



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I718206 B

(45) 公告日：中華民國 110 (2021) 年 02 月 11 日

(21) 申請案號：105137421

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 16 日

(51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2015/11/17 中國大陸

201510788907.3

(71) 申請人：大陸商江蘇恆瑞醫藥股份有限公司 (中國大陸) JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

中國大陸

大陸商上海恆瑞醫藥有限公司 (中國大陸) SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72) 發明人：屈向東 QU, XIANGDONG (CN)；胡齊悅 HU, QIYUE (CN)；徐韶瑜 XU, SHAOYU (CN)；崔東冰 CUI, DONGBING (CN)；金后聰 JIN, HOUCONG (CN)；陶維康 TAO, WEIKANG (CN)；張連山 ZHANG, LIANSHAN (CN)；曹國慶 CAO, GUOQING (CN)；孫飄揚 SUN, PIAOYANG (CN)

(74) 代理人：洪武雄；陳昭誠

(56) 參考文獻：

TW I419705B

WO 2007/005874A2

WO 2011/066389A1

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：28 項 圖式數：3 共 93 頁

(54) 名稱

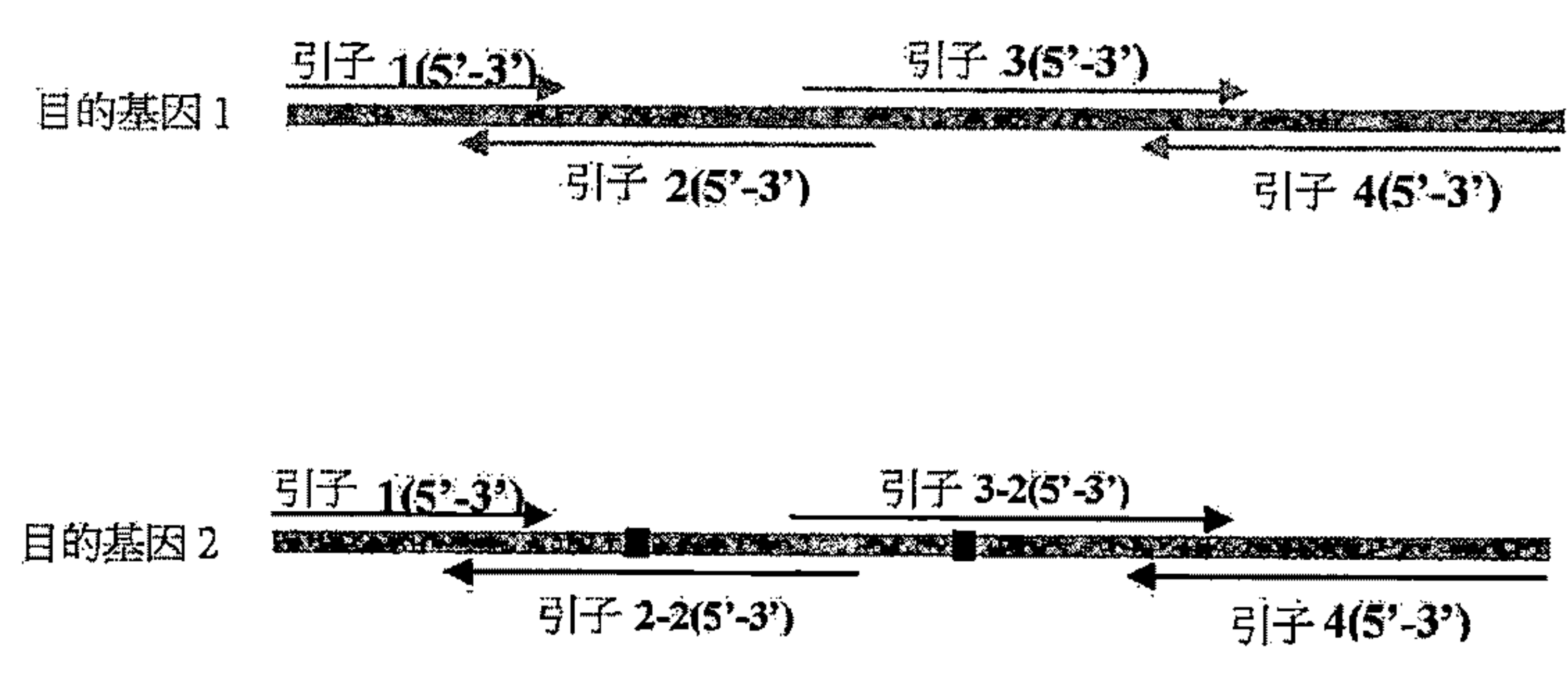
PD-L1 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

(57) 摘要

本發明涉及 PD-L1 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途。進一步地，本發明涉及包含該 PD-L1 抗體 CDR 區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含 PD-L1 抗體及其抗原結合片段的藥物組成物，以及其作為抗癌藥物的用途。特別地，本發明涉及一種人源化的 PD-L1 抗體在製備用於治療 PD-L1 介導的疾病或病症的藥物中的用途。

The present invention relates to a PD-L1 antibody, antigen-binding fragments, and pharmaceutical use thereof. Furthermore, the present invention relates to chimeric and humanized antibodies comprising the CDR regions of the present PD-L1 antibody, as well as pharmaceutical compositions comprising the present PD-L1 antibody and antigen-binding fragments thereof, and their use as anti-cancer drugs. In particular, the present invention relates to a humanized PD-L1 antibody, and its use in preparation of a medicament for the treatment of PD-L1 mediated disease.

指定代表圖：



第1圖

I718206

公告本

發明摘要

※ 申請案號： 105137421

※ 申請日： 105/11/16

※IPC 分類：

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

G12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

PD-L1 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

PD-L1 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENTS

AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

【中文】

本發明涉及 PD-L1 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途。進一步地，本發明涉及包含該 PD-L1 抗體 CDR 區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含 PD-L1 抗體及其抗原結合片段的藥物組成物，以及其作為抗癌藥物的用途。特別地，本發明涉及一種人源化的 PD-L1 抗體在製備用於治療 PD-L1 介導的疾病或病症的藥物中的用途。

【英文】

The present invention relates to a PD-L1 antibody, antigen-binding fragments, and pharmaceutical use thereof. Furthermore, the present invention relates to chimeric and humanized antibodies comprising the CDR regions of the present PD-L1 antibody, as well as pharmaceutical compositions comprising the present PD-L1 antibody and antigen-binding fragments thereof, and their use as anti-cancer drugs. In particular, the present invention relates to a humanized PD-L1 antibody, and its use in preparation of a medicament for the treatment of PD-L1 mediated disease.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

該代表圖無元件符號及其代表之意義。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無代表化學式

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

PD-L1 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

PD-L1 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENTS
AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

【技術領域】

本發明涉及 PD-L1 抗體、PD-L1 抗體的抗原結合片段、包含所述 PD-L1 抗體 CDR 區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含所述 PD-L1 抗體及其抗原結合片段的藥物組成物，以及其作為抗癌藥物的用途。

【先前技術】

腫瘤免疫治療是腫瘤治療領域一個長時期的焦點，其中 T 細胞的腫瘤免疫治療又處於其核心位置。腫瘤免疫治療是充分利用、調動腫瘤患者體內的殺傷性 T 細胞，對腫瘤進行殺傷作用，它可能是最有效的也是最安全的治療腫瘤的途徑。與此同時，腫瘤逃逸是腫瘤免疫治療面臨的一個巨大障礙，腫瘤細胞利用其自身對免疫系統的抑制作用促進了腫瘤的快速生長。

腫瘤的免疫逃逸機制與有機體對腫瘤的免疫反應之間存在著極為複雜的關係。腫瘤免疫治療早期腫瘤特異性的殺傷性 T 細胞是有其生物活性的，但隨著腫瘤生長後期失去了殺傷的功能。所以腫瘤免疫治療是為了最大限度的提高患者自身對腫瘤的免疫系統反應，它不但要在體內活

化原有的免疫系統反應，更要維持免疫系統反應的持續時間和反應強度，才是免疫治療腫瘤的關鍵。

人體內 T 細胞的活化採取了兩條信號路徑系統，除了需要藉由抗原呈遞細胞呈現 MHC-抗原肽給 T 細胞提供第一信號外，還需要一系列協同刺激分子提供第二信號，進而才能使 T 細胞產生正常的免疫反應。這個雙信號路徑系統對體內免疫系統的平衡有著至關重要的作用，它嚴格調控有機體對自身和非自身抗原產生不同的免疫反應。如果缺少協同刺激分子提供的第二信號，將會導致 T 細胞的無反應或持續特異性免疫反應，從而產生耐受。因此，第二信號路徑在有機體免疫反應的整個過程中有著非常關鍵的調節作用。

程序性死亡分子 1 (programmed death-1, PD-1) 是 1992 年發現的表現在 T 細胞表面的一個蛋白受體，參與到細胞的凋亡過程之中。PD-1 屬於 CD28 家族，與細胞毒性 T 淋巴細胞抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4) 具有 23% 的胺基酸同源性，但其表現却與 CTLA 不同，主要表現在活化的 T 細胞、B 細胞和髓系細胞上。PD-1 有兩個配體，分別為 PD-L1 和 PD-L2。PD-L1 主要表現於 T 細胞、B 細胞、巨噬細胞和樹突狀細胞 (dendritic cell, DC) 上，在活化後細胞上的表現能夠進行上調。而 PD-L2 的表現相對較局限，主要表現在抗原呈細胞上，如活化的巨噬細胞和樹突狀細胞。

PD-L1 藉由和 PD-1 及 B7-1 的結合抑制免疫系統，很

多腫瘤細胞及腫瘤組織微環境的免疫細胞表現 PD-L1。新的研究發現乳腺癌、肺癌、胃癌、腸癌、腎癌、黑色素瘤、非小細胞肺癌、結腸癌、膀胱癌、卵巢癌、胰腺癌及肝癌等人類腫瘤組織中檢測到高 PD-L1 蛋白的表現，且 PD-L1 的表現水平和患者的臨床及預後緊密相關。

由於 PD-L1 起到第二信號路徑抑制 T 細胞增殖的作用，所以阻斷 PD-L1 / PD-1 之間結合成為了腫瘤免疫治療領域一個非常有潛力的新興靶點。

目前有多家跨國製藥公司在研發針對 PD-L1 的單株抗體，它藉由阻斷 PD-L1 / PD-1 之間結合，最大限度的提高患者自身對腫瘤的免疫系統反應，從而達到對腫瘤細胞進行殺傷的目的。相關的專利如：WO0139722、WO2013173223、WO2014195852、WO2013181634、WO2015048520、WO2015036511、US2014335093、WO2014100079、WO2014055897、US6803192B1、WO2014022758、US8617546B2 和 WO2010089411A2。

本發明提供有著高親和力、高選擇性、高生物活性的 PD-L1 抗體。

【發明內容】

本發明提供一種 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其包含任意 1 個選自以下的 CDR 區序列或其突變序列：

抗體重鏈可變區 HCDR 區序列：SEQ ID NO：10-12，SEQ ID NO：16-18；和抗體輕鏈可變區 LCDR 區序列：SEQ ID NO：13-15，SEQ ID NO：19-21；

具體如下：

HCDR1 選自：NDYWX ₁	SEQ ID NO：10
或 SYWMH	SEQ ID NO：16
HCDR2 選自：YISYTGSTYYNPSLKS	SEQ ID NO：11
或 RI X ₄ PNSG X ₅ TSYNEKFKN	SEQ ID NO：17
HCDR3 選自：SGGWLAPFDY	SEQ ID NO：12
或 GGSSYDYFDY	SEQ ID NO：18
LCDR1 選自：KSSQSLFY X ₂ SNQK X ₃ SLA	SEQ ID NO：13
或 RASESVSIHGTHLMH	SEQ ID NO：19
LCDR2 選自：GASTRES	SEQ ID NO：14
或 AASNLES	SEQ ID NO：20
LCDR3 選自：QQYYGYPYT	SEQ ID NO：15
或 QQSFEDPLT	SEQ ID NO：21；

其中 X₁ 選自 N 或 T，X₂ 選自 R 或 H，X₃ 選自 N 或 H，X₄ 選自 H 或 G，X₅ 選自 G 或 F。

在本發明一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其包含任選自 SEQ ID NO：10，SEQ ID NO：11，SEQ ID NO：12，SEQ ID NO：16，SEQ ID NO：17 和 SEQ ID NO：18 的抗體重鏈可變區 HCDR 序列或其突變序列。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其包含任選自 SEQ ID NO：13，SEQ ID NO：14，SEQ ID NO：15，SEQ ID NO：19，SEQ ID NO：20，SEQ ID NO：21 的抗體輕鏈可變區 LCDR

