

一种抗 PD1 单克隆抗体、其药物组合物及其用途

技术领域

本发明属于肿瘤治疗和分子免疫学领域，涉及一种抗 PD1 抗体、其药物组合物及其用途。具体地，本发明涉及一种抗 PD1 的单克隆抗体。

背景技术

跨膜受体 PD1 (programmed cell death 1, 程序性细胞死亡因子 1, 亦简称为 PD-1) 是 CD28 基因家族成员之一，在活化的 T 细胞，B 细胞以及骨髓系细胞都有表达。PD1 的受体 PDL1 和 PDL2 均属于 B7 超家族，其中 PDL1 多种细胞都有表达，包括 T 细胞，B 细胞以及内皮细胞和上皮细胞，PDL2 则仅表达于抗原呈递细胞如树突状细胞和巨噬细胞。

T 细胞对清除病毒感染起着非常重要的作用，但 T 细胞抗病毒反应通常与免疫病理相关。PD1 在负调节 T 细胞的活化过程中起着非常重要的作用，PD1 介导的对 T 细胞负调节作用可减少促进感染过程中所引起的组织损伤，但是阻断或抑制 PD1 的负调节作用可导致自身免疫性疾病，例如，PD1 基因敲除小鼠能更有效的清除腺病毒病毒感染，但是却导致了更严重的肝脏损伤 (Isai et al., 2003, J. Exp. Med. 198:39-50)。另外，高表达 PD1 的肿瘤一般形成很难被检测到的癌症 (Hamanishi et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:3360-5)。一种实施有效的方法是通过体内注射抗体对 PD1 的表达进行调控。

由于 PD1 抗体的广谱抗肿瘤前景和惊人的药效，业界普遍认为针对 PD1 通路的抗体将导致治疗多种肿瘤治疗的突破性的进展：用于治疗非小细胞性肺癌，肾细胞癌，卵巢癌，黑色素瘤 (Homet M. B., Parisi G., et al., Anti-PD1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol. 2015 Jun;42(3):466-473)，白血病以及贫血病 (Held SA, Heine A, et al., Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets. 2013 Sep;13(7):768-74)。

PD1 抗体在 2012 年和 2013 年的美国癌症协会 (AACR) 年会以及美国临床肿瘤协会 (ASCO) 年会上揭晓了其前所未有的临床药效的数据后，即成为全球制药行业最炙手可热的在研新药。

目前，尚需要开发新的具有更好的结合效率的抗 PD1 抗体，以有效地阻断 PD1 与 PDL1 的结合。

发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，利用哺乳动物细胞表达系统表达出重组的 PD1 作为抗原免疫小鼠，经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。发明人通过进行对大量样本的筛选，得到了杂交瘤细胞株 LT003（保藏编号为 CCTCC NO: C2015105）。

本发明人惊奇地发现，杂交瘤细胞株 LT003 能够分泌产生与 PD1 特异性结合的特异性单克隆抗体（命名为 14C12），并且该单克隆抗体能够十分有效地阻断 PD1 与 PDL1 的结合。

进一步地，本发明人创造性地制得了抗 PD1 的人源化抗体（命名为 14C12H1L1）。

本发明人还惊奇地发现，本发明的抗体 14C12、14C12H1L1 能有效地结合人 T 细胞，并且激活 T 细胞，诱导人淋巴细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2。本发明的抗体 14C12、14C12H1L1 具有用于制备防治肺癌、黑色素瘤、肾肿瘤、卵巢癌、白血病等癌症以及贫血病的药物的潜力。

由此提供了下述发明：

本发明的一个方面涉及单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，

所述单克隆抗体的重链可变区(V_H)包含：氨基酸序列为 SEQ ID NO: 9—11 的 CDR；
和/或

所述单克隆抗体的轻链可变区(V_L)包含：氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12—14 的 CDR。

在本发明的一些实施方式中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，

所述单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 6；
和/或

所述单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 8。

在本发明的一个实施方案中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，所述单克隆抗体包括：

(1) 如 SEQ ID NO: 2 所示的 V_H 和如 SEQ ID NO: 4 所示的 V_L；

(2) 如 SEQ ID NO: 6 所示的 V_H 和如 SEQ ID NO: 8 所示的 V_L。

轻链和重链的可变区决定抗原的结合；每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区（CDR）（重链(H)的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链（L）的 CDR

包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3；其由 Kabat 等人命名，见 *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991)*, 第 1-3 卷, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md)。

通过本领域技术人员所熟知的技术手段，例如通过 VBASE2 数据库分析上面的 (1) - (2) 项中的单克隆抗体序列的 CDR 区的氨基酸序列：

本发明的抗体 14C12、14C12H1L1 具有相同的 CDR：

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 9) ,

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 10) ,

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 11) ;

