

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 4 月 7 日 (07.04.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/068775 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) *A61P 31/06* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) *A61P 31/18* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61P 31/20* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/121022

(22) 国际申请日: 2021 年 9 月 27 日 (27.09.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202011049435.7 2020年9月29日 (29.09.2020) CN

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(71) 申请人: 锋宏生物医药科技(昆山)有
限公司(FUNWICK BIOMEDICAL TECHNOLOGY
(KUNSHAN) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省
苏州市昆山市千灯镇玉溪路38号,
Jiangsu 215341 (CN)。

(72) 发明人: 周军(ZHOU, Jun); 中国江苏省苏州市昆
山市千灯镇玉溪路38号, Jiangsu 215341 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司
(XU&PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀
区真北路958号天地科技广场1号楼106
室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: ANTI-PD-L1 ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗PD-L1抗体及其用途

(57) Abstract: Provided in the present invention are a PD-L1 antibody and a use thereof; the antibody or an active fragment thereof does not block the binding of PD-1 with PD-L1, and specifically targets the IgC-like region of PD-L1. The non-blocking PD-L1 antibody of the present invention can circumvent SPD-L1 to the maximum extent, and has the activity of inducing ADCC/CDC functional effects whilst also having excellent anti-tumour activity.

(57) 摘要: 本发明提供了PD-L1抗体及其用途, 该抗体或其活性片段不阻断PD-1与PD-L1的结合, 并且特异性靶向PD-L1的泛IgC区段。本发明的非阻断型PD-L1抗体能最大限度地规避sPD-L1, 且具有诱导ADCC/CDC功能效应的活性, 同时具有优异的抗肿瘤活性。



WO 2022/068775 A1

抗 PD-L1 抗体及其用途

技术领域

本发明涉及肿瘤免疫学领域，更具体地涉及一类抗 PD-L1 泛 IgC 区段又诱导 ADCC/CDC 功能效应的抗体。

背景技术

在过去的十年里，各种肿瘤免疫检查点抗体阻断剂，如伊匹单抗 (ipilimumab) (CTLA4 阻断抗体)、派姆单抗 / 纳武单抗 (pembrolizumab/nivolumab) (PD-1 阻断抗体) 和阿特珠单抗 (atezolizumab) (PD-L1 阻断抗体)，在临床上的运用有了里程碑的突破。因此，美国科学家 James Allison 首先提出免疫检查点阻断 (Check-point blockade) 这一个普遍接受的概念。在不同的临床指征中，病人的治疗反应率差异很大。在最常见的实体瘤患者群中，这种治疗反应率有限，大概在 20% 左右。

PD1/PD-L1 通路是重要的免疫检查点之一。PD-L1 (程序性死亡配体 1) 是膜蛋白，它主要通过树突状细胞和单核细胞表达。它的受体是 PD-1 (程序性死亡蛋白受体 1)，通过激活的 T 细胞、B 细胞、树突状和单核细胞表达。当 T 细胞识别并结合组织相关抗原时，T 细胞被激活而表达 PD-1。PD-L1 结合 PD-1 抑制 T 细胞的活化而导致免疫功能低下。研究发现各种不同类型的肿瘤也表达 PD-L1。

研究进一步表明，PD-1 与 PD-L1 的相互作用是通过结合 PD-L1 的 IgV 功能区域 (氨基酸 19-127) 来实现的。阿特珠单抗的重链通过氢键结合 PD-L1 抗原决定基团 E58、Q66、V111、R113 和 R125；并且抗原决定基团 I54、Y56、N63、V111、M115、S117、A121、和 Y123 在 PD-L1 的 CC'FG 质片内通过范德瓦尔斯力 (van der Waals) 与重链互补决定区 (HCDRs) 结合。尽管不同 PD-L1 抗体如阿特珠单抗、德瓦鲁单抗 (durvalumab)、BMS-963559 和阿利库单抗 (avelumab) 识别不同抗原决定基团，但它们都作用于 PD-L1 的 IgV 功能区域。它们与 PD-1 竞争相同的抗原表位，其目的都是阻断 PD-L1 与 PD-1 的相互作用。目前，国内 PD-L1 抗体的研发也是基于免疫检查点阻断概念，但临床应用还没有被批准。

由免疫检查点阻断引起的治疗反应在某种程度上取决于肿瘤的特性，如肿瘤特异性免疫反应的产生、肿瘤内免疫抑制性微环境的形成和肿瘤对免疫反应的敏感度。研究发现肿瘤病人血清中存在可溶性 PD-L1 (sPD-L1)。高水平 sPD-L1

存在于侵袭性肾细胞癌、多发性骨髓瘤和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤，而且与低存活率相关。最近的研究发现，皮肤黑色素瘤细胞有四个 PD-L1 剪接变异体，它们是导致 sPD-L1 分泌的原因。sPD-L1 的分泌与剪接活性、细胞因子的刺激、细胞的应激反应、以及细胞的损伤和死亡有关。膜性 PD-L1 的表达与 sPD-L1 的分泌成正比关系。而且，各种不同类型肿瘤细胞普遍具有 PD-L1 剪接活性和分泌 sPD-L1 的功能，其中最为常见或表达量最多的是 PD-L1-3/12 和 PD-L1-9。PD-L1-3/12 和 PD-L1-9 氨基酸全长分别是氨基酸 19-178 和氨基酸 19-243。很显然分泌型 sPD-L1 都含有 IgV，即为现有阻断型 PD-L1 抗体识别区。

目前，研究进一步发现肿瘤分泌的 sPD-L1 剪接变异体可做为“诱饵”来结合 PD-L1 抗体并产生耐药性。仅 1%的肿瘤细胞分泌的 sPD-L1 就可完全废除 PD-L1 抗体的抗肿瘤作用。在 PD-L1 抗体治疗中，sPD-L1 的分泌与肿瘤患者的复发有关。这表明肿瘤分泌的 sPD-L1 可能是 PD-L1 阻断抗体治疗肿瘤的障碍，或是其重要的耐药机制之一。

综上所述，本领域迫切需要开发一类更有效的抗 sPD-L1 分泌型耐药的剂，其能最大限度地规避 sPD-L1，增强 Fc 段诱导的 ADCC/CDC 活性，并具有抗肿瘤作用的 PD-L1 特异性单克隆抗体。

发明内容

本发明的目的是提供一类抗 PD-L1 的泛 IgC 区段又诱导 ADCC/CDC 功能效应的、抗肿瘤和抗 sPD-L1 分泌型耐药的 PD-L1 抗体。

本发明的第一方面，提供了一种 PD-L1 抗体或其活性片段，所述抗体不阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合，并且所述抗体特异性结合于 PD-L1 的泛 IgC 区段，且具有诱导 ADCC/CDC 功能效应的活性。

在另一优选例中，所述的抗体不结合于 PD-L1 的 IgV 功能区域(即氨基酸 19-127)。

在另一优选例中，所述抗体不与 PD-1 竞争结合 PD-L1 的 IgV 功能区域。

在另一优选例中，所述抗体不与 PD-1 竞争结合 PD-L1 的 IgV 功能区域的相同的抗原表位。

在另一优选例中，所述的抗体对可溶性 PD-L1 (sPD-L1) 蛋白不结合或亲和力低下。

在另一优选例中，所述的抗体不结合于可溶性 PD-L1 蛋白 PD-L1-3。

在另一优选例中,所述的抗体对PD-L1-9的结合力 P_1 远低于抗体130021(参照抗体)对PD-L1-9的结合力 P_0 ,较佳地 $P_1/P_0 \leq 1/5$,更佳地 $\leq 1/10$,更佳地 $\leq 1/100$ 。

在另一优选例中,所述对可溶性PD-L1蛋白亲和力低下的抗体包括:

5 PD-L1-1和PD-L1-9。

在另一优选例中,所述抗体对可溶性PD-L1(sPD-L1)蛋白不结合或部分结合。

在另一优选例中,所述抗体不结合的可溶性PD-L1蛋白包括:PD-L1-3。

在另一优选例中,所述抗体部分结合的可溶性PD-L1蛋白包括:PD-L1-1、
10 和PD-L1-9。

所述的抗体是非阻断型抗体,不结合于PD-L1的任一氨基酸位点:

(i) E58、Q66、V111、R113、R125;和

(ii) I54、Y56、N63、V111、M115、S117、A121、和Y123。

在另一优选例中,所述的一种PD-L1抗体或其活性片段,包含:

15 (a)氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示的LCDR1、SEQ ID NO: 17所示的LCDR2、SEQ ID NO: 18所示的LCDR3;以及

(b)氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示的HCDR1、SEQ ID NO: 13所示的HCDR2和SEQ ID NO: 14所示的HCDR3。

其中,所述抗体特异性结合于PD-L1的泛IgC区段。

20 在另一优选例中,泛IgC区段为PD-L1蛋白的IgC区段和其与细胞膜的连接段区域,其中所述的区域由PD-L1蛋白的氨基酸残基132~238组成。

在另一优选例中,所述PD-L1抗体或其活性片段诱导ADCC/CDC功能效应进而杀伤肿瘤。

25 其中,上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并能够保留PD-L1结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中,上述任一CDR的氨基酸序列中包含经过添加、缺失、修饰和/或取代1、2或3个氨基酸的衍生CDR序列,并且使得含有所述衍生CDR序列的VH和VL所构成的衍生抗体能够保留与PD-L1结合的亲和力。

30 在另一优选例中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量为1-5个(如1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)。

在另一优选例中,所述的经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基

酸的，并能够保留 PD-L1 结合亲和力的衍生序列为同源性或序列相同性为至少 96% 的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述 PD-L1 抗体或其活性片段包含重链可变区域或轻链可变区域，所述重链可变区的多肽序列与 SEQ ID NO: 11、20、21、22、23、24 或 25 至少 95% 相同，所述轻链可变区的多肽序列与 SEQ ID NO: 15、26、27、28、29 或 30 至少 95% 相同。

在另一优选例中，所述的 PD-L1 抗体或其活性片段，包含：具有 SEQ ID NO: 11、20、21、22、23、24 或 25 所示多肽序列的重链可变区，和具有 SEQ ID NO: 15、26、27、28、29 或 30 所示多肽序列的轻链可变区。

在另一优选例中，所述 PD-L1 抗体或其活性片段包含选自下组的重链可变区和轻链可变区：

(1) 如 SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区；和如 SEQ ID NO: 27 所示的轻链可变区；

(2) 如 SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区；和如 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区；

(3) 如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区；和如 SEQ ID NO: 29 所示的轻链可变区；

(4) 如 SEQ ID NO: 24 所示的重链可变区；和如 SEQ ID NO: 29 所示的轻链可变区；

(5) 如 SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区；和如 SEQ ID NO: 29 所示的轻链可变区；

(6) 如 SEQ ID NO: 24 所示的重链可变区；和如 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区；和

(7) 如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区；和如 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。

在另一优选例中，所述重链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO. 11、20、21、22、23、24 或 25 所示的氨基酸序列至少有 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同源性或序列相同性。

在另一优选例中，所述轻链可变区的氨基酸序列与如序列表中 SEQ ID NO. 15、26、27、28、29 或 30 所示的氨基酸序列至少有 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同源性或序列相同性。

在另一优选例中，所述 PD-L1 抗体或其活性片段是嵌合的。

在另一优选例中，所述 PD-L1 抗体或其活性片段是人源化的。

本发明的第二方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白具有：

- (i) 如本发明的第一方面所述的 PD-L1 抗体或其活性片段；以及
- (ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中，所述的标签序列包括 6His 标签。

在另一优选例中，所述的重组蛋白特异性抗 PD-L1 蛋白。

本发明的第三方面，提供了一种多核苷酸，编码本发明第一方面所述的 PD-L1 抗体或其活性片段，或本发明第二方面所述的重组蛋白。

本发明的第四方面，提供了一种载体，它含有本发明的第三方面所述的多核苷酸。

在另一优选例中，所述的载体包括：细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

本发明的第五方面，提供了一种遗传工程化的宿主细胞，它含有本发明的第四方面所述的载体或基因组中整合有本发明的第三方面所述的多核苷酸。

本发明的第六方面，提供了一种免疫偶联物，该免疫偶联物含有：

- (a) 如本发明第一方面所述的 PD-L1 抗体或其活性片段；和
- (b) 选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。

本发明的第七方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有：

- (a) 编码本发明的第一方面所述的 PD-L1 抗体或其活性片段，或如本发明第二方面所述的重组蛋白，或如本发明的第六方面所述的免疫偶联物；以及
- (b) 药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的药物组合物还含有：额外的活性成分，较佳地所述的活性成分包括：小分子化合物、细胞因子、抗体（如抗 PD-1 抗体、抗 OX40 抗体、抗 CD137 抗体、抗 CD47 抗体、ADC、CAR-免疫细胞）。

在另一优选例中，所述的药物组合物为注射剂型。

在另一优选例中，所述的药物组合物用于制备治疗肿瘤的药物，所述的肿瘤选自下组：膀胱癌、脑癌如胶质瘤，如低度胶质瘤、胶质母细胞瘤、宫颈癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性粒细胞白血病(CML)、多发性骨髓瘤、骨髓衍生肿瘤、甲状腺癌。

在另一优选例中，所述药物组合物用于制备治疗感染性疾病的药物，所述感染性疾病包括感染性病毒疾病、感染性细菌疾病或感染性真菌疾病。

在另一优选例中，所述感染性疾病中，感染病灶或被感染的宿主细胞表达PD-L1（HIV、肝炎病毒、结核杆菌）。

在另一优选例中，所述感染性病毒疾病由选自以下的病原体引起：HIV、肝炎病毒（甲、乙、丙）、疱疹病毒、腺病毒、流感病毒、虫媒病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、流行性腮腺病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、JC病毒、虫媒病毒、和脑炎病毒。

在另一优选例中，所述的感染性细菌疾病由选自以下的病原体引起：结核杆菌、衣原体、立克次氏体菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌、淋球菌、克雷伯氏杆菌、变形菌、雷氏菌、假单胞菌、军团菌、白喉杆菌、沙门氏菌、芽孢杆菌、霍乱杆菌、破伤风杆菌、肉毒杆菌、炭疽杆菌、鼠疫杆菌、钩端螺旋体、和莱姆病细菌。

在另一优选例中，所述的感染性真菌疾病由选自以下的病原体引起：假丝酵母、新型隐球菌、曲霉菌、毛霉菌、申克孢子丝菌、皮炎芽生菌、巴西副球孢子菌、粗球孢子菌、和荚膜组织胞浆菌。在另一优选例中，所述感染性疾病由选自以下的病原体引起：HIV、肝炎病毒、流感病毒、疱疹病毒、贾第虫、疟原虫、利什曼原虫、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌。

在另一优选例中，所述感染性疾病由选自以下的病原体引起：HIV、肝炎病毒（甲、乙、丙）和结核杆菌。

在另一优选例中，所述的组合物可与另一种肿瘤免疫治疗联用，包括但不限于：化疗、抗CD20 mAb、抗TIM-3 mAb、抗LAG-3 mAb、抗CD73 mAb、抗CD47 mAb、抗DLL3 mAb、抗FRmAb mAb、抗CTLA-4抗体、抗OX40抗体、抗CD137

抗体、抗 PD-1 抗体、PD-1/PD-L1 治疗、其他免疫肿瘤药物、抗血管生成剂、放射治疗、抗体-药物偶联物(ADC)、靶向治疗或其他抗癌药物。

在另一优选例中，所述的药物组合物，靶向有需要的受试者的癌细胞表面 PD-L1、或增强 ADCC/CDC 作用的方法，包括给所述对象施用本发明的第七方面
5 所述的药物组合物。

本发明的第八方面，提供了一种检测样品中 PD-L1 蛋白的方法，所述方法包括步骤：

- (1) 从受试者获得样品；
- (2) 使样品与本发明第一方面所述的 PD-L1 抗体或其活性片段接触；
- 10 (3) 确定受试者中 PD-L1 的水平。

在另一优选例中，所述方法是非治疗和非诊断的。

在另一优选例中，所述方法为体外检测。

本发明的第九方面，提供了一种检测 PD-L1 的试剂盒，所述试剂盒含有选自下组的一种或多种：如本发明第一方面所述的 PD-L1 抗体或其活性片段、或
15 如本发明的第六方面所述的免疫偶联物，如本发明的第七方面所述的药物组合物，以及说明书。

在另一优选例中，所述的说明书记载，所述的试剂盒用于检测待测对象的 PD-L1 表达。

20 在另一优选例中，所述的试剂盒用于表达 PD-L1 蛋白(即 PD-L1 阳性)的肿瘤的检测。

在本发明的第十方面，提供了一种免疫细胞，所述免疫细胞表达或在细胞膜外暴露有本发明的第一方面所述的抗体。

25 在另一优选例中，所述的免疫细胞包括 NK 细胞、T 细胞。

在另一优选例中，所述的免疫细胞来自人或非人哺乳动物(如鼠)。

本发明的第十一方面，提供了一种治疗 PD-L1 表达或功能异常相关的疾病的方法，所述方法包括向有需要的对象施用药学有效量的如本发明第一方面所
30 述的 PD-L1 抗体，本发明的第六方面所述的免疫偶联物，或如本发明的第七方面所述的药物组合物，本发明的第十方面所述的免疫细胞，或其组合。

