

针对程序性死亡配体 (PD-L1)的单域抗体及其衍生蛋白

5 技术领域

本发明涉及医药生物领域,公开了针对程序性死亡配体 (PD-L1)的单域抗体及其衍生蛋白。具体而言,本发明公开了一种程序性死亡配体 1 (PD-L1)结合分子及其用途,特别是在治疗和/或预防、或诊断 PD-L1 相关疾病例如肿瘤中的用途。

10

背景技术

程序性死亡-1 (PD-1)是 CD28 受体家族的成员,该家族包括 CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1 和 BTLA。该家族的最初成员 CD28 和 ICOS 通过添加单克隆抗体后增强 T 细胞增殖的功能而发现(Hutloff 等(1999), Nature 15 397:263-266; Hansen 等(1980), Immunogenics 10:247-260)。已经鉴定了 PD-1 的两种细胞表面糖蛋白配体,PD-L1 和 PD-L2,已经表明它们在与 PD-1 结合后下调 T 细胞活化和细胞因子分泌(Freeman 等(2000), J Exp Med 192:1027-34; Latchman 等(2001), Nat Immunol 2:261-8; Cater 等(2002), Eur J Immunol 32:634-43; Ohigashi 等(2005), Clin Cancer Res 11:2947-53)。PD-L1 (B7-H1)和 PD-L2 (B7-DC)都是可与 PD-1 结合但是不与其他 CD28 家族成员结合的 B7 同源物(Blank 等 2004)。也已经显示通过 IFN- γ 刺激上调细胞表面上 PD-L1 的表达。

PD-L1 的表达已经在几种鼠和人类癌症中发现,包括人肺癌、卵巢癌、结肠癌、黑色素瘤和各种骨髓瘤(Iwai 等(2002), PNAS 99:12293-7; Ohigashi 25 等(2005), Clin Cancer Res 11:2947-53)。已有的结果显示,肿瘤细胞高表达的 PD-L1 通过增加 T 细胞的凋亡从而在肿瘤的免疫逃逸中起着重要的作用。研究者发现,转染 PD-L1 基因的 P815 肿瘤细胞系在体外可抵制特异性 CTL 的裂解,将其接种小鼠体内后具有更强的致瘤性和侵袭性。这些生物学特性均可通过阻断 PD-L1 而逆转。敲除 PD-1 基因的小鼠,阻断 PD-L1/PD-1 30 通路,则接种肿瘤细胞不能形成肿瘤(Dong 等(2002), Nat Med 8:793-800)。也已经提示 PD-L1 可能与肠粘膜炎症有关,并且 PD-L1 的抑制防止了与结

肠炎有关的萎缩病(Kanai 等(2003), J Immunol 171:4156-63)

本领域仍需要能够与 PD-L1 高亲和力结合, 并且能够阻断 PD-1 与 PD-L1 结合的抗 PD-L1 抗体, 特别是抗 PD-L1 重链单域抗体。

5 发明概述

本发明的发明人利用噬菌体展示技术, 通过筛选得到了具有高特异性、高亲和力和高稳定性的抗 PD-L1 重链单域抗体(VHH)。

在第一方面, 本发明提供了一种 PD-L1 结合分子, 其包括由选自 SEQ ID NO:1-6 的氨基酸序列组成的免疫球蛋白单一可变结构域和人免疫球蛋白 Fc 区。

在另一方面中, 本发明涉及编码 PD-L1 结合分子的核酸分子以及含有所述核酸分子的表达载体和宿主细胞。

本发明还涉及包含本发明的 PD-L1 结合分子的药物组合物。

本发明还涉及制备本文所述 PD-L1 结合分子的方法。

15 本发明还涉及本发明所述 PD-L1 结合分子以及药物组合物的应用, 尤其是预防和/或治疗与 PD-L1 相关的疾病的用途和方法。

附图说明

图 1. 示出 PD-L1 重链单域抗体对 PD-1/PD-L1 相互作用的阻断效应。

20 图 2. 示出 PD-L1 重链单域抗体对 PD-L1 抗原蛋白的结合曲线。

图 3. 示出 PD-L1 重链单域抗体对 PD-1 与 PD-L1 相互作用的阻断曲线。

图 4. 示出抗体株 56 的 5 种人源化变体的序列比对结果。

图 5. 示出 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PD-L1 的结合曲线 (ELISA 法)。

25 图 6. 示出 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PD-L1/PD-1 相互作用的阻断曲线 (竞争 ELISA 法)。

图 7. 示出 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PD-L1/CD80 相互作用的阻断曲线 (竞争 ELISA 法)。

30 图 8. 示出 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 293-PDL1/PD1 相互作用的阻断曲线 (FACS 法)

图 9. 示出 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 Jurket-PD1/PDL1 相互作用

的阻断曲线（FACS 法）

图 10. 流式细胞仪检测 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PD-L1 蛋白结合的特异性。

图 11. 流式细胞仪检测 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对猴 PD-L1 蛋白的结合。

图 12. 示出 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白识别患者组织切片上的 PD-L1 阳性细胞群。

图 13. 示出 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PBMC 的激活作用。

图 14. 示出 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 CD4+T 细胞的激活作用。

图 15. 示出 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白刺激分泌 IL-2。

图 16. 示出带有突变 Fc 的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白的 CDC 以及 ADCC 活性。

图 17. 示出用 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白处理后的肿瘤生长曲线。

图 18. 示出不同给药次数的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对肿瘤生长的抑制活性。

图 19. 示出 hu56V2-Fc 与 2.41 的肿瘤生长抑制活性的比较。A: A375:PBMC=5:1; B: A375:PBMC=1:1。

图 20. 示出碱及氧化处理对 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白活性的影响。

20 发明详述

定义

除非另有指示或定义，否则所有所用术语均具有本领域中的通常含义，该含义将为本领域技术人员所了解。参考例如标准手册，如 Sambrook 等人，“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”（第 2 版），第 1-3 卷，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, “Genes IV”, Oxford University Press, New York, (1990); 及 Roitt 等人, “Immunology”（第 2 版），Gower Medical Publishing, London, New York(1989)，以及本文中引用的一般现有技术；此外，除非另有说明，否则未具体详述的所有方法、步骤、技术及操作均可以且已经以本身已知的方式进行，该方式将为本领域技术人员所了解。亦参考例如标准手册、上述一般现有技术及其中引用的其他参考文献。

除非另有说明，否则可互换使用的术语“抗体”或“免疫球蛋白”在

本文中无论是指重链抗体还是指常规 4 链抗体，均用作一般术语以包括全长抗体、其单个的链以及其所有部分、结构域或片段(包括但不限于抗原结合结构域或片段，分别例如 VHH 结构域或 VH/VL 结构域)。此外，本文所用的术语“序列”(例如在“免疫球蛋白序列”、“抗体序列”、“单一可变结
5 构域序列”、“VHH 序列”或“蛋白序列”等的术语中)一般应理解为既包括相关氨基酸序列，又包括编码所述序列的核酸序列或核苷酸序列，除非本文需要更限定的解释。

如本文所用，术语(多肽或蛋白的)“结构域”是指折叠蛋白结构，其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言，结构域负责蛋白的
10 单个的功能性质，且在许多情况下可添加、移除或转移至其他蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

如本文所用的术语“免疫球蛋白结构域”是指抗体链(例如常规 4 链抗体的链或重链抗体的链)的球形区域，或是指基本上由这类球形区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于其维持抗体分子的免疫球蛋白折叠特
15 征，其由排列在两个 β 折叠中任选由保守二硫键稳定的约 7 个反平行 β 折叠股的 2 层夹层组成。

如本文所用的术语“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由本领域及下文中分别称为“框架区 1”或“FR1”、“框架区 2”或“FR2”、“框架区 3”或“FR3”、及“框架区 4”或“FR4”的四个“框架区”组成的免疫球蛋白
20 结构域，其中所述框架区由本领域及下文中分别称为“互补决定区 1”或“CDR1”、“互补决定区 2”或“CDR2”、及“互补决定区 3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”间隔开。因此，免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予抗体对抗原的特异性。

如本文所用的术语“免疫球蛋白单一可变结构域”是指能够在不与其他免疫球蛋白可变结构域配对的情况下特异性结合抗原表位的免疫球蛋白
25 可变结构域。本发明含义中的免疫球蛋白单一可变结构域的一个实例为“结构域抗体”，例如免疫球蛋白单一可变结构域 VH 及 VL(VH 结构域及 VL 结构域)。免疫球蛋白单一可变结构域的另一实例为如下文定义的骆驼科的
30 “VHH 结构域”(或简称为“VHH”)。

“VHH 结构域”，亦称为重链单域抗体、VHH、V_HH 结构域、VHH 抗

体片段和 VHH 抗体, 是称为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: “Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature 5 363,446-448(1993))。使用术语“VHH 结构域”以将所述可变结构域与存在于常规 4 链抗体中的重链可变结构域(其在本文中称为“VH 结构域”)以及存在于常规 4 链抗体中的轻链可变结构域(其在本文中称为“VL 结构域”)进行区分。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(此与常规 4 链抗体中的 VH 或 VL 结构域相反, 在该情况下表位由 VL 结构域与 10 VH 结构域一起识别)。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。

在本发明的上下文中, 术语“重链单域抗体”、“VHH 结构域”、“VHH”、“V_HH 结构域”、“VHH 抗体片段”、“VHH 抗体”以及“Nanobody®”及“Nanobody®结构域”(“Nanobody”为 Ablynx N.V.公司, Ghent, Belgium 15 的商标)可互换使用。

例如 Riechmann 及 Muyldermans, J.Immunol.Methods 231,25-38 (1999) 的图 2 中所示, 对于骆驼科的 VHH 结构域所应用的氨基酸残基, 根据 Kabat 等人给出的 VH 结构域的一般编号法来编号(“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, 公开 20 案第 91 号)。根据该编号法,

- FR1 包含在位置 1-30 处的氨基酸残基,
- CDR1 包含在位置 31-35 处的氨基酸残基,
- FR2 包含在位置 36-49 处的氨基酸,
- CDR2 包含在位置 50-65 处的氨基酸残基,
- 25 - FR3 包含在位置 66-94 处的氨基酸残基,
- CDR3 包含在位置 95-102 处的氨基酸残基, 且
- FR4 包含在位置 103-113 处的氨基酸残基。

然而应注意, 如本领域中对于 VH 结构域及 VHH 结构域所公知的, 各 CDR 中的氨基酸残基的总数可能不同, 且可能不对应于由 Kabat 编号指示 30 的氨基酸残基的总数(即根据 Kabat 编号的一个或多个位置可能在实际序列中未被占据, 或实际序列可能含有多于 Kabat 编号所允许数目的氨基酸残

基)。这意味着一般而言, 根据 Kabat 的编号可能对应或可能不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。

本领域中已知对 VH 结构域的氨基酸残基进行编号的替代方法, 所述替代方法还可以类似地应用于 VHH 结构域。然而, 除非另有说明, 否则在本说明书、权利要求书及附图中, 将遵循如上所述的根据 Kabat 且适于 VHH 结构域的编号。

VHH 结构域中的氨基酸残基的总数将通常在 110 至 120 范围内, 常常介于 112 与 115 之间。然而应注意较小及较长序列也可适于本文所述的目的。

VHH 结构域及含有其的多肽的其他结构特性及功能性质可总结如下:

VHH 结构域(其已经天然“设计”以在不存在轻链可变结构域且不与轻链可变结构域相互作用的情况下与抗原功能性结合)可用作单一且相对较小的功能性抗原结合结构单元、结构域或多肽。此区分 VHH 结构域与常规 4 链抗体的 VH 及 VL 结构域, 这些 VH 及 VL 结构域自身通常不适于作为单一抗原结合蛋白或免疫球蛋白单一可变结构域进行实际应用, 但需要以某种形式或另一形式组合以提供功能性抗原结合单元(如以诸如 Fab 片段等常规抗体片段的形式; 或以由与 VL 结构域共价连接的 VH 结构域组成的 scFv 的形式)。

由于这些独特性质, 使用 VHH 结构域一单独或作为较大多肽的一部分一提供许多优于使用常规 VH 及 VL 结构域、scFv 或常规抗体片段(例如 Fab-或 F(ab')₂-片段)的显著优势:

- 仅需要单一结构域以高亲和力及高选择性结合抗原, 从而使得既不需要存在两个单独结构域, 也不需要确保该两个结构域以适当空间构象及构型存在(例如 scFv 一般需要使用经特别设计的接头);
- VHH 结构域可自单一基因表达且不需要翻译后折叠或修饰;
- VHH 结构域可容易地改造成多价及多特异性格式(格式化);
- VHH 结构域高度可溶且无聚集趋势;
- VHH 结构域对热、pH、蛋白酶及其他变性剂或条件高度稳定, 且因此可在制备、储存或运输中不使用冷冻设备, 从而达成节约成本、时间及环境;

- VHH 结构域易于制备且相对廉价, 甚至在生产所需的规模上亦如此;
- VHH 结构域与常规 4 链抗体及其抗原结合片段相比相对较小(大约 15 kDa 或大小为常规 IgG 的 1/10), 因此相比于常规 4 链抗体及其抗原结合片段, 显示较高的组织渗透性且可以较高剂量给药;
- VHH 结构域可显示所谓腔结合性质(尤其由于与常规 VH 结构域相比其延长的 CDR3 环), 从而可到达常规 4 链抗体及其抗原结合片段不可到达的靶及表位。

