

抗 PD-L1 抗体及其应用

技术领域

[01] 本发明涉及生物医药领域，具体涉及一种抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段及其医药用途。

背景技术

[02] 近年来，在肿瘤治疗领域，越来越多地人们致力于利用自身免疫系统来抵御肿瘤，这种通过调动机体免疫系统，抑制和杀伤肿瘤细胞的方法称为肿瘤免疫治疗。肿瘤免疫治疗是当前肿瘤治疗领域中最具前景的研究方向，其中包括细胞免疫疗法、肿瘤疫苗、靶向肿瘤的被动免疫治疗，以及免疫检查点抑制剂等研究热点，并已取得了很多具有应用前景的研究成果。

[03] 免疫检查点是指通过平衡共刺激和共抑制信号来控制 T 细胞免疫应答强度的信号通路（文献 1）。机体在正常情况下，免疫检查点可以通过调节自身免疫反应的强度来维持免疫耐受。然而，机体在受到肿瘤侵袭时，免疫检查点的激活可抑制自身免疫，有利于肿瘤细胞的生长和逃逸。CTLA-4、程序性死亡受体-1 (programmed death receptor-1, PD-1) /程序性死亡配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1)、TIM-3 等是免疫检查点中关键负向调控分子，在肿瘤免疫逃逸中起重要作用。用特异性抗体阻断免疫检查点的负向调控通路，重建机体免疫系统对肿瘤细胞的识别和杀伤能力，在肿瘤免疫治疗中取得了较好的疗效。在已知的免疫检查点中，PD-1 /PD-L1 在肿瘤免疫研究和治疗中受到高度关注。

[04] PD-1 (programmed death 1, 程序性死亡受体 1, CD279) 是一种重要的免疫抑制分子，CD28 超家族成员。PD-1 表达于活化的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞以及部分肿瘤细胞，是由 PDCD1 基因编码，288 个氨基酸组成的跨膜蛋白。PD-1 结构主要包括胞外区—免疫球蛋白可变区 (IgV) 样结构域、跨膜区以及胞内区。胞内区包括 C 端和 N 端氨基酸残基，含有 2 个独立的磷酸化作用位点，分别为免疫受体酪氨酸抑制基 (immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif, ITIM) 和免疫受体酪氨酸转换基序 (immunoreceptor tyrosine based switch motif, ITSM)。PD-1 胞外 IgV 样结构与其配体结合，ITSM 改变，募集 SHP2 信号，激活下游通路（文献 2）。

[05] PD-1 的天然配体有两个, 分别为 PD-L1 和 PD-L2 (文献 3)。PD-L1(Programmed death ligand 1, CD274, B7-H1) 是 40 kDa 的跨膜蛋白, 由 CD274 基因编码, 诱导表达于 T 细胞、B 细胞、树突细胞、巨噬细胞、间充质干细胞、骨髓来源的肥大细胞和非造血细胞, 在干扰素及其他炎症因子刺激应答的肿瘤组织和其他组织中都可能会迅速上调 (文献 4)。PD-1/PD-L1 通路激活后, 在癌症、妊娠、组织移植以及自身免疫病中抑制免疫系统。PD-L2(Programmed death ligand 1, CD273, B7-DC) 表达范围较窄, 主要在活化的巨噬细胞、树突细胞、肥大细胞中表达上调 (文献 5)。PD-L1 与 PD-L2 有 37% 的同源序列, 但由于主要表达载体的不同, 导致调节作用是不同的。PD-L1 不同于 PD-L2, 表达在多种肿瘤细胞中, 使 PD-L1 成为研究 PD-1/PD-L 通路在肿瘤免疫治疗领域中的主要配体。

[06] 由于 PD-L1 还可以与 CD80 (属于免疫球蛋白超家族, 其配体是 CD28 和 CTLA4, 在自身免疫监控、体液免疫应答及移植反应中发挥重要作用) 结合 (文献 6), 抑制 PD-L1 或可解除对 CD80 的干扰, 从而增强 T 细胞活性; 从药物安全性方面考虑, 由于 PD-1 还有另外一个受体 PD-L2, 且 PD-L2 对 PD-1 的亲合力是 PD-L1 的三倍 (文献 7), 而 PD-L1 阻断剂不与 PD-L2 结合。从理论上而言, PD-1 抗体同时阻断了 PD-1 与 PD-L1、PD-L2 的关联, 而 PD-L1 抗体只阻断 PD-1 与 PD-L1 的关联, 保留了 PD-1 与 PD-L2 的相互作用。而 PD-L2 对于维持肺部、胃肠道的免疫耐受非常重要。因此, PD-L1 抗体可能比 PD-1 抗体, 在肺和胃肠道方面的副作用上, 可能更小。相对 PD-1 阻断剂, PD-L1 阻断剂从有效性和安全性方面可能会有一个更好的表现 (文献 8)。

[07] 目前, 美国 FDA 已批准上市了 3 种 PD-L1 抗体药物 (如表 1 所示)。

表 1 FDA 批准的 PD-L1 免疫检查点抑制剂

商品名	药物名称	上市时间	生产厂家	主要获批适应症
Tecentriq	Atezolizumab	2016 年	罗氏	尿路上皮癌、非小细
Bavencio	Avelumab	2017 年	默克/辉瑞	胞肺癌、Merkel 细胞
Imfinzi	Durvalumab	2017 年	阿斯利康	癌

