抗 PD-L1 和 CD40 双特异性抗体及其用途

技术领域

本发明涉及抗体药物领域，具体地涉及特异性结合 PD-L1 和 CD40 的双特异性抗体及其药物组合物和用途，尤其是在肿瘤治疗中的应用。

背景技术

PD-L1(程序性死亡配体 1, 也称为分化簇 274（CD274）或 B7 同源物 1（B7-H1)）是表达在 T 细胞、B 细胞等免疫细胞以及肿瘤细胞上的 I 型跨膜蛋白。当肿瘤细胞膜上的 PD-L1 与 T 细胞等免疫细胞上的 PD-1 结合后，肿瘤细胞发出抑制性信号，阻止 T 细胞识别和杀伤肿瘤细胞（Chamoto, K., Al-Habsi, M., & Honjo, T. (2017). "Role of PD-1 in Immunity and Diseases". Current topics in microbiology and immunology, 410, 75–97)。由此，抗 PD-1/PD-L1 单抗(例如，阿替利珠单抗 (Atezolizumab))被提出用于多种实体瘤的治疗，包括例如 NSCLC、头颈鳞癌和黑色素瘤等（Radvanyi, et al, P. (2013). "Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer"--letter. Clinical cancer research , 19(19), 5541)。然而，已有的临床试验显示， PD-1/PD-L1 抗体的响应率受 PD-L1 表达水平以及肿瘤内 T 细胞的数量和质量等多种因素的影响，目前只有少于 40%的实体瘤对治疗产生反应性。

CD40 是肿瘤坏死因子受体超家族成员的 I 型跨膜糖蛋白。其广泛表达于免疫细胞表面，包括 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞，同时也表达于非免疫细胞的表面，如上皮细胞、内皮细胞、脂肪细胞、间质细胞、血小板。人 CD40 的配体也称作 CD40L 或 CD154。目前的证据表明，CD40 在激活后，可以许可树突状细胞促进抗肿瘤 T 细胞的激活，并对肿瘤微环境产生影响，将所谓的"冷肿瘤"转化为热肿瘤(即，具有显著的 T 细胞浸润的肿瘤)，由此提升肿瘤对免疫检查点抑制疗法的敏感性。基于此作用机制的临床在研激动剂 CD40 抗体包括，具有 IgG2 同种型的 selicrelumab (RO7009789)和 CDX-1140，以及具有 IgG1 同种型的 sotigalimab (APX005M)、ChiLob7/4、ADC-1013、Dacetuzumab 和 SEA-CD40 等。这些 CD40 mAb 的激活效力各不相同，从强功效(sotigalimab 和 selicrelumab)到弱功效(Dacetuzumab)不等。 此外，不同的 CD40 mAb 对 Fc 受体(FcR) 交联的要求和能力亦各不相同。目前，对于最佳的 CD40 mAb 形式，尚未达成共识。参见例如，Vonderheide, R. H. CD40 Agonist Antibodies in Cancer Immunotherapy. Annu. Rev. Med. 71, 47–58 (2020)。

鉴于抗 CD40 激动剂抗体具有激活抗原呈递细胞的作用，已经提出抗 CD40 激动剂抗体与抗 PD-1/PD-L1 抗体的药物联用以及靶向 PD-1/PD-L1 和 CD40 的双特异性抗体作为一个有希望的抗癌发展方向(参见例如 WO2023232036A1 和 WO2023186113A1)。然而，从目前的研究看(参见例如，Padrón, L.J. et al. Sotigalimab and/or nivolumab with chemotherapy in first-line metastatic pancreatic cancer: clinical and immunologic analyses from the randomized phase 2 PRINCE trial. Nat Med 28, 1167–1177 (2022). https://doi.org/10.1038/s41591-022-01829-9)，寻找合适的药物联用和双特异性抗体形式以最大化抗肿瘤药物功效同时限制分子的毒副作用，仍是本领域需要面临的挑战。

发明概述

鉴于上述，本发明人通过锐意研究，构建了新的抗 PD-L1 和 CD40 的双特异性抗体，进而探索了具有优化的抗体构型和 Fc 区的优选实施方案，并在多种冷肿瘤模型中证实了所构建的双特异性抗体的抗肿瘤治疗功效。基于这些研究，本发明人建立了本发明的抗体及其在抗肿瘤治疗中的应用。

因此，在第一方面，本发明提供了抗 PD-L1 和 CD40 双特异性抗体及其药物组合物和用途，其中所述抗体包含至少一个特异性结合 PD-L1 的抗原结合位点和至少一个特异性结合 CD40 的抗原结合位点。在一些实施方案中，所述 PD-L1 抗原结合位点包含含有分别具有 SEQ ID NOs: 2-4 所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的 VHH 结构域。在一些实施方案中，所述 CD40 抗原结合位点包含含有分别具有 SEQ ID

NOs: 21-23 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的 VH 结构域和含有分别具有 SEQ ID NOs: 18-20 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的 VL 结构域。在一些优选实施方案中，所述抗体为每分子包含 1 个 PD-L1 抗原结合位点和 2 个 CD40 抗原结合位点的三价双特异性抗体。

在第二方面，本发明提供了一种抗 PD-L1 抗体及其药物组合物和用途。

在第三方面，本发明提供了一种包含本发明抗体的免疫缀合物或免疫融合物、及其药物组合物和用途。

在下面的附图和具体实施方案中进一步说明本发明。然而，这些附图和具体实施方案不应被认为限制本发明的范围，并且本领域技术人员容易想到的改变将包括在本发明的精神和所附权利要求的保护范围内。

附图简述

图 1 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 和 Selicrelumab 分子在 MC38 细胞（PD-L1-Negative）上的报告实验。

图 2 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 和 Selicrelumab 分子在 MC38 PD-L1 细胞（PD-L1-positive）上的报告实验。

图 3 显示，Selicrelumab, Dace-hz03C06.g6-2+1, Dace-hz03C06.g6-2+2 分子在 PD-L1 高表达条件下对 DC 的激活。

图 4 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 抗体药物在 B16F10-hPD-L1 荷瘤小鼠模型上的抗肿瘤药效。

图 5 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 抗体药物对小鼠体重变化的影响。

图 6 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 抗体药物在 B16F10-hPD-L1 荷瘤小鼠模型上的抗肿瘤药效。

图 7 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 抗体药物对小鼠体重变化的影响。

图 8 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 抗体药物在 KPC-hPD-L1 荷瘤小鼠模型上的抗肿瘤药效。

图 9 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 抗体药物对小鼠体重变化的影响。

图 10 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 和 Selicrelumab 抗体药物对小鼠血清中 ALT 水平的影响。

图 11 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 和 Selicrelumab 抗体药物对小鼠血清中 AST 水平的影响。

图 12 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 和 Selicrelumab 抗体药物对小鼠血清中 TNF-α 水平的影响。

图 13 显示，Dace-hz03C06.g6-2+1 和 Selicrelumab 抗体药物对小鼠血清中 IL-6 水平的影响。

图 14 显示，本发明 2+1 型抗 PD-L1 和 CD40 双特异性抗体的示例性分子示意图。

发明详述

除非另外限定，否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入。此外，本文中所述的材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

定义

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5%的下限和比指定数字数值大 5%的上限的范围内的数字数值。

如本文所用，术语“和/或”，在与多个可选项联用时，意指所述可选项中的任一项或所述可选项中的任意两项或多项或所有。

在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

在本文中，术语“抗原结合分子”是指包含能够与靶抗原结合的抗原结合结构域或抗原结合位点的分子，例如蛋白质或多肽或由其衍生的分子。在本发明中，当靶抗原是 PD-L1 和/或 CD40 时，结合 PD-L1 和/或 CD40 的抗原结合分子也称作 PD-L1 结合分子、CD40 结合分子或 PD-L1/CD40 结合分子。抗原结合分子

包括例如抗体及其抗原结合片段、以及基于抗体或抗原结合片段构建的各种融合物和缀合物，例如 VHH-Fc 抗体、免疫缀合物、抗体药物偶联物(ADC)、多/双特异性抗体、嵌合抗原受体(CAR)。如本领域技术人员明了的，抗体的抗原结合位点通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。

在本文中，术语“抗体”是指，至少包含轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽，所述免疫球蛋白可变区特异性识别并结合抗原。该术语涵盖各种抗体结构，包括、但不限于单克隆抗体、单链抗体或多链抗体、单特异性或多特异性抗体（例如双特异性抗体）、单域抗体、重链抗体、嵌合抗体或人源化抗体、完整抗体和抗体片段，只要它们呈现期望的抗原结合活性即可。

术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用，是指具有与天然抗体结构基本上类似的结构或具有包含本文中定义的 Fc-区的重链的抗体。在一些实施方案中，“全长抗体”是包含抗原结合可变区以及 Fc 区的抗体。在另一些实施方案中，“全长抗体”是包含抗原结合可变区以及轻链恒定结构域（CL）和重链恒定结构域 CH1、CH2 和 CH3 的抗体。优选地，“全长抗体”包含两条抗体轻链（各自包含轻链可变结构域和轻链恒定结构域）和两条抗体重链（各自包含重链可变结构域、铰链区和重链恒定结构域 CH1、CH2 和 CH3）。全长抗体的两条抗体重链可以彼此独立地存在或不存在 C-末端氨基酸残基 K 或 GK。包含在抗体中的恒定结构域可以是天然序列恒定结构域（例如，人天然序列恒定结构域）或其氨基酸序列变体。在本文中，相应地，表述“抗 CD40 全长抗体”是指包含 CD40 抗原结合可变区和 Fc 区的抗体。在一些实施方案中，优选地，所述抗 CD40 全长抗体由两个特异性结合 CD40 的 Fab 或 scFv 结构域和位于其 C 端的一个二聚体化 Fc 区组成。

在本文中，术语“抗体片段”与“抗原结合片段”可互换使用，是指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且能够结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于 Fv，Fab， crossFab、Fab’，Fab’-SH，$F(ab')_2$；双链抗体(diabody)；三链抗体(triabody)；线性抗体；单链抗体(例如 scFv 或 scFab)；单域抗体(sdAb)；骆驼科抗体(重链抗体)或其片段(例如 VHH)；和由抗体片段形成的单特异性、双特异性抗体或多特异性抗体。除非本文中另有说明或明确与上下文相悖，否则本文中提及术语“抗体”等同于“抗体或其抗体片段”。

在本文中，术语“抗原结合位点”与“抗原结合结构域”可以互换使用，表示抗体分子中与抗原实际结合的区域，其可以包括但不限于，来自重链抗体的可变结构域(即，“VHH”)以及来自常规抗体的重链和轻链可变结构域对(即，“VH”和“VL”)。

在本文中，术语“双特异性”指具有至少两个抗原结合位点的抗原结合分子(例如抗体)，其中所述至少两个抗原结合位点中的至少一个与第一抗原或第一抗原表位结合，而其余抗原结合位点与不同的第二抗原或第二抗原表位结合，例如，与不同抗原上的不同表位或同一抗原上的不同表位结合。与之相对地，“单特异性”指仅结合一种表位的能力。

在本文中，与抗体相关的表述“价”或“价数”是指，抗体分子中的抗原结合位点的总数，或具有相同抗原结合特异性的抗原结合位点的数目。例如，4 价抗体是指该抗体分子包含总共 4 个抗原结合位点；该抗体分子可以是“2+2”型的双特异性抗体，即，所述抗体具有两种不同的抗原结合特异性，其中针对每一种抗原结合特异性，分别存在 2 个相同的抗原结合位点。再例如，3 价抗体是指该抗体分子包含总共 3 个抗原结合位点；该抗体分子可以是“2+1”型的双特异性抗体，即，所述抗体具有两种不同的抗原结合特异性，其中针对一种抗原结合特异性，存在 2 个相同的抗原结合位点，而针对另一种抗原结合特异性，仅存在 1 个抗原结合位点。

在本文中，术语“PD-L1”是指程序性死亡配体-1。除非另有说明，否则该术语包括人 PD-L1 的任何变体，包括序列变体，尤其是天然存在的变体、等位基因变体，以及翻译后修饰变体和构象变体，并涵盖其物种同源物。此外，应理解，该术语不仅涵盖由细胞天然或重组表达的 PD-L1 或在天然或重组细胞上表达的 PD-L1，也涵盖重组表达的包含 PD-L1 胞外域的融合蛋白。PD-L1 的一个例子是包含 UniProtKB 登录号 Q9NZQ7 下的氨基酸序列的人 PD-L1 蛋白，或包含所述蛋白的胞外域(尤其是，氨基酸 19-238 的氨基酸序列)的重组蛋白。PD-L1 的另一个例子是猴 PD-L1 蛋白，或包含所述蛋白的胞外域的重组蛋白。在本文中，在不特别指明的情况下，术语“PD-L1”是指来源于人的 PD-L1。在本文中，“针对 PD-L1 的抗原结

合特异性”，也即，“特异性结合 PD-L1 的抗原结合位点”，优选地由 VHH 结构域提供。

在本文中，术语“PD-L1 阳性”细胞是指，呈 PD-L1 细胞表面表达阳性的细胞，例如树突细胞、癌细胞、或经改造的非肿瘤细胞。可以通过本领域已知用于确定细胞表面抗原表达水平的任何常规方法，例如，FACS 检测方法、免疫荧光染色方法或免疫组化染色方法，确定细胞表面的 PD-L1 表达水平。

在本文中，术语“CD40”是指 B 细胞表面抗原 CD40,也称肿瘤坏死因子受体超家族成员 5。除非另有说明，否则该术语包括人 CD40 的任何变体，包括序列变体，尤其是天然存在的变体、等位基因变体，以及翻译后修饰变体和构象变体，并涵盖其物种同源物。此外，应理解，该术语不仅涵盖由细胞天然或重组表达的 CD40 或在天然或重组细胞上表达的 CD40，也涵盖重组表达的包含 CD40 胞外域的融合蛋白。CD40 的一个例子是包含 UniProtKB- P25942 下的氨基酸序列的人 CD40 蛋白，或包含所述蛋白的胞外域的重组蛋白。CD40 的另一个例子是猴 CD40 蛋白，或包含所述蛋白的胞外域的重组蛋白。在本文中，在不特别指明的情况下，术语“CD40”是指来源于人的 CD40。在本发明的抗体中，“针对 CD40 的抗原结合特异性”，也即，“特异性结合 CD40 的抗原结合位点”，优选地由 VH 和 VL 结构域对提供。

在本文中，术语“CD40 阳性”细胞是指，呈 CD40 细胞表面表达阳性的细胞，例如树突细胞、B 细胞、经改造的非肿瘤细胞。可以通过本领域已知用于确定细胞表面抗原表达水平的任何常规方法，例如，FACS 检测方法或免疫荧光染色方法，确定细胞表面的 CD40 表达水平。

在本文中，与肿瘤中 PD-L1 评分相关的表述“CPS”(combined positive score)定义为，PD-L1 阳性的活肿瘤细胞（任何强度的部分或完全膜染色）及 PD-L1 阳性的淋巴细胞和巨噬细胞（任何强度的细胞膜或细胞质染色）占所有活肿瘤细胞的百分比。CPS 评分可以采用如下公式计算：（PD-L1 染色的肿瘤细胞+肿瘤相关的免疫细胞数之和）/肿瘤细胞总数 X 100，并以 0-100 数值来表示。

在本文中，术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗原结合位点与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法测定，例如，通过 ELISA 测定法检测抗体与抗原的结合能力，或通过 FACS 测定法检测抗体与表面表达抗原的细胞的结合能力，或通过 SPR 技术或 BLI 技术检测亲和力常数 KD。

