

(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
2014 年 12 月 31 日 (31.12.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/206107 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/072574

(22) 国际申请日: 2014 年 2 月 26 日 (26.02.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201310258289.2 2013 年 6 月 26 日 (26.06.2013) CN

(71) 申请人: 上海君实生物医药科技有限公司 (SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES INC.) [CN/CN]; 中国上海市张江高科技园区蔡伦路 781 号 6 楼 602 室, Shanghai 201203 (CN)。苏州君盟生物医药科技有限公司 (JUNMENG BIOSCIENCES CO., LTD) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市吴江经济技术开发区长安路东侧 (吴江科技创业园), Jiangsu 215200 (CN)。

(72) 发明人: 陈博 (CHEN, Bo); 中国上海市张江高科技园区蔡伦路 781 号 6 楼 602 室, Shanghai 201203 (CN)。武海 (WU, Hai); 中国上海市张江高科技园区蔡伦路 781 号 6 楼 602 室, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 北京柏杉松知识产权代理事务所 (普通合伙) (PATENTSINO IP FIRM); 中国北京市西城

区北三环中路 27 号商房大厦 413 室, Beijing 100029 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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-1 ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗 PD-1 抗体及其应用

(57) Abstract: The present invention provides an antibody specifically binding to PD-1 with high affinity or a functional fragment thereof. Further provided are a nucleic acid molecule encoding the antibody of the present invention or the functional fragment thereof, an expression vector and a host cell for expressing the antibody of the present invention or the functional fragment thereof, and a method of producing the antibody of the present invention or the functional fragment thereof. Further provided in the present invention are an immunoconjugate and a pharmaceutical composition containing the antibody of the present invention or the functional fragment thereof, as well as a method for treating a plurality of diseases (comprising cancers, infectious diseases and inflammatory diseases) by using the antibody of the present invention or the functional fragment thereof.

(57) 摘要: 本发明提供了以高亲和力和 PD-1 特异性结合的抗体或其功能性片段。还提供了编码本发明抗体或其功能性片段的核酸分子, 用于表达本发明抗体或其功能性片段的表达载体和宿主细胞, 以及本发明抗体或其功能性片段的产生方法。本发明还提供了包含本发明抗体或其功能性片段的免疫缀合物以及药物组合物, 以及使用本发明的抗体或其功能性片段治疗多种疾病 (包括癌症和感染性疾病、炎性疾病) 的方法。



WO 2014/206107 A1

抗 PD-1 抗体及其应用

技术领域

[01] 本发明属于生物医药领域，涉及以高亲和力与 PD-1 特异性结合的抗体或其功能性片段。还提供了编码本发明抗体或其功能性片段的核酸分子，用于表达本发明抗体或其功能性片段的表达载体和宿主细胞，以及本发明抗体或其功能性片段的生

5 产方法。本发明还提供了包含本发明抗体或其功能性片段的免疫缀合物以及药物组合物，以及使用本发明的抗体或其功能性片段治疗多种疾病（包括癌症和感染性疾病、炎性疾病）的方法。

10

背景技术

[02] 程序性死亡因子 1(programmed cell death 1, PD-1)是 CD28 家族成员，并且是在活化 T 细胞和 B 细胞表面上表达的免疫抑制性受体(Yao, Zhu et al. *Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(2): 130-146)。该受体和其配体 PD-L1 和 PD-L2 相结合可以有效降低免疫 T 细胞参与的免疫应答。肿瘤细胞通过高表达 PD-L1 逃逸机体内免疫监督(Okazaki 和 Honjo, PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunology*, 2007, 19(7): 813-824 2007)。阻断 PD1 与 PD-L1 的相互作用可以显著提高 CD8+细胞毒 T 细胞的活性，以杀伤肿瘤细胞。

15

20

[03] PD-1 主要表达于 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、NKT 细胞、B 细胞和活化的单核细胞表面，主要受 T 细胞受体(TCR)或 B 细胞受体(BCR)信号的诱导表达，TNF 可增强 PD-1 在这些细胞表面的表达(Francisco, Sage et al., *The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. Immunol Rev*, 2010, 236: 219-242)。人 PD-1 由基因 *Pdcd1* 编码，位于 2q37.3，全长 9.6 kb，由 5 个外显子和 4 个内含子组成，其上游包含 663 bp 的启动子。PD-1 分子结构由胞外区、跨膜区和胞内区构成，胞外区的氨基酸序列

25

30

和 CTLA-4 有 24% 的同源性, 和 CD28 具有 28% 的同源性, 其基因主要有 7 个单核苷酸多态性位点。胞外区含有一个免疫球蛋白可变区 IgV 结构域, 胞内区含有两个基于酪氨酸的信号转导模体 ITIM (免疫受体酪氨酸抑制作用模体) 和 ITSM (免疫受体酪氨酸转换作用模体)。在 T 细胞被激活后, PD-1 主要通过 ITSM 模体, 将酪氨酸磷脂酶 SHP2 集合, 导致包括 CD3 ζ 、PKC θ 和 ZAP70 等效应分子的去磷酸化。

[04] PD-1 配体有两个: PD-L1 和 PD-L2。PD-L1 又称 B7H1 或 CD274, PD-L2 称为 B7DC 或 CD273。PD-L 基因位于人的染色体 9p24.2 位点, 大小为 42 kb。这些配体和 B7-1、B7-2、ICOSL 有 21~27% 的氨基酸序列同源性和结构相似性: 均包含一个免疫球蛋白样可变区结构域、一个恒定区样结构域和一个跨膜区和一个短的胞质尾巴, PD-L1 的胞质尾巴比 PD-L2 更保守。PD-L1 和 PD-L2 表达于不同的细胞群体(Shimauchi, Kabashima et al., Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4⁺ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer*, 2007, 121(12): 2585-2590), 这些细胞包括非造血组织以及各种肿瘤类型。PD-L1 主要表达于 T 细胞、B 细胞、树突状细胞、巨噬细胞、间充质干细胞和骨髓来源的肥大细胞。PD-L1 也表达于非骨髓来源的细胞, 如血管内皮细胞、上皮细胞、骨骼肌细胞、肝细胞、肾小管上皮细胞、胰岛细胞, 脑部星状细胞和各类非淋巴系肿瘤如黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌, 亦表达于免疫特赦部位的细胞, 如胎盘、眼睛。这表明 PD-L1 在调节自身反应性 T、B 细胞和免疫耐受方面具有一定广泛性, 并且在外周组织 T 和 B 细胞应答起作用。但是 PD-L2 表达区域却极其有限, 仅在巨噬细胞和树突细胞中存在, 被认为主要在免疫呈递中起作用。

[05] PD-1 和 PD-L1 相互作用以调节控制 T 细胞的活化在肿瘤和病毒感染中得到了大量验证。PD-L1 表达于多种肿瘤细胞表面, 这些肿瘤细胞包括: 肺癌, 肝癌, 卵巢癌, 宫颈癌, 皮肤癌, 膀胱癌, 结肠癌, 乳腺癌, 神经胶质瘤, 肾癌, 胃癌, 食道癌, 口

腔鳞状细胞癌，头颈癌。而且在这些癌症周边也发现了大量表达 PD-L1 的 CD8+T 细胞。临床统计显示，PD-L1 在肿瘤细胞上的高表达水平与癌症患者不良预后相关(Okazaki 和 Honjo 2007, 同上)。

- 5 [06] 多种慢性和急性病毒也通过 PD-1 和 PD-L1 信号逃避人体免疫监测。例如：HIV 感染者体内 PD-1 的表达水平与 T 细胞的耗竭程度密切相关，且可作为 AIDS 病情进展的标志之一 (Trabattoni, Saresella et al., B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. *Blood*, 2003, 101(7): 2514-2520)。此现象也同样适用慢性乙肝患者(Evans, Riva et al., Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion., *Hepatology*, 2008, 48(3): 759-769)。动物实验显示，PD-1 基因剔除小鼠比正常小鼠更好地控制病毒感染；而将 HBV 特异型 T 细胞转移到 HBV 转基因动物中会引发肝炎。

发明内容

- 20 [07] 本发明涉及能够结合程序性死亡因子 1 (PD-1) 的抗 PD-1 抗体及其功能性片段。
- [08] 一方面，本发明的抗体或其功能性片段包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15 或任何所述序列之变体的重链 CDR，和/或选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18 或任何所述序列之变体的轻链 CDR。
- 25 [09] 在一些优选的实施方案中，所述抗体或其功能性片段的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列选自以下各氨基酸序列或其变体的组中的一组：

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
A	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
B	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9

C	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15
---	--------------	--------------	--------------

和/或其轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列选自以下各氨基酸序列或其变体的组中的一组:

	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
B	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
C	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18

- 5 在一些优选的实施方案中,本发明抗体或其功能性片段的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 以及轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列选自以下各氨基酸序列或其变体的组中的一组:

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
B	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
C	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18

[10] 在一些实施方案中,本发明抗体或其功能性片段包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 19, 21, 23 或任何所述序列之变体的重链可变区,和/或选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 20, 22, 24 或任何所述序列之变体的轻链可变区。

- 10 [11] 在一个优选的实施方案中,所述重链可变区为 SEQ ID NO: 19 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 20 或其变体。

[12] 在另一个优选的实施方案中,所述重链可变区为 SEQ ID NO: 21 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 22 或其变体。

- 15 [13] 在又一个优选的实施方案中,所述重链可变区为 SEQ ID NO: 23 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 24 或其变体。

[14] 本发明的抗体或其功能性片段可以是嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

[15] 本发明的抗体或其功能性片段可以是人源化的。制备人源化抗体的方法是本领域技术人员公知的。例如，可以通过将本发明的 CDR 序列转移至人抗体可变区中来制备本发明的人源化抗 PD-1 抗体。所述人源化抗体不会产生抗抗体反应 (AAR) 和人抗鼠抗体反应 (HAMA)，不会因被抗抗体中和而被快速清除，并且具有免疫效应功能，如 ADCC 和 CDC 作用。

[16] 在一些优选的实施方案中，本发明的人源化 PD-1 抗体或其功能性片段包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 33, 35, 36 或任何所述序列之变体的重链可变区，和/或选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 34, 37 或任何所述序列之变体的轻链可变区。

[17] 在本发明人源化抗体或其功能性片段的一个优选的实施方案中，所述重链可变区为 SEQ ID NO: 33 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 34 或其变体。

[18] 在本发明人源化抗体或其功能性片段的另一个优选的实施方案中，所述重链可变区为 SEQ ID NO: 35 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 34 或其变体。

[19] 在本发明人源化抗体或其功能性片段的另一个优选的实施方案中，所述重链可变区为 SEQ ID NO: 36 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 34 或其变体。

[20] 在本发明人源化抗体或其功能性片段的又一个优选的实施方案中，所述重链可变区为 SEQ ID NO: 35 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 37 或其变体。

[21] 本发明还提供了编码本发明抗体或功能性片段的分离的核酸分子。在一个优选的实施方案中，所述核酸分子包含 SEQ ID NO: 25-30, 38-42 所示的核苷酸序列或其组合。

[22] 本发明还提供了包含所述核酸分子的表达载体以及包含所述表达载体的宿主细胞。

[23] 本发明提供了产生抗 PD-1 抗体或其功能性片段的方法，其包括：在允许产生所述抗体或其功能性片段的条件下培养本发明的上述宿主细胞，以及回收这样产生的所述抗体或其功能性片段。

