

(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
2017年9月21日 (21.09.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/157334 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/077122
- (22) 国际申请日: 2017年3月17日 (17.03.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610158493.0 2016年3月18日 (18.03.2016) CN
- (71) 申请人: 苏州纳洛迈生物科技有限公司 (SUZHOU NANOMAB TECHNOLOGY LIMITED) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街218号生物纳米园A7楼205室, Jiangsu 215123 (CN)。
- (72) 发明人: 丁航海 (DING, Hanghai); 中国上海市静安区成都北路333号招商局广场南楼14楼1425室, Shanghai 200041 (CN)。 黄仲廉 (HUANGQ, Zhongli-an); 中国上海市静安区成都北路333号招商局广场南楼14楼1425室, Shanghai 200041 (CN)。
- (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路958号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, 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:

- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))

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))。



WO 2017/157334 A1

(54) Title: ANTI-PD-L1 NANOBODY, CODING SEQUENCE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗 PD-L1 纳米抗体及其编码序列和用途

(57) Abstract: Provided in the present invention are a type of anti-human PD-L1 specific nanobodies and VHH chains thereof, coding sequences of the foregoing nanobodies or VHH chains thereof, corresponding expression vectors and host cells, and a method for producing antibodies.

(57) 摘要: 提供一类抗人 PD-L1 的特异性纳米抗体及其 VHH 链, 编码上述纳米抗体或其 VHH 链的编码序列、相应的表达载体和宿主细胞, 以及生产所述抗体的方法。

抗 PD-L1 纳米抗体及其编码序列和用途

技术领域

5 本发明涉及生物学或生物制药技术领域，更具体地涉及针对 PD-L1 的纳米抗体及其编码序列和用途。

背景技术

10 程序性死亡因子 1 配体 1(programmed death 1 ligand 1, PD-L1)又称 CD274, 为 B7 家族成员, 是 PD-1 的配体。PD-L1 属于 I 型跨膜蛋白, 共 290 个氨基酸, 包含 1 个 IgV 样区、1 个 IgC 样区、1 个跨膜疏水区和 1 个由 30 个氨基酸组成的胞内区。

15 与其他 B7 家族分子不同的是, PD-L1 具有负向调节免疫应答的作用。研究发现, PD-L1 主要表达于活化的 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞等, 除淋巴细胞外, PD-L1 也表达于其他多种组织如胸腺、心脏、胎盘等的内皮细胞, 以及各类非淋巴系如黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、结肠癌、乳腺癌、食道癌、头颈癌等。PD-L1 在调节自身反应性 T、B 细胞和免疫耐受方面具有一定广泛性, 并且在外周组织 T 和 B 细胞应答起作用。PD-L1 在肿瘤细胞上的高表达与癌症患者的不良预后相关。

20 与 PD-L1 相结合的程序性死亡因子 1(programmed death-1, PD-1)又称 CD279, 是 CD28 家族成员, 其胞质区含有 2 个酪氨酸残基, 靠近 N 端的 1 个位于免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM)中, 靠近 C 端的 1 个位于免疫受体酪氨酸转化基序(immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM)中。PD-1 主要表达在活化的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和巨噬细胞表面。在正常情况下, PD-1 能够抑制 T 淋巴细胞的功能, 促进 Treg 的功能, 25 从而抑制自身免疫应答, 防止自身免疫性疾病的发生。但在肿瘤的发生中, 肿瘤细胞表达的 PD-L1 与 PD-1 结合后却能通过对淋巴细胞的抑制性作用促进肿瘤的免疫逃逸。PD-L1 与 PD-1 的结合可导致多种生物学变化, 引起免疫调控, 如能够抑制淋巴细胞的增殖和活化、抑制 CD4+ T 细胞向 Th1 和 Th17 细胞分化、抑制炎症细胞因子的释放等。

30 单克隆抗体在癌症的检测及生物靶向治疗方面成功的应用, 引起了肿瘤治疗的变革。然而, 传统的单抗(150kD)分子质量过大, 难穿透组织, 造成肿瘤区域的有效浓度较低, 治疗效果不充分; 传统的抗体具有很高的免疫原性, 而改造的抗体很难达到原来的亲和力。此外, 完全人源化的传统抗体开发周期长, 生产成本低, 稳定性不够等诸多因素限制其在临床中的应用及普及。

35 纳米抗体是目前最小的抗体分子, 其分子量是普通抗体的 1/10。纳米抗体除

具备单克隆抗体的抗原反应性外，还拥有一些独特的功能特性，如分子质量小，稳定性强、可溶性好、易表达、免疫原性弱、穿透性强、靶向性强、人源化简单，制备成本低廉等，几乎完美克服了传统抗体开发周期长，稳定性较低，保存条件苛刻等缺陷。

5 然而，目前本领域尚缺乏令人满意的针对 PD-L1 的纳米抗体。因此，本领域迫切需要开发新的有效针对 PD-L1 的特异性纳米抗体。

发明内容

本发明的目的就是提供一类有效针对 PD-L1 的特异性纳米抗体。

10

在本发明的第一方面，提供了一种抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链，所述 VHH 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. :1-150 中任一所示。

在另一优选例中，所述的 PD-L1 为人 PD-L1。

此外，还提供一种抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链，所述的 VHH 包括框架区 FR 和互补决定区 CDR，其中，所述的 CDR 包括 SEQ ID NO. :1-150 中任一序列中相应的 CDR1、CDR2 和 CDR3，以及被所述 CDR1-3 所隔开的 FR1、FR2、FR3 和 FR4。

此外，还提供一种抗人 PD-L1 抗体的重链可变区，所述的重链可变区包括三个互补决定区 CDR1、CDR2、和 CDR3，并且 3 个 CDR 包括 SEQ ID NO. :1-150 中任一序列中相应的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

20 在另一优选例中，所述的 3 个 CDR 包括如表 2 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

在本发明的第二方面，提供了一种抗 PD-L1 纳米抗体，它是针对 PD-L1 表位的纳米抗体，并且具有如 SEQ ID NO. : 1-150 中任一所示的氨基酸序列的 VHH 链。在另一优选例中，所述的抗 PD-L1 纳米抗体具有针对 PD-L1 的高亲和力。

在另一优选例中，所述的抗 PD-L1 纳米抗体具有针对 PD-L1 的高特异性或高选择性（相对于针对 PD-L2 而言）非常高，其选择性比值（如 OD 值之比）(PD-L1/PD-L2) 高达 ≥ 20 ，较佳地 20-40，或 21-35。

25 在本发明的第三方面，提供了一种多核苷酸，所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质：第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链，或第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体。

30 在另一优选例中，所述的多核苷酸包括 DNA 或 RNA。

在另一优选例中，所述的多核苷酸具有如 SEQ ID NO. : 151-300 中任一所示的核苷酸序列。

在本发明的第四方面，提供了一种表达载体，所述表达载体含有第三方面所述的多核苷酸。

35 在本发明的第五方面，提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有第四方面所

述的表达载体，或其基因组中整合有第三方面所述的多核苷酸。

在另一优选例中，所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。

在另一优选例中，所述的宿主细胞选自下组：大肠杆菌、酵母细胞。

在本发明的第六方面，提供了一种产生抗 PD-L1 纳米抗体的方法，包括步骤：

5 (a) 在适合产生纳米抗体的条件下，培养第五方面所述的宿主细胞，从而获得含所述抗 PD-L1 纳米抗体的培养物；以及

(b) 从所述培养物中分离或回收所述的抗 PD-L1 纳米抗体。

在另一优选例中，所述的抗 PD-L1 纳米抗体具有如 SEQ ID NO. : 1-150 中任一所示的氨基酸序列。

10 在本发明的第七方面，提供了一种免疫偶联物，该免疫偶联物含有：

(a) 如第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、或如第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体；和

