

# (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  
2019 年 7 月 18 日 (18.07.2019)



(10) 国际公布号  
**WO 2019/137397 A1**

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

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/070982

(22) 国际申请日: 2019 年 1 月 9 日 (09.01.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201810023267.0 2018 年 1 月 10 日 (10.01.2018) CN

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

(72) 发明人: 顾晓玲 (GU, Xiaoling); 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。蒋家骅 (JIANG, Jiahua); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。张蕾 (ZHANG, Lei); 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

胡齐悦 (HU, Qiyue); 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。顾津明 (GU, Jinming); 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康 (TAO, Weikang); 中国上海市闵行区经济技术开发区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (SHANGHAI BESHINING LAW OFFICE); 中国上海市小木桥路 681 号外经大厦 21 楼, Shanghai 200032 (CN)。

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

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,

(54) Title: PD-L1 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF, AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

(54) 发明名称: PD-L1 抗体、其抗原结合片段及医药用途

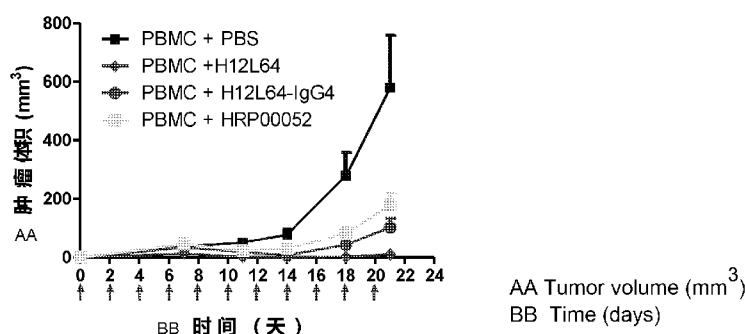


图 3

(57) Abstract: A novel PD-L1 antibody, an antigen-binding fragment thereof, and a pharmaceutical use thereof. A humanized antibody comprising a CDR of the PD-L1 antibody, a pharmaceutical composition comprising the PD-L1 antibody and the antigen-binding fragment thereof, and a use of the PD-L1 antibody as a drug. A use of a humanized PD-L1 antibody in preparing a drug for treating diseases or disorders associated with PD-L1.

(57) 摘要: 一种新的 PD-L1 抗体、其抗原结合片段及医药用途。包含所述 PD-L1 抗体 CDR 区的人源化抗体, 以及包含 PD-L1 抗体及其抗原结合片段的药物组合物, 以及其作为药物的用途。一种人源化的 PD-L1 抗体在制备用于治疗 PD-L1 相关的疾病或病症的药物中的用途。

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,  
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

**根据细则4.17的声明：**

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

**本国际公布：**

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

## PD-L1 抗体、其抗原结合片段及医药用途

本申请要求申请日为 2018 年 01 月 10 日的中国专利申请 CN201810023267.0 的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

### 技术领域

本公开涉及 PD-L1 抗体以及其抗原结合片段,进一步地,本公开还涉及包含所述 PD-L1 抗体 CDR 区的嵌合抗体、人源化抗体,本公开还涉及包含所述 PD-L1 抗体及其抗原结合片段的药物组合物,以及其作为 PD-L1 相关疾病诊断剂和治疗药物的用途。

### 背景技术

这里的陈述仅提供与本发明有关的背景信息,而不必然地构成现有技术。

肿瘤免疫治疗是肿瘤治疗领域一个长时期的热点,其中 T 细胞的肿瘤免疫治疗又处于其核心位置。肿瘤免疫治疗是充分利用、调动肿瘤患者体内的杀伤性 T 细胞,对肿瘤进行杀伤作用,它可能是最有效的也是最安全的治疗肿瘤的途径。与此同时,肿瘤逃逸是肿瘤免疫治疗面临的一个巨大障碍,肿瘤细胞利用其自身对免疫系统的抑制作用促进了肿瘤的快速生长。

肿瘤的免疫逃逸机制与机体对肿瘤的免疫应答之间存在着极为复杂的关系。肿瘤免疫治疗早期肿瘤特异性的杀伤性 T 细胞是有其生物活性的,但随着肿瘤生长后期失去了杀伤的功能。所以肿瘤免疫治疗是为了最大限度的提高患者自身对肿瘤的免疫系统反应,它不但要在体内激活原有的免疫系统反应,更要维持免疫系统反应的持续时间和反应强度,才是免疫治疗肿瘤的关键。

人体内 T 细胞的活化采取了两条信号通路系统,除了需要通过抗原呈递细胞递呈 MHC-抗原肽给 T 细胞提供第一信号外,还需要一系列协同刺激分子提供第二信号,进而才能使 T 细胞产生正常的免疫应答。这个双信号通路系统对体内免疫系统的平衡起着至关重要的作用,它严格调控机体对自身和非自身抗原产生不同的免疫应答。如果缺少协同刺激分子提供的第二信号,将会导致 T 细胞的无应答或持续特异性免疫应答,从而产生耐受。因此,第二信号通路在机体免疫应答的整个过程中起着非常关键的调节作用。

程序性死亡分子 1 (programmed death-1, PD-1) 是 1992 年发现的表达在 T 细胞表面的一个蛋白受体,参与到细胞的凋亡过程之中。PD-1 属于 CD28 家族,与细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4(cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4) 具有 23% 的氨基酸同源性,但其表

达却与 CTLA 不同，主要表达在活化的 T 细胞、B 细胞和髓系细胞上。PD-1 有两个配体，分别为 PD-L1 和 PD-L2。PD-L1 主要表达于 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)上，在活化后细胞上的表达能够进行上调。而 PD-L2 的表达相对较局限，主要表达在抗原呈递细胞上，如活化的巨噬细胞和树突状细胞。

PD-L1 通过和 PD-1 及 B7-1 的结合抑制免疫系统，很多肿瘤细胞及肿瘤组织微环境的免疫细胞表达 PD-L1。新的研究发现乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、膀胱癌、卵巢癌、胰腺癌及肝癌等人类肿瘤组织中检测到高 PD-L1 蛋白的表达，且 PD-L1 的表达水平和患者的临床及预后紧密相关。

由于 PD-L1 起到第二信号通路抑制 T 细胞增殖的作用，所以阻断 PD-L1 /PD-1 之间结合成为了肿瘤免疫治疗领域一个非常有潜力的新兴靶点。

目前有多家跨国制药公司在研发针对 PD-L1 的单克隆抗体，它通过阻断 PD-L1 /PD-1 之间结合，最大限度的提高患者自身对肿瘤的免疫系统反应，从而达到对肿瘤细胞进行杀伤的目的。相关的专利如：WO0139722、WO2013173223、WO2014195852、WO2013181634、WO2015048520、WO2015036511、US2014335093、WO2014100079、WO2014055897、US6803192B1、WO2014022758、US8617546B2 和 WO2010089411A2。

## 发明内容

本公开提供与PD-L1的胞外区的氨基酸序列或三维结构结合的单克隆抗体或抗原结合片段（也可称人PD-L1结合分子）。

在一些可选的实施方案中，本公开提供一种单克隆抗体或其抗原结合片段，所述单克隆抗体或抗原结合片段结合人 PD-L1，所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含：

(i)重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 10、12 和 13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区，所述 SEQ ID NO.12 所示的 HCDR2 中 X<sub>1</sub> 为 F 或 M，X<sub>2</sub> 为 R 或 V，X<sub>3</sub> 为 N 或 H；或

(ii)重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、12 和 13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区，所述 SEQ ID NO.12 所示的 HCDR2 中 X<sub>1</sub> 为 F 或 M，X<sub>2</sub> 为 R 或 V，X<sub>3</sub> 为 N 或 H；或

(iii)重链可变区和轻链可变区，其中重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 20、21 和 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，轻链可变区包含氨基酸序列分别如

SEQ ID NO: 23、24 和 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区, 其中 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和 LCDR1、LCDR2、LCDR3 依次不同时为 SEQ ID NO: 30、38、22、23、40 和 25,

所述 SEQ ID NO.20 和 21 所示的 HCDR1 和 HCDR2 中 X<sub>4</sub> 为 S 或 D, X<sub>5</sub> 为 Y 或 K, X<sub>6</sub> 为 H 或 M, X<sub>7</sub> 为 T、S、H 或 G, X<sub>8</sub> 为 S、N 或 G, X<sub>9</sub> 为 S、L 或 G, X<sub>10</sub> 为 F、L、W 或 M, X<sub>11</sub> 为 A、P 或 T, X<sub>12</sub> 为 M、V、L 或 S, X<sub>13</sub> 为 F 或 Y, 所述 SEQ ID NO: 24 所示的 LCDR2 中 X<sub>14</sub> 为 V 或 A, X<sub>15</sub> 为 Y 或 N, X<sub>16</sub> 为 A、L 或 V, X<sub>17</sub> 为 E、F、Y 或 A(其中包括 X<sub>17</sub> 选自 E、F 和 A 与 X<sub>17</sub> 选自 Y 的情况)。

在一些实施方案中, 如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段结合人 PD-L1, 所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 其中重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 28 或 29 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR3 区, 轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 氨基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

在一些实施方案中, 如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段的所述重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 28 或 29 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

在一些实施方案中, 如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段的所述重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 32 至 37 任一所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 39、40、41、67 和 69 任一的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 25 的 LCDR3 区。

在一些实施方案中, 如前的所述单克隆抗体或其抗原结合片段的所述重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 32、33、34、35、36 和 37 任一所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 39、40、41、67 和 69 任一的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 25 的 LCDR3 区。

在一些实施方案中, 如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14-16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区; 或

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14-16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14-16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID

NO: 67 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

在一些实施方案中,如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区,所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

在一些实施方案中,如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区,所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区;

或在一些实施方案中,如前所述单克隆抗体或其抗原所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区,所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区;或

在一些实施方案中,如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区,所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区;或

在一些实施方案中,如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区,所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

在一些实施方案中,如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段与人 PD-L1 的亲和力 KD 值小于  $10^{-9}$ M 或  $10^{-10}$ M。

在一些实施方案中,如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段交叉结合食蟹猴或恒河猴 PD-L1 和/或小鼠 PD-L1。

在一些实施方案中,如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区。

在一些实施方案中,如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区。

在一些实施方案中,如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 27 所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 45 所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 45 所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 45 所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56 和 57 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56 和 57 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56 和 57 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 49 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56 和 57 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56 和 57 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56 和 57 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56 和 57 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56 和 57 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55 和 57 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID

NO: 49 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 66 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体或抗原结合片段包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体为全长抗体，进一步包括人抗体恒定区，优选地，所述人抗体恒定区的重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区及其常规变体，所述人抗体恒定区的轻链恒定区选自人抗体  $\kappa$  和  $\lambda$  链恒定区及其常规变体，优选包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:58、60 或 65 所示的人抗体重链恒定区和 SEQ ID NO:59 所示的人轻链恒定区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体为全长抗体，进一步包括人抗体恒定区，包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:58 所示的人抗体重链恒定区和 SEQ ID NO:59 所示的人轻链恒定区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体为全长抗体，进一步包括人抗体恒定区，包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 60 所示的人抗体重链恒定区和 SEQ ID NO:59 所示的人轻链恒定区。

在一些实施方案中，如前所述单克隆抗体为全长抗体，进一步包括人抗体恒定区，包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 65 所示的人抗体重链恒定区和 SEQ ID NO:59 所示的人轻链恒定区。

在一些实施方案中，所述抗原结合片段是选自 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体 (scFv)、二聚化的 V 区 (双抗体)、二硫键稳定化的 V 区 (dsFv) 和包含 CDR 的肽的抗原结合片段。

另一方面，本公开提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的根据前述所述的单克

隆抗体或其抗原结合片段，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂，优选地，所述治疗有效量的单克隆抗体或其抗原结合片段为单位剂量 0.1-3000mg/kg 的如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些方面，本公开提供一种核酸分子，其编码前述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些方面，本公开提供一种重组载体，其包含如前所述的核酸分子。

在一些方面，本公开提供一种用根据如前所述的重组载体转化的宿主细胞，所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞，优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞。

在一些方面，本公开提供用于生产如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括将前述的宿主细胞在培养基中进行培养以形成并积累前述的单克隆抗体或其抗原结合片段，以及从培养物回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些方面，本公开提供用于免疫检测或测定人 PD-L1 的方法，所述方法包括使用如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

在一些方面，本公开提供如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段在制备与人 PD-L1 相关的疾病的诊断剂中的应用。

在一些方面，本公开提供与人 PD-L1 相关的疾病的治疗方法，所述方法包括向受试者施用药物有效量的如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，或包含如前所述的药物组合物，或如前所述的核酸分子，以治疗人 PD-L1 相关的疾病，其中所述疾病优选为肿瘤或癌症；更优选为鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑色素瘤、软组织瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌

肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌，最优选为 PD-L1 阳性的鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。

在一些方面，本公开提供如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，或包含如前所述的药物组合物，或如前所述的核酸分子在制备与人 PD-L1 相关的疾病的治疗剂中的应用，其中所述疾病优选为肿瘤或癌症；更优选为鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌，最优选为 PD-L1 阳性的鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经

胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。

作为药物的如前所述单克隆抗体或其抗原结合片段，或包含如前所述的药物组合物，或如前所述的核酸分子。

作为药物的根据如前所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，或包含如前所述的药物组合物，或如前所述的核酸分子，所述药物用于治疗 PD-L1 阳性的肿瘤或癌症，优选地，所述癌症选自鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。

## 附图说明

图 1: PD-L1 抗体在 PBMC-T 淋巴细胞激活实验中对细胞 IFN  $\gamma$  的分泌促进作用。

图 2: 不同 PD-L1 抗体的 IgG1 形式与 IgG4 形式的 ADCC 效应比较。图 2A 是 HRP00049 的 IgG1 和 IgG4 形式比较, 图 2B 是 H5L11 的 IgG1 和 IgG4 形式比较, 图 2C 是 HRP00052 的 IgG1 和 IgG4 形式比较, 图 2D 是 H6L11 的 IgG1 和 IgG4 形式比较, 图 2E 是 H18L61 的 IgG1 和 IgG4 形式比较, 图 2F 是 H12L64 的 IgG1 和 IgG4 形式比较。

