

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年12月9日 (09.12.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/244328 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/095189

(22) 国际申请日: 2021年5月21日 (21.05.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010487636.9 2020年6月2日 (02.06.2020) CN

(71) 申请人: 三生国健药业(上海)股份有限公司(SUNSHINE GUOJIAN PHARMACEUTICAL (SHANGHAI) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 朱祯平(ZHU, Zhenping); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 黄浩旻(HUANG, Haomin); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 张学赛(ZHANG, Xuesai); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 李晴柔(LI, Qingrou); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 北京律诚同业知识产权代理有限公司(LECOMO INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市海淀区西土城路1号院1号楼泰富酒店写字楼三层, Beijing 100081 (CN)。

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

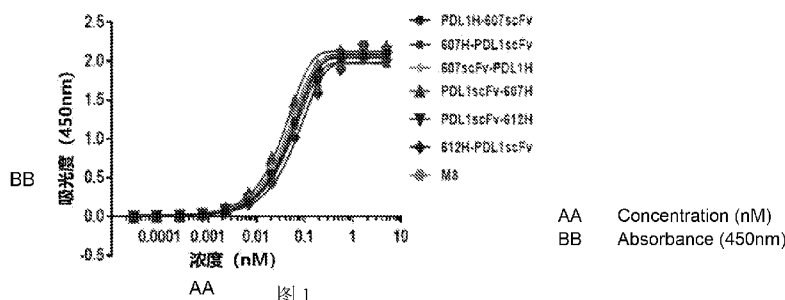
(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),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

本国际公布:

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

(54) Title: ANTI-PD-L1 AND HER2 BISPECIFIC ANTIBODY

(54) 发明名称: 一种抗PD-L1和HER2的双特异性抗体



(57) Abstract: Provided in the present invention is an anti-PD-L1 and HER2 bispecific antibody. The bispecific antibody of the present invention is capable of specifically binding with both PD-L1 and HER2 targets, and provides biological activities similar or superior to that of a monoclonal antibody.

(57) 摘要: 本发明提供了一种抗PD-L1和HER2的双特异性抗体。本发明的双特异性抗体能够同时特异性结合PD-L1和HER2两个靶点, 具有与单抗相似甚至更优的生物学活性。

WO 2021/244328 A1

一种抗 PD-L1 和 HER2 的双特异性抗体

技术领域

本发明涉及抗体领域,更具体地,本发明公开了一种抗 PD-L1 和 HER2 的双特异性抗体。

5

背景技术

人程序性细胞死亡受体-1 (PD-1) 是一种有 288 个氨基酸的 I 型膜蛋白, 是已知的主要免疫检查点 (Immune Checkpoint) 之一 (Blank et al, 2005, *Cancer Immunotherapy*, 54:307-314)。PD-1 表达在已经激活的 T 淋巴细胞, 它与配体 PD-L1 (程序性细胞死亡受体-配体 1, programmed cell death-Ligand 1) 和 PD-L2 (程序性细胞死亡受体-配体 2, programmed cell death-Ligand 2) 结合可以抑制 T 淋巴细胞的活性及相关的体内细胞免疫反应。PD-L2 主要表达在巨噬细胞和树突状细胞, 而 PD-L1 则广泛表达于 B、T 淋巴细胞及外周细胞如微血管上皮细胞, 肺、肝、心等组织细胞中。大量研究表明, PD-1 和 PD-L1 的相互作用不但是维持体内免疫系统平衡所必须, 也是导致 PD-L1 表达阳性肿瘤细胞规避免疫监视的主要机制和原因。通过阻断癌细胞对 PD-1/PD-L1 信号通路的负调控, 激活免疫系统, 能够促进 T 细胞相关的肿瘤特异性细胞免疫反应, 从而打开了一扇新的肿瘤治疗方法的大门--肿瘤免疫疗法。

PD-1 (由基因 *Pdcd1* 编码) 为与 CD28 和 CTLA-4 有关的免疫球蛋白超家族成员。研究成果显示, 当 PD-1 与其配体 (PD-L1 和/或 PD-L2) 结合时会负调节抗原受体信号转导。目前已弄清鼠 PD-1 结构以及小鼠 PD-1 与人 PD-L1 的共结晶结构 (Zhang, X.等, *Immunity* 20: 337-347(2004); Lin 等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 105: 3011-6(2008))。PD-1 及类似的家族成员为 I 型跨膜糖蛋白, 其含有负责配体结合的 Ig 可变型 (V-型) 结构域和负责结合信号转导分子的胞质尾区。PD-1 胞质尾区含有两个基于酪氨酸的信号转导模体 ITIM (免疫受体酪氨酸抑制作用模体) 和 ITSM (免疫受体酪氨酸转换作用模体)。

PD-1 在肿瘤的免疫逃避机制中起到了重要的作用。肿瘤免疫疗法, 即利用人体自身的免疫系统抵御癌症, 是一种突破性的肿瘤治疗方法, 但是肿瘤微环境可保护肿瘤细胞免受有效的免疫破坏, 因此如何打破肿瘤微环境成为抗肿瘤研究的重点。现有研究成果已确定了 PD-1 在肿瘤微环境中的作用: PD-L1 在许多小鼠和人肿瘤中表达 (并在大多数 PD-L1 阴性肿瘤细胞系中可由 IFN- γ 诱导), 并被推定为介导肿瘤免疫逃避的重要靶点 (Iwai Y.等, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99: 12293-12297(2002); Strome S.E. 等, *Cancer Res.*, 63: 6501-6505(2003))。通过免疫组织化学评估活组织检查, 已经在人的很多原发性肿瘤中发现 PD-1 (在肿瘤浸润淋巴细胞上) 和/或 PD-L1 在肿瘤细胞上的表达。这样的组织包括肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、结肠癌、神经胶质瘤、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食道癌、胃癌、口腔鳞状细胞癌、尿道上皮细胞癌和胰腺癌以及头颈肿瘤等。由此可见, 阻断 PD-1/PD-L1 的相互作用可以提高肿瘤特异性 T 细胞的免疫活性, 有助于免疫系统清除肿瘤细胞, 因此 PD-L1 成为开发肿瘤免疫治疗药物的热门靶点。

HER2/neu (人表皮生长因子受体 2), 又称 erbB2, 具有酪氨酸蛋白激酶活性, 是人表皮生长因子受体家族成员之一, 只在成年人的少数正常组织中呈低水平表达。但研究表明, HER2 在多种肿瘤中过表达, 如在约 30% 的乳腺癌患者和 16% 的胃癌患者中均存在过度表达情况, HER2 在肿瘤中的过表达可以显著促进肿瘤血管的新生、肿瘤的生长, 并增强肿瘤的侵袭和转移能力, 是这类患者预后较差的重要指征。因此, 早在 1998 年, 第一个靶向于 HER2 的单克隆抗体药物 Herceptin (赫赛汀, Trastuzumab/曲妥珠单抗, Genentech/Roche) 被 FDA 批准上市, 并用于 HER2 过表达的乳腺癌和胃癌的治疗。

双特异性抗体是指能同时特异性结合两种抗原或两种表位的抗体分子。根据对称性, 双特异性抗体可以分为结构对称的和不对称的分子。根据结合位点的多少, 双特异性抗体可以分为二价、三价、四价和多价分子。双特异性抗体正在逐步成为一类新的治疗性抗体, 可以用于治疗各种炎性疾病、癌症和其它疾病。

发明内容

本发明提供了一种抗 PD-L1 和 HER2 的双特异性抗体。

因此, 本发明的第一个目的在于提供一种抗 PD-L1 和 HER2 的双特异性抗体。

本发明的第二个目的在于提供一种编码所述的双特异性抗体的分离的核苷酸。

本发明的第三个目的在于提供一种包含所述的核苷酸的表达载体。

本发明的第四个目的在于提供一种包含所述的表达载体的宿主细胞。

本发明的第五个目的在于提供所述的双特异性抗体的制备方法。

本发明的第六个目的在于提供包含所述的双特异性抗体的药物组合物。

本发明的第七个目的在于提供所述的双特异性抗体或所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的用途。

本发明的第八个目的在于提供所述的双特异性抗体或所述的药物组合物用于治疗癌症的方法。

为了达到上述目的, 本发明提供了以下技术方案:

本发明的第一个方面提供了一种抗 PD-L1 和 HER2 的双特异性抗体, 包含两条多肽链和两条轻链, 其中:

(a) 所述的多肽链从 N 末端至 C 末端包含

VH-PDL1-CH1-CH2-CH3-L1-VH-HER2-L2-VL-HER2 或

VH-HER2-L2-VL-HER2-L1-VH-PDL1-CH1-CH2-CH3, 所述的轻链从 N 末端至 C 末端包含 VL-PDL1-CL; 或

(b) 所述的多肽链从 N 末端至 C 末端包含

VH-HER2-CH1-CH2-CH3-L1-VH-PDL1-L2-VL-PDL1 或

VH-PDL1-L2-VL-PDL1-L1-VH-HER2-CH1-CH2-CH3, 所述的轻链从 N 末端至 C 末端包含 VL-HER2-CL;

其中，所述的 VH-PDL1 为结合 PD-L1 的重链可变区，所述的 VL-PDL1 为结合 PD-L1 的轻链可变区，所述的 VH-HER2 为结合 HER2 的重链可变区，所述的 VL-HER2 为结合 HER2 的轻链可变区，所述的 L1 和 L2 为(G₄S)_x，x 为 3、4、5 或 6，所述的 CH1-CH2-CH3 为重链恒定区，所述的 CL 为轻链恒定区，所述的 VH-PDL1 与所述的 VL-PDL1 形成特异性结合 PD-L1 的抗原结合位点，所述的 VH-HER2 与所述的 VL-HER2 形成特异性结合 HER2 的抗原结合位点。

根据本发明的优选实施例，所述的 L1 为(G₄S)₃，所述的 L2 为(G₄S)₄。

根据本发明的优选实施例，所述的 VH-PDL1 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1-3 所示的重链 CDR，所述的 VL-PDL1 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4-6 所示的轻链 CDR，所述的 VH-HER2 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7-9 或 SEQ ID NO: 13-15 所示的重链 CDR，所述的 VL-HER2 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10-12 或 SEQ ID NO: 16-18 所示的轻链 CDR。

根据本发明的优选实施例，所述的 VH-PDL1 具有如 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列，所述的 VL-PDL1 具有如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列，所述的 VH-HER2 具有如 SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，所述的 VL-HER2 具有如 SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

根据本发明的优选实施例，所述的多肽链具有如 SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，所述的轻链具有如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列；或所述的多肽链具有如 SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列，所述的轻链具有如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列；或所述的多肽链具有如 SEQ ID NO: 35 或 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列，所述的轻链具有如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列。

根据本发明的优选实施例，所述的多肽链具有如 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列，所述的轻链具有如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列，且所述的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示的多肽链进一步包含以下氨基酸残基位点的突变：N76E 和/或 N213E。

根据本发明的优选实施例，所述的多肽链具有如 SEQ ID NO: 37 或 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列，所述的轻链具有如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

