(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
2017 年 6 月 29 日 (29.06.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/107885 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/110790

(22) 国际申请日: 2016 年 12 月 19 日 (19.12.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510981105.4 2015 年 12 月 23 日 (23.12.2015) CN

(71) 申请人: **杭州尚健生物技术有限公司 (HANGZHOU SUMGEN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区三墩镇古墩路 660 号紫东创意设计产业园 4 号楼 406 室, Zhejiang 310000 (CN)。

(72) 发明人: **王立燕 (WANG, Liyan)**; 中国北京市石景山区八宝山南路京汉旭城 1 号楼 2 单元 601, Beijing 100040 (CN)。

(74) 代理人: **北京律智知识产权代理有限公司 (BEIJING INTELLEGAL INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.)**; 中国北京市朝阳区慧忠路 5 号远大中心 B 座 1802, 1803, 1805, Beijing 100101 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

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

WO 2017/107885 A1

(54) **Title**: HUMAN PROGRAMMED CELL DEATH 1 RECEPTOR ANTIBODY, METHOD OF PREPARING SAME, AND USE THEREOF

(54) **发明名称** : 抗人程序性死亡受体 1 抗体及其制备方法和用途

(57) **Abstract**: Disclosed are a human programmed cell death 1 Receptor (hPD-1) antibody, a method of preparing the same, and use thereof. The preparation method comprises screening by using a natural antibody library screening platform to obtain a new human programmed cell death 1 receptor antibody. The antibody obtained by the screening step can specifically identify human PD-1 molecules and is used to inhibit mutual interactions between PD-1/PD-L1 and PD-1/PD-L2, thereby improving a level of an immune response.

(57) **摘要**: 抗人程序性死亡受体 1 抗体及其制备方法和用途。制备方法包括利用天然抗体库筛选平台筛选获得的一株新型抗人程序性死亡受体 1 抗体。筛选得到的抗体能够特异性识别人 PD-1 分子，用于阻断 PD-1/PD-L1 以及 PD-1/PD-L2 相互作用，提高免疫应答水平。

抗人程序性死亡受体 1 抗体及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及抗人程序性死亡受体 1（Human Program Death 1Receptor，hPD-1）抗体及其制备方法和用途。

背景技术

程序性死亡受体-1（Human Program Death 1 Receptor，hPD-1）是一类重要的免疫负性调控分子（也称“免疫检查点分子”），属于 CD28 家族成员，该家族成员还包括 CD28、CTLA4、ICOS 和 BTLA 等。

PD-1 是 I 型跨膜糖蛋白，由细胞外区、跨膜区和胞内区三部分构成。它的细胞膜外部分是一个免疫球蛋白可变区(IgV)样结构域，胞内部分 N-端含有一个免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif，ITIM)，C-端含有一个免疫受体酪氨酸转换基序(immunoreceptor tyrosine based switch motif，ITSM)，其中 ITSM 是 PD-1 分子向胞内传递抑制信号的关键基序。与 CTLA-4 等家族成员以同源二聚体的形式存在于 T 细胞表面不同，PD-1 以单体的形式表达于活化的 T 细胞、B 细胞和髓样细胞等细胞表面。

PD-1 有两个配体，即 PD-L1 (B7-H1，CD274)和 PD-L2 (B7-DC，CD273)，属于 B7 家族的跨膜分子。PD-L1 广泛分布于成熟的巨噬细胞、B 细胞、树突状细胞等造血细胞以及内皮细胞、胰岛细胞、肥大细胞等非造血细胞表面，而且在多种肿瘤细胞表面均高表达；PD-L2 只在巨噬细胞、树突状细胞及部分 B 细胞亚类等细胞表面表达。与经典的免疫负性调控分子细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4（CTLA-4）相类似，PD-1 通过与其配体 PDL1、PDL2 相互作用发挥免疫负调控作用。当 PD-1 与配体相互作用时，其胞内段 ITSM 发生磷酸化并且招募相应的磷酸化酶 SHP-1 和 SHP-2，导致下游信号分子去磷酸化从而下调免疫细胞应答水平。免疫系统的这一负性调控机制是维持机体免疫耐受的关键分子基础。然而，大量的研究表明，PD-1 等免疫负性调控分子过度表达及其与受体 PD-L1/PD-L2 相互作用所诱导的机体免疫抑制状态在癌症以及 HIV、HCV、HBV 等慢性感染性疾病发病过程中发挥重要作用。通过阻断 PD-1/PD-L1 相互作用，可以逆转免疫抑制，提高免疫系统杀伤病毒和肿瘤细胞的能力；同时阻断 PD-1/PD-L2 相互作用，免疫抑制状态逆转效果更好。因此，靶向这类负性调控分子成为新一代癌症治疗策略，PD1/PDL1 通路抑制剂的

研究备受关注。特异性阻断 PD1/PDL1 信号通路的抗体药物是该领域研究的重点。抗 PD1 抗体纳武单抗（Nivolumab，Opdivo，百时美施贵宝）和 Pembrolizumab（Keytruda，默克）均获得了 FDA 突破性药物资格并获批上市。其中百时美施贵宝产品纳武单抗于 2014 年 12 月获 FDA 批准上市，用于黑色素瘤临床治疗；随后在 2015 年 3 月，FDA 批准该抗体用于治疗鳞状非小细胞肺癌，标志着该类免疫疗法正式进入实体瘤临床治疗领域。

本领域依然存在对特异性阻断 PD1/PDL1 信号通路的抗体药物的需求。

发明内容

本发明的第一方面涉及一种分离的抗人程序性死亡受体-1（Human Program Death 1 Receptor，hPD-1）抗体或其抗原结合片段，其重链可变区 CDR1 序列如 SEQ ID NO:1 所示，CDR2 序列如 SEQ ID NO:2 所示，CDR3 序列如 SEQ ID NO:3 所示；和/或轻链可变区的 CDR1 序列如 SEQ ID NO:4 所示、CDR2 序列如 SEQ ID NO:5 所示，CDR3 序列如 SEQ ID NO:6 所示，或者所述重链或轻链的 CDR 序列与 SEQ ID NO：1-6 所示序列具有至少 70%的同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，如至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%的同源性，或所述重链或轻链的 CDR 序列为 SEQ ID NO：1-6 所示序列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列，如 1、2、3、4 或 5 个氨基酸残基。

在一些实施方案中，所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段包含上述重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3。

在一些实施方案中，所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段的重链可变区序列如 SEQ ID NO:7 所示；和/或轻链可变区序列如 SEQ ID NO:8 所示，或者与 SEQ ID NO：7-8 所示序列具有至少 70%的同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，如至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 99.1%的同源性，或 SEQ ID NO：7-8 所示序列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列，如 1、2、3、4、5、10、15、20、30 或 50 个氨基酸残基。

在一些实施方案中，所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:13、16 所示；和/或轻链可变区序列如 SEQ ID NO:11 所示，或者与 SEQ ID NO：13、16 或 11 所示序列具有至少 70%的同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，如至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%或 99.8%的同源性，或 SEQ ID NO：13、16 或 11 所示序

列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列，如 1、2、3、4、5、10、15、20、30、50 个或 100 氨基酸残基。

在一些实施方案中，所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段为全长抗体，优选地，其为 IgG1 或者 IgG4 同种型的全长抗体。

在一些实施方案中，所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段为抗原结合片段，优选地，其为 Fab 片段、Fab'2 片段或单链抗体。

