

(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
2021 年 4 月 22 日 (22.04.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/073611 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/121579

(22) 国际申请日: 2020 年 10 月 16 日 (16.10.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910987489.9 2019 年 10 月 17 日 (17.10.2019) CN
201910987510.5 2019 年 10 月 17 日 (17.10.2019) CN

(71) 申请人: 江苏康宁杰瑞生物制药有限公司 (JIANGSU ALPHAMAB BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市中国 (江苏) 自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区星湖街 218 号 C23 楼 401、501 单元, Jiangsu 215125 (CN)。

(72) 发明人: 徐霆(XU, Ting); 中国江苏省苏州市中国 (江苏) 自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区星湖街 218 号 C23 楼 401、501 单元, Jiangsu 215125 (CN)。 王婉琳(WANG, Pilin); 中国江苏省苏州市中国 (江苏) 自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区星湖街 218 号 C23 楼 401、501 单元, Jiangsu 215125 (CN)。 郭康平(GUO, Kangping); 中国江苏省苏州市中国 (江苏) 自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区星湖街 218 号 C23 楼 401、501 单元, Jiangsu 215125 (CN)。 金宇灏(JIN, Yuhao); 中国江苏省苏州市中国 (江苏) 自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区星湖街 218 号 C23 楼 401、501 单元, Jiangsu 215125 (CN)。 陈亭(CHEN, Ting); 中国江苏省苏州市中国 (江苏) 自由贸易试验区

苏州片区苏州工业园区星湖街 218 号 C23 楼 401、501 单元, Jiangsu 215125 (CN)。 高丽(GAO, Li); 中国江苏省苏州市中国 (江苏) 自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区星湖街 218 号 C23 楼 401、501 单元, Jiangsu 215125 (CN)。 张庆青(ZHANG, Qingqing); 中国江苏省苏州市中国 (江苏) 自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区星湖街 218 号 C23 楼 401、501 单元, Jiangsu 215125 (CN)。

(74) 代理人: 上海巛石知识产权代理事务所 (普通合伙) (SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.); 中国上海市浦东新区盛夏路 608 号 2 号楼 103 室/张琤, Shanghai 201210 (CN)。

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

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

(54) Title: OX40/PD-L1 BISPECIFIC ANTIBODY

(54) 发明名称: OX40/PD-L1 双特异性抗体

(57) Abstract: Provided is an isolated antigen-binding protein, wherein the drug is used for the treatment of tumors, and the isolated antigen-binding protein comprises a PD-L1 binding moiety and an OX40 binding moiety, wherein: the OX40 binding moiety is capable of identifying and/or binding amino acid residues G70 and/or F71 in a human OX40 extracellular domain; and the PD-L1 binding moiety is capable of identifying and/or binding amino acid residues I54, Y56, E58, Q66, and/or R113 in an N-terminal IgV domain of human PD-L1. Further provided is a use of the isolated antigen-binding protein in preparing a drug, wherein the drug is used for the treatment of tumors.

(57) 摘要: 一种分离的抗原结合蛋白, 其中所述药物用于治疗肿瘤, 所述分离的抗原结合蛋白包含 PD-L1 结合部分和 OX40 结合部分, 其中: 所述 OX40 结合部分能够识别和/或结合人 OX40 细胞外结构域中的氨基酸残基 G70 和/或 F71; 所述 PD-L1 结合部分能够识别和/或结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域中的氨基酸残基 I54, Y56, E58, Q66 和/或 R113。还提供了所述分离的抗原结合蛋白在制备治疗制备药物中的应用, 其中所述药物可用于治疗肿瘤。

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))。

OX40/PD-L1 双特异性抗体

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种分离的抗原结合蛋白。所述分离的抗原结合蛋白可包含 PD-L1 结合部分和 OX40 结合部分，可以用于抑制肿瘤或肿瘤细胞生长。

背景技术

程序性死亡配体 1 (PD-L1) 是 B7 家族的成员，能在多种免疫细胞中表达。PD-L1 结合至程序性死亡-1 受体 (Programmed Death-1; PD-1)，活化负调节信号传导途径，从而抑制 T 细胞增殖及活性。PD1/PD-L1 是调节免疫应答的重要的免疫检查点，针对 PD1 或 PD-L1 的活性调节剂可以用于例如癌症免疫治疗和病毒感染病症的治疗。PD1/PD-L1 途径的治疗性阻断有助于克服免疫耐受性，且有助于癌症或病毒感染治疗期间的免疫性。OX40 是肿瘤坏死因子受体超家族的成员，能给 T 细胞提供共刺激信号，促进增殖以及存活。

免疫系统，特别是 T 细胞介导的细胞毒性在肿瘤控制中的作用是公认的。有越来越多的证据表明 T 细胞在癌症患者中控制肿瘤生长和存活，无论是在该疾病的早期和晚期阶段。然而，肿瘤特异性 T 细胞应答很难在癌症患者中上升和维持。当与利用非特异性化学疗法和 / 或放射的疗法相比，刺激或增强对抗癌症的先天免疫应答的癌症免疫疗法的持续进展和成功使得这类疗法成为有吸引力的治疗选择。同时，有研究表明，对于一些病毒、急性细菌或真菌感染（如感染引发的脓毒症），在早期的过度炎症反应之后，机体会进入随后的持续的免疫抑制状态，并由此造成患者的病情加重或者死亡。实验结果表明，对于脓毒症中出现的持续免疫抑制状态，特别是 T 细胞耗竭，使用包括抗 PD1/PDL1 抗体在内的免疫检查点抑制剂能够有效地进行拮抗，并显著提高实验动物的生存率。所以，组合共刺激信号传导与免疫系统的其他信号传导途径可以为肿瘤或微生物感染的免疫治疗提供有效的方法。

最近，有报道使用 PD1/PD-L1 抗体和 OX40 抗体单独静脉给药的同步治疗。然而，这些同步疗法存在大量缺点。例如，患者不便、疼痛增加及制备和表征多种制剂的困难增加。另外，欠佳疗效和安全性问题也已被报道，因此，对更有效且毒性更小、尤其是能够同时作用于多个靶点的制剂的医学需求尚未得到满足。

发明内容

本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其包含 PD-L1 结合部分和 OX40 结合部分，其中：所述 OX40 结合部分能够识别和/或结合人 OX40 细胞外结构域中的氨基酸残基 G70 和/

或 F71；所述 PD-L1 结合部分能够识别和/或结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域中的氨基酸残基 I54, Y56, E58, Q66 和/或 R113。本申请还提供了分离的抗原结合蛋白在制备药物中的应用，其中所述药物可用于治疗肿瘤，病毒性感染，和/或细菌和/或真菌性感染。本申请还提供了提高有需要的受试者中免疫效应的方法。本申请所述的分离的抗原结合蛋白具有以下一种或多种性质：（1）能够高亲和力结合细胞表面的 PD-L1 和 OX40，且 PD-L1 结合部分与 OX-40 结合部分的连接位置和连接方式不影响结合 PD-L1 的能力；（2）活化 T 细胞；（3）有效的将分别表达 PDL1 以及 OX40 的两种细胞桥接起来；（4）具有体外激动活性；（5）有效阻断 PDL1 和 PD1 之间的相互作用，（5）PD-L1 结合部分与 OX-40 结合部分的连接位置和连接方式不影响 ADCC 活性；（6）激活 PBMC，（7）具有大于 60h 的半衰期，和（7）抑制肿瘤生长。

在一方面，本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其包含 PD-L1 结合部分和 OX40 结合部分，其中：所述 OX40 结合部分能够识别和/或结合人 OX40 细胞外结构域中的氨基酸残基 G70 和/或 F71，其中所述人 OX40 细胞外结构域包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列；所述 PD-L1 结合部分能够识别和/或结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域中的氨基酸残基 I54, Y56, E58, Q66 和/或 R113，且其中所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 PD-L1 结合部分还能够结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域中的氨基酸残基 D61, N63, V68, M115, S117, Y123 和/或 R125，且其中所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 PD-L1 结合部分能够结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域的构象表位，所述构象表位包含所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域中的氨基酸残基 I54, Y56, E58, Q66 和 R113，且其中所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 PD-L1 结合部分能够结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域的构象表位，所述构象表位包含所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域中的氨基酸残基 I54, Y56, E58, Q66, R113, D61, N63, V68, M115, S117, Y123 和 R125，且其中所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 OX40 结合部分能够结合人 OX40 细胞外结构域的构象表位，所述构象表位包含所述人 OX40 细胞外结构域中的氨基酸残基 G70 和 F71，且其中所述人 OX40 细胞外结构域包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 PD-L1 结合部分能够与 PD-L1 参比抗体竞争结合人 PD-L1，其

中所述 PD-L1 参比抗体包含重链可变结构域 VH2, 且所述 VH2 包含 H2CDR3, 所述 H2CDR3 包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 PD-L1 参比抗体的 H2CDR3 包含 SEQ ID NO: 39-45 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 PD-L1 参比抗体的 VH2 包含 H2CDR1, 所述 H2CDR1 包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 PD-L1 参比抗体的 H2CDR1 包含 SEQ ID NO: 21-29 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 PD-L1 参比抗体的 VH2 包含 H2CDR2, 所述 H2CDR2 包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 PD-L1 参比抗体的 H2CDR2 包含 SEQ ID NO: 30-38 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 PD-L1 参比抗体的 VH2 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 PD-L1 参比抗体的 VH2 包含 SEQ ID NO: 46-59 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 OX40 结合部分与 OX40 参比抗体竞争结合人 OX40, 其中所述 OX40 参比抗体包括重链 H1CDR3, 所述重链 H1CDR3 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 OX40 参比抗体包括重链 H1CDR1, 所述重链 H1CDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 OX40 参比抗体包括重链 H1CDR2, 所述重链 H1CDR2 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 OX40 参比抗体包括重链可变结构域 VH1, 所述 VH1 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 OX40 参比抗体包括轻链 L1CDR1, 所述 L1CDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 OX40 参比抗体包括轻链 L1CDR2, 所述 L1CDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中, 其中所述 OX40 参比抗体包括轻链 L1CDR3, 所述 L1CDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 OX40 参比抗体包括轻链可变结构域 VL1，所述 VL1 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分包含重链可变结构域 VH2，且所述 VH2 包含 H2CDR3，且所述 H2CDR3 包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分的 H2CDR3 包含 SEQ ID NO: 39-45 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分的 VH2 包含 H2CDR1，所述 H2CDR1 包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分的 H2CDR1 包含 SEQ ID NO: 21-29 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分的 VH2 包含 H2CDR2，所述 H2CDR2 包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分的 H2CDR2 包含 SEQ ID NO: 30-38 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分的 VH2 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分的 VH2 包含 SEQ ID NO: 46-59 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分为单域抗体。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 PD-L1 结合部分包含 SEQ ID NO: 46-59 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 OX40 结合部分包括重链 H1CDR3，所述重链 H1CDR3 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 OX40 结合部分包括重链 H1CDR1，所述重链 H1CDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 OX40 结合部分包括重链 H1CDR2，所述重链 H1CDR2 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 OX40 结合部分包括重链可变结构域 VH1，所述 VH1 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述 OX40 结合部分包括轻链 L1CDR1，所述 L1CDR1 包含 SEQ

ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,其中所述 OX40 结合部分包括轻链 L1CDR2,所述 L1CDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,其中所述 OX40 结合部分包括轻链 L1CDR3,所述 L1CDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,其中所述 OX40 结合部分包括轻链可变结构域 VL1,所述 VL1 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,其中所述 OX40 结合部分包括轻链恒定区,所述轻链恒定区源自 Igκ 或 Igλ。

在某些实施方式中,其中所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,其中所述 OX40 结合部分包括 Fab 结构域。

在某些实施方式中,所述的分离的抗原结合蛋白还包含重链恒定区,且所述重链恒定区源自 IgG。

在某些实施方式中,其中所述重链恒定区源自人 IgG1 或人 IgG4。

在某些实施方式中,其中所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,其中所述 PD-L1 结合部分位于所述 OX40 结合部分的 N 端。

在某些实施方式中,其中所述 PD-L1 结合部分位于所述 OX40 结合部分的 C 端。

在某些实施方式中,其中所述 OX40 结合部分包含抗体重链 H1,且所述 PD-L1 结合部分与所述 H1 的 N 末端直接或间接融合。

在某些实施方式中,其中所述 OX40 结合部分包含抗体重链 H1,且所述 PD-L1 结合部分与所述 H1 的 C 末端直接或间接融合。

在某些实施方式中,所述的分离的抗原结合蛋白包含第一多肽链和第二多肽链,其中,所述第一多肽链包含所述 OX40 结合部分的轻链可变结构域 VL1,所述第二多肽链包含所述 OX40 结合部分的重链可变结构域 VH1 和所述 PD-L1 结合部分。

在某些实施方式中,其中所述第一多肽链包含所述 OX40 结合部分的轻链 L1。

在某些实施方式中,其中所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,其中所述第二多肽链包含所述 OX40 结合部分的重链 H1 和所述 PD-L1 结合部分。

在某些实施方式中,其中在所述第二多肽链中,所述重链 H1 的 N 末端与所述 PD-L1 结合部分的 C 末端直接或间接连接。

在某些实施方式中,其中在所述第二多肽链中,所述重链 H1 的 C 末端与所述 PD-L1 结

合部分的 N 末端直接或间接连接。

在某些实施方式中，其中所述重链 H1 与所述 PD-L1 结合部分通过连接子连接。

在某些实施方式中，其中所述连接子为肽连接子。

在某些实施方式中，其中所述连接子包含 SEQ ID NO: 14-15 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，其中所述第二多肽链包含 SEQ ID NO: 17-20 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白包含 2 条所述第一多肽链以及 2 条所述第二多肽链。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白具有对称的结构。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白能够阻断 PD-1 和 PD-L1 的结合。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白能够阻断 PD-L1 与 CD80 的结合。

在某些实施方式中，所述的分离的抗原结合蛋白具有 OX40 激动剂活性。

在另一方面，本申请提供了一种免疫缀合物，其包含所述的分离的抗原结合蛋白。

在另一方面，本申请提供了分离的一个或多个核酸分子，其编码所述的分离的抗原结合蛋白或所述的免疫缀合物。

在另一方面，本申请提供了载体，其包含所述的分离的一个或多个核酸分子。

在另一方面，本申请提供了细胞，其包含所述的核酸分子或所述的载体。

在另一方面，本申请提供了药物组合物，其包含所述的分离的抗原结合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的分离的核酸分子，所述的载体，和/或所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载体。

在另一方面，本申请提供了所述的分离的抗原结合蛋白或所述的免疫缀合物在制备药物中的用途，其中所述药物用于治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤选自下组：血液瘤和实体瘤。

在另一方面，本申请提供了所述的分离的抗原结合蛋白或所述的免疫缀合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗受试者的病毒性感染。

在某些实施方式中，所述病毒性感染包括慢性病毒感染。

在某些实施方式中，所述病毒性感染是由选自下组的病毒引起的感染：乙型肝炎病毒（HBV）、流感病毒和 EBV。

在另一方面，本申请提供了所述的分离的抗原结合蛋白或所述的免疫缀合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗受试者的细菌和/或真菌性感染。

在某些实施方式中，所述细菌和/或真菌性感染包括脓毒症。

在本申请中，所述用于治疗肿瘤的药物、所述用于治疗受试者的病毒性感染的药物和/或所述用于治疗受试者的细菌和/或真菌性感染的药物，使得所述受试者中细胞因子的产生增加。

在某些实施方式中，所述药物使得所述受试者中 CD4⁺T 细胞和/或 CD8⁺T 细胞产生的细胞因子增加。

在某些实施方式中，所述细胞因子包括白介素和/或干扰素。

在某些实施方式中，所述细胞因子包括 IL2，IL21 和/或 IFN- γ 。

在某些实施方式中，所述药物提高所述受试者中 T 细胞的免疫响应。

在某些实施方式中，所述免疫响应包括细胞因子的产生增加。

在某些实施方式中，所述 T 细胞包括 CD4⁺T 细胞和/或 CD8⁺T 细胞。

在某些实施方式中，所述药物上调所述受试者中转录因子的表达水平。

在某些实施方式中，所述转录因子包括 T-bet 和/或 Bcl6。

在某些实施方式中，所述受试者为 HBeAg 阴性受试者。

在另一方面，本申请提供了一种治疗肿瘤的药物组合物，其包括所述的分离的抗原结合蛋白和任选地药学上可接受的载体。

在另一方面，本申请提供了一种治疗病毒性感染的药物组合物，其包括所述的分离的抗原结合蛋白和任选地药学上可接受的载体。

在另一方面，本申请提供了一种治疗细菌和/或真菌性感染的药物组合物，其包括所述的分离的抗原结合蛋白和任选地药学上可接受的载体。

在另一方面，本申请提供了一种治疗肿瘤的方法，其包括以下步骤：施用所述的分离的抗原结合蛋白。

在另一方面，本申请提供了一种治疗病毒性感染的方法，其包括以下步骤：向有需要的受试者施用所述的分离的抗原结合蛋白。

在另一方面，本申请提供了一种治疗细菌和/或真菌性感染的方法，其包括以下步骤：向有需要的受试者施用所述的分离的抗原结合蛋白。

在另一方面，本申请提供了一种提高有需要的受试者中免疫效应的方法，包含以下步骤：向所述受试者施用本申请所述的分离的抗原结合蛋白。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限

制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下：

图 1 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白的结构；

图 2 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白与细胞表面的 PD-L1 的结合活性；

图 3 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白与细胞表面的 OX40 的结合活性；

图 4A-4B 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白与活化的 T 细胞的结合活性；

图 5 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白的细胞桥接实验；

图 6 显示 OX40 受体激动剂细胞试验结果；

图 7 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白对 PD1 和 PD-L1 的阻断活性；

图 8 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白结合可溶的 PD-L1 蛋白分子的结果；

图 9A-9B 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白具有 ADCC 活性；

图 10A-10D 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白刺激 PBMC 分泌细胞因子的结果；

图 11A-11D 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白在 hPD-L1-MC38 小鼠模型中抑制肿瘤生长的结果；

图 12A-12F 显示本申请所述的分离的抗原结合蛋白在野生型 MC38 小鼠模型中抑制肿瘤生长的结果。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

以下对本申请做进一步描述：在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

在本申请中，术语“分离的”通常指从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境

下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

在本申请中，术语“分离的抗原结合蛋白”通常指从天然状态下经人工手段获得的具有抗原结合能力的蛋白。该“分离的抗原结合蛋白”可以包含一个或多个抗原结合部分，例如在本申请中，所述“分离的抗原结合蛋白”可以包含 PD-L1 结合部分和 OX40 结合部分。

在本申请中，术语“PD-1”通常指程序性死亡 1 受体（也称为 CD279）、其功能变体和/或其功能片段。PD-1 通常在 T 细胞、B 细胞、自然杀伤 T 细胞、活化的单核细胞和树突细胞（DC）上表达。PD-1 可以结合其配体 PD-L1 和 PD-L2。例如，术语“PD-1”可以包括与 NCBI 登录号 P42081 具有至少约 85%氨基酸序列同一性且特异性地结合 PD-L1 的多肽或其片段。在 PD-1 的定义之内还包括与天然存在的 PD-1 的氨基酸序列不同但保持特异性结合 PD-L1 的能力的变体。在 PD-1 的定义之内进一步包括增强 PD-L1 的生物活性的变体。PD-1 序列是本领域已知的，并且例如以 GenBank 登录号 Q15116.3 提供。如本文使用的术语“PD-1”包括人 PD-1（hPD-1）、hPD-1 的变体、异构体和种属同源体、以及具有至少一种含 hPD-1 的常见表位的类似物。例如，术语“PD-1”还涵盖来自其他种属比如其它哺乳动物（例如，大鼠、小鼠、兔、非人灵长类动物、猪或牛）的 PD-1。完整的 hPD-1 序列可以在 GenBank 登录号 Q15116.3 中找到。

在本申请中，术语“PD-L1”通常指程序性死亡配体 1 蛋白、其功能变体和/或其功能片段。PD-L1 也称为分化簇 274（CD274）或 B7 同源物 1（B7-H1），并且是由（人类中）CD274 基因编码的蛋白。PD-L1 结合其受体，例如程序性死亡 1（PD-1），所述 PD-1 在活化的 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞中表达（Ishida et al., 1992 EMBO J, 11:3887-3395; Okazaki et al., Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. Science, 2001; 291: 319-22）。PD-L1 和 PD-1 的络合通过抑制 T 细胞增殖和产生细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 发挥免疫抑制作用（Freeman et al., Engagement of PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, J. Exp. Med. 2000, 192:1027-1034; Carter et al., PD-1: PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. Eur. J. Immunol. 2002, 32:634 - 643）。在 PD-L1 的定义之内还包括与天然存在的 PD-L1 的氨基酸序列不同但保持特异性结合受体 PD-1 的能力的变体。在 PD-L1 的定义之内还包括增强 PD-1 的生物活性的变体。PD-L1 序列是本领域已知的，并且例如以 GenBank 登录号 29126 提供。本文使用的术语“PD-L1”包括人 PD-L1（hPD-L1）、hPD-L1 的变体、异构体和种属同源体

