

(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  
2024年7月4日 (04.07.2024)



(10) 国际公布号  
WO 2024/140854 A1

(51) 国际专利分类号:  
C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)  
C07K 16/46 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/142507

(22) 国际申请日: 2023年12月27日 (27.12.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202211737491.9 2022年12月31日 (31.12.2022) CN

(71) 申请人: 合肥天港免疫药物有限公司 (HEFEI TG IMMUNOPHARMA CO., LTD.) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市经济技术开发区芙蓉路268号合肥创新创业园1#C二楼2001, Anhui 230001 (CN)。

(72) 发明人: 曹国帅 (CAO, Guoshuai); 中国安徽省合肥市经济技术开发区芙蓉路268号合肥创新创业园1#C二楼2001, Anhui 230001 (CN)。成赢

(CHENG, Ying); 中国安徽省合肥市经济技术开发区芙蓉路268号合肥创新创业园1#C二楼2001, Anhui 230001 (CN)。李洋洋 (LI, Yangyang); 中国安徽省合肥市经济技术开发区芙蓉路268号合肥创新创业园1#C二楼2001, Anhui 230001 (CN)。武玉伟 (WU, Yuwei); 中国安徽省合肥市经济技术开发区芙蓉路268号合肥创新创业园1#C二楼2001, Anhui 230001 (CN)。

(74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区阜成路73号裕惠大厦B座806, Beijing 100142 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,

(54) Title: ANTI-PDL1 ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗PDL1的抗体及其用途

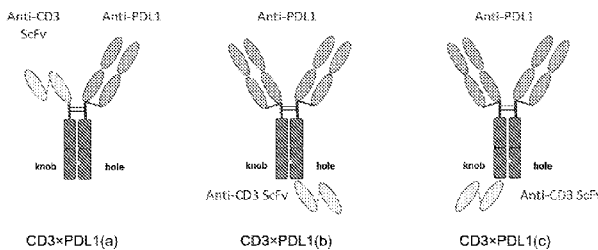
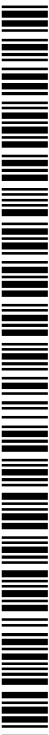


图 10

(57) Abstract: The present disclosure relates to the field of biomedicine, and in particular, to an anti-PDL1 antibody or an antigen-binding fragment thereof, and a use thereof. The anti-PDL1 antibody or the antigen-binding fragment thereof provided by the present disclosure contains a CDR sequence selected from at least one of the following or an amino acid sequence at least 80% identical thereto: heavy chain variable region CDR sequences: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, and SEQ ID NO: 3; and light chain variable region CDR sequences: SEQ ID NO: 4, WAS and SEQ ID NO: 5. The antibody has relatively high binding affinity with PDL1. Also provided is a CD3 and PDL1 bispecific antibody, which has stronger binding with tumor cells and promotes T cells to exert an anti-cancer function.

(57) 摘要: 本公开涉及生物医药领域, 具体涉及一种抗PDL1的抗体或其抗原结合片段及用途。本公开提供的抗PDL1的抗体或其抗原结合片段含有选自下列至少之一的CDR序列或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列: 重链可变区CDR序列: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3; 轻链可变区CDR序列: SEQ ID NO: 4、WAS、SEQ ID NO: 5。该抗体与PDL1具有较高的结合亲和力, 且本公开还提供一种CD3与PDL1双特异抗体, 与肿瘤细胞有更强结合, 促进T细胞发挥抗癌功能。



WO 2024/140854 A1

MU, 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, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

## 抗 PDL1 的抗体及其用途

### 优先权信息

5 本申请请求 2022 年 12 月 31 日向中国国家知识产权局提交的、专利申请号为 202211737491.9 的专利申请的优先权和权益，并且通过参照将其全文并入此处。

### 技术领域

本公开涉及生物医药领域，具体涉及一种抗 PDL1 的抗体或其抗原结合片段及用途。

### 10 背景技术

全球范围内，癌症是威胁人类生命健康的重大疾病，并且随着环境污染的加剧，癌症发病率逐年上升。与此同时，多种癌症疗法被开发，包括传统的手术切除、放疗、化疗，以及近年来兴起的靶向疗法，包括小分子靶向药物治疗、大分子靶向药物治疗、免疫检查点疗法、双特异抗体、细胞与基因疗法等。

15 近年来，最被寄予厚望的药物是免疫检查点抗体药物和双特异抗体药物。随着 CTLA4 抗体 PD-1/L1 抗体、LAG3 抗体获批，免疫检查点药物成为近年来的热潮，并在多种肿瘤包括黑色素瘤、非小细胞肺癌等瘤种中取得奇效。双特异抗体药物审批速度也明显加快，截止到目前，包括 Eemovab (CD3×EPCAM)、CD3×CD19 (Blinicyto)、Rybrevant (EGFR×cMet)、Lunsumio (CD3×CD20)、Tecvayli (CD3×BCMA) 获批，其中 Rybrevant (EGFR×cMet)、Lunsumio (CD3×CD20)、Tecvayli (CD3×BCMA) 更是去年和今年获批成药，说明这些创新药物确实能够使得更多患者受益。

20 放疗、化疗则一般伴随着强烈的副作用，以及患者体内免疫抑制状态，进而极易造成肿瘤复发。与传统的放疗、化疗细胞毒作用不同，免疫检查点疗法和双特异抗体药物借助患者自身的免疫系统抗癌，副作用相对较小，并且患者体内的免疫功能不会受到抑制。

25 PDL1 在多种肿瘤中 PDL1 表达显著上调，其通过结合 T 细胞表面的 PD-1 受体，传递免疫抑制性信号，促进 T 细胞功能耗竭，降低患者的抗癌免疫功能。利用抗体阻断 PD-1 与 PDL1 相互作用，能够逆转 T 细胞的免疫耗竭，恢复抗癌功能。截止到目前，包括 Opdivo、Keytruda 等 PD-1 抗体、以及 Tecentiq (Atezolizumab) 等 PDL1 抗体已经使得非常多的患者受益，但是应当指出，并非所有患者都响应 PD-1/L1 单抗疗法，其总体有效率在 30% 左右，仍有更多的患者无法从中受益。

由于 PD-1 受体胞外段或其变体受限于糖基化修饰的多样性，成药性不好，目前虽有 PDL1 抗体的报道以及相关产品，但均存在与肿瘤细胞表面的 PDL1 结合能力不太强的问题。

30 因此，亟需开发一种与 PDL1 具有更高亲和力的抗 PDL1 抗体。

### 发明内容

本公开旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。

为此，本公开第一方面提供一种抗体或抗原结合片段，包括：

35 选自下列至少之一的 CDR 序列或与其具有至少 80% 同一性的氨基酸序列：

重链可变区 CDR 序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3；

轻链可变区 CDR 序列：SEQ ID NO: 4、WAS、SEQ ID NO: 5。

40 本公开提供的抗体或抗原结合片段含有上述特定的 CDR 序列，其能够与肿瘤细胞表面高表达的 PDL1 特异性结合，且具有较高的结合亲和力，从而阻断免疫细胞表面的 PD-1 与 PDL1 的相互作用，促进免疫细胞抗癌功能。

在本公开的一些实施方案中，所述的抗体或抗原结合片段包括：

SEQ ID NO: 1 所示的重链可变区 CDR1 序列，SEQ ID NO: 2 所示的重链可变区 CDR2，SEQ ID NO: 3 所示的重链可变区 CDR3，SEQ ID NO: 4 所示的轻链可变区 CDR1，WAS 所示的轻链可变区 CDR2，SEQ ID NO: 5 所示的轻链可变区 CDR3。

45 在本公开的一些实施方案中，所述的抗体或抗原结合片段包括：

(a) 具有 SEQ ID NO: 6 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区；

与 (a) 相比，序列同一性至少在 80% 的氨基酸序列；

(b) 具有 SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 9 所示的轻链可变区；

与 (b) 相比, 序列同一性至少在 80% 的氨基酸序列。

在本公开的一些实施方案中, 所述的抗体或抗原结合片段包括: 如 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区; 和/或如 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 9 所示的轻链可变区。

5 在本公开的一些实施方案中, 所述的抗体或抗原结合片段包括: 如 SEQ ID NO: 6 所示的重链可变区, 和如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区; 或如 SEQ ID NO: 8 所示的重链可变区, 和如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链可变区。

在本公开的一些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段含有重链恒定区和轻链恒定区的至少之一, 所述重链恒定区和轻链恒定区的至少之一的至少一部分来自于灵长目源抗体和鼠源抗体或其突变体中的至少之一。

10 在本公开的一些实施方案中, 所述轻链恒定区和重链恒定区均来自于鼠源 IgG 抗体或其突变体或人源 IgG 抗体或其突变体。

在本公开的一些实施方案中, 所述轻链恒定区和重链恒定区均来自于鼠源 IgG1 抗体或其突变体或人源 IgG1 抗体或其突变体。

15 在本公开的一些实施方案中, 所述重链恒定区的 N 端与所述重链可变区的 C 端相连, 所述轻链恒定区的 N 端与所述轻链可变区的 C 端相连。

在本公开的一些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段具有 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12 任一项所示氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13 任一项所示氨基酸序列的轻链。

20 在本公开的一些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段具有 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 11 所示氨基酸序列的轻链; 所述抗体或抗原结合片段具有 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的轻链。

在本公开的一些实施方案中, 所述抗体或抗原结合片段包括单抗或多抗; 所述单抗包括全长抗体、Fv、单链抗体、Fab、单域抗体以及最小识别单位中的至少之一; 所述抗体或抗原结合片段能够结合 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

25 本公开第二方面提供一种双特异性结合分子, 包括: 第一结合区, 所述第一结合区包含第一方面所述的抗体或抗原结合片段; 和第二结合区, 所述第二结合区具有 CD3 结合活性。

在本公开的一些实施方案中, 所述双特异性结合分子包括对称双特异性结合分子或不对称双特异性结合分子; 所述双特异性结合分子为非对称双特异性结合分子。

30 在本公开的一些实施方案中, 所述双特异性结合分子第一结合区包含肽链 1 和肽链 2, 其中, 所述肽链 1 包括重链可变区 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 8, 所述肽链 2 包括轻链可变区 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 9。

在本公开的一些实施方案中, 所述第二结合区包括具有 CD3 结合活性的全长抗体、Fv、单链抗体、Fab、单域抗体以及最小识别单位中的至少之一。

在本公开的一些实施方案中, 所述第二结合区包括抗 CD3 单链抗体。

本公开提供的 CD3×PDL1 双特异抗体能够与肿瘤细胞有更强结合, 促进 T 细胞发挥抗癌功能。

35 在本公开的一些实施方案中, 所述抗 CD3 单链抗体包括抗 CD3 抗体重链可变区和抗 CD3 抗体轻链可变区, 其中, 所述抗 CD3 抗体重链可变区包括 SEQ ID NO: 15 所示的重链可变区 CDR1 序列, SEQ ID NO: 16 所示的重链可变区 CDR2, SEQ ID NO: 17 所示的重链可变区 CDR3; 所述抗 CD3 抗体轻链可变区具有 SEQ ID NO: 18 所示的轻链可变区 CDR1, GTN 所示的轻链可变区 CDR2, SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区 CDR3。

40 在本公开的一些实施方案中, 所述抗 CD3 单链抗体包括 SEQ ID NO: 20 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 21 所示的轻链可变区。

45 在本公开的一些实施方案中, 所述抗 CD3 单链抗体进一步包括连接肽, 其中, 所述连接肽的 N 端与所述抗 CD3 抗体重链可变区的 C 端相连, 所述连接肽的 C 端与所述抗 CD3 抗体轻链可变区的 N 端相连; 或所述连接肽的 N 端与所述抗 CD3 抗体轻链可变区的 C 端相连, 所述连接肽的 C 端与所述抗 CD3 抗体重链可变区的 N 端相连。

在本公开的一些实施方案中, 所述连接肽具有氨基酸序列 (GGGGS)<sub>n</sub>, 其中 n 为大于或等于 1 的整数, 优选为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在本公开的一些实施方案中, 所述抗 CD3 单链抗体具有如 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在本公开的一些实施方案中,所述第一结合区进一步包括第一重链恒定区和轻链恒定区的至少之一,所述第一重链恒定区和轻链恒定区的至少之一的至少一部分来自于人源抗体、灵长目源抗体和鼠源抗体或其突变体中的至少之一。

在本公开的一些实施方案中,所述第一重链恒定区和轻链恒定区均来自人源 IgG 抗体或其突变体。

5 在本公开的一些实施方案中,所述第一重链恒定区和轻链恒定区均来自人源 IgG1 抗体或其突变体。

在本公开的一些实施方案中,所述第一重链恒定区的 N 端与所述重链可变区的 C 端相连,所述轻链恒定区的 N 端与所述轻链可变区的 C 端相连。

在本公开的一些实施方案中,所述肽链 1 具有 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列,所述肽链 2 具有 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列。

10 在本公开的一些实施方案中,所述肽链 1 和肽链 2 通过二硫键相连。

在本公开的一些实施方案中,所述第二结合区进一步包括第二重链恒定区,所述第二重链恒定区的至少一部分来自于人源抗体、灵长目源抗体和鼠源抗体或其突变体中的至少之一。

在本公开的一些实施方案中,所述第二重链恒定区来自于人源 IgG 抗体或其突变体。

在本公开的一些实施方案中,所述第二重链恒定区来自于人源 IgG1 抗体或其突变体。

15 在本公开的一些实施方案中,所述第二重链恒定区的 N 端与所述抗 CD3 单链抗体的 C 端相连。

在本公开的一些实施方案中,所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区通过 knob-into-hole 结构进行连接。

本公开第三方面提供一种分离的多核苷酸,所述多核苷酸编码第一方面所述的抗体或抗原结合片段或编码第二方面所述的双特异性结合分子。

20 本公开第四方面提供一种表达载体,该表达载体携带第三方面所述的多核苷酸。

本公开第五方面提供一种重组细胞,携带第三方面所述的多核苷酸、第四方面所述的表达载体或能够表达第一方面所述的抗体或抗原结合片段或编码第二方面所述的双特异性结合分子。

在本公开的一些实施方案中,所述重组细胞是通过将第四方面表达载体导入至宿主细胞中而获得的。

在本公开的一些实施方案中,所述重组细胞为真核细胞。

25 在本公开的一些实施方案中,所述重组细胞为哺乳动物细胞。

本公开第六方面提供一种组合物,包括第一方面所述的抗体或抗原结合片段、第二方面所述的双特异性结合分子、第三方面所述的多核苷酸、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的重组细胞。

