

(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
2018年11月22日 (22.11.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/210230 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/086866

(22) 国际申请日: 2018年5月15日 (15.05.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710341680.7 2017年5月16日 (16.05.2017) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(72) 发明人: 颜贞 (YAN, Zhen); 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。杨健健 (YANG, Jianjian); 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。颜晓丹 (YAN, Xiaodan); 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。吴珊 (WU, Shan); 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。刘洵 (LIU, Xun); 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (SHANGHAI BESHINING LAW OFFICE); 中国上海市小木桥路681号外经大厦21楼, Shanghai 200032 (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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利 (细则4.17(i))
- 发明人资格 (细则4.17(iv))

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))。

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

(54) 发明名称: 一种PD-L1抗体药物组合物及其用途

(57) Abstract: The present invention provides a PD-L1 antibody pharmaceutical composition and use thereof. In particular, the present invention provides a pharmaceutical composition comprising the PD-L1 antibody or an antigen-binding fragment thereof in a succinate buffer. In addition, the pharmaceutical composition may also contain a sugar and a nonionic surfactant.

(57) 摘要: 本发明提供了一种PD-L1抗体药物组合物及其用途。具体而言, 本发明提供了一种药物组合物, 其包含琥珀酸盐缓冲剂中的PD-L1抗体或其抗原结合片段。除此之外, 该药物组合物还可含有糖和非离子表面活性剂。



WO 2018/210230 A1

一种 PD-L1 抗体药物组合物及其用途

本申请要求申请日为2017年5月16日的中国专利申请CN201710341680.7的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明属于药物制剂领域，具体涉及一种包含 PD-L1 抗体及其抗原结合片段的药物组合物，以及其作为抗癌药物的用途。

背景技术

程序性死亡分子 1 (programmed death-1, PD-1) 是 1992 年发现的表达在 T 细胞表面的一个蛋白受体，参与到细胞的凋亡过程之中。PD-1 有两个配体，分别为 PD-L1 和 PD-L2。PD-L1 主要表达于 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)上，在活化后细胞上的表达能够进行上调。而 PD-L2 的表达相对较局限，主要表达在抗原呈递细胞上，如活化的巨噬细胞和树突状细胞。

PD-L1 通过和 PD-1 及 B7-1 的结合抑制免疫系统，很多肿瘤细胞及肿瘤组织微环境的免疫细胞表达 PD-L1。新的研究发现乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、膀胱癌、卵巢癌、胰腺癌及肝癌等人类肿瘤组织中检测到高 PD-L1 蛋白的表达，且 PD-L1 的表达水平和患者的临床及预后紧密相关。由于 PD-L1 起到第二信号通路抑制 T 细胞增殖的作用，所以阻断 PD-L1 / PD-1 之间结合成为了肿瘤免疫治疗领域一个非常有潜力的新兴靶点。

抗体药物与其他的化学药物相比，其分子量更大，结构更复杂，容易降解、聚合或发生不希望发生的化学修饰等而变得不稳定。为了使抗体分子适合于给药，并且在储存及随后使用过程中能保持稳定，发挥更好的效果，抗体药物的制剂研究显得尤为重要。

目前有多家跨国制药公司在研发包含 PD-L1/PD-1 抗体的药物组合物，相关专利如：CN105793288A、CN103429264A、CN105960415A。

本发明提供足够稳定且适于给药的包含 PD-L1 抗体及其抗原结合片段的药物组合物。

发明内容

本发明提供一种药物组合物，其包含 PD-L1 抗体及抗原结合片段，以及缓冲剂，所

述缓冲剂优选为琥珀酸盐或醋酸盐缓冲剂，更优选为琥珀酸盐缓冲剂。

在本发明的实施方案中，缓冲剂的浓度为约 5mM 至 50 mM，优选为大约 10mM 至 30mM，更优选为 10mM 至 20mM，非限制性实施例包括 10mM、12mM、14mM、16mM、18mM、20mM。

在本发明的实施方案中，药物组合物的 pH 值约为 4.5 到 6.0，优选约为 4.8 到 5.7，更优选为 5.0 到 5.5，可为 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5。

在本发明的实施方案中，药物组合中抗体的浓度为约 30mg/ml 至约 80mg/ml，优选为约 40mg/ml 至约 60mg/ml，更优选为 45mg/ml 至约 55mg/ml，非限制性实施例包括 45mg/ml、46mg/ml、47mg/ml、48mg/ml、49mg/ml、50mg/ml、51mg/ml、52mg/ml、53mg/ml、54mg/ml、55mg/ml。

进一步的，本发明的药物组合物还包含糖。本发明的“糖”包含常规组合物(CH₂O)_n及其衍生物，包括单糖，二糖，三糖，多糖，糖醇，还原性糖，非还原性糖等等。可选自葡萄糖，蔗糖，海藻糖，乳糖，果糖，麦芽糖，右旋糖苷，甘油，右旋糖苷，赤藻糖醇，丙三醇，阿拉伯糖醇，sylitol，山梨糖醇，甘露醇，密里二糖，松三糖，蜜三糖，甘露三糖，水苏糖，麦芽糖，乳果糖，麦芽酮糖，山梨醇，麦芽糖醇，乳糖醇，异-麦芽酮糖等等。优选的糖是非还原性二糖，更优选为海藻糖或蔗糖。

在本发明的实施方案中，药物组合物中糖的浓度为约 30mg/ml 至约 90mg/ml，优选为 50mg/ml 至约 70mg/ml，更优选为 55mg/ml 至约 65mg/ml，非限制性实施例包括 55mg/ml、57mg/ml、59mg/ml、60mg/ml、61mg/ml、63mg/ml、65 mg/ml。

进一步的，本发明的药物组合物还包含表面活性剂。可选自聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-、硬脂基-肌氨酸、亚油基-、肉豆蔻基-、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-、柯卡酰胺基丙基-、亚油酰胺基丙基-、肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等等。优选的表面活性剂是聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20，更优选为聚山梨酯 80。

在本发明的实施方案中，药物组合物中表面活性剂的浓度为约 0.1 mg/ml 至 1.0 mg/ml，优选为 0.2 mg/ml 至 0.8 mg/ml，更优选为 0.4 mg/ml 至 0.8 mg/ml，非限制性实施例包括 0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4 mg/ml、0.5 mg/ml、0.6 mg/ml、0.7 mg/ml 和 0.8 mg/ml。

在本发明的实施方案中，药物组合物中所述抗体或抗原结合片段包含任意 1 个选自以下的 CDR 区序列或其突变序列：抗体重链可变区 HCDR 区序列：SEQ ID NO：1-3，SEQ ID NO：7-9；和/或，抗体轻链可变区 LCDR 区序列：SEQ ID NO：4-6，SEQ ID NO：10-12；

具体如下：

HCDR1 选自：NDYWX ₁	SEQ ID NO：1
或 SYWMH	SEQ ID NO：7，
HCDR2 选自：YISYTGSTYYNPSLKS	SEQ ID NO：2
或 RI X ₄ PNSG X ₅ TSYNEKFKN	SEQ ID NO：8，和/或
HCDR3 选自：SGGWLAPFDY	SEQ ID NO：3
或 GGSSYDYFDY	SEQ ID NO：9；和/或
LCDR1 选自：KSSQSLFY X ₂ SNQK X ₃ SLA	SEQ ID NO：4
或 RASESVSIHGTHLMH	SEQ ID NO：10，
LCDR2 选自：GASTRES	SEQ ID NO：5
或 AASNLES	SEQ ID NO：11，和/或
LCDR3 选自：QQYYGYPYT	SEQ ID NO：6
或 QQSFEDPLT	SEQ ID NO：12；

其中 X₁ 选自 N 或 T，X₂ 选自 R 或 H，X₃ 选自 N 或 H，X₄ 选自 H 或 G，X₅ 选自 G 或 F。

在本发明的实施方案中，优选地，药物组合物中所述的抗体或其抗原结合片段包含选自：SEQ ID NO：10，SEQ ID NO：11，SEQ ID NO：12 的轻链可变区 CDR 序列或其突变序列，和选自：SEQ ID NO：7，SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：9 的重链可变区 CDR 序列或其突变序列；更优选地，所述的抗体或其抗原结合片段包含分别如 SEQ ID NO：10，SEQ ID NO：11 和 SEQ ID NO：12 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列，以及分别如 SEQ ID NO：7，SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：9 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列；

或，优选地，药物组合物中所述的抗体或其抗原结合片段包含选自：SEQ ID NO：1，SEQ ID NO：2，SEQ ID NO：3 的重链可变区 CDR 序列或其突变序列，和选自：SEQ ID NO：4，SEQ ID NO：5 和 SEQ ID NO：6 的轻链可变区 CDR 序列或其突变序列；更优选地，所述的抗体或其抗原结合片段包含分别如 SEQ ID NO：1，SEQ ID NO：2 和 SEQ ID NO：3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列，以及分别如 SEQ ID NO：4，SEQ ID

NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列。

在本发明的实施方案中，药物组合物中所述抗体或其抗原结合片段包含与氨基酸序列：SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 具有至少 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或 99% 序列一致性的轻链可变区 CDR 序列，和与氨基酸序列：SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 具有至少 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或 99% 序列一致性的重链可变区 CDR 序列。

在本发明的实施方案中，药物组合物中所述抗体或其抗原结合片段可选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，人抗体，优选人源化抗体。