以及具有至少一种 hPD-L1 的常见表位的类似物。例如，术语“PD-L1”还涵盖来自其他种属比如其它哺乳动物（例如，大鼠、小鼠、兔、非人灵长类动物、猪或牛）的 PD-L1。完整的 hPD-L1 序列可以在 GenBank 登录号 29126 中找到。

在本申请中，术语“OX40”通常指主要存在于活化的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞、调控性 T (Treg)细胞和自然杀伤(NK)细胞上的肿瘤坏死因子受体(Croft 等人, 2009, Immunol Rev[免疫学评论] 229:173-91)。OX40 的聚集可产生 T 细胞内的有效细胞信号传导事件。在活化的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞上通过 OX40 信号传导导致增强的细胞因子产生、颗粒酶和穿孔素释放、以及效应和记忆 T 细胞池的扩增(Jensen 等人, 2010, Semin Oncol[肿瘤学研讨会], 37:524-32)。此外，Treg 细胞上的 OX40 信号传导抑制 Treg 的扩增，停止 Treg 的诱导并且阻断 Treg 抑制功能(Voo 等人, 2013, J Immunol.[免疫学杂志]191:3641—50;Vu 等人, 2007, Blood.[血液]110: 2501-10)。例如，术语“OX40”可包括与 UniProt 登记号 P43489.1 具有至少 80%氨基酸序列同一性、并且特异性结合 OX40L 的多肽或其片段。本申请中的术语“OX40”包括人 OX40 (hOX40)，hOX40 的变体、同工型和种间同源物，以及与 hOX40 具有至少一个共同表位的其类似物。

在本申请中，术语“人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域”通常指位于其 N-末端的人 PD-L1 的胞外域。术语“人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域”也可指在所述结构域之内的表位。人 PD-L1 蛋白（包括信号肽）的 N 末端 IgV 结构域可以包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在本申请中，术语“胞外结构域”通常是指蛋白质的细胞外结构域(extracellular domain)。例如，OX40 蛋白的胞外结构域通常可为基本不含跨膜和胞质结构域的 OX40 多肽形式。其中，跨膜的界定是根据本领域中用于鉴定疏水结构域类型的常规标准所鉴定的。跨膜的结构域的确切边界可有所不同，但是大部分是相似的。例如，所述 OX40 蛋白的胞外结构域可在跨膜结构域或细胞外结构域边界的任一侧含有约 5 个（或 4 个、3 个、2 个或 1 个）氨基酸。例如，所述 OX40 蛋白的胞外结构域可以带有相关的信号肽。在本申请中，术语“人 OX40 细胞外结构域”通常指位于人 OX40 的胞外域。例如，人 OX40 蛋白的胞外结构域的氨基酸序列可以如 SEQ ID NO: 43 所示(P43489, 第 1 位到第 170 位)。术语“人 OX40 细胞外结构域”也可指在所述结构域之内的表位。例如，人 OX40 蛋白（包括信号肽）的细胞外结构域可以包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在本申请中，术语“胞外域”通常指从细胞器和/或细胞的外膜突出的蛋白（例如，膜蛋白，比如受体）的一部分。如果多肽链横跨双分子层数次，则胞外域包括缠绕穿过所述膜的环。胞外域可以识别和响应特异性抗体。

在本申请中，术语“表位”通常指抗原上抗体结合的位点。表位可以由连续氨基酸（线

性表位)或由于蛋白质三级折叠而在空间上相邻的非连续氨基酸(构象表位)形成。当暴露于变性溶剂时,由连续氨基酸形成的表位通常被保留,然而当用变性溶剂处理时通过三级折叠形成的表位通常丢失。表位一般包括在独特空间构象中的至少 3 个,通常更多个,至少 5 个或 8-10 个氨基酸。测定表位的空间构象的方法包括例如 X-射线晶体衍射和 2-维核磁共振。参见,例如 *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)。

在本申请中,术语“构象表位”通常指由于蛋白质三级折叠而在空间位置上相邻的抗原(比如 PD-L1 抗原)的非连续氨基酸残基。当多肽链折叠形成天然蛋白质时,这些非连续氨基酸残基可聚集在表面上。构象表位包含但不限于功能性表位。

在本申请中,术语“可变结构域”通常指抗体重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可以分别称为“VH”和“VL”。这些结构域通常是抗体的变化最大的部分(相对于相同类型的其它抗体),且包含抗原结合位点。

在本申请中,术语“可变”通常指在抗体之间可变结构域的某些区段在序列上存在很大差异的事实。V 结构域介导抗原结合并决定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性并非在整个可变结构域范围内均匀分布。相反,它集中在轻链和重链可变结构域中称为高变区(CDR 或 HVR)的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR 区,大多数采用 β -折叠构型,通过三个 CDR 连接,其形成环形连接,并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密靠近地保持在一起,并且来自另一条链的 CDR 一同促进抗体的抗原结合位点的形成(参见 Kabat et al, *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但显示出各种效应子功能,例如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

在本申请中,术语“CD80”通常指 CD28/CTLA4 的配体(也称为 B7.1)、其功能变体和/或其功能片段。CD80 通常在专职抗原递呈细胞(APC)上表达。例如,术语“CD80”可以包含与 NCBI 登录号 P33681 具有至少约 85%氨基酸序列同一性且特异性地结合 CTLA4 的多肽或其片段。在 CD80 的定义之内还包括与天然存在的 CD80 的氨基酸序列不同但保持特异性结合 CTLA4 的能力的变体。在 CD80 的定义之内进一步包括增强 CTLA4 的生物活性的变体。CD80 序列是本领域已知的,并且例如以 GenBank 登录号 P33681 提供。如本文使用的术语“CD80”包括人 CD80(hCD80)、hCD80 的变体、异构体和种属同源体、以及具有至少一种含 hCD80 的常见表位的类似物。例如,术语“CD80”还涵盖来自其他种属比如其它哺乳动物(例如,大鼠、小鼠、兔、非人灵长类动物、猪或牛)的 CD80。完整的 hCD80 序列可

以在 GenBank 登录号 P33681 中找到。

在本申请中，术语“抗体”通常指免疫球蛋白或其片段或其衍生物，涵盖包括抗原结合位点的任何多肽，无论其是在体外还是体内产生的。该术语包括但不限于多克隆的、单克隆的、单特异性的、多特异性的、非特异性的、人源化的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂化的、突变的和移植的抗体。除非另外被术语“完整的”修饰，如在“完整的抗体”中，为了本发明的目的，术语“抗体”也包括抗体片段，比如 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb 和保持抗原结合功能（即，特异性结合例如 OX40 或 PD-L1）的其它抗体片段。通常，这样的片段应当包括抗原结合结构域。基本的 4 链抗体单元是由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。IgM 抗体由 5 个基本的异四聚体单元与另外一个称为 J 链的多肽组成，且含有 10 个抗原结合位点，而 IgA 抗体包括 2-5 个可以与 J 链相结合聚合形成多价组合的基本 4 链单元。就 IgG 而言，4 链单元一般为约 150,000 道尔顿。每个 L 链通过一个共价二硫键与 H 链连接，而两个 H 链通过一个或多个取决于 H 链同种型的二硫键相互连接。每个 H 和 L 链还具有规则间隔的链内二硫化桥键。每个 H 链在 N 末端具有可变结构域(VH)，对于 α 和 γ 链各自继之以三个恒定结构域(CH)、对于 μ 和 ϵ 同种型继之以四个 CH 结构域。每个 L 链在 N 末端具有可变结构域(VL)，在其另一端具有恒定结构域。VL 与 VH 对应，且 CL 与重链的第一恒定结构域(CH1)相对应。特定的氨基酸残基被认为在轻链和重链可变结构域之间形成界面。VH 和 VL 配对一起形成单个抗原结合位点。对于不同类别抗体的结构和性质，参见例如 Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994，第 71 页和第 6 章。来自任何脊椎动物物种的 L 链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列被分为两种明显不同的类型中的一种，称为 κ 和 λ 。取决于其重链(CH)恒定结构域的氨基酸序列，可以将免疫球蛋白分为不同的类别或同种型。存在五类免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，具有分别被命名为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。基于 CH 序列和功能方面的相对小的差异，将 γ 和 α 类进一步分成亚类，例如，人表达下述亚类：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgK1。

在本申请中，术语“CDR”通常指抗体可变结构域的区域，其序列是高度可变的和/或形成结构定义环。通常，抗体包括六个 CDR；在 VH 中三个(HCDR1、HCDR2、HCDR3)，和在 VL 中三个(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。在天然抗体中，HCDR3 和 LCDR3 显示所述六个 CDR 的大多数多样性，并且特别地 HCDR3 被认为在赋予抗体的精细特异性方面起独特作用。参见，例如 Xu et al, Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003)。实际上，仅由重链组成的天然存在的骆驼抗体在缺乏轻链的情况功能正常且稳定。参见，例如 Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-

448 (1993); Sheriff et al, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)。例如, 在本申请中, 所述 OX40 结合部分可以包含重链可变结构域 VH1, VH1 中可以包括 3 个 CDR(例如, H1CDR1、H1CDR2 和 H1CDR3), 其还可以包含轻链可变结构域 VL1, VL1 中可以包括 3 个 CDR(例如, L1CDR1、L1CDR2 和 L1CDR3)。又例如, 在本申请中, 所述 PD-L1 结合部分可以包含重链可变结构域 VH2, VH2 中可以包括 3 个 CDR(例如, H2CDR1、H2CDR2 和 H2CDR3)。

在本领域中, 可以通过多种方法来划分抗体的 CDR, 例如 1) 基于序列可变性的 Kabat 定义规则(Wu 和 Kabat, J Exp Med 132:211-50, 1970; Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), 2) 基于结构环区域位置的 Chothia 定义规则(A1- Lazikani 等人, J Mol Biol 273:927-48, 1997), 3) 用 Oxford Molecular 的 AbM 抗体模型软件权衡上述两种规则的 AbM 定义规则, 4) 基于得到的复合物晶体结构分析的 Contact 定义规则。这些标记 CDR 方法可总结如下表 1。

表 1 CDR 划分方法

	CCG 定义	Kabat 定义	AbM 定义	Chothia 定义	Contact 定义
轻链 CDR1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
轻链 CDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L45-L55
轻链 CDR3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
重链 CDR1	H26-H35	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
重链 CDR2	H50-H65	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
重链 CDR3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

其中, Laa-Lbb 的氨基酸残基位置序数是遵循 Kabat 编号系统获得的。

在本申请中, 术语“竞争结合”通常指抗体或其片段通过对另一种抗体(例如, 参比抗体)进行变构调节, 干扰另一种抗体直接地或间接地结合靶标/抗原(例如, 可以分别为 PD-L1 或 OX40)的能力。例如, 在本申请中, 所述 PD-L1 结合部分能够与 PD-L1 参比抗体竞争结合人 PD-L1。又例如, 所述 OX40 结合部分与 OX40 参比抗体竞争结合人 OX40。此外, 抗体或其片段能够干扰另一个抗体或其片段结合靶标的程度, 且因此无论其是否可以被认为是根据本发明的阻断或竞争, 都可以使用竞争性结合试验来确定。一种特别合适的定量竞争试验使用基于 FACS 或基于 AlphaScreen 方法测量标记的(例如, His 标记的、生物素化的或放射性标记的)抗体或其片段和另一抗体或其片段之间在结合靶标方面的竞争。通常, 竞争抗体或其片段为例如一种下述的: 在竞争试验中结合靶标, 使得在试验期间和在第二抗体或其片段的存在下, 本发明的分离的抗原结合蛋白的所记录的取代达到由以给定量存在的所检测的潜在阻断抗体或其片段得到的最大理论取代(例如, 由需要被阻断的冷(例如, 未标记的)抗体或其片段取代)的至多 100% (例如, 在基于 FACS 的竞争试验中)。例如, 竞争抗体

或其片段具有在 10%至 100%之间，比如在 50%至 100%之间的所记录的取代。

在本申请中，术语“单域抗体”通常又称纳米抗体（nanobody）或重链抗体（heavy chain antibody, hcAb），是从骆驼科动物和鲨鱼的血清中分离出的一种抗体，其仅有一个重链可变区结构域（VHH）。单独克隆并表达出来的 VHH 区具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及同等的抗原结合活性，VHH 是目前已知的可结合目标抗原的最小单位。例如，在本申请中，所述 PD-L1 结合部分可以为单域抗体。

在本申请中，术语“Fab 结构域”通常指包括重链可变结构域、轻链可变结构域、轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域（CH1）的区域。例如，在本申请中，所述 OX40 结合部分可以包括 Fab 结构域。

在本申请中，术语“融合”通常指两个多肽之间的共价键合。所述多肽典型地通过肽键连接，彼此直接连接或通过氨基酸连接子结合。任选地，所述肽可以经通过本领域技术人员已知的非肽共价键结合。

在本申请中，术语“多肽链”通常指包括两个或多个共价连接的肽的大分子。多肽链之内的肽可以通过一个肽键彼此连接。每条多肽链可以包括一个 N-末端或氨基末端和一个 C-末端或羧基末端。

在本申请中，术语“连接子”通常指接合或连接两个多肽序列（例如连接两个多肽结构域）的合成氨基酸序列。连接子可以通过肽键连接两个氨基酸序列。在某些实施方案中，本发明的连接子以线性顺序将生物学活性部分连接至第二部分。例如，肽连接子可以是非免疫原性的和柔性的，比如包括丝氨酸和甘氨酸序列或 Ala-Ala-Ala 重复序列的肽连接子。根据分离的抗原结合蛋白的特定结构，肽连接子可以包括例如 3-30 个（比如至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 11 个、至少 12 个、至少 13 个、至少 14 个、至少 15 个、至少 16 个、至少 17 个、至少 18 个、至少 19 个、至少 20 个、至少 21 个、至少 22 个、至少 23 个、至少 24 个、至少 25 个、至少 26 个、至少 27 个、至少 28 个、至少 29 个、至少 30 个）氨基酸残基。

在本申请中，术语“阻断”通常指抑制或降低分子和其特异性结合配偶体之间（比如配体及其特异性受体之间）的结合活性。例如，本申请所述的分离的抗原结合蛋白，其能够阻断 PD-L1 及其受体 PD-1 之间的相互作用，从而阻断 PD-1 信号通路，将 T 细胞的功能响应从功能失调状态修复为抗原刺激状态。又例如，本申请所述的分离的抗原结合蛋白，其能够阻断 PD-L1 与 CD80 的结合，从而阻断 PD-1 信号通路，将 T 细胞的功能响应从功能失调状态修复为抗原刺激状态。

在本申请中，术语“激动剂”通常是指能够激活目标分子和/或增强其活性的物质或试剂。

例如，本申请中的“激动剂”可以是激动性抗体或其它物质，所述激动剂可通过直接或间接与目标分子相结合而使目标分子由非活化状态转变为活化状态，或者由低活性状态转变为高活性状态。在本申请中，“OX40 激动剂”通常指能够激活 OX40 和/或增强其活性的物质或试剂。例如，OX40 激动剂可通过直接或间接与 OX40 相结合而使 OX40 由非活化状态转变为活化状态，或者由低活性状态转变为高活性状态。

在本申请中，术语“免疫缀合物”通常指由一种或多种免疫球蛋白相关分子或其片段与一种或多种另外的分子缀合形成的蛋白质分子。所述另外的分子可以与免疫球蛋白相关分子或其片段相同。在某些情况下，所述另外的分子可以与免疫球蛋白相关分子或其片段不同。所述一种或多种另外的分子可以彼此相同或可以彼此不同。例如，所述另外的分子可以是靶点结合部分和/或效应部分，比如毒素或信号分子。

在本申请中，术语“细胞因子”通常指由起细胞间调节剂作用的蛋白。包括，例如，白细胞介素、干扰素、趋化因子、造血生长因子，肿瘤坏死因子和转化生长因子。在某些情形中，所述细胞因子的实例可以是 IL2，IL21 和/或 IFN- γ 。本申请中的细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白，以及天然序列细胞因子的生物活性等价物。

在本申请中，术语“转录因子”通常指能够结合 DNA 并调控相关基因转录的蛋白质。

在本申请中，术语“免疫响应”通常指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子（例如抗体、细胞因子和补体）的作用，所述作用可导致选择性损害、破坏或自人体消除入侵病原体、感染病原体的细胞或组织、癌性细胞或（在自体免疫或病理性发炎的情形下的）正常人类细胞或组织。

在本申请中，术语“IL-2”或“IL2”通常指白细胞介素-2、其功能变体和/或其功能片段。术语 IL2 涵盖人 IL-2（hIL-2），以及来自其它种属比如其它哺乳动物（例如，大鼠、小鼠、兔子、非人灵长类动物、猪或牛）的 IL-2。术语“IL-2”也可指能够刺激 hIL-2 依赖性细胞溶解性或辅助性 T 细胞系的增殖的多肽，如在 Gillis, S., et al., J. Immunol. (1978) 120:2027-2032 和 Watson, J., J. Exp. Med. (1979) 150:1510-1519 的标准测定中列出的。

在本申请中，术语“IL-12”或“IL12”通常指白细胞介素-12、其功能变体和/或其功能片段。术语 IL12 涵盖人 IL-12（hIL-12），以及来自其它种属比如其它哺乳动物（例如，大鼠、小鼠、兔子、非人灵长类动物、猪或牛）的 IL-12。

在本申请中，术语“IFN- γ ”通常指干扰素 γ 及其变体，有时是指干扰素 γ 样多肽。例如，人 IFN- γ 变体可以指天然产生的（即 IFN- γ 位点上的等位基因变体）或重组制备的蛋白质，具有与成熟的天然的人 IFN- γ 相同类似或实质类似的氨基酸序列。IFN- γ 还可包括保留其活性的 IFN- γ 片段或 IFN- γ 的截短形式。

在本申请中，术语“T-bet”通常指一种转录因子，能诱导干扰素- γ (IFN- γ) 的产生，并通过调节趋化因子和趋化因子受体的表达来协调辅助性 T 细胞的迁移过程。

在本申请中，术语“Bcl6”通常指 B 细胞淋巴瘤 6 蛋白 (B-cell lymphoma 6 protein)，一种转录因子。

在本申请中，术语“HBeAg”通常指乙型肝炎的一种病毒蛋白。术语“HBeAg 阴性”通常指基于 HBeAg 测定试验（例如，ELISA 测定试验）的结果，其中对于被认为可重现地含有不可检测水平的 HBeAg 的样品，该结果等于或小于该测定试验的阈值或截断值。

在本申请中，术语“分离的一个或多个核酸分子”通常指任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，或从其天然环境分离的或人工合成的类似物。在本申请中，所述分离的一个或多个核酸分子，其编码本申请所述的分离的抗原结合蛋白或本申请所述的免疫缀合物。

在本申请中，术语“载体”通常指可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。举例来说，载体包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 来源的人工染色体 (PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可能含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。

在本申请中，术语“细胞”通常指可以是或已经是受试者质粒或载体的接受者的单个细胞、细胞系或细胞培养物，其包括本发明所述的核酸分子或本发明所述的载体。细胞可以包括单个细胞的后代。由于天然、偶然或有意的突变，后代可以不一定与原始母细胞完全相同（在总 DNA 互补体的形态上或在基因组上）。细胞可包括用本发明所述的载体在体外转染的细胞。细胞可以是细菌细胞（例如，大肠杆菌）、酵母细胞或其它真核细胞，例如 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞、HEK293 细胞、COS-1 细胞、NS0 细胞或骨髓瘤细胞。在某些实施方案中，细胞为哺乳动物细胞。在某些实施方案中，哺乳动物细胞为 HEK293 细胞。

在本申请中，术语“药学上可接受的载体”通常指与药物给药相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂等，通常安全、无毒，且既不是生物学上也非其它方

面不合需要的。

在本申请中，术语“肿瘤”通常指由异常细胞生长形成的赘生物或实体病变。在本申请中，肿瘤可以是实体瘤或血液瘤。例如，肿瘤可选自白血病、肺癌（比如，非小细胞肺癌）、乳腺癌（比如，三阴性乳腺癌）、肾癌（比如肾细胞癌）、黑色素瘤、子宫颈癌、子宫癌、胰腺癌、腹膜癌、卵巢癌、结肠癌、脑癌、膀胱癌、头颈癌、间皮瘤、前列腺癌、胃癌和髓母细胞瘤。