[08] 其中, Atezolizumab 在 2016 年 5 月首次获美国 FDA 批准, 此后两年又获批多种适应症 (如表 2 所示)。

表 2 Atezolizumab 获批适应症

年份	获批适应症
2016.05.18	(1) 治疗含铂化疗期间或后有疾病进展, (2) 或用含铂化疗新辅助或辅助治疗 12 个月内有疾病进展的局部晚期或转移性尿路上皮癌患者
2016.10.18	治疗铂类药物化疗后进展的转移性非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者
2017.04.17	(1) 治疗不适合含顺铂化疗, (2) 或在任何含铂化疗期间或之后, 或在新辅助或辅助化疗后的 12 个月内出现疾病进展的局部晚期或转移性尿路上皮癌患者
2018.06.19	(1) 治疗不适合含顺铂化疗, 表达 PD-L1(PD-L1 彩色肿瘤浸润免疫细胞(IC)覆盖 $\geq 5\%$ 的肿瘤区域), (2) 或表达 PD-L1 但不符合任何含铂化疗条件, (3) 或在任何含铂化疗期间或之后, 或新辅助或辅助化疗后 12 个月出现疾病进展的局部晚期或转移性尿路上皮癌患者
2018.07.02	(1) 治疗由 FDA 批准测试的不适合含顺铂化疗, 肿瘤表达 PD-L1(PD-L1 彩色肿瘤浸润免疫细胞(IC)覆盖 $\geq 5\%$ 的肿瘤区域), (2) 或不符合任何含铂化疗条件, (3) 或任何含铂化疗期间或之后或新辅助或辅助化疗后 12 个月内出现疾病进展的局部晚期或转移性尿路上皮癌患者

[09] 在 2019 年, Atezolizumab 又获批了 3 大难治性晚期癌症一线治疗的适应症, 包括欧盟批准的 Atezolizumab + 贝伐+化疗, 用于晚期非鳞非小细胞肺癌一线治疗; 美国批准的 Atezolizumab 联合化疗, 用于 PD-L1 阳性的晚期三阴性乳腺癌的一线治疗以及用于晚期小细胞肺癌的一线治疗。

- 5 [10] 另外两种上市的 PD-L1 抗体药物 Avelumab 和 Durvalumab 也陆续被批准用于治疗转移性 MERKEL 细胞癌、局部晚期或转移性尿路上皮癌或无法手术切除的 III 期非小细胞肺癌等, 具体见表 3-4。

表 3 Avelumab 获批适应症

年份	获批适应症
2017.03.23	治疗转移性 MERKEL 细胞癌 (MCC) 患者
2017.05.09	含铂化疗期间或化疗后病情进展的局部晚期或转移性尿路上皮癌 (mUC) 患者
2017.05.09	手术前 (新辅助治疗, neoadjuvant treatment) 或手术后 (辅助治疗, adjuvant treatment) 接受含铂化疗 12 个月内病情进展的局

	部晚期或转移性尿路上皮癌（mUC）患者
--	---------------------

表 4 Durvalumab 获批适应症

年份	获批适应症
2017.05.01	治疗铂类药物化疗或辅助化疗 12 个月后疾病进展的局部晚期或转移性尿路上皮癌患者
2018.02.16	治疗无法手术切除的 III 期非小细胞肺癌，且在铂类化疗和放疗同时治疗下病情没有进展的患者

[11] 专利申请 CN102245640A 中也公开了一种 PD-L1 抗体以及其用于增强 T 细胞功能从而上调细胞介导的免疫应答的用途和提供治疗 T 细胞功能障碍病症，所述病症包括感染(例如急性 的和慢性的)和肿瘤免疫。肿瘤免疫针对的癌症包括：乳腺癌(breast cancer)、肺癌(lung cancer)、结肠癌(colon cancer)、卵巢癌(ovarian cancer)、黑色素瘤(melanoma)、膀胱癌(bladder cancer)、肾癌(kidney cancer)、肝癌(liver cancer)、唾液腺癌(salivary cancer)、胃癌(stomach cancer)、神经胶质瘤(gliomas)、甲状腺癌(thyroid cancer)、胸腺癌(thymic cancer)、上皮癌(epithelial cancer)、头和颈癌(head and neck cancers)、胃癌和胰腺癌(gastric and pancreatic cancer)。

[12] 从目前各 PD-L1 抗体药物批准的适应症及现有技术文献来看，尽管同为 PD-L1 抗体，但所针对的适应症还存在各方面的差异，已上市的三种抗体药物还存在多个三期临床失败进程，如 Bavencio 针对卵巢癌适应症的 3 项试验：JAVELIN Ovarian 100、JAVELIN Ovarian 200 和 JAVELIN Ovarian PARP 100。这表明目前还存在大量的重大临床需求未得到满足。因此临床上还亟需开发更多药效更好且针对更多适应症有效的 PD-L1 类抑制剂，尤其是靶向 PD-L1 的单克隆抗体。

发明内容

[13] 本发明提供了一种抗 PD-L1 抗体，以及编码这些抗体的核苷酸、多核苷酸组合、表达载体以及表达载体组合。本发明还提供了包含上述抗 PD-L1 抗体的偶联物或者药物组合物。本发明还提供了上述抗 PD-L1 抗体核苷酸、多核苷酸组合、表达载体、表达载体组合、偶联物或者药物组合物在治疗或预防癌症的药物中的用途。