- 5 [24] 在另一方面，本发明涉及包含与治疗剂缀合的本发明抗体或其功能性片段的免疫缀合物。所述治疗剂优选地为毒素、放射性同位素、药物或细胞毒剂。

[25] 本发明还涉及包含本发明抗体或其功能性片段以及可药用载体的药物组合物。

- 10 [26] 在另一方面，本发明提供了用于通过消除、抑制或降低 PD-1 活性来预防或治疗疾病或病症的方法，其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本发明抗体或其功能性片段，核酸，表达载体，宿主细胞，免疫缀合物或药物组合物。其中所述疾病或病症选自癌症、感染性疾病或炎性疾病；所述癌症优选选自黑素瘤、肾癌、前列腺癌、乳癌、结肠癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、阴户癌、何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病，其包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、儿童期实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统的赘生物、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症、其包括石棉所诱发的那些，和所述癌症的组合；所述感染性疾病优选选自 HIV、流行性感、疱疹、贾第虫病、疟疾、利什曼病、以下病毒引起的致病感染：肝炎病毒（甲型、乙型和丙型）、疱疹病毒（例如 VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II 和 CMV、埃巴二氏病毒）、腺病毒、流感病毒、黄病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、
- 15
- 20
- 25
- 30

- 腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV 病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC 病毒和虫媒病毒性脑炎病毒，以下细菌引起的致病感染：衣原体、立克次氏体、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌和 *conococci*、克雷伯氏菌、变形菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团菌、白喉、沙门氏菌、杆菌、霍乱、破伤风、肉毒中毒、炭疽、鼠疫、钩端螺旋体病和莱姆氏病细菌，以下真菌引起的致病感染：假丝酵母（白色假丝酵母、克鲁斯假丝酵母、光滑假丝酵母、热带假丝酵母等）、新型隐球酵母、曲霉（烟曲霉、黑曲霉等）、毛霉目的属（毛霉属、犁头霉属、根霉属）、申克氏孢子丝菌、皮炎芽酵母、巴西副球孢子菌、粗球孢菌和加膜组织胞浆菌，及以下寄生虫引起的致病感染：痢疾内变形虫、结肠肠袋虫、福纳氏虫、棘变形虫、吸吮贾第虫、隐孢子虫、卡氏肺囊虫、间日疟原虫、田鼠巴贝虫、布鲁斯锥虫、克鲁兹锥虫、多氏利什曼虫、鼠弓浆虫和巴西日圆线虫；所述炎性疾病优选选自急性播散性脑脊髓炎、阿狄森病、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、关节炎、贝切特病、大疱性类天疱疮、腹部疾病、恰加斯病、克罗恩病、皮炎、1 型糖尿病、肺出血-肾炎综合征、移植物抗宿主病、格雷夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本病、超 IgE 综合征、特发性血小板减少性紫癜、红斑狼疮、多发性硬化症、重症肌无力、天疱疮、恶性贫血、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、类风湿关节炎、斯耶格伦综合征、颞动脉炎、血管炎和韦格纳肉芽肿病。
- 25 [27] 本发明还提供了本发明的抗体或其功能性片段、核酸、，表达载体、宿主细胞、免疫缀合物或药物组合物在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途。

附图说明

- 30 [28] 图 1 所示为 SDS-PAGE 所显示的人源性 (hu) 和食蟹猴源性 (cyno) 的 PD-1 胞外结构区的蛋白质大小。

[29] 图 2 所示为流式细胞术测定的生物素标记 rh-PD-L1 与人 T 细胞结合。

[30] 图 3 所示为通过流式细胞术测定的 PD-L1 对照、克隆 1, 10, 11、55 和 64 阻碍细胞表面的 PD-1 与配体 PD-L1 结合。

5 [31] 图 4 所示为对照抗体、克隆 1, 10, 11、55 和 64 与 PD-1 以及其他 CD28 家族成员 (ICOS、CTLA-4 以及 CD28) 的结合。

[32] 图 5 所示为检测嵌合抗体对 T 细胞的体外刺激的破伤风毒素刺激实验。

10 [33] 图 6 所示为 CD8⁺细胞因子检测试剂盒检测的人源化抗体克隆 38、39、41 以及 48 (对照 (conIgG4)) IL2 的分泌水平。

[34] 图 7 所示为树突细胞与经改造 MD-MAB-453 细胞共同培养 3 天后, 加入提取的 T 细胞和本发明人源化抗 PD-1 抗体克隆 38、39、41 以及 48 (对照 (conIgG4)) 共同培养 3 天后得到的 GFP 荧光值。

15 [35] 图 8 所示为本发明的人源化抗体与人、食蟹猴以及鼠源 PD-1 蛋白的结合。

[36] 图 9 所示为人 (human)、食蟹猴 (Cyno) 和小鼠 (mouse) PD-1 序列的比对, 其中小鼠 PD-1 与人和食蟹猴 PD-1 蛋白的主要不同区域用框架标注。

20 [37] 图 10 显示人源化抗体体外刺激 T 细胞增殖实验—破伤风抗原记忆应答实验的结果。

[38] 图 11 显示人源化抗体体外刺激 T 细胞增殖实验—病毒多肽抗原记忆应答实验的结果。

25 具体实施方式

[39] 除非另有定义, 本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的不同含义。关于本领域的定义及术语, 专业人员具体可参考 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之

一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。

[40] 本发明提供了能够结合程序性死亡因子 1(PD-1)的抗 PD-1 抗体及其功能性片段。本发明的抗体或其功能性片段具有以下特性的至少一种:能够以高亲和力阻断 PD-1 和 PD-L1 的相互作用;
5 能够与 PD-1 以高特异性结合,而与其它 CD28 家族成员(如 ICOS、CTLA-4 和 CD28)不发生结合;激活肿瘤特异性 T 细胞,从而杀伤肿瘤细胞,促进 CD8⁺进入实体瘤组织,使 IFN γ 等免疫效应物的水平大大增加。

[41] 本发明还提供了人源化抗 PD-1 抗体及其功能性片段。所述
10 人源化抗体由免疫小鼠产生的鼠源抗体经由计算机模拟设计并结合噬菌体展示技术而得到,并且根据其与不同物种的 PD-1 蛋白的结合特性,其结合表位也相应被鉴定。本发明所述的人源化抗 PD-1 抗体及其功能性片段除具备上述抗 PD-1 抗体及其功能性片段的有利特性外,还以高亲和力结合人或食蟹猴 PD-1 蛋白,
15 但不与鼠源 PD-1 蛋白相互作用。

[42] 在不实质性影响抗体活性的前提下,本领域技术人员可以对
本发明的序列替换、添加和/或缺失一个或更多个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个或更多个)氨基酸,以获得所述抗体或其功能性片段之序列的变体。它们都被视为包括在本发明保护的
20 的范围内。如在可变区将具有类似性质的氨基酸进行替换。本发明所述变体的序列可以与其来源序列有至少有 95%、96%、97%、98%或 99%的一致性。本发明所述的序列一致性可以使用序列分析软件测量。例如使用缺省参数的计算机程序 BLAST,尤其是 BLASTP 或 TBLASTN。

[43] 本发明的抗体可以是全长的(例如, IgG1 或 IgG4 抗体)
25 或可仅包含抗原结合部分(例如, Fab、F(ab')₂ 或 scFv 片段),或可以被修饰以影响功能。本发明包括具有修饰的糖基化模式的抗 PD-1 抗体。在一些应用中,进行修饰以除去不期望的糖基化位点可以是有用的,或在寡糖链上不存在岩藻糖部分以例如增强
30 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)功能的抗体。在另一些应用中,可进行半乳糖基化修饰以改变补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[44] 本文所使用的术语“功能性片段”尤其是指抗体片段如 Fv、scFv (sc 指单链)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc 片段或者双抗体 (diabody)、或者通过化学修饰或通过掺入脂质体中应能够增加半寿期的任何片段, 所述化学修饰例如添加聚(亚烷基) 5 二醇如聚乙二醇(“聚乙二醇化, PEG 化”)(被称为 Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG 或 Fab'-PEG 的聚乙二醇化片段)(“PEG”为聚乙二醇), 所述片段具有 EGFR 结合活性。优选地, 所述功能片段将由其来源抗体的重或轻可变链的部分序列构成或者包含它们, 所述部分序列足以保留与其来源抗体 10 体相同的结合特异性和充分的亲和力, 对于 PD-1, 优选至少等于其来源抗体亲和力的 1/100, 在更优选方式中至少等于 1/10。这种功能片段将包含最少 5 个氨基酸, 优选其来源的抗体序列的 10、15、25、50 和 100 个连续氨基酸。

[45] 本领域技术人员可以将编码本发明所述抗 PD-1 抗体的 15 DNA 分子克隆到载体中, 进而转化宿主细胞。因此, 本发明还提供了一种重组 DNA 载体, 其含有编码本发明所述抗 PD-1 抗体的 DNA 分子。

[46] 优选地, 所述重组 DNA 载体是一种表达载体, 本领域技术人员将所述抗体的 DNA 分子克隆到表达载体中, 转化宿主细胞, 20 通过诱导表达获得抗体。本发明的表达载体含有编码的抗 PD-1 抗体的重链可变区、轻链可变区和/或恒定区的 DNA 序列。然而, 也可有分别构建两种表达载体, 一种含有重链可变区和恒定区, 另一种含有轻链可变区和恒定区, 一同转染哺乳动物。在一个优选的实施方案中, 所述表达载体进一步含有启动子和编码分泌信号肽的 DNA 序列, 以及至少一种用于筛选的抗药基因。 25

[47] 本发明所述宿主细胞可以为其为原核宿主细胞、真核宿主细胞或噬菌体。所述原核宿主细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。所述真核宿主细胞, 可以为如巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌, 如草地粘虫等昆虫 30 细胞, 如烟草等植物细胞, 如 BHK 细胞、CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。在一些实施方案中, 本发明所

述宿主细胞优选为哺乳动物细胞，更优选 BHK 细胞、CHO 细胞、NSO 细胞或 COS 细胞。

[48] 本文使用的术语“药物组合物”表示组合在一起以实现某种特定目的的至少一种药物以及任选地可药用载体或辅料的组合。

- 5 在某些实施方案中，所述药物组合物包括在时间和/或空间上分开的组合，只要其能够共同作用以实现本发明的目的。例如，所述药物组合物中所含的成分（例如根据本发明的抗体、核酸分子、核酸分子组合和/或缀合物）可以以整体施用于对象，或者分开施用于对象。当所述药物组合物中所含的成分分开地施用于对象时，所述成分可以同时或依次施用于对象。优选地，所述可药用载体是水、缓冲水溶液、等渗盐溶液如 PBS（磷酸盐缓冲液）、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素、碳酸镁、0.3%甘油、透明质酸、乙醇或聚亚烷基二醇如聚丙二醇、甘油三酯等。所用可药用载体的类型尤其依赖于根据本发明的组合物是否配制为用于口服、鼻、皮内、皮下、肌肉或静脉施用。根据本发明的组合物可包含润湿剂、乳化剂或缓冲液物质作为添加剂。
- 10
- 15