在本申请中，术语“受试者”通常指人类或非人类动物，包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

在本申请中，术语“病毒性感染”通常指病毒感染活体细胞引起的疾病或病症。根据发病时间，病毒性感染可分为隐性感染、急性感染、潜伏性感染和慢性感染。根据传播途径和病变部位的不同可分为呼吸道病毒性疾病、胃肠道病毒性疾病、肝脏病毒性疾病、皮肤和粘膜病毒性疾病、眼病毒性疾病、中枢神经系统病毒性疾病、亲淋巴细胞性病毒性疾病、虫传病毒性疾病和慢病毒感染。其中，术语“慢性病毒感染”通常指潜伏期长的病毒感染性疾病或病症。

在本申请中，术语“细菌和/或真菌性感染”通常指由细菌或真菌在宿主体内存在或侵入正常组织，干扰宿主正常的生理运作的过程。引起感染的细菌或真菌可能产生阻断宿主防御机制的能力，如，破坏免疫系统（如，干扰 T 细胞功能）。在某些情形中，所述细菌和/或真菌性感染可包括脓毒症。

在本申请中，术语“脓毒症”通常指是由微生物感染引起的、可能危及生命的急性综合征。当严重的微生物感染引起宿主一系列多因素的、异常的免疫反应时，会导致脓毒症。机体免疫反应通常是由先天免疫系统进行精确的调控，并受到许多内源因子的重要影响。当脓毒症发生时，异常的免疫反应表现为几个发展阶段，包括早期的过度炎症反应与抗炎反应的激活，随后的免疫抑制与异常凝血，并最终导致器官功能障碍与衰竭。

在本申请中，术语“PBMC 细胞”通常指外周血单核细胞，其可以包括淋巴细胞（T 细胞、B 细胞 NK 细胞）和单核细胞。这些细胞可以使用 Ficoll（一种分离血液层的亲水性多糖）和/或梯度离心（其可以将血液分离成血浆上层、PBMC 层和包括多形核细胞（比如嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞）和红细胞的层）从全血中提取。

在本申请中，术语“提高有需要的受试者中免疫效应”通常指诱导、引起或刺激免疫细胞（比如，T-细胞或 PBMC 细胞）具有持续的或增强的生物学功能，或者更新或再活化耗尽的或失活的免疫细胞。增强免疫细胞功能的实例包括：相对于干预之前的相应水平，增加 PBMC 细胞分泌 IL-2、增加增殖、增强抗原反应性（例如，病毒或病原体清除）。增强的程

度可以是至少 50%，例如至少 50%、至少 100%、至少 200%、至少 300%、至少 400%、至少 500%。测定该增强的方式是本领域普通技术人员已知的。

在本申请中，术语“包含”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。

分离的抗原结合蛋白、抗体、变体

一方面，本申请提供一种分离的抗原结合蛋白，其包含 PD-L1 结合部分和 OX40 结合部分。

PD-L1 参比抗体

本申请所述的分离的抗原结合蛋白包含 PD-L1 结合部分。所述 PD-L1 结合部分能够与 PD-L1 参比抗体竞争结合人 PD-L1。

在本申请中，所述 PD-L1 参比抗体可包含重链可变结构域 VH2，且所述 VH2 可包含 H2CDR3，所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。在某些情形中，所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 39-45 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 PD-L1 参比抗体可包含重链可变结构域 VH2，且所述 VH2 可包含 H2CDR1，所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列。在某些情形中，所述 H2CDR1 可包含 SEQ ID NO: 21-29 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 PD-L1 参比抗体可包含重链可变结构域 VH2，且所述 VH2 可包含 H2CDR2，所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列。在某些情形中，所述 H2CDR2 可包含 SEQ ID NO: 30-38 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 PD-L1 参比抗体可包含重链可变结构域 VH2，且所述 VH2 可包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。在某些情形中，所述 VH2 可包含 SEQ ID NO: 46-59 中任一项所示的氨基酸序列。

本申请所述 PD-L1 参比抗体可包含 H2CDR3、H2CDR1 和/或 H2CDR2。其中，所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列，所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列，且所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 PD-L1 参比抗体可包含 H2CDR3、H2CDR1 和/或 H2CDR2。在某些情形中，所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 39-45 中任一项所示的氨基酸序列，所述 H2CDR1 可包含 SEQ ID NO: 21-29 中任一项所示的氨基酸序列，且所述 H2CDR2 可包含 SEQ ID NO:

30-38 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，所述 PD-L1 参比抗体可包含重链可变结构域 VH2，且所述 VH2 可包含 H2CDR3、H2CDR1 和/或 H2CDR2。其中所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列，所述 H2CDR1 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述 H2CDR2 可包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

例如，所述 PD-L1 参比抗体可包含重链可变结构域 VH2。其中所述 VH2 可包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。

例如，所述 PD-L1 参比抗体可包含重链可变结构域 VH2，且所述 VH2 可包含 H2CDR3、H2CDR1 和/或 H2CDR2。其中所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列，所述 H2CDR1 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述 H2CDR2 可包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。又例如，所述 VH2 可包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，该抗体或其抗原结合片段可包括 Hu56v1 或与其具有相同的重链可变结构域的抗体。

PD-L1 结合部分

本申请所述的分离的抗原结合蛋白包含 PD-L1 结合部分。所述 PD-L1 结合部分可包含重链可变结构域 VH2，且所述 VH2 可包含 H2CDR3，所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列：X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀Y（SEQ ID NO: 62）；其中，X₁=D 或 R；X₂=S，C 或 L；X₃=F，P 或 N；X₄=E，C，G，P，Q 或 H；X₅=D，T，K，I，Y 或 P；X₆=P，C 或 G；X₇=T，E 或 P；X₈=C，F，V 或无氨基酸；X₉=T，P，D 或无氨基酸；X₁₀=L，S，G，W 或无氨基酸；X₁₁=V，C，P 或无氨基酸；X₁₂=T，V，S 或无氨基酸；X₁₃=V，G 或无氨基酸；X₁₄=A，G 或无氨基酸；X₁₅=S，Y 或无氨基酸；X₁₆=S，W，C 或无氨基酸；X₁₇=G，P 或 L；X₁₈=A，S 或 M；X₁₉=F 或 G；X₂₀=Q，D 或 P。在某些情形中，所述 H2CDR₃ 可包含 SEQ ID NO: 39-45 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 PD-L1 结合部分可包含重链可变结构域 VH2，且所述 VH2 可包含 H2CDR1，所述 H2CDR1 可包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列：X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈MX₉（SEQ ID NO: 60）；其中，X₁=G，L 或 R；X₂=N，F，Y 或 K；X₃=I，T 或 M；X₄=S，I，F 或 V；X₅=S 或 R；X₆=R，S 或 V；X₇=R，C 或 Y；X₈=C 或 G；X₉=A 或 G。在某些情形中，所述 H2CDR1 可包含 SEQ ID NO: 21-29 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 PD-L1 结合部分可包含重链可变结构域 VH2，且所述 VH2 可包含 H2CDR2，所述 H2CDR2 可包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列：X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅KG（SEQ ID NO: 61）；其中，X₁=K，N，T 或 D；

X₂=L, I 或 V; X₃=L, T, D, S 或 N; X₄=T, S, G 或 P; X₅=T, D 或 N; X₆=S, P, T 或无氨基酸; X₇=G 或 I; X₈=S, T, N 或 G; X₉=T 或 S; X₁₀=Y, R, S, K 或 I; X₁₁=L 或 Y; X₁₂=A, V 或 N; X₁₃=D 或 Q; X₁₄=S 或 R; X₁₅=V, M 或 F。在某些情形中, 所述 H2CDR2 可包含 SEQ ID NO: 30-38 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述 PD-L1 结合部分可包含重链可变结构域 VH2, 且所述 VH2 可包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列:

QVQLX₁ESGGGX₂VQX₃GGSLRLSCAX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃MX₁₄X₁₅RQAPGKX₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆KGRFTISX₃₇X₃₈NX₃₉KX₄₀TX₄₁X₄₂LQMNSLX₄₃X₄₄EDTAX₄₅YYCX₄₆AX₄₇X₄₈X₄₉X₅₀X₅₁X₅₂X₅₃X₅₄X₅₅X₅₆X₅₇X₅₈X₅₉X₆₀X₆₁X₆₂X₆₃X₆₄X₆₅X₆₆YX₆₇GQGTGX₆₈VTVSS; 其中, X₁=V 或 Q; X₂=L 或 S; X₃=P 或 A; X₄=A 或 V; X₅=S 或 Q; X₆=G, L 或 R; X₇=N, F, Y 或 K; X₈=I, T 或 M; X₉=S, I, F 或 V; X₁₀=S 或 R; X₁₁=R, S 或 V; X₁₂=R, C 或 Y; X₁₃=C 或 G; X₁₄=A 或 G; X₁₅=F 或 Y; X₁₆=E, Q 或 G; X₁₇=R 或 L; X₁₈=E 或 V; X₁₉=R, G 或 L; X₂₀=V 或 G; X₂₁=A, D, P 或 S; X₂₂=K, N, T, D 或 A; X₂₃=I, L 或 V; X₂₄=L, T, D, S 或 N; X₂₅=T, G, S 或 P; X₂₆=T, D 或 N; X₂₇=P, T, S 或无氨基酸; X₂₈=G 或 I; X₂₉=N, S, T 或 G; X₃₀=T, S 或无氨基酸; X₃₁=Y, R, S, K 或 I; X₃₂=L 或 Y; X₃₃=A, V 或 N; X₃₄=D 或 Q; X₃₅=S 或 R; X₃₆=V, M 或 F; X₃₇=R, K 或 Q; X₃₈=D 或 N; X₃₉=S 或 A; X₄₀=N 或 S; X₄₁=V 或 L; X₄₂=Y 或 D; X₄₃=R 或 K; X₄₄=A, T 或 P; X₄₅=V 或 M; X₄₆=A 或 V; X₄₇=D 或 R; X₄₈=S, C 或 L; X₄₉=F, P 或 N; X₅₀=E, C, G, P, Q 或 H; X₅₁=D, T, K, I, Y 或 P; X₅₂=P, C 或 G; X₅₃=T, E 或 P; X₅₄=C, F, V 或无氨基酸; X₅₅=T, P, D 或无氨基酸; X₅₆=L, S, G, W 或无氨基酸; X₅₇=V, C, P 或无氨基酸; X₅₈=T, V, S 或无氨基酸; X₅₉=V, G 或无氨基酸; X₆₀=A, G 或无氨基酸; X₆₁=S, Y 或无氨基酸; X₆₂=S, W, C 或无氨基酸; X₆₃=G, P 或 L; X₆₄=A, S 或 M; X₆₅=F 或 G; X₆₆=Q, D 或 P; X₆₇=W 或 R; X₆₈=L 或 Q。在某些情形中, 所述 VH2 可包含 SEQ ID NO: 46-59 中任一项所示的氨基酸序列。

本申请所述 PD-L1 结合部分可包含 H2CDR3、H2CDR1 和/或 H2CDR2。其中, 所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列, 所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列, 且所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列。

在本申请中, 所述 PD-L1 结合部分可包含 H2CDR3、H2CDR1 和/或 H2CDR2。在某些情形中, 所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 39-45 中任一项所示的氨基酸序列, 所述 H2CDR1 可包含 SEQ ID NO: 21-29 中任一项所示的氨基酸序列, 且所述 H2CDR2 可包含 SEQ ID NO: 30-38 中任一项所示的氨基酸序列。

例如,所述 PD-L1 结合部分可包含重链可变结构域 VH2,且所述 VH2 可包含 H2CDR3、H2CDR1 和/或 H2CDR2。其中所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列,所述 H2CDR1 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列,且所述 H2CDR2 可包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

例如,所述 PD-L1 结合部分可包含重链可变结构域 VH2。其中所述 VH2 可包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。

例如,所述 PD-L1 结合部分可包含重链可变结构域 VH2,且所述 VH2 可包含 H2CDR3、H2CDR1 和/或 H2CDR2。其中所述 H2CDR3 可包含 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列,所述 H2CDR1 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列,且所述 H2CDR2 可包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。又例如,所述 VH2 可包含 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,该结合部分可包括 Hu56v1 或与其具有相同的重链可变结构域的抗体。在本申请中,所述 PD-L1 结合部分可以为单域抗体。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白包含 PD-L1 结合部分。所述 PD-L1 结合部分可识别和/或结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域中的氨基酸残基。在某些情形中,所述氨基酸残基可以是 I54, Y56, E58, Q66 和/或 R113。另一些情形中,所述氨基酸残基可以是 D61, N63, V68, M115, S117, Y123 和/或 R125。例如,所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

本申请所述 PD-L1 结合部分可结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域的构象表位。在某些情形中,所述构象表位可包含 I54, Y56, E58, Q66 和 R113。另一些情形中,所述构象表位可包含 D61, N63, V68, M115, S117, Y123 和 R125。例如,所述构象表位可包含 I54, Y56, E58, Q66, R113, D61, N63, V68, M115, S117, Y123 和 R125。例如,所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

OX40 参比抗体

本申请所述的分离的抗原结合蛋白包含 OX40 结合部分。所述 OX40 结合部分能够与 OX40 参比抗体竞争结合人 OX40。

在本申请中,所述 OX40 参比抗体可包含 H1CDR3,所述 H1CDR3 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。所述 OX40 参比抗体可包含 H1CDR2,所述 H1CDR2 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。所述 OX40 参比抗体可包含 H1CDR1,所述 H1CDR1 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述 OX40 参比抗体可包含 L1CDR3,所述 L1CDR3 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。所述 OX40 参比抗体可包含 L1CDR2,所述 L1CDR2 可包含 SEQ ID NO:

10 所示的氨基酸序列。所述 OX40 参比抗体可包含 L1CDR1，所述 L1CDR1 可包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

本申请所述 OX40 参比抗体可包含轻链可变结构域 VL1，所述 VL1 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。本申请所述 OX40 参比抗体可包含重链可变结构域 VH1，所述 VH1 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

例如，所述 OX40 参比抗体可包含 VH1 和 VL1，且所述 VH1 可包含 H1CDR3，H1CDR1 和/或 H1CDR2。其中所述 H1CDR3 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，所述 H1CDR1 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 H1CDR2 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列，且所述 VH1 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。所述 VL1 可包含 L1CDR3，L1CDR1 和/或 L1CDR2。其中所述 L1CDR3 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列，所述 L1CDR1 可包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，所述 L1CDR2 可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述 VL1 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

OX40 结合部分

本申请所述的分离的抗原结合蛋白包含 OX40 结合部分。

在本申请中，所述 OX40 结合部分可包含 H1CDR3，所述 H1CDR3 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。所述 OX40 结合部分可包含 H1CDR2，所述 H1CDR2 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。所述 OX40 结合部分可包含 H1CDR1，所述 H1CDR1 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述 OX40 结合部分可包含 L1CDR3，所述 L1CDR3 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。所述 OX40 结合部分可包含 L1CDR2，所述 L1CDR2 可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。所述 OX40 结合部分可包含 L1CDR1，所述 L1CDR1 可包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

本申请所述 OX40 结合部分可包含轻链可变结构域 VL1，所述 VL1 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。本申请所述 OX40 结合部分可包含重链可变结构域 VH1，所述 VH1 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。本申请所述 OX40 结合部分还可包含轻链恒定区，所述轻链恒定区可所述轻链恒定区源自 Igκ 或 Igλ。例如，所述轻链恒定区可包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。所述 OX40 结合部分还可包括 Fab 结构域。

本申请所述 OX40 结合部分可包含重链恒定区。所述重链恒定区可源自 IgG，如 IgG1 或 IgG4。例如，所述重链恒定区可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

所述 OX40 结合部分可包含重链 H1，所述 H1 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。所述 OX40 结合部分可包含轻链 L1，所述 L1 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

例如,所述 OX40 结合部分可包含 VH1 和 VL1,且所述 VH1 可包含 H1CDR3, H1CDR1 和/或 H1CDR2。其中所述 H1CDR3 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列,所述 H1CDR1 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列,所述 H1CDR2 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列,且所述 VH1 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。所述 VL1 可包含 L1CDR3, L1CDR1 和/或 L1CDR2。其中所述 L1CDR3 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列,所述 L1CDR1 可包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列,所述 L1CDR2 可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列,且所述 VL1 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。所述 OX40 结合部分还可包含重链恒定区和轻链恒定区。其中所述重链恒定区可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列,所述轻链恒定区可包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。本申请所述 OX40 结合部分可包含重链 H1 和轻链 L1,其中所述 H1 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。所述 L1 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白包含 OX40 结合部分。所述 OX40 结合部分能够识别和/或结合人 OX40 细胞外结构域中的氨基酸残基。例如,所述氨基酸残基可以是 G70 和/或 F71。又例如,所述人 OX40 细胞外结构域可包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

本申请所述分离的抗原结合蛋白的所述 OX40 结合部分可结合人 OX40 细胞外结构域的构象表位。所述构象表位可包含所述人 OX40 细胞外结构域中的氨基酸残基。例如,所述氨基酸残基可以是 G70 和/或 F71。又例如,所述人 OX40 细胞外结构域可包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

本申请所述分离的抗原结合部分可包含第一多肽链和第二多肽链。所述分离的抗原结合部分的第一多肽链可包含所述 OX40 结合部分的轻链可变结构域 VL1。在某些情形中,所述 VL1 可包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。所述第一多肽链可包含所述 OX40 结合部分的轻链 L1。在某些情形中,所述 L1 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。例如,所述分离的抗原结合部分的所述第一多肽链可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

本申请所述分离的抗原结合部分的所述第二多肽链可包含所述 OX40 结合部分的重链 H1 和所述 PD-L1 结合部分。例如,所述 OX40 结合部分的重链 H1 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。所述 PD-L1 结合部分可包含重链可变结构域 VH2。在某些情形中,所述 VH2 可包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。例如,所述 VH2 可包含 SEQ ID NO: 46-59 中任一项所示的氨基酸序列。

在所述第二多肽链中,所述 PD-L1 结合部分可与所述 OX40 结合部分的 H1 直接或间接地连接。在某些情形中,所述 PD-L1 结合部分可以位于所述 OX40 结合部分的所述 H1 的 N

端。例如，所述 PD-L1 结合部分的 C 端可与所述 OX40 结合部分的所述 H1 的 N 末端直接或间接融合。另一些情形中，所述 PD-L1 结合部分可位于所述 OX40 结合部分的所述 H1 的 C 端。例如，所述 PD-L1 结合部分的 N 端可与所述 OX40 结合部分的所述 H1 的 C 末端直接或间接融合。本申请所述 PD-L1 结合部分与所述 OX40 结合部分的 H1 可通过连接子连接，例如，肽连接子。所述连接子可包含 SEQ ID NO: 14-15 中任一项所示的氨基酸序列。例如，本申请所述第二多肽链可包含 SEQ ID NO: 17-20 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 2 条所述第一多肽链以及 2 条第二多肽链。所述分离的抗原结合蛋白具有对称的结构。在某些情形中，所述 PD-L1 结合部分的 C 端可与所述 OX40 的 H1 的 N 端连接，例如，所述分离的抗原结合蛋白结构可以如图 1A 所示。另一些情形中，所述 PD-L1 结合部分的 N 端可与所述 OX40 的 H1 的 C 端连接，例如，所述分离的抗原结合蛋白结构可以如图 1B 所示。图 1A 和图 1B 中的 1 或 2 分别可指所述 PD-L1 结合部分和所述 OX40 结合部分，或者，分别可指所述 OX40 结合部分和所述 PD-L1 结合部分。

例如，对于图 1A 中的结构，所述分离的抗原结合蛋白的第一多肽链可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，第二多肽链可包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，例如，该抗原结合蛋白可以为 KN052-2。例如，对于图 1A 中的结构，所述分离的抗原结合蛋白的第一多肽链可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，第二多肽链可包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列，例如，该抗原结合蛋白可以为 KN052-1。例如，对于图 1B 中的结构，所述分离的抗原结合蛋白的第一多肽链可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，第二多肽链可包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列，例如，该抗原结合蛋白可以为 KN052-4。例如，对于图 1B 中的结构，所述分离的抗原结合蛋白的第一多肽链可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，第二多肽链可包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列，例如，该抗原结合蛋白可以为 KN052-3。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白能够与细胞表面表达的 PD-L1 结合。所述细胞可以是能表达 PD-L1 的任何细胞，如 CHO 细胞或 A375 细胞。所述结合作用可采用本领域已知的方法检测，如 ELISA、流式细胞术、免疫印迹法。例如，在流式细胞术检测中，利用表达 hPD-L1 的 A375 细胞，本申请所述分离的抗原结合蛋白能与 PD-L1 结合，EC50 值可以在约 0.1nM 至约 100nM 之间，如在约 0.1nM 至约 50nM 之间、约 0.1nM 至约 30nM 之间、约 0.1nM 至约 20nM 之间、约 0.1nM 至约 10nM 之间、约 0.1nM 至约 5nM 之间或约 0.1nM 至约 1nM 之间。

