的细胞磷酸酶)的丢失或抑制增加癌症中的转录后PD-L1表达(Parsa et al, Nat. Med. 13:84-88(2007))。

[0016] PD-L2的表达比PD-L1更受限制。PD-L2在DC、巨噬细胞和骨髓来源的肥大细胞上诱导型表达。PD-L2还在约一半至三分之二的静止腹膜B1细胞上表达,但在常规B2 B细胞上不表达(Zhong et al, Eur. J. Immunol. 37:2405-10(2007))。PD-L2+B1细胞结合磷脂酰胆碱,并且可能对于针对细菌抗原的先天性免疫反应很重要。IFN- γ 对PD-L2的诱导部分地取决于NF-KB(Liang et al, Eur. J. Immunol. 33:2706-16(2003))。还可通过GM-CSF、IL-4和IFN- γ 在单核细胞和巨噬细胞上诱导PD-L2(Yamazaki et al., J. Immunol. 169:5538-45(2002); Loke et al, PNAS 100:5336-41(2003))。

[0017] PD-1信号传导一般地对细胞因子产生比对细胞增殖具有更大的影响,其中对IFN- γ 、TNF- α 和IL-2产生具有显著影响。PD-1介导的抑制性信号传导还取决于TCR信号传导的强度,在低水平的TCR刺激下提供更大的抑制作用。这种减少可通过经CD28共刺激[Freeman et al, J. Exp. Med. 192:1027-34(2000)]或IL-2的存在[Carter et al, Eur. J. Immunol. 32:634-43(2002)]来克服。

[0018] 越来越多的证据表明,通过PD-L1和PD-L2的信号传导可为双向的。即除了修饰TCR或BCR信号传导之外,该信号还可被传递回表达PD-L1和PD-L2的细胞。尽管未发现用从瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症患者分离的天然人类抗PD-L2抗体处理树突状细胞上调MHC II或B7共刺激分子,但这种细胞产生了更大量的促炎细胞因子(特别是TNF- α 和IL-6)并刺激T细胞增殖(Nguyen et al, J. Exp. Med. 196:1393-98(2002))。用该抗体进行小鼠治疗还(1)增强对移植的b16黑素瘤的抵抗力,并快速诱导肿瘤特异性CTL(Radhakrishnan et al, J. Immunol. 170:1830-38(2003); Radhakrishnan et al, Cancer Res. 64:4965-72(2004); Heckman et al, Eur. J. Immunol. 37:1827-35(2007)); (2)阻止过敏性哮喘小鼠模型中气道炎性疾病的发展(Radhakrishnan et al, J. Immunol. 173:1360-65(2004); Radhakrishnan et al, J. Allergy Clin. Immunol. UJy. 668-74(2005))。

[0019] 从用可溶性PD-1(融合到Ig恒定区的PD-1EC结构域-“s-PD-1”)培养的骨髓来源的DC的研究获得了向树突状细胞(“DC”)反向信号传递的另一证据(Kuipers et al, Eur. J. Immunol. 36:2472-82(2006))。该sPD-1通过给予抗PD-1以可逆方式抑制DC活化并增

加IL-10的产生。另外,几项研究鉴定了PD-L1或PD-L2的受体,其独立于PD-1。B7.1已被鉴定为PD-L1的结合配偶体(Butte et al, *Immunity* 27:111-22(2007))。化学交联研究表明PD-L1和B7.1可通过其IgV样结构域相互作用。B7.1:PD-L1相互作用可诱导抑制性信号传导进入T细胞。B7.1连接CD4+T细胞上的PD-L1或PD-L1连接CD4+T细胞上的B7.1提供抑制信号。缺少CD28和CTLA-4的T细胞在受到抗CD3加B7.1包被的珠粒刺激时显示出增殖和细胞因子产生减少。在缺少所有B7.1受体(即CD28、CTLA-4和PD-L1)的T细胞中,抗CD3加B7.1包被的珠粒不再抑制T细胞增殖和细胞因子产生。这表明在不存在CD28和CTLA-4的情况下,B7.1通过PD-L1特异性地作用于T细胞。类似地,缺少PD-1的T细胞当在存在抗CD3加PD-L1包被的珠粒的情况下刺激时显示出增殖和细胞因子产生减少,表明PD-L1连接对T细胞上的B7.1的抑制作用。当T细胞缺少所有已知的PD-L1受体(即没有PD-1和B7.1)时,抗CD3加PD-L1包被的珠粒不再削弱T细胞增殖。因此,PD-L1可通过B7.1或PD-1对T细胞发挥抑制作用。

[0020] B7.1和PD-L1之间的直接相互作用表明目前对共刺激的理解尚不完全,并且着重说明这些分子在T细胞上表达的重要性。PD-L1^{-/-} T细胞的研究表明,T细胞上的PD-L1可下调T细胞的细胞因子产生(Latchman et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:10691-96(2004))。由于PD-L1和B7.1两者均在T细胞、B细胞、DC和巨噬细胞上表达,因此在这些细胞类型上B7.1和PD-L1之间可能存在直接相互作用。另外,非造血细胞上的PD-L1可与T细胞上的B7.1以及PD-1相互作用,这引发了PD-L1是否参与其调控的问题。B7.1:PD-L1相互作用的抑制作用的一种可能解释为T细胞PD-L1可从与CD28的相互作用捕获或分离APC B7.1。

[0021] 结果,通过PD-L1进行信号传导的拮抗作用,包括阻断PD-L1与PD-1、B7.1或两者的相互作用,从而防止PD-L1向T细胞和其他抗原呈递细胞发送负性共刺激信号,可能响应感染(例如急性和慢性)和肿瘤免疫而增强免疫。另外,本发明的抗PD-L1抗体可与PD-1:PD-L1信号传导的其他组分的拮抗剂(例如抗PD-1和抗PD-L2抗体的拮抗剂)组合。

[0022] 特别是,已经提出抑制PD-L1信号传导作为增强T细胞免疫以治疗癌症(例如肿瘤免疫)和感染(包括急性和慢性(例如持续性)两种感染)的手段。

[0023] 阻断PD-L1:PD-1相互作用的抑制剂尤其是可从W02001014557、W02002086083、W02007005874、W02010036959、W02010077634和W02011066389获知。

[0024] 目前,在早期阶段临床试验中,有超过10种含抗PD-L1组分的单和双特异性药物。

[0025] 一种单特异性抗PD-L1抗体MPDL3280A(阿特珠单抗,Roche)已成功通过临床试验(CT)并用于临床实践。阿特珠单抗已被FDA批准用于转移性尿路上皮癌患者;在非小细胞肺癌(NSCLC)、肾细胞癌、结直肠癌(CRC)和乳腺癌(BC)患者中继续进行III期CT。该制剂为具有修饰的Fc区(为消除ADCC效应)的Ig1抗体。阿特珠单抗描述于W02010077634中。

[0026] 最后阶段CT的其他抗PD-L1制剂为阿维鲁单抗(Pfizer)和德瓦鲁单抗(AZ)制剂。德瓦鲁单抗(MEDI-4736)描述于W02011066389中。阿维鲁单抗描述于W02013079174中。阿维鲁单抗制剂的主要区别为抗体中存在ADCC效应,此外其可用IFN γ 或IL12增强(NCT01772004)。另外,阿维鲁单抗制剂的安全性概况相当于其他抗PD-1/PD-L1制剂(*Cancer Immunol Res*; 3(10) October 2015; *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab on Human Tumor Cells*; Benjamin Boyerinas)。

[0027] 因此,需要提供PD-L1(程序性死亡配体-1)的有效抑制剂。

- [0028] 参考以上内容,非常重要提供与PD-L1有效结合的新抗体。
- [0029] BCD-135抗体与PD-L1选择性地结合,并且为程序性死亡配体-1的有效抑制剂。
- [0030] 发明概述
- [0031] 本发明涉及结合分子,特别是涉及结合PD-L1的抗体。这种抗体可用于治疗由PD-L1介导的疾病或病症。
- [0032] 在一个方面,本发明涉及与PD-L1特异性结合的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变结构域(包含与SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的氨基酸序列)和轻链可变结构域(包含与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的氨基酸序列)。
- [0033] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域,后者包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。
- [0034] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含轻链可变结构域,后者包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。
- [0035] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域,后者包含与SEQ ID NOs:1-3具有至少90%同一性的氨基酸序列。
- [0036] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域,后者包含SEQ ID NOs:1-3的氨基酸序列。
- [0037] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含轻链可变结构域,后者包含与SEQ ID NOs:5-7具有至少90%同一性的氨基酸序列。
- [0038] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含轻链可变结构域,后者包含SEQ ID NOs:5-7的氨基酸序列。
- [0039] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域(包含与SEQ ID NOs:1-3具有至少90%同一性的氨基酸序列)和轻链可变结构域(包含与SEQ ID NOs:5-7具有至少90%同一性的氨基酸序列)。
- [0040] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域(包含SEQ ID NOs:1-3的氨基酸序列)和轻链可变结构域(包含SEQ ID NOs:5-7的氨基酸序列)。
- [0041] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域,后者包含与SEQ ID NO:4具有至少90%同一性的氨基酸序列。
- [0042] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域,后者包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。
- [0043] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含轻链可变结构域,后者包含与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基酸序列。
- [0044] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含轻链可变结构域,后者包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
- [0045] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域(包含与SEQ ID NO:4具有至少90%同一性的氨基酸序列)和轻链可变结构域(包含与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的氨基酸序列)。
- [0046] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变结构域(包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列)和轻链可变结构域(包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列)。
- [0047] 在一些实施方案中,单克隆抗体包含重链(包含与SEQ ID NO:9具有至少90%同一

性的氨基酸序列)和轻链(包含与SEQ ID NO:10具有至少90%同一性的氨基酸序列)。

[0048] 在一些实施方案中,单克隆抗体包含重链(包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列)和轻链(包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列)。

[0049] 在一些实施方案中,对PD-L1特异性的单克隆抗体为全长IgG抗体。

[0050] 在一些实施方案中,全长IgG抗体属于人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4同种型。

[0051] 在一些实施方案中,单克隆抗体属于人类IgG1同种型。

[0052] 在一个方面,本发明涉及编码任何以上抗体或其抗原结合片段的核酸。

[0053] 在一些实施方案中,核酸为DNA。

[0054] 在一个方面,本发明涉及包含任何以上核酸的表达载体。

[0055] 在一个方面,本发明涉及产生适合于产生任何以上抗体或其抗原结合片段的宿主细胞的方法,包括通过以上载体转化细胞。

[0056] 在一个方面,本发明涉及用于产生任何以上抗体或其抗原结合片段的宿主细胞,其包含任何以上核酸。

[0057] 在一个方面,本发明涉及用于产生任何以上抗体或其抗原结合片段的方法,包括在足以获得所述抗体的条件下将以上宿主细胞在培养基中培养,并任选地随后分离和纯化获得的抗体。

[0058] 在一个方面,本发明涉及用于预防或治疗由PD-L1介导的疾病或病症的药用组合物,其包含任何以上抗体或其抗原结合片段和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0059] 在一些实施方案中,药用组合物旨在用于预防或治疗由PD-L1介导的选自以下的疾病或病症:HNSCC、子宫颈癌、原发来源未知的癌症、成胶质细胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC、CRC、肝细胞癌、黑色素瘤、NSCLC、肾癌、卵巢癌、霍奇金淋巴瘤、CRC MSI。

[0060] 在一个方面,本发明涉及用于预防或治疗由PD-L1介导的疾病或病症的药用组合,其包含任何以上抗体或其抗原结合片段和至少一种治疗活性抗肿瘤化合物。

[0061] 在一些实施方案中,药用组合旨在用于预防或治疗PD-L1介导的选自以下的疾病或病症:HNSCC、子宫颈癌、原发来源未知的癌症、成胶质细胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC、CRC、肝细胞癌、黑色素瘤、NSCLC、肾癌、卵巢癌、霍奇金淋巴瘤、CRC MSI。

[0062] 在一些实施方案中,药用组合包含选自以下的治疗活性抗肿瘤化合物:化学治疗剂、抗体或抗激素剂。

[0063] 在一个方面,本发明涉及用于在有需要的受试者中抑制PD-L1生物活性的方法,包括给予受试者有效量的任何以上抗体或其抗原结合片段。

[0064] 在一个方面,本发明涉及任何以上抗体或其抗原结合片段或以上药用组合物用于在有需要的受试者中治疗PD-L1介导的疾病或病症的用途。

[0065] 在一些实施方案中,本发明涉及任何以上抗体或其抗原结合片段或以上药用组合物用于治疗PD-L1介导的选自以下的疾病或病症的用途:HNSCC、子宫颈癌、原发来源未知的癌症、成胶质细胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC、CRC、肝细胞癌、黑色素瘤、NSCLC、肾癌、卵巢癌、霍奇金淋巴瘤、CRC MSI。

[0066] 附图简述

[0067] 图1.人类组合幼稚文库合成方案。

[0068] 图2.用于Fab噬菌体展示文库克隆的噬菌粒的图示。

- [0069] 图3.用于Fab产生的表达质粒的图示。
- [0070] 图4A.在还原条件(12%SDS-PAGE)下的BCD-135电泳图。
- [0071] 图4B.在非还原条件(8%SDS-PAGE)下的BCD-135电泳图。
- [0072] 图5.BCD-135与PD-L1和其他抗原相互作用的酶联免疫吸附测定。
- [0073] 图6.在Jurkat-NFAT-PD-1报告细胞系中用抗PD-L1抗体进行NFAT信号传导重新激活。
- [0074] 图7.在Octet RED 96仪器上BCD-135与FcRn和Fc γ 受体的相互作用分析。
- [0075] 图8.BCD-135与不同物种的PD-L1相互作用的免疫酶分析。
- [0076] 图9.在Octet RED 96仪器上BCD-135与人类和食蟹猴PD-L1的相互作用分析。
- [0077] 图10.BCD-135的构象稳定性分析。
- [0078] 图11.BCD-135的胶体稳定性分析。
- [0079] 图12A.BCD-135在磷酸盐缓冲液中的热稳定性分析。x轴表示时间,Y轴表示吸收。
- [0080] 图12B.BCD-135在醋酸盐缓冲液中的热稳定性分析。x轴表示时间,Y轴表示吸收。
- [0081] 图12C.BCD-135在组氨酸缓冲液中的热稳定性分析。x轴表示时间,Y轴表示吸收。
- [0082] 图13A.BCD-135在人类血清中的稳定性分析。反映光密度对加入到孔中的BCD-135浓度的依赖关系的校准曲线。
- [0083] 图13B.BCD-135在人类血清中的稳定性分析。提供的表格显示在人类血清中孵育期间BCD-135浓度与孵育时间的依赖关系。
- [0084] 图14A.BCD-135和PD-L1抗原N-末端Ig结构域的复合物的3D空间模型。3D模型的全视图。
- [0085] 图14B.BCD-135和PD-L1抗原N-末端Ig结构域的复合物的3D空间模型。直接抗原-抗体接触区域的详细模型(参见实施例18中的表)。
- [0086] 发明详述
- [0087] 定义和一般方法
- [0088] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语将具有与本领域普通技术人员通常理解的不同含义。尽管与本文所述的那些类似或等同的方法和材料可用于本发明实施方案的实践或测试,但是以下描述示例性的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过参考以其全部结合。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。尽管本文引用了许多文件,但是该引用并不意味着承认任何这些文件构成本领域公知常识的一部分。
- [0089] 另外,除非上下文另外要求,否则单数形式的术语包括复数形式,并且复数形式的术语包括单数形式。一般地,本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、分析化学、有机合成化学、医学和药物化学以及蛋白质和核酸的杂交和化学所使用的分类和方法为本领域的技术人员众所周知的,并且在该领域广泛使用。酶促反应和纯化技术可根据制造商的说明书或如本领域通常完成的或如本文所述进行。
- [0090] 在该描述和实施方案中,词语“具有(have)”和“含有(contain)”或其变体,比如“具有(has)”、“具有(having)”、“含有(contains)”或“含有(containing)”应理解为包括所示的整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组。
- [0091] 抗体相关定义

[0092] PD-L1 (程序性死亡配体-1) 也称为分化簇274 (CD274) 或同源物B7 (B7-H1), 为一种40kDa的I型跨膜蛋白。其由3个结构域组成: 胞外 (由Ig V和C样结构域表示) (220)、跨膜 (21) 和胞内 (31)。其在怀孕期间的免疫系统抑制、外来组织移植、一些疾病 (例如肝炎) 中起重要作用。在正常情况下, 响应自身抗原, 在淋巴结和脾脏中积累一定量的抗原特异性CD8+T效应细胞, 以防止自身免疫过程, 形成PD-1/PD-L1或B7-1/PD-L1复合物, 导致抑制性信号传导, 其减少淋巴结中CD8+T细胞的增殖。因此, PD-1/PD-L相互作用为免疫耐受发展中的关键事件之一。

[0093] 在免疫功能障碍的上下文中, “功能障碍” 是指对抗原刺激的免疫反应性降低的状态。该术语包括耗尽和/或无反应性两者的共同要素, 其中可能会发生抗原识别, 但随后免疫反应对控制感染或肿瘤生长无效。

[0094] “增强T细胞功能” 意指诱导、引起或刺激T细胞具有持续或扩增的生物学功能, 或者更新或重新活化耗尽或失活的T细胞。增强T细胞功能的实例包括: 相对于干预之前的这种水平, γ 干扰素从CD8+T细胞的分泌增加、增殖增加、抗原反应性 (例如病毒或病原体清除) 增加。在一个实施方案中, 增强的水平为至少50%, 或者60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%。测量这种增强的方式为本领域的普通技术人员已知的。

[0095] “T细胞功能障碍性病征” 是其特征为对抗原刺激的反应性降低的T细胞的病症或病况。在一个特定的实施方案中, T细胞功能障碍性病征为与通过PD-1的信号传导不适当的增加特别相关的病症。在另一个实施方案中, T细胞功能障碍性病征为其中T细胞无反应或者分泌细胞因子、增殖或实施细胞溶解活性的能力降低的病症。在一个具体方面, 反应性降低导致对表达免疫原的病原体或肿瘤的控制无效。其特征为T细胞功能障碍的T细胞功能障碍性病征的实例包括未解决的急性感染、慢性感染和肿瘤免疫。

[0096] “肿瘤免疫” 是指其中肿瘤逃避免疫识别和清除的过程。因此, 作为治疗概念, 当这种逃避减弱时肿瘤免疫为“可治疗的”, 并且肿瘤被免疫系统识别和攻击。肿瘤识别的实例包括肿瘤结合、肿瘤收缩和肿瘤清除。

[0097] 本文使用的术语“疫苗” 包括任何非病原性免疫原, 当其被接种到宿主时诱导针对特定病原体的保护性免疫。疫苗可采取多种形式。疫苗可为与病原体共具抗原但本身不是病原性的整个生物体 (例如牛痘)。疫苗也可从灭活 (例如索尔克脊髓灰质炎疫苗) 或减毒 (产生疾病的能力丧失, 例如萨宾脊髓灰质炎疫苗) 制备。疫苗也可由从病原生物体分离的纯化的大分子制备。例如, 类毒素疫苗 (例如破伤风和白喉) 含有非活性形式的可溶性细菌毒素, 并导致产生抗毒素抗体, 但不含有对完整细菌的免疫。亚单位疫苗 (例如乙型肝炎) 仅含有从感兴趣的病原体分离的单一免疫原性蛋白。半抗原结合疫苗将从目标病原体分离的某些碳水化合物或多肽表位连接至免疫原性载体, 比如破伤风类毒素。这些策略本质上使用表位作为半抗原来诱导抗体产生, 其然后识别天然病原体中的相同表位。然而, 为了发挥最大功效, 这种疫苗必须包含B细胞和T细胞两者的表位, 并且必须选择T细胞表位以确保其可被宿主个体的免疫系统识别、呈递和应答。DNA疫苗利用宿主细胞吸收和表达肌内注射的编码病原性蛋白的DNA的能力。如果作为与佐剂的混合物给予, 可增强宿主对免疫原的反应。免疫佐剂以一种或多种以下方式发挥作用: (1) 延长免疫原的保留, (2) 增加免疫原的有效大小 (并因此促进吞噬作用和呈递给巨噬细胞), (3) 刺激巨噬细胞或其他免疫细胞流入到注射部位, 或 (4) 促进局部细胞因子的产生和其他免疫活性。佐剂的实例包括完全弗氏佐

剂(CFA)、铝盐和分枝杆菌来源的蛋白,比如胞壁酰二肽或三肽。

[0098] 已在许多癌症中发现该基因的扩增和/或其蛋白的过表达,包括HNSCC、子宫颈癌、原发来源未知的癌症、成胶质细胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC、CRC、肝细胞癌、黑素瘤、NSCLC、肾癌、卵巢癌、霍奇金淋巴瘤、CRC MSI。

[0099] 术语“结合分子”包括抗体和免疫球蛋白。

[0100] 本文使用的术语“抗体”(Ab)或“免疫球蛋白”(Ig)包括整个抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单个链。术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。每条重链含有重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区由3个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由1个结构域CL组成。VH和VL区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散置有更为保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列的3个CDR和4个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。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。

[0101] 本文使用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称“抗体部分”或“抗体片段”)是指保留与抗原特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。已经显示抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来进行。包括在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括:(i) Fab片段,一种由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,一种包含两个通过铰链区的二硫键连接的Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) dAb片段(Ward et al. (1989) Nature 341:544-546),其由VH/VHH结构域组成;和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域(VL和VH)由单独的基因编码,但可使用重组方法通过合成接头将其连接起来,所述接头使其成为连续的单链,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird et al. (1988) Science 242:423-426;和Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这种单链抗体也旨在包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且片段以与完整抗体相同的方式进行筛选。

[0102] 优选地,本发明抗体的抗原结合区的CDR或全部抗原结合部分源自小鼠、美洲驼或人类供体文库,或者基本上为人类来源的,具有某些氨基酸残基修饰,例如被不同的氨基酸残基置换以优化特定抗体特性,例如KD、k_{off}、IC₅₀、EC₅₀、ED₅₀。优选地,本发明的抗体框架区为人类来源的或基本上为人类来源的(至少80、85、90、95、96、97、98或99%的人类来源)。

[0103] 在其他实施方案中,本发明的抗体抗原结合区可源自其他非人类物种,包括(但不限于)小鼠、美洲驼、兔、大鼠或仓鼠。或者,抗原结合区可源自人类物种。

[0104] 术语“可变的”是指可变结构域的某些区段在抗体之间序列差别很大的事实。V结构域介导抗原结合并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,变化性并非在可变结构域的110个氨基酸跨度上均匀分布。相反,V区由15-30个氨基酸的称为框架区(FR)的相对不变的片段组成,这些片段被称为“高变区”或CDR或“HVR”或“HV”的较短的极端可变性片段隔开。天然重链和轻链的每个可变结构域均含有4个FR,主要接收由3个高变区连接的 β 折叠构

型,其形成结合的环,并且在一些情况下为 β 折叠结构的一部分。每条链中的高变区通过FR紧靠在一起,并且与来自另一条链的高变区一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出不同的效应子功能,比如抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0105] 本文使用的术语“高变区”(“HVR”或“HV”)是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。一般地,高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基和/或来自“高变环”的这种残基。

[0106] 在一些情况下,还可为优选的是修饰CDR区的一个或多个氨基酸残基以增加与靶表位的结合亲和力。这称为“亲和力成熟”,并且在一些情况下可与人源化结合进行,例如当抗体的人源化导致结合特异性或亲和力降低,并且仅通过反向突变不可能充分提高结合特异性或亲和力时。各种亲和力成熟方法为本领域已知的,例如Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:412-417 (1997)所述的体外扫描饱和诱变方法以及Wu et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:60376042 (1998)建议的逐步体外亲和力成熟方法。

[0107] “框架区”(FR)为除CDR残基以外的那些可变结构域残基。每个可变结构域一般地具有标识为FR1、FR2、FR3和FR4的4个FR。如果CDR为根据Kabat定义的,则轻链FR残基大约位于残基1-23(LCFR1)、35-49(LCFR2)、57-88(LCFR3)和98-107(LCFR4),和重链FR残基大约位于重链中的残基1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94(HCFR3)和103-113(HCFR4)。如果CDR包含来自高变环的氨基酸残基,则轻链FR残基大约位于轻链中的残基1-25(LCFR1)、33-49(LCFR2)、53-90(LCFR3)和97-107(LCFR4),和重链FR残基大约位于重链残基中的残基1-25(HCFR1)、33-52(HCFR2)、56-95(HCFR3)和102-113(HCFR4)。在一些情况下,当CDR包含来自根据Kabat定义的CDR的氨基酸和高变环的那些时,相应地调整FR残基。例如,当CDRH1包括氨基酸H26-H35时,重链FR1残基在1-25位和FR2残基在36-49位。

