



(21) 申請案號：107102117

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 01 月 19 日

(51) Int. Cl. :

C07K16/24 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

C07K16/30 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61P31/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

A61P37/02 (2006.01)

(30) 優先權：2017/01/20 中國大陸

201710046148.2

(71) 申請人：大陸商大有華夏生物醫藥集團有限公司 (中國大陸) TAYU HUAXIA BIOTECH MEDICAL GROUP CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72) 發明人：陳 列平 (US) ; 羅利群 (CN)

(74) 代理人：黃瑞賢

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：12 共 71 頁

(54) 名稱

人程序性死亡受體 PD-1 的單株抗體及其片段

(57) 摘要

本發明提供了針對人 PD-1 的分離的單株抗體或其抗原結合片段，包含表 2 中所列的重鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3 以及表 2 中所列的輕鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3。

指定代表圖：

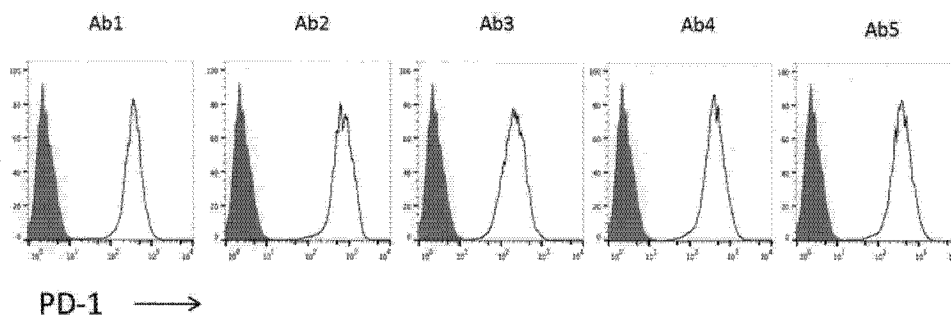


圖 1

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

人程序性死亡受體PD-1的單株抗體及其片段

【技術領域】

【0001】 本發明涉及生物製藥領域，具體而言，涉及針對人 PD-1 的單株抗體及其在疾病治療中的應用。

【先前技術】

【0002】 程序性死亡受體 1(PD-1)是在激活的 T 細胞和 B 細胞上表現的免疫抑制性受體。阻斷 PD-1 與其配體之一 PD-L1 間的相互作用提高腫瘤特異性 CD8⁺T 細胞的免疫性，因此有助於免疫系統清除腫瘤細胞。非專利文獻 1 中詳細綜述了 PD-1 及相關研究。

【0003】 在文獻中已確定了 PD-1 在癌症中的作用。業已在人的很多原發性腫瘤中發現 PD-1(在腫瘤浸潤淋巴細胞上)及/或 PD-L1(在腫瘤細胞上)。這樣的組織包括肺癌、肝癌、卵巢癌、子宮頸癌、皮膚癌、結腸癌、神經膠質瘤、膀胱癌、乳腺癌、腎癌、食道癌、胃癌、口腔鱗狀細胞癌、尿道上皮細胞癌和胰腺癌以及頭頸腫瘤。

【0004】 阻斷 PD-1/PD-L1 的相互作用可導致腫瘤特異性 T 細胞的免疫性提高，因此，有助於由免疫系統清除腫瘤細胞。

【0005】 PCT 國際申請 PCT/US2008/007463 揭露了一種針對人程序性死亡受體 PD-1 的抗體。

【0006】 PD-1/PD-L1 路徑是開發癌症治療的抗體療法的被充分證實的靶標。抗 PD-1 抗體還可用於慢性病毒性感染。最近，有研究顯示 PD-1

在來自 HIV 感染的個體的 T 細胞中高度表現。

【先前技術文獻】

【非專利文獻】

【0007】

【非專利文獻 1】 Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway, Vassiliki A. Boussiotis, NEJM n engl j med 375;18 nejm.org November 3, 2016

【發明內容】

【發明所欲解決之技術問題】

【0008】 本發明欲提供親和力更高，更有效果的單株抗體。

【技術手段】

【0009】 本發明提供了一種針對人 PD-1 的分離的單株抗體或其抗原結合片段，包含：表 2 中所列的重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3，以及表 2 中所列的輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3。

【0010】 在一個實施方案中，前述抗體或其抗原結合片段，其中，其係包含：(i) 序列表 SEQ ID NO:3 所示的重鏈胺基酸序列，及序列表 SEQ ID NO:4 所示的輕鏈胺基酸序列；或(ii)不包含信號肽部分的序列表 SEQ ID NO:3 所示的重鏈胺基酸序列，及不包含信號肽部分的序列表 SEQ ID NO:4 所示的輕鏈胺基酸序列。

【0011】 其中，SEQ ID NO:3 所示的重鏈胺基酸序列的第 1 位-第 19 位（即，MNFGLSLIFLVLVLKGVLC）是信號肽部分；SEQ ID NO:4 所示的輕鏈胺基酸序列的第 1 位-第 20 位（即，

MEKDTLLLWVLLLWVPGSTG) 是信號肽部分。

【0012】 信號肽是出於方便純化等目的而加入的，並非抗體結構中必不可少的部分。該領域具有通常知識者可以理解，在本發明的抗體或抗體片段中，信號肽是任選的，也就是說，可以包含信號肽，也可以不包含信號肽。

【0013】 本發明還提供了針對人 PD-1 的人源化的分離的單株抗體或其抗原結合片段，其包含：

【0014】 (1) 選自序列表 SEQ ID NO:13、14、15 及 16 的重鏈胺基酸序列，或不包含信號肽部分的序列表 SEQ ID NO:13、14、15 及 16 的重鏈胺基酸序列；以及

【0015】 (2) 選自序列表 SEQ ID NO:17、18、19 及 20 的輕鏈胺基酸序列，或不包含信號肽部分的序列表 SEQ ID NO:17、18、19 及 20 的輕鏈胺基酸序列。

【0016】 其中，SEQ ID NO: 13、14、15 和 16 所示的重鏈胺基酸序列的第 1 位-第 24 位（即，MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYG）是信號肽部分；SEQ ID NO:17、18、19 和 20 所示的輕鏈胺基酸序列的第 1 位-第 20 位（即，METDTLLLWVLLLWVPGSTG）是信號肽部分。

【0017】 在一些實施方案中，前述抗原結合片段選自：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂ 和雙抗體。

【0018】 本發明提供了編碼前述抗體或其抗原結合片段的分離的多核苷酸。

【0019】 在一些實施方案中，前述多核苷酸，其中，重鏈編碼序列

如序列表 SEQ ID NO:1 所示，輕鏈編碼序列如序列表 SEQ ID NO:2 所示。

【0020】 在一些實施方案中，前述多核苷酸編碼人源化抗體或其抗原結合片段，並且重鏈編碼序列選自序列表 SEQ ID NO:5、6、7 及 8，輕鏈編碼序列選自序列表 SEQ ID NO:9、10、11 及 12。

【0021】 本發明提供了包含前述分離的多核苷酸的表現載體，以及包含前述表現載體的宿主細胞。

【0022】 本發明提供了藥物組合物，包含前述抗體或其抗原結合片段以及可藥用載體。

【0023】 本發明提供了提高免疫細胞活性的方法，其特徵係包括使免疫細胞與前述抗體或其抗原結合片段接觸。

【0024】 本發明提供了治療疾病的方法，前述方法其特徵係包括將治療有效量的本發明的抗體或其抗原結合片段給予需要治療的受試者。

【0025】 在一些實施方案中，其中，前述疾病選自：癌症、感染性疾病、移植排斥、自身免疫性疾病和神經疾病。在一些實施方案中，前述方法包括對受試者聯合應用其他藥物或療法，包括化療、放射治療、靶向治療、基因治療、細胞治療、幹細胞治療。

【0026】 本發明提供了前述抗體或其抗原結合片段在製備用於治療疾病的藥物中的用途，其中，前述疾病選自：癌症、感染性疾病、移植排斥、自身免疫性疾病和神經疾病。

【0027】 本發明提供了調節細胞功能的方法，其特徵係包括將編碼本發明的抗體或其抗原結合片段的多核苷酸序列遞送至前述細胞中。

【0028】 在一些實施方案中，其中，前述方法用於基因治療、CAR-

T 治療或 CRISPR 治療。

【0029】 在一些實施方案中，利用敲除了 PD-1 基因的小鼠來產生抗人 PD-1 單株抗體，親和力更高，阻斷效果更好，細胞殺傷活力更高。試驗結果表明這種方法能夠得到高親和力的單株抗體。其親和力比目前上市的 PD-1 抗體親和力高出大約 4-7 倍，體外阻斷 PD-L1/PD-1 的相互作用非常有效。同時體外抑制腫瘤生長活性也有所提高。

【發明之效果】

【0030】 本發明試驗結果表明藉由本發明能夠得到高親和力的單株抗體。其親和力比目前上市的 PD-1 抗體親和力高出大約 4-7 倍，體外阻斷 PD-L1/PD-1 的相互作用非常有效。同時體外抑制腫瘤生長活性也有所提高。

【圖式簡單說明】

【0031】

【圖1】 顯示了 PD-1 抗體與 PD-1 蛋白的結合活性。

【圖2】 顯示了 PD-1 抗體對 PD-1 蛋白與 PD-L1 蛋白結合的阻斷效應。

【圖3】 顯示了不同抗體競爭結合實驗結果。

【圖4】 顯示了 DNA 重組抗體的結合和阻斷作用。

【圖5】 顯示了人源化抗體的與 PD-1 蛋白的結合活性

【圖6】 顯示了人源化抗體的阻斷作用。

【圖7】 顯示了人源化母本抗體不同突變體親和力之比較。

【圖8】 顯示了人源化 PD-1 抗體和食蟹猴淋巴細胞 PD-1 蛋白結合之情形。

【圖9】 顯示了人源化 PD-1 抗體體外增強效應細胞殺傷腫瘤細胞之情形。

【圖10】 顯示了人源化 PD-1 抗體阻斷人淋巴細胞的 PD-1 的誘導表現。

【圖11】 顯示了自研 PD-1 抗體與上市 PD-1 抗體動力學和親和力之比較。

【圖12】 顯示了體外抑制腫瘤生長作用之比較。

【實施方式】

【0032】 “抗體”是指表現出所需生物學活性(例如抑制配體與其受體的結合或通過抑制配體誘導的受體信號轉導)的抗體的任何形式。因此，“抗體”以其最廣泛的意義來使用，並明確包括但不限於單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體和多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。