序列或其突變序列。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中抗體輕鏈可變區可進一步包含鼠源 κ 鏈或鼠源 κ 鏈變體的輕鏈 FR 區、或者鼠源 λ 鏈或鼠源 λ 鏈變體的輕鏈 FR 區；其中抗體重鏈可變區可進一步包含鼠源 IgG1 或其變體的重鏈 FR 區、或 IgG2 或其變體的重鏈 FR 區、或 IgG3 或其變體的重鏈 FR 區。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中所述的包含鼠源 FR 區的抗體重鏈可變區選自 SEQ ID NO：6、8 或其突變序列，所述的包含鼠源 FR 區的抗體輕鏈可變區選自 SEQ ID NO：7、9 或其突變序列。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中抗體重鏈可進一步包含鼠源 κ 鏈或其變體的輕鏈恆定區、或者 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區；其中抗體輕鏈可進一步包含鼠源 IgG1 或其變體的重鏈恆定區、或 IgG2 或其變體的重鏈恆定區、或 IgG3 或其變體的重鏈恆定區。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段為嵌合抗體。根據本發明提供的 PD-L1 嵌合抗體或其片段，其進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區，較佳包含人源 IgG2 或 IgG4 重鏈恆定區，或者使用胺基酸突變後無 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體

依賴的細胞介導的細胞毒作用)毒性的 IgG1。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段為人源化抗體或其片段。較佳，所述人源化抗體為人源化抗體 9-2 或人源化抗體 24D5，所述人源化抗體重鏈可變區上的重鏈 FR 區序列來源於人種系重鏈，其中：人源化抗體 9-2 重鏈可變區上的重鏈 FR 區序列來源於人種系重鏈 IGHV4-30-4*01 和 hjh2 的組合序列；其包含人種系重鏈 IGHV4-30-4*01 的 FR1、FR2、FR3 區和 hjh2 的 FR4 區；人源化抗體 24D5 重鏈可變區上的重鏈 FR 區序列來源於人種系重鏈 IGHV1-46*01 和 hjh6.1 的組合序列；其包含人種系重鏈 IGHV1-46*01 的 FR1、FR2、FR3 區和 hjh6.1 的 FR4 區。進一步較佳，所述人源化抗體 9-2 的重鏈 FR 區序列有 0-10 個胺基酸的回復突變，較佳為一個或多個選自 W47Y、V71R、G27Y、I48M、V67L、F78Y、S30T、Q39K 的胺基酸回復突變，更佳為選自 W47Y 和 V71R 的胺基酸回復突變；所述人源化抗體 24D5 的重鏈 FR 區序列有 0-10 個胺基酸的回復突變，較佳為一個或多個選自 T74K、R72V、M48I、M70L、R38Q、L83F、V68A、和 V79A 的胺基酸回復突變。更進一步較佳，所述人源化抗體的重鏈可變區序列如下：人源化抗體 9-2 重鏈可變區序列為 SEQ ID NO：22 所示的序列或其變體；或人源化抗體 24D5 重鏈可變區序列為 SEQ ID NO：24 所示的序列或其變體。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的

PD-L1 抗體或其抗原結合片段為人源化抗體或其片段。較佳，所述的人源化抗體為人源化抗體 9-2 或人源化抗體 24D5，所述人源化抗體輕鏈可變區上的輕鏈 FR 區序列來源於人種系輕鏈，其中：人源化抗體 9-2 輕鏈可變區上的輕鏈 FR 區序列來源於人種系輕鏈 IGKV4-1*01 和 hjk4.1 的組合序列；其包含人種系輕鏈 IGKV4-1*01 的 FR1、FR2、FR3 區和 hjk4.1 的 FR4 區；人源化抗體 24D5 輕鏈可變區上的輕鏈 FR 區序列來源於人種系輕鏈 IGKV7-3*01 和 hjk2.1 的組合序列；其包含人種系輕鏈 IGKV7-3*01 的 FR1、FR2、FR3 區和 hjk2.1 的 FR4 區。進一步較佳，所述人源化抗體 9-2 的輕鏈 FR 區序列有 0-10 個胺基酸的回復突變，較佳為 P49S 的胺基酸回復突變；所述人源化抗體 24D5 輕鏈 FR 區序列有 0-10 個胺基酸的回復突變，較佳為一個或多個選自 Y91F，T22S，G72E 的胺基酸回復突變或者引入 N85E 去糖基化突變。更進一步較佳，所述人源化抗體的輕鏈可變區序列如下：人源化抗體 Ab-1 輕鏈可變區序列為 SEQ ID NO:23 所示的序列或其變體；或人源化抗體 Ab-2 輕鏈可變區序列為 SEQ ID NO:25 所示的序列或其變體。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中所述的人源化抗體或其片段可進一步進行親和力成熟設計。

在本發明一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中 X_1 為 T， X_2 為 H， X_3

為 H，X₄ 為 G，X₅ 為 F。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，包括人源化抗體可變區序列如下：

人源化抗體 9-2：重鏈可變區序列為 SEQ ID NO:26；
輕鏈可變區序列為 SEQ ID NO:27；

人源化抗體 24D5：重鏈可變區序列為 SEQ ID NO:28，
輕鏈可變區序列為 SEQ ID NO:29。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段為人源化抗體或其片段，其中所述人源化抗體重鏈進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區，較佳包含人源 IgG2 或 IgG4 重鏈恆定區，更佳包含引入 F234A 和 L235A 突變的 IgG4 重鏈 Fc 區；所述人源化抗體輕鏈進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的恆定區。可進一步包含 S228P 突變。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段為人源化抗體 9-2 或人源化抗體 24D5，其中所述人源化抗體 9-2 包含重鏈抗體序列 SEQ ID NO:30，和輕鏈抗體序列 SEQ ID NO:32；其中所述人源化抗體 24D5 包含重鏈抗體序列 SEQ ID NO:34，和輕鏈抗體序列 SEQ ID NO:36。

本發明進一步提供一種藥物組成物，其含有治療有效量的如上所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，以及一種或多種藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。

本發明進一步提供一種編碼如上所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段的 DNA 分子。

本發明進一步提供一種含有編碼如上所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段的 DNA 分子的表現載體。

本發明進一步提供一種用如上所述的表現載體轉化的宿主細胞，所述宿主細胞選自細菌、酵母菌和哺乳動物細胞；較佳哺乳動物細胞。

在本發明一個較佳的實施方案中，本發明所述的宿主細胞為細菌，較佳為大腸杆菌。

在本發明另一個較佳的實施方案中，本發明所述的宿主細胞為酵母菌，較佳為畢赤酵母。

在本發明另一個較佳的實施方案中，根據本發明提供的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗原結合片段為 Fab、Fv、ScFv、F(ab')₂。

本發明進一步提供一種根據本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段、或包含其的藥物組成物，在製備用於治療 PD-L1 介導的疾病或病症的藥物中的用途；其中所述的疾病較佳為癌症；更佳為表現 PD-L1 的癌症；所述的癌症最佳為乳腺癌、肺癌、胃癌、腸癌、腎癌、黑色素瘤、膀胱癌；進一步較佳為非小細胞肺癌、黑色素瘤、膀胱癌和腎癌。

本發明進一步提供一種治療和預防 PD-L1 介導的疾病或病症的方法，該方法包括給予所需患者治療有效量的根據本發明所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段、或包含其

的的藥物組成物；其中所述的疾病較佳為癌症；更佳為表現 PD-L1 的癌症；所述的癌症最佳為乳腺癌、肺癌、胃癌、腸癌、腎癌、黑色素瘤、非小細胞肺癌、膀胱癌；最佳為非小細胞肺癌、黑色素瘤、膀胱癌和腎癌。

【圖式簡單說明】

第 1 圖：人源化選殖株構建時引子設計示意圖。

第 2 圖：人源化選殖株構建的載體構建示意圖。

第 3 圖：人源化抗體對 PBMC 的增殖的刺激。

【實施方式】

一、術語

為了更容易理解本發明，以下具體定義了某些技術和科學術語。除非在本文中另有明確定義，本文使用的所有其它技術和科學術語都具有本發明所屬領域的一般技術人員通常理解的含義。

本發明所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如 J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

本發明所述的“抗體”指免疫球蛋白，是由兩條相同的重鏈和兩條相同的輕鏈藉由鏈間二硫鍵連接而成的四肽鏈結構。免疫球蛋白重鏈恆定區的胺基酸組成和排列順序不同，故其抗原性也不同。據此，可將免疫球蛋白分為五類，或稱為免疫球蛋白的同種型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相應的重鏈分別為 μ 鏈、 δ 鏈、 γ 鏈、 α 鏈、和 ϵ 鏈。同一類 Ig 根據其鉸鏈區胺基酸組成和重鏈二硫鍵的數目和位置的差別，又可分為不同的亞類，如 IgG 可分

為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。輕鏈藉由恆定區的不同分為 κ 鏈或 λ 鏈。五類 Ig 中每類 Ig 都可以有 κ 鏈或 λ 鏈。

在本發明中，本發明所述的抗體輕鏈可變區可進一步包含輕鏈恆定區，所述的輕鏈恆定區包含人源或鼠源的 κ 、 λ 鏈或其變體。

在本發明中，本發明所述的抗體重鏈可變區可進一步包含重鏈恆定區，所述的重鏈恆定區包含人源或鼠源的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體。

抗體重鏈和輕鏈靠近 N 端的約 110 個胺基酸的序列變化很大，為可變區 (Fv 區)；靠近 C 端的其餘胺基酸序列相對穩定，為恆定區。可變區包括 3 個高度變異區 (HVR) 和 4 個序列相對保守的骨架區 (FR)。3 個高度變異區決定抗體的特異性，又稱為互補性決定區 (CDR)。每條輕鏈可變區 (LCVR) 和重鏈可變區 (HCVR) 由 3 個 CDR 區 4 個 FR 區組成，從胺基端到羧基端依次排列的順序為：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。輕鏈的 3 個 CDR 區指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重鏈的 3 個 CDR 區指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。本發明所述的抗體或抗原結合片段的 LCVR 區和 HCVR 區的 CDR 胺基酸殘基在數量和位置符合已知的 Kabat 編號規則 (LCDR1-3，HCDE2-3)，或者符合 kabat 和 chothia 的編號規則 (HCDR1)。

本發明的抗體包括鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體，較佳人源化抗體。

術語“鼠源抗體”在本發明中為根據本領域知識和

技能製備的對人 PD-L1 的單株抗體。製備時用 PD-L1 抗原注射試驗對象，然後分離表現具有所需序列或功能特性的抗體的雜交瘤。在本發明一個較佳的實施方案中，所述的鼠源 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，可進一步包含鼠源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區，或進一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其變體的重鏈恆定區。

術語“嵌合抗體(chimeric antibody)”，是將鼠源性抗體的可變區與人抗體的恆定區融合而成的抗體，可以減輕鼠源性抗體誘發的免疫反應。建立嵌合抗體，要先建立分泌鼠源性特異性單抗的雜交瘤，然後從小鼠雜交瘤細胞中選殖可變區基因，再根據需要選殖人抗體的恆定區基因，將小鼠可變區基因與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入人載體中，最後在真核工業系統或原核工業系統中表現嵌合抗體分子。在本發明一個較佳的實施方案中，所述的 PD-L1 嵌合抗體的抗體輕鏈進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區。所述的 PD-L1 嵌合抗體的抗體重鏈進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體的重鏈恆定區。人抗體的恆定區可選自人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區，較佳包含人源 IgG2 或 IgG4 重鏈恆定區，或者使用胺基酸突變後無 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴的細胞介導的細胞毒作用)毒性的 IgG4。

術語“人源化抗體(humanized antibody)”，也稱為 CDR 移植抗體(CDR-grafted antibody)，是指將小鼠的 CDR

序列移植到人的抗體可變區框架，即不同類型的人種系抗體構架序列中產生的抗體。可以克服嵌合抗體由於攜帶大量小鼠蛋白成分，從而誘導的強烈的抗體可變抗體反應。此類構架序列可以從包括種系抗體基因序列的公共 DNA 數據庫或公開的參考文獻獲得。如人重鏈和輕鏈可變區基因的種系 DNA 序列可以在“VBase”人種系序列數據庫(在因特網 www.mrcce.com.ac.uk/vbase 可獲得)，以及在 Kabat, E.A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。為避免免疫原性下降的同時，引起的活性下降，可對所述的人抗體可變區框架序列進行最少反向突變或回復突變，以保持活性。本發明的人源化抗體也包括進一步由噬菌體展示對 CDR 進行親和力成熟後的人源化抗體。

本發明中所述的“抗原結合片段”，指具有抗原結合活性的 Fab 片段，Fab' 片段，F(ab')₂ 片段，以及與人 PD-L1 結合的 Fv 片段 ScFv 片段；其包含本發明所述抗體的選自 SEQ ID NO:10 至 SEQ ID NO:21 中的一個或多個 CDR 區。Fv 片段含有抗體重鏈可變區和輕鏈可變區，但沒有恆定區，並具有全部抗原結合位點的最小抗體片段。一般地，Fv 抗體還包含在 VH 和 VL 結構域之間的多肽接頭，且能夠形成抗原結合所需的結構。也可以用不同的連接子將兩個抗體可變區連接成一條多肽鏈，稱為單鏈抗體(single chain antibody)或單鏈 Fv(sFv)。本發明的術語“與 PD-L1 結合”，指能與人 PD-L1 相互作用。本發明的術語“抗原