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 12) ,

LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 13) ,

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 14) 。

在本发明的一些实施方式中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，所述单克隆抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体（例如，scFv）、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，所述的单克隆抗体以小于大约 10⁻⁵ M，例如小于大约 10⁻⁶ M、10⁻⁷ M、10⁻⁸ M、10⁻⁹ M 或 10⁻¹⁰ M 或更小的 K_D 结合 PD1 蛋白；优选地，所述 K_D 通过 Fortebio 分子相互作用仪测得。

在本发明的一些实施方式中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，所述的单克隆抗体以小于大约 100 nM，例如小于大约 10 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM 或更小的 EC₅₀ 结合 PD1 蛋白。具体地，所述 EC₅₀ 通过间接 ELISA 方法测得。

在本发明的一些实施方式中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，所述的单克隆抗体以小于大约 10⁻⁵ M，例如小于大约 10⁻⁶ M、10⁻⁷ M、10⁻⁸ M、10⁻⁹ M 或 10⁻¹⁰ M 或更小的 K_D 结合 PD1 蛋白。

在本发明的一些实施方式中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中，所述的单克隆抗体包括非-CDR 区，且所述非-CDR 区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体是由杂交瘤细胞株 LT003 产生的单克隆抗体，所述杂交瘤细胞株 LT003 保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2015105。

本发明的另一方面涉及一种分离的核酸分子，其包含能够编码抗体重链可变区的核酸序列，其中，

所述抗体的重链可变区包含：氨基酸序列为 SEQ ID NO: 9—11 的 CDR；

具体地，所述抗体的重链具有 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列；

更具体地，所述核酸分子具有 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列。

本发明的再一方面涉及一种分离的核酸分子，其包含能够编码抗体轻链可变区的核酸序列，其中，

所述抗体轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12—14 的 CDR；

具体地，所述抗体轻链可变区具有 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列；

更具体地，所述核酸分子具有 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列。

本发明的再一方面涉及一种载体，其包含本发明中任一项所述的分离的核酸分子。

本发明的再一方面涉及一种宿主细胞，其包含本发明中任一项所述的分离的核酸分子，或者本发明的载体。

本发明的再一方面涉及一种制备本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段的方法，其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段的步骤。

本发明的再一方面涉及杂交瘤细胞株 LT003，其保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2015105。

本发明的再一方面涉及一种偶联物，其包括单克隆抗体或其抗原结合片段以及偶联部分，其中，所述单克隆抗体为本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，所述偶联部分为可检测的标记；具体地，所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发

光物质、有色物质或酶。

本发明的再一方面涉及一种试剂盒，其包括本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，或者包括本发明的偶联物；

具体地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述单克隆抗体或其抗原结合片段；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 **PD1** 在样品中的存在或其水平。

本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明所述的偶联物；可选地，其还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗和/或诊断肿瘤或者贫血病的药物中的用途；具体地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

本发明人通过动物实验发现，**14C12H1L1** 能够有效地抑制 **PD-1 HuGEMM** 小鼠右侧皮下接种 **MC38** 肿瘤细胞的生长，表现为给予抗体药 **14C12H1L1** 可显著抑制 **PD-1 HuGEMM** 荷瘤小鼠肿瘤体积的增加，与已上市靶点药物 **Nivolumab** 单抗药效相当。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物在制备如下药物中的用途：

阻断 **PD1** 与 **PD1** 的配体结合的药物，

调节（例如下调）**PD1** 活性或水平的药物，

解除 **PD1** 对机体免疫抑制的药物，或者

提高 T 淋巴细胞中 **IFN- γ** 和/或 **IL-2** 表达的药物；

具体地，所述 **PD1** 的配体为 **PDL1** 或 **PDL2**，优选为 **PDL1**。

本发明的再一方面涉及一种在体内或体外方法，包括施加细胞或给予者有需求的受

试者以有效量的本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物的步骤，所述方法选自如下：

阻断 PD1 与 PD1 的配体结合的方法，

调节（例如下调）PD1 活性或水平的方法，

解除 PD1 对机体免疫抑制的方法，或者

提高 T 淋巴细胞中 IFN- γ 和/或 IL-2 表达的方法；

具体地，所述 PD1 的配体为 PDL1 或 PDL2，优选为 PDL1。

在本发明的一个具体的实施方案中，所述体外方法是非治疗目的的或诊断目的的。

干扰素 γ (IFN γ)，主要由自然杀伤细胞 (NK)，自然杀伤 T 细胞 (NKT) 先天产生，和由 CD4 Th1 细胞和 CD8 细胞毒性 T 淋巴细胞这些效应 T 细胞经由特定抗原刺激后产生。IFN γ 作为一种重要的先天性和获得性免疫细胞因子在对抗或抑制病毒，某些细菌和原虫性疾病感染起着重要作用。同时，IFN γ 能激活巨噬细胞，诱导 II 类主要组织相容性复合体 (MHC) 的表达激活免疫反应控制肿瘤的发展 (Schoenborn JR, Wilson CB. *Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. Advances in Immunology* 2007; 96: 41-101)。本发明的体外实验中，抗体 anti-PD1 抗体能诱导 IFN γ 的分泌激活免疫反应。