【0033】 “抗體片段”和“抗原結合片段”在本文中可互換使用，意指抗體的抗原結合片段及抗體類似物，其通常包括至少部分母體抗體(parental antibody)的抗原結合區或可變區(例如一個或多個 CDR)。抗體片段保留母體抗體的至少某些結合特異性。理想地，抗體片段保留至少 50%、70%、80%、90%、95%或 100%或更多的母體抗體對靶標的結合親和力。抗體片段實例包括但不限於：Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；雙抗體；線性抗體(linear antibody)；單鏈抗體分子，例如 sc-Fv、單抗體(技術

來自 Genmab)；奈米抗體(技術來自 Domantis)；結構域抗體(技術來自 Ablynx)；和由抗體片段形成的多特異性抗體。工程改造的抗體變體綜述於 Holliger 和 Hudson(2005)Nat.Biotechnol.23：1126-1136 中。

【0034】 “Fab 片段”由一條輕鏈和一條重鏈的 C_{H1} 及可變區組成。Fab 分子的重鏈不能與另一個重鏈分子形成二硫鍵。

【0035】 “Fc”區含有包含抗體的 C_{H1} 和 C_{H2} 結構域的兩個重鏈片段。兩個重鏈片段由兩個或多個二硫鍵並通過 $CH3$ 結構域的疏水作用保持在一起。

【0036】 “Fab'片段”含有一條輕鏈和包含 V_H 結構域和 C_{H1} 結構域以及 C_{H1} 和 C_{H2} 結構域之間區域的一條重鏈的部分，由此可在兩個 Fab'片段的兩條重鏈之間形成鏈間二硫鍵以形成 $F(ab')_2$ 分子。

【0037】 “ $F(ab')_2$ 片段”含有兩條輕鏈和兩條包含 C_{H1} 和 C_{H2} 結構域之間的恆定區的部分的重鏈，由此在兩條重鏈間形成鏈間二硫鍵。因此， $F(ab')_2$ 片段由通過兩條重鏈間的二硫鍵保持在一起的兩個 Fab'片段組成。

【0038】 “Fv 區”包含來自重鏈和輕鏈二者的可變區，但缺少恆定區。

【0039】 “單鏈 Fv 抗體”(或“scFv 抗體”)是指包含抗體的 V_H 和 V_L 結構域的抗體片段，其中這些結構域存在於單個多肽鏈中。一般而言，Fv 多肽另外在 V_H 和 V_L 結構域之間包含多肽連接子，該連接子使得 scFv 能形成用於抗原結合的所需結構。參見國際專利申請 WO88/01649。

【0040】 “雙抗體”為具有兩個抗原結合位點的小抗體片段。前述

片段包含在相同的多肽鏈中與輕鏈可變結構域(VL)連接的重鏈可變結構域(VH)(VH-VL 或 VL-VH)。通過使用短至不能在同一鏈的兩個結構域之間配對的连接子，迫使前述結構域與另一條鏈的互補結構域配對並形成兩個抗原結合位點。

【0041】 術語“嵌合”抗體指這樣的抗體以及表現出所需生物學活性的前述抗體的片段：其中部分重鏈及/或輕鏈與來源於特定物種或屬於特定抗體類別或亞類的抗體相應的序列等同或同源，同時前述鏈的其餘部分與來源於另一物種或屬於另一抗體類別或亞類的抗體相應的序列等同或同源(參見例如美國專利第 4,816,567 號和 Morrison 等，1984、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81：6851-6855)。

【0042】 非人類(例如鼠)抗體的“人源化”形式為含有最小限度的來源於非人類免疫球蛋白序列的嵌合抗體。一般而言，人源化抗體包含至少一個且通常為兩個可變結構域的幾乎全部，其中全部或幾乎全部高度變異環(hypervariable loop)對應於非人類免疫球蛋白的高度變異環，全部或幾乎全部 FR 區為人免疫球蛋白序列的 FR 區。人源化抗體還任選包含至少部分免疫球蛋白(通常為人免疫球蛋白)恆定區(Fc)。更詳細的資料參見 Jones et al，Nature 321：522-525(1986)；Riechmann et al，Nature 332：323-329(1988)。

【0043】 “分離的”抗體為業已被鑒定並與其天然環境組分相分離的抗體。在一些實施方案中，將前述抗體純化到以下程度：(1)超過 95% 重量的抗體，最理想為超過 99% 重量，其由 Lowry 法測定；(2)足以通過用旋杯式測序儀(spinning cup sequencer)獲得 N-末端或內部胺基酸序列的至

少 15 個殘基的程度；或(3)通過在還原或非還原條件下用考馬斯藍或優選銀染色的 SDS-PAGE 確定為同質。

【0044】 “分離的”核酸分子為被鑒定並與至少一種污染性核酸分子(通常在抗體核酸的天然來源中與其締合)分離的核酸分子。因此，分離的核酸分子與在其天然細胞中存在的核酸分子有區別。

【0045】 本文所用術語“單株抗體”是指從基本上同種抗體群中獲得的抗體，即除了可能少量存在的可能的天然突變體外，構成前述群的各個抗體是一致的。單株抗體具有高度特異性，可針對單個的抗原位點。此外，與通常包括針對多個不同的決定位(表位)的多種不同抗體的常規(多株)抗體製備物相反，每種單株抗體僅針對抗原上的單個決定位。修飾語“單株”表示從基本上同種抗體群獲得的抗體的特性，不應理解為需要通過任何特定方法來製備前述抗體。本文單株抗體明確包括“嵌合”抗體。

【0046】 關於抗體及其應用的更多介紹參見中國專利申請 CN201510367410.4，在此通過援引將其全部內容併入本文。

【0047】 本文所用術語“免疫細胞”包括具有造血的起源並在免疫反應中起作用的細胞。免疫細胞包括：淋巴細胞，例如 B 細胞和 T 細胞；自然殺手細胞；髓細胞，例如單核細胞、巨噬細胞、嗜酸性白血球、肥大細胞、嗜鹼性白血球和粒細胞。

【0048】 本文所用序列“變體”是指在一個或多個胺基酸殘基處不同於所示的序列但基本保留其生物學活性的序列。例如，變體可以保留原序列至少 50%，理想為至少 70%，甚至 90%的生物學活性。

【0049】 本文所用術語“約”是指數值在由本領域一般技術人員所

測定的具體值的可接受誤差範圍內，前述數值部分取決於怎樣測量或測定(即測量體系的限度)。例如，“約”或“基本上包含”可意味著不超過 20% 的範圍，理想為不超過 10%，更理想為不超過 5%。除非另外說明，否則當具體值在本文中出現時，“約”的含義應該假定為在該具體值的可接受誤差範圍內。

【0050】 當用“給予”和“治療”提及動物、人、細胞或受試者時，是指將外源性藥物、治療劑、診斷劑或組合物與動物、人、細胞或受試者接觸。“給予”和“治療”可指例如治療方法、藥動學方法、診斷方法、研究方法和實驗方法。“給予”和“治療”還意味著例如通過試劑、診斷劑、療法、聯合用藥或通過其他細胞對細胞進行體外和離體治療。

【0051】 本文所使用的術語“治療有效量”指的是足以及在受試者體內引起臨床醫師所期望的生物學或醫學反應的活性化合物的量。本發明抗體的“治療有效量”可由該領域具有通常知識者根據給藥途徑、受試者的體重、年齡、病情等因素而確定。例如，典型的週總劑量可以為至少 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重，典型地為至少 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 體重。

【0052】 本發明所提供的藥物可以製成粉末、注射劑等臨床可接受的劑型。可以使用任何適當的途徑給受試者施用本發明的藥物組合物，例如可通過口服、靜脈內輸注、肌肉內注射、皮下注射、腹膜下、直腸、舌下，或經吸入、透皮等路徑給藥。

【0053】 本發明的藥物製劑包含本發明 PD-1 抗體或其抗原結合片段以及可藥用載體。為了製備藥物組合物或無菌組合物，讓抗體或其片段與可藥用載體(或賦形劑)混合。

【0054】 本發明藥物組合物還可含有其它藥劑，包括但不限於細胞毒殺劑、細胞生長抑制劑、抗血管形成藥物或抗代謝藥物、靶向腫瘤藥物、免疫刺激劑或免疫調節劑或與細胞毒殺劑、細胞生長抑制劑或其它毒性藥物綴合的抗體。也可與其它治療形式(例如手術、化療及放射治療)一起施用前述藥物組合物。

【0055】 與人 PD-1 特異性結合的本發明抗體或抗原結合片段可用於增加、提高、刺激或上調免疫反應。本發明抗體及抗體片段尤其適用於治療罹患可通過提高 T 細胞介導的免疫反應來治療的疾病的受治療者。理想的受治療者包括需要提高免疫反應的人類患者。

【0056】 本發明抗體或抗原結合片段可用於治療癌症(即抑制腫瘤細胞的生長或存活)。可用本發明抗體抑制其生長的理想的癌症包括通常對免疫療法有反應的癌症，但還包括迄今與免疫療法尚無關聯的癌症。用於治療的理想癌症的非限制性實例包括黑色素瘤(例如惡性轉移性黑色素瘤)、腎癌(例如透明細胞癌)、前列腺癌(例如激素難控制的前列腺腺癌)、胰腺腺癌、乳腺癌、結腸癌、肺癌(例如非小細胞肺癌)、食道癌、頭頸鱗狀細胞癌、肝癌、卵巢癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、膠質母細胞瘤、神經膠質瘤、白血病、淋巴瘤和其它惡性腫瘤。另外，本發明包括可用本發明抗體抑制其生長的難治性或復發性癌。

【0057】 本發明抗體或其抗原結合片段可單獨使用或與以下其它物質聯合使用：抗腫瘤藥或免疫原劑(例如減弱的癌細胞、腫瘤抗原(包括重組蛋白質、肽和糖類分子)、抗原呈現細胞例如用來源於腫瘤的抗原或核酸刺激的樹突細胞、免疫刺激細胞因子(例如 IL-2、IFNa2、GM-CSF)和用編

