



(21)申请号 201811063921.7

(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 易玲 闫卓红 王小珏 杨斌
韦攀健 张洪涛

(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 贾颜维

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

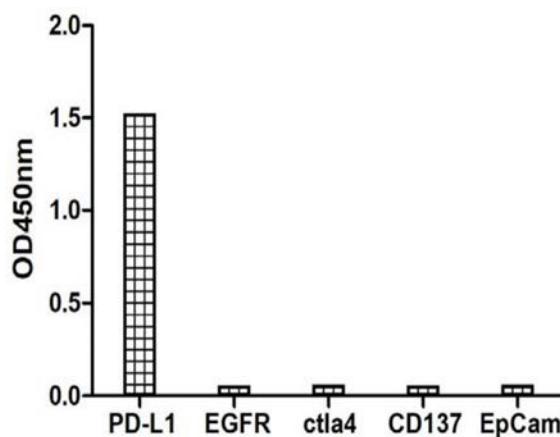
权利要求书2页 说明书14页
序列表9页 附图6页

(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 $K_d \leq 8.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 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 $K_d \leq 8.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 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的序列选自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的序列选自IgG2恒定区的序列;

优选地,所述恒定区Fc的序列选自IgG2b恒定区的序列;

优选地,所述恒定区Fc的序列选自IgG2b/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. 一种抗体组合产品，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的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:18所示；重链可变区VH的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:19所示；

优选地，所述抗体组合产品还包括PBS、BSA、ddH₂O、甘油、叠氮钠和庆大霉素的一种或多种。

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所述的抗体组合产品中的一种或多种。

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 22C3 pharmDx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 22C3 pharmDx-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 $K_d \leq 8.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 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-Fc;2:PD-1-his;3:PD-L1-his;

[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;

[0015] 图5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;

[0016] 图6为本发明实验例3中的流式细胞术检测PD-L1抗体与肺腺癌H2009细胞中PD-L1结合的结果图;PE-A:PD-L1;

[0017] 图7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;

[0018] 图8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;

[0019] 图9为本发明实验例5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;

[0020] 图10为本发明实验例5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;

[0021] 图11为本发明实验例5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

[0022] 为了本发明可以更容易地理解,选择的术语在下文定义。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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)。

[0027] 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。

[0028] 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)。

[0029] 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。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。

[0030] 本发明提供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 $K_d \leq 8.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 的亲合力;

[0031] 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;

[0032] 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。

[0033] 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 $K_d \leq 8.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$, K_d 值也可以选择 $7.8 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $7.5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $7 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $6.96 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $6.7 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $6 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $5.5 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $2 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1.0 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $9.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $8.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $7.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $6.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $5.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $4.0 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 的亲合力等。

[0034] 其中,亲合力按照本发明说明书中的方法测定。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 在一些实施方式中,所述结合蛋白还包含抗体恒定区序列。

[0038] 在一些实施方式中,所述结合蛋白包括抗体恒定区Fc。

[0039] 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。

[0040] 在一些实施方式中,所述轻链恒定区序列如SEQ ID NO:15所示。

[0041] 在一些实施方式中,所述重链恒定区序列如SEQ ID NO:16所示。

[0042] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc的序列选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD任何其中之一恒定区的序列。

[0043] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc的序列选自IgG2恒定区的序列。

[0044] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc的序列选自IgG2b恒定区的序列。

[0045] 在一些实施方式中,所述恒定区序列的选自IgG2b/kappa恒定区的序列。

[0046] 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。

[0047] 在一些实施方式中,所述恒定区来源于小鼠。

[0048] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc来源于人。

[0049] 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:

- [0050] FR-L1-CDR-VL1-FR-L2-CDR-VL2-FR-L3-CDR-VL3-FR-L4-Constant region;
- [0051] 或者;
- [0052] Leader sequence-FR-L1-CDR-VL1-FR-L2-CDR-VL2-FR-L3-CDR-VL3-FR-L4-Constant region-Stop codon(Leader sequence序列见SEQ ID NO:20)。
- [0053] 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:
- [0054] FR-H1-CDR-VH1-FR-H2-CDR-VH2-FR-H3-CDR-VH3-FR-H4-Constant region;
- [0055] 或者;
- [0056] Leader sequence-FR-H1-CDR-VH1-FR-H2-CDR-VH2-FR-H3-CDR-VH3-FR-H4-Constant region-Stop codon(Leader sequence序列见SEQ ID NO:21)。
- [0057] Constant region即恒定区Fc。
- [0058] 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。
- [0059] 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。
- [0060] 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。
- [0061] 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。
- [0062] 在一些实施方式中,所述恒定区Fc为人Ig-Fc氨基酸。
- [0063] 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。
- [0064] 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。
- [0065] 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。
- [0066] 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。
- [0067] 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。
- [0068] 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;
- [0069] 或者;
- [0070] Signal peptide+Variable region of heavy chain+Linker+Variable region of light chain+Human Fc tag+Stop codon。
- [0071] 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)。