[14] 本发明提供一种分离的抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，所述的抗

PD-L1 抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区的 CDR 和/或所述轻链可变区的 CDR 与如下序列限定的抗体具有相同的 CDR 序列或在如下序列限定的抗体的 CDR 上进行 1-2 个氨基酸替换, 所述序列限定的抗体为:

- 5 (1) 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:31 所示; 和/或
 (2) 轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:32 所示。

[15] 在特定实施方案中, 根据采用不同的测定方法或系统认定, 相应重链和轻链可变区的互补决定区 CDR 1-3 如表 5 所示。

表 5 重链和轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列

类别	系统	CDR1	CDR2	CDR3
重链	IMGT	SEQ ID NO: 1 GFSLSRYS	SEQ ID NO: 2 IWGVGTT	SEQ ID NO: 3 ARNWGTADYFDY
	Kabat	SEQ ID NO: 7 RYSVH	SEQ ID NO: 8 MIWGVGTTDYNALKS	SEQ ID NO: 9 NWGTADYFDY
	Chothia	SEQ ID NO: 13 GFSLSRYS	SEQ ID NO: 14 WGVGT	SEQ ID NO: 15 NWGTADYFDY
	AbM	SEQ ID NO: 19 GFSLSRYSVH	SEQ ID NO: 20 MIWGVGTTD	SEQ ID NO: 21 NWGTADYFDY
	Contact	SEQ ID NO: 25 SRYSVH	SEQ ID NO: 26 WLGMIWGVGTTD	SEQ ID NO: 27 ARNWGTADYFD
轻链	IMGT	SEQ ID NO: 4 KSVHTSGYSY	SEQ ID NO: 5 LAS	SEQ ID NO: 6 QHSGLPYT
	Kabat	SEQ ID NO: 10 RASKSVHTSGYSYMH	SEQ ID NO: 11 LASNLES	SEQ ID NO: 12 QHSGLPYT
	Chothia	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

		RASKSVHTSGYSYMH	LASNLES	QHSGELPYT
	AbM	SEQ ID NO: 22 RASKSVHTSGYSYMH	SEQ ID NO: 23 LASNLES	SEQ ID NO: 24 QHSGELPYT
	Contact	SEQ ID NO: 28 HTSGYSYMHY	SEQ ID NO: 29 LLIYLASNLE	SEQ ID NO: 30 QHSGELPY

[16] 进一步的, 本发明还提供了一种分离的抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段, 在某些具体实施方案中, 其包括重链和轻链可变区序列, 其中:

(1) 重链可变区 CDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO:1、7、13、19 或 25 所示或对 SEQ ID NO:1、7、13、19 或 25 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO:2、8、14、20 或 26 所示或对 SEQ ID NO: 2、8、14、20 或 26 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO:3、9、15、21 或 27 所示或对 SEQ ID NO: 3、9、15、21 或 27 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; 和/或

(2) 轻链可变区 CDR1 氨基酸序列如 SEQ ID NO:4、10、16、22 或 28 所示或对 SEQ ID NO: 4、10、16、22 或 28 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR2 氨基酸序列如 SEQ ID NO:5、11、17、23 或 29 所示对 SEQ ID NO: 5、11、17、23 或 29 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR3 氨基酸序列如 SEQ ID NO:6、12、18、24 或 30 所示或对 SEQ ID NO: 6、12、18、24 或 30 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列。

[17] 进一步, 本发明提供的分离的抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段, 在某些具体实施方案中, 其中:

(1) 重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:1-3 或对 SEQ ID NO: 1-3 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; 和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4-6 或对 SEQ ID NO: 4-6 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; 或

(2) 重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO:7-9 或对 SEQ ID NO: 7-9 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; 和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10-12 或对 SEQ ID NO: 10-12 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; 或

(3) 重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 13-15 或对 SEQ ID

NO: 13-15 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16-18 或对 SEQ ID NO: 16-18 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；或

(4) 重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 19-21 或对 SEQ ID NO: 19-21 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 22-24 或对 SEQ ID NO: 22-24 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；或

(5) 重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 25-27 或对 SEQ ID NO: 25-27 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 28-30 或对 SEQ ID NO: 28-30 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列。

[18] 在某些具体实施方案中，本发明所提供的抗体或其抗原结合片段，其重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1-3；轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4-6。

[19] 在某些具体实施方案中，本发明所提供的抗体或其抗原结合片段，其包括选自如下一组的可变区：

(1) 重链可变区的序列如 SEQ ID NO:31 所示，或与 SEQ ID NO:31 具有相同的 CDR1-3 且与 SEQ ID NO:31 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列；和/或

(2) 轻链可变区的序列如 SEQ ID NO:32 所示，或与 SEQ ID NO:32 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:32 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列。

[20] 本发明涉及的抗 PD-L1 抗体重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:31)：

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGFSL S RYSVHWIRQP PGKGLEWLGM IWGVGTTDYN 60

SALKSRLTIS KDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARNWG TADYFDYWQ GTTVTVSSAS 120

[21] 本发明涉及的抗 PD-L1 抗体轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:32)：

DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASKSVH TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60

GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCQHS GELPY TFGGGTKVEI KRT 113

[22] 在某些具体实施方案中，本发明所提供的抗体或其抗原结合片段，其中：(1) 重链可变区的序列如 SEQ ID NO:31 所示；和/或 (2) 轻链可变区的序列分别 SEQ ID NO:32 所示。