[49] 根据本发明的药物组合物可通过任何适宜的途径施用，例如可口服、鼻、皮内、皮下、肌肉或静脉内施用。

- 20 [50] 在一个相关方面，本发明提供了为抗 PD-1 抗体与第二治疗剂的组合的药物组合物。在一个实施方案中，所述第二治疗剂是有利地与抗 PD-1 抗体组合的任意试剂。可有利地与抗 PD-1 抗体组合的示例性试剂包括但不限于抑制 PD-1 活性的其他试剂（包括其他抗体或其抗原结合片段、肽抑制剂、小分子拮抗剂等）和/或干扰 PD-1 上游或下游信号转导的试剂。
- 25

- [51] 本文使用的术语“通过消除、抑制或降低 PD-1 活性来预防或治疗疾病或病症”旨在表示由 PD-1 表达所导致或者以 PD-1 表达为症状/特征的疾病或病症。在一些实施方案中，所述疾病或病症选自癌症或感染性疾病。所述癌症包括但不限于肺癌，肝癌，卵巢癌，宫颈癌，皮肤癌，膀胱癌，结肠癌，乳腺癌，神经胶质瘤，肾癌，胃癌，食道癌，口腔鳞状细胞癌，头颈癌。所述感染
- 30

性疾病包括但不限于 HIV 病毒感染和乙型肝炎病毒感染。

[52] 本文使用的“治疗有效量”是指足以显示其对于所施用对象益处的剂量。施用的实际量，以及施用的速率和时间过程会取决于所治疗者的自身情况和严重程度。治疗的处方（例如对剂量的决定等）最终是全科医生及其它医生的责任并依赖其做决定，通常考虑所治疗的疾病、患者个体的情况、递送部位、施用方法以及对于医生来说已知的其它因素。

[53] 本文所使用的术语“对象”是指哺乳动物，如人类，但也可以是其它动物，如野生动物（如苍鹭、鹤、鹤等），家畜（如鸭、鹅等）或实验动物（如猩猩、猴子、大鼠、小鼠、兔子、豚鼠等）。

[54] 提供了以下实施例以证明并进一步解释本发明的一些优选的实施方式和方面，不应被解释为限制其范围。

实施例

15 实施例 1. 克隆人 PD1 胞外结构区入真核表达质粒

[55] 以 Trizol RNA 提取试剂盒(Invitrogen)从人外周血细胞(北京市红十字血液中心)中提取总 RNA，用 Invitrogen 的逆转录试剂盒得到 cDNA，以该 cDNA 为模板，上游引物为 5'-GTACGCTAGCCACCATGCAGATCCCACAGGC -'3 (SEQ ID NO.31)，下游引物为 5' - GATCCTCGAGCCACCAGGGTTTGGAAGT -'3 (SEQ ID NO.32)，PCR 扩增 PD1 胞外片段。扩增产物在经 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切后，克隆到 pCDNA3.1 的真核表达质粒系统。以此质粒转染 293T 细胞 (ATCC) 3 天后，收集培养上清液，纯化 h-PD1。以此类似，我们从食蟹猴的外周血细胞中也提取了总 RNA 并将其产生的 cDNA 克隆至了真核表达系统。

[56] 如图 1 显示，由于糖基化等修饰原因，人源性 (hu) 和食蟹猴源性 (cyno) 的 PD-1 胞外结构区蛋白大小在 SDS-PAGE 经考马斯亮蓝染色后显示 50K 道尔顿左右。

实施例 2. 检测细胞上 PD-1 与配体 PD-L1 结合

1. 从人外周血细胞中分离 T 细胞

- [57] 外周血细胞（北京血液研究所）悬液在通过尼龙毛柱（北京海德生物技术公司）时，B 细胞、浆细胞、单核细胞和一些辅助细胞被选择性粘附于尼龙毛上，而多数 T 细胞则通过尼龙毛柱，由此获得富含 T 细胞群。其操作简述如下：取 50ml 玻璃注射器，拔去注射芯，在注射器头上套一段带夹子的胶管。将尼龙毛梳理，填入注射器内。将注射器固定在支架上，倒入 37℃ 的 RPMI 细胞培养液以预处理尼龙毛。关闭阀门半小时后，打开阀门，放掉细胞培养液。将要分离的细胞液用预先加温的 RPMI 培养液稀释成适当的浓度，约 5.00×10^7 个细胞 / ml。将细胞液倒入注射器内，使之没过尼龙毛柱。盖上注射器，37℃ 温育 1 小时。打开下口，缓慢放流（1 滴 / min），收集于离心管中。1000xg 离心 10 分钟，即获所需的 T 淋巴细胞。

2. 生物素标记 rh-PD-L1 重组蛋白

- [58] 将购自于义翘神州生物公司的 100 ug rh-PD-L1 重组蛋白与溶解于 DMSO 中的生物素-氨基己酸-NHS（Thermo）以 1: 4 的摩尔比混合，室温放置 1 小时，将反应混合物通过 G25 凝胶柱（Thermo）以分离生物素标记的 rh-PD-L1 和游离生物素。

3. 生物素标记 rh-PD-L1 与人 T 细胞结合

- [59] 将不同浓度生物素标记的 rh-PD-L1 重组蛋白和 10^5 分离的 T 细胞混合，在 4 摄氏度孵育 15 分钟。以 PBS 洗涤 3 次后，加入链亲合素别藻蓝蛋白（Thermo）(SA-APC)至 0.2ug/ml，并在 4 摄氏度孵育 20 分钟。以 PBS 洗涤 3 次后上 Beckman Dickson Calibur 细胞流式仪在 660nm 检测。结果如图 2 所示，其结果表明生物素标记的 PD-L1 蛋白可以同 T 细胞结合。

实施例 3. 抗 rh-PD-1 抗体的制备

1. 免疫动物

- [60] 将 10 ug 浓度为 1mg/ml 的 rh-PD-1 重组蛋白作为抗原与等量免疫佐剂（福氏佐剂（Sigma-Aldrich））混合，取 3 只 6 周大雌性 FVB 小鼠进行皮下免疫。在初次免疫以后，每一周进行一次相同剂量的加强免疫。

2. 细胞融合

- [61] 在最后一针加强免疫后，取小鼠大腿根处淋巴结，在生理盐水中碾磨后取富含 B 细胞的悬浮液，按常规方法电转（参见 BTX 公司电转仪手册）与 SP2/0 细胞融合。将融合细胞在含有 HAT 的 RPMI-1640 全培养基（Sigma）中置于 5%CO₂，37°C 条件下培养。

实施例 4. 配体和受体封闭实验

- [62] 在 20000 种单克隆杂交瘤细胞中，通过酶标（Elisa）反应，筛选出 1220 种所分泌的抗体可结合 PD-1 蛋白的克隆。在这 1220 种抗体中，其中有五种可以不同程度抑制生物素标记的 PD-L1 与 T 细胞上 PD-1 受体结合。

- [63] 将上述五种抗体（1ug/ml）与 312ng/ml 生物素标记的 rh-PD-L1（浓度）混合室温孵育 20 分钟。然后将混合物与分离的 T 细胞在 4 摄氏度孵育 15 分钟，以生理盐水洗涤 3 次后，加入 0.2 ug/ml 的 SA-APC 并在 4 摄氏度孵育 15 分钟。以生理盐水洗涤 3 次后，将样品上 BD 公司流式细胞仪检测以验证其是否可以抑制 rh-PD-L1 与 T 细胞表面的 PD-1 受体结合。

- [64] 由图 3 可见，克隆 1，10，11 可阻碍细胞表面的 PD-1 与配体 PD-L1 结合。而克隆 55 和 64 则只可以微弱抑制。

实施例 5. 与其他 CD28 家族蛋白的结合

- [65] 为进一步检验克隆 1、10、11、55 和 64 的候选抗体的结合特异性，将 1ug/ml 的 rh-PD-1 或其它 CD28 家族成员蛋白 ICOS、

CTLA-4 和 CD28 (R&D System) 置于 96 孔酶标板中的 0.05M PH9 碳酸盐包被缓冲液中, 4℃过夜。次日, 弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液(PBS+0.5% TWEEN)洗 3 次。然后加入含有 3%BSA 的 PBS 溶液封闭 20 分钟。用洗涤缓冲液洗 3 次后加入
5 100ul1ug/ml 候选抗体, 室温孵育 1 小时后用洗涤缓冲液冲洗 3 次, 用洗涤缓冲液以 1 比 10000 倍稀释 HRP 交联羊抗小鼠抗体 (Jsckson Immunoresearch), 室温孵育 1 小时, 经洗涤缓冲液洗涤 3 次后, 加入 50ul TMB (四甲基联苯胺) 底物溶液显色, 室温反应 10 分钟后, 以 25ul 0.5M 的硫酸溶液终止反应并在
10 450nm 处读出吸光度。

[66] 由图 4 可见, 所有测试的候选抗体均识别结合 rh-PD-1, 但是, 它们均不识别其它 CD28 家族成员。

实施例 6. 候选抗体可变区序列

15 [67] 将候选杂交瘤细胞总数量培养到 10^7 个细胞, 1000rpm 离心 10 分钟收集细胞, 并以 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 提取总 RNA。以所述 RNA 为模板, 合成第一链 cDNA (Qiagen) 后, 以第一链 cDNA 为后续模板扩增杂交瘤细胞所对应的可变区 DNA 序列。扩增反应中所使用的引物序列与抗体可变区第一框
20 架区和恒定区互补 (Larrick,J.W., et al., (1990) Scand. J. Immunol., 32, 121-128 和 Coloma,J.J.et al., (1991) BioTechniques, 11, 152-156 等人)。在 50μl 反应体系中, 分别加入 cDNA 1μl, 10×PCR 缓冲液 5μl, 上游及下游引物各 1μl (25 pmol), dNTP 1μl, 25 mmolPL MgCl₂ 1ul, H₂O 39μl, 95℃预变性 10 min, 加 Taq
25 酶 (Invitrogen) 1μl, 进入温度循环, 进行 PCR 扩增。反应条件为 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 115 min, 共 30 个循环, 然后 72 °C 保温 10 min。

[68] 将扩增产物测序后, 得到杂交瘤克隆 1、10 和 11 重链和轻链可变区序列为:

克隆 1:

重链

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
 QGQLQQSGAELVRPGASVTLTCKASGYTFDYEMHWVKQTPIHGLEWIGVIESETGGTAYNQKFKG
 <-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
 KAKLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTREGITTVATTYYWYFDVWGTTGTTVTVSS

核酸序列

CAGGGTCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGCTGACCTGCAA
 GGCTTCGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTATACATGGCCTGGAA
 TGGATTGGAGTTATTGAATCTGAAACTGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAA
 CTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCG
 TCTATTACTGTACAAGAGAGGGTATTACTACGGTAGCAACTACGTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGG
 CACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

轻链

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
 DVLMTQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPELLIYKVYNRFS
 <-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPFTFGSGTKLEIK

核酸序列

GATGTTTTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCA
 ATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAG
 TCTCCAGAGCTCCTGATCTACAAAGTTTACAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTG
 GATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCT
 TTCAAGGTTACATGTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA

克隆 10

重链

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
 QVQLQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTF**TDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGGAAYNQKFKG**

<-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->

KAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCT**REGITTSVVITYYWFVDV**WGTTGTTTVSS

核酸序列

CAGGTTCAACTGCAGCAGCTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGCTGTCTGCAAGGC
 TTCGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGA
 TTGGAGCTATTGATCCTGAAACTGGTGGTGTCTGCCTACAATCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCATACTGACT
 GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTA
 CTGTACAAGAGAGGGTATTACTACGTCACTGGTTACGTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGA
 CCACGGTACCGTCTCCTCA