在本文中，术语“亲和力”(affinity)或“结合亲和力”是指一个分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原表位)之间全部非共价相互作用总和的强度。在本文时，“结合亲和力”反映结合对的成员之间 1∶1 相互作用的内在结合亲和力。结合亲和力通常可用结合解离平衡常数(KD)来表述，并可以通过本领域已知的常用方法，例如表面等离子共振技术(Surface Plasmon Resonance, SPR)或生物膜薄层干涉技术(Biolayer Interferometry, BLI)来测量。相对地，在本文中，术语“亲合力”(avidity)或“结合亲合力”是指一个分子(抗体)的多个结合位点与相同靶标的相互作用的组合强度。

在本文中，术语“高亲和力”是指，例如通过表面等离子体共振技术(SPR)或生物膜层干涉技术(BLI)测定，抗原结合结构域对于其靶表位的结合亲和力 KD 值小于大约 $100x10^{-9}$ M，优选地小于大约 $50x10^{-9}$ M、大约 $40x10^{-9}$ M、大约 $30x10^{-9}$ M 或大约 $20x10^{-9}$ M，更优选地小于大约 $10x10^{-9}$ M。

在本文中，抗体对 PD-L1 具有“阻断活性”是指抗体阻断 PD-L1 与受体 PD-1 结合，和/或减少 PD-L1/PD-1 的信号传导的功能。用于测定此阻断活性的试验可以是例如，基于报告基因的信号通路阻断测定试验，例如实施例 2 中描述的基于报告基因的检测法。可以参照在不存在抗体时和/或存在阳性抗体时的 PD-L1/PD-1 结合或 PD-L1/PD-1 信号传递水平，确定待测抗体对 PD-L1 的阻断活性。

在本文中，抗体对 CD40 的“激活活性”是指抗体激活 CD40 信号通路的功能。用于测定该激活活性的试验可以是例如基于报告基因的信号通路激活测定试验，例如实施例 6 中描述的基于报告基因的检测法。可以参照在不存在抗体时和/或存在阳性抗体时的 CD40 信号传递水平，确定待测抗体的 CD40 激活活性。

在本文中，与抗体的 CD40 激活活性相关的表述“选择性”或“PD-L1 依赖性”是指，相对于在无 PD-L1 介导的抗体交联(或仅有低水平 PD-L1 介导的抗体交联)的情况，抗体更偏向于在有 PD-L1 介导的抗体交联(或有高水平 PD-L1 介导的抗体交联)的情况下激活 CD40 信号通路。可以用选择性指数（即，在所述两种情况下抗体激活 CD40 表达细胞的 EC50 值的比值），来表征抗体的该选择性。

在本文中，术语“免疫球蛋白”指具有天然存在抗体的结构的蛋白质。例如，IgG 类免疫球蛋白是由二

硫键键合的两条轻链和两条重链组成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。从N端至C端，每条免疫球蛋白重链具有一个重链可变区(VH)，也称作重链可变结构域，随后是三个重链恒定结构域(CH1、CH2 和 CH3)。类似地，从 N 端至 C 端，每条免疫球蛋白轻链具有一个轻链可变区(VL)，也称作轻链可变结构域，随后是一个轻链恒定结构域(CL)。免疫球蛋白的重链可以基于其恒定区的类型，归属于5个类别之一，称作 α(IgA)、δ(IgD)、ε(IgE)、γ(IgG)或 μ(IgM)，其中某些类别可以进一步划分成亚类，例如 γ1(IgG1)、γ2(IgG2)、γ3(IgG3)、γ4(IgG4)、α1(IgA1)和 α2(IgA2)。免疫球蛋白的轻链也可以基于其恒定结构域的氨基酸序列而归属于两种类型之一，称作κ和λ。

在本文中，术语“同种型”是指由抗体重链恒定区确定的抗体类型。例如，根据本发明的抗体可以是IgA(例如 IgA1 或 IgA2)、IgG1、IgG2(例如 IgG2a 或 IgG2b)、IgG3、IgG4、IgE、IgM 和 IgD 抗体，并具有所述免疫球蛋白类型的重链恒定区。在本文中，应当理解，当提及抗体具有某种同种型时，不仅涵盖具有该同种型的天然序列恒定区的抗体，也涵盖在恒定区中包含少数突变并仍归属于该同种型的抗体。

在本文中，术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。在常规抗体的情况下，重链可变结构域(VH)与轻链可变结构域(VL)配对赋予抗原结合特异性。在重链抗体例如来自骆驼科重链抗体的情况下，单个 VH 结构域(在本文中，也称作 VHH 结构域)可以足以给予抗原结合特异性。VHH 结构域与常规 IgG 抗体的重链和轻链可变区一样，都包含四个保守的框架区(FR)和三个互补决定区(CDR)，并以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CD3-FR4的顺序排列。在根据本发明的一些方面，可以对抗体的可变区中的一个或多个残基进行修饰，例如，对一个或多个 CDR 区和/或对一个或多个构架区进行残基修饰，尤其是保守残基取代，以获得仍基本上保持亲本抗体的至少一个生物学特性(例如，抗原结合能力) 的抗体变体。在再一些方面，可以通过 CDR 移植，修饰抗体可变区。由于 CDR 序列负责大多数抗体-抗原相互作用，故可以构建模拟已知抗体的性质的抗体变体。在此类抗体变体中，来自已知抗体的 CDR 序列被移植到具有不同性质的不同抗体的构架区上，并可以根据需要进行 1 至几个残基突变，例如回复突变以精细化抗体的期望性质。可以在体外或体内测定试验中评估突变和/修饰后的抗体的性质，例如靶抗原结合性质或其它期望的功能性质，例如 CD40 激活活性、和/或体内肿瘤杀伤活性。因此，本发明也考虑本文所给出的任何可变区(例如 VHH，VH/VL 区)的变体。在一些情况下，对于抗体或其衍生分子的治疗应用，期望的是降低其免疫原性。因此，在一些实施方案中，优选地，抗体包含人源化的可变结构域(例如 VHH 结构域和/或 VH/VL 结构域)。

在本文中，“互补决定区”与“CDR 区”、“CDR” 以及“高变区”可互换使用，是指抗体可变结构域中在序列上高度可变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。在 VHH 结构域中，CDR 从 N-端开始顺序编号，通常称作 CDR1、CDR2 和 CDR3。在 VH 结构域和 VL 结构域中，CDR 从 N-端开始顺序编号，通常分别称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。可以采用本领域公知的方案，确定一个确定的可变区(例如 VHH 结构域或 VH/VL 结构域)中的 CDR 序列，例如通过 Kabat、AbM、Chothia、Contact 和 IMGT 方案来定义 CDR 的区域范围及其组合范围。除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以所述的任一种方式及其组合确定的 CDR 序列。此外，本领域知晓，尽管 CDR 在抗体与抗体之间是不同的，但是 CDR 内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用 Kabat, Chothia, AbM 和 Contact 方法中的至少两种，可以确定最小重叠区域，从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。这样的最小结合单位可以是 CDR 的一个子部分。而 CDR 序列其余部分的残基，正如本领域技术人员明了，可以通过抗体的结构和蛋白折叠予以确定。因此，本发明也考虑本文所给出的任何 CDR 的变体。例如，在一个 CDR 的变体中，最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变，而其余 CDR 残基可以被替代。

除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区和 CDR 中的残基位置(包括重链可变区残基) 时，是指根据 Kabat 编号系统(Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda, MD（1991）)的编号位置。

在本文中，术语“VHH”与“VHH 结构域”可互换使用，用于指从缺乏轻链的重链抗体衍生的重链可变结构域，有时也称作单可变域片段(sVD)或单域抗体(sdAb)。因此，VHH 与四链免疫球蛋白的常规 VH 不

同，其无需与轻链可变结构域配对来形成抗原结合位点。这种 VHH 分子可以衍生自骆驼科物种(例如骆驼、羊驼、单峰驼、驼羊和原驼)中产生的抗体。除骆驼科之外的其他物种也可以产生天然缺乏轻链的重链抗体，来自这类重链抗体的 VHH 也处于本发明的范围内。

在本文中，术语“Fab 结构域”用于指，类似于常规四链 IgG 抗体中由重链可变区 VH 和重链恒定区 CH1(VH-CH1)与互补轻链可变区 VL 和轻链恒定区 CL(VL-CL)配对形成的结构。该术语也涵盖其中 CH1 与 CL 发生交换的结构，即，由 VH-CL 与 VL-CH1 配对形成的结构。在一些实施方案中，如图 14 中所示，Fab 结构域可以融合在免疫球蛋白 Fc 区的 N 端。

在本文中，术语“scFv 结构域”用于指，包含由柔性接头连接在一起的 VH 结构域和 VL 结构域的单链多肽，其中位于该多肽链上的所述 VH 结构域和所述 VL 结构域配对形成负责抗原结合的抗原结合结构域。在一些实施方案中，scFv 结构域可以融合在免疫球蛋白 Fc 区的 N 端或 C 端。

在本文中，术语“免疫球蛋白 Fc 区”，与“Fc 区”和“Fc 结构域”在本文中可互换使用，用来定义免疫球蛋白重链的 C 端区域，所述区域包含至少一部分的重链恒定区。在本文中，术语“Fc 区”或“Fc 结构域”不包括免疫球蛋白的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 以及重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL；但可以包含 CH2 结构域和 CH3 结构域，以及包含或不包含免疫球蛋白铰链区。例如，在一些实例中，Fc 区可以从 N 末端到 C 末端包含 CH2 结构域和 CH3 结构域或由所述 CH2 结构域和 CH3 结构域组成。在另一些实例中，Fc 区可以从 N 末端到 C 末端包含免疫球蛋白铰链区或部分免疫球蛋白铰链区(或可替代铰链区的连接肽)、CH2 结构域和 CH3 结构域或由所述免疫球蛋白铰链区或部分铰链区(或可替代铰链区的连接肽)、CH2 结构域和 CH3 结构域组成。构成 Fc 区的序列可以是天然序列或变体序列。因此，术语“Fc 区”在本文中涵盖了天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。可用于本发明抗体中的 Fc 区，包括但不限于，具有天然序列或变体序列的 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 的 Fc 区。

在本文中，除非另外说明，否则 Fc 区以及重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如 Kabat 等人, SEQuences of Proteins of Immunological Interes, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述的 EU 编号体系(也称作 EU 索引)进行编号。

在本文中，术语“天然序列 Fc 区”涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 区序列，例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区序列(Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.)。在一些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区具有自 Cys226 或自 Pro230 延伸至重链羧基端的氨基酸序列。然而，Fc 区的 C 端末端的赖氨酸(Lys447)或甘氨酸-赖氨酸(Gly446Lys447)可以存在或不存在。在一些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区在 N 端带有天然免疫球蛋白的铰链序列或部分铰链序列，例如根据 EU 编号，E216 到 T225 的序列或 D221 到 T225 的序列。

在本文中，术语 “变体序列 Fc 区”是指，相对于天然序列 Fc 区多肽包含修饰的 Fc 区多肽。所述的修饰可以是氨基酸残基的添加，缺失和/或取代。取代可以包括天然存在的氨基酸取代和非天然存在的氨基酸取代。修饰的目的可以是旨在改变 Fc 区与其受体的结合及由此引发的效应子功能，或修饰的目的可以是旨在防止不期望的重链错配，或者旨在定点引入可以用于链间二硫键形成的氨基酸突变。

在本文中，术语“效应子功能”指随免疫球蛋白同种型变动的归因于免疫球蛋白 Fc 区的那些生物学活性。免疫球蛋白效应子功能的例子包括：Fc 受体结合作用、C1q 结合和补体依赖的细胞毒性(CDC)、和抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。根据抗体分子的预期用途，可以修饰抗体的 Fc 区，从而相对于具有野生型 Fc 区的抗体分子，使其具有改变的效应子功能，例如降低或消除的 Fcγ 受体结合等。

在本文中，当抗体包含 Fc 区时，包含 Fc 区的抗体多肽链也称作重链，而不含 Fc 区的抗体多肽链也称作轻链。相应地，与全长抗体相关的术语“重链”是指全长抗体中包含 Fc 区的抗体链，而“轻链”是指全长抗体中不包含 Fc 区的抗体链。在一些情况下，所述全长抗体在其重链 Fc 区的 C 端可以具有或不具有共价连接的抗原结合结构域，例如 VHH 结构域。

在本文中，术语“柔性连接肽”或“连接子”或“连接肽”可互换使用，是指由氨基酸组成的短氨基酸序列，例如单独或组合使用的甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T)的肽，或来自免疫球蛋白的铰链区。

在本文中，氨基酸序列的“同一性百分数(%)”是指将候选序列与本说明书中所示的具体氨基酸序列进

行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后，并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时，候选序列中被确定为与所述具体氨基酸序列的对应位置的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分数。在一些实施方案中，本发明考虑本发明抗体分子的变体，所述变体相对于在本文中具体公开的抗体分子具有相当程度的序列同一性，例如同一性为至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%或 99%或更高。所述变体可以包含保守性修饰。

对于多肽序列，“保守性修饰”包括对多肽序列的置换，它们导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。以下 8 组含有互为保守替换的氨基酸：1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)；5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；和 8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。在一些实施方案中，术语“保守性修饰”尤其用于指不显著影响或改变待引入所述修饰的亲本多肽(例如亲本抗体)的期望性质(例如结合特征和/或 CD 激活特征)的氨基酸修饰。

在本文中，“人源化”抗体是指包含来自非人 CDR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的嵌合抗体。在一些实施方案中，人源化抗体中的所有或基本上所有的 CDR 对应于非人抗体的 CDR，并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的 FR。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。在本文中，在一些实施方案中，本发明的人源化抗体具有“来源于”特定的人种系序列的构架区序列。在此，“来源于”是指，所述抗体构架区的氨基酸序列与由所述人种系免疫球蛋白基因编码的相应构架区氨基酸序列具有至少 90%、93%、95%、96%、97%、98%或更高的同一性，并且所述抗体保持抗原结合活性。

在本文中，“分离的”抗体是指人工抗体、重组生成的抗体、以及已经与产生其的天然环境中的组分至少部分地分离的抗体。在一些实施方案中，本发明的抗体为“分离的”抗体。在一些实施方案中，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE，等电聚焦(IEF)，毛细管电泳)或层析(例如，离子交换或反相 HPLC)确定，分离的抗体被纯化至超过 90%、95%或 99%纯度。

在本文中，如果可变区氨基酸序列（例如 VHH 或 VH/VL 对）对两种不同的抗原或抗原决定簇（例如来自不同哺乳动物物种的 PD-L1 或 CD40，例如人 PD-L1 和食蟹猴 PD-L1、或人 CD40 和食蟹猴 CD40）具有特异性，则称对这两种不同的抗原或抗原决定簇是“交叉反应性的”。抗体具有人猴物种交叉反应性，尤其是具有相近似的人猴抗原结合亲和力，将是有利的，该性质可以有助于抗体的临床前药物开发。在一些实施方案中，本发明抗体优选具有人猴 PD-L1 交叉反应性和/或人猴 CD40 交叉反应性。

在本文中，术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明抗体分子的任何类型的细胞系统，包括真核细胞，例如，哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞；和原核细胞，例如，大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞，也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。

在本文中，术语“表达载体”是指能够指导与其可操作地连接的核苷酸序列表达的载体。表达载体通常包含用于所述核苷酸序列表达的顺式作用元件；而用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中提供。表达载体包括，例如但不限于，粘粒、质粒(例如，裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