[23] 在某些具体实施方案中,本发明所提供的抗体或其抗原结合片段,其:

(1) 重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示; 和/或 (2) 轻链的氨基酸序列分别 SEQ ID NO:34 所示。

[24] 本发明所提供的抗体可以是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体、多特异性抗体或 Fab 片段、F(ab') 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、dAb、Fd、单链抗体(scFv)。进一步地,所述抗体是人源化单克隆抗体。

[25] 本发明所提供的抗体进一步包括人或鼠恒定区,所述恒定区进一步可选自 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4。所述 IgG2 包括 IgG2A, IgG2B。

[26] 本发明还提供分离的编码上述抗体或其抗原结合片段的多核苷酸或编码上述抗体或抗原结合片段重链或重链部分片段以及轻链或轻链部分片段的多核苷酸组合。

[27] 本发明还提供一种核酸构建体或载体,其包含了上述编码抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

[28] 本发明进一步提供了一种宿主细胞,其包含上述核酸构建体或载体。所述细胞可以是原核细胞、真核细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、大肠杆菌细胞或 CHO 细胞、NS0 细胞、Sp2/0 细胞、BHK 细胞。

[29] 本发明进一步提供了一种抗体药物偶联物,其含有本发明中的抗 PD-L1 抗体或其抗原结合部分及药物毒素。所述药物毒素可以选自可直接或间接抑制细胞生长或杀灭细胞、或通过激活机体免疫反应从而抑制或杀死细胞,从而达到治疗肿瘤的化学物质、毒素、多肽、酶、同位素、细胞因子、抗体或其他具有生物活性的但以物质或混合物,优选白介素类、肿瘤坏死因子、趋化因子、纳米颗粒、MMAE、MMAF、DM1、DM4、卡奇霉素(Calicheamicin)、duocarmycin、阿霉素(Doxorubicin)。

[30] 本发明进一步提供了一种药物组合物,包含了本发明中的抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段和/或上述偶联物,以及药学上可接受的载体。

[31] 本发明进一步提供了一种制备抗 PD-L1 抗体的方法,其包括在适合表达编码抗 PD-L1 抗体或抗原结合片段的载体的条件下培养上述宿主细胞,并且回收所述抗体或片段。

[32] 本发明进一步提供了一种增强 T 细胞功能的方法,其包括向功能障碍的 T 细胞施用有效量本发明中的上述药用组合物。

[33] 又一方面,本发明提供了一种治疗或预防癌症的方法,其包括向有此

需要的对象施用治疗有效量的根据本发明的抗体、多核苷酸、多核苷酸组合、表达载体、偶联物和/或药物组合物。

[34] 又一方面，本发明提供了本发明中抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段、其编码多核苷酸、多核苷酸组合、相应的核酸构建体或载体、抗体药物偶联物、或药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[35] 又一方面，本发明提供了根据本发明的抗体、多核苷酸、多核苷酸组合、表达载体、偶联物和/或药物组合物，其用于治疗或预防癌症。

[36] 进一步地，其中所述癌症为实体瘤。

[37] 进一步地，其中所述实体瘤为肺癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、膀胱癌、尿路上皮癌、肾癌、肝癌、唾液腺癌、胃癌、神经胶质瘤、甲状腺癌、胸腺癌、上皮癌、头和颈癌、胃癌和胰腺癌。

[38] 进一步地，其中所述肺癌为非小细胞肺癌。

[39] 进一步地，其中所述卵巢癌为三阴性乳腺癌。

[40] 本发明又一方面提供了治疗 T 细胞功能障碍的病症的方法，其包括向患有 T 细胞功能障碍的病症的患者施用治疗有效量本发明中的上述药用组合物，所述 T 细胞功能障碍的病症包括感染、肿瘤免疫。所述肿瘤免疫由选自下述各项癌症导致：乳腺癌，肺癌、结肠癌、卵巢癌、黑色素瘤、膀胱癌、肾癌、肝癌、唾液腺癌、胃癌、神经胶质瘤、甲状腺癌、胸腺癌、上皮癌、头和颈癌、胃癌和胰腺癌。

[41] 本发明进一步提供了本发明中抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段、其编码多核苷酸、多核苷酸组合、相应的核酸构建体或载体、抗体药物偶联物、或药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[42] 本发明提供的抗 PD-L1 单克隆抗体是一种全新的靶向 PD-L1 的单克隆抗体，其具有全新的 CDR 序列及氨基酸序列。本发明提供的抗 PD-L1 单克隆抗体与人 PD-L1 具有惊人的亲和力和特异性，在与人 PD-1 竞争结合人 PD-L1 上具有显著优势。本发明提供的抗 PD-L1 单克隆抗体在非小细胞肺癌和结直肠癌的体外动物模型中均表现出意料不到的抑制肿瘤效果，为抑制肿瘤进程提供了更佳的选择。

附图说明

[43] 图 1 显示了 hAAG5D8 与人 PD-L1 的亲和力结合解离曲线，其中编号为 1 的曲线表示 hAAG5D8 的浓度为 100nM，编号为 2 的曲线表示 hAAG5D8