碼免疫刺激細胞因子(例如但不限於 GM-CSF)的基因轉染的細胞；標準癌症治療(例如化療、放射治療或手術)；或其它抗體(包括但不限於針對以下物質的抗體：VEGF、EGFR、Her2/neu、VEGF 受體、其它生長因子受體、CD20、CD40、CTLA-4、OX-40、4-1BB 和 ICOS)。

【0058】 本發明抗體或其抗原結合片段還可用於防止或治療感染和感染性疾病。抗體或其抗原結合片段可單獨使用，或與疫苗聯合使用，以刺激針對病原體、毒素和自體抗原的免疫反應。抗體或其抗原結合片段可用於刺激對感染人的病毒的免疫反應，這些病毒例如但不限於人免疫缺陷病毒、甲、乙、丙型肝炎病毒、愛滋斯坦-巴爾病毒、人巨細胞病毒、人乳頭瘤病毒、疱疹病毒。抗體或其抗原結合片段可用於刺激對細菌或真菌寄生蟲及其它病原體引起的感染的免疫反應。

【0059】 本發明抗體或其抗原結合片段還可用於防止或治療移植排斥、自身免疫性疾病和神經疾病。

【0060】 本文中使用的術語“自身免疫性疾病”是指由自身免疫反應所引起的任何疾病，即，免疫反應針對受試者身體內的物質。

【0061】 應當注意的是由於自身免疫性可以影響受試者的任何器官或組織，例如受試者的大腦、皮膚、腎臟、肺、肝臟、心臟或甲狀腺，疾病的臨床表現取決於受影響的部位。

【0062】 典型的自身免疫性疾病包括但不限於類風濕性關節炎、銀屑病性關節炎、骨關節炎、斯蒂爾病(Still's disease)、青少年關節炎、狼瘡、糖尿病、重症肌無力症、橋本甲狀腺炎、奧德甲狀腺炎、格雷夫斯病(Graves'disease)、類風濕性關節炎症候群、多發性硬化症、傳染性神經元

炎、急性播散性腦脊髓炎、阿狄森病(Addison)、視性眼陣攣-肌陣攣綜合症、強直性脊椎炎、抗磷脂抗體綜合症、再生障礙性貧血、自身免疫性肝炎、乳糜瀉、古德帕斯徹症候群、特發性血小板減少性紫癩、視神經炎、硬皮病、原發性膽汁性肝硬化、萊特爾症候群(Reiter syndrome)、高安動脈炎(Takayasu's arteritis)、顛動脈炎、溫型自身免疫性溶血性貧血、韋格納肉芽腫病、銀屑病、全身脫毛、貝赫切特病(Behcet's Disease)、慢性疲勞、家族性自主神經功能異常、子宮內膜異位、間質性膀胱炎、神經肌強直、硬皮病和外陰痛等。

【0063】 本文中使用的術語"神經疾病"是指影響中樞神經系統及/或具有在中樞神經系統中的病因的疾病或病症。示例性的神經疾病的具體例子包括但不限於：帕金森病、阿爾茨海默病 (Alzheimer's disease)、普里昂疾病 (prion disease)、亨廷頓病 (Huntington's disease)、雷特症候群 (Rett syndrome)等。

【0064】 本發明抗 PD-1 抗體或其抗原結合片段可以與其他藥物或療法聯合應用，例如與一種或多種其它治療劑(例如細胞毒劑、放射性毒性劑或免疫抑制劑)聯合應用。前述抗體可與前述藥劑連接(作為免疫複合體)，或可與治療劑分開給予，例如可在給予治療劑之前、之後或同時給予抗體。此外，本發明抗體可與化療、放射治療、靶向治療、基因治療、細胞治療、幹細胞治療等聯合應用，尤其是用於癌症的治療。

【0065】 本發明抗 PD-1 抗體或其抗原結合片段或其編碼基因還可以被導入細胞中，以調節細胞功能或活性，或用於治療疾病。該方法包括體外應用和體內應用。該方法特別適合用於基因治療、CAR-T 治療或

CRISPR 治療。

【0066】 本發明抗體及抗體片段的非治療性應用包括：用於流式細胞術分析、免疫組織化學和體外功能分析、西方點墨法和 ELISA 等。本發明抗體還可用作親和純化試劑。

【0067】 前述抗體還可用於診斷測定，例如用於檢測 PD-1 在特定的細胞、組織或血清中的表現。為了診斷應用，通常用可檢測的部分標記(直接或間接)抗體。可利用眾多標記物，其通常分為以下類別：生物素、螢光染料、放射性核苷酸、酶、碘和生物合成標記物。

【0068】 本發明抗體可用於任何已知的測定法中，例如競爭性結合測定法，直接和間接酵素免疫分析法和免疫沉澱測定法。抗體還可用於體內診斷測定。例如用放射性核素(例如 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^4C 、 ^{31}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{18}F)標記抗體，以便定位抗原或表現抗體的細胞。

【0069】 通過參考以下實施例將更充分地理解本發明。然而，這些實施例不應該理解為限制本發明範圍。

【實施例】

實施例 1 產生及篩選 PD-1 抗體

【0070】 1.產生人 PD-1 融合蛋白

從人周邊血單核細胞 (PBMC) 利用 MACS 磁珠 (MiltenyiBiotec) 分離出 T 淋巴細胞，提取 RNA (RNeasy mini kit, QIAGEN) 並獲得第一鏈 cDNA (SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen) 並根據人 PD-1 基因 DNA 序列 (NCBI Reference Sequence: NM_005018.2) 通過 PCR

反應獲得人 PD-1 分子全長序列。人 PD-1 融合蛋白是將 PD-1 分子胞外部分序列插入到一個含有小鼠免疫球蛋白 G2aCH2-CH3 結構域的表現質體 mIgV(H Dong et al Nat Med. 1999;5:1365-1369) 中。利用暫態表現方法 (transient expression)將質體 DNA 用 PEI 試劑 (Sigma-Aldrich) 轉染 293T 細胞產生人 PD-1 小鼠 Ig 融合蛋白 (hPD-1mIg)，細胞分泌上清液經 IgA 純化柱 (HiTrap Protein A HP, GE healthcare) 純化蛋白並經 SDS-PAGE 凝膠電泳鑒定確認。

【0071】 2.構建 PD-1 穩定表現細胞株

為檢測和鑒定 PD-1 抗體，本發明構建了人 PD-1 蛋白穩定表現細胞株。將上述得到的 PD-1 全長序列插入到 pcDNA3.1(-)表現質體，利用 lipofactamin 2000 轉染試劑 (Thermo Fisher Scientific) 轉染中國倉鼠卵巢成纖維細胞 (CHO)，經 G418 篩選得到穩定表現的陽性(positive)細胞株 (CHO/hPD1)。

【0072】 3.免疫小鼠

取 6-8 周齡大小的雌性 Balb/c 小鼠，用 hPD-1mIg 融合蛋白與福氏完全佐劑(CFA, Sigma)混合乳化液皮下多點接種免疫，每隻小鼠 80-100 μ g 蛋白，3 周後用相同融合蛋白與不完全佐劑(IFA, Sigma)乳化液進行加強免疫，共免疫 3 次。每次在小鼠免疫後 2 周左右取血清測定抗體效價，血清效價用 CHO/hPD1 細胞通過流式細胞儀測定。二抗用螢光標記的羊抗鼠 IgG (eBioscience)。當血清效價達到足夠高時，用 80 μ g hPD-1mIg 融合蛋白溶於 PBS 中，腹腔注射加強免疫一次，5 天后取出脾臟進行融合。

【0073】 4.製備及篩選雜交瘤

雜交瘤細胞的產生通過免疫小鼠的脾細胞與小鼠骨髓瘤細胞系 (SP2/0-Ag14) 在聚乙二醇(PEG1500, Roche) 融合劑作用下進行融合，融合的細胞經過 HAT (Sigma Aldrich) 選擇培養，利用發明人實驗室建立的高通量轉染和篩選系統 (S Yao et al. Immunity.2011; 34(5):729-40.) 鑒定培養上清，篩選得到的陽性單株抗體再經過流式細胞儀檢測確認能夠和 PD-1 陽性表現細胞結合。挑選出的陽性株(positive clone)細胞株經過 5 遍以上有限稀釋法進行次選植，確保是單一來源的陽性株。

實施例 2 抗 PD-1 單株抗體的特性分析

【0074】 單株抗體同種型(isotype)的鑒定

得到的幾株單株抗體用小鼠 IgG 同種型檢測套組(Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit, BD Biosciences) 進行測定，5 個單株抗體重鏈均為 IgG1，輕鏈均為κ鏈。

【0075】 單株抗體特異性結合的評估

種屬交叉反應的鑒定顯示幾株 PD-1 抗體株只和人 PD-1 蛋白結合，與小鼠 PD-1 無交叉結合。

【0076】 PD-1 抗體與 PD-1 蛋白的結合反應：將發明人實驗室得到的 5 個 PD-1 抗體用流式細胞儀檢測及比較與 CHO/hPD-1 細胞結合活性，結果顯示這些抗體與 PD-1 蛋白都有較強的結合活性 (圖 1)。

【0077】 PD-1 抗體對 PD-1 受體蛋白和其配體 PD-L1 結合的阻斷作用：腫瘤細胞上表現 PD-L1 配體蛋白與其在淋巴細胞表現的 PD-1 受體結合會誘導產生免疫細胞功能抑制而導致腫瘤逃避宿主免疫系統監視作用，阻斷 PD-1 與 PD-L1 之間的相互作用是 PD-1 抗體抗腫瘤免疫治療的一個

重要作用機制。為檢測抗體的阻斷活性，本發明將 100ng hPD-1hIg 融合蛋白分別與 100ng、200ng、400ng 和 800ng 不同劑量的不同 PD-1 抗體混合，並設 mIgG 和 PBS 緩衝液對照組。4°C 培養 30 分鐘，然後與 PD-L1 陽性表現細胞(CHO/PD-L1)在 4°C 作用 30 分鐘，用含 1%小牛血清 PBS 緩衝液離心洗一遍，加入螢光標記的羊抗人 IgG，4°C 培養 20 分鐘，洗後用流式細胞儀檢測。結果顯示 2 個 PD-1 抗體沒有阻斷活性，其餘 3 個抗體都能夠以劑量依賴性阻斷 PD-1 與 PD-L1 蛋白間的結合（圖 2）。

