

(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
2018年12月27日(27.12.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/233574 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/13 (2006.01) A61K 51/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/091639

(22) 国际申请日: 2018年6月15日(15.06.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710471317.7 2017年6月20日(20.06.2017) CN

(71) 申请人: 华兰生物工程股份有限公司(HUALAN BIOLOGICAL ENGINEERING INC.) [CN/CN]; 中国河南省新乡市华兰大道甲1号, Henan 453003 (CN)。 华兰基因工程有限公司(HUALAN GENETIC ENGINEERING CO., LTD.) [CN/CN]; 中国河南省新乡市平原示范区黄河路甲1-1号, Henan 453500 (CN)。

(72) 发明人: 安康(AN, Kang); 中国河南省新乡市华兰大道甲1号, Henan 453003 (CN)。 安文琪(AN, Wenqi); 中国河南省新乡市华兰大道甲1号, Henan 453003 (CN)。 范蓓(FAN, Bei); 中国河南省新乡市华兰大道甲1号, Henan 453003 (CN)。 马小伟(MA, Xiaowei); 中国河南省新乡市华兰大道甲1号, Henan 453003 (CN)。 潘若文(PAN, Ruowen); 中国河南省新乡市华兰大道甲1号, Henan 453003 (CN)。 张宝献(ZHANG, Baoxian); 中国河南省新乡市华兰大道甲1号, Henan 453003 (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

(54) Title: ANTI-PD-L1 HUMANIZED NANOBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种抗PD-L1人源化纳米抗体及其应用

(57) Abstract: Provided are an anti-PD-L1 humanized nanobody and the use thereof. In particular, provided is a nanobody of an anti-protein programmed death ligand 1 (PD-L1). The anti-PD-L1 nanobody can effectively block the binding of PD-L1 to a programmed death molecule 1 (PD-1), and can thus successfully block the inhibitory effect of PD-L1 on T cells expressing PD-1. The PD-L1 nanobody can be applied to the prevention, diagnosis and treatment of PD-L1-related diseases. Further provided is a humanized PD-L1 nanobody sequence. The humanized nanobody still has the function of blocking the binding of PD-L1 to PD-1, and has high affinity and high specificity, and can be used as an antibody drug for a tumor immunity target site.

(57) 摘要: 提供了一种抗PD-L1人源化纳米抗体及其应用。具体地, 提供了一种抗蛋白程序性死亡配体1(PD-L1)的纳米抗体。该抗PD-L1纳米抗体能有效阻断PD-L1与程序性死亡分子1(PD-1)的结合, 因此可成功阻断PD-L1对表达PD-1的T细胞的抑制作用。该PD-L1纳米抗体可应用于PD-L1相关疾病的预防、诊断、治疗。进一步还提供了人源化的PD-L1纳米抗体序列, 人源化后的纳米抗体仍具有阻断PD-L1与PD-1结合的功能, 并具有高亲和力及高特异性, 可作为肿瘤免疫靶点抗体药物。

WO 2018/233574 A1

一种抗 PD-L1 人源化纳米抗体及其应用

技术领域

5 本发明涉及生物学或生物制药技术领域，更具体地涉及抗 PD-L1 纳米抗体及其应用。

背景技术

10 细胞介导的细胞免疫应答是抗肿瘤免疫的基础，T 细胞的活化和增殖需要双重信号。即除了需要 T 细胞受体(TCR)与表达在抗原递呈细胞(APCs)表面的 MHC-抗原肽复合物结合产生的第一信号外；还需要多种协同刺激分子参与提供的第二信号(协同刺激信号)。

15 免疫应答初始阶段，T 细胞在 TCR 提供的第一信号及协同刺激信号的共同作用下，达到其激活阈而被激活，产生效应及记忆性细胞，发挥免疫防御功能，而该激活过程又引起一系列协同刺激抑制性分子的上调表达，以维持其处于持续的激活状态或抑制其过度活化增殖。如果缺少协同刺激分子提供的第二信号，将会导致 T 细胞的无反应或特异性免疫耐受，甚至诱导细胞进入凋亡。相反，若协同刺激信号反映过度，则可能导致免疫细胞异常激活，从而引发各种自身免疫性疾病。因此，免疫细胞所获得的正性和负性协同刺激信号需要到达相对平衡以使免疫应答适时开启又能恰当终止，在机体抵抗外来抗原入侵和防止自身免疫性疾病的发生中起着
20 重要的作用。

随着广泛而深入的研究，协同刺激分子已成为免疫学研究新的热点之一。介导协同刺激信号的分子主要包括肿瘤坏死因子/肿瘤坏死因子受体(TNF/TNFR)超家族和免疫球蛋白超家族，如 CD28/B7 等两大超家族。这些共刺激分子以手配体相互作用的方式传导信号。

25 程序性死亡因子 1/程序性死亡因子 1 配体 1(PD-1/PD-L1)作为 CD28/B7 协同刺激分子超家族的新成员，可以介导负性协同刺激信号，能有效抑制 T、B 细胞功能和增殖，同时减少细胞因子 IL-2、IL-10 和 IFN- γ 的分泌，该抑制途径参与的免疫调节在肿瘤免疫、移植免疫、病毒感染、自身免疫等疾病的研究中都具有重要意义。

30 PD-1 是免疫球蛋白 B7-CD28 家族成员之一，由胞外段、疏水性跨膜区、胞内段组成，其胞内段含有免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM)、免疫受体酪氨酸转换基序(immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM)。其中，ITSM 的激活与效应性 T 细胞应答活性密切相关。PD-1 可表达于活化的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B 细胞、自然杀伤 T 细胞、单核细胞
35 和树突状细胞上。另外，PD-1 也表达于调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)，并能促进 Treg 细胞的增殖，抑制免疫应答。

程序性死亡因子 1 配体 1(programmed death 1 ligand 1, PD-L1)又称 CD274, 为 B7 家族成员, 是 PD-1 的配体。PD-L1 属于 I 型跨膜蛋白, 共 290 个氨基酸, 分子量约为 30-35KD。人 PD-L1 分子可组成性表达于胎盘、心、肝、肺、肾、骨骼肌和部分造血细胞等非淋巴组织, 在胸腺、淋巴结和脾脏等淋巴组织中也有适度表达。此外, PD-L1 在肺癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌等癌组织细胞上也具有表达, 且癌组织经过诱导亦可上调其表达。在健康的机体中, PD-1/PD-L1 信号通路的激活可最大程度减少免疫反应对周围组织的损伤, 避免发生自身免疫疾病。然而, PD-1/PD-L1 信号通路激活改变肿瘤局部微环境使得 T 细胞免疫效应降低, 从而介导肿瘤免疫逃逸, 促进肿瘤生长。PD-L1 在肿瘤上的表达与食管癌、胰腺癌和其它类型的癌症的生存率下降相关, 突出了该通路可以作为新的有前途的肿瘤免疫治疗靶点, 并以得到诸多实验证实。

纳米抗体作为一种新型的小分子抗体片段, 由骆驼天然的重链抗体重链可变区(VHH)克隆获得。纳米抗体具有优良的生物学特性, 分子量 12-15 KD, 是完整抗体的十分之一, 在克服了天然抗体分子量大的弊端的同时又拥有完整的抗原结合位点, 具有很好的组织穿透性, 特异性高, 水溶性好。因其特殊的结构性质, 兼具了传统抗体与小分子药物的优势, 几乎完美克服了传统抗体的开发周期长, 稳定性较低, 保存条件苛刻等缺陷, 逐渐成为新一代抗体治疗中的新兴力量, 在免疫诊断和治疗中显示出广阔的应用前景

本研究将重点开发与 PD-L1 高亲和力结合, 且可以阻断 PD-L1/PD-1 结合的纳米抗体, 尤其是人源化之后的 PD-L1 纳米抗体仍然保持较高的阻断活性。

发明内容

本发明提供了一种特异性针对 PD-L1 的纳米抗体, 并能够有效阻断 PD-L1 与 PD-1 的结合。

在本发明的第一方面, 提供了一种抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链, 所述 VHH 链包括互补决定区 CDR, 所述的互补决定区 CDR 包括 SEQ ID NO.: 5 所示的 CDR1, SEQ ID NO.: 6 所示的 CDR2, 和 SEQ ID NO.: 7 所示的 CDR3(或由所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 构成)。

在另一优选例中, 所述 PD-L1 为人 PD-L1。

在另一优选例中, 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、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 高亲和力结合、阻断 PD-L1 与 PD-1 结合的衍生序列。

在另一优选例中, 所述 VHH 链还包括框架区 FR, 所述的 CDR1、CDR2 和 CDR3 由 VHH 链的框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 所隔开。