本发明的第二方面涉及一种组合物，其包含上述第一方面所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段。

本发明的第三方面涉及一种核酸分子，其编码上述第一方面所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述的核酸分子的序列如 SEQ ID NO：9 或 10 所示，或者是与 SEQ ID NO：9 或 10 具有至少 70%同源性且仍编码具有本发明的抗体或其抗原结合片段的活性的变体分子，如至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.4%、99.5%、99.6%或 99.7%的同源性，或是与序列如 SEQ ID NO：9 或 10 所示的核酸分子完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核酸分子，所述中度严格条件的一个例子是包括在 5×SSC、0.5％SDS、1.0 mM EDTA(pH8.0)的溶液中预洗；在 50-60℃、5×SSC、过夜的条件下杂交；再于 65℃ 下 20 分钟用含 0.1％SDS 的 2×、0.5×和 0.2×的 SSC 各洗涤两次，合适的高严格杂交条件包括上述的条件，所不同的是杂交温度升高了，例如达到 60-65℃或 65-70℃。

在一些实施方案中，所述的核酸分子的序列如 SEQ ID NO：12 或 14 所示，或者是与 SEQ ID NO：12 或 14 具有至少 70%同源性且仍编码具有本发明的抗体或其抗原结合片段的活性的变体分子，如至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或更高的同源性，或是与序列如 SEQ ID NO：12 或 14 所示的核酸分子完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核酸分子，所述中度严格条件的一个例子是包括在 5×SSC、0.5％SDS、1.0 mM EDTA(pH8.0)的溶液中预洗；在 50-60℃、5×SSC、过夜的条件下杂交；再于 65℃ 下 20 分钟用含 0.1％SDS 的 2×、0.5×和 0.2×的 SSC 各洗涤两次，合适的高严格杂交条件包括上述的条件，所不同的是杂交温度升高了，例如达到 60-65℃或 65-70℃。

本发明的第四方面涉及一种表达载体，其上述第三方面所述的核酸分子。本发明的表达载体并无特别限定，只要其能表达本发明要求保护的抗体或其抗原结合片段即可。

本发明的第五方面涉及一种宿主细胞，其包含上述第四方面所述的表达载体。

本发明的第六方面涉及一种生产上述第一方面所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括步骤：将第五方面所述的宿主细胞在适合所述抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段表达的培养条件下表达，任选地，将表达的抗体或其抗原结合片段进行纯化。

本发明第七方面涉及上述第一方面所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于调控哺乳动物包括人的免疫应答的试剂中的用途。

换言之，本发明利用天然抗体库筛选平台筛选获得一株新型抗 hPD-1 抗体 SG001，其能够特异性识别人和猴的 PD-1 分子，阻断 PD-1/PD-L1 以及 PD-1/PD-L2 相互作用，调节免疫应答，提高免疫应答水平。本发明的抗人 PD-1 抗体与人 PD1 特异性结合并表现出良好的特性。这些特性包括与人 PD-1 的高亲和力结合，但与 CD28、CTLA4、BTLA 以及 ICOS 等其它 CD28 家族成员没有交叉反应。

在一些实施方案中，本发明涉及抗人 PD-1 抗体或其抗原结合部分，其至少表现出一项下列性质：

（1）以 1×10^{-7}M 或更小的 K_D 与人 PD-1 结合；

（2）不显著与 CD28、CTLA4、BTLA 以及 ICOS 等结合；

（3）在 MLR 实验中增加干扰素 γ 的表达水平；

（4）以 1×10^{-7}M 或更小的 K_D 与猴 PD-1 结合；

（5）抑制 PD-L1 和/或 PD-L2 与 PD-1 的结合；

（6）刺激免疫应答。

本发明的抗人 PD-1 抗体或其抗原结合部分的优点尤其表现在其阻断 PD1/PDL1 的活性相对于现有技术具有显著性的提高，例如与现有技术的 BMS01 相比，其阻断 PD1/PDL1 的活性提高了 6 倍（如实施例 6 和图 6 所示，SG001 抗体半数抑制剂量为 1.47±0.227μg/mL，显著优于阳性抗体 BMS01(10.62±0.536μg/mL)，P<0.0001）。本发明的抗人 PD-1 抗体或其抗原结合部分的优点还表现在其在真核表达系统中的表达量相对于现有技术的抗人 PD-1 抗体或其抗原结合部分的表达量得到显著提升，在一些实施方案中，表达量高至少 50%、至少 100%，在一些实施方案中，表达量高至少 150%、至少 200%、至少 300%、至少 400%。在一些实施方案中，真核表达系统为哺乳动物细胞表达系统。在一些实施方案中，哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、小仓鼠肾（BHK）细胞、COS 细胞、小鼠 NSO 胸腺瘤细胞和小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞等。在一些实施方案中，哺乳动物细胞为 CHO 细胞。本领域的真核表达载体都可以用于本发明的抗人 PD-1 抗体或其抗原结合部分的表达。在

一些实施方案中，所述真核表达载体为 pCMVp-NEO-BAN 载体、pEGFP 增强型绿色荧光蛋白表达载体、pEGFT-Actin 增强型绿色荧光蛋白/人肌动蛋白表达载体、pSV2 表达载体、CMV4 表达载体、pCMV-163 等。在一些实施方案中，真核表达载体为 pCMV-163。

本发明的某些实施方案涉及涉及抗 hPD-1 抗体或其抗原结合部分，其重链可变区 CDR1 序列如 SEQ ID NO:1 所示，CDR2 序列如 SEQ ID NO:2 所示，CDR3 序列如 SEQ ID NO:3 所示；和/或轻链可变区的 CDR1 序列如 SEQ ID NO:4 所示、CDR2 序列如 SEQ ID NO:5 所示，CDR3 序列如 SEQ ID NO:6 所示，或者与 SEQ ID NO：1-6 所示序列具有至少 70%的同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，如至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同源性，或 SEQ ID NO：1-6 所示序列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列，如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基。。

在某些实施方案中，本发明的抗人 PD-1 抗体或其抗原结合部分包含上述重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3。

在某些实施方案中，本发明抗体的重链可变区序列如 SEQ ID NO: 7 所示；和/或轻链可变区序列如 SEQ ID NO:8 所示，或者与 SEQ ID NO：7-8 所示序列具有至少 70%的同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，如至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同源性，或 SEQ ID NO：7-8 所示序列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列，如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基。。

在某些实施方案中，本发明的抗体为全长抗体，例如但不限于 IgG1 或者 IgG4 同种型的全长抗体；或者为抗原结合片段，例如但不限于 Fab 片段、Fab'2 片段、单链抗体等；

本发明的另一方面涉及包含治疗有效量的本发明的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段的组合物。所述组合物例如但不限于免疫偶联物、双特异性分子以及药学上可接受的载体等。本发明的组合物还可以包含另一种活性成分，如另一种用于调节受试者免疫应答的活性成分。

本发明的另一方面涉及编码本发明的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合部分的核酸分子。在某些实施方案中，上述核酸分子的序列如 SEQ ID NO：9 或 10 所示，或者与 SEQ ID NO：9 或 10 具有至少 70%同源性且仍编码具有本发明的抗体或其抗原结合部分的活性的变体分子，或者与序列如 SEQ ID NO：9 或 10 所示的核酸分子完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核酸分子。在一些实施方案中，所述严格杂交条件为为了说明的目的，用于

