



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111363041 B

(45) 授权公告日 2022.02.22

(21) 申请号 202010174431.5

(22) 申请日 2017.02.10

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111363041 A

(43) 申请公布日 2020.07.03

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2016/077082 2016.03.23 CN

(62) 分案原申请数据

201780018886.4 2017.02.10

(73) 专利权人 苏州创胜医药集团有限公司

地址 215028 江苏省苏州市吴中区园区星湖街218号生物纳米园b2栋609室

(72) 发明人 钱雪明 滕菲 李振

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 吴瑜 杜丹

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

(54) 发明名称

新型抗-PD-L1抗体

(57) 摘要

提供了一种分离的PD-L1抗体,在相同的实验条件下,所述抗体在酸性pH下与PD-L1的结合显著低于其在中性pH下与PD-L1的结合,以及提供了一种分离的PD-L1抗体,所述抗体与PD-L1的结合不具有pH依赖性。还提供了所述抗体的药物组合物,所述抗体的编码多核苷酸、表达载体和分离的宿主细胞,以及包含所述PD-L1抗体的试剂盒。本申请还提供了使用所述PD-L1抗体治疗PD-L1相关病况的方法。

(56) 对比文件

CN 103987405 A, 2014.08.13

WO 2013055404 A1, 2013.04.18

WO 2014151006 A2, 2014.09.25

WO 2014165082 A3, 2015.03.19

WO 2013079174 A1, 2013.06.06

WO 2014055897 A2, 2014.04.10

WO 2013173223 A1, 2013.11.21

Benjamin Boyerinas. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells. 《Cancer Immunol Res.》.2015, 第1148-1157页。

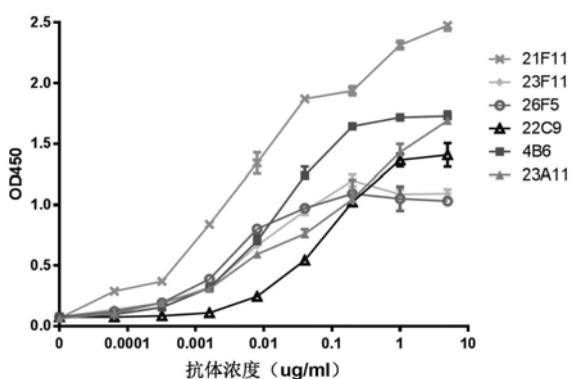
Rong Deng等. Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue distribution, and tumor penetration of anti-PD-L1 monoclonal antibody, an immune checkpoint inhibitor. 《Mabs》.2016, 第8卷(第3期), 第593-603页。

审查员 梁亚茹

权利要求书3页 说明书78页

序列表63页 附图63页

纯化的抗体与hPD-L1-his的结合



1. 一种分离的PD-L1抗体，所述抗体包含重链HCDR1'、HCDR2'和HCDR3'以及轻链LCDR1'、LCDR2'和LCDR3'序列，其中

所述HCDR1'序列是DYYMN(SEQ ID NO:23)；

所述HCDR2'序列是DINPNNGGTSYNX<sub>1</sub>KFX<sub>2</sub>G(SEQ ID NO:24)；

所述HCDR3'序列是VKWGDGPFAY(SEQ ID NO:25)；

所述LCDR1'序列是X<sub>3</sub>ASQNVGAAVA(SEQ ID NO:26)；

所述LCDR2'序列是SASNX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>T(SEQ ID NO:27)；

所述LCDR3'序列是QQYSNYPT(SEQ ID NO:28)；

其中X<sub>1</sub>是H;X<sub>2</sub>是K;X<sub>3</sub>是K;X<sub>4</sub>是R;X<sub>5</sub>是Y，

或者X<sub>1</sub>是Q;X<sub>2</sub>是Q;X<sub>3</sub>是Q;X<sub>4</sub>是R;和X<sub>5</sub>是Y，

或者X<sub>1</sub>是Q;X<sub>2</sub>是Q;X<sub>3</sub>是Q;X<sub>4</sub>是L;和X<sub>5</sub>是Y。

2. 如权利要求1所述的抗体，进一步包含重链框架HFR1'、HFR2'、HFR3'和HFR4'以及轻链框架LFR1'、LFR2'、LFR3'和LFR4'，其中重链可变区的序列如下式所示：HFR1' - HCDR1' - HFR2' - HCDR2' - HFR3' - HCDR3' - HFR4'，并且轻链可变区的序列如下式所示：LFR1' - LCDR1' - LFR2' - LCDR2' - LFR3' - LCDR3' - LFR4'，

所述HFR1'序列是

X<sub>1</sub>a<sub>1</sub>VQLX<sub>2</sub>a<sub>2</sub>QSGX<sub>3</sub>a<sub>3</sub>EX<sub>4</sub>a<sub>4</sub>X<sub>5</sub>a<sub>5</sub>KPGASVKX<sub>6</sub>a<sub>6</sub>SCKASGYVFT(SEQ ID NO:47)；

所述HFR2'序列是WVX<sub>7</sub>a<sub>7</sub>QX<sub>8</sub>a<sub>8</sub>X<sub>9</sub>a<sub>9</sub>GX<sub>10</sub>a<sub>10</sub>X<sub>11</sub>a<sub>11</sub>LEWIG(SEQ ID NO:48)；

所述HFR3'序列是

X<sub>12</sub>a<sub>12</sub>X<sub>13</sub>TVTVDX<sub>14</sub>a<sub>14</sub>SX<sub>15</sub>a<sub>15</sub>X<sub>16</sub>TAYMELX<sub>17</sub>a<sub>17</sub>X<sub>18</sub>a<sub>18</sub>LX<sub>19</sub>a<sub>19</sub>SX<sub>20</sub>a<sub>20</sub>DX<sub>21</sub>a<sub>21</sub>AVYYC(SEQ ID NO:49)；

所述HFR4'序列是WGQQGTLVTVSX<sub>22</sub>a<sub>22</sub>(SEQ ID NO:50)；

所述LFR1'序列是

DIX<sub>23</sub>MTQSX<sub>24</sub>a<sub>24</sub>X<sub>25</sub>a<sub>25</sub>X<sub>26</sub>a<sub>26</sub>X<sub>27</sub>SX<sub>28</sub>a<sub>28</sub>SVGDRVX<sub>29</sub>a<sub>29</sub>ITC(SEQ ID NO:51)；

所述LFR2'序列是WYQQKPGX<sub>30</sub>a<sub>30</sub>X<sub>31</sub>a<sub>31</sub>PKLLIY(SEQ ID NO:52)；

所述LFR3'序列是GVPX<sub>32</sub>a<sub>32</sub>RFX<sub>33</sub>a<sub>33</sub>GSGSGTDFTLTISX<sub>34</sub>a<sub>34</sub>X<sub>35</sub>QX<sub>36</sub>a<sub>36</sub>EDX<sub>37</sub>a<sub>37</sub>AX<sub>38</sub>a<sub>38</sub>YFC(SEQ ID NO:53)；

所述LFR4'序列是FGSGTKLGIK(SEQ ID NO:54)；

其中X<sub>1</sub>a<sub>1</sub>是E;X<sub>2</sub>a<sub>2</sub>是Q;X<sub>3</sub>a<sub>3</sub>是P;X<sub>4</sub>a<sub>4</sub>是L;X<sub>5</sub>a<sub>5</sub>是V;X<sub>6</sub>a<sub>6</sub>是I;X<sub>7</sub>a<sub>7</sub>是K;X<sub>8</sub>a<sub>8</sub>是S;X<sub>9</sub>a<sub>9</sub>是H;X<sub>10</sub>a<sub>10</sub>是K;X<sub>11</sub>a<sub>11</sub>是S;X<sub>12</sub>a<sub>12</sub>是K;X<sub>13</sub>a<sub>13</sub>是A;X<sub>14</sub>a<sub>14</sub>是K;X<sub>15</sub>a<sub>15</sub>是S;X<sub>16</sub>a<sub>16</sub>是R;X<sub>17</sub>a<sub>17</sub>是L;X<sub>18</sub>a<sub>18</sub>是S;X<sub>19</sub>a<sub>19</sub>是T;X<sub>20</sub>a<sub>20</sub>是E;X<sub>21</sub>a<sub>21</sub>是S;X<sub>22</sub>a<sub>22</sub>是A;X<sub>23</sub>a<sub>23</sub>是V;X<sub>24</sub>a<sub>24</sub>是Q;X<sub>25</sub>a<sub>25</sub>是K;X<sub>26</sub>a<sub>26</sub>是F;X<sub>27</sub>a<sub>27</sub>是M;X<sub>28</sub>a<sub>28</sub>是T;X<sub>29</sub>a<sub>29</sub>是S;X<sub>30</sub>a<sub>30</sub>是Q;X<sub>31</sub>a<sub>31</sub>是S;X<sub>32</sub>a<sub>32</sub>是D;X<sub>33</sub>a<sub>33</sub>是T;X<sub>34</sub>a<sub>34</sub>是N;X<sub>35</sub>a<sub>35</sub>是M;X<sub>36</sub>a<sub>36</sub>是S;X<sub>37</sub>a<sub>37</sub>是L;X<sub>38</sub>a<sub>38</sub>是D；

其中X<sub>1</sub>a<sub>1</sub>是Q;X<sub>2</sub>a<sub>2</sub>是V;X<sub>3</sub>a<sub>3</sub>是A;X<sub>4</sub>a<sub>4</sub>是V;X<sub>5</sub>a<sub>5</sub>是V;X<sub>6</sub>a<sub>6</sub>是I;X<sub>7</sub>a<sub>7</sub>是K;X<sub>8</sub>a<sub>8</sub>是A;X<sub>9</sub>a<sub>9</sub>是P;X<sub>10</sub>a<sub>10</sub>是Q;X<sub>11</sub>a<sub>11</sub>是G;X<sub>12</sub>a<sub>12</sub>是R;X<sub>13</sub>a<sub>13</sub>是A;X<sub>14</sub>a<sub>14</sub>是K;X<sub>15</sub>a<sub>15</sub>是T;X<sub>16</sub>a<sub>16</sub>是R;X<sub>17</sub>a<sub>17</sub>是S;X<sub>18</sub>a<sub>18</sub>是R;X<sub>19</sub>a<sub>19</sub>是R;X<sub>20</sub>a<sub>20</sub>是D;X<sub>21</sub>a<sub>21</sub>是T;X<sub>22</sub>a<sub>22</sub>是S;X<sub>23</sub>a<sub>23</sub>是Q;X<sub>24</sub>a<sub>24</sub>是Q;X<sub>25</sub>a<sub>25</sub>是S;X<sub>26</sub>a<sub>26</sub>是S;X<sub>27</sub>a<sub>27</sub>是L;X<sub>28</sub>a<sub>28</sub>是A;X<sub>29</sub>a<sub>29</sub>是T;X<sub>30</sub>a<sub>30</sub>是K;X<sub>31</sub>a<sub>31</sub>是A;X<sub>32</sub>a<sub>32</sub>是S;X<sub>33</sub>a<sub>33</sub>是S;X<sub>34</sub>a<sub>34</sub>是S;X<sub>35</sub>a<sub>35</sub>是M;X<sub>36</sub>a<sub>36</sub>是P;X<sub>37</sub>a<sub>37</sub>是I;X<sub>38</sub>a<sub>38</sub>是T；

其中X<sub>1</sub>a<sub>1</sub>是Q;X<sub>2</sub>a<sub>2</sub>是V;X<sub>3</sub>a<sub>3</sub>是A;X<sub>4</sub>a<sub>4</sub>是V;X<sub>5</sub>a<sub>5</sub>是K;X<sub>6</sub>a<sub>6</sub>是V;X<sub>7</sub>a<sub>7</sub>是R;X<sub>8</sub>a<sub>8</sub>是A;X<sub>9</sub>a<sub>9</sub>是P；

X' a<sub>10</sub>是Q;X' a<sub>11</sub>是G;X' a<sub>12</sub>是R;X' a<sub>13</sub>是V;X' a<sub>14</sub>是T;X' a<sub>15</sub>是I;X' a<sub>16</sub>是R;X' a<sub>17</sub>是S;X' a<sub>18</sub>是R;X' a<sub>19</sub>是R;X' a<sub>20</sub>是D;X' a<sub>21</sub>是T;X' a<sub>22</sub>是S;X' a<sub>23</sub>是Q;X' a<sub>24</sub>是Q;X' a<sub>25</sub>是S;X' a<sub>26</sub>是S;X' a<sub>27</sub>是L;X' a<sub>28</sub>是A;X' a<sub>29</sub>是T;X' a<sub>30</sub>是K;X' a<sub>31</sub>是A;X' a<sub>32</sub>是S;X' a<sub>33</sub>是S;X' a<sub>34</sub>是S;X' a<sub>35</sub>是M;X' a<sub>36</sub>是P;X' a<sub>37</sub>是I;X' a<sub>38</sub>是T;

其中X' a<sub>1</sub>是Q;X' a<sub>2</sub>是V;X' a<sub>3</sub>是A;X' a<sub>4</sub>是V;X' a<sub>5</sub>是V;X' a<sub>6</sub>是I;X' a<sub>7</sub>是K;X' a<sub>8</sub>是A;X' a<sub>9</sub>是P;X' a<sub>10</sub>是Q;X' a<sub>11</sub>是G;X' a<sub>12</sub>是R;X' a<sub>13</sub>是A;X' a<sub>14</sub>是K;X' a<sub>15</sub>是T;X' a<sub>16</sub>是R;X' a<sub>17</sub>是S;X' a<sub>18</sub>是R;X' a<sub>19</sub>是R;X' a<sub>20</sub>是D;X' a<sub>21</sub>是T;X' a<sub>22</sub>是S;X' a<sub>23</sub>是Q;X' a<sub>24</sub>是P;X' a<sub>25</sub>是S;X' a<sub>26</sub>是S;X' a<sub>27</sub>是L;X' a<sub>28</sub>是A;X' a<sub>29</sub>是T;X' a<sub>30</sub>是K;X' a<sub>31</sub>是A;X' a<sub>32</sub>是S;X' a<sub>33</sub>是S;X' a<sub>34</sub>是S;X' a<sub>35</sub>是L;X' a<sub>36</sub>是P;X' a<sub>37</sub>是I;X' a<sub>38</sub>是T;或

其中X' a<sub>1</sub>是Q;X' a<sub>2</sub>是V;X' a<sub>3</sub>是A;X' a<sub>4</sub>是V;X' a<sub>5</sub>是K;X' a<sub>6</sub>是V;X' a<sub>7</sub>是R;X' a<sub>8</sub>是A;X' a<sub>9</sub>是P;X' a<sub>10</sub>是Q;X' a<sub>11</sub>是G;X' a<sub>12</sub>是R;X' a<sub>13</sub>是V;X' a<sub>14</sub>是T;X' a<sub>15</sub>是I;X' a<sub>16</sub>是R;X' a<sub>17</sub>是S;X' a<sub>18</sub>是R;X' a<sub>19</sub>是R;X' a<sub>20</sub>是D;X' a<sub>21</sub>是T;X' a<sub>22</sub>是S;X' a<sub>23</sub>是Q;X' a<sub>24</sub>是P;X' a<sub>25</sub>是S;X' a<sub>26</sub>是S;X' a<sub>27</sub>是L;X' a<sub>28</sub>是A;X' a<sub>29</sub>是T;X' a<sub>30</sub>是K;X' a<sub>31</sub>是A;X' a<sub>32</sub>是S;X' a<sub>33</sub>是S;X' a<sub>34</sub>是S;X' a<sub>35</sub>是L;X' a<sub>36</sub>是P;X' a<sub>37</sub>是I;X' a<sub>38</sub>是T。

3. 如权利要求1所述的抗体,包含如SEQ ID NO:65中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:66中所示的轻链可变区;或者包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:68中所示的轻链可变区;或者包含如SEQ ID NO:65中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:68中所示的轻链可变区;或者包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:66中所示的轻链可变区;或者包含如SEQ ID NO:85中所示的重链可变区或其人源化形式和如SEQ ID NO:86中所示的轻链可变区或其人源化形式。

4. 如权利要求1-3中任意一项所述的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、重组抗体、标记的抗体、二价抗体或抗独特型抗体。

5. 如权利要求4所述的抗体,其中所述双特异性抗体结合两种不同的抗原。

6. 如权利要求1-3中任意一项所述的抗体,其中所述抗体是选自下组的抗原结合片段:骆驼源化单结构域抗体、双功能抗体(diabody)、scFv、scFv二聚体、BsFv、dsFv、(dsFv)2、dsFv-dsFv'、Fv片段、Fab、Fab'、F(ab')2、ds双功能抗体、纳米抗体、结构域抗体和二价结构域抗体。

7. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-6中任意一项所述的抗体。

8. 一种多核苷酸,所述多核苷酸编码如权利要求1-6中任意一项所述的抗体。

9. 一种载体,所述载体包含如权利要求8所述的多核苷酸。

10. 一种分离的宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求9所述的载体。

11. 如权利要求10所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞产生由所述多核苷酸编码的所述抗体。

12. 一种试剂盒,所述试剂盒包含如权利要求1-6中任意一项所述的抗体或如权利要求7所述的药物组合物。

13. 一种生产PD-L1抗体的方法,所述方法包括在表达所述多核苷酸的条件下培养如权利要求10或权利要求11所述的宿主细胞。

14. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-6中任意一项所述的PD-L1抗体和第二治疗剂。

15. 如权利要求14所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂是在放疗、化疗、靶向疗法、基因疗法、免疫疗法、激素疗法、血管生成抑制、姑息治疗、外科手术或其组合中使用的药剂。

16. 如权利要求15所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂是VEGFR2抗体。

17. 如权利要求1-6中任意一项所述的抗体在制备用于治疗个体中与PD-L1相关的病况的药物中的用途,其中所述与PD-L1相关的病况为实体瘤、血液恶性肿瘤或传染病。

18. 如权利要求7和14-16中任意一项所述的药物组合物在制备用于治疗个体中与PD-L1相关的病况的药物中的用途,其中,所述与PD-L1相关的病况为实体瘤、血液恶性肿瘤或传染病。

19. 如权利要求7和14-16中任意一项所述的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

20. 如权利要求19所述的用途,其中所述癌症是实体瘤或血液恶性肿瘤。

21. 如权利要求20所述的用途,其中所述实体瘤是非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结直肠癌、结肠癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈癌、肉瘤、胶质母细胞瘤、宫颈癌、梅克尔细胞癌、滑膜瘤、淋巴恶性肿瘤、基底细胞癌、腺癌、嗜铬细胞瘤、支气管癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯瘤或睾丸肿瘤。

22. 如权利要求20所述的用途,其中所述实体瘤是乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、前列腺癌、胸腺癌、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、汗腺癌、皮脂腺癌、髓样癌或精原细胞瘤。

23. 如权利要求20所述的用途,其中所述血液恶性肿瘤是经典型霍奇金氏淋巴瘤(CHL)、原发性纵隔大B 细胞淋巴瘤、富含T 细胞/组织细胞的B 细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、单核细胞白血病和红白血病、慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性淋巴细胞白血病、EBV-阳性和阴性PTLD、弥漫性大B 细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤或多发性骨髓瘤。

24. 如权利要求20所述的用途,其中所述血液恶性肿瘤是结外NK/T 细胞淋巴瘤或与HHV8 相关的原发性渗出性淋巴瘤。

25. 如权利要求19所述的用途,其中所述癌症是转移性的。

26. 如权利要求19所述的用途,其中所述癌症是表达PD-L1的转移性肿瘤。

27. 如权利要求1-6中任意一项所述的PD-L1的抗体在制备用于筛选或评估针对所述抗体的体内效力的试剂盒中的用途,所述用途包括将包含编码人PD-L1蛋白的多核苷酸的非人肿瘤细胞接种进非人动物,将所述抗体与所述非人动物中的所述非人肿瘤细胞接触,并且确定所述非人肿瘤细胞的肿瘤负荷。

## 新型抗-PD-L1抗体

[0001] 本申请是申请号为201780018886.4、申请日为2017年2月10日、发明名称为“新型抗-PD-L1抗体”的中国发明专利申请的分案申请，原申请为国际申请号为PCT/CN2017/073242的国家阶段申请，该国际申请要求申请日为2016年3月23日，申请号为PCT/CN2016/077082的国际申请的优先权。

### 发明领域

[0002] 本公开内容总体上涉及与人PD-L1特异性结合的新型抗-PD-L1抗体。

### 背景技术

[0003] CD28家族成员PD-1是一种在T细胞表面上表达的抑制性受体，其功能是在生理上限制T细胞活化和增殖。其配体PD-L1 (B7-H1/CD274) 在抗原提呈细胞和肿瘤细胞上表达。PD-L1与其受体的结合抑制T细胞活化并抵消T细胞刺激性信号，如B7与CD28的结合。

[0004] 正常上皮组织不表达PD-L1，然而其在多种人类癌症中异常表达。由此，PD-L1可以通过使宿主抗肿瘤应答失效来促使癌症的发展。其在肿瘤细胞上的表达与肾细胞癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、尿路上皮癌、胃癌、食道癌和肝细胞癌的预后较差有关。

[0005] 已经产生了多种靶向PD-1的抗体，并且其在随机对照试验中在肿瘤生长和延长总体存活方面显示出有效性。已发现了几种靶向PD-L1的抗体，并且其显示出抑制肿瘤生长的活性。由于这些抗体被表达PD-L1的细胞内化并在内涵体和溶酶体小室中迅速降解，因此这些抗体被表达PD-L1的细胞迅速消除，这些抗体抑制肿瘤生长的能力因而受到所递送抗体量的限制。对肿瘤生长的持续抑制需要连续输注大量抗体，以在肿瘤部位保持足以阻断PD-L1活性的高抗体浓度。因此，提供这些药剂的成本预计将非常高，因为需要向患者注射大量抗体。更重要的是，实现完全应答的能力也将受到限制。因而，需要产生具有比现有抗-PD-L1抗体更高药效的抗体。

### 发明内容

[0006] 本公开内容提供了一种新的单克隆抗-PD-L1抗体(特别是嵌合的和人源化抗体)，编码其的多核苷酸，使用其的方法及其在人PD-L1蛋白上的结合表位。

[0007] 在某些实施方式中，本申请提供了一种分离的PD-L1抗体，所述抗体包含重链HCDR1、HCDR2和HCDR3以及轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3序列，其中

[0008] 所述HCDR1序列是TYWX<sub>1</sub>H (SEQ ID NO:1) 或与其具有至少80% (例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列；

[0009] 所述HCDR2序列是MIQPNSGGTKYNX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>FKX<sub>4</sub> (SEQ ID NO:2) 或与其具有至少80% (例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列；

[0010] 所述HCDR3序列是GAGTVDYFDY (SEQ ID NO:3) 或与其具有至少80% (例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源

序列；

[0011] 所述LCDR1序列是RASESVDIYGNSFMH (SEQ ID NO:4) 或与其具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列；

[0012] 所述LCDR2序列是RASNLES (SEQ ID NO:5) 或与其具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列；

[0013] 所述LCDR3序列是X<sub>5</sub>QSX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>DPYT (SEQ ID NO:6) 或与其具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列

[0014] 其中X<sub>1</sub>是I或M;X<sub>2</sub>是D或E;X<sub>3</sub>是Q或K;X<sub>4</sub>是N或K;X<sub>5</sub>是Q或H;X<sub>6</sub>是N或T;X<sub>7</sub>是D或E。

[0015] 在某些实施方式中,X<sub>1</sub>是I或M;X<sub>2</sub>是D或E;X<sub>3</sub>是Q或K;X<sub>4</sub>是N或K;X<sub>5</sub>是Q;X<sub>6</sub>是N或T;X<sub>7</sub>是D或E。在某些实施方式中,X<sub>1</sub>是I;X<sub>2</sub>是D;X<sub>3</sub>是Q;X<sub>4</sub>是N;X<sub>5</sub>是Q;X<sub>6</sub>是N;X<sub>7</sub>是D。在某些实施方式中,X<sub>1</sub>是M;X<sub>2</sub>是E;X<sub>3</sub>是K;X<sub>4</sub>是K;X<sub>5</sub>是Q;X<sub>6</sub>是T;X<sub>7</sub>是E。在某些实施方式中,X<sub>1</sub>是I;X<sub>2</sub>是D;X<sub>3</sub>是Q;X<sub>4</sub>是N;X<sub>5</sub>是H;X<sub>6</sub>是N;X<sub>7</sub>是D。在某些实施方式中,X<sub>1</sub>是M;X<sub>2</sub>是E;X<sub>3</sub>是K;X<sub>4</sub>是K;X<sub>5</sub>是H;X<sub>6</sub>是T;X<sub>7</sub>是E。

[0016] 在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含1、2、3、4、5或6个CDR,所述CDR选自SEQ ID NO:7-12或与其具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列。在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含3个重链CDR,所述重链CDR选自SEQ ID NO:7-9。在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含3个轻链CDR,所述轻链CDR选自SEQ ID NO:10-12。在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含6个CDR,所述CDR选自SEQ ID NO:7-12。

[0017] 在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含重链框架序列HFR1、HFR2、HFR3和HFR4以及轻链框架序列LFR1、LFR2、LFR3和LFR4,其中重链可变区的序列如下式所示:HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4,并且轻链可变区的序列如下式所示:LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4。

[0018] 在某些实施方式中,其中所述HFR1序列是X<sub>a1</sub>VQLXa<sub>2</sub>QXa<sub>3</sub>GAE<sub>a4</sub>Xa<sub>5</sub>KPGASVKXa<sub>6</sub>SCKASGYXa<sub>7</sub>FT (SEQ ID NO:13) ;

[0019] 所述HFR2序列是WVXa<sub>8</sub>QXa<sub>9</sub>PGQGLEWIG (SEQ ID NO:14) ;

[0020] 所述HFR3序列是

[0021] Xa<sub>10</sub>Xa<sub>11</sub>TLTVDXa<sub>12</sub>SXa<sub>13</sub>Xa<sub>14</sub>TAXa<sub>15</sub>MXa<sub>16</sub>LSXa<sub>17</sub>LXa<sub>18</sub>SXa<sub>19</sub>DXa<sub>20</sub>AVYYCAR (SEQ ID NO:15) ;

[0022] 所述HFR4序列是WGQGXa<sub>21</sub>TLXa<sub>22</sub>Xa<sub>23</sub>SS (SEQ ID NO:16) ;

[0023] 所述LFR1序列是DIVLTXa<sub>24</sub>SPXa<sub>25</sub>SLXa<sub>26</sub>VSXa<sub>27</sub>GQRATIXa<sub>28</sub>C (SEQ ID NO:17) ;

[0024] 所述LFR2序列是WYQQKPGQXa<sub>29</sub>PKLLIY (SEQ ID NO:18) ;

[0025] 所述LFR3序列是GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAXa<sub>30</sub>DXa<sub>31</sub>ATYYC (SEQ ID NO:19) ;

[0026] 所述LFR4序列是FGGGTKLEXa<sub>32</sub>K (SEQ ID NO:20) ;

[0027] 其中X<sub>a1</sub>是Q或L;X<sub>a2</sub>是Q或V;X<sub>a3</sub>是S或P;X<sub>a4</sub>是L或V;X<sub>a5</sub>是V或K;X<sub>a6</sub>是L或V;X<sub>a7</sub>是T、S或I;X<sub>a8</sub>是W、K或R;X<sub>a9</sub>是R或A;X<sub>a10</sub>是R或K;X<sub>a11</sub>是V或A;X<sub>a12</sub>是K或T;X<sub>a13</sub>是S或I;X<sub>a14</sub>是S或T;X<sub>a15</sub>是Y或S;X<sub>a16</sub>是Q或E;X<sub>a17</sub>是S、G或R;X<sub>a18</sub>是T或R;X<sub>a19</sub>是E或D;X<sub>a20</sub>是S或T;X<sub>a21</sub>是T或S;

$Xa_{22}$ 是S或T;  $Xa_{23}$ 是V或I;  $Xa_{24}$ 是Q或H;  $Xa_{25}$ 是A或V;  $Xa_{26}$ 是A或T;  $Xa_{27}$ 是L、A或V;  $Xa_{28}$ 是S或T;  $Xa_{29}$ 是S、P或A;  $Xa_{30}$ 是D、N或Q;  $Xa_{31}$ 是V或T;  $Xa_{32}$ 是L、T或I;  $Xa_{33}$ 是F或Y;  $Xa_{34}$ 是T或Q;  $Xa_{35}$ 是V或L;  $Xa_{36}$ 是D或S;  $Xa_{37}$ 是M或L;  $Xa_{38}$ 是T或S;  $Xa_{39}$ 是F或S;  $Xa_{40}$ 是D或Q;  $Xa_{41}$ 是V或A;  $Xa_{42}$ 是V或I;  $Xa_{43}$ 是D或A;  $Xa_{44}$ 是T或S;  $Xa_{45}$ 是Y或S;  $Xa_{46}$ 是G或R;  $Xa_{47}$ 是F或L;  $Xa_{48}$ 是S或N;  $Xa_{49}$ 是T或P;  $Xa_{50}$ 是Q或E;  $Xa_{51}$ 是V或T;  $Xa_{52}$ 是F或Y;  $Xa_{53}$ 是A或G。

[0028] 在某些实施方式中,  $Xa_1$ 是Q;  $Xa_2$ 是V;  $Xa_3$ 是S;  $Xa_4$ 是V;  $Xa_5$ 是K;  $Xa_6$ 是L;  $Xa_7$ 是I;  $Xa_8$ 是K;  $Xa_9$ 是R;  $Xa_{10}$ 是R或K;  $Xa_{11}$ 是A;  $Xa_{12}$ 是K;  $Xa_{13}$ 是I;  $Xa_{14}$ 是S;  $Xa_{15}$ 是Y;  $Xa_{16}$ 是E;  $Xa_{17}$ 是R;  $Xa_{18}$ 是T;  $Xa_{19}$ 是D;  $Xa_{20}$ 是T;  $Xa_{21}$ 是T或S;  $Xa_{22}$ 是T或S;  $Xa_{23}$ 是I或V;  $Xa_{24}$ 是Q;  $Xa_{25}$ 是A;  $Xa_{26}$ 是A;  $Xa_{27}$ 是V;  $Xa_{28}$ 是T;  $Xa_{29}$ 是A或P;  $Xa_{30}$ 是Q;  $Xa_{31}$ 是T;  $Xa_{32}$ 是T或I;  $Xa_{33}$ 是Y;  $Xa_{34}$ 是Q;  $Xa_{35}$ 是L;  $Xa_{36}$ 是D;  $Xa_{37}$ 是L;  $Xa_{38}$ 是S;  $Xa_{39}$ 是S;  $Xa_{40}$ 是Q;  $Xa_{41}$ 是A;  $Xa_{42}$ 是I;  $Xa_{43}$ 是A;  $Xa_{44}$ 是S;  $Xa_{45}$ 是S;  $Xa_{46}$ 是R;  $Xa_{47}$ 是L;  $Xa_{48}$ 是N;  $Xa_{49}$ 是P;  $Xa_{50}$ 是E;  $Xa_{51}$ 是T;  $Xa_{52}$ 是Y;  $Xa_{53}$ 是G。

[0029] 在某些实施方式中,  $Xa_1$ 是Q;  $Xa_2$ 是V;  $Xa_3$ 是S;  $Xa_4$ 是V;  $Xa_5$ 是K;  $Xa_6$ 是L;  $Xa_7$ 是I;  $Xa_8$ 是K;  $Xa_9$ 是R;  $Xa_{10}$ 是R;  $Xa_{11}$ 是A;  $Xa_{12}$ 是K;  $Xa_{13}$ 是I;  $Xa_{14}$ 是S;  $Xa_{15}$ 是Y;  $Xa_{16}$ 是E;  $Xa_{17}$ 是R;  $Xa_{18}$ 是T;  $Xa_{19}$ 是D;  $Xa_{20}$ 是T;  $Xa_{21}$ 是T;  $Xa_{22}$ 是S;  $Xa_{23}$ 是I;  $Xa_{24}$ 是Q;  $Xa_{25}$ 是A;  $Xa_{26}$ 是A;  $Xa_{27}$ 是V;  $Xa_{28}$ 是T;  $Xa_{29}$ 是A;  $Xa_{30}$ 是Q;  $Xa_{31}$ 是T;  $Xa_{32}$ 是T;  $Xa_{33}$ 是Y;  $Xa_{34}$ 是Q;  $Xa_{35}$ 是L;  $Xa_{36}$ 是D;  $Xa_{37}$ 是L;  $Xa_{38}$ 是S;  $Xa_{39}$ 是S;  $Xa_{40}$ 是Q;  $Xa_{41}$ 是A;  $Xa_{42}$ 是I;  $Xa_{43}$ 是A;  $Xa_{44}$ 是S;  $Xa_{45}$ 是S;  $Xa_{46}$ 是R;  $Xa_{47}$ 是L;  $Xa_{48}$ 是N;  $Xa_{49}$ 是P;  $Xa_{50}$ 是E;  $Xa_{51}$ 是T;  $Xa_{52}$ 是Y;  $Xa_{53}$ 是G。

[0030] 在某些实施方式中,  $Xa_1$ 是Q;  $Xa_2$ 是V;  $Xa_3$ 是S;  $Xa_4$ 是V;  $Xa_5$ 是K;  $Xa_6$ 是L;  $Xa_7$ 是I;  $Xa_8$ 是K;  $Xa_9$ 是R;  $Xa_{10}$ 是K;  $Xa_{11}$ 是A;  $Xa_{12}$ 是K;  $Xa_{13}$ 是I;  $Xa_{14}$ 是S;  $Xa_{15}$ 是Y;  $Xa_{16}$ 是E;  $Xa_{17}$ 是R;  $Xa_{18}$ 是T;  $Xa_{19}$ 是D;  $Xa_{20}$ 是T;  $Xa_{21}$ 是S;  $Xa_{22}$ 是T;  $Xa_{23}$ 是V;  $Xa_{24}$ 是Q;  $Xa_{25}$ 是A;  $Xa_{26}$ 是A;  $Xa_{27}$ 是V;  $Xa_{28}$ 是T;  $Xa_{29}$ 是P;  $Xa_{30}$ 是Q;  $Xa_{31}$ 是T;  $Xa_{32}$ 是I;  $Xa_{33}$ 是Y;  $Xa_{34}$ 是Q;  $Xa_{35}$ 是L;  $Xa_{36}$ 是D;  $Xa_{37}$ 是L;  $Xa_{38}$ 是S;  $Xa_{39}$ 是S;  $Xa_{40}$ 是Q;  $Xa_{41}$ 是A;  $Xa_{42}$ 是I;  $Xa_{43}$ 是A;  $Xa_{44}$ 是S;  $Xa_{45}$ 是S;  $Xa_{46}$ 是R;  $Xa_{47}$ 是L;  $Xa_{48}$ 是N;  $Xa_{49}$ 是P;  $Xa_{50}$ 是E;  $Xa_{51}$ 是T;  $Xa_{52}$ 是Y;  $Xa_{53}$ 是G。

[0031] 在某些实施方式中,  $Xa_1$ 是L或Q;  $Xa_2$ 是V;  $Xa_3$ 是S;  $Xa_4$ 是V;  $Xa_5$ 是K;  $Xa_6$ 是L;  $Xa_7$ 是I;  $Xa_8$ 是K;  $Xa_9$ 是R;  $Xa_{10}$ 是R;  $Xa_{11}$ 是A;  $Xa_{12}$ 是K;  $Xa_{13}$ 是I;  $Xa_{14}$ 是S;  $Xa_{15}$ 是Y;  $Xa_{16}$ 是E;  $Xa_{17}$ 是R;  $Xa_{18}$ 是T;  $Xa_{19}$ 是D;  $Xa_{20}$ 是T;  $Xa_{21}$ 是T;  $Xa_{22}$ 是S;  $Xa_{23}$ 是I;  $Xa_{24}$ 是Q;  $Xa_{25}$ 是A;  $Xa_{26}$ 是A;  $Xa_{27}$ 是V;  $Xa_{28}$ 是T;  $Xa_{29}$ 是S;  $Xa_{30}$ 是N;  $Xa_{31}$ 是T;  $Xa_{32}$ 是T;  $Xa_{33}$ 是Y;  $Xa_{34}$ 是Q;  $Xa_{35}$ 是L;  $Xa_{36}$ 是D;  $Xa_{37}$ 是L;  $Xa_{38}$ 是S;  $Xa_{39}$ 是S;  $Xa_{40}$ 是Q;  $Xa_{41}$ 是A;  $Xa_{42}$ 是I;  $Xa_{43}$ 是A;  $Xa_{44}$ 是S;  $Xa_{45}$ 是S;  $Xa_{46}$ 是R;  $Xa_{47}$ 是L;  $Xa_{48}$ 是N;  $Xa_{49}$ 是P;  $Xa_{50}$ 是E;  $Xa_{51}$ 是T;  $Xa_{52}$ 是Y;  $Xa_{53}$ 是G。

[0032] 在某些实施方式中,  $Xa_1$ 是L;  $Xa_2$ 是V;  $Xa_3$ 是S;  $Xa_4$ 是V;  $Xa_5$ 是K;  $Xa_6$ 是V;  $Xa_7$ 是I;  $Xa_8$ 是R;  $Xa_9$ 是A;  $Xa_{10}$ 是R;  $Xa_{11}$ 是V;  $Xa_{12}$ 是T;  $Xa_{13}$ 是I;  $Xa_{14}$ 是S;  $Xa_{15}$ 是Y;  $Xa_{16}$ 是E;  $Xa_{17}$ 是R;  $Xa_{18}$ 是R;  $Xa_{19}$ 是D;  $Xa_{20}$ 是T;  $Xa_{21}$ 是T;  $Xa_{22}$ 是S;  $Xa_{23}$ 是I;  $Xa_{24}$ 是Q;  $Xa_{25}$ 是A;  $Xa_{26}$ 是A;  $Xa_{27}$ 是V;  $Xa_{28}$ 是T;  $Xa_{29}$ 是S;  $Xa_{30}$ 是N;  $Xa_{31}$ 是T;  $Xa_{32}$ 是T;  $Xa_{33}$ 是Y;  $Xa_{34}$ 是Q;  $Xa_{35}$ 是L;  $Xa_{36}$ 是D;  $Xa_{37}$ 是L;  $Xa_{38}$ 是S;  $Xa_{39}$ 是S;  $Xa_{40}$ 是Q;  $Xa_{41}$ 是A;  $Xa_{42}$ 是I;  $Xa_{43}$ 是A;  $Xa_{44}$ 是S;  $Xa_{45}$ 是S;  $Xa_{46}$ 是R;  $Xa_{47}$ 是L;  $Xa_{48}$ 是N;  $Xa_{49}$ 是P;  $Xa_{50}$ 是E;  $Xa_{51}$ 是T;  $Xa_{52}$ 是Y;  $Xa_{53}$ 是G。

[0033] 在某些实施方式中,  $Xa_1$ 是L;  $Xa_2$ 是V;  $Xa_3$ 是S;  $Xa_4$ 是V;  $Xa_5$ 是K;  $Xa_6$ 是V;  $Xa_7$ 是I;  $Xa_8$ 是R;  $Xa_9$ 是A;  $Xa_{10}$ 是R;  $Xa_{11}$ 是V;  $Xa_{12}$ 是T;  $Xa_{13}$ 是I;  $Xa_{14}$ 是S;  $Xa_{15}$ 是Y;  $Xa_{16}$ 是E;  $Xa_{17}$ 是R;  $Xa_{18}$ 是R;  $Xa_{19}$ 是D;  $Xa_{20}$ 是T;  $Xa_{21}$ 是T;  $Xa_{22}$ 是S;  $Xa_{23}$ 是I;  $Xa_{24}$ 是Q;  $Xa_{25}$ 是A;  $Xa_{26}$ 是A;  $Xa_{27}$ 是V;  $Xa_{28}$ 是T;  $Xa_{29}$ 是A;  $Xa_{30}$ 是Q或N;  $Xa_{31}$ 是T;  $Xa_{32}$ 是T;  $Xa_{33}$ 是Y;  $Xa_{34}$ 是Q;  $Xa_{35}$ 是L;  $Xa_{36}$ 是D;  $Xa_{37}$ 是L;  $Xa_{38}$ 是S;  $Xa_{39}$

是S;Xa<sub>40</sub>是Q;Xa<sub>41</sub>是A;Xa<sub>42</sub>是I;Xa<sub>43</sub>是A;Xa<sub>44</sub>是S;Xa<sub>45</sub>是S;Xa<sub>46</sub>是R;Xa<sub>47</sub>是L;Xa<sub>48</sub>是N;Xa<sub>49</sub>是P;Xa<sub>50</sub>是E;Xa<sub>51</sub>是T;Xa<sub>52</sub>是Y;Xa<sub>53</sub>是G。

[0034] 在某些实施方式中,Xa<sub>1</sub>是Q;Xa<sub>2</sub>是V;Xa<sub>3</sub>是S;Xa<sub>4</sub>是V;Xa<sub>5</sub>是K;Xa<sub>6</sub>是V;Xa<sub>7</sub>是I;Xa<sub>8</sub>是R;Xa<sub>9</sub>是A;Xa<sub>10</sub>是K;Xa<sub>11</sub>是A;Xa<sub>12</sub>是T;Xa<sub>13</sub>是I;Xa<sub>14</sub>是S;Xa<sub>15</sub>是Y;Xa<sub>16</sub>是E;Xa<sub>17</sub>是R;Xa<sub>18</sub>是R;Xa<sub>19</sub>是D;Xa<sub>20</sub>是T;Xa<sub>21</sub>是S;Xa<sub>22</sub>是T;Xa<sub>23</sub>是V;Xa<sub>24</sub>是Q;Xa<sub>25</sub>是A;Xa<sub>26</sub>是A;Xa<sub>27</sub>是V;Xa<sub>28</sub>是T;Xa<sub>29</sub>是P;Xa<sub>30</sub>是N;Xa<sub>31</sub>是T;Xa<sub>32</sub>是I;Xa<sub>33</sub>是Y;Xa<sub>34</sub>是Q;Xa<sub>35</sub>是L;Xa<sub>36</sub>是D;Xa<sub>37</sub>是L;Xa<sub>38</sub>是S;Xa<sub>39</sub>是S;Xa<sub>40</sub>是Q;Xa<sub>41</sub>是A;Xa<sub>42</sub>是I;Xa<sub>43</sub>是A;Xa<sub>44</sub>是S;Xa<sub>45</sub>是S;Xa<sub>46</sub>是R;Xa<sub>47</sub>是L;Xa<sub>48</sub>是N;Xa<sub>49</sub>是P;Xa<sub>50</sub>是E;Xa<sub>51</sub>是T;Xa<sub>52</sub>是Y;Xa<sub>53</sub>是G。

[0035] 在某些实施方式中,Xa<sub>1</sub>是Q;Xa<sub>2</sub>是V;Xa<sub>3</sub>是S;Xa<sub>4</sub>是V;Xa<sub>5</sub>是K;Xa<sub>6</sub>是V;Xa<sub>7</sub>是I;Xa<sub>8</sub>是R;Xa<sub>9</sub>是A;Xa<sub>10</sub>是K;Xa<sub>11</sub>是A;Xa<sub>12</sub>是T;Xa<sub>13</sub>是I;Xa<sub>14</sub>是S;Xa<sub>15</sub>是Y;Xa<sub>16</sub>是E;Xa<sub>17</sub>是R;Xa<sub>18</sub>是R;Xa<sub>19</sub>是D;Xa<sub>20</sub>是T;Xa<sub>21</sub>是S;Xa<sub>22</sub>是T;Xa<sub>23</sub>是V;Xa<sub>24</sub>是Q;Xa<sub>25</sub>是A;Xa<sub>26</sub>是A;Xa<sub>27</sub>是V;Xa<sub>28</sub>是T;Xa<sub>29</sub>是P;Xa<sub>30</sub>是N或Q;Xa<sub>31</sub>是T;Xa<sub>32</sub>是I;Xa<sub>33</sub>是Y;Xa<sub>34</sub>是Q;Xa<sub>35</sub>是L;Xa<sub>36</sub>是D;Xa<sub>37</sub>是L;Xa<sub>38</sub>是S;Xa<sub>39</sub>是S;Xa<sub>40</sub>是Q;Xa<sub>41</sub>是A;Xa<sub>42</sub>是I;Xa<sub>43</sub>是A;Xa<sub>44</sub>是S;Xa<sub>45</sub>是S;Xa<sub>46</sub>是R;Xa<sub>47</sub>是L;Xa<sub>48</sub>是N;Xa<sub>49</sub>是P;Xa<sub>50</sub>是E;Xa<sub>51</sub>是T;Xa<sub>52</sub>是Y;Xa<sub>53</sub>是G。

[0036] 在某些实施方式中,Xa<sub>1</sub>是Q;Xa<sub>2</sub>是V;Xa<sub>3</sub>是S;Xa<sub>4</sub>是V;Xa<sub>5</sub>是K;Xa<sub>6</sub>是L;Xa<sub>7</sub>是I;Xa<sub>8</sub>是K;Xa<sub>9</sub>是R;Xa<sub>10</sub>是K;Xa<sub>11</sub>是A;Xa<sub>12</sub>是K;Xa<sub>13</sub>是I;Xa<sub>14</sub>是S;Xa<sub>15</sub>是Y;Xa<sub>16</sub>是E;Xa<sub>17</sub>是R;Xa<sub>18</sub>是T;Xa<sub>19</sub>是D;Xa<sub>20</sub>是T;Xa<sub>21</sub>是S;Xa<sub>22</sub>是T;Xa<sub>23</sub>是V;Xa<sub>24</sub>是Q;Xa<sub>25</sub>是A;Xa<sub>26</sub>是A;Xa<sub>27</sub>是V;Xa<sub>28</sub>是T;Xa<sub>29</sub>是P;Xa<sub>30</sub>是N;Xa<sub>31</sub>是T;Xa<sub>32</sub>是I;Xa<sub>33</sub>是Y;Xa<sub>34</sub>是Q;Xa<sub>35</sub>是L;Xa<sub>36</sub>是D;Xa<sub>37</sub>是L;Xa<sub>38</sub>是S;Xa<sub>39</sub>是S;Xa<sub>40</sub>是Q;Xa<sub>41</sub>是A;Xa<sub>42</sub>是I;Xa<sub>43</sub>是A;Xa<sub>44</sub>是S;Xa<sub>45</sub>是S;Xa<sub>46</sub>是R;Xa<sub>47</sub>是L;Xa<sub>48</sub>是N;Xa<sub>49</sub>是P;Xa<sub>50</sub>是E;Xa<sub>51</sub>是T;Xa<sub>52</sub>是Y;Xa<sub>53</sub>是G。

[0037] 在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:61中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:62中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:71中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:72中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:71中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:69中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:72中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:69中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:73中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:74中所示的轻链可变区。

[0038] 在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:63中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:64中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:75中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:76中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:77中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:78中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:75中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:78中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:77中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:76中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:79中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:80中所示的轻链可变区。

[0039] 本公开内容还提供了包含1、2、3、4、5或6个CDR的PD-L1抗体,所述CDR选自SEQ ID

NO:7-12。在某些实施方式中,所述抗体包含3个重链CDR,所述重链CDR选自SEQ ID NO:7-9。在某些实施方式中,所述抗体包含3个轻链CDR,所述轻链CDR选自SEQ ID NO:10-12。在某些实施方式中,所述抗体包含如SEQ ID NO:21中所示的重链可变区,或其人源化版本。在某些实施方式中,所述抗体包含如SEQ ID NO:22中所示的轻链可变区,或其人源化版本。在某些实施方式中,所述抗体包含如SEQ ID NO:21中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:22中所示的轻链可变区,或其人源化版本。

[0040] 一种分离的PD-L1抗体,所述抗体通过实验测得在酸性pH下与PD-L1结合,以及通过实验测得在中性pH下与PD-L1结合,其中所述在酸性pH下与PD-L1结合显著低于所述在中性pH下与PD-L1结合。在某些实施方式中,在相同实验条件下,所述PD-L1抗体在酸性pH下与PD-L1结合不超过所述抗体在中性pH下与PD-L1结合的80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或5%。在某些实施方式中,所述中性pH是7.4,并且所述酸性pH是6.0、5.5、5.0、4.5或4.0。在某些实施方式中,在相同实验条件下,本申请所述的PD-L1抗体在酸性pH6.0、pH5.5或pH5.0下与PD-L1的结合显著低于其在pH7.4下与PD-L1的结合。

[0041] 在某些实施方式中,体外测定结合或阻断活性是经由ELISA、FACS、表面等离子体共振、GST pull down、表位标签、免疫沉淀、Far-Western、荧光共振能量转移、时间分辨荧光免疫测定(TR-FIA)、放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定、乳胶凝集、Western印迹、免疫组织化学及其任意组合来测定。

[0042] 在某些实施方式中,本公开内容还提供了一种分离的PD-L1抗体,所述抗体与PD-L1抗体结合至相同表位或与PD-L1抗体竞争性结合。在某些实施方式中,所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个(例如,至少2个、3个、4个或5个):E58、K62、N63、I64、S80和Y81。在某些实施方式中,所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个(例如,至少2个或3个):R113、M115、Y123、K124和R125。在某些实施方式中,所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1)E58、R113、M115、Y123和K124;2)E58、S80、R113和R125。在某些实施方式中,所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个(例如,至少2个或3个):K62、N63、I64、Y81和D122。在某些实施方式中,所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1)E58、N63、I64、S80、Y81、R113和R125;2)E58、S80、R113、M115、D122、Y123、K124和R125;3)E58、K62、N63、S80、Y81、R113和R125;4)E58、N63、I64、S80、Y81、R113、K124和R125。

[0043] 本申请提供了一种治疗需要其的个体中与PD-L1相关的病况的方法,所述方法包括向所述个体施用一种分离的PD-L1抗体从而治疗所述病况,在相同的实验条件下,所述分离的PD-L1抗体在酸性pH下与PD-L1的结合显著低于其在中性pH下与PD-L1的结合。

[0044] 在某些实施方式中,所述抗体以不超过参照剂量80%、70%、60%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%或10%的剂量施用,其中将参照抗体达到相当的体内疗效时的剂量确定为参照剂量,其中所述参照抗体在酸性pH和中性pH下均显示出与PD-L1相似的结合,并且其中所述参照抗体和所述抗体在中性pH下具有与PD-L1相似的结合。

[0045] 在某些实施方式中,所述抗体以低于参照给药频率的给药频率施用,其中将参照抗体达到相当的体内疗效时的给药频率确定为参照给药频率,其中所述参照抗体在酸性pH和中性pH下均显示出与PD-L1相似的结合,并且其中所述参照抗体和所述抗体在中性pH下具有与PD-L1相似的结合。

[0046] 在某些实施方式中,所述抗体在靶器官中具有比参照体内半衰期更长的体内半衰期,其中所述参照体内半衰期通过参照抗体确定,其中所述参照抗体在酸性pH和中性pH下均显示出与PD-L1相似的结合,并且其中所述参照抗体和所述抗体在中性pH下具有与PD-L1相似的结合。在某些实施方式中,所述靶器官包括血清、肾、肺、胰腺、肝、胆囊、膀胱、皮肤、食管、卵巢、乳房、结肠、直肠、胃、脾或脑中的一个或多个。

[0047] 本公开内容还提供了一种分离的PD-L1抗体,所述抗体包含重链HCDR1'、HCDR2' 和 HCDR3' 以及轻链LCDR1'、LCDR2' 和LCDR3' 序列,其中

[0048] 所述HCDR1' 序列选自下组:DYYMN (SEQ ID NO:23)、SEQ ID NO:29、35、41以及与其具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列;

[0049] 所述HCDR2' 序列选自下组:DINPNNGGTSYNX' <sub>1</sub>KFX' <sub>2</sub>G (SEQ ID NO:24)、SEQ ID NO: 30、36、42以及与其具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列;

[0050] 所述HCDR3' 序列选自下组:VKWGDGPFAY (SEQ ID NO:25)、SEQ ID NO:31、37、43以及与其具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列;

[0051] 所述LCDR1' 序列选自下组:X' <sub>3</sub>ASQNVGAAVA (SEQ ID NO:26)、SEQ ID NO:32、38、44以及与其具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列;

[0052] 所述LCDR2' 序列选自下组:SASNX' <sub>4</sub>X' <sub>5</sub>T (SEQ ID NO:27)、SEQ ID NO:33、39、45以及与其具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列;

[0053] 所述LCDR3' 序列选自下组:QQYSNYPT (SEQ ID NO:28)、SEQ ID NO:34、40、46以及与其具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的同源序列;

[0054] 其中X' <sub>1</sub>是H或Q;X' <sub>2</sub>是K或Q;X' <sub>3</sub>是K或Q;X' <sub>4</sub>是R或L;X' <sub>5</sub>是Y或E。

[0055] 在某些实施方式中,X' <sub>1</sub>是Q;X' <sub>2</sub>是Q;X' <sub>3</sub>是Q;X' <sub>4</sub>是R;X' <sub>5</sub>是Y。

[0056] 在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含重链框架HFR1'、HFR2'、HFR3' 和 HFR4' 以及轻链框架LFR1'、LFR2'、LFR3' 和LFR4' ,其中重链可变区的序列如下式所示: HFR1' -HCDR1' -HFR2' -HCDR1' -HFR3' -HCDR1' -HFR4' ,并且轻链可变区的序列如下式所示: LFR1' -LCDR1' -LFR2' -LCDR1' -LFR3' -LCDR1' -LFR4' 。

[0057] 在某些实施方式中,所述HFR1' 序列是

[0058] X' a<sub>1</sub>VQLX' a<sub>2</sub>QSGX' a<sub>3</sub>EX' a<sub>4</sub>X' a<sub>5</sub>KPGASVKX' a<sub>6</sub>SCKASGYVFT (SEQ ID NO:47) ;

[0059] 所述HFR2' 序列是WVX' a<sub>7</sub>QX' a<sub>8</sub>X' a<sub>9</sub>GX' a<sub>10</sub>X' a<sub>11</sub>LEWIG (SEQ ID NO:48) ;

[0060] 所述HFR3' 序列是

[0061] X' a<sub>12</sub>X' a<sub>13</sub>TVTVDX' a<sub>14</sub>SX' a<sub>15</sub>X' a<sub>16</sub>TAYMELX' a<sub>17</sub>X' a<sub>18</sub>LX' a<sub>19</sub>SX' a<sub>20</sub>DX' a<sub>21</sub>AVYYC (SEQ ID NO:49) ;

[0062] 所述HFR4' 序列是WGQGTLTVSX' a<sub>22</sub> (SEQ ID NO:50) ;

[0063] 所述LFR1' 序列是DIX' a<sub>23</sub>MTQSX' a<sub>24</sub>X' a<sub>25</sub>X' a<sub>26</sub>X' a<sub>27</sub>SX' a<sub>28</sub>SVGDRVX' a<sub>29</sub>ITC (SEQ ID

NO:51) ;

[0064] 所述LFR2' 序列是WYQQKPGX' a<sub>30</sub>X' a<sub>31</sub>PKLLIY (SEQ ID NO:52) ;

[0065] 所述LFR3' 序列是

[0066] GVPX' a<sub>32</sub>RFX' a<sub>33</sub>GSGSGTDFTLTISX' a<sub>34</sub>X' a<sub>35</sub>QX' a<sub>36</sub>EDX' a<sub>37</sub>AX' a<sub>38</sub>YFC (SEQ ID NO:53) ;

[0067] 所述LFR4' 序列是FGSGTKLGK (SEQ ID NO:54) ;

[0068] 其中X' a<sub>1</sub>是Q或E;X' a<sub>2</sub>是Q或V;X' a<sub>3</sub>是A或P;X' a<sub>4</sub>是L或V;X' a<sub>5</sub>是V或K;X' a<sub>6</sub>是I或V;X' a<sub>7</sub>是K或R;X' a<sub>8</sub>是S或A;X' a<sub>9</sub>是H或P;X' a<sub>10</sub>是Q或K;X' a<sub>11</sub>是S或G;X' a<sub>12</sub>是K或R;X' a<sub>13</sub>是A或V;X' a<sub>14</sub>是K或T;X' a<sub>15</sub>是S,T或I;X' a<sub>16</sub>是S或R;X' a<sub>17</sub>是L或S;X' a<sub>18</sub>是S或R;X' a<sub>19</sub>是R或T;X' a<sub>20</sub>是E或D;X' a<sub>21</sub>是S或T;X' a<sub>22</sub>是A或S;X' a<sub>23</sub>是Q或V;X' a<sub>24</sub>是Q或P;X' a<sub>25</sub>是K或S;X' a<sub>26</sub>是F或S;X' a<sub>27</sub>是M或L;X' a<sub>28</sub>是T或A;X' a<sub>29</sub>是S或T;X' a<sub>30</sub>是Q或K;X' a<sub>31</sub>是S或A;X' a<sub>32</sub>是S或D;X' a<sub>33</sub>是S或T;X' a<sub>34</sub>是S或N;X' a<sub>35</sub>是M或L;X' a<sub>36</sub>是S或P;X' a<sub>37</sub>是L或I;X' a<sub>38</sub>是D或T。

[0069] 在某些实施方式中,X' a<sub>1</sub>是Q;X' a<sub>2</sub>是V;X' a<sub>3</sub>是A;X' a<sub>4</sub>是V;X' a<sub>5</sub>是V;X' a<sub>6</sub>是I;X' a<sub>7</sub>是K;X' a<sub>8</sub>是A;X' a<sub>9</sub>是P;X' a<sub>10</sub>是Q;X' a<sub>11</sub>是G;X' a<sub>12</sub>是R;X' a<sub>13</sub>是A;X' a<sub>14</sub>是K;X' a<sub>15</sub>是T;X' a<sub>16</sub>是R;X' a<sub>17</sub>是S;X' a<sub>18</sub>是R;X' a<sub>19</sub>是R;X' a<sub>20</sub>是D;X' a<sub>21</sub>是T;X' a<sub>22</sub>是S;X' a<sub>23</sub>是Q;X' a<sub>24</sub>是Q;X' a<sub>25</sub>是S;X' a<sub>26</sub>是S;X' a<sub>27</sub>是L;X' a<sub>28</sub>是A;X' a<sub>29</sub>是T;X' a<sub>30</sub>是K;X' a<sub>31</sub>是A;X' a<sub>32</sub>是S;X' a<sub>33</sub>是S;X' a<sub>34</sub>是S;X' a<sub>35</sub>是M;X' a<sub>36</sub>是P;X' a<sub>37</sub>是I;X' a<sub>38</sub>是T。

[0070] 在某些实施方式中,X' a<sub>1</sub>是Q;X' a<sub>2</sub>是V;X' a<sub>3</sub>是A;X' a<sub>4</sub>是V;X' a<sub>5</sub>是K;X' a<sub>6</sub>是V;X' a<sub>7</sub>是R;X' a<sub>8</sub>是A;X' a<sub>9</sub>是P;X' a<sub>10</sub>是Q;X' a<sub>11</sub>是G;X' a<sub>12</sub>是R;X' a<sub>13</sub>是V;X' a<sub>14</sub>是T;X' a<sub>15</sub>是I;X' a<sub>16</sub>是R;X' a<sub>17</sub>是S;X' a<sub>18</sub>是R;X' a<sub>19</sub>是R;X' a<sub>20</sub>是D;X' a<sub>21</sub>是T;X' a<sub>22</sub>是S;X' a<sub>23</sub>是Q;X' a<sub>24</sub>是Q;X' a<sub>25</sub>是S;X' a<sub>26</sub>是S;X' a<sub>27</sub>是L;X' a<sub>28</sub>是A;X' a<sub>29</sub>是T;X' a<sub>30</sub>是K;X' a<sub>31</sub>是A;X' a<sub>32</sub>是S;X' a<sub>33</sub>是S;X' a<sub>34</sub>是S;X' a<sub>35</sub>是M;X' a<sub>36</sub>是P;X' a<sub>37</sub>是I;X' a<sub>38</sub>是T。

[0071] 在某些实施方式中,X' a<sub>1</sub>是Q;X' a<sub>2</sub>是V;X' a<sub>3</sub>是A;X' a<sub>4</sub>是V;X' a<sub>5</sub>是V;X' a<sub>6</sub>是I;X' a<sub>7</sub>是K;X' a<sub>8</sub>是A;X' a<sub>9</sub>是P;X' a<sub>10</sub>是Q;X' a<sub>11</sub>是G;X' a<sub>12</sub>是R;X' a<sub>13</sub>是A;X' a<sub>14</sub>是K;X' a<sub>15</sub>是T;X' a<sub>16</sub>是R;X' a<sub>17</sub>是S;X' a<sub>18</sub>是R;X' a<sub>19</sub>是R;X' a<sub>20</sub>是D;X' a<sub>21</sub>是T;X' a<sub>22</sub>是S;X' a<sub>23</sub>是Q;X' a<sub>24</sub>是P;X' a<sub>25</sub>是S;X' a<sub>26</sub>是S;X' a<sub>27</sub>是L;X' a<sub>28</sub>是A;X' a<sub>29</sub>是T;X' a<sub>30</sub>是K;X' a<sub>31</sub>是A;X' a<sub>32</sub>是S;X' a<sub>33</sub>是S;X' a<sub>34</sub>是S;X' a<sub>35</sub>是L;X' a<sub>36</sub>是P;X' a<sub>37</sub>是I;X' a<sub>38</sub>是T。

[0072] 在某些实施方式中,X' a<sub>1</sub>是Q;X' a<sub>2</sub>是V;X' a<sub>3</sub>是A;X' a<sub>4</sub>是V;X' a<sub>5</sub>是K;X' a<sub>6</sub>是V;X' a<sub>7</sub>是R;X' a<sub>8</sub>是A;X' a<sub>9</sub>是P;X' a<sub>10</sub>是Q;X' a<sub>11</sub>是G;X' a<sub>12</sub>是R;X' a<sub>13</sub>是V;X' a<sub>14</sub>是T;X' a<sub>15</sub>是I;X' a<sub>16</sub>是R;X' a<sub>17</sub>是S;X' a<sub>18</sub>是R;X' a<sub>19</sub>是R;X' a<sub>20</sub>是D;X' a<sub>21</sub>是T;X' a<sub>22</sub>是S;X' a<sub>23</sub>是Q;X' a<sub>24</sub>是P;X' a<sub>25</sub>是S;X' a<sub>26</sub>是S;X' a<sub>27</sub>是L;X' a<sub>28</sub>是A;X' a<sub>29</sub>是T;X' a<sub>30</sub>是K;X' a<sub>31</sub>是A;X' a<sub>32</sub>是A;X' a<sub>33</sub>是S;X' a<sub>34</sub>是S;X' a<sub>35</sub>是L;X' a<sub>36</sub>是P;X' a<sub>37</sub>是I;X' a<sub>38</sub>是T。

[0073] 在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:65中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:66中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:68中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:68中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:66中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:66中所示的轻链可变区。在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体包含如SEQ ID NO:85中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:86中所示

的轻链可变区。

[0074] 本公开内容还提供了包含至少1、2、3、4、5或6个CDR的另一种分离的PD-L1抗体,所述CDR选自SEQ ID NO:29-46。在某些实施方式中,所述分离的PD-L1抗体包含:1)所述重链HCDR1'是SEQ ID NO:29、HCDR2'是SEQ ID NO:30和HCDR3'是SEQ ID NO:31;2)所述重链HCDR1'是SEQ ID NO:35、HCDR2'是SEQ ID NO:36和HCDR3'是SEQ ID NO:37;或者3)所述重链HCDR1'是SEQ ID NO:41、HCDR2'是SEQ ID NO:42和HCDR3'是SEQ ID NO:43。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含1)所述轻链LCDR1'是SEQ ID NO:32、LCDR2'是SEQ ID NO:33和LCDR3'是SEQ ID NO:34;2)所述轻链LCDR1'是SEQ ID NO:38、LCDR2'是SEQ ID NO:39和LCDR3'是SEQ ID NO:40;或者3)所述轻链LCDR1'是SEQ ID NO:44、LCDR2'是SEQ ID NO:45和LCDR3'是SEQ ID NO:46。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含1)所述重链HCDR1'是SEQ ID NO:29、HCDR2'是SEQ ID NO:30和HCDR3'是SEQ ID NO:31,所述轻链LCDR1'是SEQ ID NO:32、LCDR2'是SEQ ID NO:33和LCDR3'是SEQ ID NO:34;2)所述重链HCDR1'是SEQ ID NO:35、HCDR2'是SEQ ID NO:36和HCDR3'是SEQ ID NO:37,所述轻链LCDR1'是SEQ ID NO:38、LCDR2'是SEQ ID NO:39和LCDR3'是SEQ ID NO:40;或者3)所述重链HCDR1'是SEQ ID NO:41、HCDR2'是SEQ ID NO:42和HCDR3'是SEQ ID NO:43,所述轻链LCDR1'是SEQ ID NO:44、LCDR2'是SEQ ID NO:45和LCDR3'是SEQ ID NO:46。

[0075] 在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含选自下组的重链可变区:SEQ ID NO:55、57和59。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含选自下组的轻链可变区:SEQ ID NO:56、58和60。

[0076] 在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含SEQ ID NO:55所示的重链可变区或其人源化形式,以及SEQ ID NO:56所示的轻链可变区或其人源化形式。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含SEQ ID NO:57所示的重链可变区或其人源化形式,以及SEQ ID NO:58所示的轻链可变区或其人源化形式。在某些实施方式中,所述PD-L1抗体包含SEQ ID NO:59所示的重链可变区或其人源化形式,以及SEQ ID NO:60所示的轻链可变区或其人源化形式。

[0077] 本公开内容还提供了另一种分离的PD-L1抗体,所述抗体与本申请所述的PD-L1抗体结合至相同表位或与本申请所述的PD-L1抗体竞争性结合。在某些实施方式中,所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个:E58和S80。在某些实施方式中,其中所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个(例如,至少2个、3个或4个):Y56、R113、D122、Y123和R125。在某些实施方式中,所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1)E58、R113、D122、Y123和R125;2)Y56、E58和R113;3)E58、R113和R125。在某些实施方式中,其中所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个(或至少2个):S80和D122。在某些实施方式中,所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1)E58、S80、R113、D122、Y123和R125;2)E58、S80、R113和R125。

[0078] 本公开内容还提供了一种分离的PD-L1抗体,所述抗体具有高于76(例如,高于80、高于85或高于90)摄氏度的热转变中点( $T_m$ ),所述热转变中点通过差示扫描量热法测定。在某些实施方式中,本申请的所述抗体是双特异性抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、重组抗体、标记的抗体、二价抗体或抗独特型抗体。在某些实施方式中,所述抗体是选自下组的抗原结合片段:骆驼源化单结构域抗体、双功能抗体(diabody)、scFv、scFv二聚体、BsFv、dsFv、(dsFv)<sub>2</sub>、dsFv-dsFv'、Fv片段、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、ds双功能抗体、纳米抗体、结

构域抗体、分离的CDR和二价结构域抗体。

[0079] 在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体(如4B6、26F5、21F11、23A11、23F11和22C9)与人和非人灵长类动物的PD-L1结合,但不与小鼠PD-L1结合。在某些实施方式中,本申请所述的PD-L1抗体(如18G4)与人和小鼠PD-L1结合。

[0080] 本公开内容还涉及一种药物组合物,所述药物组合物包含本申请所述的抗体。

[0081] 本公开内容还涉及一种编码本申请所述的抗体的多核苷酸。本申请提供了一种载体,所述载体包含所述多核苷酸。本申请还提供了一种分离的宿主细胞,所述宿主细胞包含所述载体。在某些实施方式中,所述宿主细胞产生由所述多核苷酸编码的所述抗体。

[0082] 本公开内容还涉及一种试剂盒,所述试剂盒包含本申请所述的抗体。

[0083] 本公开内容还涉及一种生产本申请所述的抗体的方法,所述方法包括在表达所述多核苷酸的条件下培养所述宿主细胞。

[0084] 本公开内容还涉及一种治疗需要其的个体中与PD-L1相关的病况的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的本申请所述的抗体。在某些实施方式中,所述第二治疗剂是在放疗、化疗、靶向疗法、基因疗法、免疫疗法、激素疗法、血管生成抑制、姑息治疗、外科手术或其组合中使用的药剂。在某些实施方式中,所述第二治疗剂是VEGFR2抗体。

[0085] 本公开内容还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本申请所述的PD-L1抗体和第二治疗剂。

[0086] 在本公开内容中还提供了一种治疗需要其的个体中与PD-L1相关的病况的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的所述药物组合物。

[0087] 本公开内容还提供了一种分离的非人肿瘤细胞,所述肿瘤细胞包含编码人PD-L1蛋白的多核苷酸。在某些实施方式中,所述非人肿瘤细胞是啮齿动物(例如,小鼠、大鼠或仓鼠等)肿瘤细胞。

[0088] 本申请还提供了一种生产非人肿瘤细胞的方法,所述肿瘤细胞包含编码人PD-L1蛋白的多核苷酸,所述方法包括引入编码所述人PD-L1的多核苷酸。在某些实施方式中,所述方法还包括使内源性非人PD-L1基因失活。在某些实施方式中,所述失活包括破坏蛋白编码区的基因、突变、添加、基因沉默或基因缺失,从而使靶基因的表达消除或最小化,或者产生功能上失活/截短的蛋白。在某些实施方式中,将所述人PD-L1基因区段可操作地插入所述内源性非人PD-L1基因座。在某些实施方式中,在所述内源性非人PD-L1基因座以外的位点插入所述人PD-L1基因区段。在某些实施方式中,所述人PD-L1基因区段是游离DNA区段的形式。

[0089] 一种筛选或评估针对人PD-L1的抗体的体内药效的方法,所述方法包括将包含编码人PD-L1蛋白的多核苷酸的非人肿瘤细胞接种进非人动物,将所述抗体与所述非人动物中的所述非人肿瘤细胞接触,并且确定所述非人肿瘤细胞的肿瘤负荷。所述肿瘤细胞可以是实体肿瘤细胞或非实体肿瘤细胞。在某些实施方式中,将所述非人细胞接种到同系非人动物中以产生同系肿瘤模型。在某些实施方式中,所述非人动物是啮齿动物(例如,小鼠、大鼠或仓鼠等)。

[0090] 在一个方面,本公开内容提供了一种分离的PD-L1抗体,其中所述抗体与表位结合或竞争性地与所述表位结合,所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1) E58和S80;2) E58和R113;3) E58和D122;4) E58和R125。在某些实施方式中,所述表位还包含下述

PD-L1的氨基酸残基的至少一个:Y56和Y123。在某些实施方式中,所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1) E58、R113、M115、Y123和K124;2) E58、S80、R113和R125;3) E58、R113、D122、Y123和R125;4) Y56、E58和R113;5) E58、R113和R125。在某些实施方式中,所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个:K62、N63、I64和Y81。在某些实施方式中,所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1) E58、N63、I64、S80、Y81、R113和R125;2) E58、S80、R113、M115、D122、Y123、K124和R125;3) E58、K62、N63、S80、Y81、R113和R125;4) E58、N63、I64、S80、Y81、R113、K124和R125;5) E58、S80、R113、D122、Y123和R125。

[0091] 在一个方面中,本申请还提供了一种分离的PD-L1抗体,所述抗体与由PD-L1的氨基酸残基S80组成的表位结合或竞争性地与所述表位结合。

[0092] 在一个方面中,本公开内容提供了一种分离的PD-L1抗体,所述抗体具有至少7天(例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35或40天)的持续的PD-L1受体占据期。

[0093] 一种分离的PD-L1抗体,所述抗体以约0.03 $\mu$ g/ml的EC<sub>50</sub>值与活化的人T细胞结合,所述EC<sub>50</sub>值通过ELISA测定(例如,0.001 $\mu$ g/ml-1 $\mu$ g/ml(例如,0.001 $\mu$ g/ml-0.5 $\mu$ g/ml、0.001 $\mu$ g/ml-0.2 $\mu$ g/ml、0.001 $\mu$ g/ml-0.1 $\mu$ g/ml、0.01 $\mu$ g/ml-0.2 $\mu$ g/ml、0.01 $\mu$ g/ml-0.1 $\mu$ g/ml、0.01 $\mu$ g/ml-0.05 $\mu$ g/ml、0.01 $\mu$ g/ml-0.03 $\mu$ g/ml或0.001 $\mu$ g/ml-0.01 $\mu$ g/ml)的EC<sub>50</sub>值,所述EC<sub>50</sub>值通过ELISA测定,或者0.01 $\mu$ g/ml-1 $\mu$ g/ml(例如,0.01 $\mu$ g/ml-0.5 $\mu$ g/ml、0.01 $\mu$ g/ml-0.2 $\mu$ g/ml、0.02 $\mu$ g/ml-1 $\mu$ g/ml、0.02 $\mu$ g/ml-0.5 $\mu$ g/ml、0.02 $\mu$ g/ml-0.2 $\mu$ g/ml或0.02 $\mu$ g/ml-0.1 $\mu$ g/ml)的EC<sub>50</sub>值,所述EC<sub>50</sub>值通过FACS测定)。

## 附图说明

[0094] 图1A是表示在杂交瘤上清中的小鼠抗-PD-L1抗体阻断包被在板上的hPD-L1-Fc与hPD-1-his结合的能力的柱状图,图1B是表示在杂交瘤上清中的小鼠抗-PD-L1抗体阻断包被在板上的hPD-L1-Fc与hPD-1-his结合的能力的柱状图,并且图1C也是表示在杂交瘤上清中的小鼠抗-PD-L1抗体阻断包被在板上的hPD-L1-Fc与hPD-1-his结合的能力的柱状图,其通过ELISA测得。

[0095] 图2A是显示杂交瘤上清中的小鼠抗-PD-L1抗体23A11与hPD-L1-his的pH依赖性结合的图示说明,其在pH7.4下具有较高的结合(三角形),在pH6.0下具有较低的结合(菱形),其通过ELISA测定。图2B是显示杂交瘤上清中的小鼠抗体克隆23F11与hPD-L1的pH依赖性结合,其在pH7.4下具有较高的结合(三角形),在pH6.0下具有较低的结合(菱形),其通过ELISA测定。

[0096] 图3显示不同克隆系列稀释的纯化的小鼠单克隆PD-L1抗体(21F11(十字形)、23F11(菱形)、26F5(空心圆形)、22C9(空心三角形)、4B6(实心方形)、23A11(实心三角形))与hPD-L1的结合,其通过ELISA分析测定。

[0097] 图4A显示系列稀释的纯化的小鼠单克隆PD-L1抗体(23A11(浅灰色实心方形)、23F11(实心三角形)、4B6(实心圆形)、22C9(实心菱形)、26F5(黑色实心方形)、21F11(倒三角形)和BM-GT(空心圆形))阻断hPD-L1-Fc与hPD-1-N297A-生物素结合的活性,其通过ELISA测定;图4B显示10 $\mu$ g/ml的PD-L1抗体阻断hPD-1-Fc N297A与HCC827上表达的hPD-L1结合的活性,其通过FACS分析测定。

- [0098] 图5A显示小鼠纯化的PD-L1抗体与HCC827上表达的hPD-L1的剂量依赖性的结合；
- [0099] 图5B显示了小鼠纯化的PD-L1抗体阻断hPD-1-N297A与HCC827上表达的hPD-L1结合的剂量依赖性活性。21F11(圆形)、23A11(三角形)、23F11(倒三角形)、22C9(菱形)和4B6(大圆形)。
- [0100] 图6A(4B6-C)、图6B(23A11)、图6C(23F11)、图6D(22C9)和图6E(21F11)显示小鼠和/或嵌合PD-L1抗体与人和食蟹猴PD-L1-his相似地结合。而与人和食蟹猴PD-L1特异性结合的这些抗体不与小鼠PD-L1-his结合,其通过ELISA测定,但18G4除外,该抗体与人和小鼠PD-L1均结合(图6F)。图6G显示了所有抗体均能与hPD-L1结合,但不与hPD-L2结合,其通过ELISA测定。
- [0101] 图7显示了嵌合和/或人源化PD-L1抗体与HCC827上表达的hPD-L1结合,其通过FACS测定。
- [0102] 图8显示了嵌合和/或人源化PD-L1抗体阻断PD-1与HCC827上表达的hPD-L1的活性,其通过FACS测定。
- [0103] 图9A(18G4)、图9B(4B6)和图9C(23A11)是显示在竞争性抗体4B6、23A11、23F11、22C9和21F11存在的条件下PD-L1抗体与hPD-L1-Fc的表位结合结果的柱状图,其分别通过竞争ELISA测得。
- [0104] 图10A(23F11-C)、图10B(23A11-C)、图10C(22C9-C)、图10D(21F11-C)、图10E(4B6-C)和图10F(26F5-C)是显示嵌合PD-L1抗体在pH7.4和pH5.5下与hPD-L1-his pH-依赖性结合的图表,其分别通过ELISA测得。
- [0105] 图11A显示了在MC38/人-PD-L1敲入肿瘤模型中随着时间的推移测得的平均肿瘤体积,其表明纯化的小鼠抗-PD-L1抗体(4B6(实心菱形)、23A11(空心倒三角形)、23F11(实心条纹菱形)和26F5(空心菱形))和载剂(实心圆形)在体内抑制肿瘤生长方面的抗肿瘤活性;图11B显示了在第29天针对相同抗体的平均肿瘤体积;图11C显示了针对相同抗体随着时间的推移测得的平均体重。3次/周向小鼠腹腔注射(每组n=8)10mg/kg(即mpk)抗体,持续3周,结果以平均值±S.E.M表示。
- [0106] 图12A显示了在抑制肿瘤生长方面的活性,在MC38/hPD-L1敲入肿瘤模型中注射纯化的小鼠/嵌合PD-L1抗体(4B6-C(浅灰色实心三角形)、23F11(黑色实心倒三角形))以及参照抗体BM-GT(空心圆形)和BM-ME(空心方形)或对照PBS(实心圆形),随着时间的推移测得的平均肿瘤体积;图12B显示了持续3周,3次/周腹腔注射1mpk(mg/kg)所述抗体组(每组n=8)的各小鼠在第20天的平均肿瘤体积;图12C显示了静脉注射1mpk(浅灰色实心倒三角形)或3mpk(实心菱形)小鼠抗体18G4的各组小鼠(每组n=8)后随着时间的推移测得的平均肿瘤体积;图12D显示了静脉内注射1mpk(浅灰色实心倒三角形)或3mpk(实心菱形)小鼠抗体18G4的各组小鼠(每组n=8)在第25天的平均肿瘤体积;图12E显示静脉注射1mpk(空心圆形)或3mpk(空心方形)小鼠抗体22C9后的各组小鼠(每组n=8)随着时间的推移测得的平均肿瘤体积;图12F显示了静脉注射1mpk(空心圆形)或3mpk(空心方形)小鼠抗体22C9后的各组小鼠(每组n=8)在第25天的平均肿瘤体积;结果以平均值±S.E.M表示。
- [0107] 图13A显示了在MC38/人-PD-L1敲入肿瘤模型中随着时间的推移测得的平均肿瘤体积,其显示了纯化的pH依赖性嵌合PD-L1抗体(23A11-C空心圆形,23F11-C空心三角形)在体内抑制肿瘤生长方面的抗肿瘤活性;图13B显示了在第29天的平均肿瘤体积;3次/周向小

鼠(每组n=8)腹腔注射1mpk抗体,持续3周,结果以平均值±S.E.M表示,P为<0.05。载体以实心圆形表示,并且参照抗体GT以实心倒三角形表示。

[0108] 图14A显示了4B6的重链种系和人源化可变区的氨基酸序列(4B6-种系、4B6-Hzd-HC-V3和4B6-HC-V4),图14B显示了4B6的轻链种系和人源化可变区的氨基酸序列(4B6 LC种系、4B6-Hzd-LC-V3和4B6-LC-V4)。

[0109] 图15A显示了23A11抗体的重链种系和人源化可变区的氨基酸序列(23A11-HC-种系、23A11-HC-V3和23A11-HC-V5),图15B显示了23A11抗体的轻链种系和人源化可变区的氨基酸序列(23A11-LC-种系、23A11-LC-V3和23A11-LC-V5)。

[0110] 图16A显示了23F11抗体的种系和人源化重链可变区的氨基酸序列(23F11种系HC、23F11-HC-V4和23F11-HC-V6),并且图16B显示了23F11抗体的种系和人源化轻链可变区的氨基酸序列(23F11种系LC、23F11-LC-V4和23F11-LC-V6)。

[0111] 图17A是显示23F11抗体(H4L4、H4L6、H6L4、H6L6和嵌合)与hPD-L1-his结合的柱状图,图17B显示了人源化23A11抗体(H3L3、H3L5、H5L3和H5L5)与hPD-L1-his的结合,其通过ELISA测定。

[0112] 图18A至图18D是显示通过ELISA测得的人源化PD-L1抗体阻断hPD-L1-Fc与hPD-1-N297A结合的活性的柱状图。图18A至图18D分别显示了人源化4B6(H3L3、H3L4、H4L3和H4L4,图18A)、23F11(H4L4、H4L6、H6L4、H6L6和嵌合(C),图18B)、人源化23A11(H3L3、H3L5、H5L3和H5L5,图18C)、人源化23A11(H3L3和H3L5)和人源化23F11(H4L4)以及参照抗体(BM-GT和BM-ME,参见图18D)的结果。

[0113] 图19显示了通过FACS测得的人源化PD-L1抗体(BM-GT、BM-ME、4B6-H3L4、4B6-H4L3、23F11-H4L4、23F11-H4L6、23F11-H6L4、23F11-H6L6、23A11-H3L3、23A11-H3L5、23A11-H5L3和23A11-H5L5)与HCC827上表达的hPD-L1的结合。

[0114] 图20A是显示通过FACS测得的人源化4B6(H3L4和H4L3)和参照抗体(BM-GT和BM-ME)阻断hPD-1-N297A与HCC827上表达的hPD-L1结合的活性的柱状图。图20B显示了通过FACS测得的人源化23A11 H3L5(分别在CHO和293细胞中产生)、人源化23F11 H4L4(分别在CHO和293细胞中产生)和参照抗体(BM-GT和BM-ME)阻断hPD-1-N297A与HCC827上表达的hPD-L1结合的活性。

[0115] 图21A是说明在混合淋巴细胞反应(MLR)中由人源化4B6-H3L3抗体、hIgG1、BM-GT和BM-ME刺激活化的供体5CD4 T细胞中产生的IL-2的柱状图。图21B显示了在相同实验中由人源化4B6-H3L3抗体、hIgG1、BM-GT和BM-ME刺激活化的供体5CD4 T细胞中产生的IFN- $\gamma$ 。图21C显示了在相同实验中由人源化抗体23A11-H3L3、23A11-H3L5、23F11-H4L4和23F11-H6L4以及hIgG1、BM-GT和BM-ME刺激活化的供体6CD4 T细胞中产生的IL-2。图21D显示了在相同实验中由人源化抗体23A11-H3L3、23A11-H3L5、23F11-H4L4和23F11-H6L4以及hIgG1、BM-GT和BM-ME刺激活化的供体6CD4 T细胞中产生的IFN- $\gamma$ 。

[0116] 图22A和22C分别显示了通过ELISA测得的在CHO细胞和293细胞中产生的人源化23A11-H3L5在pH7.4(三角形)和pH5.5(菱形)下与hPD-L1-his的pH依赖性结合;图22B和22D显示了通过ELISA测得的在相同细胞中产生的人源化23F11-H4L4在pH7.4(三角形)和pH5.5(菱形)下与hPD-L1-his的结合;图22E显示了通过ELISA测得的分别在pH7.4(三角形)和pH5.5(菱形)下对参照抗体BM-GT与hPD-L1-his的结合进行的相同实验。

[0117] 图23A显示通过ELISA测得的在中性pH(即7.4)和酸性pH(即6.0、5.5、5.0、4.5、4.0)下23A11-H3L5与hPD-L1-his的pH依赖性结合;图23B显示了将23A11-H3L5的相同结果以归一化至pH 7.4信号的百分比;图23C表示通过ELISA测得的在中性pH(即7.4)和酸性pH(即6.0、5.5、5.0、4.5、4.0)下23F11-H4L4与hPD-L1-his的pH依赖性结合;图23D显示了将23F11-H4L4的相同结果以归一化至pH 7.4信号的百分比;图23E表示通过ELISA测得的在中性pH(即7.4)和酸性pH(即6.0、5.5、5.0、4.5、4.0)下22C9-C与hPD-L1-his的pH依赖性结合;图23F显示了将22C9-C的相同结果以归一化至pH 7.4信号的百分比。在图23的所有图中, pH7.4(灰色圆形), pH6.0(黑色圆形), pH 5.5(黑色方形), pH 5.0(灰色倒三角形), pH 4.5(灰色菱形), pH 4.0(灰色三角形)。

[0118] 图24A至图24I是显示通过ELISA测得的PD-L1抗体(23F11(图24A), 23A11(图24B), 26F5(图24C), 18G4(图24D), 4B6(图24E), 21F11(图24F), 22C9(图24G), 23F11-H4L4(图24H)和23A11-H3L5(图24I))与丙氨酸突变的hPD-L1-Fc(在实施例18中产生)结合的柱状图。

[0119] 图25显示了在MC38/人PD-L1 KI肿瘤模型中注射人源化PD-L1抗体(实心圆形表示载剂, 空心方形表示BT-GM以及空心圆形表示4B6-H3L3-N297A), 其抗肿瘤活性以随时间变化的平均肿瘤体积表示, 3次/周(每组n=8)腹腔注射3mpk抗体, 持续3周, 结果以平均值±S.E.M表示。

[0120] 图26A显示了在给予了载剂(实心圆形)、BM-ME(空心方形)、BM-GT(空心菱形)、23A11-H3L5(空心三角形)和23F11-H4L4(空心倒三角形)的MC38/人-PD-L1敲入肿瘤模型中测得的平均肿瘤体积随时间变化的情况, 结果表明人源化PD-L1抗体在体内抑制肿瘤生长方面具有抗肿瘤活性;图26B显示了注射了1mpk抗体的小鼠在第28天的平均肿瘤体积;图26C显示了与图26A相同的实验, 但使用10mpk抗体;图26D显示了与图26B进行相同的实验, 但使用10mpk抗体;图26E比较注射了不同抗体及剂量(实心圆形表示载剂, 实心菱形表示1mpk BM-GT, 实心倒三角形表示3mpk BM-GT, 实心方形表示10mpk BM-GT和空心圆形表示1mpk 23F11-H4L4)的小鼠中的肿瘤体积。3次/周向小鼠(每组n=8)腹腔注射抗体, 持续3周结果以平均值±S.E.M表示。

[0121] 图27A显示了在MC38/人-PD-L1敲入肿瘤模型中注射人源化PD-L1抗体后的平均肿瘤体积随时间变化的情况, 表明抗体在抑制肿瘤生长方面具有体内抗肿瘤活性(实心圆形表示载剂, 空心三角形表示BM-GT, 空心圆形表示23A11-H3L5和虚线空心圆形表示23F11-H4L4)。图27B显示了给予抗体的各组小鼠在第26天的平均肿瘤体积(实心圆形表示载剂, 实心三角形表示BM-GT, 实心倒三角形表示23A11-H3L5和空心圆形表示23F11-H4L4)。在第0天和第15天向小鼠(每组n=12)静脉注射1mpk抗体, 结果以平均值±S.E.M表示。

[0122] 图28A至图28D是显示以静脉注射1mg/kg PD-L1抗体(载剂(图28A), BM-GT(图28B), 23A11-H3L5(图28C)和23F11-H4L4(图28D))处理的小鼠, 其肿瘤大小归一化至初始点的肿瘤尺寸变化情况的瀑布图。

[0123] 图29A显示了在静脉注射给予不同剂量PD-L1抗体(实心圆形表示载剂, 空心方形表示1mpk BM-GT, 实心方形表示10mpk BM-GT, 实心菱形表示1mpk 23F11-H4L4, 实心倒三角形表示10mpk 23F11-H4L4, 空心圆形表示1mpk 23A11-H3L5, 实心三角形表示10mpk 23A11-H3L5)的MC38/人-PD-L1敲入肿瘤模型中在抑制肿瘤生长方面测定的平均肿瘤体积随时间变化的情况, 表明其具有体内抗肿瘤活性。图29B显示了给予了不同抗体(实心圆形表示载

剂,黑色空心方形表示1mpk BM-GT,浅色空心方形表示10mpk BM-GT,浅色空心圆形表示1mpk 23A11-H3L5,黑色空心三角形表示10mpk 23A11-H3L5,黑色空心圆形表示1mpk 23F11-H4L4和黑色空心倒三角形表示10mpk 23F11-H4L4)的各组小鼠在第15天的平均肿瘤体积。在第0天向小鼠(每组n=12)静脉注射抗体,结果以平均值±S.E.M表示。

[0124] 图30显示了在第35天用肿瘤细胞再攻毒的MC38/人-PD-L1敲入肿瘤模型中,人源化PD-L1抗体23A11-H3L5(三角形)和23F11-H4L4(圆形)的体内抗肿瘤活性。

[0125] 图31A显示了染料标记的pH依赖性PD-L1抗体23F11-H4L4和BM-GT在静脉注射1mg/kg剂量后,在不同时间点渗透进入MC38/hPD-L1肿瘤细胞的抗体辐射信号的图像;图31B显示了在各小鼠中测得的辐射/肿瘤体积比随小时变化的情况(对于BM-GT,2-1(灰色倒三角形),2-2(实心灰色菱形),2-3(空心灰色圆形),以及对于23F11-H4L4,4-1(黑色空心菱形),4-2(黑色实心菱形),4-3(黑色星形));图31C显示了在给予BM-GT(方形)或23F11-H4L4(倒三角形)的各小鼠中测得的肿瘤体积随天数变化的情况,线条表示平均值。

[0126] 图32A显示了在分别给予载剂(实心圆形)、仅DC101(空心方形表示的抗-VEGFR2抗体)、仅23A11-C(空心倒三角形)以及23A11-C和DC101的组合(空心圆形)的hPD-L1/MC38小鼠肿瘤模型中测得的平均肿瘤体积随时间变化的情况,表示组合具有体内抗肿瘤活性;图32B显示了分别注射载剂(实心圆形)、仅DC101(实心方块表示的抗-VEGFR2抗体)、仅23A11-C(实心倒三角形)以及23A11-C和DC101组合(实心菱形)的小鼠在第29天的平均肿瘤体积;图32C显示了分别给予载剂(实心圆形)、仅DC101(实心方形表示的抗-VEGFR2抗体)、仅23A11-C(实心倒三角形)以及23A11-C和DC101组合(实心菱形)的小鼠在相同实验中测得的平均小鼠体重随时间变化的情况,并且每周3次向小鼠(每组n=8)静脉注射0.3mpk 23A11-C和/或20mpk DC101,持续3周。图32D表明分别给予了10mpk对照IgG(实心圆形)、仅1mpk DC101(实心方块)、仅1mpk 23A11-H3L5(实心菱形)以及1mpk 23A11-H3L5和1mpk DC101组合(实心三角形)的小鼠测得的平均肿瘤体积随时间变化的情况;图32E显示了分别给予了10mpk对照IgG(实心圆形)、仅3mpk DC101(实心三角形)、仅3mpk 23A11-H3L5(空心圆形)以及3mpk 23A11-H3L5与3mpk DC101的组合(空心倒三角形)的小鼠测得的平均肿瘤体积随时间变化的情况。每周一次(每组n=8)静脉注射抗体,持续2-3周。结果以平均值±S.E.M表示。

[0127] 图33A和图33B分别示出了通过差示扫描量热法(DSC)测得的23F11-H4L4和23A11-H3L5的热转变中点(T<sub>m</sub>)的图表。

[0128] 图34显示了本公开内容中描述的序列表。

[0129] 图35显示了23F11-H4L4内吞进入MC38/hPD-L1细胞的图表。Y轴显示通过Varioskan Flash测得的在不同抗体浓度下内吞进细胞中23F11-H4L4的荧光信号。灰色小圆形表示24小时后测得的23F11-H4L4,以及黑色大圆形表示6小时后测得的23F11-H4L4。

[0130] 图36A和图36B显示了23F11-H4L4与活化的人T细胞的结合。图36A显示了23F11-H4L4与CD3和CD28阳性单核细胞的结合,而在CD3和CD28阴性单核细胞中几乎没有结合。

[0131] 图37A-37C显示了PD-L1抗体在接种MC38/hPD-L1细胞的人PD-1敲入小鼠模型中的体内有效性研究。图37A显示了在分别施用了PBS和23F11-H4L4的人PD-1敲入C57BL/6小鼠中肿瘤体积随时间变化的情况。图37B显示了在分别以静脉注射PBS或3mg/kg PD-L1抗体处理的每只小鼠肿瘤大小归一化至起始点的肿瘤尺寸变化情况。图37C显示了分别给予PBS

(实心圆形) 和23F11-H4L4(实心方形)的小鼠在相同实验中测得的平均小鼠体重随时间变化的情况。

[0132] 图38A-38C显示了PD-L1抗体在接种MC38/hPD-L1细胞的人PD-1敲入小鼠模型中的体内有效性研究。图38A和38B显示了在分别施用了23F11-H4L4(1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg),对照hIgG(AB160160,10mg/kg)和BM-GT(10mg/kg)的人PD-1敲入C57BL/6小鼠中肿瘤体积随时间变化的情况。图38C显示了在分别以腹腔注射PD-L1抗体、对照hIgG或BM-GT处理的每只小鼠肿瘤大小归一化至起始点的肿瘤尺寸变化情况。

[0133] 图39显示了在具有MC38/hPD-L1肿瘤的小鼠中静脉注射23F11-H4L4和BM-GT后第2、7和14天测得的PD-L1受体占据比例。

[0134] 图40显示了10mpk给药后第7天23F11-H4L4和TIL在MC38/hPD-L1 CDx冰冻肿瘤切片上的浸润图像。图A:用Alexa Fluor 488山羊抗-人IgG(H+L)二抗染色的23F11-H4L4(绿色);图B:用Alexa Fluor® 594抗-小鼠CD8b.2染色的TIL(红色);图C:用Alexa Fluor® 594抗-小鼠CD31染色的血管(红色);图D:阴性对照。用DAPI进行核染色(蓝色)。

## 具体实施方式

[0135] 本申请的以下描述只为说明本申请的多种实施方式。因此,此处讨论的具体修改方式不应理解为对申请范围的限制。本领域的技术人员在不偏离本申请范围的情况下即可很容易地得出多种等同方式,变化和修改,应理解这样的等同实施方式包括在本发明范围内。在本申请中引用的所有文献,包括公开出版物、专利和专利申请都通过引用的方式全文并入。

### [0136] 定义

[0137] 本发明中的“PD-L1”(也称为B7-H1/CD274)一词指程序性细胞死亡配体1(PD-L1,参见例如Freeman等(2000)J.Exp.Med.192:1027)。其在胎盘、脾脏、淋巴结、胸腺、心脏、胎儿肝脏中表达,并且也存在于多种肿瘤或癌细胞上。“PD-L2”指程序性细胞死亡配体2(PD-L2,参见例如Latchman等,(2001)Nat.Immunol.2:261)。“PD-1”(也称为CD279)指程序性细胞死亡蛋白1,其为CD28家族的成员,由PDCD1基因编码,并且是在T细胞表面上表达的一种抑制性受体,功能是在生理上限制T细胞的活化和增殖。代表性的人PD-1氨基酸序列如NCBI登录号:NP\_005009.2所示,并且代表性的人PD-1核酸序列如NCBI登录号:NM\_005018.2所示。“PD-1配体”包括PD-L1和PD-L2两者或两者之一,以及其由细胞天然表达的任何变体或异构体,和/或其具有全长多肽的至少一种生物活性的片段。人PD-L1的序列如NCBI登录号:NP\_054862.1(代表性的氨基酸序列)和NCBI登录号:NM\_014143.3所示(代表性的核酸序列)。

[0138] 本发明中的“抗体”一词包括任意可结合某特定抗原的免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体或双特异性(二价)抗体或其功能性片段。一个天然的完整抗体包含通过二硫键彼此连接的两条重链(H)和两条轻链(L)。每条重链由一可变区(VH)和第一、第二、第三恒定区(分别为CH1、CH2和CH3)组成,每条轻链由一可变区(VL)和一恒定区(CL)组成。哺乳动物的重链可分为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ ,哺乳动物的轻链可分为 $\lambda$ 或 $\kappa$ 。轻链和重链的可变区决定抗原的结合。每条链的可变区通常分成三个高变区,称互补决定区(CDR)(轻链(L)的CDR包含LCDR1、LCDR2、LCDR3,重链(H)的CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本

发明中公开的抗体和抗原结合片段的CDR边界可通过Kabat, Chothia或Al-Lazikani命名法命名或辨别。(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 273 (4), 927 (1997); Chothia, C. 等, J Mol Biol Dec

[0139] 5;186 (3) :651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 196, 901 (1987); Chothia, C.