結合位點”指抗原上不連續的，由本發明抗體或抗原結合片段識別的三維空間位點。

本發明中所述的“ADCC”，即 antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴的細胞介導的細胞毒作用，是指表現 Fc 受體的細胞藉由識別抗體的 Fc 段直接殺傷被抗體包覆的靶細胞。可藉由對 IgG 上 Fc 段的修飾，降低或消除抗體的 ADCC 效應功能。所述的修飾指在抗體的重鏈恆定區進行突變，如選自 IgG1 的 N297A、L234A、L235A； IgG2/4chimera，IgG4 的 F234A/L235A 突變。

本發明中所述的融合蛋白是一種藉由 DNA 重組得到的兩個基因共表現的蛋白產物。重組 PD-L1 胞外區 Fc 融合蛋白是藉由 DNA 重組將 PD-L1 胞外區和人抗體 Fc 片段共表現的融合蛋白。所述的 PD-L1 胞外區是指 PD-L1 蛋白表現在細胞膜以外的部分，序列見下面 SEQID NO:4 劃線區。

現有技術中熟知生產和純化抗體和抗原結合片段的方法，如冷泉港的抗體實驗技術指南，5-8 章和 15 章。例如，老鼠可以用人 PD-L1 或其片段免疫，所得到的抗體能被復性、純化，並且可以用常規的方法進行胺基酸測序。抗原結合片段同樣可以用常規方法製備。發明所述的抗體或抗原結合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 區加上一個或多個人源 FR 區。人 FR 種系序列可以藉由比對 IMGT 人類抗體可變區種系基因數據庫和 MOE 軟件，從 ImMunoGeneTics(IMGT)的網站 <http://imgt.cines.fr> 得到，或者從免疫球蛋白雜誌，2001ISBN012441351 上獲得。

本發明工程化的抗體或抗原結合片段可用常規方法製備和純化。比如，編碼重鏈 (SEQID NO: 30) 和輕鏈 (SEQID NO: 32) 的 CDNA 序列，可以選殖並重組至 GS 表現載體。重組的免疫球蛋白表現載體可以穩定地轉染 CHO 細胞。作為一種更推薦的現有技術，哺乳動物類表現系統會導致抗體的糖基化，特別是在 Fc 區的高度保守 N 端位點。藉由表現與人 PD-L1 特異性結合的抗體得到穩定的選殖株。陽性的選殖株在生物反應器的無血清培養基中擴大培養以生產抗體。分泌了抗體的培養液可以用常規技術純化。比如，用含調整過的緩衝液的 A 或 G Sepharose FF 柱進行純化。洗去非特異性結合的組分。再用 PH 梯度法沖提結合的抗體，用 SDS-PAGE 檢測抗體片段，收集。抗體可用常規方法進行過濾濃縮。可溶的混合物和多聚體，也可以用常規方法去除，比如分子篩、離子交換。得到的產物需立即冷凍，如 -70°C ，或者凍乾。

“給予”和“處理”當應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組成物與動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。“給予”和“處理”可以指例如治療、藥物代謝動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中所述流體與細胞接觸。“給予”和“處理”還意指藉由試劑、診斷、結合組成物或藉由另一種細胞體外和離體處理例如細胞。“處理”當應用於人、獸醫學或研究

受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

“治療”意指給予患者內用或外用治療劑，例如包含本發明的任一種結合化合物的組成物，所述患者具有一種或多種疾病症狀，而已知所述治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療患者或群體中以有效緩解一種或多種疾病症狀的量給予治療劑，以誘導這類症狀退化或抑制這類症狀發展到任何臨床可測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量(也稱作“治療有效量”)可根據多種因素變化，例如患者的疾病狀態、年齡和體重，以及藥物在患者產生需要療效的能力。藉由醫生或其它專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否已被減輕。儘管本發明的實施方案(例如治療方法或製品)在緩解某個目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計學檢定方法如 Student t 檢定、卡方檢定、依據 Mann 和 Whitney 的 U 檢定、Kruskal-Wallis 檢定(H 檢定)、Jonckheere-Terpstra 檢定和 Wilcoxon 檢定確定，其在統計學顯著數目的患者中應當減輕目標疾病症狀。

本發明中所述的“或其突變序列”或“或其變體”中的“突變序列”或“變體”指對相關的序列進行“保守修飾”或“保守置換或取代”。所述的“保守修飾”或“保守置換或取代”是指具有類似特徵(例如電荷、側鏈大小、疏水性/親水性、主鏈構象和剛性等)的其它胺基酸置

換蛋白中的胺基酸，使得可頻繁進行改變而不改變蛋白的生物學活性。本領域技術人員知曉，一般而言，多肽的非必需區域中的單個胺基酸置換基本上不改變生物學活性（參見例如 Watson 等 (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., 第 224 頁, (第 4 版)）。另外，結構或功能類似的胺基酸的置換不大可能破壞生物學活性。

“有效量”包含足以改善或預防醫學疾病的症狀或病症的量。有效量還意指足以允許或促進診斷的量。用於特定患者或獸醫學受試者的有效量可依據以下因素而變化：例如，待治療的病症、患者的總體健康情況、給藥的方法途徑和劑量以及副作用嚴重性。有效量可以是避免顯著副作用或毒性作用的最大劑量或給藥方案。

“外源性”指根據情況在生物、細胞或人體外產生的物質。“內源性”指根據情況在細胞、生物或人體內產生的物質。

“同源性”是指兩個多核苷酸序列之間或兩個多肽之間的序列相似性。當兩個比較序列中的位置均被相同鹼基或胺基酸單體亞基占據時，例如如果兩個 DNA 分子的每一個位置都被腺嘌呤占據時，那麼所述分子在該位置是同源的。兩個序列之間的同源性百分率是兩個序列共有的匹配或同源位置數除以比較的位置數 $\times 100$ 的函數。例如，在序列最佳比對時，如果兩個序列中的 10 個位置有 6 個匹配或同源，那麼兩個序列為 60%同源。一般而言，當比對兩

個序列而得到最大的同源性百分率時進行比較。

本文使用的表述“細胞”、“細胞株”和“細胞培養物”可互換使用，並且所有這類名稱都包括後代。因此，單詞“轉化體”和“轉化細胞”包括原代受試細胞和由其衍生的培養物，而不考慮轉移數目。還應當理解的是，由於故意或非有意的突變，所有後代在 DNA 含量方面不可能精確相同。包括具有與最初轉化細胞中篩選的相同的功能或生物學活性的突變後代。在意指不同名稱的情況下，其由上下文清楚可見。

本文使用的“聚合酶鏈式反應”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美國專利號 4,683,195 中所述擴增的程序或技術。一般來說，需要獲得來自目標區域末端或之外的序列信息，使得可以設計寡核苷酸引子；這些引子在序列方面與待擴增模板的對應鏈相同或相似。2 個引子的 5' 末端核苷酸可以與待擴增材料的末端一致。PCR 可用於擴增特定的 RNA 序列、來自總基因組 DNA 的特定 DNA 序列和由總細胞 RNA 轉錄的 cDNA、噬菌體或質粒序列等。一般參見 Mullis 等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich 編輯，(1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被視為用於擴增核酸測試樣品的核酸聚合酶反應法的一個實例，但不是唯一的實例，所述方法包括使用作為引子的已知核酸和核酸聚合酶，以擴增或產生核酸的特定部分。

“任選”或“任選地”意味著隨後所描述地事件或

環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。例如，“任選包含 1-3 個抗體重鏈可變區”意味著特定序列的抗體重鏈可變區可以但不必須存在。

“藥物組成物”表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前體藥物與其他化學組分的混合物，所述其他組分例如生理學/可藥用的載體和賦形劑。藥物組成物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

二、實施例與測試例

以下結合實施例進一步描述本發明，但這些實施例並非限制著本發明的範圍。本發明實施例中未注明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件，如冷泉港的抗體技術實驗手冊，分子選殖手冊；或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。未注明具體來源的試劑，為市場購買的常規試劑。

實施例 1、PD-L1 抗原及檢測用蛋白的製備

一、蛋白設計及表現

以 UniProt Programmed Cell Death1 Ligand1(PD-L1) isoform1(SEQ ID NO: 1)的人 PD-L1 全長基因(義翹神州生物技術有限公司, HG10084-M), 作為本發明 PD-L1 的模板, 獲得編碼本發明抗原及檢測用蛋白的基因序列, 可選地與抗體重鏈 Fc 片段(如 human IgG1)重組, 分別選殖到 pTT5 載體上 (Biovector, Cat#: 102762) 或 pTarget 載體上 (promega, A1410), 在 293F 細胞 (Invitrogen, R79007) 瞬轉

表現或 CHO-S 細胞 (Invitrogen, k9000-20) 穩定表現，純化，獲得編碼本發明抗原及檢測用蛋白。人 PD-1 基因購自 ORIGENE，貨號 SC117011，NCBI Reference Sequence: NM_005018.1。

1、人 PD-L1 全長胺基酸序列

MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC
KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVOHSS
YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG
ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTSE HELTCQAEGY
PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN
TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERTH
LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK
KQSDTHLEET

SEQ ID NO : 1

注釋：

雙橫線部分為信號肽 (Signal peptide: 1-18)；

劃橫線部分為 PD-L1 胞外區 (Extracellular domain: 19-238)，其中 19-127 為 Ig-like V-type Domain，133-225 為 Ig-like C2-type Domain；

點劃線部分為跨膜區部分 (Transmembrane domain: 239-259)；

斜體部分為胞內區 (Cytoplasmic domain: 260-290)。

2、免疫原：帶 His、PADRE 標籤的 PD-L1：PD-L1(Extra Cellular Domain，簡稱 ECD) -PADRE-His6

FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL
AALIVYWEME
DKNIIQFVHG EEDLKVOHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ
ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR
ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT
TTNSKREEKL FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH
TAEVIPPEL LAHPPNERGS GAKFVAAWTL KAAAHHHHHH

SEQ ID NO : 2

注釋：劃橫線部分為 PD-L1 胞外區；點劃線部分為 PADRE 標記；斜體部分為 His6-tag 標記。

3、得到帶 FLAG、HIS 標籤的 PD-L1：
 PD-L1(ECD)-Flag-His6，用於本發明抗體的性能測試。

FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL
AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVOHSS YRQRARLLKD
QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS
DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT
FRRLDPEENH TAEVIPPEL LAHPPNERDY KDDDDKHHHH
HH

SEQ ID NO : 3

注釋：劃橫線部分為 PD-L1 胞外區；點劃線部分為 FLAG-Tag 標記；斜體部分為 His6-tag 標記。

4、PD-L1 的 Fc 融合蛋白：PD-L1(ECD)-Fc，用作本發明的免疫抗原或檢測試劑。

VKL-PD-L1(ECD)-Fc(human IgG1)

FTVTVPKDLYVVEYGSNM TIECKFPVEKQLDLAALIVYWEM
EDKNIIQFVHG EEDLKVOHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQI
TDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRIL
VVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNS
KREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPE
LPLAHPPNER*DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI*
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO : 4

注釋：劃橫線部分為 PD-L1 胞外區；斜體部分為 human IgG1 Fc 部分。

5、PD-1 的 Fc 融合蛋白：PD-1(ECD)-Fc，用於本發明抗體的性能測試。

PGWFLDSPDRPWN PPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESF
VLNWYRMSPSNQTDKLA AFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGR
DFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE
RRAEVPTAHPS SPRPAGQFOTLV*EPKSSDKTHTCPPCPAPELL*
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
*KEYKCKVSNKALPAPIEKTI**SKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL*

KNQVSLTCLVKGFPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

SEQ ID NO : 5

注釋：劃橫線部分為 PD-1(ECD)胞外區；斜體部分為 hFC(human IgG1)部分。

實施例 2、PD-L1、PD-1 重組蛋白以及雜交瘤抗體、重組抗體的純化

1、 “ 帶 His、PADRE 標籤的 PD-L1 ”：
 PD-L1(ECD)-PADRE-His6(SEQ ID NO: 2)重組蛋白的純化步驟

將細胞表現上清樣品高速離心去除雜質，並將緩衝液換置換為 PBS，加入咪唑至終濃度為 5mM。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液平衡鎳柱，沖洗 2-5 倍柱體積。將置換後的上清樣品裝載於 Ni 柱(GE, 17-5318-01)上。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液沖洗柱子，至 A_{280} 讀數降至基線。後用 PBS+10mM 咪唑沖洗層析柱，除去非特異結合的雜蛋白，並收集流出液。再用含有 300mM 咪唑的 PBS 溶液沖提目的蛋白，並收集沖提峰。收集的沖提液濃縮後用凝膠層析 Superdex200(GE)進一步純化，流動相為 PBS。去聚體峰，收集沖提峰。所得到的蛋白經電泳、肽指紋圖(安捷倫，6530 Q-TOF)、LC-MS(安捷倫，6530 Q-TOF)鑒定為正確後分裝備用。得到帶 His、PADRE 標籤的 PD-L1：
 PD-L1(ECD)-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 2)用於本發明抗體