测试本发明的多核苷酸与其他多核苷酸杂交的合适中等严格条件包括在 5×SSC、0.5％SDS、1.0 mM EDTA(pH8.0)的溶液中预洗；在 50-60℃、5×SSC、过夜的条件下杂交；再于 65℃ 下 20 分钟用含 0.1％SDS 的 2×、0.5×和 0.2×的 SSC 各洗涤两次，合适的高严格杂交条件包括上述的条件，所不同的是杂交温度升高了，例如达到 60-65℃或 65-70℃。

本发明的另一方面涉及包含此类核酸分子的表达载体。在某些实施方案中，所述表达载体是原核表达载体或真核表达载体。在某些实施方案中，所述表达载体是真核表达载体。在某些实施方案中，所述真核表达载体是 pCMVp-NEO-BAN 载体、pEGFP 增强型绿色荧光蛋白表达载体、pEGFT-Actin 增强型绿色荧光蛋白/人肌动蛋白表达载体、pSV2 表达载体、CMV4 表达载体、pCMV-163 等。在一些实施方案中，真核表达载体为 pCMV-163。

本发明的还一方面涉及包含此类表达载体的宿主细胞。在某些实施方案中，所述宿主细胞选自细菌、真菌、放线菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞。在某些实施方案中，所述宿主细胞选自哺乳动物细胞，更具体地，所述哺乳动物细胞选自中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、小仓鼠肾（BHK）细胞、COS 细胞、小鼠 NSO 胸腺瘤细胞和小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞等。

本发明的一个方面涉及生产本发明的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括步骤：将上述包含本发明的表达载体的宿主细胞在适合所述抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段表达的培养条件下表达，任选地，将表达的抗体或其抗原结合片段进行纯化。本领域技术人员知晓适合抗体或其抗原结合片段表达的培养条件。

本发明的另一个方面涉及使用所述抗人 PD-1 抗体或其抗原结合片段调控哺乳动物包括人的免疫应答的方法，其包括向哺乳动物包括人施用本发明的抗体或其抗原结合片段，使得所述哺乳动物包括人的免疫应答得到调控，所述调控包括免疫应答的增强、增加或刺激。

本发明的一个方面涉及所述抗人 PD-1 抗体或其抗原结合片段在制备用于调控哺乳动物包括人的免疫应答的试剂中的用途。

本发明的一个方面涉及所述抗人 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其用于调控哺乳动物包括人的免疫应答。

本发明的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段能够特异性识别人和猴的 PD-1 分子，阻断 PD-1/PD-L1 以及 PD-1/PD-L2 相互作用，调节免疫应答，提高免疫应答水平。本发明的抗人 PD-1 抗体与人 PD1 特异性结合并表现出良好的特性。这些特性包括与人 PD-1 的高亲和力结合，但与 CD28、CTLA4、BTLA 以及 ICOS 等其它 CD28 家族成员没有交叉

反应。本发明的抗人 PD-1 抗体或其抗原结合部分的优点尤其表现在其阻断 PD1/PDL1 的活性相对于现有技术具有显著性的提高。本发明的抗人 PD-1 抗体或其抗原结合部分的优点还表现在其在真核表达系统中的表达量相对于现有技术的抗人 PD-1 抗体或其抗原结合部分的表达量得到显著提升。

附图说明

图 1 表达载体 pCMV-163 的物理图谱。

图 2 双夹心 ELISA 检测细胞培养上清中抗体表达水平。

图 3 SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体特异性识别抗原人 PD1。

图 4 SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体与 CD28 家族其他成员无特异性结合。

图 5 SG001 抗体特异性竞争 BMS01 阳性抗体识别靶抗原。

图 6 SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体特异性阻断 PD1/PDL1 相互作用。

图 7 SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体特异性阻断 PD1/PDL2 相互作用。

图 8 A：SG001 抗体特异性识别猴 PD1 和人 PD1；

图 8B：BMS01 阳性抗体特异性识别猴 PD1 和人 PD1。

图 9 SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体体外增强免疫应答反应。

图 10 SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体体内增强免疫应答反应。

图 11 SG001-IgG4 抗体和 Nivolumab 阳性抗体抑制肿瘤生长。

具体实施方式

定义

本文所用的术语“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异抗体和多反应性抗体)以及抗体片段。因此，在本说明书任意语境使用的术语“抗体”包括但不限于任意的特异性结合成员、免疫球蛋白类型和/或同种型(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD、IgE 和 IgM)；和其生物相关片段或特异性结合成员，包括但不限于 Fab、F(ab')2、Fv 和 scFv(单链或相关物)。本领域知晓，抗体是包含通过二硫键内部相连的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH1、CH2 和 CH3)组成。轻链是由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。重链和轻链两者的可变区都包括框架区(FWR)和互补决定区(CDR)。四个 FWR 区相对保守，而 CDR 区(CDR1、CDR2 和 CDR3)代表超变区并且从 NH2 末端到 COOH 末端排列

如下：FWR1、CDR1、FWR2、CDR2、FWR3、CDR3、FWR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域，而依据同种型，恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合。

同时，本文所定义的“抗体”也包括嵌合抗体、人源化抗体和重组抗体、产生于转基因非人类动物的人抗体以及选自利用本领域技术人员可使用的富集技术产生的库的抗体。

术语“可变”是指抗体间可变(V)区的某些片段在序列上存在广泛差异。所述 V 结构域介导抗原结合并且定义了特定抗体对于其特定抗原的特异性。然而，可变性并非均匀分布在跨越 110 个氨基酸的可变区域中。相反，V 区域由每个均长 9-12 个氨基酸的被称为“超变区”的具有极度可变性的较短区域所分割的具有 15-30 个氨基酸的相对不变的被称为框架区(FR)的片段组成。天然的重链和轻链的可变区每一个都包括四个 FR，大多采取 β-片层构型，通过 3 个超变区相连，其形成连接部分 β-片层结构，并且在某些情况中形成部分 β-片层结构的环。每条链中的超变区通过 FR 紧密相连，并与来自其它链的超变区一起促进抗体的抗原结合位点形成。

本文的术语“超变区”是指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。超变区通常包含来自“互补决定区”(“CDR”)的氨基酸残基。

本文所用术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即包含个体抗体的群体除可能少量存在的天然发生的突变之外是相同的。术语“多克隆抗体”是指包括抗不同决定簇(“表位”)的不同抗体的制备物。

本文的单克隆抗体包括“嵌合”抗体，其中部分重链和/或轻链与来自特定物种的或属于特定抗体类别或亚类的抗体的相应序列是相同或同源的，而链的其余部分与来自另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体以及此类抗体的片段的相应序列是相同的或同源的，只要它们展现出期望的生物学活性。本发明提供了来自人抗体的可变区抗原结合序列。因此，本文主要关注的嵌合抗体包括具有一个或多个人抗原结合序列(如 CDR)并含有一个或多个来自非人抗体的序列如 FR 或 C 区序列的抗体。此外，本文所述的嵌合抗体是包含一种抗体类别或亚类的人可变区域抗原结合序列以及来自另一个抗体类别或亚类的另一个序列如 FR 或 C 区序列的抗体。

“人源化抗体”通常是具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基的人抗体。这些非人氨基酸残基经常称为“引入”残基，其通常取自“引入”可变区。

“抗体片段”包含完整抗体的部分，如完整抗体的抗原结合部分或片段或可变区域。完整抗体的抗原结合部分或片段或可变区域包括，但不限于 Fab、Fab'、F(ab')2 和 Fv 片

