

(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
2016 年 12 月 15 日 (15.12.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/197497 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/091842

(22) 国际申请日: 2015 年 10 月 13 日 (13.10.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510312910.8 2015 年 6 月 9 日 (09.06.2015) CN

(71) 申请人: 北京东方百泰生物科技有限公司 (BEIJING DONGFANG BIOTECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市大兴区北京经济技术开发区荣京东街 2 号 1 幢 406 室周墨玥, Beijing 100176 (CN)。北京精益泰翔科技发展有限公司 (BEIJING JINGYITAI XIANG TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市北京市经济技术开发区荣京东街 2 号 1 幢 406 室周墨玥, Beijing 100176 (CN)。

(72) 发明人: 周海平 (ZHOU, Haiping); 中国北京市北京市大兴区北京经济技术开发区荣京东街 2 号 1 幢, Beijing 100176 (CN)。李晓敏 (LI, Xiaomin); 中国北京市北京市大兴区北京经济技术开发区荣京东街

2 号 1 幢, Beijing 100176 (CN)。周俊杰 (ZHOU, Junjie); 中国北京市北京市大兴区北京经济技术开发区荣京东街 2 号 1 幢, Beijing 100176 (CN)。裴爽 (PEI, Shuang); 中国北京市北京市大兴区北京经济技术开发区荣京东街 2 号 1 幢, Beijing 100176 (CN)。咎琰璐 (ZAN, Yanlu); 中国北京市北京市大兴区北京经济技术开发区荣京东街 2 号 1 幢, Beijing 100176 (CN)。白义 (BAI, Yi); 中国北京市北京市大兴区北京经济技术开发区荣京东街 2 号 1 幢, Beijing 100176 (CN)。白先宏 (BAI, Xianhong); 中国北京市北京市大兴区北京经济技术开发区荣京东街 2 号 1 幢, Beijing 100176 (CN)。

(74) 代理人: 北京中济纬天专利代理有限公司 (BEIJING WITAL PATENT AGENCY LTD.); 中国北京市朝阳区东三环北路甲 2 号 8 号楼 0548 室陆薇, Beijing 100027 (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, 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。

[见续页]

(54) Title: ANTI-PD-1 MONOCLONAL ANTIBODY AND OBTAINING METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种抗 PD-1 的单克隆抗体及其获得方法

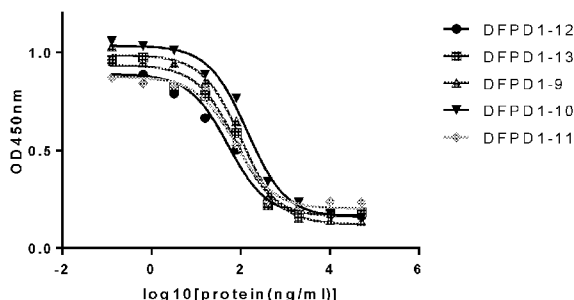


图 16

(57) Abstract: The present invention relates to the technical field of antibody engineering. Provided are a full human anti-PD-1 monoclonal antibody, a preparation method therefor, and uses thereof. Anti-PD-1 monoclonal antibodies are obtained from a fully synthetic antibody library by means of screening, and then light-chain CDR1-3-region and heavy-chain CDR1-3-region mutation construction libraries of the obtained antibody are screened in sequence by means of an affinity maturation technology to obtain a high-affinity anti-PD-1 antibody. The antibody can be used for treating tumors, inflammations, and autoimmune diseases.

(57) 摘要: 本发明属于抗体工程技术领域, 提供了一种全人源的抗 PD-1 的单克隆抗体、其制备方法及用途。从全合成抗体库中筛选得到抗 PD-1 的单克隆抗体, 然后通过亲和力和成熟技术依次对所得抗体的轻链 CDR1-3 区和重链 CDR1-3 区突变建库, 筛选获得高亲和力的抗 PD-1 的抗体。所述抗体可用于肿瘤、炎症、自身免疫性疾病的治疗。



WO 2016/197497 A1



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

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括经修改的权利要求(条约第 19 条(1))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

一种抗 PD-1 的单克隆抗体及其获得方法**技术领域**

本发明涉及抗体工程技术领域，具体涉及全人源的抗 PD-1 的单克隆抗体、及其获得方法与应用。

背景技术

免疫调节在机体免疫应答过程中起着极其重要的作用，而免疫活性细胞的活化对整个免疫应答的调节极其关键。研究表明，T 细胞活化和增殖依赖于双重信号途径。“协同刺激信号”的概念是 1970 年 Bretscher 和 Cohn 在 T 细胞活化双信号模型的基础上提出来的，即 T 细胞的活化不仅需要通过 APC 递呈 MHC-抗原肽复合物给抗原特异性 T 细胞来提供第一信号外，还需要多种协同刺激分子参与提供辅助的第二信号（协同刺激信号）；随着研究的深入，协同刺激信号逐渐成为免疫学的热点领域；这些协同信号分子主要包括 CD28/B7 和 TNFR/TNF 两大超家族。PD-1/PD-L1 作为 CD28/B7 超家族的成员，能介导负性协同刺激信号。PD-1/PD-L1 信号通路能有效抑制 T、B 细胞功能，使 T 细胞增殖受抑，同时减少细胞因子 IL-2、IL-10 和 IFN- γ 的分泌，在免疫调节中发挥着重要的作用，并在肿瘤免疫、自身免疫、移植免疫、哮喘、病毒感染等疾病的研究中有着重要的意义。

PD-1 属于免疫球蛋白超家族 I 型跨膜蛋白，分子量约为 50-55KD。最初是在凋亡的 T 细胞杂交瘤中通过消减杂交技术得到的，因其与细胞凋亡有关故命名为程序性细胞死亡因子 1（Programmed Cell Death 1）。PD-1 的编码基因是 PD-CD1，定位于人染色体 2q37.3，和 CTLA4 基因具有 23%的同源性。PD-1 由胞内区、跨膜区和胞外区构成，其胞外区包含一个免疫球蛋白可变区 IgV 样结构域；其胞内区 N 端的两个酪氨酸残基与其他氨基酸残基共同组成了一个免疫受体酪氨酸抑制基序（ITIM），ITIM 通过酪氨酸的磷酸化发挥拮抗抗原受体刺激信号的功能，从而在免疫应答过程中发挥负性调控功能；PD-1 分子可在活化的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞和树突状细胞表面诱导性地表达，并与其配体 PD-L1、PD-L2 相结合而对淋巴细胞的活化产生抑制作用，从而抑制免疫细胞的免疫应答反应。

PD-L1（CD274 或 B7H1）和 PD-L2（CD273 或 B7DC）是 PD1 的两个配体，这两个配体基因均定位于人染色体 9p24.2，并起始于同一方向，间隔 42kb 左右；它们同属 B7 家族，因而同其他成员一样，在蛋白结构上 PD-L1 和 PD-L2 均由 IgV 样结构域、IgC 样结构域、跨膜区和短而保守的胞质区尾巴组成；与 PD-L2 相比，PD-L1 的胞质尾巴在不同种属间更为保守。PD-L1 在活化的 T 细胞、B 细胞、树突状细胞、单核细胞和多种类型的肿瘤细胞（如肺癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、头颈癌、食道癌、皮肤癌、鳞状细胞癌等）上诱导性表达；PD-L2 主要表达于活化的巨噬细胞、树突细胞和个别肿瘤细胞（如霍奇金淋巴瘤）上。肿瘤表面的

PD-L1 与 PD-1 相互作用,可导致肿瘤抗原特异性 T 细胞凋亡,使肿瘤细胞逃脱机体免疫监控。抗 PD-1 的单抗通过阻断 PD-1/PD-L1 信号通路促进肿瘤抗原特异性 T 细胞增殖,发挥杀伤肿瘤细胞的作用,能有效提高免疫治疗效果,具有治疗多种类型肿瘤的潜力。

目前多家大型国际制药公司都在进行针对 PD-1 或 PD-L1 的单抗药物(如表 1 所示),其中百事美施贵宝的 PD-1 抑制剂 Opdivo (Nivolumab) 于 2014 年 7 月获日本批准上市;默沙东的 PD-1 抑制剂于 2014 年 9 月获 FDA 批准上市;这两个药物的首个适应症均为黑色素瘤。随着各公司临床项目的推进,适应症已扩展到肺癌、乳腺癌、血液癌症等领域。

表 1、当前正在开展临床实验的抗 PD-1 抗体

抗体名称	开发公司	临床研究	
		适应症	阶段
nivolumab	Bristol-Myers Squibb(Princeton NJ USA)	霍奇金淋巴瘤	I
		肿瘤	II
		肾细胞瘤(RCC)	II
		黑色素瘤	上市
	Ono Pharmaceutical Co., Ltd(Osaka Japan)	C 型肝炎	I
pembrolizumab	Merck & Co., Inc.(Whitehouse Station NJ USA)	膀胱癌	III
		非小细胞肺癌(NSCLC)	III
		实体瘤	I
		头颈部癌	II
		霍奇金淋巴瘤	I
		黑色素瘤	上市
pidilizumab	CureTech(Yavne Israel)	滤泡性淋巴瘤	II
		转移性结直肠癌	II
		胰腺癌	II
		霍奇金淋巴瘤	II
		前列腺癌	II
		急性髓系白血病(AML)	II
		肝癌	I/II
		C 型肝炎	I/II
		多发性骨髓瘤	II

说明书

目前全人源性抗体是治疗性抗体发展的主要方向，抗体库技术的出现为人源抗体的制备筛选提供了良好的技术平台。抗体库技术绕过了以往单抗研制过程中必须的杂交瘤过程，甚至不需要经过免疫过程即可获得各种抗体基因及抗体分子片段。噬菌体抗体库是最早出现也是目前应用最广泛的抗体库。