在另一优选例中，所述 PD-L1 表达或功能异常相关的疾病为肿瘤或感染性

疾病。

在另一优选例中，所述的 PD-L1 抗体可单独使用、或与其他治疗剂联合施用。

在另一优选例中，所述其他治疗剂包括免疫检查点阻断剂、佐剂或疫苗。

5

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

10 附图说明

图 1 中 A 图显示了 PD-L1 的全长和它的剪接变异体 sPD-L1-3 或 12，sPD-L1-9 的氨基酸区域，已知 PD-L1 抗体的识别区域和 PD-L1 鼠单克隆抗体 mAb#19 和其人源化抗体的抗原表位。B 图显示了人源 PD-L1 IgC 及其与细胞膜的连接段氨基酸序列。其中下划点段表示信号肽段，下划双线段表示 IgV (氨基酸 19-127)，下划单线段表示 IgC 及其与细胞膜的连接段(氨基酸 132-238)，下划短线加下划点线段表示跨膜结构域(氨基酸 239-259)，下划波浪线段表示胞内结构域(氨基酸 260-290)。

图 2 显示了人源 PD-L1 剪接变异体的示意图。其中 A 图表示 PD-L1 全长含有六个外显子，PD-L1-1、PD-L1-3、PD-L1-9 和 PD-L1-12 分别为剪接变异体，跨膜区位于第四外显子并以粉红色标示，剪除段以括弧标示，Stop 代表终止密码子。B 图分别表示全长膜型 PD-L1、剪接变异体 PD-L1-1、PD-L1-3、PD-L1-9 和 PD-L1-12 的核酸和氨基酸序列，其中跨膜区在外显子 4 区段内以粉红色标示，剪除段以红色括弧标示，每一个剪接变异体的氨基酸序列以蓝色标示，下划线表示额外不同的氨基酸。

图 3 显示了 PD-L1 鼠单克隆抗体对人源 PD-L1 和泛 IgC 的结合力。其中 A 图显示了流式细胞术检测 PD-L1 鼠单克隆抗体 130021(R&D systems, 美国)和 29E. 2A3(Biolegend, 美国)对人源 PD-L1 和泛 IgC 的结合力。其中，抗体 130021 结合 PD-L1 和泛 IgC；抗体 29E. 2A3 仅结合 PD-L1 而不识别泛 IgC 段，表明它的识别区只在 IgV；克隆 24F. 10C12(Biolegend)为人源 PD-L2 鼠单抗；B 图显示了 PD-L1 鼠单克隆抗体的细胞流式筛选图，其中筛选的 5 个 PD-L1 鼠单克隆抗体 mAb#4、mAb#11、mAb#15、mAb#19 和 mAb#23 既能结合 PD-L1 也能识别泛 IgC。其中，PD-L1 PE 表示 PE 荧光标记 PD-L1 抗体。

图 4 显示了 PD-L1 鼠单克隆抗体对重组蛋白 rPD-L1 的亲合力。其中 A 图显示了 ELISA 检测 5 个 PD-L1 鼠单克隆抗体 mAb#4、mAb#11、mAb#15、mAb#19 和 mAb#23 与重组蛋白 PD-L1 的亲合力；B 图显示了流式细胞术检测重组蛋白 rPD-L1-3-HIS 和 rPD-L1-9-HIS 对 5 个 PD-L1 鼠单克隆抗体 mAb#4、mAb#11、mAb#15、mAb#19 和 mAb#23 的阻断作用；C 图显示了流式细胞术检测不同浓度的重组蛋白 rPD-L1-9-HIS 对鼠单克隆抗体#19 结合 PD-L1 的影响。

图 5 显示了 ELISA 检测 PD-L1 鼠单克隆抗体#19 对自然形态 sPD-L1 的亲合力。其中 A 图显示了鼠单克隆抗体 mAb#19 对细胞培养上清中 sPD-L1-3 与 sPD-L1-9 的亲合力，B 图显示了鼠单克隆抗体 mAb#19 对细胞培养上清中 sPD-L1-3 的亲合力，C 图显示了鼠单克隆抗体 mAb#19 对细胞培养上清中 sPD-L1-9 的亲合力。其中，Blank 表示培养液阴性对照。

图 6 显示了 PD-L1 鼠单克隆抗体#19 在表达人源 PD-L1 和 sPD-L1-9 的 MC38 小鼠肿瘤模型上的抗肿瘤作用，其中 A 图表示不同天数下小鼠的肿瘤大小，以肿瘤容积平均值±标准误表示；B 图表示不同天数下小鼠的存活率。

图 7 显示了鼠单抗#19 人源化。不同重 (A) 轻 (B) 链 Fab 氨基酸序列如图所示。mVH 和 mVL: 鼠单抗重和轻链可变区。VH 和 VL: 人源化抗体重和轻链可变区。重轻链的 CDR 区以红色粗体字和下划线表示。

图 8 显示了鼠单抗#19 人源化，不同重 (H) 轻 (L) 链组合对膜型和分泌型 PD-L1，以及对泛 IgC 的亲合力。

图 9 显示了鼠单抗#19 人源化，不同重 (H) 轻 (L) 链组合对膜型 PD-L2 (人源) 的亲合力。通过细胞流式检测克隆#19 人源化抗体对膜型 PD-L2 (A, 以 MFI 图示; B, 以点图示) 的亲合力。C: CHO-K1 亲本细胞, 为阴性对照。克隆 24F.10C12: 人源 PD-L2 鼠单抗。二抗: PE 标记的羊抗鼠抗体 (BD biosciences, 美国)。

图 10 显示了鼠单抗#19 人源化，不同重 (H) 轻 (L) 链组合对膜型 CD80 (人源) 的亲合力。通过细胞流式检测克隆#19 人源化抗体对膜型 CD80 (A, 以 MFI 图示; B, 以点图示) 的亲合力。C: CHO-K1 亲本细胞, 为阴性对照。克隆 2D10: 人源 CD80 鼠单抗克隆 (Elabscience, 武汉)。二抗: PE 标记的羊抗鼠抗体 (BD biosciences)。

图 11 显示了人源化抗体 H6L2, 在无或有 rPD-L1-9-HIS 条件下, 对膜型 PD-L1 的亲合力。通过细胞流式检测人源化抗体 H6L2 对膜型 PD-L1 亲合力 (A), 和不同浓度的 rPD-L1-9-HIS 对 H6L2 亲和力的影响 (B, 以 MFI 图示, 和 C, 以

点图示)，同时，对比阿利库单抗(Avelumab)和阿特殊单抗(Atezolizumab)。

图 12 显示了人源化抗体 H6L2,在有或 rPD-L1-3-HIS 条件下,对膜型 PD-L1 的亲合力。通过细胞流式检测不同浓度的 rPD-L1-3-HIS 对 H6L2 亲和力的影响 (A, 以 MFI 图示, 和 B, 以点图示) , 同时, 对比阿利库单抗(Avelumab)

5 和阿特殊单抗(Atezolizumab)。

图 13 显示了人源化抗体 H6L2 对 PD-1 与 PD-L1 结合的阻断作用。

图 14 显示了人源化抗体 H6L2 的 ADCC 活性和分泌型 sPD-L1 对其 ADCC 作用的影响。在 Jurkat-CD16-NFAT-Luciferase 平台, 无(A)和有(B)分泌型 sPD-L1(重组蛋白 rPDL1-3-HIS 或 rPDL1-9-HIS)条件下, 检测#19 人源化抗体
10 诱导 Luciferase(萤光素酶)的活性能力, 同时, 对比阿利库单抗(Avelumab)。

图 15 显示了人源化抗体 H6L2 的抗肿瘤作用。A. 肿瘤大小, 以各组肿瘤容积的平均值±标准误表示。B. 生存率。PBS 和阿利库单抗(Avelumab)分别为阴和阳性对照组。

图 16 显示了抗人源 PD-L1 抗体阿特殊单抗对自然形态的 sPD-L1 的结合力。
15 ELISA 检测抗人源 PD-L1 抗体阿特殊单抗与自然形态的 sPD-L1 的结合力。其中, BL 表示无 sPD-L1 上清, 做为背景对照; ate treated 表示通过阿特殊单抗处理; hIgG1 treated 表示通过人源 hIgG1 处理; sPD-L1-3 或 sPD-L1-9 分别表示含有 sPD-L1-3 或 sPD-L1-9 的上清液

图 17 显示了人源 PD-L1 抗体 avelumab 和 atezolizumab 对 PD-1 与 PD-L1
20 结合的阻断作用, 以及分泌型 sPD-L1 对其阻断作用的影响。A 和 B. Avelumab (阿利库单抗) 和 Atezolizumab (阿特殊单抗) 对细胞间 PD-1 与 PD-L1 相互作用的影响; C 和 D. sPD-L1 对 Avelumab 和 Atezolizumab 阻断影响。抗体用量为 100 ng/数据点, rPD-L1-9-HIS 用量如图所示。

25 具体实施方式

本发明人经过广泛而深入地研究, 首次发现一类非阻断型 PD-L1 抗体, 所述的抗体不阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合, 然而这类非阻断型 PD-L1 抗体居然具有优异的抗肿瘤活性。研究表明, 本发明的非阻断型 PD-L1 抗体可特异性靶向 PD-L1 的泛 IgC 区间, 能最大限度地规避 sPD-L1, 同时诱导 ADCC/CDC 活性。
30 在此基础上完成了本发明。

具体地, 本发明人构建了五个特异性抗人源 PD-L1 鼠单克隆抗体, 均不结合 sPD-L1-3, 且其中一个单抗能部分规避 PD-L1 的胞外全长 sPD-L1-9, 其人

源化抗体在此方面明显优于对照抗人源 PD-L1 阿特珠和阿利库抗体。

术语

为了可以更容易地理解本公开，首先定义某些术语。如本申请中所使用的，
5 除非本文另有明确规定，否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。

在本发明中，术语“本发明的非阻断型 PD-L1 抗体”、“本发明的 PD-L1 抗体”、“本发明的特异性抗体”、“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用，都指特异性结合 PD-L1 蛋白的抗体。本发明的非阻断
10 型 PD-L1 抗体不阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合，可特异性靶向 PD-L1 的泛 IgC 区间，且具有诱导 ADCC/CDC 功能效应的活性。例如具有重链(如 SEQ ID NO: 11、20, 21, 22, 23, 24 和 25 所示的氨基酸序列)和/或轻链(如 SEQ ID NO: 15、26, 27, 28, 29 和 30 所示的氨基酸序列)的蛋白或多肽。它们可含有或不含起始甲硫氨酸。

15

泛 IgC 区段

如本文所用，IgC 区与细胞膜的连接段记为“泛 IgC 区段”，为 PD-L1 蛋白 SEQ ID No: 19 中的氨基酸 132-238 区段（图 1 中的 A 和 B）。

PD-L1 抗体

本发明提供了对人 PD-L1 蛋白具有高亲和力的 PD-L1 抗体。受测抗体表现出有效的结合和杀伤肿瘤活性，并可用于治疗 and 诊断用途。PD-L1 蛋白是 40kDa 的 I 型跨膜蛋白。其胞外部分包含 N-末端免疫球蛋白 V(IgV) 结构域(氨基酸 19~127)和 C 末端免疫球蛋白 C(IgC) 结构域(氨基酸 132~225)。如同抗体的
25 IgV 结构域和 T 细胞受体的相互作用一样，PD-1 和 PD-L1 通过它们的 IgV 结构域的保守的正面和侧面相互作用。目前的抗 PD-L1 抗体全都结合到 IgV 结构域，从而阻断 PD-1 和 PD-L1 之间的结合（图 1A 和 B）。因此，本发明揭示了一个发现：即本发明的非阻断型 PD-L1 抗体其与 PD-L1 蛋白的泛 IgC 结构域结合后可以有效地利用 PD-L1 靶点，导致治疗效果能够更进一步的改善。因此，本发明公开的一个实施方案提供了抗 PD-L1 抗体或其活性片段，该抗体或其活性片段可以特异性结合人程序性死亡配体 1 (PD-L1) 蛋白的泛免疫球蛋白 C(IgC) 结构域。本发明的抗体具有一种或多种期望的功能特性，包括但不限于与 PD-L1 的
30

高亲和力结合、对 PD-L1 的高特异性、刺激补体依赖性细胞毒性（CDC）的能力、抗体依赖性吞噬作用（ADPC）和/或针对表达 PD-L1 细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC），以及在受试者和动物模型中单独或与其他抗癌疗法联合使用时具有抑制肿瘤生长的能力。

- 5 在一些实施方案中，泛 IgC 结构域由氨基酸残基 132~238 组成。在一些实施方案中，所述抗体或其活性片段可以结合至 PD-L1 蛋白的氨基酸残基。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述 PD-L1 的氨基酸序列为：
 MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQF
 VHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY
 10 NKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINT
 TTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMD
 VKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO:19)。

其中，SEQ ID No: 19 中第 132-238 位为泛 IgC 区。

15 MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVY
WEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMI
SYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLS
GKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPN
ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
 (SEQ ID No: 19)

- 20 PD-L1 的氨基酸区段及位置如下表所示：

区段	SEQ ID No: 19 中位置	备注
信号肽	1-18	按照 SEQ ID No: 19 标识的位置
IgV 区	19-127	
IgC 区	132-225	
IgC 区与细胞膜的 连接段(泛 IgC 区)	132-238 其中, IgC: 132-225	
跨膜区	239-259	
胞内结构域	260-290	

分泌型 sPD-L1 剪接异体

本发明人首次发现分泌型 PD-L1 剪接异体，以及它们与 sPD-L1 分泌的关

系。sPD-L1 的分泌与膜型 PD-L1 的表达成正比关系，而且也与它剪接活性、细胞因子的刺激、细胞的应激反应、以及细胞的损伤和死亡有关。人源 PD-L1 剪接变异体 PD-L1-1、PD-L1-3、PD-L1-9 和 PD-L1-12 及其序列如图 2 所示(注：PD-L1-12 与 PD-L1-3 氨基酸序列相同)。其中，“分泌型 PD-L1”、“可溶性 PD-L1”、“分泌型 sPD-L1”、“sPD-L1”可互换使用，均指分泌型 PD-L1 剪接变异体。

在一个具体实施例中，自然形态的分泌型 sPD-L1 通过 MC38 细胞表达和分泌；rPD-L1-HIS 为通过 HEK293 细胞重组表达的带有 His 标签的分泌型 sPD-L1，包括 rPD-L1-3-HIS、rPD-L1-9-HIS。

在另一优选例中，成功挑选出五个特异性抗人源 PD-L1 鼠单克隆抗体，它们识别表达在细胞上的 PD-L1 和 IgC。这 5 个单抗都不结合 sPD-L1-3，其中 1 个单抗还能部分规避 sPD-L1-9，而 sPD-L1-9 是整个 PD-L1 的胞外全长，包括 IgV 和 IgC 功能段。分泌 sPD-L1-9 的小鼠肿瘤模型中的体内实验显示它具有抗耐药和抗肿瘤作用。

在另一优选例中，挑选出 PD-L1 鼠单克隆抗体#19。

抗体 130021(参照抗体),即鼠单克隆抗体 130021(R&D systems)，结合 PD-L1 的泛 IgC 区段，不与可溶性 PD-L1 蛋白中的 sPD-L1-3 结合，与 sPD-L1-9 结合。

如本文所用，术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

如本文所用，术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。

天然重链和轻链的可变区中各自包含四个 FR 区，它们大致上呈 β -折叠构型，由形成连接环的三个 CDR 相连，在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密地靠在一起并与另一链的 CDR 一起形成了抗体的抗原

结合部位(参见 Kabat 等, NIH Publ. No. 91-3242, 卷 I, 647-669 页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显不同的两类(称为 κ 和 λ)中的一类。根据其重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同的种类。主要有 5 类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,其中一些还可进一步分成亚类(同种型),如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 和 IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

如本文所用,术语“单克隆抗体(单抗)”指从一类基本均一的群体获得的抗体,即该群体中包含的单个抗体是相同的,除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地针对单个抗原位点。而且,与常规多克隆抗体制剂(通常是具有针对不同决定簇的不同抗体)不同,各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤培养来合成的,不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性,是从基本均一的抗体群中获得的,这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

本发明还包括具有所述的抗 PD-L1 蛋白单克隆抗体的相应氨基酸序列的单克隆抗体、具有所述的抗 PD-L1 蛋白单克隆抗体可变区链的单克隆抗体,以及具有这些链的其他蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物。具体地,本发明包括具有含超变区(互补决定区, CDR)的轻链和重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物),只要该超变区与本发明的轻链和重链的超变区相同或至少 90%同源性,较佳地至少 95%同源性。

如本领域技术人员所知,免疫偶联物及融合表达产物包括:药物、毒素、细胞因子(cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与所述的抗 PD-L1 蛋白单克隆抗体或其片段结合的而形成的偶联物。本发明还包括与所述的抗 PD-L1 蛋白单克隆抗体或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

本发明不仅包括完整的单克隆抗体,还包括具有免疫活性的抗体片段,如 Fab 或(Fab')₂ 片段;抗体重链;抗体轻链。

如本文所用,术语“重链可变区”与“VH”可互换使用。

如本文所用,术语“可变区”与“互补决定区(complementarity determining region, CDR)”可互换使用。

在另一个优选例中，所述抗体的重链可变区包括包括三个互补决定区 CDR1、CDR2、和 CDR3。

在另一个优选例中，所述抗体的重链包括上述重链可变区和重链恒定区，所述重链恒定区可以为鼠源或人源。

- 5 在另一优选例中，所述的抗体为抗 PD-L1 蛋白的鼠或人鼠嵌合单克隆抗体，它的重链恒定区和/或轻链恒定区可以是人源化的重链恒定区或轻链恒定区。更优选地，所述的人源化的重链恒定区或轻链恒定区为人 IgG1、IgG2 等的重链恒定区或轻链恒定区。

- 10 本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地，本发明包括具有含可变区的重链和轻链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物)，只要该可变区与本发明抗体的重链和轻链的可变区相同或至少 90% 同源性，较佳地至少 95% 同源性。