[0072] 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)。

[0073] 所述Signal peptide即信号肽氨基酸,序列如SEQ ID NO:22所示。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 在一些实施方式中,所述载体为pcDNA3.1表达体系。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 在一些实施方式中,所述宿主细胞为哺乳细胞293。

[0084] 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、TransIntroTM EL 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 本发明的另一方面还在于提供一种抗体组合产品,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。

[0091] 在一些实施方式中,所述组合产品包装于盒体中。

[0092] 在一些实施方式中,所述结合蛋白与所述第二抗体分别盛装于不同的容器(例如EP管)中。

[0093] 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。

[0094] 在一些实施方式中,所述抗体组合产品还包括PBS、BSA、ddH₂O、甘油、叠氮钠和庆大霉素的一种或多种。

[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,所述结合蛋白包含可检测的标记。

[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,所述结合蛋白作为非封阻型抗原捕获抗体,可与PD-L1抗原捕获或表位不同的抗PD-L1抗体形成抗体配对,如PD-1-PD-L1抗PD-L1捕获抗体,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、Alexa 555、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 Green 514、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

双吡啶基二胺铈、铈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、¹⁵⁰、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物酶、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铈。

[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产品中的一种或多种。

[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;或,作为第二抗原,与抗原或捕获抗原的第一抗体结合,共同作用检测抗原,提高检测的灵敏度和准确性;或,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] 实施例2 PD-L1抗体在宿主细胞的表达和纯化

[0122] 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-STM (ThermoFisher) 瞬时转染表达。

[0123] 第1天:将新鲜解冻的ExpiCHO-STM细胞复苏、扩增至细胞密度达到约 $4-6 \times 10^6$ 个活细胞/mL。

[0124] 第2天:分种ExpiCHO-STM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。

[0125] 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。

[0126] 使用新鲜预热至37℃的ExpiCHOTM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。

[0127] 第4天:转染。使用冷的试剂(4℃),ExpiFectamineTMCHO和冷质粒溶液,充分混匀配制ExpiFectamineTMCHO/质粒。以轻链可变区总质粒0.5-1.0 μg 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4.0-8.0 μg)。

[0128] 具体按下所述操作:(i) 将ExpiFectamineTMCHO试剂瓶轻轻上下颠倒4-5次,充分混匀。使用冷的OptiPROTM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0.5-1.0 μg /mL培养物体积,混匀。(ii) 使用OptiPROTM7.4mL培养基稀释ExpiFectamineTMCHO试剂 (ThermoFisher) 640 μL ,晃动或上下颠倒试管,混匀。(iii) 将稀释的ExpiFectamineTMCHO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ExpiFectamineTMCHO/质粒DNA复合物1-5分钟(即刻加入ExpiFectamineTMCHO/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) $120 \pm 5\text{rpm}$ 。

[0129] 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ExpiFectamineTMCHO增强剂1.2mL和ExpiCHOTM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。

[0130] 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。

[0131] 抗体纯化:4000g离心20min,去除细胞颗粒或碎片,用0.22 μ m或0.45 μ m膜滤器过滤,测定上清液的pH值,用0.2M Na₂HP0₄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。

[0132] 实施例3抗人PD-L1单克隆抗体的制备方法

[0133] 1.动物的免疫

[0134] 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)。

[0135] 第0天,进行初免,完全佐剂乳化抗原,每只小鼠0.25mL,10~100 μ g,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,10~50 μ g,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,10~50 μ g,腹腔注射免疫。

[0136] 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,10~50 μ g,尾静脉及腹腔注射免疫。一周后(第60天),进行细胞融合。

[0137] 2.细胞融合

[0138] (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 1×10^5 /mL,加入96孔板,100 μ L/孔,放入37℃CO₂孵箱培养。

[0139] (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 10^8 个脾淋巴细胞悬液备用。

[0140] (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 1×10^7 细胞备用。

[0141] (4)融合:

[0142] 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。

[0143] 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。

[0144] 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。

[0145] ④于800rpm/min条件下离心6min。

[0146] ⑤除上清,用含20%小牛血清HAT选择培养液重悬。

[0147] ⑥将上述细胞,加到已有饲养细胞层96孔板内,每孔加100 μ L,一个免疫脾脏接种10块96孔板,共计20块。

[0148] ⑦将培养板置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。

[0149] 3. 杂交瘤初筛及其分泌抗体检测

[0150] (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。

[0151] (2) 抗体的检测采用酶联免疫吸附试验(ELISA),包被2 μ g/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。

[0152] 4. 杂交瘤克隆化

[0153] 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。

[0154] 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100 μ L,孵育于37 $^{\circ}$ C、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。

[0155] 将阳性孔的细胞移至24孔板中扩大培养。

[0156] 检测抗体,扩大培养,必要时,重复进行再克隆化。

[0157] 5. 杂交瘤细胞冻存与复苏

[0158] (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 $^{\circ}$ C后放入-70 $^{\circ}$ C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。

[0159] (2) 细胞复苏:将玻璃安瓿自液氮中小心取出,放37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C、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。