[0140] 等, Nature. Dec 21-28; 342 (6252) :877-83 (1989); Kabat E.A. 等, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)。其中,三个CDR由被称为框架区(FR)的侧翼延伸部分间隔开,框架区比CDR更加高度保守并形成一个支架支撑超变环。因此,VH和VL各自以下述顺序(从氨基酸残基的N末端至C末端)包含三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的恒定区与抗原结合无关,但具有多种效应功能。抗体依据重链恒定区的氨基酸序列分成五个主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其分别含有 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和 $\mu$ 重链。几个主要的抗体类别的亚类为,如IgG1 ( $\gamma$  1重链)、IgG2 ( $\gamma$  2重链)、IgG3 ( $\gamma$  3重链)、IgG4 ( $\gamma$  4重链)、IgA1 ( $\alpha$ 1重链)或IgA2 ( $\alpha$ 2重链)等。

[0141] 本发明中的“抗原结合片段”一词,指由含有一个或多个CDR的抗体片段或者任何其他结合抗原但不具有完整天然抗体结构的抗体的片段所形成的一种抗体片段。在某些实施方式中,本申请所述的抗体是抗原结合片段。抗原结合片段的例子包括,但不限于,双功能抗体(diabody)、Fab、Fab'、 $F(ab')$ <sub>2</sub>、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)<sub>2</sub>、双特异性dsFv(dsFv—dsFv')、二硫键稳定的双功能抗体(ds diabody)、单链抗体分子(scFv)、scFv二聚体(二价的双功能抗体)、多特异性抗体、骆驼化单域抗体(camelized single domain antibody)、纳米抗体、域抗体、分离的CDR和二价域抗体。抗原结合片段可以与亲本抗体结合相同的抗原。在某些实施方式中,抗原结合片段可以含有来自特定人抗体的一个或多个CDR。

[0142] 抗体的“Fab”片段是指抗体的单价抗原结合片段,其由一条轻链(包括可变区和恒定区)和一条重链的可变区和第一恒定区经二硫键结合组成。Fab可以通过在抗体铰链区的重链之间近二硫键N-末端的残基处经由木瓜蛋白酶消化来获得。

[0143] “Fab'”指包含了部分铰链区的Fab片段,其可以通过抗体在铰链区的重链之间的近二硫键C末端的残基处由胃蛋白酶消化来获得,因此其与Fab在铰链区有少量残基(包括一个或多个半胱氨酸)的不同。

[0144] “ $F(ab')$ <sub>2</sub>”是指Fab'的二聚体,其包含两条轻链和两条重链的一部分。

[0145] 抗体的“Fc”是指由第一重链的第二、第三恒定区经二硫键与第二重链的第二和第三恒定区结合组成的抗体部分。IgG和IgM的Fc区含有三个重链恒定区(在每条链中的第二、第三和第四重链恒定区)。其可以通过抗体的木瓜蛋白酶消化获得。抗体的Fc段负责多种不同的效应功能如ADCC和CDC,但不参与抗原的结合。

[0146] 抗体的“Fv”段指的是含有完整抗原结合位点的最小抗体片段。Fv片段由一条轻链的可变区结合至一条重链的可变区组成。“dsFv”指二硫键稳定的Fv片段,其单个轻链可变区与单个重链可变区之间的键是二硫键。

[0147] “单链Fv抗体”或“scFv”是指由轻链可变区与重链可变区直接相连或通过一个多肽连接子序列连接而成的工程化抗体(Huston JS等, Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879 (1988))。“scFv二聚体”是指包含通过连接子连接的两个重链可变区和两个轻链可变区的

单链。在某些实施方式中，“scFv二聚体”是二价双功能抗体或二价ScFv (BsFv) ,其包含与另一 $V_H$ - $V_L$ 部分二聚化的 $V_H$ - $V_L$  (通过一个肽连接子连接) ,以使得一个部分的 $V_H$ 与另一部分的 $V_L$ 配位并形成能够靶向相同抗原 (或表位) 或不同抗原 (或表位) 的两个结合位点。在其他实施方式中，“scFv二聚体”是双特异性双功能抗体,其包含 $V_{H1}$ - $V_{L2}$  (通过一个肽连接子连接) 与 $V_{L1}$ - $V_{H2}$  (也是通过一个肽连接子连接) 结合,以使得 $V_{H1}$ 与 $V_{L1}$ 配位且 $V_{H2}$ 与 $V_{L2}$ 配位,并且每个配位对具有不同的抗原特异性。

[0148] “单链Fv-Fc抗体”或“scFv-Fc”是指由scFv连接到抗体Fc区组成的工程化抗体。

[0149] “骆驼化单域抗体 (Camelized single domain antibody)”、“重链抗体”、“纳米抗体”或“HCAb”都是指含有两个 $V_H$ 域而不含有轻链的抗体 (Riechmann L. 和Muyldermans S. , J Immunol Methods. Dec 10; 231 (1-2) : 25-38 (1999) ; Muyldermans S. , J Biotechnol. Jun; 74 (4) : 277-302 (2001) ; W094/04678; W094/25591; 美国专利号6,005,079)。重链抗体最初从驼科 (骆驼、单峰驼和美洲驼) 得到。虽然缺失轻链,骆驼化抗体 (camelized antibodies) 有确证的抗原结合全部功能 (Hamers-Casterman C等, Nature. Jun 3; 363 (6428) : 446-8 (1993) ; Nguyen VK. 等, “Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation,” Immunogenetics. Apr; 54 (1) : 39-47 (2002) ; Nguyen VK. 等, Immunology. May; 109 (1) : 93-101 (2003) )。重链抗体的可变区 (VHH 域) 是最小的已知的获得性免疫产生的抗原结合单位 (Koch-Nolte F. 等, FASEB J. Nov; 21 (13) : 3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007) )。“双功能抗体 (diabody)”包括带有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中该片段含有在同一条多肽链上相连的 $V_H$ 域和 $V_L$ 域 ( $V_H$ - $V_L$ 或 $V_H$ - $V_L$ ) (参见例如 Holliger P. 等, Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 15; 90 (14) : 6444-8 (1993) ; EP404097; W093/11161)。同一条链上的两个域由于连接子过短而不能配对,因此迫使两个域与另一条链的互补域配对,形成两个抗原结合位点。这两个抗原结合位点可靶向结合相同或不同的抗原 (或抗原表位)。

[0150] “域抗体”是指仅含有重链可变区或轻链可变区的抗体片段。在某些实施方式中,两个或多个 $V_H$ 域由一个肽连接子共价结合以形成二价或多价域抗体。二价域抗体的两个 $V_H$ 域可靶向作用于相同或不同的抗原。

[0151] 在某些实施方式中,“ $(dsFv)_2$ ”含有三条肽链:两个 $V_H$ 部分间通过肽连接子相连,并通过二硫键与两个 $V_L$ 部分结合。

[0152] 在某些实施方式中,“双特异性ds双功能抗体”含有 $V_{H1}$ - $V_{L2}$  (由肽连接子相连) 与 $V_{L1}$ - $V_{H2}$  (也是由肽连接子相连) 通过在 $V_{H1}$ 和 $V_{L1}$ 间的二硫键结合。

[0153] 在某些实施方式中,“双特异性dsFv”或“dsFv-dsFv”含有三条肽链: $V_{H1}$ - $V_{H2}$ 部分,其中两者的重链通过肽连接子 (如:长的柔性连接子) 相结合,并通过二硫键分别与 $V_{L1}$ 和 $V_{L2}$ 部分配对。每对通过二硫键配对的重链轻链具有不同的抗原特异性。

[0154] 本申请中使用的术语“人源化”或“人源化版本”当用于抗体或抗原结合片段时,是指包括来源于非人动物 (例如,啮齿动物、家兔、犬、山羊、马或鸡) 的CDR、来源于人的FR区,以及来源于人的恒定区 (当适用时) 的抗体或抗原结合片段。在某些实施方式中,来自人抗体的恒定区与非人可变区融合。人源化抗体或抗原结合片段可用作人用治疗剂,因为其与非人物种抗体相比具有降低的免疫源性,或者在人体内诱导免疫应答的可能性更小。在一些实施方式中,所述非人动物是哺乳动物例如小鼠、大鼠、家兔、山羊、绵羊、豚鼠、仓鼠或非

人灵长动物(例如,猴(例如,食蟹猴或恒河猴)或猿(例如,黑猩猩、大猩猩、类人猿或猴(affen))。在一些实施方式中,所述人源化抗体或抗原结合片段除了CDR序列是非人源的以外,基本上全部由人源序列组成。在一些实施方式中,对人源化抗体或抗原结合片段进行修饰以改善抗体性能,如结合或结合亲和性。例如,改变一个或多个非人CDR中的一个或多个氨基酸残基以降低在人体内的潜在免疫原性,其中改变的氨基酸残基对免疫特异性结合不起关键作用,或者改变是保守性改变,以使得人源化抗体与抗原的结合不受到显著影响。在一些实施方式中,所述来源于人的FR区可以包括与其来源的人源抗体相同的氨基酸序列,或其可以包括一些氨基酸改变,例如,不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸改变。在一些实施方式中,该氨基酸改变可以仅存在于重链FR区、仅存在于轻链FR区或同时存在于两个链中。在一些优选实施方式中,所述人源化抗体包括人源FR1-3和人源JH和J $\kappa$ 。

[0155] 本申请中使用的术语“嵌合”是指具有来源于一个物种的重链和/或轻链的一部分,且所述重链和/或轻链其余部分来源于不同物种的抗体或抗原结合片段。在一个示例性的例子中,嵌合抗体可以包括来源于人的恒定区和来源于非人动物物种(例如小鼠)的可变区。

[0156] 本申请中使用的“抗-PD-L1抗体”是指能够特异性结合PD-L1(例如,人或非人灵长动物PD-1)的抗体,其具有足以提供诊断和/或治疗用途的亲和性。

[0157] 在本申请中的“基本上”、“基本上相同”是指两个数值之间具有较高的相似度,并且本领域技术人员将不会识别或考虑这两个值之间有显著差异,或者在由其值所示的统计学和/或生物活性方面几乎没有差异。相比之下,“基本上更低”是指数值低于约50%、低于约40%、低于约30%、低于约20%、低于约10%的参照值。

[0158] 本申请中的“特异性结合”或“特异性的结合”是指,指两分子间的非随机结合反应,如抗体和抗原间的反应。在某些实施方式中,本申请的抗体或抗原结合片段与人和/或非人灵长类动物PD-1特异性结合,并且在pH 7.4下其结合亲和力( $K_D$ )为约0.01nM至约100nM、约0.1nM至约100nM、0.01nM至约10nM、约0.1nM至约10nM、0.01nM至约1nM、约0.1nM至约1nM,或者约0.01nM至约0.1nM。本申请中的 $K_D$ 是指解离速率与结合速率的比值( $k_{off}/k_{on}$ ),可通过表面等离子体共振的方法测定,例如使用如Biacore的仪器。

[0159] 本申请中的“阻断结合”或“竞争相同表位”的能力是指抗体或其抗原结合片段将两个分子间结合(例如人PD-L1和抗-PD-L1抗体)的相互作用抑制到任何可检测的程度的能力。在某些实施方式中,阻断两个分子间结合的抗体或抗原结合片段可将两个分子间结合的相互作用抑制至少50%。在某些实施方式中,这样的抑制作用可以大于60%,大于70%,大于80%,或大于90%。

[0160] 本申请中使用的术语“表位”是指抗原上与抗原结合蛋白(如抗体)结合的特定的原子基团(例如,糖侧链、磷酰基、磺酰基)或氨基酸。表位可以是构象型的或线形的。由于蛋白的三维三级折叠,构象型表位可以包含不连续的但在空间上相邻的氨基酸残基,其中这种残基直接有助于相互作用的亲和性,并且在暴露于变性溶剂时将失去相互作用的能力。相比之下,线形表位的所有相互作用位点沿蛋白上的一级氨基酸残基线形排布,并且连续氨基酸的小区段可以由与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原消化获得,或者在暴露于变性溶剂后被保留(Salmerón A等,J Immunol.1991 Nov 1;147 (9):3047-52; Goldsby等,Immunology (Fifth ed.).New York:W.H.Freeman and Company.pp.57-

75. ISBN0-7167-4947-5)。在本公开内容的一个实施方式中,与本申请所述的PD-L1抗体结合的表位是构象型的。在本公开内容的另一个实施方式中,与本申请公开的PD-L1抗体结合的表位是线形的。如果两种抗体表现出对抗原的竞争性结合,则可能结合抗原上的相同表位。例如,如果抗体或抗原结合片段阻断本公开内容的示例抗体(如21F11、18G4、4B6、26F5、23A11、23F11、22C9,其嵌合抗体,人源化4B6、人源化23A11和人源化23F11)与人PD-1的结合,那么所述抗体或其抗原结合片段可以被认为与那些示例的抗体结合相同的表位。

[0161] 可以将表位中的特定氨基酸残基突变(例如,通过丙氨酸扫描诱变),并且鉴定减少或阻止蛋白结合的突变。“丙氨酸扫描诱变”是一种能够用于鉴定蛋白的某些残基或区域的方法,这些残基或区域影响表位同与其结合的另一化合物或蛋白的相互作用。蛋白中的残基或目标残基组被中性或带负电荷的氨基酸(最优选的是丙氨酸或聚丙氨酸,或者保守性氨基酸替代)取代。氨基酸残基或编码其的密码子的任何下述突变都可能在与蛋白结合的表位内,该突变对蛋白结合的减少超过阈值,或者对蛋白结合的减少达到高于其他突变的最大程度。在本公开内容的某些实施方式中,对pH依赖性PD-L1抗体至关重要的表位包含氨基酸残基E58、N63、S80、Y81和I64中的至少一个。

[0162] 下文中所述的序列可以参见图34。

[0163] 本申请中的“18G4”是指具有如SEQ ID NO:55(对应的编码DNA序列为SEQ ID NO:93)所示的重链可变区和如SEQ ID NO:56(对应的编码DNA序列为SEQ ID NO:94)所示的轻链可变区的小鼠单克隆抗体。其嵌合抗体(即18G4-C/18G4-嵌合)包含与小鼠可变区融合的IgG1同种型人恒定区。

[0164] 本申请中的“4B6”是指具有如SEQ ID NO:85所示的重链可变区和如SEQ ID NO:86所示的轻链可变区的小鼠单克隆抗体。其嵌合抗体(即4B6-C/4B6-嵌合)包含与小鼠可变区融合的IgG1同种型人恒定区。将抗体的重链和轻链人源化以产生人源化重链(H1对应于序列SEQ ID NO:81;H2对应于序列SEQ ID NO:83;H3对应于序列SEQ ID NO:65(其编码DNA序列为SEQ ID NO:99);以及H4对应于序列SEQ ID NO:67)和轻链(L1对应于序列SEQ ID NO:82,L2对应于序列SEQ ID NO:84,L3对应于序列SEQ ID NO:66(其编码DNA序列为SEQ ID NO:100),以及L4对应于序列SEQ ID NO:68),从而产生人源化抗体,如4B6-H3L3、4B6-H3L4、4B6-H4L3和4B6-H4L4。还可以在CHO细胞中产生人源化抗体,用于小规模/大规模生产在Fc区的第297位处由N突变为A的抗体。

[0165] 本申请中的“26F5”是指具有如SEQ ID NO:59(其编码DNA序列为SEQ ID NO:97)所示的重链可变区和如SEQ ID NO:60(其编码DNA序列为SEQ ID NO:98)所示的轻链可变区的小鼠单克隆抗体。其嵌合抗体(即26F5-C/26F5-嵌合)包含与小鼠可变区融合的IgG1同种型人恒定区。

[0166] 本申请中的“21F11”是指具有如SEQ ID NO:57(其编码DNA序列为SEQ ID NO:95)所示的重链可变区和如SEQ ID NO:58(其编码DNA序列为SEQ ID NO:96)所示的轻链可变区的小鼠单克隆抗体。其嵌合抗体(即21F11-C/21F11-嵌合)包含与小鼠可变区融合的IgG1同种型人恒定区。

[0167] 本申请中的“23A11”是指具有如SEQ ID NO:73所示的重链可变区和如SEQ ID NO:74所示的轻链可变区的小鼠单克隆抗体。其嵌合抗体(即23A11-C/23A11-嵌合)包含与小鼠可变区融合的IgG1同种型人恒定区。将抗体的重链和轻链人源化以产生人源化重链(H3对

应于序列SEQ ID NO:71(其编码DNA序列为SEQ ID NO:103);H5对应于序列SEQ ID NO:69)和轻链(L3对应于序列SEQ ID NO:72,L5对应于序列SEQ ID NO:70(其编码DNA序列为SEQ ID NO:104)),从而在293细胞中产生人源化抗体,如23A11-H3L5、23A11-H5L3、23A11-H3L3和23A11-H5L5。还可以在CHO细胞中产生抗体,用于小规模/大规模生产在Fc区的297位中由N突变为A的抗体,如23A11-H3L5(H3和L5的相应序列为SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62)。

[0168] 本申请中的“23F11”是指具有如SEQ ID NO:79所示的重链可变区和如SEQ ID NO:80所示的轻链可变区的小鼠单克隆抗体。其嵌合抗体(即23F11-C/23F11-嵌合)包含与小鼠可变区融合的IgG1同种型人恒定区。将重链和轻链人源化以产生人源化重链(H4对应于序列SEQ ID NO:75(其编码DNA序列为SEQ ID NO:105);H6对应于序列SEQ ID NO:77)和轻链(L4对应于序列SEQ ID NO:76(具有编码DNA的序列SEQ ID NO:106),L6对应于序列SEQ ID NO:78),从而在293细胞中产生人源化抗体,如23F11-H4L4、23F11-H6L4、23F11-H4L6、23F11-H6L6。还可以在CHO细胞中产生抗体,用于小规模/大规模生产在Fc区的297位中由N突变为A的抗体,如23F11-H4L4(H4和L4的相应序列为SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64)。

[0169] 本申请中使用的“22C9”指具有如SEQ ID NO:21(其编码DNA序列为SEQ ID NO:101)所示的重链可变区和具有SEQ ID NO:22(其编码DNA序列为SEQ ID NO:102)所示的轻链可变区的小鼠单克隆抗体。其嵌合抗体(即22C9-C/22C9-嵌合)包含与小鼠可变区融合的IgG1同种型人恒定区。

[0170] 当“保守替代”用于氨基酸序列时,是指将一个氨基酸残基用另一个具有相似理化性质的侧链的氨基酸残基替代或用对多肽的活性不起关键作用的那些氨基酸替代。例如,可以在具有非极性侧链的氨基酸残基间(例如,Met、Ala、Val、Leu和Ile、Pro、Phe、Trp)、具有不带电荷的极性侧链的残基间(例如,Cys、Ser、Thr、Asn、Gly和Gln)、具有酸性侧链的残基间(例如,Asp、Glu)、具有碱性侧链氨基酸间(例如,His、Lys和Arg)、具有 $\beta$ 支链侧链的氨基酸间(例如,Thr、Val和Ile)、具有含硫侧链的氨基酸间(例如,Cys和Met)或者具有芳香侧链的残基间(例如,Trp、Tyr、His和Phe)进行保守替代。在某些实施方式中,替代、缺失或添加也可以认为是“保守替代”。插入或缺失的氨基酸数量可以在约1至5个范围内。本领域公知保守替代通常不会引起蛋白构象结构的显著变化,因此能够保留蛋白质的生物活性。

[0171] 当“百分比(%)序列同一性”用于氨基酸序列(或核酸序列)时,是指在进行序列比对,并且必要时引入空位使对应氨基酸(或核酸)数目达到最多后,在候选序列中,与参比序列相同的氨基酸(或核酸)残基占所述候选序列的氨基酸(或核酸)残基的百分比。所述氨基酸残基的保守替代可以认为或可以不认为是相同残基。可以通过本领域公开的工具,例如BLASTN, BLASTp(美国国家生物技术信息中心网站(NCBI),也可参见Altschul S.F.等、J.Mol.Biol.,215:403-410(1990);Stephen F.等,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402(1997))、ClustalW2(欧洲生物信息研究所网站,可参见Higgins D.G.等,Methods in Enzymology,266:383-402(1996);Larkin M.A.等,Bioinformatics(Oxford,England),23(21):2947-8(2007))和ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件,对序列进行比对以确定氨基酸(或核酸)序列的百分比序列同一性。本领域技术人员可以使用所述工具的默认参数或根据比对的需要适当调整参数,例如通过挑选合适的算法。

[0172] 本申请使用中的“同源序列”和“同源性序列”可以互换使用,是指与另一序列任选

地比对时具有至少80% (例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%) 序列同一性的多核苷酸序列(或其互补链)或氨基酸序列。

[0173] 本申请中使用的“T细胞”是指一种在细胞介导的免疫中起关键作用的淋巴细胞,包括辅助T细胞(例如,CD4<sup>+</sup>T细胞、T辅助1型T细胞、T辅助2型T细胞、T辅助3型T细胞、T辅助17型T细胞)、细胞毒性T细胞(例如,CD8<sup>+</sup>T细胞)、记忆T细胞(例如,中央记忆T细胞(TCM细胞)、效应记忆T细胞(TEM细胞和TEMRA细胞)和常驻记忆T细胞(TRM),其为CD8+或CD4+)、自然杀伤T(NKT)细胞和抑制性T细胞。

[0174] 本申请中使用的“效应功能”或“抗体效应功能”是指抗体的Fc区与其效应器例如C1复合物和Fc受体结合的生物活性。示例性的效应功能包括抗体与C1复合物上的C1q相互作用诱导的补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体的Fc区与效应细胞上的Fc受体结合诱导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),以及吞噬。“降低或耗竭效应功能”是指抗体效应功能与亲本抗体相比降低至少50% (例如,60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%)。在某些实施方式中,通过Fc区中消除糖基化的突变(例如N297A或D265A)以消除效应功能,(参见Shields等,J.Biol.Chem.276 (9) :6591-6604 (2001) )、K322A、L234A/L235A。本申请中使用的“Fc区”是指免疫球蛋白重链的C-末端区域。

[0175] 本申请中使用的“癌症”或“癌症病况”是指以恶性细胞生长或赘生物、异常增殖、浸润或转移为特征的任何医学病况,并且包括实体肿瘤癌症和非实体癌症(血液恶性肿瘤),如白血病。实体肿瘤包括肉瘤(sarcoma)和癌(carcinoma)。肉瘤是在血管、骨骼、脂肪组织、韧带、淋巴管、肌肉或肌腱中的非上皮肿瘤,而癌(carcinoma)是在皮肤、腺体和器官内层的上皮肿瘤。本申请中使用的“肿瘤”是指赘生细胞和/或恶性细胞的实体团块。

[0176] 本申请中使用的对某种病况的“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”或“疗法”可以互换使用,并且包括治疗性治疗、预防性(prophylactic)或预防性(preventative)措施,如预防或减轻病况、减缓病况的发病或发展的速率、减少发展出某种状况的风险,预防或推迟与病况相关的症状发展,减少或终止与病况相关的症状,产生病况的完全或部分消退,治愈病况,或其某些组合。对于癌症而言,“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”或“疗法”可以指抑制或减缓赘生细胞或恶性细胞生长(如与对照相比减小肿瘤体积)、增殖、浸润至其他器官或转移,预防、推迟或停止赘生细胞或恶性细胞生长、增殖或转移的发展,或其某些组合。对于肿瘤而言,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”包括根除全部或部分肿瘤、抑制或减缓肿瘤生长和转移、预防或推迟肿瘤的发展,或其某些组合。“分离的”物质在人工处理后,由自然状态发生改变。如果自然界中出现某种“分离的”成分或物质,那么其发生改变或脱离其原始状态,或二者均有发生。例如,“分离的”多核苷酸或多肽是分别不含其他多核苷酸或多肽的多核苷酸或多肽,并且不与在天然状态下与该多核苷酸或多肽共存的天然组分结合。在某些实施方式中,通过至少一个步骤将“分离的”抗体纯化成纯度至少为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,其通过电泳方法(如使用考马斯亮蓝或银染进行的SDS-PAGE、等电聚焦、毛细管电泳)、色谱方法(如离子交换色谱或反相HPLC)或Lowry法确定。

[0177] 本申请中使用的“载体”是指,可将编码某蛋白的多核苷酸操作性地插入并转运至其中,以在宿主细胞中表达该蛋白的一种运载工具。载体可用于转化、转导或转染宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内得以表达。载体的示例性类型包括但不限于:质

粒(例如,噬菌粒、柯斯质粒、酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC))、病毒载体(噬菌体如λ噬菌体或M13噬菌体或动物病毒)、细菌载体或非游离型哺乳动物载体。用作载体的动物病毒种类包括逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。载体可含有多种控制表达的元件,包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,载体(例如,病毒载体或游离型哺乳动物载体)可以含有复制起始位点。载体还可包含协助其进入细胞的成分,包括但不限于,病毒颗粒、脂质体或蛋白衣壳。

[0178] 本申请中使用的“宿主细胞”是指引入外源多核苷酸和/或载体以表达一种或多种外源性蛋白的细胞。其旨在指特定的对象细胞及其后代。宿主细胞可以是原核细胞、真核细胞、植物细胞、动物细胞或杂交瘤。其可以是不能表达所需水平的蛋白但包含该核酸的细胞,除非将调节剂引入细胞或将调控序列引入宿主细胞以使得其与核酸可操作地连接。

[0179] 本申请中使用的“PD-L1相关病况”是指由PD-L1(例如,人PD-L1)增加或减少的表达或活性引起、加剧或以其他方式相关的任何病况。

[0180] 本申请中使用的术语“治疗有效量”或“有效剂量”是指有效治疗与人PD-L1相关的疾病或病况的药物的剂量或浓度。例如,对于使用本申请公开的抗体或抗原结合片段治疗癌症,治疗有效量是能够减小肿瘤体积、根除全部或部分肿瘤、抑制或减缓肿瘤生长或癌细胞浸润至其他器官、抑制介导癌症病况的细胞生长或增殖、抑制或减缓肿瘤细胞转移、减轻与肿瘤或癌症病况相关的任何症状或标志、阻止或延缓肿瘤或癌症病况进展,或其某些组合的抗体或抗原结合片段的剂量或浓度。

[0181] 术语“药学上可接受的”是指所指的运载体、载剂、稀释剂、辅料和/或盐,总的来说在化学上和/或在物理上与制剂中的其他配料相兼容,并在生理上与接受者相兼容。

[0182] 术语“受体占据”是指在平衡状态下时被配体占据的受体与可用受体总数之比,通常以百分比表示。可以通过测量和比较不同时间点的受体占据情况评估受体占据持续时间。受体占据的测量方法是本领域公知的,如FACS、正电子发射计算机断层显像(PET)、放射自显影等。

### [0183] 抗-PD-L1抗体

[0184] 本公开内容提供了抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段。在某些实施方式中,本公开内容提供了示例性的单克隆抗体21F11、18G4、4B6、26F5、23A11、23F11、22C9、其嵌合抗体、人源化4B6、人源化23A11和人源化23F11。

[0185] 在某些实施方式中,抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段与抗原(例如,人PD-L1)的结合是pH依赖性的。pH依赖性的抗体在生理中性pH(即pH 7.4)下显示出比在酸性pH 5.5或6.0下(例如,在内涵体pH下)更高的抗原结合。此类pH依赖性抗体优选地在内涵体中与抗原解离。当抗原经历抗原介导的清除时,这能够增加抗体的半衰期,因为通过在内涵体中与抗原解离并且再循环离开细胞,pH依赖性抗体能够逃离溶酶体中抗原介导的降解。由于与参照PD-L1抗体相比,pH依赖性抗体具有改善再循环和延长的血清半衰期的特性,因而治疗性pH依赖性抗体的优点包括更低的剂量(不超过参照PD-L1抗体在另外的情况下为了达到相当的体内治疗效果所需要的剂量的80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%的剂量)或更低的给药频率,两种抗体均达到相当的体内治疗作用。参照抗体是非pH依赖性的,其在

酸性和中性pH下与PD-L1均具有相似的结合，并且其在中性pH下具有与pH依赖性抗体相似的结合。在某些实施方式中，与其具有相同的与PD-L1的结合的非pH依赖性的版本相比，pH依赖性抗体具有上述优点。

[0186] 在某些实施方式中，pH依赖性抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段在中性pH(例如，pH7.4)下与人PD-L1的特异性结合比在酸性pH下(例如，pH 6.0、5.5、5.0、4.5或4.0)更高。在某些实施方式中，在相同的实验条件下，抗体在酸性pH5.5下与PD-L1的结合显著低于其在pH7.4下与PD-L1的结合。在某些实施方式中，本申请所述的PD-L1抗体及其抗原结合片段在酸性pH下的结合至多是其在中性pH(即7.4)下的2%、5%、10%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或85%，其通过ELISA测定。在某些实施方式中，pH依赖性抗-PD-L1抗体与人PD-L1在酸性pH/中性pH下的 $K_d$ 比和/或 $K_{off}$ 比是2、3、4、5、8、10、15、20、30、40或100或者更高。在某些实施方式中，在25°C或37°C的酸性pH下，pH依赖性抗-PD-L1抗体与人PD-L1的解离半衰期( $t_{1/2}$ )小于5、4、3、2、1、0.5、0.2或0.1分钟。在某些实施方式中，与在中性pH下的参照PD-L1抗体相比，本申请所述的pH依赖性抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段在酸性pH下与人PD-L1的解离半衰期( $t_{1/2}$ )减少至少约2、3、5、8、10、15、20、30、50或100倍。在某些实施方式中，与在中性pH下具有相似的与PD-L1的结合的参照PD-L1抗体相比，暴露于pH依赖性抗-PD-L1抗体可以使体内PD-L1蛋白的量的减少维持更长时间。在某些实施方式中，施用某一剂量后，与相同剂量的参照PD-L1抗体相比，pH依赖性抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段与人PD-L1结合具有增加的靶器官半衰期。在某些实施方式中，如果抗体及其抗原结合片段在酸性pH和中性pH下与PD-L1有相似的结合，则其在靶器官中的体内半衰期会较短。在某些实施方式中，靶器官包括但不限于血液或血清、肾、肺、胰脏、肝、胆囊、膀胱、皮肤、食道、卵巢、乳腺、结肠、直肠、胃、脾或脑。

[0187] 本领域技术人员将理解，可以对本申请所述的CDR序列进行修饰，以包含一个或多个氨基酸残基的取代(或者插入或缺失)，以使得所得到抗体一个或多个性质上有所改进(如改进的结合或结合亲和性、增加的药代动力学半衰期、pH敏感性、对偶联的相容性、降低的CDR残基上的糖基化和/或脱氨基的风险，以及降低的免疫原性)，以及其他与亲本抗体相当(即除上述修饰和改变外具有相同CDR序列的抗体)，或至少实质上保留了亲本抗体的抗原结合性质。例如，可以利用噬菌体展示技术生产并表达抗体变体库(例如，Fab或scFv变体)，随后筛选与人PD-L1结合或有结合亲和性的抗体。另一个例子中，可以用计算机软件模拟所述抗体与人PD-L1的结合并鉴别抗体上形成结合界面的氨基酸残基，来避免这些残基的替代以防止结合或结合亲和性降低，或可以靶向这些残基进行替代以形成更强的结合。在某些实施方式中，CDR序列中的至少一个(或全部)取代是保守替代。

[0188] 在某些实施方式中，所述抗体及其抗原结合片段包括一个或多个CDR序列，这些序列与本申请所述的序列具有至少80%(例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)的序列同一性，并且同时保留了与其亲本抗体水平相似或甚至更高的与人PD-L1的结合活性或结合亲和性，所述亲本抗体具有基本相同的序列，除了其相应的CDR序列与本申请所述的序列具有100%序列同一性。

[0189] 在某些实施方式中，所述抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段是嵌合的。嵌合抗体含有来自某一抗体的一个或多个区域和来自其他抗体或物种的一个或多个区域。在某些实施方式中，嵌合抗-PD-L1抗体的至少一个CDR来源于一个物种。在某些实施方式中，所有CDR来

源于另一物种。在某些实施方式中，嵌合抗-PD-L1抗体的可变区来源于一个物种，并且与另一物种的抗体的恒定区连接。嵌合抗体保留了亲本抗体的结合活性或结合亲和性。

[0190] 在某些实施方式中，所述抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段是人源化的。在某些实施方式中，人源化抗体源自非人物种，并对重链和轻链框架区和恒定区的若干氨基酸残基进行了突变以降低或避免在人体内的免疫原性。在某些实施方式中，将非人物种的可变区与人抗体的恒定区融合。在某些实施方式中，通过CDR移植产生人源化抗体，即用非人抗体的对应CDR替代人抗体的CDR。这样，人源化抗体在人体内的免疫原性较低。在某些实施方式中，人框架区被CDR序列来源的非人抗体（例如，小鼠框架区）的一个或多个氨基酸残基取代以，例如，改善或保持结合活性或结合亲和性。在某些实施方式中，人源化抗体保持或增强亲本抗体的结合活性或结合亲和性。

[0191] 在一些实施方式中，嵌合的或人源化的抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段包含选自下组的重链可变区：SEQ ID NO:21、47、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83和85，以及与其具有至少80%（例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）序列同一性的同源序列；和/或选自下组的轻链可变区：SEQ ID NO: 22、48、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84和86，以及与其具有至少80%（例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）序列同一性的同源序列。这些人源化抗体保持了与人PD-L1的结合活性或结合亲和性，优选地以与下述示例性抗体之一的结合水平相似：4B6、18G4、26F5、21F11、23A11、23F11、22C9及其嵌合抗体、人源化4B6、人源化23F11和人源化23A11。

[0192] 在某些实施方式中，PD-L1抗体4B6、26F5、21F11、23A11、23F11、22C9及其嵌合抗体、人源化4B6、人源化23F11和人源化23A11与人以及非人灵长动物PD-L1结合，但不与小鼠PD-L1结合。在某些实施方式中，PD-L1抗体（例如，18G4）及其嵌合抗体以及其抗原结合片段能够与人以及小鼠PD-L1结合。结合活性或结合亲和性通过（如ELISA、放射性配体竞争结合实验和FACS分析）确定。

[0193] 在一些实施方式中，本申请所述的抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段能够以约 $10^{-7}$ M或更低（例如， $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M、 $10^{-12}$ M）的结合亲和性（ $K_D$ ）与人PD-L1特异性结合，其通过表面等离子体共振结合法测定。结合亲和性可以用 $K_D$ 值表示，其通过当抗原和抗原结合分子的结合达到平衡时的解离速率与结合速率的比值（ $k_{off}/k_{on}$ ）计算得到。所述抗原结合亲和性（例如 $K_D$ ）可以通过本领域已知的适宜方法适宜地确定，所述方法包括使用仪器如Biacore的表面等离子体共振结合法（参见例如Murphy, M.等, Current protocols in protein science, Chapter 19, unit 19.14, 2006）。

[0194] 在某些实施方式中，PD-L1抗体及其抗原结合片段能够以0.001μg/ml-1μg/ml（例如，0.001μg/ml-0.5μg/ml、0.001μg/ml-0.2μg/ml、0.001μg/ml-0.1μg/ml、0.01μg/ml-0.2μg/ml、0.01μg/ml-0.1μg/ml、0.01μg/ml-0.05μg/ml、0.01μg/ml-0.03μg/ml或0.001μg/ml-0.01μg/ml）的EC<sub>50</sub>（即50%结合浓度）与hPD-L1结合，其通过ELISA测定，或者以0.01μg/ml-1μg/ml（例如，0.01μg/ml-0.5μg/ml、0.01μg/ml-0.2μg/ml、0.05μg/ml-1μg/ml、0.05μg/ml-0.5μg/ml或0.05μg/ml-0.2μg/ml）的EC<sub>50</sub>与hPD-L1结合，其通过FACS测定。可以通过本领域公知的方法测量抗体与人PD-L1的结合，例如ELISA、FACS、表面等离子体共振、GST pull down、表位标签、免疫沉淀、Far-Western、荧光共振能量转移、时间分辨荧光免疫测定（TR-FRET）。

FIA)、放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定、乳胶凝集、Western印迹和免疫组织化学或者其他结合测定。在一个说明性实例中,测试抗体(即一抗)能够与固化的人PD-L1或表达人PD-L1的细胞结合,随后洗掉未结合抗体,引入标记的二抗,其能够与一抗结合因此能够检测出结合的一抗。当使用固化的PD-L1时,可以使用酶标仪进行检测,或者当使用表达人PD-L1的细胞时,通过使用FACS分析进行检测。

[0195] 在某些实施方式中,本申请所述的抗体及其片段以0.05 $\mu$ g/ml-1 $\mu$ g/ml(例如,0.05 $\mu$ g/ml-0.8 $\mu$ g/ml、0.05 $\mu$ g/ml-0.5 $\mu$ g/ml或0.05 $\mu$ g/ml-0.3 $\mu$ g/ml)的IC<sub>50</sub>抑制人PD-1与人PD-L1的结合,其通过FACS测定,或者以0.001 $\mu$ g/ml-0.5 $\mu$ g/ml(例如,0.001 $\mu$ g/ml-0.2 $\mu$ g/ml、0.001 $\mu$ g/ml-0.1 $\mu$ g/ml、0.001 $\mu$ g/ml-0.05 $\mu$ g/ml、0.001 $\mu$ g/ml-0.02 $\mu$ g/ml、0.005 $\mu$ g/ml-0.05 $\mu$ g/ml、0.005 $\mu$ g/ml-0.02 $\mu$ g/ml或0.005 $\mu$ g/ml-0.01 $\mu$ g/ml)的IC<sub>50</sub>抑制人PD-1与人PD-L1的结合,其通过ELISA测定。

[0196] 在某些实施方式中,本申请所述的抗体及其片段阻断人PD-L1与其受体(即人PD-1)的结合,从而提供下述生物活性,包括例如从活化的T细胞(如CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞)中诱导细胞因子产生、诱导活化的T细胞(如CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞)的增殖以及逆转T<sub>reg</sub>的抑制功能。示例性的细胞因子包括IL-2和IFN $\gamma$ 。术语“IL-2”是指白介素2,是免疫系统中一种调节白血细胞(例如,白细胞)活性的细胞因子信号分子。术语“干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )”是由自然杀伤(NK)细胞、NK T细胞、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞产生的一种细胞因子,其是巨噬细胞的关键激活剂和主要组织相容性复合物(MHC)分子表达的诱导剂。可以使用本领域公知的方法确定细胞因子的产生情况,例如,通过ELISA。也可以使用检测T细胞增殖的方法,包括[<sup>3</sup>H]胸腺嘧啶掺入测定和发光细胞活力测定。

[0197] 抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段对人PD-L1和/或非人灵长动物是特异性的。在某些实施方式中,抗体及其抗原结合片段不与PD-L2(例如,人PD-L2)结合。例如,与PD-L2的结合亲和性小于与人PD-L1的结合亲和性的15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0198] 在某些实施方式中,抗体及其抗原结合片段以0.001 $\mu$ g/ml-0.5 $\mu$ g/ml(例如,

[0199] 0.001 $\mu$ g/ml-0.2 $\mu$ g/ml、0.001 $\mu$ g/ml-0.1 $\mu$ g/ml、0.001 $\mu$ g/ml-0.05 $\mu$ g/ml、0.001 $\mu$ g/ml-0.02 $\mu$ g/ml、0.005 $\mu$ g/ml-0.05 $\mu$ g/ml、0.005 $\mu$ g/ml-0.02 $\mu$ g/ml或0.005 $\mu$ g/ml-0.01 $\mu$ g/ml)的EC<sub>50</sub>与非人灵长动物PD-L1结合,其通过ELISA测定。

[0200] 抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段对人PD-L1和/或非人灵长动物PD-L1是特异性的。在某些实施方式中,抗体及其抗原结合片段不与小鼠PD-L1结合。例如,与小鼠PD-L1的结合亲和性小于与人PD-L1的结合亲和性的15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0201] 在某些实施方式中,抗体及其抗原结合片段不与小鼠PD-L1结合,但是以与人PD-L1相似的结合活性或结合亲和性与非人灵长动物PD-L1结合。例如,在常规结合测定(如ELISA或FACS分析)中,示例性抗体4B6、26F5、21F11、23A11、23F11、22C9及其嵌合抗体、人源化4B6、人源化23F11和人源化23A11与小鼠PD-L1的结合极低,而这些抗体通过ELISA或FACS测定的与非人灵长动物PD-L1的结合与人PD-L1类似。在某些实施方式中,抗体及其抗原结合片段(如18G4)以与人PD-L1相似的结合活性或结合亲和性与小鼠PD-L1以及非人灵长动物PD-L1结合。

[0202] 在某些实施方式中,可以将本申请所述的抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段与免疫原性剂联用,如肿瘤细胞、纯化的肿瘤抗原以及转染了编码免疫刺激细胞因子的基因的细胞、肿瘤疫苗。此外,可以将抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段包括在联用疗法中,包括标准化疗和放疗(例如,放射疗法、X-射线疗法)、基于靶点的小分子疗法(例如,酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼、吉非替尼;单克隆抗体、光动力疗法)、免疫疗法(例如,针对肿瘤标记物的抗体,如癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿肿瘤相关抗原、胚胎抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸Lewis抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B和p155、DLL4、Notch1、Notch2/3、Fzd7或者Wnt、r-spondin (RSPO) 1、RSPO2、RSPO3或RSPO4)、新兴的其他免疫检查点调节剂疗法(例如,疫苗)、激素疗法、血管生成抑制(血管生成抑制剂)、基因疗法(细胞增殖诱导剂、细胞增殖抑制剂或程序性细胞死亡调节剂)、姑息治疗(即旨在改善护理质量以减轻疼痛(例如,吗啡和羟考酮)的治疗、恶心、呕吐(例如,昂丹司琼和阿瑞吡坦)、腹泻和出血的治疗)和手术。在某些实施方式中,可以将抗体及其抗原结合片段作为抗体-药物偶联物、双特异性或多价抗体的基础分子。

[0203] 本申请所述的抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段可以是单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、重组抗体、双特异性抗体、标记抗体、二价抗体或抗独特型抗体。重组抗体是在体外使用重组方法而非动物制备的抗体。双特异性抗体或二价抗体是具有两种不同的单克隆抗体的片段的人工抗体,其能结合两种不同的抗原。“二价”的抗体和其抗原结合片段包括两个抗原结合位点。两个抗原结合位点可以结合相同抗原,或者可以各自结合到不同的抗原(在这种情况下,抗体或抗原结合片段为“双特异性”)。

[0204] 在一些实施方式中,本申请所述的抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段是人源化抗体或嵌合抗体。在某些实施方式中,使用重组方法制备人源化抗体或嵌合抗体。例如,可以用合适的抗原(如人PD-L1蛋白)免疫非人动物。从小鼠单克隆抗体的基因剪切下编码与抗原结合的抗体可变区的基因片段,并将这一部分与来源于人IgG1的抗体的恒定区基因可操作地连接。将此重组基因片段掺入表达载体,然后将该表达载体引入用于产生嵌合抗体的宿主细胞(参见美国专利号4,816,397;4,816,567;5,807,715)。

[0205] “人源化抗体”是通过将非人源抗体CDR基因移植到人抗体基因上而获得的抗体,使得可变区框架和恒定区(如果存在)全部或基本上来自人抗体序列。用于制备人源化抗体的方法是本领域公知的(参见例如美国专利号5,225,539、美国专利号5,530,101、美国专利号6,407,213;美国专利号5,859,205;美国专利号6,881,557、EP239400、EP125023、W090/07861和W096/02576)。在某些实施方式中,人源化抗体包含人源化重链和人源化轻链。在某些实施方式中,在人源化PD-L1抗体中移植的CDR序列与对应的CDR至少60%、70%、80%、82%、85%、88%、90%、95%或100%相同。在某些实施方式中,在人源化PD-1抗体的CDR中存在不超过3个连续的氨基酸取代。在某些实施方式中,将人源化PD-L1抗体可变区框架的氨基酸残基取代以进行序列优化。在某些实施方式中,人源化PD-L1抗体链的可变区框架序列与对应的人可变区框架序列至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%相同。

[0206] 在一些实施方式中,抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段是骆驼化单域抗体(camelized single chain domain antibody)、双功能抗体(diabody)、scFv、scFv二聚体、BsFv、dsFv、(dsFv)2、dsFv-dsFv'、Fv片段、Fab、Fab'、F(ab')2、ds双功能抗体(ds diabody)、纳米抗体、域抗体、分离的CDR或双价域抗体。

[0207] 在一些实施方式中,抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段还包含免疫球蛋白恒定区。在一些实施方式中,免疫球蛋白恒定区包含重链和/或轻链恒定区。重链恒定区包含CH1、CH1-CH2或CH1-CH3区。在一些实施方式中,恒定区还可以包含一个或多个修饰以使其具有所需的性质。例如,可以对恒定区进行修饰以降低或消除一个或多个效应功能,以改善FcRn受体结合,或引入一个或多个半胱氨酸残基。

[0208] 在某些实施方式中,抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段具有改善的热稳定性。本申请中使用的术语“热稳定性”或“耐热性”是指抗-PD-L1抗体的功能稳定性,而不是热力学性质,以及指抗体对由热和/或物理/化学操作导致的不可逆性的抗性,所述操作包括但不限于:加热、冷却、冷冻、冻融循环、振荡、涡旋、超声、化学变性剂、pH、去垢剂、盐、添加剂、蛋白酶或温度。不可逆性导致抗体的功能构象不可逆的解折叠、生物活性丧失和变性蛋白的聚集。可以通过测量配体结合或通过使用对在升高温度下的解折叠敏感的光谱法(如荧光、圆二色光谱(CD)或光散射)确定热稳定性的增加情况。本申请所述的PD-L1抗体能够增加热稳定性,其通过在有功能构象的状态下至少2°C、至少5°C、至少8°C、至少10°C、至少15°C、至少20°C或至少30°C下热稳定性的增加测定。本申请所述的抗体的热稳定性可以通过以下方法检测,例如通过差示扫描荧光法(DSF)或差示扫描量热法(DSC)(参见He F等, *J Pharm Sci.* 2011 Apr; 100 (4) :1330-40.),其中测得热转变中点(T<sub>m</sub>),结果表明蛋白在液体中相对稳定。在某些实施方式中,PD-L1抗体的T<sub>m</sub>高于74°C、高于76°C、高于78°C、高于80°C、高于82°C、高于84°C、高于86°C、高于88°C、高于90°C、高于92°C、高于94°C、高于96°C或高于98°C。在某些实施方式中,具有改善的热稳定性的PD-L1抗体是23F11(例如,23F11-H4L4、23A11-H6L4、23A11-H4L6或23A11-H6L6),其热转变中点(T<sub>m</sub>)高于90°C。

[0209] 在一些实施方式中,抗-PD-L1抗体及其抗原结合片段进一步形成抗体-药物偶联物(ADC)。可以设想,可以将多种有效载荷与本申请所述的抗体或抗原结合片段连接(参见例如“Conjugate Vaccines”, Contributions to Microbiology and Immunology, J.M.Cruise and R.E.Lewis, Jr. (编), Carger Press, 纽约(1989))。术语“有效载荷”可以与“药物”互换使用,并且这些有效载荷可以通过共价结合、亲和结合、嵌入、同等结合(coordinate binding)、络合、结合、混合或加入等其他方式与所述抗体或抗原结合片段连接。在某些实施方式中,本发明公开的抗体和抗原结合片段可以通过工程化的方法使其含有表位结合部分以外的特定位点,这些位点可用来结合一种或多种有效载荷,如肽、核酸分子、药物、细胞毒素、多肽、蛋白、融合蛋白、抗体、半抗原、小分子、模拟剂、合成药物、无机分子、有机分子、放射性核素和报告基团。例如,这种位点可以包括一个或多个反应性氨基酸残基,如半胱氨酸组氨酸残基,以促进其与有效载荷的共价连接。在某些实施方式中,抗体可以通过接头,或通过另一有效载荷,与有效载荷间接连接。例如,抗体或抗原结合片段可以与生物素偶联,然后与同亲和素偶联的第二有效载荷间接偶联。有效载荷可以是报告基团或可检测的标记、药代动力学修饰部分、纯化部分或细胞毒性部分。可检测的标记的例子可以包括荧光标记(例如,荧光素、罗丹明、丹酰、藻红蛋白或德克萨斯红)、酶-底物标记物(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶或β-D-半乳糖苷酶)、放射性同位素(例如,<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H、<sup>111</sup>In、<sup>112</sup>In、<sup>14</sup>C、<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>86</sup>Y、<sup>88</sup>Y、<sup>90</sup>Y、<sup>177</sup>Lu、<sup>211</sup>At、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>153</sup>Sm、<sup>212</sup>Bi和<sup>32</sup>P、其他镧系元素、发光标记)、发色团部分、地高辛、生物素/亲和素、DNA分子或金以进行检测。在某些实施方式中,有效载荷可以是药代动

力学修饰部分如PEG,其帮助延长抗体的半衰期。其他适宜的聚合物包括例如羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇/丙二醇共聚物等。在某些实施方式中,有效载荷可以是纯化部分例如磁珠。“细胞毒性”部分的有效载荷可以是对细胞有害的或可能损坏或杀死细胞的任何试剂。细胞毒性部分的示例包括,但不限于:化疗剂、抗肿瘤剂、生长抑制剂、药物、毒素,如紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普蔡洛尔、嘌呤霉素及其类似物、抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴)、烷化剂(例如,氮芥、塞替派苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类抗生素(例如,柔红霉素(以前称为道诺霉素)和阿霉素)、抗生素(例如,更生霉素(以前称为放线菌素)、博来霉素、光神霉素、铂类(例如,顺铂和奥沙利铂)、植物生物碱(例如,拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱、紫杉烷和表鬼臼毒素)和氨茴霉素(AMC))以及抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。本申请中使用的术语“载荷”或“药物载荷”或“有效载荷”是指每个抗体的平均药物/有效载荷数。药物载荷可以在每个抗体1至20(例如,1至15、1至10、2至10、1至8、2至8、2至6、2至5或2至4)个药物的范围内(也称为药物与抗体之比),其通过本领域中的适宜方法确定,如质谱、UV/可见光谱、ELISA测定和HPLC。在某些实施方式中,药物载荷是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0210] 多核苷酸和重组方法

[0211] 本公开内容提供了编码抗-PD-L1抗体和其抗原结合片段的分离的多核苷酸。在某些实施方式中,所述分离的多核苷酸包括一个或多个核苷酸序列,其编码本公开内容中所述的CDR序列。

[0212] 产生单克隆抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段的方法包括:用人PD-L1蛋白或产生hPD-L1的细胞免疫适宜的动物。动物可以是小鼠、大鼠、绵羊、山羊、家兔或豚鼠。使用脾脏或淋巴结产生杂交瘤,或者收集免疫动物的B细胞并测量PD-L1抗体滴度。用适宜滴度的杂交瘤或来自免疫动物的B细胞克隆,来克隆编码PD-L1抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。将克隆的或经修饰的(例如,嵌合的、人源化的)多核苷酸掺入适宜载体,然后将该载体引入宿主细胞以产生本公开内容所述的抗体。可以通过培养宿主细胞,随后分离和纯化宿主细胞或培养液(例如,上清液),获得基本上纯净且均一形式的本申请所述的抗体及其抗原结合片段。可以采用用于多肽纯化的常规方法分离和纯化抗体或其抗原结合片段。

[0213] 在一些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码重链可变区并包括选自下组的序列:SEQ ID NO:93、95、97、99、101、103和105,以及与之具有至少80%(例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)的序列同一性的同源序列。在一些实施方式中,所述分离的多核苷酸编码轻链可变区并包括选自下组的序列:SEQ ID NO:94、96、98、100、102、104和106,以及与之具有至少80%(例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)的序列同一性的同源序列。在某些实施方式中,所述同一性的百分比是源自遗传密码的简并性,而编码的蛋白序列保持不变。

[0214] 使用本领域公知的重组技术,可以将编码所述抗-PD-L1抗体和其抗原结合片段的分离的多核苷酸插入载体用于进一步克隆(扩增DNA)或用于表达。在另一实施方式中,所述

抗体可通过本领域公知的同源重组的方法制得。编码所述单克隆抗体的DNA可以通过常规的方法分离和测序(如可以使用寡核苷酸探针,该探针可特异性与编码所述抗体的重链和轻链的基因结合)。多种载体可供选择。载体组分通常包括,但不限于,以下的一种或多种:信号序列(例如,翻译信号或前导序列)、复制起始点、一种或多种选择性标记基因、增强子元件、启动子(例如,SV40、CMV、EF-1 $\alpha$ )和转录终止序列。

[0215] 在一些实施方式中,所述载体系统包括哺乳动物、细菌、酵母系统等,并包括质粒例如但不限于pALTER、pBAD、pcDNA、pCa1、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pCMV、pEGFP、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS420、pLexA、pACT2.2、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、pEF-1、pCMV-SCRIPT.RTM.、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos等,以及其他可从实验室获得或市售的表达载体。适宜的载体可以包括质粒或病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。载体可以维持单一拷贝或多个拷贝,或者整合至宿主细胞基因组中。可以将包括编码所述抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列的载体引入宿主细胞用于复制或基因表达。适用于克隆或表达所述载体中的DNA的宿主细胞为原核细胞、酵母、昆虫细胞或上述高级真核细胞。适用于本发明用途的原核细胞包括真细菌如,革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌,例如肠杆菌科,如肠杆菌属,例如大肠杆菌,肠杆菌,欧文氏菌属,克雷白氏杆菌属,变形杆菌属,沙门氏菌属,如,鼠伤寒沙门(氏)杆菌,沙雷氏菌属,如,粘质沙雷氏菌,以及志贺氏菌属,及杆菌属,如枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌,假单胞菌,如绿脓杆菌和链霉菌,芽孢杆菌,链球菌,链霉菌,葡萄球菌,肠球菌,乳酸杆菌,乳球菌,梭菌,土芽孢杆菌,海洋杆菌,假单胞菌,沙门氏菌,弯曲杆菌,螺杆菌,黄杆菌,梭杆菌,泥杆菌,奈瑟氏菌和脲原体。适宜的昆虫细胞包括果蝇Schnieder S2细胞和Sf9。适宜的酵母包括甲醇毕赤酵母、巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母或普通面包酵母。优选的哺乳动物细胞包括CHO细胞、HEK293细胞、淋巴细胞和骨髓瘤。在某些实施方式中,当不需要抗体的糖基化和Fc效应功能时,抗体可以在细菌中产生。

[0216] 除了上面的例子以外,许多其他属、种和株都比较常用且在本发明中适用,如粟酒裂殖酵母;克鲁维酵母属宿主,如乳酸克鲁维酵母、脆壁克鲁维酵母(ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(ATCC 16,045)、魏氏克鲁维酵母(ATCC 24,178)、克鲁维酵母(ATCC56,500)、果蝇克鲁维酵母(ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母和马克斯克鲁维酵母;解脂耶氏酵母(EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(EP 183,070);假丝酵母;里氏木霉(EP 244,234);链孢霉;许旺酵母,如西方许旺酵母;和丝状真菌,如脉孢菌、青霉菌、弯颈霉和曲霉菌,如钩巢曲霉和黑曲霉。

[0217] 本发明中提供的适用于表达糖基化抗体或其抗原结合片段的宿主细胞由多细胞生物衍生得到。无脊椎细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已发现多种杆状病毒株(baculoviral strains)及其变体以及对应的容许性昆虫宿主细胞(permissive insect host cells),来自于诸如以下的宿主:草地夜蛾(毛虫)、埃及斑蚊(蚊子)、白纹伊蚊(蚊子)、黑腹果蝇(果蝇)及家蚕。多种用于转染的病毒株为公众可得,例如苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒的L-1变体和家蚕核型多角体病毒的Bm-5变种,这些病毒都可在本发明中使用,特别是用于转染草地夜蛾细胞。棉花、玉米、土豆、大豆、矮牵牛花、西红柿和烟草的植物细胞培养也可用作宿主。

[0218] 但是,脊椎动物细胞最为重要,且培养的脊椎动物细胞(组织培养)的扩增已经成为常规操作。可用的哺乳动物宿主细胞实例有,SV40转化的猴肾细胞CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚胎肾细胞系(293或悬浮培养的293细胞亚克隆,Graham等,J.Gen Virol.36:59(1977));幼地鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));小鼠睾丸支持细胞(TM4,Mather, Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞癌细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺瘤(MMT060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;PC12;小鼠胚胎成纤维细胞系(3T3);NS0骨髓瘤细胞(不能内源性产生任何功能性免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)。不同的宿主细胞具有蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的各种特征和机制。因此,可以选择适宜的细胞系作为宿主细胞以确保对所表达抗体正确的修饰和加工(如初级转录物、糖基化和磷酸化)。在一些优选的实施方式中,宿主细胞是HEK293T细胞。在一些优选的实施方式中,宿主细胞是CHO细胞。

[0219] 用上述的可产生抗-PD-L1抗体的表达或克隆载体转化宿主细胞,并将其在常规的营养培养基中培养,所述营养培养基经修饰后适宜于诱导启动子、选择转化细胞或扩增编码目的序列的基因。在某些实施方式中,可以采用本领域公知的方法将载体转移进入宿主细胞,如转化、电穿孔、磷酸钙处理、脂质体转染。在某些实施方式中,将载体转染进入真核细胞包括磷酸钙共沉淀、显微注射、电穿孔、脂质体转染和病毒感染。可以将真核宿主细胞与编码抗体的第二多核苷酸共转化。在某些实施方式中,含有转染载体的宿主细胞能够瞬时表达抗-PD-L1抗体。

[0220] 本发明中用于生产所述抗体或其抗原结合片段的宿主细胞可在多种培养基中培养。市售的培养基如Ham's F10 (Sigma)、最低基本培养液(MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 及 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma),Luria肉汤(LB) 和Terrific肉汤(TB) 可用于培养所述宿主细胞。另外,任何在Ham等,Meth. Enz. 58:44(1979),Barnes等,Anal.Biochem.102:255(1980),美国专利号4,767,704;4,657,866;4,927,762;

[0221] 4,560,655;或5,122,469;W0 90/03430;W0 87/00195;或美国专利申请Re.30,985 中描述的培养基都可以用作所述宿主细胞的培养基。这些培养基都可添加必要的激素和/或其他生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐类(如氯化钠、氯化钙、氯化镁和磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷酸和胸腺嘧啶)、抗生素(如庆大霉素)、微量元素(定义为终浓度通常在微摩尔范围无机化合物),和葡萄糖或与之等同的能量源。所述培养基还可含有本领域公知的适当浓度的任何其他必要的添加剂。所述培养基的条件,如温度、pH值等类似条件,为选择用于表达的宿主细胞此前所使用的条件,为普通技术人员所熟知。

[0222] 在使用重组技术时,所述抗体及其抗原结合片段可在胞内、壁膜空间生成,或直接分泌到培养基中。如果所述抗体在胞内生成,首先除去宿主细胞或裂解片段的颗粒残骸,例如,可通过离心或超声的方法。Carter等,Bio/Technology 10:163-167(1992) 描述了将分泌到大肠杆菌壁膜空间的抗体分离的方法。简要地说,在醋酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲磺酰

氟(PMSF)存在的条件下解冻细胞糊(cell paste)约30分钟以上。离心除去细胞碎片。如所述抗体及其抗原结合片段分泌到培养基中,则通常首先使用市售的蛋白浓度过滤器,如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元,浓缩该表达系统的上清液。在任何前述的步骤中都可加入蛋白酶抑制剂如PMSF以抑制蛋白降解,以及抗生素以防止偶然污染物的生长。

[0223] 从所述细胞中制得的抗体可采用纯化方法进行纯化,例如羟磷灰石色谱、疏水色谱、反相色谱、吸附色谱、过滤、超滤、溶剂沉淀、溶剂提取、蒸馏、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、透析、DEAE-纤维素离子交换色谱柱、硫酸铵沉淀、盐析、免疫沉淀、等电聚焦、重结晶以及亲和色谱,其中亲和色谱为优选的纯化技术。所述抗体的种类以及所述抗体中存在任何免疫球蛋白的Fc结构域决定了蛋白A作为亲和配体是否适合。蛋白A可用于纯化基于人 $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2或 $\gamma$ 4重链的抗体(Lindmark等,J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。蛋白A柱的实例包括Hyper D、POROS和Sepharose FF(GE Healthcare Biosciences)。蛋白G适用于所有鼠源同种型和人 $\gamma$ 3(Guss等,EMBO J. 5:1567 1575 (1986))。琼脂糖是最常用的亲和配体附着基质,但也可选用其他基质。机械力稳定的基质如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯)苯与用琼脂糖相比可实现更快的流速和更短的处理时间。如该抗体含有CH3结构域,则可用Bakerbond ABX.TM树脂进行纯化(J.T.Baker, Phillipsburg, N.J.)。也可根据需要获得的抗体确定其他蛋白纯化的技术,如离子交换柱中的分馏、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶色谱、基于阴离子或阳离子交换树脂的肝素琼脂糖<sup>TM</sup>凝胶色谱(如聚天冬氨酸柱)、层析聚丙烯酰胺凝胶电泳、以及硫酸铵沉淀。

[0224] 在任意初步纯化步骤之后,可用低pH疏水相互作用色谱的方法处理含有目的抗体和杂质的混合物,用pH约2.5-4.5的洗涤缓冲液,优选地在低盐浓度下进行(例如,从约0到0.25M盐浓度)。

#### [0225] 试剂盒

[0226] 本公开内容提供了试剂盒,所述试剂盒包含抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段,或者包含本申请所述的抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段的药物组合物。在一些实施方式中,所述试剂盒用于检测生物样品中PD-L1的存在情况或水平。生物样品可以包含细胞或组织。

[0227] 在一些实施方式中,在试剂盒中包含的抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段与可检测标记偶联(例如,荧光、放射性或酶标记)。在某些其他实施方式中,试剂盒包含未标记的抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段,或者含有未标记的抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段的药物组合物,并且进一步包含能够与未标记的抗-PD-L1抗体结合的第二标记抗体。试剂盒可以进一步包括检测标记的手段(例如,用于检测荧光标记的滤波器组,用于酶标记的酶底物等)。试剂盒可以包含用于进行特定方法的其他试剂和缓冲剂。试剂盒可以进一步包含使用说明书,以及分隔试剂盒中各成分的包装。在某些实施方式中,试剂盒包含用于检测PD-L1抗体的免疫测定。

[0228] 在某些实施方式中,在试剂盒中包含的抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段与用于夹心测定(如ELISA)或用于免疫成像测定的底物或装置相关。可用的底物或装置可以是例如酶标板和检测试纸。

[0229] 在某些实施方式中,提供了用于检测PD-L1蛋白水平的试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒用于预测、诊断、预防或治疗与PD-L1相关的病况。

#### [0230] 药物组合物和治疗方法

[0231] 本公开内容进一步提供了包括抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段和一种或多种药学上可接受的运载体的药物组合物。

[0232] 用在本申请公开的药物组合物中的药用可接受载剂可包括,例如,药用可接受的液体、凝胶或固体运载体、水相介质、非水相介质、抗微生物物质、等渗物质、缓冲液、抗氧剂、麻醉剂、悬浮剂/分散剂、螯合剂、稀释剂、佐剂、辅料或无毒辅助物质,其他本领域公知的组分或以上的多种组合。

[0233] 适用的组分可包括,例如,抗氧剂、保湿剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、缓冲液、防腐剂、润滑剂、搅味剂、增稠剂、着色剂、乳化剂或稳定剂例如糖和环糊精。适用的抗氧剂可包括,例如,甲硫氨酸、抗坏血酸、EDTA、硫代硫酸钠、铂、过氧化氢酶、柠檬酸、半胱氨酸、巯基甘油、巯基乙酸、巯基山梨醇、丁基甲基茴香醚、丁基化羟基甲苯和/或没食子酸丙酯。如本发明所公开,在一种含有本发明公开的抗体或其抗原结合片段的组合物中包括一种或多种抗氧剂如甲硫氨酸,可将降低所述抗体或其抗原结合片段的氧化。对氧化作用的减少可防止或减少结合活性或结合亲和力的降低,从而提高抗体稳定性并延长保质期。因此,在某些实施方式中,本发明提供的组合物中含有一种或多种所述的抗体或其抗原结合片段以及一种或多种抗氧剂例如甲硫氨酸。本发明进一步提供了多种方法,通过将本发明中提供的抗体或其抗原结合片段与一种或多种抗氧剂混合,例如甲硫氨酸,可防止所述抗体或其抗原结合片段氧化、延长其保质期和/或提高其活性。适宜的保湿剂包括乙二醇、甘油或山梨醇。适宜的润滑剂包括,例如,鲸酯蜡、氢化植物油、硬脂酸镁、硬脂酸甲酯、矿物油、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物、聚乙二醇、聚乙烯醇、十二烷基硫酸钠或白蜡,或者其两种或多种的混合物。适宜的乳化剂包括卡波姆、聚氧乙烯-20-十八烷基醚、十六十八醇、十六醇、胆固醇、硬脂酸二甘醇酯、硬脂酸甘油酯、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羊毛脂、聚氧乙烯十二烷基醚、甲基纤维素、聚氧乙烯硬脂酸酯、聚山梨醇酯、丙二醇单硬脂酸酯、脱水山梨醇酯或硬脂酸。

[0234] 进一步的说,药用可接受的运载体可包括,例如,水相介质如氯化钠注射液、林格氏液注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液、或葡萄糖和乳酸林格注射液、非水介质例如:植物来源的不挥发性油、棉花子油、玉米油、芝麻油、或者花生油、细菌抑制或真菌抑制浓度下的抗菌物质、等渗剂如:氯化钠或葡萄糖、缓冲液如:磷酸盐或枸橼酸盐缓冲液,抗氧化剂如:硫酸氢钠,局部麻醉剂如:盐酸普鲁卡因,助悬剂和分散剂如:羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮,乳化剂如:聚山梨醇酯80(吐温-80)、螯合试剂如EDTA(乙二胺四乙酸)或EGTA(乙二醇四乙酸)、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。作为载剂的抗菌剂可加入多次剂量容器中的药物组合物中,其包括酚类或甲酚、汞制剂、苯甲醇、氯代丁醇、甲基和丙基对羟基苯甲酸酯、噻汞撒、氯苯甲烷铵和氯苯乙铵。适用的辅料可包括,例如,水、盐、葡萄糖、甘油或乙醇。适用的无毒辅助物质可包括,例如,润湿剂或乳化剂、pH值缓冲剂、稳定剂、增溶剂,或者醋酸钠、去水山梨糖醇月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或者环糊精之类的物质。

[0235] 所述药物组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳剂、乳液、泡沫、丸剂、胶囊、片剂、持续释放制剂、软膏剂、乳膏剂、糊剂、凝胶剂、喷雾剂、气雾剂或粉末。口服制剂可以包括标准载体如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0236] 在某些实施方式中,所述药物组合物被制剂成可注射的组合物。可注射的药物组合物可以任何常规的形式制备,例如,液体溶剂、悬浮剂、乳化剂或适用于产生液体溶剂、悬浮剂或乳化剂的固体形式。注射制剂可包括现用于注射的无菌和/或无热原溶液、使用前现与溶剂结合的无菌干燥的可溶物,如冻干粉,包括皮下片、注射即用的无菌悬浮剂、使用前现与介质结合的无菌干燥不溶产品,和无菌和/或无热原的乳剂。溶剂可以为水相或非水相。

[0237] 在某些实施方式中,单位剂量的胃肠外制剂包装在安瓿、药瓶或带有针头的针筒中。本领域习知,所有胃肠外给药的制剂应为无菌无热原。

[0238] 在某些实施方式中,通过将本申请公开的抗体或其抗原结合片段溶解于适当的溶剂中可制备无菌冻干的粉末。所述溶剂可含有提高稳定性的赋形剂或者粉末状或由粉末制备的重构溶液的其他药理成分。适用的赋形剂包括,但不限于,水、葡萄糖、三梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他适用的物质。溶剂可含有缓冲液,如枸橼酸缓冲液、磷酸钠或磷酸钾缓冲液或其他本技术人员公知的缓冲液,在一个实施方式中,缓冲液的pH为中性。在本领域公知的标准条件下对所述溶解进行随后的过滤除菌,然后冻干制得理想的制剂。在一个实施方式中,将所得的溶液分装至药瓶中冻干。每支药瓶可容纳单次剂量或多次剂量的所述抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段或其组合物。每支药瓶中的装入量可略微高于每次剂量所需或多次剂量所需(例如,10%过量),从而保证取样准确和给药准确。冻干粉可在适当的条件下储存,如在约4°C到室温范围。

[0239] 用注射用水将冻干粉重构得到用于胃肠外给药的制剂。在一个实施方式中,可将冻干粉加至无菌和/或无热原水或其他适用的液体载剂中重构。精确的量由选择的疗法决定,可根据经验确定。

[0240] 还提供了用于治疗PD-L1相关病况的治疗方法,包括将治疗有效量的本申请所述的PD-L1抗体或其抗原结合片段施用给个体,由此治疗或预防与PD-L1相关的病况或病症。在另一个实施方式中,还提供了治疗会从上调的免疫应答获益的个体的病况的方法,包括对所述需要其的个体施用治疗有效量的本申请所述的PD-L1抗体。

[0241] 本申请中提供的抗体或其抗原结合片段的治疗有效剂量(当单独使用或与其他药剂(如化疗剂)联用时)依赖于本领域公知的多种因素,例如所治疗的疾病类型、抗体类型、体重、年龄、过往病史、现用治疗、个体的健康状况、免疫状况和交叉反应的潜在可能性、过敏、敏感和副作用,以及给药途径和类型、疾病的严重程度和进展,以及主治医师或兽医的判断。在某些实施方式中,本申请所述的抗体或抗原结合片段可以每日一次或多次以约0.01mg/kg至约100mg/kg(例如,每日一次或多次以约0.01mg/kg、约0.3mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约3mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约45mg/kg、约50mg/kg、约55mg/kg、约60mg/kg、约65mg/kg、约70mg/kg、约75mg/kg、约80mg/kg、约85mg/kg、约90mg/kg、约95mg/kg或约100mg/kg)的治疗有效剂量施用。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段以约50mg/kg或更低的剂量施用,在某些实施方式中,剂量为20mg/kg或更低、10mg/kg或更低、3mg/kg或更低、1mg/kg或更低、0.3mg/kg或更低,或者0.1mg/kg或更低。在某些实施方式中,施用剂量可以在治疗过程中改变。例如,在某些实施方式中,初始施用剂量可以高于随后的施用剂量。在某些实施方式中,可以在治疗过程中根据个体的反应改变施用剂量。

[0242] 给药方案可通过调整达到最佳所需应答(例如,治疗应答)。在某些实施方式中,一次性地或在一系列的治疗中向个体施用本申请所述的抗体或抗原结合片段。在某些实施方式中,取决于疾病的类型和严重程度,通过一次或多次的单独施用,或通过连续输注,向个体施用本申请所述的抗体或抗原结合片段。指导可见于例如美国专利号4,657,760;5,206,344;5,225,212。

[0243] 本发明中公开的抗体和抗原结合片段可通过本领域公知的任何给药途径给药,例如胃肠外给药(例如,皮下注射、腹腔注射、静脉注射,包括静脉输注、肌肉注射或皮内注射)或非胃肠外给药(例如,口服给药、鼻内给药、眼内给药、舌下给药、直肠给药或局部给药)途径。

[0244] 在某些实施方式中,可以以控释方式施用本申请公开的抗体和抗原结合片段。可以将控释胃肠外制剂制成植入物、油性注射剂或微粒系统(例如,微球、微粒、微囊、纳米胶囊、纳米球和纳米颗粒)(参见Bang, A. J., *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pa., (1995); Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*, J. Kreuter编, Marcel Dekker, Inc., 纽约州纽约, pp. 219-342 (1994); Tice&Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus编, Marcel Dekker, Inc. New York, 纽约州纽约, pp. 315-339, (1992))。在某些实施方式中,可以在可降解或不可降解的聚合物基质中施用本申请公开的PD-L1抗体和抗原结合片段(参见Langer, *Accounts Chem. Res.* 26:537-542, 1993)。

[0245] 与PD-L1相关的病况可以是与免疫相关的疾病或病症。在某些实施方式中,病况是实体瘤、血液病、传染病、自身免疫性疾病或纤维化疾病。在某些实施方式中,实体瘤包括例如非小细胞肺癌(鳞状/非鳞状)、小细胞肺癌、肾细胞癌、结直肠癌、结肠癌、卵巢癌、乳腺癌(包括基底乳腺癌、导管癌和小叶乳腺癌)、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、胸腺癌,黑色素瘤、骨髓瘤、真菌病、梅克尔细胞癌、肝细胞癌(HCC)、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、淋巴恶性肿瘤、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、乳头状甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤。血液系统病症包括如经典型霍奇金氏淋巴瘤(CHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的B细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性髓性白血病和成髓细胞、早幼粒细胞、骨髓单核细胞、单核细胞白血病和红白血病、慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、真性红细胞增多症、肥大细胞衍生的肿瘤、EBV-阳性和阴性PTLD、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞淋巴瘤,结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌、与HHV8相关的原发性渗出性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓发育不良综合征、毛细胞白血病和骨髓发育不良、中枢神经系统肿瘤(CNS),如原发性CNS淋巴瘤、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。在某些实施方式中,肿瘤和癌症是转移性的,特别是表达PD-L1的转移性肿瘤。在某些实施方式中,肿瘤是黑色素瘤或结肠癌。