的免疫原。

2、帶 His 標籤和 Flag 標籤的 PD-L1(ECD)-Flag-His6(SEQ ID NO: 3)重組蛋白的純化步驟

將樣品高速離心去除雜質，並濃縮至適當體積。將如上 IMAC 柱洗出的蛋白峰裝載於 0.5×PBS 平衡的 flag 親和柱(Sigma, A2220)上，沖洗 2-5 倍柱體積。將除雜後的細胞表現上清樣品裝載於柱上。用 0.5×PBS 沖洗柱子，至 A_{280} 讀數降至基線。用含有 0.3M NaCl 的 PBS 沖洗柱子，沖洗雜蛋白，並收集。用 0.1M 乙酸(pH3.5-4.0)沖提目的蛋白，並收集，調節 pH 至中性。收集的沖提液濃縮後用凝膠層析 Superdex200(GE)進一步純化，流動相為 PBS。去聚體峰，收集沖提峰收集樣品經電泳、肽指紋圖、LC-MS 鑒定正確後分裝備用。得到帶 His 標籤和 Flag 標籤的 PD-L1: PD-L1(ECD)-Flag-His6(SEQ ID NO: 3)，用於本發明抗體的性能測試。

3、PD-L1 和 PD-1 的 Fc 融合蛋白的純化步驟

將細胞表現上清樣品高速離心去除雜質，濃縮至適當體積後裝載於 Protein A 柱(GE, 17-5438-01)上。用 PBS 沖洗柱子，至 A_{280} 讀數降至基線。用 100mM 醋酸鈉 pH3.0 沖提目的蛋白。1M TrisHCl 中和後的蛋白上 PBS 平衡好的凝膠層析 Superdex200(GE)進一步純化。去聚體峰，收集沖提峰後，分裝備用。此方法用來純化 PD-L1(ECD)-Fc(SEQ ID NO: 4)和 PD-1(ECD)-Fc(SEQ ID NO: 5)。PD-L1(ECD)-Fc 可用作本發明的免疫抗原或檢測試劑，PD-1(ECD)-Fc 用於本

發明抗體的性能測試。

實施例 3、 抗人 PD-L1 雜交瘤單株抗體的製備

1、 免疫

抗人 PD-L1 單株抗體藉由免疫小鼠產生。實驗用 SJL 白小鼠，雌性，6 周齡(北京維通利華實驗動物技術有限公司，動物生產許可證號：SCXK(京)2012-0001)。飼養環境：SPF 級。小鼠購進後，實驗室環境飼養 1 周，12/12 小時光/暗周期調節，溫度 20-25 °C；濕度 40-60 %。將已適應環境的小鼠按兩種方案(方案 A 和方案 B)免疫，每組 6-10 隻。免疫抗原為帶 His、PADRE 標籤的 PD-L1：PD-L1(ECD)-PADRE-His6(SEQ ID NO：2)。

方案 A 用弗氏佐劑(sigma Lot Num：F5881/F5506)乳化：初始免疫用弗氏完全佐劑(CFA)，其餘加強免疫用弗氏不完全佐劑(IFA)。抗原與佐劑比例為 1:1，100ug/隻(初始免疫)，50ug/隻(加強免疫)。第 0 天腹膜內(IP)注射 100ug/隻的乳化後抗原，初始免疫後每兩周一次，共 6-8 周。

方案 B 用 Titermax (sigma Lot Num：T2684)與 Alum (Thremo Lot Num：77161)交叉免疫。抗原與佐劑(titermax)比例為 1:1，抗原與佐劑(Alum)比例為 3:1，10-20ug/隻(初始免疫)，5ug/隻(加強免疫)。第 0 天腹膜內(IP)注射 20/10 μ g/隻的乳化後抗原，初始免疫後每周一次，Titermax 和 Alum 交替使用，共 6-11 周。免疫四周後，根據背部結塊和腹部腫脹情況，選擇背部或腹膜內注射抗原。

2、 細胞融合

選擇血清中抗體滴度高(見後面的測試例 1, 結合 PD-L1 的 ELISA 方法)並且滴度趨於平台的小鼠進行脾細胞融合, 融合前 72 小時衝刺免疫所選小鼠, PD-L1-His 10ug/隻, 腹腔注射。採用優化的 PEG 介導的融合步驟將脾淋巴細胞與骨髓瘤細胞 Sp2/0 細胞(ATCC® CRL-8287™)進行融合得到雜交瘤細胞。融合好的雜交瘤細胞用 HAT 完全培養基(含 20%FBS、1×HAT 和 1×OPI 的 RPMI-1640 培養基)重懸, 分裝於 96 孔細胞培養板中(1×10^5 /150ul/孔), 37°C、5%CO₂ 培育。融合後的第 5 天加入 HAT 完全培養基, 50ul/孔, 37°C、5%CO₂ 培育。融合後第 7 天至 8 天, 根據細胞生長密度, 全換液, 培養基為 HT 完全培養基(含 20%FBS、1×HT 和 1×OPI 的 RPMI-1640 培養基), 200ul/孔, 37°C、5%CO₂ 培育。

3、雜交瘤細胞篩選

融合後第 10-11 天, 根據細胞生長密度, 進行結合 PD-L1 的 ELISA 方法檢測(見測試例 1)。並將結合 ELISA 檢測的陽性孔細胞進行 PD-L1/PD-1 結合的阻斷 ELISA 檢測(見測試例 2), 陽性孔換液, 並根據細胞密度及時擴大至 24 孔板中。移入 24 孔板的細胞株經過復測後進行保種和第一次亞選殖。第一次亞選殖篩選(見測試例 1)為陽性的進行保種, 並進行第二次亞選殖。第二次亞選殖為陽性(見測試例 1)的進行保種和蛋白表現。多次融合獲得有阻斷 PD-L1 和 PD-1 結合效果(見測試例 2)的雜交瘤細胞。

藉由阻斷實驗和結合實驗篩選得到雜交瘤株 9-2 和

24D5，用腹水法或用無血清細胞培養法進一步製備抗體，按純化實例純化抗體，供在檢測例中使用。

其中測得雜交瘤株 9-2 的鼠抗可變區序列如下：

>9-2 mVH：9-2 鼠源重鏈可變區序列

*EVQLQESG**PLAKPSQTL**SLTCSVAGYSITNDYWNWIRKFPG
NKLEYMGYISY**TGSTYYNPSLKSRLSITRDT**SKNQYYLQLNS
VTAEDTAIYYCAR**SGGWLAPFDY**WGRGTTLVSS*

SEQ ID NO：6

>9-2 mVL：9-2 鼠源輕鏈可變區序列

*DIVMSQSPSSLVVS**VGEKVIM**SCKSSQSLFYRSNQKNSLAWY
QKPGQSPKLLIY**GASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTVTISSVK
AEDLAVYYC**QQYYGYPY**TFGGGTKLEIK*

SEQ ID NO：7

注：順序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為 FR 序列，下劃線為 CDR 序列。

其中測得雜交瘤株 24D5 的鼠抗可變區序列如下：

24D5-VH：24D5 鼠源重鏈可變區序列

*QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMH**WVQQR**
PGQGLEWIGRIHPNSGGTSYNEKFKNRA**TLTVDKSS**STAYMQ
FSSLTSEDSA**VYY**SARGGSSYDYFDYWGQGTTLTVSS*

SEQ ID NO：8

24D5-VL：24D5 鼠源輕鏈可變區序列

*DIVLTQSPASLA**VSLGQRATIS**CRASESVSIHGTHLMHWYQQ
KPGQPPKLLIYAASNLES**GVPARFSGSG**SETDFTLNHPVEEE*

DATTYFCQQSFEDPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO : 9

注：順序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為 FR 序列，下劃線為 CDR 序列。

各重鏈及輕鏈 CDR 區序列如下：

	重鏈		輕鏈	
(9-2)	HCDR1	NDYWN SEQ ID NO : 38	LCDR1	KSSQSLFYRSNQKNSLA SEQ ID NO : 40
	HCDR2	YISYTGSTYYNPSLKS SEQ ID NO : 11	LCDR2	GASTRES SEQ ID NO : 14
	HCDR3	SGGWLAPFDY SEQ ID NO : 12	LCDR3	QQYYGYPYT SEQ ID NO : 15
(24D5)	HCDR1	SYWMH SEQ ID NO : 16	LCDR1	RASESVSIHGTHLMH SEQ ID NO : 19
	HCDR2	RIHPNSGGTSYNEKFKN SEQ ID NO : 39	LCDR2	AASNLES SEQ ID NO : 20
	HCDR3	GGSSYDYFDY SEQ ID NO : 18	LCDR3	QQSFEDPLT SEQ ID NO : 21

其中，SEQ ID NO : 38 為 SEQ ID NO : 10 的 X₁ 為 N 時；
SEQ ID NO : 39 為 SEQ ID NO : 17 的 X₄ 為 H，X₅ 為 G
時；

SEQ ID NO : 40 為 SEQ ID NO : 13 的 X₂ 為 R，X₃ 為 N
時。

實施例 4、抗人 PD-L1 雜交瘤單株抗體的人源化

1、雜交瘤株 9-2 人源化構架選擇

藉由比對 IMGT 人類抗體重輕鏈可變區種系基因數據庫和 MOE 軟件，分別挑選與 9-2 和 24D5 同源性高的重輕鏈可變區種系基因作為模板，將這兩個鼠源抗體的 CDR 分別移植到相應的人源模板中，形成次序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可變區序列。其中胺基酸殘基由 Kabat 編號系統確定並注釋。

鼠源抗體 9-2 的人源化輕鏈模板為 IGKV4-1*01 和 hjk4.1，人源化重鏈模板為 IGHV4-30-4*01 和 hjh2，人源化可變區序列如下：

>9-2 hVH- CDR graft

*QVQLQESGPGLVKPSQTL~~SLTCTVSGGSIS~~NDYWNWIRQH
PGKLEWIGYISYTGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV
TAADTA VYYCARSGGWLAPFDYWGRGTLVTVSS*

SEQ ID NO : 22

>9-2 hVL CDR graft

*DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYRSNQKNSLA WY
QQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
AEDVA VYYCQQYYGYPYTFGGGTKVEIK*

SEQ ID NO : 23

注：順序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為 FR 序列，下劃線為 CDR 序列。

2、雜交瘤株 9-2 的模板選擇和回復突變設計，見下表 1：

表 1

9_2_VL		9_2_VH	
h9_2_VL.1	Grafted	h9_2_VH.1	Grafted
h9_2_VL.1A	P49S	h9_2_VH.1A	W47Y, V71R
		h9_2_VH.1B	W47Y, V71R, G27Y, I48M, V67L
		h9_2_VH.1C	W47Y, V71R, G27Y, I48M, V67L, F78Y, S30T
		h9_2_VH.1D	W47Y, V71R, G27Y, I48M, V67L, F78Y, S30T, Q39K

注：如 P49S 表示依照 Kabat 編號系統，將 49 位 P 突變回 S。

Grafted 代表鼠抗體 CDR 植入人種系 FR 區序列。

表 2：鼠抗 9-2 人源化序列組合

	h9_2_VH.1	h9_2_VH.1A	h9_2_VH.1B	h9_2_VH.1C	h9_2_VH.1D
h9_2_VL.1	9_2-1	9_2-2	9_2-3	9_2-4	9_2-5
h9_2_VL.1A	9_2-6	9_2-7	9_2-8	9_2-9	9_2-10

注：該表表示各種突變組合所得的序列。如 9_2-2 表示，在人源化的鼠抗體 9_2-2 上的有輕鏈 h9_2_VL1、重鏈 h9_2-VH.1A 兩種突變。其它類推。

3、雜交瘤株 24D5 人源化構架選擇

PD-L1 雜交瘤單抗 24D5 第 96 位為絲胺酸 (Serine)，而生殖細胞系基因的該位點在 FR3 上是保守的半胱胺酸 (Cysteine)，與第 22 位的半胱胺酸形成保守的鏈內二硫鍵。我們構建了 24D5 的嵌合抗體和第 96 位的絲胺酸回復突變為半胱胺酸的嵌合抗體，兩種形式的嵌合抗體的親和力和雜交瘤抗體一致。抗體人源化採用 CDR 移植策略進行，24D5 的 96 位突變在骨架上，不會影響設計方案。

鼠源抗體 24D5 的人源化輕鏈模板為 IGKV7-3*01 和

hjk2.1，人源化重鏈模板為 IGHV1-46*01 和 hjh6.1，人源化可變區序列如下：

>24D5 人源化重鏈可變區 VH.1

*QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMH WVRQA
PGQGLEWMGRIHPNSGGTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYM
ELSSLRSEDTA VYYCARGGSSYDYFDY WGQGTTVTVSS*

