



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108299560 A

(43)申请公布日 2018.07.20

(21)申请号 201710024750.6 *A61K 45/06*(2006.01)
(22)申请日 2017.01.13 *A61K 31/655*(2006.01)
(71)申请人 杭州翰思生物医药有限公司 *A61P 35/00*(2006.01)
地址 310051 浙江省杭州市滨江区长河街 *A61P 37/04*(2006.01)
道滨江路688号5幢26层2613室 *G01N 33/53*(2006.01)
申请人 中山康方生物医药有限公司
(72)发明人 张发明 席甘 黄莺 夏瑜
李百勇 王忠民
(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201
代理人 赵天月
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页
序列表6页 附图9页

(54)发明名称

抗PD-1的单克隆抗体及其应用

(57)摘要

本发明公开了抗PD-1的单克隆抗体及其应用,该抗PD-1的单克隆抗体包括具有SEQ ID NO: 5所示氨基酸序列的FcRn结合位点区域。本发明的抗PD-1的单克隆抗体,其重链恒定区的FcRn结合位点区域第254、308、434位氨基酸分别为苏氨酸、脯氨酸和丙氨酸。发明人惊奇地发现,该抗体对FcRn的结合亲和力强,血清半衰期长,并且,其对抗原PD-1的结合亲和力和识别特异性好。

1. 一种抗PD-1的单克隆抗体或其抗原结合片段,其特征在于,包括具有SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的FcRn结合位点区域。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,包括:

具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的轻链。

3. 一种分离的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸编码权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段。

4. 根据权利要求3所述的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸包含下列编码氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的抗体FcRn结合位点区域的核苷酸序列:

SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列或其互补序列。

5. 根据权利要求3所述的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:2所示。

6. 一种表达载体,其特征在于,包含权利要求3-5任一项所述的多核苷酸。

7. 一种重组细胞,其特征在于,包含权利要求6所述的表达载体。

8. 一种制备权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其特征在于,包括培养权利要求7所述的重组细胞。

9. 权利要求3-5任一项所述的多核苷酸、权利要求6所述的表达载体、或权利要求7所述的重组细胞在制备抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗体与PD-1特异性结合。

10. 权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求3-5任一项所述的多核苷酸、权利要求6所述的表达载体、或权利要求7所述的重组细胞在制备药物中的用途,所述药物用于促进T细胞的活化和增殖,并调节细胞因子的表达和分泌,使用来刺激抗肿瘤细胞产生更强的免疫应答。

11. 一种药物组合物,其特征在于,包含权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求3-5任一项所述的多核苷酸、权利要求6所述的表达载体、或权利要求7所述的重组细胞。

12. 一种用于鉴定能够与PD-1结合的药物的方法,其特征在于,包括:

在候选药物存在时,使权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段与抗原接触,并且确定所述抗体或其抗原结合片段与所述抗原的第一结合量,其中,所述抗原为PD-1或其片段;以及

在不存在所述候选药物时,使权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段与抗原接触,并且确定所述抗体或其抗原结合片段与所述抗原的第二结合量,其中,所述抗原为PD-1或其片段,

其中,所述第二量大于所述第一量是所述候选药物能够与PD-1结合的指示。

13. 一种药物联合,其特征在于,包括:

(1) 权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求3-5任一项所述的多核苷酸、权利要求6所述的表达载体、或权利要求7所述的重组细胞;以及

(2) 与(1)不同的免疫增强药物。

14. 根据权利要求13所述的药物联合,其特征在于,所述与(1)不同的免疫增强药物包括选自下列的至少之一:

抗CTLA-4抗体,抗CD40抗体,Budesonide,水杨酸盐,任选地所述水杨酸盐类包括

sulfasalazine、olsalazine、balsalazide以及mesalamine的至少之一。

抗PD-1的单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学和抗体工程技术领域,具体涉及抗PD-1的单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 然而,目前延长IgG类抗体(尤其是天然IgG类抗体)的血清半衰期并提高其对FcRn的结合亲和力的方法仍有待进一步研究。

[0003] 程序化死亡因子1(PD-1),也称为CD279;基因名称PDCD1;登录号NP_005009为在调节免疫系统的刺激性与抑制性信号之间的平衡和维持外周耐受性中具有至关重要的作用的细胞表面受体。其为与CD28具有同源性的免疫球蛋白超家族的抑制性成员。PD-1的结构为单体I型跨膜蛋白,其由一个免疫球蛋白可变区样细胞外结构域以及含有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)和免疫受体酪氨酸转换基序(ITSM)的细胞质结构域组成。PD-1的表达在T细胞、B细胞、天然杀伤(NK)细胞和单核细胞上是可诱导的,例如在通过T细胞受体(TCR)或B细胞受体(BCR)信号转导活化淋巴细胞后。PD-1具有两个已知的配体,PD-L1(B7-H1,CD274)和PD-L2(B7-DC,CD273),它们为B7家族的细胞表面表达的成员。当衔接配体时,PD-1将磷酸酶例如SHP-1和SHP-2招募至其细胞内酪氨酸基序,所述基序随后使被TCR或BCR信号转导激活的效应分子脱去磷酸。由此,仅当其同时与TCR或BCR衔接时,PD-1才可将抑制性信号转导入T细胞和B细胞。

[0004] 然而,目前特异性识别PD-1的抗体仍有待改进。并且,特异性识别PD-1的抗体(即抗PD-1的单克隆抗体)如IgG类抗体常用于治疗中,而天然IgG类抗体在治疗用途中的关键问题之一是它们在血液循环中的持久性低、血清半衰期短,以至抗体清除的速度直接影响治疗的功效,并因此影响在患者中引起副作用且还增加治疗费用的药物施用的频率和量。因此,延长现有IgG类抗体(尤其是天然IgG类抗体)的血清半衰期并提高其对FcRn的结合亲和力,获得一种新的、对FcRn的结合亲和力增强且血清半衰期延长的IgG类抗体,意义重大。

发明内容

[0005] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提供一种新的、对FcRn的结合亲和力增强且血清半衰期延长的抗PD-1的单克隆抗体。需要说明的是,本发明是基于发明人的下列发现和工作而完成的:

[0006] 用木瓜蛋白酶水解IgG抗体,可将其从铰链区二硫键的N端部位切断,得到三个片段:二个相同的可与抗原结合的片段称为Fab片段;一个可结晶的片段称为Fc片段。抗体的Fc区与大量Fc受体和配体相互作用,赋予抗体一些重要的效应器功能的性能。效应器功能包括启动补体依赖的细胞毒性(CDC)、启动吞噬作用和抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)并通过胞转作用转运抗体通过细胞屏障。此外,FC区域对维持IgG类抗体血清的半衰期非常重要。

[0007] 新生儿Fc受体(FcRn)是负责上皮细胞主动转运免疫球蛋白IgG的受体,是由 α 链和

β链两个亚基以非共价键的形式组成的异源二聚体。IgG分子的Fc部分包括2条相同的多肽链,其中每条多肽链通过其FcRn结合位点结合单个FcRn分子。在成年哺乳动物中,IgG通过Fc部分与FcRn结合,从而保护IgG抗体免受降解,在维持血清抗体水平中起关键作用。IgG分子被内皮细胞内吞后,如果它们与FcRn结合,那么再循环进入循环内。相比之下,不与FcRn结合的IgG分子进入细胞,被溶酶体降解。因而,FC区域对于IgG抗体对FcRn的结合亲和力的强弱也至关重要。

[0008] 因而,发明人以已知特异性识别PD-1的IgG类抗体H2L2为对象,尝试通过改变IgG抗体重链恒定区(即FC区)的序列,延长其血清半衰期并提高其对FcRn的结合亲和力。也即,发明人旨在通过突变IgG抗体H2L2的Fc端,达到改变其血清半衰期,以及对FcRn的结合亲和力的目的。经过一系列的实验设计和探索,发明人惊喜地发现,以在人IgG分子恒定区中引入的几个突变作为基础,这些突变改变了IgG分子对FcRn的亲和力,从而改变了抗体的血清半衰期。具体地,在IgG类抗体的重链恒定区的氨基酸残基254、308、434中引入不同于未修饰抗体中的氨基酸残基,这种突变使得优化的抗体具有比野生型抗体更长的血清半衰期,并且其对抗原PD-1的结合亲和力和识别特异性没有降低。

[0009] 进而,在本发明的第一方面,本发明提供了一种抗PD-1的单克隆抗体或其抗原结合片段。根据本发明的实施例,该抗体包括具有SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的FcRn结合位点区域。

[0010]

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI **T**
RTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT **P**
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALH **A**HYTQKSLSLGK (SEQ ID NO:5),
其中,方框标记的氨基酸为该抗PD-1的单克隆抗体的重链恒定区的FcRn结合位点区域的第254、308、434位氨基酸。换言之,根据本发明的实施例,本发明的抗PD-1的单克隆抗体(IgG类抗体),其重链恒定区的FcRn结合位点区域第254、308、434位氨基酸分别为苏氨酸、脯氨酸和丙氨酸。发明人惊奇地发现,该抗体对FcRn的结合亲和力强,血清半衰期长,并且,其对抗原PD-1的结合亲和力和识别特异性好。

[0011] 根据本发明的实施例,该抗体包括:具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的轻链。在本文中,将此抗PD-1的单克隆抗体命名为H8L2,其相对于野生型H2L2抗体,重链恒定区的FcRn结合位点区域第254、308、434位氨基酸分别突变为苏氨酸、脯氨酸和丙氨酸。由此,相对于野生型H2L2抗体,本发明的抗PD-1的单克隆抗体(H8L2)对FcRn的结合亲和力增强、血清半衰期延长,并且,其对抗原PD-1的结合亲和力和识别特异性没有降低。

[0012] 在本发明的第二方面,本发明提供了一种分离的多核苷酸。根据本发明的实施例,该多核苷酸编码前面所述的抗体或其抗原结合片段。根据本发明的实施例,该分离的多核苷酸编码的抗体,对FcRn的结合亲和力强、血清半衰期长,并且,其对抗原PD-1的结合亲和力和识别特异性好。

[0013] 根据本发明的实施例,所述多核苷酸包含下列编码氨基酸序列如SEQ ID NO:5所

示的抗体FcRn结合位点区域的核苷酸序列:SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列或其互补序列。

[0014]

AAGGGCGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATC
CGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAG
TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCC
CAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCACCCGG
ACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCA
CCCCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATC
GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGAT
GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGG
CTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACGCCA
CTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA (SEQ ID NO:6)。

[0015] 由此,该分离的多核苷酸编码的抗体,其重链恒定区的FcRn结合位点区域第254、308、434位氨基酸分别为苏氨酸、脯氨酸和丙氨酸,并且,该抗体对FcRn的结合亲和力强,血清半衰期长,对抗原PD-1的结合亲和力和识别特异性好。

[0016] 根据本发明的实施例,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:2所示。由此,该分离的多核苷酸编码的抗体,相对于野生型H2L2抗体,重链恒定区的FcRn结合位点区域第254、308、434位氨基酸分别突变为苏氨酸、脯氨酸和丙氨酸;且相对于野生型H2L2抗体,本发明的抗PD-1的单克隆抗体对FcRn的结合亲和力增强,血清半衰期延长,并且,其对抗原PD-1的结合亲和力和识别特异性没有降低。