轻链

<-----FR1-----> CDR1 <----FR2-----> CDR2
 DVIMTQTPLSLPVSLGDQASIS**CRSSQSIVHSNGNTYLEWY**LQKPGQSPKLLI**YKVS**NRFS

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->

GVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEPEDLGYYC**FOGSHVPLT**FGSGTKLEIK

核酸序列

GATGTTTGTATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCA
 ATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGT
 CTCCAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGA
 TCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGAGTGGAGCCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCA
 AGGTTACATGTTCCACTCACGTTCTGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA

克隆 11

重链

<-----FR1-----> CDR1 <----FR2-----> CDR2
 QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTFGMGVGVIRQPSGKLEWLAHIWWDDDKYYNPALKS

<-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->

RLTISKNTSKNQVFLKIANVDTEATATYYCARIEERFRWYFDVWGTGTIVTVSS

核酸序列

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTT
 CTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTTTGGTATGGGTGTCGGCTGGATTCTGCAGCCTTCAGGGAAGGGTCTGG
 AGTGGCTGGCACACATTGGTGGGATGATGATAAGTACTATAATCCCGCCCTGAAGAGTCGGCTCACAATC
 TCCAAGAATACCTCCAAAAACCAAGGTATTCCTCAAGATCGCCAATGTGGACACTGAAGATACTGCCACATA
 CTACTGTGCTCGAATAGAGGAGAGGTTCGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCG
 TCTCCTCA

轻链

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
 RAGWTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAITTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAP

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

核酸序列

AGGGCTGGTTGGACTCAGGAATCTGCACTCACCATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACTTGTCGCT
 CAAGTACTGGGGCTATTACAAGTAACTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCAAGATCATTTATTCAC
 TGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGA
 GACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGT
 ACAGCAACCACTGGGTGTTGCGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCCTA

实施例 7. 构建嵌合抗体表达载体

- [69] 从人血细胞（北京血液研究所）中克隆重链恒定区 Fc 片段
 5 和轻链 k/λ 恒定区，连入 pCDNA3.1 质粒（见 Walls MA, Hsiao H
 和 Harris LJ (1993), Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 12 2921
 -2929）加以改造。实施例 6 所述重链和轻链序列片段由 Genscript
 公司合成，重链经 Xho I 和 Age I 酶切，轻链片段经 Sma I 和
 10 Dra III 酶切后，连入相对应改造的 pCDNA3.1 质粒中，并经测
 序确定克隆 DNA 序列。后续的实验材料均由此系列质粒转染细
 胞后，提纯获得。

实施例 8. 嵌合抗体体外刺激 T 细胞功能实验—破伤风毒素刺激试验

- [70] 将新鲜制备的 PBMC 铺板至 96 孔平底板中，孵育过夜后，加入不同浓度的抗体及 100ng/ml 的破伤风毒素（TT）（List Biological Laboratories）。三天后收获上清，并使用 R&D System 公司的 IFN γ 试剂盒通过 Elisa 检测上清液中的 IFN γ 含量。由图 5 结果可见，在阻断 PD-1 信号后，受 TT 刺激激活的免疫细胞分泌的细胞因子大大增加。并且候选抗体效价高于申请号：200980147059.0 中购于 Biolegend 公司的 EH12.2H7。

实施例 9. 不同抗体轻重链互换后与 PD-1 相互作用

- [71] 将抗体 1, 10 的轻重链相互重新组合，得到 H1L10（重链 1 轻链 10）和 H10L1（重链 10 轻链 1）。类似于实施例 7 中所述，我们得到重新组合的抗体，并与原有抗体 1（重链 1，轻链 1）和原有抗体 10（重链 10，轻链 10）在 Elisa 实验结果产生的 EC50 结果见下表：

样品	H1L1	H10L10	H1L10	H10L1
EC50 (pM)	338.1	426.3	270.1	528.1

- 结果表明，新组合产生的抗体仍然可以高效结合 PD-1 蛋白。

实施例 10. 抗体的人源化改造

- [72] 根据上述获得的杂交瘤细胞分泌的抗体的可变区序列，进行人源化改造。简言之，人源化改造过程涉及以下步骤：A、把各杂交瘤细胞分泌的抗体的基因序列与人胚胎系抗体基因序列进行比对，找出同源性高的序列；B、分析考察 HLA-DR 亲和性，选出亲和力低的人胚胎系框架序列；C、利用计算机模拟技术，应用分子对接分析可变区及其周边的框架氨基酸序列，考察其空间立体结合方式。通过计算静电力，范德华力，亲疏水性和熵值，分析各杂交瘤细胞分泌的抗体基因序列中可与 PD-1 作用以及维护空间构架的关键氨基酸个体，将其嫁接回已经选择的人胚胎系

基因框架，并在此基础上标配出必须保留的框架区氨基酸位点，合成随机引物，自制噬菌体文库，筛选人源化抗体文库 (Pini, A. 等, et al. (1998). **Design and Use of a Phage Display Library: HUMAN ANTIBODIES WITH SUBNANOMOLAR AFFINITY AGAINST A MARKER OF ANGIOGENESIS ELUTED FROM A TWO-DIMENSIONAL GEL.**, *Journal of Biological Chemistry*, 273(34): 21769-21776)。在此基础上我们得到了以下多个人源化抗体。其中包括以下克隆，其中，38, 39, 41 的轻链序列相同，39 和 48 的重链序列相同。

10

38 重链

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
 QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPIHGLEWIGVIESETGGTAYNQKFKG

<-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREGITTVATTYYWYFDVWGQGT VTVSS

CAGGGCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCA
 AGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGAGATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCATCCACGGCCTGG
 AGTGGATCGGCGTGATCGAGAGCGAGACCGGCGGCACCGCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGAGTG
 ACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACAC
 CGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGGGCATCACCAACCGTGGCCACCACCTACTACTGGTACTTCGACGTG
 TGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

38 轻链

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISRSSQSI VHSNNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC
 CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC
 CAGAGCCCGCAGCTGCTGATTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTAGCGGC
 AGCGGCAGCGGCACCGATTTACCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGATTAT
 TGCTTTCAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAATTTAA

39 重链

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
 QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGVIESETGGTAYNQKFKG

<-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
 RAKITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTREGITTVATTYYWYFDVWGQGT VTVSS

CAGGGCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCA
 AGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGAGATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCGCCAGGGCCTG
 GAGTGGATGGGCGTGATCGAGAGCGAGACCGGCGGCACCGCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGAG
 CCAAGATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGAC
 ACCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGGGCATCACCAACCGTGGCCACCACCTACTACTGGTACTTCGACG
 TGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

39 轻链

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISRSSQSI VHSNNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC
 CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC
 CAGAGCCCGCAGCTGCTGATTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTAGCGGC

AGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTAT
TGCTTTCAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAATTTAA

41 重链

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGVIESETGGTAYNQKFG
<-----FR3-----> CDR3 <----FR4---->
RVTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREGITTVATTYYWYFDVWGQGTIVTVSS

CAGGGCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCA
AAGCGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATGAAATGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG
AATGGATGGGCGTGATTGAAAGCGAAACCGGCGGCACCGCGTATAACCAGAAATTTAGGGCCGCGTG
ACCTGACCGCGGATAAAAGCAGCAGCACC GCGTATATGGAAGT GAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAACC
GCGGTGTATTATGCACCCGCGAAGGCATTACCAACCGTGGCGACCACTATTATTGGTATTTTGTGTGT
GGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

41 轻链

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS
<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVLTFGQGTKLEIK

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC
CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC
CAGAGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGC
AGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTAT
TGCTTTCAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAATTTAA

48 重链

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGVIESETGGTAYNQKFKG
<-----FR3-----> CDR3 <----FR4---->
RAKITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREGITTVATTYYWYFDVWGQGTIVTVSS

CAGGGCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCA
AGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGAGATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCCGGCCAGGGCCTG
GAGTGGATGGGCGTGATCGAGAGCGAGACCGGCGGCACCGCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGAG
CCAAGATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACC GCGTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGAC
ACCGCCGTGTAATACTGACACAGAGAGGCGATCACCAACCGTGGCCACCACCTACTACTGGTACTTCGACG
TGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTGAGCAGC

48 轻链

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFS
<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVLTFGQGTKLEIK

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC
CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC
CAGAGCCCGCGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGC
AGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTAT
TGCTTTCAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAATTTAA

实施例 11. 人源化抗体在体外刺激 T 细胞

- [73] 将新鲜制备的 PBMC (北京血液研究所) 铺板至 96 孔平底板中, 孵育过夜后, 加入 10ug/ml 的抗体及 100ng/ml 的破伤风毒素 (TT), 培养 3 天后收集上清液, 用 Life Technology 公司的 Luminex 仪与 EMD 公司的 CD8+ 细胞因子检测试剂盒检测人源化抗体克隆 38、39、41 以及 48 (对照 (conIgG4)) IL2 的分泌水平。结果 (见图 6) 显示人源化抗体均可刺激 T 细胞的功能。

实施例 12. 人源化抗体可在体外刺激 T 细胞杀伤肿瘤细胞

- [74] 以表达 PD-L1 蛋白的慢病毒 (Qiagen) 感染 MD-MAB-453 细胞, 得到稳定表达 PD-L1 的 MD-MAB-453 细胞系, 在此基础上再导入 GFP 基因, 使其稳定表达 GFP 蛋白。从人新鲜外周血细胞中提取树突细胞 (DC), 在 96 孔盘中, 以 300 个细胞/孔与上述改造的 MD-MAB-453 细胞 (300 个/孔) 共同培养 3 天后, 加入提取的 T 细胞 (1000 个/孔) 和 10ug/ml 的人源化抗 PD-1 抗体克隆 38、39、41 以及 48 (对照 (conIgG4)), 再共同培养 3 天, 读取 GFP 荧光值。结果 (见图 7) 表明人源化抗体均刺激 T 细胞以杀伤肿瘤细胞。

实施例 13. 人源化抗体与不同物种 PD-1 蛋白的结合

- [75] 将 1 ug/ml 的上述人源 PD-1、食蟹猴 PD-1 以及鼠源 PD-1 (Sinobiological 购得) 稀释在 0.05M PH9 的碳酸盐包被缓冲液中, 在 4℃ 下过夜。次日, 弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液清洗 3 次。然后加入含有 3%BSA 的 PBS 溶液封闭 20 分钟。用洗涤缓冲液洗 3 次后加入 100ul 稀释后不同浓度候选抗体, 室温孵育 1 小时后用洗涤缓冲液冲洗 3 次, 用洗涤缓冲液以 1:10000 倍稀释 HRP 缀合羊抗人抗体 (Jackson Immunoresearch) 室温孵育 1 小时, 经洗涤缓冲液冲洗 3 次后, 加入 50ul TMB 底物溶液显色, 室温反应 10 分钟后, 以 25ul 0.5M 的硫酸溶液终止反应并在 450nm 处读出吸光度。结果 (图 8A、B、C) 表明, 各克隆以类

似的亲和力结合人或食蟹猴 PD-1 蛋白,但它们均不与鼠源 PD-1 蛋白相互作用。

- [76] 比对人、食蟹猴和小鼠 PD-1 序列 (见图 9, 其中小鼠 PD-1 与人和食蟹猴 PD-1 蛋白的主要不同区域用框架标注)。通过实验证实, 候选抗体对 PD-1 蛋白的表位存在于这几个区域中。