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

15 在另一优选例中，所述偶联部分为药物或毒素。

在另一优选例中，所述偶联部分为可检测标记物。

在另一优选例中，所述偶联物选自：荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI (磁共振成像) 或 CT (电子计算机 X 射线断层扫描技术) 造影剂、或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子 (如 IL-2 等)、抗体、抗体 Fc 片段、抗体 scFv 片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶 (例如，DT-心肌黄酶 (DTD) 或联苯基水解酶-样蛋白质 (BPHL))、化疗剂 (例如，顺铂) 或任何形式的纳米颗粒等。

在另一优选例中，所述免疫偶联物含有：多价 (如二价) 的如本发明第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、如本发明第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体。
25 所述多价是指，在所述免疫偶联物的氨基酸序列中包含多个重复的如本发明第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、如本发明第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体。

在本发明的第八方面，提供了本发明所述的抗 PD-L1 纳米抗体的用途，它被用于制备 (a) 用于检测 PD-L1 分子的试剂；(b) 用于治疗肿瘤的药物。

30 在另一优选例中，所述的检测包括流式检测、细胞免疫荧光检测。

在本发明的第九方面，提供了一种药物组合物，含有：

(i) 如本发明第一方面所述的 VHH、如本发明第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体、或如本发明第七方面所述的免疫偶联物；以及

(ii) 药学上可接受的载体。

35 在另一优选例中，所述的药物组合物为注射剂型。

在另一优选例中，所述的药物组合物用于制备治疗肿瘤的药物，所述的肿瘤选自下组：胃癌、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、前列腺癌、宫颈癌、淋巴瘤、肾上腺肿瘤、或膀胱肿瘤。

5 本发明的第十方面，提供了本发明所述的抗 PD-L1 纳米抗体的一种或多种的用途：

- (i) 用于检测人 PD-L1 分子；
- (ii) 用于流式检测；
- (iii) 用于细胞免疫荧光检测；
- 10 (iv) 用于治疗肿瘤；
- (v) 用于肿瘤诊断。

在另一优选例中，所述用途为非诊断的和非治疗的。

在本发明的第十一方面，还提供了一种抗体，所述抗体具有：如本发明第一方面所述的重链可变区 VHH。

15 在另一优选例中，所述的抗体为特异性抗 PD-L1 蛋白的抗体。

在另一优选例中，所述抗体为纳米抗体。

在本发明的第十二方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白具有：

(i) 如本发明第一方面所述的重链可变区 VHH 的序列或如本发明第二方面所述的纳米抗体的序列；以及

20 (ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中，所述的标签序列包括 6His 标签和 HA 标签

在另一优选例中，所述的重组蛋白特异性结合于 PD-L1 蛋白。

在本发明的第十三方面，提供了如本发明第一方面所述的重链可变区 VHH、如本发明第二方面所述的纳米抗体、或如本发明第七方面所述的免疫偶联物的用途，
25 它们被用于制备药剂、试剂、检测板或试剂盒；

其中，所述试剂、检测板或试剂盒用于：检测样品中 PD-L1 蛋白；

其中，所述药剂用于治疗或预防表达 PD-L1 蛋白(即 PD-L1 阳性)的肿瘤。

在另一优选例中，所述肿瘤包括：胃癌、淋巴瘤、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、前列腺癌、或肾
30 上腺肿瘤。

在本发明的第十四方面，提供了一种检测样品中 PD-L1 蛋白的方法，所述方法包括步骤：

(1) 将样品与本发明第二方面所述的纳米抗体接触；

35 (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在 PD-L1 蛋白。

在本发明的第十五方面，提供了一种治疗疾病的方法，所述方法包括，给需要的对象施用本发明的纳米抗体或免疫偶联物。

在另一优选例中，所述的对象包括哺乳动物，如人。

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

附图说明

- 10 图 1 显示了构建文库的插入率检测图。各泳道如下：泳道 M 为 DNA 分子标记，泳道 1-24 分别为检测插入片段的 PCR 产物，PCR 产物带约为 500bp。

图 2 是 12 株抗 PD-L1 纳米抗体纯化图。泳道 M 为分子量标准品，泳道 1-12 分别对应 SEQ ID NO. :1-12 氨基酸序列的纳米抗体。

15 具体实施方式

- 本发明人通过广泛而深入的研究，经过大量的筛选，成功获得一类抗 PD-L1 纳米抗体，实验结果表明，所述纳米抗体不仅特异性高，而且能够显著与表达 PD-L1 分子的细胞株(包括 T 淋巴细胞或自然杀伤细胞 NK)上的 PD-L1 分子进行高效结合，可以通过对这一类抗体改造来递送功能性分子(毒素或者小分子 RNA)对 PD-L1 分子
20 阳性细胞进行杀伤或者其他功能研究。在此基础上完成了本发明。

- 具体地，本发明利用人源的 PD-L1 抗原蛋白免疫骆驼，获得高质量的免疫纳米抗体基因文库。然后将 PD-L1 蛋白分子偶联在酶标板上，展示 PD-L1 蛋白的正确空间结构，以此形式的抗原利用噬菌体展示技术筛选免疫纳米抗体基因库(骆驼重链抗体噬菌体展示基因库)，从而获得了 PD-L1 特异性的纳米抗体基因。再将此
25 基因转至大肠杆菌中，从而获得了能在大肠杆菌中高效表达的、且特异性高的纳米抗体株。

- 如本文所用，术语“本发明纳米抗体”、“本发明的抗 PD-L1 纳米抗体”、“本发明 PD-L1 纳米抗体”可互换使用，均指特异性识别和结合于 PD-L1(包括人
30 PD-L1)的纳米抗体。特别优选的是 VHH 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. :1-150 中任一所示的纳米抗体。

- 如本文所用，术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二
35 硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有

可变区(VH)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

如本文所用，术语“单域抗体(VHH)”、“纳米抗体”(nanobody)具有相同的含义，指克隆抗体重链的可变区，构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)，它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区 1(CH1)的抗体后，再克隆抗体重链的可变区，构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)。

如本文所用，术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区，它们大致上呈 β -折叠构型，由形成连接环的三个CDR相连，在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等，NIH Publ. No. 91-3242，卷I，647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

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

如本文所用，术语“重链可变区”与“ V_H ”可互换使用。

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

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链可变区包括包括三个互补决定区CDR1、CDR2、和CDR3。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链包括上述重链可变区和重链恒定区。

在本发明中，术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用，都指特异性结合PD-L1蛋白的多肽，例如具有重链可变区的蛋白或多肽。它们可含有或不含起始甲硫氨酸。

本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地，本发明包括具有含可变区的重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物)，只要该可变区与本发明抗体的重链可变区相同或至

少 90% 同源性，较佳地至少 95% 同源性。

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

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

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

如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是 (i) 有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基 (优选保守性氨基酸残基) 被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或 (ii) 在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或 (iii) 成熟多肽与另一个化合物 (比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇) 融合所形成的多肽，或 (iv) 附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽 (如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与 6His 标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

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

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

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

约 80 个连续氨基酸，最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

在本发明中，“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比，有至多 10 个，较佳地至多 8 个，更佳地至多 5 个，最佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 1 进行氨基酸替换而产生。

表 1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

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

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

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

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，较佳地至少 70%，更佳地至少 80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 0.2×SSC，0.1%SDS，60℃；或(2)杂交

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

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

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

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

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

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

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

30 获得的转化子可以用常规方法培养, 表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞, 培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后, 用合适的方法(如温度转换或化学诱导) 诱导选择的启动子, 将细胞再培养一段时间。

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

析 (HPLC) 和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

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

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

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

药物组合物

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

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

25 本发明的药物组合物含有安全有效量 (如 0.001-99wt%, 较佳地 0.01-90wt%, 更佳地 0.1-80wt%) 的本发明上述的纳米抗体 (或其偶联物) 以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括 (但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式, 例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量, 例如每天约 10 微克/千克体重-约 50 毫克/千克体重。此外, 本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