在某些情形中，本申请所述分离的抗原结合蛋白能与细胞表面的 OX40 结合，所述细胞可以是能表达 OX40 的任何细胞，如 HEK293 细胞或 T 细胞。所述结合作用可采用本领域已

知的方法检测，如 ELISA、流式细胞术、免疫印迹法。例如，将本申请所述抗原结合蛋白与能够表达 OX40 的 HEL293 细胞共同孵育，进行流式细胞分析，结合的 EC50 值可以在约 0.1nM 至约 100nM 之间，如约 0.1nM 至约 50nM 之间、约 0.1nM 至约 30nM 之间、约 0.1nM 至约 20nM 之间、约 0.1nM 至约 15nM 之间、约 1nM 至约 15nM 之间或约 5nM 至约 10nM 之间。

本申请所述分离的抗原结合蛋白可以桥接表达 PD-L1 的细胞和表达 OX40 的细胞。在某些情形中，可以将本申请所述抗原结合蛋白与表达 PD-L1 的 CHO 细胞和表达 OX40 的 293 细胞混合，通过不同的荧光标记，检测桥接在一起的两种细胞占整体细胞的比例。例如，所述抗原结合蛋白可以使桥接细胞的比例增加约 5% 以上（例如，约 6% 以上、约 8% 以上、约 10% 以上、约 12% 以上、约 15% 以上、约 20% 以上或更大）。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白能够阻断 PD-1 和 PD-L1 的结合。在某些情形中，所述 PD-L1 可包括天然的 PD-L1 蛋白或其功能性片段、变体、同种型和物种同系物，以及与 PD-L1 具有至少一个共同表位的类似物，也可以是人工合成的。在某些情形中，所述 PD-L1 可以是 PDL1-Fc 融合的蛋白。所述阻断活性可以采用本领域已知的任何方法检测，如 ELISA、流式细胞术、免疫印迹法。在某些情形中，所述阻断活性可以采用 ELISA 检测。例如，当所述抗原结合蛋白浓度为约与须阻断的受体蛋白（PD1 蛋白）的浓度比为约 1:10 时，阻断活性可以为约 40% 以上（约 50% 以上、约 60% 以上、约 70% 以上或更大）。本申请所述抗原结合蛋白可以解除 PD1/PDL1 造成的抑制效果。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白具有 OX40 激动剂活性。在某些实施方案中，本申请所述分离的抗原结合蛋白可通过直接或间接与 T 细胞表面的 OX40 结合而使 OX40 由非活化状态转变为活化状态，或者由低活性状态转变为高活性状态，在某些方式中，可利用 NF- κ B 荧光素酶检测系统，首先，构建 OX40 转染载体，所述载体可以是质粒。再构建稳定表达荧光素酶的细胞系，如 293T 细胞系。然后将 OX40 质粒转染进入细胞，培养一段时间后加入待测抗体，最后检测荧光素酶活性。例如，所述抗原结合蛋白的体外激动剂活性与单纯的 OX40 抗体效果相当。

在本申请中涉及的蛋白质、多肽和/或氨基酸序列，还应理解为至少包含以下的范围：与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的变体或同源物。

在本申请中，所述变体可以为，在所述蛋白质和/或所述多肽的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如，所述功能性变体可包含已经通过至少 1 个，例如 1-30 个、1-20 个或 1-10 个，又例如 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变（例如取代、缺失或添加）之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如，所述功能性变体可

保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少 60%，70%，80%，90%，或 100% 的生物学活性（例如抗原结合能力）。例如，所述取代可以为保守取代。

在本申请中，所述同源物可以为，与所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 CD38 蛋白的抗体或其片段）的氨基酸序列具有至少约 85%（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”：将两条待比对的序列在比较窗中进行比较，确定两条序列中存在相同核酸碱基（例如，A、T、C、G）或相同氨基酸残基（例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met）的位置的数目以得到匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数（即，窗大小），并且将结果乘以 100，以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性百分数而进行的比对，可以按本领域已知的多种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign（DNASTAR）软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数，包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定：FASTA 和 BLAST。对 FASTA 算法的描述可以参见 W. R. Pearson 和 D. J. Lipman 的“用于生物学序列比较的改进的工具”，美国国家科学院院刊（Proc. Natl. Acad. Sci.），85：2444-2448，1988；和 D. J. Lipman 和 W. R. Pearson 的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”，Science，227：1435-1441，1989。对 BLAST 算法的描述可参见 S. Altschul、W. Gish、W. Miller、E. W. Myers 和 D. Lipman 的“一种基本的局部对比（alignment）搜索工具”，分子生物学杂志，215：403-410，1990。

分离的核酸分子、载体和细胞

在另一个方面，本申请还提供了分离的一种或多种核酸分子，所述一种或多种核酸分子可编码本申请所述分离的抗原结合蛋白。例如，所述一种或多种核酸分子中的每一个核酸分子可以编码完整的分离的抗原结合蛋白，也可以编码其中的一部分。

本申请所述的核酸分子可以是相互分离的，例如，其可以分别包含编码一种本申请所述分离的抗原结合蛋白或其一部分的核苷酸序列。本申请所述的核酸分子也可以同时包含多种编码本申请所述分离的抗原结合蛋白或其一部分的核苷酸序列。

在本申请中，所述核酸分子可以通过本领域常规的方法合成。例如，其可以通过以下方法产生或合成的：(i) 在体外扩增的，例如通过聚合酶链式反应（PCR）扩增产生的，(ii)

通过克隆重组产生的，(iii) 纯化的，例如通过酶切和凝胶电泳分级分离，或者 (iv) 合成的，例如，可以通过化学合成。在某些情形下，所述的核酸分子可以通过重组 DNA 技术制备。

在本申请中，可以通过本领域已知的多种方法来制备编码所述的抗体或其抗原结合片段的核酸，这些方法包括但不限于，采用限制性片段操作或采用合成性寡核苷酸的重叠延伸 PCR，具体操作可参见 Sambrook 等人，Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989；和 Ausubel 等人 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York N.Y., 1993。

在另一个方面，本申请提供了一种或多种载体，其包含本申请所述的一种或多种核酸分子。每种载体中可包含一种或多种所述核酸分子。此外，所述载体中还可包含其他基因，例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外，所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所熟知的，例如，可包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或 mRNA 翻译的其他控制元件等。本申请所述的一种或多种核酸分子可以与所述表达控制元件可操作地连接。

所述载体可以包括，例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者在例如遗传工程中通常使用的其他载体。例如，所述载体为表达载体。

在另一方面，本申请提供了一种细胞，所述细胞可包含本申请所述的一种或多种核酸分子和/或本申请所述的一种或多种载体。在某些实施方式中，每种或每个宿主细胞可包含一个或一种本申请所述的核酸分子或载体。在某些实施方式中，每种或每个宿主细胞可包含多个（例如，2 个或以上）或多种（例如，2 种或以上）本申请所述的核酸分子或载体。例如，可将本申请所述的载体引入所述细胞中，例如原核细胞（例如，细菌细胞）、CHO 细胞、NS/O 细胞、HEK293T 细胞或 HEK293A 细胞，或者其他真核细胞，如来自植物的细胞、真菌或酵母细胞等。可通过本领域已知的方法将本申请所述的载体引入所述细胞中，例如电穿孔、lipofectine 转染、lipofectamin 转染等。例如，所述宿主细胞可以为 COS、CHO、NSO、sf9、sf21、DH5a、BL21 (DE3) 或 TG1。

药物组合物、用途和方法

另一方面，本申请提供了一种免疫缀合物，其包含所述的分离的抗原结合蛋白。

另一方面，本申请提供了一种本申请所述分离的抗原结合蛋白或所述免疫缀合物在制备药物中的用途，其中所述药物可以用于治疗肿瘤。所述药物可用于抑制肿瘤或肿瘤细胞生长。其中所述肿瘤可选自下组：血液瘤和实体瘤。例如，黑色素瘤、白血病、结肠癌。例如，本申

请的药物可以抑制或延缓疾病的发展或进展，可以减小肿瘤大小（甚至基本消除肿瘤），和/或可以减轻和/或稳定疾病状态。抑制肿瘤或肿瘤细胞生长的实例包括：相对于干预之前的相应水平，肿瘤生长体积减小。减小的程度可以是至少 50%，例如至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 100%、至少 120%、至少 150%或至少 200%。

另一方面，本申请还提供了一种所述分离的抗原结合蛋白或所述的免疫缀合物在制备药物中的用途，所述药物可用于治疗受试者的病毒性感染。在某些情形中，所述病毒性感染可以是慢性病毒感染。慢性病毒感染的例子有乙型肝炎病毒感染（HBV）、流感病毒感染或 Epstein-Barr 病毒（EBV）。

另一方面，本申请提供了所述的分离的抗原结合蛋白或所述的免疫缀合物在制备药物中的用途，所述药物可用于治疗受试者的细菌和/或真菌性感染。细菌和/或真菌性感染可以包括全身炎症反应综合征、脓毒症和/或严重脓毒症。在某些情形中，细菌和/或真菌性感染可以包括脓毒症。

所述药物可以提高所述受试者的免疫响应，如，T 细胞的免疫响应。提高的 T 细胞免疫响应可以通过例如处理的 T 细胞或来自处理的受试者的 T 细胞被高度活化来证实。所述 T 细胞可包括 CD4⁺T 细胞和/或 CD8⁺T 细胞。T 细胞活化可以通过刺激 PBMC 分化为 T 细胞或激活的 T 细胞分泌细胞因子来评价。例如，细胞因子可以是 IL-2、IL21 和/或 IFN- γ 。在某些情形中，可以使用病毒抗原刺激 PBMC，然后使用 ELISA 法检测细胞因子的分泌。

另一方面，本申请提供了一种药物组合物，其包含所述分离的抗原结合蛋白，所述的免疫缀合物，所述的分离的核酸分子，所述的载体或者所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载体。所述药学上可接受的佐剂可以包括缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属复合物和/或非离子表面活性剂等。

在本申请中，所述药物可被配制用于口服给药，静脉内给药，肌肉内给药，在肿瘤部位的原位给药，吸入，直肠给药，阴道给药，经皮给药或通过皮下储存库给药。例如，对于注射制剂，药物组合物可以被制备成例如一次剂量的剂型的安瓿瓶或例如多剂量容器的单元型剂型。药物组合物还可以被制备成溶液，悬浮液，药片，药丸，胶囊和长效制剂。

本申请所述的药物可以包含预防和/或治疗有效量的所述抗体、其抗原结合片段。所述预防和/或治疗有效量是能够预防和/或治疗（至少部分治疗）患有或具有发展风险的受试者中的疾病或病症和/或其任何并发症而所需的剂量。本申请所述的药物组合物的给药剂量和频率由活性成分的类型和其他各种因素共同决定，包括待治疗的疾病，给药途径，患者的年龄，性别和体重以及疾病严重程度等。除了药物给药途径和治疗频率之外，还应考虑各种因素，包括患者的年龄，体重，健康状况，性别，疾病严重程度，饮食和代谢速率来确定药物的有效

剂量。鉴于此，针对特定情况的使用，本领域技术人员可以容易地确定本文公开的药物组合物的有效剂量。本文公开的药物组合物不特别限于剂型，给药途径和方式，只要其显示出有效性即可。

另一方面，本申请所述的抗原结合蛋白、核酸分子、载体、组合物或细胞可以用于治疗所述肿瘤。

另一方面，本申请提供了所述的抗原结合蛋白，所述的核酸分子，所述的载体，所述的组合物，或所述的细胞，其可以治疗肿瘤。

另一方面，本申请还提供了一种抑制肿瘤或肿瘤细胞生长的方法，包含以下步骤：施用本申请所述的分离的抗原结合蛋白。其中所述肿瘤可选自下组：血液瘤和实体瘤。例如，黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、消化道癌、消化腺癌、肺癌、头颈癌、肉瘤、生殖腺癌等。

另一方面，本申请还提供了一种治疗肿瘤的方法，包含以下步骤：施用本申请所述的分离的抗原结合蛋白，所述的免疫缀合物，或所述药物组合物。另一方面，本申请还提供了一种治疗病毒性感染的方法，包含以下步骤：施用本申请所述的分离的抗原结合蛋白，所述的免疫缀合物，或所述药物组合物。另一方面，本申请还提供了一种治疗细菌和/或真菌性感染的方法，其包括以下步骤：向有需要的受试者施用所述的分离的抗原结合蛋白。

本申请所述的药物组合物的给药剂量和频率由活性成分的类型和其他各种因素共同决定，包括待治疗的疾病，给药途径，患者的年龄，性别和体重以及疾病严重程度等。除了药物给药途径和治疗频率之外，还应考虑各种因素，包括患者的年龄，体重，健康状况，性别，疾病严重程度，饮食和代谢速率来确定药物的有效剂量。鉴于此，针对特定情况的使用，本领域技术人员可以容易地确定本文公开的药物组合物的有效剂量。本文公开的药物组合物不特别限于剂型，给药途径和方式，只要其显示出有效性即可。

另一方面，本申请还提供了一种提高有需要的受试者中免疫效应的方法，包含以下步骤：向所述受试者施用本申请所述的分离的抗原结合蛋白。提高的免疫效应可包括例如提高的体液免疫效应（又可称为，抗体依赖性）和/或细胞免疫效应（又可称为，非抗体依赖性）。提高的体液免疫效应可以通过显示处理的受试者中的抗体滴度升高（例如，通过 ELISA 试验的）证实。提高的细胞免疫效应可以通过例如处理的 T 细胞或来自处理的受试者的 T 细胞被高度活化来证实。T 细胞活化可以通过刺激 PBMC 分化为 T 细胞或激活的 T 细胞分泌细胞因子来评价。例如，细胞因子可以是 IL-2。

实施例

给出下述实施例仅仅是为了阐释本申请的分离的抗原结合蛋白和用途等，而不适用于限制本申请发明的范围，也不意欲表示下述试验是进行的全部和唯一的试验。已经进行了努力以确保所用数值（例如数量、温度等）的准确性，但是应当考虑到某些实验误差和偏差。除非另有说明，否则份数为重量份，分子量为重均分子量，温度为摄氏温度，压力为常压或接近常压。可以使用标准缩写词，例如 bp，碱基对；kb，千碱基对； μ l，微微升；s 或 sec，秒；min，分钟；h 或 hr，小时；aa，氨基酸；nt，核苷酸；iv，静脉注射；i.m.，肌肉内；i.p.，腹膜内；s.c.，皮下等。

实施例 1 分离的抗原结合蛋白的制备

作为实例，产生下述本发明的分离的抗原结合蛋白：KN052-1、KN052-2、KN052-3 和 KN052-4。氨基酸序列如下表 2 所示。

表 2 本申请所述抗原结合蛋白的氨基酸序列

	第一多肽链	第二多肽链
KN052-1	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 18
KN052-2		SEQ ID NO: 17
KN052-3		SEQ ID NO: 20
KN052-4		SEQ ID NO: 19

将上述 KN052-1、KN052-2、KN052-3、KN052-4 的序列克隆到表达载体 pCDNA4 (Invitrogen, Cat V86220) 中，分别得到相应的重组表达载体。然后，用这些重组表达载体转染 HEK293 细胞，进行重组蛋白表达。简而言之，将质粒用 Freestyle293 培养基稀释，其中加入 PEI (聚乙烯亚胺) 溶液。将每种质粒/ PEI 溶液加入到 HEK293 细胞悬液中，并在 37°C、10% CO₂、90rpm 下培养 5-6 天。收集上清液，并使用 A 蛋白亲和色谱纯化，分别得到纯化的分离的抗原结合蛋白。

实施例 2 结合活性的检测

2.1 体外结合 A375-hPD-L1 细胞

将 A375-hPD-L1 细胞（具有恒定表达人 PD-L1 蛋白的 A375 细胞系，将人 PD-L1 的表达盒稳定地转染到 A374 细胞系中产生）密度调节为 4×10^6 细胞/mL，加入 96 孔板。再加入稀释到一定浓度的实施例 1 得到的待测抗体。抗 PD-L 抗体 KN035（抗体序列：SEQ ID NO. 64）为阳性对照。在结合和洗涤过程之后，将样品载入流式细胞仪进行分析，以测量荧光强度中

位值 (MFI)。

结果如图 2 所示, 相比于 KN035, 本申请所述的分离的抗原结合蛋白 KN052-1、KN052-2、KN052-3 和 KN052-4 均表现出良好的 PD-L1 结合能力, 且 PD-L1 结合部分与 OX-40 结合部分的连接位置和连接方式不影响结合 PD-L1 的能力。

2.2 体外结合 HEK293-OX40 细胞

将 HEK293-OX40 细胞(具有瞬时表达人 OX40 蛋白的 HEK293 细胞系, 其通过将人 OX40 表达盒瞬时转染到 HEK293 细胞系中产生)的密度调节为 4×10^6 细胞/ml, 加入 96 孔板。再加入稀释到一定浓度的待测抗体。抗 OX-40 抗体 DF004 (重链: SEQ ID NO: 8, 轻链: SEQ ID NO: 16) 为阳性对照, 为人工合成。在结合和洗涤过程之后, 将样品载入流式细胞仪进行分析, 以测量荧光强度中位值 (MFI)。

结果如图 3 所示, 相比于 DF004, 本申请所述的分离的抗原结合蛋白均表现出良好的 OX40 结合能力。

2.3 体外结合活化的 T 细胞

利用人淋巴细胞分离液 (天津灏洋) 密度梯度离心从健康捐献者外周血中分离外周血单个核细胞 PBMC, 接种到 RPMI 完全培养基中。用终浓度为 200ng/ml 的 SEB 活化 PBMC 4 天。将细胞重悬于 3% PBS-BSA Buffer 中, 加入不同浓度待测抗体, 室温孵育 60 min。洗涤后加入 biolegend 二抗 APC anti-hIgG, 以及 Alexa Fluor 405-anti-CD3 (life technologies, 货号 CD0326), Alexa Fluor 488-anti-CD4 (life technologies, 货号 mhcd0420) 和 APC-Alexa Fluor 750-anti-CD8 (life technologies, 货号 mhcd0827), 冰上孵育 20min。洗涤后将细胞重悬于 500 μ l 1% PBS-BSA Buffer 中, 流式细胞仪进行检测。

结果如图 4A-4B 所示, KN052-1、KN052-2 可以很好的结合活化的 CD4⁺T 细胞 (图 4A) 和 CD8⁺T 细胞 (图 4B), 且强于对照抗体 KN035 和 DF004。说明 KN052-1、KN052-2 都可以结合 OX40。

实施例 3 细胞桥接实验

将表达 PD-L1 的 CHO 细胞, 以及表达 OX40 的 293 细胞混合, 随后加入 KN052 蛋白, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。抗 PD-L1 抗体 KN035 与抗 OX40 抗体 DF004 的等摩尔混合组作为阴性对照组。之后通过不同的荧光标记, 考察被本申请所述抗原结合蛋白桥接在一起的两种细胞占整体细胞的比例。

结果如图 5 所示, KN052 蛋白可以有效的将分别表达 PDL1 以及 OX40 的两种细胞桥接起来。而单纯的抗 PD-L1 抗体与抗 OX40 抗体的混合物则无法达成这一结果。

实施例 4. NF- κ B 系统检测抗体体外激动剂 (agonist) 活性

构建 OX40-CD40 质粒：根据蛋白数据库 Uniprot 上人 OX40 的氨基酸序列 (P43489)，得到人 OX40 胞外结构域的和跨膜区氨基酸序列 (即 P43489 中第 1 位残基至 235 位残基)；根据蛋白数据库 Uniprot 上人 CD40 氨基酸序列 (P25942)，得到人 CD40 的胞内段氨基酸序列 (即 P25942 中第 216 位残基至 277 位残基)；通过基因合成的方法将两者拼接到一起，再经 Fermentas 公司的 HindIII 与 EcoRI 双酶切亚克隆到商业化载体 pcDNA4/myc-HisA (Invitrogen, V863-20) 中，测序验证构建质粒的准确性，获得重组质粒 DNA 即：pcDNA4-OX40-CD40 (即下文中提到的 OX40-CD40)。

293T-NF- κ B 稳定细胞系：293T 细胞接种 24 孔板， 1×10^5 /well，每孔 200 μ l DMEM 完全培养基，同时加入 20 μ l NF- κ B-荧光素酶-lentivirus (Qiagen, cat: CLS-013L)，MOI=2。感染 24h 之后，弃去上清，加入 1ml DMEM 完全培养基继续培养，24h 后，换用含 0.3 μ g/ml 嘌呤霉素的 DMEM 完全培养基继续培养，培养扩大细胞并冻存。用嘌呤霉素筛选的 293T-NF- κ B 细胞接种 24 孔板， 1×10^5 /well，10ng/ml TNF- α 刺激 6h 后，裂解细胞检测荧光素酶，结果显示，TNF- α 刺激过的细胞荧光素酶值明显高于未刺激的细胞，证明 NF- κ B-荧光素酶已经稳转进 293T 细胞。

