

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年5月14日 (14.05.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/088904 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/126656

(22) 国际申请日: 2020年11月5日 (05.11.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201911088643.5 2019年11月8日 (08.11.2019) CN

(71) 申请人: 先声生物医药科技有限公司 (SIMCERE BIO-PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号32幢, Jiangsu 210042 (CN)。江苏先声药业有限公司 (JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。

(72) 发明人: 赵新燕 (ZHAO, Xinyan); 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。邓婧 (DENG, Jing); 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。卢士强 (LU, Shiqiang); 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。李鑫鑫 (LI, Xinxin); 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。任晋生 (REN, Jinsheng); 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝阳区建国门外大街22号赛特广场7层, Beijing 100004 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

(54) Title: ANTI-HUMAN PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND-1 (PD-L1) ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗人程序性死亡配体-1(PD-L1)的抗体及其用途

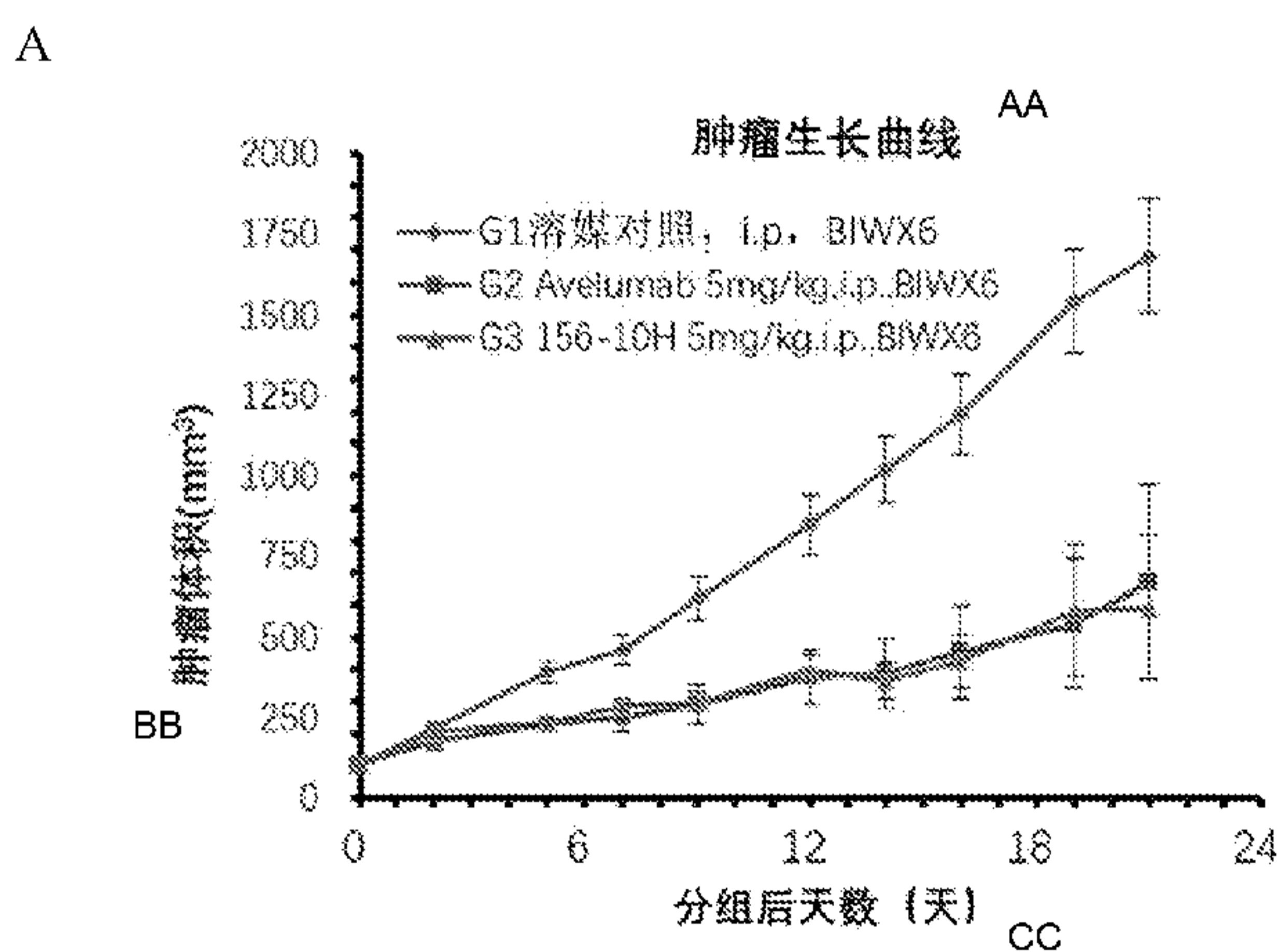


图9

AA Tumor growth curve
 BB Tumor volume
 CC Number of days after grouping (day)
 G1 Vehicle control
 G2 Avelumab

(57) Abstract: The present invention relates to an antibody or antigen-binding fragment specifically binding to human programmed cell death ligand-1 (PD-L1), the antibody or antigen-binding fragment being able to enhance the function of T cells and upregulate a T cell-mediated immune response; the invention also relates to use of the antibody or the antigen-binding fragment for the treatment of diseases, e.g. tumor, associated with aberrant expression of PD-L1 and/or dysfunction of T cells.

(57) 摘要: 涉及特异性结合人程序性死亡配体-1(PD-L1)的抗体或抗原结合片段, 所述抗体或抗原结合片段能够增强T细胞的功能, 上调T细胞介导的免疫应答; 还涉及所述抗体或抗原结合片段用于治疗PD-L1表达异常相关和/或T细胞功能异常的疾病, 例如肿瘤的用途。



WO 2021/088904 A1

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

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))。

抗人程序性死亡配体-1 (PD-L1) 的抗体及其用途

本申请要求于 2019 年 11 月 08 日提交中国专利局、申请号为 201911088643.5、发明名称为“抗人程序性死亡配体-1 (PD-L1) 的抗体及其用途”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

5

技术领域

本发明涉及抗人程序性死亡配体-1 (PD-L1) 的抗体或其抗原结合片段，其编码核酸、表达载体和表达细胞、制备方法、药物组合物、以及它们用于增强 T 细胞的功能，上调 T 细胞介导的免疫应答和用于治疗 PD-L1 表达异常和 T 细胞功能异常相关的疾病，如肿瘤的用途。

10

背景技术

免疫治疗已成为肿瘤治疗中发展最为迅速、最具前景的研究领域之一，而运用免疫检查点抑制剂，如 PD-1/PD-L1 单抗，CTLA-4 单抗则是肿瘤免疫疗法革命性的治疗方法，大大地提高了恶性肿瘤患者地生存期。

15

T 细胞介导的免疫反应受到共刺激和共抑制机制的严格调控，在抗原免疫反应和维持自我耐受之间保持最佳平衡。该平衡由多种激活性和抑制性蛋白参与。抑制性蛋白，也被称为免疫检查点类蛋白，调节杀伤性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的激活和效应功能，以维持自我耐受性。免疫检查点类抑制性蛋白在肿瘤的调节通路中起着关键作用。其中一个重要的免疫检查点蛋白 PD-1，与其配体 PD-L1 结合后，会传导免疫抑制信号，降低 T 细胞的活性。同时肿瘤细胞也可以通过在细胞表面表达 PD-L1 来抑制 T 细胞的激活和增殖，从而逃避 CTL 的攻击和杀伤。利用 PD-1 或 PD-L1 单抗，阻止 PD-1/PD-L1 的结合和相互作用，可以部分恢复 T 细胞的功能，从而增强杀伤肿瘤细胞的能力。

20

2011 年，第一个免疫检测点抑制剂伊普利单抗作为一种抗 CTLA-4 单克隆抗体，成为成功用于治疗黑色素瘤的肿瘤免疫疗法，至今治疗的很多患者已获得相比与传统治疗方法更好的 5 年生存期。之后，FDA 又先后批准了 3 个 PD-1 单抗和 3 个 PD-L1 单抗，成功地用于免疫治疗除黑色素瘤之外的十几种肿瘤，并成为多种癌症的一线治疗手段，如非小细胞肺癌 (NSCLC)、肾细胞癌 (RCC) 和膀胱或尿路上皮癌等。中国至

25

今已批准了 2 个进口 PD-1 抗体和 3 个国产 PD-1 抗体上市，但是还没有 PD-L1 抗体获批，并且鉴于 PD-L1 抗体与 PD-1 抗体治疗机理上及目前临床试验联用药物和适用适应症的不同，研发新的 PD-L1 单抗和基于 PD-L1 的双抗仍然有重大的社会和经济意义。

5

发明内容

本发明提供特异性结合人程序性死亡配体-1 (PD-L1) 的抗体及抗原结合片段，编码这些抗体及抗原结合片段的核酸，包含所述抗体及抗原结合片段和药物组合物和试剂盒，以及它们用于增强 T 细胞的功能，上调 T 细胞介导的免疫应答和用于治疗 PD-L1 表达异常和 T 细胞功能异常相关的病症，例如肿瘤免疫的用途。该抗体不仅可以与人和食蟹猴 PD-L1 蛋白结合，还可以阻断人 PD-L1 和人 PD-1 之间的相互作用。

在一些实施方案中，特异性结合人程序性死亡配体-1 (PD-L1) 的分离的抗体或抗原结合片段，包含重链 CDRs 组合和轻链 CDRs 组合：

(1) 所述重链 CDRs 组合包含：CDR1-VH、CDR2-VH 和 CDR3-VH；所述 CDR1-VH、CDR2-VH 和 CDR3-VH 具有选自以下的任意序列组合或者与所述序列组合相比具有 1、2、3 或更多个氨基酸插入、缺失和/或替换的序列组合：

编号	SEQ ID NO.		
	CDR1-VH	CDR2-VH	CDR3-VH
VH1	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.20	SEQ ID NO.21
VH2	SEQ ID NO.25	SEQ ID NO.26	SEQ ID NO.27
VH3	SEQ ID NO.31	SEQ ID NO.32	SEQ ID NO.33
VH4	SEQ ID NO.37	SEQ ID NO.38	SEQ ID NO.39
VH5	SEQ ID NO.43	SEQ ID NO.44	SEQ ID NO.45
VH6	SEQ ID NO.49	SEQ ID NO.50	SEQ ID NO.51
VH7	SEQ ID NO.55	SEQ ID NO.56	SEQ ID NO.57
VH8	SEQ ID NO.61	SEQ ID NO.62	SEQ ID NO.63
VH9	SEQ ID NO.67	SEQ ID NO.68	SEQ ID NO.69

VH10	SEQ ID NO.73	SEQ ID NO.74	SEQ ID NO.75
VH11	SEQ ID NO.79	SEQ ID NO.80	SEQ ID NO.81
VH12	SEQ ID NO.85	SEQ ID NO.86	SEQ ID NO.87
VH13	SEQ ID NO.91	SEQ ID NO.92	SEQ ID NO.93
VH14	SEQ ID NO.97	SEQ ID NO.98	SEQ ID NO.99
VH15	SEQ ID NO.103	SEQ ID NO.104	SEQ ID NO.105
VH16	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.111
VH17	SEQ ID NO.115	SEQ ID NO.116	SEQ ID NO.117
VH18	SEQ ID NO.121	SEQ ID NO.122	SEQ ID NO.123

和,

(2) 所述轻链 CDRs 组合包含: CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL, 所述 CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL 具有选自以下任意序列组合或者与所述序列组合相比具有 1、2、3 或更多个氨基酸插入、缺失和/或替换的序列组合:

编号	SEQ ID NO.		
	CDR1-VL	CDR2-VL	CDR3-VL
VL1	SEQ ID NO.22	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.24
VL2	SEQ ID NO.28	SEQ ID NO.29	SEQ ID NO.30
VL3	SEQ ID NO.34	SEQ ID NO.35	SEQ ID NO.36
VL4	SEQ ID NO.40	SEQ ID NO.41	SEQ ID NO.42
VL5	SEQ ID NO.46	SEQ ID NO.47	SEQ ID NO.48
VL6	SEQ ID NO.52	SEQ ID NO.53	SEQ ID NO.54
VL7	SEQ ID NO.58	SEQ ID NO.59	SEQ ID NO.60
VL8	SEQ ID NO.64	SEQ ID NO.65	SEQ ID NO.66
VL9	SEQ ID NO.70	SEQ ID NO.71	SEQ ID NO.72
VL10	SEQ ID NO.76	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.78
VL11	SEQ ID NO.82	SEQ ID NO.83	SEQ ID NO.84

VL12	SEQ ID NO.88	SEQ ID NO.89	SEQ ID NO.90
VL13	SEQ ID NO.94	SEQ ID NO.95	SEQ ID NO.96
VL14	SEQ ID NO.100	SEQ ID NO.101	SEQ ID NO.102
VL15	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.108
VL16	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.113	SEQ ID NO.114
VL17	SEQ ID NO.118	SEQ ID NO.119	SEQ ID NO.120
VL18	SEQ ID NO.124	SEQ ID NO.125	SEQ ID NO.126

各个 CDR1-VH、CDR2-VH、CDR3-VH、CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL 为根据 KABAT、Chothia 或 IMGT 的通行分析方法编码。

在一些实施方案中，特异性结合人程序性死亡配体-1 (PD-L1) 的分离的人源化抗体或抗原结合片段，包含重链 CDRs 组合和轻链 CDRs 组合：

- 5 (1) 所述重链 CDRs 组合包含：CDR1-VH、CDR2-VH 和 CDR3-VH；所述 CDR1-VH、CDR2-VH 和 CDR3-VH 具有选自以下的任意序列组合或者与所述序列组合相比具有 1、2、3 或更多个氨基酸插入、缺失和/或替换的序列组合：

编号	SEQ ID NO.		
	CDR1-VH	CDR2-VH	CDR3-VH
VH19	SEQ ID NO.135	SEQ ID NO.136	SEQ ID NO.137
VH20	SEQ ID NO.141	SEQ ID NO.142	SEQ ID NO.143
VH21	SEQ ID NO.147	SEQ ID NO.148	SEQ ID NO.149
VH22	SEQ ID NO.153	SEQ ID NO.154	SEQ ID NO.155
VH23	SEQ ID NO.159	SEQ ID NO.160	SEQ ID NO.161
VH24	SEQ ID NO.165	SEQ ID NO.166	SEQ ID NO.167
VH25	SEQ ID NO.171	SEQ ID NO.172	SEQ ID NO.173
VH26	SEQ ID NO.177	SEQ ID NO.178	SEQ ID NO.179

和，

- 10 (2) 所述轻链 CDRs 组合包含：CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL，所述 CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL 具有选自以下任意序列组合或者与所述序列组合

相比具有 1、2、3 或更多个氨基酸插入、缺失和/或替换的序列组合：

编号	SEQ ID NO.		
	CDR1-VL	CDR2-VL	CDR3-VL
VL19	SEQ ID NO.138	SEQ ID NO.139	SEQ ID NO.140
VL20	SEQ ID NO.144	SEQ ID NO.145	SEQ ID NO.146
VL21	SEQ ID NO.150	SEQ ID NO.151	SEQ ID NO.152
VL22	SEQ ID NO.156	SEQ ID NO.157	SEQ ID NO.158
VL23	SEQ ID NO.162	SEQ ID NO.163	SEQ ID NO.164
VL24	SEQ ID NO.168	SEQ ID NO.169	SEQ ID NO.170
VL25	SEQ ID NO.174	SEQ ID NO.175	SEQ ID NO.176
VL26	SEQ ID NO.180	SEQ ID NO.181	SEQ ID NO.182

各个 CDR1-VH、CDR2-VH、CDR3-VH、CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL 为根据 KABAT、Chothia 或 IMGT 的通行分析方法编码。

特别地，例如本发明的抗体或其抗原结合片段包含选自以下的重链 CDRs 和轻链 CDRs 组合：VH1+VL1、VH2+VL2、VH3+VL3、VH4+VL4、VH5+VL5、VH6+VL6、VH7+VL7、VH8+VL8、VH9+VL9、VH10+VL10、VH11+VL11、VH12+VL12、VH13+VL13、VH14+VL14、VH15+VL15、VH16+VL16、VH17+VL17、VH18+VL18、VH19+VL19、VH20+VL20、VH21+VL21、VH22+VL22、VH23+VL23、VH24+VL24、VH25+VL25、或 VH26+VL26，以及与所述重链和轻链 CDRs 组合之序列相比具有 1、2、3 或更多个氨基酸插入、缺失和/或替换的 CDRs 组合。

在另一个具体实施方案中，本发明提供这样的抗体或其抗原结合片段，其中：

- 1) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示序列，或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高一致性的序列；
- 2) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 所示序列，或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高一致性的序列；
- 3) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示序列，

或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%
或更高一致性的序列;

4) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 所示序列,
或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%
5 或更高一致性的序列;

5) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示序列,
或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%
或更高一致性的序列;

6) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 所示序
10 列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、
99%或更高一致性的序列;

7) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示序
列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、
99%或更高一致性的序列;

8) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示序
15 列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、
99%或更高一致性的序列;

9) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 所示序
列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、
20 99%或更高一致性的序列;

10) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 127 和 SEQ ID NO: 128 所示
序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、
99%或更高一致性的序列;

11) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 129 和 SEQ ID NO: 130 所示
25 序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、
99%或更高一致性的序列;

12) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 131 和 SEQ ID NO: 132 所示
序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、
99%或更高一致性的序列; 或,

13) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 133 和 SEQ ID NO: 134 所示序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性的序列。

5 在一个优选实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段是嵌合的或人源化的或全人源的。

在一个优选实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段, 其与人程序性死亡配体-1(PD-L1)结合的解离常数(KD)不大于 10nM, 与食蟹猴程序性死亡配体-1(PD-L1)结合的解离常数(KD)不大于 100nM。

10 在一个优选实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段, 包含人或鼠抗体 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE 或 IgD 任何其中之一恒定区的序列; 优选包含人或鼠抗体 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区的序列; 或携带突变的人或鼠抗体 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区的序列。

在一个优选实施方案中, 本发明所述抗原结合片段选自 F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、双特异抗体、纳米抗体和抗体最小识别单位中的一种或多种。

15 在一个优选实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段可与选自编号 34、50、90、130、156、370、373、413、或 794 的抗体竞争性的结合 PD-L1, 并且具备以下特性:

- 1) 特异性结合 PD-L1 重组蛋白及表达 PD-L1 的细胞;
- 2) 阻断 PD-L1 与 PD-1 蛋白的结合;
- 20 3) 抑制 PD-1 与细胞表面表达的 PD-L1 的结合;
- 4) 增强 T 细胞活性;
- 5) 介导抗体依赖的细胞杀伤(ADCC)活性; 或/和
- 6) 抑制肿瘤生长。

25 在一些实施方案中, 本发明提供一种分离的核酸分子, 所述核酸分子编码本发明上述所述的抗体、抗原结合片段、或其任意组合。

在一些实施方案中, 本发明提供一种表达载体, 其包含本发明上述所述分离的核酸分子。

在一些实施方案中, 本发明提供一种宿主细胞, 其包含本发明上述所述分离的核酸分子或表达载体。

在一个优选实施方案中，所述宿主细胞是真核细胞或原核细胞；更优选，所述宿主细胞来源于哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞、大肠杆菌和/或枯草杆菌；更优选，所述宿主细胞选自中国仓鼠卵巢细胞（CHO）。

5 在一些实施方案中，本发明提供一种抗体或抗原结合片段的制备方法，在适当的条件下培养本发明上述所述的宿主细胞，并分离抗体或抗原结合片段。

在一些实施方案中，本发明提供一种药物组合物，组合物包含本发明上述所述的抗体或抗原结合片段、本发明上述所述分离的核酸分子、本发明上述所述表达载体、本发明上述所述细胞，或本发明上述所述方法制备的产品（例如抗体和抗原结合片段），以及药学上可接受的载体。

10 在一个优选实施方案中，所述药物组合物还包含额外的抗肿瘤剂。

在一些实施方案中，本发明提供一种预防和/或治疗 PD-L1 表达异常和/或 T 细胞功能异常相关的疾病的方法，包含向有此需要的患者施用本发明上述所述的抗体或抗原结合片段、本发明上述所述的分离的核酸分子、本发明上述所述的表达载体、本发明上述所述的细胞、本发明上述所述的方法制备的产品（例如抗体和抗原结合片段）、
15 或本发明上述所述药物组合物；所述疾病优选肿瘤；所述肿瘤优选结直肠癌。

在一些实施方案中，本发明提供上述所述的抗体或抗原结合片段、本发明上述所述的分离的核酸分子、本发明上述所述的表达载体、本发明上述所述的细胞、本发明上述所述的方法制备的产品（例如抗体和抗原结合片段）、或本发明上述所述药物组合物在制备预防和/或治疗 PD-L1 表达异常相关的疾病的药物中的用途，所述疾病优
20 选肿瘤；所述肿瘤优选结直肠癌。

在一些实施方案中，本发明提供一种试剂盒，其包含本发明上述所述的抗体或抗原结合片段、本发明上述所述的分离的核酸分子、本发明上述所述的表达载体、本发明上述所述的细胞、或本发明上述所述的方法制备的产品（例如抗体和抗原结合片段），以及使用说明。

25 术语和定义：

除非另外说明，本文所用术语具有所属技术领域普通技术人员通常理解的含义。对于本文中明确定义的术语，则该术语的含义以所述定义为准。

如本文所用，术语“抗体”（Ab）是指与目标抗原特异性结合或具有免疫反应性的免疫球蛋白分子，包括抗体的多克隆、单克隆、基因工程化和其他修饰形式（包括但

不限于嵌合抗体，人源化抗体，全人源抗体，异源偶联抗体（例如双特异性、三特异性和四特异性抗体，双抗体，三抗体和四抗体），抗体缀合物）以及抗体的抗原结合片段（包括例如 Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG 和 scFv 片段）。此外，除非另有说明，否则术语“单克隆抗体”（mAb）意指包括能够特异性结合靶蛋白的完整抗体分子以及
5 不完整的抗体片段（例如 Fab 和 F(ab')₂ 片段，它们缺少完整抗体的 Fc 片段（从动物循环中更快地清除），因此缺乏 Fc 介导的效应功能（effector function）（参见 Wahl 等人，J.Nucl.Med.24:316,1983；其内容援引加入本文）。

如本文所用，术语“抗原结合片段”是指保留特异性结合靶抗原的能力的一个或多个抗体片段。抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。抗体片段可以是
10 Fab、F(ab')₂、scFv、SMIP、双抗体、三抗体、亲和体（affibody）、纳米抗体、适体或结构域抗体。涵盖术语抗体的“抗原结合片段”的结合片段的实例包括但不限于：（i）Fab 片段，一种由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；（ii）F(ab)₂ 片段，一种包含由二硫键在铰链区连接的两个 Fab 片段的双价片段；（iii）由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；（iv）由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；（v）包
15 含 VH 和 VL 结构域的 dAb；（vi）由 VH 结构域组成的 dAb 片段（Ward 等人，Nature 341:544-546,1989）；（vii）由 VH 或 VL 结构域组成的 dAb；（viii）分离的互补决定区（CDR）；以及（ix）两个或多个分离的 CDR 的组合，所述 CDR 可以任选地由合成接头连接。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 是通过独立的基因编码的，但是这两个结构域可以使用重组方法通过接头接合，该接头能够使其制成其中 VL 和
20 VH 区配对以形成单价分子的单蛋白质链（称为单链 Fv（scFv）；参见例如，Bird 等人，Science 242:423-426,1988 以及 Huston 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883,1988）。这些抗体片段可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得，并且这些片段被筛选用于与完整抗体相同的方式使用。可以通过重组 DNA 技术、完整免疫球蛋白的酶促或化学裂解、或在一些实施方式中通过本领域已知的化学肽合成
25 程序来产生抗原结合片段。

如本文所用，术语“PD-L1”是指程序性死亡配体-1，也称为 CD279（分化簇 279），是一种重要的免疫抑制分子。所述 PD-L1 优选地是人 PD-L1。

如本文所用，术语“抗-程序性死亡配体-1 抗体”、“程序性死亡配体-1 抗体”、“抗 PD-L1 抗体”、“PD-L1 抗体”、“抗-PD-L1 抗体部分”和/或“抗-PD-L1 抗体片段”等是指