30 使用药物组合物时, 是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物, 其中该安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重, 而且在大多数情况下不超过约 50 毫克/千克体重, 较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 10 毫克/千克体重。当然, 具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素, 这些都是熟练医师技能范围之内的。

35 标记的纳米抗体

在本发明的一个优选例中，所述纳米抗体带有可检测标记物。更佳地，所述的标记物选自下组：同位素、胶体金标记物、有色标记物或荧光标记物。

胶体金标记可采用本领域技术人员已知的方法进行。在本发明的一个优选的方案中，抗 PD-L1 的纳米抗体用胶体金标记，得到胶体金标记的纳米抗体。

5 本发明的抗 PD-L1 纳米抗体具有很好的特异性，很高的效价。

检测方法

本发明还涉及检测 PD-L1 蛋白的方法。该方法步骤大致如下：获得细胞和/或组织样本；将样本溶解在介质中；检测在所述溶解的样本中 PD-L1 蛋白的水平。

10 在本发明的检测方法中，所使用的样本没有特别限制，代表性的例子是存在于细胞保存液中的含细胞的样本。

试剂盒

15 本发明还提供了一种含有本发明的抗体(或其片段)或检测板的试剂盒，在本发明的一个优选例中，所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。

本发明还提供了用于检测 PD-L1 水平的检测试剂盒，该试剂盒包括识别 PD-L1 蛋白的抗体，用于溶解样本的裂解介质，检测所需的通用试剂和缓冲液，如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

20 应用

如上所述，本发明的纳米抗体有广泛生物应用价值和临床应用价值，其应用涉及到与 PD-L1 相关的疾病的诊断和治疗、基础医学研究、生物学研究等多个领域。一个优选的应用是用于针对 PD-L1 的临床诊断和靶向治疗。

25 本发明的主要优点包括：

- (a) 本发明纳米抗体高特异性针对人的具有正确空间结构的 PD-L1 蛋白。
- (b) 本发明纳米抗体的亲和力强。
- (c) 本发明纳米抗体的生产简便。

30 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

35

实施例 1: PD-L1 纳米抗体文库的构建:

(1) 将 1mg PD-L1 抗原与弗氏佐剂等体积混合, 免疫一只新疆双峰驼, 每周一次, 共免疫 7 次, 刺激 B 细胞表达抗原特异性的纳米抗体;

(2) 7 次免疫结束后, 提取 100 mL 骆驼外周血淋巴细胞并提取总 RNA;

5 (3) 合成 cDNA 并利用套式 PCR 扩增 VHH;

(4) 利用限制性内切酶 PstI 及 NotI 酶切 20 ug pMECS 噬菌体展示载体(购自 Biovector) 及 10 ug VHH, 并连接两个片段, 获得连接产物;

(5) 将连接产物转化至电转常规的感受态细胞 TG1 中, 构建 PD-L1 纳米抗体文库并测定库容, 库容大小为 1.5×10^9 。

10 与此同时, 随机挑取 24 个克隆进行菌落 PCR 检测, 结果如图 1 所示。图 1 显示了构建的单域抗体文库的插入率检测结果。检测结果表明, 该文库的插入率达到约 100%。

实施例 2: 针对 PD-L1 的纳米抗体筛选过程:

15 (1) 将溶解在 100 mM NaHCO_3 、pH 8.2 中的 20 ug PD-L1 抗原偶联在 NUNC 酶标板上, 4 °C 放置过夜;

(2) 第二天加入 100 uL 0.1% 酪蛋白, 室温封闭 2 h;

(3) 2 h 后, 加入 100 uL 噬菌体 (5×10^{11} CFU 免疫骆驼纳米抗体噬菌展示基因库), 室温作用 1 h;

20 (4) 用 0.05% PBS+Tween-20 洗 5 遍, 以洗掉非特异的噬菌体;

(5) 用 100 mM TEA (triethylamine) 将与 PD-L1 特异性结合的噬菌体解离下, 并感染处于对数期生长的大肠杆菌 TG1 细胞, 37 °C 培养 1 h, 产生并纯化噬菌体用于下一轮的筛选, 相同筛选过程重复 3-4 轮, 逐步得到富集。

25 实施例 3: 用噬菌体的酶联免疫方法 (ELISA) 筛选特异性单个阳性克隆

(1) 从实施例 2 中经 3-4 轮筛选后含有噬菌体的细胞培养皿中, 挑选 1000 个单个菌落并接种于含有 100 微克每毫升的氨苄青霉素的 TB 培养基 (1 升 TB 培养基中含有 2.3 克磷酸二氢钾, 12.52 克磷酸氢二钾, 12 克蛋白胨, 24 克酵母提取物, 4 毫升甘油) 中, 生长至对数期后, 加终浓度 1 毫摩尔的 IPTG, 28 °C 培养过夜。

30 (2) 利用渗透法获得粗提抗体, 并将抗体转移到经抗原包被的 ELISA 板中, 在室温下放置 1 小时。

(3) 用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入一 mouse anti-HA tag antibody (抗鼠抗 HA 抗体, 购自北京康为世纪生物科技有限公司), 在室温下放置 1 小时。

35 (4) 用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入 anti-mouse alkaline phosphatase conjugate (山羊抗小鼠碱性磷酸酶标记抗体, 购自艾美捷科技有限公司), 在室温

下放置 1 小时。

(5)用 PBST 洗去未结合的抗体，加入碱性磷酸酶显色液，于 ELISA 仪上，在 405 nm 波长，读取吸收值。

5 (6)当样品孔 OD 值大于对照孔 OD 值 3 倍以上时(Ratio+/->3)，判为阳性克隆孔。

(7)将阳性克隆孔的菌转摇在含有 100 微克每毫升的 LB 液体中以便提取质粒并进行测序。

10 根据序列比对软件 Vector NTI 确定各个克隆株的基因序列，最终共确定了 150 株不同的抗体。其抗体 VHH 链的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO. : 1-150 所示。其中，编号为 n 的 VHH(n=1-150 的正整数)，其氨基酸序列为 SEQ ID NO. : n，相应的编码序列为 SEQ ID NO. : 150+n。

表 2

编号 No.	氨基酸序列 SEQ ID NO.:	核苷酸序列 SEQ ID NO.:	3个CDR的位置(基于氨基酸序列)		
			CDR1	CDR2	CDR3
1	1	151	26-35	51-58	97-116
2	2	152	26-38	54-61	100-118
3	3	153	26-35	51-58	97-116
4	4	154	26-35	51-58	97-116
5	5	155	26-35	51-58	97-116
6	6	156	26-35	51-57	96-115
7	7	157	26-35	52-58	97-116
8	8	158	26-35	51-57	101-114
9	9	159	26-35	51-58	97-113
10	10	160	26-35	51-57	96-114
11	11	161	26-35	51-57	96-115
12	12	162	26-35	51-58	97-116
...			
n	n	150+n			

15 150 株纳米抗体的序列如下，其中第 1-12 株纳米抗体的三个 CDR 区分别用下划线标出。

SEQ ID NO. :1
 QVQLQESGGGVSQTGGSLRLSCTASTSIYSNNYMAWFSQSPGKREGVAAVYMDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTMYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

20 SEQ ID NO. :2
 QVQLQESGGGVSQAGGSLRLSCAVSRYSASNNVIKWMGWRQAPGKEREVAAALYTSGGNTYYADSVKGRFTISRDIYSENTVSLQMNNL
 KPEDTGMYYCATTVGTVLGAPLSARKYNYWGQGTQVTVSS

25 SEQ ID NO. :3
 QVQLQESGGGVSQTGGSLRLSCAASTLSLYSNYMAWFSQAPGKREGVAAVYVGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNAVYLMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO. :4
 QVQLQESGGGVSQTGGSLRLSCAASPSIYSANYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLGHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