[0246] 在某些实施方式中,与PD-L1相关的病况和病症包括自身免疫性或炎性疾病,如系统性红斑狼疮(SLE)、肠粘膜炎症,与结肠炎相关的消耗性疾病、多发性硬化、病毒感染、类风湿性关节炎、骨关节炎、克罗恩病和炎性肠病、牛皮癣、系统性硬皮病、自身免疫性糖尿病等。在某些实施方式中,与PD-L1相关的病况或病症包括传染病,如真菌感染、寄生虫/原生动物感染或慢性病毒感染,例如球孢子菌病、组织胞浆菌病、甲真菌病、曲霉菌病、芽生菌病、白色念珠菌病、副球孢子菌病、微孢子虫病、棘阿米巴角膜炎、阿米巴病、蛔虫病、巴贝斯虫病、小袋纤毛虫病、贝利斯蛔虫病、南美锥虫病、华支睾吸虫病、锥虫病、隐孢子虫病、裂头绦虫病、麦地那龙线虫病、包虫病、象皮病、蛲虫病、肝片吸虫病、姜片虫病、丝虫病、贾第虫病、颤口线虫病、膜壳绦虫病、等孢球虫病、片山热、利什曼病、莱姆病、疟疾、后殖吸虫病、蝇蛆病、盘尾丝虫病、虱病、疥疮、血吸虫病、昏睡病、类圆线虫病、绦虫病、弓蛔虫病、弓形虫病、旋毛虫病、鞭虫病、锥虫病、蠕虫感染、乙肝病毒(HBV)感染、丙肝病毒(HCV)感染、疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、HIV、巨细胞病毒、I型单纯疱疹病毒、II型单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒、腺病毒、I型人免疫缺陷病毒、II型人免疫缺陷病毒、与卡波西氏肉瘤相关的疱疹病毒流行病、细环病毒(Torqueteno病毒)、I型人T淋巴细胞病毒、II型人T淋巴细胞病毒、水痘带状疱疹、JC病毒或BK病毒。在某些实施方式中,与PD-L1相关的病况包括纤维化疾病,如肾小球肾炎、神经瘢痕、皮肤瘢痕、肺部纤维化、肺纤维化、辐射诱发的纤维化、肝纤维化、骨髓纤维化。

[0247] 使用方法

[0248] 本公开内容还提供了使用抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段的方法。

[0249] 在一些实施方式中,本公开内容提供了治疗个体中与PD-L1相关的病况的方法,所述方法包括向个体施用治疗有效量的抗体或其抗原结合片段。在某些实施方式中,个体已被鉴定为患有可能对PD-L1拮抗剂产生应答的疾病或病况。在某些实施方式中,本公开内容提供了预防、检测或诊断与PD-L1相关的病况的方法,所述方法包括将本申请所述的PD-L1抗体或其抗原结合片段与获取自疑似患有或患有与PD-L1相关的病况,或处于与PD-L1相关的病况的风险中的个体的生物样品接触,并确定与生物样品中的PD-L1结合的PD-L1抗体或其抗原结合片段的水平。

[0250] 对于治疗与PD-L1相关的病况,个体被检测为PD-L1表达阳性,或被检测为PD-L1表达水平升高。可以使用各种方法来确定来自个体的测试生物样品中的PD-L1存在情况或水平。例如,可以将测试生物样品暴露于抗-PD-L1抗体或其抗原结合片段,其与PD-L1蛋白结合并检测其表达。或者,还可以使用诸如qPCR、逆转录PCR、微阵列、SAGE、FISH等的方法在核酸表达水平对PD-L1进行检测。在一些实施方式中,测试样品来源于癌细胞或组织(例如,来自器官的活检组织)、肿瘤浸润免疫细胞或体液(例如,血液或血清)。在某些实施方式中,在测试生物样品中存在PD-L1或其水平上调表明可能产生应答。在本申请中所使用的术语“上调”指与使用相同抗体检测的参照样品中PD-L1蛋白水平相比,使用本申请所述的抗体或其抗原结合片段在测试样品中检测的PD-L1蛋白水平的总的增加不少于10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或更多。参照样品可以是从健康或无疾病的个体中获得的对照样品,或者是从测试样品来源的个体中获得的健康或无疾病的样品,或者是在治疗病况过程中的较早时间点从同一个体获得的样品。例如,参照样品可以是与测试样品(例如,肿瘤)临近或在其附近的无病样品。

[0251] 本申请公开的抗体或抗原结合片段可单独给药或与一种或多种其他治疗手段或物质联合给药。例如,本申请公开的抗体或抗原结合片段可以与第二疗法联合施用,如放疗、化疗、靶向疗法、基因疗法、免疫疗法、激素疗法、血管生成抑制、姑息疗法、用于治疗癌症的手术(例如,肿瘤切除术)、用于化疗引起的并发症的一种或多种止吐药或其他治疗,或者用于治疗由PD-L1介导的癌症或任何医学病症的第二治疗剂,例如另一种抗体、治疗性多核苷酸、化疗剂、抗血管生成剂、细胞因子、其他细胞毒性剂、生长抑制剂。在某些这样的实施方式中,本发明公开的抗体和抗原结合片段与一种或多种其他的治疗剂联用时,可与所述的一种或多种治疗剂同时给药,在某些这样的实施方式中,所述的抗体和抗原结合片段和其他治疗剂可作为同一个药物组合物的一部分给药。但是,与其他治疗剂“联用”的抗体和抗原结合片段不需要与所述治疗剂同时给药或与该治疗剂在同一组合物中给药。本发明中“联用”的含义还包括在另一个治疗剂之前或之后给药的抗体和抗原结合片段,即使所述抗体或其抗原结合片段与第二种治疗剂通过不同给药方式给药。在可能的情况下,与本发明公开的抗体或其抗原结合片段联用的其他治疗剂可参照该其他治疗剂的产品说明书的方法用药,或参照外科医生的案头参考书2003 (Physicians' Desk Reference, 第57版; Medical Economics Company; ISBN:1563634457; 第57版(2002年11月)),或参照其他本领域公知的方法。在某些实施方式中,与本申请提供的PD-L1抗体联合施用的抗血管生成剂是用于抗血管生成疗法的单克隆抗体,如贝伐单抗(VEGF抗体)、IMC-1C11或DC101(VEGFR-2抗体)、mF4-31C1(VEGFR-3抗体)和Vitaxin(整合素 $\alpha_v\beta_3$ 抗体)。

[0252] 在某些实施方式中,治疗剂可以诱导或激发针对癌症的免疫应答。例如,可以将肿瘤疫苗用于诱导对某种肿瘤或癌症的免疫应答。还可以将细胞因子疗法用于增强免疫系统的肿瘤抗原提呈。细胞因子疗法的实例包括但不限于干扰素如干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 和- $\gamma$ ,集落刺激因子如巨噬细胞-CSF、粒细胞巨噬细胞CSF和粒细胞-CSF,胰岛素生长因子(IGF-1),血管内皮生长因子(VEGF),转化生长因子(TGF),成纤维细胞生长因子(FGF),白介素(如IL-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11和IL-12),肿瘤坏死因子(如TNF- $\alpha$ 和TNF- $\beta$ )或其组合。还可以使用使免疫抑制靶标失活的药剂,例如IL-1拮抗剂(IL-1A)、VEGFR2拮抗剂(例如,瓦他拉尼、舒尼替尼、索拉非尼、帕唑帕尼)、TGF- $\beta$ 抑制剂、FGFR拮抗剂、血小板源生长因子受体(PDGFR)拮抗剂(例如,伊马替尼、舒尼替尼、索拉非尼、帕唑帕尼)、表皮生长因子受体(EGFR, ErbB)拮抗剂(例如,吉非替尼、拉帕替尼、卡奈替尼)、IL-10抑制剂、Fas配体抑制剂或其任意组合。另一组药剂包括活化对肿瘤或癌细胞的免疫应答的药剂,例如增强T细胞活化的药剂(例如,T细胞共刺激分子(如CTLA-4、ICOS和OX-40)激动剂)和增强树突细胞功能和抗原提呈的药剂。

### [0253] 抗-PD-L1抗体体内有效性的筛选和评估

[0254] 为了筛选和/或评估PD-L1抗体或其抗原结合片段的体内有效性(例如,结合活性或结合亲和性),产生接种了表达人PD-L1蛋白的非人肿瘤细胞的非人动物。在某些实施方式中,非人肿瘤细胞是啮齿类(例如,小鼠、大鼠或仓鼠等)细胞。在某些实施方式中,非人肿瘤细胞是黑色素瘤细胞系(B16)或小鼠结肠癌细胞系(MC38)。非人肿瘤细胞可以包含编码内源性非人PD-L1基因区段失活的人PD-L1蛋白的多核苷酸。靶基因的失活可以由位于内源性基因座的蛋白编码序列的基因破坏、突变、添加、基因沉默(例如, RNAi基因反义)或基因缺失(例如,编码序列或包含翼侧区的编码序列的部分或全部缺失)引起,从而消除或最小

化非人靶基因的表达,或者产生不与其配体结合的功能上失活/截短的多肽。编码序列在5'和3'末端的翼侧区可以在约1bp至约500bp的范围内,或者翼侧区可以大于500bp但是将不包括根据本公开内容的其他基因的失活。本申请中使用的“基因破坏”是指向天然存在的序列中加入一个或多个核苷酸或氨基酸。基因破坏可以是将标记物/报告基因加入或插入蛋白编码序列。在某些实施方式中,失活是不可逆的。在某些实施方式中,失活导致在细胞中不具有可检测的靶基因或基因产物的活性。使用本领域中适宜的方法将靶基因失活,例如同源重组、RNA干扰(RNAi)或CRISPR/Cas9系统。在某些实施方式中,将编码人PD-L1蛋白的人PD-L1基因区段可操作地插入内源性非人PD-L1基因座(基因置换)。在某些实施方式中,将插入的编码人PD-L1的多核苷酸整合在随机的、非特异性位置(基因增强)。在又一个实施方式中,编码人PD-L1的多核苷酸可以作为游离基因稳定地保持在细胞中,例如以独立的、游离DNA区段形式,并且游离DNA的复制独立于宿主细胞周期或者与宿主细胞周期同步。

[0255] 可以通过细胞表面表达的FACS分析或检测靶基因转录,识别靶基因完全失活的非人肿瘤细胞。可以通过本领域公知的任意适宜方法(如同源重组和转基因方法)经由如本公开内容所述的任意适宜表达载体(如慢病毒载体)将编码人PD-L1蛋白的多核苷酸引入肿瘤细胞。可以通过细胞表面表达的FACS分析或采用本领域的任意适宜方法检测靶基因转录,识别靶基因完全失活和/或表达所引入的目的基因的肿瘤细胞。

[0256] 筛选或评估针对人PD-L1的抗体或其抗原结合片段体内有效性的方法包括将包含编码人PD-L1蛋白的多核苷酸的肿瘤细胞接种至非人动物,将抗体与非人动物中的肿瘤细胞接触并确定肿瘤细胞的肿瘤负荷。本申请中使用的“肿瘤负荷”是个体中肿瘤细胞的量,其可以通过肿瘤体积、数量或重量确定。肿瘤细胞可以是实体肿瘤细胞或非实体肿瘤细胞(如血液细胞)。肿瘤细胞可以是人肿瘤细胞或非人肿瘤细胞。在某些实施方式中,将肿瘤细胞接种至同源非人动物以产生同源肿瘤模型。在某些实施方式中,在接种至非人动物之前,将肿瘤细胞培养几代。在某些实施方式中,非人动物具有人免疫系统。在某些实施方式中,通过对给予PD-L1抗体的非人动物中肿瘤体积的生长抑制与对照进行比较确定PD-L1抗体或其抗原结合片段的体内有效性。

[0257] 本发明还包括以下实施方式:

[0258] 实施方式1.一种分离的PD-L1抗体,所述抗体包含重链HCDR1、HCDR2和HCDR3以及轻链LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,其中

[0259] 所述HCDR1序列是TYWX<sub>1</sub>H (SEQ ID NO:1)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列;

[0260] 所述HCDR2序列是MIQPNSGGTKYNX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>FKX<sub>4</sub> (SEQ ID NO:2)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列;

[0261] 所述HCDR3序列是GAGTVDYFDY (SEQ ID NO:3)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列;

[0262] 所述LCDR1序列是RASESVDIYGNFSFMH (SEQ ID NO:4)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列;

[0263] 所述LCDR2序列是RASNLES (SEQ ID NO:5)或与其具有至少80%序列同一性的同源序列;

[0264] 所述LCDR3序列是X<sub>5</sub>QSX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>DPYT (SEQ ID NO:6)或与其具有至少80%序列同一性的

同源序列；

[0265] 其中X<sub>1</sub>是I或M;X<sub>2</sub>是D或E;X<sub>3</sub>是Q或K;X<sub>4</sub>是N或K;X<sub>5</sub>是Q或H;X<sub>6</sub>是N或T;X<sub>7</sub>是D或E。

[0266] 实施方式2.如实施方式1所述的抗体,其中X<sub>1</sub>是I;X<sub>2</sub>是D;X<sub>3</sub>是Q;X<sub>4</sub>是N;X<sub>5</sub>是Q;X<sub>6</sub>是N;X<sub>7</sub>是D。

[0267] 实施方式3.如实施方式1所述的抗体,其中X<sub>1</sub>是M;X<sub>2</sub>是E;X<sub>3</sub>是K;X<sub>4</sub>是K;X<sub>5</sub>是Q;X<sub>6</sub>是T;X<sub>7</sub>是E。

[0268] 实施方式4.一种分离的PD-L1抗体,所述抗体包含1、2、3、4、5或6个CDR,所述CDR选自SEQ ID NO:7-12或与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0269] 实施方式5.如实施方式1-4中任意一项所述的抗体,所述抗体包含重链框架序列HFR1、HFR2、HFR3和HFR4以及轻链框架序列LFR1、LFR2、LFR3和LFR4,其中重链可变区的序列如下式所示:HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4,并且轻链可变区的序列如下式所示:LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4。

[0270] 实施方式6.如实施方式5所述的抗体,其中

[0271] 所述HFR1序列是Xa<sub>1</sub>VQLXa<sub>2</sub>QXa<sub>3</sub>GAEXa<sub>4</sub>Xa<sub>5</sub>KPGASVKXa<sub>6</sub>SCKASGYXa<sub>7</sub>FT (SEQ ID NO:13)；

[0272] 所述HFR2序列是WVXa<sub>8</sub>QXa<sub>9</sub>PGQGLEWIG (SEQ ID NO:14)；

[0273] 所述HFR3序列是

[0274] Xa<sub>10</sub>Xa<sub>11</sub>TLTVDXa<sub>12</sub>SXa<sub>13</sub>Xa<sub>14</sub>TAXa<sub>15</sub>MXa<sub>16</sub>LSXa<sub>17</sub>LXa<sub>18</sub>SXa<sub>19</sub>DXa<sub>20</sub>AVXa<sub>33</sub>YCAR (SEQ ID NO:15)；

[0275] 所述HFR4序列是WGXA<sub>34</sub>GXA<sub>21</sub>TXA<sub>35</sub>Xa<sub>22</sub>Xa<sub>23</sub>SS (SEQ ID NO:16)；

[0276] 所述LFR1序列是Xa<sub>36</sub>IVXa<sub>37</sub>TXa<sub>24</sub>Xa<sub>38</sub>PXa<sub>25</sub>Xa<sub>39</sub>LXa<sub>26</sub>VSXa<sub>27</sub>GXA<sub>40</sub>RXa<sub>41</sub>TIXa<sub>28</sub>C (SEQ ID NO:17)；

[0277] 所述LFR2序列是WYQQKPGQXa<sub>29</sub>PKLLIY (SEQ ID NO:18)；

[0278] 所述LFR3序列是

[0279] GXa<sub>42</sub>PXa<sub>43</sub>RFXa<sub>44</sub>GSGXA<sub>45</sub>Xa<sub>46</sub>RTDFTXa<sub>47</sub>TIXa<sub>48</sub>Xa<sub>49</sub>VXa<sub>50</sub>AXa<sub>30</sub>DXa<sub>31</sub>AXa<sub>51</sub>YXa<sub>52</sub>C (SEQ ID NO:19)；

[0280] 所述LFR4序列是FGXA<sub>53</sub>GTKLEXa<sub>32</sub>K (SEQ ID NO:20)；

[0281] 其中Xa<sub>1</sub>是Q或L;Xa<sub>2</sub>是Q或V;Xa<sub>3</sub>是S或P;Xa<sub>4</sub>是L或V;Xa<sub>5</sub>是V或K;Xa<sub>6</sub>是L或V;Xa<sub>7</sub>是T、S或I;Xa<sub>8</sub>是W、K或R;Xa<sub>9</sub>是R或A;Xa<sub>10</sub>是R、K或T;Xa<sub>11</sub>是V或A;Xa<sub>12</sub>是K或T;Xa<sub>13</sub>是S或I;Xa<sub>14</sub>是S或T;Xa<sub>15</sub>是Y或S;Xa<sub>16</sub>是Q或E;Xa<sub>17</sub>是S、G或R;Xa<sub>18</sub>是T或R;Xa<sub>19</sub>是E或D;Xa<sub>20</sub>是S或T;Xa<sub>21</sub>是T或S;Xa<sub>22</sub>是S或T;Xa<sub>23</sub>是V或I;Xa<sub>24</sub>是Q或H;Xa<sub>25</sub>是A、K或V;Xa<sub>26</sub>是A、S或T;Xa<sub>27</sub>是L、A或V;Xa<sub>28</sub>是S或T;Xa<sub>29</sub>是S、P或A;Xa<sub>30</sub>是D、E、N或Q;Xa<sub>31</sub>是V、L或T;Xa<sub>32</sub>是L、T或I;Xa<sub>33</sub>是F或Y;Xa<sub>34</sub>是T或Q;Xa<sub>35</sub>是V或L;Xa<sub>36</sub>是D或S;Xa<sub>37</sub>是M或L;Xa<sub>38</sub>是T或S;Xa<sub>39</sub>是F或S;Xa<sub>40</sub>是D或Q;Xa<sub>41</sub>是V或A;Xa<sub>42</sub>是V或I;Xa<sub>43</sub>是D或A;Xa<sub>44</sub>是T或S;Xa<sub>45</sub>是Y或S;Xa<sub>46</sub>是G或R;Xa<sub>47</sub>是F或L;Xa<sub>48</sub>是S或N;Xa<sub>49</sub>是T或P;Xa<sub>50</sub>是Q或E;Xa<sub>51</sub>是V或T;Xa<sub>52</sub>是F或Y;Xa<sub>53</sub>是A或G。

[0282] 实施方式7.如实施方式6所述的抗体,其中Xa<sub>1</sub>是Q;Xa<sub>2</sub>是V;Xa<sub>3</sub>是S;Xa<sub>4</sub>是V;Xa<sub>5</sub>是K;Xa<sub>6</sub>是L;Xa<sub>7</sub>是I;Xa<sub>8</sub>是K;Xa<sub>9</sub>是R;Xa<sub>10</sub>是R或K;Xa<sub>11</sub>是A;Xa<sub>12</sub>是K;Xa<sub>13</sub>是I;Xa<sub>14</sub>是S;Xa<sub>15</sub>是Y;Xa<sub>16</sub>是E;Xa<sub>17</sub>是R;Xa<sub>18</sub>是T;Xa<sub>19</sub>是D;Xa<sub>20</sub>是T;Xa<sub>21</sub>是T或S;Xa<sub>22</sub>是T或S;Xa<sub>23</sub>是I或V;Xa<sub>24</sub>是Q;Xa<sub>25</sub>是A;Xa<sub>26</sub>是A;Xa<sub>27</sub>是V;Xa<sub>28</sub>是T;Xa<sub>29</sub>是A或P;Xa<sub>30</sub>是Q;Xa<sub>31</sub>是T;Xa<sub>32</sub>是T或I;Xa<sub>33</sub>是Y;Xa<sub>34</sub>是Q;Xa<sub>35</sub>

是L;Xa<sub>36</sub>是D;Xa<sub>37</sub>是L;Xa<sub>38</sub>是S;Xa<sub>39</sub>是S;Xa<sub>40</sub>是Q;Xa<sub>41</sub>是A;Xa<sub>42</sub>是I;Xa<sub>43</sub>是A;Xa<sub>44</sub>是S;Xa<sub>45</sub>是S;Xa<sub>46</sub>是R;Xa<sub>47</sub>是L;Xa<sub>48</sub>是N;Xa<sub>49</sub>是P;Xa<sub>50</sub>是E;Xa<sub>51</sub>是T;Xa<sub>52</sub>是Y;Xa<sub>53</sub>是G。

[0283] 实施方式8.如实施方式6所述的抗体,其中Xa<sub>1</sub>是Q;Xa<sub>2</sub>是V;Xa<sub>3</sub>是S;Xa<sub>4</sub>是V;Xa<sub>5</sub>是K;Xa<sub>6</sub>是L;Xa<sub>7</sub>是I;Xa<sub>8</sub>是K;Xa<sub>9</sub>是R;Xa<sub>10</sub>是R;Xa<sub>11</sub>是A;Xa<sub>12</sub>是K;Xa<sub>13</sub>是I;Xa<sub>14</sub>是S;Xa<sub>15</sub>是Y;Xa<sub>16</sub>是E;Xa<sub>17</sub>是R;Xa<sub>18</sub>是T;Xa<sub>19</sub>是D;Xa<sub>20</sub>是T;Xa<sub>21</sub>是T;Xa<sub>22</sub>是S;Xa<sub>23</sub>是I;Xa<sub>24</sub>是Q;Xa<sub>25</sub>是A;Xa<sub>26</sub>是A;Xa<sub>27</sub>是V;Xa<sub>28</sub>是T;Xa<sub>29</sub>是A;Xa<sub>30</sub>是Q;Xa<sub>31</sub>是T;Xa<sub>32</sub>是T;Xa<sub>33</sub>是Y;Xa<sub>34</sub>是Q;Xa<sub>35</sub>是L;Xa<sub>36</sub>是D;Xa<sub>37</sub>是L;Xa<sub>38</sub>是S;Xa<sub>39</sub>是S;Xa<sub>40</sub>是Q;Xa<sub>41</sub>是A;Xa<sub>42</sub>是I;Xa<sub>43</sub>是A;Xa<sub>44</sub>是S;Xa<sub>45</sub>是S;Xa<sub>46</sub>是R;Xa<sub>47</sub>是L;Xa<sub>48</sub>是N;Xa<sub>49</sub>是P;Xa<sub>50</sub>是E;Xa<sub>51</sub>是T;Xa<sub>52</sub>是Y;Xa<sub>53</sub>是G。

[0284] 实施方式9.如实施方式6所述的抗体,其中Xa<sub>1</sub>是Q;Xa<sub>2</sub>是V;Xa<sub>3</sub>是S;Xa<sub>4</sub>是V;Xa<sub>5</sub>是K;Xa<sub>6</sub>是L;Xa<sub>7</sub>是I;Xa<sub>8</sub>是K;Xa<sub>9</sub>是R;Xa<sub>10</sub>是K;Xa<sub>11</sub>是A;Xa<sub>12</sub>是K;Xa<sub>13</sub>是I;Xa<sub>14</sub>是S;Xa<sub>15</sub>是Y;Xa<sub>16</sub>是E;Xa<sub>17</sub>是R;Xa<sub>18</sub>是T;Xa<sub>19</sub>是D;Xa<sub>20</sub>是T;Xa<sub>21</sub>是S;Xa<sub>22</sub>是T;Xa<sub>23</sub>是V;Xa<sub>24</sub>是Q;Xa<sub>25</sub>是A;Xa<sub>26</sub>是A;Xa<sub>27</sub>是V;Xa<sub>28</sub>是T;Xa<sub>29</sub>是P;Xa<sub>30</sub>是Q;Xa<sub>31</sub>是T;Xa<sub>32</sub>是I;Xa<sub>33</sub>是Y;Xa<sub>34</sub>是Q;Xa<sub>35</sub>是L;Xa<sub>36</sub>是D;Xa<sub>37</sub>是L;Xa<sub>38</sub>是S;Xa<sub>39</sub>是S;Xa<sub>40</sub>是Q;Xa<sub>41</sub>是A;Xa<sub>42</sub>是I;Xa<sub>43</sub>是A;Xa<sub>44</sub>是S;Xa<sub>45</sub>是S;Xa<sub>46</sub>是R;Xa<sub>47</sub>是L;Xa<sub>48</sub>是N;Xa<sub>49</sub>是P;Xa<sub>50</sub>是E;Xa<sub>51</sub>是T;Xa<sub>52</sub>是Y;Xa<sub>53</sub>是G。

[0285] 实施方式10.如实施方式1-3和5-9中任意一项所述的抗体,所述抗体包含如SEQ ID NO:61中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:62中所示的轻链可变区。

[0286] 实施方式11.如实施方式1-3和5-9中任意一项所述的抗体,所述抗体包含如SEQ ID NO:63中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:64中所示的轻链可变区。

[0287] 实施方式12.如实施方式4-9中任意一项所述的抗体,所述抗体包含如SEQ ID NO:21中所示的重链可变区或其人源化形式。

[0288] 实施方式13.如实施方式4-9和12中任意一项所述的抗体,所述抗体包含如SEQ ID NO:22中所示的轻链可变区或其人源化形式。

[0289] 实施方式14.一种分离的PD-L1抗体,所述抗体通过实验测定在酸性pH下与PD-L1结合,以及通过所述实验测定在中性pH下与PD-L1结合,其中所述在酸性pH下与PD-L1结合显著低于所述在中性pH下与PD-L1结合。

[0290] 实施方式15.如实施方式14所述的抗体,其中所述在酸性pH下与PD-L1结合不超过所述在中性pH下与PD-L1结合的80%。

[0291] 实施方式16.如实施方式14或15所述的抗体,其中所述中性pH是7.4,以及所述酸性pH是6.0、5.5、5.0、4.5或4.0。

[0292] 实施方式17.如实施方式14-16中任意一项所述的抗体,其中所述酸性pH是pH6.0、pH5.5或pH5.0,以及所述中性pH是pH7.4。

[0293] 实施方式18.如实施方式14-17中任意一项所述的抗体,其中所述测定检测经由ELISA、FACS、表面等离子体共振、GST pull down、表位标签、免疫沉淀、Far-Western、荧光共振能量转移、时间分辨荧光免疫测定(TR-FIA)、放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定、乳胶凝集、Western印迹、免疫组织化学或其任意组合,测定结合或阻断活性。

[0294] 实施方式19.一种分离的PD-L1抗体,所述抗体与前述任意一项实施方式所述的抗体结合至相同表位或与前述任意一项实施方式所述的抗体竞争性结合。

[0295] 实施方式20.如实施方式19所述的抗体,其中所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个:E58、K62、N63、I64、S80和Y81。

[0296] 实施方式21.如实施方式19或20所述的抗体,其中所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个:R113、M115、Y123、K124和R125。

[0297] 实施方式22.如实施方式19-21中任意一项所述的抗体,其中所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1) E58、R113、M115、Y123和K124;2) E58、S80、R113和R125。

[0298] 实施方式23.如实施方式19-22中任意一项所述的抗体,其中所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个:K62、N63、I64、Y81和D122。

[0299] 实施方式24.如实施方式19-23中任意一项所述的抗体,其中所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1) E58、N63、I64、S80、Y81、R113和R125;2) E58、S80、R113、M115、D122、Y123、K124和R125;3) E58、K62、N63、S80、Y81、R113和R125;4) E58、N63、I64、S80、Y81、R113、K124和R125。

[0300] 实施方式25.一种治疗个体中与PD-L1相关的病况的方法,所述方法包括向所述个体施用如实施方式1-24中任意一项所述的PD-L1抗体,从而治疗所述病况。

[0301] 实施方式26.如实施方式25所述的方法,其中所述抗体以不超过参照剂量50%的剂量施用,其中将参照抗体达到相当的体内疗效时的剂量确定为参照剂量,其中所述参照抗体在酸性pH和中性pH下均显示出与PD-L1相似的结合,并且其中所述参照抗体和所述抗体在中性pH下具有与PD-L1相似的结合。

[0302] 实施方式27.如实施方式25或26所述的方法,其中所述抗体以低于参照给药频率的给药频率施用,其中将参照抗体达到相当的体内疗效时的给药频率确定为参照给药频率,其中所述参照抗体在酸性pH和中性pH下均显示出与PD-L1相似的结合,并且其中所述参照抗体和所述抗体在中性pH下具有与PD-L1相似的结合。

[0303] 实施方式28.如实施方式25-27中任意一项所述的方法,其中所述抗体在靶器官中具有比参照体内半衰期更长的体内半衰期,其中所述参照体内半衰期通过参照抗体确定,其中所述参照抗体在酸性pH和中性pH下均显示出与PD-L1相似的结合,并且其中所述参照抗体和所述抗体在中性pH下具有与PD-L1相似的结合。

[0304] 实施方式29.如实施方式28所述的方法,其中所述靶器官包括血清、肾、肺、胰腺、肝、胆囊、膀胱、皮肤、食管、卵巢、乳房、结肠、直肠、胃、脾或脑中的一个或多个。

[0305] 实施方式30.一种分离的PD-L1抗体,所述抗体包含重链HCDR1'、HCDR2' 和HCDR3' 以及轻链LCDR1'、LCDR2' 和LCDR3' 序列,其中

[0306] 所述HCDR1' 序列选自下组:DYYMN (SEQ ID NO:23)、SEQ ID NO:29、35、41以及与其具有至少80%序列同一性的同源序列;

[0307] 所述HCDR2' 序列选自下组:DINPNNGGTSYNX<sub>1</sub>KFX<sub>2</sub>G (SEQ ID NO:24)、SEQ ID NO:30、36、42以及与其具有至少80%序列同一性的同源序列;

[0308] 所述HCDR3' 序列选自下组:VKWGDGPFAY (SEQ ID NO:25)、SEQ ID NO:31、37、43以及与其具有至少80%序列同一性的同源序列;

[0309] 所述LCDR1' 序列选自下组:X<sub>3</sub>ASQNVGAAVA (SEQ ID NO:26)、SEQ ID NO:32、38、44以及与其具有至少80%序列同一性的同源序列;

[0310] 所述LCDR2' 序列选自下组:SASNX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>T (SEQ ID NO:27)、SEQ ID NO:33、39、45以及与其具有至少80%序列同一性的同源序列;

[0311] 所述LCDR3' 序列选自下组: QQYSNYPT (SEQ ID NO:28)、SEQ ID NO:34、40、46以及与其具有至少80% 序列同一性的同源序列;

[0312] 其中X' <sub>1</sub>是H或Q;X' <sub>2</sub>是K或Q;X' <sub>3</sub>是K或Q;X' <sub>4</sub>是R或L;X' <sub>5</sub>是Y或E。

[0313] 实施方式31.如实施方式30所述的抗体,其中X' <sub>1</sub>是Q;X' <sub>2</sub>是Q;X' <sub>3</sub>是Q;X' <sub>4</sub>是R;和X' <sub>5</sub>是Y。

[0314] 实施方式32.如实施方式30-31中任意一项所述的抗体,包含如SEQ ID NO:65中所示的重链可变区和如SEQ ID NO:66中所示的轻链可变区。

[0315] 实施方式33.如实施方式30所述的抗体,包含

[0316] 1) 所述重链HCDR1' 是SEQ ID NO:29、HCDR2' 是SEQ ID NO:30和HCDR3' 是SEQ ID NO:31;

[0317] 2) 所述重链HCDR1' 是SEQ ID NO:35、HCDR2' 是SEQ ID NO:36和HCDR3' 是SEQ ID NO:37;或者

[0318] 3) 所述重链HCDR1' 是SEQ ID NO:41、HCDR2' 是SEQ ID NO:42和HCDR3' 是SEQ ID NO:43。

[0319] 实施方式34.如实施方式30或33所述的抗体,包含

[0320] 1) 所述轻链LCDR1' 是SEQ ID NO:32、LCDR2' 是SEQ ID NO:33和LCDR3' 是SEQ ID NO:34;

[0321] 2) 所述轻链LCDR1' 是SEQ ID NO:38、LCDR2' 是SEQ ID NO:39和LCDR3' 是SEQ ID NO:40;或者

[0322] 3) 所述轻链LCDR1' 是SEQ ID NO:44、LCDR2' 是SEQ ID NO:45和LCDR3' 是SEQ ID NO:46。

[0323] 实施方式35.如实施方式30和33-34中任意一项所述的抗体,其中

[0324] 1) 所述重链HCDR1' 是SEQ ID NO:29、HCDR2' 是SEQ ID NO:30和HCDR3' 是SEQ ID NO:31,所述轻链LCDR1' 是SEQ ID NO:32、LCDR2' 是SEQ ID NO:33和LCDR3' 是SEQ ID NO:34;

[0325] 2) 所述重链HCDR1' 是SEQ ID NO:35、HCDR2' 是SEQ ID NO:36和HCDR3' 是SEQ ID NO:37,所述轻链LCDR1' 是SEQ ID NO:38、LCDR2' 是SEQ ID NO:39和LCDR3' 是SEQ ID NO:40;或者

[0326] 3) 所述重链HCDR1' 是SEQ ID NO:41、HCDR2' 是SEQ ID NO:42和HCDR3' 是SEQ ID NO:43,所述轻链LCDR1' 是SEQ ID NO:44、LCDR2' 是SEQ ID NO:45和LCDR3' 是SEQ ID NO:46。

[0327] 实施方式36.如实施方式30和33-35中任意一项所述的抗体,包含选自下组的重链可变区:SEQ ID NO:55、57和59。

[0328] 实施方式37.如实施方式30和33-36中任意一项所述的抗体,包含选自下组的轻链可变区:SEQ ID NO:56、58和60。

[0329] 实施方式38.如实施方式30和33-37中任意一项所述的抗体,包含SEQ ID NO:55所示的重链可变区或其人源化形式,以及SEQ ID NO:56所示的轻链可变区或其人源化形式。

[0330] 实施方式39.如实施方式30和33-37中任意一项所述的抗体,包含SEQ ID NO:57所示的重链可变区或其人源化形式,以及SEQ ID NO:58所示的轻链可变区或其人源化形式。

- [0331] 实施方式40.如实施方式30和33-37中任意一项所述的抗体,包含SEQ ID NO:59所示的重链可变区或其人源化形式,以及SEQ ID NO:60所示的轻链可变区或其人源化形式。
- [0332] 实施方式41.一种分离的PD-L1抗体,所述抗体与如实施方式30-40中任意一项所述的抗体结合至相同表位或与如实施方式30-40中任意一项所述的抗体竞争性结合。
- [0333] 实施方式42.如实施方式41所述的抗体,其中所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个:E58和S80。
- [0334] 实施方式43.如实施方式41或42所述的抗体,其中所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个:Y56、R113、D122、Y123和R125。
- [0335] 实施方式44.如实施方式41-43中任意一项所述的抗体,其中所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1) E58、R113、D122、Y123和R125;2) Y56、E58和R113;3) E58、R113和R125。
- [0336] 实施方式45.如实施方式41-44中任意一项所述的抗体,其中所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个:S80和D122。
- [0337] 实施方式46.如实施方式41-45中任意一项所述的抗体,其中所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1) E58、S80、R113、D122、Y123和R125;2) E58、S80、R113和R125。
- [0338] 实施方式47.一种分离的PD-L1抗体,所述抗体具有高于76摄氏度的热转变中点(T<sub>m</sub>) ,所述热转变中点通过差示扫描量热法测定。
- [0339] 实施方式48.如实施方式47所述的抗体,其中所述热转变中点高于90摄氏度。
- [0340] 实施方式49.如实施方式1-24和30-48中任意一项所述的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、重组抗体、标记的抗体、二价抗体或抗独特型抗体。
- [0341] 实施方式50.如实施方式1-24和30-49中任意一项所述的抗体,其中所述抗体是选自下组的抗原结合片段:骆驼源化单结构域抗体、双功能抗体(diabody)、scFv、scFv二聚体、BsFv、dsFv、(dsFv)2、dsFv-dsFv'、Fv片段、Fab、Fab'、F(ab')2、ds双功能抗体、纳米抗体、结构域抗体、分离的CDR和二价结构域抗体。
- [0342] 实施方式51.一种药物组合物,所述药物组合物包含如实施方式1-24和30-50中任意一项所述的抗体。
- [0343] 实施方式52.一种多核苷酸,所述多核苷酸编码如实施方式1-24和30-50中任意一项所述的抗体。
- [0344] 实施方式53.一种载体,所述载体包含如实施方式52所述的多核苷酸。
- [0345] 实施方式54.一种分离的宿主细胞,所述宿主细胞包含如实施方式53所述的载体。
- [0346] 实施方式55.如实施方式54所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞产生由所述多核苷酸编码的所述抗体。
- [0347] 实施方式56.一种试剂盒,所述试剂盒包含如实施方式1-24和30-50中任意一项所述的抗体或如实施方式51所述的药物组合物。
- [0348] 实施方式57.一种生产PD-L1抗体的方法,所述方法包括在表达所述多核苷酸的条件下培养如实施方式54或实施方式55所述的宿主细胞。
- [0349] 实施方式58.一种药物组合物,所述药物组合物包含如实施方式1-24和30-50中任

意一项所述的PD-L1抗体和第二治疗剂。

[0350] 实施方式59. 如实施方式58所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂是在放疗、化疗、靶向疗法、基因疗法、免疫疗法、激素疗法、血管生成抑制、姑息治疗、外科手术或其组合中使用的药剂。

[0351] 实施方式60. 如实施方式59所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂是VEGFR2抗体。

[0352] 实施方式61. 一种治疗个体中与PD-L1相关的病况的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的如实施方式30-50中任意一项所述的抗体。

[0353] 实施方式62. 一种治疗个体中与PD-L1相关的病况的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的如实施方式59-61中任意一项所述的药物组合物。

[0354] 实施方式63. 一种分离的非人肿瘤细胞,所述肿瘤细胞包含编码人PD-L1蛋白的多核苷酸。

[0355] 实施方式64. 一种生产非人肿瘤细胞的方法,所述肿瘤细胞包含编码人PD-L1蛋白的多核苷酸,所述方法包括引入编码所述人PD-L1的多核苷酸。

[0356] 实施方式65. 如实施方式64所述的方法,所述方法还包括使内源性非人PD-L1基因失活。

[0357] 实施方式66. 一种筛选或评估针对人PD-L1的抗体的体内效力的方法,所述方法包括将包含编码人PD-L1蛋白的多核苷酸的非人肿瘤细胞接种进非人动物,将所述抗体与所述非人动物中的所述非人肿瘤细胞接触,并且确定所述非人肿瘤细胞的肿瘤负荷。

[0358] 实施方式67. 一种分离的PD-L1抗体,其中所述抗体与表位结合或竞争性地与所述表位结合,所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1) E58和S80;2) E58和R113;3) E58和D122;4) E58和R125。

[0359] 实施方式68. 如实施方式67所述的抗体,其中所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个:Y56和Y123。

[0360] 实施方式69. 如实施方式67或68所述的抗体,其中所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1) E58、R113、M115、Y123和K124;2) E58、S80、R113和R125;3) E58、R113、D122、Y123和R125;4) Y56、E58和R113;5) E58、R113和R125。

[0361] 实施方式70. 如实施方式67-69中任意一项所述的抗体,其中所述表位还包含下述PD-L1的氨基酸残基的至少一个:K62、N63、I64和Y81。

[0362] 实施方式71. 如实施方式67-70中任意一项所述的抗体,其中所述表位包含下述PD-L1的氨基酸残基的组合的一种:1) E58、N63、I64、S80、Y81、R113和R125;2) E58、S80、R113、M115、D122、Y123、K124和R125;3) E58、K62、N63、S80、Y81、R113和R125;4) E58、N63、I64、S80、Y81、R113、K124和R125;5) E58、S80、R113、D122、Y123和R125。

[0363] 实施方式72. 一种分离的PD-L1抗体,其中所述抗体与由PD-L1的氨基酸残基S80组成的表位结合或竞争性地与所述表位结合。

[0364] 实施方式73. 一种分离的PD-L1抗体,所述抗体具有至少7天的持续的PD-L1受体占据期。

[0365] 实施方式74. 一种分离的PD-L1抗体,所述抗体以约0.03 $\mu$ g/ml的EC<sub>50</sub>值与活化的人T细胞结合,所述EC<sub>50</sub>值通过ELISA测定。

[0366] 以下实施例旨在更好地说明本发明,且不应理解为限制本发明的范围。所有下述的特定组合物、材料和方法,其整体或部分,都在本发明的范围内。这些特定的组合物、材料和方法不是为了限制本发明,而只是为说明特定的实施方式在本发明的范围内。本领域熟练技术人员可不添加创造性及不偏离本发明范围而开发出等同的组合物、材料和方法。应理解,本发明保护范围包括对本发明的方法作出的多种改动。发明人意在将这样的变动包括在本发明的范围内。

[0367] 实施例

[0368] 实施例1:PD-L1蛋白的制备和表征

[0369] 人PD-L1/CD274蛋白:在人293细胞(HEK293)中表达重组人PD-L1/CD274蛋白(登记号#NP\_054862.1) (hPD-L1-his)。简言之,将在C-末端具有6×组氨酸标签的来自Phe19-Arg238的人PD-L1基因的编码区用于转染。使用组氨酸标签亲和柱纯化上清液。使用SDS-PAGE凝胶表征所得到的纯化蛋白。该蛋白购自ACRO Biosystems (PD1-H5229)。

[0370] 具有C-Fc标签的人PD-L1/CD274:在人293细胞(HEK293)中表达具有C-Fc标签的重组人PD-L1/CD274蛋白(登记号#NP\_054862.1) (hPD-L1-Fc)。简言之,将在C-末端融合了人IgG1的Fc片段的来自Phe19-Arg238的人PD-L1基因的编码区用于转染。使用Fc标签亲和柱纯化上清液。使用SDS-PAGE凝胶表征所得到的纯化蛋白。该蛋白购自ACRO Biosystems (PD1-H5258)。

[0371] 小鼠PD-L1/CD274蛋白:将重组小鼠PD-L1/CD274蛋白(mPD-L1-his) Phe19-Arg238(登记号#NP\_068693)在C-末端与6×组氨酸标签融合并在人293细胞(HEK293)中生产。使用His标签亲和柱纯化来自HEK293细胞的转染上清。使用SDS-PAGE凝胶表征所得到的纯化蛋白。该蛋白购自ACRO Biosystems (PD1-M5220)。

[0372] 具有C-Fc标签的小鼠PD-L1/CD274:将具有C-Fc标签的重组小鼠PD-L1/CD274蛋白(mPD-L1-Fc) Phe19-Arg238(登记号#NP\_068693)在C-末端与人IgG1的Fc片段融合,并且在人293细胞(HEK293)中生产。使用Fc标签亲和柱纯化来自HEK293细胞的转染上清。使用SDS-PAGE凝胶表征所得到的纯化蛋白。该蛋白购自ACRO Biosystems (PD1-M5251)。

[0373] 具有组氨酸标签的食蟹猴PD-L1/CD274:将重组食蟹猴PD-L1/CD274蛋白(cPD-L1-His) Phe19-Arg238(登记号#F6VEW6)在C-末端与多组氨酸标签融合,并且在人293细胞(HEK293)中生产。使用组氨酸标签亲和柱纯化来自HEK293细胞的转染上清。使用SDS-PAGE凝胶表征所得到的纯化蛋白。该蛋白购自ACRO Biosystems (PD1-C52H4)。

[0374] 具有C-Fc标签的食蟹猴PD-L1/CD274:将带有C-Fc Tag的重组食蟹猴PD-L1/CD274蛋白(cyno PD-L1-Fc) Phe19-Arg238(登记号#F6VEW6)在C-末端与人IgG1的Fc片段融合,并且在人293细胞(HEK293)中生产。使用Fc标签亲和柱纯化来自HEK293细胞的转染上清。使用SDS-PAGE凝胶表征所得到的纯化蛋白。该蛋白购自ACRO Biosystems (PD1-C5253)。

[0375] 将上述PD-L1蛋白用于以下实验。

[0376] 实施例2:抗体的产生

[0377] 1. 抗原偶联和免疫

[0378] 为进行免疫,将重组hPD-L1-Fc(或mPD-L1-Fc)蛋白与Mabspace多种免疫增强肽偶联。简言之,将2-8倍摩尔过量的肽与Sulfo-SMCC(磺基琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸酯,Pierce#22322)活化的hPD-L1-Fc蛋白混合并在室温下孵育1小时。

终止反应并使用SDS-PAGE凝胶对偶联蛋白进行分析和质量控制(QC)。

[0379] 使用完全弗氏佐剂(Pierce)按照1:1的比例分别对上述偶联的hPD-L1-Fc和mPD-L1-Fc蛋白进行乳化,然后通过皮下和腹腔注射至C57B/L6小鼠。后续免疫使用CpG和Alum以保持蛋白的天然构象。至少每2周进行一次免疫并在第一次免疫后取小鼠血清,用于ELISA测定PD-L1抗体滴度。为确定血清滴度,每只免疫小鼠取20 $\mu$ l血清。将高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用1 $\mu$ g/ml含小鼠或人PD-L1-his的缓冲液包被,100 $\mu$ l/孔,所述缓冲液由高pH包被缓冲液(0.16%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,0.3%NaHCO<sub>3</sub>,pH9.8)组成。将板在4℃下孵育过夜,然后在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液PBS+0.1%吐温20(Sigma)洗涤一次。每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液(PBS+1%BSA+1%山羊血清+0.05%吐温20)并在室温下孵育2小时。然后吸出封闭缓冲液,并将100 $\mu$ l在稀释缓冲液(PBS+1%BSA+1%山羊血清+0.01%吐温20)中系列稀释的血清转移至ELISA板的各孔中,并在室温下孵育60分钟。然后使用上文所述的方法洗板3次。然后,将在稀释缓冲液中稀释的HRP偶联的山羊抗-小鼠Fc抗体(Abcam)溶液以100 $\mu$ l/孔加入板的各孔中。随后,将ELISA板在室温下孵育60分钟,用洗涤缓冲液洗板3次(250 $\mu$ l/孔)。最后,将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板。

[0380] 2.融合

[0381] 在融合前4天,腹腔注射未偶联的hPD-L1-Fc或mPD-L1-Fc蛋白,对小鼠进行融合前加强免疫。在融合当天,在无菌条件下取出脾脏并将该器官制成单细胞悬液。裂解红细胞并用DMEM(Gibco)洗涤脾细胞。将存活的、处于对数生长期的骨髓瘤细胞(SP2/0)以1:4的比例与小鼠脾细胞混合。然后,在与PEG融合前,洗涤细胞两次。融合后,用DMEM洗涤细胞并将其混悬于补充了10%FBS+HFCS+OPI+1X HAT的细胞生长培养基中。将该细胞悬液以200 $\mu$ l每孔铺板至96孔细胞培养板中,并且在37℃,湿度10%的CO<sub>2</sub>培养箱中孵育过夜。细胞孵育7天后,吸走孔中的培养基并换成新鲜的生长培养基。在更换培养基2-3天后开始筛选杂交瘤上清。

[0382] 实施例2:抗体筛选

[0383] 1.通过ELISA测定筛选产生PD-L1结合剂

[0384] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用含0.5 $\mu$ g/ml hPD-L1-his或mPD-L1-his的高pH包被缓冲液包被(100 $\mu$ l/孔)并在4℃下孵育过夜。然后,在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液(PBS+0.1%吐温20(Sigma))洗涤一次。每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.05%吐温20)并在室温下孵育2小时。将100 $\mu$ l杂交瘤上清转移至ELISA板的各孔中并在室温下孵育60分钟。然后使用上文所述的方法洗板3次。然后,将在封闭缓冲液中稀释的HRP偶联的山羊抗-小鼠Fc抗体(Abcam)溶液以100 $\mu$ l/孔加入板的各孔中。将ELISA板在室温下孵育60分钟,然后使用洗涤缓冲液洗板3次(250 $\mu$ l/孔)。最后,将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板。随后将来自ELISA阳性杂交瘤孔的细胞在细胞培养基中扩增用于进一步的表征研究。

[0385] 2.在ELISA中评估杂交瘤上清抑制PD-1与PD-L1结合的阻断活性

[0386] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用含2 $\mu$ g/ml的hPD-L1-Fc(Acrobiosystems,目录号#PD1-H5258)的高pH包被缓冲液包被(100 $\mu$ l/孔)并在4℃下孵育过夜。然后将板在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液(PBS+0.1%吐温20(Sigma))洗涤一次。每孔加入200 $\mu$ l封闭缓

冲液 (PBS+1% BSA+1% 正常山羊血清+0.05% 吐温20) 并在室温下孵育2小时。将100 $\mu$ l杂交瘤上清转移至ELISA板的各孔中并在室温下孵育60分钟。然后使用上文所述的方法洗板3次。将80 $\mu$ l 1 $\mu$ g/ml hPD-1-his (ACRO Biosystems, 目录号#PD1-H5221) 加入含缓冲液的各孔中。然后向孔板的各个孔中加入在封闭缓冲液中稀释的Anti-his-HRP (1:4000稀释, CWBIO, 目录号#CW0285) (100 $\mu$ l/孔)。将ELISA板在室温下孵育60分钟,然后使用洗涤缓冲液洗板3次 (250 $\mu$ l/孔)。最后,将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板。随后将来自ELISA阳性杂交瘤孔的细胞在细胞培养基中扩增用于进一步的表征研究(参见图1A-C)。

[0387] 3.通过FACS评估杂交瘤上清抑制PD-1与肿瘤细胞上的PD-L1结合的阻断活性

[0388] 收集经IFN- $\gamma$ 刺激(500U/ml刺激2天)的对数期HCC827细胞并在封闭缓冲液(5% BSA+PBS)中重悬。每管加入 $2 \times 10^5$ 个细胞,然后用PBS洗涤一次(1500rpm,5分钟,室温)。将具有封闭缓冲液的杂交瘤上清(100 $\mu$ l/管)加入相应管中并在4°C下孵育1小时。然后用1ml PBS洗涤细胞两次,随后以100 $\mu$ l/管加入3 $\mu$ g/ml生物素化的hPD-1-Fc-N297A (ACRObiosystems),并且在4°C下孵育1小时。用PBS洗涤3次后,将封闭缓冲液中1:200的链霉亲和素-PE (EBiosciences)加入每个管中(100 $\mu$ l/管)。将细胞在4°C下孵育1小时,然后用PBS洗涤两次,随后将各样品的细胞重悬于150 $\mu$ l PBS中。然后将细胞转移至FACS管,并且使用流式细胞仪(ACEA Bioscience Novocyte)检测抗体与细胞的结合。

[0389] 4.通过ELISA筛选pH依赖性PD-L1的结合

[0390] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用含0.5 $\mu$ g/ml的hPD-L1-his (100 $\mu$ l/孔)的高pH包被缓冲液包被,并在4°C下孵育过夜。然后将板在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液(PBS+0.1% 吐温20 (Sigma))洗涤一次。每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液 (PBS+1% BSA+1% 正常山羊血清+0.05% 吐温20) 并在室温下孵育2小时。将100 $\mu$ l杂交瘤上清转移至ELISA板的各孔中,并且在pH7.4或pH6.0条件下室温孵育60分钟。然后使用上文所述的方法用pH7.4或pH6.0的缓冲液洗板3次。然后,将在pH7.4的封闭缓冲液中稀释的HRP偶联的山羊抗-小鼠Fc抗体(Abcam)溶液以100 $\mu$ l/孔加入板的各孔中。之后,将ELISA板在室温下孵育60分钟,然后用pH7.4或pH6.0洗涤缓冲液洗板3次 (200 $\mu$ l/孔)。最后,将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板。随后将来自ELISA阳性杂交瘤孔的细胞在细胞培养基中扩增,用于进一步的表征研究。显示了克隆23A11(图2A)和克隆23F11(图2B)的结果。

[0391] 实施例3:阳性杂交瘤克隆的亚克隆和小规模抗体生产

[0392] 1.阳性杂交瘤克隆的亚克隆

[0393] 选择来自具有所需结合性质和阻断活性的ELISA阳性杂交瘤孔的细胞,并且用有限稀释,将每个上述细胞在96孔板中铺板。将这些细胞培养7天。一旦达到足够的细胞量,从每个孔收集上清并重新筛选抗原结合能力(参见实施例2中的筛选)。

[0394] 从每块96孔板中识别具有最高抗原结合活性的克隆,并且用有限稀释进一步扩增至每孔含200 $\mu$ l杂交瘤生长培养基的96孔板中。7天后,检测96孔板中细胞的抗原结合。进行两次以上的亚克隆。多于90个孔显示出阳性结合信号时,确定具有最高抗原结合活性的两个克隆并转移至含培养基的24孔板中,使其再生长2天。待24孔板细胞铺满孔底,将细胞转移至6孔板。培养5天后,将一部分细胞冻存。将其余细胞转移至培养瓶中并进行扩增。待培

养瓶细胞长满,将一半细胞冻存(每个克隆3管),作为另外的备份。将另一半在含培养基的培养瓶中进一步扩增用于抗体生产。使用标准方法确定同种型。

[0395] 2. 小规模抗体生产

[0396] 将杂交瘤细胞接种至转瓶中,并且用200-300ml杂交瘤培养基(Invitrogen)培养14天。按照如下所述从杂交瘤细胞培养物中纯化PD-L1单克隆抗体(mAb)。全部纯化过程在室温下进行。用同一个纯化方案和亲和层析法纯化各种mAb。

[0397] 将宿主细胞培养液(CCF)离心除去细胞碎片。然后将CCF上清过滤,稀释,之后上样到柱式蛋白G层析介质(蛋白G高性能柱(Bio-Rad))上并进行平衡。

[0398] 上样后,洗涤蛋白G柱直至流出物在280nm下的吸光度回到基线。然后使用pH 2.5的甘氨酸将PD-L1 mAb从柱中洗脱,并立即通过每ml洗脱体积加入50μl 1M Tris碱储存液对其进行中和。监测洗脱液在280nm处的吸光度,并且收集含蛋白的馏分,以制备蛋白A混合物。

[0399] 纯化后,通过使用10,000MWCO膜(Pierce Slide-A-Lyzer或透析管)透析将PD-L1 mAb在PBS中制剂。制剂后,将PD-L1 mAb过滤除菌。

[0400] 实施例4:纯化抗体与PD-L1结合的分析

[0401] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用高pH包被缓冲液包被0.5μg/ml的hPD-L1-his(100μl/孔)并在4℃下孵育过夜。然后将板在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液(PBS+0.1%吐温20(Sigma))洗涤一次。每孔加入200μl封闭缓冲液(PBS+1% BSA+1%正常山羊血清+0.05%吐温20)并在室温下孵育2小时。然后加入用稀释缓冲液(PBS+1% BSA+1%正常山羊血清+0.01%吐温-20)系列稀释的纯化抗体并在室温下孵育1小时。然后使用上文所述的方法洗板3次。将稀释缓冲液中的HRP偶联的山羊抗-小鼠Fc抗体(Abcam)溶液以100μl/孔加入板的各孔中。之后,将ELISA板在室温下孵育60分钟,然后用洗涤缓冲液洗板3次(250μl/孔)。最后,将TMB以100μl/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板(参见图3)。

[0402] 实施例5:评估纯化抗体抑制PD-1与PD-L1结合的阻断活性

[0403] 1. 在ELISA中的评估

[0404] 将高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用由0.5μg/ml hPD-L1-Fc组成的包被溶液包被(100μl/孔)并在4℃下孵育过夜。然后,在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液PBS+0.1%吐温20(Sigma)洗涤一次。每孔加入200μl封闭缓冲液(PBS+1% BSA+1%正常山羊血清+0.05%吐温-20)并在室温下孵育2小时。然后加入用稀释缓冲液(PBS+1% BSA+1%正常山羊血清+0.01%吐温-20)系列稀释(由10μg/ml稀释至0.0006μg/ml)的抗体,并且在室温下孵育1小时。然后使用上文所述的方法洗板3次。加入1μg/ml生物素化的hPD-1-Fc-N297A(AcroBiosystems)并在室温下孵育1小时。洗板3次后,将在稀释缓冲液中稀释的HRP偶联的中性亲和素抗体(Pierce)溶液以100μl/孔加入板的各孔中。之后,将ELISA板在室温下孵育60分钟,然后使用洗涤缓冲液洗板3次(250μl/孔)。最后,将TMB以100μl/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板(参见图4A)。BM-GT是美国专利号8217849中公开的基准抗体(MPDL-3280A)。

[0405] 2. 通过FACS在肿瘤细胞上的评估

[0406] 收集经IFN-γ刺激(500U/ml刺激2天)的对数期HCC827细胞并在封闭缓冲液(5%

BSA+PBS) 中重悬。每管加入 $2 \times 10^5$ 个细胞, 然后使用PBS洗涤一次(1500rpm, 5分钟, 室温)。将在封闭缓冲液中稀释的抗体(100 $\mu$ l/管)加入相应管中使其终浓度为10 $\mu$ g/ml, 并且在4℃下孵育1小时。然后用1ml PBS洗涤细胞两次, 随后加入3 $\mu$ g/ml生物素化的hPD-1-Fc-N297A (Acrobiosystems) (100 $\mu$ l/管) 并在4℃下孵育1小时。用PBS洗涤3次后, 将封闭缓冲液中1:200的链霉亲和素-PE (EBiosciences) 加入每个管中(100 $\mu$ l/管)。将细胞在4℃下孵育1小时, 然后用PBS洗涤两次, 随后将各样品的细胞重悬于150 $\mu$ l PBS中。然后将细胞转移至FACS管, 并且使用流式细胞仪(ACEA Bioscience Novocyte) 检测hPD-1-Fc与细胞的结合(参见图4B)。

[0407] 实施例6:纯化PD-L1抗体的剂量依赖性应答

[0408] 1. 通过FACS测得的纯化PD-L1抗体与HCC827结合的剂量依赖性应答

[0409] 收集经IFN- $\gamma$ 刺激(500U/ml刺激2天)的对数期HCC827细胞并在封闭缓冲液(5% BSA+PBS) 中重悬。每管加入 $2 \times 10^5$ 个细胞, 然后使用PBS洗涤一次(1500rpm, 5分钟, 室温)。将在封闭缓冲液中系列稀释的从杂交瘤上清中纯化的PD-L1抗体(100 $\mu$ l/管)加入相应管中并在4℃下孵育1小时。然后用1ml PBS洗涤细胞两次, 随后加入封闭缓冲液中的二抗(1:400稀释抗-mIgG (H+L) -PE, Cell signaling) (100 $\mu$ l/管)。将细胞在4℃下孵育1小时, 然后使用PBS洗涤两次, 随后将各样品的细胞重悬于150 $\mu$ l PBS中。然后将细胞转移至FACS管, 并且使用流式细胞仪(BD Accuri C6) 检测抗体与细胞的结合(参见图5A)。

[0410] 2. 通过FACS测得的纯化PD-L1抗体在HCC827上阻断hPD-1与hPD-L1结合的剂量依赖性活性

[0411] 收集经IFN- $\gamma$ 刺激(500U/ml刺激2天)的对数期HCC827细胞并在封闭缓冲液(5% BSA+PBS) 中重悬。每管加入 $2 \times 10^5$ 个细胞, 然后使用PBS洗涤一次(1500rpm, 5分钟, 室温)。将用封闭缓冲液系列稀释的从杂交瘤上清中纯化的PD-L1抗体(100 $\mu$ l/管)加入相应管中并在4℃下孵育1小时。然后用1ml PBS洗涤细胞两次, 随后加入3 $\mu$ g/ml生物素化的hPD-1-N297A (100 $\mu$ l/管) 并在4℃下孵育1小时。用PBS洗涤3次后, 将在封闭缓冲液中以1:200稀释的抗体(家兔抗-hIgG-PE, Santa Cruz) (100 $\mu$ l/管) 加入每个管中。将细胞在4℃下孵育1小时, 然后用PBS洗涤两次, 随后将各样品的细胞重悬于150 $\mu$ l PBS中。然后将细胞转移至FACS管, 并且使用流式细胞仪(BD Accuri C6) 检测hPD-1-hFc与细胞的结合(参见图5B)。

[0412] 实施例7:杂交瘤抗体的克隆和测序

[0413] 通过称为5' RACE (cDNA末端的快速扩增) 的聚合酶链式反应(PCR) 扩增技术获得小鼠抗-人PD-L1抗体轻链和重链可变区的序列。使用Trizol (Invitrogen) 分离来自生产4B6/23A11/23F11/22C9/26F5/21F11/18G4抗体的杂交瘤细胞的总RNA并使用利用Oligo (DT) 12-18引物(Invitrogen) 的Superscript第一链合成系统(Invitrogen) 合成cDNA。通过使用针对重链可变区的MuIgG VH3'-2和MuIg-5'前导引物和针对轻链可变区的MuIgK VL3'-1和MuIg-5"前导引物(NOVAGEN) 的PCR, 克隆小鼠IgG基因的可变区。将所得到的各抗体条带克隆到TOPO TA克隆载体中并使用ABI DNA测序仪(Perkin Elmer) 将来自10个以上克隆的DNA进行测序和测定。使用Vector NTI Advance 10软件(Invitrogen) 确定一致的序列。

[0414] 嵌合抗体的产生:在测序分析和确认后, 将每个上文所述基因的可变区克隆进入重组表达载体, 例如分别将轻链可变区(VL) 的序列克隆进入pCP-hIgG1和将重链可变区(VH) 的序列克隆进入pCP-hIgG1, 用于抗体生产和纯化。

[0415] 实施例8:重组嵌合抗体的表达和纯化

[0416] 通过下述方法对上述产生的重组嵌合抗体蛋白进行表达和纯化:用终浓度为0.5 $\mu$ g/ml的等量重链载体和轻链载体DNA以及1.0 $\mu$ g/ml PEI (聚乙烯亚胺-线形, Polyscience) 对以1x10<sup>6</sup>个细胞/ml在含10%普朗尼克(Pluronic) F-68的Freestyle 293表达培养基中培养的HEK293E细胞进行转染。DNA与PEI之比为1:2。在Optimal MEM中形成DNA和PEI复合物的时间应为在室温下15分钟。在5%CO<sub>2</sub>、37℃和125rpm振荡速度的条件下,在培养瓶中培养转染细胞。在转染22至26小时后加入1%蛋白胨培养基。在第6天收集条件培养基并以3,000rpm将上清离心30分钟。然后将澄清的条件培养基上样至蛋白A柱(G.E. Healthcare),用PBS加上0.1%triton-X100洗涤,并且最后用pH 3.5的含0.1M甘氨酸的溶液洗脱结合的IgG。将洗脱的抗体蛋白透析至PBS并在-80℃下保存。为除去内毒素,通过Hitrap DEAE琼脂糖F.F柱从而进一步处理纯化的蛋白,并且使用尺寸排阻色谱(Superdex 200 5/150GL, G.E. Healthcare)对所得到的抗体进行分析以确定纯度水平。

[0417] 实施例9:纯化的PD-L1抗体与食蟹猴和啮齿动物PD-L1蛋白的交叉反应性以及对hPD-L1和hPD-L2的结合选择性

[0418] 1.与食蟹猴PD-L1蛋白的跨物种结合

[0419] 将高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用高pH包被缓冲液包被0.5 $\mu$ g/ml的人或食蟹猴(cyno)PD-L1-his(100 $\mu$ l/孔)并在4℃下孵育过夜。然后将板在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液(PBS+0.1%吐温20(Sigma))洗涤一次。每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.05%吐温-20)并在室温下孵育2小时。然后加入用稀释缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.01%吐温-20)系列稀释的抗体,并且在室温下孵育1小时。然后使用上文所述的方法洗板3次。然后以100 $\mu$ l/孔,将稀释缓冲液中的针对小鼠杂交瘤抗体的HRP缀合的山羊抗-小鼠Fc抗体(Abcam)溶液,或者针对4B6嵌合抗体的山羊抗-人IgG Fc-HRP(Abcam)加入板的各孔中。之后,将ELISA板在室温下孵育60分钟,然后用洗涤缓冲液洗板3次(250 $\mu$ l/孔)。最后,将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板(参见图6A至6E)。

[0420] 嵌合抗体4B6-C与其亲本抗体4B6具有相似的结合亲和性。如图6A所示,4B6与人和猴抗原的结合亲和性与4B6-C相似,以及如图6E所示,4B6-C在小鼠中的结合亲和性与4B6类似。

[0421] 2.与小鼠PD-L1蛋白的跨物种结合

[0422] 将高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用高pH包被缓冲液包被1 $\mu$ g/ml的小鼠PD-L1-his(100 $\mu$ l/孔)并在4℃下孵育过夜。然后将板在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液(PBS+0.1%吐温20(Sigma))洗涤一次。每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.05%吐温-20)并在室温下孵育2小时。然后加入20 $\mu$ g/ml稀释缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.01%吐温-20)中的纯化的杂交瘤小鼠抗体并在室温下孵育1小时。然后使用洗涤缓冲液(250 $\mu$ l/孔)洗板3次。然后将稀释缓冲液中的HRP缀合的山羊抗-小鼠Fc抗体(Abcam)溶液(100 $\mu$ l/孔)加入板的各孔中。之后,将ELISA板在室温下孵育60分钟,然后用洗涤缓冲液洗板3次(250 $\mu$ l/孔)。最后,将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板(参见图6F)。

[0423] 3.与hPD-L2蛋白的跨家族结合

[0424] 与上文所述用于跨物种结合的方法类似,方法通过ELISA评估纯化抗体(4B6、23A11、26F5、23F11和22C9)与人PD-L2蛋白的结合。简言之,将高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用高pH包被缓冲液(0.16%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+0.3%NaHCO<sub>3</sub>,pH 9.8)包被0.5μg/ml的人PD-L1-Fc(Acrobiosystems,目录号PD1-H5258)或1μg/ml hPD-L2-Fc(Acrobiosystems,目录号PD2-H5251)(100μl/孔)并在4℃下孵育过夜。然后将板在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液(PBS+0.1%吐温20(Amresco))洗涤一次。每孔加入200μl封闭缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.05%吐温-20)并在室温下孵育2小时。然后加入100μl用稀释缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.01%吐温-20)稀释的2μg/ml纯化的PD-L1抗体,并且在室温下孵育1小时。然后用洗涤缓冲液洗板3次。然后将稀释缓冲液中的HRP缀合的山羊抗-小鼠IgG抗体(1:20000,Abcam)溶液(100μl/孔)加入板的各孔中。之后,将ELISA板在室温下孵育60分钟,然后用洗涤缓冲液洗板3次(250μl/孔)。最后,将TMB以100μl/孔加入各孔中作用15分钟并使用0.16M/L硫酸(50μl/孔)终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nm处读板(参见图6G)。

[0425] 如图6G中所示,所有检测的抗体都能够与hPD-L1结合,但不与hPD-L2结合。

[0426] 实施例10:纯化的抗-PD-L1抗体与肿瘤细胞上的PD-L1结合的表征:FACS结合测定(HCC827细胞)

[0427] 收集经IFN-γ刺激(500U/ml刺激2天)的对数期HCC827细胞并在封闭缓冲液(5%BSA+PBS)中重悬。每管加入2×10<sup>5</sup>个细胞,然后用PBS洗涤一次(1500rpm,5分钟,室温)。将用封闭缓冲液系列稀释的生物素化的PD-L1抗体(100μl/管)加入相应管中并在4℃下孵育1小时。然后用1ml PBS洗涤细胞两次,随后加入封闭缓冲液中的二抗(或1:200稀释的家兔抗-人IgG-PE(Santa Cruz))(100μl/管)。将细胞在4℃下孵育1小时,然后用PBS洗涤两次,随后将各样品的细胞重悬于150μl PBS中。然后将细胞转移至FACS管,并且使用流式细胞仪(ACEA Bioscience Novocyte)检测抗体与细胞的结合(参见图7)。带“C”的抗体表示嵌合抗体,抗体“4B6-H3L3”是指如实施例15中产生的具有重链H3和轻链L3的组合的人源化4B6。

[0428] 实施例11:评估纯化的抗-PD-L1抗体抑制PD-1与肿瘤细胞上的PD-L1结合的阻断活性

[0429] 收集经IFN-γ刺激(500U/ml刺激2天)的对数期HCC827细胞并在封闭缓冲液(5%BSA+PBS)中重悬。每管加入2×10<sup>5</sup>个细胞,然后使用PBS洗涤一次(1500rpm,5分钟,室温)。将用封闭缓冲液系列稀释的PD-L1抗体(100μl/管)(参见图8)加入相应管中并在4℃下孵育1小时。然后用1ml PBS洗涤细胞两次,随后加入3μg/ml生物素化的hPD-1-N297A(100μl/管)并在4℃下孵育1小时。用PBS洗涤3次后,用封闭缓冲液1:200稀释的链霉亲和素-PE(eBioscience)(100μl/管)加入每个管中。将细胞在4℃下孵育1小时,然后用PBS洗涤两次,随后将每个样品的细胞重悬于150μl PBS中。然后将细胞转移至FACS管并用流式细胞仪(ACEA Bioscience Novocyte)检测hPD-1-N297A与细胞的结合。

[0430] 如图8中所示,FACS结果表明抗-PD-L1抗体显示出抑制hPD-1与肿瘤细胞HCC827上的hPD-L1结合的浓度依赖性的活性。

[0431] 实施例12:通过竞争ELISA对选定的抗-PD-L1抗体进行表位分组(Epitope binning)

[0432] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)上包被0.5μg/ml hPD-L1-Fc(100μl/孔)并

在4°C下孵育过夜。然后将板在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液(PBS+0.1%吐温20(Sigma))洗涤一次,随后向每个孔中加入200μl封闭缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.05%吐温-20)。将板在室温下孵育2小时。然后加入在稀释缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.01%吐温-20)中以20μg/ml系列稀释的竞争性抗体4B6、23A11、23F11、22C9和21F11,并且将板在室温下孵育1小时。然后使用洗涤缓冲液洗板3次。加入产生80%最大结合信号的不同浓度的生物素化的抗-PD-L1抗体(例如,18G4、23A11、4B6),并且在室温下孵育1小时。洗板3次后,将在稀释缓冲液中稀释的HRP缀合的中性亲和素抗体(Pierce)溶液加入板的各孔中,100μl/孔。随后,将ELISA板在室温下孵育60分钟,然后用洗涤缓冲液洗板3次(250μl/孔)。最后,将TMB以100μl/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板(参见图9A至图9C)。

[0433] 实施例13:重组嵌合抗体pH依赖性结合的表征

[0434] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板用高pH包被缓冲液包被0.5μg/ml的hPD-L1-his(Acrobiosystems)(100μl/孔)并在4°C下孵育过夜。然后将包被的板在自动洗板仪上用PBS+0.1%吐温20(Sigma)洗涤一次。随后,每孔加入200μl封闭缓冲液,并将板在室温下孵育2小时。吸出封闭缓冲液后,加入在pH 7.4的稀释缓冲液中系列稀释的嵌合抗体,并且将板在室温下孵育40分钟。然后,用pH 7.4或5.5的洗涤缓冲液(250μl/孔)洗板1次,再加入100μl pH7.4或pH5.5的抗体稀释缓冲液,并且在室温下继续孵育2小时。随后,用250μl洗涤缓冲液洗板3次(每次洗涤振摇10秒),然后将在pH 7.4稀释缓冲液中以1:20000稀释的HRP缀合的山羊抗-人Fc抗体(Abcam)溶液加入板的每个孔中,100μl/孔,并且在室温下孵育1小时。之后,用250μl洗涤缓冲液洗板3次(每次洗涤振摇10秒)。最后,将TMB以100μl/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板(参见图10A-F)。

[0435] 如图10A至10F中所示,嵌合抗体23F11、23A11和22C9(图10A至10C)显示出pH依赖性地与hPD-L1结合(例如,在pH7.4下具有比在pH5.5下更高的结合),而嵌合抗体21F11、4B6、26F5(图10D至10F)未显示出pH依赖性地与hPD-L1结合(在pH5.5/pH7.4下的结合亲和性相似)。

[0436] 实施例14:对抗-PD-L1抗体的体内评估

[0437] 使用经改良的同源小鼠移植肿瘤模型评估上述获得的抗-PD-L1抗体的体内活性。通过皮下注射接种小鼠肿瘤细胞,该肿瘤细胞的小鼠PD-L1基因已被人PD-L1基因取代,包括小鼠结肠癌细胞系MC38和黑色素瘤细胞系B16。每周3次腹腔(IP)注射3mg/kg、10mg/kg和/或30mg/kg抗-人PD-L1抗体,或者每周1次以1、3或10mg/kg的剂量静脉注射抗-人PD-L1抗体。将参照PD-L1抗体BM-GT(即如美国专利号8217149(Genentech)中公开的YW243.55.S70或MPDL3280A)和BM-ME(即在美国专利号US8779108中的2.14H90P)作为阳性对照。当载剂组的肿瘤达到1000mm<sup>3</sup>的体积时,评估抗体对肿瘤生长的作用。如下所述每周两次测量肿瘤体积和体重,根据与载剂组相比的肿瘤生长抑制(TGI)情况计算抗体对肿瘤生长的作用。

[0438] 1. 表达人PD-L1的小鼠肿瘤细胞系的产生

[0439] 使用我们最新开发的高效CRISPR/Cas9系统敲除小鼠肿瘤细胞系(分别为B16和MC38,均购自ATCC)中的内源性CD274/PD-L1。简言之,设计靶向小鼠CD274/PD-L1基因第一编码外显子的sgRNA,通过hit-and-run CRISPR/Cas9+sgRNA构建体转染细胞并且选择敲除

细胞。通过对在稳态或干扰素 $\gamma$ 刺激条件下在细胞表面的表达CD274/PD-L1的情况进行FACS分析,识别完全敲除内源性CD274/PD-L1的细胞,随后通过对靶基因组区域TA克隆和测序进行验证。为产生人CD274/PD-L1取代细胞系,将人CD274/PD-L1 cDNA编码序列克隆进入FG12衍生的慢病毒载体。然后,用表达人CD274/PD-L1的慢病毒感染敲除了小鼠CD274/PD-L1的细胞,并且通过FACS分析确证人CD274/PD-L1在已建立细胞系中高水平且稳定的表达。该工程化的B16和MC38细胞分别命名为B16-hPD-L1 KI和MC38-hPD-L1 KI。

[0440] 2.PD-L1抗体在B16/人-PD-L1敲入肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0441] 将B16细胞工程化,以用人PD-L1取代小鼠PD-L1基因,并将其命名为B16-hPD-L1 KI。在研究之前,将B16-hPD-L1 KI细胞进行5代以内的传代培养,然后接种至小鼠。向10只雌性SPF级C57BL/6小鼠中的每一只皮下注射 $2 \times 10^6$ 个细胞/0.2mL。在注射肿瘤细胞一天后注射第一剂(3mpk或10mpk)抗体(例如,BM-GT、4B6-C和23A11)。每周两次,使用卡尺(INSIZE)在两个维度上测量肿瘤尺寸。根据在第29天测得的数值计算肿瘤生长抑制(TGI) %。使用Prism GraphPad分析结果并以平均值±S.E.M表示。通过T-检验进行两组之间的比较,如果P<0.05则认为差异具有显著性(参见表1)。

[0442] 表1:检测PD-L1抗体在治疗B16/hPDL1同源小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤活性的研究设计

组别	处理	动物编号	剂量	给药途径	方案	肿瘤生长抑制(%)
[0443]	1 对照 (PBS)	1-10	-	腹腔注射	3 次/周*3	
	2 BM-GT	1-10	3 mpk	腹腔注射	3 次/周*3	15.54
	3 BM-GT	1-10	10 mpk	腹腔注射	3 次/周*3	33.92
	4 4B6-C	1-10	3 mpk	腹腔注射	3 次/周*3	34.00
	5 4B6-C	1-10	10 mpk	腹腔注射	3 次/周*3	37.79
	6 23A11	1-10	3 mpk	腹腔注射	3 次/周*3	37.63
	7 23A11	1-10	10 mpk	腹腔注射	3 次/周*3	51.06**, p<0.05

[0444] 3.PD-L1抗体在MC38/人-PD-L1敲入(KI)肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0445] 将工程化以用人PD-L1取代小鼠PD-L1基因的MC-38细胞命名为MC38-hPD-L1 KI。在37°C、含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中,用含10%热灭活胎牛血清(ExCell Biology)、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Hyclone)的RPMI1640培养基(Thermo Fisher)以单层培养物形式体外维持MC38/hPDL1-KI肿瘤细胞。通过胰酶-EDTA处理(Hyclone),每周两次对肿瘤细胞进行常规传代培养。收获指数生长期的细胞并计数,用于肿瘤接种。通过在右侧肋腹部皮下注射,向每只雌性SPF级C57BL/6小鼠接种 $2 \times 10^6$ 个细胞。接种约10天后,选择40只肿瘤体积约100mm<sup>3</sup>的小鼠并随机分成5组(参见表2中的方案)。然后用PBS或10mg/kg体重的纯化的来自抗体杂交瘤的小鼠抗体4B6、23A11、23F11、26F5中的每种腹腔注射到小鼠体内。从首次注射开始,每周注射3次,持续4周。在研究结束时通过吸入CO<sub>2</sub>处死小鼠。每周两次,使用卡尺(INSIZE)在两个维度上测量肿瘤尺寸,并且使用下述公式以mm<sup>3</sup>表示体积: $V=0.5a \times b^2$ ,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。使用PrismGraphPad分析结果并以平均值±S.E.M表示。

通过T-检验进行两组之间的比较,如果P\*<0.05和\*\*<0.01则认为差异具有显著性(参见表3)。

[0446] 表2:检测PD-L1抗体在治疗MC38/hPDL1同源小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤活性的研究设计

组别	处理	动物编号	剂量	给药途径	方案
[0447]	1	对照 (PBS)	1-8	-	腹腔注射 3 次/周*3
	2	4B6	1-8	10 mpk	腹腔注射 3 次/周*3
	3	23A11	1-8	10 mpk	腹腔注射 3 次/周*3
	4	23F11	1-8	10 mpk	腹腔注射 3 次/周*3
	5	26F5	1-8	10 mpk	腹腔注射 3 次/周*3

[0448] 表3:肿瘤体积

处理	第 29 天时的肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	TGI (%)	相对于 PBS 的 p 值
PBS	677.1±203.2	--	--
4B6 10 mpk	71.7±45.5	89.4	0.0084*
23A11 10 mpk	295.9±199.8	56.3	0.2054
26F5 10 mpk	194.4±194.4	71.3	0.1102
23F11 10 mpk	27.6±27.6	95.9	0.0048**

[0450] 注释:a. 平均值±SEM,\*P<0.05,\*\*P<0.01

[0451] 如表3和图11A-11C所示,在研究结束时,对照组的平均肿瘤体积是起始点时体积的6.7倍。在经抗体4B6、23A11、26F5和23F11处理的小鼠中,分别有4/8、6/8、7/8和7/8只小鼠无可检测的肿瘤,因此可以认为是完全响应。在4B6处理组中,2/8只小鼠具有>70%的肿瘤缩小(参见图11B)。这些数据表明这些抗体是已建立肿瘤的非常有效的生长抑制剂,并且具有在大多数小鼠中清除肿瘤的能力。

[0452] 4.PH依赖性PD-L1抗体在MC38/人-PD-L1敲入肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0453] 为评估pH依赖性抗体在体内肿瘤抑制中是否具有优势,我们对一种pH依赖性抗体23F11与一种非pH依赖性结合抗体4B6-C的活性进行了比较(参见图12A和12B)。这些抗体具有较强的中和活性,并且还在高剂量下抑制肿瘤。为揭示pH依赖性抗体的潜在优势,我们在低剂量下(腹腔注射1mg/kg)对抗体进行了检测。简言之,通过在右侧肋腹部皮下注射,向每只雌性SPF级C57BL/6小鼠接种 $2 \times 10^6$ 个细胞(即MC38-hPD-L1 KI)。接种约10天后,选择40只肿瘤体积约200mm<sup>3</sup>的小鼠并随机分成5组。然后,用PBS或1mg/kg体重的在PBS中制剂的纯化的抗体4B6-嵌合(4B6-C)、23F11、参照抗体BM-GT(在美国专利号US8217149中也称为YW243.55.S70或MPDL3280A)和BM-ME(在美国专利号US8779108中也称为2.14H90PT)腹腔注射到小鼠体内。从首次注射开始,每周注射3次,持续3周。在研究结束时通过吸入CO<sub>2</sub>处死小鼠。每周两次,使用卡尺(INSIZE)在两个维度上测量肿瘤尺寸,并且使用下述公式以mm<sup>3</sup>表示计算体积: $V=0.5a \times b^2$ ,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。使用Prism GraphPad分析结果并以平均值±S.E.M表示。通过T-检验进行两组之间的比较,如果P<0.05则认为差异具有显著性。

[0454] 图12A和12B中的数据表明具有pH依赖性结合性质的抗体比不具有pH依赖性结合性质的抗体更有效地抑制肿瘤生长。与PBS处理组相比,用1mg/kg剂量的抗体23F11处理使得8只小鼠中的3只中的肿瘤完全消除,以及8只小鼠中的1只中的肿瘤体积缩小超过70%。用非pH依赖性结合抗体4B6-C处理不会导致肿瘤体积显著缩小,并且每只小鼠的肿瘤均大于起始点时的肿瘤体积。因此,具有pH依赖性结合的抗体能够在低于非pH依赖性结合抗体的浓度下起到抑制肿瘤生长的作用。

[0455] 同样在MC38/人-PD-L1 KI肿瘤模型中检测了静脉注射抗体18G4(参见图12C和12D)和22C9(参见图12E和12F)的肿瘤生长抑制作用。简言之,如前所述将MC38/hPD-L1肿瘤细胞接种至C57BL/6小鼠并让其生长6天。此时,选择平均肿瘤体积约120mm<sup>3</sup>的小鼠并随机分成8组,每组8只小鼠。在第0天将1或3mg/kg纯化自杂交瘤培养物中的纯化抗体18G4和22C9等体积地通过静脉注射到每只小鼠并跟进至第25天。在研究结束时通过吸入CO<sub>2</sub>处死小鼠。每周两次,使用卡尺(INSIZE)在两个维度上测量肿瘤尺寸,并且使用下述公式以mm<sup>3</sup>表示计算体积:V=0.5a×b<sup>2</sup>,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径(参见表4和图12C-12F)。如果肿瘤体积缩小至小于处理开始时肿瘤体积的50%,但是未低于可测量尺寸,则记录为部分肿瘤消退(PR),或者如果肿瘤负荷变得难以察觉,则记录为完全肿瘤消退(CR)(参见表5)。使用Prism GraphPad分析图12C-12F中的结果并以平均值±S.E.M表示。通过T-检验进行两组之间的比较,如果P<0.05则认为差异具有显著性。数据表明在相同条件下1或3mg/kg剂量的18G4(参见表4和5,以及图12C和12D)和22C9(参见表4和5,以及图12E和12F)在抑制肿瘤生长方面非常有效。

[0456] 表4:MC38/hPD-L1同源肿瘤模型中18G4和22C9的肿瘤生长抑制

组号 (n=8)	处理	PR	CR	ORR%
[0457]	1 对照 IgG 3 mpk	0	1	12.5
	2 18G4 1mpk	0	3	37.5
	3 18G4 3mpk	1	0	12.5
	4 22C9 1mpk	0	3	37.5
	5 22C9 3mpk	0	4	50

[0458] 注释:CR:完全消退;PR:部分消退;ORR:客观缓解率

[0459] 表5:第25天的肿瘤消退情况

组号 (n=8)	处理	第 25 天时的肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	第 25 天时的 TGI (%)
[0460]	1 对照 IgG 3 mpk	769.64±590.08	-
	2 18G4 1mpk	218.80±296.83	71.57*
	3 18G4 3mpk	270.44±140.37	64.86*
	4 22C9 1mpk	285.82±423.96	62.86
	5 22C9 3mpk	278.53±418.35	63.81

[0461] 注释: \*p<0.05;平均值±SD,n=8

[0462] 5. 嵌合pH依赖性PD-L1抗体在MC38/人-PD-L1敲入肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0463] 为进一步验证具有pH依赖性抗原结合性质的抗体与不具有pH依赖性结合的抗体相比能够更好地在体内抑制肿瘤生长,并且能够消除Fc结构域的潜在影响,我们重新检测了用与参照抗体(即BM-GT)相同的IgG同种型(即人IgG1)在HEK293细胞中产生的嵌合抗体(即23A11-C和23F11-C)。