任何包含能够特异性结合 PD-L1 的免疫球蛋白分子的至少一部分(例如但不限于重链或轻链的至少一个互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架区或其任何部分)的含蛋白质或肽的分子。PD-L1 抗体还包括抗体样蛋白支架(如第十纤连蛋白 III 型结构域(10Fn3)), 其含有与抗体 CDR 在结构和溶剂可及性上相似的 BC、DE 和 FG 结构环。10Fn3 结构域的三级结构类似于 IgG 重链可变区的三级结构, 并且通过将 10Fn3 的 BC、DE 和 FG 环的残基用来自 PD-L1 单克隆抗体的 CDR-H1、CDR-H2 或 CDR-H3 区的残基替换, 本领域技术人员可以将例如 PD-L1 单克隆抗体的 CDR 接枝到纤连蛋白支架上。

如本文所用, 术语“双特异性抗体”是指对至少两种不同的抗原具有单克隆结合特异性的抗体, 其通常是人或人源化的抗体。在本发明中, 结合特异性之一可以针对 PD-L1 的抗原表位而被检测, 另一个可以针对 PD-L1 的另一个抗原表位或任何其他抗原, 例如针对细胞表面蛋白、受体、受体亚基、组织特异性抗原、病毒来源蛋白、病毒编码的包膜蛋白、细菌来源蛋白或细菌表面蛋白等而被检测。

如本文所用, 术语“嵌合”抗体是指以下抗体, 其具有源自一种来源生物(如大鼠或小鼠)的免疫球蛋白的可变序列以及源自不同生物体(例如人)的免疫球蛋白的恒定区。用于生产嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见例如, Morrison, 1985, Science 229(4719):1202-7; Oi 等人, 1986, Bio Techniques 4:214-221; Gillies 等人, 1985 J Immunol Methods 125:191-202; 以上通过援引加入并入本文。

如本文所用, 术语“互补决定区”(CDR)指在轻链和重链可变结构域中均发现的高变区。可变结构域中更高保守性的部分称为框架区(FR)。如本领域所理解的, 表示抗体的高变区的氨基酸位置可以根据上下文和本领域已知的各种定义而变化。可变结构域内的一些位置可以被视为杂合高变位置, 因为这些位置可以被认为是在一组标准(如 IMGT 或 KABAT)下的高变区之内, 而被认为在不同组的标准(如 KABAT 或 IMGT)下的高变区之外。这些位置中的一个或更多个也可以在延伸的高变区中找到。本发明包括在这些杂合高变的位置中包含修饰的抗体。天然重链和轻链的可变结构域各自包含主要采用片层构型的四个框架区, 其通过三个 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3)连接, 这三个 CDR 形成连接片层结构的环, 并且在一些情况下形成片层结构的一部分。每条链中的 CDR 通过 FR 区按顺序 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 紧密保持在一起, 并且与来自其他抗体链的 CDR 促成了抗体的抗原结合位点的形成

(参见 Kabat 等人, Sequences of Protein of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987; 其通过援引加入并入本文)。例如在本文中, CDR1-VH、CDR2-VH 和 CDR3-VH 分别是指重链可变区 (VH) 的第一个 CDR、第二个 CDR 和第三个 CDR, 这三个 CDR 构成了重链 (或其可变区) 的 CDR 组合 (VHCDR 组合);
5 CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL 分别是指轻链可变区 (VL) 的第一个 CDR、第二个 CDR 和第三个 CDR, 这三个 CDR 构成了轻链 (或其可变区) 的 CDR 组合 (VLCDR 组合)。

如本文所用, 术语“抗体缀合物”是指抗体分子直接或者通过连接接头与另一个分子化学键合而形成的偶联体/缀合物。例如抗体-药物缀合物 (ADC), 其中药物分子就是所述的另一个分子。
10

如本文所用, 术语“单克隆抗体”是指来源于单个克隆 (包括任何真核、原核、或噬菌体克隆) 的抗体, 而限于该抗体的产生方法。

如本文所用, 术语“VH”是指抗体的免疫球蛋白重链 (包括 Fv、scFv 或 Fab 的重链) 的可变区。术语“VL”是指免疫球蛋白轻链 (包括 Fv、scFv、dsFv 或 Fab 的轻链) 的可变区。
15

如本文所用, 术语“百分比 (%) 序列一致性”是指在为达到最大百分比序列一致性而比对序列和引入空位 (如果需要) (例如, 为了最佳比对, 可以在候选和参比序列中的一个或两个中引入空位, 并且出于比较的目的, 可以忽略非同源序列) 之后, 候选序列的氨基酸 (或核苷酸) 残基与参比序列的氨基酸 (或核苷酸) 残基相同的百分比。出于确定百分比序列一致性的目的, 可以用本领域技术人员熟知的多种方式来实现比对, 例如使用公众可得的计算机软件, 如 BLAST、ALIGN 或 Megalign(DNASTAIi) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数, 包括需要在被比较序列的全长范围实现最大比对的任何算法。例如, 用于与候选序列进行比较而比对的参比序列可以显示候选序列在候选序列的全长或候选序列的连续氨基酸 (或核苷酸) 残基的
20 选定部分上表现出从 50% 至 100% 的序列同一性。出于比较目的而比对的候选序列的长度可以是例如参比序列的长度的至少 30% (例如 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100%)。当候选序列中的位置被与在参比序列中的相应位置相同的氨基酸 (或核苷酸) 残基占据时, 则这些分子在那个位置是相同的。
25

如本文所用，术语“特异性结合”是指一种结合反应，其决定抗原在蛋白质和其他生物分子的一个异质性群体中的存在状况，所述蛋白质和其他生物分子例如被抗体或其抗原结合片段特异性识别。与抗原特异性结合的抗体或其抗原结合片段将以小于100nM的KD与抗原结合。例如，与抗原特异性结合的抗体或其抗原结合片段将以高达100nM（例如，1pM至100nM之间）的KD与抗原结合。不显示与特定抗原或其表位特异性结合的抗体或其抗原结合片段将显示对该特定抗原或其表位的大于100nM（例如，大于500nM、1μM、100μM、500μM或1mM）的KD。可以使用多种免疫测定方式来选择与特定蛋白或碳水化合物进行特异性免疫反应的抗体。例如，常规地使用固相ELISA免疫测定法来选择与蛋白质或碳水化合物进行特异性免疫反应的抗体。参见，Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1988)以及 Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York (1999)，其描述了可以用于确定特异免疫反应性的免疫测定方式和条件。

如本文所用，术语“载体”包括核酸载体，例如DNA载体（如质粒），RNA载体，病毒或其他适合的复制子（例如病毒载体）。已经开发了多种载体用于将编码外源蛋白质的多核苷酸递送到原核或真核细胞中。本发明的表达载体含有多核苷酸序列以及例如用于表达蛋白质和/或将这些多核苷酸序列整合到哺乳动物细胞基因组中的附加序列元件。可以用于表达本发明的抗体和抗体片段的某些载体包括含有指导基因转录的调控序列（如启动子和增强子区域）的质粒。用于表达抗体和抗体片段的其他有用的载体含有多核苷酸序列，其增强这些基因的翻译速率或改善由基因转录产生的mRNA的稳定性或核输出。这些序列元件包括例如5'和3'非翻译区、内部核糖体进入位点(IRES)和聚腺苷酸化信号位点，以便指导表达载体上携带的基因的有效转录。本发明的表达载体还可以含有以下多核苷酸，该多核苷酸编码用于选择含有这种载体的细胞的标记。适合的标记的实例包括编码抗生素（如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素或诺尔丝菌素）抗性的基因。

如本文所用，术语“受试者”、“对象”和“患者”是指接受对如本文所述的特定疾病或病症（如癌症或传染性疾病）的治疗的生物体。对象和患者的实例包括接受疾病或病症（例如细胞增殖性病症，如癌症或传染性疾病）的治疗的哺乳动物，如人、灵长

类动物、猪、山羊、兔、仓鼠、猫、狗、豚鼠、牛科家族成员（如家牛、野牛、水牛、麋鹿和牦牛等）、牛、绵羊、马和野牛等。

如本文所用，术语“治疗”是指外科手术或药物处理（surgical or therapeutic treatment），其目的是预防、减缓（减少）治疗对象中不希望的生理变化或病变，如
5 细胞增殖性病症（如癌症或传染性疾病）的进展。有益的或所希望的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病程度减弱、疾病状态稳定（即，未恶化）、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓和、以及缓解（无论是部分缓解或完全缓解），无论是可检测的或不可检测的。需要治疗的对象包括已患有病症或疾病的对象以及易于患上病症或疾病的对象或打算预防病症或疾病的对象。当提到减缓、减轻、减弱、缓和、
10 缓解等术语时，其含义也包括消除、消失、不发生等情况。

附图说明

下面通过对本发明的详细描述以及附图来清楚地说明本发明前面叙述的方面以及其他方面。本文中附图是为了举例说明本发明的一些优选的实施方案，然而，可以
15 理解，本发明并不限于所公开的特定实施方案。

图 1、末次免疫后测定的小鼠血清结合人 PD-L1-mFc (A) 和 PD-L1-His (B) 重组蛋白的滴度；

图 2、PD-L1 特异性 B 细胞的流式细胞染色分选(FACS)和圈门策略图；

图 3、竞争性 ELISA 方法测定抗 PD-L1 抗体阻断 PD-L1 蛋白与 PD-1 蛋白结合；

20 图 4、FACS 测定抗 PD-L1 抗体结合细胞表面 PD-L1 蛋白的 EC50；

图 5、抗 PD-L1 抗体增加 Jurkat-PD-1-CHO-PD-L1-NFAT 体系中报告基因的表达和活性；

图 6、抗 PD-L1 抗体促进混合淋巴细胞反应中 IFN- γ 的分泌；

图 7、抗 PD-L1 抗体对 A431 细胞的抗体依赖的细胞杀伤(ADCC)活性；

25 图 8、鼠源抗 PD-L1 抗体抑制人 PD-1/PD-L1 转基因小鼠体内 MC38-hPD-L1 结肠癌肿瘤生长；

图 9、人源化抗 PD-L1 抗体抑制人 PD-L1 转基因小鼠体内 MC38-hPD-L1 结肠癌肿瘤生长。

具体实施方式

下面结合实施例和附图对本发明进行详细描述，本文中附图是为了举例说明本发明的一些优选的实施方案，然而，可以理解，本发明并不限于所公开的特定实施方案或看作对本发明范围的限制。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

实施例 1 小鼠免疫产生 PD-L1 抗体

对 6-8 周龄的雌性 SJL 小鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司）或者 Balb/c 小鼠（购自上海斯莱克实验动物有限公司），使用融合了小鼠 Fc 的人 PD-L1 蛋白（PD-L1-mFc, Novoprotein, Cat.CM06, 或 Sino Biological, Cat.10084-H05H）或人 PD-L1-His (Novoprotein, Cat.C315 或 Sino Biological, Cat: .10084-H08H) 与弗氏完全佐剂 (complete freund's adjuvant, CFA, Sigma, Cat.F5881) 进行第一次免疫；使用上述 PD-L1-mFc 或人 PD-L1-His 与弗氏不完全佐剂 (incomplete freund's adjuvant, IFA, Sigma, Cat.F5506) 和加未甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸 (CpGODN1826, 合成自上海生工生物) 进行后三次免疫，免疫时注射 50 μ g/只/次通过乳化操作形成的均一稳定的乳剂。特别地，第一次和第二次免疫注射后足垫和背部，第三次和第四次免疫注射尾部皮下及背部，以获得高滴度高亲和力高特异性的抗血清及特异性的免疫细胞。在末次免疫（第四次免疫）后的第 5-7 天，安乐死小鼠并无菌取出脾脏，无菌分离提取小鼠脾脏淋巴细胞，分装至冻存管中，冻存于液氮中。分别在二次免疫，三次免疫后 10 天及安乐死小鼠当天进行小鼠的采血操作，分离血清，使用酶联免疫吸附 (ELISA) 方法测定血清中抗 PD-L1 特异性抗体的滴度。

实验结果如图 1，显示经过四次免疫后，所免疫小鼠的血清与人 PD-L1-mFc 和 PD-L1-His 结合的滴度都很高。说明了使用此方法进行小鼠的免疫，可以使小鼠产生高滴度的抗 PD-L1 抗体。

实施例 2 PD-L1 特异性单个 B 细胞的流式细胞荧光分选 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)

PD-L1 蛋白免疫的小鼠脾脏细胞，经抗原 PD-L1-His 蛋白 (Novoprotein, Cat.C315 或 Sino Biological, Cat. 10084-H08H) 及间接标记抗体 anti-His-APC (R&D Systems,

Cat. IC050A) 和针对小鼠 B 细胞表面特有标志的抗体 (anti-mouse B220-Pacific Blue, R&D Systems, Cat.553089; anti-mouse IgD-PE, R&D Systems,Cat. 558597; anti- mouse IgM-PE Cy7, R&D Systems, Cat. 552867) 染色, 并在分选前加入区分死细胞和活细胞的染料 7-AAD (R&D Systems, Cat. 51-68981E), 用 AriaIII (BD 公司) 流式细胞分选
 5 仪分选 PD-L1 特异性的单个 B 细胞 (7AAD⁻B220⁺IgD⁻IgM⁻PDL1-His⁺) 至含有细胞裂解液, RNA 酶抑制剂的 PCR 孔中, 每个孔收集一个细胞。结果显示 (图 2) 空白对照未免疫的小鼠脾脏(A), 或使用带 His 的不相关蛋白 CREG-His 染色的 PD-L1 免疫的小鼠脾脏(B)均未检测到明显的 PD-L1⁺ 抗原特异性 B 细胞亚群, 而使用 PD-L1-His 染色的 PD-L1 免疫的小鼠脾脏(C)则检测到一群 PD-L1⁺B 细胞, 每 10⁶ 个脾脏细胞中
 10 约有 114 个 PD-L1⁺B 细胞。

实施例 3 单克隆抗体的扩增和高通量表达

采用专利“一种用于巢式扩增的组合引物及其应用”专利申请号: 201811618134.4 中实施例 1 的方法, 将单细胞的 mRNA 反转录成 cDNA。然后以 cDNA 为模板进行
 15 巢式 PCR, 分别进行抗体重链和轻链扩增。扩增得到抗体重链可变区和轻链可变区, 分别通过同源重组方法克隆到重链表达载体和轻链表达载体。重链表达载体和轻链表达载体的恒定区都来自于人 IgG1。完整重链表达序列是信号肽-VH-CH1-铰链区-CH2-CH3, 完整轻链表达序列是信号肽-V_K-C_K。以上所述单 B 细胞抗体克隆和表达
 20 皆在 96 孔板内以高通量方式达到抗体的快速鉴定和发现。经过一系列理化和功能筛选 324 对克隆表达的抗体重链和轻链后, 共获得 9 个与已上市的 PD-L1 抗体 Avelumab 或 Atezolizumab 理化和功能活性相当或更好的候选鼠源抗体分子, 其序列的 CDRs 分别用 IMGT 和 KABAT 软件分析, 对应的序列信息如下表 1 至 2 所示, 其中表 1 示出鼠源抗体分子的 VH 和 VL 序列, 表 2 示出鼠源抗体分子的 IMGT 和 KABAT 分析结果。

25 **表 1. 鼠源抗 PD-L1 抗体重链可变区和轻链可变区的具体序列信息**

抗体编号	序列编号	重链可变区序列 (VH)
34	SEQ ID NO.1	EVQLQESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFNTYGMSWVR QTPDKRLEWVATLSSGGSYTYYESVKGRFTISRDNANK

		<p>TLYLQMNSLKSEDTAIYYCARPTADWHLDVWGTGTTV TVSS</p>
50	SEQ ID NO.3	<p>EVQLQESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFNTYGMSWVR QTPDKRLEWVATLSSGGSYTYYESVKGRFTISRDNKN TLYLQMTSLKSEDTAIYYCARPTADWHLDVWGTGTTVT VSS</p>
90	SEQ ID NO.5	<p>EVQLQESGGDLVKPGGSLKLSCTASGFTFSTYGMSWVR QTPDKRLEWVATVSSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKN NTLYLQMSSLKSEDTAIYYCARPTADWHLDVWGTGTTV TVSS</p>
130	SEQ ID NO.7	<p>EVQLQESGPGLAKPSQTLSLTCSVTGYSITSDYWNWIRK FPGNKLEYVGYISYTGSTYYNPSLRSRISITRDTSKNQYY LQLNSVTAEDTATYYCARCPGWLNAMDYWGQGTTVT VSS</p>
156	SEQ ID NO.9	<p>EVQLQESGPPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYIMNWVR QSHGKSLEWIGDINPNNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMDLRSLTSEDSAVYYCASSVMDYWGQGTTVTVSS</p>
370	SEQ ID NO.11	<p>EVQLQESGPGLAKPSQTLSLTCSVTGYSITSDYWNWIRK FPGNKLEYMGYISYTGSTYYNPSLKSRSIARDTSRNQYY LQLNSVTTEDSATYYCARAGGWLLPFAVWGTGTTVTVS S</p>
373	SEQ ID NO.13	<p>EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYGMHWVR QAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNKN LFLQMTSLRSEDAMYYCARRNFGSSYDYWGQGTTVT VSS</p>
413	SEQ ID NO.15	<p>EVQLQESGPGLAKPSQTLSLTCSVTGYSITSDYWNWIRK FPGNKLEYMGYISYTGSTYYNPSLKSRSIARDTSRNQYY LQLKSVTTEDTATYYCARAGGWLLPFAVWGTGTTVTVS S</p>

794	SEQ ID NO.17	EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWNWIRKF PGNKLEYMGYISYSGSTYYNPFLKSRISITRDTSKNQYYL QLNSVTTEDTATYYCAKMGDWLAWFAYWGQGTTVTV SS
抗体编 号	序列编号	轻链可变区序列 (VL)
34	SEQ ID NO.2	DILMTQSPSSLSASLGGKVTITCNASQDINKYIAWYQHKP GKGPSLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDISFSISNLEPED IATYYCLQHDNLLFTFGSGTKLEIK
50	SEQ ID NO.4	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQHK PGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDISFSISNLEPE DIATYYCLQHDNLLFTFGSGTKLEIK
90	SEQ ID NO.6	DIQMTQTPSSLSASLGGKVTITCKASQDINRYIAWYQHKP GKGPSLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDISFSISNLEPED IATYYCLQHDNLLFTFGSGTKLEIK
130	SEQ ID NO.8	DILMTQSPSSLA VSVGEKVTLSCKSSQSLLYSNNQKNSL AWYQQKPGQSPKLLIYWASTGESGVPDRFTGSGSGTDF TLTISSVKAEDLAVYYCQQYYGYPTFGAGTKLEIK
156	SEQ ID NO.10	DIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVNYVYWYQQK PRSSPKPWIYLTFLNLSGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEA EDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLEIK
370	SEQ ID NO.12	DIVITQSPSSLA VSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQNSLA WYQQKPGQSPILLIYWASTRESGVPDRFTGGGSGTDFTL TISSVRAEDLAVYYCQQYYNYPWTFGGGTKLEIK
373	SEQ ID NO.14	EIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVDPVAWYQQ KPGQSPRLLIYWASIRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNV QSEDLADYFCQQYSSYPLTFGSGTKLEIK
413	SEQ ID NO.16	DIVMTQSPSSLA VSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQNSL AWYQQKPGQSPILLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTL

		TISSVRAEDLAVYYCQQYYSPWTFGGGTKLEIK
794	SEQ ID NO.18	EIVMTQSPSSLA VSVGEK VTL SCKSSQSLLYSSNQKNSLA WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTL TISSVKAEDLAVYYCQQYYGYPTYTFGGGTKLEIK

分别使用 KABAT 和 IMGT 软件分析各抗体的 CDRs，具体的序列信息如下表 2：

表 2. KABAT 和 IMGT 软件分析各鼠源抗体的 CDRs 具体序列信息

KABAT 分析						
抗体 编号	序列编号	CDR1-HC	序列编号	CDR2-HC	序列编 号	CDR3-HC
34	SEQ ID NO.19	TYGMS	SEQ ID NO.20	TLSSGGSYT YYSESVKG	SEQ ID NO.21	PTADWHL DV
50	SEQ ID NO.25	TYGMS	SEQ ID NO.26	TLSSGGSYT YYSESVKG	SEQ ID NO.27	PTADWHL DV
90	SEQ ID NO.31	TYGMS	SEQ ID NO.32	TVSSGGSYT YYPDSVKG	SEQ ID NO.33	PTADWHL DV
130	SEQ ID NO.37	SDYWN	SEQ ID NO.38	YISYTGSTY YNPSLRS	SEQ ID NO.39	CPGWLNA MDY
156	SEQ ID NO.43	DYYMN	SEQ ID NO.44	DINPNNGDT SYNQKFKG	SEQ ID NO.45	SSVMDY
370	SEQ ID NO.49	SDYWN	SEQ ID NO.50	YISYTGSTY YNPSLKS	SEQ ID NO.51	AGGWLLP FAV
373	SEQ ID NO.55	DYGMH	SEQ ID NO.56	YISSGSSTIY YADTVKG	SEQ ID NO.57	RNFGSSY DY
413	SEQ ID NO.61	SDYWN	SEQ ID NO.62	YISYTGSTY YNPSLKS	SEQ ID NO.63	AGGWLLP FAV
794	SEQ ID NO.67	SGYWN	SEQ ID NO.68	YISYSGSTY YNPFLKS	SEQ ID NO.69	MGDWLA WFAY
抗体 编号	序列编号	CDR1-LC	序列编号	CDR2-LC	序列编 号	CDR3-LC

34	SEQ ID NO.22	NASQDIN KYIA	SEQ ID NO.23	YTSTLQP	SEQ ID NO.24	LQHDNLL FT
50	SEQ ID NO.28	KASQDIN KYIA	SEQ ID NO.29	YTSTLQP	SEQ ID NO.30	LQHDNLL FT
90	SEQ ID NO.34	KASQDINR YIA	SEQ ID NO.35	YTSTLQP	SEQ ID NO.36	LQHDNLL FT
130	SEQ ID NO.40	KSSQSLLY SNNQKNS LA	SEQ ID NO.41	WASTGES	SEQ ID NO.42	QQYYGYP FT
156	SEQ ID NO.46	SASSSVNY VY	SEQ ID NO.47	LTFNLAS	SEQ ID NO.48	QQWSSNP LT
370	SEQ ID NO.52	KSSQSLLY SSNQQNSL A	SEQ ID NO.53	WASTRES	SEQ ID NO.54	QQYYNYP WT
373	SEQ ID NO.58	KASQDVD TPVA	SEQ ID NO.59	WASIRHT	SEQ ID NO.60	QQYSSYPL T
413	SEQ ID NO.64	KSSQSLLY SSNQQNSL A	SEQ ID NO.65	WASTRES	SEQ ID NO.66	QQYYSYP WT
794	SEQ ID NO.70	KSSQSLLY SSNQKNSL A	SEQ ID NO.71	WASTRES	SEQ ID NO.72	QQYYGYP YT
IMGT 分析						
抗体 编号	序列编号	CDR1-HC	序列编号	CDR2-HC	序列编 号	CDR3-HC
34	SEQ ID NO.73	GFTFNTY G	SEQ ID NO.74	LSSGGSYT	SEQ ID NO.75	ARPTADW HLDV
50	SEQ ID NO.79	GFTFNTY G	SEQ ID NO.80	LSSGGSYT	SEQ ID NO.81	ARPTADW HLDV

90	SEQ ID NO.85	GFTFSTYG	SEQ ID NO.86	VSSGGSYT	SEQ ID NO.87	ARPTADW HLDV
130	SEQ ID NO.91	GYSITSDY	SEQ ID NO.92	ISYTGST	SEQ ID NO.93	ARCPGWL NAMDY
156	SEQ ID NO.97	GYTFTDY Y	SEQ ID NO.98	INPNNGDT	SEQ ID NO.99	ASSVMDY
370	SEQ ID NO.103	GYSITSDY	SEQ ID NO.104	ISYTGST	SEQ ID NO.105	ARAGGWL LPFAV
373	SEQ ID NO.109	GFTFSDYG	SEQ ID NO.110	ISSGSSTI	SEQ ID NO.111	ARRNFGSS YDY
413	SEQ ID NO.115	GYSITSDY	SEQ ID NO.116	ISYTGST	SEQ ID NO.117	ARAGGWL LPFAV
794	SEQ ID NO.121	GDSITSGY	SEQ ID NO.122	ISYSGST	SEQ ID NO.123	AKMGDW LAWFAY
抗体 编号	序列编号	CDR1-LC	序列编号	CDR2-LC	序列编 号	CDR3-LC
34	SEQ ID NO.76	QDINKY	SEQ ID NO.77	YTS	SEQ ID NO.78	LQHDNLL FT
50	SEQ ID NO.82	QDINKY	SEQ ID NO.83	YTS	SEQ ID NO.84	LQHDNLL FT
90	SEQ ID NO.88	QDINRY	SEQ ID NO.89	YTS	SEQ ID NO.90	LQHDNLL FT
130	SEQ ID NO.94	QSLLYSNN QKNS	SEQ ID NO.95	WAS	SEQ ID NO.96	QQYYGYP FT
156	SEQ ID NO.100	SSVNY	SEQ ID NO.101	LTF	SEQ ID NO.102	QQWSSNP LT
370	SEQ ID NO.106	QSLLYSSN QQNS	SEQ ID NO.107	WAS	SEQ ID NO.108	QQYYNYP WT
373	SEQ ID	QDVDTP	SEQ ID	WAS	SEQ ID	QQYSSYPL