在另一优选例中, 所述的框架区 FR 由

(a)SEQ ID NO.: 1 所示的 FR1, SEQ ID NO.: 2 所示的 FR2, SEQ ID NO.: 3 所

示的 FR3, SEQ ID NO.: 4 所示的 FR4 组成; 或

(b)SEQ ID NO.: 10 所示的 FR1, SEQ ID NO.: 11 所示的 FR2, SEQ ID NO.: 12 所示的 FR3, SEQ ID NO.: 13 所示的 FR4 组成。

5 在另一优选例中, 所述的框架区 FR 含有所述的 FR1、FR2、FR3 和 FR4(SEQ ID NO.: 1-4 或 SEQ ID NO.: 10-13)。

在另一优选例中, 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO.: 8 或 14 所示。

此外, 还提供一种抗人 PD-L1 抗体的重链可变区, 所述的重链可变区包括三个互补决定区 CDR1、CDR2、和 CDR3, 并且 3 个 CDR 包括 SEQ ID NO.: 5 所示的 CDR1, SEQ ID NO.: 6 所示的 CDR2, SEQ ID NO.: 7 所示的 CDR3。

10 本发明第二方面, 提供了一种抗 PD-L1 纳米抗体, 它是针对 PD-L1 表位的纳米抗体, 并且具有如 SEQ ID NO.: 8 或 SEQ ID NO.: 14 中所示的氨基酸序列的 VHH 链。

15 在另一优选例中, 所述抗 PD-L1 纳米抗体固定(或负载于)在固体载体或半固体载体。

本发明第三方面, 提供了一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质: 本发明第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链或本发明第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体。

20 在另一优选例中, 所述多核苷酸具有如 SEQ ID NO.: 9 或 15 所示的核苷酸序列。

在另一优选例中, 所述的多核苷酸包括 DNA 或 RNA。

本发明第四方面, 提供了一种表达载体, 所述表达载体含有本发明第三方面所述的多核苷酸。

25 在另一优选例中, 所述的表达载体选自下组: DNA、RNA、病毒载体、质粒、转座子、其他基因转移系统、或其组合。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、逆转录病毒、或其组合。

本发明第五方面, 提供了一种宿主细胞, 所述宿主细胞含有本发明第四方面所述的表达载体, 或其基因组中整合有本发明第三方面所述的多核苷酸。

在另一优选例中, 所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。

30 在另一优选例中, 所述的宿主细胞选自下组: 大肠杆菌、酵母细胞。

本发明第六方面, 提供了一种产生抗 PD-L1 纳米抗体的方法, 包括步骤:

(a) 在适合产生纳米抗体的条件下, 培养本发明第五方面所述的宿主细胞, 从而获得含所述抗 PD-L1 纳米抗体的培养物; 以及

(b) 从所述培养物中分离或回收所述的抗 PD-L1 纳米抗体。

35 在另一优选例中, 所述方法还包括步骤: (c) 进一步纯化和/或修饰得步骤(b)的 PD-L1 纳米抗体。

在另一优选例中，所述的抗 PD-L1 纳米抗体具有如 SEQ ID NO.: 8 或 14 所示的氨基酸序列。

本发明第七方面，提供了一种多肽(优选重组多肽)，所述多肽含有：

5 (a) 如本发明第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、或如本发明第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体；

(b) 任选的、与所述多肽结合或偶联的选自下组的修饰标记物：化学标记物或生物标记物。

在另一优选例中，所述的多肽为融合多肽。

在另一优选例中，所述化学标记为同位素、免疫毒素和/或化学药物。

10 在另一优选例中，所述生物标记为生物素、亲和素或酶标记。

在另一优选例中，所述融合物固定(或负载于)在固体载体或半固体载体。

本发明第八方面，提供了一种免疫偶联物，该免疫偶联物含有：

(a) 如本发明第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、或如本发明第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体；和

15 (b) 选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

在另一优选例中，所述偶联部分为药物或毒素。

在另一优选例中，所述偶联部分为可检测标记物。

20 在另一优选例中，所述偶联物选自：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、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如 IL-2 等)、抗体、抗体 Fc 片段、抗体 scFv 片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、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))、化疗剂(例如，顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

25 在另一优选例中，所述免疫偶联物含有：多价(如二价)的如本发明第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、如本发明第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体。

在另一优选例中，所述多价是指，在所述免疫偶联物的氨基酸序列中包含多个重复的如本发明第一方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、本发明第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体。

30 在另一优选例中，所述免疫偶联物固定(或负载于)在固体载体或半固体载体。

本发明第九方面，提供了本发明第二方面所述的抗 PD-L1 纳米抗体的用途，用于制备(a) 用于检测 PD-L1 分子的试剂；(b) 用于阻断 PD-L1 与 PD-1 结合的制剂；(c) 用于治疗肿瘤的药物。

在另一优选例中，所述的检测包括流式检测、细胞免疫荧光检测。

35 本发明第十方面，提供了一种药物组合物，含有：

(i) 本发明第一方面抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、或如本发明第二方面所述

的抗 PD-L1 纳米抗体、或本发明第八方面所述的免疫偶联物；以及

(ii) 药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的药物组合物为注射剂型。

5 在另一优选例中，所述的药物组合物用于制备治疗肿瘤的药物，所述的肿瘤选自下组：胃癌、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、前列腺癌、宫颈癌、淋巴瘤、肾上腺肿瘤、或膀胱肿瘤。

本发明第十一方面，提供了本发明第二方面所述抗 PD-L1 纳米抗体的一种或多种的用途：

(i) 用于检测人 PD-L1 分子；

10 (ii) 用于流式检测；

(iii) 用于细胞免疫荧光检测；

(iv) 用于治疗肿瘤；

(v) 用于肿瘤诊断。

在另一优选例中，所述用途为非诊断的和非治疗的。

15 本发明第十二方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白具有：

(i) 如本发明第一方面所述的重链可变区 VHH 的序列或如本发明第二方面所述的纳米抗体的序列；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中，所述的标签序列包括 6His 标签和 HA 标签。

20 在另一优选例中，所述的重组蛋白特异性结合于 PD-L1 蛋白。

本发明第十三方面，提供了如本发明第一方面所述的 VHH 链、如本发明第二方面所述的纳米抗体、或本发明第八方面所述的免疫偶联物的用途，它们被用于制备药剂、试剂、检测板或试剂盒；

其中，所述试剂、检测板或试剂盒用于：检测样品中 PD-L1 蛋白；

25 其中，所述药剂用于治疗或预防表达 PD-L1(即 PD-L1 阳性)的肿瘤。

在另一优选例中，所述肿瘤包括：黑色素瘤、胃癌、淋巴瘤、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、前列腺癌、或肾上腺肿瘤。

30 本发明第十四方面，提供了一种检测样品中 PD-L1 蛋白的方法，所述方法包括步骤：

(1) 将样品与本发明第二方面所述的纳米抗体接触；

(2) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在 PD-L1 蛋白。

35 本发明第十五方面，提供了一种治疗疾病的方法，所述方法包括，给需要的对象施用本发明第二方面所述的纳米抗体或本发明第八方面所述的免疫偶联物。

在另一优选例中，所述的对象包括哺乳动物，如人。

本发明第十六方面，提供了一种抗 PD-L1 纳米抗体 VHH 链的框架区 FR，所述的 VHH 链的框架区 FR 由 SEQ ID NO.: 1 所示的 FR1, SEQ ID NO.: 2 所示的 FR2, SEQ ID NO.: 3 所示的 FR3, SEQ ID NO.: 4 所示的 FR4 组成。

5 本发明第十七方面，提供了一种试剂盒，所述试剂盒中包括：(a) 如本发明第二方面所述的纳米抗体、本发明第七方面所述的融合物、本发明第八方面所述的免疫偶联物、本发明第十二方面所述的重组蛋白；(b) 容器。

本发明第十八方面，提供了一种 CAR-T 细胞，所述 CAR-T 细胞表达嵌合抗原受体 CAR，所述 CAR 的抗原结合结构域具有如本发明第一方面所述的 VHH 链、或本发明第二方面所述的纳米抗体。

10

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

15 附图说明

图 1 显示了利用噬菌体展示技术筛选出的 9 种 PD-L1 纳米抗体阳性克隆吸光值。

图 2 是 FACS 初步鉴定 PD-L1 纳米抗体的阻断效果。结果表明本发明的特异性针对 PD-L1 的纳米抗体 Nb43 对 PD-L1 与 PD-1 的结合具有很好的阻断效果。

