

(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
2024年10月24日 (24.10.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/217575 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) **C12N 15/13** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/088960

(22) 国际申请日: 2024年4月19日 (19.04.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310427416.0 2023年4月20日 (20.04.2023) CN

(71) 申请人: 康立泰生物医药(青岛)有限公司(KANGLITAI BIOMEDICAL (QINGDAO) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园6号楼405房间, Shandong 266111 (CN)。

(72) 发明人: 徐银凤(XU, Yinfeng); 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园6号楼405房间, Shandong 266111 (CN)。郑彬彬(ZHENG, Binbin); 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园6号楼405房间, Shandong 266111 (CN)。王璐(WANG, Lu); 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园6号楼405房间, Shandong 266111 (CN)。李蕾(LI, Lei); 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园6号楼405房间, Shandong 266111 (CN)。李婷婷(LI, Tingting); 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园6号楼405房间, Shandong 266111 (CN)。唐甜(TANG, Tian); 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园6号楼405房间, Shandong 266111 (CN)。蒋立仲(JIANG, Lizhong); 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园6号楼405房间, Shandong 266111 (CN)。

266111 (CN)。王建刚(WANG, Jiangang); 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园6号楼405房间, Shandong 266111 (CN)。吴明远(WU, Mingyuan); 中国山东省青岛市高新区河东路368号青岛蓝色生物医药产业园6号楼405房间, Shandong 266111 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司(XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路958号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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:

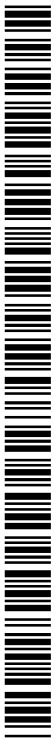
- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: ANTI-PD-L1 NANOBODY, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种抗PD-L1纳米抗体及其制备方法和应用

(57) Abstract: An anti-PD-L1 nanobody, a preparation method therefor and the use thereof. The anti-PD-L1 nanobody is prepared by means of screening. The anti-PD-L1 nanobody has high affinity and specificity, can efficiently target PD-L1, has a simple structure, is easy to prepare, and can be further used for preparing PD-L1-binding molecules, immunoconjugates, etc. Therefore, the anti-PD-L1 nanobody has wide application prospects in the fields of immunodetection, tumor treatment, etc.

(57) 摘要: 一种抗PD-L1纳米抗体及其制备方法和应用。筛选制备得到抗PD-L1纳米抗体, 所述抗PD-L1纳米抗体具备高亲和力和特异性, 能够高效靶向PD-L1, 结构简单, 易于制备, 且能够进一步制备PD-L1结合分子和免疫偶联物等, 在免疫检测、肿瘤治疗等领域具有广阔的应用前景。



WO 2024/217575 A1

一种抗 PD-L1 纳米抗体及其制备方法和应用

本申请要求申请号为 202310427416.0 专利申请的优先权(在先申请的申请日为 2023 年 04 月 20 日, 发明名称为一种抗 PD-L1 纳米抗体及其制备方法和应用)。

5

技术领域

本发明属于生物技术领域, 涉及一种抗 PD-L1 纳米抗体及其制备方法和应用。

背景技术

10 细胞程序性死亡-配体 1 (Programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)也称为表面抗原分化簇 274 (cluster of differentiation 274, CD274)或 B7 同源体 (B7 homolog 1, B7-H1), 是人类体内的一种蛋白质, 由 CD274 基因编码, 分子量为 40 kD 的第一型跨膜蛋白, 属于 B7 家族。

研究发现, PD-L1 蛋白主要表达于抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC)、活化的 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、胎盘滋养层细胞、心脏内皮细胞和胸腺皮质上皮细胞。在多种

15 人类肿瘤组织中可检测到 PD-L1 的表达, 并且较正常组织 PD-L1 表达水平高。T 细胞表面受体 PD-1 与其配体 PD-L1 结合后, 招募蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (src homology region 2 domain-containing phosphatase-1, SHP-1)和 SHP-2, 生成一个阻滞信号抑制下游效应 PI3K/Akt 通路的磷酸化以及 mTOR 和 ERK2 的活化, 促进 $CD4^+ Foxp3^+$ T 细胞向 $CD4^+ Foxp3^+$ Tregs 分化。简言之, 肿瘤微环境中的肿瘤细胞表面 PD-L1 表达增高, 与活化的 T 细胞表面的 PD-1

20 结合, 会传递负性调控信号, 导致肿瘤抗原特异性 T 细胞的凋亡或免疫无能, 从而抑制免疫反应。目前发现使用抗体阻断 PD-1/PD-L1 信号通路, 能够恢复 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤力, 帮助癌症患者用自身的免疫力清除癌细胞, 针对 PD-1/PD-L1 信号通路的抗体在肿瘤治疗领域具有广阔的应用前景。

纳米抗体是由比利时科学家于 1993 年在自然杂志中首次报道, 在羊驼外周血液中存在

25 一种天然缺失轻链的抗体, 该抗体只包含一个重链可变区 (VHH)和两个常规的 CH2 与 CH3 区。单独克隆并表达出来的 VHH 结构具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及与抗原的结合活性, 是目前已知的可结合目标抗原的最小单位。VHH 晶体为 2.5 nm, 长 4 nm, 分子量只有 15 KD, 因此也被称作纳米抗体(Nanobody, Nb)。纳米抗体具有分子量小, 易于渗透进致密组织甚至是血脑屏障; 亲和力高、特异性强、溶解性及稳定性好; 人体的免疫原性弱,

30 生物相容性好; 原核或真核系统中高表达, 易于生产; Nb 结构简单, 易于工程化改造等优势。

综上所述, 开发新型针对 PD-L1 的纳米抗体, 对于肿瘤治疗领域具有重要意义。

发明内容

35 针对现有技术的不足和实际需求, 本发明提供一种抗 PD-L1 纳米抗体及其制备方法和应用, 本发明筛选并制备具备高亲和力的抗 PD-L1 纳米抗体, 在免疫检测、肿瘤治疗等领域

具有广阔的应用前景。

为达上述目的，本发明采用以下技术方案：

第一方面，本发明提供一种抗 PD-L1 纳米抗体，所述抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链的互补决定区选自下组中任意一种：

5 (1) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

(2) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

10 (3) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

(4) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

15 本发明中，筛选抗 PD-L1 纳米抗体，所述抗 PD-L1 纳米抗体仅包括重链可变区具备高亲和力和特异性，能够高效靶向 PD-L1，结构简单，易于制备，在免疫检测、肿瘤治疗等领域具有广阔的应用前景。

SEQ ID NO: 1: GFTVSNSAVS。

SEQ ID NO: 2: LIDSNRNTV。

SEQ ID NO: 3: KGIWGSTL。

SEQ ID NO: 4: GSIFRITPVA。

20 SEQ ID NO: 5: VITDNGSTD。

SEQ ID NO: 6: SRARPVRWT。

SEQ ID NO: 7: GFTFSTSFVS。

SEQ ID NO: 8: RISP GGASTS。

SEQ ID NO: 9: REIYSGRFSGFDY。

25 SEQ ID NO: 10: GIISDINMVA。

SEQ ID NO: 11: KIFRGGSTY。

SEQ ID NO: 12: ARIQIRADRDYSDY。

可以理解，又一方面，本发明要求保护纳米抗体的重链可变区 VHH，所述 VHH 互补决定区选自下组中任意一种：

30 (1) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

(2) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

35 (3) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

(4) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 所示的 CDR1、

CDR2 和 CDR3。

可以理解，在上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列基础上任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个 (如 1-3 个，较佳地 1-2 个，更佳地 1 个)氨基酸并能保留与 PD-L1 结合能力的衍生序列，均在本发明保护范围内。

5 本发明一具体实施例中，所述的经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留与 PD-L1 特异性结合能力的衍生序列为同源性或序列相同性为至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的氨基酸序列。

10 优选地，所述抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 13-SEQ ID NO:16 所示序列或与其同源性至少为 80%的序列中任意一种，包括但不限于至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的氨基酸序列。

SEQ ID NO:13:

15 QVQLQESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
TVYAQSVRGRFTISRDNVKNVTYVYLQMNSLKPEDTAVYYCAKGIWGSTLTGQGTQVTVSS
。

SEQ ID NO:14:

20 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGSIFRITPVAWYRQAPEKQRELVAVITDNGST
DYGDFVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSRARPVVWWTWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO:15:

25 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSFVSWVRQAPGKGLEWVSRISPGGAS
TSYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLKPEDTALYYCAREIYSGRFSGFDYWGQGTQV
TVSS。

SEQ ID NO:16:

30 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIISDINMVAWYRQAPGKQRELVAKIFRGGST
YYTDFVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLKPDDTAVYYCNARIQIRADRDYSDYWGQGTQ
VTVSS。

第二方面，本发明提供一种 PD-L1 结合分子，所述 PD-L1 结合分子含有第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体或所述重链可变区 VHH。

35 本发明中，筛选制备得到具备高亲和力、特异性的 PD-L1 重链单域抗体(纳米抗体)，在其基础上，可制备多种不同的 PD-L1 结合分子，如连接任选的协助表达和/或纯化的标签序列；或对其进行人源化，获得人源化抗体；或利用其制备多特异性抗体，包括二价抗体、和/或多价抗体，所述多特异性抗体含有一个或多个第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体和/或 VHH 结构域，还可含有靶向任意其他抗原的抗体。

在一具体实施例中，所述的标签序列包括 Fc 标签、HA 标签、GGGS 序列、FLAG 标签、Myc 标签或 6His 标签中任意一种或至少两种的组合。

40 在另一具体实施例中，所述 PD-L1 结合分子为单体、二聚体或多聚体。

在第三方面，本发明提供一种人源化抗体，所述人源化抗体由第一方面所述的纳米抗体得到。

5 在另一优选例中，所述人源化抗体具有 SEQ ID NO: 23-42 中任一项所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述人源化抗体具有 SEQ ID NO: 30、33、36、40、41 中任一项所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述人源化抗体具有 SEQ ID NO: 30 或 40 所示的氨基酸序列。

10 在第四方面，本发明提供一种嵌合抗原受体 (CAR)，所述 CAR 含有一胞外结构域，所述胞外结构域包含如本发明第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体、第二方面所述的抗 PD-L1 结合分子、或如本发明第三方面所述的人源化抗体。

在另一优选例中，所述胞外结构域还包括信号肽。

在另一优选例中，所述胞外结构域还包括其他的外源蛋白。

15 在另一优选例中，所述 CAR 具有式 Ia 所示结构：

L-Nb-H-TM-C-CD3 ζ (Ia)

式中，

L 为无或信号肽序列；

Nb 是特异性结合结构域；

20 H 为无或铰链区；

TM 为跨膜结构域；

C 为共刺激信号结构域；

CD3 ζ 为源于 CD3 ζ 的胞浆信号传导序列(包括野生型、或其突变体/修饰体)；

所述“-”为连接肽或肽键。

25 在另一优选例中，所述 L 分别选自下组蛋白的信号肽：CD8、GM-CSF、CD4、CD28、CD137，或其突变/修饰体，或其组合。

在另一优选例中，所述 Nb 靶向 PD-L1。

在另一优选例中，所述 Nb 为抗 PD-L1 纳米抗体。

30 在另一优选例中，所述 H 选自下组蛋白的铰链区：CD8、CD28、CD137、IgG，或其组合。

在另一优选例中，所述 H 为人 IgG1 Fc 铰链区。

在另一优选例中，所述 TM 选自下组蛋白的跨膜区：CD28、CD3 epsilon、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、CD278、CD152、CD279、CD233，或其突变/修饰体，或其组合。

35 在另一优选例中，所述 C 选自下组蛋白的共刺激结构域：OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD134、4-1BB (CD137)、PD-1、Dap10、LIGHT、

NKG2C、B7-H3、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、NKG2D、GITR、OX40L、2B4、TLR，或其突变/修饰体，或其组合。

在另一优选例中，所述 CAR 包括细胞因子的胞内结构域。

5 在另一优选例中，所述细胞因子包括：白介素(IL)、干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子(TNF)、集落刺激因子(CSF)、生长因子、趋化因子，或其组合；优选地，所述细胞因子为白介素。

在另一优选例中，所述 CAR 包括白介素的胞内结构域。

在另一优选例中，所述白介素选自下组：IL-12、IL-2、IL-15、IL-21，或其组合；优选地为 IL-12。

10

在本发明的第五方面，提供了一种融合蛋白，所述融合蛋白具有：

(Z1) 第一蛋白，所述第一蛋白包括：如本发明第一方面所述的抗 PL-L1 纳米抗体、如本发明第二方面所述的抗 PD-L1 结合分子、或如本发明第三方面所述的人源化抗体或其活性片段；

15 (Z2) 第二蛋白，所述第二蛋白包括 Fc 片段或细胞因子；和

(Z3) 任选的位于所述第一蛋白和所述第二蛋白之间的接头。

在另一优选例中，所述细胞因子包括：白介素(IL)、干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子(TNF)、集落刺激因子(CSF)、生长因子、趋化因子，或其组合。

在另一优选例中，所述第二蛋白为白介素。

20 在另一优选例中，所述白介素选自下组：IL-12、IL-2、IL-15、IL-21，或其组合。

在另一优选例中，所述白介素为 IL-12。

在另一优选例中，所述 Fc 片段是人 IgG 的 Fc 片段。

第六方面，本发明提供一种核酸分子，所述核酸分子含有第一方面所述的抗 PD-L1 纳
25 米抗体或所述重链可变区 VHH、第二方面所述的抗 PD-L1 结合分子、第三方面所述的人源化抗体或其活性片段、第四方面所述的嵌合抗原受体或第五方面所述的融合蛋白的编码核酸。

在一具体实施例中，所述核酸分子可以编码所述抗 PD-L1 纳米抗体、所述重链可变区 VHH、所述 PD-L1 结合分子、所述人源化抗体、所述嵌合抗原受体或所述融合蛋白，可
30 以为 RNA、DNA 或 cDNA。

第七方面，本发明提供一种重组表达载体，所述重组表达载体含有第六方面所述的核酸分子。

在一具体实施例中，所述表达载体选自下组：DNA、RNA、病毒载体、质粒、转座子
35 或其他基因转移系统中任意一种或至少两种的组合。优选地，所述表达载体包括病毒载体，如慢病毒、腺病毒、AAV 病毒或逆转录病毒中任意一种或至少两种的组合。

在另一具体实施例中，所述表达载体选自下组：pTomo 慢病毒载体、plenti、

pLVTH、pLJM1、pHCMV、pLBS.CAG、pHR、pLV 或 pComb3XSS 等。

在另一具体实施例中，所述的表达载体中还包括选自下组的：启动子、转录增强元件 WPRE 或长末端重复序列 LTR 等。

5 第八方面，本发明提供一种重组细胞，所述重组细胞含有第六方面所述的核酸分子或第七方面所述的重组表达载体。

优选地，所述核酸分子整合于所述重组细胞的基因组中。

优选地，所述重组细胞的出发细胞包括原核细胞或真核细胞，进一步选自大肠杆菌、酵母细胞或哺乳动物细胞。

10

第九方面，本发明提供一种制备第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的方法，所述方法包括：

将编码第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的基因插入表达载体，得到重组载体，将所述重组载体导入宿主细胞进行培养，从培养物中分离获取所述抗 PD-L1 纳米抗体。

15

第十方面，本发明提供第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体、第二方面所述的抗 PD-L1 结合分子、第三方面所述的人源化抗体或其活性片段、第四方面所述的嵌合抗原受体或第五方面所述的融合蛋白在靶向结合 PD-L1 中的应用。

20 本发明中，筛选并制备具备高特异性、亲和力的抗 PD-L1 纳米抗体，具备广阔的应用前景，如用于以非疾病诊断和/或治疗为目的的体外免疫检测，对于 PD-L1 的基础行为的研究等等；还可用于制备与 PD-L1 结合的结合剂，所述结合剂包括：预防和/或治疗 PD-L1 高表达疾病的药物；和/或，检测 PD-L1 高表达疾病的试剂。

25 第十一方面，本发明提供第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体、第二方面所述的抗 PD-L1 结合分子、第三方面所述的人源化抗体或其活性片段、第四方面所述的嵌合抗原受体、或第五方面所述的融合蛋白、第六方面所述的核酸分子、第七方面所述的重组载体或第八方面所述的重组细胞在制备靶向治疗 PD-L1 相关疾病的药物中的应用。

优选地，所述 PD-L1 相关疾病是 PD-L1 高表达疾病。

优选地，所述 PD-L1 高表达疾病是表达 PD-L1 的肿瘤。

30 优选地，所述表达 PD-L1 的肿瘤包括但不限于：胃癌、肺癌、肝癌、骨肉瘤、乳腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、卵巢癌、食道癌、膀胱(尿路上皮)癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌等。

35 第十二面，本发明提供一种免疫偶联物，所述免疫偶联物含有第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体、第二方面所述的抗 PD-L1 结合分子、第三方面所述的人源化抗体或其活性片段、或第五方面所述的融合蛋白和偶联部分，所述偶联部分选自蛋白、小分子化合物、荧

光素、放射性同位素、造影剂或脂肪酸中任意一种或至少两种的组合。

优选地，所述抗 PD-L1 纳米抗体与所述偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

在一具体实施例中，所述放射性同位素包括：

(i) 诊断用同位素，所述的诊断用同位素选自下组：Tc-99m、Ga-68、F-18、I-123、
5 I-125、I-131、In-111、Ga-67、Cu-64、Zr-89、C-11、Lu-177 或 Re-188 中任意一种或至少两
种的组合；和/或

(ii) 治疗用同位素，所述的治疗用同位素选自下组：Lu-177、Y-90、Ac-225、
As-211、Bi-212、Bi-213、Cs-137、Cr-51、Co-60、Dy-165、Er-169、Fm-255、Au-198、
Ho-166、I-125、I-131、Ir-192、Fe-59、Pb-212、Mo-99、Pd-103、P-32、K-42、Re-186、
10 Re-188、Sm-153、Ra223、Ru-106、Na24、Sr89、Tb-149、Th-227、Xe-133、Yb-169 或
Yb-177 中任意一种或至少两种的组合。

第十三方面，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物含有第一方面所述的抗
PD-L1 纳米抗体、第二方面所述的抗 PD-L1 结合分子、第三方面所述的人源化抗体或其活
15 性片段、第四方面所述的嵌合抗原受体、第五方面所述的融合蛋白、第六方面所述的核酸分
子、第七方面所述的重组载体、第八方面所述的重组细胞或第十二方面所述的免疫偶联物中
任意一种或至少两种的组合。

第十四方面，提供一种工程化免疫细胞，所述工程化免疫细胞含有如本发明第七方面
20 所述的表达载体或其基因组中整合有外源的如本发明第六方面所述的核酸分子，或表达如
本发明第四方面所述的嵌合抗原受体。

在另一优选例中，所述工程化免疫细胞选自下组：

- (i) 嵌合抗原受体 $\alpha\beta$ T 细胞 (CAR-T 细胞)；
- (ii) 嵌合抗原受体 $\gamma\delta$ T 细胞 (CAR-T 细胞)；
- 25 (iii) 嵌合抗原受体 NKT 细胞 (CAR-NKT 细胞)；
- (iv) 嵌合抗原受体 NK 细胞 (CAR-NK 细胞)。

在另一优选例中，所述工程化免疫细胞包括自体或异体的 $\alpha\beta$ T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、NKT
细胞、NK 细胞，或其组合。

在另一优选例中，所述工程化免疫细胞为 CAR-T 细胞。

30

第十五方面，提供了一种试剂盒，所述试剂盒中包括：

(1) 第一容器，所述第一容器中含有如本发明第一所述的抗 PD-L1 纳米抗体、第二方
面所述的抗 PD-L1 结合分子、第三方面所述的人源化抗体或其活性片段、本发明第四方面
所述的嵌合抗原受体、本发明第十三方面所述的免疫偶联物、如本发明第八方面所述的重
35 组细胞或其组合；和/或

(2) 第二容器，所述第二容器中含有抗所述第一容器内容物的二抗；

或者，

所述试剂盒含有一检测板，所述检测板包括：基片(支撑板)和测试条，所述的测试条含有如本发明第一所述的抗 PD-L1 纳米抗体、第二方面所述的抗 PD-L1 结合分子、第三方面所述的人源化抗体或其活性片段、第四方面所述的嵌合抗原受体、本发明第十三方面所述的免疫偶联物，或其组合。