【0078】 抗體競爭結合實驗：為弄清這些 PD-1 抗體是否識別同一個或不同抗原表位，本發明做了抗體競爭結合實驗。首先分別用 10 μ g 不同 PD-1 抗體與 CHO/hPD-1 細胞在 4°C 培養 30 分鐘，用含 1%小牛血清 PBS 緩衝液離心洗一遍後加入 0.1 μ g 的生物素（Biotin）標記的 Ab4 或 Ab5，4°C 培養 20 分鐘，洗後加入螢光標記的鏈黴親和素（Streptavidin,SA; eBioscience），4°C 培養 20 分鐘，洗後用流式細胞儀進行分析。結果顯示 Ab4 和 Ab5 相互競爭結合同一抗原表位，這兩個抗體與 Ab3 有部分競爭結合，與 Ab1 和 Ab2 不存在競爭結合（圖 3）。

實施例 3 抗 PD-1 抗體的序列測定和人源化

【0079】 為了將 PD-1 抗體能夠用於臨床腫瘤治療，本發明根據上述抗體活性的測試結果選擇了 Ab4 進行序列測定和人源化。

【0080】 單株抗體序列測定

首先利用 RNA 純化套組（RAeasy Mini Kit，Qiagen 74104，QIAshredder，Qiagen 79654）從雜交瘤細胞提取和純化總 RNA。然後用套組（SMARTer RACE cDNA Amplification Kit, Clontech）並按公司試劑操作

手冊將 RNA 反轉錄合成第一鏈 cDNA 鏈。利用 5' RACE 技術，用套組提供的通用引子 UPM (universal primer) 作為上游引子，和根據小鼠 IgG1 重鏈可變區和輕鏈 κ 鏈基因序列設計的基因特異引子 GSP (genespecific primer) 作為下游引子，以 SMART 第一鏈 cDNA 為模板進行 PCR 循環 (cycle)。然後將 PCR 產物分別連接到 T 載體 (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen K2875-J10)。選殖進行序列測定和分析，分別得到抗體的輕鏈和重鏈可變區序列，再根據重鏈可變區序列和小鼠 IgG1 序列設計引子，通過 PCR 獲得重鏈全長序列，利用 VBASE2 對序列進行分析，確定了該抗體輕、重鏈的胺基酸序列以及相應的 CDR 區域 (見表 2)。其 DNA 編碼序列參見表 1。

【0081】 單株抗體 DNA 重組序列和抗體表現

為確保選殖抗體序列的正確性，分別把抗體的輕、重鏈全長序列插入到 pcDNA3.1(-)表現質體中，並通過暫態轉染 293T 細胞得到蛋白產物，經純化和鑒定確認蛋白產物與原抗體一樣能夠和 PD-1 蛋白結合 (圖 4.A) 並能夠阻斷 PD-1 蛋白與 PD-L1 的結合(圖 4.B)。

【0082】 抗體序列人源化

為了使抗體能夠應用臨床病人治療，對抗體序列進行了人源化改造。首先將抗體重鏈的 Fc 部分換為人 IgG4 序列，並將 IgG 鉸鏈區 4 的 CPSCP 換為 IgG1 的 CPPCP (S228P)，同時把抗體輕鏈換成人的 κ 鏈，得到人鼠嵌合的母本抗體 (Chimeric Antibody)。在確認母本抗體的功能活性後對重鏈可變區和輕鏈可變區序列進行人源化改造，將所得到的 3 個人源化重鏈變異體 (表 3 序列 6-8，表 4 序列 14-16)、3 個人源化輕鏈變異

體（表 3 序列 10–12，表 4 序列 18–20）互相組合，共得到 9 個不同的變異體序列（Variants 1 至 Variants 9）。將 1 個母本和 9 個變異體序列分別選殖到高表現載體中，用暫態轉染 293 細胞得到抗體上清，純化後的抗體經 SDS-PAGE 膠蛋白電泳和定序驗證確認正確。抗體的 DNA 和胺基酸序列見表 3、表 4。其中，Variants 1 的重鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：6，輕鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：10；Variants 2 的重鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：6，輕鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：11；Variants 3 的重鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：6，輕鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：12；Variants 4 的重鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：7，輕鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：10；Variants 5 的重鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：7，輕鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：11；Variants 6 的重鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：7，輕鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：12；Variants 7 的重鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：8，輕鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：10；Variants 8 的重鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：8，輕鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：11；Variants 9 的重鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：8，輕鏈胺基酸序列為 SEQ ID NO：12。

實施例 4 人源化抗體的特性和功能

【0083】 人源化抗體的與 PD-1 蛋白之結合活性：對嵌合母本和突變抗體進行測試和比較，取 CHO/hPD-1 細胞懸浮於含 1%小牛血清的 PBS 並分裝於流式管中，分別加入不同劑量的母本和突變體抗體，4°C 培養 30 分鐘，用含 1%小牛血清 PBS 緩衝液離心洗一遍後加入螢光標記的羊抗人 IgG 二抗（eBioscience），4°C 培養 20 分鐘洗後用流式細胞儀進行分析。結果顯示所有人源化突變體均可與 PD-1 蛋白結合，與嵌合母本抗體比較，

部分突變抗體的結合能力更高，有的相對要低一些（圖 5）。

【0084】 人源化抗體對 PD-1 受體蛋白和其配體 PD-L1 結合的阻斷作用：用 400ng、300ng、200ng、100ng 和 50ng 不同 PD-1 抗體分別與 100ng hPD-1mIg 融合蛋白混合，設 hIgG 和 PBS 緩衝液對照組，4°C 培養 30 分鐘，然後與 PD-L1 陽性表現細胞(CHO/PD-L1)作用 30 分鐘，用含 1% 小牛血清 PBS 緩衝液離心洗一遍後加入螢光標記的羊抗鼠 IgG-，4°C 培養 20 分鐘，洗後用流式細胞儀檢測。結果顯示所有人源化突變體抗體都能夠阻斷 PD-1 與 PD-L1 蛋白間的結合並呈劑量依賴性，部分突變體的阻斷作用高於母本抗體（圖 6）。

【0085】 人源化抗體親和力；利用 Biacore 儀器（Biacore T100，GE Healthcare Life Sciences）對母本抗體和突變體抗體進行了親和力的分析比較。將蛋白抗原 hPD-1mIg 偶聯在 CM5 晶片表面，檢測抗體作為分析物（流動相），檢測相互作用。結果顯示突變體抗體與母本抗體比較，結合速率(K_a)差異不大，解離速率(K_d)有 2 個突變體較嵌合抗體略慢，親和力 (K_D)母本抗體為 $9.89E-11M$ ，具有較強的親和力，有 2 個突變體 K_D 值與嵌合抗體接近（圖 7）。

實施例 5 人源化抗體其它生物功能特性

【0086】 人源化 PD-1 抗體與食蟹猴的淋巴細胞 PD-1 蛋白交叉結合：為今後臨床前的毒理測試需要，本發明測試 PD-1 抗體能否結合猴子 PD-1 蛋白。取食蟹猴的周邊單核細胞，用淋巴細胞分離液分離出淋巴細胞懸浮於 10%小牛血清 RPMI 1640 培養液裡，加入固著 $1\mu g/ml$ 抗人 CD3 抗體的 24 孔培養板中或加入沒有固著抗體的 24 孔培養板中，培養液中加入

10ng/ml 抗 hIFN γ 和 50imL hIL2，5%CO2，37°C 條件培養 2 天。收穫細胞用 PBS 洗 1 遍，加入 PD-1 抗體，4°C 培養 30 分鐘，洗後再加入螢光標記的抗人 IgG，4°C 培養 20 分鐘，洗後用流式細胞儀檢測。結果顯示人源化 PD-1 抗體能夠和食蟹猴淋巴細胞 PD-1 蛋白結合（圖 8）。

【0087】 體外抗腫瘤作用：發明人根據 PD-1 抗腫瘤作用的機制設計了一個體外模型。首先利用從人周邊血淋巴細胞（PBMC）分離出的 CD8+淋巴細胞，與經過放射線照射的轉染 hB7-1 的人黑色素瘤細胞（624 Mel/B7-1）共培養，產生能夠殺傷 624 Mel 瘤細胞的同種異體細胞毒性淋巴細胞（alloCD8+ CTL）。然後將 allo CTL 效應細胞和 624 Mel 瘤細胞按一定比例混合後，加入 PD-1 抗體或對照蛋白培養 5 天，用 0.5%結晶紫染色細胞後，用酵素免疫分析測讀儀讀取 OD(450nm)值，根據瘤細胞存活計算殺傷活性，結果顯示部分人源化的 PD-1 突變體抗體體外情形下能夠增強效應細胞殺傷腫瘤細胞的功能（圖 9，E：T=效應細胞（Effect cells）：靶細胞(target cells)）。

【0088】 人源化 PD-1 抗體抑制人淋巴細胞 PD-1 的表現：腫瘤細胞表現 PD-L1 可誘導周邊的淋巴細胞表現 PD-1 而導致淋巴細胞活性受抑制而不能殺傷腫瘤細胞，發明人利用體外模型類比這種情況，檢測在加入 PD-1 抗體後能否抑制人淋巴細胞 PD-1 的表現從而恢復淋巴細胞的正常功能。發明人將轉染 PD-L1 的人黑色素瘤細胞(624 Mel/hPD-L1)與 alloCD8+ CTL 按比例混合加入 24 孔培養板，並在培養液中分別加入 10 μ g/ml 不同 PD-1 抗體及對照蛋白，培養 4 天后，用螢光標記的 PD-1 和 CD8 抗體染色細胞後用流式細胞儀檢測淋巴細胞上 PD-1 的表現情況。結果顯示培養

液和 hIgG 對照組的 CD8+ 淋巴細胞表現 PD-1 表現陽性，而加入母本抗體和突變抗體的各組 CD8+ 淋巴細胞 PD-1 蛋白均為陰性（圖 10），說明加入 PD-1 抗體後能抑制淋巴細胞表面的 PD-1 表現。