根据本发明，所述的重链恒定区包括 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区，所述的轻链恒定区包括 κ 或 λ 轻链恒定区。

本发明的第二个方面提供了一种分离的核苷酸，所述的核苷酸编码所述的双特异性抗体。

本发明的第三个方面提供了一种表达载体，所述的表达载体含有如上所述的核苷酸。

本发明的第四个方面提供了一种宿主细胞，所述的宿主细胞含有如上所述的表达载体。

本发明的第五个方面提供了所述的双特异性抗体的制备方法，所述方法包含以下步骤：

(a) 在表达条件下，培养如上所述的宿主细胞，从而表达所述的双特异性抗体；

(b) 分离并纯化 (a) 所述的双特异性抗体。

本发明的第六个方面提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有如上所述的双特异性抗体和药学上可接受的载体。

本发明的第七个方面提供了如上所述的双特异性抗体或如上所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的用途。

根据本发明，所述癌症选自由以下组成的组：黑素瘤、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤及其它赘生性恶性疾病等。

本发明的第八个方面提供了一种治疗癌症的方法，包括向有需要的受试者施用如上所述的双特异性抗体或如上所述的药物组合物。

根据本发明，所述癌症选自由以下组成的组：黑素瘤、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤及其它赘生性恶性疾病等。

有益效果：本发明提供了一种抗 PD-L1 和 HER2 的双特异性抗体，体外和体内实验结果显示其能够同时特异性结合 PD-L1 和 HER2 两个靶点，具有与单抗相似甚至更优的生物学活性。

15 附图说明

图 1 为 ELISA 测定双特异性抗体对 PDL1-ECD-his 的亲和力结果。

图 2 为 ELISA 测定双特异性抗体对 HER2-ECD-his 的亲和力结果，其中，图 2A 为 M8 与 607 组合的双特异性抗体，图 2B 为 M8 和 612 组合的双特异性抗体。

图 3 为双特异性抗体竞争性抑制 PD-1 与 PD-L1 的结合结果。

20 图 4 为双特异性抗体抑制 PD-1 和 PD-L1 高表达细胞株的结合活性测定结果。

图 5 为双特异性抗体抑制 BT474 细胞增殖的活性测定结果。

图 6 为双特异性抗体抑制 N87 细胞增殖的活性测定结果。

图 7 为双特异性抗体抑制 BT474 细胞增殖的活性测定结果。

图 8 为双特异性抗体抑制 N87 细胞增殖的活性测定结果。

25 图 9 为双特异性抗体对胃癌细胞 NCI-N87 的异种移植瘤的生长抑制结果。

图 10 为双特异性抗体对 MC38-hPD-L1 移植瘤的生长抑制结果。

图 11 为双特异性抗体 PDL1scFv-607H 突变体对 PDL1-ECD-his 的亲和力测定结果。

图 12 为双特异性抗体 PDL1scFv-607H 突变体对 HER2-ECD-his 的亲和力测定结果。

30 图 13 为双特异性抗体 PDL1scFv-607H 突变体抑制 PD-1 和 PD-L1 高表达细胞株的结合活性。

图 14 为双特异性抗体 PDL1scFv-607H 突变体对 HER2 高表达细胞株细胞增殖抑制活性测定。

图 15 为混合淋巴细胞反应（MLR）实验测定双特异性抗体促进 T 细胞的 IL-2 的分泌的结果。

35 图 16 为混合淋巴细胞反应（MLR）实验测定双特异性抗体促进 T 细胞的 IFN- γ 的分泌的

结果。

具体实施方式

本发明中，术语“抗体（Antibody，缩写 Ab）”和“免疫球蛋白 G（Immunoglobulin G，缩写 IgG）”是有相同结构特征的约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两条相同的轻链（L）和两条相同的重链（H）组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型（isotype）的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区（VH），其后是恒定区，重链恒定区由三个结构域 CH1、CH2、以及 CH3 构成。每条轻链的一端有可变区（VL），另一端有恒定区，轻链恒定区包括一个结构域 CL；轻链的恒定区与重链恒定区的 CH1 结构域配对，轻链的可变区与重链的可变区配对。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用（ADCC，antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）等。重链恒定区包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 亚型；轻链恒定区包括κ（Kappa）或λ（Lambda）。抗体的重链和轻链通过重链的 CH1 结构域和轻链的 CL 结构域之间的二硫键共价连接在一起，抗体的两条重链通过铰链区之间形成的多肽间二硫键共价连接在一起。

本发明中，术语“双特异性抗体（双抗）”是指能同时特异性结合两种抗原（靶点）或两种表位的抗体分子。

本发明中，术语“单克隆抗体（单抗）”指从一类基本均一的群体获得的抗体，即该群体中包含的单个抗体是相同的，除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地针对单个抗原位点。而且，与常规多克隆抗体制剂（通常是具有针对不同抗原决定簇的不同抗体的混合物）不同，各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外，单克隆抗体的好处还在于它们可以通过杂交瘤培养来合成，不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性，是从基本均一的抗体群中获得的，这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

本发明中，术语“Fab”和“Fc”是指木瓜蛋白酶可将抗体裂解为两个完全相同的 Fab 段和一个 Fc 段。Fab 段由抗体的重链的 VH 和 CH1 以及轻链的 VL 和 CL 结构域组成。Fc 段即可结晶片段（fragment crystallizable, Fc），由抗体的 CH2 和 CH3 结构域组成。Fc 段无抗原结合活性，是抗体与效应分子或细胞相互作用的部位。

本发明中，术语“scFv”为单链抗体（single chain antibody fragment, scFv），由抗体重链可变区和轻链可变区通过 15~25 个氨基酸的短肽（linker）连接而成。

本发明中，术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于重链可变区和轻链可变区中称为互补决定区（complementarity-determining region, CDR）或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为框架区（frame region, FR）。

天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区，它们大致上呈 β -折叠构型，由形成连接环的三个CDR相连，在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位（参见Kabat等，NIH Publ.No.91-3242，卷I，647-669页（1991））。

5 本发明中，术语“抗”、“结合”、“特异性结合”是指两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。通常，抗体以小于大约 10^{-7}M ，例如小于大约 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 或更小的平衡解离常数（KD）结合该抗原。本发明中，术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。例如，使用表面等离子体共振
10 术（Surface Plasmon Resonance，缩写SPR）在BIACORE仪中测定抗体与抗原的结合亲和力或使用ELISA测定抗体与抗原结合的相对亲和力。

本发明中，术语“表位”是指与抗体特异性结合的多肽决定簇。本发明的表位是抗原中被抗体结合的区域。

15 本发明中，术语“表达载体”可以为pTT5，pSECTag系列，pCGS3系列，pcDNA系列载体等，以及其它用于哺乳动物表达系统的载体等，表达载体中包括连接有合适的转录和翻译调节序列的融合DNA序列。

本发明中，术语“宿主细胞”是指适用于表达上述表达载体的细胞，可以是真核细胞，如哺乳动物或昆虫宿主细胞培养系统均可用于本发明的融合蛋白的表达，CHO（中国仓鼠卵巢，Chinese Hamster Ovary），HEK293，COS，BHK以及上述细胞的衍生细胞均可适用于本发明。

20 本发明中，术语“药物组合物”是指本发明的双特异性抗体可以和药学上可以接受的载体一起组成药物制剂组合物从而更稳定地发挥疗效，这些制剂可以保证本发明公开的双特异性抗体的氨基酸核心序列的构象完整性，同时还保护蛋白质的多官能团防止其降解（包括但不限于凝聚、脱氨或氧化）。

25 以下实施例、实验例是对本发明进行进一步的说明，不应理解为对本发明的限制。实施例不包括对传统方法的详细描述，如那些用于构建载体和质粒的方法，将编码蛋白的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒引入宿主细胞的方法。这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的，并且在许多出版物中都有所描述，包括Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition,
30 Cold spring Harbor Laboratory Press。

实施例1 抗PD-L1和HER2双特异性抗体的构建

本发明的双特异性抗体的结构通式如下：

- 1) Ab-L1-scFv;
- 35 2) scFv-L1-Ab;

其中 Ab 为抗体，包含两条重链和两条轻链；

scFv 为单链抗体，是由另一个抗体的重链可变区和轻链可变区通过连接序列 L2 连接而成，并通过连接序列 L1 分别连接在 Ab 的两条重链的 N 末端或 C 末端；

L1 和 L2 为连接序列 (G₄S)_x，x 可以为 3、4、5 或 6。

- 5 本发明使用抗人 PD-L1 抗体 M8（序列来源于 PCT/CN2020/090442）、抗人 HER2 抗体 607（根据曲妥珠单抗序列制备，序列来源于 US5821337）和抗人 HER2 抗体 612（序列来源于 WO2020/025013A1）的组合构建双特异性抗体，具体结构如表 1 所示。

表 1、本发明的双特异性抗体的结构

名称	多肽链（N 末端至 C 末端）	轻链
PDL1H-607scFv	PDL1-HC- (G ₄ S) ₃ -607-VH- (G ₄ S) ₄ -607-VL	PDL1-LC
607H-PDL1scFv	607-HC- (G ₄ S) ₃ -PDL1-VH- (G ₄ S) ₄ -PDL1-VL	607-LC
607scFv-PDL1H	607-VH- (G ₄ S) ₄ -607-VL - (G ₄ S) ₃ -PDL1-HC	PDL1-LC
PDL1scFv-607H	PDL1-VH- (G ₄ S) ₄ -PDL1-VL - (G ₄ S) ₃ -607-HC	607-LC
PDL1scFv-612H	PDL1-VH- (G ₄ S) ₄ -PDL1-VL - (G ₄ S) ₃ -612-HC	612-LC
612H-PDL1scFv	612-HC- (G ₄ S) ₃ -PDL1-VH- (G ₄ S) ₄ -PDL1-VL	612-LC

- 10 其中，PDL1-HC 代表 M8 的重链，PDL1-LC 代表 M8 的轻链，607-VH 代表 607 的重链可变区，607-VL 代表 607 的轻链可变区，其余类似。

本发明构建的双特异性抗体相关的序列信息如表 2 所示，其中，CDR 根据 Kabat 规则编码。

表 2、本发明的抗体的序列信息

SEQ ID NO:	序列名称
1	抗 PD-L1 抗体的重链互补决定区 H-CDR1 的氨基酸序列
2	抗 PD-L1 抗体的重链互补决定区 H-CDR2 的氨基酸序列
3	抗 PD-L1 抗体的重链互补决定区 H-CDR3 的氨基酸序列
4	抗 PD-L1 抗体的轻链互补决定区 L-CDR1 的氨基酸序列
5	抗 PD-L1 抗体的轻链互补决定区 L-CDR2 的氨基酸序列
6	抗 PD-L1 抗体的轻链互补决定区 L-CDR3 的氨基酸序列
7	607 的重链互补决定区 H-CDR1 的氨基酸序列
8	607 的重链互补决定区 H-CDR2 的氨基酸序列
9	607 的重链互补决定区 H-CDR3 的氨基酸序列
10	607 的轻链互补决定区 L-CDR1 的氨基酸序列
11	607 的轻链互补决定区 L-CDR2 的氨基酸序列
12	607 的轻链互补决定区 L-CDR3 的氨基酸序列
13	612 的重链互补决定区 H-CDR1 的氨基酸序列
14	612 的重链互补决定区 H-CDR2 的氨基酸序列
15	612 的重链互补决定区 H-CDR3 的氨基酸序列
16	612 的轻链互补决定区 L-CDR1 的氨基酸序列
17	612 的轻链互补决定区 L-CDR2 的氨基酸序列
18	612 的轻链互补决定区 L-CDR3 的氨基酸序列
19	抗 PD-L1 抗体的重链可变区的氨基酸序列