在另一优选例中，所述试剂盒中还含有一说明书，根据所述说明书记载，所述试剂盒用于非侵入性地检测待测对象的 PD-L1 表达。

在另一优选例中，所述的试剂盒用于 PD-L1 高表达疾病的检测。

在另一优选例中，所述 PD-L1 高表达疾病包括但不限于：实体瘤、血液肿瘤、免疫疾病，或其组合。

在另一优选例中，所述 PD-L1 高表达疾病包括但不限于：胃癌、肺癌、肝癌、骨肉瘤、乳腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、卵巢癌、食道癌、膀胱(尿路上皮)癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌等，或其组合。

在本发明的第十六方面，提供了一种预防和/或治疗 PD-L1 相关疾病的方法，所述方法包括：给需要的对象施用如本发明第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体、第二方面所述的抗 PD-L1 结合分子、第三方面所述的人源化抗体或其活性片段、第四方面所述的嵌合抗原受体、第五方面所述的融合蛋白、第十三方面所述的免疫偶联物、如本发明第十二方面所述的药物组合物，本发明第十四方面所述的工程化免疫细胞，或其组合。

在另一优选例中，所述 PD-L1 相关疾病是 PD-L1 高表达疾病。

在另一优选例中，所述对象包括哺乳动物，如人。

在另一优选例中，所述 PD-L1 高表达疾病包括但不限于：实体瘤、血液肿瘤、免疫疾病，或其组合。

在另一优选例中，所述 PD-L1 高表达疾病包括但不限于：胃癌、肺癌、肝癌、骨肉瘤、乳腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、卵巢癌、食道癌、膀胱(尿路上皮)癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌等，或其组合。

在另一优选例中，所述方法可与其他治疗方法联合使用。

在另一优选例中，所述其他治疗方法包括化疗、放疗、靶向治疗等方法。

在本发明的第十七方面，提供了一种抗 PD-L1 相关疾病的诊断方法，包括步骤：

(i) 从诊断对象获取一样品，将所述的样品与如本发明第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体、第二方面所述的抗 PD-L1 结合分子、第三方面所述的人源化抗体或其活性片段、本发明第十方面所述的免疫偶联物，或其组合接触；和

(ii) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示所述的对象为 PD-L1 高表达疾病的确诊患者。

在另一优选例中，所述 PD-L1 相关疾病是 PD-L1 高表达疾病。

在另一优选例中，所述样品为血液样品或咽拭子样品，或其他组织器官中的样品。

在另一优选例中，所述 PD-L1 高表达疾病包括但不限于：实体瘤、血液肿瘤、免疫疾病，或其组合。

在另一优选例中，所述 PD-L1 高表达疾病包括但不限于：胃癌、肺癌、肝癌、骨肉瘤、乳腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、卵巢癌、食道癌、膀胱(尿路上皮)癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌等，或其组合。

本发明中，筛选制备得到具备高亲和力、特异性的 PD-L1 重链单域抗体 (纳米抗体)，在其基础上，可进一步连接化学标记、生物标记、小分子化合物以及蛋白等等，制备应用于免疫检测、治疗领域的免疫偶联物，如所述化学标记可以为同位素、免疫毒素和/或化学药物等；所述生物标记可以为生物素、亲和素或酶标记；所述小分子化合物包括但不限于有明确或潜在治疗或辅助治疗肿瘤或自身免疫性疾病等的药物或毒素；所述造影剂包括金纳米颗粒/纳米棒或纳米磁粒等；所述的蛋白包括但不限于抗体 Fc、HRP、抗体、酶、细胞因子、病毒外壳蛋白、VLP 及其他生物活性蛋白或多肽等。

优选地，所述蛋白包括 IL-12 蛋白。

15

附图说明

图 1 为 SDS-PAGE 验证纯化后的 PD-L1 纯度结果图；

图 2 为 SDS-PAGE 对纯化后纳米抗体进行鉴定结果图；

图 3 为抗原重组蛋白鉴定结果图；

图 4 为 Elisa 检测候选 PD-L1 纳米抗体对人 PD-L1 蛋白的结合 1/2 结果图；

图 5 为 Elisa 检测候选 PD-L1 纳米抗体对人 PD-L1 蛋白的结合 2/2 结果图；

图 6 为 SPR 法测定纳米抗体对 PD-L1 单浓度亲和力结果图；

图 7 为 FACS 检测 PDL1 纳米抗体与 Raji 细胞表达的 PDL1 结合活性结果图；

图 8 为 ELISA 检测 PD-L1 纳米抗体对 PD-1/PD-L1 相互作用的阻断效果图；

图 9 为 Raji 细胞表面水平纳米抗体阻断活性鉴定结果图；

图 10 为 SDS-PAGE 鉴定 anti-PDL1-Fc 纳米抗体蛋白纯度结果图；

图 11 为 NbsPD-L1-Fc 融合蛋白对人 PD-L1 蛋白的结合结果图；

图 12 为 Elisa 法检测 Nbs-PD-L1 -Fc 融合蛋白对 PD-L1 蛋白的结合能力结果图；

图 13 为 SPR 法测定 NbsPD-L1-Fc 融合蛋白的亲和力结果图；

图 14 为 FACS 法检测 NbsPDL1-1-Fc 与 Raji-PDL1/Raji 细胞的结合活性结果图；

图 15 为 PD-L1 纳米抗体对 PDL1 蛋白结合的特异性结果图。

图 16A 为 PDL1-1 人源化单域抗体鉴定结果图 (PDL1-1v4、PDL1-1v7、PDL1-1v9、PDL1-1v1 和 PDL1-1v2)；

图 16B 为 PDL1-1 人源化单域抗体鉴定结果图 (PDL1-1v3、PDL1-1v10、PDL1-1v8、PDL1-1v5、PDL1-1v6、PDL1-1v10、PDL1-1v13、PDL1-1v19 和 PDL1-1v17)；

图 16C 为 PDL1-1 人源化单域抗体鉴定结果图 (PDL1-1v11、PDL1-1v14、PDL1-1v16、PDL1-1v15、PDL1-1v12 和 PDL1-1v18);

图 17 为 PDL1-1 人源化单域抗体结合力检测结果图;

图 18 为 PDL1-1 人源化单域抗体结合力检测结果图;

5 图 19 为 PDL1-1 人源化单域抗体结合力检测结果图;

图 20 为 PDL1-1 人源化单域抗体结合力检测结果图;

图 21 为 PDL1-1 人源化单域抗体阻断活性检测结果图;

图 22 为 PDL1-1 人源化单域抗体在细胞水平的阻断活性检测结果图;

图 23 为 PDL1 单域抗体及人源化抗体对 PBMC 的激活检测结果图;

10 图 24 为 PDL1 单域抗体及人源化抗体对 PBMC 的激活检测结果图;

图 25 为 PDL1-1 人源化重链单域抗体对靶细胞的杀伤检测结果图;

图 26 为模拟融合蛋白表达形式图;

图 27 为融合蛋白凝胶电泳分析图;

图 28 为融合蛋白 1-融合 4 对 PD-L1 结合活性检测结果图;

15 图 29 为融合蛋白 5-融合 9 对 PD-L1 结合活性检测结果图;

图 30 为融合蛋白 1-融合 4 传感图及对应的拟合曲线图;

图 31 为融合蛋白 5-融合 9 传感图及对应的拟合曲线图。

图 32 为融合蛋白 4,7,8 对增强效应细胞对靶细胞的杀伤作用。

20 具体实施方式

本发明人经过广泛而深入地研究, 经过大量的筛选, 首次意外地获得具有高亲和力和、高特异性的抗 PD-L1 纳米抗体。利用所述抗 PD-L1 纳米抗体与 IL-12 蛋白制备融合蛋白, 所述融合蛋白既能够靶向肿瘤病灶, 又能够释放 IL-12 细胞因子起到刺激免疫细胞发挥免疫杀伤功能的效果, 从而为 PD-L1 相关疾病, 例如肿瘤的治疗提供了更

25 好的诊断手段。在此基础上完成了本发明。

术语

为了可以更容易地理解本公开, 首先定义某些术语。如本申请中所使用的, 除非本文另有明确规定, 否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。

30 术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成, 其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

术语“施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一种将本发明的产品物理引入受试者, 包括静脉内、瘤内、肌内、皮下、腹膜内、脊髓或其它肠胃外给药途径, 例如通过注射或输注。

35 在具体的实施方式中, 本发明纳米抗体的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列以及 VHH 链的氨基酸序列分别如下表所示:

CDR1 氨基酸序列编号	CDR2 氨基酸序列编号	CDR3 氨基酸序列编号	VHH链 氨基酸序列编号
1	2	3	13
4	5	6	14
7	8	9	15
10	11	12	16

如本文所用，术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(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)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

如本文所用，术语“单域抗体”、“VHH”、“纳米抗体(Nanobody)”、“单域抗体 (Single domain antibody, sdAb, 或纳米抗体 nanobody)”具有相同的含义并可互换使用，指克隆抗体重链的可变区，构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)，它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区 1 (CH1) 的抗体后，再克隆抗体重链的可变区，构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)。

在本发明中，术语“本发明纳米抗体”、“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用，都指特异性结合 PD-L1 的多肽，例如具有重链可变区的蛋白或多肽。它们可含有或不含有起始甲硫氨酸。

如本文所用，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，它形成了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。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为骨架区(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)）。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，例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

如本文所用，术语“超变区”、“高变区”、“互补性决定区”与“互补决定区 (Complementarity determining region, CDR)”可互换使用。在本发明的优选实施方式中，所述纳米抗体或抗体的重链可变区包括三个互补决定区 CDR1、CDR2、和 CDR3。在本发明的另一优选实施方式中，所述纳米抗体或抗体的重链包括重链可变区和重链恒定区。

抗体的抗原结合特性通常可由位于重链可变区的 3 个特定的区域来描述，称为可变区域(CDR)，将该段间隔成 4 个骨架区域(FR)，4 个 FR 的氨基酸序列相对比较保守，不直接参

与结合反应。这些 CDR 形成环状结构，通过其间的 FR 形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近，重链上的 CDR 和相应轻链上的 CDR 构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了 FR 或 CDR 区域。

本发明纳米抗体或抗体的重链可变区是关键，因为它们中至少部分涉及结合抗原。

5 因此，本发明包括那些具有带 CDR 的抗体重链可变区的分子，只要其 CDR 与此处鉴定的 CDR 具有 90%以上（较佳地 95%以上，最佳地 98%以上）的同源性。

在具体的实施方式中，本发明纳米抗体的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列以及 VHH 链的氨基酸序列分别如下表所示：

CDR1 氨基酸序列编号	CDR2 氨基酸序列编号	CDR3 氨基酸序列编号	VHH链 氨基酸序列编号
1	2	3	13
4	5	6	14
7	8	9	15
10	11	12	16

10 如本领域技术人员所知，免疫偶联物及融合表达产物包括：药物、毒素、细胞因子 (Cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与本发明的抗体或其片段结合而形成的偶联物。本发明还包括与所述的针对 CD38 的纳米抗体或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

15 本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地，本发明包括具有含可变区的重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物（即免疫偶联物及融合表达产物），只要该可变区与本发明抗体的重链可变区相同或至少 90%同源性，较佳地至少 95%同源性。

20 本文所用的术语“人源化抗体”具有本领域技术人员常规理解的意义，其是指对羊驼源进行人源化得到的抗体，从而能够降低羊驼源抗体的免疫原性。基于本发明的抗 PD-L1 纳米抗体，本领域技术人员知晓如何进行人源化从而得到人源化抗体。在具体的实施方式中，本发明的人源化抗体具有 SEQ ID NO: 23-42 中任一项所示；优选 SEQ ID NO: 30、33、36、40、41 中任一项所示；更优选 SEQ ID NO: 30 或 40 所示的氨基酸序列。

为提高人源化抗体的亲和力，本领域技术人员可以对人源化抗体作回复突变，从而获得亲和力提高的人源化抗体。

25 基于本发明的教导，本领域技术人员还知晓如何获得本发明的抗体的活性片段，即具有与本发明的抗体相同或相似免疫活性的抗体片段。因此，本发明不仅包括完整的抗体，还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。例如，本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

30 如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i) 有一个或多

5 个保守或非保守性氨基酸残基（优选保守性氨基酸残基）被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii) 在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii) 成熟多肽与另一个化合物（比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇）融合所形成的多肽，或(iv) 附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽（如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与 6His 标签形成的融合蛋白）。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

10 术语“本发明的抗体”不仅包括具有 PD-L1 蛋白结合活性的、包含上述 CDR 区的多肽；还包括具有与本发明抗体相同功能的、包含上述 CDR 区的多肽的变异形式。这些变异形式包括（但并不限于）：一个或多个（通常为 1-50 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个）氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个（通常为 20 个以内，较佳地为 10 个以内，更佳地为 5 个以内）氨基酸。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质的功能。又比如，在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。

15 该多肽的变异形式包括：同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

20 本发明还提供了其他多肽，如包含抗体或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本发明还包括了本发明抗体的片段。通常，该片段具有本发明抗体的至少约 50 个连续氨基酸，较佳地至少约 50 个连续氨基酸，更佳地至少约 80 个连续氨基酸，最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

在本发明中，“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比，有至多 10 个，较佳地至多 8 个，更佳地至多 5 个，最佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据下表进行氨基酸替换而产生。

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明还提供了编码上述抗体或其片段或其融合蛋白的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。

5 编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列（和任选的附加编码序列）以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

10 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，较佳地至少 70%，更佳地至少 80% 相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 $0.2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, 60°C；或(2) 杂交时加有变性剂，如 50%(v/v) 甲酰胺, 0.1% 小牛血清/0.1% Ficoll, 42°C 等；或(3) 仅在两条序列之间的相同性至少在 90% 以上，更好是 95% 以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能

15 和活性。本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外，还可将重链的编码序列和表达标签(如 6His)融合在一起，形成融合蛋白。

20 一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子（核酸、蛋白等）包括以分离的形式存在的生物分子。

25 目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白（或其片段，或其衍生物）的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子（或如载体）和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明还涉及包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

30 宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS7、293 细胞的动物细胞等。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl_2 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要，转化也可用电穿孔的方

法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法（如温度转换或化学诱导）诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理（盐析方法）、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析（凝胶过滤）、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

本发明的纳米抗体或抗体或人源化抗体可以单独使用，也可与可检测标记物（为诊断目的）、治疗剂、PK（蛋白激酶）修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

用于诊断目的可检测标记物包括但不限于：荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI（磁共振成像）或 CT（电子计算机 X 射线断层扫描技术）造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

可与本发明抗体结合或偶联的治疗剂包括但不限于：1. 放射性核素；2. 生物毒；3. 细胞因子如 IL-2 等；4. 金纳米颗粒/纳米棒；5. 病毒颗粒；6. 脂质体；7. 纳米磁粒；8. 前药激活酶（例如，DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL)）等。

PD-L1 相关疾病

基于本发明的教导，本领域技术人员会知晓本发明的纳米抗体、其活性片段或衍生物等可以用于治疗 PD-L1 相关疾病。

所述 PD-L1 相关疾病是 PD-L1 高表达疾病。在具体的实施方式中，所述 PD-L1 高表达疾病是表达 PD-L1 的肿瘤；包括但不限于：胃癌、肺癌、肝癌、骨肉瘤、乳腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、卵巢癌、食道癌、膀胱(尿路上皮)癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌等。

试剂盒

本发明还提供了一种含有本发明的抗 PD-L1 纳米抗体或抗体或人源化抗体（或其片段）或检测板的试剂盒。在优选的实施方式中，所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。

本发明还提供了用于检测 PD-L1 蛋白水平的检测试剂盒，该试剂盒包括识别 PD-L1 蛋白的本发明的抗体，用于溶解样本的裂解介质，检测所需的通用试剂和缓冲液，如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

药物组合物

基于本发明的抗体，本发明还提供了一种药物组合物，其包含本发明的抗 PD-L1 纳米抗体、抗 PD-L1 的结合分子、人源化抗体、嵌合抗原受体、融合蛋白、重组蛋白、宿主细胞、工程化免疫细胞、免疫偶联物，或它们的组合作为活性成分。本发明的药物组合物还可以包含任意的药学上可接受的载体。

5 通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中 pH 通常约为 5-8，较佳地 pH 约为 6-8，尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括（但并不限于）：腹膜内、静脉内、或局部给药。

10 本发明的药物组合物含有安全有效量（如 0.001-99 wt%，较佳地 0.01-90 wt%，更佳地 0.1-80 wt%）的本发明上述的抗体（或其偶联物）以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括（但并不限于）：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约 10 微克/15 千克体重至约 50 毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约 50 毫克/千克体重，较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重至约 10 毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

20

应用

如上所述，本发明的纳米抗体、其活性片段或衍生物等有广泛生物应用价值和临床应用价值，其应用涉及到与 PD-L1 蛋白相关的疾病的诊断和治疗、基础医学研究、生物学研究等多个领域。一个优选的应用是用于针对 PD-L1 蛋白的临床诊断、预防和治疗。

25 本发明也提供了刺激靶向哺乳动物肿瘤细胞群或组织的 T 细胞所介导的免疫应答的方法，其包括以下步骤：给哺乳动物施用本发明的 CAR-T 细胞。

在一实施方式中，本发明包括一类细胞疗法，分离病人自体 T 细胞（或者异源供体），激活并进行基因改造产生 CAR-T 细胞，随后注入同一病人体内。这种方式使移植物抗宿主反应的发生概率极低，抗原被 T 细胞以无 MHC 限制方式识别。此外，一种 CAR-T 30 就可以治疗表达该抗原的所有癌症。不像抗体疗法，CAR-T 细胞能够体内复制，产生可导致持续控制肿瘤的长期持久性。

在一实施方式中，本发明的 CAR-T 细胞可经历稳定的体内扩增并可持续数月至数年的时间。另外，CAR 介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分，其中，CAR-T 细胞可诱导对 CAR 抗原结合结构域所识别的抗原的高表达肿瘤细胞的特异性免疫应答。35 例如，本发明的 CAR-T 细胞引起针对 PD-L1 高表达的肿瘤细胞的特异性免疫应答。在具体的实施方式中，所述 PD-L1 高表达的肿瘤包括但不限于：胃癌、肺癌、肝癌、骨肉

瘤、乳腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、卵巢癌、食道癌、膀胱(尿路上皮)癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌等。

通常地，如本文所述活化和扩增的细胞可用于治疗和预防肿瘤等疾病。因此，本发明提供了治疗癌症的方法，其包括给予需要其治疗的对象治疗有效量的本发明的 CAR-T 细胞。

本发明的 CAR-T 细胞可被单独给予或作为药物组合物与稀释剂和/或其他组分诸如 IL-2、IL-17 或其他细胞因子或细胞群结合施用。简单地说，本发明的药物组合物可包括如本文所述的靶细胞群，与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂结合。

本发明的药物组合物可以以适于待治疗（或预防）的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由如患者的病症、和患者疾病的类型和严重度等因素确定，或可由临床试验确定。

当指出“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时，待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定，其考虑患者（对象）的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。包括本文描述的 T 细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg 体重的剂量，优选 10^5 至 10^7 个细胞/kg 体重的剂量（包括范围内的所有整数值）施用。T 细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术（见例如 Rosenberg 等，NewEng.J. of Med.319:1676, 1988）施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可由医学领域技术人员通过监测患者的疾病迹象容易地确定，并以此调整治疗。

对象组合物的给予可以以任何方便的方式进行，包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方式中，本发明的 T 细胞组合物通过皮内或皮下注射被施用给患者。在另一个实施方式中，本发明的 T 细胞组合物优选通过静脉内注射施用。T 细胞的组合物可被直接注入肿瘤，淋巴结或感染位置。

在本发明的某些实施方式中，利用本文描述的方法或本领域已知的其他将 T 细胞扩展至治疗性水平的方法活化和扩展的细胞，与任何数量的有关治疗形式结合（例如，之前、同时或之后）施用给患者，所述治疗形式包括但不限于用以下试剂进行治疗：所述试剂诸如抗病毒疗法、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷（也已知为 ARA-C）或对 MS 患者的那他珠单抗治疗或对牛皮癣患者的厄法珠单抗治疗或对 PML 患者的其他治疗。在进一步的实施方式中，本发明的 T 细胞可与以下结合使用：化疗、辐射、免疫抑制剂，诸如，环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯和 FK506，抗体或其他免疫治疗剂。在进一步的实施方式中，本发明的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂诸如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺结合（例如，之前、同时或之后）而施用给患者。例如，在一个实施方式中，对象可经历高剂量化疗的标准治疗，之后进行外周血干细胞移植。在一些实施方式中，在移植后，对象接受本发明的扩展的免疫细胞的注入。

