



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108997499 A

(43)申请公布日 2018.12.14

(21)申请号 201811063916.6

(22)申请日 2018.09.12

(71)申请人 首都医科大学附属北京胸科医院
地址 101149 北京市通州区北关大街9号院
申请人 北京市结核病胸部肿瘤研究所

(72)发明人 张洪涛 王小珏 易玲 闫卓红

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 吕露

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页

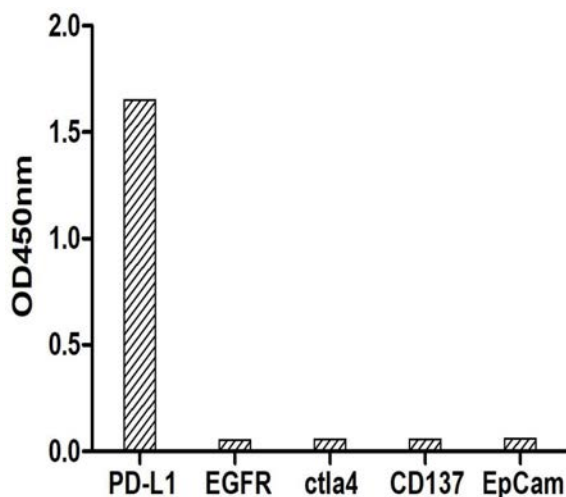
序列表10页 附图7页

(54)发明名称

一种抗人PD-L1抗体及其应用

(57)摘要

本发明涉及免疫技术领域,具体而言,涉及一种抗人PD-L1抗体及其应用。所述抗体包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,其中所述抗原结合结构域包括选自下述氨基酸序列的至少一个互补决定区,或:与下述氨基酸序列的互补决定区具有至少80%的序列同一性,且与PD-L1蛋白具有 $K_d \leq 2.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 亲和力;互补决定区CDR-VL1、CDR-VL2、CDR-VL3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1-3所示;互补决定区CDR-VH1、CDR-VH2、CDR-VH3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4-6所示。所述结合蛋白活性强,与人PD-L1蛋白具有高亲和力。



1. 一种包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,其特征在于,其中所述抗原结合结构域包括选自下述氨基酸序列的至少一个互补决定区,或:与下述氨基酸序列的互补决定区具有至少80%的序列同一性,且与PD-L1蛋白具有 $K_d \leq 2.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 亲和力;

互补决定区CDR-VL1、CDR-VL2、CDR-VL3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1-3所示;

互补决定区CDR-VH1、CDR-VH2、CDR-VH3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4-6所示。

2. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其特征在于,所述结合蛋白中包括至少3个CDRs;或者,所述结合蛋白包括至少6个CDRs;

优选地,所述结合蛋白包括序列依次如SEQ ID NO:7-10所示的轻链骨架区FR-L1、FR-L2、FR-L3及FR-L4,和/或,序列依次如SEQ ID NO:11-14所示的重链骨架区FR-H1、FR-H2、FR-H3及FR-H4。

3. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其特征在于,所述结合蛋白还包括抗体恒定区Fc;

优选地,所述恒定区Fc包括轻链恒定区和重链恒定区;

优选地,所述轻链恒定区序列如SEQ ID NO:15所示;

优选地,所述重链恒定区序列如SEQ ID NO:16所示;

优选地,所述恒定区Fc序列选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD任何其中之一恒定区的序列;

优选地,所述恒定区Fc序列选自IgG2恒定区的序列;

优选地,所述恒定区Fc序列选自IgG2a恒定区的序列;

优选地,所述恒定区Fc序列选自IgG2a/kappa恒定区的序列;

优选地,所述恒定区Fc的种属来源为牛、马、乳牛、猪、绵羊、山羊、大鼠、小鼠、狗、猫、兔、骆驼、驴、鹿、貂、鸡、鸭、鹅、火鸡、斗鸡或人;

优选地,所述恒定区Fc来源于小鼠;

优选地,所述恒定区Fc来源于人。

4. 根据权利要求2所述的结合蛋白,其特征在于,所述结合蛋白为纳米抗体、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、Fd、scFv、scFv-Fc嵌合片段、双特异抗体和抗体最小识别单位中的一种;

优选地,所述结合蛋白为scFv-Fc嵌合片段,所述scFv-Fc嵌合片段包含权利要求3中所述的恒定区Fc、权利要求1~3中任一项所述的互补决定区、权利要求2中所述的轻链骨架区和所述的重链骨架区;

优选地,所述恒定区Fc为人Ig-Fc氨基酸;

优选地,所述人Ig-Fc氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示;

优选地,所述scFv-Fc嵌合片段还包括人工柔性连接肽。

5. 一种分离的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子为DNA或RNA,其编码权利要求1~4任一项所述的结合蛋白。

6. 一种载体,其特征在于,其包含权利要求5所述的核酸分子。

7. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞包括权利要求5所述的核酸分子或权利要求6所述的载体。

8. 权利要求1~4任一项所述的结合蛋白在制备用于诊断和/或治疗疾病的药物中的应用;所述疾病包括癌症和/或免疫关联疾病;

优选地,所述癌症包括肺癌、黑色素瘤、NSCLC、经典霍奇金淋巴瘤、HNSCC、肾细胞癌、尿

路上皮癌、头颈部癌、胃癌、血液恶性肿瘤、前列腺癌、子宫颈癌、脑癌、肝细胞癌和结直肠癌的一种或多种；

优选地，所述免疫关联疾病包括病毒感染、细菌感染、真菌感染、寄生虫和类风湿关节炎、溃疡性结肠炎、天疱疮、皮炎、阿尔茨海默病的一种或多种。

9. 一种抗体组合物，其包括权利要求1~4任一项所述的结合蛋白以及第二抗体；

所述第二抗体特异性识别PD-L1，且其识别表位不同于所述结合蛋白；

优选地，所述第二抗体的轻链可变区VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示；重链可变区VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示。

10. 一种试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括权利要求1~4任一项所述的结合蛋白、权利要求5所述的核酸分子、权利要求6所述的载体和权利要求9所述的抗体组合物中的一种或多种。

一种抗人PD-L1抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫技术领域,具体而言,涉及一种抗人PD-L1抗体及其应用。

背景技术

[0002] 世界范围肺癌、特别是女性肺癌发病呈上升趋势,肺癌是我国发病率最高的恶性肿瘤,其死亡率也居恶性肿瘤之首。目前国际发达国家在肺癌的防治上已取得成效,肺癌死亡率正逐年下降,除控烟、早期发现外,靶向治疗为代表的精准治疗手段也使得肺癌患者受益,特别是近年来肺癌的免疫治疗取得实质突破,其有效治疗较传统化疗生存期显著延长。肺癌免疫治疗主要是针对一种表达于衰竭状态T淋巴细胞的表达分子PD-1(程序性死亡受体-1),利用该分子特异性抗体或其配体(PD-L1)抗体,封阻PD-1-PD-L1介导的T细胞负性调节信号,从而逆转T细胞衰竭态势,恢复其杀伤肿瘤细胞活性,除肺癌这一最大适应症外,PD-1-PD-L1阻断治疗广泛用于黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、霍奇金淋巴瘤、头颈部癌、宫颈癌、胃癌、肠癌等MSI-H(高度微卫星不稳定)或DNA错配修复缺陷,具有广谱抗肿瘤活性,目前肺癌PD-1靶点治疗性抗体主要有Keytruda和Opdivo,两者对肺癌患者治疗有效率约20%,接受PD-1抗体治疗的晚期肺癌患者5年生存率提高5-6倍,为此,筛选治疗有效候选患者具有重要临床意义,也可避免盲目用药。目前具有临床指导价值的预测方法包括肿瘤突变载量(TMB)、MSI检测和PD-L1表达分析,PD-L1检测是最为经典的检测方法,国际通行两个检测试剂,分别是Ventana PD-L1兔单克隆抗体(克隆SP142)和PD-L1, IHC 22C3pharmDx鼠单克隆抗体atezolizumab(克隆22C3),用于免疫组化伴随检测,已经准入作为临床肿瘤组织PD-L1表达水平的标准检测抗体,其检出肿瘤细胞表达率超过50%时,Keytruda可用于一线非小细胞肺癌治疗。此外,PD-L1表达与多种肿瘤预后相关,其检测可以预测存活期。

[0003] 鉴于具有临床指导价值的潜在预测,局限于肿瘤突变载量(TMB)、MSI检测和组织PD-L1表达分析等几种方法,前两者检测涉及分子生物学手段和核酸全基因组测序,费用高,且依赖于手术或穿刺获得肿瘤组织,在非手术或转移病灶不易获取组织标本患者检测应用受限,此外,TMB和MSI检测尚未被确定为临床标准的检测方法。近年来,上述准入的抗体制剂进行免疫组化PD-L1表达分析(目前FDA批准的唯一诊断伴侣为PD-L1 IHC 22C3pharmDx-用于筛选pembrolizumab治疗的患者),相对简便,临床应用更为普遍,目前,这两种试剂批准抗体仅限于免疫组化(IHC)伴随检测,针对肿瘤组织,同样依赖于组织标本获取;此外,PD-L1阴性仍存在不可靠性,检测结果可能因为抗体不同和组织样本不同而异,同是,肿瘤组织异质性,低表达以及诱导基因也可能导致抽样误差或假阴性,特别是免疫组化染色分析,其临床PD-L1组织表达临界值读取存在主观因素,因此,目前PD-L1-IHC阳性仍然是一种不完全反应生物标志物,不能作为筛选PD-1-PD-L1抑制剂治疗患者的“确定性”指标,需要不断发掘精确、简便可行、具有系统性的多组分预测标志物。

[0004] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0005] 本发明涉及一种新颖的包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,并对该结合蛋白的制备、应用等方面进行研究。其可高效的用于不依赖于肿瘤患者组织标本的补充PD-L1分析方法,建立起适用于肺癌等恶性肿瘤血液标本测定sPD-L1水平的酶联免疫检测(ELISA)技术,检测时需要采集患者少许血液标本实施检测,血液采集无创或微创,便于反复多次检测,且检测灵敏度高。

[0006] 所述抗原结合结构域包括选自下述氨基酸序列的至少一个互补决定区,或:与下述氨基酸序列的互补决定区具有至少80%的序列同一性,且与PD-L1蛋白具有 $K_d \leq 2.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 的亲合力;

[0007] 互补决定区CDR-VL1、CDR-VL2、CDR-VL3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1-3所示;

[0008] 互补决定区CDR-VH1、CDR-VH2、CDR-VH3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4-6所示。

[0009] 一个重要优点在于,所述结合蛋白活性强,与人PD-L1蛋白具有高亲和力。

附图说明

[0010] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0011] 图1为本发明实验例1中的ELISA鉴定PD-L1抗体特异性的结果图;

[0012] 图2为本发明实验例1中的Western blot鉴定PD-L1抗体特异性的结果图;M:Marker;1:PD-L1-his;2:PD-1-his;3:PD-L1-hFc;

[0013] 图3为本发明实验例2中的PD-L1抗体和PD-L1蛋白亲和力的检测;

[0014] 图4为本发明实验例2中的不同浓度的PD-L1-scFv结合PD-L1蛋白的ELISA曲线图;

[0015] 图5为本发明实验例3中的流式细胞术检测pcDNA3.1-PD-L1质粒的转染率;FITC-A:GFP;APC-A:PD-L1;

[0016] 图6为本发明实验例3中的流式细胞术检测PD-L1抗体与细胞膜上的PD-L1蛋白结合的结果图;FITC-A:GFP;APC-A:PD-L1;

[0017] 图7为本发明实验例3中的流式细胞术检测PD-L1抗体与肺腺癌H2009细胞中PD-L1结合的结果图;APC-A:PD-L1;

[0018] 图8为本发明实验例3中的流式细胞术检测亲和素标记的PD-L1抗体与肺腺癌H2009细胞中PD-L1结合的结果图;APC-A:PD-L1;

[0019] 图9为本发明实验例4中的PD-L1抗体建立夹心ELISA的标准曲线图;

[0020] 图10为本发明实验例4中的PD-L1抗体检测肺癌病人和正常人血清中的sPD-L1的结果图;