20	抗 PD-L1 抗体的轻链可变区的氨基酸序列
21	607 的重链可变区的氨基酸序列
22	607 的轻链可变区的氨基酸序列
23	612 的重链可变区的氨基酸序列
24	612 的轻链可变区的氨基酸序列
25	抗 PD-L1 抗体的重链的氨基酸序列
26	抗 PD-L1 抗体的轻链的氨基酸序列
27	607 的重链的氨基酸序列
28	607 的轻链的氨基酸序列
29	612 的重链的氨基酸序列
30	612 的轻链的氨基酸序列
31	PDL1H-607scFv 的多肽链的氨基酸序列
32	607H-PDL1scFv 的多肽链的氨基酸序列
33	607scFv-PDL1H 的多肽链的氨基酸序列
34	PDL1scFv-607H 的多肽链的氨基酸序列
35	PDL1scFv-612H 的多肽链的氨基酸序列
36	612H-PDL1scFv 的多肽链的氨基酸序列

通过基因合成及常规的分子克隆方法，通过 EcoRI 和 HindIII 两个酶切位点构建到 pTT5 表达载体（购自 NRC biotechnology Research Institute），获得各双特异性抗体及其对应的单克隆抗体的重链和轻链的表达载体，将上述各重链序列表达载体与其对应的轻链表达载体共转染 HEK293F 细胞（购自 Thermo Fisher，货号 A14527），表达并纯化获得各双特异性抗体 PDL1H-607scFv、607H-PDL1scFv、607scFv-PDL1H、PDL1scFv-607H、PDL1scFv-612H 和 612H-PDL1scFv，以及对应的单抗 M8、607、612。

实施例 2 ELISA 法测定双特异性抗体靶向 HER2 和 PD-L1 的亲合力

10 PDL1-ECD-his（NCBI 登记号为 NP_054862.1）和 HER2-ECD-his 蛋白（NCBI 登记号为 NP_004439.2）制备方法如下：根据 NCBI 提供的序列分别合成 PD-L1 和 HER2 胞外域基因并在其 N 端加上信号肽序列，C 末端加上 6×His 标签，通过 EcoRI 和 HindIII 两个酶切位点分别构建到 pTT5 表达载体中，转染 HEK-293F 细胞表达并纯化获得。

15 将 PDL1-ECD-his 或 HER2-ECD-his 蛋白稀释并分别包被 96 孔 ELISA 板，0.05μg/孔，4℃ 包被过夜，PBST（PBS 含 0.05% Tween20）洗涤 3 次，用 PBS 配制 2%BSA，200μL/孔，于室温封闭 2h，PBST 洗涤 2 次后，用 PBST 配制的 1%BSA 将 PDL1H-607scFv、607H-PDL1scFv、607scFv-PDL1H、PDL1scFv-607H、PDL1scFv-612H、612H-PDL1scFv 和 M8 稀释至不同浓度并加至 ELISA 孔，100μL/孔，每个浓度设置 3 个复孔，室温孵育 1h，PBST 洗涤 3 次，用 PBST 配制的 1%BSA 按照适当比例稀释二抗（HRP-anti human IgG Fc，购自 Millipore 公司，货号 AP101P），加入 ELISA 孔，100μL/孔，室温孵育 1h，PBST 洗涤 3 次后添加 TMB 显色液，100μL/孔，显色至预期颜色，用 2M H₂SO₄ 终止显色反应，50μL/孔，使各反应液振荡均匀并于酶标

仪测定 OD450nm, 分析数据, 计算 EC₅₀。

实验结果分别如图 1 和图 2 所示, 各双特异性抗体对 PDL1-ECD-his 和 HER2-ECD-his 的亲合力 (EC₅₀) 分别如表 3 和表 4 所示, 可见各双特异性抗体与 PDL1-ECD-his 的亲合力与 M8 相当, 均在同一个水平, PDL1scFv-607H 稍优。而对 HER2-ECD-his 的亲合力, 在 607 与 M8 的双特异性抗体组合中, 则以 607scFv-PDL1H 和 PDL1H-607scFv 更优, 与 607 单抗的亲合力相当, PDL1scFv-607H 和 607H-PDL1scFv 则相对偏弱; 在 612 与 M8 的双特异性抗体组合中, PDL1scFv-612H 和 612H-PDL1scFv 对 HER2-ECD-his 的亲合力相当, 均稍弱于 612 单抗。

表 3、各双特异抗体对 PDL1-ECD-his 的 EC₅₀

Sample	PDL1H-607scFv		607H-PDL1scFv		607scFv-PDL1H		PDL1scFv-607H		PDL1scFv-612H		612H-PDL1scFv		M8	
EC ₅₀ (nM)	0.048	0.048	0.053	0.050	0.043	0.042	0.036	0.033	0.044	0.047	0.068	0.059	0.041	0.037
Mean	0.048		0.052		0.042		0.034		0.046		0.064		0.039	
SD	0.000		0.002		0.001		0.003		0.002		0.006		0.003	

表 4、各双特异抗体对 HER2-ECD-his 的 EC₅₀

Sample	PDL1scFv-607H		607scFv-PDL1H		607H-PDL1scFv		PDL1H-607scFv		607		612H-PDL1scFv		PDL1scFv-612H		612	
EC ₅₀ (nM)	0.155	0.160	0.077	0.083	0.189	0.210	0.098	0.095	0.096	0.088	0.158	0.149	0.093	0.081	0.051	0.056
Mean	0.158		0.080		0.200		0.096		0.092		0.153		0.087		0.053	
SD	0.003		0.004		0.015		0.002		0.006		0.006		0.008		0.003	

实施例 3 双特异性抗体竞争性抑制 PD-1 与 PD-L1 结合活力测定

将 PDL1-ECD-Fc 蛋白 (制备方法同上, 只是将 C 端标签换成人 Fc 序列) 稀释并包被 96 孔 ELISA 板, 0.2μg/孔, 4℃包被过夜, PBST (PBS 含 0.05% Tween20) 洗涤 3 次, 用 PBS 配制 2%BSA, 200μL/孔, 于室温封闭 2h, PBST 洗涤 2 次后, 用含 1% BSA 的 PBST 配制的 500 ng/ml 生物素标记的 PD1-Fc (即 PD1-Fc-biotin, NCBI 登记号为 NP_005009.2, 根据 NCBI 上登记信息获取 PD-1 的胞外域基因, 克隆及制备方法同 PDL1-ECD-Fc) 溶液将 PDL1H-607scFv、607H-PDL1scFv、607scFv-PDL1H、PDL1scFv-607H、PDL1scFv-612H、612H-PDL1scFv 和 M8 稀释至不同浓度并加至 ELISA 孔, 100μL/孔, 每个浓度设置 3 个复孔, 室温孵育 1h, PBST 洗涤 3 次, 用 PBST 配制的 1%BSA 按照适当比例稀释二抗 (HRP 标记的 streptavidin, 购自 Sigma, 货号 S4672-5MG), 加入 ELISA 孔, 100μL/孔, 室温孵育 1h, PBST 洗涤 3 次后添加 TMB 显色液, 100μL/孔, 显色至预期颜色, 用 2M H₂SO₄ 终止显色反应, 50μL/孔, 使各反应液振荡均匀并于酶标仪测定 OD450nm, 分析数据, 计算 EC₅₀。

实验结果如图 3 所示, 各双特异性抗体竞争性抑制 PD-1 与 PD-L1 结合的活力 (IC₅₀) 如表 5 所示, 可见各双特异性抗体竞争抑制 PD-1 与 PD-L1 活性相当。

表 5、各双特异抗体竞争性抑制 PD-1 与 PD-L1 结合的 IC₅₀

Sample	PDL1H-607scFv		607H-PDL1scFv		PDL1scFv-607H		607scFv-PDL1H		PDL1scFv-612H		612H-PDL1scFv		M8	
IC ₅₀ (nM)	3.272	3.572	3.756	3.732	3.128	2.935	2.901	3.019	2.913	2.597	1.786	1.787	2.340	2.419
Mean	3.422		3.744		3.032		2.960		2.755		1.787		2.380	
SD	0.212		0.017		0.136		0.083		0.223		0.001		0.056	

实施例 4 双特异性抗体抑制 PD-1 和 PD-L1 高表达细胞株的结合活性

PD-1 高表达细胞系 PD-1 Effector Cells 和 PD-L1 高表达细胞系 PD-L1 aAPC/CHO-K1 Cells

均购自 Promega 公司（货号：J1252）。

1) 将处于对数生长期的 PDL1-aAPC/CHO-K1 细胞用胰酶消化，离心，计数，用 10%FBS Ham/F12 培养基（购自 Thermo Fisher，货号 11765054）重悬，按照 100 μ L/孔，每孔铺 40000 个细胞，接种至白板透明底 96 孔板中，于 CO₂ 细胞培养箱 37°C 生长过夜。

5 2) 用含 1%FBS 的 RPMI1640 培养基（购自 Thermo Fisher，货号 61870036）分别配制最高浓度为 200nM 的 M8、607H-PDL1scFv、PDL1scFv-607H、PDL1H-607scFv、607scFv-PDL1H、PDL1scFv-612H、612H-PDL1scFv，并按照 3 倍梯度稀释（工作浓度最高剂量为 100nM），同时以 1%FBS 的 RPMI1640 培养基稀释 PD-1 Effector Cells 至 1.25×10^6 个/mL。

10 3) 弃净上述培养有 PDL1-aAPC/CHO-K1 细胞的 96 孔板上清，加入 40 μ L 稀释好的 PD-1 Effector Cell 悬液以及 40 μ L 稀释好的抗体，轻拍孔板摇匀，于 37°C 细胞培养箱继续培养 6h。

4) 按照 80 μ L/孔加入已恢复至室温的 Bio-Glo Luciferase Assay Reagent（购自 Promega，货号：G7941），室温孵育 10min。

5) 于多功能酶标仪中测定其发光强度，通过 GraphPad Prism 6 分析数据。

15 实验结果如图 4 所示，各双特异性抗体抑制 PD-1 和 PD-L1 高表达细胞株的结合活性的 IC₅₀ 如表 6 所示，可见 PDL1H-607scFv、607scFv-PDL1H 活性相对较优，PDL1scFv-612H 和 PDL1scFv-607H 次之。