- 15 一般，抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的 3 个特定的区域来描述，称为可变区域(CDR)，将该段间隔成 4 个框架区域(FR)，4 个 FR 的氨基酸序列相对比较保守，不直接参与结合反应。这些 CDR 形成环状结构，通过其间的 FR 形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近，重链上的 CDR 和相应轻链上的 CDR 构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了 FR 或 CDR 区域。

- 20 本发明抗体的重链和/或轻链的可变区特别令人感兴趣，因为它们中至少部分涉及结合抗原。因此，本发明包括那些具有带 CDR 的单克隆抗体轻链和重链可变区的分子，只要其 CDR 与此处鉴定的 CDR 具有 90% 以上(较佳地 95% 以上，最佳地 98% 以上)的同源性。

- 25 本发明不仅包括完整的单克隆抗体，还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此，本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

- 30 如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前

导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与 6His 标签形成的融合蛋白)。根据本文所用，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

5 本发明抗体指具有 PD-L1 蛋白结合活性的、包括上述 CDR 区的多肽。该术语还包括具有与本发明抗体相同功能的、包含上述 CDR 区的多肽的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于)：一个或多个(通常为 1-50 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 20 个以内，较佳地为 10 个以内，更佳地为 5 个以内)氨基酸。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又比如，在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。

15 该多肽的变异形式包括：同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码 DNA 杂交的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

本发明还提供了其他多肽，如包含人抗体或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本发明还包括了本发明抗体的片段。通常，该片段具有本发明抗体的至少约 50 个连续氨基酸，较佳地至少约 50 个连续氨基酸，更佳地至少约 80 个连续氨基酸，最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

20 本发明还提供了编码上述抗体或其片段或其融合蛋白的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。

25 编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

30 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，较佳地至少 70%，更佳地至少 80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 $0.2 \times \text{SSC}$ ，0.1%SDS，60℃；

或(2)杂交时加有变性剂,如 50%(v/v)甲酰胺,0.1%小牛血清/0.1% Ficoll, 42℃等;或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90%以上,更好是 95%以上时才发生杂交。并且,可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

5 本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外,还可将重链的编码序列和表达标签(如 6His)融合在一起,形成融合蛋白。

10 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。

15 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明还涉及包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

20 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞;真菌细胞如酵母;果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞;CHO、COS7、293 细胞的动物细胞等。

25 用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获,用 CaCl_2 法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的 DNA 转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔,脂质体包装等。

30 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的

方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

本发明的抗体可以单独使用,也可与可检测标记物(为诊断目的)、治疗剂、PK(蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

用于诊断目的可检测标记物包括但不限于:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

可与本发明抗体结合或偶联的治疗剂包括但不限于:1.放射性核素;2.生物毒;3.细胞因子如IL-2等;4.金纳米颗粒/纳米棒;5.病毒颗粒;6.脂质体;7.纳米磁粒;8.前药激活酶(例如,DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL));10.化疗剂(例如,顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

免疫偶联物

本发明还提供了基于本发明抗体的免疫偶联物,较佳地,所述免疫偶联物为抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)。

典型地,所述抗体偶联药物包括所述抗体、以及效应分子,所述抗体与所述效应分子偶联,并优选为化学偶联。其中,所述效应分子优选为具有治疗活性的药物。此外,所述效应分子可以是毒蛋白、化疗药物、小分子药物或放射性核素中的一种或多种。

本发明抗体与所述效应分子之间可以通过偶联剂进行偶联。所述偶联剂的例子可以是非选择性偶联剂、利用羧基的偶联剂、肽链、利用二硫键的偶联剂中的任意一种或几种。所述非选择性偶联剂是指使效应分子和抗体形成共价键连接的化合物,如戊二醛等。所述利用羧基的偶联剂可以是顺乌头酸酐类偶联剂(如顺乌头酸酐)、酰基脲类偶联剂(偶联位点为酰基脲)中的任意一种或几种。

抗体上某些残基(如Cys或Lys等)用于与多种功能基团相连,其中包括成像试剂(例如发色基团和荧光基团),诊断试剂(例如MRI对比剂和放射性同位素),

稳定剂(例如乙二醇聚合物)和治疗剂。抗体可以被偶联到功能剂以形成抗体-功能剂的偶联物。功能剂(例如药物,检测试剂,稳定剂)被偶联(共价连接)至抗体上。功能剂可以直接地、或者是通过接头间接地连接于抗体。

5 抗体可以偶联药物从而形成抗体药物偶联物(ADCs)。典型地,ADC包含位于药物和抗体之间的接头。接头可以是可降解的或者是不可降解的接头。可降解的接头典型地在细胞内环境下容易降解,例如在目标位点处接头发生降解,从而使药物从抗体上释放出来。合适的可降解的接头包括,例如酶降解的接头,其中包括可以被细胞内蛋白酶(例如溶酶体蛋白酶或者内体蛋白酶)降解的含有肽基的接头,或者糖接头例如,可以被葡萄糖苷酸酶降解的含葡萄糖苷酸的接头。

10 肽基接头可以包括,例如二肽,例如缬氨酸-瓜氨酸,苯丙氨酸-赖氨酸或者缬氨酸-丙氨酸。其它合适的可降解的接头包括,例如,pH敏感接头(例如pH小于5.5时水解的接头,例如脲接头)和在还原条件下会降解的接头(例如二硫键接头)。不可降解的接头典型地在抗体被蛋白酶水解的条件下释放药物。

15 药物可以是任何细胞毒性,抑制细胞生长或者免疫抑制的药物。在实施方式中,接头连接抗体和药物,而药物具有可以和接头成键的功能性基团。例如,药物可以具有可以和连接物成键的氨基,羧基,巯基,羟基,或者酮基。在药物直接连接到接头的情况下,药物在连接到抗体之前,具有反应的活性基团。

有用的药物类别包括,例如,抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。特别有用的细胞毒性药物类的例子包括,

20 例如,DNA小沟结合试剂、DNA烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如DM1和DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs),吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑烷并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))和长春花生物碱(vinca alkaloids)。

25

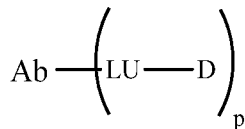
在本发明中,药物-接头可以用于在一个简单步骤中形成ADC。在其它实施方式中,双功能连接物化合物可以用于在两步或多步方法中形成ADC。例如,半胱氨酸残基在第一步骤中与接头的反应活性部分反应,并且在随后的步骤中,接头上的功能性基团与药物反应,从而形成ADC。

30

本发明还提供了制备ADC的方法，可进一步地包括：将抗体与药物-接头化合物，在足以形成抗体偶联物(ADC)的条件下进行结合。

在某些实施方式中，本发明方法包括：在足以形成抗体-接头偶联物的条件下，将抗体与双功能接头化合物进行结合。在这些实施方式中，本发明方法还进一步地包括：在足以将药物部分通过接头共价连接到抗体的条件下，将抗体接头偶联物与药物部分进行结合。

在一些实施方式中，抗体药物偶联物ADC如下分子式所示：



其中：

10 Ab是抗体，

LU是接头；

D是药物；

而且下标p是选自1到8的值。

15 药物组合物

本发明还提供了一种组合物。在优选例中，所述的组合物是药物组合物，它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白，以及药学上可接受的载体。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中 pH 通常约为 5-8，较佳地 pH 约为 6-8，尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但并不限于)：瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

本发明的药物组合物可直接用于结合 PD-L1 蛋白分子，因而可用于预防和治疗肿瘤。此外，还可同时使用其他治疗剂。

本发明的药物组合物含有安全有效量(如 0.001-99wt%，较佳地 25 0.01-90wt%，更佳地 0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。30 活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约 1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

在另一具体实施方式中，药物组合物还含有：额外的活性成分，较佳地所述的活性成分包括：小分子化合物、细胞因子、抗体（如抗 PD-1 抗体、抗 OX40 抗体、抗 CD137 抗体、抗 CD47 抗体、ADC、CAR-免疫细胞）。

在另一具体实施方式中，在癌症，炎性疾病、病症或病况，免疫疾病、病症或病况，自身免疫性疾病、病症或病况或感染性疾病、病症或病况的治疗中使用的组合物可与另一种治疗联用，包括但不限于：化疗、抗 CD20 mAb、抗 TIM-3 mAb、抗 LAG-3 mAb、抗 CD73 mAb、抗 CD47 mAb、抗 DLL3 mAb、抗 FRmAb mAb、抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体、PD-1/PD-L1 治疗、其他免疫肿瘤药物、抗血管生成剂、放射治疗、抗体-药物偶联物(ADC)、靶向治疗或其他抗癌药物。抗 PD-L1 抗体可与针对以下靶点的伴侣 mAb 共同构建双特异性抗体以治疗表达 PD-L1 和特定肿瘤相关抗原的癌症/肿瘤：PD-1、OX40、CD137、LAG3、TIM-3、CTLA-4、EGFR、HER-2、CD19、CD20、CD33、CD73、CD47、DLL-3、CLDN18.2、叶酸受体 α (FOLR1)，和/或其他肿瘤表面抗原。

使用药物组合物时，是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约 8 毫克/千克体重，较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 1 毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

20 应用

本发明的其他方法用于治疗暴露于特定毒素或病原体的患者。因此，本发明的另一方面提供一种预防和/或治疗对象中的肿瘤或感染性疾病的方法，包括给该对象施用本发明的 PD-L1 结合分子，使得所述对象的肿瘤或感染性疾病得到预防和/或治疗。

25 在另一优选例中，所述的药物组合物用于制备治疗肿瘤的药物，所述的肿瘤选自下组：膀胱癌、脑癌如胶质瘤，如低度胶质瘤、胶质母细胞瘤、宫颈癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性粒细胞白血病(CML)、多发性骨髓瘤、骨髓衍生肿瘤、甲状腺癌。

类似于对于如上所述的肿瘤的应用，本发明的 PD-L1 抗体可以单独使用，或者作为佐剂与疫苗组合使用来刺激对病原体、毒素和自身抗原的免疫应答。特别可

PD-L1 蛋白的抗体，用于溶解样本的裂解介质，检测所需的通用试剂和缓冲液，如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

本发明的主要优点包括

- 5 (a) 本发明抗 PD-L1 蛋白的抗体，具有独特的抗原表位，靶向泛 IgC 功能段。不同于已知的针对的是 IgV 功能段的 PD-L1 单克隆抗体，如：阿特珠单抗、德瓦鲁单抗、BMS-963559 和阿利库单抗。
- (b) 本发明抗 PD-L1 蛋白的抗体能够特异性识别膜型 PD-L1，最大限度地规避分泌型 sPD-L1。
- 10 (c) 本发明抗 PD-L1 蛋白的抗体对分泌 sPD-L1 的肿瘤具有抗耐药性。
- (d) 本发明抗 PD-L1 蛋白的抗体能够增强 ADCC 功能。
- (e) 本发明抗 PD-L1 蛋白的抗体具有肿瘤杀伤作用。
- (f) 本发明的 PD-L1 抗体，或其它抗肿瘤药的联合用药，为阻断型 PD-L1 抗体耐药的肿瘤提供一可选择的方法，进而提高免疫治疗的疗效。

15

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂

20 商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

引物的序列及表达宿主细胞

表 1. 人或鼠源 PD-L1/PD-1 特异性引物

表达宿主 细胞	名称	序列 (5' -3')	SEQ ID No:
CHO-K1	hPD-L1-F1	GCGTCGGCTAGCGCCACCATGAGGATATTTGCTGTCT	1
MC38	hPD-L1-R1	GCGCCACTCGAGTTACGTCTCCTCCAAATGTGT	2
CHO-K1	泛 IgC-F2	GCCCCATACAACAAAATCAAC	3
MC38	泛 IgC-R2	GTTGATTTTGTGTATGGGGCTGCGTTCAGCAAATGCCAG	4
MC38	hPD-L1-3-R3	GCGTCGCTCGAGTTAATCTCCACTCAGGACTTG	5
	hPD-L1-9-R3	GCGTCGCTCGAGTTATTCTCCCAAGTGAGTCCTTTC	6
CHO-K1	hPD-1-F4	GCGTCGGCTAGCGCCACCATGCAGATCCCACAGGCGC	7

MC38	hPD-1-R4	GCGCCACTCGAGTCAGAGGGGCAAGAGCAGTG	8
CHO-K1	hPD-L2-F5	GCGTCGGCTAGCGCCACCATGATCTTCCTCCTGCTAATG	9
MC38	hPD-L2-R5	GCGCCACTCGAGTCAGATAGCACTGTTCACTTC	10

注：h 表示人源

基因表达宿主细胞和试验用途

表 2. 基因表达宿主细胞和试验用途

基因表达宿主细胞类型	试验用途
CHO-K1、MC38 细胞表达 hPD-L1 (膜型)	PD-L1 抗体的检测；细胞结合试验
CHO-K1、MC38 细胞表达 hPD-1 (膜型)	细胞结合试验
CHO-K1 细胞表达泛 IgC 片段	免疫原 (用于免疫小鼠)；PD-L1 抗体的检测
MC38 细胞表达泛 IgC 片段	PD-L1 抗体的检测
CHO-K1、MC38 细胞表达 hPD-L2 (膜型)	PD-L1 抗体的检测 (阴性对照)
MC38 细胞表达 sPD-L1-3 (分泌型或可溶性)	分泌 sPD-L1-3 MC38 肿瘤小鼠模型
MC38 细胞表达 sPD-L1-9 (分泌型或可溶性)	分泌 sPD-L1-9 MC38 肿瘤小鼠模型

5 注：h 表示人源，s 表示分泌型或可溶性。

表 3. 本发明中涉及的抗体

抗体名称	特异性
阿特珠单抗 (atezolizumab)	抗 PD-L1 (结合 IgV)
鼠单克隆抗体 130021	抗 PD-L1 (结合泛 IgC)
鼠单克隆抗体 29E. 2A3	抗 PD-L1 (结合 IgV)
鼠单克隆抗体 24F. 10C12	抗 PD-L2
鼠单克隆抗体 2D10	抗 CD80
鼠单克隆抗体 Ab#18	阴性对照

鼠单克隆抗体 Ab#4	抗 PD-L1 (结合泛 IgC)
鼠单克隆抗体 Ab#11	抗 PD-L1 (结合泛 IgC)
鼠单克隆抗体 Ab#15	抗 PD-L1 (结合泛 IgC)
鼠单克隆抗体 Ab#19	抗 PD-L1 (结合泛 IgC)
鼠单克隆抗体 Ab#23	抗 PD-L1 (结合泛 IgC)
mIgG	阴性对照

注：m 表示鼠源

细胞系以及细胞培养条件

MC38 是一种小鼠结肠癌细胞，HEK293 是一种人胚肾细胞，两者从上海盖
 5 宁生物科技有限公司获得，生长在 DMEM+10%胎牛血清培养液中。CHO-K1 是一种中国仓鼠卵巢细胞，由杭州化安生物科技有限公司提供，生长在 RPMI1640+10%胎牛血清培养液中。

细胞荧光抗体标记与细胞流式检测

10 MC38/CHO-K1 细胞分别表达 PD-L1 和泛 IgC 做为阳性检测细胞。而 MC38/CHO-K1 细胞野生型和表达 PD-L2 做为阴性对照。加小鼠免疫后血清 (1:100、1:1000、1:10000)或抗体克隆杂较瘤细胞培养上清液 (50 μ l)，或鼠单抗（浓度在图释中标出），和其人源化抗体（浓度在图释中标出）标记大约 1×10^5 阴性和阳性检测细胞，在 4℃ 下孵育 15min。加 PBS 清洗后，再加 PE 结合
 15 的羊抗鼠抗体(BD biosciences)标记，在 4℃ 避光下孵育 15min。再加 PBS 清洗后，进行细胞流式检测 (NovoCyte, Aceabio, 杭州)。

PD-L1 细胞 ELISA、直接 PD-L1 蛋白 ELISA、和分泌型 sPD-L1 间接 ELISA

20 通过已建立的细胞 ELISA 来筛选 PD-L1 抗体亚克隆。在 96 孔细胞培养板上，每孔铺 5000 个阳性细胞，在 37℃ CO₂细胞培养箱里培养 2 天。加 PBS 清洗细胞，离心培养板，每分钟 1500 转, 3 分钟，共清洗二遍。加小鼠免疫后血清或抗体克隆杂较瘤细胞培养上清液，在 4℃ 下孵育 1 小时。再用 PBS 清洗 2 遍，加 HRP 结合的羊抗鼠二抗(Proteintech, 武汉, 1:1000 稀释)并在 4℃ 下孵育 30 分钟。PBS 清洗 2 遍后，加 TMB 显色，再用 1M HCl 终止显色反应。在一
 25 酶标仪上(Synergy LX, Biotek, 美国)，通过 450 波长的吸收值来检测上清液中有或无 PD-L1 抗体。

通过已建立的直接蛋白 ELISA 来分析 PD-L1 抗体是否结合 sPD-L1。如过去所做，包被 50 ng PD-L1-3-HIS 或 PD-L1-9-HIS 每孔在具有蛋白高亲和力的 96 孔板上，在 4℃ 静置过夜。弃上清液，每孔加 100 μ l PBS+吐温 20(0.05%)清洗 96 孔板三次。每孔再加 100 μ l PBS+1%BSA，室温静置 4 小时。弃上清液后，

5 每孔加 50 μ l 抗体克隆杂交瘤细胞培养上清液，在 4℃ 下孵育过夜。弃上清液后，每孔加 100 μ l PBS+吐温 20(0.05%)清洗 96 孔板五次。加 HRP 结合的羊抗鼠二抗(Proteintech, 1:1000 稀释)并在室温下孵育两小时。加 TMB 显色后，通过 450 波长的吸收值来检测抗体是否结合 sPD-L1。