[0021] 图11为本发明实验例5中的PD-L1抗体免疫组化检测转染293细胞表达PD-L1的结果图(20 $\times$);

[0022] 图12为本发明实验例6中的流式细胞术检测转染293细胞表达PD-L1结果图;APC-A:PD-L1;

[0023] 图13为本发明实验例6中的流式细胞术检测PD-L1抗体对PD-L1与PD-1的结合的封阻结果图;

[0024] 图14为本发明实验例6中的ELISA检测PD-L1抗体对PD-1与PD-L1的结合的封阻结果图。

具体实施方式

[0025] 为了本发明可以更容易地理解,选择的术语在下文定义。

[0026] 术语“分离的结合蛋白”是这样的蛋白,其由于衍生起源或来源不与天然结合的组分结合,所述天然结合的组分在其天然状态下与其伴随;基本上不含来自相同物种的其他蛋白;由来自不同物种的细胞表达;或在自然界中不存在。因此,化学合成或在不同于其天然起源的细胞系统中合成的蛋白将是与其天然结合的组分“分离的”。还可以通过分离,使用本领域众所周知的蛋白纯化技术,使得蛋白基本上不含天然结合的组分。

[0027] 术语“包括抗原结合结构域的分离的结合蛋白”泛指包含CDR区的一切蛋白/蛋白片段。“抗体”此用语包括多克隆抗体及单克隆抗体以及这些抗体的抗原化合物结合片段,包括Fab、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、双特异抗体和抗体最小识别单位,以及这些抗体和片段的单链衍生物。抗体的类型可以选择IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD。此外,“抗体”此用语包括天然发生的抗体以及非天然发生的抗体,包括例如嵌合型(chimeric)、双功能型(bifunctional)和人源化(humanized)抗体,以及相关的合成异构形式(isoforms)。“抗体”此用语可和“免疫球蛋白”互换使用。

[0028] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基端结构域。重链的可变结构域可以被称为“VH”。轻链的可变结构域可以被称为“VL”。这些结构域通常是抗体的最可变的区域,并含有抗原结合位点。轻链或重链可变区(VL或VH)由三个称为“互补决定区”或“CDR”的高变区打断的骨架区构成。骨架区和CDR的范围已被精确定义,例如在Kabat(参见《免疫重要的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest), E. Kabat等,美国卫生与人类服务部(U.S. Department of Health and Human Services), (1983)和Chothia中。抗体的骨架区,即构成要件轻链和重链的骨架区,起到定位和对齐CDR的作用,所述CDR主要负责与抗原的结合。

[0029] 当在本文中使用时,“骨架”或“FR”区意味着抗体可变结构域的排除被定义为CDR的那些区域之外的区域。每个抗体可变结构域骨架可以被进一步细分成被CDR分隔开的毗邻区域(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0030] 通常情况下,重链和轻链的可变区VL/VH可由以下编号的CDR与FR按如下组合排列连接获得:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0031] 当在本文中使用时,与多肽或核酸相关联的术语“纯化的”或“分离的”是指多肽或核酸不是处于其天然介质中或天然形式下。因此,术语“分离的”包括从其原始环境,例如如果它是天然存在的,从天然环境取出的多肽或核酸。例如,分离的多肽通常不含通常与其结合或通常与其混合或在溶液中的至少某些蛋白质或其他细胞组分。分离的多肽包括细胞裂解物中包含的天然生产的所述多肽,纯化或部分纯化形式的所述多肽,重组多肽,被细胞表达或分泌的所述多肽,以及在异源宿主细胞或培养物中的所述多肽。与核酸相关联,术语分离的或纯化的指示例如所述核酸不在其天然的基因组背景中(例如在载体中,作为表达盒,连接到启动子,或人工引入到异源宿主细胞中)。

[0032] 由于体内肿瘤微环境中PD-L1主要表达于肿瘤细胞或肿瘤其它基质细胞,PD-L1表

达可从肿瘤等细胞表面经间质蛋白酶消化脱落或者以不同的mRNA剪切蛋白释放入血循环,血液中PD-L1水平,潜在的反映肿瘤环境中PD-L1表达状况,其表达水平与肿瘤大小、坏死和患者预后直接有关,可溶性的PD-L1 (sPD-L1) 同样发挥抑制T细胞活性作用。PD-1抗体治疗与肿瘤微环境非肿瘤基质细胞表达PD-L1有高度相关性,表明除肿瘤细胞外,其它细胞PD-L1表达对免疫逃逸也发挥重要作用,并且肿瘤组织中(包括非肿瘤细胞)表达水平越高,该类抗体封阻药物治疗越有效,sPD-L1更能代表不同来源机体PD-L1水平,包括肿瘤微环境肿瘤细胞和其它肿瘤基质细胞,此外,sPD-L1能在多种肿瘤及肿瘤以外的自身免疫病以及感染性疾病患者血清中检测到。

[0033] 本发明提供的一种包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,所述抗原结合结构域包括选自下述氨基酸序列的至少一个互补决定区,或:与下述氨基酸序列的互补决定区具有至少80%的序列同一性,且与PD-L1蛋白具有 $K_d \leq 2.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 的亲合力;

[0034] 互补决定区CDR-VL1、CDR-VL2、CDR-VL3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1-3所示;

[0035] 互补决定区CDR-VH1、CDR-VH2、CDR-VH3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4-6所示。

本领域公知,抗体的结合特异性及亲合力均主要由CDR序列决定,根据成熟、公知的现有各项技术可轻易地将非CDR区域的氨基酸序列改变而获得具有相类似的生物活性的变体。因此,本发明也包括该结合蛋白的“功能性衍生物”。“功能性衍生物”是指氨基酸替换的变体(可以是取代、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有相同或相似活性的抗体或片段),一个功能性衍生物保留有可检测的结合蛋白活性,优选为能结合cTnI的抗体的活性。“功能性衍生物”可以包含“变体”和“片段”,因其具有与本发明所述的结合蛋白完全相同的CDR序列,因此具有相类似的生物活性。

[0036] 在一些实施方式中,所述抗原结合结构域与下述氨基酸序列的互补决定区具有至少85%,或90%,或91%,或92%,或93%,或94%,或95%,或96%,或97%,或98%,或99%的序列同一性,且与PD-L1蛋白具有 $K_d \leq 2.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$, K_d 值也可以选择 $1.9 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1.8 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1.79 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1.7 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1.6 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1.5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1.4 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1.3 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1.2 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $9.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $8.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $7.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $6.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $5.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $4.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 的亲合力等。

[0037] 其中,亲合力按照本发明说明书中的方法测定。

[0038] 在一些实施方式中,所述结合蛋白中包括至少3个CDRs(例如3个重链CDRs或3个轻链CDRs);或者,所述结合蛋白包括至少6个CDRs。

[0039] 在一些实施方式中,所述结合蛋白包括序列依次如SEQ ID NO:7-10所示的轻链骨架区FR-L1、FR-L2、FR-L3及FR-L4,和/或,序列依次如SEQ ID NO:11-14所示的重链骨架区FR-H1、FR-H2、FR-H3及FR-H4。

[0040] 在一些实施方式中,所述结合蛋白还包含抗体恒定区序列。

[0041] 在一些实施方式中,所述结合蛋白包括抗体恒定区Fc。

[0042] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc包括轻链恒定区和重链恒定区。

[0043] 在一些实施方式中,所述轻链恒定区序列如SEQ ID NO:15所示。

[0044] 在一些实施方式中,所述重链恒定区序列如SEQ ID NO:16所示。

[0045] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc序列选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、

IgD任何其中之一恒定区的序列。

[0046] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc序列选自IgG2恒定区的序列。

[0047] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc序列选自IgG2a恒定区的序列。

[0048] 在一些实施方式中,所述恒定区序列选自IgG2a/kappa恒定区的序列。

[0049] 在一些实施方式中,所述恒定区的种属来源为牛、马、乳牛、猪、绵羊、山羊、大鼠、小鼠、狗、猫、兔、骆驼、驴、鹿、貂、鸡、鸭、鹅、火鸡、斗鸡或人。

[0050] 在一些实施方式中,所述恒定区来源于小鼠。

[0051] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc来源于人。

[0052] 在一些实施方式中,所述结合蛋白的轻链氨基酸的组成包括:

[0053] FR-L1-CDR-VL1-FR-L2-CDR-VL2-FR-L3-CDR-VL3-FR-L4-Constant region;

[0054] 或者;

[0055] Leader sequence-FR-L1-CDR-VL1-FR-L2-CDR-VL2-FR-L3-CDR-VL3-FR-L4-Constantregion-Stop codon(Leader sequence序列见SEQ ID NO:20)。

[0056] 在一些实施方式中,所述结合蛋白的重链氨基酸的组成包括:

[0057] FR-H1-CDR-VH1-FR-H2-CDR-VH2-FR-H3-CDR-VH3-FR-H4-Constant region;

[0058] 或者;

[0059] Leader sequence-FR-H1-CDR-VH1-FR-H2-CDR-VH2-FR-H3-CDR-VH3-FR-H4-Constantregion-Stop codon(Leader sequence序列见SEQ ID NO:21)。

[0060] Constant region即恒定区Fc。

[0061] 在一些实施方式中,所述结合蛋白为包含可变区和恒定区Fc的完整抗体。

[0062] 在一些实施方式中,所述结合蛋白为抗体的“功能片段”,如纳米抗体、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、Fd、scFv、scFv-Fc嵌合片段/双特异抗体和抗体最小识别单位中的一种。

[0063] 本发明所述的“功能片段”特别地指对于PD-L1具有与母体抗体相同特异性的抗体片段。除上述功能片段外,还包括半衰期已增加的任何片段。这些功能片段通常具有与其来源抗体相同的结合特异性。本领域技术人员根据本发明说明中记载的内容推断,本发明的抗体片段可以通过比如酶消化的方法(包括胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)和/或通过化学还原分裂二硫键的方法获得上述的功能片段。抗体片段还可以通过也是本领域技术人员所知的重组遗传学技术或通过例如自动肽合成仪,比如Applied BioSystems等销售的自动肽合成仪,通过肽合成获得。

[0064] 在一些实施方式中,所述结合蛋白为scFv-Fc嵌合片段,所述scFv-Fc嵌合片段包含上述的恒定区Fc、上述的互补决定区、上述的轻链骨架区和重链骨架区。

[0065] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc为人Ig-Fc氨基酸。

[0066] 在一些实施方式中,所述人Ig-Fc氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示。

[0067] scFv(single chain antibody fragment, scFv)即单链抗体片段,是由抗体重链可变区和轻链可变区通过15~20个氨基酸的人工柔性连接肽(Linker)连接而成。

[0068] scFv-Fc嵌合片段即单链抗体嵌合形式,是由scFv和恒定区Fc组成。

[0069] 在一些实施方式中,所述scFv-Fc嵌合片段还包括人工柔性连接肽。

[0070] 在一些实施方式中,所述人工柔性连接肽的氨基酸的数目为10~29个,序列为(GGGGS)_n, n为2、3、4、5、6,或序列为GSTSGAGKSSEGKG。所述人工柔性连接肽还包括其他具有

连接作用的氨基酸序列。

[0071] 在一些实施方式中,所述scFv-Fc嵌合片段即单链抗体嵌合形式的组成包括: Variable region of heavy chain+Linker+Variable region of light chain+Human Fc tag;

[0072] 或者;

[0073] Signal peptide+Variable region of heavy chain+Linker+Variable region of light chain+HumanFc tag+Stop codon。

[0074] 所述Variable region of heavy chain即重链可变区(FR-H1-CDR-VH1-FR-H2-CDR-VH2-FR-H3-CDR-VH3-FR-H4)。

[0075] 所述Variable region of light chain即轻链可变区(FR-L1-CDR-VL1-FR-L2-CDR-VL2-FR-L3-CDR-VL3-FR-L4)。