在本发明的实施方案中，药物组合物中所述抗体或其抗原结合片段包含与氨基酸序列 SEQ ID NO: 13 具有至少 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或 99% 序列一致性的重链可变区序列，和与氨基酸序列 SEQ ID NO: 14 具有至少 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或 99% 序列一致性的轻链可变区序列。

在本发明的实施方案中，药物组合物中所述抗体或其抗原结合片段包含与氨基酸序列 SEQ ID NO: 15 具有至少 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或 99% 序列一致性的重链可变区序列，和与氨基酸序列 SEQ ID NO: 17 具有至少 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，或 99% 序列一致性的轻链序列。

本发明进一步提供一种药物组合物，该药物组合物包含浓度为约 30mg/ml 至约 80mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，浓度为约 5mM 至约 50mM 的琥珀酸盐缓冲剂，pH5.0-6.0，浓度为约 30 mg/ml 至约 90 mg/ml 的二糖，浓度为约 0.1 mg/ml 至约 1.0 mg/ml 的聚山梨酯 80。

本发明进一步提供一种药物组合物，该药物组合物包含 40-60mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段，10-30mM 的琥珀酸盐缓冲剂，pH5.0-5.5，40-80 mg/ml 的蔗糖，0.4-0.8 mg/ml 的聚山梨酯 80。

本发明进一步提供一种药物组合物，该药物组合物包含 45-55mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，10-20mM 的琥珀酸盐缓冲剂，pH5.0-5.5，55-65 mg/ml 的蔗糖，0.5-0.7 mg/ml 的聚山梨酯 80。

本发明进一步提供一种药物组合物，该药物组合物包含浓度为约 30mg/ml 至约 80mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，浓度为约 5mM 至约 50mM 的醋酸盐缓冲剂，

pH5.0-6.0, 浓度为约 30 mg/ml 至约 90 mg/ml 的二糖, 浓度为约 0.1 mg/ml 至约 1.0 mg/ml 的聚山梨酯 80。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 10mM 的琥珀酸盐缓冲剂, pH5.3, 60 mg/ml 的蔗糖。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 10mM 的醋酸盐缓冲剂, pH5, 90 mg/ml 的蔗糖。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 30mM 的醋酸盐缓冲剂, pH5, 60 mg/ml 的海藻糖。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 30mM 的醋酸盐缓冲剂, pH5, 60 mg/ml 的海藻糖。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 30mM 的醋酸盐缓冲剂, pH5.6, 90 mg/ml 的蔗糖。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 10 mM 琥珀酸盐缓冲体系, pH5.0-5.5, 60 mg/ml 蔗糖, 0.2 mg/ml 的聚山梨醇酯 20。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 10-20 mM 琥珀酸盐缓冲体系, pH5.2, 60 mg/ml 蔗糖, 0.2 mg/ml 的聚山梨醇酯 20。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 20mM 的醋酸盐缓冲剂, pH5.2, 60 mg/ml 的蔗糖, 0.1-0.3 mg/ml 的聚山梨酯 20。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 20mM 的醋酸盐缓冲剂, pH5.2, 60 mg/ml 的蔗糖, 0.1-0.3 mg/ml 的聚山梨酯 80。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段, 20mM 的琥珀酸盐缓冲剂, pH5.2, 60 mg/ml 的蔗糖, 0.2-0.6mg/ml 的聚山梨酯 20。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段, 20mM 的琥珀酸盐缓冲剂, pH5.2, 60 mg/ml 的蔗糖, 0.4-0.8 mg/ml 的聚山梨酯 80。

本发明进一步提供一种药物组合物, 该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或其

抗原结合片段，20mM 的琥珀酸盐缓冲剂，pH5.2，60 mg/ml 的蔗糖，0.4 mg/ml 的聚山梨酯 80。

本发明进一步提供一种药物组合物，该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，20mM 的琥珀酸盐缓冲剂，pH5.2，60 mg/ml 的蔗糖，0.6 mg/ml 的聚山梨酯 80。

本发明进一步提供一种药物组合物，该药物组合物包含 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，20mM 的琥珀酸盐缓冲剂，pH5.2，60 mg/ml 的蔗糖，0.8 mg/ml 的聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，该药物组合物中的琥珀酸盐缓冲剂的浓度为约 5mM 至 50 mM。在一些实施方案中，该药物组合物中的琥珀酸盐缓冲剂的浓度为约 10mM 至 30mM。在一些实施方案中，该药物组合物中的琥珀酸盐缓冲剂的浓度为约 20mM。

在一些实施方案中，该药物组合物中的醋酸盐缓冲剂的浓度为约 5mM 至 50 mM。在一些实施方案中，该药物组合物中的醋酸盐缓冲剂的浓度为约 10mM 至 30mM。在一些实施方案中，该药物组合物中的醋酸盐缓冲剂的浓度为约 20mM。

在一些实施方案中，该药物组合物的 pH 值约为 5.0 到 6.0。在一些实施方案中，该药物组合物的 pH 值约为 5.0 到 5.5。在一些实施方案中，该药物组合物的 pH 值约为 5.2 或 5.5。

在一些实施方案中，该药物组合物中抗体的浓度为约 30mg/ml 至约 80mg/ml。在一些实施方案中，该药物组合物中抗体的浓度为约 40mg/ml 至约 60mg/ml。在一些实施方案中，该药物组合物中抗体的浓度为约 50 mg/ml。

在一些实施方案中，该药物组合物中包含所述二糖的浓度为约 30mg/ml 至约 90mg/ml。在一些实施方案中，该药物组合物中的所述二糖的浓度为约 40mg/ml 至约 80mg/ml。在一些实施方案中，该药物组合物中的所述二糖的浓度为约 60mg/ml。

在一些实施方案中，该药物组合物中所述聚山梨酯为聚山梨酯 20 或聚山梨酯 80。在一些实施方案中，该药物组合物中所述聚山梨酯为聚山梨酯 80。在一些实施方案中，该药物组合物中所述聚山梨酯的浓度为约 0.1 mg/ml 至 1.0 mg/ml。在一些实施方案中，该药物组合物中所述聚山梨酯的浓度为约 0.4 mg/ml 至 0.8 mg/ml。在一些实施方案中，该药物组合物中所述聚山梨酯的浓度为约 0.6 mg/ml。

在一些实施方案中，该配制剂于 2-8℃ 稳定至少 3 个月，至少 6 个月，至少 12 个月，至少 18 个月或至少 24 个月。在一些实施方案中，该配制剂于 40℃ 稳定至少 7 天，至少 14 天或至少 28 天。

本发明进一步提供一种制品或试剂盒，其包含装有本文所述任何稳定的药物组合物的容器。在一些实施方案中，该容器为玻璃瓶，该玻璃瓶为中性硼硅玻璃管制注射剂瓶。

本发明进一步提供一种制备以上任一项所述的药物组合物的方法，包括将 PD-L1 抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂混合。

本发明进一步提供以上任一项所述药物组合物在制备用于治疗 PD-L1 介导的疾病或病症的药物中的用途，其中所述的疾病或病症优选为癌症；更优选为表达 PD-L1 的癌症；最优选为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌；进一步优选为非小细胞肺癌、黑素瘤、膀胱癌和肾癌。

本发明进一步提供一种治疗和预防 PD-L1 介导的疾病或病症的方法，该方法包括给予所需患者有效量的包含 PD-L1 抗体或其抗原结合片段的药物组合物；其中所述的疾病优选为癌症；更优选为表达 PD-L1 的癌症；所述的癌症最优选为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌；最优选为非小细胞肺癌、黑素瘤、膀胱癌和肾癌。

如本领域技术人员所熟知的，本公开中所述各个实施方案的一项、一些或所有特性可以进一步组合以形成本发明的其它实施方案。本发明的以上实施方案和通过组合得到的其他实施方案通过下面的详述进一步说明。

附图说明

图 1：人源化克隆构建时引物设计示意图。

图 2：人源化克隆构建的载体构建示意图。

图 3：Tm 各因子主效应图（包括缓冲体系、缓冲液浓度、药物组合物的 pH、糖浓度和糖的种类）。

具体实施方式

术语

为了更容易理解本发明，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

“缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲剂。本发明的缓冲剂 pH 约为 4.5 到 6.0，优选为大约 5.0 至 6.0，更优选为大约 5.0 至 5.5，最优选为 5.2。将 pH 控制在此范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸、草

酸盐、乳酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。本发明优选的缓冲剂是琥珀酸盐缓冲剂或醋酸盐缓冲剂，更优选为琥珀酸盐缓冲剂。

“琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠、琥珀酸组氨酸盐、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。本发明优选的琥珀酸盐缓冲剂是琥珀酸-琥珀酸钠。

“醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、醋酸组氨酸盐、醋酸-醋酸钾、醋酸醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。本发明优选的醋酸盐缓冲剂是醋酸-醋酸钠。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

本发明所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果：其中的抗体在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合物，优选地，药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术，可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

稳定的药物抗体制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂：在冷藏温度(2-8℃)保存至少3个月、优选6个月、更优选1年，且甚至更优选地最长达2年。另外，稳定的液体制剂包括这样的液体制剂：其在包括25℃和40℃在内的温度保存包括1个月、3个月、6个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的可接受的标准如下：通过SEC-HPLC测得，通常不超过约10%、优选不超过约5%的抗体单体发生降解。通过视觉分析，药物抗体制剂是无色的，或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH和重量克分子渗透压浓度具有不超过±10%变化。通常观察到不超过约10%、优选不超过约5%的截短。通常形成不超过约10%、优选不超过约5%的聚集。

如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过UV光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)和动态光散射(DLS)测得，抗体没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法(其确定蛋白三级结构)和通过FTIR光谱法(其确定蛋白二级结构)来评价。