获得结合特定抗原或表位的 VHH 的方法, 先前已公开于以下文献中:

- 10 R. van der Linden et al., *Journal of Immunological Methods*, 240 (2000) 185–195; Li et al., *J Biol Chem.*, 287 (2012) 13713–13721; Deffar et al., *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (12), pp. 2645-2652, 17 June, 2009 和 WO94/04678。

15 源自骆驼科的 VHH 结构域可通过以人常规 4 链抗体 VH 结构域中相应位置处存在的一个或多个氨基酸残基置换原始 VHH 序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基而经“人源化”。人源化 VHH 结构域可含有一个或多个完全人框架区序列, 且在一具体实施方案中, 可含 IGHV3 的人框架区序列。

一般而言, 术语“特异性”是指特定抗原结合分子或抗原结合蛋白(例如本发明的免疫球蛋白单一可变结构域)分子可结合的不同类型抗原或表位的数目。可基于抗原结合分子的亲和力和/或亲合力确定其特异性。由抗原与抗原结合蛋白的解离平衡常数(KD)所表示的亲和力, 是表位与抗原结合蛋白上抗原结合位点之间结合强度的量度: KD 值越小, 表位与抗原结合分子之间的结合强度越强(或者, 亲和力也可表示为缔合常数(KA), 其为 1/KD)。如本领域技术人员将了解, 取决于具体感兴趣的抗原, 可以以已知方式测定亲和力。亲合力为抗原结合分子(例如免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单一可变结构域或含有其的多肽)与相关抗原之间结合强度的量度。亲合力与以下两者有关: 与其抗原结合分子上的抗原结合位点之间的亲和力, 以及存在于抗原结合分子上的相关结合位点的数目。

30 通常, 特异性的结合分子将以如于 Biacore 或 KinExA 测定中测量的优选 10^{-7} 至 10^{-11} 摩尔/升(M)、更优选 10^{-8} 至 10^{-11} 摩尔/升、甚至更优选

10⁻⁹至10⁻¹¹、甚至更优选10⁻¹⁰至10⁻¹¹或更低的解离常数(KD)，和/或以至少10⁷M⁻¹、优选至少10⁸M⁻¹、更优选至少10⁹M⁻¹，更优选至少10¹⁰M⁻¹、例如至少10¹¹M⁻¹的缔合常数(KA)结合所要结合的抗原。任何大于10⁻⁴M的KD值一般都视为指示非特异性结合。抗原结合蛋白对抗原或表位的
5 特异性结合可以以已知的任何适合方式来测定，包括例如本文所述的表面等离子体共振术(SPR)测定、Scatchard 测定和/或竞争性结合测定(例如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)及夹心式竞争性测定。

氨基酸残基将根据如本领域中公知且达成一致的标准三字母或一字母氨基酸编码加以表示。在比较两个氨基酸序列时，术语“氨基酸差异”
10 是指与另一序列相比，在参考序列某一位置处指定数目氨基酸残基的插入、缺失或取代。在取代的情况下，所述取代将优选为保守氨基酸取代，所述保守氨基酸是指氨基酸残基被化学结构类似的另一氨基酸残基置换，且其对多肽的功能、活性或其他生物性质影响较小或基本上无影响。所述保守氨基酸取代在本领域中是公知的，例如保守氨基酸取代优选是
15 以下组(i)-(v)内的一个氨基酸被同一组内的另一氨基酸残基所取代：(i)较小脂族非极性或弱极性残基：Ala、Ser、Thr、Pro 及 Gly；(ii)极性带负电残基及其(不带电)酰胺：Asp、Asn、Glu 及 Gln；(iii)极性带正电残基：His、Arg 及 Lys；(iv)较大脂族非极性残基：Met、Leu、Ile、Val 及 Cys；及(v)芳族残基：Phe、Tyr 及 Trp。特别优选的保守氨基酸取代
20 如下：Ala 被 Gly 或 Ser 取代；Arg 被 Lys 取代；Asn 被 Gln 或 His 取代；Asp 被 Glu 取代；Cys 被 Ser 取代；Gln 被 Asn 取代；Glu 被 Asp 取代；Gly 被 Ala 或 Pro 取代；His 被 Asn 或 Gln 取代；Ile 被 Leu 或 Val 取代；Leu 被 Ile 或 Val 取代；Lys 被 Arg、Gln 或 Glu 取代；Met 被 Leu、Tyr 或 Ile 取代；Phe 被 Met、Leu 或 Tyr 取代；Ser 被 Thr 取代；Thr 被 Ser
25 取代；Trp 被 Tyr 取代；Tyr 被 Trp 或 Phe 取代；Val 被 Ile 或 Leu 取代。

相比于其天然生物来源和/或获得该多肽或核酸分子的反应介质或培养基，当其已与至少一种在该来源或介质(培养基)中通常与之相关的其他组分(例如另一蛋白/多肽、另一核酸、另一生物组分或大分子或至少一种污染物、杂质或微量组分)分离时，多肽或核酸分子视为“基本上
30 分离的”。特别地，多肽或核酸分子在其已纯化至少2倍、特别是至少10倍、更特别是至少100倍且多达1000倍或1000倍以上时被视为“基

基本上分离的”。经适合的技术(例如适合色谱技术,如聚丙烯酰胺凝胶电泳)确定,“基本上分离的”多肽或核酸分子优选基本上为均质的。

如本文所用的术语“对象”意指哺乳动物,尤其灵长类动物,尤其是人。

5

本发明的 PD-L1 结合分子

在第一方面,本发明提供了一种 PD-L1 结合分子,其能够特异性结合 PD-L1 且由式 A-L-B 的氨基酸序列组成,其中 A 表示免疫球蛋白单一可变结构域,L 表示氨基酸接头或不存在,且 B 表示人免疫球蛋白 Fc 区,

10 其中所述免疫球蛋白单一可变结构域由选自 SEQ ID NO:1-6 的氨基酸序列组成,

所述 PD-L1 结合分子能够通过所述人免疫球蛋白 Fc 区形成(A-L-B)₂ 形式的同二聚体。

如本发明所用,术语“人免疫球蛋白 Fc 区”指的是来自人 IgG1、IgG2、
15 IgG3 或 IgG4 的恒定区(其恒定区氨基酸序列分别参考 www.uniprot.org 蛋白质数据库中的条目 P01857、P01859、P01860、P01861)的 Fc 区,其包含免疫球蛋白恒定区的铰链区(Hinge)或部分铰链区、CH2 区、以及 CH3 区。本发明中,“人免疫球蛋白 Fc 区”的氨基酸序列可通过突变 CH2 区上的 1-5 个氨基酸以增加或去除 Fc 介导的 ADCC 或 CDC 活性或是增强或减弱 FcRn
20 的亲和力;或者通过突变 Hinge 区的 1-4 个氨基酸增加蛋白的稳定性。但是,本发明中,“人免疫球蛋白 Fc 区”不包括促进或阻止形成 Fc 异二聚体的突变,也不包括在 Fc 片段的氮端或碳端增加其他功能性蛋白序列的修饰。

在一个优选的实施方式中,所述人免疫球蛋白 Fc 区被突变以去除 ADCC 和 CDC 活性。在一个具体实施方式中,所述免疫球蛋白 Fc 区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:7-9。
25

本领域技术人员将理解,在人免疫球蛋白 Fc 区的作用下,本发明的 PD-L1 结合分子通常将以同二聚体的形式存在。

如本发明所用,术语“氨基酸接头”指的是长 1-20 个氨基酸残基、无二级以上结构的非功能性氨基酸序列。所述氨基酸接头例如是柔性接头,
30 例如 GGGGS, GS, GAP 等。

在一些实施方案中,本发明的 PD-L1 结合分子由选自 SEQ ID

NO:10-27 的氨基酸序列组成。

本发明的 PD-L1 结合分子具有下述特征中的至少一个：

- (a) 结合人 PD-L1 的 KD 值小于 1×10^{-7} M；
- (b) 阻断 PD-L1 和 PD-1 的相互作用；
- 5 (c) 增强 PBMC 和 T 细胞的活化；
- (d) 抑制肿瘤生长。

本发明的所述 PD-L1 结合分子结合 PD-L1 的 KD 值可以小于 1×10^{-7} M, 优选小于 1×10^{-8} M、更优选小于 1×10^{-9} M、更优选小于 1×10^{-10} M、尤其更优选小于 1×10^{-11} M。

- 10 在一些实施方案中，本发明的 PD-L1 结合分子能够特异性结合人 PD-L1 并阻断 PD-L1 和 PD-1 的相互作用。在一些实施方案中，本发明的 PD-L1 结合分子能够特异性结合人 PD-L1 并阻断 PD-L1 和 CD80 的相互作用。

- 15 本发明的 PD-L1 结合分子能够抑制肿瘤生长至少约 10%，优选至少约 20%，更优选至少约 30%，更优选至少约 40%，更优选至少约 50%，更优选至少约 60%，更优选至少约 70%，更优选至少约 80%。

- 20 此外，本发明的 PD-L1 结合分子对碱处理和氧化处理具有抗性。例如，强碱(如 500mM 碳酸氢铵)处理约 8 小时、优选约 16 小时、更优选约 24 小时或更优选约 32 小时后，本发明的 PD-L1 结合分子活性保持不变。或者，氧化剂(1%双氧水)处理约 2 小时、优选约 4 小时或更优选约 8 小时后，本发明的 PD-L1 结合分子活性保持不变。

- 此外，本发明的 PD-L1 结合分子具有在高浓度下的稳定性。例如，在约 100mg/ml、更优选约 150mg/ml、更优选约 200mg/ml 或更优选约 250mg/ml 的浓度下，本发明的 PD-L1 结合分子保持稳定而不出现聚集。

25

核酸、载体、宿主细胞

在另一方面中，本发明涉及编码本发明的 PD-L1 结合分子的核酸分子。本发明的核酸可为 RNA、DNA 或 cDNA。根据本发明的一个实施方案，本发明的核酸是基本上分离的核酸。

- 30 本发明的核酸也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体例如质粒、粘端质粒或 YAC。载体可尤其为表达载体，即

可提供 PD-L1 结合分子体外和/或体内(即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中)表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本发明的核酸,其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、增强子、终止子等)。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本发明的 PD-L1 结合分子的表达有用或必需的调控元件及其他元件的具体实例,例如启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本发明的核酸可基于关于本文给出的本发明的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式(例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术)制备或获得,和/或可从适合的天然来源加以分离。

在另一方面中,本发明涉及表达或能够表达一种或多种本发明的 PD-L1 结合分子和/或含有本发明的核酸或载体的宿主细胞。本发明的优选宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

适合的细菌细胞包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

适合的真菌细胞包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属(*Aspergillus*)的物种的细胞;或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

适合的哺乳动物细胞包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而,本发明也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

本发明还提供产生本发明的 PD-L1 结合分子的方法,所述方法通常包含以下步骤:

-在允许表达本发明的 PD-L1 结合分子的条件下培养本发明的宿主细胞；及

-从培养物回收由所述宿主细胞表达的 PD-L1 结合分子；及

-任选进一步纯化和/或修饰本发明的 PD-L1 结合分子。

- 5 在一个优选的实施方案中，本发明的 PD-L1 结合分子使用哺乳动物细胞产生。本发明的 PD-L1 结合分子可以在哺乳动物细胞中获得高表达。例如，表达水平可达大约 5 g/L、优选大约 6 g/L、优选大约 7 g/L、优选大约 8 g/L、更优选大约 9 g/L 或更优选大约 10g/L 或者更高。

- 10 本发明的 PD-L1 结合分子可在如上所述细胞中以细胞内方式(例如在细胞质中、在周质中或在包涵体中)产生，接着从宿主细胞分离且任选进一步纯化；或其可以细胞外方式(例如在培养宿主细胞的培养基中)产生，接着自培养基分离且任选进一步纯化。

- 15 用于重组产生多肽的方法及试剂，例如特定适合表达载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。类似地，适用于制造本发明的 PD-L1 结合分子的方法中的蛋白分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。

然而，本发明的 PD-L1 结合分子也可以通过本领域已知的其它产生蛋白质的方法获得，例如化学合成，包括固相或液相合成。

20 药物组合物

- 另一方面，本发明提供一种组合物，例如药物组合物，其含有与药学上可接受的载体配制在一起的一种或组合的本发明的 PD-L1 结合分子。这样的组合物可以包含一种或组合的(例如两种或多种不同的)本发明的 PD-L1 结合分子。本领域技术人员将理解，在人免疫球蛋白 Fc 区的作用下，本发明的 PD-L1 结合分子通常将以同二聚体的形式存在。

- 30 本发明的药物组合物也可以在联合治疗中施用，即与其他药剂联用。例如，联合治疗可包括本发明的 PD-L1 结合分子联合至少一种其他的抗肿瘤药物。例如，本发明的 PD-L1 结合分子可以与靶向其它肿瘤特异性抗原的抗体联合使用。所述靶向其它肿瘤特异性抗原的抗体包括但不限于，抗 EGFR 抗体、抗 EGFR 变体的抗体、抗 VEGFa 抗体、抗 HER2 抗体、或抗 CMET 抗体。优选所述抗体是单克隆抗体。