[0160] 6. 杂交瘤抗体核酸全长测序

[0161] 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。

[0162] 实施例4夹心ELISA检测sPD-L1

[0163] 实施例1中的抗体作为非封阻型抗体,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)为抗原捕获抗体进行夹心ELISA实验。

[0164] 1. 抗体包被

[0165] 将终浓度为2 μ g/mL的X单抗稀释到包被液中,每孔加入100 μ L到ELISA-96孔板中。盖上盖子或者保护膜,4 $^{\circ}$ C过夜。第二天,取出包被好的板子,弃去上清,用1 $\times$ 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。

[0166] 2. 封闭

[0167] 加入200 μ L/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 $^{\circ}$ C2小时或者4 $^{\circ}$ C过夜。第二天,弃去上清,用1 $\times$ 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。

[0168] 3. 标准品和样品的孵育

[0169] 加入稀释好的标准品(或者样品),100 μ L/孔。盖上盖子或者保护膜,室温放置2小时。弃去上清,用1 $\times$ 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。

[0170] 4. 二抗及HRP-Strep孵育

[0171] 加入bio标记的实施例1中的PD-L1抗体,终浓度为2 μ g/mL,100 μ L/孔,盖上盖子或者保护膜,室温放置1小时。弃去上清,用1 $\times$ 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),100 μ L/孔,盖上盖子或者保护膜,室温放置半小时。弃去上清,用1 $\times$ Wash Buffer洗五次,弃去上清,在滤纸或者手纸上扣干孔中的液体。

[0172] 5. 检测

[0173] 加入100 μ L/孔的A+B混合液,室温避光显色5-10分钟。加入50 μ L/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。

[0174] 实验例1 PD-L1抗体特异性鉴定

[0175] 1.1 ELISA鉴定

[0176] 参考实施例4的方法进行实验,分别包被PD-L1,EGFR,CTLA-4,CD137,EpCam融合蛋白(均为胞外区蛋白)1 μ g/mL,均为his标签蛋白,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。

[0177] 1.2 Western blot鉴定

[0178] 使用常规Western blot方法进行实验,待检测品分别为PD-L1-Fc,PD-1-his,PD-L1-his,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。

[0179] 实验例2 PD-L1抗体亲和力检测

[0180] 具体方法如下:

[0181] 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。

[0182] 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。

[0183] 3.将平衡液加入第一列与第三列中,200 μ L/孔。

[0184] 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。

[0185] 5.用Fortebio Octet96分析软件对曲线进行拟合分析,获得亲和力数值。

[0186] 表1 Fortebio Octet分析PD-L1抗体与PD-L1结合及解离结果

[0187]

Conc. (nM)	Sample ID	Response	KD (M)	KD Error	kon(1/Ms)	kon Error	kdis(1/s)	kdis Error
100	PD-L1-HIS	0.0869	6.96E-09	1.01E-10	3.15E+05	3.67E+03	2.19E-03	1.92E-05
50	PD-L1-HIS	0.0615	6.96E-09	1.01E-10	3.15E+05	3.67E+03	2.19E-03	1.92E-05
25	PD-L1-HIS	0.0518	6.96E-09	1.01E-10	3.15E+05	3.67E+03	2.19E-03	1.92E-05
12.5	PD-L1-HIS	0.0347	6.96E-09	1.01E-10	3.15E+05	3.67E+03	2.19E-03	1.92E-05
6.25	PD-L1-HIS	0.0216	6.96E-09	1.01E-10	3.15E+05	3.67E+03	2.19E-03	1.92E-05
3.13	PD-L1-HIS	0.0134	6.96E-09	1.01E-10	3.15E+05	3.67E+03	2.19E-03	1.92E-05
1.78	PD-L1-HIS	0.0093	6.96E-09	1.01E-10	3.15E+05	3.67E+03	2.19E-03	1.92E-05

[0188] 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 6.96×10^{-9} mol/L,即可以达到 10^{-9} mol/L,且亲和力越小,结合能力越强。

[0189] 实验例3 PD-L1抗体在流式细胞术应用中的验证

[0190] 3.1 PD-L1抗体检测细胞膜上的PD-L1

[0191] 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4。从图4可以看出,有37.1%的细胞呈GFP阳性,也就是说转染率为37.1%。

[0192] 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:

[0193] 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。

[0194] 实验结果见图5,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,且准确性较高。

[0195] 3.2 PD-L1抗体检测肿瘤细胞PD-L1

[0196] 实验方法参考实验例3.1,待检测品为H2009人肺腺癌细胞,H2009细胞系与PD-L1抗体孵育或者不孵育(空白对照),再与羊抗鼠IgG-PE二抗孵育之后流式分析,左峰图未与抗体孵育,右峰为与抗体孵育。实验结果见图6。结果显示,本发明的PD-L1抗体可作为流式抗体检测癌细胞的PD-L1。

[0197] 实验例4 PD-L1抗体在ELISA应用中的验证

[0198] 4.1 PD-L1抗体建立夹心ELISA的标准曲线

[0199] 参考实施例4的实验方法,以PD-L1抗体作为非封阻型抗体,并以biotin进行标记作为检测抗体,以抗体X作为捕获抗体,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7,表2)。