在本文中，术语“免疫缀合物”或“免疫偶联物”通常指通过将一种或多种免疫球蛋白相关分子或其片段(例如抗体或其片段)与一种或多种其他分子缀合或融合而形成的分子。在一些情况下，所述其他分子可以是蛋白质性质的分子，例如肽、多肽或蛋白质。在一些情况下，所述其他分子也可以是非蛋白质性质的分子，例如，化学毒素。在一些情况下，所述其他分子可以同为免疫球蛋白相关分子或其片段。在一些情况下，其他分子可以不同于免疫球蛋白相关分子或其片段。所述一种或多种其他分子可以相同或彼此不同。例如，所述其他分子可以是靶标结合元件和/或效应子元件，诸如化疗剂，毒素，药物（如免疫治疗剂），放射性元素，探针或信号分子等。

在本文中，术语“个体”或“受试者”可互换地使用，是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。在一些实施方案中，个体尤其是指人类个体。

在本文中，术语“治疗”指意欲改变正在接受治疗的个体中疾病之天然过程的临床介入。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态，以及缓解或改善预后。涉及肿瘤或癌症治疗的情形下，“治疗”涵盖可以通过人为干预手段(例如，通过药物的施用)引起的抗肿瘤生物学效果，包括但不限于，例如，肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。

在本文中，术语“预防”是指在疾病的至少一个症状发生前实施的医学干预，以抑制、延缓或阻止疾病或特定疾病症状的发生或发展。因此，在一些实施方案中，预防包括在受试者中于疾病或症状发生前进行药物施用。

在本文中，术语“癌症”和“肿瘤”可互换使用，指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌，实体瘤和液体瘤。

具体实施方案

随着新型免疫治疗药物的引入，癌症的治疗已经发生了革命性的变化。然而，设计和开发成功的抗癌疗法仍然面临诸多的挑战。在探索针对抑制性免疫检查点和共刺激性检查点的抗体药物的研究过程中，本发明人构建了新的抗 PD-L1 和 CD40 双特异性抗体。因此，在一些方面，本发明提供了新颖的抗 PD-L1 和 CD40 双特异性抗体。在一些实施方案中，所述抗体包含高亲和力 PD-L1 抗原结合结构域，例如具有 SEQ ID NOs: 2-4 的 CDR 序列的 PD-L1 抗原结合结构域；以及在无交联存在下具有弱激动活性的 CD40 抗原结合结构域，例如，具有 SEQ ID NOs: 18-23 的 CDR 序列的 CD40 抗原结合结构域。在一些实施方案中，本发明的抗体呈现出 PD-L1 依赖的 CD40 激活作用，和/或相较于非 PD-L1 依赖的激动剂 CD40 抗体，增强的选择性激活抗原呈递细胞（如树突细胞)的能力。

在上述抗体的基础上，在本发明的一些方面，本发明人进一步探索并建立了具有不同的抗体构型的本发明抗体的优选实施方案。根据之前的报告，CD40 和 PD-L1 双特异性抗体多采用 2+2 型的分子设计。为了进一步优化抗体，本发明人探索了不同的抗体构型对本发明双特异性抗体的药效的影响。研究显示，相较于已报道的 2+2 型分子构型，具有 2+1 构型的本发明抗体(即，每个分子包含 2 个抗 CD40 抗原结合位点和 1 个抗-PD-L1 抗原结合位点)，可以在同等 PD-L1 丰度和抗体分子剂量下，更好地实现对靶组织中 PD-L1 锚定分子的充分利用，并由此发挥出最大的药效。因此，在本发明的一些优选实施方案中，本发明提供了 2+1 型的本发明抗 PD-L1 和 CD40 双特异性抗体。在一些再优选的实施方案中，所述抗体包含 2 个抗 CD40 Fab 和 1 个抗-PD-L1 VHH。在一些更优选的实施方案中，所述的双特异性抗体包含或由一个抗 CD40 全长 IgG 抗体和缀合在其上（例如缀合在其一条抗体重链 C 末端）的一个抗 PD-L1 VHH 结构域组成，例如具有图 14 所示的结构。

在上述抗体的基础上，在另一些方面，本发明人进一步探索并建立了具有不同 Fc 区的本发明抗体的优选实施方案。具有 CD40 激动活性的抗体所面临的一个主要问题是较大的系统性毒副作用和较低的耐受剂量。已经报道，具有 IgG2 同种型的 Selicrelumab 在临床试验中用药剂量超过 0.2mg/kg 时可以在部分患者中引起细胞因子释放综合征和肝脏毒性等毒副作用(WO2023/232036)。据推测，造成此较大毒副作用的原因之一可能来自抗体的 Fc 区。之前的文献 (Xiaojie Yu et al, Isotype Switching Converts Anti-CD40 Antagonism to Agonism to Elicit Potent Antitumor Activity, Cancer Cell. 2020 Jun 8;37(6):850-866.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2020.04.013)提示，具有 IgG2 同种型的 Fc 区具有促进 CD40 抗体的激动活性的潜力，但由于其可以不依赖 Fc-γ 受体而诱导 CD40 的簇集和激活，因此也具有较大的可能在体内诱发非肿瘤特异性的免疫激活，带来更大的毒副作用，从而限制抗体在临床上的可耐受的给药剂量和对应的药效(Xiaojie Yu et al, Cancer Cell. 2020 Jun 8;37(6):850-866.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2020.04.013)。有鉴于此，本发明人考察了不同 Fc 区对本发明双特异性抗体分子的药效和安全性的影响，并提出了有利于本发明抗体的优化 Fc 区设

计。在一些实施方案中，该优化 Fc 区具有 IgG1 同种型并具有导致其与 Fcγ 受体结合活性降低或消除的修饰(例如氨基酸突变或糖基化修饰)。相较于之前文献报道的 IgG2 Fc 区，研究表明，本发明的该优化 Fc 区一方面可以消除抗体 Fc 与 Fcγ 受体的相互作用，另一方面并无 IgG2 带来的 CD40 非特异性激动活性，从而极大地减小了本发明双抗分子的肿瘤外非特异性毒性，提高了其安全性和可耐受剂量以及随之的抗体有效性。因此，在本发明的一些优选实施方案中，本发明提供了具有优化 Fc 区设计的双特异性抗体，其中所述 Fc 区为具有降低或消除 Fcγ 受体结合活性的突变的 IgG1 Fc 区，其中所述突变尤其可以是 LALA 突变(L234A, L235A)。

在本发明抗体分子的药效确认研究中，与抗体分子的潜在临床应用场景相匹配，采用了多种不同冷肿瘤模型，包括 B16F10-hPDL1(Urska Kamensek 等, Bioelectrochemistry 140 (2021) 107831, doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107831)和 KPC-hPDL1 冷肿瘤模型(doi.org/10.3390%2Fcancers13030440), 来测试本发明的双特异性抗体。研究结果表明，本发明抗体在对 PD-1/L1 免疫检查点抑制剂具有耐药性的肿瘤上具有良好的药效功效，是具有广泛的临床应用前景的抗癌候选药物。

以下就本发明双特异性抗体的组件进行详述描述。本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，这些组件的任何技术特征的任何组合均在本发明考虑范畴之中。并且，本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，本发明的抗体(包括任何形式的抗体)可以包含任何这样的组合特征。

抗原结合位点

在研究中，本发明人发现，在一些情况下，将具有高结合亲和力的 PD-L1 抗原位点与在无交联存在下仅具有弱激动活性的 CD40 抗原结合位点组合，可以有利地赋予本发明双特异性抗体在功效和安全性方面的优势。

因此，在根据本发明的一些实施方案中，本发明提供了双特异性抗体，其包含以高亲合力结合 PD-L1 的 PD-L1 抗原结合位点以及在无交联存在下仅具有弱激动活性的 CD40 抗原结合位点。优选地，所述 CD40 抗原结合位点为以 PD-L1 依赖性方式选择性激活 CD40 信号通路的 CD40 抗原结合位点。

在一些实施方案中，所述 PD-L1 抗原结合位点以小于大约 $30x10^{-9}$ M、小于大约 $20x10^{-9}$ M、小于大约 $15\ x10^{-9}$ M、或小于 $10\ x10^{-9}$ M 的 KD 值结合 PD-L1。在一些实施方案中，所述 PD-L1 抗原结合位点以大约 $10x10^{-9}$ M 至 $0.1x10^{-9}$ M 的 KD 值，例如，大约 $9x10^{-9}$ M、大约 $8x10^{-9}$ M、大约 $7x10^{-9}$ M、大约 $6\ x10^{-9}$ M、大约 $5\ x10^{-9}$ M、大约 $4\ x10^{-9}$ M、大约 $3\ x10^{-9}$ M、大约 $2x10^{-9}$ M 或大约 $1\ x10^{-9}$ M 或更小的 KD 值结合 PD-L1。在一些实施方案中，所述 PD-L1 抗原结合位点优选地以大约 $5x10^{-9}$ M 至 $0.5x10^{-9}$ M 的 KD 值，再优选地大约 1nM 至大约 5nM 的 KD 值，结合 PD-L1。在一些实施方案中，使用生物膜层干涉技术测定，例如按照实施例 8 所述，测定所述 KD 值。

在一些实施方案中，所述 CD40 抗原结合位点以 PD-L1 依赖性方式选择性激活 CD40 信号通路，优选地，以 PD-L1 表达细胞不存在与存在下的抗体 EC50 值的比值定义的选择性指数大于 100，例如大于 150、大于 200、大于 300，再例如为大约 300-1000、500-1000、700-1000。在一些实施方案中，使用荧光报告分子测定法，在有和无 PD-L1(高)表达细胞的情况下，例如按照实施例 6 所述，测定所述 EC50 值并计算选择性指数。

在一些实施方案中，所述 PD-L1 抗原结合位点具有人猴 PD-L1 交叉反应性。在另一些实施方案中，所述 CD40 抗原结合位点具有人猴 CD40 交叉反应性。

在一些实施方案中，所述 PD-L1 抗原结合位点由特异性结合 PD-L1 的抗原结合结构域提供，所述抗原结合结构域可以选自，例如但不限于，VHH 结构域、单域抗体、VH/VL 结构域对、Fab 结构域和 scFv 结构域，优选地，所述抗原结合结构域包含或由 VHH 结构域组成。

在一些实施方案中，所述 CD40 抗原结合位点由特异性结合 CD40 的抗原结合结构域提供，所述抗原结合结构域可以选自，例如但不限于，VHH 结构域、单域抗体、VH/VL 结构域对、Fab 结构域和 scFv 结构域，优选地所述抗原结合结构域包含或由 Fab 结构域或 scFv 结构域组成。

在一些实施方案中，所述 PD-L1 抗原结合位点由 VHH 结构域提供；且所述 CD40 抗原结合位点由 Fab

结构域提供。

示例性 PD-L1 抗原结合位点

在本文中，根据本发明的 PD-L1 抗原结合位点也简称作根据本发明的抗 PD-L1 结构域。在根据本发明的双特异性抗体中，在一些实施方案中，优选地，根据本发明的 PD-L1 抗原结合位点由 VHH 结构域(或简称为“抗 PD-L1 VHH 结构域”)提供。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 PD-L1 VHH 结构域包含具有 SEQ ID NOs: 5 或 6 所示氨基酸序列的可变区中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。优选地，所述可变区中的 CDR 序列根据 AbM、Chothia、Kabat、IMGT 或其任意组合进行定义。再优选地，所述 CDR 根据 Kabat 进行定义。但应当明了，所述的 CDR 也可以采用本领域已知的任何其他方式定义。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 PD-L1 VHH 结构域包含 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列，其中

(i)所述 CDR1 包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 所述 CDR2 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或由其组成；

(iii) 所述 CDR3 包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 PD-L1 VHH 结构域包含本发明示例性抗 PD-L1 抗体之任一的 VHH 可变区序列或其变体。例如，所述 VHH 结构域可以具有与所述示例性抗体之一相同的 CDR 序列，以及相同或不同的构架区序列，例如为具有人源化序列的 VHH 结构域。可以在体外或体内测定试验中评估所述 VHH 结构域的 PD-L1 抗原结合性质或其它功能性质的保持或改善情况。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 PD-L1 VHH 结构域包含 SEQ ID NO:5 或 6 的氨基酸序列或由其组成。在再一些实施方案中，所述 VHH 结构域包含与 SEQ ID NO: 5 或 6 的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性并且保留特异性结合 PD-L1 的能力的氨基酸序列。在再一些实施方案中，所述 VHH 结构域包含与 SEQ ID NO: 5 或 6 的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代(例如，保守性取代)并且保留特异性结合 PD-L1 的能力的氨基酸序列。优选地，所述氨基酸的添加、缺失和/或取代不发生在 CDR 区中。

在一些优选的实施方案中，根据本发明的抗 PD-L1 VHH 结构域包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列组成。

示例性 CD40 抗原结合位点

在本文中，根据本发明的 CD40 抗原结合位点也简称作根据本发明的抗 CD40 结构域。在一些实施方案中，优选地，根据本发明的 CD40 抗原结合位点由配对的 VH 结构域和 VL 结构域提供。在一些实施方案中，根据本发明的 CD40 抗原结合位点由 Fab 结构域(或简称为“抗 CD40 Fab 结构域”)或 scFv 结构域(或简称为“抗 CD40 scFv 结构域”)提供。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 CD40 结构域来自抗 CD40 抗体，且优选地包含来自所述抗体的 VH/VL 结构域对。 可用于本发明的抗 CD40 抗体的例子包括，例如但不限于，S2C6 抗体(美国专利号 6,946,129)或其人源化形式(参见例如 WO 2006/128103 和 WO2008/091954)。

在一些实施方案中，所述抗 CD40 抗体具有如下一种或多种或所有性质：

- 与人 CD40 蛋白以及食蟹猕猴 CD40 蛋白的交叉免疫反应性；

- 激活 CD40 信号传导途径。

在一些实施方案中，根据本发明的抗 CD40 结构域包含 VH 和 VL 结构域，其中所述 VH 结构域包含具有 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列的重链可变区中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列；且所述 VL 结构域包含具有 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列的轻链可变区中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列。优选地，所述可变区中的 CDR 序列根据 AbM、Chothia、Kabat、IMGT 或其任意组合进行定义。再优选地，所述 CDR 根据 Kabat 进行定义。但应当明了，所述的 CDR 也可以采用本领域已知的任何其他方式定义。

在一些实施方案中，根据本发明的特异性结合 CD40 的抗原结合位点包含：

(i)包含 SEQ ID NO: 21 或由 SEQ ID NO:21 组成的 HCDR1；

(ii)包含 SEQ ID NO:22 或由 SEQ ID NO: 22 组成的 HCDR2；
(iii)包含 SEQ ID NO: 23 或由 SEQ ID NO: 23 组成的 HCDR3；
(iv)包含 SEQ ID NO: 18 或由 SEQ ID NO: 18 组成的 LCDR1；
(v)包含 SEQ ID NO: 19 或由 SEQ ID NO: 19 组成的 LCDR2；和
(vi)包含 SEQ ID NO: 20 或由 SEQ ID NO: 20 组成的 LCDR3。

在一些实施方案中，根据本发明的 CD40 抗原结合位点包含本发明示例性抗 CD40 抗体之任一的 VH/VL 可变区序列或其变体。例如，所述 CD40 抗原结合位点可以具有与所述示例性抗体之一相同的 CDR 序列以及相同或不同的构架区序列，例如为具有人源化序列的抗 CD40 抗体片段。可以在体外或体内测定试验中评估所述 CD40 抗原结合位点的抗原结合性质或其它功能性质的保持或改善情况。