	NO.112		NO.113		NO.114	T
413	SEQ ID NO.118	QSLLYSSN QQNS	SEQ ID NO.119	WAS	SEQ ID NO.120	QQYYSTYP WT
794	SEQ ID NO.124	QSLLYSSN QKNS	SEQ ID NO.125	WAS	SEQ ID NO.126	QQYYGYP YT

实施例 4 抗体人源化

首先采用经典“CDRs 移植”方法进行抗体人源化，即通过序列挑选同源性最高的人源性抗体提供抗体骨架区 (FRs)，把目标抗体的基于 Kabat 命名方法的抗原结合片段互补决定区 (CDRs)，移植到前者形成人源化抗体。其次，为更好保持抗体活性和亲和力，基于抗体结构建模分析 (MOE 软件)：1). 选择抗体骨架区位于 VH-VL 界面、靠近或与 CDRs 有直接相互作用等氨基酸残基进行回复突变，这类氨基酸残基对保持 CDRs 区构象多较重要；2). 考虑到免疫原性，尽量选择包埋在蛋白内部的氨基酸进行回复突变；3). 考虑到抗体稳定性和表达水平，优先考虑分子能量降低突变；4). 在人源化过程中通过 CDRs 区的氨基酸定点突变尝试进一步提升人源化抗体亲和力。通过测试含有不同突变的人源化抗体与人 PD-L1 的亲和力以及和表面表达 PD-L1 的细胞的结合，筛选与鼠源 PD-L1 抗体亲和力、抗体表征和活性功能相当或更好的人源化抗体。

其中，PDL1-156 抗体经过人源化后的优选候选抗体分子的序列的 CDRs 如下，分别用 IMGT 和 KABAT 软件分析，对应的序列信息如下表 3 和表 4 所示，其中表 3 示出人源化抗体分子的 VH 和 VL 序列，表 4 示出人源化抗体分子的 IMGT 和 KABAT 分析结果)。

表 3. 人源化抗 PD-L1 抗体重链可变区和轻链可变区的具体序列信息

抗体编号	序列编号	重链可变区序列 (VH)
156-1H	SEQ ID NO.127	QVQLVQSGPELKKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWV RQAPGQSLEWIGDIWPNNGDTWYNQKFKGRVTLTRDT STSTVYME LRSLRSED TAVYYCARSVMDYWGQGLVT VSS

156-7H	SEQ ID NO.129	QVQLVQSGPELKKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWV RQAPGQSLEWIGDIWPNNGDTSYNQKFKGRVTLTRDTS TSTVYMELRSLRSEDVAVYYCARSVMDTWGQGTLVTV SS
156-10 H	SEQ ID NO.131	QVQLVQSGPELKKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWV RQAPGQSLEWIGDIWPNNGDTSYNQKFKGRVTLTRDTS TSTVYMELRSLRSEDVAVYYCARSVMSDWGQGTLVTV SS
156-11 H	SEQ ID NO.133	QVQLVQSGPELKKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWV RQAPGQSLEWIGDIWPNNGDTSYNQKFKGRVTLTRDTS TSTVYMELRSLRSEDVAVYYCARSVMDYWGQGTLVTV SS
抗体编 号	序列编号	轻链可变区序列 (VL)
156-1H	SEQ ID NO.128	EIVLTQSPALLSLSPGERVTLSCSASSSVNYVYWYQQKP GQAPRPLIYLTFNLAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPE DFAVYYCQQWSVNPLTFGGGTKVEIK
156-7H	SEQ ID NO.130	EIVLTQSPALLSLSPGERVTLSCSASSSVNYVYWYQQKP GQAPRPLIYLTFNLAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPE DFAVYYCQQWSVNPLTFGGGTKVEIK
156-10 H	SEQ ID NO.132	EIVLTQSPALLSLSPGERVTLSCSASSSVNYVYWYQQKP GQAPRPLIYLTFNLAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPE DFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK
156-11 H	SEQ ID NO.134	EIVLTQSPALLSLSPGERVTLSCSASSSVNYVYWYQQKP GQAPRPLIYLTFNLAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPE DFAVYYCQQWSVNPLTFGGGTKVEIK

分别使用 KABAT 和 IMGT 软件分析各人源化抗体的 CDRs, 具体的序列信息如下:

表 4. KABAT 和 IMGT 软件分析各人源化 PD-L1 抗体的 CDRs 具体序列信息

KABAT 分析						
抗体编号	序列编号	CDR1-HC	序列编号	CDR2-HC	序列编号	CDR3-HC
156-1H	SEQ ID NO.135	DYYMN	SEQ ID NO.136	DIWPNNGDT WYNQKFKG	SEQ ID NO.137	SVMDY
156-7H	SEQ ID NO.141	DYYMN	SEQ ID NO.142	DIWPNNGDT SYNQKFKG	SEQ ID NO.143	SVMDT
156-10 H	SEQ ID NO.147	DYYMN	SEQ ID NO.148	DIWPNNGDT SYNQKFKG	SEQ ID NO.149	SVMSD
156-11 H	SEQ ID NO.153	DYYMN	SEQ ID NO.154	DIWPNNGDT SYNQKFKG	SEQ ID NO.155	SVMDY
抗体编号	序列编号	CDR1-LC	序列编号	CDR2-LC	序列编号	CDR3-LC
156-1H	SEQ ID NO.138	SASSSVN YVY	SEQ ID NO.139	LTFNLAS	SEQ ID NO.140	QQWSVNP LT
156-7H	SEQ ID NO.144	SASSSVN YVY	SEQ ID NO.145	LTFNLAS	SEQ ID NO.146	QQWSVNP LT
156-10 H	SEQ ID NO.150	SASSSVN YVY	SEQ ID NO.151	LTFNLAS	SEQ ID NO.152	QQWSSNP LT
156-11 H	SEQ ID NO.156	SASSSVN YVY	SEQ ID NO.157	LTFNLAS	SEQ ID NO.158	QQWSVNP LT
IMGT 分析						
抗体编号	序列编号	CDR1-HC	序列编号	CDR2-HC	序列编号	CDR3-HC
156-1H	SEQ ID NO.159	GYTFTD YY	SEQ ID NO.160	IWPNNGDT	SEQ ID NO.161	ARSVMDY
156-7H	SEQ ID NO.165	GYTFTD YY	SEQ ID NO.166	IWPNNGDT	SEQ ID NO.167	ARSVMDT

156-10 H	SEQ ID NO.171	GYTFTD YY	SEQ ID NO.172	IWPNNGDT	SEQ ID NO.173	ARSVMSD
156-11 H	SEQ ID NO.177	GYTFTD YY	SEQ ID NO.178	IWPNNGDT	SEQ ID NO.179	ARSVMDY
抗体编 号	序列编 号	CDR1-LC	序列编号	CDR2-LC	序列编 号	CDR3-LC
156-1H	SEQ ID NO.162	SSVNY	SEQ ID NO.163	LTF	SEQ ID NO.164	QQWSVNP LT
156-7H	SEQ ID NO.168	SSVNY	SEQ ID NO.169	LTF	SEQ ID NO.170	QQWSVNP LT
156-10 H	SEQ ID NO.174	SSVNY	SEQ ID NO.175	LTF	SEQ ID NO.176	QQWSSNP LT
156-11 H	SEQ ID NO.180	SSVNY	SEQ ID NO.181	LTF	SEQ ID NO.182	QQWSVNP LT

实施例 5 分子排阻色谱法测定抗体纯度

采用 TSKgel G3000SWXL 色谱柱 (TOSOH, 0008541), 预柱 Tskgel guard column SWXL (TOSOH, Cat. 0008543) 进行分子排阻色谱法测定抗体纯度。流动相为磷酸盐缓冲液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$), 配制: 称取 8.88g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 33.33g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 。流动相平衡色谱柱, 流速为 1mL/min。待基线走平后进样, 其中进样体积 10 μL , 紫外检测波长 280nm, 带宽 16nm, 参比波长关闭。测定结果如表 5 所示。

表 5. 人源化抗 PD-L1 抗体的纯度

样品编号	主峰 (%)	高分子量峰 (%)	降解 (%)
PDL1-156	95.03	1.33	2.88
156-1H	96.16	3.00	0.84
156-7H	81.80	3.56	14.64

156-10H	86.05	3.5	10.45
156-11H	93.17	6.83	/

实施例 6 抗体与人以及食蟹猴 PD-L1 重组蛋白结合的 KD 测定

使用 Biacore T200 (GE Healthcare) 测定 PD-L1 抗体对于人和食蟹猴 PD-L1-His 蛋白的结合亲和力。25°C 下在 CM5 芯片 (GE Healthcare, Cat. BR-1005-30) 上固定 anti-human IgG Fc (Genway, Cat. GWB-20A705)。将 anti-human Fc (Genway, Cat. GWB-20A705) 用 Acetate pH5.0 (GE Healthcare, BR-1003-51) 稀释至 20 μ g/mL。使用 Immobilization method 中 Amine 方法进行固定。或者使用商品化 Protein A (GE Healthcare, Cat. 29127556) 芯片进行检测。25°C 下采用多循环动力学法测定抗体与抗原的亲和力, 在每一个循环中, 首先将待测抗体捕获到固定好的 CM5 芯片, 然后注入重组人 PD-L1-His (Novoprotein, Cat. 315) 和食蟹猴 PD-L1-His 蛋白 (Sino Biological, Cat. 90251-C08H), 最后用 Glycine pH1.5 再生。流动相为 HBS-EP+ Buffer (GE Healthcare, Cat. BR-1006-69), 流速 30 μ L/min, 结合时间为 300 秒。再生流速 30 μ L/min, 时间为 30 秒。应用 Biacore T200 Evaluation Software (version 3.0), 以 1: 1 结合模型, 分析试验数据, 拟合抗体抗原的平衡解离常数 KD, 确定结合速率常数 ka 和解离速率常数 kd。

从结果可知所测试的 PD-L1 抗体对人 PD-L1 重组蛋白的结合, 都表现出 nM 或更高的亲和力, 且都与食蟹猴的 PD-L1 重组蛋白的亲和力在 62.5nM 到 0.375nM 之间, 详见下表 6。

表 6. 鼠源 PD-L1 抗体 Biacore 结合亲和力 KD 测定结果 (M)

抗体编号	人 PD-L1	食蟹猴 PD-L1
PDL1-156	2.91E-10	3.75E-10
PDL1-794	1.25E-09	8.83E-10
PDL1-130	2.18E-09	1.95E-09
PDL1-34	4.58E-10	5.43E-09
PDL1-50	6.99E-10	3.31E-08
PDL1-90	8.70E-10	6.25E-08
PDL1-370	2.42E-09	2.18E-09

PDL1-373	2.45E-09	3.64E-09
PDL1-413	2.09E-09	2.76E-09

表 7 则显示鼠源抗体 PDL1-156 来源的人源化抗体 156-1H、156-7H、156-10H 和 156-11H 对人 PD-L1 蛋白的结合，表现出与 PDL1-156 相当的亲和力。

表 7. 人源化 PD-L1 抗体 Biacore 结合亲和力测定结果

抗体编号	结合速率常数 k_a (1/Ms)	解离速率常数 k_d (1/s)	平衡解离常数 K_D (M)
PDL1-156	8.02E+05	2.33E-04	2.91E-10
156-1H	4.940E+05	2.265E-04	4.584E-10
156-7H	5.184E+05	1.805E-04	3.481E-10
156-10H	5.954E+05	1.333E-04	2.239E-10
156-11H	5.742E+05	1.928E-04	3.359E-10

5 实施例 7 抗体阻断 PD-L1 和 PD-1 相互作用的 IC50 测定

通过竞争性 ELISA 方法确定抗 PD-L1 抗体阻断 PD-L1 蛋白与 PD-1 蛋白结合的 IC50。

使用碳酸盐缓冲液稀释人 PD-L1 重组蛋白(Sino Biological, Cat.10084-H05H)，加入 96 孔酶标板，终浓度为 1 μ g/ml。用含 3% BSA 的 PBS 溶液封闭，加入梯度稀释的抗 PD-L1 抗体 (6000ng/ml~2ng/ml) 以及人 PD-1-His 重组蛋白 (Sino Biological, Cat.10377-H08H) 进行共孵育后，加入 HRP 标记的抗 His 标签抗体(MBL, Cat.D291-7)，TMB 显色，1M 硫酸终止后读取 OD 值(双波长 450nm-630nm)。将抗体浓度与 OD 值对应即可绘制出测试抗体的竞争结合曲线，计算出 IC50 值。图 3 显示了抗 PD-L1 抗体与人 PD-L1 重组蛋白的竞争结合曲线。结果表明，图中所示与没有任何阻断作用的抗体同型阴性对照 anti-Hel(百英生物制备)相比，被测试的 9 个鼠源抗 PD-L1 抗体(A)和 4 个人源化抗体(B)均可以有效的阻断人 PD-L1 蛋白与人 PD-1 蛋白的相互作用，且人源化抗体与人源化之前的鼠源 PDL1-156 的抑制活性相当 (B)，IC50 分别为 197.0ng/mL (156-1H)、230.5 ng/mL (156-7H)、250.1 ng/mL (156-10H)、207.2 ng/mL (156-11H)。鼠源 PD-L1-156 的 IC50 则为 221.3ng/ml，阳性对照 Atezolizumab (百英生物制备)为 446.4ng/ml、Avelumab (Pfizer, lot AU020322) 为 190.3ng/ml。

实施例 8 FACS 测定 PD-L1 抗体对细胞表面 PD-L1 结合的 EC₅₀

将梯度浓度的待检测抗体（抗体终浓度：10000ng/ml-0.1ng/ml，10 倍系列稀释）与细胞表面高表达 PD-L1 的 CHO-PD-L1 细胞（南京勇山生物科技有限公司，10⁵ 个/孔），4°C 共同孵育 30min。孵育结束后，加入 1:250 稀释的 anti-human IgG PE 荧光抗体（eBioscience, Cat. 12-4998-8），4°C 下共同孵育 30min，荧光抗体与待检测抗体的 Fc 段产生特异性结合，通过 FACS 检测 PE 荧光强度的高低而对待检测抗体的结合细胞表面高表达的 PD-L1 蛋白的能力进行分析。图 4 结果显示，待测的鼠源 PD-L1 抗体 EC₅₀ 均与本次实验的阳性对照 Avelumab (EC₅₀ 为 58.2ng/ml) 和 Atezolizumab (~99.73ng/ml) 相近，其中 PDL1-156 和 PDL1-370 的 EC₅₀ 最低，被检测的人源化抗体 156-1H, 156-7H, 156-10H 和 156-11H 的 EC₅₀ 分别为 49.42ng/ml, 78.37ng/ml, 63.5ng/ml 和 49.97ng/ml, 与本次实验的阳性对照 Avelumab (EC₅₀ 为 56.88ng/ml) 相近。该检测定量地证实了待测各 PD-L1 抗体对细胞表面上 PD-L1 靶点剂量依赖性结合的能力。MFI fold = 实验组 MFI 值/未加药物的对照组 MFI 值。

实施例 9 PD-1/PD-L1-NFAT 报告基因测试抗 PD-L1 抗体阻抑 PD-1:PD-L1 结合和信号传导

利用稳定转染 PD-1 的 Jurkat 细胞株（GenScript, Cat.00612）和稳定转染 PD-L1 的 CHO 细胞株（GenScript, Cat. M00613）比较 PD-L1 抗体对 PD-1/PD-L1 蛋白相互作用及其信号通路的拮抗作用。当抑制信号通路阻抑，NFAT 控制的发光报告基因表达增强，发光信号值增加。通过发光读值的强弱(relative light units, RLU)反应抗体对 PD-L1 的阻断作用强弱。

将稳转 PD-L1 的 CHO 细胞株种在 96 孔白底板上，每孔 40000 个细胞，100μl/孔，放回培养箱过夜；第二天，取出孔板，吸去培养基，加入稳转 PD-1 的细胞株及待测的 PD-L1 抗体共孵育，PD-1 细胞每孔加样量为 16000 个/孔，抗体则做梯度稀释，每个剂量 3 复孔，孵育体积为 100μl/孔，孵育时长为 6 小时，待孵育完成时，取出孔板，等体积（100μl）加入发光检测试剂，读值。根据检测值用 Graphpad 进行 4 参数分析做回归曲线，得到各抗体的 EC₅₀ 值，结果详见图 5A，被测的鼠源 PD-L1 抗体的 EC₅₀ 值均与阳性对照抗体 Avelumab 和 Atezolizumab 的 EC₅₀ 值(222.9ng/ml, 321.6ng/ml)相近，图 5B 和 5C 则显示 4 个人源化 PD-L1 抗体 156-1H, 156-7H 和 156-10H, 156-11H 的 EC₅₀ 分别为：342ng/ml, 313.7ng/ml, 357.1ng/ml 和 282.2ng/ml,

和阳性对照 Avelumab 的 EC50 相近。该检测定量地证实了鼠源和人源化的抗 PD-L1 抗体对细胞表面 PD-1: PD-L1 相互作用导致的 T 细胞活性抑制呈现剂量依赖性的抑制能力, 从而剂量依赖地增强 Jurkat 细胞内报告基因的活性。

实施例 10 ELISA 检测混合淋巴细胞反应中 T 细胞分泌的 IFN- γ

5 通过混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction, MLR) 来测定 PD-L1 单抗增强 T 细胞的活性。从健康人供体 1 的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 中分离 CD14⁺单核细胞, 应用重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF, Peprotech, Cat.300-03)和重组人白介素 4 (rhIL-4, Peprotech, Cat.200-04) 进行体外诱导分化为树突状细胞 (dendritic cell, DC), 于培养第 6 天加入 LPS(Sigma, 10 Cat: L4516)刺激成熟 DC, 第 7 天将供体 1 的 DC 细胞与从健康供体 2 的 PBMC 富集的 CD4⁺T 细胞混合共培养, DC: CD4⁺T 细胞数比例为 1:10, 加入待测抗体或阳性对照抗体 Avelumab 或 Atezolizumab (抗体浓度为 1000ng/ml, 100ng/ml, 10 ng/ml, 15 1ng/ml), 共培养 4 天。4 天后收集细胞培养上清, 用 ELISA 方法检测上清中 IFN- γ 的含量如图 6 显示, 所有测试的鼠源抗体及阳性对照抗体 Avelumab、Atezolizumab 相比 anti-HEL 单抗和 no treatment (即没有给药) 阴性对照组, 均可明显增强 MLR 15 实验中 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ 的能力, 并且随着 PD-L1 抗体药物浓度降低, 增加分泌 IFN- γ 的活性也降低。该结果表明 PD-L1 抗体可增强 T 细胞的功能, 且具有剂量依赖性。T-test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

20 实施例 11 抗 PD-L1 抗体的抗体依赖的细胞杀伤 (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC)活性检测

通过分离纯化的正常人 PBMC 中的天然杀伤(natural killer, NK)细胞对高表达人 PD-L1 的 A431 细胞的杀伤实验来测定抗 PD-L1 单抗介导的抗体依赖的细胞杀伤活性。

25 效应细胞的制备: 复苏冻存的人 PBMC 细胞(Stemexpress 公司)后, 在补充有 100IU/ml 重组人白介素 2(rhIL-2, Peprotech, Cat. 200-02) 的 RPMI1640 培养基 (Invitrogen, Cat. 11835030)中孵育过夜。其后, 收集细胞后进行活细胞计数。然后使用 NK 细胞磁珠分离试剂盒 (Stemcell, Cat. 17955), 从 PBMC 中纯化 NK 细胞, 将 NK 细胞用补充有 10% 灭活的胎牛血清的 DMEM (Invitrogen, Cat. 11965084) 重悬后

进行计数，用作效应细胞。

靶细胞的制备：靶细胞 A431 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养，ADCC 实验前一天，加上终浓度为 500IU 干扰素 IFN- γ (Peprotech, Cat. 300-02) 进行刺激培养过夜后待用。

5 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基稀释抗 PD-L1 抗体，稀释好的抗体以 25 μ l/孔分至白壁 96 孔板 (Corning, Cat. 3610) 中，并且将靶细胞加入孔中 (25 μ l/孔, 10000 细胞/孔)。使板在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中孵育 30 分钟。随后，将效应细胞加入孔中 (25 μ l/孔, 40000 细胞/孔, 即效靶比 NK: A431 为 4:1), 总体积为 100 μ l, 使板在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中孵育 4 个小时。

10 需同时设置培养基背景对照孔(即孔中加入 100 μ l 培养基), 靶细胞自发死亡释放孔 (即孔中只有靶细胞), 效应细胞自发死亡释放孔 (即孔中只有 NK 细胞), 靶细胞最大死亡释放孔(即靶细胞加 CytoTox-GloTM Cytotoxicity 试剂盒(Promega, Cat. G9291) 中提供的 lysis buffer, 所有对照孔的体积最后用培养基统一补充至 100 μ l。培养 4 小时后, 将板取出, 每孔加入 50 μ l CytoTox-GloTM Cytotoxicity Assay Reagent, 放于摇床上混匀后, 室温放置 15 分钟后进行读数化学发光(luminescence, RLU)。

根据下面步骤进行计算由 ADCC 活性引起的细胞裂解率: 先将所有孔的读值减去培养基背景对照孔的平均读值, 然后计算裂解率%=(实验孔读值-靶细胞自发死亡释放孔读值-效应细胞自发死亡释放孔)/(靶细胞最大死亡释放孔读值-靶细胞自发死亡释放孔读值)*100

20 结果显示于图 7 中, 实验结果显示所测试的 3 个鼠源 PD-L1 抗体和 FDA 已批准上市的阳性对照抗 PD-L1 药物 Avelumab 均显示出对靶细胞 A431 细胞的抗体浓度依赖性的裂解杀伤活性和相近的 EC50 数值, 同时, 阴性同型对照抗体 hIgG1, K (Abdserotec, PHP010) 即使在最高浓度时也显示没有 ADCC 活性。

实施例 12 鼠源 PD-L1 抗体 PDL1-156 的小鼠体内药效检测

25 利用 B-hPD-1/hPD-L1 转基因小鼠 (北京百奥赛图基因技术有限公司) 建立 MC38-hPD-L1 结肠癌动物模型并进行 PD-L1 抗体药效实验。小鼠右侧皮下接种 5 \times 10⁵ MC38-hPD-L1 结肠癌细胞。当肿瘤体积达到~110mm³ 时, 挑选个体肿瘤体积适中的小鼠入组, 将动物按肿瘤体积使用随机分组软件分配到 3 个实验组: anti-Hel hIgG 同型对照组、抗 PDL1-156 抗体组、阳性药 Avelumab 组 (Pfizer, lot AU020322), 每组

8 只，分组当天开始给药（定义为研究第 0 天）。各组均按照 10 mg/kg 剂量，每周腹腔注射给药两次，共 7 次。每周两次测量肿瘤体积和小鼠体重，并记录测量值，计算肿瘤体积（长径 x 短径 2/2）和生长抑制率（tumor growth inhibition %, TGITV (%) = [1-(Ti-T0)/(Vi-V0)]×100%；Ti: 治疗组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，T0: 治疗组在
5 给药第 0 天的肿瘤体积均值；Vi: 溶剂对照组在给药第 i 天的肿瘤体积均值，V0: 溶剂对照组在给药第 0 天的肿瘤体积均值），同时对肿瘤体积进行统计学分析，P < 0.05 认为有显著性差异。