[0108] 本发明的与靶抗原“结合”的抗体为以足够的亲和力与抗原结合的抗体,使得抗体在靶向蛋白或表达抗原的细胞或组织时可用作诊断和/或治疗剂,并且与其他蛋白有轻微的交叉反应。基于分析方法:荧光活化细胞分选(FACS)、放射免疫沉淀(RIA)或ELISA,在这种实施方案中,抗体与非靶蛋白(与“脱靶蛋白”)结合的程度少于抗体与特定靶蛋白结合的10%。关于抗体与靶分子的结合,术语“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶标上的表位或“与其特异性地结合”或“对其具有特异性”意指与非特异性相互作用在可检测(可测量)方面不同的结合(例如对于bH1-44或bH1-81,非特异性相互作用为与牛血清白蛋白、酪蛋白、胎牛血清或neuravidin的结合)。特异性结合可例如通过确定与对照分子的结合相比较的分子的结合来测量。例如,特异性结合可通过与同靶标相似的另一分子(例如过量的非标记靶标)的竞争反应来确定。在这种情况下,如果标记的靶标与探针的结合被过量的非标记靶标竞争性抑制,则表明为特异性结合。本文使用的术语“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶标上的表位或短语“与其特异性地结合”或“对其具有特异性”例如可由针对靶标的Kd为至少约200nM、或至少约150nM、或至少约100nM、或至少约60nM、或至少约50nM、或至少约40nM、或至少约30nM、或至少约20nM、或至少约10nM、或至少约8nM、或至少约6nM、或至少约4nM、或至少约2nM、或至少约1nM或更大的分子来呈现。在一个实施方案中,术语“特异性结

合”是指其中分子与特定多肽或特定多肽上的表位结合而基本上不与任何其他多肽或多肽表位结合的结合。

[0109] 本文使用的术语“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而术语“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。

[0110] “结合亲和力”通常是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外说明,否则“结合亲和力”是指固有的(内在的,真实的)结合亲和力,其反映结合对的成员(例如抗体和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可用解离常数(K_d)表示。合乎期望地, K_d 为约200nM、150nM、100nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、8nM、6nM、4nM、2nM、1nM或更小。亲和力可通过本领域已知的常用方法(包括本文所述的那些方法)进行测量。低亲和力抗体通常缓慢结合抗原并往往易于解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并往往保持结合更长时间。用于测量结合亲和力的多种方法为本领域已知的,其任何一种方法均可用于本发明的目的。

[0111] 在一个实施方案中,本发明的“ K_d ”或“ K_d 值”通过使用表面等离子体共振测定,在BIAcore™-2000或BIAcore™-3000仪器(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)上,于25°C下使用固定化抗原CM5芯片以~10个响应单位(RU)进行测量。简而言之,根据制造商的说明,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。将抗原用10mM醋酸钠(pH 4.8)稀释至5 μ g/ml(~0.2 μ M)浓度,并以后以5 μ l/min的流速上样(注射)以获得约10个响应单位(RU)的结合蛋白。注射抗原后,注射1M乙醇胺溶液以封闭未反应的基团。为了进行动力学测量,将Fab的两倍连续稀释液(例如0.78nM-500nM)在含有0.05% Tween 20的PBS(PBST)中在25°C下以约25 μ l/min的流速注入。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIAcore Evaluation Software版本3.2)计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(K_d)被计算为比率 k_{off}/k_{on} 。参见例如Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881。如果通过以上表面等离子体共振测定测得的缔合速率(on-rate)超过 $10^6 M^{-1} s^{-1}$,则可通过使用荧光猝灭技术进行测定,该技术如使用分光计(比如断流分光光度计(Aviv Instruments))或带搅拌比色杯的8000系列SLM-Aminco分光光度计(ThermoSpectronic))测量的那样,在存在抗原浓度增加的情况下,于25°C下测量在PBS(pH 7.2)中浓度为20nM的抗抗原抗体(Fab形式)溶液的荧光发射强度的增加或减少(激发=295nm;发射=340nm,带通16nm)。

[0112] 术语“ k_{off} ”是指结合分子与抗原之间特定相互作用的解离速率常数。解离速率常数 k_{off} 可通过生物层干涉,例如使用Octet™系统来测量。

[0113] 本发明的“缔合速率”(“on-rate”)或“ k_{on} ”还可用与上述相同的表面等离子体共振技术,使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000仪器(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.),于25°C下用固定化抗原CM5芯片以~10个响应单位(RU)进行测定。简而言之,根据制造商的说明,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。将抗原用10mM醋酸钠(pH 4.8)稀释至5 μ g/ml(~0.2 μ M)浓度,并以后以5 μ l/min的流速上样(注射)以获得约10个响应单位(RU)的结合蛋白。注射抗原后,注射1M乙醇胺溶液以封闭未反应的基团。为了进行动力学测

量,将Fab的两倍连续稀释液(例如0.78nM-500nM)在含有0.05%Tween 20的PBS(PBST)中在25°C下以约25 μ l/min的流速注入。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIAcore Evaluation Software版本3.2)计算缔合速率(kon)和解离速率(koff)。平衡解离常数(Kd)被计算为比率koff/kon。参见例如Chen,Y.,et al.,(1999) J.Mol.Biol.293:865-881。然而,如果通过以上表面等离子体共振测定测得的缔合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则可通过使用荧光猝灭技术进行测定,该技术如使用分光计(比如断流分光光度计(Aviv Instruments))或带搅拌比色杯的8000系列SLM-Aminco分光光度计(ThermoSpectronic))测量的那样,在存在抗原浓度增加的情况下,于25°C下测量在PBS(pH7.2)中浓度为20nM的抗抗原抗体(Fab形式)溶液的荧光发射强度的增加或减少(激发=295nm;发射=340nm,带通16nm)。

[0114] 除非另外说明,否则关于本发明的多肽的短语“生物活性的”和“生物活性”和“生物学特性”意指具有与生物分子结合的能力。

[0115] 短语“生物分子”是指核酸、蛋白、碳水化合物、脂质及其组合。在一个实施方案中,生物分子存在于自然界中。

[0116] 可通过经常规方法进行胃蛋白酶或木瓜蛋白酶水解整个抗体来获得抗体片段,比如Fab和F(ab')₂片段。此外,如本文所述,可使用标准重组DNA技术获得抗体、抗体部分和免疫粘附分子。

[0117] 术语“重组抗体”是指从包含编码抗体的核苷酸序列的细胞或细胞系表达的抗体,其中所述核苷酸序列不与细胞天然相关。

[0118] 本文使用的术语“变体”抗体是指通过相对于亲本抗体序列添加、去除和/或置换一个或多个氨基酸残基而具有与其“亲本”抗体的氨基酸序列不同的氨基酸序列的抗体。在一个优选的实施方案中,变体抗体相对于亲本抗体包含至少一个或多个(例如1-12个,例如2、3、4、5、6、7、8或9、10、11或12个,并且在本发明的一些实施方案中1-约10个)氨基酸的添加、缺失和/或置换。在一些实施方案中,在CDR变体抗体位点进行本发明的添加、缺失和/或置换。关于变体抗体序列的同一性或同源性在本文定义为,在对齐序列并引入空位(如果有必要)以获得最大百分比序列同一性之后,变体抗体序列中与亲本抗体残基相同的氨基酸残基的百分比。变体抗体保留与相同抗原,和优选地与同亲本抗体结合的表位结合的能力,并且在一些实施方案中,至少一种性质或生物活性大于亲本抗体的类似性质。例如,与亲本抗体相比较,变体抗体可为例如表达的结合亲和力、更长的半衰期、更低的IC₅₀或增强的抑制抗原生物活性的能力。本文特别感兴趣的是显示出亲本抗体的生物活性的超过至少2倍(优选地至少5倍、10倍或20倍)的生物活性的变体抗体。

[0119] 术语“双特异性抗体”意指含有能够与一个生物分子上的两个不同表位特异性结合或能够与两个不同生物分子上的表位特异性结合的一个或多个抗原结合结构域的抗体。双特异性抗体在本文也称为具有“双重特异性”或具有“双重特异性”的抗体。

[0120] 术语“嵌合抗体”广义上是指含有来自一种抗体的一个或多个区域和来自一种或多种其他抗体的一个或多个区域的抗体,一般地为部分人类来源的和部分非人类来源的抗体,即部分获自非人类动物,例如小鼠、大鼠或其他啮齿动物或骆驼科动物(比如美洲驼或羊驼)。为了降低针对人类抗体的免疫反应(例如在鼠抗体的情况下在人中针对鼠抗体的反应)的风险,嵌合抗体优于非人类抗体。典型的嵌合抗体的一个实例为其中可变区序列为鼠

而恒定区序列为人类的抗体。在嵌合抗体的情况下,非人类部分可进行进一步变化以便抗体人源化。

[0121] 术语“人源化”是指这样的事实:当抗体完全或部分地为非人类来源,例如通过用感兴趣的抗原分别免疫小鼠或美洲驼获得的小鼠或美洲驼抗体,或者为基于这种小鼠或美洲驼抗体的嵌合抗体时,可置换一些氨基酸,特别是在重链和轻链的框架区和恒定结构域中,以在人类中避免或最小化免疫反应。抗体与靶抗原之间相互作用的特异性主要是位于六个重链和轻链CDR区的氨基酸残基固有的。因此,与CDR区以外的序列相比较,CDR区内的氨基酸序列在不同抗体之间变化更大。由于CDR区序列负责大多数抗体-抗原相互作用,因此有可能表达重组抗体,其模仿特定天然存在的抗体,或者更通常地具有给定氨基酸序列的任何特定抗体的特性,例如通过构建在另一种抗体的框架序列中表达特定抗体的CDR区序列的表达载体。结果,可“人源化”非人类抗体并基本上保留亲本抗体的结合特异性和亲和力。尽管无法准确预测针对人类抗体(特定抗体)的免疫原性并因此预测免疫反应,但非人类抗体通常比人类抗体更具免疫原性。嵌合抗体(其中外源性(例如骆驼或啮齿动物)恒定区已被人类来源的序列置换)通常显示出比完全外源性来源的抗体低的免疫原性,并且存在使用人源化或完全人类抗体作为治疗性抗体的趋势。因此,可将嵌合抗体或非人类来源的其他抗体人源化以在人类中减少针对抗体的免疫反应的风险。

[0122] 对于嵌合抗体,人源化通常包括可变区序列的框架区的修饰。为互补决定区(CDR区)一部分的氨基酸残基最有可能不会由于人源化而变化,尽管在一些情况下可能期望变化CDR区中的单个氨基酸残基,例如以去除糖基化位点、脱酰胺位点、天冬氨酸异构化部分或不期望的半胱氨酸或甲硫氨酸残基。N-连接的糖基化通过在三肽序列Asn-X-Ser或Asn-X-Thr中的天冬酰胺残基添加寡糖链而发生,其中X可为除Pro之外的任何氨基酸。去除N-糖基化位点可通过将Asn或Ser/Thr残基突变为另一种残基,优选地通过保守性置换来实现。天冬酰胺和谷氨酰胺残基的脱酰胺可取决于因素比如pH和表面暴露而发生。天冬酰胺残基特别易于脱酰胺,特别是如果其存在于Asn-Gly序列中并且在较小程度上其存在于其他二肽序列比如Asn-Ala中。对于这种脱酰胺的区域,特别是CDR区序列中的Asn-Gly,可优选的是通常通过保守性置换去除所涉及的残基之一来去除该区域。

[0123] 用于人源化抗体序列的许多方法为本领域已知的,参见例如Almagro&Fransson, *Front Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 的综述。最常用的方法之一为移植CDR区,例如鼠来源的嵌合抗体涉及鉴定鼠可变区基因的人类种系基因等同物并将小鼠CDR区序列移植到该框架中。CDR区移植可基于根据Kabat的CDR区域定义,尽管后来的公开(Magdelaine-Beuzelin et al, *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210-225 (2007)) 表明IMGT® (the international ImMunoGeneTics information system®, www.imgt.org) 的定义可改善人源化结果(参见Lefranc et al, *Dev. Comp Immunol.* 27:55-77 (2003))。在一些情况下,与来源的亲本抗体CDR区相比较,CDR区移植可降低非人类CDR移植的抗体的结合特异性和亲和力,从而降低生物活性。为了恢复亲本抗体的结合亲和力和特异性,可将反向突变(有时称为“框架区修复”)应用于CDR移植的抗体中的选定位置(通常为框架区)。可使用文献和抗体数据库中可获得的信息来进行反向突变的可能位置的确定。作为反向突变候选物的氨基酸残基一般地暴露于抗体分子的表面,而加深或具有较低的表面暴露程度的残基通常不会变化。人源化的CDR区移植和反向突变方法的备选方法为当保留非人类来源的未暴露残基,而将暴露的

残基置换为人类残基时的表面变化。

[0124] 获得完全人类抗体的技术有两种:使用体外构建的噬菌体文库或通过对人源化动物(小鼠、大鼠等)进行体内免疫。

[0125] 噬菌体展示为用于抗体鉴定的第一个和最广泛使用的体外技术。1985年,Smith发现可将外源性DNA序列以使克隆的基因序列作为融合蛋白在噬菌体颗粒的表面上表达的这种方式克隆到丝状噬菌体M13中(Smith GP:Filamentous fusion phage:novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.Science 1985,228:1315-1317)。因此,感兴趣的融合蛋白可基于其结合其他蛋白的能力进行选择。这项发现与PCR扩增技术相结合,使得能够克隆免疫球蛋白基因的cDNA库,以创建多种含有可变结构域的噬菌体文库,可用于快速搜索靶标特异性单克隆抗体。噬菌体文库的库反映其血液用于创建文库的各人类或动物的B淋巴细胞抗体库。1995年,有两篇文章报道了有关表达完全人类抗体的基因工程小鼠的创建,其库可能与通过杂交瘤技术产生的那些匹配(Lonberg N,Taylor LD,Harding FA,Trounstein M,Higgins KM,Schramm SR,Kuo CC,Mashayekh R,Wymore K,McCabe JG et al.:Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications.Nature 1994,368:856-859; Green LL,Hardy MC,Maynard-Currie CE,Tsuda H,Louie DM,Mendez MJ,Abderrahim H,Noguchi M,Smith DH,Zeng Y et al.:Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs.Nat Genet 1994,7:13-21)。这些动物破坏了其自身免疫球蛋白的内源性重链和k轻链的靶向基因,并引入了代表人类重链和k轻链基因区段的转基因。发现人类基因库被小鼠免疫系统用来产生针对更多种抗原的高度特异性和高亲和力的抗体。尽管人类免疫球蛋白转基因小鼠表达的B细胞受体本质上为小鼠和人类成分(例如人类免疫球蛋白、小鼠Ig α 和Ig β 及其他信号传导分子)的杂合体,但其B细胞正常发育并成熟。在一些情况下,还可为优选的是修饰CDR区的一个或多个氨基酸残基以增加与靶表位的结合亲和力。这称为“亲和力成熟”,并且在一些情况下可与人源化结合进行,例如当抗体的人源化导致结合特异性或亲和力降低,并且仅通过反向突变不可能充分提高结合特异性或亲和力时。各种亲和力成熟方法为本领域已知的,例如Burks et al.,Proc Natl Acad Sci USA,94:412-417(1997)所述的体外扫描饱和诱变方法以及Wu et al.,Proc Natl Acad Sci USA 95:60376042(1998)建议的逐步体外亲和力成熟方法。

[0126] 术语“单克隆抗体”或“mAb”是指由细胞的单个克隆群合成和分泌的抗体。克隆群可为永生化细胞的克隆群。在一些实施方案中,克隆群中的永生化细胞为一般地通过将来自免疫动物的单个B淋巴细胞与来自淋巴细胞肿瘤的单个细胞融合而产生的杂交细胞(杂交瘤)。杂交瘤为工程化细胞类型,并且在自然界中不存在。

[0127] “天然抗体”一般地为约150000道尔顿的异源四聚体糖蛋白,其由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成。每条轻链通过一个共价二硫键连接于重链,而重链之间的二硫键数量在不同的免疫球蛋白同种型之间有所不同。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫键。每条重链在一端具有可变结构域(VH),随后为多个恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(VL)和在其另一端具有恒定结构域。轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,而轻链的可变结构域与重链的可变结构域对齐。据信特定的氨基酸残基

在轻链和重链可变结构域之间形成界面。

[0128] 用于描述本公开的各种抗体的“分离的”（“分开的”）定义是指从其中表达它的细胞或细胞培养物鉴定和分离和/或再生的抗体。其天然环境的污染物成分（污染物）为通常干扰多肽的诊断或治疗用途的材料，并且可能包括酶、激素以及其他蛋白或非蛋白种类。在优选的实施方案中，(1) 将抗体纯化至足以通过使用转杯式测序仪（Edman测序仪）获得N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度，或(2) 在还原或非还原条件下，使用考马斯蓝或优选地银染剂，通过SDS-PAGE方法将抗体纯化至均质。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体，因为不存在抗体天然环境的至少一种成分。然而，通常，分离的抗体通过至少一个纯化步骤来制备。

[0129] “分离的”核酸分子为被鉴定并与至少一种通常在抗体核酸的天然来源中与之伴随的污染物核酸分子分离的核酸分子。分离的核酸分子区别于自然界中发现它的形式或背景。因此，分离的核酸分子区别于如其在天然细胞中存在的核酸分子。然而，分离的核酸分子包括通常表达抗体的细胞中含有的核酸分子，其中例如该核酸分子处于与天然细胞不同的染色体位置。

[0130] 本文使用的术语“表位”是指与结合分子（例如抗体或相关分子，比如双特异性结合分子）特异性结合的抗原的一部分（决定簇）。表位决定簇通常由分子的化学活性表面分组（比如氨基酸或糖侧链）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。表位可为“线性的”或“构象的”。在线性表位中，蛋白（例如抗原）和相互作用分子（比如抗体）之间的所有相互作用点均沿着蛋白的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用点存在于蛋白上在一级氨基酸序列中彼此分开的氨基酸残基上。一旦鉴定出期望的抗原表位，就可使用本领域众所周知的技术产生针对该表位的抗体。另外，抗体或其他结合分子的产生和表征可阐明有关合乎期望的表位的信息。基于该信息，然后可竞争性地筛选用于与相同或相似的表位结合的结合分子，例如通过竞争研究找到竞争与抗原的结合的结合分子。

[0131] 术语“肽接头”本文意指具有连接一定长度的结构域的能力的任何肽，该长度取决于其彼此结合的含有任何氨基酸序列的结构域。优选地，肽接头具有超过5个氨基酸的长度，并且由选自G、A、S、P、E、T、D、K的任何氨基酸组组成。

[0132] 术语抗体的“效应子功能”是指与抗体的Fc区（Fc区天然序列或变体Fc区氨基酸序列）相关的生物活性，并且根据抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例为C1_q-结合、补体依赖性细胞毒性、Fc受体结合、抗体依赖性细胞毒性（ADCC）、吞噬作用、下调细胞表面受体（例如B细胞受体，BCR）和B细胞活化。

[0133] “细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应，其中表达Fc受体（FcR）的非特异性细胞毒性细胞（例如自然杀伤（NK）细胞、嗜中性粒细胞、细胞和巨噬细胞）识别靶细胞上结合的抗体，并随后诱导靶细胞裂解。用于介导ADCC的原代细胞（NK细胞）仅表达Fc γ RIII，而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达概述于Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991) 中第464页的表3中。为了评价感兴趣的分子的ADCC活性，可进行体外ADCC测定，比如美国专利第5500362或5821337号所述的。可用于这种测定的效应细胞包括外周血单核细胞（PBMC）和自然杀伤（NK）细胞。或者或另外地，可在体内，例如在比如Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656

(1998)所公开的动物模型中评价感兴趣的分子的ADCC活性。

[0134] “人类效应细胞”为表达一种或多种FcR并实施效应子功能的白细胞。优选地,细胞至少表达Fc γ RIII并实施ADCC效应子功能。介导ADCC的人类白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞,PBMC和NK细胞为优选的。如本文所述,效应细胞可从其天然来源,例如从血液或PBMC中分离。

[0135] 术语“Fc受体”或“FcR”用于描述结合抗体的Fc区的受体。优选的FcR为天然序列人类FcR。此外,优选的FcR为结合IgG抗体的FcR(受体 γ),优选的受体包括受体的Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类,包括这些受体的等位基因变体和可选剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有类似的氨基酸序列,主要区别在于胞质结构域。活化受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997))。FcR的综述提供于Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34(1994); 和de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)中。其他FcR(包括未来将被鉴定的FcR)在本文包括在术语“FcR”中。该术语还包括新生儿受体FcRn,其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587(1976), and Kim et al., *J. Immunol.* 24:249(1994))。

[0136] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在存在补体的情况下分子裂解靶标的的能力。补体活化途径通过补体系统的第一组分(C1q)与同其抗原复合的分子(例如抗体)的结合而启动。为了评价补体活化,可进行CDC测定,例如如Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163(1996)所述。

[0137] 术语“同一性”或“同源性”应解释为意指如果有必要获得整个序列的最大同一性百分比,并且不将序列同一性的任何部分置换为所考虑的保守序列,在比对序列时和引入“空位”之后,具有相应序列的候选序列中的残基与相同氨基酸残基相比较的百分比。N-或C-末端的延伸和插入均不应解释为减少同一性或同源性。用于比对的方法和计算机程序为众所周知的。序列同一性可使用序列分析软件(例如Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Ave., Madison, WI 53705)进行测量。该软件可通过确定各种置换、缺失(消除)和其他修饰的同源性程度来用于这种序列。

[0138] 关于抗体多肽序列的术语“同源的”应解释为呈现出与多肽序列具有至少70%、优选地80%,更优选地90%和最优选地95%的序列同一性的抗体。关于核酸序列的术语应解释为呈现出相对于核酸序列具有至少85%,优选地90%,更优选地95%和最优选地97%的序列同一性的核苷酸序列。

[0139] 提供本文所述抗体的氨基酸序列的修饰。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。通过将适当的核苷酸变化引入到抗体核酸中或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。这种修饰包括例如抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或置换。进行缺失、插入和置换的任何组合以获得最终构建体,只要最终构建体具有期望的特征。氨基酸改变也可改变抗体的翻译后加工,比如糖基化位点的数量或位置的变化。

[0140] 通过氨基酸置换修饰抗体的氨基酸序列的变体。这种变体为抗体分子中的至少一

个氨基酸残基被另一残基置换。置换诱变的目标位点包括高变区或CDR,但也考虑在FR或Fc区进行置换。保守性置换显示在表1的“优选置换”标题下。如果这种置换导致生物活性的变化,则可引入更显著的变化,表A中命名的示例性的置换,或者如以下参考氨基酸类别进一步描述的,并且可筛选产物。

初始残基	示例性的置换	优选的置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn (N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0141] 术语“核酸”、“核序列”、“核酸序列”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”本文可互换使用,表示修饰或未修饰的核苷酸的准确序列,其确定含有或不含非天然核苷酸的核酸片段或区域,并且为双链DNA或RNA或者单链DNA或RNA或所述DNA的转录产物。

[0142] 必须理解,本发明不涉及处于其天然染色体环境,即处于天然状态的核苷酸序列。本发明的序列已经分离和/或纯化,即其已例如通过复制直接或间接地收集,其环境已被至少部分地改变。因此,本文也考虑通过遗传重组例如通过接受细胞(宿主细胞)或通过化学合成获得的分离的核酸。

[0143] 除非另外规定,否则提及核苷酸序列包括其互补序列。因此,提及具有特定序列的核酸应理解为包括其具有其互补序列的互补链。

[0144] 表述“控制序列”是指在特定宿主生物体中表达可操作地连接的编码序列所必需的DNA序列。适合于原核生物的控制序列例如包括启动子、任选操纵子、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

[0145] 当核酸与另一核酸序列处于功能关系时,其为“可操作地连接的”。例如,当前序列或分泌前导DNA序列表达为参与多肽分泌的前蛋白时,其可操作地连接于多肽DNA;当启动

子或增强子影响序列转录时,其可操作地连接于编码序列;或当核糖体结合位点被定位以便于翻译时,其可操作地连接于编码序列。通常,“可操作地连接”意指连接的DNA序列为连续的,并且对于分泌前导而言为连续的并且处于阅读相中。然而,增强子不必为连续的。连接通过在现有的限制性位点连接来完成。如果不存在这种位点,则按照常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