本公开第七方面提供一种制备第一方面所述的抗体或抗原结合片段、第二方面所述的双特异性结合分子的方法,包括培养第五方面所述的重组细胞。

30 本公开第八方面提供一种药物,包括第一方面所述的抗体或抗原结合片段、第二方面所述的双特异性结合分子、第三方面所述的多核苷酸、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的重组细胞或第六方面所述的组合物。

本公开第九方面提供一种试剂盒,所述试剂盒含有第一方面所述的抗体或抗原结合片段、第二方面所述的双特异性结合分子、第三方面所述的多核苷酸、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的重组细胞。

35 本公开第十方面提供第一方面所述的抗体或抗原结合片段、第二方面所述的双特异性抗体、第三方面所述的多核苷酸、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的重组细胞或第六方面所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防和/或治疗 PDL1 介导的相关疾病,包括癌症。

在本公开的一些实施方案中,所述癌症包括选自以下中的至少之一:

40 肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

本公开第十一方面提供第二方面所述的双特异性结合分子、第三方面所述的多核苷酸、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的重组细胞或第六方面所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防和/或治疗 PDL1 和 CD3 介导的相关疾病。

45 在本公开的一些实施方案中,所述 PDL1 和 CD3 介导的相关疾病包括癌症。

在本公开的一些实施方案中,所述癌症包括下列中的至少之一:

肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

本公开第十二方面提供第一方面所述的抗体或抗原结合片段、第二方面所述的双特异性抗体、第三方面所述的多核苷酸、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的重组细胞在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 PDL1。

5 本公开第十三方面提供第二方面所述的双特异性结合分子、第三方面所述的多核苷酸、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的重组细胞在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 PDL1 和/或 CD3。

利用本公开提供的 CD3 抗体与 PD-1 受体胞外段蛋白组成抗体-融合蛋白，桥联 T 细胞与 PDL1 阳性的肿瘤，能够促进 T 细胞杀伤肿瘤，即使肿瘤细胞低表达 PDL1，T 细胞仍能够促进肿瘤完全杀伤。

10 本公开第十四方面提供第一方面所述的抗体或抗原结合片段、第二方面所述的双特异性抗体、第三方面所述的多核苷酸、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的重组细胞、第六方面所述的组合物、第八方面所述的药物在预防或治疗疾病中的用途，所述疾病包括癌症，所述癌症的癌细胞表面 PDL1 呈阳性。

根据本公开的具体实施方案，所述癌症选自：肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少之一。

本公开第十五方面提供一种治疗肿瘤的方法，包括向受试者施用以下中的至少之一：

15 第一方面所述的抗体或抗原结合片段、第二方面所述的双特异性抗体、第三方面所述的多核苷酸、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的重组细胞、第六方面所述的组合物或第八方面所述的药物。

根据本公开的具体实施方案，所述肿瘤的肿瘤细胞表面 PDL1 呈阳性，所述肿瘤选自肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少之一。

20 本公开的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本公开的实践了解到。

#### 附图说明

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

图 1 为本公开一个实施方案中的鼠源 19B8 抗体与人(左 A)、食蟹猴 PDL1(右 B)蛋白结合的 ELISA 结果图；

图 2 为本公开一个实施方案中的鼠源 19B8 抗体阻断 PD-1 与 PDL1 结合的 ELISA 结果图；

图 3 为本公开一个实施方案中的鼠源 19B8 抗体与人肺癌 A549 细胞结合的流式细胞术结果图；

30 图 4 为本公开一个实施方案中的 19B8 嵌合抗体与人(左 A)、食蟹猴 PDL1(右 B)蛋白结合的 ELISA 结果图；

图 5 为本公开一个实施方案中的 19B8 嵌合抗体阻断 PD-1 与 PDL1 结合的 ELISA 结果图；

图 6 为本公开一个实施方案中的 19B8 嵌合抗体与人黑色素瘤 A375 细胞(左 A)、人肺癌 A549 细胞(右 B)结合的流式细胞术结果图；

35 图 7 为本公开一个实施方案中的人源化 19B8 抗体阻断 PD-1 与 PDL1 结合的 ELISA 结果图；

图 8 为本公开一个实施方案中的人源化 19B8 抗体与人黑色素瘤 A375 细胞(左 A)、人肺癌 A549 细胞(右 B)结合的流式细胞术结果图；

图 9 为本公开一个实施方案中的人源化 19B8 抗体促进 SEB 诱导的人 PBMC 分泌 IL-2 结果图；

图 10 为本公开一个实施方案中的 CD3×PDL1 双特异抗体模式图；

40 图 11 为本公开一个实施方案中的 CD3×PDL1 双特异抗体结合 PDL1 融合蛋白的结果图；

图 12 为本公开一个实施方案中的 CD3×PDL1 双特异抗体阻断 PD-1 与 PDL1 结合的 ELISA 结果图；

图 13 为本公开一个实施方案中的 CD3×PDL1 双特异抗体促进 PBMC 杀伤人黑色素瘤 A375 细胞的结果图；

45 图 14 为本公开一个实施方案中的 CD3×PDL1 双特异抗体与人肺腺癌 A549 细胞结合的流式细胞术结果图；

图 15 为本公开一个实施方案中的 CD3×PDL1 双特异抗体促进 PBMC 杀伤人黑色素瘤 A375 细胞的结果图；

图 16 为本公开一个实施方案中的 CD3×PDL1 抗体促进 PBMC 重建小鼠抗癌的结果图。

## 发明详细描述

下面详细描述本公开的实施例。下面描述的实施例是示例性的，仅用于解释本公开，而不能理解为对本公开的限制。

5 此外，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本公开的描述中，“多个”的含义是至少两个，例如两个，三个等，除非另有明确具体的限定。

10 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值，这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说，各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间，以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围，这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

15 为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义，否则本文中使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。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。

在本文中，术语“包含”或“包括”为开放式表达，即包括本公开所指明的内容，但并不排除其他方面的内容。

在本文中，术语“任选地”、“任选的”或“任选”通常是指随后所述的事件或状况可以但未必发生，并且该描述包括其中发生该事件或状况的情况，以及其中未发生该事件或状况的情况。

20 本公开所述的抗体或抗原结合片段通常由生物合成的方法制备。根据本公开所述的核苷酸序列，本领域技术人员可方便地用各种已知方法制得本公开的编码核酸。这些方法例如但不限于：PCR，DNA 人工合成等，具体的方法可参见 J.萨姆布鲁克，《分子克隆实验指南》。作为本公开的一种实施方式，可通过分段合成核苷酸序列再进行重叠延伸 PCR 的方法来构建本公开的编码核酸序列。其中，所述抗体或抗原片段是采用 Kabat 编号系统进行编号和定义的。在本文中，术语“抗体”是能够与特异性抗原结合的免疫球蛋白分子。包括两条分子量较轻的轻链和两条分子量较重的重链，重链（H 链）和轻链（L 链）由二硫键连接形成一个四肽链分子。其中，肽链的氨基端（N 端）氨基酸序列变化很大，称为可变区（V 区），羧基端（C 端）相对稳定，变化很小，称为恒定区（C 区）。L 链和 H 链的 V 区分别称为 VL 和 VH。在可变区中某些区域氨基酸组成和排列顺序具有更高的变化程度，称为高变区（Hypervariable region, HVR），高变区为抗原和抗体结合的位置，因此也称为决定簇互补区（complementarity-determining region, CDR）。重链可变区和轻链可变区上均有三个 CDR 区。

本公开的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，优选人源化抗体。

35 术语“鼠源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能制备的对人 B7H6 的单克隆抗体。制备时用抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本公开一个优选的实施方式中，所述的鼠源 B7H6 抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源  $\kappa$ 、 $\lambda$  链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链恒定区。

在本文中，术语“抗原结合片段”也即“抗体片段”，抗体片段通常是指抗原结合性抗体片段，可以包括完整抗体的一部分，一般是抗原结合区或可变区，抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 或 scFv，双抗体，线性抗体，单链抗体分子等。

本文中，所述“单抗”是指具有单一抗原结合位点的抗体。

40 本文中，所述“双抗”是指具有两个不同抗原结合位点的抗体。

在本文中，术语“突变体”或“变体”可以指包含对任何天然存在的或工程化的分子进行包含一个或多个核苷酸或氨基酸突变获得的分子。

45 在本文中，术语“互补决定区”或“CDR”或“CDR 序列”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸序列，例如，通常包括：轻链可变区中 23-34(L1)、50-56(L2)和 89-97(L3)附近，和重链可变区中 31-35B(H1)、50-65(H2)和 95-102(H3)附近的氨基酸残基（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)）；和/或来自“高变环”（例如，轻链可变区中 26-32(L1)、50-52(L2)和 91-96(L3)，和重链可变区中 26-32(H1)、53-55(H2)和 96-101(H3)附近的氨基酸残基（Chothia 和 Lesk J.Mol.Biol.196: 901-917(1987)）。

在本文中，术语“功能性片段”尤其是指抗体片段如 Fv、scFv(sc 指单链)、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv-Fc 片段或者双抗体(diabody)、或者通过化学修饰或通过掺入脂质体中应能够增加半寿期的任何片段，所述化学修饰例如添加聚(亚烷基)二醇，如聚乙二醇(“聚乙二醇化，PEG 化”)(被称为 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')<sub>2</sub>-PEG 或 Fab'-PEG 的聚乙二醇化片段)(“PEG”为聚乙二醇)。

5 在本文中，术语“嵌合抗体”是指利用重组 DNA 技术，将来自一个物种(如小鼠)的单克隆抗体的恒定区氨基酸序列替换为来自另一个物种(如人)的抗体的恒定区而获得的重组抗体。

在本文中，术语“人源化抗体”(humanized antibody)是指利用重组 DNA 技术，将来自一个物种(如小鼠)的单克隆抗体的恒定区和可变区的非 CDR (Fv 骨架区(FR))氨基酸序列全部替换为来自另一个物种(如人)的抗体的恒定区和可变区的非 CDR 氨基酸序列而获得的重组抗体。也即，一个抗体的恒定区被人源化时称为嵌合抗体，而恒定区和可变区的非 CDR 氨基酸序列全部人源化后称为人源化抗体。

10 在本文中，所述“全长抗体”是由两条相同的轻链和两条相同的重链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构，如免疫球蛋白 G (IgG)、免疫球蛋白 A (IgA)、免疫球蛋白 M (IgM)、免疫球蛋白 D (IgD) 或免疫球蛋白 E (IgE)。同一类免疫球蛋白也可以根据氨基酸组成为不同的亚类，如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4。免疫球蛋白轻链根据恒定区的不同分为 κ 链或者 λ 链。

15 在本文中，“knob into hole 结构”为在抗体重链恒定区的 CH3 区形成钮 (Knob)扣 (hole)突变，便于重链咬合，形成异二聚体。

在本文中，术语“同一性”用于描述相对于参考序列的氨基酸序列或核酸序列时，采用通过常规的方法进行确定两个氨基酸序列或核酸序列之间的相同氨基酸或核苷酸的百分比，例如参见，Ausubel 等，编著(1995)，Current Protocols in Molecular Biology，第 19 章(Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York); 和 ALIGN 程序 (Dayhoff(1978)，Atlas of Protein Sequence and Structure 5: Suppl.3(National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.))。关于比对序列和测定序列同一性有很多算法，包括，Needleman 等(1970)J.Mol.Biol.48: 443 的同源性比对算法; Smith 等(1981)Adv.Appl.Math.2: 482 的局部同源性算法; Pearson 等(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.85: 2444 的相似性搜索方法; Smith-Waterman 算法 (Meth.Mol.Biol.70: 173-187(1997)); 和 BLASTP, BLASTN, 和 BLASTX 算法(参见 Altschul 等 25 (1990)J.Mol.Biol.215: 403-410)。利用这些算法的计算机程序也是可获得的，并且包括但不限于: ALIGN 或 Megalign(DNASTAR)软件，或者 WU-BLAST-2(Altschul 等, Meth.Enzym., 266: 460-480(1996)); 或者 GAP, BESTFIT, BLAST Altschul 等, 上文, FASTA, 和 TFASTA, 在 Genetics Computing Group(GCG)包, 8 版, Madison, Wisconsin, USA 中可获得; 和 Intelligenetics, Mountain View, California 提供的 PC/Gene 程序中的 CLUSTAL。

30 在不实质性影响抗体活性(保留至少 95%的活性)的前提下，本领域技术人员可以对本公开的序列替换、添加和/或缺失一个或更多个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个或更多个)氨基酸，以获得所述抗体或其功能性片段之序列的变体。它们都被视为包括在本公开保护的范围内。如在可变区将具有类似性质的氨基酸进行替换。本公开所述变体序列可以与参比序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的一致性(或同源性)。本公开所述的序列一致性可以使用序列分析软件测量。 35 例如使用缺省参数的计算机程序 BLAST，尤其是 BLASTP 或 TBLASTN。本公开所述的氨基酸序列均按照 N 端至 C 端的方式示出。

#### 抗 PDL1 抗体或抗原结合片段

根据本公开的具体实施方案，本公开提供一种能特异性识别 PDL1 的抗体(抗 PDL1 抗体)或抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段含有选自下列至少之一的 CDR 序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列：重链可变区 CDR 序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3；轻链可变区 CDR 40 序列：SEQ ID NO: 4、WAS、SEQ ID NO: 5。

CDR 序列中的“WAS”是指氨基酸序列。

根据本公开一个具体的实施方案，所述抗 PDL1 抗体或抗原结合片段包括：

SEQ ID NO: 1 所示的重链可变区 CDR1 序列，SEQ ID NO: 2 所示的重链可变区 CDR2，SEQ ID NO: 3 所示的重链可变区 CDR3，SEQ ID NO: 4 所示的轻链可变区 CDR1，WAS 所示的轻链可变区 CDR2， 45 SEQ ID NO: 5 所示的轻链可变区 CDR3。

根据本公开一个具体的实施方案，所述抗 PDL1 抗体或抗原结合片段包括：如 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO:8 所示的重链可变区；和/或

如 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO:9 所示的轻链可变区。

根据本公开一个具体的实施方案，所述抗 PDL1 抗体或抗原结合片段包括：

如 SEQ ID NO: 6 所示的重链可变区，和如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区；或

如 SEQ ID NO:8 所示的重链可变区，和如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链可变区。

5 根据本公开的具体实施方案，在不实质性影响抗体活性（保留至少 95%的活性）的前提下，本领域技术人员可以对本公开的序列替换、添加和/或缺失一个或更多个（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个或更多个）氨基酸，以获得所述抗体或其功能性片段之序列的变体。它们都被视为包括在本公开保护的范围内。如在可变区将具有类似性质的氨基酸进行替换。本公开所述变体的序列可以与参比序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的一致性（或同源性）。本公开所述的序列一  
10 致性可以使用序列分析软件测量。例如使用缺省参数的计算机程序 BLAST, 尤其是 BLASTP 或 TBLASTN。本公开所述的氨基酸序列均按照 N 端至 C 端的方式示出。本领域技术人员应知的是，不同数据库分析出来的 CDR 序列可能不一样，但是这些变化均应包含在本公开的保护范围之内。