白细胞介素 2 (IL-2) 由 T 细胞产生，是调节 T 细胞亚群的生长因子，也是调控免疫应答的重要因子，并可促进活化 B 细胞增殖，参与抗体反应、造血和肿瘤监视。重组的人 IL-2 已经被美国 FDA 批准用于治疗恶性肿瘤（包括黑色素瘤、肾肿瘤等），同时正在进行治疗慢性病毒感染的临床研究 (Chavez, A.R., et al., *Pharmacologic administration of interleukin-2. Ann N Y Acad Sci*, 2009. 1182: p. 14-27)。体外实验中，本发明的 PD1 抗体可特异地解除 PD1 对机体免疫抑制，激活 T 细胞，诱导 IL-2 产生，在抗肿瘤及寄生虫等疾病的基因治疗中有广泛应用前景。

根据本发明任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者偶联物，其用于预防和/或治疗和/或辅助治疗和/或诊断肿瘤或者贫血病；具体地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

根据本发明任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者偶联物，其用于：

阻断 PD1 与 PD1 的配体结合，

调节（例如下调）PD1 活性或水平，
解除 PD1 对机体免疫抑制，或者
提高 T 淋巴细胞中 IFN- γ 和/或 IL-2 表达；

具体地，所述 PD1 的配体为 PDL1 或 PDL2，优选为 PDL1。

在本发明的一个具体的实施方案中，本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段或者偶联物仅阻断 PD1 与 PDL1 的结合。

本发明的再一方面涉及一种预防和/或治疗和/或辅助治疗和/或诊断肿瘤或者贫血病的方法，包括给予受试者有效量的本发明中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段或者本发明所述的单克隆抗体偶联物的步骤；具体地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，当提及 PD1 蛋白（Programmed cell death protein 1, NCBI GenBank: NP_005009.2）的氨基酸序列时，其包括 PD1 蛋白的全长，或者 PD1 的胞外片段 PD1ECD 或者包含 PD1ECD 的片段；还包括 PD1ECD 的融合蛋白，例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段（mFc 或 hFc）进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在 PD1 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异（包括但不限于置换，缺失和/或添加），而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“PD1 蛋白”应包括所有此类序列，及其天然或人工的变体。并且，当描述 PD1 蛋白的序列片段时，其不仅包括序列片段，还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

如本文中所使用的，当提及 PDL1 蛋白（Programmed death-ligand 1, NCBI Genbank ID: NP_054862.1）的氨基酸序列时，其包括 PDL1 蛋白的全长，或者 PDL1 的胞外片段 PDL1ECD 或者包含 PDL1ECD 的片段；还包括 PDL1ECD 的融合蛋白，例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段（mFc 或 hFc）进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在 PDL1 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异（包括但不限于置换，缺失和/或添加），而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“PDL1 蛋白”应包括

所有此类序列以及其天然或人工的变体。并且，当描述 PDL1 蛋白的序列片段时，包括 PDL1 序列片段，还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

如本文中所使用的，术语 EC_{50} 是指半最大效应浓度（concentration for 50% of maximal effect），是指能引起 50% 最大效应的浓度。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，是指通常由两对多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由 3 个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分($C1q$)的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区 (FR) 的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG (例如，IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的，术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽，其保持特异性结合全长抗体所结合的共同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合，其也被称为“抗原结合部分”。通常参见，Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下，抗原结合片段包括 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体 (例如，scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

在一些情况下，抗体的抗原结合片段是双抗体，即，双价抗体，其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见，例如，Holliger P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)，和 Poljak R. J.等人, *Structure* 2:1121-1123 (1994))。

可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如本发明提供的单克隆抗体 14C12、14C12H1L1)获得抗体的抗原结合片段(例如，上述抗体片段)，并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