图 3: PD-L1 抗体对小鼠 A375 异种移植模型肿瘤体积的影响。

图 4: PD-L1 抗体对小鼠结肠癌模型肿瘤体积的影响。

图 5: PD-L1 抗体对小鼠移植瘤模型肿瘤体积的影响。

## 具体实施方案

### 一. 术语

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

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

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

在本公开中, 本公开所述的抗体轻链可进一步包含轻链恒定区, 所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的  $\kappa$ 、 $\lambda$  链或其变体。

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

抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大, 为可变区 (Fv 区); 靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定, 为恒定区。可变区包括 3 个高变区 (HVR) 和 4 个序列相对保守的骨架区 (FR)。3 个高变区决定抗体的特异性, 又称为互补性决定区 (CDR)。每条轻链可变区 (LCVR) 和重链可变区 (HCVR) 由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区

组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。本公开所述的抗体或抗原结合片段的 LCVR 区和 HCVR 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号规则（LCDR1-3，HCDR1-3）。

本公开的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，优选人源化抗体。

“单克隆抗体”是指从基本上均质抗体的群体获得的抗体，即除可能的变体抗体(例如含有天然存在的突变或在制造单克隆抗体制剂的期间产生的突变，这些变体通常以少量存在)之外，构成所述群体的个别抗体相同和/或结合相同表位。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同，单克隆抗体制备物（制剂）的每个单克隆抗体是针对抗原上的单一决定簇的。因此，修饰语“单克隆”指示如从基本上均质抗体群体获得的抗体的特性，且不应解释为需要通过任何特定方法来制造抗体。例如，本公开的单克隆抗体可通过各种技术制备，所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组 DNA 方法、噬菌体展示方法以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法，此类方法以及用于制备单克隆抗体的其他示例性方法在本文中进行描述。

术语“鼠源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能制备的对人 PD-L1 的单克隆抗体。制备时用 PD-L1 抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本公开一个优选的实施方案中，所述的鼠源 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源  $\kappa$ 、 $\lambda$  链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链恒定区。

术语“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆人抗体的恒定区基因，将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。在本公开一个优选的实施方案中，所述的 PD-L1 嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源  $\kappa$ 、 $\lambda$  链或其变体的轻链恒定区。所述的 PD-L1 嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变(如 YTE 突变或回复突变)的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体。

术语“人源化抗体（humanized antibody）”，也称为 CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody），是指将鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异

源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库（在因特网 [www.mrccpe.com.ac.uk/vbase](http://www.mrccpe.com.ac.uk/vbase) 可获得），以及在 Kabat, E.A. 等人, 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时, 引起的活性下降, 可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变, 以保持活性。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。在本公开一个优选的实施方案中, 人的抗体可变区框架经过设计选择, 其中所述抗体重链可变区上的重链 FR 区序列, 来源于人种系重链 IGHV3-23\*04 和 hJH4.1 的组合序列, 和人种系轻链 IGKV1-12\*01 和 hJK4.1 的组合序列。为避免免疫原性下降的同时, 引起的活性下降, 可对所述的人抗体可变区可进行最少反向突变（回复突变, 即将人抗体来源的 FR 区氨基酸残基突变成原始来源抗体对应位置的氨基酸残基）, 以保持活性。

CDR 的移植可由于与抗原接触的构架残基而导致产生的 PD-L1 抗体或其抗原结合片段对抗原的亲和力减弱。此类相互作用可以是体细胞高度突变的结果。因此, 可能仍然需要将此类供体构架氨基酸移植至人源化抗体的构架。来自非人 PD-L1 抗体或其抗原结合片段的参与抗原结合的氨基酸残基可通过检查鼠单克隆抗体可变区序列和结构来鉴定。CDR 供体构架中与种系不同的的各残基可被认为是相关的。如果不能确定最接近的种系, 那么可将序列与亚型共有序列或具有高相似性百分数的鼠序列的共有序列相比较。稀有构架残基被认为可能是体细胞高度突变的结果, 从而在结合中起着重要作用。

术语抗体的“抗原结合片段”或“功能片段”是指抗体的保持特异性结合抗原(例如, PD-L1) 的能力的一个或多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括(i)Fab 片段, 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段; (ii)F(ab')<sub>2</sub> 片段, 包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段, (iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段; (v) 单结构域或 dAb 片段(Ward 等人, (1989)*Nature*341 : 544-546), 其由 VH 结构域组成; 和(vi) 分离的互补决定区(CDR) 或(vii) 可任选地通过合成的接头连接的两个或更多个分离的 CDR 的组合。此外, 虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码, 但可使用重组方法, 通过合成的接头连接它们, 从而使得其能够产生为其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单个蛋白质链(称为单链 Fv(scFv) ; 参见, 例如, Bird 等人(1988)*Science*242 :423-426 ; 和 Huston 等人(1988)*Proc.Natl.Acad.Sci USA*85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的

“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

本公开的抗原结合片段包括 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、单链抗体 (scFv)、二聚化的 V 区 (双抗体)、二硫键稳定化的 V 区 (dsFv)、包含 CDR 的肽等。

Fab 是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶 (切割 H 链的 224 位的氨基酸残基) 处理 IgG 抗体分子所获得的片段中的具有约 50,000 的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段，其中 H 链 N 端侧的约一半和整个 L 链通过二硫键结合在一起。

本公开的 Fab 可以通过用木瓜蛋白酶处理本公开的特异性识别 PD-L1 并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体来生产。此外，可以通过将编码所述抗体的 Fab 的 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达 Fab 来生产所述 Fab。

F(ab')<sub>2</sub> 是通过用酶胃蛋白酶消化 IgG 铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约 100,000 并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个 Fab 区的抗体片段。

本公开的 F(ab')<sub>2</sub> 可以通过用胃蛋白酶处理本公开的特异性识别 PD-L1 并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体来生产。此外，可以通过用硫醚键或二硫键连接下面描述的 Fab' 来生产所述 F(ab')<sub>2</sub>。

Fab' 是通过切割上述 F(ab')<sub>2</sub> 的铰链区的二硫键而获得的分子量为约 50,000 并具有抗原结合活性的抗体片段。本公开的 Fab' 可以通过用还原剂例如二硫苏糖醇处理本公开的特异性识别 PD-L1 并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的 F(ab')<sub>2</sub> 来生产。

此外，可以通过将编码抗体的 Fab' 片段的 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达 Fab' 来生产所述 Fab'。

术语“单链抗体”、“单链 Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域(或区域; VH) 和抗体轻链可变结构域(或区域; VL) 的分子。此类 scFv 分子可具有一般结构: NH<sub>2</sub>-VL-接头-VH-COOH 或 NH<sub>2</sub>-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成，例如使用 1-4 个重复的变体 (Holliger 等人(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448)。可用于本公开的其他接头由 Alfthan 等人(1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi 等人(2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Hu 等人(1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov 等人(1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 和

Roovers 等人(2001), *Cancer Immunol.* 描述。

本公开的scFv可以通过以下步骤来生产:获得本公开的特异性识别人PD-L1并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA,构建编码scFv的DNA,将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达scFv。

双抗体是其中scFv被二聚体化的抗体片段,是具有二价抗原结合活性的抗体片段。在二价抗原结合活性中,两个抗原可以是相同或不同的。

本公开的双抗体可以通过以下步骤来生产:获得本公开的特异性识别人PD-L1并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA,构建编码scFv的DNA以使肽接头的氨基酸序列长度为8个残基或更少,将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达双抗体。

dsFv是通过将其中每个VH和VL中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽经由半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。可以按照已知方法(*Protein Engineering*, 7,697(1994))基于抗体的三维结构预测来选择被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基。

本公开的dsFv可以通过以下步骤来生产:获得本公开的特异性识别人PD-L1并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA,构建编码dsFv的DNA,将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达dsFv。

包含CDR的肽是通过包含VH或VL的CDR中的一个或多个区域而构成的。包含多个CDR的肽可以被直接相连或经由适合的肽接头相连。

本公开的包含CDR的肽可以通过以下步骤来生产:构建本公开的特异性识别人PD-L1并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的CDR的编码DNA,将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达所述肽。也可以通过化学合成方法例如Fmoc方法或tBoc方法来生产所述包含CDR的肽。

术语“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的6个高变区之一。所述6个CDR的最常用的定义之一由Kabat E.A.等人,(1991)*Sequences of proteins of immunological interest*. NIH Publication 91-3242)提供。如本文中使用的,CDR的Kabat定义应用于轻链可变结构域的CDR1、CDR2和CDR3(CDR L1、CDR L2、CDR L3或L1、

L2、L3)，以及重链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3(CDR H1、CDR H2、CDR H3 或 H2、H3)。

本文中使用的术语“抗体框架”，是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲，其是不具有 CDR 的可变结构域。

人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区的“常规变体”是指现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体，示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区变体，具体替换如现有技术已知的 YTE 突变，L234A 和/或 L235A 突变，或 S228P 突变，或获得 knob-into-hole 结构的突变（使得抗体重链具有 knob-Fc 和 hole-Fc 组合），或上述突变体的组合，这些突变已被证实使得抗体具有新的性能，但不改变抗体可变区的功能。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位(例如，PD-L1 分子上的特定部位)。表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸。参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷，G.E.Morris, Ed.(1996)。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常，抗体以大约小于  $10^{-8}\text{M}$ ，例如大约小于  $10^{-9}\text{M}$ 、 $10^{-10}\text{M}$ 、 $10^{-11}\text{M}$  或更小的亲和力(KD) 结合。

术语“KD”或“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常，本公开的抗体以小于大约  $10^{-7}\text{M}$ ，例如小于大约  $10^{-8}\text{M}$ 、 $10^{-9}\text{M}$  或  $10^{-10}\text{M}$  或更小的解离平衡常数(KD) 结合 PD-L1，例如，如使用表面等离子体共振(SPR) 技术在 BIACORE 仪中测定的。

当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的情况中时，意指在抗原结合蛋白之间竞争，其通过以下测定法来测定：在所述测定法中，待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫学功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如 PD-L1 抗原或其片段)的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争，这些测定例如：固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahli 等，1983，Methods in Enzymology 9: 242-253)；固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Kirkland 等，1986，J.Immunol.137: 3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如 Harlow 和 Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual(抗体，实验室手册)，Cold Spring Harbor Press)；用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA(参见例如 Morel 等，1988，Molec.Immunol.25: 7-15)；固相直接生物素-亲和素 EIA(参

见例如 Cheung, 等, 1990, Virology 176: 546-552); 和直接标记的 RIA(Moldenhauer 等, 1990, Scand.J.Immunol.32: 77-82)。通常所述测定法涉及使用结合荷有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白任一种的固态表面或细胞的纯化的抗原。通过测量在所测抗原结合蛋白存在下结合固态表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常所测抗原结合蛋白过量存在。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括: 结合与参考抗原结合蛋白同一表位的抗原结合蛋白; 和结合充分接近参考抗原结合蛋白的结合表位的邻近表位的抗原结合蛋白, 所述两个表位在空间上互相妨碍发生结合。在本文实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时, 其将抑制(例如降低)至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或 75%或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下, 结合被抑制至少 80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或 97%或更多。

本文中使用的术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的, 但优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时, 核酸是“有效连接的”。例如, 如果启动子或增强子影响编码序列的转录, 那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中, 载体是“质粒”, 其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。在另一个实施方案中, 载体是病毒载体, 其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如, 具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组, 从而随宿主基因组一起复制(例如, 非附加型哺乳动物载体)。

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

术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae)的成员, 例如大肠杆菌(Escherichia coli)或沙门氏菌(Salmonella)的菌株; 芽孢杆菌科(Bacillaceae)例

如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ; 肺炎球菌(*Pneumococcus*) ; 链球菌(*Streptococcus*) 和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO( 中国仓鼠卵巢细胞系) 和 NS0 细胞。

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

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

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

验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

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

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

“外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。“内源性”指根据情况在细胞、生物或人体内产生的物质。

“同源性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100$ 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源；如果两个序列中的 100 个位置有 95 个匹配或同源，那么两个序列为 95%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括后代。因此，单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物，而不考虑转移数目。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下，其由上下文清楚可见。

本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美国专利号 4,683,195 中所述扩增的程序或技术。一般来说，需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息，使得可以设计寡核苷酸引物；这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2 个引物的 5'末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR 可用于扩增特定的 RNA 序列、来自总基因组 DNA 的特定 DNA 序列和由总细胞 RNA 转录的 cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见 Mullis 等(1987) Cold Spring

Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich 编辑, (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被视为用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个实例,但不是唯一的实例,所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶,以扩增或产生核酸的特定部分。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如,“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

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

此外,本公开包括用于治疗与 PD-L1 阳性细胞相关的疾病的药剂,所述药剂包含本公开的单克隆抗体或其抗体片段作为活性成分。

对与 PD-L1 相关的疾病没有限制,只要它是与 PD-L1 相关的疾病即可,例如利用本公开的分子诱导的治疗反应可通过结合人类 PD-L1,然后阻遏 PD-L1 与其配体 PD-1、B7-1 的结合,或杀伤过表达 PD-L1 的肿瘤细胞。因此,当处于适于治疗应用的制备物和制剂中时,本公开的分子对这样一些人是非常有用的,他们患有肿瘤或癌症,优选黑色素瘤、结肠癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、非小细胞肺癌、膀胱癌等。

此外,本公开涉及用于免疫检测或测定 PD-L1 的方法、用于免疫检测或测定 PD-L1 的试剂、用于免疫检测或测定表达 PD-L1 的细胞的方法和用于诊断与 PD-L1 阳性细胞相关的疾病的诊断剂,其包含本公开的特异性识别 PD-L1 并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体或抗体片段作为活性成分。

在本公开中,用于检测或测定 PD-L1 的量的方法可以是任何已知方法。例如,它包括免疫检测或测定方法。

免疫检测或测定方法是使用标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。免疫检测或测定方法的实例包括放射性物质标记的免疫抗体方法 (RIA)、酶免疫测定法 (EIA 或 ELISA)、荧光免疫测定法 (FIA)、发光免疫测定法、蛋白质免疫印迹法、物理化学方法等。