如果抗体没有显示出显著的化学改变，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白，可以评估化学稳定性。经常改变蛋

白化学结构的降解过程包括水解或截短(通过诸如尺寸排阻色谱法和 SDS-PAGE 等方法来评价)、氧化(通过诸如与质谱法或 MALDI/TOF/MS 结合的肽谱法等方法来评价)、脱酰胺作用(通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价)和异构化(通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等来评价)。

如果抗体在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内,那么所述抗体在药物制剂中“保留它的生物活性”。抗体的生物活性可以例如通过抗原结合测定来确定。

本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J. *biol. chem.*, 243, p3558 (1968)中所述。

本发明所述的“抗体”指免疫球蛋白,是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,故其抗原性也不同。据此,可将免疫球蛋白分为五类,或称为免疫球蛋白的同种型,即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE,其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其较链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别,又可分为不同的亚类,如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

在本发明中,本发明所述的抗体轻链可进一步包含轻链恒定区,所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ 、 λ 链或其变体。

在本发明中,本发明所述的抗体重链可进一步包含重链恒定区,所述的重链恒定区包含人源或鼠源的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体。

抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大,为可变区 (Fv 区);靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区。可变区包括 3 个高变区 (HVR) 和 4 个序列相对保守的骨架区 (FR)。3 个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区 (CDR)。每条轻链可变区 (LCVR) 和重链可变区 (HCVR) 由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3;重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。本发明所述的抗体或抗原结合片段的 LCVR 区和 HCVR 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号规则 (LCDR1-3, HCDE2-3),或者符合 kabat 和 chothia 的编号规则 (HCDR1)。

本发明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。

术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的对人 PD-L1 的单克隆

抗体。制备时用 PD-L1 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。在本发明一个优选的实施方案中，所述的鼠源 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源 κ 、 λ 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。

术语“嵌合抗体 (chimeric antibody)”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从小鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆人抗体的恒定区基因，将小鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入人载体中，最后在真核工业系统或原核工业系统中表达嵌合抗体分子。在本发明一个优选的实施方案中，所述的 PD-L1 嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的 PD-L1 嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区。人抗体的恒定区可选自人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变后无 ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, 抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用) 毒性的 IgG4。

术语“人源化抗体 (humanized antibody)”，也称为 CDR 移植抗体 (CDR-grafted antibody)，是指将小鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量小鼠蛋白成分，从而诱导的强烈的抗体可变抗体反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库 (在因特网 www.mrccpe.com.ac.uk/vbase 可获得)，以及在 Kabat, E.A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。本发明的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。

本发明中所述的“抗原结合片段”，指具有抗原结合活性的 Fab 片段，Fab ‘片段，F (ab’) 2 片段，以及与人 PD-L1 结合的 Fv 片段 ScFv 片段；其包含本发明所述抗体的选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:12 中的一个或多个 CDR 区。Fv 片段含有抗体重链可变区和轻链可变区，但没有恒定区，并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般地，Fv 抗体还包含在 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，且能够形成抗原结合所需的结构。也可以用不同的连接物将两个抗体可变区连接成一条多肽链，称为单链抗体 (single chain

antibody) 或单链 Fv (sFv)。本发明的术语“与 PD-L1 结合”，指能与人 PD-L1 相互作用。本发明的术语“抗原结合位点”指抗原上不连续的，由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8 章和 15 章。例如，老鼠可以用人 PD-L1 或其片段免疫，所得到的抗体能被复性、纯化，并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或多个个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件，从 ImMunoGeneTics(IMGT)的网站 <http://imgt.cines.fr> 得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001ISBN012441351 上获得。

本发明工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 CDNA 序列，可以克隆并重组至 GS 表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。通过表达与人 PD-L1 特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如，用含调整过的缓冲剂的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 PH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测抗体片段，收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如 -70°C，或者冻干。

“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页，（第 4 版））。另外，结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。

“一致性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是一致的。两个序列之间的一致性百分率是两个序列共有的匹配或一致位置数除以比较的位置数 $\times 100$ 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或一致，那么两个序列为 60%一致性。

一般而言，当比对两个序列而得到最大的一致性百分率时进行比较。

“给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，例如包含本发明的任一种结合化合物的组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本发明的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：例如，待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

“T_m 值”是指蛋白质热变性温度，即一半蛋白去折叠时的温度，此时蛋白的空间结构被破坏，所以 T_m 值越高，蛋白热稳定性越高。

以下结合实施例进一步描述本发明，但这些实施例并非限制着本发明的范围。本发明实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例中 SEC-HPLC 和 IEC-HPLC 的检测使用安捷伦-HPLC1260 高压液相色谱仪（Waters Xbridge[®] BEH 200Å SEC 3.5μm 7.8*300mm 色谱柱和 Thermo ProPac[™] WCX-10 BioLC[™], 250×4mm 色谱柱）。还原 CE-SDS 及非还原 CE-SDS 的检测使用 Beckman 公司

的 PA 800plus 毛细管电泳仪。蛋白热变性温度 (T_m) 的测定使用 GE 公司 MicroCal VP-Capillary DSC 差示扫描热量计。DLS (Dynamic Light Scattering) 平均粒径的测定用马尔文 Zetasizer Nano ZS 纳米粒度电位仪。

实施例 1 PD-L1 抗体的制备

(1) PD-L1 抗原及检测用蛋白的制备

以 UniProt Programmed Cell Death 1 Ligand 1 (PD-L1) isoform 1 (SEQ ID NO: 19) 的人 PD-L1 全长基因 (义翘神州生物技术有限公司, HG10084-M), 作为本发明 PD-L1 的模板, 获得编码本发明抗原及检测用蛋白的基因序列, 可选地与抗体重链 Fc 片段 (如 human IgG1) 重组, 分别克隆到 pTT5 载体上 (Biovector, Cat#: 102762) 或 pTarget 载体上 (promega, A1410), 在 293F 细胞 (Invitrogen, R79007) 瞬转表达或 CHO-S 细胞 (Invitrogen, k9000-20) 稳定表达, 纯化, 获得编码本发明抗原及检测用蛋白。人 PD-1 基因购自 ORIGENE, 货号 SC117011, NCBI Reference Sequence: NM_005018.1。

1、人 PD-L1 全长氨基酸序列

MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL
AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVOHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ
ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE
HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN
TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNER TH LVILGAILLC LGVALTFIFR
LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET

SEQ ID NO: 19

注释: 双横线部分为信号肽 (Signal peptide: 1-18); 划横线部分为 PD-L1 胞外区 (Extracellular domain: 19-238), 其中 19-127 为 Ig-like V-type Domain, 133-225 为 Ig-like C2-type Domain; 点划线部分为跨膜区部分 (Transmembrane domain: 239-259); 斜体部分为胞内区 (Cytoplasmic domain: 260-290)。

2、免疫原: 带 His、PADRE 标签的 PD-L1: PD-L1 (Extra Cellular Domain, 简称 ECD) -PADRE-His6

FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME
DKNIIQFVHG EEDLKVOHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG
VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY
PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT
FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERGS GAKFVAAWTL KAAAHHHHHH

SEQ ID NO: 20

注释：划横线部分为 PD-L1 胞外区；点划线部分为 PADRE 标记；斜体部分为 His6-tag 标记。

3、得到带FLAG、HIS标签的PD-L1：PD-L1(ECD)-Flag-His6，用于本发明抗体的性能测试。

FT VTVPKDLYVV EYGSNM[·]TIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG
EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG
ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVD[·]PVTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS
DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNV[·]TSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH
TAELVIPELP LAHPPNERDY KDDDDKHHHH HH

SEQ ID NO: 21

注释：划横线部分为 PD-L1 胞外区；点划线部分为 FLAG-Tag 标记；斜体部分为 His6-tag 标记。

4、PD-L1的Fc融合蛋白：PD-L1(ECD)-Fc，用作本发明的免疫抗原或检测试剂。

VKL-PD-L1(ECD)-Fc(human IgG1)

FTVTVPKDLYVVEYGSNM[·]TIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKV
QHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAP
YNKINQRILVVD[·]PVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLF
NVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERDKTH[·]TCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 22

注释：划横线部分为 PD-L1 胞外区；斜体部分为 human IgG1 Fc 部分。

5、PD-1的Fc融合蛋白：PD-1(ECD)-Fc，用于本发明抗体的性能测试。

PGWFLDSPDRPWN[·]PPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLN[·]WYRMSPSNQT
DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYL[·]CGAISLAPKAQI
KESLRAELRVTERRAEVPTAHSPSPRPAGQFQTLVEPKSSDKTH[·]TCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 23

注释：划横线部分为 PD-1 (ECD) 胞外区；斜体部分为 hFc (human IgG1) 部分。

(2) PD-L1、PD-1 重组蛋白以及杂交瘤抗体、重组抗体的纯化

1、“带 His、PADRE 标签的 PD-L1”：PD-L1(ECD)-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 20) 重组蛋白的纯化步骤

将细胞表达上清样品高速离心去除杂质，并将缓冲液换置为 PBS，加入咪唑至终浓度为 5mM。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液平衡镍柱，冲洗 2-5 倍柱体积。将置换后的上清样品装载于 Ni 柱 (GE, 17-5318-01) 上。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液冲洗柱子，至 A₂₈₀ 读数降至基线。后用 PBS+10mM 咪唑冲洗层析柱，除去非特异结合的杂蛋白，并收集流出液。再用含有 300mM 咪唑的 PBS 溶液洗脱目的蛋白，并收集洗脱峰。收集的洗脱液浓缩后用凝胶层析 Superdex200 (GE) 进一步纯化，流动相为 PBS。去聚体峰，收集洗脱峰。所得到的蛋白经电泳、肽图 (安捷伦, 6530 Q-TOF)、LC-MS (安捷伦, 6530 Q-TOF) 鉴定为正确后分装备用。得到带 His、PADRE 标签的 PD-L1：PD-L1(ECD)-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 2) 用于本发明抗体的免疫原。