用不含双抗的培养基重悬 5×10^5 个 293T-NF- κ B 细胞，接种于 6 孔板中。24h 后，弃上清，并用 PBS 清洗一遍，加入 1.8ml 的无双抗无血清的培养液。以质粒：脂质体=1:3 的比例，转染 0.2 μ g OX40-CD40 质粒。转染 4h 后，弃上清，换成新鲜完全培养液，继续培养。转染次日，将细胞以 5×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板，加入一系列浓度梯度的抗体 (初浓度 10 μ g/ml，10 倍稀释 7 个梯度)，37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后裂解细胞检测荧光素酶。

如图 6 所示，为待测抗体浓度取 log 之后的体外激动剂活性检测结果图。结果显示 KN052 (无论连接子长短和两个结合部分的连接位置) 在体外均有良好的激动活性，且与抗 OX-40 抗体 DF004 效果相当。

实施例 5 阻断 PD1 和 PDL1 的结合

PDL1-Fc 融合蛋白 4 $^{\circ}$ C 过夜包被，之后每孔加入 100 μ L 梯度稀释的待测蛋白 KN052-1、KN052-2、KN052-3 和 KN052-4，稀释液中含有 100 μ g/mL PD1-Fc-Biotin，室温下反应 1 小时。之后加入 SA-HRP (购自 Sigma 公司)，室温反应 1 小时。之后加入显色液，405nm 波长读取吸收值。

应用软件 SotfMax Pro v5.4 进行数据处理和作图分析，通过四参数拟合，得到抗体对 PDL1-

PD1 阻断曲线及 IC₅₀ 值。结果见图 7，由此可知 KN052-1、KN052-2、KN052-3 和 KN052-4 能有效阻断 PDL1 和 PD1 之间的相互作用。

实施例 6 阻断 PD-L1 和 CD80 的结合

CD80-Fc 蛋白由 HEK293 细胞表达获得。利用 Thermo 公司的 Biotinlytion 试剂盒，得到生物素化的蛋白 CD80-Fc-Biotin。

PDL1-Fc 融合蛋白 4℃过夜包被，之后每孔加入 100 μL 梯度稀释的待测蛋白 KN052-1,2,3,4（稀释液中含有 300 μg/mL CD80-Fc-Biotin），室温下反应 1 小时。之后加入 SA-HRP（购自 Sigma 公司），室温反应 1 小时。之后加入显色液，405nm 波长读取吸收值。

应用软件 SotfMax Pro v5.4 进行数据处理和作图分析，通过四参数拟合，得到抗体对 PDL1-CD80 的阻断曲线及 IC₅₀ 值。结果显示 KN052-1、KN052-2、KN052-3 和 KN052-4 能有效阻断 PDL1-CD80 之间的相互作用。

实施例 7 在 NFAT 系统中有效解除 PD1/PDL1 造成的抑制效果

使用 10%FBS+F-12K+G418+HB 重悬 PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞（CHO-K1 细胞，稳定表达人 PD-L1 和一种能以不依赖于抗原方式激活同源 TCR 的细胞表面蛋白，Promega），调整细胞数至 4×10^5 cells/ml，每孔加入 50 μl 细胞悬液，同时加入 50 μl 培养基过夜培养。用 F-12K+2%FBS 配制不同浓度水平的抗 PD-L1 抗体 KN035 或 KN052 抗体：最高 10nM（终浓度：5000 pM），2 倍稀释，8 个浓度，弃旧培养基，每孔加入 50 μl 药物，培养箱孵育 90min。收集 Jurkat-PD1-NFAT 细胞（Promega），使用 1640+2%FB 调整细胞数 8×10^5 cells/ml，每孔加入 50 μl，培养箱共孵育 6 小时。每孔加入 10 μl 的荧光素酶检测底物，荧光酶标仪检测。

结果如图 8 所示，KN052 能有效解除 PD1-PDL1 结合造成的抑制作用。

实施例 8 检测本申请所述的分离的抗原结合蛋白的 ADCC 活性

以改造的 Jurkat 细胞（加入 CD16a 受体，同时在 NFAT 通路上构建荧光素酶标签，购自 Promega）作为效应细胞，细胞数为 1×10^5 细胞/孔；以分别表达 PD-L1 和 OX40 的 HEK293 细胞（分别通过将人 PD-L1 或 OX40 表达盒瞬时转染到 HEK293 细胞系中产生）为靶细胞，细胞数为 2.5×10^4 细胞/孔，37℃培养 5 小时后使用荧光底物检测荧光素酶的产生。

结果如图 9 所示，图 9A 为 KN052-1 对 ADCC 活性的影响，图 9B 为 KN052-3 对 ADCC 活性的影响。结果显示，待测抗体均有 ADCC 活性。比较 9A 和 9B 可以看出，PD-L1 结合部分融合在 OX40 结合部分的 N 端或是 C 端，对 ADCC 活性影响的差异不是很明显。

实施例 9 对 PBMC 的激活作用

检验本申请的分离的抗原结合蛋白在刺激免疫应答中的体外活性，如通过 PBMC 细胞分泌 IL-2 所显示的。简而言之，从各种健康供体分离 PBMC，并分别用 200 ng/mL 浓度的金黄色葡萄球菌肠毒素 B (SEB) 培养。加入不同浓度 (0.015 nM、0.15 nM、1.5 nM、15 nM、0.3906 nM、3.125 nM、25 nM 和 200 nM) 的所述分离的抗原结合蛋白 (KN052-1、KN052-2、KN052-3 或 KN052-4) 或对照分子 (DF004、KN035、KN035+DF004)。在培养 5 天之后，收集上清液，并用人 IL-2 DuoSet ELISA 试剂盒分析 IL-2 水平。

结果如图 10 所示。图 10A-10D 显示来自四个不同的供体的 PBMC 得到的结果。可以看出，本申请的分离的抗原结合蛋白 KN052-1、KN052-2、KN052-3 和 KN052-4 在增强免疫应答方面的能力比对照分子或对照分子的组合显著增强，说明具有强协同作用。

实施例 10 评价本申请所述的分离的抗原结合蛋白在 MC38-hPD-L1 双敲入小鼠模型中的抗肿瘤功效

将人 OX40 和 PD-L1 基因敲入 C57BL/6 小鼠，产生人源化的双敲入 (KI) 小鼠。此外，通过用人 PD-L1 替代小鼠 PD-L1 构建小鼠结肠癌 hPD-L1-MC38 细胞系 (恒定地表达人 PD-L1 蛋白的 MC38 细胞系，其通过将人 PD-L1 表达盒稳定地转染到 MC38 细胞系中产生)。给双敲入小鼠的右前腹侧皮下接种 MC38-hPD-L1 肿瘤细胞 (5×10^5 个)，得到 hPD-L1-MC38 双敲入小鼠模型。当平均肿瘤尺寸达到约 60-65 mm³ 时，将小鼠分组，每组 6 只。将本申请所述的分离的抗原结合蛋白 (例如，KN052-2) 或对照溶液 (例如，PBS 溶液) 经腹腔注射至所述小鼠，给药的具体时间点为平均肿瘤尺寸达到约 60-65 mm³ 的当天 (即第 0 天)、之后的第 4 天、第 7 天和第 11 天。定期测量肿瘤体积。

结果如图 11A-11D 和表 2 所示。其中，图 11A 显示的是施用 PBS 溶液、0.3mg/kg 的 KN052-2、3mg/kg 的 KN052-2 后不同时间后每组小鼠的平均肿瘤体积；图 11B 显示的是施用 PBS 溶液的组每只小鼠的肿瘤体积；图 11C 显示的是施用 0.3mg/kg 的 KN052-2 的组每只小鼠的肿瘤体积，其中 CR=1/6；图 11D 显示的是施用 3mg/kg 的 KN052-2 的组每只小鼠的肿瘤体积，其中 CR=5/6。下表 3 显示的是首次给药后 25 天后的肿瘤生长抑制率。从结果可以看出，在 0.3mg/kg 或 3mg/kg 的剂量下，本申请的分离的抗原结合蛋白 KN052-2 具有显著的抗肿瘤活性，且存在剂量依赖性；当剂量为 3mg/kg 时，KN052-2 在首次给药后 25 天后完全抑制肿瘤生长。

表 3 25 天时的肿瘤生长抑制率 (TGI)

KN052-2 剂量	0.3 mg/kg	3 mg/kg
TGI (%)	63.98	99.83

实施例 11 评价本申请所述的分离的抗原结合蛋白在野生型 MC38(不表达人的 PD-L1) 双敲入小鼠模型中的抗肿瘤功效

将人 OX40 和 PD-L1 基因敲入 C57BL/6 小鼠，产生人源化的双敲入 (KI) 小鼠。将野生型 MC38 肿瘤细胞通过右前腹侧皮下接种至双敲入小鼠 (3×10^5 个) 得到，得到不表达 PD-L1 的 MC38 双敲入小鼠模型。当平均肿瘤尺寸达到约 $60-65 \text{ mm}^3$ 时，将小鼠分组，每组 6 只。将本申请所述的分离的抗原结合蛋白 (例如，KN052-2) 或对照溶液 (例如，PBS 溶液) 经静脉注射至所述小鼠，给药的具体时间点为平均肿瘤尺寸达到约 $60-65 \text{ mm}^3$ 的当天 (即第 0 天)、之后的第 4 天、第 7 天和第 11 天。定期测量肿瘤体积。

结果如图 12A-12E 所示。其中，图 12A 显示的是施用 PBS 溶液、0.5mg/kg 的 KN052-2)、3mg/kg 的 KN052-2 和 15mg/kg 的 KN052-2 后不同时间后每组小鼠的平均肿瘤体积；图 12B 显示的是施用 PBS 溶液的组的 6 只小鼠中每只小鼠的肿瘤体积；图 12C 显示的是施用 0.5mg/kg 的 KN052-2 的组中 6 只小鼠的每只小鼠的肿瘤体积；图 12D 显示的是施用 3mg/kg 的 KN052-2 的组中 6 只小鼠的每只小鼠的肿瘤体积；图 12E 显示的是施用 15mg/kg 的 KN052-2 的组中 6 只小鼠的每只小鼠的肿瘤体积。从结果可以看出，本申请的分离的抗原结合蛋白 KN052-2 在不表达人 PD-L1 的肿瘤中同样具有抗肿瘤活性，且存在剂量依赖性。

将人 OX40 和 PD-L1 基因敲入 C57BL/6 小鼠，产生人源化的双敲入 (KI) 小鼠。将野生型 MC38 肿瘤细胞通过右前腹侧皮下接种至双敲入小鼠 (3×10^5 个) 得到，得到不表达 PD-L1 的 MC38 双敲入小鼠模型。当平均肿瘤尺寸达到约 $50-70 \text{ mm}^3$ 时，将小鼠分组，每组 6 只。将本申请所述的分离的抗原结合蛋白 (例如，5mg/kg 的 KN052-2, G3) 或对照溶液 (例如，PBS 溶液, G1) 或对照组合药 (如 2.3mg/kg 的 KN035 与 4.2mg/kg 的 DF004 组合, G2) 经静脉注射至所述小鼠，给药的具体时间点为平均肿瘤尺寸达到约 $50-70 \text{ mm}^3$ 的当天 (即第 0 天)、之后的第 4 天、第 6 天、第 7 天、第 9 天和第 10 天。定期测量肿瘤体积。

结果见图 12F，可以看到在等摩尔剂量给药下，双特异性的本申请的分离的抗原结合蛋白 KN052-2 的抑瘤效果优于其母本单特异性抗体 KN035+DF004 的联合用药。

实施例 12 药代动力学试验

单次静脉给予食蟹猴 (苏州西山中科) KN052-1 1 mg/kg、10mg/kg，每个剂量组动物为

2 只，雌雄各半，于给药前和静脉注射结束后 0.083、2、4、8、24、48、72（3 天）、120（5 天）、168（7 天）、216（9 天）、264（11 天）、336（14 天）、504（21 天）、672（28 天）经股静脉采集所需血样，分离血清，Elisa 法测定食蟹猴血清中 KN052-1 的浓度，并用 DAS (3.2.8) 软件计算药代动力学参数。

结果如表 4 所示，KN052-1 在食蟹猴体内半衰期为 69~99 小时。

表 4 PK 分析

	剂量：1mg/kg		剂量：10mg/kg	
	雌	雄	雌	雄
半衰期 $t_{1/2}$ (h)	99	71	69	95
C _{max} (μg/L)	29942	26045	318177	224148
AUC(0-t) (μg/L*h)	1622882	1088052	13021571	13825759

实施例 13 抗病毒感染活性检测

选取慢性乙肝（CHB）患者，年龄在 20 岁-60 岁之间，记录完整的临床信息并签署知情同意书。采集上述 CHB 患者的外周血 10mL，分离 PBMC 后液氮保存细胞。

包含不同亚型乙肝表面抗原序列的多肽库（sAg 多肽库），以及乙肝 c 抗原多肽库（cAg 多肽库），分别参照本领域已知的方法（请参见 Chen L, et al. J Immuno, 2007）进行合成。

使用 R&D 的 ELISpot 试剂盒进一步考察上述 PBMC 在 KN052 的刺激下，分泌 IFN γ 、IL2 以及 TNF α 的情况。所使用的试剂盒依次为：Human IFN-gamma ELISpot Kit (Lot#: EL285)；Human IL-2 ELISpot Kit (Lot#: EL202)；Human TNF-alpha ELISpot Development Module (Lot#: SEL210)。

来自不同的病人的 PBMC 分别用 sAg 多肽库，cAg 多肽库，非特异性佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯（phorbol myristate acetate, PMA）或是单纯的培养基预刺激；之后加入 KN052 蛋白，或是同型对照进一步刺激。之后根据 R&D 说明书进行实验操作，通过 ELISpot 的方式考察不同刺激条件下分泌 IFN γ 、IL2 以及 TNF α 的情况。

结果显示，KN052 刺激后的细胞因子分泌增加。

实施例 14 脓毒症模型药效检测

本实验的目的是考察 KN052 对盲肠结扎穿孔（CLP）脓毒症模型小鼠的 7 天生存率。本实验采用 6~8 周大的 PDL1/OX40 人源化小鼠，根据体重将小鼠随机分为 4 组：假手术组

(Sham 组)、CLP 模型对照组 (CLP 组)、CLP 模型+注射 KN052 实验组 (KN035 给药组) 和 CLP 模型+注射同型对照抗体组 (Isotype 给药组)。CLP 造模如下述: 盲肠结扎长度为 1.5cm, 结扎完毕用 25G 无菌针头对结扎的盲肠进行穿刺用以造模。在造模 3h 后通过腹腔注射给药 sham 组和 CLP 组小鼠各 200ul 生理盐水, 分别给予 KN052 给药组和 Isotype 给药组小鼠 50 μ g KN035 和 Isotype。给药后观察小鼠的 7 天生存率, 观察过程从手术及当天开始, 记为 0 天, 以后每 24h 为一个观察时间点, 记录每组存活的小鼠, 计算各组小鼠 7d 生存率 (%) 并绘制生存曲线。

结果表明, Isotype 组小鼠的生存率和 CLP 组小鼠相比, 没有显著差异; 而 KN052 给药组小鼠与 CLP 模型组小鼠相比, 其生存率大幅度提高。

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的, 并非要限制所附权利要求的范围。目前本申请所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的, 且保留在所附的权利要求和其等同方案的范围内。

权 利 要 求 书

1. 分离的抗原结合蛋白，其包含 PD-L1 结合部分和 OX40 结合部分，其中：
所述 OX40 结合部分能够识别和/或结合人 OX40 细胞外结构域中的氨基酸残基 G70 和/或 F71，
其中所述人 OX40 细胞外结构域包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列；
所述 PD-L1 结合部分能够识别和/或结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域中的氨基酸残基 I54，
Y56，E58，Q66 和/或 R113，且其中所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域包含 SEQ ID NO: 2
所示的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 PD-L1 结合部分还能够结
合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域中的氨基酸残基 D61，N63，V68，M115，S117，Y123 和/
或 R125，且其中所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 PD-L1 结合部分
能够结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域的构象表位，所述构象表位包含所述人 PD-L1 的 N
末端 IgV 结构域中的氨基酸残基 I54，Y56，E58，Q66 和 R113，且其中所述人 PD-L1 的 N 末
端 IgV 结构域包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 PD-L1 结合部分
能够结合人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域的构象表位，所述构象表位包含所述人 PD-L1 的 N
末端 IgV 结构域中的氨基酸残基 I54，Y56，E58，Q66，R113，D61，N63，V68，M115，S117，
Y123 和 R125，且其中所述人 PD-L1 的 N 末端 IgV 结构域包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸
序列。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 OX40 结合部分
能够结合人 OX40 细胞外结构域的构象表位，所述构象表位包含所述人 OX40 细胞外结构域
中的氨基酸残基 G70 和 F71，且其中所述人 OX40 细胞外结构域包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨
基酸序列。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 PD-L1 结合部分
能够与 PD-L1 参比抗体竞争结合人 PD-L1，其中所述 PD-L1 参比抗体包含重链可变结构域
VH2，且所述 VH2 包含 H2CDR3，所述 H2CDR3 包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。
7. 根据权利要求 6 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 PD-L1 参比抗体的 H2CDR3
包含 SEQ ID NO: 39-45 中任一项所示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 6-7 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 PD-L1 参比抗体
的 VH2 包含 H2CDR1，所述 H2CDR1 包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 8 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 PD-L1 参比抗体的 H2CDR1
包含 SEQ ID NO: 21-29 中任一项所示的氨基酸序列。

10. 根据权利要求 6-9 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 PD-L1 参比抗体的 VH2 包含 H2CDR2, 所述 H2CDR2 包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 10 所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 PD-L1 参比抗体的 H2CDR2 包含 SEQ ID NO: 30-38 中任一项所示的氨基酸序列。

12. 根据权利要求 6-11 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 PD-L1 参比抗体的 VH2 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。

13. 根据权利要求 6-12 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 PD-L1 参比抗体的 VH2 包含 SEQ ID NO: 46-59 中任一项所示的氨基酸序列。

14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 OX40 结合部分与 OX40 参比抗体竞争结合人 OX40,其中所述 OX40 参比抗体包括重链 H1CDR3, 所述重链 H1CDR3 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 14 所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 OX40 参比抗体包括重链 H1CDR1, 所述重链 H1CDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

16. 根据权利要求 14-15 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 OX40 参比抗体包括重链 H1CDR2, 所述重链 H1CDR2 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

17. 根据权利要求 14-16 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 OX40 参比抗体包括重链可变结构域 VH1, 所述 VH1 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

18. 根据权利要求 14-17 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 OX40 参比抗体包括轻链 L1CDR1, 所述 L1CDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

19. 根据权利要求 14-18 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 OX40 参比抗体包括轻链 L1CDR2, 所述 L1CDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

20. 根据权利要求 14-19 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 OX40 参比抗体包括轻链 L1CDR3, 所述 L1CDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

21. 根据权利要求 14-20 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 OX40 参比抗体包括轻链可变结构域 VL1, 所述 VL1 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 PD-L1 结合部分包含重链可变结构域 VH2, 且所述 VH2 包含 H2CDR3, 且所述 H2CDR3 包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列。

23. 根据权利要求 22 所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 PD-L1 结合部分的 H2CDR3 包含 SEQ ID NO: 39-45 中任一项所示的氨基酸序列。

24. 根据权利要求 22-23 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述 PD-L1 结合部

分的 VH2 包含 H2CDR1, 所述 H2CDR1 包含 SEQ ID NO: 60 所示的氨基酸序列。

25. 根据权利要求 24 所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 PD-L1 结合部分的 H2CDR1 包含 SEQ ID NO: 21-29 中任一项所示的氨基酸序列。

26. 根据权利要求 22-25 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 PD-L1 结合部分的 VH2 包含 H2CDR2, 所述 H2CDR2 包含 SEQ ID NO: 61 所示的氨基酸序列。

27. 根据权利要求 26 所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 PD-L1 结合部分的 H2CDR2 包含 SEQ ID NO: 30-38 中任一项所示的氨基酸序列。

28. 根据权利要求 22-27 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 PD-L1 结合部分的 VH2 包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。

29. 根据权利要求 22-28 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 PD-L1 结合部分的 VH2 包含 SEQ ID NO: 46-59 中任一项所示的氨基酸序列。

30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 PD-L1 结合部分为单域抗体。

31. 根据权利要求 1-30 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 PD-L1 结合部分包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。

32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 PD-L1 结合部分包含 SEQ ID NO: 46-59 中任一项所示的氨基酸序列。