20 图 3 是 FACS 检测人源化纳米抗体(Nb43)和人源化 PD-L1 纳米抗体 Fc 融合蛋白(MY1909)阻断 PD-L1/PD-1 的结合。

图 4 显示了人源化 PD-L1 纳米抗体 Fc 融合蛋白(MY1909)可刺激 T 细胞的活化。

25 图 5 显示了人源化 PD-L1 纳米抗体 Fc 融合蛋白(MY1909)对肿瘤生长的抑制活性检测。

图 6 显示了 MY1909 对肿瘤生长的抑制活性检测。

具体实施方式

30 本发明人通过广泛而深入的研究，经过大量的筛选，成功获得一类抗 PD-L1 纳米抗体。实验结果表明，本发明获得的一株 PD-L1 纳米抗体能有效阻断 PD-L1 与 PD-1 之间的相互作用，且经本发明人源化后的 PD-L1 纳米抗体亦能有效阻断 PD-L1 与 PD-1 结合。在此基础上完成了本发明。

35 具体地，本发明利用人源的 PD-L1 胞外段抗原蛋白免疫骆驼，获得高质量的纳米抗体噬菌体展示文库。然后将 PD-L1 蛋白分子偶联在酶标板上，展示 PD-L1 蛋白的正确空间结构，以此形式的抗原利用噬菌体展示技术筛选免疫纳米抗体基因库(骆驼重链抗体噬菌体展示基因库)，从而获得了 PD-L1 特异性的纳米抗体基因。

再将此基因转至大肠杆菌中，从而获得了能在大肠杆菌中高效表达的、且特异性高的纳米抗体株。

如本文所用，术语“本发明纳米抗体”、“本发明的抗 PD-L1 纳米抗体”、“本发明 PD-L1 纳米抗体”可互换使用，均指特异性识别和结合于 PD-L1 (包括人 PD-L1) 的纳米抗体。特别优选的是 VHH 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO.:8 或 14 所示的纳米抗体。

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASRFTASMGWFRQAPGKEREGIATVSG
AASTNYADSVRGRFTISKDNAKNTLYLQINSLKPEDTAVYYCAADDDYYAFLS
RGARDFRYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 8)

10 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTASMGWFRQAPGKGLEGIATVSG
AASTNYADSVKGRFTISKDNSKNTLYLQINSLRDEDTAVYYCAADDDYYAFLS
RGARDFRYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 14)

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。

20 如本文所用，术语“单域抗体”、“纳米抗体”具有相同的含义，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，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。

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构架区(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。

35 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抗 PD-L1 蛋白抗体或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

如本文所用，术语“重链可变区”与“V_H”可互换使用。

如本文所用，术语“可变区”与“互补决定区(complementarity determining region, CDR)”可互换使用。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链可变区包括三个互补决定
5 区 CDR1、CDR2、和 CDR3。

在另一优选例中，所述的互补决定区 CDR 包括 SEQ ID NO.: 5 所示的 CDR1，
SEQ ID NO.: 6 所示的 CDR2，和 SEQ ID NO.: 7 所示的 CDR3(或由所述 CDR1、
CDR2 和 CDR3 构成)。

RFTASMG (SEQ ID NO: 5)

10 VSGAAS (SEQ ID NO: 6)

AADDDYYAFLSRGARDFRY (SEQ ID NO: 7)

在另一优选例中，所述抗体的重链可变区还包括框架区 FR，所述的 CDR1、
CDR2 和 CDR3 由 VHH 链的框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 所隔开。

在另一优选例中，所述的框架区 FR 由

15 (a)SEQ ID NO.: 1 所示的 FR1，SEQ ID NO.: 2 所示的 FR2，SEQ ID NO.: 3 所
示的 FR3，SEQ ID NO.: 4 所示的 FR4 组成；或

(b)SEQ ID NO.: 10 所示的 FR1，SEQ ID NO.: 11 所示的 FR2，SEQ ID NO.: 12
所示的 FR3，SEQ ID NO.: 13 所示的 FR4 组成。

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 1)

20 WFRQAPGKEREGIAT (SEQ ID NO: 2)

NYADSVRGRFTISKDNAKNTLYLQINSLKPEDTAVYYC (SEQ ID NO: 3)

WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 4)

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 10)

WFRQAPGKGLEGIAT (SEQ ID NO: 11)

25 NYADSVKGRFTISKDNSKNTLYLQINSLRDEDTAVYYC (SEQ ID NO: 12)

WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 13)

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链包括上述重链可变区和重
链恒定区。

在本发明中，术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用，
30 都指特异性结合 PD-L1 蛋白的多肽，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。

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
35 90%同源性，较佳地至少 95%同源性。

一般，抗体的抗原结合特性可由位于重链可变区的 3 个特定区域来描述，称为

可变区域(CDR), 将该段间隔成 4 个框架区域(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。

本发明抗体的重链的可变区特别令人感兴趣, 因为它们中至少部分涉及结合抗原。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。

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。因此, 本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

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。

本发明抗体指具有 PD-L1 蛋白结合活性的、包括上述 CDR 区的多肽。该术语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。

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。

本发明还提供了其他多肽, 如包含纳米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纳米抗体的片段。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表 1 进行氨基酸替换而产生。

表 1

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

5 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。

10 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。

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 $0.2\times\text{SSC}$ ， $0.1\%\text{SDS}$ ， 60°C ；或(2)杂交时加有变性剂，如 $50\%(\text{v/v})$ 甲酰胺， 0.1% 小牛血清/ $0.1\%\text{Ficoll}$ ， 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。

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。

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。

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。

5 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。

10 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. 药激活酶(例如，DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))；9. 疗剂(例如，顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

药物组合物

15 本发明还提供了一种组合物。优选地，所述的组合物是药物组合物，它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白，以及药学上可接受的载体。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)：瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

20 本发明的药物组合物可直接用于结合PD-L1蛋白分子，因而可用于治疗肿瘤。此外，还可同时使用其他治疗剂。

25 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%，较佳地0.01-90wt%，更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的纳米抗体(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/千克体重-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。

30 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-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。

35 标记的纳米抗体

在本发明的一个优选例中，所述纳米抗体带有可检测标记物。更佳地，所述的

标记物选自下组：同位素、胶体金标记物、有色标记物或荧光标记物。

胶体金标记可采用本领域技术人员已知的方法进行。在本发明的一个优选的方案中，抗 PD-L1 的纳米抗体用胶体金标记，得到胶体金标记的纳米抗体。

本发明的抗 PD-L1 纳米抗体具有很好的特异性，很高的效价。

5

检测方法

本发明还涉及检测 PD-L1 蛋白的方法。该方法步骤大致如下：获得细胞和/或组织样本；将样本溶解在介质中；检测在所述溶解的样本中 PD-L1 蛋白的水平。

在本发明的检测方法中，所使用的样本没有特别限制，代表性的例子是存在于
10 细胞保存液中的含细胞的样本。

试剂盒

本发明还提供了一种含有本发明的抗体(或其片段)或检测板的试剂盒，在本发明的一个优选例中，所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。

15 本发明还提供了用于检测 PD-L1 水平的检测试剂盒，该试剂盒包括识别 PD-L1 蛋白的抗体，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。

应用

20 如上所述，本发明的纳米抗体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 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 的临床诊断和靶向治疗。

本发明的主要优点包括：

- 25 (a) 本发明纳米抗体高特异性针对人的具有正确空间结构的 PD-L1 蛋白。
(b) 本发明纳米抗体的亲和力强。
(c) 本发明纳米抗体的生产简便。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本
30 发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

35 实施例 1：人 PD-L1 蛋白的表达纯化

(1)将人 PD-L1 的核苷酸序列合成在 pCDNA3.1(-)载体上，然后将其胞外段序

列亚克隆至 pFMSE-IgG1 载体上;

(2)用 Omega 质粒大提试剂盒提取构建的 pFMSE-IgG1-hPD-L1(ECD)质粒;

(3)培养 HEK293F 细胞至 OD 为 2.0×10^6 个/mL;

5 (4)将质粒与转染试剂 PEI 1:3 混合均匀后静置 10 min, 然后加入到 HEK293F 细胞中, 37°C, 6% CO₂ 摇床培养箱中培养 5-6 天;

(5)收集细胞上清, 与 Protein A 珠子在室温下结合 1 h;

(6)用磷酸盐缓冲液 pH 7.0 洗涤珠子后, 再用 0.1 M pH 3.0 Glycine 洗脱蛋白;

(7)将洗脱的蛋白超滤至 PBS 中, 测定产量后取样进行 SDS-PAGE 对抗原纯度进行检测, 其余蛋白保存于 -80°C 冰箱;