噬菌体展示技术是由 Smith 首先建立的一种将编码外源蛋白或多肽的基因插入噬菌体衣壳蛋白基因，使外源蛋白或多肽与噬菌体衣壳蛋白融合表达于噬菌体表面的技术。噬菌体抗体库就是利用了上述原理将不同特异性的抗体或其功能性片段（Fab、Fv、ScFv）表达在噬菌体表面，再用抗原进行筛选。噬菌体抗体库根据抗体基因的来源分为免疫库和非免疫库，非免疫库又包括天然库、半合成库和全合成库。噬菌体抗体库的筛选模拟了抗体亲和力成熟的过程，通常将抗原包被在固相介质上，加入待筛选的噬菌体抗体库，通过数轮“吸附-洗涤-洗脱-扩增”的过程（即淘选）直至筛选到高亲和力特异的抗体。

发明内容

本发明提供了一种抗 PD-1 的单克隆抗体；本发明从全合成抗体库中筛选出抗 PD-1 的单克隆抗体，然后通过计算机辅助设计分析，构建小容量合成噬菌体抗体轻链库的方法，对初筛获得的抗 PD-1 单克隆抗体 DFPD1-1 轻链的互补决定区 CDR1、2、3 区突变建库；筛选后，选取亲和力较高的单克隆抗体 DFPD1-3 和 DFPD1-7，再对其重链 CDR1、2、3 区突变建库进行筛选，最终筛选到了高亲和力的抗 PD-1 的单克隆抗体。

为实现上述目的，本发明一种抗 PD-1 的单克隆抗体的获得过程包括：

(1)、抗 PD-1 单链抗体的生物淘选，通过三轮抗体库的富集筛选，从全合成的 ScFv 噬菌体库中获得了一种亲和力较高的抗体序列 DFPD1-1，其重链为 DFPD1-H1（SEQ NO.1），轻链为 DFPD1-L1（SEQ NO.5）。

(2)、以 DFPD1-1 为基础，通过计算机三级结构模拟，构建轻链互补决定区 CDR1、2、3 突变库并对该抗体库进行生物淘选和阳性克隆的筛选及鉴定，获得了 6 种不同轻链的抗体序列 DFPD1-2、DFPD1-3、DFPD1-4、DFPD1-5、DFPD1-6、DFPD1-7，他们对应的轻链序列分别为 DFPD1-L2（SEQ NO.6）、DFPD1-L3（SEQ NO.7）、DFPD1-L4（SEQ NO.8）、DFPD1-L5（SEQ NO.9）、DFPD1-L6（SEQ NO.10）、DFPD1-L7（SEQ NO.11）；将上述 7 种单链抗体在噬菌体水平进行亲和力比较。

(3)、选出两株亲和力较高的克隆 DFPD1-3 和 DFPD1-7，构建重链互补决定区 CDR1、2、3 库并对该库进行生物淘选和阳性克隆的筛选，获得了五种不同的单链抗体序列 DFPD1-9，DFPD1-10、DFPD1-11、DFPD1-12、DFPD1-13。其中 DFPD1-9、DFPD1-11 和 DFPD1-12 的轻链可变区序列是 DFPD1-L3，而 DFPD1-10 和 DFPD1-13 的轻链可变区序列是 DFPD1-L7；DFPD1-9 和 DFPD1-10 的重链可变区序列是 DFPD1-H2（SEQ NO.2），DFPD1-11 和 DFPD1-13 的重链可变区

说明书

是 DFPD1-H3 (SEQ NO. 3), DFPD1-12 的重链可变区是 DFPD1-H4 (SEQ NO. 4)。将上述单链抗体在噬菌体水平上进行亲和力比较。

(4)、将(3)中所述单克隆重链可变区基因和轻链可变基因及轻重链恒定区基因克隆到真核表达载体,转染宿主细胞,获得单克隆抗体的全抗再进行亲和力和其他生物学功能比较。

通过上述方法获得的抗 PD-1 的单克隆抗体,包括:轻链和重链;所述轻链的互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别用 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 表示;LCDR1 包含 RASQNIHSYLD、RASQNVSNWLD、RASQSIHNYLD、RASQDINNWLD RASQDVRTYLD、RASQGINSWLD 或 RASQSVSNYLD 中的任一种;LCDR2 包含 EASTRAS、DASNRAT、NASTRAT、DASTLAT、GASTRAT 或 DASTRAT 中的任一种;LCDR3 包含 QQALKLPIT、QQSRHIPLT、QQELHLPLT、QQNVNLPLT、QQDIDLPLT、QQSYRLPLT 或 QQNMQLPLT 中的任一种。

其中,所述轻链可变区氨基酸序列包含 SEQ NO. 5、SEQ NO. 6、SEQ NO. 7、SEQ NO. 8、SEQ NO. 9、SEQ NO. 10 或 SEQ NO. 11 中的任一种。

通过上述方法获得的抗 PD-1 的单克隆抗体,包括:轻链和重链;所述重链的互补决定区 CDR1, CDR2 和 CDR3 分别用 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 表示;HCDR1 包含 SNNGMH 或 SNYGMH;HCDR2 包含 VIWYDGSKK、VIWYDSSRK 或 VIWYDSTKK 中的任一种;HCDR3 包含 TAVYYCATNNDYW 或 TAVYYCATNTDYW。

其中,所述重链可变区氨基酸序列包含 SEQ NO. 1、SEQ NO. 2、SEQ NO. 3 或 SEQ NO. 4 中的任一种。

其中,本发明还提供了一种包含上述轻链或上述重链的抗体、多肽或蛋白质。

其中,本发明还提供了一种包含上述轻链或上述重链的抗体,所述抗体能够阻断 PD-1 与其配体 PD-L1 的结合,抑制 PD-1 的生物学活性。

其中,本发明还提供了一种包含上述轻链或上述重链的多核苷酸序列或组合。

其中,本发明还提供了一种包含上述多核苷酸序列或组合的重组 DNA 表达载体;所述载体的 DNA 序列中包含编码抗 PD1 抗体的重链可变区及恒定区或轻链可变区及恒定区序列的氨基酸序列。

其中,本发明还提供了一种转染上述重组 DNA 表达载体的宿主细胞,所述宿主细胞包含大肠杆菌等原核细胞、酵母或哺乳动物细胞。

优选地,所述宿主细胞包含 HEK293E 细胞、CHO 细胞或 NS0 细胞。

其中,本发明还提供了一种含有上述轻链或上述重链的抗体,用于全抗、单链抗体、单域抗体、双特异抗体、抗体药物偶联物或嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法。

其中,本发明还提供了一种含有上述轻链或上述重链的单克隆抗体、人工载体、药物或

药物组合物

其中，本发明还提供了一种含有上述轻链或上述重链的检测试剂或试剂盒。

其中，所述抗 PD-1 的单克隆抗体包含全长抗体和抗 PD-1 单克隆抗体的片段，所述片段包含但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 ScFv。

其中，所述全长抗体是全人源的。

其中，所述抗 PD-1 的单克隆抗体的重链恒定区包含 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4；所述轻链恒定区包含 C κ 或 C λ 。

优选地：所述恒定区为 IgG4。

优选地，所述轻链恒定区为 C κ 。

其中，所述 CDR 为互补决定区 (complementarity-determining region)；所述 ScFv 为单链抗体(single-chain fragment variable)；所述 ADCs 为抗体药物偶联物(antibody-drug conjugates)；所述 CAR-T 为嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法 (Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy)；所述 HEK293E 细胞为人胚肾 293E 细胞 (human embryonic kidney 293E cell)；CHO 细胞为中国仓鼠卵巢细胞 (chinese hamster ovary cell)；NS0 细胞为小鼠 NS0 胸腺瘤细胞。

本发明相对于现有技术而言，具备的有益效果是：

本发明提供的单克隆抗体可以通过消除、抑制 PD-1 活性来预防或治疗疾病，其中所述疾病选自癌症、感染性疾病或免疫系统疾病。所述癌症包括但不限于肺癌、肾癌、黑色素瘤、乳腺癌、肝癌、头颈癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、卵巢癌、骨癌、结直肠癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌、霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、慢性或急性白血病、实体瘤。所述感染性疾病包括不限于 HIV 病毒感染、肝炎病毒 (A 型、B 型和 C 型) 感染、疱疹病毒感染、流感病毒感染。所述免疫系统疾病包括不限于红斑狼疮、类风湿关节炎、强直性脊柱炎、重症肌无力、多发性硬化症、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、硬皮病、结节性多动脉炎、Wegener 肉芽肿病。

说明书附图

图 1、pScFvDisb-s 质粒图谱；

图 2、轻链突变库构建中以 DFPD1-1 为模板扩增的重链及 linker 区电泳图；

图 3、轻链突变库构建中以合成的轻链突变库为模板扩增的轻链库基因电泳图；

图 4、轻链突变库构建中通过扩增获得的 VLCDR123M-DFPD1-1 突变库的电泳图；

图 5、轻链突变库构建中通过 NcoI-HF 和 NotI 对质粒 pScFvDisb-s 进行双酶切的酶切产物的电泳图；

图 6、单克隆 phage ELISA 鉴定 phage-Abs 的相对亲和力；

图 7、梯度稀释 phage ELISA 鉴定 phage-Abs 的相对亲和力；

图 8、重链突变库构建中以合成的重链突变库为模板扩增的重链库基因的电泳图；

图 9、重链突变库构建中以 DFPD1-3 和 DFPD1-7 质粒为模板扩增的轻链及 linker 区的电泳图；

图 10、重链突变库构建中通过扩增获得的 VHCDR123M-DFPD1-3 突变库的电泳图；

图 11、重链突变库构建中通过扩增获得的 VHCDR123M-DFPD1-7 突变库的电泳图；

图 12、单克隆 phage ELISA 鉴定 phage-Abs 的相对亲和力；

图 13、梯度稀释 phage ELISA 鉴定 phage-Abs 的相对亲和力；

图 14、pTSE 质粒载体图；

图 15、全抗体与 PD-1 在分子水平上结合试验；

图 16、全抗体与 PD-L1 的竞争抑制试验；

图 17、全抗体与细胞表面的 PD-1 结合试验；

具体实施方式

本发明详细的实施方式参见实施例，实施例中所所述的实验方法和试剂，若无特殊说明均为常规实验方法和试剂。以下实施例仅用于说明和解释本发明，而不是以任何方式限制本发明。