在本文中，除非上下文文明确指出，否则当提及术语“抗体”时，其不仅包括完整抗体，而且包括抗体的抗原结合片段。

如本文中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片断，也即除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 (*Nature*, 256:495, 1975)，但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S.P 4,816,567)。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体(供体抗体)的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段，其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如，小鼠、大鼠或兔)抗体。此外，受体抗体的构架区(FR)的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换，或被其他抗体的氨基酸残基替换，以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容，可参见例如，Jones et al., *Nature*, 321:522 525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323 329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593 596 (1992);和 Clark, *Immunol. Today* 21: 397 402 (2000)。

如本文中所使用的，术语“分离的”或“被分离的”指的是，从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混

有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的，术语“载体 (vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 来源的人工染色体 (PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒 (包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒 (如 SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体 (或对某抗原具有特异性的抗体) 是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力 (K_D) 结合该抗原。

如本文中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体 (例如，本发明的单克隆抗体 14C12、14C12H1L1) 以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数 (K_D) 结合抗原 (例如，PD1 蛋白)。可以使用本领域技术人员知悉的方法测定 K_D ，例如使用 ForteBio 分子相互作用仪测定。

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

如本文中所使用的，术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”可互换使用，并且当提及术语

“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”时，其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。例如，当提及杂交瘤细胞株 LT003 时，其还指杂交瘤细胞株 LT003 的亚克隆和后代细胞。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例如 **Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995**），并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 **Tween-80**；离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如肿瘤）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

发明的有益效果

本发明的单克隆抗体特别是 **14C12H1L1** 能够很好地特异性与 **PD1** 结合，并且能够十分有效地阻断 **PD1** 与 **PDL1** 的结合，特异地解除 **PD1** 对机体免疫抑制，激活 **T** 淋巴细胞。其中，**PD1** 抗体 **14C12H1L1** 对 **IFN- γ** 和 **IL-2** 分泌的诱导效果明显强于对照抗体 **5C4**（**5C4: PD1 antibody**, 来源于 **Medarex** 公司: **Alan J. Korman, et al., Human monoclonal antibodies to programmed death 1 (PD1) and methods for treating cancer using anti-PD1 antibodies alone or in combination with other immunotherapeutics, United States Patent, Patent No. US 8008449 B2**）。本发明的单克隆抗体特别是 **14C12H1L1** 的抗肿瘤作用与同靶点上市药物 **Nivolumab** 效果相当。本发明的抗体具有用于制备或者作为防治非小细胞性肺癌、肾细胞癌、卵巢癌、黑色素瘤、白血病或者贫血病的药物的潜力。

附图说明

图 1: 单克隆人源化抗体 **14C12H1L1** 的 **SDS-PAGE** 检测结果。从左至右的 4 个泳道

的样品及其上样量依次为：1. 非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μg ；2. 还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μg ；Marker，5 μl ；3. BSA，1 μg 。

图 2：抗体 14C12 的动力学特征参数检测结果。

图 3：抗体 14C12H1L1 的动力学特征参数检测结果。

图 4：抗体 5C4 的动力学特征参数检测结果。

图 5：间接 ELISA 检测抗体 14C12H1L1 和 5C4 与 PD1 的结合。

图 6：竞争 ELISA 检测抗体 14C12H1L1 和 5C4 与 PDL1 竞争结合 PD1。

图 7：抗体 14C12H1L1 与 293T-PD1 细胞表面的靶标 PD1 蛋白结合 EC_{50} 。

图 8：抗体 14C12H1L1 与 T 细胞表面抗原 PD1 的结合活性。

图 9：抗体 14C12H1L1 对混合淋巴细胞的 IFN- γ 分泌的影响。

图 10：抗体 14C12H1L1 对混合淋巴细胞的 IL-2 分泌的影响。

图 11：抗体 14C12H1L1 对混合 PBMC、MDA-MB-231 和 Raji 细胞共培养所诱导的细胞因子 IL-2 的分泌的影响。

图 12：抗体 14C12H1L1 对 PD-1 HuGEMM 小鼠 MC38 肿瘤模型的肿瘤生长的影响。

杂交瘤细胞株 LT003，其于 2015 年 6 月 16 日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2015105，保藏地址为中国.武汉.武汉大学，邮编：430072。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。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者，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，均为可以通过市场购买获得的常规产品。

在下面的实施例中，使用的 T 细胞来自中山康方生物医药有限公司；使用的 BALB/C 小鼠购自广东省医学实验动物中心。使用的 PD-1 HuGEMM 小鼠来源于南京银河生物医药有限公司；使用的 MC38 细胞来源于上海复旦 IBS 细胞资源中心；使用的同靶点上市药物 Nivolumab (Opdivo®) 单抗来源于百时美施贵宝公司。