10 (8)选取纯度大于 90%的抗原进行后续骆驼的免疫。

实施例 2: PD-L1 纳米抗体文库的构建

(1)将 1 mg hPD-L1(ECD)-Fc 抗原与弗氏佐剂等体积混合, 免疫一只新疆双峰驼, 每周一次, 共免疫 3 次, 刺激 B 细胞表达抗原特异性的纳米抗体;

15 (2)3 次免疫结束后, 提取 100 mL 骆驼外周血淋巴细胞并提取总 RNA;

(3)合成 cDNA 并利用套式 PCR 扩增 VHH;

(4)利用限制性内切酶 *Pst* I 及 *Not* I 酶切 20 μ g pMECS 噬菌体展示载体 (Biovector 供应)及 10 μ g VHH 并连接两个片段;

20 (5)将连接产物转化至电转感受态细胞 TG1 中, 构建 PD-L1 纳米抗体文库并测定库容, 库容大小为 1.0×10^9 CFU;

与此同时, 随机挑取 24 颗克隆进行菌落 PCR 检测, 结果表明所建文库的插入率为达 95.8%。上述结果说明, 获得了库容和插入率均合格的 PD-L1 纳米抗体噬菌体展示文库。

25 实施例 3: PD-L1 纳米抗体的筛选及鉴定

抗体筛选:

(1)将溶解在 100 mM NaHCO₃、pH 8.2 中的 10 μ g hPD-L1(ECD)-Fc 抗原(10 μ g Fc in NaHCO₃ 作为对照)偶联在 NUNC 酶标板上, 4°C 放置过夜;

(2)第二天加入 100 μ L 0.01%BSA, 室温封闭 0.5 h;

30 (3)2 h 后, 加入 100 μ L 噬菌体(2×10^{11} CFU 免疫骆驼纳米抗体噬菌展示基因库), 室温作用 0.5 h;

(4)用 0.05% PBS+Tween-20 洗 5 遍, 以洗掉非特异的噬菌体;

(5)用 100 mM 三乙醇胺将与 PD-L1 特异性结合的噬菌体解离下, 并感染处于对数期生长的大肠杆菌 TG1 细胞, 37°C 培养 1 h, 产生并纯化噬菌体用于下一轮的筛选, 相同筛选过程重复 3 轮, 富集倍数分别为无富集, 11.4 倍和 270 倍。

用噬菌体的酶联免疫方法(ELISA)筛选特异性单个阳性克隆:

(1)从上述 3 轮筛选后含有噬菌体的细胞培养皿中, 挑选 600 个单个菌落并接种于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素的 TB 培养基(1 L TB 培养基中含有 2.3 g KH_2PO_4 , 12.52 g K_2HPO_4 , 12 g 蛋白胨, 24 g 酵母提取物, 4 mL 甘油)中, 生长至对数期后, 加终浓度 1mM 的 IPTG, 28°C 培养过夜;

5 (2)利用渗透法获得粗提抗体, 并将抗体转移到经抗原包被的 ELISA 板中, 在室温下放置 1 h;

(3)用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入鼠抗 HA 抗体, 购自北京康为世纪生物科技有限公司), 在室温下放置 1 h;

10 (4)用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入山羊抗小鼠碱性磷酸酶标记抗体, 在室温下放置 1 h;

(5)用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入碱性磷酸酶显色液, 于 ELISA 仪上, 在 405 nm 波长, 读取吸收值;

(6)当样品孔 OD 值大于对照孔 OD 值 3 倍以上时(Ratio+/->3), 判为阳性克隆孔。结果表明 600 颗克隆共出现 95 颗阳性克隆;

15 (7)将 95 颗阳性克隆孔的菌转摇在含有 2 mL 氨苄青霉素浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 液体中以便提取质粒并进行测序;

(8)对比分析 95 株克隆系列, 最终获得 9 种 CDR3 区序列明显差异纳米抗体, 编号为 Nb1, Nb4, Nb16, Nb23, Nb36, Nb43, Nb96, Nb102, Nb156(图 1 显示了其 ELISA 吸光值)。

20

实施例 4: 流式细胞术初步鉴定纳米抗体的阻断功能

(1)制备 hPD-1(ECD)-Biotin 蛋白(制备方法同实施例 1, SDS-PAGE 纯度验证), 蛋白生物素化的方法参照生物素试剂说明书。

(2)稳定表达 PD-L1 的 A375 转基因细胞的构建。

25 (3)制备 PD-L1 纳米抗体 TG1 菌株粗提裂解液, 制备方法同实施例 3。

(4)每个样品取 1×10^6 个稳转 PD-L1 细胞重悬于 0.5% BSA-PBS buffer 中, 加入上述粗提液 50 μL , 同时设置阴性对照(hIgG1)和空白组(PBS), 每孔加入 5 μg hPD-1(ECD)-Fc-Biotin, 4°C 孵育 20 min。

30 (5)PBS 洗涤 2 次细胞, 加入 eBioscience 的 SA-PE, 4°C 孵育 20 min, PBS 洗涤 2 次细胞后用流式细胞仪(BD FACS Calibur)检测结果如图 2 所示。

(6)从筛选获得的 9 株 CDR3 区序列明显差异纳米抗体中, 发现其中 1 株(Nb 43)具有明显的阻断效果。

实施例 5: PD-L1 阻断型纳米抗体的人源化改造

35 (1)首先以 SEQ ID NO.: 8 所示的 PD-L1 纳米抗体序列为模板在结构数据库中同源结构的搜索, 共搜寻到 1500 个结构, 取其中 E value=0.0 并且序列等同性 $\geq 70\%$

的 40 个结构；

(2)对这 40 个结构进行结构比对,并依据晶体结构分辨率大小和构建的进化树,最终选取包括 3dwt 在内的 7 个蛋白,进行基于 SEQ ID NO.: 8 所示的 PD-L1 纳米抗体序列的多模板同源模建,最终获得的 10 个结构,再依据打分函数的高低排序,

5 选取 molpdf 最低的结构,继续下面的工作;

(3)对模建的最优结构,利用 ProtSA 服务器计算残基的溶剂可接触性,即残基的折叠态相对于去折叠态的溶剂可接触面积的比值为判据,取大于 40% 的残基为暴露于溶剂外的残基;

(4)对模建的最优结构和 DP-47 进行序列比对,替换相应的暴露于溶剂的残基。
10 最终确定出一种人源化 PD-L1 纳米抗体,由 SEQ ID NO.14 所示的氨基酸序列编码。人源化前后抗体序列对应如下表 2:

表 2

抗体区域	序列编号(SEQ ID NO.:)	
	人源化前	人源化后
FR1	1	10
CDR1	5	5
FR2	2	11
CDR2	6	6
FR3	3	12
CDR3	7	7
FR4	4	13
完整氨基酸序列	8	14
完整核苷酸序列	9	15

人源化前后抗体骨架区与 DP-47 骨架区的同源性比较如下表 3:

表 3

15

抗体区域	与 DP-47 的同源性	
	人源化前	人源化后
FR1	84%	92%
FR2	53.33%	66.67%
FR3	81.58%	89.47%
FR4	90.91%	100%

实施例 6: 人源化 PD-L1 阻断型纳米抗体真核表达纯化

(1)将人源化后的 PD-L1 纳米抗体序列合成至 pFMSE-IgG1 载体(购自 Invivogen),用 Omega 质粒大提试剂盒提取 pFMSE-IgG1-Nb(humanized)质粒;

(2)培养 HEK293F 细胞至 OD 为 2.0×10^6 个/mL;

(3)将质粒与转染试剂 PEI 按照 1:3 混合均匀后静置 10 min, 然后加入到 HEK293F 细胞中, 37°C, 6% CO₂ 摇床培养箱中培养 5-6 天;

(4)收集细胞上清, 与 Protein A 珠子在室温下结合 1 h;

5 (5)用磷酸盐缓冲液 pH 7.0 洗涤珠子后, 再用 0.1M pH 3.0 Glycine 洗脱蛋白;

(6)将洗脱的蛋白超滤至 PBS 中, 测定产量后取样进行 SDS-PAGE 检测才纯度, 其余蛋白保存于 -80°C 冰箱;

(7)结果显示成功表达纯化获得 Nb43 高纯度人源化纳米抗体 (SEQ ID NO.:14)。

10

实施例 7: 流式细胞术检测人源化 PD-L1 纳米抗体的阻断功能

方法同实施例 4:

(1)每个样品取 1×10^6 个稳定表达 PD-L1 的细胞株重悬于 0.5% BSA-PBS buffer 中, 加入 10 μ g 纯化的人源化 PD-L1 纳米抗体, 同时设置阴性对照(hIgG1)和空白组(PBS), 所有样本加入 5 μ g hPD-1(ECD)-Fc-Biotin 蛋白, 4°C 孵育 20 min;

15 (2)PBS 洗涤 2 次细胞, 加入 eBioscience 的 SA-PE, 4°C 孵育 20 min, PBS 洗涤 2 次细胞后上机检测, 检测结果如图 3 所示, Nb43 表现出很好的阻断活性。

20 实施例 8: 人源化阻断型 PD-L1 纳米抗体 Fc 融合蛋白在树突细胞-T 细胞混合淋巴反应中对 CD4⁺T 细胞的激活作用测定

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

(2)用无血清的 RPMI 1640 培养基培养 1-2 h, 除去未贴壁的细胞, 将细胞培养于含 10% FBS, 10 ng/mL GM CSF 以及 20 ng/mL IL 4 的 RPMI 中;

25 (3)培养 5-6 天, 加入 10 ng/mL 的 TNF- α 并孵育 24 h, 获得成熟的树突细胞;

(4)获得的树突细胞重悬于 RPMI 完全培养基中, 2×10^5 /mL。然后在 96 孔 U 形底板(Costar:3799)中每孔加入 50 μ L, 培养箱中培养;

(5)利用磁珠分离试剂盒(Mi 1 tenyi Bio tee : 130-096-533)按照说明书方法从另一个供体 PBMC 中分离 CD4⁺T 细胞;

30 (6) 1×10^4 个树突细胞和 1×10^5 个 CD4⁺T 细胞混合, 于 RPMI 完全培养基中重悬并加入 96 孔培养板, 每孔加入 50 μ L 细胞混液: 每孔加入 100 μ L 稀释于 RPMI 完全培养基中的人源化 PD-L1 纳米抗体(SEQ ID NO.:14)Fc 融合蛋白(MY1909), 培养 5-7 天后去上清, 利用 IFN- γ ELISA 检测试剂盒(ebioscience)检测上清中 IFN- γ 水平;

35 结果如图 4 所示, 可见 PD-L1 纳米抗体 Fc 融合蛋白可增强混合淋巴细胞反应中 CD4⁺T 细胞的 γ 干扰素分泌, 即 PD-L1 阻断型纳米抗体 Fc 融合蛋白增强了 T 细胞的活化。

实施例 9: 人源化阻断型 PD-L1 纳米抗体 Fc 融合蛋白对肿瘤生长的抑制活性

采用免疫缺陷 NOD/SCID(非肥胖型糖尿病 / 重症联合免疫缺陷)小鼠研究其体内活性。通过对 NOD/ SCID 小鼠皮下移植表达人 PD-L1 的黑色素瘤细胞系 A375 和人的外周血单个核细胞 PBMC 实验来完成。详细步骤如下:

(1)A375 和 PBMC 在注射前混合, 皮下注射;

(2)人源化阻断型 PD-L1 纳米抗体(SEQ ID NO.:14)Fc 融合蛋白(MY1909)在肿瘤接种后 24 h 第一次腹腔注射给药, 之后每周给药一次, 给药剂量为 2 mg/kg;

(3)PBS 作为阴性对照, 罗氏公司的 TECENTRIQ 作为阳性对照(benchmark, BMK)。每个实验组 11 只小鼠。每周两次观察肿瘤的形成, 并用游标卡尺测量肿瘤长径和短径, 计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线图(图 5)。结果显示融合蛋白(抗体)MY1909 在 2 mg/kg 剂量下就可以显著抑制肿瘤生长。

实施例10: MY1909对肿瘤生长的抑制活性

采用 C57BL/6 小鼠皮下移植肿瘤模型研究 MY1909 的体内活性。通过对 C57BL/6 小鼠皮下接种表达人 PD-L1 的结肠癌细胞系 MC38(MC38-hPD-L1)来构建试验模型, 评价 MY1909 对其肿瘤的抑制活性。详细步骤如下:

(1) 在受试 C57BL/6 小鼠右侧皮下接种 MC38-hPD-L1 肿瘤细胞 (1×10^6 /只, 细胞培养于含 10% 热灭活胎牛血清(ExCell Biology)和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycin B 的 DMEM 培养基中, 1×10^6 细胞使用 100 μL PBS 重悬)。当小鼠平均荷瘤肿瘤体积达到约 64 mm^3 时, 将 24 只荷瘤鼠随机分入 3 个实验组, 每组 6 只, 分组当天定义为第 0 天。

(2)3 组小鼠于第 0 天分别给予同型对照(Isotype control) hIgG1(01 组)作为阴性对照、Analogue to Atezolizumab (Roche) (02 组)作为阳性对照、MY1909(03 组), 供试品都使用 PBS 稀释至 0.5 mg/mL, 给药剂量 5 mg/kg, 腹腔注射, 给药频率每周 2 次, 共给药 3 周。

(3)在分组后, 实验中每周两次测量动物的肿瘤体积。肿瘤体积通过卡尺测量, 公式为 $TV = 0.5 a \times b^2$, 其中 a 是肿瘤的长径, b 是肿瘤的短径。绘制肿瘤生长曲线图(图 6), 考察各组供试品对肿瘤生长的抑制作用(表 4)。结果显示 MY1909 在 5 mg/kg 剂量下就可以显著抑制肿瘤生长。

表 4. MY1909 在皮下 MC38-hPD-L1 肿瘤模型中的抗肿瘤效果

给药组	肿瘤体积 (mm^3) ^a		T/C ^b	TGI ^c	P 值 ^d
	第 0 天	第 20 天	(%)	(%)	
第 1 组, 同型对照(Isotype control) hIgG1	63.72±5.17	1325.97±192.84	-	-	-

第2组, Analogue to Atezolizumab (Roche PDL1)	63.70±5.14	269.40±132.37	20.32	83.70	0.004
第3组, MY1909	63.74±4.73	591.54±319.26	44.61	58.19	0.025

备注: a. 平均值± SEM;

b. 相对肿瘤增殖率T/C(%), 是抗肿瘤活性评价指标: 公式: $T/C \% = Ti/Ci * 100\%$;

Ti和Ci分别为处理组和对照组Day i天的平均肿瘤体积

c. 肿瘤生长抑制 (Tumor growth inhibition, TGI): 公式: $\%TGI = (1 - (Ti - T0) / (Ci - C0)) * 100\%$;

5 Ti和Ci分别为处理组和对照组Day i天的平均肿瘤体积;

T0和C0分别为处理组和对照组Day 0天的平均肿瘤体积

d. 与第1组相比较。数据在利用独立样本T检验分析之前进行了SQRT转换。第2组和第3组相比, $P > 0.05$.

10 (4)在分组治疗后第20天, 与Isotype hIgG1对照处理组相比, MY1909单药治疗组的肿瘤生长抑制率(TGI%)为58.19%, 具有统计学显著的抗MC38-hPD-L1肿瘤生长的作用($P < 0.05$)。MY1909单药治疗组中, 5个肿瘤完全消退, 截止实验终点时(第34天)无肿瘤生长迹象。表明MY1909在5 mg/kg剂量下就可以显著抑制肿瘤生长。

15 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链，其特征在于，所述 VHH 链包括互补决定区 CDR，所述的互补决定区 CDR 包括 SEQ ID NO.: 5 所示的 CDR1，SEQ ID NO.: 5
6 所示的 CDR2，和 SEQ ID NO.: 7 所示的 CDR3。
2. 一种抗 PD-L1 纳米抗体，其特征在于，它是针对 PD-L1 表位的纳米抗体，并且具有如 SEQ ID NO.: 8 或 SEQ ID NO.: 14 中所示的氨基酸序列的 VHH 链。
3. 一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质：权利要求 1 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链或权利要求 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗
10 体。
4. 一种表达载体，其特征在于，所述表达载体含有权利要求 3 所述的多核苷酸。
5. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求 4 所述的表达载体，或其基因组中整合有权利要求 3 所述的多核苷酸。
- 15 6. 一种产生抗 PD-L1 纳米抗体的方法，其特征在于，包括步骤：
(a) 在适合产生纳米抗体的条件下，培养权利要求 5 所述的宿主细胞，从而获得含所述抗 PD-L1 纳米抗体的培养物；以及
(b) 从所述培养物中分离或回收所述的抗 PD-L1 纳米抗体。
7. 一种多肽，其特征在于，所述多肽含有：
20 (a) 如权利要求 1 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、或如权利要求 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体；
(b) 任选的、与所述多肽结合或偶联的选自下组的修饰标记物：化学标记物或生物标记物。
8. 一种免疫偶联物，其特征在于，该免疫偶联物含有：
25 (a) 如权利要求 1 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、或如权利要求 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体；
(b) 选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。
9. 权利要求 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的用途，其特征在于，用于制备(a)
30 用于检测 PD-L1 分子的试剂；(b) 用于阻断 PD-L1 与 PD-1 结合的制剂；(c) 用于治疗肿瘤的药物。
10. 一种药物组合物，其特征在于，含有：
(i) 如权利要求 1 所述的抗 PD-L1 纳米抗体的 VHH 链、或如权利要求 2 所述的抗 PD-L1 纳米抗体、或如权利要求 8 所述的免疫偶联物；以及
35 (ii) 药学上可接受的载体。