表 6、各双特异抗体抑制 PD-1 和 PD-L1 高表达细胞株的结合的 IC₅₀

Sample	PDL1H-607scFv		607H-PDL1scFv		PDL1scFv-607H		607scFv-PDL1H		PDL1scFv-612H		612H-PDL1scFv		M8	
IC ₅₀ (nM)	0.373	0.408	0.948	0.888	0.698	0.710	0.463	0.566	0.852	0.649	1.173	0.991	0.309	0.267
Mean	0.391		0.918		0.704		0.515		0.750		1.082		0.288	
SD	0.025		0.042		0.008		0.072		0.144		0.129		0.030	

20 实施例 5 双特异性抗体对 HER2 高表达细胞株细胞增殖抑制活性测定

1) 将处于对数生长期的 BT474 和 N87 细胞用胰酶消化，计数，用完全培养基，即含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基（购自 Thermo Fisher，货号 61870036）重悬，按照 150 μ L/孔，分别接种至 96 孔细胞培养板中，乳腺癌细胞 BT474（购自中国科学院细胞库，目录号：TCHu143）每孔铺 10000 个，胃癌细胞 N87（购自中国科学院细胞库，目录号：SCSP-534）每孔铺 8000 个，于 CO₂ 细胞培养箱 37°C 培养过夜。

2) 用完全培养基按照 3 倍梯度稀释待测抗体，各组均连续稀释 9 梯度，各抗体最高浓度为 400nM（最终工作浓度为 100nM），加入 50 μ L 上述抗体至 96 孔细胞培养板，每孔终体积为 200 μ L，设置未给药组作为阴性对照，于 37°C 细胞培养箱继续培养 5d，每个浓度平行做 2 个复孔。

30 3) 弃净细胞培养上清液，按照 100 μ L/孔加入 CCK8 反应液（以完全培养基按 1: 10 比例稀释，购自 Dojindo，货号 CK04），于 37°C 孵育。

4) 待细胞培养孔颜色显色至预期深浅，于多功能酶标仪中在 450nm 波长处测定其吸光度，通过 GraphPad Prism 6 分析数据。

5) 按照下述公式计算细胞存活率及生长抑制率：

存活率=(OD 给药-OD 空白)/(OD 对照-OD 空白)×100%。生长抑制率=1-存活率。

实验结果分别如图 5、图 6、图 7 和图 8 所示，各双特异性抗体对 HER2 高表达细胞株 BT474 和 N87 增殖抑制的 IC₅₀ 分别如表 7、表 8、表 9、表 10 所示，可见，对于 607 和 M8 的双抗组合，PDL1scFv-607H、607H-PDL1scFv 对 BT474 细胞增殖的抑制活性更优；对 N87 细胞增殖抑制活性，PDL1H-607scFv 活性最弱，虽然 PDL1scFv-607H、607H-PDL1scFv 的 IC₅₀ 相当，但在高浓度下 PDL1scFv-607H 对 N87 细胞的最大杀伤效应最强。对于 612 和 M8 的双抗组合，则 PDL1scFv-612H 和 612H-PDL1scFv 对细胞增殖抑制活性相当。

表 7、双特异性抗体抑制 BT474 细胞增殖的 IC₅₀

Sample	PDL1H-607scFv	607scFv-PDL1H	607H-PDL1scFv	PDL1scFv-607H	607	607+M8						
IC ₅₀ (nM)	\	\	2.496	1.726	0.913	0.940	1.175	1.102	0.777	0.733	0.720	0.707
Mean	\	\	2.111		0.927		1.139		0.755		0.713	
SD	\	\	0.544		0.019		0.052		0.031		0.009	

表 8、双特异性抗体抑制 N87 细胞增殖的 IC₅₀

Sample	PDL1H-607scFv	607scFv-PDL1H	607H-PDL1scFv	PDL1scFv-607H	607	607+M8						
IC ₅₀ (nM)	\	\	0.697	0.777	0.222	0.445	0.845	1.086	0.344	0.345	\	0.139
Mean	\	\	0.737		0.334		0.965		0.344		0.139	
SD	\	\	0.057		0.158		0.171		0.001		\	

表 9、双特异性抗体抑制 BT474 细胞增殖的 IC₅₀

Sample	PDL1scFv-612H	612H-PDL1scFv	612			
IC ₅₀ (nM)	0.624	0.297	0.963	0.767	0.788	0.755
Mean	0.460		0.865		0.771	
SD	0.231		0.138		0.023	

表 10、双特异性抗体抑制 N87 细胞增殖的 IC₅₀

Sample	PDL1scFv-612H	612H-PDL1scFv	612			
IC ₅₀ (nM)	0.448	0.406	0.290	0.281	0.364	0.270
Mean	0.427		0.286		0.317	
SD	0.030		0.007		0.066	

实施例 6 基于胃癌细胞 NCI-N87 异种移植瘤的体内药效研究

通过胰酶消化对数生长期的胃癌细胞 NCI-N87（购自中科院典型培养物保藏委员会细胞库），离心收集并重悬于 RPMI1640 无血清培养基（购自 Thermo Fisher，货号 61870036）中以调整细胞浓度，将细胞悬液与等体积基质胶混合，使细胞终浓度为 8*10⁷/mL。无菌操作，接种 100μL 细胞悬液至 BALB/c 裸小鼠（雌性，体重 18-20 g，购自北京维通利华生物科技有限公司）右侧肋部皮下。待肿瘤生长至 100-200mm³，将动物随机分为 5 组，每组 8 只动物。包括溶剂对照组（Control），单抗对照组 607，受试样品组 PDL1scFv-607H。分组当天开始给药，607 给药剂量为 20mg/kg，PDL1scFv-607H 给药剂量为 27mg/kg，每周通过腹腔给药两次，连续给药 7 次。每周测量两次肿瘤直径，记录，并按照下述公式计算肿瘤体积和肿瘤生长抑制率。

肿瘤体积(tumor volume ,TV)的计算公式为：TV= 1/2×长×宽²。

肿瘤生长抑制率（TGI）=(1- 实验组肿瘤体积/溶剂对照组肿瘤体积)×100%。

实验结果如图 9 所示，双特异性抗体 PDL1scFv-607H 和单抗 607 均可有效抑制胃癌细胞

NCI-N87 的异种移植瘤的生长,且给药后的第 25 天 PDL1scFv-607H 的肿瘤生长抑制率为 57%,明显优于单抗对照品 607 的 40%。

实施例 7 基于 B-hPD-L1 人源化小鼠的 MC38-hPD-L1 结肠癌动物模型的体内药效研究

收集体外培养的 MC38-hPD-L1 结肠癌细胞,并用 PBS 重悬至浓 $5 \times 10^5/0.1$ mL 浓度,按照 0.1 mL/只接种于 B-hPD-L1 人源化小鼠的右侧皮下。当平均肿瘤体积达到大约 138mm^3 时,挑选个体肿瘤体积合适的小鼠入组实验组,并分配到 3 个实验组,即溶剂对照组 (Control)、单抗对照组 M8 和受试样品组 PDL1scFv-607H,每组 8 只小鼠。分组当天通过腹腔注射,开始给药,每两天给药 1 次,连续给药 8 次,其中 M8 给药剂量为 20mg/kg, PDL1scFv-607H 给药剂量为 27.5mg/kg。每周测量两次肿瘤直径,记录,并按照下述公式计算肿瘤体积和肿瘤生长抑制率。

肿瘤体积(tumor volume ,TV)的计算公式为: $TV = 1/2 \times \text{长} \times \text{宽}^2$ 。

肿瘤生长抑制率 (TGI) = $(1 - \text{实验组肿瘤体积} / \text{溶剂对照组肿瘤体积}) \times 100\%$ 。

本实验中 B-hPD-L1 人源化小鼠和 MC38-hPD-L1 结肠癌细胞均由百奥赛图 (北京) 医药科技股份有限公司提供。

实验结果如图 10 所示,双特异性抗体 PDL1scFv-607H 和单抗 M8 均可有效抑制 MC38-hPD-L1 移植瘤的生长,且给药后的第 23 天 PDL1scFv-607H 的肿瘤生长抑制率为 74%,M8 的肿瘤生长抑制率为 89%。虽然,双特异性抗体 PDL1scFv-607H 在本实验结束时对肿瘤的生长抑制率略低于单抗对照品 M8,但二者无显著差异,不具有统计学意义。

实施例 8 双特异性抗体 PDL1scFv-607H 突变体的制备

根据本申请人之前的研究结果 (参照中国专利申请 202110085824.3),通过对 scFv 片段上特异性天冬酰胺 (N) 的突变可有效的改善双特异性抗体的理化性质。因此,本发明利用常规的分子克隆技术对 PDL1scFv-607H 的 scFv 片段上天冬酰胺 (N) 分别进行单点或组合突变成谷氨酸 (E),抽提各突变质粒并与对应的轻链配对转染 HEK293F 细胞表达并纯化获得双特异性抗体 PDL1scFv-607H 各突变体样品。排除不表达、或突变后对抗体活性有较大影响以及突变后理化性质变得更差的位点,最终确定 PDL1scFv-607H 的多肽链上的第 76 位 N、第 213 位 N 突变成 E 后对样品的理化性质有明显的改善作用,将上述突变体对应命名为 PDL1scFv-607H-VHN76E、PDL1scFv-607H-VLN76E 和 PDL1scFv-607H-VHN76E-VLN76E,各自对应的多肽链序列如 SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38 和 SEQ ID NO: 39 所示。

PDL1scFv-607H 各突变体通过一步 proteinA 纯化后,其超高效液相色谱(UPLC)检测结果如表 11 所示。

表 11、PDL1scFv-607H 各突变体经一步 proteinA 纯化后的 UPLC 检测结果

样品	主峰比例(n=3)
PDL1scFv-607H	88.1%
PDL1scFv-607H-VHN76E	96.7%

PDL1scFv-607H-VLN76E	90.8%
PDL1scFv-607H-VHN76E-VLN76E	95.6%

实施例 9 双特异性抗体 PDL1scFv-607H 突变体对 PD-L1 和 HER2 的亲力的亲和力测定

实验方法参照实施例 2。

实验结果分别如图 11 和图 12 所示，各双特异性抗体对 PDL1-ECD-his 和 HER2-ECD-his 的亲力 (EC₅₀) 分别如表 12 和表 13 所示，可见各突变体与 PDL1-ECD-his 的亲力与 PDL1scFv-607H 和 M8 相当，未见明显衰减。各突变体与 HER2-ECD-his 的亲力与 PDL1scFv-607H 相当，稍弱于单抗 607。

表 12、PDL1scFv-607H 各突变体对 PDL1-ECD-his 结合的 EC₅₀

Sample	PDL1scFv-607H		PDL1scFv-607H-VHN76E		PDL1scFv-607H-VLN76E		PDL1scFv-607H-VHN76E-VLN76E		M8	
EC ₅₀ (nM)	0.045	0.040	0.0409	0.0497	0.043	0.038	0.047	0.038	0.040	0.044
Mean	0.042		0.045		0.041		0.042		0.042	
SD	0.004		0.006		0.004		0.006		0.003	