的浓度为 50nM, 编号为 3 的曲线表示 hAAG5D8 的浓度为 25nM。

[44] 图 2 显示了 hAAG5D8 与人 PD-1 的竞争结合曲线。

[45] 图 3 显示了 hAAG5D8 与多种 B7 家族蛋白 (PD-L1、PD-L2、B7-H3、PD-1 及 CD80) 的结合能力。

5 [46] 图 4 显示了在人非小细胞肺癌皮下异种移植肿瘤模型中, 给药 hAAG5D8 (5mg/kg)、MPDL3820A (5mg/kg, 阳性对照)、Human IgG1 (5mg/kg, 阴性对照) 后的肿瘤生长曲线图。

[47] 图 5 显示了在人结直肠癌皮下异种移植肿瘤模型中, 给药 hAAG5D8 (1mg/kg、3mg/kg、9mg/kg)、MPDL3820A (10mg/kg, 阳性对照)、PBS
10 (阴性对照) 后的肿瘤体积变化趋势。

具体实施方式

定义

[48] 除非另有定义, 本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的相同含义。关于本领域的定义及术语, 专业人员具体可参考 Current
15 Protocols in Molecular Biology(Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。

[49] 在本发明中, 抗体可变域的互补决定区(CDR)测定或编号方法包括本领域熟知的 IMGT、Kabat、Chothia、AbM 以及 Contact 法。

[50] 对本发明来说, 两种核酸或者氨基酸序列间的“一致性”、“同一性”或
20 “相似性”是指, 在最佳比对(最优比对)后所获得的、待比较的两序列之间相同核苷酸或相同氨基酸残基的百分数, 该百分数是纯粹统计学的并且两种序列间的差异随机分布并覆盖其全长。两种核酸或者氨基酸序列之间的序列比较通常是在以最优方式使它们匹配以后, 通过比较这些序列而进行, 所述比较能够通过区段或者通过“比较窗”实施。除了能够手工实施外,
25 用于比较序列的最优比对, 还能够通过 Smith 和 Waterman(1981)[Ad.App.Math.2:482]的局部同源性算法、通过 Needleman 和 Wunsch 的(1970)[J.Mol.Biol.48: 443]局部同源性算法、通过 Pearson 和 Lipman 的(1988)[Proc. Natl.Acad.Sci.USA 85: 2444]相似性搜索方法、通过使用这些算法的计算机软件实施 (GAP、BESTFIT、FASTA 和
30 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575Science Dr., Madison, WI, 或者通过 BLAST N or BLAST P 比较软件)。

[51] 本文所使用的“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）；本文所使用的“抗原结合片段”是指抗体片段由其来源抗体的重或轻可变链的部分序列构成或者包含它们，所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和充分的亲和力，优选至少等于其来源抗体亲和力的1/100，在更优选方式中至少等于1/10。这种功能片段将包含最少5个氨基酸，优选其来源的抗体序列的10、15、25、50和100个连续氨基酸。包括(特别是)Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fd、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、二价单链抗体，其含有至少一个足以使得特异性抗原结合于该多肽的免疫球蛋白片段。上述片段可经合成、或酶法、或通过对完整免疫球蛋白的化学切割而制备，或通过重组DNA技术进行遗传工程改造。其生产的方法在本领域中众所周知。一条重链包含一重链可变区(缩写为VH)和一重链恒定区。重链恒定区包含三个域(domain)，CH1、CH2和CH3。一条轻链包含一轻链可变区(缩写为VL)和一轻链恒定区。该轻链恒定区包含一个域，CL。VH和VL区域还可再细分为具有高可变性的多个区，被称为互补决定区(CDR)，其间散布有更为保守的被称为框架区(FR)的多个区域。每个VH和VL均由三个CDR和四个FR构成，按照以下顺序从氨基端至羧基端排布：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的这些可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主的组织或因子结合，包括免疫系统的各种细胞(如效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q)。嵌合或人源化抗体也涵盖在根据本发明的抗体中。

[52] 术语“人源化抗体”是指一种抗体，其包含来源于非人源抗体的CDR区、并且该抗体分子的其他部分来源于一种(或几种)人抗体。而且，为了保留结合亲和力，可以修饰骨架(称为FR)区段的一些残基(Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332: 323-327, 1988)。通过本领域技术人员已知的技术可以制备根据本发明的人源化抗体或其片段(例如，描述于文件 Singer et al., J.Immun.150: 2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol.Genet.Eng.Rev., 10: 1-142, 1992; 或 Bebbington et al., Bio/Technology, 10: 169-175, 1992)。

[53] 术语“嵌合抗体”系指以下抗体，其中的可变区序列来自一物种而恒定区序列来自另一物种，例如可变区序列来自小鼠抗体而恒定区序列来自人抗体的抗体。通过使用基因重组技术可以制备根据本发明的嵌合抗体或其

片段。例如，所述嵌合抗体可以通过克隆重组 DNA 来生产，所述重组 DNA 包含启动子和编码根据本发明的非人尤其是鼠单克隆抗体可变区的序列、以及编码人抗体恒定区的序列。由这种重组基因编码的本发明嵌合抗体将是，例如，鼠-人嵌合体，该抗体的特异性由来源于鼠 DNA 的可变区确定，并且其同种型由来源于人 DNA 的恒定区来确定。对于制备嵌合抗体的方法，例如，可以参考文件 Verhoeven et al.(BioEssays, 8: 74, 1988)。