[0017] 在本发明的第三方面,本发明提供了一种表达载体。根据本发明的实施例,该表达载体包含前面所述的多核苷酸。

[0018] 在本发明的第四方面,本发明提供了一种重组细胞。根据本发明的实施例,该重组细胞包含前面所述的表达载体。

[0019] 发明人发现,通过培养上述重组细胞能够有效地合成根据本发明实施例的特异性识别PD-1的抗体或其抗原结合片段。因而,在本发明的第五方面,本发明提供了一种制备前面所述的抗体或其抗原结合片段的方法。根据本发明的实施例,该方法包括培养前面所述的重组细胞。关于特异性识别PD-1的抗体或其抗原结合片段,前面所描述的特征和优点同样适用该方法,在此不再赘述。

[0020] 在本发明的第六方面,本发明还提供了前面所述的多核苷酸、表达载体、或重组细胞在制备抗体或其抗原结合片段的用途,所述抗体与PD-1特异性结合。由此,发明人发现,利用上述的多核苷酸、表达载体、或重组细胞能够有效地制备得到能够与PD-1特异性结合的抗体或其抗原结合片段,并且该抗体的血清半衰期长、对FcRn的结合亲和力强,对抗原PD-1的结合亲和力和识别特异性好。进而利用制备得到的抗体或其抗原结合片段有效地阻断PD-1与其受体的结合,进而阻断PD-1受体例如SHP1/2相关信号通路,从而可以有效地抑

制肿瘤的增长。

[0021] 在本发明的第七方面,本发明提供了前面所述的抗体或其抗原结合片段、多核苷酸、表达载体、或重组细胞在制备药物中的用途,所述药物用于促进T细胞的活化和增殖,并调节细胞因子的表达和分泌,使用来刺激抗肿瘤细胞产生更强的免疫应答。

[0022] 在本发明的第八方面,本发明提供了一种药物组合物。根据本发明的实施例,该包含括面所述的抗体或其抗原结合片段、多核苷酸、表达载体、或重组细胞。由此,该药物组合物能够有效用于促进T细胞的活化和增殖,并调节细胞因子的表达和分泌,使用来刺激抗肿瘤细胞产生更强的免疫应答。

[0023] 在本发明的第九方面,本发明提供了一种用于鉴定能够与PD-1结合的药物的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:在候选药物存在时,使前面所述的抗体或其抗原结合片段与抗原接触,并且确定所述抗体或其抗原结合片段与所述抗原的第一结合量,其中,所述抗原为PD-1或其片段;以及在不存在所述候选药物时,使前面所述的抗体或其抗原结合片段与抗原接触,并且确定所述抗体或其抗原结合片段与所述抗原的第二结合量,其中,所述抗原为PD-1或其片段,其中,所述第二量大于所述第一量是所述候选药物能够与PD-1结合的指示。由此,通过采用该方法,能够筛选与PD-1结合的候选药物。

[0024] 需要说明的是,PD-1和CTLA-4联合阻断将会与标准肿瘤治疗联合使用。例如PD-1和CTLA-4联合阻断会与化疗的组织有效的结合。试验表明,通过与抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体联合使用,降低化疗药物的剂量即可达到相同的疗效。文献发布的实例:用抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体与decarbazine(多西紫杉醇,一种抗癌药)联合使用来治疗黑色素瘤。另一个实例用抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体与IL-2(白细胞介素-2)来治疗黑色素瘤。以上联合使用的原理为:细胞死亡是很多化疗药物中细胞毒素作用的结果,会使肿瘤细胞表达抗原的途径的水平增加。另外一个联合治疗是用抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体联合阻断来增加放射治疗、手术治疗、激素治疗等的协同作用。每一种方法都是增加了抗原在机体中的来源。血管增生抑制剂也可和抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体联合使用,抑制血管增生进而抑制肿瘤细胞的生长。这可能也是通过增加机体内肿瘤细胞抗原的表达。

[0025] 因而,在本发明的第十方面,本发明提供了一种药物联合。根据本发明的实施例,该药物联合包括:

[0026] (1) 前面所述的抗体或其抗原结合片段、多核苷酸、表达载体、或重组细胞;以及

[0027] (2) 与(1)不同的免疫增强药物。

[0028] 由此,对肿瘤治疗的效果更好。

[0029] 根据本发明的实施例,所述与(1)不同的免疫增强药物包括选自下列的至少之一:抗CTLA-4抗体,抗CD40抗体,Budesonide,水杨酸盐,任选地所述水杨酸盐类包括sulfasalazine、olsalazine、balsalazide以及mesalamine的至少之一。

[0030] 其中,需要说明的是,本文中使用的术语“氨基酸”意指可以存在于具体的、确定的位置上的20种天然氨基酸或任意非天然类似物之一。可以用三字母密码或用单字母密码缩写天然氨基酸:

	丙氨酸	ala	A
	精氨酸	arg	R
	天冬酰胺	asn	N
	天冬氨酸	asp	D
	天冬酰胺或天冬氨酸	asx	B
	半胱氨酸	cys	C
	谷氨酸	glu	E
	谷氨酰胺	gln	Q
	谷氨酰胺或谷氨酸	glx	Z
[0031]	甘氨酸	gly	G
	组氨酸	his	H
	异亮氨酸	ile	I
	亮氨酸	leu	L
	赖氨酸	lys	K
	甲硫氨酸	met	M
	苯丙氨酸	phe	F
	脯氨酸	pro	P
	丝氨酸	ser	S
	苏氨酸	thr	T
	色氨酸	try	W
[0032]	酪氨酸	tyr	Y
	缬氨酸	val	V

[0033] 本文中使用的表达方式“第n位氨基酸”(例如第254、308、434位氨基酸)是指蛋白质的序列中的位置。对于本发明中针对的Fc区,可以根据Kabat中的EU索引编号位置。

[0034] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0035] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0036] 图1是根据本发明的实施例,H8L2与H2L2对PD1的结合ELISA的结果图;

[0037] 图2是根据本发明的实施例,H8L2与H2L2对Pd1和PdL1抑制的竞争Elisa的结果图;

[0038] 图3是根据本发明的实施例,H8L2与H2L2对Pd1和PdL2抑制的竞争Elisa的结果图;

- [0039] 图4是根据本发明的实施例,H8L2和H2L2动力学特征参数检测结果图;
- [0040] 图5是根据本发明的实施例,抗体H8L2和H2L2通过阻断PD-1蛋白功能活化刺激T细胞分泌IL-2水平图;
- [0041] 图6是根据本发明的实施例,抗体H8L2和H2L2通过阻断PD-1蛋白功能活化刺激T细胞分泌IFN γ 水平图;
- [0042] 图7是根据本发明的实施例,食蟹猴血清浓度研究中,ELISA测定的H8L2与H2L2的血药浓度时间曲线;
- [0043] 图8是根据本发明的实施例,食蟹猴药代动力学研究中,变体H8L2的1mg/kg个体血药浓度数据;
- [0044] 图9是根据本发明的实施例,食蟹猴药代动力学研究中,变体H8L2的3mg/kg个体血药浓度数据;
- [0045] 图10是根据本发明的实施例,食蟹猴药代动力学研究中,变体H8L2的10mg/kg个体血药浓度数据;
- [0046] 图11是根据本发明的实施例,食蟹猴药代动力学研究中,野生型H2L2的10mg/kg个体血药浓度数据;
- [0047] 图12是根据本发明的实施例,食蟹猴药代动力学研究中,变体H8L2和野生型H2L2平均有效半衰期;
- [0048] 图13是根据本发明的实施例,H8L2的SDS-PAGE鉴定结果;
- [0049] 图14是根据本发明的实施例,H8L2的SEC-HPLC鉴定结果;
- [0050] 图15是根据本发明的实施例,FACS方法检测H8L2与PD-1的结合活性的结果图;
- [0051] 图16是根据本发明的实施例,FACS方法检测H8L2阻断PDL-1与PD-1结合的活性的结果图;
- [0052] 图17是根据本发明的实施例,ADCC和CDC效应研究中,H8L2与Fc γ RIIIa亲和力常数检测结果图;
- [0053] 图18是根据本发明的实施例,ADCC和CDC效应研究中,H8L2与C1q亲和力常数检测结果图。

具体实施方式

[0054] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品,例如可以采购自Illumina公司。

[0055] 实施例1H8L2突变体的蛋白表达

[0056] 在人源化抗体H2L2(抗PD-1的IgG类抗体)基础上,使其抗体重链恒定区的FcRn结合位点区域第254、308、434位氨基酸分别突变为苏氨酸、脯氨酸和丙氨酸,命名为H8L2(抗PD-1的IgG类抗体变体)。

[0057] 也即,目的抗体H8L2突变体,其相对于人源化抗体H2L2,抗体重链恒定区的FcRn结合位点区域第254、308、434位氨基酸分别突变为苏氨酸、脯氨酸和丙氨酸,其他区域序列不

变。

[0058] 实际操作中,全基因合成编码人源化抗体H8L2的核酸序列,并构建到表达载体。提取表达载体DNA,转染哺乳动物细胞293细胞。细胞转染后,抗体在哺乳动物细胞内表达,并分泌到细胞外。然后,通过抗体亲和层析柱,纯化表达的抗体,即获得人源化抗体H8L2蛋白。用SDS-PAGE和SEC-HPLC标准分析技术对其进行质量鉴定后用于后续的药效学研究。

[0059] 其中,H8L2的SDS-PAGE和SEC-HPLC鉴定结果分别见图13和图14。

[0060] H8L2的SDS-PAGE鉴定结果见图13。如图13所示,泳道1:H8L2非还原;泳道2:H8L2还原;泳道M:DNA标准品(14.4KDa 18.4KDa 25KDa 35KDa 45KDa 66.2KDa 116KDa);泳道3:BSA。由图13可知,候选抗体18A10H8L2样品总体纯度较高。

[0061] H8L2的SEC-HPLC鉴定结果见图14。如图14所示,积分定量确认该抗体总纯度为98.19%。

[0062] 如前所述,人源化抗体H2L2与H8L2抗体,仅重链恒定区的FcRn结合位点区域第254、308、434位氨基酸不同,因而下面仅提供H8L2突变体的H8L2序列以供参考。

[0063] H8L2重链氨基酸序列:

[0064]

EVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRDTYYPDSVKGFRFTISRDN SKN
NLYLQMNSLRAEDTALYYCARQKGEAWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMITRTPEVTCVVVDVSVQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTP
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHAHYTQKLSLSLGK (SEQ ID NO:1),
 其中,下划线标注的部分为抗体可变区,方框标记的为H8L2相对于抗体H2L2的突变位点,即重链恒定区的FcRn结合位点区域的第254、308、434位氨基酸。

[0065] 其中,相对于人源化抗体H2L2,H8L2突变体的抗体重链恒定区的FcRn结合位点区域的第254位氨基酸由丝氨酸突变为苏氨酸,第308位氨基酸由缬氨酸突变为脯氨酸,第434位氨基酸由天冬酰胺突变为丙氨酸。

[0066] 编码H8L2重链的核酸序列:

[0067]