[0147] 本文使用的术语“载体”意指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。在本发明的一些实施方案中,载体为质粒,即环状双链DNA片段,其中可连接另外的DNA区段。在本发明的一些实施方案中,载体为病毒载体,其中可将另外的DNA区段连接至病毒基因组。在本发明的一些实施方案中,载体能够在其被引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。在本发明的其他实施方案中,当将载体(例如非游离型哺乳动物载体)引入到宿主细胞时,可将其整合到宿主细胞基因组中,从而与宿主基因一起复制。此外,某些载体能够指导与其可操作地连接的基因的表达。这种载体在本文称为“重组表达载体”(或简称“表达载体”)。

[0148] 本文使用的术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)旨在指其中已引入重组表达载体的细胞。本发明涉及宿主细胞,其可包含例如上述本发明的载体。本发明还涉及宿主细胞,其例如包含在本发明的三特异性结合分子中在第一结合结构域和/或第二结合结构域中编码重链或其抗原结合部分的核苷酸序列、编码轻链或其抗原结合部分的核苷酸序列或者两者。应当理解,“重组宿主细胞”和“宿主细胞”不仅旨在指特定的对象细胞,而且还指这种细胞的后代。由于因突变或环境影响而可能在后代中保留修饰,因此实际上这种后代与亲代细胞可能并不相同,但是这种细胞仍然包括在本文使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0149] 术语“赋形剂”本文用于描述除本发明化合物以外的任何成分。

[0150] “药用组合物”意指包含本发明的抗体和至少一种选自以下的组分的组合物:药学上可接受的和药理学上相容的媒介物、溶剂、稀释剂、载体、助剂、分配和接受剂、递送剂,比如防腐剂、稳定剂、填充剂、分散剂、湿润剂、乳化剂、悬浮剂、增稠剂、甜味剂、香料、矫味剂、抗细菌剂、杀真菌剂、润滑剂和延长递送调节剂,其选择和合适的比例取决于性质和给予方法和剂量。示例性的悬浮剂为乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯、山梨醇和失水山梨醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶及其混合物。针对微生物作用的保护可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(比如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、山梨酸和类似化合物)来提供。组合物还可包含等渗剂,例如糖、氯化钠等。组合物的延长作用可通过使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)提供。合适的载体、溶剂、稀释剂或递送剂的实例为水、乙醇、多元醇及其混合物、植物油(比如橄榄油)和可注射有机酯(比如油酸乙酯)。示例性的填充剂为乳糖(lactose)、乳糖(milk sugar)、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸钙等。分散剂和分配剂的实例为淀粉、藻酸及其盐、硅酸盐。润滑剂的实例为硬脂酸镁、月桂基硫酸钠、滑石粉和高分子量的聚乙二醇。单独或与另一种药物组合用于口服、舌下、经皮、肌内、静脉内、皮下、局部或直肠给予药物的药用组合物可作为与常规药用载体的混合物以标准给予形式给予动物和人类。合适的标准给予形式包括口服形式(比如片剂、明胶胶囊剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、口香糖和口服溶液剂或混悬剂)、舌下和含服给予形式、气雾剂、植入剂、局部、经皮、皮下、肌内、静脉内、鼻内或眼内给予形式和直肠给予形式。

[0151] “药物(药物治疗)”意指以旨在恢复、纠正或改变人类和动物的生理功能以及用于治疗和预防疾病、诊断、麻醉、避孕、美容等的片剂、胶囊剂、注射剂、软膏剂及其他即用型的形式存在的物质(或以药用组合物的形式存在的物质混合物)。

[0152] 术语“PD-L1介导的疾病或病症”考虑与PD-L1直接或间接相关的所有疾病或病症,包括疾病或病症的病因学、发展、进展、持续性或病理学。

[0153] “治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“疗法(therapy)”是指减轻或消除生物学病症和/或至少一种其相关症状的方法。本文使用的“减轻”疾病、病症或病况意指降低疾病、病症或病况症状的严重程度和/或发生率。另外,本文提及“治疗”包括提及治愈性、姑息性和预防性治疗。

[0154] 在一个方面,治疗的受试者或患者为哺乳动物,优选地为人类受试者。以上受试者可为任何年龄的雄性或雌性。

[0155] 术语“病症”意指可通过本发明的治疗改善的任何病症。该术语的定义包括慢性和急性病症或疾病,包括引起哺乳动物易患病症表现的病理状况。要治疗的疾病的非限制性实例包括良性和恶性肿瘤;白血病和淋巴系统恶性肿瘤,特别是乳腺癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、前列腺癌或膀胱癌;神经、神经胶质、星形细胞、下丘脑和其他腺体、巨噬细胞、上皮、间质和囊胚性病症;炎性、血管生成和免疫病症。要根据本发明治疗的优选病症为癌症。

[0156] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述在哺乳动物中一般地特征为不受控制的细胞生长/增殖的生理状况。该定义包括良性和恶性癌症。癌症的实例包括(但不限于)癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。这种癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(例如肾细胞癌)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤和各种类型的头颈癌。

[0157] 术语“免疫反应”、“自身免疫反应”和“自身免疫性炎症”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由这些细胞或肝细胞产生的可溶性大分子(包括从人体选择性损害、破坏或消除侵入性病原体、感染有病原体的细胞或组织、癌细胞,或者在自身免疫性或病理性炎症情况下的正常人体细胞或组织产生的抗体、细胞因子和补体)的作用。

[0158] “治疗有效量”认为是在治疗期间给予的将在某种程度上减轻所治疗疾病的一种或多种症状的治疗剂的量。

[0159] 术语“长期”应用是指与急性(短期)给予相反的一种或多种药物的连续(延长)使用,以便维持初始治疗效果(活性)很长一段时间。

[0160] “间歇性”使用是指一种治疗,其并非始终不间断地进行,而是其本质上为周期性的。

[0161] 在本描述和以下权利要求中,除非上下文另外要求,否则词语“具有(have)”、“含有(contain)”和“包含(comprise)”或其变体,比如“具有(has)”、“具有(having)”、“含有(contains)”、“含有(containing)”、“包含(comprises)”或“包含(comprising)”应理解为包括所述整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组。

[0162] 发明详述

[0163] 抗体

[0164] 本发明涉及与PD-L1(程序性死亡配体1蛋白)结合的抗体或抗原结合片段。

[0165] 在一个实施方案中,本发明涉及与PD-L1结合并包含以下的分离的抗体或其抗原结合片段:

[0166] (a)重链可变区,其包含与APLLLAMTFGVGS(SEQ ID NO:3)的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的CDR3,和

[0167] (b)轻链可变区,其包含与ALYMGNGGHM(SEQ ID NO:7)的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的CDR3。

[0168] 在一个实施方案中,本发明涉及与PD-L1结合并包含以下的分离的抗体或其抗原结合片段:

[0169] (a)重链可变区,其包含具有APLLLAMTFGVGS(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的CDR3,和(b)轻链可变区,其包含具有ALYMGNGGHM(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的CDR3。

[0170] 在一个实施方案中,本发明涉及与PD-L1结合并包含以下的分离的抗体或其抗原结合片段:

[0171] (a)重链可变区,其包含以下:

[0172] (i)具有与DYAMS(SEQ ID NO:1)的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的CDR1,

[0173] (ii)具有与DISWSGSNTNYADSVKG(SEQ ID NO:2)的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的CDR2,

[0174] (iii)具有与APLLLAMTFGVGS(SEQ ID NO:3)的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的CDR3,和

[0175] (b)轻链可变区,其包含以下:

[0176] (i)具有与GLSSGTVTAINYPG(SEQ ID NO:5)的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的CDR1,

[0177] (ii)具有与NTNTRHS(SEQ ID NO:6)的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的CDR2,

[0178] (iii)具有与ALYMGNGGHM(SEQ ID NO:7)的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的CDR3。

[0179] 在一个实施方案中,本发明涉及与PD-L1结合并包含以下的分离的抗体或其抗原结合片段:

[0180] (a)重链可变区,其包含以下:

[0181] (i)具有DYAMS(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的CDR1,

[0182] (ii)具有DISWSGSNTNYADSVKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的CDR2,

[0183] (iii)具有APLLLAMTFGVGS(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的CDR3,和

[0184] (b)轻链可变区,其包含以下:

[0185] (i)具有GLSSGTVTAINYPG(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的CDR1,

[0186] (ii)具有NTNTRHS(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的CDR2,

[0187] (iii)具有ALYMGNGGHM(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的CDR3。

[0188] 在一个实施方案中,本发明涉及与PD-L1结合并包含以下的分离的抗体或其抗原结合片段:

[0189] (a) 具有与EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISWGSNTN YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARAPLLLAMTFGVGSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:4) 的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的重链可变区,和

[0190] (b) 具有与QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCLSSGTVTAINYPGWYQQTPGQAPRTLIYNTNTRHSG VPDRFSGSISGNKAALTITGAQAEDEADYYCALYMGNGGHMFGGGTK (SEQ ID NO:8) 的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

[0191] 在一个实施方案中,本发明涉及与PD-L1结合并包含以下的分离的抗体或其抗原结合片段:

[0192] (a) 具有EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISWGSNTNYA DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARAPLLLAMTFGVGSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列的重链可变区,和

[0193] (b) 具有QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCLSSGTVTAINYPGWYQQTPGQAPRTLIYNTNTRHSGVP DRFSGSISGNKAALTITGAQAEDEADYYCALYMGNGGHMFGGGTK (SEQ ID NO:8) 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0194] 在一个实施方案中,本发明涉及与PD-L1结合并包含以下的分离的抗体:

[0195] (a) 具有与EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISWGSNTN YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARAPLLLAMTFGVGSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVS VLT VLVHQLDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN HYTKQKLSLSPGK (SEQ ID NO:9) 的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的重链,和

[0196] (b) 具有与QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCLSSGTVTAINYPGWYQQTPGQAPRTLIYNTNTRHSG VPDRFSGSISGNKAALTITGAQAEDEADYYCALYMGNGGHMFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKAT LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:10) 的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性或同一性的氨基酸序列的轻链。

[0197] 在一个实施方案中,本发明提供与PD-L1结合并包含以下的分离的抗体:

[0198] (a) 具有EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISWGSNTNYA DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARAPLLLAMTFGVGSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVS VLT VLVHQLDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY

TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:9) 的氨基酸序列的重链,和

[0199] (b) 具有QTVVTQEP SLSVSPGGTVTLTCGLSSGTVTAINYPGWYQQTPGQAPRTLIYNTNTRHSGVP DRFSGSISGKAALTITGAQAEDEADYYCALYMGNGGHMFGGKTLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT ECS (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列的轻链。

[0200] 在本发明的一个实施方案中,与PD-L1结合的分离的抗体为单克隆抗体。

[0201] 在本发明的一个实施方案中,与PD-L1结合的单克隆抗体为全长IgG抗体。

[0202] 在本发明的一个实施方案中,全长IgG抗体属于人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4同种型。

[0203] 在本发明的一个实施方案中,全长IgG抗体属于人类IgG1同种型。

[0204] 在本发明的一个实施方案中,分离的抗体为BCD-135抗体,其结合PD-L1并且含有重链可变区(包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR3)、轻链可变区(包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR3)。

[0205] 在本发明的一个实施方案中,分离的抗体为BCD-135抗体,其结合PD-L1并且含有重链可变区(包含具有SEQ ID NO:1-3的相应氨基酸序列的CDR1-3)和轻链可变区(包含具有SEQ ID NO:5-7的相应氨基酸序列的CDR1-3)。

[0206] 在本发明的一个实施方案中,分离的抗体为BCD-135抗体,其与PD-L1结合并且含有具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。

[0207] 在本发明的一个实施方案中,分离的抗体为BCD-135抗体,其与PD-L1结合并且含有具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链。

[0208] 核酸分子

[0209] 本发明还涉及编码本文所述的本发明的抗PD-L1抗体的核酸分子和序列。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体的第一结构域和第二结构域氨基酸序列由各种核酸分子编码。在第一结构域和/或第二结构域包含重链和轻链的情况下,在一些实施方案中,重链和轻链氨基酸序列由各种核酸编码。在其他实施方案中,重链和轻链氨基酸序列由相同的核酸分子编码。在某些实施方案中,核酸分子可编码第一和第二结构域的氨基酸序列(例如重链和轻链序列)的任何组合。在一个特定实施方案中,核酸分子可编码第一结合结构域的氨基酸序列和第二结合结构域的轻链氨基酸序列,任选地包括其连接的肽接头的任何序列。除非另外规定,否则提及核苷酸序列包括其互补序列。因此,提及具有特定序列的核酸应理解为包括其具有其互补序列的互补链。本文提及的术语“多核苷酸”意指长度为至少10个碱基的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核苷酸或者任何一种类型核苷酸的修饰形式)的聚合形式。该术语包括单链和双链形式。

[0210] 本发明还涉及与编码选自SEQ ID NO:1-3、5-7的氨基酸序列的一种或多种以上核苷酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列。在某些实施方案中,核苷酸序列与编码选自SEQ ID NO:4或8的氨基酸序列的核苷酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。本发明还涉及与编码选自SEQ ID NO:9-10的氨基酸序列的一种或多种以上核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列。

[0211] 在一个方面,本发明涉及包含编码选自SEQ ID NO:1-10的氨基酸序列的核苷酸序列的核酸分子。核酸分子也可包含这些核苷酸序列的任何组合。在一个实施方案中,核酸分子包含编码SEQ ID NO:3的氨基酸的核苷酸序列和编码SEQ ID NO:7的氨基酸序列的核苷酸序列。在另一个实施方案中,核酸分子包含编码SEQ ID NO:1-3的氨基酸的核苷酸序列和编码SEQ ID NO:5-7的氨基酸序列的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含编码SEQ ID NO:4的氨基酸的核苷酸序列和编码SEQ ID NO:8的氨基酸序列的核苷酸序列。在一个实施方案中,核酸分子包含编码SEQ ID NO:9的氨基酸的核苷酸序列和编码SEQ ID NO:10的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0212] 在任何以上实施方案中,核酸分子可以是分离的。

[0213] 本发明的核酸分子可从产生抗PD-L1抗体或其一部分的任何来源分离。在某些实施方案中,本发明的核酸分子可以是合成的而不是分离的。

[0214] 在一些实施方案中,本发明的核酸分子可包含编码来自本发明的抗PD-L1抗体的第一或第二结构域的VH结构域的核苷酸序列,其在框架内与编码来自任何来源的重链恒定结构域的核苷酸序列偶联。类似地,本发明的核酸分子可包含编码来自本发明的抗PD-L1抗体的第一或第二区域的VL结构域的核苷酸序列,其在框架内与编码来自任何来源的轻链恒定结构域的核苷酸序列组合。

[0215] 在本发明的另一方面,可将编码第一或第二结合结构域的重(VH)和轻(VL)链的可变结构域的核酸分子“转化”为全长抗体基因。在一个实施方案中,通过分别插入已经编码重链恒定(CH)或轻链恒定(CL)结构域的表达载体中将编码VH或VL结构域的核酸分子转化为全长抗体基因,使得VH区段可操作连接于载体内的CH区段和/或VL区段可操作连接于载体内的CL区段。在另一个实施方案中,通过使用标准分子生物学技术将编码VH和/或VL结构域的核酸分子连结(例如连接)于编码CH和/或CL结构域的核酸分子,将编码VH和/或VL结构域的核酸分子转化为全长抗体基因。编码全长重链和/或轻链的核酸分子然后可从其已被引入的细胞中表达。

[0216] 核酸分子可用于表达大量重组抗PD-L1抗体。核酸分子可用于产生人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、单链抗体、免疫粘附素、双抗体、突变抗体和抗体衍生物,如本文所述。

[0217] 载体

[0218] 在又一方面,本发明涉及适合于表达本文所述的任何核苷酸序列的载体。

[0219] 本发明涉及含有编码如本文所述的抗PD-L1抗体或其部分的任何氨基酸序列(例如第一结合结构域重链和/或第二结合结构域重链和/或轻链序列)的核酸分子的载体。本发明进一步涉及包含编码融合蛋白、修饰的抗体、抗体片段的核酸分子的载体。

[0220] 在本发明的另一个实施方案中,核酸分子和载体可用于产生突变的抗PD-L1抗体。抗体可在第一和/或第二结合结构域重链和/或轻链的可变结构域内突变,例如以改变抗PD-L1抗体的结合亲和力。例如,突变可发生在一个或多个CDR区,以增大或减小抗PD-L1抗体的 K_D ,以增大或减小 k_{off} 或者改变抗体对PD-L1的结合特异性。在另一个实施方案中,经受一个或多个突变的是已知与抗体的种系(对应于本发明的抗PD-L1抗体的第一或第二结合结构域)相比较被改变的氨基酸残基。这些突变可在可变结构域或恒定结构域内的CDR区或框架区进行。在本发明的一个优选实施方案中,突变在可变结构域内产生。在本发明的另一

个实施方案中,经受一个或多个突变的是已知与种系相比较在本发明的抗PD-L1抗体的可变结构域的CDR或框架区中被改变的氨基酸残基。

[0221] 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1抗体通过在表达载体中插入如上所述获得的部分或完全编码第一和第二结合结构域的序列(例如重链和轻链的序列,其中结合结构域包含重链和轻链序列)的DNA,使得该基因可操作连接于必要的表达控制序列(比如转录和翻译控制序列)来表达。表达载体包括质粒、逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒(AAV)、植物病毒(比如花椰菜花叶病毒、烟草花叶病毒)、粘粒、YAC、EBV来源的附加体等。可将DNA分子连接到载体中,使得载体中控制转录和翻译的序列发挥DNA转录和翻译调控的预期功能。可选择表达载体和表达控制序列,以便与所使用的表达宿主细胞相容。可将编码第一和第二结合结构域的一部分或全长序列(例如重链和轻链的序列,其中结合结构域包含重链和轻链的序列)的DNA分子插入到分开的载体中。在本发明的一个实施方案中,将以上DNA分子的任何组合引入到相同的表达载体中。DNA分子可通过标准方法(例如抗体基因片段和载体上互补限制性位点的连接,或者如果没有限制性位点则进行平末端连接)引入到表达载体中。

[0222] 合适的载体为编码人类CH或CL免疫球蛋白的功能完整序列以设计适当的限制性位点,使得如上所述,任何VH或VL序列均可易于掺入和表达的载体。这种载体中的NA-和LC-编码基因可含有内含子序列,其通过稳定相应的mRNA导致蛋白抗体产物的总体增加。内含子序列被剪接供体和剪接受体位点围绕,这些位点决定RNA剪接将发生的位置。当使用几个内含子时,内含子序列可位于抗体链的可变或恒定区内,或者位于可变和恒定区两者中。聚腺苷酸化和转录终止可在天然染色体位点编码区域的下游。重组表达载体还可编码促进宿主细胞产生抗体链的信号肽。可将抗体链基因克隆到载体中,使得信号肽连接于免疫球蛋白链的阅读框氨基末端。信号肽可为免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即不具有免疫球蛋白蛋白质性质的信号肽)。

[0223] 除了抗体链基因之外,本发明的重组表达载体还可携带调控序列,其控制抗体链基因在宿主细胞中的表达。本领域的技术人员将意识到,表达载体的设计,包括调控序列的选择,可能取决于因素比如要转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白表达水平等。用于哺乳动物表达宿主细胞的优选的调控序列包含病毒元件,以确保在哺乳动物细胞中高水平的蛋白表达,比如源自逆转录病毒LTR、巨细胞病毒(CMV)(例如CMV启动子/增强子)、猿猴病毒40(SV40)(例如SV40启动子/增强子)、腺病毒(例如大腺病毒晚期启动子(AdMLP))、多瘤病毒的启动子和/或增强子以及强哺乳动物启动子(比如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子)。对于病毒调控元件及其序列的进一步描述,参见例如美国专利5168062、4510245和4968615。用于在植物中表达结合分子比如抗体的方法,包括启动子和载体的描述以及植物转化,为本领域已知的。参见例如美国专利6517529。用于在细菌细胞或真菌细胞例如酵母细胞中表达多肽的方法也为本领域众所周知的。

[0224] 除了抗体链基因和调控序列之外,本发明的重组表达载体还可携带另外的序列,比如调控载体在宿主细胞中的复制(例如复制起点)的序列和可选择标记基因。可选择标记基因助于选择其中已引入载体的宿主细胞(参见例如美国专利4399216、4634665和5179017)。例如,一般地可选择标记基因赋予其中引入载体的宿主细胞对药物(比如G418、潮霉素或氨甲蝶呤)的抗性。例如,可选择标记基因包括二氢叶酸还原酶基因(DHFR)(在dhfr-宿主细胞中用于选择/MTX扩增)、neo基因(用于选择G418)和谷氨酸合成酶基因。

[0225] 本文使用的术语“表达控制序列”意指实现与其连接的编码序列的表达和加工必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列；有效的RNA加工信号，比如剪接和聚腺苷酸化信号；稳定胞质mRNA的序列；提高翻译效率的序列（即Kozak共有序列）；提高蛋白稳定性的序列；以及任选地增强蛋白分泌的序列。这种控制序列的性质取决于宿主生物体而不同；在原核生物中，这种控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列；在真核生物中，通常这种控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”至少包括其存在对于表达和加工必不可少的所有成分，并且还可包括其存在为有用的另外成分，例如前导序列和融合细胞序列。

[0226] 宿主细胞

[0227] 本发明的另一方面涉及用于产生本发明的抗PD-L1抗体的方法。本发明的一个实施方案涉及用于产生如本文定义的抗PD-L1抗体的方法，方法包括提供能够表达抗PD-L1抗体的重组宿主细胞，在适合于产生抗PD-L1抗体的条件下培养所述宿主细胞，和回收产生的抗PD-L1抗体。通过在这种重组宿主细胞中的这种表达产生的抗PD-L1抗体在本文称为“重组抗PD-L1抗体”。本发明还涉及这种宿主细胞的后代细胞和涉及通过相同方式获得的抗PD-L1抗体。

[0228] 编码本发明抗PD-L1抗体的核酸分子和包含这些核酸分子的载体可用于转染合适的哺乳动物、植物、细菌或酵母宿主细胞。转化可通过用于将多核苷酸引入到宿主细胞的任何已知方法进行。用于将异源多核苷酸引入到哺乳动物细胞的方法为本领域众所周知的，并且包括葡聚糖介导的转染、核酸和荷正电的聚合物复合物转染、核酸和磷酸钙沉淀转染、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、通过将多核苷酸封装在脂质体中的转染和将DNA直接显微注射到细胞核中。另外，可通过病毒载体将核酸分子引入到哺乳动物细胞。用于转化细胞的方法为本领域众所周知的。参见例如美国专利4399216、4912040、4740461和4959455。用于转化植物细胞的方法为本领域众所周知的，包括例如土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 介导的转化、基因枪转化、直接注入、电穿孔和病毒转化。用于转化细菌和酵母细胞的方法也为本领域众所周知的。

[0229] 用作转化宿主的哺乳动物细胞系为本领域众所周知的，并且包括许多永生化的可用细胞系。这些特别包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)、NS0细胞、SP2、HEK-293T细胞、Freestyle 293细胞 (Invitrogen)、NIH-3T3细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、非洲绿猴肾细胞 (COS)、人类肝细胞癌细胞 (例如Hep G2)、A549细胞和许多其他细胞系。通过确定哪些细胞系具有高表达水平和提供所产生蛋白的期望的特征来选择细胞系。可使用的其他细胞系为昆虫细胞系，比如Sf9或Sf21细胞。当将编码抗PD-L1抗体的重组表达载体引入到哺乳动物宿主细胞时，通过将宿主细胞培养足以在宿主细胞中表达抗体，或更优选地在其中宿主细胞生长的培养基中释放抗体的时间来产生抗体。可使用标准蛋白纯化方法从培养基中回收抗PD-L1抗体。植物宿主细胞例如包括烟草属 (*Nicotiana*)、拟南芥属 (*Arabidopsis*)、浮萍、玉米、小麦、马铃薯等。细菌宿主细胞包括大肠杆菌 (*E. coli*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*) 物种。酵母宿主细胞包括粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。

[0230] 另外，可使用多种已知方法来提高从生产细胞系产生本发明的抗PD-L1抗体的水平。例如，谷氨酰胺合成酶基因表达系统 (GS系统) 在某些条件下用于增强表达相当普遍。GS