在分组给药第 21 天，与对照组相比，阳性药 Avelumab 组和 PDL1-156 鼠源抗 PD-L1 抗体组在肿瘤体积上有显著且相近的抑制效果，且具有统计学差异 (P<0.05)。见图 8A、B、C，表 8。

表 8. 受试品对 B-hPD-1/hPD-L1 人源化小鼠 MC38-hPD-L1 肿瘤体积的影响

组别	受试品	肿瘤体积 (mm ³) ^a			TGI _{TV} (%)	P ^b
		给药前	分组给药第 21 天			
G1	hIgG	114±3	2675±470	-	-	
G2	Avelumab	114±3	797±176	73.3	**0.001	
G3	PDL1-156	114±3	1173±291	58.6	*0.014	

注：a: 平均数±标准误；b: 给药组肿瘤体积与 hIgG 对照肿瘤体积在分组给药后第 21 天进行统计学分析，Two-way ANOVA test * p<0.05 **p<0.01 ***P<0.001 ****p<0.0001。

此外，在实验过程中，除 hIgG 对照组有 1 只小鼠提前异常死亡。其余实验动物在给药期间活动和进食状态良好，体重均有一定程度的上升，结果说明该抗体安全性较高，见图 8D、表 9。

表 9. 受试品对 MC38-hPD-L1 肿瘤细胞移植 B-hPD-1/hPD-L1 人源化小鼠体重的影响

		体重 (g) ^a	
			给药 21 天

组别	受试品	给药前	分组给药第 21 天	P ^b	后
					体重变化 (g)
G1	hIgG	18.1±0.3	21.3±0.5	-	+3.2
G2	Avelumab	18.4±0.4	21.1±0.4	0.765	+2.7
G3	Sim-anti-PD-L1	18.4±0.3	21.5±0.5	0.747	+3.1

注：a：平均数±标准误；b：给药组体重与 hIgG 对照体重在分组给药第 21 天做统计学比较，T-test。

实施例 13 人源化抗 PD-L1 抗体的小鼠体内药效检测

MC38-hPD-L1 细胞以 5×10^5 个/0.1mL 浓度接种于雌性 6-8 周 B-hPD-L1 转基因小鼠（百奥赛图江苏基因生物技术有限公司）的右侧皮下，待肿瘤生长到大约 108 mm^3 时按肿瘤体积挑选 24 只随机分组，每组 8 只，共 3 组，分别为：生理盐水、Avelumab（5 mg/kg）、156-10H（5 mg/kg）。所有组给药途径均为腹腔注射，每周给药 2 次，连续给药 6 次，末次给药 5 天后结束实验。给药和观察期间每周测量 3 次小鼠体重和肿瘤体积，并记录测量值，计算肿瘤体积（长径 \times 短径²/2）和生长抑制率（ $\text{TGI}_{\text{TV}}(\%)$ ），在分组给药第 21 天，与生理盐水对照组相比，阳性药 Avelumab 组和 PD-L1 抗体 156-10H 组在肿瘤体积上有显著且相近的抑制效果，且具有统计学差异（ $P < 0.05$ ）。见图 9A、B、C，表 10。

表 10. 受试物对 B-hPD-L1 人源化小鼠 MC38-hPD-L1 肿瘤体积的影响

组别	受试物	肿瘤体积 (mm^3) ^a			P ^b
		给药前	分组给药 第 21 天	TGI_{TV} (%)	
G1	生理盐水	108±4	1682±177	-	-
G2	Avelumab	108±5	672±301	64.2	*0.012
G3	156-10H	108±5	593±223	69.2	**0.002

注：a：平均数±标准误；b：给药组肿瘤体积与生理盐水对照组肿瘤体积在分组给药第 21 天进行统计学比较，T-test 分析，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

实验动物在给药期间活动和进食状态良好，体重均有一定程度的上升，见图 9D、

表 11。

表 11 受试物对 MC38-hPD-L1 细胞移植 B-hPD-L1 人源化小鼠体重的影响

组别	受试物	体重 (g) ^a			给药 21 天后 体重变化 (g)
		给药前	分组给药 第 21 天	P ^b	
G1	生理盐水	19.5±0.7	22.5±0.9	-	+3.0
G2	Avelumab	19.5±0.6	22.8±0.6	0.762	+3.3
G3	156-10H	19.5±0.3	22.4±0.5	0.972	+2.9

注：a：平均数±标准误；b：给药组体重与 Vehicle 对照组体重在分组给药第 21 天进行统计学比较，T-test 分析。

- 5 以上结果表明人源化的 PD-L1 抗体 156-10H 对 MC38-hPD-L1 肿瘤皮下移植瘤生长具有显著抑制作用且表现出较高安全性。与阳性对照抗体 Avelumab 相比，两者 TGI 水平相当，且 156-10H 显示更均一抗肿瘤效果。

10 以上对本发明所提供的抗人程序性死亡配体-1 (PD-L1) 的抗体及其用途进行了详细介绍。本文应用了具体个例对本发明的原理及实施方式进行了阐述，以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出，对于本技术领域技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以对本发明进行若干改进和修饰，这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

15

20

权 利 要 求

1、特异性结合人程序性死亡配体-1 (PD-L1) 的分离的抗体或抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或抗原结合片段包含重链 CDRs 组合和轻链 CDRs 组合：

- 5 (1) 所述重链 CDRs 组合包含：CDR1-VH、CDR2-VH 和 CDR3-VH；所述 CDR1-VH、CDR2-VH 和 CDR3-VH 具有选自以下的任意序列组合或者与所述序列组合相比具有 1、2、3 或更多个氨基酸插入、缺失和/或替换的序列组合：

编号	SEQ ID NO.		
	CDR1-VH	CDR2-VH	CDR3-VH
VH1	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.20	SEQ ID NO.21
VH2	SEQ ID NO.25	SEQ ID NO.26	SEQ ID NO.27
VH3	SEQ ID NO.31	SEQ ID NO.32	SEQ ID NO.33
VH4	SEQ ID NO.37	SEQ ID NO.38	SEQ ID NO.39
VH5	SEQ ID NO.43	SEQ ID NO.44	SEQ ID NO.45
VH6	SEQ ID NO.49	SEQ ID NO.50	SEQ ID NO.51
VH7	SEQ ID NO.55	SEQ ID NO.56	SEQ ID NO.57
VH8	SEQ ID NO.61	SEQ ID NO.62	SEQ ID NO.63
VH9	SEQ ID NO.67	SEQ ID NO.68	SEQ ID NO.69
VH10	SEQ ID NO.73	SEQ ID NO.74	SEQ ID NO.75
VH11	SEQ ID NO.79	SEQ ID NO.80	SEQ ID NO.81
VH12	SEQ ID NO.85	SEQ ID NO.86	SEQ ID NO.87
VH13	SEQ ID NO.91	SEQ ID NO.92	SEQ ID NO.93
VH14	SEQ ID NO.97	SEQ ID NO.98	SEQ ID NO.99
VH15	SEQ ID NO.103	SEQ ID NO.104	SEQ ID NO.105
VH16	SEQ ID NO.109	SEQ ID NO.110	SEQ ID NO.111
VH17	SEQ ID NO.115	SEQ ID NO.116	SEQ ID NO.117

VH18	SEQ ID NO.121	SEQ ID NO.122	SEQ ID NO.123
------	---------------	---------------	---------------

和,

(2) 所述轻链 CDRs 组合包含: CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL, 所述 CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL 具有选自以下任意序列组合或者与所述序列组合相比具有 1、2、3 或更多个氨基酸插入、缺失和/或替换的序列组合:

编号	SEQ ID NO.		
	CDR1-VL	CDR2-VL	CDR3-VL
VL1	SEQ ID NO.22	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.24
VL2	SEQ ID NO.28	SEQ ID NO.29	SEQ ID NO.30
VL3	SEQ ID NO.34	SEQ ID NO.35	SEQ ID NO.36
VL4	SEQ ID NO.40	SEQ ID NO.41	SEQ ID NO.42
VL5	SEQ ID NO.46	SEQ ID NO.47	SEQ ID NO.48
VL6	SEQ ID NO.52	SEQ ID NO.53	SEQ ID NO.54
VL7	SEQ ID NO.58	SEQ ID NO.59	SEQ ID NO.60
VL8	SEQ ID NO.64	SEQ ID NO.65	SEQ ID NO.66
VL9	SEQ ID NO.70	SEQ ID NO.71	SEQ ID NO.72
VL10	SEQ ID NO.76	SEQ ID NO.77	SEQ ID NO.78
VL11	SEQ ID NO.82	SEQ ID NO.83	SEQ ID NO.84
VL12	SEQ ID NO.88	SEQ ID NO.89	SEQ ID NO.90
VL13	SEQ ID NO.94	SEQ ID NO.95	SEQ ID NO.96
VL14	SEQ ID NO.100	SEQ ID NO.101	SEQ ID NO.102
VL15	SEQ ID NO.106	SEQ ID NO.107	SEQ ID NO.108
VL16	SEQ ID NO.112	SEQ ID NO.113	SEQ ID NO.114
VL17	SEQ ID NO.118	SEQ ID NO.119	SEQ ID NO.120
VL18	SEQ ID NO.124	SEQ ID NO.125	SEQ ID NO.126

5 各个 CDR1-VH、CDR2-VH、CDR3-VH、CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL 为

根据 KABAT、Chothia 或 IMGT 的通行分析方法编码。

2、特异性结合人程序性死亡配体-1 (PD-L1) 的分离的人源化抗体或抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或抗原结合片段包含重链 CDRs 组合和轻链 CDRs 组合：

- 5 (1) 所述重链 CDRs 组合包含：CDR1-VH、CDR2-VH 和 CDR3-VH；所述 CDR1-VH、CDR2-VH 和 CDR3-VH 具有选自以下的任意序列组合或者与所述序列组合相比具有 1、2、3 或更多个氨基酸插入、缺失和/或替换的序列组合：

编号	SEQ ID NO.		
	CDR1-VH	CDR2-VH	CDR3-VH
VH19	SEQ ID NO.135	SEQ ID NO.136	SEQ ID NO.137
VH20	SEQ ID NO.141	SEQ ID NO.142	SEQ ID NO.143
VH21	SEQ ID NO.147	SEQ ID NO.148	SEQ ID NO.149
VH22	SEQ ID NO.153	SEQ ID NO.154	SEQ ID NO.155
VH23	SEQ ID NO.159	SEQ ID NO.160	SEQ ID NO.161
VH24	SEQ ID NO.165	SEQ ID NO.166	SEQ ID NO.167
VH25	SEQ ID NO.171	SEQ ID NO.172	SEQ ID NO.173
VH26	SEQ ID NO.177	SEQ ID NO.178	SEQ ID NO.179

和，

- 10 (2) 所述轻链 CDRs 组合包含：CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL，所述 CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL 具有选自以下任意序列组合或者与所述序列组合相比具有 1、2、3 或更多个氨基酸插入、缺失和/或替换的序列组合：

编号	SEQ ID NO.		
	CDR1-VL	CDR2-VL	CDR3-VL
VL19	SEQ ID NO.138	SEQ ID NO.139	SEQ ID NO.140
VL20	SEQ ID NO.144	SEQ ID NO.145	SEQ ID NO.146
VL21	SEQ ID NO.150	SEQ ID NO.151	SEQ ID NO.152
VL22	SEQ ID NO.156	SEQ ID NO.157	SEQ ID NO.158

VL23	SEQ ID NO.162	SEQ ID NO.163	SEQ ID NO.164
VL24	SEQ ID NO.168	SEQ ID NO.169	SEQ ID NO.170
VL25	SEQ ID NO.174	SEQ ID NO.175	SEQ ID NO.176
VL26	SEQ ID NO.180	SEQ ID NO.181	SEQ ID NO.182

各个 CDR1-VH、CDR2-VH、CDR3-VH、CDR1-VL、CDR2-VL 和 CDR3-VL 为根据 KABAT、Chothia 或 IMGT 的通行分析方法编码。

3、权利要求 1 或 2 所述的抗体或抗原结合片段，其特征在于，其包含选自以下的重链 CDRs 和轻链 CDRs 组合：VH1+VL1、VH2+VL2、VH3+VL3、VH4+VL4、
5 VH5+VL5、VH6+VL6、VH7+VL7、VH8+VL8、VH9+VL9、VH10+VL10、VH11+VL11、VH12+VL12、VH13+VL13、VH14+VL14、VH15+VL15、VH16+VL16、VH17+VL17、VH18+VL18、VH19+VL19、VH20+VL20、VH21+VL21、VH22+VL22、VH23+VL23、VH24+VL24、VH25+VL25、或 VH26+VL26，以及与所述重链和轻链 CDRs 组合之序列相比具有 1、2、3 或更多个氨基酸插入、缺失和/或替换的 CDRs 组合。

10 4、权利要求 1-3 任一项所述的抗体或抗原结合片段，其特征在于，

1) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示序列，或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高一致性的序列；

15 2) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 所示序列，或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高一致性的序列；

3) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示序列，或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高一致性的序列；

20 4) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 所示序列，或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高一致性的序列；

25 5) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示序列，或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高一致性的序列；

6) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 所示序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性的序列;

5 7) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性的序列;

8) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性的序列;

10 9) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 所示序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性的序列;

15 10) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 127 和 SEQ ID NO: 128 所示序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性的序列;

11) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 129 和 SEQ ID NO: 130 所示序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性的序列;

20 12) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 131 和 SEQ ID NO: 132 所示序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性的序列; 或,

13) 重链可变区和轻链可变区分别具有 SEQ ID NO: 133 和 SEQ ID NO: 134 所示序列, 或者与所示序列具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性的序列。

25 5、权利要求 1-4 任一项的抗体或抗原结合片段, 其特征在于, 其与人程序性死亡配体-1 (PD-L1) 结合的解离常数(KD)不大于 10nM, 与食蟹猴程序性死亡配体-1 (PD-L1) 结合的解离常数(KD)不大于 100nM。

6、权利要求 1-5 任一项的抗体或抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或抗原结合片段为:

- (1) 嵌合抗体或其片段;
- (2) 人源化抗体或其片段;
- (3) 全人源抗体或其片段。

7、权利要求 1-6 任一项的抗体或抗原结合片段，其特征在于，所述抗体包含人
5 或鼠抗体 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE 或 IgD 任何其中之一恒定区的
序列；优选包含人或鼠抗体 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区的序列。

8、权利要求 1-7 任一项的抗体或抗原结合片段，其特征在于，所述抗原结合片
段选自 F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、双特异抗体、纳米抗体和抗体最小识别单位中
的一种或多种。

10 9、一种抗体或抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或抗原结合片段与权利要
求 1-8 任一项所述的抗体或抗原结合片段竞争性地结合 PD-L1 或其抗原表位，并且具
备以下特性：

- 1) 特异性结合 PD-L1 重组蛋白及表达 PD-L1 的细胞;
- 2) 阻断 PD-L1 与 PD-1 蛋白的结合;
- 15 3) 抑制 PD-1 与细胞表面表达的 PD-L1 的结合;
- 4) 增强 T 细胞活性;
- 5) 介导抗体依赖的细胞杀伤(ADCC)活性; 或/和
- 6) 抑制肿瘤生长。

10、一种分离的核酸分子，其特征在于，所述核酸分子编码权利要求 1-9 任一项
20 所述的抗体、抗原结合片段、或其任意组合。

11、包含权利要求 10 所述分离的核酸分子的表达载体。

12、包含权利要求 10 所述的分离的核酸分子、或权利要求 11 所述的表达载体的
分离的宿主细胞；优选，所述宿主细胞是真核细胞或原核细胞；更优选，所述宿主细
胞来源于哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞、大肠杆菌和/或枯草杆菌；更优选，
25 所述宿主细胞选自中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)。

13、一种抗体或抗原结合片段的制备方法，其特征在于，在适当的条件下培养权
利要求 12 所述的宿主细胞，并分离抗体或抗原结合片段。

14、一种药物组合物，其特征在于，所述组合物包含权利要求 1-9 任一项所述的
抗体或抗原结合片段、权利要求 10 的分离的核酸分子、权利要求 11 的表达载体、权

利要求 12 的细胞, 或权利要求 13 方法制备的产品, 以及药学上可接受的载体; 优选, 所述药物组合物还包含额外的抗肿瘤剂。

15、权利要求 1-9 任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 10 的分离的核酸分子、权利要求 11 的表达载体、权利要求 12 的细胞、权利要求 13 方法制备的产品、或权利要求 14 所述的药物组合物在制备预防和/或治疗 PD-L1 表达异常相关的疾病的药物中的用途, 所述疾病优选肿瘤。

16、一种预防和/或治疗 PD-L1 表达异常和/或 T 细胞功能异常相关的疾病的方法, 包含向有此需要的患者施用权利要求 1-9 任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 10 的分离的核酸分子、权利要求 11 的表达载体、权利要求 12 的细胞、权利要求 13 方法制备的产品、或权利要求 14 所述药物组合物; 所述疾病优选肿瘤; 所述肿瘤优选结直肠癌。

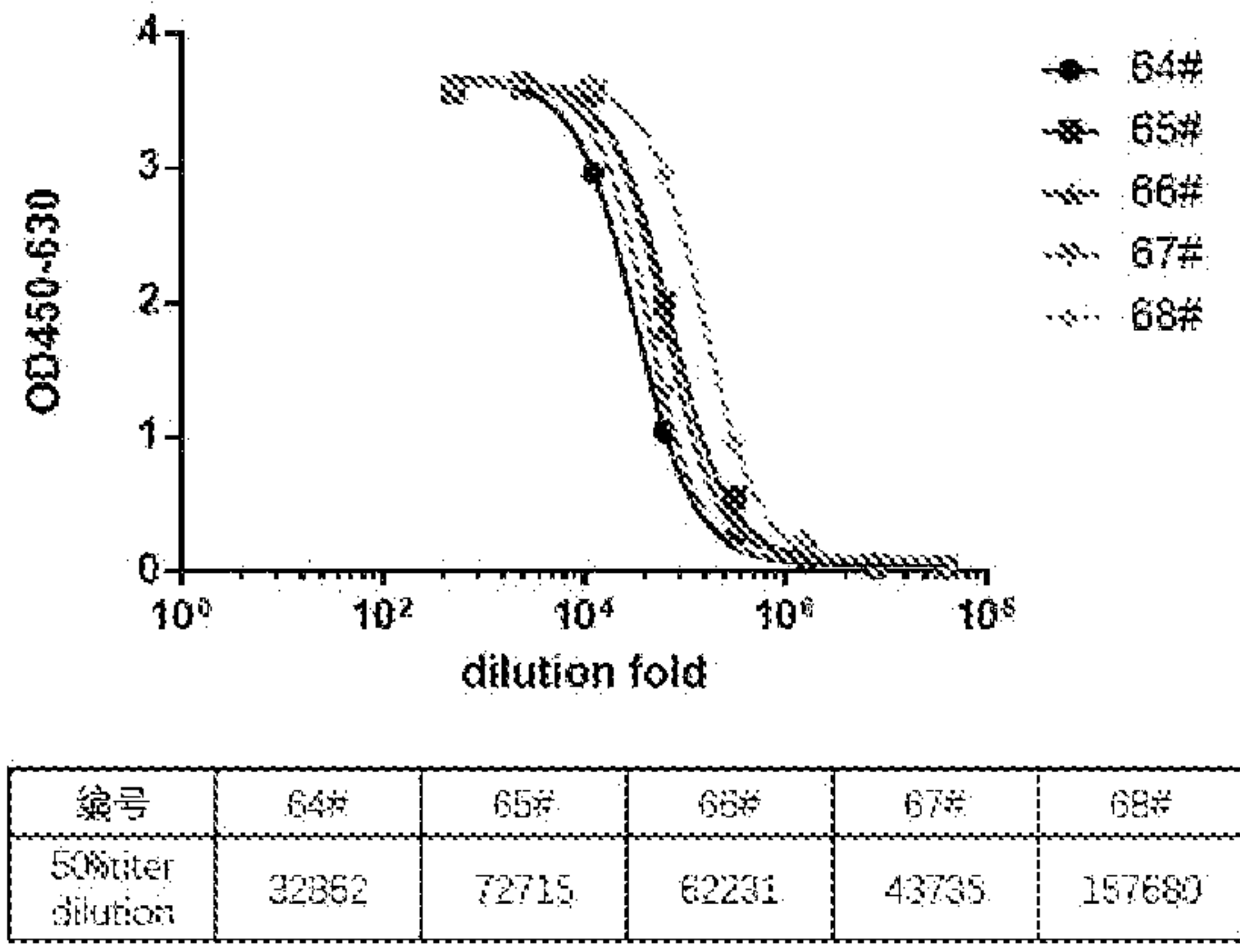
17、一种试剂盒, 其包含权利要求 1-9 任一项的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 的分离的核酸分子、权利要求 11 的表达载体、权利要求 12 的细胞、权利要求 13 方法制备的产品, 以及使用说明。