本文使用的“药学上可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地，该载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。根据施用途径，可将活性化合物即抗体分子、
5 免疫缀合物包裹于一种材料中，以保护该化合物免受可使该化合物失活的酸和其他天然条件的作用。

本发明的药物组合物可包含一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保持了亲代化合物的所需生物活性而不引起任何不期望的毒理学作用的盐(参见如 Berge, S.M.等(1977) J.Pharm. Sci.66:
10 1-19)。这样的盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些由诸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等无毒性无机酸衍生的盐，以及由诸如脂族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸等无毒性有机酸衍生的盐。碱加成盐包括那些由诸如钠、钾、镁、钙等碱土金属衍生的盐，以及由诸如 N,
15 N' -二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等无毒性有机胺衍生的盐。

本发明的药物组合物也可含有药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的例子包括：(1)水溶性抗氧化剂，如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠，亚硫酸钠等；(2)油溶性抗氧化剂，如
20 棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等；和(3)金属螯合剂，如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

这些组合物还可含有佐剂，如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

可以通过灭菌程序或通过包含诸如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯
25 酚山梨酸等各种抗菌剂和抗真菌剂确保防止存在微生物。在很多情况下，组合物中优选包含等渗剂，例如，糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇或氧化钠。通过在组合物中加入延迟吸收剂，例如单硬脂酸盐和明胶，可实现注射型药物延长的吸收。

药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌
30 注射液或分散液的粉末剂。这些用于药学活性物质的介质和试剂的使用是本领域公知的。常规介质或试剂，除了任何与活性化合物不相容的范

围外，都可能在本发明的药物组合物中。还可以向组合物中掺入补充的活性化合物。

治疗性组合物一般必须是无菌的并且在制备和贮存条件下稳定的。可以将组合物配制成溶液、微乳状液、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇
5 和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散剂。例如，通过使用包衣，例如卵磷脂，在分散液的情况下通过保持所需的颗粒大小，以及通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。

通过将活性化合物以需要的量混入合适的溶剂中，并且根据需要加入以上列举的成分中的一种或其组合，接着无菌微过滤，可制备无菌注射液。通常，通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质和上面所列其他所需成分的无菌载体中制备分散剂。对于用于制备无菌注射液的无菌
10 粉末剂，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干)，由其预先无菌过滤的溶液得到活性成分加任何额外所需成分的粉末。

可以与载体材料组合制备单一剂量形式的活性成分的量根据所治疗的对象和特定给药方式而不同。可以与载体材料组合制备单一剂量形式的活性成分的量一般是产生治疗效果的组合物的量。通常，以 100%计，这个量的范围是大约 0.01%至大约 99%的活性成分，优选大约 0.1%至大约 70%，最优选大约 1%至大约 30%的活性成分，与药学上可接受的载体
15 体相组合。

可以调节剂量方案以提供最佳的期望的反应(例如，治疗反应)。例如，可以施用单一推注，可以随时间施用几次分开的剂量，或者根据治疗状况的紧急情况所需，可以按比例减小或增加剂量。特别有利的是将肠胃外组合物配制成容易给药并且剂量均匀的剂量单位形式。此处使用的剂量单位形式是指适合作为单位剂量用于所治疗的对象
20 的物理不连续单位；每个单位含有预定量的活性化合物，经计算该预定量的活性化合物与需要的药物载体组合产生所需的治疗效果。对本发明剂量单位形式的具体说明限定于且直接依赖于(a)活性化合物的独特特性和要达到的特定治疗效果，和(b)本领域中固有的对于配制这种用于治疗个体敏感性的活性化合物的限制。

对于抗体分子的给药而言，剂量范围为约 0.0001 至 100mg/kg，更通

常为 0.01 至 20mg/kg 受者体重。例如，剂量可以是 0.3mg/kg 体重、1mg/kg 体重、3mg/kg 体重、5mg/kg 体重，10mg/kg 体重或 20mg/kg 体重，或在 1-20mg/kg 范围内。示例性的治疗方案需要每周给药一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每 3 个月一次、每 3-6 个月一次、
5 或起始给药间隔略短（如每周一次至每三周一次）后期给药间隔加长（如每月一次至每 3-6 个月一次）。

或者，抗体分子也可以作为持续释放制剂来给药，在此情况中需要频率较低的给药。剂量和频率根据抗体分子在患者中的半衰期而不同。通常，人抗体表现出最长的半衰期，之后是人源化抗体、嵌合抗体和非
10 人类抗体。给药剂量和频率根据处理是预防性的还是治疗性的而不同。在预防性应用中，在长时间内以较不频繁的间隔给予相对较低的剂量。有些患者在余生中持续接受处理。在治疗性应用中，有时需要以较短的间隔给予较高的剂量，直到疾病的进展减轻或停止，优选直到患者表现为疾病症状部分或完全改善。之后，可以以预防性方案给患者给药。

15 本发明药物组合中活性成分的实际剂量水平可能改变，以获得可有效实现对特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应，而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素，包括应用的本发明特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性，给药途径，给药时间，应用的特定化合物的排泄速率，治疗的持续时间，与应用的特定
20 组合物联合应用的其他药物、化合物和/或材料，接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和病史，以及医学领域中公知的类似因素。

本发明的 PD-L1 结合分子的“治疗有效量”优选地导致疾病症状的严重性降低，疾病无症状期的频率和持续时间增加，或者防止因疾病痛苦而引起的损伤或失能。例如，对于 PD-L1 相关肿瘤的治疗，相对于未
25 接受治疗的对象，“治疗有效量”优选地将细胞生长或肿瘤生长抑制至少约 10%，优选至少约 20%，更优选至少约 30%，更优选至少约 40%，更优选至少约 50%，更优选至少约 60%，更优选至少约 70%，更优选至少约 80%。抑制肿瘤生长的能力可以在预测对人类肿瘤的疗效的动物模型系统中评价。或者，也可以通过检查抑制细胞生长的能力来评价，这种抑制可以通过本领域技术人员公知的试验在体外测定。治疗有效量的
30

治疗性化合物能够减小肿瘤大小，或者以其他方式缓解对象的症状。本领域技术人员可以根据如下因素确定这种量，如对象的大小、对象症状的严重性和选择的特定组合物或给药途径。

本发明的组合物可以利用本领域公知的一种或多种方法通过一种或多种给药途径给药。本领域技术人员应当理解，给药途径和/或方式根据期望的结果而不同。本发明 PD-L1 结合分子的优选给药途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外给药途径，例如注射或输注。本文使用的短语“肠胃外给药”是指除肠和局部给药以外的给药模式，通常是注射，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊
5 内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

或者，本发明的 PD-L1 结合分子也可以通过非肠胃外途径给药，如局部、表皮或粘膜途径给药，例如，鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。

15 活性化合物可以与保护化合物不被快速释放的载体一起制备，例如控释制剂，包括植入物、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这样的制剂的很多方法受专利保护或者通常为本领域技术人员所公知。参见，例如，Sustained and controlled
20 Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

治疗性组合物可应用本领域公知的医疗装置给药。例如，在一个优选实施方案中，本发明的治疗组合物可用无针皮下注射装置给药，如在美国专利 No.5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880;
25 4,790,824; 或 4,596,556 中公开的装置。可用于本发明的公知的植入物和模块的例子包括：美国专利 No.4,487,603，该专利公开了用于以受控速率分散药物的可植入微量输注泵；美国专利 No.4,486,194，该专利公开了用于通过皮肤给药的治疗装置；美国专利 No.4,447,233，该专利公开了用于以精确的输注速率递送药物的医用输注泵；美国专利
30 No.4,447,224，该专利公开了用于连续递送药物的交流可植入输注装置；美国专利 No.4,439,196，该专利公开了具有多腔区室的渗透药物递送系

统：和美国专利 No.4,475,196，该专利公开了一种渗透药物递送系统。这些专利引入本文作为参考。本领域技术人员公知许多其他这样的植入物、递送系统和模块。

在某些实施方案中，本发明的 PD-L1 结合分子可配制为确保在体内的正确分布。例如，血-脑屏障(BBB)阻止了许多高度亲水性的化合物。为了确保本发明的治疗性化合物能够跨过 BBB(如果需要时)，可将它们配制在如脂质体中。至于制备脂质体的方法，参见，例如，美国专利 4,522,811；5,374,548 和 5,399,331。脂质体包含可被选择性地转运入特定细胞或器官内的一个或多个靶向部分，从而增强靶向药物递送(参见，例如，V.V.Ranade (1989) J.Clin.Pharmacol. 29: 685)。靶向部分的例子包括叶酸或生物素(参见，例如，Low 等的美国专利 5,416,016)；甘露糖苷 (Umezawa 等(1988) Biochem.Biophys.Res.Comm. 153: 1038)；抗体 (P.G.Bloeman 等 (1995) FEBS Lett. 357:140；M.Owais 等 (1995) Antimicrob.Agents Chemother. 39:180)；表面活性剂蛋白 A 受体(Briscoe 等(1995) Am.J.Physiol. 1233:134)；p120 (Schreier 等(1994) J.Biol.Chem. 269:9090)；也参见 K.Keinanen；M.L.Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123；J.J.Killion；I.J.Fidler (1994) Immunomethods 4: 273。

疾病预防和治疗

在另一方面，本发明提供了本发明所述 PD-L1 结合分子、核酸分子、宿主细胞及药物组合物在预防和/或治疗与 PD-L1 相关的疾病中用途和方法。可用本发明的 PD-L1 结合分子预防和/或治疗的 PD-L1 相关的疾病如下详述。

癌症

本发明的 PD-L1 结合分子对 PD-L1 的阻断可以增强患者中对癌细胞的免疫应答。PD-L1 富含于多种人类癌中(Dong 等 (2002) Nat Med. 8:78 7-9)。PD-1 与 PD-L1 的相互作用导致浸润肿瘤的淋巴细胞减少，T 细胞受体介导的增殖减少，以及癌细胞的免疫逃逸 (Dong 等(2003) J Mol Med 81:281-7；Blank 等(2004) Cancer Immunol Immunother [epub]；Konishi 等 (2004) Clin Cancer Res 10:5094-5100)。抑制 PD-L1 与 PD-1 的局部相互

作用可以逆转免疫抑制，当 PD-L2 与 PD-1 的相互作用也被阻断时，效应是协同的(Iwai 等(2002) PNAS 99: 12293-7; Brown 等(2003) J Immunol 170: 1 257-66)。本发明的 PD-L1 结合分子可以单独使用，以抑制癌性肿瘤的生长。或者如以下所述，本发明的 PD-L1 结合分子可以与其它抗肿瘤治疗手段联合使用，例如与其他免疫原性剂、标准癌症疗法或其他抗体分子联合使用。

因此，在一个实施方案中，本发明提供一种预防和/或治疗癌症的方法，包括给该对象施用治疗有效量的本发明的 PD-L1 结合分子，抑制对象中的肿瘤细胞生长。

使用本发明的 PD-L1 结合分子可以预防和/或治疗的优选的癌症包括一般对免疫治疗有应答的癌症。可治疗的优选癌症的非限制性的例子包括肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤(例如转移的恶性黑色素瘤)、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤和骨肉瘤。可以用本发明的方法治疗的其他癌症的例子包括：骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、何杰金病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病，包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合。本发明也可用于治疗转移性癌，特别是表达 PD-L1 的转移性癌(Iwai 等(2005)Int Immunol 17: 133-144)。

任选地，本发明的 PD-L1 结合分子可以与免疫原性剂如癌细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、用编码免疫刺激细胞因子的基因转染的细胞联用(He 等(2004) J.Immunol 173: 4919-28)。可以应用的免疫原性剂的非限制性实例包括黑素瘤抗原的肽，如 gp100 的肽、MAGE 抗原、Trp-2、MART1 和/或酪氨酸酶，或转染后表达细胞

因子 GM-CSF 的肿瘤细胞。

在人类中，已经表明一些肿瘤是具有免疫原性的，如黑素瘤。预期通过使用本发明的 PD-L1 结合分子阻断 PD-L1 来促进 T 细胞活化，可以激活宿主中的肿瘤应答。当与肿瘤接种方案联合时，PD-L1 阻断剂(如抗 PD-L1 抗体，例如本发明的 PD-L1 结合分子)可能最有效。已经设计了针对肿瘤接种的许多实验策略(参见 Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D.2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K.2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; 参见 Restifo, N.和 Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch.61, pp.3023-3043, DeVita, V.等(eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology.第五版)。在这些策略之一中，使用自体或异体肿瘤细胞制备疫苗。已经证明，当肿瘤细胞被转导而表达 GM-CSF 时，这些细胞疫苗最有效。已经表明 GM-CSF 是用于肿瘤接种的抗原呈递的强激活剂 (Dranoff 等(1993) Proa Natl. Acad.Sci U.S.A. 90: 3539-43)。