2、带 His 标签和 Flag 标签的 PD-L1(ECD)-Flag-His6 (SEQ ID NO: 21) 重组蛋白的纯化步骤

将样品高速离心去除杂质，并浓缩至适当体积。将如上 IMAC 柱洗出的蛋白峰装载于 0.5×PBS 平衡的 flag 亲和柱 (Sigma, A2220) 上，冲洗 2-5 倍柱体积。将除杂后的细胞表达上清样品装载于柱上。用 0.5×PBS 冲洗柱子，至 A₂₈₀ 读数降至基线。用含有 0.3M NaCl 的 PBS 冲洗柱子，冲洗杂蛋白，并收集。用 0.1M 乙酸 (pH3.5-4.0) 洗脱目的蛋白，并收集，调节 pH 至中性。收集的洗脱液浓缩后用凝胶层析 Superdex200 (GE) 进一步纯化，流动相为 PBS。去聚体峰，收集洗脱峰。收集样品经电泳、肽图、LC-MS 鉴定正确后分装备用。得到带 His 标签和 Flag 标签的 PD-L1：PD-L1(ECD)-Flag-His6 (SEQ ID NO: 3)，用于本发明抗体的性能测试。

3、PD-L1 和 PD-1 的 Fc 融合蛋白的纯化步骤

将细胞表达上清样品高速离心去除杂质，浓缩至适当体积后装载于 Protein A 柱 (GE, 17-5438-01) 上。用 PBS 冲洗柱子，至 A₂₈₀ 读数降至基线。用 100mM 醋酸钠 pH3.0 洗脱目的蛋白。1M TrisHCl 中和后的蛋白上 PBS 平衡好的凝胶层析 Superdex200 (GE) 进一步纯化。去聚体峰，收集洗脱峰后，分装备用。此方法用来纯化 PD-L1(ECD)-Fc (SEQ ID NO: 4) 和 PD-1(ECD)-Fc (SEQ ID NO: 5)。PD-L1(ECD)-Fc 可用作本发明的免疫抗原或检测试剂，PD-1(ECD)-Fc 用于本发明抗体的性能测试。

(3) 抗人 PD-L1 杂交瘤单克隆抗体的制备

1、免疫

抗人 PD-L1 单克隆抗体通过免疫小鼠产生，实验用 SJL 白小鼠，雌性，6 周龄(北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号：SCXK(京)2012-0001)。饲养环境：SPF 级。小鼠购进后，实验室环境饲养 1 周，12/12 小时光/暗周期调节，温度 20-25℃；湿度 40-60 %。将已适应环境的小鼠按两种方案（方案 A 和方案 B）免疫，每组 6-10 只。免疫抗原为带 His、PADRE 标签的 PD-L1：PD-L1(ECD)-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 20)。

方案 A 用弗氏佐剂(sigma Lot Num: F5881/F5506)乳化：首免用弗氏完全佐剂(CFA)，其余加强免疫用弗氏不完全佐剂(IFA)。抗原与佐剂比例为 1:1，100ug/只(首免)，50ug/只(加强免疫)。第 0 天腹膜内(IP)注射 100ug/只的乳化后抗原，首免后每两周一次，共 6-8 周。

方案 B 用 Titermax (sigma Lot Num: T2684)与 Alum (Thremo Lot Num: 77161) 交叉免疫。抗原与佐剂 (titermax) 比例为 1:1，抗原与佐剂 (Alum) 比例为 3:1，10-20ug/只(首免)，5ug/只 (加强免疫)。第 0 天腹膜内(IP)注射 20/10ug/只的乳化后抗原，首免后每周一次，Titermax 和 Alum 交替使用，共 6-11 周。免疫四周后，根据背部结块和腹部肿胀情况，选择背部或腹膜内注射抗原。

2、细胞融合

选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合，融合前 72 小时冲刺免疫所选小鼠，腹腔注射。采用优化的 PEG 介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞(ATCC® CRL-8287™)进行融合得到杂交瘤细胞。融合好的杂交瘤细胞用 HAT 完全培养基 (含 20%FBS、1×HAT 和 1×OPI 的 RPMI-1640 培养基) 重悬，分装于 96 孔细胞培养板中 (1×10⁵/150ul/孔)，37℃、5%CO₂ 孵育。融合后的第 5 天加入 HAT 完全培养基，50ul/孔，37℃、5%CO₂ 孵育。融合后第 7 天~8 天，根据细胞生长密度，全换液，培养基为 HT 完全培养基 (含 20%FBS、1×HT 和 1×OPI 的 RPMI-1640 培养基)，200ul/孔，37℃、5%CO₂ 孵育。

3、杂交瘤细胞筛选

融合后第 10-11 天，根据细胞生长密度，进行结合 PD-L1 的 ELISA 方法检测。并将结合 ELISA 检测的阳性孔细胞进行 PD-L1/PD-1 结合的阻断 ELISA 检测，阳性孔换液，并根据细胞密度及时扩大至 24 孔板中。移入 24 孔板的细胞株经过复测后进行保种和第一次亚克隆。第一次亚克隆筛选为阳性的进行保种，并进行第二次亚克隆。第二次亚克隆为阳性的进行保种和蛋白表达。多次融合获得有阻断 PD-L1 和 PD-1 结合效果的杂交

瘤细胞。

通过阻断实验和结合实验筛选得到杂交瘤克隆 1 和 2,用腹水法或用无血清细胞培养法进一步制备抗体,按纯化实例纯化抗体,供在检测例中使用。

测序获得鼠源抗体的可变区序列,其中测得杂交瘤克隆的 CDR 可变区序列如下表 1 所示:

表 1

	重链		轻链	
1	HCDR1	NDYWX1 SEQ ID NO: 1	LCDR1	KSSQSLFYX2SNQKX3SLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	YISYTGSTYYNPSLKS SEQ ID NO: 2	LCDR2	GASTRES SEQ ID NO: 5
	HCDR3	SGGWLAPFDY SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYYGYPYT SEQ ID NO: 6
2	HCDR1	SYWMH SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASESVSIHGTHLMH SEQ ID NO: 10
	HCDR2	RIX4PNSGX5TSYNEKFKN SEQ ID NO: 8	LCDR2	AASNLES SEQ ID NO: 11
	HCDR3	GGSSYDYFDY SEQ ID NO: 9	LCDR3	QQSFEDPLT SEQ ID NO: 12

其中 X1 选自 N 或 T, X2 选自 R 或 H, X3 选自 N 或 H, X4 选自 H 或 G, X5 选自 G 或 F。

(4) 抗人 PD-L1 杂交瘤单克隆抗体的人源化

通过比对 IMGT 人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和 MOE 软件,挑选同源性高的重轻链可变区种系基因作为模板,将鼠源抗体 1 和 2 的 CDR 分别移植到相应的人源模板中,经亲和力成熟后形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。

鼠源抗体 1 的人源化轻链模板为 IGKV4-1*01 和 hjk4.1,人源化重链模板为 IGHV4-30-4*01 和 hjh2,人源化可变区序列如下:

>1 hVH- CDR graft

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISNDYWNWIRQHPGKGLEWIGYISYTGST
YYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGGWLAPFDYWGRGTLVTVSS

SEQ ID NO: 24

>1 hVL CDR graft

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYRSNQKNSLAWYQOKPGQPPKLLIYGAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYGYPTYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 25

鼠源抗体2的人源化轻链模板为IGKV7-3*01和hjk2.1，人源化重链模板为IGHV1-46*01和hjh6.1，人源化可变区序列如下：

>2- hVH.1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIHPNS
GGTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYWGQGTTVVSS

SEQ ID NO: 26

>2-hVL.1

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQOKPGQPPKLLIYAASNLE
SGVPARFSGSGSGTDFLTINPVEANDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 27

注：顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为FR序列，下划线为CDR序列。

(5) 人源化克隆构建

设计引物 PCR 搭建各人源化抗体 VH/VK 基因片段，再与表达载体 pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)进行同源重组，构建抗体全长表达载体 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。

1、引物设计：利用在线软件 DNABworks (v3.2.2) (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>) 设计多条引物合成 VH/VK 含重组所需基因片段：5'-30bp 信号肽 + VH/VK + 30bp CH1/CL-3'。引物设计原则：目的基因2与目的基因1有2个aa不一样，则另设突变位点所在引物，如图1所示。

2、片段拼接：按照 TaKaRa 公司 Primer STAR GXL DNA 聚合酶操作说明书，用上面设计的多条引物，分两步 PCR 扩增得到 VH/VK 含重组所需基因片段。

3、表达载体 pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)构建及酶切

利用一些特殊的限制性内切酶，如 BsmBI，识别序列与酶切位点不同的特性设计构建表达载体 pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)，构建示意图如图2所示。

BsmBI 酶切载体，切胶回收备用。

4、重组构建表达载体 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr

VH/VK 含重组所需基因片段与 BsmBI 酶切回收表达载体 pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)按摩尔比 3:1 比例分别加入 DH5H 感受态细胞中, 0°C 冰浴 30min, 42°C 热击 90s, 加入 5 倍体积 LB 介质, 37°C 孵育 45min, 涂布 LB-Amp 平板, 37°C 培养过夜, 挑取单克隆送测序得到各目的克隆。