30 SEQ ID NO. :5
 QVQLQESGGGVSQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNGLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

- SEQ ID NO. :6
QVQLQESGGGSVQAGETLRLSCTASGDTFDASGVGWFRQVSGNECDLVSSINRDGTTYAPSVAGRFTMSQNNAKNTVYLQMNSLKPPD
TAVYYCATDPAVGIVRSTCRGPFYWGQGTQVTVSS
- 5 SEQ ID NO. :7
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCACSTSIYSTNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :8
QVQLQESGGDSVQAGGSLRLACKVPGFTSNTCAMAWFRQAPGKEREVSSISTGGTGYAESAKGRFTLSKDEAKDTVYLQMNSLKPED
TAMYFCKSYACRTCIGRYCRTAPDAWGQGTQVTVSS
- 10 SEQ ID NO. :9
QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSNDGMGFRQIPGKEREVAAISPTGRRTEYADSVQGRFTISRDNAMLSLQMNSLKPE
DTGMYCAREGSGSFLQNSAVRSWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :10
QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGFTSKTCAMRWYRQAPGKEREVSAISTVGTTTYADSVKGRFTISKDEAKDTVYLQINSLKPED
- 15 TAMYCKTFACRHCIGQSCRTEPDYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :11
QVQLQESGGGSVQAGETLRLSCTASGDTFDDSGVWFRQVSGNECDLVSSINRDGTTYAPSVAGRFTISQNNAKNTVYLQMNSLKPPD
TAVYYCATVPAVGIVRITCRGPFYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :12
QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTRSSHCMVWFRQAPGKEREVALIYTGSGSTYYADSVKGRFTISQDNAKKTLYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAGTSSSSCPGLLGPPTYNWGGQGTQVTVSS
- 20 SEQ ID NO. :13
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQNPQKREGVAAVYIGDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :14
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQVNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- 25 SEQ ID NO. :15
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRTYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSYNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :16
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASPISYNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- 30 SEQ ID NO. :17
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSLNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPYYADHVKGRFTISLDTAKNTVYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :18
QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSNDGMGFRQTPGKEREVAAISPTGRRTEYADSVKGRFTISRDNAMLSLQMNSLKPE
DTGMYCAREGWSFSLANSVRSWGQGTQVTVSS
- 40 SEQ ID NO. :19
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :20
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTGSIYAMSWVRQAPGKLEWVSTISSSGRRFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQLNSLKTE
DTAMYYCARCSDIYCDNGASYRGQGTQVTVSS
- 45 SEQ ID NO. :21
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSLNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKSE
DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :22
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPRKREGVAAVYIGDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- 50 SEQ ID NO. :23
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSLYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYVDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :24
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCTASTSIYSNNYMAWFSQSPGKREGVAAVYMDDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTMYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :25
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCTASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- 60 SEQ ID NO. :26
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYNNYMAWFSQAPGKEREVAAVYIGDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
- SEQ ID NO. :27
QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCTASTSIYSNNYMAWFSQSPGKREGVAAVYMDDGRPYYADSVKGRFTISLDSAKNTMYLQMNSLKPE
- 65

DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :28
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIYSNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

5 DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :29
 QVQLQESGGGSVRTGGSLRRLSCAASPSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :30
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCTASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

10 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :31
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIYSNNYMAWFRQAPGKREGVAGVYIGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

DTAMYYCAAAPGPLSHHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :32
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIYSINMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

15 DTAMYYCAAAPGPLSQHYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :33
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCACSTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTMYLQMNLSKPE

DTAMYYCAAAPGPLSQHYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :34
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRRLSCAASGYTRSLYCMGWFRQAPGREREGVAHVYTGDSPPYADSVKGRFTISQDNGESTLYLQMNLSKPE

20 DTAMYYCAAGTSALSRPYGPISYGYWYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :35
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCTASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

25 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :36
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSLYSNYMAWFSQAPGKREGVAAVYVGDGRPPYAAVSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :37
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIYSINMAWFRQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

30 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :38
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSAKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :39
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTIALDSAKNTVYVYLMNSLKPE

35 DTAMYYCAAAPGPLKHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :40
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTIALDSAKNTVYVYLMNSLKPE

40 DTAMYYCAAAPGPLKHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :41
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIYSNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSAKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :42
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIYSNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTISPDYAKNTVYVYLMNSLKPE

45 DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :43
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASSIASNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :44
 QVQLQESGGGSVRTGGSLRRLSCAASTSIYSLNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADHVKGRFTISLDTAKNTVYVYLMNSLKPE

50 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :45
 QVQLQESGGGLVQPGSLRRLSCAASGFTFSIKAMSWVRQAPGKLEWVSTIDSGGRRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLSSLKTE

55 DTAMYFCARCSDIYCYNGASYRGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :46
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIDSNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :47
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCTASTSIYNNYMAWFSQSPGKREGVAAVYMDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTMYLQMNLSKPE

60 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :48
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE

DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYASANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :49

QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSAASTSIYSINYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :50

5 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCIASGFTFSIMAMSWVRQAPGKLEWVSTINSDGGKTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLNSLRTE
DMAMYYCRRCADIIYCSGGGWTGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :51

10 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCTASTSIYSNSYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :52

15 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :53

20 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAPSTSIYDNNYMAWFSQAPGKREGVAAIYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :54

25 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCVASTSIFSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :55

30 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSAASTSIYSANYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :56

35 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSAASTSIYSINYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :57

40 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCALSGFTSTIYAMSWVRQAPGKLEWVSTINSDGGYRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLNSPKTE
DTAMYYCARCSDIYCYNGPSYRGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :59

45 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCACSTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTLYLQVNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :60

50 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIEDGRPPYADSVKGRFTISPDRAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :61

55 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSAAASGDFSSRAMSWVRQAPGKLEWVSTINSGGSRYYADSVKGRFTISRDNKNTLALQLNSLKTE
DTAMYYCARCSDIYCDNGAWYRGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :62

60 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSAASTSIYSNNYMAWFRQTPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHDYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :63

65 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNRLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :64

70 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAATPGPLSQHYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :65

75 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSILAMSWVRQAPGKLEWISTINSSGTTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLNSLRTE
DTAMYYCRRCTDIYCSLSGGWTGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :66

80 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSAASTSIYNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYVGDGRTYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :67

85 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCTASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :68

90 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCTCSTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :69

95 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYVYLMNSLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :70

100 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSIRAMSWVRQAPGKLEWVSTINSGGSRYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQLNSLKTE
DTAMYYCVRCSDIYCYNGASYRGQGTQVTVSS

SEQ ID NO. :71
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSVINSGGSNTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKTE
 DTAVYYCATAWMGYSYLDGIARGQGTQVTVSS

5 SEQ ID NO. :72
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGLPFSIIAMSWVRQAPGKGLEWVSTINSDGGTTHYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQLNSLRTE
 DTAMYYCRRCTDIYCSGGWTGQGTQVTVSS

10 SEQ ID NO. :73
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGLPFSIIAMSWVRQAPGKGLEWVSTINSDGGTTHYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQLNSLRTE
 DTAMYYCRRCTDIYCSGFGGWTGQGTQVTVSS

15 SEQ ID NO. :74
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFTGSIYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSSGRRFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQLNSLKTE
 DTAMYYCARCSDIYCDNGASYRGQGTQVTVSS

SEQ ID NO. :75
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIGDGRPYADSAKGRFTISLDSAKNTVYLHMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS

20 SEQ ID NO. :76
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFRQVPGKREGVAAVYIDDGRTYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS

SEQ ID NO. :77
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCTASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

25 SEQ ID NO. :78
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSLYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYVGDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO. :79
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPFSIIAMSWVRQAPGKGLEWVSTINSGGGTTHYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQLNSLRTE
 DTAVYYCRRCADIYCSGGWTGLGTQVTVSS