在一些实施方案中，根据本发明的 CD40 抗原结合位点包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。在一些实施方案中，所述 VH 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列或由其组成。在另一些实施方案中，所述 VH 包含与 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性并且保留特异性结合 CD40 的能力的氨基酸序列。在另一些实施方案中，所述 VH 包含与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代(例如，保守性取代)并且保留特异性结合 CD40 的能力的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸的添加、缺失和/或取代不发生在 CDR 区中。在一些实施方案中，所述 VL 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列或由其组成。在另一些实施方案中，所述 VL 包含与 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性并且保留特异性结合 CD40 的能力的氨基酸序列。在另一些实施方案中，所述 VL 包含与 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代(例如，保守性取代)并且保留特异性结合 CD40 的能力的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸的添加、缺失和/或取代不发生在 CDR 区中。

在一些优选的实施方案中，根据本发明的 CD40 抗原结合位点包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中所述 VH 包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列组成；且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列组成。

免疫球蛋白 Fc 区

在一些实施方案中，本发明双特异性抗体可以包含免疫球蛋白 Fc 区。天然 Fc 区是免疫球蛋白的 C 端恒定结构域，与细胞表面 Fc 受体和补体系统的一些蛋白质相互作用。免疫球蛋白 Fc 区通常包含两个或三个重链恒定结构域(称为 CH2、CH3 和 CH4)以及任选地铰链区，并通常以二聚化形式存在。

用于本发明双特异性抗体的免疫球蛋白 Fc 区可以为来自任何免疫球蛋白的 Fc 区。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 区至少包含免疫球蛋白 CH2 结构域和 CH3 结构域。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 区还包含铰链区或部分铰链区。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 区从 N 端到 C 端包含免疫球蛋白铰链区或部分铰链区、CH2 结构域和 CH3 结构域，或由其组成。在一些情况下，包含铰链区序列的免疫球蛋白 Fc 区是优选的，其可以例如促进抗体多肽链的二聚化。

免疫球蛋白 Fc 区可以融合至其他结构域（即 PD-L1 或 CD40 结合结构域）的 C 或 N 末端。免疫球蛋白 Fc 可以通过连接子融合至其他结构域，或者直接融合至其他结构域。在免疫球蛋白 Fc 区以其 N 端融合其他结构域的实施方案中，优选地，通过免疫球蛋白铰链区序列进行所述融合。在免疫球蛋白 Fc 区以其 C 端融合其他结构域的实施方案中，优选地，通过柔性连接肽（如 SEQ ID NO:30 的连接肽）进行所述融合。

用于本发明双特异性抗体的免疫球蛋白 Fc 区可以为天然 Fc 区序列。或者，所述 Fc 区可以包含相对于天然 Fc 序列的突变。突变包括替换、插入和/或缺失。可以出于引入所需治疗特性的目的而进行此类突变。例如，为了促进异二聚化，可以将 Knob-into-Hole (KiH) 突变引入 CH3 结构域中。在这种情况下，一条 Fc 链被设计为包含一个大的突出残基（即 Knob），而另一条 Fc 链被设计为包含一个互补的口袋（即 Hole）。KiH 突变的合适位置是本领域已知的。示例性 KiH 突变包括，但不限于，Knob 突变 T366W 和

Hole 突变 T366S,L368A,Y407V 组合；和 Knob 突变 T366Y 和 Hole 突变 Y407T 组合。关于具有 KiH 突变的二聚化 Fc 及其在工程化抗体中的应用，可参见例如 Carter P.; Ridgway J.B.B.; Presta L.G.: Immunotechnology，第 2 卷，1996 年 2 月 1 日，pp. 73-73。在本发明双特异性抗体包含不对称双链结构时，优选地 Fc 区包含促进抗体多肽链进行正确异二聚化的 KiH 突变。

用于本发明双特异性抗体的免疫球蛋白 Fc 区可以包含用于在重链与重链之间形成链间二硫键的半胱氨酸残基部分，例如，引入 Fc 区的半胱氨酸残基突变。示例性的半胱氨酸残基突变包括，但不限于，在二聚化 Fc 区的一条 Fc 链上引入 Y359C 突变且在另一条 Fc 链上引入 S354C。

根据抗体或基于抗体的分子的具体应用，用于本发明双特异性抗体的免疫球蛋白 Fc 区可以包含改变效应子功能的突变。例如，在不需要效应子功能的情况下，Fc 区可以包含降低或消除效应子功能的突变。可用的此类突变可参见例如，Ian Wilkinson 等, Fc-engineered antibodies with immune effector functions completely abolished, PLoS ONE 16(12), https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260954。在人类中，已经表征了三种类型的 FcγR，其为：

- FcγRI（CD64），该受体以高亲合力结合单体 IgG 并且在巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸粒细胞上表达。至少在氨基酸残基 E233-G236、P238、D265、N297、A327 和 P329（编号根据 Kabat 的 EU 索引）中的一个上修饰 IgG Fc-区，可以降低与 FcγRI 的结合。

- FcγRII（CD32），该受体以中等至低的亲合力结合复合的 IgG 并且广泛表达。这种受体可以分成两个亚类，FcγRIIA 和 FcγRIIB。FcγRIIA 在许多涉及杀伤活性的细胞（例如，巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞）上表达，并且能够激活杀伤过程。FcγRIIB 在抑制过程中起作用并且发现存在于 B-细胞、巨噬细胞以及肥大细胞和嗜酸性粒细胞上。已经发现，至少在氨基酸残基 E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292 和 K414（编号根据 Kabat 的 EU 索引）的一个上突变 IgG Fc-区，可以降低与 FcγRIIA 的结合。

- FcγRIII（CD16），该受体以中等至低的亲合力结合 IgG 并且以两种形式，FcγRIIIA 和 FcγRIIIB 存在。在 NK 细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞以及一些单核细胞和 T 细胞上发现了 FcγRIIIA，其介导 ADCC。FcγRIIIB 在嗜中性粒细胞上高度表达。已经发现，在氨基酸残基 E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338 和 D376（编号根据 Kabat 的 EU 索引）的至少一个上具有突变的 IgG Fc-区，具有降低的与 FcγRIIIA 的结合。

在一些情况下，优选地，用于本发明双特异性抗体的免疫球蛋白 Fc 区包含降低或消除 Fc 区与 Fcγ 受体结合的突变，例如 Fc 区的 234 和 235 位赖氨酸（L）变成丙氨酸（A）的 LALA 突变。另外地或备选地，可以在 Fc 区中引入突变以增加与 FcRn 的结合和/或去除蛋白酶位点的氨基酸修饰。另外或备选地，可以出于抗体生产原因，对 Fc 区进行突变，例如去除或替换可能发生翻译后修饰（例如糖基化）的氨基酸，以提供治疗性抗体改善的成药性和可开发性。

在一些实施方案中，根据本发明双特异性抗体包含来自 IgG 的 Fc 区。在一些实施方案中，优选地，所述免疫球蛋白 Fc 区具有 IgG1 同种型或其亚型。在一些实施方案中，优选地，所述免疫球蛋白 Fc 区包含来自人的 Fc 区序列。可用于本发明抗体的该 Fc 区序列包括，但不限于，选自 SEQ ID NOs: 25-27 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，根据本发明双特异性抗体包含二聚化 Fc 区，其中所述二聚化 Fc 区由第一和第二 Fc 区组成。在一些实施方案中，第一和第二 Fc 区之一或两者均包含降低或消除与 Fcγ 受体结合的突变，优选地，L234AL235A 突变(根据 Kabat EU 索引编号)。

在一些优选实施方案中，第一和第二 Fc 区相同。在一些实施方案中，所述第一和第二 Fc 区具有 IgG1 同种型。

在另一些优选实施方案中，第一和第二 Fc 区互不同。在一些实施方案中，所述第一和第二 Fc 区包含 KiH 突变，以及任选地用于在第一和第二 Fc 区之间形成链间二硫键的半胱氨酸残基突变。在一些实施方案中，所述 KiH 突变为 Knob 突变 T366W 和 Hole 突变 T366S,L368A,Y407V 的组合(根据 Kabat EU 索引编号)。在一些优选实施方案中，所述第一和第二 Fc 区彼此独立地包含选自以下的突变组合：(a) T366W；

和(b) T366S,L368A,Y407V。在另一些优选实施方案中，所述第一和第二 Fc 区彼此独立地包含选自以下的突变组合：(a) S354C 和 T366W；和(b) Y349C 和 T366S,L368A,Y407V。在另一些优选实施方案中，所述第一和第二 Fc 区彼此独立地包含选自以下的突变组合：(a) S354C 和 T366W 以及 L234AL235A；和(b) Y349C 和 T366S,L368A,Y407V 以及 L234AL235A 突变。在一些实施方案中，所述第一和第二 Fc 区具有 IgG1 同种型。

在一些实施方案中，根据本发明双特异性抗体包含由两个不同的 Fc 结构域形成的二聚化 Fc 区，其中第一 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，且第二 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列；优选地第一 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列且第二 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列。优选地，所述双特异性抗体为具有不对称结构的三价双特异性抗体，尤其是图 14 所示结构的三价双特异性抗体。

在另一些实施方案中，根据本发明双特异性抗体包含由两个相同的 Fc 结构域形成的二聚化 Fc 区，其中所述 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列。优选地，所述双特异性抗体为对称结构，例如“2+2 型”四价双特异性抗体。

连接肽

在根据本发明的双特异抗体中，抗体组件（即，抗原结合结构域和可选地免疫球蛋白 Fc 区）之间可以采用连接肽进行连接。

可以用于本发明抗体中的连接肽并无特定限制。连接肽序列通常具有柔性。其可以主要由甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸等不具有可能限制灵活性的大侧链的氨基酸组成。 或者，其可以由来自免疫球蛋白铰链区的序列组成。根据连接位置和待连接的组件，本领域技术人员可以容易地确定可用的连接肽的序列或最佳长度。

适宜的连接肽长度可以为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个氨基酸长度，或者更长。在一些情况下，连接肽序列的长度可以较短，例如小于约 20 个或 15 个氨基酸长度，例如 2-15 个氨基酸长度或 5-10 个氨基酸长度。

适宜的连接肽序列包含但不限于，G4S (SEQ ID NO: 32)；(G4S)2 (SEQ ID NO: 33)；(G4S)3 (SEQ ID NO: 34)；GGGSG (SEQ ID NO: 35)；GGSGG (SEQ ID NO: 36)；GSGGG (SEQ ID NO: 37)；GSGGGP (SEQ ID NO: 38)；GGEPS (SEQ ID NO: 39)；GGEGGGP (SEQ ID NO: 40)和 GGEGGGSEGGGS (SEQ ID NO: 41)；以及(G4S)n (SEQ ID NO: 42)，其中 n 是等于或大于 1 的整数； TS(G4S)n (SEQ ID NO: 43)，其中 n 是等于或大于 1 的整数；G(G4S)n (SEQ ID NO: 44)，其中 n 是等于或大于 1 的整数；(G4)n (SEQ ID NO: 45)，其中 n 是等于或大于 1 的整数；(GRPGS)n (SEQ ID NO: 46)，其中 n 是等于或大于 1 的整数。可以用于本发明抗体分子的连接肽还可以是，例如但不限于，如下氨基酸序列：(G3S)2 (SEQ ID NO: 47)、(G4S)2 (SEQ ID NO: 48)、(G3S)3 (SEQ ID NO: 49)、(G4S)3 (SEQ ID NO: 50)、(G3S)4 (SEQ ID NO: 51)、(G4S)4 (SEQ ID NO: 52)、(G3S)5 (SEQ ID NO: 53)、(G4S)5 (SEQ ID NO: 54)、(G3S)6 (SEQ ID NO: 55)、(G4S) (SEQ ID NO: 56)、GGG (SEQ ID NO: 57)、DGGGS (SEQ ID NO: 58)、TGEKP (SEQ ID NO: 59)、GGRR (SEQ ID NO: 60)、EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 61)、 KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 62)、GGRRGGGS (SEQ ID NO: 63)、LRQRDGERP (SEQ ID NO: 64)、LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO: 65)和 GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 66)。或者，可以使用计算机程序模拟蛋白和肽的三维结构，或通过噬菌体展示方法，来合理地设计合适的柔性连接肽。

在一些实施方案中，用于本发明抗体中的连接肽为 5-50 个氨基酸的柔性连接肽，优选地包含甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T)的连接肽。在一个实施方案中，所述连接肽具有 5-50 个氨基酸长度，例如，5、10、15、20、25 或 30 个氨基酸长度，或具有落入任何两个整数之间的氨基酸长度。在一些实施方案中，连接肽包含氨基酸序列(G)n，其中 n 是等于或大于 5 的整数，例如，n 是 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 的整数。在再一些实施方案中，连接肽为来自免疫球蛋白的铰链区。

在一些优选实施方案中，根据本发明的双特异性抗体包含具有 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列的连接肽。在一些实施方案中，所述连接肽用于将根据本发明的抗 PD-L1 VHH 结构域缀合至 Fc 区的 C 末端，更优选地，缀合至包含 Fc 区的根据本发明的抗 CD40 全长抗体的一条或两条(优选一条)重链的 C 末端。

双特异性抗体的形式

根据本发明的双特异性抗体可以采用任何适宜的形式，例如单链、双链、三链或四链，对称或不对称形式。优选地，根据本发明的双特异性抗体为每个分子包含 2 个 PD-L1 结合位点和 2 个 CD40 结合位点的 2+2 型抗体。更优选地，根据本发明的双特异性抗体为每个分子包含 1 个 PD-L1 结合位点和 2 个 CD40 结合位点的 2+1 型抗体。在一些实施方案中，根据本发明的双特异性抗体还包含 Fc 区。

在一些实施方案中，本发明提供了双特异性抗体，其包含：

(a)一个抗 CD40 全长抗体，所述全长抗体包含一个二聚化 Fc 区和与之连接的两个根据本发明的 CD40 抗原结合位点；和

(b)一个或两个(优选一个)根据本发明的 PD-L1 抗原结合位点，

其中所述 PD-L1 抗原结合位点，任选地通过连接肽，缀合在所述全长抗体上，

优选地所述 CD40 抗原结合位点连接在所述二聚化 Fc 区的 N 末端，且所述 PD-L1 抗原结合位点连接在所述二聚化 Fc 区的 C 末端，

更优选地，所述 CD40 抗原结合位点选自 Fab、VH/VL 对、scFab、scFv 和 crossFab，优选地为 Fab 或 scFv 结构域，更优选地为 Fab 结构域；且所述 PD-L1 抗原结合位点为 VHH 结构域。

在一些优选的实施方案中，所述全长抗体包含两条重链，所述抗 PD-L1 VHH 结构域融合在所述全长抗体的一条重链的 C 末端。在一个实施方案中

a）与抗 PD-L1 VHH 结构域融合的全长抗体重链具有三肽 LSP 作为 C-末端氨基酸残基，其中其脯氨酸经由连接肽与所述 VHH 结构域融合，且

b）没有与所述 VHH 结构域融合的全长抗体重链具有三肽 LSP 或 SPG 或 PGK 作为 C-末端氨基酸残基。

示例性双特异性抗体

在一些方面，本发明提供了双特异性抗体，其包含第一、第二和第三多肽链，其中，

-所述第一多肽链从 N 端至 C 端包含 VH 结构域、CH1 结构域、Fc 区、连接肽和 VHH 结构域；

-所述第二多肽链从 N 端至 C 端包含 VH 结构域、CH1 结构域和 Fc 区；

-所述第三多肽链从 N 端至 C 端包含 VL 结构域和 CL 结构域；

其中所述 VHH 结构域特异性结合 PD-L1，且其中所述 VH 结构域与所述 VL 结构域配对并特异性结合 CD40。优选地，所述 VHH 结构域为根据本发明的抗 PD-L1 结构域，且所述 VH 与所述 VL 结构域配对为根据本发明的抗 CD40 结构域。

在一些实施方案中，所述 VH 结构域包含分别具有 SEQ ID NOs: 21、22 和 23 所示的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 结构域包含分别具有 SEQ ID NOs: 18、19 和 20 所示的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，