[0200] 表2标准曲线中标准品浓度及对应OD450读数

[0201]

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

[0202] 4.2 PD-L1抗体检测肿瘤患者PD-L1

[0203] 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8)。

[0204] 实验例5 PD-L1抗体对PD-1与PD-L1结合的阻断作用

[0205] 5.1流式细胞术检测PD-L1抗体对PD-1与PD-L1结合的阻断作用

[0206] 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22.7%(图9);PD-L1的293转染细胞先与PD-L1抗体孵育后,再分别与PD-1-his及抗his荧光二抗孵育,结果显示阳性率为29.9%(图10),说明PD-L1抗体不封阻PD-1-his蛋白与转染细胞的结合。

[0207] 5.2 ELISA检测PD-L1抗体对PD-1与PD-L1结合的阻断作用

[0208] 包被PD-1-his 1 μ g/ml,同时PD-L1-Fc与PD-L1抗体混合放置4度过夜。第二天,将混合液加到包被PD-1-his的ELISA板室温温孵育2h,用HRP-链酶亲和素来检测。读取OD450值(图11);并计算阻断率:阻断率(抑制率) = $(OD1 - OD0) / OD0$ 。

[0209] 实验说明PD-L1抗体不封阻PD-1-his蛋白与转染细胞的结合。

[0210] 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> 24

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 1

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 2

Tyr Thr Ser His Leu His Ser

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 3

Gln Gln Tyr Val Lys Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 4

Asn Tyr Trp Ile Glu

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 5

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 6

Glu Arg Ala Ser Thr Ser

1 5

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 8

Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 9

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile 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 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

20 25 30

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 12

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 13

Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln

1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

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> 336

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 16

```

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

```

Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro
145					150					155					160
Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala
				165					170					175	
Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg	Val	Val
				180					185					190	
Ser	Thr	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe
		195					200					205			
Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr
	210					215					220				
Ile	Ser	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Ile	Leu
225					230					235					240
Pro	Pro	Pro	Ala	Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Asp	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
				245					250					255	
Leu	Val	Val	Gly	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Thr	Ser
			260					265						270	
Asn	Gly	His	Thr	Glu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asp	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Asp
		275						280					285		
Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Met	Lys	Thr	Ser
	290					295					300				
Lys	Trp	Glu	Lys	Thr	Asp	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Val	Arg	His	Glu	Gly
305					310					315					320
Leu	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys
			325						330					335	

<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
	50					55					60				
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	160
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>	106																		
<212>	PRT																		
<213>	人工合成																		
<400>	18																		
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	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Ile				
																20	25	30	
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr				
																35	40	45	
Asp	Thr	Ser	Pro	Leu	Ala	Ser	Gly	Phe	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser				
																50	55	60	
Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Ile	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu				
65																70	75	80	
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Arg	Ser	Ser	Phe	Pro	Trp	Thr				
																85	90	95	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys										
																100	105		

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 19

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

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 20

Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln Gly
1 5 10 15
Thr Arg Cys

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 21

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

<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> 702

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 23

```
atgtcctctg ctcagttcct tggctctcctg ttgctctgtt ttcaaggtag cagatgtgat 60
atccagatga cacagactac atcctcctctg tctgcctctc tgggagacag agtcaccatc 120
acttgcagtg caagtcaggg cattagcaat tatttaaact ggtatcagca gaatccagat 180
ggaactgtta aactcctgat ctattacaca tcacatttac actcaggagt ctcattccagg 240
ttcagtggca gtgggtcttg gacagattat tctctcacca tcagcaacct ggaacctgaa 300
gatattgcca ctactattg tcaacagtat gtcaagcttc cgtggacgtt cgggtggaggc 360
accaagctgg aaatcaaacg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 420
agtgagcagt taacatctgg aggtgcctca gtcgtgtgct tcttgaacaa cttctacccc 480
aaagacatca atgtcaagtg gaagattgat ggcagtgaac gacaaaatgg cgtcctgaac 540
agttggactg atcaggacag caaagacagc acctacagca tgagcagcac cctcacgttg 600
accaaggacg agtatgaacg acataacagc tatacctgtg aggccactca caagacatca 660
acttcaccca ttgtcaagag cttcaacagg aatgagtgtt ag 702
```