SEQ ID NO : 24

>24D5 人源化輕鏈可變區 VL.1

*DIVLTQSPASLA VSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMH WYQQ
KPGQPPKLLIYAASNLES GVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAN
DTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIK*

SEQ ID NO : 25

注：順序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為 FR 序列，下劃線為 CDR 序列。

4、雜交瘤株 24D5 的模板選擇和回復突變設計，見下表 3：

表 3

24D5_VL		24D5_VH	
24D5_VL.1	Grafted	24D5_VH.1	Grafted
24D5_VL.1A	Y91F	24D5_VH.1A	T74K
24D5_VL.1B	Y91F, G72E	24D5_VH.1B	T74K, R72V, M48I, M70L
24D5_VL.1C	Y91F, G72E, T22S	24D5_VH.1C	T74K, R72V, M48I, M70L, R38Q
		24D5_VH.1D	T74K, R72V, M48I, M70L, R38Q, L83F
		24D5_VH.1E	T74K, R72V, M48I, M70L, R38Q, L83F, V68A, V79A

注：如 Y91F 表示依照 Kabat 編號系統，將 91 位 Y 突變回 F。

Grafted 代表鼠抗體 CDR 植入人種系 FR 區序列。

表 4：鼠抗 24D5 人源化序列組合

	h24D5_VL.1	h24D5_VL.1A	h24D5_VL.1B	h24D5_VL.1C
h24D5_VH.1	1	2	3	4
h24D5_VH.1A	5	6	7	8
h24D5_VH.1B	9	10	11	12
h24D5_VH.1C	13	14	15	16
h24D5_VH.1D	17	18	19	20
h24D5_VH.1E	21	22	23	24

注：該表表示各種突變組合所得的序列。如 5 表示，在人源化的鼠抗體 5 上的有重鏈 h24D5_VH.1A、輕鏈 h24D5_VL.1 兩種突變。其它類推。

實施例 5、人源化選殖株構建

設計引子 PCR 搭建各人源化抗體 VH/VK 基因片段，再與表現載體 pHr(帶信號肽及恆定區基因(CH1-FC/CL)片段)進行同源重組，構建抗體全長表現載體 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。

1、引子設計：利用在線軟件 DNABWorks(v3.2.2) (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>) 設計多條引子合成 VH/VK 含重組所需基因片段：5' -30bp 信號肽 + VH/VK + 30bp CH1/CL-3'。引子設計原則：目的基因 2 與目的基因 1 有 2 個 aa 不一樣，則另設突變位點所在引子，如第 1 圖所示。

2、片段拼接：按照 TaKaRa 公司 Primer STAR GXL DNA 聚合酶操作說明書，用上面設計的多條引子，分兩步 PCR 擴增得到 VH/VK 含重組所需基因片段。

3、表現載體 pHr(帶信號肽及恆定區基因(CH1-FC/CL)片段)構建及酶切

利用一些特殊的限制性內切酶，如 BsmBI，識別序列與酶切位點不同的特性設計構建表現載體 pHr(帶信號肽及恆定區基因(CH1-FC/CL)片段)，如第 2 圖所示。BsmBI 酶切載體，切膠回收備用。

4、重組構建表現載體 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr

VH/VK 含重組所需基因片段與 BsmBI 酶切回收表現載體 pHr(帶信號肽及恆定區基因(CH1-FC/CL)片段)按 3:1 比例分別加入 DH5H 感受態細胞中，0℃冰浴 30min，42℃熱擊 90s，加入 5 倍體積 LB 介質，37℃培育 45min，塗布 LB-Amp 平板，37℃培養過夜，挑取單選殖株送測序得到各目的選殖株。

5、根據本實施例的設計方案構建質粒，然後按實施例 2 表現純化蛋白，用檢測例 SPR 測定所得蛋白親和力。

6、結果：

用 BIACORE(測試例 4)測定 9_2-2 的親和力與嵌合抗體相似，更多的回復突變只有細微的親和力增加。24D5 的 CDR 直接嵌入人源化模板就有很好的親和力，但嵌合抗體本身的親和力就弱於雜交瘤抗體。輕鏈引入 N85E 突變，以去糖基化，可以提高產品的均一性，不影響親和力。

最終用 BIACORE 測試人源化回復突變體與人源 PD-L1-his 或雜交瘤抗體的親和力，篩選得到的人源化回復突變位點的選擇及序列組合如下表 5：

表 5

人源化變異體	VH	VL	Kd(人源化)	Kd(雜交瘤)
9_2-2	VH.1 W47Y/V71R	VL.1	5.68E-10	4.79E-10
24D5-H	CDR Graft	VL.1 N85E	1.68E-10	6.68E-11

實施例 6、 抗-PD-L1 人源化抗體親和力成熟

1、 構建人源化 9-2-2 和 24D5 噬菌粒載體

人源化後的 9-2-2 和 24D5 分別以 scFv 模式(VH-3 個 GGGGS-VL)構建到噬菌粒載體中，作為野生型序列(即相對於親和力成熟篩選得到的突變序列，作為原始或起始序列)。利用 over-lap PCR 拼接 VH、(GGGGS)₃ linker、VL，採用 NcoI 和 NotI 酶切位點連接入噬菌粒載體。

2、 構建噬菌體展示文庫

利用構建好的野生型 scFv 為模板，採用 codon-based 引子，在引子合成過程中，突變區域每個密碼子都有 50% 野生型的密碼子和 50% 的 NNK(反向引子為 MNN))在所有 CDR 區引入突變構建突變文庫。PCR 片段經過 NcoI 和 NotI 酶切，連接到噬菌粒體載體中，最後電轉化大腸杆菌 TG1。每條 codon-based 引子建立一個獨立的文庫，期中 9-2-2 分為 7 個文庫，24D5 分為 8 個文庫。

3、 文庫淘篩

文庫經過拯救包裝出淘篩用的噬菌體顆粒後，利用生物素化的人 PD-L1 (ECD) 抗原和鏈霉親和素磁珠進行液相

法淘篩，並且每一輪篩選相對於上一輪都降低抗原濃度。
三輪淘篩之後，9-2-2 和 24D5 分別挑取 250 選殖株進行噬
菌體 ELISA 檢測結合活性，陽性選殖株進行測序。

4、表面等離子體共振 (SPR) 檢測親合力

經過對測序選殖株進行比對分析，去除冗餘序列之
後，將非冗餘序列轉換成全長 IG ($\gamma 1, \kappa$) 進行哺乳動物細
胞表現。親和純化之後的全長 IG 採用 BIAcore™ X-100
instrument (GE Life Sciences) 進行親合力測定。

經篩選確認選擇的可變區序列：

>9-2 hVH(T)

*QVQLQESGPGLVKPSQTL~~SL~~TCTVSGGSISNDYWT**WIRQHPG*
KGLE~~YIGYISY~~TGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVT
*AADTA**VYYCARSGGWLAPFDY**WGRGTLVTVSS*

SEQ ID NO : 26

其中，CDR1 為 SEQ ID NO : 10 的 X₁ 為 T。

>9-2 hVL(H)

*DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYHSNQHSLA**WY*
*QQKPGQPPKLLIYGASTRES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ*
*AEDVA**VYYCQQYYGYPYTFGGGTKVEIK*

SEQ ID NO : 27

其中，CDR1 為 SEQ ID NO : 13 的 X₂ 為 H，X₃ 為 H。

親和力成熟：

>24-D5 hVH(GF)

*QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF**TSYWMH**WVRQA*

PGQGLEWMGRIGPNSGFTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYM
ELSSLRSEDTA VYYCARGGSSYDYFDY WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 28

其中，CDR2 為 SEQ ID NO : 17 的 X₄ 為 G，X₅ 為 F。

>24-D5 hVL

DIVLTQSPASLA VSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMH WYQQ
KPGQPPKLLIYAASNLES GVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAE
DTANYYCQQSFEDPLT FGQGTKLEIK

SEQ ID NO : 29

注：順序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為 FR 序列；下劃線為 CDR 序列，其中雙下劃線的位點為親和力成熟篩選後得到的位點。

實施例 7、構建和表現抗-PD-L1 人源 IgG4 類型

由於 PD-L1 在活化 T 細胞中也有表現，如果採用野生型 IgG1 恆定區會引起 Fc 介導的效應作用，比如 ADCC 和 CDC，從而導致活化 T 細胞的消滅。IgG1 的 Fc 突變比如 D265A、N297A、L234A/L235A 或 L234F/L235A 等可以降低 ADCC，P331S 或附近的突變可降低 CDC。IgG2 的突變以及 IgG2/4 的 Fc 雜交抗體也可以降低 ADCC 和 CDC。本文選擇突變 IgG4 以得到無 ADCC 和 CDC 的抗體。因此將親合力成熟得到的選殖株轉換成 IgG4 類型，IgG4 的核心鉸鏈區包含 S228P 突變，可增強核心鉸鏈區內的二硫鍵連接，從而阻止 IgG4 Fab 臂交換，大大減少了半分子抗體的形成。並進一步引入 F234A 和 L235A 突變 (mAbs 4:3, 310-318;

May/June 2012), 此種形式的 IgG4 突變抗體改變 CH2 結構域, 降低與 Fc 受體的相互作用而達到降低 ADCC 活性的效果, 本發明中藉由測試抗體對 PD-L1 CHO-S 細胞的 ADCC 活性獲得。根據本實施例表現純化的 9-2 H2L10 命名為 HRP00049, 24D5 29H1 GF 命名為 HRP00052。

這些蛋白將在測試例中進一步鑒定。

IgG4 類型的突變體與人源 PD-L1-his 或恆河猴 PD-L1-his 的親合力測試, 見測試例 4, 表 6。

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

重鏈 : HRP00049 抗體重鏈序列

QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGGSISNDYWTWIRQHPG
KGLEYGYSYTGSTYYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVT
AADTAVYYCARSGGWLAPFDYWGRGTLVTVSSASTKGPSVF
 PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
 VDKRVEISKYGPCCPCPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO : 30

HRP00049 抗體重鏈序列編碼基因序列 :

CAGGTGCAACTGCAGGAGAGCGGCCCGGACTCGTGAAAC

CCTCCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTACCGTGAGCGGCGGC
AGCATCAGCAACGACTACTGGACTTGGATCAGGCAGCACC
CCGGCAAAGGCCTGGAGTACATCGGCTACATCAGCTACAC
CGGCTCCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGGGTG
ACCATCAGCCGGGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGA
AGCTGAGCAGCGTGACCGCTGCCGACACAGCCGTGTACTA
TTGTGCCAGAAGCGGCGGATGGCTGGCCCCTTTCGACTACT
GGGGCAGAGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTTCCAC
CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGA
GCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA
GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCA
GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA
GTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCCAGC
ACCTGAGGCTGCTGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCC
CAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCC
GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG
ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA

GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGC
 CCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCG
 TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA
 GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
 TCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGA
 GGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
 ACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT
 AAATGA

SEQ ID NO : 31

輕鏈：HRP00049 抗體輕鏈序列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYHSNOKHSLAWY
QQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLO
AEDVAVYYCQQYYGYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP
 VTKSFNRGEC

SEQ ID NO : 32

HRP00049 抗體輕鏈序列編碼基因序列：

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCTGATAGCCTGGCTGTGA
GCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCA
GAGCCTGTTCTACCATAGCAACCAGAAGCACAGCCTCGCCT
GGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAACCCCAAGCTGCTGAT
CTACGGCGCCAGCACAAAGAGAGAGCGGAGTGCCCGATAGG

TTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCACCCTGACCAT
CAGCAGCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGC
CAGCAGTACTACGGCTACCCTTACACCTTCGGCGGGCGGCAC
CAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTC
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
GGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT
CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC
AACAGGGGAGAGTGTTGA

SEQ ID NO : 33

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

重鏈 : HRP00052 抗體重鏈序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA
PGQGLEWMGRIGPNSGFTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYM
ELSSLRSED TAVYYCARGGSSYDYFDYWGQGTTVTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS

DI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGK

SEQ ID NO : 34

HRP00052 抗體重鏈序列編碼基因序列：

CAGGTGCAACTGGTGCAGAGCGGTGCCGAGGTGAAGAAGC
CTGGCGCAAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTA
CACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCC
CCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGGATCGGGCCCA
ACAGTGGTTTCACTAGCTACAATGAAAAGTTCAAGAACAG
GGTAACCATGACCAGGGACACCTCCACCAGCACAGTGTAT
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGT
ACTACTGTGCCAGAGGGCGGCAGCAGCTACGACTACTTCGA
CTATTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTGAGCAGTGCT
TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTC
CAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA
ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCT
GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACC
TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
AGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGC
CCAGCACCTGAGGCTGCTGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTT
CCCCCAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGA

CCCCAGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAG
 GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCA
 ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
 CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
 CCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCC
 AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCC
 TGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAG
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCG
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA
 CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT
 TCCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 GGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
 TGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG
 GGTAATGA