30 SEQ ID NO. :80
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCVASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRSYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO. :81
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRTYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

35 SEQ ID NO. :82
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCTASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO. :83
 QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYLAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPYADSVKGRFPISLNSAQNKVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

40 SEQ ID NO. :84
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIDSNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIDDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS

SEQ ID NO. :85
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIADDRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

45 SEQ ID NO. :86
 QVQLQDSGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSINYMAWFSQAPGKREGVAAVYTDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO. :87
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTRSSYCMGWFRQAPGKERERVAYIYSGSGSTHYADSVKGRFTISQDNGKNTLYLQMNNLKPE
 DTAMYYCAAGTSGTSCPTGAFMYEYWYWGQGTQVTVSS

50 SEQ ID NO. :88
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYVGDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

55 SEQ ID NO. :89
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDGRPYADSVKGRFTISLDSARNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO. :90
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

60 SEQ ID NO. :91
 QVQLQESGGDLVQPGGSLRLSCAASGLPFSIIAMSWVRQAPGKGLEWVSTINNDGGTTHYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQLNSLRTE
 DTAMYYCRRCTDIYCSGGWTGQGTQVTVSS

SEQ ID NO. :92
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASTSIYNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIDDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNSLKPE

65

DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :93
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSAASTSIYSNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIGDGRYYADSAKGRFTISLDSAKNTVYLHMNSLKP
 5 DTAMYYCAAAPGPLTRHFYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :94
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSAASTSLYSNNYMAWFSQAPGKGRGGVAAVYVGDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :95
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRRLSAAASGYTVSNNYMGWFRQAPGKREGVAAVYIGDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 10 DTAMYYCAAAPGPLSQHYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :96
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRRLSAAFGFTFGSYWMKWVRQAPGKLEWVPIIDNGGRSTWYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLKIE
 DTAMYYCADRNGNRGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :97
 15 QVQLQESGGGSVQTGGSLRHSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :98
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRHSCAASTSIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIDDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSHNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 20 SEQ ID NO. :99
 QVQLQESGGGSVTTGGSLRRLSAASTSIYSNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIGDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :100
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRRLSAAASGFTFSIMAMSWVRQAPGRGLEWVSTINSDGGKTYADSVKGRFTASRDNKNTLYLQLNSLRTE
 25 DTAMYYCRRADIYCSGGGWTGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :101
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSCAVSGFTDTYFALGWFRQAPGKEREVAAIDSDGSTYADSVKGRFTISKDNKNTVYLMNSLKPED
 TAMYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :102
 30 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSAASTSIYSNNYMAWFRQAPAKGREGVAAVYIGDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 DTAIYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :103
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSAASTSIYNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIEDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 35 SEQ ID NO. :104
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSAASTSIYSNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIDDGRYYADSVKGRFAISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTSANYDYWGPGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :105
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRRLSAAASGFTFSSLAMSWVRQAPGKLEWVSTINSGGVYTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLNLRTE
 40 DTAMYYCRRCTDIYCSGGGWTGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :106
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRRLSCAVSGFTFSIIAMSWVRQAPGKLEWVSTINSDGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLNSLRTE
 DTAMYYCRRADIYCSGGGWTGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :107
 45 QVQLQESGGGLVQPGGSLRRLSCEASGLPFSIIAMSWVRQAPGKLEWVSTINSDGGTTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLNSLRSE
 DTAMYYCRRCTDIYCSGGGSTKQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :108
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSAASTSIYSNNYMAWFRQAPGKREGVAAVYIGDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRHYWYTTANYDYWGPGTQVTVSS
 50 SEQ ID NO. :109
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRRLSAAASGYTRSSYCMGWFRQAPGKERERVAHIYTGSGTTHYADSMKGRFTISQDNGKNTLYLMNNLKPE
 DTAMYYCAAGTSGTSCATGPFVYGYWYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :110
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRRLSCAYTPRRLCMGMWFRQGLGKEREVATIDDAGSTTYADSVKARFTISQDNKNTLYLQMDSLKPEDS
 55 AMYYCAARAGVWYQVSCPEESRTSAFVYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :111
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSAASTSIYNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIEDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMNSLKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :112
 60 QVQLQESGGGLVQPGGSLRRLSAAASGLTFSIVAMSWVRQAPGKLEWVSTINSDGGSTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLNSLRTE
 DTAMYYCRRCTDIYCSGGGWTGQGTQVTVSS
 SEQ ID NO. :113
 QVQLQESGGGSVQTGGSLRRLSAASTSIISFNMAWFRRAPGKREGVAAVYIDDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLMGSLRPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWHTPANYDYWGQGTQVTVSS
 65 SEQ ID NO. :114

QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASGYAGRLYSMGWFRQVAGKEREVSSIESDGGSTFYTDSVKGRFTTTRDSAKNTLYLQMNLLKPED
TAMYYCAAFCLRVGHGGRCTEYKYWGRGTQVTVSS
SEQ ID NO. :115

5 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTRSSYCMGWFRQAPGKERERVAHIYTGSGSTHYADSVKGRFTISQDNGKNTLYLQMNLLKPE
DTAMYYCAAGTSGTSCATGPFVYKYWYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :116

10 QLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSTYAMSWVRQAPGKLEWVSGINGGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLNSLKTEDT
AMYYCGQAYWAYCNGGCNPPGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :117

15 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASSTIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDRPYADSVKGRFTISLDSAKDTVYLQMNLLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :118

20 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASSTIYSNNYMAWFSQAPGKREGVAAVYIGDRPYDSSVKGLFTISLDSAKNTVYLQMNLLKPE
DTAMYYCAAAPGPLIRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :119

25 QVQLQESGGGSVQTGGSLRLSCAASSTLYSYNYMAWFSQAPGKREGVAAVYVGDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNLLKPE
DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :120

30 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGFTSNTCAMAWFRQAPGKEREFVSSMSTVGSTRFADSVKGRFTISKDEVKDTVYLQMNLLKPED
TAMYFCKTYACRECTGRYCRTAPDAWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :121

35 QVQLQESGGGSAQAGGSLRLSCTAPGFTSNTCAMAWYRQAPGKEREFVSSRSTVGTGYADSVKGRFTISKDEAKDTVYLQMNLLKPED
TAMYFCKTYACRNCIGRHCRTPAPDAWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :122

40 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGFTSNTCAMAWFRQAPGKEREFVSSLSTVGTGYADSVKGRFTISKDEAKDTVYLLMNLLKPED
TAMYFCKTFACRDCSGRYCRTAPDAWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :123

45 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGFTSNTCAMAWYRQAPGKEREFVSSRSTVGTGYADSVKGRFTISKDEAKDTVYLQMNLLKPED
TAMYFCKTYACRNCIGRHCRTPAPDAWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :124

50 QVQLQESGGGSVQAGRSLRLSCAVSRYASNNVVKMGWFRQAPGKEREGVAALYTSGGNTYYADSVKGRFTISRDIYSENTVSLQMNLL
KPEDTGMYYCAATVGTVLGAPLSARKYNYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :125

55 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSDMAWFRQAPGKLEWVSVIDSGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLNSLKTE
DTAMYYCAKTDLRYSRIPYKYGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :126

60 QVQLQESGGGSVQAGRSLRLPCAVSRYASNNVVKMGWFRQAPGKEREGVAALYTSGGNTYYADSVKGRFTISRDIYSENTVSLQMNLL
KPEDTGMYYCAATVGTVLGAPLSARKYNYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :127

65 QVQLQESGGGLVQAGGSLTLSCRGSGFTSNTCAMAWFRQAPGKEREFVSSMSTVGSTRFADSVKGRFTISKDEAKDTVYLQMNLLKPED
TAMYFCKTYACRECTGRYCRTAPDAWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :128