段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

“Fv”是包含完整的抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该片段包含由一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域以紧密的非共价结合的方式形成的二聚体。从这两个结构域的折叠产生出 6 个超变环(从 H 和 L 链各形成 3 个环)，其提供氨基酸残基用于抗原结合，并赋予抗体抗原结合特异性。然而，即使是单个可变区域(或 Fv 的一半，其仅包含 3 个抗原特异的 CDR)也具有识别和结合抗原的能力，虽然与完整结合位点相比，其亲和力较低。

“单链 Fv”(“sFv”或“scFv”)是包含连接成单个多肽链的 VH 和 VL 抗体结构域的抗体片段。sFv 多肽可以进一步包含位于 VH 和 VL 结构域之间的多肽连接臂，其使得 sFv 形成抗原结合所需的结构。。

术语“双价抗体”是通过构建在 VH 和 VL 结构域之间具有短连接臂(约 5-10 个残基)的 sFv 片段制备的小抗体片段，使得获得 V 结构域的链间而不是链内的配对，形成二价片段，即具有两个抗原结合位点的片段。双特异双价抗体是两个“交叉”的 sFv 片段的异二聚体，其中两个抗体的 VH 和 VL 结构域存在于不同的多肽链上。

结构域抗体(dAb)可以以完全人的形式进行生产，是抗体的最小已知的抗原结合片段，其范围为约 11kDa 至约 15kDa。dAb 是免疫球蛋白的重链和轻链的可变区(分别是 VH 和 VL)。其高表达于微生物细胞培养物中，显示出良好的生物物理特性，包括例如但不限于，溶解度和温度稳定性，并且非常适合于在体外筛选系统如噬菌体展示中进行筛选和亲和力成熟。dAb 作为单体具有生物活性，并且由于它们的小尺寸和固有的稳定性，可以形成较大的分子以产生具有延长的血清半衰期或其它药理活性的药物。

Fv 和 sFv 是唯一的具有完整结合位点而缺少恒定区的种类。因此，它们在体内使用中适合于减少非特异结合。构建 sFv 融合蛋白以产生在 sFv 的氨基末端或羧基末端任意一端的效应蛋白的融合。抗体片段还可以是“线性抗体”。此类线性抗体片段可以是单特异的或双特异的。

抗体的其它修饰在本文中也有涉及。例如，抗体可被连接到多种非蛋白质性质的聚合物之一，例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。抗体还可以通过如凝聚技术或通过界面聚合包埋在制备的微胶囊中并用于胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或用于大珠滴乳液。。

通常，本发明的抗体是重组产生的，使用的载体和方法是本领域已有的。人抗体还可以通过体外活化的 B 细胞来产生。人抗体也可以在转基因动物(如小鼠)中产生，其能够

在不产生内源性免疫球蛋白的情况下产生全组成成分的人抗体。

抗体片段通通过蛋白水解消化衍生自完整抗体。然而，这些片段也可直接由重组宿主细胞产生。Fab、Fv 和 ScFv 抗体片段都可表达在 E. coli 中并由 E. coli 分泌，从而可容易地生成大量的这样的片段。Fab'-SH 片段可从 E. coli 中直接回收并化学偶联以形成 F(ab')2 片段。用于生产抗体片段的技术对于技术人员是明显的。

变体抗体也包括在本发明范围之内。因此，申请中所列举的序列的变体也包括在本发明范围之内。可以通过使用本领域已知的方法获得具有改良的亲和性的抗体序列的其他变体并且这些变体也包括在本发明范围之内。例如，氨基酸替换可用于获得具有进一步改良的亲和性的抗体。或者，核苷酸序列的密码子优化可用于改善抗体生产中的表达系统的翻译效率。

这样的变体抗体序列与申请中列举的序列具有 70％或更多(例如 80％、85％、90％、95％、97％、98％、99％或更高)的序列同源性。这样的序列同源性是相对于参考序列(即，申请中列举的序列)的全长计算获得的。

术语“多肽”取其常规含义，即氨基酸的序列。多肽不限于一个特定长度的产物。肽、寡肽和蛋白质均包括在多肽的定义之内，并且除非另有说明，这些术语可以互换地使用。此术语也包括多肽的表达后修饰，例如糖基化、乙酰化、磷酸化等，以及本领域已知的天然存在的和非天然存在的其它修饰。多肽可以是完整的蛋白质或其亚序列。本发明语境中感兴趣的特定多肽是含有 CDR、VH 和 VL 的氨基酸亚序列，并能够结合 hPD-1。

本文所用的术语多肽“变体”是多肽，其通常不同于本文所具体公开的多肽，其具有一个或多个替换、缺失、添加和/或插入。这样的变体可以是天然存在或合成产生的，例如，通过对本发明的一个或多个上述多肽序列进行修饰，且对本文所述的多肽的一个或多个生物活性进行评估和/或使用任何数量的本领域公知的技术。

例如，某些氨基酸可以替换在蛋白质结构中的其它氨基酸而没有明显损失与其它多肽(如抗原)或细胞结合的能力。由于结合能力和蛋白性质决定了蛋白的生物功能活性，可以在蛋白序列上进行某些氨基酸序列的替换，从而获得具有类似性质的蛋白质。因此，考虑到的是，在所公开的组合物的肽序列或相应的编码所述肽的 DNA 序列中制备各种变化，而未明显损失它们的生物效用或活性。

在许多情况中，多肽变体含有一个或多个保守替换。“保守替换”是指其中氨基酸被其它具有类似性质的氨基酸所替换，使得肽化学领域中技术人员可预期多肽的二级结构和亲水性质基本上不发生变化。

氨基酸替换通常是基于氨基酸侧链取代基的相对相似性，如它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑了各种前述特征的示例性替换是本领域技术人员公知的并包括：精氨酸和赖氨酸；谷氨酸和天冬氨酸；丝氨酸和苏氨酸；谷氨酰胺和天冬酰胺；以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

“同源性”或“序列同一性”是指在序列比对和引入缺口后，多核苷酸或多肽序列变体的残基与非变体序列的相同的百分比。在具体实施方式中，多核苷酸和多肽变体与本文所述的多核苷酸或多肽具有至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、或至少约 99%的多核苷酸或多肽同源性。

这样的变体多肽序列与申请所列举的序列具有 70%或以上(即 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或更多)的序列同一性。在其他实施方式中，本发明提供了多肽片段，其包括本文所公开的氨基酸序列的各种长度的连续延伸段。例如，适用的情况下，本发明提供的肽序列包含至少约 5、10、15、20、30、40、50、75、100、150 或更多的本发明公开的一个或多个序列的连续肽以及其之间所有的中间长度的肽。

本发明的载体包括可以在任何类型的细胞或生物体中进行复制的载体，包括如质粒、噬菌体、粘粒和迷你染色体。在一些实施方式中，包括本发明多核苷酸的载体是适合于多核苷酸繁殖或复制的载体，或者是适合于表达本发明多肽的载体。这样的载体是本领域已知并可以购买的。

“载体”包括穿梭载体和表达载体。通常，质粒构建体也包括分别用于细菌中质粒复制和选择的复制起点(如复制的 ColE1 起点)和选择标记(如氨苄青霉素或四环素抗性)。“表达载体”是指包含用于在细菌或真核细胞中表达本发明的抗体包括抗体片段所需要的控制序列或调控元件的载体。