33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 OX40 结合部分包括重链 H1CDR3, 所述重链 H1CDR3 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 OX40 结合部分包括重链 H1CDR1, 所述重链 H1CDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 OX40 结合部分包括重链 H1CDR2, 所述重链 H1CDR2 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

36. 根据权利要求 1-35 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 OX40 结合部分包括重链可变结构域 VH1, 所述 VH1 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 OX40 结合部分包括轻链 L1CDR1, 所述 L1CDR1 包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

38. 根据权利要求 1-37 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 OX40 结合部分包括轻链 L1CDR2, 所述 L1CDR2 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

39. 根据权利要求 1-38 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白, 其中所述 OX40 结合部分包括轻链 L1CDR3, 所述 L1CDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

40. 根据权利要求 1-39 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 OX40 结合部分包括轻链可变结构域 VL1，所述 VL1 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

41. 根据权利要求 1-40 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 OX40 结合部分包括轻链恒定区，所述轻链恒定区源自 Igκ 或 Igλ。

42. 根据权利要求 41 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。

43. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 OX40 结合部分包括 Fab 结构域。

44. 根据权利要求 1-43 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其还包含重链恒定区，且所述重链恒定区源自 IgG。

45. 根据权利要求 44 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述重链恒定区源自人 IgG1 或人 IgG4。

46. 根据权利要求 44-45 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

47. 根据权利要求 1-46 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 PD-L1 结合部分位于所述 OX40 结合部分的 N 端。

48. 根据权利要求 1-46 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 PD-L1 结合部分位于所述 OX40 结合部分的 C 端。

49. 根据权利要求 1-47 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 OX40 结合部分包含抗体重链 H1，且所述 PD-L1 结合部分与所述 H1 的 N 末端直接或间接融合。

50. 根据权利要求 1-48 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 OX40 结合部分包含抗体重链 H1，且所述 PD-L1 结合部分与所述 H1 的 C 末端直接或间接融合。

51. 根据权利要求 1-50 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含第一多肽链和第二多肽链，其中，所述第一多肽链包含所述 OX40 结合部分的轻链可变结构域 VL1，所述第二多肽链包含所述 OX40 结合部分的重链可变结构域 VH1 和所述 PD-L1 结合部分。

52. 根据权利要求 51 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一多肽链包含所述 OX40 结合部分的轻链 L1。

53. 根据权利要求 51-52 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

54. 根据权利要求 51-53 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二多肽链包含所述 OX40 结合部分的重链 H1 和所述 PD-L1 结合部分。

55. 根据权利要求 54 所述的分离的抗原结合蛋白，其中在所述第二多肽链中，所述重链 H1 的 N 末端与所述 PD-L1 结合部分的 C 末端直接或间接连接。

56. 根据权利要求 54 所述的分离的抗原结合蛋白，其中在所述第二多肽链中，所述重链 H1 的 C 末端与所述 PD-L1 结合部分的 N 末端直接或间接连接。

57. 根据权利要求 54-56 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述重链 H1 与所述 PD-L1 结合部分通过连接子连接。

58. 根据权利要求 57 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述连接子为肽连接子。

59. 根据权利要求 57-58 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述连接子包含 SEQ ID NO: 14-15 中任一项所示的氨基酸序列。

60. 根据权利要求 51-59 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第二多肽链包含 SEQ ID NO: 17-20 中任一项所示的氨基酸序列。

61. 根据权利要求 51-60 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述分离的抗原结合蛋白包含 2 条所述第一多肽链以及 2 条所述第二多肽链。

62. 根据权利要求 1-61 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其具有对称的结构。

63. 根据权利要求 1-62 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其能够阻断 PD-1 和 PD-L1 的结合。

64. 根据权利要求 1-63 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其能够阻断 PD-L1 与 CD80 的结合。

65. 根据权利要求 1-64 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其具有 OX40 激动剂活性。

66. 免疫缀合物，其包含权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

67. 分离的一个或多个核酸分子，其编码权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求 65 所述的免疫缀合物。

68. 载体，其包含权利要求 67 所述的分离的一个或多个核酸分子。

69. 细胞，其包含权利要求 67 所述的分离的一个或多个核酸分子或权利要求 68 所述的载体。

70. 药物组合物，其包含权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，权利要求 66 所述的免疫缀合物，权利要求 67 所述的分离的一个或多个核酸分子，权利要求 68 所述的载体，和/或权利要求 69 所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载体。

71. 权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白在制备药物中的用途，其中所述药物用于治疗肿瘤。

72. 根据权利要求 71 所述的用途，其中所述肿瘤选自下组：血液瘤和实体瘤。
73. 权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求 66 所述的免疫缀合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗受试者的病毒性感染。
74. 根据权利要求 73 所述的用途，其中所述病毒性感染包括慢性病毒感染。
75. 根据权利要求 73-74 中任一项所述的用途，其中所述病毒性感染是由选自下组的病毒引起的感染：乙型肝炎病毒（HBV）、流感病毒和 EBV。
76. 权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求 66 所述的免疫缀合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗受试者的细菌和/或真菌性感染。
77. 根据权利要求 76 所述的用途，其中所述细菌和/或真菌性感染包括脓毒症。
78. 根据权利要求 71-77 中任一项所述的用途，其中所述药物使得受试者中细胞因子的产生增加。
79. 根据权利要求 71-78 中任一项所述的用途，其中所述药物使得受试者中 CD4⁺ T 细胞和/或 CD8⁺ T 细胞产生的细胞因子增加。
80. 根据权利要求 78-79 中任一项所述的用途，其中所述细胞因子包括白介素和/或干扰素。
81. 根据权利要求 78-80 中任一项所述的用途，其中所述细胞因子包括 IL2、IL21 和/或 IFN- γ 。
82. 根据权利要求 71-81 中任一项所述的用途，其中所述药物提高受试者中 T 细胞的免疫响应。
83. 根据权利要求 82 所述的用途，其中所述免疫响应包括细胞因子的产生增加。
84. 根据权利要求 82-83 中任一项所述的用途，其中所述 T 细胞包括 CD4⁺T 细胞和/或 CD8⁺T 细胞。
85. 根据权利要求 71-84 中任一项所述的用途，其中所述药物上调所述受试者中转录因子的表达水平。
86. 根据权利要求 85 所述的用途，其中所述转录因子包括 T-bet 和/或 Bcl6。
87. 根据权利要求 71-86 中任一项所述的用途，其中所述受试者为 HBeAg 阴性受试者。
88. 治疗肿瘤的药物组合物，其包括权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白和任选地药学上可接受的载体。
89. 治疗病毒性感染的药物组合物，其包括权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白和任选地药学上可接受的载体。
90. 治疗细菌和/或真菌性感染的药物组合物，其包括权利要求 1-65 中任一项所述的分

离的抗原结合蛋白和任选地药学上可接受的载体。

91. 治疗病毒性感染的方法，其包括以下步骤：向有需要的受试者施用权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

92. 治疗细菌和/或真菌性感染的方法，其包括以下步骤：向有需要的受试者施用权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

93. 抑制肿瘤或肿瘤细胞生长的方法，其包含以下步骤：施用权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

94. 提高有需要的受试者中免疫效应的方法，包含以下步骤：向所述受试者施用权利要求 1-65 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