在一个额外的实施方式中，扩展的细胞在外科手术前或外科手术后施用。

施用给患者的以上治疗的剂量将随着治疗病症的精确属性和治疗的接受者而变化。人施用的剂量比例可根据本领域接受的实践实施。通常，每次治疗或每个疗程，可将 1×10^5 个至 1×10^{10} 个本发明经修饰的 T 细胞，通过例如静脉回输的方式，施用于患者。

5

本发明的主要优点

1. 本发明的抗 PD-L1 纳米抗体具备高亲和力和高特异性，从而能够高效靶向 PD-L1；

10 2. 本发明的抗 PD-L1 纳米抗体结构简单，易于制备，从而在免疫检测、肿瘤治疗等领域具有广阔的应用前景。

为进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果，以下结合实施例和附图对本发明作进一步地说明。可以理解的是，此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本发明，而非对本发明的限定。

15 实施例 1 中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件，或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可通过正规渠道购买获得的常规产品。

本发明具体实施例中，缩略语和关键术语定义如下所示。

缩略词	英文全称	中文全称
AHC	anti-human IgG (Fc) capture antibody	抗人 Fc 捕获抗体
CDR	complementary determining region	互补决定区
EC ₅₀	concentration for 50% of maximal effect	半数最大效应浓度
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
Fc	fragment of crystallization	易结晶片段(抗体 Fc 区)
FITC	fluorescein isothiocyanate	硫氰酸酯荧光素
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HSA	human serum albumin	人血清白蛋白
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration	半数最大抑制浓度
IFN	interferon	干扰素
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
kD	kilodalton	千道尔顿
mAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
Nb	Nanobody	纳米抗体
MFI	median fluorescent intensity	中位荧光强度
NK	nature killer	自然杀伤
nM	nanomole	纳摩尔
OD	optical density	光密度值
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇

SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SPR	surface plasmon resonance	表面等离子共振
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺

实施例 1

本实施例筛选针对 PD-L1 的重链单域抗体。

1. 制备免疫抗原

5 通过基因合成抗原 PD-L1 胞外段 (1-238)，在 C 端添加 6 个组氨酸标签，亚克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 上，构建 PD-L1 的重组蛋白 (PD-L1-His) 的表达载体，氨基酸序列如 SEQ ID NO.17 所示。将构建好的 PD-L1-His 进行质粒抽提，测序正确后，转染 FreeStyle™293-F 细胞，于 37°C、120 rpm、5% CO₂ 水平摇床摇瓶培养 3.5 天，离心收集表达上清，用 0.45 μm 的滤膜过滤，采用 HisTrap™ FF 进行亲和纯化，500 mM 咪唑洗脱收集样品，超滤浓缩管进行 Buffer 置换和浓缩，SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度，结果如图 1 所示，抗原蛋白电泳位置符合预期，条带清晰，纯度较高，PD-L1 蛋白未观察到断裂、降解条带。

其中 1、2 泳道为非还原型 PD-L1 蛋白，4、5 泳道为还原型 PD-L1 蛋白还原，3、6 泳道为蛋白分子量标准。分光光度计定量蛋白浓度为 2 mg/mL。

SEQ ID NO.17:

15 MRIFAVFIFMTYWHELLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVY
WEMEDKNIIQFVHGEECLKVQHSSYRQRARLLKQDLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCM
ISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLS
GKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNER。

2. 构建文库

20 选取一只健康羊驼 (1.5 岁，雄性，体重 160 斤左右，由青岛康大生物科技有限公司提供)进行免疫，颈部及肩部皮下多点注射，5 次免疫结束，提取羊驼 100 mL 外周血淋巴细胞，使用天津市灏洋生物的羊驼外周血淋巴细胞分离液 KIT 将 PBMC 细胞分离，使用诺维赞公司 RNA Keeper Tissue Atabilizer 提取试剂盒提取 RNA，使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (诺唯赞，R312-01)试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA，利用巢氏 PCR 扩增重链抗体的可变区的核酸片段；

第一轮 PCR:

上游引物 F1: GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG (SEQ ID NO. 43);

下游引物 R1: GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC (SEQ ID NO. 44);

以 cDNA 为模板通过 PCR 扩增得到重链抗体的 Fab，反应程序如下:

温度	时间	循环
95 °C	5 min	-
95 °C	30 s	15 个循环
57 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	-

30 使用琼脂糖含量为 2% 的凝胶进行电泳，切割~ 700 bp 左右的条带，使用 Gelextraction

kit(诺唯赞)按照说明书回收目的基因。

第二轮 PCR:

以第一轮 PCR 产物作模板,再次 PCR 扩增得到纳米抗体,反应体系和反应程序如表所示。

- 5 上游引物 F2: atgccccaggtgcagctgcagGAGTCTGGRGGAGG (SEQ ID NO. 45);
下游引物 R2: gtggtgtgaggagacGGTGACCTGGGT (SEQ ID NO. 46);
反应体系如下:

组分	体积
第一轮 PCR 产物	1 μ L
上游引物 F2(10 μ M)	1 μ L
下游引物 R2(10 μ M)	1 μ L
2 \times PCR Bestaq™ Master Mix	25 μ L
ddH ₂ O	补足至 50 μ L

PCR 反应程序如下:

温度	时间	循环
95 °C	5 min	-
95 °C	30 s	20 个循环
55 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	-

- 10 回收目标重链单域抗体核酸片段,并使用限制性内切酶(购自 NEB)Pst I 和 BstE II 克隆到噬菌体展示用载体 pMES4 中,制备新鲜的感受态细胞 TG1,将产物电转到感受态细胞 TG1 中,通过梯度稀释铺板,计算库容大小 10^{11} ,随机选取 20 个克隆进行菌落 PCR 并测序验证,结果显示插入率达 100%,构建完成针对 PD-L1 的重链单域抗体噬菌体展示文库。

3. 淘选针对 PD-L1 重链单域抗体

- 15 用 PD-L1-his 融合蛋白 (SEQ ID NO. 18)10 μ g/mL 包被到免疫管上,4°C 过夜,次日用 1 mL PBS 牛奶 (含 2%脱脂奶粉的 PBS)37°C 封闭免疫管 1 h,同时封闭噬菌体库 100 μ L(来自上述构建的重链单域抗体噬菌体展示文库);将封闭后的噬菌体抗体库加入免疫管,4°C 结合过夜;弃免疫管中液体,分别用 PBS、PBST 及 PBS+NaCl 进行洗涤,洗涤强度逐轮加强,3 轮洗涤结束后,弃去免疫管中液体,加 1 mL 0.2 mol/L 甘氨酸-盐酸 (pH 2.2)洗脱,并用 1 mol/L Tris 中和至 pH 7.4;向免疫管中加对数生长期大肠杆菌 TG1 进行感染,将洗脱感染菌液重悬
20 沉淀后均匀涂布于 2YT-AG (A: 氨苄青霉素钠 G: 葡萄糖)平板,37°C 静置培养过夜后收集全部菌落;取适量菌液投入到 100 mL 2YT-AG 液体培养基中,培养至 600 nm 处吸光度(A)值为 0.7,按感染系数(MOI) = 50 : 1 加辅助噬菌体 M13KO7,25°C 静置 30 min,37°C,150 r/min 培养 1 h,加终浓度为 0.15 mmol/L 的 IPTG,30°C,200 rpm 培养 10 h,PEG8000 沉淀回收噬菌体抗体,取一定量投入下一轮筛选。如此反复经过 3 轮筛选,最终,阳性克隆得到富集,
25 达到利用噬菌体展示技术筛选得到 PD-L1 特异性抗体的目的。

SEQ ID NO. 18:

MRIFAVFIFMTYWHELLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVY
 WEMEDKNIIQFVHGEEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCM
 ISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSDDHQLVLS
 GKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERH
 5 HHHHH.

4. 用噬菌体酶联免疫法 (Elisa)筛选阳性克隆

挑取筛选产出的单克隆菌落，于含有 2×YT-AG 培养基的 96 孔板中 37℃、220 rpm 培
 养过夜至饱和；按转接饱和菌液至 OD₆₀₀ 约为 0.5，按感染系数(MOI)=50: 1 加入辅助噬菌
 体 M13KO7，25℃静置 30 min 后于 37℃、150 rpm 培养 1 h，加入卡那霉素至终浓度为 20
 10 μg/mL、IPTG 至终浓度 0.15 mM，于 30℃、200 rpm 诱导呈现 12 h；离心收集上清为噬菌体
 抗体，包被目的抗原 (PDL1-his)、对照抗原 (BSA)4℃过夜，噬菌体抗体 37℃结合 1 h，洗
 涤，抗 M13 抗体 37℃结合 45 min，洗涤后加入 TMB 单组份显色液，波长 450 nm 测吸收峰，
 样品孔 OD 值大于 3 倍对照孔 OD 值，鉴定为阳性的单克隆菌落，并送测序，获得 11 个候
 选抗体的可变区基因。

15

实施例 2

本实施例针对 PD-L1 的重链单域抗体进行初步评价鉴定

1. 重链单域抗体在大肠杆菌中表达、纯化

将实施例 1 测序分析获得的 11 株单域抗体 (分别编号为 PDL1-1、PDL1-3、PDL1-4、
 20 PDL1-6、PDL1-8、PDL1-13、PDL1-14、PDL1-16、PDL1-19、PDL1-20 和 PDL1-21。)提取
 质粒后，通过热击法转化入 BL21 (DE3)感受态细胞。在超净台内取 1 mL 阳性克隆菌液加入
 100 mL LB 液体培养基 (含 100 μg/mL 氨苄霉素)，37℃振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.8 左右，加入
 终浓度 1 mM 的 IPTG，30℃振荡培养过夜。次日，8000 rpm，离心 10 min，收集菌体，加
 入 1.5 mL 预冷的 TES 缓冲液重悬沉淀并在冰浴中搅拌 30 min。加 3.0 mL TES/4 (将 TES
 25 用纯水稀释 4 倍)，继续在冰浴中搅拌 30 min。9000 rpm，4℃离心 10 min，收集上清 (周质
 蛋白提取物)进行 SDS-PAGE 电泳分析。基于蛋白纯化系统，采用 HisTrap™ FF 进行亲和纯
 化，300mM 咪唑缓冲液洗脱收集样品。分光光度计定量抗体浓度，SDS-PAGE 鉴定抗体纯
 度，结果如图 2 所示，提取的蛋白电泳位置符合预期，条带清晰，纯度较高，所有 PD-L1
 蛋白未观察到断裂、降解条带。其中，12 为蛋白分子量标准，1-11 分别为 PDL1-1、PDL1-3、
 30 PDL1-4、PDL1-6、PDL1-8、PDL1-13、PDL1-14、PDL1-16、PDL1-19、PDL1-20 和 PDL1-21
 共 11 个纳米抗体蛋白纯化样品。

2. 抗原重组蛋白构建

构建 PDL1 与人 Fc 的重组蛋白 (PDL1-Fc)的表达载体。将 PDL1 基因与人 Fc 基因克隆
 到 pcDNA3.1 载体中，测序正确后，转染状态良好的 FreeStyle™293-F 细胞，于 37℃、120
 35 rpm、5% CO₂ 水平摇床摇瓶培养 3.5 天，收集上清，ProteinA 柱进行纯化，柠檬酸-柠檬酸钠
 缓冲液洗脱，超滤浓缩管进行 Buffer 置换和浓缩，SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度，结果如图 3 所
 示，泳道 1: PDL1-Fc 蛋白非还原 SDS-PAGE，泳道 2: 蛋白分子量标准；泳道 3: PDL1-Fc

蛋白还原 SDS-PAGE, 表明抗原重组蛋白电泳位置符合预期, 条带清晰, 纯度较高, PDL1-Fc 重组蛋白未观察到断裂、降解条带。分光光度计定量蛋白浓度, 蛋白浓度为 2 mg/mL。

3.Elisa 检测候选 PD-L1 纳米抗体对人 PD-L1 蛋白的结合

取人 PDL1-Fc 融合蛋白 (SEQ ID NO. 19)包被平板 200ng/孔, 4°C 过夜, 随后将上述获得的
 5 重链单域抗体从 10 μg/mL 起 3 倍连续稀释 12 个梯度, 37°C 封闭 1 h, 按 100 μL/孔加入
 经封闭后的全抗体, 37°C 静置 1 h, 洗涤后加入 HRP 标记的抗 his 标签抗体 (His Tag Antibody
 HRP, Sino Biological), 按 100 μL/孔加入酶联板, 37°C 静置 45 min, 洗涤后按 100 μL/孔加
 入 TMB 底物显色液, 25°C 静置 10 min, 1 M H₂SO₄ 100 μL/孔终止。酶标仪测 450 nm 波长的
 10 光吸收值 (图 4 和图 5), 使用 Graphd Prism Software 5.0 进行数据处理和参数拟合, 计算 EC₅₀
 值, 结果如表 1 和表 2 所示, 筛选得到的 11 株纳米抗体中, 有 4 株原核表达纳米抗体 PDL1-1、
 PDL1-3、PDL1-13、PDL1-14 与 PDL1-Fc 融合蛋白结合, 相应氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:
 13-SEQ ID NO: 16 所示。

SEQ ID NO. 19:

15 MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYW
 EMEDKNIIQFVHGEECLKVQHSSYRQRARLLKDKLSLGNAAALQITDVKLQDAGVYRCMIS
 YGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSG
 KTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNEREP
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 20 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

表 1

	PDL1-1	PDL1-3	PDL1-4	PDL1-6	PDL1-8
EC50(ug/ml)	0.008252	0.01278	~ 0.001032	1.821	9.787

表 2

	PDL1-13	PDL1-14	PDL1-16	PDL1-19	PDL1-20	PDL1-21
EC50(ug/ml)	0.06611	0.1235	0.002282	~ 4.598	2.518	12.26

25 实施例 3

本实施例采用 SPR 法 (即 BIcore)鉴定 PD-L1 单域抗体蛋白对 PD-L1 结合能力。

采用单浓度亲和力筛选测试的方法, 所有待测纳米抗体, 均采用相同的单一浓度进行
 测试, 平行比较待测纳米抗体, 检测纳米抗体之间的结合活性差异。采用 Human Antibody
 Capture Kit 将捕获抗体偶联至 CM5 芯片表面, 多循环动力学 (Multi-cycle kinetics)方法测定
 30 抗体-抗原相互作用的动力学参数; HBS-EP 缓冲液分别稀释纯化后的 PDL1-his 至 1 μg/mL,
 按照温度 25°C, 5 μL/min*1min 的条件捕获固定于芯片表面, 捕获目标响应值 (Response)为
 400RU 左右; HBS-EP 缓冲液将纳米抗体 PDL1-1、PDL1-3、PDL1-13、PDL1-14 稀释为 1.5
 μg/mL 作为流动相; 测试条件为 25°C、30 μL/min, 结合 60s, 解离 120s, 再生条件为 10 mM
 甘氨酸盐酸缓冲液 pH 2.5、30 μL/min*90s; 并进行结果分析, 结果如图 6 和表 3 所示, 抗体
 35 亲和力 (Affinity)是评价抗体分子的重要指标, 而表面等离子共振 (SPR)技术是公认的检测

抗体亲和力的金标准。我们采用 BIAcore T100 系统, 采用单浓度亲和力筛选测试的方法, PDL1-1、PDL1-3、PDL1-13 结合活性参数分别为 0.5, 0.6 和 0.2, PDL1-14 无活性。

表 3

样品	结合值(60s)RU	解离值(120s)RU	解离百分比%	结合活性评价参数
PDL1-1	26.7	-14.1	52.8	0.5
PDL1-3	30.3	-14.4	47.6	0.6
PDL1-13	13.5	-12	89.1	0.2

实施例 4

5 本实施例使用 FACS 方法检测纳米抗体和 Raji-PDL1/Raji 细胞的结合活性。

购买带有人 PD-L1 全长基因质粒的 Raji 细胞 (北京康源博创, KC-1886) 并培养至对数生长期, 使用 FACS buffer 重悬细胞, 调整细胞密度为 $3E6/mL$, 每孔铺 $100 \mu L$, 随后将实施例 2 获得的重链单域抗体 (阳性对照组为康宁杰瑞 KN035) 用 FACS buffer 稀释一抗 $30 \mu g/mL$ 5 倍稀释, $100 \mu L/$ 孔重悬细胞, $4^{\circ}C$ 孵育 60 min , PBS 洗三次, 二抗 THE™ His Tag
10 Antibody [FITC], mAb, Mouse 重悬细胞, $4^{\circ}C$ 孵育 60 min , PBS 洗三次, PBS $100-200 \mu L/$ 孔重悬细胞, 贝克曼/ CytoFLEX 检测 MFI, 使用 Graphd Prism Software 5.0 进行数据处理和参数拟合, 计算 EC_{50} 值, 结果如图 7 和表 4 所示, PDL1-1、PDL1-3 具有与 Raji 细胞表达的 PDL1 蛋白高的结合活性, 且具有典型剂量依赖特征。

表 4

	PDL1-1	PDL1-3
EC_{50} (ug/ml)	0.0606	0.07298

15

实施例 5

本实施例采用竞争 ELISA 检测 PD-L1 重链单域抗体对 PD-1 与 PD-L1 相互作用的阻断效果。

使用 PBS 稀释 PDL1-his 蛋白至 $2 \mu g/mL$, 按 $100 \mu L/$ 孔加入 96 孔酶联板, $4^{\circ}C$ 包被过夜, 2.5% PBST 牛奶将实施例 2 获得的重链单域抗体从 $200 \mu g/mL$ 起 2 倍连续稀释 13 个梯度, 其中含有 PD1-Fc(SEQ ID NO. 20) 重组蛋白终浓度 $50 \mu g/mL$ (空白组不加入任何抗体或者蛋白, 只加入等体积缓冲液), $37^{\circ}C$ 封闭 1 h , $37^{\circ}C$ 结合 1 h , 洗涤后加入抗 IgG 抗体 (购自中杉金桥), $37^{\circ}C$ 静置 45 min , 洗涤后按 $100 \mu L$ 孔加入 TMB 底物显色液, $25^{\circ}C$ 静置 10 min , $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ $100 \mu L/$ 孔终止, 酶标仪测 450 nm 波长的光吸收值, 使用 Graphd Prism Software 5.0 进
20 行数据处理和参数拟合, 计算半数最大抑制浓度 (IC_{50}), 结果如图 8 和表 5 所示, 表明 PDL1-1 与 PDL1-3 在一定的浓度范围内可阻断 PDL1-his 蛋白与 PD1-Fc 的结合, 且呈剂量依赖关系, PDL1-1 及 PDL1-3 的 IC_{50} 值分别为 $2.323 \mu g/mL$ 及 $1.312 \mu g/mL$, 二者阻断活性相近。

25

表 5

	PDL1-1	PDL1-3
IC_{50} (ug/ml)	2.323	1.312

SEQ ID NO. 20:

30 PGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNHWYRMSPSNQTD
KLAAPEDRSQPGQDCRFRTVQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKES

LRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
 FYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
 5 LHNHYTQKSLSLSPGK。

实施例 6

本实施例使用 FACS 方法检测抗体在细胞水平的阻断活性 (cell-based RBA)。

将带有人 PD-L1 全长基因质粒的 Raji 细胞并培养至对数生长期, FACS buffer 重悬细胞,
 10 调整细胞密度为 3E6/ml, 每孔铺 100 μ L。50 μ L/well 的 PD1-Fc 和 50 μ L/well 的待测抗体,
 重悬细胞, 4 度孵育 60 min。PBS 200 μ L/孔, 洗三次, 300 g/5 min 离心弃掉上清。FACS buffer
 稀释二抗 SA-488, 100 μ L/孔重悬细胞, 4 度孵育 60 min。PBS 200 μ L/孔, 洗三次, 300 g/5
 min 离心弃掉上清。用 PBS 100/孔重悬细胞, 上机检测。结果如图 9 和表 6 所示, PDL1-1
 与 PDL1-3 在一定的浓度范围内可阻断 Raji 细胞表面 PDL1 蛋白与 PD1-Fc 的结合, 且呈剂
 15 量依赖关系, PDL1-1 及 PDL1-3 的 IC₅₀ 值分别为 0.06263 ug/ml 及 0.04058 ug/ml, 二者阻断
 活性相近。