實施例 6 人源化 PD-1 抗體與商業化抗體功能比較

【0089】 發明人選擇了目前已獲批在臨床治療腫瘤病人的 2 個廠家的商業化 PD-1 抗體和本發明的抗體做基本特性的比較，包括 Keytruda (penbrolizumab) (Merck & CO., INC), 100mg/4ml, Lot MO23694 Exp 2017JUL13；Opdivo (nivolumab) (Bristol-Myers Squibb), 100mg/10ml, Lot AAK5824Exp 02.2018；Opdivo (nivolumab) (Bristol-Myers Squibb), 40mg/4ml, Lot AAK2713Exp10. 2017。

【0090】 6.1 抗體動力學和親和力比較

抗體動力學及親和力比較使用 Biacore T200 儀器 (GE Healthcare Life Sciences)，在 GE 公司技術工程師操作下，檢測了本發明所得 PD-1 抗體 FMU100（即，Variant 3）與 3 個上市抗體對 PD-1mFc 蛋白的動力學及親和力的差異。將 PD-1mFc 蛋白分別偶聯在 CM5 晶片的 4 通道（33RU），本發明所得抗體和商品抗體作為分析物（流動相），檢測相互作用。經摸索後，將 PD-1 抗體均稀釋到 50nM 作為最高濃度；1.5625，3.125，6.25，12.5，25，50nM 進行濃度梯度進樣，使用 Glycine pH1.7 作為再生條件。測試結果顯示結合速率 K_a 差異不大，本發明所得抗體較商品抗體稍低；解離速率 K_d ，本發明所得抗體較商品抗體慢 10 倍；親和力 K_D ，本發明所得抗體較商品抗體高 4-7 倍（圖 11）。

【0091】 6.2 體外抑制腫瘤生長作用比較

如前所述，將 alloCD8+CTL 效應細胞和 624 Mel 瘤細胞按一定比例混合後，加入本發明所得 PD-1 抗體和 3 個上市抗體或對照蛋白共培養 5 天，用 0.5% 結晶紫染色細胞後，用酵素免疫分析測讀儀讀取 OD(450nm) 值，根據瘤細胞存活計算殺傷活性，結果顯示本發明的 PD-1 抗體和 3 個上市抗體體外都能夠增強效應細胞殺傷腫瘤細胞的功能，本發明的抗體增強作用高於 2 個上市抗體（圖 12，E：T = 效應細胞 (Effect cells): 靶細胞 (target cells)）。

【0092】 【表 1】 PD-1 單株抗體 DNA 序列 (對應於 Ab4)

重鏈序列 (SEQ ID NO:1)

ATGAATTTCTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTGTGTTTTAAAGGTGTCCTGTGTGAAGTGAAGTTGGTGGAGT
 CTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTA
 TACCATGTCTTGGATTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTAGTCATGGTGGTGGTGC
 ACCTACTATCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAA
 TGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACATAGTGGTTACGAGAGGGGATATTACTA
 TGTATGGATTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCA
 CTGGCCCTGGATCTGCTGCCCAAACCTAACCATGGTGACCCTGGGATGCCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGC
 CAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCcCAGCTGTCTCTGCAGTCTGACCT
 CTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCCTCACCTGCAACGTTGCCAC
 CCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCC
 CAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCAAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTAC
 GTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCAC
 ACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACC
 AGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCAT
 CTCCAAAACCAAAGGCAGACCAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACC'TCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGAT
 AAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGC
 CAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTTACTTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGT
 GCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACT
 GAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA

輕鏈序列(SEQ ID NO:2)

ATGGAGAAAAGACACACTCCTGCTATGGGTCTGCTTCTCTGGGTTCCAGGTTCCACAGGTGACATTGTGCTGACCC
 AATTTCCAACCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGATTA
 CTATGGCTTTAGTTTTATAAACTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCC
 AACCAGGGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTTGGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCATCCTA
 TGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTTCAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAA
 GCTGGAAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA
 GGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAAC'TTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTG
 AACGACAAAATGGCGTCTTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCT
 CACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCC
 ATTTAA

【0093】 【表 2】 PD-1 單株抗體的胺基酸序列(對應於 Ab4)

重鏈序列 (SEQ ID NO:3)

MNFGLSLIFLVLVLKGVLCEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWIRQTPEKRLEWVAYISHGGGDTY
 signal Peptide CDR1 CDR2
YPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYERGYYYVMDYWGQTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPG
 CDR3
SAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLSQDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTK
 CH1(constant region1)
VDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPRE
 Hinge CH2(constant region2)
EQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITD
FFPEDITVEWQNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
 CH3(constant region3)

輕鏈序列 (SEQ ID NO:4)

MEKDTLLLWLLLWVPGSTGDIVLTQFPTSLAVSLGQRATISCRASESVDYYGFSFINWFQKPGQPKLLIYAASNQ
 signal Peptide CDR1 CDR2
GSGVPARFGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV
 CDR3
VCFLNNFYPKDINVKKIDGSERQNGVLNSWTDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI
 Kappa Constant Region

【0094】 【表 3】 PD-1 單株抗體母本和人源化變異體 DNA 序列

單株抗體母本重鏈 hIgG4-S228P (SEQ ID NO:5)

ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCCCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCGAAG
TGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACTTTCAGTAGCTATACCATGTCTTGGATTCCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTAGT
CATGGTGGTGGTGACACCTACTATCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAATGCCAAGAACA
CCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACATAGTGGTTACGA
GAGGGGATATTACTATGTTATGGATTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGC
CCCAGCGTGTTCCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGG
ACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGGGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGT
CCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTACCCTGCTTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTAC
ACCTGCAACGTGGACCATAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGTGGAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTC
CTCCTTGCCCTGCTCCTGAATTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGAT
GATCTCCCGGACACCCGAAGTCACCTGCGTCTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGAGTGGAGGTGCATAACGCCAAAACCAAGCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCCG
TGTCCGTGCTCACCGTCTGCATCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCT
GCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCCTCCCTCCC
AGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAAGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTG
TGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAACAAC TACAAGACCACACCCCCGCTGCTGGACTCCGATGGCTCCTT
CTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCCCGTGGCAAGAGGGAAACGTGTTTCTGCTGCTCCGTGATGCAC
GAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCAAGTAG

人源化重鏈變異體 1 (SEQ ID NO:6)

ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCCCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCGAAG
TGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTT
CACCTTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCTGGAATGGGTGTCTACATCTCT
CACGGCGGAGGCGACACCTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAACCTCAAGAACA
CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTCGGCACCTTGCTACGA
GCGGGGCTACTACTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTATCTGCTAGCACCAAGGGC
CCCAGCGTGTTCCTCTCGTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGG
ACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGGGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGT
CCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTACCCTGCTTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTAC
ACCTGCAACGTGGACCATAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGTGGAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTC
CTCCTTGCCCTGCTCCTGAATTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGAT
GATCTCCCGGACACCCGAAGTCACCTGCGTCTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGAGTGGAGGTGCATAACGCCAAAACCAAGCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCCG
TGTCCGTGCTCACCGTCTGCATCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCT
GCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCCTCCCTCCC
AGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAAGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTG

TGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAACAACCTACAAGACCACACCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTT
 CTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCAC
 GAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCAAGTAG

人源化重鏈變異體 2 (SEQ ID NO:7)

ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCGAAG
 TGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTT
 CACCTTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATCTCT
 CACGGCGGAGGCGACACCTACTACCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAACCTCAAGAACA
 CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTCGGCACCTCTGGCTACGA
 GCGGGGCTACTACTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTTCATCTGCTAGCACCAAGGGC
 CCCAGCGTGTCTTCTCTCGTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGG
 ACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCTCCGCTGT
 CCTGCAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTACCCTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTAC
 ACCTGCAACGTGGACCATAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTC
 CTCCTTGCCCTGCTCCTGAATTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGAT
 GATCTCCCGGACACCCGAAGTCACCTGCGTCTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGG
 TACGTGGACGGAGTGGAGGTGCATAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCG
 TGTCCGTGCTCACCGTCTGCATCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCT
 GCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCTCCCTCCC
 AGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAAGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTG
 TGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAACAACCTACAAGACCACACCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTT
 CTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCAC
 GAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCAAGTAG

人源化重鏈變異體 3 (SEQ ID NO:8)

ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCGAAG
 TGAAGCTGCTGGAAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTT
 CACCTTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATCTCT
 CACGGCGGAGGCGACACCTACTACCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAACCTCAAGAACA
 CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTCGGCACCTCTGGCTACGA
 GCGGGGCTACTACTACGTGATGGACTACTGGGGCAAGGGCACCACCGTACCCTGTTCATCTGCTAGCACCAAGGGC
 CCCAGCGTGTCTTCTCTCGTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGG
 ACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCTCCGCTGT
 CCTGCAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTACCCTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTAC
 ACCTGCAACGTGGACCATAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTC
 CTCCTTGCCCTGCTCCTGAATTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGAT
 GATCTCCCGGACACCCGAAGTCACCTGCGTCTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGG
 TACGTGGACGGAGTGGAGGTGCATAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCG
 TGTCCGTGCTCACCGTCTGCATCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCT
 GCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCTCCCTCCC
 AGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAAGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTG
 TGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAACAACCTACAAGACCACACCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTT

CTTCCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACGTGTTTCAGCTGCTCCCGTGATGCAC
GAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCAAGTAG

單株抗體母本 kappa 輕鏈(SEQ ID NO:9)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCGGCTCCACCGGAGACATTGTGCTGACCC
AATTTCCAACCTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGATTA
CTATGGCTTTAGTTTTATAAACTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCC
AACCAGGGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTTGGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCATCCTA
TGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTGAGCAAGTAAGGAGGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAA
GCTGGAATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGC
ACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCC
TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCT
GACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCC
GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

人源化輕鏈變異體 1 (SEQ ID NO:10)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCGGCTCCACCGGAGACATCGTGATGACCC
AGTCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCTCCGAGTCCGTGGACTA
CTACGGCTTCTCCTTCTGAACTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCC
AACC CGAGTCTGGCGTGCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCTGACCATCAGCTCCC
TGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAGAGGTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACAAA
GCTGGAATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGC
ACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCC
TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCT
GACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCC
GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

人源化輕鏈變異體 2 (SEQ ID NO:11)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCGGCTCCACCGGAGACATCGTGATGACCC
AGTCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGGCCTCCGAGTCCGTGGACTA
CTACGGCTTCTCCTTCTGAACTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCC
AACC CGAGTCTGGCGTGCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCTGACCATCAGCTCCC
TGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAGAGGTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACAAA
GCTGGAATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGC
ACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCC
TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCT
GACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCC
GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