各种肿瘤中基因表达和大规模基因表达模式的研究鉴定出许多所谓的肿瘤特异性抗原(Rosenberg, SA (1999) Immunity 10: 281-7)。在许多情况下，这些肿瘤特异性抗原是在肿瘤和产生肿瘤的细胞中表达的分化抗原，例如 gp100、MAGE 抗原和 Trp-2。更重要的是，证明这些抗原中的许多是在宿主中发现的肿瘤特异性 T 细胞的靶标。本发明的 PD-L1 结合分子可以与重组产生的肿瘤特异性蛋白和/或肽组合使用，以产生针对这些蛋白质的免疫应答。这些蛋白质在正常情况下被免疫系统看作自身抗原，因此对其耐受。肿瘤抗原也可以包括蛋白质端粒酶，该酶是染色体的端粒合成所必需的，并且在 85%以上的人类癌中表达，而仅在有限数量的自身组织中表达(Kim, N 等(1994) Science 266: 2011-2013)。肿瘤抗原也可以是癌细胞表达的“新抗原”，例如由于体细胞突变改变蛋白质序列或产生两种无关序列的融合蛋白(例如，Philadelphia 染色体中的 bcr-abl)。

其他肿瘤疫苗可以包括来自与人类癌症有关的病毒的蛋白质，如人类乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV 和 HCV)和卡波西疱疹肉瘤病毒(KHSV)。可以与 PD-L1 阻断剂(如抗 PD-L1 抗体，例如本发明的 PD-L1

结合分子)联合应用的另外一种形式的肿瘤特异性抗原是从肿瘤组织本身中分离的纯化的热休克蛋白(HSP)。这些热休克蛋白含有来自肿瘤细胞的蛋白质的片段,这些 HSP 在向抗原呈递细胞递送以引发肿瘤免疫方面非常有效(Suot, R 和 Srivastava, P (1995) *Science* 269: 1585-1588; Tamura, Y.等(1997) *Science* 278: 117-120)。

树突细胞(DC)是强抗原呈递细胞,可以用来引发抗原特异性应答。DC 可以在体外产生,并且载有各种蛋白质和肽抗原以及肿瘤细胞提取物(Nestle, F.等(1998) *Nature Medicine* 4: 328-332)。DC 也可以通过遗传手段转导,从而也表达这些肿瘤抗原。已经为了免疫而直接将 DC 融合到肿瘤细胞上(Kugler, A.等(2000) *Nature Medicine* 6: 332-336)。作为接种方法,DC 免疫可以与 PD-L1 阻断剂(如抗 PD-L1 抗体,例如本发明的 PD-L1 结合分子)有效地组合,以激活更强的抗肿瘤应答。

CAR-T, 全称是嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法(Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy)是另一种有效的恶性肿瘤的细胞治疗方法。嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)是将能识别某种肿瘤抗原的抗体的抗原结合部与 CD3- ζ 链或 Fc ϵ RI γ 的胞内部分在体外偶联为一个嵌合蛋白,通过基因转导的方法转染患者的 T 细胞,使其表达嵌合抗原受体(CAR)。同时,还可以引入共刺激分子信号序列以提高 T 细胞的细胞毒性、增殖性与存活时间,促进细胞因子的释放。患者的 T 细胞被“重编码”后,可在体外扩增生成大量肿瘤特异性的 CAR-T 细胞并回输患者体内,实现肿瘤治疗的目的。PD-L1 阻断剂(如抗 PD-L1 抗体,例如本发明的 PD-L1 结合分子)可以与 CAR-T 细胞疗法联合,激活更强的抗肿瘤应答。

本发明的 PD-L1 结合分子也可以与标准癌症治疗组合。本发明的 PD-L1 结合分子可以与化疗方案有效地组合。在这些例子中,它可以减少施用的化疗剂的剂量 (Mokyr, M.等(1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304)。这种组合的一个例子是抗 PD-L1 抗体与氨烯咪胺联用治疗黑素瘤。这种组合的另外一个实例是抗 PD-L1 抗体与白介素-2(IL-2)联用治疗黑素瘤。本发明的 PD-L1 结合分子和化学疗法联用的科学原理是细胞死亡,这是大多数化疗化合物的细胞毒性作用的结果,应会导致抗原呈递途径中的肿瘤抗原水平升高。可以通过细胞死亡与 PD-L1 阻断协同

作用的其他联合治疗有放疗、手术和激素剥夺。这些方案都在宿主中产生肿瘤抗原的来源。血管发生抑制剂也可以与本发明的 PD-L1 结合分子组合。血管发生的抑制导致肿瘤细胞死亡，这可以将肿瘤抗原提供给宿主的抗原呈递途径。

5 本发明的 PD-L1 结合分子还可以与靶向其它肿瘤特异性抗原的抗体联合使用。所述靶向其它肿瘤特异性抗原的抗体包括但不限于，抗 EGFR 抗体、抗 EGFR 变体的抗体、抗 VEGFa 抗体、抗 HER2 抗体、或抗 CMET 抗体。优选所述抗体是单克隆抗体。

 本发明的 PD-L1 结合分子也可以与将 Fc α 或 Fc γ 受体表达效应细胞
10 靶向至肿瘤细胞的双特异性抗原联合应用(参见，例如 US Patent Nos. 5,922,845 和 5,837,243)。也可以利用双特异性抗体靶向两种不同的抗原。例如，已经利用抗-Fc 受体/抗肿瘤抗原(例如 Her-2/neu)双特异性抗体将巨噬细胞靶向肿瘤部位。这种靶向可以更有效地激活肿瘤特异性应答。利用 PD-L1 阻断剂可以加强这些应答的 T 细胞方面。或者，可以利用结
15 合肿瘤抗原和树突细胞特异性细胞表面标记的双特异性抗体将抗原直接递送至 DC。

 肿瘤通过多种机制逃避宿主的免疫监视。其中许多机制可以通过灭活肿瘤表达的免疫抑制性蛋白质来克服。尤其包括 TGF- β (Kehr L. J.等 (1986) J.Exp.Med. 163: 1037-1050)、IL-10 (Howard, M.和 O' Garra, A.
20 (1992) Immunology Today 13: 198-200)和 Fas 配体(Hahne, M.等 (1996) Science 274: 1363-1365)。其中每种抗体可以与本发明的 PD-L1 结合分子联用，来抵抗免疫抑制剂的作用，并且有利于宿主的肿瘤免疫应答。

 可以用于激活宿主免疫应答的其他抗体可以与本发明的 PD-L1 结合分子联用。抗-CD40 抗体能够有效地替代 T 细胞辅助活性(Ridge, J.等
25 (1998) Nature 393: 474-478)，并且可以与本发明的 PD-L1 结合分子联用(Ito, N.等(2000) Immunobiology 201(5)527-40)。也可以为了提高 T 细胞活化的水平而联合对 T 细胞共刺激分子如 OX-40 (Weinberg, A.等(2000) Immunol 164: 2160-2169)、4-1BB (Melero, I.等(1997) Nature Medicine 3: 682-685(1997)和 ICOS (Hutloff, A.等(1999) Nature 397: 262-266)的活化
30 抗体以及阻断阴性共刺激分子如 CTLA-4 (例如，美国专利 No. 5,811,097)或 BTLA (Watanabe, N.等(2003) Nat Immunol 4: 670-9)、B7-H4 (Sica,

GL 等(2003) Immunity 18: 849-61)的活性的抗体。

骨髓移植当前用来治疗造血来源的多种肿瘤。移植物抗宿主疾病是这种治疗的一种后果，移植物对抗肿瘤的应答可以获得治疗性益处。可以利用 PD-L1 阻断剂提高肿瘤特异性 T 细胞的有效性。也有几种实验治疗方案涉及抗原特异性 T 细胞的离体激活和扩增以及这些细胞向受体内的过继转移，以用抗原特异性 T 细胞对抗肿瘤(Greenberg, R.和 Riddell, S. (1999) Science 285: 546-51)。这些方法也可以用来激活 T 细胞对传染原如 CMV 的应答。预期在本发明的 PD-L1 结合分子存在下离体激活可以提高过继转移的 T 细胞的频率和活性。因此，本发明还提供了一种离体
5 激活免疫细胞(如 PBMC 或 T 细胞)的方法，包括使所述免疫细胞与本发明的 PD-L1 结合分子接触。

感染性疾病

本发明的其他方法用于治疗暴露于特定毒素或病原体的患者。因此，
15 本发明的另一方面提供一种预防和/或治疗对象中的感染性疾病的方法，包括给该对象施用本发明的 PD-L1 结合分子，使得所述对象的感染性疾病得到预防和/或治疗。

类似于对于如上所述的肿瘤的应用，PD-L1 阻断剂可以单独使用，或者作为佐剂与疫苗组合使用来刺激对病原体、毒素和自身抗原的免疫
20 应答。特别可以应用该治疗方法的病原体的实例包括当前没有有效疫苗的病原体，或常规疫苗不完全有效的病原体。其中包括但不限于 HIV、肝炎病毒(甲、乙、丙)、流感病毒、疱疹病毒、贾第虫、疟疾、利什曼原虫、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌。PD-L1 阻断剂特别可用于对抗诸如 HIV 等病原体已建立的感染，其在感染过程中呈现改变的抗原。在抗人
25 PD-L1 抗体给药时，这些新的表位被作为外源物识别，从而引起不受 PD-L1 的负信号影响的强 T 细胞应答。

引起可用本发明的方法治疗的感染性疾病的病原体病毒的一些实例包括 HIV、肝炎(甲、乙、丙)、疱疹病毒(例如 VZV、HSV-1、HAV-6，
30 HSV-II 和 CMV、EB 病毒)、腺病毒、流感病毒、虫媒病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、流行性腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV 病毒、

登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、JC病毒和虫媒病毒脑炎病毒。

引起可用本发明的方法治疗的感染性疾病的病原体细菌的一些实例包括衣原体、立克次氏体菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、
5 脑膜炎球菌和淋球菌、克雷伯氏杆菌、变形菌、雷氏菌、假单胞菌、军团杆菌、白喉杆菌、沙门氏菌、芽孢杆菌、霍乱菌、破伤风菌、肉毒杆菌、炭疽杆菌、鼠疫杆菌、钩端螺旋体、和莱姆病细菌。

引起可用本发明的方法治疗的感染性疾病的病原体真菌的一些实例包括假丝酵母(白假丝酵母、克鲁斯假丝酵母、光滑假丝酵母、热带假丝
10 酵母等)、新型隐球菌、曲霉属(烟曲霉、黑曲霉等)、毛霉属(毛霉、犁头霉、根霉)、申克孢子丝菌、皮炎芽生菌、巴西副球孢子菌、粗球孢子菌和荚膜组织胞浆菌。

引起可用本发明的方法治疗的感染性疾病的病原体寄生虫的一些实例包括溶组织内阿米巴、结肠小袋纤毛虫、福氏耐格里阿米巴、棘阿米
15 巴属的种、兰伯贾第虫、隐孢子虫属的种、卡氏肺囊虫、间日疟原虫、果氏巴贝虫、布氏锥虫、克氏锥虫、杜氏利什曼原虫、鼠弓形体、巴西日圆线虫。

在所有上述的方法中，PD-L1 阻断剂可以与其他形式的免疫疗法如细胞因子治疗(例如干扰素、GM-CSF、G-CSF、IL-2)或双特异性抗体治疗联合，双特异性抗体治疗提供增强的肿瘤抗原的呈递(参见，例如，
20 Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123)。

自身免疫反应

25 抗 PD-L1 抗体可以激起和扩大自身免疫应答。因此，可以考虑利用抗 PD-L1 抗体联合多种自身蛋白质来设计接种方案，以有效地产生对抗这些自身蛋白质的免疫应答，用于疾病治疗。

例如，阿尔茨海默病涉及 A β 肽在脑中淀粉样蛋白沉积物中的不当的积累；针对淀粉样蛋白的抗体应答能够清除这些淀粉样蛋白沉积物
30 (Schenk 等(1999) Nature 400: 173-177)。也可以使用其他自身蛋白作为靶标，如涉及治疗变态反应和哮喘的 IgE，和涉及类风湿性关节炎的

TNF α 。最后，可以利用抗 PD-L1 抗体诱导抗体对各种激素的应答。中和抗体对生殖激素的应答可以用于避孕。中和抗体对激素和特定肿瘤生长所需的其他可溶性因子的应答也可以被认为是可能的接种靶标。

如上所述，应用抗 PD-L1 抗体的类似方法可以用来诱导治疗性自身
5 免疫应答，以治疗具有不恰当的自身抗原积累的患者，如淀粉状蛋白沉积物包括阿尔茨海默病中的 A β 、细胞因子如 TNF α 和 IgE。

慢性炎性疾病

抗 PD-L1 抗体也可以用来治疗如下疾病，如慢性炎性疾病，如扁平
10 苔藓、T 细胞介导的慢性炎性皮肤粘膜病(Youngnak-Piboonratanakit 等 (2004) Immunol Letters 94; 215-22)。因此，在一个方面，本发明提供一种用 T 细胞消除慢性炎性疾病的方法，包括给对象施用本发明的 PD-L1 结合分子。

15 疫苗佐剂

本发明的一个方面提供了本发明的 PD-L1 结合分子作为疫苗佐剂的用途。通过共施用抗 PD-L1 抗体和目标抗原(例如疫苗)，可以利用抗 PD-L1 抗体提高针对抗原的特异性免疫应答。