优选地，所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 17 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 17 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列；且

所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 16 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 16 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列；

最优选地，所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，且所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述VHH结构域包含分别具有SEQ ID NOs: 2、3和4所示氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3。优选地，所述VHH结构域包含SEQ ID NO: 5或6所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO: 5或6具有至少80%、85%、90%、95%或99%同一性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO：5或6相比具有一个或多个(优选地1-10个，更优选地1-5个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。最优选地，所述VHH结构域包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列，或由SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述CH1结构域为人IgG CH1结构域。在一些实施方案中，所述CH1结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列或与其具有至少80%、85%、90%、95%或99%同一性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO：29相比具有一个或多个(优选地1-10个，更优选地1-5个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。最优选地，所述CH1结构域包含SEQ ID NO: 29的氨基酸序列，或由SEQ ID NO: 29所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述CL结构域为人免疫球蛋白kappa或lamda轻链恒定结构域。在一些实施方案中，所述CL结构域包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列或与其具有至少80%、85%、90%、95%或99%同一性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO：24相比具有一个或多个(优选地1-10个，更优选地1-5个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。最优选地，所述CH1结构域包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列，或由SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述第一多肽链和所述第二多肽链的Fc区分别包含促进所述第一和所述第二多肽链异二聚化的Knob突变和Hole突变，以及任选地用于在所述第一和所述第二多肽链之间形成链间二硫键的半胱氨酸残基突变。在一些实施方案中，所述knob突变为T366W；且所述Hole突变为T366S, L368A, Y407V。在一些实施方案中，所述半胱氨酸残基突变为引入第一多肽链Fc区中的Y349C和引入第二多肽链Fc区中的S354C，或为引入第一多肽链Fc区中的S354C和引入第二多肽链Fc区中的Y349C。再优选地，第一和第二多肽链的Fc区分别独立地包含选自以下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 25或与其至少95%同一性的氨基酸序列以及SEQ ID NO: 26或与其至少95%同一性的氨基酸序列。更优选地，第一多肽链的Fc区包含SEQ ID NO: 25的氨基酸序列且第二多肽链的Fc区包含SEQ ID NO: 26的氨基酸序列；或反之亦然。

再优选地，其中所述双特异性抗体包含第一、第二和第三多肽链，其中：

第一多肽链包含SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列；

第二多肽链包含SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列；且

第三多肽链包含SEQ ID NO: 7所示的氨基酸序列与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

再优选地，所述双特异性抗体包含分别具有SEQ ID NOs: 9、8和7所示的氨基酸序列第一、第二和第三多肽链。最优选地，所述双特异性抗体为由一条第一多肽链、一条第二多肽链和两条轻链组成的三价双特异性抗体。

在另一些方面，本发明提供了双特异性抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含第一和第二多肽链，其中：

-所述第一多肽链从N端至C端包含VH结构域、CH1结构域、Fc区、连接肽和VHH结构域；

-所述第二多肽链从N端至C端包含VL结构域和CL结构域；

其中所述VHH结构域特异性结合PD-L1，且其中所述VH结构域与所述VL结构域配对并特异性结合CD40。优选地，所述VHH结构域为根据本发明的抗PD-L1结构域，且所述VH与所述VL结构域配对为根据本发明的抗CD40结构域。

在一些实施方案中，所述VH结构域包含分别具有SEQ ID NOs: 21、22和23所示的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3，所述VL结构域包含分别具有SEQ ID NOs: 18、19和20所示的氨基酸序列

的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，

优选地，所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 17 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 17 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列；且

所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 16 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 16 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列；

最优选地，所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，且所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述 VHH 结构域包含分别具有 SEQ ID NOs: 2、3 和 4 所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3。优选地，所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO: 5 或 6 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 5 或 6 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：5 或 6 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。最优选地，所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述 CH1 结构域为人 IgG CH1 结构域。在一些实施方案中，所述 CH1 结构域包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列或与其具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：29 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。最优选地，所述 CH1 结构域包含 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述 CL 结构域为人免疫球蛋白 kappa 或 lamda 轻链恒定结构域。在一些实施方案中，所述 CL 结构域包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列或与其具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：24 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。最优选地，所述 CH1 结构域包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述第一多肽链的 Fc 区包含与 SEQ ID NO: 27 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：27 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。最优选地，所述 Fc 区包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，优选地，所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；且

第二多肽链包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

再优选地，所述双特异性抗体包含分别具有 SEQ ID NOs: 11 和 10 所示的氨基酸序列的第一和第二多肽链。最优选地，所述双特异性抗体由两条第一多肽链和两条条第二多肽链装配成四价双特异性抗体。

本发明抗体的性质

本发明双特异性抗体可以具有以下一个或多个性质：

（i）以高亲和力与表达 PD-L1 的细胞(优选肿瘤细胞或抗原呈递细胞，如 DC 细胞)结合；

（ii）具有与食蟹猴 PD-L1 的物种交叉反应性；

（iii）具有与食蟹猴 CD40 的物种交叉反应性；以及

（iv）能够依赖 PD-L1 选择性激活 CD40 信号通路和激活 DC 细胞。

在一些方面，根据本发明的双特异性抗体，通过 PD-L1 结合位点作为抗体实现交联的媒介，赋予抗体在 PD-L1 表达细胞存在下选择性激活 CD40 表达细胞（例如 DC 细胞）的能力。本发明抗体的该选择性特征可以允许降低抗体在正常组织中诱导 CD40 激活和由此引发毒副作用的可能性。与此同时，毒副作用

的降低可以增加本发明抗体在人体中的可耐受给药剂量。给药剂量的增加可以带来血液中抗体浓度的提升，及其在肿瘤微环境中的富集，从而增强抗体的药效。

在另一些方面，根据本发明的双特异性抗体，通过去除 Fc 区与 Fcγ 受体的结合，降低了 Fc 区介导的效应子功能如 ADCC 和 CDC，由此可以避免所述效应子功能对抗体靶向结合的抗原呈递细胞(如 DC 细胞)的杀伤作用，增强抗体的药效。

在再一些方面，根据本发明的抗体通过独特的 2+1 型设计，采用单价 PD-L1 结合位点作为锚定位点，不仅相比采用二价 PD-L1 结合位点的设计，可以实现对靶肿瘤组织中 PD-L1 的最大可能利用，且可以降低抗体的 PD-L1 结合亲合力(avidity)，从而减少抗体对具有低 PD-L1 表达水平的正常组织细胞的结合，增加抗体选择性结合肿瘤环境中 PD-L1 高表达细胞的能力，利于抗体在肿瘤微环境中的富集，促进抗体的安全性和药效。

II. 本发明的抗 PD-L1 抗体

在第二方面，本发明提供了抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，其包含特异性结合 PD-L1 的 VHH 结构域，且其中所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO:5 或 6 中所含的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列；

优选地，所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列分别包含 SEQ ID NOs:2, 3 和 4 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO: 5 或 6 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 5 或 6 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：5 或 6 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列组成。

根据本发明的抗 PD-L1 抗体可以具有任何适宜的抗体结构，包括，但不限于，单链抗体或多链抗体、单特异性或多特异性抗体（例如双特异性抗体）、线性抗体、单域抗体、重链抗体、嵌合抗体或人源化抗体。在一些实施方案中，根据本发明的抗 PD-L1 抗体包含与所述 VHH 结构域连接的免疫球蛋白 Fc 区（即，具有 VHH-Fc 形式）。在一些实施方案中，根据本发明的抗 PD-L1 抗体是重链抗体。在本文中，术语“重链抗体(heavy-chain antibody, hcAb)”是指不具有轻链的抗体，从 N 端到 C 端可以包含 VHH-CH2-CH3，或可以包含 VHH-CH1-CH2-CH3；其可以构成同型二聚体，例如不具有轻链的重链二聚体抗体。

根据本发明的抗 PD-L1 抗体的 VHH 结构域具有良好的肿瘤靶向性，并具有人猴物种免疫交叉反应性。因此根据本发明的抗 PD-L1 抗体或其 VHH 结构域可作为缀合物或偶联物的靶向模块，并缀合或偶联诸如化疗剂，毒素，药物（如免疫治疗剂），放射性元素，探针或信号分子等，以提供更好的肿瘤杀伤、免疫调节或疾病检测等应用。

III. 本发明抗体的生产和纯化

在第三方面，本发明提供用于生产本发明抗体的方法。为了产生本发明的抗体，可以例如通过固态肽合成(例如 Merrifield 固相合成)或重组生产获得本发明的抗体的多肽链，并在适宜条件下使其装配。

为了重组生产，可以将编码所述抗体的任意一条多肽链和/或多条多肽链的多核苷酸分离并插入一个或多个载体中以便进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。使用常规方法，可以轻易地分离所述多核苷酸并将其测序。在一个实施方案中，提供了编码本发明抗体的一条或多条多肽链的多核苷酸。在再一实施方案中，本发明提供了包含本发明的一种或多种多核苷酸的载体，优选地表达载体。因此，在一个实施方案中，本发明提供用于生产本发明抗体的方法，所述方法包括：在适于表达所述抗体的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞；和任选地在适于所述多肽链装配为所述抗体的条件下使多肽链装配产生所述抗体。

可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。表达载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

在一个实施方案中，本发明也提供了包含一种或多种本发明多核苷酸的宿主细胞。在一些实施方案

中，提供了包含本发明表达载体的宿主细胞。合适的宿主细胞包括原核微生物，如大肠杆菌，真核微生物如丝状真菌或酵母，或各种真核细胞，如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、昆虫细胞等。可以使用适于悬浮培养的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)、人胚肾系(HEK293 或 293F 细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝脏细胞(HepG2)、CHO 细胞、NSO 细胞、骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0 等。在一个优选的实施方案中，所述宿主细胞是 CHO 或 HEK293 细胞。

通过本文所述方法制备的抗体，可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。在纯化后，可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗体的纯度，所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。可以通过本领域已知的多种测定法，鉴定、筛选或表征本文提供的抗体的物理/化学特性和/或生物学活性。

在一个优选的实施方案中，本发明抗体在哺乳动物宿主细胞例如 CHO 细胞中重组生产时表现出良好的生产性质，尤其是，良好的表达产量和良好的副产物谱。

IV．免疫融合物和免疫缀合物

在第四方面，本发明提供通过将本发明抗体融合或缀合于异源分子而产生的免疫融合物或免疫缀合物。

在一个实施方案中，在免疫融合物中，本发明的抗体(或其抗原结合片段)与异源肽或多肽分子直接或通过氨基酸接头连接。可以提及的异源肽或多肽包括但不限于，赋予该融合物另一功能活性的蛋白或多肽、或利于免疫融合物纯化或检测的标签肽。

在一个实施方案中，在免疫缀合物中，本发明的抗体(或其抗原结合片段)与治疗剂或诊断剂或可检测剂缀合。在缀合物中，可以使用接头来共价连接缀合物的不同实体。适宜的接头包括化学接头或肽接头。有利地的是，接头是利于多肽在递送至靶位点后释放的“可裂解接头”。例如，可以使用酸不稳定性接头、肽酶敏感性接头、光不稳定性接头、二甲基接头或含二硫化物的接头。

在与治疗剂缀合的实施方案中，适用于缀合物的治疗剂包括但不限于细胞毒素（例如细胞生长抑制剂或细胞杀伤剂），药物或放射性同位素。

在与诊断剂或可检测剂缀合的实施方案中，这类缀合物可以作为临床检验方法的部分(如确定特定疗法的效力)，用于监测或预测疾病或病症的发作、形成、进展和/或严重性。可以通过将抗体与可检测剂偶联实现这类诊断和检测，所述可检测剂包括但不限于多种酶，例如辣根过氧化物酶；辅基，例如链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素；荧光物质；发光物质；放射性物质；和用于各种正电子发射成像术中的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

V. 药物组合物、药物联合和试剂盒

在第五方面，本发明提供了组合物，例如，药物组合物，所述组合物包含与可药用载体配制在一起的本发明抗体或本发明免疫缀合物或免疫融合物。如本文所用，“可药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。本发明的药物组合物适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、直肠、脊髓或表皮施用(例如，通过注射或输注)。在一些实施方案中，本发明抗体或本发明免疫缀合物或免疫融合物是药物组合物中的唯一活性成分。在另一些实施方案中，药物组合物可以包含本发明抗体或本发明免疫缀合物或免疫融合物与一种或多种其他治疗剂。

在另一方面，本发明也提供包含本文所述的抗体或本发明免疫缀合物或免疫融合物与一种或多种其他治疗剂的药物联合。

适用于本发明的药物组合物和药物联合中的其他治疗剂可以为选自以下类别(i)-(iv)中任一类别的治疗剂：(i)增强抗原呈递(例如，肿瘤抗原呈递)的药物；(ii)增强效应细胞反应(例如，B 细胞和/或 T 细胞活化和/或动员)的药物；(iii)减少免疫抑制的药物；和(iv)具有抑制肿瘤作用的药物。

本发明的药物组合物可以包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明所述抗体或本发明免疫缀合物或免疫融合物。“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量等变动治疗有效量。治疗有效量是任何有毒或有害作用不及治疗有益作用的量。相对于未治疗的受试者，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤生长率)至少约 20%、更优选地至少约 40%、甚至更优选地至少约 60%和进一步更优选地至少约 80%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价本发明的抗体抑制可度量参数(例如，肿瘤体积)的能力。“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在受试者中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量小于治疗有效量。

包含本文所述抗体的试剂盒也处于本发明的范围内。试剂盒可以包含一个或多个其他要素，例如包括：使用说明书；其他试剂，例如标记物或用于偶联的试剂；可药用载体；和用于施用至受试者的装置或其他材料。

VI. 用途和方法

在第六方面，基于本发明抗体或本发明免疫缀合物或融合物对于肿瘤细胞以及肿瘤微环境细胞的良好靶向性以及上述其他优良性质，本发明也提供了本发明抗体或本发明免疫缀合物或融合物在肿瘤治疗和预防中的应用和方法。在所述应用中，本发明的抗体或抗原结合片段、或本发明的免疫缀合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物，可以作为唯一活性剂施用于受试者，或可以与其它疗法或治疗剂联合施用于受试者。所述的其它疗法和治疗剂包括，例如，靶向肿瘤细胞表面的抗原，通过结合和/或阻断这些分子而消灭肿瘤的药物；激活受试者的免疫系统，促使其自发消灭肿瘤的药物。

在再一个方面，本发明也提供了在受试者中预防或治疗肿瘤的方法，包括向有需要的受试者施用本发明的抗体或其抗原结合片段，或向有需要的受试者施用本发明的免疫缀合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物。

适用于本发明方法和应用的肿瘤可以是各种实体瘤和血液瘤。适用于本发明方法和应用的肿瘤可以是处于早期、中期或晚期或是转移性的癌。此外，适用于本发明方法和应用的肿瘤可以是先前接受过治疗而发生免疫逃逸的肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤为抗 PD-1 或 PD-L1 抑制剂耐药性肿瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为具有较少 T 细胞浸润的冷肿瘤。对 PD-1 或 PD-L1 抑制剂耐药性肿瘤（所谓的“冷肿瘤”）的研究发现，肿瘤的耐药性在很多程度上与浸润肿瘤 T 细胞的数量和质量相关。对于一些此类肿瘤中 PD-L1 表达分析显示，尽管肿瘤微环境中具有较少的免疫细胞浸润，但部分肿瘤细胞可以表现出中等水平的 PD-L1 表达，且肿瘤微环境中的 DC 和巨噬细胞可以表现出非常高水平的 PD-L1 表达。因此，预计通过激活肿瘤微环境中 DC 和/或巨噬细胞，进一步刺激 T 细胞浸润肿瘤和 T 细胞的抗肿瘤功能，将有利于克服此类肿瘤的耐药性。参见例如，Rafael Winograd 等，Induction of T-cell immunity overcomes complete resistance to PD-1 and CTLA-4 blockade and improves survival in pancreatic carcinoma, Cancer Immunol Res. 2015 Apr; 3(4): 399–411，doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0215。Haidong Tang 等，Facilitating T cell infiltration in tumor microenvironment overcomes resistance to PD-L1 blockade，Cancer Cell. 2016 March 14; 29(3): 285–296. doi:10.1016/j.ccell.2016.02.004。