表 6

	PDL1-1	PDL1-3
IC50(ug/ml)	0.06263	0.04058

实施例 7

20 本实施例分析 PD-L1 纳米抗体对 PDL1-Fc 蛋白结合的特异性。

包被不同蛋白 200 ng/孔, 抗原 HpaA、UreB、HtrA、HER2、BCMA、PD1、IL-12、IL-18、
 IL-15、Pertuzuman、HAS、BSA、PDL1, 蛋白均来自自己实验室, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜, 加抗体 PDL1-1
 0.2 μ g, PDL1-3 0.2 μ g, PDL1-13 0.2 μ g, PDL1-14 0.2 μ g, 复孔检测, 37 $^{\circ}$ C 静置 1h, 洗涤后
 加入 HRP 标记的抗 his 标签抗体, 按 100 μ L/孔加入酶联板, 37 $^{\circ}$ C 静置 45 min, 洗涤后按 100
 25 μ L/孔加入 TMB 底物显色液, 1M H2SO4 100 μ L/孔终止。酶标仪测 450 nm 波长的光吸收值。
 Graphd Prism Software 5.0 进行数据处理。由图 15 特异性实验结果表明, PDL1-1、PDL1-3、
 PDL1-13、PDL1-14 均只特异性结合人 PDL1, 与其他无关蛋白都不结合。

实施例 8

30 本实施例利用哺乳动物细胞制备 NbsPDL1-Fc 融合蛋白。

鉴定为阳性单链抗体的克隆 (PDL1-1、PDL1-3 和 PDL1-13) 进行测序, 分析测序结果,
 采用引物 HF (ccttaagggcgtgcagtgccaggtgcagctgcaggagtc; SEQ ID NO. 47) 和 HR
 (gatttgggctcgtagctgaggagacgggtgacctggg; SEQ ID NO. 48) 扩增阳性单链可变区基因, 扩增反应
 体系如表 7 所示, 反应程序如表 8 所示。通过同源重组的方法将阳性单链抗体基因克隆入载
 35 体带有人 Fc (SEQ ID NO. 21) 的 pcDNA3.1(+) 载体, 反应体系如表 9 所示, 反应条件为 37 $^{\circ}$ C,
 30 min。

SEQ ID NO. 21:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 5 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

表 7

噬粒模板	0.5 μ L
HF 引物(10 μ M)	1 μ L
HR 引物(10 μ M)	1 μ L
2 \times Phanta Max Master Mix	15 μ L
灭菌去离子水	12.5 μ L
总和	30 μ L

表 8

温度	时间	循环
95 $^{\circ}$ C	3min	-
95 $^{\circ}$ C	15s	30 个循环
62 $^{\circ}$ C	15s	
72 $^{\circ}$ C	20s	-
72 $^{\circ}$ C	5min	-
4 $^{\circ}$ C	保持	-

表 9

载体 pABG1-Fc(0.02 pmol)	0.4 μ L
PD-L1 目的片段(0.06 pmol)	0.3~3 μ L
Exnase II	1 μ L
5 \times CE II buffer	2 μ L
灭菌去离子水	3.6~6.3 μ L
总和	10 μ L

使用去内毒素质粒提取试剂提取质粒，分光光度计定量并送测序。转染前一天离心收
 10 集 FreeStyleTM293-F 细胞，调整细胞密度为 1×10^6 cells/mL，转染比例：(细胞：培养基=20：
 1)；Polyethylenimine Lineae (PEI) 2 μ L /mL；质粒 1 μ g/mL；即吸取质粒 40 μ g 溶于 2 mL
 Opti-MEM 培养基，轻轻混匀，随后加入 80 μ L 的 PEI 转染试剂，涡旋 10s，充分混匀，25 $^{\circ}$ C
 静置 13 min；将 2 mL 混合溶液加入 40 mL 状态良好的 FreeStyleTM293-F 细胞，轻轻混匀，
 于 37 $^{\circ}$ C、120 rpm、5% CO₂ 水平摇床摇瓶培养 4 天。收集上清进行 SDS-PAGE 电泳分析。
 15 基于蛋白纯化系统，采用 ProteinA 亲和纯化，0.1 M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液洗脱收集样品。
 分光光度计定量抗体浓度，SDS-PAGE 鉴定抗体纯度如图 10 所示，还原及非还原型
 NbPDL1-Fc 融合蛋白电源位置符合预期，条带清晰，纯度较高，所有 NbsPDL1-Fc 融合蛋白
 均未观察到断裂、降解条带。其中，第 1、2 泳道为非还原型 NbPDL1-1-Fc 融合蛋白，第 3
 泳道为蛋白分子量标准，第 4、5 泳道为还原型 NbPDL1-1-Fc 融合蛋白及 NbPDL1-3-Fc 融合
 20 蛋白。

实施例 9

本实施例检测候选 NbsPD-L1-Fc 融合蛋白对人 PD-L1 蛋白的结合。

使用人 PDL1-his 蛋白包被平板 200 ng/孔, 4°C 过夜, 随后将实施例 7 获得的重链单域抗体 (阳性对照组为康宁杰瑞含 Fc 的 KN035 (SEQ ID NO. 22)) 从 10 µg/mL 起 3 倍连续稀释 12 个梯度, 37°C 封闭 1 h, 按 100 µL/孔加入经封闭后的全抗体, 37°C 静置 1h, 洗涤后加入 HRP 标记的抗 his 标签抗体, 按 100 µL/孔加入酶联板, 37°C 静置 45min, 洗涤后按 100 µL/孔加入 TMB 底物显色液, 25°C 静置 10min, 1 M H₂SO₄ 100 µL/孔终止。酶标仪测 450 nm 波长的光吸收值。使用 Graphd Prism Software 5.0 进行数据处理和参数拟合, 计算 EC₅₀ 值, 结果如表 10 及图 11 所示, NbPDL1-1-Fc 融合蛋白、NbPDL1-3-Fc 融合蛋白、NbPDL1-13-Fc 融合蛋白与对照抗体含 Fc KN035 相比, 结合活性更好, 且具有典型剂量依赖特征。

10

表 10

	NbPDL1-1-Fc	NbPDL1-3-Fc	NbPDL1-13-Fc	KN035-Fc
EC ₅₀ (ug/ml)	0.01237	0.01106	0.01212	0.04186

SEQ ID NO. 22:

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSRRRCMAWFRQAPGKERERVAKLLTTS
 GSTYLADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADSFEDPTCTLVTSSGAF
 QYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK。

15

20

实施例 10

本实施例检测候选 NbPD-L1-Fc 融合蛋白对 PD-L1 (Cynomolgus) 蛋白的结合能力。

使用 Cynomolgus PDL1-his 蛋白包被平板 100 ng/孔, 4°C 过夜, 酶联板弃包被液, 按 120 µL 孔加入 2.5% PBS 牛奶 (含 2.5% 脱脂奶粉的 PBS), 2.5% PBST 将实施例 7 获得的重链单域重组抗体 (阳性对照组为康宁杰瑞 KN035) 从 50 µg/mL 起 3 倍连续稀释 12 个梯度, 37°C 封闭 1 h, 弃酶联板封闭液, 按 100 µL/孔加入经封闭后的全抗体, 37°C 静置 1 h, PBST 洗涤 6 次, 2.5% PBST 牛奶 1: 3000 稀释 HRP 标记的山羊抗人 IgG 抗体, 按 100 µL/孔加入酶联板, 37°C 静置 45 min, PBST 洗 6 次, 弃去洗涤液, 按 100 µL/孔加入 TMB 底物显色液, 25°C 静置 10 min。1 M H₂SO₄ 100 µL/孔终止, 采用酶标仪测 450 nm 波长的光吸收值, 结果如图 12 和表 11 所示, NbPDL1-1-Fc 与 NbPDL1-3-Fc 能有效的与 Cynomolgus PDL1 蛋白结合, 且呈剂量依赖性关系。

25

30

表 11

	NbPDL1-1-Fc	NbPDL1-3-Fc	NbPDL1-13-Fc	NbPDL1-14-Fc
EC ₅₀ (ug/ml)	0.01625	0.009659	5.099	31.88

实施例 11

本实施例采用 SPR 法 (即 BCore) 鉴定 PD-L1 单域抗体 Fc 融合蛋白对 PD-L1 结合能力。采用单浓度亲和力筛选测试的方法, 所有待测纳米抗体, 均采用相同的单一浓度进行

35

测试, 平行比较待测纳米抗体, 检测纳米抗体之间的结合活性差异。采用 Human Antibody Capture Kit 将捕获抗体偶联至 CM5 芯片表面, 多循环动力学 (Multi-cycle kinetics) 方法测定抗体-抗原相互作用的动力学参数; HBS-EP 缓冲液分别稀释纯化后的 PDL1-his 至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 按照温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ *1min 的条件捕获固定于芯片表面, 捕获目标响应值 (Response) 为 400 RU 左右; HBS-EP 缓冲液将纳米抗体 PDL1-1-Fc、PDL1-3-Fc、PDL1-13-Fc、PDL1-14-Fc 稀释为 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为流动相; 测试条件为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $\mu\text{l}/\text{min}$, 结合 60s, 解离 120s, 再生条件为 10 mM 甘氨酸盐酸缓冲液 pH 2.5、30 $\mu\text{l}/\text{min}$ *90s; 并进行结果分析。

如表 12 和图 13 所示, NbPDL1-1-Fc、NbPDL1-3-Fc、NbPDL1-13-Fc 能够有效结合 PD-L1, 其结合活性参数分别为 8.2, 12.7 和 2.4, NbPDL1-14 无结合活性。

10

表 12

样品	结合值(60s)RU	解离值(120s)RU	解离百分比%	结合活性评价参数
NbPDL1-1-Fc	83.1	-8.4	10.1	8.2
NbPDL1-3-Fc	105.7	-8.8	8.3	12.7
NbPDL1-13-Fc	112.3	-51.8	46.1	2.4

实施例 12

本实施例使用 FACS 方法检测 NbPDL1-1-Fc 融合蛋白和 Raji-PDL1/Raji 细胞的结合活性。

15 买带有人 PDL1 全长基因质粒的 Raji 细胞 (北京康源博创, KC-1886) 并培养至对数生长期, FACS buffer 重悬细胞, 调整细胞密度为 3E6/mL, 每孔铺 100 μL 。随后将实施例 7 获得的重链单域抗体 (阳性对照组为康宁杰瑞含 Fc KN035) 用 FACS buffer 稀释一抗 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5 倍稀释, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 重悬细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。PBS 洗三次, 二抗 THETM His Tag Antibody [FITC], mAb, Mouse 重悬细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。PBS 洗三次, PBS 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 重悬细胞, 20 使用贝克曼/ CytoFLEX 检测 MFI, Graphd Prism Software 5.0 进行数据处理和参数拟合, 计算 EC50 值, 结果如表 13 和图 14 所示, NbPDL1-1-Fc 融合蛋白、NbPDL1-3-Fc 融合蛋白与含 Fc KN035 的亲合力相当。

表 13

	KN035-Fc	NbPDL1-1-Fc	NbPDL1-3-Fc
EC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.1392	0.2041	0.1968

25

实施例 13

本实施例进行 PDL1-1 单域抗体人源化。

人源化采用蛋白表面氨基酸人源化方法。使用参考同源序列全人源序列在 IMGT 进行比对, 根据设计原则进行蛋白表面氨基酸人源化, 将氨基酸进行定点突变, 完成抗体的人源化。

30

对抗体 PDL1-1 进行人源化, 获得 20 株人源化的抗体株。

人源化序列

PDL1-1v1

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRNT
VYAQSVRGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 23)。

5

PDL1-1v2

QVQLVES GGGLVKPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
TVYAQSVRGRFTISRDN AKNSVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 24)。

PDL1-1v3

10 QVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
TVYAQSVRGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 25)。

PDL1-1v4

15 EVQLQES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
TVYAQSVRGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 26)。

PDL1-1v5

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRNT
VYAQSVRGRFTISRDN VKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 27)。

PDL1-1v6

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRNT
VYAQSVRGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLKAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 28)。

25

PDL1-1v7

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRNT
VYAQSVRGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 29)。

PDL1-1v8

30 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRNT
VYAQSVRGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLTGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 30)。

PDL1-1v9

35 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRNT
VYAQSVRGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTQVTVSS
(SEQ ID NO. 31)。

PDL1-1v10-

40 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIASNRNT
VYAQSVRGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 32)。

PDL1-1v11

QVQLQES GGGLVKPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
TVYAQSVRGRFTISRDN AKNSVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 33)。

45

PDL1-1v12

QVQLVES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
TVYAQSVRGRFTISRDN AKNSVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 34)。

PDL1-1v13

50 QVQLVES GGGLVKPGGSLT LSCAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRNT

- VYAQSVRGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 35).
PDL1-1v14
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
5 TVYAQSVRGRFTISRDNVKNVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 36).
PDL1-1v15
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
TVYAQSVRGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
10 (SEQ ID NO. 37).
PDL1-1v16
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
TVYAQSVRGRFTISRDNKNSVYLQMNSLKAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 38).
15 PDL1-1v17
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
TVYAQSVRGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRPEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 39).
PDL1-1v18
20 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
TVYAQSVRGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLTGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO. 40).
PDL1-1v19
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIDSNRN
25 TVYAQSVRGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTQVTVSS
(SEQ ID NO. 41).
PDL1-1v20
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTVSNSAVSWARQAPGKGLEWVSLIASNRN
TVYAQSVRGRFTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGIWGSTLWGQGTTVTVSS
30 (SEQ ID NO. 42).

实施例 14

本实施例鉴定 PD-L1-1 人源化单域抗体功能。

14.1 哺乳动物细胞制备 PDL1-1 人源化单域抗体蛋白

- 35 合成 PDL1-1 人源化单域抗体序列基因到载体 pcDNA3.1。转染 FreeStyleTM293-F 细胞，
调整细胞密度为 1×10^6 cells/mL，转染比例 (细胞: 培养基 = 20: 1); Polyethylenimine Lineax
(PEI) 2 μ L /mL; 质粒 1 μ g/mL; 随后加入 80 μ L 的 PEI 转染试剂，25°C 静置 10 min; 加入到
FreeStyleTM293-F 细胞，37°C、120 rpm、5% CO₂ 水平摇床摇瓶培养 3.5 天。基于蛋白纯化
系统，采用 HisTrapTM FF 进行亲和纯化，300 mM 咪唑缓冲液洗脱收集样品。收集上清进行
40 SDS-PAGE 电泳分析。

结果如图 16A-图 16C 所示，非还原 (Non-Reduced)SDS-PAGE 凝胶电泳对 PDL1-1 人
源化单域抗体进行鉴定。(图 16A) 1: PDL1-1v4, 2: PDL1-1v7, 3: PDL1-1v9, 4: PDL1-1v1,
5: PDL1-1v2, 6: 蛋白分子量标准; (图 16B) 1: PDL1-1v3, 2: PDL1-1v10, 3: PDL1-1v8,
4: PDL1-1v5, 5: PDL1-1v6, 6: 蛋白分子量标准, 7: PDL1-1v20, 8: PDL1-1v13 9: PDL1-1v19,

10: PDL1-1v17; (图 16C) 1: PDL1-1v11, 2: PDL1-1v14, 3: PDL1-1v16, 4: PDL1-1v15, 5: PDL1-1v12, 6: PDL1-1v18, 7: 蛋白分子量标准。结果表明, 人源化单域抗体蛋白电泳位置符合预期, 条带清晰, 纯度较高, 未观察到断裂、降解条带。

14.2 Elisa 鉴定 PD-L1-1 人源化单域抗体对 PD-L1 结合能力

5 人 PDL1-Fc 重组蛋白包被平板 200 ng/孔, 4°C 过夜, 随后将 14.1 获得的 20 株人源化单域抗体从 10 μ g/mL 起 3 倍连续稀释 12 个梯度, 37°C 封闭 1h, 37°C 结合 1h, 洗涤后加入 HRP 标记的抗 his 标签抗体 (His Tag Antibody HRP, Sino Biological), 37°C 静置 45 min, 洗涤后加入 TMB 底物显色液, 1 M H₂SO₄ 终止反应。酶标仪测 450 nm 波长的光吸收值。Graphd Prism Software 5.0 进行数据处理和参数拟合, 计算 EC₅₀ 值 (表 14-表 17)。

10

表 14

	PDL1-1V3	PDL1-1V10	PDL1-1V8	PDL1-1V6	PDL1-1V1
EC ₅₀ (ug/ml)	0.03357	~ 109.7	0.01084	0.05046	0.02747

表 15

	PDL1-1V4	PDL1-1V5	PDL1-1V7	PDL1-1V9	PDL1-1V1
EC ₅₀ (ug/ml)	3.997	0.04781	0.028	0.02596	0.02508

表 16

	PDL1-1V11	PDL1-1V14	PDL1-1V16	PDL1-1V15	PDL1-1V2
EC ₅₀ (ug/ml)	0.02	0.0342	0.06285	0.04318	0.04228

表 17

	PDL1-1V12	PDL1-1V13	PDL1-1V20	PDL1-1V17	PDL1-1V18	PDL1-1V19	PDL1-1V2
EC ₅₀ (ug/ml)	1.244	0.04608	0.8745	0.06636	0.01819	0.04843	0.05909

15 通过 ELISA 对纯化获得的 20 个 PD-L1-1 人源化单域抗体与 PDL1-Fc 蛋白的结合活性进行分析, 结果显示 (图 17-图 20), PD-L1-1 人源化单域抗体与 PDL1-Fc 蛋白有高的结合活性, 且具有典型剂量依赖特征。

14.3 forteBIOTM 系统测定各突变体与亲本亲和力变化

20 forteBIO™ Octet QK^c 生物大分子相互作用实时检测系统是基于生物膜层干涉技术 (BLI) 的八通道检测平台, 我们利用该平台高通量的特点, 比较分析不同突变体抗体分子与不同突变体抗原相互作用的动力学特征。具体方法如下:

1) 10 mM PBS+0.05% Tween-20 缓冲液分别稀释 PDL1-Fc 亲本、各突变体至 100 nM, 按 200 μ L/孔加入检测用 96 孔板;

25 2) 执行 Loading > Baseline > Association > Disassociation 流程, 设置 Association 2 min, Disassociation 3 min, Baseline 与 Disassociation 过程均在 10 mM PBS + 0.05% Tween-20 缓冲液中, Loading 过程对应特定浓度的 PDL1-Fc 稀释液, Association 过程对应特定浓度的突变体稀释液;

3) Data Analysis 拟合分析结果, 得出不同 PDL1-1 突变体的亲和力常数 K_D。

结果如表 18 所示, KD: 平衡解离常数 (equilibrium disassociation constant)。

表 18

样品 ID(Sample ID)	$K_D(M)$
1v1	1.313E-08
1v2	1.428E-08
1v3	1.85E-08
1v4	1.316E-06
1v5	1.22E-08
1v6	2.205E-08
1v7	1.09E-08
1v8	5.901E-09
1v9	1.210E-08
1v10	3.05E-08
1v11	5.86E-09
1v12	3.890E-07
1v13	1.136E-08
1v14	7.37E-09
1v15	1.08E-08
1v16	1.43E-08
1v17	1.017E-08
1v18	4.158E-09
1v19	9.859E-09
1v20	3.25E-08

采用捕获法分别测定 PDL1-Fc 与 PDL1-1 突变体重组蛋白的亲和力常数。测定的亲和力常数结果如表 18 所示,突变体 1v8 对 PDL1-Fc 亲和力为 5.901 nM,突变体 1v11 对 PDL1-Fc 亲和力为 5.86 nM,突变体 1v14 对 PDL1-Fc 亲和力为 7.37 nM,突变体 1v18 对 PDL1-Fc 亲和力为 4.158 nM,突变体 1v19 对 PDL1-Fc 亲和力为 9.859 nM,明显高于其他突变体。

14.4 Elisa 鉴定 PD-L1-1 人源化重链单域抗体对 PD-1 与 PD-L1 相互作用的阻断效果

使用 PBS 稀释 PDL1-his 蛋白至 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 2.5% PBST 牛奶将 14.1 获得的人源化重链单域抗体从 200 $\mu\text{g/mL}$ 起 2 倍连续稀释 13 个梯度, 其中含有 PD1-Fc (SEQ ID NO. 20)重组蛋白终浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ (空白组不加入任何抗体或者蛋白, 只加入等体积缓冲液), 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, 37 $^{\circ}\text{C}$ 结合 1 h, 洗涤后加入抗 IgG 抗体 (购自中杉金桥), 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 45 min, 洗涤后加入 TMB 底物显色液, 25 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min, 1 M H_2SO_4 100 μL /孔终止, 酶标仪测 450 nm 波长的光吸收值, 使用 Graphd Prism Software 5.0 进行数据处理和参数拟合, 计算半数最大抑制浓度 (IC_{50})。

阻断活性检测结果如图 21 所示, 竞争性 ELISA 结果 (表 19)显示, 人源化抗体 PDL1-1v8 与 PDL1-1v18 可阻断 PDL1-his 蛋白与 PD1-Fc 的结合, 与 PDL1-1 阻断活性相近, 且呈剂量依赖关系, PDL1-1v8 与 PDL1-1v18 的 IC_{50} 值分别为 5.576 $\mu\text{g/mL}$ 及 5.216 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 19