系统总体上或部分地与EP专利0216846、0256055、0323997和0338841结合进行讨论。

[0231] 来自不同细胞系或转基因动物的抗PD-L1抗体的糖基化谱可能有所不同。然而,由本文所述的核酸分子编码或包含本文所述的氨基酸序列的所有抗PD-L1抗体均为本发明的一部分,不管结合分子的糖基化状态如何,并且通常不管翻译后修饰的存在与否。

[0232] 抗体制备

[0233] 本发明还涉及用于产生抗PD-L1抗体及其抗原结合片段的方法和过程。

[0234] 单克隆抗体

[0235] 单克隆抗体可使用首先由Kohler et al., Nature, 256, 1975, p. 495所述的基于杂交瘤的方法制备,或者可通过重组DNA方法 (US 4816567) 制备。

[0236] 在基于杂交瘤的方法中,将小鼠或其他适当的宿主动物(比如仓鼠)如上文所述进行免疫,以引发产生或能够产生可与用于免疫的蛋白特异性结合的抗体的淋巴细胞。或者,淋巴细胞可进行体外免疫。免疫之后,分离淋巴细胞,并使用合适的融合剂(比如聚乙二醇)将其与骨髓瘤细胞系融合,以形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, pp. 59-103)。

[0237] 将由此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中铺展并生长,该培养基优选地含有抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT或HPRT),则杂交瘤培养基一般地应包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷 (HAT培养基),即阻止HGPRT缺陷细胞生长的物质。

[0238] 用作细胞融合成分的优选的骨髓瘤细胞为易于融合,通过选定的产生抗体的细胞维持稳定的高水平抗体产生并且对选择未结合的亲本细胞的选择性培养基敏感的细胞。优选的骨髓瘤细胞系为鼠骨髓瘤系,比如可从Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA获得的源自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的那些以及可从American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA获得的SP-2或X63-Ag8-653细胞。还已经描述了用于产生人类单克隆抗体的人类骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系 (Kozbor, J. Immunol., 133, 1984, p. 3001; 和Brodeur et al, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker Inc., New York, 1987, pp. 51-63)。

[0239] 优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合测定,比如放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA), 测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0240] 单克隆抗体或其部分的结合亲和力也可通过Munson et al, Anal. Biochem., 107, 1980, p. 220中所述的Scatchard分析来确定。

[0241] 在鉴定出产生具有期望的特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,克隆可通过有限稀释方法进行亚克隆,并通过标准方法使其生长 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, pp. 59-103)。用于该目的的有效培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可在动物中作为腹水肿瘤进行体内生长,例如通过将细胞腹膜内 (i.p.) 注射到小鼠内。

[0242] 通过亚克隆分泌的单克隆抗体可通过常规免疫球蛋白纯化方法(比如亲和色谱(例如蛋白质A-或蛋白质Q-Sepharose)或离子交换色谱、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析等)从培养基、腹水液或血清中分离出来。

[0243] 编码单克隆抗体的DNA易于使用常规程序(例如通过使用能够与编码鼠抗体的重

链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)进行分离和测序。杂交瘤细胞用作这种DNA的优选来源。一旦分离,可将DNA置于表达载体中,其然后转染到宿主细胞(比如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或否则不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞)中,以提供重组宿主细胞中单克隆抗体的合成。有关编码抗体的DNA在细菌中重组表达的综述性文章参见Skerra et al.,*Curr.Opinion in Immunol.*,5,1993,pp.256-262,和Pliickthun,*Immunol.Revs.*130,1992,pp.151-188。

[0244] 在本发明的另一个实施方案中,单克隆抗体或抗体片段可从使用McCafferty et al.,*Nature*,348,1990,pp.552-554所述的技术产生的抗体噬菌体文库分离。Clackson et al.,*Nature*,352,1991,pp.624-628和Marks et al.,*J.Mol.Biol.*,222,1991,pp.581-597分别描述了使用噬菌体文库分离鼠和人类抗体。随后的出版物描述了通过链替换(Marks et al.,*Bio/Technology*,10,1992,pp.779-783)以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse et al.,*Nucl.Acids.Res.*,21,1991,pp.2265-2266)产生高亲和力(nM范围)人类抗体。因此,这些技术为用于分离单克隆抗体的传统的单克隆抗体基于杂交瘤的技术的可行备选方法。

[0245] 编码抗体的DNA也可被修饰,例如以便获得嵌合或融合的抗体多肽,例如通过将重链和轻链(CH和CL)恒定区的序列置换为同源鼠序列(US 4816567;和Morrison,et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*:81,1984,p.6851)或通过将免疫球蛋白编码序列与编码非免疫球蛋白多肽(异源多肽)的全部或部分序列共价连接。可将非免疫球蛋白多肽序列置换为抗体恒定区或置换为抗体抗原结合位点的可变区,产生嵌合二价抗体,其含有一个对抗原具有特异性的抗原结合位点和另一个对另一种抗原具有特异性的抗原结合位点。

[0246] 人源化抗体

[0247] 用于在非人类动物中产生“人源化”抗体的方法为本领域已知的。优选地,人源化抗体具有其中掺入的源自非人类来源的一个或多个氨基酸残基。这些源自非人类来源的氨基酸残基通常称为“输入”残基,因为其通常是从“输入的”可变区获得。基本上可按照Winter和同事的方法(Jones et al.,*Nature*,321,1986,pp.522-525;Riechmann et al.,*Nature*,332,1988,pp.323-327;Verhoeyen et al.,*Science*,239,1988,pp.1534-1536),通过用高变区序列置换人类抗体的相应序列来进行人源化。因此,“人源化”抗体为嵌合抗体(US 4816567),其中明显小于完整人类可变区的区域已被来自非人类物种的相应序列置换。在实践中,人源化抗体一般地为人类抗体,其中一些高变区残基和可能一些FR残基被啮齿动物抗体中类似区域的残基置换。

[0248] 当抗体旨在用于人类治疗时,要用于制备人源化抗体的人类可变结构域(轻链和重链两者)的选择,对于降低抗原性和HAMA-反应(人类抗鼠抗体)非常重要。根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知的人类可变区序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变区的序列。鉴定最接近啮齿动物的人类V区序列,并在其中选择适合用于人源化抗体的人类框架(FR)(Sims et al.,*J.Immunol.*,151,1993,p.2296;Chothia et al.,*J.Mol.Biol.*,196,1987,p.901)。另一种方法使用源自所有人类抗体轻链或重链的特定亚组的共有序列的特定框架。相同的框架可用于几种不同的人源化抗体(Carter et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*:89,1992,p.4285;Presta et al.,*J.Immunol.*,151,1993,p.2623)。

[0249] 进一步重要的是将抗体人源化,同时保留对抗原的高结合亲和力和其他有利的生

物特性。为了实现该目的,根据优选的方法,使用亲本和人源化序列的概念性三维模型,通过对亲本序列和各种人源化产物的分析过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型为通常可获得的并且为本领域的技术人员所熟悉。可获得计算机程序,其说明并显示选定的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。对这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能方面的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可从受体和输入序列中选择并组合FR残基,使得获得期望的抗体特征,比如对靶抗原的亲合力增加。通常,高变区残基直接且最主要地参与影响抗原结合。

[0250] 人源化抗体可为抗体片段,比如Fab片段,其任选地与一种或多种细胞毒剂缀合以产生免疫缀合物。或者,人源化抗体可为全长抗体,例如全长IgG1抗体。

[0251] 人类抗体和噬菌体展示文库技术

[0252] 作为人源化的备选方法,可获得人类抗体。例如,目前可产生转基因动物(例如小鼠),其在免疫后能够在不产生内源性免疫球蛋白的情况下产生全谱人类抗体。例如,已经描述了在嵌合和种系突变小鼠的抗体重链连接区(J_H -区段)基因的纯合缺失导致完全抑制内源性抗体产生。将人类种系免疫球蛋白基因阵列转移至这种种系突变小鼠,导致抗原攻击后产生人类抗体(参见例如Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 90, 1993, p. 2551; Jakobovits et al., Nature, 362, 1993, pp. 25-258; Bruggemann et al., Year in Immuno., 7, 1993, p. 33; US 5545806; 5569825; 5591669(全部属于GenPharm); US 5545807和WO 97/17852)。

[0253] 或者,为了从免疫供体的免疫球蛋白可变区(V)谱体外产生人类抗体和抗体片段,可使用噬菌体展示技术(McCafferty et al., Nature, 348, 1990, pp. 552-553)。根据该技术,将抗体V区基因与丝状噬菌体比如M13或fd的包膜蛋白的主要或次要基因一起克隆在阅读框中,并作为功能性抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面上。由于丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA的拷贝,因此基于功能特性的抗体选择也导致选择编码具有所述特性的抗体的基因。因此,噬菌体模仿B细胞的一些特性。噬菌体展示可以各种形式进行(综述参见例如Johnson Kevin S. and Chiswell David J., Current Opinion in Structural Biology, 3, 1993, pp. 564-571)。对于噬菌体展示,可使用不同来源的V基因区段。Clackson et al., Nature, 352, 1991, pp. 624-628从源自免疫小鼠脾脏的V基因的小的任意组合文库分离了抗噁唑酮抗体的各种组。可设计从免疫的人类供体获得的V基因谱,并且通常可根据Marks et al., J. Mol. Biol., 222, 1991, pp. 581-597, 或Griffith et al., EMBO J., 12, 1993, pp. 725-734所述的方法分离针对不同组抗原(包括自身抗原)的抗体(也参见US 5565323和5537905)。

[0254] 如上所述,人类抗体也可通过活化的B细胞在体外产生(参见US 5567610和US 5229275)。

[0255] 抗体片段

[0256] 在某些情况下,可建议使用抗体片段而不是完整抗体。较小的片段大小有助于其快速清除,并且可能有助于更好地穿透进入实体肿瘤。

[0257] 已开发了用于产生抗体片段的各种技术。传统上,这些片段经完整抗体的蛋白水解消化而获得(参见例如Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24, 1992, pp. 107-117, 和Brennan et al., Science, 229, 1985, p. 81)。然而,这些

片段现在可由重组宿主细胞直接产生。抗体的Fab、Fv和scFv片段可从能够促进产生大量这些片段的大肠杆菌表达和分泌。可从以上噬菌体抗体文库分离抗体片段。在另一个实施方案中,Fab'-SH片段可直接从大肠杆菌分离并化学偶联以形成F(ab')₂片段(Carter et al, Bio/Technology, 10, 1992, pp. 163-167)。根据另一种方法,可直接从重组宿主细胞的培养物分离F(ab')₂片段。其中保留表位结合受体的残基的具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段描述于US 5869046中。用于制备抗体片段的其他程序对本领域的技术人员应为显而易见的。在其他实施方案中,选择的抗体为单链Fv片段(scFv)(参见W0 93/16185、US 5571894和US 5587458)。Fv和sFv为仅有的具有完整结合位点和缺少恒定区的种类,结果,其可用于在体内使用时减少非特异性结合。携带sFv的融合蛋白可被设计为在sFv的N-或C-末端产生效应蛋白的融合物(参见以上Antibody Engineering, ed. Borrebaeck)。抗体片段也可作为“线性抗体”,例如如US 5641870所述。线性抗体的这种片段可为单特异性或双特异性的。

[0258] 双特异性抗体

[0259] 双特异性抗体为能与两个不同表位特异性结合的抗体。例如,双特异性抗体可与PD-L1蛋白的两个不同表位结合。其他双特异性抗体可携带PD-L1的结合位点与另一种蛋白的结合位点的组合。双特异性抗体可作为全长抗体或抗体片段(例如双特异性抗体的F(ab')₂片段)获得。

[0260] 用于制备双特异性抗体的方法为本领域众所周知的。全长双特异性抗体的传统生产为基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两个链具有不同的特异性(Millstein et al, Nature, 305, 1983, pp. 537-539)。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤)产生10种不同抗体分子的潜在混合物,其中仅有一种具有正确的双特异性结构。通常通过几个亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦,并且产物收率低。类似的程序公开于W0 93/08829和Traunecker et al., EMBO J., 10, 1991, pp. 3655-3659中。

[0261] 根据不同的方法,将具有期望的结合特异性的抗体可变结构域(抗体抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定区序列融合。融合优选地与包含铰链C_H2和C_H3区的至少一部分的Ig-重链恒定区一起进行。优选的是具有至少一种融合物中存在的含有轻链结合必需的位点的第一重链恒定区(C_H1)。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如果需要)免疫球蛋白轻链的DNA插入到分开的表达载体中,并共转染到合适的宿主生物体中。在构建体中使用不相等比率的3个多肽链以提供最佳收率的实施方案中,这在调节3个多肽片段的相互比例方面提供极大的灵活性。然而,当至少2个多肽链以相等的比率表达导致高收率或者当比率没有特别意义时,可在一个表达载体中插入2个或全部3个多肽链的编码序列。

[0262] 在该方法的一个优选实施方案中,双特异性抗体由在一个臂具有第一结合特异性的杂化免疫球蛋白重链和在另一臂的杂化免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。已经发现,这种不对称结构促进期望的双特异性分子与不需要的免疫球蛋白链组合的分离,因为仅在双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链提供一种简便的分离方式。该方法在W0 94/04690中公开。对于产生双特异性抗体的进一步细节参见例如Suresh et al., Methods in Enzymology, 121, 1986, p. 210。

[0263] 根据US 5731168所述的另一种方法,可对一对抗体分子之间的界面进行工程改造

以最大化从重组细胞培养物回收的异源二聚体的百分比。优选的界面包括 C_H3 区域的至少一部分。在这种方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链置换为较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)。通过用较小的侧链(例如用丙氨酸或苏氨酸)置换大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生与该大侧链相同或类似大小的补偿“腔”。这提供一种机制,用于提高异源二聚体相对于其他不需要的最终产物(比如同源二聚体)的收率。

[0264] 双特异性抗体包括交联抗体或“异源缀合物”。例如,异源缀合物中的一种抗体可与亲和素偶联,另一种与生物素偶联。这种抗体可例如用于使免疫系统细胞靶向不需要的细胞(US 4676980)并用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373和EP 03089)。异源缀合物抗体可使用任何便利的交联方法制备。合适的交联剂为本领域众所周知的,并且与许多交联技术一起描述于US 4676980中。

[0265] 用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术也已在文献中描述。例如,双特异性抗体可使用化学键来制备。Brennan et al., *Science*, 229, 1985, p. 81描述了一种程序,其中完整抗体被蛋白水解切割以产生 $F(ab')_2$ 片段。这些片段在存在二硫醇络合剂(比如亚硫酸钠)的情况下被还原,以稳定邻位的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原将一种 Fab' -TNB衍生物恢复为 Fab' -硫醇,并与等摩尔量的另一种 Fab' -TNB衍生物混合以产生双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作用于选择性固定酶的试剂。

[0266] 目前的进展使得可促进 Fab' -SH片段直接从大肠杆菌中回收,该片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175, 1992, pp. 217-225描述了完全人源化双特异性抗体分子 $F(ab')_2$ 片段的产生。每个 Fab' 片段分别从大肠杆菌分泌出来,并在体外经受直接化学偶联以形成双特异性抗体。如此获得的双特异性抗体具有与其特征为ErbB2受体的过表达的细胞和正常人类T细胞结合以及刺激人类乳腺肿瘤靶向的人类细胞毒性淋巴细胞的裂解活性的能力。

[0267] 还已经描述了用于直接从重组细胞培养物制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如,已经使用亮氨酸“拉链”产生了双特异性抗体(Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5), 1992, pp. 1547-1553)。Fos和Jun蛋白的亮氨酸“拉链”肽通过基因融合连接于两种不同抗体的 Fab' 片段。在铰链区还原抗体同源二聚体以形成单体,并然后再氧化以形成抗体异源二聚体。该方法也可用于产生抗体同源二聚体。由Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1993, pp. 6444-6448描述的“双抗体”技术为用于制备双特异性抗体片段的备选机制。该片段包含通过接头连接于轻链可变(VL)区的重链可变(VH)区,该接头太短而使得无法在同一条链上的两个结构域之间配对。因此,一个片段的VH和VL区被迫与另一片段的互补VL和VH区配对,从而形成两个抗原结合位点。也已经报道了用于基于使用单链 Fv (sFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略(参见Gruber et al., *J. Immunol.*, 152, 1994, p. 5368)。

[0268] 具有超过两价的抗体也落入本发明的范围内。例如可制备三特异性抗体(Tutt et al., *J. Immunol.*, 147, 1991, p. 60)。

[0269] 多价抗体

[0270] 多价抗体可被表达与抗体结合的抗原的细胞比二价抗体更快地内化(和/或异化)。本发明的抗体可为具有三个或更多个抗原结合位点的多价抗体(非IgM类)(例如四价

抗体),其可通过重组表达编码抗体多肽链的核酸而易于制备。多价抗体可包含二聚化结构域和三个或更多个抗原结合位点。优选的二聚化结构域包含Fc片段或铰链区(或由其组成)。在这种情况下,抗体应含有Fc片段和相对于Fc片段位于N-末端的三个或更多个抗原结合位点。本文使用的优选的多价抗体包含3-约8个,但优选地4个抗原结合位点(或由其组成)。多价抗体包含至少一条多肽链(和优选地两条多肽链),其中多肽链包含两个或更多个可变区。例如,多肽链可包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc,其中VD1为第一可变结构域,VD2为第二可变结构域,Fc为Fc区的一条多肽链,X1和X2代表氨基酸或多肽,和n为0或1。例如,多肽链可包含以下链:VH-CH1-柔性接头-VH-CH1-Fc区;或VH-CH1-VH-CH1-Fc区。本文提供的多价抗体优选地进一步包含至少2个(和优选地4个)轻链可变区多肽。本文提供的多价抗体可例如包含约2-约8个轻链可变区多肽。本文使用的轻链可变区多肽包含轻链可变区和任选地进一步包含CL区。

[0271] 药用组合物

[0272] 本发明的另一方面为药用组合物,其包含对PD-L1特异性的抗体作为活性成分(或作为单一活性成分)。药用组合物可包含本文所述的任何抗PD-L1抗体。在本发明的一些实施方案中,组合物用于改善、预防或治疗可能与PD-L1活性相关的病症。

[0273] 通常,本发明的抗PD-L1抗体适合作为与例如以下所述的一种或多种药学上可接受的赋形剂组合的剂型使用。

[0274] 本发明的药用组合物可含有至少一种抗PD-L1抗体和靶向一种或多种相应表面受体的一种或多种另外的结合分子(例如抗体)。

[0275] 当药用组合物为无菌的,即不含活的微生物及其孢子时,其为“消过毒的”。

[0276] 当活性剂在储存温度(例如在2-8°C的温度)下在其整个保质期中保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性时,药用组合物为“稳定的”组合物。期望活性剂保持其物理和化学稳定性以及其生物活性。基于在加速和自然储存条件下的稳定性研究结果选择储存期。

[0277] 术语“赋形剂”本文用于描述除本发明化合物以外的任何成分。惰性赋形剂的选择主要取决于因素,比如特定的给予方式、赋形剂对溶解度和稳定性的影响以及剂型的性质。本文使用的“药学上可接受的赋形剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂以及类似的生理相容性物质。药学上可接受的赋形剂的一些实例为水、盐水、磷酸盐缓冲液、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。在许多情况下,优选的是在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(比如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。药学上可接受的物质的进一步实例为润湿剂或次要辅助物质,比如润湿或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其增强抗体的保质期或有效性。

[0278] “缓冲剂”意指由于构成其组成的酸性和碱性组分之间的相互作用而能够保持pH值的溶液。通常,药用组合物的pH优选地在4.5-7.0之间。本领域的技术人员已知并且可在文献中找到的缓冲剂的实例包括(但不限于)组氨酸、柠檬酸盐、琥珀酸盐、醋酸盐、磷酸盐(phosphate)、磷酸盐(phosphate-salt)、柠檬酸盐-磷酸盐缓冲剂和基于氨丁三醇的缓冲剂等或合适的混合物。

[0279] “等渗剂”意指提供溶液的等渗渗透压的辅助物质或者两种或更多种辅助物质的混合物。“等渗”被认为溶液产生约250-350mOsm/kg的渗透压。作为等渗剂,可使用(但不限

于)多元醇、单糖和二糖、氨基酸、金属盐(例如氯化钠)等。术语“低渗的”描述具有低于人类血液的渗透压的组合物。相应地,术语“高渗的”描述具有高于人类血液的渗透压的组合物。

[0280] 本文使用的术语“表面活性剂”(也称为去污剂或表面活性剂或SAS)是指可改变液体抗体制剂的表面张力的赋形剂。在某些实施方案中,表面活性剂降低液体抗体制剂的表面张力。在其他实施方案中,“表面活性剂”可助于改善制剂中任何抗体的胶体稳定性或溶解度。表面活性剂可减少所产生的抗体制剂的聚集和/或最小化制剂中颗粒的形成和/或减少吸附。表面活性剂还可在冷冻/解冻循环期间和之后以及在振荡期间改善抗体的稳定性。表面活性剂可为离子型或非离子型。可包含在本发明制剂中的示例性的非离子表面活性剂包括例如烷基聚(环氧乙烷)、烷基聚葡萄糖苷(例如辛基葡萄糖苷和癸基麦芽糖苷)、脂肪醇(比如鲸蜡醇和油醇)、椰油酰胺MEA、椰油酰胺DEA和椰油酰胺TEA。可包含在本发明制剂中的特定非离子表面活性剂包括例如聚山梨酯,比如聚山梨酯20(Tween 20)、聚山梨酯28、聚山梨酯40、聚山梨酯60、聚山梨酯65、聚山梨酯80(Tween 80)、聚山梨酯81和聚山梨酯85;泊洛沙姆,比如泊洛沙姆188(Kolliphor P188)、泊洛沙姆407;聚乙二醇-聚丙二醇;或聚乙二醇(PEG)、乙二醇和丙二醇共聚物(例如Pluronic PF68等)。

[0281] “稳定剂”意指提供活性剂的物理和/或化学稳定性的辅助物质或者两种或更多种辅助物质的混合物。作为稳定剂,可使用氨基酸,例如(但不限于)精氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸;表面活性剂,例如(但不限于)聚山梨酯20(商品名Tween 20)、聚山梨酯80(商品名Tween 80)、聚乙二醇-聚丙二醇及其共聚物(商品名Poloxamer)、Pluronic、十二烷基硫酸钠(SDS);抗氧化剂,例如(但不限于)甲硫氨酸、乙酰半胱氨酸、抗坏血酸、一硫代甘油、硫酸盐等;螯合剂,例如(但不限于)EDTA、DTPA、柠檬酸钠等。

[0282] “药学上可接受的酸”包括在其配制的浓度和形式下非毒性的无机和有机酸。例如,合适的无机酸包括盐酸、高氯酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、硫酸、磺酸、硫酸、磺胺酸、磷酸、碳酸等。合适的有机酸包括直链和支链烷基、芳族、环状、环脂族、芳基脂肪族、杂环、饱和、不饱和、单、二-和三-羧酸,包括例如甲酸、乙酸、2-羟基乙酸、三氟乙酸、苯乙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、邻氨基苯甲酸、丙酸、2-羟基丙酸、2-氧代丙酸、丙二酸、环戊烷丙酸、环戊烷丙酸、3-苯基丙酸、丁酸、丁二酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、2-乙酰氧基-苯甲酸、抗坏血酸、肉桂酸、月桂基硫酸、硬脂酸、粘康酸、扁桃酸、琥珀酸、亚甲基双羧萘酸、富马酸、苹果酸、马来酸、羟基马来酸、丙二酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、乙醇酸、葡萄糖酸、葡萄糖酸、丙酮酸、乙醛酸、草酸、甲磺酸、琥珀酸、水杨酸、邻苯二甲酸、棕榈酸(palmoic)、棕榈酸(palmeic)、硫氰酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、萘-2-磺酸、对甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基双环[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸、葡庚糖酸、4,4'-亚甲基双-3-(羟基-2-烯-1-甲酸)、羟基萘甲酸。

[0283] “药学上可接受的碱”包括在其配制的浓度和形式下非毒性的无机和有机碱。例如,合适的碱包括由形成无机碱的金属(比如锂、钠、钾、镁、钙、铵、铁、锌、铜、锰、铝)形成的那些、N-甲基葡萄糖胺、吗啉、哌啶和有机非毒性碱,包括伯、仲和叔胺、取代的胺、环胺和碱性离子交换树脂[例如N(R')₄⁺(其中R'独立地为H或C₁₋₄烷基,例如铵、Tris)],例如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二乙基氨基乙醇、三甲胺、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、多胺树脂等。特别优选的有机非毒性碱为异丙胺、二

乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己胺、胆碱和咖啡因。可用于本发明的另外的药学上可接受的酸和碱包括源自氨基酸(例如组氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸和天冬酰胺)的那些酸和碱。