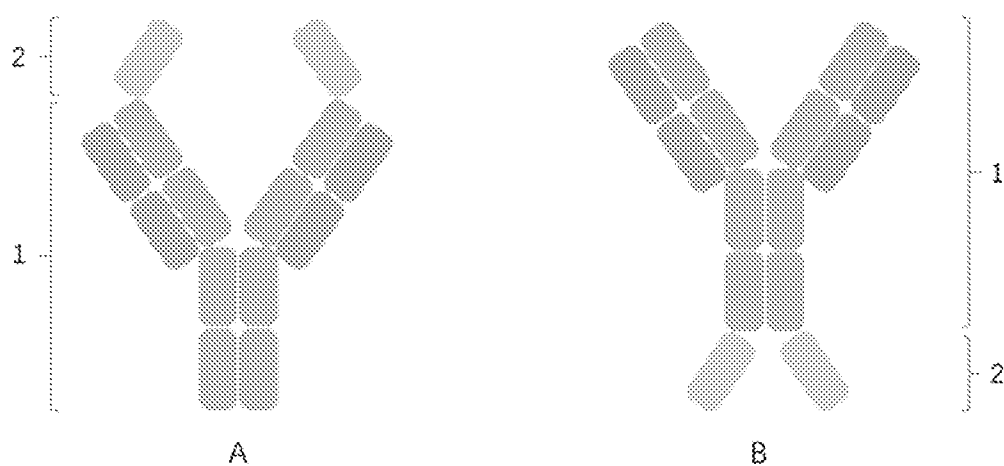


图 1

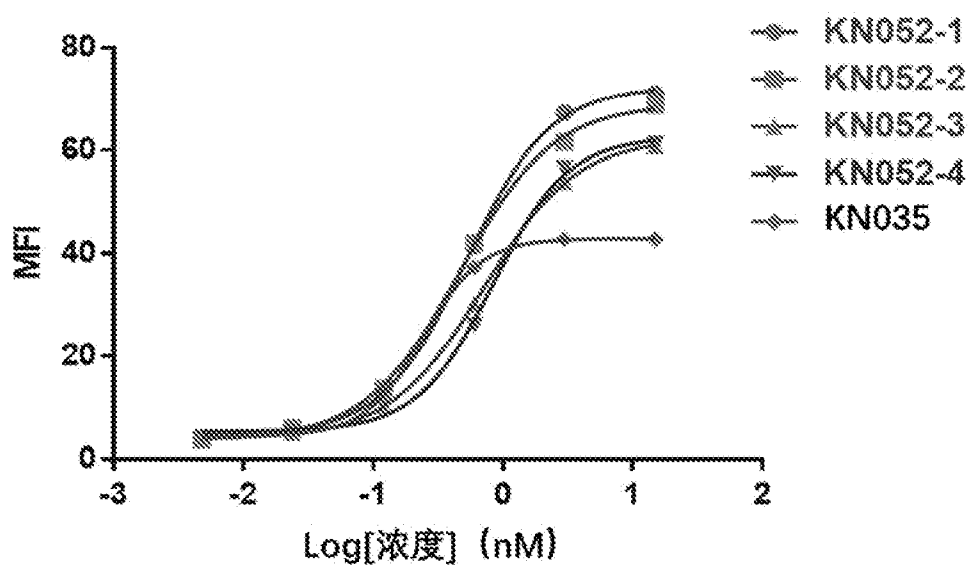


图 2

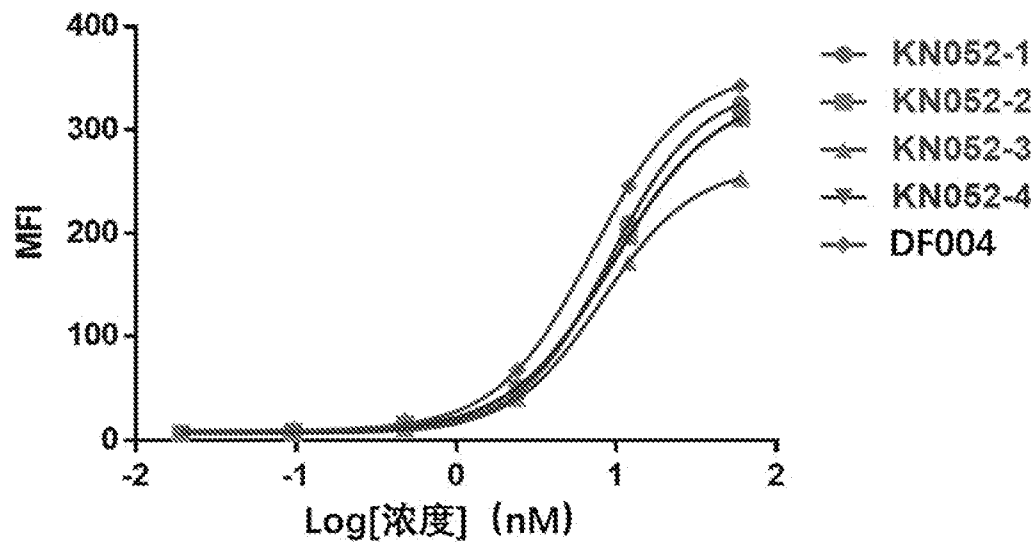


图 3

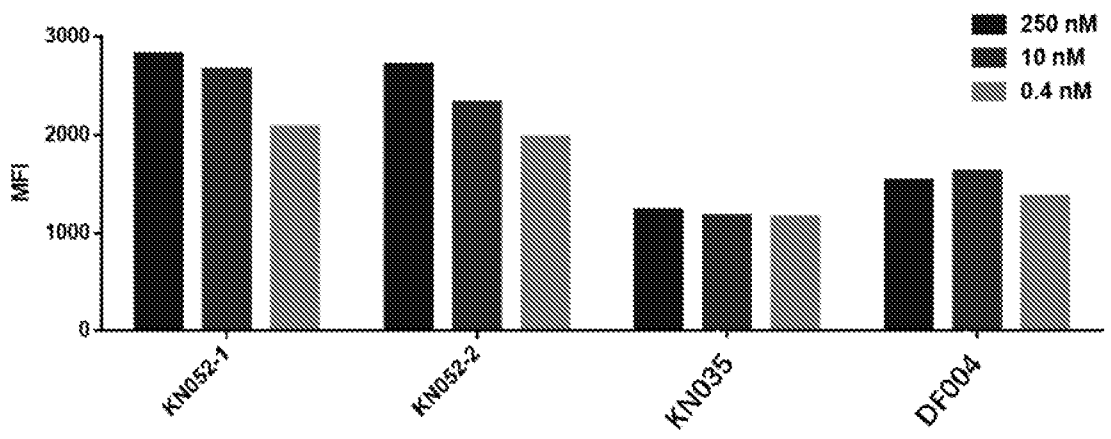


图 4A

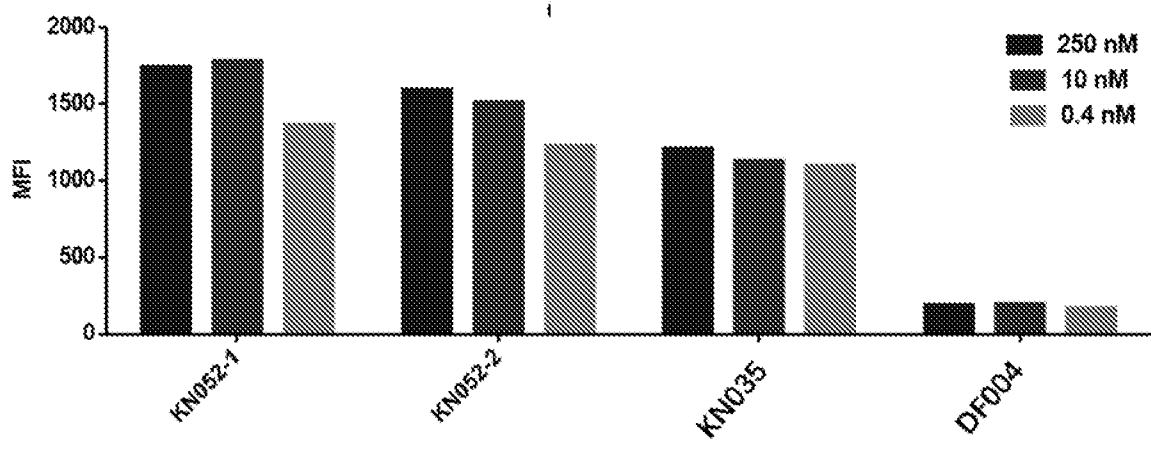


图 4B

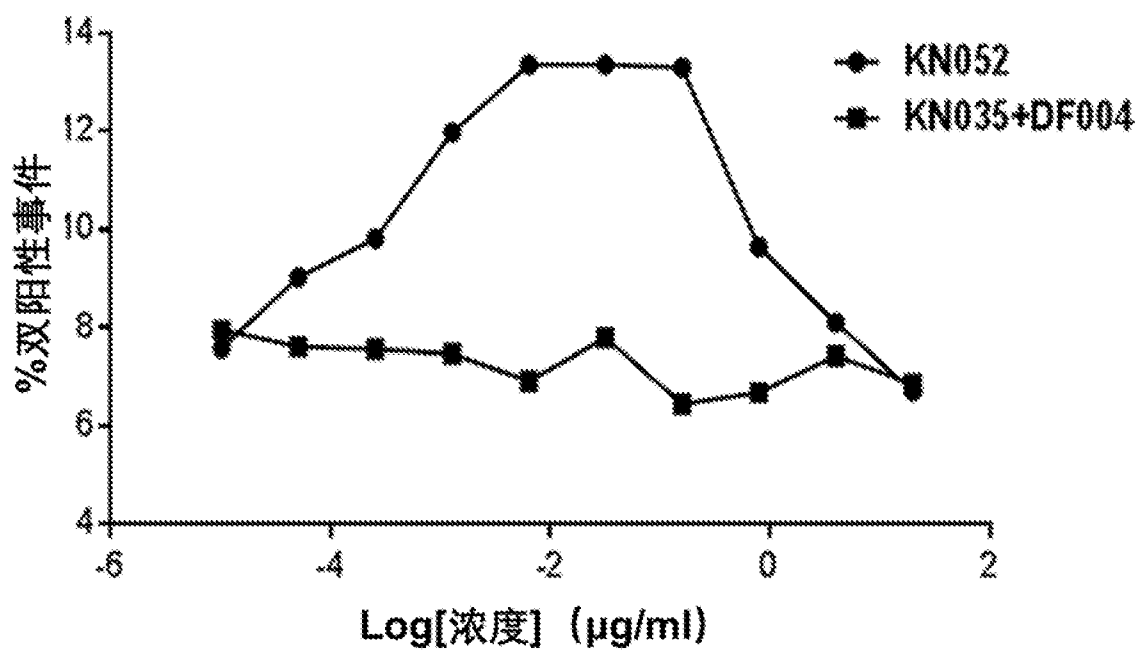


图 5

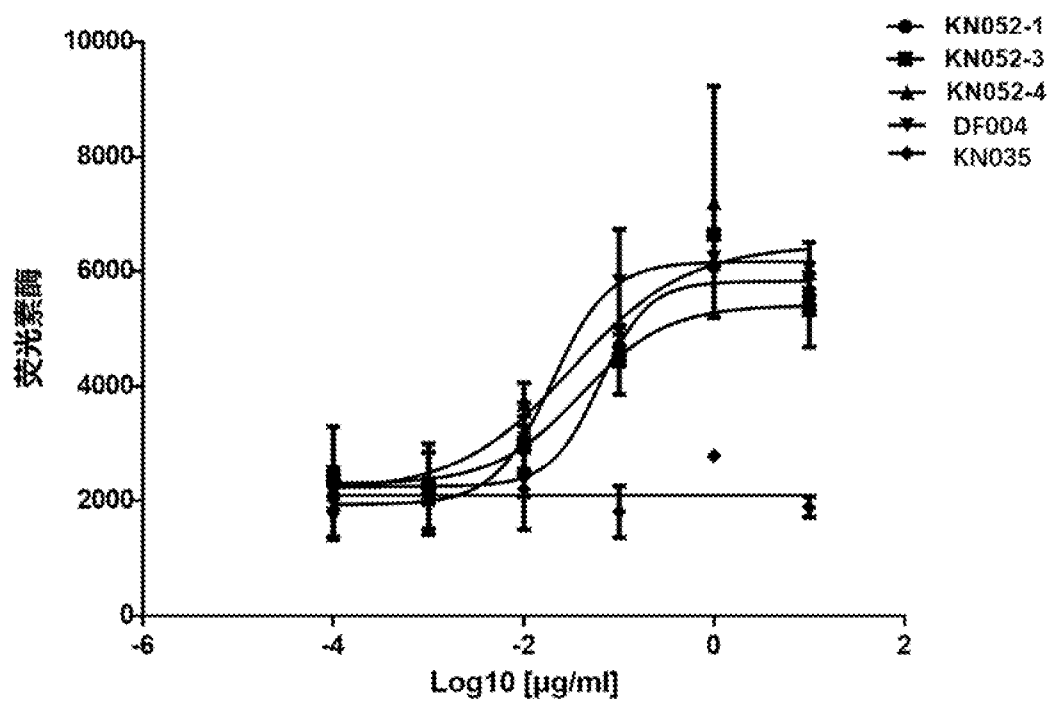


图 6

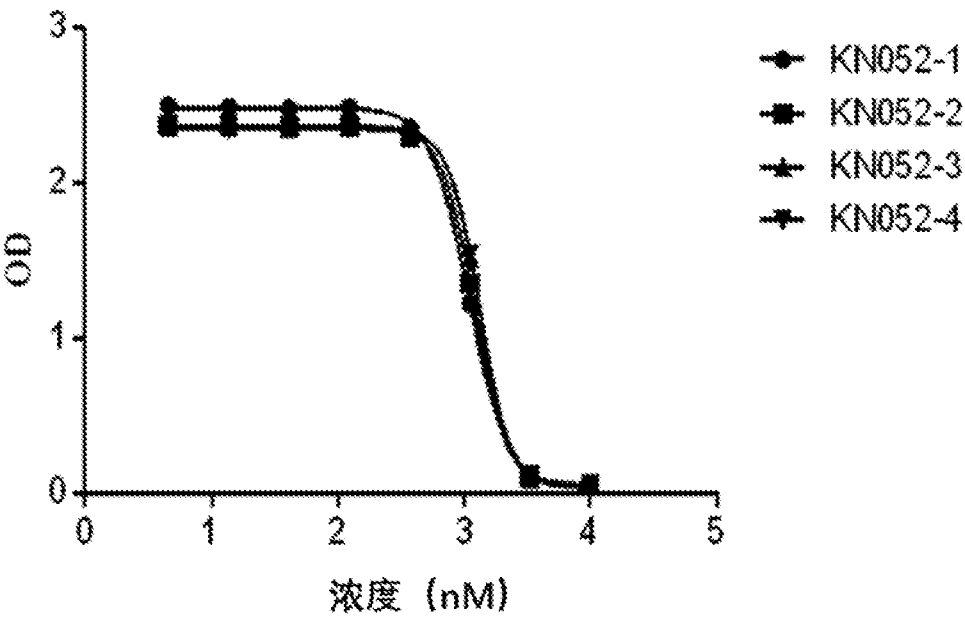


图 7

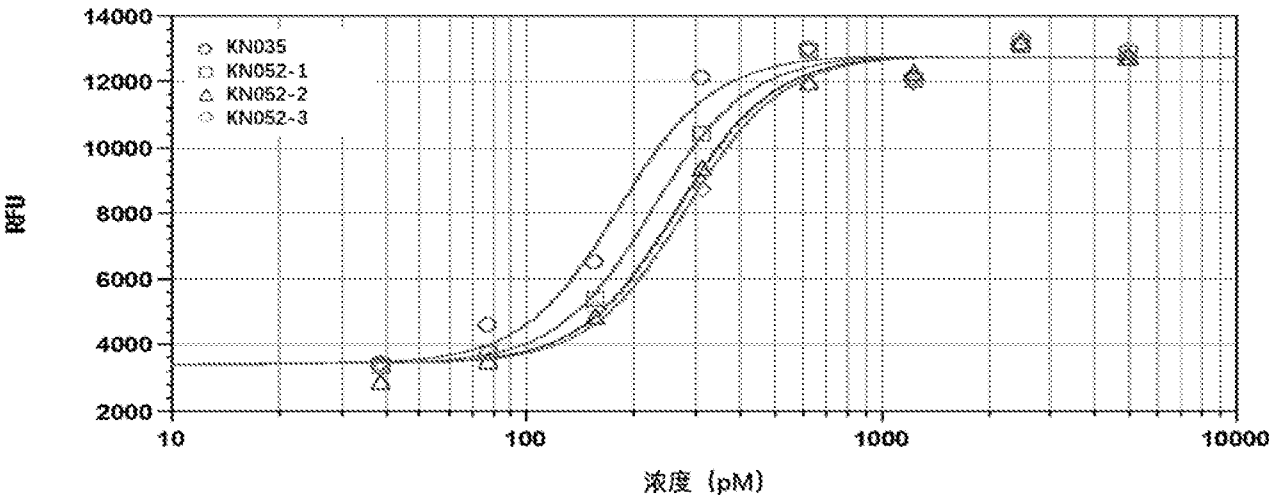


图 8

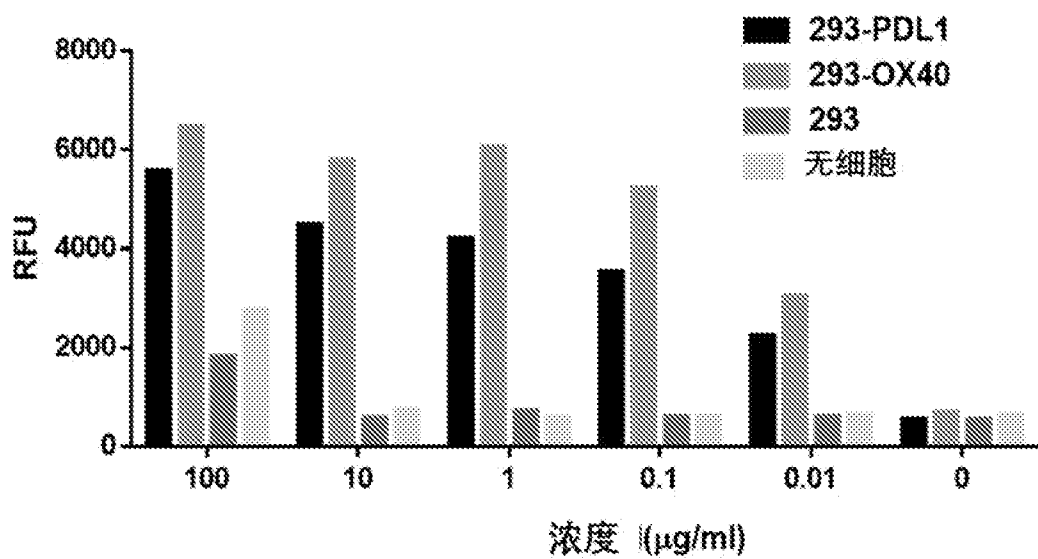


图 9A

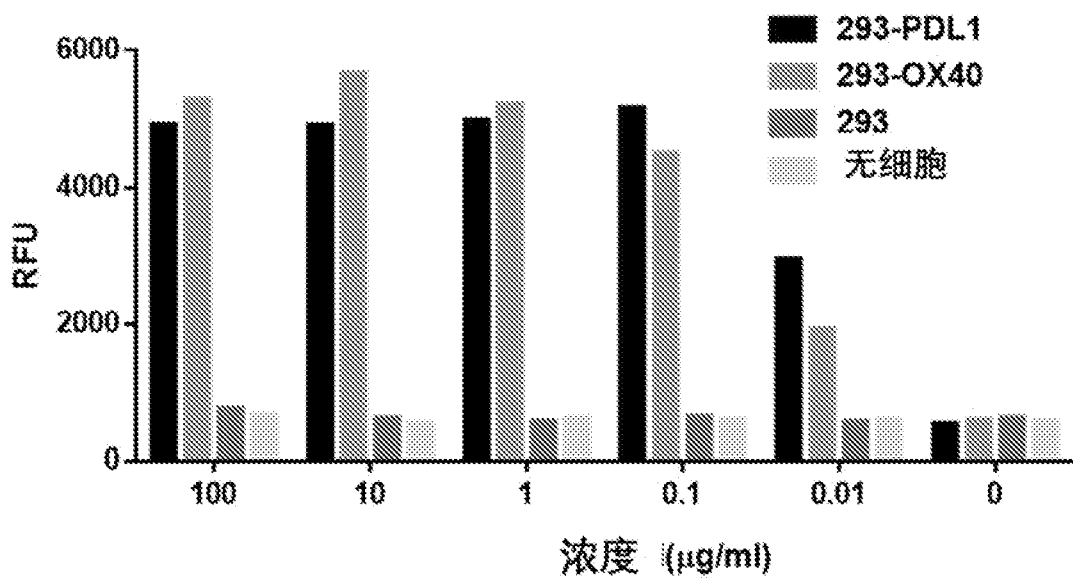


图 9B

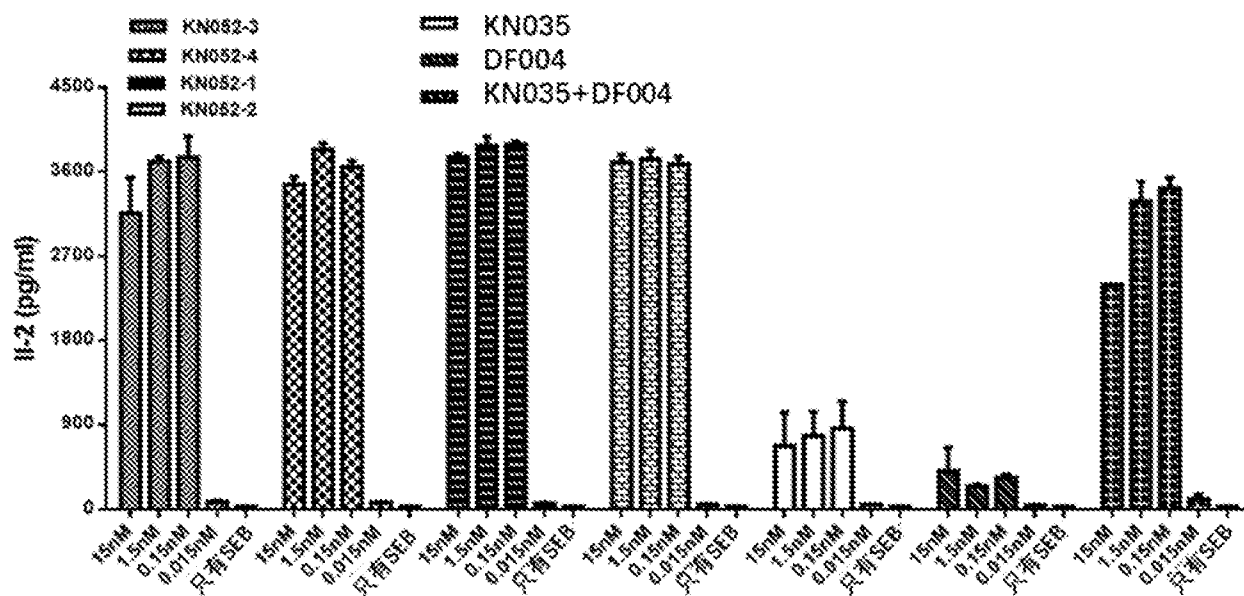


图 10A

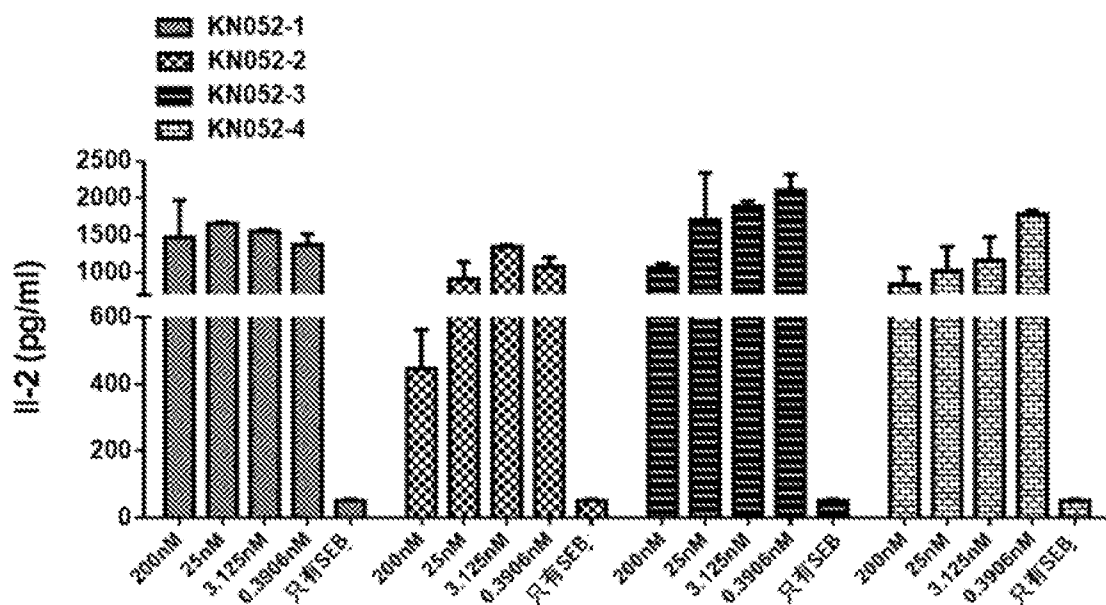


图 10B

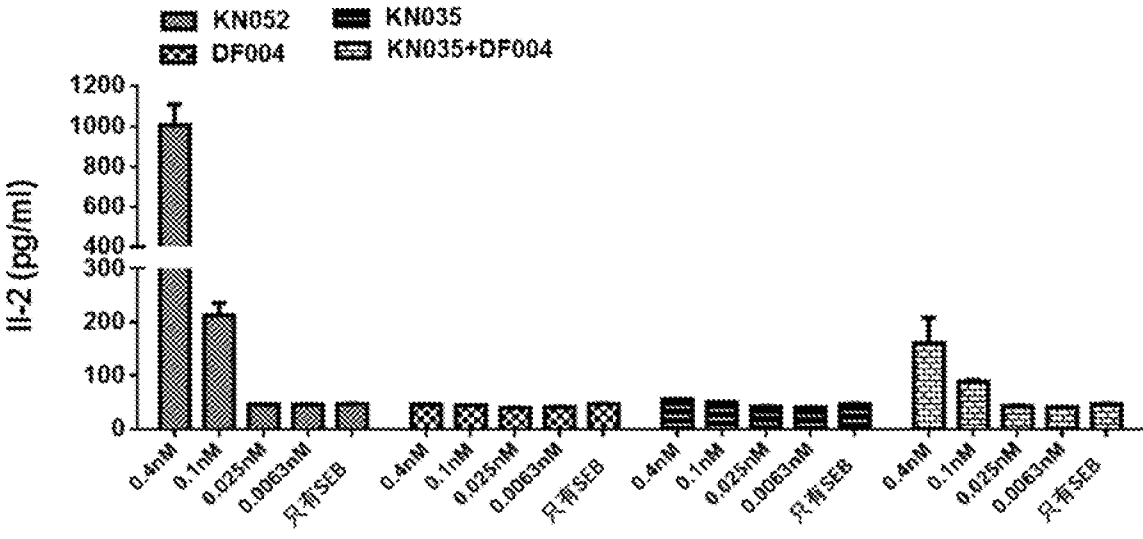


图 10C

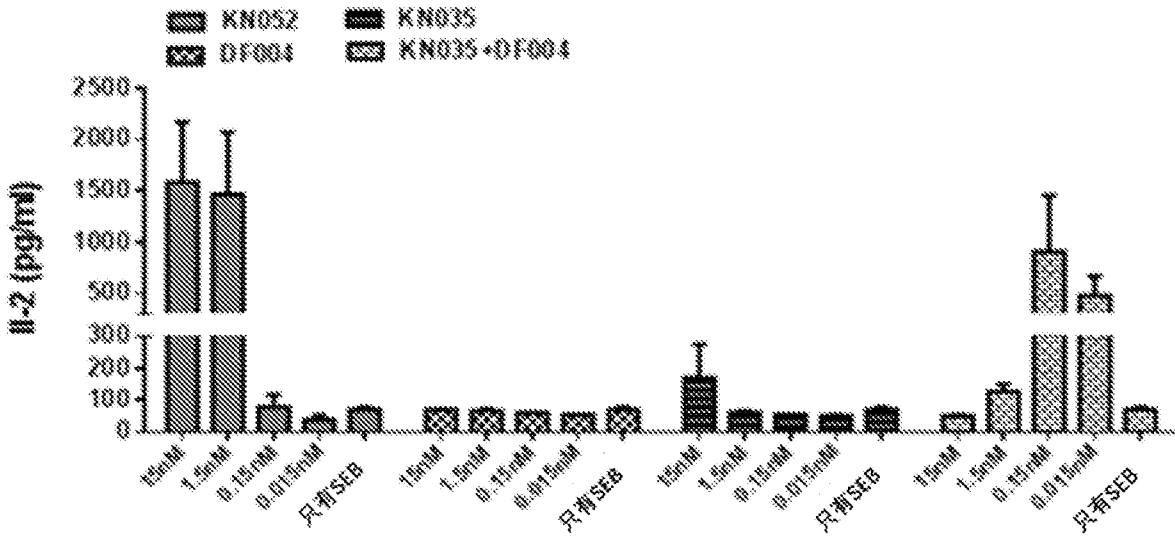


图 10D

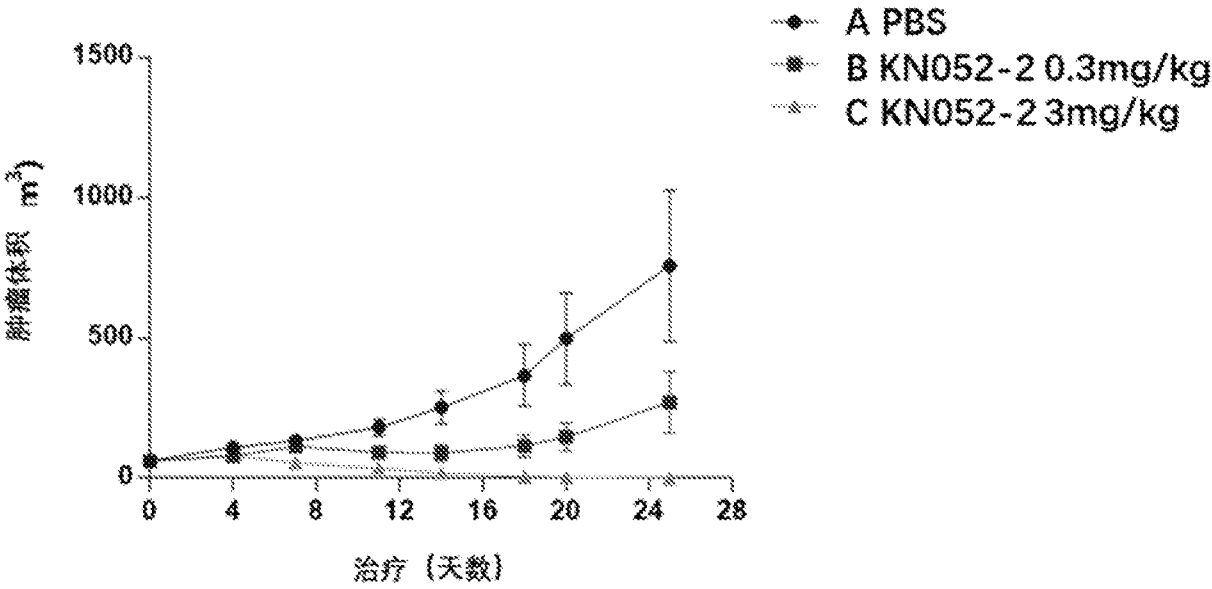


图 11A

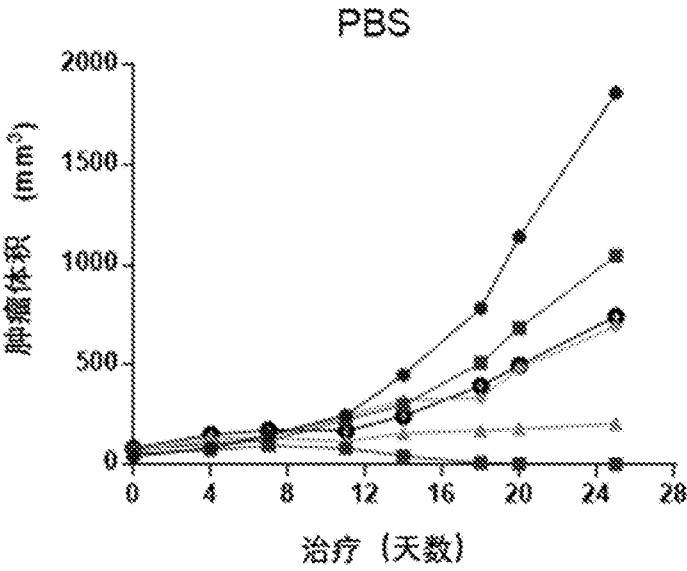


图 11B

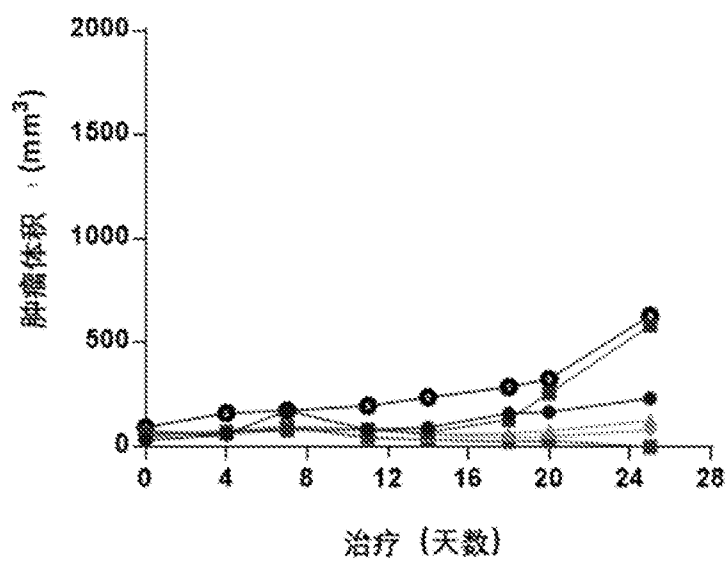


图 11C

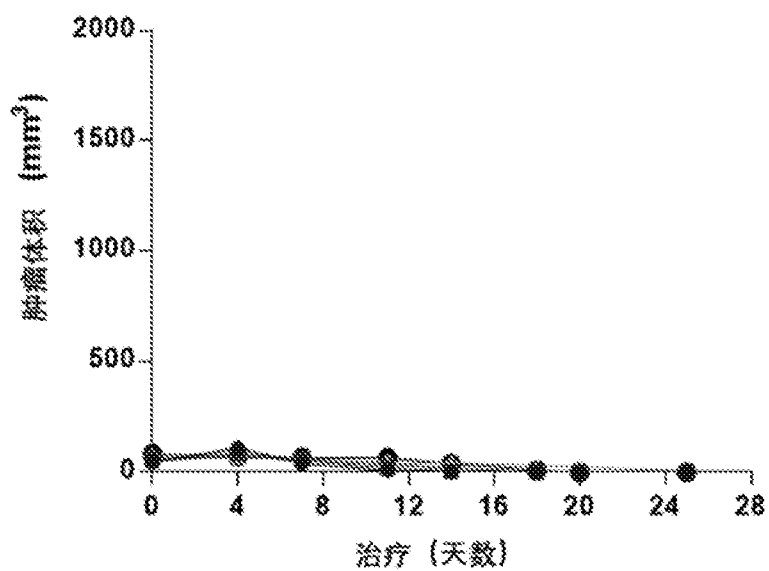


图 11D

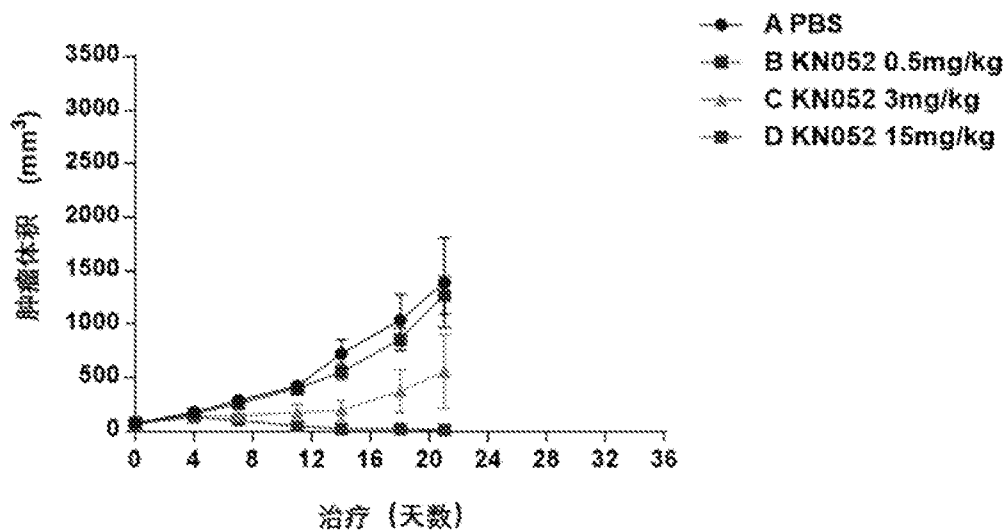


图 12A

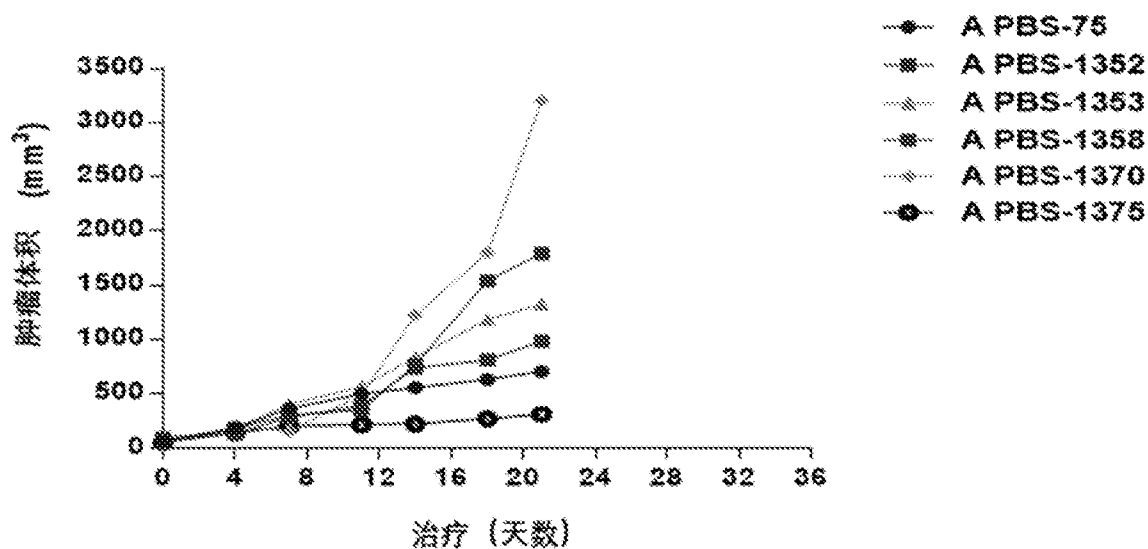


图 12B

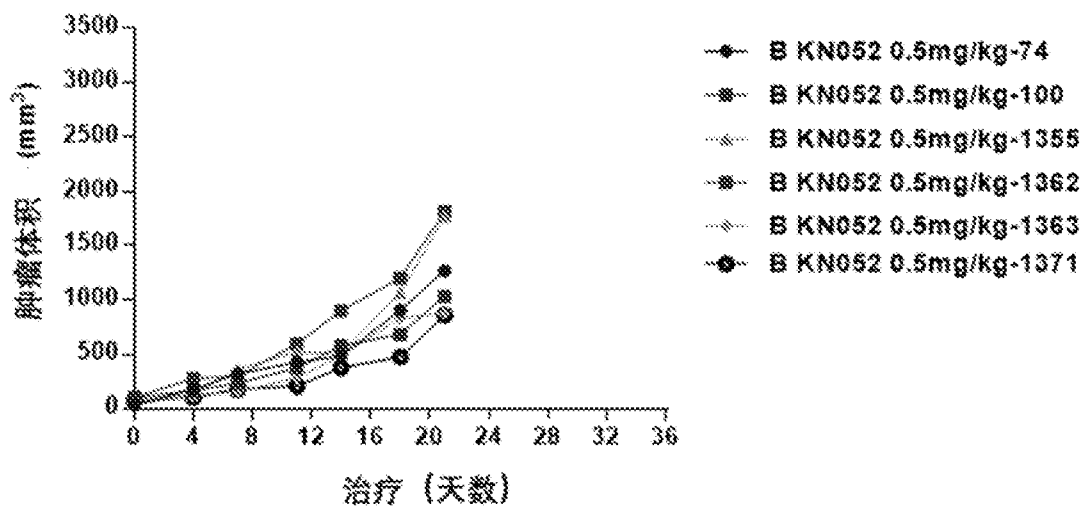


图 12C

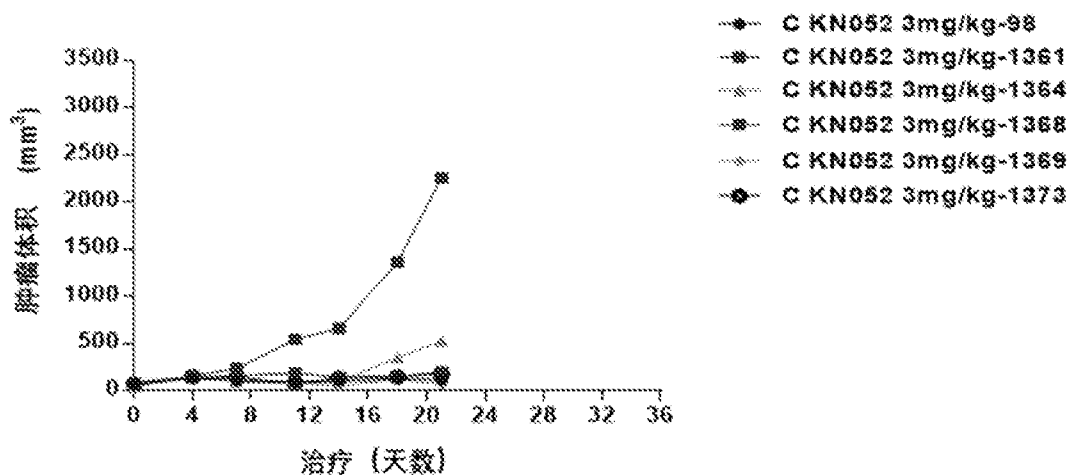


图 12D

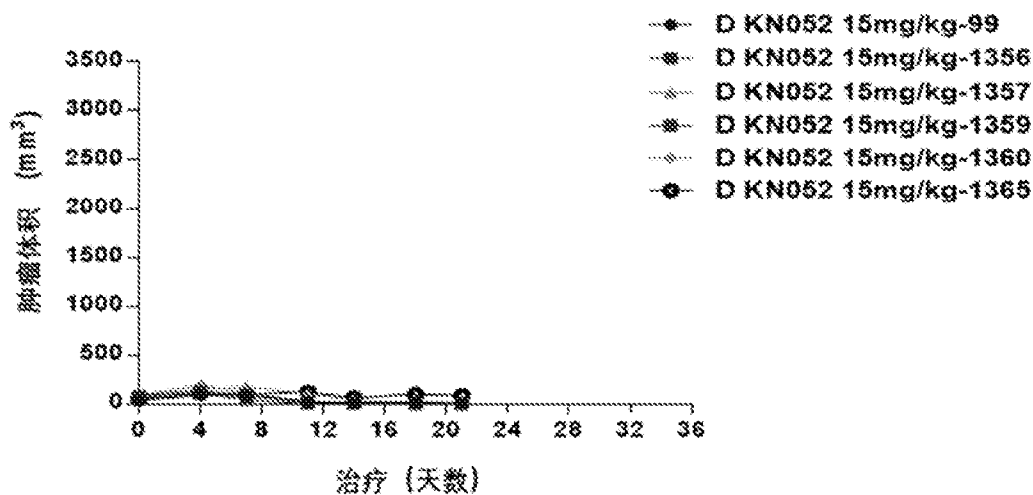


图 12E

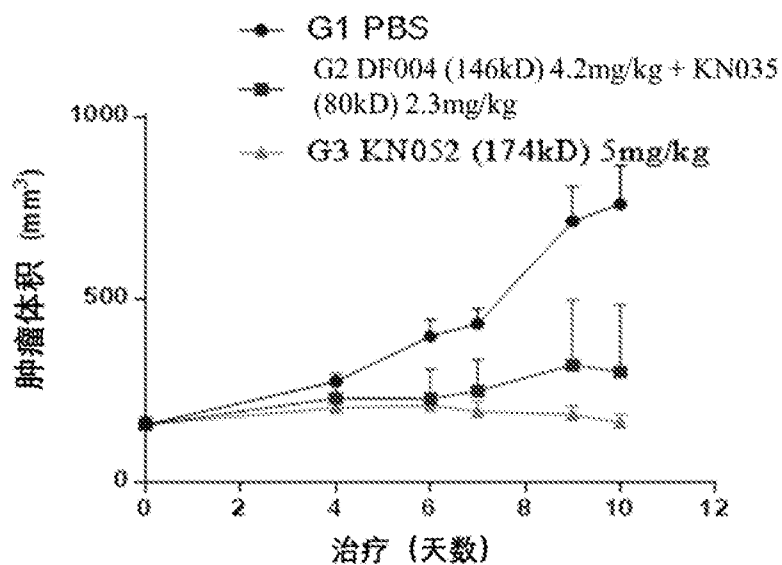


图 12F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/121579

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(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; A61P; A61K

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)

CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, GOOGLE, PUBMED, 双特异性, 双功能, 抗体, 受体, 肿瘤, 癌, 轻链, 重链, 互补决定区, 可变, 恒定, 重链, 轻链, 胞外结构域, N末端, IgV结构域, bispecific, bifunctional, OX40, CD134, TNF RSF4, ACT35, pd-L1, CD274, B7-H1, antibody, receptor, tumor, cancer, target?, extracellular domain, HEAVY CHAIN, LIGHT CHAIN, VH, LH, LCDR, HCDR, IgV, N terminal, SEQ ID NOs: 1-2.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110305210 A (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) 08 October 2019 (2019-10-08) claims 1-24, description, paragraphs [0151]-[0165]	1-94
A	CN 109475603 A (KYMAB LIMITED) 15 March 2019 (2019-03-15) entire document	1-94
A	CN 110156895 A (SHANGHAI JIABEI BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 23 August 2019 (2019-08-23) entire document	1-94
A	WO 2018202649 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB) 08 November 2018 (2018-11-08) entire document	1-94
A	CN 110078825 A (BEIJING MABWORKS BIOTECH CO., LTD.) 02 August 2019 (2019-08-02) entire document	1-94



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

03 January 2021

Date of mailing of the international search report

15 January 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/121579

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KVARNHAMMAR A.M. et al. "The CTLA-4 x OX40 bispecific antibody ATOR-1015 induces anti-tumor effects through tumor-directed immune activation" <i>Journal for Immunotherapy of Cancer</i> , Vol. 7, 11 April 2019 (2019-04-11), abstract, page 2, right-hand column, paragraph 2 - page 4, right-hand column, paragraph 4	1-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/121579

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/121579**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.: **91-94**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 91-94 respectively relate to methods for treating viral, bacterial and/or fungal infection, inhibiting tumor or tumor cell growth, and improving immunological effect in a subject having such need, and thus belong to methods for treatment of diseases as stipulated in PCT Rule 39.1(iv). A search has been performed on the basis of a corresponding drug preparation use of the isolated antigen binding protein.
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/CN2020/121579

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110305210	A	08 October 2019	TW	201946655	A	16 December 2019
CN	109475603	A	15 March 2019	WO	2017220990	A1	28 December 2017
				EP	3471754	A1	24 April 2019
				RU	2018147423	A	21 July 2020
				BR	112018076260	A2	26 March 2019
				WO	2017220988	A1	28 December 2017
				EP	3471753	A1	24 April 2019
				AU	2017281830	A1	13 December 2018
				KR	20190032355	A	27 March 2019
				WO	2017220989	A1	28 December 2017
				CA	3026474	A1	28 December 2017
				TW	201803904	A	01 February 2018
				MX	2018016364	A	28 November 2019
				CN	109475602	A	15 March 2019
				RU	2018147413	A3	21 July 2020
				JP	2020511932	A	23 April 2020
				TW	I640536	B	11 November 2018
				SG	11201810509 P	A	28 December 2018
				KR	20190030208	A	21 March 2019
				WO	2017220990	A9	01 March 2018