[54] 术语“单克隆抗体”系指具有单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和性。

[55] 术语“分离地”核酸分子是从至少一个污染物核酸分子中鉴别与分离的核酸分子，在抗体核酸的天然来源中其一般地与该污染物核酸分子有联系。分离的核酸分子在其形式或环境上与其在自然界中发现时不同。分离的核酸分子因此不同于其在自然细胞中存在的核酸分子。然而，分离的核酸分子包括在通常表达抗体的细胞中加以包含的核酸分子，在该细胞中例如核酸分子位于与自然细胞不同的染色体位置上。

[56] 通常，为了制备单克隆抗体或其功能片段，尤其是鼠源的单克隆抗体或其功能片段，可以参考尤其描述在手册“Antibodies”中的技术 (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp.726, 1988)或者参考 Kohler 和 Milstein 描述的从杂交瘤细胞制备的技术(Nature, 256: 495-497, 1975)。

实施例

[57] 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，下面实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。

[58] 实施例 1 抗 PD-L1 抗体的产生

[59] 通过对免疫小鼠后获得的抗 PD-L1 抗体的大量筛选，从中确定了一个候选鼠源抗体 mAAG5D8。通过进一步在抗体可变区数据库中比对，我们确定了与鼠源 PD-L1 抗体 mAAG5D8 具有很高同源性的人 IgG1 框架区。针对 mAAG5D8，我们进一步设计了多种人源化抗体并进行亲和力比较，最终确定候选的人源化抗 PD-L1 抗体 hAAG5D8。

表 6.抗 PD-L1 人源化抗体 hAAG5D8 重链可变区和轻链可变区 CDR 1-3

(IMGT 法测定) 的氨基酸序列

重链	CDR1	SEQ ID NO:1	GFSLSRYS
	CDR2	SEQ ID NO:2	IWGVGTT
	CDR3	SEQ ID NO:3	ARNWGTADYFDY
轻链	CDR1	SEQ ID NO:4	KSVHTSGYSY
	CDR2	SEQ ID NO:5	LAS
	CDR3	SEQ ID NO:6	QHSSELPTY

[60] 抗 PD-L1 人源化抗体 hAAG5D8 重链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:31) :

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGFSLR YSVHWIRQP PGKGLEWLGW IWGVGTTDYN 60
SALKSRLTIS KDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARNWG TADYFDYWGQ GTTVTVSSAS 120

[61] 抗 PD-L1 人源化抗体 hAAG5D8 轻链可变区氨基酸序列 (SEQ ID NO:32) :

DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASKSVH TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60
GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCQHSSELPT TFGGGTKVEI KRT 113

5 [62] 抗 PD-L1 人源化抗体 hAAG5D8 重链和轻链氨基酸序列分别如序列 33 (SEQ ID NO:33) 和序列 34 (SEQ ID NO:34) 所示。

[63] 实施例 2 hAAG5D8 与人 PD-L1 的亲和力比较

[64] 采用生物层干涉 (BLI) 法检测 hAAG5D8 对人 PD-L1 的亲和力。黑色 96 孔板 A-D 第 1、3、5 列分别加入 PBS 溶液分别作为基线 1、基线 2 和解离液, 第 2 列加入 PD-L1 溶液 (R&D 公司), 第 4 列加入 hAAG5D8 溶液 (浓度依次为 100 nM-50 nM-25 nM-0 nM), 第 10 列加入咪唑溶液, 第 11 列加入水, 第 12 列加入硫酸镍溶液。实验采用 Ni-NTA 探针 (Fortebio 公司), 首先将探针浸入 A-D 第 1 列, 保持 180s, 使基数稳定; 将 Ni-NTA 探针浸入 A-D 第 2 列, 保持 300s, 使 PD-L1 固化到探针上; 将 Ni-NTA 探针浸入 A-D 第 3 列, 保持 120s, 使基数稳定; 将 Ni-NTA 探针浸入 A-D 第 4 列, 保持 600s, 使不同浓度的 hAAG5D8 与探针上固化的 PD-L1 蛋白结合; 将 Ni-NTA 探针浸入 A-D 第 5 列, 保持 600s, 使抗体自然解离; 之后将 Ni-NTA 探针依次浸入 A-D 第 10、11、12 列, 使固化在探针上的 PD-L1 从探针上强制解离。使用 Data analysis 7.0 进行数据分析获得结合解离平衡常数 K_D 。

[65] 结果及结论: hAAG5D8 与人 PD-L1 的结合解离平衡常数 K_D 值和亲和

力结合解离曲线分别如表 7 和图 1 所示。实验结果表明，hAAG5D8 亲和力与人 PD-L1 亲和力远高于 PD-L1 与 PD-1 的亲和力 8.2 μ M (Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology , Hyun Tae Lee 等 , Molecules 2019, 24, 1190; doi:10.3390/molecules24061190, 2019 年 3 月 26 日, 第 4 页最后 1 段)。