15

20

A

末次免疫后小鼠血清与 PD-L1-His 结合滴度



B

末次免疫后小鼠血清与 PD-L1-mFc 结合滴度

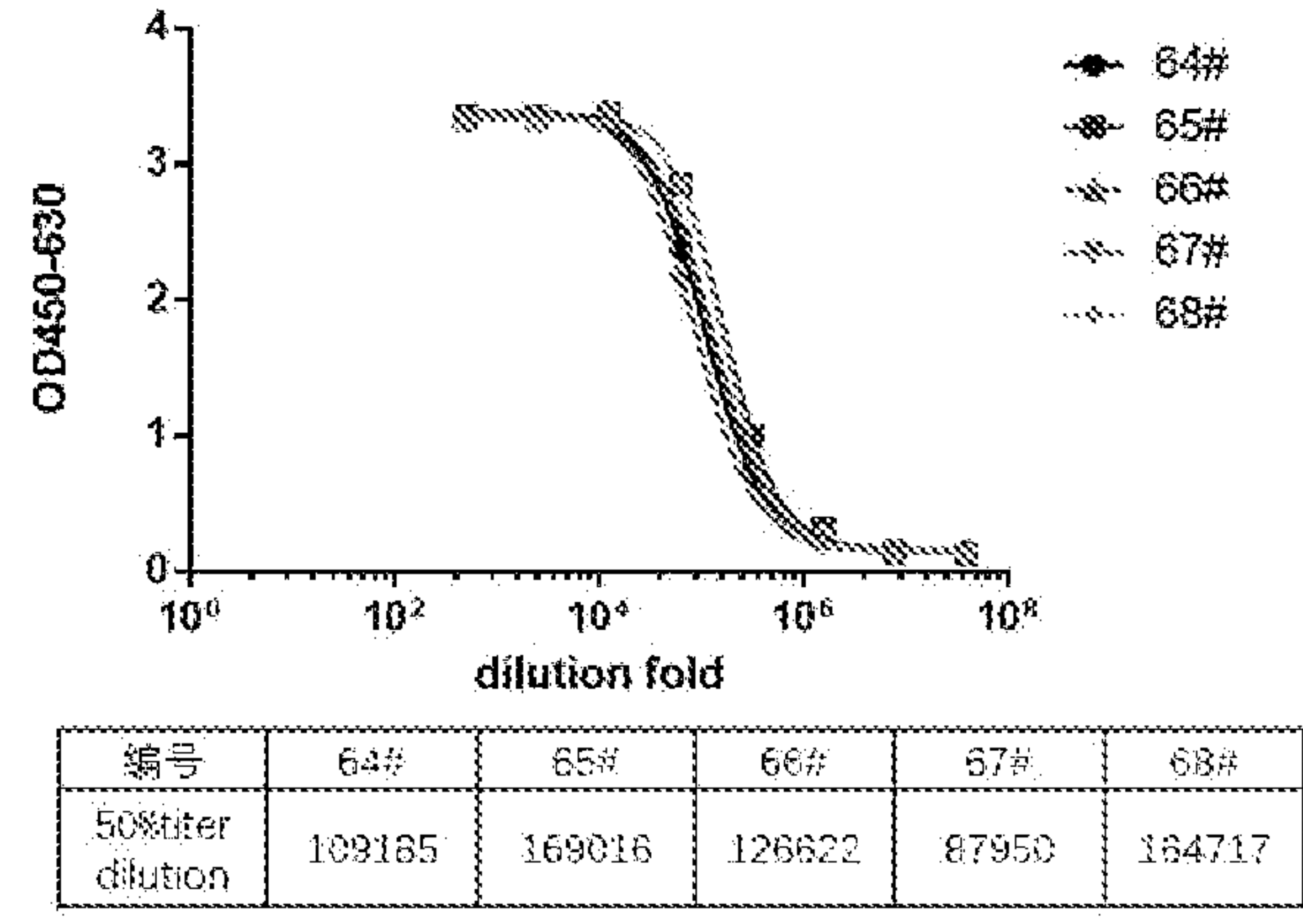
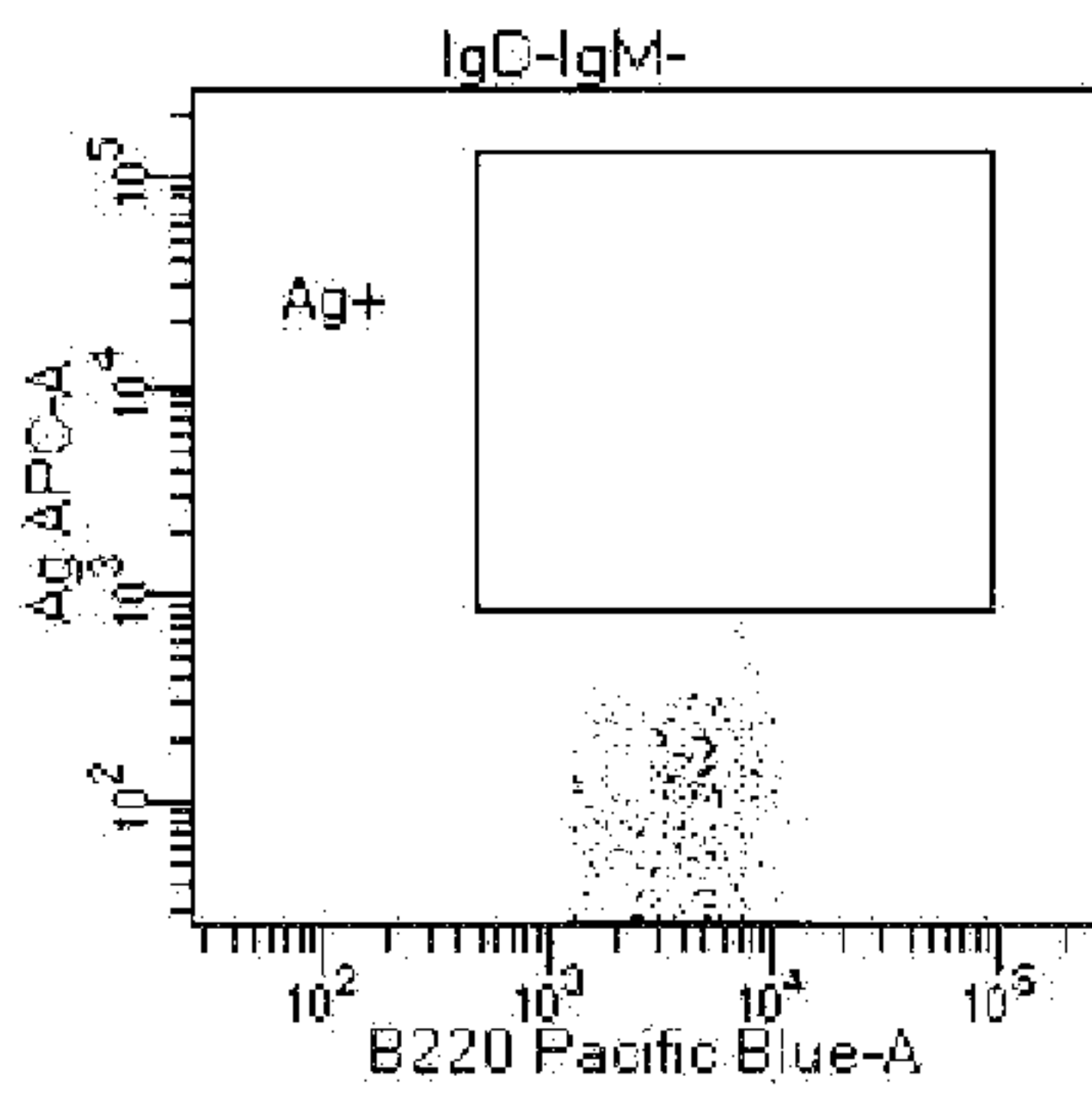


图 1

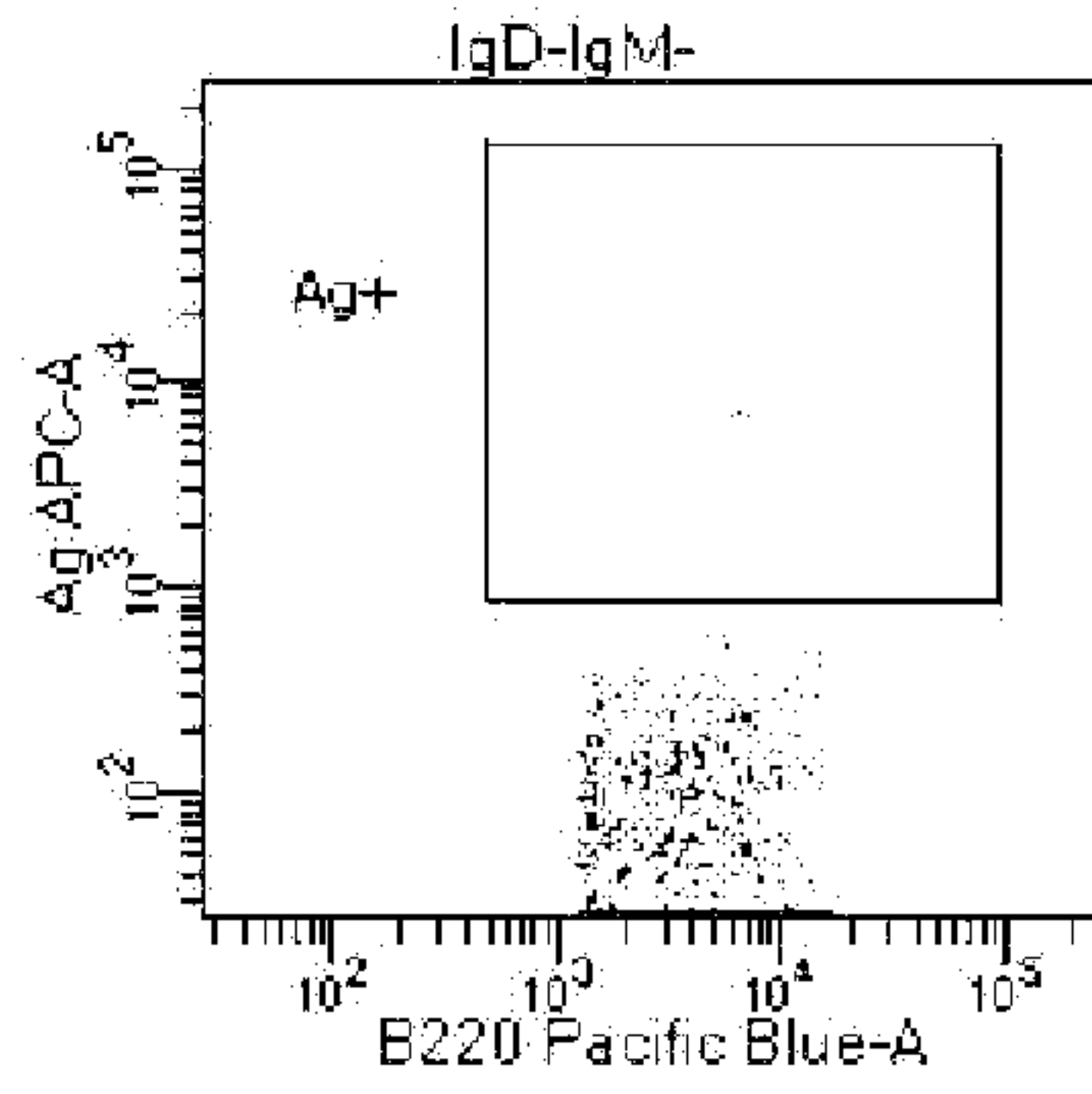
A

未免疫小鼠脾脏+PD-L1-His



B

PD-L1免疫小鼠脾脏+CREG-His



C

PD-L1免疫小鼠脾脏+PD-L1-His

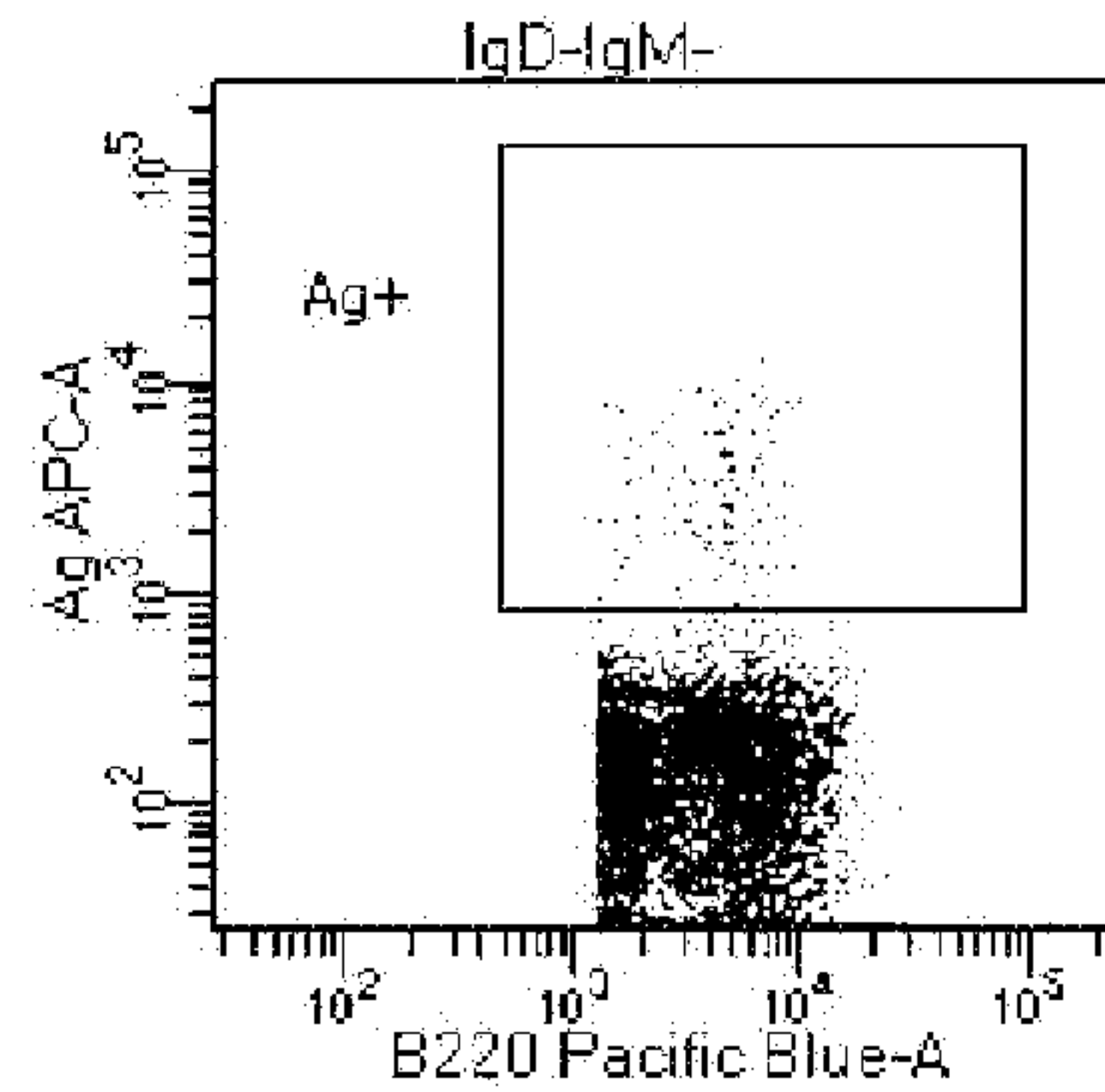
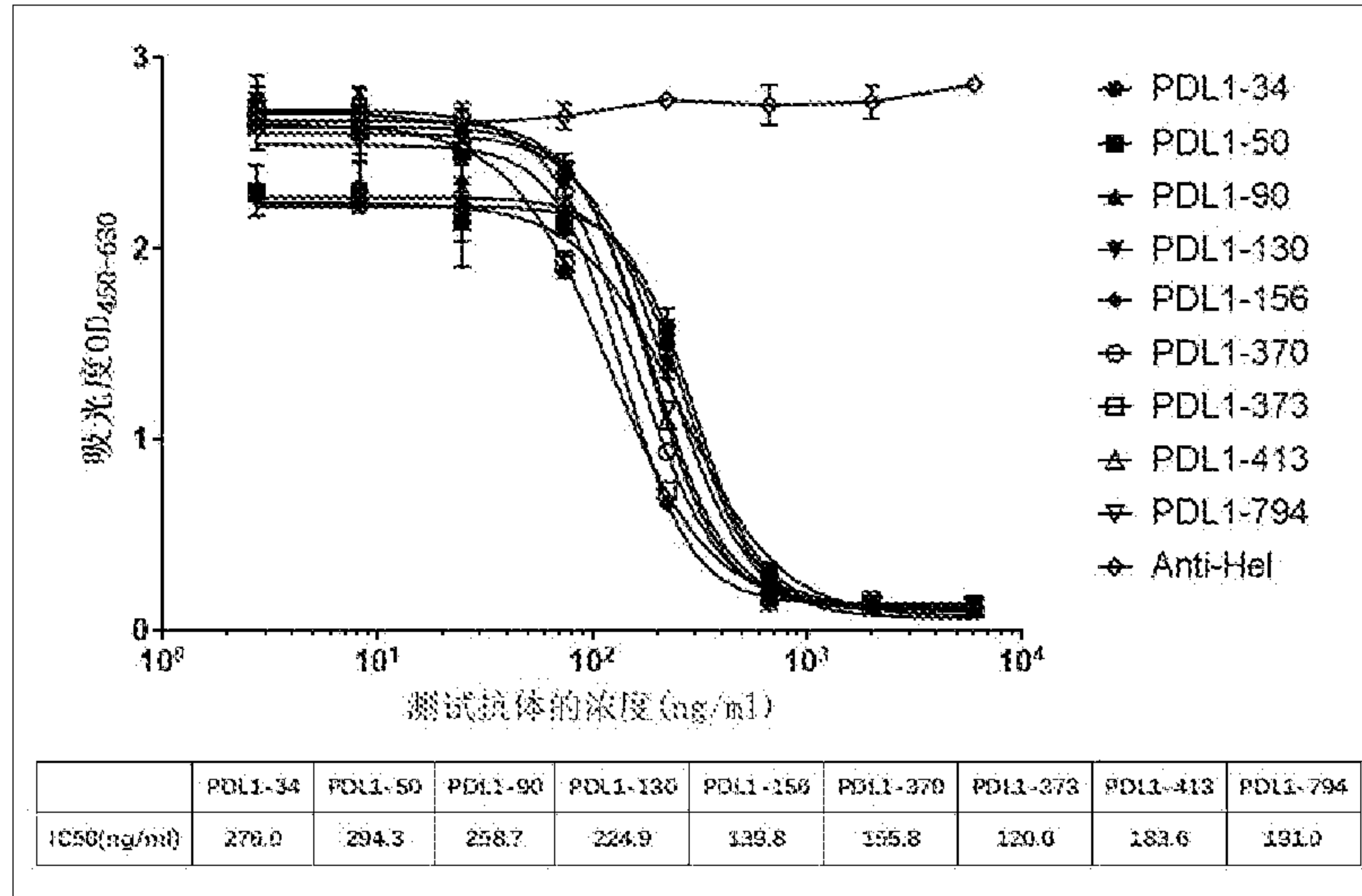


图 2

A



B

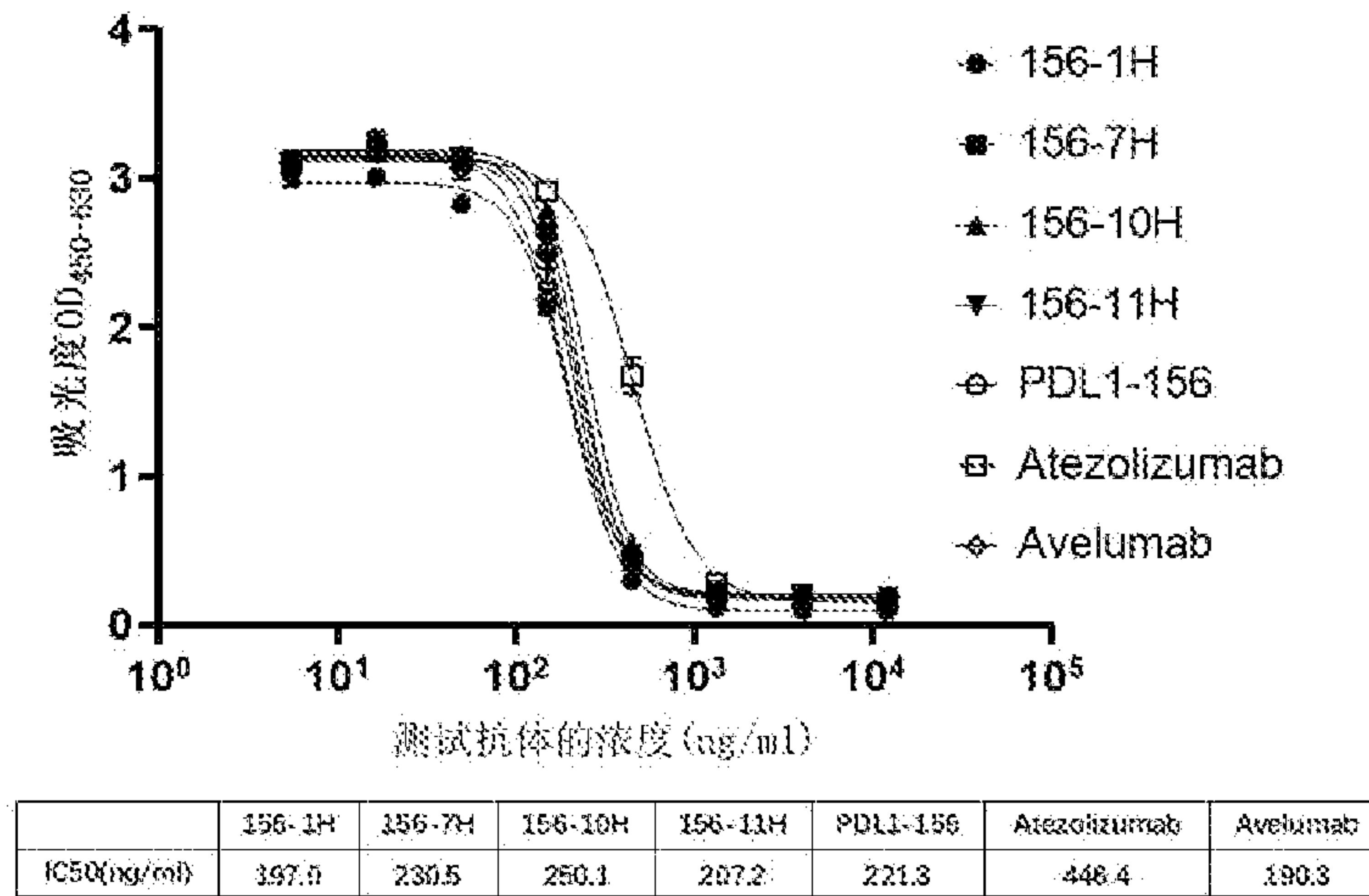
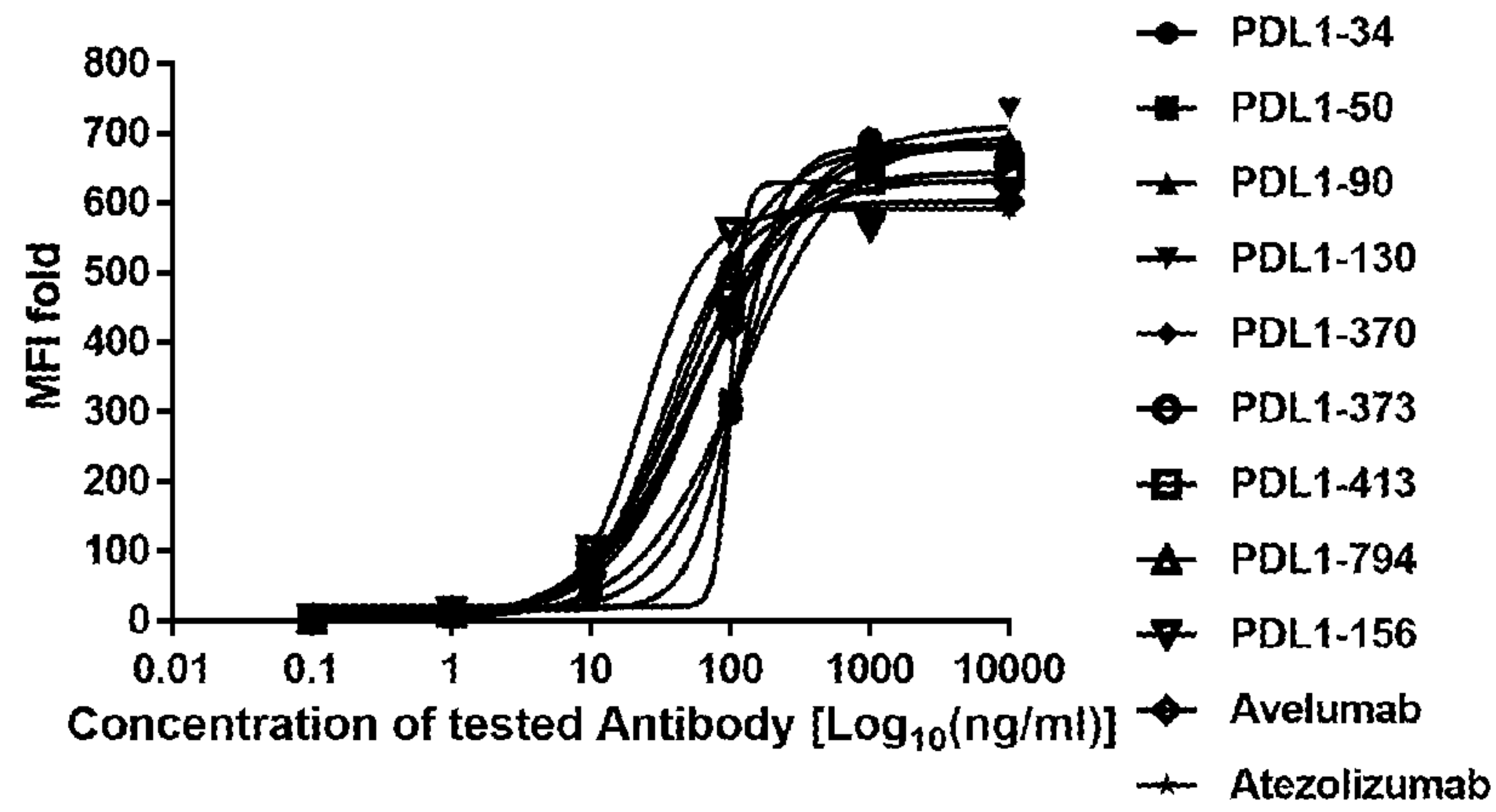