				TW	201900680	A	01 January 2019
				IL	263834	D0	31 January 2019
				WO	2017220988	A9	15 February 2018
				WO	2017220989	A8	27 December 2018
				JP	2019528083	A	10 October 2019
				BR	112018076281	A2	26 March 2019
				TW	201803905	A	01 February 2018
				TW	201811820	A	01 April 2018
				RU	2018147413	A	21 July 2020
				CA	3026477	A1	28 December 2017
CN	110156895	A	23 August 2019	None			
WO	2018202649	A1	08 November 2018	EP	3619236	A1	11 March 2020
				CN	110709421	A	17 January 2020
				SG	11201910027 Y	A	28 November 2019
				CA	3061549	A1	08 November 2018
				BR	112019023097	A2	28 July 2020
				KR	20200002889	A	08 January 2020
				AU	2018262156	A1	28 November 2019
				JP	2020518622	A	25 June 2020
				US	2020048358	A1	13 February 2020
CN	110078825	A	02 August 2019	CN	111699199	A	22 September 2020
				US	10442866	B1	15 October 2019
				WO	2020151258	A1	30 July 2020
				US	2020231692	A1	23 July 2020
				CN	110078825	B	26 May 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/121579

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61P; A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, GOOGLE, PUBMED, 双特异性, 双功能, 抗体, 受体, 肿瘤, 癌, 轻链, 重链, 互补决定区, 可变, 恒定, 重链, 轻链, 胞外结构域, N末端, IgV结构域, bispecific, bifunctional, 0X40, CD134, TNF RSF4, ACT35, pd-L1, CD274, B7-H1, antibody, receptor, tumor, cancer, target?, extracellular domain, HEAVY CHAIN, LIGHT CHAIN, VH, LH, LCDR, HCDR, IgV, N terminal, SEQ ID NOs: 1-2。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 110305210 A (信达生物制药苏州有限公司) 2019年 10月 8日 (2019 - 10 - 08) 权利要求1-24、说明书第[0151]-[0165]段	1-94
A	CN 109475603 A (科马布有限公司) 2019年 3月 15日 (2019 - 03 - 15) 全文	1-94
A	CN 110156895 A (上海甲贝生物医药技术股份有限公司) 2019年 8月 23日 (2019 - 08 - 23) 全文	1-94
A	WO 2018202649 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB) 2018年 11月 8日 (2018 - 11 - 08) 全文	1-94
A	CN 110078825 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年 8月 2日 (2019 - 08 - 02) 全文	1-94

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
---	---

国际检索实际完成的日期

2021年 1月 3日

国际检索报告邮寄日期

2021年 1月 15日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

彭海航

电话号码 86-(10)-53961949

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	KVARNHAMMAR A.M. 等. "The CTLA-4 x OX40 bispecific antibody ATOR-1015 induces anti-tumor effects through tumor-directed immune activation" JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, 第7卷, 2019年 4月 11日 (2019 - 04 - 11), 摘要、第2页右栏第2段-第4页右栏第4段	1-94

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

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

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

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

3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 91-94
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91-94分别涉及治疗病毒性、细菌和/或真菌性感染，抑制肿瘤或肿瘤细胞生长，提高有需要的受试者中免疫效应的方法，属于PCT细则39.1(iv)规定的疾病的治疗方法，基于分离的抗原结合蛋白相应制药用途作出。
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/CN2020/121579

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	110305210	A	2019年 10月 8日	TW	201946655	A	2019年 12月 16日
CN	109475603	A	2019年 3月 15日	WO	2017220990	A1	2017年 12月 28日
				EP	3471754	A1	2019年 4月 24日
				RU	2018147423	A	2020年 7月 21日
				BR	112018076260	A2	2019年 3月 26日
				WO	2017220988	A1	2017年 12月 28日
				EP	3471753	A1	2019年 4月 24日
				AU	2017281830	A1	2018年 12月 13日
				KR	20190032355	A	2019年 3月 27日
				WO	2017220989	A1	2017年 12月 28日
				CA	3026474	A1	2017年 12月 28日
				TW	201803904	A	2018年 2月 1日
				MX	2018016364	A	2019年 11月 28日
				CN	109475602	A	2019年 3月 15日
				RU	2018147413	A3	2020年 7月 21日
				JP	2020511932	A	2020年 4月 23日
				TW	I640536	B	2018年 11月 11日
				SG	11201810509P	A	2018年 12月 28日
				KR	20190030208	A	2019年 3月 21日
				WO	2017220990	A9	2018年 3月 1日
				TW	201900680	A	2019年 1月 1日
				IL	263834	D0	2019年 1月 31日
				WO	2017220988	A9	2018年 2月 15日
				WO	2017220989	A8	2018年 12月 27日
				JP	2019528083	A	2019年 10月 10日
				BR	112018076281	A2	2019年 3月 26日
				TW	201803905	A	2018年 2月 1日
				TW	201811820	A	2018年 4月 1日
				RU	2018147413	A	2020年 7月 21日
				CA	3026477	A1	2017年 12月 28日
CN	110156895	A	2019年 8月 23日	无			
WO	2018202649	A1	2018年 11月 8日	EP	3619236	A1	2020年 3月 11日
				CN	110709421	A	2020年 1月 17日
				SG	11201910027Y	A	2019年 11月 28日
				CA	3061549	A1	2018年 11月 8日
				BR	112019023097	A2	2020年 7月 28日
				KR	20200002889	A	2020年 1月 8日
				AU	2018262156	A1	2019年 11月 28日
				JP	2020518622	A	2020年 6月 25日
				US	2020048358	A1	2020年 2月 13日
CN	110078825	A	2019年 8月 2日	CN	111699199	A	2020年 9月 22日
				US	10442866	B1	2019年 10月 15日
				WO	2020151258	A1	2020年 7月 30日
				US	2020231692	A1	2020年 7月 23日
				CN	110078825	B	2020年 5月 26日