70 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGFTSNTCAMAWFRQAPGKEREFVSSMSTGGTGYGDSVKGRFTSSKDAAKDTVYLQMNLLKPED
TAIFYCKTYACRDCIGRYCRTAPDAWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :129

75 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGFTSNTCAMAWYRQAPGKEREFVSSRSTVGTGYADSVKGRFTLSKDEAKDTVYLQMNLLKPED
TAMYFCKTYACRNCIGRHCRTPAPDAWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :130

80 QVQLQESGGGSVQAGETLRLSCTVSGDTFEASGVGWFRQVSGNECDLVSSINRDGTTYTPSVAGRFTMSQNNKNTVYLQMNLLKPED
TAVYYCATDPAVGIVRSTCRGPFYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :131

85 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTVSGNTDSMNLMGWFRQAPGKEREGVASIYTGSRITITPDSVKGRFTISQDNKNTVYLQMNLLKPE
DTAMYYCAADYRARYGASLRTSAYTYWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :132

90 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGFTSNTCAMAWYRQAPGKEREFVSSRSTVGTGYADSVKGRFTISKDEAKDTVYLQMNLLKPED
TAKYFCKTYACRDCIGRYCRTAPDAWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :133

95 QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSVVSQYTWCRYDMSWYRQAPGKEREFVSVIDDNGSTNYADSVKGRFTISKDNGNTVTLQMTSLKPADT
AMYYCQTGRYRSRLGYGRCPGDIWGLGTQVTVSS
SEQ ID NO. :134

100 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAVSGYSISNYCMGWFRQPPGKEREGVANIDTWGVTSYTDSVKGRFTISKDNKNTLYLQMNLLKPED
TALYYCARRQFVNCGLTAPVNYVNWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO. :135

105 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASGFTFSTLAMS WVRQAPGKLEWVSTISSTGGATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQLNSLKPE
DTAMYYCRRCTDIYCSNSARWTGQGTQVTVSS

SEQ ID NO. :136
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTLAMSWVRQAPGKLEWVSTISSTGGATYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQNLKPKPE
 DTAMYYCRRCTDIYCSNSARWTGQGTQVTVSS

5 SEQ ID NO. :137
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFSFSSSGMSWVRQAPGKLEWVSTISYNGGSTFYTDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQNLKTE
 DTAMYYCAKSGTPVLAPNSVRGQGTQVTVSS

10 SEQ ID NO. :138
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVSSGYAYNRYYMAWFSQAPGKREGVAAYIGDGRPYADSVKGRFTISLDSAKNTVYLQMNLSKPE
 DTAMYYCAAAPGPLSRNYWYTSANYDYWGQGTQVTVSS

15 SEQ ID NO. :139
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVASGYTNCRYDMSWYRQAPGKEREVSSIDSEGVARHADSVKGRFGISQDNAKSTLYLQMNLSKPED
 TAVYYCKTDYITCRFGSWSDSTWGQGTQVTVSS

20 SEQ ID NO. :140
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVASGYTNCRYDMSWYRQAPGKEREVSSIDSEGVARHADSVKGRFGISQDNAKSTLYLQMNLSKPED
 TAMYYCKMDYIRCRFGSWSESTWGQGTQVTVSS

25 SEQ ID NO. :141
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGFTSNTCAMAWFRQAPGKEREVSSMSTVGSTRFADSVKGRFTISKDEAKDTVYLQMNLSKPED
 TAMYFCKTYACRECTGRYCRTAPDAWGQGTQVTVSS

30 SEQ ID NO. :142
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAVSRYASNNVIKWMGFRQAPGKEREVAALYTSGGNTYYADSVKGRFTISRDIYSENTVSLQMNNL
 KPEDTGMYYCAATVGTVLGAPLSARKYNYWGQGTQVTVSS

35 SEQ ID NO. :143
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGFTSNTCAMAWYRQAPGKEREVSSISTVRTAYADSVKGRFTISKDEAKATVYLQMNLSKPED
 TAMYFCKSYACRDCIGRYCRTAPDAWGQGTQVTVSS

40 SEQ ID NO. :144
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASGYTDSRYCMGFRQAPGKERERVTTIHTGTGITYYADSVKGRFISQDNAQNTMYLQMNLSLEPE
 DTAMYYCATTDYVYSASASWCNGYGVFNWQGTQVTVSS

45 SEQ ID NO. :145
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGFTSNTCAMAWYRQAPGKEREVSSRSTVGTGYADSVKGRFTISKDEAKDTVYLQMNLSKPED
 TAKYFCKTYACRDCIGRYCRTAPDAWGQGTQVTVSS

50 SEQ ID NO. :146
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAVSRYASNNVIKWMGFRQAPGKEREVAALYTSGGNTYYADSVKGRFTISRDIYSENTVSLQMNNL
 KPEDTGMYYCATTVGTVLGAPLSARKYNYWGQGTQVTVSS

55 SEQ ID NO. :147
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTSRPNFMVWFRQAPGKEREAVAGIYTVTGGTLYSDPVKGRFTISQDKAKNTVYLQMNLSNPE
 DTAMYYCAVKWYGGSDAATFRTWGRGTQVTVSS

60 SEQ ID NO. :148
 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYSYNIDYMAWFRQAPGKEREVAAIYTGSRRTYYSDSVKGRFAISQDNADNTVYLQMNALKPE
 DTAMYFCAALVSRPGRSWDKNEYRYWGQGTQVTVSS

65 SEQ ID NO. :149
 QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGFTFDDYSMGWFRQAPGKEREGISCIDWSSGRTNYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSKPE
 DTAMYYCAANSAYSSCSLSTHYKYWGQGTQVTVSS

70 SEQ ID NO. :150
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMSWVRQAPGKGFVWVSTINSGGGTTFYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQNLRLTE
 DTAMYYCRRCADIYCSLSGGWTGQGTQVTVSS

再结合 PE-LISA 结果，依据 OD 比值 (实验组 (A₄₀₅ nm) / 对照组 (A₄₀₅ nm)) 将这些 VHH 链分为四类，分类结果如表 3 所示。

表 3 纳米抗体的亲和力

OD 值之比 实验组 (A ₄₀₅ nm) / 对照组 (A ₄₀₅ nm)	纳米抗体
>20	SEQ ID NO. :1-86
10-20	SEQ ID NO. :87-118
6-10	SEQ ID NO. :119-138
3-6	SEQ ID NO. :139-150

值得注意的是，对于 SEQ ID NO. :1-86 中任一 VHH，其相应 OD 值之比高达 20 以上，提示其具有非常高的结合于 PD-L1 的亲合力。

5 即使对于 SEQ ID NO. :139-150 中任一 VHH，其相应 OD 值之比仍高达 3 倍以上，提示其具有良好的结合于 PD-L1 的亲合力。

实施例 4：纳米抗体在宿主菌大肠杆菌中表达、纯化：

10 (1)对于实施例 3 测序分析所获得不同克隆株(表 2 中的 150 种纳米抗体)，将各相应质粒电转化到大肠杆菌 WK6 中，并将其涂布在 LA+glucose 即含有氨苄青霉素和葡萄糖的培养平板上，37 °C 培养过夜；

(2)挑选单个菌落接种在 5 mL 含有氨苄青霉素的 LB 培养液中，37 °C 摇床培养过夜；

(3)接种 1 mL 的过夜菌种至 330 mL TB 培养液中，37 °C 摇床培养，培养到 OD 值达到 0.6-1 时，加入 IPTG，28 °C 摇床培养过夜；