在一些实施方案中，根据本发明方法治疗的肿瘤具有至少 1%、 2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、99%、100%的PD-L1 阳性细胞，或其 CPS 评分为 1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、95、99、100。可以通过免疫组织化学，评估肿瘤及肿瘤微环境活检物上 PD-L1 的表达水平。可以参考 Karina Kulangara 等(Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer, Arch Pathol Lab Med (2019) 143 (3): 330–337, https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0043-OA)中描述的方法，确定肿瘤的 CPS 评分。在一些实施方案中，本发明方法在所述癌症中的应用，诱导肿瘤消退。在一些实施方案中，本发明方法在所述癌症中的应用，导致肿瘤生长抑制。

在本发明方法的上述任何一个实施方案中，根据本发明的抗体或其结合片段和根据本发明的免疫缀

合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物的施用，可以包括 1)治疗性措施，该措施治愈、减缓、减轻经诊断的病理状况或疾患的症状及/或停止该经诊断的病理状况或疾患的进展；或 2)预防性或防范性措施，该措施预防及/或减缓病理状况或疾患的发展。因此，在本发明的方法中，受试者可以是，已罹患疾患的个体、易于罹患疾患的个体，或欲预防疾患的个体。所述个体将受益于所述的治疗性措施或预防性措施，并相比于未接受所述处理的个体，表现出在疾病、病症、病状、和/或症状的发生、复发或发展上的减轻或改善。在一些实施方案中，本发明涉及疾病或病症的治疗；在另一些实施方案中，本发明涉及疾病或病症的预防。

根据本发明的抗体或其结合片段和根据本发明的免疫缀合物或其可药用盐或溶剂化物，以及任选地与之联用的其他治疗剂，可以通过任何合适的方法给药，包括肠胃外给药，肿瘤内给药和鼻内给药。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。本文中涵盖各种用药时程，包括，但不限于，单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病，根据本发明的抗体或其结合片段和根据本发明的免疫缀合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)，将取决于待治疗疾病的类型、所用药物的具体类型、疾病的严重性和进程、所述药物是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答，和主治医师的判断力。

在一些实施方案中，本发明也提供本发明的免疫缀合物或偶联物或其可药用盐或溶剂化物以及本发明的抗体或抗体片段用作药物或用于制备药物的用途。在一些实施方案中，所述药物为用于前述治疗和预防方法的药物。

上文以及整个本申请中所描述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以举例说明为目的，不应理解为构成任何限制。

实施例

实施例 1. PD-L1 噬菌体展示库的制备和淘选

1.1 选取健康成年羊驼(成都阿帕克公司)2 只，将人 PD-L1 胞外段（UniProtKB 登录号 Q9NZQ7, Phe19-Arg238）重组蛋白（CST 公司，产品货号: 71391S）与弗氏佐剂按 1:1 比例混匀，皮下多点注射免疫羊驼，共免疫五次，免疫间隔为 2-3 周。

1.2 采集第三四五次免疫后的羊驼外周血，分离淋巴细胞，加入 Trizol 试剂(Thermo 公司)抽提总 RNA。将抽取的 RNA 使用 PrimeScript 逆转录试剂盒（Takara 公司）进行反转录。以 cDNA 为模板进行 PCR 反应，扩增出抗体片段。将噬菌体展示载体和 PCR 产物进行双酶切，酶切产物按比例混合加入 T4 连接酶（Thermo 公司）进行连接反应，连接产物电转化 TG1 感受态细胞，构建 VHH 抗体免疫文库。

取上述文库菌液接种并培养至对数生长期，加入 M13KO7 辅助噬菌体进行感染，制备成噬菌体展示文库。

1.3 重组噬菌体使用生物素标记抗原 PD-L1-His（ACRO 公司，产品货号: PD1-H82E5-200UG）进行 2 轮淘选实验。每轮淘选，洗脱后的重组噬菌体，侵染对数生长期 TG1 细胞，制备成噬菌体文库进行下一轮的淘选。与此同时，将每一轮侵染后菌液梯度稀释后涂布在平板上使之在平板上形成单克隆，用于 Binding ELISA 检测。

1.4 Binding ELISA 检测结合活性。

取 1.3 中的单克隆平板，挑取单克隆用 IPTG 进行诱导表达，取诱导表达后的上清进行 binding ELISA 检测。使用 Human PD-L1 抗原（ACRO 公司，产品货号: PD1-H5258-1MG）包被 96 孔 ELISA 板，每孔中加入 80μL 封闭剂和 20μL 细菌表达上清，室温孵育 1 小时。PBST 洗 3 遍，加入封闭剂稀释的 Anti-Flag/HRP 二抗，室温孵育 1 小时。PBST 洗涤后，加入 TMB 显色液，避光显色，终止液终止反应后，酶标仪读数，测定 OD450nm 吸光值，读值大于 0.1 的细菌克隆为阳性克隆，进行阻断功能筛选。

实施例 2. PD-L1 VHH 阻断抗体的筛选

2.1 Blocking ELISA 筛选 PD-L1 阳性克隆

取 Human PD-L1 FC（ACRO 公司，产品货号: PD1-H5258-1MG）抗原用 PBS 缓冲液稀释并包被在 96 孔 ELISA 板。在封闭后的 96 孔板中加入 80μL 封闭剂稀释的 biotin 标记的 PD-1 和 20μL 稀释后的细菌表达上清，室温孵育 1 小时。 PBST 洗 3 遍，加入封闭剂稀释的 HRP avidin 二抗（Thermo 公司，产品货号: 21126），室温孵育 1 小时。PBST 洗涤后，加入 TMB 显色液避光显色，终止液终止，酶标仪读数，测定 OD450nm 吸光值，读值小于 0.15 的细菌克隆视为有阻断功能的克隆。

2.2 reporter assay 筛选 PD-L1 阳性克隆

采用之前文献(Liu, C.等, Small molecule inhibitors against PD-1/PD-L1 immune checkpoints and current methodologies for their development: a review. Cancer Cell Int 21, 239 (2021). https://doi.org/10.1186/s12935-021-01946-4) 中描述的类似方法，进行报告分子测定试验。简言之，使用 PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay 试剂盒(Promega, J1252)，按照厂商说明书，在 96 孔培养板中铺 PD-L1 αAPC 细胞(重组表达 PD-L1 的人工抗原呈递细胞)，培养过夜，在孔板中加入稀释后的细菌上清和 PD-1 效应细胞(稳定表达人 PD-1 和 NFAT-RE-萤光素酶报告分子的 Jurkat 细胞)，培养 6h，在孔板中加入显色底物，室温孵育，多功能酶标仪测定发光值。

将在 blocking ELISA 和 reporter assay 中筛选到的有阻断功能的细菌克隆送供应商进行测序。

实施例 3. VHH 候选抗体的真核表达和纯化

利用分子生物学技术，将从实施例 2 中获得的有阻断功能的抗 PD-L1 VHH 抗体序列，利用 PCR 方式扩增并插入到真核表达载体中，转染 HEK-293，进行表达并纯化，最终获得 VHH-His 重组抗体。

将纯化后抗体用实施例 2 描述的 Blocking ELISA 和 reporter assay 进行筛选，最终获得了 1 个可以阻断 PD-1&PD-L1 结合的 lead 分子。

本发明获得的该抗 PD-L1 VHH 抗体（LA03C06）的全长碱基序列和氨基酸序列，以及序列编号请参见后附序列列表。

实施例 4. 生物膜薄层干涉技术测定本发明的 VHH 抗体与抗原的结合动力学

采用生物膜薄层干涉测定技术(ForteBio)测定本发明抗 PD-L1 VHH 抗体结合人或猴 PD-L1 的平衡解离常数（KD）。ForteBio 亲和力测定按照现有的方法（Estep, P 等人，High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 页）进行。实验开始前半个小时，根据样品数量，取合适数量的 AHC(18-5060, Sartorius)传感器浸泡于 SD buffer(PBS 1×，BSA 0.1%，Tween 20 0.05%)中。取 100μl 的 SD 缓冲液、抗体、抗原分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板(Greiner，675076)中。根据样品位置布板，选择传感器位置。仪器设置参数如下：运行步骤：Baseline 120 s、Loading～1nm、Baseline 120 s、Association 100 s 和 Dissociation 120 s, 转速为 1000rpm，温度为 30℃。使用 ForteBio 分析软件分析 KD 值。

测定抗体的亲和力如表 1 所示：

表 1. ForteBio 检测 PD-L1 抗原抗体单价结合的亲和力常数（平衡解离常数）

	Affinity					
Clone ID	Human PD-L1 FC			Cyno PD-L1 FC		
	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
LA03C06	1.19E-10	1.68E+06	2.00E-04	1.11E-10	1.81E+06	2.00E-04
NB-His*	4.63E-09	1.91E+06	8.86E-03	4.73E-09	2.10E+06	9.94E-03

*对照分子 NB 来自专利 CN107686520A，具有 SEQ ID NO: 31 的 VHH 序列。

实施例 5. PD-L1 VHH 抗体人源化和双特异性抗体蛋白表达纯化

1、PD-L1 VHH 抗体的人源化

基于 Discovery Studio 及 PyMOL 软件，将免疫羊驼筛选得到的纳米抗体 LA03C06，经过以下步骤进行人源化设计：

（1）确定纳米抗体的 CDR 区；

（2）在人种系序列数据库筛选与 V / J 区域最接近的同源序列；

（3）将纳米抗体的 CDR 区构建至人的骨架区上；

（4）基于序列和结构特征，确定骨架区中起到维持 CDR 功能的氨基酸位置，在确定为重要的序列位置进行回复突变；

（5）合成序列，制备单域 VHH-His 抗体之后，采用生物膜薄层干涉测定技术（BLI） 测定人源化分子与人 PD-L1 的亲和力。

根据表 2 亲和力数据可以得出，人源化后 hz03C06.g6 分子保持了与驼源单域抗体相当的亲和力。嵌合抗体及人源化的 hz03C06.g6 分子的氨基酸序列参见表 2。

表 2. ForteBio 检测抗原抗体单价结合的亲和力常数(M)

抗体	人 PD-L1		
	KD(M)	Kon(1/Ms)	Kdis(1/s)
LA03C06	4.31E-10	1.33E+06	5.73E-04
hz03C06.g6	3.45E-10	1.87E+06	6.46E-04

2、双特异性抗体蛋白制备：

合成编码双特异性抗体序列的 DNA，并插入表达质粒 pcDNA3.1 中，以构建分别表达 2+1 型双特异性抗体 Dace-hz03C06.g6-2+1 (SEQ ID NOs: 7-9)和 Dace-hz03C06.g6-2+2 型双特异性抗体(SEQ ID NOs: 10 和 11)的轻链质粒和重链质粒。同时也构建表达对照抗 PD-L1 单抗 Atezolizumab (SEQ ID NOs: 12-13)和抗 CD40 单抗 Selicrelumab (SEQ ID NOs: 14-15)的轻链质粒和重链质粒。

用 Expi293F 培养基(Gibco，REF# A14351-01)培养 Expi293F 细胞(购自 Gibco)，转染前一天检测细胞密度（活力需大于 95%），并用新鲜的 Expi293F 培养基调整到 3×10^6 个细胞/ml 继续培养，转染当天将细胞密度调整为 3×10^6 个细胞/ml。

取 1/10 转染终体积的 Opti-MEM 培养基（Gibco，REF# 31985-070）作为转染缓冲液，按照 1mg/L 的比例加入待转染的 DNA，其中 2+1 型抗体分子的轻重链比例为 2:1:1、其余抗体的轻重链质粒配比为 1:1，混匀，按照 DNA：PEI 质量比 1:3 加入 PEIMax（Polysciences Inc. Cat# 24765-1），混匀，室温孵育 20 min，然后将混合物轻柔地倒入 Expi293F 细胞悬液中，边倒边摇，细胞置于摇床培养，培养条件为 8 % CO2、36.5 ℃、120 rpm。

培养 16~18h 后，向细胞悬液中补加 2%（体积比）的浓度为 200 g/L 的 Feed（100 g/L Phytone Peptone + 100g/L Difco Select Phytone）、终浓度为 5 g/L 的葡萄糖溶液和终浓度为 2.2 mM 的 Valproic acid sodium salt（Merk，Cat# P4543-100G），轻轻混匀，8 % CO2、36.5 ℃、120 rpm 继续培养 7 天后收样。将细胞料液与硅藻土（Sartorius，Cat 1000037025）混匀(1L 细胞料液加 40g 硅藻土)，用 0.22μm 的一次性真空过滤装置进行过滤。

亲和层析纯化目的蛋白：选用 HiTrap MabSelect PrismA（GE Healthcare，Cat# 17549853）亲和层析柱进行亲和捕获，纯化前用 10-20 倍柱体积的 0.1 M NaOH 流经管路及亲和层析柱，然后用 10-20 倍柱体积的蒸馏水清洗管路以及柱子，用 5 倍柱体积的 1×PBS（Gibco）平衡填料柱；将过滤后的细胞料液通过柱子，再用 10 倍柱体积的 1×PBS 清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液（100 mM sodium citrate，pH 3.5）冲洗填料，收集洗脱液，用 2 M Tris 调节 pH 至 6.0，过滤除菌。

离子交换层析纯化双抗：选用 Mono S 5/50 GL (获自 GE Healthcare)离子交换层析柱，并置于 AKTApure 系统（获自 GE healthcare）内。用 0.5 M NaOH 对装备有 Mono S 5/50 GL 离子交换层析柱的 AKTApure 系统除内毒素 2 小时，然后，用蒸馏水清洗系统以及柱子。使用 5-10 倍柱体积的上样缓冲液（20 mM 磷酸盐, pH 6.0）平衡柱子，直至电导以及 pH 稳定；将亲和层析所获得的蛋白用上样缓冲液稀释

10倍，然后上样；使用5倍柱体积的上样缓冲液再平衡；以洗脱缓冲液(20 mM 磷酸盐, 1 M NaCl, pH 6.0)的含量为0-40 %的梯度进行线性洗脱，共洗脱30个柱体积，根据紫外吸收值来收集样品。

SDS-PAGE电泳分析收集的各组分样品。取离子交换后的蛋白样品，分别加入还原loading buffer（翌圣生物,货号：20315ES05）或非还原 loading buffer（北京百奥莱博，货号：WE0289），70摄氏度加热10分钟，取适量样品加入预制胶4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel（Bio-rad货号：4561095）,同时加入蛋白 marker（Biorad，货号：1610375）作为对照，150V 电泳 50 分钟，用蛋白染色仪（金斯瑞，L00760C）染色，然后用凝胶成像仪（上海天能，Tanon-1600）进行拍照。

利用大小排阻层析 (size exclusion chromatography；SEC)检测收集的各组分样品的纯度。综合 SDS-PAGE和SEC的结果，将纯度大于95%的组分样品合并。

将纯度达标的蛋白样品使用15 ml超滤离心管，4000转／分钟离心10分钟，使用PBS将蛋白稀释后继续离心，4000转／分钟离心10分钟，重复该操作几次，以更换蛋白的存储缓冲液。换液完成后，过滤除菌，检测抗体浓度。进一步利用毛细管电泳（CE-SDS）和液相色谱-质谱联用技术（LC-MS）相结合对双特异性抗体的成分和含量进行定性和定量。