<210> 24

<211> 1413

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 24

```
atggaatgga cctggctctt tctcttctc ctgtcagtaa ctgcagggtg ccaactccag 60
gttcagctgc agcagtctgg aactgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120
tgcaaggcta ctggttacac attcagtaac tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct 180
ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa gtggttaatac taactacaat 240
gagaacttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaatac agcctacatg 300
caactcagca ggctgacatc tgaggactct gccgtctatt attgtgcaag agagagggtc 360
tcgacttcgt ggggccaaagg gactctggtc actgtctctg cagccaaaac aacaccccc 420
tcagtctatc cactggcccc tgggtgtgga gatacaactg gttcctccgt gactctggga 480
tgcttggtca agggctactt ccctgagtca gtgactgtga cttggaactc tggatccctg 540
tccagcagtg tgcacacctt cccagctctc ctgcagtctg gactctacac tatgagcagc 600
tcagtgactg tcccctccag cacctggcca agtcagaccg tcacctgcag cgttgtctac 660
```

ccagccagca gcaccacggt ggacaaaaaa cttgagccca gcgggcccac ttcaacaatc 720
aaccctgtc ctccatgcaa ggagtgtcac aaatgccag ctcctaacct cgagggtgga 780
ccatccgtct tcatcttccc tccaaatata aaggatgtac tcatgatctc cctgacaccc 840
aaggtcacgt gtgtggtggt ggatgtgagc gaggatgacc cagacgtcca gatcagctgg 900
tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa cccatagaga ggattacaac 960
agtactatcc gggtagtcag caccctcccc atccagcacc aggactggat gagggtgcaag 1020
gagttcaaat gcaagggtcaa caacaaagac ctcccatcac ccatcgagag aaccatctca 1080
aaaattaaag ggctagtcag agtccacaa gtatacatct tgccgccacc agcagagcag 1140
ttgtccagga aagatgtcag tctcacttgc ctggctgtgg gcttcaaccc tggagacatc 1200
agtgtggagt ggaccagcaa tgggcataca gaggagaact acaaggacac cgcaccagtc 1260
ctggactctg acggttctta cttcatatat agcaagctca atatgaaaac aagcaagtgg 1320
gagaaaacag attccttctc atgcaacgtg agacacgagg gtctgaaaaa ttactacctg 1380
aagaagacca tctcccggtc tccgggtaaa tga 1413