因此，本发明的一个方面提供了增强对象中对抗原的免疫应答的方法，包括给该对象施用：(i)抗原；和(ii)本发明的 PD-L1 结合分子，使得
20 所述对象中对抗原的免疫应答得到加强。所述抗原可以是，例如，肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原或来自病原体的抗原。这些抗原的非限定性实例包括以上章节中所述的那些，例如以上所述的肿瘤抗原(或肿瘤疫苗)，或来自上述病毒、细菌或其他病原体的抗原。

25

试剂盒

本发明的范围内还包括试剂盒，该试剂盒包括本发明的 PD-L1 结合分子、免疫缀合物或药物组合物，以及使用说明。该试剂盒可以进一步包括至少一种另外的试剂或一种或多种另外的本发明的 PD-L1 结合分子
30 (例如，结合 PD-L1 不同表位的结合分子)。试剂盒一般包括表明试剂盒内容物的预期用途的标签。术语标签包括在试剂盒上或与试剂盒一起

提供的或以其他方式随试剂盒提供的任何书面的或记录的材料。

实施例

下面将通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所描述的实施例范围内。

实施例 1：针对 PD-L1 的重链单域抗体的筛选

1.1 文库的构建：

免疫用的 PDL1-Fc 融合蛋白(SEQ ID NO:28)由 CHO 细胞表达(pCDNA4, Invitrogen, Cat V86220)，经 Protein A 亲和层析纯化得到。选取一只新疆双峰驼 (*Camelus bactrianus*) 进行免疫。4 次免疫结束后，提取骆驼 100ml 外周血的淋巴细胞并使用 QIAGEN 公司提供的 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，使用 Super-Script III FIRST STRAND SUPERMIX 试剂盒按照说明书将提取的 RNA 反转录成 cDNA。用巢式 PCR 扩增编码重链抗体的可变区的核酸片段：

15 第一轮 PCR：

上游引物：GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGGC (SEQ ID NO:29)；

下游引物：GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC (SEQ ID NO:30)。

第二轮 PCR：

以第一轮 PCR 产物作模板，

20 上游引物：GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG (SEQ ID NO:31)；

下游引物：GGACTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT (SEQ ID NO:32)。

回收目标重链单域抗体核酸片段，并使用限制性内切酶(购自 NEB)PstI 及 NotI 将其克隆进入噬菌体展示用载体 pCDisplay-3 (Creative Biolabs, Cat: VPT4023)中。产物随后电转化至大肠杆菌电转感受态细胞 TG1 中，构建针对 PD-L1 的重链单域抗体噬菌体展示文库并对文库进行检定。通过梯度稀释铺板，计算库容的大小为 1.33×10^8 。为检测文库的插入率，随机选取 24 个克隆做菌落 PCR。结果显示插入率已达到 100%。

30

1.2 针对 PD-L1 的重链单域抗体淘选：

用 PDL1-Fc 融合蛋白 10 μ g/孔包被平板，4℃放置过夜。第二天用 1% 脱脂奶室温封闭 2 小时后，加入 1 $\frac{1}{2}$ ml 噬菌体(8×10^{11} tfu，来自 1.1 所构建的

骆驼重链单域抗体噬菌展示文库), 在室温下作用 1 小时。之后用 PBST(PBS 中含有 0.05%吐温 20)洗 5 遍, 以洗掉不结合的噬菌体。最后用三乙基胺(100 mM)将与 PD-L1 特异性结合的噬菌体解离下, 并感染处于对数期生长的大肠杆菌 TG1, 产生并纯化噬菌体用于下一轮的筛选。相同筛选过程重复 3-4 轮。由此, 阳性的克隆被富集, 达到了利用噬菌体展示技术筛选抗体库中 PD-L1 特异抗体的目的。

1.3 用噬菌体的酶联免疫方法(ELISA)筛选特异性单个阳性克隆

3-4 轮淘选后, 获得的 PD-L1 结合阳性的噬菌体感染空白大肠杆菌并铺板。随后挑选 96 个单菌落分别培养, 生产并纯化噬菌体。用 PDL1-Fc 融合蛋白包被平板 4℃过夜, 将获得的样品噬菌体(对照组为空白噬菌体)加入, 室温下反应 1 小时。洗涤之后加入一抗小鼠抗-HA 标签抗体(购自北京康为世纪生物科技有限公司), 室温反应 1 小时。洗涤之后加入二抗山羊抗-小鼠碱性磷酸酶标记抗体(购自艾美捷科技有限公司), 室温反应 1 小时。洗涤之后加入碱性磷酸酶显色液, 405nm 波长读取吸收值。当样品孔 OD 值大于对照孔 OD 值 3 倍以上时, 判为阳性克隆孔。将阳性克隆孔的菌转移至含有 100 微克每毫升氨苄霉素的 LB 液体中培养以便提取质粒并进行测序。

根据序列比对软件 Vector NTI 分析各个克隆的蛋白序列。把 CDR1、CDR2、CDR3 序列均相同的克隆视为同一抗体株, 而 CDR 序列不同的克隆视为不同抗体株。

实施例 2: 针对 PD-L1 的重链单域抗体的初步评价鉴定

2.1 重链单域抗体在宿主菌大肠杆菌中表达、纯化:

将测序分析所获得的重链单域抗体的编码序列亚克隆至表达载体 PET32b (Novagen, 产品号: 69016-3)中, 并将测序鉴定正确的重组质粒转化到表达型宿主菌 BL1(DE3)(天根生化科技, 产品号: CB105-02)中, 其涂布在含有 100 微克每毫升氨苄青霉素的 LB 固体培养基的板上, 37℃过夜。挑选单菌落接种、培养过夜, 第二天将过夜菌种转接扩增, 37℃摇床培养至 OD 值达到 0.6-1 时, 0.5mM IPTG 诱导, 28℃摇床培养过夜。第二天, 离心收菌, 并将菌体破碎以获得抗体粗提液。然后镍离子亲和层析柱纯化抗体蛋白。最终得到纯度达 90%以上的抗体蛋白。

2.2 检测候选 PD-L1 重链单域抗体对人 PD-L1 蛋白的特异性结合

用 PDL1-Fc 融合蛋白包被平板 4℃ 过夜，每孔加入 100 ng 实施例 2.1 所得的重链单域抗体(对照组为不结合 PDL1-Fc 蛋白的单域抗体)，室温下反
 5 应 1 小时。洗涤之后加入一抗小鼠抗-His 标签抗体(购自北京康为世纪生物
 科技有限公司)，室温反应 1 小时。洗涤之后加入二抗山羊抗小鼠辣根过氧
 化物酶标记抗体(义翘神州，Cat: SSA007200)，室温反应 1 小时。洗涤之后
 加入显色液，405nm 波长读取吸收值。

用 Fc 蛋白包被平板 4℃ 过夜，每孔加入 100 ng 实施例 2.1 所得的重链
 10 单域抗体(对照组为针对其他不相关靶标的单域抗体)，室温下反应 1 小时。
 洗涤之后加入一抗兔抗人 Fc 抗体(购自上海普欣生物技术有限公司)，室温
 反应 1 小时。洗涤之后加入二抗山羊抗兔辣根过氧化物酶标记抗体(购自上
 海普欣生物技术有限公司)，室温反应 1 小时。洗涤之后加入显色液，405nm
 波长读取吸收值。

15 其中当对 PDL1-Fc 蛋白的 OD 值除以空白对照 OD 值的比值 ≥ 4 时，
 判断候选抗体能结合 PDL1-Fc 蛋白；同时上述能结合 PDL1-Fc 抗原蛋白的
 抗体，其结合 PDL1-Fc 的 OD 值除以其结合 Fc 蛋白的 OD 值，比值 ≥ 5 时，
 则认为该候选抗体能特异性结合 PD-L1 部分而非 Fc 部分。

结果显示筛选出的一个抗体株，抗体株 56，能特异性结合 PD-L1，而
 20 不与 Fc 结合。具体结果见下表 1：

表 1

抗体株	OD (对 PD-L1)	OD (对 Fc)	OD (PD-L1/Fc)	OD (PD-L1/空白)	SEQ ID NO
<i>PDL1-56 dAb</i>	<i>2.931</i>	<i>0.068</i>	<i>43.10294118</i>	<i>54.27777778</i>	<i>1</i>
空白	0.054	0.072	0.75	1	

2.3 PD-L1 重链单域抗体对小鼠 PD-L1 蛋白的结合情况

小鼠 PDL1-Fc 蛋白(SEQ ID NO:33)由 HEK293 细胞表达获得(pCDNA4,
 25 Invitrogen, Cat V86220)。

用小鼠 PDL1-Fc 融合蛋白 0.5μg/孔包被平板 4℃ 过夜，每孔加入 100 ng
 实施例 2.1 所得的重链单域抗体(对照组为针对其他不相关靶标的单域抗
 体)，室温下反应 1 小时。洗涤之后加入一抗小鼠抗-His 标签抗体，室温反
 应 1 小时。洗涤之后加入二抗山羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记抗体，室温

反应 1 小时。洗涤之后加入显色液，405nm 波长读取吸收值。结果见表 2。

表 2

抗体株	OD (对小鼠 PD-L1)
PDL1-56 dAb	0.075
空白	0.096

可见，本发明的人 PD-L1 的重链单域抗体不结合小鼠 PDL1-Fc 蛋白。

5 2.4 竞争 ELISA 考察 PD-L1 重链单域抗体对 PD-1 与 PD-L1 相互作用的阻断效果

PDL1-Fc 蛋白与 PD1-Fc 蛋白(SEQ ID NO:34)由 HEK293 细胞表达获得 (pCDNA4, Invitrogen, Cat V86220)。利用 Thermo 公司的 Biotinlytion 试剂盒，得到生物素化的蛋白 PD1-Fc-Biotin。

10 PDL1-Fc 融合蛋白 0.5μg/孔 4℃过夜包被平板，之后每孔加入 100 ng 实施例 2.1 所得的重链单域抗体(对照组为针对其他不相关靶标的单域抗体，或只是缓冲液)以及 10μg PD1-Fc-Biotin(空白组不加入任何抗体或蛋白，只加入等体积缓冲液)，室温下反应 1 小时。之后加入 SA-HRP(购自 Sigma 公司)，室温反应 1 小时。之后加入显色液，405nm 波长读取吸收值。当样品
15 OD 值比对照 OD 值<0.8 时，则认为抗体有阻断效果。

结果如表 3 所示，抗体株 56 表现出对 PD-1/PD-L1 相互作用的阻断效应。

表 3

样品	OD
对照 1	2.335
对照 2	2.413
空白	0.079
PDL1-56	0.129

20 2.5 通过 FACS 考察 PD-L1 重链单域抗体对细胞表面 PD-L1 与 PD-1 相互作用的阻断效果

通过向人 HEK293 细胞瞬时转染带有人 PD-L1 全长蛋白基因的质粒 (pCDNA4, Invitrogen, Cat V86220)，获得在膜上瞬时表达人 PD-L1 蛋白的 HEK293 细胞(293-PDL1 细胞)。

25 取 293-PDL1 细胞，在 96 孔板重悬于 0.5%PBS-BSA 缓冲液中，加入上述待检测抗体。同时设置阴性对照，阴性对照为 2 μ g 的针对其他靶标的单

域抗体。所有样本加入 0.3 μ g hPD-1-Fc-biotin, 二抗为 eBioscience 的 SA-PE, 染色完毕后流式细胞仪进行检测。如果加入抗体后荧光值比不加抗体组向空白方向迁移, 则认为该抗体能阻断细胞表面 PD-L1 和 PD-1 的相互作用。以此方法鉴定能阻断细胞表面 PD-L1 抗原和 PD-1 结合的抗体。

- 5 结果如图 1 显示, 抗体株 56 表现出对 PD-1/PD-L1 相互作用的阻断效应。

2.6 PD-L1 重链单域抗体对 PD-L1 抗原蛋白的结合曲线

- 用得到的 PD-L1 重链单域抗体 0.5 μ g/孔 4 $^{\circ}$ C 过夜包被平板, 随后加入
10 PDL1-Fc 融合蛋白的梯度稀释系列, 室温下反应 1 小时。洗涤之后加入山羊抗人 IgG-Fc 辣根过氧化物酶标记抗体, 室温反应 1 小时。洗涤之后加入辣根过氧化物酶显色液, 405nm 波长读取吸收值。应用软件 SotfMax Pro v5.4 进行数据处理和作图分析, 通过四参数拟合, 得到抗体对 PD-L1 结合曲线及 EC50 值(约为 5 ng/ml)。结果见图 2。

15

2.7 PD-L1 重链单域抗体对 PD-1 与 PD-L1 相互作用的阻断曲线

- 用 PDL1-Fc 融合蛋白 0.5 μ g/孔 4 $^{\circ}$ C 过夜包被平板, 之后每孔加入 100uL PD-L1 阻断型单域抗体 Fc 融合蛋白的梯度稀释系列(稀释液中含有 100 μ g/mL PD1-Fc-Biotin), 室温下反应 1 小时。之后加入 SA-HRP(购自 Sigma
20 公司), 室温反应 1 小时。之后加入显色液, 405nm 波长读取吸收值。

应用软件 SotfMax Pro v5.4 进行数据处理和作图分析, 通过四参数拟合, 得到抗体株 56 对 PD-L1/PD-1 阻断曲线及 IC50 值(143ng/mL)。结果见图 3。