实施例 1：杂交瘤细胞株 LT003 的获得以及单克隆抗体 14C12 的制备

1. 杂交瘤细胞株 LT003 的建立

用 PD1-mFc (PD1: Programmed cell death protein 1, NCBI GenBank ID: NP_005009.2) 融合蛋白作为抗原, 取免疫 BALB/C 小鼠 (购自广东医学实验动物中心) 的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞, 参考目前已确立的方法 (例如, Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000)。

用 PD1-mFc 作为抗原包被酶标板, 进行间接 ELISA 法筛选, 得到分泌与 PD1 特异性结合的新的抗体的杂交瘤细胞。

通过竞争 ELISA 筛选出能够分泌与配体 PDL1-hFc 融合蛋白 (PDL1: Programmed death-ligand 1, NCBI Genebank ID: NP_054862.1) 竞争结合 PD1 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株, 并经过有限稀释法得到 LT003 稳定细胞株 (其分泌的单克隆抗体命名为 14C12)。

杂交瘤细胞株 LT003 (PD1-14C12), 其于 2015 年 6 月 16 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO: C2015105, 保藏地址为中国.武汉.武汉大学, 邮编: 430072。

2. 单克隆抗体 14C12 的制备

用含 10% 的低 IgG 胎牛血清的 IMDM 培养基对本发明 LT003 细胞株进行培养, 7 天后收集细胞培养上清进行纯化制备获得抗体 14C12。

实施例 2：单克隆抗体 14C12 的轻链和重链序列的获得

按照培养细胞细菌总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen, 货号 DP430) 的方法, 从实施例 1 制得的杂交瘤细胞株 LT003 中提取 mRNA。

按照 Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA, 并进行 PCR 扩增。

PCR 扩增产物直接进行 TA 克隆, 具体操作参考 pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101) 试剂盒说明书进行。

将 TA 克隆的产物直接进行测序, 测序结果如下:

重链可变区的 DNA 测序结果: (354 bp)

GAGGTCAAACCTGGTGGAGAGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCGGCGGGT

CACTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATG
TCATGGGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTCGCTACTATCAG
CGGAGGCGGGCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGATTCACAA
TTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTAGTCTGCGG
TCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGCATGGTT
TGCCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCTGCC (SEQ ID NO: 1)

其编码的蛋白序列: (118 aa)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATIS
GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAWFAY
WGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 2)

轻链可变区的 DNA 测序结果: (318 bp)

GACATTAAGATGACACAGTCCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGA
GCGAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTCTT
GGTTTCAGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAAT
AGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGGGCAGG
ATTACTCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATCTACTATT
GCCTGCAGTATGATGAGTTCCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAAAACCTGGAA
CTG (SEQ ID NO: 3)

其编码的蛋白序列: (106 aa)

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL (SEQ
ID NO: 4)

2. 重组抗体 14C12(Re)的制备

将 14C12(Re)的重链 cDNA 序列 (其可变区序列如 SEQ ID NO: 1 所示) 和轻链的 cDNA 序列 (其可变区序列如 SEQ ID NO: 3 所示) 分别克隆到 pUC57simple (金斯瑞公司提供) 载体中 (酶切位点: XbaI & BamHI), 分别获得 pUC57simple-14C12H 和

pUC57simple-14C12L 质粒。

分别将质粒 pUC57simple-14C12H 和 pUC57simple-14C12L 进行酶切 (HindIII & EcoRI)，电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中，提取重组质粒共转染 293F 细胞。

细胞培养 7 天后，将培养液通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤后，上样至 HiTrap MabSelectSuRe 柱，用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白，回收目标样品并用 HiTrap Desalting 换液至 PBS 后进行纯化获得重组抗体 14C12(Re)。

重组抗体 14C12(Re)经 ELISA 结合活性验证具有与抗体 14C12 相当的结合活性，可以用于进行下一步抗体人源化设计。

实施例 3：人源化抗体 14C12H1L1 的重链和轻链序列的设计

1. 人源化抗体 14C12H1L1 的轻链和重链序列的设计

根据 PD1 蛋白的三维晶体结构 (Shinohara T, et al., Structure and chromosomal localization of the human PD1 gene (PDCD1). Genomics 1995, 23 (3): 704-6) 以及实施例 2 获得的抗体 14C12 的序列，通过计算机模拟抗体模型，根据模型设计突变，得到抗体 14C12H1L1 的可变区序列 (重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857, 轻链恒定区为 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834)，可变区序列如下：

重链可变区的 DNA 序列：(354 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGT
CACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATG
TCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTC
AGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAA
TCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGG
GCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTT
TGCTTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 5)

其编码的蛋白序列：(118 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATIS

GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFA
YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 6)