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGCGCGCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTC
TGGCGGCGGACTGGTGCAGCCCGGCGGCTACTGAAGCTGAGCTGCGCCGCTCCGGCTTACCTTTAGCTCCTACG
GAATGTCCTGGGTGCACAGGCACCCGGAAGGGGCTGGACTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGAGACACC
TACTATCCTGATAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATTAGCCGGGACAACAGCAAGAACAATCTGTACCTGCAGATGAA
CAGCCTGAGGGCTGAGGATACTGCACTGTACTATTGTGCCCGCCAGAAGGGCGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGCC
AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGC
ACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
GACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGACCATCAGT
CTTCTGTTCCCCCAAACCAAGGACACTCTCATGATACCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG

TGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCCCCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGG
GGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACGCCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG
GGTAAA (SEQ ID NO:2), 其中, 下划线标注的部分为抗体可变区。

[0068] H8L2轻链氨基酸序列:

[0069]

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNKGTGVPARFSGSGSDTFTL
NINPMEENDTAMYFCQSQKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
3), 其中, 下划线标注的部分为抗体可变区。

[0070] 编码H8L2轻链的核酸序列:

[0071]

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGCGTGCACTCCGATATTGTGCTGACTCAGAG
CCCTGCTTCCCTGGCCGTGTCTCCAGGACAGCGAGCTACCATCACATGCAGAGCATCTGAGAGTGTGGACAACTACG
GAATTAGTTTCATGAATTGGTTTCAGCAGAAGCCCGCCAGCCCCCTAAACTGCTGATCTATGCCGCCAGCAACAAG
GGCACCGGGGTGCCTGCTCGATTCTCAGGAAGCGGCTCCGGGACAGACTTTACTCTGAACATTAACCCAATGGAGGA
AAATGATACAGCAATGTACTTCTGCCAGCAGAGCAAGGAGGTGCCCTGGACCTTTGGCGGGGAACAAAGCTGGAAA
TCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCT
GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG
TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC
TTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:4), 其中, 下划线标注的部分为抗体可变区。

[0072] 实施例2H8L2突变体重组人源化抗体ELISA实验

[0073] 针对H2L2抗体和实施例1制备获得的H8L2抗体, 进行ELISA结合实验和竞争ELISA实验比较研究, 具体如下:

[0074] 1、18A10H8L2、18A10H2L2ELISA结合实验

[0075] 具体步骤如下:

[0076] 1) 包被抗原: PD-1-his抗原0.25 μ g/ml, 100 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0077] 2) 1% BSA (PBS稀释) 37 $^{\circ}$ C封闭2小时, 1 \times PBST (Tween-20, 1%) 洗涤3次, 轻轻拍干;

[0078] 3) 一抗: 2 μ g/ml, 1:3梯度稀释7个梯度浓度, 空白对照组为PBS, 37 $^{\circ}$ C孵育1小时;

[0079] 4) 二抗: PBST洗涤3次, 轻轻拍干, 每孔100 μ l加入1:10000稀释的HRP酶标羊抗人IgG (H+L) 二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育1小时;

[0080] 5) 显色: PBST洗涤3次, 轻轻拍干; 每孔100 μ l加入TMB显色剂, 室温反应5~10min;

[0081] 6) 显色终止: 50 μ l/孔加入2M H₂SO₄溶液终止显色反应;

[0082] 7) 读数: 在酶标仪上, 用吸光度450nm检测各孔的吸光值。

[0083] 结果见图1,可计算出H8L2和H2L2对PD-1的EC₅₀值分别为0.04nM和0.05nM。由图1可知,FcRN结合区域上的突变对抗体与PD-1亲和力没有影响。

抗体稀释	18A10 H8L2		18A10 H2L2	
	2 µg/ml	1.881	1.84	1.9
1:3	1.756	1.756	1.784	1.757
1:9	1.661	1.628	1.716	1.736
[0084] 1:27	1.214	1.156	1.341	1.34
1:81	0.429	0.419	0.514	0.491
1:243	0.127	0.125	0.146	0.14
1:729	0.072	0.066	0.068	0.069
0	0.052	0.05	0.054	0.048

[0085] 2、18A10H8L2、18A10H2L2与PDL1竞争ELISA实验

[0086] 具体步骤如下:

[0087] 1) 包被抗原:在96孔酶标板上包被PD-1-hIgGFc抗原0.5µg/ml,50µl/孔,4℃包被过夜;

[0088] 2) PBST洗板3次,轻轻拍干,加入1%BSA(PBS稀释)37℃封闭2小时,1×PBST(Tween-20,1%)洗涤3次;

[0089] 3) 一抗:6µg/ml,1:3梯度稀释7个梯度浓度,空白对照组为PBS,50µl/孔加入到包被好的酶标板上,室温孵育10min;

[0090] 4) 配体:加入PDL1-mIgG2aFc溶液0.6µg/ml,50µl/孔,37℃孵育1小时;

[0091] 5) 二抗:PBST洗涤3次,轻轻拍干;每孔50µl加入1:5000稀释的HRP酶标羊抗鼠IgG(H+L)二抗,37℃孵育1小时;

[0092] 5) 显色:PBST洗涤3次,轻轻拍干;每孔50µl加入TMB显色剂,室温反应5-10min;

[0093] 6) 终止:50µl/孔加入2M H₂SO₄终止显色反应;

[0094] 7) 读数:在酶标仪上,用吸光度450nm检测各孔的吸光值。

[0095] 结果见图2,并且H8L2和H2L2抑制Pd-1与PdL1的EC₅₀值分别为0.474nM和0.783nM。由此可知,FcRN上的突变对抗体抑制Pd-1与PdL1的结合没有影响。

抗体稀释	18A10 H8L2		18A10 H2L2	
	3 µg/ml	0.367	0.348	0.301
1:3	0.329	0.293	0.26	0.276
1:9	0.325	0.34	0.335	0.31
[0096] 1:27	0.658	0.642	0.828	0.883
1:81	1.275	1.194	1.191	1.214
1:243	1.454	1.344	1.276	1.336
1:729	1.489	1.5	1.385	1.369
0	2.113	2.067	2.09	1.417
配体	PDL1-mIgG2aFc 0.3 µg/ml			

[0097] 3、18A10H2L2与PDL2竞争ELISA实验

[0098] 具体步骤如下:

[0099] 1) 包被抗原:在96孔酶标板上包被PD-1-hIgGFc抗原1.0 μ g/ml,100 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0100] 2) PBST洗板3次,轻轻拍干,加入1%BSA (PBS稀释) 37 $^{\circ}$ C封闭2小时,1 \times PBST (Tween-20,1%) 洗涤4次;

[0101] 3) 一抗:20 μ g/ml,1:3梯度稀释7个梯度浓度,空白对照组为PBS,50 μ l/孔加入到包被好的酶标板上,室温孵育10min;

[0102] 4) 配体:加入PDL2-his tag溶液1.0 μ g/ml,50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1小时;

[0103] 5) 二抗:PBST洗涤5次,轻轻拍干;每孔50 μ l加入1:750稀释的HRP酶标抗his tag小鼠单克隆抗体二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1小时;

[0104] 5) 显色:PBST洗涤6次,轻轻拍干;每孔100 μ l加入TMB显色剂,室温反应30min;

[0105] 6) 终止:50 μ l/孔加入2M H₂SO₄终止显色反应;

[0106] 7) 读数:在酶标仪上,用吸光度450nm检测各孔的吸光值。

[0107] 结果见图3,并且H8L2和H2L2抑制Pd-1与PdL2的EC₅₀值分别为1.83nM和1.58nM.由此可知,FcRN上的突变对抗体抑制Pd-1与PdL2的结合没有影响。

抗体稀释	18A10 H8L2		18A10 H2L2	
	10 μ g/ml	1.681	1.551	1.493
1:3	1.628	1.596	1.46	1.455
1:9	1.74	1.643	1.585	1.566
1:27	2.101	2.331	2.206	2.072
1:81	3.485	3.577	3.139	3
1:243	3.682	3.685	3.476	3.475
1:729	3.692	3.682	3.773	3.432
空白	0.401	0.28		
配体	PDL2-his tag 0.5 μ g/ml			

[0108] 4、H8L2与猴子PD1-hFc结合的活性研究

[0110] 本实验应用ELISA的方法测定H8L2与其他非人源来源的抗原:猴子PD1是否有结合,以间接考察H8L2与非人源抗原的交叉反应。

[0111] 以0.125 μ g/ml的猴子PD1-hFc,每孔50 μ l包被酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。洗板一次拍干后,每孔用300 μ l 1%BSA溶液封闭,37 $^{\circ}$ C孵育2小时。洗板一次拍干后,抗体稀释至7nM作为起始浓度,在板上进行1:3的梯度稀释,另设空白对照,均做2个复孔,每孔体积100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗板三次后,每孔加入50 μ l辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG F(ab')₂二抗工作液,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗板四次后,每孔加入50 μ l TMB显色液,室温避光显色5分钟后,每孔加入50 μ l终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中,选择450nm光波长读取酶标板各孔的OD数值。用SoftMax Pro 6.2.1软件对数据进行分析处理。

[0112] 450nm波长下测定的H8L2与猴子PD1-hFc的结合活性检测结果见下表:

抗体稀释	H8L2	
	1 μ g/ml	2.446
1:3	2.355	2.390
1:9	1.928	2.152
1:27	1.369	1.455
1:81	0.637	0.648
1:243	0.343	0.288
1:729	0.159	0.167
0	0.087	0.092
EC ₅₀ (nM)	0.219	

[0114] 上表中的450nm读数结果显示H8L2与猴子PD1-hFc的结合EC₅₀为0.219nM。

[0115] 5、H8L2与大鼠PD1结合的活性研究(ELISA法)

[0116] 本实验应用ELISA的方法测定H8L2与其他非人源来源的抗原:大鼠PD1是否有结合,以间接考察H8L2与非人源抗原的交叉反应。

[0117] 以1 μ g/ml的大鼠PD1,每孔50 μ l包被酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。洗板一次拍干后,每孔用300 μ l 1%BSA溶液封闭,37 $^{\circ}$ C孵育2小时。洗板三次拍干后,抗体稀释至7nM作为起始浓度,在板上进行1:3的梯度稀释,另设空白对照,均做2个复孔,每孔体积100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗板三次后,每孔加入50 μ l辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG二抗工作液,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗板四次后,每孔加入50 μ l TMB显色液,室温避光显色5分钟后,每孔加入50 μ l终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中,选择450nm光波长读取酶标板各孔的OD数值。用SoftMax Pro 6.2.1软件对数据进行分析处理。

[0118] 450nm波长下测定的H8L2与大鼠PD1的结合活性检测结果见下表:

抗体稀释	H8L2	
	7nM	0.098
1:3	0.061	0.063
1:9	0.052	0.051
1:27	0.047	0.047
1:81	0.044	0.044
1:243	0.044	0.043
1:729	0.044	0.043
0	0.044	0.043
EC ₅₀ (nM)	3.69E+06	

[0120] 上表中的450nm读数结果显示H8L2与大鼠PD1无结合活性。

[0121] 实施例3使用Fortebio分子相互作用仪测定H8L2和H2L2动力学参数

[0122] 使用Fortebio分子相互作用仪测定并比较H8L2(实施例1制备获得)和H2L2的动力学参数,具体如下:

[0123] 生物素标记的抗原PD-1固定于SA传感器表面,在PBST中平衡后,与抗体H8L2结合,H8L2用PBST三倍稀释,浓度为200、66.67、22.22、7.41、2.47、0.82、0.27、0nM,于PBST中解