根据本公开的具体实施方案，本公开的抗体可以是全长的（例如，IgG1 或 IgG4 抗体）或可仅包含抗原结合部分（例如，Fab、F(ab')<sub>2</sub> 或 scFv 片段），或可以被修饰以影响功能。本公开包括具有修饰的糖基化模式的抗 PDL1 抗体。在一些应用中，进行修饰以除去不期望的糖基化位点可以是有用的，或在寡糖链上不存在岩藻糖部分以例如增强抗体依赖性细胞毒性(ADCC) 功能的抗体。在另一些应用中，可进行半乳糖基化修饰以改变补体依赖性细胞毒性(CDC)。经过一系列修饰后，本公开所述片段依旧具有具有 PDL1 结合活性，特别是特别是 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。优选地，所述功能性片段将由其来源抗体的重链可变区或轻链可变区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  
15 抗体相同的结合特异性和充分的亲和力，对于 PDL1，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、  
20 50 和 100 个连续氨基酸。

根据本公开的具体实施方案，为了进一步提高抗体的生物可接受性，本公开对抗体进行了人源化处理，人源化的方法可以参照常规的抗体工程技术进行，本公开提供的人源化抗体的重链可变区的序列如  
25 SEQ ID NO: 8 所示，轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

#### 核酸分子、重组载体、重组细胞、免疫缀合物

在制备或者获取这些抗体的过程中，可以利用表达这些抗体的核酸分子，与不同的载体连接，然后在不同细胞中表达，来获得相应抗体。

因此，本公开还提供了编码上述抗体或其抗原结合片段的分离的核酸以及含有该核酸的重组载体和  
30 转化子。所述核酸分子编码上述所述的抗体或其抗原结合片段，所述核酸优选为基因工程手段获得的表达盒。

重组载体可以指克隆载体，也可以指表达载体，可以通过将所述核酸与商购的载体（如质粒或病毒载体）可操作地连接而获得，常用的质粒包括 pSeTag2、PEE14、pMH3 等。

在一些优选的实施方案中，所述核酸分子经过种属优化，更易在哺乳动物细胞中表达。

35 本公开还提供了一种表达载体，所述表达载体包含上述分离的核酸分子。在将上述分离的多核苷酸连接到载体上时，可以将多核苷酸与载体上的控制元件直接或者间接相连，只要这些控制元件能够控制多核苷酸的翻译和表达等即可。当然这些控制元件可以直接来自于载体本身，也可以是外源性的，即并非来自于载体本身。当然，多核苷酸与控制元件进行可操作地连接即可。本文中“可操作地连接”是指将外源基因连接到载体上，使得载体内的控制元件，例如转录控制序列和翻译控制序列等等，能够发挥其  
40 预期的调节外源基因的转录和翻译的功能。当然用来编码抗体重链和轻链的多核苷酸，可以分别独立的插入到不同的载体上，常见的是插入到同一载体上。常用的载体例如可以为质粒、噬菌体等等。

本公开还提供了一种重组细胞，该重组细胞中包含有该表达载体。可以将表达载体导入到哺乳动物细胞中，构建获得重组细胞，然后利用这些重组细胞表达本公开提供的抗体或者抗原结合片段。通过该重组细胞进行培养，即可以获得相应抗体。本公开所述宿主细胞可以为原核宿主细胞、真核宿主细胞或噬菌体。所述原核宿主细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。所述真核宿主细胞可以为包括巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌，草地粘虫等昆虫细胞，烟草等植物细胞，  
45 BHK 细胞、CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施方式中，本公开所述宿主细胞优选为哺乳动物细胞，更优选 BHK 细胞、CHO 细胞、NSO 细胞或 COS 细胞。

本公开提供的免疫缀合物含有治疗剂以及与治疗剂偶联的如前所述的抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段与治疗剂偶联的方式可以为常规的方式。

5 本公开提供的组合物含有如前所述的抗体或其抗原结合片段、和/或上述免疫缀合物、以及药学上可接受的载体。在某些实施方式中，所述组合物包括在时间和/或空间上分开的组合，只要其能够共同作用以实现本公开的目的。例如，所述组合物中所含的成分可以以整体施用于受试者，或者分开施用于受试者。当所述组合物中所含的成分分开地施用于受试者时，各个成分可以同时或依次施用于受试者。

#### 药物、试剂盒及制药用途和在制备试剂盒中的用途

本公开还提供了一种药物，所述药物包括上述抗体或者其抗原结合片段和药学可接受的载体，还可以包括上述免疫缀合物、核酸分子、表达载体、重组细胞。

10 在一些实施例中，这些药物组合物进一步包括药学上可接受的载体，包括任何溶剂、固体赋形剂、稀释剂、粘合剂、崩解剂、或其他液体赋形剂、分散剂、矫味剂或悬浮剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂、乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、助流剂或润滑剂，等等，适合于特有的目标剂型。除了任何常规的辅料与本公开的化合物不相容的范围，例如所产生的任何不良的生物效应或与药学上可接受的组合物的任何其他组分以有害的方式产生的相互作用，它们的用途也是本公开所考虑的范围。

15 本公开的组合物也可以相互组合、或与一种或多种其它的治疗化合物组合地给药，例如，与化疗剂组合给药。因此，所述组合物还可以含有化疗剂。本公开的抗体或其抗原结合片段、或免疫缀合物还可以与第二治疗剂组合，所述第二治疗剂的示例性试剂包括但不限于抑制 PDL1 活性的其他试剂（包括其他抗体或其抗原结合片段、肽抑制剂、小分子拮抗剂等）和/或干扰 PDL1 上游或下游信号转导的试剂。

20 通常，所述抗体或其抗原结合片段以有效量给药，即足以实现期望的治疗和/或预防效果的量，例如，引起与被治疗的疾病相关的症状的预防或缓解的量，所述疾病例如与 PDL1 相关的疾病。给药至受试者的组合物的有效量将取决于疾病的类型和严重程度，以及取决于个体的特征，例如一般健康状态、年龄、性别、体重和对药物的耐受性；还将取决于疾病的严重程度和类型，本领域技术人员将能够根据这些因素等确定合适的剂量。

25 在本公开的一些实施方案中，本公开提供的用于检测样品中 PDL1 的试剂盒含有如上所述的抗体或其抗原结合片段，药学可接受的载体，免疫缀合物、核酸分子、表达载体、重组细胞。在一些实施方案中，所述样品可以为患有 PDL1 介导的疾病的患者（特别是移植排斥、自身免疫病、感染性疾病或癌症患者，更优选是患有肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种的患者）的组织。所述试剂盒还可以包括常规用于检测 PDL1 的试剂，如包被液等。

30 本公开还提供了所述的抗体或其抗原结合片段，药学可接受的载体，免疫缀合物、核酸分子、表达载体、重组细胞。在制备用于预防和/或治疗 PDL1 介导的疾病的药物中的用途。优选地，所述 PDL1 介导的疾病为移植排斥、自身免疫病、感染性疾病或癌症。更优选地，所述癌症为表达 PDL1 的癌症。进一步优选地，所述癌症为肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少一种。进一步优选地，所述感染性疾病包

35 括但不限于 HIV 病毒感染和/或乙型肝炎病毒感染。本公开还涉及一种预防和/或治疗 PDL1 介导的疾病（如前所述）的方法，该方法包括：将有效量的本公开的抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物和组合物中的至少一种给药至患者。其中，给药的方式可以为口服给药、经鼻给药、皮内给药、皮下给药、肌内给药或静脉给药或腹腔内给药。

40 编码本公开的抗体的重链和/或轻链的核酸在本公开的范围內，根据重链和/或轻链的氨基酸序列，本领域技术人员能够很容易得到相应的核酸序列，如表 1 所示。

表 1

SEQ ID NO:	序列	说明
1	GYSFTGY	19B8 HCDR1
2	INPYNGAT	19B8 HCDR2
3	VPTGMGYFLMDY	19B8 HCDR3
4	QDVGSA	19B8 LCDR1
WAS	WAS	19B8 LCDR2

5	QQFTSYPT	19B8 LCDR3
6	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSHVKSLE WIGRINPYNGATTYSQNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVY YCVPTGMGYFLMDYWGQGTSTVTVSS	鼠源 19B8 VH
7	DIVMTQSHKFMSASVGDVRSITCKASQDVGSVAVVWYRQKPGQSPKLL IYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQQFTSYPT FGSGTRLEIK	鼠源 19B8 VL
8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYMHVVRQAPGQGL EWIGRINPYNGATTYSQNFKDRATMTVDTSISTAYMELSRRLRSDDTAV YCVPTGMGYFLMDYWGQGTSTVTVSS	人源化 19B8 VH
9	DIQLTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQDVGSVAVVWYQKPGKAPKLLI YWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQQFTSYPTFG QGTKLEIK	人源化 19B8 VL
10	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSHVKSLE WIGRINPYNGATTYSQNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVY YCVPTGMGYFLMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNS MVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT VPSSRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQ PREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK KGRPKAPQVYVYTPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFPEDITVEWQWNGQ PAENYKNTQPMINTNGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLH NHHTEKSLSHSPGK	鼠源重链 19B8 VH-mIgG1
11	DIVMTQSHKFMSASVGDVRSITCKASQDVGSVAVVWYRQKPGQSPKLL IYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQQFTSYPT FGSGTRLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNPFYPKDINV KWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	鼠源轻链 19B8 VL-mK
12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYMHVVRQAPGQGL EWIGRINPYNGATTYSQNFKDRATMTVDTSISTAYMELSRRLRSDDTAV YCVPTGMGYFLMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	人源化 19B8 重链 -hIgG1LALA
13	DIQLTQSPSFLSASVGDVRSITCKASQDVGSVAVVWYQKPGKAPKLLI YWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQQFTSYPTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSTLTLTKADYEEKHKVYAC EVTHQGLSPVTKSFNRGEC	人源化 19B8 轻链 -hK
14	MQIQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFPALLVVTGEG DNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRF RVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYLCAISLAPKAQIKESLRAELR VTERRAEVPTAHPSPRPAGQFQTLVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI	PD-1

	CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPV PCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	
15	GFTFNTYA	CD3 HCDR1
16	IRSKYNNYAT	CD3 HCDR2
17	VRHGNFGNSYVSWFAY	CD3 HCDR3
18	TGAVTTSNY	CD3 LCDR1
GTN	GTN	CD3 LCDR2
19	ALWYSNLWV	CD3 LCDR3
20	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	CD3 VH
21	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYS NLWVFGGGTKLTVL	CD3 VL
22	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGG GSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALW YNSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 单链抗体
23	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHVWRQAPGQGL EWIGRINPYNGATTYSQNFKDRATMTVDTSISTAYMELSRRLRSDDTAV YYCVPTGMGYFLMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	h19B8-hIgG1LAL Ahoss
24	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGG GSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAP RGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALW YNSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS LHNHYTQKSLSLSPGK	CD3-hIgG1LALA kbss
25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHVWRQAPGQGL EWIGRINPYNGATTYSQNFKDRATMTVDTSISTAYMELSRRLRSDDTAV YYCVPTGMGYFLMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	h19B8-hIgG1LAL Akbss

	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
26	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHVWRQAPGQGLEWIGRINPYNGATTYSQNFKDRATMTVDTISITAYMELSRLRSDDTAVYYCVPTGMGYFLMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGSELVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	h19B8-hIgG1LAL AkbssCross3
27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYMHVWRQAPGQGLEWIGRINPYNGATTYSQNFKDRATMTVDTISITAYMELSRLRSDDTAVYYCVPTGMGYFLMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGSELVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	h19B8-hIgG1LAL AhossCross3
28	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFSTYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARKFHVSGSPFGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	12A4-hIgG1LALA
29	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGDTFSTYAISWVRQAPGQGLEW	12A4-hIgG1LALA

	MGGIPIFGKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFC ARKFHFVSGSPFGMDVWGQTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	hoss
30	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFG QGTEKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	12A4-hK
31	EVQLQSSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSHVKSLE WIGRINPYNGATTYSQNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVY YCVPTGMGYFLMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	鼠源 19B8 重链 -hIgG1LALA 嵌合 抗体
32	DIVMTQSHKFMASVGDVRSITCKASQDVGSVVWYRQKPGQSPKLL IYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTITISNVQSEDLADYFCQQFTSYPT FGSGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	鼠源 19B8 轻链 -hK 嵌合抗体

下面将结合实施例对本公开的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本公开，而不应视为限定本公开的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

**实施例 1 抗体的制备**

生成针对人 PDL1 的鼠源单克隆抗体，用纯化的重组 PDL1 胞外区 Strep tag 标签融合蛋白(PDL1-strep) 作为抗原，免疫 C57BL/6 小鼠（9 周龄，购自上海莱斯克，体重 20g 左右）。

免疫小鼠使用纯化抗原和完全弗氏佐剂进行 3 次免疫，通过尾静脉放血后检测免疫应答。通过 ELISA、流式细胞术筛选血清，获取有抗人 PDL1 免疫球蛋白的小鼠。并对有最高的抗 PDL1 免疫球蛋白的小鼠取出脾细胞与鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞（ATCC 编号 CRL-1581）进行融合。融合后的杂交瘤细胞进行抗体筛选，得到鼠单抗。

将候选杂交瘤细胞总数量培养到 10<sup>6</sup> 个，800rpm 离心 10 分钟收集细胞，并以 Trizol 试剂盒(Invitrogen) 提取总 RNA；以总 RNA 为模板，逆转录合成 cDNA 文库（Invitrogen），又以 cDNA 为模板 PCR 扩增杂交瘤细胞的所对应的可变区核酸序列。PCR 扩增反应中所使用的引物序列与抗体可变区第一框架区或信号肽区和恒定区互补(Larrick, J.W., et al., (1990) Scand.J.Immunol., 32, 121-128 和 Coloma, J.J.et al., (1991) BioTechniques, 11, 152-156)。在 50μl 反应体系中，分别加入 cDNA 2μl，10×PCR 缓冲液 5μl，上

游及下游引物 2 $\mu$ l (5 $\mu$ mol), dNTP 2 $\mu$ l, Taq 酶 1 $\mu$ l (Takara, Ex Taq), H<sub>2</sub>O 38 $\mu$ l; 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 进入温度循环, 进行 PCR 扩增。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 30S, 58 $^{\circ}$ C 退火 45S, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50S, 共 32 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延长 7 min。将扩增产物测序后, 得到鼠单抗的重链和轻链可变区序列。