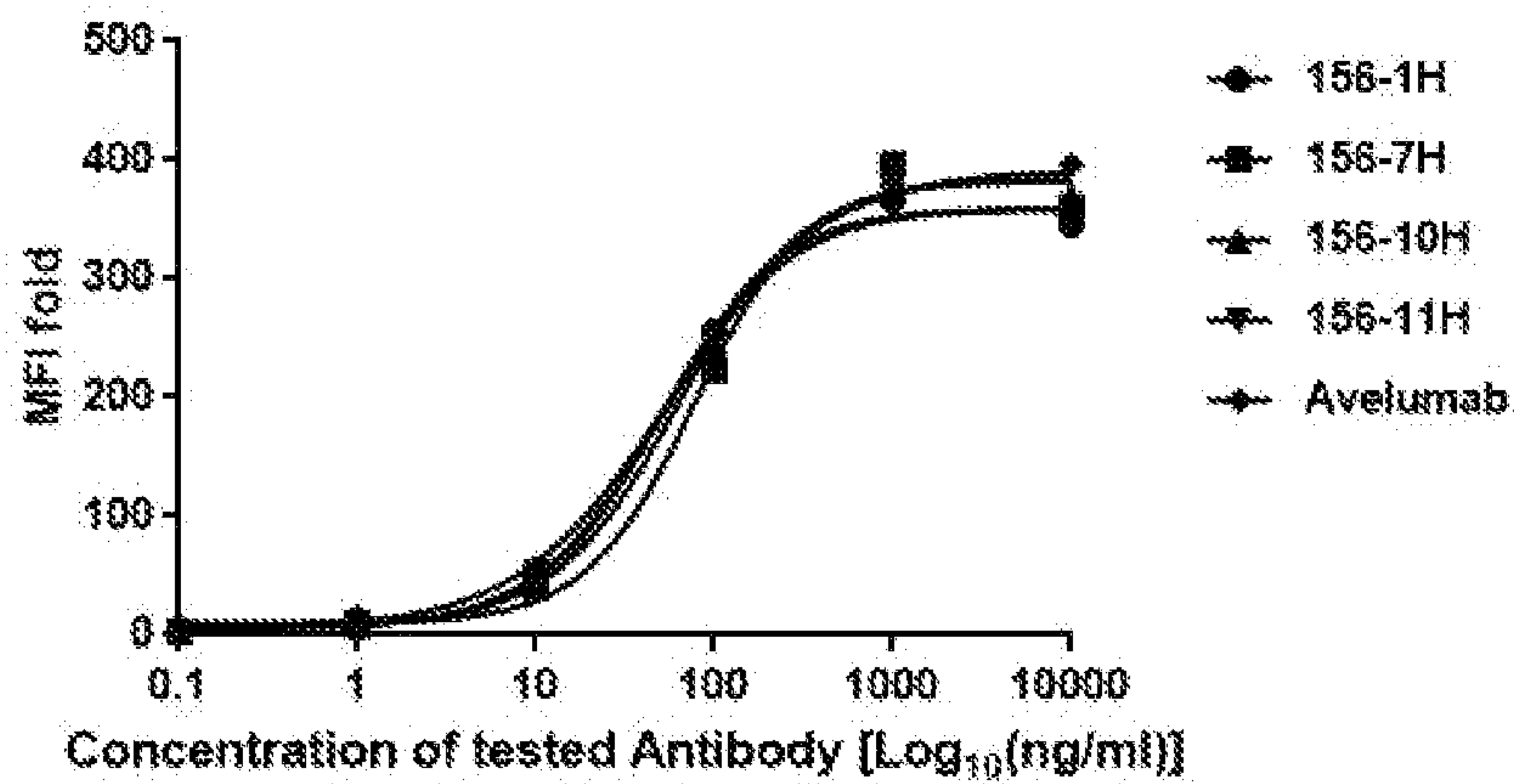
图 3

A



	PDL1-34	PDL1-50	PDL1-90	PDL1-130	PDL1-370	PDL1-373	PDL1-413	PDL1-794	PDL1-156	Avelumab	Atezolizumab
EC50	112.7	113.3	119.5	64.57	33.87	63.27	46.83	45.58	23.52	58.2	~99.73

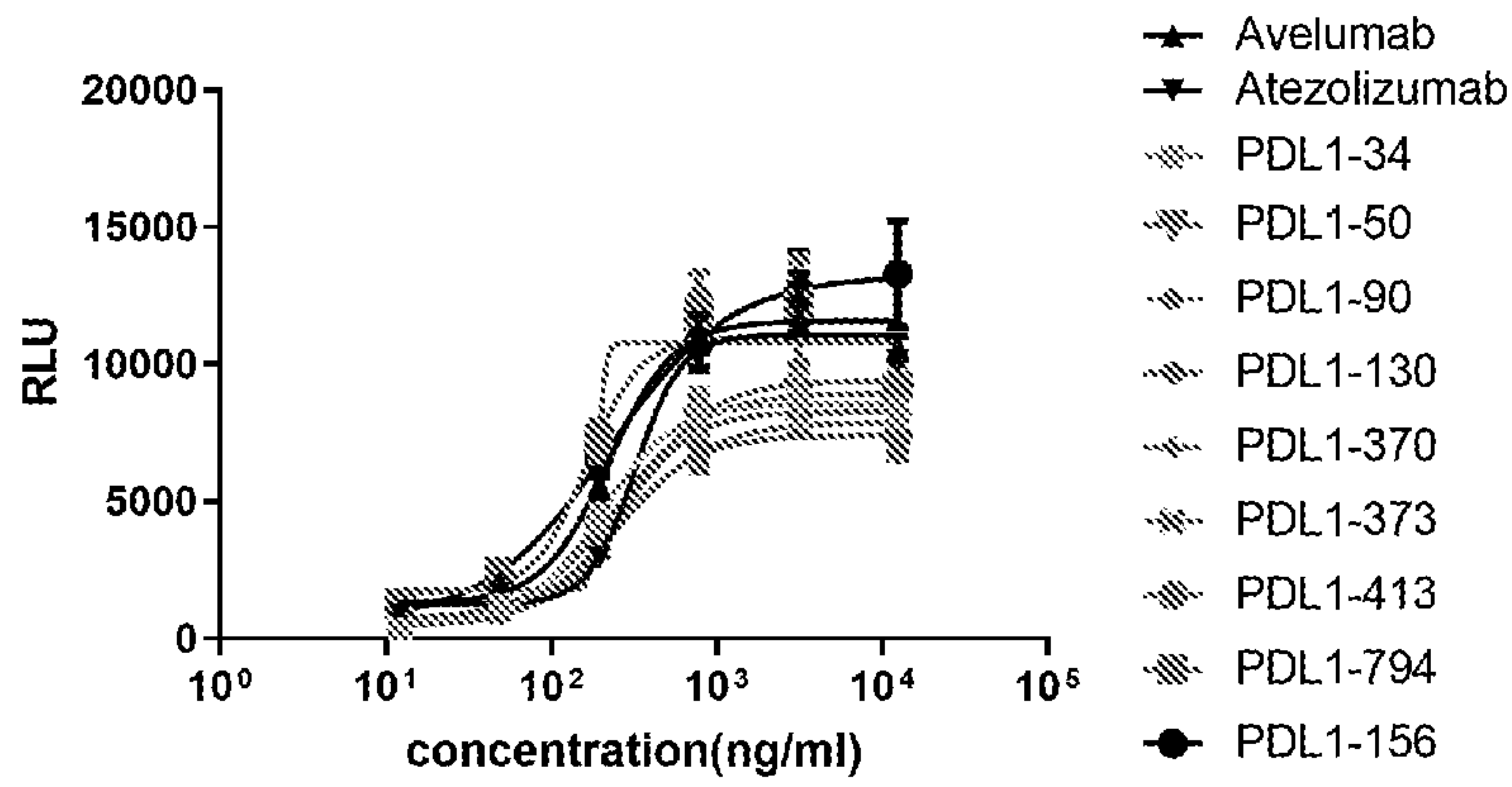
B



	156-1H	156-7H	156-10H	156-11H	Avelumab
EC50	49.42	78.37	63.5	49.97	58.88

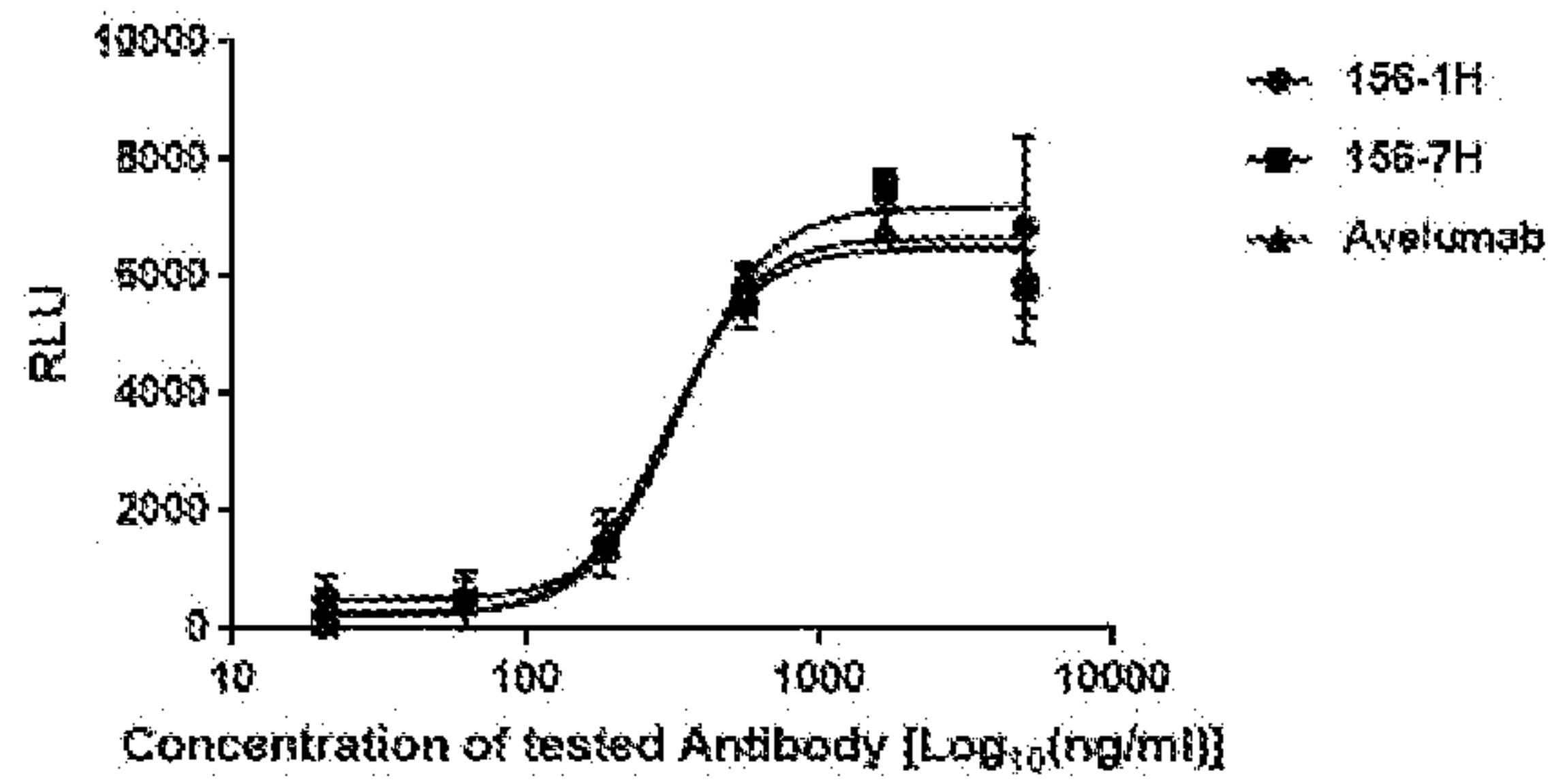
图 4

A



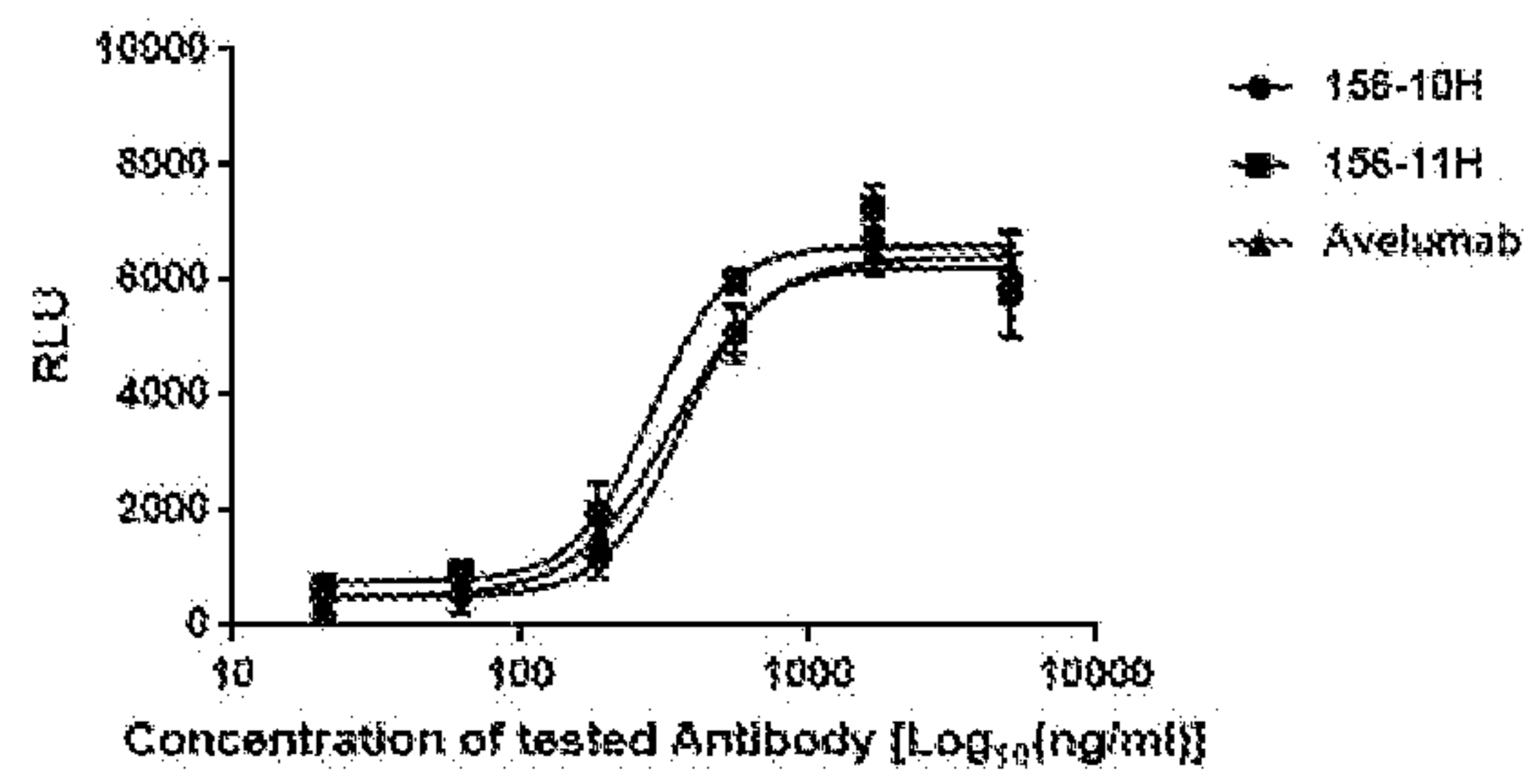
	PDL1-34	Avelumab	Atezolizumab	PDL1-90	PDL1-90	PDL1-130	PDL1-370	PDL1-373	PDL1-413	PDL1-794	PDL1-156
EC50	199.3	222.9	321.6	252.6	282.6	268.5	240.3	271.1	~192.7	164.3	221.9

B



	156-1H	156-7H	Avelumab
EC50	342	313.7	297.5

C



	156-10H	156-11H	Avelumab
EC50	357.1	292.2	335.2

图 5

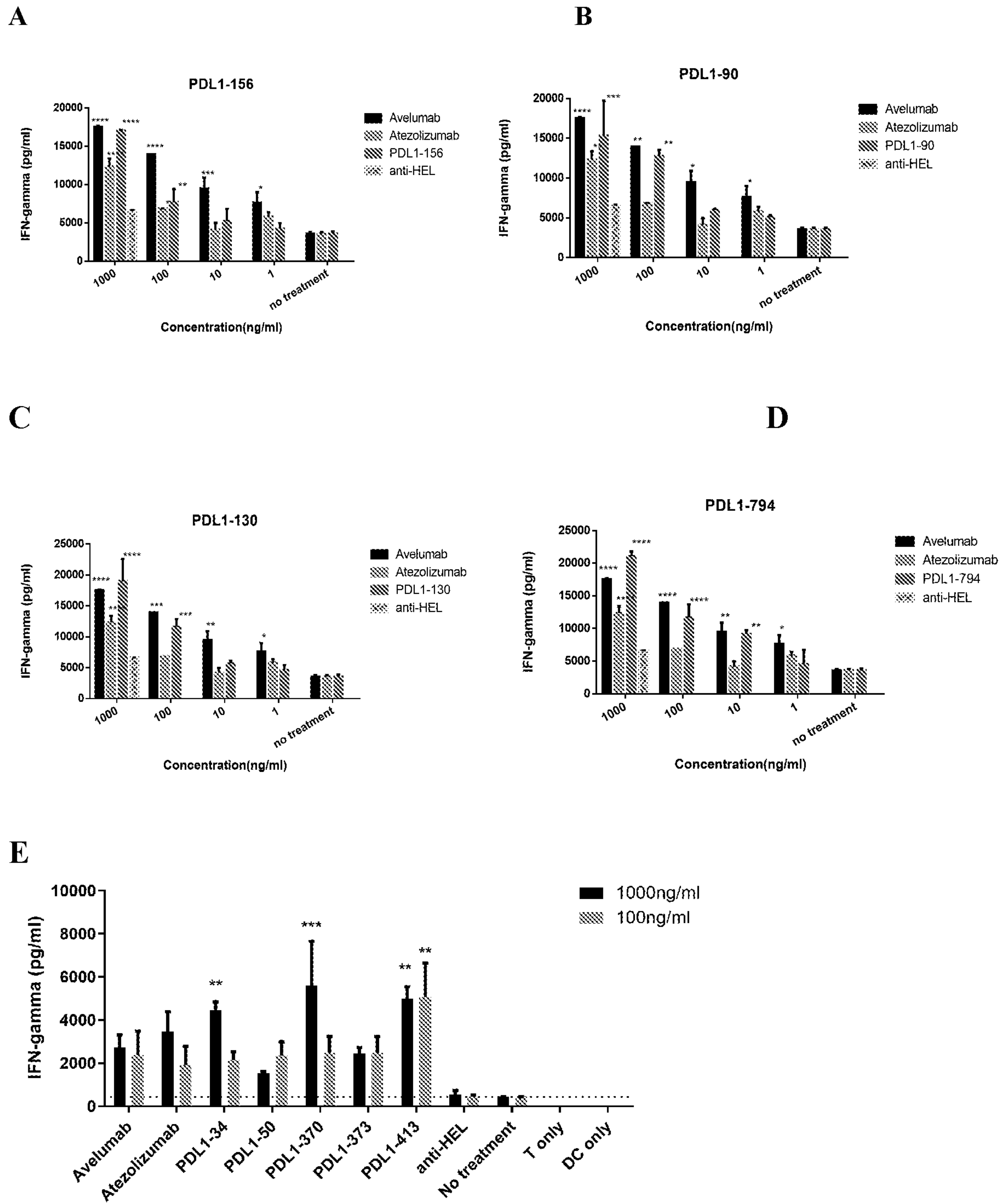
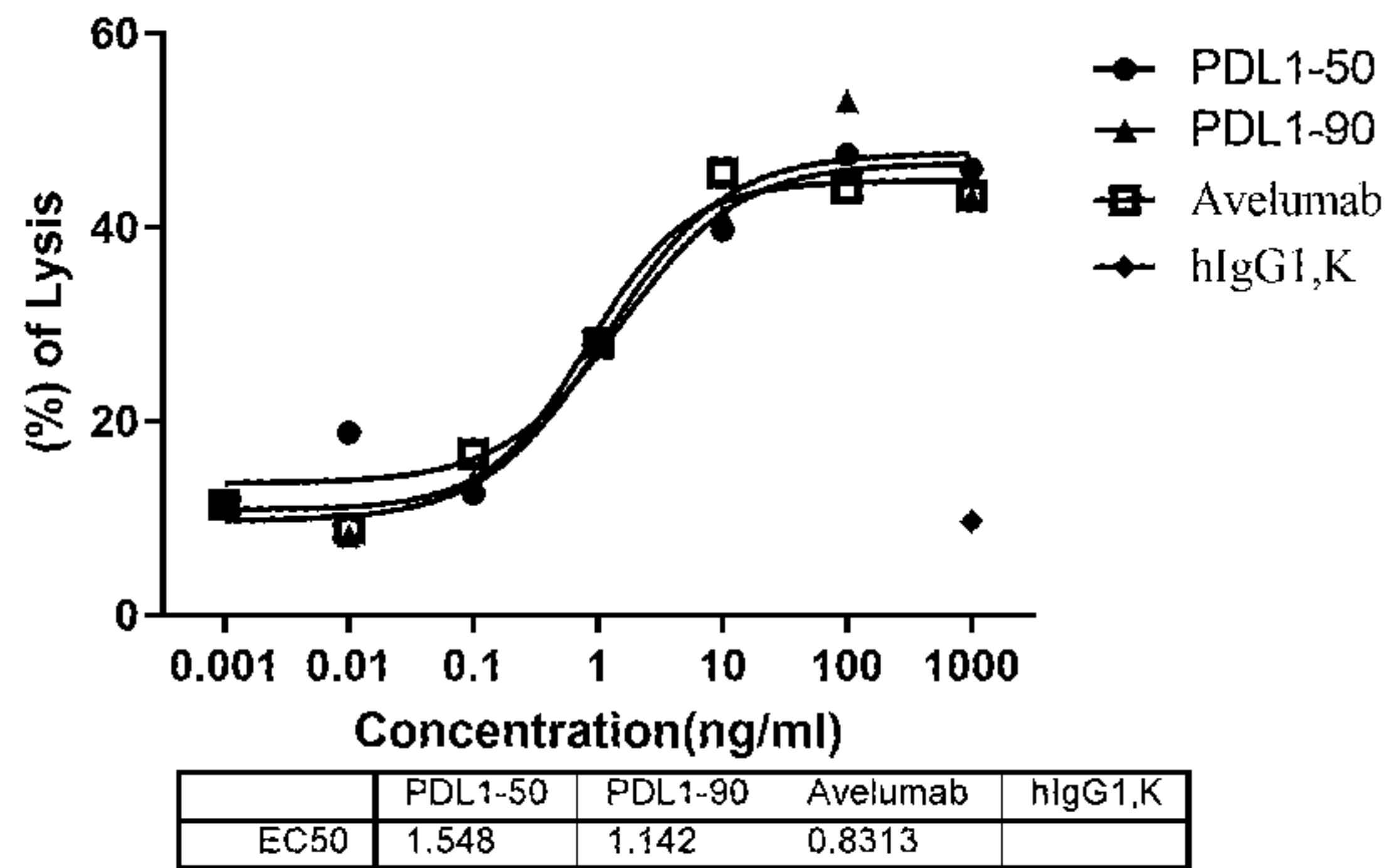