离。H2L2的检测方法与H8L2相同。H8L2、H2L2动力学参数结果图见图4。由图4可见，FcRN上的突变对抗体的动力学参数没有影响。

[0124] 实施例4使用FACS方法检测H8L2的结合及竞争活性

[0125] 使用FACS方法检测H8L2(实施例1制备获得)的结合及竞争活性,具体如下:

[0126] 1、FACS方法检测H8L2与PD1的结合活性

[0127] 本试验采用293T-PD1稳定转染细胞株细胞作为实验细胞,采用FACS方法检测H8L2与细胞膜表面PD1蛋白的结合情况。具体方法如下:

[0128] (1) 将表达PD-1的293T细胞消化下来,计数,将其最终浓度配成 10^6 细胞/ml。

[0129] (2) 每组取100 μ l的细胞混悬液到1.5ml的EP管中,即每组 10^5 个细胞。

[0130] (3) 加入配好的各浓度的抗体,冰上孵育1小时。

[0131] (4) 1小时后,离心,用PBS洗涤一次。

[0132] (5) 每组加入配好的FITC Goat Anti-human IgG二抗,冰上避光孵育1小时。

[0133] (6) 1h后,低温高速离心(4000r/min,5min),用PBS洗涤一次,最终用200 μ l的PBS混悬,细胞上机检测。

[0134] 通过FACS方法检测H8L2与细胞膜表面PD1的结合活性情况,结果如图15和下表所示。

[0135]

浓度/nM	平均荧光强度								EC ₅₀ (nM)
	0.01	0.10	1.00	2.50	5.00	10.00	20.00	50.00	
H8L2	3.50	7.57	36.59	82.64	147.23	219.65	235.05	197.69	3.40

[0136] 由图15和上表的统计结果可知,H8L2与PD-1的结合EC₅₀为3.40nM。

[0137] 2、FACS方法检测H8L2阻断PDL1与PD1结合的活性

[0138] 本试验采用293T-PD1稳定转染细胞株细胞作为实验细胞,PDL1蛋白为竞争蛋白,采用FACS方法检测PDL1与细胞膜表面PD1蛋白的结合情况,以间接反应H8L2阻断PDL1与PD1结合的情况。具体方法如下:

[0139] (1) 将表达PD1的293T细胞消化下来,计数,将其最终浓度配成 10^6 细胞/ml。

[0140] (2) 每组细胞取100 μ l细胞混悬液到1.5ml的EP管中,即每组 10^5 个细胞。

[0141] (3) 加入配好的各浓度的抗体,冰上孵育0.5小时。

[0142] (4) 在所有组中加入配体PDL1-mFc使其最终浓度为20nM。

[0143] (5) 加入配体0.5小时后,离心,用PBS洗涤一次。

[0144] (6) 每组加入配好的FITC Goat Anti-mouse IgG/IgM二抗,冰上避光孵育1小时。

[0145] (7) 1小时后,低温高速离心(4000r/min,5min),用PBS洗涤一次,最终用200 μ l的PBS混悬,细胞上机检测。

[0146] 通过FACS方法检测PDL1与细胞膜表面PD1的结合活性情况,结果如图16和下表所示。

[0147]

浓度/nM	平均荧光强度								EC ₅₀ (nM)
	0.10	1.00	2.50	5.00	10.00	20.00	50.00	100.00	
H8L2	50.26	54.90	53.77	48.00	42.85	27.70	4.56	4.14	19.65

[0148] 由图16和上表的统计结果可知,18A10H8L2阻断PDL1与PD1结合的EC₅₀是19.65nM。

[0149] 实施例5混合淋巴反应检测PD1抗体生物学活性

[0150] 利用混合淋巴细胞反应 (MLR) 实验检测并比较H8L2 (实施例1制备获得) 和H2L2刺激T淋巴细胞分泌IL-2和IFN γ 分泌能力,具体如下:

[0151] MLR实验采用不同人来源的T细胞 (TC) 和树突状细胞 (DC) 进行混合,利用DC细胞抗体提呈能力刺激T细胞分泌IL-2和IFN γ 。首先用细胞因子GM-CSF和IL-4诱导血液中单核细胞分化成树突状细胞,然后用TNF α 刺激是未成熟的DC细胞成熟。成熟后的DC与同种异源的TC细胞进行混合5天后,检测细胞上清中的IL-2和IFN γ 的分泌水平。在96孔板中混合TC和DC,按每孔加入TC 1×10^5 和DC 1×10^4 ,设置抗体浓度从10 μ M到0.09765625nM共8个梯度,混合反应5天后,用IL-2检测试剂盒定量检测上清IL-2含量。设置抗体浓度300nM到0.1nM共5个梯度。混合反应5天后,用IFN γ 检测试剂盒定量检测IFN γ 含量。

[0152] 抗体H8L2和H2L2刺激T细胞分泌IL-2分泌水平如图5所示。由图5可见,抗体H8L2和H2L2能有效地刺激T细胞分泌IL-2,FcRN位点的突变对抗体刺激T细胞分泌IL-2的能力没有影响。

[0153] 抗体H8L2和H2L2刺激T细胞分泌IFN γ 分泌水平如图6所示。由图6可见,抗体H8L2和H2L2能有效地刺激T细胞分泌IFN γ ,FcRN位点的突变对抗体刺激T细胞分泌IFN γ 的能力没有影响。其中,图6中的“IgG”为同型抗体对照。

[0154] 实施例6食蟹猴血清浓度研究

[0155] 对H8L2 (实施例1制备获得) 和H2L2进行食蟹猴血清浓度比较研究,具体如下:

[0156] 4只食蟹猴根据体重随机分为2组,分别为H8L2 (1mg/kg) 组和H2L2 (1mg/kg) 剂量组,每组2只。每次静脉注射给药。各剂量组分别于给药前,给药后5分钟及5、24、72、168、240小时采集全血,离心分离血清。采用ELISA法测定食蟹猴血清中H8L2和H2L2的浓度(见下表和图7)。

[0157]

时间 (h)	血药浓度 (ug/ml)					
	H2L2	H2L2	平均值	H8L2	H8L2	平均值
0	0	0	0	0	0	0
0.015(Tmax)	62.5	75	68.75	95	67.5	81.25
5	32.5	45	38.75	90	52.5	71.25
24	22.5	22.5	22.5	80	42.5	61.25
72	15	10	12.5	50	30	40
168	10	5	7.5	27.5	20	23.75
240	5	0	2.5	0	10	5

[0158] 实施例7食蟹猴药代动力学研究

[0159] 对H8L2 (实施例1制备获得) 和H2L2进行食蟹猴药代动力学比较研究,具体如下:

[0160] 24只食蟹猴根据体重随机分为4组,分别为野生型H2L2组(10mg/kg),以及变体(H8L2)低、中、高(1、3、10mg/kg)剂量组,每组6只,雌雄各半。每次静脉注射给药。各剂量组分别于给药前,给药后5、30分钟及1、2、4、8、24、48、144、216小时采集全血,离心分离血清。采用ELISA法测定食蟹猴血清中野生型和变体的浓度,并采用PhoenixWinNonlin(Pharsight)6.4计算相关的药代动力学参数。

[0161] 食蟹猴单次给药前所有个体的血清药物浓度水平均低于定量下限。变体组三个剂量组,食蟹猴体内血清药物浓度水平随给药剂量增加而增加;变体低、中、高(1、3、10mg/kg)剂量组的平均有效半衰期分别为215.72(见图8)、288.78(见图9)、268.92h(见图10),野生型(10mg/kg)的平均有效半衰期为224h(见图11)。在同等剂量(10mg/kg)下,变体比野生型具有更长的平均有效半衰期(见图12)。

[0162] 实施例8H8L2在HCC827人非小细胞肺癌皮下移植MiXeno模型中的抗肿瘤作用

[0163] 利用NSG小鼠建立人肿瘤移植模型,研究H8L2(实施例1制备获得)在HCC827人非小细胞肺癌皮下移植MiXeno模型中的抗肿瘤作用,具体如下:

[0164] NSG小鼠具有NOD,Prkdc^{scid},IL2rg^{null}缺失/变异特征,是目前免疫缺陷程度最高、最适合人源细胞移植的工具小鼠,对人源细胞和组织几乎没有排斥反应。因此,发明人选择过继转输人外周血单核细胞(PBMC)至NSG小鼠所构建的移植物抗宿主反应(GVHD)模型,并由此来衡量H8L2的体内药效学。发明人运用NSG小鼠建立人肿瘤移植模型(Mixeno模型),研究H8L2在HCC827人非小细胞肺癌皮下移植MiXeno模型中的抗肿瘤作用。

[0165] 第0天(Day 0)在右侧背部皮下接种 5×10^6 HCC827细胞于40只NCG小鼠(32只小鼠加上8只富余量)中,接种肿瘤细胞后6天(Day 6)当平均瘤体积达到 66mm^3 ,选择肿瘤体积较好的32只小鼠均匀分成4组,每组8只小鼠。自尾静脉移植PBMC于32只NCG小鼠(第1-4组小鼠)中,细胞重悬在PBS中(0.1ml接种体积)。试验分为测试药H8L2 5mg/kg和10mg/kg、阳性对照Opdivo 5mg/kg组及同型抗体Human IgG4 5mg/kg对照组。尾静脉注射给药,分别于接种肿瘤细胞后第6,9,13,16,19,22天给药,共给药六次(见表1)。根据相对肿瘤抑制率(TGI_{RTV})进行疗效评价,根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

[0166] 表1测试药H8L2在HCC827人非小细胞肺癌Mixeno肿瘤模型中的抗肿瘤作用实验设计

[0167]

组别	n	(Day 0)皮下接种	PBMC	给药组	剂量(mg/kg)	给药方式	给药体积	给药周期
1	8	5X10 ⁶ /100ul	瘤体积 66mm ³ (肿瘤细胞接种后第6天) i.v. 接种 PBMC (100μL/mouse)	Anti-Hel-hIgG4	5	i.v.	10μl/g	肿瘤细胞接种后第6, 9, 13, 16, 19, 22天
2	8			Opdivo	5	i.v.	10μl/g	
3	8			H8L2	5	i.v.	10μl/g	
4	8			H8L2	10	i.v.	10μl/g	

[0168] 注:给药体积为10ul/g;n:动物只数;Day 0为肿瘤细胞接种当天;i.v.:尾静脉给药。

[0169] 相对对照组接种了PBMC的同型抗体(Human IgG4),测试药H8L2(10mg/kg)在接种肿瘤细胞后第9、13天都表现显著的肿瘤生长抑制作用,相对肿瘤抑制率TGI_{RTV}(%)分别为30%(p=0.007),30%(p=0.039);H8L2(5mg/kg)在接种肿瘤细胞后第9、13天都表现显著的肿瘤生长抑制作用,相对肿瘤抑制率TGI_{RTV}(%)分别为18%(p=0.049),25%(p=

0.041)。对应的,Opdivo没有表现出显著的肿瘤生长抑制作用,在接种肿瘤细胞后第9、13天相对肿瘤抑制率TGI_{RTV}(%)分别为17%(p=0.084),23%(p=0.073)(表2)。试验结果证明H8L2对HCC827人源非小细胞肺癌Mixeno肿瘤模型有显著抑制肿瘤生长的作用,药效相对阳性对照品Opdivo更好。H8L2(10mg/kg,5mg/kg)和Opdivo(5mg/kg)各治疗组在给药开始16天内(即肿瘤接种22天内)均未发生药物治疗相关的毒性反应(如严重体重下降或死亡),说明治疗耐受良好。