分泌型 sPD-L1(自然形态) ELISA 用来进一步澄清抗体对 sPD-L1 的亲合力。

- 10 如以前所做，自然形态 sPD-L1 通过 MC38 细胞表达和分泌。含有 sPD-L1 的细胞培养上清液被用于检测 PD-L1 抗体的亲合力。纯化的 PD-L1 单克隆抗体(0.2 μ g/孔) 4℃ 过夜包被。表达 sPD-L1-3 和/或 sPD-L1-9 的 MC38 细胞培养上清，加 100 μ l/孔。4℃ 过夜和清洗后，加 100 μ l/0.1 μ g/孔生物素化的 PD-L1 抗体(Biolegend, 美国)，室温下孵育两小时。清洗后加链霉亲和素
- 15 -HRP(1:20,000, Jackson ImmunoResearch, 美国)，室温下孵育两小时。加 70 μ l/孔 TMB 底物成色，随后加 35 μ l/孔 1M HCl 终止反应。抗体与 sPD-L1 的结合力通过 450 波长的吸收值来检测。

细胞结合试验

- 20 为了分析 PD-L1 抗体对 PD-L1 与 PD-1 相互作用的影响，MC38 和 CHO-K1 细胞分别被转染和表达人源 PD-L1 和 PD-1。按照美国 EMD 公司的细胞荧光染色标记方法，表达 PD-L1 的 MC38 和 CHO-K1 细胞被 PKH67 标记，而表达 PD-1 的 MC38 和 CHO-K1 细胞被 PKH26 标记。两个不同标记的细胞在有或无 PD-L1 或同型抗体的条件下共培养一小时。PD-L1 抗体对 PD-L1 与 PD-1 的相互作用的影响，通过细胞流式进行检测。双阳标记的细胞集群表示 PD-L1 已与 PD-1 结合。此外，
- 25 表达人源 PD-L1 的 MC38 和 CHO-K1 细胞被 PKH26 标记，而表达人源 PD-1 的 MC38 和 CHO-K1 细胞被 PKH67 标记。表达 PD-L1 而不同标记的 MC38 细胞共培养，表达 PD-1 而不同标记的 MC38 细胞共培养，双阳标记的细胞集群表示非特异性结合(背景对照)。

30

ADCC 检测

通过爱康德生物(苏州)提供 Jurkat NFAT-Luciferase - CD16 测量抗体

Fc 诱导 CD16 活化和细胞内 NF-AT 信号通路的激活和报告基因萤光素酶的产生，定量检测抗体 Fc 效应因子功能。在不同浓度的人源化 PD-L1 抗体条件下，大约 1.25×10^4 /孔表达 PD-L1 的 CHO-K1 靶细胞与表达人源 Fc γ RIIIa 的效应细胞按 1:10 的比例混合。在细胞培养箱里培养 10 小时。加 75 μ l/孔 Bright Lite™ 萤光素酶底物(诺唯赞生物，南京)并在常温下孵育 5 至 30 分钟。通过光度计 (Synergy LX) 检测发光强度来定量分析抗体 Fc 诱导的 ADCC 功能。

抗 PD-L1 抗体的制备

与 PD-L1 的泛 IgC 区段结合的具有高亲和力的抗体通过进行初步抗体生产、纯化和验证获得。

表 4 本发明的抗 PD-L1 抗体的重链可变区、HCDR、轻链可变区和 LCDR 的氨基酸序列

名称	#19鼠单克隆抗体(IgG2b κ) 及人源化抗体序列	SEQ ID No:	位置
#19 鼠 单 克隆 抗体 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGSFAFSSSWMNWLK QRPGQGLEWIGRIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSVDSAVYFCARRRANHYGSNWYFDVWG AGTTVTVSS	11	
VH-CDR1	GSAFSSS	12	26-32位
VH-CDR2	IYPGDGDT	13	51-58位
VH-CDR3	ARRRANHYGSNWYFDV	14	97-112位
#19 鼠 单 克隆 抗体 VL	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKSFMH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFT LTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPYTFGGGKLEIK	15	
VL-CDR1	ESVDSYGKSF	16	27-36位
VL-CDR2	LAS	17	54-56位
VL-CDR3	QQNNEDPYT	18	93-101位
VH1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGSFAFSSSWMNWLR QAPGQGLEWMGRIYPGDGDTNYNQKFQGRVTLTADKST STAYMELSSLRSVDTAVYFCARRRANHYGSNWYFDVWG QGTTVTVSS	20	
VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSFAFSSSWMNWLR QAPGQGLEWIGRIYPGDGDTNYNQKFQGRVTLTADSSI STAYMELSRLRSVDTVVYFCARRRANHYGSNWYFDVWG QGTTVTVSS	21	
VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGSFAFSSSWMNWLR	22	

	QAPGQGLEWMGRIYPGDGDTNYNQKFQGRVTLTADKSI STAYMELSRLRSVDTAVYFCARRRANHYGSNWYFDVWG QGT TVTVSS		
VH4	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGSASFSSSWMNWLR QRP GQGLEWIGRIYPGDGDTNYNGKFKGRVTLTADKSS STAYMELSSLRSVDTAVYFCARRRANHYGSNWYFDVWG AGT TVTVSS	23	
VH5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGSASFSSSWMNWLR QRP GQGLEWIGRIYPGDGDTNYNGKFKGRVTLTADKSI STAYMELSRLRSVDTAVYFCARRRANHYGSNWYFDVWG AGT TVTVSS	24	
VH6	EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCASGSASFSSSWMNWLK QRP GQGLEWIGRIYPGDGDTNYNGKFKGRVTLTADKSS STAYMQLSSLRSEDVAVYFCARRRANHYGSNWYFDVWG AGT TVTVSS	25	
VL1	NIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDSYGKSFMH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGIPARFSGSGSRTDFT LTISLQPEDFAVYYCQQNNEDPYTFGGGTKLEIK	26	
VL2	NIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDSYGKSFMH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSRTDFT LTISLQPEDFATYYCQQNNEDPYTFGGGTKLEIK	27	
VL3	NIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDSYGKSFMH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGIPARFSGSGSRTDFT LTIDSLEPEDFAVYYCQQNNEDPYTFGGGTKLEIK	28	
VL4	NIVLTQSPASLSASVGDRTISCRASESVDSYGKSFMH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSRTDFT LTISLQPEDFATYYCQQNNEDPYTFGGGTKLEIK	29	
VL5	NIVLTQSPASLSASVGDRTISCRASESVDSYGKSFMH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSRTDFT LTIDSLQPEDFATYYCQQNNEDPYTFGGGTKLEIK	30	

注：VH：重链，VH-CDR：重链可变区；VL：轻链；VL-CDR：轻链可变区。如本文所用，H6L2 即代表重链可变区为 VH6，和轻链可变区为 VL2 的抗 PD-L1 人源化抗体。

5 实施例 1 抗 PD-L1 抗体的制备

步骤一：PD-L1/PD-1 和 PD-L1-泛 IgC 片段表达细胞株的建立

人源或鼠源 PD-L1、PD-1 和 PD-L2 基因模板从长沙优宝生物获得。各基因与基因片段通过基因特异性引物分别进行 PCR 扩增(如表 1 所示)。

扩增的 PCR 产物通过酶切和 T4 DNA 联结酶插入相同酶切的 pcDNA4 质粒

(Thermofisher, 美国)。表达基因与基因片段的 pcDNA4 质粒载体分别转染入不同的表达宿主细胞, 并进行抗性筛选。其中, 含 PD-L1、泛 IgC、PD-L2、或 PD-1 基因片段的质粒载体分别转染入 CHO-K1 和 MC38 细胞; 含 sPD-L1-3 和 sPD-L1-9 基因片段的质粒载体分别转染入 MC38 细胞; 含 sPD-L1-3-HIS 和 sPD-L1-9-HIS 基因片段的质粒载体均分别转染入 HEK293 细胞。PD-L1、泛 IgC、PD-L2、或 PD-1 基因表达的宿主细胞和用途如表 2 所列。

步骤二: 单克隆杂交瘤细胞的制备

以一质粒载体表达 hPD-L1(氨基酸 19-290)和泛 IgC 高(氨基酸 132-290)表达的 CHO-K1 细胞系两种方式各免疫小鼠。将血清 1:100、1:1000、1:10000 稀释, 用 MC38 表达 PD-L1 细胞(阳性细胞), MC38 野生型和表达 PD-L2 细胞(阴性细胞)通过细胞流式来检测小鼠血清中特异性抗体的滴度。选择阳性血清的小鼠进行细胞融合。用直接 PD-L1 蛋白 ELISA 和阳性和阴性细胞流式来检测培养上清抗体的特异性和滴度。选择合格的母克隆和亚克隆, 并进一步获得单克隆杂交瘤细胞。将进一步用 sPD-L1 蛋白检测这些抗体的结合能力, 筛选出对 sPD-L1 亲和力缺失或低下的人源 PD-L1 鼠单克隆抗体, 特别是具有 ADCC 和 CDC 功能的鼠 IgG2a 和 IgG2b 亚型。

步骤三: 抗 PD-L1 单克隆抗体的制备

单克隆抗体通过单克隆杂交瘤细胞腹腔注摄, 腹水制备, 蛋白 A 亲和层析纯化获得。

步骤四: 抗人源 PD-L1 鼠单克隆抗体重轻链可变区 DNA 测序, 以及其人源化和表达与提纯

简而言之, 总 RNA 将从产生鼠单克隆抗体的杂交瘤细胞获取。利用基因特异的引物并通过逆转录和 PCR 反应获得重链和对应的轻链可变区 DNA, 并进一步以 TOPO TA 克隆方法将目的基因插入 pCR™ 载体质粒并进行测序。鼠单抗可变区人源化包括 CDR 移植和回复突变(Back mutation), 并移植入人源 IgG1, κ 。合成人源化抗体序列后, 分别构建人源化重和轻链抗体表达载体 pcDNA3.1(Thermofisher); 同时构建一个人鼠嵌合抗体表达载体作为对照。重轻链表达质粒共转染进入 HEK293 细胞。分泌抗体的细胞株进一步扩增。含抗体的培养上清通过蛋白 A 亲和层析纯化获得。

实施例 2: PD-L1 小鼠单克隆抗体的筛选

通过流式细胞仪筛选与人源 PD-L1 和泛 IgC 的结合力强的 PD-L1 鼠单克隆抗体。MC38 细胞分别表达 PD-L1 和泛 IgC 做为阳性检测细胞。MC38 细胞表达人源 PD-L2, 和 MC38 亲本细胞, 用做阴性对照。

- 5 用抗体克隆杂交瘤细胞培养上清液 (50 μ l) 或鼠单抗 (100 ng) 标记大约 1×10^5 阴性和阳性检测细胞, 在 4°C 下孵育 15min。加 PBS 清洗后, 再加 PE 结合的羊抗鼠抗体 (BD biosciences) 标记, 在 4°C 避光下孵育 15min。加 PBS 清洗后, 进行细胞流式检测。

- 如图 3A 所示, PD-L1 鼠单克隆抗体 130021 (R&D systems) 结合 PD-L1 和泛 IgC。PD-L1 鼠单克隆抗体 29E. 2A3 (Biolegend) 仅结合 PD-L1 而不识别泛 IgC 段, 表明它的识别区只在 IgV。如图 3B 所示, 通过细胞流式检测, 从 33 个 PD-L1 鼠单克隆抗体中筛选出 5 个既能结合 PD-L1 也能识别泛 IgC 的单克隆抗体, 分别是 mAb#4、mAb#11、mAb#15、mAb#19 和 mAb#23。

15 实施例 3: PD-L1 鼠单克隆抗体对 PD-L1 的亲合力, 以及 sPD-L1 对其亲和力的影响

- 通过直接 PD-L1 蛋白 ELISA 检测 PD-L1 抗体与重组蛋白 PD-L1 的亲合力。重组蛋白 PD-L1-3-HIS 和 PD-L1-9-HIS 由 HEK293 细胞表达, 其培养上清液通过 Ni 柱来纯化 rPD-L1-HIS。包被 50ng PD-L1-3-HIS 或 PD-L1-9-HIS 每孔在具有蛋白高亲和力的 96 孔板上, 在 4°C 静置过夜。弃上清液, 每孔加 100 μ l PBS+吐温 20 (0.05%) 清洗 96 孔板三次。每孔再加 100 μ l PBS+1%BSA, 室温静置 4 小时。弃上清液后, 每孔加 100 μ l (100ng) 单克隆抗体, 在 4°C 下孵育过夜。弃上清液后, 每孔加 100 μ l PBS+吐温 20 (0.05%) 清洗 96 孔板五次。加 HRP 结合的羊抗鼠二抗 (Proteintech, 1:1000 稀释) 并在室温下孵育两小时。加 TMB 显色后, 通过 450 波长的吸收值来检测抗体是否结合 sPD-L1。通过直接 ELISA 来检测 5 个 PD-L1 鼠单克隆抗体 mAb#4、mAb#11、mAb#15、mAb#19 和 mAb#23 对重组蛋白 PD-L1 (rPD-L1) 的结合力。

实验结果如图 4A 所示, 5 个 PD-L1 鼠单克隆抗体都不与 PD-L1-3-HIS 结合; 鼠单克隆抗体 mAb#19 与 PD-L1-9-HIS 结合能力最小。

- 通过细胞流式检测重组蛋白 PD-L1-3-HIS (rPD-L1-3-HIS) 和 PD-L1-9-HIS 对 5 个 PD-L1 鼠单克隆抗体的阻断作用。200 ng 重组蛋白 PD-L1-3-HIS (摩尔数 14 倍于抗体) 或重组蛋白 PD-L1-9-HIS (摩尔数 10 倍于抗体) 分别与 100 ng PD-L1 鼠单克隆抗体 mAb#4、mAb#11、mAb#15、mAb#19 和 mAb#23 在 4°C 下预先

孵育 2 小时后，再与表达 PD-L1 的 MC38 细胞预孵育 30 分钟。

实验结果如图 4B 所示，结果表明：rPD-L1-3-HIS 不能阻断 5 个 PD-L1 鼠单克隆抗体与 PD-L1 结合，rPD-L1-9-HIS 能阻断 mAb#4、mAb#15、和 mAb#23，但仅部分抑制 PD-L1 鼠单克隆抗体 mAb#11、mAb#19 与细胞上的 PD-L1 结合。

- 5 说明鼠单克隆抗体能够规避分泌型的 PD-L1-3-HIS，且能够部分规避 PD-L1-9-HIS

从筛选的 5 个鼠单克隆抗体中挑选 PD-L1 鼠单克隆抗体#19，检测重组蛋白 PD-L1-9 对鼠单克隆抗体#19 结合 PD-L1 的影响。100 ng 抗体#19 与不同浓度(如图所示)的重组蛋白 rPD-L1-9-HIS 预先在 4℃ 下孵育 2 小时后，再与表达 PD-L1 的 MC38
10 细胞孵育 30 分钟。通过细胞流式分析 rPD-L1-9-HIS 对 PD-L1 鼠单克隆抗体#19 结合功能的影响。

实验结果如图 4C 所示，结果表明：重组蛋白 PD-L1-9 的摩尔数是鼠单克隆抗体 mAb#19 的 40 倍时，鼠单克隆抗体 mAb#19 仍然能和 PD-L1 结合。进一步说明鼠单克隆抗体能够部分规避 rPD-L1-9-HIS。

- 15 通过分泌型 sPD-L1 间接 ELISA 检测 PD-L1 鼠单克隆抗体#19 对自然形态 sPD-L1 的亲合力。MC38 细胞被转染和表达自然形态 sPD-L1。其细胞培养上清含有自然形态 sPD-L1。纯化的 PD-L1 单克隆抗体(0.2 μg/孔) 4℃ 过夜包被。加 100 μl/孔来自于表达 sPD-L1-3 或 sPD-L1-9 的 MC38 细胞培养上清。4℃ 过夜和清洗后，加 100 μl/0.1 μg/孔生物素化的 PD-L1 抗体(Biolegend)，室温
20 下孵育两小时。清洗后加链霉亲和素-HRP(1:20,000，Jackson ImmunoResearch)，室温下孵育两小时。加 70 μl/孔 TMB 底物成色，随后加 35 μl/孔 1M HCl 终止反应。抗体与 sPD-L1 的结合力通过 450 波长的吸收值来检测。

- 25 ELISA 检测#19 单抗对细胞培养上清含 sPD-L1-3 与 sPD-L1-9(A)、sPD-L1-3(B)，或 sPD-L1-9(C)的亲合力。Anti-PD-L1^{total} 识别 sPD-L1-3 和 sPD-L1-9，而克隆 130021 只结合 sPD-L1-9。

- 实验结果如图 5 所示，结果表明：PD-L1 鼠单克隆抗体#19 特异性识别细胞上人源膜型 PD-L1，但不结合自然形态 sPD-L1-3，对自然形态 sPD-L1-9 的亲合力远低于克隆 130021(值得注意在图 3A 和 3B 的流式检测中显示此抗体对膜
30 型 hPD-L1 亲合力非常低下，远弱于 PD-L1 鼠单克隆抗体#19)，即最大限度的规避分泌型 sPD-L1(sPD-L1-3 和 sPD-L1-9)。

实施例 4：小鼠 MC38 肿瘤模型检测抗体活性

MC38 细胞表达人源 PD-L1 与 MC38 细胞分泌人源 sPD-L1-9 按 20:1 比例混和，大约 5×10^5 细胞皮下注射入 C57BL/6J 小鼠，每组 6 只。7 天后可见肿瘤形成，腹腔注射 100 μ g/鼠同种型抗体或单克隆抗体#19(anti-PD-L1 treatment)，
5 抗体治疗分别在肿瘤细胞注射后的第 7、10、和 15 天，共三次。定期检测肿瘤大小和小鼠生存率。肿瘤容积=(长 $\times$ 宽 2)/2。T 检验 (Student's T test) 和时序检验 (Log-rank test) 分别用于检验肿瘤大小和生存率实验中实验组间有无显著性差异。