实施例 3: PD-L1 单域抗体的人源化

- 25 人源化方法采用蛋白表面氨基酸人源化(resurfacing)的方法及 VHH 人源化通用框架移植法(CDR grafting to a universal framework)完成。

- 人源化步骤如下: 对抗体株 56 进行同源建模, 建模软件为 Modeller9。参考同源序列为 NbBcII10 抗体 (PDB 编号为: 3DWT), 并根据蛋白三维结构计算氨基酸的相对溶剂可及性 (relative solvent accessibility)。如抗体株
30 56 的某个氨基酸暴露在溶剂内, 则替换为参考人抗体 DP-47 序列相同位置的氨基酸, 最终完成全部替换。

VHH 人源化通用框架移植法具体步骤如下：首先获取 Cécile Vincke 等人根据序列同源性设计完成的通用性人源化 VHH 框架 h-NbBcII10FGLA(PDB 编号为：3EAK)，该框架设计基于纳米抗体 NbBcII10 抗体（PDB 编号为：3DWT），参考人源抗体 DP-47 进行蛋白表面氨基酸人源化，并改造 VHH 序列框架 2（framework-2）的部分氨基酸 FGLA 完成。我们直接使用 h-NbBcII10FGLA 作为框架，将 CDR 替换为抗体株 56 的 CDR 区，完成抗体的人源化。

对抗体株 56 进行人源化，获得 5 种抗体株 56 的人源化变体。表 4 列出这些人源化变体的序列编号以及其中的氨基酸变化，其中氨基酸残基编号比照 Kabat 编号。图 4 显示人源化序列的比对结果。

表 4

	Q5V	K27F	M28T	S29F	E44G	R45L	Q71R	N72D	A74S	S76N	K83R	P84A	M89V
Hu56V1 (SEQ ID NO:2)	✓						✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hu56V2 (SEQ ID NO:3)	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hu56V3 (SEQ ID NO:4)	✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hu56V4 (SEQ ID NO:5)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hu56V5 (SEQ ID NO:6)	✓						✓	✓	✓	✓		✓	✓

实施例 4：用哺乳动物细胞制备 PD-L1 阻断型抗体蛋白

4.1 制备 PD-L1 单域抗体的 Fc 融合蛋白

根据蛋白数据库 Uniprot 上人免疫球蛋白 gamma1(IgG1)的恒定区氨基酸序列(P01857)，得到人 IgG1-Fc 区氨基酸序列(SEQ ID NO: 7)。通过逆转录 PCR，从人 PBMC 总 RNA 中获得编码人 IgG1-Fc 的核酸片段，再通过 overlapping PCR 得到由上述实施例获得的 PD-L1 单域抗体与 Fc 的融合蛋白的编码核酸片段。之后再亚克隆至载体 pCDNA4 (Invitrogen，Cat V86220)。也可使用经定点突变去除 ADCC 活性或 CDC 活性的 Fc 区序列，如 SEQ ID NO: 8 或 9。

重组构建的单域抗体-Fc 融合蛋白质粒转染 HEK293 细胞进行抗体表达。将重组表达质粒用 Freestyle293 培养基稀释并加入转化所需 PEI (Polyethylenimine)溶液，将每组质粒/PEI 混合物分别加入 HEK293 细胞悬液中，放置在 37℃，10% CO2，90rpm 中培养；同时补加 50 μg/L IGF-1。四小时后再补加 EX293 培养基，2m₃₀⁻ 谷氨酰胺和 50 μg/L IGF-1，135rpm 培

养。24 小时后加 3.8mM VPA。培养 5~6 天后，收集瞬时表达培养上清液，通过 Protein A 亲和层析法，纯化得到目标 PD-L1 单域抗体-Fc 融合蛋白。

所获得的 PD-L1 单域抗体-Fc 融合蛋白的序列示于 SEQ ID NO: 10-27。

5 4.2 制备 MedImmune LLC 公司和 Roche 公司的 PD-L1 抗体

MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体，参照专利 US20130034559 中 2.14H9 的方法克隆抗体基因，并将其克隆进载体 pCDNA4 中。TM004 为 Roche 公司的抗 PD-L1 抗体，参照专利 US20130045201 A1 中 YW243.55.S70.hIgG 的方法克隆其抗体基因，并将其克隆进载体 pCDNA4 中。

重组构建的质粒通过 4.1 相同的方法进行 HEK293 细胞的瞬时转染表达，得到的 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体重新命名为 2.41H90P；Roche 公司的抗 PD-L1 抗体重新命名为 243.55。

15 4.3 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白与两种已知 PD-L1 抗体表达结果比较

利用相同的表达体系和瞬时转染条件，本发明的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白的表达水平平均高于为 200mg/L，而抗体 2.41H90P 表达水平约为 80mg/L，抗体 243.55 表达水平约为 40mg/L。该结果表明，本发明的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白相比另两种已知 PD-L1 抗体，其结构更为稳定，能够获得更高表达水平。

实施例 5：鉴定 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白的功能

5.1 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PD-L1 结合能力鉴定(ELISA 法)

PDL1-Chis 蛋白(SEQ ID NO:35)由 HEK293 瞬时表达及镍柱亲和层析纯化获得。得到的 PDL1-Chis 蛋白 0.5μg/孔 4℃过夜包被平板，之后加入上述实施例获得的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白的梯度稀释系列，室温下反应 1 小时。洗涤之后加入山羊抗人 IgG-Fc 辣根过氧化物酶标记抗体，室温反应 1 小时。洗涤之后加入显色液，405nm 波长读取吸收值。应用软件 SotfMax Pro v5.4 进行数据处理和作图分析，通过四参数拟合，得到抗体对 PD-L1 结合曲线及 EC50 值(所有供试抗体 EC50 值均为约 150ng/mL)以反映抗体对 PD-L1 的亲合能力。

结果见图 5，其中纵坐标为 OD405，横坐标为 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白浓度(单位 ng/mL)；倒三角、正三角、方形分别代表抗体株 56 的三种不同人源化形式的 Fc 融合蛋白：hu56v1-Fc、hu56v2-Fc、hu56v5-Fc。三种蛋白对 PD-L1 的亲合力相当。

5

5.2 鉴定 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PD-L1 结合能力(SPR 法)并与已知抗体比较

上述实施例获得的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白针对重组的人 PD-L1 的结合动力学通过表面等离子共振(surface plasmon resonance, SRP)方法，使用 BIAcore X100 仪器测量。重组的人 PDL1-Fc 直接包被于 CM5 生物传感器芯片上以获得大约 1000 应答单位(response units, RU)。对于动力学测量，将抗体用 HBS-EP+ 1×缓冲液(GE, cat#BR-1006-69)三倍连续稀释(1.37nm 至 1000nm)，在 25℃进样 120s，解离时间为 30min，10mM 甘氨酸-HCl(pH2.0)再生 120s。使用简单一对一 Languir 结合模型(BIAcore 评价软件 3.2 版(BIAcore Evaluation Software version 3.2)) 计算结合速率(kon)和解离速率(koff)。平衡解离常数(kD) 以比率 koff/kon 计算。

测量的抗 PD-L1 抗体的结合亲和力见表 5。结果表明 PDL1-56-Fc 蛋白对 PD-L1 靶标蛋白的亲和力显著高于两个本领域已知 PD-L1 抗体，其较高的 Ka 及较低的 Kd 值说明该抗体融合蛋白能更快速的结合 PD-L1 抗原并很难解离下来，这进一步说明 PDL1-56-Fc 作为一个阻断型抗体，其性质更优于两个已知 PD-L1 抗体。

表 5

抗体	Ka	Kd	KD
PDL1-56-Fc	1.796E+6	1.432E-5	7.975E-12
PDL1-hu56V2-Fc	2.123E+6	1.820E-5	8.573E-12
PDL1-56	3.323E+6	8.213E-4	2.472E-10
2.41H90P	7.949E+5	6.160E-5	7.750E-11
243.55	4.481E+5	6.055E-5	1.351E-10

5.3 鉴定 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PDL1-PD1 相互作用的阻断效果(竞争 ELISA 法)

PDL1-Fc 融合蛋白 0.5μg/孔 4℃过夜包被平板，之后加入上述实施例获得的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白的梯度稀释系列，每孔 100uL(稀释液中

含有 100ug/mL PD1-Fc-Biotin), 室温下反应 1 小时。洗涤之后加入 SA-HRP(购自 Sigma 公司), 室温反应 1 小时。洗涤之后加入显色液, 405nm 波长读取吸收值。

5 应用软件 SotfMax Pro v5.4 进行数据处理和作图分析, 通过四参数拟合, 得到抗体对 PDL1-PD1 阻断曲线及 IC50 值。结果见图 6, 其中纵坐标为 OD405, 横坐标为 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白浓度(单位 ng/mL); 倒三角、正三角、方形分别代表抗体株 56 的三种不同人源化形式的 Fc 融合蛋白: hu56v1-Fc、hu56v2-Fc、hu56v5-Fc。三种蛋白对 PDL1-PD1 相互作用的阻断能力相当。

10

5.4 鉴定 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PD-L1/CD80 相互作用的阻断能力 (竞争 ELISA 法)

CD80-Fc 蛋白(SEQ ID NO:36)由 HEK293 细胞表达获得。利用 Thermo 公司的 Biotinlytion 试剂盒, 得到生物素化的蛋白 CD80-Fc-Biotin。

15 PDL1-Fc 融合蛋白 0.5μg/孔 4℃过夜包被平板, 之后加入上述实施例获得的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白的梯度稀释系列, 每孔 100uL (稀释液中含有 300ug/mL CD80-Fc-Biotin), 室温下反应 1 小时。洗涤之后加入 SA-HRP (购自 Sigma 公司), 室温反应 1 小时。洗涤之后加入显色液, 405nm 波长读取吸收值。

20 应用软件 SotfMax Pro v5.4 进行数据处理和作图分析, 通过四参数拟合, 得到抗体对 PDL1-CD80 阻断曲线及 IC50 值。结果见图 7, 其中纵坐标为 OD405, 横坐标为 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白 hu56V2-Fc 的浓度(单位 ng/mL)。结果显示, PD-L1 阻断型单域抗体 Fc 融合蛋白 hu56V2-Fc 能有效阻断 PD-L1 与 CD80 之间的相互作用。

25

5.5 鉴定 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PD-L1/PD1 相互作用的阻断能力 (FACS 法)

人 HEK293 细胞通过瞬时转染包含人 PD-L1 全长基因的质粒, 于膜上瞬时表达猴 PD-L1 蛋白。

30 按照 5×10⁵cells/tube 分组, 每组加入工作浓度 2ug/ml 的 PD1-muFc (SEQ ID NO: 39), 再加入不同浓度的 KN035, 冰上孵育 30min, 洗涤 3

次后加入 PE 标记的羊抗鼠二抗作为检测抗体,冰上孵育 30min 后,流式细胞仪检测荧光强度。

应用软件 GraphPad Prism 进行数据处理和作图分析,通过四参数拟合,得到抗体对 293 细胞膜表达 PDL1 与可溶 PD1 直接相互作用的阻断曲线及 IC50 值。结果见图 8,其中纵坐标为 MFI,横坐标为 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白 hu56V1-Fcm1 的浓度(单位 μ g/mL)。结果显示,PD-L1 阻断型单域抗体 Fc 融合蛋白能有效阻断 293 细胞膜表达 PDL1 与 PD1 之间的相互作用。

Jurket 细胞株转入并整合包含人 PD1 全长基因的质粒,得到稳定表达人 PD1 蛋白的 Jurket 细胞株,命名为 Jurket-PD1。

取 Jurkat-PD1 细胞与生物素标记的 PDL1-muFc (SEQ ID NO: 38) 蛋白 (30 μ g/ml) 冰上孵育 30min 后,加入梯度稀释的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白 hu56V1-Fcm1,冰上孵育 1h, PBS 洗涤 3 次,加入 1:250 稀释的 Streptavidin PE,冰上孵育 30min, PBS 洗涤 3 次后,流式细胞仪检测荧光强度。

应用软件 GraphPad Prism 进行数据处理和作图分析,通过四参数拟合,得到抗体对 Jurkat-PD1 与可溶 PDL1-muFc 蛋白直接相互作用的阻断曲线及 IC50 值。结果见图 9,其中纵坐标为 MFI,横坐标为 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白 hu56V1-Fcm1 的浓度(单位 μ g/mL)。结果显示,PD-L1 阻断型单域抗体 Fc 融合蛋白能有效阻断 Jurkat-PD1 与 PD-L1 之间的相互作用。

5.6 分析 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PD-L1 蛋白结合的特异性

人 HEK293 细胞通过瞬时转染带有人 B7 家族蛋白全长基因的质粒 (pCDNA4, Invitrogen, Cat V86220),于膜上瞬时表达人 PD-L1 蛋白。该质粒还使得目标蛋白 C 端融合 EGFP 蛋白,从而可以通过绿色荧光强度来考察膜上 B7 家族蛋白的表达水平。构建好的瞬时转染细胞株包括: 293-PDL1-EGFP, 293-PDL2-EGFP, 293-B7H3-EGFP, 293-B7H3-EGFP。