上述与 PD-L1 阳性细胞相关的疾病可以通过用本公开的单克隆抗体或抗体片段检测或测定表达 PD-L1 的细胞来诊断。

为了检测表达多肽的细胞,可以使用已知的免疫检测方法,并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外,可以使用利用 FMAT8100HTS 系统 (Applied

Biosystem) 的荧光抗体染色法等。

在本公开中, 对用于检测或测定 PD-L1 的活体样品没有特别限制, 只要它具有包含表达 PD-L1 的细胞的可能性即可, 例如组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

根据所需的诊断方法, 含有本公开的单克隆抗体或其抗体片段的诊断剂还可以含有用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测反应的试剂。用于执行抗原-抗体反应的试剂包括缓冲剂、盐等。用于检测的试剂包括通常用于免疫检测或测定方法的试剂, 例如识别所述单克隆抗体、其抗体片段或其结合物的标记的第二抗体和与所述标记对应的底物等。

通过改造, 本公开获得了亲和力更高、肿瘤杀伤活性更强、免疫原性更低等效果的 PD-L1 抗体。

## 二. 实施例与测试例

以下结合实施例进一步描述本公开, 但这些实施例并非限制着本公开的范围。本公开实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 如冷泉港的抗体技术实验手册, 分子克隆手册; 或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂, 为市场购买的常规试剂。

### 实施例 1. PD-L1 抗体的亲和力成熟酵母文库的构建以及文库的验证

为获得药效更佳的抗人PD-L1抗体, 在HRP00052和HRP00049两个抗体的基础上设计并制备scFv抗体的亲和力成熟酵母文库, 并从中筛选新的人PD-L1抗体。HRP00052和HRP00049的CDR和轻重链可变区序列均来自WO2017084495A1。具体序列如下:

HRP00049: 9-2(H2/L10) IgG4(AA)(S228P)

重链: HRP00049 抗体重链序列: (SEQ ID NO: 1)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISNDYWTWIRQHPGKGLEYIGYISYTGS  
TYYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARSGGWLAPFDYWGRGTLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDPKPSNTKVDKRVEVKYGPCCPPCPAPEAA  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT  
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR  
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

HRP00049 抗体重链序列编码基因序列: (SEQ ID NO: 2)

CAGGTGCAACTGCAGGAGAGCGGCCCCGGACTCGTGAAACCCTCCCAGACCC

TGAGCCTGACCTGTACCGTGAGCGGCGGCAGCATCAGCAACGACTACTGGACTTGG  
ATCAGGCAGCACCCCGGCAAAGGCCTGGAGTACATCGGCTACATCAGCTACACCGG  
CTCCACCTACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGGGTGACCATCAGCCGGGACACCA  
GCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCTGCCGACACAGCCGT  
GTACTATTGTGCCAGAAGCGGCGGATGGCTGGCCCCCTTTCGACTACTGGGGCAGAG  
GCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG  
 GCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA  
 AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG  
 CGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA  
 GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA  
 GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTC  
 CCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCTGCTGGGGGACCATCAGTCTTCCTG  
 TCCCCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTG  
 CGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG  
 GATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACA  
 GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC  
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAA  
 CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCC  
 ATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC  
 TTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA  
 ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC  
 AGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCG  
 TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG  
 GGTAATGA

轻链：HRP00049 抗体轻链序列：（SEQ ID NO： 3）

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYHSNQKHS  
LAWYQQKPGQPPKLLIYG  
ASTRESGV  
PDRFSGSGSDFTLT  
ISSLQAEDVAVYYCQ  
QYYGYPYTFGGGTKVEIKRT  
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
 SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HRP00049 抗体轻链序列编码基因序列：（SEQ ID NO： 4）

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCTGATAGCCTGGCTGTGAGCCTGGGCGAGAG

AGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGTTCTACCATAGCAACCAGAAGC  
ACAGCCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCCAACCCCCCAAGCTGCTGATCTAC  
GGCGCCAGCACAAGAGAGAGCGGAGTGCCCGATAGGTTTCAGCGGCAGCGGATCCG  
GCACCGATTTACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTAC  
TACTGCCAGCAGTACTACGGCTACCCTTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGA  
GATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA  
GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA  
GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG  
AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGA  
CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA  
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

HRP00052: 24D5(GF)IgG4(AA) (S228P)

重链: HRP00052 抗体重链序列: (SEQ ID NO: 5)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIG  
PNSGFTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYW  
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG  
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPP  
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN  
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR  
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS  
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

HRP00052 抗体重链序列编码基因序列: (SEQ ID NO: 6)

CAGGTGCAACTGGTGCAGAGCGGTGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCAAGCG  
TGAAAGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGG  
GTGAGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGGATCGGGCCCAACA  
GTGGTTTCACTAGCTACAATGAAAAGTTCAAGAACAGGGTAACCATGACCAGGGAC  
ACCTCCACCAGCACAGTGTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCG  
CCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCGGCAGCAGCTACGACTACTTCGACTATTGGGGC  
CAGGGCACCAACCGTGACCGTGAGCAGTGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC  
CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG  
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGAC

CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA  
 GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA  
 CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATAT  
 GGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCTGCTGGGGGACCATCAGTCTT  
 CCTGTTCCCCC AAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA  
 CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTA  
 CGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTC  
 AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA  
 CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAG  
 AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGC  
 CCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAA  
 AGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG  
 AACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA  
 CAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC  
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTC  
 TCTGGGTAAATGA

轻链：HRP00052 抗体轻链序列：（SEQ ID NO： 7）

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPLLIYAASN  
LESGVPARFSGSGSGTDFTLTNPVEAEDTANYCYQQSFEDPLTFGQGTKLEIKRTVAAP  
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HRP00052 抗体轻链序列编码基因序列：（SEQ ID NO： 8）

GACATCGTGCTGACCCAGAGTCCCGCCTCACTTGCCGTGAGCCCCGGTCAGAG  
GGCCACCATCACCTGTAGGGCCAGCGAGAGCGTGAGCATCCACGGCACCCACCTG  
ATGCACTGGTATCAACAGAAACCCGGCCAGCCCCCAA ACTGCTGATCTACGCCGC  
CAGCAACCTGGAGAGCGGCGTGCCCGCCAGGTTCAGCGGCTCCGGCAGCGGCACC  
GACTTCACCCTCACTATCAACCCCGTGGAGGCCGAGGACACCGCCA ACTACTACTG  
CCAGCAGAGCTTCGAGGACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATC  
AAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG  
 AAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC  
 AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT

CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG  
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG  
GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

上述抗体序列中下划线部分为抗体的可变区部分，其他正体部分为抗体恒定区部分。

酵母文库的构建：设计简并引物，通过PCR的方法将设计的突变氨基酸引入到HRP00049和HRP00052抗体的文库中。再通过二代测序的方法对文库的QC进行验证，其中基于HRP00049和HRP00052序列分别各构建了7个库容为 $10^9$ 级别的抗体酵母文库。

## 实施例 2. 抗原的制备

设计并合成人 PD-L1-IgG1Fc 融合蛋白，经 Protein A 的亲和柱纯化，可获得高纯度的重组 PD-L1-Fc 蛋白，用于检测抗 PD-L1 抗体与抗原的结合。

人 PD-L1-IgG1Fc: (SEQ ID NO: 9)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALI  
VYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGV  
YRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTS  
SDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELP  
LAHPPNEREPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

注释：信号肽+胞外区+hIgG1Fc。

## 实施例 3. 抗体的筛选

HRP00052 文库利用生物素化的人 PD-L1-hIgG1Fc 抗原，经过两轮 MACS 筛选(链霉素磁珠，Invitrogen)和两轮 FACS 筛选 (BD FACSAria™ FUSION)。再挑选 400 个左右的酵母单克隆培养和诱导表达，FACS(BD FACSCanto II)检测酵母单克隆对人 PD-L1-hIgG1Fc 抗原的结合，挑选出比野生型 HRP00052 抗体亲和力高的酵母单克隆测序验证，经过对测序克隆进行比对分析，去除冗余序列之后，将非冗余序列转换成全长 IgG ( $\gamma 1, \kappa$ )进行哺乳动物细胞表达。亲和纯化之后的全长抗体采用 BIAcore™ X-100 (GE Life Sciences)进行亲和力测定。

HRP00049文库利用生物素化的人PD-L1-hIgG1Fc抗原和生物素化的小鼠PD-L1-hIgG1Fc，经过三轮MACS筛选和三轮FACS筛选。再挑选400个左右的酵母单克隆培养

和诱导表达，FACS检测酵母单克隆对人PD-L1-hIgG1Fc抗原和小鼠PD-L1-hIgG1Fc抗原的结合，挑选出同时结合人PD-L1-hIgG1Fc抗原和小鼠PD-L1-hIgG1Fc抗原的酵母单克隆测序验证。去除冗余序列之后，将非冗余序列转换成全长IgG ( $\gamma 1, \kappa$ )进行哺乳动物细胞表达。亲和纯化之后的全长抗体采用BIAcore™ X-100 (GE Life Sciences)进行亲和力测定。

经筛选确认选择抗体CDR区序列。

#### 来自 HRP00049 突变文库的抗体

基于 HRP00049 序列的突变文库所挑选的克隆与 HRP00049 在 HCDR1 和 HCDR2 上有差异。相关的 CDR 序列或通式及其相应重链可变区如下所描述。

HCDR1 为 DGSAYWS (SEQ ID NO: 10) 或 NDYWT (SEQ ID NO: 11)

HCDR2  $X_1ISX_2AGSTYX_3TPSLKG$  SEQ ID NO: 12

HCDR3 SGGWLAPFDY SEQ ID NO: 13

LCDR1 KSSQSLFYHSNQKHSLA SEQ ID NO: 14

LCDR2 GASTRES SEQ ID NO: 15

LCDR3 QQYYGYPYT SEQ ID NO: 16

进而获得相关的重链可变区序列通式如下：

$QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISDGSAYWSWIRQHPGKGLEYIGX_1ISX_2AGSTYX_3TPSLKGRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGGWLAPFDYWGRGTLVTVSS$  (SEQ ID NO: 17)

或

$QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISNDYWTWIRQHPGKGLEYIGX_1ISX_2AGSTYX_3TPSLKGRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGGWLAPFDYWGRGLTVTVSS$  (SEQ ID NO: 18)。上述 SEQ ID NO.12 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO.17 或 18 所示的重链可变区中  $X_1$  选自 F 或 M,  $X_2$  选自 R 或 V,  $X_3$  选自 N 或 H。

获得相关的轻链可变区序列如下：(SEQ ID NO: 19)

$DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYHSNQKHSLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYGYPYTFGGGTKVEIK$

#### 来自 HRP00052 突变文库的抗体

基于 HRP00052 序列的突变文库所挑选的克隆与 HRP00052 在 HCDR1 和 HCDR2 及 LCDR2 上有差异。相关的 HCDR1 和 HCDR2 及 LCDR2 通式及其相应重轻链可变区如下所描述。

|       |                                                                                                                         |               |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| HCDR1 | X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> WMX <sub>6</sub>                                                                          | SEQ ID NO: 20 |
| HCDR2 | RIX <sub>7</sub> PX <sub>8</sub> X <sub>9</sub> GX <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> YNEKX <sub>13</sub> KN | SEQ ID NO: 21 |
| HCDR3 | GGSSYDYFDY                                                                                                              | SEQ ID NO: 22 |
| LCDR1 | RASESVSIHGTHLMH                                                                                                         | SEQ ID NO: 23 |
| LCDR2 | X <sub>14</sub> ASX <sub>15</sub> X <sub>16</sub> X <sub>17</sub> S                                                     | SEQ ID NO: 24 |
| LCDR3 | QQSFEDPLT                                                                                                               | SEQ ID NO: 25 |

进而获得相关的重链可变区序列通式如下：(SEQ ID NO: 26)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>WMX<sub>6</sub>WVRQAPGQGLEWMGR  
IX<sub>7</sub>PX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>GX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>YNEKX<sub>13</sub>KNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGGSS  
YDYFDYWGQGTTVTVSS, 上述 SEQ ID NO. 20 和 21 所示的 HCDR1 和 HCDR2 及 SEQ  
 ID NO.26 所示的重链可变区中 X<sub>4</sub> 选自 S 和 D, X<sub>5</sub> 选自 Y 和 K, X<sub>6</sub> 选自 H 和 M, X<sub>7</sub> 选  
 自 T, S, H 和 G, X<sub>8</sub> 选自 S, N 和 G, X<sub>9</sub> 选自 S, L 和 G, X<sub>10</sub> 选自 F, L, W 和 M, X<sub>11</sub>  
 选自 A, P 和 T, X<sub>12</sub> 选自 M, V, L 和 S, X<sub>13</sub> 选自 F 和 Y。

进而获得相关的轻链可变区序列通式如下：(SEQ ID NO: 27)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPLLIYX<sub>14</sub>AS  
X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>SGVPARFSGSGSGTDFTLTNPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIK ,  
 上述 SEQ ID NO: 24 所示的 LCDR2 及 SEQ ID NO.27 所示的轻链可变区中 X<sub>14</sub> 选自 V 和  
 A, X<sub>15</sub> 选自 Y 和 N, X<sub>16</sub> 选自 A, L 和 V, X<sub>17</sub> 选自 E, F, Y 和 A(其中包括 X<sub>17</sub> 选自 E,  
 F 和 A 与 X<sub>17</sub> 选自 Y 的情况)。获得的具体相关序列包括但不限于表 1 和表 2 所述:

表 1.亲和力筛选所确定的重链可变区序列

| 重链可变区    | VH 序列代号       | 包含的 HCDR1 序列                    | 包含的 HCDR2 序列                               | 包含的 HCDR3 序列                         |
|----------|---------------|---------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------|
| 9-2 H5   | SEQ ID NO: 42 | DGSAYWS<br>(SEQ ID NO: 10)      | FISRAGSTYNTPSLKG<br>(SEQ ID NO: 28)        | SGGWLAPFDY<br>(SEQ ID NO: 13)        |
| 9-2 H6   | SEQ ID NO: 43 | <u>NDYWT</u><br>(SEQ ID NO: 11) | <u>FISRAGSTYNTPSLKG</u><br>(SEQ ID NO: 28) | <u>SGGWLAPFDY</u><br>(SEQ ID NO: 13) |
| 9-2 H7   | SEQ ID NO: 44 | <u>NDYWT</u><br>(SEQ ID NO: 11) | <u>MISVAGSTYHTPSLKG</u><br>(SEQ ID NO: 29) | <u>SGGWLAPFDY</u><br>(SEQ ID NO: 13) |
| 24D5 H12 | SEQ ID NO: 46 | SYWMH<br>(SEQ ID NO: 30)        | RITPSSGFAMYNEKFKN<br>(SEQ ID NO: 32)       | GGSSYDYFDY<br>(SEQ ID NO: 22)        |
| 24D5 H13 | SEQ ID NO: 47 | SYWMH<br>(SEQ ID NO: 30)        | RISPSLGLAVYNEKFKN<br>(SEQ ID NO: 33)       | GGSSYDYFDY<br>(SEQ ID NO: 22)        |
| 24D5 H14 | SEQ ID NO: 48 | SYWMH<br>(SEQ ID NO: 30)        | RIHPSLGLPLYNEKFKN<br>(SEQ ID NO: 34)       | GGSSYDYFDY<br>(SEQ ID NO: 22)        |
| 24D5 H15 | SEQ ID NO:    | DKWMM                           | RITPSSGFAMYNEKFKN                          | GGSSYDYFDY                           |

|          |                  |                          |                                      |                               |
|----------|------------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
|          | 49               | (SEQ ID NO: 31)          | (SEQ ID NO: 32)                      | (SEQ ID NO: 22)               |
| 24D5 H16 | SEQ ID NO:<br>50 | SYWMH<br>(SEQ ID NO: 30) | RISPSLGLAVYNEKFKN<br>(SEQ ID NO: 33) | GGSSYDYFDY<br>(SEQ ID NO: 22) |
| 24D5 H17 | SEQ ID NO:<br>51 | SYWMH<br>(SEQ ID NO: 30) | RIGPNLGWAMYNEKYKN<br>(SEQ ID NO: 35) | GGSSYDYFDY<br>(SEQ ID NO: 22) |
| 24D5 H18 | SEQ ID NO:<br>52 | SYWMH<br>(SEQ ID NO: 30) | RISPSSGMAVYNEKFKN<br>(SEQ ID NO: 36) | GGSSYDYFDY<br>(SEQ ID NO: 22) |
| 24D5 H19 | SEQ ID NO:<br>53 | SYWMH<br>(SEQ ID NO: 30) | RISPGGGFTLYNEKFKN<br>(SEQ ID NO: 37) | GGSSYDYFDY<br>(SEQ ID NO: 22) |
| 24D5 H20 | SEQ ID NO:<br>54 | SYWMH<br>(SEQ ID NO: 30) | RIGPNSGFTSYNEKFKN<br>(SEQ ID NO: 38) | GGSSYDYFDY<br>(SEQ ID NO: 22) |
| 24D5 H21 | SEQ ID NO:<br>66 | DKWMM<br>(SEQ ID NO: 31) | RITPSSGFAMYNEKFKN<br>(SEQ ID NO: 32) | GGSSYDYFDY<br>(SEQ ID NO: 22) |

表 2.亲和力筛选所确定的轻链可变区序列

| 轻链可变区    | VL 序列代号       | 包含的 LCDR1 序列                                           | 包含的 LCDR2 序列                      | 包含的 LCDR3 序列                        |
|----------|---------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 9-2 L11  | SEQ ID NO: 45 | <u>KSSQSLFYHSNQ</u><br><u>KHSLA</u><br>(SEQ ID NO: 14) | <u>GASTRES</u><br>(SEQ ID NO: 15) | <u>QQYYGYPYT</u><br>(SEQ ID NO: 16) |
| 24D5 L64 | SEQ ID NO: 55 | <u>RASESVSIHGTH</u><br><u>LMH</u><br>(SEQ ID NO: 23)   | <u>VASYAAS</u><br>(SEQ ID NO: 39) | <u>QQSFEDPLT</u><br>(SEQ ID NO: 25) |
| 24D5 L61 | SEQ ID NO: 56 | <u>RASESVSIHGTH</u><br><u>LMH</u><br>(SEQ ID NO: 23)   | <u>AASNLES</u><br>(SEQ ID NO: 40) | <u>QQSFEDPLT</u><br>(SEQ ID NO: 25) |
| 24D5 L66 | SEQ ID NO: 57 | <u>RASESVSIHGTH</u><br><u>LMH</u><br>(SEQ ID NO: 23)   | <u>VASNVFS</u><br>(SEQ ID NO: 41) | <u>QQSFEDPLT</u><br>(SEQ ID NO: 25) |
| 24D5 L67 | SEQ ID NO: 70 | <u>RASESVSIHGTH</u><br><u>LMH</u><br>(SEQ ID NO: 23)   | <u>VASNVES</u><br>(SEQ ID NO: 67) | <u>QQSFEDPLT</u><br>(SEQ ID NO: 25) |
| 24D5 L68 | SEQ ID NO: 71 | <u>RASESVSIHGTH</u><br><u>LMH</u><br>(SEQ ID NO: 23)   | <u>VASNVWS</u><br>(SEQ ID NO: 68) | <u>QQSFEDPLT</u><br>(SEQ ID NO: 25) |
| 24D5 L69 | SEQ ID NO: 72 | <u>RASESVSIHGTH</u><br><u>LMH</u>                      | <u>VASNVYS</u><br>(SEQ ID NO: )   | <u>QQSFEDPLT</u><br>(SEQ ID NO: )   |

|  |  |                    |     |     |
|--|--|--------------------|-----|-----|
|  |  | (SEQ ID NO:<br>23) | 69) | 25) |
|--|--|--------------------|-----|-----|

衍生自 HRP00049 抗体突变文库的抗体轻重链可变区具体序列:

9-2 H5 重链可变区 (SEQ ID NO: 42)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISDGSAYWSWIRQHPGKGLEYIGFISRA  
GSTYNTPSLKGRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGGWLAPFDYWGRGT  
 LVTVSS

9-2 H6 重链可变区 (SEQ ID NO: 43)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISNDYWTWIRQHPGKGLEYIGFISRAGS  
TYNTPSLKGRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGGWLAPFDYWGRGTLV  
 TVSS

9-2 H7 重链可变区 (SEQ ID NO: 44)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISNDYWTWIRQHPGKGLEYIGMISVAGS  
TYHTPSLKGRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGGWLAPFDYWGRGTLV  
 TVSS

9-2 L11 轻链可变区 (SEQ ID NO: 45)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYHSNQHSLAWYQQKPGQPPKLLIYG  
ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYGYPTYTFGGGTKVEIK

衍生自 HRP00052 抗体突变文库的抗体轻重链可变区具体序列:

24D5 H12 重链可变区 (SEQ ID NO: 46)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIT  
PSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYW  
 GQGTTVTVSS

24D5 H13 重链可变区 (SEQ ID NO: 47)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIS  
PSLGLAVYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYW  
 GQGTTVTVSS

24D5 H14 重链可变区 (SEQ ID NO: 48)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIH  
PSLGLPLYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYW  
 GQGTTVTVSS

24D5 H15 重链可变区 (SEQ ID NO: 49)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKANGYTFTDKWMMWVRQAPGQGLEWMGRITPSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYWGQGTTVTVSS

24D5 H16 重链可变区 (SEQ ID NO: 50)

QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRISPSLGLAVYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYWGGGTTVTVSS

24D5 H17 重链可变区 (SEQ ID NO: 51)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIGPNLGWAMYNEKYKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLGSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYWGQGTTVTVSS

24D5 H18 重链可变区 (SEQ ID NO: 52)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRISPSSGMAVYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYWGGGTTVTVSS

24D5 H19 重链可变区 (SEQ ID NO: 53)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRISPGGGFTLYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYWGGGTTVTVSS

24D5 H20 重链可变区 (SEQ ID NO: 54)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIGPNSGFTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYWGGGTTVTVSS

24D5 H21 重链可变区 (SEQ ID NO: 66)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDKWMMWVRQAPGQGLEWMGRITPSSGFAMYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGGSSYDYFDYWGGGTTVTVSS

24D5 L64 轻链可变区 (SEQ ID NO: 55)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPLLIYVASYAASGVPARFSGSGSGTDFTLTNPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGGGTKLEIK

24D5 L61 轻链可变区 (SEQ ID NO: 56)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLIYAAS  
NLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIK

24D5 L66 轻链可变区 (SEQ ID NO: 57)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLIYVASN  
VFSGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIK

24D5 L67 轻链可变区 (SEQ ID NO: 70)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLIYVASN  
VESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIK

24D5 L68 轻链可变区 (SEQ ID NO: 71)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLIYVASN  
VWSGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIK

24D5 L69 轻链可变区 (SEQ ID NO: 72)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLIYVASN  
VYSGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIK

上述抗体的轻重链可变区, 选用人重链 IgG1/轻链 kappa 的恒定区分别与各重链可变区和轻链可变区组合, 形成完整的抗体重链和轻链, 具体重链恒定区和轻链恒定区序列如下:

IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO: 58)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

kappa 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 59)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

表 3 由 HRP00049 突变衍生的完整抗体的轻重链可变区组合

| 抗体名称  | 重轻链可变区组合         |
|-------|------------------|
| H5L11 | 9-2 H5 和 9-2 L11 |
| H6L11 | 9-2 H6 和 9-2 L11 |
| H7L11 | 9-2 H7 和 9-2 L11 |

表 4-1 由 HRP00052 突变衍生的完整抗体的轻重链可变区组合

| 可变区组合名称 | 重轻链可变区组合            | 可变区组合名称 | 重轻链可变区组合            |
|---------|---------------------|---------|---------------------|
| H12L64  | 24D5 H12 和 24D5 L64 | H17L61  | 24D5 H17 和 24D5 L61 |
| H12L61  | 24D5 H12 和 24D5 L61 | H18L61  | 24D5 H18 和 24D5 L61 |
| H13L61  | 24D5 H13 和 24D5 L61 | H19L61  | 24D5 H19 和 24D5 L61 |
| H14L61  | 24D5 H14 和 24D5 L61 | H20L66  | 24D5 H20 和 24D5 L66 |
| H15L61  | 24D5 H15 和 24D5 L61 | H20L64  | 24D5 H20 和 24D5 L64 |
| H16L61  | 24D5 H16 和 24D5 L61 |         |                     |

表 4-2 由 HRP00052 突变衍生的完整抗体的轻重链可变区组合

| 可变区名称    | 24D5 L61 | 24D5 L64 | 24D5 L66 | 24D5 L67 | 24D5 L68 | 24D5 L69 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 24D5 H12 | H12L61   | H12L64   | H12L66   | H12L67   | H12L68   | H12L69   |
| 24D5 H13 | H13L61   | H13L64   | H13L66   | H13L67   | H13L68   | H13L69   |
| 24D5 H14 | H14L61   | H14L64   | H14L66   | H14L67   | H14L68   | H14L69   |
| 24D5 H15 | H15L61   | H15L64   | H15L66   | H15L67   | H15L68   | H15L69   |
| 24D5 H16 | H16L61   | H16L64   | H16L66   | H16L67   | H16L68   | H16L69   |
| 24D5 H17 | H17L61   | H17L64   | H17L66   | H17L67   | H17L68   | H17L69   |
| 24D5 H18 | H18L61   | H18L64   | H18L66   | H18L67   | H18L68   | H18L69   |
| 24D5 H19 | H19L61   | H19L64   | H19L66   | H19L67   | H19L68   | H19L69   |
| 24D5 H20 | H20L61   | H20L64   | H20L66   | H20L67   | H20L68   | H20L69   |
| 24D5 H21 | H21L61   | H21L64   | H21L66   | H21L67   | H21L68   | H21L69   |

在本公开具体实施方案中,如表 5-1 和表 5-2 所述衍生自 HRP00049 和 HRP00052 突变抗体文库中的重轻链可变区,在与重轻链恒定区连接形成完整抗体时,均表示与上述人 IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO: 58) 和 kappa 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 59) 连接形成完整抗体,如 H15L61 即指由 H15 与 IgG1 重链恒定区连接形成重链和 L61 与 kappa 轻链恒定区连接形成轻链,轻重链组合形成完整抗体,其他命名类推。

HRP00052-IgG1 则指将 HRP00052 的重链恒定区 (IgG4 亚类) 替换为上述 IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO: 58) 后形成的完整抗体。

表 5-1 重链可变区连接 IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO: 58) 和轻链可变区连接

kappa 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 59) 后的全长抗体名称

| 可变区名称    | 24D5 L61 | 24D5 L64 | 24D5 L66 | 24D5 L67 | 24D5 L68 | 24D5 L69 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 24D5 H12 | H12L61   | H12L64   | H12L66   | H12L67   | H12L68   | H12L69   |
| 24D5 H13 | H13L61   | H13L64   | H13L66   | H13L67   | H13L68   | H13L69   |
| 24D5 H14 | H14L61   | H14L64   | H14L66   | H14L67   | H14L68   | H14L69   |
| 24D5 H15 | H15L61   | H15L64   | H15L66   | H15L67   | H15L68   | H15L69   |
| 24D5 H16 | H16L61   | H16L64   | H16L66   | H16L67   | H16L68   | H16L69   |

|          |        |        |        |        |        |        |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 24D5 H17 | H17L61 | H17L64 | H17L66 | H17L67 | H17L68 | H17L69 |
| 24D5 H18 | H18L61 | H18L64 | H18L66 | H18L67 | H18L68 | H18L69 |
| 24D5 H19 | H19L61 | H19L64 | H19L66 | H19L67 | H19L68 | H19L69 |
| 24D5 H20 | H20L61 | H20L64 | H20L66 | H20L67 | H20L68 | H20L69 |
| 24D5 H21 | H21L61 | H21L64 | H21L66 | H21L67 | H21L68 | H21L69 |