10 实验结果如图 6 所示。结果表明：在表达人源 PD-L1 和 sPD-L1 的 MC38 小鼠肿瘤模型上，PD-L1 特异性抗体具有抗耐药和抗肿瘤作用。

实施例 5：鼠单抗#19 人源化抗体活性

将鼠单抗#19 人源化，获得其人源化抗体。鼠单抗#19 和其人源化氨基酸序列，不同重 (A) 轻 (B) 链 Fab 氨基酸序列如图 7 和表 4 所示。其中，VH1、
15 VH2、VH3、VH4、VH5、VH6 为鼠单抗#19 人源化抗体的重链可变区；VL1、VL2、VL3、VL4、VL5 为鼠单抗#19 人源化抗体的轻链可变区。

5.1. 鼠单抗#19 人源化抗体对膜型和分泌型 PD-L1，以及泛 IgC 的亲合力

通过检测不同的重 (H) 轻 (L) 链组合对膜型和分泌型 PD-L1，以及对泛
20 IgC 的亲合力，筛选出有高亲和力的重 (H) 轻 (L) 链组合。其中，H6L2、H6L5、H4L4、H5L4、H6L4、H5L5，以及 H4L5 的亲合力最佳。

其中，鼠单抗#19 人源化的不同重 (H) 轻 (L) 链组合 (H6L2、H6L5、H4L4、H5L4) 对膜型和分泌型 PD-L1，以及对泛 IgC 的亲合力检测如图 8 所示。

25 通过细胞流式检测鼠单抗#19 人源化抗体对膜型 PD-L1 (A) 和 PD-L1 泛 IgC (B) 亲合力。

MC38 细胞分别转染和分泌自然形态 sPDL1-3 和 sPDL1-9 的细胞培养上清，对比鼠单抗#19 和其嵌合抗体 (Chimeric)，130021，和 anti-PD-L1^{total}，通过 ELISA 检测鼠单抗#19 人源化抗体对分泌型 sPD-L1 (C 和 D) 的结合力。

30 实验结果显示：鼠单抗#19 人源化的重轻链组合 (H6L2、H6L5、H4L4、H5L4) 结合 PD-L1 和泛 IgC，并且，它们不结合 sPD-L1-3，并且对 sPD-L1-9 的亲合力低下。

5.2 鼠单抗#19 人源化抗体对膜型 PD-L2(人源)的亲合力

通过细胞流式检测鼠单抗#19 人源化不同重(H)轻(L)链组合对膜型 PD-L2 的亲合力。

实验结果如图 9 所示: H6L2 和 H6L5 不结合 PD-L2, 而 H5L4 对 PD-L2 和 CHO-K1 亲本细胞有微弱的结合。

5.3 鼠单抗#19 人源化抗体对膜型 CD80(人源)的亲合力

通过细胞流式检测不同重(H)轻(L)链组合对膜型 CD80(人源)的亲合力。

实验结果如图 10 所示: H6L2 和 H6L5 不结合 CD80。

10

5.4 鼠单抗#19 人源化抗体 H6L2 对膜型 PD-L1 的亲合力

5.4.1 人源化抗体 H6L2, 在有或 rPD-L1-9-HIS 条件下, 对膜型 PD-L1 的亲合力

通过细胞流式检测, 与 Avelumab 和 Atezolizumab 相比, 人源化抗体 H6L2 对膜型 PD-L1 的亲合力; 和与 Avelumab 和 Atezolizumab 相比, 不同浓度的 rPD-L1-9-HIS 对 H6L2 亲和力的影响。

实验结果如图 11A 所示, 测得 H6L2 的 EC50 为 0.62 $\mu\text{g/ml}$, Avelumab 的 EC50 为 0.17 $\mu\text{g/ml}$, Atezolizumab 的 EC50 为 0.21 $\mu\text{g/ml}$ 。

实验结果如图 11B 和 C 显示: 人源化抗体 H6L2 亲合力对抗 sPD-L1-9 强于 Avelumab 和 Atezolizumab。

5.4.2 人源化抗体 H6L2, 在有或 rPD-L1-3-HIS 条件下, 对膜型 PD-L1 的亲合力

通过细胞流式检测, 与 Avelumab 和 Atezolizumab 相比, 不同浓度的 rPD-L1-3-HIS 对 H6L2 亲和力的影响。

如图 12 所示, 实验结果显示: 人源化抗体 H6L2 亲合力对抗 sPD-L1-3 强于 Avelumab 和 Atezolizumab。

5.5 人源化抗体 H6L2 对 PD-1 与 PD-L1 结合的阻断作用

为分析 PD-L1 与 PD-1 相互作用, CHO-K1 细胞分别被转染和表达人源 PD-L1 和 PD-1。表达 PD-L1 的 CHO-K1 细胞被 PKH67 标记, 而表达 PD-1 的 CHO-K1 细胞被 PKH26 标记。两个不同标记的细胞在有或无 H6L2 的条件下共培养一小时。

不同抗体浓度如图所示。通过细胞流式进行检测此抗体对细胞间 PD-L1 和 PD-1 相互作用的影响，双阳标记的细胞集群表示 PD-L1 已与 PD-1 结合。同时，表达 PD-L1 的 CHO-K1 细胞也被 PKH26 标记，而表达 PD-1 的 CHO-K1 细胞也被 PKH67 标记。表达 PD-L1 而不同标记的 CHO-K1 细胞共培养，表达 PD-1 而不同标记的 CHO-K1 细胞共培养，双阳标记的细胞集群表示非特异性结合(背景对照)。结果如图 13 所示。

实验结果显示：H6L2 不能阻断细胞间 PD-L1 与 PD-1 的结合。

5.6 人源化抗体 H6L2 的 ADCC 活性和分泌型 sPD-L1 对其 ADCC 作用的影响

如图 14 所示，在 Jurkat-CD16-NFAT-Luciferase 平台，无(A)和有(B)分泌型 sPD-L1(重组蛋白 rPDL1-3-HIS 或 rPDL1-9-HIS)条件下，检测#19 人源化抗体诱导 Luciferase(萤光素酶)的活性能力，同时，对比 Avelumab。

实验结果显示：人源化抗体 H6L2 诱导 ADCC 活性和其对抗 sPD-L1 的能力优于 Avelumab。

实施例 6：鼠单抗#19 人源化抗体 H6L2 的抗肿瘤作用

3 至 5×10^5 /鼠的表达人源 PD-L1 的 MC38 细胞被皮下注射入 C57BL/6J 小鼠，每组 5 只。7 天后可见肿瘤形成，分别在肿瘤细胞注射后的第 7、10、和 13 天，腹腔注射 100 μ g/鼠人源化抗体 H6L2 或 Avelumab、或 PBS 对照组，共三次。

结果如图 15 所示，其中 A. 肿瘤大小，以各组肿瘤大小的平均值 $\pm$ 标准误差表示。B. 生存率。T 检验和时序检验分别用于检验肿瘤大小和生存率实验中实验组间有无显著性差异。

实验结果显示：人源化抗体 H6L2 具有统计学意义的抗肿瘤作用，并显著性的优于 Avelumab。

对比例 1：间接 ELISA 检测抗人源 PD-L1 抗体阿特殊单抗与自然形态的 sPD-L1 的结合力

通过分泌型 sPD-L1 的间接 ELISA 检测抗人源 PD-L1 抗体阿特殊单抗与自然形态的 sPD-L1 的结合力，MC38 细胞分别表达 sPD-L1-3 或 sPD-L1-9。通过 ELISA 检测阿特殊单抗孵育过的细胞培养上清液中 sPD-L1 浓度来分析对其结合力。含有 sPD-L1-3 或 sPD-L1-9 无血清细胞培养上清液先分别与 1.5 μ g/ml 阿特殊单抗或人源 IgG1 过夜孵育(图示 ate treated 或 hIgG1 treated)，再加

蛋白 G 琼脂糖(Thermo fisher)和离心来去除阿特殊单抗。含有 sPD-L1-3 或 sPD-L1-9 的上清液(图示 sPD-L1-3 或 sPD-L1-9)无任何预先孵育作为阳性对照。BL 表示无 sPD-L1 上清, 做为背景对照。

实验结果如图 16 所示, 结果表明: 阿特殊单抗均能与 sPD-L1-3 和 sPD-L1-9 结合。

对比例 2 人源 PD-L1 抗体 avelumab 和 atezolizumab 对 PD-1 与 PD-L1 结合的阻断作用, 以及分泌型 sPD-L1 对其阻断作用的影响

为检测人源 PD-L1 抗体 avelumab 和 atezolizumab 对 PD-1 与 PD-L1 结合的阻断作用, 以及分泌型 sPD-L1 对其阻断作用的影响, CHO-K1 细胞分别被转染和表达人源 PD-L1 和 PD-1。表达 PD-L1 的 CHO-K1 细胞被 PKH67 标记, 而表达 PD-1 的 CHO-K1 细胞被 PKH26 标记。两个不同标记的细胞分别在有 avelumab 或 atezolizumab 的条件下共培养一小时。不同抗体浓度如图 17 所示。通过细胞流式进行检测两个抗体对细胞间 PD-L1 和 PD-1 相互作用的影响, 双阳标记的细胞集群表示 PD-L1 已与 PD-1 结合。

其中 A 和 B 显示了 Avelumab 和 Atezolizumab 对细胞间 PD-1 与 PD-L1 相互作用的影响。C 和 D 显示了 sPD-L1 对 Avelumab 和 Atezolizumab 阻断影响。抗体用量为 100 ng/数据点, rPD-L1-9-HIS 用量如图所示。同时, 表达 PD-L1 的 CHO-K1 细胞也被 PKH26 标记, 而表达 PD-1 的 CHO-K1 细胞也被 PKH67 标记。表达 PD-L1 而不同标记的 CHO-K1 细胞共培养, 表达 PD-1 而不同标记的 CHO-K1 细胞共培养, 双阳标记的细胞集群表示非特异性结合(背景对照)。

实验结果显示: 大于 1 μ g/ml 浓度的 Avelumab 和 Atezolizumab 才能达到完全阻断细胞间 PD-L1 与 PD-1 的结合, sPD-L1 可使 Avelumab 和 Atezolizumab 的阻断作用减弱或丧失, 而不能达到完全阻断。

对比例的结果表明高浓度(大于 1 μ g/ml)的阿利库和阿特殊单抗才能完全阻断 PD-L1 与 PD-1 的相互作用, 但因能与自然形态的 sPD-L1 的结合, 降低这两个单抗的阻断能力, 而产生耐药性。

讨论

抗体 Fc 段与它的受体 Fc γ R 相结合。Fc γ R 表达于一系列免疫细胞, 如自然杀伤细胞、单核细胞、中性粒细胞和巨核细胞。Fc 与 Fc γ R 的相互作用对调控 ADCC、CDC、抗体代谢和效价起着不可替代的作用。通过分子生物工程在 Fc

CH2 段进行 DEL 氨基酸置换能显著地增加自然杀伤细胞的功能。

对于阻断型 PD-L1 抗体 Fc 在抗肿瘤中所起的作用，研究显示一个 PD-L1 阻断型抗体(克隆 14D8)被置换为不同功能的小鼠 Fc 段，它们的识别特异性、亲和力、以及代谢动力学特征没有改变，但抗肿瘤作用有统计学意义的差别。

5 如 14D8 抗体带有 IgG2a 的 Fc (即 14D8/IgG2a)可特异性地结合和激活 Fc 受体，其具有抑制肿瘤生长的功能；结合抑制性 Fc γ R 受体的 14D8/IgG1 抗体，和失去 Fc 受体的结合能力的 14D8/IgG1-D265A 抗体，这两种抗体在统计学上丧失了肿瘤抑制作用。另外，相对于野生型小鼠，在缺失激活性 Fc γ Rs 而保留抑制性 Fc γ RIIb 的小鼠肿瘤模型中，另一阻断型 PD-L1 抗体(克隆 10F.9G2)的抗肿瘤作用有显著意义的减弱。在鼠肿瘤模型中，该抗体被广泛应用于抗肿瘤的机理研究。这些研究表明，在抗肿瘤方面，阻断型 PD-L1 抗体的关键作用可能在于其 Fc 诱导的 ADCC/CDC 活性；另一方面也表明阻断型 PD-L1 抗体的通过阻断 PD-L1 与 PD-1 相互作用来达到抗肿瘤作用非常有限。我们的研究也表明只有较高浓度的阻断型 PD-L1 抗体才能达到完全阻断。

15 NK细胞是先天性免疫效应细胞，它能裂解组织相容复合体(MHC class I)阴性的肿瘤细胞和病毒感染的细胞，并协调先天免疫应答。NK细胞持续性地表达裂解系统。因此，NK细胞不需要预先激活来杀伤靶细胞，并在免疫监控变异细胞或肿瘤细胞起重要作用。

ADCC 主要依赖于 NK 细胞的杀伤活性。不同于 T 细胞表达 PD-1，NK 细胞带有各种激动性或抑制性生物标记状态下，通过不同的检测手段，如细胞流式、qRT-PCR、和 RNA-seq，它们持续性地缺乏表达 PD-1。这一特点有利于越过 PD-1/PD-L1 通路和杀伤具有表达 PD-L1 的肿瘤细胞。而且，已成功研发出靶向肿瘤的抗体，它们能诱导 ADCC 并临床上有效地治疗癌症病人，如 rituximab, daratumumab, trastuzumab, 和 Cetuximab。对比 avelumab，我们的抗体有强诱导 NK 细胞活性和显著地抗肿瘤作用。综上所述，不局限于阻断 PD-L1 的功能和 T 细胞功能恢复和间接杀伤作用，可利用 ADCC 和 NK 细胞靶向具有表达 PD-L1 的肿瘤细胞，达到直接杀伤作用，因此，有潜在增加反应率的可能。

单抗 130021、#4、#15 和#23 结合细胞上膜型 PD-L1 的能力弱于#19，但结合 sPD-L1-9(胞外全长)的能力强于#19。这表明与细胞上膜型 PD-L1 的亲和力不决定对 sPD-L1 的泛 IgG 区的结合力，反之亦然。此外，细胞上的膜型与分泌型蛋白的三级结构可能不完全一样。实验结果提示，抗体对这两种类型的目标蛋白的亲和力产生差异，可能为治疗 sPD-L1 分泌型耐药性肿瘤提供有利机

会。

5 基于分泌型 sPD-L1 这一耐药机理和它们的氨基酸序列特点，以及 PD-L1 抗体的 Fc 和 NK 细胞在抗肿瘤中所起的关键性作用，发明人设计一个全新的抗原表位并用做免疫原和筛选 PD-L1 特异性单克隆抗体，它针对 PD-L1 的 IgC 功能区段。而且，它最大限度地规避 sPD-L1，增强 Fc 的 ADCC/CDC 活性，并具有抗肿瘤作用。这对治疗分泌 sPD-L1 而产生对阻断型 PD-L1 抗体耐药的肿瘤和联合用药提供一可选择的途径或方案，并对改善肿瘤免疫治疗的疗效有潜在意义。

10 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

15

权 利 要 求

1. 一种 PD-L1 抗体或其活性片段，其特征在于，所述抗体不阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合，并且所述抗体特异性结合于 PD-L1 的泛 IgC 区段，且具有诱导 ADCC/CDC 功能效应的活性。

5 2. 如权利要求 1 所述的一种 PD-L1 抗体或其活性片段，其特征在于，包含：

(a) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2、SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR3；以及

10 (b) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR3；

其中，所述抗体特异性结合于 PD-L1 的泛 IgC 区段。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 PD-L1 抗体或其活性片段，其特征在于，所述 PD-L1 抗体或其活性片段包含重链可变区域或轻链可变区域，所述重链可变区的多肽序列与 SEQ ID NO: 11、20、21、22、23、24 或 25 所示多肽序列至少 95% 相同，所述轻链可变区的多肽序列与 SEQ ID NO: 15、26、27、28、29 或 30 所示多肽序列至少 95% 相同。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的 PD-L1 抗体或其活性片段，包含：具有 SEQ ID NO: 11、20、21、22、23、24 或 25 所示多肽序列的重链可变区，和具有 SEQ ID NO: 15、26、27、28、29 或 30 所示多肽序列的轻链可变区。

20 5. 如权利要求 1-4 任一项所述的 PD-L1 抗体或其活性片段，其特征在于，所述 PD-L1 抗体或其活性片段是嵌合的。

6. 如权利要求 1-5 任一项所述的 PD-L1 抗体或其活性片段，其特征在于，所述 PD-L1 抗体或其活性片段是人源化的。

7. 一种重组蛋白，其特征在于，所述的重组蛋白具有：

25 (i) 如权利要求 1-6 任一项所述的 PD-L1 抗体或其活性片段；以及
(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

8. 一种多核苷酸，其特征在于，编码权利要求 1-6 中任一项所述的 PD-L1 抗体或其活性片段，或权利要求 7 所述的重组蛋白。

9. 一种载体，其特征在于，它含有权利要求 8 所述的多核苷酸。

30 10. 一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，它含有如权利要求 9 所述的载体或基因组中整合有权利要求 8 所述的多核苷酸。