重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示:

5 EVQLQQSGPDLV KPGASVKISCKASGYSFTGYYMHVVKQSHVKSLEWIGRINPYNGATTYSQNFK  
DKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCVPTGMGYFLMDYWGQGTSTVTVSS

轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示:

DIVMTQSHKFMSASV GDRVSITCKASQDVGS AVVWYRQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGS  
GSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQFTSYPTFGSGTRLEIK

10

## 实施例 2 PDL1 抗体 ELISA 结合实验

ELISA 实验被用于检测 PDL1 抗体的结合特性。PDL1 胞外区蛋白包被到 96 孔板中, 抗体加入后信号的强弱用于判断抗体和 PDL1 的结合特性。

15 抗体生产: 分别将上述抗体的重链和轻链核苷酸序列的 pcDNA3.4 载体 (南京金斯瑞合成, 鼠源 19B8 重链即 19B8-mIgG1 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示)、鼠源 h19B8 轻链即 19B8-mK (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示) 瞬时转染 ExpiCHO-S 细胞 (Gibco, 货号 A29127) 来制备抗体。

20 EVQLQQSGPDLV KPGASVKISCKASGYSFTGYYMHVVKQSHVKSLEWIGRINPYNGATTYSQNFK  
DKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCVPTGMGYFLMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPG  
SAAQTNSMVTGLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPPSPRSETVTCNV  
AHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT CVVVDISKDDPEVQFSWF  
VDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQ  
VYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNVQKS  
NWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (SEQ ID NO: 10)

25 DIVMTQSHKFMSASV GDRVSITCKASQDVGS AVVWYRQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGS  
GSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQFTSYPTFGSGTRLEIKRADAAPT VSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLN  
NFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV  
KSFNRNEC (SEQ ID NO: 11)

30 转染前一天, 将 ExpiCHO-S 细胞调整细胞密度为 (3~4)  $\times 10^6$ /mL, 在 37 $^{\circ}$ C、8%CO<sub>2</sub> 和 95 rpm 条件下摇动培养过夜。转染当天, 细胞生长到 7 $\times 10^6$ ~1 $\times 10^7$ /mL, 存活率大于 95% 时准备转染, 使用新鲜预热的 ExpiCHO 培养基 (Gibco, 货号 A2910002) 将细胞稀释到 6 $\times 10^6$ /mL, 将上述携带有重链和轻链的 pcDNA3.4 质粒 (轻重链质粒配比 1: 1) 和 ExpiFectamine CHO 转染试剂 (Gibco, 货号 A29129) 转染到 ExpiCHO-S 细胞中, 在 37 $^{\circ}$ C、8%CO<sub>2</sub> 和 95 rpm 条件下摇动培养。转染后 18-22 h, 将 ExpiFectamine CHO Enhancer 和 ExpiCHO Feed 混匀后立即加入转染后细胞, 混匀, 于 32 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 和 95 rpm 条件下摇动培养。转染后第 5 天, 向细胞中再补加 8 mL ExpiCHO Feed, 混匀后继续培养。每日观察细胞数和细胞活率变化, 待细胞活率下降至 80% 以下或培养 10~14 天后离心收获细胞。表达的上清用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 利用 Mabselect prism A protein A 亲和层析柱 (购自苏州纳微) 从表达上清中捕获带有 Fc 结构域的抗体, 用 pH7.2 的磷酸盐缓冲液平衡层析柱后, 上清过亲和层析柱, 用洗脱缓冲液 (100 mM 柠檬酸, pH2.7) 洗脱, 最后用 PBS 缓冲液浓缩置换, 纯化后的抗体通过 SDS-PAGE 鉴定纯度在 95% 以上, 结果显示最终获得了上述抗体。

40 用 PBS 缓冲液将人 PDL1-Fc 融合蛋白 (购自 Acro) 或猴 PDL1-His tag 蛋白 (购自 Acro) 稀释为 1 $\mu$ g/ml, 以 100 $\mu$ l/孔的体积加于 96 孔板中, 于 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。将 96 孔板中 PBS 缓冲液吸掉, 用 PBST (pH7.2 PBS 含 0.1% Tween 20) 缓冲液洗板 6 次后, 加入 200 $\mu$ l/孔 PBS/10% BSA, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h 进行封闭。移去封闭液, 用 PBST 洗板 6 次后, 加入 100 $\mu$ l/孔用 PBST/0.05% BSA 稀释至合适浓度的待测鼠源 PDL1 抗体 19B8, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。移去反应体系, 用 PBST 洗板 6 次后, 以 100 $\mu$ l/孔用 PBST/0.05% BSA 稀释 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的抗鼠 IgG 抗体二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用 PBST 洗板 6 次后, 加入 80 $\mu$ l/孔 TMB (四甲基联苯胺), 于室温孵育 3min, 加入 80 $\mu$ l/孔 4M 硫酸终止反应。用酶标仪在 450nm 处读取吸光值。结果如图 1 所示, 表明本公开的 PDL1 抗体能够结合人、猴 PDL1 蛋白。

45

**实施例 3: 鼠源 PDL1 抗体阻断活性检测实验**

ELISA 实验被用于检测抗体对 PDL1 与其受体 PD-1 结合的影响, 具体实验如下:

用 PBS 缓冲液将 PDL1-Fc 融合蛋白 (购自 Acro) 稀释为 5 $\mu$ g/mL, 以 100 $\mu$ L/孔的体积加于 96 孔板中, 于 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。将 96 孔板中 PBS 缓冲液吸掉, 用 PBST (pH7.2 PBS 含 0.1% Tween 20) 缓冲液洗板 6 次后, 加入 200 $\mu$ L/孔 PBS/10% BSA, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h 进行封闭。移去封闭液, 用 PBST 洗板 6 次后, 加入 100 $\mu$ L/孔用 PBST/0.05% BSA 稀释至不同浓度的 19B8 抗体、稀释至 2 $\mu$ g/ml 的 PD-1-Avi tag (购自 Acro), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。移去反应体系, 用 PBST 洗板 6 次后, 以 100 $\mu$ L/孔用 PBST/0.05% BSA 稀释 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的 Streptavidin 二抗 (购自 Southern biotech), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用 PBST 洗板 6 次后, 加入 80 $\mu$ L/孔 TMB (四甲基联苯胺), 于室温孵育 3min, 加入 80 $\mu$ L/孔 4M 硫酸终止反应, 其中, 以 mIgG (购自 Biolegend) 为对照。用酶标仪在 450nm 处读取吸光值。结果如图 2 所示, 表明本公开的鼠源 PDL1 抗体 (19B8) 能够阻断 PDL1 与其受体 PD-1 的结合。

**实施例 4: 鼠源 PDL1 抗体流式细胞术结合实验**

用 PBS 将人肺腺癌 A549 细胞稀释为 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL, 以 100 $\mu$ L/管的体积加于 1.5mL EP 管中, 向其中加入 10 $\mu$ L/管山羊血清, 于 4 $^{\circ}$ C 封闭 30min。加入不同浓度的 19B8 抗体 (重链氨基酸序列如 SEQ IDNO:10 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ IDNO:11 所示), 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 30min。向 EP 管中加入 1mL PBS, 于 4 $^{\circ}$ C、3500rpm $\times$ 5min 离心, 弃尽上清, 再用 PBS 洗一遍。离心后弃尽上清, 用 100 $\mu$ L/管 PBS 重悬细胞, 向其中加入 1 $\mu$ L/管 Alexa-647 标记的山羊抗小鼠抗体二抗 (Biolegend), 于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min。用 PBS 洗两遍, 离心后弃尽上清。用 200 $\mu$ L/管 PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪进行检测, 结果如图 3 所示, 进一步显示本公开的鼠源 PDL1 抗体能够结合肿瘤细胞表面的 PDL1。

**实施例 5: 人鼠嵌合 PDL1 抗体 ELISA 结合实验**

ELISA 实验被用于检测 PDL1 抗体的结合特性。PDL1 胞外区蛋白包被到 96 孔板中, 抗体加入后信号的强弱用于判断抗体和 PDL1 的结合特性。

抗体生产: 分别将上述抗体的重链和轻链核苷酸序列的 pcDNA3.4 载体 (南京金斯瑞合成, 鼠源 19B8 重链 hIgG1LALA 即 19B8-hIgG1LALA (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示)、鼠源 h19B8 轻链 hK 即 19B8-hK (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示)、全人源 12A4 抗体重链 12A4-hIgG1LALA (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示)、全人源 12A4 抗体轻链 12A4-hK (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示) 瞬时转染 ExpiCHO-S 细胞 (Gibco, 货号 A29127) 来制备抗体。

EVQLQQSGPDLVKGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSHVKSLEWIGRINPYNGATTYSQNFK  
DKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCVPTGMGYFLMDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPS  
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICN  
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 31)

DIVMTQSHKFMSASVGDVRSITCKASQDVGSVAVVWYRQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGS  
GSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQFTSYPTFGSGTRLEIKRTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN  
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 32)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKTSGDTFSTYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFKQ  
GRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPL  
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 28)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG

TDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS  
FNRGEC (SEQ ID NO: 30)

5 转染前一天, 将 ExpiCHO-S 细胞调整细胞密度为  $(3\sim 4) \times 10^6/\text{mL}$ , 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $8\%\text{CO}_2$  和 95 rpm 条件下摇动培养过夜。转染当天, 细胞生长到  $7 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7/\text{mL}$ , 存活率大于 95% 时准备转染, 使用新鲜预热的 ExpiCHO 培养基 (Gibco, 货号 A2910002) 将细胞稀释到  $6 \times 10^6/\text{mL}$ , 将上述携带有重链和轻链的 pcDNA3.4 质粒 (轻重链质粒配比 1: 1) 和 ExpiFectamine CHO 转染试剂 (Gibco, 货号 A29129) 转染到 ExpiCHO-S 细胞中, 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $8\%\text{CO}_2$  和 95 rpm 条件下摇动培养。转染后 18-22 h, 将 ExpiFectamine CHO Enhancer 和 ExpiCHO Feed 混匀后立即加入转染后细胞, 混匀, 于  $32^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  和 95 rpm 条件下摇动培养。转染后第 5 天, 向细胞中再补加 8 mL ExpiCHO Feed, 混匀后继续培养。每日观察细胞数和细胞活率变化, 待细胞活率下降至 80% 以下或培养 10~14 天后离心收获细胞。表达的上清用  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤, 利用 Mabselect prism A protein A 亲和层析柱 (购自苏州纳微) 从表达上清中捕获带有 Fc 结构域的抗体, 用 pH7.2 的磷酸盐缓冲液平衡层析柱后, 上清过亲和层析柱, 用洗脱缓冲液 (100 mM 柠檬酸, pH2.7) 洗脱, 最后用 PBS 缓冲液浓缩置换, 纯化后的抗体通过 SDS-PAGE 鉴定纯度在 95% 以上, 结果显示最终获得了上述抗体。

10 用 PBS 缓冲液将人 PDL1-Fc 融合蛋白 (购自 Acro) 或猴 PDL1-His tag 融合蛋白 (购自 Acro) 稀释为  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 以  $100 \mu\text{l}/\text{孔}$  的体积加于 96 孔板中, 于  $4^\circ\text{C}$  放置过夜。将 96 孔板中 PBS 缓冲液吸掉, 用 PBST (pH7.2 PBS 含 0.1% Tween 20) 缓冲液洗板 6 次后, 加入  $200 \mu\text{l}/\text{孔}$  PBS/10% BSA,  $37^\circ\text{C}$  孵育 2h 进行封闭。移去封闭液, 用 PBST 洗板 6 次后, 加入  $100 \mu\text{l}/\text{孔}$  用 PBST/0.05% BSA 稀释至合适浓度的待测嵌合抗体 19B8-hIgG1LALA、对照抗体 12A4-hIgG1LALA,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h。移去反应体系, 用 PBST 洗板 6 次后, 以  $100 \mu\text{l}/\text{孔}$  用 PBST/0.05% BSA 稀释 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的抗人 IgG-Fab 抗体二抗,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h。用 PBST 洗板 6 次后, 加入  $80 \mu\text{l}/\text{孔}$  TMB (四甲基联苯胺), 于室温孵育 3min, 加入  $80 \mu\text{l}/\text{孔}$  4M 硫酸终止反应。用酶标仪在 450nm 处读取吸光值。结果如图 4, 表明本公开的嵌合抗体 19B8-hIgG1LALA 能够结合人、猴 PDL1 蛋白。

25

#### 实施例 6: 人鼠嵌合 PDL1 抗体阻断活性检测实验

ELISA 实验被用于检测嵌合抗体对 PDL1 与其受体 PD-1 结合的影响, 具体实验如下:

30 用 PBS 缓冲液将 PDL1-Fc 融合蛋白 (购自 Acro) 稀释为  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 以  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  的体积加于 96 孔板中, 于  $4^\circ\text{C}$  放置过夜。将 96 孔板中 PBS 缓冲液吸掉, 用 PBST (pH7.2 PBS 含 0.1% Tween 20) 缓冲液洗板 6 次后, 加入  $200 \mu\text{L}/\text{孔}$  PBS/10% BSA, 于  $37^\circ\text{C}$  孵育 2h 进行封闭。移去封闭液, 用 PBST 洗板 6 次后, 加入  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  用 PBST/0.05% BSA 稀释至不同浓度的 19B8-hIgG1LALA 抗体或 12A4-hIgG1LALA 抗体、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  的 PD-1-Avi tag 蛋白 (购自 Acro), 并加入  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  用 PBST/0.05% BSA,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h。移去反应体系, 用 PBST 洗板 6 次后, 以  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  用 PBST/0.05% BSA 稀释 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的 Streptavidin 二抗 (购自 Southern biotech),  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h。用 PBST 洗板 6 次后, 加入  $80 \mu\text{L}/\text{孔}$  TMB (四甲基联苯胺), 于室温孵育 3min, 加入  $80 \mu\text{L}/\text{孔}$  4M 硫酸终止反应, 其中, 以 mIgG (购自 Biolegend) 为对照。用酶标仪在 450nm 处读取吸光值。结果如图 5 显示, 表明本公开的嵌合抗体 19B8-hIgG1LALA 能够阻断 PDL1 与其受体 PD-1 的结合。