本文所用术语“细胞”可以是任何细胞，包括但不限于真核、多细胞物种(如与单细胞的酵母细胞相反)，例如但不限于，哺乳动物细胞或人细胞。细胞可作为单一实体或者是较大的细胞群的一部分而存在。这样的“较大的细胞群”可以包括如细胞培养物(混合的或纯的)、组织(如内皮组织、上皮组织、粘膜组织或其它组织)、器官(如肺、肝、肌肉和其它器官)、器官系统(如循环系统、呼吸系统、胃肠道系统、泌尿系统、神经系统、皮肤系统或其他器官系统)或生物体(如鸟、哺乳动物等)。

本发明的术语“高亲和力结合”是指抗 hPD-1 抗体以 1×10^{-7}M 或更小的 K_D 与人 PD-1 结合，例如至少 1×10^{-7}M、1×10^{-8}M、1×10^{-9}M、1×10^{-10}M、1×10^{-11}M 的 K_D。

本发明的“不显著与 CD28、CTLA4、BTLA 以及 ICOS 等结合”是指所述抗 hPD-1

抗体与人 PD-1 结合的比例高于与 CD28、CTLA4、BTLA 以及 ICOS 等结合的比例的至少 10 倍，例如至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150、200、300、500、1000、5000、10000 倍或更多倍。

在提供了范围的值时，应该理解，除非文中另有明确说明，否则每个插入值、到下限的单位的十分之一、该范围的上限和下限之间和任何其它在所述范围内的所述值或插入值都包含于本发明范围之内。可独立地包括于较小范围内的这些较小范围的上限和下限也包含在本发明内，只要去除被特地排除在外的极限所述范围内被特定排除在外的任何界限。当所述范围包括界限的一个或两个时，排除被包括的界限的一个或两个的范围也包括于本发明中。

除非另有定义，本文所使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的具有相同的含义。虽然任何类似或等同于本文所述的方法和材料也可以在本发明的实施或测试中使用，但现在公开了优选的方法和材料。本文提及的所有出版物均通过引用而全部并入本文。

本发明提供实施例一方面是用于描述本发明抗体制备过程，该制备过程仅是说明相关方法，并非是限制性的，本领域技术人员公知，在不背离本发明精神的情况下，可以对本发明做出许多修改，这样的修改也落入本发明的范围。本发明提供实施例另一方面是用于表明本发明抗体的特征和优点，但本发明不限于这些特征和优点。

下述实验方法如无特别说明，均为常规方法，所使用的实验材料如无特别说明，均可容易地从商业公司获取。本发明下述实施例中使用的各种抗体均来源于商业途径的标准抗体。

实施例 1　抗体筛选

为了避免个体免疫背景的偏向性，尽可能保证抗体库的多样性，利用淋巴细胞分离液分离 162 名成年健康人（男女各半）外周血及 10 例新生儿（男女各半）脐带血淋巴细胞（均签订知情同意书），共收集 2×10^9 个细胞。Trizol 法提取总 RNA，反转录为 cDNA，常规 PCR 方法扩增不同抗体亚型的可变区基因。根据抗体库载体 pDF（军事医学科学院院刊，2008，32（4）：305-308，358。）信息，引入酶切位点 BssH II、Nhe I 和带有 Loxp511 序列（序列为：SGGSTITSYNVYYTKLSSSGT（SEQ ID NO：15））的连接肽，通过重叠 PCR 方法拼接成 ScFv（单链抗体：VL-Linker（含 Loxp511 序列）-VH，上下游分别引入 BssH II、Nhe I 位点）形式（具体方法见《生物文库技术》，邵宁生等主编，军事医学科

学出版社，2011 年第一版）。电泳分离后，将所获得的 scFv 用 BssH II、Nhe I 酶切后克隆入同样酶切处理的 pDF 载体中，电穿孔转化大肠杆菌 XL1-Blue（Agilent Technology）。经 SB 培养液扩大培养后，加 1×10^{13} pfu 辅助病毒 VCSM13（BioVector NTCC Inc.）感染，获得初级噬菌体抗体库，测定效价为 8×10^{12} cfu/mL。按比例（感染复数 MOI>200）混合初级抗体库和 BS1365 菌[基因型：F'kan recA1 endA1 gryA96 thi21 ΔlacU169supE44 hsdR17（λimm434X12cre)]（BioVector NTCC Inc.），借助 BS165 菌表达的 Cre 重组酶介导 loxp/loxp511 重组（具体方法参考：Hum Antibodies. 1999;9(1):67-77； J Biomol Screen. 2014 Feb 4;19(6):839-846. ），得到大容量重组抗体库。

利用哺乳动物细胞 - 中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1（ATCC® CCL-61™）表达的人 PD-1 蛋白（人 PD-1 蛋白胞外段-人 IgG1 Fc 段融合蛋白，命名为 hPD1-Fc，其中人 PD-1 的序列信息参考 NP.054862.1，人 IgG1 Fc 片段的序列参考 AEO21920.1）为靶点，筛选靶抗体。5%脱脂奶粉封闭 hPD1-Fc 包被的免疫试管（Maxisorp 免疫试管，Thermo Nunc）后，加入上述噬菌体抗体库，37℃孵育 2h；弃去未结合的噬菌体，TBS-T 洗液洗涤 5 遍，充分洗去非特异吸附噬菌体；加入 1mL 洗脱缓冲液（0.1mol/L 甘氨酸-HCl，pH 2.2）洗脱噬菌体并以 40μL 2mol/L Tris 溶液中和；加入对数期 XL1-Blue 菌、SB 培养基（SB 培养液：胰蛋白胨 30g，酵母提取物 20g，MOPS 10g，溶于 950mL 去离子水中，氢氧化钠调 pH 值至 7.0，定容至 1L，高压灭菌）及辅助噬菌体 VCSM13 进行扩增富集；重复该过程 3-4 轮，将洗脱下来的噬菌体感染新鲜制备的对数期 XL1-Blue 菌涂培养板，37℃过夜培养后，随机挑取单克隆至 96 孔深孔板（Corning），扩大培养后进行 phage-ELISA（具体方法参考：军事医学科学院院刊，2008，32（4）：305-308，358。），检测与抗原的结合特性；共鉴定 165 个克隆，其中 48 个特异性结合 hPD1-Fc 的克隆中，SG001 结合活性最好。

将 SG001 克隆送测序，所获得的可变区基因经 IMGT（http://imgt.cines.fr/imgtvquest/vquest）在线分析，获得的 SG001 克隆中，重链可变区序列如 SEQ ID NO:7 所示，其三个 CDR 区氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3；轻链可变区序列为 SEQ ID NO:8，其三个 CDR 区氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6。编码所述重链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO.9 所示；编码轻链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO.10 所示。

实施例 2　抗体表达纯化

将获得的 SG001 克隆可变区基因克隆入含有人 IgG 恒定区基因的真核表达载体

pCMV-163 中，构建全抗体表达载体，其物理图谱如图 1 所示（真核表达载体 pCMV-163 的各个组成成分均为本领域已知的成分，按照所示次序重组而成）。全抗体称为 SG001 抗体（轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO.11，核苷酸序列为 SEQ ID NO.12；重链氨基酸序列为 SEQ ID NO.13，核苷酸序列 SEQ ID NO.14）。将获得的真核表达载体，通过 Lipofectamine2000 脂质体介导的方法转染至 CHO 细胞中，经过 ELISA 试验（利用羊抗人 IgG 以及辣根酶标记的羊抗人 IgG 进行双夹心 ELISA 法检测上清中抗体的含量，以未转染上清作为阴性对照，人 IgG 纯品作为标准品），检测培养上清中抗体表达量，筛选获得表达量较高的单克隆细胞株。