表 13、PDL1scFv-607H 各突变体对 HER2-ECD-his 结合的 EC₅₀

Sample	PDL1scFv-607H		PDL1scFv-607H-VHN76E		PDL1scFv-607H-VLN76E		PDL1scFv-607H-VHN76E-VLN76E		607	
EC ₅₀ (nM)	0.047	0.046	0.062	0.060	0.054	0.051	0.061	0.055	0.033	0.030
Mean	0.046		0.061		0.053		0.058		0.031	
SD	0.001		0.001		0.002		0.004		0.002	

实施例 10 双特异性抗体 PDL1scFv-607H 突变体抑制 PD-1 和 PD-L1 高表达细胞株的结合活性

实验方法参照实施例 4。

实验结果如图 13 所示，PDL1scFv-607H 各突变双特异性抗体抑制 PD-1 和 PD-L1 高表达细胞株的结合活性与 PDL1scFv-607H 和 M8 相当，未见突变后活性下降，其各自 IC₅₀ 详见表 14。

表 14、PDL1scFv-607H 各突变体抑制 PD-1 和 PD-L1 高表达细胞株的结合的 IC₅₀

Sample	PDL1scFv-607H		PDL1scFv-607H-VHN76E		PDL1scFv-607H-VLN76E		PDL1scFv-607H-VHN76E-VLN76E		M8	
IC ₅₀ (nM)	0.871	0.817	0.839	0.727	0.940	1.022	0.916	0.926	0.739	0.718
Mean	0.844		0.783		0.981		0.921		0.728	
SD	0.038		0.079		0.058		0.007		0.014	

实施例 11 双特异性抗体 PDL1scFv-607H 突变体对 HER2 高表达细胞株细胞增殖抑制活性测定

实验方法参照实施例 5。

实验结果如图 14 所示，PDL1scFv-607H 各突变双特异性抗体对 HER2 高表达细胞株 BT474 的增殖抑制作用与 PDL1scFv-607H 活性相同，其各自的 IC₅₀ 分别如表 15 所示。

表 15、PDL1scFv-607H 各突变体抑制 BT474 细胞增殖的 IC₅₀

Sample	PDL1scFv-607H		PDL1scFv-607H-VHN76E		PDL1scFv-607H-VLN76E		PDL1scFv-607H-VHN76E-VLN76E		607	
IC ₅₀ (nM)	1.288	1.220	1.462	1.444	1.372	1.249	1.389	1.278	0.829	0.712
Mean	1.254		1.453		1.311		1.334		0.771	
SD	0.048		0.013		0.087		0.078		0.083	

实施例 12 混合淋巴细胞反应 (MLR) 实验测定双特异性抗体的活性

实验步骤如下:

1、树突状细胞的诱导

5 1) 取适当数量的 PBMC (外周血单核细胞, 购自上海赛笠生物科技有限公司) 与适当体积的 CD14 MicroBeads (购自 MiltenyiBiotec, 货号 130-050-201) 混合, 混匀后 4℃ 冰箱中放置 15min; 然后按照生产商提供的说明用 MACS 磁性细胞分选装置将 CD14+ 单核细胞分离出来。

10 2) 用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基 (购自 Thermo Fisher, 货号 61870036) 重悬 CD14+ 单核细胞至浓度 5×10^5 cells/mL, 分别加入 50ng/mL 的 GM-CSF (购自 R&D, 货号 215-GM-050) 和 IL-4 (购自 R&D, 货号: 204-IL-050) 进行诱导。

3) 第四天, 含 10%FBS、50ng/mL GM-CSF 和 50ng/mL IL-4 的 RPMI1640 培养基对上述细胞进行半换液。

15 4) 第七天, 通过添加 1 μ g/ml LPS (购自 sigma, 货号 L6529-1MG) 作用 24h 诱导 DC 细胞成熟。

2、T 细胞的分离和给药

1) 利用 Pan T cell Isolation Kit (购自 MiltenyiBiotec, 货号 130-096-535) 根据说明书要求从 PBMC 中分离 T 细胞, 并用 37℃ 预热的 PBS 洗涤 T 细胞一次, 计数, 备用。

20 2) 收集上述诱导成熟的 DC 细胞 (mDC), 并用含 2% FBS 的 PBS 洗涤 3 次, 计数备用。

3) 将待测抗体用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基按照 3 倍梯度进行稀释, 最高终浓度为 300nM。

25 4) 取上述稀释好的抗体按照 50 μ L/孔加入到 96-孔 U 形底培养板中, 将 mDC 和 T 细胞按照 2×10^5 /mL 和 1×10^6 /mL 的浓度比例进行混匀, 并取 100 μ L 细胞混合液加入到上述 96-孔 U 形底培养板中。

5) 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养 3d, 收集 50 μ L 细胞培养上清用于 IL-2 检测; 培养 5d, 收集 120 μ L 细胞培养上清用于 IFN- γ 检测。

3、IL-2 和 IFN- γ 分泌水平检测

30 1) 用 ELISA 包被液将 mouse-anti-human IL-2 蛋白 (购自 BD Pharmingen, 货号 555051) 稀释至 2.5 μ g/mL 和 mouse-anti-human IFN- γ (购自 BD Pharmingen, 货号 551221) 蛋白稀释至 4 μ g/mL, 分别包被 ELISA 板, 100 μ L/孔, 置于湿盒中, 4 $^{\circ}$ C, 包被 16 h。

2) 用 PBST 洗涤 ELISA 板三次, 去除未结合抗原, 并将 ELISA 板于吸水纸上拍干, 除去多余的液体, 然后用 PBS 配制的 2%BSA, 200 μ L/孔, 于室温封闭 1-2 h。

3) 配制 IL-2/IFN- γ 标准品：用 RPMI1640 培养基配制标准品，使 IL-2 初始浓度为 40ng/ml，使 IFN- γ 初始浓度为 400ng/ml，分别进行 2 倍稀释，每个标准品共稀释 12 个梯度。每孔加入 100 μ l 的标准品稀释液，每个浓度设 2 个复孔。

4) 用 PBST 洗涤一次，洗除多余的封闭液，并将 ELISA 板拍干，除去多余的液体，将培养 5d 的细胞上清用 PBST 配制的 1%BSA 稀释 10 倍加入到 mouse-anti-human IFN- γ 包被板；将 45 μ L 3d 的细胞上清及 65 μ L 5d 的细胞上清的上清混合后，取 100 μ L 混合液加入到 mouse-anti-human IL-2 包被板，室温孵育 1h。

5) 洗除未结合的或非特异性结合的一抗，用含有 1% BSA 的 PBST（抗体稀释液）将 biotin-mouse-anti-human IL-2（购自 BD Pharmingen，货号 555040）和 biotin-mouse-anti-human IFN- γ （购自 BD Pharmingen，货号 554550）二抗分别稀释 1000 倍，加入 ELISA 板，100 μ L/孔，室温孵育 1h。随后 PBST 洗涤三次，用抗体稀释液将 Streptavidin-HRP（购自 BD Pharmingen，货号 554066）稀释 5000 倍，加入 ELISA 板，100 μ L/孔，室温孵育 1h。

6) 用 PBST 洗涤五次，并将 ELISA 板于吸水纸上拍干，除去多余的液体，加入 TMB 显色液，100 μ L/孔，显色至合适深浅，加入 2M H₂SO₄，50 μ L/孔，以终止显色，并于多功能酶标仪中在 450nm 波长处测定其吸光度，分析数据。

实验结果分别如图 15 和图 16 所示，可见突变体 PDL1scFv-607H-VHN76E 可显著促进 T 细胞的 IL-2 和 IFN- γ 的分泌，并且在高浓度下对 IL-2 分泌的促进作用优于 PDL1scFv-607H，其各自的 EC₅₀ 分别如表 16 和 17 所示。

表 16、PDL1scFv-607H 及突变体促进 IL2 分泌的 EC₅₀

Sample	PDL1scFv-607H		PDL1scFv-607H-VHN76E		M8	
EC ₅₀ (nM)	0.877	0.438	0.417	0.846	1.137	0.759
Mean	0.658		0.632		0.948	
SD	0.310		0.303		0.267	

表 17、PDL1scFv-607H 及突变体促进 IFN- γ 分泌的 EC₅₀

Sample	PDL1scFv-607H		PDL1scFv-607H-VHN76E		M8	
EC ₅₀ (nM)	0.792	1.335	0.992	1.348	0.642	1.221
Mean	1.063		1.170		0.932	
SD	0.384		0.252		0.409	

权利要求书

1、抗 PD-L1 和 HER2 的双特异性抗体，其特征在于，包含两条多肽链和两条轻链，其中：

(a) 所述的多肽链从 N 末端至 C 末端包含

5 VH-PDL1-CH1-CH2-CH3-L1-VH-HER2-L2-VL-HER2 或
VH-HER2-L2-VL-HER2-L1-VH-PDL1-CH1-CH2-CH3，所述的轻链从 N 末端至 C 末端包含
VL-PDL1-CL；或

(b) 所述的多肽链从 N 末端至 C 末端包含

VH-HER2-CH1-CH2-CH3-L1-VH-PDL1-L2-VL-PDL1 或
10 VH-PDL1-L2-VL-PDL1-L1-VH-HER2-CH1-CH2-CH3，所述的轻链从 N 末端至 C 末端包含
VL-HER2-CL；

其中，所述的 VH-PDL1 为结合 PD-L1 的重链可变区，所述的 VL-PDL1 为结合 PD-L1 的轻链可变区，所述的 VH-HER2 为结合 HER2 的重链可变区，所述的 VL-HER2 为结合 HER2 的轻链可变区，所述的 L1 和 L2 为 $(G_4S)_x$ ，x 为 3、4、5 或 6，所述的 CH1-CH2-CH3 为重链
15 恒定区，所述的 CL 为轻链恒定区，所述的 VH-PDL1 与所述的 VL-PDL1 形成特异性结合 PD-L1 的抗原结合位点，所述的 VH-HER2 与所述的 VL-HER2 形成特异性结合 HER2 的抗原结合位点。

2、如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的 L1 为 $(G_4S)_3$ ，所述的 L2 为 $(G_4S)_4$ 。

3、如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的 VH-PDL1 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的重链 CDR，所述的 VL-PDL1 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的轻链 CDR，所述的
20 VH-HER2 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 或如 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15 所示的重链 CDR，所述的 VL-HER2 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 或如 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 所示的轻链 CDR。

4、如权利要求 3 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的 VH-PDL1 具有如 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列，所述的 VL-PDL1 具有如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列，所述的
30 VH-HER2 具有如 SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，所述的 VL-HER2 具有如 SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

5、如权利要求 4 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的多肽链具有如 SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，所述的轻链具有如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列；或所述的多肽链具有如 SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列，所述的
35 轻链具有如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列；或所述的多肽链具有如 SEQ ID NO: 35 或 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列，所述的轻链具有如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序

列。

6、如权利要求 5 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的多肽链具有如 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列，所述的轻链具有如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列，且所述的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示的多肽链进一步包含以下氨基酸残基位点的突变：N76E 和/或 N213E。