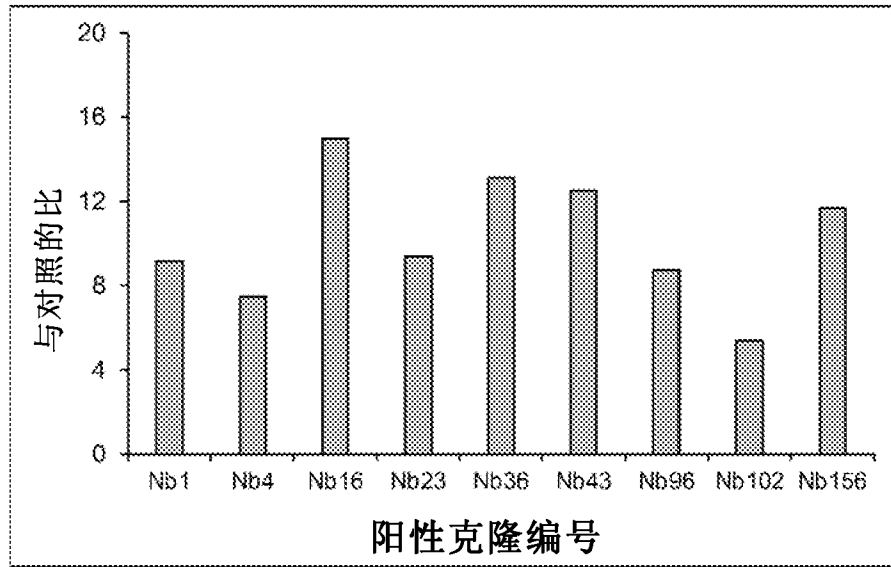


图 1

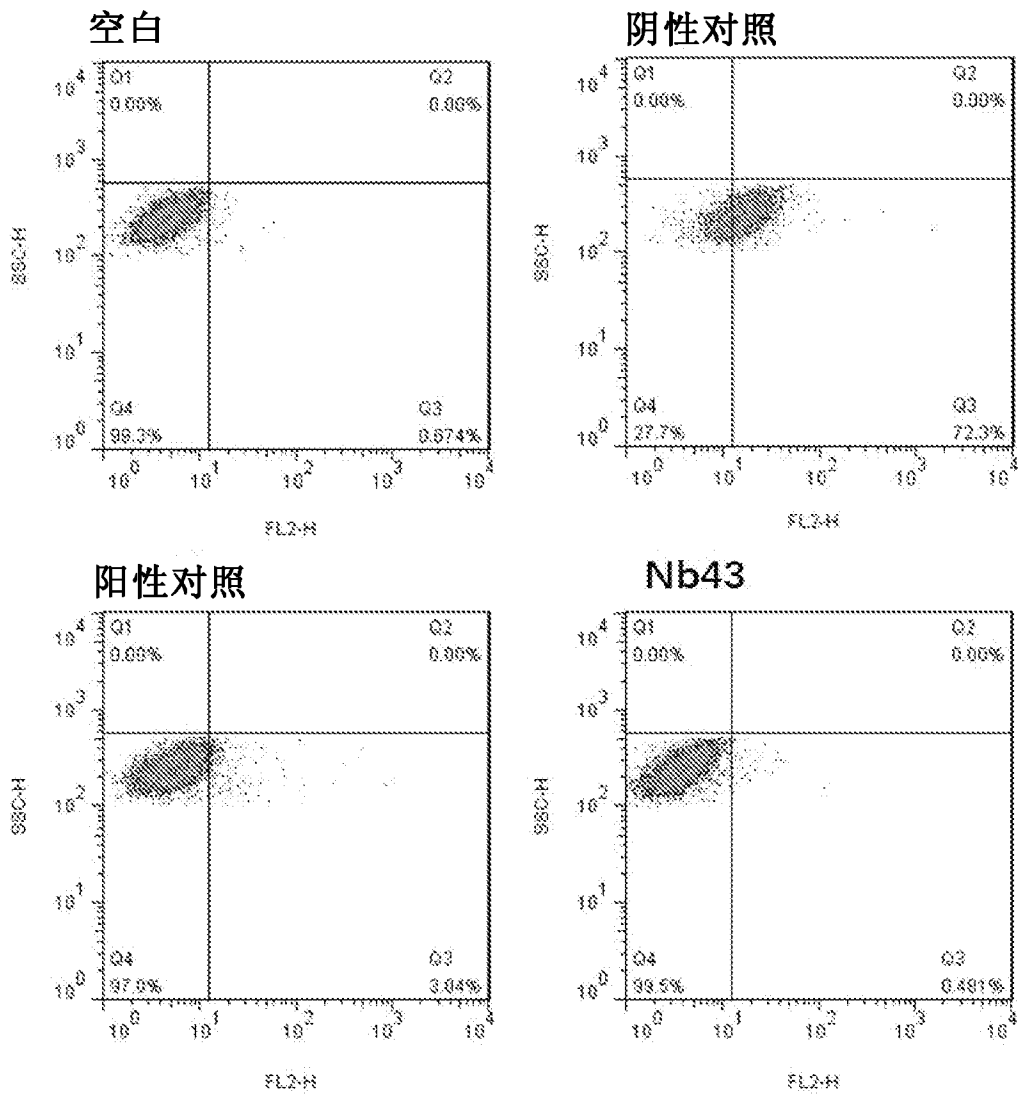


图 2

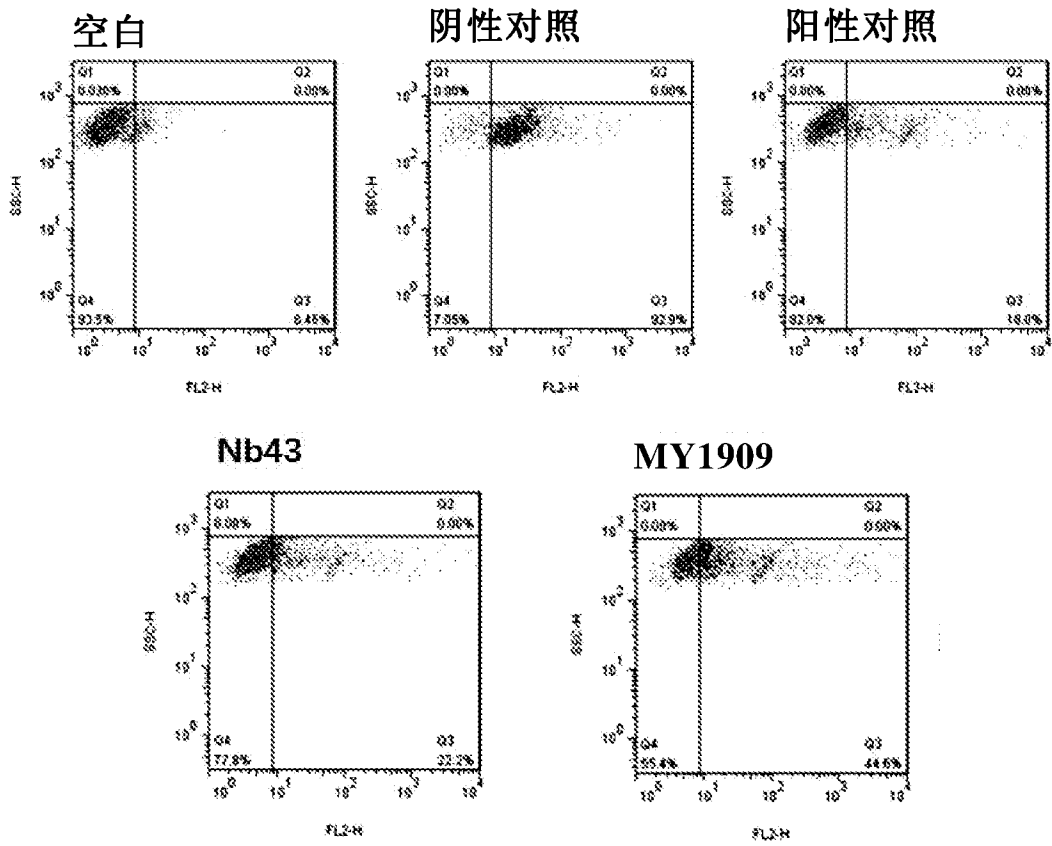


图 3

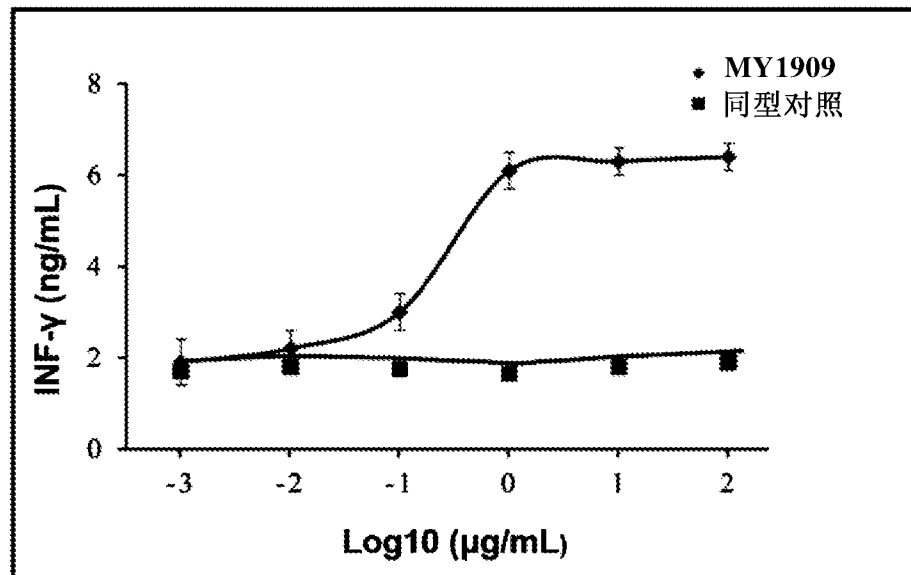


图 4

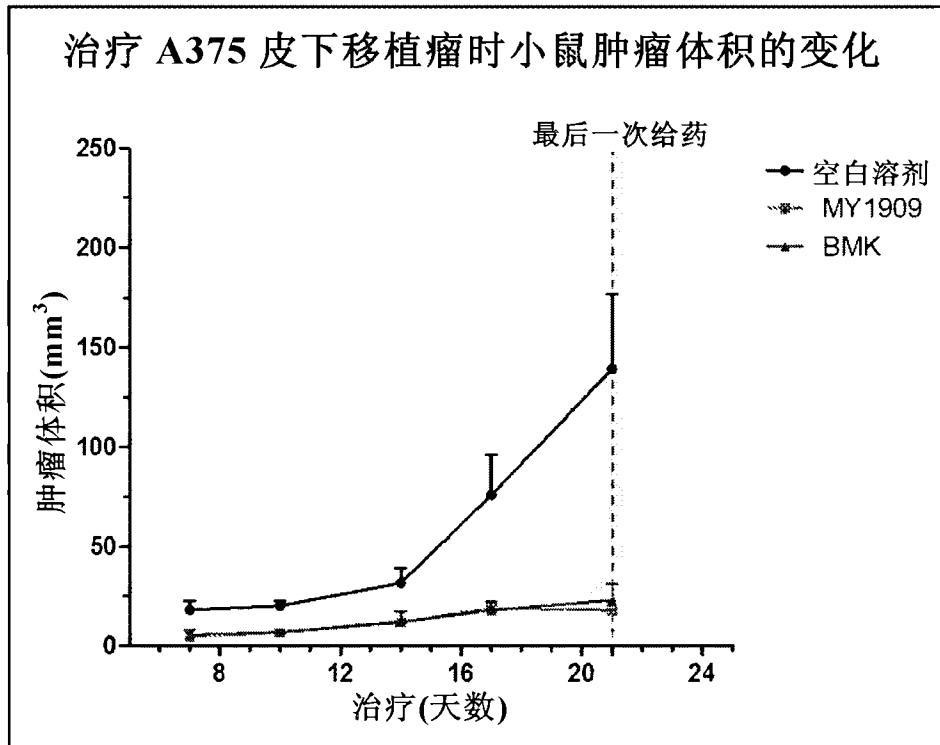


图 5

受试抗体在C57BL/6小鼠皮下MC38-hPD-L1肿瘤模型中的药效和安全性评估

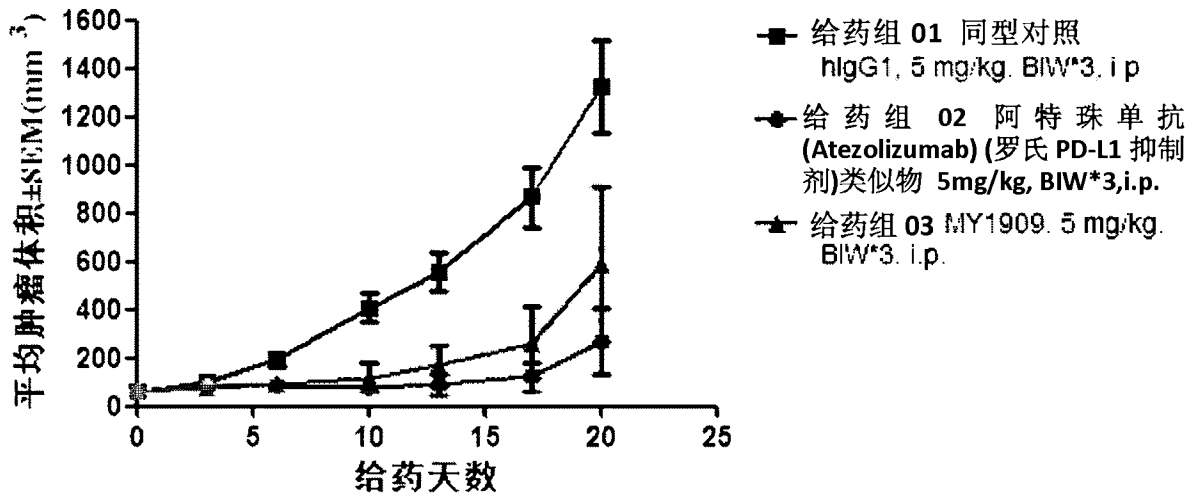


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/091639

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/13(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 51/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15; C07K16; A61K39; A61K51; A61P35

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)

CNABS, VEN, CNKI, 万方, WANFANG, PUBMED, ISI WEB OF KNOWLEDGE, GENBANK, 中国专利生物序列检索系统, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: B7-H1, PD-L1, B7H1, PDL1, CD274, 程序性死亡因子配体, programmed death 1, ligand, 纳米抗体, nanobody, 华兰基因, 华兰生物, 张宝献, 潘若文, 马小伟, SEQ ID NOS: 5-8, 14

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009068625 A2 (ABLYNX N.V.) 04 June 2009 (2009-06-04) description, page 29, line 11 to page 32, line 23, example 4, and table B-2, SEQ ID NO: 2219	1-10
A	WO 2008071447 A2 (ABLYNX N.V.) 19 June 2008 (2008-06-19) description, examples 17-22, and table B-5	1-10
A	CN 105085677 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 25 November 2015 (2015-11-25) description, paragraphs [0009]-[0023]	1-10
A	CN 104404630 A (SOUTHEAST UNIVERSITY) 11 March 2015 (2015-03-11) description, paragraphs [0007]-[0010], and embodiments 1-4	1-10
A	王兰东 (WANG, Landong). "纳米抗体研究进展 (Research Progress of Nanobody)" <i>生物技术通讯 (Letters in Biotechnology)</i> , Vol. 27, No. (3), 31 May 2016 (2016-05-31), pages 453-458	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 2018

Date of mailing of the international search report

12 September 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/091639

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG, Fei et al. "Structural Basis of a Novel PD-L1 Nanobody for Immune Checkpoint Blockade" <i>Cell Discovery</i> , Vol. 3, 07 March 2017 (2017-03-07), 17004	1-10
<hr/>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/091639