本发明提供了一种特异性结合 PD-1 的单克隆抗体，所述重链可变区序列包含 SEQ NO. 1、2、3、4，所述轻链可变区序列包含 SEQ NO. 5、6、7、8、9、10、11。

优选地，所述特异性结合 PD-1 的单克隆抗体的重链可变区序列包含 SEQ NO. 2、3、4，所述轻链可变区序列选自 SEQ NO. 7、11。

通过轻链噬菌体库筛选，所述抗体轻链或其功能性片段的轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列选自以下各氨基酸序列中的一组（如表 1 所示）。

表 1、轻链各个 CDR 区的氨基酸序列

NO	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A	RASQNIHSYLD	EASTRAS	QQALKLPIT
B	RASQNVSNWLD	DASNRAT	QQSRHIPLT
C	RASQSIHNYLD	NASTRAT	QQELHLPLT
D	RASQDINNWLD	DASTLAT	QQNVNLPLT
E	RASQDVRTYLD	GASTRAT	QQDIDLPLT
F	RASQGINSWLD	DASTRAT	QQSYRLPLT
G	RASQSVSNYLD	DASTRAT	QQNMQPLT

通过重链噬菌体库筛选,所述抗体重链或其功能性片段重链的互补决定区 CDR1, CDR2 和 CDR3 分别用 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 表示: HCDR1 为 SNNGMH 或 SNYGMH; HCDR2 为 VIWYDGSKK、VIWYDSSRK 或 VIWYDSTKK 中的任一种; HCDR3 为 TAVYYCATNNDYW 或 TAVYYCATNTDYW。

优选地,通过重链噬菌体库筛选,所述特异性结合 PD-1 的单克隆抗体包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列的重链可变区及含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列的轻链可变区。其中,所述重链可变区 HCDR1 序列为选自 SNNGMH、SNYGMH 的氨基酸;所述轻链可变区 LCDR1 序列为选自 RASQSIHNYLD、RASQSVSNYLD 的氨基酸;所述重链可变区 HCDR2 序列为选自 VIWYDGSKK、VIWYDSSRK 的氨基酸;所述轻链可变区 LCDR2 序列为选自 NASTRAT、DASTRAT 的氨基酸;所述重链可变区 HCDR3 序列为选自 TAVYYCATNNDYW、TAVYYCATNTDYW 的氨基酸;所述轻链可变区 LCDR3 序列为选自 QQELHLPLT、QQNMQLPLT 的氨基酸。

本发明利用全合成 ScFv 单链噬菌抗体库获得特异性抗体的方法,所述全人源的特异性结合 PD-1 的单克隆抗体是利用噬菌体抗体库技术筛选而得,其步骤在于:

(1)、抗 PD-1 单链抗体的生物淘选,通过三轮抗体库的富集筛选,获得了一种亲和力较高的抗体序列 DFPD1-1。

(2)、以 DFPD1-1 为基础,通过计算机辅助设计,构建轻链 CDR1、2、3 突变库并对该抗体库进行生物淘选和阳性克隆的筛选及鉴定,获得了 6 种不同轻链的抗体序列 DFPD1-2、DFPD1-3、DFPD1-4、DFPD1-5、DFPD1-6、DFPD1-7。将上述 7 种单链抗体在噬菌体水平进行亲和力比较。

(3)、选出两株亲和力较高的克隆 DFPD1-3 和 DFPD1-7,构建重链 CDR1、2、3 库并对该库进行生物淘选和阳性克隆的筛选,获得了五种不同序列的单链抗体 DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12, DFPD1-13。将上述单链抗体在噬菌体水平上进行亲和力比较。

(4)、将(3)中所述单克隆重链可变区基因和轻链可变基因及轻重链恒定区基因克隆到真核表达载体,转染宿主细胞,获得单克隆抗体的全抗,再进行亲和力和其他生物学功能比较。

具体实施例:

以下结合附图和实施例详述本发明。

实施例 1、抗 PD-1 单链抗体的生物淘选

采用一系列基因克隆的方法对载体 pCom3 载体(购自中国质粒载体菌株细胞株基因保藏中心)进行改造,使之用于噬菌体单链抗体库的构建和表达。改造后的载体命名为 pScFvDisb-s,其质粒图谱如图 1 所示,并以此载体为基础,构建全合成噬菌体抗体库。

以 PD-1-His 为抗原包被免疫管,抗原包被量为 5ug/500ul/管,4℃包被过夜。再用 4%脱脂奶粉/PBST 分别封闭免疫管和全合成噬菌体抗体库,室温封闭 1h。封闭后的噬菌体抗体

库加入免疫管中进行抗原抗体结合，噬菌体投入量约为 10^9 – 10^{12} 个，室温反应 1h。PBST-PBS 洗去未结合的噬菌体，0.1M PH2.2 的 Glycine-HCl 洗脱，用 1.5M PH8.8 的 Tris-HCl 中和洗脱下来的噬菌体抗体溶液至 PH7.0 左右。

将上述中和后的噬菌体感染 10ml 生长至对数期的 TG1 菌液，37℃ 培养箱中静置 30min，取出部分菌液进行梯度稀释，涂布于 2YTAG 平板上，用于计算噬菌体产出量。剩余的菌液离心弃上清，将菌体沉淀重悬于少量培养基，吸出后涂布于 2YTAG 大平板，为下一轮筛选做准备。

将上述感染后涂板的菌体从大平板上刮下，接菌至 2YTAG 液体培养基，摇至对数期后加入 M13 辅助噬菌体超感染，28℃ 培养过夜扩增噬菌体，PEG/NaCl 沉降纯化噬菌体用于下一轮筛选。共进行三轮噬菌体库富集筛选。

实施例 2、抗 PD-1 噬菌体单链抗体阳性克隆的筛选

经过三轮筛选后，挑取分隔良好的单克隆菌落，接种于加有 2YTAG 液体培养基的 96 孔深孔板，37℃，220rpm 培养至其对数生长期，每孔加入约 10^{10} 的辅助噬菌体 M13K07，37℃ 静止感染 30min。4000rpm，离心 15min，弃去上清，菌体用 2YTAK 重悬沉淀，28℃，220rpm 培养过夜。4000rpm，4℃ 离心 15min，吸取扩增后的噬菌体上清进行 ELISA 鉴定。筛选得到亲和力较高的单链抗体 DFPD1-1，其重链可变区命名为 DFPD1-H1，其氨基酸序列见 SEQ NO. 1；其轻链可变区命名为 DFPD1-L1，氨基酸序列见 SEQ NO. 5。

实施例 3、对筛选出的抗 PD-1 单链抗体 DFPD1-1 进行体外亲和力成熟

3.1. DFPD1-1 轻链 CDR1、2、3 突变库的构建

设计引物 PVL1 和 PVL2 以合成的轻链突变库（SEQ NO. 12）为模板，PCR 扩增轻链库基因（图 3）；设计引物 PVH1 和 PVH2 以 DFPD1-1 质粒为模板扩增其重链及 linker 区（图 2）。反应条件：95℃ 30s，1 cycle；95℃ 15s，60℃ 10s，72℃ 30s，3 cycles；95℃ 15s，72℃ 40s，25 cycles，72℃ 5 min，4℃ 保存。天根通用回收试剂盒回收 PCR 目的片段。

引物如下所示：

PVL1: 5' -GATATCCAGATGACCCAGAGC -3'

PVL2: 5' -CTAAGCGGCCGCTTTGATCTCCACTTTGGTGC-3'

PVH1: 5' -CATAACATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG-3'

PVH2: 5' -GCTCTGGGTCATCTGGATATCGGATCCACCACC-3'

将上述两部分 PCR 反应产物进行 Overlap PCR 扩增获得 DFPD1-1 的轻链突变库基因。反应条件：95℃ 30s，1 cycle；95℃ 15s，72℃ 30s，4 cycle；（加入引物 PVH1 和 PVL2），95℃ 15s，72℃ 40s，25 cycles；72℃ 5 min，4℃ 保存。天根通用回收试剂盒回收 PCR 目的片段，对应的 PCR 产物命名为 VLCDR123M-DFPD1-1（图 4）。

用 NcoI-HF 和 NotI 对质粒 pScFvDisb-s 进行双酶切, 酶切产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (图 5), 切胶回收; 用 NcoI-HF 和 NotI 分别对 VLCDR123M-DFPD1-1 PCR 产物进行双酶切。PCR 酶切产物采用通用回收试剂盒进行回收。回收后的 PCR 片段与 pScFvDisb-s 按摩尔比 4:1 比例经 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接 4h。将连接产物电击法转化至 TG1 感受态中。使用 SOC 培养基 37℃ 培养 1h 复苏。按比例取菌液, 涂平板, 计算库容量。其余菌液 4000rpm, 室温下离心 15min。弃上清, 沉淀涂布于 2YTAG 大平板上, 37℃ 倒置培养过夜。