#### 实施例 7: 人鼠嵌合 PDL1 抗体流式细胞术结合实验

40 用 PBS 将人黑色素瘤 A375 细胞、人肺腺癌 A549 细胞分别稀释为  $1 \times 10^6/\text{mL}$ , 以  $100 \mu\text{L}/\text{管}$  的体积加于 1.5mL EP 管中, 向其中加入  $10 \mu\text{L}/\text{管}$  大鼠血清, 于  $4^\circ\text{C}$  封闭 30min。加入不同浓度的嵌合抗体 19B8-hIgG1LALA 或对照抗体 12A4-hIgG1LALA, 于  $4^\circ\text{C}$  孵育 30min。向 EP 管中加入 1mL PBS, 于  $4^\circ\text{C}$ 、 $3500\text{rpm} \times 5\text{min}$  离心, 弃尽上清, 再用 PBS 洗一遍。离心后弃尽上清, 用  $100 \mu\text{L}/\text{管}$  PBS 重悬细胞, 向其中加入  $1 \mu\text{L}/\text{管}$  Alexa-647 标记的大鼠抗人抗体二抗 (Biolegend), 于  $4^\circ\text{C}$  避光孵育 30min。用 PBS 洗两遍, 离心后弃尽上清。用  $200 \mu\text{L}/\text{管}$  PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪进行检测, 结果如图 6 所示, 进一步显示本公开的嵌合抗体能够结合肿瘤细胞表面 PDL1 蛋白, 并且其结合强于对照抗体 12A4。

#### 实施例 8: 小鼠抗体人源化实验

参照 PDL1 抗体轻链可变区序列和重链可变区序列，选取与其非 CDR 区匹配最好的人源化模板。将鼠源抗体 CDR 区移植到选择的人源化模板上，替换人源模板的 CDR 区，得到人源化的抗体。然后，以鼠源抗体的三维结构为基础，对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基，以及对 VL 和 VH 的构象有重要影响的残基进行回复突变，得到人源化之后的抗体，人源化 PDL1 抗体重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 8 所示，轻链可变区序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

#### 实施例 9：人源化 PDL1 抗体阻断活性检测实验

ELISA 实验被用于检测抗体对 PDL1 与其受体 PD-1 结合的影响，具体实验如下：

抗体生产：分别将上述抗体的重链和轻链核苷酸序列的 pcDNA3.4 载体（南京金斯瑞合成，人源化 19B8 重链 hIgG1LALA 即 h19B8-hIgG1LALA（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示）、人源化 h19B8 轻链 hK 即 h19B8-hK（氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示）瞬时转染 ExpiCHO-S 细胞（Gibco, 货号 A29127）来制备抗体。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYMHWRQAPGQGLEWIGRINPYNGATTYSQNF  
KDRATMTVDTISISTAYMELSRLSDDTAVYYCVPTGMGYFLMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAP  
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 12）

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGSVAVVWYQQKPKGAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSG  
SGTEFTLTISSLQPEDFATYFCQQFTSYPTFGGQTKLEIKRTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF  
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK  
SFNRGEC（SEQ ID NO: 13）

转染前一天，将 ExpiCHO-S 细胞调整细胞密度为  $(3\sim 4) \times 10^6/\text{mL}$ ，在  $37^\circ\text{C}$ 、 $8\%\text{CO}_2$  和 95 rpm 条件下摇动培养过夜。转染当天，细胞生长到  $7 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7/\text{mL}$ ，存活率大于 95% 时准备转染，使用新鲜预热的 ExpiCHO 培养基（Gibco, 货号 A2910002）将细胞稀释到  $6 \times 10^6/\text{mL}$ ，将上述携带有重链和轻链的 pcDNA3.4 质粒（轻重链质粒配比 1: 1）和 ExpiFectamine CHO 转染试剂（Gibco, 货号 A29129）转染到 ExpiCHO-S 细胞中，在  $37^\circ\text{C}$ 、 $8\%\text{CO}_2$  和 95 rpm 条件下摇动培养。转染后 18-22 h，将 ExpiFectamine CHO Enhancer 和 ExpiCHO Feed 混匀后立即加入转染后细胞，混匀，于  $32^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  和 95 rpm 条件下摇动培养。转染后第 5 天，向细胞中再补加 8 mL ExpiCHO Feed，混匀后继续培养。每日观察细胞数和细胞活率变化，待细胞活率下降至 80% 以下或培养 10-14 天后离心收获细胞。表达的上清用  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤，利用 Mabselect prism A protein A 亲和层析柱（购自苏州纳微）从表达上清中捕获带有 Fc 结构域的抗体，用 pH7.2 的磷酸盐缓冲液平衡层析柱后，上清过亲和层析柱，用洗脱缓冲液（100 mM 柠檬酸，pH2.7）洗脱，最后用 PBS 缓冲液浓缩置换，纯化后的抗体通过 SDS-PAGE 鉴定纯度在 95% 以上，结果显示最终获得了上述抗体。

用 PBS 缓冲液将 PDL1-Fc 融合蛋白（购自 Acro）稀释为  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，以  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  的体积加于 96 孔板中，于  $4^\circ\text{C}$  放置过夜。将 96 孔板中 PBS 缓冲液吸掉，用 PBST（pH7.2 PBS 含 0.1% Tween 20）缓冲液洗板 6 次后，加入  $200 \mu\text{L}/\text{孔}$  PBS/10% BSA，于  $37^\circ\text{C}$  孵育 2h 进行封闭。移去封闭液，用 PBST 洗板 6 次后，加入  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  用 PBST/0.05% BSA 稀释至合适浓度的待测人源化 PDL1 抗体 h19B8-hIgG1LALA 或对照抗体 12A4-hIgG1LALA、Atezulizumab 类似物（购自百英生物）、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  PD-1-Avi tag（购自 Acro）， $37^\circ\text{C}$  孵育 1h。移去反应体系，用 PBST 洗板 6 次后，以  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  用 PBST/0.05% BSA 稀释 HRP（辣根过氧化物酶）标记的 Streptavidin 二抗（购自 Southern biotech）， $37^\circ\text{C}$  孵育 1h。用 PBST 洗板 6 次后，加入  $80 \mu\text{L}/\text{孔}$  TMB（四甲基联苯胺），于室温孵育 3min，加入  $80 \mu\text{L}/\text{孔}$  4M 硫酸终止反应，其中，以 mIgG（购自 Biolegend）为对照。用酶标仪在 450nm 处读取吸光值。结果如图 7 显示，表明本公开的人源化 PDL1 抗体 h19B8 能够阻断 PDL1 与其受体 PD-1 的结合，并且阻断能力与 12A4、Atezulizumab 类似物相当。

#### 实施例 10：人源化 PDL1 抗体流式细胞术结合实验

用 PBS 将人黑色素瘤 A375 细胞、人肺腺癌 A549 细胞分别稀释为  $1 \times 10^6/\text{mL}$ ，以  $100 \mu\text{L}/\text{管}$  的体积加

于 1.5mL EP 管中，向其中加入 10 $\mu$ L/管大鼠血清，于 4 $^{\circ}$ C 封闭 30min。加入不同浓度的人源化抗体 h19B8-hIgG1LALA（重链和轻链如 SEQ ID NO:12-13 所示）或对照抗体 12A4-hIgG1LALA、Atezulizumab 类似物（购自百英生物），于 4 $^{\circ}$ C 孵育 30min。向 EP 管中加入 1mL PBS，于 4 $^{\circ}$ C、3500rpm $\times$ 5min 离心，弃尽上清，再用 PBS 洗一遍。离心后弃尽上清，用 100 $\mu$ L/管 PBS 重悬细胞，向其中加入 1 $\mu$ L/管 Alexa-647 标记的大鼠抗人抗体二抗（Biolegend），于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min。用 PBS 洗两遍，离心后弃尽上清。用 200 $\mu$ L/管 PBS 重悬细胞，用流式细胞仪进行检测，结果如图 8 所示，进一步显示本公开的嵌合抗体能够结合肿瘤细胞表面 PDL1 蛋白，并且其结合强于对照抗体 12A4、Atezulizumab 类似物。

#### 实施例 11：人源化 PDL1 抗体促进 SEB 诱导的人 PBMC 分泌 IL-2

用完全 RPMI-1640 培养基将人 PBMC 细胞稀释为 2 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL，以 100 $\mu$ L/孔的体积加于 96 孔板中，向其中加入 50 $\mu$ L/孔不同浓度的人源化抗体 h19B8-hIgG1LALA 或 Atezulizumab 类似物，于 4 $^{\circ}$ C 封闭 30min。加入不同浓度的人源化抗体 h19B8-hIgG1LALA（SEQ ID NO:12-13 所示）或对照抗体 Atezulizumab 类似物（购自百英生物），加入 50 $\mu$ L/孔 0.4 $\mu$ g/ml 的 SEB，于 37 $^{\circ}$ C，5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72h。利用人 IL-2 ELISA 检测试剂盒检测培养上清中 IL-2 含量。结果如图 9 所示，进一步显示本公开的人源化 PDL1 抗体能够促进 PBMC 分泌 IL-2（其中图 A 和图 B 中 PBMC 细胞来自于不同的人类个体），并且促进能力与 Atezulizumab 类似物相当或略优。

#### 实施例 12：CD3 $\times$ PDL1 抗体 ELISA 结合实验

ELISA 实验被用于检测 PDL1 抗体的结合特性。PDL1 胞外区融合蛋白包被到 96 孔板中，抗体加入后信号的强弱用于判断抗体和 PDL1 的结合特性。

用 PBS 缓冲液将 PDL1-Fc 融合蛋白稀释为 1 $\mu$ g/ml，以 100 $\mu$ L/孔的体积加于 96 孔板中，于 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。将 96 孔板中 PBS 缓冲液吸掉，用 PBST（pH7.2 PBS 含 0.1% Tween 20）缓冲液洗板 6 次后，加入 200 $\mu$ L/孔 PBS/10% BSA，37 $^{\circ}$ C 孵育 2h 进行封闭。移去封闭液，用 PBST 洗板 6 次后，加入 100 $\mu$ L/孔用 PBST/0.05% BSA 稀释至合适浓度的待测人源化抗体 h19B8-hIgG1LALA、双特异抗体 CD3 $\times$ h19B8，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。移去反应体系，用 PBST 洗板 6 次后，以 100 $\mu$ L/孔用 PBST/0.05% BSA 稀释 HRP（辣根过氧化物酶）标记的抗人 IgG-Fab 抗体二抗，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用 PBST 洗板 6 次后，加入 80 $\mu$ L/孔 TMB（四甲基联苯胺），于室温孵育 3min，加入 80 $\mu$ L/孔 4M 硫酸终止反应。用酶标仪在 450nm 处读取吸光值。图 10 展示了本公开中的 CD3 $\times$ PDL1 双特异抗体的几种连接方式，图 11 表明本公开的 CD3 $\times$ h19B8 抗体能够结合 PDL1 蛋白，结合能力稍弱于 h19B8 单抗。

本公开的实施例中所用的 CD3 $\times$ h19B8 抗体（模式图如图 10 所示）、CD3 $\times$ 12A4 抗体的具体序列信息，如表 2 所示。

表 2

双抗名称	重链 1	重链 2	轻链 1
CD3 $\times$ h19B8(a)	CD3-hIgG1LALAKbss SEQ ID NO: 24	h19B8-hIgG1LALAhoss SEQ ID NO:23	h19B8-hK SEQ ID NO:13
CD3 $\times$ h19B8(b)	h19B8-hIgG1LALAKbssCross3 SEQ ID NO: 26	h19B8-hIgG1LALAhoss SEQ ID NO:23	h19B8-hK SEQ ID NO:13
CD3 $\times$ h19B8(c)	h19B8-hIgG1LALAKbss SEQ ID NO: 25	h19B8-hIgG1LALAhossCross3 SEQ ID NO:27	h19B8-hK SEQ ID NO:13
CD3 $\times$ 12A4(a)	CD3-hIgG1LALAKbss SEQ ID NO: 24	12A4-hIgG1LALAhoss SEQ ID NO:29	12A4-hK SEQ ID NO:30

#### 实施例 13：CD3 $\times$ PDL1 抗体阻断活性检测实验

ELISA 实验被用于检测抗体对 PDL1 与其受体 PD-1 结合的影响，具体实验如下：

用 PBS 缓冲液将 PDL1-Fc 融合蛋白（购自 Acro）稀释为 5 $\mu$ g/mL，以 100 $\mu$ L/孔的体积加于 96 孔板

中，于4°C放置过夜。将96孔板中PBS缓冲液吸掉，用PBST（pH7.2 PBS含0.1% Tween 20）缓冲液洗板6次后，加入200 $\mu$ L/孔PBS/10% BSA，于37°C孵育2h进行封闭。移去封闭液，用PBST洗板6次后，加入100 $\mu$ L/孔用PBST/0.05% BSA稀释至合适浓度的待测人源化抗体h19B8-hIgG1LALA或双特异抗体CD3 $\times$ h19B8、2 $\mu$ g/mL PD-1-Avi tag（购自Acro），37°C孵育1h。移去反应体系，用PBST洗板6次后，以100 $\mu$ L/孔用PBST/0.05% BSA稀释HRP（辣根过氧化物酶）标记的Streptavidin二抗（购自Southern biotech），37°C孵育1h。用PBST洗板6次后，加入80 $\mu$ L/孔TMB（四甲基联苯胺），于室温孵育3min，加入80 $\mu$ L/孔4M硫酸终止反应。用酶标仪在450nm处读取吸光值。结果如图12显示，表明本公开的双特异抗体CD3 $\times$ h19B8能够阻断PDL1与其受体PD-1的结合，并且阻断能力与对照Atezulizumab相比稍弱。

10

#### 实施例14: CD3 $\times$ PDL1 抗体促进 PBMC 杀伤肿瘤细胞

本实施例检测双特异性抗体对PBMC杀伤。

(1) 按照50 $\mu$ L/孔的体积向16孔RTCA板中加入完全RPMI-1640培养基，上机校准；

15 (2) 用完全RPMI-1640培养基将人肺腺癌A375细胞稀释为 $2\times 10^5$ /mL，按照50 $\mu$ L/孔的体积分别单独添加至加入步骤(1)获得的RTCA板中，然后于37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下使用xCELLigence RTCA MP设备检测细胞系数24h；

(3) 用完全RPMI-1640培养基将双特异抗体稀释为一系列浓度梯度，加入步骤(2)获得的RTCA板中，添加体积为20 $\mu$ L/孔；

20 (4) 用完全RPMI-1640培养基将PBMC（赛笠生物）稀释为 $1.25\times 10^6$ 个/mL，加入步骤(3)获得的RTCA板中，添加体积为80 $\mu$ L/孔；

(5) 将步骤(4)获得的反应体系于37°C，5% CO<sub>2</sub>使用xCELLigence RTCA MP设备检测细胞系数24h。

具体的实验结果如图13所示，进一步显示本公开的CD3 $\times$ h19B8 (a) 双特异抗体能够促进PBMC杀伤A375肿瘤细胞，并且其促杀伤能力优于(b)和(c)构型。