[0464] 简言之,小鼠接种MC38/hPD-L1 KI细胞后,当肿瘤体积为100mm<sup>3</sup>时开始通过腹腔注射1mg/kg的抗体治疗,每周3次通过腹腔注射给予抗体。使用Prism GraphPad分析结果并以平均值±S.E.M表示。通过T-检验进行两组(测试vs载剂)之间的比较,如果P<0.05则认为差异具有显著性。

[0465] 如图13A和13B所示,在MC38/人-PD-L1小鼠模型中,注射了1mpk嵌合pH-依赖性抗体(即23A11-C和23F11-C)的肿瘤体积小于注射了1mpk参照抗体(即BM-GT)的肿瘤体积。

[0466] 实施例15:人源化抗体的产生和表征

[0467] 1. 人源化抗体的产生、表达和纯化

[0468] 使用小鼠抗体4B6、23A11和23F11可变结构域的序列鉴定与鼠源框架具有最高同源性的种系序列。使用计算机建模设计具有CDR移植和回复突变的人源化变体。

[0469] 4B6

[0470] 分别将针对轻链的人种系框架序列VK/1D-13和针对重链的人种系框架序列VH/1-2用于CDR移植。

[0471] 通过向种系序列(SEQ ID NO:87)直接移植3个CDR,以及分别针对重链(HC)变体3移植回复突变K12V、T28V、V68A、R72V、T74K、S77R(SEQ ID NO:65)和针对HC变体4移植回复突变T28V、R72V、S77R(SEQ ID NO:67)获得HC变体3和4(参见图14A)。

[0472] 4B6 HC的种系序列:

[0473] VH/1-2(4B6-种系,SEQ ID NO:87):

[0474] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAR

[0475] VH/1-2变体3(4B6-Hzd-HC-V3,SEQ ID NO:65):

[0476] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYVFTDYYMNWVKQAPGQGLEWIGDINPNNGGTSYNQKFQGRATVTVDKSTRTAYMELSRRLSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLTVSS

[0477] VH/1-2变体4(4B6-HC-V4,SEQ ID NO:67):

[0478] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQGLEWIGDINPNNGGTSYNQKFQGRVTVTVDTSIRTAYMELSRRLSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLTVSS

[0479] 通过向种系序列(SEQ ID NO:88)直接移植3个CDR以及分别针对轻链(LC)变体3移植回复突变L4M、P8Q、L78M、Y87F(SEQ ID NO:66)和针对LC变体4移植回复突变L4M、Y87F(SEQ ID NO:68)获得LC变体3和4(参见图14B)。

[0480] 4B6 LC的种系序列:

[0481] VK/1D-13(4B6 LC种系,SEQ ID NO:88)

[0482] DIQLTQSPSSLASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQFNNYP

[0483] VK/1D-13变体3(4B6-Hzd-LC-V3,SEQ ID NO:66)

[0484] DIQMTQSQSSLASVGDRVTITCQASQNVGAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGT

DFTLTISMQPEDIATYFCQQYSNYPTFGSGTKLGK

[0485] VK/1D-13变体4 (4B6-LC-V4, SEQ ID NO:68)

[0486] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNVGAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLYTGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDIATYFCQQYSNYPTFGSGTKLGK

[0487] 23A11

[0488] 分别将针对重链的人种系框架序列VH/1-2和针对轻链的人种系框架序列VK/7-3用于CDR移植。

[0489] 通过向种系序列 (SEQ ID NO:89) 直接移植3个CDR以及分别针对HC变体3移植回复突变V20L、M48I、V68A、M70L、R72V、T75K、R87T (SEQ ID NO:71) 和针对HC变体5移植回复突变M48I、M70L、R72V (SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:69中第1个氨基酸转变成Q) 获得HC变体3和5 (参见图15A)。

[0490] 23A11 HC的种系序列:

[0491] VH/1-2 (23A11-HC-种系, SEQ ID NO:89) :

[0492] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTYWIHWVQAPGQGLEWMWINPNSGGTNYAQKFQGRVT  
MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR

[0493] VH/1-2变体3 (23A11-HC-V3, SEQ ID NO:61) :

[0494] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTYWIHWVQAPGQGLEWIGMIQPNSGGTKYNDQFKNRAT  
LTVDKSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARGAGTVDYFDYWGQGTTLSISS

[0495] VH/1-2变体5 (23A11-HC-V5, SEQ ID NO:189) :

[0496] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTYWIHWVQAPGQGLEWIGMIQPNSGGTKYNDQFKNRVT  
LTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGTVDYFDYWGQGTTLSISS

[0497] 通过向种系序列 (SEQ ID NO:90) 直接移植3个CDR以及分别针对LC变体3移植回复突变P15V、P47S、Q54R、V62I、G72R、N89T、L93H (SEQ ID NO:72) 和针对LC变体5移植回复突变P15V、P47A、Q54R、V62I、G72R、N89T、L93Q (SEQ ID NO:70) 获得轻链变体3和5 (参见图15B)。

[0498] 23A11 LC的种系序列

[0499] VK/7-3 (23A11-LC-种系, SEQ ID NO:90) :

[0500] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSELGINLIHWYQQKPGQPPKLLIYQASNKDTGVPARFSGS  
GSGTDFLTINPVEANDTANYYCLQSKNFP

[0501] VK/7-3变体3 (23A11-LC-V3, SEQ ID NO:72) :

[0502] DIVLTQSPASLAVSVGQRATITCRASESVDIYGNSFMHWYQQKPGQSPKLLIYRASNLESGIPARFSGS  
GSRTDFLTINPVEANDTATYYCHQSNDDPYTFGGGTLETK

[0503] VK/7-3变体5 (23A11-LC-V5, SEQ ID NO:70) :

[0504] DIVLTQSPASLAVSVGQRATITCRASESVDIYGNSFMHWYQQKPGQAPKLLIYRASNLESGIPARFSGS  
GSRTDFLTINPVEANDTATYYCQQSNDDPYTFGGGTLETK

[0505] 23F11

[0506] 分别将针对重链的人种系框架序列VH/1-2和针对轻链的人种系框架序列VK/7-3用于CDR移植。

[0507] 通过向种系序列 (SEQ ID NO:91) 直接移植3个CDR以及分别针对重链 (HC) 变体4移植回复突变V20L、M48I、R67K、V68A、M70L、R72V、T74K、R87T (SEQ ID NO:75) 和针对HC变体6

移植回复突变M48I、R67K、V68A、M70L、R72V (SEQ ID NO:77) 获得重链变体4和6 (参见图16A)。

[0508] 23F11 HC的种系序列:

[0509] VH/1-2 (23F11种系HC,SEQ ID NO:91) :

[0510] VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTM  
TRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR

[0511] VH/1-2变体4 (23F11-HC-V4,SEQ ID NO:75) :

[0512] QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYIFTTYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIQPNSGGTKYNEKFKKAT  
LTVDKSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARGAGTVDFDYWGQGSTLTVSS

[0513] VH/1-2变体6 (23F11-HC-V6,SEQ ID NO:77) :

[0514] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTTYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIQPNSGGTKYNEKFKKAT  
LTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGAGTVDFDYWGQGSTLTVSS

[0515] 通过向种系序列 (SEQ ID NO:92) 直接移植3个CDR以及分别针对LC变体4移植回复突变P15V、Q54R、V62I、N89T、L93Q (SEQ ID NO:76) 和针对LC变体6移植回复突变P15V、Q54R、V62I、N89T、L93H (SEQ ID NO:78) 获得轻链变体4和6 (参见图16B)。

[0516] 23F11 LC的种系序列

[0517] VK/7-3 (23F11种系LC,SEQ ID NO:92) :

[0518] DIVLTQSPASLA VSPGQRATITCRASES VSELGINLIHWYQQKPGQPPKLLIYQASNKDTGVPARFSGS  
GSGTDFLTINPVEANDT ANYYCLQSKNFP

[0519] VK/7-3变体4 (23F11-LC-V4,SEQ ID NO:76) :

[0520] DIVLTQSPASLA VSVGQRATITCRASES VDIYGSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGS  
GSRTDFTLTINPVEANDTATYYCQQSTEDPYTFGGGTLEIK

[0521] VK/7-3变体6 (23F11-LC-V6,SEQ ID NO:78) :

[0522] DIVLTQSPASLA VSVGQRATITCRASES VDIYGSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGS  
GSRTDFTLTINPVEANDTATYYCHQSTEDPYTFGGGTLEIK

[0523] 如本领域所熟知的,合成上述重链和轻链cDNA,并且与在Fc区中具有N297A突变(根据Kabat的EU索引对本申请所述的重链残基编号(参见Kabat等, "Proteins of Immunological Interest", US Dept. of Health&Human Services (1983)))的人IgG1的恒定区融合,以降低或最小化Fc区的效应功能。合成选定抗体的重链和轻链可变区基因并克隆进入表达载体,使用Promega的PureYield<sup>TM</sup>Plasmid Maxiprep System进行大规模DNA制备。根据生产厂商的方案使用Invitrogen的ExpiFectamine<sup>TM</sup>293试剂进行转染。在细胞活力约为50%时收获上清液。将蛋白A小珠与澄清的上清液在4℃下振摇孵育2小时,然后过柱。用PBS洗涤柱子内的蛋白A小珠,并使用100mM甘氨酸缓冲液(pH3.0)洗脱抗体,将其在PBS缓冲液(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4)中4℃下透析过夜。最后,使用Pierce高性能内毒素脱除树脂(Invitrogen, 目录号:88271)除去内毒素。通过SDS-PAGE和SEC-HPLC对纯化抗体进行表征。

[0524] 2. 通过ELISA测定人源化抗体与hPD-L1的结合

[0525] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用高pH包被缓冲液包被0.5μg/ml的人PD-L1-his (Acrobiosystems, 目录号PD1-H5229) (100μl/孔) 并在4℃下孵育过夜。然后将板在

自动洗板仪上使用洗涤缓冲液 (PBS+0.1% 吐温20 (Sigma)) 洗涤一次。每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液 (PBS+1% BSA+1% 正常山羊血清+0.05% 吐温-20), 并将板在室温下孵育2小时。然后, 加入用稀释缓冲液 (PBS+1% BSA+1% 正常山羊血清+0.01% 吐温-20) 系列稀释的人源化抗体 (在293细胞中产生) 并在室温下孵育1小时。之后, 使用洗涤缓冲液洗板3次。随后, 将稀释缓冲液中HRP缀合的山羊抗-人Fc抗体 (Abcam) 加入板的各孔中, 100 $\mu$ l/孔。然后, 将ELISA板在室温下孵育60分钟, 而后用pH 7.4的洗涤缓冲液洗板3次, 200 $\mu$ l/孔。最后, 将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板 (参见图17A和17B)。

[0526] 3. 通过ELISA测定hPD-1与hPD-L1结合的阻断

[0527] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板 (Nunc) 上包被1 $\mu$ g/ml hPD-L1-Fc (100 $\mu$ l/孔) 在4℃下孵育过夜。然后将板在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液 (PBS+0.1% 吐温20 (Sigma)) 洗涤一次。每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液 (PBS+1% BSA+1% 正常山羊血清+0.05% 吐温-20), 并将板在室温下孵育2小时。然后, 加入使用稀释缓冲液 (PBS+1% BSA+1% 正常山羊血清+0.01% 吐温-20) 系列稀释的抗体 (即在293细胞中产生的人源化4B6、23F11、23A11和亦是在293细胞中产生的参照抗体BM-GT和BM-ME) 并在室温下孵育1小时。然后, 使用上文所述的方法洗板3次。加入1 $\mu$ g/ml生物素化的hPD-1-N297A (Acrobiosystem) 并在室温下孵育1小时。洗板3次后, 将在稀释缓冲液中以1:5000稀释的HRP缀合的中性亲和素抗体 (Pierce) 溶液加入板的各孔中, 100 $\mu$ l/孔。随后, 将ELISA板在室温下孵育60分钟, 然后使用洗涤缓冲液洗板3次 (250 $\mu$ l/孔)。最后, 将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板 (参见图18A至18D)。

[0528] 图18中的数据表明一些人源化抗体与其他抗体相比在抑制人PD-L1与人PD-1结合方面具有显著更高的效力。

[0529] 4. 通过FACS测定hPD-L1抗体与HCC827上的hPD-L1的结合

[0530] 收集经IFN- $\gamma$ 刺激 (500U/ml刺激2天) 的对数期HCC827细胞并在封闭缓冲液 (5% BSA+PBS) 中重悬。每管加入2 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞, 然后用PBS洗涤一次 (1500rpm, 5分钟, 室温)。将用封闭缓冲液系列稀释的人源化PD-L1抗体 (在293细胞中产生) (100 $\mu$ l/管) 加入相应管中并在4℃下孵育1小时。然后用1ml PBS洗涤细胞两次, 随后加入封闭缓冲液中的二抗 (1:200稀释的家兔抗-人IgG-PE) (100 $\mu$ l/管)。将细胞在4℃下孵育1小时, 然后用PBS洗涤两次, 随后将每个样品的细胞重悬于150 $\mu$ l PBS中。然后将细胞转移至FACS管并用流式细胞仪 (ACEA Bioscience Novocyte) 检测抗体与细胞的结合 (参见图19)。

[0531] 5. 通过FACS测定hPD-1与HCC827上的hPD-L1结合的阻断

[0532] 收集经IFN- $\gamma$ 刺激 (500U/ml刺激2天) 的对数期HCC827细胞并在封闭缓冲液 (5% BSA+PBS) 中重悬。每管加入2 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞, 然后用PBS洗涤一次 (1500rpm, 5分钟, 室温)。将用封闭缓冲液系列稀释的人源化PD-L1抗体 (对于下述实验中的小规模生产, 将在293细胞中表达的抗体称为“旧”抗体, 将在CHO细胞中产生的抗体称为“新”抗体。即4B6-H3L4、4B6-H4L3、23A11-H3L5 293和23F11 H4L4 293是在293细胞中产生的; 23A11-H3L5 CHO和23F11 H4L4 CHO是在CHO细胞中产生的) (100 $\mu$ l/管) 加入相应管中并在4℃下孵育1小时。然后用1ml PBS洗涤细胞两次, 随后加入3 $\mu$ g/ml生物素化的hPD-1-N297A (100 $\mu$ l/管) 并在4℃下孵育1小时。用PBS洗涤3次后, 向各管中加入封闭缓冲液中1:200稀释的链霉亲和素-PE (100 $\mu$

1/管)。将细胞在4°C下孵育1小时,然后用PBS洗涤两次,随后将每个样品的细胞重悬于150 $\mu$ l PBS中。然后将细胞转移至FACS管并用流式细胞仪(ACEA Bioscience Novocyte)检测hPD-1-N297A与细胞的结合(参见图20A和20B)。

[0533] 实施例16:在混合淋巴细胞反应(MLR)中评估纯化的人源化抗体刺激T细胞活化的能力

[0534] 为评估抗-PD-L1抗体减轻PD-1/PD-L1介导的T细胞活化的抑制的能力,我们进行了混合淋巴细胞反应(MLR)测定。在第一项实验中,从新鲜人血液的PBMC中分离粘附性外周血单核细胞,得到树突细胞(DC)。将PBMC以 $2 \times 10^6$ /ml的密度铺板于无血清培养基的6孔板中。2小时后,弃去悬浮细胞并用10ng/ml GM-CSF和30ng/ml IL-4处理粘附性细胞。每3天更换一次培养基,并在第6天加入20ng/ml TNF $\alpha$ 使DC细胞成熟。在第7天时,使用抗-CD11c-PE(Biolegend)和抗-HLA-DR-APC(Biolegend)通过FACS检测DC的表型。使用CD4 $^+$ T细胞富集试剂盒(Stem Cell Inc.)从另一供体的新鲜血液中分离CD4 $^+$ T细胞。在用丝裂霉素C处理DC(10 $\mu$ g/ml处理2小时)后,以DC与CD4 $^+$ T细胞比例为1:10的比例加入DC和CD4 $^+$ T细胞和PD-L1抗体(200 $\mu$ l/孔),并且在37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下的孵箱中孵育5天。然后,使用IL-2duo-set(R&D)和IFN- $\gamma$ 检测试剂盒(Peprotech)检测上清液中的IL-2和IFN- $\gamma$ (参见图21A和21B)。通过CellTiter-Glo发光细胞活力测定试剂盒(Promega)测量T细胞的增殖情况。

[0535] 在第二项实验中,收获外周血并在加入1:1体积的Ficoll溶液后分离PBMC,随后离心30分钟。将PBMC用于使用包被了CD14的磁珠和CD4阴性磁珠分离单核细胞和T细胞。通过在存在500U/ml IL-4(R&D)和250U/ml GM-CSF(R&D)条件下培养7天将上述获得的单核细胞分群,随后加入100ng/ml TNF $\alpha$ (R&D)并继续培养3天。对上述获得的DC细胞计数并且每孔100 $\mu$ l体积中的10,000个DC细胞与50 $\mu$ l体积中的100,000个T细胞混合,然后加入50 $\mu$ l体积的测试抗体或对照IgG,在额外加入或不加入人PD-L1的条件下(终浓度1 $\mu$ g/ml)双复孔培养5天。收获上清液并使用ELISA(R&D)对IL-2和IFN $\gamma$ 的浓度定量(参见图21C和21D)。

[0536] 实施例17:通过Biacore评估选定的人源化抗-PD-L1抗体的结合亲和性

[0537] 通过注射1:1新制的50mM N-羟基琥珀酰亚胺(NHS):200mM 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)(10 $\mu$ l/分钟注射7分钟),来活化每个流动池中的CM5传感器芯片。然后将用10mM乙酸钠缓冲液稀释的浓度为10 $\mu$ g/ml的抗-人Fc抗体(GE Healthcare)以10 $\mu$ l/分钟流速注射至活化的芯片上(HBS-EP运行缓冲液:10mM HEPES,150mM NaCl,3.4mM EDTA,0.005%表面活性剂P20,pH 7.4)。通过注射1M乙醇胺(10 $\mu$ l/分钟注射7分钟),来封闭剩余的活性偶联位点。每个流动池的固化水平为~9000RU。在FC2中用抗-人Fc IgG(GE Healthcare)来捕获抗体,信号水平在200~300RU。将FC1作为参照池。在捕获抗体后以不同浓度注射抗原。抗体结合抗原的结合时间为180秒。表面再生条件为以10 $\mu$ l/分钟注射Gly pH1.5 120秒。用Biacore X100评估软件2.0版(Biacore)计算捕获抗体的信号减去未捕获抗体的信号。

[0538] 表6:与抗原结合的抗体的亲和性参数

抗体	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)	
<b>4B6-H3L3</b>	1.495E+5	9.270E-4	6.355E-9	
<b>4B6-H4L3</b>	1.317E+5	1.484E-3	1.127E-8	
<b>23A11-H3L3</b>	7.318E+5	5.421E-2	7.409E-8	
<b>23A11-H3L5</b>	5.171E+5	2.232E-2	4.317E-8	
<b>23F11-H4L4</b>	4.649E+5	3.042E-2	6.543E-8	
<b>23F11-H6L4</b>	4.353E+5	4.481E-2	1.029E-7	
<b>18G4-嵌合</b>	4.500E+5	5.155E-3	1.133E-8	
<b>BM-GT</b>	5.321E+5	1.158E-4	2.177E-10	
<b>[0539]</b>				
<b>[0540]</b>	<b>BM-ME</b>	<b>6.605E+5</b>	<b>4.040E-4</b>	<b>6.177E-10</b>

[0541] 已知人PD-1/hPD-L1之间的相互作用较弱,并且具有约7500+/-2200nM的 $K_D$ (N=6, Cheng X等, Structure and interactions of the human programmed cell death 1receptor, J Biol Chem. 2013; 288 (17) :11771-85)。因此,如表6中所示,我们的抗体与hPD-L1结合的亲和性比现有技术中的PD-1高100倍。

[0542] 实施例18:对选定PD-L1中和人源化抗体的pH依赖性结合的评估

[0543] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板用高pH包被缓冲液包被0.5 $\mu$ g/ml的PD-L1-his (100 $\mu$ l/孔) 并在4℃下孵育过夜。然后将包被的板在自动洗板仪上用PBS+0.1%吐温20 (Sigma) 洗涤一次。随后,每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液,并将板在室温下孵育2小时。吸出封闭缓冲液后,加入在pH 7.4中的稀释缓冲液中系列稀释的抗体(即由CHO或293细胞产生的23A11 H3L5、23F11 H4L4),并且将板在室温下孵育40分钟。然后,用pH 7.4的洗涤缓冲液(250 $\mu$ l/孔) 洗涤一次,之后加入pH7.4或pH5.5的洗涤缓冲液(100 $\mu$ l/孔),并且在室温下振荡孵育2小时。随后,使用pH 7.4的洗涤缓冲液洗板3次,然后向板的各孔中加入用pH 7.4的稀释缓冲液稀释的HRP缀合的山羊抗-人Fc抗体 (Abcam) 溶液(100 $\mu$ l/孔)。在将板在室温下孵育60分钟后,用pH 7.4的洗涤缓冲液洗板3次(200 $\mu$ l/孔)。最后,将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nM处读板(参见图22A至22E)。

[0544] 在较大pH范围内对pH依赖性hPD-L1结合的表征

[0545] 在不同pH值(如pH4、pH4.5、pH5.0、pH5.5、pH6.0、pH7.4)下进一步测定了pH依赖性结合亲和性。以与上文所述的方法类似的方式通过ELISA进行测量。在高结合透明聚苯乙烯96孔板用高pH包被缓冲液包被0.5 $\mu$ g/ml的hPD-L1-his (100 $\mu$ l/孔) 并在4℃下孵育过夜。然后将包被的板在自动洗板仪上用PBS+0.1%吐温20 (Amresco) 洗涤3次,每次振荡10s。随后,每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液(1% BSA (Solarbio) +1% 正常山羊血清 (Solarbio) +0.05% 吐温20 (Amresco)),之后将板在室温下孵育2小时,并且如上所述洗板3次。吸出封闭缓冲液后,加入100 $\mu$ l在pH 7.4的稀释缓冲液(1% BSA (Solarbio) +1% 正常山羊血清 (Solarbio) +0.01% 吐温20 (Amresco))中系列稀释的抗体(即由293细胞产生的23A11 H3L5、23F11 H4L4 和22C9-C),并且将板在室温下孵育40分钟。然后,使用pH7.4、pH6.0、pH5.5、pH5.0、pH4.5或pH4.0的洗涤缓冲液洗板一次(250 $\mu$ l/孔),之后加入pH7.4或pH5.5的洗涤缓冲液(100 $\mu$ l/孔),并且在室温下继续振荡孵育2小时。随后,使用pH 7.4的洗涤缓冲液洗板3次,然后向板的各孔中加入用pH 7.4的稀释缓冲液稀释的山羊抗-hIgG HRP抗体(1:20000, Abcam) 溶液(100 $\mu$ l/孔)。在将板在室温下孵育60分钟后,用pH 7.4的洗涤缓冲液洗涤3次(250 $\mu$ l/孔)。最后,将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中作用15分钟并使用0.16M/L硫酸终止反应(50 $\mu$ l/孔)。在

Thermo Multiscan FC上在450nm处读板(参见图23A-23F)。测量重复进行三次。

[0546] 与在pH 7.4下相比,每种抗体在低pH下的结合信号更低。在特定抗体浓度下,pH越低,结合信号越低。在pH 5下,三种检测抗体在高浓度下(例如,0.1、0.3或1μg/ml)的结合信号小于其在pH 7.4下信号的50%;在pH 5.5下,三种检测抗体的信号小于其在pH 7.4下信号的75%。

[0547] 实施例18:通过丙氨酸扫描对选定抗-PD-L1进行表位分组(binning)

[0548] 1. 突变人PD-L1重组蛋白的产生

[0549] 在体外合成编码胞外人PD-L1(氨基酸19-238)和人IgG1的Fc片段的cDNA(SEQ ID NO:107为氨基酸序列,且SEQ ID NO:108为相应的DNA序列)。通过如下所述的重叠PCR,使用如(表7)中所示的引物(Dr.Oligo BLP-192,Biolytic)扩增在如下所列的指定位置具有单个氨基酸改变的人PD-L1变体。用分别针对5'端和3'端的Hind III和BamH I的限制性内切酶消化所得到的片段。然后根据生产厂商的说明,使用Synbio组装混合试剂(Synbio),通过同源重组的方法将PCR产物克隆进入pcDNA3.1(+)载体。使用QIAGEN质粒Mega试剂盒(QIAGEN)对质粒进行纯化。

[0550] 氨基酸序列(SEQ ID NO:107):

[0551] METDTLLLWVLLWVPGSTGFTVTPKDLVVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQF VHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVV DPVTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSVDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHT AELVIPELPLAHPPNERENLYFQGAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[0552] DNA序列(SEQ ID NO:108):

[0553] AAGCTTgccgccaccATGGAAACCGACACTCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGTGGGTGCCAGGGTC AACCGGGTTCACCGTGACAGTGCCCAAGGACCTGTACGTGGAGTACGGCAGCAACATGACCATCGAGTGCAAG TTCCCCGTGGAGAACGAGCTGGATCTGGCCGCCCTGATCGTGTATTGGGAGATGGAGGACAAGAACATCATCCAGT TCGTGCACGGCGAAGAGGGACCTGAAGGTGCAGCACAGCAGCTACAGGCAGAGGGCCAGACTGCTGAAGGACAGCT GTCTCTGGAAACGCAGCTCTGCAGATACCGACGTGAAGCTGAGGACGCAGGAGTCTACCGCTGCATGATCAGC TACGGCGGAGCCGACTACAAGAGGATCACCGTGAGGTCAACGCCCCCTACAACAAGATCAACCAGAGAACATCCTGG TGGTGGACCCCGTGACCGAGCGACGACTTGCAAGGCTACCCCAAGGCCGAAGTGATTGGAC CAGCAGCGACCATCAGGTGCTGAGCGAAAGACCACCAACAGCAAGCGGGAGGAGAAGCTGTTAACGTG ACCAGCACCTCGGGATCAACACCAACCAACGAGATCTTCTACTGCACCTCCGGAGACTGGACCCAGAGGAGA ACCACACAGCCGAGCTGGTCATCCCAGAACACTGCCTCTGGCTCACCTCCTAACGAGAGAGAGAACATCTGTATTTCAGC GGGAGCACCAGAACTGCTGGAGGACCATCCGTGTTCCCTGTTCCACCCAAACCTAACGGACACCCCTGATGATTAGC AGAACACCAGAAAGTCACCTGGCTGGTCGTGGACGTGTCACAGGACCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGG ATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAACGACCAACCAAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTATAGGGTCGTGTCCTG CCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAATGCAAGGTGTCTAACAAAGGCCCTGCCAGCT CCCATCGAGAAGACTATTAGTAAAGCTAACGGCCAGCCCCCGAACCTCAGGTGTACACCCCTGCCATCCCGAG ACGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCTCTGACTTGTCTGGTAAGGGATTCTATCCATCAGATATCGCAGTGGAGTG

GGAAAGCAATGGCCAGCCCGAGAACATTACAAGACTACCCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCTTTCTTCTG  
TATTCTAAACTGACCGTGGATAAGAGTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTCATGCAGCGTGATGCACGAGGCAC  
TGCACAATCATTACACTCAGAAGTCCCTGTCACTGTACCTGGAAAGtagGGATCC

[0554] 用上文产生的野生型PD-L1质粒 (SEQ ID NO:107和108) 作为模板, 使用大型引物产生整合序列的两个区段 (表7), 并且通过同源重组完成连接。然后, 将产物克隆进入pcDNA3.1 (+) 载体, 在通过测序单个阳性集落以识别变体后, 证实成功产生了PD-L1突变。

[0555] PCR程序和条件如下所示:

[0556] 步骤1:产生变体的两个大型片段

		$\mu l$
	<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	35
	<i>5×S15 PCR 缓冲液</i>	10
	<i>10mM dNTP</i>	1
[0557]	<i>F 引物</i>	1
	<i>R 引物</i>	1
	<i>PCR 产物</i>	1
	<i>S15 聚合酶</i>	1

50

[0558]	初始变性	98°C	1 分钟
	变性	98°C	15 秒
	退火	58°C	30 秒
	延伸	72°C	每Kb 30 秒
	最终延伸	72°C	3 分钟 30 个循环

[0559] 步骤2:将两个片段连接在一起

[0560] 在冰上进行下述反应 (同源重组):

[0561]	<i>Syno 组装混合物</i>	<i>10μl</i>
	<i>序列产物 1</i>	<i>2μl</i>
	<i>序列产物 2</i>	<i>2μl</i>
	<i>去离子 H<sub>2</sub>O</i>	<i>6μl</i>

总体积 *20μl*

[0562] 表7:变体突变的引物序列

[0563]	<b>野生型</b>	1-F	TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTAAACTTA AGCTTGCCGCCACCATGAAACCGACACT	SEQ ID NO: 109
	<b>野生型</b>	1-R	TGGATATCTGCAGAATTCCACCACACTGGACTAGTG GATCCCTACTTCCAGGTGACAGTGACAGGGACT	SEQ ID NO: 110
	<b>M36-A</b>	2-AR	CACGGGAACTTGCACTCGATGGTGGCGTTGCTGC CGTACTCCACCACGTACAGGTCCCTTGG	SEQ ID NO: 111
		2-BF	TACGTGGTGGAGTACGGCAGCAACGCCACCATCGA GTGCAAGTTCCCCGTGGAGAAGCAGCT	SEQ ID NO: 112
	<b>I38A</b>	3-AR	CTTCTCCACGGGAAACTTGCACTCGGCGGTATGTT GCTGCCGTACTCCACCACGTACAGGT	SEQ ID NO: 113
		3-BF	GTGGAGTACGGCAGCAACATGACCGCCGAGTGCAA GTTCCCCGTGGAGAAGCAGCTGGATCT	SEQ ID NO: 114
	<b>K41A</b>	4-AR	ATCCAGCTGCTTCTCCACGGGAAAGGCGCACTCGAT GGTCATGTTGCTGCCGTACTCCACCA	SEQ ID NO: 115
		4-BF	GGCAGCAACATGACCATCGAGTGCACCTCCCCGT GGAGAAGCAGCTGGATCTGCCGCCCT	SEQ ID NO: 116
	<b>Q47A</b>	5-AR	CACGATCAGGGCGGCCAGATCCACGGGCCTCTCCA CGGGGAACCTGCACTCGATGGTCATGT	SEQ ID NO: 117
		5-BF	GAGTGCAAGTCCCCGTGGAGAAGGCCCTGGATCT GGCCGCCCTGATCGTATTGGGAGAT	SEQ ID NO: 118
	<b>A51S</b>	6-AR	CATCTCCAAATACACGATCAGGGCGCTCAGATCCAG CTGCTTCTCCACGGGAACTTGCAC	SEQ ID NO: 119
		6-BF	CCCGTGGAGAAGCAGCTGGATCTGAGGCCCTGAT CGTGTATTGGGAGATGGAGGACAAGAA	SEQ ID NO: 120
	<b>I54A</b>	7-AR	TCTTGTCCATCTCCAATACACGGCCAGGGCGG	SEQ ID NO: 121

[0564]		CCAGATCCAGCTGCTTCTCCACGGGG	
		7-BF AAGCAGCTGGATCTGGCCGCCCTGGCCGTATTGG GAGATGGAGGACAAGAACATCATCCA	SEQ ID NO: 122
	M59A	8-AR GAACTGGATGATGTTCTTGTCCCTCGGCCCTCCAAATA CACGATCAGGGCGGCCAGATCCAGCT	SEQ ID NO: 123
		8-BF GCCGCCCTGATCGTATTGGGAGGCCGAGGACAA GAACATCATCCAGTTCTGACGGCGA	SEQ ID NO: 124
	K62A	9-AR GCCGTGCACGAACCTGGATGATGTTGGCGTCCTCCAT CTCCCAATACACGATCAGGGCGGCCA	SEQ ID NO: 125
		9-BF ATCGTGTATTGGGAGATGGAGGACGCCAACATCATC CAGTTCTGACGGCGAAGAGGAGACCT	SEQ ID NO: 126
	N63A	10-AR TTGCGCCGTGCACGAACCTGGATGATGGCCTTGTCCCT CATCTCCCAATACACGATCAGGGCGG	SEQ ID NO: 127
		10-BF GTGTATTGGGAGATGGAGGACAAGGCCATCATCCA GTTCTGACGGCGAAGAGGAGACCTGAA	SEQ ID NO: 128
	I64A	11-AR CTCTTCGCCGTGCACGAACCTGGATGGCCTTGTGTC CTCCATCTCCCAATACACGATCAGGG	SEQ ID NO: 129
		11-BF TATTGGGAGATGGAGGACAAGAACGCCATCCAGTT CGTGCACGGCGAAGAGGAGCTGAAGGT	SEQ ID NO: 130
	H69A	12-AR CTGCACCTTCAGGTCCCTTCGCCGGCACGAAC GATGATGTTCTGTCCTCCATCTCCC	SEQ ID NO: 131
		12-BF GACAAGAACATCATCCAGTTCTGCGGCCGGCGAAGA GGACCTGAAGGTGCAGCACAGCAGCTA	SEQ ID NO: 132
	V76A	13-AR CCTCTGCCGTAGCTGCTGTGGGCCTTCAGGTC CTCTTCGCCGTGCACGAACCTGGATGA	SEQ ID NO: 133
		13-BF GTGCACGGCGAAGAGGACCTGAAGGCCAGCACA GCAGCTACAGGCAGAGGCCAGACTGCT	SEQ ID NO: 134
	S80A	14-AR CAGCAGTCTGCCCTCTGCCGTAGGCCGTGCTG CACCTTCAGGTCCCTTCGCCGTGCA	SEQ ID NO: 135
		14-BF GAGGACCTGAAGGTGCAGCACAGCGCCTACAGGCA GAGGCCAGACTGCTGAAGGACCAGCT	SEQ ID NO: 136
	Y81A	15-AR CTTCAGCAGTCTGCCCTCTGCCGTAGGCCGTGCTG CTGCACCTTCAGGTCCCTTCGCCGT	SEQ ID NO: 137
		15-BF GACCTGAAGGTGCAGCACAGCAGGCCAGGCAGA GGGCCAGACTGCTGAAGGACCAGCTGTC	SEQ ID NO: 138
	Q83A	16-AR CTGGTCCTTCAGCAGTCTGCCCTGCCCTGTAGCT GCTGTGCTGCACCTTCAGGTCCCTT	SEQ ID NO: 139
		16-BF AAGGTGCAGCACAGCAGCTACAGGCCAGGCCA GACTGCTGAAGGACCAGCTGCTCTGGG	SEQ ID NO: 140
	R86A	17-AR CAGAGACAGCTGGCCTTCAGCAGGCCGCCCT GCCGTAGCTGCTGTGCTGCACCTTC	SEQ ID NO: 141
		17-BF CACAGCAGCTACAGGCAGAGGCCGCCCTGCTGAA GGACCAAGCTGCTCTGGGAAACGCAGC	SEQ ID NO: 142
	L88A	18-AR GTTCCCAGAGACAGCTGGCCTTGGCCAGTCTGG CCCTCTGCCGTAGCTGCTGTGCTGCA	SEQ ID NO: 143
		18-BF AGCTACAGGCAGAGGCCAGACTGCCAACAGGACC AGCTGCTCTGGGAAACGCAGCTGCA	SEQ ID NO: 144
	S93A	19-AR GATCTGCAGAGCTGCGTTCCCAGGCCAGCTGGT CCTCAGCAGTCTGCCCTCTGCCGT	SEQ ID NO: 145
		19-BF GCCAGACTGCTGAAGGACCAGCTGCCCTGGGAAA CGCAGCTCTGCAGATCACCGACGTGAA	SEQ ID NO: 146
	L94A	20-AR GGTGATCTGCAGAGCTGCGTTCCGGCAGACAGCT GGTCCTTCAGCAGTCTGCCCTCTGCC	SEQ ID NO: 147
		20-BF AGACTGCTGAAGGACCAGCTGCTGCCGGAAACGC AGCTCTGCAGATCACCGACGTGAAGCT	SEQ ID NO: 148

[0565] 注释:AR-反向引物,BF-正向引物

[0566] 由另一公司Genewiz(中国苏州)构建另外20个变体。进行与Synbio Tech类似的方

法合成PD-L1变体。并且,在表8中描述了所使用的针对突变位点的大型引物。

[0567] 表8:变体突变引物序列

[0568]	F19A	1-BF	CTGTGGGTGCCAGGGTCAACCGGGGCCACCGTGACA GTGCCAAGGACCTGTACGTGGTGG	SEQ ID NO: 149
		1-AR	CAGGTCTTGGCACTGTCACGGTGGCCCGGTTGAC CCTGGCACCCACAGCAGCAGCACCC	SEQ ID NO: 150
T20A	2-BF	TGGGTGCCAGGGTCAACCGGGTTCGCCGTGACAGTG CCCAAGGACCTGTACGTGGTGGAGTA	SEQ ID NO: 151	
		2-AR	GTACAGGTCTTGGCACTGTCACGGCGAACCCGGTT GACCCCTGGCACCCACAGCAGCAGCA	SEQ ID NO: 152
D26A	3-BF	GGGTTCACCGTGACAGTGCCAAGGCCCTGTACGTGG TGGACTACGGCAGCAACATGACCAT	SEQ ID NO: 153	
		3-AR	GCTGCCGTACTCCACCACGTACAGGGCCTTGGCACT GTCACGGTGAACCCGGTTGACCTG	SEQ ID NO: 154
Y28A	4-BF	ACCGTGACAGTGCCAAGGACCTGGCCGTGGAG TACGGCAGCAACATGACCATCGAGTG	SEQ ID NO: 155	
		4-AR	CATGTTGCTGCCGTACTCCACCACGCCAGGGCCTTGG GGCACTGTACGGTGAACCCGGTTG	SEQ ID NO: 156
Y32A	5-BF	CCCAAGGACCTGTACGTGGTGGAGGCCGGCAGCAAC ATGACCATCGAGTGCAAGTCCCCGT	SEQ ID NO: 157	
		5-AR	GCACTCGATGGTCATGTTGCTGCCGGCTCCACCACG TACAGGGCCTTGGCACTGTACGG	SEQ ID NO: 158
Y56A	6-BF	CTGGATCTGGCCGCCCTGATCGTGGCCTGGGAGATGG AGGACAAGAACATCATCCAGTTCGTGCACGG	SEQ ID NO: 159	
		6-AR	GATGTTCTTGTCCCTCCATCTCCAGGCCACGATCAGG GCTTCCAGATCCAGCTGCTTCTCCA	SEQ ID NO: 160
E58A	7-BF	CTGGCCGCCCTGATCGTGTATTGGGCCATGGAGGACA AGAACATCATCCAGTTCGTGCACGG	SEQ ID NO: 161	
		7-AR	CTGGATGATGTTCTTGTCCCTCCATGGCCAATACACGA TCAGGGCTTCCAGATCCAGCTGCT	SEQ ID NO: 162
E60A	8-BF	GCCCTGATCGTGTATTGGGAGATGGCCGACAAGAAC TCATCCAGTTCGTGCACGGCGAAGAAC	SEQ ID NO: 163	
		8-AR	CACGAACCTGGATGATGTTCTTGTGGCCATCTCCAAT ACACGATCAGGGCTTCCAGATCCA	SEQ ID NO: 164
D61A	9-BF	CTGATCGTGTATTGGGAGATGGGAGGCCAAGAACATCA TCCAGTTCGTGCACGGCGAAGAGGA	SEQ ID NO: 165	
		9-AR	GTGCACGAACCTGGATGATGTTCTTGGCCTCCATCTCCC AATACACGATCAGGGCTTCCAGAT	SEQ ID NO: 166
Q66A	10-BF	GAGATGGAGGACAAGAACATCATGCCCTCGTGCACG GCGAAGAGGCCACTGAAGGTGCAGCA	SEQ ID NO: 167	
		10-AR	CAGGTCTCTTCGCCGTGCACGAAGGCCAGATGATGTT TTGTCCCTCCATCTCCAATACACGA	SEQ ID NO: 168
K75A	11-BF	TTCGTGCACGGCGAAGAGGCCACTGGCCGTGCAGCAC AGCAGCTACAGGCAGAGGGCCAGACT	SEQ ID NO: 169	
		11-AR	CTGCCTGTAGCTGCTGTGCACGGCCAGGTCCCT TCGCCGTGCACGAACCTGGATGATGT	SEQ ID NO: 170
	R82A	12-BF	CTGAAGGTGCAGCACAGCAGCTACGCCAGAGGGCC	SEQ ID NO: 171

[0569]	R113A	12-AR	AGACTGCTGAAGGACCAAGCTGTCTCT GTCCTTCAGCAGTCTGGCCCTCTGGGCGTAGCTGCTG TGCTGCACCTTCAGGTCCTCTCGC	SEQ ID NO: 172
		13-BF	AAGCTGCAGGACGCAGGAGTCTACGCCATGCATGATCA GCTACGGCGGAGCCACTACAAGAG	SEQ ID NO: 173
	M115A	13-AR	GGCTCCGCCGTAGCTGATCATGCAGGCGTAGACTCCT GCGTCCTGCAGCTTCACGTCGGTGA	SEQ ID NO: 174
		14-BF	CAGGACGCAGGAGTCTACCGCTGCGCCATCAGCTACG GCGGAGCCACTACAAGAGGATCAC	SEQ ID NO: 175
	S117A	14-AR	GTAGTCGGCTCCGCCGTAGCTGATGGCGCAGCGGTAG ACTCCTGCGTCCTGCAGCTTCACGT	SEQ ID NO: 176
		15-BF	GCAGGAGTCTACCGCTGCATGATCGCCTACGGCGGAG CCGACTACAAGAGGATCACCGTGAA	SEQ ID NO: 177
	A121S	15-AR	CCTCTTGTAGTCGGCTCCGCCGTAGGCGATGGCGCAG CGGTAGACTCCTGCGTCCTGCAGCT	SEQ ID NO: 178
		16-BF	CGCTGCATGATCAGCTACGGCGGAAGCGACTACAAGA GGATCACCGTGAAAGGTCAACGCC	SEQ ID NO: 179
		16-AR	CTTCACGGTGATCCTCTTGTAGTCGCTTCCGCCGTAGC TGATGGCGCAGCGGTAGACTCCTG	SEQ ID NO: 180
	D122A	17-BF	TGCATGATCAGCTACGGCGGAGCCCTACAAGAGGA TCACCGTGAAAGGTCAACGCC	SEQ ID NO: 181
		17-AR	GACCTTCACGGTGATCCTCTTGTAGGCGGCTCCGCCG TAGCTGATGGCGCAGCGGTAGACTC	SEQ ID NO: 182
	Y123A	18-BF	ATGATCAGCTACGGCGGAGCCGACGCCAAGAGGATC ACCGTGAAAGGTCAACGCCCTACAA	SEQ ID NO: 183
		18-AR	GTTGACCTTCACGGTGATCCTCTTGGCGTCGGCTCCG CCGTAGCTGATGGCGCAGCGGTAGA	SEQ ID NO: 184
	K124A	19-BF	ATCAGCTACGGCGGAGCCGACTACGCCAGGATCACCG TGAAGGTCAACGCCCTACAAACAA	SEQ ID NO: 185
		19-AR	GGCGTTGACCTTCACGGTGATCCTGGCGTAGTCGGCT CCGCCGTAGCTGATGGCGCAGCGGT	SEQ ID NO: 186
	R125A	20-BF	AGCTACGGCGGAGCCGACTACAAGGCCATCACCGTG AAGGTCAACGCCCTACAAACAGAT	SEQ ID NO: 187
		20-AR	GGGGCGTTGACCTTCACGGTGATGCCCTGTAGTCG GCTCCGCCGTAGCTGATGGCGCAGC	SEQ ID NO: 188

[0570] 注释:AR-反向引物,BF-正向引物

[0571] 随后,将突变体和野生型PD-L1的这些质粒转染进入293T (ATCC® CRL3216) 细胞系。首先,在60mm平皿中接种 $5 \times 10^6$ 个293T细胞,以确保初始转染率为60%~80%。然后在400 $\mu$ l 1×HBS中稀释10 $\mu$ g DNA,孵育约5分钟。向上述混合物中加入10 $\mu$ l 25kDa线性PEI转染试剂(溶解在1×HBS中,1mg/ml储存液),以确保DNA/PEI比为1:2.5。然后,将混合物逐滴加入293T的平皿中。约6-8小时后,更换培养基,替换成完全DMEM。72小时后,分别用0.22 $\mu$ m滤器收集细胞培养基上清,然后在-80°C条件下保存备用。

[0572] 2.通过ELISA测定PD-L1抗体的结合

[0573] 按照如下所述通过ELISA将上清液用于检测PD-L1抗体的结合。

[0574] 2.1对于小鼠抗体:

[0575] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用由高pH缓冲液包被0.5 $\mu$ g/ml的抗-人Fc抗体(Abcam)在室温下孵育一小时(100 $\mu$ l/孔)。然后将板在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液(PBS+0.1%吐温20(Sigma))洗涤一次,随后每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.05%吐温20)。将板在4°C下孵育过夜。然后用洗涤缓冲液洗板一次,并且向每孔中加入160 $\mu$ l上述DMEM培养上清液(含有不同突变的人PD-L1-Fc蛋白或500ng/ml野生

型人PD-L1-Fc蛋白),在室温下孵育1小时。随后,使用上文所述的方法洗板3次。加入0.5 $\mu$ g/ml小鼠抗-PD-L1抗体并在室温下孵育1小时。使用pH7.4洗涤缓冲液洗板3次后(200 $\mu$ l/孔),随后将在稀释缓冲液中稀释的HRP缀合的小鼠IgG抗体溶液(1:20000,Pierce)(100 $\mu$ l/孔)加入板的各孔中。之后,将ELISA板在室温下孵育60分钟,再用pH7.4洗涤缓冲液冲洗3次(200 $\mu$ l/孔)。最后,将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nm处读板(参见图24)。

[0576] 2.2对于具有人Fc的抗体(嵌合或人源化抗体):

[0577] 在高结合透明聚苯乙烯96孔板(Nunc)用高pH缓冲液包被0.5 $\mu$ g/ml抗-人Fc(小鼠抗体)或能够与其他PD-L1抗体配对的抗-hPD-L1抗体溶液,在室温下包被一小时(100 $\mu$ l/孔)。然后将板在自动洗板仪上使用洗涤缓冲液(PBS+0.1%吐温20(Sigma))洗涤一次,随后每孔加入200 $\mu$ l封闭缓冲液(PBS+1%BSA+1%正常山羊血清+0.05%吐温20)。将板在4℃下孵育过夜。然后用洗涤缓冲液洗板一次,并且向每孔中加入160 $\mu$ l上述DMEM培养上清液(含有不同突变的人PD-L1-Fc蛋白或500ng/ml野生型人PD-L1-Fc蛋白),在室温下孵育1小时。随后,使用上文所述的方法洗板3次。加入0.5 $\mu$ g/ml如上产生的生物素化的人源化抗-PD-L1抗体(23F11-H4L4-bio和23A11-H3L5-bio)或PD-1蛋白并在室温下孵育1小时。使用pH 7.4洗涤缓冲液洗板3次后(200 $\mu$ l/孔),随后将在稀释缓冲液中稀释的HRP缀合的抗-小鼠Fc抗体(Abcam)或HRP缀合的中性亲和素(1:5000,Pierce)溶液(100 $\mu$ l/孔)加入板的各孔中。之后,将ELISA板在室温下孵育60分钟,再用pH7.4洗涤缓冲液洗板3次(200 $\mu$ l/孔)。最后,将TMB以100 $\mu$ l/孔加入各孔中并使用0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在Thermo Multiscan FC上在450nm处读板(参见图24)。

[0578] 表9总结了在ELISA测定中每个针对人PD-L1的所检测抗体所需的关键残基。标记了人PD-L1蛋白上导致结合信号与野生型蛋白相比显著降低的氨基酸残基突变。

[0579] 表9:每种抗体所需hPD-L1上的关键残基汇总

突变号	突变	4B6	18G4	21F11	26F5	22C9	23A11	23A11-H3L5	23F11	23F11-H4L4	PD-1-Fc-生物素
1	F19A	★									★★★
2	T20A										
3	D26A										
4	Y28A										
5	Y32A										
6	M36-A										
7	I38A										
8	K41A										
9	Q47A										
10	A51S										
11	I54A								★		★★
12	Y56A		★★★		★						
13	E58A	★	★★	★	★★★	★★	★★★	★★★	★★★	★★★	
14	M59A										
15	E60A						★		★		
16	D61A						★				
17	K62A						★★				
18	N63A						★★	★★	★★	★★	
19	I64A					★		★★	★★	★★	
20	Q66A		★								
21	H69A										
22	K75A										
23	V76A										
24	S80A	★★	★★		★★	★★	★★	★★★	★★	★★★	★★
25	Y81A						★★	★★	★★	★★	
26	R82A										
27	Q83A										
28	R86A										
29	L88A										
30	S93A										
31	L94A										
32	R113A	★★ ★		★★★	★★★	★★★ ★	★★★ ★	★★★ ★	★★★ ★	★★★ ★	★★★
33	M115A	★		★	★	★★★					★★
34	S117A										
35	A121S	★		★							★
36	D122A	★★ ★				★★					★★★
37	Y123A	★★ ★		★		★★★		★	★	★★★	
38	K124A	★				★★★		★	★★	★★	
39	R125A	★★ ★		★	★★★	★★★	★★★	★★★ ★	★★★	★★★ ★	★★★

[0581] 表9中的数据表明具有pH依赖性结合性质的抗体利用了很多下述氨基酸来与人PD-L1的结合。

[0582] R125和S80对于PD-1与这两种类型的PD-L1抗体(例如,pH依赖性和非-pH依赖性)的结合是重要的,其中此前没有报道过S80对于本申请提供的PD-L1抗体结合的重要性。

[0583] 与非-pH依赖性结合抗体(包括参照抗体,如BM-ME)相比,E58和R113对于22C9、23A11、23F11及其人源化版本更加重要,其中E58是我们对抗体22C9、23A11、23F11进行分析后发现的新位点并且未在现有技术中被揭示,因为其对于PD-1与PD-L1的结合并不重要。

[0584] M115和K124对于22C9是独特的,但是已知这两个残基对于PD-1与PD-L1的结合是重要的。

[0585] N63和Y81对于23F11及其人源化23F11和人源化23A11(而非23A11)是独特的,但是其对于PD-1与PD-L1的结合并不重要,其对于参照抗体与hPD-L1的结合也不重要,因此是新位点。

[0586] I64对于23F11及其人源化版本是独特的,并且现有技术中并不知晓其对于PD-1与PD-L1的结合是否重要。

[0587] K62对于23A11的人源化版本是独特的,并且现有技术中并不知晓其对于PD-1与PD-L1的结合是否重要。

[0588] Y123对于4B6和参照抗体是最关键的,但是对于包括pH依赖性抗体在内的其他抗体不太关键(其对于另一种pH依赖性结合抗体22C9也是重要的)。

[0589] Y56对于21F11是独特的,并且现有技术中并不知晓其对于PD-1与PD-L1的结合是否重要。

[0590] 已报道抗-PD-L1抗体中R113和R125突变为A将导致其与人PD-L1的结合能力的丧失(参见美国专利号8779108),并且如Lin DY等,Proc Natl Acad Sci U S A.2008年2月26日;105(8):3011-6中所述,已知其对于PD-1与PD-L1的结合是重要的。

[0591] 实施例19:用于体内研究的抗-PD-L1抗体的大规模生产

[0592] 使用在CHO-K1细胞中的瞬时表达生产抗体。使用蛋白A亲和柱纯化所生产的抗体,并且在脱盐后,以5mg/ml将抗体在PBS中制剂,其内毒素水平<3单位/mg。使用SDS-PAGE凝胶和SEC-HPLC表征所得抗体的纯度。

[0593] 使用CHO-K1细胞的重组抗体的瞬时表达和纯化

[0594] 合成选定抗体的重链和轻链可变区基因并将其克隆进入表达载体。将所得到的表达构建体用于转染适于在无血清培养基中生长的CHO-K1细胞。在10L Applikon生物反应器中生长10天后,收获培养基并使用超滤器除去细胞和细胞碎片。然后,超滤浓缩澄清的上清液并将其上样至预制的蛋白A(人IgG)或G-琼脂糖(小鼠IgG)柱。在UV监测器监测下用平衡缓冲液冲洗至基线后,用0.1M柠檬酸(pH 3.5)洗脱柱,立即用1.0M Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)中和洗脱得到的抗体,并且通过两次缓冲液交换将其在2-8°C下用PBS(pH 7.2, Invitrogen)透析过夜。将纯化的抗体通过0.22μm无菌注射器滤器过滤,分装后在-80°C或更低温度下保存。

[0595] 实施例20:抗-PD-L1人源化抗体的体内评估

[0596] 如实施例14中所述评估人源化抗-PD-L1抗体的体内活性。

[0597] 1.在MC38/人-PD-L1敲入肿瘤模型中人源化PD-L1抗体的抗肿瘤活性

[0598] 如实施例14中所述在MC38/人-PD-L1敲入肿瘤模型中检测人源化PD-L1抗体4B6-H3L3-N297A的抗肿瘤活性,结果如表10和图25中所示(显示了使用PBS、BM-GT和4B6-H3L3-N297A治疗的结果)。

[0599] 表10:PD-L1抗体对MC38/hPD-L1同源小鼠肿瘤模型的抗肿瘤活性的研究设计

组别	处理	动物编号	剂量	给药途径	方案
1	载体 (PBS)	1-8	-	腹腔注射	3 次/周*3
[0600]	2 BM-GT	1-8	3 mpk	腹腔注射	3 次/周*3
	3 4B6-嵌合	1-8	3 mpk	腹腔注射	3 次/周*3
	4 4B6-H3L3-N297A	1-8	3 mpk	腹腔注射	3 次/周*3

[0601] 2. 腹腔注射人源化抗体对MC38/hPD-L1 KI肿瘤生长的抑制

[0602] 本研究旨在评估以1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg剂量腹腔注射人源化抗-PD-L1抗体抑制肿瘤生长的作用。简言之,与此前一样在C57BL/6小鼠中接种 $2 \times 10^6$ 个MC38/hPD-L1肿瘤细胞并使其生长6天。此时,选择平均肿瘤体积80-100mm<sup>3</sup>的小鼠并将其随机分组,每组8只小鼠。从第6天开始,每周3次,以1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg BM-GT或23F11-H4L4(1mg/kg)将各测试抗体等体积地通过腹腔注射给予每只小鼠。在研究结束时(第25天)通过CO<sub>2</sub>吸入处死小鼠。每周两次,使用卡尺(INSIZE)在两个维度上测量肿瘤尺寸,并且使用下述公式以mm<sup>3</sup>表示计算体积:V=0.5a×b<sup>2</sup>,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。如果肿瘤体积缩小至小于处理开始时肿瘤体积的50%,但是未低于可测量尺寸,则记录为部分肿瘤消退(PR),或者如果肿瘤负荷变得难以察觉,则记录为完全肿瘤消退(CR)(参见表11)。使用Prism GraphPad分析结果并以平均值±S.E.M表示。通过T-检验进行两组之间的比较,如果P<0.05则认为差异具有显著性。图26E显示了在给予不同抗体(BM-GT、BM-ME、23A11-H3L5和23F11-H4L4)的每只小鼠中测得的肿瘤体积。RTV表示与在同一小鼠中第1天测得的肿瘤体积相比的相对肿瘤体积,TV表示在最后一天(即研究的第25天)测得的肿瘤体积。

[0603] 表11:在第25天测得的肿瘤消退情况

处理	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )	TGI %	PR	CR	
载体 (PBS)	745.04±76.86		0/8	0/8	
BM-GT 1mg/kg	453.04±61.70	44.46*	0/8	1/8	
[0604]	BM-GT 3mg/kg	418.20±88.91	50.81*	1/8	0/8
	BM-GT 10mg/kg	316.66±61.70	66.44**	0/8	2/8
	23F11-H4L4 1mg/kg	288.86±64.95	70.76**	0/8	2/8

[0605] 注释:与载体比较,\*p<0.05;\*\*P<0.01.

[0606] PR(部分消退):肿瘤体积缩小至小于处理开始时肿瘤体积的50%,但不低于可测量尺寸

[0607] CR(完全消退):肿瘤负荷已变得难以察觉

[0608] 3. 静脉注射人源化PD-L1抗体对MC38/hPD-L1 KI肿瘤生长的抑制情况

[0609] 本研究旨在评估静脉注射人源化抗体时其抑制肿瘤生长的作用,以预计如何将其用于患者。简言之,与此前一样在C57BL/6小鼠中接种MC38/hPD-L1肿瘤细胞并使其生长10天。此时,选择平均肿瘤体积180-220mm<sup>3</sup>的小鼠并将其随机分组,每组12只小鼠。在第0天和第15天以1mg/kg将各测试抗体等体积地通过静脉注射给予每只小鼠。通过吸入CO<sub>2</sub>处死小鼠。每周两次,使用卡尺(INSIZE)在两个维度上测量肿瘤尺寸,并且使用下述公式以mm<sup>3</sup>表示计算体积: $V=0.5a \times b^2$ ,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。如果肿瘤体积缩小至小于处理开始时肿瘤体积的50%,但是未低于可测量尺寸,则记录为部分肿瘤消退(PR),或者如果肿瘤负荷变得难以察觉,则记录为完全肿瘤消退(CR)(参见表12)。使用Prism GraphPad分析结果并以平均值±S.E.M表示。通过T-检验进行两组之间的比较,如果P<0.05则认为差异具有显著性。

[0610] 图29中的数据表明,与其他剂量相比,1mg/kg的23A11-H3L5和23F11-H4L4在相同条件下更有效地抑制肿瘤生长。图27A表明与载剂对照相比,1mg/kg的23F11-H4L4或23A11-H3L5分别产生91%和82%的肿瘤生长抑制,而1mg/kg的参照抗体产生41.6%的肿瘤生长抑制。图29A表明1mg/kg 23F11-H4L4或23A11-H3L5抑制MC38/hPD-L1敲入肿瘤生长的水平与10mg/kg BM-GT相似,并且在相同条件下其显示出无统计学显著差异的肿瘤抑制活性。因此,以23F11-H4L4和23A11-H3L5示例的抗体的体内活性是参照抗体BM-GT(也称为MPDL-3280A)的约10倍,BM-GT不以pH依赖的方式与抗原结合(参见图29A和29B)。

[0611] 表12:在第26天测得的肿瘤消退情况

处理	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )	TGI %	PR	CR
载剂 (PBS)	809.7±563.9		0/12	0/12
BM-GT 1mg/kg	472.9±221.40	41.6	0/12	1/12
23A11-H3L5 1mg/kg	142.2±235.8	82.4**	2/12	7/12
23F11-H4L4 1mg/kg	71.9±116.3	91.1***	3/12	6/12

[0613] \*\*相对于载剂p值<0.01;\*\*\*相对于载剂p值<0.005

[0614] PR:部分响应,与初始时间点相比,肿瘤体积缩小>50%

[0615] CR:完全响应,与初始时间点相比,肿瘤体积缩小100%

[0616] 在研究终点时每只小鼠肿瘤尺寸的变化用瀑布图显示,并且以与初始时间点相比的肿瘤尺寸变化表示(参见图28A至28D)。肿瘤尺寸增加超过100%的小鼠以100%表示,肿瘤尺寸增加小于100%或与初始时间点相比减小的小鼠以确切变化的百分比表示。

[0617] 上述结果表明在1mg/kg剂量下23F11-H4L4和23A11-H3L5与参照抗体BM-GT相比显著更有效地抑制肿瘤生长的作用(参见图27和图28)。此外,1mg/kg 23A11-H3L5和23F11-H4L4抑制肿瘤生长的能力与10mg/kg BM-GT相当(参见图29A和29B)。而且,与剂量为1mg/kg时相比,剂量为10mg/kg时23A11-H3L5或23F11-H4L4的肿瘤生长抑制活性没有进一步增加,但是在这种情况下BM-GT的活性显著增加。因此,具有pH依赖性抗原结合的抗体可能是能够在非常低的剂量下抑制肿瘤生长的新类抗体。

[0618] 4. 肿瘤再攻毒研究

[0619] 为了了解用PD-L1抗体静脉注射治疗后肿瘤完全清除的小鼠是否能够持续免疫应答和控制新肿瘤出现,我们在小鼠的一个亚组中使用新的肿瘤细胞对小鼠进行再攻毒挑战,所述亚组的小鼠在给予1mg/kg 23A11-H3L5或23F11-H4L4时,到第10-35实现完全响应。然后,在接种后第35天向这些小鼠注射 $2 \times 10^6$ 个新肿瘤细胞/只。新输注的肿瘤细胞能够在输注后的前5至10天生长,但是随后肿瘤尺寸开始缩小,并且到第50天时(再攻毒后15天),小鼠均测量不到肿瘤。这表明,尽管此时并不存在抗体,但这些小鼠已对相同的肿瘤细胞产生了记忆,并且可以持久应答,产生肿瘤抑制效应(参见图30)。

[0620] 实施例21:选定的依赖性中和抗体的肿瘤渗透作用评估

[0621] 抗体需要渗透到肿瘤中才能发挥其作用。为评估pH依赖性抗体是否在渗透进入肿瘤方面具有优势以及其在肿瘤中的停留时间是否具有差异,我们进行了体内成像研究。

[0622] 简言之,采用近红外荧光标记染料(CF750,目录号99952,批号:12M0413,BIOTIUM)标记测试抗体BM-GT和23F11-H4L4:在PBS中将抗体稀释为0.1mg/ml,然后以1:9的比例将0.8ml的各抗体溶液用移液管移入装有已预热的10×反应缓冲液的管中,使得抗体溶液含有终浓度为1×的反应缓冲液。通过用移液管上下吹打几次将溶液混合后,将各管中的全部溶液转移至含CF染料的管中,涡旋混合几秒并避光孵育30分钟。然后,将约0.2ml的抗体-染料溶液静脉注射至每只小鼠。

[0623] MC38/hPD-L1同源肿瘤模型

[0624] 将 $2 \times 10^6$ 个MC38/hPD-L1细胞皮下植入8周龄C57BL/6小鼠中,选择12只小鼠并随机分成4组。当肿瘤生长至约 $220\text{mm}^3$ 时,向小鼠静脉注射0.2ml抗体-染料溶液。

[0625] 在给药后1小时、4小时、24小时、48小时、96小时、第7天、第11天、第15天、第18天和第21天的时间点,麻醉后用IVIS Lumina II对每只小鼠的肿瘤部位成像。简言之,在各时间点,在IVIS成像前用50mg/kg戊巴比妥钠对每只小鼠进行麻醉。当动物停止移动时,将动物置入观察箱中(肿瘤侧朝上)并关闭箱门,然后使用活体成像软件对每只小鼠成像。

[0626] 显示了BM-GT和人源化23F11(即23F11-H4L4)的辐射信号的实例(参见图31A)。对每个时间点每只小鼠的平均辐射信号进行定量并用GraphPad prism分析,如图31B中所示。结果表明肿瘤中抗体23F11-H4L4与参照抗体相比具有显著更高的辐射信号,因此与参照抗体相比有更多抗体停留在肿瘤中。随着时间的推移在肿瘤中的抗体越来越多,用23F11-H4L4处理的三只小鼠中的两只肿瘤明显缩小,而用BM-GT处理的小鼠均未出现肿瘤明显缩小(参见图31C)。因此,具有pH依赖性性质的抗体23F11-H4L4可能具有独特的优势并且在抑制肿瘤生长方面更加有效。图31B图例中的2-1、2-2、2-3、4-1、4-2和4-3分别表示第2组和第4组中的1、2或3号小鼠。

[0627] 实施例22:选定的人源化抗-PD-L1抗体与其他肿瘤调节剂的联合疗法

[0628] 为了评估检验点抑制剂抗-PD-L1抗体和抗-VEGFR2抗体(抗血管生成)联用是否能够更好地控制肿瘤生长,用20mg/kg对小鼠VEGFR2具有中和活性的抗体DC101,或者亚最佳剂量0.3mg/kg的PD-L1抗体23A11-嵌合,或二者联合治疗hPD-L1/MC38肿瘤。简言之,与此前一样在C57BL/6小鼠中接种 $2 \times 10^6$ 个MC38/hPD-L1肿瘤细胞并使其生长3天。此时,对小鼠进行随机分组,每组8只小鼠。从第3天开始,连续3周每周3次,以0.3mg/kg 23A11-嵌合或20mg/kg DC101或二者联合,将各测试抗体通过腹腔注射给予每只小鼠。在研究结束时通过

吸入CO<sub>2</sub>处死小鼠。每周两次,使用卡尺(INSIZE)在两个维度上测量肿瘤尺寸,并且使用下述公式以mm<sup>3</sup>表示计算体积:V=0.5a×b<sup>2</sup>,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。使用Prism GraphPad分析结果并以平均值±S.E.M表示。通过T-检验进行两组之间的比较,如果P<0.05则认为差异具有显著性。数据表明联合治疗在抑制肿瘤细胞生长方面更加有效(参见图32A至图32C)。

[0629] 为进一步证明联合疗法比单一疗法更有效,我们在肿瘤体积约180mm<sup>3</sup>时开始治疗。我们在对人源化PD-L1或VEGFR2抗体DC101不太敏感的小鼠品系中成对给予1mg/kg或3mg/kg这两种抗体。所述治疗每周通过静脉注射给予一次,持续2-3周。数据表明这两种治疗联用在抑制肿瘤生长方面比单独的抗体显著地更为有效(参见图32D和32E)。

[0630] 因此,我们证实了人源化PD-L1抗体与血管生成抑制剂(如VEGFR2抗体)联用可能是用于治疗已建立的肿瘤的生长或新形成肿瘤的发展的有效方法。

[0631] 实施例23:PD-L1抗体的热稳定性

[0632] 利用毛细管细胞差示扫描量热法(DSC)通过检测在升温过程中样品和对照的热量差异评估蛋白的热稳定性。特别地,其用于测量热转变中点(T<sub>m</sub>),其指示蛋白在液体中的相对稳定性。用缓冲液(20mM His-His-HCl,5%蔗糖,pH=6.0)将抗体23F11-H4L4或23A11-H3L5(在CHO细胞中产生)稀释至1mg/ml并加入DSC 96孔板。用MicroCal VP-DSC毛细管细胞微型量热仪(GE)对样品进行检测,温度范围为10~110°C,扫描速率为200°C/小时,并且用MicroCal VP毛细管DSC自动分析软件对结果进行分析。毛细管细胞DSC检测结果如下表13以及图33A和33B中所示。

[0633] 如表13所示,23F11-H4L4抗体显示显著升高的T<sub>m</sub>值(即T<sub>m</sub>2,其表示Fab片段的T<sub>m</sub>,而T<sub>m</sub>1表示CH2片段的T<sub>m</sub>)。

[0634] 表13

样品名称	扫描温度	初始T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>m</sub> 1(°C)	T <sub>m</sub> 2(°C)
23F11-H4L4	10~110°C	52.3	64.1	90.2
23A11-H3L5	10~110°C	52.3	64.4	76.7

[0636] 实施例24:通过E58对抗-PD-L1抗体的表位分组

[0637] 使用如实施例18中所述的基于ELISA的结合测定,分析E58残基对于本申请提供的抗-PD-L1抗体结合的重要性。生产野生型抗-PD-L1蛋白或具有E58A的突变体,在同一块板上测定抗体与两种蛋白的相对结合,结果如下表14中所示:

[0638] 表14

抗体名称	PD-L1 蛋白名称	样品-1 的 OD450nM	样品-2 的 OD450nM	平均值	抗体与 E58A 突变体的结合相对于抗体与野生型 PD-L1 的结合的百分比
[0639]	23F11-H4L4 野生型	1.18	1.33	1.255	
	E58A	0.129	0.103	0.116	9.2%
	23A11-H3L5 野生型	1.224	1.467	1.345	
	E58A	0.128	0.094	0.111	8.3%
	MEDI4736 (BM-ME) 野生型	1.472	1.58	1.526	
	E58A	1.059	1.072	1.0655	69.8%
	MPDL3280A (BM-GT) 野生型	1.30	1.417	1.359	
	E58A	0.814	0.574	0.694	51%
	23F11 野生型	1.65	1.765	1.71	
	E58A	0.383	0.292	0.3375	9.9%
[0640]	22C9 野生型	1.9	1.941	1.92	
	E58A	0.35	0.309	0.3295	17.2%
	23A11 野生型	1.5	1.615	1.56	
	E58A	0.854	0.76	0.807	51.7%
	26F5 野生型	1.387	1.683	1.535	
	E58A	1.183	0.678	0.93	60.6%
[0641]	4B6 野生型	1.432	1.545	1.489	
	E58A	1.063	1.009	1.036	69.6%
	18G4 野生型	1.556	1.34	1.448	
	E58A	1.524	1.883	1.703	117%

[0641] 数据表明残基E58对于23F11和23F11-H4L4是关键的,当人PD-L1中的该残基突变为丙氨酸时,结合降低90%以上。类似地,23A11-H3L5和22C9的结合也降至WT PD-L1蛋白结合的信号的8.3%和17.2%。另一方面,当E58突变为Ala时,BM-GT或BM-ME的结合降至野生型PD-L1结合信号的51%或69.8%。类似地,23A11、26F5和4B6的结合也降至野生型PD-L1蛋白的51.7%、60.6%和69.6%。最不同的是,当E58突变为Ala时,18G4与PD-L1的结合完全没有降低。因此,不同抗体与PD-L1蛋白的结合对于E58的需求是不同的,其对于23F11、23F11-H4L4和22C9是关键残基。

[0642] 还注意到18G4是一种表位结合性质与本申请公开的其他抗-PD-L1抗体有非常大区别的抗体,在通过丙氨酸扫描分析的39个不同氨基酸中其仅需要S80的结合。该抗体在体内抑制肿瘤生长方面也是非常有效的。

[0643] 实施例25:人源化PD-L1抗体的内化

[0644] 为评估23F11-H4L4(来源于CHO细胞)是否能够被内化,我们进行了下述实验。首先用pH敏感性染料pHAb胺活性染料(Sigma, G9845)标记山羊抗-人Fc二抗。这种染料在中性pH下无荧光,但是在酸性pH下具有很强的荧光。当用这种染料标记的抗体内化进入胞内的内涵体(pH 6.0-6.5)和溶酶体(4.5-5.5)时,能够检测到较强的荧光信号。用含10%胎牛血清(Hyclone)的RPMI-1640培养基培养MC38-hPD-L1细胞(MabSpace)。离心收集对数期生长细胞并以 $2 \times 10^4$ /孔的密度(50 $\mu$ l/孔)将细胞接种至96孔板中,使细胞贴壁过夜。然后,将2 $\mu$ g/ml用pHAb胺活性染料标记的山羊-抗-人Fc(Jackson ImmunoResearch,目录号109-005-098)加入每个孔中(25 $\mu$ l/孔),随后向每个孔中加入系列稀释的23F11-H4L4或hIgG1(25 $\mu$ l/孔)。将抗体与细胞在37°C下孵育6小时或24小时。孵育结束后,除去培养基并向每个孔中加入100 $\mu$ l PBS。使用Varioskan Flash(Thermo Scientific)通过读取Ex 532nm/Em 560nm下的光谱确定培养板各孔中抗体的信号。图35中的数据表明,在6或24小时后,细胞中的荧光信号以浓度依赖性的方式显著增加。这些结果表明23F11-H4L4在与MC38/hPD-L1细胞表面

上的hPD-L1结合后能够有效内化(参见图35)。

[0645] 实施例26:人源化PD-L1抗体与活化的T细胞的体外结合

[0646] 使用Ficoll-Paque密度梯度离心从白细胞分离试剂盒(leukapheresis pack)中分离外周血单核细胞并将其重悬于加入了2%FBS的PBS中。用培养基将细胞稀释至密度为 $0.5 \times 10^7$ 个细胞/ml,然后将其加入用抗-人CD3抗体(OKT3,ebioscience,目录号16-0037)(1 $\mu$ g/ml,1ml/孔)包被的培养板中。将抗-人CD28(BD,目录号555725)加入各孔中,然后将细胞在37°C下在含有加入了10%FBS的RPMI 1640的6孔板中培养3天。随后,收集细胞并置入含FACS缓冲液(PBS+5%BSA)的96孔圆底培养板中。离心并弃去上清后,加入系列稀释的23F11-H4L4抗体,或者作为阴性对照的具有N297A突变的hIgG1。将培养板在4°C下孵育1小时,然后使用PBS洗涤细胞3次。之后,将2.5 $\mu$ l/孔小鼠抗人CD3-Alexa488(BD,目录号557705)和5 $\mu$ l/孔抗人IgG-APC(Biolegend,目录号409306)加入每个孔中并将板在4°C下孵育一小时,洗板3次后用流式细胞仪(Beckman Cytoflex)进行分析。

[0647] 图36A和36B中的数据表明23F11-H4L4能够以剂量依赖性的方式与活化的T细胞上表达的PD-L1结合,而其与未活化的T细胞几乎不结合。

[0648] 实施例27:PD-L1抗体在接种MC38/hPD-L1细胞的hPD-1敲入小鼠模型中的体内有效性研究

[0649] 在此前的实验中(例如,实施例14和20),同源小鼠中的PD-1蛋白是小鼠来源的,并且免疫抑制由hPD-L1与小鼠PD-1的结合所介导。为了进一步评估如果将小鼠PD-1换成hPD-1(在人类患者中存在的情况),MC38/hPD-L1同源模型中的抗体治疗是否存在差异,我们将MC38/hPD-L1肿瘤细胞植入PD-1敲入小鼠中。特别地,在37°C下,含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中,将MC38/hPD-L1肿瘤细胞作为单层培养物用含10%热灭活胎牛血清(ExCell Biology)、100U/ml青霉素和100 $\mu$ g/ml链霉素(Hyclone)的RPMI1640培养基(Thermo Fisher)中进行体外培养。通过胰酶-EDTA处理(Hyclone),每周两次对肿瘤细胞进行常规传代培养。收获指数生长期生长的细胞并计数,以通过FACS分析确认hPD-L1表达和肿瘤接种。将每只5-6周龄的PD-1敲入雌性小鼠(C57BL/6-Pdcd/tm1(hPDCD1),Beijing Biocytogen Co.,Ltd)在右侧肋腹部皮下接种在0.1ml PBS中经确认具有PD-L1表达的MC38/hPD-L1肿瘤细胞( $2 \times 10^6$ )用于形成肿瘤。在接种大约7天后,当肿瘤尺寸达到约100mm<sup>3</sup>时开始治疗。每组由10只荷瘤小鼠组成(参见图37A)。吸取200 $\mu$ l浓度为3mg/ml的储存液并用1.8ml制剂缓冲液(组氨酸20mM,蔗糖250mM,聚山梨醇酯80 0.02%,pH6.0±0.2)稀释得到0.3mg/ml的工作溶液,从而制备待测物(即23F11-H4L4),并且将其通过静脉注射到小鼠体内。每周两次,使用卡尺(INSIZE)在两个维度上测量肿瘤尺寸,并且使用下述公式以mm<sup>3</sup>表示计算体积: $V = 0.5a \times b^2$ ,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。如果肿瘤体积缩小至小于治疗开始时肿瘤体积的50%,但是未低于可测量尺寸,则记录为部分肿瘤消退(PR),或者如果肿瘤负荷变得难以察觉,则记录为完全肿瘤消退(CR)。每个治疗组中的肿瘤尺寸示于表15以及图37B和37C中。这些数据表明,用抗体23F11-H4L4治疗导致了显著的肿瘤生长抑制,在经治疗的10只小鼠中有5只小鼠肿瘤消除或完全抗体响应,而用生理盐水处理的小鼠均有肿瘤生长且在任何小鼠中均无肿瘤消退。

[0650] 表15:在第31天的肿瘤生长抑制(TGI)率

组别	肿瘤体积	TGI %	P 值	CR %	PR %	ORR %
[0651]	PBS	588.12±364.42	/	/	0	0
	23F11-H4L4 (3 mg/kg)	119.24±163.20	79.73	0.002	50	0

[0652] 为进一步比较体内肿瘤生长抑制的相对有效性,我们进行了另一项实验。类似地,将每只5-6周龄的PD-1敲入雌性小鼠(C57BL/6-Pdcd/tm1(hPDCD1),Beijing Biocytogen Co.,Ltd)在右侧肋腹部皮下接种在0.1mL PBS中经确认具有PD-L1表达的MC38/hPD-L1肿瘤细胞( $2 \times 10^6$ )用于形成肿瘤。在接种大约7天后,当肿瘤尺寸达到约 $100\text{mm}^3$ 时开始治疗。每组由8只荷瘤小鼠组成。吸取0.128mL、0.384mL和1.28mL浓度为3mg/mL的储存液并分别用3.712、3.456和2.58mL无菌PBS(Hyclone,目录号SH30256.01)稀释得到0.1mg/mL、0.3mg/mL或1mg/mL的工作溶液,从而制备待测物,并且将其每周两次通过腹腔注射到每只小鼠体内,以达到给药剂量1、3、10mg/kg。类似地,吸取1.280mL 3mg/mL CHO细胞来源的BM-GT加入到2.560mL PBS中,或者吸取0.662mL 5.8mg/mL储存液加入到3.178mL无菌PBS中,从而制备BM-GT(MABSPACE,在CHO细胞中产生)和具有N297A突变的对照IgG(CrownBio,来自CHO细胞的AB160160),并通过每周两次向每只小鼠腹腔注射200 $\mu\text{l}$ 最终的稀释溶液,以达到每周两次以10mg/kg通过腹腔注射给药。每周两次,使用卡尺(INSIZE)在两个维度上测量肿瘤尺寸,并且使用下述公式以 $\text{mm}^3$ 表示计算体积: $V = 0.5a \times b^2$ ,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。如果肿瘤体积缩小至小于治疗开始时肿瘤体积的50%,但是未低于可测量尺寸,则记录为部分肿瘤消退(PR),或者如果肿瘤负荷变得难以察觉,则记录为完全肿瘤消退(CR)(参见表16和图38A-38C)。

[0653] 表16:在hPD-1小鼠的MC38/hPD-L1同源肿瘤模型中的肿瘤生长抑制率(N=8,第27天)

组别	处理	肿瘤体积 ( $\pm\text{SD}$ )	TGI %	PR	CR	ORR %
[0654]	1 对照 IgG 10mpk N=8	691.93±377.72		0/8	0/8	0
	2 23F11-H4L4 1mpk N=8	138.88±119.50**	79.93	0/8	1/8	12.5
	3 23F11-H4L4 3mpk N=8	83.14±118.68**	87.98	1/8	4/8	62.5
	4 23F11-H4L4 10mpk N=8	10.81±20.51**#	98.44	2/8	6/8	100
	5 BM-GT 10mpk N=8	71.27±73.01**	86.70	0/8	3/8	37.5

[0655] \*\*:与对照IgG组相比p<0.01;#:与BM-GT组相比p<0.05

[0656] 来自上述实验的数据表明,在接种了表达人PD-L1的MC38肿瘤细胞的PD-1敲入小鼠中:1) 23F11-H4L4显示出高效的、剂量依赖性的肿瘤生长抑制活性,在1、3和10mg/kg下的总响应(PR+CR)率分别为12.5%、62.5%和100%(参见图38A);2) 3mg/kg的23F11-H4L4至少与10mg/kg的BM-GT一样有效(参见图38B和38C);3) 以3mg/kg通过腹腔注射或静脉注射给药的23F11-H4L4在实现完全肿瘤消退方面显示出相似的活性(50%)(参见图37A-37B和38A-38C)。

38C) ; 4) 10mg/kg剂量下的23F11-H4L4与10mg/kg的BM-GT相比,不仅在总体肿瘤尺寸缩小方面,而且在达到完全肿瘤消退的小鼠数量方面(6/8对3/8),均显著更加有效(参见图38C)。因此,pH依赖性抗原结合和相关的再循环特性以及肿瘤中更长的药物停留时间可以更好的控制肿瘤和使肿瘤消退,尤其是在BM-GT的最大有效剂量下。

[0657] 实施例28:受体占据和小鼠药代动力学/药效学

[0658] 为测量在单次静脉注射抗体后,在MC38/hPD-L1肿瘤中抗体与靶蛋白人PD-L1结合的持续时间,在抗体注射后取不同时间点的肿瘤,制备成单细胞并用FACS检测可用靶蛋白结合位点的量。特别地,在37°C下,含5%CO<sub>2</sub>的空气环境中,将MC38/hPD-L1肿瘤细胞作为单层培养物在补充了10%热灭活胎牛血清(ExCell Biology)、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Hyclone)的RPMI1640培养基(Thermo Fisher)中进行体外培养。通过胰酶-EDTA处理(Hyclone),每周两次对肿瘤细胞进行常规继代培养。收获指数生长期生长的细胞并计数,以通过FACS分析确认hPD-L1表达和肿瘤接种。将每只5-6周龄的雌性C57BL/6小鼠在右侧肋腹部皮下接种在0.1ml PBS中经确认具有PD-L1表达的MC38/hPD-L1肿瘤细胞(2×10<sup>6</sup>)用于形成肿瘤。接种12天后,当肿瘤尺寸达到约200-300mm<sup>3</sup>时开始治疗,给予3mpk剂量的23F11-H4L4(参见表17)。施用后的第2天、第7天和第14天收集肿瘤用于受体占据评估。收获肿瘤并将其切成小块,然后以10ml/0.5g组织的浓度加入ACCUMAX<sup>TM</sup>细胞分离液(STEMCELL,目录号07921)。之后将肿瘤团块悬液在室温下轻柔振摇1-2小时,并且在孵育过程中反复上下吹打以进一步使细胞分离。在孵育结束时,使细胞悬液通过40μm尼龙筛。然后,用冷PBS洗涤细胞3次并在1500rpm下离心5分钟。随后,用1-2ml PBS将收集得到的细胞重悬,计数细胞总数。此后,将50μl细胞悬液(约1000000个细胞)加入96孔板的各孔中。用FACS缓冲液(含1%BSA的PBS)洗涤细胞两次。然后用2μg/ml 23F11-H4L4抗体或PBS或同种型对照孵育细胞。将混合物在2-8°C下或在冰上避光孵育至少30分钟。用FACS缓冲液洗涤细胞3次,之后在1500rpm下离心5分钟。加入抗-人IgG FC-FITC二抗,并且在2-8°C下避光孵育30分钟,随后用FACS缓冲液洗涤细胞3次。最后,将细胞重悬于0.5ml FACS缓冲液中并使用流式细胞仪进行分析。使用流式细胞仪数据分析软件(Cytoflex)和GraphPad Prism计算与同种型匹配对照抗体染色细胞相比的PD-L1阳性细胞百分比和平均荧光强度(MFI)。将在体外用饱和量的同种型对照hIgG1-N197A(CrownBio,AB160160)(以检测23F11-H4L4与PD-L1的体内结合)或23F11-H4L4或BM-GT(以检测可用的PD-L1结合位点)预孵育细胞之中的相对平均荧光强度(RMFI)变化比,用于估算受体占据(R0)。将数值针对适当的同种型对照hIgG1-N297A归一化。数据(参见表18)表明单次注射3mg/kg的23F11-H4L4能够导致持续至少7天的肿瘤PD-L1占据。另一方面,3mg/kg的BM-GT显示出大于2天但小于7天的肿瘤PD-L1占据,尽管其初始占据率更高,这表明23F11-H4L4的pH依赖性PD-L1结合的性质能够使抗体在肿瘤中停留更长时间并且与肿瘤细胞上的PD-L1结合。

[0659] 表17:研究设计

组别编号	处理	动物编号	途径	剂量 (mg/kg)	给药体积 (μl/g)	方案*
[0660]	1	PBS	IV	-	10	单次
	2	23F11-H4L4	IV	3	10	单次
	3	BM-GT	IV	3	10	单次

[0661] 注释:给药体积:根据体重校正的给药体积。IV:静脉注射

[0662] 表18:受体占据结果

组别 (n=3)	RMFI (第2天)				RMFI (第7天)				RMFI (第14天)			
	占据的	共计	RO(%)	平均值 RO(%)	占据的	共计	RO(%)	平均 RO(%)	占据的	共计	共计	平均 RO(%)
24F11- H4L4 3mpk (n=3)	5732.00	13018.60	44.59	52.9	7213.67	12221.67	51.00	55.04	-77.93	3013.57	-2.28	-3.79
	8300.40	15082.20	64.57		7381.97	12242.27	52.19		-109.23	3689.27	-3.20	
	6368.60	10464.90	49.54		8760.97	17967.97	61.94		-201.43	3551.37	-5.89	
BM-GT 3mpk (n=3)	6737.60	8745.50	95.35	81.23	-399.93	11237.67	-3.21	-2.27	16.37	5589.47	0.23	-0.19
	5096.70	5661.30	72.13		-54.73	13264.17	-0.44		-168.83	7392.47	-2.35	
	5386.30	6791.90	76.23		-395.63	12872.17	-3.18		111.27	8540.87	1.55	