构建抗体库库容大约为 10^8 , 从上述抗体库中分别随机挑取 20 个克隆进行序列分析正确率 95%, 抗体库库容远远超过抗体库的多样性。

3.2. 噬菌体抗体库的生物淘选和阳性克隆的筛选

在按照实施例 1 的方法进行筛选, 得到亲和力较高的克隆测序, 共得到 6 种不同的单链抗体序列, 分别命名为 DFPD1-2、DFPD1-3、DFPD1-4、DFPD1-5、DFPD1-6、DFPD1-7, 对应的轻链可变区命名为 DFPD1-L2、DFPD1-L3、DFPD1-L4、DFPD1-L5、DFPD1-L6、DFPD1-L7, 它们对应的氨基酸序列分别见 SEQ NO. 6、SEQ NO. 7、SEQ NO. 8、SEQ NO. 9、SEQ NO. 10 和 SEQ NO. 11。单克隆 phage ELISA 鉴定 phage-Abs 的相对亲和力如图 3 所示。

3.3. 梯度稀释 phage ELISA 鉴定抗 PD1 单链抗体的亲和力

将本实施例 2 中获得的克隆进行单克隆 phage 的展示和纯化, 进行 phage 梯度稀释 ELISA 实验鉴定 phage-Abs 的亲和力。

用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液包被 PD1-His, 4℃ 包被过夜。PBST 洗涤三次, 4% milk-PBST 37℃ 封闭 1h。将纯化后的 phage 用 4% milk-PBST 三倍稀释, 每孔加入 100ul 稀释后的样品, 室温静置 1h。用 PBST 洗涤 ELISA 板, 将 4% 脱脂奶粉稀释后的 anti-M13-HRP 单克隆抗体加入 ELISA 板中, 室温放置 1h。TMB 显色试剂盒显色, 室温显色 5min。用 2M H_2SO_4 终止显色, 50ul/孔。酶标仪 450nm 单波长测定光密度值。结果显示筛选出的几株不同的噬菌体抗体均能与 PD-1 进行结合, 而且 DFPD1-3、DFPD1-7 的亲和力明显高于其它克隆 (图 4), 选取 DFPD1-3 和 DFPD1-7 进行下一步试验。

实施例 4、对筛选出的抗 PD-1 的单链抗体 DFPD1-3, DFPD1-7 再次进行体外亲和力成熟

4.1 DFPD1-3 和 DFPD1-7 重链 CDR1、2、3 突变库的构建

设计引物 PVHF2 和 PVHR2 以合成的重链突变库 (SEQ NO. 13) 为模板, PCR 扩增重链库基因 (图 8); 设计引物 PVLRF2 和 PVLR2 以 DFPD1-3 和 DFPD1-7 质粒为模板分别扩增其轻链及 linker 区 (图 9), 其中, 左侧为 DFPD1-3, 右侧为 DFPD1-7。反应条件: 95℃ 30s, 1 cycle; 95℃ 15s, 60℃ 10s, 72℃ 30s, 3 cycles; 95℃ 15s, 72℃ 40s, 25 cycles; 72℃ 5 min, 4℃ 保存。天根通用回收试剂盒回收 PCR 目的片段。

引物如下所示:

PVHF2: '5CATACCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG3'

PVHR2: '5TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCCCTG 3'

PVLF2: '5 CTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTAGC3'

PVLR2: '5 CTAAGCGGCCGCTTTGATCTCCACTTTGGTGC3'

将上述两部分 PCR 反应产物进行 Overlap PCR 扩增获得 DFPD1-3 和 DFPD1-7 的重链突变库基因。反应条件: 95°C 30s, 1 cycle; 95°C 15s, 72°C 30s, 4 cycles; (加入引物 PVHF2 和 PVLR2), 95°C 15s, 72°C 40s, 25 cycles; 72°C 5 min, 4°C 保存。天根通用回收试剂盒回收 PCR 目的片段, 将对应的产物命名为 VHCDR123M-DFPD1-3(图 10)和 VHCDR123M-DFPD1-7(图 11)。

用 NcoI-HF 和 NotI 对质粒 pScFvDisb-s 进行双酶切, 酶切产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳(图 5), 切胶回收; 用 NcoI-HF 和 NotI 分别对 VHCDR123M-DFPD1-3 和 VHCDR123M-DFPD1-7 PCR 产物进行双酶切。PCR 酶切产物采用天根通用回收试剂盒进行回收。回收后的 PCR 片段与 pScFvDisb-s 按摩尔比 4: 1 比例经 T4 DNA 连接酶 16°C 连接 4h。将连接产物电击法转化至 TG1 感受态中。使用 SOC 培养基 37°C 培养 1h 复苏。按比例取菌液, 涂平板, 计算库容量。其余菌液 4000rpm, 室温下离心 15min。弃上清, 沉淀涂布于 2YTAG 大平板上, 37°C 倒置培养过夜。

构建了 2 个不同的抗体库。每个抗体库库容大约为 10^7 , 抗体库库容远远超过抗体库的多样性。从上述抗体库中分别随机挑取 20 个克隆进行序列分析, 正确率为 90%。

4.2 噬菌体抗体库的生物淘选和阳性克隆的筛选

将上述构建的两种抗体库, 进行 phage 展示, 纯化和沉淀。然后从该库中淘选抗 PD1 的单链抗体。噬菌体抗体库的生物淘选方法同实施案例 1。抗 PD-1 的单链抗体阳性克隆的筛选的方法同实施案例 2。结果发现共筛选到 5 种不同的抗 PD-1 抗体序列, 分别命名为 DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12, DFPD1-13。其中 DFPD1-9, DFPD1-11 和 DFPD1-12 的轻链可变区序列是 DFPD1-L3, 而 DFPD1-10 和 DFPD1-13 的轻链可变区序列是 DFPD1-L7; DFPD1-9 和 DFPD1-10 的重链可变区序列是 DFPD1-H2, DFPD1-11 和 DFPD1-13 的重链可变区是 DFPD1-H3, DFPD1-12 的重链可变区是 DFPD1-H4。单克隆 phage ELISA 鉴定 phage-Abs 的相对亲和力如图 12 所示。

4.3. 梯度稀释 phage ELISA 鉴定抗 PD1 单链抗体的亲和力

将本实施例 4.2 中获得的克隆进行单克隆 phage 的展示和纯化, 进行 phage 梯度稀释 ELISA 实验鉴定 phage-abs 的亲和力, 方法同实施例 3 中 3.1。结果显示筛选出的几株不同的噬菌体抗体均能与 PD1 进行结合, 亲和力相差不是很大(图 13), 其中 DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12, DFPD1-13 略好, 选择这几种单链抗体进行后面试验。

实施例 5、抗 PD-1 全抗体 DFPD1-9、DFPD1-10、DFPD1-11、DFPD1-12、DFPD1-13 亲和力

鉴定

5.1 抗 PD-1 全抗体的制备

将上述抗体的重链 VH 和轻链 VK 基因分别克隆至装有重链和轻链恒定区基因的载体 pTSE (图 14), 编码人恒定区 $\gamma 4$ (见 SEQ NO. 14) 和 κ 链 (见 SEQ NO. 15) 的 pTSE 载体中 (pTSE 载体结构如图 14 所示, 制备过程参见 CN103525868A 说明书第 3 页第[0019]段)。瞬时转染 HEK293E 细胞, 进行全抗体表达。使用 AKTA 仪器 protein A 亲和柱纯化获得全抗体蛋白。

5.2 BIAcore X100 测定全抗体的亲和力

采用捕获法测定全抗体的亲和力。将抗人 IgG 偶联到 CM5 芯片表面, 分别稀释 DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12 和 DFPD1-13 保证大约 300RU 左右的抗体被抗人 IgG 捕获。将 PD-1 设置一系列的浓度梯度 (1000nM, 500nM, 250nM, 125nM, 62.5nM, 31.25nM, 15.625nM, 7.8125nM, 3.9063nM, 1.9531nM, 0.9766nM) 流经固定相表面, 测定抗体的亲和力。结果发现筛出的抗体的亲和力相差不是太大 (表 3)。

表 3、抗 PD1 全抗体亲和力常数测定数值

Sample	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD
DFPD1-9	1.626E+4	1.045E-4	6.429E-9
DFPD1-10	3.285E+4	1.300E-4	3.957E-9
DFPD1-11	9.357E+3	1.015E-4	1.085E-8
DFPD1-12	1.327E+4	2.975E-4	2.242E-8
DFPD1-13	1.811E+4	1.079E-4	9.504E-9

5.3 全抗体与 PD-1 的结合实验

用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液包被 PD-1-His, 60ng/孔/100 μ l, 4℃过夜包被。用 300 μ l/孔 PBST 洗五次, 再加入 1%BSA-PBS 在 37℃封闭 2h。加入不同稀释度的全抗 DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12 和 DFPD1-13。五种全抗体最高浓度是 16 μ g/ml, 4 倍稀释做 11 个梯度, 最后一个孔作为阴性对照——即只加稀释液 PBS, 37℃孵育 1h。用 300 μ l/孔 PBST 洗五次, 再加入用 1%BSA-PBS 1:40000 稀释的 Anti-Human Fc-HRP 二抗 37℃孵育 1h。TMB 显色试剂盒显色, 100 μ l/孔, 室温显色 8min, 然后用 2M H_2SO_4 终止显色, 50 μ l/孔。450nm/630nm 读数。实验结果如图 15 所示, 所有抗体均能很好的与 PD-1 分子结合。