[0076] 所述Signal peptide即信号肽氨基酸,序列如SEQ ID NO:22所示。

[0077] 本发明的另一方面还在于提供一种分离的核酸分子,所述核酸分子为DNA或RNA,其编码如上所述的结合蛋白。

[0078] 其中的核酸序列与至少一种调节序列可操作连接。“可操作连接”指的是编码序列以允许编码序列的表达的方式与调节序列连接。调节序列选择用来在合适的宿主细胞中指导目的蛋白质的表达,包含启动子、增强子和其它的表达调控元件。

[0079] 在一些实施方式中,编码轻链氨基酸和重链氨基酸的DNA序列分别见SEQ ID NO: 23-24。

[0080] 在本文中,核酸包含其保守置换的变体(例如简并密码子的置换)和互补序列。术语“核酸”和“多核苷酸”是同义的,包含基因、cDNA分子、mRNA分子以及它们的片段例如寡核苷酸。

[0081] 本发明的另一方面还在于提供一种载体,其包含上述的核酸分子。

[0082] 所述载体可以包含选择标记,以及与所述克隆载体所指定的细胞类型相匹配的复制起点,而表达载体则包含对于影响指定靶细胞中的表达必要的调节元件。所述载体可以是克隆载体与表达载体,包括质粒载体、噬菌体载体、病毒载体等,在表达或是制备抗体或片段时,常涉及原核表达载体和真核表达载体,原核表达载体常用PET系列、pGEX系列,真核表达载体常用pcDNA3.1、pcDNA3.4、pEGFP-N1、pEGFP-N1、pSV2等,所述病毒载体可是慢病毒、逆转录病毒、腺病毒或腺相关病毒。

[0083] 在一些实施方式中,所述载体为pcDNA3.1表达体系。

[0084] 本发明的另一方面还在于提供一种宿主细胞,所述宿主细胞包括如上所述的核酸分子或上述的载体。

[0085] 所述宿主细胞主要涉及真核细胞,真核细胞包括哺乳细胞、酵母、昆虫细胞。尤其是全抗体或全长抗体制备,常用到哺乳细胞,可以是CHO、293、NS0细胞。

[0086] 在一些实施方式中,所述宿主细胞为哺乳细胞293。

[0087] 在一些实施方式中,所述载体导入所述宿主细胞的方法,包括脂质体转染方法和电穿孔方法,如LipofectamineTM、RNAiMAX、HiPerFect、DharmaFECT、X-tremeGENE siLentFectTM、TransIntroTMEL Transfection Reagent等。病毒载体通过其自然感染方式导入哺乳细胞,如逆转录病毒或慢病毒通过制备完整病毒颗粒直接加入培养细胞感染哺乳

细胞。

[0088] 本发明的另一方面还在于提供一种生产上述的结合蛋白的方法,包括如下步骤:在培养基中培养上述的宿主细胞,从培养基中或从所培养的宿主细胞中回收如此产生的结合蛋白。

[0089] 本发明的另一方面还在于提供如上所述的结合蛋白在制备用于诊断和/或治疗疾病的药物中的应用;所述疾病包括癌症和/或免疫关联疾病。

[0090] 在一些实施方式中,所述癌症包括肺癌、黑色素瘤、NSCLC、经典霍奇金淋巴瘤、HNSCC、肾细胞癌、尿路上皮癌、头颈部癌、胃癌、血液恶性肿瘤、前列腺癌、子宫颈癌、脑癌、肝细胞癌和结直肠癌的一种或多种。

[0091] 在一些实施方式中,所述免疫关联疾病包括病毒感染、细菌感染、真菌感染、寄生虫和类风湿关节炎、溃疡性结肠炎、天疱疮、皮炎、阿尔茨海默病的一种或多种。

[0092] 在一些实施方式中,所述癌症包括微卫星不稳定性高 (MSI-H) 或错配修复基因 (MMR) 缺陷的癌症。

[0093] 本发明的另一方面还在于提供一种抗体组合物,其包括上述的结合蛋白以及第二抗体;所述第二抗体特异性识别PD-L1,且其识别表位不同于所述结合蛋白。

[0094] 在一些实施方式中,所述第二抗体的轻链可变区VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示;重链可变区VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示。

[0095] 本发明还涉及一种检测测试样品中的PD-L1蛋白的方法,其包括:

[0096] a) 在足以发生抗体/抗原结合反应的条件下,使所述测试样品中的PD-L1蛋白与上述的结合蛋白接触以形成免疫复合物;和

[0097] b) 检测所述免疫复合物的存在,所述复合物的存在指示所述测试样品中所述PD-L1蛋白的存在。

[0098] 在一些实施方式中,所述免疫复合物中还包括第二抗体,所述第二抗体与所述PD-L1蛋白或所述结合蛋白结合。

[0099] 在一些实施方式中,所述第二抗体与所述结合蛋白结合。

[0100] 在一些实施方式中,所述第二抗体包含可检测的标记。

[0101] 在一些实施方式中,所述待检测品为血液、细胞或组织。

[0102] 在一些实施方式中,所述结合蛋白作为抗原捕获抗体可与PD-1-PD-L1非封阻型或表位不同的抗PD-L1抗体形成抗体配对,使用夹心ELISA进行检测。

[0103] 所述的结合蛋白或第二抗体可以标记由显示信号强度的指示剂,以使得所述复合物容易被检测。

[0104] 在一些实施方式中,所述显示信号强度的指示剂包括荧光物质、量子点、地高辛标记探针、生物素、放射性同位素、放射性造影剂、顺磁离子荧光微球、电子致密物质、化学发光标记物、超声造影剂、光敏剂、胶体金或酶中的任一种。

[0105] 在一些实施方式中,所述荧光物质包括Alexa 350、Alexa 405、Alexa 430、Alexa 488、Alexa555、Alexa 647、AMCA、氨基吡啶、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、5-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素、5-羧基-2',4',5',7'-四氯荧光素、5-羧基荧光素、5-羧基罗丹明、6-羧基罗丹明、6-羧基四甲基罗丹明、Cascade Blue、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7、6-FAM、丹磺酰氯、荧光素、HEX、6-JOE、NBD (7-硝

基苯并-2-氧杂-1,3-二唑)、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green514、Pacific Blue、邻苯二甲酸、对苯二甲酸、间苯二甲酸、甲酚固紫、甲酚蓝紫、亮甲酚蓝、对氨基苯甲酸、赤藓红、酞菁、偶氮甲碱、花青、黄嘌呤、琥珀酰荧光素、稀土金属穴状化合物、三双吡啶基二胺钼、钼穴状化合物或螯合物、二胺、双花青苷、La Jolla蓝染料、别藻蓝蛋白、allocoyanin B、藻蓝蛋白C、藻蓝蛋白R、硫胺、藻红青蛋白、藻红蛋白R、REG、罗丹明绿、罗丹明异硫氰酸酯、罗丹明红、ROX、TAMRA、TET、TRIT(四甲基罗丹明异硫醇)、四甲基罗丹明和德克萨斯红中的任一种。

[0106] 在一些实施方式中,所述放射性同位素包括¹¹⁰In、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁸F、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、^{94m}Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴-¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、^{52m}Mn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、^{82m}Rb和⁸³Sr中的任一种。

[0107] 在一些实施方式中,所述酶包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酶和葡萄糖氧化酶中的任一种。

[0108] 在一些实施方式中,所述荧光微球为:聚苯乙烯荧光微球,内部包裹有稀土荧光离子钬。

[0109] 本发明的另一方面还在于提供一种试剂盒,所述试剂盒包括如上所述的结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体和所述的抗体组合物中的一种或多种。

[0110] 所述试剂盒可用于肿瘤和其它各种免疫关联疾病的评估。

[0111] 在一些实施方式中,含有所述结合蛋白的抗体可加入可检测的标记后制备标记检测示踪试剂,也可作为第一抗体结合抗原或捕获抗原,与第二抗体共同作用检测抗原,提高检测的灵敏度和准确性。

[0112] 在此实施方式中,可选择流式细胞术、Western blot、ELISA或免疫组化进行检测。

[0113] 在一些实施例中,抗人PD-L1单克隆抗体具体到一株小鼠来源抗人PD-L1杂交瘤分泌的单克隆抗体,该株杂交瘤以其特定的抗体核酸序列,编码抗体特异性结合人PD-L1胞外区,抗体蛋白完全封阻PD-1-PD-L1结合,对PD-L1结合亲和力等基本特征明确。

[0114] 在一些实施方式中,本发明涉及该所述抗体与其它不同表位抗人PD-L1抗体之间组合,建立灵敏的夹心ELISA方法,用于肺癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、霍奇金淋巴瘤、头颈部癌、宫颈癌、胃癌、肠癌等MSI-H(高度微卫星不稳定)或DNA错配修复缺陷(MSI/dMMR)各类型肿瘤患者的血液可溶性PD-L1(sPD-L1)浓度评估,测定患者sPD-L1浓度水平,其敏感度,达到个位数量级有效检出浓度(5pg/mL)。抗体还能用于肿瘤组织PD-L1检测,指导临床PD-1-PD-L1通路阻断剂的治疗和预后评价,潜在的拓展用于其它免疫关联疾病炎症状况分析。

[0115] 本发明抗体编码核酸全序列,便于PD-L1抗体工程化,如免疫球蛋白类别、亚类转换和各种亚单位功能小分子抗体改造,该抗体序列在哺乳细胞系统有效表达策略,适于遗传性状稳定抗体生产。

[0116] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0117] 实施例1 PD-L1单链抗体的构建

[0118] 本发明PD-L1scFv-Fc嵌合片段即单链抗体嵌合形式的设计依次是：重链可变区+连接柔性肽+轻链可变区+人源Fc融合蛋白标签+终止密码子。

[0119] 其编码486个氨基酸，其中编码鼠源抗体氨基酸259个，重链可变区 (FR-H1-CDR-VH1-FR-H2-CDR-VH2-FR-H3-CDR-VH3-FR-H4) 138个，包括序列如SEQ ID NO:22所示的19个信号肽氨基酸 (Signal peptide)，人工柔性连接肽 (Linker) 氨基酸15个，随后是轻链可变区 (FR-L1-CDR-VL1-FR-L2-CDR-VL2-FR-L3-CDR-VL3-FR-L4) 106个氨基酸，轻链可变区氨基酸不包括引导序列氨基酸。随后衔接序列如SEQ ID NO:17所示的227个人Ig-Fc氨基酸序列 (Human Fc tag)，该标签序列可用于表达蛋白纯化和检测，其氨基酸设计结构如下：

[0120] Signal peptide+Variable region of heavy chain+Linker+Variable region of light chain+Human Fc tag+Stop codon

[0121] 鉴于不同的表达系统对密码子的偏好性，为便于在293细胞和淋巴细胞等哺乳细胞系统表达，进行了密码子优化，最终优化密码子见SEQ ID NO:25。其中上游加入GAATTC为EcoRI限制酶切点，GCCGCCACC为表达调控Kozak序列，用来增强真核基因的翻译效率，下游引入终止密码子TGA和HindIII限制酶切点AAGCTT，合成该全序列并克隆入pcDNA3.1表达载体，通过脂质体转入293细胞，72小时收集表达上清。

[0122] 实施例2 PD-L1抗体在宿主细胞的表达和纯化

[0123] 将含有轻链DNA (序列如SEQ ID NO:23所示) 全长和含有重链DNA (序列如SEQ ID NO:24所示) 全长分别克隆入pcDNA3.1或pcDNA3.4，转化感受态大肠杆菌，扩增质粒，经过酶切和测序鉴定序列正确性后，使用分光光度计定量，下述质粒用量为轻链载体和重链表达载体按照2:1混合后的DNA质量 (μg)，用于哺乳细胞ExpiCHO-S™ (ThermoFisher) 瞬时转染表达。

[0124] 第1天：将新鲜解冻的ExpiCHO-S™细胞复苏、扩增至细胞密度达到约 $4-6 \times 10^6$ 个活细胞/mL。

[0125] 第2天：分种ExpiCHO-S™培养物，调整细胞密度为 $3-4 \times 10^6$ 个活细胞/mL，细胞过夜生长。

[0126] 第3天：测定活细胞密度和存活率百分比。细胞密度应达到约 $7-10 \times 10^6$ 个活细胞/mL。存活率应为95-99%，方可继续转染。