[0170] 表2. 在HCC827人非小细胞肺癌Mixeno肿瘤模型中的药效分析

[0171]

实验组	Day	肿瘤体积 (mm ³) (Mean±SEM)	相对肿瘤体积 (Mean±SEM)	TGI _{RTV} (%)	P value ¹
G1 Human IgG4 5 mg/kg	9	88±8	1.33±0.08	-	-
	13	116±12	1.76±0.15	-	-
	16	132±15	2.00±0.17	-	-
G2 Opdivo 5 mg/kg	9	74±8	1.11±0.09	17	0.084
	13	91±14	1.35±0.15	23	0.073
	16	109±11	1.64±0.12	18	0.106
G3 H8L2 5mg/kg	9	72±6	1.09±0.07	18	0.049
	13	87±10	1.32±0.12	25	0.041
	16	103±12	1.57±0.17	21	0.097
G4 H8L2 10mg/kg	9	62±8	0.93±0.09	30	0.007
	13	82±14	1.22±0.18	30	0.039
	16	110±24	1.63±0.33	18	0.340

[0172] 注:P value¹是与同型对照组(G1Human IgG4)比较

[0173] 抗PD-1单克隆抗体注射液在10mg/kg,5mg/kg剂量下对HCC827人源非小细胞肺癌Mixeno肿瘤模型均有显著抑制肿瘤生长的作用,其中10mg/kg抗PD-1单克隆抗体注射液抑制肿瘤生长效果最明显,药效相对5mg/kg的阳性对照品Opdivo更好。荷瘤小鼠对抗PD-1单克隆抗体注射液在测试剂量下耐受良好。

[0174] 实施例9H8L2在MC38小鼠结肠癌HuGEMM模型中的抗肿瘤作用

[0175] 临床前验证在PD-1HuGEMM小鼠中使用H8L2(实施例1制备获得)治疗小鼠MC38肿瘤模型的药效,具体如下:

[0176] MC38细胞为源自C57BL/6小鼠的鼠源结肠癌细胞。PD-1HuGEMM小鼠是经过基因工程技术,将C57BL/6小鼠体内与PD-L1蛋白分子相互作用的鼠源PD-1蛋白分子部分替换为人源蛋白的小鼠模型。

[0177] 在受试小鼠右侧皮下接种MC38肿瘤细胞(1×10⁶/只),当平均肿瘤体积达到约134mm³时,根据肿瘤体积将小鼠随机分入4个实验组,每组8只,每笼4只。4个实验组分为测试药H8L2 5mg/kg和10mg/kg、对照Keytruda 10mg/kg组及同型抗体Human IgG4 5mg/kg对照组。尾静脉注射给药,共给药六次(见表3)。

[0178] 表3. 药效学实验设计

[0179]

组号	动物数	治疗	给药剂量(mg/kg)	给药途径	给药安排
----	-----	----	-------------	------	------

1	8	Isotype control	10	i.p.	BIW×3
2	8	Keytruda	10	i.p.	BIW×3
3	8	H8L2	5	i.p.	BIW×3
4	8	H8L2	10	i.p.	BIW×3

[0180] 在分组后第13天,第1组小鼠的平均肿瘤体积达到 1933.67mm^3 ;在该时间点,Keytruda治疗的第2组(高剂量组)以及H8L2治疗的第3组(低剂量组)、第4组(高剂量组)的TGI(%)分别为85%、93%、90%(见表4)。荷瘤鼠体重改变百分比分别为8.72%,0.94%,-2.07%,1.68%。各治疗组荷瘤鼠无明显体重降低或死亡,第2-4组与第1组相比均有统计学显著差异($P<0.05$)。

[0181] 表4.H8L2在PD-1HuGEMM MC38荷瘤鼠中的抑瘤效果

[0182]

组	治疗药物	第0天肿瘤体积 ^a (mm^3)	第13天肿瘤体积 ^a (mm^3)	TGI (%)	T-C (天)	P值 ^b
1	Isotype control 10 mg/kg	132.86±14.78	1933.67±454.6	-	-	-
2	Keytruda 10 mg/kg	135.35±20.19	275.71±160.18	85	10	<0.05
3	H8L2 5 mg/kg	133.70±17.67	133.72±80.59	93	14	<0.05
4	H8L2 10 mg/kg	134.16±14.89	198.59±122.12	90	>14	<0.05

[0183] 注释:a.数据以“平均值±标准误差”表示;

[0184] b.利用单因素方差分析(one-way ANOVA)方法进行各治疗组肿瘤体积间的显著性差异分析;第2-4组与第1组相比在统计学上均有显著性差异($P<0.05$)。

[0185] 第2-4组的T-C(当肿瘤体积达到 1000mm^3 时)分别为10天、14天、>14天。当本实验在第55天结束时,第2-4组分别有3、5、5只小鼠肿瘤完全消退且持续一个月以上(见表5)。

[0186] 表5.MC38肿瘤体积的原始数据

[0187]

组	ID	研究天数																
		0	3	6	10	13	17	20	24	27	31	34	38	41	45	48	52	55
01	11240	91.50	215.37	266.98	613.57	1171.37	1697.85	2643.02	4731.76	7309.75								
01	11243	133.90	232.18	359.57	1304.79	3568.60												
01	11250	80.84	109.37	143.14	271.79	466.01	894.52	1343.39	3027.15	4135.77								
01	11260	119.44	189.27	546.36	1410.43	2834.20	5938.21											
01	11275	190.55	501.32	1112.25	1864.70	3346.82												
01	11282	188.05	370.78	715.45	1249.03	2433.64	4743.60											
01	11285	154.20	312.96	497.55	884.87	1392.71	2469.10	3736.92										
01	11286	104.36	174.07	177.68	201.64	256.00	276.76	419.35	799.84	1211.13	1774.66	2951.53	4747.39					
02	11248	125.08	136.50	118.99	40.80	17.53	19.47	39.80	61.94	111.33	248.10	525.66	1075.55	1492.19	2249.90	3687.06		
02	11252	153.95	209.80	191.10	41.33	44.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
02	11257	116.34	235.53	425.25	668.02	1331.44	2715.30	5742.74										
02	11259	257.74	414.24	200.04	59.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
02	11269	69.55	88.27	86.53	204.59	307.77	738.17	1166.89	2582.80	3679.77	6089.10							
02	11270	108.74	242.30	69.38	34.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
02	11276	155.75	255.32	322.67	193.87	97.11	66.56	0.00	0.00	93.66	176.81	298.47	508.68	600.08	1040.07	1845.48	2366.75	2736.56
02	11288	95.64	192.09	170.04	183.64	407.20	571.17	895.93	1662.92	2679.55	4223.34							
03	11237	116.72	115.78	45.94	12.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
03	11244	233.44	256.00	101.65	36.89	11.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
03	11245	110.01	165.51	349.87	389.56	602.01	1450.15	1927.01	4714.50	7447.65								
03	11247	168.78	263.15	172.85	50.65	25.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
03	11264	150.08	194.36	148.77	151.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
03	11265	121.96	141.16	236.14	289.38	374.76	962.20	1562.71	2562.71	3682.44	4901.56							
03	11281	75.20	90.90	36.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
03	11289	93.41	109.80	73.81	66.41	55.68	127.42	205.34	340.20	604.39	1050.03	1480.22	1917.34	2547.62	4278.69			
04	11239	105.92	130.21	81.11	42.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
04	11249	131.09	245.40	328.17	223.28	177.06	357.63	455.97	910.09	1640.19	2614.29	3839.06						
04	11251	210.58	295.98	669.19	683.19	986.53	2054.54	3341.94										
04	11254	177.51	210.00	135.76	104.35	380.87	586.87	1149.45	2010.34	2455.90	4046.48							
04	11267	145.05	246.21	110.43	42.45	17.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
04	11272	90.66	135.37	103.80	48.45	26.57	22.81	22.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
04	11277	118.78	124.35	51.15	28.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
04	11280	93.70	184.72	101.03	32.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

[0188] H8L2 (5mg/kg、10mg/kg) 在PD-1HuGEMM小鼠MC38肿瘤模型中显示有统计学显著的抗肿瘤作用;与Keytruda相比,H8L2能更有效的使小鼠体内肿瘤完全消退。

[0189] 实施例10H8L2的ADCC和CDC效应研究

[0190] 对H8L2(实施例1制备获得) 进行ADCC和CDC效应研究,具体如下:

[0191] 1、H8L2与Fc γ RIIIa的亲合力常数测定

[0192] Fc受体Fc γ RIIIa(又名CD16a) 可与IgG抗体的Fc端结合,参与抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)。治疗性单克隆抗体与Fc受体结合的能力影响到该抗体的安全性和有效性。本实验使用ForteBio分子相互作用仪系统检测H8L2与Fc γ RIIIa的亲合力常数,以评价H8L2与Fc受体的结合能力。

[0193] 采用ForteBio Octet分子相互作用仪检测抗体与Fc γ RIIIa的亲合力常数。以PBST作为缓冲液,1μg/ml Fc γ RIIIa-Biotin固定于SA传感器表面,时间300s。抗体与Fc γ RIIIa结合步骤中,H8L2实验中抗体浓度为4000nM,结合时间为120s,解离时间为180s。使用ForteBio Data Acquisition 7.0软件进行数据采集,ForteBio Data Analysis 7.0软件进行数据分析。

[0194] 结果如图17所示,H8L2与Fc γ RIIIa没有结合。

[0195] 2、AK103与C1q的亲合力常数测定

[0196] 血清补体C1q可与IgG抗体的Fc端结合,参与补体依赖的细胞毒性作用(CDC)。治疗性单克隆抗体与C1q结合的能力影响到该抗体的安全性和有效性。本实验使用ForteBio分子相互作用仪系统检测了H8L2与C1q的亲合力常数,以评价H8L2与C1q的结合能力。

[0197] 采用ForteBio Octet分子相互作用仪检测抗体与C1q的亲合力常数。以PBST作为缓冲液,100 μ g/ml的抗体固定于FAB2G传感器表面,时间300s。抗体与C1q结合步骤中,C1q浓度为3.13-200nM,结合时间为120s,解离时间180s。使用ForteBio Data Acquisition 7.0软件进行数据采集,ForteBio Data Analysis 7.0软件进行数据分析。

[0198] 结果如图18所示,H8L2与C1q没有结合。

[0199] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0200] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Thr Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Pro Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 2

<211> 1392

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 编码H8L2重链的核酸序列

<400> 2

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gactcgcgag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cggcggactg gtgcagcccc gcgggtcact gaagctgagc 120
 tgcgccgctt ccggcttcac ctttagctcc tacggaatgt cctgggtgcg acaggcacc 180
 gggaaagggc tggactgggt cgctactatc tcaggaggcg ggagagacac ctactatcct 240
 gatagcgtca agggccggtt cacaattagc cgggacaaca gcaagaacaa tctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgagggc tgaggatact gactgtact attgtgcccc ccagaagggc 360
 gaagcatggt ttgcctattg gggccaggga accctggta cegtctctc agcttcacc 420
 aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctcca gagcacagcc 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac tgtgccctcc agcagcttg gcacgaagac ctacacctgc 660
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720
 ccccatgcc caccatgcc agcacctgag ttctggggg gaccatcagt ctctctgttc 780
 cccccaaac ccaaggacac tctcatgatc acccgacc ctgaggteac gtgcgtggtg 840
 gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 960
 agcgtctca cccccctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtaca gtgcaaggtc 1020
 tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagcaa agggcagccc 1080
 cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccagtc 1140
 agcctgacct gcctgggtcaa aggettctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc cgacggctcc 1260
 ttcttctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggagg gaatgtcttc 1320
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac gccactaca cacagaagag cctctccctg 1380
 tctctgggta aa 1392