[0664] 实施例29:肿瘤浸润结果

[0665] 当肿瘤达到200-300mm<sup>3</sup>时,正常同源C57B/L6小鼠中具有MC38/hPD-L1肿瘤生长的3只小鼠接受单次静脉注射10mg/kg 23F11-H4L4的处理。施用抗体后的第7天收集肿瘤用于肿瘤浸润和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)分析。特别地,根据生产厂商的说明书使用Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) (Tissue Tek) 制备肿瘤块。制备6μm厚的组织切片,用甲醇固定组织切片,随后用PBS洗涤,然后用0.2% TritonX-100透化5分钟。之后,用PBS洗涤切片并使用封闭缓冲液(含3.0% BSA的1×PBS)在室温下封闭30-60分钟,随后用PBS-T洗涤切片3次,每次5分钟。然后,将在PBS中稀释的Alexa Fluor 488山羊-抗人IgG (H+L) 二抗(Thermo, 目录号A11013, 用于检测23F11-H4L4)、Alexa Fluor<sup>®</sup> 594抗-小鼠CD31抗体(Biolegend, 目录号102520, 用于检测脉管系统)和Alexa Fluor<sup>®</sup> 594抗-小鼠CD8a抗体(Biolegend, 目录号100758, 用于检测CD8 T细胞)施用于切片上,并使其在4°C下避光孵育过夜。弃去二抗并用PBS-T洗涤切片3次(每次5分钟)后,用DAPI对盖有盖玻片的切片进行复染,并在4°C下避光保存。使用荧光显微镜(Nikon Ni-U)分析23F11-H4L4和TIL与对照冰冻组织切片相比的位置和分布。

[0666] 在以10mpk给药后第7天的冰冻MC38/hPD-L1 CDx肿瘤切片上23F11-H4L4浸润和TIL的代表性图像如图40中所示。

[0667] 虽然用参考特定实施方式(其中的一些是优选实施方式)特别示出和描述了本公开内容,但是本领域技术人员应当理解的是,在形式和细节上对本申请进行各种改变是没有脱离本申请公开的主旨和范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 迈博斯生物医药(苏州)有限公司
- [0003] <120> 新型抗-PD-L1抗体
- [0004] <130> 063694-8001W002
- [0005] <160> 189
- [0006] <170> PatentIn 3.5版
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 5
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 小鼠
- [0011] <220>
- [0012] <221> misc\_feature
- [0013] <222> (4) .. (4)
- [0014] <223> Xaa可以是Ile或Met
- [0015] <400> 1
- [0016] Thr Tyr Trp Xaa His
- [0017] 1 5
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 17
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 小鼠
- [0022] <220>
- [0023] <221> misc\_feature
- [0024] <222> (13) .. (14)
- [0025] <223> 第13位上的Xaa可以是Asp或Glu, 第14位上的Xaa可以是
- [0026] Gln或Lys
- [0027] <220>
- [0028] <221> misc\_feature
- [0029] <222> (17) .. (17)
- [0030] <223> Xaa可以是Asn或Lys
- [0031] <400> 2
- [0032] Met Ile Gln Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Xaa Xaa Phe Lys
- [0033] 1 5 10 15
- [0034] Xaa
- [0035] <210> 3
- [0036] <211> 10
- [0037] <212> PRT
- [0038] <213> 小鼠
- [0039] <400> 3
- [0040] Gly Ala Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr
- [0041] 1 5 10

- [0042] <210> 4  
[0043] <211> 15  
[0044] <212> PRT  
[0045] <213> 小鼠  
[0046] <400> 4  
[0047] Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Met His  
[0048] 1 5 10 15  
[0049] <210> 5  
[0050] <211> 7  
[0051] <212> PRT  
[0052] <213> 小鼠  
[0053] <400> 5  
[0054] Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
[0055] 1 5  
[0056] <210> 6  
[0057] <211> 9  
[0058] <212> PRT  
[0059] <213> 小鼠  
[0060] <220>  
[0061] <221> misc\_feature  
[0062] <222> (1) .. (1)  
[0063] <223> Xaa可以是Gln或His  
[0064] <220>  
[0065] <221> misc\_feature  
[0066] <222> (4) .. (5)  
[0067] <223> 第4位上的Xaa可以是Asn或Thr, 第5位上的Xaa可以是Asp  
[0068] 或Glu  
[0069] <400> 6  
[0070] Xaa Gln Ser Xaa Xaa Asp Pro Tyr Thr  
[0071] 1 5  
[0072] <210> 7  
[0073] <211> 5  
[0074] <212> PRT  
[0075] <213> 小鼠  
[0076] <400> 7  
[0077] Ser Tyr Trp Met His  
[0078] 1 5  
[0079] <210> 8  
[0080] <211> 17  
[0081] <212> PRT  
[0082] <213> 小鼠  
[0083] <400> 8

---

[0084]	Met Ile His Pro Asn Ser Asp Ile Thr Asn Cys Asn Glu Asn Phe Lys
[0085]	1 5 10 15
[0086]	His
[0087]	<210> 9
[0088]	<211> 11
[0089]	<212> PRT
[0090]	<213> 小鼠
[0091]	<400> 9
[0092]	Ser Asp Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
[0093]	1 5 10
[0094]	<210> 10
[0095]	<211> 11
[0096]	<212> PRT
[0097]	<213> 小鼠
[0098]	<400> 10
[0099]	Lys Ala Gly Gln Ser Val Asn Asn Asp Val Ala
[0100]	1 5 10
[0101]	<210> 11
[0102]	<211> 7
[0103]	<212> PRT
[0104]	<213> 小鼠
[0105]	<400> 11
[0106]	Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
[0107]	1 5
[0108]	<210> 12
[0109]	<211> 9
[0110]	<212> PRT
[0111]	<213> 小鼠
[0112]	<400> 12
[0113]	Gln Gln Asp Phe Ser Ser Pro Leu Thr
[0114]	1 5
[0115]	<210> 13
[0116]	<211> 30
[0117]	<212> PRT
[0118]	<213> 人工序列
[0119]	<220>
[0120]	<223> 合成的
[0121]	<220>
[0122]	<221> misc_feature
[0123]	<222> (1) .. (1)
[0124]	<223> Xaa可以是Gln或Leu
[0125]	<220>

- [0126] <221> misc\_feature  
 [0127] <222> (5) .. (5)  
 [0128] <223> Xaa可以是Gln或Val  
 [0129] <220>  
 [0130] <221> misc\_feature  
 [0131] <222> (7) .. (7)  
 [0132] <223> Xaa可以是Ser或Pro  
 [0133] <220>  
 [0134] <221> misc\_feature  
 [0135] <222> (11) .. (12)  
 [0136] <223> 第11位上的Xaa可以是Leu或Val, 第12位上的Xaa可以是  
 [0137] Val或Lys  
 [0138] <220>  
 [0139] <221> misc\_feature  
 [0140] <222> (20) .. (20)  
 [0141] <223> Xaa可以是Leu或Val  
 [0142] <220>  
 [0143] <221> misc\_feature  
 [0144] <222> (28) .. (28)  
 [0145] <223> Xaa可以是Thr、Ser或Ile  
 [0146] <400> 13  
 [0147] Xaa Val Gln Leu Xaa Gln Xaa Gly Ala Glu Xaa Xaa Lys Pro Gly Ala  
 [0148] 1 5 10 15  
 [0149] Ser Val Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr  
 [0150] 20 25 30  
 [0151] <210> 14  
 [0152] <211> 14  
 [0153] <212> PRT  
 [0154] <213> 人工序列  
 [0155] <220>  
 [0156] <223> 合成的  
 [0157] <220>  
 [0158] <221> misc\_feature  
 [0159] <222> (3) .. (3)  
 [0160] <223> Xaa可以是Trp、Lys或Arg  
 [0161] <220>  
 [0162] <221> misc\_feature  
 [0163] <222> (5) .. (5)  
 [0164] <223> Xaa可以是Arg或Ala  
 [0165] <400> 14  
 [0166] Trp Val Xaa Gln Xaa Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 [0167] 1 5 10

- [0168] <210> 15
- [0169] <211> 32
- [0170] <212> PRT
- [0171] <213> 人工序列
- [0172] <220>
- [0173] <223> 合成的
- [0174] <220>
- [0175] <221> misc\_feature
- [0176] <222> (1) .. (2)
- [0177] <223> 第1位上的Xaa可以是Arg、Lys或Thr, 第2位上的Xaa可以是
- [0178] Val或Ala
- [0179] <220>
- [0180] <221> misc\_feature
- [0181] <222> (8) .. (8)
- [0182] <223> Xaa可以是Lys或Thr
- [0183] <220>
- [0184] <221> misc\_feature
- [0185] <222> (10) .. (11)
- [0186] <223> 第10位上的Xaa可以是Ser或Ile, 第11位上的Xaa可以是
- [0187] Ser或Thr
- [0188] <220>
- [0189] <221> misc\_feature
- [0190] <222> (14) .. (14)
- [0191] <223> Xaa可以是Tyr或Ser
- [0192] <220>
- [0193] <221> misc\_feature
- [0194] <222> (16) .. (16)
- [0195] <223> Xaa可以是Gln或Glu
- [0196] <220>
- [0197] <221> misc\_feature
- [0198] <222> (19) .. (19)
- [0199] <223> Xaa可以是Ser、Gly或Arg
- [0200] <220>
- [0201] <221> misc\_feature
- [0202] <222> (21) .. (21)
- [0203] <223> Xaa可以是Thr或Arg
- [0204] <220>
- [0205] <221> misc\_feature
- [0206] <222> (23) .. (23)
- [0207] <223> Xaa可以是Glu或Asp
- [0208] <220>
- [0209] <221> misc\_feature

- [0210] <222> (25) .. (25)
- [0211] <223> Xaa可以是Ser或Thr
- [0212] <220>
- [0213] <221> misc\_feature
- [0214] <222> (28) .. (28)
- [0215] <223> Xaa可以是Phe或Tyr
- [0216] <400> 15
- [0217] Xaa Xaa Thr Leu Thr Val Asp Xaa Ser Xaa Xaa Thr Ala Xaa Met Xaa
- [0218] 1 5 10 15
- [0219] Leu Ser Xaa Leu Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ala Val Xaa Tyr Cys Ala Arg
- [0220] 20 25 30
- [0221] <210> 16
- [0222] <211> 11
- [0223] <212> PRT
- [0224] <213> 人工序列
- [0225] <220>
- [0226] <223> 合成的
- [0227] <220>
- [0228] <221> misc\_feature
- [0229] <222> (3) .. (3)
- [0230] <223> Xaa可以是Thr或Gln
- [0231] <220>
- [0232] <221> misc\_feature
- [0233] <222> (5) .. (5)
- [0234] <223> Xaa可以是Thr或Ser
- [0235] <220>
- [0236] <221> misc\_feature
- [0237] <222> (7) .. (9)
- [0238] <223> 第7位上的Xaa可以是Val或Leu, 第8位上的Xaa可以是Ser
- [0239] 或Thr, 第9位上的Xaa可以是Val或Ile
- [0240] <400> 16
- [0241] Trp Gly Xaa Gly Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Ser Ser
- [0242] 1 5 10
- [0243] <210> 17
- [0244] <211> 23
- [0245] <212> PRT
- [0246] <213> 人工序列
- [0247] <220>
- [0248] <223> 合成的
- [0249] <220>
- [0250] <221> misc\_feature
- [0251] <222> (1) .. (1)

- [0252] <223> Xaa可以是Asp或Ser
- [0253] <220>
- [0254] <221> misc\_feature
- [0255] <222> (4) .. (4)
- [0256] <223> Xaa可以是Met或Leu
- [0257] <220>
- [0258] <221> misc\_feature
- [0259] <222> (6) .. (7)
- [0260] <223> 第6位上的Xaa可以是Gln或His, 第7位上的Xaa可以是Thr  
或Ser
- [0261] <220>
- [0262] <221> misc\_feature
- [0263] <222> (9) .. (10)
- [0264] <223> 第9位上的Xaa可以是Ala、Lys或Val, 第10位上的Xaa可以是  
Phe或Ser
- [0265] <220>
- [0266] <221> misc\_feature
- [0267] <222> (12) .. (12)
- [0268] <223> Xaa可以是Ala、Ser或Thr
- [0269] <220>
- [0270] <221> misc\_feature
- [0271] <222> (15) .. (15)
- [0272] <223> Xaa可以是Leu、Ala或Val
- [0273] <220>
- [0274] <221> misc\_feature
- [0275] <222> (17) .. (17)
- [0276] <223> Xaa可以是Asp或Gln
- [0277] <220>
- [0278] <221> misc\_feature
- [0279] <222> (19) .. (19)
- [0280] <223> Xaa可以是Val或Ala
- [0281] <220>
- [0282] <221> misc\_feature
- [0283] <222> (22) .. (22)
- [0284] <223> Xaa可以是Ser或Thr
- [0285] <400> 17
- [0286] Xaa Ile Val Xaa Thr Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Leu Xaa Val Ser Xaa Gly
- [0287] 1 5 10 15
- [0288] Xaa Arg Xaa Thr Ile Xaa Cys
- [0289] 20
- [0290] <210> 18
- [0291] <211> 15

- [0294] <212> PRT  
[0295] <213> 人工序列  
[0296] <220>  
[0297] <223> 合成的  
[0298] <220>  
[0299] <221> misc\_feature  
[0300] <222> (9) .. (9)  
[0301] <223> Xaa可以是Ser、Pro或Ala  
[0302] <400> 18  
[0303] Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
[0304] 1 5 10 15  
[0305] <210> 19  
[0306] <211> 32  
[0307] <212> PRT  
[0308] <213> 人工序列  
[0309] <220>  
[0310] <223> 合成的  
[0311] <220>  
[0312] <221> misc\_feature  
[0313] <222> (2) .. (2)  
[0314] <223> Xaa可以是Val或Ile  
[0315] <220>  
[0316] <221> misc\_feature  
[0317] <222> (4) .. (4)  
[0318] <223> Xaa可以是Asn或Ala  
[0319] <220>  
[0320] <221> misc\_feature  
[0321] <222> (7) .. (7)  
[0322] <223> Xaa可以是Thr或Ser  
[0323] <220>  
[0324] <221> misc\_feature  
[0325] <222> (11) .. (12)  
[0326] <223> 第11位上的Xaa可以是Tyr或Ser, 第12位上的Xaa可以是  
[0327] Gly或Arg  
[0328] <220>  
[0329] <221> misc\_feature  
[0330] <222> (17) .. (17)  
[0331] <223> Xaa可以是Phe或Leu  
[0332] <220>  
[0333] <221> misc\_feature  
[0334] <222> (20) .. (21)  
[0335] <223> 第20位上的Xaa可以是Ser或Asn, 第21位上的Xaa可以是

- [0336] Thr或Pro
- [0337] <220>
- [0338] <221> misc\_feature
- [0339] <222> (23) .. (23)
- [0340] <223> Xaa可以是Gln或Glu
- [0341] <220>
- [0342] <221> misc\_feature
- [0343] <222> (25) .. (25)
- [0344] <223> Xaa可以是Asp、Glu、Asn或Gln
- [0345] <220>
- [0346] <221> misc\_feature
- [0347] <222> (27) .. (27)
- [0348] <223> Xaa可以是Val、Leu或Thr
- [0349] <220>
- [0350] <221> misc\_feature
- [0351] <222> (29) .. (29)
- [0352] <223> Xaa可以是Val或Thr
- [0353] <220>
- [0354] <221> misc\_feature
- [0355] <222> (31) .. (31)
- [0356] <223> Xaa可以是Phe或Cys
- [0357] <400> 19
- [0358] Gly Xaa Pro Xaa Arg Phe Xaa Gly Ser Gly Xaa Xaa Thr Asp Phe Thr
- [0359] 1 5 10 15
- [0360] Xaa Thr Ile Xaa Xaa Val Xaa Ala Xaa Asp Xaa Ala Xaa Tyr Xaa Cys
- [0361] 20 25 30
- [0362] <210> 20
- [0363] <211> 10
- [0364] <212> PRT
- [0365] <213> 人工序列
- [0366] <220>
- [0367] <223> 合成的
- [0368] <220>
- [0369] <221> misc\_feature
- [0370] <222> (3) .. (3)
- [0371] <223> Xaa可以是Ala或Gly
- [0372] <220>
- [0373] <221> misc\_feature
- [0374] <222> (9) .. (9)
- [0375] <223> Xaa可以是Leu、Thr或Ile
- [0376] <400> 20
- [0377] Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Xaa Lys

[0378]	1	5	10													
[0379]	<210>	21														
[0380]	<211>	120														
[0381]	<212>	PRT														
[0382]	<213>	小鼠														
[0383]	<400>	21														
[0384]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
[0385]	1		5							10						15
[0386]	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
[0387]				20					25							30
[0388]	Trp	Met	His	Trp	Val	Trp	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[0389]					35				40							45
[0390]	Gly	Met	Ile	His	Pro	Asn	Ser	Asp	Ile	Thr	Asn	Cys	Asn	Glu	Asn	Phe
[0391]					50				55							60
[0392]	Lys	His	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0393]					65				70							80
[0394]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Phe	Tyr	Cys
[0395]						85				90						95
[0396]	Ala	Arg	Ser	Asp	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Thr
[0397]						100				105						110
[0398]	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
[0399]					115				120							
[0400]	<210>	22														
[0401]	<211>	107														
[0402]	<212>	PRT														
[0403]	<213>	小鼠														
[0404]	<400>	22														
[0405]	Ser	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	Phe	Leu	Ser	Val	Ser	Ala	Gly
[0406]	1		5						10							15
[0407]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Gly	Gln	Ser	Val	Asn	Asn	Asp
[0408]					20				25							30
[0409]	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
[0410]					35				40							45
[0411]	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
[0412]					50				55							60
[0413]	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Thr	Val	Gln	Ala
[0414]					65				70							80
[0415]	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asp	Phe	Ser	Ser	Pro	Leu
[0416]						85				90						95
[0417]	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys					
[0418]						100				105						
[0419]	<210>	23														

- [0420] <211> 5
- [0421] <212> PRT
- [0422] <213> 小鼠
- [0423] <400> 23
- [0424] Asp Tyr Tyr Met Asn
- [0425] 1 5
- [0426] <210> 24
- [0427] <211> 17
- [0428] <212> PRT
- [0429] <213> 小鼠
- [0430] <220>
- [0431] <221> misc\_feature
- [0432] <222> (13) .. (13)
- [0433] <223> Xaa可以是His或Gln
- [0434] <220>
- [0435] <221> misc\_feature
- [0436] <222> (16) .. (16)
- [0437] <223> Xaa可以是Lys或Gln
- [0438] <400> 24
- [0439] Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Xaa Lys Phe Xaa
- [0440] 1 5 10 15
- [0441] Gly
- [0442] <210> 25
- [0443] <211> 10
- [0444] <212> PRT
- [0445] <213> 小鼠
- [0446] <400> 25
- [0447] Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr
- [0448] 1 5 10
- [0449] <210> 26
- [0450] <211> 11
- [0451] <212> PRT
- [0452] <213> 小鼠
- [0453] <220>
- [0454] <221> misc\_feature
- [0455] <222> (1) .. (1)
- [0456] <223> Xaa可以是Lys或Gln
- [0457] <400> 26
- [0458] Xaa Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala Val Ala
- [0459] 1 5 10
- [0460] <210> 27
- [0461] <211> 7

- [0462] <212> PRT  
[0463] <213> 小鼠  
[0464] <220>  
[0465] <221> misc\_feature  
[0466] <222> (5) .. (6)  
[0467] <223> 第5位上的Xaa可以是Arg或Leu, 第6位上的Xaa可以是Tyr  
[0468] 或Glu  
[0469] <400> 27  
[0470] Ser Ala Ser Asn Xaa Xaa Thr  
[0471] 1 5  
[0472] <210> 28  
[0473] <211> 8  
[0474] <212> PRT  
[0475] <213> 小鼠  
[0476] <400> 28  
[0477] Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr  
[0478] 1 5  
[0479] <210> 29  
[0480] <211> 6  
[0481] <212> PRT  
[0482] <213> 小鼠  
[0483] <400> 29  
[0484] Ser Ser Tyr Tyr Ile His  
[0485] 1 5  
[0486] <210> 30  
[0487] <211> 17  
[0488] <212> PRT  
[0489] <213> 小鼠  
[0490] <400> 30  
[0491] Asn Ile Asn Pro Phe Asn Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
[0492] 1 5 10 15  
[0493] Asn  
[0494] <210> 31  
[0495] <211> 5  
[0496] <212> PRT  
[0497] <213> 小鼠  
[0498] <400> 31  
[0499] Trp His Phe Asp Tyr  
[0500] 1 5  
[0501] <210> 32  
[0502] <211> 17  
[0503] <212> PRT

- [0504] <213> 小鼠
- [0505] <400> 32
- [0506] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Trp Ser Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu
- [0507] 1 5 10 15
- [0508] Ser
- [0509] <210> 33
- [0510] <211> 7
- [0511] <212> PRT
- [0512] <213> 小鼠
- [0513] <400> 33
- [0514] Gly Ala Ser Ile Arg Glu Ser
- [0515] 1 5
- [0516] <210> 34
- [0517] <211> 11
- [0518] <212> PRT
- [0519] <213> 小鼠
- [0520] <400> 34
- [0521] Gln His Asn His Gly Ser Phe Leu Pro Tyr Thr
- [0522] 1 5 10
- [0523] <210> 35
- [0524] <211> 5
- [0525] <212> PRT
- [0526] <213> 小鼠
- [0527] <400> 35
- [0528] Ser Asn Trp Met His
- [0529] 1 5
- [0530] <210> 36
- [0531] <211> 17
- [0532] <212> PRT
- [0533] <213> 小鼠
- [0534] <400> 36
- [0535] Met Met His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
- [0536] 1 5 10 15
- [0537] Asn
- [0538] <210> 37
- [0539] <211> 12
- [0540] <212> PRT
- [0541] <213> 小鼠
- [0542] <400> 37
- [0543] Ser Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
- [0544] 1 5 10
- [0545] <210> 38

- [0546] <211> 11  
[0547] <212> PRT  
[0548] <213> 小鼠  
[0549] <400> 38  
[0550] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
[0551] 1 5 10  
[0552] <210> 39  
[0553] <211> 7  
[0554] <212> PRT  
[0555] <213> 小鼠  
[0556] <400> 39  
[0557] Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
[0558] 1 5  
[0559] <210> 40  
[0560] <211> 9  
[0561] <212> PRT  
[0562] <213> 小鼠  
[0563] <400> 40  
[0564] Gln Gln Gly Asp Thr Leu Pro Trp Thr  
[0565] 1 5  
[0566] <210> 41  
[0567] <211> 5  
[0568] <212> PRT  
[0569] <213> 小鼠  
[0570] <400> 41  
[0571] Ser Tyr Trp Met His  
[0572] 1 5  
[0573] <210> 42  
[0574] <211> 17  
[0575] <212> PRT  
[0576] <213> 小鼠  
[0577] <400> 42  
[0578] Met Ile Gln Pro Ser Thr Ser Gly Thr Ile Tyr Asn Glu Arg Phe Lys  
[0579] 1 5 10 15  
[0580] Asn  
[0581] <210> 43  
[0582] <211> 10  
[0583] <212> PRT  
[0584] <213> 小鼠  
[0585] <400> 43  
[0586] Gly Thr Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr  
[0587] 1 5 10

- [0588] <210> 44  
[0589] <211> 15  
[0590] <212> PRT  
[0591] <213> 小鼠  
[0592] <400> 44  
[0593] Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Ile His  
[0594] 1 5 10 15  
[0595] <210> 45  
[0596] <211> 7  
[0597] <212> PRT  
[0598] <213> 小鼠  
[0599] <400> 45  
[0600] Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
[0601] 1 5  
[0602] <210> 46  
[0603] <211> 10  
[0604] <212> PRT  
[0605] <213> 小鼠  
[0606] <400> 46  
[0607] Gln Gln Ser Lys Glu Asp Pro Tyr Thr Phe  
[0608] 1 5 10  
[0609] <210> 47  
[0610] <211> 30  
[0611] <212> PRT  
[0612] <213> 人工序列  
[0613] <220>  
[0614] <223> 合成的  
[0615] <220>  
[0616] <221> misc\_feature  
[0617] <222> (1) .. (1)  
[0618] <223> Xaa可以是Gln或Glu  
[0619] <220>  
[0620] <221> misc\_feature  
[0621] <222> (5) .. (5)  
[0622] <223> Xaa可以是Gln或Val  
[0623] <220>  
[0624] <221> misc\_feature  
[0625] <222> (9) .. (9)  
[0626] <223> Xaa可以是Ala或Pro  
[0627] <220>  
[0628] <221> misc\_feature  
[0629] <222> (11) .. (12)

- [0630] <223> 第11位上的Xaa可以是Leu或Val, 第12位上的Xaa可以是
- [0631] Val或Lys
- [0632] <220>
- [0633] <221> misc\_feature
- [0634] <222> (20) .. (20)
- [0635] <223> Xaa可以是Ile或Val
- [0636] <400> 47
- [0637] Xaa Val Gln Leu Xaa Gln Ser Gly Xaa Glu Xaa Xaa Lys Pro Gly Ala
- [0638] 1 5 10 15
- [0639] Ser Val Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr
- [0640] 20 25 30
- [0641] <210> 48
- [0642] <211> 14
- [0643] <212> PRT
- [0644] <213> 人工序列
- [0645] <220>
- [0646] <223> 合成的
- [0647] <220>
- [0648] <221> misc\_feature
- [0649] <222> (3) .. (3)
- [0650] <223> Xaa可以是Lys或Arg
- [0651] <220>
- [0652] <221> misc\_feature
- [0653] <222> (5) .. (6)
- [0654] <223> 第5位上的Xaa可以是Ser或Ala, 第6位上的Xaa可以是His
- [0655] 或Pro
- [0656] <220>
- [0657] <221> misc\_feature
- [0658] <222> (8) .. (9)
- [0659] <223> 第8位上的Xaa可以是Gln或Lys, 第9位上的Xaa可以是Ser
- [0660] 或Gly
- [0661] <400> 48
- [0662] Trp Val Xaa Gln Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Leu Glu Trp Ile Gly
- [0663] 1 5 10
- [0664] <210> 49
- [0665] <211> 30
- [0666] <212> PRT
- [0667] <213> 人工序列
- [0668] <220>
- [0669] <223> 合成的
- [0670] <220>
- [0671] <221> misc\_feature

- [0672] <222> (1) .. (2)
- [0673] <223> 第1位上的Xaa可以是Lys或Arg, 第2位上的Xaa可以是Ala
- [0674] 或Val
- [0675] <220>
- [0676] <221> misc\_feature
- [0677] <222> (8) .. (8)
- [0678] <223> Xaa可以是Lys或Thr
- [0679] <220>
- [0680] <221> misc\_feature
- [0681] <222> (10) .. (11)
- [0682] <223> 第10位上的Xaa可以是Ser、Thr或Ile, 第11位上的Xaa可以是
- [0683] Ser或Arg
- [0684] <220>
- [0685] <221> misc\_feature
- [0686] <222> (18) .. (19)
- [0687] <223> 第18位上的Xaa可以是Leu或Ser, 第19位上的Xaa可以是
- [0688] Ser或Arg
- [0689] <220>
- [0690] <221> misc\_feature
- [0691] <222> (21) .. (21)
- [0692] <223> Xaa可以是Arg或Thr
- [0693] <220>
- [0694] <221> misc\_feature
- [0695] <222> (23) .. (23)
- [0696] <223> Xaa可以是Glu或Asp
- [0697] <220>
- [0698] <221> misc\_feature
- [0699] <222> (25) .. (25)
- [0700] <223> Xaa可以是Ser或Thr
- [0701] <400> 49
- [0702] Xaa Xaa Thr Val Thr Val Asp Xaa Ser Xaa Xaa Thr Ala Tyr Met Glu
- [0703] 1 5 10 15
- [0704] Leu Xaa Xaa Leu Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0705] 20 25 30
- [0706] <210> 50
- [0707] <211> 11
- [0708] <212> PRT
- [0709] <213> 人工序列
- [0710] <220>
- [0711] <223> 合成的
- [0712] <220>
- [0713] <221> misc\_feature

- [0714] <222> (11) .. (11)
- [0715] <223> Xaa 可以是 Ala 或 Ser
- [0716] <400> 50
- [0717] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Xaa
- [0718] 1 5 10
- [0719] <210> 51
- [0720] <211> 23
- [0721] <212> PRT
- [0722] <213> 人工序列
- [0723] <220>
- [0724] <223> 合成的
- [0725] <220>
- [0726] <221> misc\_feature
- [0727] <222> (3) .. (3)
- [0728] <223> Xaa 可以是 Gln 或 Val
- [0729] <220>
- [0730] <221> misc\_feature
- [0731] <222> (8) .. (11)
- [0732] <223> 第 8 位上的 Xaa 可以是 Gln 或 Pro, 第 9 位上的 Xaa 可以是 Lys
- [0733] 或 Ser, 第 10 位上的 Xaa 可以是 Phe 或 Ser, 第 11 位上的 Xaa
- [0734] 可以是 Met 或 Leu
- [0735] <220>
- [0736] <221> misc\_feature
- [0737] <222> (13) .. (13)
- [0738] <223> Xaa 可以是 Thr 或 Ala
- [0739] <220>
- [0740] <221> misc\_feature
- [0741] <222> (20) .. (20)
- [0742] <223> Xaa 可以是 Ser 或 Thr
- [0743] <400> 51
- [0744] Asp Ile Xaa Met Thr Gln Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Ser Val Gly
- [0745] 1 5 10 15
- [0746] Asp Arg Val Xaa Ile Thr Cys
- [0747] 20
- [0748] <210> 52
- [0749] <211> 15
- [0750] <212> PRT
- [0751] <213> 人工序列
- [0752] <220>
- [0753] <223> 合成的
- [0754] <220>
- [0755] <221> misc\_feature

- [0756] <222> (8) .. (9)
- [0757] <223> 第8位上的Xaa可以是Gln或Lys, 第9位上的Xaa可以是Ser
- [0758] 或Ala
- [0759] <400> 52
- [0760] Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Xaa Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
- [0761] 1 5 10 15
- [0762] <210> 53
- [0763] <211> 32
- [0764] <212> PRT
- [0765] <213> 人工序列
- [0766] <220>
- [0767] <223> 合成的
- [0768] <220>
- [0769] <221> misc\_feature
- [0770] <222> (4) .. (4)
- [0771] <223> Xaa可以是Ser或Asp
- [0772] <220>
- [0773] <221> misc\_feature
- [0774] <222> (7) .. (7)
- [0775] <223> Xaa可以是Ser或Thr
- [0776] <220>
- [0777] <221> misc\_feature
- [0778] <222> (21) .. (22)
- [0779] <223> 第21位上的Xaa可以是Ser或Asn, 第22位上的Xaa可以是
- [0780] Met或Leu
- [0781] <220>
- [0782] <221> misc\_feature
- [0783] <222> (24) .. (24)
- [0784] <223> Xaa可以是Ser或Pro
- [0785] <220>
- [0786] <221> misc\_feature
- [0787] <222> (27) .. (27)
- [0788] <223> Xaa可以是Leu或Ile
- [0789] <220>
- [0790] <221> misc\_feature
- [0791] <222> (29) .. (29)
- [0792] <223> Xaa可以是Asp或Thr
- [0793] <400> 53
- [0794] Gly Val Pro Xaa Arg Phe Xaa Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
- [0795] 1 5 10 15
- [0796] Leu Thr Ile Ser Xaa Xaa Gln Xaa Glu Asp Xaa Ala Xaa Tyr Phe Cys
- [0797] 20 25 30

[0798]	<210> 54		
[0799]	<211> 10		
[0800]	<212> PRT		
[0801]	<213> 人工序列		
[0802]	<220>		
[0803]	<223> 合成的		
[0804]	<400> 54		
[0805]	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys		
[0806]	1	5	10
[0807]	<210> 55		
[0808]	<211> 114		
[0809]	<212> PRT		
[0810]	<213> 小鼠		
[0811]	<400> 55		
[0812]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0813]	1	5	10
[0814]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0815]	20	25	30
[0816]	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0817]	35	40	45
[0818]	Gly Asn Ile Asn Pro Phe Asn Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0819]	50	55	60
[0820]	Lys Asn Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr		
[0821]	65	70	75
[0822]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0823]	85	90	95
[0824]	Ala Arg Trp His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val		
[0825]	100	105	110
[0826]	Ser Ser		
[0827]	<210> 56		
[0828]	<211> 115		
[0829]	<212> PRT		
[0830]	<213> 小鼠		
[0831]	<400> 56		
[0832]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Thr Ala Gly		
[0833]	1	5	10
[0834]	Glu Lys Val Thr Leu Lys Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Trp Ser		
[0835]	20	25	30
[0836]	Gly Asn Gln Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Gln		
[0837]	35	40	45
[0838]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Glu Ser Trp Val		
[0839]	50	55	60

[0840]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
[0841]	65	70	75	80
[0842]	Ile Gly Asn Val Ser Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His			
[0843]		85	90	95
[0844]	Asn His Gly Ser Phe Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu			
[0845]		100	105	110
[0846]	Glu Ile Lys			
[0847]		115		
[0848]	<210> 57			
[0849]	<211> 121			
[0850]	<212> PRT			
[0851]	<213> 小鼠			
[0852]	<400> 57			
[0853]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[0854]	1	5	10	15
[0855]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn			
[0856]		20	25	30
[0857]	Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0858]		35	40	45
[0859]	Gly Met Met His Pro Asn Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe			
[0860]		50	55	60
[0861]	Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
[0862]		65	70	75
[0863]	75	80		
[0864]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0865]		85	90	95
[0866]	Ala Arg Ser Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly			
[0867]		100	105	110
[0868]	Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
[0869]		115	120	
[0870]	<210> 58			
[0871]	<211> 107			
[0872]	<212> PRT			
[0873]	<213> 小鼠			
[0874]	<400> 58			
[0875]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
[0876]	1	5	10	15
[0877]	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
[0878]		20	25	30
[0879]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
[0880]		35	40	45
[0881]	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
		50	55	60

[0882]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Glu			
[0883]	65	70	75	80
[0884]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asp Thr Leu Pro Trp			
[0885]		85	90	95
[0886]	Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0887]		100	105	
[0888]	<210> 59			
[0889]	<211> 119			
[0890]	<212> PRT			
[0891]	<213> 小鼠			
[0892]	<400> 59			
[0893]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[0894]	1	5	10	15
[0895]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Ser Tyr			
[0896]		20	25	30
[0897]	Trp Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0898]		35	40	45
[0899]	Gly Met Ile Gln Pro Ser Thr Ser Gly Thr Ile Tyr Asn Glu Arg Phe			
[0900]		50	55	60
[0901]	Lys Asn Gln Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
[0902]		65	70	75
[0903]	80			
[0904]	Met Gln Leu Ser Ser Gln Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0905]		85	90	95
[0906]	Ala Arg Gly Thr Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0907]		100	105	110
[0908]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
[0909]		115		
[0910]	<210> 60			
[0911]	<211> 111			
[0912]	<212> PRT			
[0913]	<213> 小鼠			
[0914]	<400> 60			
[0915]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
[0916]	1	5	10	15
[0917]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr			
[0918]		20	25	30
[0919]	Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
[0920]		35	40	45
[0921]	35	40	45	
[0922]	Lys Leu Leu Ile His Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala			
[0923]		50	55	60
[0924]	Thr Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn			
[0925]		65	70	75
[0926]	65	70	75	80

[0924]	Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys			
[0925]	85	90	95	
[0926]	Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0927]	100	105	110	
[0928]	<210> 61			
[0929]	<211> 119			
[0930]	<212> PRT			
[0931]	<213> 人工序列			
[0932]	<220>			
[0933]	<223> 合成的			
[0934]	<400> 61			
[0935]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[0936]	1 5 10 15			
[0937]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr			
[0938]	20 25 30			
[0939]	Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0940]	35 40 45			
[0941]	Gly Met Ile Gln Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Asp Gln Phe			
[0942]	50 55 60			
[0943]	Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
[0944]	65 70 75 80			
[0945]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0946]	85 90 95			
[0947]	Ala Arg Gly Ala Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0948]	100 105 110			
[0949]	Thr Thr Leu Ser Ile Ser Ser			
[0950]	115			
[0951]	<210> 62			
[0952]	<211> 111			
[0953]	<212> PRT			
[0954]	<213> 人工序列			
[0955]	<220>			
[0956]	<223> 合成的			
[0957]	<400> 62			
[0958]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Val Gly			
[0959]	1 5 10 15			
[0960]	Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr			
[0961]	20 25 30			
[0962]	Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro			
[0963]	35 40 45			
[0964]	Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala			
[0965]	50 55 60			

[0966]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn			
[0967]	65	70	75	80
[0968]	Pro Val Glu Ala Gln Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn			
[0969]		85	90	95
[0970]	Asp Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys			
[0971]		100	105	110
[0972]	<210> 63			
[0973]	<211> 119			
[0974]	<212> PRT			
[0975]	<213> 人工序列			
[0976]	<220>			
[0977]	<223> 合成的			
[0978]	<400> 63			
[0979]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[0980]	1	5	10	15
[0981]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr			
[0982]		20	25	30
[0983]	Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0984]		35	40	45
[0985]	Gly Met Ile Gln Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
[0986]		50	55	60
[0987]	Lys Lys Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
[0988]		65	70	75
[0989]	80			
[0990]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0991]		85	90	95
[0992]	Ala Arg Gly Ala Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0993]		100	105	110
[0994]	Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser			
[0995]		115		
[0996]	<210> 64			
[0997]	<211> 111			
[0998]	<212> PRT			
[0999]	<213> 人工序列			
[1000]	<220>			
[1000]	<223> 合成的			
[1001]	<400> 64			
[1002]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Val Gly			
[1003]	1	5	10	15
[1004]	Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr			
[1005]		20	25	30
[1006]	Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
[1007]		35	40	45

[1008]	Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala			
[1009]	50	55	60	
[1010]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn			
[1011]	65	70	75	80
[1012]	Pro Val Glu Ala Gln Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr			
[1013]	85	90	95	
[1014]	Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[1015]	100	105	110	
[1016]	<210> 65			
[1017]	<211> 117			
[1018]	<212> PRT			
[1019]	<213> 人工序列			
[1020]	<220>			
[1021]	<223> 合成的			
[1022]	<400> 65			
[1023]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala			
[1024]	1	5	10	15
[1025]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr			
[1026]	20	25	30	
[1027]	Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[1028]	35	40	45	
[1029]	Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe			
[1030]	50	55	60	
[1031]	Gln Gly Arg Ala Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Thr Arg Thr Ala Tyr			
[1032]	65	70	75	80
[1033]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1034]	85	90	95	
[1035]	Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
[1036]	100	105	110	
[1037]	Val Thr Val Ser Ser			
[1038]	115			
[1039]	<210> 66			
[1040]	<211> 106			
[1041]	<212> PRT			
[1042]	<213> 人工序列			
[1043]	<220>			
[1044]	<223> 合成的			
[1045]	<400> 66			
[1046]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Gln Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[1047]	1	5	10	15
[1048]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala			
[1049]	20	25	30	

[1050]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[1051]	35	40	45	
[1052]	Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[1053]	50	55	60	
[1054]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro			
[1055]	65	70	75	80
[1056]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr			
[1057]	85	90	95	
[1058]	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys			
[1059]	100	105		
[1060]	<210> 67			
[1061]	<211> 117			
[1062]	<212> PRT			
[1063]	<213> 人工序列			
[1064]	<220>			
[1065]	<223> 合成的			
[1066]	<400> 67			
[1067]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[1068]	1	5	10	15
[1069]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr			
[1070]	20	25	30	
[1071]	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[1072]	35	40	45	
[1073]	Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe			
[1074]	50	55	60	
[1075]	Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Thr Ser Ile Arg Thr Ala Tyr			
[1076]	65	70	75	80
[1077]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1078]	85	90	95	
[1079]	Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
[1080]	100	105	110	
[1081]	Val Thr Val Ser Ser			
[1082]	115			
[1083]	<210> 68			
[1084]	<211> 106			
[1085]	<212> PRT			
[1086]	<213> 人工序列			
[1087]	<220>			
[1088]	<223> 合成的			
[1089]	<400> 68			
[1090]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[1091]	1	5	10	15

[1092]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala			
[1093]	20	25	30	
[1094]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[1095]	35	40	45	
[1096]	Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[1097]	50	55	60	
[1098]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[1099]	65	70	75	80
[1100]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr			
[1101]	85	90	95	
[1102]	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys			
[1103]	100	105		
[1104]	<210> 69			
[1105]	<211> 119			
[1106]	<212> PRT			
[1107]	<213> 人工序列			
[1108]	<220>			
[1109]	<223> 合成的			
[1110]	<400> 69			
[1111]	Leu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[1112]	1	5	10	15
[1113]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr			
[1114]	20	25	30	
[1115]	Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[1116]	35	40	45	
[1117]	Gly Met Ile Gln Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Asp Gln Phe			
[1118]	50	55	60	
[1119]	Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
[1120]	65	70	75	80
[1121]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1122]	85	90	95	
[1123]	Ala Arg Gly Ala Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[1124]	100	105	110	
[1125]	Thr Thr Leu Ser Ile Ser Ser			
[1126]	115			
[1127]	<210> 70			
[1128]	<211> 111			
[1129]	<212> PRT			
[1130]	<213> 人工序列			
[1131]	<220>			
[1132]	<223> 合成的			
[1133]	<400> 70			

[1134]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Val Gly			
[1135]	1	5	10	15
[1136]	Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr			
[1137]	20	25	30	
[1138]	Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro			
[1139]	35	40	45	
[1140]	Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala			
[1141]	50	55	60	
[1142]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn			
[1143]	65	70	75	80
[1144]	Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn			
[1145]	85	90	95	
[1146]	Asp Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys			
[1147]	100	105	110	
[1148]	<210>	71		
[1149]	<211>	119		
[1150]	<212>	PRT		
[1151]	<213>	人工序列		
[1152]	<220>			
[1153]	<223>	合成的		
[1154]	<400>	71		
[1155]	Leu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[1156]	1	5	10	15
[1157]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr			
[1158]	20	25	30	
[1159]	Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[1160]	35	40	45	
[1161]	Gly Met Ile Gln Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Asp Gln Phe			
[1162]	50	55	60	
[1163]	Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
[1164]	65	70	75	80
[1165]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1166]	85	90	95	
[1167]	Ala Arg Gly Ala Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[1168]	100	105	110	
[1169]	Thr Thr Leu Ser Ile Ser Ser			
[1170]	115			
[1171]	<210>	72		
[1172]	<211>	111		
[1173]	<212>	PRT		
[1174]	<213>	人工序列		
[1175]	<220>			

- [1176] <223> 合成的
- [1177] <400> 72
- [1178] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
- [1179] 1 5 10 15
- [1180] Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
- [1181] 20 25 30
- [1182] Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
- [1183] 35 40 45
- [1184] Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
- [1185] 50 55 60
- [1186] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
- [1187] 65 70 75 80
- [1188] Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Asn
- [1189] 85 90 95
- [1190] Asp Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys
- [1191] 100 105 110
- [1192] <210> 73
- [1193] <211> 119
- [1194] <212> PRT
- [1195] <213> 小鼠
- [1196] <400> 73
- [1197] Leu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
- [1198] 1 5 10 15
- [1199] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr
- [1200] 20 25 30
- [1201] Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
- [1202] 35 40 45
- [1203] Gly Met Ile Gln Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Asp Gln Phe
- [1204] 50 55 60
- [1205] Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Ser
- [1206] 65 70 75 80
- [1207] Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
- [1208] 85 90 95
- [1209] Ala Arg Gly Ala Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
- [1210] 100 105 110
- [1211] Thr Thr Leu Ser Ile Ser Ser
- [1212] 115
- [1213] <210> 74
- [1214] <211> 111
- [1215] <212> PRT
- [1216] <213> 小鼠
- [1217] <400> 74

[1218]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly			
[1219]	1	5	10	15
[1220]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr			
[1221]	20	25	30	
[1222]	Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro			
[1223]	35	40	45	
[1224]	Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala			
[1225]	50	55	60	
[1226]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn			
[1227]	65	70	75	80
[1228]	Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Asn			
[1229]	85	90	95	
[1230]	Asp Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys			
[1231]	100	105	110	
[1232]	<210> 75			
[1233]	<211> 119			
[1234]	<212> PRT			
[1235]	<213> 人工序列			
[1236]	<220>			
[1237]	<223> 合成的			
[1238]	<400> 75			
[1239]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[1240]	1	5	10	15
[1241]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr			
[1242]	20	25	30	
[1243]	Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[1244]	35	40	45	
[1245]	Gly Met Ile Gln Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
[1246]	50	55	60	
[1247]	Lys Lys Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
[1248]	65	70	75	80
[1249]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1250]	85	90	95	
[1251]	Ala Arg Gly Ala Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[1252]	100	105	110	
[1253]	Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser			
[1254]	115			
[1255]	<210> 76			
[1256]	<211> 111			
[1257]	<212> PRT			
[1258]	<213> 人工序列			
[1259]	<220>			

- [1260] <223> 合成的
- [1261] <400> 76
- [1262] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
- [1263] 1 5 10 15
- [1264] Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
- [1265] 20 25 30
- [1266] Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
- [1267] 35 40 45
- [1268] Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
- [1269] 50 55 60
- [1270] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
- [1271] 65 70 75 80
- [1272] Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr
- [1273] 85 90 95
- [1274] Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
- [1275] 100 105 110
- [1276] <210> 77
- [1277] <211> 119
- [1278] <212> PRT
- [1279] <213> 人工序列
- [1280] <220>
- [1281] <223> 合成的
- [1282] <400> 77
- [1283] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
- [1284] 1 5 10 15
- [1285] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr
- [1286] 20 25 30
- [1287] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
- [1288] 35 40 45
- [1289] Gly Met Ile Gln Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
- [1290] 50 55 60
- [1291] Lys Lys Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
- [1292] 65 70 75 80
- [1293] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [1294] 85 90 95
- [1295] Ala Arg Gly Ala Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
- [1296] 100 105 110
- [1297] Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
- [1298] 115
- [1299] <210> 78
- [1300] <211> 111
- [1301] <212> PRT

- [1302] <213> 人工序列
- [1303] <220>
- [1304] <223> 合成的
- [1305] <400> 78
- [1306] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
- [1307] 1 5 10 15
- [1308] Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
- [1309] 20 25 30
- [1310] Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
- [1311] 35 40 45
- [1312] Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
- [1313] 50 55 60
- [1314] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
- [1315] 65 70 75 80
- [1316] Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Thr
- [1317] 85 90 95
- [1318] Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
- [1319] 100 105 110
- [1320] <210> 79
- [1321] <211> 119
- [1322] <212> PRT
- [1323] <213> 小鼠
- [1324] <400> 79
- [1325] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
- [1326] 1 5 10 15
- [1327] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
- [1328] 20 25 30
- [1329] Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
- [1330] 35 40 45
- [1331] Gly Met Ile Gln Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
- [1332] 50 55 60
- [1333] Lys Lys Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Ser
- [1334] 65 70 75 80
- [1335] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
- [1336] 85 90 95
- [1337] Ala Arg Gly Ala Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
- [1338] 100 105 110
- [1339] Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
- [1340] 115
- [1341] <210> 80
- [1342] <211> 111
- [1343] <212> PRT

- [1344] <213> 小鼠
- [1345] <400> 80
- [1346] Asp Ile Val Leu Thr His Ser Pro Val Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
- [1347] 1 5 10 15
- [1348] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
- [1349] 20 25 30
- [1350] Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
- [1351] 35 40 45
- [1352] Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
- [1353] 50 55 60
- [1354] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
- [1355] 65 70 75 80
- [1356] Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr
- [1357] 85 90 95
- [1358] Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
- [1359] 100 105 110
- [1360] <210> 81
- [1361] <211> 117
- [1362] <212> PRT
- [1363] <213> 人工序列
- [1364] <220>
- [1365] <223> 合成的
- [1366] <400> 81
- [1367] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
- [1368] 1 5 10 15
- [1369] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
- [1370] 20 25 30
- [1371] Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
- [1372] 35 40 45
- [1373] Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
- [1374] 50 55 60
- [1375] Gln Gly Arg Ala Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
- [1376] 65 70 75 80
- [1377] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [1378] 85 90 95
- [1379] Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
- [1380] 100 105 110
- [1381] Val Thr Val Ser Ser
- [1382] 115
- [1383] <210> 82
- [1384] <211> 106
- [1385] <212> PRT

- [1386] <213> 人工序列
- [1387] <220>
- [1388] <223> 合成的
- [1389] <400> 82
- [1390] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
- [1391] 1 5 10 15
- [1392] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala
- [1393] 20 25 30
- [1394] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
- [1395] 35 40 45
- [1396] Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
- [1397] 50 55 60
- [1398] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro
- [1399] 65 70 75 80
- [1400] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
- [1401] 85 90 95
- [1402] Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys
- [1403] 100 105
- [1404] <210> 83
- [1405] <211> 117
- [1406] <212> PRT
- [1407] <213> 人工序列
- [1408] <220>
- [1409] <223> 合成的
- [1410] <400> 83
- [1411] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
- [1412] 1 5 10 15
- [1413] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
- [1414] 20 25 30
- [1415] Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
- [1416] 35 40 45
- [1417] Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
- [1418] 50 55 60
- [1419] Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
- [1420] 65 70 75 80
- [1421] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [1422] 85 90 95
- [1423] Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
- [1424] 100 105 110
- [1425] Val Thr Val Ser Ser
- [1426] 115
- [1427] <210> 84

- [1428] <211> 106
- [1429] <212> PRT
- [1430] <213> 人工序列
- [1431] <220>
- [1432] <223> 合成的
- [1433] <400> 84
- [1434] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
- [1435] 1 5 10 15
- [1436] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala
- [1437] 20 25 30
- [1438] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
- [1439] 35 40 45
- [1440] Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
- [1441] 50 55 60
- [1442] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
- [1443] 65 70 75 80
- [1444] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
- [1445] 85 90 95
- [1446] Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys
- [1447] 100 105
- [1448] <210> 85
- [1449] <211> 117
- [1450] <212> PRT
- [1451] <213> 小鼠
- [1452] <400> 85
- [1453] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
- [1454] 1 5 10 15
- [1455] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
- [1456] 20 25 30
- [1457] Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
- [1458] 35 40 45
- [1459] Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe
- [1460] 50 55 60
- [1461] Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
- [1462] 65 70 75 80
- [1463] Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
- [1464] 85 90 95
- [1465] Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
- [1466] 100 105 110
- [1467] Val Thr Val Ser Ala
- [1468] 115
- [1469] <210> 86

- [1470] <211> 106
- [1471] <212> PRT
- [1472] <213> 小鼠
- [1473] <400> 86
- [1474] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
- [1475] 1 5 10 15
- [1476] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala
- [1477] 20 25 30
- [1478] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
- [1479] 35 40 45
- [1480] Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
- [1481] 50 55 60
- [1482] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
- [1483] 65 70 75 80
- [1484] Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
- [1485] 85 90 95
- [1486] Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys
- [1487] 100 105
- [1488] <210> 87
- [1489] <211> 98
- [1490] <212> PRT
- [1491] <213> 人工序列
- [1492] <220>
- [1493] <223> 合成的
- [1494] <400> 87
- [1495] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
- [1496] 1 5 10 15
- [1497] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
- [1498] 20 25 30
- [1499] Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
- [1500] 35 40 45
- [1501] Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
- [1502] 50 55 60
- [1503] Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
- [1504] 65 70 75 80
- [1505] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [1506] 85 90 95
- [1507] Ala Arg
- [1508] <210> 88
- [1509] <211> 95
- [1510] <212> PRT
- [1511] <213> 人工序列

- [1512] <220>
- [1513] <223> 合成的
- [1514] <400> 88
- [1515] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
- [1516] 1 5 10 15
- [1517] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
- [1518] 20 25 30
- [1519] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
- [1520] 35 40 45
- [1521] Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
- [1522] 50 55 60
- [1523] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
- [1524] 65 70 75 80
- [1525] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Asn Tyr Pro
- [1526] 85 90 95
- [1527] <210> 89
- [1528] <211> 98
- [1529] <212> PRT
- [1530] <213> 人工序列
- [1531] <220>
- [1532] <223> 合成的
- [1533] <400> 89
- [1534] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
- [1535] 1 5 10 15
- [1536] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
- [1537] 20 25 30
- [1538] Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
- [1539] 35 40 45
- [1540] Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
- [1541] 50 55 60
- [1542] Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
- [1543] 65 70 75 80
- [1544] Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [1545] 85 90 95
- [1546] Ala Arg
- [1547] <210> 90
- [1548] <211> 99
- [1549] <212> PRT
- [1550] <213> 人工序列
- [1551] <220>
- [1552] <223> 合成的
- [1553] <400> 90

[1554]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly			
[1555]	1	5	10	15
[1556]	Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Glu Leu			
[1557]	20	25	30	
[1558]	Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
[1559]	35	40	45	
[1560]	Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Asn Lys Asp Thr Gly Val Pro Ala			
[1561]	50	55	60	
[1562]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn			
[1563]	65	70	75	80
[1564]	Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys			
[1565]	85	90	95	
[1566]	Asn Phe Pro			
[1567]	<210> 91			
[1568]	<211> 97			
[1569]	<212> PRT			
[1570]	<213> 人工序列			
[1571]	<220>			
[1572]	<223> 合成的			
[1573]	<400> 91			
[1574]	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser			
[1575]	1	5	10	15
[1576]	Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr			
[1577]	20	25	30	
[1578]	Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly			
[1579]	35	40	45	
[1580]	Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln			
[1581]	50	55	60	
[1582]	Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met			
[1583]	65	70	75	80
[1584]	Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[1585]	85	90	95	
[1586]	Arg			
[1587]	<210> 92			
[1588]	<211> 99			
[1589]	<212> PRT			
[1590]	<213> 人工序列			
[1591]	<220>			
[1592]	<223> 合成的			
[1593]	<400> 92			
[1594]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly			
[1595]	1	5	10	15

[1596] Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Glu Leu  
 [1597] 20 25 30  
 [1598] Gly Ile Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 [1599] 35 40 45  
 [1600] Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Asn Lys Asp Thr Gly Val Pro Ala  
 [1601] 50 55 60  
 [1602] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn  
 [1603] 65 70 75 80  
 [1604] Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys  
 [1605] 85 90 95  
 [1606] Asn Phe Pro  
 [1607] <210> 93  
 [1608] <211> 342  
 [1609] <212> DNA  
 [1610] <213> 小鼠  
 [1611] <400> 93  
 [1612] caggtccagc tgcagcagcc tggactgca ctggtaagc ctggggcttc agtgaagctg 60  
 [1613] tcctgcaagg cttctggcta caccttctcc agctactaca tacactgggt gaaacagagg 120  
 [1614] cctggacaag gccttgagtg gattggaaat attaatcctt tcaatggtgg ttctatctac 180  
 [1615] aatgagaagt tcaagaacaa ggccctcgctg actgttagaca catcctccaa cacagcctac 240  
 [1616] atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggctt attattgtgc aaggtggcac 300  
 [1617] ttgactact gggccaagg caccctctc acagtctcct ca 342  
 [1618] <210> 94  
 [1619] <211> 345  
 [1620] <212> DNA  
 [1621] <213> 小鼠  
 [1622] <400> 94  
 [1623] gacattgtga tgacccagtc tccatcctcc ctggctgtga cagcaggaga gaaggtca 60  
 [1624] ttgaaatgca agtccagtc gagtttttg tggagtggaa accaaaataa ctacttatcc 120  
 [1625] tggtaccagc agaaacaagg gcagcctctt aaactgctt tctatgggc atccattaga 180  
 [1626] gaatcttggg tccctgatcg attcacagga agtggatctg ggacagactt cactcttacc 240  
 [1627] attggcaatg tgtctgctga agaccttagca gtttattact gtcagcacaa tcatggcagc 300  
 [1628] ttctccctt acacgttcgg agggggacc aggctggaaa taaaa 345  
 [1629] <210> 95  
 [1630] <211> 363  
 [1631] <212> DNA  
 [1632] <213> 小鼠  
 [1633] <400> 95  
 [1634] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagttg 60  
 [1635] tcctgcaagg cttctggcta cacttcacc agcaactgga tgcactgggt gaagcagagg 120  
 [1636] cctggacaag gccttgagtg gattggaaatg atgcattcta atagtggtag tatcaattac 180  
 [1637] aatgagaagt tcaagaacaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

- [1638] atgcaactca gtagcctgac atctgaggac tctgcggct actactgtgc aagatcctac 300  
[1639] tacggtagta gcccgtaacta cttgactac tggggccaaag gcaccactct cacagtctcc 360  
[1640] tca 363  
[1641] <210> 96  
[1642] <211> 321  
[1643] <212> DNA  
[1644] <213> 小鼠  
[1645] <400> 96  
[1646] gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctggaga cagagtcacc 60  
[1647] atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120  
[1648] gatggaaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180  
[1649] aggttcagtgcagtttgc tggaaacagat ttttctctca ccattagcaa cctggaggaa 240  
[1650] gaagatattg ccacttactt ttgccagcag ggtgatacgc ttccgtggac gttcggtgga 300  
[1651] ggcaccaagc tggaaatcaa a 321  
[1652] <210> 97  
[1653] <211> 357  
[1654] <212> DNA  
[1655] <213> 小鼠  
[1656] <400> 97  
[1657] caggtccaaat ttcagcagcc tggggcttagt ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagttg 60  
[1658] tcctgcaagg cttctggcta cactttcccc agctactgga tgcactggat gaagcagagg 120  
[1659] cctggacaag gccttgagtg gattggaatg attcagccata gtacttctgg tactatctac 180  
[1660] aatgagagat tcaagaacca ggtcacactg actgttagaca aatcttccag cacagcctac 240  
[1661] atgcaactca gcagccagac atctgaggac tctgcggctt attactgtgc aagaggaact 300  
[1662] gggacgggtgg actactttga ttactgggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357  
[1663] <210> 98  
[1664] <211> 333  
[1665] <212> DNA  
[1666] <213> 小鼠  
[1667] <400> 98  
[1668] gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
[1669] atatcctgca gagccagcga aagtgttgat agttatggca atagtttat acactggtag 120  
[1670] caacagaagc caggacagcc acccaaactc ctcatccatc gtgcatccaa cctagaatct 180  
[1671] gggatccctg ccacattcag cggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccataaat 240  
[1672] cctgtggagg ctgatgtat tgcaacctat tactgtcaac aaagtaagga ggacccgtac 300  
[1673] acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333  
[1674] <210> 99  
[1675] <211> 351  
[1676] <212> DNA  
[1677] <213> 人工序列  
[1678] <220>  
[1679] <223> 合成的

- [1680] <400> 99
- [1681] caggtgcagc tgggtcagag cggcgagaa gtggtaagc caggagcctc agtgaagatc 60
- [1682] agctgcaagg ccagcggcta cgtttcacc gactactata tgaactgggt gaaacaggca 120
- [1683] ccaggacagg gactggagt gatcggttattt attaacccta acaatggcgg aacaagctac 180
- [1684] aatcagaagt ttcagggcag ggcaaccgtg acagtggaca aatctactag taccgcctat 240
- [1685] atggaactgt ctcggcttag aagcgacgt accgctgtgt actattgtgt caagtggggc 300
- [1686] gacggaccct tcgcattttt gggccagggg acactggtga ctgtcagctc c 351
- [1687] <210> 100
- [1688] <211> 318
- [1689] <212> DNA
- [1690] <213> 人工序列
- [1691] <220>
- [1692] <223> 合成的
- [1693] <400> 100
- [1694] gacattcaga tgacacagtc tcagagtagc ctgtcagccca gcgtggcga ccgagtcacc 60
- [1695] atcacatgcc aggcaggatca gaacgtggga gccgctgtcg cttggtaacca gcagaagcca 120
- [1696] ggcggaaagctc ccaagctgtct gatctactcc gcatctaattt ggtacacagg ggtggccagc 180
- [1697] agattcagtg gctcaggagcgaaactgac tttactctga ccatcagctc catgcagcct 240
- [1698] gaagatattt ccacctactt ctggcagcag tactcaaactt atccaacccctt tggcagcggg 300
- [1699] acaaaaactgg ggatcaag 318
- [1700] <210> 101
- [1701] <211> 360
- [1702] <212> DNA
- [1703] <213> 小鼠
- [1704] <400> 101
- [1705] caggtccaaac tgcagcagtc tggggcttag ttggtaaagc cggggccttc agtgaagttt 60
- [1706] tcctgcaagg cttctggcta cactttcacc agctactggta tgcactgggt gtggcagagg 120
- [1707] cctggacaag gccttgagtg gatggaaatg attcatccta atatgtatata tactaactgc 180
- [1708] aatgagaatt tcaaggcacac ggtcacactg actgttgaca aatcctccag tacagcctac 240
- [1709] atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggctt tttactgtgc aagatcgac 300
- [1710] ggttagtagct actggtagttt cgtgtctgg ggcacaggga ccacggcac cgtctccctca 360
- [1711] <210> 102
- [1712] <211> 322
- [1713] <212> DNA
- [1714] <213> 小鼠
- [1715] <400> 102
- [1716] agtattgtga tgacccagac tcccaaattt ctgtctgtat cagcaggaga cagggttacc 60
- [1717] ataacactgca aggcggtca gaggtgtaat aatgtatgtat cttggtaacca acagaagcca 120
- [1718] gggcagtctc ctaaaactgtct gatataattt gcatccaatc gttataactgg agtccctgtat 180
- [1719] cgcttcactg gcagtggtata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggat 240
- [1720] gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattttagctt ctccgctcac gttcggtgt 300
- [1721] gggaccaagc tgaaactgaa ac 322

- [1722] <210> 103  
[1723] <211> 322  
[1724] <212> DNA  
[1725] <213> 人工序列  
[1726] <220>  
[1727] <223> 合成的  
[1728] <400> 103  
[1729] agtattgtga tgacccagac tcccaaattc ctgtctgtat cagcaggaga cagggttacc 60  
[1730] ataacctgca aggccggtca gagtgtgaat aatgatgtag cttgttacca acagaagcca 120  
[1731] gggcagtctc ctaaactgct gatatattat gcatccaatc gttatactgg agtccctgat 180  
[1732] cgttcaactg gcagtggtata tggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct 240  
[1733] gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattttagct ctccgctcac gttcggtgct 300  
[1734] gggaccaagc tggaactgaa ac 322  
[1735] <210> 104  
[1736] <211> 333  
[1737] <212> DNA  
[1738] <213> 人工序列  
[1739] <220>  
[1740] <223> 合成的  
[1741] <400> 104  
[1742] gacatcgtgc tgacccagag cccgcgcagc ctggccgtga gcgtggcca gagagccacc 60  
[1743] atcacctgca gagccagcga gagcgtggac atctacggca acagcttcat gcattggat 120  
[1744] caacagaagc cccgcgcaggc ccccaagctg ctgatctatc gggccagcaa cctggagagc 180  
[1745] ggcattccccg ccagattcag cggcagcggc agcagaaccg acttcaccct gaccatcaac 240  
[1746] cccgtggagg ccaacgcac cgcacccctac tactgccaac agagcaacga cgaccctac 300  
[1747] acttcggcg gcggcaccaa gctggagacc aag 333  
[1748] <210> 105  
[1749] <211> 357  
[1750] <212> DNA  
[1751] <213> 人工序列  
[1752] <220>  
[1753] <223> 合成的  
[1754] <400> 105  
[1755] caggtgcagc tgggtcagag cggcgccgag gtgaagaagc cggcgccag cgtgaagctg 60  
[1756] agctgcagg ccaggcgcta catcttcacc acctactgga tgcactgggt gaagcagaga 120  
[1757] cccggccagg gcctggagtg gatcggcatg atccagccca acagcggcgg caccaagtac 180  
[1758] aacgagaagt tcaagaagaa ggccacccctg accgtggaca agagcatcag caccgcctac 240  
[1759] atggagctga gcagactgac cagcgacgac accgcgtgt actactgcgc cagaggcgcc 300  
[1760] ggcaccgtgg actacttcga ctactgggc cagggcagca ccctgaccgt ctcgagc 357  
[1761] <210> 106  
[1762] <211> 333  
[1763] <212> DNA

[1764]	<213> 人工序列			
[1765]	<220>			
[1766]	<223> 合成的			
[1767]	<400> 106			
[1768]	gacatcggtgc tgacccagag ccccgccagc ctggccgtga gcgtggcca gagagccacc 60			
[1769]	atcacctgca gagccagcga gagcgtggac atctacggca acagcttcat gcattggat 120			
[1770]	caacagaagc cccggccagcc ccccaagctg ctgatctatc gggccagcaa cctggagagc 180			
[1771]	ggcatccccg ccagattcag cggcagcggc agcagaaccg acttcaccct gaccatcaac 240			
[1772]	cccggtggagg ccaacgacac cgcacccctac tactgccagc agagcaccga agacccctac 300			
[1773]	accttcggcg gcggcaccaa gctggagatc aag 333			
[1774]	<210> 107			
[1775]	<211> 464			
[1776]	<212> PRT			
[1777]	<213> 人工序列			
[1778]	<220>			
[1779]	<223> 合成的			
[1780]	<400> 107			
[1781]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro			
[1782]	1	5	10	15
[1783]	Gly Ser Thr Gly Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val			
[1784]	20	25	30	
[1785]	Glu Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys			
[1786]	35	40	45	
[1787]	Gln Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys			
[1788]	50	55	60	
[1789]	Asn Ile Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His			
[1790]	65	70	75	80
[1791]	Ser Ser Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu			
[1792]	85	90	95	
[1793]	Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly			
[1794]	100	105	110	
[1795]	Val Tyr Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile			
[1796]	115	120	125	
[1797]	Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu			
[1798]	130	135	140	
[1799]	Val Val Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu			
[1800]	145	150	155	160
[1801]	Gly Tyr Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val			
[1802]	165	170	175	
[1803]	Leu Ser Gly Lys Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu			
[1804]	180	185	190	
[1805]	Phe Asn Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Asn Glu Ile			

[1806]	195	200	205
[1807]	Phe Tyr Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala		
[1808]	210	215	220
[1809]	Glu Leu Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg		
[1810]	225	230	235
[1811]	Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
[1812]	245	250	255
[1813]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
[1814]	260	265	270
[1815]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
[1816]	275	280	285
[1817]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
[1818]	290	295	300
[1819]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[1820]	305	310	315
[1821]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr		
[1822]	325	330	335
[1823]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
[1824]	340	345	350
[1825]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[1826]	355	360	365
[1827]	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[1828]	370	375	380
[1829]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[1830]	385	390	395
[1831]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[1832]	405	410	415
[1833]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[1834]	420	425	430
[1835]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[1836]	435	440	445
[1837]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1838]	450	455	460
[1839]	<210> 108		
[1840]	<211> 1416		
[1841]	<212> DNA		
[1842]	<213> 人工序列		
[1843]	<220>		
[1844]	<223> 合成的		
[1845]	<400> 108		
[1846]	aagcttgccg ccaccatgga aaccgacact ctgctgctgt gggtgctgct gctgtgggtg 60		
[1847]	ccagggtcaa ccgggttac cgtgacagtg cccaaggacc tgtacgtggt ggagtacggc 120		

- [1848] agcaacatga ccatcgagtg caagttcccc gtggagaagc agctggatct ggccgcctg 180  
 [1849] atcgtgtatt gggagatgga ggacaagaac atcatccagt tcgtcacgg cgaagaggac 240  
 [1850] ctgaagggtgc agcacagcag ctacaggcag agggccagac tgctgaagga ccagctgtct 300  
 [1851] ctgggaaacg cagctctgca gatcaccgac gtgaagctgc aggacgcagg agtctaccgc 360  
 [1852] tgcgtatca gctacggcgg agccgactac aagaggatca ccgtgaaggt caacgcctt 420  
 [1853] tacaacaaga tcaaccagag aatcctggtg gtggaccccg tgaccagcga gcacgagctg 480  
 [1854] acttgcgtcagg cagagggcta ccccaaggcc gaagtgattt ggaccagcag cgaccatcag 540  
 [1855] gtgcgtgagcg gaaagaccac caccaccaac agcaagcggg aggagaagct gttcaacgtg 600  
 [1856] accagcaccc tgcggatcaa caccaccacc aacgagatct tctactgcac cttccggaga 660  
 [1857] ctggacccag aggagaacca cacagccgag ctggatcc cagaactgcc tctggctcac 720  
 [1858] cctcctaacg agagagagaa tctgtatccc cagggagcac cagaactgct gggaggacca 780  
 [1859] tcgcgttcc tggttccacc caaacctaag gacaccctga tgattagcag aacaccagaa 840  
 [1860] gtcacttgcg tggcgatggc cgtgtccac gaggaccccg aagtcaaatt caactggatc 900  
 [1861] gtggatggcg tcgaggtgca taatgctaag accaaaccaa gagaggaaca gtacaacagc 960  
 [1862] acctataggg tcgtgtccgt cctgacagtg ctgcaccagg actggctgaa cggaaaggag 1020  
 [1863] tataaatgca aggtgtctaa caaggccctg ccagctccca tcgagaagac tattagtaaa 1080  
 [1864] gctaagggcc agccccgcga acctcaggtg tacaccctgc ctccatcccg agacgagctg 1140  
 [1865] accaagaacc aggtctctt gacttgcgtc gtgaaggat tctatccatc agatatcgca 1200  
 [1866] gtggagtgccc aaagcaatgg ccagcccgag aacaattaca agactacccc ccctgtgctg 1260  
 [1867] gactccgatg gctttttttt tctgtattct aaactgaccg tggataagag tcgggtggcag 1320  
 [1868] caggggaatg tcttttcatg cagcgtgatg cacgaggcac tgcacaatca ttacactcag 1380  
 [1869] aagtccctgt cactgtcacc tggaaagttag ggatcc 1416  
 [1870] <210> 109  
 [1871] <211> 65  
 [1872] <212> DNA  
 [1873] <213> 人工序列  
 [1874] <220>  
 [1875] <223> 合成的  
 [1876] <400> 109  
 [1877] tatagggaga cccaaagctgg ctagcgatcc aacttaagct tgccgccacc atggaaaccg 60  
 [1878] acact 65  
 [1879] <210> 110  
 [1880] <211> 70  
 [1881] <212> DNA  
 [1882] <213> 人工序列  
 [1883] <220>  
 [1884] <223> 合成的  
 [1885] <400> 110  
 [1886] tggatatctg cagaattcca ccacactgga ctagtggatc cctactttcc aggtgacagt 60  
 [1887] gacagggact 70  
 [1888] <210> 111  
 [1889] <211> 62

- [1890] <212> DNA
- [1891] <213> 人工序列
- [1892] <220>
- [1893] <223> 合成的
- [1894] <400> 111
- [1895] cacgggaaac ttgcactcga tggggcggt gctgccgtac tccaccacgt acaggtcctt 60
- [1896] gg 62
- [1897] <210> 112
- [1898] <211> 62
- [1899] <212> DNA
- [1900] <213> 人工序列
- [1901] <220>
- [1902] <223> 合成的
- [1903] <400> 112
- [1904] tacgtggtgg agtacggcag caacgccacc atcgagtgc a gttcccggt ggagaagcag 60
- [1905] ct 62
- [1906] <210> 113
- [1907] <211> 62
- [1908] <212> DNA
- [1909] <213> 人工序列
- [1910] <220>
- [1911] <223> 合成的
- [1912] <400> 113
- [1913] cttctccacg g g g a a c t t g c a c t c g c g g t c a g t t g c t g c c g t a c t c c a c c a g 60
- [1914] gt 62
- [1915] <210> 114
- [1916] <211> 62
- [1917] <212> DNA
- [1918] <213> 人工序列
- [1919] <220>
- [1920] <223> 合成的
- [1921] <400> 114
- [1922] g t g g a g t a c g g c a a c a t g a c c g c g a g t g c a a g t t c c c c g t g g a g a a g c a g t g g a t 60
- [1923] ct 62
- [1924] <210> 115
- [1925] <211> 62
- [1926] <212> DNA
- [1927] <213> 人工序列
- [1928] <220>
- [1929] <223> 合成的
- [1930] <400> 115
- [1931] a t c c a g t g c t t c t c c a c g g g a a g g c g c a c t c g a t g g t c a g t a c t c c a c 60

- [1932] ca 62  
[1933] <210> 116  
[1934] <211> 62  
[1935] <212> DNA  
[1936] <213> 人工序列  
[1937] <220>  
[1938] <223> 合成的  
[1939] <400> 116  
[1940] ggcagcaaca tgaccatcga gtgcgccttc cccgtggaga agcagctgga tctggccgcc 60  
[1941] ct 62  
[1942] <210> 117  
[1943] <211> 62  
[1944] <212> DNA  
[1945] <213> 人工序列  
[1946] <220>  
[1947] <223> 合成的  
[1948] <400> 117  
[1949] cacgatcagg gcggccagat ccagggcctt ctccacgggg aacttgcact cgatggtcat 60  
[1950] gt 62  
[1951] <210> 118  
[1952] <211> 62  
[1953] <212> DNA  
[1954] <213> 人工序列  
[1955] <220>  
[1956] <223> 合成的  
[1957] <400> 118  
[1958] gagtgcaagt tccccgtgga gaaggccctg gatctggcccg ccctgatcgt gtattggag 60  
[1959] at 62  
[1960] <210> 119  
[1961] <211> 62  
[1962] <212> DNA  
[1963] <213> 人工序列  
[1964] <220>  
[1965] <223> 合成的  
[1966] <400> 119  
[1967] catctcccaa tacacgatca gggcgctcag atccagctgc ttctccacgg ggaacttgca 60  
[1968] ct 62  
[1969] <210> 120  
[1970] <211> 62  
[1971] <212> DNA  
[1972] <213> 人工序列  
[1973] <220>

- [1974] <223> 合成的
- [1975] <400> 120
- [1976] cccgtggaga agcagctgga tctgagcgcc ctgatcgtgt attggagat ggaggacaag 60
- [1977] aa 62
- [1978] <210> 121
- [1979] <211> 62
- [1980] <212> DNA
- [1981] <213> 人工序列
- [1982] <220>
- [1983] <223> 合成的
- [1984] <400> 121
- [1985] tcttgcctc catctccaa tacacggcca gggcggccag atccagctgc ttctccacgg 60
- [1986] gg 62
- [1987] <210> 122
- [1988] <211> 62
- [1989] <212> DNA
- [1990] <213> 人工序列
- [1991] <220>
- [1992] <223> 合成的
- [1993] <400> 122
- [1994] aagcagctgg atctggccgc cctggccgtg tattggaga tggaggacaa gaacatcatc 60
- [1995] ca 62
- [1996] <210> 123
- [1997] <211> 62
- [1998] <212> DNA
- [1999] <213> 人工序列
- [2000] <220>
- [2001] <223> 合成的
- [2002] <400> 123
- [2003] gaactggatg atgttcttgt cctcggcctc ccaatacacg atcagggcgg ccagatccag 60
- [2004] ct 62
- [2005] <210> 124
- [2006] <211> 62
- [2007] <212> DNA
- [2008] <213> 人工序列
- [2009] <220>
- [2010] <223> 合成的
- [2011] <400> 124
- [2012] gccgcctga tcgtgtattg ggaggccgag gacaagaaca tcatccagtt cgtgcacggc 60
- [2013] ga 62
- [2014] <210> 125
- [2015] <211> 62

- [2016] <212> DNA
- [2017] <213> 人工序列
- [2018] <220>
- [2019] <223> 合成的
- [2020] <400> 125
- [2021] gccgtgcacg aactggatga tgtggcgtc ctccatctcc caatacacga tcagggcggc 60
- [2022] ca 62
- [2023] <210> 126
- [2024] <211> 62
- [2025] <212> DNA
- [2026] <213> 人工序列
- [2027] <220>
- [2028] <223> 合成的
- [2029] <400> 126
- [2030] atcgtgtatt gggagatgga ggacgccaac atcatccagt tcgtgcacgg cgaagaggac 60
- [2031] ct 62
- [2032] <210> 127
- [2033] <211> 62
- [2034] <212> DNA
- [2035] <213> 人工序列
- [2036] <220>
- [2037] <223> 合成的
- [2038] <400> 127
- [2039] ttcgcgtgc acgaactgga tcatggcatt gtcctccatc tcccaataca cgatcaggac 60
- [2040] gg 62
- [2041] <210> 128
- [2042] <211> 62
- [2043] <212> DNA
- [2044] <213> 人工序列
- [2045] <220>
- [2046] <223> 合成的
- [2047] <400> 128
- [2048] gtgtattggg agatggagga caaggccatc atccagttcg tgcacggcga agaggacctg 60
- [2049] aa 62
- [2050] <210> 129
- [2051] <211> 62
- [2052] <212> DNA
- [2053] <213> 人工序列
- [2054] <220>
- [2055] <223> 合成的
- [2056] <400> 129
- [2057] ctttcgccg tgcacgaact ggatggcggtt cttgtcctcc atctccaat acacgatcag 60

- [2058] gg 62  
[2059] <210> 130  
[2060] <211> 62  
[2061] <212> DNA  
[2062] <213> 人工序列  
[2063] <220>  
[2064] <223> 合成的  
[2065] <400> 130  
[2066] tattgggaga tggaggacaa gaacgccatc cagttcgtgc acggcagaaga ggacctgaag 60  
[2067] gt 62  
[2068] <210> 131  
[2069] <211> 62  
[2070] <212> DNA  
[2071] <213> 人工序列  
[2072] <220>  
[2073] <223> 合成的  
[2074] <400> 131  
[2075] ctgcacccatc aggtcctttt cgccggccac gaactggatg atgttcttgt cctccatctc 60  
[2076] cc 62  
[2077] <210> 132  
[2078] <211> 62  
[2079] <212> DNA  
[2080] <213> 人工序列  
[2081] <220>  
[2082] <223> 合成的  
[2083] <400> 132  
[2084] gacaagaaca tcatccagtt cgtggccggc gaagaggacc tgaaggtgca gcacagcagc 60  
[2085] ta 62  
[2086] <210> 133  
[2087] <211> 62  
[2088] <212> DNA  
[2089] <213> 人工序列  
[2090] <220>  
[2091] <223> 合成的  
[2092] <400> 133  
[2093] cctctgcctg tagctgctgt gctgggcctt caggtcctct tcggccgtgca cgaactggat 60  
[2094] ga 62  
[2095] <210> 134  
[2096] <211> 62  
[2097] <212> DNA  
[2098] <213> 人工序列  
[2099] <220>

- [2100] <223> 合成的  
[2101] <400> 134  
[2102] gtgcacggcg aagaggacct gaaggcccag cacagcagct acaggcagag ggccagactg 60  
[2103] ct 62  
[2104] <210> 135  
[2105] <211> 62  
[2106] <212> DNA  
[2107] <213> 人工序列  
[2108] <220>  
[2109] <223> 合成的  
[2110] <400> 135  
[2111] cagcagtctg gccctctgcc ttaggcgt gtgtgcacc ttcaggtcct ctgcgcgtg 60  
[2112] ca 62  
[2113] <210> 136  
[2114] <211> 62  
[2115] <212> DNA  
[2116] <213> 人工序列  
[2117] <220>  
[2118] <223> 合成的  
[2119] <400> 136  
[2120] gaggacctga aggtgcagca cagcgcctac aggcagaggg ccagactgct gaaggaccag 60  
[2121] ct 62  
[2122] <210> 137  
[2123] <211> 62  
[2124] <212> DNA  
[2125] <213> 人工序列  
[2126] <220>  
[2127] <223> 合成的  
[2128] <400> 137  
[2129] cttcagcgt ctggccctt gcctggcgct gctgtgctgc acttcaggt cctttcgcc 60  
[2130] gt 62  
[2131] <210> 138  
[2132] <211> 62  
[2133] <212> DNA  
[2134] <213> 人工序列  
[2135] <220>  
[2136] <223> 合成的  
[2137] <400> 138  
[2138] gacctgaagg tgcagcacag cagcgccagg cagagggcca gactgctgaa ggaccagctg 60  
[2139] tc 62  
[2140] <210> 139  
[2141] <211> 62

- [2142] <212> DNA
- [2143] <213> 人工序列
- [2144] <220>
- [2145] <223> 合成的
- [2146] <400> 139
- [2147] ctggtccttc agcagtctgg ccctggccct gtagctgctg tgctgcacct tcaggtcctc 60
- [2148] tt 62
- [2149] <210> 140
- [2150] <211> 62
- [2151] <212> DNA
- [2152] <213> 人工序列
- [2153] <220>
- [2154] <223> 合成的
- [2155] <400> 140
- [2156] aaggtgcagc acagcagcta cagggccagg gccagactgc tgaaggacca gctgtctctg 60
- [2157] gg 62
- [2158] <210> 141
- [2159] <211> 62
- [2160] <212> DNA
- [2161] <213> 人工序列
- [2162] <220>
- [2163] <223> 合成的
- [2164] <400> 141
- [2165] cagagacagc tggtccttca gcagggcggc cctctgcctg tagctgctgt gctgcaccc 60
- [2166] ca 62
- [2167] <210> 142
- [2168] <211> 62
- [2169] <212> DNA
- [2170] <213> 人工序列
- [2171] <220>
- [2172] <223> 合成的
- [2173] <400> 142
- [2174] cacagcagct acaggcagag ggccgcctg ctgaaggacc agctgtctct gggaaacgca 60
- [2175] gc 62
- [2176] <210> 143
- [2177] <211> 62
- [2178] <212> DNA
- [2179] <213> 人工序列
- [2180] <220>
- [2181] <223> 合成的
- [2182] <400> 143
- [2183] gttcccaaga gacagctggc cctggccag tctggccctc tgcctgtac tgctgtctg 60

- [2184] ca 62  
[2185] <210> 144  
[2186] <211> 62  
[2187] <212> DNA  
[2188] <213> 人工序列  
[2189] <220>  
[2190] <223> 合成的  
[2191] <400> 144  
[2192] agctacaggc agagggccag actggccaag gaccagctgt ctctggaaa cgtagctctg 60  
[2193] ca 62  
[2194] <210> 145  
[2195] <211> 62  
[2196] <212> DNA  
[2197] <213> 人工序列  
[2198] <220>  
[2199] <223> 合成的  
[2200] <400> 145  
[2201] gatctgcaga gctgcgttcc ccagggccag ctggcccttc agcagtctgg ccctctgcct 60  
[2202] gt 62  
[2203] <210> 146  
[2204] <211> 62  
[2205] <212> DNA  
[2206] <213> 人工序列  
[2207] <220>  
[2208] <223> 合成的  
[2209] <400> 146  
[2210] gccagactgc tgaaggacca gctggccctg ggaaacgcag ctctgcagat caccgacgtg 60  
[2211] aa 62  
[2212] <210> 147  
[2213] <211> 62  
[2214] <212> DNA  
[2215] <213> 人工序列  
[2216] <220>  
[2217] <223> 合成的  
[2218] <400> 147  
[2219] ggtgatctgc agagctgcgt ttccggcaga cagctggtcc ttcagcagtc tggccctctg 60  
[2220] cc 62  
[2221] <210> 148  
[2222] <211> 62  
[2223] <212> DNA  
[2224] <213> 人工序列  
[2225] <220>

- [2226] <223> 合成的  
[2227] <400> 148  
[2228] agactgctga aggaccagct gtctgccgga aacgcagctc tgcagatcac cgacgtgaag 60  
[2229] ct 62  
[2230] <210> 149  
[2231] <211> 62  
[2232] <212> DNA  
[2233] <213> 人工序列  
[2234] <220>  
[2235] <223> 合成的  
[2236] <400> 149  
[2237] ctgtgggtgc cagggtcaac cggggccacc gtgacagtgc ccaaggacct gtacgtggtg 60  
[2238] ga 62  
[2239] <210> 150  
[2240] <211> 62  
[2241] <212> DNA  
[2242] <213> 人工序列  
[2243] <220>  
[2244] <223> 合成的  
[2245] <400> 150  
[2246] caggtccttg ggcactgtca cggtgccccc gttgaccct ggcacccaca gcagcagcac 60  
[2247] cc 62  
[2248] <210> 151  
[2249] <211> 62  
[2250] <212> DNA  
[2251] <213> 人工序列  
[2252] <220>  
[2253] <223> 合成的  
[2254] <400> 151  
[2255] tgggtgccag ggtcaaccgg gttcgccgtg acagtgccca aggacctgta cgtggtgag 60  
[2256] ta 62  
[2257] <210> 152  
[2258] <211> 62  
[2259] <212> DNA  
[2260] <213> 人工序列  
[2261] <220>  
[2262] <223> 合成的  
[2263] <400> 152  
[2264] gtacagggtcc ttgggcactg tcacggcgaa cccggttgac cctggcaccc acagcagcag 60  
[2265] ca 62  
[2266] <210> 153  
[2267] <211> 62