[0127] 使用新鲜预热至37℃的ExpiCHO™表达培养基，将细胞稀释至最终密度为 6×10^6 个活细胞/mL，轻轻晃动培养瓶，混匀细胞。

[0128] 第4天：转染。使用冷的试剂 (4℃)，ExpiFectamine™ CHO和冷质粒溶液，充分混匀配制ExpiFectamine™ CHO/质粒。以轻链可变区总质粒0.5-1.0μg DNA/mL的浓度为转染培养体积 (以1升培养瓶体系为例，培养体积为280mL，质粒DNA的体积为8mL，质粒总量需要4.0-8.0μg)。

[0129] 具体按下所述操作：(i) 将ExpiFectamine™ CHO试剂瓶轻轻上下颠倒4-5次，充分混匀。使用冷的OptiPRO™培养基 (ThermoFisher) 稀释质粒DNA，晃动或上下颠倒试管，室温与DNA混合，使得总质粒DNA™为0.5-1.0μg/mL培养物体积，混匀。(ii) 使用OptiPRO™ 7.4mL培养基稀释ExpiFectamine™ CHO试剂 (ThermoFisher) 640μL，晃动或上下颠倒试管，混匀。(iii) 将稀释的ExpiFectamine™ CHO试剂加入到稀释的DNA中，晃动或上下颠倒试管，混匀。(iv) 室温孵育ExpiFectamine™ CHO/质粒DNA复合物1-5分钟 (即刻加入ExpiFectamine™

CHO/DNA复合物至细胞中,混合不超过5分钟,然后将溶液缓慢转移至第4步的培养瓶中,在添加过程中轻轻晃动培养瓶。将细胞置于轨道摇床上,于37℃培养箱含8%CO₂的湿化空气条件下培养,摇床振荡速度(25-mm轨道)120±5rpm。

[0130] 第5天:转染后次日(第1天,转染后18-22小时),根据所选择的实验方案进行添加ExpiFectamine™ CHO增强剂1.2mL和ExpiCHO™辅料48mL:将培养瓶转移至32℃培养箱含5%CO₂的湿化空气条件下振荡培养。

[0131] 第12-14天:收集培养上清。抗体蛋白最佳收集时间通常为转染后8-10天。

[0132] 抗体纯化:4000g离心20min,去除细胞颗粒或碎片,用0.22μm或0.45μm膜滤器过滤,测定上清液的pH值,用0.2M Na₂HPO₄或0.2M NaH₂PO₄(1M NaOH或1M HCl)调节pH值至7.0~7.4,用缓冲液(PBS,pH7-7.4)完全平衡蛋白质A纯化柱(Sigma),用AKTA系统或蠕动泵将细胞培养上清液在4℃加载到完全平衡的柱上,用3CV~5CV结合缓冲液平衡柱;用AKTA系统从洗脱缓冲液中从柱中洗脱抗体/蛋白质。根据UV280吸光度在1-3mL/min收集洗脱液,经脱盐柱脱盐,进行分光光度计定量,分装,-80度或冷冻干燥保存。

[0133] 实施例3抗人PD-L1单克隆抗体的制备方法

[0134] 1.动物的免疫

[0135] 免疫原为可溶性抗原PD-L1标签(Fc)蛋白(义翘公司)。选择4-6周龄纯种BALB/c小鼠,在融合前2个月开始初次免疫,为增加可溶性蛋白免疫原性,本实验中采用的佐剂包括福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂(Sigma)。

[0136] 第0天,进行初免,完全佐剂乳化抗原,每只小鼠0.25mL,10-100μg,腹腔注射免疫,共5只小鼠。第14天,二免,不完全佐剂乳化抗原,每只小鼠0.25mL,10-50μg,腹腔注射免疫。第24天,尾静脉采血,于37℃1小时,4℃2小时后离心,收集上清,初次检测血清效价。第35天,三免,不完全佐剂乳化抗原,每只小鼠0.25mL,10-50μg,腹腔注射免疫。

[0137] 在第45天,尾静脉采血,37℃1小时,4℃2小时后离心,收集上清,ELISA检测血清效价。所免疫的5只小鼠效价均达到或超过1:512000,选择2只效价超过1:512000的小鼠,在第56天,进行终免,抗原溶于PBS,每只小鼠0.25mL,10-50μg,尾静脉及腹腔注射免疫。一周后(第60天),进行细胞融合。

[0138] 2.细胞融合

[0139] (1)制备饲养细胞层:选用小鼠腹腔巨噬细胞。与免疫小鼠相同品系的小鼠,为BALB/c小鼠6~10周龄,拉颈处死,浸泡在75%酒精内,3~5min,用无菌剪刀剪开皮肤,暴露腹膜,用无菌注射器注入5~6mL预冷的培养液,反复冲洗,吸出冲洗液,冲洗液放入10mL离心管,1200rpm/min分离5~6min,用20%小牛血清(NCS)或胎牛血清(FCS)的培养液混悬,调整细胞数至1×10⁵/mL,加入96孔板,100μL/孔,放入37℃CO₂孵箱培养。

[0140] (2)制备免疫脾细胞:最后一次加强免疫3天后,将小鼠引颈处死,无菌取脾脏,培养液洗一次。脾脏研碎,过不锈钢筛网,离心后,将细胞用培养液洗2次,计数,取10⁸个脾淋巴细胞悬液备用。

[0141] (3)制备骨髓瘤细胞:取对数生长骨髓瘤细胞离心,用无血清培养液洗2次,计数,取1×10⁷细胞备用。

[0142] (4)融合:

[0143] ①将骨髓瘤细胞与脾细胞按1:10或1:5的比例混合在一起,在50mL离心管中用无

血清不完全培养液洗1次,于1200rpm/min条件下离心8min;弃上清,用吸管吸净残留液体,以免影响聚乙二醇(PEG)浓度。轻轻弹击离心管底,使细胞沉淀略松动。

[0144] ②90s内加入37℃预温的1mL 45%PEG(分子量4000)溶液,边加边轻微摇动。于37℃水浴作用90s。

[0145] ③加37℃预温的不完全培养液以终止PEG作用,每隔2min分别加入1mL、2mL、3mL、4mL、5mL和6mL。

[0146] ④于800rpm/min条件下离心6min。

[0147] ⑤除上清,用含20%小牛血清HAT选择培养液重悬。

[0148] ⑥将上述细胞,加到已有饲养细胞层96孔板内,每孔加100μL,一个免疫脾脏接种10块96孔板,共计20块。

[0149] ⑦将培养板置37℃、5%CO₂培养箱中培养。

[0150] 3. 杂交瘤初筛及其分泌抗体检测

[0151] (1) HAT选择杂交瘤。脾细胞和骨髓瘤细胞经PEG处理后,形成多种细胞的混合体,在HAT选择培养液中维持7~10天后,换用HT培养液,维持2周,改用一般培养液。在上述选择培养期间,杂交瘤细胞布满孔底1/10面积时,开始检测特异性抗体,筛选出所需要的杂交瘤细胞系。在选择培养期间,一般每2~3天换一半培养液。

[0152] (2) 抗体的检测采用酶联免疫吸附试验(ELISA),包被2μg/mL浓度的人PD-L1(包括PD-L1-Fc和PD-L1-his)融合蛋白,检测杂交瘤培养上清,通过酶标记的抗小鼠二抗和底物显色,并检测OD值,本试验中初步筛选出40个阳性孔(PD-L1-Fc阴性和PD-L1-his阳性),进一步克隆化。

[0153] 4. 杂交瘤克隆化

[0154] 将检测为阳性杂交克隆进行克隆化,避免被抗体非分泌的细胞所抑制,造成使抗体分泌的细胞丢失,克隆化过的杂交瘤细胞也需要定期再克隆,以防止杂交瘤细胞突变或染色体丢失,从而丧失产生抗体的能力。本实验中采用了有限稀释法进行克隆化,试验中筛选的抗体经过4次以上亚克隆。

[0155] 克隆前1天制备饲养细胞层(同细胞融合)。将要克隆杂交瘤细胞从培养孔内轻轻吹起,计数。调整细胞为3~10个细胞/mL。取头天准备的饲养细胞层的细胞培养板,每孔加入稀释细胞100μL,孵育于37℃、5%CO₂孵箱中。在第7天换液,以后每2~3天换液1次。8~9天可见细胞克隆形成,及时ELISA检测抗体活性。

[0156] 将阳性孔的细胞移至24孔板中扩大培养。

[0157] 检测抗体,扩大培养,必要时,重复进行再克隆化。

[0158] 5. 杂交瘤细胞冻存与复苏

[0159] (1) 细胞的培养过程中可能发生分泌抗体能力的丧失,杂交瘤冻存可验证杂交瘤稳定性和长期保存杂交瘤株。杂交瘤细胞的冻存每支安瓿含 1×10^7 以上,细胞冻存液:50%小牛血清;40%不完全培养液;10%DMSO(二甲基亚砷)。冻存时从室温可立即降至0℃后放入-70℃超低温冰箱,次日转入液氮中。也可用细胞冻存装置进行冻存。冻存细胞要定期复苏,检查细胞的活性和分泌抗体的稳定性,在液氮中细胞可保存数年或更长时间。

[0160] (2) 细胞复苏:将玻璃安瓿自液氮中小心取出,放37℃水浴中,在1min内使冻存的细胞解冻,将细胞用完全培养液洗涤两次,然后移入头天已制备好的饲养层细胞的培养瓶

内,置37℃、5%CO₂孵箱中培养,当细胞形成集落时,ELISA检测上清抗体活性,本发明涉及杂交瘤经历反复冻融过程,其抗体分泌活性和产量稳定。

[0161] 6. 杂交瘤抗体核酸全长测序

[0162] 依据TrIZOL®试剂(AMBIION,CAT,编号:15596-026)技术手册,从杂交瘤细胞中分离出总RNA,依据PrimeSeCpTTM第一链cDNA合成试剂盒(Takara,CAT,号码:610A)技术手册,使用同种型特异性反义引物(或通用引物)将总RNA逆转录成cDNA,根据GESTcript的cDNA末端(RACE)快速扩增标准操作程序(SOP)扩增VH、VL、CH和CL的抗体片段,将扩增的抗体片段分别克隆到标准克隆载体中、测序,可变区的序列分析工具:(i)NCBI Nucleotide BLAST;(ii)IMGT/V Quest program;(iii)NCBI Ig BLAST.选用菌落PCR筛选具有正确大小插入物,不少于五个具有正确大小插入物的每个片段被测序,对不同克隆序列进行比对,得到一致测序结果。

[0163] 实施例4夹心ELISA检测sPD-L1

[0164] 实施例1中的抗体作为抗原捕获抗体,以另一抗体X(抗体X的轻链可变区VL的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示;重链可变区VH的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示)为非封阻型抗体进行夹心ELISA实验。

[0165] 1. 抗体包被

[0166] 将终浓度为2μg/mL的PD-L1单抗稀释到包被液中,每孔加入100μL到ELISA-96孔板中。盖上盖子或者保护膜,4℃过夜。第二天,取出包被好的板子,弃去上清,用1×Wash Buffer洗3次,弃去上清,在滤纸或者手纸上扣干孔中的液体,拍干。

[0167] 2. 封闭

[0168] 加入200μL/孔5%牛奶以封闭非特异性的结合位点。盖上盖子或者保护膜,37℃2小时或者4℃过夜。第二天,弃去上清,用1×Wash Buffer洗1次,弃去上清,在滤纸或者手纸上扣干孔中的液体,拍干。

[0169] 3. 标准品和样品的孵育

[0170] 加入稀释好的标准品(或者样品),100μL/孔。盖上盖子或者保护膜,室温放置2小时。弃去上清,用1×Wash Buffer洗五次,弃去上清,在滤纸或者手纸上扣干孔中的液体,拍干。

[0171] 4. 二抗及HRP-Strep孵育

[0172] 加入bio标记的PD-L1抗体X,终浓度为2μg/mL,100μL/孔,盖上盖子或者保护膜,室温放置1小时。弃去上清,用1×Wash Buffer洗五次,弃去上清,在滤纸或者手纸上扣干孔中的液体。加入HRP-Streptavidin(Cell signaling 3999S,1:5000),100μL/孔,盖上盖子或者保护膜,室温放置半小时。弃去上清,用1×Wash Buffer洗五次,弃去上清,在滤纸或者手纸上扣干孔中的液体。