(6) 抗-PD-L1 人源化抗体亲和力成熟

1、构建人源化PD-L1抗体1和2噬菌粒载体

人源化后的PD-L1抗体1和2分别以scFv模式 (VH-3个GGGGS-VL) 构建到噬菌粒载体中, 作为野生型序列 (即相对于亲和力成熟筛选得到的突变序列, 作为原始或起始序列)。利用over-lap PCR拼接VH、(GGGGS) 3 linker、VL, 采用NcoI和NotI酶切位点连接入噬菌粒载体。

2、构建噬菌体展示文库

利用构建好的野生型scFv为模板, 采用codon-based引物, 在引物合成过程中, 突变区域每个密码子都有50%野生型的密码子和50%的NNK(反向引物为MNN) 在所有CDR区引入突变构建突变文库。PCR片段经过NcoI和NotI酶切, 连接到噬菌粒载体中, 最后电转化大肠杆菌TG1。每条codon-based引物建立一个独立的文库, 其中抗体1分为7个文库, 抗体2分为8个文库。

3、文库淘筛

文库经过拯救包装出淘筛用的噬菌体颗粒后, 利用生物素化的人PD-L1 (ECD) 抗原和链霉亲和素磁珠进行液相法淘筛, 并且每一轮筛选相对于上一轮都降低抗原浓度。三轮淘筛之后, 抗体1和抗体2分别挑取250克隆进行噬菌体 ELISA检测结合活性, 阳性克隆进行测序。

4、表面等离子体共振 (SPR) 检测亲和力

经过对测序克隆进行比对分析, 去除冗余序列之后, 将非冗余序列转换成全长 IG ($\gamma 1$, κ) 进行哺乳动物细胞表达。亲和纯化之后的全长 IG 采用 BIAcore™ X-100 instrument (GE Life Sciences) 进行亲和力测定。

亲和力成熟后的人源化抗体 2 的可变区序列如下:

重链可变区

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIGPNS
GFTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGGSSYDYFDYWGQGT
VT
VSS

SEQ ID NO: 13

其中，CDR2 的 X₄ 为 G，X₅ 为 F。

轻链可变区

*DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPLLIYAASNLE
SGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIK*

SEQ ID NO: 14

注：序列中斜体为 FR 序列；下划线为 CDR 序列，其中双下划线的位点为亲和力成熟筛选后得到的位点。

亲和力成熟后的人源化抗体 1 的可变区序列如下：

重链可变区

*QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISNDYWTWIRQHPGKGLEIYGYISYTGSTY
YNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGGWLAPFDYWGRGTLVTVSS*

SEQ ID NO: 28

其中，CDR1 的 X₁ 为 T。

轻链可变区

*DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYHSNQHSLAWYQQKPGQPPLLIYGAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYGYPYTFGGGGTKVEIK*

SEQ ID NO: 29

其中，CDR1 X₂ 为 H，X₃ 为 H。

将亲合力成熟得到的克隆转换成 IgG4 类型，选择核心铰链区包含 S228P 突变的 IgG4 以得到无 ADCC 和 CDC 的抗体，其中由抗体 2 得到的抗体命名为 HRP00052。

下述基因序列 SEQ ID NO: 16 和 18 的最后三位核苷酸“TGA”为终止密码子，不编码任何氨基酸。

HRP00052 抗体重链序列

*QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIG
PNSGFTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYW
GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS*

FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 15

HRP00052 抗体重链序列编码基因序列

CAGGTGCAACTGGTGCAGAGCGGTGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCAAGCG
TGAAAGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGG
GTGAGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGGATCGGGCCCAACA
GTGGTTTCACTAGCTACAATGAAAAGTTCAAGAACAGGGTAACCATGACCAGGGAC
ACCTCCACCAGCACAGTGTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCG
CCGTGTACTACTGTGCCAGAGGGCGGCAGCAGCTACGACTACTTCGACTATTGGGGC
CAGGGCACCAACCGTGACCGTGAGCAGTGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC
CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCA
GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATAT
GGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGGCTGCTGGGGGACCATCAGTCTT
CCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTA
CGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAG
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
CAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
TCTGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 16

HRP00052 抗体轻链序列

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPELLIYAASN

LESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYCYCQSFEDPLTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 17

HRP00052 抗体轻链序列编码基因序列:

GACATCGTGCTGACCCAGAGTCCCGCCTCACTTGCCGTGAGCCCCGGTCAGAG
GGCCACCATCACCTGTAGGGCCAGCGAGAGCGTGAGCATCCACGGCACCCACCTGA
TGCACTGGTATCAACAGAAACCCGGCCAGCCCCCAAAGTCTGATCTACGCCGCC
AGCAACCTGGAGAGCGGCGTGCCCGCCAGGTTTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCACCG
ACTTCACCCTCACTATCAACCCCGTGGAGGCCGAGGACACCGCCAACTACTACTGC
CAGCAGAGCTTCGAGGACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCA
AGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
AAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC
ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG
CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

SEQ ID NO: 18

注: 划线部分为抗体重链或轻链的可变区序列, 或编码其的核苷酸序列; 未划线部分为抗体恒定区序列及其相应的编码核苷酸序列。

构建用于表达 PD-L1 抗体 HRP00052 的表达质粒, 通过 DNA 序列分析, 确认了编码重链和轻链的核苷酸序列以及它们各自的启动子和聚腺苷酸信号序列, 随后使用所述表达载体转染 CHO 细胞系。基于生长和生产稳定性选择表达抗体的克隆, 制备主种子库, 然后使用该种子库来制备抗体和产生主细胞库。

在摇瓶、培养袋和种子生物反应器中繁殖来自主细胞库的细胞, 将所得的种细胞利用生物反应器生产抗体产物。得到的抗体进一步通过蛋白 A 亲和色谱法、阳离子交换色谱法和阴离子交换色谱法纯化, 以及低 pH 病毒灭活和过滤步骤清除病毒。具体纯化步骤如下: 将细胞表达上清样品装载于 PBS 缓冲液平衡的 Protein A 柱 (Merck, 175118824) 上, 用 PBS 冲洗柱子, 至 A280 读数降至基线, 后用 PB 缓冲液冲洗柱子, 洗去杂蛋白, 再用 50mM 柠檬酸钠 pH3.5 洗脱目的蛋白并收集洗脱峰。用 1M Tris 中和后的蛋白上 PB 缓冲液平衡好的阴离子层析柱 (GE, 17-5316-10) 进行纯化, 收集流穿峰, 用 1M 柠檬

酸回调至 pH5.0。阴离子层析后蛋白上柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 平衡好的阳离子层析柱 (Merck, 1.16882) 进一步纯化, 用含 0.18M 氯化钠的柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 洗脱目的蛋白并收集洗脱峰, 分装备用。

实施例 2

以 PD-L1 制剂 (1mg/ml) 缓冲体系、缓冲剂浓度、pH 值、糖种类以及糖浓度进行实验设计, 利用 DSC 技术测定样品的 T_m 值, 初步筛选制剂的处方。

以缓冲体系、缓冲剂浓度、pH 值、糖种类以及糖浓度为因子, 以 T_m 值为响应值设计试验, 生成设计表, 根据设计表实验组进行实验, 测定 T_m 值。

表 2. 以 T_m 值为响应值的 DSC 结果

	缓冲体系	缓冲剂浓度 (mM)	pH	糖种类	糖浓度 (%)	T_m
1	琥珀酸-琥珀酸钠	10	5	海藻糖	3	83.35
2	琥珀酸-琥珀酸钠	10	5.3	蔗糖	6	84.13
3	琥珀酸-琥珀酸钠	20	5.6	蔗糖	6	83.89
4	琥珀酸-琥珀酸钠	30	5	蔗糖	6	83.06
5	琥珀酸-琥珀酸钠	30	5.6	海藻糖	3	83.49
6	醋酸-醋酸钠	10	5	蔗糖	9	84.57
7	醋酸-醋酸钠	10	5.6	蔗糖	3	84.15
8	醋酸-醋酸钠	30	5	海藻糖	6	84.03
9	醋酸-醋酸钠	30	5.6	蔗糖	9	84.51
10	组氨酸-组氨酸盐酸	10	5	蔗糖	6	82.41
11	组氨酸-组氨酸盐酸	10	5.6	海藻糖	9	83.96
12	组氨酸-组氨酸盐酸	20	5.3	海藻糖	3	81.92
13	组氨酸-组氨酸盐酸	30	5	海藻糖	9	80.85
14	组氨酸-组氨酸盐酸	30	5.6	蔗糖	6	83.03
15	柠檬酸-磷酸氢二钠	10	5	海藻糖	6	83.41
16	柠檬酸-磷酸氢二钠	10	5.6	蔗糖	3	83.53
17	柠檬酸-磷酸氢二钠	30	5	蔗糖	3	82.61
18	柠檬酸-磷酸氢二钠	30	5.6	海藻糖	6	83.87

以 T_m 值为响应值, 根据实验结果, 对模型进行拟合, R^2 为 0.999877, 调整 R^2 为 0.997913, 方差分析 $P=0.0348 < 0.05$, 模型有效, 结果可靠。