取构建好的细胞,重悬于 0.5% PBS-BSA Buffer 中,加入 hu56V2-Fc 抗体,同时设置阴性对照为 2 μ g 的针对其他不相关靶标的单域抗体,冰上孵育 20min。洗涤后加入 eBioscience 二抗 anti-hIg-PE,冰上 20min。洗涤后将细胞重悬于 500 μ l 的 0.5% PBS-BSA Buffer 中,流式细胞仪进行检测。

结果如图 10 所示。上排为对照组，下排为样品组。可以清楚的看到，hu56V2-Fc 抗体只特异性结合人 PD-L1 蛋白，而不与其他 B7 家族蛋白结合。

5.7 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对猴 PD-L1 蛋白的结合

5 人 HEK293 细胞通过瞬时转染包含猴 PD-L1 全长基因的质粒，于膜上瞬时表达猴 PD-L1 蛋白(SEQ ID NO:37)。该质粒上还使得目标蛋白 C 端融合 EGFP 蛋白，从而可以通过绿色荧光强度来考察膜上猴 PD-L1 蛋白的表达水平。

取构建好的细胞，重悬于 0.5% PBS-BSA Buffer 中，加入 hu56V2-Fc 抗体，冰上孵育 20min。洗涤后加入 eBioscience 二抗 anti-hIg-PE，冰上 20min。洗涤后将细胞重悬于 500 μ l 0.5%PBS-BSA Buffer 中，流式细胞仪进行检测。

结果如图 11 所示。可以清楚的看到，hu56V2-Fc 抗体能有效与猴 PD-L1 蛋白结合。

15 5.8 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白可有效识别病人组织切片上的 PD-L1 阳性细胞群

PD-L1 阳性肺癌病人的肿瘤组织切片，用 5 μ g/mL 的 hu56V2-Fc 抗体作为一抗过夜染色，用山羊抗人 HRP 标记抗体(Perkin-Elmer, Cat: NEF802001EA)为二抗室温反应 1.5hr，最后显色。

20 结果如图 12, hu56V2-Fc 抗体能有效识别肺癌病人组织切片上的 PD-L1 阳性细胞群，且能同时识别 PD-L1 阳性的肿瘤细胞和 PD-L1 阳性的免疫细胞。

5.9 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白在对 PBMC 的激活作用

25 利用人淋巴细胞分离液(天津灏洋)密度梯度离心从健康捐献者外周血浓缩白细胞中分离外周血单个核细胞(PBMC)。

将 2.5 μ g/mL 抗-CD3 抗体以及 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白 hu56V2-Fc (实验中也命名为 KN035)的梯度稀释系列在 4℃过夜包被于细胞培养板上。第二天每孔中加入 1×10^5 个 PBMC 细胞。培养 5 天后取上清，利用 IFN- γ ELISA 检测试剂盒(ebioscience)检测上清中 IFN- γ 的水平。

结果见图 13。可见 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白配合 anti-CD3 抗体可

以增强 PBMC 中细胞分泌 γ -干扰素，即 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白增强了 PBMC 细胞的活化。同时这种激活效果具有浓度依赖性。

5.10 在树突细胞-T 细胞混合淋巴反应中测定 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 CD4⁺T 细胞的激活作用，并与 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体进行比较

利用人淋巴细胞分离液(天津灏洋)密度梯度离心从健康捐献者外周血浓缩白细胞中分离外周血单个核细胞 PBMC。然后将其用无血清的 RPMI1640 培养基培养 1-2 小时，除去未贴壁的细胞，并将细胞培养于含 10% FBS，10ng/ml GM-CSF 以及 20ng/mL IL-4 的 RPMI 中。培养 5-6 天后，加入 10ng/ml 的 TNF- α 并孵育 24 小时，获得成熟的树突细胞 (DC 细胞)。

将通过此方法获得的 DC 细胞重悬于 RPMI 完全培养基中， 2×10^5 /ml。然后在 96 孔 U 形底板(Costar:3799)中每孔加入 50 μ l，在培养箱中培养。

利用磁珠分离试剂盒(Miltenyi Biotec: 130-096-533)按照说明书方法从另一个供体 PBMC 中分离 CD4⁺ T 细胞。

将通过上述方法获得的 1×10^4 个树突细胞和 1×10^5 个 CD4⁺T 细胞混合，于 RPMI 完全培养基中重悬并加入 96 孔培养板，每孔加入 50 μ l 细胞混液；每孔加入 100 μ l 稀释于 RPMI 完全培养基中的 hu56V2-Fc，抗体终浓度为 0.1 μ g/ml 或 0 μ g/ml。培养 5-7 天后取上清，利用 IFN- γ ELISA 检测试剂盒(ebioscience)检测上清中 IFN- γ 的水平。

结果见图 14 A。可见 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白可以增强混合淋巴细胞反应中 CD4⁺ T 细胞的 γ -干扰素分泌，即 PD-L1 阻断型单域抗体 Fc 融合蛋白增强了 T 细胞的活化。

50ng/ml GM-CSF+25ng/ml IL-4 培养供试者 1 的 PBMC，6 天后，用 TNF- α (50ng/ml) 成熟 24h，收集 DC 细胞；再从供试者 2 的 PBMC 中用磁珠分离试剂盒(Miltenyi Biotec: 130-096-533)分选出 CD4⁺ T cell；DC 细胞按照 10^4 /well 加入到 96 孔 U 形底板，2-4h 后加入 10^5 cells/well 的 CD4⁺ T；每孔加入不同浓度的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白 hu56V1-Fcm1 或者 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体 2.41H90P；培养 5 天后，利用 IFN- γ ELISA 检测试剂盒(ebioscience)检测上清中 IFN- γ 的水平。

结果见图 14 B，其中灰色柱状图指示 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白刺激

分泌 IFN- γ 的情况，黑色柱状图指示 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体 2.41H90P。PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白可随浓度增加而增强混合淋巴细胞反应中 CD4⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的能力，且相同浓度条件下，PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白活化 T 细胞的能力略强于 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体 2.41H90P。

5.11 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白在 Jurkat/Raji-PDL1 混合培养体系刺激 T 细胞分泌 IL-2 作用并与 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体进行比较

我们构建了一个 T 细胞活化体系即 Jurkat/Raji-PDL1 共培养体系来检测 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 T 细胞活化的作用并与 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体进行比较。

该体系采用 Jurkat 细胞（T 细胞）作为效应细胞，以 anti-human CD3 Antibody 作为 Jurkat 细胞活化的第一信号；通过基因工程改造、稳定表达人 PDL1 的 Raji 细胞 Raji-PDL1 细胞，其表面的 B7 家族分子中 CD80 提供第二共刺激信号活化 Jurkat 细胞，同时其细胞表面高表达的 PDL1 作为负调节因子通过结合 PD1 抑制 Jurkat 细胞活化。

使用 10%FBS+1640+150ng/ml anti-CD3 配制梯度稀释的 hu56V1-Fcml 和 2.41H90P 抗体蛋白；Jurkat 和 Raji-PDL1 细胞用 10%FBS 分别调整至 3×10^6 cells/ml 和 1.5×10^6 cells/ml，每孔加入 50ul，37℃放置 24 小时后，取出 100ul 培养上清，使用试剂盒检测 IL-2 的表达量。

图 15 显示，其中黑色柱状图指示 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白刺激分泌 IL-2 的情况，灰色柱状图指示 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体 2.41H90P。PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白可随浓度增加而增强该混合淋巴细胞反应中 Jurkat 细胞分泌 IL-2 的能力，且相同浓度条件下，其活化 Jurkat 细胞的能力略强于 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体 2.41H90P。

5.12 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白与 FcRn 的亲和力

生物素化的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白 hu56V1-Fc, hu56V2-Fc, hu56V1-Fcml 以及 hu56V2-Fcml 稀释至 10ug/mL 固化到 SA biosensor 上，人 FcRn 蛋白（RnD Systems，货号 8639-FC-050）稀释至 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM 5 个梯度。使用 Fortebio 公司的 Octet K2 检测其相

互作用，其中固化 100s，结合 60s，解离 30s。

表 6 显示，PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白与 FcRn 的平均 KD 约为 5.1E-07M。突变 Fc (Fcm1) 与野生型 Fc 相比，亲和力没有明显差异。

表 6

样品名称	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
hu56V1-Fc	5.13E-07	1.95E+05	1.00E-01
hu56V2-Fc	5.05E-07	2.10E+05	1.06E-01
hu56V1-Fcm1	5.10E-07	1.89E+05	9.63E-02
hu56V2-Fcm1	5.10E-07	2.34E+05	1.19E-01

5

5.13 带有突变 Fc 的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白的 CDC 以及 ADCC 活性考察

以 300IU/ml IL-2 活化 24 小时后 PBMCs 为效应细胞，细胞数为 8×10^5 cells/well；以稳定表达人 PDL1 蛋白的 Raji-PDL1 为靶细胞，细胞数为 2×10^5 cells/well；加入不同浓度的 hu56V1-Fcm1 或者作为阳性对照的 Rituxan 蛋白，37℃培养 6 小时后使用 CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测试剂盒检测浓度下的 ADCC 活性(%)。

图 16A 显示，与阳性对照 Rituxan 相比，hu56V1-Fcm1 无明显 ADCC 活性。

以 Raji-PDL1 细胞为靶细胞，细胞数为 2×10^4 cells/well，5%食蟹猴血清提供补体，加入不同浓度的 hu56V1-Fcm1 和阳性对照 Rituxan，37℃培养 2h 后，使用 CCK-8 检测样品的 CDC 活性。

图 16B 显示，与阳性对照相比，hu56V1-Fcm1 在 0.02ug/ml 至 20ug/ml 浓度范围内，无 CDC 活性。

20

5.14 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对肿瘤生长的抑制活性

对于不能识别小鼠 PD-L1 的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白，hu56V2-Fc，采用免疫缺陷 NOD/SCID(非肥胖型糖尿病/重症联合免疫缺陷)小鼠研究其体内活性。通过对 NOD/SCID 小鼠皮下移植表达人 PD-L1 的黑色素瘤细胞系 A375(ATCC, CRL-1619™)和人的外周血单个核细胞 PBMC 的实验来实现此研究目的。A375 和 PBMC 在注射前按 5: 1 的比例混合，皮下注射总体

积 100 μ l(含 500 万 A375, 100 万 PBMC)。抗体在肿瘤接种后 24 小时第一次腹腔注射给药, 之后每周给药一次, 给药剂量为 0.3mg/kg; PBS 作为阴性对照。每个实验组 4-6 只小鼠。每周两次观察肿瘤的形成, 并用游标卡尺测量肿瘤长径和短径, 计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线图(参见图 17 A),
5 可以看出抗体 hu56V2-Fc 在 0.3mg/kg 剂量下就可以显著抑制肿瘤生长。

使用相同的体内模型考察同样不识别小鼠 PD-L1 的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白, hu56V1-Fcm1。A375 与人 PBMCs 按 4:1 混合后接种于 NOD-SCID 小鼠皮下, 4 小时后腹腔注射给予不同剂量的 hu56V1-Fcm1 (0.1、0.3、1、3、10mg/kg), 研究一周一次连续 4 周给药后对 NOD-SCID 小鼠 A375 /human
10 PBMCs 异体移植瘤的抑瘤作用。PBS 作为阴性对照。每个实验组 4-6 只小鼠。每周两次观察肿瘤的形成, 并用游标卡尺测量肿瘤长径和短径, 计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线图(参见图 17 B)。结果显示, hu56V1-Fcm1 各剂量组 (0.1~10mg/kg) 均对 NOD-SCID 小鼠 A375 /human PBMCs 异体移植瘤具有显著抑瘤作用, 但无明显剂量相关性。抗体 hu56V1-Fcm1 在
15 0.1mg/kg 剂量下就可以显著抑制肿瘤生长。

5.15 不同给药次数的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对肿瘤生长的抑制活性

继续使用上述 NOD-SCID 小鼠 A375 /human PBMCs 异体移植瘤模型进行考察。A375 与人 PBMCs 按 4: 1 混合后接种于 NOD-SCID 小鼠皮下, 4
20 小时后腹腔注射给予 hu56V1-Fcm1 (0.3mg/kg), 之后每三天腹腔给药一次。最终给药次数分别为 1, 2, 3, 4 次。每三天观察肿瘤的形成, 并用游标卡尺测量肿瘤长径和短径, 计算肿瘤体积, 直至第一次给药算起第 33 天。绘制肿瘤生长曲线图 (图 18), 结果显示考察周期内各给药次数均对 NOD-SCID 小鼠 A375 /human PBMCs 异体移植瘤具有显著抑瘤作用。

25

5.16 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对肿瘤生长的抑制活性并与 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体进行比较

通过对 NOD/SCID 小鼠皮下移植表达人 PD-L1 的黑色素瘤细胞系 A375(ATCC, CRL-1619™)和人的外周血单个核细胞 PBMC 的实验来实现此
30 研究目的。A375 和 PBMC 在注射前按 5: 1 的比例混合, 皮下注射总体积 100 μ l(含 500 万 A375, 100 万 PBMC), 抗体在肿瘤接种后 24 小时第一次