[0284] 本文使用的感兴趣的“稀释剂”为药学上可接受的(对于给予人类为安全和非毒性的)并且可用于制备液体组合物(比如冻干之后重构成的组合物)的稀释剂。示例性的稀释剂包括水、注射用抑菌水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。在一个备选的实施方案中,稀释剂可包括盐和/或缓冲剂的水性溶液。

[0285] “防腐剂”为可添加到本文提供的组合物中以降低细菌活性的化合物。防腐剂的添加可例如促进多用途(多剂量)组合物的产生。潜在的防腐剂的实例包括十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六甲双铵、苯扎氯铵(烷基苄基二甲基氯化铵的混合物,其中烷基为长链化合物)和苄索氯铵。其他类型的防腐剂包括芳族醇比如苯酚、丁醇和苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯(比如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯)、邻苯二酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚。本文提供的最优选的防腐剂为苯甲醇。

[0286] 本文使用的术语“冻干的”是指已经受本领域称为冷冻干燥的方法的制剂,该方法包括冷冻制剂并然后使冰从冷冻的内容物中升华。

[0287] 本文使用的术语“氨基酸”表示氨基酸(游离氨基酸,即不是肽或蛋白质序列中的氨基酸)。本文使用的氨基酸例如包括(但不限于)精氨酸、甘氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸和脯氨酸。

[0288] 本发明的药用组合物及其制备方法对于本领域的技术人员无疑是显而易见的。这种组合物及其制备方法可例如在Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21th Edition, Troy, Beringer., Lippincott Williams and Wilkins., Philadelphia, PA 2006中找到。药用组合物的产生应优选地符合GMP(良好生产规范)的要求。

[0289] 本发明的药用组合物可作为一个或多个单一单位剂量被制造、包装或总体上分配。本文使用的术语“单一单位剂量”意指包含预定量的活性成分的离散量的药用组合物。活性成分的量通常等于将被给予受试者的活性成分的剂量或该剂量的便利部分,例如这种剂量的一半或三分之一。

[0290] 本领域接受的用于给予肽、蛋白或抗体的任何方法均可适用于本发明的抗PD-L1抗体。

[0291] 本发明的药用组合物通常适合于非肠道给予。本文使用的术语药用组合物的“非肠道给予”包括任何给予途径,其特征为通过组织的破坏而对受试者组织完整性进行物理扰动和给予药用组合物,这通常导致与血流直接接触、进入肌肉或进入内部器官。因此,非肠道给予包括(但不限于)通过注入组合物、通过经手术切口给予组合物、通过经组织穿透性非手术伤口施用组合物等来给予药用组合物。特别是,假定非肠道给予包括(但不限于)皮下、腹膜内、肌内、静脉内、动脉内、鞘内、心室内、尿道内、颅内、关节内注入或输注;以及肾透析和输注技术。瘤内递送,例如瘤内注入,也可能是有用的。还考虑局部灌注。优选的实施方案包括静脉内和皮下途径。

[0292] 适合于非肠道给予的药用组合物的剂型便利地包含与药学上可接受的载体/赋形剂(比如无菌水或无菌等渗盐水)一起的活性成分。这种剂型可以适合于推注给予或连续给

予的形式制备、包装或分配。注射剂型可以单位剂型制备、包装或分配,例如在安瓿或含有防腐剂的多剂量容器中。用于非肠道给予的剂型包括(但不限于)混悬剂、溶液剂、在油性或水性基质中的乳剂、糊剂等。这种剂型还可含有一种或多种另外的成分,包括(但不限于)悬浮剂、稳定剂或分散剂。在用于非肠道给予的本发明组合物的一个实施方案中,活性成分以干燥形式(即粉剂或颗粒剂)提供,以用合适的基质(例如无菌无热原水)溶解,在然后非肠道给予重构的制剂。非肠道剂型还包括水性溶液剂,其可含有填充剂,比如盐、碳水化合物和缓冲剂(优选地pH为3-9,和更优选地pH为4.5-7),但是对于一些应用,更合适的剂形可为无菌的非水性溶液剂或连同合适的基质(比如无菌无热原水)一起使用的干燥形式。非肠道给予形式的实例包括在无菌水性溶液例如丙二醇水性溶液或右旋糖溶液中的溶液剂或混悬剂。这种剂型可任选地被缓冲。用于非肠道给予的其他合适剂型可包括包含以微晶形式或以脂质体制剂存在的活性成分的那些剂型。用于非肠道给予的剂型可制成立即释放和/或修饰释放。修饰释放的剂型包括延迟、持续、脉冲、控制、靶向和程序释放。

[0293] 例如,在一个方面,无菌注射溶液剂可通过将所需量的三特异性抗PD-L1抗体掺入根据需要含有上述成分中的一种或组合的适当溶剂中,随后过滤灭菌来制备。通常,通过将活性化合物掺入无菌溶剂中来制备分散体,所述无菌溶剂含有基础分散介质和所需的上述其他成分。在用于制备无菌注射溶液剂的无菌粉剂的情况下,制备方法为冷冻干燥(冻干),其从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分加上任何另外期望的成分的粉剂。溶液的适当流动性可例如通过使用包衣材料(比如卵磷脂),在分散体的情况下通过维持所需的粒径和使用表面活性剂来维持。可通过在组合物中包含吸收延迟剂(例如单硬脂酸酯和明胶)和/或通过修饰释放包衣(例如缓慢释放包衣)来实现注射组合物的延长吸收。

[0294] 本发明的抗PD-L1抗体也可一般地从干粉吸入器(比如气雾剂加压容器、泵、喷射器、雾化器(优选地为使用电流体动力学原理产生细雾的雾化器)或其中使用或不使用合适的推进剂的喷雾器)以干粉形式(既可单独、也可作为例如与合适的药学上可接受的填充剂混合的混合物或以混合组分的颗粒形式),或作为滴鼻剂,经鼻内或通过吸入给予。

[0295] 加压容器、泵、喷射器、雾化器或喷雾器通常含有本发明结合分子的溶液或混悬液,其包含例如适合于分散、溶解或延长释放活性物质的试剂,作为溶剂的推进剂。

[0296] 在以干粉或混悬剂使用之前,通常将药物微粉化至适合于通过吸入递送的大小(一般地小于5微米)。这可通过任何适当的粉碎方法来实现,比如在螺旋式气流粉碎机中粉碎、流化床式气流粉碎、超临界流体处理以形成纳米颗粒、高压均质化或喷雾干燥。

[0297] 可将用于吸入器或吹入器的胶囊、泡罩和药筒配置为含有本发明的化合物与合适的粉末基质和活性改性剂的粉末混合物。

[0298] 用于使用电流体动力学原理产生细雾的雾化器的溶液剂的合适配方可在每次驱动时含有合适剂量的本发明的抗PD-L1抗体,并且每次按压的体积可以变化,例如 $1\mu\text{l}$ - $200\mu\text{l}$,更优选地为 $1\mu\text{l}$ - $100\mu\text{l}$ 。

[0299] 在旨在用于吸入/鼻内给予的本发明剂型中,可加入合适的矫味剂(比如薄荷醇和左薄荷脑)或甜味剂(比如糖精或糖精钠)。

[0300] 用于非肠道给予的剂型可制成立即释放和/或修饰释放。修饰释放的剂型包括延迟、持续、脉冲、控制、靶向和程序释放。

[0301] 在干粉吸入器和气雾剂的情况下,剂量单位通过输送计量量的阀门来确定。通常

将本发明的单元设置成给予计量剂量或“注射”的本发明的结合分子。每日总剂量将通常以单剂量或更通常地全天作为分剂量给予。

[0302] 本发明的抗PD-L1抗体也可配置为用于口服给予的剂型。口服给予可包括吞服(使得化合物进入胃肠道)和/或含服、舌或舌下(直接从口腔进入血流)。

[0303] 适合于口服给予的剂型包括固体、半固体和液体系统(比如片剂);软或硬胶囊剂(含有多或纳米颗粒)、液体或粉剂;锭剂(包括填充液体的锭剂);咀嚼形式;凝胶剂;速溶剂型;膜剂;栓剂;喷雾剂以及颊/粘膜粘附贴剂。

[0304] 液体剂型包括混悬剂、溶液剂、糖浆剂和酞剂。这种制剂可用作软或硬胶囊剂(例如来自明胶或羟丙基甲基纤维素)中的填充剂,并且一般地包含载体(例如水、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、甲基纤维素或合适的油)以及一种或多种乳化剂和/或悬浮剂。液体剂型也可通过例如从小袋中减少固体来制备。

[0305] 本发明的抗PD-L1抗体的治疗用途

[0306] 在一个方面,本发明的抗PD-L1抗体用于治疗与PD-L1活性相关的疾病和病症,例如选自以下的疾病或病症:HNSCC(头颈部鳞状细胞癌)、子宫颈癌、原发来源未知的癌症、成胶质细胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC(三阴性乳腺癌)、CRC(结直肠癌)、肝细胞癌、黑素瘤、NSCLC(非小细胞肺癌)、肾癌、卵巢癌、霍奇金淋巴瘤、CRC MSI(高频微卫星不稳定性结直肠癌)。

[0307] 在一个方面,治疗的受试者或患者为哺乳动物,优选地为人类受试者。以上受试者可为任何年龄的雄性或雌性。

[0308] 在肿瘤(例如癌症)的情况下,治疗有效量的抗体或抗体片段(例如与PD-L1特异性结合的抗体或抗体片段)可减少癌细胞的数量、减小肿瘤大小、抑制(即在一定程度上减慢和优选地停止)癌细胞浸润到周围器官、抑制(即在一定程度上减慢和优选地停止)肿瘤转移、在一定程度上抑制肿瘤生长和/或在一定程度上减轻与病症相关的一种或多种症状。抗体或抗体片段可在一定程度上阻止生长和/或杀死现有的癌细胞,其可提供细胞生长抑制和/或细胞毒性作用。对于癌症治疗,可例如通过评价寿命、疾病进展时间(TTP)、反应率(RR)、反应持续时间和/或生活质量来测量疗效。

[0309] 本文使用的涉及抗PD-L1抗体与一种或多种其他治疗剂的术语“伴随处方”、“伴随开处方的”和“与……组合”认为意指、指或包括:

[0310] 1) 当将本发明的抗PD-L1抗体和治疗剂一起配制成所述组分几乎同时从中释放给需要治疗的患者的一种剂型时,将所述组分的这种组合同时给予所述患者;

[0311] 2) 当将本发明的抗PD-L1抗体和治疗剂分别配制成几乎同时发生将其引入给需要治疗的患者的不同剂型时,将所述组分的这种组合同时给予所述患者,其中所述组分基本上同时释放给所述患者;

[0312] 3) 当将本发明的抗PD-L1抗体和治疗剂彼此分开配制成由需要治疗的患者按时间依序服用,每次给予之间有明显时间间隔的单独剂型时,将所述组分的这种组合依序给予所述患者,其中所述组分在基本上不同的时间释放给所述患者;和

[0313] 4) 当将本发明的抗PD-L1抗体和治疗剂一起配制成以控制的方式发生从中释放这些组分的单一剂型时,将所述组分的这种组合依序给予需要治疗的患者,其中所述组分同时、连续或一起同时和/或在不同时间释放给所述患者,其中每个部分可通过一种途径或通

过不同的途径给予。

[0314] 可在不进行另外的治疗性治疗的情况下,即作为单独治疗,开具本发明的抗PD-L1抗体。此外,本发明的抗PD-L1抗体的治疗可包括至少一种另外的治疗性治疗(组合治疗)。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体可与另一种用于癌症治疗的药物/药物治疗一起给予或者一起配制。

[0315] 本文使用的术语“细胞毒剂”是指抑制或阻止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。术语旨在包括放射性同位素(例如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和Lu的放射性同位素)、化学治疗剂和毒素,比如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体。

[0316] “化学治疗剂”为可用于治疗癌症的化合物。化学治疗剂的实例包括烷化剂,比如塞替派和环磷酰胺(CYTOXAN[®]);烷基磺酸酯,比如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,比如benzodopa、卡波醌、meturedopa和uredopa;乙撑亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺;多聚乙酰类(尤其是Bullatacin和Bullatacinone); δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚, MARENOL[®]); β -拉帕醌;拉帕醇;秋水仙碱;桦木酸;喜树碱(包括合成类似物拓扑替康(HYCAMTIN[®])、CPT-11(伊立替康, CAMPTOSAR[®])、乙酰基喜树碱、东莨菪亭和9-氨基喜树碱);苔藓虫素;callystatin;CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);鬼臼毒素;鬼臼酸;替尼泊苷;隐藻素类(特别是隐藻素1和隐藻素8);多拉司他汀;倍癌霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);软珊瑚醇(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑制素(spongistatin);氮芥类,比如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、盐酸氧氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、乌拉莫司汀;亚硝基脲类,比如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫斯汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素类,比如烯二炔类抗生素(例如卡奇霉素,尤其是卡奇霉素 γ II和卡奇霉素 ω II(参见例如Angew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)));达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新抑癌素生色团和相关的色蛋白烯二炔类抗生物生色团、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素、authramycin、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括ADRIAMYCIN[®]、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯并多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射液(DOXIL[®])、脂质体多柔比星TLC D-99(MYOCET[®])、聚乙二醇化脂质体多柔比星(CAELYX[®])和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素(比如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链霉黑素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物,比如甲氨蝶呤、吉西他滨(GEMZAR[®])、替加氟(UFTORAL[®])、卡培他滨(XELODA[®])、埃博霉素和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,比如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,比如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,比如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;抗肾上腺素类,比如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,比如亚叶酸;醋葡萄糖内酯;醛磷酸

胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙;地磷酰胺;地美可辛;地吡醌;依氟鸟氨酸;依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;美登木素生物碱,比如美登木素和柄型菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇;nitraerine;喷司他丁;蛋氨酸芥;吡柔比星;洛索蒽醌;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK®多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);雷佐生;根瘤菌素;西佐喃;spirogermarium;细格孢氮杂酸;三亚胺醌;2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯族毒素类(尤其是T-2毒素、疣孢菌素A、杆孢菌素A和蛇形菌素);乌拉坦;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿糖胞苷("Ara-C");塞替派;紫杉烷类,例如紫杉醇(TAXOL®)、紫杉醇的白蛋白工程化纳米微粒制剂(ABRAXANE)和多西他赛(TAXOTERE®);苯丁酸氮芥;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类药物,比如顺铂、奥沙利铂和卡铂;防止微管蛋白聚合形成微管的长春花类,包括长春碱(VELBAN®)、长春新碱(ONCOVIN®)、长春地辛(ELDISINE®, FILDESIN®)和长春瑞滨(NAVELBINE®);依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;亚叶酸;诺消灵;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;伊班膦酸盐;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维甲酸类,比如视黄酸,包括贝沙罗汀(TARGRETIN®);二膦酸盐类,比如氯膦酸盐(例如BONEFOS®或OSTAC®)、依替膦酸盐(DIDROCAL®)、NE-58095、唑来膦酸/唑来膦酸盐(ZOMETA®)、阿仑膦酸盐(FOSAMAJX®)、帕米膦酸盐(AREDIA®)、替鲁膦酸盐(SKELID®)或利塞膦酸盐(ACTONEL®);曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是抑制与异常细胞增殖相关的信号传导途径中的基因(比如PKC- α 、Raf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R))的表达的那些寡核苷酸;疫苗,比如THERATOPE®疫苗和基因治疗疫苗,例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗;拓扑异构酶1抑制剂(例如LURTOTECAN®);rmRH(例如ABARELIX®);BAY439006(索拉非尼,Bayer);SU-11248(Pfizer);哌立福新、COX-2抑制剂(例如塞来昔布或依托昔布)、蛋白酶体抑制剂(例如PS341);硼替佐米(VELCADE®);CCI-779;替吡法尼(811577);索拉非尼、ABT510;Bcl-2抑制剂,比如奥利默森钠(GENASENSE®);匹杉琼(pixantrone);EGFR抑制剂(参见以下定义);酪氨酸激酶抑制剂(参见以下定义);和以上任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物;以及以上两种或更多种的组合,比如CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙的组合治疗的缩写)和FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATIN)与5-FU和亚叶酸组合的治疗方案的缩写)。

[0317] 该定义还包括抗激素剂,其起调控或抑制激素对肿瘤的作用,比如具有混合的激动剂/拮抗剂特性的抗雌激素,包括他莫昔芬(NOLVADEX®)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、托瑞米芬(FARESTON®)、艾多昔芬、屈洛昔芬、雷洛昔芬(EVISTA®)、曲沃昔芬、keoxifene和选择性雌激素受体调节剂(SERM),比如SERM3;纯的无激动剂特性的抗雌激素,比如氟维司群(FASLODEX®)和EM800(此类药物可阻断雌激素受体(ER)的二聚作用,抑制DNA结合,增加ER周转和/或抑制ER水平);芳香酶抑制剂,包括甾体类芳香酶抑制剂(比如福美斯坦和依西美坦(AROMASIN®))以及非甾体类芳香酶抑制剂(比如阿那曲唑(ARIMIDEX®)、来曲唑(FEMARA®)和氨鲁米特),以及其他芳香酶抑制剂,包括伏氯唑(RIVISOR®)、醋酸甲

地孕酮 (MEGASE[®])、法倔唑、咪唑;促黄体生成激素释放激素激动剂,包括亮丙瑞林 (LUPRON[®]和 ELIGARD[®])、戈舍瑞林、布舍瑞林和 tripterylin;性类固醇,包括孕激素类 (比如醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮)、雌激素类 (比如己烯雌酚和普力马林) 以及雄激素类/维甲酸类化合物,比如氟甲睾酮、全反式视黄酸和芬维A胺;奥那斯酮;抗孕激素;雌激素受体下调剂 (ERD);抗雄激素,比如氟他胺、尼鲁米特和比卡鲁胺;睾内酯;和以上任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物;以及以上两种或更多种的组合。

[0318] 可与本发明的抗PD-L1抗体组合使用的其他治疗剂可为生长因子功能抑制剂,例如,这种抑制剂包括生长因子抗体和生长因子受体抗体 (例如抗erbB2抗体曲妥珠单抗 [赫赛汀]、抗EGFR抗体帕尼单抗、抗erbB1抗体西妥昔单抗 [爱必妥, C225] 以及 Stern et al. Critical reviews in oncology/haematology, 2005, Vol. 54, pp11-29 中公开的任何生长因子或生长因子受体抗体);抗血管生成剂,比如对血管内皮生长因子的抑制作用 [例如抗血管内皮细胞生长因子抗体贝伐单抗 (安维汀)、抗血管内皮生长因子受体抗体,比如抗KDR抗体和抗flt1抗体];反义治疗,例如针对以上靶标,比如ISIS2503、抗ras反义药物或G3139 (Genasense)、抗bc12反义药物;基因治疗方法,包括例如置换异常基因 (比如异常p53或异常BRCA1或BRCA2) 的方法、使用胞嘧啶脱氨酶、胸苷激酶或细菌硝基还原酶的GDEPT (基因定向酶前药治疗) 方法以及旨在提高患者对化学治疗或放射治疗的耐受性的方法,比如多药耐药基因治疗;免疫治疗方法,包括例如用阿仑单抗 (campath-1H) (针对CD52的单克隆抗体) 的治疗或用针对CD22的抗体的治疗、提高患者肿瘤细胞的免疫原性的离体和体内方法、用细胞因子比如白介素2、白介素4或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子转染,旨在降低T细胞无反应性的方法,比如用抑制CTLA-4的单克隆抗体治疗、使用转染的免疫细胞 (比如细胞因子转染的树突状细胞) 的方法、使用细胞因子转染的肿瘤细胞系的方法和使用抗独特型抗体的方法、使用暴露于非特异性活化或靶向特定目标抗原的T细胞进行T细胞的适应性传输 (离体);蛋白降解抑制剂,比如蛋白酶体抑制剂,比如万珂 (Velcade) (硼替佐米);生物治疗性治疗方法,例如使用螯合配体受体、阻断配体与受体结合或减弱受体信号传导 (例如由于受体降解增加或表达水平降低) 的肽或蛋白 (比如外部受体结构域的抗体或可溶性构建体)。

[0319] 剂量和给予途径

[0320] 本发明的抗PD-L1抗体将以有效治疗受试者病症的量,即以获得期望的结果必需的剂量和时间段给予。治疗有效量可根据因素比如患者的某种待治疗的病症、年龄、性别和体重以及抗PD-L1抗体的给予是单独治疗还是与一种或多种另外的抗自身免疫或抗炎治疗方法组合进行而变化。

[0321] 可调整剂量方案以提供最佳的期望的反应。例如,可给予一次推注,可在一段时间内给予几个单独的剂量,或者可根据治疗情况的严重性或比例地减少或增加剂量。为了简化给予和给药均匀性,特别有用的是产生单位剂型的非肠道组合物。本文使用的单位剂型涉及适合作为用于待治疗的患者/受试者的单位剂量的物理离散单位,每个单位包含与期望的药用载体组合经计算产生期望的治疗作用的预定量的活性化合物。一般地,本发明的单位剂型的规格被定义并且直接取决于 (a) 化学治疗剂的独特特性和要实现的特定治疗或预防作用,和 (b) 用于这种活性化合物的复合技术对于治疗受试者的易感性固有的局限性。

[0322] 因此,基于本文提供的公开,本领域的技术人员应当意识到,按照治疗领域众所周

知的方法调整剂量和剂量方案。也就是说,可易于确定最大可耐受剂量,并且还可确定向患者提供可检测的治疗益处的有效量,正如给予每种药物以向患者提供可检测的治疗益处的时间要求。因此,尽管本文通过实例提供了一些剂量和剂量方案,但是这些实例绝不限制患者在实践本发明时可能需要的剂量和剂量方案。

[0323] 注意的是,剂量值可根据要减轻的病症的类型和严重程度而变化,并且可包括一个或多个剂量。另外,应当理解,对于任何某个患者,某些剂量方案应根据个体需要并在进行或控制组合物的给予的执业医师的判断下随着时间的推移进行调整,并且本文的浓度范围仅通过实例提供,而不旨在限制要求保护的组合物的范围或实践。另外,本发明组合物的剂量方案可基于不同的因素,包括疾病的类型、年龄、体重、性别、患者健康状态、病症严重程度、给予途径以及使用的特定抗PD-L1抗体。因此,剂量方案可在很大程度上变化,但是可使用标准方法常规确定。例如,剂量可基于药代动力学和药效学参数(可包括临床作用,比如毒性作用或实验室值)进行调整。因此,本发明包括由技术人员确定的个体剂量递增。所需剂量和方案的确定在相关领域中为众所周知的,并且本领域的技术人员基于对本文公开的了解应当意识到。

[0324] 以上提供了合适的给予途径的实例。

[0325] 考虑本发明的抗PD-L1抗体的合适剂量在0.1-200mg/kg的范围内,优选地为0.1-100mg/kg,包括约0.5-50mg/kg,例如约1mg/kg-20mg/kg。抗PD-L1抗体可例如以至少0.25mg/kg,例如至少0.5mg/kg,包括至少1mg/kg,例如至少1.5mg/kg,例如以及至少2mg/kg,例如至少3mg/kg,包括至少4mg/kg,例如至少5mg/kg;和例如最高至多50mg/kg,包括最高至多30mg/kg,例如最高至多20mg/kg,包括最高至多15mg/kg的剂量给予。通常以合适的时间间隔重复给予,例如每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次,并且只要医生认为可取,并且如果必要,剂量可由医师任选地增加或减少。

[0326] 制品(产品)和试剂盒

[0327] 本发明的另一个实施方案为一种制品,其包含用于治疗癌症,特别是HNSCC、原发来源未知的癌症、成胶质细胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC、CRC、肝细胞癌、黑素瘤、NSCLC、肾癌、卵巢癌、霍奇金淋巴瘤、CRC MSI的产品。该产品为容器以及置于容器上或插入其中的标签或包装说明书。可接受的容器例如罐子、小瓶、注射器等。容器可由各种材料(比如玻璃或塑料)制成。容器含有有效治疗特定病症的组合物,并且可具有无菌入口通道(例如容器可为静脉输液袋或设有塞子的小瓶,其可用针刺穿以进行皮下注射)。组合物中的至少一种活性物质为本发明的抗PD-L1抗体。标签或包装说明书指示组合物用于治疗特定病症。标签或包装说明书应另外含有用于将抗体组合物给予患者的说明。