注：糖的浓度单位为 g/100mL。

根据 T_m 值最大化原则，由 T_m 各因子主效应图（图 3）初步筛选出的处方为：缓冲体系，醋酸（钠）较好，其次是琥珀酸（钠）；缓冲剂浓度 20-30mM 时，T_m 值较高；pH5-5.6 对 T_m 值无显著影响；糖浓度 6% 最好。

实施例 3

将抗 PD-L1 抗体（HRP00052）分别配制为 pH5.0-5.5 的含 10 mM 琥珀酸（钠）、醋酸（钠），60 mg/ml 蔗糖，0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 20 的制剂，蛋白浓度为 50 mg/ml。过滤并灌装每种制剂于中性硼硅玻璃管制注射剂瓶中，所述玻璃瓶用注射液用溴化丁基橡胶塞封口，进行 2~8℃ 长期稳定性考察，样品稳定性通过表 3 所示的多种特征进行说明。

对样品于室温下以黑色背景在白色荧光灯下通过目测检查确定样品颜色，外观和清澈度。通过高效尺寸排阻色谱法（HP-SEC）进一步评估样品的纯度，其中测定单体的百分比以及高分子量物质（可能为聚集体）和晚期洗脱峰（可能为降解产物）的百分比。使用高效离子交换色谱法（HP-IEC），通过揭示酸性或碱性变体的存在来评估纯度，将结果表示为总观察物质的百分比。通过 CE-SDS 技术分析样品，其中在还原和非还原条件下用十二烷基硫酸钠（SDS）将蛋白变性，并使用毛细管电泳（CE）进行分离。所述蛋白基于它们的表观分子量而分离。在非还原条件下，除了主要 IgG 峰以外的所有物质被归类为杂质。在还原条件下，IgG 被拆分为重链和轻链，所有其它物质被归类为杂质。

结果显示抗 PD-L1 抗体在琥珀酸缓冲盐体系中的稳定性明显优于醋酸盐缓冲体系；抗 PD-L1 抗体在 pH 5.0-5.5 均非常稳定。

表 3. pH 及缓冲盐体系对抗 PD-L1 抗体的 2~8℃ 长期稳定性的影响

缓冲剂	pH	时间 (月)	外观	SEC (面积%)		IEC (面积%)			CE-SDS (%CPA)	
				单体	聚体	酸性峰	主峰	碱性峰	还原	非还原
醋酸 (钠)	5.0	0	澄清透明	98.30	1.0	21.0	63.7	15.3	97.40	96.00
		3	澄清透明	98.30	1.0	24.1	62.2	13.7	98.76	95.30
		6	有烟雾状细小的悬浮物	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
醋酸 (钠)	5.2	0	澄清透明	98.3	1.0	21.1	63.7	15.2	97.20	96.10
		3	澄清透明	98.2	1.1	24.1	61.8	14.0	98.74	95.45
		6	有烟雾状细小的悬浮物	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
醋酸	5.5	0	澄清透明	98.3	1.0	21.0	64.1	15.0	97.20	96.10

(钠)		3	澄清透明	98.2	1.1	24.0	62.4	13.6	98.76	95.41
		6	有烟雾状细小的悬浮物	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
琥珀酸 (钠)	5.0	0	澄清透明	98.4	1.0	21.4	63.6	14.9	97.80	96.10
		3	澄清透明	98.3	1.0	24.4	61.5	14.1	98.65	95.85
		6	澄清透明	97.2	0.7	25.0	60.6	14.4	98.43	96.11
琥珀酸 (钠)	5.2	0	澄清透明	98.2	1.0	21.9	62.5	15.6	97.40	95.80
		3	澄清透明	98.2	1.0	24.3	61.1	14.6	98.64	95.20
		6	澄清透明	97.2	0.7	24.9	60.7	14.4	98.44	96.15
琥珀酸 (钠)	5.5	0	澄清透明	98.2	1.1	23.0	62.4	14.7	97.50	95.90
		3	澄清透明	98.2	1.1	24.1	61.6	14.3	98.61	95.45
		6	澄清透明	97.2	0.7	24.9	60.6	14.5	97.66	96.19

实施例 4

将抗 PD-L1 抗体分别配制为 10 mM 及 20mM 琥珀酸 (钠), pH5.2, 60 mg/ml 蔗糖, 0.2 mg/ml 聚山梨醇酯 20 的制剂, 蛋白浓度为 50 mg/ml。过滤并灌装每种制剂于中性硼硅玻璃管制注射剂瓶中, 所述玻璃瓶用注射液用溴化丁基橡胶塞封口, 进行 40℃ 加速和 2~8℃ 长期稳定性研究考察。结果显示抗 PD-L1 抗体在 10~20 mM 的琥珀酸缓冲体系中均非常稳定。

表 4. 不同缓冲体系浓度的制剂处方 40 °C 稳定性结果

浓度	时间 (天)	外观	SEC (面积%)		IEC (面积%)			非还原 CE-SDS (%CPA)
			单体	聚体	酸性峰	主峰	碱性峰	
10 mM	0	澄清透明	98.2	1.2	23.4	60.4	16.2	95.28
	28	澄清透明	96.9	2.0	35.0	51.8	13.1	93.66
20 mM	0	澄清透明	98.1	1.2	23.5	60.9	15.6	95.30
	28	澄清透明	96.8	2.1	35.5	52.2	12.3	93.74

表 5. 不同缓冲体系浓度的制剂处方 2~8 °C 稳定性结果

浓度	时间 (月)	外观	SEC (面积%)		IEC (面积%)			非还原 CE-SDS (%CPA)
			单体	聚体	酸性峰	主峰	碱性峰	

10 mM	0	澄清透明	98.2	1.2	23.4	60.4	16.2	95.28
	1	澄清透明	98.1	1.1	24.2	60.4	15.4	96.31
	3	澄清透明	96.9	1.0	24.8	58.7	16.5	96.10
	6	澄清透明	98.2	1.1	23.6	60.9	15.5	94.86
20 mM	0	澄清透明	98.1	1.2	23.5	60.9	15.6	95.30
	1	澄清透明	98.0	1.1	24.2	60.2	15.6	95.78
	3	澄清透明	96.9	1.0	24.9	58.7	16.4	96.05
	6	澄清透明	98.2	1.1	23.3	61.5	15.2	95.70

实施例 5

制备 PD-L1 抗体 (HRP00052) 浓度为 50 mg/ml, 含 20 mM 醋酸 (钠), pH 5.2, 60 mg/ml 蔗糖, 含不同种类及浓度表面活性剂的抗 PD-L1 抗体制剂, 过滤并灌装每种制剂于中性硼硅玻璃管制注射剂瓶中, 所述玻璃瓶用注射液用溴化丁基橡胶塞封口, 置于 25°C 恒温摇床上, 以 200 rpm 的速度振摇。

使用 DLS (Dynamic Light Scattering) 测量平均扩散系数, 用于表征溶液中纳米级粒子的粒径大小和粒径分布, PDI (particle dispersion index) 分布系数体现了粒子粒径均一程度, PDI 越小, 则粒径分布越窄, 粒径越均一。

稳定性结果表明, 0.1 - 0.3 mg/ml 聚山梨酯 20 或聚山梨酯 80, 有效防止了抗 PD-L1 抗体的聚集和团聚大颗粒物的形成。

表 6. 不同种类和浓度的聚山梨酯振摇实验结果

种类	浓度 (mg/ml)	时间 (天)	外观	DLS (nm)		SEC (面积%)	
				Z-Ave Mean	PDI	单体	聚体
无聚山梨酯	0	0	澄清透明	17.27	0.29	98.8	1.2
		3	浑浊	16.23	0.25	98.2	1.3
		7	浑浊	15.41	0.25	97.9	1.4
聚山梨酯 20	0.1	0	澄清透明	13.98	0.13	98.7	1.3
		3	偶有悬浮物	14.08	0.13	98.2	1.3
		7	偶有悬浮物	13.80	0.10	97.8	1.4
聚山梨酯 20	0.2	0	澄清透明	14.08	0.14	98.7	1.3
		3	偶有悬浮物	14.13	0.14	98.0	1.4
		7	偶有悬浮物	13.82	0.09	97.8	1.5

聚山梨酯 20	0.3	0	澄清透明	14.13	0.14	98.7	1.3
		3	偶有悬浮物	13.90	0.13	98.1	1.3
		7	偶有悬浮物	14.13	0.15	97.8	1.5
聚山梨酯 80	0.1	0	澄清透明	14.22	0.16	98.7	1.3
		3	偶有悬浮物	14.07	0.12	98.1	1.4
		7	偶有悬浮物	15.08	0.17	98.0	1.3
聚山梨酯 80	0.2	0	澄清透明	14.51	0.18	98.7	1.3
		3	偶有悬浮物	13.73	0.10	98.2	1.2
		7	偶有悬浮物	14.15	0.13	97.4	1.9
聚山梨酯 80	0.3	0	澄清透明	13.74	0.12	98.8	1.2
		3	偶有悬浮物	14.10	0.14	98.3	1.2
		7	偶有悬浮物	14.15	0.13	97.9	1.4

实施例 6

制备 PD-L1 抗体 (HRP00052) 浓度为 50 mg/ml, 含 20 mM 琥珀酸 (钠), pH 5.2, 60 mg/ml 蔗糖, 含不同种类及浓度表面活性剂的抗 PD-L1 抗体制剂, 过滤并灌装每种制剂于中性硼硅玻璃管制注射剂瓶中, 所述玻璃瓶用注射液用溴化丁基橡胶塞封口, 置于 2 ~ 8 °C 条件下进行稳定性实验。结果表明聚山梨酯 80 明显优于聚山梨酯 20, 且各个浓度之间无明显差异。