11. 一种免疫偶联物，其特征在于，该免疫偶联物含有：

(a) 如权利要求 1 所述的 PD-L1 抗体或其活性片段；和

(b) 选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。

5 12. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

(a) 如权利要求 1 所述的 PD-L1 抗体或其活性片段，或如权利要求 2 所述的重组蛋白，或如权利要求 11 所述的免疫偶联物；以及

(b) 药学上可接受的载体。

13. 一种检测样品中 PD-L1 蛋白的方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

10 (1) 从受试者获得样品；

(2) 使样品与权利要求 1 所述的 PD-L1 抗体或其活性片段接触；

(3) 确定受试者中 PD-L1 的水平。

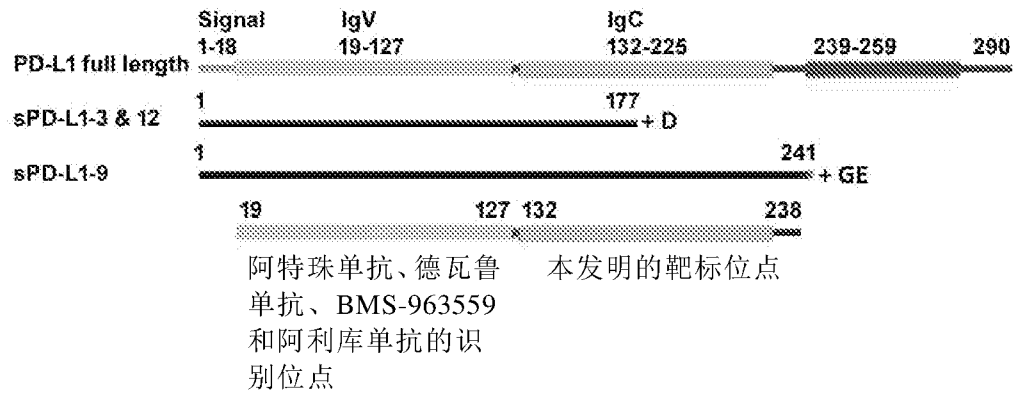
14. 一种免疫细胞，其特征在于，所述免疫细胞表达或在细胞膜外暴露有如权利要求 1-4 任一项所述的 PD-L1 抗体或其活性片段。

15 15. 一种治疗 PD-L1 表达或功能异常相关的疾病的方法，其特征在于，所述方法包括向有需要的对象施用药学有效量的如权利要求 1 所述的 PD-L1 抗体或其活性片段、如权利要求 11 所述的免疫偶联物，如权利要求 12 所述的药物组合物，或如权利要求 14 所述的免疫细胞，或其组合。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述的 PD-L1 表达或功能
20 异常相关的疾病为肿瘤或感染性疾病。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述感染性疾病由选自以下的病原体引起：HIV、肝炎病毒（甲、乙、丙）和结核杆菌。

A



B

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVY
WEMEDKNIIQFVHGEECLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMI
SYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLS
GKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPN
ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

图 1

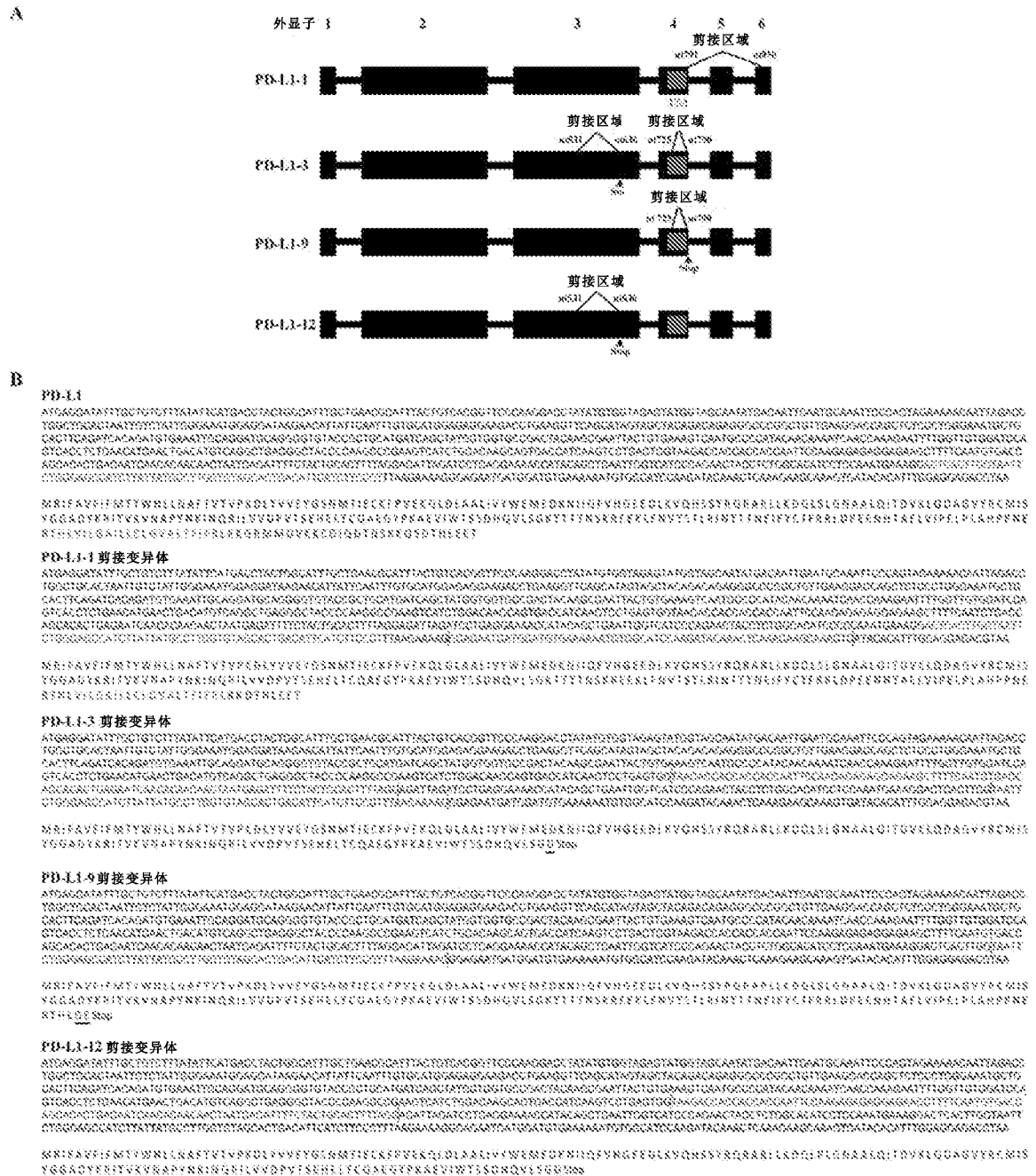


图 2

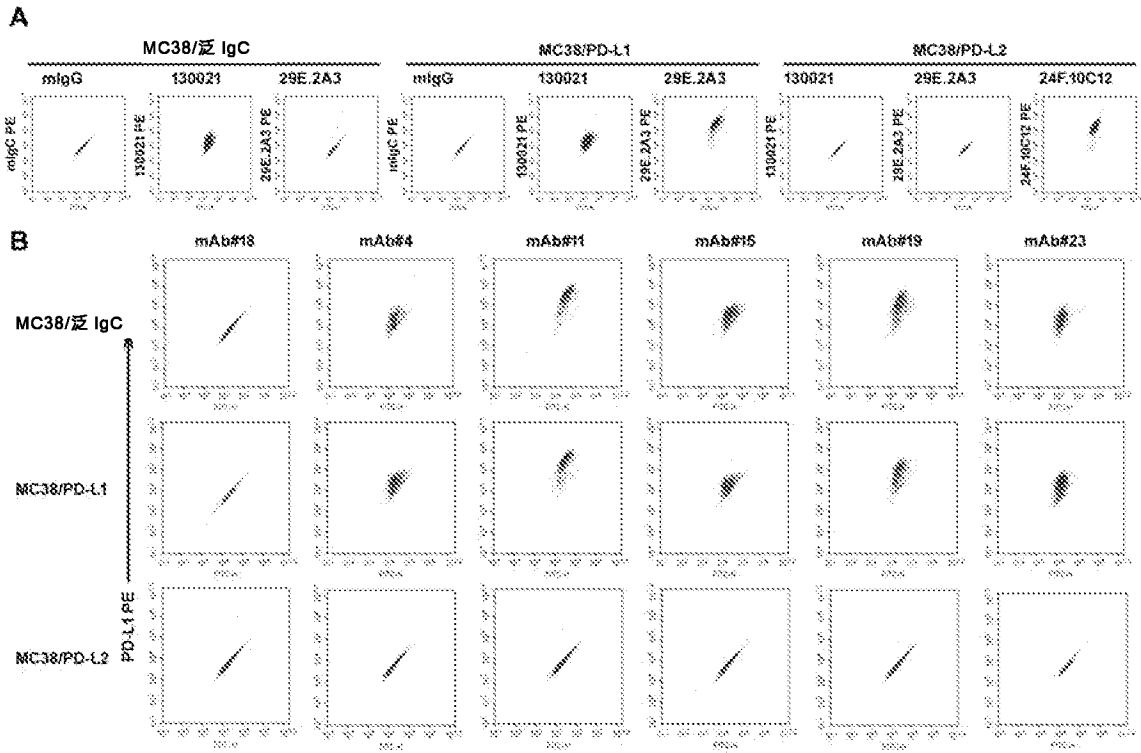


图 3

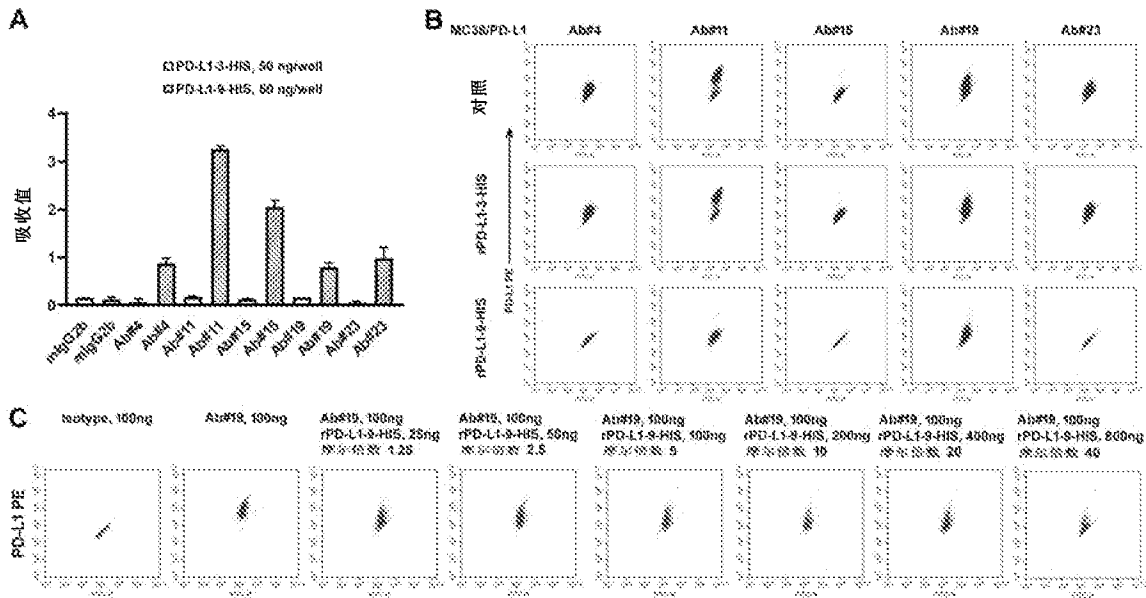


图 4

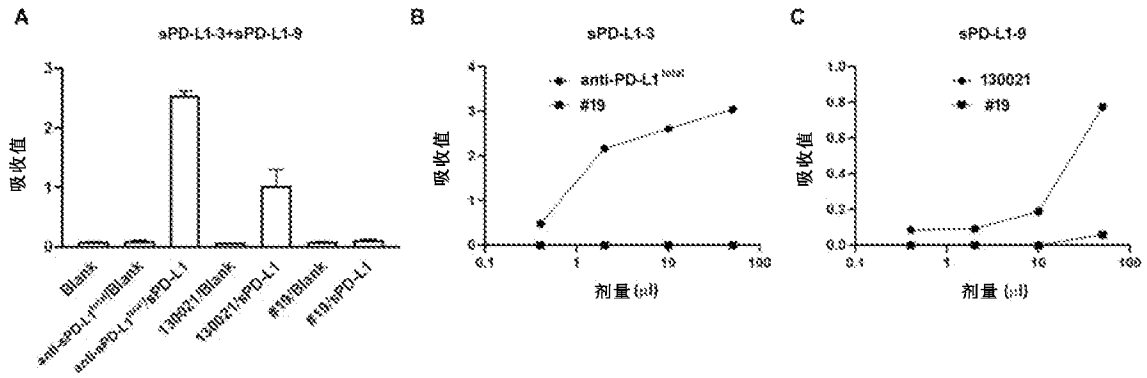


图 5

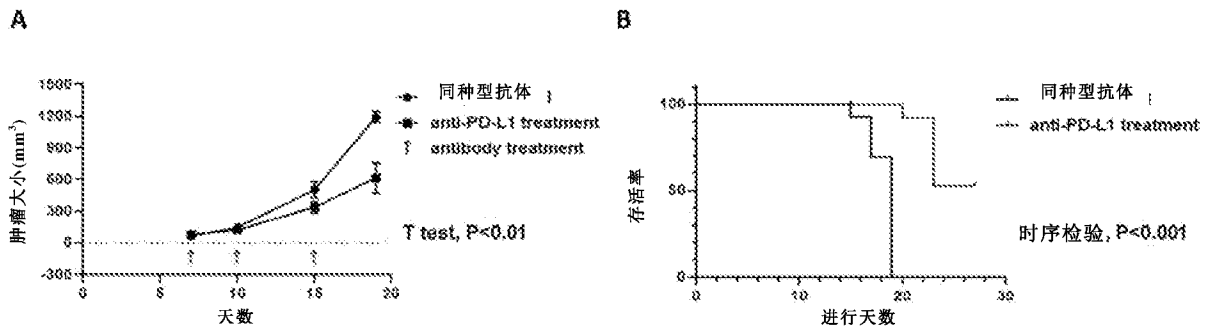


图 6

#19 mVH
 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGSAFSSSWMNWLKQRPQGQGLEWIGRIYPGDDITNYNGKFQKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDSAVYFCARRRANHYGSNWYFDVWGAGTTTVSS

#19 VH1
 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGSAFSSSWMNWLQAPQGQLEWMGRITPGDDITNYNQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSRLSVDTAIVYFCARRRANHYGSNWYFDVWGQGTITTVSS

#19 VH2
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGSAFSSSWMNWLQAPQGQGLEWIGRIYPGDDITNYNQKFQGRVTLTADSSISTAYMELSSRLSVDTVVYFCARRRANHYGSNWYFDVWGQGTITTVSS

#19 VH3
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGSAFSSSWMNWLQAPQGQLEWMGRITPGDDITNYNQKFQGRVTLTADKSSISTAYMELSSRLSVDTAIVYFCARRRANHYGSNWYFDVWGQGTITTVSS

#19 VH4
 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGSAFSSSWMNWLQRPQGQLEWIGRIYPGDDITNYNGKFQGRVTLTADKSSSTAYMELSSRLSVDTAIVYFCARRRANHYGSNWYFDVWGAGTTTVSS

#19 VH5
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGSAFSSSWMNWLQRPQGQGLEWIGRIYPGDDITNYNGKFQGRVTLTADKSSISTAYMELSSRLSVDTAIVYFCARRRANHYGSNWYFDVWGAGTTTVSS

#19 VH6
 EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVCKASGSAFSSSWMNWLKQRPQGQGLEWIGRIYPGDDITNYNGKFQGRVTLTADKSSSTAYMQLSSLRSEDTAIVYFCARRRANHYGSNWYFDVWGAGTTTVSS

#19 mVL
 NIVLTQSPASVLASLGQRATISCRASESVDSYGKSFMHWYQKPGQPPKLLIYLAASNLESGVPAFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCCQNNEDPYTFGGGKLEIK

#19 VL1
 NIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDSYGKSFMHWYQKPGQPPKLLIYLAASNLETGIPARFSGSGSRTDFTLTISSELPEDFAVYYCCQNNEDPYTFGGGKLEIK

#19 VL2
 NIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDSYGKSFMHWYQKPGQPPKLLIYLAASNLESGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFATYYCCQNNEDPYTFGGGKLEIK

#19 VL3
 NIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDSYGKSFMHWYQKPGQPPKLLIYLAASNLETGIPARFSGSGSRTDFTLTISLEPEDFAVYYCCQNNEDPYTFGGGKLEIK

#19 VL4
 NIVLTQSPASLSASVGDRTISCRASESVDSYGKSFMHWYQKPGQPPKLLIYLAASNLESGVPAFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFATYYCCQNNEDPYTFGGGKLEIK

#19 VL5
 NIVLTQSPASLSASVGDRTISCRASESVDSYGKSFMHWYQKPGQPPKLLIYLAASNLESGVPAFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFATYYCCQNNEDPYTFGGGKLEIK