5.4 全抗体竞争抑制 PD-L1 与 PD-1 结合

用 pH9.6 的碳酸盐包被 PDL1-Fc, 4℃包被过夜。PBST 洗涤五次, 1%BSA-PBS 37℃封闭 2h。用 4 μ g/ml 的 PD1-His 分别稀释 DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12 和 DFPD1-13 这五种全抗体, 全抗体与 PD-1 的摩尔比从 10: 1 开始, 五倍梯度稀释, 每个样品做 9 个稀

释度, 37℃孵育 1h。PBST 洗五次, 加入用 1%BSA-PBS 稀释的 HRP 标记的小鼠抗 His 抗体, 37℃孵育 1h。TMB 显色试剂盒显色, 100μl/孔, 室温显色 8min。用 10%H₂SO₄终止显色, 50μl/孔。450nm/630nm 读数。结果如图 16 所示, DFPD1-9, DFPD1-10, DFPD1-11, DFPD1-12 和 DFPD1-13 均能抑制 PD-1 与 PD-L1 的结合 (结果见图 16)。

实例 6、抗 PD-1 抗体与细胞表面 PD-1 结合试验

先构建过表达的 PD-1 的 CHO 稳定细胞系, 将它命名为 PD1-CHO。用明胶包被 96 孔板后, PD1-CHO 细胞胰酶消化后中止, 离心重悬, 稀释至 2×10^5 细胞/ml, 每孔 100ul 铺于 96 孔板中, 共 12 孔×6 排, 即 2×10^4 细胞/孔, 5%CO₂, 37℃培养过夜。第二天弃去培养基, 用 350ul 预冷的 PBS 洗一遍, 2%新鲜配制的 PFA 固定 5min, PBS 洗 2 遍。

细胞板中加入倍比稀释好的抗 PD-1 全抗, 稀释液为含 0.5% BSA 的 PBS。样品浓度从 100ug/ml 起, 8 倍稀释, 共 12 稀释度, 室温孵育 30min。然后弃去上清, 350ulPBS 洗 3 遍后, 加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗人二抗, 室温孵育 15min。

再用 350ulPBS 洗 3 遍, 每孔加入 100ulTMB 显色液, 室温显色 15-30min。每孔加入 50ul 2M H₂SO₄ 中止显色, 酶标仪 450nm 读数。用 Graphpad prism 软件处理结果, 计算结合常数 (见图 17)。

对于本领域的普通技术人员而言, 具体实施例只是对本发明进行了示例性描述, 显然本发明具体实现并不受上述方式的限制, 只要采用了本发明的方法构思和技术方案进行的各种非实质性的改进, 或未经改进将本发明的构思和技术方案直接应用于其它场合的, 均在本发明的保护范围之内。

1. 一种抗 PD-1 的单克隆抗体，其特征在于；包括：轻链和重链；所述轻链的互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别用 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 表示；LCDR1 包含 RASQNIHSYLD、RASQNVSNWLD、RASQSIHNYLD、RASQDINNWLD、RASQDVRTYLD、RASQGINSWLD 或 RASQSVSNYLD 中的任一种；LCDR2 包含 EASTRAS、DASNRAT、NASTRAT、DASTLAT、GASTRAT 或 DASTRAT 中的任一种；LCDR3 包含 QQALKLPIT、QQSRHIPLT、QQELHLPLT、QQNVNLPLT、QQDIDLPLT、QQSYRLPLT 或 QQNMQLPLT 中的任一种。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 PD-1 的单克隆抗体，其特征在于；所述轻链可变区氨基酸序列包含 SEQ NO. 5、SEQ NO. 6、SEQ NO. 7、SEQ NO. 8、SEQ NO. 9、SEQ NO. 10 或 SEQ NO. 11 中的任一种。

3. 一种抗 PD-1 的单克隆抗体，其特征在于；包括：轻链和重链；所述重链的互补决定区 CDR1，CDR2 和 CDR3 分别用 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 表示；HCDR1 包含 SNNGMH 或 SNYGMH；HCDR2 包含 VIWYDGSKK、VIWYDSSRK 或 VIWYDSTKK 中的任一种；HCDR3 包含 TAVYYCATNNDYW 或 TAVYYCATNTDYW。

4. 根据权利要求 3 所述的抗 PD-1 的单克隆抗体，其特征在于；所述重链可变区氨基酸序列包含 SEQ NO. 1、SEQ NO. 2、SEQ NO. 3 或 SEQ NO. 4 中的任一种。

5. 一种抗体、多肽或蛋白，其特征在于；所述抗体、多肽或蛋白包含权利要求 1-4 任一所述的轻链或重链。

6. 一种多核苷酸序列或组合，其特征在于；所述多核苷酸序列或组合包含权利要求 1-4 任一所述的轻链或重链。

7. 一种重组 DNA 表达载体，其特征在于；所述重组 DNA 表达载体包含权利要求 6 所述的多核苷酸序列或组合。

8. 一种宿主细胞，其特征在于；所述宿主细胞在转染所述重组 DNA 表达载体时用到，所述宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞。

9. 根据权利要求 1-4 任一所述的抗 PD-1 的单克隆抗体，其特征在于；所述抗体为全人源抗体；所述抗体的重链恒定区包含 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4；所述抗体的轻链恒定区包含 C κ 或 C λ 。

10. 一种全抗、单链抗体、单域抗体、双特异抗体、抗体药物偶联物或嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法，包含权利要求 1-4 任一所述的轻链或重链。

11. 一种单克隆抗体、人工载体、药物或药物组合物，其特征在于；所述单克隆抗体、人工载体、药物或药物组合物包含权利要求 1-4 任一所述的轻链或重链。

12. 一种检测试剂或试剂盒，其特征在于；所述检测试剂或试剂盒包含权利要求 1-4 任一所述的轻链或重链。

1. 一种抗 PD-1 的单克隆抗体，其特征在于；包括：轻链和重链；所述轻链的互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别用 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 表示；LCDR1 包含 RASQNIHSYLD、RASQNVSNWLD、RASQSIHNYLD、RASQDINNWLD RASQDVRTYLD、RASQGINSWLD 或 RASQSVSNYLD 中的任一种；LCDR2 包含 EASTRAS、DASNRAT、NASTRAT、DASTLAT、GASTRAT 或 DASTRAT 中的任一种；LCDR3 包含 QQALKLPIT、QQSRHIPLT、QQELHLPLT、QQNVNLPLT、QQDIDLPLT、QQSYRLPLT 或 QQNMQLPLT 中的任一种。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 PD-1 的单克隆抗体，其特征在于；所述轻链可变区氨基酸序列包含 SEQ NO. 5、SEQ NO. 6、SEQ NO. 7、SEQ NO. 8、SEQ NO. 9、SEQ NO. 10 或 SEQ NO. 11 中的任一种。

3. 一种抗 PD-1 的单克隆抗体，其特征在于；包括：轻链和重链；所述重链的互补决定区 CDR1，CDR2 和 CDR3 分别用 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 表示；HCDR1 包含 SNNGMH 或 SNYGMH；HCDR2 包含 VIWYDGSKK、VIWYDSSRK 或 VIWYDSTKK 中的任一种；HCDR3 包含 TAVYYCATNNDYW 或 TAVYYCATNTDYW。

4. 根据权利要求 3 所述的抗 PD-1 的单克隆抗体，其特征在于；所述重链可变区氨基酸序列包含 SEQ NO. 1、SEQ NO. 2、SEQ NO. 3 或 SEQ NO. 4 中的任一种。

5. 一种抗体、多肽或蛋白，其特征在于；所述抗体、多肽或蛋白包含权利要求 1-4 任一所述的轻链或重链。

6. 一种多核苷酸序列或组合，其特征在于；所述多核苷酸序列或组合编码如权利要求 1-4 任一所述的轻链或重链。

7. 一种重组 DNA 表达载体，其特征在于；所述重组 DNA 表达载体包含权利要求 6 所述的多核苷酸序列或组合。

8. 一种转染如权利要求 7 所述重组 DNA 表达载体的宿主细胞，所述宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞。

9. 根据权利要求 1-4 任一所述的抗 PD-1 的单克隆抗体，其特征在于；所述抗体为全人源抗体；所述抗体的重链恒定区包含 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4；所述抗体的轻链恒定区包含 C_κ或 C_λ。