SEQ ID NO : 35

輕鏈：HRP00052 抗體輕鏈序列

DIVLTQSPASLA VSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQ
KPGQPPKLLIYAASNLESGV PARFSGSGSGTDFTLTINPVEAE
DTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC

SEQ ID NO : 36

HRP00052 抗體輕鏈序列編碼基因序列：

GACATCGTGCTGACCCAGAGTCCCGCCTCACTTGCCGTGAG
CCCCGGTCAGAGGGCCACCATCACCTGTAGGGCCAGCGAG
AGCGTGAGCATCCACGGCACCCACCTGATGCACTGGTATC
AACAGAAACCCGGCCAGCCCCCAAACTGCTGATCTACGC
CGCCAGCAACCTGGAGAGCGGGCGTGCCCGCCAGGTTTCAGC
GGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTCACTATCAACCC
CGTGGAGGCCGAGGACACCGCCAACTACTGACCAGCAG
AGCTTCGAGGACCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGC
TGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC
 TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC
 TGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
 AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA
 CTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
 ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAG
 ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
 TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG
 GGAGAGTGTTGA

SEQ ID NO : 37

注：劃線部分為抗體重鏈或輕鏈的可變區序列，或編碼其的核苷酸序列；未劃線部分為抗體恆定區序列及其相應的編碼核苷酸序列。

以下用生化測試方法驗證本發明性能及有益效果。

測試例 1、結合 PD-L1 的 ELISA

PD-L1(ECD)-Fc (SEQ ID NO : 4) $1 \mu\text{g/ml}$ ， $100 \mu\text{l/孔}$ ，4

°C 塗布過夜，5% Skim Milk(BD, 232100, PBS 配製)，150 μ l/孔，4°C 封閉過夜；洗板 2 次，加入細胞上清，50 μ l/孔，37°C 溫育 2h；洗板 3 次，加入 Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Human IgG(Jackson, 115-035-003)，用 KPL Milk(KPL, 50-82-01)配製，1:5000 稀釋，50 μ l/孔，37°C 溫育 1h。洗板 4 次，加入 TMB，50 μ l/孔，37°C 顯色 10 分鐘；加入 1M H₂SO₄，50 μ l/孔，中止顯色；微盤分析儀(BMG Labtech, NOVOSTar)OD450nm 讀數。

測試例 2、PD-L1/PD-1 結合的阻斷 ELISA

生物素(東仁化學, LK03: 3 samples)和親和素(Sigma, S2438-250UG)的稀釋液為 6% BSA(用含 0.1% Tween20 的 PBS 配製)，PBS 為塗布溶液；PD-L1-Fc(SEQ ID NO: 4) 1 μ g/ml，100 μ l/孔，4°C 塗布過夜；洗板 3 次。3% BSA(用含 0.05% Tween20 的 PBS 配製)120 μ l/孔，37°C 封閉 2h；洗板 3 次。加入細胞上清，50 μ l/孔。緊接著加入 bio-PD-1-Fc (生物素標記的 PD1-Fc, SEQ ID NO: 5, 2 μ g/ml，按東仁化學 Biotin Labeling Kit-NH₂, LK03: 3 samples, 試劑盒方法標記 PD-1-FC)，50 μ l/孔，在振盪器上振盪片刻使之混勻，37°C 溫育 1h；洗板 6 次。加入 Streptavidin-Peroxidase Polymer(S2438-250UG, Sigma, 1:400 稀釋)，50 μ l/孔，室溫振盪溫育 50min；洗板 6 次。加入 100 μ l/孔 TMB，37°C 顯色 5-10min；加入 1M H₂SO₄，100 μ l/孔，中止顯色；微盤分析儀(BMG Labtech, NOVOSTar)450nm 讀數，計算 PD-1 抗體對配體 PD-L1 結合阻斷的 IC₅₀ 值。本發明人源化抗體

對 PD-L1/PD-1 結合的阻斷活性見下表 6。

在篩選雜交瘤抗體的時候也使用了類似的單點阻斷實驗。

測試例 3、PD-L1 抗體對 PD-L1 和 B7.1 結合的阻斷

本實驗與以上 PD-L1 抗體對 PD-L1 和 PD-1 結合的阻斷實驗(測試例 2)相似。將測試例 2 中的 bio-human PD-1(ECD)-Fc 替換為 bio-human-B7.1(human-B7.1, *Sino Biological* 10698-H03H-200), 其它步驟相同。另外, 本發明用類似的方法也檢測了 PD-L1 抗體對 PD-L2-Fc (Q9BQ51, 胞外域(aa20-aa220))和 PD-1 結合阻斷的特異性, 發現受測抗體不能阻斷 PD-L2 和 PD-1 的結合。

在篩選雜交瘤抗體的時候也使用了類似的單點阻斷實驗。

本發明人源化抗體對 PD-L1 和 B7.1 結合的阻斷, 和對 PD-L2 和 PD-1 的結合阻斷活性見下表 6。

表 6 本發明人源化抗體的阻斷活性

待測抗體	huPD-L1-Fc/huPD-1 結合 IC50 (ng/ml)	huPD-L1-Fc/huB7.1-Fc 結合 IC50 (ng/ml)	huPD-L2-Fc/huPD-1 結合 IC50 (ng/ml)
HRP00052	114	69.6	NA
HRP00049	174	113	NA
MPDL3280A	126	92.9	NA

注：NA 表示沒有阻斷活性。

測試例 4、Biacore 測定 PD-L1 抗體 HRP00049 和 HRP00052

對 PD-L1 抗原的親和力

按照人抗捕獲試劑盒(GE, BR-1008-39)說明書中所述的方法, 將人抗捕獲抗體共價偶聯於 CM5 生物晶片(GE, BR-1000-12)上, 從而親和捕獲本發明的 PD-L1 抗體。然後於晶片表面流經一系列濃度的人 PD-L1 抗原(Sino biological, 10084-H08H-200), 利用 Biacore 儀器(GE, BiacoreX100)實時檢測反應信號從而獲得結合和解離曲線, 藉由擬合得到親和力數值。在實驗中每個循環解離完成後, 用人抗捕獲試劑盒(GE)裡配置的再生溶液將生物晶片洗淨再生。使用 GE BIAevaluation 軟件以 1:1(Langmuir)結合模型分析所得數據, 以此法測定 k_a (k_{on})、 k_d (k_{off}) 和 KD 值。雜交瘤抗體和人源化抗體的親和力已總結在其它實例中。下表 7 是親和力成熟後抗體以及對照抗體對人 PD-L1 抗原 (huPD-L1-his, Sino biological, 10084-H08H-200)、食蟹猴 PD-L1 抗原 (Cyno PD-L1-his, Sino biological, 90251-C08H-100) 和鼠 PD-L1 抗原 (Mouse PD-L1-his, Sino biological, 50010-M08H-100) 的親和力:

表 7 HRP00049 和 HRP00052 解離常數及種系選擇性

抗體	huPD-L1-his			CynoPD-L1-his			mousePD-L1		
	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
HRP00052	1.77E+06	1.01E-04	5.70E-11	1.84E+06	1.06E-04	5.79E-11	NA	NA	NA
HRP00049	9.52E+05	1.62E-04	1.70E-10	9.74E+05	1.67E-04	1.72E-10	NA	NA	NA
MPDL3280A	1.15E+06	2.79E-04	2.43E-10			5.63E-09	3.48E+05	1.24E-03	3.56E-09

測試例 5、體外細胞學實驗

新鮮人外周血單個核細胞(PBMC)在抗體作用下的增殖試驗，用來對 PD-L1 抗體進行細胞活性的檢測。

新鮮人 PBMC(健康人隨機採取)調整細胞密度為 $2 \times 10^6/\text{ml}$ ，每孔 2ml 接種於 6 孔板， 37°C 、5% CO_2 培養箱中放置 6 小時，將懸浮細胞吸走，向貼壁細胞中加入 2ml 含有 100ng/ml GM-CSF(粒細胞集落刺激生物因子，Peprtech，AF-300-03)和 100 ng/ml IL-4(Peprtech，AF-200-04) 的 RPMI1640 培養基(Hyclone，SH30809.01B)，培養 2 天後每孔再加入 1ml 含有 100ng/ml GM-CSF 和 100 ng/ml IL-4 的 RPMI1640 培養基，繼續培養 2 天後，每孔加入 100ng/ml TNF- α (腫瘤壞死因子- α ，Peprtech，AF-300-01A)，繼續培養 2 天得到成熟樹突細胞。將上述樹突細胞及同種異體的 T 細胞分別離心重懸成濃度為 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 和 $1 \times 10^5/\text{ml}$ ，於 96 孔板中每孔各加入 100 μl ，抗體用 PBS 按一定倍數稀釋成不同濃度梯度 96 孔板中每孔加入 20 μl ， 37°C 、5% CO_2 培

養箱中培養 5 天，取 100 μ l 用 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 試劑盒 (Promega, G7571) 檢測細胞增殖；同時，檢測其細胞因子 IFN- γ (干擾素- γ) 的分泌。

HRP00052 以及 HRP00049 都能有效地刺激細胞因子 IFN- γ 的分泌。同樣的方法也用於檢測人源化抗體對 PBMC 的增殖的刺激 (第 3 圖) 和對細胞因子 IFN- γ 的分泌的刺激 (表 8)。從第 3 圖和表 8 可發現本發明的人源化抗體相對於陽性對照 MPDL3280A (Atezolizumab, WHO Drug Information, Vol. 28, No. 4, 2014, P488)，對 PBMC 的增殖的刺激更強，對細胞因子 IFN- γ 的分泌的刺激更有效。

表 8 HRP00052 和 HRP00049 刺激 PBMC 釋放細胞因子 IFN- γ

待測抗體	干擾素- γ 釋放 EC50 (ng/ml)
MPDL3280A	72.1
HRP00052	18.7
HRP00049	34

測試例 6、對結核菌素刺激的 PBMC 增殖活性

對受測抗體 HRP00052、HRP00049 以及參照抗體在體外對結核菌素刺激的 PBMC 的增殖活性進行檢測。

取 15ml 新鮮 PBMC 細胞，約 3×10^7 個，加入 20 μ l 結核菌素 (上海碧優生物科技, cat#97-8800)，37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培養箱培養 5 天。第 6 天，取上述培養的細胞離心，重懸至新鮮的培養基中，調整密度為 5×10^5 個/ml。在 96 孔細胞

培養板中加入 190 μ l 重懸後的細胞，將人源化抗體 HRP00052、HRP00049 加入上述 96 孔細胞培養板的對應孔中，每孔 10 μ l，對照組和空白組分別加入 10 μ l PBS。細胞培養板置於 37°C、5% CO₂ 培養箱培育 72 小時後檢測 PBMC 細胞增殖(Promega, cat#G7571)和 IFN- γ 的分泌(NeoBioscience, cat#EHC102g)。結果如下表 9。

表 9 本發明人源化抗體對結核菌素刺激的 PBMC 增殖活性

待檢抗體	T 細胞增殖 EC50(ng/ml)	IFN- γ EC50(ng/ml)
HRP00052	9.8	19.6
HRP00049	112	45.5
MPDL3280A	1464	353

結論：本實驗證明了本發明的人源化抗體對經外源抗原刺激後的 PBMC 增殖具有更強的刺激作用，該特性在適用於腫瘤治療時，有意料不到的效果。

測試例 7、PD-L1 抗體 HRP00052 抑制 U87MG 荷瘤小鼠腫瘤生長作用

本實驗採用免疫缺陷小鼠接種人腦膠質母細胞瘤 U87MG 細胞，成瘤後將用抗 CD3 抗體活化的人 PBMC 注射到腫瘤組織中，評價比較 PD-L1 抗體對腦膠質瘤 U87 MG 小鼠皮下移植瘤的療效。

從兩名志願者提供的血液中分離提取 PBMC，使用抗

CD3 抗體 (Miltenyi Biotec, 130-093-387) 培養活化 PBMC。將 U87MG 細胞接種於免疫缺陷小鼠 (維通利華, 11400700081219) 右肋部皮下, 待腫瘤生長滿 2 周, 瘤體積 $\geq 40 \text{ mm}^3$ 後去除體重、腫瘤過大和過小的, 按腫瘤體積將小鼠隨機分組。將經 CD3 抗體刺激後的兩名志願者的 PBMC 以 1:1 比例混合注射到腫瘤組織中。同時開始皮下注射抗體和空白載體 (5% 葡萄糖溶液), 第 0、7、14 和 21 天, 各給藥一次共 4 次。

實驗結果見表 10, 顯示 PD-L1 抗體 HRP00052 的 3 mg/kg 劑量能顯著抑制人惡性腦膠質瘤 U87MG 小鼠皮下移植瘤的生長。

表 10 PD-L1 抗體對腦膠質瘤 U87MG 小鼠皮下移植瘤的療效

分組	0 天	24 天	P(vs 空白載體)	%TGI
	平均值 \pm SEM(mm^3)	平均值 \pm SEM(mm^3)		
空白載體	46.1 \pm 7.6	875.3 \pm 225.5	-	-
HRP00052 (3mg/kg)	41.9 \pm 4.7	355.3 \pm 94.3 *	0.0460	62.21%