表 5-2 重链可变区连接 IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO: 58) 和轻链可变区连接 kappa 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 59) 后的全长抗体名称

| 可变区名称   | 9-2 H5 | 9-2 H6 | 9-2 H7 |
|---------|--------|--------|--------|
| 9-2 L11 | H5L11  | H6L11  | H7L11  |

为了与连接人 IgG1 重链恒定区的完整抗体进行对比, 某些具体实施方案中, 表 6-1 和表 6-2 中的全长抗体, 是上述衍生自 HRP00049 和 HRP00052 突变抗体文库中筛选获得的重轻链可变区分别与下述人 IgG4 重链恒定区 (如 SEQ ID NO: 60 所示, 含 S228P 和 234A235A 突变) 和 kappa 轻链恒定区 (同 SEQ ID NO: 59) 连接形成完整抗体, 如 H15L61-IgG4 即指由 H15 与 IgG4 重链恒定区连接形成重链和 L61 与 kappa 轻链恒定区连接形成轻链, 轻重链组合形成完整抗体, 其他命名类推。

人 IgG4 重链恒定区: (SEQ ID NO: 60)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTT  
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR  
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

表 6-1 重链可变区连接人 IgG4 重链恒定区 (SEQ ID NO: 60) 和轻链可变区连接

kappa 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 59) 后的全长抗体名称

| 可变区名称    | 24D5 L61    | 24D5 L64    | 24D5 L66    | 24D5 L67    | 24D5 L68    | 24D5 L69    |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 24D5 H12 | H12L61-IgG4 | H12L64-IgG4 | H12L66-IgG4 | H12L67-IgG4 | H12L68-IgG4 | H12L69-IgG4 |
| 24D5 H13 | H13L61-IgG4 | H13L64-IgG4 | H13L66-IgG4 | H13L67-IgG4 | H13L68-IgG4 | H13L69-IgG4 |
| 24D5 H14 | H14L61-IgG4 | H14L64-IgG4 | H14L66-IgG4 | H14L67-IgG4 | H14L68-IgG4 | H14L69-IgG4 |
| 24D5 H15 | H15L61-IgG4 | H15L64-IgG4 | H15L66-IgG4 | H15L67-IgG4 | H15L68-IgG4 | H15L69-IgG4 |
| 24D5 H16 | H16L61-IgG4 | H16L64-IgG4 | H16L66-IgG4 | H16L67-IgG4 | H16L68-IgG4 | H16L69-IgG4 |

|             |                 |                 |                 |                 |                 |             |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| 24D5<br>H17 | H17L61-<br>IgG4 | H17L64-<br>IgG4 | H17L66-<br>IgG4 | H17L67-<br>IgG4 | H17L68-<br>IgG4 | H17L69-IgG4 |
| 24D5<br>H18 | H18L61-<br>IgG4 | H18L64-<br>IgG4 | H18L66-<br>IgG4 | H18L67-<br>IgG4 | H18L68-<br>IgG4 | H18L69-IgG4 |
| 24D5<br>H19 | H19L61-<br>IgG4 | H19L64-<br>IgG4 | H19L66-<br>IgG4 | H19L67-<br>IgG4 | H19L68-<br>IgG4 | H19L69-IgG4 |
| 24D5<br>H20 | H20L61-<br>IgG4 | H20L64-<br>IgG4 | H20L66-<br>IgG4 | H20L67-<br>IgG4 | H20L68-<br>IgG4 | H20L69-IgG4 |
| 24D5<br>H21 | H21L61-<br>IgG4 | H21L64-<br>IgG4 | H21L66-<br>IgG4 | H21L67-<br>IgG4 | H21L68-<br>IgG4 | H21L69-IgG4 |

表 6-2 重链可变区连接人 IgG4 重链恒定区 (SEQ ID NO: 60) 和轻链可变区连接

kappa 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 59) 后的全长抗体名称

| 可变区名称   | 9-2 H5     | 9-2 H6     | 9-2 H7     |
|---------|------------|------------|------------|
| 9-2 L11 | H5L11-IgG4 | H6L11-IgG4 | H7L11-IgG4 |

某些具体实施方案中, 表 7-1 和表 7-2 中的全长抗体, 是上述衍生自 HRP00049 和 HRP00052 突变抗体文库中筛选获得的重轻链可变区分别与下述人 IgG4 S228P 重链恒定区 (如 SEQ ID NO: 65 所示, 含 S228P 突变) 和 kappa 轻链恒定区 (同 SEQ ID NO: 59) 连接形成完整抗体, 如 H15L61-IgG4 即指由 H15 与 IgG4 重链恒定区连接形成重链和 L61 与 kappa 轻链恒定区连接形成轻链, 轻重链组合形成完整抗体, 其他命名类推。IgG4 S228P 的重链恒定区序列如下: (SEQ ID NO: 65)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTT  
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

表 7-1 重链可变区连接人 IgG4 S228P 重链恒定区 (SEQ ID NO: 65) 和轻链可变

区连接 kappa 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 59) 后的全长抗体名称

| 可变区<br>名称   | 24D5 L61              | 24D5 L64              | 24D5 L66              | 24D5 L67              | 24D5 L68              | 24D5 L69             |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| 24D5<br>H12 | H12L61-<br>IgG4 S228P | H12L64-<br>IgG4 S228P | H12L66-<br>IgG4 S228P | H12L67-<br>IgG4 S228P | H12L68-<br>IgG4 S228P | H12L69-IgG4<br>S228P |
| 24D5<br>H13 | H13L61-<br>IgG4 S228P | H13L64-<br>IgG4 S228P | H13L66-<br>IgG4 S228P | H13L67-<br>IgG4 S228P | H13L68-<br>IgG4 S228P | H13L69-IgG4<br>S228P |
| 24D5<br>H14 | H14L61-<br>IgG4 S228P | H14L64-<br>IgG4 S228P | H14L66-<br>IgG4 S228P | H14L67-<br>IgG4 S228P | H14L68-<br>IgG4 S228P | H14L69-IgG4<br>S228P |
| 24D5        | H15L61-               | H15L64-               | H15L66-               | H15L67-               | H15L68-               | H15L69-IgG4          |

|             |                       |                       |                       |                       |                       |                      |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| H15         | IgG4 S228P            | IgG4 S228P            | IgG4 S228P            | IgG4 S228P            | IgG4 S228P            | S228P                |
| 24D5<br>H16 | H16L61-<br>IgG4 S228P | H16L64-<br>IgG4 S228P | H16L66-<br>IgG4 S228P | H16L67-<br>IgG4 S228P | H16L68-<br>IgG4 S228P | H16L69-IgG4<br>S228P |
| 24D5<br>H17 | H17L61-<br>IgG4 S228P | H17L64-<br>IgG4 S228P | H17L66-<br>IgG4 S228P | H17L67-<br>IgG4 S228P | H17L68-<br>IgG4 S228P | H17L69-IgG4<br>S228P |
| 24D5<br>H18 | H18L61-<br>IgG4 S228P | H18L64-<br>IgG4 S228P | H18L66-<br>IgG4 S228P | H18L67-<br>IgG4 S228P | H18L68-<br>IgG4 S228P | H18L69-IgG4<br>S228P |
| 24D5<br>H19 | H19L61-<br>IgG4 S228P | H19L64-<br>IgG4 S228P | H19L66-<br>IgG4 S228P | H19L67-<br>IgG4 S228P | H19L68-<br>IgG4 S228P | H19L69-IgG4<br>S228P |
| 24D5<br>H20 | H20L61-<br>IgG4 S228P | H20L64-<br>IgG4 S228P | H20L66-<br>IgG4 S228P | H20L67-<br>IgG4 S228P | H20L68-<br>IgG4 S228P | H20L69-IgG4<br>S228P |
| 24D5<br>H21 | H21L61-<br>IgG4 S228P | H21L64-<br>IgG4 S228P | H21L66-<br>IgG4 S228P | H21L67-<br>IgG4 S228P | H21L68-<br>IgG4 S228P | H21L69-IgG4<br>S228P |

表 7-2 重链可变区连接人 IgG4 S228P 重链恒定区 (SEQ ID NO: 65) 和轻链可变区连接 kappa 轻链恒定区 (SEQ ID NO: 59) 后的全长抗体名称

| 可变区名称   | 9-2 H5           | 9-2 H6           | 9-2 H7           |
|---------|------------------|------------------|------------------|
| 9-2 L11 | H5L11-IgG4 S228P | H6L11-IgG4 S228P | H7L11-IgG4 S228P |

具体轻重链恒定区并非作为本公开抗体恒定区的限制，也可选用本领域其它已知的轻重链恒定区及其突变体来增加其性能。

本公开以 Merck 的 PD-L1 抗体 Avelumab (A09) 和/或 Genetech 的 3280A 为阳性对照，其中 A09 的轻重链氨基酸序列 (来源自 US20140341917) 如下：

>A09 重链：(SEQ ID NO: 61)

EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y I M M W V R Q A P G K G L E W V S S I Y P S G  
G I T F Y A D T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R I K L G T V T T V D Y W G Q G  
T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T  
F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P  
C P A E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N  
A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R  
E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S  
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

>A09 轻链：(SEQ ID NO: 62)

Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S S D V G G Y N Y V S W Y Q Q H P G K A P K L M I Y D V S N  
R P S G V S N R F S G S K S G N T A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S S T R V F G T G T K V T V L G Q P K  
A N P T V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D G S P V K A G V E T T K P S K Q S  
N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S

3280A(Genetechnology, Atezolizumab, WHO Drug Information, Vol. 28, No. 4, 2014, P488)的轻重链氨基酸序列如下:

>3280A 重链: (SEQ ID NO: 63)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPY  
GGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGO  
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP  
PCPAPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
KSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>3280A 轻链: (SEQ ID NO: 64)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWAYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS  
GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS  
SSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEN

PD-L1 抗体经常规方法纯化获得。

以下实施例中抗体均为全长抗体

#### 实施例 4. 抗体和配体阻断试验

深入研究了本品对 PD-L1 与 PD1 结合的阻断作用, 同时与在临床试验中的同类产品进行了比较。方法参照 WO2017084495A1 测试例 2 和 3, 在小鼠 PD-L1/PD-1 结合阻断试验中使用人 PD-L1 抗体阻断小鼠 PD-L1/PD-1 的结合。数据详见下表 8。

表 8 PD-L1 抗体阻断 PD-L1 与其配体的结合测试

| 抗体            | 阻断人 PD-L1/PD-1<br>结合 (10 $\mu$ g/ml*)<br>IC50 (ng/ml) | 阻断小鼠 PD-L1/PD-1<br>结合 (5 $\mu$ g/ml*)<br>IC50 (ng/ml) | 阻断 B7-1 与人 PD-L1<br>结合 (1 $\mu$ g/ml*) IC50<br>(ng/ml) |
|---------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| H5L11         | 0.1679                                                | 0.9267                                                | 1.445                                                  |
| H6L11         | 0.2901                                                | 1.230                                                 | 1.688                                                  |
| HRP00049-IgG1 | 0.2647                                                | -                                                     | 1.882                                                  |
| A09           | 0.3039                                                | 1.040                                                 | 1.565                                                  |
| HRP00052-IgG1 | 0.3379                                                | -                                                     | 1.651                                                  |
| H18L61        | 0.2275                                                | -                                                     | 1.329                                                  |
| H12L64        | 0.2153                                                | -                                                     | 0.8258                                                 |

|              |        |   |       |
|--------------|--------|---|-------|
| HRP00052     | 0.2418 | - | 1.228 |
| IgG1 control | -      | - | -     |

\*10 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml 和 1 $\mu$ g/ml 分别是不同阻断试验中 PD-L1 的浓度。

配体阻断实验证明, 本公开 PD-L1 抗体能够阻断 PD-L1 与 PD1 的结合, 也能够阻断 PD-L1 与 B7-1 的结合, 并且由 HRP00049 突变而来的 H5L11, H6L11 抗体具有小鼠 PD-L1 交叉结合活性, 可阻断小鼠 PD-L1 与 PD-1 结合的能力。

### 实施例 5. 实例性抗体的 BIAcore 抗体亲和力实验

按照人抗捕获试剂盒 (Cat. # BR-1008-39, GE) 说明书中的方法将人抗捕获抗体共价偶联于生物传感芯片 CM5 (Cat. # BR-1000-12, GE) 生物芯片上, 从而亲和捕获一定量的人 PD-L1 (Cat. #10084-H08H, Sino Biological), 猴 PD-L1 (Cat. #90251-C08H, Sino Biological), 小鼠 PD-L1 (Cat. #50010-M08H, Sino Biological)。用 Biacore X100, GE 仪器测定 PD-L1 抗体和 PD-L1 的反应亲和力。试验使用的是 HBS-EP+ 10 X 缓冲溶液 (Cat. # BR-1006-69, GE) 用 D. I. Water 稀释至 1 $\times$  (pH7.4), 用 BIAevaluation version 4.1, GE 软件以 (1:1) Langmuir 模型拟合数据, 得出亲和力数值, 结果见表 9。