表 7 抗 PD-L1 抗体结合 PD-L1 的亲动力学常数

主要参数	K _D (M)
亲和动力学常数	7.62E-11±3.32E-11

[66] 实施例 3 hAAG5D8 与人 PD-1 的竞争结合

[67] 采用 ELISA 法检测 hAAG5D8 竞争 PD-1 结合 PD-L1 的能力。用包被缓冲液 (6mM Na₂CO₃, 14mM NaHCO₃) 稀释 PD-L1 (Fc Tag) 至 1 μ g/mL, 每孔加入 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 洗板, 每孔加入 250 μ L 封闭液封闭 (3%BSA/PBST) 25 $^{\circ}$ C 封闭 2h, PBST 洗板, 每孔加入 50 μ L 浓度为 6 μ g/mL 的人 PD-1, 同时加入 50 μ L 梯度稀释的 hAAG5D8 溶液 (浓度为 8000ng/mL、2000ng/mL、500ng/mL、250ng/mL、125ng/mL、62.5ng/mL、31.25ng/mL、6.25ng/mL、1.25ng/mL) 混匀后 25 $^{\circ}$ C 孵育 2h, PBST 洗板, 每孔加入 100 μ L 酶标二抗 (1: 5000 比例稀释的羊抗人 IgG-Fc-HRP) 25 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 显色, 在 450 nm 处读数, 并用四参数方程进行曲线拟合, 计算 EC₅₀ 值。

[68] 结果及结论: hAAG5D8 竞争结合人 PD-L1 的 EC₅₀ 值和竞争结合曲线分别如表 8 和图 2 所示。实验结果表明, hAAG5D8 能够有效阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合。

表 8 hAAG5D8 与人 PD-1 的竞争结合 (pM, Mean±SD)

主要参数	抗 PD-L1 抗体
与人 PD-1 竞争 EC ₅₀	715.56±61.58

[69] 实施例 4 hAAG5D8 与多种其他 B7 家族蛋白的亲和力

[70] 采用 ELISA 法检测了 hAAG5D8 与多种其他 B7 家族蛋白的亲和力 (PD-L1、PD-L2、B7-H3、PD-1 及 CD80)。用包被缓冲液 (6mM Na₂CO₃, 14mM NaHCO₃) 稀释 hAAG5D8 至 100 ng/mL, 每孔加入 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 洗板, 每孔加入 250 μ L 封闭液封闭 (3%BSA/PBST) 25 $^{\circ}$ C 封闭

2h, PBST 洗板, 每孔加入 100 μ L 浓度为 5 μ g/mL 的蛋白样品 (rhPD-L1, rhPD-L2, rhB7-H3, rhPD-1 及 rhCD80) 25 $^{\circ}$ C 孵育 2h, PBST 洗板, 每孔加入 100 μ L 酶标二抗 (1: 5000 比例稀释二抗 Anti-His-tag) 25 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBST 洗板, 显色, 在 450 nm 处读数。

5 [71] 结果及结论: hAAG5D8 与 B7 家族蛋白 (PD-L1、PD-L2、B7-H3、PD-1 及 CD80) 的结合如图 3 所示。结果表明, hAAG5D8 能够特异性的结合 PD-L1 不结合 PD-L2, hAAG5D8 也不与同家族具有相关功能的其他蛋白结合 (B7-H3, PD-1, CD80), 由此可知 hAAG5D8 与 PD-L1 的结合具有极高的特异性。

10 [72] 实施例 5 hAAG5D8 对人非小细胞肺癌 HCC827 NCG 小鼠皮下移植瘤的疗效研究

[73] 取 12 只周龄 4-5 周, 体重 20-26g, 高度免疫缺陷的雄性 NCG 小鼠 (购自南京大学模式动物研究中心), 分别自尾静脉注射 100 μ L 人外周血单个核细胞 PBMC (1×10^7 细胞/100 μ L, 分离自健康捐献者血液), 尾静脉注射 3 天后于小鼠右侧皮下接种人非小细胞肺癌 HCC827 细胞 (ATCC), 接种后 3 天 (平均瘤体积为 57mm³), 将小鼠随机分为 3 个组 (A-1 组、A-2 组、A-3 组), 每组 4 只, 按照表 9 所示的给药方案给药。实验同时设置阳性对照和阴性对照, 阳性对照为 MPDL3820A (即 Atezolizumab), 阴性对照为 Human IgG1 (中美冠科 (太仓) 有限公司, 批号为 AB160083)。第 4 次给药后当天 (即肿瘤细胞接种后第 13 天), 将实验小鼠 CO₂ 安乐死后取瘤, 分别计算相对肿瘤抑制率 (TGI_{RTV}) 和肿瘤增长抑制率 (TGI _{Δ TV}) 进行药效评价。

25 [74] 相对肿瘤抑制率的计算公式为: $TGI_{RTV} = 1 - T_{RTV} / C_{RTV}$ (%)。(其中, T_{RTV} 为阳性对照组或治疗组在某一特定时间点的相对肿瘤体积 (TV); C_{RTV} 为阴性对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积; T_{RTV} / C_{RTV} 为阳性对照组或治疗组和阴性对照组相对肿瘤体积的百分比值; $RTV = V_t / V_0$, V_0 为分组时该动物的瘤体积, V_t 为治疗后该动物的瘤体积。);

30 [75] 肿瘤增长抑制率的计算公式为: $TGI_{\Delta TV} \% = (1 - \Delta T / \Delta C) \times 100\%$ 。(其中, ΔT = 阳性对照组或治疗组某一特定时间点的平均肿瘤体积 - 阳性对照组或治疗组给药起始的平均肿瘤体积, ΔC = 阴性对照组某一特定时间点的平均肿瘤体积 - 阴性对照组给药起始的平均肿瘤体积。)