	PDL1-1v8	PDL1-1v11	PDL1-1v14	PDL1-1v18	PDL1-1v19	PDL1-1
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	5.576	31.13	37.06	5.216	18.8	5.805

14.5 用 FACS 方法检测 PDL1-1 人源化重链单域抗体在细胞水平的阻断活性

将带有人 PD-L1 全长基因质粒的 Raji 细胞并培养至对数生长期, FACS buffer 重悬细胞, 调整细胞密度为 3E6/mL, 每孔铺 100 μ L。 50 μ L/well 的 PD1-Fc 和 50 μ L/well 的待测抗体, 重悬细胞, 4 度孵育 60 min。 PBS 200 μ L/孔 洗三次, 300 g/5 min 离心弃掉上清。 FACS buffer 稀释二抗 SA-488, 100 μ L/孔重悬细胞, 4 度孵育 60 min。 PBS 200 μ L/孔 洗三次, 300 g/5 min 离心弃掉上清。 用 PBS 100/孔重悬细胞, 上机检测。

结果如图 22 和表 20 所示, 人源化抗体 PDL1-1v8 与 PDL1-1v18 可阻断 Raji 细胞与 PD1-Fc 的结合, 与 PDL1-1 阻断活性相近, 且呈剂量依赖关系, PDL1-1v8 与 PDL1-1v18 的 IC₅₀ 值分别为 0.458 μ g/mL 及 0.6938 μ g/mL。

表 20

	PDL1-1v8	PDL1-1v1 1	PDL1-1v1 4	PDL1-1v1 8	PDL1-1v1 9	PDL1-1
IC ₅₀ (μ g/mL)	0.458	2.477	4.585	0.6938	2.593	0.477

10 **14.6 PDL1 单域抗体及人源化抗体对 PBMC 的激活作用**

利用人外周血淋巴细胞分离管 (达优) 密度梯度离心从 2 名健康捐献者外周血中分离外周血单个核细胞 (PBMC), 抗 CD3 抗体稀释 1/2000 加入细胞与 PDL1-1、1v8、1v18、KN035 分别加入 1 μ g、0.1 μ g、0.01 μ g、0 μ g, 每孔加 1E5 个 PBMC 细胞, 培养 5 天。利用 γ 干扰素检测试剂盒检测上清中 IFN- γ 的水平。

15 结果如图 23-图 24 所示, PDL1 单域抗体 PDL1-1 及人源化抗体 1v8、1v18 可以增强 PBMC 中 γ 干扰素的分泌, 即 PDL1 单域抗体增强了 PBMC 的活化, 同时这种激活具有剂量依赖性。

14.7 PDL1-1 人源化重链单域抗体增强效应细胞对靶细胞的杀伤作用

复苏 Raji-PDL1 3E5/mL 细胞, 每孔 50 μ L, NK92 细胞按效靶比 1: 10 加入 (效靶比杀伤实验如图), 抗体 10 μ g/mL, 过夜培养 20h, 混匀加入 CCK8 (爱必信), 37 $^{\circ}$ C 孵育 4h 结果, 检测 OD₄₅₀ 波长。

20 结果如图 25, PDL1-1 人源化重链单域抗体 1v8 对靶细胞的杀伤作用优于 KN035, 1v18 与 KN035 杀伤作用相当, 但是都优于未人源化的抗体 PDL1-1。

实施例 15

25 本实施例进行 PD-L1-1 重链单域抗体融合鼠源 IL-12。

15.1 PDL1-1 重链单域抗体融合鼠源 IL-12 的不同形式蛋白

30 构建 PD-L1-1 重链单域抗体与鼠源 IL-12 不同形式的融合蛋白, 分别将鼠源 P35/P40 与 PDL1-1 用(4GS)3 连接, 构建①-⑥种形式, 如表 21 所示, 并进行质粒提取, 质粒量按照 1: 1 共转染表达蛋白, 模拟融合蛋白形式如图 26, 融合 1-融合 4 为单个 PDL1-1 重链单域抗体与鼠源 IL-12 融合, 融合 5-融合 9 为 2 个 PDL1-1 重链单域抗体与鼠源 IL-12 融合。

表 21

融合蛋白	形式
融合 1	① pXC17.4-mP35-P1-8his ② pCDNA3.1-mP40

融合 2	③ pXC17.4-mP35-6his ④ pCDNA3.1-mP40-P1
融合 3	⑤ pXC17.4-P1- mP35-8his ② pCDNA3.1-mP40
融合 4	③ pXC17.4-mP35-6his ⑥ pCDNA3.1-P1-mP40
融合 5	① pXC17.4-P1-mP35-P1-8his ② pCDNA3.1-mP40
融合 6	③ pXC17.4- P1- P1-mP35-6his ④ pCDNA3.1-mP40
融合 7	⑤ pXC17.4 - mP35-P1-P1-8his ② pCDNA3.1-mP40
融合 8	① pXC17.4-mP35-P1-8his ⑥ pCDNA3.1-P1-mP40
融合 9	⑤ pXC17.4-P1- mP35-8his ⑥ pCDNA3.1-P1-mP40

利用非还原 (Non-Reduced)SDS-PAGE 凝胶电泳对融合蛋白进行鉴定, 结果如图 27 所示, 1: 融合 1, 2: 融合 2, 3: 融合 3, 4: 融合 4, 5: 融合 5, 6: 融合 6, 7: 融合 7, 8: 融合 8, 9: 融合 9, 10: 蛋白分子量标准。结果表明融合蛋白电泳位置符合预期, 条带清晰, 纯度较高, 未观察到断裂、降解条带。

5 15.2 PD-L1-1 重链单域抗体融合 IL-12 蛋白对 PD-L1 结合能力

人 PDL1-Fc 重组蛋白包被平板 200 ng/孔, 4°C 过夜, 随后将 15.1 获得的 PD-L1-1 人源化重链单域抗体融合 IL-12 蛋白从 50 µg/mL 起 3 倍连续稀释 12 个梯度, PDL1-1 重链单域抗体从 10 µg/mL 起 3 倍连续稀释 12 个梯度, 37°C 封闭 1h, 37°C 结合 1h, 洗涤后加入 HRP 标记的抗 his 标签抗体 (His Tag Antibody HRP, Sino Biological), 37°C 静置 45 min, 洗涤后加入 TMB 底物显色液, 1 M H₂SO₄ 终止反应。酶标仪测 450_{nm} 波长的光吸收值。Graphd Prism Software 5.0 进行数据处理和参数拟合, 计算 EC₅₀ 值。

结果如图 28-图 29, 表 22 和表 23 所示, Elisa 水平检测, 融合 2 与融合 4 蛋白的结合活性相对较低, 融合 7 和融合 9 蛋白的结合活性相对较高, 其他融合蛋白结合活性相当。

表 22

	融合 1	融合 2	融合 3	融合 4
EC ₅₀ (ug/ml)	0.373	4.104	0.2514	0.7497
EC ₅₀ (nmol/L)	4.93	54.29	3.33	9.91
		PDL1-1		
		EC ₅₀ (ug/ml)		0.04208
		EC ₅₀ (nmol/L)		3.48

15.3 forteBIOTM 系统测定 PD-L1-1 重链单域抗体融合 IL-12 蛋白与 PD-L1 亲和力变化

forteBIO™ Octet QK^c 生物大分子相互作用实时检测系统是基于生物膜层干涉技术 (BLI) 的八通道检测平台, 我们利用该平台高通量的特点, 比较分析不同突变体抗体分子与不同突变提抗原相互作用的动力学特征。具体方法如下:

1) 10 mM PBS + 0.05% Tween-20 缓冲液分别稀释 PDL1-Fc 亲本、融合蛋白至 100 nM,

按 200 μ L/孔加入检测用 96 孔板；

2) 执行 Loading > Baseline > Association > Disassociation 流程, 设置 Association 2 min, Disassociation 3 min, Baseline 与 Disassociation 过程均在 10 mM PBS + 0.05% Tween-20 缓冲液中, Loading 过程对应特定浓度的 PDL1-Fc 稀释液, Association 过程对应特定浓度的突变体稀释液；

3) Data Analysis 拟合分析结果, 得出不同融合蛋白的平衡解离常数 K_D 以比率 k_{dis}/k_{on} 计算。

结果如图 30-图 31, 表 24、表 25 所示, forteBIO 水平检测, 融合 9 对 PDL1 蛋白亲和力为 0.0589 nM, 解离速率 k_{dis} 最低, 融合 5-融合 8 相当; 融合 1、融合 2 平衡解离常数 K_D 较高, 融合 3、4 与 PDL1-1 平衡解离常数 K_D 相当。

表 24

		KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
A12	融合 1	1.35E-08	4.77E+05	6.46E-03
B12	融合 2	1.15E-08	6.39E+05	7.35E-03
C12	融合 3	4.05E-09	9.24E+05	3.75E-03
D12	融合 4	7.40E-09	6.47E+05	4.78E-03
E12	PDL1-1	3.39E-09	1.66E+06	5.63E-03

表 25

		KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
A12	融合 5	2.39E-10	6.31E+05	1.51E-04
B12	融合 6	1.31E-10	7.13E+05	9.36E-05
C12	融合 7	2.13E-10	7.48E+05	1.60E-04
D12	融合 8	1.58E-10	9.25E+05	1.46E-04
E12	融合 9	5.89E-11	9.69E+05	5.71E-05
F12	PDL1-1	2.96E-09	1.80E+06	5.32E-03

15.4 PD-L1-1 重链单域抗体融合 IL-12 蛋白对 NK-92 细胞的激活作用

分别取 100 μ L PD-L1-1 重链单域抗体融合 IL-12 蛋白及 WHO IL-12 标准品工作液, 加入 96 孔板已准备好的 NK-92 细胞中, 使其最终效价分别为 500.00 U/mL、166.67 U/mL、55.56 U/mL、18.52 U/mL、6.18 U/mL、2.06 U/mL、0.685 U/mL、0.23 U/mL, 每个浓度做 2 个复孔, 细胞终浓度为 1×10^5 cells/mL, 刺激细胞(24 \pm 2)小时, 1000 rpm 离心 96 孔板 5 分钟。用 ELISA Kit 中的标准稀释液 (1X Dilution buffer R) 稀释 60 倍, 吸取上清 5 μ L 加入 295 μ L 标准稀释液中; 用洗板机高速震荡 5 分钟。每孔加入 50 μ L 1X Biotinylated antibody, 用洗板机震荡 30s 混匀, 室温孵育 120 分钟。洗板后加入 100 μ L 1X Steptavidin-HRP, 室温孵育 20 分钟。洗板后加入 100 μ L TMB, 25 $^\circ$ C 避光孵育 18 分钟, 加入 100 μ L Stop solution 终止反应, 使用 SpectraMax M2 酶标仪检测 450_{nm} 处 OD 值, 用 GraphPad Prism6 软件处理数据, 以 OD 值为纵坐标, 以稀释倍数为横坐标, 用四参数进行拟合, 获得活性曲线、Top 值和 Bottom 值以及 R^2 值, R^2 值 ≥ 0.95 。

表 26

批号	样品效价 (10 ⁶ U/ml)	蛋白含量 (mg/ml)	摩尔浓度 (uM)	样品比活性 (10 ⁶ U/uM)	下降倍数
融合 1	1.185796384	1.245	16.46825397	0.072004985	0.2367967
融合 2	2.270666032	1.49	19.70899471	0.115209632	0.1479958
融合 3	4.62416746	0.4587	6.067460317	0.762125703	0.0223724
mIL-12	0.3054196	1.0658	17.91260504	0.017050541	1
R202112001	11.91817317	1			
融合 4	1.17833531	1.276	16.87830688	0.0698136	0.25009045
融合 5	5.003232601	0.596	6.711711712	0.745448079	0.0234218
融合 7	1.357483993	0.917	10.32657658	0.131455375	0.1328186
mIL-12	0.312748962	1.0658	17.91260504	0.017459714	1
R202112001	16.83726459	1			
融合 6	9.546284306	1.43	16.1036036	0.592804228	0.0227643
融合 8	0.374900535	1.03	11.5990991	0.032321522	0.4175158
融合 9	1.367544038	0.917	10.32657658	0.132429564	0.1019013
mIL-12	0.242678608	1.07	17.98319328	0.013494745	1
R202112001	14.89835083	1			
PDL1-1	/	0.9		/	/
R202112001	11.57800636	1			

由表 26 可知，同摩尔质量的条件下，鼠源 IL12 对 NK-92 细胞的激活作用为 1，融合蛋白对 NK-92 细胞的激活作用融合 4 下降 2.5 倍，其余融合蛋白都有不同程度的提高，融合蛋白中的纳米抗体 PDL1-1 对 NK92 无激活作用，由此可见，融合蛋白中鼠源 IL12 和重链单域抗体 PDL1-1 存在协同作用，促进对 NK92 激活作用。

15.5 PD-L1-1 重链单域抗体融合 IL-12 蛋白增强效应细胞对靶细胞的杀伤作用

铺板 MDAMB231 3E5/mL 细胞，每孔 50 μ L，NK 细胞按效靶比 1: 2.5 和 1: 5 加入，抗体 5 μ g/mL，过夜培养 20h，混匀加入 CCK8 (爱必信)，37 $^{\circ}$ C 孵育 4h 结果，检测 OD₄₅₀ 波长，计算杀伤率。

10 结果如图 32, PD-L1-1 重链单域抗体融合 IL-12 蛋白融合 4、融合 7 和融合 8 较鼠源 IL-12 均对靶细胞的杀伤作用更强，也优于 PD-L1-1 重链单域抗体，证明了融合蛋白中鼠源 IL12 和重链单域抗体 PDL1-1 的协同效果。

15 综上所述，本发明筛选制备得到抗 PD-L1 纳米抗体，所述抗 PD-L1 纳米抗体具备高亲和力和特异性，能够高效靶向 PD-L1，结构简单，易于制备，且能够进一步制备 PD-L1 结合分子和免疫偶联物等，在免疫检测、肿瘤治疗等领域具有广阔的应用前景。

20 申请人声明，本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法，但本发明并不局限于上述详细方法，即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本发明的任何改进，对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

权 利 要 求

1. 一种抗 PD-L1 纳米抗体，其特征在于，所述抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链的互补决定区选自下组中任意一种：

5 (1)氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

(2)氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

10 (3)氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

(4)氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

15 2. 根据权利要求 1 所述抗 PD-L1 纳米抗体，其特征在于，所述抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 13-SEQ ID NO: 16 所示序列或与其同源性至少为 80% 的序列中任意一种。

3. 一种 PD-L1 结合分子，所述 PD-L1 结合分子含有权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体或所述重链可变区 VHH。

4. 如权利要求 3 所述的 PD-L1 结合分子，其特征在于，所述 PD-L1 结合分子为单体、二聚体或多聚体。

20 5. 一种人源化抗体或其活性片段，所述人源化抗体由权利要求 1 或 2 所述的纳米抗体得到。

6. 如权利要求 5 所述的人源化抗体，其特征在于，所述人源化抗体具有 SEQ ID NO: 23-42 中任一项所示的氨基酸序列；优选具有 SEQ ID NO: 30、33、36、40、41 中任一项所示的氨基酸序列；更优选具有 SEQ ID NO: 30 或 40 所示的氨基酸序列。

25 7. 一种嵌合抗原受体 (CAR)，所述 CAR 含有一胞外结构域，所述胞外结构域包含如权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、或如权利要求 5 或 6 所述的人源化抗体。

8. 一种融合蛋白，所述融合蛋白具有：

(Z1) 第一蛋白，所述第一蛋白包括：如权利要求 1 或 2 所述的抗 PL-L1 纳米抗体、权利要求 3 或 4 所述的抗 PD-L1 结合分子、或权利要求 5 或 6 所述的人源化抗体或其活性片段；

30 (Z2) 第二蛋白，所述第二蛋白包括 Fc 片段或细胞因子；和

(Z3) 任选的位于所述第一蛋白和所述第二蛋白之间的接头。

9. 如权利要求 8 所述的融合蛋白，其特征在于，所述白介素为 IL-12；或者，所述 Fc 片段是人 IgG 的 Fc 片段。

35 10. 一种核酸分子，其特征在于，所述核酸分子含有权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、权利要求 3 或 4 所述 PD-L1 结合分子、权利要求 5 或 6 所述的人源化抗体或其活性片段、权利要求 7 所述的嵌合抗原受体或权利要求 8 或 9 所述的融合蛋白的编码核酸。

11. 一种重组表达载体，其特征在于，所述重组表达载体含有权利要求 10 所述的核酸分子。

12. 一种重组细胞，其特征在于，所述重组细胞含有权利要求 10 所述的核酸分子或权利要求 11 所述的重组表达载体。

5 13. 一种制备权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的方法，其特征在于，所述方法包括：

将编码权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的基因插入表达载体，得到重组载体，将所述重组载体导入宿主细胞进行培养，从培养物中分离获取所述抗 PD-L1 纳米抗体。

10 14. 权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体在靶向结合 PD-L1 中的应用。

15. 权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、权利要求 3 或 4 所述 PD-L1 结合分子、权利要求 5 或 6 所述的人源化抗体或其活性片段、权利要求 7 所述的嵌合抗原受体、权利要求 8 或 9 所述的融合蛋白、权利要求 10 所述的核酸分子、权利要求 11 所述的重组表达载体或权利要求 12 所述的重组细胞在制备靶向治疗肿瘤的药物中的应用；

15 优选地，所述肿瘤包括表达 PD-L1 的肿瘤；

优选地，所述表达 PD-L1 的肿瘤包括胃癌、肺癌、肝癌、骨肉瘤、乳腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、卵巢癌、食道癌、膀胱癌、黑色素瘤或默克尔细胞癌中任意一种。

20 16. 一种免疫偶联物，其特征在于，所述免疫偶联物含有权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、权利要求 3 或 4 所述 PD-L1 结合分子、权利要求 5 或 6 所述的人源化抗体或其活性片段、权利要求 7 所述的嵌合抗原受体、权利要求 8 或 9 所述的融合蛋白和偶联部分；

所述偶联部分选自蛋白、小分子化合物、荧光素、放射性同位素、造影剂或脂肪酸中任意一种或至少两种的组合。

25 17. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、权利要求 3 或 4 所述 PD-L1 结合分子、权利要求 5 或 6 所述的人源化抗体或其活性片段、权利要求 7 所述的嵌合抗原受体、权利要求 8 或 9 所述的融合蛋白、权利要求 10 所述的核酸分子、权利要求 11 所述的重组表达载体、权利要求 12 所述的重组细胞或权利要求 16 所述的免疫偶联物中任意一种或至少两种的组合。

30 18. 一种工程化免疫细胞，所述工程化免疫细胞含有权利要求 11 所述的重组表达载体或其基因组中整合有外源的如权利要求 10 所述的核酸分子，或表达如权利要求 7 所述的嵌合抗原受体。

19. 一种试剂盒，所述试剂盒中包括：

35 (1) 第一容器，所述第一容器中含有权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、权利要求 3 或 4 所述 PD-L1 结合分子、权利要求 5 或 6 所述的人源化抗体或其活性片段、权利要求 7 所述的嵌合抗原受体、权利要求 8 或 9 所述的融合蛋白、权利要求 12 所述的重组细胞或权利要求 16 所述的免疫偶联物或它们的组合；和/或

(2) 第二容器，所述第二容器中含有抗所述第一容器内容物的二抗；
或者，

所述试剂盒含有一检测板，所述检测板包括：基片(支撑板)和测试条，所述的测试条含有权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、权利要求 3 或 4 所述 PD-L1 结合分子、权利要求 5 或 6 所述的人源化抗体或其活性片段、权利要求 7 所述的嵌合抗原受体、权利要求 8 或 9 所述的融合蛋白、权利要求 12 所述的重组细胞或权利要求 16 所述的免疫偶联物或它们的组合。

20. 一种预防和/或治疗 PD-L1 相关疾病的方法，所述方法包括：给需要的对象施用权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、权利要求 3 或 4 所述 PD-L1 结合分子、权利要求 5 或 6 所述的人源化抗体或其活性片段、权利要求 7 所述的嵌合抗原受体、权利要求 8 或 9 所述的融合蛋白、权利要求 16 所述的免疫偶联物、权利要求 17 所述的药物组合物、权利要求 18 所述的工程化免疫细胞，或它们的组合。