图 6

A



B

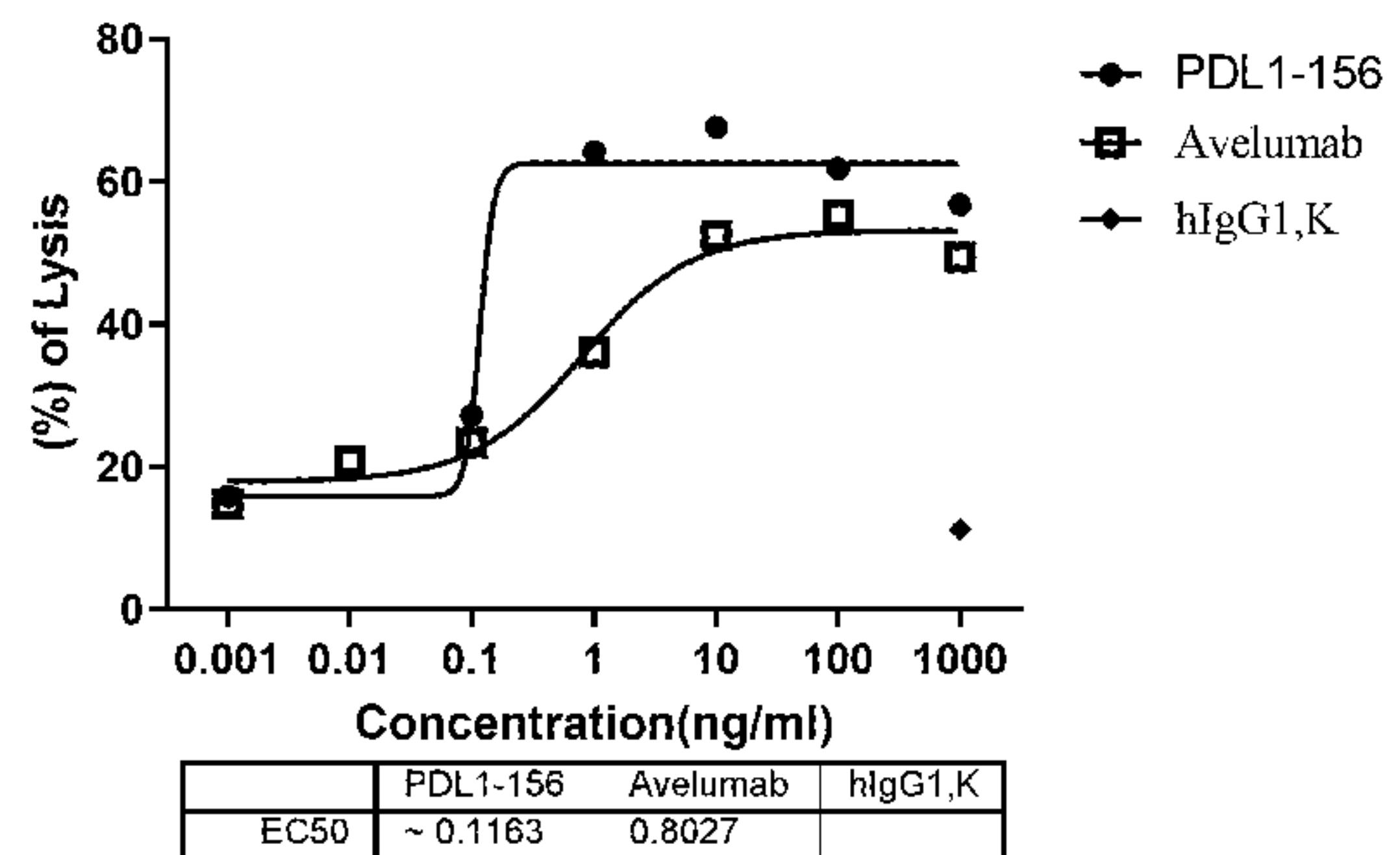
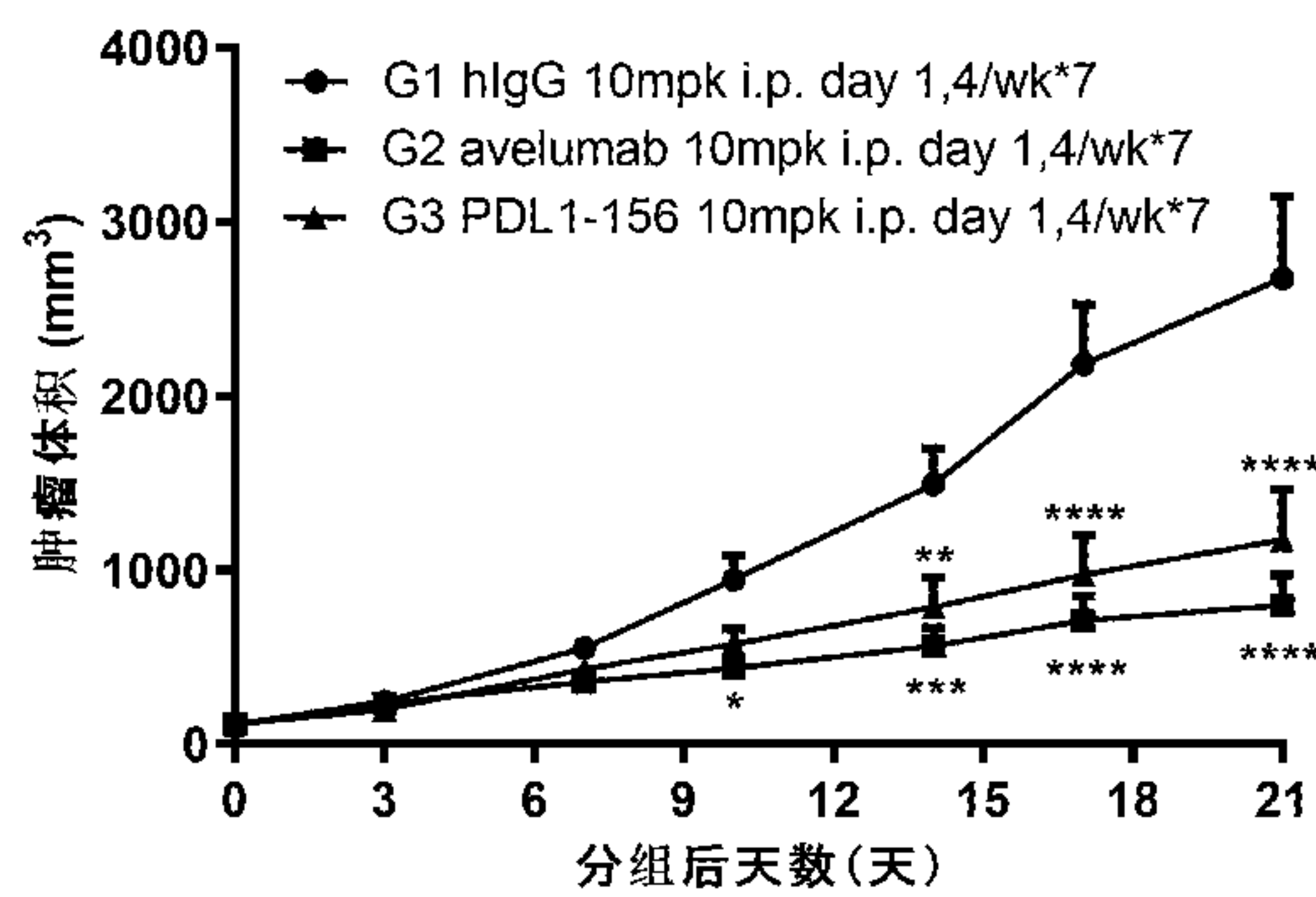


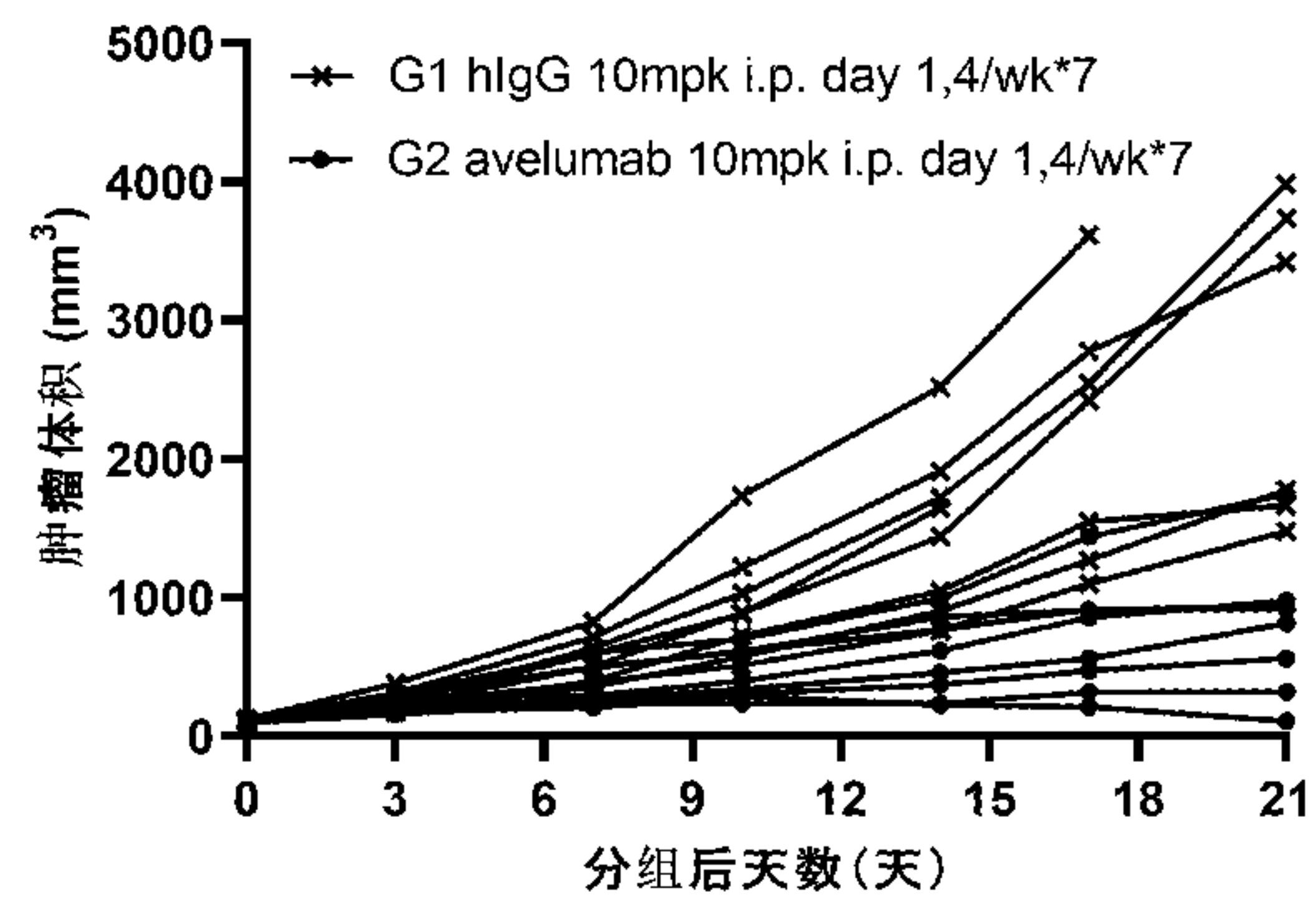
图 7

A



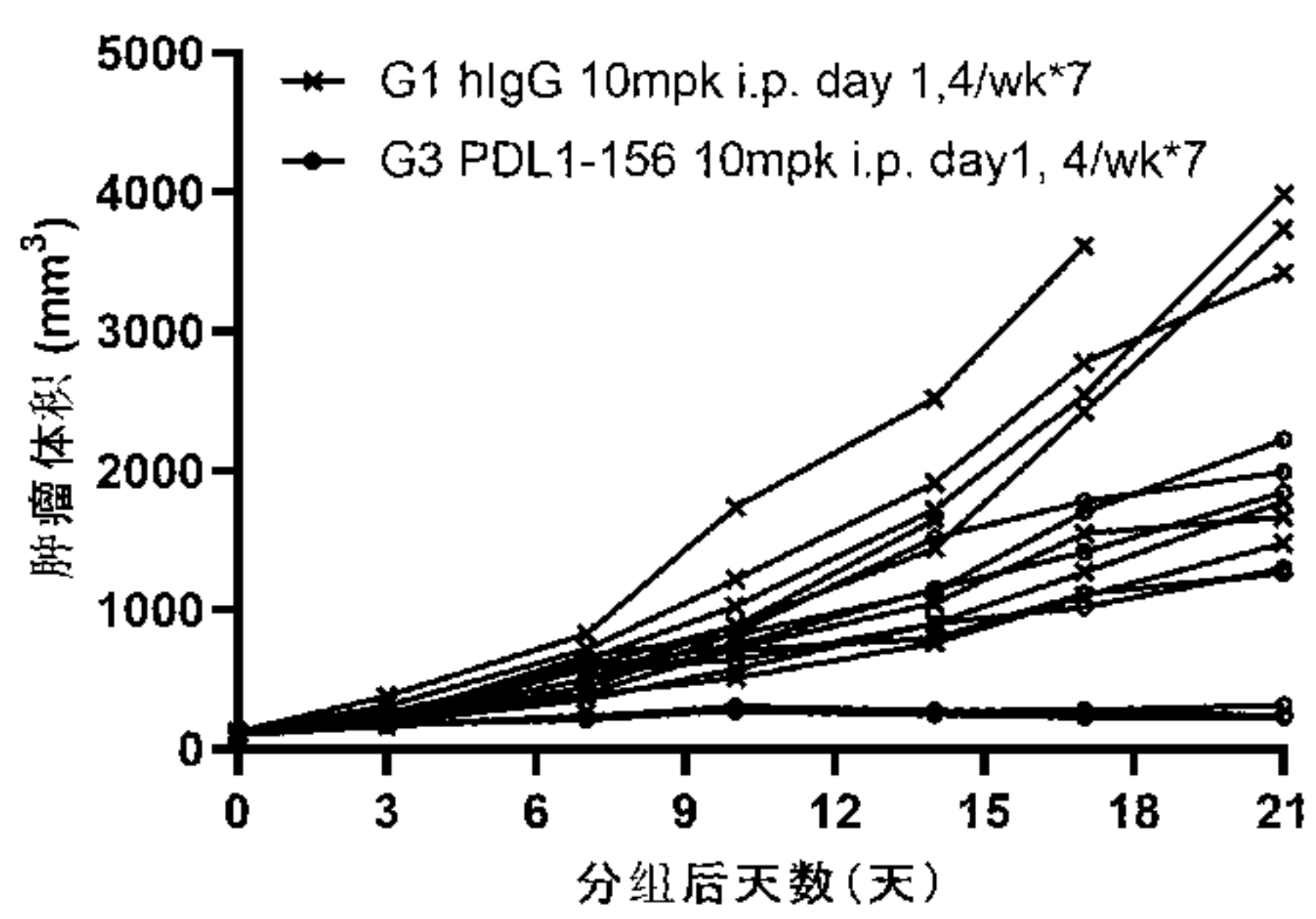
B

G1 VS G2



C

G1 VS G3



D

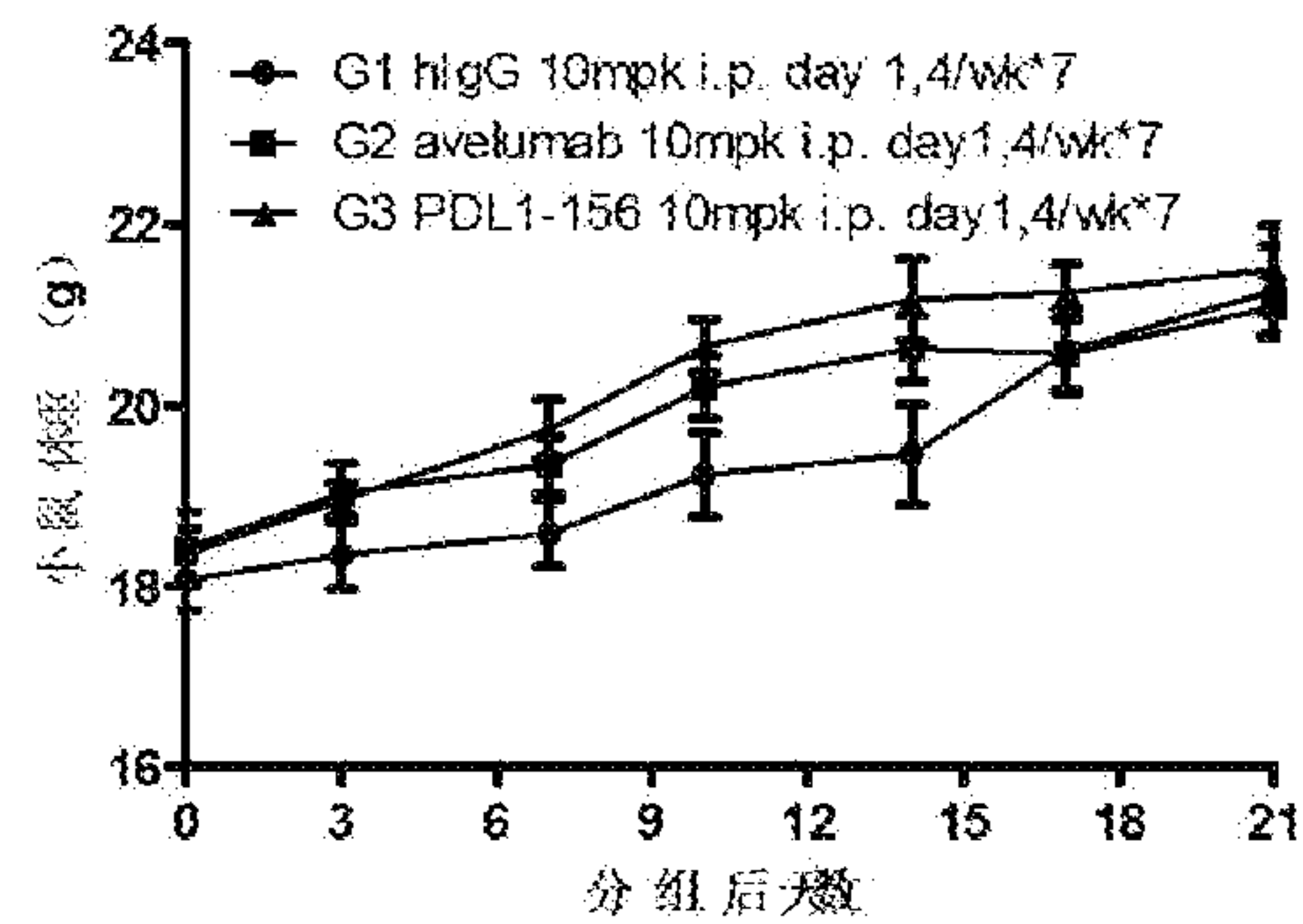
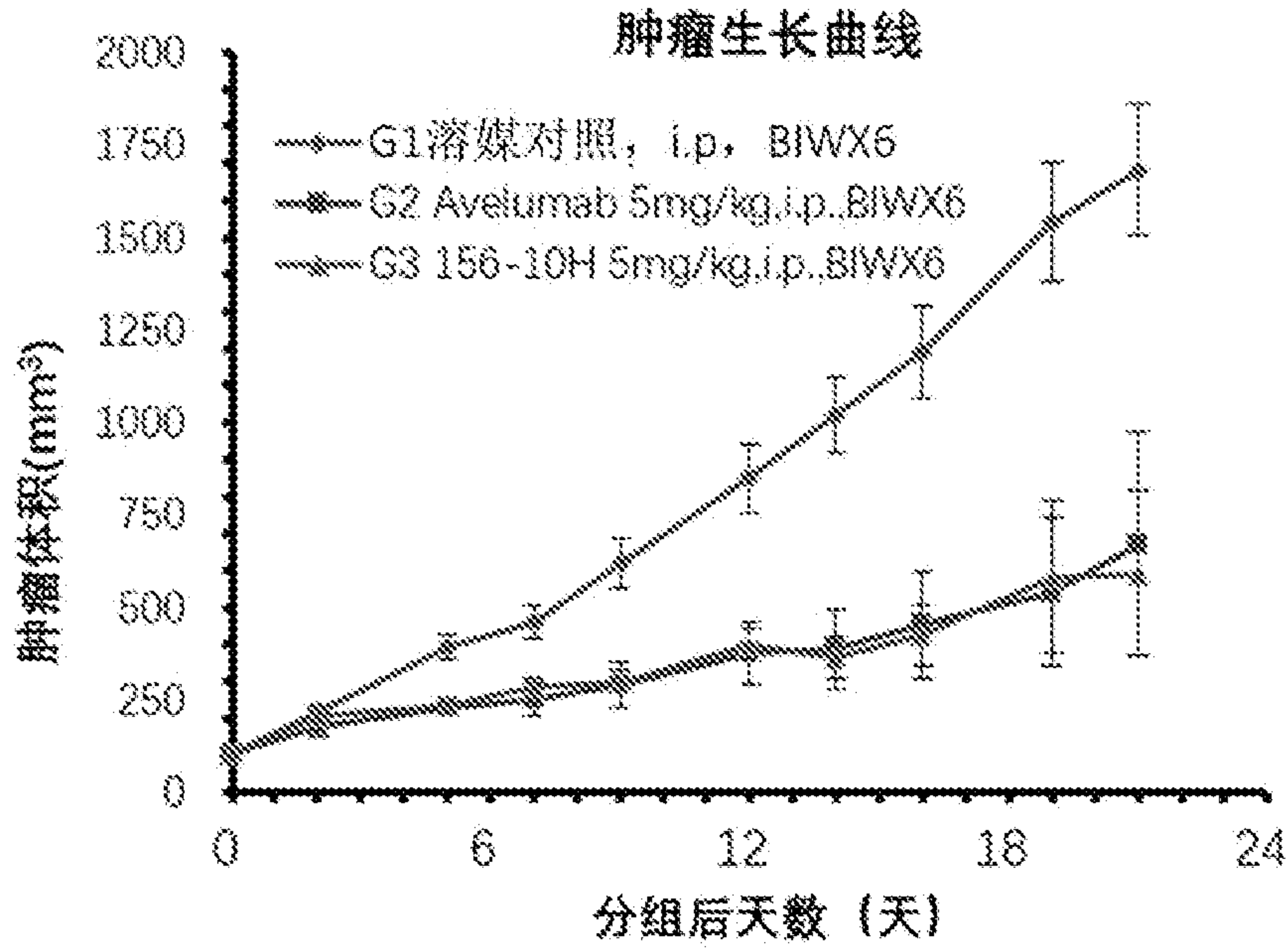
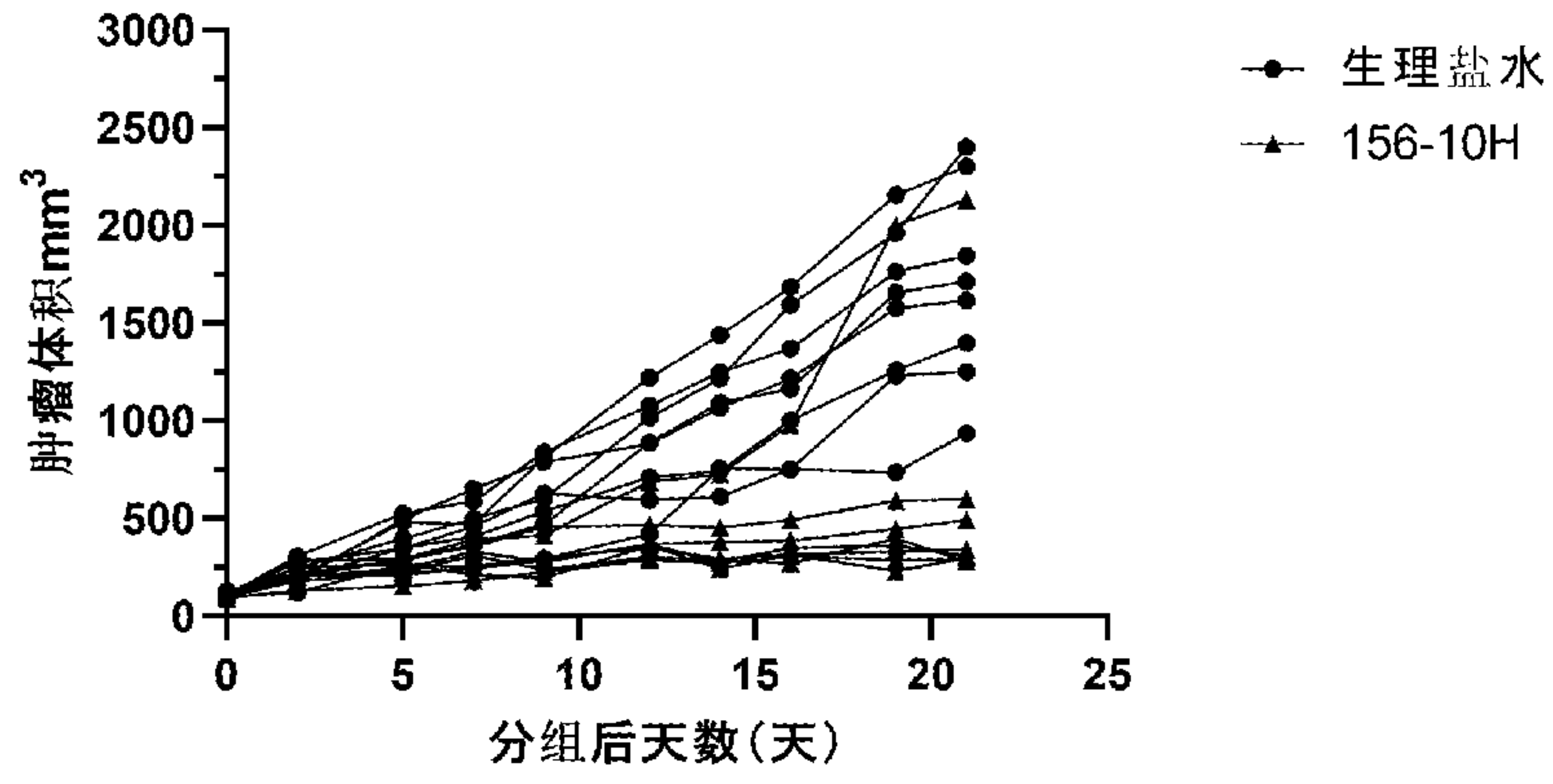