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/091639

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2009068625 A2	04 June 2009	WO 2009068630 A1	04 June 2009
		US 2015232562 A1	20 August 2015
		US 9969805 B2	15 May 2018
		US 2011028695 A1	03 February 2011
		WO 2009068625 A3	06 August 2009
		CN 101970490 A	09 February 2011
		EP 2220120 A2	25 August 2010
		EP 2215123 A1	11 August 2010
		US 8975382 B2	10 March 2015
		ZA 201004057 B	28 April 2011
		EP 2215125 A1	11 August 2010
		US 2011059090 A1	10 March 2011
		CA 2705890 A1	04 June 2009
		JP 2011504740 A	17 February 2011
		EP 2650311 A3	04 June 2014
		EP 2650311 A2	16 October 2013
		KR 20100097716 A	03 September 2010
		US 2011053865 A1	03 March 2011
		CA 2706200 A1	04 June 2009
		BR PI0819656 A2	23 June 2015
		AU 2008328784 B2	27 March 2014
		IL 205734 D0	30 November 2010
		CA 2706675 A1	04 June 2009
		US 2011189203 A1	04 August 2011
		WO 2009068627 A3	01 October 2009
		AU 2008328779 B2	05 June 2014
		CA 2706425 A1	04 June 2009
		EP 2225278 A2	08 September 2010
		WO 2009068627 A2	04 June 2009
		WO 2009068628 A1	04 June 2009
		WO 2009068631 A1	04 June 2009
		AU 2008328785 A1	10 June 2010
		AU 2008328784 A1	10 June 2010
		AU 2008328779 A1	10 June 2010
		AU 2008328781 A1	17 June 2010
		MX 2010005783 A	31 August 2010
WO 2008071447 A2	19 June 2008	EP 2102241 A2	23 September 2009
		CA 2672595 A1	19 June 2008
		US 2015266958 A1	24 September 2015
		US 2016280786 A1	29 September 2016
		US 2011262427 A1	27 October 2011
		US 8907065 B2	09 December 2014
		US 2010028341 A1	04 February 2010
		WO 2008071447 A8	12 September 2008
		US 2016289327 A1	06 October 2016
		AU 2007331672 A1	30 July 2009
CN 105085677 A	25 November 2015	None	
CN 104404630 A	11 March 2015	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/091639

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/13(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 51/10(2006.01)i; A61P 35/00(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>C12N15; C07K16; A61K39; A61K51; A61P35</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>CNABS, VEN, CNKI, 万方, PubMed, ISI Web of Knowledge, GenBank, 中国专利生物序列检索系统: B7-H1, PD-L1, B7H1, PDL1, CD274, 程序性死亡因子配体, programmed death 1, ligand, 纳米抗体, nanobody, 华兰基因, 华兰生物, 张宝献, 潘若文, 马小伟, SEQ ID NOs:5-8, 14</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 2009068625 A2 (ABLYNX N.V.) 2009年 6月 4日 (2009 - 06 - 04) 说明书第29页第11行-第32页第23行, 实施例4, 表B-2, SEQ ID NO:2219</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2008071447 A2 (ABLYNX N.V.) 2008年 6月 19日 (2008 - 06 - 19) 说明书实施例17-22, 表B-5</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105085677 A (中国科学院上海药物研究所) 2015年 11月 25日 (2015 - 11 - 25) 说明书第[0009]-[0023]段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104404630 A (东南大学) 2015年 3月 11日 (2015 - 03 - 11) 说明书第[0007]-[0010]段, 实施例1-4</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>王兰东. "纳米抗体研究进展" 生物技术通讯, 第27卷, 第3期, 2016年 5月 31日 (2016 - 05 - 31), 第453-458页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ZHANG, F.等. "Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade" Cell Discovery, 第3卷, 2017年 3月 7日 (2017 - 03 - 07), 17004</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	WO 2009068625 A2 (ABLYNX N.V.) 2009年 6月 4日 (2009 - 06 - 04) 说明书第29页第11行-第32页第23行, 实施例4, 表B-2, SEQ ID NO:2219	1-10	A	WO 2008071447 A2 (ABLYNX N.V.) 2008年 6月 19日 (2008 - 06 - 19) 说明书实施例17-22, 表B-5	1-10	A	CN 105085677 A (中国科学院上海药物研究所) 2015年 11月 25日 (2015 - 11 - 25) 说明书第[0009]-[0023]段	1-10	A	CN 104404630 A (东南大学) 2015年 3月 11日 (2015 - 03 - 11) 说明书第[0007]-[0010]段, 实施例1-4	1-10	A	王兰东. "纳米抗体研究进展" 生物技术通讯, 第27卷, 第3期, 2016年 5月 31日 (2016 - 05 - 31), 第453-458页	1-10	A	ZHANG, F.等. "Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade" Cell Discovery, 第3卷, 2017年 3月 7日 (2017 - 03 - 07), 17004	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
A	WO 2009068625 A2 (ABLYNX N.V.) 2009年 6月 4日 (2009 - 06 - 04) 说明书第29页第11行-第32页第23行, 实施例4, 表B-2, SEQ ID NO:2219	1-10																					
A	WO 2008071447 A2 (ABLYNX N.V.) 2008年 6月 19日 (2008 - 06 - 19) 说明书实施例17-22, 表B-5	1-10																					
A	CN 105085677 A (中国科学院上海药物研究所) 2015年 11月 25日 (2015 - 11 - 25) 说明书第[0009]-[0023]段	1-10																					
A	CN 104404630 A (东南大学) 2015年 3月 11日 (2015 - 03 - 11) 说明书第[0007]-[0010]段, 实施例1-4	1-10																					
A	王兰东. "纳米抗体研究进展" 生物技术通讯, 第27卷, 第3期, 2016年 5月 31日 (2016 - 05 - 31), 第453-458页	1-10																					
A	ZHANG, F.等. "Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade" Cell Discovery, 第3卷, 2017年 3月 7日 (2017 - 03 - 07), 17004	1-10																					
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																							
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																						
2018年 8月 31日	2018年 9月 12日																						
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																						
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	毛颖																						
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-53961979																						

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:
 附件C/ST. 25文本文件形式
 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/091639

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	2009068625	A2	2009年 6月 4日	WO	2009068630	A1	2009年 6月 4日
				US	2015232562	A1	2015年 8月 20日
				US	9969805	B2	2018年 5月 15日
				US	2011028695	A1	2011年 2月 3日
				WO	2009068625	A3	2009年 8月 6日
				CN	101970490	A	2011年 2月 9日
				EP	2220120	A2	2010年 8月 25日
				EP	2215123	A1	2010年 8月 11日
				US	8975382	B2	2015年 3月 10日
				ZA	201004057	B	2011年 4月 28日
				EP	2215125	A1	2010年 8月 11日
				US	2011059090	A1	2011年 3月 10日
				CA	2705890	A1	2009年 6月 4日
				JP	2011504740	A	2011年 2月 17日
				EP	2650311	A3	2014年 6月 4日
				EP	2650311	A2	2013年 10月 16日
				KR	20100097716	A	2010年 9月 3日
				US	2011053865	A1	2011年 3月 3日
				CA	2706200	A1	2009年 6月 4日
				BR	PI0819656	A2	2015年 6月 23日
				AU	2008328784	B2	2014年 3月 27日
				IL	205734	D0	2010年 11月 30日
				CA	2706675	A1	2009年 6月 4日
				US	2011189203	A1	2011年 8月 4日
				WO	2009068627	A3	2009年 10月 1日
				AU	2008328779	B2	2014年 6月 5日
				CA	2706425	A1	2009年 6月 4日
				EP	2225278	A2	2010年 9月 8日
				WO	2009068627	A2	2009年 6月 4日
				WO	2009068628	A1	2009年 6月 4日
				WO	2009068631	A1	2009年 6月 4日
				AU	2008328785	A1	2010年 6月 10日
				AU	2008328784	A1	2010年 6月 10日
				AU	2008328779	A1	2010年 6月 10日
				AU	2008328781	A1	2010年 6月 17日
				MX	2010005783	A	2010年 8月 31日
WO	2008071447	A2	2008年 6月 19日	EP	2102241	A2	2009年 9月 23日
				CA	2672595	A1	2008年 6月 19日
				US	2015266958	A1	2015年 9月 24日
				US	2016280786	A1	2016年 9月 29日
				US	2011262427	A1	2011年 10月 27日
				US	8907065	B2	2014年 12月 9日
				US	2010028341	A1	2010年 2月 4日
				WO	2008071447	A8	2008年 9月 12日
				US	2016289327	A1	2016年 10月 6日
				AU	2007331672	A1	2009年 7月 30日
CN	105085677	A	2015年 11月 25日	无			
CN	104404630	A	2015年 3月 11日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)