- [2268] <212> DNA
- [2269] <213> 人工序列
- [2270] <220>
- [2271] <223> 合成的
- [2272] <400> 153
- [2273] gggttcaccg tgacagtgcc caaggccctg tacgtggtgg agtacggcag caacatgacc 60
- [2274] at 62
- [2275] <210> 154
- [2276] <211> 62
- [2277] <212> DNA
- [2278] <213> 人工序列
- [2279] <220>
- [2280] <223> 合成的
- [2281] <400> 154
- [2282] gctgccgtac tccaccacgt acagggcctt gggcactgtc acggtaacc cggttgaccc 60
- [2283] tg 62
- [2284] <210> 155
- [2285] <211> 62
- [2286] <212> DNA
- [2287] <213> 人工序列
- [2288] <220>
- [2289] <223> 合成的
- [2290] <400> 155
- [2291] accgtgacag tgcccaagga cctggccgtg gtggagtagc gcagcaacat gaccatcgag 60
- [2292] tg 62
- [2293] <210> 156
- [2294] <211> 62
- [2295] <212> DNA
- [2296] <213> 人工序列
- [2297] <220>
- [2298] <223> 合成的
- [2299] <400> 156
- [2300] catgttgctg ccgtactcca ccacggccag ggccttggc actgtcacgg tgaaccgg 60
- [2301] tg 62
- [2302] <210> 157
- [2303] <211> 62
- [2304] <212> DNA
- [2305] <213> 人工序列
- [2306] <220>
- [2307] <223> 合成的
- [2308] <400> 157
- [2309] cccaaggacc tgtacgttgt ggaggccggc agcaacatga ccatcgagtg caagttcccc 60

- [2310] gt 62  
[2311] <210> 158  
[2312] <211> 62  
[2313] <212> DNA  
[2314] <213> 人工序列  
[2315] <220>  
[2316] <223> 合成的  
[2317] <400> 158  
[2318] gcactcgatg gtcatgttgc tgccggcctc caccacgtac agggccttgg gcactgtcac 60  
[2319] gg 62  
[2320] <210> 159  
[2321] <211> 62  
[2322] <212> DNA  
[2323] <213> 人工序列  
[2324] <220>  
[2325] <223> 合成的  
[2326] <400> 159  
[2327] ctggatctgg ccgcctgat cgtggcctgg gagatggagg acaagaacat catccagttc 60  
[2328] gt 62  
[2329] <210> 160  
[2330] <211> 62  
[2331] <212> DNA  
[2332] <213> 人工序列  
[2333] <220>  
[2334] <223> 合成的  
[2335] <400> 160  
[2336] gatgttcttg tcctccatct cccaggccac gatcagggt tccagatcca gctgcttctc 60  
[2337] ca 62  
[2338] <210> 161  
[2339] <211> 62  
[2340] <212> DNA  
[2341] <213> 人工序列  
[2342] <220>  
[2343] <223> 合成的  
[2344] <400> 161  
[2345] ctggccgccc tgatcgtgta ttggccatg gaggacaaga acatcatcca gttcgtcac 60  
[2346] gg 62  
[2347] <210> 162  
[2348] <211> 62  
[2349] <212> DNA  
[2350] <213> 人工序列  
[2351] <220>

- [2352] <223> 合成的  
[2353] <400> 162  
[2354] ctggatgatg ttcttgtcct ccatggccca atacacgatc agggcttcca gatccagctg 60  
[2355] ct 62  
[2356] <210> 163  
[2357] <211> 62  
[2358] <212> DNA  
[2359] <213> 人工序列  
[2360] <220>  
[2361] <223> 合成的  
[2362] <400> 163  
[2363] gccctgatcg tgtattggga gatggccgac aagaacatca tccagttcgt gcacggcga 60  
[2364] ga 62  
[2365] <210> 164  
[2366] <211> 62  
[2367] <212> DNA  
[2368] <213> 人工序列  
[2369] <220>  
[2370] <223> 合成的  
[2371] <400> 164  
[2372] cacgaactgg atgatgttct tgtcgccat ctcccaatac acgatcaggg cttccagatc 60  
[2373] ca 62  
[2374] <210> 165  
[2375] <211> 62  
[2376] <212> DNA  
[2377] <213> 人工序列  
[2378] <220>  
[2379] <223> 合成的  
[2380] <400> 165  
[2381] ctgatcgtgt attggagat ggaggccaag aacatcatcc agttcgtgca cggcgaagag 60  
[2382] ga 62  
[2383] <210> 166  
[2384] <211> 62  
[2385] <212> DNA  
[2386] <213> 人工序列  
[2387] <220>  
[2388] <223> 合成的  
[2389] <400> 166  
[2390] gtgcacgaac tggatgatgt tctggcctc catctccaa tacacgatca gggcttccag 60  
[2391] at 62  
[2392] <210> 167  
[2393] <211> 62

- [2394] <212> DNA
- [2395] <213> 人工序列
- [2396] <220>
- [2397] <223> 合成的
- [2398] <400> 167
- [2399] gagatggagg acaagaacat catgccttc gtgcacggcg aagaggacct gaaggtgcag 60
- [2400] ca 62
- [2401] <210> 168
- [2402] <211> 62
- [2403] <212> DNA
- [2404] <213> 人工序列
- [2405] <220>
- [2406] <223> 合成的
- [2407] <400> 168
- [2408] caggtcctct tcgcccgtca cgaaggcgat gatgttcttg tcctccatct cccaaatacac 60
- [2409] ga 62
- [2410] <210> 169
- [2411] <211> 62
- [2412] <212> DNA
- [2413] <213> 人工序列
- [2414] <220>
- [2415] <223> 合成的
- [2416] <400> 169
- [2417] ttcgtgcacg gcgaagagga cctggccgtg cagcacagca gctacaggca gagggccaga 60
- [2418] ct 62
- [2419] <210> 170
- [2420] <211> 62
- [2421] <212> DNA
- [2422] <213> 人工序列
- [2423] <220>
- [2424] <223> 合成的
- [2425] <400> 170
- [2426] ctgcctgttag ctgctgtgct gcacggccag gtcctttcg ccgtgcacga actggatgat 60
- [2427] gt 62
- [2428] <210> 171
- [2429] <211> 62
- [2430] <212> DNA
- [2431] <213> 人工序列
- [2432] <220>
- [2433] <223> 合成的
- [2434] <400> 171
- [2435] ctgaagggtgc agcacagcag ctacgcccag agggccagac tgctgaagga ccagctgtct 60

- [2436] ct 62  
[2437] <210> 172  
[2438] <211> 62  
[2439] <212> DNA  
[2440] <213> 人工序列  
[2441] <220>  
[2442] <223> 合成的  
[2443] <400> 172  
[2444] gtccttcagc agtctggccc tctggcgta gctgctgtgc tgcacccca ggtcctcttc 60  
[2445] gc 62  
[2446] <210> 173  
[2447] <211> 62  
[2448] <212> DNA  
[2449] <213> 人工序列  
[2450] <220>  
[2451] <223> 合成的  
[2452] <400> 173  
[2453] aagctgcagg acgcaggagt ctacgcctgc atgatcagct acggcggagc cgactacaag 60  
[2454] ag 62  
[2455] <210> 174  
[2456] <211> 62  
[2457] <212> DNA  
[2458] <213> 人工序列  
[2459] <220>  
[2460] <223> 合成的  
[2461] <400> 174  
[2462] ggctccgcg tagctgatca tgcaggcgta gactcctgcg tcctgcagct tcacgtcgg 60  
[2463] ga 62  
[2464] <210> 175  
[2465] <211> 62  
[2466] <212> DNA  
[2467] <213> 人工序列  
[2468] <220>  
[2469] <223> 合成的  
[2470] <400> 175  
[2471] caggacgcag gagtctaccg ctgcgccatc agctacggcg gagccgacta caagaggatc 60  
[2472] ac 62  
[2473] <210> 176  
[2474] <211> 62  
[2475] <212> DNA  
[2476] <213> 人工序列  
[2477] <220>

- [2478] <223> 合成的  
[2479] <400> 176  
[2480] gtagtcggct ccgcccgttagc ttagatggcgca gcggtagact cctgcgtcct gcagcttcac 60  
[2481] gt 62  
[2482] <210> 177  
[2483] <211> 62  
[2484] <212> DNA  
[2485] <213> 人工序列  
[2486] <220>  
[2487] <223> 合成的  
[2488] <400> 177  
[2489] gcaggaggatct accgctgtcat gatgcctac ggccggagccg actacaagag gatcaccgtg 60  
[2490] aa 62  
[2491] <210> 178  
[2492] <211> 62  
[2493] <212> DNA  
[2494] <213> 人工序列  
[2495] <220>  
[2496] <223> 合成的  
[2497] <400> 178  
[2498] cctctttag tcggctccgc cgttaggcgtat ggccgcagg tagactcctg cgtcctgcag 60  
[2499] ct 62  
[2500] <210> 179  
[2501] <211> 62  
[2502] <212> DNA  
[2503] <213> 人工序列  
[2504] <220>  
[2505] <223> 合成的  
[2506] <400> 179  
[2507] cgctgcgtatga tcagctacgg cgaaagcgac tacaagagggat tcaccgtgaa ggtcaacgccc 60  
[2508] cc 62  
[2509] <210> 180  
[2510] <211> 62  
[2511] <212> DNA  
[2512] <213> 人工序列  
[2513] <220>  
[2514] <223> 合成的  
[2515] <400> 180  
[2516] cttcacgggtg atcctttgtt agtcgttcc gccgttagctg atggcgccgc ggttagactcc 60  
[2517] tg 62  
[2518] <210> 181  
[2519] <211> 62

- [2520] <212> DNA
- [2521] <213> 人工序列
- [2522] <220>
- [2523] <223> 合成的
- [2524] <400> 181
- [2525] tgcatgatca gctacggcgg agccgcctac aagaggatca ccgtgaaggt caacgcccc 60
- [2526] ta 62
- [2527] <210> 182
- [2528] <211> 62
- [2529] <212> DNA
- [2530] <213> 人工序列
- [2531] <220>
- [2532] <223> 合成的
- [2533] <400> 182
- [2534] gaccctcacg gtgatccctct ttaggcggc tccgcgttag ctgatggcgc agcggttagac 60
- [2535] tc 62
- [2536] <210> 183
- [2537] <211> 62
- [2538] <212> DNA
- [2539] <213> 人工序列
- [2540] <220>
- [2541] <223> 合成的
- [2542] <400> 183
- [2543] atgatcagct acggcggagc cgacgccaag aggatcaccc tgaaggtcaa cgccccctac 60
- [2544] aa 62
- [2545] <210> 184
- [2546] <211> 62
- [2547] <212> DNA
- [2548] <213> 人工序列
- [2549] <220>
- [2550] <223> 合成的
- [2551] <400> 184
- [2552] gttgaccttc acggtgatcc tctggcgtc ggctccgccc tagctgtatgg cgcagcggta 60
- [2553] ga 62
- [2554] <210> 185
- [2555] <211> 62
- [2556] <212> DNA
- [2557] <213> 人工序列
- [2558] <220>
- [2559] <223> 合成的
- [2560] <400> 185
- [2561] atcagctacg gcgagccga ctacgccagg atcaccgtga aggtcaacgc cccctacaac 60

- [2562] aa 62  
[2563] <210> 186  
[2564] <211> 62  
[2565] <212> DNA  
[2566] <213> 人工序列  
[2567] <220>  
[2568] <223> 合成的  
[2569] <400> 186  
[2570] ggcgttacc ttcacggta tcctggcgta gtcggctccg ccgtagctga tggcgcagcg 60  
[2571] gt 62  
[2572] <210> 187  
[2573] <211> 62  
[2574] <212> DNA  
[2575] <213> 人工序列  
[2576] <220>  
[2577] <223> 合成的  
[2578] <400> 187  
[2579] agctacggcg gagccgacta caaggccatc accgtgaagg tcaacgcccc ctacaacaag 60  
[2580] at 62  
[2581] <210> 188  
[2582] <211> 62  
[2583] <212> DNA  
[2584] <213> 人工序列  
[2585] <220>  
[2586] <223> 合成的  
[2587] <400> 188  
[2588] gggggcgtt acttcacgg ttagtccctt ttagtcggct ccgcgttagc ttagtggcgca 60  
[2589] gc 62  
[2590] <210> 189  
[2591] <211> 119  
[2592] <212> PRT  
[2593] <213> 人工序列  
[2594] <220>  
[2595] <223> 合成的  
[2596] <400> 189  
[2597] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
[2598] 1 5 10 15  
[2599] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Tyr  
[2600] 20 25 30  
[2601] Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
[2602] 35 40 45  
[2603] Gly Met Ile Gln Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Asp Gln Phe

---

[2604]	50	55	60
[2605]	Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
[2606]	65	70	75
[2607]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[2608]		85	90
[2609]	Ala Arg Gly Ala Gly Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		95
[2610]		100	105
[2611]	Thr Thr Leu Ser Ile Ser Ser		110
[2612]		115	

杂交瘤上清液阻断hPD-L1-Fc与hPD-1-his的结合

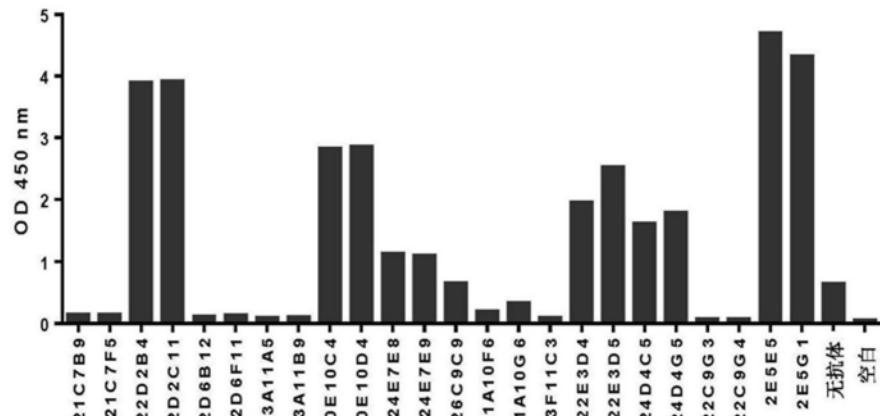


图1A

杂交瘤上清液阻断hPD-L1-Fc与hPD-1-his的结合

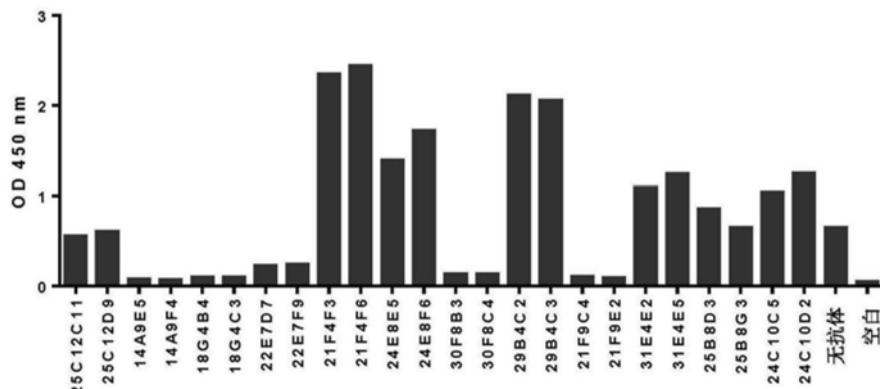


图1B

杂交瘤上清液阻断hPD-L1-Fc与hPD-1-his的结合

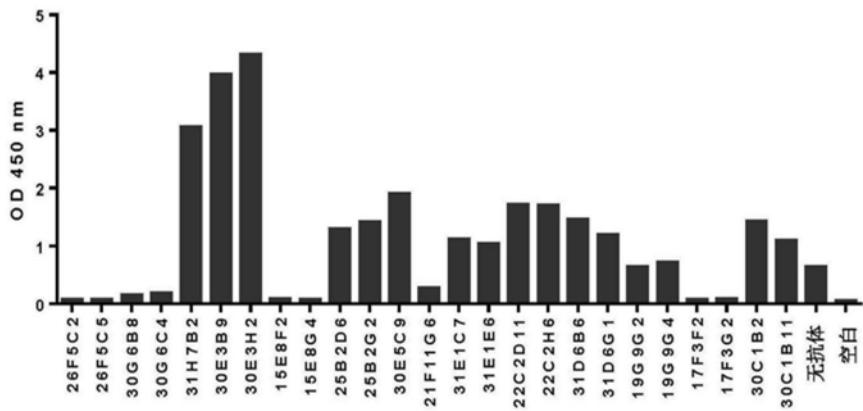


图1C

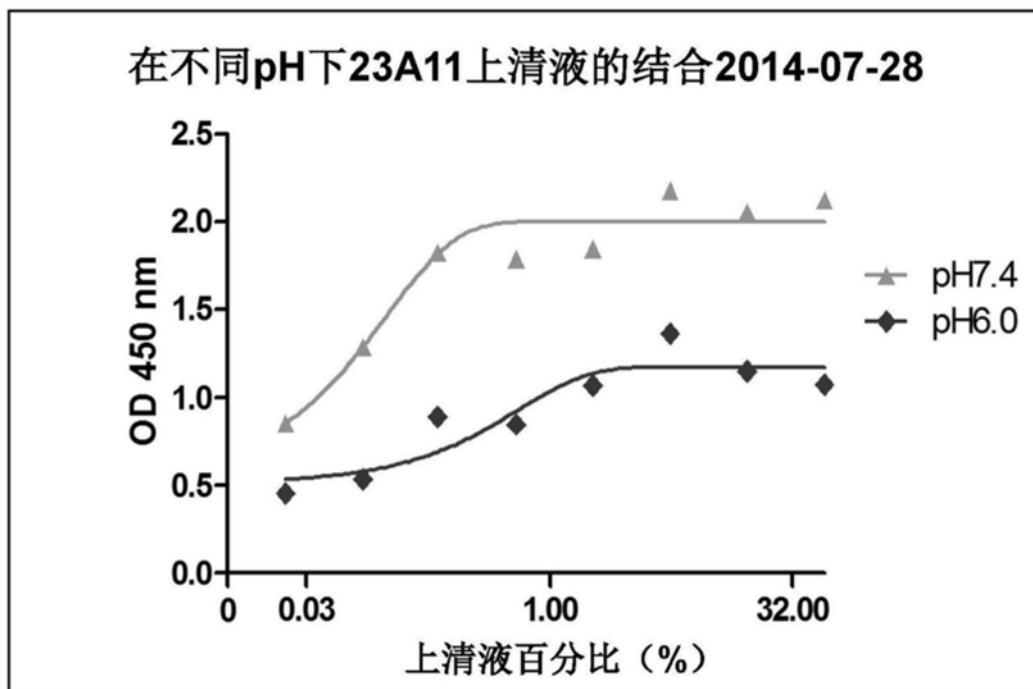


图2A

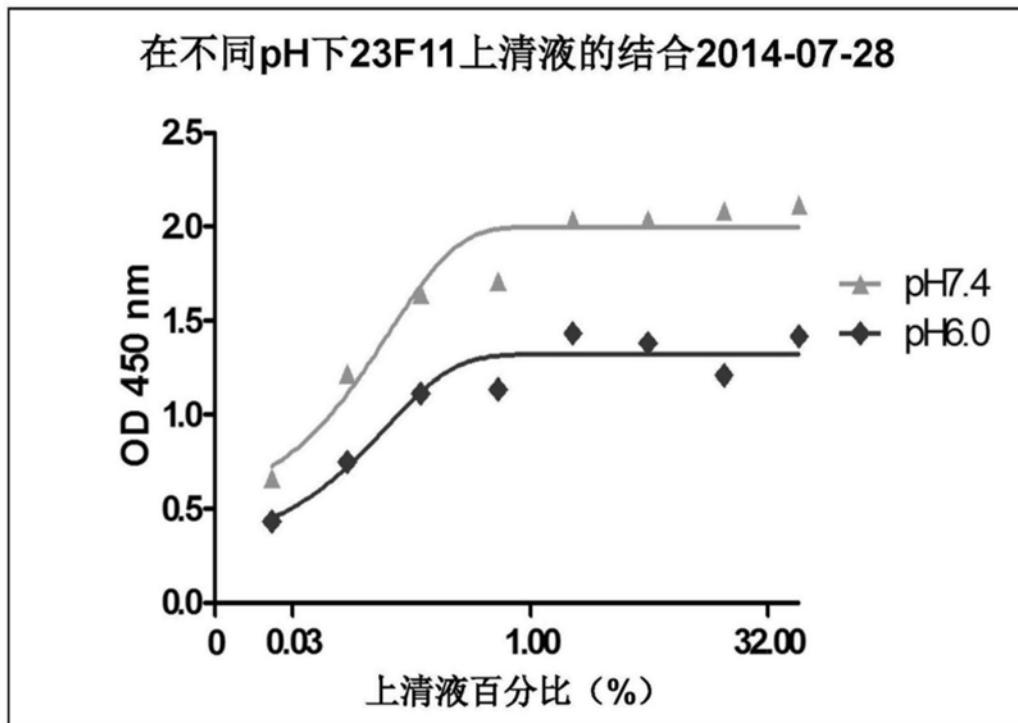


图2B

## 纯化的抗体与hPD-L1-his的结合

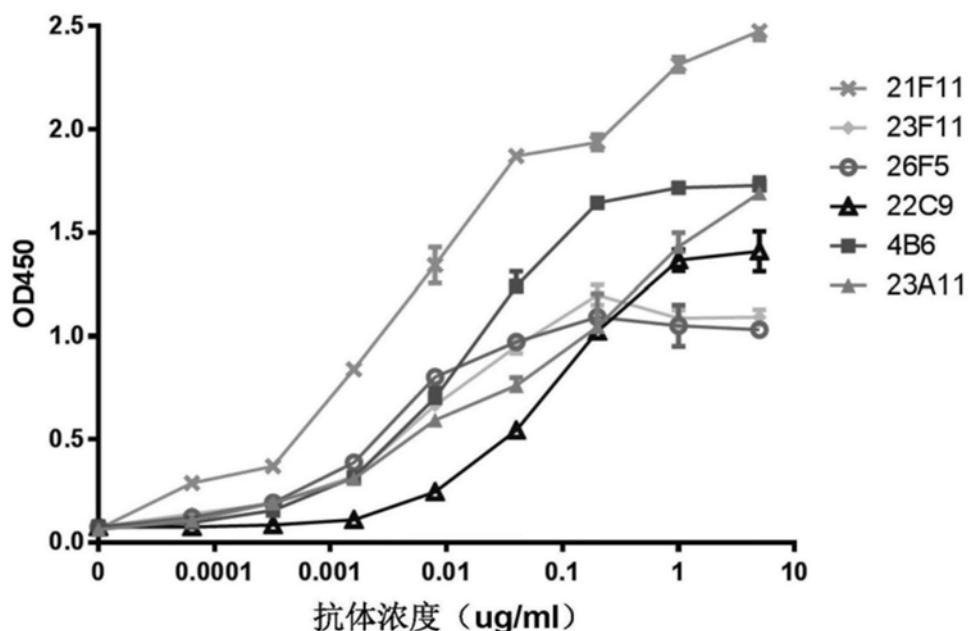


图3

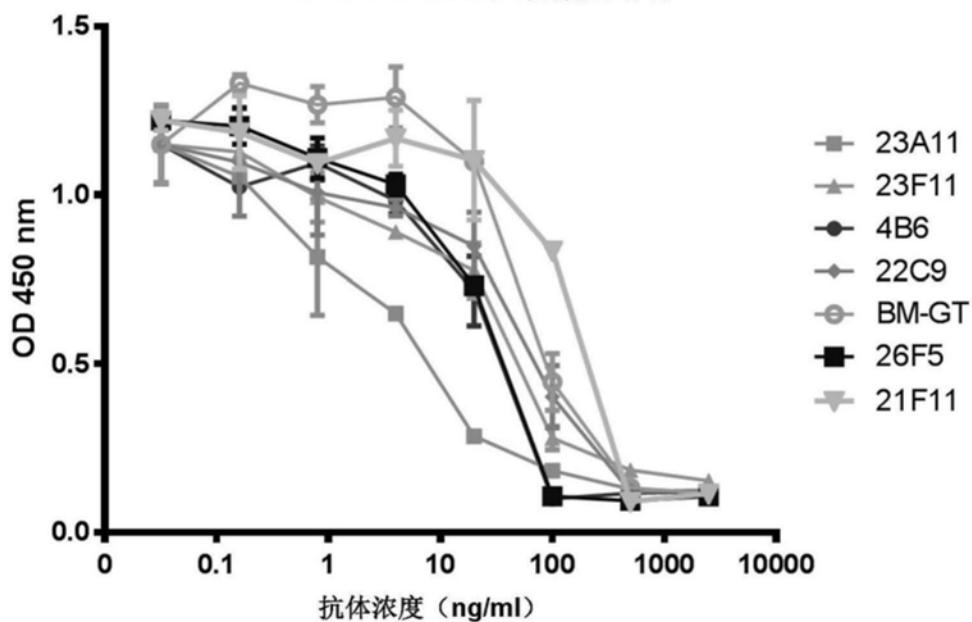
阻断hPD-L1-Fc与  
hPD-1-N297A-生物素的结合

图4A

## 10 ug/ml的抗体阻断hPD-1与HCC827

上的hPD-L1结合的活性

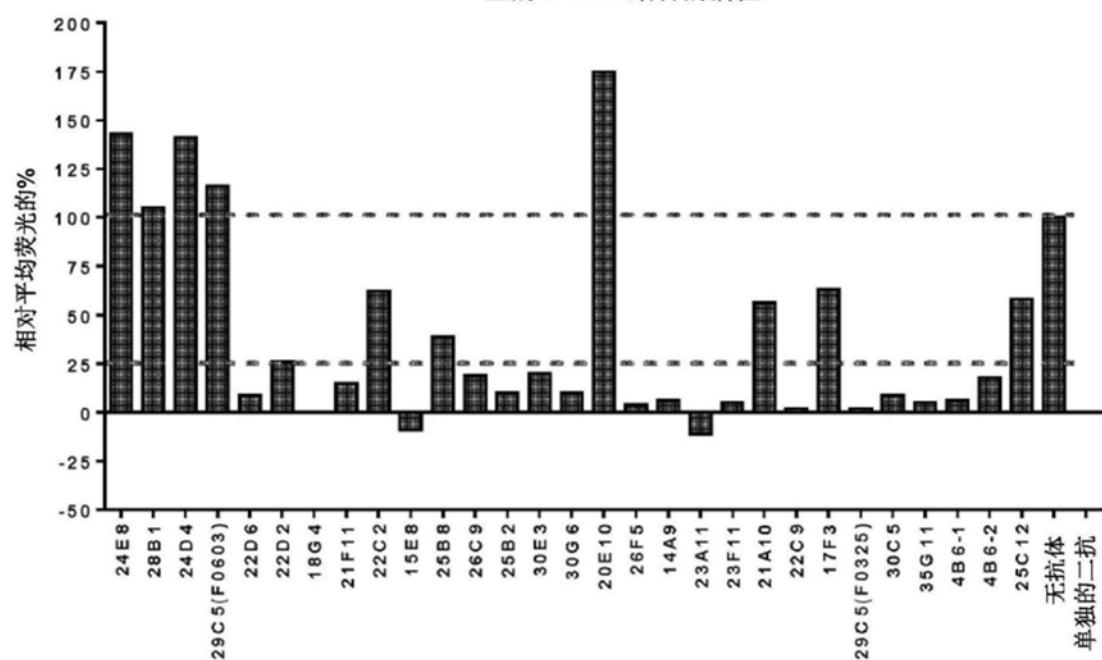


图4B

## PD-L1 抗体在HCC827细胞上的结合

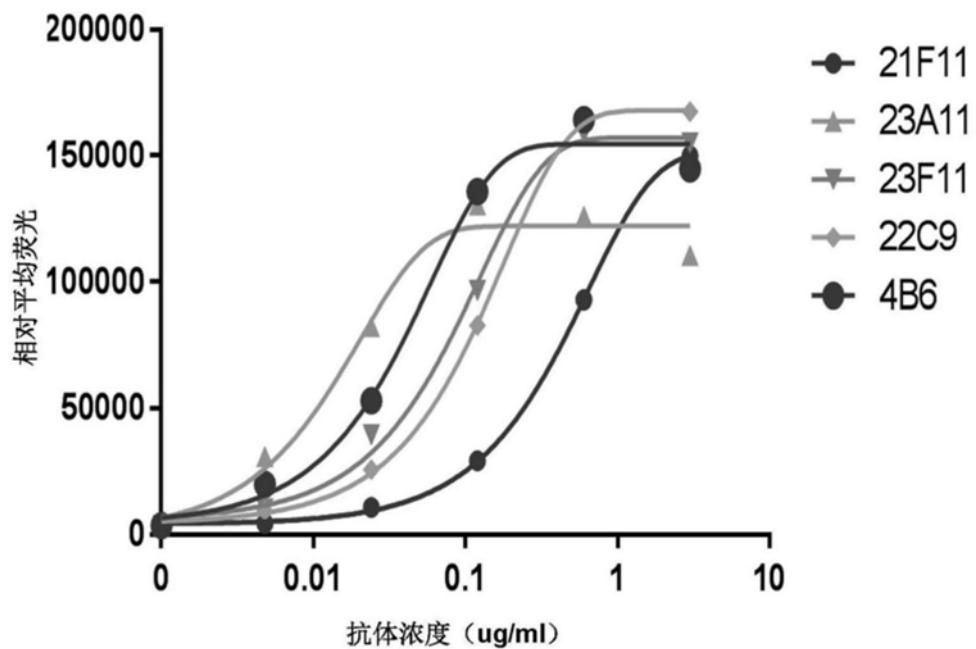


图5A

## 纯化的抗体在HCC827细胞上的阻断

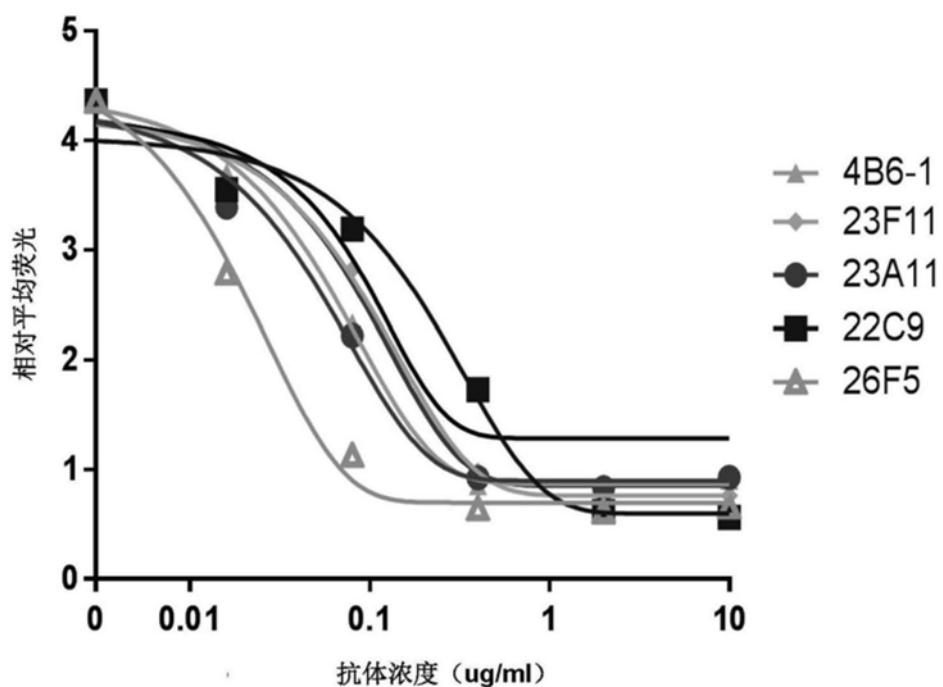


图5B

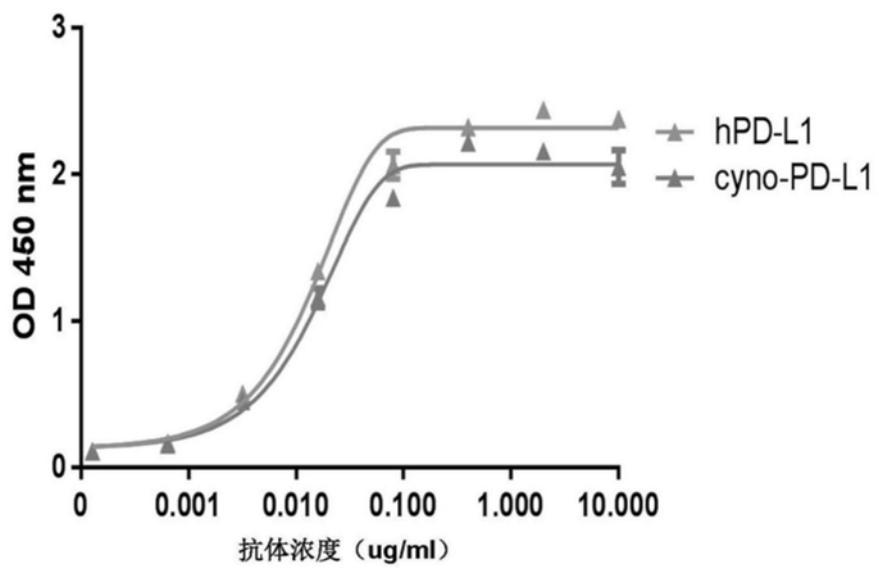
4B6-C与hPD-L1和cyno-PD-L1  
的结合

图6A

23A11与hPD-L1和cyno-PD-L1  
的结合

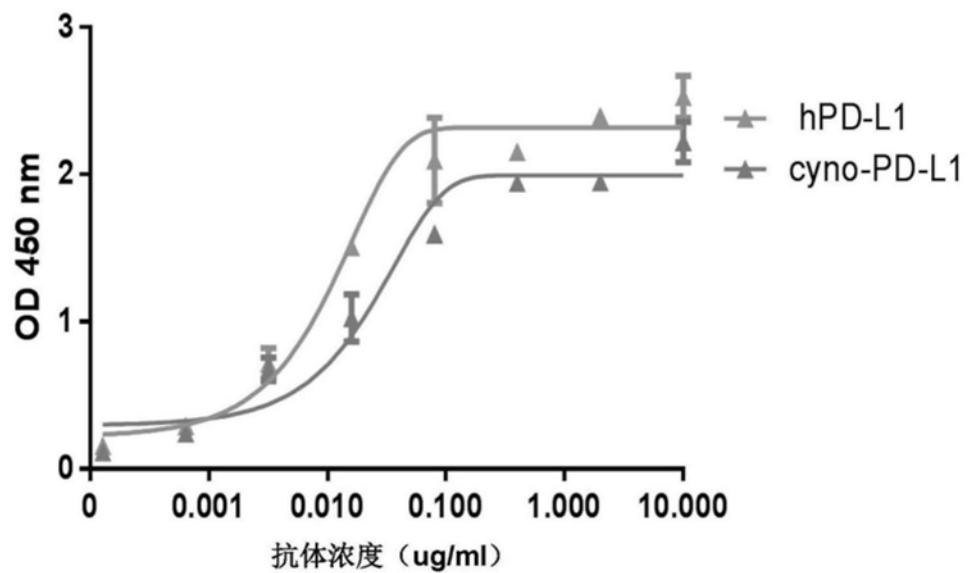


图6B

23F11与hPD-L1和cyno-PD-L1  
的结合

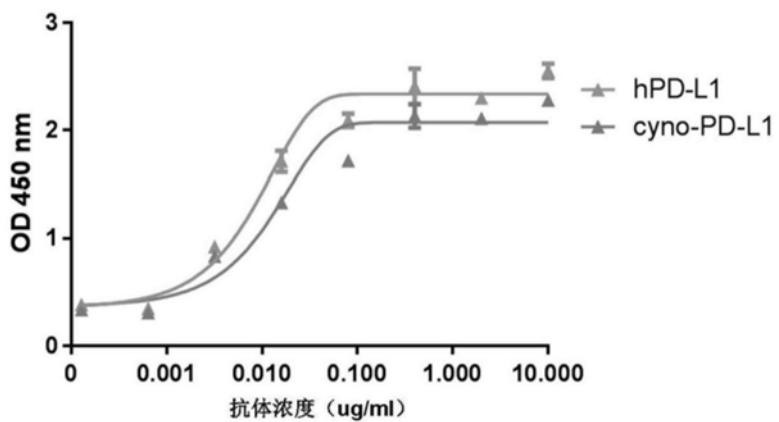


图6C

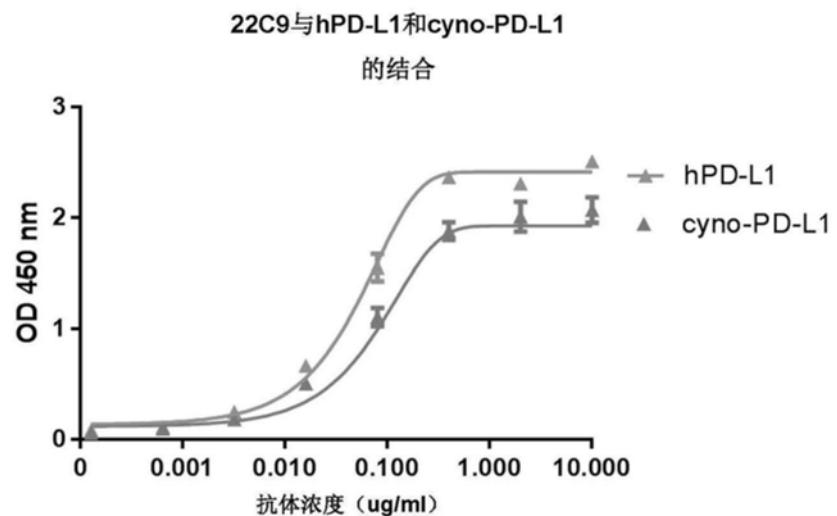


图6D

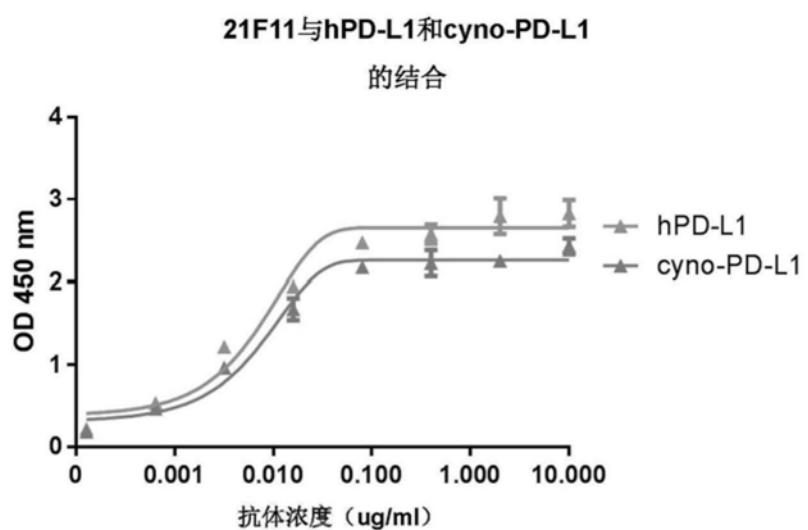


图6E

## PD-L1抗体与mPD-L1-Fc的结合

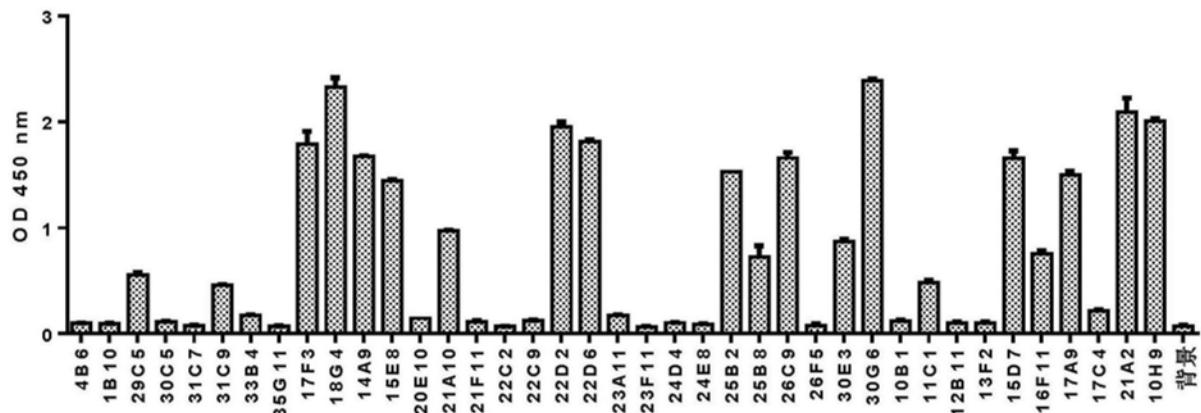


图6F

## PD-L1抗体与PD-L1和PD-L2的结合 2015-3-10

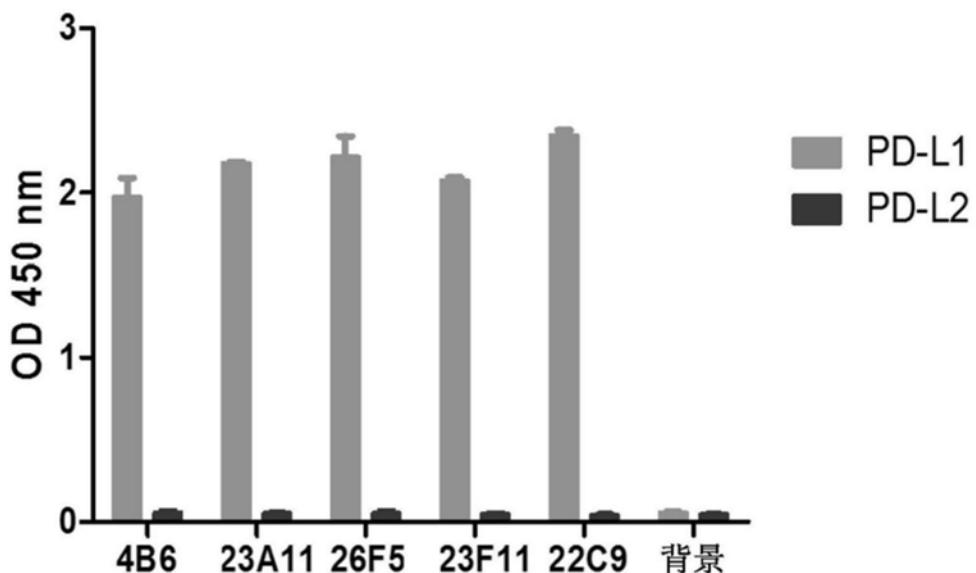


图6G

## 与HCC827上hPD-L1的结合

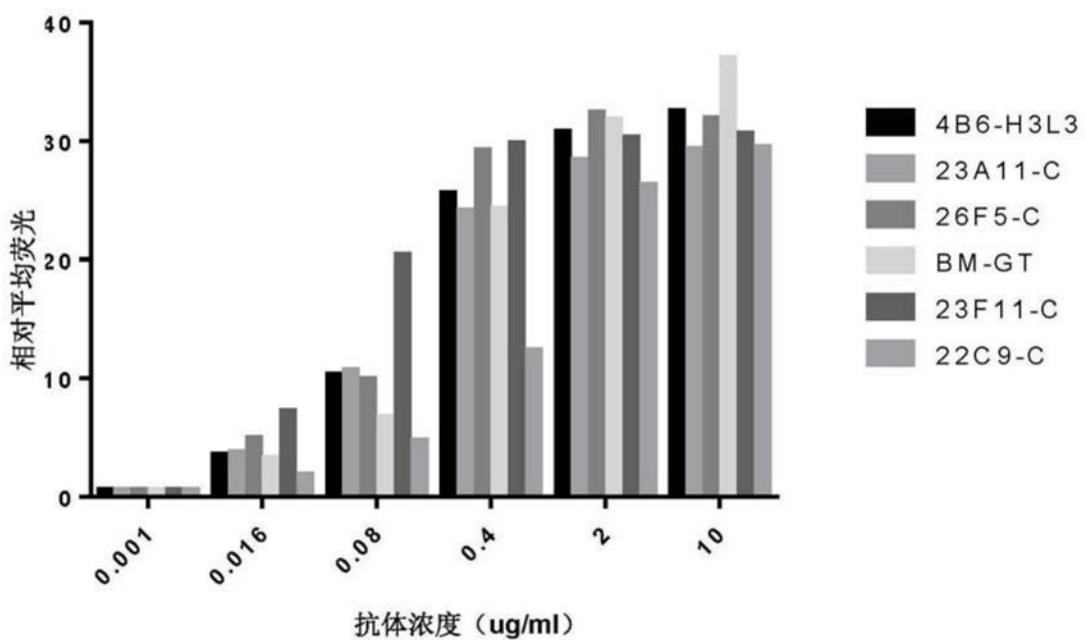


图7

## PD-1与HCC827的结合

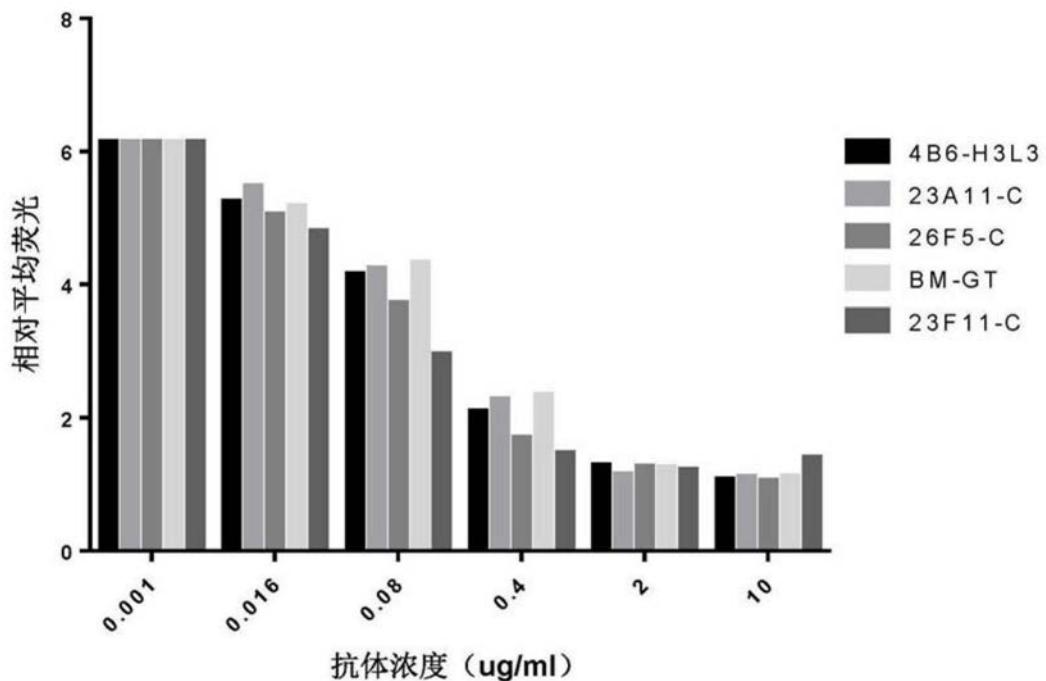


图8

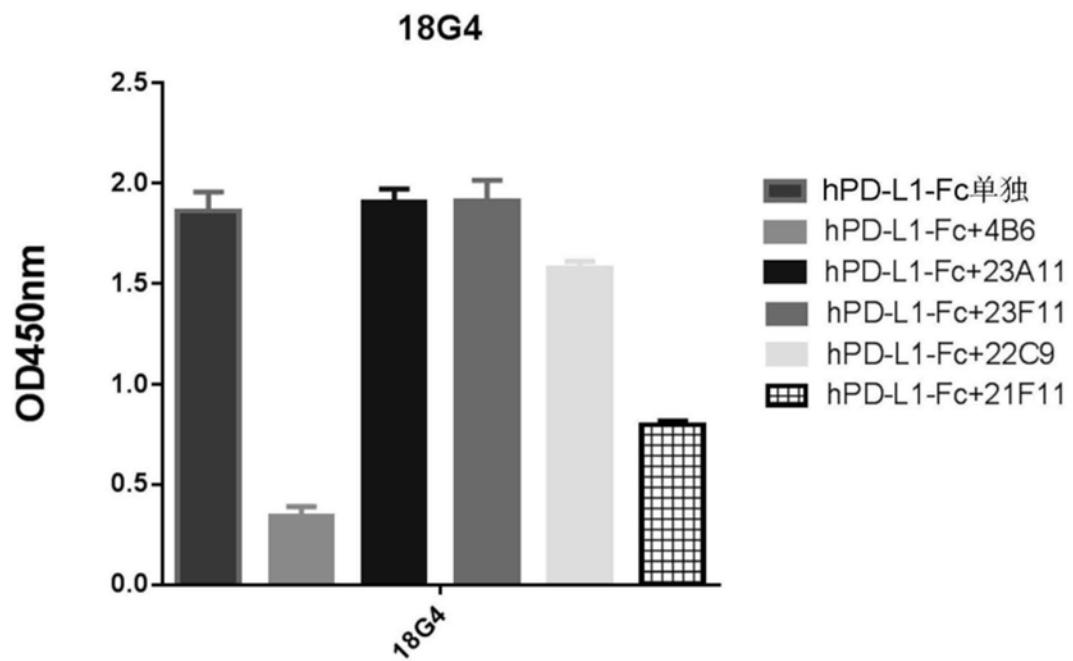


图9A

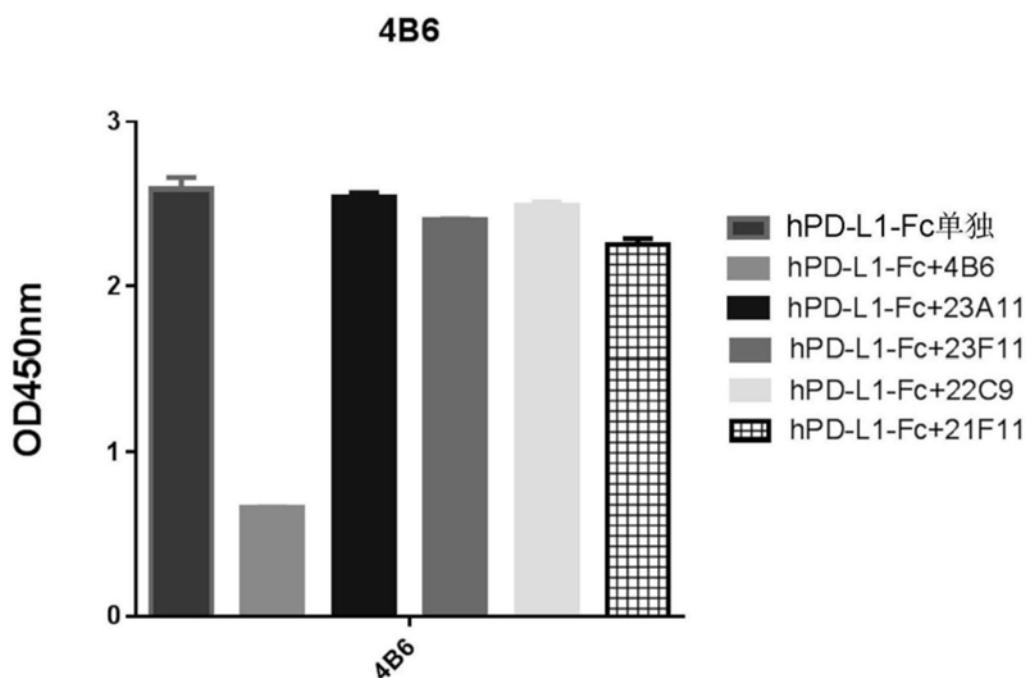


图9B

23A11

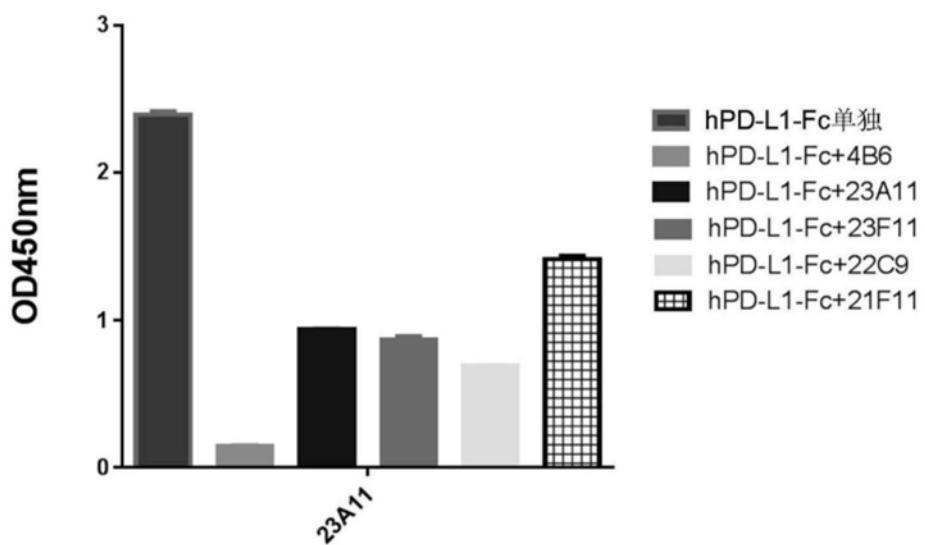


图9C

23F11-嵌合

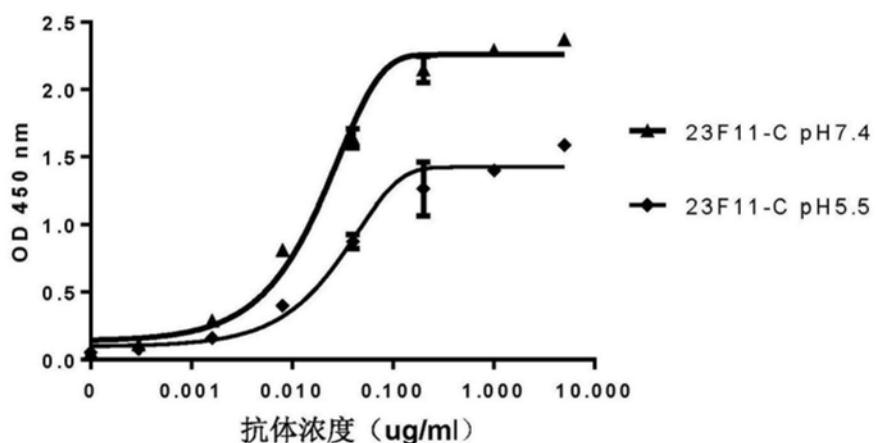


图10A

## 23A11-嵌合

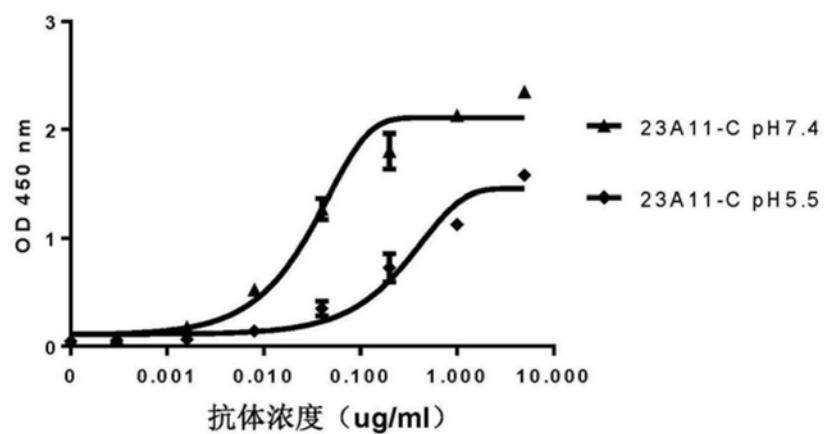


图10B

## 22C9-嵌合

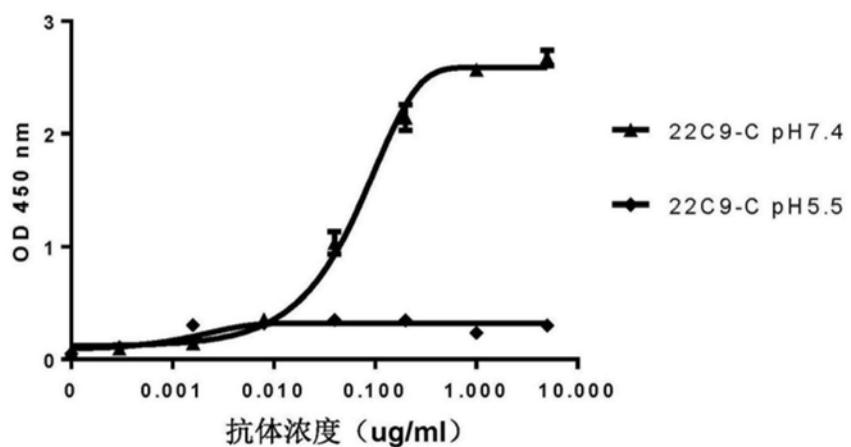


图10C

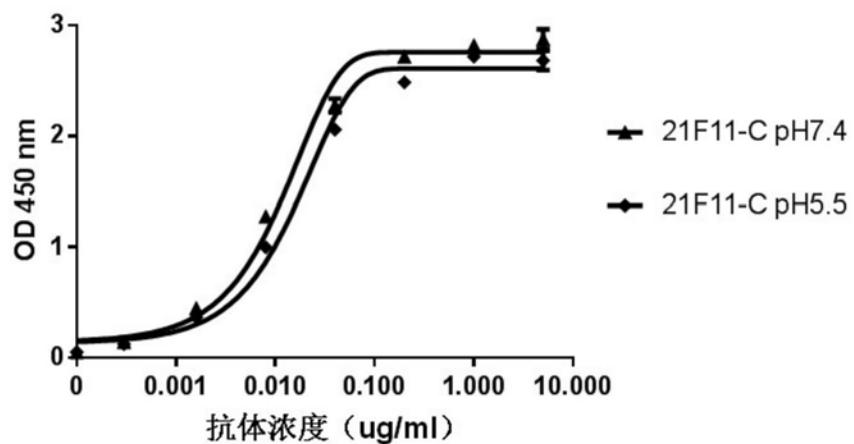
**21F11-嵌合**

图10D

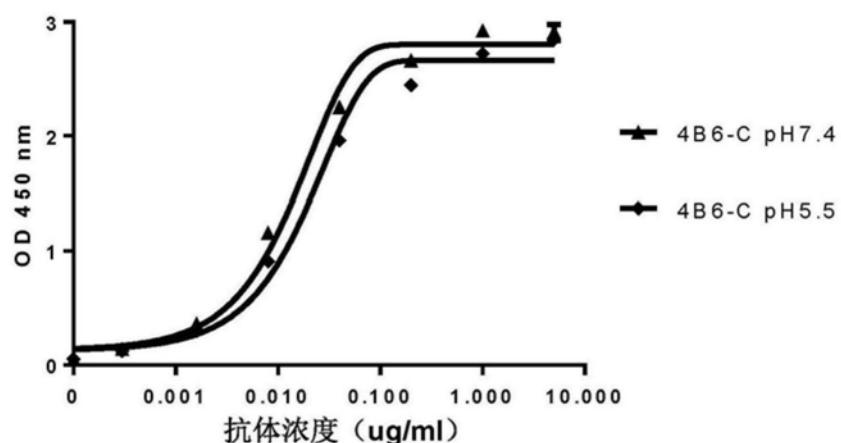
**4B6-嵌合**

图10E

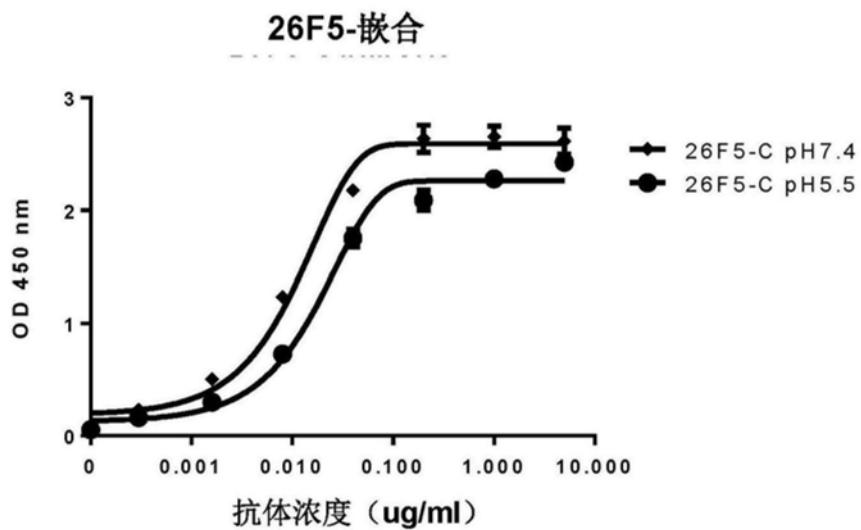


图10F

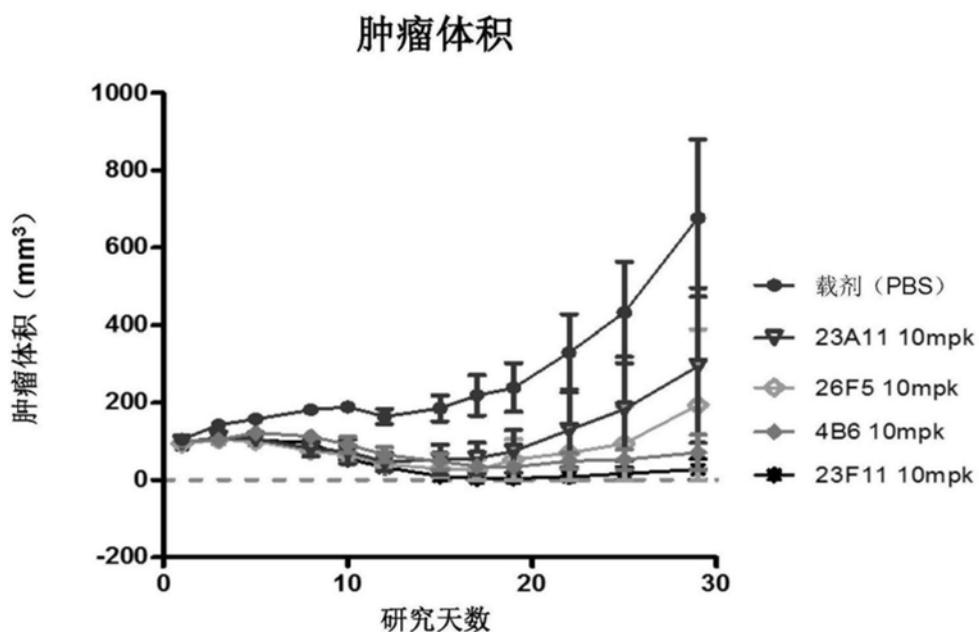


图11A

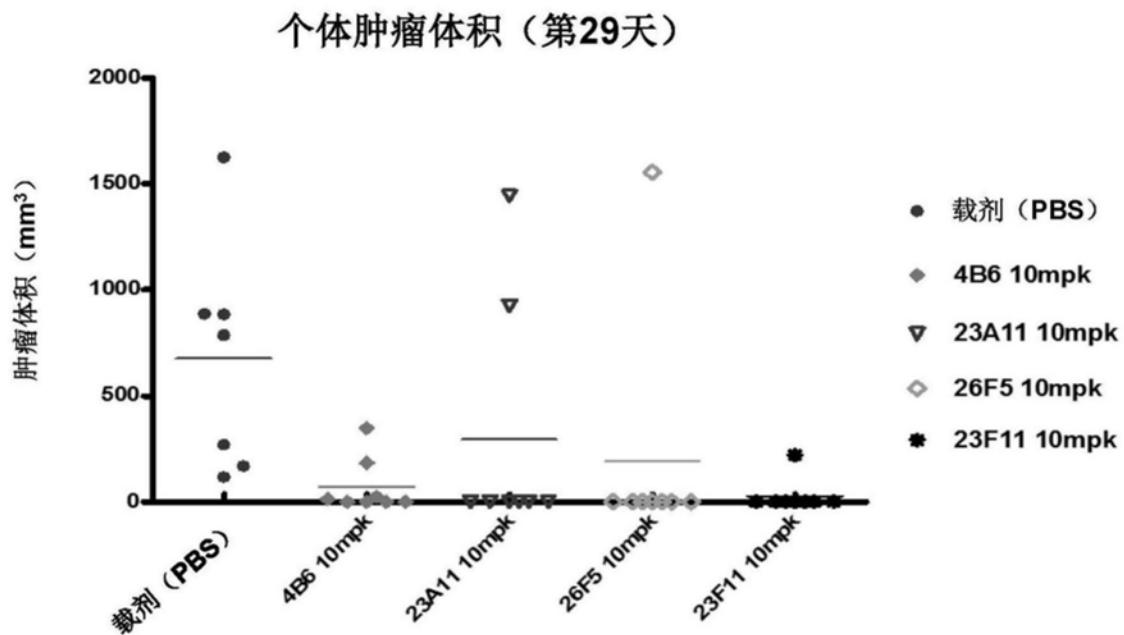


图11B

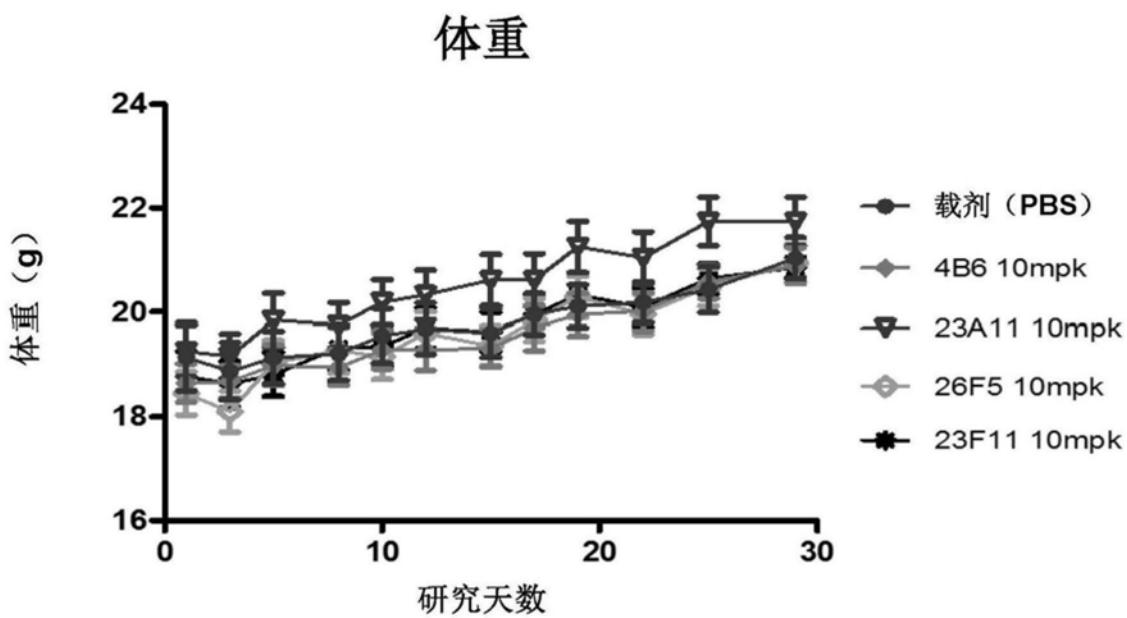


图11C

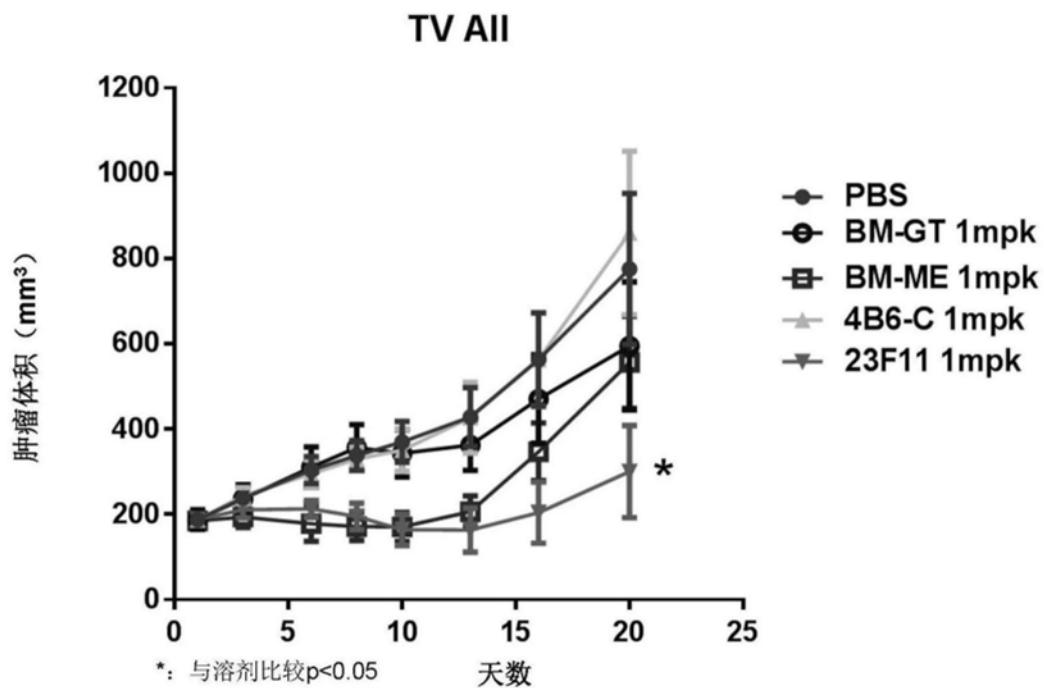


图12A

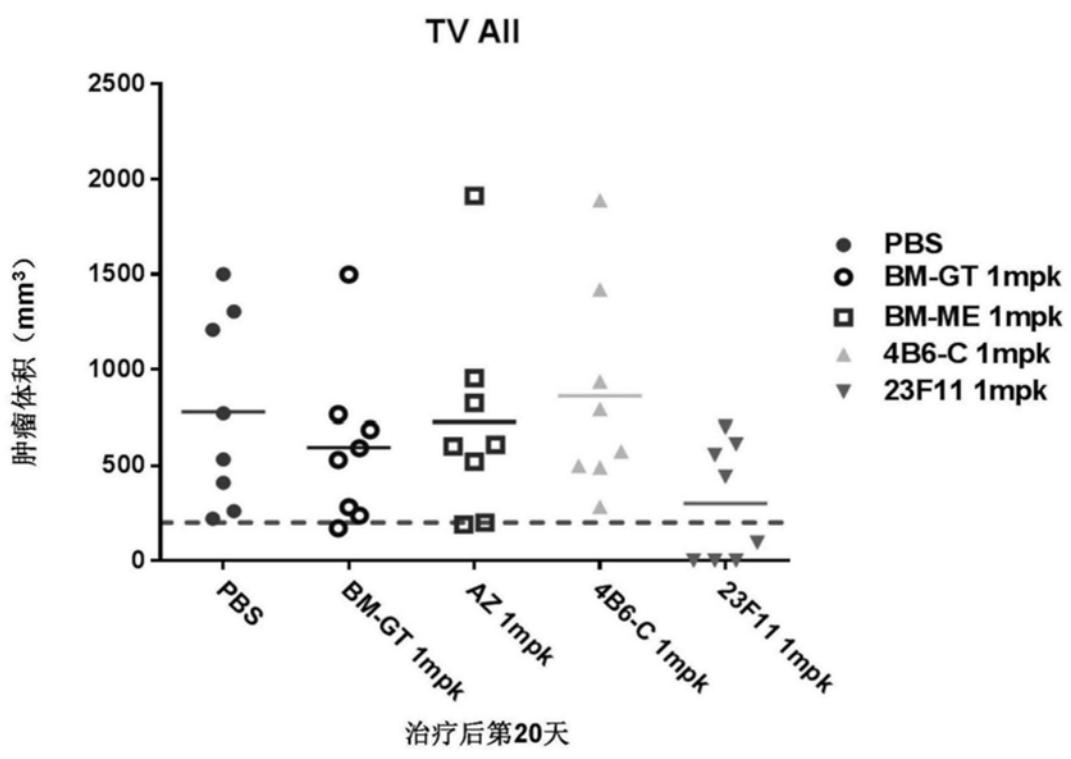


图12B

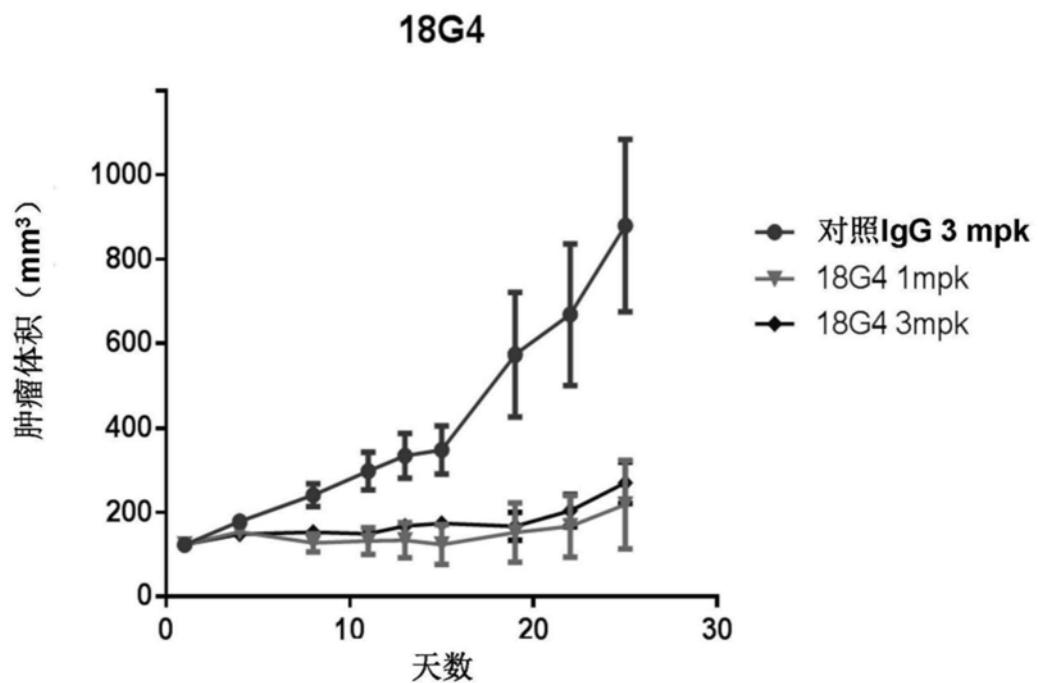


图12C

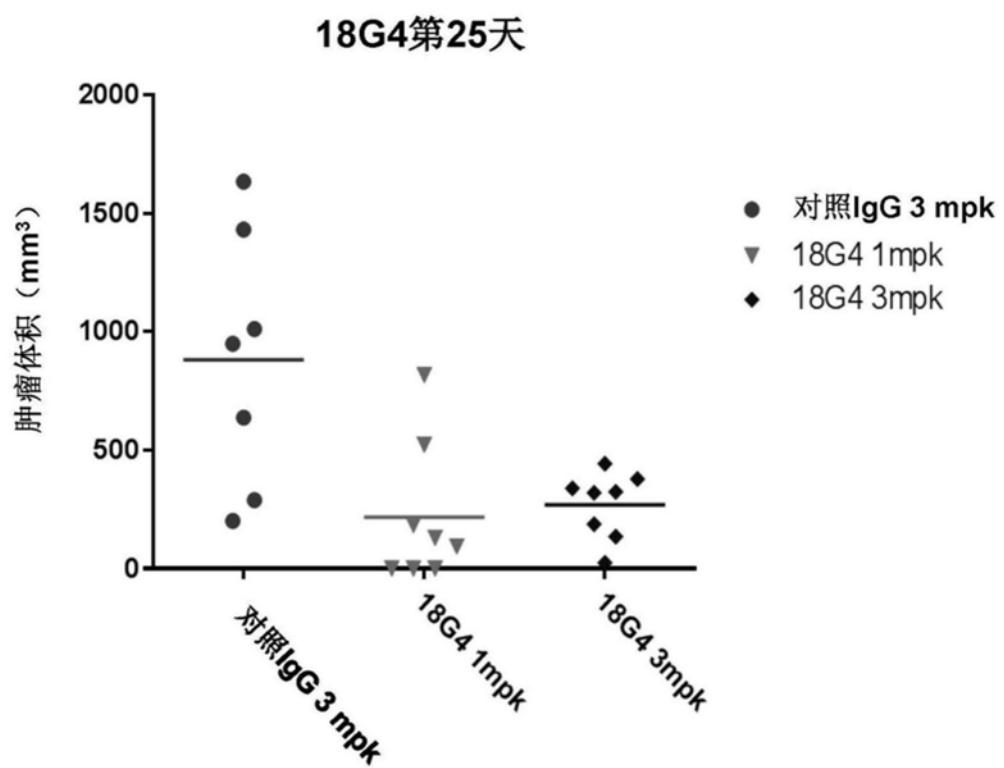


图12D

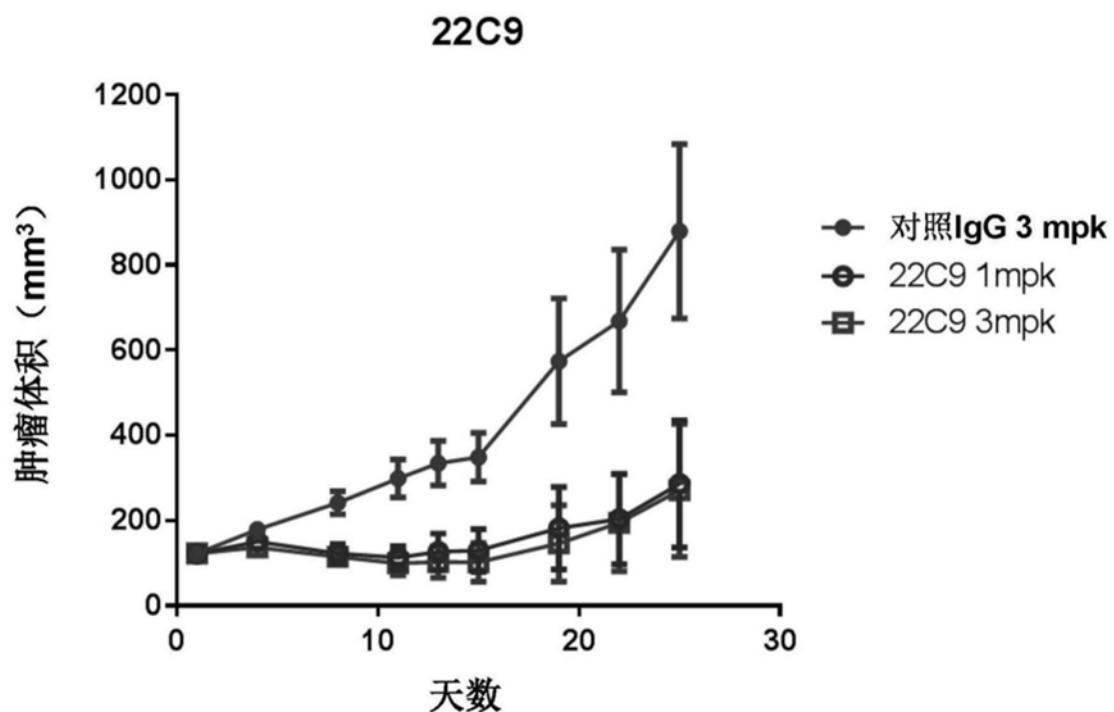


图12E

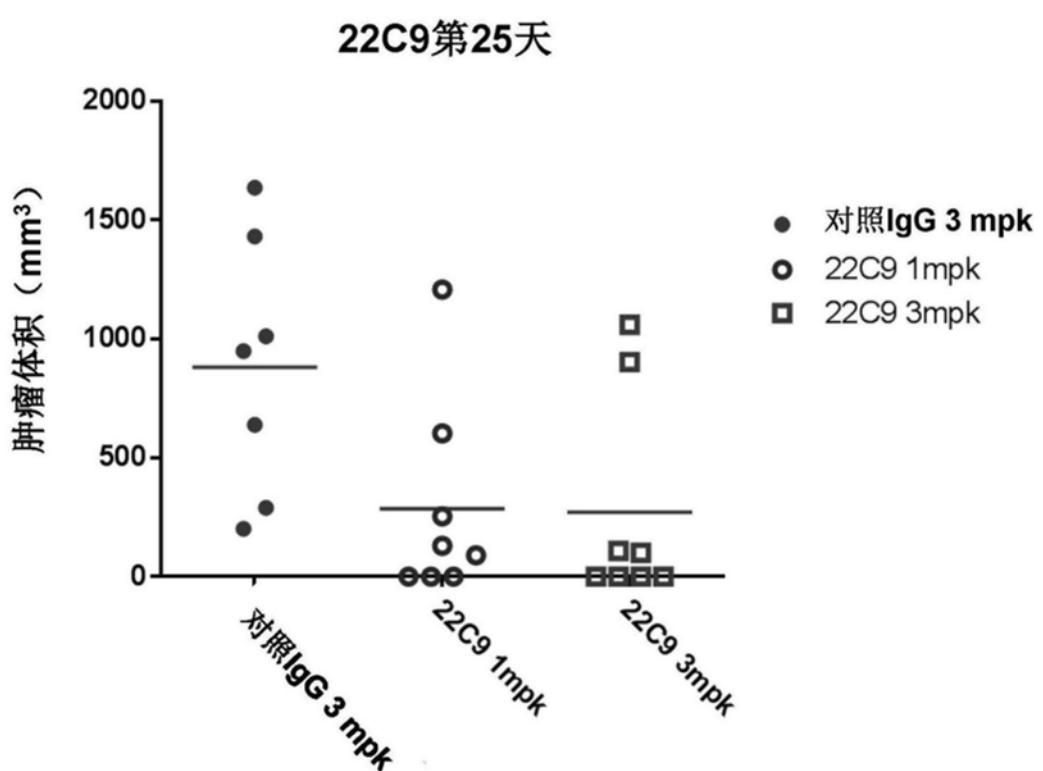
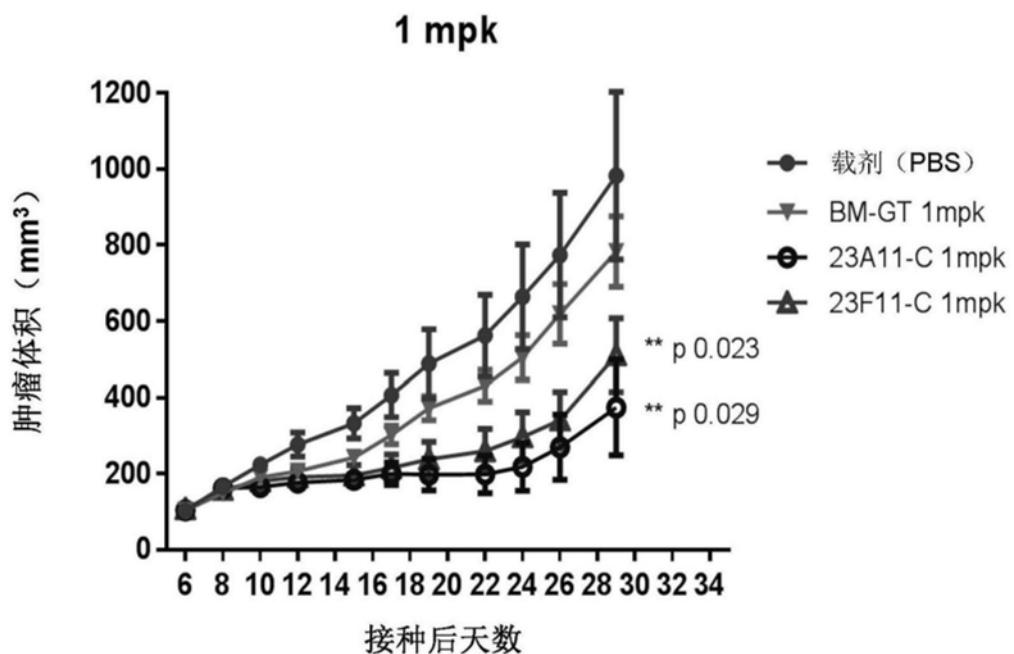