25

#### 实施例15: CD3 $\times$ PDL1 抗体流式细胞术结合实验

用PBS将人肺腺癌A549细胞分别稀释为 $1\times 10^6$ /mL，以100 $\mu$ L/管的体积加于1.5mL EP管中，向其中加入10 $\mu$ L/管大鼠血清，于4°C封闭30min。加入不同浓度的双特异抗体CD3 $\times$ h19B8或对照抗体CD3 $\times$ 12A4，于4°C孵育30min。向EP管中加入1mL PBS，于4°C、3500rpm $\times$ 5min离心，弃尽上清，再用PBS洗一遍。离心后弃尽上清，用100 $\mu$ L/管PBS重悬细胞，向其中加入1 $\mu$ L/管Alexa-647标记的大鼠抗人抗体二抗（Biolegend），于4°C避光孵育30min。用PBS洗两遍，离心后弃尽上清。用200 $\mu$ L/管PBS重悬细胞，用流式细胞仪进行检测，结果如图14所示，进一步显示本公开的双特异抗体CD3 $\times$ h19B8能够结合肿瘤细胞表面PDL1蛋白，并且其结合强于对照抗体CD3 $\times$ 12A4。

#### 35 实施例16: CD3 $\times$ PDL1 抗体促进 PBMC 杀伤肿瘤细胞

本实施例检测双特异性抗体对PBMC杀伤。

(1) 按照50 $\mu$ L/孔的体积向16孔RTCA板中加入完全RPMI-1640培养基，上机校准；

40 (2) 用完全RPMI-1640培养基将人肺腺癌A375细胞稀释为 $2\times 10^5$ /mL，按照50 $\mu$ L/孔的体积分别单独添加至加入步骤(1)获得的RTCA板中，然后于37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下使用xCELLigence RTCA MP设备检测细胞系数24h；

(3) 用完全RPMI-1640培养基将双特异抗体稀释为一系列浓度梯度，加入步骤(2)获得的RTCA板中，添加体积为20 $\mu$ L/孔；

(4) 用完全RPMI-1640培养基将PBMC（赛笠生物）稀释为 $1.25\times 10^6$ 个/mL，加入步骤(3)获得的RTCA板中，添加体积为80 $\mu$ L/孔；

45 (5) 将步骤(4)获得的反应体系于37°C，5% CO<sub>2</sub>使用xCELLigence RTCA MP设备检测细胞系数24h。

具体的实验结果如图15所示，进一步显示本公开的CD3 $\times$ h19B8双特异抗体能够促进PBMC杀伤A375肿瘤细胞，并且其促杀伤能力与对照抗体CD3 $\times$ 12A4相当或略优。

**实施例 17: CD3×PDL1 抗体对小鼠抗癌的影响**

体内药效实验, 用于检测所述双特异抗体 CD3×h19B8 促进免疫重建小鼠抗癌功能。

- 5 (1) 在第-4 天, 将人 PBMC 尾静脉转输给 NCG 小鼠 (购自集萃药康), 1E7 /只;
- (2) 第 0 天, NCG 小鼠右腹侧皮下荷瘤, 每只鼠注射  $1 \times 10^6$  个人黑色素瘤 A375 细胞;
- (2) 于第 8、11、14、17 天, 为小鼠尾静脉注射所述 CD3×h19B8 (a) 抗体, 每只鼠 25 $\mu$ g;
- (3) 注射上述抗体后每 3 天测量一次肿瘤体积。

结果如图 16 所示, 可以看出, 本公开的 CD3×h19B8 双特异抗体可以有效抑制肿瘤的生长, 具有抗癌功能。

- 10 从以上实验结果可以看出, 本公开的 PDL1 抗体具有以下特性: 与肿瘤细胞有更强的结合能力; 能够与人及猴 PDL1 结合; 能够阻断 PDL1 与其受体 PD-1 的结合; 能够促进免疫细胞抗癌功能。

- 15 本公开提供了一种 PDL1 抗体 (h19B8), 与抗体 12A4 及 Atezolizumab 相比, 该抗体与肿瘤细胞表面的 PDL1 结合更强。并且, 当重组表达为 CD3×PDL1 双特异抗体后, 本公开的 CD3×h19B8 抗体与 CD3×12A4 抗体相比, 也具有更加强烈的结合能力, 提示该双特异抗体具有更强的肿瘤识别, 进而诱导更强的 T 细胞杀伤。本公开也比较了不同结构的 CD3×PDL1 抗体的功能活性, 获得了具有更强功能活性的双特异抗体。

- 20 在本说明书的描述中, 参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本公开的至少一个实施例或示例中。在本说明书中, 对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且, 描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外, 在不相互矛盾的情况下, 本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

- 25 尽管上面已经示出和描述了本公开的实施例, 可以理解的是, 上述实施例是示例性的, 不能理解为对本公开的限制, 本领域的普通技术人员在本公开的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

## 权利要求书

- 1.一种抗体或抗原结合片段，其中，包括：  
选自下列至少之一的 CDR 序列或与其具有至少 80%同一性的氨基酸序列：  
5 重链可变区 CDR 序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3；  
轻链可变区 CDR 序列：SEQ ID NO: 4、WAS、SEQ ID NO: 5。
2. 根据权利要求 1 所述的抗体或抗原结合片段，其中，包括：  
SEQ ID NO: 1 所示的重链可变区 CDR1 序列，SEQ ID NO: 2 所示的重链可变区 CDR2，SEQ ID NO:  
3 所示的重链可变区 CDR3，SEQ ID NO: 4 所示的轻链可变区 CDR1，WAS 所示的轻链可变区 CDR2，  
10 SEQ ID NO: 5 所示的轻链可变区 CDR3。
- 3.根据权利要求 1 所述的抗体或抗原结合片段，其中，包括下列至少之一：  
(a) 具有 SEQ ID NO:6 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:7 所示的轻链可变区；  
与 (a) 相比，序列同一性至少在 80%的氨基酸序列。
- 4.根据权利要求 1 所述的抗体或抗原结合片段，其中，包括下列至少之一：  
15 (b) 具有 SEQ ID NO:8 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:9 所示的轻链可变区；  
与 (b) 相比，序列同一性至少在 80%的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 1 所述的抗体或抗原结合片段，其中，包括：  
如 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO:8 所示的重链可变区；和/或  
如 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO:9 所示的轻链可变区。
- 20 6.根据权利要求 5 所述的抗体或抗原结合片段，其中，包括：  
如 SEQ ID NO:6 所示的重链可变区，和如 SEQ ID NO:7 所示的轻链可变区；或  
如 SEQ ID NO:8 所示的重链可变区，和如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链可变区。
7. 根据权利要求 1~6 中任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段含有重  
链恒定区和轻链恒定区的至少之一，所述重链恒定区和轻链恒定区的至少之一的至少一部分来自于灵长  
25 目源抗体和鼠源抗体或其突变体中的至少之一。
- 8.根据权利要求 1~7 中任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述轻链恒定区和重链恒定区均  
来自于鼠源 IgG 抗体或其突变体或人源 IgG 抗体或其突变体。
- 9.根据权利要求 1~7 中任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述轻链恒定区和重链恒定区均  
来自于鼠源 IgG1 抗体或其突变体或人源 IgG1 抗体或其突变体。
- 30 10.根据权利要求 1~8 中任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述重链恒定区的 N 端与所述重  
链可变区的 C 端相连，所述轻链恒定区的 N 端与所述轻链可变区的 C 端相连。
- 11.根据权利要求 1~10 中任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段具有  
SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12 任一项所示氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13 任  
一项所示氨基酸序列的轻链。
- 35 12. 根据权利要求 1~11 中任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段具有  
SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO:11 所示氨基酸序列的轻链；  
所述抗体或抗原结合片段具有 SEQ ID NO:12 所示氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序  
列的轻链。
13. 根据权利要求 1~12 中任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段包括  
40 单抗或多抗。
- 14.根据权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述单抗包括全长抗体、Fv、  
单链抗体、Fab、单域抗体以及最小识别单位中的至少之一。
- 15.根据权利要求 1~13 中任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段能够  
结合 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。
- 45 16.一种双特异性结合分子，其中，包括：  
第一结合区，所述第一结合区包含权利要求 1~15 任一项所述的抗体或抗原结合片段；和  
第二结合区，所述第二结合区具有 CD3 结合活性。
17. 根据权利要求 16 所述的双特异性结合分子，其中，所述双特异性结合分子包括对称双特异性结

合分子或不对称双特异性结合分子。

18.根据权利要求 16 或 17 所述的双特异性结合分子,其中,所述双特异性结合分子为非对称双特异性结合分子。

19.根据权利要求 16~18 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第一结合区包含肽链 1 和肽链 2,其中,所述肽链 1 包括权利要求 1~15 任一项中所述的重链可变区,所述肽链 2 包括权利要求 1~15 任一项中所述的轻链可变区。

20.根据权利要求 16~19 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第二结合区包括具有 CD3 结合活性的全长抗体、Fv、单链抗体、Fab、单域抗体以及最小识别单位中的至少之一。

21.根据权利要求 16~20 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第二结合区包括抗 CD3 单链抗体。

22.根据权利要求 16~21 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述抗 CD3 单链抗体包括抗 CD3 抗体重链可变区和抗 CD3 抗体轻链可变区,其中,所述抗 CD3 抗体重链可变区包括 SEQ ID NO: 15 所示的重链可变区 CDR1 序列,SEQ ID NO: 16 所示的重链可变区 CDR2,SEQ ID NO: 17 所示的重链可变区 CDR3;

所述抗 CD3 抗体轻链可变区具有 SEQ ID NO: 18 所示的轻链可变区 CDR1,GTN 所示的轻链可变区 CDR2,SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区 CDR3。

23.根据权利要求 16~22 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述抗 CD3 单链抗体包括 SEQ ID NO: 20 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 21 所示的轻链可变区。

24.根据权利要求 16~23 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述抗 CD3 单链抗体进一步包括连接肽,其中,所述连接肽的 N 端与所述抗 CD3 抗体重链可变区的 C 端相连,所述连接肽的 C 端与所述抗 CD3 抗体轻链可变区的 N 端相连;或所述连接肽的 N 端与所述抗 CD3 抗体轻链可变区的 C 端相连,所述连接肽的 C 端与所述抗 CD3 抗体重链可变区的 N 端相连。

25.根据权利要求 16~24 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述连接肽具有氨基酸序列 (GGGGS)<sub>n</sub>,其中 n 为大于或等于 1 的整数,优选为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

26.根据权利要求 16~25 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述抗 CD3 单链抗体具有如 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列。

27.根据权利要求 16~26 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第一结合区进一步包括第一重链恒定区和轻链恒定区的至少之一,所述第一重链恒定区和轻链恒定区的至少之一的至少一部分来自于人源抗体、灵长目源抗体和鼠源抗体或其突变体中的至少之一。

28.根据权利要求 16~27 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第一重链恒定区和轻链恒定区均来自人源 IgG 抗体或其突变体。

29.根据权利要求 16~28 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第一重链恒定区和轻链恒定区均来自人源 IgG1 抗体或其突变体。

30.根据权利要求 16~29 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第一重链恒定区的 N 端与所述重链可变区的 C 端相连,所述轻链恒定区的 N 端与所述轻链可变区的 C 端相连。

31.根据权利要求 16~30 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述肽链 1 具有 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列,所述肽链 2 具有 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列。

32.根据权利要求 16~31 中所述的双特异性结合分子,其中,所述肽链 1 和肽链 2 通过二硫键相连。

33.根据权利要求 16~32 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第二结合区进一步包括第二重链恒定区,所述第二重链恒定区的至少一部分来自于人源抗体、灵长目源抗体和鼠源抗体或其突变体中的至少之一。

34.根据权利要求 16~33 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第二重链恒定区来自于人源 IgG 抗体或其突变体。

35.根据权利要求 16~34 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第二重链恒定区来自于人源 IgG1 抗体或其突变体。

36.根据权利要求 16~35 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第二重链恒定区的 N 端与所述抗 CD3 单链抗体的 C 端相连。

37.根据权利要求 16~36 中任一项所述的双特异性结合分子,其中,所述第一重链恒定区和所述第二

重链恒定区通过 knob-into-hole 结构进行连接。

38.一种分离的多核苷酸,其中,所述多核苷酸编码权利要求 1~15 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或编码权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子。

39.一种表达载体,其中,携带权利要求 38 所述的多核苷酸。

5 40.一种重组细胞,其中,携带权利要求 38 所述的多核苷酸、权利要求 39 所述的表达载体或能够表达权利要求 1~15 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或编码权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子。

41.根据权利要求 40 所述的重组细胞,其中,所述重组细胞是通过将权利要求 39 所述的表达载体导入至宿主细胞中而获得的。

10 42.根据权利要求 41 所述的重组细胞,其中,所述重组细胞为真核细胞。

43.根据权利要求 41 所述的重组细胞,其中,所述重组细胞为哺乳动物细胞。

44.一种组合物,其中,包括权利要求 1~15 中任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子、权利要求 38 所述的多核苷酸、权利要求 39 所述的表达载体、权利要求 40~43 中任一项所述的重组细胞。

15 45.一种制备权利要求 1~15 中任一项所述的抗体或抗原结合片段或权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子的方法,其中,包括培养权利要求 40~43 中任一项所述的重组细胞。

46.一种药物,其中,包括权利要求 1~15 中任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子、权利要求 38 所述的多核苷酸、权利要求 39 所述的表达载体、权利要求 40~43 中任一项所述的重组细胞或权利要求 44 所述的组合物。

20 47.一种试剂盒,其中,所述试剂盒含有权利要求 1~15 中任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子、权利要求 38 所述的多核苷酸、权利要求 39 所述的表达载体、权利要求 40~43 中任一项所述的重组细胞。

48.权利要求 1~15 中任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子、权利要求 38 所述的多核苷酸、权利要求 39 所述的表达载体、权利要求 40~43 中任一项所述的重组细胞或权利要求 47 所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防和/或治疗 PDL1 介导的相关疾病。

49.根据权利要求 48 所述的用途,其中,所述 PDL1 介导的相关疾病包括癌症。

50.根据权利要求 49 所述的用途,其中,所述癌症包括选自以下中的至少之一:

30 肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

51.权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子、权利要求 38 所述的多核苷酸、权利要求 39 所述的表达载体、权利要求 40~43 中任一项所述的重组细胞或权利要求 47 所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防和/或治疗 PDL1 和 CD3 介导的相关疾病。

52.根据权利要求 51 所述的用途,其中,所述 PDL1 和 CD3 介导的相关疾病包括癌症。

35 53.根据权利要求 52 所述的用途,其中,所述癌症包括下列中的至少之一:

肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌。

40 54.权利要求 1~15 中任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子、权利要求 38 所述的多核苷酸、权利要求 39 所述的表达载体、权利要求 40~43 中任一项所述的重组细胞在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测 PDL1。