10. 一种全抗、单链抗体、单域抗体、双特异抗体或抗体药物偶联物，使用如权利要求 1-4 任一所述的轻链或重链。

11. 一种单克隆抗体、人工载体、药物或药物组合物，其特征在于；所述单克隆抗体、人工载体、药物或药物组合物包含权利要求 1-4 任一所述的轻链或重链。

12. 一种检测试剂或试剂盒，其特征在于：所述检测试剂或试剂盒包含权利要求 1-4 任一所述的轻链或重链。

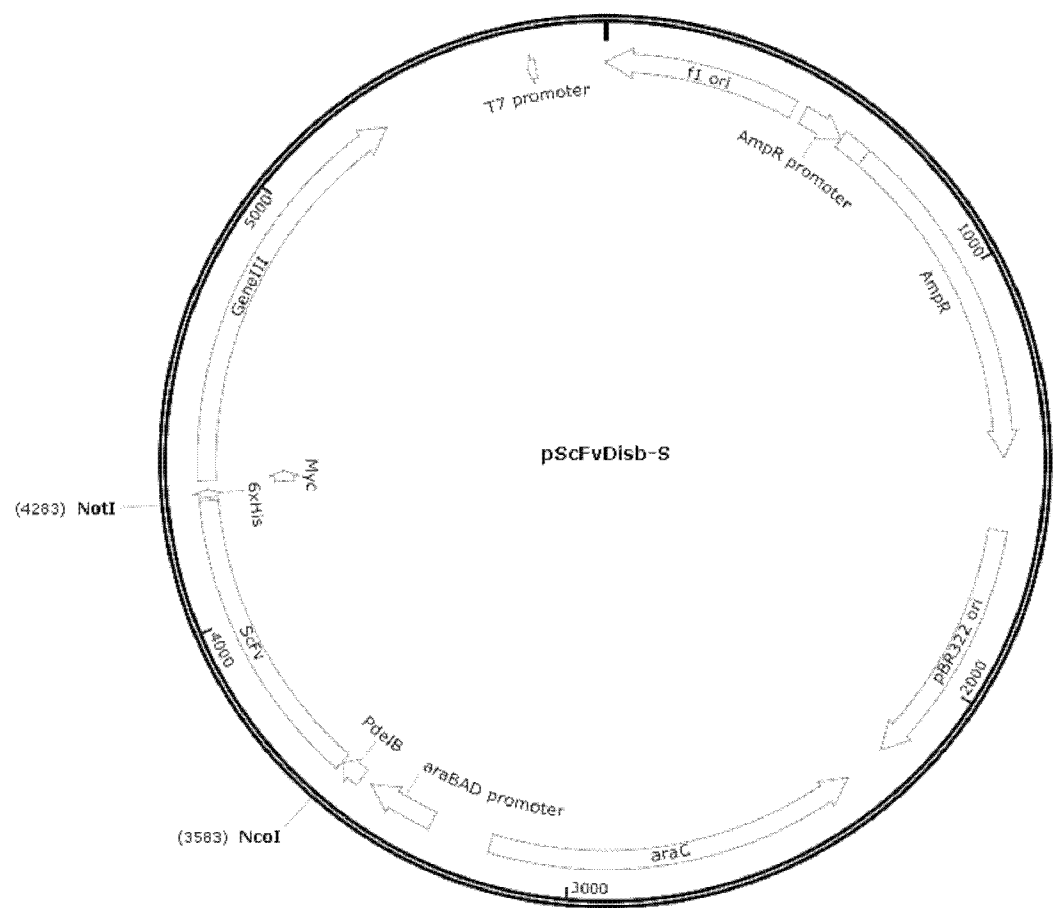


图 1

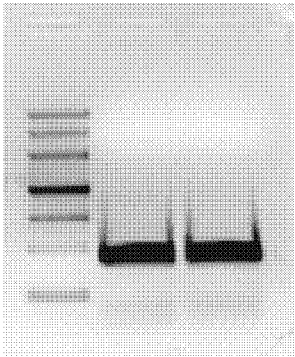


图 2

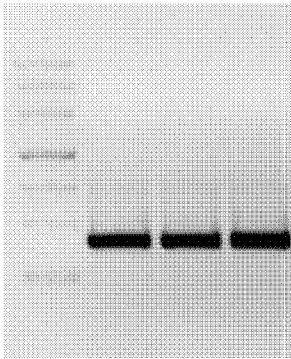


图 3

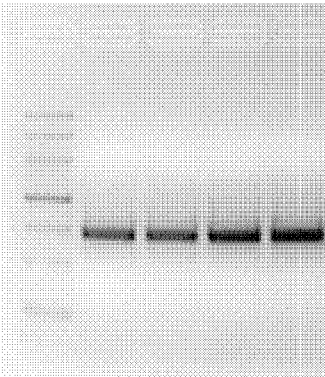


图 4

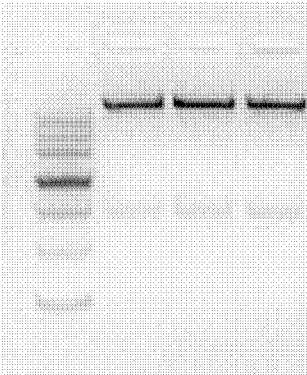


图 5

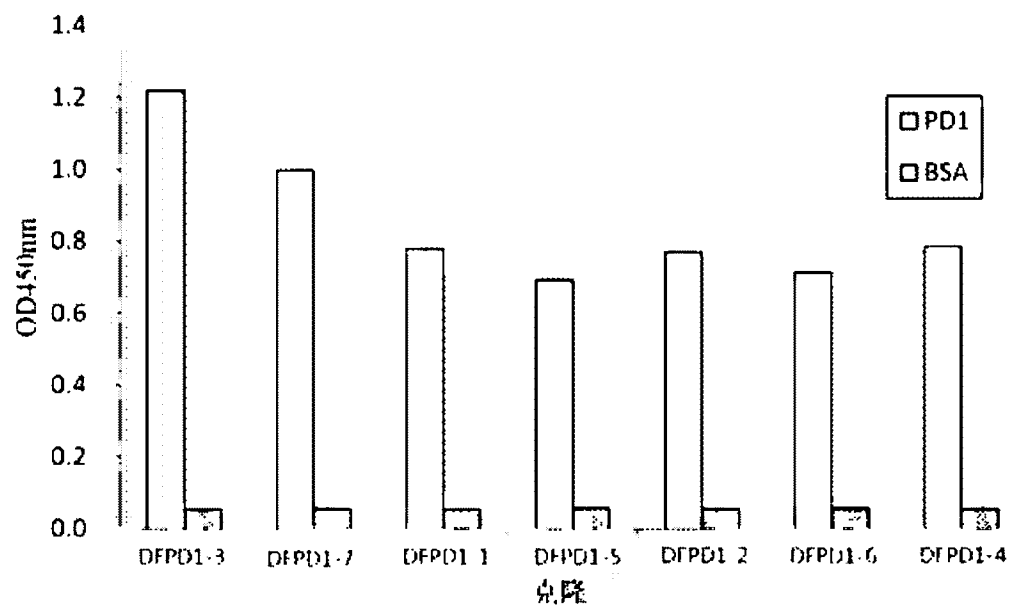


图 6

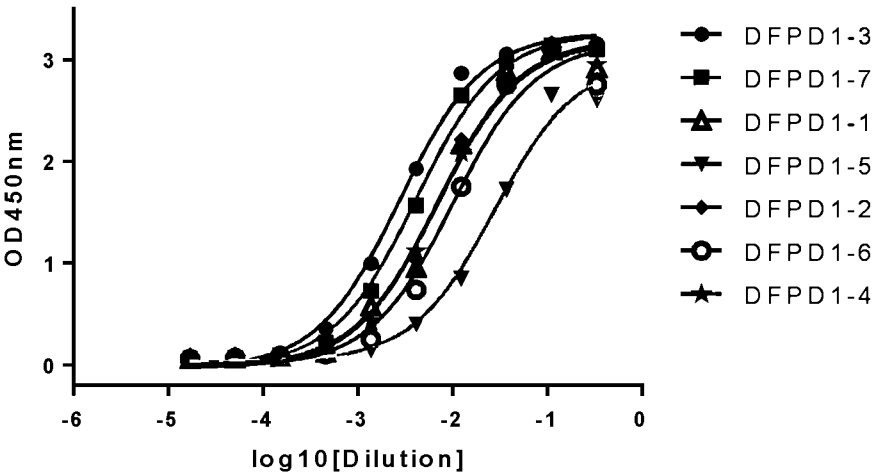


图 7

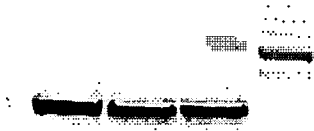


图 8

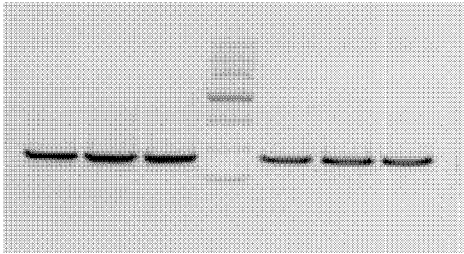