[76] 结果及结论: hAAG5D8 对人非小细胞肺癌模型肿瘤抑制作用分别如

表 10 和图 4 所示，其中表 10 为 hAAG5D8 对人非小细胞肺癌细胞的相对肿瘤抑制率和肿瘤增长抑制率，图 4 为给药后的肿瘤生长曲线图。实验结果表明，hAAG5D8 对人非小细胞肺癌肿瘤有显著的抑制作用。

表 9 hAAG5D8 对人非小细胞肺癌肿瘤抑制活性研究给药方案

组别	给药对象	给药组	给药剂量(mg/kg)	给药方式	给药体积	给药周期
1	A-1 组	Human IgG1	5	静脉注射	10μl/g	BIW×4 次
2	A-2 组	MPDL3820A	5	静脉注射	10μl/g	BIW×4 次
3	A-3 组	hAAG5D8	5	静脉注射	10μl/g	BIW×4 次

注：第 1 组为阴性对照组，第 2 组为阳性对照组，第 3 组为治疗组。

表 10 hAAG5D8 对人非小细胞肺癌肿瘤细胞的相对肿瘤抑制率和肿瘤增长抑制率

给药组	TGI _{RTV} (%)	TGI _{ΔTV} (%)
Human IgG1(5mg/kg)	--	--
MPDL3820A(5mg/kg)	25.3	49.5
hAAG5D8 (5mg/kg)	35.9	63.3

[77] 实施例 6 hAAG5D8 对小鼠结直肠癌 MC38 转基因小鼠皮下移植瘤疗效的研究

[78] 人 PD-1 的转基因雌性 C57 小鼠 30 只（同济大学动物实验中心），每只小鼠在左侧腹皮下植入 3×10⁶ 个表达人 PD-L1 的小鼠结直肠癌细胞（同济大学，细胞代号 MC38-hPD-L1），待肿瘤体积生长至约 100 mm³ 左右时，将上述小鼠随机分为 5 组：C-1 组（阴性对照组、PBS，6 只）、C-2 组（阳性对照组、Atezolizumab、3mg/kg，6 只）、C-3 组（给药组、hAAG5D8、1mg/kg，6 只）、C-4 组（给药组、hAAG5D8、3mg/kg，6 只）、C-5 组（给药组、hAAG5D8、9mg/kg，6 只），每周腹腔给药 2 次，共 5 次。每周测两次肿瘤体积，直至给药开始后第 16 天。

[79] 计算公式：

[80] 肿瘤体积：TV=D1×D2²/2，其中 D1、D2 分别表示瘤长径、瘤短径；

- [81] 相对肿瘤体积： $RTV=T_{VT}/T_{V1}$ ，其中 T_{V1} 为给药前肿瘤体积， T_{VT} 为每次测量时肿瘤体积；
- [82] 相对肿瘤增殖率： $T/C(\%)=T_{RTV}/C_{RTV}\times 100\%$ ， T_{RTV} 表示给药组或阳性对照组 RTV， C_{RTV} 表示 阴性对照组 RTV；
- 5 [83] 相对肿瘤抑制率： $TGI_{RTV}(\%)=(1-T_{RTV}/C_{RTV})\times 100\%$ 。
- [84] 结果及结论：hAAG5D8 对小鼠结直肠癌肿瘤抑制作用分别如表 11 和图 5 所示，结果表明，在浓度为 3mg/kg 及以上剂量 hAAG5D8 对小鼠结直肠癌皮下移植瘤具有显著的抑瘤作用。在同样 3mg/kg 剂量时，抗 PD-L1 抗体的抑瘤作用已经显著优于 Atezolizumab 的抑瘤效果。

10 表 11 给药后荷瘤鼠肿瘤体积变化

组别	剂量 (mg/kg)	肿瘤体积 TV (mm ³)		$T_{RTV}/C_{RTV}(\%)$	$TGI_{RTV}(\%)$
		D0	D16		
PBS	--	99.9±13.2	1974.2±413.2	--	--
Atezolizumab	3	95.9±16.8	1111.6±435.2*	53	47
hAAG5D8	1	95.5±9.8	1138.8±144.9*	64	36
hAAG5D8	3	90.7±12.4	664.8±92.0**	39	61
hAAG5D8	9	91.2±15.9	319.1±190.4**	14	86

注：给药当天定义为 D0；*P<0.05, **P<0.01 vs PBS

参考文献：

1. CHEN L, FLIES D B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition [J]. Nature reviews Immunology, 2013, 13(4): 227-42.

15 2. OHAEBULAM K C, ASSAL A, LAZAR-MOLNAR E, et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway [J]. Trends in molecular medicine, 2015, 21(1): 24-33.

3. ISHIDA M, IWAI Y, TANAKA Y, et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an

inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues [J]. Immunology letters, 2002, 84(1): 57-62.

4. TAUBE J M, ANDERS R A, YOUNG G D, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape [J]. Science translational medicine, 2012, 4(127): 127ra37.
5. TSENG S Y, OTSUJI M, GORSKI K, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells [J]. The Journal of experimental medicine, 2001, 193(7): 839-46.
6. BUTTE M J, KEIR M E, PHAMDUY T B, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses [J]. Immunity, 2007, 27(1): 111-22.
7. CHENG X, VEVERKA V, RADHAKRISHNAN A, et al. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor [J]. The Journal of biological chemistry, 2013, 288(17): 11771-85.
8. 刘安, PD-1/PD-L1 通路小分子抑制剂的发现[D], 吉林: 吉林大学药学院, 2016, 15.