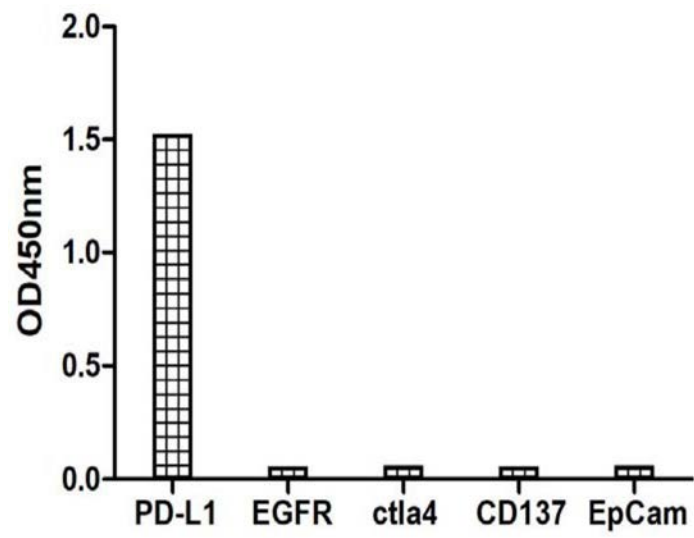


图1

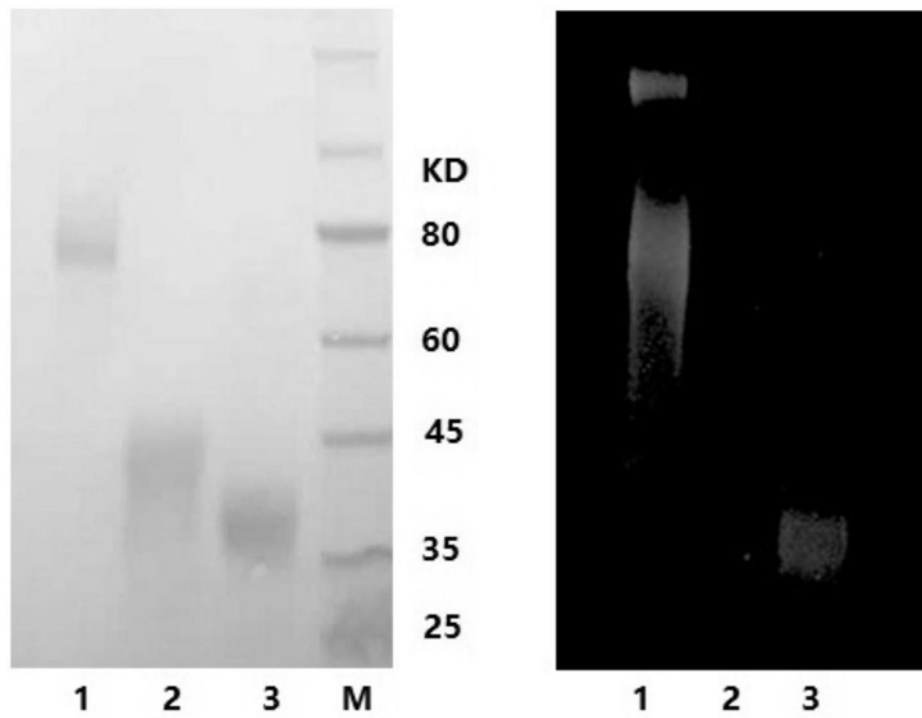


图2

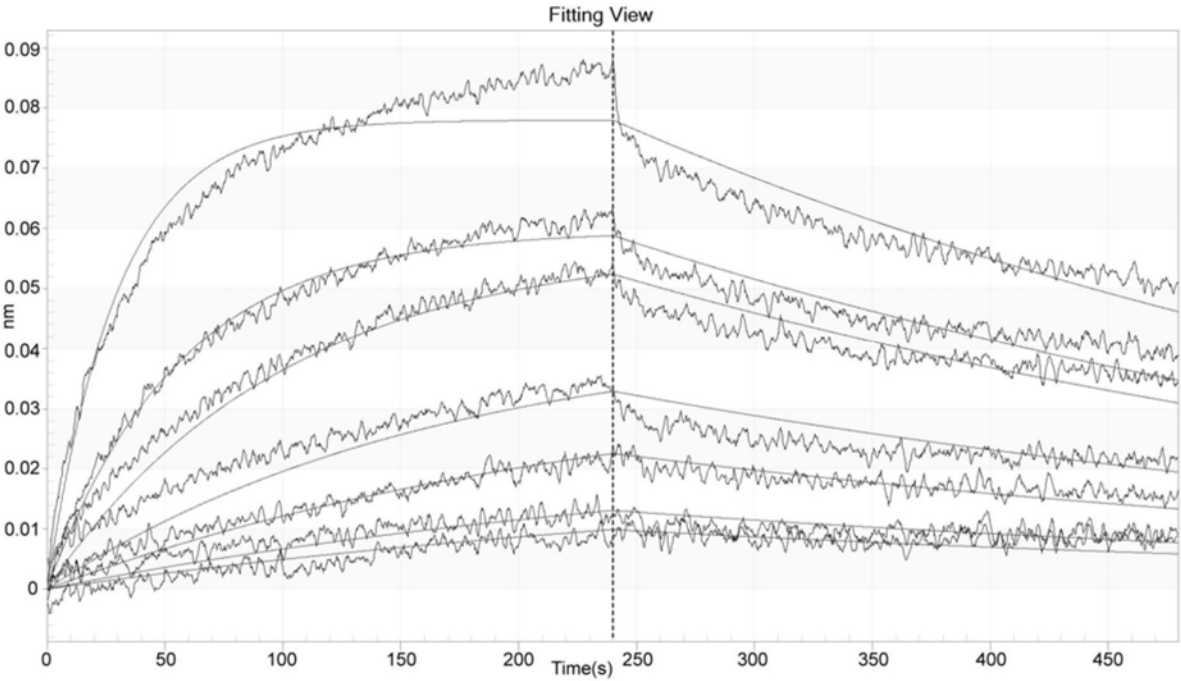


图3

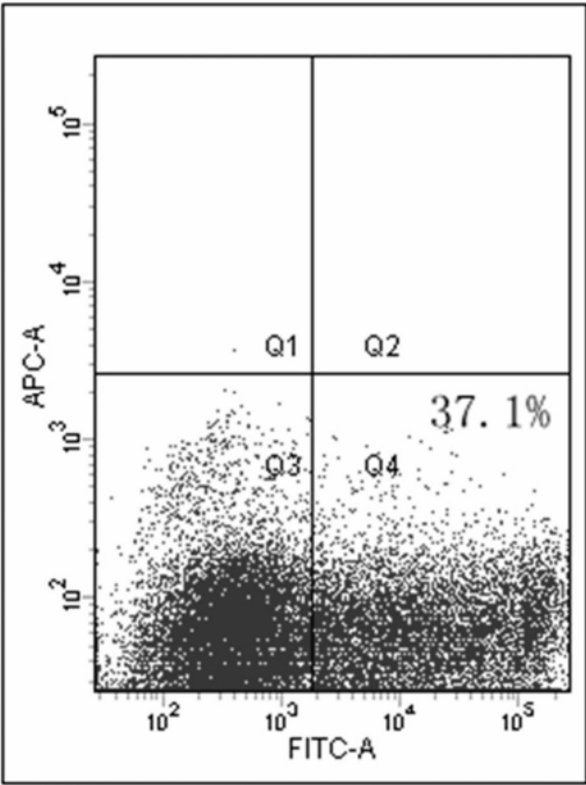


图4

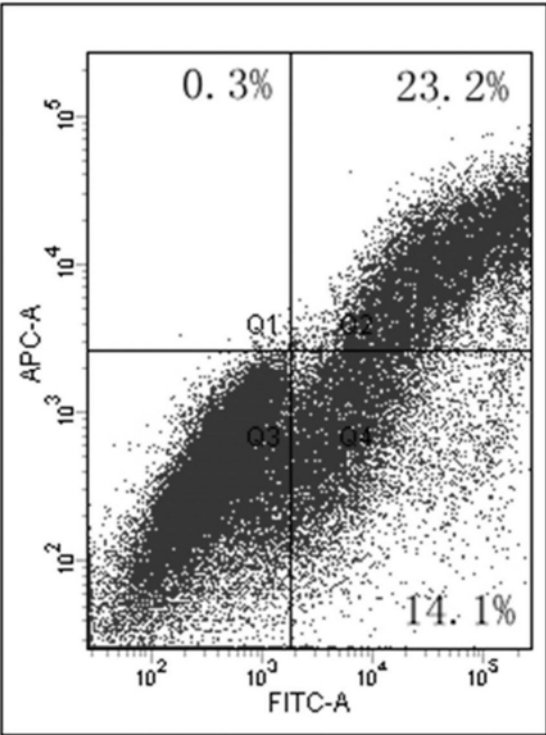


图5

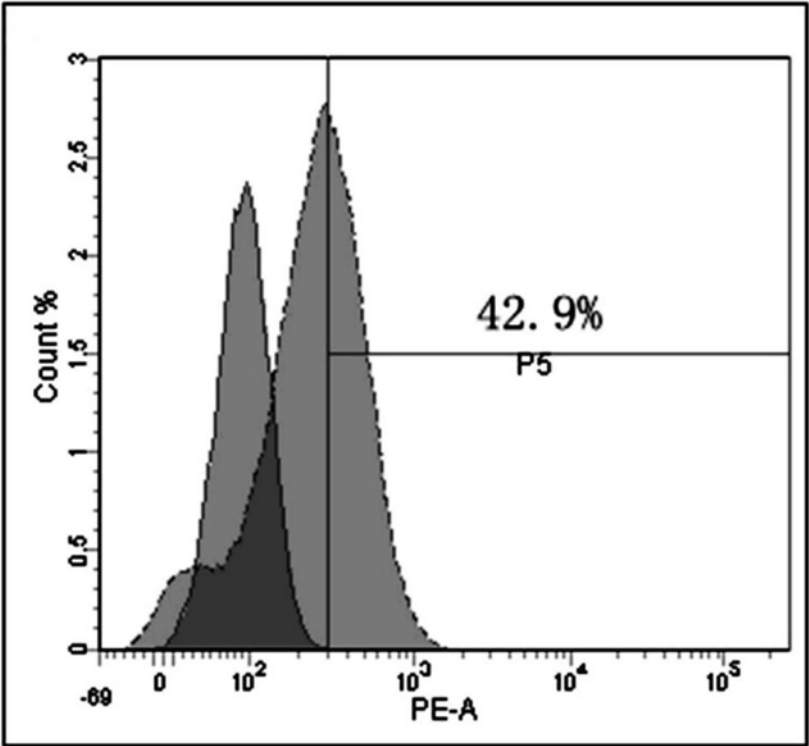


图6

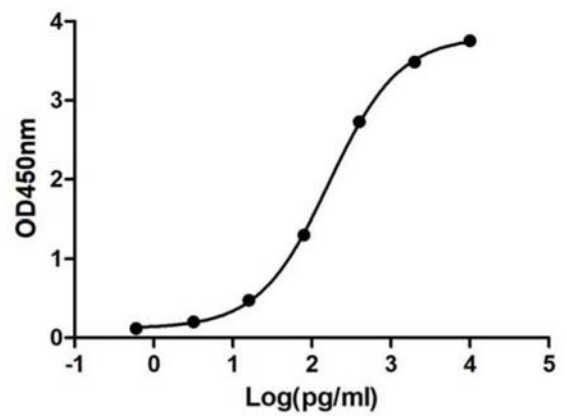