图 9

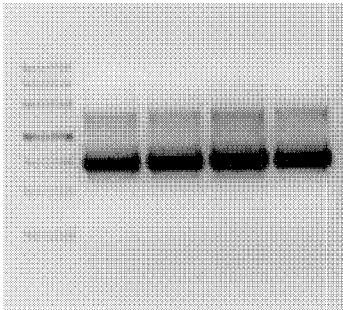


图 10

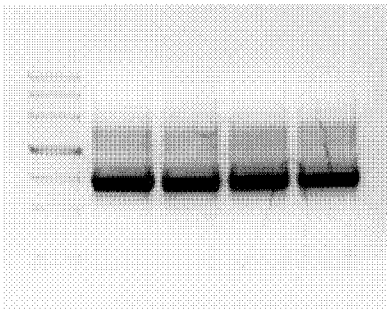


图 11

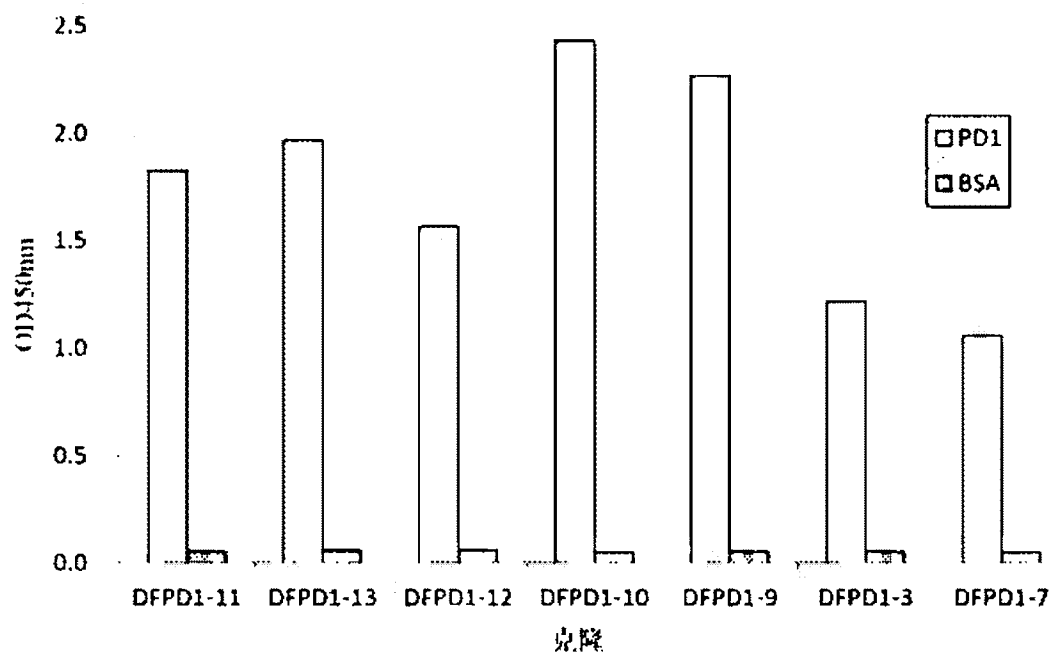


图 12

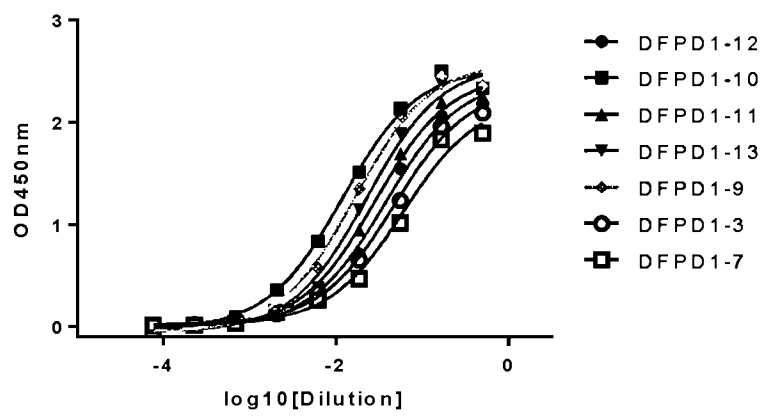


图 13

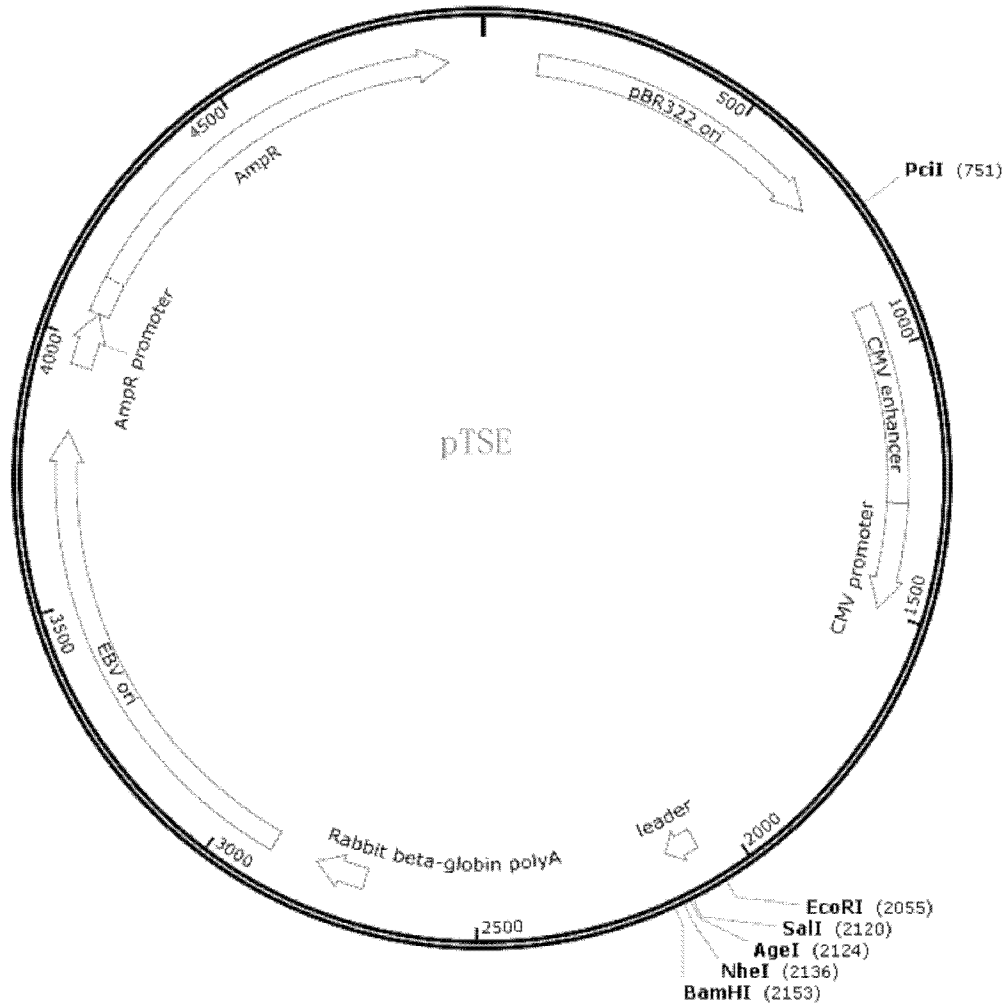


图 14

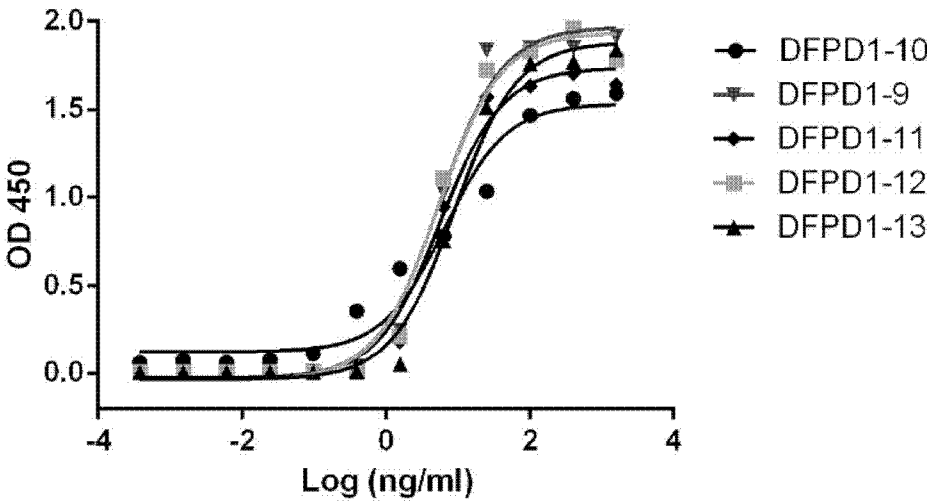


图 15

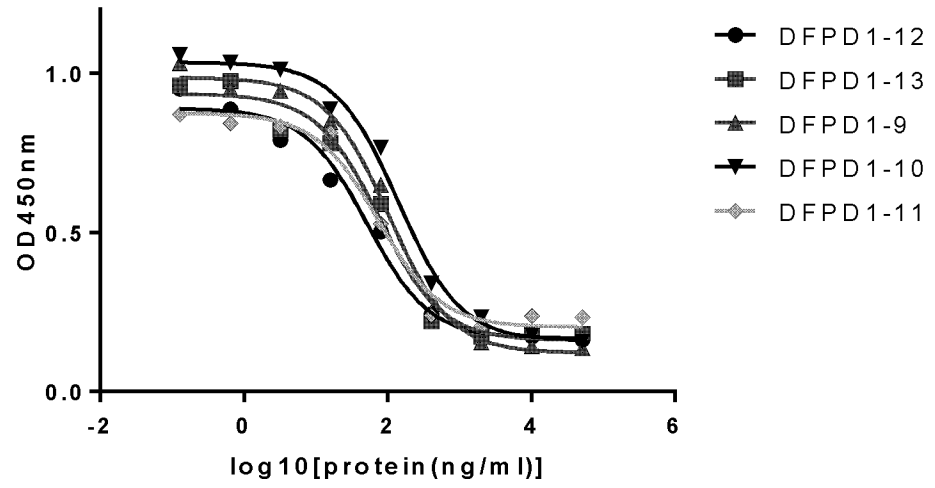


图 16

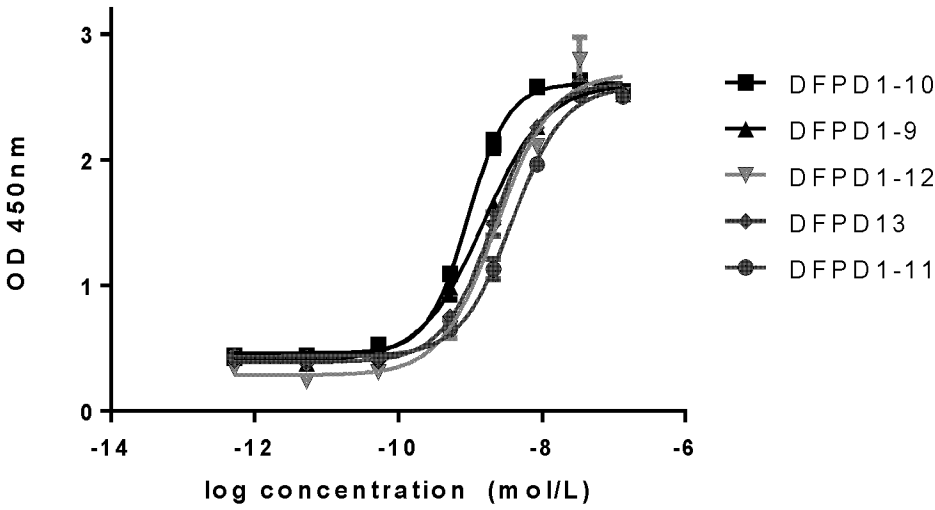


图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/091842

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 37/00 (2006.01) i; G01N 33/577 (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; G01N