实施例 6.目标分子的 CD40 reporter 实验

1．检测方法：

复苏后的HEK-Blue CD40L 细胞(重组表达CD40以及在NF-κB反应元件控制下的SEAP报告基因的HEK293细胞，购自InvivoGen，货号 hkb-cd40)、MC38 细胞、MC38 PD-L1 细胞(重组高表达 PD-L1 的MC38细胞)，经过2-3次传代后，倒去培养基，10 ml PBS清洗细胞，2 ml胰酶消化，用培养基终止后400 x g离心3 min弃上清，培养基重悬，取20 ul细胞悬液至1.5 ml EP管，计数。在15 ml离心管中将HEK-Blue CD40L配成细胞悬液，$3x10^4$个/well，用排枪按50ul每孔加入两块96孔板（平底）；然后 plate1 按$0.5x10^4$个/well加入50 ul MC38和50 ul梯度稀释的待测双特异性抗体药物并混匀。plate2按$0.5x10^4$个/well加入50 ul MC38 PD-L1和50 ul梯度稀释的待测双特异性抗体药物并混匀。在细胞外周加200 ul PBS防止边缘效应，将细胞板放入培养箱继续培养20 h。

按照厂商说明书，准备QUANTI-Blue™ (InvivoGen)溶液。简言之，用50 ml离心管取10 ml ddH_2O，依次加入100 ul buffer和100 ul QUANTI-Blue（100x），混匀后用锡纸包被置于4 ℃冰箱保存，使用前预热30 min，然后吸取180 ul/well QUANTI-Blue至96孔板（平底）备用。准备新的圆底96孔板，加入80 ul培养基，然后加入20 ul之前与待测药物以及MC38或MC38 PD-L1共培养20 h后的HEK-Blue CD40L细胞的上清液，混匀（即稀释5倍），取20 ul至加有QUANTI-Blue的细胞板中，37 ℃孵育1 h，开盖置于酶标仪中，OD635nm读板。

2 CD40 reporter实验结果：

HEK-Blue CD40L细胞稳转有CD40和SEAP报告基因载体。CD40配体结合细胞表面的CD40将引发信号级联反应，导致细胞中NF-KB的激活，并随后分泌SEAP到细胞上清。QUANTI-Blue是一种酶比色检测试剂，可以通过QUANTI-Blue检测细胞上清中SEAP水平以表征CD40配体的活性。

结果显示，由Dace-hz03C06.g6-2+1诱导的CD40激活，在没有PD-L1存在的情况下，比Selicrelumab弱91倍左右(如图1所示)；而在PD-L1存在的情况下，有明显地提高，比Selicrelumab强12倍左右(如图2所示)。此结果说明，Dace-hz03C06.g6-2+1分子对CD40的激动活性呈现明显的PD-L1依赖性；通过单价PD-L1结合位点的设计，该抗体分子选择性激活CD40信号通路的能力明显提升（相较于PD-L1不存在的情况下，EC_{50}约为8.6nM；在PD-L1存在下，EC_{50}约为0.009nM）。

实施例 7. 双抗 CD40/PD-L1 分子的 DC 激活实验

1．检测方法：

从人PBMC分离并诱导树突细胞(DC)。简言之，从液氮罐中取出hPBMC（50 million），37℃水浴融

化后加RPMI 1640完全培养基，300 x g离心5 min，然后用1 mL培养基重悬，调整浓度约为5X10^7 cells/mL，转移到 5 mL 流式管中。使用不去除 CD16 的人单核细胞富集试剂盒(Stemcell，货号 19058)，按照厂商说明书，加入 100 uL enrichment cocktail，混匀后 4℃静置 10 min；涡旋磁珠 30 s，取 100 uL 磁珠加入样品，混匀 4℃静置 5 min；加入 medium（RPMI 1640+10%FBS）至 2.5 mL，轻轻混匀 2~3 次；置于磁力架上室温静置 2.5 min，将上清倒到新的 5 mL 流式管中，计数，调整细胞浓度约为 5E5 cell/mL；加入终浓度均为 40 ng/mL 的 GM-CSF 和 IL-4，置于 37℃培养箱培养；第三天收集细胞悬液，300 x g 5 min 离心弃上清，用培养基重悬后计数，调整细胞密度至 5E5 cell/mL，重新加入终浓度均为 40 ng/mL 的 GM-CSF 和 IL-4，然后加回原培养瓶中，置于 37℃培养箱继续培养；第六天收集悬浮细胞，300 x g 5 min 离心弃上清，得到单核细胞来源的 DC 树突细胞(DC)。用培养基重悬细胞后计数，在 96 孔圆底板中每孔铺入 50 uL 使细胞数为 1.2E5 cell/well。

收集不表达人 PD-L1 的 CHOK1 细胞培养物(CHOK1 WT)和重组表达人 PD-L1 的 CHOKI 细胞培养物(CHOKI PD-L1)，弃去培养上清，10 mL PBS 润洗一遍，再用 4 mL 胰蛋白酶消化细胞，以培养基终止消化反应以后 400 xg 离心 3 min 弃上清，以培养基再次重悬计数。将所得 CHOK1 WT 细胞或 CHOKI PD-L1 细胞加入前述 96 孔圆底板的板孔中，每孔铺入 50 uL 使细胞数为 0.8E5 cell/well。

取待测抗体，按 1 比 4 的比例系列稀释，得到 0.009766nM 至 40nM 的 8 个浓度，分别加入前述 96 孔圆底板的板孔中，每孔加入 50 uL 抗体，置于培养箱孵育 48 h。取出 96 孔板离心 300 x g 5 分钟，取 20 ul 细胞上清加入 180 uL 培养基混匀，将稀释 10 倍的细胞上清用联科生物 EK1183-96 ELISA 试剂盒按照厂商说明书分析检测细胞因子 IL-12p40 水平。

2. DC 激活实验结果：

DC 细胞表面的 CD40 能与其配体结合并相互作用，通过信号转导激活不同信号通路，促进 DC 细胞成熟，分泌细胞因子 IL-12。通过相应的 ELISA 试剂盒检测细胞上清中 IL-12p40 的浓度，可以表明抗体分子对 DC 的激活情况。

如图 3 所示，与 Selicrelumab 抗体的 CD40 激活不依赖于交联的之前报道相一致，Selicrelumab 在 PD-L1 高表达和低表达条件下均有较强的 DC 激活活性，。而 Dace-hz03C06.g6-2+1 和 Dace-hz03C06.g6-2+2 均表现出对 PD-L1 介导的交联作用的依赖性，在 PD-L1 较高表达的情况下比在 PD-L1 低表达的情况下表现出更强的 DC 激活。此外，从图 3 可见，在 PD-L1 高表达的情况下 Dace-hz03C06.g6-2+1 的激活明显强于 Dace-hz03C06.g6-2+2，并表现出更为显著的选择性 DC 激活作用。该结果说明，2+1 型的分子构型对于本发明抗体充分利用 PD-L1 及选择性激活 DC 细胞是更为有利的。

实施例 8. 生物膜薄层干涉技术测定 Dace-hz03C06.g6-2+1 抗体与抗原的结合动力学

采用生物膜薄层干涉测定技术(ForteBio)测定本发明抗体结合人，猴，大鼠，小鼠的 CD40 及 PD-L1 的平衡解离常数（KD）。ForteBio 亲和力测定按照现有的方法（Estep, P 等人，High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 页）进行。实验开始前半个小时，根据样品数量，取合适数量的 AHC(18-5060, Sartorius)传感器浸泡于 SD buffer(PBS 1×，BSA 0.1%，Tween 20 0.05%)中。取 100μl 的 SD 缓冲液、抗体、抗原分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板(Greiner，675076)中。根据样品位置布板，选择传感器位置。仪器设置参数如下：运行步骤：Baseline 120 s、Loading～1nm、Baseline 120 s、Association 100 s 和 Dissociation 120 s, 转速为 1000rpm，温度为 30℃。使用 ForteBio 分析软件分析 KD 值。

测定的抗体的亲和力如表 3 所示：

表 3. ForteBio 检测 Dace-hz03C06.g6-2+1 抗原抗体单价结合的亲和力常数

Species	CD40(K_D, nM)	PD-L1(K_D, nM)
Human	11.9	1.71
Cyno	9.16	3.77
Rat	N.B.	N.B.

Mouse	N.B.	N.B.

N.B.表示不结合

实施例 9. Dace-hz03C06.g6-2+1 在 B16F10- hPD-L1 模型中的治疗作用

本实验采用 B16F10-hPD-L1 细胞接种 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠测定本发明的 Dace-hz03C06.g6-2+1 抗体的抗肿瘤作用。

C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠：

雌性 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因背景的小鼠购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司，等级为 SPF 级，质检单位为苏州西山生物技术有限公司，合格证编号为 NO. 320726230100116536。小鼠在到达后驯化 3 天，随后开始研究。

细胞：

B16F10-hPD-L1 黑色素瘤细胞来自信达生物制药（苏州）有限公司 (CAT#:N/A)，并严格按照说明书进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，在无菌 PBS 中重悬细胞并调整细胞密度为 5×10^6 个/ml。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠右侧腹部区域中来建立 B16F10-hPD-L1 荷瘤小鼠模型。

给药：

肿瘤细胞接种 7 天后检测各只小鼠瘤体积。挑选出瘤体积在约 18-89 mm^3 之间的小鼠，按瘤体积平均分组（每组 7 只小鼠）。给药剂量和方式如表 4 所示，h-IgG(购自 EQUITECH-BIO)作为阴性对照。在接种后第 7 天给药，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。在每次给药前测定体重和肿瘤体积，接种后第 18 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：TGI%=100% * (对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(对照组肿瘤体积–对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

表 4. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	3 mg/kg	Q3-4D*3	腹腔注射
Dace-hz03C06.g6-2+1	0.3 mg/kg	Q3-4D*3	腹腔注射
Dace-hz03C06.g6-2+1	1 mg/kg	Q3-4D*3	腹腔注射
Dace-hz03C06.g6-2+1	3 mg/kg	Q3-4D*3	腹腔注射

肿瘤抑制率结果如图 4 和表 5 所示。在接种后第 18 天，Dace-hz03C06.g6-2+1, 0.3 mg/kg 组、Dace-hz03C06.g6-2+1, 1 mg/kg 组和 Dace-hz03C06.g6-2+1, 3 mg/kg 组的肿瘤抑制率分别为 27%、63% 和 88%。同时我们对小鼠体重进行监测，结果如图 5 所示，小鼠体重无显著差异。因此，本发明中 Dace-hz03C06.g6-2+1 药物对肿瘤有明显的抑制效果且呈现剂量效应关系。

表 5. 第 18 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积（mm3）	TGI(%)
h-IgG, 3 mg/kg	3094	N/A
Dace-hz03C06.g6-2+1, 0.3 mg/kg	1733	27
Dace-hz03C06.g6-2+1, 1 mg/kg	339	63
Dace-hz03C06.g6-2+1, 3 mg/kg	206	88

实施例 10. Dace-hz03C06.g6-2+1 在 B16F10-hPD-L1 模型中的治疗作用

本实验采用 B16F10-hPD-L1 细胞接种 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠，测定本发明的 Dace-hz03C06.G6-2+1 抗体的抗肿瘤作用。

C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠：

雌性 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因背景的小鼠购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司，等级为 SPF 级，质检单位为苏州西山生物技术有限公司，合格证编号为 NO. 320726230100038316。小鼠在到达后驯化 3 天，随后开始研究。

细胞：

B16F10-hPD-L1 黑色素瘤细胞购自信达生物制药（苏州）有限公司 (CAT#:N/A)，并严格按照说明书进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，在无菌 PBS 中重悬细胞并调整细胞密度为 5×10^6 个/ml。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠右侧腹部区域中来建立 B16F10-hPD-L1 荷瘤小鼠模型。

给药：

肿瘤细胞接种 6 天后检测各只小鼠瘤体积，挑选出瘤体积在约 22-116 mm^3 左右的小鼠，按瘤体积平均分组（每组 7 只小鼠）。给药剂量和方式如表 6 所示，h-IgG(购自 EQUITECH-BIO，货号 SLH56-0001) 作为阴性对照，分别在接种后第 6 天给药，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。在每次给药前测定体重和肿瘤体积，接种后第 20 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：TGI%=100% * (对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(对照组肿瘤体积–对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

表 6. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	10 mg/kg	Q3-4D*3	腹腔注射
Atezolizumab	10 mg/kg	Q3-4D*3	腹腔注射
Dace-hz03C06.g6-2+1	3 mg/kg	Q3-4D*3	腹腔注射
Dace-hz03C06.g6-2+2	3 mg/kg	Q3-4D*3	腹腔注射

肿瘤抑制率结果如图 6 和表 7 所示。在接种后第 20 天，抗 PD-L1 单抗 Atezolizumab, 10 mg/kg 组、Dace-hz03C06.g6-2+1, 3 mg/kg 组、和 Dace-hz03C06.g6-2+2, 3 mg/kg 组的肿瘤抑制率分别为：4.2%、97% 和 67%。Dace-hz03C06.g6-2+1, 3 mg/kg 组和 Dace-hz03C06.g6-2+2, 3 mg/kg 组药效要显著强于 PD-L1 单抗 Atezolizumab, 10 mg/kg 组。同时我们对小鼠体重进行检测，结果如图 7 所示，小鼠体重无显著差异。因此，Dace-hz03C06.g6-2+1 和 Dace-hz03C06.g6-2+2 对 B16F10-hPD-L1 肿瘤有明显的抑制效果，且 Dace-hz03C06.g6-2+1 药效明显优于 Dace-hz03C06.g6-2+2。

表 7. 第 20 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积（mm3）	TGI(%)
h-IgG	1836	N/A
Atezolizumab, 10mg/kg	1760	4.2
Dace-hz03C06.g6-2+1, 3mg/kg	111	97
Dace-hz03C06.g6-2+2, 3mg/kg	647	67

实施例 11. Dace-hz03C06.g6-2+1 在 KPC-HPD-L1 模型中的治疗作用

本实验采用 KPC-hPD-L1 细胞接种 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠，测定 Dace-hz03C06.g6-2+1 的抗肿瘤作用。

C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠：

雌性 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因背景的小鼠购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司，等级为 SPF 级，质检单位为苏州西山生物技术有限公司，合格证编号为 NO. A202311090029。小鼠在到达后驯化 3 天，随后开始研究。

细胞：

KPC-hPD-L1胰腺癌细胞来自信达生物制药（苏州）有限公司(CAT#:N/A)，并严格按照说明书进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，在无菌 PBS 中重悬细胞并调整细胞密度为 30×10^6 个/ml。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠右侧腹部区域中来建立 KPC-hPD-L1 荷瘤小鼠模型。

给药：

肿瘤细胞接种 4 天后检测各只小鼠瘤体积，挑选出瘤体积在约 42-121 mm^3 左右的小鼠，按瘤体积平均分组（每组 6 只小鼠）。给药剂量和方式如表 8 所示，h-IgG(购自 EQUITECH-BIO)作为阴性对照。在接种后第 4 天给药，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。在每次给药前测定体重和肿瘤体积，接种后第 29 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：TGI%=100% * (对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(对照组肿瘤体积–对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

表 8. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	20 mg/kg	Q3-4D*5	腹腔注射
Dace-hz03C06.g6-2+1	10 mg/kg	Q3-4D*5	腹腔注射