表 9-1 HRP00049 和 HRP00052 及其突变抗体与不同物种 PD-L1 结合的 Biacore 亲和力和力 (同批次试验)

| 抗体       | 靶蛋白            | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M)   |
|----------|----------------|-----------|----------|----------|
| HRP00052 | 人 PD-L1        | 1.73E6    | 1.16E-4  | 6.72E-11 |
| 3280A    |                | 1.52E5    | 2.51E-4  | 1.66E-9  |
| H12L64   |                | 2.18E6    | 7.10E-5  | 3.26E-11 |
| H12L61   |                | 2.18E6    | 7.10E-5  | 3.26E-11 |
| H13L61   |                | 2.55E6    | 6.66E-5  | 2.61E-11 |
| H14L61   |                | 2.40E6    | 9.10E-5  | 3.80E-11 |
| H15L61   |                | 2.43E6    | 7.88E-5  | 3.25E-11 |
| H16L61   |                | 2.53E6    | 6.43E-5  | 2.54E-11 |
| H17L61   |                | 2.43E6    | 9.53E-5  | 3.93E-11 |
| H18L61   |                | 1.71E6    | 5.63E-5  | 3.30E-11 |
| H19L61   |                | 2.34E6    | 7.65E-5  | 3.27E-11 |
| HRP00049 |                | 6.38E5    | 1.19E-4  | 1.86E-10 |
| A09      |                | 3.46E5    | 1.15E-4  | 3.33E-10 |
| H5L11    |                | 6.11E5    | 1.24E-4  | 2.03E-10 |
| H6L11    |                | 4.95E5    | 1.13E-4  | 2.27E-10 |
| H7L11    |                | 2.81E5    | 3.89E-4  | 1.39E-9  |
| HRP00052 | 猴 (cyno) PD-L1 | 1.51E6    | 9.38E-5  | 6.20E-11 |
| H12L64   |                | 1.83E6    | 8.38E-5  | 4.58E-11 |
| H18L61   |                | 1.60E6    | 7.68E-5  | 4.80E-11 |
| HRP00049 |                | 5.93E5    | 1.11E-4  | 1.87E-10 |
| H6L11    |                | 4.74E5    | 1.51E-4  | 3.18E-10 |

|          |         |        |         |          |
|----------|---------|--------|---------|----------|
| H5L11    |         | 5.72E5 | 1.21E-4 | 2.11E-10 |
| HRP00049 | 鼠 PD-L1 | 不结合    |         |          |
| HRP00052 |         | 不结合    |         |          |
| A09      |         | 1.89E4 | 9.14E-5 | 4.85E-9  |
| 3280A    |         | 6.33E4 | 3.39E-3 | 5.35E-8  |
| H5L11    |         | 8.11E5 | 5.64E-2 | 6.96E-8  |
| H6L11    |         | 6.55E5 | 1.19E-2 | 1.81E-8  |
| H7L11    |         | 1.35E5 | 1.82E-2 | 1.35E-7  |

表 9-2 HRP00052 及其突变抗体与不同物种 PD-L1 结合的 Biacore 亲和力  
(同批次试验)

| 抗体       | 靶蛋白        | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M)   |
|----------|------------|-----------|----------|----------|
| HRP00052 | hPDL1      | 1.26E+06  | 1.39E-04 | 1.10E-10 |
|          | Cyno PDL1  | 1.26E+06  | 1.43E-04 | 1.14E-10 |
| H21L66   | hPD-L1     | 1.95E+06  | 1.04E-04 | 5.33E-11 |
|          | Cyno PD-L1 | 2.17E+06  | 1.22E-04 | 5.63E-11 |
| H21L67   | hPD-L1     | 2.30E+06  | 1.20E-04 | 5.22E-11 |
|          | Cyno PD-L1 | 2.35E+06  | 1.24E-04 | 5.28E-11 |
| H21L68   | hPD-L1     | 不结合       |          |          |
|          | Cyno PD-L1 | 不结合       |          |          |
| H21L69   | hPD-L1     | 2.29E+06  | 1.29E-04 | 5.63E-11 |
|          | Cyno PD-L1 | 2.27E+06  | 1.19E-04 | 5.26E-11 |

结果显示, 筛选自HRP00052突变抗体文库的抗体(除H21L68外)与人PD-L1的亲合力均较HRP00052有所提高, 且均高于阳性对照抗体。而筛选自HRP00049突变抗体文库的抗体H5L11, H6L11, H7L11则产生较强的鼠PD-L1交叉亲和活性。

#### 实施例 6. PD-L1 抗体在 PBMC-T 淋巴细胞激活实验中对细胞 IFN $\gamma$ 的分泌作用

为了研究 PD-L1 抗体对人原代 T 淋巴细胞功能的影响, 收集和纯化人外周血单核细胞(PBMC), 采用结核菌素 (TB) 体外刺激 5 天后, 检测细胞因子 IFN $\gamma$  分泌水平。实验过程简单描述如下:

新鲜血液利用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心(Stem Cell Technologies)得到 PBMC, 于 RPMI 1640 培养基中培养, 该培养基中添加 10% (v/v) FBS, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

新鲜分离纯化的 PBMC 以 RPMI 1640 培养基调整密度为  $2 \times 10^6$  / ml, 20mL 细胞悬液中加入 25 $\mu$ l 结核菌素, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 5 天。第 6 天, 收集上述培养的细胞离心, 用 PBS 洗一次, 重悬至新鲜的 RPMI 1640 培养基中, 调整密度为  $1 \times 10^6$  / ml, 接种至 96 孔细胞培养板, 每孔 90 $\mu$ l。同时加入梯度稀释的抗体样品(用 PBS 稀释)或等量的同型 IgG 作为空白对照, 每孔 10 $\mu$ l。细胞培养板置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 3

天。取出细胞培养板，离心（4000rpm，10min）收集细胞培养上清，采用 ELISA 的方法（人 IFN- $\gamma$  检测试剂盒，欣博盛，EHC102g.96）检测 IFN- $\gamma$  的水平。具体操作参考试剂说明书。

结果（见图 1）显示，H18L61，H12L64，H5L11，H6L11 均能较强地刺激细胞 IFN $\gamma$  的分泌，其中 H12L64，H5L11，H6L11 在促进细胞 IFN $\gamma$  分泌时，呈现出剂量依赖关系，上述四种抗体在某些剂量或所有剂量上优于 HRP00052-IgG1 的作用。

#### 实施例 7. 实例性抗体介导的 PD-L1+细胞的 ADCC 效应

将人全血用等体积的 PBS 缓冲液进行稀释后，加入已有适量 Lymphoprep (STEMCELL Technologies Inc., 07851)的 SepMate (STEMCELL Technologies Inc., 15460)管底部，室温下以 1200g 离心 10 分钟。将管中上层液体倒入新的 50ml 离心管中，用 PBS 缓冲液洗涤细胞，并以 300g 离心 8 分钟，得到 PBMC。用含有 5% Low IgG FBS (BIOSUN, BS-0007-500)的 RPMI-1640 培养液重悬 PBMC，进行细胞计数。

将 CHO-S/PD-L1 细胞用含有 5% Low IgG FBS 的 RPMI1640 培养基重悬并计数，以每孔 10,000 个细胞的密度接种在 96 孔板中，然后加入梯度稀释的 PD-L1 抗体孵育 15 分钟，再在每孔中加入 300,000 个人 PBMC 细胞作用 4 小时，设置培养基对照，CHO-S/PD-L1 细胞自发释放对照，PBMC 细胞自发释放对照和 CHO-S/PD-L1 细胞最大裂解对照。4 小时后，将 96 孔板离心，每孔取 50  $\mu$ L 上清转移至另一 96 孔板，每孔加入 50  $\mu$ L CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, G1780)，避光室温孵育 30 分钟，加入终止液，在 490nm 波长处读取吸光值。按照下列公式分析数据，计算出裂解率，用 Graphpad Prism 软件根据抗体各浓度与相应的裂解率计算抗体 ADCC 效应的 EC<sub>50</sub> 值。

裂解率%=(样品孔<sub>490nm</sub>-PBMC 细胞自发释放<sub>490nm</sub>-CHO-S/PD-L1 细胞自发释放<sub>490nm</sub>)/(CHO-S/PD-L1 细胞最大裂解<sub>490nm</sub>-CHO-S/PD-L1 细胞自发释放<sub>490nm</sub>) $\times$ 100

结果显示(图 2A 至图 2F 所示)，不同 PD-L1 抗体 HRP00049-IgG1，H5L11，HRP00052-IgG1，H6L11，H18L61，H12L64 的 IgG1 形式都有较强的 ADCC 效应，并且这些分子的 ADCC 效应均明显优于各 PD-L1 抗体的 IgG4 形式。

#### 实施例 8. 实例性抗体在人的黑色素瘤 A375 异种移植模型中的作用

将培养的 A375 细胞与 PBMC 混合接种于 NOG 小鼠皮下。实验分为 PBMC + PBS 组、PBMC + H12L64 20 mg/kg 组、PBMC + H12L64- IgG4-20 mg/kg 组和 PBMC + HRP00052 20 mg/kg 组。每组 6 只，每两天一次，腹腔注射给药，连续给药 11 次。给药实验结束后，使用肿瘤生长抑制率 TGI (%) 和相对肿瘤增值率 T/C (%) 进行疗效评价。

结果见图 3 和表 10，H12L64 20 mg/kg 组 TGI 为 98.15%，与 PBMC + PBS 组相比有

显著性差异 ( $p=0.0018$ ); H12L64-IgG4 20 mg/kg 组肿瘤抑制率 TGI 为 82.15%, 与 PBMC + PBS 组相比有显著性差异 ( $p=0.0064$ ); HRP00052 20mg/kg 组肿瘤抑制率 TGI 为 68.84%, 与 PBMC+PBS 组相比有显著性差异 ( $p=0.0291$ )。该结果表明, H12L64 20 mg/kg 组和 H12L64-IgG4 20mg/kg 及 HRP00052 20mg/kg 能有效抑制 A375 的生长( $p<0.05$ )。在整个实验过程中, H12L64, H12L64-IgG4 和 HRP00052 荷瘤小鼠均没有出现体重下降或动物死亡情况, 表明小鼠对该剂量下的 H12L64, H12L64-IgG4 和 HRP00052 耐受性良好。

表 10 PD-L1 抗体在人源化 A375 皮下移植瘤模型的疗效

| 实验组                         | N | 肿瘤体积<br>(mm <sup>3</sup> ) | TGI%<br>Day21 | T/C%<br>Day21 | P<br>Vs<br>PBMC+PBS<br>Day21 | 备注      |
|-----------------------------|---|----------------------------|---------------|---------------|------------------------------|---------|
|                             |   | (Mean±SEM)<br>Day21        |               |               |                              |         |
| PBMC+PBS                    | 6 | 581.31±177.69              | --            | --            | --                           | --      |
| PBMC+H12L64 20mg/kg         | 6 | 10.77±7.38                 | 98.15         | 1.85          | 0.0018                       | 4/6(CR) |
| PBMC+H12L64-IgG4<br>20mg/kg | 6 | 103.74±30.41               | 82.15         | 17.85         | 0.0064                       | 0/6(CR) |
| PBMC+HRP00052 20mg/kg       | 5 | 181.14±39.94               | 68.84         | 31.16         | 0.0291                       | 0/5(CR) |

TGI%: 抑瘤率; T/C%: 肿瘤增值率; CR: 肿瘤消退。

#### 实施例 9. PD-L1 抗体在小鼠结肠癌模型 MC38-hPD-L1 中的作用

将MC38-hPD-L1细胞(向小鼠结肠癌细胞MC38转化hPD-L1后在细胞表面可表达hPD-L1,  $4 \times 10^5$ 个) 100  $\mu$ l接种至50只C57小鼠右肋部皮下, 7天后去除肿瘤体积过大过小动物, 按平均肿瘤体积约52mm<sup>3</sup>将小鼠随机分为: 3个PD-L1抗体单用组和阴性对照组, 共4组, 每组10只。分组后腹腔给与各药物(对照组注射等量体积的PBS), 每周天三次, 共12次, 给药周期28天, 停药后两天结束对荷瘤小鼠的监测。每周测2次瘤体积, 称体重, 记录数据。分组及给药情况见下表。各组动物体重、肿瘤体积以及瘤重均用平均值±标准差(Mean ± SEM)表示, 并用Graphpad Prism 5 和Excel软件作图, 使用student t test统计分析。

$$\text{肿瘤体积 (TV)} = 1/2 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$$

$$\text{肿瘤增殖率 T/C\%} = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100\%$$

$$\text{抑瘤率 \%TGI} = 1 - T/C \%$$

| G      | 组别                  | 动物只数 | 给药剂量 (mg/kg) | 给药途径 |
|--------|---------------------|------|--------------|------|
| Group1 | 对照组 (PBS)           | 10   | -            | ip   |
| Group2 | HRP00052-IgG1-10mpk | 10   | 10           | ip   |
| Group3 | H6L11-10mpk         | 10   | 10           | ip   |
| Group4 | A09-10mpk           | 10   | 10           | ip   |

实验结果（见图 4）显示，H6L11，A09 都能显著抑制 MC38-hPD-L1 小鼠皮下移植瘤的生长。与阴性对照组相比，两组瘤体积从给药后 3 天都出现统计学差异（ $p < 0.05$ ），实验结束时（给药后 27d），两组抑瘤率分别为 106.74%、103.47%，与阴性对照组有极显著差异（ $p < 0.001$ ），约 80%-90% 的肿瘤能完全消退，H6L11 比 A09 抑瘤效果更好，但二者没有统计学差异（见图 4）。HRP00052-IgG1 在实验结束时，抑瘤率为 29.10%。

实验结束后将荷瘤鼠安乐死并剥瘤称重，瘤重结果与瘤体积大小基本相符：三个药物组中，H6L11 组平均瘤重最小，A09 组次之，HRP00052-IgG1 的平均瘤重最大；H6L11，A09 两组与对照组之间都存在显著差异（ $p < 0.001$ ）。荷瘤小鼠对各药物均能很好耐受，无药物致体重减轻等症状发生。

### 实施例 10. PD-L1 抗体在小鼠结肠癌模型 MC38-hPD-L1 中的作用

将 MC38-hPD-L1 细胞以  $5.8 \times 10^5$  个/100 $\mu$ l/只接种到 C57/BL-6 小鼠皮下，荷瘤模型确立后，测量肿瘤体积，去除体重、肿瘤过大和过小的动物，按照肿瘤体积大小将荷瘤小鼠随机分为 2 组（ $n=7$ ）：IgG-PBS（C25-IgG4）对照组、H5L11-IgG4 S228P 实验组，以分组给药日期设定为 D0。分组后腹腔给与各药物，每周三次，共 10 次，给药周期 18 天，停药后两天结束对荷瘤小鼠的监测。每周测 2 次瘤体积，称体重，记录数据。分组及给药情况见下表。各组动物体重、肿瘤体积以及瘤重均用平均值 $\pm$ 标准差（Mean $\pm$ SEM）表示，并用 Graphpad Prism 6 和 Excel 软件作图，使用 student t test 统计分析。

$$\text{肿瘤体积 (TV)} = 1/2 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$$

$$\text{肿瘤增殖率 T/C\%} = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100\%$$

$$\text{抑瘤率 \%TGI} = 1 - T/C \%$$

如图 5 结果显示，与小鼠 PD-L1 存在交叉反应的 PD-L1 单抗（H5L11-IgG4 S228P 组）实验组肿瘤体积显著小于对照组，并且在给药后一周左右开始即与对照组之间出现统计学差异。