21. 一种 PD-L1 相关疾病的诊断方法，包括步骤：

(i) 从诊断对象获取一样品，将所述的样品与权利要求 1 或 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、权利要求 3 或 4 所述 PD-L1 结合分子、权利要求 5 或 6 所述的人源化抗体或其活性片段、权利要求 16 所述的免疫偶联物、或它们组合接触；和

(ii) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示所述的对象为 PD-L1 相关疾病的确诊患者。

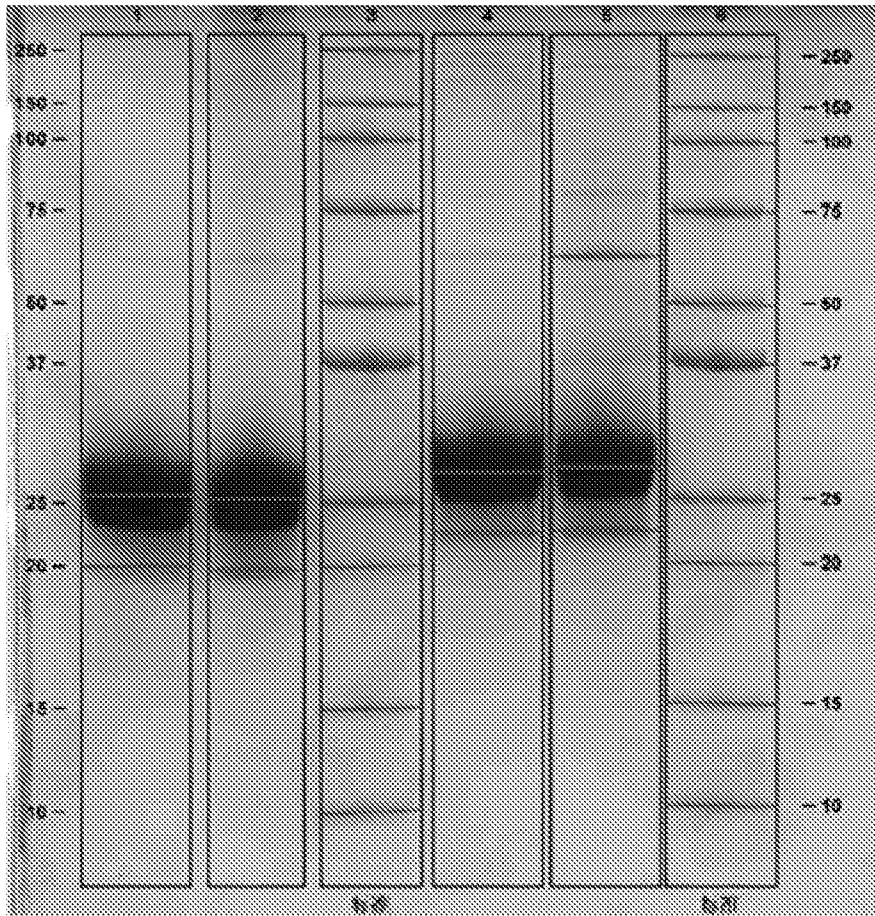


图 1

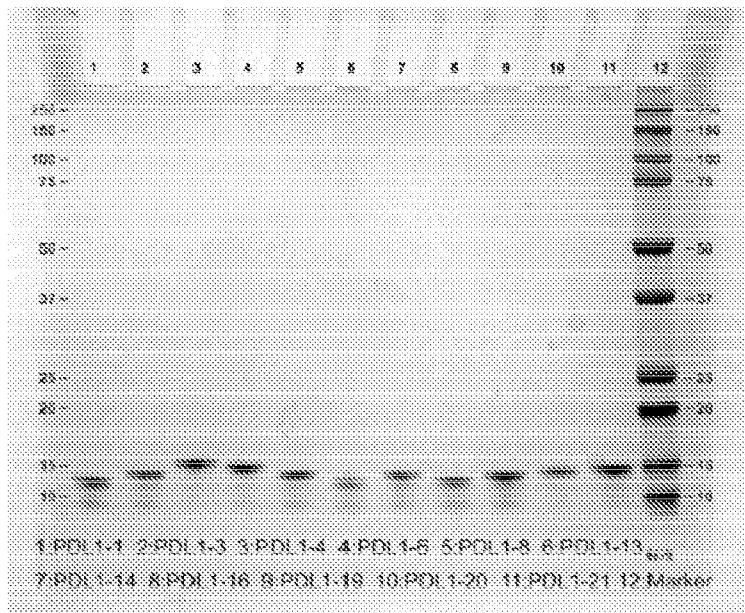


图 2

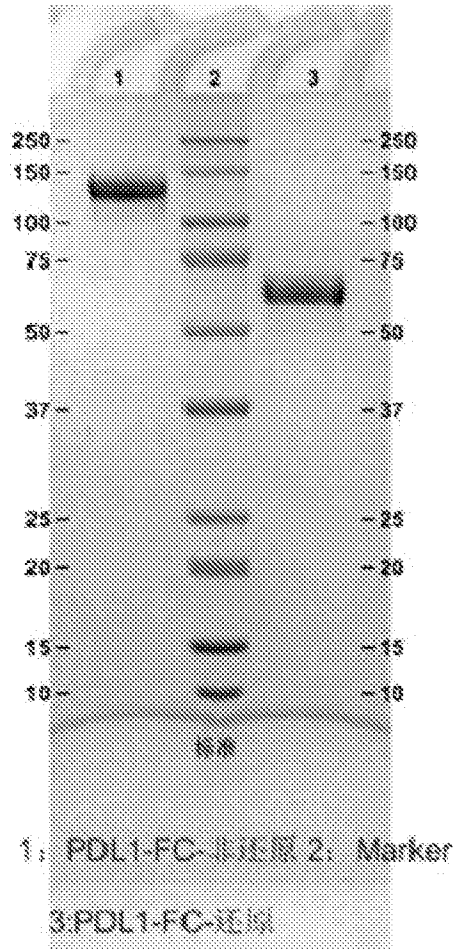


图 3

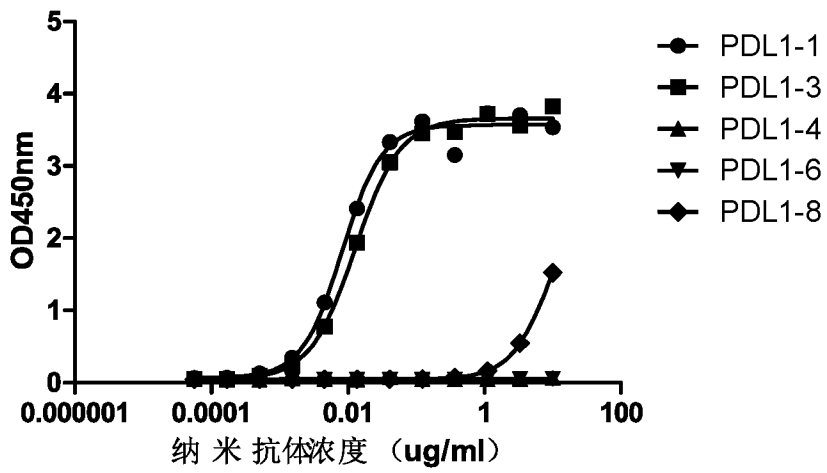


图 4

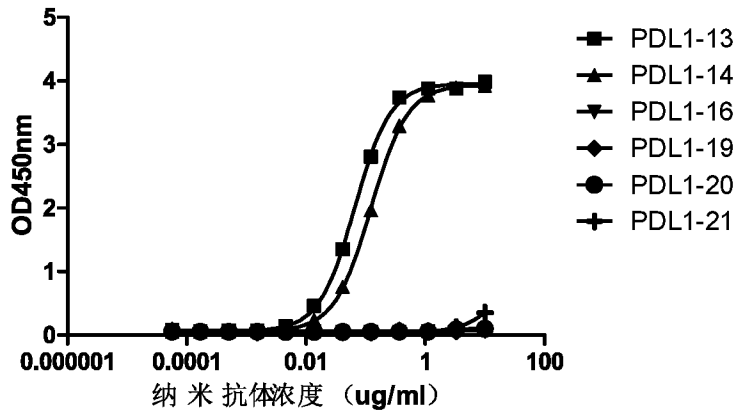


图 5

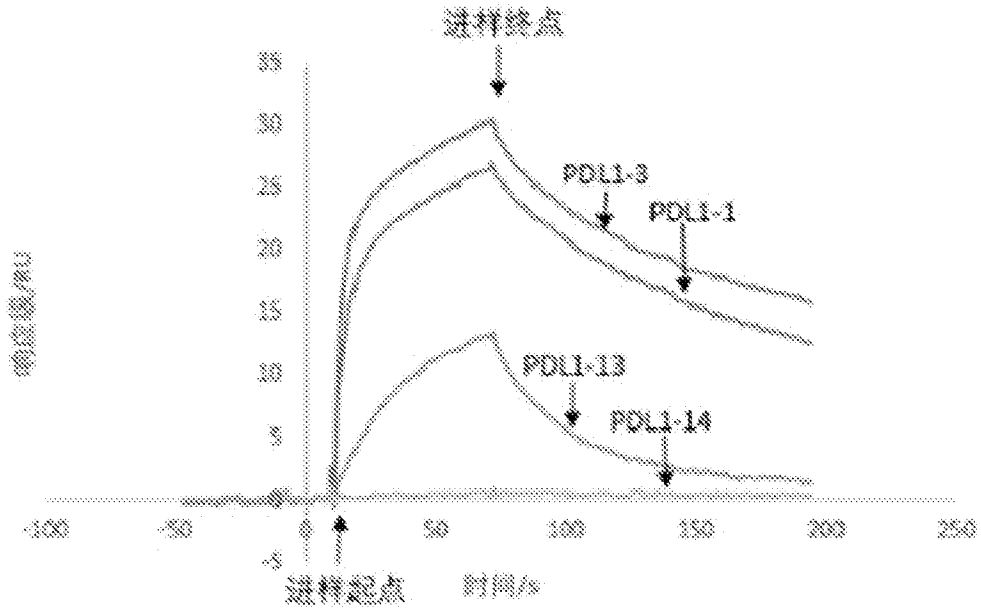


图 6

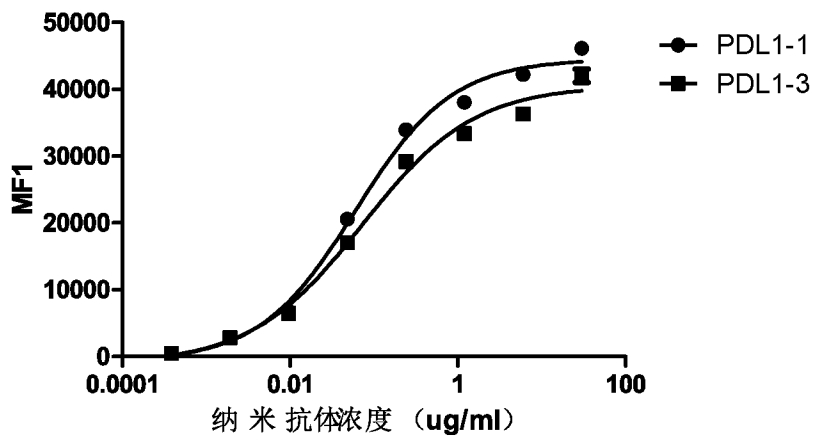


图 7

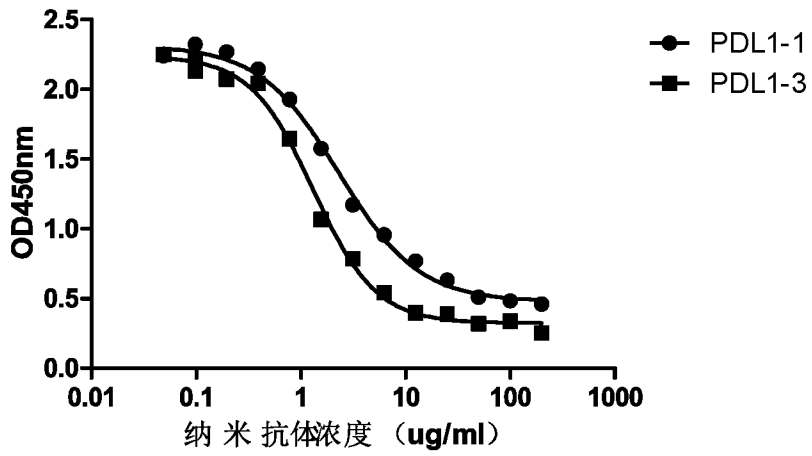


图 8

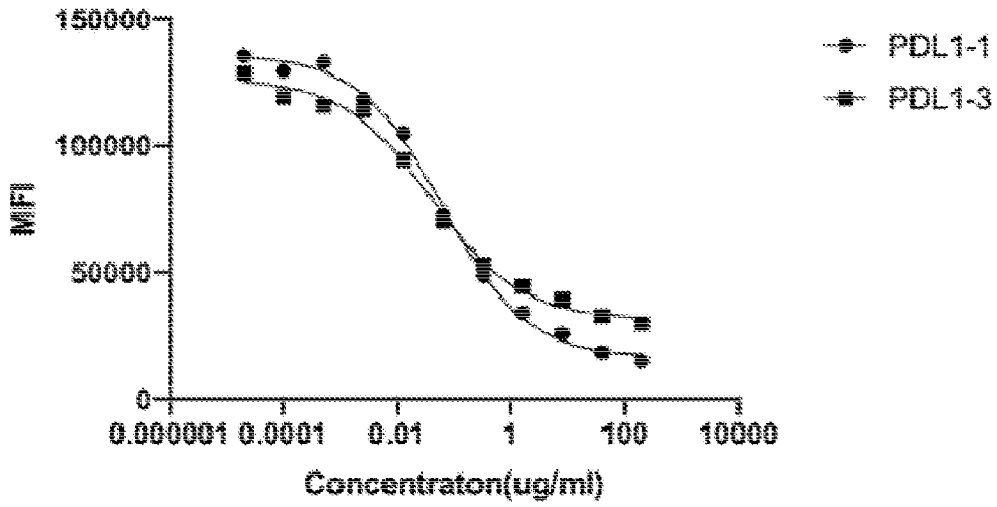


图 9

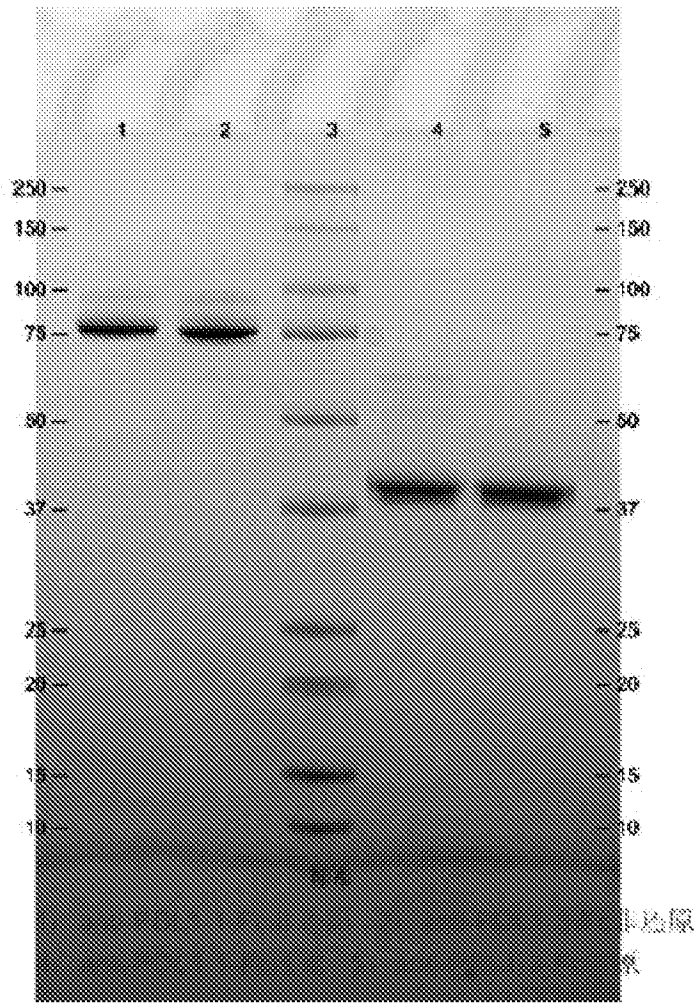


图 10

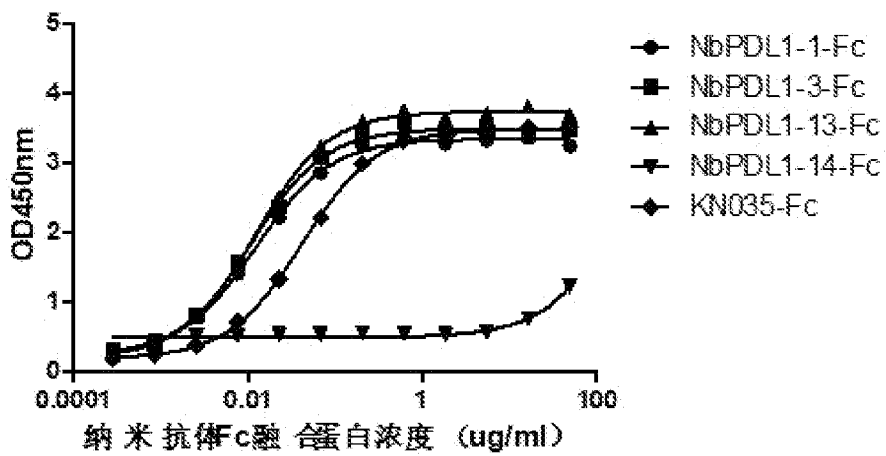


图 11

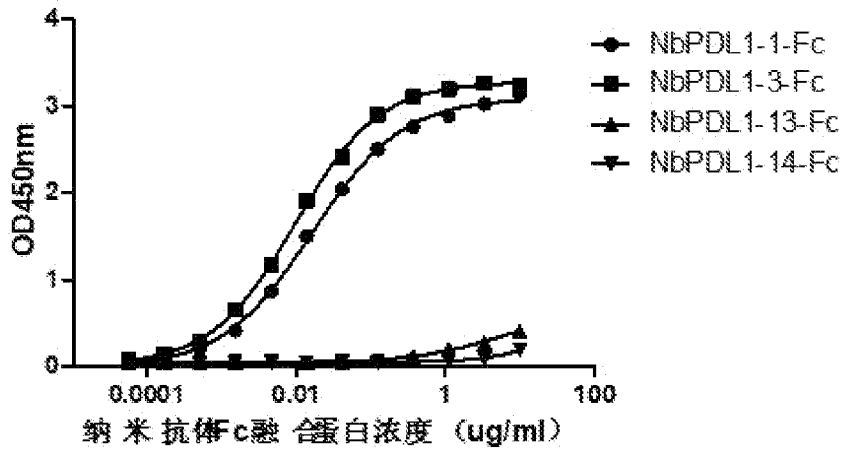


图 12

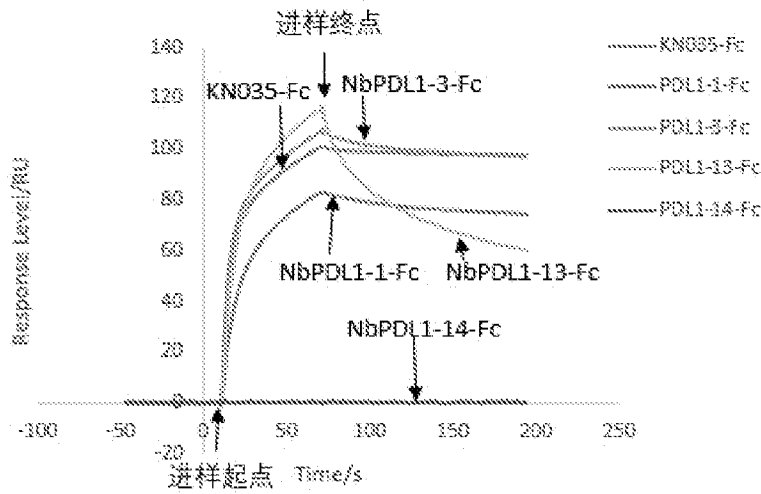


图 13

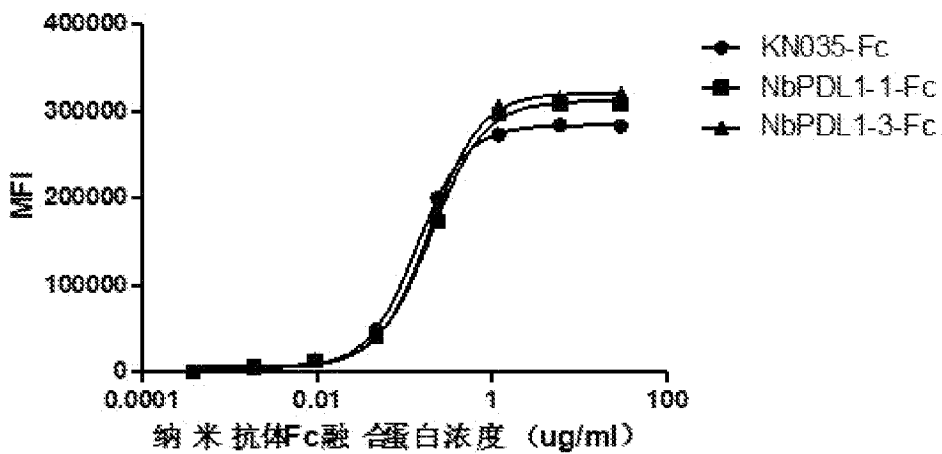


图 14

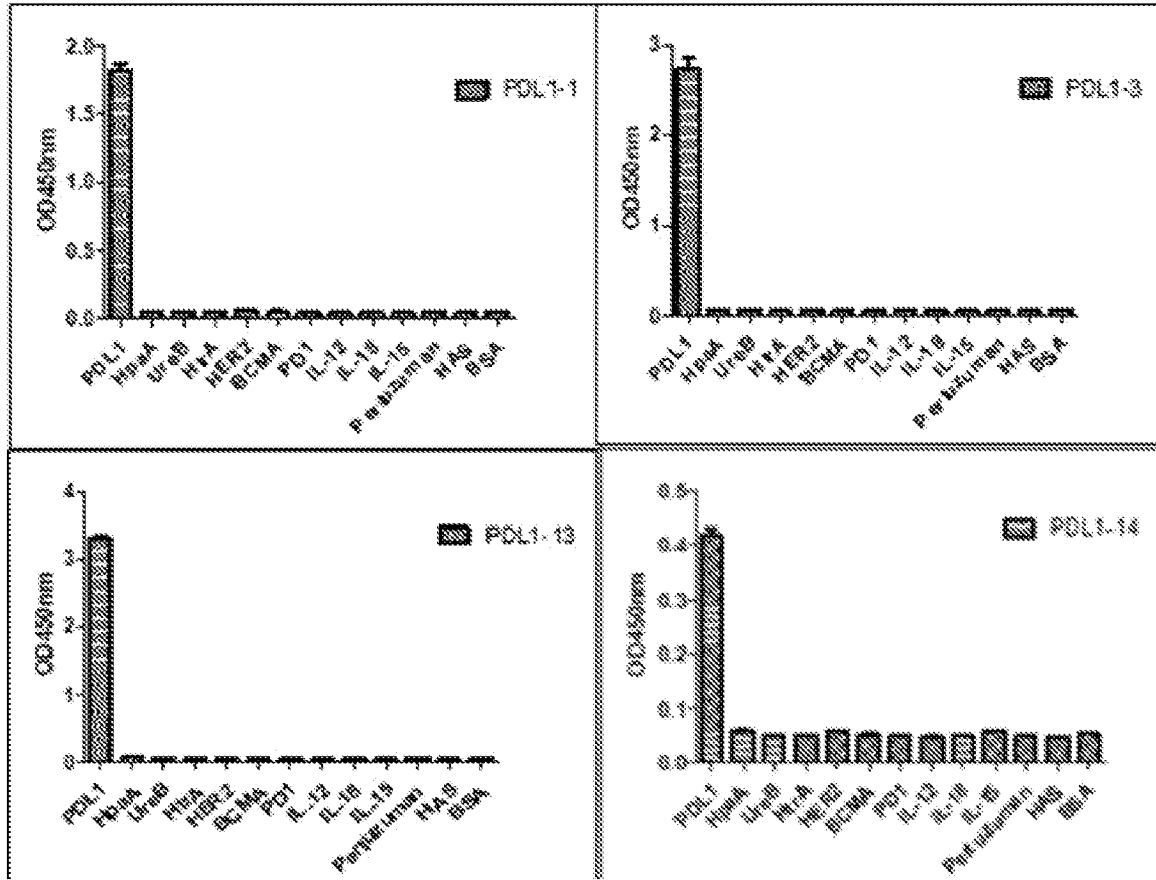


图 15

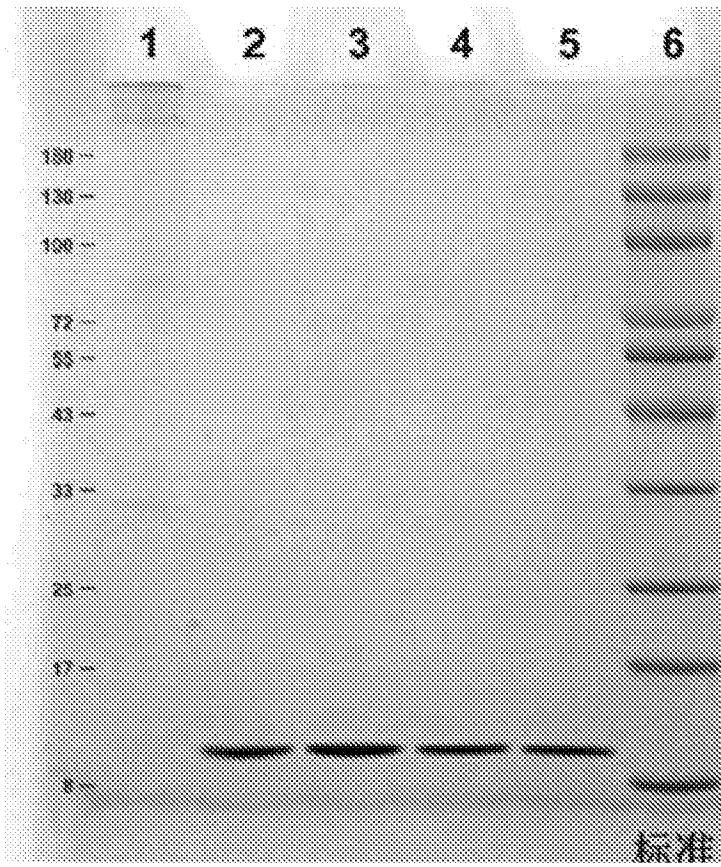


图 16A

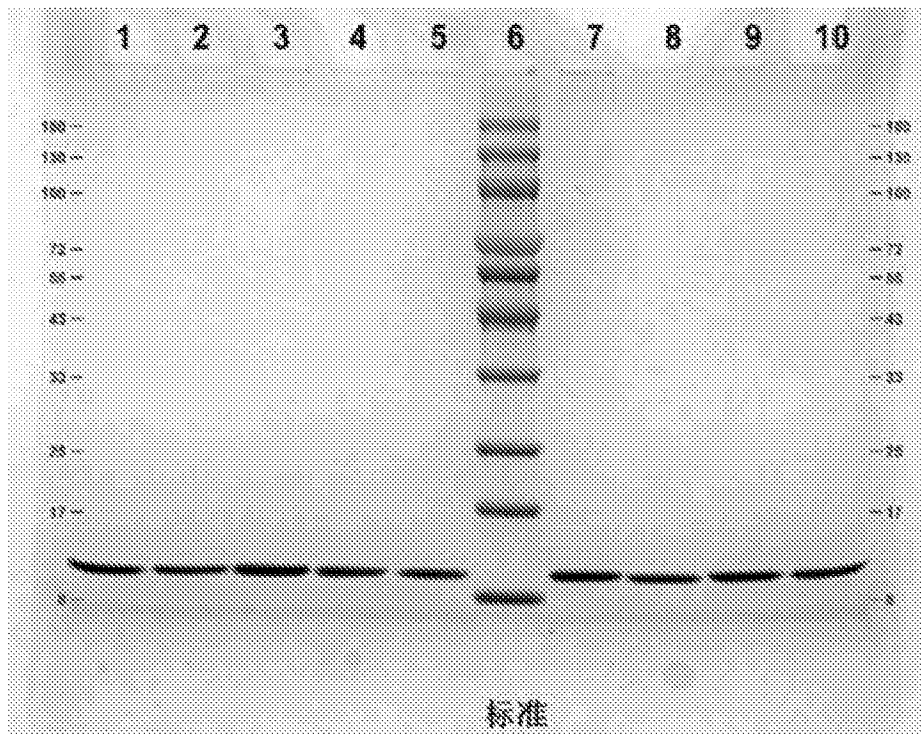


图 16B

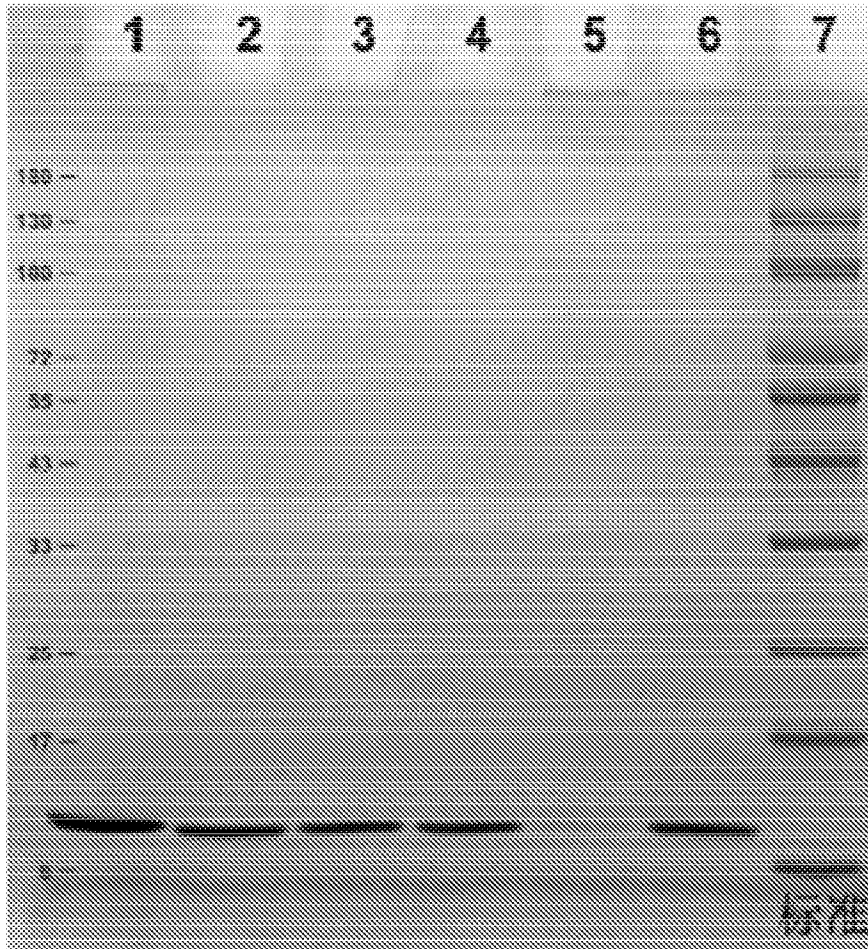


图 16C

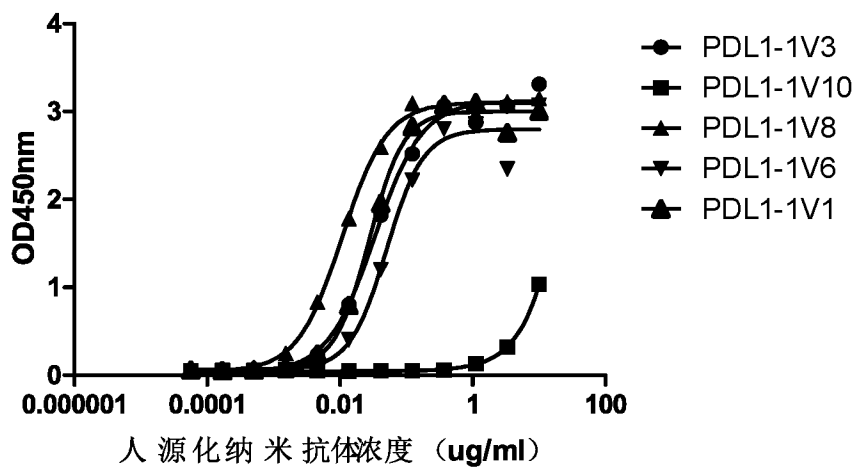


图 17

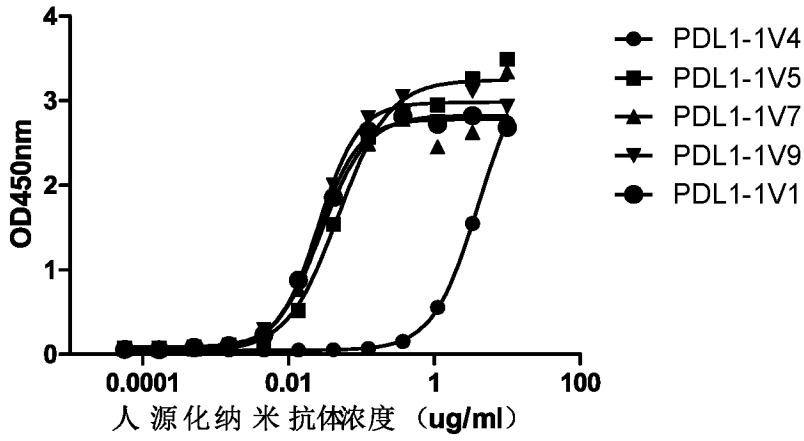


图 18

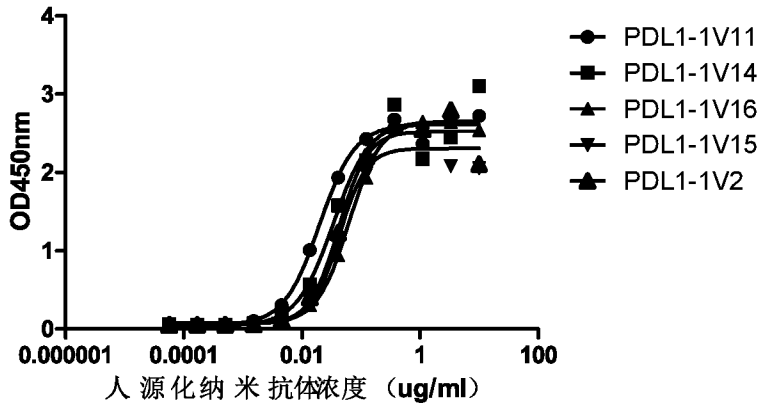


图 19

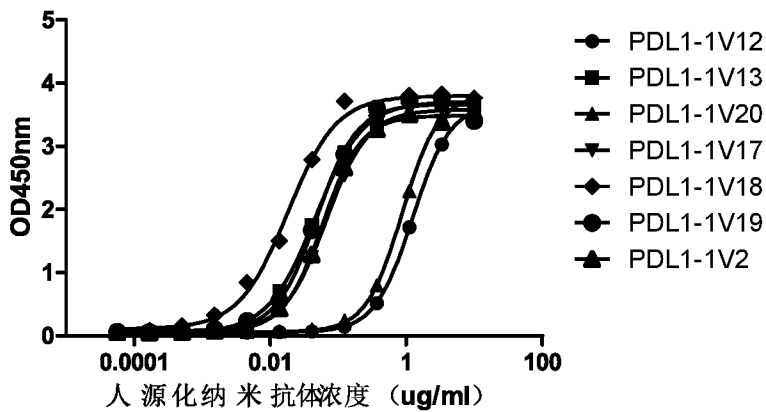


图 20

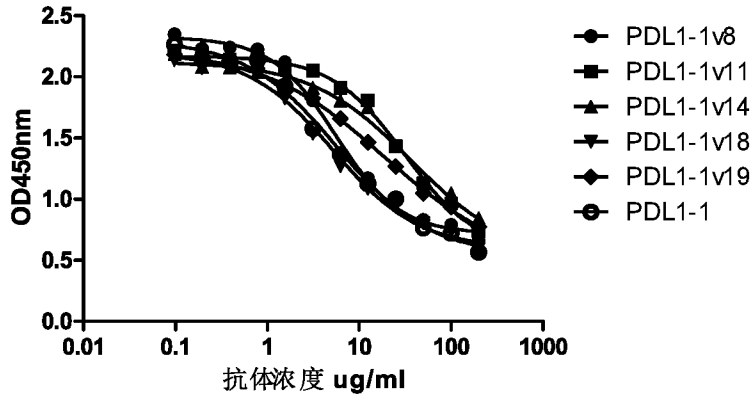


图 21

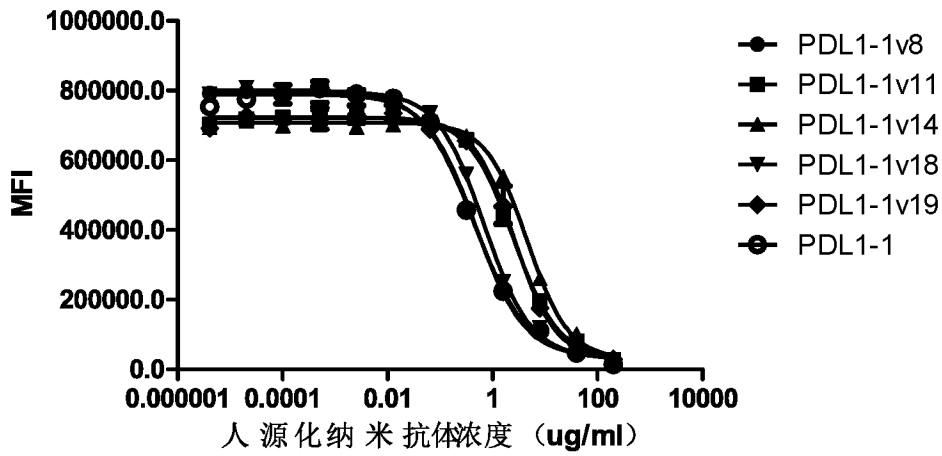


图 22

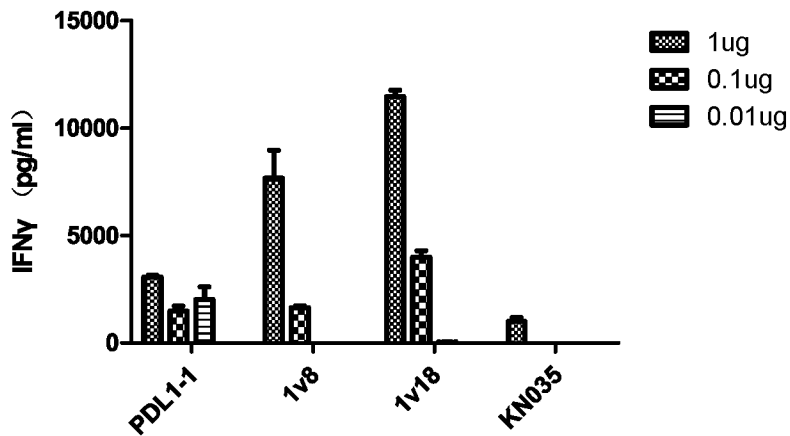


图 23

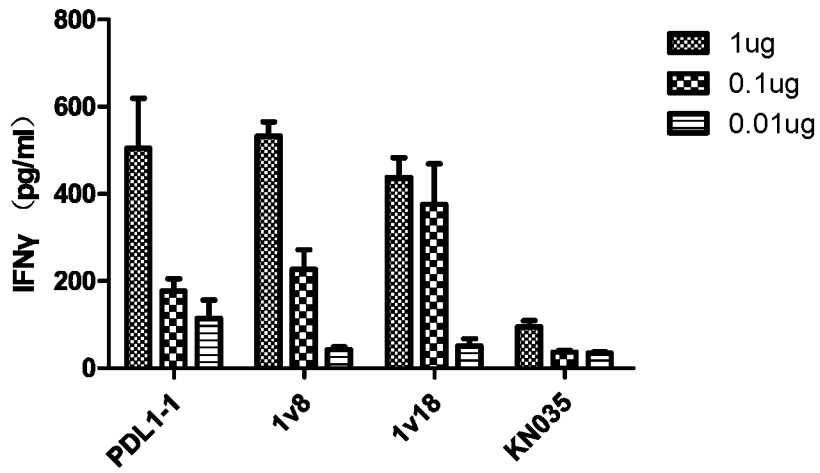


图 24

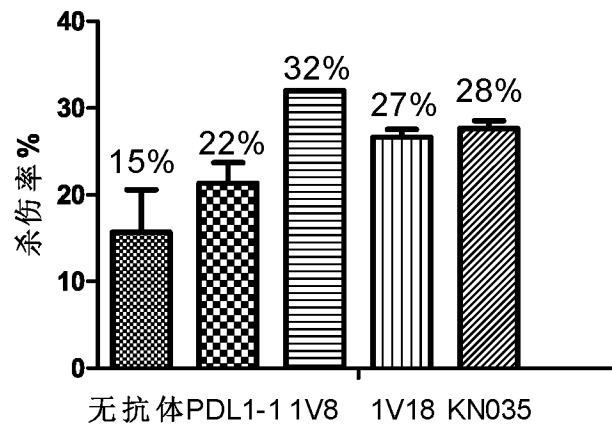


图 25

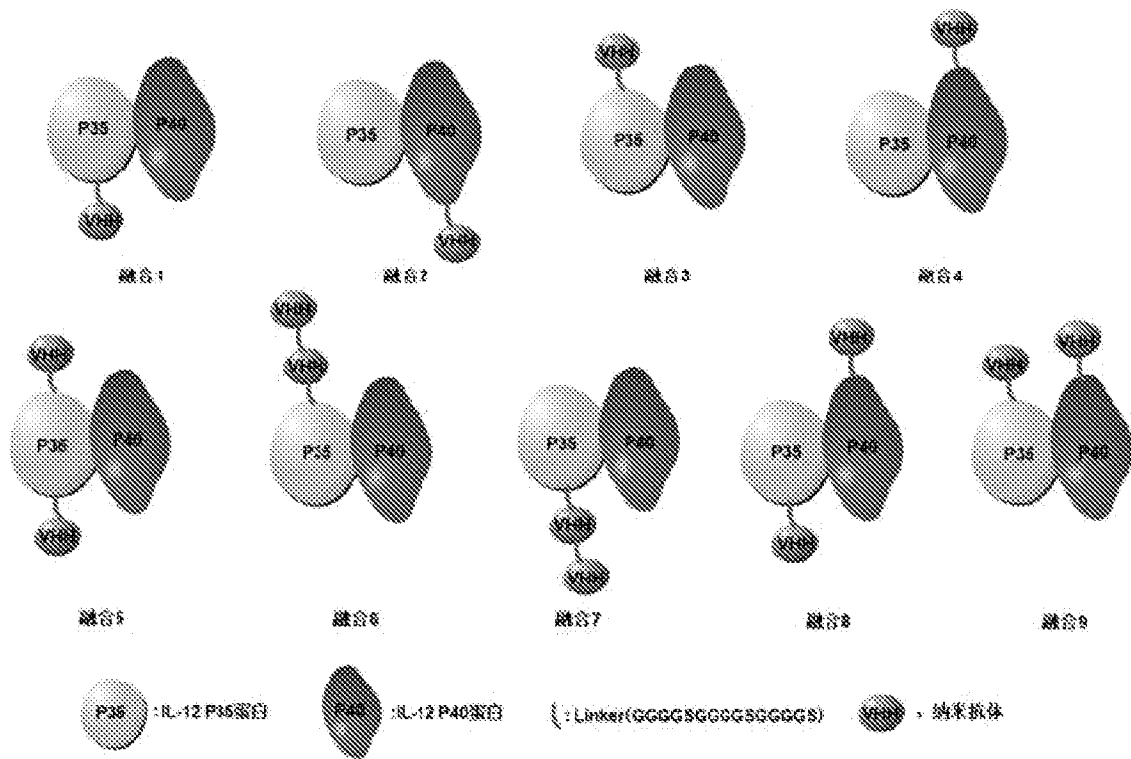


图 26

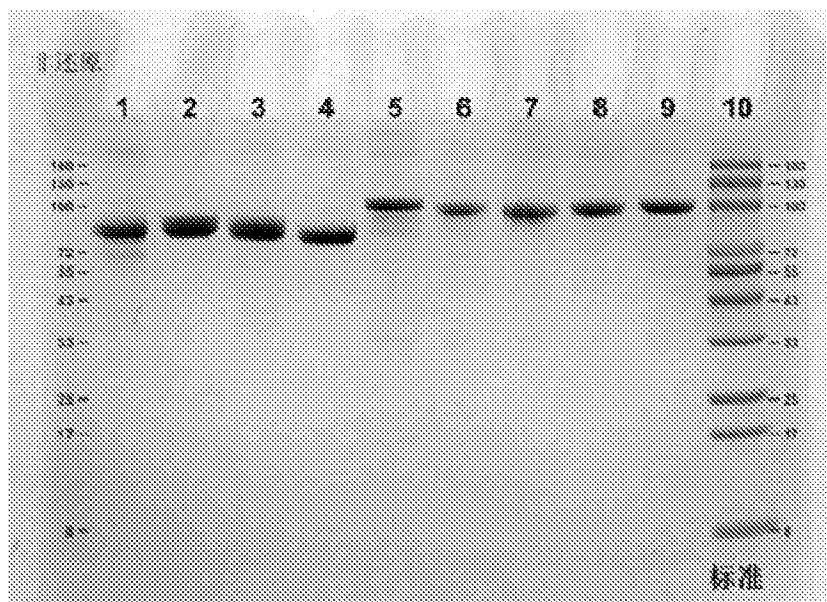


图 27

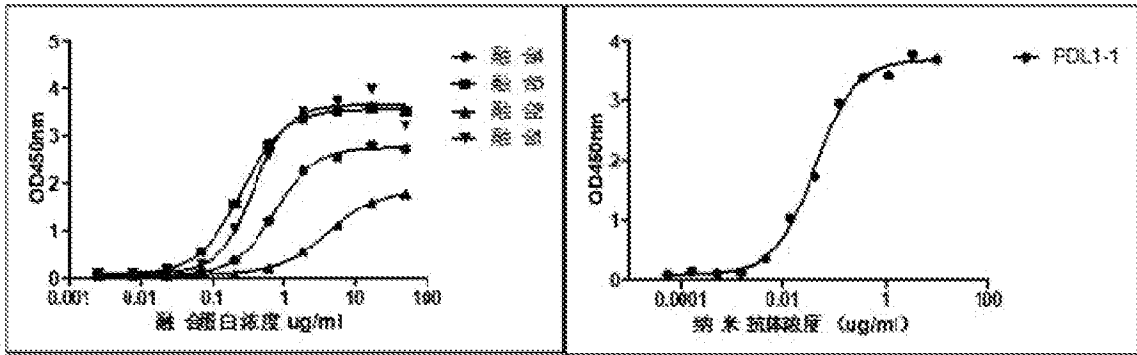


图 28

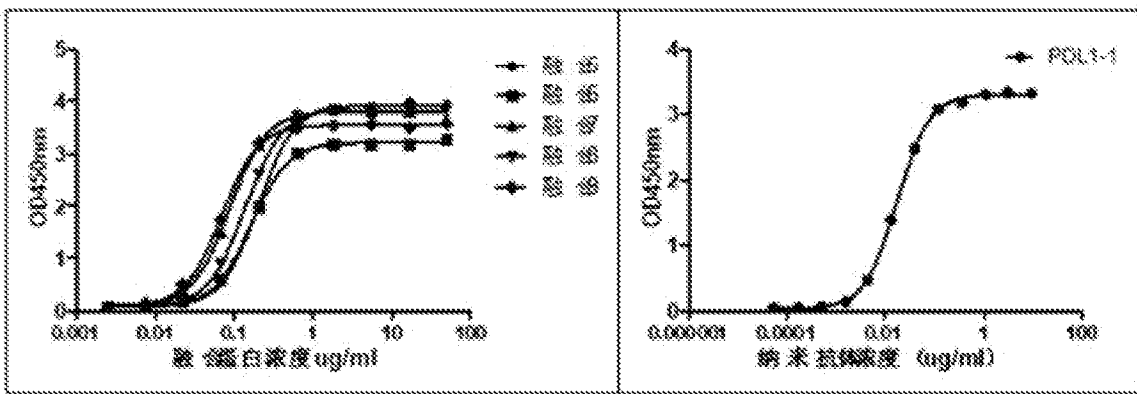


图 29

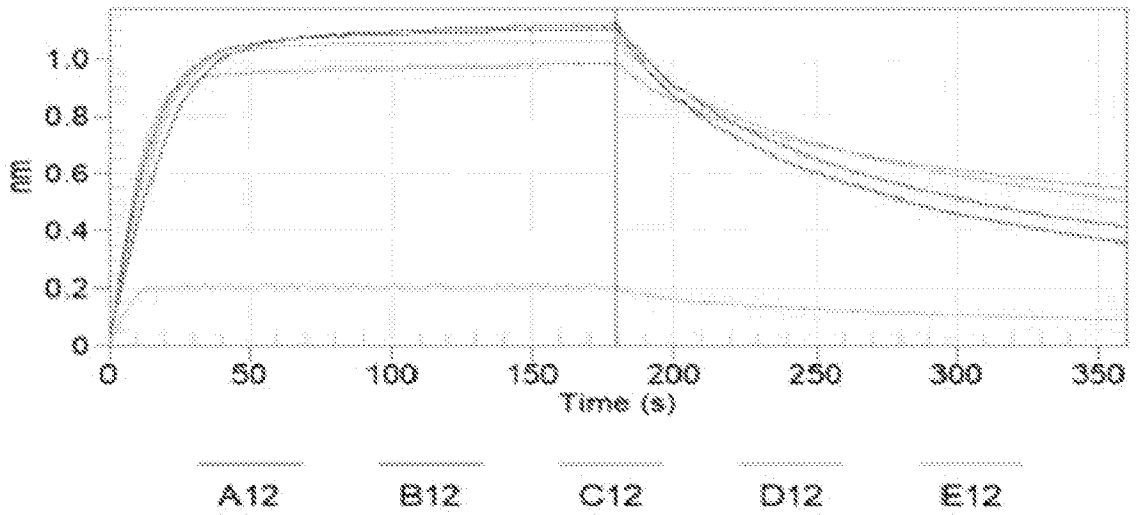


图 30

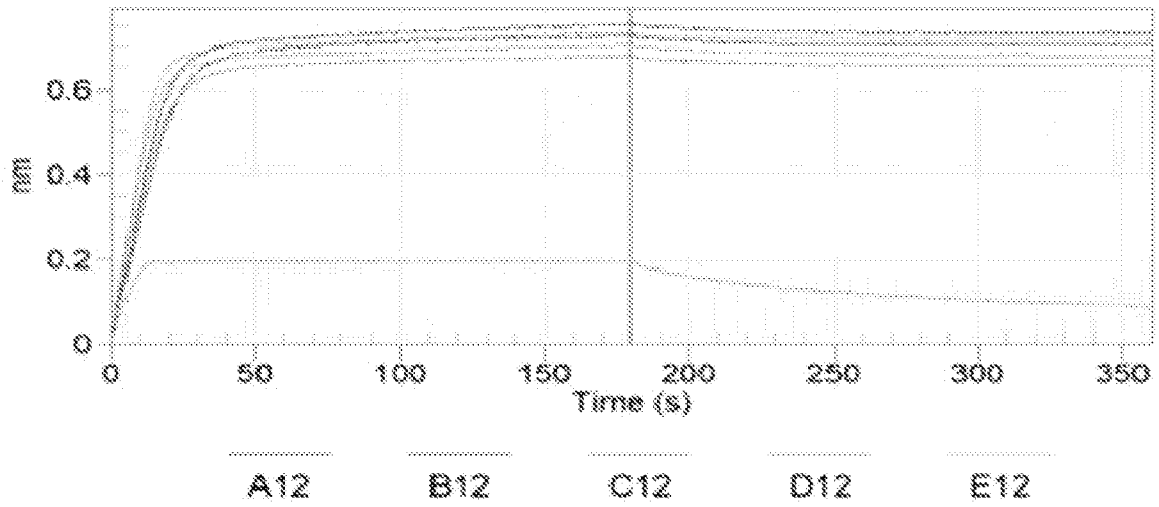


图 31

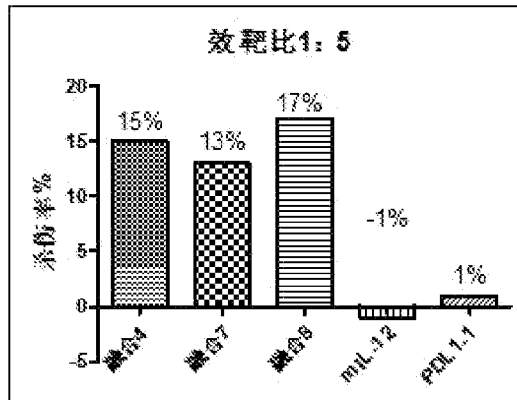


图 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/088960

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K16/28(2006.01)i; A61P37/02(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; C12N15/13(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) IPC: C07K, A61P, A61K, C12N		
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) CNTXT, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, 万方数据, WANFANG DATA, Web of Science, 百度学术, Baidu Scholar, HimmPat, incoPat, 读秀, DUXIU, 中国生物序列检索系统, China Biological Sequence Search System, NCBI, EBI, STNext: 申请人, 发明人, Applicants, Inventors, PD-L1, 纳米抗体, 单域抗体, 重链抗体, CAR, 嵌合抗原受体, 融合蛋白, IL-12, Fc, 偶联, ADC, nanobody, single domain antibody, heavy chain antibody, chimeric antigen receptor, rusion protein, coupl+, 序列 1-16, 23-42, sequences 1-16 and 23-42		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021031716 A1 (ZHEJIANG DOER BIOLOGICS CORP.) 25 February 2021 (2021-02-25) description, paragraphs 5-26 and 32-38	1-21
A	WO 2023011654 A1 (QURE BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 09 February 2023 (2023-02-09) description, paragraphs 7-22	1-21
A	CN 112142842 A (QURE BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 29 December 2020 (2020-12-29) description, paragraphs 18-33	1-21