15 (4)离心，收菌；

(5)利用渗透法，获得抗体粗提液；

(6)经镍柱离子亲和层析制备纯化的纳米抗体。

纯化结果表明，制备的纳米抗体的纯度均达 95%以上。

20 其中，第 1-12 株抗 PD-L1 纳米抗体的(SEQ ID NO. : 1-12)的纯化结果如图 2 所示。该图经镍柱树脂凝胶亲和层析纯化后，抗 PD-L1 纳米抗体的 SDS-PAGE 的电泳图。结果显示，抗 PD-L1 纳米抗体经过该纯化过程，其纯度可达到 95%以上。

实施例 5：酶联免疫法(ELISA)鉴定 12 株纯化的纳米抗体的特异性：

25 (1)包被抗原蛋白 PD-L1 及 PD-L2：每孔 0.5 μg(5 μg/mL，100 μL)，包被 NaHCO₃(100 mM，Ph8.2)为空白对照，4°C 过夜。

(2)第二天用 PBST 洗涤 3 次，加入 200 μL 的 1%BSA 室温下封闭 2 小时。

(3)将每株纯化的纳米抗体稀释至 10 μg/mL，分别取 100 μL 与包被的 PD-L1、PD-L2 及空白对照组孵育，室温下反应 1 小时。

30 (4)用 PBST 洗去未结合的抗体，加入 100 μL mouse anti-HA tag antibody(1:2000 稀释)，在室温下放置 1 小时。

(5)用 PBST 洗去未结合的抗体，加入 anti-mouse alkaline phosphatase conjugate(1:2000 稀释)，在室温下放置 1 小时。

(6)用 PBST 洗去未结合的抗体，加入碱性磷酸酶显色液，于 ELISA 仪上，在 405 nm 波长，读取吸收值。根据吸收值判断纳米抗体的特异性。

35 检测结果如下表 4 所示。

表 4 纳米抗体的特异性

孵育纳米抗体	包被抗原			
	PD-L1	PD-L2	空白对照	OD 值之比
SEQ ID NO. :1	3.803	0.118	0.116	32.2
SEQ ID NO. :2	3.626	0.114	0.118	31.8
SEQ ID NO. :3	2.356	0.112	0.119	21.0
SEQ ID NO. :4	3.512	0.137	0.124	25.6
SEQ ID NO. :5	3.376	0.128	0.138	26.4
ELISA 吸光值 (A _{405nm}) SEQ ID NO. :6	3.437	0.115	0.129	29.9
SEQ ID NO. :7	3.506	0.119	0.131	29.5
SEQ ID NO. :8	3.371	0.133	0.110	25.3
SEQ ID NO. :9	3.558	0.131	0.119	27.2
SEQ ID NO. :10	3.342	0.117	0.126	28.6
SEQ ID NO. :11	2.895	0.116	0.120	25.0
SEQ ID NO. :12	2.987	0.125	0.117	23.9

表 4 结果显示, 本发明的纳米抗体具有非常高的特异性, 其针对 PD-L1 的选择性非常高, OD 值之比 (PD-L1/PD-L2) 高达 21-35。

5

此外, 通过流式细胞仪对 PD-L1 的纳米抗体的特异性进行的检测。在常规的 293F 细胞中瞬转 PD-L1 全长基因以及 PD-L2 全长基因, 选取其中 PD-L1 的一株纳米抗体 (SEQ ID NO. : 1) 孵育进行流式检测。纳米抗体 (SEQ ID NO. : 1) 针对在 PD-L1 瞬转细胞的阳性率为 55%, 针对 PD-L2 瞬转细胞阳性率为 0.1%, 两者相差至少约 550 倍, 这进一步提示本发明纳米抗体具有非常优异针对 PD-L1 的特异性。

10

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

15

权 利 要 求

1. 一种抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链，其特征在于，所述 VHH 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. :1-150 中任一所示。
- 5 2. 一种抗 PD-L1 纳米抗体，其特征在于，它是针对 PD-L1 表位的纳米抗体，并且具有如 SEQ ID NO. : 1-150 中任一所示的氨基酸序列的 VHH 链。
3. 一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质：权利要求 1 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链，或权利要求 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体。
- 10 4. 如权利要求 3 所述的多核苷酸，其特征在于，具有如 SEQ ID NO. : 151-300 中任一所示的核苷酸序列。
5. 一种表达载体，其特征在于，所述表达载体含有权利要求 3 所述的多核苷酸。
6. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求 5 所述的表达载体，或其基因组中整合有权利要求 3 所述的多核苷酸。
- 15 7. 一种产生抗 PD-L1 纳米抗体的方法，其特征在于，包括步骤：
(a) 在适合产生纳米抗体的条件下，培养权利要求 6 所述的宿主细胞，从而获得含所述抗 PD-L1 纳米抗体的培养物；以及
(b) 从所述培养物中分离或回收所述的抗 PD-L1 纳米抗体。
- 20 8. 一种免疫偶联物，其特征在于，该免疫偶联物含有：
(a) 如权利要求 1 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、或如权利要求 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体；和
(b) 选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶。
- 25 9. 权利要求 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的用途，其特征在于，用于制备 (a) 用于检测 PD-L1 分子的试剂； (b) 用于治疗肿瘤的药物。
10. 一种药物组合物，其特征在于，含有：
(i) 权利要求 1 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、或如权利要求 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、或如权利要求 8 所述的免疫偶联物；以及
30 (ii) 药学上可接受的载体。

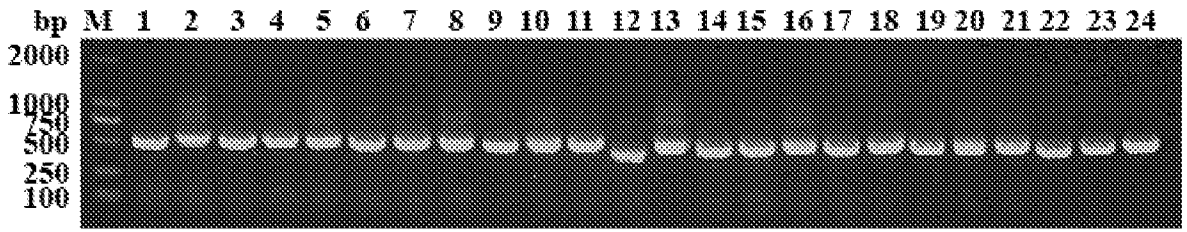


图 1

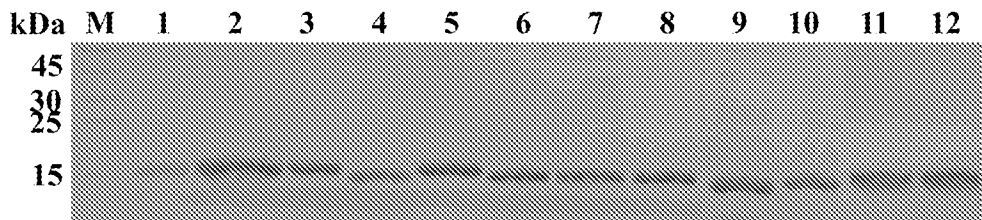


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/077122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; 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)

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)

CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of knowledge: camel, camelid, single-domain antibody, vhh, nanobody, single-domain antibody, pd-11;

GenBank+EMBL+DDBJ: search on SEQ ID NOs: 1 and 151

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103421115 A (SOUTHEAST UNIVERSITY), 04 December 2013 (04.12.2013), see the whole document	1-10 (partial of each)
A	CN 103987405 A (MERCK PATENT GMBH), 13 August 2014 (13.08.2014), see the whole document	1-10 (partial of each)
A	CN 104736168 A (SORRENTO THERAPEUTICS, INC.), 24 June 2015 (24.06.2015), see the whole document	1-10 (partial of each)
A	FU, X. et al., "Camelus Bactraianus Clone VHH-BC-21 Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region mRNA, Partial Cds", GenBank registry number: KF179380.1, 21 September 2013 (21.09.2013), see sequence and relevant information	1-10 (partial of each)

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search
05 June 2017 (05.06.2017)

Date of mailing of the international search report
22 June 2017 (22.06.2017)