人源化輕鏈變異體 3 (SEQ ID NO:12)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCGGCTCCACCGGAGACATCCAGCTGACCC
AGTCCCCGACTCCCTGTCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGGCCTCCGAGTCCGTGGACTA
CTACGGCTTCTCCTTCTGAACTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCC

AACCGCCAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCC
TGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACAAA
GCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGC
ACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGGAAGGTGGACAACGCCC
TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTT
GACCTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCC
GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

【0095】 【表 4】 PD-1 單株抗體母本和人源化變異體胺基酸序列

單株抗體母本重鏈 hIgG4-S228P (SEQ ID NO:13)

MDPKGSLSWRILLFSLAFELSYGEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSYTM^{CDR1}SWIRQTPEKRLEWVAYISHGGGDTYYPDTV
 signal Peptide CDR1 CDR2
 KGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYER^{CDR3}GYYYVMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
 CDR3
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV^{CH1 (constant region1)}DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
 CH1 (constant region1) Hinge
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 CH2 (constant region2)
 KVS^{CH3 (constant region3)}NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
 CH3 (constant region3)
 TVDKSRWQEGNVFSCSV^{CH3 (constant region3)}MHEALHNHYTQKLSLSLGK

人源化重鏈變異體 1 (SEQ ID NO:14)

MDPKGSLSWRILLFSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTM^{CDR1}SWVRQAPGKGLEWVSYISHG
 CDR1 CDR2
 GGD^{CDR3}TYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYER^{CDR3}GYYYVMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF
 CDR3
 PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV^{CDR3}DH
 KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV^{CDR3}MHEALHNHYTQKSL
 SLSLGK

人源化重鏈變異體 2 (SEQ ID NO:15)

MDPKGSLSWRILLFSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTM^{CDR1}SWVRQAPGKGLEWVSYISHG
 CDR1 CDR2
 GGD^{CDR3}TYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYER^{CDR3}GYYYVMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF
 CDR3
 PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV^{CDR3}DH
 KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV^{CDR3}MHEALHNHYTQKSL
 SLSLGK

人源化重鏈變異體 3 (SEQ ID NO:16)

MDPKGSLSWRILLFSLAFELSYGEVKLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTM^{CDR1}SWVRQAPGKGLEWVSYISHG
 CDR1 CDR2
 GGD^{CDR3}TYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYER^{CDR3}GYYYVMDYWGKGTTVTVSSASTKGPSVF

CDR3

PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDH
 KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
 SLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL
 SLSLGK

單株抗體母本 kappa 輕鏈(SEQ ID NO:17)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQFPTSLAVSLGQRATISCRASESVDYYGFSFINWFQQKPGQPPKLLIYAASNQ

signal Peptide

CDR1

CDR2

GSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV

CDR3

VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN

Kappa Constant Region

RGEC

人源化輕鏈變異體 1 (SEQ ID NO:18)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVDYYGFSFLNWFQQKPGQPPKLLIYAASNR

CDR1

CDR2

ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV

CDR3

VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN

RGEC

人源化輕鏈變異體 2 (SEQ ID NO:19)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDYYGFSFLNWFQQKPGQPPKLLIYAASNR

CDR1

CDR2

ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV

CDR3

VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN

RGEC

人源化輕鏈變異體 3 (SEQ ID NO:20)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDYYGFSFLNWFQQKPGQPPKLLIYAASNR

CDR1

CDR2

QSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV

CDR3

VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN

RGEC

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 大有華夏生物醫藥集團有限公司

<120> 人程序性死亡受體 PD-1 的單株抗體及其片段

<130> T00022-P01

<140> 107102117

<141> 2018-01-19

<150> CN 201710046148.2

<151> 2017-01-20

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1 單株抗體DNA 序列 (對應於Ab4): 重鏈序列

<400> 1

atgaatttcg ggctcagctt gatcttcctt gtccttgttt taaaagggtg cctgtgtgaa 60

gtgaagttgg tggagtctgg gggagggtta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tataccatgt cttggattcg ccagactcca 180

gagaagaggg tggagtgggt cgcatacatt agtcatgggtg gtggtgacac ctactatcca 240

gacactgtaa agggccgatt caccatctcc agggacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgagca gtctgaagtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acatagtggg 360

tacgagaggg gatattacta tgttatggat tactgggggtc aaggaacctc agtcaccgtc 420

tcctcagcca aaacgacacc cccatctgtc tatccactgg ccctggatc tgctgcccaa 480

actaactcca tggtgaccct gggatgcctg gtcaagggtc atttccctga gccagtgaca 540

gtgacctgga actctggatc cctgtccagc ggtgtgcaca ccttcccagc tgtcctgcag 600
 tctgacctct aactctgag cagctcagtg actgtcccct ccagcacctg gccagcgag 660
 accgtcacct gcaacgttgc ccaccggcc agcagcacca aggtggaca gaaaattgtg 720
 cccagggatt gtggttgtaa gccttgcata tgtacagtcc cagaagtatc atctgtcttc 780
 atcttcccc caaagcccaa ggatgtgctc accattactc tgactcctaa ggtcacgtgt 840
 gttgtggtag acatcagcaa ggatgatccc gaggtccagt tcagctgggt tgtagatgat 900
 gtggaggtgc acacagctca gacgcaacc cgggaggagc agttcaacag cactttccgc 960
 tcagtcagtg aacttcccat catgcaccag gactggctca atggcaagga gttcaaatgc 1020
 aggtcaaca gtgcagcttt cctgcccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaaggc 1080
 agaccgaagg ctccacaggt gtacaccatt ccacctcca aggagcagat ggccaaggat 1140
 aaagtcagtc tgacctgcat gataacagac ttcttcctg aagacattac tgtggagtgg 1200
 cagtggaatg ggagccagc ggagaactac aagaacctc agccatcat ggacacagat 1260
 ggctcttact tcgtctacag caagctcaat gtgcagaaga gcaactggga ggcaggaaat 1320
 actttcacct gctctgtgtt acatgagggc ctgcacaacc accatactga gaagagcctc 1380
 tcccactctc ctggtaaatg a 1401

<210> 2

<211> 690

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1 單株抗體DNA 序列 (對應於Ab4): 輕鏈序列

<400> 2

atggagaaaag acacactcct gctatgggtc ctgcttctct gggttccagg ttccacaggt 60

gacattgtgc tgaccaatt tccaacttct ttggctgtgt ctctaggga gagggccacc 120

atctcctgca gagccagcga aagtgttgat tactatggct ttagttttat aaactggttc 180
 caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccagggatcc 240
 ggggtccctg ccaggtttgg tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 300
 cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420
 atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggagggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480
 aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
 aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
 agcacctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
 actcacaaga catcaacttc acccatttaa 690

<210> 3

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體的胺基酸序列(對應於Ab4): 重鏈序列

<400> 3

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

Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp
 385 390 395 400

Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile
 405 410 415

Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln
 420 425 430

Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His
 435 440 445

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 4

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體的胺基酸序列(對應於Ab4): 輕鏈序列

<400> 4

Met Glu Lys Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Phe Pro Thr Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45

Val Asp Tyr Tyr Gly Phe Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
 85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220

Ser Thr Ser Pro Ile
 225

<210> 5

<211> 1425

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體母本和人源化變異體DNA 序列:

單株抗體母本重鏈hIgG4-S228P

<400> 5

atggaccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcctgagcct ggccttcgag	60
ctgagctacg gcgaagtgaa gttggtggag tctgggggag gtttagtgca gcctggaggg	120
tccctgaaac tctcctgtgc agcctctgga ttcactttca gtagctatac catgtcttgg	180
attcgccaga ctccagagaa gaggctggag tgggtcgcat acattagtca tgggtggtgt	240
gacacctact atccagacac tgtaaagggc cgattcacca tctccagggg caatgccaaag	300
aacaccctgt acctgcaaat gagcagtctg aagtctgagg acacggccat gtattactgt	360
gcaagacata gtggttacga gaggggatat tactatgtta tggattactg gggcaagga	420
acctcagtca ccgtctctc agctagcacc aagggcccca gcgtgtttcc tctcgtccc	480
tgcagccgga gcacatccga gagcaccgct gctctgggct gtctcgtgaa ggactacttc	540
cctgaacccg tcaccgtcag ctggaatagc ggcgcctga catccggcgt ccacacattc	600
cccgtgttcc tgcagagcag cggcctgtac agcctgagct ccgtggtcac cgtgcctagc	660
agcagcctgg gaacaaagac ctacacctgc aacgtggacc ataagccctc caacaccaag	720
gtggacaagc ggggtggaatc caagtatgga cccccctgtc ctccctgccc tgctcctgaa	780
tttctcggag gcccctccgt ctctcgtttt ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc	840
tcccggacac ccgaagtcac ctgcgtcgtg gtggatgtca gccaggaaga tcccgaggtg	900
cagttcaact ggtacgtgga cggagtgagg gtgcataacg ccaaaaaccaa gccagggaa	960
gagcagttca acagcaccta tcgggtcgtg tccgtgctca ccgtcctgca tcaggattgg	1020

ctcaacggca aggagtacaa gtgcaagggtg tccaacaagg gcttgccttc ctccatcgag 1080
 aagaccatct ccaaggctaa gggccaacct cgggagcccc aagtgtatac cctccctccc 1140
 agccaggagg agatgaccaa gaatcaagtg agcctgacct gcctcgtgaa gggattttac 1200
 ccctccgaca tcgctgtgga atgggaaagc aatggccaac ctgagaacaa ctacaagacc 1260
 acaccccccg tgctggactc cgatggctcc ttcttctgt acagcaggct gaccgtggac 1320
 aaatcccgtt ggcaagaggg aaacgtgttc agctgctccg tgatgcacga ggctctccac 1380
 aaccactaca cccagaagag cctctccctg agcctcggca agtag 1425