55.权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子、权利要求 38 所述的多核苷酸、权利要求 39 所述的表达载体、权利要求 40~43 中任一项所述的重组细胞在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测 PDL1 和/或 CD3。

45 56.权利要求 1~15 中任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子、权利要求 38 所述的多核苷酸、权利要求 39 所述的表达载体、权利要求 40~43 中任一项所述的重组细胞、权利要求 44 所述的组合物或权利要求 46 所述的药物在预防或治疗疾病中的用途,所述疾病包括癌症,所述癌症的癌细胞表面 PDL1 呈阳性。

57.根据权利要求 56 所述的用途,其中,所述癌症选自:肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、

膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少之一。

58. 一种预防或治疗肿瘤的方法，其中，包括向受试者施用以下中的至少之一：

权利要求 1~15 中任一项所述的抗体或抗原结合片段；

权利要求 16~37 中任一项所述的双特异性结合分子；

5 权利要求 38 所述的多核苷酸；

权利要求 39 所述的表达载体；

权利要求 40~43 中任一项所述的重组细胞；

权利要求 44 所述的组合物；

权利要求 46 所述的药物。

10 59. 根据权利要求 58 所述的方法，其中，所述肿瘤的肿瘤细胞表面 PDL1 呈阳性，所述肿瘤选自肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、神经胶质瘤、肾癌、胃癌、食道癌、口腔鳞状细胞癌和头颈癌中的至少之一。