为了对比本发明抗体 SG001 的特性，本发明将同类上市抗体 Nivolumab（Opdivo，百时美施贵宝）轻、重链可变区序列构建到相同载体 pCMV-163 上（全抗体命名为 BMS01），同样经过转染至 CHO 细胞获得表达上清、ELISA 测定上清抗体浓度, 筛选获得表达量较高的单克隆细胞株。根据抗体发挥作用的原理，BMS01 抗体的活性与上市抗体 Nivolumab 一致，可以用作本发明抗体的阳性对照。

ELISA 实验结果显示，SG001 抗体以及 BMS01 抗体表达上清中均有抗体表达。在相同的表达载体、细胞以及表达条件下，SG001 抗体表达量约为 BMS01 抗体表达量的 2~3 倍（SG001 74.5±4.9 ug/mL vs BMS01 28.7±6.6，P=0.016），结果如图 2 所示。

收集足够上清，利用常规的 Protein A 亲和纯化目标抗体。

实施例 3　抗体特异性结合活性分析

将靶抗原 hPD1-Fc 包被 ELISA 板条，1ug/ml，4℃过夜；PBST 洗涤后，加入 1.5%的酪蛋白，4℃封闭过夜；加入不同浓度的 SG001 抗体或者 BMS01 抗体，37℃反应 2 小时；PBST 洗涤后，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 Fab 二抗（GAH-Fab-HRP，Abcam），室温反应 45 分钟；PBST 重复洗板 5 遍，在吸水纸上尽量拍干残留液滴；每孔加入 100 μl TMB，室温（20±5℃）避光放置 3min；每孔加入 100 μl 2N H_2SO_4 终止液终止底物反应，酶标仪 450 nm 处读取 OD 值，分析抗体与靶抗原 hPD1-Fc 结合能力。SG001 抗体或者 BMS01 阳性抗体均能特异性识别靶抗原 hPD1-Fc；该识别活性呈显著的剂量依赖性，结果如图 3 所示。

将各 CD28 家族成员 hPD1-FC、CD28、CTLA4、BTLA 以及 ICOS（北京义翘神州生物技术有限公司）分别包被 ELISA 板条，1ug/ml，4℃过夜；PBST 洗涤后，加入 1.5%的酪蛋白，4℃封闭过夜；加入不同浓度的 SG001 抗体或者 BMS01 抗体，37℃反应 2 小时；

PBST 洗涤后，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 Fab 二抗（GAH-Fab-HRP），室温反应 45 分钟；PBST 重复洗板 5 遍，在吸水纸上尽量拍干残留液滴；每孔加入 100 μl TMB，室温（20±5℃）避光放置 3min；每孔加入 100 μl 2N H_2SO_4 终止液终止底物反应，酶标仪 450 nm 处读取 OD 值，分析抗体与各 CD28 家族成员结合能力。

结果显示，SG001 抗体或者 BMS01 阳性抗体均能特异性识别靶抗原 hPD1-Fc，并呈显著的剂量依赖性；SG001 抗体或者 BMS01 阳性抗体与 CD28、CTLA4、BTLA 以及 ICOS 等其他 CD28 家族成员无显著的结合反应；结果如图 4 所示。

实施例 4　抗体亲和力分析

采用 BIACORE 生物大分子相互作用仪（GE 公司）分析抗体亲和力。在芯片上偶联抗人 IgG-Fab 抗体（Abcam），利用抗人 IgG-Fab 抗体捕获 SG001 抗体或者 BMS01 阳性抗体，抗体浓度定为 1μg/mL，进样时间为 60-150 秒；抗原 hPD1-FC 作为流动相，使用 6 个浓度梯度（3.125、6.25、12.5、25、50、100nM），结合时间为 120 秒；解离时间为 1200S；使用 10mM 甘氨酸-盐酸缓冲液（pH2.1）再生，时间为 60S。结果显示 SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体分别为 2.15 nM、1.4nM，亲和力基本一致。结果如表 1 所示。

表 1 SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体亲和力测定结果

抗体	结合常数 Ka (1/Ms)	解离常数 Kd (1/s)	亲和常数 KD (M)
BMS01	5.594×10^{5}	7.900×10^{-5}	1.412×10^{-10}
SG001	3.184×10^{5}	6.850×10^{-5}	2.151×10^{-10}

实施例 5　SG001 抗体竞争 BMS01 阳性抗体识别抗原

将 hPD1-FC 蛋白稀释于包被缓冲液中，包被浓度为 1 μg/mL，然后以 100 μl/孔的量加入到包被板孔中，4℃包被过夜；洗涤液（PBS+0.2% 吐温 20）重复洗板 3 遍，用 1.5% 酪蛋白以 200 μl/孔加入相应的孔中，37℃封闭 1h。用 PBS 缓冲液稀释 Biotin 标记的 BMS01 抗体（BMS01-Biotin）至 0.5μg/mL，以该抗体溶液分别稀释待测抗体 SG001、BMS01。SG001 和 BMS01 最高浓度为 400μg/mL，倍比稀释，共设立 12 个浓度；将该梯度稀释的抗体溶液加入封闭后的 ELISA 反应孔中，每孔 100 μl，每个样品浓度设 2 个平行复孔，盖好封板膜，37℃水平放置 1.5 小时。洗涤液重复洗板 3 遍，加入 HRP 标记的亲和素，

室温（20±5℃）避光放置 45 分钟。洗涤液重复洗板 5 遍，在吸水纸上尽量拍干残留液滴；每孔加入 100 μl TMB，室温（20±5℃）避光放置 3min；每孔加入 100 μl 2N H_2SO_4 终止液终止底物反应，酶标仪 450 nm 处读取 OD 值。

结果显示，SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体都能够竞争抑制 BMS01-Biotin 与抗原 hPD1-FC 结合，且呈剂量依赖性；SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体之间无显著差别；结果如图 5 所示。

实施例 6 抗体阻断 PD1 与 PDL1 相互作用

将 hPDL1 蛋白（义翘神州公司产品）稀释于包被缓冲液中，浓度为 1 μg/mL，以 100 μl/孔的量加入到 ELISA 板各个孔中，4℃包被过夜。洗涤液重复洗板 3 遍后，每孔加入 200μl 1.5%酪蛋白，37℃封闭 1h。用 PBS 缓冲液稀释 hPD1-FC-Biotin（生物素 Biotin 标记的 hPD1-FC 蛋白，其中 hPD1-FC 由实施例 1 获得，委托嘉喧生物完成标记）至 5μg/mL，以该溶液稀释待测抗体 SG001、BMS01。SG001 和 BMS01 最高浓度为 500μg/mL，根据预实验提示，SG001 按 5 倍稀释，BMS01 按 4 倍稀释，各 8 个浓度；将梯度稀释的抗体溶液加入封闭后的 ELISA 反应孔中，每孔 100 μl，每个样品浓度设 2 个平行复孔，盖好封板膜，37℃水平放置 1.5 小时。洗涤液重复洗板 3 遍后，加入 HRP 标记的亲和素，室温（20±5℃）避光放置 45 分钟。洗涤液重复洗板 5 遍，在吸水纸上尽量拍干残留液滴；每孔加入 100 μl TMB，室温（20±5℃）避光放置 3min；每孔加入 100 μl 2N H_2SO_4 终止液终止底物反应，酶标仪 450 nm 处读取 OD 值。分析抗体阻断 PD1 与 PDL1 相互作用的活性。