<210> 6

<211> 1425

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體母本和人源化變異體DNA 序列：人源化重鏈變異體 1

<400> 6

atggaccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcctgagcct ggccttcgag 60
 ctgagctacg gcgaagtgca gctgggtgaa tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga 120
 tctctgagac tgtcttgtgc cgcctccggc ttcaccttct ccagctacac catgtcctgg 180
 gtgcgacagg ctcttgcaa gggcctggaa tgggtgtcct acatctctca cggcggaggc 240
 gacacctact acgccgactc tgtgaagggc cggttcacca tctcccggga caactccaag 300
 aacaccctgt acctgcagat gaactcctg cgggccgagg acaccgccgt gtactactgt 360
 gctcggcact ctggctacga gcggggctac tactacgtga tggactactg gggccagggc 420
 accctcgtga ccgtgtcatc tgctagcacc aagggcccca gcgtgtttcc tctcgtccc 480
 tgcagccgga gcacatccga gagcaccgct gctctgggct gtctcgtgaa ggactacttc 540
 cctgaaccgg tcaccgtcag ctggaatagc ggcgcctga catccggcgt ccacacattc 600

cccgctgtcc tgcagagcag cggcctgtac agcctgagct ccgagggtcac cgtgcctagc 660
 agcagcctgg gaacaaagac ctacacctgc aacgtggacc ataagccctc caacaccaag 720
 gtggacaagc ggggtggaatc caagtatgga cccccctgtc ctccctgccc tgctcctgaa 780
 tttctcggag gccctccgt cttcctgttt ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc 840
 tcccggacac ccgaagtcac ctgcgctcgtg gtggatgtca gccaggaaga tcccgaggtg 900
 cagttcaact ggtacgtgga cggagtgagg gtgcataacg ccaaaaccaa gcccagggaa 960
 gagcagttca acagcaccta tcgggctcgtg tccgtgctca ccgtcctgca tcaggattgg 1020
 ctcaacggca aggagtacaa gtgcaagggtg tccaacaagg gcctgccctc ctccatcgag 1080
 aagaccatct ccaaggctaa gggccaacct cgggagcccc aagtgtatac cctccctccc 1140
 agccaggagg agatgaccaa gaatcaagtg agcctgacct gcctcgtgaa gggattttac 1200
 ccctccgaca tcgctgtgga atgggaaagc aatggccaac ctgagaacaa ctacaagacc 1260
 acaccccccg tgctggactc cgatggctcc ttcttctcgt acagcaggct gaccgtggac 1320
 aaatcccggg ggcaagaggg aaacgtgttc agctgctccg tgatgcacga ggctctccac 1380
 aaccactaca ccagaagag cctctccctg agcctcggca agtag 1425

<210> 7

<211> 1425

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體母本和人源化變異體DNA 序列：人源化重鏈變異體 2

<400> 7

atggacccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcctgagcct ggccttcgag 60
 ctgagctacg gcgaagtgca gctgggtgaa tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga 120
 tctctgagac tgtcttgtgc cgcctccggc ttcaccttct ccagctacac catgtcctgg 180

gtgcgacagg ctcttgga gggcctggaa tgggtgtcct acatctctca cggcggaggc 240
 gacacctact accccgactc tgtgaagggc cggttcacca tctcccggga caactccaag 300
 aacaccctgt acctgcagat gaactccctg cgggccgagg acaccgccgt gtactactgt 360
 gctcggcact ctggctacga gcggggctac tactacgtga tggactactg gggccagggc 420
 accctcgtga ccgtgtcatc tgctagcacc aagggcccca gcgtgtttcc tctcgtccc 480
 tgcagccgga gcacatccga gagcaccgct gctctgggct gtctcgtgaa ggactacttc 540
 cctgaaccgg tcaccgtcag ctggaatagc ggcgccctga catccggcgt ccacacattc 600
 cccgctgtcc tgcagagcag cggcctgtac agcctgagct ccgtggtcac cgtgcctagc 660
 agcagcctgg gaacaaagac ctacacctgc aacgtggacc ataagccctc caacaccaag 720
 gtggacaagc ggggtggaatc caagtatgga cccccctgtc ctcttgccc tgctcctgaa 780
 tttctcggag gccctccgt cttcctgttt ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc 840
 tcccggacac ccgaagtac ctgcgtcgtg gtggatgtca gccaggaaga tcccaggtg 900
 cagttcaact ggtacgtgga cggagtggag gtgcataacg ccaaaaccaa gccagggaa 960
 gagcagttca acagcaccta tcgggtcgtg tccgtgctca ccgtcctgca tcaggattgg 1020
 ctcaacggca aggagtacaa gtgcaagggtg tccaacaagg gcctgccctc ctccatcgag 1080
 aagaccatct ccaaggctaa gggccaacct cgggagcccc aagtgtatac cctccctccc 1140
 agccaggagg agatgaccaa gaatcaagtg agcctgacct gcctcgtgaa gggattttac 1200
 ccctccgaca tcgctgtgga atgggaaagc aatggccaac ctgagaacia ctacaagacc 1260
 acaccccccg tgctggactc cgatggctcc ttcttctgt acagcaggct gaccgtggac 1320
 aaatcccggg ggcaagaggg aaacgtgttc agctgctccg tgatgcacga ggctctccac 1380
 aaccactaca ccagaagag cctctccctg agcctcggca agtag 1425

<210> 8

<211> 1425

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體母本和人源化變異體DNA 序列：人源化重鏈變異體 3

<400> 8

```

atggaccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcttgagcct ggccttcgag      60
ctgagctacg gcgaagtgaa gctgctggaa tctggcggcg gactggtgca gcctggcggga      120
tctctgagac tgtcttgtgc cgcctccggc ttcaccttct ccagctacac catgtcctgg      180
gtgcgacagg ctctggcaa gggcctggaa tgggtgtcct acatctctca cggcggaggc      240
gacacctact accccgactc tgtgaagggc cggttcacca tctcccggga caactccaag      300
aacaccctgt acctgcagat gaactccctg cgggcccagg acaccgccgt gtactactgt      360
gctcggcact ctggctacga gcggggctac tactacgtga tggactactg gggcaagggc      420
accaccgtga ccgtgtcacc tgctagcacc aagggcccca gcgtgtttcc tctcgctccc      480
tgcagccgga gcacatccga gagcaccgct gctctgggct gtctctgtgaa ggactacttc      540
cctgaacccg tcaccgtcag ctggaatagc ggcgccctga catccggcgt ccacacattc      600
cccgtgttcc tgcagagcag cggcctgtac agcctgagct ccgtggtcac cgtgcctagc      660
agcagcctgg gaacaaagac ctacacctgc aacgtggacc ataagccctc caacaccaag      720
gtggacaagc ggggtggaatc caagtatgga cccccctgtc ctccctgccc tgctcctgaa      780
tttctcggag gccctccgt ctctctgttt ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc      840
tcccggacac ccgaagtac ctgcgtcgtg gtggatgtca gccaggaaga tcccgaggtg      900
cagttcaact ggtacgtgga cggagtgagg gtgcataacg ccaaaaccaa gccacgggaa      960
gagcagttca acagcaccta tcgggtcgtg tccgtgctca ccgtcctgca tcaggattgg     1020
ctcaacggca aggagtacaa gtgcaaggtg tocaacaagg gcctgccctc ctccatcgag     1080

```

aagaccatct ccaaggctaa gggccaacct cgggagcccc aagtgtatac cctccctccc 1140
 agccaggagg agatgaccaa gaatcaagtg agcctgacct gcctcgtgaa gggattttac 1200
 ccctccgaca tcgctgtgga atgggaaagc aatggccaac ctgagaacaa ctacaagacc 1260
 acaccccccg tgctggactc cgatggctcc ttcttctgt acagcaggct gaccgtggac 1320
 aaatcccggg ggcaagaggg aaacgtgttc agctgctccg tgatgcacga ggctctccac 1380
 aaccactaca ccagaagag cctctccctg agcctcggca agtag 1425

<210> 9

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體母本和人源化變異體DNA 序列:單株抗體母本 kappa輕鏈

<400> 9

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccgg ctccaccgga 60
 gacattgtgc tgaccaatt tccaacttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120
 atctcctgca gagccagcga aagtgttgat tactatggct ttagttttat aaactggttc 180
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatcaa ccagggatcc 240
 ggggtccctg ccaggtttgg tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 300
 cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg 360
 acgttcggtg gaggaccaa gctggaatc aagcggaccg tggccgcccc cagcgtgttc 420
 atcttccctc ccagcgacga gcagctgaag tctggcaccg ccagcgtggg gtgcctgctg 480
 aacaacttct acccccgcga ggccaagggt cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 540
 ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gactccaagg acagcaccta cagcctgagc 600
 agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaggtg 660

accaccagg gactgtctag ccccgtagacc aagagcttca accggggcga gtgctaa 717

<210> 10

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體母本和人源化變異體DNA 序列：人源化輕鏈變異體 1

<400> 10

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccgg ctccaccgga 60

gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagagccacc 120

atcaactgca agtcctccga gtccgtggac tactacggct tctccttctt gaactggttc 180

cagcagaagc ccggccagcc ccctaagctg ctgatctacg ccgcctccaa ccgcgagtct 240

ggcgtgcccg atagattctc cggctctggc tctggcaccg actttaccct gaccatcagc 300

tccttcagc ccgaggatgt ggccgtgtac tactgccagc agtccaaaga ggtgccctgg 360

accttcggcc agggcacaaa gctggaaatc aagcggaccg tggccgcccc cagcgtgttc 420

atcttccctc ccagcgacga gcagctgaag tctggcaccg ccagcgtggg gtgcctgctg 480

aacaacttct acccccgcga ggccaaggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 540

ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gactccaagg acagcaccta cagcctgagc 600

agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaggtg 660

accaccagg gactgtctag ccccgtagacc aagagcttca accggggcga gtgctaa 717

<210> 11

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體母本和人源化變異體DNA 序列：人源化輕鏈變異體 2

<400> 11

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccgg ctccaccgga 60

gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagagccacc 120

atcaactgca aggcctccga gtccgtggac tactacggct tctccttctt gaactggttc 180

cagcagaagc ccggccagcc ccctaagctg ctgatctacg ccgcctccaa ccgcgagtct 240

ggcgtgcccg atagattctc eggctctggc tctggcaccg actttaccct gaccatcagc 300

tccttgacag ccgaggatgt ggccgtgtac tactgccagc agtccaaaga ggtgccctgg 360

accttcggcc agggcacaaa gctggaaatc aagcggaccg tggccgcccc cagcgtgttc 420

atcttcctc ccagcgacga gcagctgaag tctggcaccg ccagcgtggt gtgcctgctg 480

aacaacttct acccccgcga ggccaaggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 540

ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gactccaagg acagcaccta cagcctgagc 600

agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaggtg 660

accaccagc gactgtctag ccccgtagcc aagagcttca accggggcga gtgctaa 717

<210> 12

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體母本和人源化變異體DNA 序列：人源化輕鏈變異體 3

<400> 12

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccgg ctccaccgga 60

gacatccagc tgaccagtc ccccgactcc ctgtctgtgt ctctgggcga gagagccacc 120

atcaactgca aggcctccga gtccgtggac tactacggct tctccttctt gaactggttc 180

cagcagaagc ccggccagcc ccctaagctg ctgatctacg ccgcctccaa ccgccagtct 240

ggcgtgcccg atagattctc cggctctggc tctggcaccg actttaccct gaccatcagc 300
 tccctgcagg ccgaggatgt ggccgtgtac ttctgccagc agtccaaaga ggtgccctgg 360
 accttcggcc agggcacaaa gctggaaatc aagcggaccg tggccgcccc cagcgtgttc 420
 atcttccctc ccagcgacga gcagctgaag tctggcaccg ccagcgtggt gtgcctgctg 480
 aacaacttct acccccgcga ggccaaggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 540
 ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gactccaagg acagcaccta cagcctgagc 600
 agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaggtg 660
 acccaccagg gactgtctag ccccgtagcc aagagcttca accggggcga gtgctaa 717

<210> 13

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體母本和
 人源化變異體氨基酸序列：
 單株抗體母本重鏈hIgG4-S228P

<400> 13

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly
 20 25 30

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
 35 40 45

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr
 50 55 60

Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser His Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 85 90 95

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser
 100 105 110

Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Glu Arg
 115 120 125

Gly Tyr Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 145 150 155 160

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 165 170 175

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 180 185 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 195 200 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 210 215 220

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 225 230 235 240

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 245 250 255

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 35 40 45

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala
 50 55 60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser His Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 85 90 95

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 100 105 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Glu Arg
 115 120 125

Gly Tyr Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 145 150 155 160

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 165 170 175

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 180 185 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 195 200 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 210 215 220

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 225 230 235 240

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 245 250 255

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 465 470

<210> 15

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-1單株抗體母本和人源化變異體氨基酸序列：人源化重鏈變異體 2

<400> 15

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser
1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 20 25 30

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 35 40 45

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala
 50 55 60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser His Gly Gly Gly
65 70 75 80

Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 85 90 95

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 100 105 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Glu Arg
 115 120 125

Gly Tyr Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
145 150 155 160

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 165 170 175

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 180 185 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 195 200 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 210 215 220

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 225 230 235 240

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 245 250 255

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 145 150 155 160

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 165 170 175

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 180 185 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 195 200 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 210 215 220

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 225 230 235 240

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 245 250 255

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser
 35 40 45

Val Asp Tyr Tyr Gly Phe Ser Phe Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 19

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人源化輕鏈變異體2

<400> 19

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser
 35 40 45

Val Asp Tyr Tyr Gly Phe Ser Phe Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 20

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人源化輕鏈變異體3

<400> 20

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser
 35 40 45

Val Asp Tyr Tyr Gly Phe Ser Phe Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Gln Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys
 100 105 110

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】 人程序性死亡受體PD-1的單株抗體及其片段

【中文】

本發明提供了針對人 PD-1 的分離的單株抗體或其抗原結合片段，包含表 2 中所列的重鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3 以及表 2 中所列的輕鏈 CDR1、CDR2 和 CDR3。

【代表圖】

【本案指定代表圖】： 圖1

【本代表圖之符號簡單說明】：

申請專利範圍

1. 一種針對人 PD-1 的分離的單株抗體或其抗原結合片段，包含：表 2 中所列的重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3，以及表 2 中所列的輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3。
2. 如申請專利範圍第 1 項所記載之單株抗體或其抗原結合片段，其中，其係包含：(i) 序列表 SEQ ID NO:3 所示的重鏈胺基酸序列，及序列表 SEQ ID NO:4 所示的輕鏈胺基酸序列；或(ii)不包含信號肽部分的序列表 SEQ ID NO:3 所示的重鏈胺基酸序列，及不包含信號肽部分的序列表 SEQ ID NO:4 所示的輕鏈胺基酸序列。
3. 如申請專利範圍第 1 項所記載之單株抗體或其抗原結合片段，其中，前述單株抗體或其抗原結合片段係被人源化，並且包含：
 - (1) 選自序列表 SEQ ID NO:13、14、15 及 16 的重鏈胺基酸序列，或不包含信號肽部分的序列表 SEQ ID NO:13、14、15 及 16 的重鏈胺基酸序列；以及
 - (2) 選自序列表 SEQ ID NO:17、18、19 及 20 的輕鏈胺基酸序列，或不包含信號肽部分的序列表 SEQ ID NO:17、18、19 及 20 的輕鏈胺基酸序列。
4. 如申請專利範圍第 1 項所記載之單株抗體或其抗原結合片段，其中，其係包含：序列表 SEQ ID NO:13 所示的重鏈胺基酸序列，及序列表 SEQ ID NO:17 所示的輕鏈胺基酸序列。
5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所記載之單株抗體或其抗原結合片

段，其中，前述抗原結合片段選自：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂及雙抗體。

6. 一多核苷酸，其係編碼申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之抗體或其抗原結合片段的分離的多核苷酸。
7. 如申請專利範圍第 6 項所記載之分離的多核苷酸，其中，重鏈編碼序列如序列表 SEQ ID NO:1 所示，輕鏈編碼序列如序列表 SEQ ID NO:2 所示。
8. 如申請專利範圍第 6 項所記載之分離的多核苷酸，該多核苷酸係編碼人源化抗體或其抗原結合片段，且其中：
 - 重鏈編碼序列選自序列表 SEQ ID NO:5、6、7 及 8，
 - 輕鏈編碼序列選自序列表 SEQ ID NO:9、10、11 及 12。
9. 包含如申請專利範圍第 6-8 中任一項的分離的多核苷酸的表現載體。
10. 一種宿主細胞，其特徵係包含如申請專利範圍第 9 的表現載體。
11. 一種藥物組合物，其特徵係包含申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項的抗體或其抗原結合片段以及可藥用載體。
12. 一種提高免疫細胞活性的方法，其特徵係包括使前述免疫細胞與申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之抗體或其抗原結合片段接觸。
13. 一種治療疾病的方法，其特徵係包括將治療有效量的申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項的抗體或其抗原結合片段給予需要治療的受試者。
14. 如申請專利範圍第 13 項所記載之方法，其中，前述疾病選自：癌症、感染性疾病、移植排斥、自身免疫性疾病及神經疾病。
15. 如申請專利範圍第 13 或 14 項所記載之方法，其中，進一步包括對前

述受試者聯合應用其他藥物或療法。

16. 如申請專利範圍第 15 項所記載之方法，其中，前述其他療法選自：化療、放射治療、靶向治療、基因治療、細胞治療、幹細胞治療。
17. 一種申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之抗體或其抗原結合片段在製備用於治療疾病的藥物中的用途，其中，前述疾病選自：癌症、感染性疾病、移植排斥、自身免疫性疾病及神經疾病。
18. 如申請專利範圍第 17 項所記載之應用，其中，前述藥物係與其他藥物或療法進行聯合應用。
19. 如申請專利範圍第 18 項所記載之應用，其中，前述其他療法選自：化療、放射治療、靶向治療、基因治療、細胞治療、幹細胞治療。
20. 一種調節細胞功能的方法，其特徵係包括將編碼申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之抗體或其抗原結合片段的多核苷酸序列遞送至前述細胞中。
21. 如申請專利範圍第 20 項所記載之方法，其中，前述方法用於基因治療、CAR-T 治療或 CRISPR 治療。

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
母體	2.88E+05	2.85E-05	9.89E-11
突變體 1	2.10E+05	6.15E-05	2.93E-10
突變體 2	2.10E+05	7.64E-05	3.63E-10
突變體 3	2.42E+05	2.33E-05	9.63E-11
突變體 4	1.19E+05	6.29E-05	3.38E-10
突變體 5	2.11E+05	6.94E-05	3.29E-10
突變體 6	2.48E+05	2.23E-05	8.98E-11
突變體 7	2.18E+05	6.48E-05	2.91E-10
突變體 8	2.22E+05	7.95E-05	3.58E-10
突變體 9	2.59E+05	3.20E-05	1.23E-10

圖 7

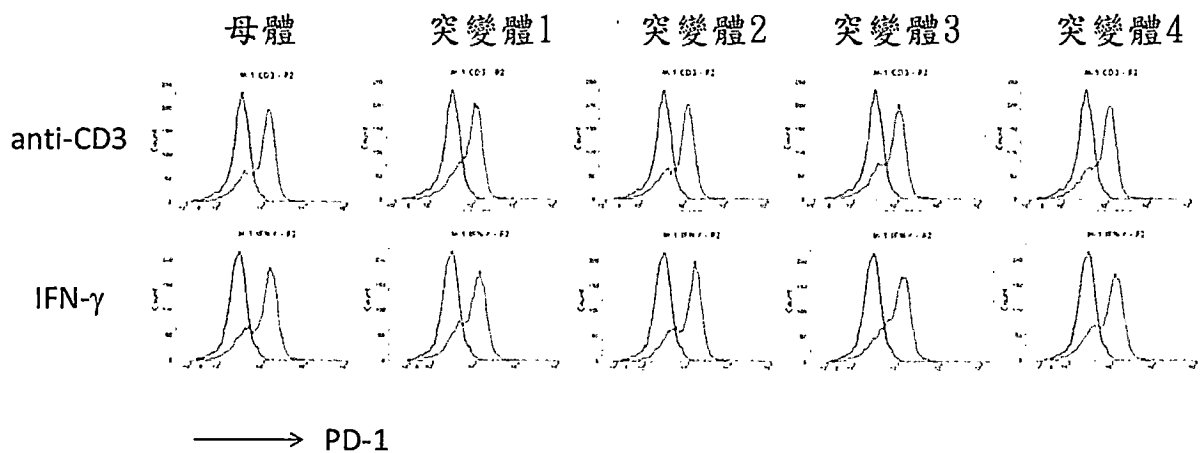


圖 8