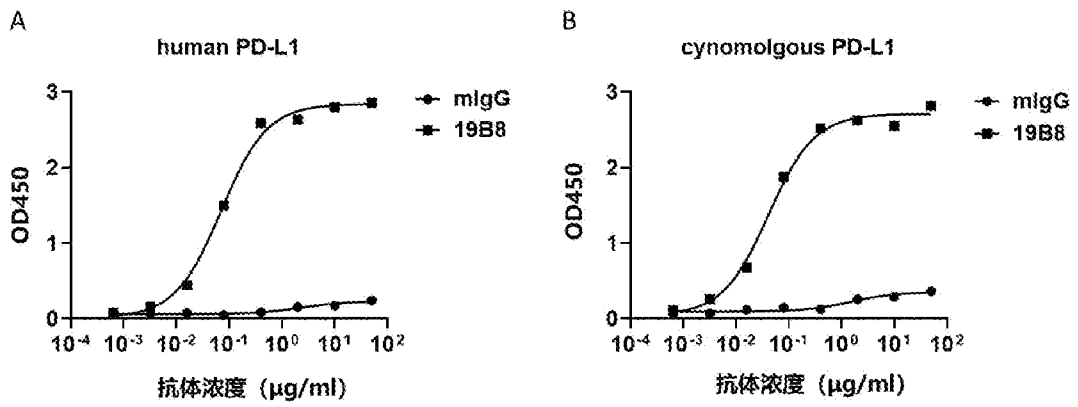


图 1

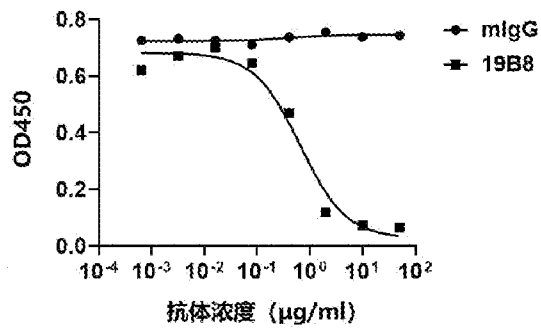


图 2

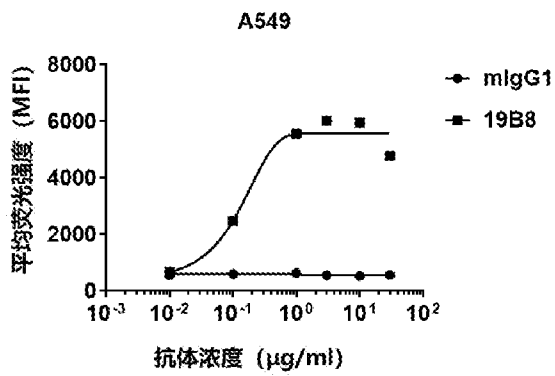


图 3

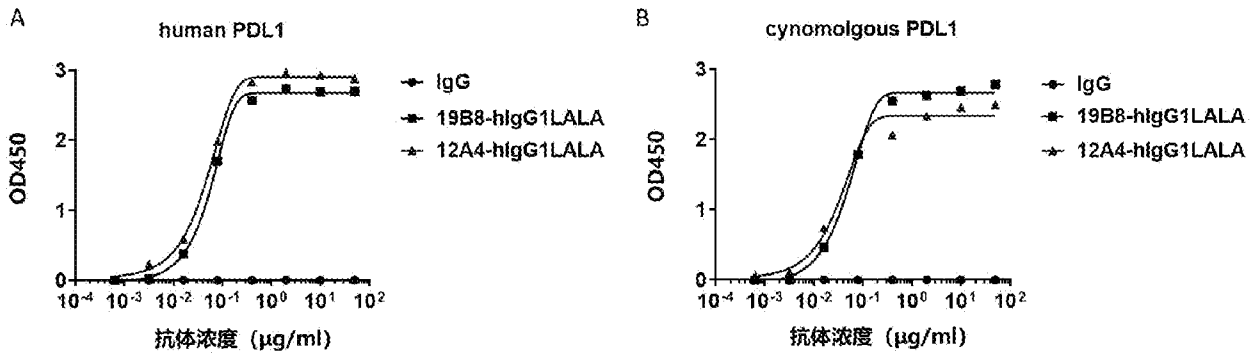


图 4

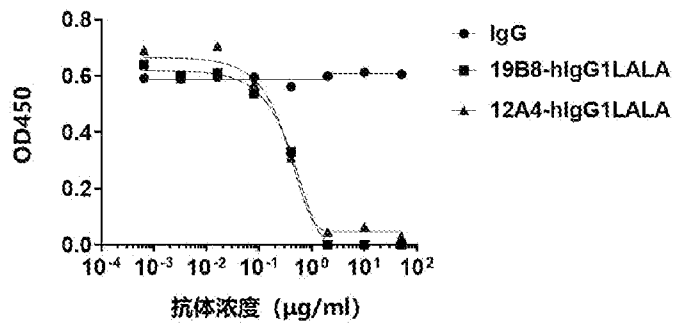


图 5

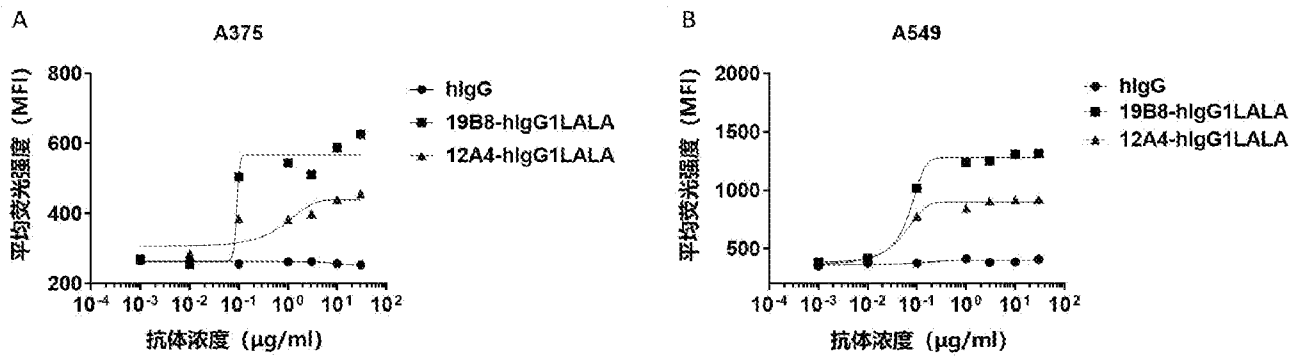


图 6

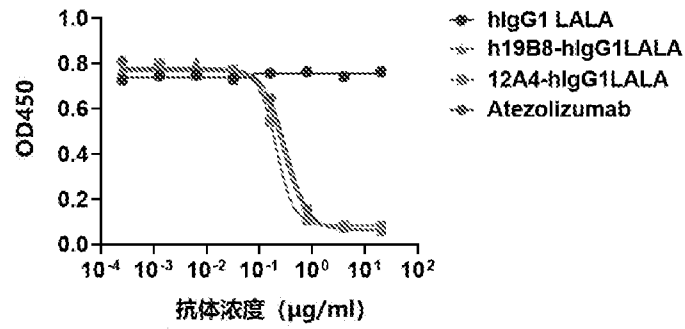


图 7

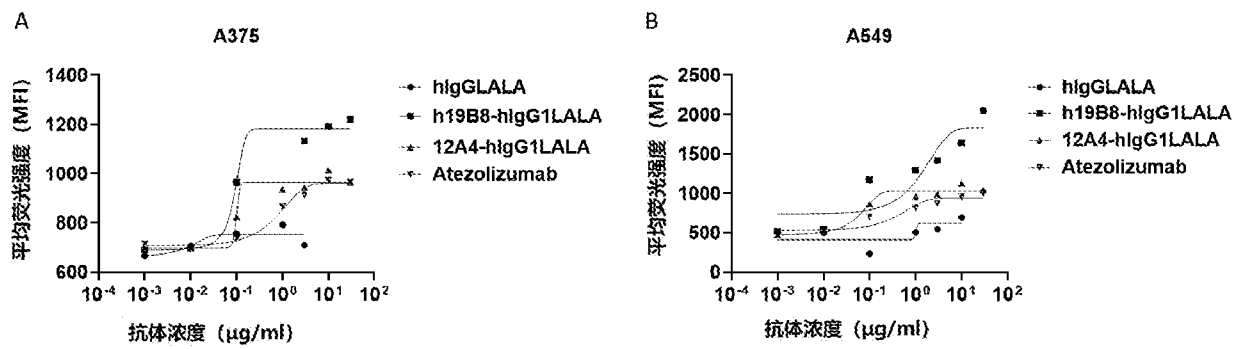


图 8

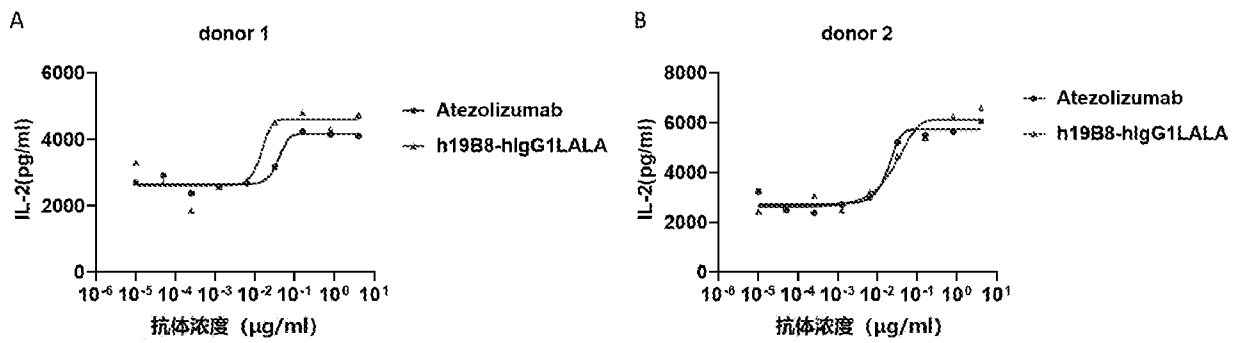


图 9

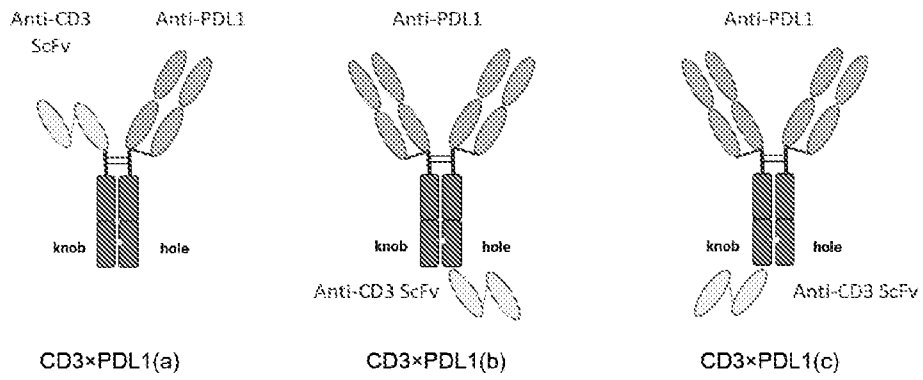


图 10

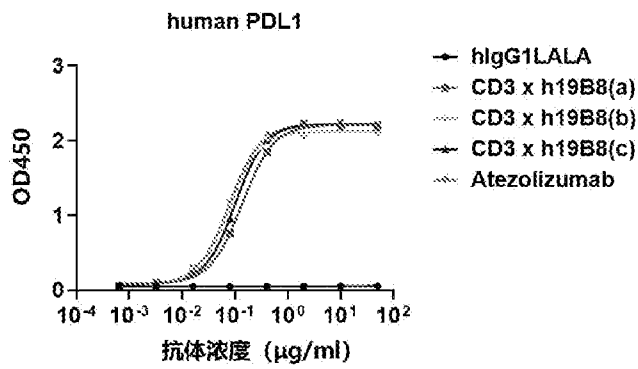


图 11

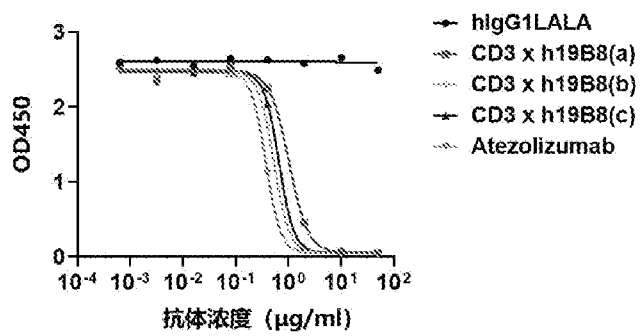


图 12

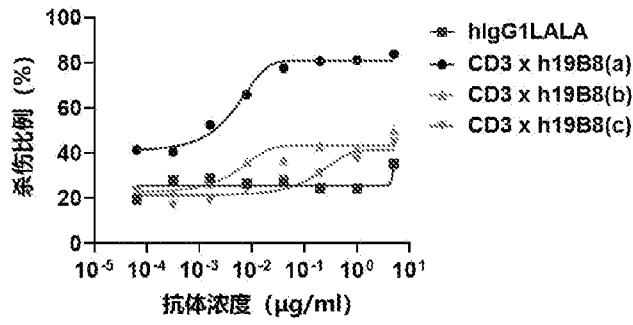


图 13

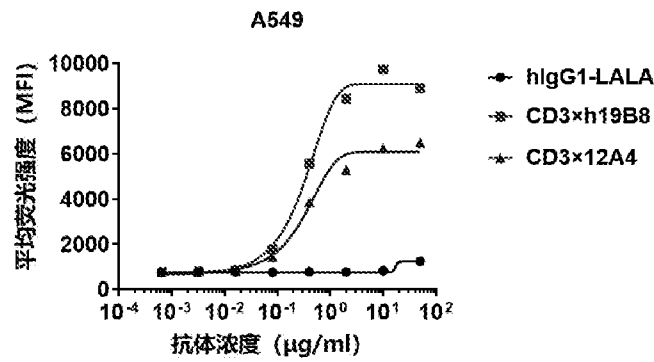


图 14

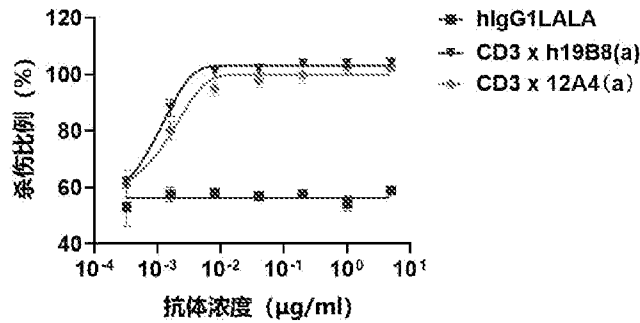


图 15

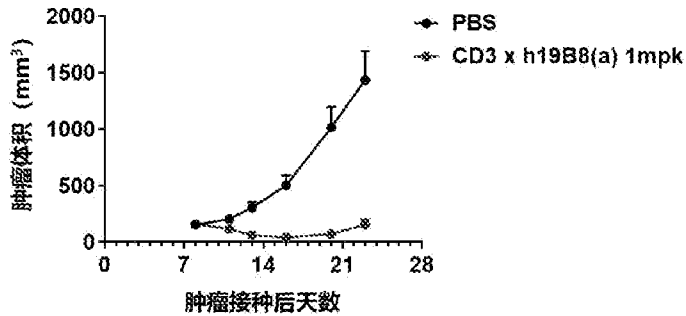


图 16

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/142507

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K16/28(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C12N15/85(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(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)

IPC:C07K C12N A61K A61P

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)

CNTXT, DWPL, VEN, ENTXTC, CNKI, 万方数据资源系统, Wanfang Data System, PubMed, ISI web of knowledge and keywords: 天港免疫, PDL1, PD-L1, B7-H3, CD274, CD3, 抗体, antibody; GenBank, 中国专利生物序列检索, EBI-EMBL, STN和序列: SEQ ID NO: 1-5, WAS, GenBank, China Patent Biological Sequence Search, EBI-EMBL, STN and sequences: SEQ ID NOS: 1-5, WAS.

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116063526 A (HEFEI TG IMMUNOPHARMA CO., LTD.) 05 May 2023 (2023-05-05) description, paragraphs [0009]-[0070]	1-55
A	WO 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO. et al.) 26 May 2017 (2017-05-26) description, page 2, paragraph 6 to page 6, paragraph 1	1-55
A	WO 2022247826 A1 (HARBOUR BIOMED SHANGHAI CO., LTD.) 01 December 2022 (2022-12-01) description, paragraphs [0010]-[0244]	1-55
A	WO 2019068302 A1 (BIOCAD JOINT STOCK CO.) 11 April 2019 (2019-04-11) description, page 5, paragraph 3 to page 12, paragraph 1	1-55
A	WO 2017118321 A1 (HARBOUR BIOMED LTD. et al.) 13 July 2017 (2017-07-13) claims 1-15	1-55

 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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

15 April 2024

Date of mailing of the international search report

30 April 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Telephone No.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/142507

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.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

**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.: **56-59**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
PCT Rule 39.1(iv) – methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.
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/CN2023/142507**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	116063526	A	05 May 2023	None			
WO	2017084495	A1	26 May 2017	KR	20180071376	A	27 June 2018
				JP	2018536401	A	13 December 2018
				JP	6983371	B2	17 December 2021
				HK	1247213	A1	21 September 2018
				BR	112018009064	A2	30 October 2018
				BR	112018009064	A8	26 February 2019
				MX	2018005720	A	09 November 2018
				CA	3004804	A1	26 May 2017
				US	2020399375	A1	24 December 2020
				US	11780923	B2	10 October 2023
				TW	201718657	A	01 June 2017
				TWI	718206	B	11 February 2021
				EP	3378871	A1	26 September 2018
				EP	3378871	A4	07 August 2019
				US	2018334504	A1	22 November 2018
				US	10815304	B2	27 October 2020
				AU	2016357901	A1	24 May 2018
				AU	2016357901	B2	25 May 2023
				RU	2018119165	A	19 December 2019
				RU	2018119165	A3	14 February 2020
				RU	2727914	C2	24 July 2020
WO	2022247826	A1	01 December 2022	None			
WO	2019068302	A1	11 April 2019	JOP	20200078	A1	30 April 2020
				JP	2020535839	A	10 December 2020
				EP	3693390	A1	12 August 2020
				EP	3693390	A4	03 November 2021
				PE	20210460	A1	08 March 2021
				AR	113342	A1	22 April 2020
				CL	2020000919	A1	16 October 2020
				US	2020270345	A1	27 August 2020
				US	11840567	B2	12 December 2023
				EA	201791961	A1	30 April 2019
				EA	039662	B1	24 February 2022
				TW	201922781	A	16 June 2019
				TWI	768129	B	21 June 2022
				RU	2020115122	A3	29 October 2021
				MA	49599	A1	29 January 2021
				MA	49599	B1	31 May 2023
				CO	2020004199	A2	24 April 2020
				ECSP	20024555	A	30 June 2020
				CA	3078413	A1	11 April 2019
				KR	20200058542	A	27 May 2020
				MX	2020004027	A	13 August 2020
				ZA	202002047	B	31 August 2022
				PH	12020550214	A1	15 February 2021
				BR	112020006706	A2	06 October 2020
				JP	2023130455	A	20 September 2023
				AU	2018345458	A1	14 May 2020
				AU	2018345458	A2	21 May 2020

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/142507**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)				
WO	2017118321	A1	13 July 2017	HK	1255604	A1	23 August 2019				
				JP	2019503687	A	14 February 2019				
				JP	6779299	B2	04 November 2020				
				US	2019010233	A1	10 January 2019				
				US	10889648	B2	12 January 2021				
				EP	3400243	A1	14 November 2018				
				EP	3400243	A4	25 September 2019				
				-----							
WO	2020038397	A1	27 February 2020	AU	2019326635	A1	15 April 2021				
				KR	20210049128	A	04 May 2021				
				EP	4249511	A2	27 September 2023				
				EP	4249511	A3	10 January 2024				
				US	2022363763	A1	17 November 2022				
				BR	112021003089	A2	11 May 2021				
				EP	3833693	A1	16 June 2021				
				EP	3833693	A4	07 June 2023				
				CA	3109999	A1	27 February 2020				
				JP	2021536437	A	27 December 2021				
				JP	7177543	B2	24 November 2022				
				-----							

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列表进行的:
  - a.  作为国际申请的一部分提交的:
  - b.  为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),  
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2.  本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
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： 56-59  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
PCT细则39.1 (iv) ——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法，以及诊断方法。
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。

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K16/28(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C12N15/85(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i</p> <p>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</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC:C07K C12N A61K A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNXTX,DWPI,VEN,ENTXTC,CNKI,万方数据资源系统, PubMed,ISI web of knowledge和关键词: 天港免疫, PDL1, PD-L1,B7-H3, CD274, CD3, 抗体, antibody; GenBank,中国专利生物序列检索, EBI-EMBL, STN和序列: SEQ ID NO: 1-5, WAS。</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 116063526 A (合肥天港免疫药物有限公司) 2023年5月5日 (2023 - 05 - 05) 说明书第[0009]-[0070]段</td> <td>1-55</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO,等) 2017年5月26日 (2017 - 05 - 26) 说明书第2页第6段-第6页第1段</td> <td>1-55</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2022247826 A1 (HARBOUR BIOMED SHANGHAI CO LTD) 2022年12月1日 (2022 - 12 - 01) 说明书第[0010]-[0244]段</td> <td>1-55</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2019068302 A1 (BIOCAD JOINT STOCK CO) 2019年4月11日 (2019 - 04 - 11) 说明书第5页第3段-第12页第1段</td> <td>1-55</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017118321 A1 (HARBOUR BIOMED LTD 等) 2017年7月13日 (2017 - 07 - 13) 权利要求1-15</td> <td>1-55</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2020038397 A1 (I MAB, 等) 2020年2月27日 (2020 - 02 - 27) 说明书第2页第6段-第7页第2段</td> <td>1-55</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 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          “D” 申请人在国际申请中引证的文件          “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          “&amp;” 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 116063526 A (合肥天港免疫药物有限公司) 2023年5月5日 (2023 - 05 - 05) 说明书第[0009]-[0070]段	1-55	A	WO 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO,等) 2017年5月26日 (2017 - 05 - 26) 说明书第2页第6段-第6页第1段	1-55	A	WO 2022247826 A1 (HARBOUR BIOMED SHANGHAI CO LTD) 2022年12月1日 (2022 - 12 - 01) 说明书第[0010]-[0244]段	1-55	A	WO 2019068302 A1 (BIOCAD JOINT STOCK CO) 2019年4月11日 (2019 - 04 - 11) 说明书第5页第3段-第12页第1段	1-55	A	WO 2017118321 A1 (HARBOUR BIOMED LTD 等) 2017年7月13日 (2017 - 07 - 13) 权利要求1-15	1-55	A	WO 2020038397 A1 (I MAB, 等) 2020年2月27日 (2020 - 02 - 27) 说明书第2页第6段-第7页第2段	1-55
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 116063526 A (合肥天港免疫药物有限公司) 2023年5月5日 (2023 - 05 - 05) 说明书第[0009]-[0070]段	1-55																					
A	WO 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO,等) 2017年5月26日 (2017 - 05 - 26) 说明书第2页第6段-第6页第1段	1-55																					
A	WO 2022247826 A1 (HARBOUR BIOMED SHANGHAI CO LTD) 2022年12月1日 (2022 - 12 - 01) 说明书第[0010]-[0244]段	1-55																					
A	WO 2019068302 A1 (BIOCAD JOINT STOCK CO) 2019年4月11日 (2019 - 04 - 11) 说明书第5页第3段-第12页第1段	1-55																					
A	WO 2017118321 A1 (HARBOUR BIOMED LTD 等) 2017年7月13日 (2017 - 07 - 13) 权利要求1-15	1-55																					
A	WO 2020038397 A1 (I MAB, 等) 2020年2月27日 (2020 - 02 - 27) 说明书第2页第6段-第7页第2段	1-55																					
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																						
2024年4月15日	2024年4月30日																						
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																						
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	张娜																						
	电话号码 (+86) 010-62411542																						

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/142507

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	116063526	A	2023年5月5日	无			
WO	2017084495	A1	2017年5月26日	KR	20180071376	A	2018年6月27日
				JP	2018536401	A	2018年12月13日
				JP	6983371	B2	2021年12月17日
				HK	1247213	A1	2018年9月21日
				BR	112018009064	A2	2018年10月30日
				BR	112018009064	A8	2019年2月26日
				MX	2018005720	A	2018年11月9日
				CA	3004804	A1	2017年5月26日
				US	2020399375	A1	2020年12月24日
				US	11780923	B2	2023年10月10日
				TW	201718657	A	2017年6月1日
				TWI	718206	B	2021年2月11日
				EP	3378871	A1	2018年9月26日
				EP	3378871	A4	2019年8月7日
				US	2018334504	A1	2018年11月22日
				US	10815304	B2	2020年10月27日
				AU	2016357901	A1	2018年5月24日
				AU	2016357901	B2	2023年5月25日
				RU	2018119165	A	2019年12月19日
				RU	2018119165	A3	2020年2月14日
				RU	2727914	C2	2020年7月24日
WO	2022247826	A1	2022年12月1日	无			
WO	2019068302	A1	2019年4月11日	JOP	20200078	A1	2020年4月30日
				JP	2020535839	A	2020年12月10日
				EP	3693390	A1	2020年8月12日
				EP	3693390	A4	2021年11月3日
				PE	20210460	A1	2021年3月8日
				AR	113342	A1	2020年4月22日
				CL	2020000919	A1	2020年10月16日
				US	2020270345	A1	2020年8月27日
				US	11840567	B2	2023年12月12日
				EA	201791961	A1	2019年4月30日
				EA	039662	B1	2022年2月24日
				TW	201922781	A	2019年6月16日
				TWI	768129	B	2022年6月21日
				RU	2020115122	A3	2021年10月29日
				MA	49599	A1	2021年1月29日
				MA	49599	B1	2023年5月31日
				CO	2020004199	A2	2020年4月24日
				ECSP	20024555	A	2020年6月30日
				CA	3078413	A1	2019年4月11日
				KR	20200058542	A	2020年5月27日
				MX	2020004027	A	2020年8月13日
				ZA	202002047	B	2022年8月31日
				PH	12020550214	A1	2021年2月15日
				BR	112020006706	A2	2020年10月6日
				JP	2023130455	A	2023年9月20日
				AU	2018345458	A1	2020年5月14日
				AU	2018345458	A2	2020年5月21日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/142507

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)
WO	2017118321	A1	2017年7月13日	HK	1255604	A1	2019年8月23日
				JP	2019503687	A	2019年2月14日
				JP	6779299	B2	2020年11月4日
				US	2019010233	A1	2019年1月10日
				US	10889648	B2	2021年1月12日
				EP	3400243	A1	2018年11月14日
				EP	3400243	A4	2019年9月25日
				-----	-----	-----	-----
WO	2020038397	A1	2020年2月27日	AU	2019326635	A1	2021年4月15日
				KR	20210049128	A	2021年5月4日
				EP	4249511	A2	2023年9月27日
				EP	4249511	A3	2024年1月10日
				US	2022363763	A1	2022年11月17日
				BR	112021003089	A2	2021年5月11日
				EP	3833693	A1	2021年6月16日
				EP	3833693	A4	2023年6月7日
				CA	3109999	A1	2020年2月27日
				JP	2021536437	A	2021年12月27日
				JP	7177543	B2	2022年11月24日
				-----	-----	-----	-----