<210> 3

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> H8L2轻链氨基酸序列

<400> 3

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ile	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
			35				40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Lys	Gly	Thr	Gly	Val	Pro	Ala
			50			55						60			

<210> 5
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 抗PD-1的单克隆抗体的重链恒定区的FcRn结合位点区域
 <400> 5
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Thr Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Pro Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 6

<211> 1038

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 编码抗体重链恒定区的FcRn结合位点区域的核酸序列

<400> 6

aagggcgaag catggtttgc ctattggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctcagct 60
 tccaccaagg gcccattcgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 120
 acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 180
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 240
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgactgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac 300
 acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagtccaaa 360
 tatggtcccc catgcccacc atgcccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc 420
 ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatcacc ggaccctga ggtcacgtgc 480
 gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 540
 gtggagggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 600
 gtggtcagcg tcctcacc cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 660
 aaggtctcca acaaaggcct cccgtctctc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 720
 cagccccgag agccacaggt gtacacctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 780
 caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg 840
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 900
 ggctccttct tcctctacag caggtaacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 960
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacgccc actacacaca gaagagcctc 1020
 tccctgtctc tgggtaaa 1038

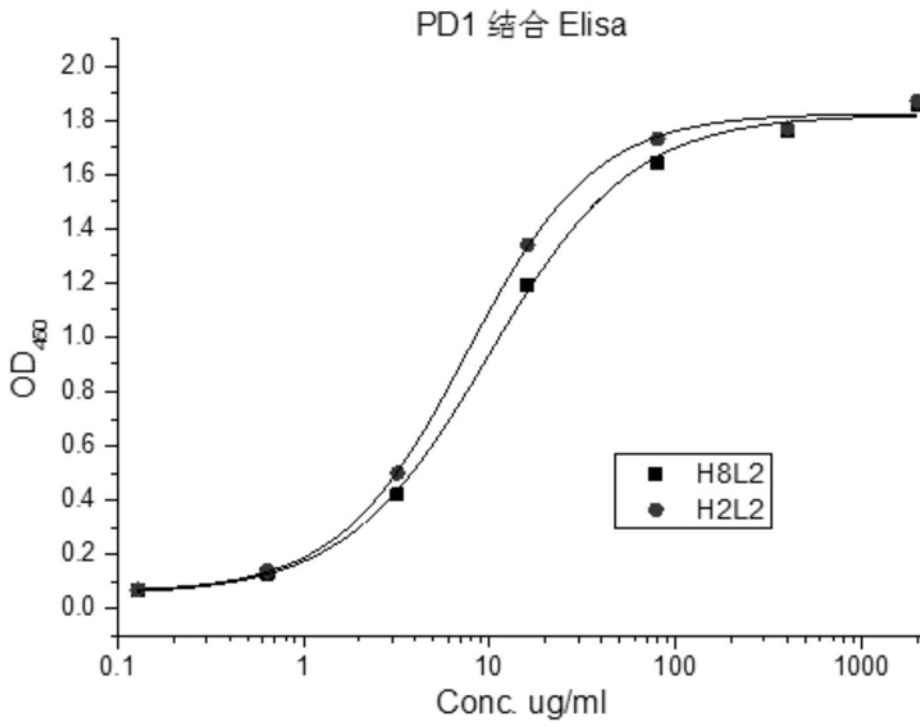


图1

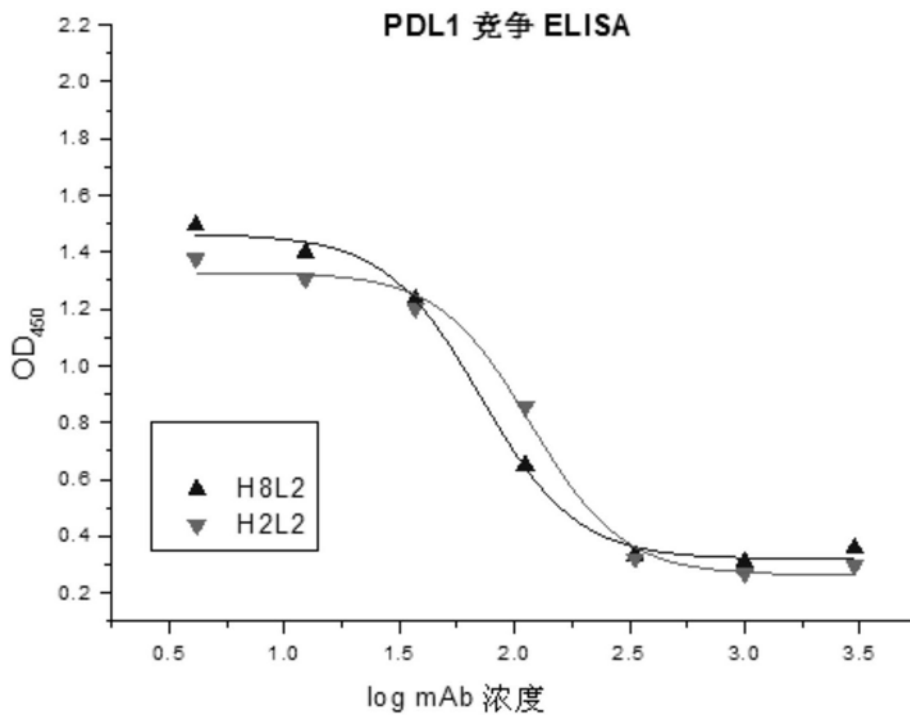


图2

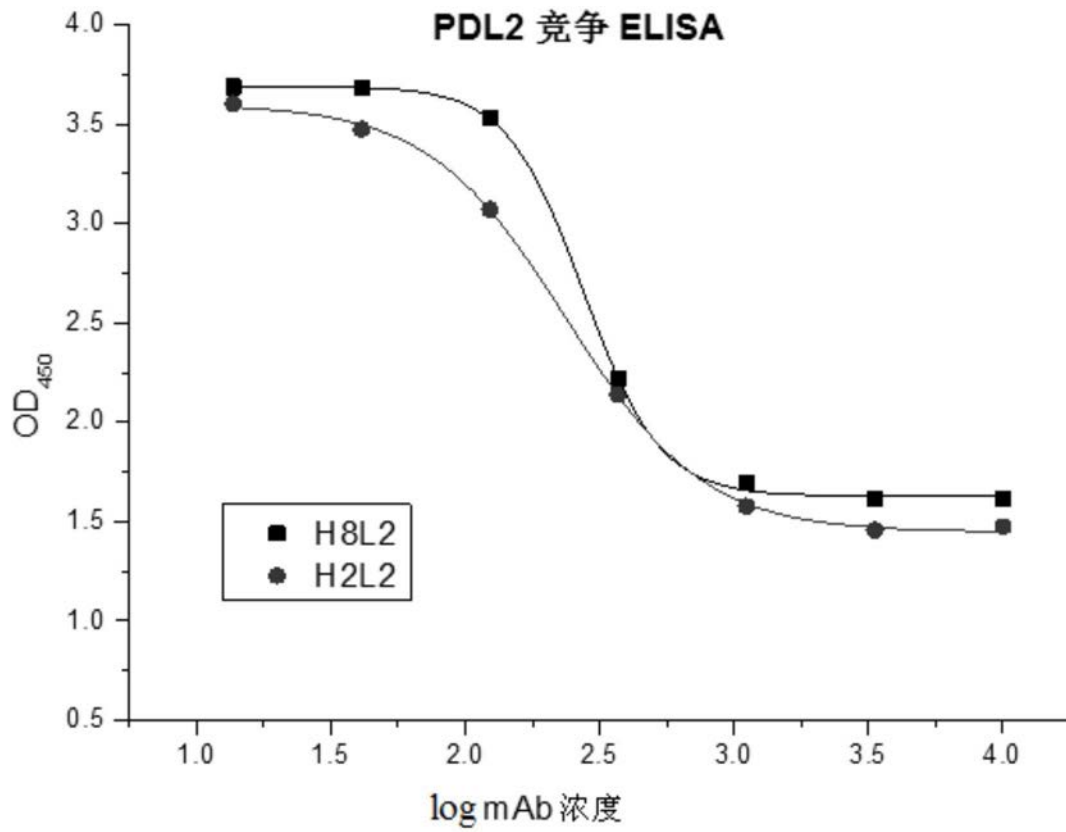


图3

抗体名称	平衡解离常数 (M)	结合速率常数(1/Ms)	结合速率常数误差	解离速率常数(1/s)	解离速率常数误差	Rmax 范围
H2L2	2.70E-10	2.40E+05	4.52E+03	6.48E-05	8.97E-06	0.2973-0.6169
H8L2	1.03E-10	5.18E+05	1.36E+04	5.35E-05	1.06E-05	0.3548-1.0526