实施例 14. 人源化抗体体外刺激 T 细胞增殖实验—破伤风抗原记忆应答实验

- [77] 将新鲜制备的 PBMC (北京血液研究所) 铺板至 96 孔平底板中, 孵育过夜后用 CFSE 标记, 加入 10ug/ml 的人源化抗体 (38, 39, 41 和 48) 及 100ng/ml 的破伤风毒素 (TT) (List Biological Laboratories)。在第 6, 8 和 10 天后用流式细胞计数仪 (FACS) 通过 CSFE 的稀释倍数对 T 细胞增值进行定量分析。由图 10 结果可见, 与对照 IgG 相比, 阻断 PD-1 信号诱导 TT 刺激激活的免疫细胞进一步分裂增殖。

实施例 15. 人源化抗体体外刺激 T 细胞增殖实验—病毒多肽抗原记忆应答实验

- [78] 将新鲜制备的 PBMC (北京血液研究所) 铺板至 96 孔平底板中, 孵育过夜后用 CFSE 标记, 加入浓度 10ug/ml 的人源化抗体 (38, 39, 41 和 48) 及 1ug/ml 的 CEF 多肽混合物 (CMV, EBV 和 Influenza)。在第 6, 8 和 10 天后用流式细胞计数仪 (FACS) 通过 CSFE 的稀释倍数对 T 细胞增值进行定量分析。由图 11 结果可见, 与对照 IgG 相比, 阻断 PD-1 信号诱导 CEF 混合多肽刺激激活的免疫细胞进一步分裂增殖。

权 利 要 求

1. 能够结合程序性死亡因子 1 (PD-1) 的抗体或其功能性片段, 其包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15 或任何所述序列之变体的重链 CDR, 和/或选自氨基酸序列
- 5 SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18 或任何所述序列之变体的轻链 CDR。

2. 权利要求 1 所述的抗体或其功能性片段, 其中所述重链 CDR 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列选自以下各氨基酸序列或其变体的组中的一组:

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
A	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3
B	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9
C	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15

- 10 和/或所述轻链 CDR 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列选自以下各氨基酸序列或其变体的组中的一组:

	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
B	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
C	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗体或其功能性片段, 其重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 以及轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列选自以下各氨基酸序列或其变体的组中的一组:

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
B	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12

C	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
---	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

4. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗体或其功能性片段，其包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 19, 21, 23 或任何所述序列之变体的重链可变区，和/或选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 20, 22, 24 或任何所述序列之变体的轻链可变区。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体或其功能性片段，其中所述重链可变区为 SEQ ID NO: 19 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 20 或其变体，或者所述重链可变区为 SEQ ID NO: 21 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 22 或其变体，或者所述重链可变区为 SEQ ID NO: 23 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 24 或其变体。

6. 权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其功能性片段，其为嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

7. 权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗体或其功能性片段，其包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 33, 35, 36 或任何所述序列之变体的重链可变区，和/或选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 34, 37 或任何所述序列之变体的轻链可变区。

8. 权利要求 1 至 7 中任一项所述的抗体或其功能性片段，其中所述重链可变区为 SEQ ID NO: 33 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 34 或其变体，或者所述重链可变区为 SEQ ID NO: 35 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 34 或其变体，或者所述重链可变区为 SEQ ID NO: 36 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 34 或其变体，或者所述重链可变区为 SEQ ID NO: 35 或其变体并且所述轻链可变区为 SEQ ID NO: 37 或其变体。

9. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体或功能性片段。

10. 表达载体，其包含权利要求 9 所述的核酸分子。

11. 宿主细胞，其包含权利要求 10 所述的表达载体。

12. 产生抗 PD-1 抗体或其功能性片段的方法，其包括：在允许产生所述抗体或其功能性片段的条件下培养包含权利要求 11 所述的宿主细胞，以及回收这样产生的所述抗体或其功能性片段。

5 13. 免疫缀合物，其包含与治疗剂偶联的权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体或其功能性片段，优选地所述治疗剂为毒素、放射性同位素、药物或细胞毒剂。

14. 药物组合物，其包含权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体或其功能性片段，以及可药用载体。

10 15. 用于通过消除、抑制或降低 PD-1 活性来预防或治疗疾病或病症的方法，其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的权利要求 1 至 8 所述的抗体或其功能性片段，权利要求 9 所述的核酸分子、权利要求 10 所述的表达载体、权利要求 11 所述的宿主细胞、权利要求 13 所述的免疫缀合物或权利要求 14 所述的药物
15 组合物，其中所述疾病或病症选自癌症、感染性疾病或炎性疾病；所述癌症优选选自黑素瘤、肾癌、前列腺癌、乳癌、结肠癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输
20 卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、阴户癌、何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病，其包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样
25 白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、儿童期实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统的赘生物、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤
30 血管发生、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症、其包括石棉所诱发的那些，和所述癌症的组合；所述感染性疾病优选
选自 HIV、流行性感冒、疱疹、贾第虫病、疟疾、利什曼病、
以下病毒引起的致病感染：肝炎病毒（甲型、乙型和丙型）、疱疹病毒（例如 VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II 和 CMV、埃巴二

- 氏病毒)、腺病毒、流感病毒、黄病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV 病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、
- 5 JC 病毒和虫媒病毒性脑炎病毒, 以下细菌引起的致病感染: 衣原体、立克次氏体、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌和 *conococci*、克雷伯氏菌、变形菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团菌、白喉、沙门氏菌、杆菌、霍乱、破伤风、肉毒中毒、炭疽、鼠疫、钩端螺旋体病和莱姆氏病细菌, 以下真菌引
- 10 起的致病感染: 假丝酵母(白色假丝酵母、克鲁斯假丝酵母、光滑假丝酵母、热带假丝酵母等)、新型隐球酵母、曲霉(烟曲霉、黑曲霉等)、毛霉目的属(毛霉属、犁头霉属、根霉属)、申克氏孢子丝菌、皮炎芽酵母、巴西副球孢子菌、粗球孢菌和加膜组织胞浆菌, 及以下寄生虫引起的致病感染: 痢疾内变形虫、结肠肠
- 15 袋虫、福纳氏虫、棘变形虫、吸吮贾第虫、隐孢子虫、卡氏肺囊虫、间日疟原虫、田鼠巴贝虫、布鲁斯锥虫、克鲁兹锥虫、多氏利什曼虫、鼠弓浆虫和 巴西日圆线虫; 所述炎性疾病优选选自急性播散性脑脊髓炎、阿狄森病、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综
- 20 合征、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、关节炎、贝切特病、大疱性类天疱疮、腹部疾病、恰加斯病、克罗恩病、皮肤炎、1 型糖尿病、肺出血-肾炎综合征、移植物抗宿主病、格雷夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本病、超 IgE 综合征、特发性血小板减少性紫癜、红斑狼疮、多发性硬化症、重症肌无力、天疱疮、恶性贫血、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、类风湿关节
- 25 炎、斯耶格伦综合征、颞动脉炎、血管炎和韦格纳肉芽肿病。