图 7

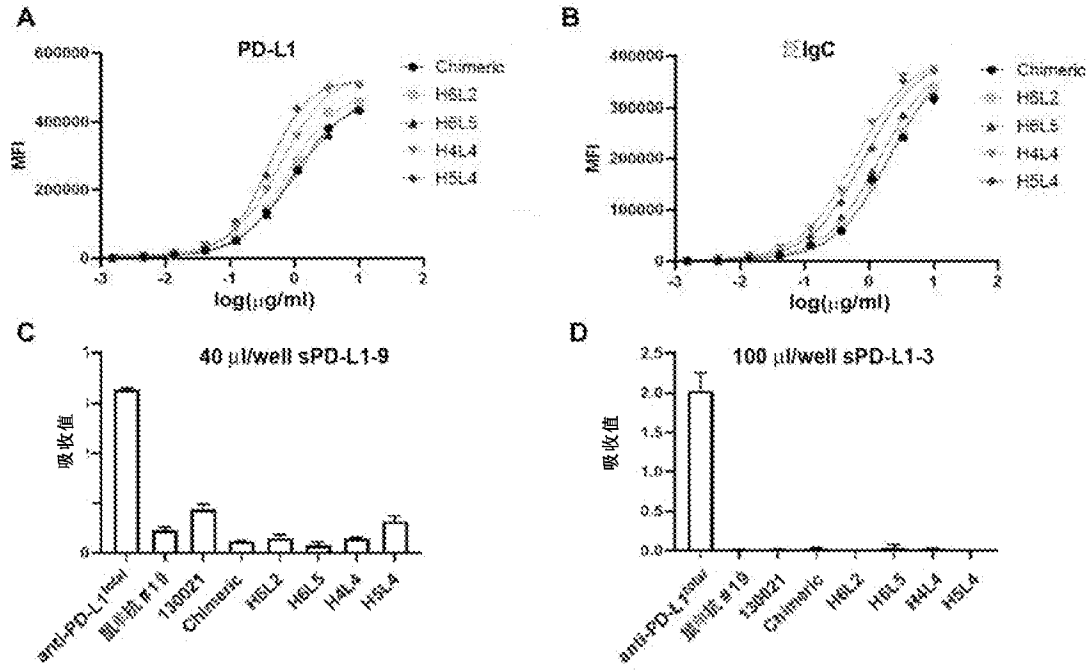


图 8

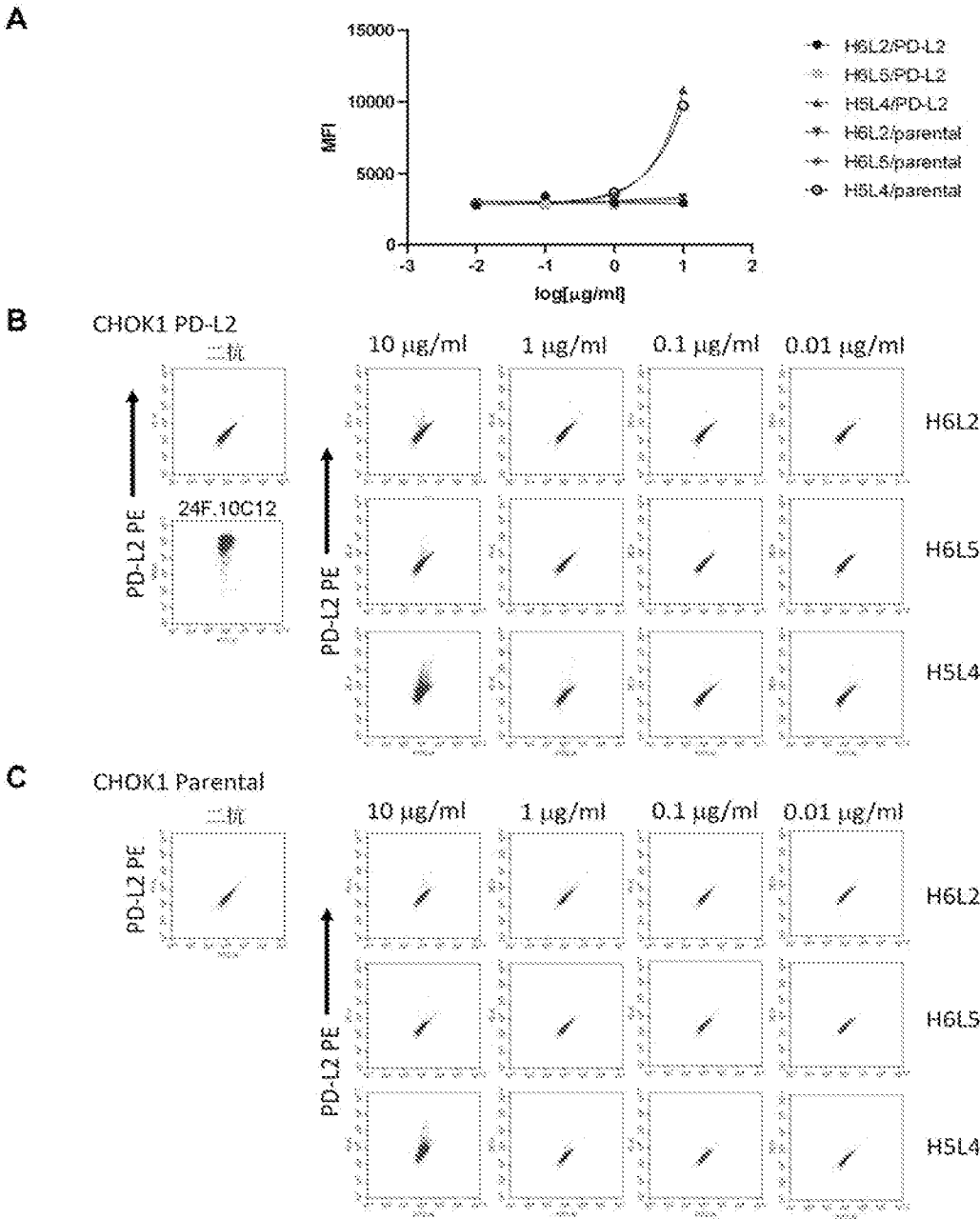


图 9

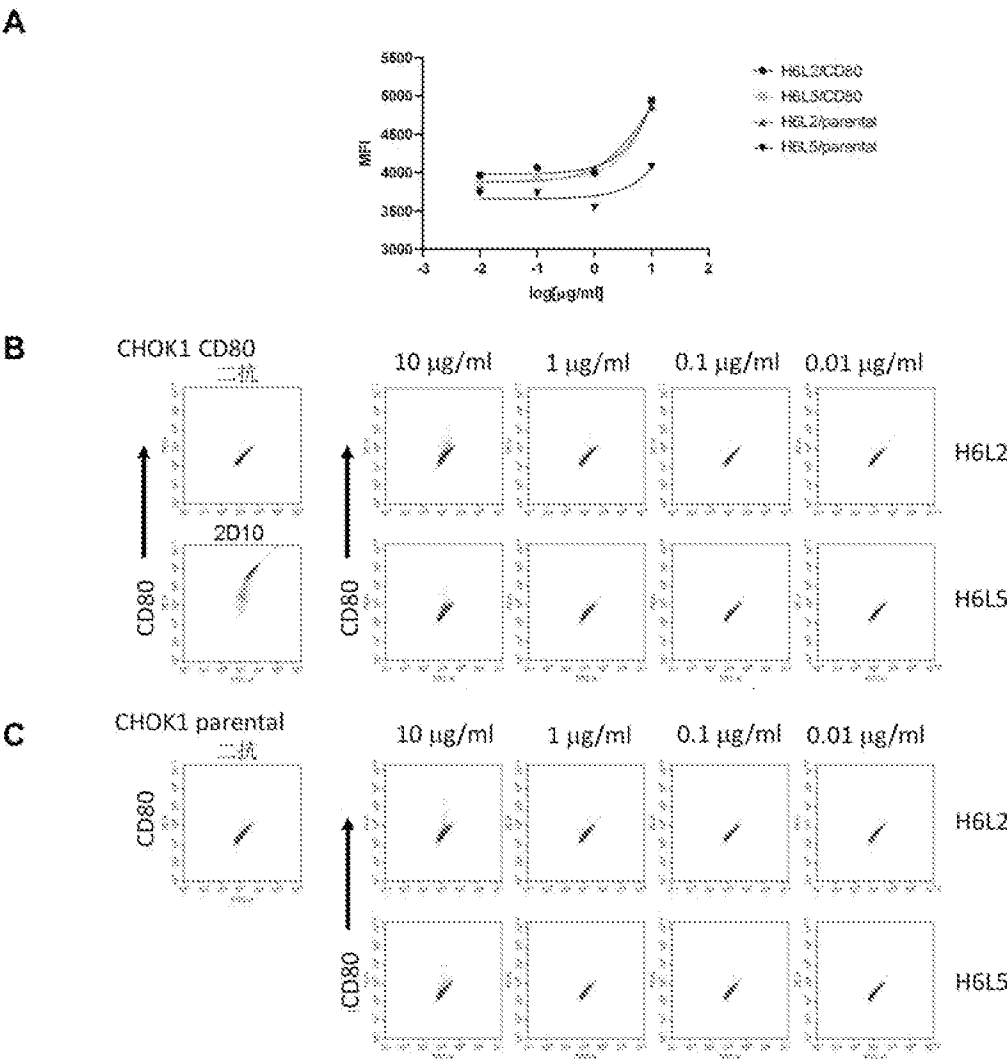


图 10

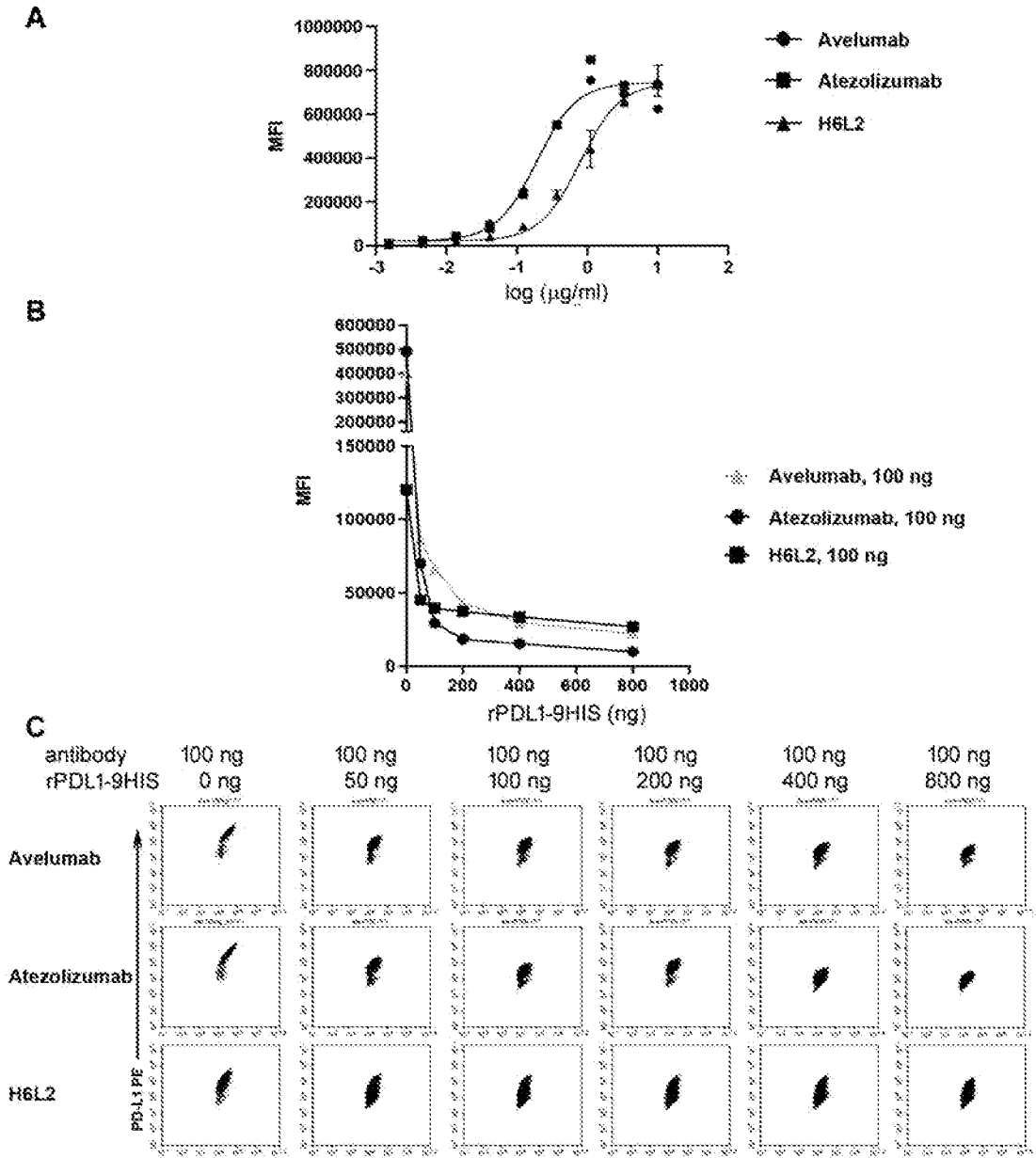


图 11

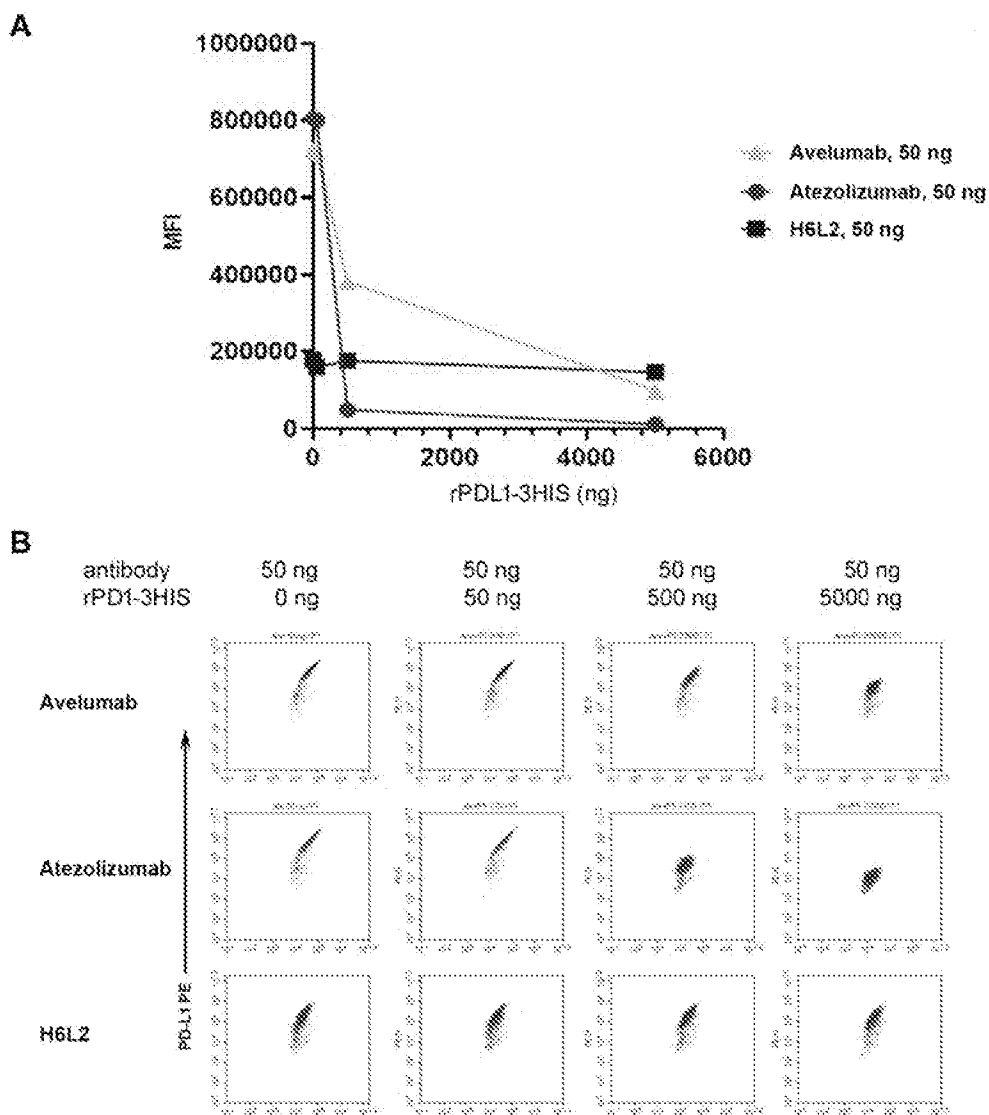


图 12

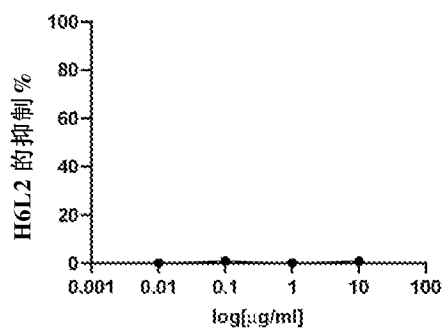


图 13

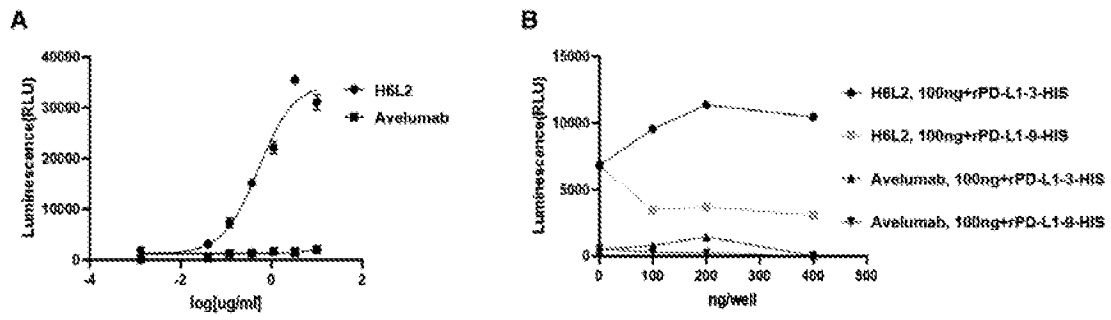


图 14

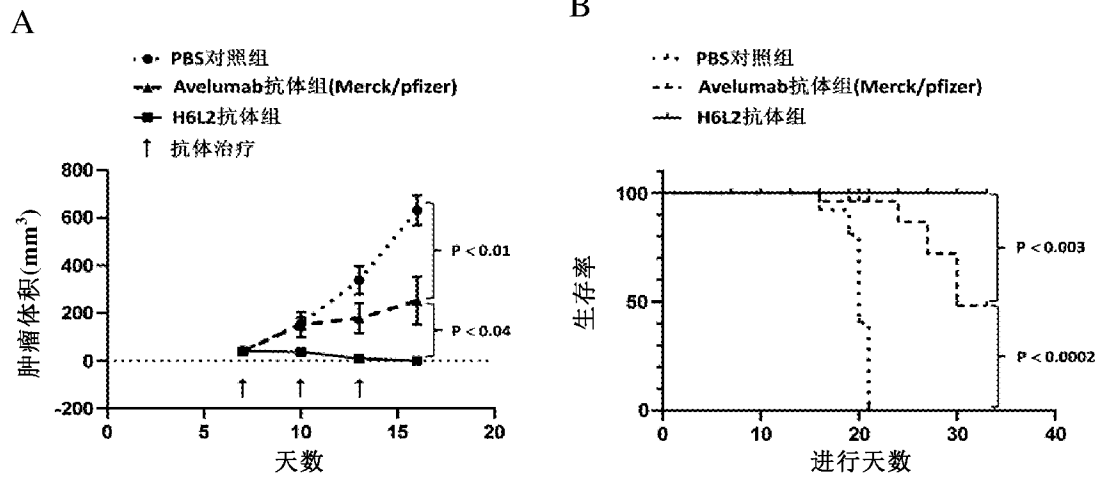


图 15

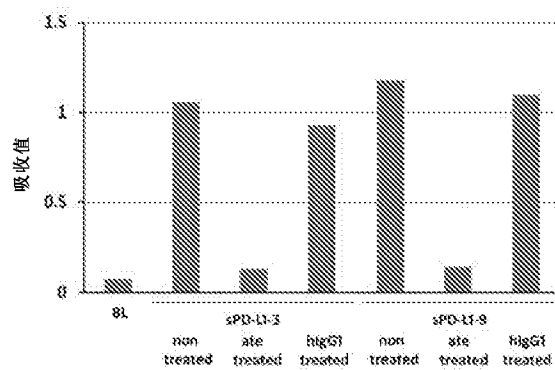


图 16

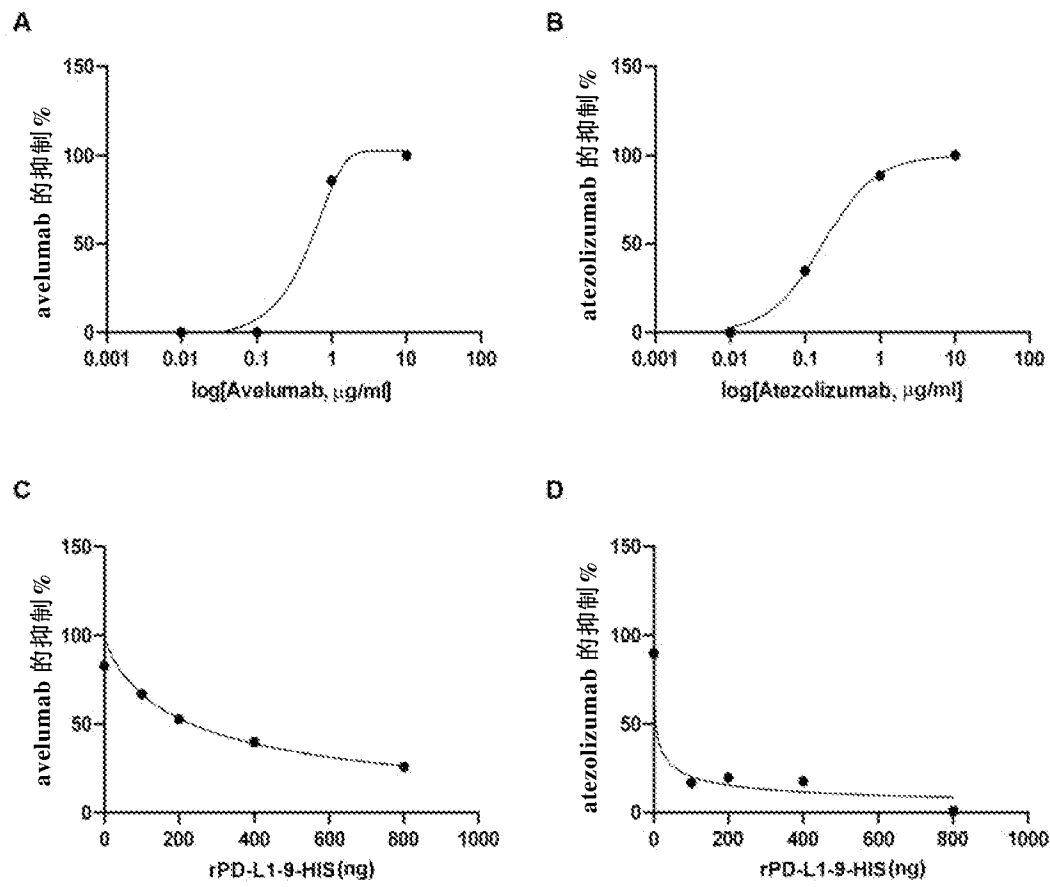


图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/121022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i;
A61K 39/395(2006.01)i; A61P 31/06(2006.01)i; A61P 31/18(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 31/20(2006.01)i;
A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPABSC; CNTXT; CNKI; ISI; ELSEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; STN; 万方; 中国专利生物序
列检索系统数据库, 检索词: 程序性死亡配体1, 分化簇274, B7同源体1, PD-L1, CD274, B7-H1, IgC, C区, C结构域, 抗体,
C region, c domain, antibody, SEQ ID NOS: 11-30

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110891975 A (IMAB) 17 March 2020 (2020-03-17) see entire document	1-17
A	CN 108350082 A (I-MAB) 31 July 2018 (2018-07-31) see entire document	1-17
A	CN 107488229 A (ZANG, Jingwu) 19 December 2017 (2017-12-19) see entire document	1-17
A	CN 105461808 A (CHANGCHUN GENESCENCE PHARMACEUTICALS CO., LTD.) 06 April 2016 (2016-04-06) see entire document	1-17
A	CN 104356236 A (MEDAREX, INC.) 18 February 2015 (2015-02-18) see entire document	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 December 2021

Date of mailing of the international search report

29 December 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/121022

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/121022

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **15-17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Although claims 15-17 relate to a method for treating diseases (PCT Rule 39.1(iv)), a search has still been carried out on the basis of uses of an antibody or an active fragment thereof as discussed in claims 1-4 in preparing a drug for treating diseases associated with PD-L1 expression or function abnormalities.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/121022

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110891975	A	17 March 2020	EA	202091590	A1	21 January 2021
				PH	12020551173	A1	31 May 2021
				CA	3086434	A1	03 October 2019
				CL	2020002223	A1	29 January 2021
				WO	2019185029	A1	03 October 2019
				IL	275734	D0	31 August 2020
				PE	20210377	A1	02 March 2021
				KR	20190128716	A	18 November 2019
				KR	102177931	B1	13 November 2020
				US	2020157222	A1	21 May 2020
				KR	20200130747	A	19 November 2020
				JP	2020518233	A	25 June 2020
				BR	112020019827	A2	05 January 2021
				SG	11202006008 W	A	29 July 2020
				AU	2019241339	A1	14 November 2019
				AU	2019241339	B2	12 August 2021
				EP	3589660	A1	08 January 2020
				EP	3589660	A4	07 April 2021
CN	108350082	A	31 July 2018	AU	2020217358	A1	03 September 2020
				PH	12018502623	A1	07 October 2019
				KR	20190079713	A	05 July 2019
				CL	2018003583	A1	17 May 2019
				HK	1259426	A1	29 November 2019
				AU	2017284632	A1	03 January 2019
				AU	2017284632	B2	14 May 2020
				US	2020317789	A1	08 October 2020
				KR	20180039182	A	17 April 2018
				KR	101996019	B1	03 July 2019
				MX	2018015584	A	18 September 2019
				NZ	749019	A	29 January 2021
				BR	112018075737	A2	26 March 2019
				EP	3325513	A1	30 May 2018
				EP	3325513	A4	19 December 2018
				WO	2017215590	A1	21 December 2017
				JP	2019531256	A	31 October 2019
				JP	6730466	B2	29 July 2020
				US	2018208659	A1	26 July 2018
				US	10059769	B2	28 August 2018
				US	2018346573	A1	06 December 2018
				US	10208119	B2	19 February 2019
				US	2018346574	A1	06 December 2018
				US	10723799	B2	28 July 2020
				CA	3027209	A1	21 December 2017
				PE	20190510	A1	10 April 2019
				JP	2020180135	A	05 November 2020
				CO	2018013500	A2	19 February 2019
				KR	20210084680	A	07 July 2021
				SG	11201811003 P	A	30 January 2019
				IL	263509	D0	31 January 2019
				IL	263509	A	31 January 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/121022

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107488229	A	19 December 2017	None			
CN	105461808	A	06 April 2016	None			
CN	104356236	A	18 February 2015	PL	1907424	T3	31 December 2015
				MX	2007015942	A	07 March 2008
				DK	1907424	T3	09 November 2015
				JP	2020072712	A	14 May 2020
				SG	163554	A1	30 August 2010
				KR	20080045674	A	23 May 2008
				KR	101411165	B1	25 June 2014
				RS	54271	B1	29 February 2016
				WO	2007005874	A2	11 January 2007
				WO	2007005874	A3	19 July 2007
				BR	PI0613361	A2	04 January 2011
				HR	P20151102	T1	20 November 2015
				SI	1907424	T1	31 December 2015
				JP	2016006123	A	14 January 2016
				US	2020062848	A1	27 February 2020
				KR	20140002041	A	07 January 2014
				KR	101607288	B1	05 April 2016
				NO	20080590	L	31 March 2008
				US	2016075782	A1	17 March 2016
				US	9580505	B2	28 February 2017
				IL	241092	D0	30 November 2015
				KR	20150082674	A	15 July 2015
				KR	101704734	B1	09 February 2017
				JP	2018027952	A	22 February 2018
				JP	6684253	B2	22 April 2020
				US	2013122014	A1	16 May 2013
				US	9102725	B2	11 August 2015
				CN	101248089	A	20 August 2008
				US	2009055944	A1	26 February 2009
				US	7943743	B2	17 May 2011
				US	2015337038	A1	26 November 2015