*: $P < 0.05$, vs 空白載體

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 江蘇恆瑞醫藥股份有限公司、上海恆瑞醫藥有限公司

<120> PD-L1 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

<150> CN 201510788907.3

<151> 2015 年 11 月 17

<160> 40

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 290

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285

Glu Thr
 290

<210> 2
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 帶 HIS、PADRE 標籤的 PD-L1 (ECD) 免疫原：PD-L1(ECD) -PADRE-His6

<400> 2

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
 1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
 20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
 35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
 50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
 85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
 100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
 115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
 130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
 145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
 165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
 180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
 195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Gly Ser Gly Ala
 210 215 220

Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala His His His His
 225 230 235 240

His His

<210> 3
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 帶 FLAG、HIS 標籤的 PD-L1 (ECD 免疫原): PD-L1(ECD)-Flag-His6

<400> 3

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
 1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
 20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
 35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
 50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
 85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
 97400

	100		105		110										
Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Pro
	115						120					125			
Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr	Pro	Lys
	130					135					140				
Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Lys
145					150					155					160
Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Val	Thr
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	Cys	Thr
			180						185				190		
Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ile
		195					200					205			
Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Asp	Tyr	Lys	Asp
	210					215					220				
Asp	Asp	Asp	Lys	His	His	His	His	His	His						
225					230										

<210> 4
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PD-L1 的 Fc 融合蛋白 : PD-L1(ECD)-Fc

<400> 4

Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Asp	Leu	Tyr	Val	Val	Glu	Tyr	Gly	Ser
1				5					10					15	
Asn	Met	Thr	Ile	Glu	Cys	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Lys	Gln	Leu	Asp	Leu
			20					25					30		

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
 35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
 50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
 85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
 100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
 115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
 130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
 145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
 165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
 180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
 195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

225					230					235				240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
		275					280					285			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
	290					295					300				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330					335	
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			340					345					350		
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
		355					360					365			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
	370					375					380				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
385					390					395					400
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
			405						410					415	
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			420					425					430		

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 5
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PD-1 的 Fc 融合蛋白：PD-1(ECD)-Fc

<400> 5

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr

145 150 155 160
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 165 170 175
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 180 185 190
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 195 200 205
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 210 215 220
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 225 230 235 240
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 245 250 255
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 260 265 270
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 275 280 285
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 290 295 300
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 305 310 315 320
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 325 330 335
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 340 345 350

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
355 360 365

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> 小鼠

<223> 9-2 VH

<400> 6

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Ala Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ala Gly Tyr Ser Ile Thr Asn Asp
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ser Gly Gly Trp Leu Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 113
<212> PRT
<213> 小鼠

<223> 9-2 VL

<400> 7

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Val Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Ile Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Arg
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Val Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> 小鼠

<223> 24D5 VH

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Arg Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Ser
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 9
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <223> 24D5 VL
 <400> 9
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile His
 20 25 30
 Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Thr Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Phe

85

90

95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HCDR1

<400> 10

Asn Asp Tyr Trp X1
 1 5

<210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小鼠 9-2 HCDR2

<400> 11

Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小鼠 9-2 HCDR3

<400> 12

Ser Gly Gly Trp Leu Ala Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR1

<400> 13

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr X2 Ser Asn Gln Lys X3 Ser Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 9-2 LCDR2

<400> 14

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 9-2 LCDR3

<400> 15

Gln Gln Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 24D5 HCDR1

<400> 16

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 24D5 HCDR2

<400> 17

Arg Ile X4 Pro Asn Ser Gly X5 Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 24D5 HCDR3

<400> 18

Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 24D5 LCDR1

<400> 19

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile His Gly Thr His Leu Met His
1 5 10 15

97400

15

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小鼠 24D5 LCDR2

<400> 20

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 小鼠 24D5 LCDR3

<400> 21

Gln Gln Ser Phe Glu Asp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 22
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 9-2 人源化重鏈可變區序列

<400> 22

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Asp
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ser Gly Gly Trp Leu Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 23
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 9-2 人源化輕鏈可變區序列

<400> 23

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Arg
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 24
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 24D5 人源化重鏈可變區序列

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 25
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 24D5 人源化輕鏈可變區序列

<400> 25

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile His
 20 25 30

Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe
 85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 9-2 親和力成熟後重鏈可變區序列

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Asp
20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ser Gly Gly Trp Leu Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 9-2 親和力成熟後輕鏈可變區序列

<400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr His
20 25 30

Ser Asn Gln Lys His Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 28
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 24D5 親和力成熟後重鏈可變區序列

 <400> 28

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Gly Pro Asn Ser Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asn Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 24D5 親和力成熟後輕鏈可變區序列

<400> 29

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile His
20 25 30

Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe
85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 30
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HRP00049 9-2 重鏈序列

<400> 30

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Asp
 20 25 30

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ser Gly Gly Trp Leu Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

- <210> 31
- <211> 1338
- <212> DNA
- <213> 人工序列 1

- <220>
- <223> HRP00049 9-2 重鏈序列編碼基因

<400> 31
 caggtgcaac tgcaggagag cggccccgga ctctgtaaac cctcccagac cctgagcctg 60
 acctgtaccg tgagcggcgg cagcatcagc aacgactact ggacttggat caggcagcac 120
 cccggcaaag gcctggagta catcggctac atcagctaca ccggctccac ctactacaac 180
 cccagcctga agtccagggt gaccatcagc cgggacacca gcaagaacca gttcagcctg 240
 aagctgagca gcgtgaccgc tgccgacaca gccgtgtact attgtgccag aagcggcggg 300
 tggctggccc ctttcgacta ctggggcaga ggcaccctgg tgaccgtgag cagcgccttc 360
 accaagggcc catcgggtctt ccccctggcg ccttgcctca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgecc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtiga gtccaaatat 660

ggtccccat gccaccatg cccagcacct gaggtgctg ggggaccatc agtcttcctg 720
 ttcccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccagag gtccagtcca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 32
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HRP00049 9-2 輕鏈序列

<400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr His
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys His Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 33
<211> 663
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HRP00049 9-2 輕鏈序列編碼基因

<400> 33
gacatcgtga tgaccagag ccctgatagc ctggctgtga gcctgggcga gagagccacc 60

atcaactgca agagcagcca gagcctgttc taccatagca accagaagca cagcctcgcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccaaccccc aagctgctga tctacggcgc cagcacaaga 180
 gagagcggag tgcccgatag gttcagcggc agcggatccg gcaccgattt cacctgacc 240
 atcagcagcc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gccagcagta ctacggctac 300
 ccttacacct tcggcggcgg caccaaggtg gagatcaagc gtacgggtggc tgcacatct 360
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 480
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660
 tga 663

<210> 34
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HRP00052 24D5 重鏈序列

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Gly Pro Asn Ser Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65					70						75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gly	Gly	Ser	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
		115					120					125				
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	
	130					135					140					
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
145					150					155					160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
				165					170					175		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
			180				185						190			
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	
		195					200					205				
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	
	210					215					220					
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
225					230					235					240	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				245					250					255		
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
			260					265					270			

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 35
 <211> 1341
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HRP00052 24D5 重鏈序列編碼基因

<400> 35

caggtgcaac tgggtgcagag cgggtgccgag gtgaagaagc ctggcgcaag cgtgaaagtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggcc 120
cctggacagg gcctggagtg gatgggcagg atcgggcca acagtggttt cactagctac 180
aatgaaaagt tcaagaacag ggtaacatg accagggaca cctccaccag cacagtgtat 240
atggagctga gcagcctgag gagcaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcggc 300
agcagctacg actacttcga ctattggggc cagggcacca ccgtgaccgt gagcagtgt 360
tccaccaagg gcccatcggc ctccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac 600
acctgcaacg tagatcaca gccagcaac accaagggtg acaagagagt tgagtccaaa 660
tatggtcccc catgcccacc atgcccagca cctgaggctg ctgggggacc atcagtcttc 720
ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 780
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 840
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1020
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caggctcacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1320
tccctgtctc tgggtaaagt a 1341

<210> 36

<211> 218

97400

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HRP00052 24D5 輕鏈序列

<400> 36

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile His
 20 25 30

Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe
 85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 37
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HRP00052 24D5 輕鏈序列編碼基因

<400> 37
 gacatcgtgc tgaccagag tccgcctca cttgccgtga gccccgtca gagggccacc 60
 atcacctgta gggccagcga gagcgtgagc atccacggca cccacctgat gcactggtat 120
 caacagaaac ccggccagcc ccccaaactg ctgatctacg ccgccagcaa cctggagagc 180
 ggcgtgcccc ccaggttcag cggctccggc agcggcaccg acttcaccct cactatacaac 240
 cccgtggagg ccgaggacac cgccaactac tactgccagc agagcttcga ggaccccctg 300
 accttcggcc agggcaccaa gctggagatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttga 657

<210> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 9-2 HCDR1

<400> 38

Asn Asp Tyr Trp Asn
1 5

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 24D5 HCDR2

<400> 39

Arg Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠 9-2 LCDR1

<400> 40

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn Ser Leu
1 5 10 15

Ala

申請專利範圍

1. 一種 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其包含選自以下的 CDR 區序列：

抗體重鏈可變區 HCDR 區序列：SEQ ID NO：16 至 18；和抗體輕鏈可變區 LCDR 區序列：SEQ ID NO：19 至 21；

具體如下：

HCDR1：SYWMH	SEQ ID NO：16
HCDR2：RI X ₄ PNSG X ₅ TSYNEKFKN	SEQ ID NO：17
HCDR3：GGSSYDYFDY	SEQ ID NO：18
LCDR1：RASESVSIHGTHLMH	SEQ ID NO：19
LCDR2：AASNLES	SEQ ID NO：20
LCDR3：QQSFEDPLT	SEQ ID NO：21；

其中：

X₄ 選自 H 或 G，X₅ 選自 G 或 F；且

當 X₄ 選自 G 時，X₅ 選自 F；或者

當 X₄ 選自 H 時，X₅ 選自 G。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中抗體輕鏈可變區進一步包含鼠源 κ 鏈或鼠源 κ 鏈變體的重鏈 FR 區、或者鼠源 λ 鏈或鼠源 λ 鏈變體的重鏈 FR 區；其中抗體重鏈可變區進一步包含鼠源 IgG1 或其變體的重鏈 FR 區、或 IgG2 或其變體的重鏈 FR 區、或 IgG3 或其變體的重鏈 FR 區。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結

- 合片段，其中該包含鼠源 FR 區的抗體重鏈可變區選自 SEQ ID NO：8，該包含鼠源 FR 區的抗體輕鏈可變區選自 SEQ ID NO：9。
4. 如申請專利範圍第 2 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中抗體重鏈進一步包含鼠源 κ 鏈或其變體的輕鏈恆定區、或者鼠源 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區；其中抗體輕鏈進一步包含鼠源 IgG1 或其變體的重鏈恆定區、或 IgG2 或其變體的重鏈恆定區、或 IgG3 或其變體的重鏈恆定區。
 5. 如申請專利範圍第 1 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為嵌合抗體。
 6. 如申請專利範圍第 1 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為人源化抗體或其片段。
 7. 如申請專利範圍第 6 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體重鏈可變區上的重鏈 FR 區序列來源於人種系重鏈 IGHV1-46*01 和 hjh6.1 的組合序列；其包含人種系重鏈 IGHV1-46*01 的 FR1、FR2、FR3 區和 hjh6.1 的 FR4 區。
 8. 如申請專利範圍第 7 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體的重鏈 FR 區序列有 1 至 8 個胺基酸的回復突變；其中該胺基酸的回復突變選自 T74K、R72V、M48I、M70L、R38Q、L83F、V68A 和 V79A 的胺基酸回復突變。