图12F



注：将接种日计为第1天

图13A

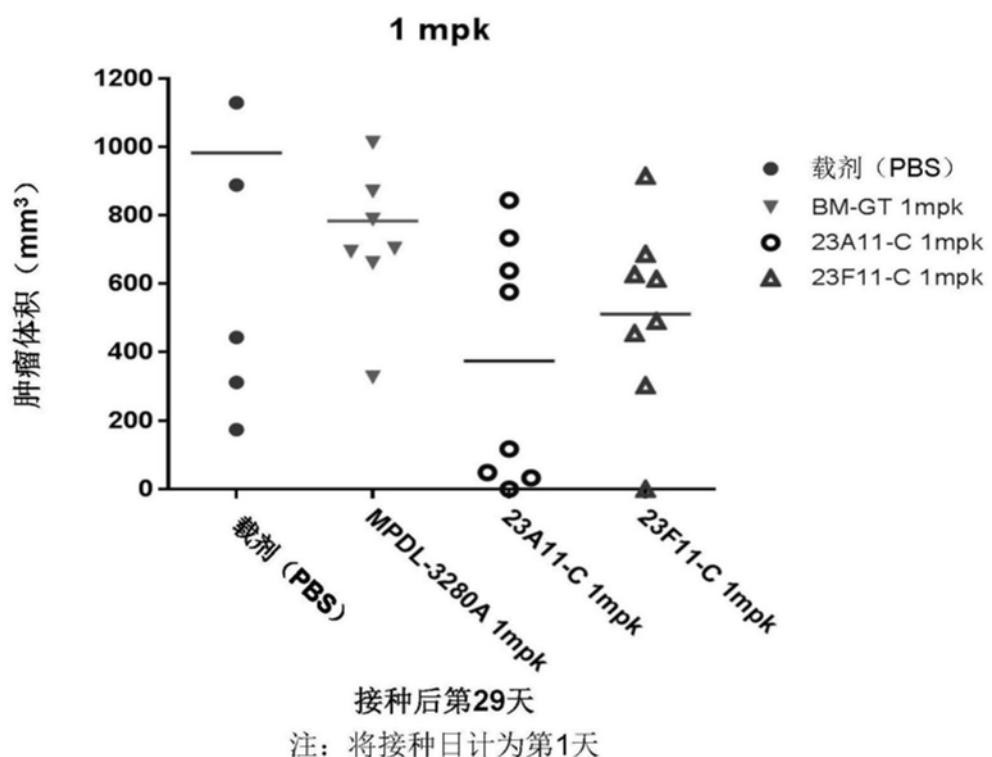


图13B

		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
SEQ ID NO: 87	4B6-4种系	1	QVQLVQSGAEVKKR	KGASVKKVSCASGVY	IFIGYTHWVRQAPGG	GLEMGWINNSGGIN	YAKFQGRVIM	TRDTISRTAYMELSR	RSDDTAVYVCAR	-----			
SEQ ID NO: 67	4B6-HC-V4	1	QVQLVQSGAEVKKR	KGASVKKVSCASGVY	IFIDYMWVRQAPGG	GLEMGDINNNGTSY	YQKFGGRVIVD	TRDTISRTAYMELSR	RSDDTAVYVCAR	-----			
SEQ ID NO: 65	4B6-HzD-HC-V3	1	QVQLVQSGAEVKKR	KGASVKKVSCASGVY	IFIDYNNWVRQAPGG	GLEMGDINNNGTSY	YQKFGGRATIVD	TRDTISRTAYMELSR	RSDDTAVYVCAR	-----			

图14A

SEQ ID NO: 88	4B6-LC-种系	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
SEQ ID NO: 68	4B6-LC-V4	1	DIQLQSPSSLSASVGDRTVITICASQESSALMYQCKPGRAPKLLIDASILESGPSRESGSGSGIDFTLIISSLQPEDFATYCOFNNYV-----									
SEQ ID NO: 66	4B6-Hzd-LC-V3	1	DIQMfqSPSSLSASVGDRTVITICASQNSVGAAVWYQCKPGRAPKLLIYASASNLVYIGPSRSFSGSGIDFTLIISSLQPEDIATIFCQYSNTFGSSTKLGIK-----									
SEQ ID NO: 66	4B6-Hzd-LC-V3	1	DIQMfqSQSSLSASVGDRTVITICASQNSVGAAVWYQCKPGRAPKLLIYASASNLVYIGPSRSFSGSGIDFTLIISSMQPEDIAIYFCQYSNTFGSSTKLGIK-----									

图14B

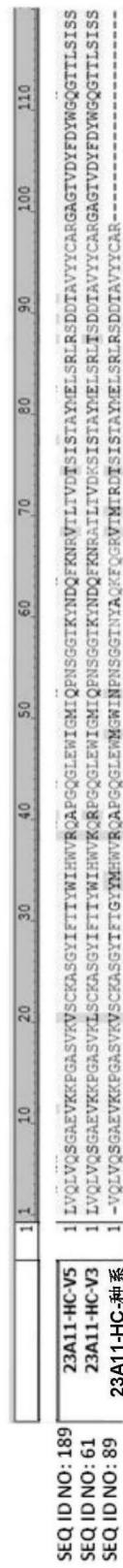


图15A

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
23A11-LC-V3	1	DIVITQSPASLAVS <span style="color: red;">V</span> Q <span style="color: red;">A</span> TTIC <span style="color: red;">T</span> CA <span style="color: red;">S</span> E <span style="color: red;">T</span> DIY <span style="color: red;">Y</span> GS <span style="color: red;">N</span> SE <span style="color: red;">M</span> WY <span style="color: red;">Q</span> RF <span style="color: red;">P</span> Q <span style="color: red;">S</span> E <span style="color: red;">K</span> LL <span style="color: red;">I</span> Y <span style="color: red;">R</span> AS <span style="color: red;">N</span> LE <span style="color: red;">S</span> G <span style="color: red;">P</span> AR <span style="color: red;">F</span> GS <span style="color: red;">S</span> RT <span style="color: red;">D</span> FT <span style="color: red;">I</span> LT <span style="color: red;">I</span> NE <span style="color: red;">V</span> AN <span style="color: red;">D</span> AT <span style="color: red;">Y</span> CH <span style="color: red;">Q</span> ND <span style="color: red;">D</span> P <span style="color: red;">T</span> FG <span style="color: red;">G</span> ST <span style="color: red;">K</span> LE <span style="color: red;">K</span>										
23A11-LC-V5	1	DIVITQSPASLAVS <span style="color: red;">V</span> Q <span style="color: red;">A</span> TTIC <span style="color: red;">T</span> CA <span style="color: red;">S</span> E <span style="color: red;">T</span> DIY <span style="color: red;">Y</span> GS <span style="color: red;">N</span> SE <span style="color: red;">M</span> WY <span style="color: red;">Q</span> RF <span style="color: red;">P</span> Q <span style="color: red;">S</span> E <span style="color: red;">K</span> LL <span style="color: red;">I</span> Y <span style="color: red;">R</span> AS <span style="color: red;">N</span> LE <span style="color: red;">S</span> G <span style="color: red;">P</span> AR <span style="color: red;">F</span> GS <span style="color: red;">S</span> RT <span style="color: red;">D</span> FT <span style="color: red;">I</span> LT <span style="color: red;">I</span> NE <span style="color: red;">V</span> AN <span style="color: red;">D</span> AT <span style="color: red;">Y</span> CH <span style="color: red;">Q</span> ND <span style="color: red;">D</span> P <span style="color: red;">T</span> FG <span style="color: red;">G</span> ST <span style="color: red;">K</span> LE <span style="color: red;">K</span>										
23A11-LC-种系	1	DIVITQSPASLAVS <span style="color: red;">V</span> Q <span style="color: red;">A</span> TTIC <span style="color: red;">T</span> CA <span style="color: red;">S</span> E <span style="color: red;">T</span> DIY <span style="color: red;">Y</span> GS <span style="color: red;">N</span> SE <span style="color: red;">M</span> WY <span style="color: red;">Q</span> RF <span style="color: red;">P</span> Q <span style="color: red;">S</span> E <span style="color: red;">K</span> LL <span style="color: red;">I</span> Y <span style="color: red;">R</span> AS <span style="color: red;">N</span> LE <span style="color: red;">S</span> G <span style="color: red;">P</span> AR <span style="color: red;">F</span> GS <span style="color: red;">S</span> RT <span style="color: red;">D</span> FT <span style="color: red;">I</span> LT <span style="color: red;">I</span> NE <span style="color: red;">V</span> AN <span style="color: red;">D</span> AT <span style="color: red;">Y</span> CH <span style="color: red;">Q</span> ND <span style="color: red;">D</span> P <span style="color: red;">T</span> FG <span style="color: red;">G</span> ST <span style="color: red;">K</span> LE <span style="color: red;">K</span>										

图15B

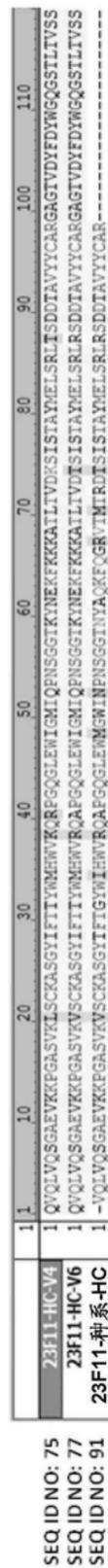


图16A

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
SEQ ID NO: 76	23F11-LC-V4	1	DIVITQSPASLAVSGRATITCRASESYDIYNSF	MYYQQRPQGPQPKLIVTRASNEESGIPARFSSGSR	IDEFTLITINPVEANDTATYYCQ	QSTEDPYT	FGGGT	KLEIK				
SEQ ID NO: 78	23F11-LC-V6	1	DIVITQSPASLAVSGRATITCRASESYDIYNSF	MYYQQRPQGPQPKLIVTRASNEESGIPARFSSGSR	IDEFTLITINPVEANDTATYYCQ	QSTEDPYT	FGGGT	KLEIK				
SEQ ID NO: 92	23F11-种系-LC	1	DIVITQSPASLAVSGRATITCRASESYDIYNSF	MYYQQRPQGPQPKLIVTRASNEESGIPARFSSGSR	IDEFTLITINPVEANDTATYYCQ	QSTEDPYT	FGGGT	KLEIK				

图16B

## 与hPD\_L1的结合

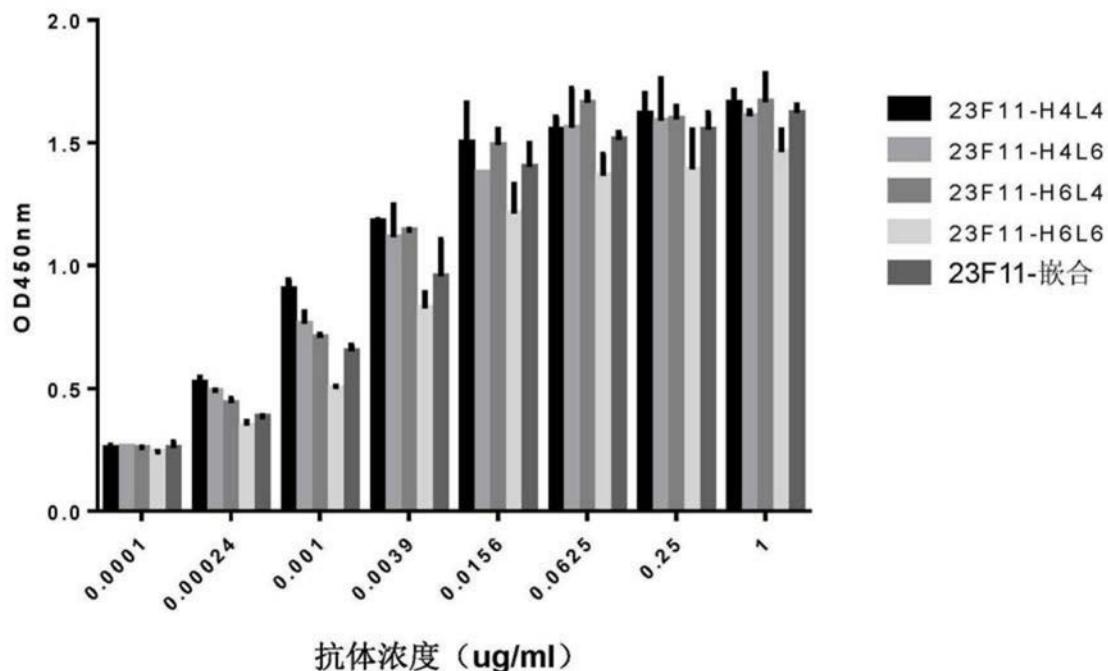


图17A

## 与hPD\_L1的结合

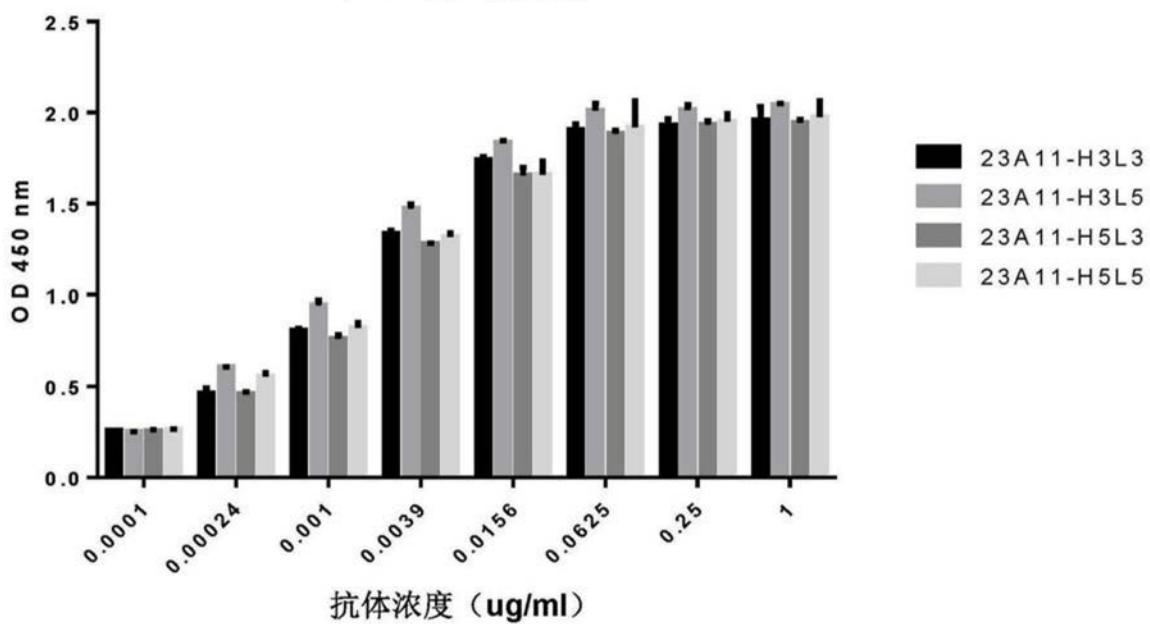


图17B

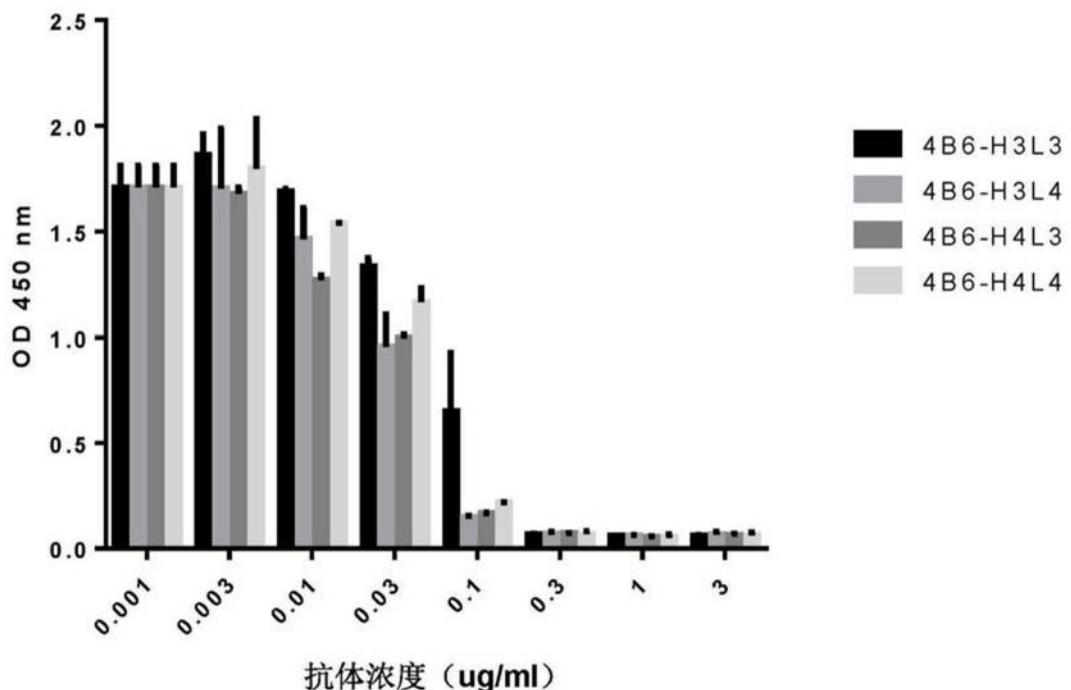
**hPD-L1-Fc与hPD-1-N297A-生物素的结合**

图18A

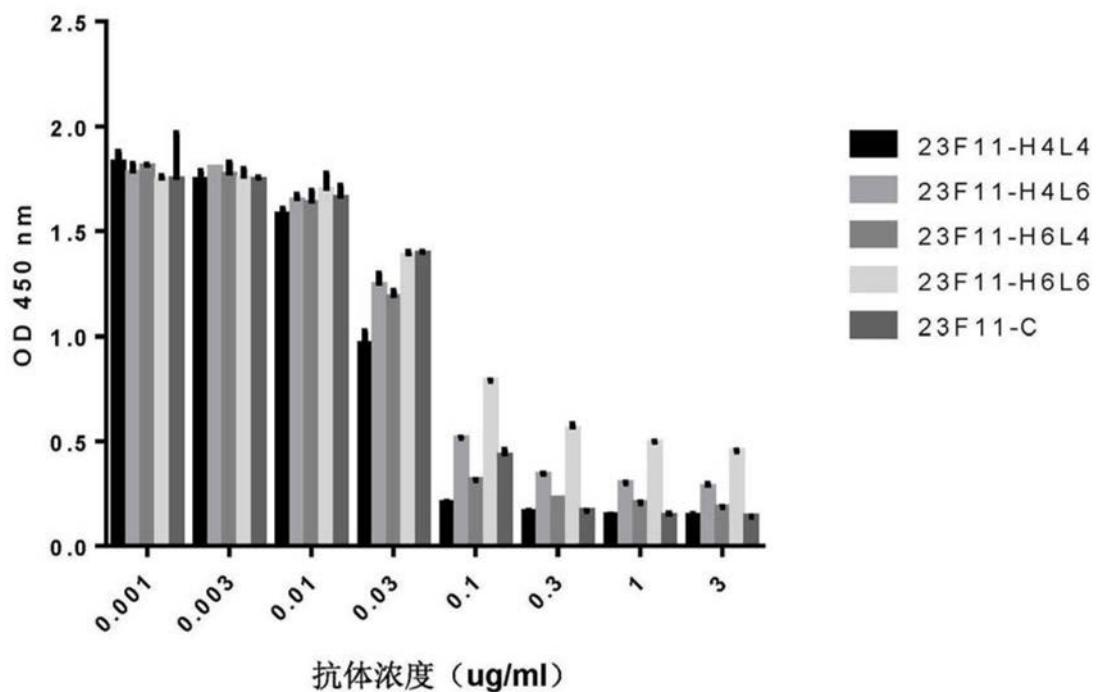
**hPD-L1-Fc与hPD-1-N297A-生物素的结合**

图18B

### hPD-L1-Fc与hPD-1-N297A-生物素的结合

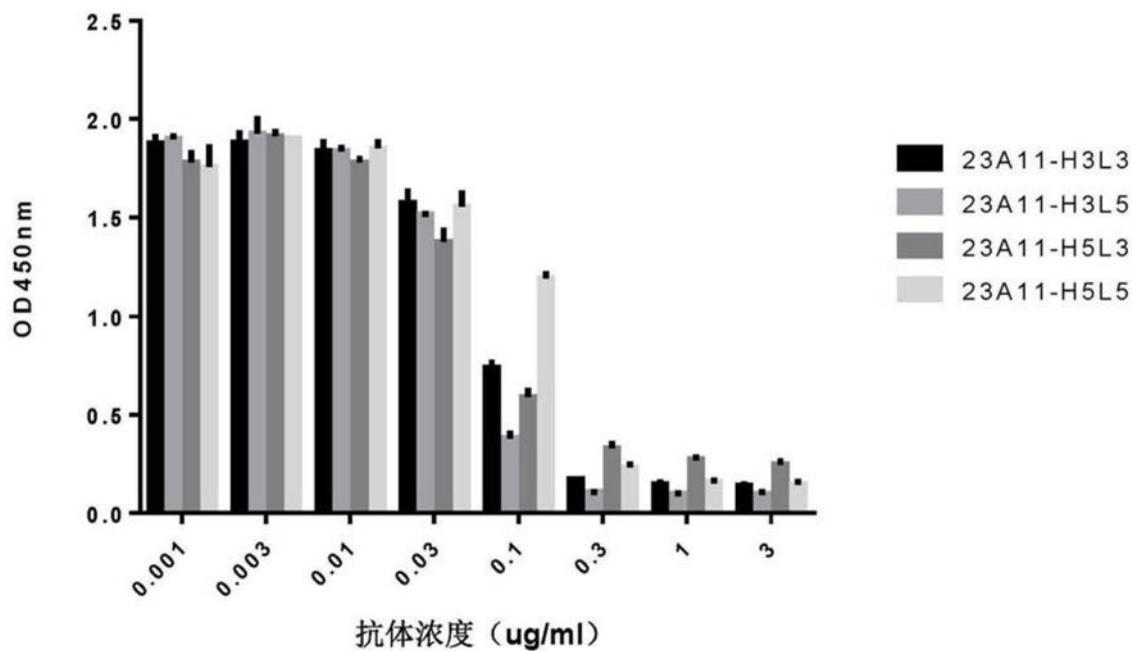


图18C

### hPD-L1-Fc与hPD-1-N297A-生物素的结合

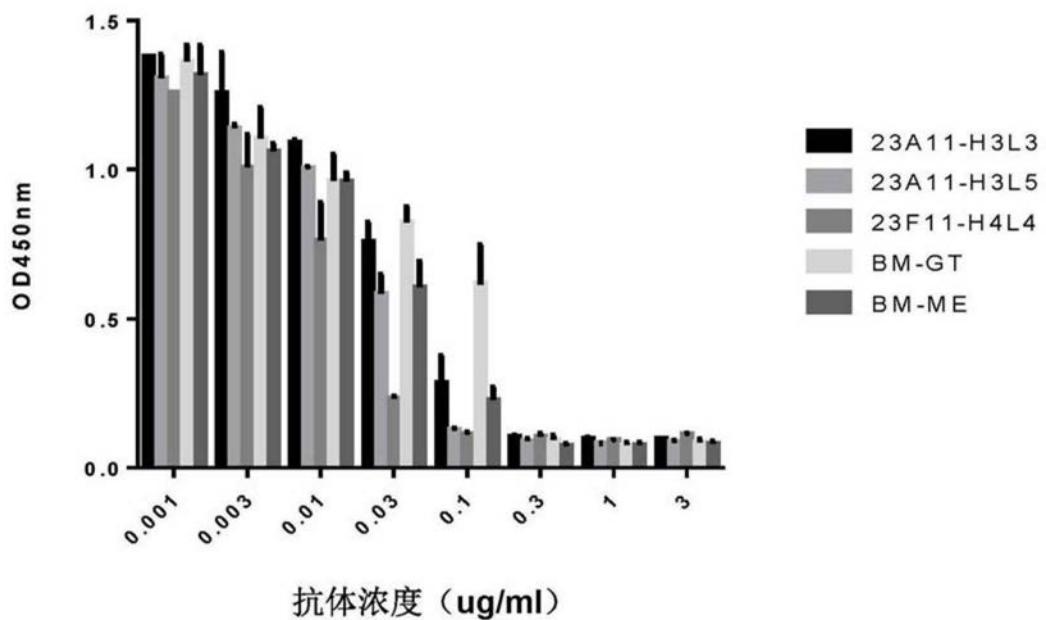


图18D

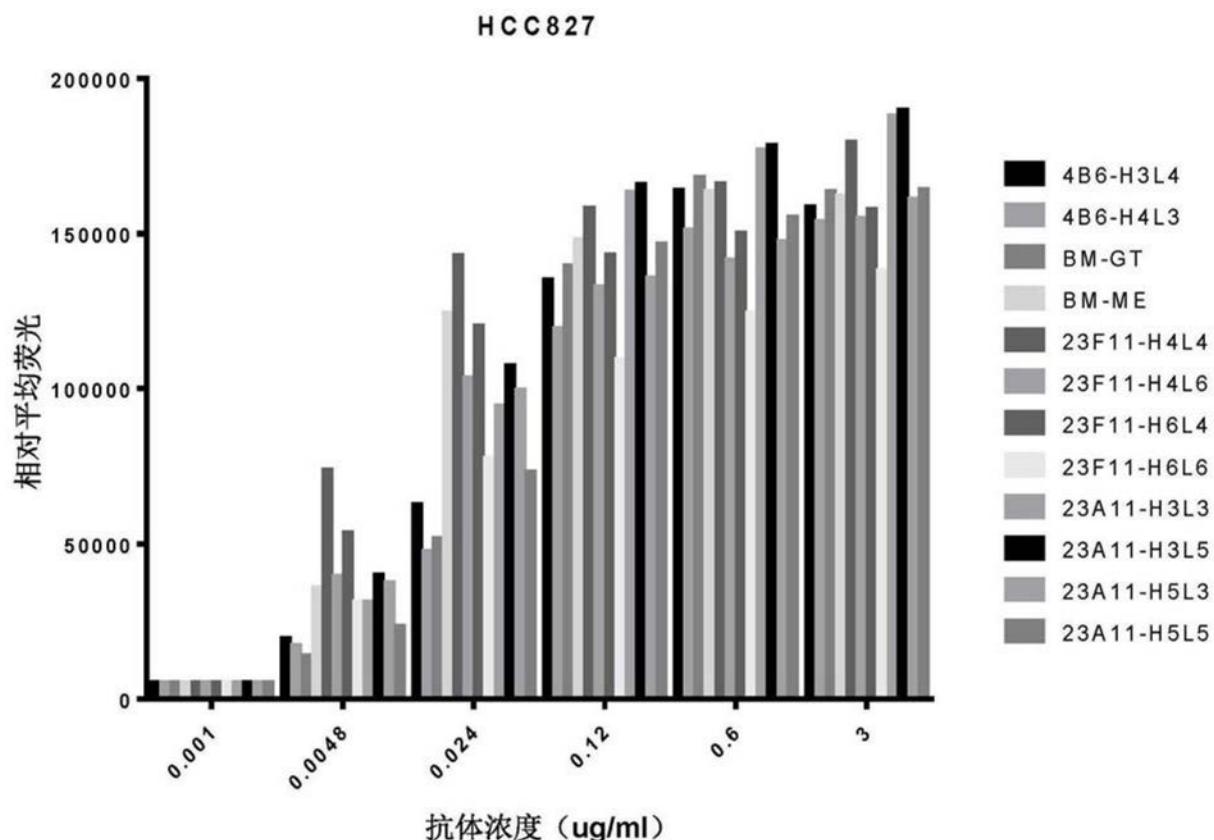


图19

### PD-1与HCC827的结合

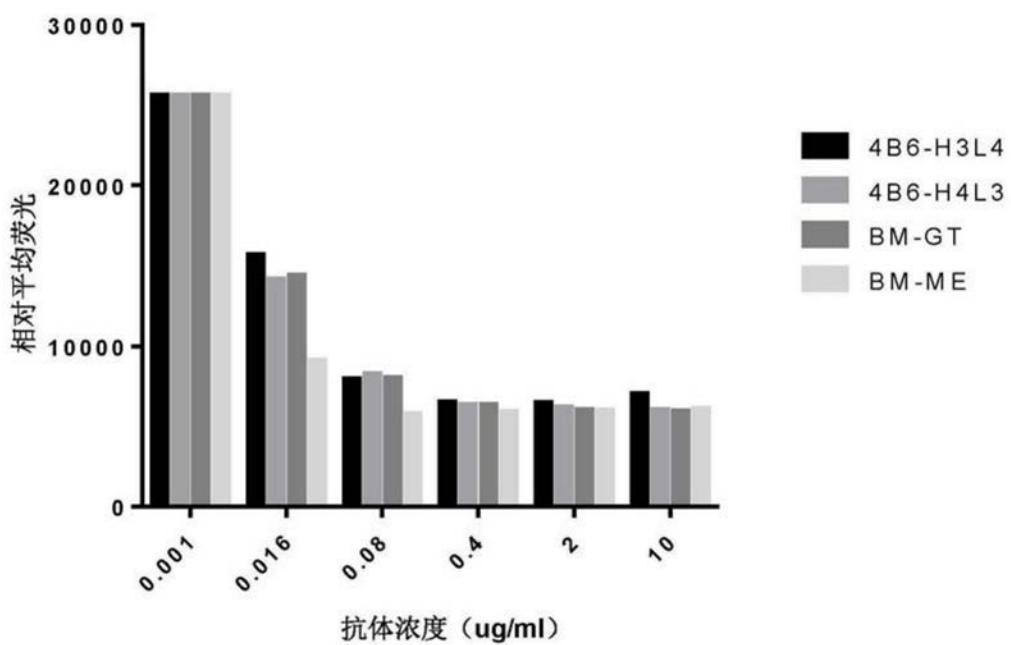


图20A

## PD-1与HCC827的结合

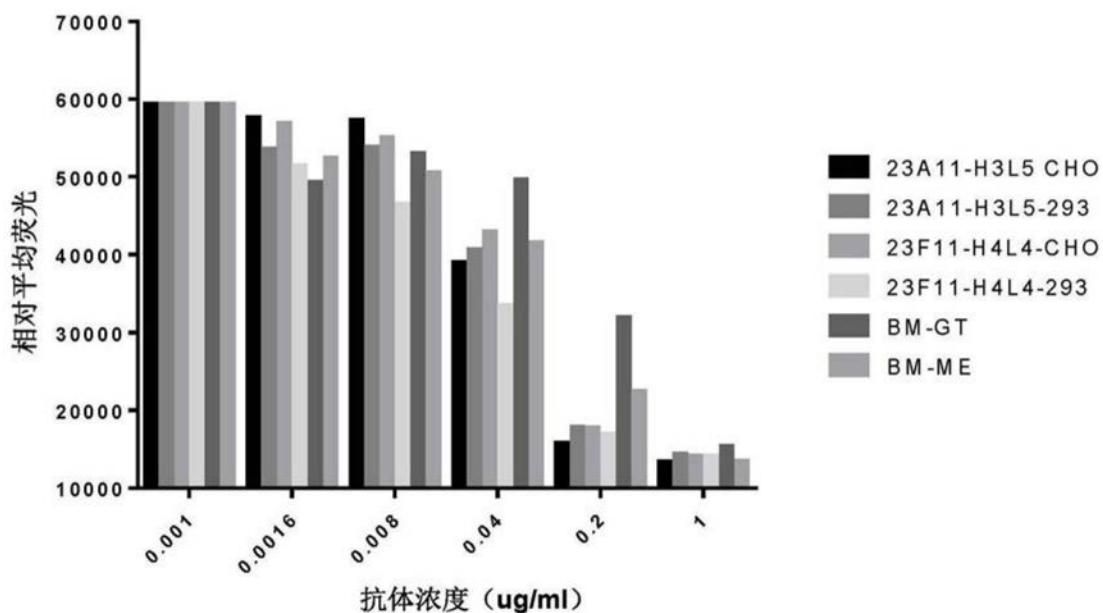


图20B

## 人抗体在与同种异体DC的MLR中对细胞因子产生的影响

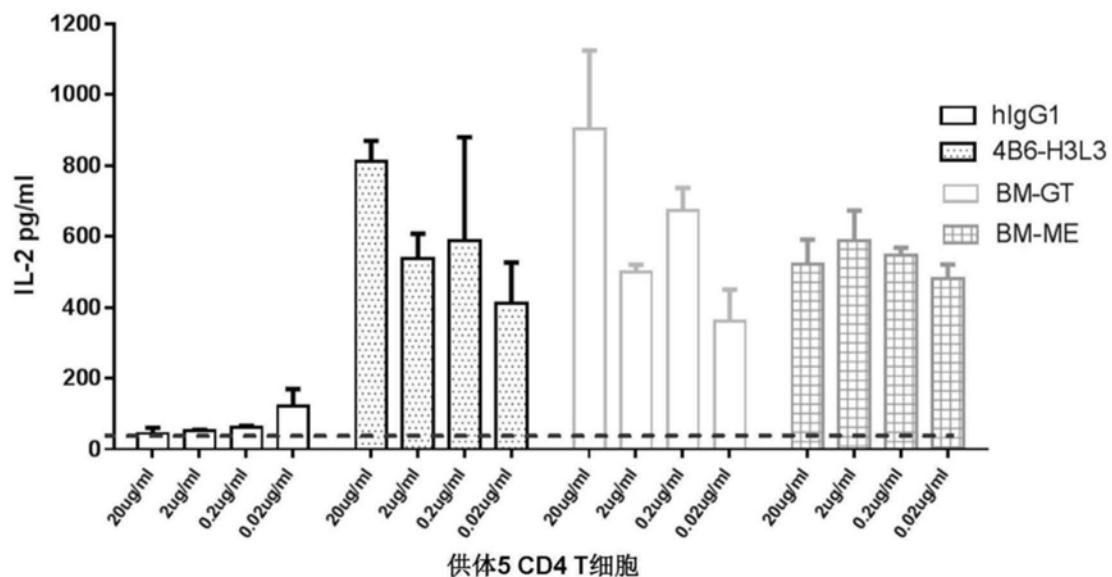


图21A

人抗体在与同种异体DC的MLR中对细胞因子产生的影响

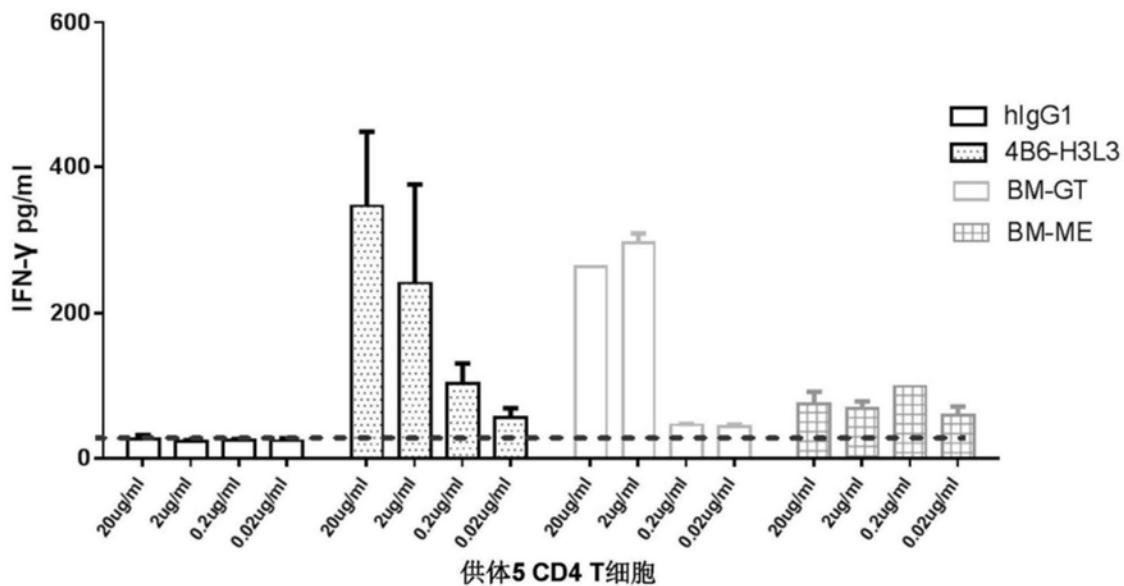


图21B

人抗体在与同种异体DC的MLR中对细胞因子产生的影响

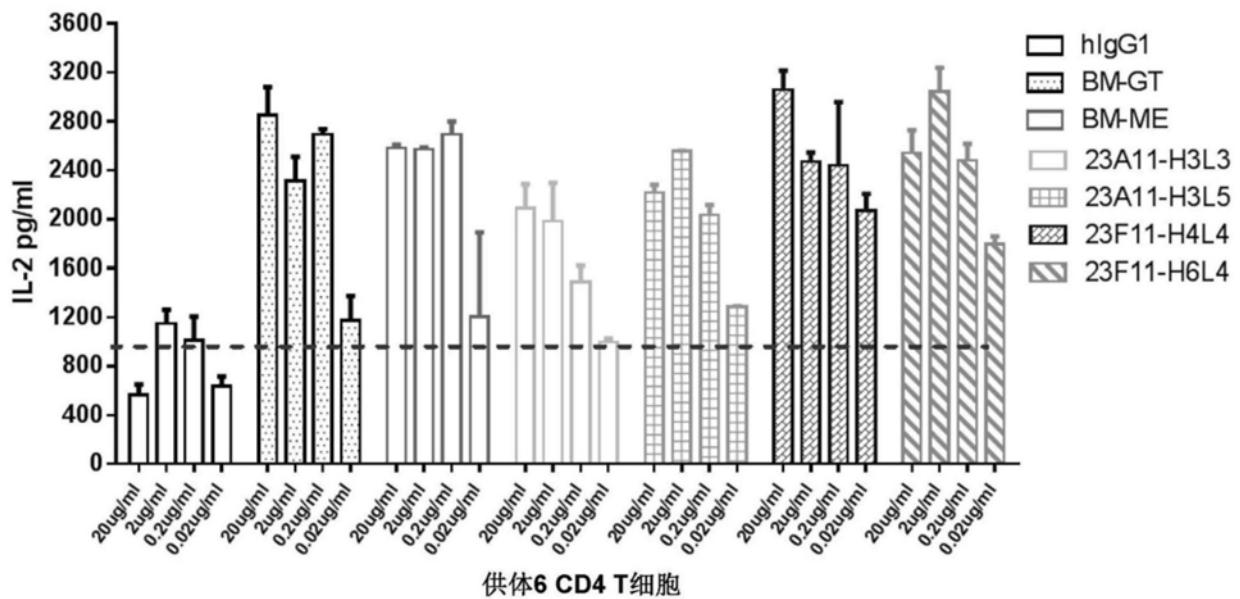


图21C

人抗体在与同种异体DC的MLR中对细胞因子产生的影响

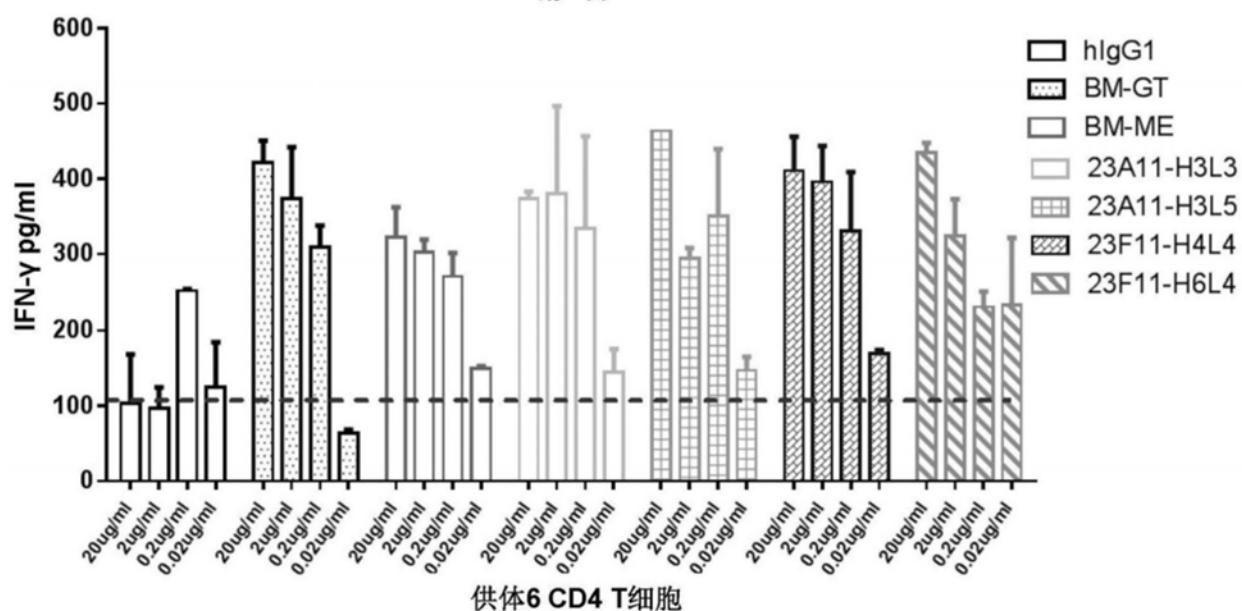


图21D

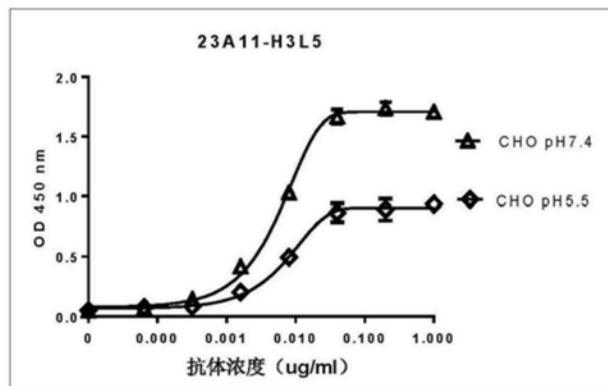


图22A

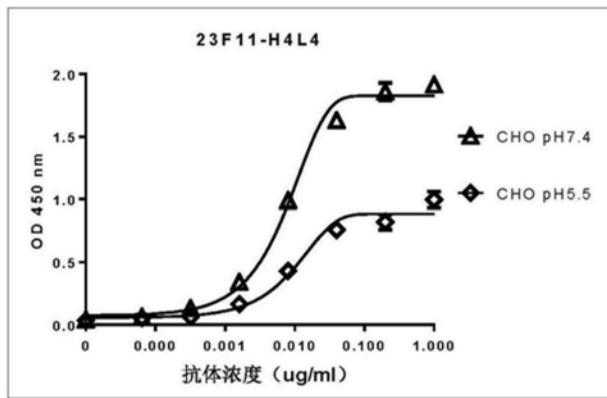


图22B

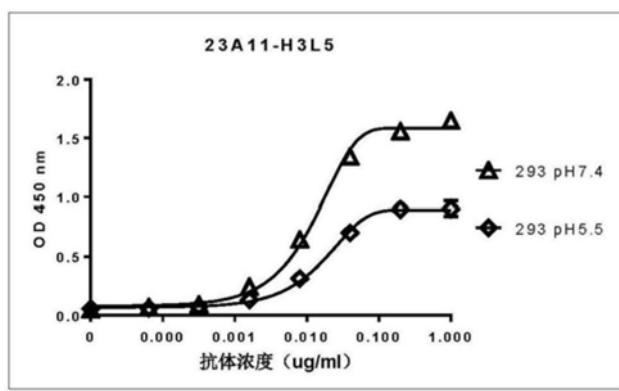


图22C

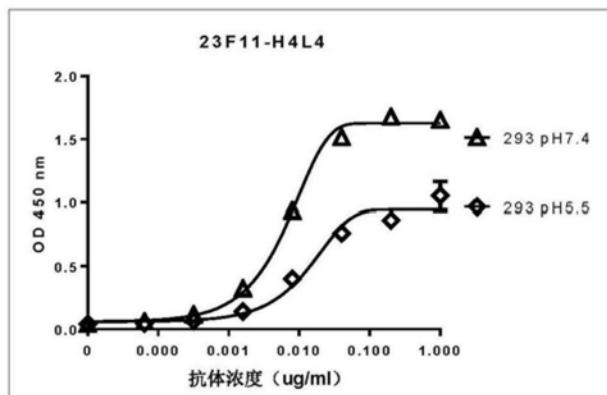


图22D

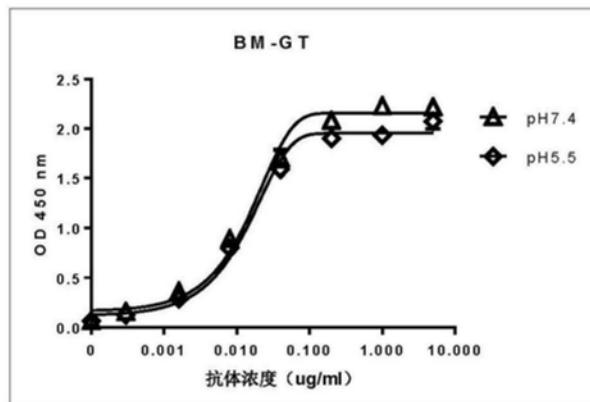


图22E

### 在不同pH下23A11-H3L5与hPD-L1的结合

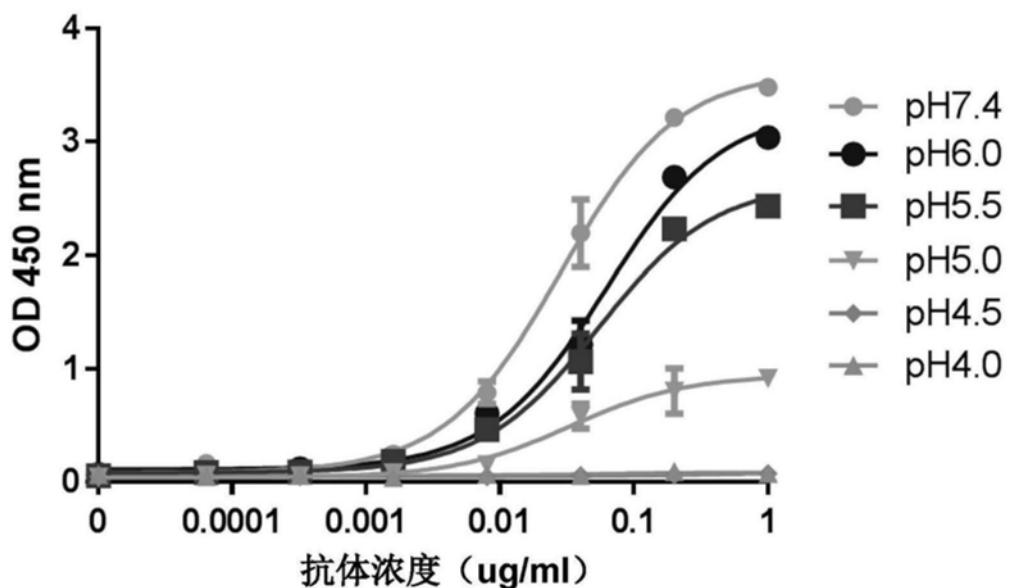


图23A

### 在不同pH下23A11-H3L5与PD-L1的结合

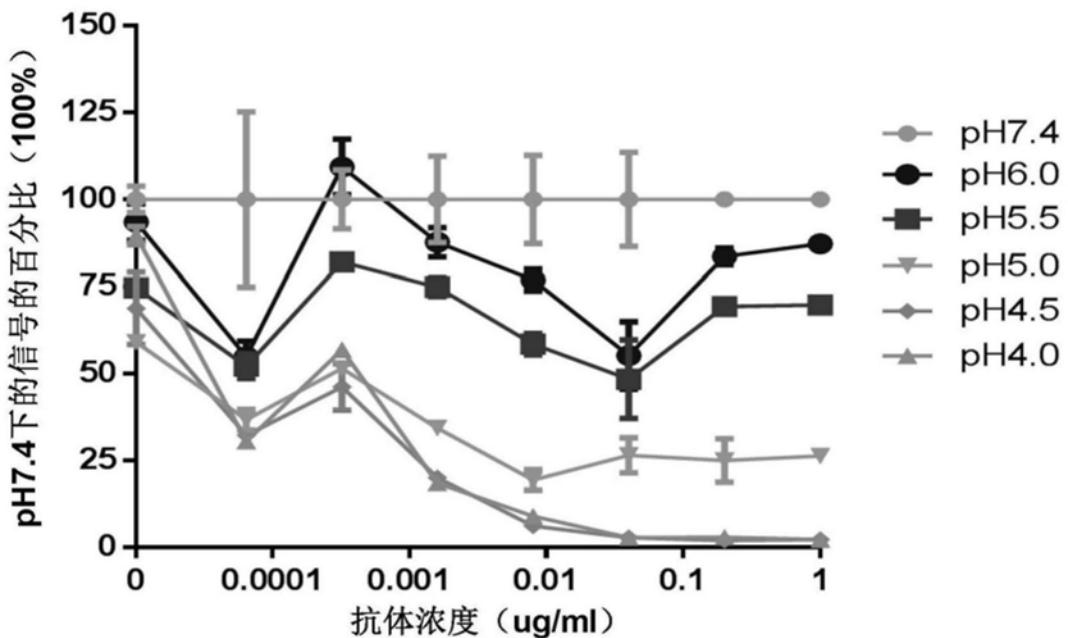


图23B

### 在不同pH下23F11-H4L4与hPD-L1的结合

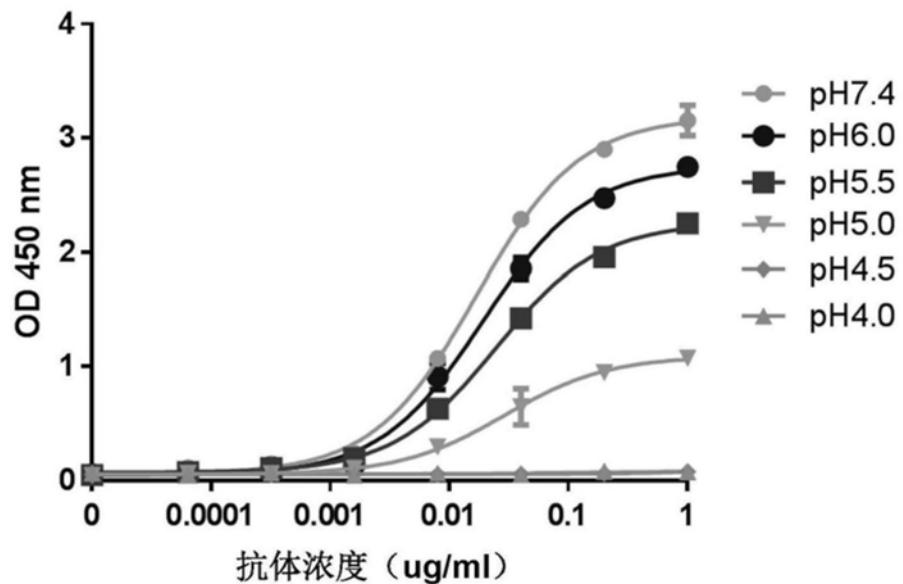


图23C

## 在不同pH下23F11-H4L4与hPD-L1的结合

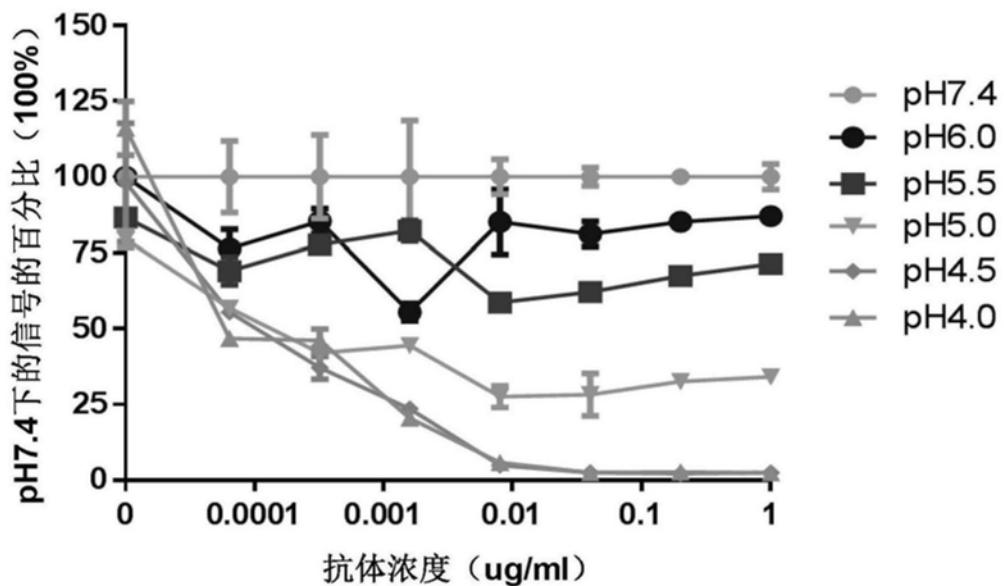


图23D

## 在不同pH下22C9-C与hPD-L1的结合

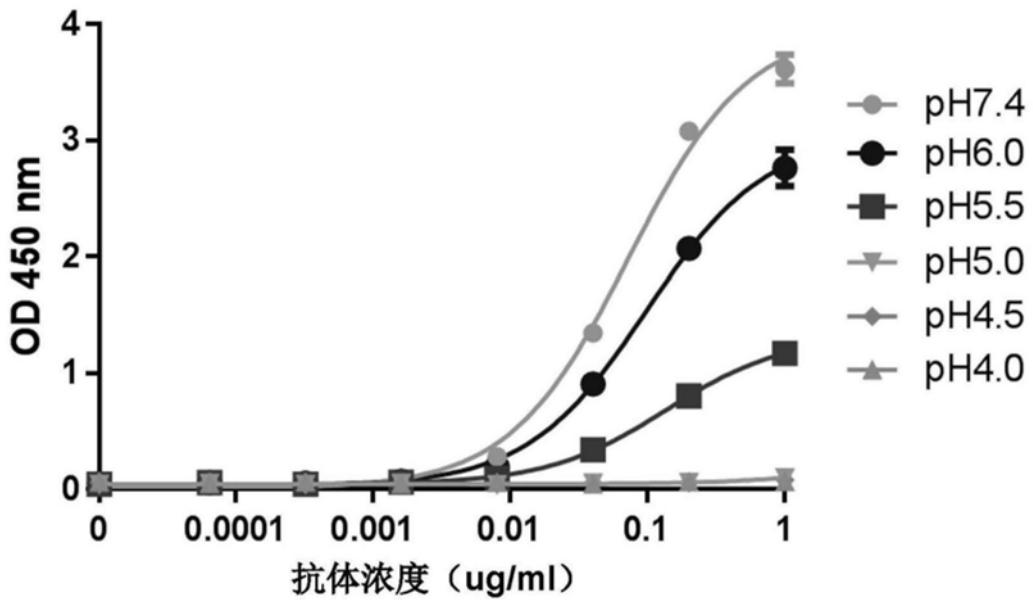


图23E

## 在不同pH下22C9-C与hPD-L1的结合

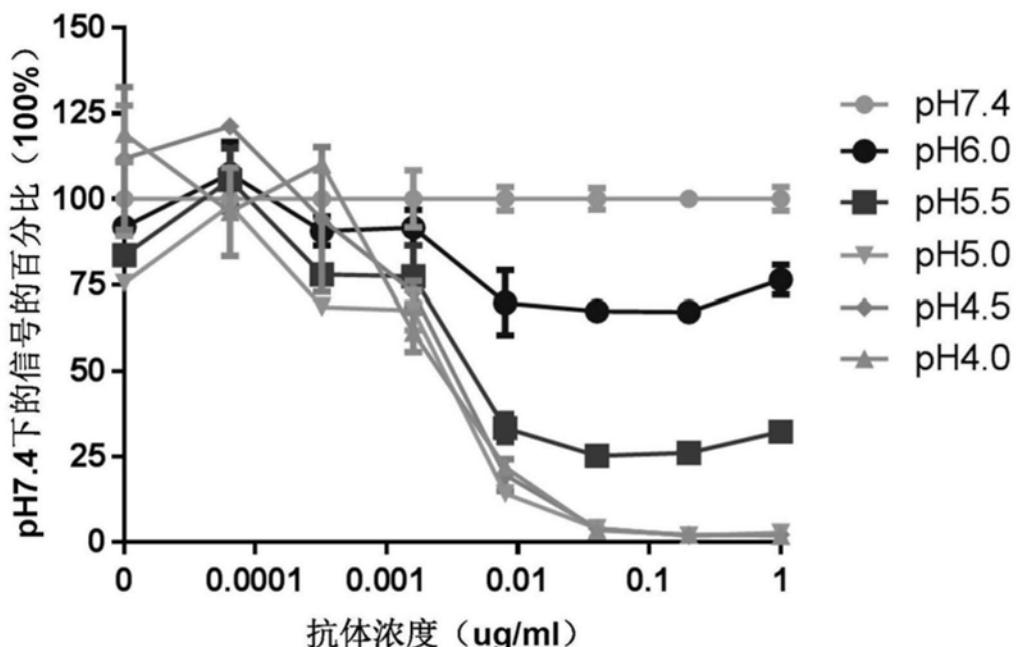


图23F

## 23F11与hPD-L1-Fc的结合

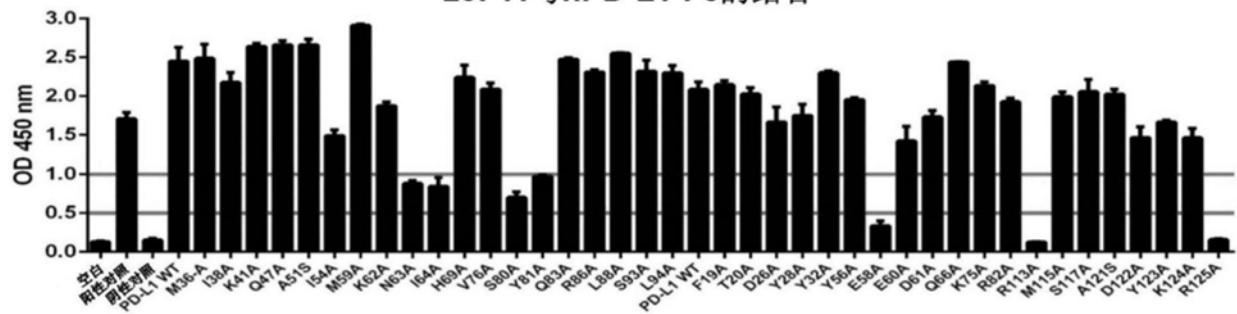


图24A

## 23A11与hPD-L1-Fc的结合

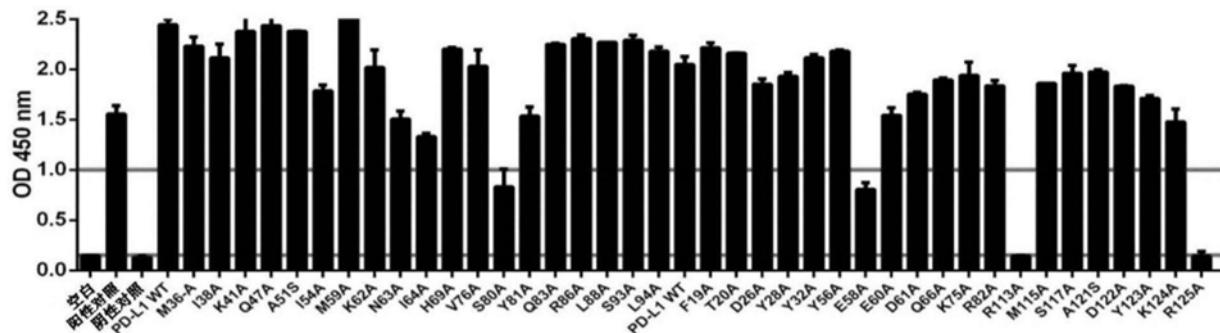


图24B

## 26F5与hPD-L1-Fc的结合

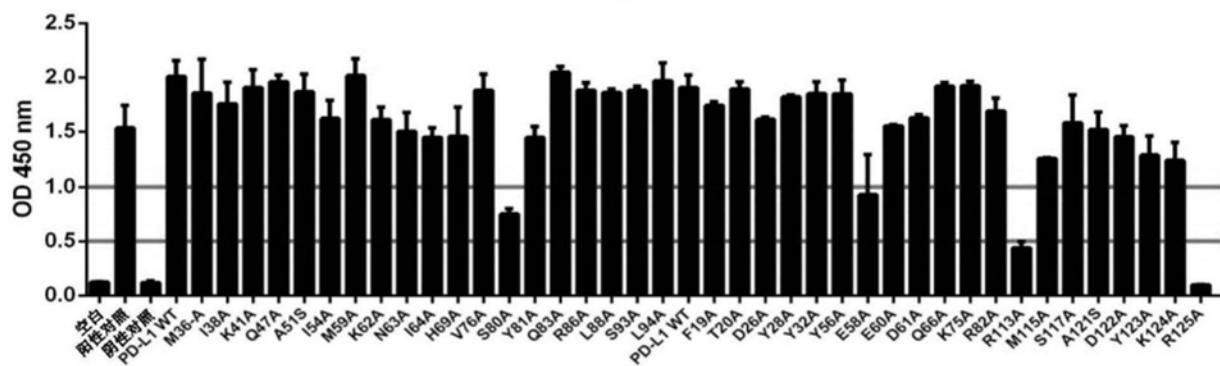


图24C

## 18G4与hPD-L1-Fc的结合

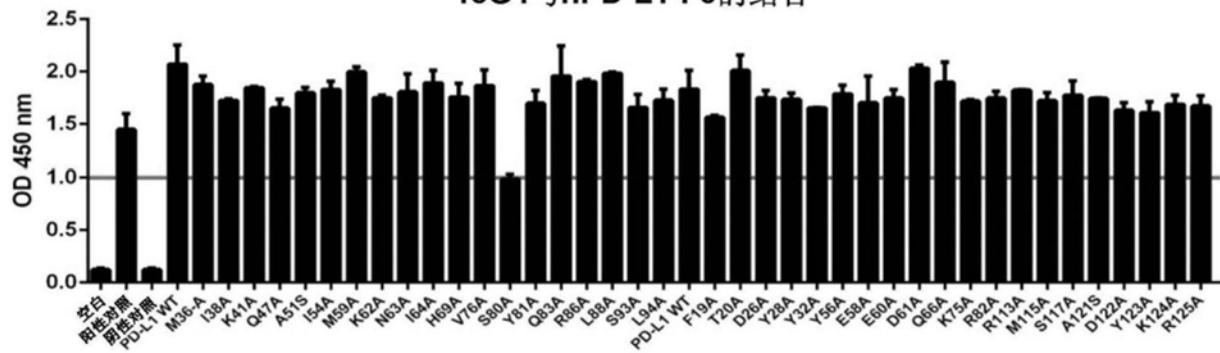


图24D

## 4B6与hPD-L1-Fc的结合

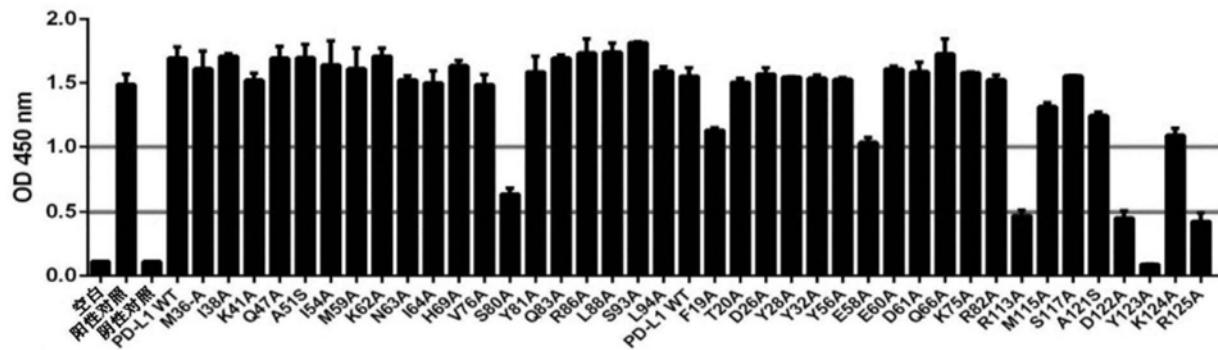


图24E

## 21F11与hPD-L1-Fc的结合

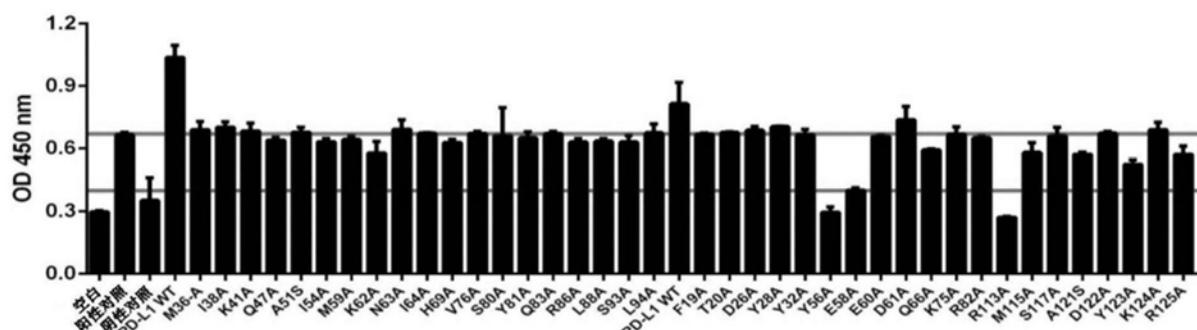


图24F

## 22C9与hPD-L1-Fc的结合

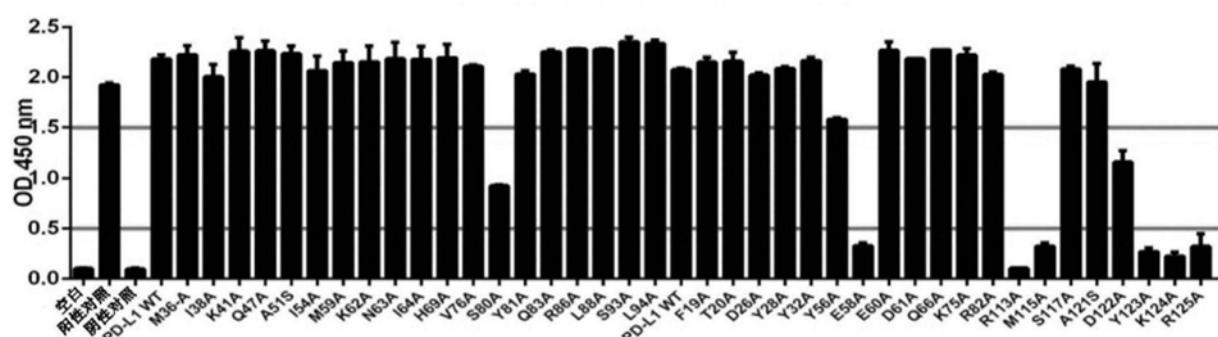


图24G

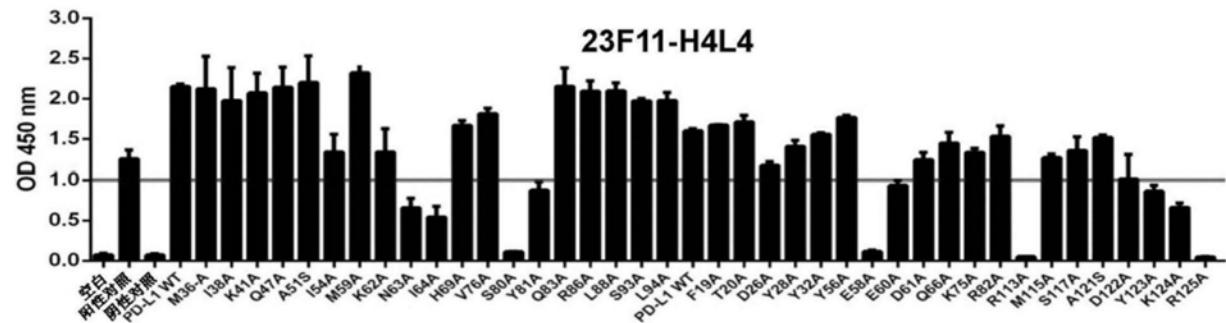


图24H

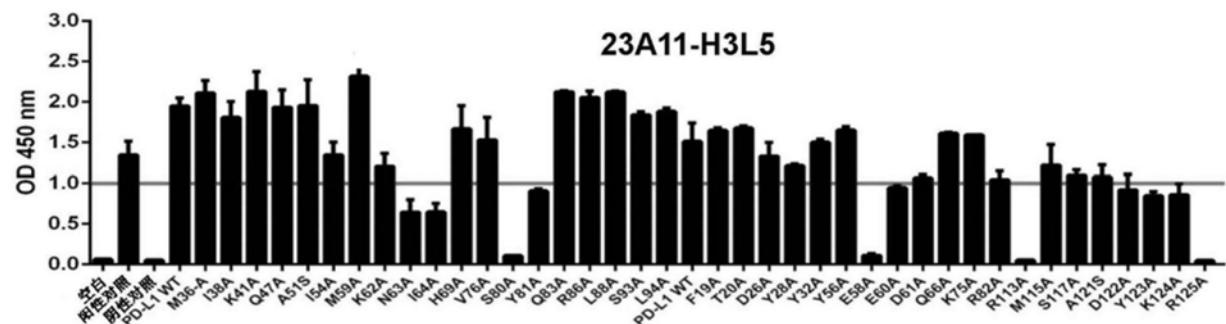


图24I

## 肿瘤体积

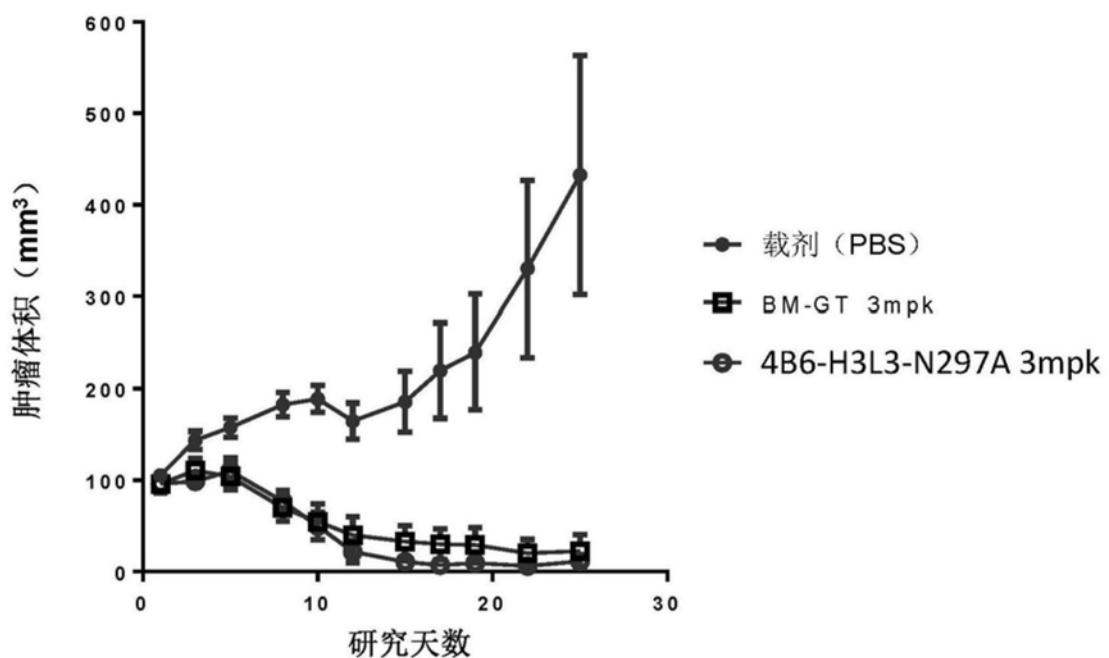
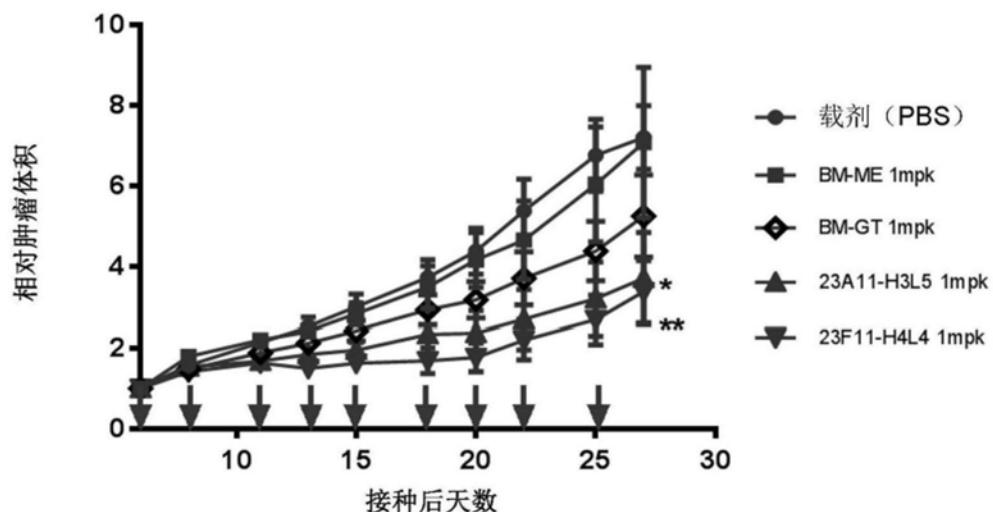


图25

## RTV-1mpk



注意：将接种日计为第1天；在红色箭头标注的当天给药。

\*p值<0.05 vs. 载剂

\*\*p值<0.005 vs. 载剂

图26A

## 1 m p k

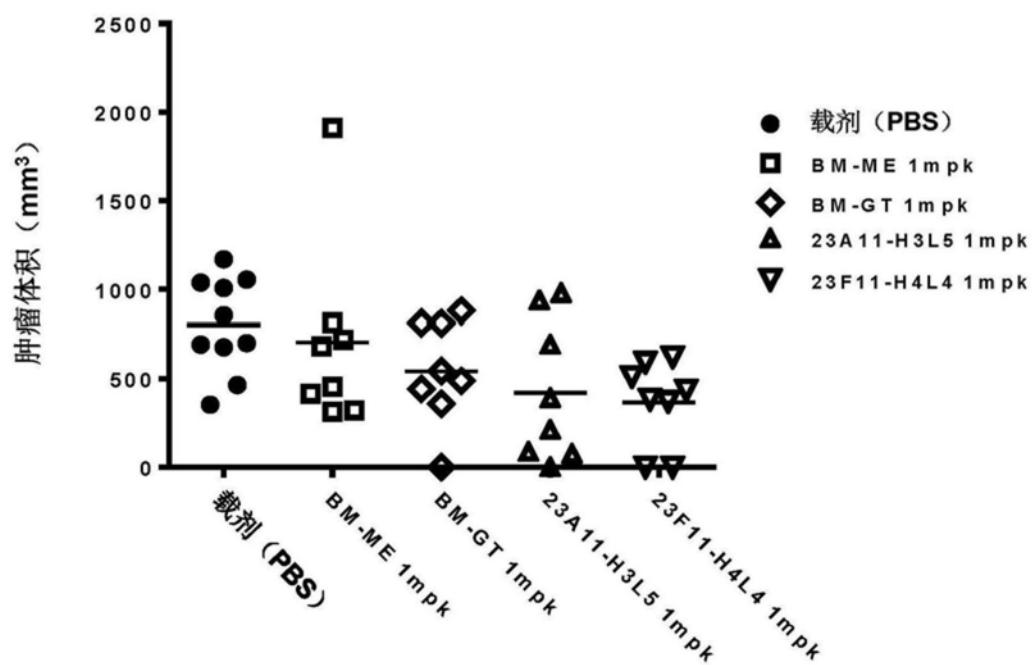
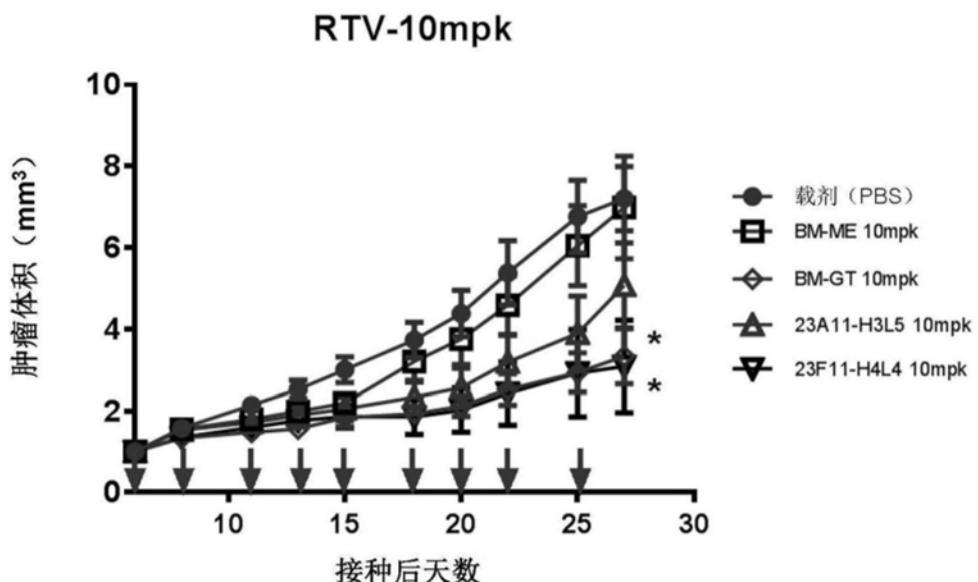