图7

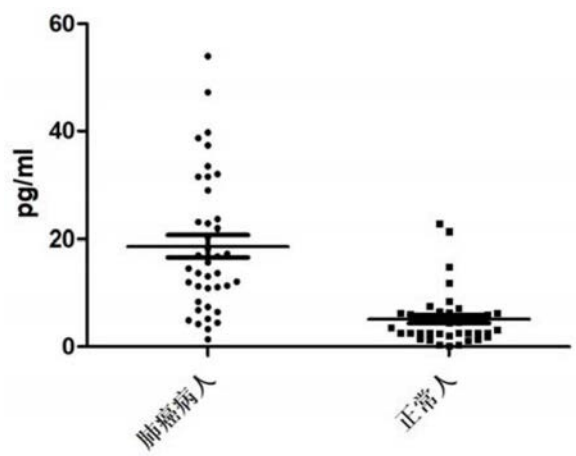


图8

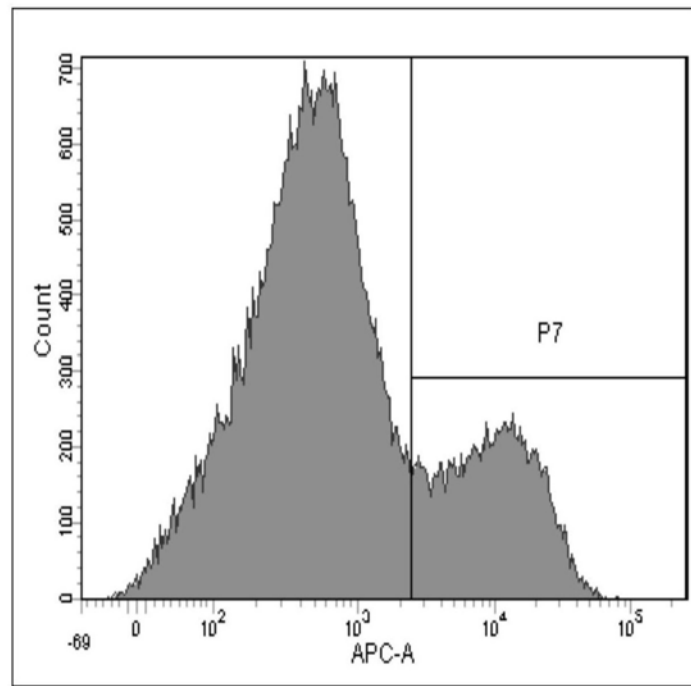


图9

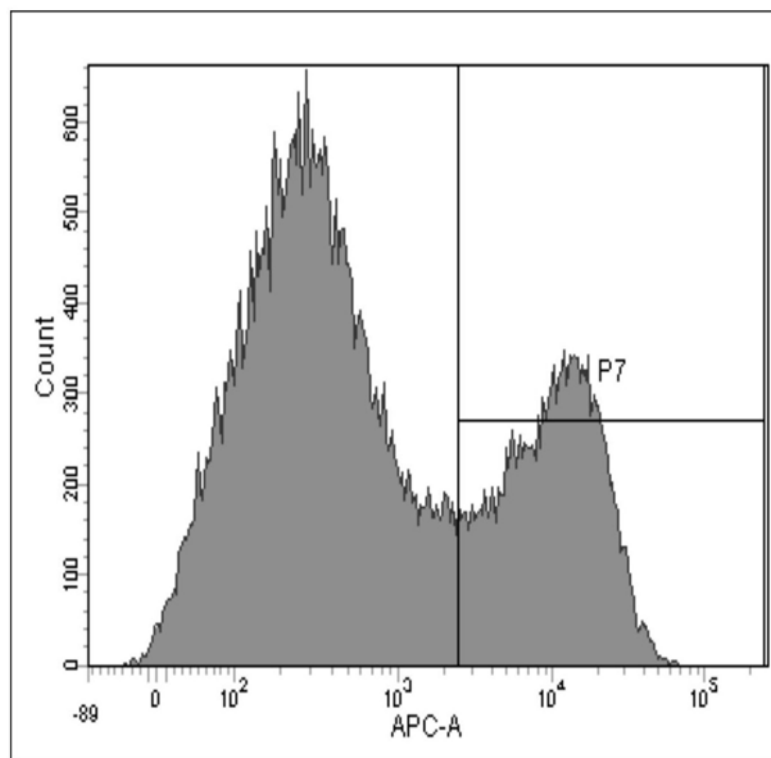


图10

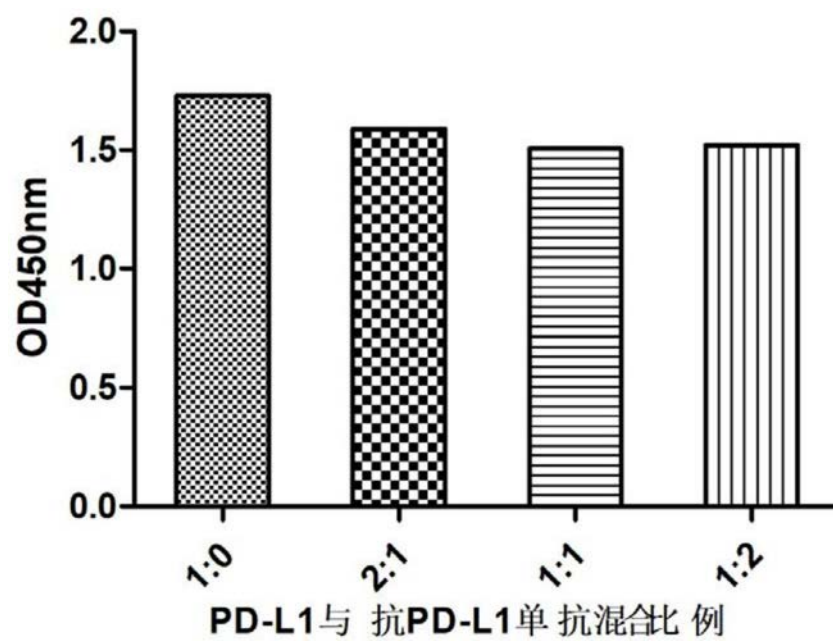


图11

专利名称(译)	一种抗人PD-L1抗体及其应用		
公开(公告)号	CN108997500A	公开(公告)日	2018-12-14
申请号	CN201811063921.7	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	易玲 闫卓红 王小珏 杨斌 韦攀健 张洪涛		
发明人	易玲 闫卓红 王小珏 杨斌 韦攀健 张洪涛		
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)	贾颜维		
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 $K_d \leq 8.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 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。