肿瘤抑制率结果如图 8 和表 9 所示。在接种后第 29 天，Dace-hz03C06.g6-2+1 的肿瘤抑制率为 54%。同时我们对小鼠体重进行检测，结果如图 9 所示，小鼠体重无明显变化。因此，Dace-hz03C06.g6-2+1 组对 KPC-hPD-L1 肿瘤有明显的抑制效果。

表 9. 第 29 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积（mm3）	TGI(%)
h-IgG	965	N/A
Dace-hz03C06.g6-2+1, 10mg/kg	485	54

实施例 12. Dace-hz03C06.g6-2+1 在 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 小鼠中的毒性作用

本实验采用 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠, 通过腹腔单次注射 Dace- hz03C06.g6-2+1 药物，观察小鼠血清中 ALT、AST 和细胞因子的释放情况，以测定药物的毒性大小。

C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因小鼠：

雌性 C57 KI hPD-1/hPD-L1/hCD40 转基因背景的小鼠购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司，等级为 SPF 级，质检单位为苏州西山生物技术有限公司，合格证编号为 NO. 320726230100133615。小鼠在到达后驯化 3 天，随后开始研究。

给药：

小鼠按表 10 实验设计分组、称重，在第 0 天腹腔注射 h-IgG、Selicrelumab、Dace-hz03C06.g6-2+1 药物，然后在第 1 天取血样。

表 10. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	50 mg/kg	Single dose	腹腔注射
Selicrelumab	50 mg/kg	Single dose	腹腔注射
Dace-hz03C06.g6-2+1	50 mg/kg	Single dose	腹腔注射

ALT 和 AST 检测：

取样后血样 4℃, 3000 rpm, 10 min 离心后取上清，送至苏州西山中科药物研究开发有限公司检测谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）。结果如图 10 和图 11 所示，Dace-hz03C06.g6-2+1 组 AST 和 ALT 数

值远低于 Selicrelumab 组，且与 IgG1 组相当，由此可知与参考品 Selicrelumab 相比，Dace-hz03C06.g6-2+1 对小鼠肝脏损害较小。

细胞因子检测：

采用 CBA（cytometric Beads Array）细胞因子检测系统，使用 Human Th1/Th2/Th17 CBA 试剂盒(供应商 BD, 货号 560484)进行血清中细胞因子水平的检测。取 Th1/Th2/Th17 标准品，使用 2ml assay diluent 重悬，以 1:2 比例向后稀释，得到梯度浓度为 5000-20 pg/ml 的标准品溶液。接下来，根据样本量确定 capture beads 体积（一个样品 10ul beads），将所有 beads 混合并涡旋备用（微球易沉积，每次吸出前需充分混匀）。准备一块 96 孔板，分别加入 50ul 以下溶液：mixed capture beads、标准品以及血清样品、PE Detection reagent，室温避光孵育 2h。孵育结束后，加入 200 ul wash buffer，200 g 离心 5 min，去上清，使用 150 ul wash buffer 重悬 beads 后上机测试。流式检测结果使用 FCAP Array software 进行分析。

CBA 细胞因子检测系统通过已知体积大小和荧光强度的微球捕获单个或多个蛋白，达到对可溶性蛋白检测的目的。该检测系统中每一种捕获微球（capture beads）表面包被一种特异性抗体。当 capture beads、检测抗体、待测样本共孵育后，三者形成双抗夹心复合物，可以通过流式细胞仪进行检测。检测结果如图 12 和 13 所示，与 CD40 激动剂 Selicrelumab 相比，Dace-hz03C06.g6-2+1 组 TNF-α 和 IL-6 均有大幅度降低且与 IgG1 组相当。这提示 Dace-03C06.g6-2+1 诱导细胞因子风暴的风险更小。

肝酶与细胞因子检测结果综合表明，与 CD40 激动剂 Selicrelumab 相比，Dace-hz03C06.g6-2+1 在小鼠上展现了更好的安全性。

序列表概览

SEQ ID NO:	序列描述	序列
1	LA03C06 碱基序列	CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGC AGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGACACACCTCTAGCAACTATGCCATGGGCTGGTTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAACT CGTGGCTGGAAAGGTGATACATACTATGCAGAGTCCG TGAAGGGCCGATTCGTCATCTCCATGGACAACGCCAA GAACACGGTGTTTCTGCAAATGAACAGTCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGTTTCCCTGCT GGGCCCTACGGTAGTGCCTGGCGGATATAACTACTGG GGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCG
2	LA03C06/ hz03C06.g6 单域抗体 CDR1 氨基酸序列 VH CDR1(AbM)：	GHTSSNYAMG
3	LA03C06/ hz03C06.g6 单域抗体 CDR2 氨基酸序列 VH CDR2(Kabat)	TRGWKGDTYYAESVKG
4	LA03C06/ hz03C06.g6 单域抗体 CDR3 氨基酸序列 VH CDR3(Kabat)	SLLGPTVVPGGYNY
5	单域抗体 LA03C06 的氨基酸序列	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGHTSSNYAMGWFR QAPGKEREFVATRGWKGDTYYAESVKGRFVISMDNAKN TVFLQMNSLKPEDTAVYYCAVSLLGPTVVPGGYNYWGQ GTQVTVSS
6	单域抗体 hz03C06.g6 的氨基酸序列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGHTSSNYAMGWFR QAPGKGLEFVSTRGWKGDTYYAESVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAVSLLGPTVVPGGYNYWGQ G
7	双特异性抗体 Dace-hz03C06.g6-2+1 的轻链氨基酸序列（CDR 下划线标出）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHW YQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
8	双特异性抗体 Dace-hz03C06.g6-2+1 的重链 1 氨基酸序列（CDR 下划线标出）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQ APGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
9	双特异性抗体 Dace-hz03C06.g6-2+1 的重链 2 氨基酸序列（CDR 下划线标出）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQ APGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW

		LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGEVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGHTSSNYAMGWFRQAPGKGLEFVST RGWKGDTYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAVSLLGPTVVPGGYNYWGQGTLVTVSS
10	双特异性抗体 Dace-hz03C06.g6-2+2 的轻链氨基酸序列（CDR 下划线标出）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHW YQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	双特异性抗体 Dace-hz03C06.g6-2+2 的重链氨基酸序列（CDR 下划线标出）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQ APGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGHTSSNYAMGWFRQAPGKGLEFVSTRGWK GDTYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAVSLLGPTVVPGGYNYWGQGTLVTVSS
12	Atezolizumab 抗体的重链氨基酸序列	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQ APGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
13	Atezolizumab 抗体的轻链氨基酸序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
14	Selicrelumab 抗体的重链氨基酸序列	MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSG GTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYY CARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSF

		FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
15	Selicrelumab 抗体的轻链氨基酸序列	MRLPAQLLGLLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
16	抗 CD40 Fab (Dace)轻链可变区	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHW YQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIK
17	抗 CD40 Fab (Dace)重链可变区	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQ APGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSS
18	抗 CD40 Fab (Dace)轻链可变区 LCDR1	RSSQSLVHSNGNTFLH
19	抗 CD40 Fab (Dace)轻链可变区 LCDR2	TVSNRFS
20	抗 CD40 Fab (Dace)轻链可变区 LCDR3	SQTTHVPWT
21	抗 CD40 Fab (Dace)重链可变区 HCDR1	GYSFTGYYIH
22	抗 CD40 Fab (Dace)重链可变区 HCDR2	RVIPNAGGTSYNQKFKG
23	抗 CD40 Fab (Dace)重链可变区 HCDR3	EGIYW
24	人轻链恒定区 kappa (CL-κ)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
25	人 IgG1 Fc LALA+ 二硫键突变 (Y349C)+Hole 突变 (T366S, L368A, Y407V)	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	人 IgG1 Fc LALA+ 二硫键突变 (S354C)+ Knob 突变 (T366W)	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
27	人 IgG1 Fc LALA	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
28	人 IgG2 Fc	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	人 IgG1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKV

30	接头	GGGGGGGGGGG
31	对照 NB 分子	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASAYTISRNSMGWFRQAPGKGLEGVAAIESDGSTSYSDSVKGRFTISLDNSKNTLYLEMNSLRAEDTAVYYCAAPKVGLGPRTALGHLAFMTLPALNYWGQGTLVTVSS
32	连接肽	G4S
33	连接肽	(G4S)2
34	连接肽	(G4S)3
35	连接肽	GGGSG
36	连接肽	GGSGG
37	连接肽	GSGGG
38	连接肽	GSGGGP
39	连接肽	GGEPS
40	连接肽	GGEGGGP
41	连接肽	GGEGGGSEGGGS
42	连接肽	(G4S)n，其中 n 是等于或大于 1 的整数
43	连接肽	TS(G4S)n，其中 n 是等于或大于 1 的整数
44	连接肽	G(G4S)n，其中 n 是等于或大于 1 的整数
45	连接肽	(G4)n，其中 n 是等于或大于 1 的整数
46	连接肽	(GRPGS)n，其中 n 是等于或大于 1 的整数
47	连接肽	(G3S)2
48	连接肽	(G4S)2
49	连接肽	(G3S)3
50	连接肽	(G4S)3
51	连接肽	(G3S)4
52	连接肽	(G4S)4
53	连接肽	(G3S)5
54	连接肽	(G4S)5
55	连接肽	(G3S)6
56	连接肽	G4S
57	连接肽	GGG
58	连接肽	DGGGS
59	连接肽	TGEKP
60	连接肽	GGRR
61	连接肽	EGKSSGSGSESKVD
62	连接肽	KESGSVSSEQLAQFRSLD
63	连接肽	GGRRGGGS
64	连接肽	LRQRDGERP
65	连接肽	LRQKDGGGSERP
66	连接肽	GSTSGSGKPGSGEGSTKG

权利要求

1. 一种特异性结合 PD-L1 和 CD40 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含至少一个特异性结合 PD-L1 的抗原结合位点和至少一个特异性结合 CD40 的抗原结合位点。

2. 权利要求 1 的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中：

- 所述 PD-L1 抗原结合位点以高亲合力结合人 PD-L1，优选地，KD 值为大约 $5x10^{-9}$ M 至 $0.5x10^{-9}$ M；

- 所述 CD40 抗原结合位点以 PD-L1 依赖性方式选择性激活 CD40 信号通路，优选地，以 PD-L1 表达细胞不存在与存在下的抗体 EC50 值的比值定义的选择性指数大于 100，例如为大约 300-1000；和/或

- 所述抗体为包含 1 个 PD-L1 抗原结合位点和 2 个 CD40 抗原结合位点的三价双特异性抗体。

3. 权利要求 1-2 任一项的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中所述 PD-L1 抗原结合位点包含或由 VHH 结构域组成；且所述 CD40 抗原结合位点包含或由 Fab 或 scFv 结构域组成。

4. 权利要求 1-3 任一项的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中所述 PD-L1 抗原结合位点包含 SEQ ID NO:5 或 6 所示的 VHH 结构域中的 CDR1-3 序列；且其中所述 CD40 抗原结合位点包含 SEQ ID NO:16 所示的轻链可变结构域中的 LCDR1-3 序列以及 SEQ ID NO: 17 所示的重链可变结构域中的 HCDR1-3 序列。

5. 权利要求 1-4 任一项的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体还包含免疫球蛋白 Fc 区，优选地，所述 Fc 区为 IgG1 Fc 区，更优选地，所述 Fc 区具有降低或消除 Fcγ 受体结合活性的突变。

6. 权利要求 1-5 任一项的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含或由一个抗 CD40 全长抗体和缀合在其上的一个或两个（优选一个）抗 PD-L1 VHH 结构域组成。

7. 权利要求 1-6 任一项的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述 PD-L1 抗原结合位点包含 VHH 结构域，其中所述 VHH 结构域包含分别包含或由 SEQ ID NOs: 2、3 和 4 所示氨基酸序列组成的 CDR1、CDR2 和 CDR3，

优选地，所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO: 5 或 6 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 5 或 6 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：5 或 6 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列组成。

8. 权利要求 1-7 任一项的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，所述 CD40 抗原结合位点包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)，其中所述 VH 结构域包含分别包含或由 SEQ ID NOs: 21、22 和 23 所示的氨基酸序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 结构域包含分别包含或由 SEQ ID NOs: 18、19 和 20 所示的氨基酸序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，

优选地，所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 17 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 17 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列；且

所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 16 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 16 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列；

最优选地，所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列且所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列。

9. 权利要求 1-8 任一项的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中，其中所述双特异性抗体包含连接肽，所述连接肽包含 10-20 个氨基酸长度，优选地，包含 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列。

10. 根据权利要求 1-9 任一项的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含第一、第二和第三多肽链，其中，

-所述第一多肽链从 N 端至 C 端包含 VH 结构域、CH1 结构域、Fc 区、连接肽和 VHH 结构域；

-所述第二多肽链从 N 端至 C 端包含 VH 结构域、CH1 结构域和 Fc 区；

-所述第三多肽链从 N 端至 C 端包含 VL 结构域和 CL 结构域；

其中所述 VHH 结构域特异性结合 PD-L1，且其中所述 VH 结构域与所述 VL 结构域配对并特异性结合 CD40，

优选地，第一和第二多肽链的 Fc 区分别包含促进第一和第二多肽链异二聚化的 Knob 突变和 Hole 突变，以及任选地用于在第一和第二多肽链之间形成链间二硫键的半胱氨酸残基突变；

再优选地，第一和第二多肽链的 Fc 区分别独立地包含选自以下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 25 或与其至少 95%同一性的氨基酸序列以及 SEQ ID NO: 26 或与其至少 95%同一性的氨基酸序列，

再优选地，其中所述双特异性抗体包含第一、第二和第三多肽链，其中：

第一多肽链包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；

第二多肽链包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；且

第三多肽链包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

11. 权利要求 1-9 任一项的双特异性抗体或其抗原结合片段，其中所述双特异性抗体包含第一和第二多肽链，其中：

-所述第一多肽链从 N 端至 C 端包含 VH 结构域、CH1 结构域、Fc 区、连接肽和 VHH 结构域；

-所述第二多肽链从 N 端至 C 端包含 VL 结构域和 CL 结构域；

其中所述 VHH 结构域特异性结合 PD-L1，且其中所述 VH 结构域与所述 VL 结构域配对并特异性结合 CD40，

优选地，所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；

第二多肽链包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

12. 一种抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，其包含特异性结合 PD-L1 的 VHH 结构域，且其中所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO:5 或 6 中所含的 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列；

优选地，所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 序列分别包含 SEQ ID NOs:2, 3 和 4 的氨基酸序列或由其组成；

再优选地，所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO: 5 或 6 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 5 或 6 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：5 或 6 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VHH 结构域包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列组成。

13. 多核苷酸，其编码权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

14. 载体，优选地表达载体，其包含权利要求 13 的多核苷酸。

15. 宿主细胞，其包含权利要求 13 所述的多核苷酸或权利要求 14 所述的载体，任选地所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

16. 用于生产权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括：在适于表达所述抗体或其抗原结合片段的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的多核苷酸的宿主细胞。

17. 包含权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的免疫缀合物或免疫融合物。

18. 药物组合物，其包含权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 17 的免疫缀合物或免疫融合物和可药用载体。

19. 权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 17 的免疫缀合物或免疫融合物用作药物或用于制备药物的用途。

20. 权利要求 19 的用途，其中所述药物用于在个体中治疗和/或预防癌症，或用作疾病的诊断工具，优选地，所述个体是哺乳动物，更优选地是人。

21．一种治疗或预防癌症的方法，包括向有需要的个体施用有效量的权利要求 1-12 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 17 的免疫缀合物或免疫融合物。

22. 权利要求 19-21 任一项的用途或方法，其中所述癌症为实体瘤或血液瘤，优选地所述肿瘤为 PD-L1 阳性肿瘤。