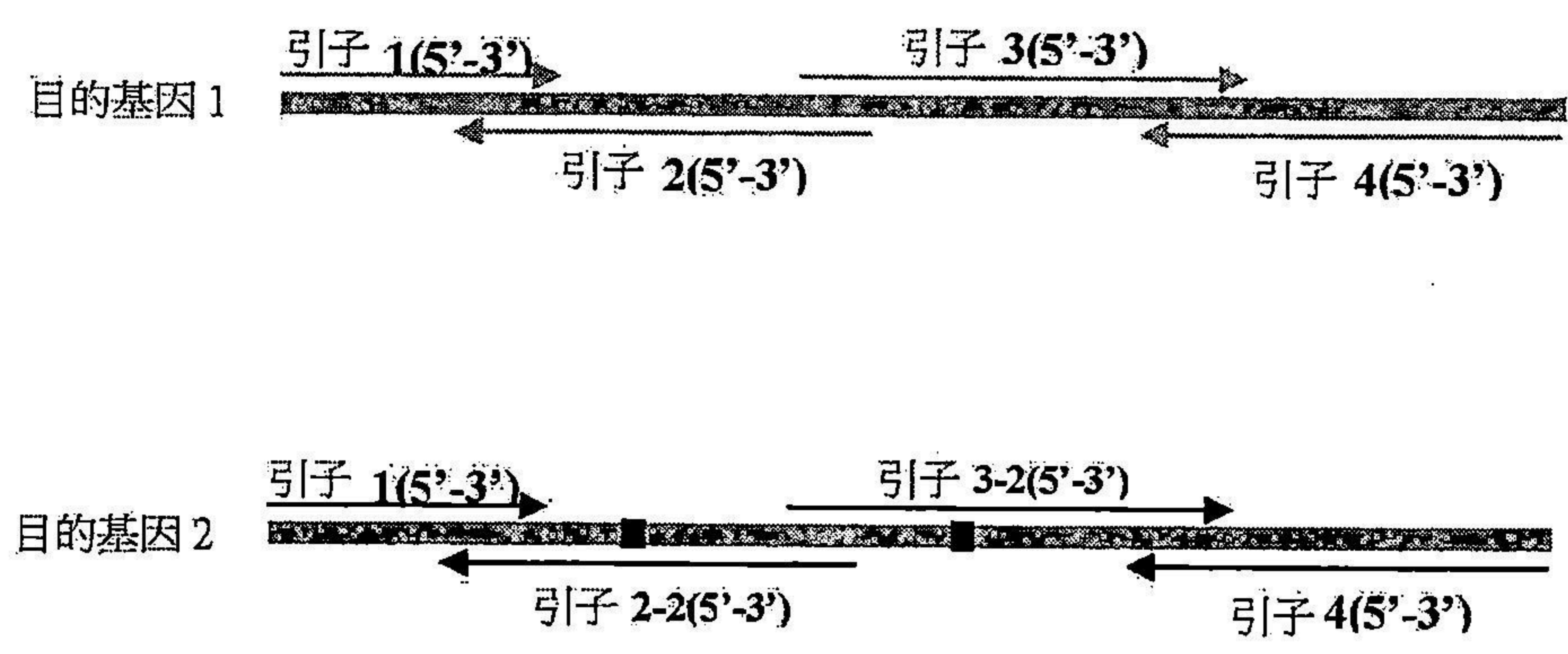
9. 如申請專利範圍第 7 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體的重鏈可變區序列為 SEQ ID NO：24 所示的序列。
10. 如申請專利範圍第 6 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體輕鏈可變區上的輕鏈 FR 區序列來源於人種系輕鏈 IGKV7-3*01 和 hjk2.1 的組合序列；其包含人種系輕鏈 IGKV7-3*01 的 FR1、FR2、FR3 區和 hjk2.1 的 FR4 區。
11. 如申請專利範圍第 10 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體的輕鏈 FR 區序列有 1 至 3 個胺基酸的回復突變，或者引入 N85E 去糖基化突變；該胺基酸的回復突變選自 Y91F、T22S 和 G72E 的胺基酸回復突變。
12. 如申請專利範圍第 10 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體的輕鏈可變區序列為 SEQ ID NO:25 所示的序列。
13. 如申請專利範圍第 6 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中 X₄ 為 G，X₅ 為 F。
14. 如申請專利範圍第 13 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體可變區序列如下：
重鏈可變區序列為 SEQ ID NO：28，輕鏈可變區序列為 SEQ ID NO：29。
15. 如申請專利範圍第 14 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體重鏈進一步包含人源 IgG1、

- IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區；該人源化抗體輕鏈進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的恆定區。
16. 如申請專利範圍第 14 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體重鏈進一步包含人源 IgG2 或 IgG4 重鏈恆定區。
 17. 如申請專利範圍第 14 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體重鏈進一步包含引入 F234A 和 L235A 突變的 IgG4 重鏈恆定區。
 18. 如申請專利範圍第 14 項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，其中該人源化抗體包含序列如 SEQ ID NO:34 重鏈，和序列如 SEQ ID NO:3 的輕鏈。
 19. 一種藥物組成物，其含有如申請專利範圍第 1 至 18 項中任一項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，以及一種或多種藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。
 20. 一種編碼如申請專利範圍第 1 至 18 項中任一項所述的 PD-L1 抗體或其抗原結合片段的 DNA 分子。
 21. 一種含有如申請專利範圍第 20 項所述的 DNA 分子表現載體。
 22. 一種用如申請專利範圍第 21 項所述的表現載體轉化的宿主細胞，該宿主細胞係選自細菌、酵母菌和哺乳動物細胞。
 23. 如申請專利範圍第 22 項所述的宿主細胞，其中該宿主細胞係哺乳動物細胞。
 24. 一種如申請專利範圍第 1 至 18 項中任一項所述的 PD-

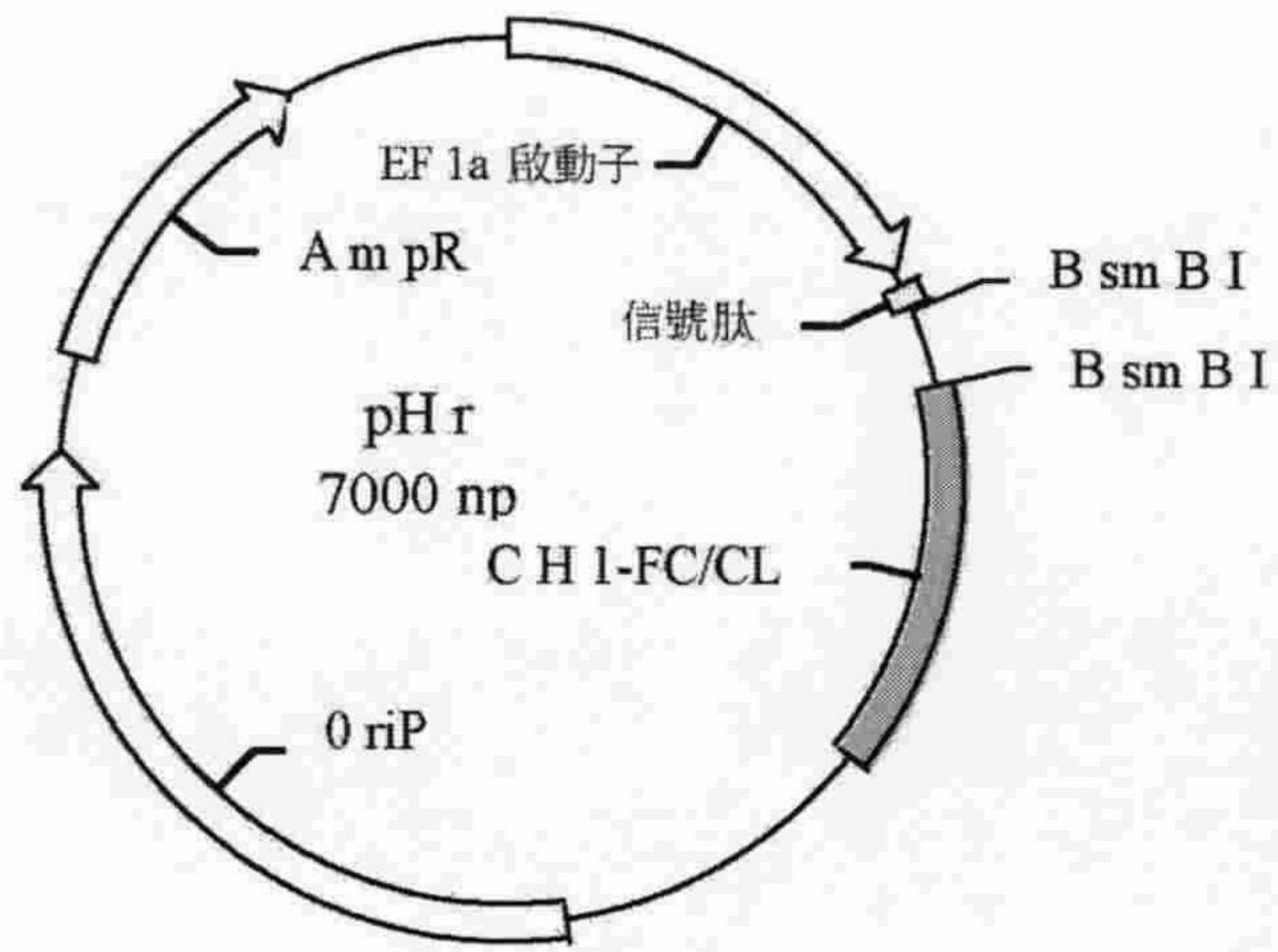
L1 抗體或其抗原結合片段或如申請專利範圍第 19 項所述的藥物組成物在製備用於治療 PD-L1 介導的疾病或病症的藥物中的用途。

25. 如申請專利範圍第 24 項所述的用途，其中該疾病或病症為癌症。
26. 如申請專利範圍第 24 項所述的用途，其中該疾病或病症為表現 PD-L1 的癌症。
27. 如申請專利範圍第 24 項所述的用途，其中該疾病或病症為乳腺癌、肺癌、胃癌、腸癌、腎癌、黑色素瘤、或者非小細胞肺癌。
28. 如申請專利範圍第 24 項所述的用途，其中該疾病或病症進一步為非小細胞肺癌、黑色素瘤、膀胱癌或者腎癌。

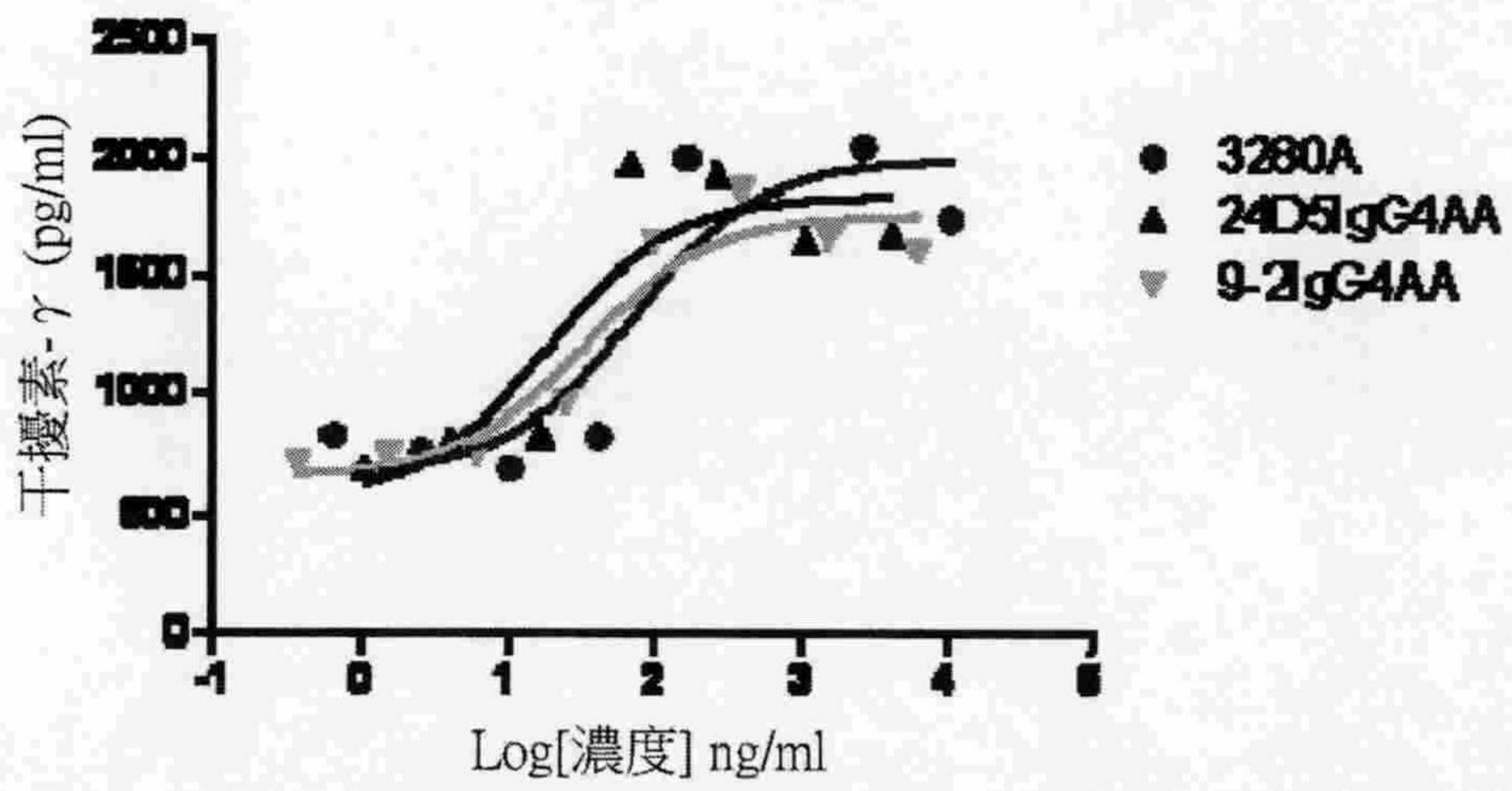
圖式



第1圖



第2圖



第3圖