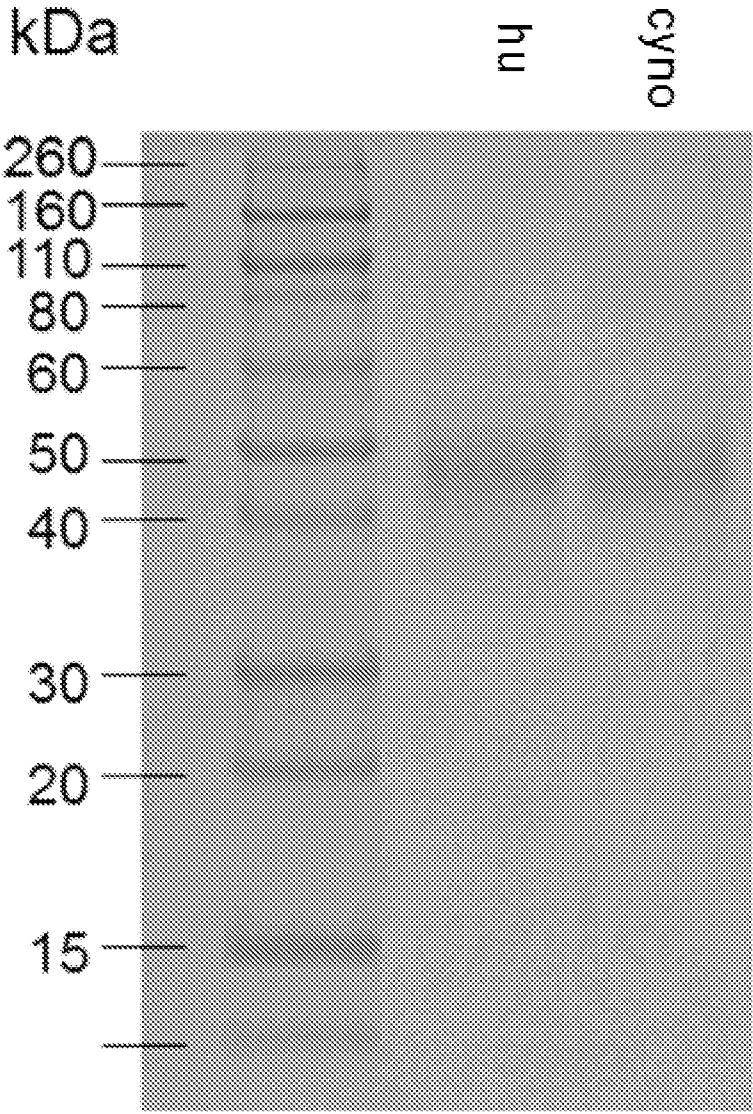


图 1

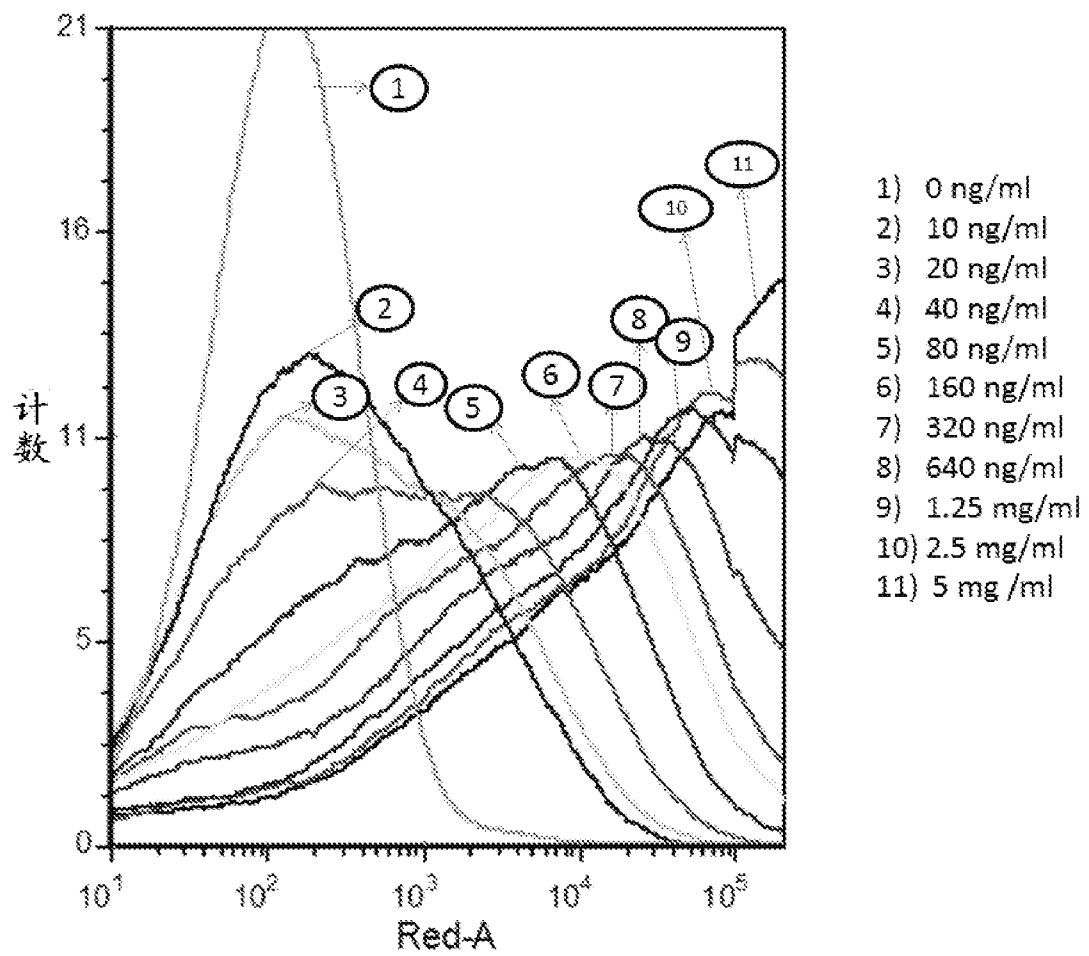
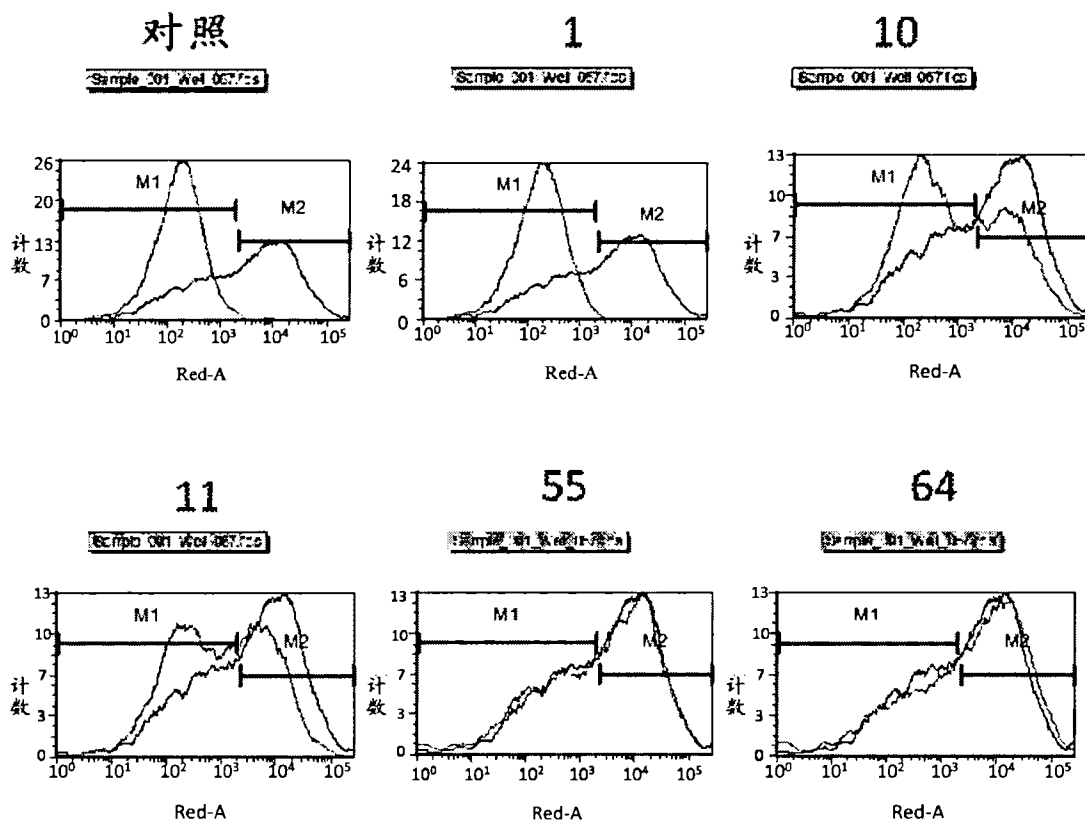