[0328] 包装说明书含有通常的说明,包括提供出售的治疗产品的包装,包括关于适应症、用途、剂量、给予途径、禁忌和/或关于使用这种治疗产品的注意事项的示例性信息。在本发明的一个实施方案中,包装说明书指示组合物用于治疗癌症,特别是HNSCC、原发来源未知的癌症、成胶质细胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC、CRC、肝细胞癌、黑素瘤、NSCLC、肾癌、卵巢癌、霍奇金淋巴瘤、CRC MSI。

[0329] 另外,制品可进一步包含第二容器,该容器含有药学上可接受的缓冲剂,比如抑菌注射用水(BWI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。另外,其可包括从商业和用户角度来看需要的其他产品,特别是其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0330] 本发明还涉及可用于各种目的,例如用于检测哺乳动物生物体的组织、细胞或流体中的PD-L1的试剂盒。这种试剂盒将适合于与PD-L1疾病相关的筛查。试剂盒包含特定结合剂或本发明的抗体以及指示特定结合剂或抗体与PD-L1(如果存在)的反应行为的方法。在一个实施方案中,抗体为单克隆抗体。在一个实施方案中,PD-L1结合抗体被标记。在另一个实施方案中,抗体为未标记的第一抗体,并且试剂盒进一步包含第一抗体检测剂。在一个实施方案中,检测剂包含标记的第二抗体,其为抗免疫球蛋白。抗体可用选自荧光染料、酶、放射性核素材料和放射性不透明剂的标志物标记。试剂盒可为包含用于在体外(例如在ELISA或Western印迹中)检测和量化PD-L1的抗体的试剂盒。而且,如同制品一样,试剂盒包含容器以及置于容器上或内部的标签或包装说明书。容器含有包含至少一种本发明的抗PD-L1抗体的组合物。另外的容器可含有例如稀释剂和缓冲剂、对照抗体。标签或包装说明书可包含对组合物的描述及其在体外使用或用于诊断目的的说明。

[0331] 诊断用途和组成

[0332] 本发明的抗PD-L1抗体也用于诊断过程(例如体外、离体)。例如,抗PD-L1抗体可用于检测或测量从患者获取的样品(例如组织样品或体液样品,比如炎性渗出液、血液、血清、肠液、唾液或尿液)中的PD-L1水平。合适的检测和测量技术包括免疫学技术,比如流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、化学发光分析、放射免疫测定和免疫组织学。本发明进一步提供包含本文所述的抗PD-L1抗体的试剂盒(例如诊断试剂盒)。

[0333] 为了最好地理解本发明,提供以下实施例。提供以下实施例仅用于说明性目的,并且不应以任何方式解释为限制本发明应用的范围。

[0334] 说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请均通过参考结合至本文中。尽管出于排除模糊解释的目的已通过图示和实例在一些细节上描述了前述发明,但是本领域的技术人员基于本文公开的概念将清楚地意识到,可进行某些改变和修改而不背离本发明所附实施方案的基本原理和范围。

实施例

[0335] 实施例1

[0336] 以悬浮哺乳动物细胞培养产生重组抗原和抗体

[0337] 根据公开的方案[Biotechnol Bioeng.2005Sep 20;91(6):670-677,Liao Metal.,2004;Biotechnol Lett.2006Jun;28(11):843-848;Biotechnol Bioeng.2003Nov 5;84(3):332-342],以从中国仓鼠卵巢细胞(CHO-K1)获取的已建立的细胞系产生抗体和抗原。使用组成型表达EBNA1蛋白(Epstein-Barr病毒核抗原1)的基因的细胞。使用Life Technologies Corporation的无血清培养基和按照制造商的指导,在轨道摇动器上的烧瓶中进行悬浮培养。为了瞬时表达,使用线性聚乙烯亚胺(PEI MAX,Polysciences)转染浓度为 2×10^6 /ml的细胞。DNA/PEI比率为1:3/1:10。转染之后5-7天,将细胞培养物以2000g离心20分钟并通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤。通过亲和色谱从培养液分离目标蛋白。

[0338] 使用CaptureSelect C-tag Affinity Matrix吸附剂从培养液分离和纯化在蛋白的C-末端含有EPEA-标签(谷氨酸-脯氨酸-谷氨酸-丙氨酸)的重组PD-L1蛋白。使培养液通过预先填充有5ml C-标签吸附剂的色谱柱,然后用25ml PBS洗涤该柱以洗出非特异性结合的组分。在温和条件下用20mM Tris,2M MgCl_2 pH 7.0-7.4洗脱结合的抗原。然后使用半渗

透透析膜将蛋白透析到PBS (pH 7.4) 中, 过滤 (0.22 μ m), 转移至管中并储存于-70 $^{\circ}$ C下。

[0339] 使用蛋白A亲和HPLC柱从培养液中分离并纯化重组蛋白PD-1和PD-L1-Fc。使澄清的培养液通过用磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 7.4) 平衡的5ml HiTrap rProtein A Sepharose FF柱 (GE Healthcare)。然后用5个体积的PBS洗涤柱以去除非特异性结合的组分。用0.1M甘氨酸缓冲液 (pH 3) 洗脱结合的抗原。收集主要蛋白洗脱峰, 并用1M Tris缓冲液 (pH 8) 调节至中性pH。所有阶段均以110cm/h的流速进行。然后使用半渗透透析膜将分离出的蛋白透析到PBS (pH 7.4) 中, 过滤 (0.22 μ m), 转移至管中并储存于-70 $^{\circ}$ C下。

[0340] IgG1抗体按照以上用于抗原的程序在1ml Hi Trap rProteinA FF柱 (GE Healthcare) 上纯化。通过SDS-PAGE评估所获取的蛋白溶液的纯度 (图4A和4B)。

[0341] 实施例2

[0342] 天然人类抗体Fab文库MeganLibTM的创建

[0343] 按照提供的方案 (QIAGEN), 使用RNeasy Mini Kit分离从超过一千名人类供体收集的血液样品中的总B淋巴细胞RNA。使用Nanovue试剂盒 (GE Healthcare) 进行RNA浓度测定, 并通过1.5%琼脂糖凝胶电泳测试分离出的RNA的质量。

[0344] 使用MMuLV逆转录酶和随机六聚体寡核苷酸作为引物, 根据推荐的方案, 使用MMLV RT试剂盒 (来自Evrogen) 进行逆转录反应。

[0345] 逆转录产物在两阶段聚合酶链反应中用作模板, 遵循作者的方案, 使用寡核苷酸组来产生侧翼为限制性位点的可变结构域基因 [J Biol Chem.1999Jun 25;274(26):18218-30]。

[0346] 用限制性酶NheI/Eco91I处理获得的DNA制备物VL-CK-VH (图1), 并连接到初始噬菌粒pH5中 (图2)。将连接产物转化到根据 [Methods Enzymol.2000;328:333-63] 所述的方案制备的电转感受态SS320细胞中。组合噬菌体Fab展示文库MeganLibTM的库为 10^{11} 个转化体。根据上述程序从Fab文库制备噬菌体制备物 [J Mol Biol.1991Dec 5;222(3):581-97]。

[0347] 实施例3

[0348] 噬菌体抗体Fab文库的选择

[0349] 从组合噬菌体Fab展示文库MeganLibTM获得特定噬菌体人类抗PD-L1 Fab抗体。通过噬菌体展示方法对人类PD-L1进行选择 [Nat Biotechnol.1996Mar;14(3):309-14; J Mol Biol.1991Dec 5;222(3):581-97], 但是使用了磁性颗粒和KingFisher Flex仪器, 因为使用该技术使得能够并行进行多达96种不同的生物淘选方案和变体。

[0350] 在生物淘选中, 通过在室温下于旋转器上将蛋白和颗粒一起孵育1小时, 将浓度为10 μ g/ml的生物素化的PD-L1-Fc固定于链霉亲和素磁性颗粒的表面上。然后用PBS (pH7.4) 洗涤颗粒, 然后将颗粒用2%脱脂乳溶液/PBS (pH 7.4) 封闭1小时。然后, 向抗原结合的磁性颗粒加入含有2%脱脂乳的PBS (pH 7.4) 中的噬菌体溶液, 噬菌体颗粒的浓度为 2.5×10^{12} /ml。将混合物伴随搅拌下孵育40分钟。在用含有0.1% Tween 20的PBS溶液 (pH7.4) 几次洗涤磁性颗粒期间去除未结合的噬菌体。洗涤次数在轮次之间增加 (第一轮为10次, 第二轮为20次和第三轮为30次)。在搅拌下, 于15分钟期间用100mM Gly-HCl溶液 (pH 2.2) 从颗粒洗脱磁性颗粒表面上保持与抗原结合的噬菌体, 并然后用1M TRIS-HCl (pH7.6) 中和。用获得的噬菌体感染大肠杆菌TG1细菌; 噬菌体在其中产生并分离且用于下一轮选择。两到三轮之后, 从噬菌体分离出DNA (噬菌粒), 并将抗体可变结构域基因克隆到表达载体 (图3) 中以在

大肠杆菌细胞中产生Fab。

[0351] 实施例4

[0352] 特异性结合人类PD-L1的Fab筛选

[0353] ELISA用于搜索与人类PD-L1结合的Fab。作为阳性对照,使用具有公开的序列阿特珠单抗(Genentech)的Fab。对于特异性结合测定,将ELISA板孔(中等结合,来自Greiner bio one)用50 μ l PD-L1-FE(在1 \times 碳酸盐缓冲液中0.2 μ g/ml)包被,气密密封并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。使用基于GenetixQ-Qpix2xt(来自Molecular Device)和Tecan Freedom EVO 200(来自Tecan)机器人系统的高通量自动化平台,根据标准ELISA方案进行所有后续步骤。为了阻断非特异性结合,添加了封闭缓冲液BB(200 μ L PBS中的0.5%脱脂奶)。将板在振荡器上于室温下孵育1小时。用PBS-Tween洗涤之后,每孔加入50 μ l含有与等体积BB混合的测试Fab的测试细胞上清液。将板再次孵育,在室温下振荡1小时,随后用PBS-Twin缓冲液将每个板孔洗涤3次。一旦经过洗涤,将(50 μ L/孔)抗人类Fab HRP缀合的第二抗体(来自Pierce-ThermoScientific)以在PBS-Tween中1:5000的比率加入。如上所述,在旋转振荡器上振荡板(50分钟,室温),并用FSB-Twin缓冲液洗涤3次。通过添加TMB(50 μ L/孔)使比色信号显色直至饱和(平均3-5分钟),然后通过添加终止溶液(30 μ L/孔,10%硫酸)淬灭显色。使用合适的Tecan-Sunrise读板仪(来自Tecan)在450nm的波长下测量颜色信号。抗体结合水平与产生颜色信号成比例。在ELISA中测试颜色信号大于对照抗体信号的克隆的非特异性结合。

[0354] 实施例5

[0355] 所选Fab与其他抗原的非特异性结合的分析

[0356] ELISA用于测量研究的Fab片段与其他抗原的非特异性结合。如上所述进行了研究,但是将IL6R-Fc、INF α 2b、PCSK9-VG-FE、PD-1-Fc(在1 \times 碳酸盐缓冲液中2.5 μ g/ml)用作用于固定的抗原。PD-L1-Fc(在1 \times 碳酸盐缓冲液中0.2 μ g/ml)用作特异性结合的对照。使用基于GenetixQ-Qpix2xt(来自Molecular Device)和Tecan Freedom EVO 200(来自Tecan)机器人系统的高通量自动化平台,按照标准ELISA方案进行所有其他阶段。在竞争性ELISA测定中测试非特异性结合的颜色信号不大于特异性结合的信号克隆,以鉴定阻断配体与受体之间相互作用的拮抗剂Fab。

[0357] 实施例6

[0358] 阻断PD-L1与其PD-1受体之间的相互作用的竞争性ELISA

[0359] 竞争性ELISA用于测试预选的抗人类PD-L1特异性Fab阻断与PD-1受体的相互作用的能力。作为阳性对照拮抗剂,使用具有公开的序列阿特珠单抗(Genentech)的Fab。

[0360] 将PD-1-Fc以在1 \times 碳酸盐缓冲液中为1 μ g/ml的浓度,以50 μ l固定于ELISA板孔(中等结合,来自Greiner bio one)中,并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。使用基于GenetixQ-Qpix2xt(来自Molecular Device)和Tecan Freedom EVO 200(来自Tecan)机器人系统的高通量自动化平台,按照标准ELISA方案进行所有后续步骤。为了阻断非特异性结合,添加了封闭缓冲液BB(200 μ L PBS中的0.5%脱脂奶)。将板在振荡器上于室温下孵育1小时。

[0361] 平行地,将含有测试Fab的细胞上清液和PD-L1-Fc(在PBS-Twin中最终浓度为2 μ g/ml)以1:1的比率在非吸收性板中混合,在室温下孵育45分钟并以500rpm振荡。

[0362] 从含有PD-1受体的板进行BB洗涤之后,向其中加入Fab和PD-L1的混合物,在室温下孵育45分钟并以500rpm振荡。之后,将每个板孔用PBS-Twin缓冲液洗涤3次,将50 μ l/孔的

抗人类Fab HRP缀合的第二抗体(来自Pierce-ThermoScientific)以在PBS-Tween中1:5000的比率加入。将其在室温下孵育45分钟并以500rpm振荡,随后如上所述将每个板孔用PBS-Tween缓冲液洗涤3次。通过添加TMB(50 μ L/孔)使比色信号显色直至饱和(平均3-5分钟),然后通过添加终止溶液(30 μ L/孔,10%硫酸)淬灭显色。使用合适的Tecan-Sunrise读板仪(来自Tecan)在450nm的波长下测量颜色信号。Fab结合水平与产生颜色信号成反比。显示以对照Fab抗体阿特殊单抗的水平阻断的克隆记录为阳性,并用于进一步分析。在Applied Biosystems 3130Genetic Analyzer仪器(Applied Biosystems)上根据标准方案对阳性克隆的可变结构域基因进行测序,并进行分析。

[0363] 实施例7

[0364] 基于Koff的人类抗PD-L1 Fab候选物的比较筛选

[0365] 使用Pall Forte Bio Octet Red 96仪器进行Koff筛选。将抗FABCH1-生物传感器(SA)在含有10mM PBS(pH 7.2-7.4)、0.1%Tween-20、0.1%BSA的反应缓冲液中再水化30分钟。将反应缓冲液添加到研究的大肠杆菌上清液样品中至最终浓度为1 \times 。然后,将抗FABCH1-生物传感器在4 $^{\circ}$ C下于含有候选抗体的Fab片段的大肠杆菌上清液中浸入12小时。将具有表面固定的Fab片段的传感器转移至含有反应缓冲液的孔中,其中记录基线(持续60秒)。接下来,将传感器转移至含有分析物溶液(PD-L1,30 μ g/mL)的孔中,以使抗原-抗体复合物缔合(300s)。然后,使传感器返回到含有反应缓冲液的孔中进行接着的解离步骤(600s)。每次实验之后,将使用的传感器通过3次将其置于再生缓冲液(Gly-HCl,pH 1.7)中进行再生,之后将其用于下一个实验。使用Octet Data Analysis(ver 7.0)软件,根据标准程序,使用1:1相互作用模型进行获得的曲线分析。

[0366] 实施例8

[0367] 抗PD-L1抗体与PD-L1和其他抗原相互作用的酶免疫测定

[0368] ELISA用于测量抗PD-L1抗体和其他抗原的相对亲和力。对于结合测定,将ELISA板孔(中等结合,来自Greiner bio one)用50 μ l PD-L1-Fc、fPCSK9-EPEA、Ang2-H6F、GM-CSF-FE、CD3-ED-Fc、IL17a、CD38-Fc、IL6R-Fc(在1 \times 碳酸盐缓冲液中1 μ g/ml)包被,气密密封并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。所有后续步骤均按照标准ELISA方案进行。为了阻断非特异性结合,添加了缓冲液BB(200 μ L PBS中的0.5%脱脂奶)。将板在振荡器上于室温下孵育1小时。一旦经用PBS-Tween洗涤,每孔加入50 μ l在PBS-Tween中浓度为5 μ g/ml的测试BCD-135抗体。将板再次孵育,在室温下振荡1小时,随后用PBS-Tween缓冲液将每个板孔洗涤3次。一旦经过洗涤,将(50 μ L/孔)抗人类Fab HRP缀合的第二抗体(来自Pierce-ThermoScientific)以在PBS-Tween中1:5000的比率加入。如上所述,在旋转振荡器上振荡板(50分钟,室温),并用PBS-Tween缓冲液洗涤3次。通过添加TMB(50 μ L/孔)使比色信号显色直至饱和(平均3-5分钟),然后通过添加终止溶液(30 μ L/孔,10%硫酸)淬灭显色。使用合适的Tecan-Sunrise读板仪(来自Tecan)在450nm的波长下测量颜色信号。抗体结合比率与产生颜色信号成比例(图5)。抗PD-L1抗体与PD-L1特异性结合,并且不与研究的其他抗原结合。

[0369] 实施例9

[0370] 在Jurkat-NFAT-PD-1报告细胞系中用抗PD-L1抗体进行NFAT信号传导重新激活人类T细胞来源的品系Jurkat的工程改造通过将两种遗传构建体引入到其基因组来进行。一种构建体编码人类PD-1受体基因。另一种构建体在NFAT敏感的遗传元件的控制下编码荧光

素酶基因。结果,获得了Jurkat-NFAT-PD-1报告细胞系,其在表面膜上表达PD-1受体,并含有指导萤光素酶基因转录的NFAT依赖性启动子。该品系的细胞中萤光素酶的合成与NFAT活性水平成比例,而NFAT活性水平又反映了T-淋巴细胞活化的总体水平。

[0371] 使用该细胞系如下分析抗PD-L1抗体的活性:通过抗CD3和抗CD28抗体激活TCR受体会触发细胞内级联,从而导致NFAT启动子激活。PD-L1存在于被干扰素活化的MDA-MB-231细胞的表面上。PD-L1和PD-1之间的相互作用抑制从TCR受体到NFAT启动子的信号传导。抗PD-L1抗体阻断PD-L1-PD-1的相互作用,并重新激活细胞内信号传导。

[0372] 用干扰素- γ 溶液活化MDA-MB-231细胞以产生PD-L1,为此目的,在测定之前72小时,将干扰素 γ 加入到细胞悬液中至浓度为20ng/ml,然后将细胞以10000个细胞/孔的比率接种于96孔培养板中。

[0373] 活化72小时之后,从含有MDA-MB-231细胞的板去除生长培养基,并添加分析抗体、对照抗体和同种型对照在细胞生长培养基中的稀释液(10 μ g/ml-0.001 μ g/ml),在室温下孵育30分钟。

[0374] 进一步地,将Jurkat-NFAT-PD-1细胞的悬浮液和激活抗体aCD3/aCD28/a-小鼠IgG的溶液添加到每孔。将板置于CO₂培养箱中6小时。

[0375] 将萤光素酶的预先制备的底物Bio-Glo萤光素酶测定系统(Promega)添加到V池/V基底。在Fluoroscan Ascent上测量了发光水平(图6)。抗PD-L1抗体重新激活了Jurkat-PD-1-NFAT报告细胞系的发光水平。

[0376] 实施例10

[0377] 使用Octet RED 96测定抗PD-L1抗体与FcRn和Fc γ 受体的相互作用为了测定抗体与Fc γ RIIIaV、Fc γ RIa、FcRn受体的相互作用,使用了ForteBio Octet RED96仪器。使用C-末端生物素化的受体和链霉亲和素包被的生物传感器(SA-链霉亲和素)。

[0378] 生物素化的受体被固定于传感器的表面上。进一步地,进行缔合阶段:将具有结合的抗原的传感器浸入不同浓度的抗体溶液中(预先制备一系列在工作缓冲液中的抗体稀释液,并将其置于96孔板的适当孔中)。之后,进行解离阶段:将传感器从抗体溶液转移至含有工作缓冲液的孔中。

[0379] 为了测定对Fc γ RIIIaV和Fc γ RIa的抗体亲和常数,使用磷酸盐缓冲液(PH7.4),对于FcRn使用磷酸盐缓冲液(PH6.0)。

[0380] 使用Forte Bio Data Analysis 8.2软件和1:1结合模型进行获得的曲线分析。结果如图7所示。与野生型变体相比较,未检测到与修饰的IgG1抗体的Fc γ 受体的结合,这表明在分析的抗体中不存在效应子功能。分析的抗PD-L1抗体中对FcRn的亲和常数为1.69E-081/M。

[0381] 实施例11

[0382] 抗PD-L1抗体与来自不同生物体的PD-L1之间相互作用的酶联免疫吸附测定ELISA用于从不同生物体测量抗PD-L1抗体的相对亲和力。对于结合测定,将ELISA板孔(中等结合,来自Greiner bio one)用50 μ l人、食蟹猴、小鼠、大鼠、犬、兔PD-L1-Fc(在1 \times 碳酸盐缓冲液中0.5 μ g/ml)包被,气密密封并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。所有后续阶段均按照上述标准ELISA方案进行。抗PD-L1抗体与人和食蟹猴PD-L1特异性结合,并且不与研究的其他受体结合(图8)。

[0383] 实施例12

[0384] 在Octet RED 96仪器上抗PD-L1抗体与人和食蟹猴PD-L1的相互作用分析用OctetRed 96仪器(来自ForteBio)测量抗体对人和食蟹猴PD-L1的结合亲和力常数。根据制造商关于AR2G传感器制备和固定的说明,按照标准方案,将浓度为30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的BCD-135抗体非特异性地固定于第二代氨基反应性生物传感器(ForteBio, AR2G)的表面上。使用含有0.1% Tween-20和0.1% BSA的PBS作为反应缓冲液,在30 $^{\circ}\text{C}$ 下进行测定。在抗原浓度为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的工作缓冲液中分析人和猴PD-L1溶液与传感器结合的抗体的结合。

[0385] 减去参考信号的结合曲线使用Octet Data Analysis(ver 8.2)软件,根据标准程序使用1:1相互作用模型进行分析。抗PD-L1抗体分别与人和食蟹猴PD-L1抗原特异性和亲和性结合(图9),常数为 $<1.0\text{E}-12$ 和 $5.55\text{E}-101\text{M}$ 。

[0386] 实施例13

[0387] 抗PD-L1抗体稳定性测定

[0388] 使用动态光散射技术(DLS)基于蛋白聚集点评估BCD-135的构象稳定性。使用Zetasizer Nano ZSP仪器确定研究蛋白(1 mg/ml)的蛋白聚集点。为此目的,将0.5 ml 溶液置于无尘石英比色皿中,后者在仪器中从50 $^{\circ}\text{C}$ 逐渐加热到90 $^{\circ}\text{C}$,同时持续测量散射光强度。BCD-135抗体在20 mM 醋酸盐缓冲液中呈现出高构象稳定性,解链温度高于80 $^{\circ}\text{C}$ (图10)。

[0389] 通过PEG-蛋白聚集方法评估候选物的胶体稳定性。对于该实验,使用蛋白浓度为5 mg/ml 的样品。向UV分光光度板中添加计算量的样品、安慰剂溶液和PEG 6000溶液。通过吸液将孔中的所有溶液充分混合。进一步地,目视评价溶液的浊度,并且还测量在 $\lambda=320\text{nm}$ 下的溶液光密度。BCD-135抗体显示出高的胶体稳定性(图11)。

[0390] 通过在3种不同的缓冲液中于50 $^{\circ}\text{C}$ 下热应激48小时评估抗体的热稳定性:pH 6.0的20 mM 磷酸盐缓冲液(图12A)、pH 5.0的20 mM 醋酸盐缓冲液(图12B)和pH 5.5的20 mM 组氨酸缓冲液(图12C)。通过HPLC方法(SEC HPLC)进行均质性控制。

[0391]	名称	测试缓冲液	48 h 的主峰含量变化
	BCD-135	pH 6.0 的 20 mM 磷酸盐缓冲液	$\Delta=-0.126\%$
[0392]	名称	测试缓冲液	48 h 的主峰含量变化
	BCD-135	pH 5.0 的 20 mM 醋酸盐缓冲液	$\Delta=-2.04\%$
	BCD-135	pH 5.5 的 20 mM 组氨酸缓冲液	$\Delta=-1.55\%$

[0393] 将蛋白浓度为 $\sim 5\text{mg}/\text{ml}$ 的测试样品分为两部分,并置于单独的试管中:将每种制剂的一根试管储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中,其余的置于恒温器中,并在50 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育72小时。一旦温热完成后,将试管从恒温器中取出并转移进行分析(在图12A、12B和12C中,红色表示保持在+4的对照,蓝色表示热应激之后的样品)。抗PD-L1抗体在所有3种缓冲液中均显示出高热稳定性(热应激前后溶液中的聚集体含量之差不超过5%)。