轻链可变区的 DNA 序列: (321 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGA
CAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCT
GGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAAT
AGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGG
ACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTAT
TGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAA ACTGGA
GCTGAAG (SEQ ID NO: 7)

其编码的蛋白序列: (107 aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
(SEQ ID NO: 8)

实施例 4: 人源化抗体 14C12H1L1 的制备和 SDS-PAGE 电泳检测

将 14C12H1L1 的重链 cDNA (其可变区序列为 SEQ ID NO: 5, 重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857) 和轻链的 cDNA (其可变区序列为 SEQ ID NO: 7, 轻链恒定区为 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834) 分别克隆到 pUC57simple (金斯瑞公司提供) 载体中 (酶切位点: XbaI&BamHI), 分别获得 pUC57simple-14C12H1 和 pUC57simple-14C12L1 质粒, 并分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中 (酶切位点: XbaI&BamHI), 提取重组质粒共转染 293F 细胞。

细胞培养 7 天后, 将培养液通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤后, 上样至 HiTrap MabSelectSuRe 柱, 用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白, 回收目标样品并用 HiTrap Desalting 换液至 PBS 后进行纯化获得重组抗体 14C12 H1L1。进行 SDS-PAGE 电泳检测。

结果如图 1 所示, 还原型蛋白样品目标蛋白大约在 24.5 kD 和 49 KD 处, 非还原型蛋白样品目标蛋白大约在 147 kD 处。

实施例 5: 抗体的动力学参数测定

使用 ForteBio 分子相互作用仪测定抗体 14C12 及人源化 14C12H1L1 与抗原 PD1 结合的动力学参数。

1. 用 TEV 蛋白酶酶切 PD1-mFc 蛋白, 并过柱纯化获得 PD1 抗原。

2. 抗原 PD1 (抗原浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$) 经生物素标记后固定于 SA 传感器表面, 于 PBST 中平衡后, 分别与抗体 14C12、14C12H1L1 和 5C4 结合, 抗体用 PBST 从 200nM 往下三倍稀释, 于 PBST 中解离。

抗体 14C12、14C12H1L1 和 5C4 的动力学参数见表 1, 动力学特征参数检测结果分别如图 2、图 3 和图 4 所示。结果表明, 14C12 和 14C12H1L1 与抗原均有较好的亲和力, 且亲和力均强于对照抗体 5C4。

表 1: 抗体 14C12 动力学参数

抗体名称	K_D (M)	K_{on} (1/Ms)	K_o 误差	K_{dis} (1/s)	K_{dis} 误差
14C12	1.81E-11	3.38E+05	8.23E+03	6.12E-06	1.04E-05
14C12H1L1	2.42E-11	3.17E+05	5.90E+03	7.66E-06	8.70E-06
5C4	6.46E-10	5.63E+05	1.38E+04	3.63E-04	9.77E-06

K_D 为亲和力常数; k_{on} 为抗原抗体结合速率; k_{dis} 为抗原抗体解离速率;
 $K_D = k_{dis}/k_{on}$ 。

实施例 6: 间接 ELISA 方法检测抗体与抗原 PD1 的结合活性

采用间接 ELISA 方法分别测定 14C12H1L1 和 5C4 分别与 PD1 的结合活性。方法具体如下:

酶标板中加入 PD1-mFc 孵育, 4℃过夜, 用 1%的 BSA 37℃封闭 2 h 后, 分别加入抗体, 37℃孵育 30 min, 加入 HRP 标记羊抗人 IgG (H+L) 二抗 (Jackson, 109-035-088), 用 TMB (Neogen, 308177) 进行显色反应 5 min, 并在酶标仪中检测 450nm 波长吸光度。

检测抗体 14C12H1L1 和 5C4 与抗原 PD1 结合结果如图 5 所示。由图 5 可见, 抗体 14C12H1L1 和 5C4 均能有效地结合 PD1 蛋白, 并且其结合效率呈剂量依赖关系, 各剂量的荧光强度见表 2。通过对结合的抗体 14C12H1L1 和 5C4 进行荧光定量分析, 曲线模拟 14C12H1L1 和 5C4 抗体的结合效率 EC_{50} 分别为 0.032nM 和 0.043 nM。

表 2: 抗体 14C12H1L1 和 5C4 分别与 PD1 结合的荧光强度

	抗原包被: PD1-mFc (0.5 μ g/mL)			
抗体浓度 (μ g/mL)	14C12H1L1		5C4	
1	2.970	2.954	2.959	2.991
0.3	2.886	2.961	2.978	3.079
0.1	2.864	2.868	2.838	2.926
0.03	2.674	2.669	2.617	2.659
0.01	2.222	2.201	1.981	2.221
0.003	1.383	1.464	1.169	1.222
0.001	0.676	0.736	0.527	0.548
0	0.062	0.062	0.065	0.073
二抗	HRP 标记羊抗人二抗			