				US	9273135	B2	01 March 2016
				PT	1907424	E	09 October 2015
				CN	105330741	A	17 February 2016
				ME	02260	B	29 February 2016
				HU	E026039	T2	30 May 2016
				US	2016362495	A1	15 December 2016
				US	9580507	B2	28 February 2017
				US	2011209230	A1	25 August 2011
				US	8383796	B2	26 February 2013
				JP	2013150606	A	08 August 2013
				JP	5848719	B2	27 January 2016
				IL	188124	D0	20 March 2008
				IL	188124	A	29 September 2016
				HR	P20080053	A2	31 August 2009
				NZ	564592	A	25 November 2011
				ZA	200710919	B	29 October 2008
				EA	200800229	A1	30 June 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/121022

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EA 019344 B1	31 March 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/121022

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i;
C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 31/06(2006.01)i; A61P 31/18(2006.01)i; A61P
31/14(2006.01)i; A61P 31/20(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPABSC;CNTXT;CNKI;ISI;ELSEVER;NCBI;PUBMED;GOOGLE;GenBank;EMBL;STN;万方;中国专利生物序列检索系统数据库, 检索词:程序性死亡配体1, 分化簇274, B7同源体1, PD-L1, CD274, B7-H1, IgC, C区, C结构域, 抗体, C region, c domain, antibody, SEQ ID NOS:11-30

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 110891975 A (天境生物科技上海有限公司) 2020年3月17日 (2020 - 03 - 17) 参见全文	1-17
A	CN 108350082 A (爱迈博) 2018年7月31日 (2018 - 07 - 31) 参见全文	1-17
A	CN 107488229 A (臧敬五) 2017年12月19日 (2017 - 12 - 19) 参见全文	1-17
A	CN 105461808 A (长春金赛药业有限责任公司) 2016年4月6日 (2016 - 04 - 06) 参见全文	1-17
A	CN 104356236 A (梅达雷克斯有限责任公司) 2015年2月18日 (2015 - 02 - 18) 参见全文	1-17

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2021年12月9日

国际检索报告邮寄日期

2021年12月29日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

马岚

电话号码 86-(10)-62412181

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 15-17
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 虽然权利要求15-17涉及疾病的治疗方法（PCT实施细则第39.1(iv)），但仍对权利要求1-4所述的抗体或其活性片段在制备治疗PD-L1表达或功能异常相关的疾病的药物中的应用进行了检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/121022

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110891975	A	2020年3月17日	EA	202091590	A1	2021年1月21日
				PH	12020551173	A1	2021年5月31日
				CA	3086434	A1	2019年10月3日
				CL	2020002223	A1	2021年1月29日
				WO	2019185029	A1	2019年10月3日
				IL	275734	D0	2020年8月31日
				PE	20210377	A1	2021年3月2日
				KR	20190128716	A	2019年11月18日
				KR	102177931	B1	2020年11月13日
				US	2020157222	A1	2020年5月21日
				KR	20200130747	A	2020年11月19日
				JP	2020518233	A	2020年6月25日
				BR	112020019827	A2	2021年1月5日
				SG	11202006008W	A	2020年7月29日
				AU	2019241339	A1	2019年11月14日
				AU	2019241339	B2	2021年8月12日
				EP	3589660	A1	2020年1月8日
				EP	3589660	A4	2021年4月7日
CN	108350082	A	2018年7月31日	AU	2020217358	A1	2020年9月3日
				PH	12018502623	A1	2019年10月7日
				KR	20190079713	A	2019年7月5日
				CL	2018003583	A1	2019年5月17日
				HK	1259426	A1	2019年11月29日
				AU	2017284632	A1	2019年1月3日
				AU	2017284632	B2	2020年5月14日
				US	2020317789	A1	2020年10月8日
				KR	20180039182	A	2018年4月17日
				KR	101996019	B1	2019年7月3日
				MX	2018015584	A	2019年9月18日
				NZ	749019	A	2021年1月29日
				BR	112018075737	A2	2019年3月26日
				EP	3325513	A1	2018年5月30日
				EP	3325513	A4	2018年12月19日
				WO	2017215590	A1	2017年12月21日
				JP	2019531256	A	2019年10月31日
				JP	6730466	B2	2020年7月29日
				US	2018208659	A1	2018年7月26日
				US	10059769	B2	2018年8月28日
				US	2018346573	A1	2018年12月6日
				US	10208119	B2	2019年2月19日
				US	2018346574	A1	2018年12月6日
				US	10723799	B2	2020年7月28日
				CA	3027209	A1	2017年12月21日
				PE	20190510	A1	2019年4月10日
				JP	2020180135	A	2020年11月5日
				CO	2018013500	A2	2019年2月19日
				KR	20210084680	A	2021年7月7日
				SG	11201811003P	A	2019年1月30日
				IL	263509	D0	2019年1月31日
				IL	263509	A	2021年1月31日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/121022

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107488229	A	2017年12月19日	无			
CN	105461808	A	2016年4月6日	无			
CN	104356236	A	2015年2月18日	PL	1907424	T3	2015年12月31日
				MX	2007015942	A	2008年3月7日
				DK	1907424	T3	2015年11月9日
				JP	2020072712	A	2020年5月14日
				SG	163554	A1	2010年8月30日
				KR	20080045674	A	2008年5月23日
				KR	101411165	B1	2014年6月25日
				RS	54271	B1	2016年2月29日
				WO	2007005874	A2	2007年1月11日
				WO	2007005874	A3	2007年7月19日
				BR	PI0613361	A2	2011年1月4日
				HR	P20151102	T1	2015年11月20日
				SI	1907424	T1	2015年12月31日
				JP	2016006123	A	2016年1月14日
				US	2020062848	A1	2020年2月27日
				KR	20140002041	A	2014年1月7日
				KR	101607288	B1	2016年4月5日
				NO	20080590	L	2008年3月31日
				US	2016075782	A1	2016年3月17日
				US	9580505	B2	2017年2月28日
				IL	241092	D0	2015年11月30日
				KR	20150082674	A	2015年7月15日
				KR	101704734	B1	2017年2月9日
				JP	2018027952	A	2018年2月22日
				JP	6684253	B2	2020年4月22日
				US	2013122014	A1	2013年5月16日
				US	9102725	B2	2015年8月11日
				CN	101248089	A	2008年8月20日
				US	2009055944	A1	2009年2月26日
				US	7943743	B2	2011年5月17日
				US	2015337038	A1	2015年11月26日
				US	9273135	B2	2016年3月1日
				PT	1907424	E	2015年10月9日
				CN	105330741	A	2016年2月17日
				ME	02260	B	2016年2月29日
				HU	E026039	T2	2016年5月30日
				US	2016362495	A1	2016年12月15日
				US	9580507	B2	2017年2月28日
				US	2011209230	A1	2011年8月25日
				US	8383796	B2	2013年2月26日
				JP	2013150606	A	2013年8月8日
				JP	5848719	B2	2016年1月27日
				IL	188124	D0	2008年3月20日
				IL	188124	A	2016年9月29日
				HR	P20080053	A2	2009年8月31日
				NZ	564592	A	2011年11月25日
				ZA	200710919	B	2008年10月29日
				EA	200800229	A1	2008年6月30日

国际申请号
PCT/CN2021/121022

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
EA 019344 B1 2014年3月31日			