图4

混合淋巴反应中IL-2分泌

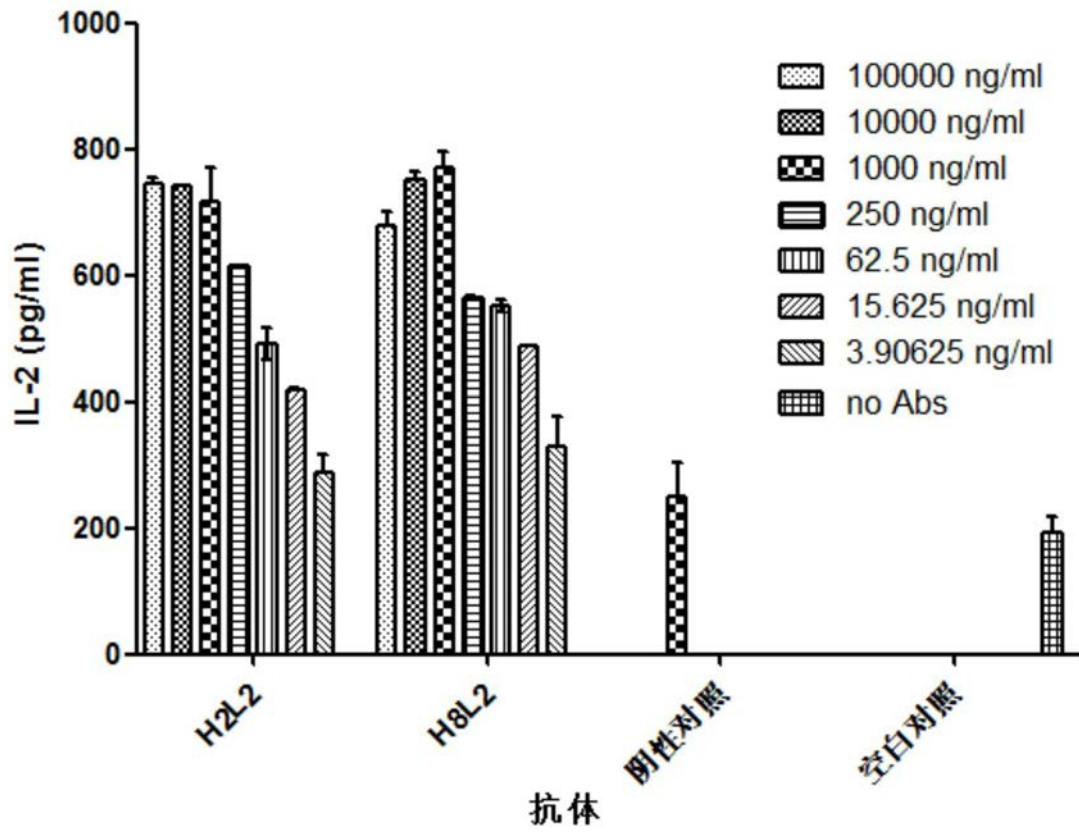


图5

混合淋巴反应中IFN-gamma分泌

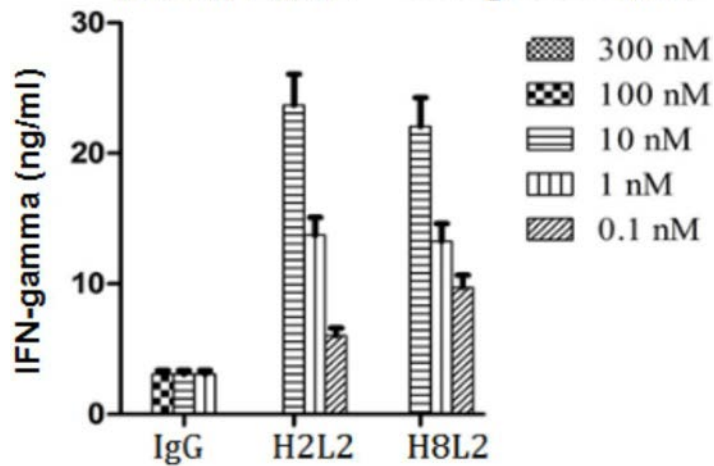


图6

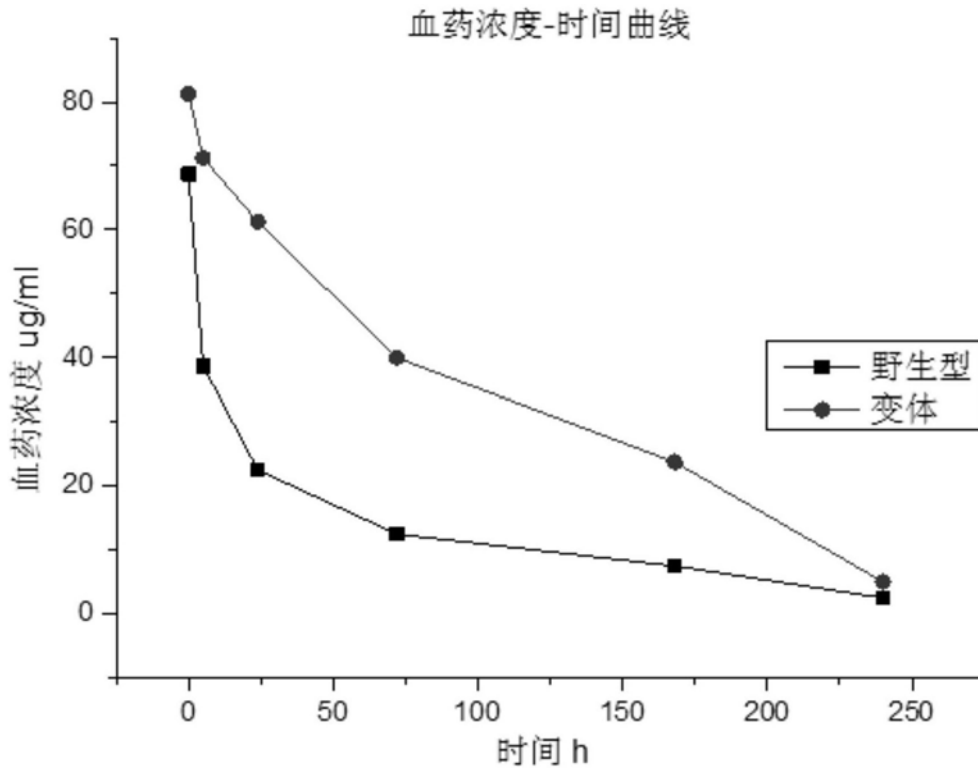


图7

时间 (h)	雌					雄				
	2F001	2F002	2F003	Mean	SD	2M001	2M002	2M003	Mean	SD
0	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	/	/	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	/	/
0.083	21.042	22.321	19.750	21.038	1.286	21.456	20.738	16.799	19.664	2.507
0.5	19.647	20.949	20.562	20.386	0.669	20.832	18.869	15.552	18.418	2.669
1	20.309	21.950	19.412	20.557	1.287	23.770	18.120	14.653	18.848	4.602
2	18.785	19.913	18.344	19.014	0.809	19.763	19.183	15.034	17.993	2.579
4	16.283	17.645	17.406	17.111	0.727	17.589	16.083	13.459	15.710	2.090
8	15.111	14.531	17.122	15.588	1.360	15.402	14.830	12.477	14.236	1.550
24	14.199	12.379	16.018	14.199	1.820	14.081	11.915	10.898	12.298	1.626
48	12.211	10.736	15.216	12.721	2.283	14.916	13.530	10.144	12.863	2.455
144	7.816	9.632	13.344	10.264	2.818	12.330	9.072	7.201	9.534	2.596
216	6.913	7.610	9.096	7.873	1.115	8.772	6.508	5.299	6.860	1.763

图8

时间 (h)	雌					雄				
	3F001	3F002	3F003	Mean	SD	3M001	3M002	3M003	Mean	SD
0	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	/	/	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	/	/
0.083	41.269	54.197	53.307	49.591	7.221	58.729	25.366	44.087	42.727	16.723
0.5	42.043	50.905	49.391	47.446	4.740	54.306	26.127	46.694	42.376	14.577
1	45.104	57.663	52.232	51.666	6.299	56.874	29.785	48.446	45.035	13.863
2	42.736	59.548	50.522	50.935	8.414	55.484	29.153	42.630	42.422	13.167
4	32.389	45.291	42.719	40.133	6.829	45.426	29.277	38.147	37.617	8.088
8	31.168	44.824	37.592	37.861	6.832	43.286	28.877	34.568	35.577	7.257
24	25.038	35.214	31.669	30.640	5.165	35.426	26.926	33.644	31.999	4.483
48	24.511	34.493	29.873	29.626	4.996	34.894	28.257	31.762	31.638	3.320
144	20.966	25.218	22.870	23.018	2.130	25.044	22.856	23.753	23.884	1.100
216	19.794	20.579	18.615	19.663	0.989	24.871	17.126	19.503	20.500	3.968

图9

时间 (h)	雌					雄				
	4F001	4F002	4F003	Mean	SD	4M001	4M002	4M003	Mean	SD
0	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	/	/	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	/	/
0.083	168.622	181.695	222.556	190.958	28.135	212.165	202.114	184.324	199.534	14.099
0.5	180.423	189.465	217.407	195.765	19.280	200.985	204.463	196.901	200.783	3.785
1	171.584	180.131	227.327	193.014	30.022	213.926	129.091	200.903	181.307	45.687
2	162.088	158.081	195.920	172.030	20.786	159.397	171.065	162.022	164.161	6.121
4	129.262	141.646	166.375	145.761	18.896	147.036	164.261	148.131	153.143	9.644
8	109.762	130.214	154.920	131.632	22.612	144.861	164.234	141.027	150.041	12.440
24	99.563	116.381	131.541	115.828	15.996	139.223	153.140	118.217	136.860	17.581
48	102.600	101.538	128.206	110.781	15.100	103.992	113.076	101.747	106.272	5.999
144	68.168	75.714	93.658	79.180	13.094	79.281	61.980	85.163	75.475	12.051
216	63.303	63.073	89.478	71.951	15.179	77.849	68.156	79.443	75.149	6.109

图10

时间 (h)	雌					雄				
	1F001	1F002	1F003	Mean	SD	1M001	1M002	1M003	Mean	SD
0	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	/	/	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	/	/
0.083	323.851	211.543	252.755	262.716	56.813	255.966	364.165	386.764	335.632	69.912
0.5	263.121	208.089	227.314	232.841	27.929	248.995	335.200	349.019	311.071	54.202
1	298.671	241.494	249.499	263.221	30.960	243.824	289.423	354.839	296.029	55.802
2	256.607	178.398	204.337	213.114	39.836	230.920	296.360	290.313	272.531	36.163
4	210.804	157.444	178.245	182.164	26.895	197.774	292.110	256.715	248.866	47.655
8	203.407	162.388	155.066	173.620	26.055	193.104	315.456	268.494	259.018	61.724
24	151.595	129.710	131.365	137.557	12.186	148.790	236.325	230.304	205.140	48.893
48	153.499	111.356	104.802	123.219	26.427	146.723	185.313	190.617	174.218	23.958
144	121.662	89.144	81.140	97.315	21.461	104.556	136.766	130.371	123.898	17.053
216	98.221	96.450	86.855	93.842	6.115	93.562	148.813	115.229	119.201	27.839

图11

分组	动物	$t_{1/2}$ (h)	动物	$t_{1/2}$ (h)
1 mg/kg	2F001	169.02	2M001	223.86
	2F002	308.65	2M002	159.49
	2F003	248.30	2M003	184.99
	N	3	N	3
	Mean	241.99	Mean	189.45
	SD	70.03	SD	32.42
3 mg/kg	3F001	536.79	3M001	248.13
	3F002	224.72	3M002	235.85
	3F003	246.35	3M003	240.84
	N	3	N	3
	Mean	335.95	Mean	241.61
	SD	174.26	SD	6.18
10 mg/kg	4F001	248.51	4M001	203.33
	4F002	243.53	4M002	141.08
	4F003	312.98	4M003	464.12
	N	3	N	3
	Mean	268.34	Mean	269.51
	SD	38.74	SD	171.38
10 mg/kg 野生型	1F001	262.08	1M001	264.17
	1F002	249.34	1M002	177.68
	1F003	218.56	1M003	172.15
	N	3	N	3
	Mean	243.33	Mean	204.67
	SD	22.37	SD	51.61