A	CN 112409483 A (ZHEJIANG DOER BIOLOGICS CORPORATION) 26 February 2021 (2021-02-26) description, paragraphs 5-29	1-21
<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>“D” document cited by the applicant in the international application</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 03 July 2024		Date of mailing of the international search report 08 July 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022105832 A1 (QURE BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 27 May 2022 (2022-05-27) description, paragraphs 8-20 and 35-36	1-21
A	US 2022372150 A1 (ZHEJIANG DOER BIOLOGICS CO., LTD.) 24 November 2022 (2022-11-24) description, paragraphs 6-17, 26 and 34-37	1-21
A	SUN, X. et al. "PD-L1 Nanobody Competitively Inhibits the Formation of the PD-1/PD-L1 Complex: Comparative Molecular Dynamics Simulations" <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , Vol. 19, No. (7), 07 July 2018 (2018-07-07), article no. 1984 abstract, and sections 2.1 and 2.2	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/088960

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.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
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.: **20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 20 sets forth a method for preventing and/or treating PD-L1-related diseases. The method is a method for treating diseases, and therefore said claim does not comply with PCT Rule 39.1(iv). However, this search is made on the basis that the subject matter is amended to be a pharmaceutical use.
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/CN2024/088960

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021031716	A1	25 February 2021	US	2022372150	A1	24 November 2022
				JP	2022545117	A	25 October 2022
				JP	7373650	B2	02 November 2023
				AU	2020332969	A1	07 April 2022
				AU	2020332969	B2	19 October 2023
				EP	4019550	A1	29 June 2022
				EP	4019550	A4	13 September 2023

WO	2023011654	A1	09 February 2023	None			

CN	112142842	A	29 December 2020	None			

CN	112409483	A	26 February 2021	None			

WO	2022105832	A1	27 May 2022	None			

US	2022372150	A1	24 November 2022	JP	2022545117	A	25 October 2022
				JP	7373650	B2	02 November 2023
				WO	2021031716	A1	25 February 2021
				AU	2020332969	A1	07 April 2022
				AU	2020332969	B2	19 October 2023
				EP	4019550	A1	29 June 2022
				EP	4019550	A4	13 September 2023

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K16/28(2006.01)i; A61P37/02(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: C07K, A61P, A61K, C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNXTX, WPABSC, WPABS, ENTXTC, ENTXT, DPWI, VEN, CNKI, 万方数据, Web of Science, 百度学术, HimmPat, incoPat, 读秀, 中国生物序列检索系统, NCBI, EBI, STNext; 申请人, 发明人, Applicants, Inventors, PD-L1, 纳米抗体, 单域抗体, 重链抗体, CAR, 嵌合抗原受体, 融合蛋白, IL-12, Fc, 偶联, ADC, nanobody, single domain antibody, heavy chain antibody, chimeric antigen receptor, rusion protein, coupl+, 序列1-16、23-42</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2021031716 A1 (ZHEJIANG DOER BIOLOGICS CORP.) 2021年2月25日 (2021 - 02 - 25) 说明书第5-26、32-38段</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2023011654 A1 (QURE BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 