图 2



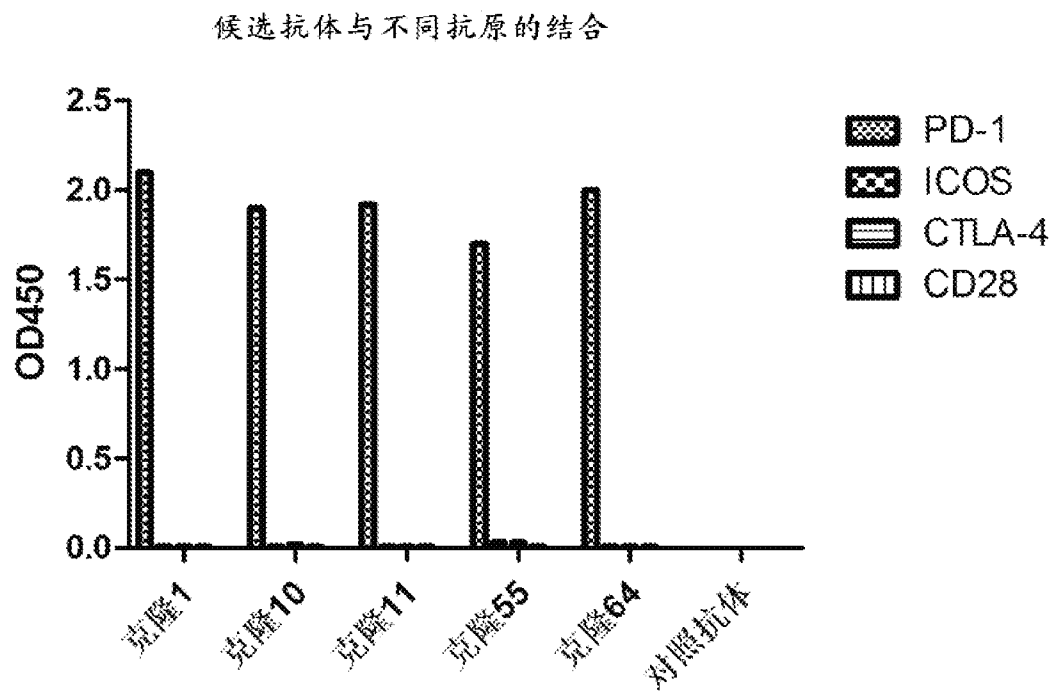


图4

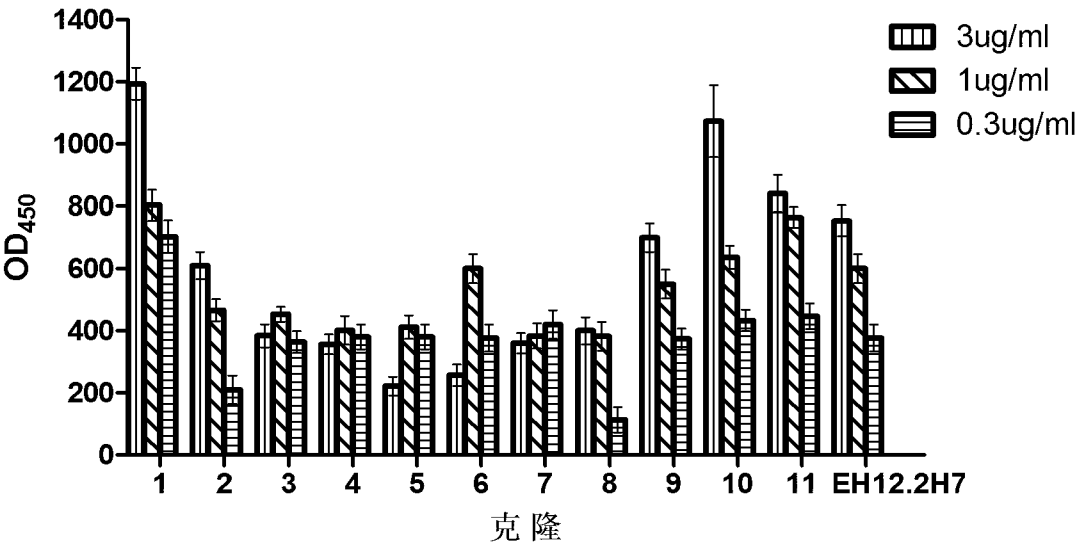


图 5

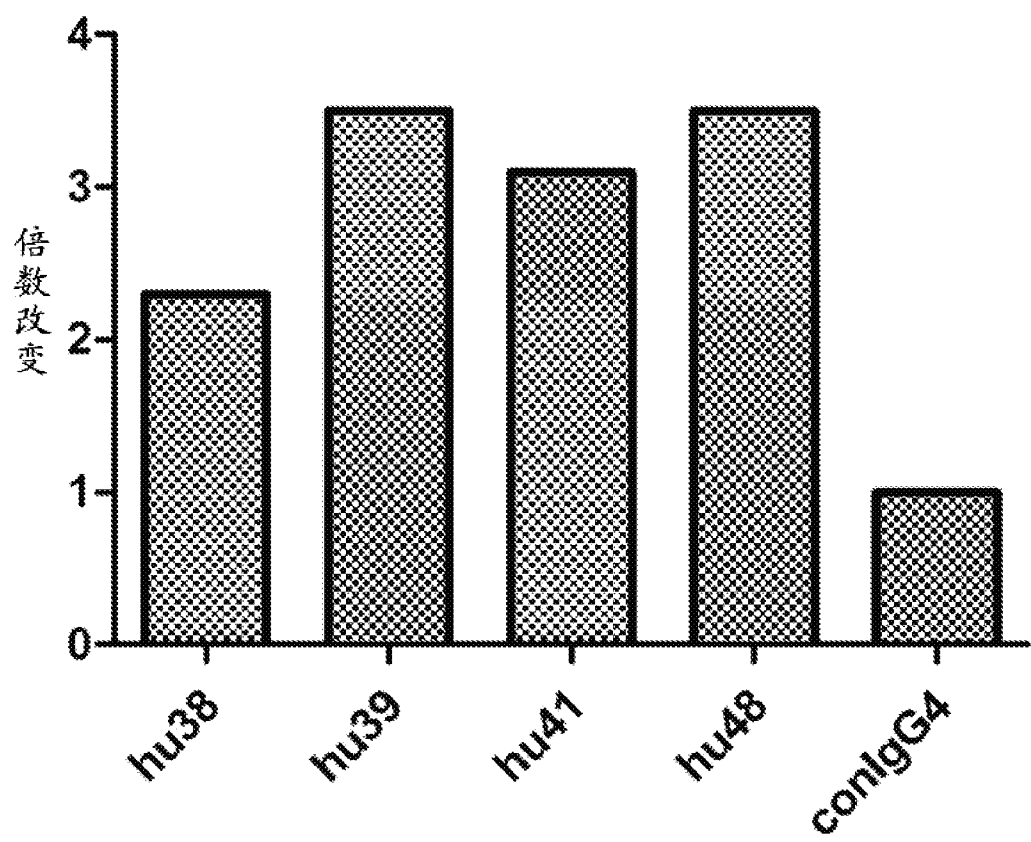


图 6

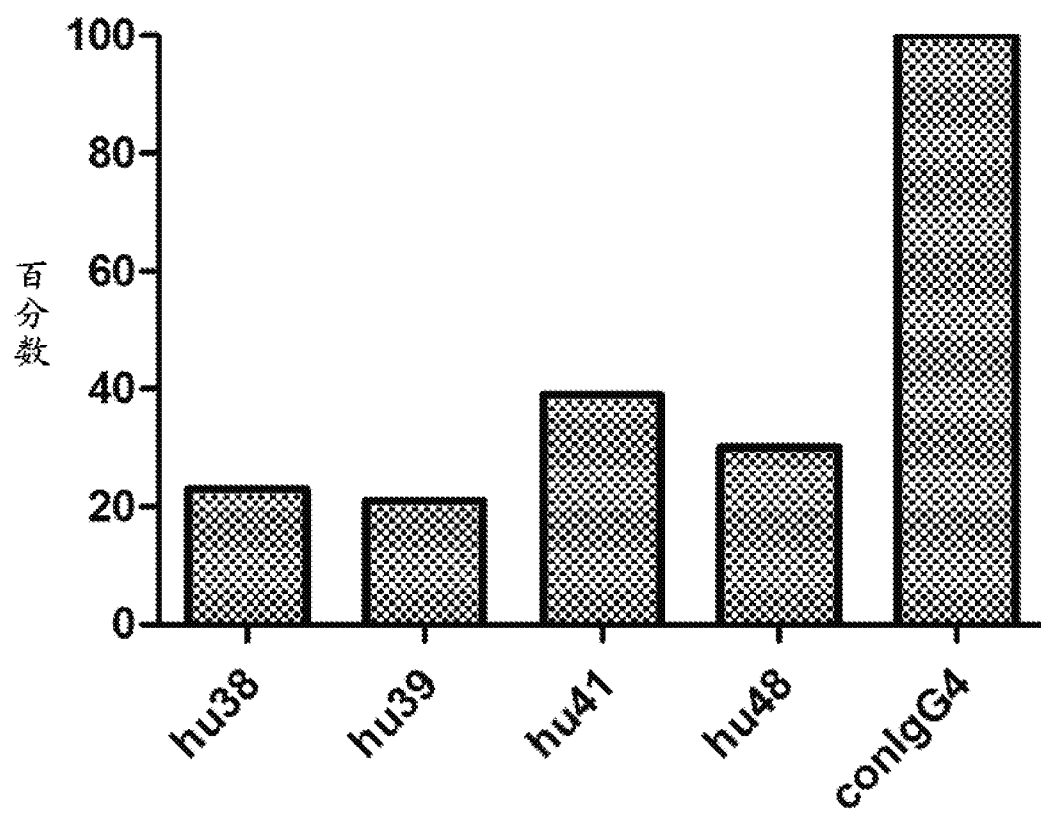
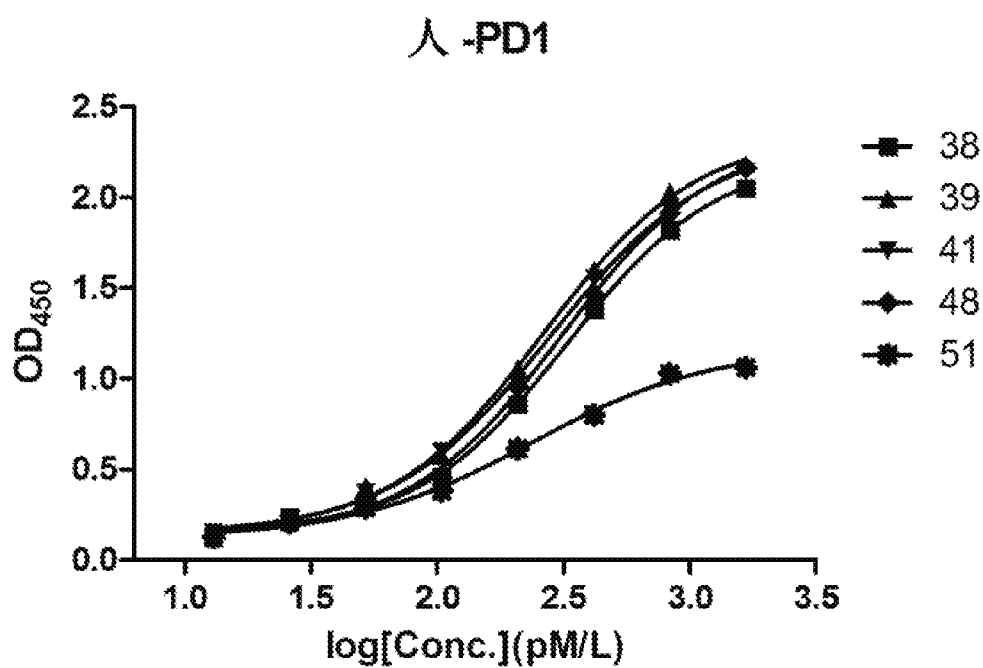
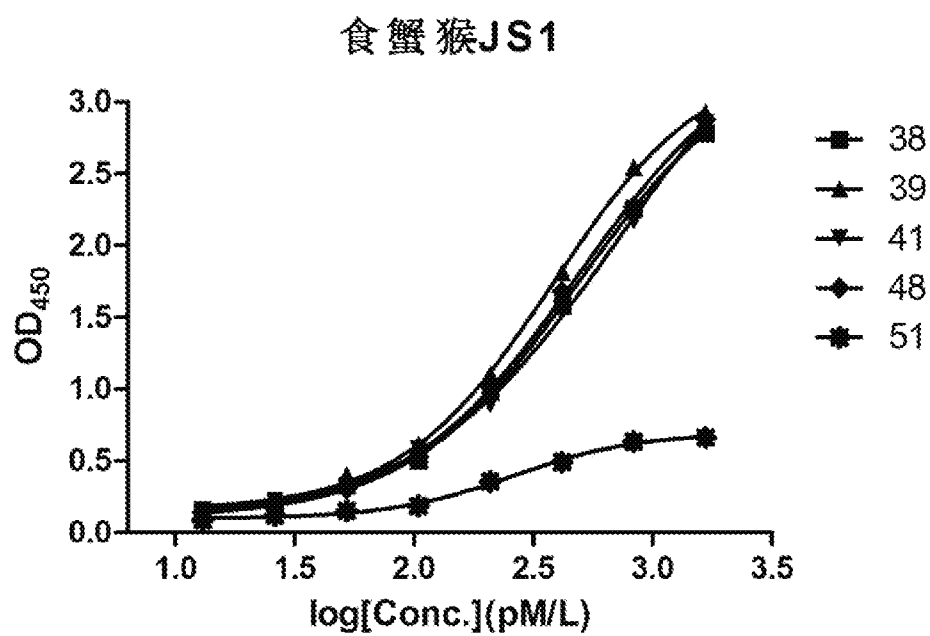


图7



NO.	38	39	41	48	51
$\text{EC}_{50}(\text{pM/L})$	326.1	262.9	279.6	310.9	236.5

图 8A



NO.	38	39	41	48	51
EC ₅₀ (pM/L)	488.8	381.9	724.8	485.3	259.9

图 8B

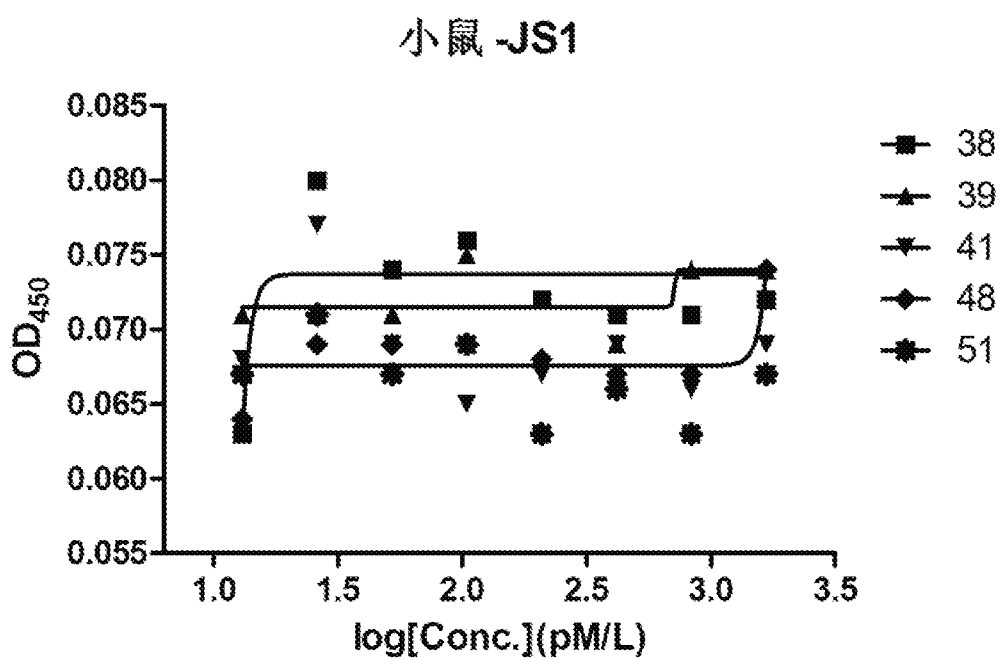


图 8C

		1		50
Human	(1)	MQLPQAPWFWVWAVLQLEWRFPGWEIDSPLRPWSEPTFSPALLVITEGNA		
Cyno	(1)	MQLPQAPWFWVWAVLQLEWRFPGWEIDSPLRPWSEPTFSPALLVITEGNA		
mouse	(1)	MWLRQVPWSFTWAVLQLSWDSENLLEVENGPWRSILTFYPAWLTVSEGANA		
		51		100
Human	(51)	TFTCSFESNTSESEVLNWIRFSPSNQTEKLAAPFEDESQPGGLCRFRVTQL		
Cyno	(51)	TFTCSFESNASESEVLNWIRFSPSNQTEKLAAPFEDESQPGGLCRFRVTQL		
mouse	(51)	TFTCSLSNWSEDILNWIRFSPSNQTEKQAAFCNGLSQPVGDARFQIIQL		
		101		150
Human	(101)	PNGEDFHMSSVVRARRNDSCGYLOGAISLAPKAOIKESLRAEILVTERPAE		
Cyno	(101)	PNGEDFHMSSVVRARRNDSCGYLOGAISLAPKAOIKESLRAEILVTERPAE		
mouse	(101)	PNRHDFHNNILDFERNDSGYLOGAISLHPKAKIEESPGAELVTERILE		
		151		200
Human	(151)	VPTAHPSPSRFPAGCFQTLVVGWVGGLLGE--LVLLVWVLAVICSHAAPR		
Cyno	(151)	VPTAHPSPSRFPAGCFQTLVVGWVGGLLGE--LVLLVWVLAVICSHAAPR		
mouse	(151)	TSTRIPSPSPKPEGRFCENIGIMSILVGIPVILLAWALAVFCITMSF		
		201		250
Human	(199)	TIGARPTGSELKEPSAIPVPSVYGEELDFQREKTPESPASCVPEETEV		
Cyno	(199)	TIGARPTGSELKEPSAIPVPSVYGEELDFQREKTPESPASCVPEETEV		
mouse	(201)	ARERGSKDDILKEEPSAIPVPSVAYEELDFQGREKTPPELPTACV--HTEY		
		251		290
Human	(249)	ATIVFESGLGTSPPARRGSADGPRSAQPERPEDGHCSWPL		
Cyno	(249)	ATIVFESGLGTSPPARRGSADGPRSPPEPEPEDGHCSWPL		
mouse	(249)	ATIVFTEGLGASAMGPRGSADGLQGPPEPRHEDGHCSWPL		