实施例 7: 竞争 ELISA 方法检测抗体与 PDL1 竞争结合抗原 PD1 的活性

采用竞争 ELISA 方法分别测定人源化抗体 14C12H1L1 以及 5C4 与 PDL1 的竞争结合抗原 PD1。方法具体如下:

用 PD1-mFc 包被酶标板 4℃ 过夜, 1% BSA 封闭 2 h 后, 分别将不同浓度的抗体 14C12H1L1 和 5C4 分别与 PDL1-mFc 混合 10 min (稀释浓度见表 3), 37℃ 孵育 30 min 后加入相应的抗人和抗鼠酶标二抗 37℃ 孵育 30 min。在酶标仪上检测 450 nm 的吸光值。

检测抗体 14C12H1L1 和 5C4 与抗原 PD1 结合结果如图 6 所示。由图 6 可见, 抗体 14C12H1L1 能有效地与 PDL1 竞争结合 PD1 蛋白, 并且其结合效率呈剂量依赖关系, 各剂量的荧光强度见表 3。通过对结合的抗体 14C12H1L1 和 5C4 进行荧光定量分析, 曲线模拟抗体 14C12H1L1 和 5C4 的结合效率 EC_{50} 分别为: 1.322 nM 和 1.199 nM。

表 3: 抗体 14C12H1L1 和 5C4 与 PDL1 竞争结合 PD1

抗原包被	PD1-mFc 0.5 μ g/mL			
抗体浓度/稀释梯度	14C12H1L1		5C4	
1.5 μ g/ml	0.062	0.064	0.070	0.075
1:3	0.069	0.064	0.081	0.086
1:9	0.363	0.305	0.372	0.269
1:27	1.727	1.543	1.429	1.604

1:81	1.892	1.752	1.766	1.881
1:243	1.984	2.029	2.045	2.005
1:729	1.937	1.978	1.934	1.954
0	1.870	1.977	1.933	1.977
配体	PDL1-mFc 0.3μg/ml			
二抗	HRP 标记羊抗鼠二抗			

实施例 8：流式细胞仪方法检测抗体与细胞表面抗原 PD1 的结合活性

首先构建表达 PD1 抗原的宿主细胞 293T，然后用本发明中制备的人源化抗体 14C12H1L1（见实施例 4）对改宿主细胞进行标记。然后采用流式细胞术分析验证抗体 14C12H1L1 对细胞表面天然构象的抗原特异性的结合能力。

1. 表达 PD1 抗原的宿主细胞 293T 的构建

具体步骤如下：

表达 PD1 抗原的宿主细胞 293T 的构建：按照 lipofectamin 转染试剂盒（购自 Invitrogen 公司）方法将包含 PD1 的载体 pLenti6.3- PD1（载体 pLenti6.3 购自 Invitrogen 公司）转染 293T 细胞，经筛选获得稳定表达 PD1 的克隆群体 293T-PD1。

2. 抗体对 293T-PD1 细胞表面抗原的结合

抗体标记和流式细胞仪检测：采用常规胰酶消化方法上述步骤获得的表达 PD1 抗原的宿主细胞 293T-PD1，并使每个收集管细胞数为 2×10^5 ，用 PBS（1% BSA）配制浓度分别为 50 nM，10 nM，5 nM，1 nM，0.1 nM，0.01 nM 的 PD1 抗体稀释液，冰上与表达 PD1 的 293T 细胞孵育 2 小时，每管加入 100 μL FITC 羊抗人 IgG（1: 500）冰上孵育 1 小时用 PBS 洗 3 次后加入 300 μL PBS 重悬细胞，在流式细胞仪上用 FITC 通道检测荧光信号。

人源化抗体 14C12H1L1 与 293T-PD1 细胞的结合结果如图 7 所示。由图 7 可见，14C12H1L1 抗体能有效地结合宿主细胞 293T-PD1 表面的靶标 PD1 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 4。通过对结合的 14C12H1L1 抗体进行荧光定量分析，曲线模拟 14C12H1L1 抗体的结合效率 EC_{50} 为 1.89 nM。