图12

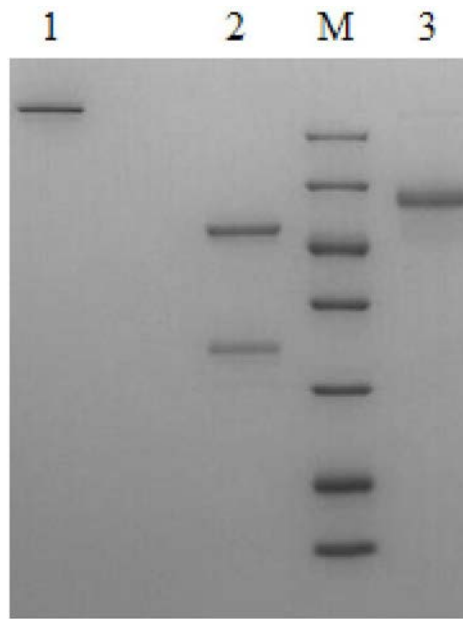
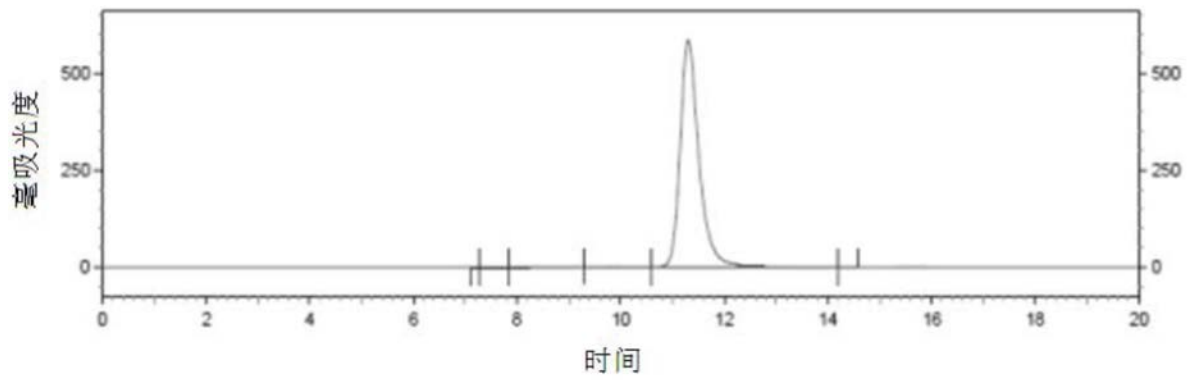


图13



时间	面积	百分比
7.267	9869	0.00
7.853	1408890	0.07
8.427	18048344	0.89
9.940	16791480	0.83
11.307	1987958248	98.19
14.200	312708	0.02
总和	2024529539	100.00

图14

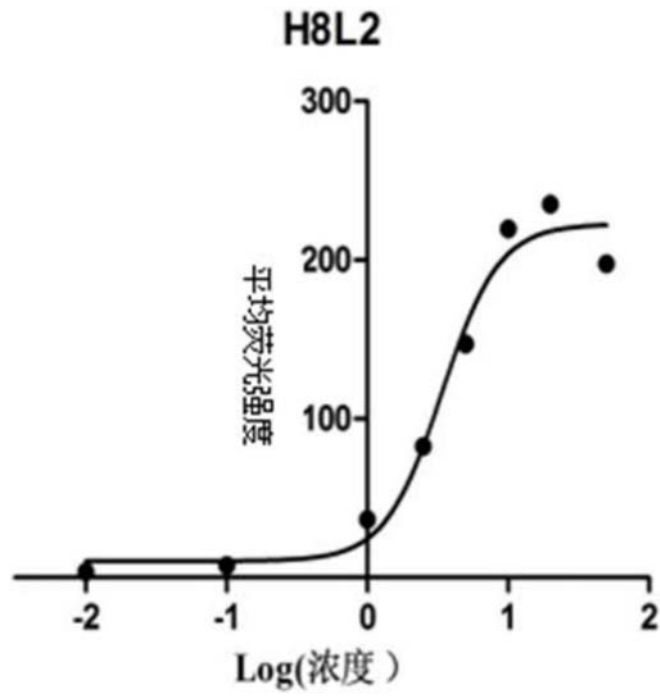


图15

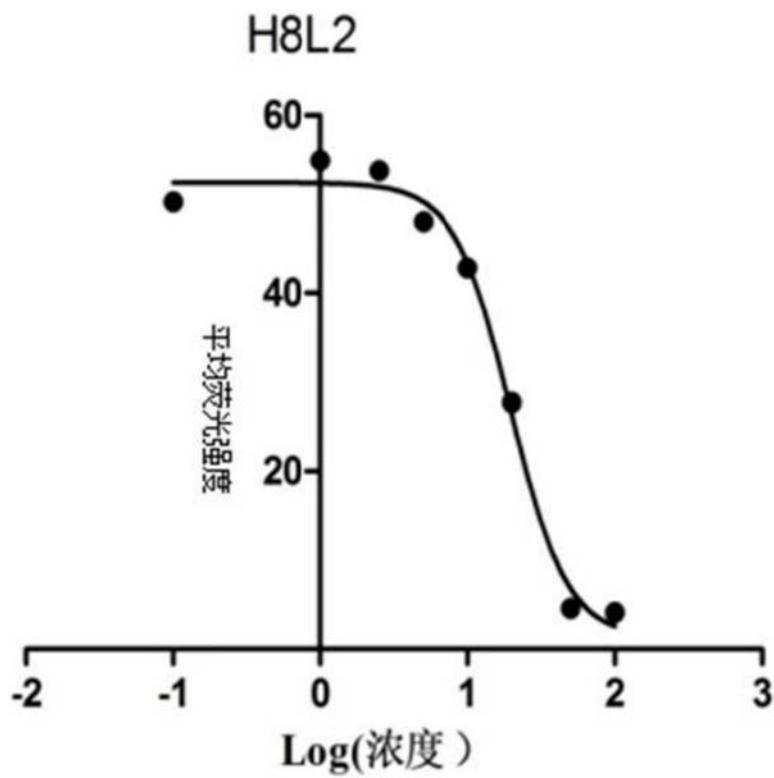


图16

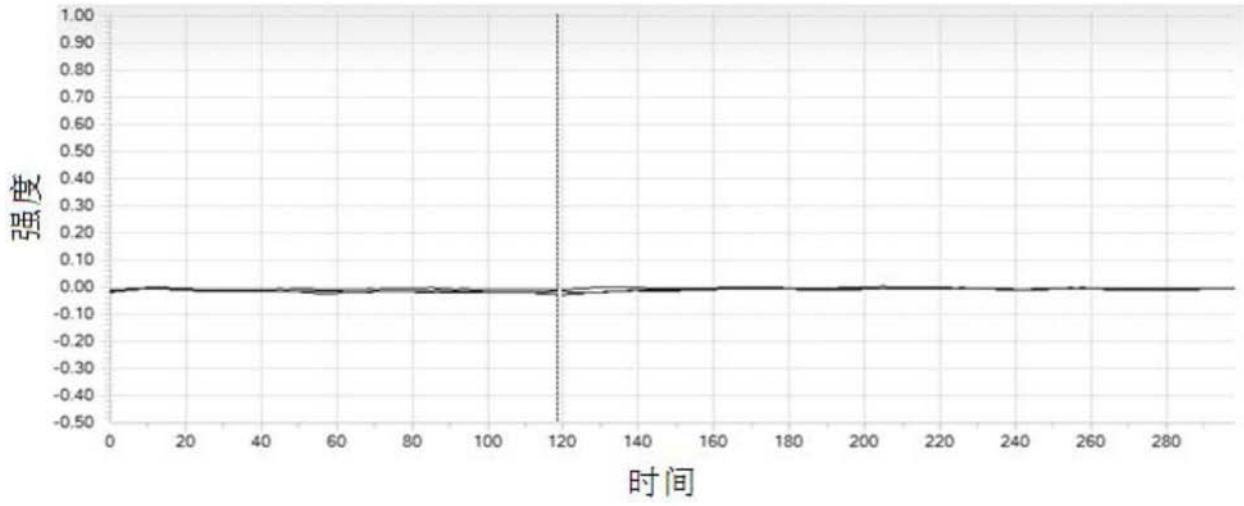


图17

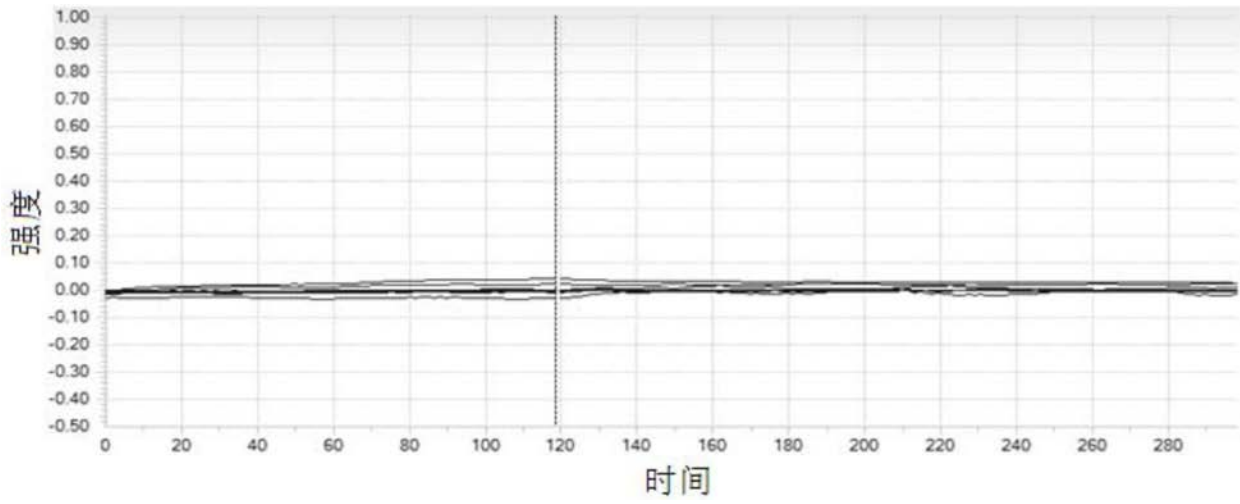


图18

专利名称(译)	抗PD-1的单克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	CN108299560A	公开(公告)日	2018-07-20
申请号	CN201710024750.6	申请日	2017-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	中山康方生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	中山康方生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中山康方生物医药有限公司		
[标]发明人	张发明 席甘 黄莺 夏瑜 李百勇 王忠民		
发明人	张发明 席甘 黄莺 夏瑜 李百勇 王忠民		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 A61K39/395 A61K45/06 A61K31/655 A61P35/00 A61P37/04 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/655 A61K39/3955 A61K45/06 C07K16/2827 G01N33/53 A61K2300/00		
代理人(译)	赵天月		
其他公开文献	CN108299560B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了抗PD-1的单克隆抗体及其应用，该抗PD-1的单克隆抗体包括具有SEQ ID NO : 5所示氨基酸序列的FcRn结合位点区域。本发明的抗PD-1的单克隆抗体，其重链恒定区的FcRn结合位点区域第254、308、434位氨基酸分别为苏氨酸、脯氨酸和丙氨酸。发明人惊奇地发现，该抗体对FcRn的结合亲和力强，血清半衰期长，并且，其对抗原PD-1的结合亲和力和识别特异性好。

丙氨酸	ala	A
精氨酸	arg	R
天冬酰胺	asn	N
天冬氨酸	asp	D
天冬酰胺或天冬氨酸	asx	B
半胱氨酸	cys	C
谷氨酸	glu	E
谷氨酰胺	gln	Q
谷氨酰胺或谷氨酸	glx	Z
甘氨酸	gly	G
组氨酸	his	H
异亮氨酸	ile	I
亮氨酸	leu	L
赖氨酸	lys	K
甲硫氨酸	met	M
苯丙氨酸	phe	F
脯氨酸	pro	P
丝氨酸	ser	S
苏氨酸	thr	T