图 9

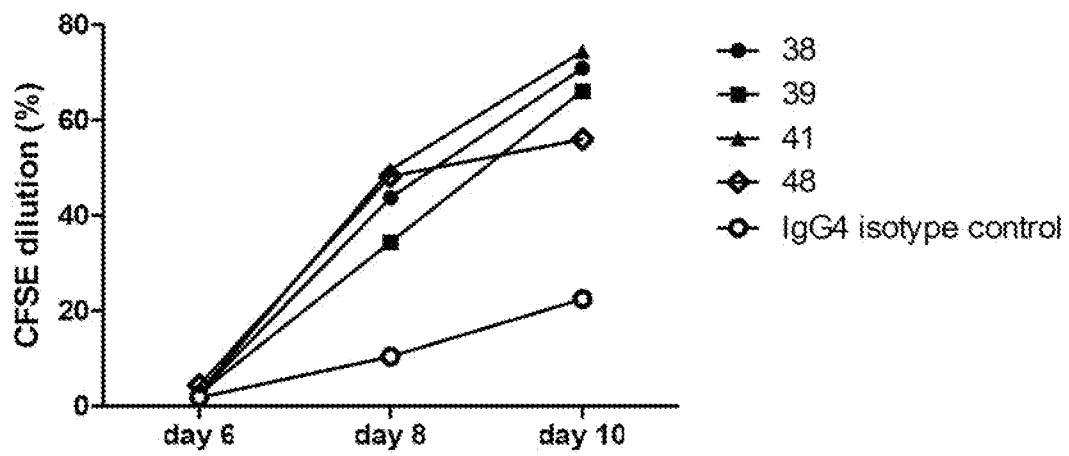
Tetanus-Toxoid Recall T Cell Proliferation

图 10

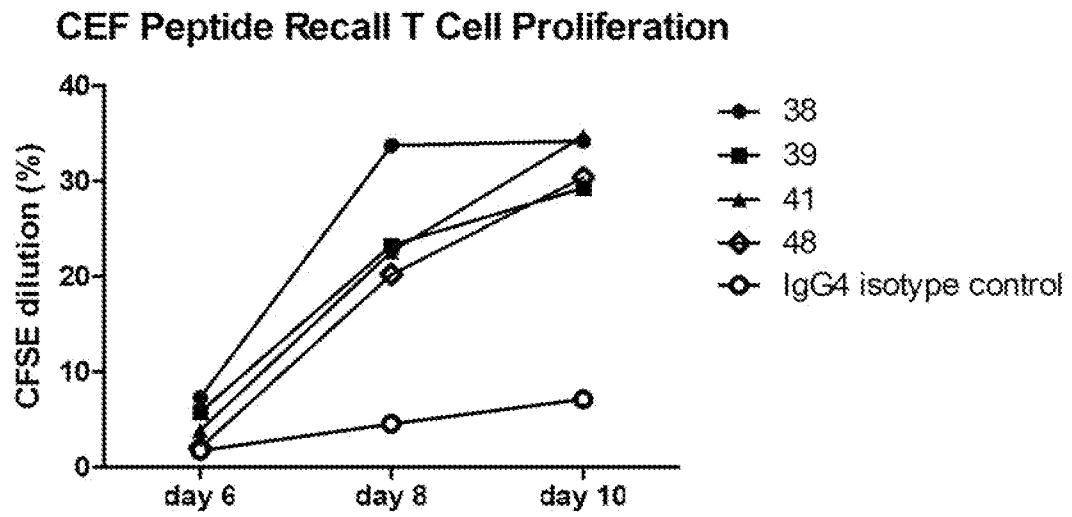


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/072574

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01) i; C07K 14/705 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C07K 16/46 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

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)

CPRS; CNKI; CNTXT and Key Words: programmed death factor, programmed death molecule, programmed death receptor, programmed death protein, programmed death polypeptide, programmed death 1, antibody, monoclonal, humanized etc.

WPI; EPODOC; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT and Key Words: programmed death-1, PD-1, CD279, monoclonal antibody, humanized, anti-human PD-1 etc.

National Bio-Sequence Database Of Chinese Patent; Genbank; EMBL; STN and Searched Sequences: SEQ ID NOs: 1-42

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008156712 A1 (ORGANON NV), 24 December 2008 (24.12.2008), description, page 27, paragraph 3 to page 38, paragraph 6, and embodiments 1-8	1-15
X	WO 2011110604 A1 (UCB PHARMA SA), 15 September 2011 (15.09.2011), description, page 18, paragraph 1 to page 25, paragraph 8, and embodiments 1-3	1-15
X	WO 2011110621 A1 (UCB PHARMA SA), 15 September 2011 (15.09.2011), description, page 19, paragraph 2 to page 25, paragraph 7, and embodiments 1-4	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 15 May 2014 (15.05.2014)	Date of mailing of the international search report 29 May 2014 (29.05.2014)
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 Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer MA, Zhenlian Telephone No.: (86-10) 62412131

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/072574

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 15

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] PCT Rule 39.1(iv)--a method for treating diseases.

[2] The search on claim 15 is given on the basis of the subject matter that may be rationally expected: the use of an antibody or a functional segment thereof as claimed in any one of claims 1-8, nucleic acid molecules as claimed in claim 9, an expression vector as claimed in claim 10, a host cell as claimed in claim 11 or an immunoconjugate as claimed in claim 13 in preparing medicines for preventing or treating corresponding diseases or conditions.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/072574

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2008156712 A1	24 December 2008	IL 225530 D0 HRP 20131167 T1 CA 2691357 A1 KR 20100054780 A AU 2008266951 B2 NZ 600758 A MX 2009014199 A US 2010266617 A1 AU 2008266951 A1 EP 2170959 B1 US 8354509 B2 EP 2535354 A1 JP 2010530753 A DK 2170959 T3 US 2013108651 A1 NZ 582150 A PT 2170959 E JP 2012254092 A IL 202813 D0 HK 1140497 A1 CN 102131828 A EP 2170959 A1 JP 5191537 B2 ES 2437327 T3 US 2013109843 A1	27 June 2013 03 January 2014 24 December 2008 25 May 2010 12 December 2013 27 September 2013 24 May 2010 21 October 2010 24 December 2008 02 October 2013 15 January 2013 19 December 2012 16 September 2010 13 January 2014 02 May 2013 31 August 2012 07 January 2014 27 December 2012 01 August 2011 07 March 2014 20 July 2011 07 April 2010 08 May 2013 10 January 2014 02 May 2013
WO 2011110604 A1	15 September 2011	CA 2791930 A1 US 2013095098 A1 CN 102892786 A EP 2545078 A1 JP 2013521768 A	15 September 2011 18 April 2013 23 January 2013 16 January 2013 13 June 2013
WO 2011110621 A1	15 September 2011	TW 201134488 A CN 102892785 A JP 2013521769 A AR 080501 A1 EP 2545076 A1 US 2011229461 A1	16 October 2011 23 January 2013 13 June 2013 11 April 2012 16 January 2013 22 September 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/072574

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRS; CNKI; CNTXT和关键词: 程序性死亡因子, 程序性死亡分子, 程序性死亡受体, 程序性死亡蛋白, 程序性死亡多肽, 程序性死亡1, 抗体, 单克隆, 人源化等; WPI; EPODOC; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT和关键词: programmed death-1, PD-1, CD279, monoclonal antibody, humanized, anti-human PD-1等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NO:1-42。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2008156712A1 (ORGANON NV) 2008年 12月 24日 (2008 - 12 - 24) 说明书第27页第3段-第38页第6段, 实施例1-8	1-15
X	WO 2011110604A1 (UCB PHARMA SA) 2011年 9月 15日 (2011 - 09 - 15) 说明书第18页第1段-第25页第8段, 实施例1-3	1-15
X	WO 2011110621A1 (UCB PHARMA SA) 2011年 9月 15日 (2011 - 09 - 15) 说明书第19页第2段-第25页第7段, 实施例1-4	1-15

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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
“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)	“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
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	

国际检索实际完成的日期

2014年 5月 15日

国际检索报告邮寄日期

2014年 5月 29日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

受权官员

马振莲

电话号码 (86-10)62412131

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
 - [1] PCT细则39.1 (iv)一疾病的治疗方法。
 - [2] 对权利要求15的检索是基于以下合理预期的主题作出的：权利要求1至8中的任一项所述的抗体或其功能性片段、权利要求9所述的核酸分子、权利要求10所述的表达载体、权利要求11所述的宿主细胞或权利要求13所述的免疫缀合物在制备预防或治疗相应疾病或病症的药物中的用途。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求， 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/072574

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 2008156712A1	2008年 12月 24日	IL 225530D0	2013年 6月 27日
		HR P20131167T1	2014年 1月 03日
		CA 2691357A1	2008年 12月 24日
		KR 20100054780A	2010年 5月 25日
		AU 2008266951B2	2013年 12月 12日
		NZ 600758A	2013年 9月 27日
		MX 2009014199A	2010年 5月 24日
		US 2010266617A1	2010年 10月 21日
		AU 2008266951A1	2008年 12月 24日
		EP 2170959B1	2013年 10月 02日
		US 8354509B2	2013年 1月 15日
		EP 2535354A1	2012年 12月 19日
		JP 2010530753A	2010年 9月 16日
		DK 2170959T3	2014年 1月 13日
		US 2013108651A1	2013年 5月 02日
		NZ 582150A	2012年 8月 31日
		PT 2170959E	2014年 1月 07日
		JP 2012254092A	2012年 12月 27日
		IL 202813D0	2011年 8月 01日
		HK 1140497A1	2014年 3月 07日
		CN 102131828A	2011年 7月 20日
		EP 2170959A1	2010年 4月 07日
		JP 5191537B2	2013年 5月 08日
		ES 2437327T3	2014年 1月 10日
		US 2013109843A1	2013年 5月 02日
WO 2011110604A1	2011年 9月 15日	CA 2791930A1	2011年 9月 15日
		US 2013095098A1	2013年 4月 18日
		CN 102892786A	2013年 1月 23日
		EP 2545078A1	2013年 1月 16日
		JP 2013521768A	2013年 6月 13日
WO 2011110621A1	2011年 9月 15日	TW 201134488A	2011年 10月 16日
		CN 102892785A	2013年 1月 23日
		JP 2013521769A	2013年 6月 13日
		AR 080501A1	2012年 4月 11日
		EP 2545076A1	2013年 1月 16日
		US 2011229461A1	2011年 9月 22日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)