图 8

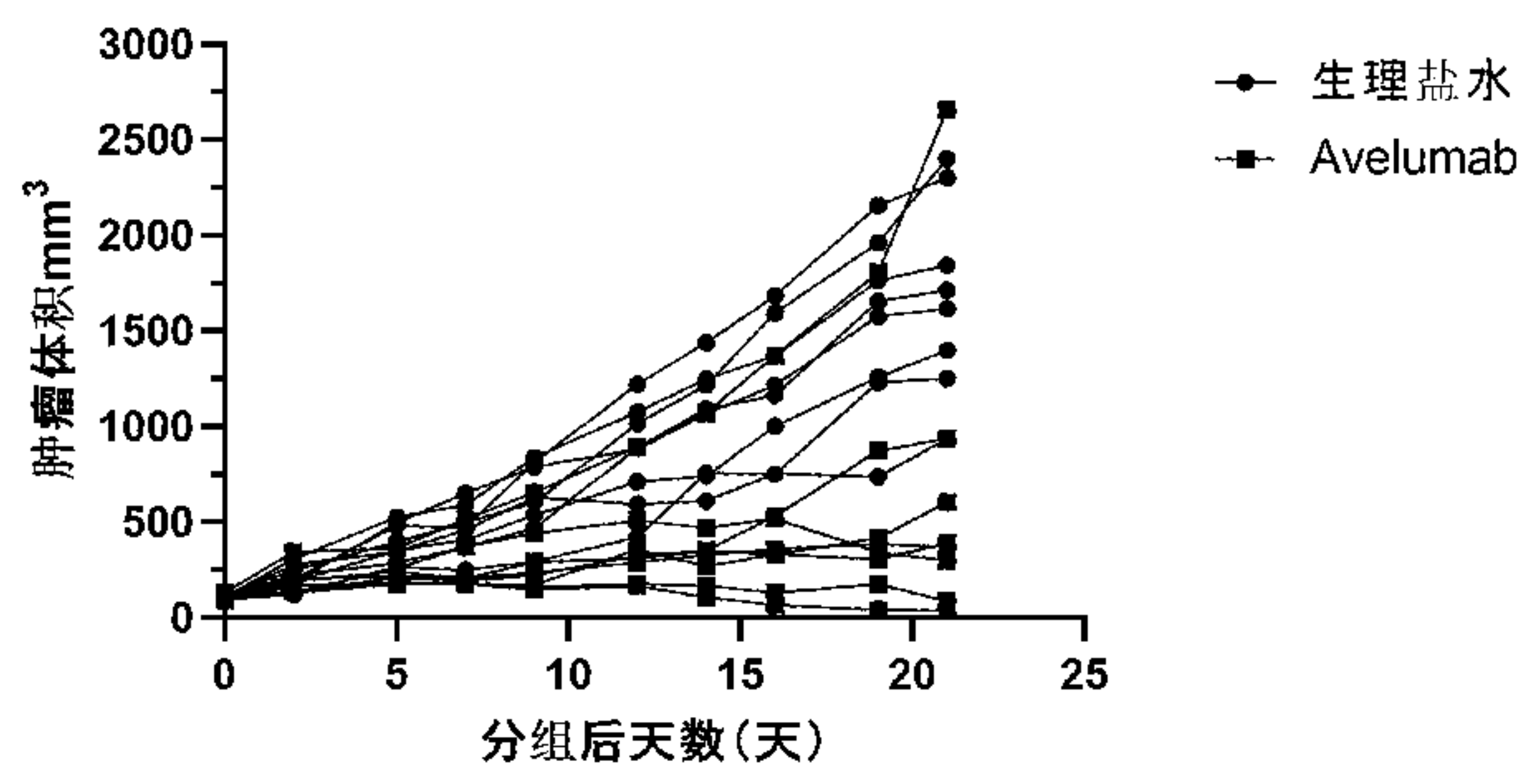
A



B



C



D

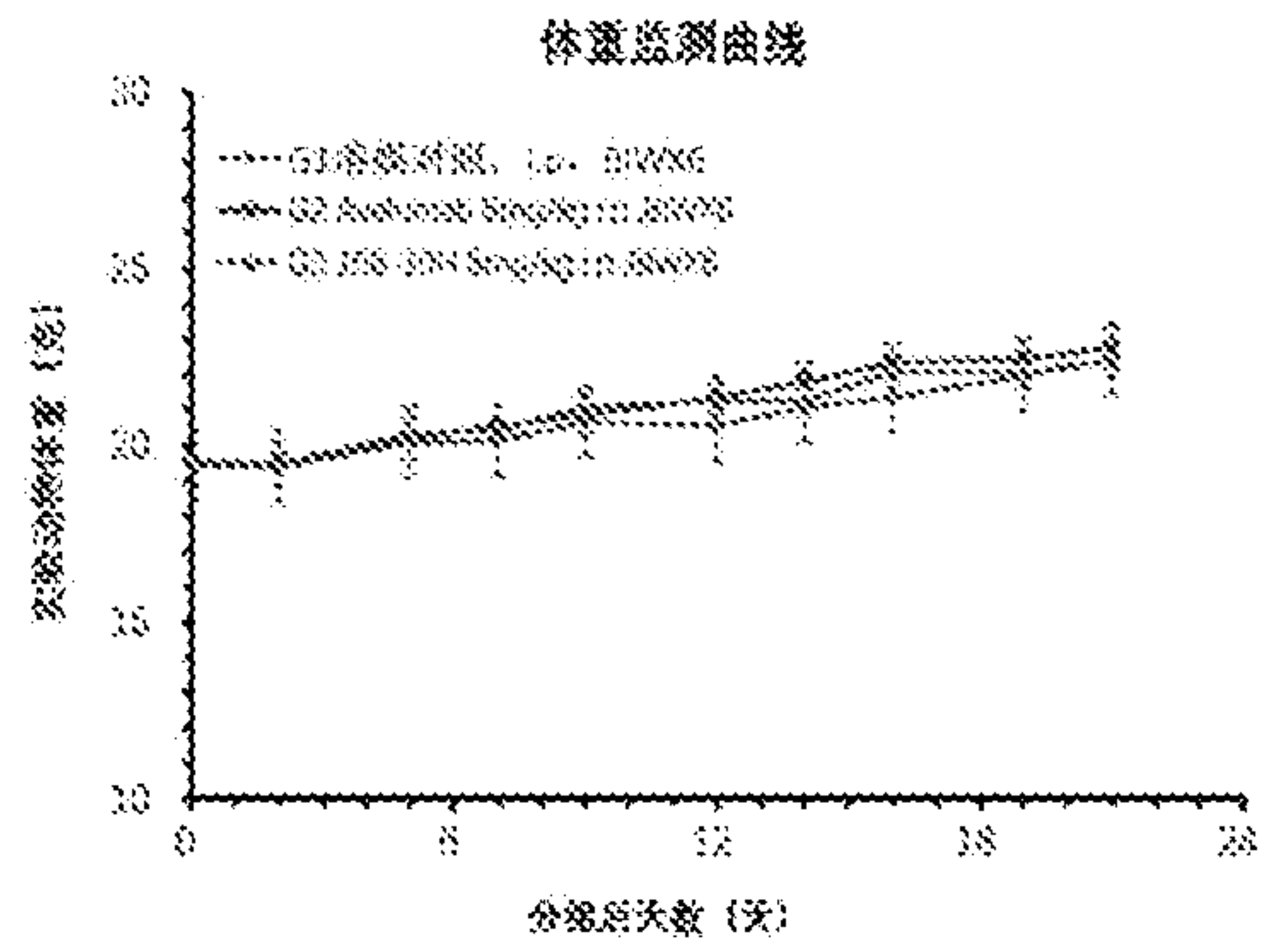


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/126656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K, C12N, C12P		
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)		
CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, NCBI, EMBL, STN: 抗体, antibody, PD-L1, 细胞程序性死亡配体-1, SEQ ID NOs: 1-182		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106243225 A (GENRIX (SHANGHAI) BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 21 December 2016 (2016-12-21) entire document	1-17
A	CN 109563503 A (SHIZUOKA PREFECTURE) 02 April 2019 (2019-04-02) entire document	1-17
A	CN 108276492 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 13 July 2018 (2018-07-13) entire document	1-17
A	WO 2017118321 A1 (HARBOUR BIOMED LIMITED) 13 July 2017 (2017-07-13) entire document	1-17
A	WO 2016024021 A1 (MERCK PATENT GMBH) 18 February 2016 (2016-02-18) entire document	1-17
A	WO 2017205742 A1 (ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.) 30 November 2017 (2017-11-30) entire document	1-17
A	WO 2017031458 A2 (ABBVIE STEMCENTRX LLC) 23 February 2017 (2017-02-23) entire document	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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		Date of mailing of the international search report
08 January 2021		27 January 2021
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/126656**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

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

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.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 16 relates to a method for preventing and/or treating diseases related to PD-L1 expression abnormalities and/or T cell function abnormalities, and thus belongs to the subject matter defined in PCT Rule 39(iv). However, a search has nevertheless been performed on the basis of a use in preparing a drug for preventing and/or treating diseases related to PD-L1 expression abnormalities and/or T cell function abnormalities.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/126656

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106243225	A	21 December 2016	None			
CN	109563503	A	02 April 2019	US	2019343964	A1	14 November 2019
				KR	20190034236	A	01 April 2019
				JP	WO2018021301	A1	13 June 2019
				EP	3492591	A1	05 June 2019
				WO	2018021301	A1	01 February 2018
				EP	3492591	A4	01 April 2020
CN	108276492	A	13 July 2018	None			
WO	2017118321	A1	13 July 2017	JP	2019503687	A	14 February 2019
				CN	108699146	A	23 October 2018
				CN	106939047	A	11 July 2017
				EP	3400243	A1	14 November 2018
				HK	1255604	A1	23 August 2019
				US	2019010233	A1	10 January 2019
				EP	3400243	A4	25 September 2019
WO	2016024021	A1	18 February 2016	IL	250622	D0	30 April 2017
				SI	3180363	T1	29 May 2020
				US	2016177276	A1	23 June 2016
				EP	3180363	B1	25 September 2019
				RU	2017108203	A	17 September 2018
				JP	2017525698	A	07 September 2017
				DK	3180363	T3	04 November 2019
				CN	107108748	A	29 August 2017
				CA	2956126	A1	18 February 2016
				MX	2017001712	A	27 April 2017
				HR	P20191872	T1	07 February 2020
				PL	3180363	T3	28 February 2020
				LT	3180363	T	25 November 2019
				AU	2015303135	A1	23 February 2017
				ES	2751915	T3	02 April 2020
				EP	3643727	A1	29 April 2020
				EP	3180363	A1	21 June 2017
				BR	112017002646	A2	27 February 2018
				SG	11201701189 T	A	30 March 2017
				PT	3180363	T	05 November 2019
				RU	2017108203	A3	13 March 2019
				KR	20170036796	A	03 April 2017
				HU	E046661	T2	30 March 2020
WO	2017205742	A1	30 November 2017	AU	2017271602	A1	13 December 2018
				RU	2018146533	A3	29 June 2020
				US	2019071509	A1	07 March 2019
				SG	10201914132 R	A	30 March 2020
				SG	CN 11201810522	A	28 December 2018
					U		
				CL	2018003366	A1	15 March 2019
				MX	2018014630	A	10 June 2019
				CO	2018012699	A2	20 August 2019
				CN	109476750	A	15 March 2019
				TW	201806971	A	01 March 2018
				EP	3464361	A1	10 April 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/126656

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 3025347 A1	30 November 2017
		BR 112018074468 A2	06 March 2019
		KR 20190014524 A	12 February 2019
		US 10400041 B2	03 September 2019
		CR 05.06.2018 A	13 January 2020
		US 2018186889 A1	05 July 2018
		IL 263223 D0	31 December 2018
		RU 2018146533 A	29 June 2020
		PH 12018502456 A1	21 October 2019
		US 10597460 B2	24 March 2020
		US 10519243 B2	31 December 2019
		PE 20190970 A1	09 July 2019
		AR 108611 A1	05 September 2018
		US 10023645 B1	17 July 2018
		US 2017342159 A1	30 November 2017
		JP 2019523221 A	22 August 2019
		DO P2018000258 A	15 February 2019
		US 2020040090 A1	06 February 2020
		US 2020010558 A1	09 January 2020
		EC SP18094829 A	29 March 2019
WO 2017031458 A2	23 February 2017	BR 112018003269 A2	25 September 2018
		PE 20181292 A1	07 August 2018
		EP 3337517 A4	17 April 2019
		CO 2018001624 A2	19 July 2018
		CL 2018003758 A1	15 March 2019
		CL 2018000458 A1	13 July 2018
		MX 2018002166 A	12 September 2018
		EA 201890530 A1	28 September 2018
		KR 20180041717 A	24 April 2018
		EP 3337517 A2	27 June 2018
		HK 1257056 A1	11 October 2019
		TW 201718026 A	01 June 2017
		UY 36862 A	31 March 2017
		WO 2017031458 A3	06 April 2017
		IL 257645 D0	30 April 2018
		ZA 201801401 B	28 August 2019
		CA 2996165 A1	23 February 2017
		PH 12018500380 A1	03 September 2018
		US 2018243435 A1	30 August 2018
		JP 2018529656 A	11 October 2018
		AU 2016308365 A1	15 March 2018
		CN 108136015 A	08 June 2018
WO 2017215590 A1	21 December 2017	MX 2018015584 A	18 September 2019
		US 2018346574 A1	06 December 2018
		KR 101996019 B1	03 July 2019
		US 10723799 B2	28 July 2020
		HK 1259426 A1	29 November 2019
		KR 20180039182 A	17 April 2018
		US 2018208659 A1	26 July 2018
		US 2018346573 A1	06 December 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/126656

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		AU 2020217358 A1	03 September 2020
		IL 263509 D0	31 January 2019
		SG 11201811003 P A	30 January 2019
		CL 2018003583 A1	17 May 2019
		CA 3027209 A1	21 December 2017
		US 2020317789 A1	08 October 2020
		AU 2017284632 A1	03 January 2019
		JP 2019531256 A	31 October 2019
		BR 112018075737 A2	26 March 2019
		EP 3325513 A1	30 May 2018
		KR 20190079713 A	05 July 2019
		PH 12018502623 A1	07 October 2019
		US 10059769 B2	28 August 2018
		US 10208119 B2	19 February 2019
		EP 3325513 A4	19 December 2018
		JP 6730466 B2	29 July 2020
		CO 2018013500 A2	19 February 2019
		CN 108350082 A	31 July 2018
		AU 2017284632 B2	14 May 2020
		PE 20190510 A1	10 April 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/126656

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K, C12N, C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, NCBI, EMBL, STN: 抗体, antibody, PD-L1, 细胞程序性死亡配体-1, SEQ ID NOs: 1-182</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 106243225 A (智翔上海医药科技有限公司) 2016年 12月 21日 (2016 - 12 - 21) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109563503 A (静冈县) 2019年 4月 2日 (2019 - 04 - 02) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108276492 A (中国药科大学) 2018年 7月 13日 (2018 - 07 - 13) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017118321 A1 (HARBOUR BIOMED LIMITED) 2017年 7月 13日 (2017 - 07 - 13) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016024021 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2016年 2月 18日 (2016 - 02 - 18) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017205742 A1 (ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.) 2017年 11月 30日 (2017 - 11 - 30) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017031458 A2 (ABBVIE STEMCENTRX LLC) 2017年 2月 23日 (2017 - 02 - 23) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 106243225 A (智翔上海医药科技有限公司) 2016年 12月 21日 (2016 - 12 - 21) 全文	1-17	A	CN 109563503 A (静冈县) 2019年 4月 2日 (2019 - 04 - 02) 全文	1-17	A	CN 108276492 A (中国药科大学) 2018年 7月 13日 (2018 - 07 - 13) 全文	1-17	A	WO 2017118321 A1 (HARBOUR BIOMED LIMITED) 2017年 7月 13日 (2017 - 07 - 13) 全文	1-17	A	WO 2016024021 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2016年 2月 18日 (2016 - 02 - 18) 全文	1-17	A	WO 2017205742 A1 (ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.) 2017年 11月 30日 (2017 - 11 - 30) 全文	1-17	A	WO 2017031458 A2 (ABBVIE STEMCENTRX LLC) 2017年 2月 23日 (2017 - 02 - 23) 全文	1-17
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
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) 全文	1-17																								
A	CN 109563503 A (静冈县) 2019年 4月 2日 (2019 - 04 - 02) 全文	1-17																								
A	CN 108276492 A (中国药科大学) 2018年 7月 13日 (2018 - 07 - 13) 全文	1-17																								
A	WO 2017118321 A1 (HARBOUR BIOMED LIMITED) 2017年 7月 13日 (2017 - 07 - 13) 全文	1-17																								
A	WO 2016024021 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2016年 2月 18日 (2016 - 02 - 18) 全文	1-17																								
A	WO 2017205742 A1 (ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.) 2017年 11月 30日 (2017 - 11 - 30) 全文	1-17																								
A	WO 2017031458 A2 (ABBVIE STEMCENTRX LLC) 2017年 2月 23日 (2017 - 02 - 23) 全文	1-17																								
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																										
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 1月 8日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 1月 27日</p>																								
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>张蕾</p> <p>电话号码 86-(10)-53962037</p>																								

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 2017215590 A1 (I-MAB) 2017年 12月 21日 (2017 - 12 - 21) 全文	1-17

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政法规第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 16
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 虽然权利要求16涉及一种预防和/或治疗PD-L1表达异常和/或T细胞功能异常相关的疾病的方法，属于PCT细则第39条(iv)规定的主题，但是基于预防和/或治疗PD-L1表达异常和/或T细胞功能异常相关疾病的药物的制备用途进行检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/126656

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106243225	A	2016年 12月 21日	无			
CN	109563503	A	2019年 4月 2日	US	2019343964	A1	2019年 11月 14日
				KR	20190034236	A	2019年 4月 1日
				JP	W02018021301	A1	2019年 6月 13日
				EP	3492591	A1	2019年 6月 5日
				WO	2018021301	A1	2018年 2月 1日
				EP	3492591	A4	2020年 4月 1日
CN	108276492	A	2018年 7月 13日	无			
WO	2017118321	A1	2017年 7月 13日	JP	2019503687	A	2019年 2月 14日
				CN	108699146	A	2018年 10月 23日
				CN	106939047	A	2017年 7月 11日
				EP	3400243	A1	2018年 11月 14日
				HK	1255604	A1	2019年 8月 23日
				US	2019010233	A1	2019年 1月 10日
				EP	3400243	A4	2019年 9月 25日
WO	2016024021	A1	2016年 2月 18日	IL	250622	D0	2017年 4月 30日
				SI	3180363	T1	2020年 5月 29日
				US	2016177276	A1	2016年 6月 23日
				EP	3180363	B1	2019年 9月 25日
				RU	2017108203	A	2018年 9月 17日
				JP	2017525698	A	2017年 9月 7日
				DK	3180363	T3	2019年 11月 4日
				CN	107108748	A	2017年 8月 29日
				CA	2956126	A1	2016年 2月 18日
				MX	2017001712	A	2017年 4月 27日
				HR	P20191872	T1	2020年 2月 7日
				PL	3180363	T3	2020年 2月 28日
				LT	3180363	T	2019年 11月 25日
				AU	2015303135	A1	2017年 2月 23日
				ES	2751915	T3	2020年 4月 2日
				EP	3643727	A1	2020年 4月 29日
				EP	3180363	A1	2017年 6月 21日
				BR	112017002646	A2	2018年 2月 27日
				SG	11201701189T	A	2017年 3月 30日
				PT	3180363	T	2019年 11月 5日
				RU	2017108203	A3	2019年 3月 13日
				KR	20170036796	A	2017年 4月 3日
				HU	E046661	T2	2020年 3月 30日
WO	2017205742	A1	2017年 11月 30日	AU	2017271602	A1	2018年 12月 13日
				RU	2018146533	A3	2020年 6月 29日
				US	2019071509	A1	2019年 3月 7日
				SG	10201914132R	A	2020年 3月 30日
				SG	11201810522U	A	2018年 12月 28日
				CL	2018003366	A1	2019年 3月 15日
				MX	2018014630	A	2019年 6月 10日
				CO	2018012699	A2	2019年 8月 20日
				CN	109476750	A	2019年 3月 15日
				TW	201806971	A	2018年 3月 1日
				EP	3464361	A1	2019年 4月 10日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/126656

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CA 3025347 A1	2017年 11月 30日
		BR 112018074468 A2	2019年 3月 6日
		KR 20190014524 A	2019年 2月 12日
		US 10400041 B2	2019年 9月 3日
		CR 20180605 A	2020年 1月 13日
		US 2018186889 A1	2018年 7月 5日
		IL 263223 D0	2018年 12月 31日
		RU 2018146533 A	2020年 6月 29日
		PH 12018502456 A1	2019年 10月 21日
		US 10597460 B2	2020年 3月 24日
		US 10519243 B2	2019年 12月 31日
		PE 20190970 A1	2019年 7月 9日
		AR 108611 A1	2018年 9月 5日
		US 10023645 B1	2018年 7月 17日
		US 2017342159 A1	2017年 11月 30日
		JP 2019523221 A	2019年 8月 22日
		DO P2018000258 A	2019年 2月 15日
		US 2020040090 A1	2020年 2月 6日
		US 2020010558 A1	2020年 1月 9日
		EC SP18094829 A	2019年 3月 29日
-----	-----	-----	-----
WO 2017031458 A2	2017年 2月 23日	BR 112018003269 A2	2018年 9月 25日
		PE 20181292 A1	2018年 8月 7日
		EP 3337517 A4	2019年 4月 17日
		CO 2018001624 A2	2018年 7月 19日
		CL 2018003758 A1	2019年 3月 15日
		CL 2018000458 A1	2018年 7月 13日
		MX 2018002166 A	2018年 9月 12日
		EA 201890530 A1	2018年 9月 28日
		KR 20180041717 A	2018年 4月 24日
		EP 3337517 A2	2018年 6月 27日
		HK 1257056 A1	2019年 10月 11日
		TW 201718026 A	2017年 6月 1日
		UY 36862 A	2017年 3月 31日
		WO 2017031458 A3	2017年 4月 6日
		IL 257645 D0	2018年 4月 30日
		ZA 201801401 B	2019年 8月 28日
		CA 2996165 A1	2017年 2月 23日
		PH 12018500380 A1	2018年 9月 3日
		US 2018243435 A1	2018年 8月 30日
		JP 2018529656 A	2018年 10月 11日
		AU 2016308365 A1	2018年 3月 15日
		CN 108136015 A	2018年 6月 8日
-----	-----	-----	-----
WO 2017215590 A1	2017年 12月 21日	MX 2018015584 A	2019年 9月 18日
		US 2018346574 A1	2018年 12月 6日
		KR 101996019 B1	2019年 7月 3日
		US 10723799 B2	2020年 7月 28日
		HK 1259426 A1	2019年 11月 29日
		KR 20180039182 A	2018年 4月 17日
		US 2018208659 A1	2018年 7月 26日
		US 2018346573 A1	2018年 12月 6日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/126656

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		AU	2020217358	A1	2020年 9月 3日
		IL	263509	D0	2019年 1月 31日
		SG	11201811003P	A	2019年 1月 30日
		CL	2018003583	A1	2019年 5月 17日
		CA	3027209	A1	2017年 12月 21日
		US	2020317789	A1	2020年 10月 8日
		AU	2017284632	A1	2019年 1月 3日
		JP	2019531256	A	2019年 10月 31日
		BR	112018075737	A2	2019年 3月 26日
		EP	3325513	A1	2018年 5月 30日
		KR	20190079713	A	2019年 7月 5日
		PH	12018502623	A1	2019年 10月 7日
		US	10059769	B2	2018年 8月 28日
		US	10208119	B2	2019年 2月 19日
		EP	3325513	A4	2018年 12月 19日
		JP	6730466	B2	2020年 7月 29日
		CO	2018013500	A2	2019年 2月 19日
		CN	108350082	A	2018年 7月 31日
		AU	2017284632	B2	2020年 5月 14日
		PE	20190510	A1	2019年 4月 10日