7、如权利要求 6 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的多肽链具有如 SEQ ID NO: 37 或 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 39 所示的氨基酸序列，所述的轻链具有如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

8、如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的重链恒定区包括 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区，所述的轻链恒定区包括 κ 或 λ 轻链恒定区。

9、一种分离的核苷酸，其特征在于，所述的核苷酸编码如权利要求 1-8 中任一项所述的双特异性抗体。

10、一种表达载体，其特征在于，所述的表达载体含有如权利要求 9 所述的核苷酸。

11、一种宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞含有如权利要求 9 所述的表达载体。

12、如权利要求 1-8 中任一项所述的双特异性抗体的制备方法，其特征在于，所述方法包含以下步骤：

(a) 在表达条件下，培养如权利要求 11 所述的宿主细胞，从而表达所述的双特异性抗体；

(b) 分离并纯化 (a) 所述的双特异性抗体。

13、一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有如权利要求 1-8 中任一项所述的双特异性抗体和药学上可接受的载体。

14、如权利要求 1-8 中任一项所述的双特异性抗体或如权利要求 13 所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的用途。

15、如权利要求 14 所述的用途，其特征在于，所述癌症选自由以下组成的组：黑素瘤、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤及其它赘生性恶性疾病。

16、一种治疗癌症的方法，其特征在于，包括向有需要的受试者施用如权利要求 1-8 中任一项所述的双特异性抗体或如权利要求 13 所述的药物组合物。

17、如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述癌症选自由以下组成的组：黑素瘤、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、食道癌、头颈鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤及其它赘生性恶性疾病。