实验结束后对荷瘤小鼠进行安乐死并剥瘤称重，瘤重结果与瘤体积大小存在一定相似性。实验过程中，给药组与对照组动物体重未出现明显差异，小鼠对各给药抗体耐受良好。

虽然为了清楚的理解，已经借助于附图和实例详细描述了上述发明，但是描述和实例不应当解释为限制本公开的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

## 权利要求

1. 一种单克隆抗体或其抗原结合片段，所述单克隆抗体或抗原结合片段结合人 PD-L1，所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中：

(i)所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 10、12 和 13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，且所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区，所述 SEQ ID NO.12 所示的 HCDR2 中 X<sub>1</sub> 为 F 或 M，X<sub>2</sub> 为 R 或 V，X<sub>3</sub> 为 N 或 H；或

(ii)所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、12 和 13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，且所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区，所述 SEQ ID NO.12 所示的 HCDR2 中 X<sub>1</sub> 为 F 或 M，X<sub>2</sub> 为 R 或 V，X<sub>3</sub> 为 N 或 H；或

(iii)所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 20、21 和 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，且所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、24 和 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区，其中 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和 LCDR1、LCDR2、LCDR3 依次不同时为 SEQ ID NO: 30、38、22、23、40 和 25，

所述 SEQ ID NO.20 和 21 中的 X<sub>4</sub> 为 S 或 D，X<sub>5</sub> 为 Y 或 K，X<sub>6</sub> 为 H 或 M，X<sub>7</sub> 为 T、S、H 或 G，X<sub>8</sub> 为 S、N 或 G，X<sub>9</sub> 为 S、L 或 G，X<sub>10</sub> 为 F、L、W 或 M，X<sub>11</sub> 为 A、P 或 T，X<sub>12</sub> 为 M、V、L 或 S，X<sub>13</sub> 为 F 或 Y，所述 SEQ ID NO: 24 所示的 LCDR2 中 X<sub>14</sub> 为 V 或 A，X<sub>15</sub> 为 Y 或 N，X<sub>16</sub> 为 A、L 或 V，X<sub>17</sub> 为 E、F、Y 或 A。

2. 一种单克隆抗体或其抗原结合片段，所述单克隆抗体或其抗原结合片段结合人 PD-L1，所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中：

所述重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 28 或 29 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

所述重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 28 或 29 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

所述重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 32 至 37 任一所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 39、40、41、67 和 69 任一

的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 25 的 LCDR3 区; 或

所述重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 32 至 37 任一所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 39、40、41、67 和 69 任一的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 25 的 LCDR3 区。

3. 根据权利要求 2 所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中:

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 28 和 SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区;

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 28 和 SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区;

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区;

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 39 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区;

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区;

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区;

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区, 所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区;

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 67 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 69 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 35 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区；或

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 37 和 SEQ ID NO: 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或抗原结合片段包含：

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可

变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区；或

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 27 所示的轻链可变区。

5. 如权利要求 4 所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体或抗原结合片段包含：

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 45 所示的轻链可变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 45 所示的轻链可变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 45 所示的轻链可变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 49 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区；

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 53 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区；或

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 66 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 55、56、57、70 和 72 任一所示的轻链可变区。

6. 如权利要求 1 至 5 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体为全长抗体, 进一步包括人抗体恒定区, 优选地, 所述人抗体恒定区的重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区及其常规变体, 所述人抗体恒定区的轻链恒定区选自人抗体  $\kappa$  和  $\lambda$  链恒定区及其常规变体, 更优选所述全长抗体包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:58、60 或 65 所示的人抗体重链恒定区和 SEQ ID NO:59 所示的人轻链恒定区。

7. 如权利要求 1 至 5 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段是选自 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体 (scFv)、二聚化的 V 区 (双抗体)、二硫键稳定化的 V 区 (dsFv) 和包含 CDR 的肽的抗原结合片段。

8. 一种药物组合物, 其含有治疗有效量的根据权利要求 1 至 7 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

9. 一种核酸分子, 其编码权利要求 1 至 7 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

10. 一种重组载体, 其包含权利要求 9 所述的核酸分子。

11. 一种用如权利要求 10 所述的重组载体转化的宿主细胞, 所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞, 优选真核细胞, 更优选哺乳动物细胞。

12. 用于生产如权利要求 1 至 7 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段的方法, 所述方法包括将如权利要求 11 所述的宿主细胞在培养基中进行培养以形成并积累权利要求 1 至 7 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 以及从培养物回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段。

13. 用于免疫检测或测定人 PD-L1 的方法, 所述方法包括使用如权利要求 1 至 7 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

14. 如权利要求 1 至 7 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段在制备与人 PD-L1 相关的疾病的诊断剂中的应用。

15. 与人 PD-L1 相关的疾病的治疗方法, 所述方法包括向受试者施用药物有效量的如权利要求 1 至 7 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段, 或包含权利要求 8 所述的药物组合物, 或权利要求 9 所述的核酸分子, 以治疗人 PD-L1 相关的疾病, 其中所述疾病优选肿瘤或癌症; 更优选 PD-L1 阳性的鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、头和颈鳞状细胞癌 (HNSCC)、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤 (DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性髓细胞样白血病 (AML)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性髓细胞样白血病 (CML)、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤 (MCL)、小淋巴

细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。

16. 如权利要求 1 至 7 任一项所示的单克隆抗体或其抗原结合片段，或包含权利要求 8 所述的药物组合物，或权利要求 9 所述的核酸分子在制备与人 PD-L1 相关的疾病的治疗剂中的应用，其中所述疾病优选肿瘤或癌症；更优选 PD-L1 阳性的鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。

17. 作为药物的如权利要求 1 至 7 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，或包含权利要求 8 所述的药物组合物，或权利要求 9 所述的核酸分子。

18. 作为药物的如权利要求 1 至 7 任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段，或包含权利要求 8 所述的药物组合物，或权利要求 9 所述的核酸分子，所述药物用于治疗 PD-L1 阳性的肿瘤或癌症，优选地，所述癌症选自鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、

非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。

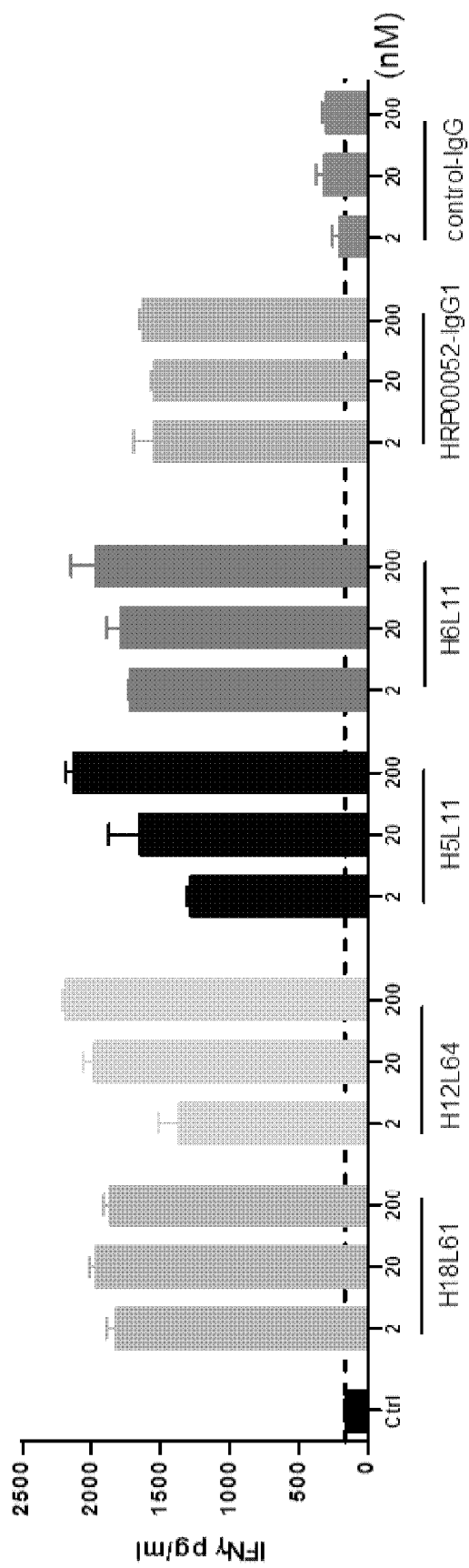


图 1

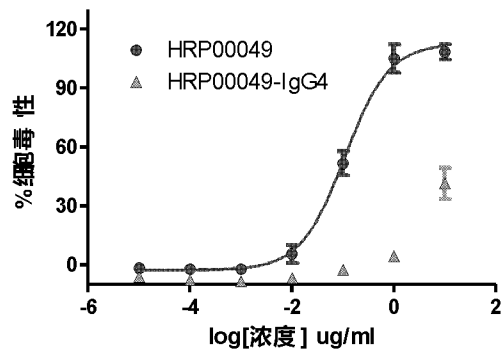


图 2A

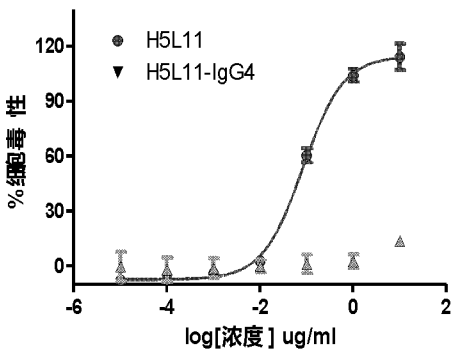


图 2B

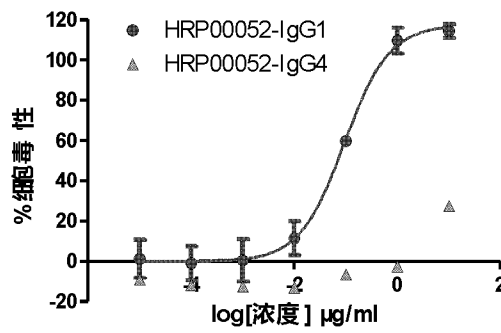


图 2C

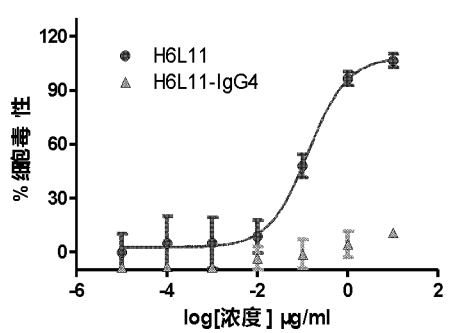


图 2D

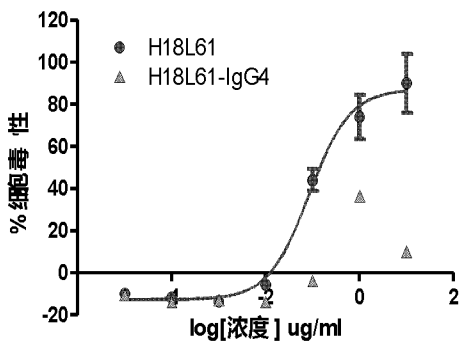


图 2E

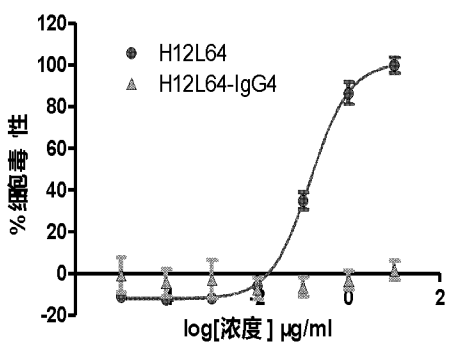


图 2F

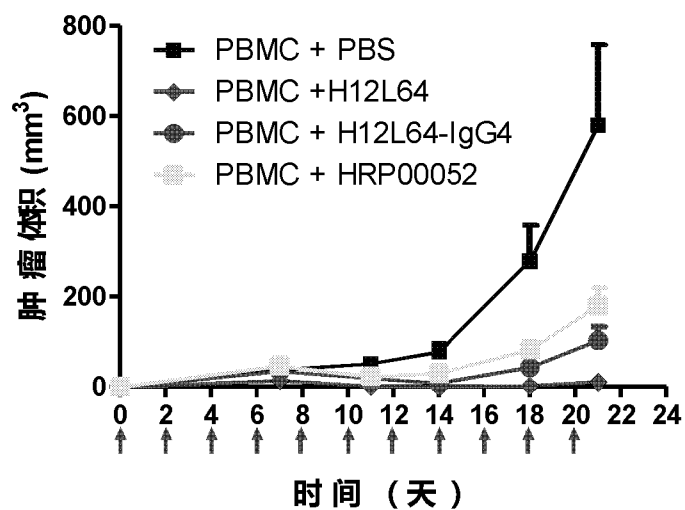


图 3

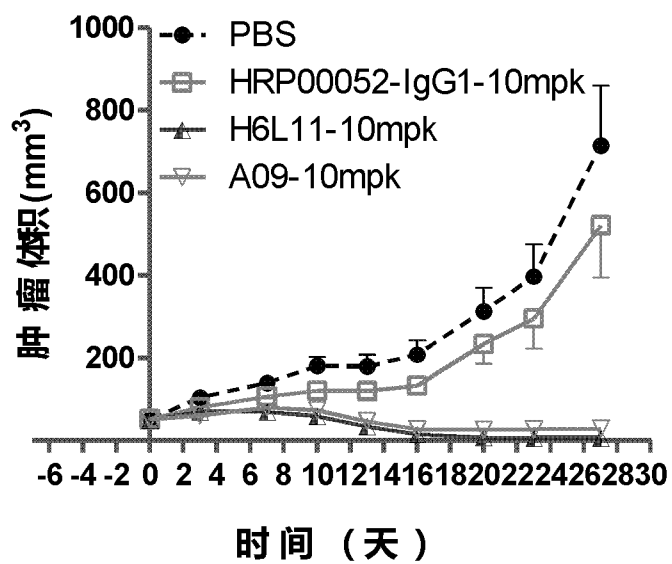


图 4

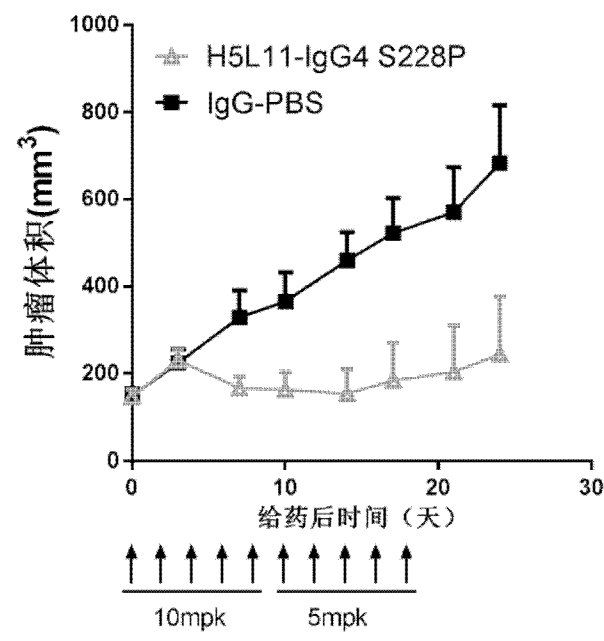


图 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/070982

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/13(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 16/-;A61K 39/-;C12N 15/-;A61P 35/-