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)
CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT and Key words: programmed cell death factor 1; ZHOU, Haiping; programmed death 1, PD-1, monoclonal antibody, etc.
NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; Genbank; EMBL; STN and searched sequences: SEQ ID NOs: 1-11

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105061597 A (BEIJING ORIENTAL 100 TAI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.; BEIJING JINGYI TAIXIANG TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.), 18 November 2015 (18.11.2015), claims 1-12	1-12
X	CN 104479020 A (SHANGHAI HENLIUS BIOTECH CO., LTD.), 01 April 2015 (01.04.2015), see abstract, and description, paragraphs 14-20	8
X	CN 102892785 A (UCB PHARMA SA), 23 January 2013 (23.01.2013), see description, paragraphs 120-122, and claims 19-22	8
X	WO 2006121168 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO), 16 November 2006 (16.11.2006), see abstract, and description, page 36, paragraph 3 to page 37, paragraph 1	8
A	WO 2006121168 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO et al.), 16 November 2006 (16.11.2006), see abstract, and embodiments 1-3	1-7, 9-12
A	PATNAIK, A. et al., "Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors", CLIN CANCER RES, volume 21, number 19, 14 May 2015 (14.05.2015), see abstract, tables 1-3, and figures 1-4	1-12

☐ 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 07 March 2016 (07.03.2016)	Date of mailing of the international search report 18 March 2016 (18.03.2016)
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 WANG, Jinfeng Telephone No.: (86-10) 62412282

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/091842

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.: 10 (partial)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv) - methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy. Search for the technical solution of the subject of claim 10 relating “a chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy” is made on the basis that the subject is reasonably expected to be amended as “a pharmaceutical composition for chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy” reasonably predicted amendments.
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/CN2015/091842

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105061597 A	18 November 2015	None	
CN 104479020 A	01 April 2015	None	
CN 102892785 A	23 January 2013	TW 201134488 A	16 October 2011
		CA 2791944 A1	15 September 2011
		JP 2013521769 A	13 June 2013
		AR 080501 A1	11 April 2012
		US 9102728 B2	11 August 2015
		EP 2545076 A1	16 January 2013
		US 2011229461 A1	22 September 2011
		WO 2011110621 A1	15 September 2011
WO 2006121168 A1	16 November 2006	JP 2006340714 A	21 December 2006
		EP 2161336 B1	31 July 2013
		RU 2010135087 A	27 February 2012
		US 9084776 B2	21 July 2015
		RU 2013133714 A	27 January 2015
		US 2014348743 A1	27 November 2014
		ES 2427646 T3	31 October 2013
		US 2009217401 A1	27 August 2009
		AU 2006244885 B2	31 March 2011
		KR 101339628 B1	09 December 2013
		DK 2161336 T3	28 October 2013
		IL 208642 A	30 August 2012
		JP 5028700 B2	19 September 2012
		EP 2418278 A2	15 February 2012
		KR 101498834 B1	05 March 2015
		US 2015165025 A1	18 June 2015
		US 8008449 B2	30 August 2011
		EP 2418278 A3	04 July 2012
		EP 1896582 A4	08 April 2009
		CN 103059138 B	28 October 2015
		JP 2012158605 A	23 August 2012
		US 2014328833 A1	06 November 2014
		KR 20130114226 A	16 October 2013
		KR 20130032908 A	02 April 2013
		TW I379898 B	21 December 2012
		CN 103059138 A	24 April 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/091842

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US 8779105 B2	15 July 2014
		JP 2009155338 A	16 July 2009
		KR 101318469 B1	23 October 2013
		EP 2161336 A1	10 March 2010
		CA 2607147 A1	16 November 2006
		IL 187108 A	30 June 2011
		AU 2006244885 A1	16 November 2006
		US 2013133091 A1	23 May 2013
		PT 2161336 E	03 October 2013
		EP 2439272 A2	11 April 2012
		EP 2439272 A3	31 July 2013
		IL 187108 D0	09 February 2008
		NZ 563193 A	28 May 2010
		NO 20075697 A	11 February 2008
		KR 20080011428 A	04 February 2008
		EP 1896582 A1	12 March 2008
		EP 2439273 A2	11 April 2012
		US 2014212422 A1	31 July 2014
		RU 2494107 C2	27 September 2013
		EP 2439273 A3	03 October 2012
		IL 208642 D0	30 December 2010
		JP 4361545 B2	11 November 2009
		HK 1140793 A1	27 June 2014
		JP 2014077015 A	01 May 2014

A. 主题的分类		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; G01N 33/577(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;G01N		
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))		
CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT和关键词: 周海平, 程序性细胞死亡因子1, 单克隆抗体, Zhou haiping, programmed death 1, PD-1, monoclonal antibody, 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:1-11		
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
PX	CN 105061597 A (北京东方百泰生物科技有限公司 北京精益泰翔技术发展有限公司) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 权利要求1-12	1-12
X	CN 104479020 A (上海复宏汉霖生物技术股份有限公司) 2015年 4月 1日 (2015 - 04 - 01) 见摘要及说明书第14-20段	8
X	CN 102892785 A (UCB医药有限公司) 2013年 1月 23日 (2013 - 01 - 23) 见说明书第120-122段及权利要求19-22	8
X	WO 2006121168 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO) 2006年 11月 16日 (2006 - 11 - 16) 见摘要及说明书第36页第3段至37页第1段	8
A	WO 2006121168 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO等) 2006年 11月 16日 (2006 - 11 - 16) 见摘要及实施例1-3	1-7、9-12
A	PATNAIK A等. "Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors" Clin Cancer Res, 第21卷, 第19期, 2015年 5月 14日 (2015 - 05 - 14), 见摘要、表1-3及图1-4	1-12
☐ 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 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2016年 3月 7日		2016年 3月 18日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		王金凤
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62412282

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： 10（部分）
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）——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。对权利要求10中涉及“一种嵌合抗原受体T细胞免疫疗法”主题的技术方案的检索是基于合理预期该主题修改为“一种用于嵌合抗原受体T细胞免疫疗法的药物组合物”而做出的。
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/CN2015/091842

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)
CN	105061597	A	2015年 11月 18日	无			
CN	104479020	A	2015年 4月 1日	无			
CN	102892785	A	2013年 1月 23日	TW	201134488	A	2011年 10月 16日
				CA	2791944	A1	2011年 9月 15日
				JP	2013521769	A	2013年 6月 13日
				AR	080501	A1	2012年 4月 11日
				US	9102728	B2	2015年 8月 11日
				EP	2545076	A1	2013年 1月 16日
				US	2011229461	A1	2011年 9月 22日
				WO	2011110621	A1	2011年 9月 15日
WO	2006121168	A1	2006年 11月 16日	JP	2006340714	A	2006年 12月 21日
				EP	2161336	B1	2013年 7月 31日
				RU	2010135087	A	2012年 2月 27日
				US	9084776	B2	2015年 7月 21日
				RU	2013133714	A	2015年 1月 27日
				US	2014348743	A1	2014年 11月 27日
				ES	2427646	T3	2013年 10月 31日
				US	2009217401	A1	2009年 8月 27日
				AU	2006244885	B2	2011年 3月 31日
				KR	101339628	B1	2013年 12月 9日
				DK	2161336	T3	2013年 10月 28日
				IL	208642	A	2012年 8月 30日
				JP	5028700	B2	2012年 9月 19日
				EP	2418278	A2	2012年 2月 15日
				KR	101498834	B1	2015年 3月 5日
				US	2015165025	A1	2015年 6月 18日
				US	8008449	B2	2011年 8月 30日
				EP	2418278	A3	2012年 7月 4日
				EP	1896582	A4	2009年 4月 8日
				CN	103059138	B	2015年 10月 28日
				JP	2012158605	A	2012年 8月 23日
				US	2014328833	A1	2014年 11月 6日
				KR	20130114226	A	2013年 10月 16日
				KR	20130032908	A	2013年 4月 2日
				TW	I379898	B	2012年 12月 21日
				CN	103059138	A	2013年 4月 24日
				US	8779105	B2	2014年 7月 15日
				JP	2009155338	A	2009年 7月 16日
				KR	101318469	B1	2013年 10月 23日
				EP	2161336	A1	2010年 3月 10日
				CA	2607147	A1	2006年 11月 16日
				IL	187108	A	2011年 6月 30日
				AU	2006244885	A1	2006年 11月 16日
				US	2013133091	A1	2013年 5月 23日
				PT	2161336	E	2013年 10月 3日
				EP	2439272	A2	2012年 4月 11日
				EP	2439272	A3	2013年 7月 31日
				IL	187108	D0	2008年 2月 9日
				NZ	563193	A	2010年 5月 28日
				NO	20075697	A	2008年 2月 11日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/091842

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)
		KR 20080011428 A	2008年 2月 4日
		EP 1896582 A1	2008年 3月 12日
		EP 2439273 A2	2012年 4月 11日
		US 2014212422 A1	2014年 7月 31日
		RU 2494107 C2	2013年 9月 27日
		EP 2439273 A3	2012年 10月 3日
		IL 208642 D0	2010年 12月 30日
		JP 4361545 B2	2009年 11月 11日
		HK 1140793 A1	2014年 6月 27日
		JP 2014077015 A	2014年 5月 1日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)