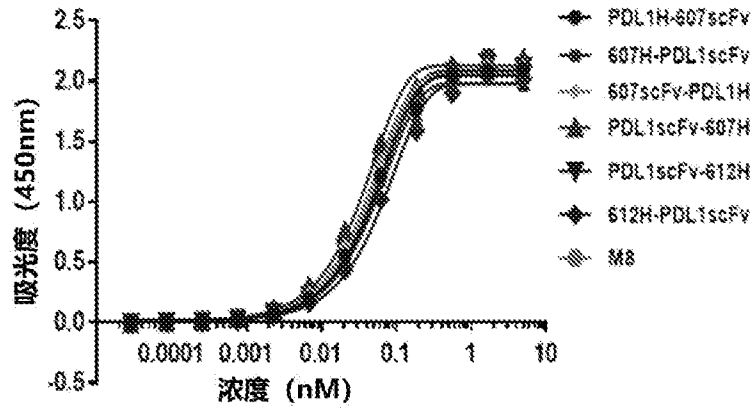


图 1

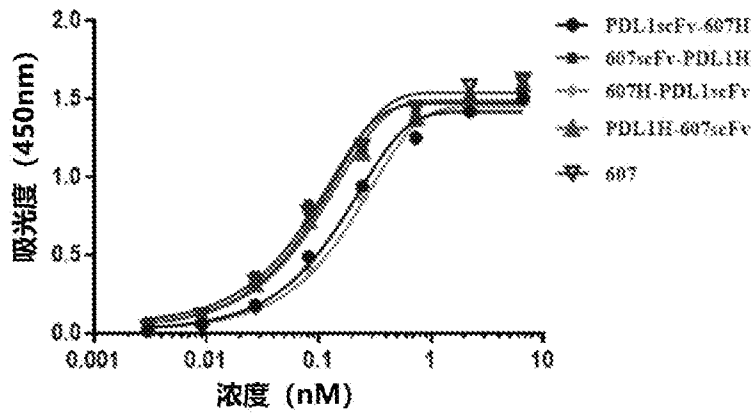


图 2A

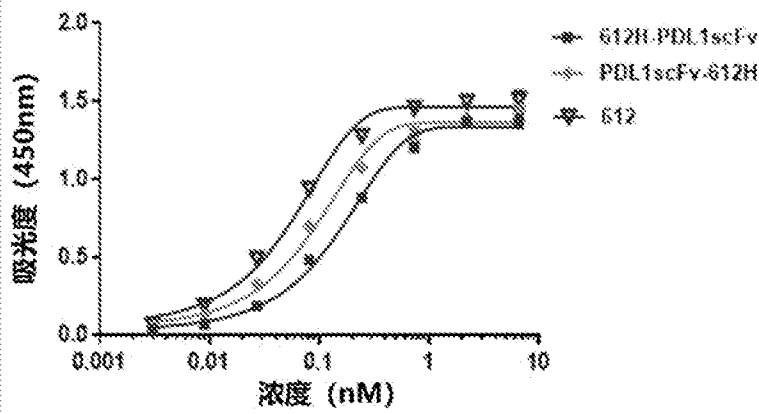


图 2B

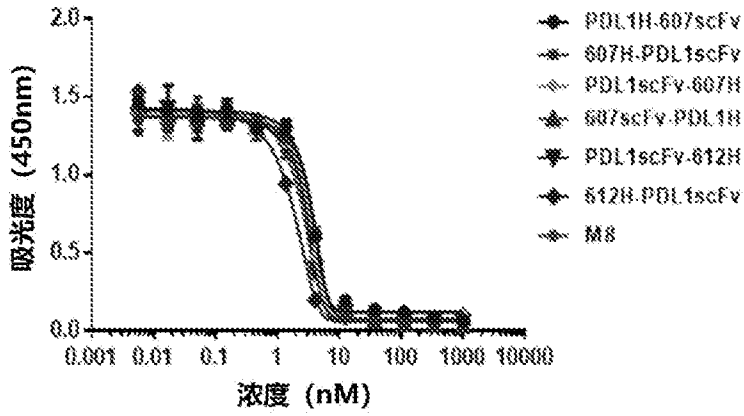


图 3

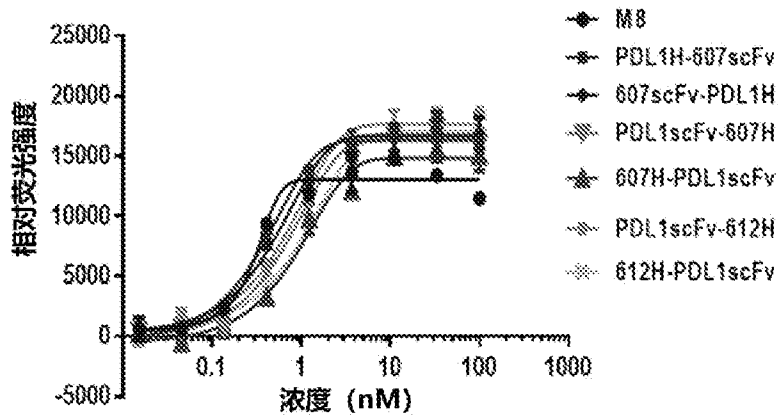


图 4

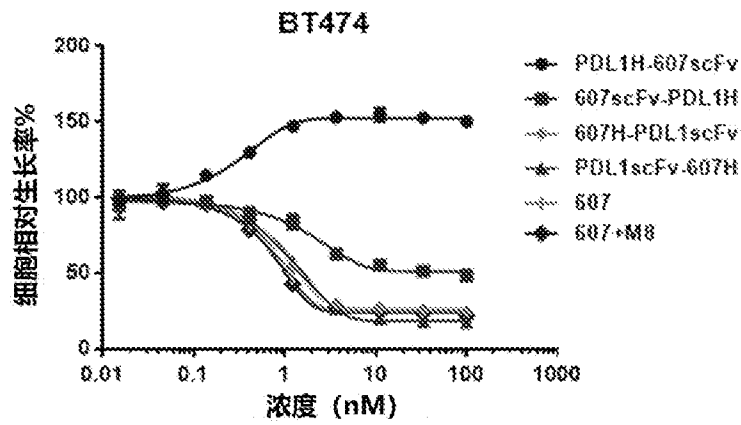


图 5

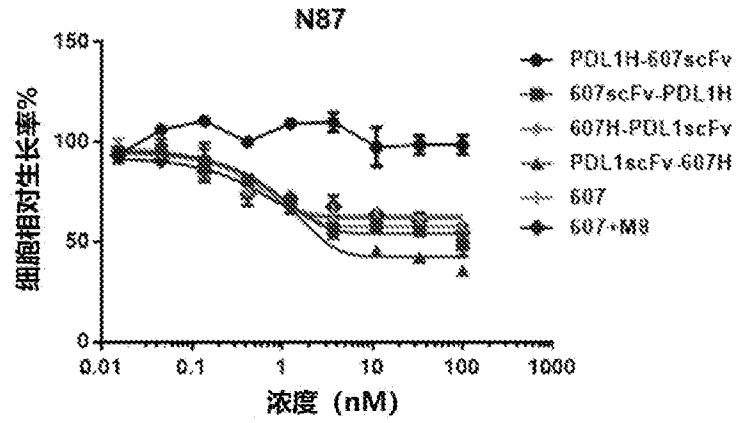


图 6

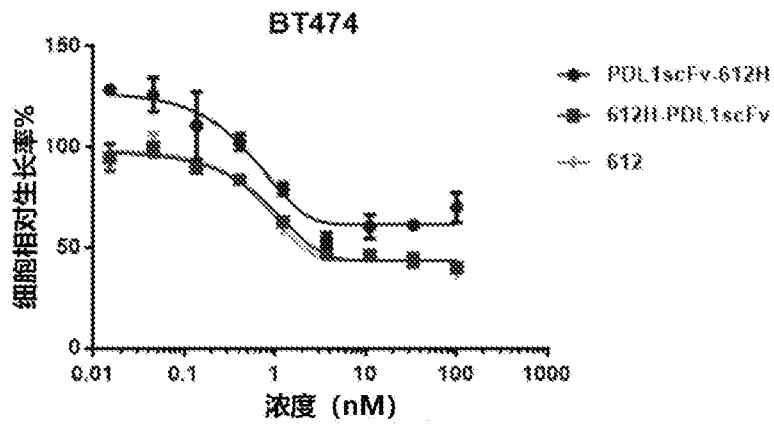


图 7

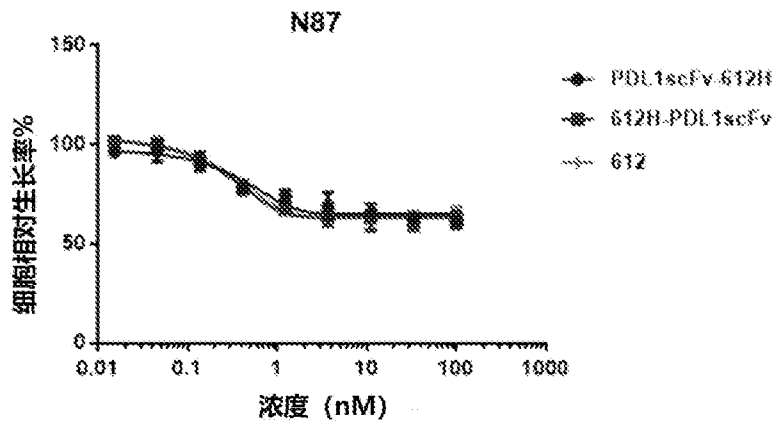


图 8

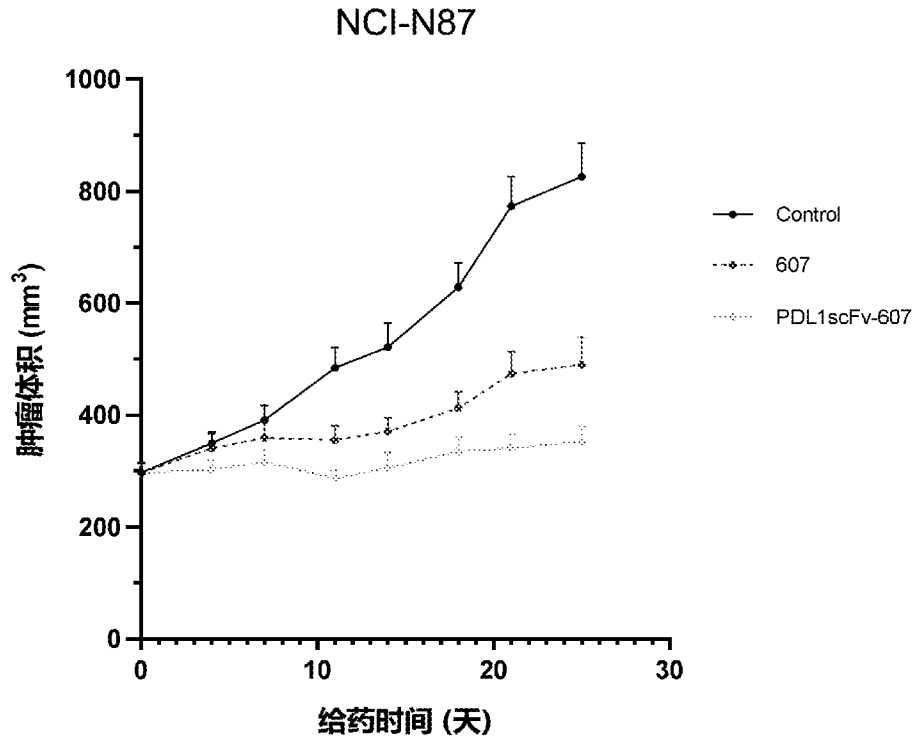


图 9

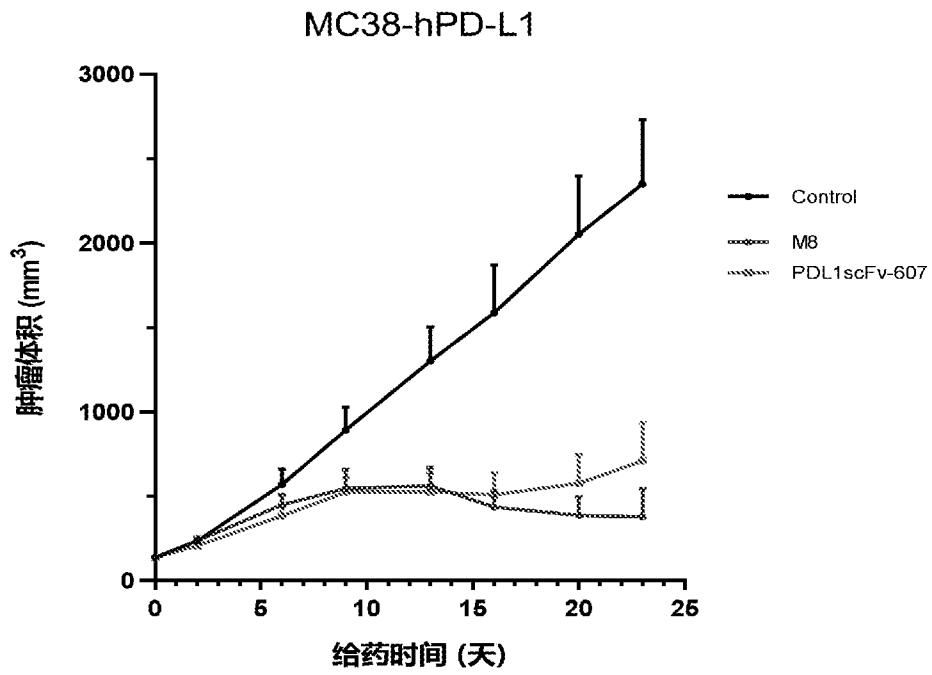


图 10

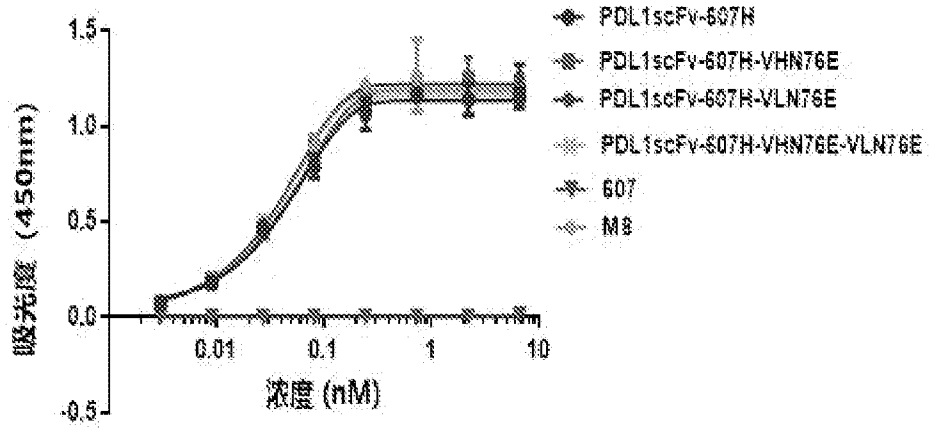


图 11

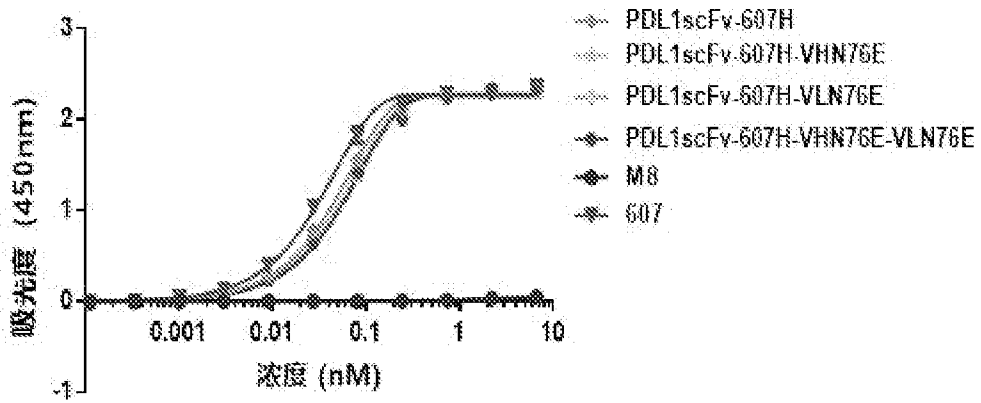


图 12

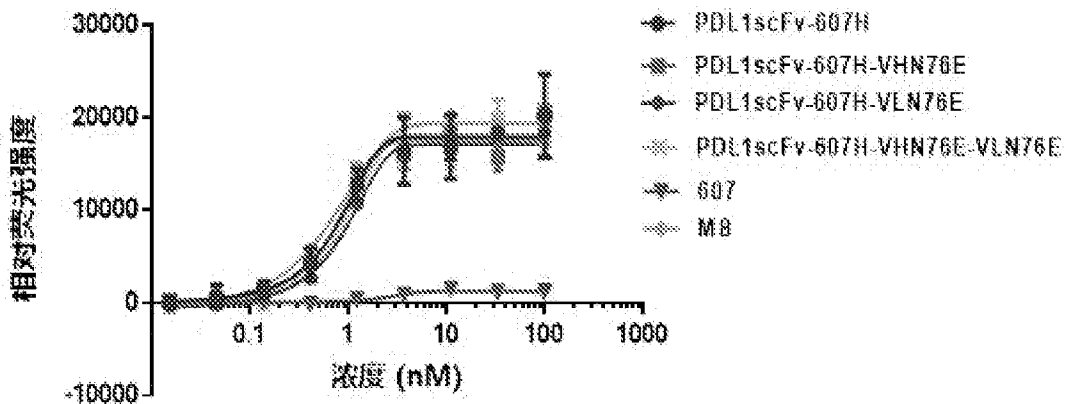


图 13

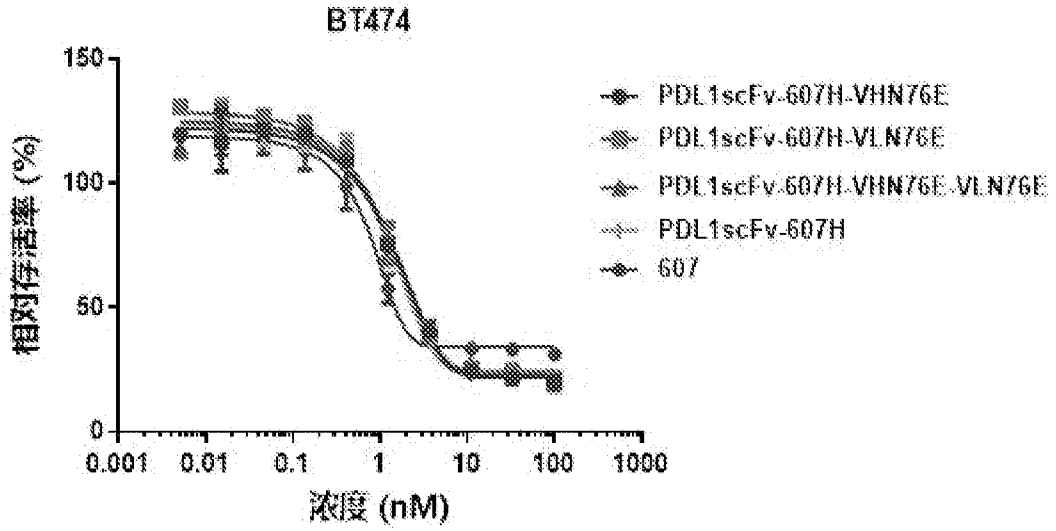


图 14

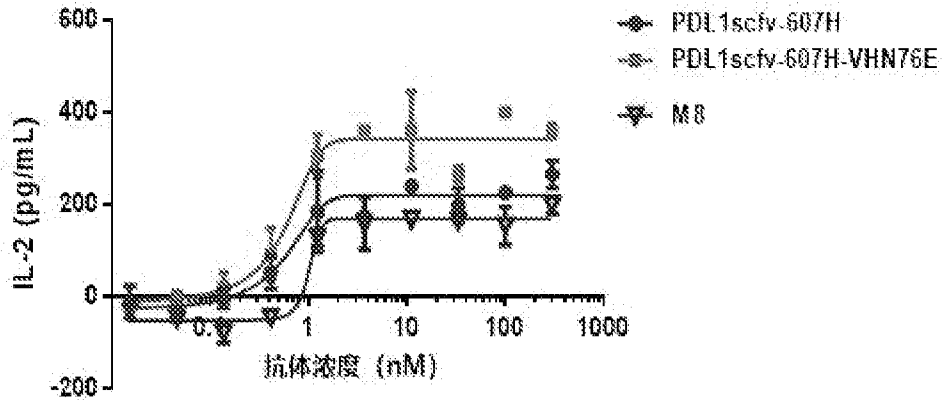


图 15

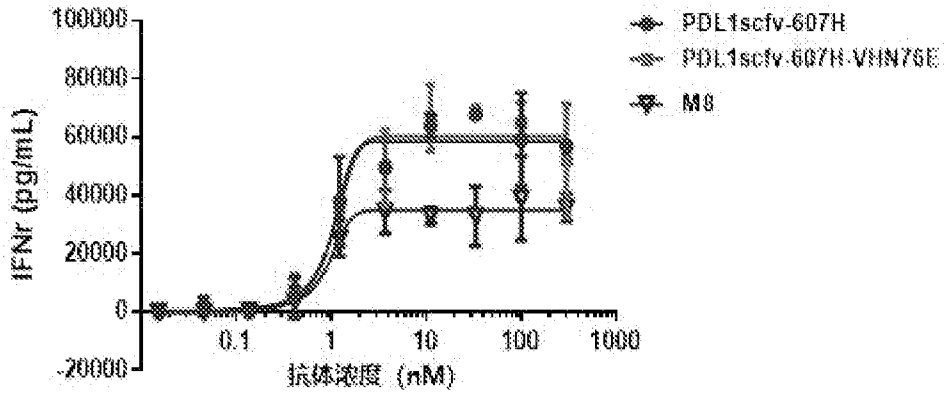


图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/095189

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16; C12N15; A61K39		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) VEN; USTXT; WOTXT; EPTXT; JPTXT; CNABS; CNTXT; CNKI; PubMed; ISI web of knowledge; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; Genbank; EMBL-EBI; STN: her2, PD-L1, erbb2, cd274, b7-h1, 双特异性抗体, bispecific antibody, IgG-scFv, scFv, 单链抗体, SEQ ID NO: 1-39		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Deepak Mittal et al. "Blockade of ErbB2 and PD-L1 Using a Bispecific Antibody to Improve Targeted Anti-ErbB2 Therapy" <i>Oncoimmunology</i> , Vol. 8, No. 11, 26 August 2019 (2019-08-26), ISSN: 2162-4011, the abstract, and p. e1648171-2, left column, paragraph 3 and p. e1648171-9, right column, the last paragraph	1, 2, 8-15
Y	CN 111196856 A (SUNSHINE GUOJIAN PHARMACEUTICAL (SHANGHAI) CO., LTD.) 26 May 2020 (2020-05-26) claims 1, 4-6 and 11, and description, figures 1A and 1B	1, 2, 8-15
Y	WO 2017196867 A1 (IGM BIOSCIENCES, INC.) 16 November 2017 (2017-11-16) claims 36-38 and 42-99	1, 2, 8-15
Y	WO 2018002339 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB) 04 January 2018 (2018-01-04) claims 1, 2, 4-6, 11-15, 30 and 33, and description, figure 1	1, 2, 8-15
A	US 5821337 A (GENENTECH INC.) 13 October 1998 (1998-10-13) entire document	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 02 July 2021		Date of mailing of the international search report 12 August 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/095189

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110790840 A (SUNSHINE GUOJIAN PHARMACEUTICAL (SHANGHAI) CO., LTD.) 14 February 2020 (2020-02-14) entire document	1-15
.....		

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

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

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.: **16-17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 16 and 17 set forth a method of treating cancer, capable of being used in the treatment of disease in the human or animal body, which is an excluded subject matter as defined in PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/095189

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111196856	A	26 May 2020	WO	2020103629	A1	28 May 2020
WO	2017196867	A1	16 November 2017	CA	3021669	A1	16 November 2017
				JP	2019519492	A	11 July 2019
				US	2019338031	A1	07 November 2019
				EP	3455257	A1	20 March 2019
				CN	109311985	A	05 February 2019
				KR	20190003989	A	10 January 2019
				SG	11201809336Q	A	29 November 2018
				AU	2017264683	A1	01 November 2018
				US	10954302	B2	23 March 2021
				HK	1261643	A0	03 January 2020
				IN	201817039976	A	08 February 2019
WO	2018002339	A1	04 January 2018	EP	3478720	A1	08 May 2019
				GB	201611530	D0	17 August 2016
				US	2019161555	A1	30 May 2019
US	5821337	A	13 October 1998	AT	255131	T	15 December 2003
				JP	2005000169	A	06 January 2005
				DE	122004000008	I1	09 June 2005
				EP	0590058	A1	06 April 1994
				US	6639055	B1	28 October 2003
				US	6719971	B1	13 April 2004
				AU	2250992	A	12 January 1993
				AU	675916	B2	27 February 1997
				JP	4836147	B2	14 December 2011
				LU	91067	I2	02 April 2004
				JP	2008291036	A	04 December 2008
				DE	69233254	D1	08 January 2004
				GE	P20074141	B	10 July 2007
				DK	0590058	T3	29 March 2004