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, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, CNKI, 万方, WANFANG, 百度, BAIDU, GOOGLE SCHOLAR, PUBMED, ISI Web of Knowledge, PATENTICS, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀, DUXIU: SEQ ID NO s: 1-72; CD28, PD-L1, PD-1, 程序性死亡分子1, 配体, CD28, CDR, 重链, 轻链, antibod+, 癌, 肿瘤, 单克隆抗体, 抗体, T细胞, 抗原结合片段, antigen-binding fragment, carcinoma, tumor, immune+, pharmaceutical composition., variable region.

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. ET AL.) 26 May 2017 (2017-05-26)<br>claims 1-24, embodiments 5-7, and test embodiments 1-7 | 1-18                  |
| A         | CN 105777906 A (SUZHOU DINGFU BIOTARGET CO., LTD.) 20 July 2016 (2016-07-20)<br>entire document                                                 | 1-18                  |
| A         | CN 106243225 A (GENRIX (SHANGHAI) BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 21 December 2016 (2016-12-21)<br>entire document                                 | 1-18                  |
| A         | CN 106699891 A (BEIJING MABWORKS BIOTECH CO., LTD.) 24 May 2017 (2017-05-24)<br>entire document                                                 | 1-18                  |
| A         | CN 101104640 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 16 January 2008 (2008-01-16)<br>entire document                                                             | 1-18                  |
| A         | WO 2017196867 A1 (IGM BIOSCIENCES, INC.) 16 November 2017 (2017-11-16)<br>entire document                                                       | 1-18                  |

☒ 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

26 March 2019

Date of mailing of the international search report

10 April 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

National Intellectual Property Administration, PRC (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/CN2019/070982

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | WO 2014151006 A2 (GENENTECH, INC. ET AL.) 25 September 2014 (2014-09-25)<br>entire document                                                                                                                                    | 1-18                  |
| A         | ZHAN, M.M. et al. "From Monoclonal Antibodies to Small Molecules: The Development of Inhibitors Targeting the PD-1/PD-L1 Pathway"<br><i>Drug Discovery Today</i> , Vol. 21, No. 6, 30 June 2016 (2016-06-30),<br>pp. 1027-1036 | 1-18                  |
| A         | HAMANISHI, J. et al. "Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer"<br><i>Journal of Clinical Oncology</i> , 08 September 2015 (2015-09-08),<br>pp. 1-14 | 1-18                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2019/070982****Box No. II      Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☒ Claims Nos.: **15**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  - [1] The subject matter of claims 15 relates to a method of treatment of a human or animal body by therapy, and therefore do not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv). The search is based on the use of a PD-L1 monoclonal antibody or antigen-binding fragment thereof in the preparation of a medicament for the treatment of human PD-L1-related diseases.
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/CN2019/070982**

| Patent document<br>cited in search report |            |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |              |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|------------|----|--------------------------------------|-------------------------|--------------|----|--------------------------------------|
| WO                                        | 2017084495 | A1 | 26 May 2017                          | CA                      | 3004804      | A1 | 26 May 2017                          |
|                                           |            |    |                                      | AU                      | 2016357901   | A1 | 24 May 2018                          |
|                                           |            |    |                                      | US                      | 2018334504   | A1 | 22 November 2018                     |
|                                           |            |    |                                      | TW                      | 201718657    | A  | 01 June 2017                         |
|                                           |            |    |                                      | CN                      | 107614529    | A  | 19 January 2018                      |
|                                           |            |    |                                      | EP                      | 3378871      | A1 | 26 September 2018                    |
|                                           |            |    |                                      | JP                      | 2018536401   | A  | 13 December 2018                     |
|                                           |            |    |                                      | BR                      | 112018009064 | A2 | 30 October 2018                      |
|                                           |            |    |                                      | KR                      | 20180071376  | A  | 27 June 2018                         |
| CN                                        | 105777906  | A  | 20 July 2016                         | None                    |              |    |                                      |
| CN                                        | 106243225  | A  | 21 December 2016                     | None                    |              |    |                                      |
| CN                                        | 106699891  | A  | 24 May 2017                          | None                    |              |    |                                      |
| CN                                        | 101104640  | A  | 16 January 2008                      | None                    |              |    |                                      |
| WO                                        | 2017196867 | A1 | 16 November 2017                     | CA                      | 3021669      | A1 | 16 November 2017                     |
|                                           |            |    |                                      | CN                      | 109311985    | A  | 05 February 2019                     |
|                                           |            |    |                                      | KR                      | 20190003989  | A  | 10 January 2019                      |
|                                           |            |    |                                      | SG                      | 11201809336Q | A  | 29 November 2018                     |
|                                           |            |    |                                      | AU                      | 2017264683   | A1 | 01 November 2018                     |
| WO                                        | 2014151006 | A2 | 25 September 2014                    | SG                      | 11201507333X | A  | 29 October 2015                      |
|                                           |            |    |                                      | US                      | 2016222118   | A1 | 04 August 2016                       |
|                                           |            |    |                                      | RU                      | 2015139224   | A3 | 12 March 2018                        |
|                                           |            |    |                                      | KR                      | 20150131269  | A  | 24 November 2015                     |
|                                           |            |    |                                      | CA                      | 2905798      | A1 | 25 September 2014                    |
|                                           |            |    |                                      | HK                      | 1212769      | A1 | 17 June 2016                         |
|                                           |            |    |                                      | RU                      | 2015139224   | A  | 21 April 2017                        |
|                                           |            |    |                                      | AU                      | 2014235453   | A1 | 08 October 2015                      |
|                                           |            |    |                                      | CN                      | 105209919    | A  | 30 December 2015                     |
|                                           |            |    |                                      | SG                      | 10201701380T | A  | 27 April 2017                        |
|                                           |            |    |                                      | IL                      | 241309       | D0 | 30 November 2015                     |
|                                           |            |    |                                      | MX                      | 2015011774   | A  | 01 December 2015                     |
|                                           |            |    |                                      | AU                      | 2017225061   | A1 | 28 September 2017                    |
|                                           |            |    |                                      | WO                      | 2014151006   | A3 | 27 November 2014                     |
|                                           |            |    |                                      | JP                      | 2016520800   | A  | 14 July 2016                         |
|                                           |            |    |                                      | KR                      | 20180103192  | A  | 18 September 2018                    |
|                                           |            |    |                                      | BR                      | 112015023120 | A2 | 21 November 2017                     |
|                                           |            |    |                                      | EP                      | 2972373      | A2 | 20 January 2016                      |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/070982

## A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61P 35/00(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 16/-;A61K 39/-;C12N 15/-;A61P 35/-

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, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, CNKI, 万方, 百度, GOOGLE SCHOLAR, PUBMED, ISI Web of Knowledge, PATENTICS, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀:SEQ ID NO s: 1-72; CD28, PD-L1, PD-1, 程序性死亡分子1, 配体, CD28, CDR, 重链, 轻链, antibody, 癌, 肿瘤, 单克隆抗体, 抗体, T细胞, 抗原结合片段, antigen-binding fragment, carcinoma, tumor, immune+, pharmaceutical composition., variable region.

## 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    | WO 2017084495 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司 等) 2017年 5月 26日 (2017 - 05 - 26)<br>权利要求1-24, 实施例5-7, 测试例1-7 | 1-18    |
| A    | CN 105777906 A (苏州丁孚靶点生物技术有限公司) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20)<br>全文                         | 1-18    |
| A    | CN 106243225 A (智翔上海医药科技有限公司) 2016年 12月 21日 (2016 - 12 - 21)<br>全文                          | 1-18    |
| A    | CN 106699891 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2017年 5月 24日 (2017 - 05 - 24)<br>全文                        | 1-18    |
| A    | CN 101104640 A (苏州大学) 2008年 1月 16日 (2008 - 01 - 16)<br>全文                                   | 1-18    |
| A    | WO 2017196867 A1 (IGM BIOSCIENCES, INC.) 2017年 11月 16日 (2017 - 11 - 16)<br>全文               | 1-18    |

☒ 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

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 3月 26日

国际检索报告邮寄日期

2019年 4月 10日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

传真号 (86-10)62019451

受权官员

沈晶晶

电话号码 86-(10)-53961944

## 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    | WO 2014151006 A2 (GENENTECH, INC. 等) 2014年 9月 25日 (2014 - 09 - 25)<br>全文                                                                                                                                            | 1-18    |
| A    | ZHAN, M. M. 等. "From monoclonal antibodies to small molecules: the development of inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 pathway"<br>DRUG DISCOVERY TODAY, 第21卷, 第6期, 2016年 6月 30日 (2016 - 06 - 30),<br>第1027-1036页    | 1-18    |
| A    | HAMANISHI, J. 等. "Safety and Antitumor Activity of Anti - PD-1<br>Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer"<br>JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 2015年 9月 8日 (2015 - 09 - 08),<br>第1-14页 | 1-18    |

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 15  
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15保护主题涉及治疗人体或动物体的疗法，因此依据PCT条约17(2)(a)(i)和PCT实施细则39.1(iv)不进行国际检索。检索是基于PD-L1单克隆抗体或其抗原结合片段在制备治疗与人PD-L1相关疾病药物用途作出。
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/CN2019/070982

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |              |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|--------------|----|----------------|
| WO          | 2017084495 | A1 | 2017年 5月 26日   | CA   | 3004804      | A1 | 2017年 5月 26日   |
|             |            |    |                | AU   | 2016357901   | A1 | 2018年 5月 24日   |
|             |            |    |                | US   | 2018334504   | A1 | 2018年 11月 22日  |
|             |            |    |                | TW   | 201718657    | A  | 2017年 6月 1日    |
|             |            |    |                | CN   | 107614529    | A  | 2018年 1月 19日   |
|             |            |    |                | EP   | 3378871      | A1 | 2018年 9月 26日   |
|             |            |    |                | JP   | 2018536401   | A  | 2018年 12月 13日  |
|             |            |    |                | BR   | 112018009064 | A2 | 2018年 10月 30日  |
|             |            |    |                | KR   | 20180071376  | A  | 2018年 6月 27日   |
| CN          | 105777906  | A  | 2016年 7月 20日   | 无    |              |    |                |
| CN          | 106243225  | A  | 2016年 12月 21日  | 无    |              |    |                |
| CN          | 106699891  | A  | 2017年 5月 24日   | 无    |              |    |                |
| CN          | 101104640  | A  | 2008年 1月 16日   | 无    |              |    |                |
| WO          | 2017196867 | A1 | 2017年 11月 16日  | CA   | 3021669      | A1 | 2017年 11月 16日  |
|             |            |    |                | CN   | 109311985    | A  | 2019年 2月 5日    |
|             |            |    |                | KR   | 20190003989  | A  | 2019年 1月 10日   |
|             |            |    |                | SG   | 11201809336Q | A  | 2018年 11月 29日  |
|             |            |    |                | AU   | 2017264683   | A1 | 2018年 11月 1日   |
| WO          | 2014151006 | A2 | 2014年 9月 25日   | SG   | 11201507333X | A  | 2015年 10月 29日  |
|             |            |    |                | US   | 2016222118   | A1 | 2016年 8月 4日    |
|             |            |    |                | RU   | 2015139224   | A3 | 2018年 3月 12日   |
|             |            |    |                | KR   | 20150131269  | A  | 2015年 11月 24日  |
|             |            |    |                | CA   | 2905798      | A1 | 2014年 9月 25日   |
|             |            |    |                | HK   | 1212769      | A1 | 2016年 6月 17日   |
|             |            |    |                | RU   | 2015139224   | A  | 2017年 4月 21日   |
|             |            |    |                | AU   | 2014235453   | A1 | 2015年 10月 8日   |
|             |            |    |                | CN   | 105209919    | A  | 2015年 12月 30日  |
|             |            |    |                | SG   | 10201701380T | A  | 2017年 4月 27日   |
|             |            |    |                | IL   | 241309       | D0 | 2015年 11月 30日  |
|             |            |    |                | MX   | 2015011774   | A  | 2015年 12月 1日   |
|             |            |    |                | AU   | 2017225061   | A1 | 2017年 9月 28日   |
|             |            |    |                | WO   | 2014151006   | A3 | 2014年 11月 27日  |
|             |            |    |                | JP   | 2016520800   | A  | 2016年 7月 14日   |
|             |            |    |                | KR   | 20180103192  | A  | 2018年 9月 18日   |
|             |            |    |                | BR   | 112015023120 | A2 | 2017年 11月 21日  |
|             |            |    |                | EP   | 2972373      | A2 | 2016年 1月 20日   |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)