[0394] 还评价了BCD-135在正常人类血清中在37 $^{\circ}\text{C}$ 下7天的稳定性。为此目的,将重组PDL1(100 μl ,在1 \times 碳酸盐缓冲液中2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)添加到96孔高吸附ELISA板的孔中。将其在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育18小时。进一步地,去除孔的内容物,并加入封闭缓冲液(200 μL TBST中的0.5%脱脂奶)。将板在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分钟,然后用TBST溶液洗涤2次。

[0395] 为了绘制校准曲线,将100 μ l含有在封闭缓冲液中稀释的浓度为0、7.8、15.6、31.25、62.5、125.0、250.0ng/ml的BCD-135的溶液添加到第一垂直行的孔中。

[0396] 将板在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后将板用TBST溶液洗涤3次。进一步地,将100 μ l与辣根过氧化物酶缀合的抗人类IgG Fc片段山羊多克隆抗体溶液添加到每孔中。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。然后将板用TBST溶液洗涤4-5次。向洗涤和干燥的孔中添加100 μ lTMB溶液以显色。将板置于避光的地方,并在22 $^{\circ}$ C的温度下孵育20-25分钟以显色。通过向孔中添加50 μ l终止溶液(0.9M硫酸)来淬灭反应。在微板阅读器上以450nm波长测量孔中溶液的光密度。

[0397] 基于获得的数据绘制校准曲线(图13A),其表示光密度与添加到孔中的BCD-135浓度的依赖关系。为了绘制曲线,使用溶液光密度算术平均值。基于校准曲线,发现样品中的BCD-135浓度值与其在实验中获得的光密度值相对应。

[0398] 基于研究结果,在人类血清中于37 $^{\circ}$ C下储存7天之后,测定的BCD-135浓度与分析之前即刻制备的血清样品中测定的浓度无明显差异(图13B),表明抗体的稳定性。

[0399] 实施例14

[0400] 构建对PD-L1特异性的BCD-135突变抗体的文库

[0401] 为了构建对PD-L1特异性的BCD-135突变抗体,使用来自BIOCAD的YLab软件包和PD-L1模型(PDB 4ZQK,PDB 4Z18)进行了基于3D建模的结构分析(也请参见实施例18)。基于该计算模型,在SEQ ID NO:4的重链可变结构域的第一和第三CDR区以及SEQ ID NO:8的轻链可变结构域的第三CDR的位置合成具有部分简并密码子的BCD-135基因文库(FUH GET AL.,Improving antibody binding affinity and specificity for therapeutic development,Methods Mol Biol.,2009,525,353-376)。根据实施例2所述的方案,将所得的随机基因组的DNA克隆到噬菌体展示质粒pH5(图2)中。根据程序[Methods Enzymol.2000;328:333-63],将这些构建体转化到SS320菌株,为文库产生5*10⁷个独立的转化体。根据先前描述的程序[Mol Biol.1991Dec 5;222(3):581-97],制备了突变体VH BCD-135文库的噬菌体制备物。

[0402] 在类似于上述那些的条件下进行获得的噬菌体突变体BCD-135Fab文库的选择(实施例3)。

[0403] 在对人类重组PD-L1产物进行上述文库的第三轮选择后,对多克隆噬菌体产物进行的ELISA测定显示出显著的富集并且比非特异性结合背景高出10倍以上。将来自对人类PD-L1-Fc特异性的BCD-135突变Fab抗体的富集噬菌体文库的基因池重新克隆到表达质粒pLL(图3)中,该质粒在C-末端含有myc-标签肽,用于ELISA检测。

[0404] 实施例15

[0405] 对PD-L1特异性的BCD-135突变Fab抗体的比较性ELISA测定

[0406] ELISA用于测量测试的突变Fab抗体与人类PD-L1的结合,类似于实施例4所述。测试的克隆(BCD-135突变Fab抗体的生产者)数为400个单位。将具有SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8的序列的BCD-135Fab抗体的野生型用作阳性对照。

[0407] 结果,选择了给出比对照野生型BCD-135Fab抗体更高或类似的信号的85个阳性克隆(数值在0.7-1.2个相对单位的范围内)。

[0408] 实施例16

[0409] 对PD-L1特异性的BCD-135突变Fab抗体的表征

[0416] 稳定细胞系的产生,抗PD-L1抗体的产生和纯化

[0417] 通过使用Neon Transfection System(Life Technologies)装置,用含有优化比率的抗体轻链和重链的载体构建体,将亲本悬浮细胞系CHO-S电穿孔转染获得单克隆抗体BCD-135生产者的稳定细胞系。使用ClonePix自动化平台(Molecular Devices),并以不同培养形式使用抗生素进行初步阶段的微型池选择,制备了具有高水平生产力(超过1000mg/L)的克隆系。使用Octet RED96分析系统(Pall Life Sciences)进行生产力测定。使用基于Biomek FX机器人计算机的系统(Beckman Coulter)进行基本培养基选择和培养方案的DOE。为了培养生产者,使用无血清培养基和不含动物蛋白的给料。用于临床前研究的BCD-135制备在工作容积为50l的HyLone一次性生物反应器(Thermo Fisher Scientific)发酵罐中进行。

[0418] 在Millistak COHC深层过滤器(Merck-Millipore)上澄清培养液。在含有蛋白A的亲吸附剂上从澄清的CL进行抗体的初步纯化。在酸性条件(pH 3.3-3.8)下于甘氨酸缓冲液中进行目标蛋白的特异性洗脱。将所得洗脱液在酸性pH下保持30-60分钟以使病毒灭活,并然后用1M Tris-OH溶液中和至pH 6.5-7.0。以穿透模式在CaptoAdhere吸附剂(GE HealthCare LifeSciences)上进行最终的色谱纯化,以去除残留的DNA,生产细胞蛋白、亲和吸附剂的被切割的配体、抗体聚集体和片段。为此,以6.5-7.0的pH值且电导率低($<3\text{mS}/\text{cm}^2$),使蛋白溶液通过制备的吸附剂。使用Viresolve PRO过滤器套件(Millipore)使纯化的蛋白经受抗病毒过滤,浓缩和针对含有醋酸盐缓冲液(pH 5.0-5.5)和海藻糖的最终缓冲液进行渗滤。所得蛋白的浓度为50mg/ml或以上。

[0419] 实施例18

[0420] BCD-135抗体和人类PD-L1复合物的计算机建模

[0421] 为了产生对PD-L1特异性的BCD-135突变抗体,使用来自Schrodinger的Schrodinger Suite软件和来自BIOCAD的YLAB包进行基于3D建模的结构分析。选择PDB 5C3T作为目标晶体结构,这是因为它比经典的4ZQK结构(重点放在PD-1上)具有更多的结晶氨基酸。对接使用HEDGE仪器(来自BIOCAD的YLab包的一部分)进行。最佳位置的选择通过以10纳秒分子动力学间隔估算自由能来进行(Desmond仪器,Schrodinger Suite包的一部分)。使用来自Schrodinger的PyMOL仪器创建了所得结构的可视化。包括可变结构域BCD-135的模型在图14A中显示,而图14B显示了抗原和抗体相互作用的区域,其中隔离的氨基酸残基形成紧密的蛋白间接触。

[0422] 表B显示抗体和抗原两者的关键氨基酸残基引起密集蛋白间相互作用。

[0423]

	参与与人类 PD-L1 相互作用的位置	参与与 BCD-135 相互作用的人类 PD-L1 的位置
VH BCD-135	N55	G33
	L99	K105
	M100a	D103
	T100b	Q83
VL BCD-135	N50	N35
	N94	A85
	Y32	K89
	T30a	Q100

[0424] 表B.中列代表与人类PD-L1相互作用的BCD-135抗体的氨基酸残基。右列列出与BCD-135抗体相互作用的PD-L1抗原的相应氨基酸残基。

序列表

<110> Joint Stock Company BIOCAD
 <120> 针对 PD-L1 的单克隆抗体
 <140> RU2017113141
 <141> 2017-04-17
 <160> 10
 <170> BiSSAP 1.3.6
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 1
 Asp Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 2
 Asp Ile Ser Trp Ser Gly Ser Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 [0001] <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 3
 Ala Pro Leu Leu Leu Ala Met Thr Phe Gly Val Gly Ser
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Asp Ile Ser Trp Ser Gly Ser Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
 85 90 95

Ala Arg Ala Pro Leu Leu Leu Ala Met Thr Phe Gly Val Gly Ser Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 5
Gly Leu Ser Ser Gly Thr Val Thr Ala Ile Asn Tyr Pro Gly
1 5 10
<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 6
Asn Thr Asn Thr Arg His Ser
1 5
<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 7
[0002] Ala Leu Tyr Met Gly Asn Gly Gly His Met
1 5 10
<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<400> 8
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Thr Val Thr Ala Ile
20 25 30
Asn Tyr Pro Gly Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
35 40 45
Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Tyr Met Gly Asn
85 90 95
Gly Gly His Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys
100 105
<210> 9
<211> 452
<212> PRT

<213> 人工序列
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Asp Ile Ser Trp Ser Gly Ser Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Pro Leu Leu Leu Ala Met Thr Phe Gly Val Gly Ser Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

[0003]

355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 10
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 10
 Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Thr Val Thr Ala Ile
 20 25 30
 Asn Tyr Pro Gly Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Tyr Met Gly Asn
 85 90 95
 Gly Gly His Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

[0004]

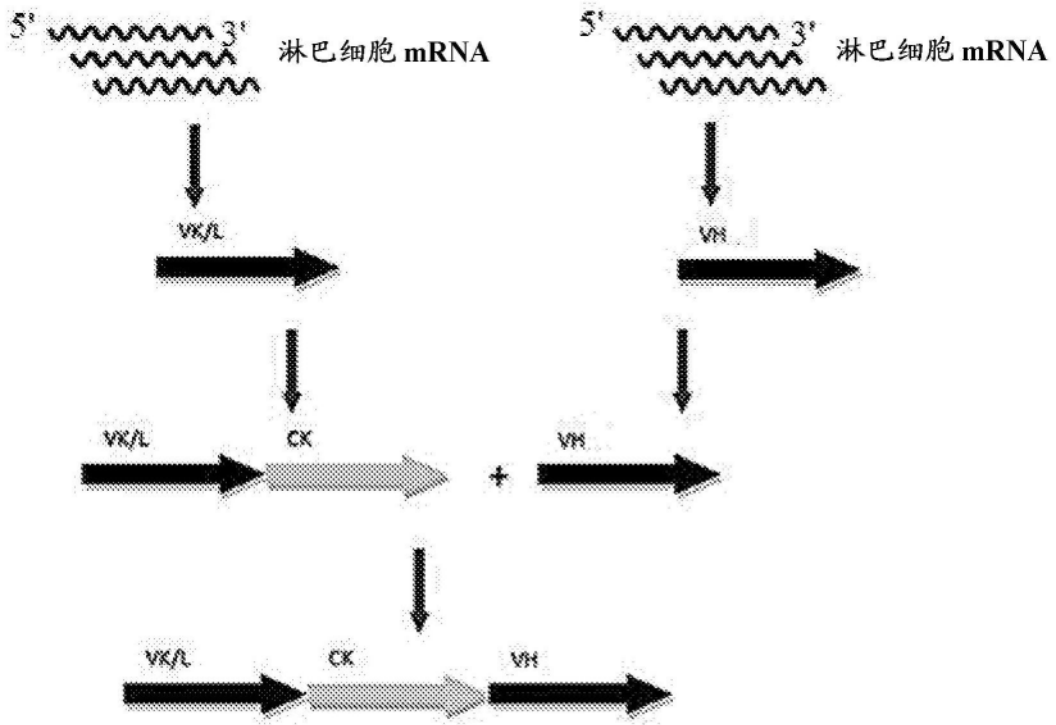


图1

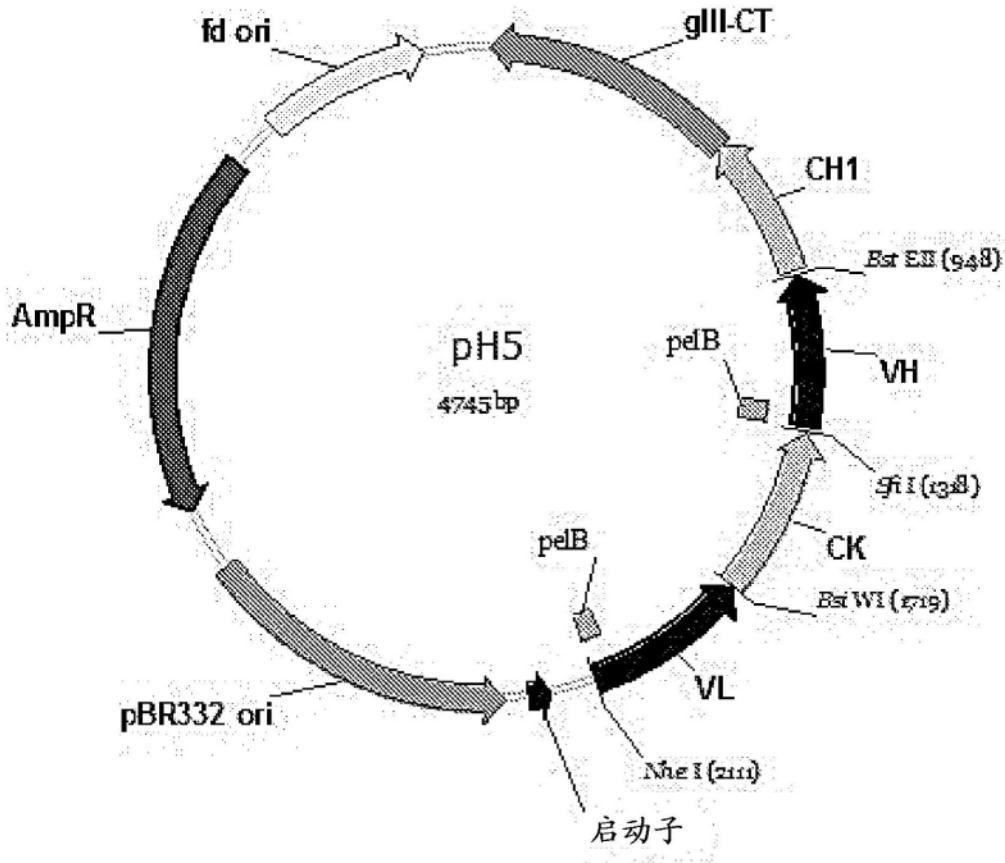


图2

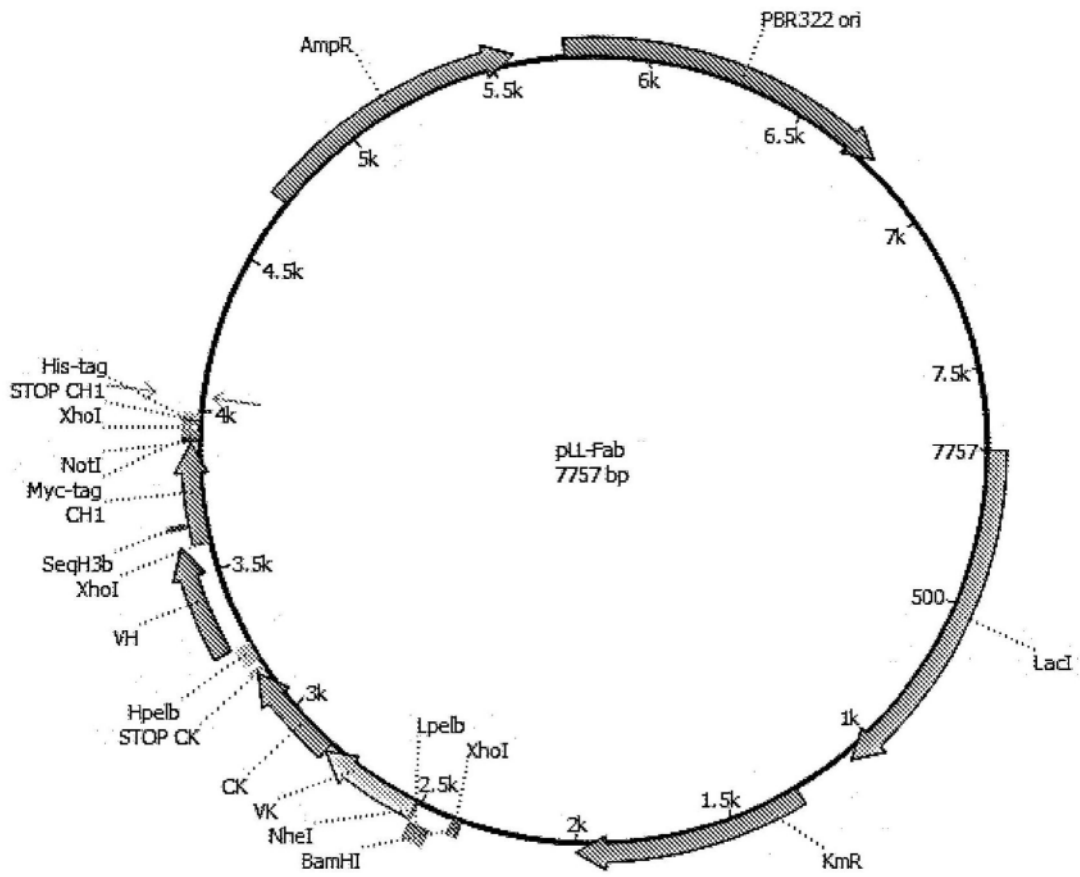
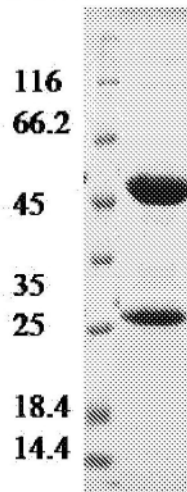