结果显示，SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体都能够阻断 hPDL1 与 hPD1-FC 结合，并呈剂量依赖性；SG001 抗体半数抑制剂量为 1.47±0.227μg/mL，显著优于阳性抗体 BMS01(10.62±0.536μg/mL)，$P<0.0001$。结果如图 6 所示。

实施例 7 抗体阻断 PD1 与 PDL2 相互作用

将 PDL2 蛋白（北京义翘神州生物技术有限公司）稀释于包被缓冲液中，浓度为 1 μg/mL，以 100 μl/孔的量加入到 ELISA 板各个孔中，4℃包被过夜。洗涤液重复洗板 3 遍后，每孔加入 200μl 1.5%酪蛋白，37℃封闭 1h。用 PBS 缓冲液稀释 hPD1-FC-Biotin（生物素 Biotin 标记的 hPD1-FC 蛋白，其中 hPD1-FC 由实施例 1 获得，委托嘉喧生物完成标记）至 10μg/mL，以该溶液稀释待测抗体 SG001、BMS01。SG001 和 BMS01 最高浓度为

100μg/mL，倍比稀释，共设立 12 个浓度；将该梯度稀释的抗体溶液加入封闭后的 ELISA 反应孔中，每孔 100 μl，每个样品浓度设 2 个平行复孔，盖好封板膜，37℃水平放置 1.5 小时。洗涤液重复洗板 3 遍后，加入 HRP 标记的亲和素，室温（20±5℃）避光放置 45 分钟。洗涤液重复洗板 5 遍，在吸水纸上尽量拍干残留液滴；每孔加入 100 μl TMB，室温（20±5℃）避光放置 3min；每孔加入 100 μl 2N H_2SO_4 终止液终止底物反应，酶标仪 450 nm 处读取 OD 值。分析抗体阻断 PD1 与 PDL2 相互作用的活性。

结果显示，SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体都能够阻断 hPD1-FC-Biotin 与 PDL2 相互作用，并呈剂量依赖性；SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体之间无显著差别。结果如图 7 所示。

实施例 8 抗体识别猴 PD1 抗原

将猴 PD1（义翘神州）、hPD1-Fc 分别包被 ELISA 板条，1ug/ml，4℃过夜；PBST 洗涤后，加入 1.5%的酪蛋白，4℃封闭过夜；加入不同浓度的 SG001 抗体或者 BMS01 抗体，37℃反应 2 小时；PBST 洗涤后，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 Fab 二抗（GAH-Fab-HRP），室温反应 45 分钟；PBST 重复洗板 5 遍，在吸水纸上尽量拍干残留液滴；每孔加入 100 μl TMB，室温（20±5℃）避光放置 3min；每孔加入 100 μl 2N H_2SO_4 终止液终止底物反应，酶标仪 450 nm 处读取 OD 值，分析抗体与猴 PD1 结合能力。

SG001 抗体（图 8A）或者 BMS01 阳性抗体（图 8B）均能特异性识别猴 PD1 蛋白，呈显著的剂量依赖性；抗体识别猴 PD1 蛋白活性与识别猴 PD1 蛋白活性没有显著差别。

实施例 9 抗体体外增强免疫应答

取健康人外周血，用淋巴细胞分离液（天津市灏洋生物制品科技有限责任公司）分离外周血单个核细胞（PBMC），进一步采单核细胞分离试剂盒（Miltenyi 公司）从 PBMC 中分离单核细胞；调整细胞浓度，按 2×10^4/孔接种 96 孔细胞培养板，培养体系为 1640 培养基，含 10%胎牛血清、25ng/ml GM-SCF（BioLegend 公司）和 50ng/ml IL-4（BioLegend 公司）；37℃，5% CO_2，常规培养；每 3 天更换一次新鲜培养基，培养 7 天，诱导树突状细胞（DC）。

实验第 7 天，取另外一份健康人血，分离 PBMC；进一步使用 CD4 阳性 T 细胞（$CD4^+T$）分选试剂盒（eBioscience）从分离的 PBMC 中分离出 $CD4^+T$ 细胞；调整细胞浓度，按 2×10^5/孔接种前述诱导 DC 细胞的培养板中。分别加入 SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体，

浓度梯度为 0.016、0.08、0.4、2、10、50μg/ml，设置 3 个复孔；实验中设置阴性组（只有 $CD4^+$T、DC 以及 $CD4^+$T 联合 DC）。

37℃，5% CO_2，常规培养 5 天后收获上清，测定上清中 IFN-γ 表达水平。

结果显示（图 9），单纯 $CD4^+$T 细胞、DC 细胞以及 $CD4^+$T 联合 DC 细胞的培养上清中，IFN-γ 表达呈本底水平；在加入不同浓度梯度抗体后，IFN-γ 表达显著增加，且具有剂量依赖性；SG001 抗体和 BMS01 阳性抗体之间没有显著差别。

实施例 10 抗体体内增强免疫应答

取健康人外周血，用淋巴细胞分离液（天津市灏洋生物制品科技有限责任公司）分离外周血单个核细胞（PBMC）；用 1640 培养基（不含血清）将 PBMC 浓度调成为 5×10^6/ml，尾静脉注射 NPG 小鼠（免疫缺陷型小鼠，维通达公司产品），每只 200μl，建立人 PMBC 移植小鼠的移植物抗宿主排斥（GVHD）模型；实验设置三组，分别给予 SG001 抗体、BMS01 阳性抗体和生理盐水，抗体给药剂量为 150μg/只，一周给药 2 次，给药 2 周；分析抗 PD1 抗体在体内增强免疫反应的生物学功能；每五天测量一次体重，记录小鼠的存活时间并计算生存率。

PMBC 移植小鼠体重早期逐渐上升，到 20 天后体重开始下降，小鼠产生了 GVHD 反应，随后小鼠开始出现死亡（图 10）。生理盐水对照组中位生存时间为 41 天，SG001 抗体、BMS01 阳性抗体组的中位生存时间分别为 36 天和 39 天，小鼠存活率降低（SG001 vs NC，P=0.0044; BMS01 vs NC, P=0.5240），生存时间缩短，提示 GVHD 效应加剧；相比 BMS01 阳性抗体组，SG001 抗体组小鼠平均生存时间更短，提示 GVHD 效应更为显著（SG001 vs BMS01，P=0.0827）。实验结果提示，SG001 抗体以及 BMS01 阳性抗体均可以增强体内免疫反应，SG001 抗体活性略优于 BMS01 阳性抗体。

实施例 11　抗体抑制肿瘤生长

将实施例 2 获得的真核表达载体中的抗体重链恒定区基因替换为人 IgG4 亚型的恒定区基因，构建 IgG4 亚型的 SG001 抗体（SG001-IgG4，轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO.11，重链氨基酸序列为 SEQ ID NO.16），并参考实施例 2 的方法和流程，制备样品 SG001-IgG4。

通过在 PD-1 人源化的 B-hPD-1 小鼠上接种鼠肠癌 MC38 细胞（美国 ATCC 产品）建立肿瘤模型，评价 PD1 抗体抑制肿瘤生长的活性。选择雄性、4~6 周龄的 B-hPD-1 小鼠（北京百奥赛图基因生物技术有限公司产品）。小鼠肠癌 MC38 细胞复苏培养至所需数量