表 7. 不同聚山梨酯种类及浓度的制剂处方 2 ~ 8°C 稳定性结果

种类	浓度 mg/ml	时间 (月)	外观	SEC (面积%)		IEC (面积%)			非还原 CE-SDS (%CPA)
				单体	聚体	酸性峰	主峰	碱性峰	
聚山梨	0.2	0	澄清透明	98.1	1.20	24.3	60.5	15.2	95.9

		3	有细小悬浮物	N/A	N/A	24.5	59.6	15.9	96.6
		6	有明显悬浮性颗粒	98.3	1.15	23.8	60.3	15.9	96.2
	0.4	0	澄清透明	98.2	1.20	24.4	59.4	16.2	96.0
		3	有细小悬浮物	N/A	N/A	24.7	59.5	15.8	95.9
		6	有明显悬浮性颗粒	98.2	1.17	23.6	58.7	17.7	95.9
	0.6	0	澄清透明	98.1	1.20	24.3	60.2	15.5	95.3
		3	澄清透明	N/A	N/A	24.6	59.3	16.1	95.9
		6	有明显悬浮性颗粒	98.3	1.16	24.1	60.0	15.9	95.9
	聚山梨酯 80	0.4	0	澄清透明	98.1	1.20	23.7	60.5	15.8
3			澄清透明	N/A	N/A	24.7	59.5	15.8	95.3
6			澄清透明	98.3	1.17	23.3	58.7	18.0	95.8
0.6		0	澄清透明	98.2	1.10	24.7	59.8	15.5	94.8
		3	澄清透明	N/A	N/A	25.0	58.7	16.3	96.6
		6	澄清透明	98.3	1.15	23.6	58.5	17.9	95.7
0.8		0	澄清透明	98.1	1.20	24.2	59.8	16.0	95.7
		3	澄清透明	N/A	N/A	24.8	59.4	15.9	95.7
		6	澄清透明	98.3	1.14	23.9	59.9	16.2	95.4

权利要求

1. 一种药物组合物，其包含 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，以及缓冲剂，所述缓冲剂优选为琥珀酸盐或醋酸盐缓冲剂，更优选为琥珀酸盐缓冲剂。

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其 pH 约为 4.5 到 6.0，优选为大约 5.0 至 6.0，更优选为大约 5.0 至 5.5，最优选为 5.2。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，其中所述缓冲剂浓度为大约 5mM 至 50 mM，优选为大约 10mM 至 30mM，更优选为 10mM 至 20mM，最优选为 20mM。

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的药物组合物，其中所述抗体浓度为大约 30mg/ml 至 80mg/ml，优选为大约 40mg/ml 至 60mg/ml，更优选为大约 45mg/ml 至 55mg/ml，最优选为 50 mg/ml。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的药物组合物，其中还包括糖，所述糖优选为二糖，更优选自海藻糖或蔗糖，最优选为蔗糖。

6. 根据权利要求 5 所述的药物组合物，其中所述糖浓度为大约 30 mg/ml 至 90 mg/ml，优选为大约 40mg/ml 至 80 mg/ml，更优选为 55 mg/ml 至 65 mg/ml，最优为 60 mg/ml。

7. 根据权利要求 1 至 6 任一项所述的药物组合物，其中还包括表面活性剂，所述表面活性剂优选为聚山梨酯，更优选为聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20。

8. 根据权利要求 7 所述的药物组合物，其中表面活性剂的浓度从大约 0.1 mg/ml 至 1.0 mg/ml，优选为 0.4 mg/ml 至 0.8 mg/ml，更优选为 0.5 mg/ml 至 0.7 mg/ml，最优选为 0.6 mg/ml。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的药物组合物，其包含：

(a) 30-80mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段；

(b) 5-50mM 的琥珀酸盐缓冲剂，pH5.0-6.0；

(c) 30-90 mg/ml 的二糖；和，

(d) 0.1-1.0 mg/ml 的聚山梨酯 80；

优选地，所述药物组合物包含：40-60mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段，10-30mM 的琥珀酸盐缓冲剂，pH5.0-5.5，40-80 mg/ml 的蔗糖，0.4 -0.8 mg/ml 的聚山梨酯 80；

更优选地，所述药物组合物包含：45-55mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，10-20mM 的琥珀酸盐缓冲剂，pH5.0-5.5，55-65 mg/ml 的蔗糖，0.5-0.7 mg/ml 的聚山梨酯 80。

10. 根据权利要求 9 所述的药物组合物，其可选自以下组合物中的一种：

药物组合物 A, 包含: 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 20mM 的琥珀酸盐缓冲剂, pH5.2, 60 mg/ml 的蔗糖, 0.4 mg/ml 的聚山梨酯 80;

药物组合物 B, 包含: 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段, 20mM 的琥珀酸盐缓冲剂, pH5.2, 60 mg/ml 的蔗糖, 0.6mg/ml 的聚山梨酯 80;

药物组合物 C, 包含: 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段, 20mM 的琥珀酸盐缓冲剂, pH5.2, 60 mg/ml 的蔗糖, 0.8 mg/ml 的聚山梨酯 80;

药物组合物 D, 包含: 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段, 20mM 的琥珀酸盐缓冲剂, pH5.5, 60 mg/ml 的蔗糖, 0.6 mg/ml 的聚山梨酯 80;

药物组合物 E, 包含: 50mg/ml 的 PD-L1 抗体或抗原结合片段, 20mM 的琥珀酸盐缓冲剂, pH5.8, 60 mg/ml 的蔗糖; 0.6 mg/ml 的聚山梨酯 80。

11. 根据权利要求 1 至 10 任一项所述的药物组合物, 其中所述的抗体或其抗原结合片段包含任意 1 个选自以下的 CDR 区序列或其突变序列: 抗体重链可变区 HCDR 区序列: SEQ ID NO: 1-3 以及 SEQ ID NO: 7-9; 和/或, 抗体轻链可变区 LCDR 区序列: SEQ ID NO: 4-6 以及 SEQ ID NO: 10-12; 优选地,

HCDR1 选自: NDYWX1	SEQ ID NO: 1
或 SYWMH	SEQ ID NO: 7,
HCDR2 选自: YISYTGSTYYNPSLKS	SEQ ID NO: 2
或 RI X4PNSGX5TSYNEKFKN	SEQ ID NO: 8, 和/或
HCDR3 选自: SGGWLAPFDY	SEQ ID NO: 3
或 GGSSYDYFDY	SEQ ID NO: 9; 和/或
LCDR1 选自: KSSQSLFYX2SNQKX3SLA	SEQ ID NO: 4
或 RASESVSIHGTHLMH	SEQ ID NO: 10,
LCDR2 选自: GASTRES	SEQ ID NO: 5
或 AASNLES	SEQ ID NO: 11, 和/或
LCDR3 选自: QQYYGYPYT	SEQ ID NO: 6
或 QQSFEPLT	SEQ ID NO: 12;

其中 X1 选自 N 或 T, X2 选自 R 或 H, X3 选自 N 或 H, X4 选自 H 或 G, X5 选自 G 或 F。

12. 根据权利要求 11 所述的药物组合物, 其中所述的抗体或其抗原结合片段包含选自: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 的轻链可变区 CDR 序列或其突变序列, 和选自: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 的重链可变区 CDR

序列或其突变序列；优选地，所述的抗体或其抗原结合片段包含分别如 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列，以及分别如 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列；

或，所述的抗体或其抗原结合片段包含选自：SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 的重链可变区 CDR 序列或其突变序列，和选自：SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 的轻链可变区 CDR 序列或其突变序列；优选地，所述的抗体或其抗原结合片段包含分别如 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列，以及分别如 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列。

13. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的药物组合物，其中所述的抗体或其抗原结合片段选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，人抗体，优选人源化抗体。

14. 根据权利要求 12 所述的药物组合物，其中所述的抗体或其抗原结合片段的重链可变区序列为 SEQ ID NO: 13，轻链可变区序列为 SEQ ID NO: 14。

15. 根据权利要求 12 所述的药物组合物，其中所述的抗体或其抗原结合片段重链序列为 SEQ ID NO: 15，轻链序列为 SEQ ID NO: 17。

16. 制备权利要求 1 至 15 任一项所述的药物组合物的方法，包括将 PD-L1 抗体或抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂混合。

17. 根据权利要求 1 至 15 任一项所述的药物组合物在制备用于治疗 PD-L1 介导的疾病或病症的药物中的用途，其中所述的疾病或病症优选为癌症；更优选为表达 PD-L1 的癌症；最优选为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌；进一步优选为非小细胞肺癌、黑素瘤、膀胱癌和肾癌。

18. 一种治疗和预防 PD-L1 介导的疾病或病症的方法，包括给予所需患者治疗有效量的根据权利要求 1 至 15 任一项所述的药物组合物；其中所述的疾病优选为癌症；更优选为表达 PD-L1 的癌症；所述的癌症最优选为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌；最优选为非小细胞肺癌、黑素瘤、膀胱癌和肾癌。