图3

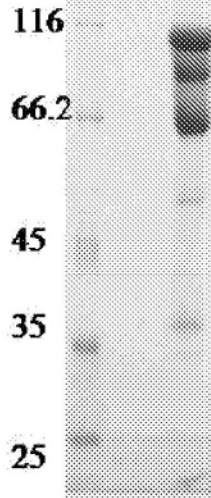
kDa M BCD-135



M - Fermentas, 未染色的 PW 标志物

图4A

kDa M BCD-135



M - Fermentas, 未染色的 PW 标志物

图4B

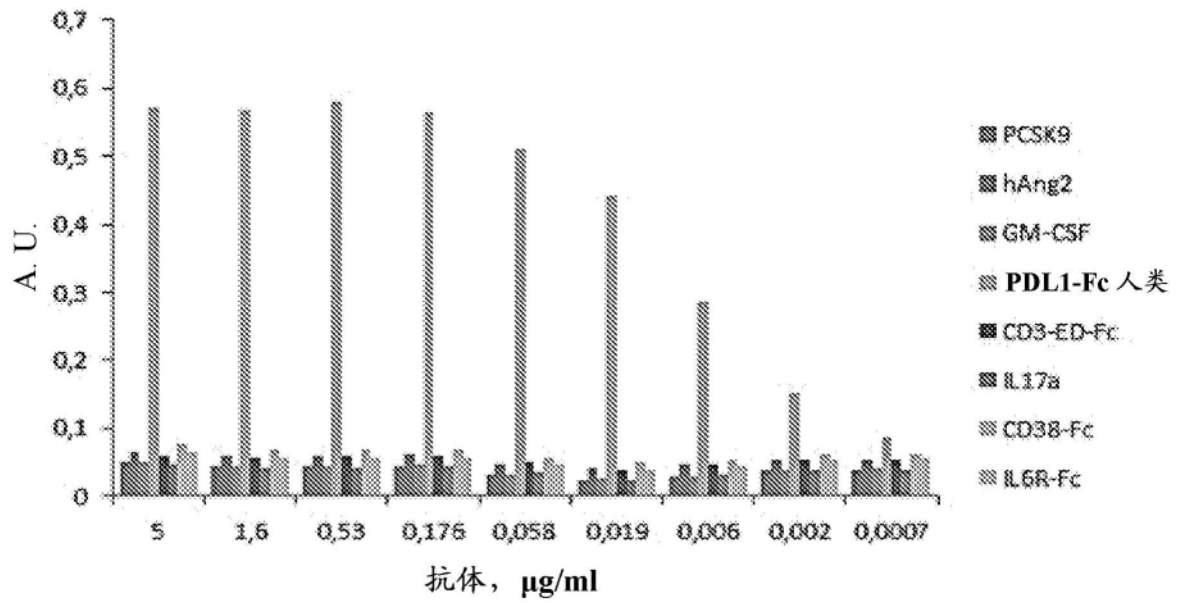


图5

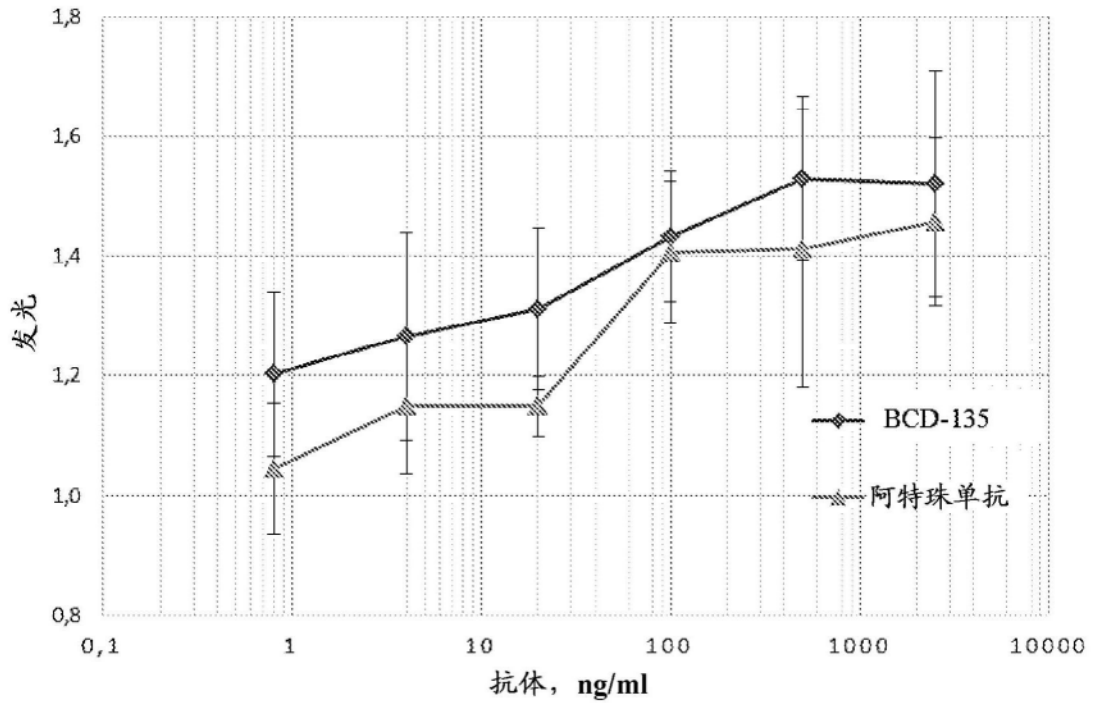


图6

抗体	FcRn	FcgRIa	FcgRIIIaV
BCD-135	1.69E-08	-	-
阿特殊单抗	1.45E-08	-	-

图7

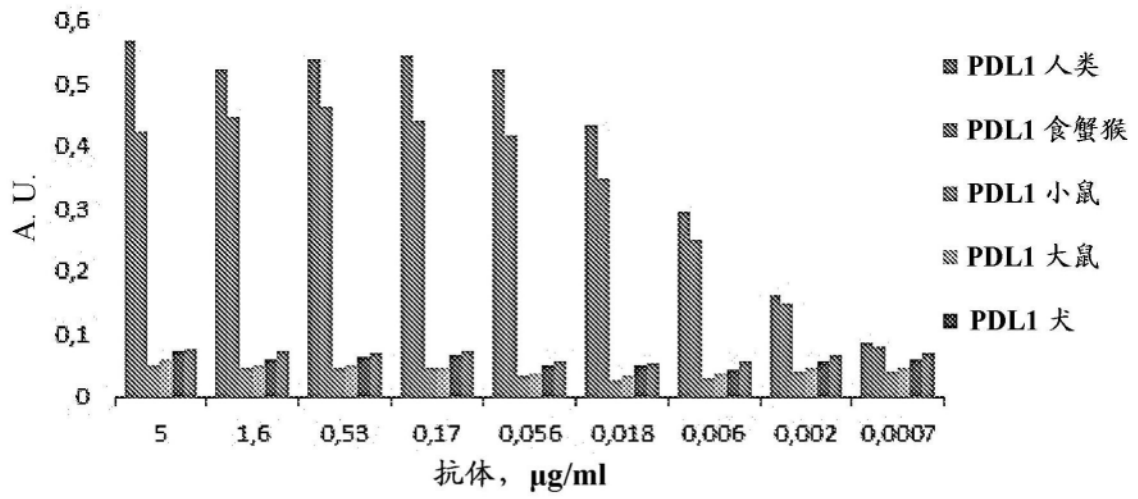


图8

抗原	浓度(nM)	Kd (M)
人类 PDL1	9.62	<1.0E-12
食蟹猴 PDL1	19.2	5.55E-10

图9

平均粒径与温度的依赖关系图

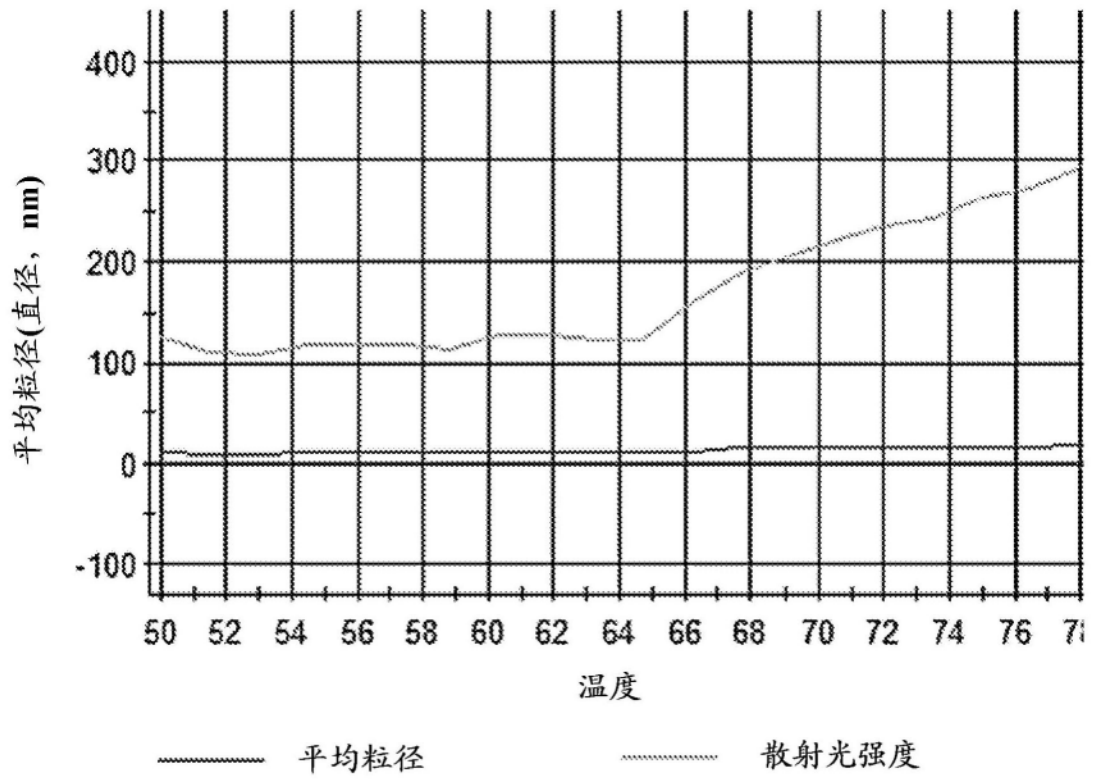
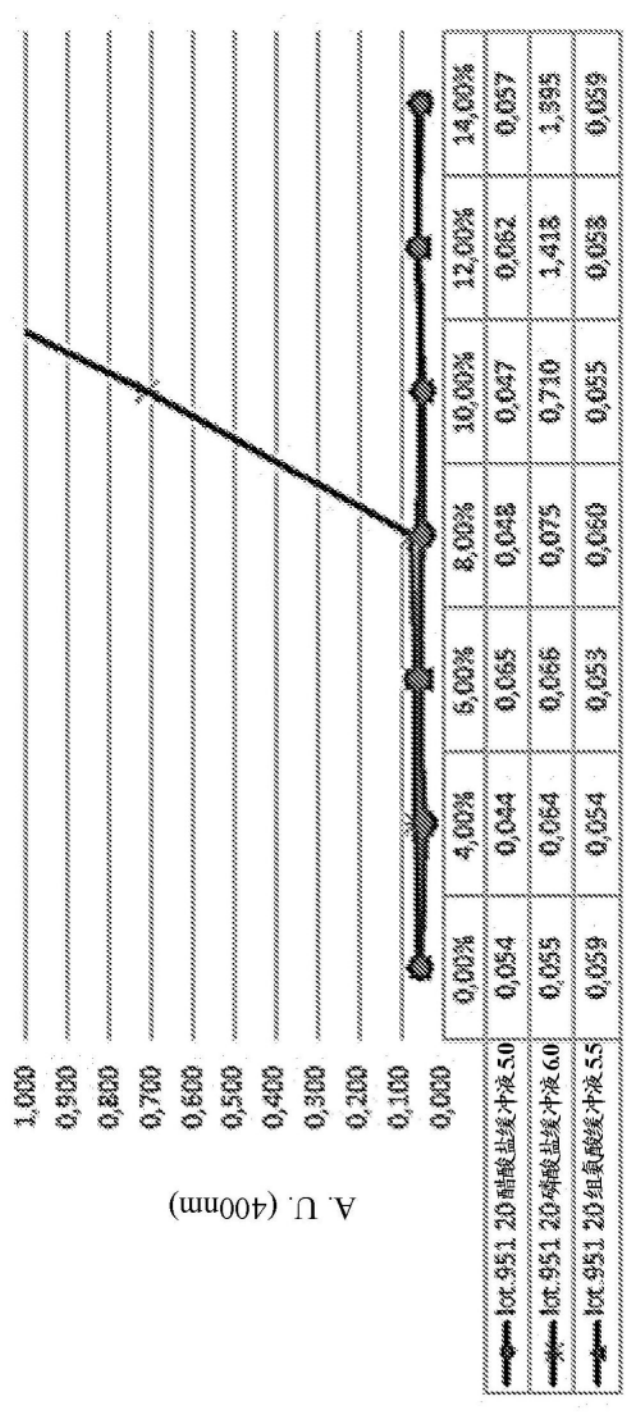


图10



A. U. (400nm)

图11

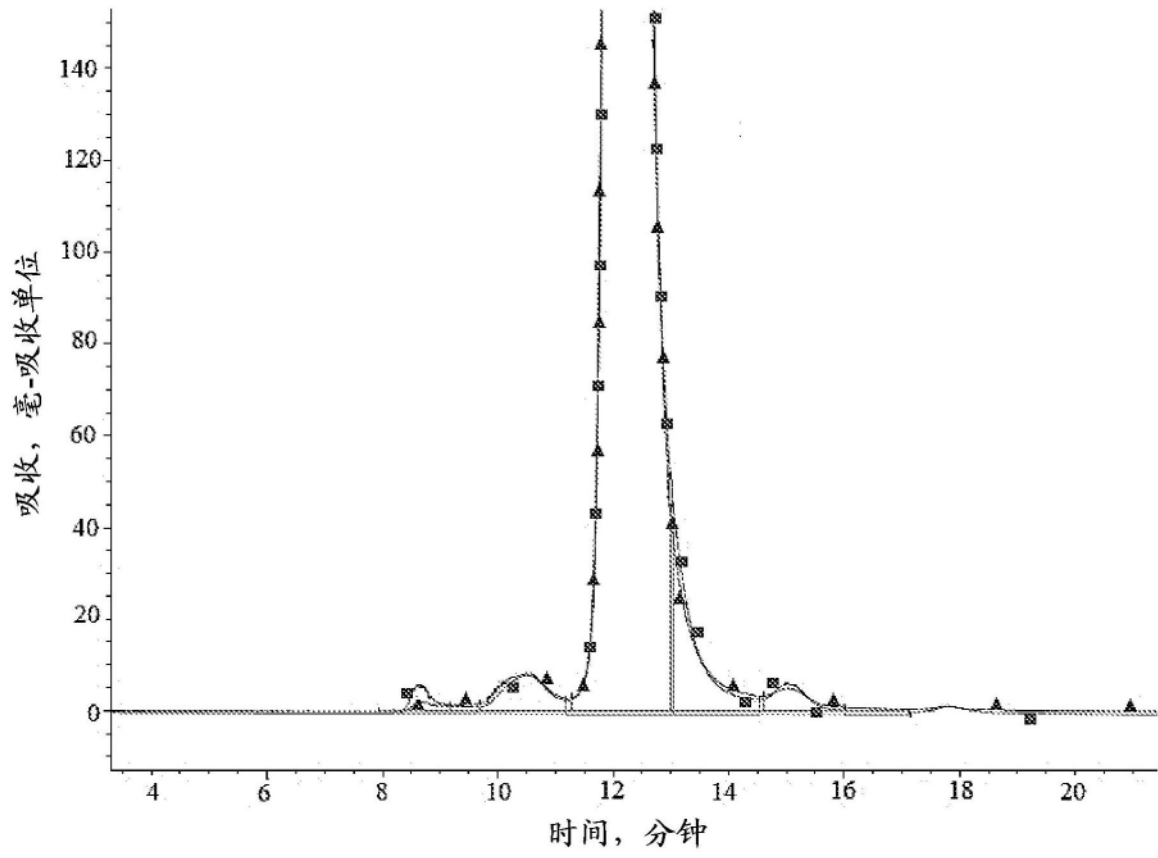


图12A

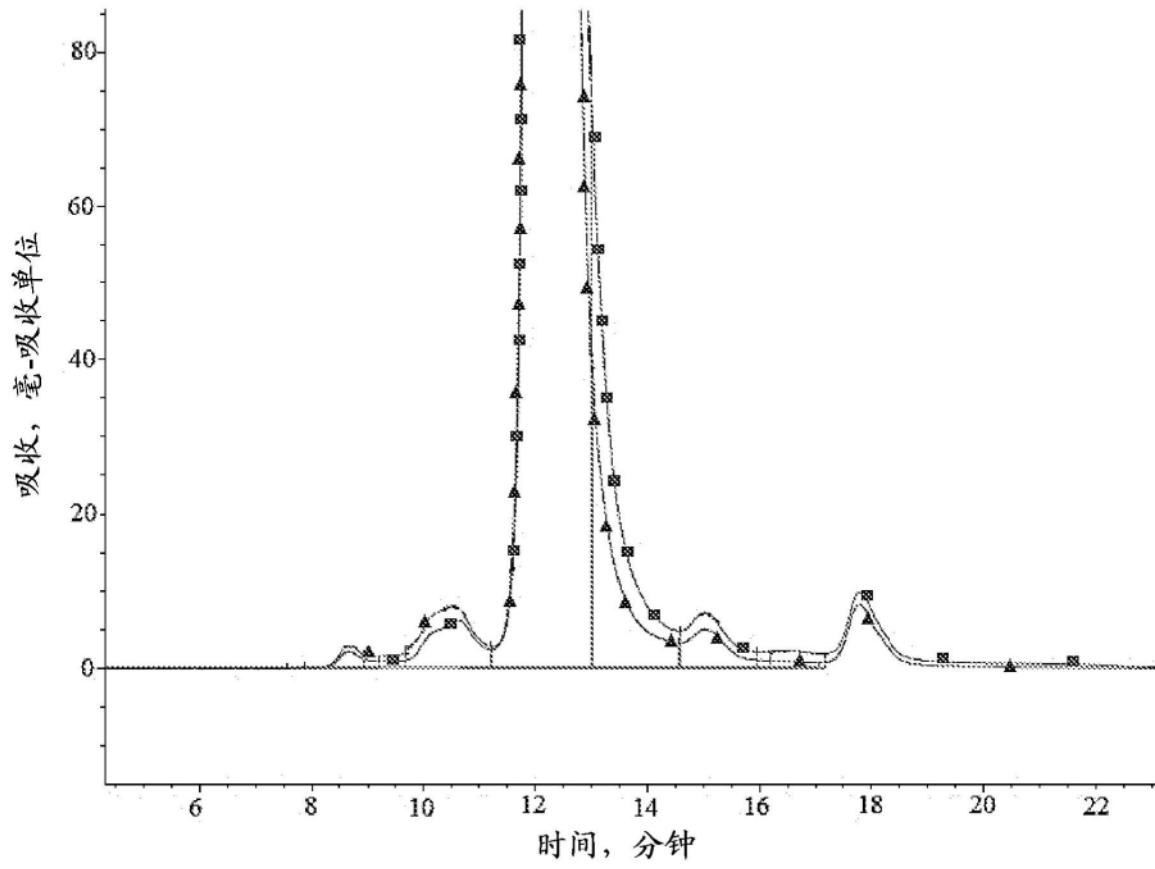


图12B

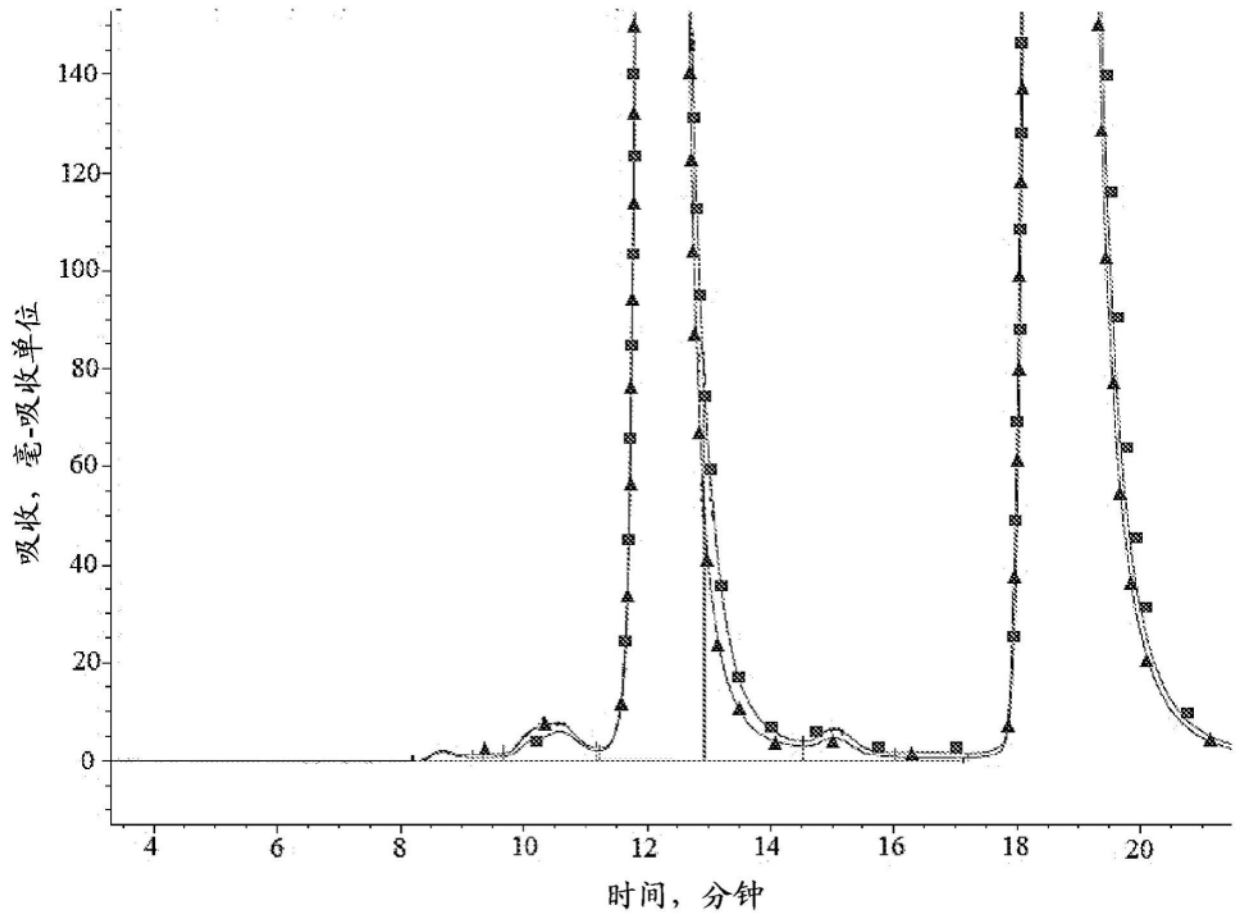


图12C

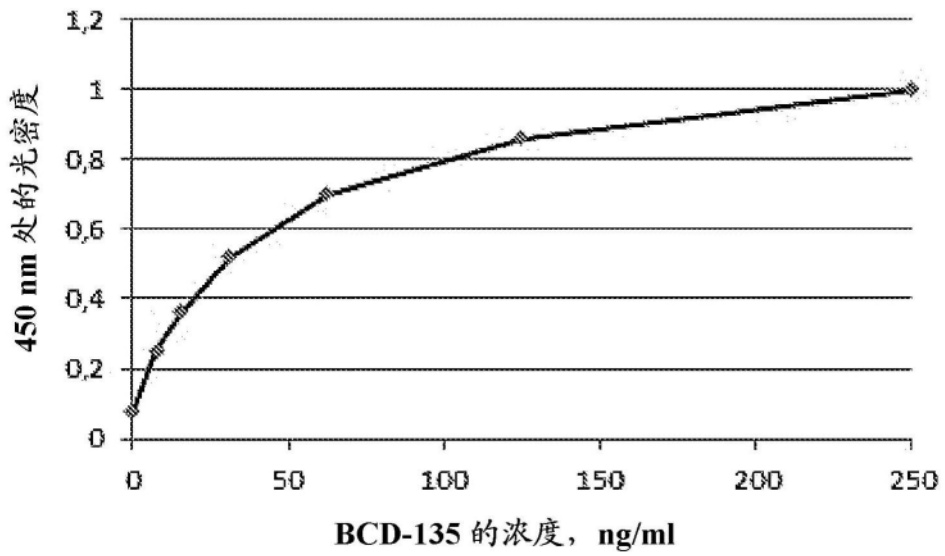


图13A

100%人类血清中的浓度	计算的浓度 $\mu\text{g/ml}$	测量的浓度 $\mu\text{g/ml}$	降低, 倍数
4 $\mu\text{g/ml}$, 对照	4	>10	<0.40
20 $\mu\text{g/ml}$, 对照	20	26,2	0.77
100 $\mu\text{g/ml}$, 对照	100	98,4	1.02
4 $\mu\text{g/ml}$, 7天 37°C	4	9,1	0.44
20 $\mu\text{g/ml}$, 7天 37°C	20	34,7	0.58
100 $\mu\text{g/ml}$, 7天 37°C	100	114,3	0.87

图13B

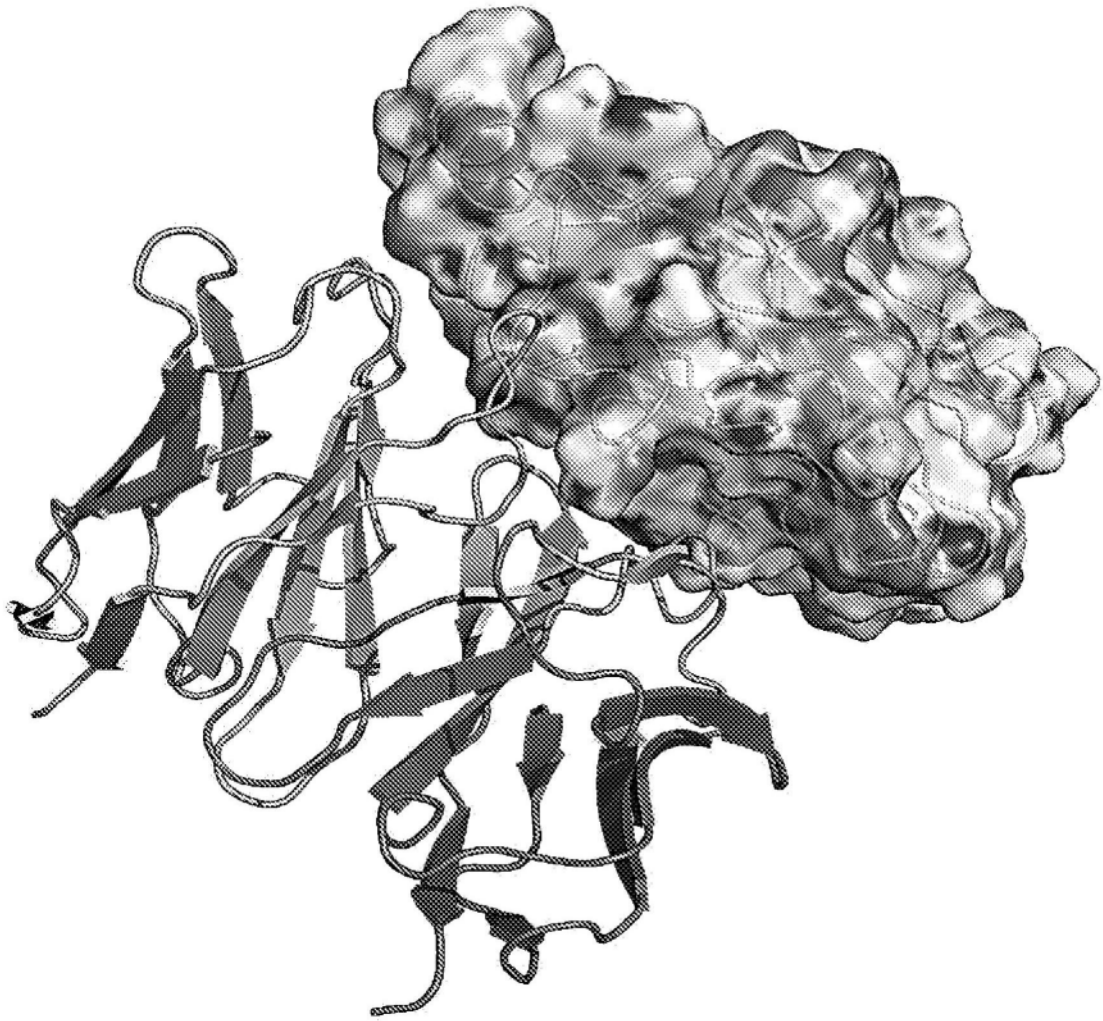


图14A

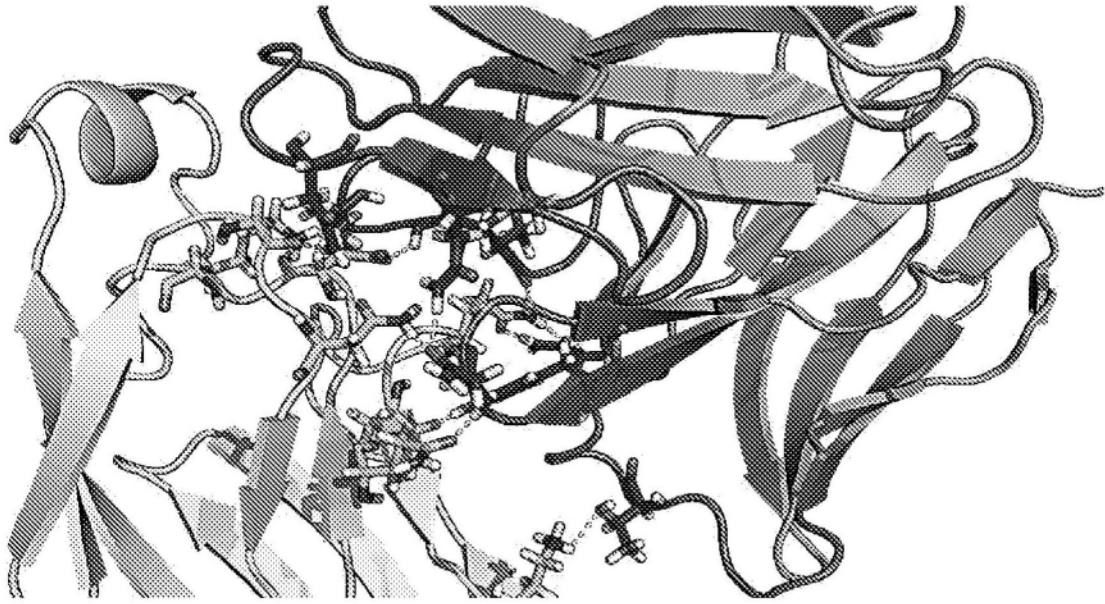


图14B