腹腔注射给药，之后每周给药一次，给药剂量为 1mg/kg。给药组包括 hu56V2-Fc(表示为 hu56)以及 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体组(表示为 2.41)，PBS 作为阴性对照。每个实验组 4-6 只小鼠。每周两次观察肿瘤的形成，并用游标卡尺测量肿瘤长径和短径，计算肿瘤体积，绘制肿瘤生长曲线图(参见图 19 A)。其中 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体在此模型下基本无效，且在第 35 天肿瘤体积已经超出阴性对照组，因此停止给药及肿瘤体积测量。可以看出在该模型下，hu56V2-Fc 在 1mg/kg 剂量下抑制 A375 肿瘤生长的效果显著优于 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体 2.41H90P。

由于上述体系下 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体没有显示出肿瘤抑制效果，有可能是由于体系内 PBMC 的激活不足以抑制肿瘤细胞的生长。因此增加混合细胞中 PBMC 的含量重复考察 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体的抑瘤效果。

A375 和 PBMC 在注射前按 1:1 的比例混合，皮下注射总体积 100 μ l(含 500 万 A375，500 万 PBMC)，抗体在肿瘤接种后 24 小时第一次腹腔注射给药 MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体(2.41H90P)，之后每周给药一次，给药剂量为 1mg/kg；PBS 作为阴性对照。每个实验组 4-6 只小鼠。每周两次观察肿瘤的形成，并用游标卡尺测量肿瘤长径和短径，计算肿瘤体积，绘制肿瘤生长曲线图(参见图 19 B)。可以看出，增加 PMBC 的比例后，MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体在体内模型中表现出了抑瘤效果。

计算抗体在第 42 天的平均肿瘤抑制率($TGI=(1-\text{给药组肿瘤体积}/\text{对照组肿瘤体积})\times 100\%$)，列入下表 7：

表 7

A375 细胞($\times 10^6$): PBMC 细胞($\times 10^6$)	TGI	
	hu56V2-Fc	2.41H90P
5:1	65.7%	N.A.
5:5	—	41.7%

上述体内抑瘤实验结果表明，本发明的 PD-L1 阻断型单域抗体 Fc 融合蛋白在对黑色素瘤 A375 的裸鼠体内模型中，表现出显著优于已知 PD-L1 阻断型抗体(MedImmune LLC 公司的抗 PD-L1 抗体)的抑瘤效果。

实施例 6： PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白稳定性研究

6.1 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对碱性破坏及氧化破坏的抗性研究

使用 500mM 碳酸氢铵作为碱性破坏试剂，37℃处理 38 小时。选择 1% 双氧水作为氧化剂，室温处理 8 小时。

- 使用竞争 ELISA 法检测处理前后的上述实施例获得的 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白的生物学活性变化。如图 20 可知，碱性及氧化破坏不影响候选
- 5 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白的活性，38 小时碱处理后的竞争 ELISA 活性相对 0 小时为 103%。8 小时氧化的竞争 ELISA 活性相对 0 小时为 106%。

6.2 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白在高浓缩下的稳定性

- 将 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白通过 UF/DF 浓缩并换液到 PBS 缓冲液中。并通过 SE-HPLC 检测其聚体的形成趋势。
- 10

浓缩至 200mg/mL 时，PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白的 SE-HPLC 检测纯度为 96.8%，与低浓度(~2mg/mL)时相比，聚体增加了约 2.4%。整个浓缩过程中，蛋白溶液未出现浑浊或聚集现象。

序列表

>SEQ ID NO:1 抗体株 56

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISQNNAKSTVY LQMNSLKPEDTAMY YCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTQVTVSS

5

>SEQ ID NO:2 Hu56V1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTTLTVSS

10

>SEQ ID NO:3 Hu56V2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTTLTVSS

>SEQ ID NO:4 Hu56V3

15 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCAWFRQAPGKGLERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTTLTVSS

>SEQ ID NO:5 Hu56V4

20 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCAWFRQAPGKGLERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTTLTVSS

>SEQ ID NO:6 Hu56V5

25 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNSKNTVY LQMNSLKAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTTLTVSS

> SEQ ID NO:7 IgG1-Fc

30 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:8 IgG1-Fc-m1

35 EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVAVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:9 IgG1-Fc-m2

40 EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:10 56-Fc

45 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISQNNAKSTVY LQMNSLKPEDTAMY YCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTQVTVSSEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
50 RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:11 Hu56V1-Fc

55 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTTLTVSSEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:12 Hu56V2-Fc

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLLTVTSSEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
5 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:13 Hu56V3-Fc

10 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRRCMAWFRQAPGKGLERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLLTVTSSEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
15 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:14 Hu56V4-Fc

20 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRRCMAWFRQAPGKGLERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLLTVTSSEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:15 Hu56V5-Fc

25 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLKAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLLTVTSSEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
30 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:16 56-Fc-m1

35 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISQNNAKSTVYVYLMNSLKPEDTAMYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTQVTVSSEP
KSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
40 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:17 Hu56V1-Fc-m1

45 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLLTVTSSEPK
SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:18 Hu56V2-Fc-m1

50 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLLTVTSSEPK
SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQVY
55 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:19 Hu56V3-Fc-m1

60 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRRCMAWFRQAPGKGLERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYY₄₃AADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLLTVTSSEPK

SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

> SEQ ID NO:20 Hu56V4-Fc-m1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRRCMAWFRQAPGKGLERVAKLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGLTVTSSEP
SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

> SEQ ID NO:21 Hu56V5-Fc-m1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGLTVTSSEP
KSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15

20

> SEQ ID NO:22 56-Fc-m2

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLTTSGSTYLADSVK
GRFTISQNNAKSTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTQVTSSEP
KSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25

> SEQ ID NO:23 Hu56V1-Fc-m2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGLTVTSSEPK
SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

35

>SEQ ID NO:24 Hu56V2-Fc-m2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGLTVTSSEPK
SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

45

> SEQ ID NO:25 Hu56V3-Fc-m2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSRRRCMAWFRQAPGKGLERVAKLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGLTVTSSEP
SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

50

> SEQ ID NO:26 Hu56V4-Fc-m2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRRCMAWFRQAPGKGLERVAKLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGLTVTSSEP
SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

55

60

- > SEQ ID NO:27 Hu56V5-Fc-m2
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLLTTSGSTYLADSVK
GRFTISRDN SKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCAADSFE DPTCTLVTSSGAFQYWGQGLVTVSSEP
5 KSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- 10 >SEQ ID NO:28 Human PDL1-Fc
TVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEE DLKVQHSSYRQR
ARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKNINQRILVVDPVTS
EHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREENL FNVSTSLRINTTTNEIFYCTFRRLDP
EENHTAELVPELPLAHPPNERTDDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
15 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- >SEQ ID NO:29
20 GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGGC
- >SEQ ID NO:30
GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC
- 25 >SEQ ID NO:31
GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG
- >SEQ ID NO:32
GGACTAGTGC GGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT
- 30 >SEQ ID NO:33 mice PDL1-Fc
FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLK PQHSNFRGR
ASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKV NAPYKINQRISVDPATSEHE
LICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGM LLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQ
35 NHTAELIPELPATHPPQNRTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- 40 >SEQ ID NO:34 Human PD1-Fc
PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLN WYRMSPSNQTDKLAAFPEDR
SQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV TERRAEVP
TAHPSPSRPAGQFQDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
45 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- >SEQ ID NO:35 PDL1-Chis
TVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEE DLKVQHSSYRQR
50 ARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYKNINQRILVVDPVTS
EHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREENL FNVSTSLRINTTTNEIFYCTFRRLDP
EENHTAELVPELPLAHPPNERTDGSHHHHHHHH
- >SEQ ID NO:36 CD80-Fc
55 VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNL
SIVILALRPSDEGTYESCVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFP
EPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLD FNMMTNHSFMCLIKYGH LRVNQTFNWNTTK
QEHFPDNDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
60 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT

VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:37 monkey PDL1

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSNYRQ
5 RAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVT
SEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRLLDP
EENHTAELVIPELPLALPPNERTHLVILGAIFLLLGVALTFIFYLRKGRMMDMKKSGIRVTNSKKQRD
TQLEET

10 >SEQ ID NO:38 human PDL1-muFc

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQ
RARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVT
SEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLD
PEENHTAELVIPELPLAHPNERTDIEGRMDPKSSDKTHTCPPCPAPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPK
15 VTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRV
NSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAEN
YKNTQPIMN TNGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK

>SEQ ID NO:39 Human PD1-muFc

20 PGWFLDSPDRPWN PPTFSPALLV VTEGDNATFTCSFSNTSESFVLN WYRMSPSNQTDKLA AFPEDR
SQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV TERRAEVP
TAHPSPSPRPAGQFQIEGRMDPKSSDKTHTCPPCPAPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVT CVVVDIS
KDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFPAPIE
KTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAEN YKNTQPIMN
25 TNGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK

权 利 要 求 书

1. 程序性死亡配体 1 (PD-L1)结合分子,其能够特异性结合 PD-L1 且由式 A-L-B 的氨基酸序列组成,其中 A 表示免疫球蛋白单一可变结构域, L 不存在或表示氨基酸接头, 且 B 表示人免疫球蛋白 Fc 区,

其中所述免疫球蛋白单一可变结构域由选自 SEQ ID NO:1-6 的氨基酸序列组成,

所述 PD-L1 结合分子能够通过所述人免疫球蛋白 Fc 区形成同二聚体。

2. 权利要求 1 的 PD-L1 结合分子, 其中所述人免疫球蛋白 Fc 区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。

3. 权利要求 1 的 PD-L1 结合分子, 其中所述人免疫球蛋白 Fc 区被突变以去除 ADCC 和 CDC 活性

4. 权利要求 1 的 PD-L1 结合分子, 其中所述免疫球蛋白 Fc 区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:7-9。

5. 权利要求 1-4 中任一项的 PD-L1 结合分子, 其中所述氨基酸接头长 1-20 个氨基酸。

6. 权利要求 1-5 中任一项的 PD-L1 结合分子, 其由选自 SEQ ID NO:10-27 的氨基酸序列组成。

7. 权利要求 1-6 中任一项的 PD-L1 结合分子, 其具有下述特征中的至少一个:

- (a)与人 PD-L1 结合的 KD 值小于 1×10^{-7} M;
- (b)阻断 PD-L1 和 PD-1 的相互作用;
- (c)增强 PBMC 和/或 T 细胞的活化;
- (d)抑制肿瘤生长。

8. 权利要求 1-7 中任一项的 PD-L1 结合分子, 其结合 PD-L1 的 KD 值小于 1×10^{-7} M, 优选小于 1×10^{-8} M、更优选小于 1×10^{-9} M、更优选小于 1×10^{-10} M、尤其更优选小于 1×10^{-11} M。

9. 核酸分子, 其编码权利要求 1-8 中任一项的 PD-L1 结合分子。

10. 表达载体, 其包含与表达调控元件可操作地连接的权利要求 9 的核酸分子。

11. 宿主细胞, 其包含权利要求 9 的核酸分子或以权利要求 10 的表达

载体转化，并能够表达所述 PD-L1 结合分子。

12. 产生权利要求 1-8 中任一项的 PD-L1 结合分子的方法，包括：

a) 在允许所述 PD-L1 结合分子表达的条件下培养权利要求 11 的宿主细胞；

b) 从得自步骤 a) 的培养物回收由所述宿主细胞表达的 PD-L1 结合分子；及

c) 任选进一步纯化和/或修饰得自步骤 b) 的 PD-L1 结合分子。

13. 药物组合物，其包含权利要求 1-8 任一项的 PD-L1 结合分子以及药学上可接受的载体。

14. 一种在对象中预防和/或治疗癌症的方法，包括给所述对象施用有效量的权利要求 1-8 任一项的 PD-L1 结合分子或权利要求 13 的药物组合物。

15. 权利要求 14 的方法，其还包括给所述对象施用其它抗肿瘤治疗手段。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述其它抗肿瘤治疗手段包括化疗、放疗或靶向其它肿瘤特异性抗原的抗体。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述靶向其它肿瘤特异性抗原的抗体包括抗 EGFR 抗体、抗 EGFR 变体的抗体、抗 VEGFa 抗体、抗 HER2 抗体、或抗 CMET 抗体。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述靶向其它肿瘤特异性抗原的抗体是单克隆抗体。

19. 权利要求 14-18 中任一项的方法，其中所述癌症选自肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体癌、骨肉瘤。

20. 一种在对象中预防和/或治疗感染性疾病的方法，包括给所述对象施用有效量的权利要求 1-8 任一项的 PD-L1 结合分子或权利要求 13 的药物组合物。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述感染性疾病由选自以下的病原体引起：HIV、肝炎病毒、流感病毒、疱疹病毒、贾第虫、疟原虫、利什曼原虫、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌。

22. 一种在对象中预防和/或治疗慢性炎性疾病的方法，包括给所述对象施用有效量的权利要求 1-8 任一项的 PD-L1 结合分子或权利要求 13 的药物组合物。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述慢性炎性疾病为扁平苔藓或 T 细胞介导的慢性炎性皮肤粘膜病。

24. 权利要求 1-8 任一项的 PD-L1 结合分子或权利要求 13 的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗癌症、感染性疾病或慢性炎性疾病。