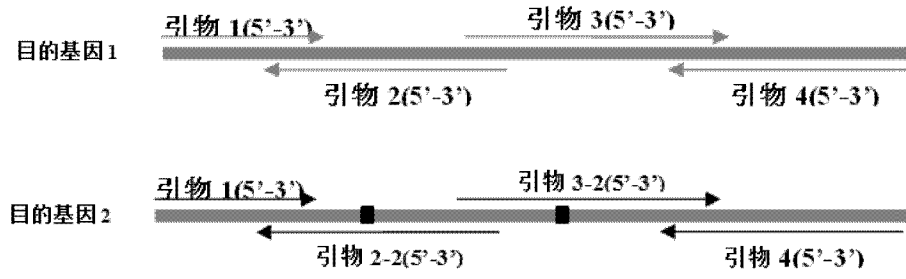


图 1

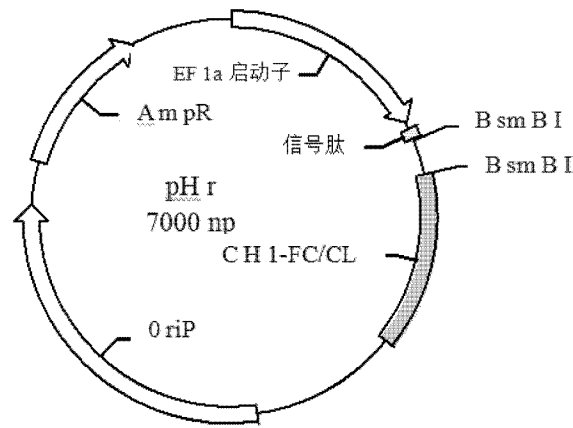


图 2

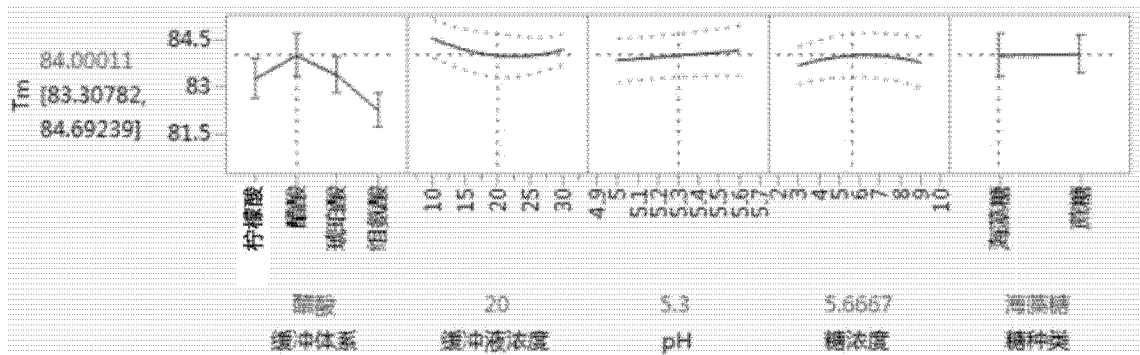


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/086866

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(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)

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)

CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; CNKI; ISI web of Science; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统, NATIONAL BIO-SEQUENCE RETRIEVAL SYSTEM DATABASE OF CHINESE PATENT: PD, PDL1, 恒瑞, 抗体, 醋酸, 琥珀酸, 缓冲液, PD-L1, 乙酸, antibody, succinate, acetate, buffer, search based on sequences 1-12

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107198773 A (WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI) CO., LTD.; WUXI APPTec BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.; WUXI APPTec (SUZHOU) TESTING TECHNOLOGY CO., LTD.) 26 September 2017 (2017-09-26) claims 1-13	1-10, 13, 16
PY	CN 107198773 A (WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI) CO., LTD.; WUXI APPTec BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.; WUXI APPTec (SUZHOU) TESTING TECHNOLOGY CO., LTD.) 26 September 2017 (2017-09-26) claims 1-13	11-12, 14-15, 17
PY	WO 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. ET AL.) 26 May 2017 (2017-05-26) claims 1-25	11-12, 14-15, 17
X	CN 105793288 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 20 July 2016 (2016-07-20) abstract, and claims 1-41	1-10, 13, 16-17
A	CN 105793288 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 20 July 2016 (2016-07-20) claims 1-41	11-12, 14-15

 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

17 July 2018

Date of mailing of the international search report

20 August 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/086866

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.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claim 18 sets forth a method for the treatment of a human or animal body, which falls within the subject matter for which a search is not required under PCT Rule 39.1(iv), and therefore a search is not made.

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/CN2018/086866

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107198773	A	26 September 2017	None			
WO	2017084495	A1	26 May 2017	CA	3004804	A1	26 May 2017
				AU	2016357901	A1	24 May 2018
				CN	107614529	A	19 January 2018
				TW	201718657	A	01 June 2017
CN	105793288	A	20 July 2016	KR	20160058938	A	25 May 2016
				JP	2016533335	A	27 October 2016
				TW	201542225	A	16 November 2015
				AR	097791	A1	13 April 2016
				EP	3049441	A1	03 August 2016
				PH	12016500566	A1	23 May 2016
				CR	20160141	A	15 July 2016
				CL	2016000680	A1	23 December 2016
				US	2016319022	A1	03 November 2016
				CA	2925310	A1	02 April 2015
				PE	05412016	A1	03 June 2016
				BR	112016006397	A2	26 September 2017
				EA	201690667	A1	31 August 2016
				HK	1222867	A1	14 July 2017
				WO	2015048520	A1	02 April 2015
				SG	11201602283U	A	28 April 2016
				SG	10201708542R	A	28 December 2017
				IL	244712	D0	21 April 2016
				MX	2016003939	A	17 June 2016
				AU	2014324703	A1	21 April 2016
				MA	38960	A1	31 October 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/086866

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(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>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>CPRSABS;CNABS;DWPI;SIPOABS;CNKI;ISI web of Science;Genbank;EMBL;中国专利生物序列检索系统:PD, PDL1, 恒瑞, 抗体, 醋酸, 琥珀酸, 缓冲液, PD-L1, 乙酸, antibody, succinate, acetate, buffer, 基于序列1-12的检索</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 107198773 A (上海药明生物技术有限公司 无锡药明康德生物技术股份有限公司 苏州药明康德检测检验有限责任公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 权利要求1-13</td> <td>1-10, 13, 16</td> </tr> <tr> <td>PY</td> <td>CN 107198773 A (上海药明生物技术有限公司 无锡药明康德生物技术股份有限公司 苏州药明康德检测检验有限责任公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 权利要求1-13</td> <td>11-12, 14-15, 17</td> </tr> <tr> <td>PY</td> <td>WO 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO等) 2017年 5月 26日 (2017 - 05 - 26) 权利要求1-25</td> <td>11-12, 14-15, 17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105793288 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 摘要, 权利要求1-41</td> <td>1-10, 13, 16-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105793288 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 权利要求1-41</td> <td>11-12, 14-15</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 107198773 A (上海药明生物技术有限公司 无锡药明康德生物技术股份有限公司 苏州药明康德检测检验有限责任公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 权利要求1-13	1-10, 13, 16	PY	CN 107198773 A (上海药明生物技术有限公司 无锡药明康德生物技术股份有限公司 苏州药明康德检测检验有限责任公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 权利要求1-13	11-12, 14-15, 17	PY	WO 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO等) 2017年 5月 26日 (2017 - 05 - 26) 权利要求1-25	11-12, 14-15, 17	X	CN 105793288 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 摘要, 权利要求1-41	1-10, 13, 16-17	A	CN 105793288 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 权利要求1-41	11-12, 14-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 107198773 A (上海药明生物技术有限公司 无锡药明康德生物技术股份有限公司 苏州药明康德检测检验有限责任公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 权利要求1-13	1-10, 13, 16																		
PY	CN 107198773 A (上海药明生物技术有限公司 无锡药明康德生物技术股份有限公司 苏州药明康德检测检验有限责任公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 权利要求1-13	11-12, 14-15, 17																		
PY	WO 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO等) 2017年 5月 26日 (2017 - 05 - 26) 权利要求1-25	11-12, 14-15, 17																		
X	CN 105793288 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 摘要, 权利要求1-41	1-10, 13, 16-17																		
A	CN 105793288 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 权利要求1-41	11-12, 14-15																		
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2018年 7月 17日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2018年 8月 20日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>吴立</p> <p>电话号码 62411046</p>																		

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： 18
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求18属于人体或动物体的治疗方法，属于细则39.1(iv)定义的不要求检索的主题，因此未进行检索
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/CN2018/086866

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	107198773	A	2017年 9月 26日	无			
WO	2017084495	A1	2017年 5月 26日	CA	3004804	A1	2017年 5月 26日
				AU	2016357901	A1	2018年 5月 24日
				CN	107614529	A	2018年 1月 19日
				TW	201718657	A	2017年 6月 1日
CN	105793288	A	2016年 7月 20日	KR	20160058938	A	2016年 5月 25日
				JP	2016533335	A	2016年 10月 27日
				TW	201542225	A	2015年 11月 16日
				AR	097791	A1	2016年 4月 13日
				EP	3049441	A1	2016年 8月 3日
				PH	12016500566	A1	2016年 5月 23日
				CR	20160141	A	2016年 7月 15日
				CL	2016000680	A1	2016年 12月 23日
				US	2016319022	A1	2016年 11月 3日
				CA	2925310	A1	2015年 4月 2日
				PE	05412016	A1	2016年 6月 3日
				BR	112016006397	A2	2017年 9月 26日
				EA	201690667	A1	2016年 8月 31日
				HK	1222867	A1	2017年 7月 14日
				WO	2015048520	A1	2015年 4月 2日
				SG	11201602283U	A	2016年 4月 28日
				SG	10201708542R	A	2017年 12月 28日
				IL	244712	D0	2016年 4月 21日
				MX	2016003939	A	2016年 6月 17日
				AU	2014324703	A1	2016年 4月 21日
				MA	38960	A1	2017年 10月 31日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)