[0173] 5. 检测

[0174] 加入100μL/孔的A+B混合液,室温避光显色5-10分钟。加入50μL/孔的终止液,混匀。利用读板机(Thermo scientific Multiskan GO)读取450nm的OD值。建立标准曲线,计算样品浓度。

[0175] 实验例1 PD-L1抗体特异性鉴定

[0176] 1.1 ELISA鉴定

[0177] 参考实施例4的方法进行实验,分别包被PD-L1-his,EGFR,CTLA-4-his,CD137-hFc,EpCam-hFc蛋白(均为胞外区蛋白)1 μ g/mL,加入实施例1的抗体,HRP标记的羊抗鼠IgG为二抗,加底物显色,测定OD450值。实验结果见图1,结果显示,本发明实施例1中的抗体具有PD-L1-his强特异性。

[0178] 1.2 Western blot鉴定

[0179] 使用常规Western blot方法进行实验,待检测品分别为PD-L1-his,PD-1-his,PD-L1-Fc,经SDS-PAGE电泳转膜之后丽春红染色(图2左),随后孵育实施例1的抗体,ECL显色(图2右)。结果显示,PD-L1-his和PD-L1-Fc泳道有蛋白条带,说明本发明的抗体只与PD-L1结合而不与PD-1结合。

[0180] 实验例2 PD-L1抗体亲和力和单链抗体结合抗原活性

[0181] 2.1亲和力测定

[0182] 具体方法如下:

[0183] 1.AMC传感器(美国PALL公司)在平衡液中(0.1%BSA+0.02%TWEEN20的PBS溶液)预湿10分钟,将PD-L1抗体用平衡液稀释为20 μ g/mL,加到避光96孔板第二列中,200 μ L/孔。

[0184] 2.将PD-L1-his从500nM起始倍比稀释至7.8nM,加入避光96孔板的第四列中,200 μ L/孔,孔H4为空白对照,加入200 μ L平衡液。

[0185] 3.将平衡液加入第一列与第三列中,200 μ L/孔。

[0186] 4.使用Fortebio octet96仪器检测,将传感器在第一列中平衡120秒获得基础平衡曲线,然后在第二列中进行抗体固化,300秒。在第三列中进行再平衡120秒,在第四列中结合抗原180秒获得结合曲线,回到第三列中解离300秒,获得解离曲线。

[0187] 5.用Fortebio Octet96分析软件对曲线进行拟合分析,获得亲和力数值。

[0188] 表1 Fortebio Octet分析PD-L1抗体与PD-L1结合及解离结果

[0189]

Conc. (nM)	Sample ID	Response	KD (M)	KD Error	kon(1/Ms)	kon Error	kdis(1/s)	kdis Error
100	PD-L1-HIS	0.0658	1.80E-09	2.35E-11	7.55E+05	6.78E+03	1.36E-03	1.30E-05
50	PD-L1-HIS	0.0553	1.80E-09	2.35E-11	7.55E+05	6.78E+03	1.36E-03	1.30E-05
25	PD-L1-HIS	0.051	1.80E-09	2.35E-11	7.55E+05	6.78E+03	1.36E-03	1.30E-05
12.5	PD-L1-HIS	0.0332	1.80E-09	2.35E-11	7.55E+05	6.78E+03	1.36E-03	1.30E-05
6.25	PD-L1-HIS	0.03	1.80E-09	2.35E-11	7.55E+05	6.78E+03	1.36E-03	1.30E-05
3.13	PD-L1-HIS	0.0212	1.80E-09	2.35E-11	7.55E+05	6.78E+03	1.36E-03	1.30E-05
1.78	PD-L1-HIS	0.0144	1.80E-09	2.35E-11	7.55E+05	6.78E+03	1.36E-03	1.30E-05

[0190] 实验结果见图3和表1,Fortebio Octet分子相互作用分析仪测定实施例1的抗体与PD-L1-his蛋白结合的亲和力为1.80 $\times 10^{-9}$ mol/L,且亲和力越小,结合能力越强。

[0191] 2.2 ELISA检测PD-L1-scFv与PD-L1蛋白的结合活性

[0192] 参考实施例4的实验方法,ELISA检验PD-L1-scFv结合PD-L1的能力,包被1-5 μ g/mL,100 μ L/孔PD-L1-his蛋白,加入PD-L1-scFv-Fc,加入鼠抗人IgG Fc-HRP,加底物显色。结

果见图4和表2,说明PD-L1-scFv与PD-L1保持有优良的结合能力,经不同倍数稀释后仍然有较高的活性。

[0193] 表2标准曲线中PD-L1-scFv浓度及OD450读数

[0194]

抗体浓度 (ng/mL)	1000	333.33	111.110	37.040	12.350	4.120	1.370	0.460	0.150	0.050	0.020	0.000
OD450读数	3.154	3.361	3.154	2.572	1.417	0.565	0.219	0.121	0.083	0.064	0.061	0.068

[0195] 实验例3 PD-L1抗体在流式细胞术应用中的验证

[0196] 3.1 PD-L1抗体检测细胞膜上的PD-L1

[0197] 参考实施例2的方法,将带有pGFP标签的pcDNA3.1-PD-L1质粒转入293细胞中,通过流式细胞仪检测此重组细胞GFP (FITC) 的表达情况,继而得出转染率,实验结果见图5。从图5可以看出,有13.9%的细胞呈GFP阳性,也就是说转染率为13.9%。

[0198] 通过流式细胞仪检测此重组细胞中PD-L1的表达情况,具体方法为:

[0199] 取总数为 1×10^6 的细胞悬于含1%牛血清的PBS缓冲液100 μ L,分别加入1 μ g体积为1-2 μ L的PD-L1抗体,室温或是4 $^{\circ}$ C染色30min,用含1mL 1%牛血清PBS缓冲液重悬细胞,轻轻混匀,1000rpm离心,洗涤2次,随后重新悬浮细胞于100 μ L的1%牛血清的PBS缓冲液,加入羊抗小鼠IgG-APC (约1 μ g),染色30min,再经1%牛血清PBS缓冲液洗涤2次,将细胞悬于1%牛血清PBS缓冲液1mL中,流式细胞仪分析细胞表面PD-L1表达水平。

[0200] 实验结果见图6,显示GFP阳性细胞中PD-L1抗体染色同样呈阳性,说明本发明中PD-L1抗体可检出细胞膜上的PD-L1,且准确性高(图5显示的13.9%阳性细胞,使用本发明的抗体可检测到13.5%)。

[0201] 3.2 PD-L1抗体检测肿瘤细胞PD-L1

[0202] 实验方法参考实验例3.1,待检测品为H2009人肺腺癌细胞,加入的PD-L1抗体分别是生物素化抗体和未标记全抗体,二抗分别为亲和素标记的荧光素二抗和荧光素标记的羊抗鼠IgG-APC二抗,流式细胞仪分析H2009人肺腺癌细胞表面PD-L1表达水平。

[0203] 实验结果见图7和图8。结果显示,PD-L1未标记全抗体经羊抗鼠IgG-APC二抗染色以及PD-L1生物素化抗体经抗亲和素-APC二抗染色后均能检测出H2009人肺腺癌细胞中的PD-L1,且经生物素化的抗体检测效果更好(图8)。

[0204] 实验例4 PD-L1抗体在ELISA应用中的验证

[0205] 4.1 PD-L1抗体建立夹心ELISA的标准曲线

[0206] 参考实施例4的实验方法,以PD-L1抗体作为捕获抗体,生物素标记的抗体X (见实施例4) 为检测抗体,配对建立夹心ELISA,检测稀释的PD-L1-his蛋白标准品。结果显示,制成的标准曲线拟合度较高, R^2 为0.9998,预期敏感度(The expected sensitivity)为5pg/mL,换句话说PD-L1抗体检测敏感度高,最低检测浓度为5pg/mL (图9,表3)。

[0207] 表3标准曲线中标准品浓度及对应OD450读数

[0208]

抗原浓度 (pg/mL)	10000	2000	400	80	16	3.2	0.6	0
OD450读数	3.7540	3.4865	2.7289	1.3016	0.4757	0.2005	0.1179	0.0912

[0209] 4.2 PD-L1抗体检测肿瘤患者PD-L1

[0210] 参考实施例4的实验方法,取正常人和晚期肺癌患者的血清各40例,经过1:25稀释后使用夹心ELISA进行PD-L1测定。结果显示两组检测血清sPD-L1浓度具有显著差异($p <$

0.001) (图10)。

[0211] 实验例5 PD-L1抗体在免疫组化应用中的验证

[0212] 293细胞转染PD-L1 (同实验例3.1), 细胞转染率约30%, 转染细胞制备石蜡包埋块, 石蜡切片置于67℃烘箱中, 烘片2小时, 脱蜡水化后的组织切片微波处理10分钟, 微波盒流水自然冷却, 先用蒸馏水冲洗两次, 切片加1滴3% H₂O₂, 室温下孵育10分钟, 阻断内源性过氧化物酶的活性, 每张切片加1滴PD-L1抗体1μg/ml, 室温下孵育2小时, 切片加1滴酶标抗鼠/兔聚合物, 室温下孵育30分钟, 加1滴新鲜配制DAB液 (二氨基联苯胺), 显微镜观察, 随后苏木素复染, 0.1% HCl分化, 自来水冲洗, 切片经梯度酒精脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 晾干后观察。结果见图11, 棕色为PD-L1阳性细胞, 显示用PD-L1抗体染色后约30%的细胞被检出, 与PD-L1细胞转染率一致, 说明本发明的PD-L1抗体可作为良好的免疫组化抗体。

[0213] 实验例6 PD-L1抗体对PD-1与PD-L1结合的阻断作用

[0214] 6.1流式细胞术检测PD-L1抗体对PD-1与PD-L1结合的阻断作用

[0215] 参考实验例3的实验方法, 将转染pcDNA-3.1-PD-L1的293细胞, 孵育PD-1-his蛋白, 加入抗his荧光二抗, 结果显示阳性率为10.2% (图12); PD-L1的293转染细胞先与PD-L1抗体孵育后, 再与PD-1-his孵育, 结果显示阳性率降至接近为0 (图13), 说明PD-L1抗体封阻了PD-1-his蛋白与转染细胞的结合。

[0216] 6.2 ELISA检测PD-L1抗体对PD-1与PD-L1结合的阻断作用

[0217] 包被PD-1-his 1μg/mL, 100μL/well, 4℃反应过夜; 取出包被好的板子, 弃去包被液, 用1×PBST洗板3次, 拍干; 加入含5%牛奶的PBS封闭液封闭板子, 200μL/well, 37℃2h; 封闭结束, 弃去封闭液, 洗3次, 拍干; 加入预混液至包被且封闭好的酶标板中, (预混液为PD-L1-Fc蛋白1μg和PD-L1抗体1μg, 及不同比例预混液, 加入100μL封闭液中, 4℃过夜), 无关蛋白作为空白, PD-L1-Fc蛋白10μg/ml作为阳性对照, 加入酶标板中, 37℃反应1h; 取出板子, 弃去反应溶液, 洗板4次, 拍干; 加入抗人IgG-HRP, 0.2μg/mL, 100μL/well, 37℃1h; 取出板子, 弃去反应溶液, 洗板4次, 拍干; 加入显色液, 100μL/well, 25℃15min; 加入1N-HCl终止反应, 读取OD450值 (图14); 并计算阻断率: 阻断率 (抑制率) = (OD1-OD0/OD0)。

[0218] 实验证明, PD-L1抗体阻断PD-1与PD-L1结合的阻断率达90%。

[0219] 最后应说明的是: 以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案, 而非对其限制; 尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明, 但本领域的普通技术人员应当理解: 其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改, 或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换; 而这些修改或者替换, 并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