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
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
WANG, Qiyang
Telephone No.: (86-10) **62088409**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/077122

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] invention 1: claims 1-10 (partial of each) relate to the section of SEQ ID NOs: 1 and 151;
- [2] invention 2: claims 1-10 (partial of each) relate to the section of SEQ ID NOs: 2 and 152;
- [3]
- [4] invention 150: claims 1-10 (partial of each) relate to the section of SEQ ID NOs: 150 and 300;
- [5] the common technical feature of inventions 1-150 is the VHH chain resisting the PD-L1 nanobody; however, the PD-L1 antibody has been disclosed in the prior art (e.g., CN 103987405 A, (date of publication: 13 August 2014 (13.08.2014)) and CN 104736168 A, (date of publication: 24 June 2015 (24.06.2015)), and the prior art (CN 103421115 A, date of publication: 04 December 2013 (04.12.2013)) also disclosed a method for preparing the nanobody. Therefore, such a feature cannot be considered as a special technical feature that makes a contribution over the art, and therefore the above-mentioned 150 inventions do not share the same or the corresponding special technical feature, do not fall within a single general inventive concept, and accordingly lack unity of invention and do not comply with the requirements of PCT Rules 13.1, 13.2 and 13.3.

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: claims 1-10 (partial of each) relate to the section of SEQ ID NOs: 1 and 151.

Remark on protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/077122

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103421115 A	04 December 2013	CN 103421115 B	03 June 2015
CN 103987405 A	13 August 2014	CN 103987405 B	29 March 2017
		EA 201400625 A1	28 November 2014
		AU 2012344260 A1	17 July 2014
		JP 2015500207 A	05 January 2015
		KR 20140104982 A	29 August 2014
		AR 089010 A1	23 July 2014
		CA 2856895 A1	06 June 2013
		EP 2785375 A1	08 October 2014
		WO 2013079174 A1	06 June 2013
		HK 1200736 A1	14 August 2015
		IL 232778 D0	31 July 2014
		SG 11201402603W A	27 June 2014
		MX 2014006316 A	04 September 2014
		US 2014341917 A1	20 November 2014
CN 104736168 A	24 June 2015	KR 20150042751 A	21 April 2015
		AU 2013267161 A1	20 November 2014
		EP 2854843 A2	08 April 2015
		JP 2015519375 A	09 July 2015
		US 2013323249 A1	05 December 2013
		EP 2854843 A4	01 June 2016
		CA 2872030 A1	05 December 2013
		WO 2013181634 A3	13 March 2014
		CO 7160115 A2	15 January 2015
		US 9175082 B2	03 November 2015
		WO 2013181634 A2	05 December 2013
		HK 1204557 A1	27 November 2015

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; 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>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>CPEA, DWPI, JPABS, SIPOABS, VEN, CPRSABS, MOABS, CNABS, TWABS, CJFD, CSCD, SIPONPL USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, isi web of knowledge:骆驼, 纳米抗体, 单域抗体, camel, camelid, single-domain antibody, vhh, nanobody, single-domain antibody, pd-11; GenBank+EMBL+DDBJ:关于SEQ ID NOs:1,151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>A</td> <td>CN 103421115 A (东南大学) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 参见全文</td> <td>1-10(均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103987405 A (默克专利股份公司) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 参见全文</td> <td>1-10(均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104736168 A (索伦托治疗有限公司) 2015年 6月 24日 (2015 - 06 - 24) 参见全文</td> <td>1-10(均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Fu, X. 等. "Camelus bactraianus clone VHH-BC-21 immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds" GenBank登录号:KF179380.1, 2013年 9月 21日 (2013 - 09 - 21), 参见序列和相关信息</td> <td>1-10(均为部分)</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	A	CN 103421115 A (东南大学) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 参见全文	1-10(均为部分)	A	CN 103987405 A (默克专利股份公司) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 参见全文	1-10(均为部分)	A	CN 104736168 A (索伦托治疗有限公司) 2015年 6月 24日 (2015 - 06 - 24) 参见全文	1-10(均为部分)	A	Fu, X. 等. "Camelus bactraianus clone VHH-BC-21 immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds" GenBank登录号:KF179380.1, 2013年 9月 21日 (2013 - 09 - 21), 参见序列和相关信息	1-10(均为部分)
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 103421115 A (东南大学) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 参见全文	1-10(均为部分)															
A	CN 103987405 A (默克专利股份公司) 2014年 8月 13日 (2014 - 08 - 13) 参见全文	1-10(均为部分)															
A	CN 104736168 A (索伦托治疗有限公司) 2015年 6月 24日 (2015 - 06 - 24) 参见全文	1-10(均为部分)															
A	Fu, X. 等. "Camelus bactraianus clone VHH-BC-21 immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds" GenBank登录号:KF179380.1, 2013年 9月 21日 (2013 - 09 - 21), 参见序列和相关信息	1-10(均为部分)															
<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>2017年 6月 5日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 6月 22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>王启扬</p> <p>电话号码 (86-10)62088409</p>															

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 发明1: 权利要求1-10 (均为部分) 涉及SEQ ID NOs: 1, 151的部分;
- [2] 发明2: 权利要求1-10 (均为部分) 涉及SEQ ID NOs: 2, 152的部分;
- [3]
- [4] 发明150: 权利要求1-10 (均为部分) 涉及SEQ ID NOs: 150, 300的部分;
- [5] 发明1-150的共同技术特征在于抗PD-L1纳米抗体的VHH链, 然而现有技术中已经公开了PD-L1抗体(如CN103987405 A(公开日: 13. 8月2014(13. 08. 2014)), CN104736168 A(公开日: 24. 6月2015(24. 06. 2015))且现有技术(CN103421115 A, 公开日: 04. 12月2013(04. 12. 2013))中也公开了制备纳米抗体的方法, 因此这一特征不能被认为是对现有技术作出贡献的特定技术特征, 故以上150项发明不具有相同或相应的特定技术特征, 不属于一个总的发明构思, 因而不具备单一性, 不符合专利合作条约实施细则13. 1、13. 2和13. 3的规定。

- 1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
- 2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何加费。
- 3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求, 具体地说, 是权利要求:
- 4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是: 权利要求1-10 (均为部分) 涉及SEQ ID NOs: 1, 151的部分;

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/077122

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	103421115	A	2013年 12月 4日	CN	103421115	B	2015年 6月 3日
CN	103987405	A	2014年 8月 13日	CN	103987405	B	2017年 3月 29日
				EA	201400625	A1	2014年 11月 28日
				AU	2012344260	A1	2014年 7月 17日
				JP	2015500207	A	2015年 1月 5日
				KR	20140104982	A	2014年 8月 29日
				AR	089010	A1	2014年 7月 23日
				CA	2856895	A1	2013年 6月 6日
				EP	2785375	A1	2014年 10月 8日
				WO	2013079174	A1	2013年 6月 6日
				HK	1200736	A1	2015年 8月 14日
				IL	232778	D0	2014年 7月 31日
				SG	11201402603W	A	2014年 6月 27日
				MX	2014006316	A	2014年 9月 4日
				US	2014341917	A1	2014年 11月 20日
CN	104736168	A	2015年 6月 24日	KR	20150042751	A	2015年 4月 21日
				AU	2013267161	A1	2014年 11月 20日
				EP	2854843	A2	2015年 4月 8日
				JP	2015519375	A	2015年 7月 9日
				US	2013323249	A1	2013年 12月 5日
				EP	2854843	A4	2016年 6月 1日
				CA	2872030	A1	2013年 12月 5日
				WO	2013181634	A3	2014年 3月 13日
				CO	7160115	A2	2015年 1月 15日
				US	9175082	B2	2015年 11月 3日
				WO	2013181634	A2	2013年 12月 5日
				HK	1204557	A1	2015年 11月 27日