				JP	2006083180	A	30 March 2006
				EP	0590058	B1	26 November 2003
				NL	300145	I1	01 June 2004
				EP	1400536	A1	24 March 2004
				ES	2206447	T3	16 May 2004
				CA	2103059	C	22 March 2005
				CY	2500	B1	02 September 2005
				CA	2103059	A1	15 December 1992
				US	6407213	B1	18 June 2002
				WO	9222653	A1	23 December 1992
				EP	0940468	A1	08 September 1999
				JP	H06508267	A	22 September 1994
				JP	4124480	B2	23 July 2008
				DE	69233254	T2	16 September 2004
				US	6054297	A	25 April 2000
				US	5821337	A	13 October 1998
				AU	5083193	A	15 March 1994
				WO	9404679	A1	03 March 1994
CN	110790840	A	14 February 2020	WO	2020025013	A1	06 February 2020
				CN	112513094	A	16 March 2021

A. 主题的分类		
C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K16; C12N15; A61K39		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
VEN;USTXT;WOTXT;EPTXT;JPTXT;CNABS;CNTXT;CNKI;PubMed;ISI web of knowledge;中国专利生物序列检索系统; Genbank;EMBL-EBI;STN:her2, PD-L1, erbb2, cd274, b7-h1, 双特异性抗体, bispecific antibody, IgG-scFv, scFv, 单链抗体, SEQ ID NO: 1-39		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	Deepak Mittal 等. "Blockade of ErbB2 and PD-L1 using a bispecific antibody to improve targeted anti-ErbB2 therapy" ONCOIMMUNOLOGY, 第8卷, 第11期, 2019年 8月 26日 (2019 - 08 - 26), ISSN: 2162-4011, 摘要, 第e1648171-2页左栏第3段, 第e1648171-9页右栏最后1段	1-2, 8-15
Y	CN 111196856 A (三生国健药业上海股份有限公司) 2020年 5月 26日 (2020 - 05 - 26) 权利要求1, 4-6, 11, 说明书附图图1A, 图1B	1-2, 8-15
Y	WO 2017196867 A1 (IGM BIOSCIENCES INC) 2017年 11月 16日 (2017 - 11 - 16) 权利要求36-38, 42-99	1-2, 8-15
Y	WO 2018002339 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB) 2018年 1月 4日 (2018 - 01 - 04) 权利要求1-2, 4-6, 11-15, 30, 33, 说明书附图图1	1-2, 8-15
A	US 5821337 A (GENENTECH INC) 1998年 10月 13日 (1998 - 10 - 13) 全文	1-15
A	CN 110790840 A (三生国健药业上海股份有限公司) 2020年 2月 14日 (2020 - 02 - 14) 全文	1-15
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2021年 7月 2日		2021年 8月 12日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中国 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		高赞
传真号 (86-10)62019451		电话号码 86-(20)-28950493

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

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

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 16-17
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求16-17请求保护一种治疗癌症的方法，能够用于人体或动物体的疾病治疗，不符合PCT实施细则第39.1(iv)的规定，属于被排除的主题。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/095189

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111196856	A	2020年 5月 26日	WO	2020103629	A1	2020年 5月 28日
WO	2017196867	A1	2017年 11月 16日	CA	3021669	A1	2017年 11月 16日
				JP	2019519492	A	2019年 7月 11日
				US	2019338031	A1	2019年 11月 7日
				EP	3455257	A1	2019年 3月 20日
				CN	109311985	A	2019年 2月 5日
				KR	20190003989	A	2019年 1月 10日
				SG	11201809336Q	A	2018年 11月 29日
				AU	2017264683	A1	2018年 11月 1日
				US	10954302	B2	2021年 3月 23日
				HK	1261643	A0	2020年 1月 3日
				IN	201817039976	A	2019年 2月 8日
WO	2018002339	A1	2018年 1月 4日	EP	3478720	A1	2019年 5月 8日
				GB	201611530	D0	2016年 8月 17日
				US	2019161555	A1	2019年 5月 30日
US	5821337	A	1998年 10月 13日	AT	255131	T	2003年 12月 15日
				JP	2005000169	A	2005年 1月 6日
				DE	122004000008	I1	2005年 6月 9日
				EP	0590058	A1	1994年 4月 6日
				US	6639055	B1	2003年 10月 28日
				US	6719971	B1	2004年 4月 13日
				AU	2250992	A	1993年 1月 12日
				AU	675916	B2	1997年 2月 27日
				JP	4836147	B2	2011年 12月 14日
				LU	91067	I2	2004年 4月 2日
				JP	2008291036	A	2008年 12月 4日
				DE	69233254	D1	2004年 1月 8日
				GE	P20074141	B	2007年 7月 10日
				DK	0590058	T3	2004年 3月 29日
				JP	2006083180	A	2006年 3月 30日
				EP	0590058	B1	2003年 11月 26日
				NL	300145	I1	2004年 6月 1日
				EP	1400536	A1	2004年 3月 24日
				ES	2206447	T3	2004年 5月 16日
				CA	2103059	C	2005年 3月 22日
				CY	2500	B1	2005年 9月 2日
				CA	2103059	A1	1992年 12月 15日
				US	6407213	B1	2002年 6月 18日
				WO	9222653	A1	1992年 12月 23日
				EP	0940468	A1	1999年 9月 8日
				JP	H06508267	A	1994年 9月 22日
				JP	4124480	B2	2008年 7月 23日
				DE	69233254	T2	2004年 9月 16日
				US	6054297	A	2000年 4月 25日
				US	5821337	A	1998年 10月 13日
				AU	5083193	A	1994年 3月 15日
				WO	9404679	A1	1994年 3月 3日
CN	110790840	A	2020年 2月 14日	WO	2020025013	A1	2020年 2月 6日
				CN	112513094	A	2021年 3月 16日