表 4：流式细胞仪检测 14C12H1L1 结合 PD1 宿主细胞 293T-PD1 表面抗原的荧光强度分析

浓度 (nM)	0.01	0.1	1	5	10	50
荧光强度	8.32	20.31	174.62	579.41	686.49	669.54

实施例 9：流式细胞仪方法检测抗体与 T 细胞表面抗原 PD1 的结合活性

采用 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare LOT No.:171440-02)分离 PBMC, 从 PBMC 中分离得到 CD4⁺ 细胞, 用 PHA (上海疾控生物科技有限公司, 50 µl/ml) 刺激三天后用 PBS 洗一次, 加入不同浓度的抗体, 冰上孵育 1.5 h。孵育完成后, 用 PBS 洗涤一次, 加入 FITC-标记抗人二抗 IgG (Jackson immunoresearch lot.102155)。冰上避光孵育 1 h 后, 用 PBS 洗涤一次并用流式细胞仪检测。

人源化抗体 14C12H1L1 与 T 细胞的结合结果如图 8 所示。由图 8 可见, 14C12H1L1 抗体能有效地结合 T 细胞表面的靶标 PD1 蛋白, 并且其结合效率呈剂量依赖关系。

实施例 10：混合淋巴细胞反应：细胞因子 IFN-γ, IL-2 的分泌

采用 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare LOT No.:171440-02)分离 PBMC, 将分离出来的 PBMC 加入 IL-4 (Peprotech K2513, 1000U/ml) 和 GM-CSF (Peprotech H1513, 1000U/ml) 诱导 6 天后, 加入 TNF-α (Peprotech G1513, 200U/ml) 诱导 3 天获得 DC 细胞。

PBMC 中分离得到 T 细胞, 将获得的 DC 细胞与 T 细胞按 1:10 的比例混合培养, 同时加入不同比例的抗体 14C12H1L1、5C4 和 hIgG (hIgG 做为同型对照) 培养 5-6 天后, 采用 ELISA 试剂盒检测 IFN-γ (购自达科为公司) 和 IL-2 (购自达科为公司) 的分泌量。

DC 细胞和 T 细胞混合培养后 IFN-γ 和 IL-2 的分泌检测结果分别如图 9、图 10 所示: 14C12H1L1 抗体能有效地诱导混合淋巴细胞分泌 IFN-γ 和 IL-2, 并且其分泌量与抗体 14C12H1L1 呈剂量依赖关系。抗体 14C12H1L1 对 IFN-γ 和 IL-2 分泌量的诱导效果均强于对照抗体 5C4。

实施例 11：诱导 IL-2 分泌

将分离得到的 PBMC (方法同实施例 10) 用 PHA (上海疾控生物科技有限公司, 50 µl/mL) 刺激 3 天后, 96 孔板中加入刺激成熟的 PBMC (5×10⁴ cells/孔), Raji 细胞 (上海中科院) (5×10⁴ cells/孔) 和 MDA-MB-231 细胞 (ATCC) (1×10⁴ cells/孔), 加入 100 nM 14C12H1L1 或对照抗体 5C4 或 hIgG (hIgG 为同型对照) 混合均匀共培养。3 天

后，采用 ELISA 试剂盒检测 IL-2（购自达科为公司）的分泌量，具体操作按照试剂盒说明书进行。

细胞混合培养后的 IL-2 的分泌检测结果如图 11 所示。由图 11 可见，14C12H1L1 抗体能有效地诱导 PBMC 分泌 IL-2，抗体 14C12H1L1 对 IL-2 分泌的诱导效果显著强于对照抗体 5C4。

实例 12：抗体 14C12H1L1 对 PD-1 HuGEMM 小鼠 MC38 肿瘤模型的肿瘤生长的影响

在 PD-1 HuGEMM 小鼠(人 PD-1 转基因小鼠)右侧皮下接种 MC38 肿瘤细胞(1×10^6 /只)，当平均肿瘤体积达到约 118 mm^3 时，根据肿瘤体积将小鼠随机分入 4 个实验组并进行腹腔给药，每组小鼠均为 8 只。具体分组和给药剂量如下：

Isotype Control 组（给药剂量 8mg/kg），

14C12H1L1 高剂量组（给药剂量 8mg/kg），

14C12H1L1 低剂量组（给药剂量 0.8mg/kg），

Nivolumab 组（给药剂量 8mg/kg）。

以上 4 组均按照每周给药 2 次，共给药 5 次。分组给药后，每周测量肿瘤大小两次。结果如图 12 所示。

结果显示：

Nivolumab 组、14C12H1L1 高剂量组、14C12H1L1 低剂量组的肿瘤体积在统计学上均显著小于 Isotype control 组 ($P < 0.01$ 、 < 0.01 、 < 0.05)。14C12H1L1 高剂量组 (8 mg/kg) 在 PD-1 HuGEMM 小鼠 MC38 肿瘤模型中显示有统计学显著意义的抗肿瘤作用，并且与同靶点上市药物 Nivolumab (8 mg/kg) 药效相当。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。