2023年2月9日 (2023 - 02 - 09) 说明书第7-22段</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112142842 A (启愈生物技术(上海)有限公司) 2020年12月29日 (2020 - 12 - 29) 说明书第18-33段</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112409483 A (浙江道尔生物科技有限公司) 2021年2月26日 (2021 - 02 - 26) 说明书第5-29段</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2022105832 A1 (QURE BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 说明书第8-20、35-36段</td> <td>1-21</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “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</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	WO 2021031716 A1 (ZHEJIANG DOER BIOLOGICS CORP.) 2021年2月25日 (2021 - 02 - 25) 说明书第5-26、32-38段	1-21	A	WO 2023011654 A1 (QURE BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 2023年2月9日 (2023 - 02 - 09) 说明书第7-22段	1-21	A	CN 112142842 A (启愈生物技术(上海)有限公司) 2020年12月29日 (2020 - 12 - 29) 说明书第18-33段	1-21	A	CN 112409483 A (浙江道尔生物科技有限公司) 2021年2月26日 (2021 - 02 - 26) 说明书第5-29段	1-21	A	WO 2022105832 A1 (QURE BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 说明书第8-20、35-36段	1-21
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	WO 2021031716 A1 (ZHEJIANG DOER BIOLOGICS CORP.) 2021年2月25日 (2021 - 02 - 25) 说明书第5-26、32-38段	1-21																		
A	WO 2023011654 A1 (QURE BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 2023年2月9日 (2023 - 02 - 09) 说明书第7-22段	1-21																		
A	CN 112142842 A (启愈生物技术(上海)有限公司) 2020年12月29日 (2020 - 12 - 29) 说明书第18-33段	1-21																		
A	CN 112409483 A (浙江道尔生物科技有限公司) 2021年2月26日 (2021 - 02 - 26) 说明书第5-29段	1-21																		
A	WO 2022105832 A1 (QURE BIOTECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 说明书第8-20、35-36段	1-21																		
国际检索实际完成的日期	2024年7月3日	国际检索报告邮寄日期	2024年7月8日																	
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	授权官员	刘春杰 电话号码 (+86) 010-53961934																	

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2022372150 A1 (ZHEJIANG DOER BIOLOGICS CO., LTD.) 2022年11月24日 (2022 - 11 - 24) 说明书第6-17、26、34-37段	1-21
A	SUN, X.等. "PD-L1 Nanobody Competitively Inhibits the Formation of the PD-1/PD-L1 Complex: Comparative Molecular Dynamics Simulations" INT. J. MOL. SCI., 第19卷, 第7期, 2018年7月7日 (2018 - 07 - 07), 第1984篇 摘要, 第2.1、2.2节	1-21

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
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：20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求20要求保护一种预防和/或治疗PD-L1相关疾病的方法，该方法为疾病的治疗方法，因此不符合PCT细则39.1(iv)的规定。但是，本次检索基于上述主题修改为制药用途而作出。
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/CN2024/088960

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)
WO	2021031716	A1	2021年2月25日	US	2022372150	A1	2022年11月24日
				JP	2022545117	A	2022年10月25日
				JP	7373650	B2	2023年11月2日
				AU	2020332969	A1	2022年4月7日
				AU	2020332969	B2	2023年10月19日
				EP	4019550	A1	2022年6月29日
				EP	4019550	A4	2023年9月13日

WO	2023011654	A1	2023年2月9日	无			

CN	112142842	A	2020年12月29日	无			

CN	112409483	A	2021年2月26日	无			

WO	2022105832	A1	2022年5月27日	无			

US	2022372150	A1	2022年11月24日	JP	2022545117	A	2022年10月25日
				JP	7373650	B2	2023年11月2日
				WO	2021031716	A1	2021年2月25日
				AU	2020332969	A1	2022年4月7日
				AU	2020332969	B2	2023年10月19日
				EP	4019550	A1	2022年6月29日
				EP	4019550	A4	2023年9月13日