图26B



注意：将接种日计为第1天；在红色箭头标注的天数给药。

\*p值<0.05

图26C

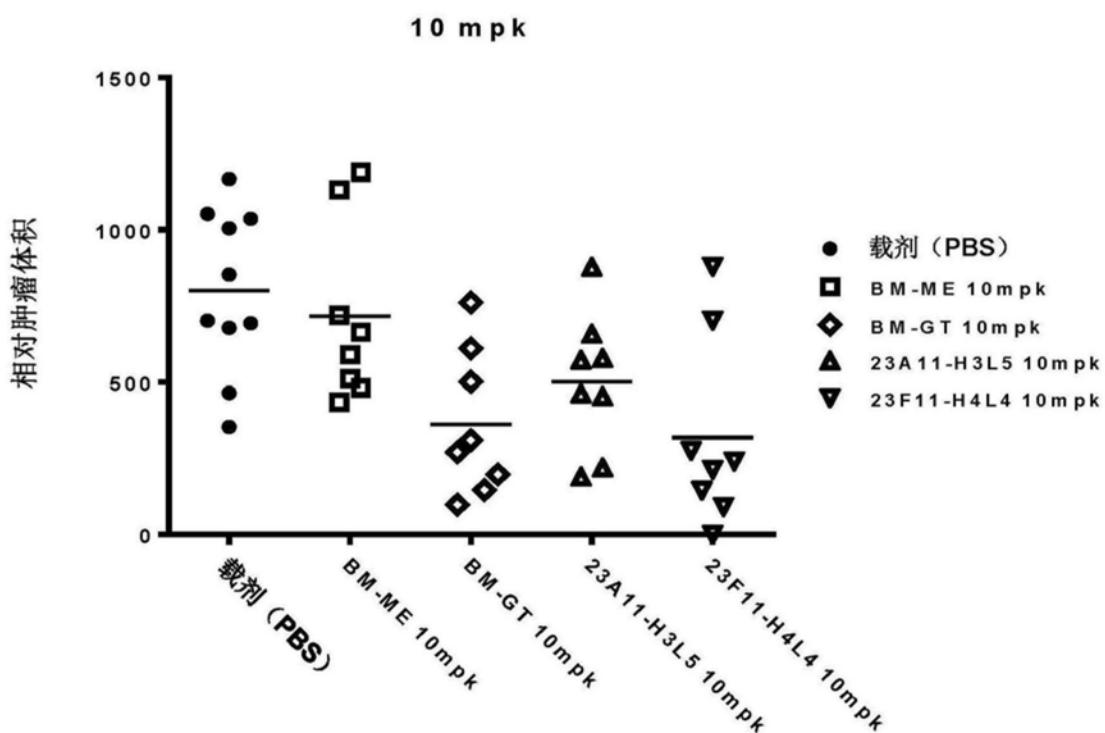


图26D

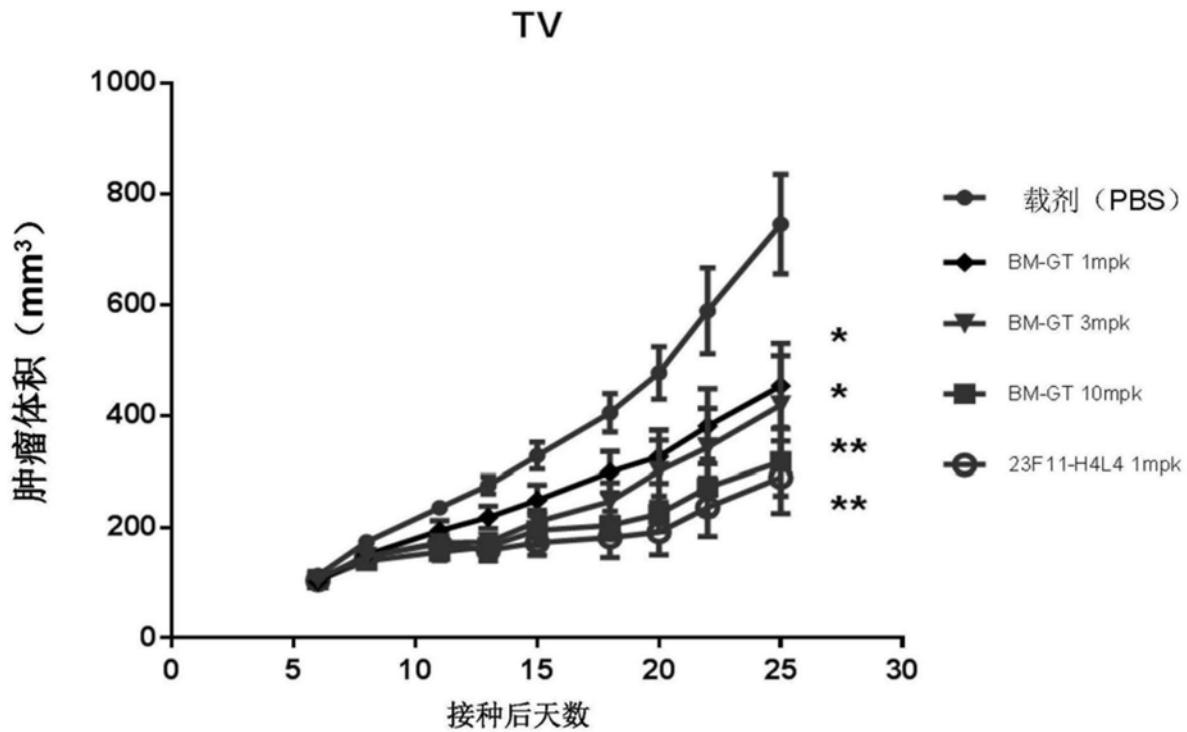


图26E

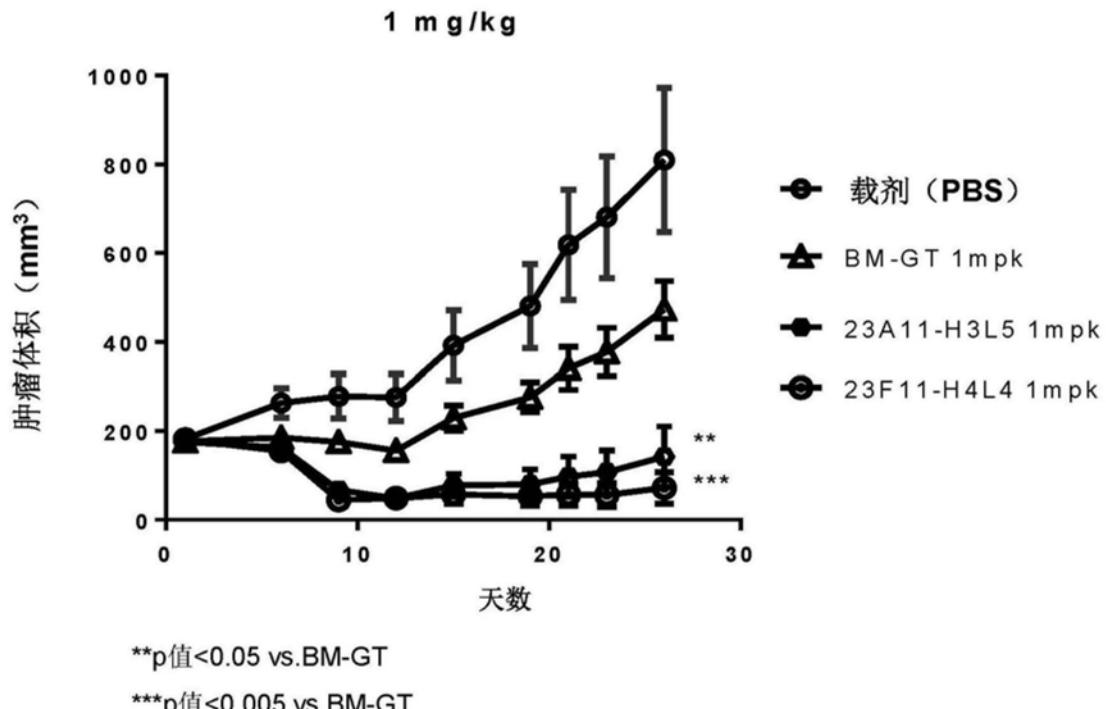


图27A

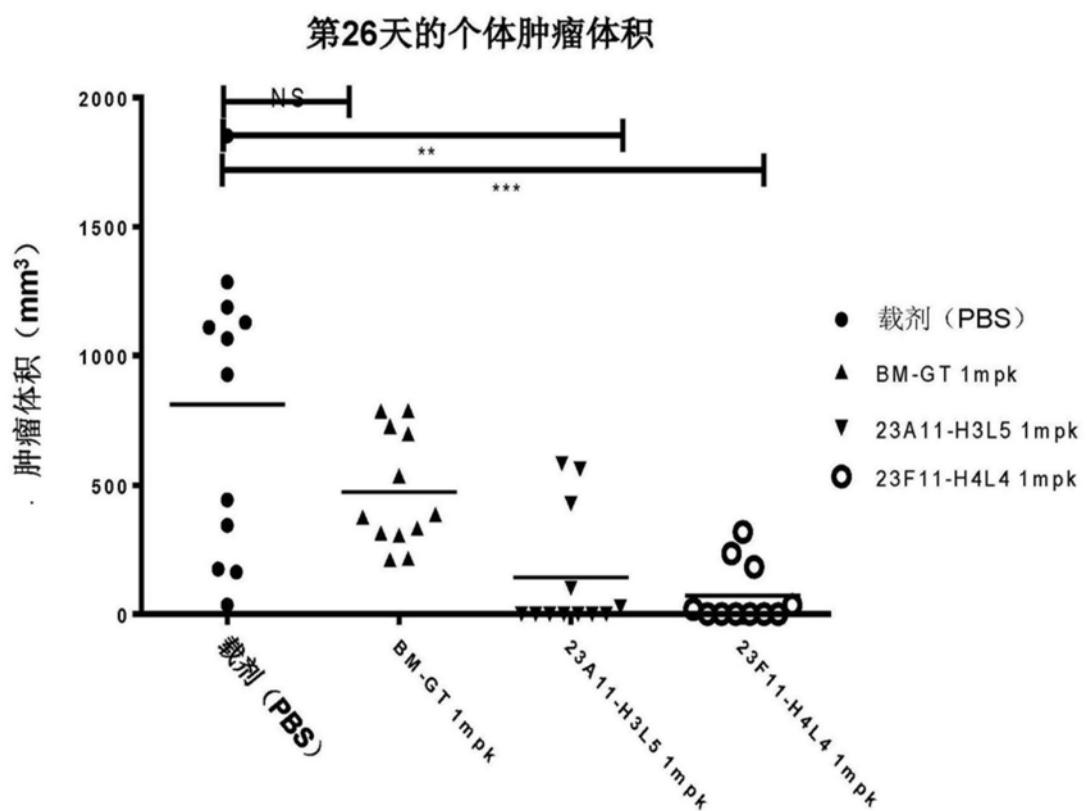


图27B

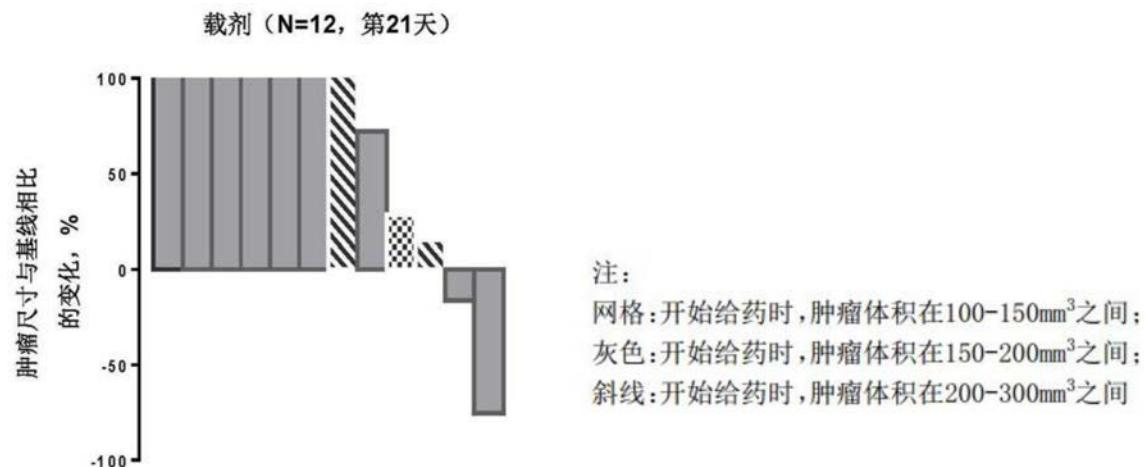


图28A

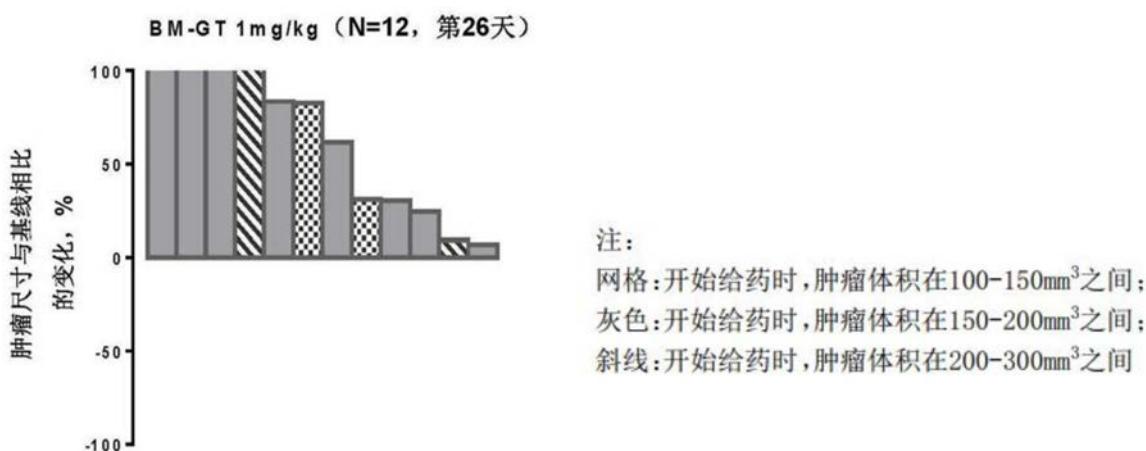


图28B

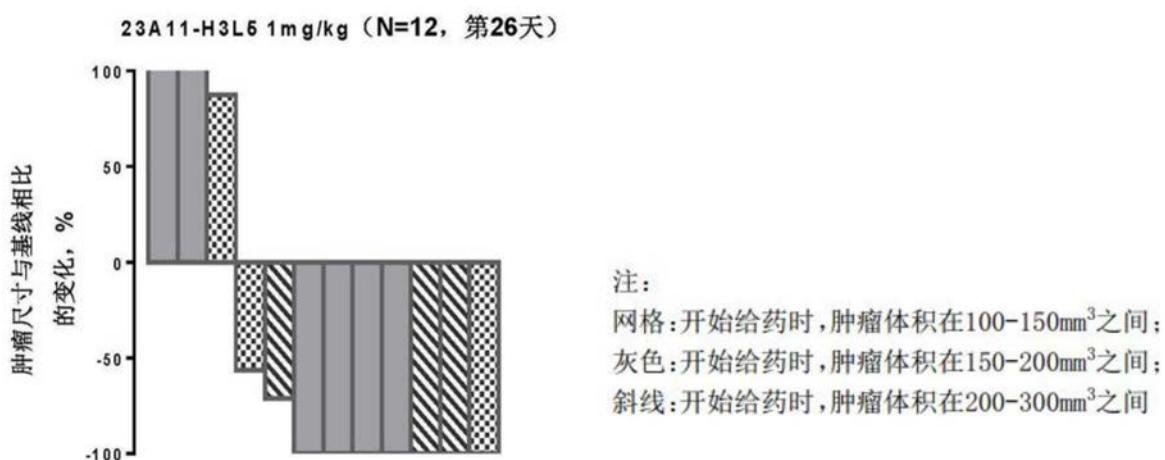
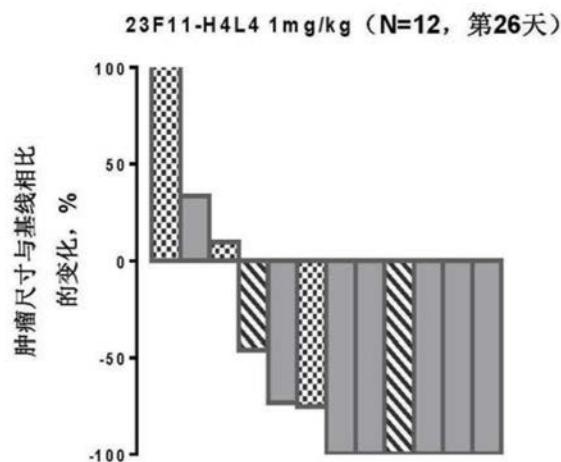


图28C



注：

网格：开始给药时，肿瘤体积在100-150mm<sup>3</sup>之间；

灰色：开始给药时，肿瘤体积在150-200mm<sup>3</sup>之间；

斜线：开始给药时，肿瘤体积在200-300mm<sup>3</sup>之间

图28D

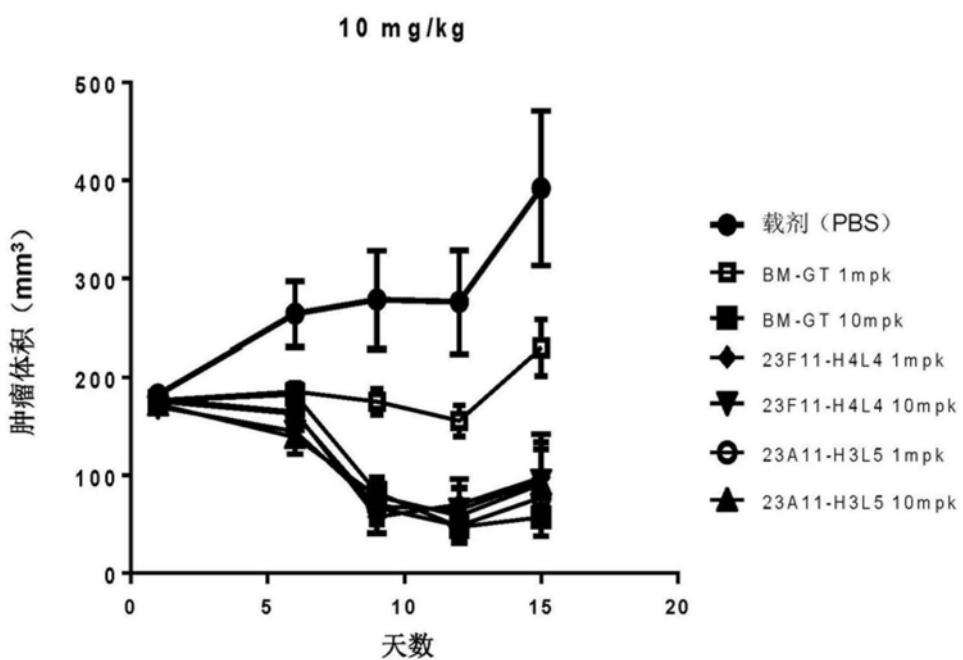


图29A

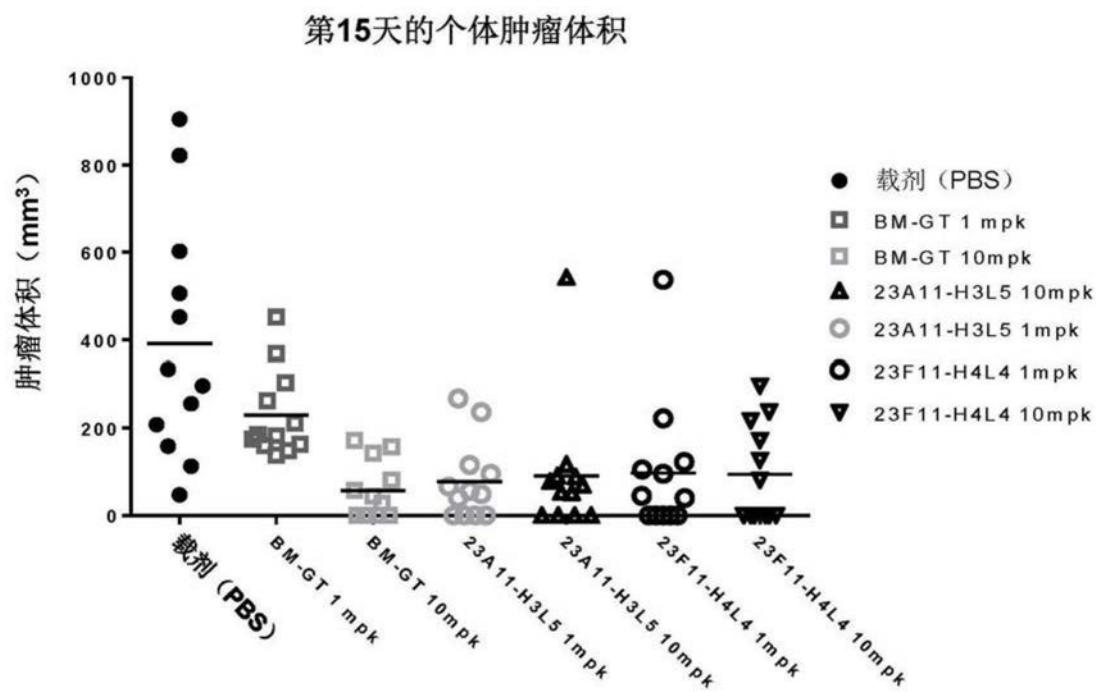
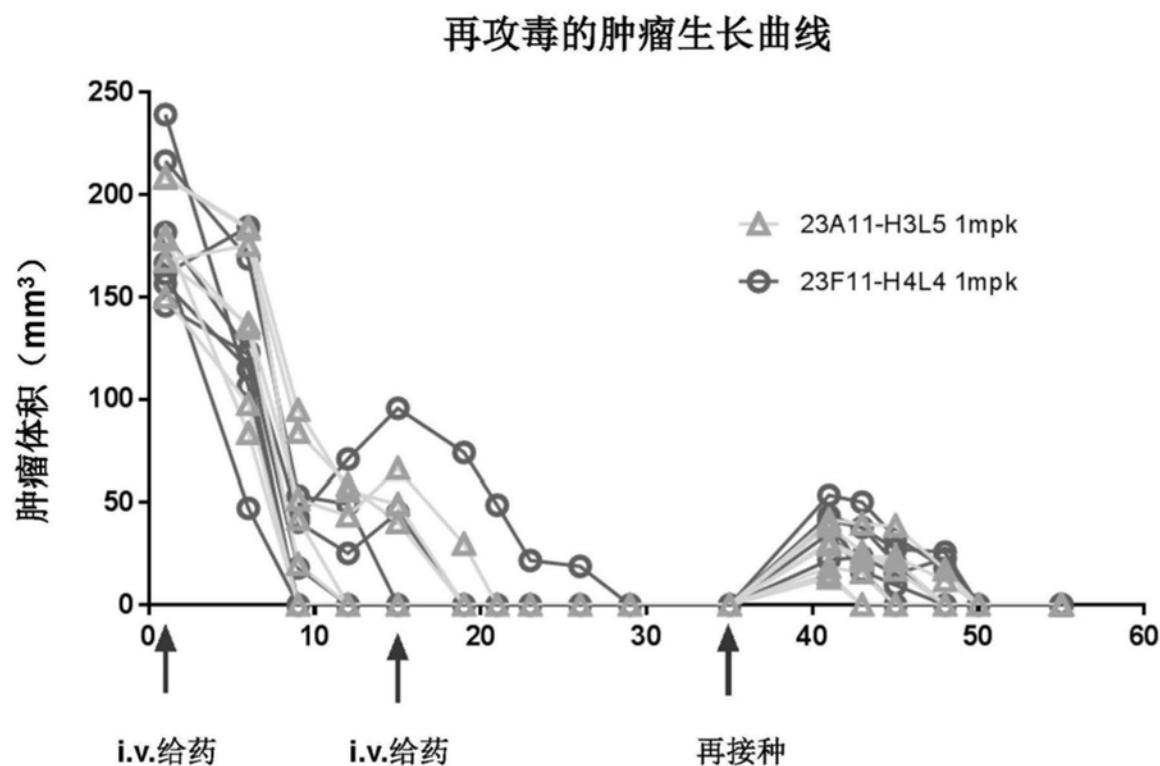


图29B



向CR小鼠再接种 $2 \times 10^6$ 个MC38/PD-L1细胞/小鼠

图30

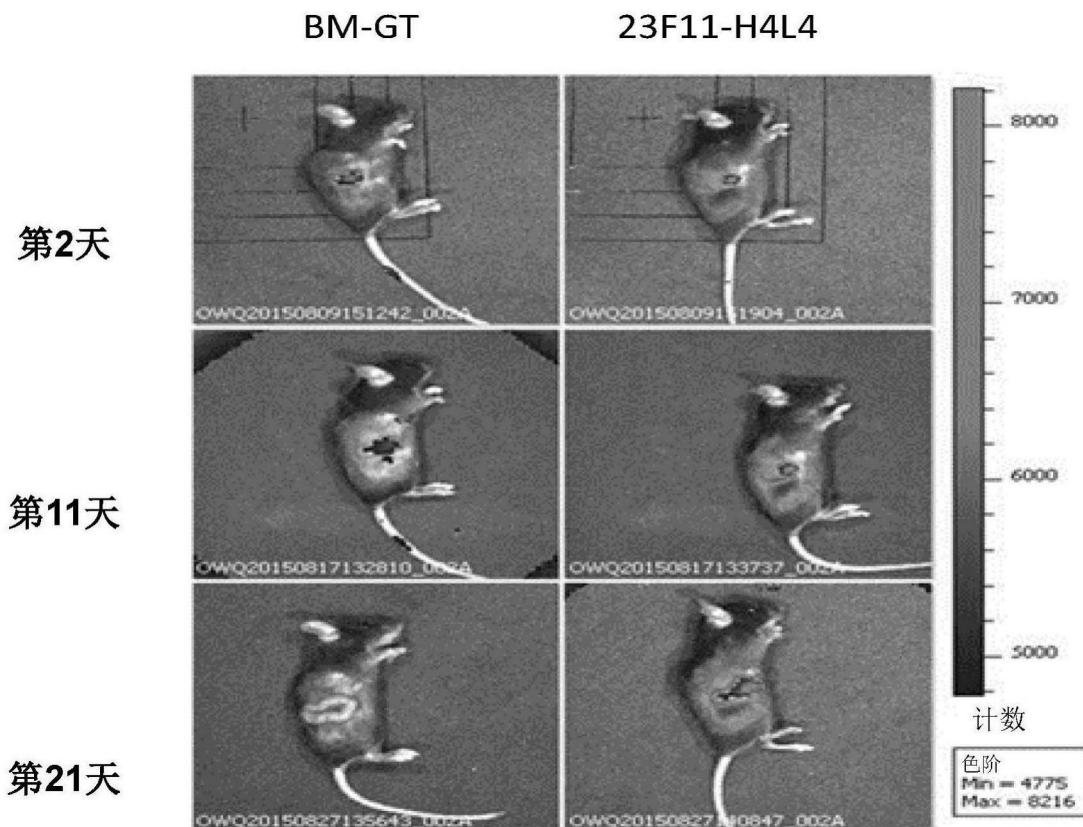


图31A

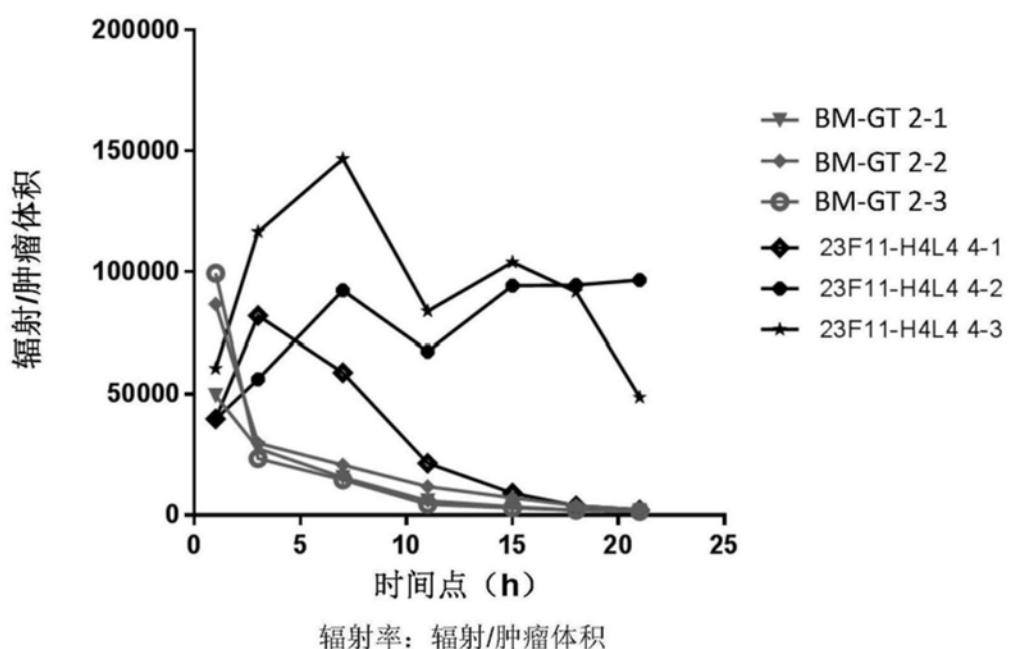


图31B

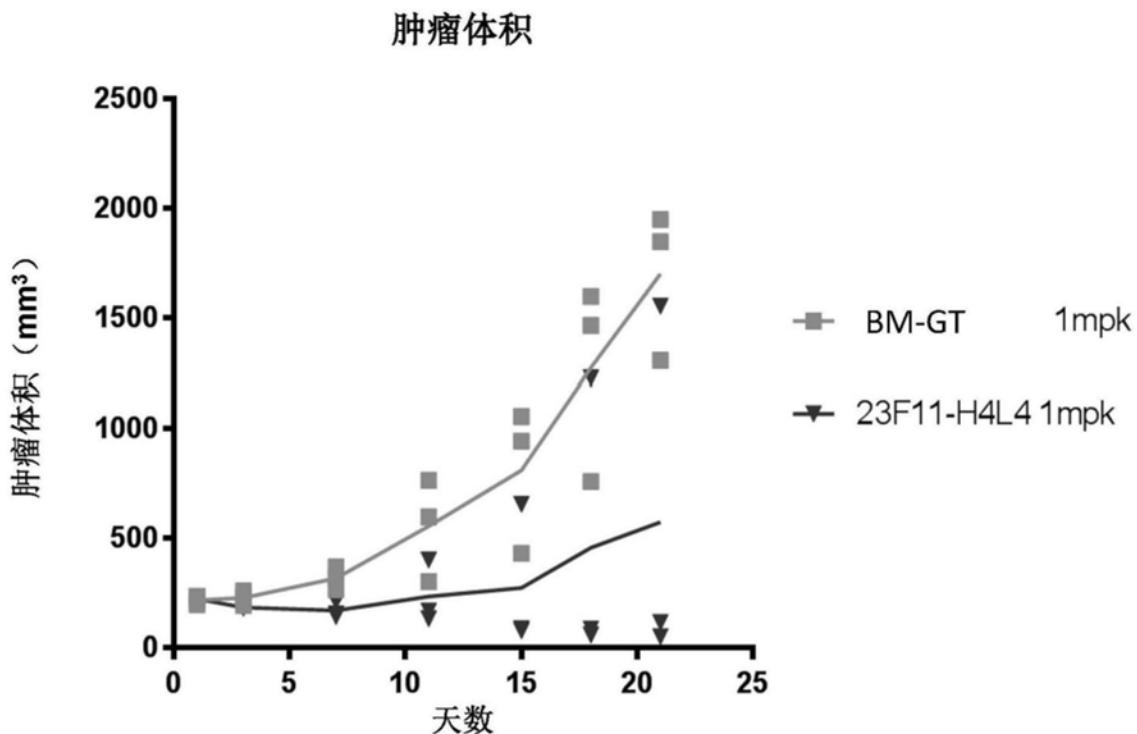
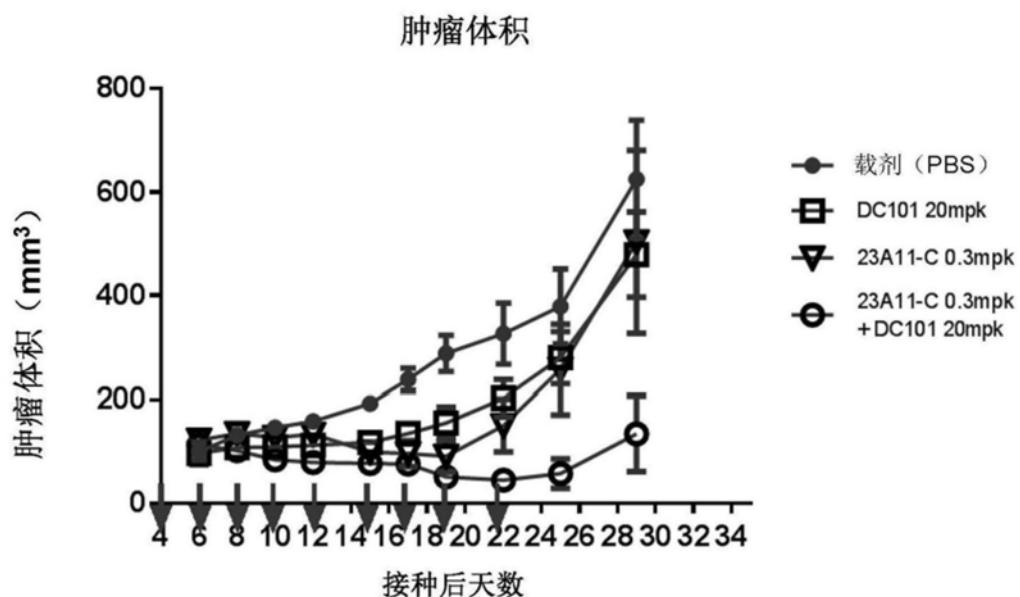


图31C



注意：将接种日计为第1天；  
在红色箭头标注的当天给予动物药物。

图32A

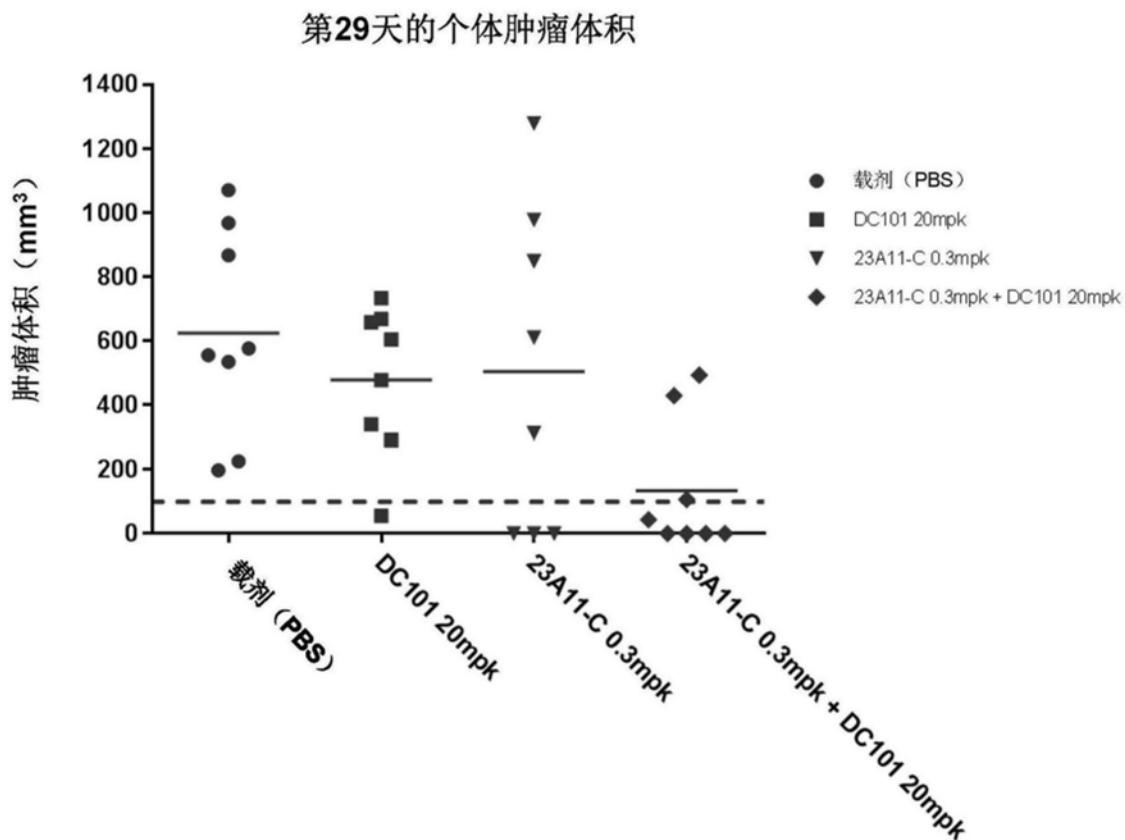
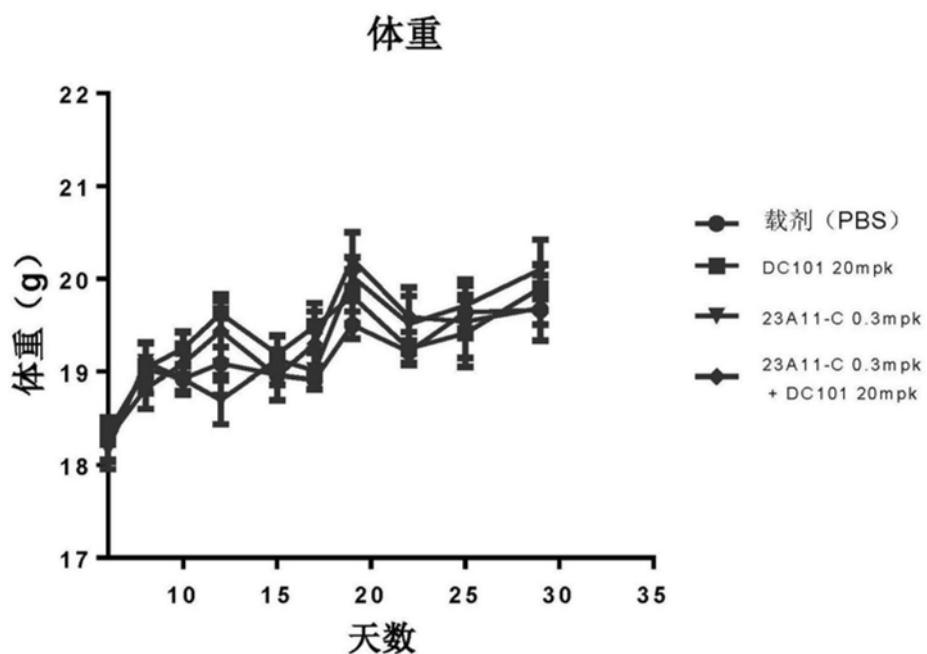


图32B



注意：将接种日计为第1天

图32C

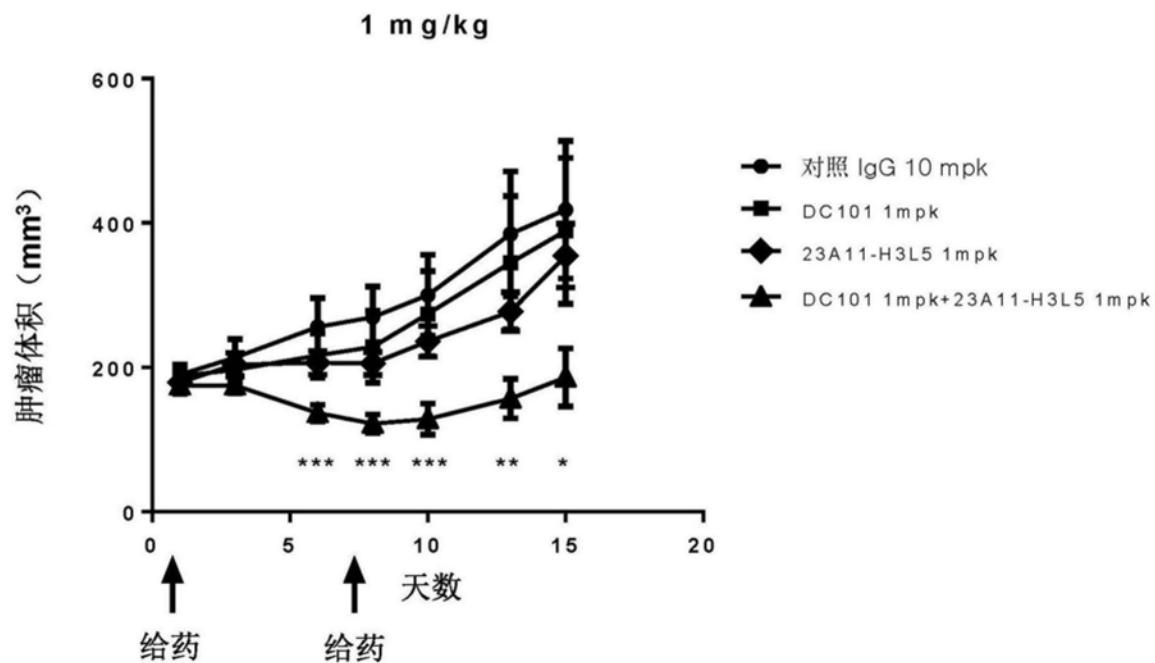


图32D

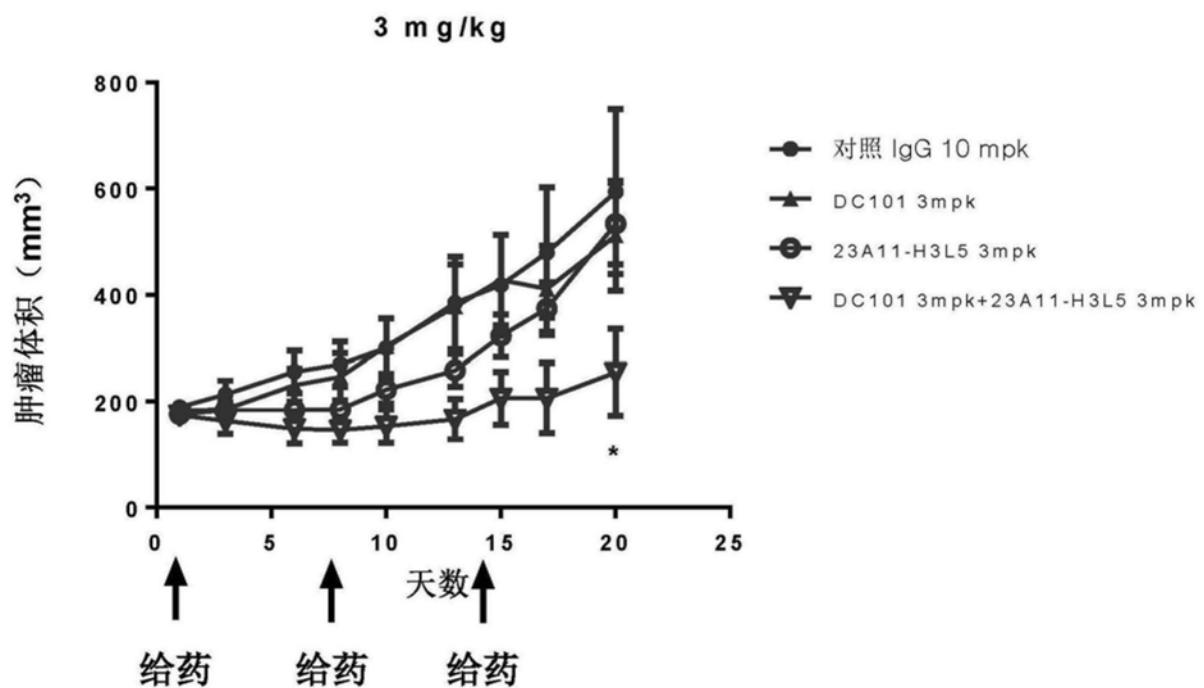


图32E

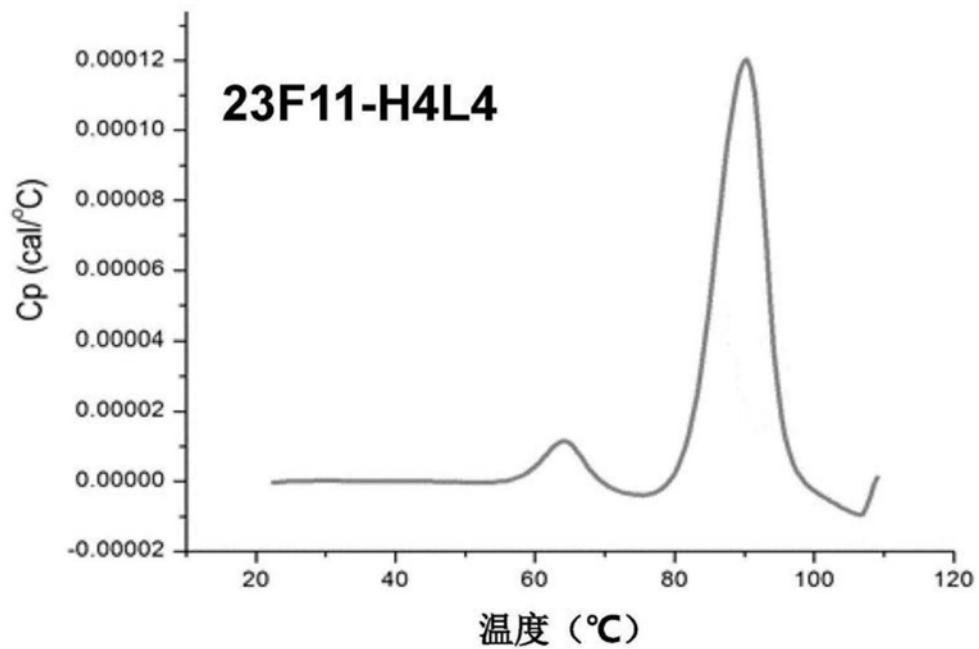


图33A

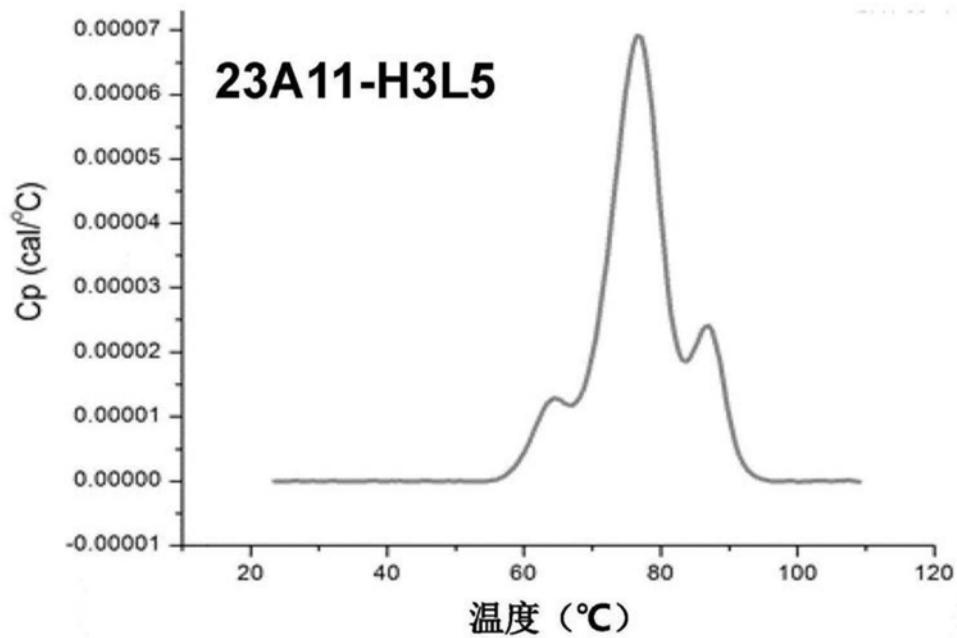


图33B

名称	序列	SEQ ID NO:
22C9 H-CDR1	SYWMH	7
22C9 H-CDR2	MIHPNSDITNCNENFKH	8
22C9 H-CDR3	SDGSSYWYFDV	9
22C9 L-CDR1	KAGQSVNNDVA	10
22C9 L-CDR2	YASNRYT	11
22C9 L-CDR3	QQDFSSPLT	12
小鼠/嵌合抗体中的 22C9 HC	QVQLQQSGAELVKPGASVQLSCKASGYTFTSYWMHWVWQ RPGQGLEWIGMIHPNSDITNCNENFKHTVTLTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVFYCARSDGSSYWYFDVWGTGTTVTVSS	21
小鼠/嵌合抗体中的 22C9 LC	SIVMTQTPKFLSVASGDRVITCKAGQSVNNDAWYQQKPGQSP KLLIYYASNRVTGVPDRFTGSGYGTDFITSTVQAEDLAVYFCQ QDFSSPLTFGAGTKLELK	22
18G4 H-CDR1	SSYYIH	29
18G4 H-CDR2	NINPFNGGSIYNEKFKN	30
18G4 H-CDR3	WHFDY	31
18G4 L-CDR1	KSSQSLLWSGNQNQNNYLS	32
18G4 L-CDR2	GASIRES	33
18G4 L-CDR3	QHNHGSLPYT	34
21F11 H-CDR1	SNWMH	35
21F11 H-CDR2	MMHPNSGSINYNEKFKN	36
21F11 H-CDR3	SYYGSSPYYFDY	37
21F11 L-CDR1	RASQDISNYLN	38
21F11 L-CDR2	YTSRLHIS	39
21F11 L-CDR3	QQGDTLPWT	40
26F5 H-CDR1	SYWMH	41
26F5 H-CDR2	MIQPSTSGTIYNERFKN	42
26F5 H-CDR3	GTGTVDYFDY	43
26F5 L-CDR1	RASESVDSYGNFSIH	44
26F5 L-CDR2	RASNLES	45
26F5 L-CDR3	QQSKEDPYTF	46
小鼠/嵌合抗体中的 18G4 HC	QVQLQQPGTALVKPGASVQLSCKASGYTFTSSYYIHVKQRP GQGLEWIGNINPFNGGSIYNEKFKNKASLTVDTSSNTAYMQ LSSLTSEDSA VYYCARWHFDYWGQGTSLTVSS	55
小鼠/嵌合抗体中的 18G4 LC	DIVMTQSPSSLAVTAGEKVTLKCKSSQSLWWSGNQNQNNYLSW YQQKQGQPPKLLIYGASIRESWVPDRFTGSGSGTDFLTIGN VSAEDLA VYYCQHNHGSFLPYTFGGGTRLEIK	56
小鼠/嵌合抗体中的 21F11 HC	QVQLQQPGAELVKPGASVQLSCKASGYTFTSNWMHWVKQ RPGQGLEWIGMMHPNSGSINYNEKFKNKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSA VYYCARSSYYGSSPYFDYWGQGTTLTVSS	57
小鼠/嵌合抗体中的 21F11 LC	DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDG TVKLLIYYTSRLHSGVPSRSGSGSGTDFSLTISNLEEDIATY FCQQGDTLPWTFGGGTKLEIK	58
小鼠/嵌合抗体中的 26F5 HC	QVQLQQPGAELVKPGASVQLSCKASGYTFTPSYWMHWVKQ RPGQGLEWIGMIQPSTSGTIYNERFKNQVTLTVDKSSSTAYM QLSSQTSEDSA VYYCARGTGTVDYFDYWGQGTTLTVSS	59
小鼠/嵌合抗体中的 26F5 LC	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVDSYGNFSIHWYQQ KPGQPKLLIHRASNLESGIPATFSGSGSRTDFLTINPVEAD DVATYYCQQSKEDPYTFGGGKLEIK	60
CHO 细胞中的 23A11 H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVQLSCKASGYIFTYWIHWVKQR PGQGLEWIGMIQPNSGGTKYNDQFKNRLTVDKSISTAYM ELSRLTSDDTAVYYCARGAGTVDFDYWGQGTTLSSI	61
CHO 细胞中的 23A11 L5	DIVLTQSPASLA VSVGQRATITCRASESVDIYGNFSFMHWYQ QKPGQAPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFLTINPVEA QDTATYYCQQSNDDPYTFGGGKLETK	62
CHO 细胞中的	QVQLVQSGAEVKKPGASVQLSCKASGYIFTYWMHWVKQR	63

23F11 H4	PGQGLEWIGMIQPNSSGKTYNEFKKKATLTVDKSISTAYM ELSRLTSDDTAVYYCARGAGTVDFYFDYWGQGSTLT VSS	
CHO 细胞中的 23F11 L4	DIVLTQSPASLA VSVGQRAITCRASESVDIYGN SFMHWYQ QKPGQPKL IYRASNLE SGIPARFSG GSRTDFTL TINPVEA QDTATYYC CQSTEDPY TFGGT KLEIK	64
CHO 细胞中的 4B6 H3	QVQLVQSGAEV VKPGASV KISCKAS GYVFTD YMNW VKQ APGQGLEW IGDINP NNGG TSY NQK FQGR ATV DKSTR TAY MEL SRL RSDD TAV YYCV KG DGF FAY WGQ GTL TVSS	65
CHO 细胞中的 4B6 L3	DIQMTQS QSSLSAS VGDR VTITC QASQ NVGA AVAW YQQ K GKAP KLI YAS NRYT GVPS RSG SGS RTD FTL TISS MQP EDI ATY FC CQ YQ SNY PTF GSG TKLG IK	66
CHO 细胞中的 4B6 H4	QVQLVQSGAEV VKPGASV VSCKAS GYVFTD YMNW VRQ APGQGLEW IGDINP NNGG TSY NQK FQGR ATV DKSTR TAY MEL SRL RSDD TAV YYCV KG DGF FAY WGQ GTL TVSS	67
CHO 细胞中的 4B6 L4	DIQMTQS QSSLSAS VGDR VTITC QASQ NVGA AVAW YQQ K KAP KLI YAS NLYT GVPS RSG SGS RTD FTL TISS LQ PEDI AT YFC CQ YQ SNY PTF GSG TKLG IK	68
HEK293 细胞中 的 23A11 H5	LVQLVQSGAEV VKPGASV VSCKAS GYIFT TYWI HWVR Q PGQGLEW IGMIQ PNSSG GT YNDQ FKN RVT LTV DTS ISTAY M EL SRL RSDD TAV YYC ARGAG TVDF YWGQ GTT LSS	69
HEK293 细胞中 的 23A11 L5	DIVLTQSP SASVGDR VTITC QASQ NVGA AVAW YQQ K QKPG QAP KLI YRASN LESGI PARF SGSG RTD FTL TINP VEA NDT ATYYC CQ SNDD PYTF GGGT KLET K	70
HEK293 细胞中 的 23A11 H3	LVQLVQSGAEV VKPGASV VLSCKAS GYIFT TYWI HWVK QRP GQGLEW IGMIQ PNSSG GT YNDQ FKN RAT LTV DKS ISTAY ME LSRL TSDD TAV YYC ARGAG TVDF YWGQ GTT LSS	71
HEK293 细胞中 的 23A11 L3	DIVLTQSP SASVGDR VTITC QASQ NVGA AVAW YQQ K QKPG QSP KLI YRASN LESGI PARF SGSG RTD FTL TINP VEA NDT ATYYC HQ SNDD PYTF GGGT KLET K	72
小鼠/嵌合抗体中 的 23A11 HC	LVQLQQ PGAEV VKPGASV KLSCKAS GYIFT TYWI HWVK QRP GQGLEW IGMIQ PNSSG GT YNDQ FKN RAT LTV DKS TTAS MQ LSGL TSE DSA YYC ARGAG TVDF YWGQ GTT LSS	73
小鼠/嵌合抗体中 的 23A11 LC	DIVLTQSP SASVGDR VTITC QASQ NVGA AVAW YQQ K KPG QSP KLI YRASN LESGI PARF SGSG RTD FTL TINP VEAD DV ATYYC HQ SNDD PYTF GGGT KLET K	74
HEK293 细胞中 的 23F11 H4	QVQLVQSGAEV VKPGASV VLSCKAS GYIFT TYWM HWVK Q PGQGLEW IGMIQ PNSSG GT YNE FKK KATL TV DKS ISTAY M EL SRL RSDD TAV YYC ARGAG TVDF YWGQ GTT LSS	75
HEK293 细胞中 的 23F11 L4	DIVLTQSP SASVGDR VTITC QASQ NVGA AVAW YQQ K QKPG QPK KLI YRASN LESGI PARF SGSG RTD FTL TINP VEA NDT ATYYC CQ STED PYTF GGGT KLET K	76
HEK293 细胞中 的 23F11 H6	QVQLVQSGAEV VKPGASV VSCKAS GYIFT TYWM HWVR Q APGQGLEW IGMIQ PNSSG GT YNE FKK KATL TV DTS ISTAY M EL SRL RSDD TAV YYC ARGAG TVDF YWGQ GTT LSS	77
HEK293 细胞中 的 23F11 L6	DIVLTQSP SASVGDR VTITC QASQ NVGA AVAW YQQ K QKPG QPK KLI YRASN LESGI PARF SGSG RTD FTL TINP VEA NDT ATYYC HQ CQ STED PYTF GGGT KLET K	78
小鼠/嵌合抗体中 的 23F11 HC	QVQLQQ PGAEV VKPGASV KLSCKAS GYIFT TYWM HWVK Q RPGQGLEW IGMIQ PNSSG GT YNE FKK KATL TV DKS TTAS M EL SSL TSE DSA YYC ARGAG TVDF YWGQ GTT LSS	79
小鼠/嵌合抗体中 的 23F11 LC	DIVLTHSP VSLA VSLGQR ATISC RASES VDIY GN SF MH WY QQ KPG QPK KLI YRASN LESGI PARF SGSG RTD FTL TINP VEAD DV ATYYC CQ STED PYTF GGGT KLET K	80
CHO 细胞中的 4B6 H1	QVQLVQSGAEV VKPGASV KISCKAS GYVFTD YMNW VKQ APGQGLEW IGDINP NNGG TSY NQK FQGR ATV DKSTR TAY MEL SRL RSDD TAV YYCV KG DGF FAY WGQ GTL TVSS	81
CHO 细胞中的	DIQMTQS QSSLSAS VGDR VTITC QASQ NVGA AVAW YQQ K GKAP KLI YAS NLYT GVPS RSG SGS RTD FTL TISS LQ PEDI AT YFC CQ YQ SNY PTF GSG TKLG IK	82

4B6 L1	GKAPKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSQGTDFTLTISSMQPEDI ATYFCQQYSNYPTFGSGTKLGK	
CHO 细胞中的 4B6 H2	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQ APGQGLEWIGDINPNNGGTSYNQKFQGRVTVTVDTSISTAY MELSLRLSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLTVSS	83
CHO 细胞中的 4B6 L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQNVGAAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSQGTDFTLTISSLQPEDIAT YFCQQYSNYPTFGSGTKLGK	84
小鼠/嵌合抗体中 的 B6 HC	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYVFTDYYMNWVKQS HGKSLEWIGDINPNNGGTSYNHKFKGATVTVDKSSRTAY MELSLTSEDSAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLTVSA	85
小鼠/嵌合抗体中 的 4B6 LC	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGAAVAWYQQKP GQSPKLLIYSASNRYTGVPDFRTGSGSGTDFTLTISNMQSED LADYFCQQYSNYPTFGSGTKLGK	86
小鼠/嵌合抗体中 的 18G4 HC-DNA 序列	CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCTGGGACTGCACTGGTGAAGC CTGGGGCTTCAGTGAAGCTGCTCTGCAAGGCTCTGGCTA CACCTTCTCCAGCTACTACATACACTGGGTGAAACAGAGG CCTGGACAAGGCTTGAGTGGATTGAAATATTAATCCTTT CAATGGTGGTTCTATCTACAAATGAGAAGTTCAAGAACAAAG GCCTCGCTGACTGTAGACACATCCTCCAACACAGCCTACA TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTA TTATTGTGCAAGGTGGACTTGACTACTGGGGCCAAGGC ACCTCTCTCACAGTCTCCTCA	93
小鼠/嵌合抗体中 的 18G4 LC-DNA 序列	GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGAC AGCAGGAGAGAAGGTCACTTIGAAATGCAAGTCCAGTCAG AGTCTTTGTGGAGTGGAAACCAAAATAACTACTTATCCTG GTACCAGCAGAAACAAGGGCAGCCTCTAAACTGCTTATC TATGGGGCATCCATTAGAGAATCTGGGTCCCTGATCGATT CACAGGAAGTGGATCTGGACAGACTTCACTTACCAATT GGCAATGTGTCGCTGAAGACCTAGCAGTTATTACTGTCA GCACAATCATGGCAGCTTCTCCCACACGTTGGAGGG GGGACCAGGCTGAAATAAAA	94
小鼠/嵌合抗体中 的 21F11 HC-DNA 序列	CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGCTGAGCTGGTAAAGC CTGGGGCTTCAGTGAAGTTGCTCTGCAAGGCTCTGGCTAC ACTTTCACCAGCAACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGC CTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAATGATGCATCCTAA TAGTGGTAGTATCAATTACAATGAGAAGTTCAAGAACAAAG GCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCAGCACAGCCTACA TGCAACTCAGTAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTA CTACTGTGCAAGATCCTACTACGGTAGTAGCCCCGTACTACT TTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	95
小鼠/嵌合抗体中 的 21F11 LC-DNA 序列	GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCGCCCTC TCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAG GACATTAGCAATTATTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAG ATGGAACCTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTAA CACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTG GAACAGATTTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGGAAGA AGATATTGCCACTTACTTTGCCAGCAGGGTATACGCTTC CGTGGACGTTGGAGGGCACCAAGCTGGAAATCAA	96
小鼠/嵌合抗体中 的 26F5 HC-DNA 序列	CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGCTGAGCTGGTAAAGC CTGGGGCTTCAGTGAAGTTGCTCTGCAAGGCTCTGGCTAC ACTTTCACCAGCAACTGGATGCACTGGATGAAGCAGAGGC CTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAATGATTGAGCCTAG TACTTCTGGTACTATCTACAAATGAGAAGATTCAAGAACCAAG GTCACACTGACTGTAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACA TGCAACTCAGCAGCAGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTA TTACTGTGCAAGAGGAACCTGGACGGTGGACTACTTTGAT	97

小鼠/嵌合抗体中的 26F5 LC-DNA 序列	TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA GACATTGTGCTGACCCAAATCTCCAGCTTCTTGCTGTGTC TCTAGGGCAGAGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGCGAA AGTGTGATAGTTATGGCAATAGTTTATACACTGGTACCA ACAGAAGCCAGGACGCCACCCAAACTCCTCATCCATCGT GCATCCAACCTAGAATCTGGATCCCTGCCACATTAGCG GCAGTGGCTAGGACAGACTCACCCCTACCCATAATCC TGTGGAGGCTGATGATGTTGCAACCTATTACTGTCAACAA AGTAAGGAGGACCCGTACACGTTCGGAGGGGGACCAAG CTGGAAATAAAA	98
CHO 细胞中的 4B6 H3-DNA 序列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGCGCAGAAGTGGTCAAGC CAGGAGCCTCAGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGCTA CGTGTTCACCGACTACTATGAACTGGGTGAAACAGGCA CCAGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGATATTAACCTA ACAATGGCGGAACAAGCTACAATCAGAAGTTCAAGGAG GGCAACCGTGACAGTGGACAAATCTACTAGTACCGCCTAT ATGGAACGTCTCGGCTGAGAAGCGACGATACCGCTGTG ACTATTGTGTCAAGTGGGCGACGGACCCCTCGCATATTG GGGCCAGGGGACACTGGTACTGTCAAGCTCC	99
CHO 细胞中的 4B6 L3-DNA 序列	GACATTAGATGACACAGTCTCAGAGTAGCCTGTCAGCCA GCGTGGCGACCGAGTCACCACATGCCAGGCCAGTC GAACGTGGAGCCGCTGCGCTGGTACCAAGCAGAAGCCA GGCAAGCTCCAAGCTGCTGATCTACTCCGATCTAATC GGTACACAGGGTGCAGCAGATTCACTGGCTCAGGGAG CGGAACGTGACTTACTCTGACCATCAGCTCCATGCAGCCT GAAGATATTGCCACCTACTCTGCCAGCAGTACTCAAAC ATCCAACCTTGGCAGCGGGACAAACTGGGATCAAG	100
小鼠/嵌合抗体中的 22C9 HC-DNA 序列	CAGGTCCAACGTGAGCAGTCTGGGCTGAGTTGGTAAAGC CGGGGGCTTCAGTGAAGTTGCTCTGCAAGGCTCTGGCTA CACTTTCACCAAGCTACTGGATGCACTGGGTGTGGCAGAGG CCTGGACAAGGCCCTGAGTGGATTGGAATGATTCACTCCTA ATAGTGATATTACTAACTGCAATGAGAATTCAAGCACAC GGTCACACTGACTGTTGACAATCCTCCAGTACAGCCTAC ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCT TTTACTGTGCAAGATCGGACGGTAGTAGCTACTGGTACTTC GATGTCGGGGCACAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCA	101
小鼠/嵌合抗体中的 22C9 LC-DNA 序列	AGTATTGTGATGACCCAGACTCCAAATTCTGTCTGTATC AGCAGGAGACAGGGTACCCATAACCTGCAAGGCCGGTCAG AGTGTGATAATGATGATGCTGTTGGTACCAACAGAAGCCAG GGCAGTCTCTAAACTGCTGATATATTATGCACTCAATCGT TATACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGG GACGGATTTCACTTTACCCATCAGCAGTGTGCAAGGCTGAA GACCTGGCAGTTATTCTGTCAGCAGGATTAGCTCTCC GCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGAACTGAAAC	102
293 细胞中的 23A11 H3	AGTATTGTGATGACCCAGACTCCAAATTCTGTCTGTATC AGCAGGAGACAGGGTACCCATAACCTGCAAGGCCGGTCAG AGTGTGATAATGATGATGCTGTTGGTACCAACAGAAGCCAG GGCAGTCTCTAAACTGCTGATATATTATGCACTCAATCGT TATACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGG GACGGATTTCACTTTACCCATCAGCAGTGTGCAAGGCTGAA GACCTGGCAGTTATTCTGTCAGCAGGATTAGCTCTCC GCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGAACTGAAAC	103
293 细胞中的 23A11 L5	GACATCGTGTGACCCAGAGGCCAGGCCAGCCTGGCGTGA GCGTGGGCCAGAGGCCACCATCACCTGCAAGGCCAGCG AGAGCGTGGACATCTACGGCAACAGCTCATGCAATTGTA TCAACAGAAGGCCAGGCCAGGCCAGCTGCTGATCTAT CGGGCCAGCAACCTGGAGGAGCGGCATCCCCGCCAGATTCA CGGGCAGCGCAGCAGAACCGACTTCACCCGTACCATCAA	104

	CCCCGTGGAGGCCAACGACACCGCCACCTACTACTGCCAA CAGAGCAACGACGACCCCTACACCTCGGCGGCGCACCA AGCTGGAGACCAAG	
293 细胞中的 23F11 H4	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCCAGGGTGAAGAAG CCCAGGCCAGCGTGAAGCTGAGCTGCAAGGCCAGCGCT ACATCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAG ACCCGGCCAGGGCTGGAGTGGATCGGCATGATCCAGCCC AACAGCGCCGGCACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGAAG AAGGCCACCCCTGACCGTGGACAAGAGCATCAGCACCGCCT ACATGGAGCTGAGCAGACTGACCAGCAGCACCCGCGT GTACTACTGCGCCAGAGGCCGGCACCGTGGACTACTTC GACTACTGGGCCAGGGCAGCACCCCTGACCGTCTCgagC	105
293 细胞中的 23A11 L4	GACATCGTGTGACCCAGAGCCCCGCCAGCCTGGCGTGA GCGTGGGCCAGAGAGCCACCATCACCTGCAGAGCCAGCG AGAGCGTGGACATCTACGGCAACAGCTTCATGCATTGGTA TCAACAGAACGCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTAT CGGGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCATCCCCGCCAGATTCA GCGGCAGCGGCAGCAGAACCGACTTCACCCCTGACCATCAA CCCCGTGGAGGCCAACGACACCGCCACCTACTACTGCCAG CAGAGCACCGAACAGACCCCTACACCTCGGCGGCGCACCA AGCTGGAGATCAAG	106

图34

## 内化进入M38/hPD-L1

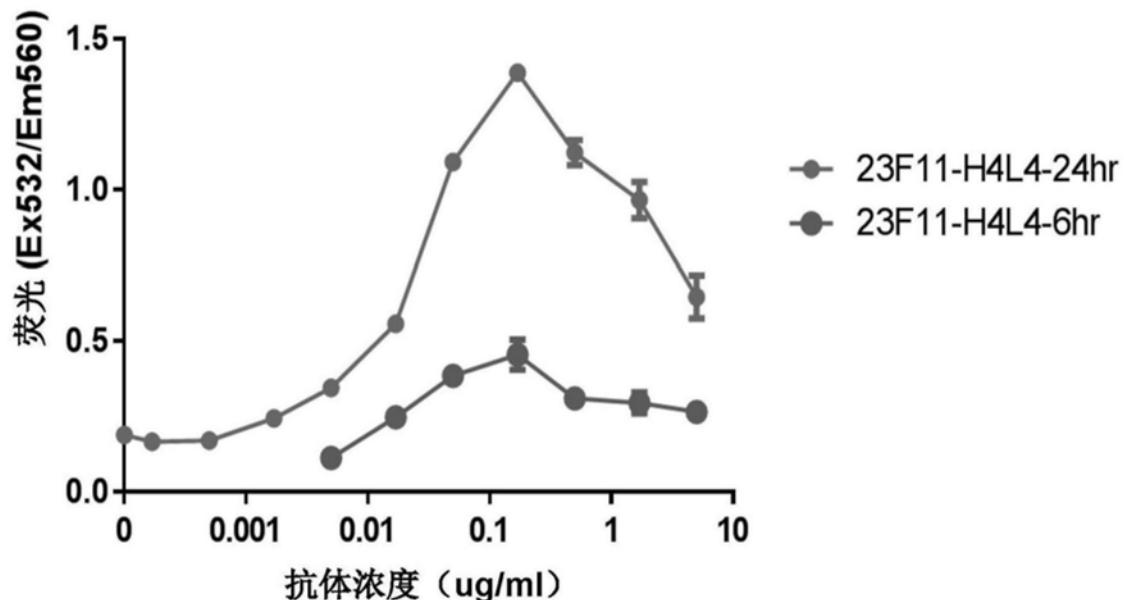


图35

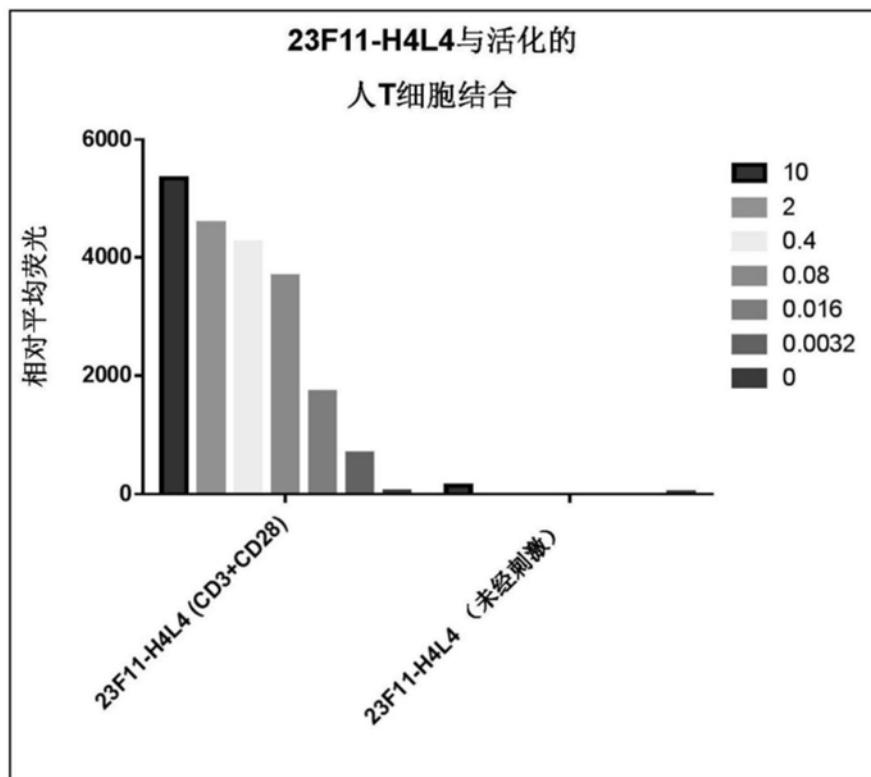


图36A

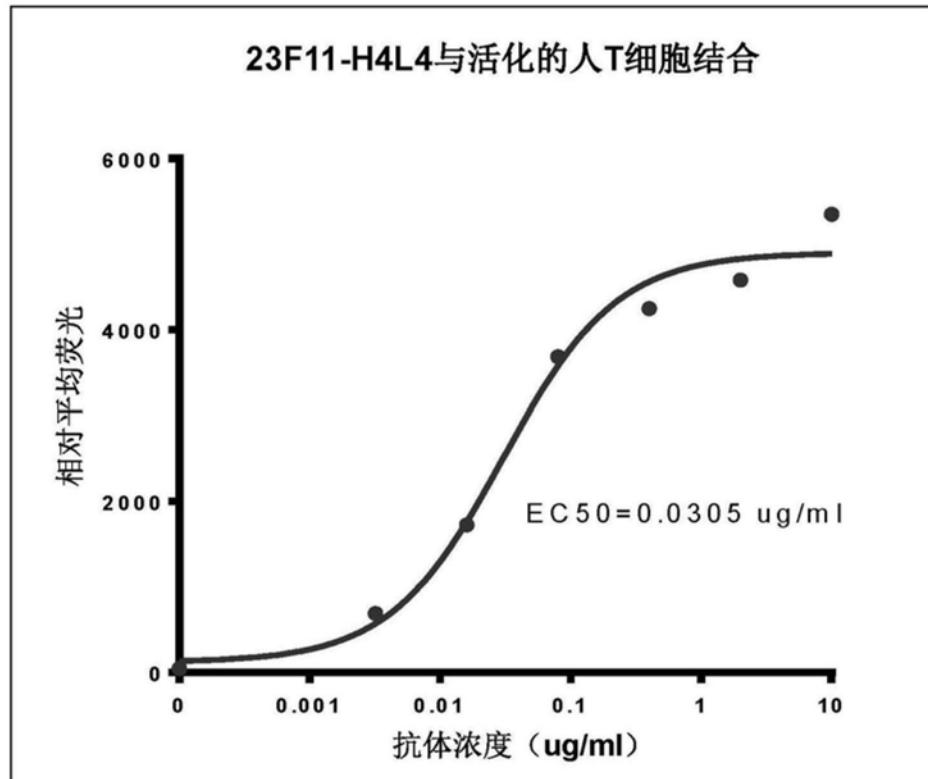


图36B

在人PD-1敲入C57BL/6小鼠的MC38/hPD-L1肿瘤模型中23F11-H4L4的有效性研究 (N=10)

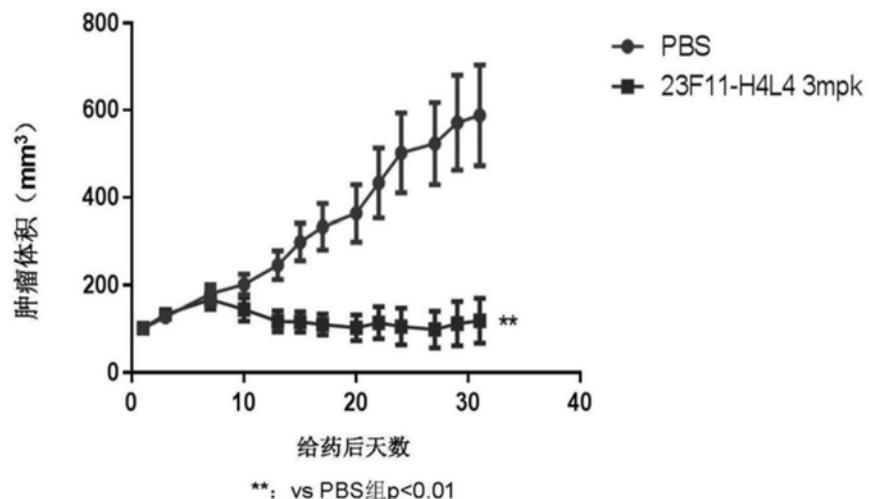


图37A

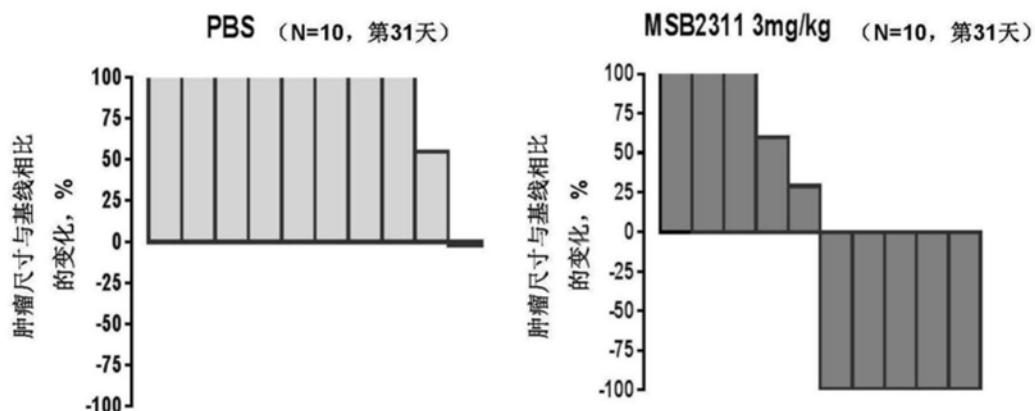


图37B

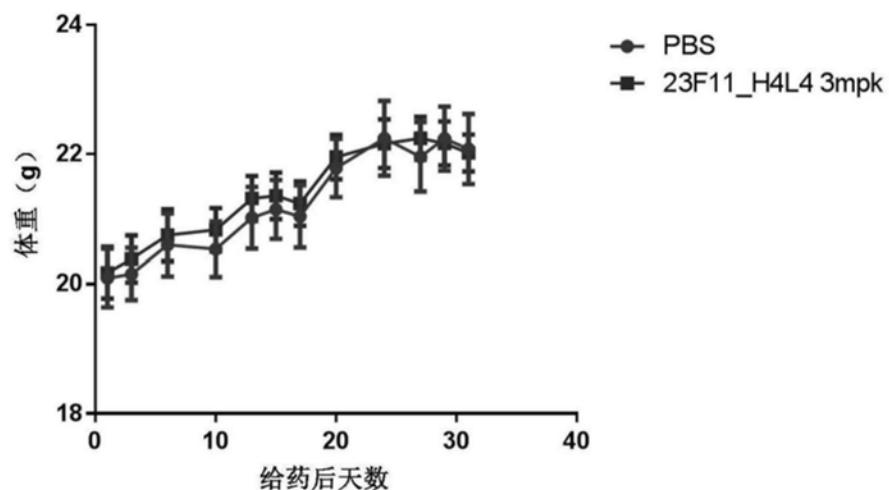


图37C

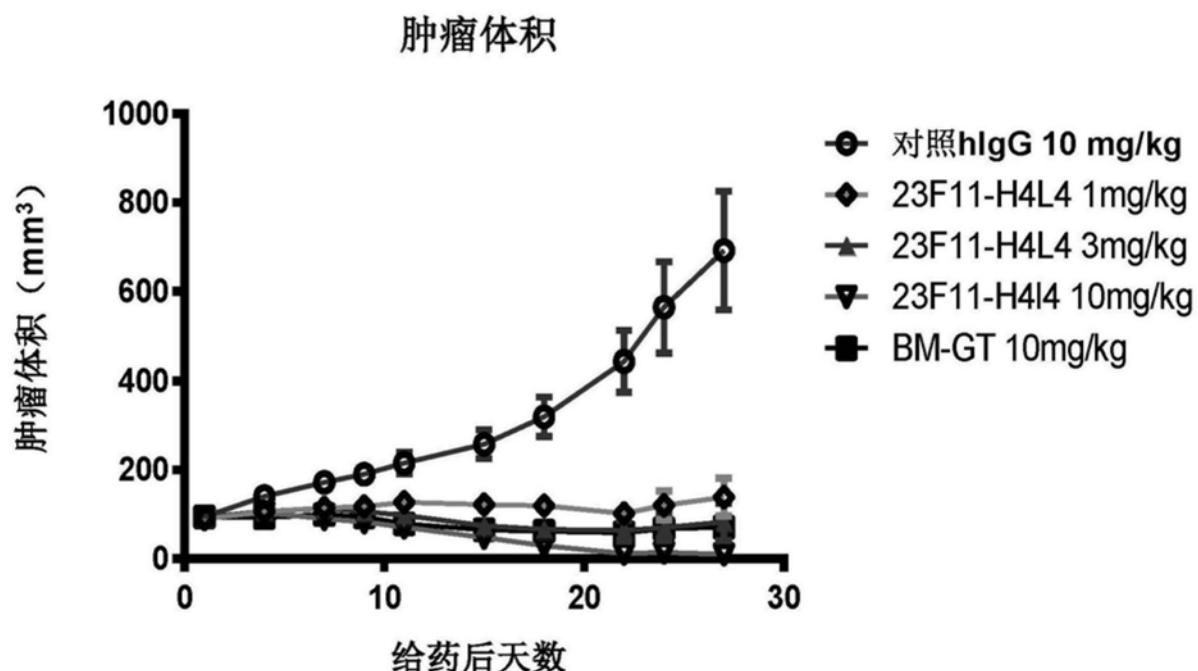


图38A

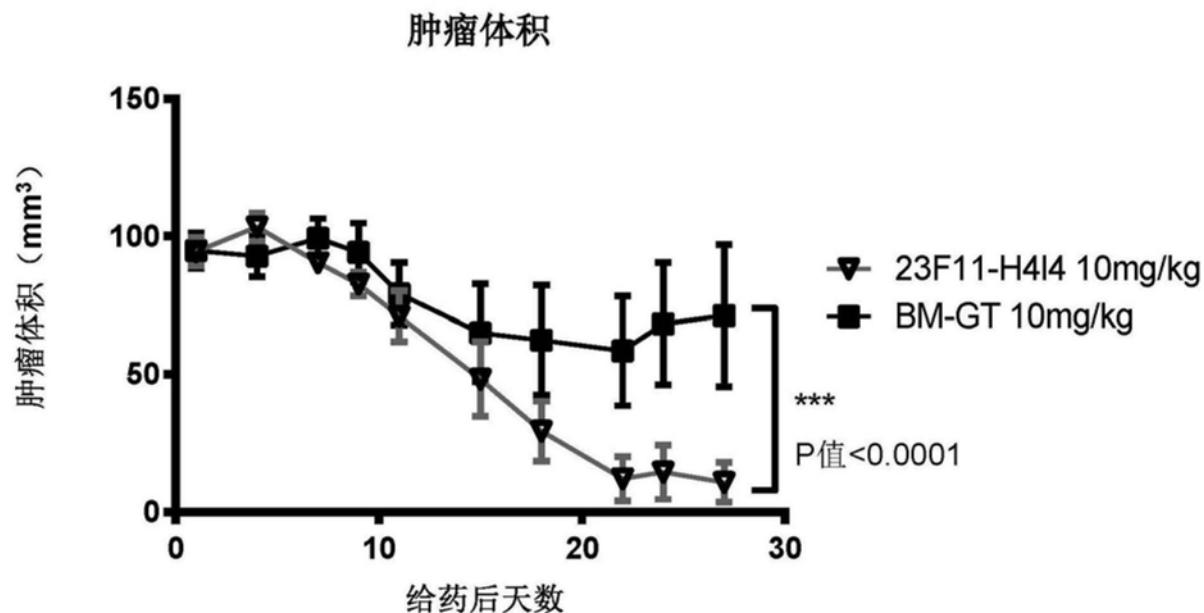


图38B

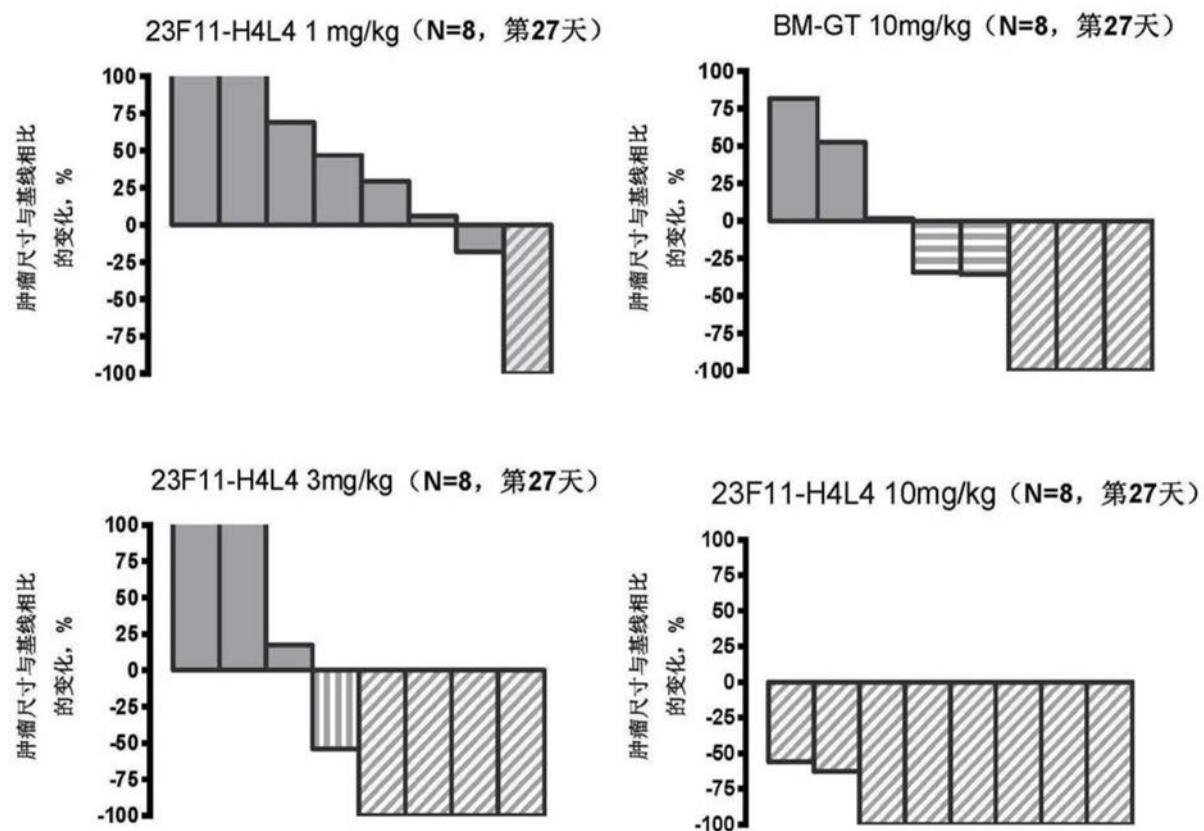


图38C

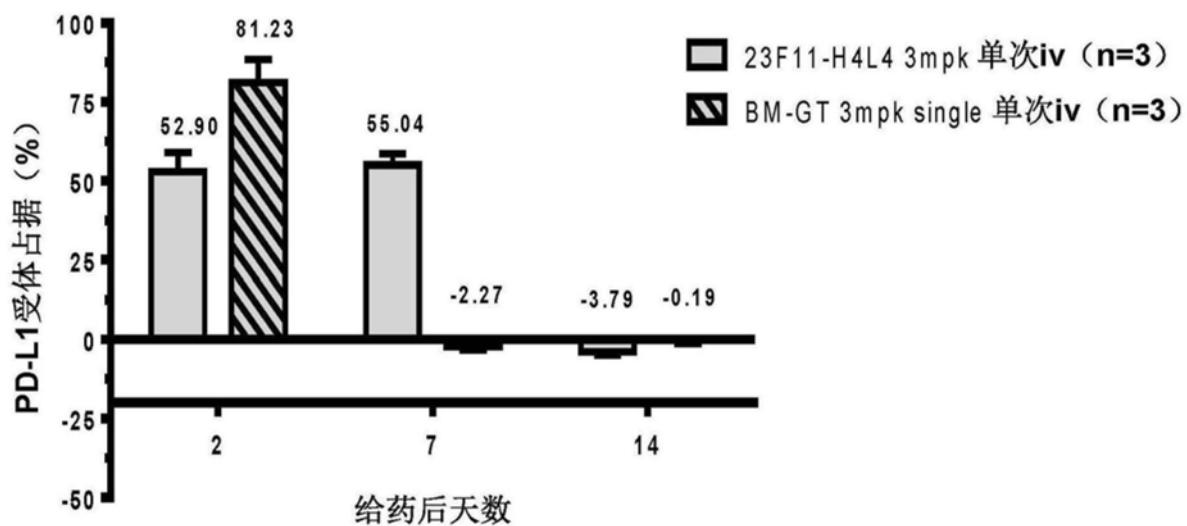


图39

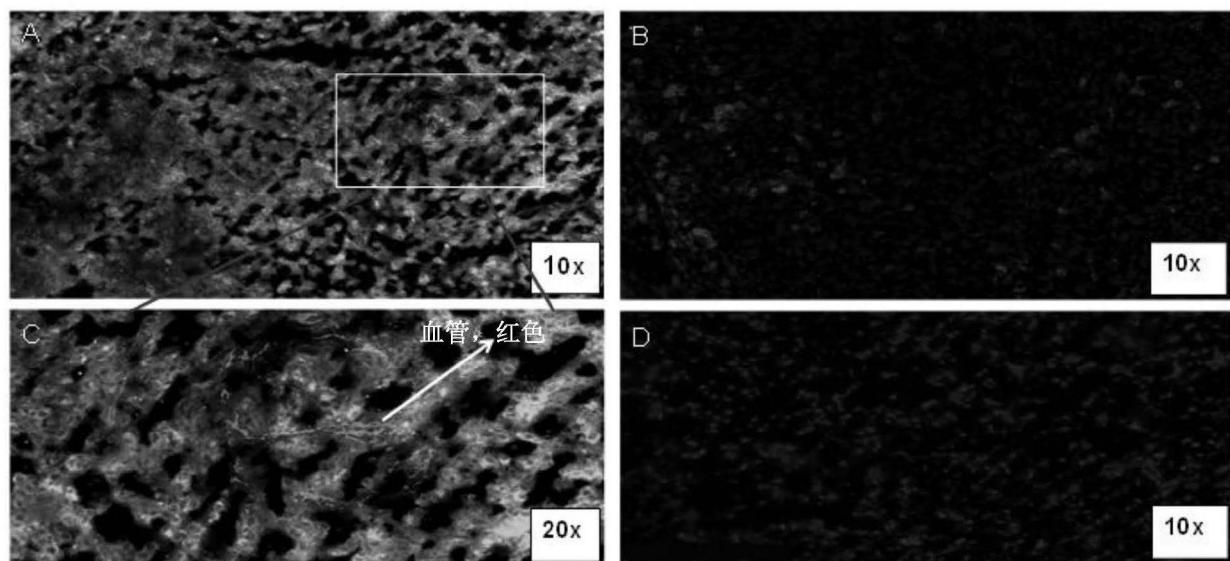


图40