SEQUENCE LISTING

<110> 首都医科大学附属北京胸科医院;北京市结核病胸部肿瘤研究所

<120> 一种抗人PD-L1抗体及其应用

<130> 20180910

<160> 25

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 1

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 2

Asp Thr Ser Pro Leu Ala Ser

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 3

His Gln Arg Ser Ser Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 4

Ser Ser Tyr Ile Ser

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 5

Trp Ile Phe Ala Gly Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Thr
1 5 10 15

Asp

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 6

His Glu Gly Lys Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 7

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
20

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 8

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 9

Gly Phe Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Ile Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 10

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 11

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 12

Trp Leu Lys Gln Lys Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 13

Lys Ala Gln Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln

1 5 10 15

Phe Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 14

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 15

```

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

```

<210> 16

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 16

```

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
1           5           10           15
Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
          20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
          35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
          50           55           60
Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65           70           75           80
Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
          85           90           95
Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
          100          105          110
Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
          115          120          125
Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
          130          135          140

```

Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp
145					150					155					160
Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg
					165					170					175
Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln
					180					185					190
His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn
					195					200					205
Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly
Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met
					245					250					255
Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu
					260					265					270
Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe
					275					280					285
Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn
Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr
305					310					315					320
Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys						
					325					330					

<210> 17

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 17

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				20				25					30		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
				35				40				45			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
130	135	140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
145	150	155
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
210	215	220
Pro Gly Lys		
225		
<210> 18		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工合成		
<400> 18		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr		
20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Tyr Thr Ser His Leu His Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro		
65	70	75
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Val Lys Leu Pro Trp		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	

<210> 19

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 19

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

<210> 20

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 20

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser
1				5					10					15	
Ala	Ile	Met	Ser	Arg	Gly										
															20

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 21

Met	Glu	Trp	Asn	Trp	Val	Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ala	Gly
1					5				10					15	
Val	Tyr	Ala													

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 22

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1

5

10

15

Val His Ser

<210> 23

<211> 708

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 23

```
atggattttc aagtgcagat ttttagcttc ctgctaatac gtgcttcagc cataatgtcc 60
agaggacaaa ttcttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtcagttaca tacactggta ccaacagaag 180
ccaggatcct cgcccaaacc ctggatttat gacacatccc ccctggcttc tggattccct 240
gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcataatcag cagcatggag 300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccat cagcggagta gtttcccatg gacgttcggt 360
ggaggcacca agctggagat caaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 480
taccctaaag acatcaatgt caagtgaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgctc 540
ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccttc 600
acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 660
acatcaactt caccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgttag 708
```

<210> 24

<211> 1407

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 24

```
atggaatgga actgggtcgt tctcttcttc ctgtcattaa ctgcaggtgt ctatgcccag 60
ggtcagatgc agcagtctgg agttgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaaggtgtcc 120
tgcaagactt ctggcttcac cttcagcagt agttatataa gttggttgaa gcaaaagcct 180
ggacagagtc ttgagtggat tgcattggatt tttgctggaa caggtggtac tagctataat 240
ccgaagtcca cagacaaggc ccaactgact gttgacacat cctccagcac agcctacatg 300
cagttcagca gcctgacaac tgaggactct gccatttatt actgtgcaag gcacgagggc 360
aaatactggg acttcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctcagccaaa 420
acaacagccc catcggctta tccactggcc cctgtgtgtg gagatacaac tggctcctcg 480
gtgactctag gatgcctggt caagggttat ttccctgagc cagtgcctt gacctggaac 540
tctggatccc tgtccagtgg tgtgcacacc ttcccagctg tcctgcagtc tgacctctac 600
```

accctcagca gctcagtgac tgtaacctcg agcacctggc ccagccagtc catcacctgc 660
 aatgtggccc acccggaag cagcaccaag gtggacaaga aaattgagcc cagagggccc 720
 acaatcaagc cctgtcctcc atgcaaatgc ccagcaccta acctcttggg tggaccatcc 780
 gtcttcatct tccctccaaa gatcaaggat gtactcatga tctccctgag ccccatagtc 840
 acatgtgtgg tgggtgatgt gagcgaggat gaccagatg tccagatcag ctggtttgtg 900
 aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca caaacccata gagaggatta caacagtact 960
 ctccgggtgg tcagtgccct ccccatccag caccaggact ggatgagtgg caaggagttc 1020
 aaatgcaagg tcaacaacaa agacctccca gcgcccacg agagaacctat ctcaaaaccc 1080
 aaagggtcag taagagctcc acaggtatat gtcttgccct caccagaaga agagatgact 1140
 aagaaacagg tcaactctgac ctgcatggtc acagacttca tgcctgaaga catttacgtg 1200
 gagtggacca acaacgggaa aacagagcta aactacaaga aactgaacc agtcttgga 1260
 tctgatggtt cttacttcat gtacagcaag ctgagagtgg aaaagaagaa ctgggtggaa 1320
 agaaatagct actcctgttc agtgggtccac gaggtctgc acaatcacca cagactaag 1380
 agcttctccc ggactccggg taaatga 1407

<210> 25

<211> 1485

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 25

gaattcccg cgcaccatg ggctggtcct gcatcatcct gtttctggtg gccacagcca 60
 caggcgtgca ctctcagga cagatgcagc agtctggcgt ggaactggtt aagcctggcg 120
 cctctgtgaa ggtgtcctgc aagaccagcg gcttcacctt cagcagcagc tacatcagct 180
 ggctgaagca gaagcctggc cagagcctgg aatggatcgc ctggatcttt gccggaacag 240
 gcggcaccag ctacaacccc aagttcaccg ataaggccca gctgaccgtg gacacaagca 300
 gcagcacagc ctacatgcag ttcagcagcc tgaccaccga ggacagcgcc atctactact 360
 gtgccagaca cgagggcaag tactggtact tcgatgtgtg gggagccggc accaccgtga 420
 cagtttctag cggaggcgga ggatctggtg gcggaggaag tggcgagggc gtttctcaa 480
 ttctgtctgac acagagcccc gccatcatgt ctgctagccc tggcgagaaa gtgaccatga 540
 cctgtagcgc cagcagctcc gtgtcctaca tccactggta tcagcagaaa cccggcagca 600
 gcccgaagcc ttgatctac gatacaagcc ctctggcctc cggctttccc gccagatttt 660
 ctggctcttg cagcggcaca agctatagcc tgatcatcag cagcatggaa gccgaggatg 720
 ccgccaccta ctattgccac cagagaagca gcttcccttg gacctttggc ggcggaacaa 780
 agctggaaat caaggacaag acccacacct gtcttccatg tctgtctcca gaactgctcg 840
 gcggaccttc cgtgttcctg tttctccaa agcctaagga caccctgatg atctccagaa 900
 caccgaagt gacctgcgtg gtggtggatg tgtctcacga ggacctgaa gtgaagtcca 960
 attggtacgt ggacggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga gaggaacagt 1020
 acaacagcac ctacagagtg gtgtccgtgc tgacagtgt gcaccaggat tggctgaacg 1080
 gcaaagagta caagtgcag gtgtccaaca aggcctgcc tgctcctatc gagaaaacca 1140
 tcagcaaggc caagggccag cctagggaa cccaggttta cacactgcct ccaagccggg 1200

aagagatgac caagaaccag gtgtccctga cctgcctggt caagggttc tacccttcg 1260
atatcgccgt ggaatgggag agcaatggcc agcctgagaa caactacaag acaaccctc 1320
ctgtgctgga cagcgacggc tcattcttcc tgtacagcaa gctgactgtg gataagagcc 1380
ggtggcagca gggcaacgtg ttcagctgtt ctgtgatgca cgaggccctg cacaaccact 1440
acaccagaa gtccctgagc ctgtctcctg gcaaatgata agctt 1485

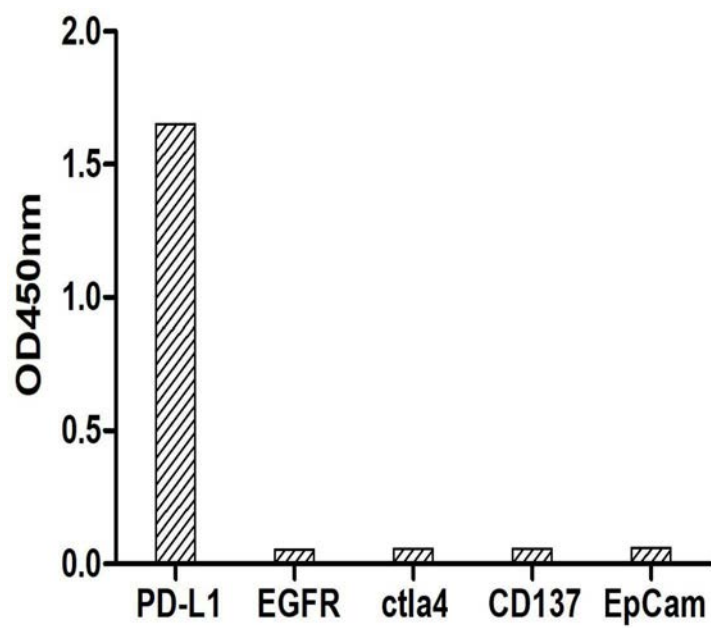


图1

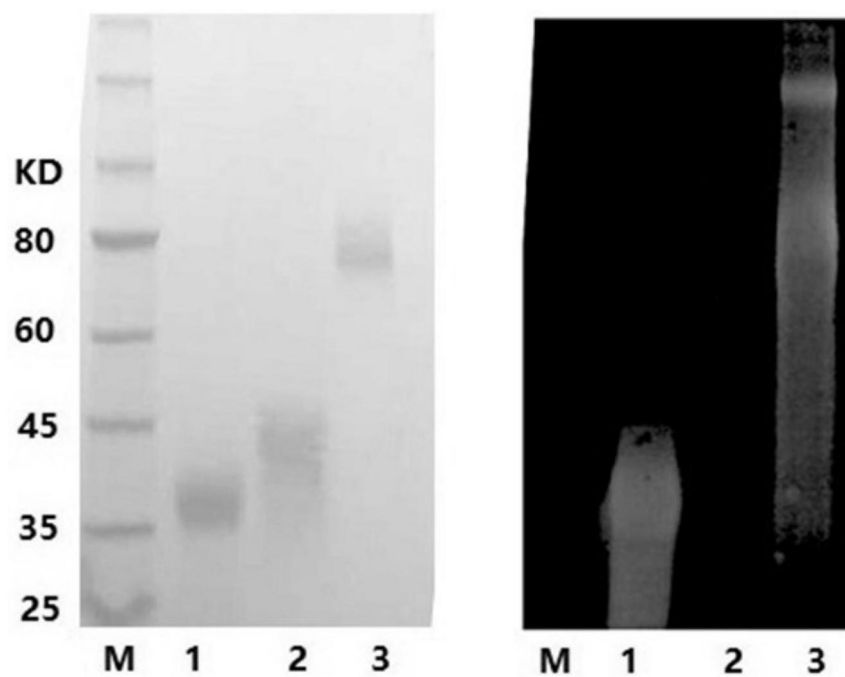


图2

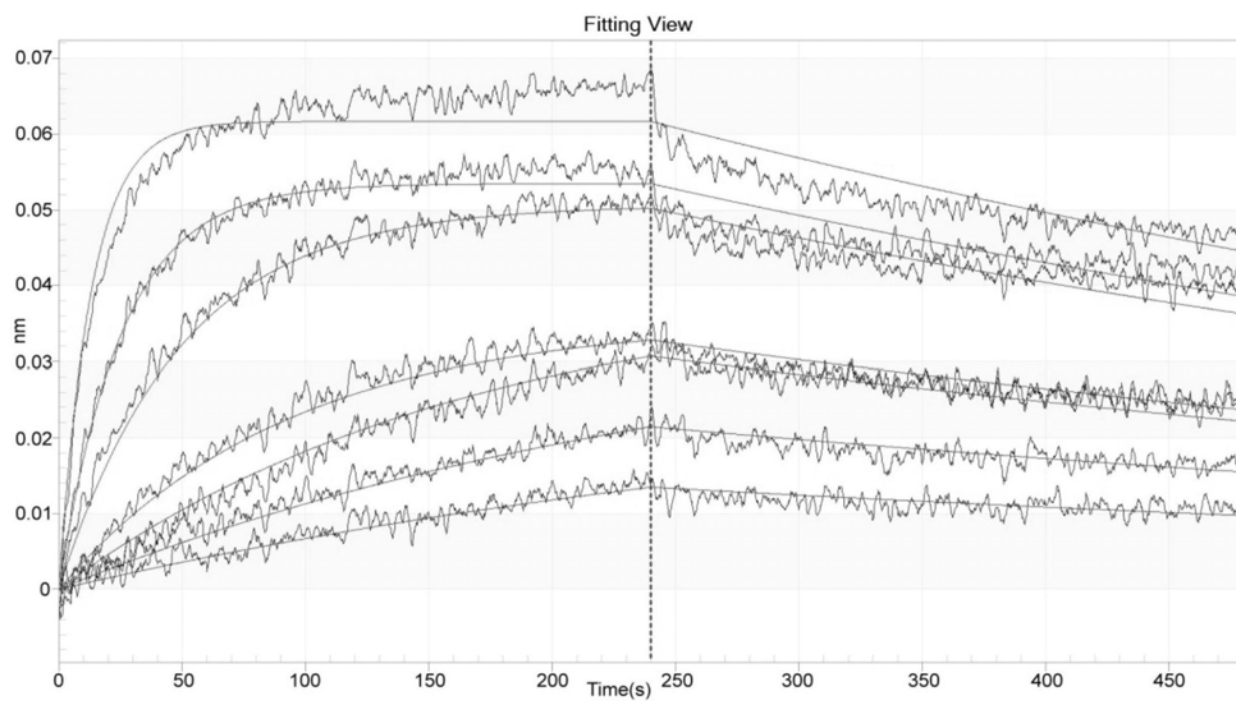


图3

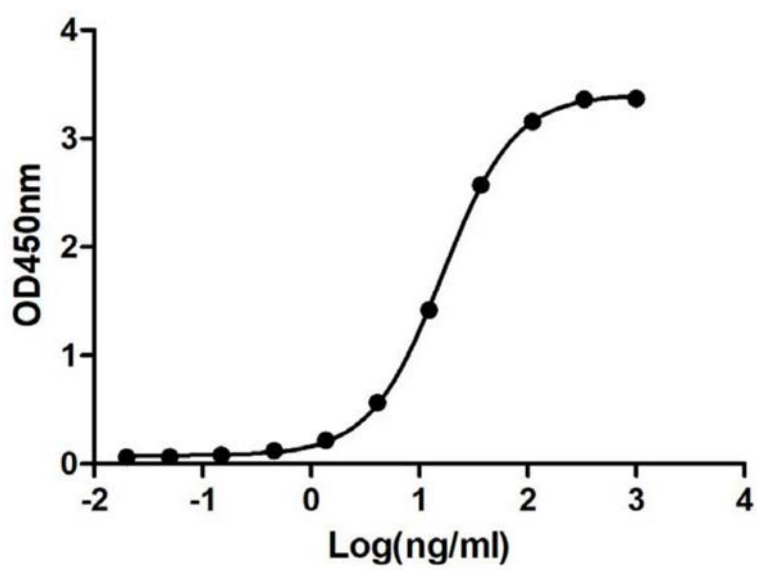


图4

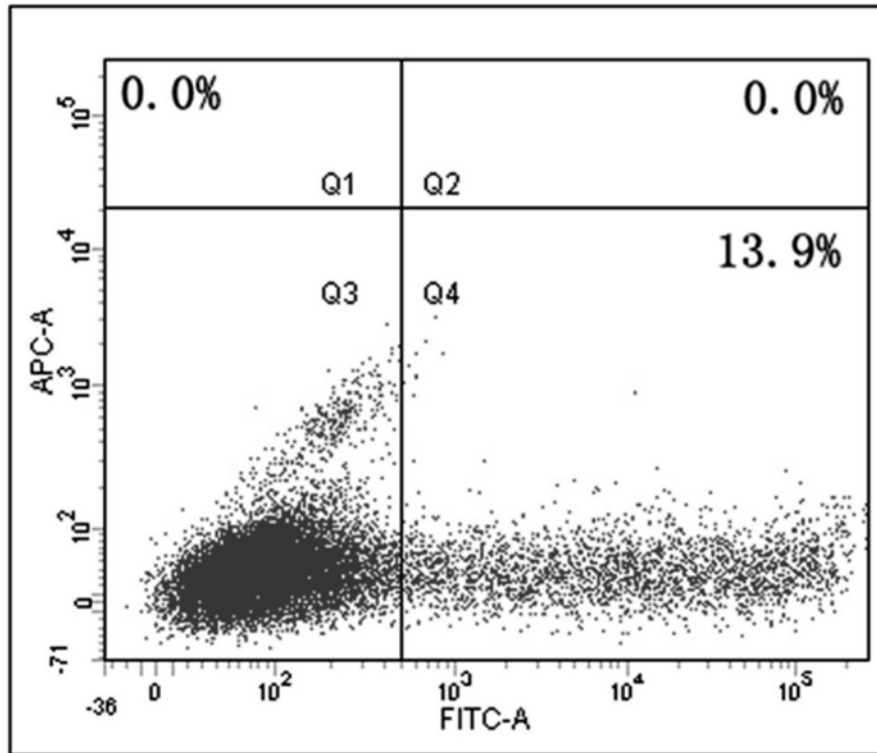


图5

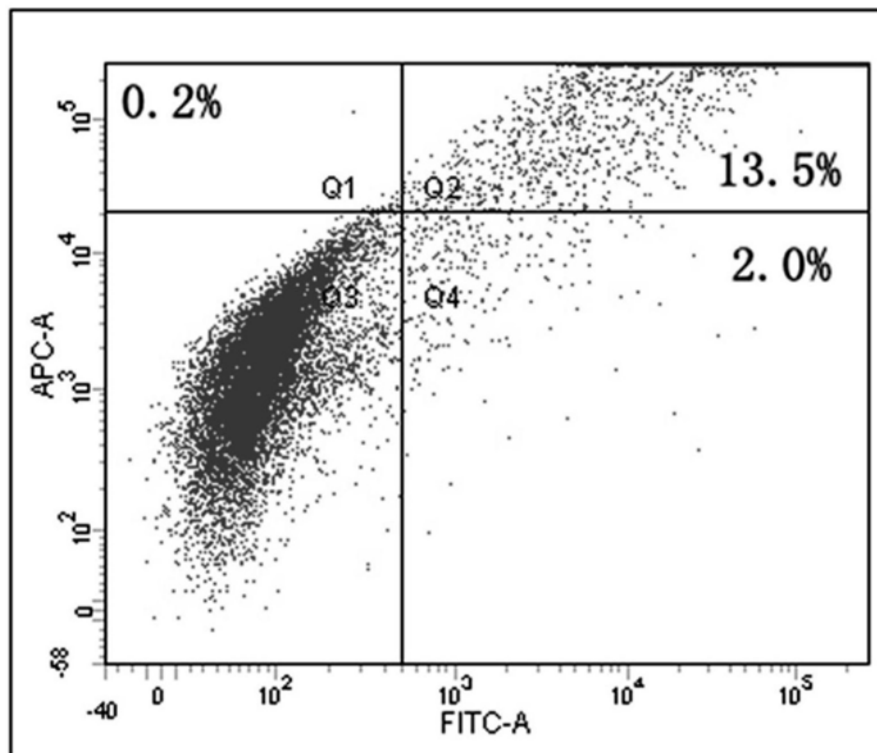


图6

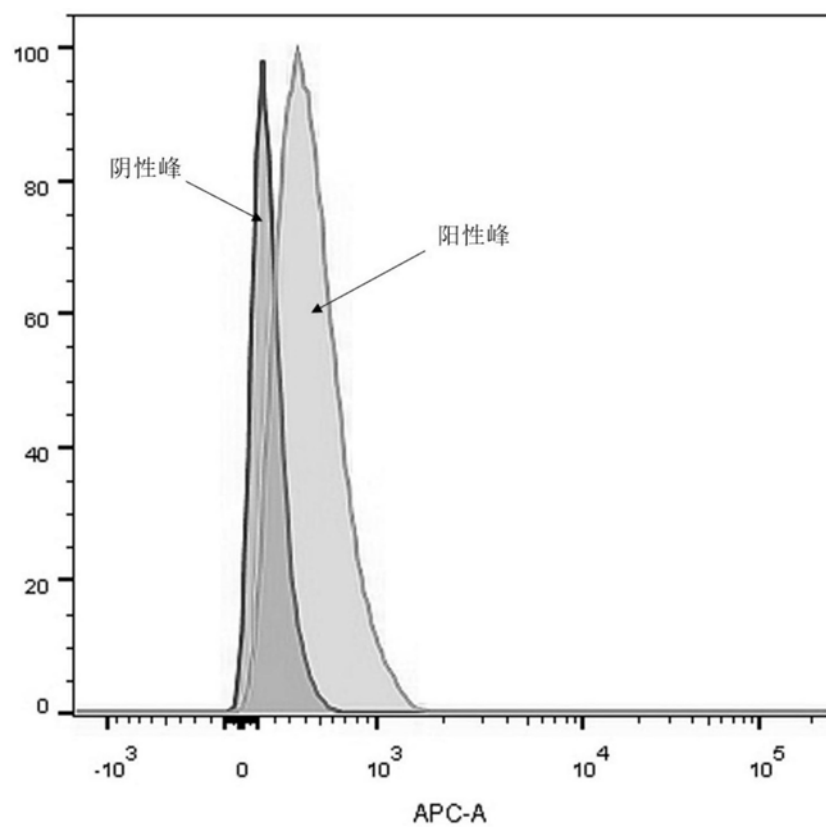


图7

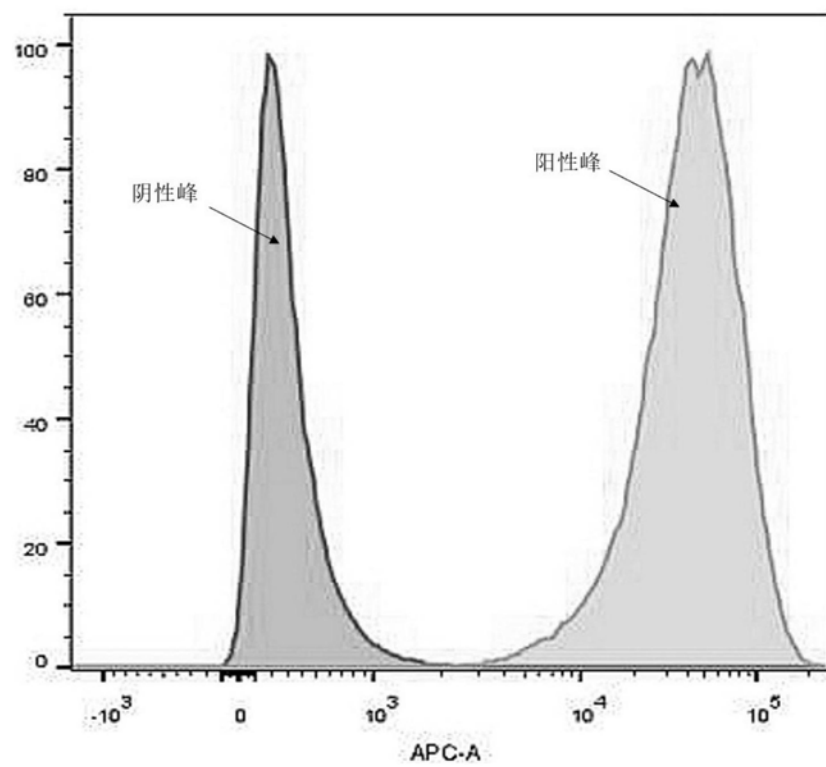


图8

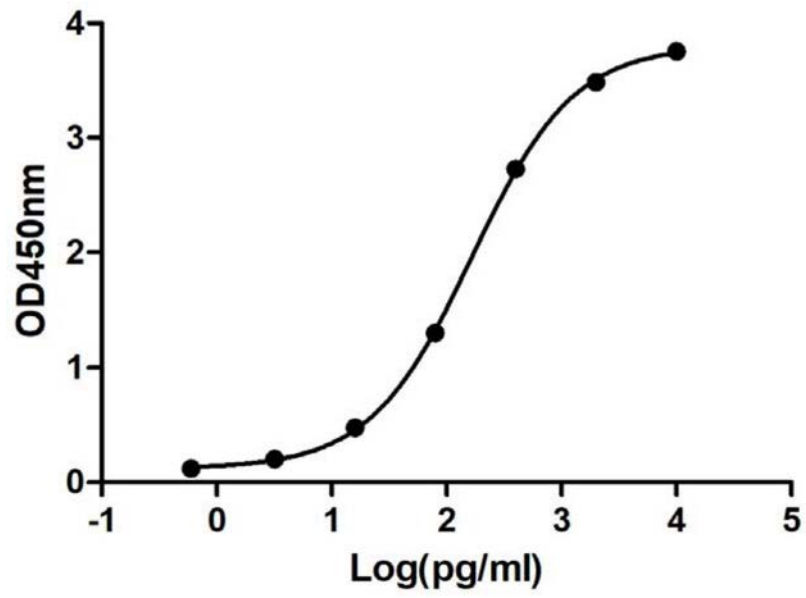


图9

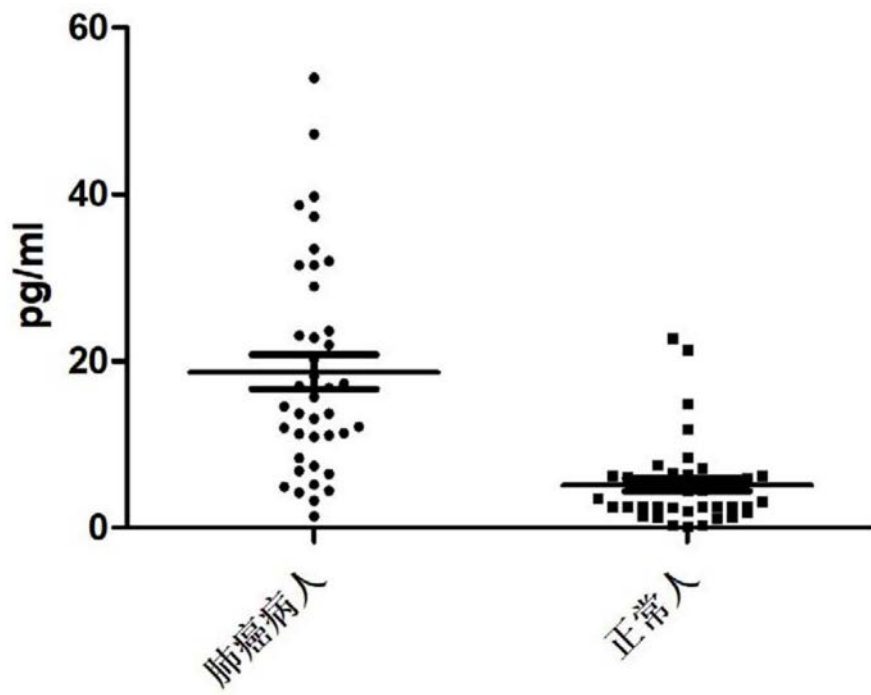


图10

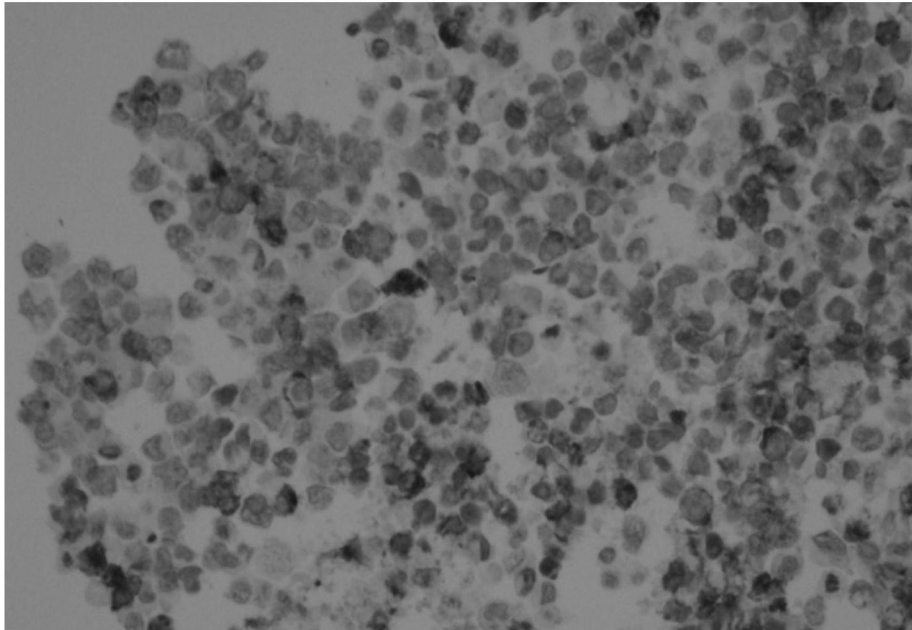


图11

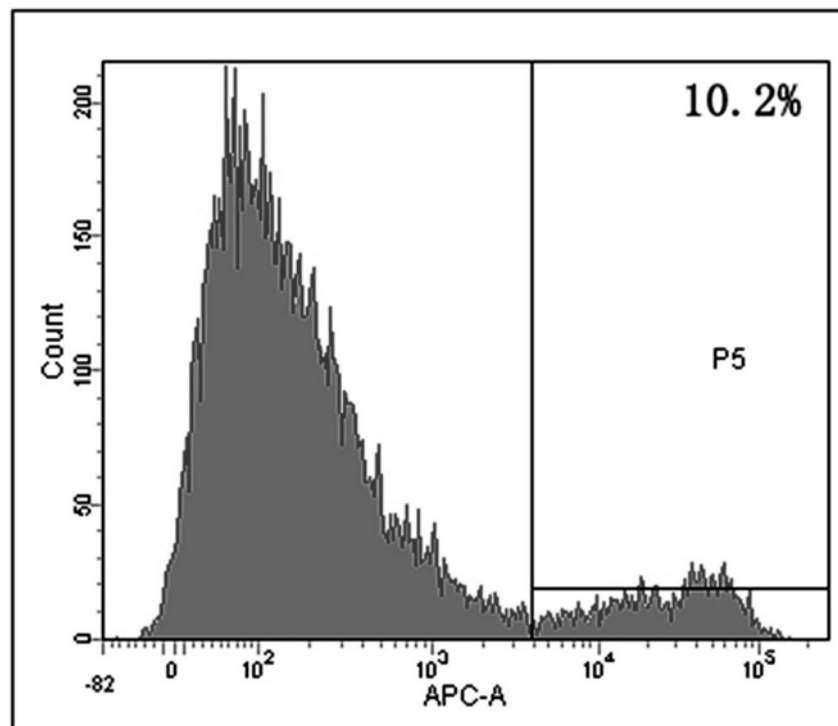


图12

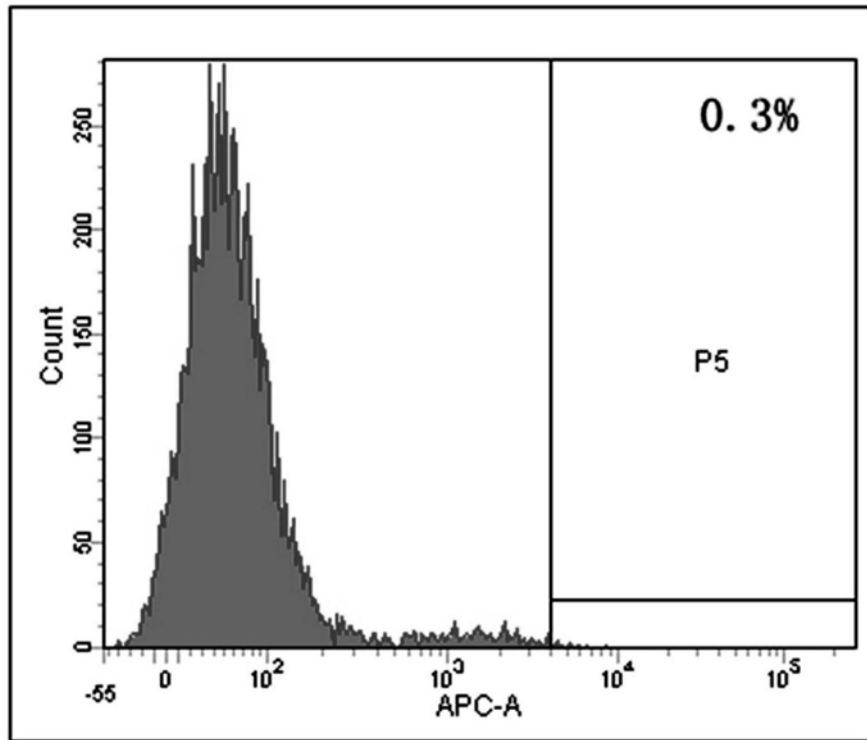


图13

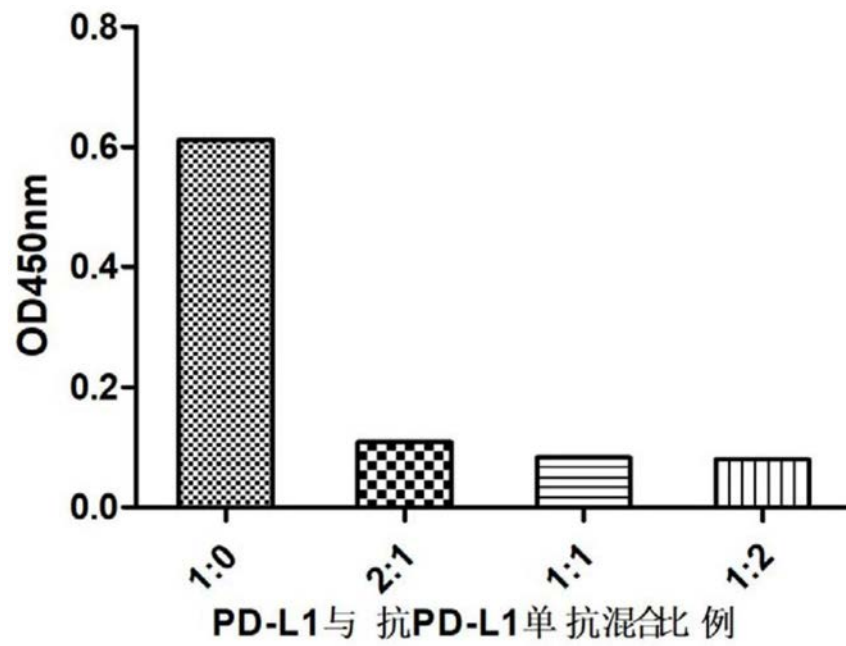


图14

专利名称(译)	一种抗人PD-L1抗体及其应用		
公开(公告)号	CN108997499A	公开(公告)日	2018-12-14
申请号	CN201811063916.6	申请日	2018-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所		
申请(专利权)人(译)	首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所		
当前申请(专利权)人(译)	首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所		
[标]发明人	张洪涛 王小珏 易玲 闫卓红		
发明人	张洪涛 王小珏 易玲 闫卓红		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/2827 C07K2317/52 C07K2317/565 C07K2317/92 G01N33/53 G01N33/574		
代理人(译)	吕露		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫技术领域，具体而言，涉及一种抗人PD-L1抗体及其应用。所述抗体包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白，其中所述抗原结合结构域包括选自下述氨基酸序列的至少一个互补决定区，或：与下述氨基酸序列的互补决定区具有至少80%的序列同一性，且与PD-L1蛋白具有 $K_d \leq 2.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 亲和力；互补决定区CDR-VL1、CDR-VL2、CDR-VL3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1-3所示；互补决定区CDR-VH1、CDR-VH2、CDR-VH3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4-6所示。所述结合蛋白活性强，与人PD-L1蛋白具有高亲和力。