后，收集对数期生长细胞悬浮至10^7细胞/mL浓度，皮下接种0.1mL(1×10^6细胞)至B-hPD-1小鼠上。每日观察动物情况，检查肿瘤生长，待肿瘤平均大小至100mm^3时进行随机分组，开始对动物进行给药，设生理盐水对照组、SG001-IgG4组以及Nivolumab组（日本施贵宝公司）；移植后第6天开始给药，给药剂量为20mg/kg，给药周期为每4天给药一次，共给药6次，观察小鼠体重以及肿瘤生长情况。

结果显示，试验中使用的抗PD-1抗体阳性参考药物(Nivolumab原研药)和SG001-IgG4抗体均可为实验动物所接受，动物体重呈连续上升状态，给药组和阴性抗体对照无显著性差异。各组给药动物和溶剂对照组比较有明显肿瘤生长抑制效果（图11）。Nivolumab组的平均肿瘤抑制率为16%，而SG001-IgG4组的平均肿瘤抑制率为58%，SG001-IgG4组相对于Nivolumab组有统计学差异（$P<0.05$）。

权 利 要 求 书

1．一种分离的抗人程序性死亡受体-1（Human Program Death 1 Receptor，hPD-1）抗体或其抗原结合片段，其重链可变区 CDR1 序列如 SEQ ID NO:1 所示，CDR2 序列如 SEQ ID NO:2 所示，CDR3 序列如 SEQ ID NO:3 所示；和/或轻链可变区的 CDR1 序列如 SEQ ID NO:4 所示、CDR2 序列如 SEQ ID NO:5 所示，CDR3 序列如 SEQ ID NO:6 所示，或者所述重链或轻链的 CDR 序列与 SEQ ID NO：1-6 所示序列具有至少 70%的同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，或所述重链或轻链的 CDR 序列为 SEQ ID NO：1-6 所示序列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列。

2．如权利要求 1 所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段，其包含上述重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3。

3．如权利要求 1 或 2 所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段，其重链可变区序列如 SEQ ID NO:7 所示；和/或轻链可变区序列如 SEQ ID NO:8 所示，或者是与 SEQ ID NO：7-8 所示序列具有至少 70%的同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，或是 SEQ ID NO：7-8 所示序列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列。

4．如权利要求 1-3 任一项所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段，其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 或 16 所示；和/或轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示，或者是与 SEQ ID NO：13、16 或 11 所示序列具有至少 70%的同源性且保留相应母体序列生物活性的变体序列，或是 SEQ ID NO：13、16 或 11 所示序列经删除、替换和/或添加一个或多个氨基酸残基后获得的保留相应母体序列生物活性的变体序列。

5．如权利要求 1-4 任一项所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段，其为全长抗体，优选地，其为 IgG1 或者 IgG4 同种型的全长抗体。

6．如权利要求 1-5 任一项所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段，其为抗原结合片段，优选地，其为 Fab 片段、Fab’2 片段或单链抗体。

7．一种组合物，其包含权利要求 1-6 任一项所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段。

8．一种核酸分子，其编码权利要求 1-6 任一项所述的抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段。

9．如权利要求 8 所述的核酸分子，其序列如 SEQ ID NO：9 或 10 所示，或者是与

SEQ ID NO：9 或 10 具有至少 70%同源性且仍编码具有本发明的抗体或其抗原结合片段的活性的变体分子，或是与序列如 SEQ ID NO：9 或 10 所示的核酸分子完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核酸分子。

10．如权利要求 8 或 9 所述的核酸分子，其序列如 SEQ ID NO：12 或 14 所示，或者是与 SEQ ID NO：12 或 14 具有至少 70%同源性且仍编码具有本发明的抗体或其抗原结合片段的活性的变体分子，或是与序列如 SEQ ID NO：12 或 14 所示的核酸分子完全互补或在中度至高度严格条件下杂交的核酸分子。

11．一种表达载体，其包含权利要求 8-10 任一项所述的核酸分子。

12．一种宿主细胞，其包含权利要求 11 所述的表达载体。

13．一种生产权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括步骤：将权利要求 12 所述的宿主细胞在适合所述抗 hPD-1 抗体或其抗原结合片段表达的培养条件下表达，任选地，将表达的抗体或其抗原结合片段进行纯化。

14．权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于调控哺乳动物包括人的免疫应答的试剂中的用途。

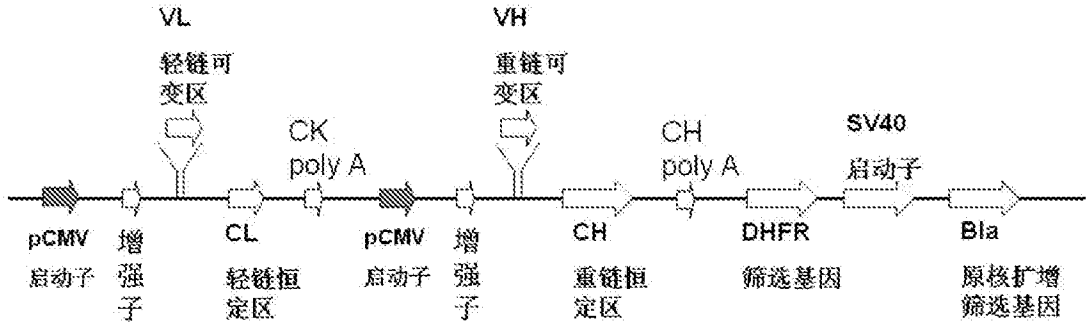

VL
轻链可变区
VH
重链可变区
CK poly A
CH poly A
SV40 启动子
pCMV 启动子
增强子
CL 轻链恒定区
pCMV 启动子
增强子
CH 重链恒定区
DHFR 筛选基因
Bla 原核扩增筛选基因

图 1

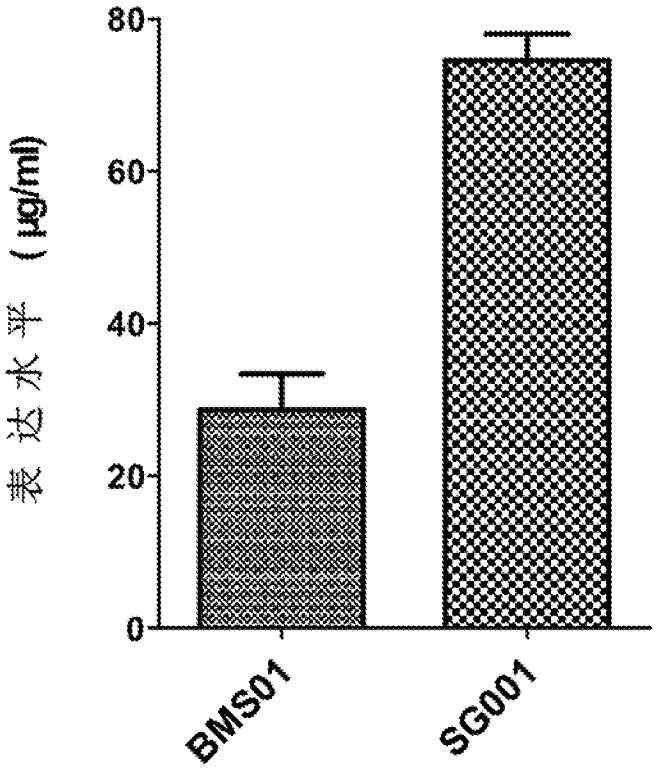

表达水平（μg/ml）
80
60
40
20
0
BMS01
SG001

图 2

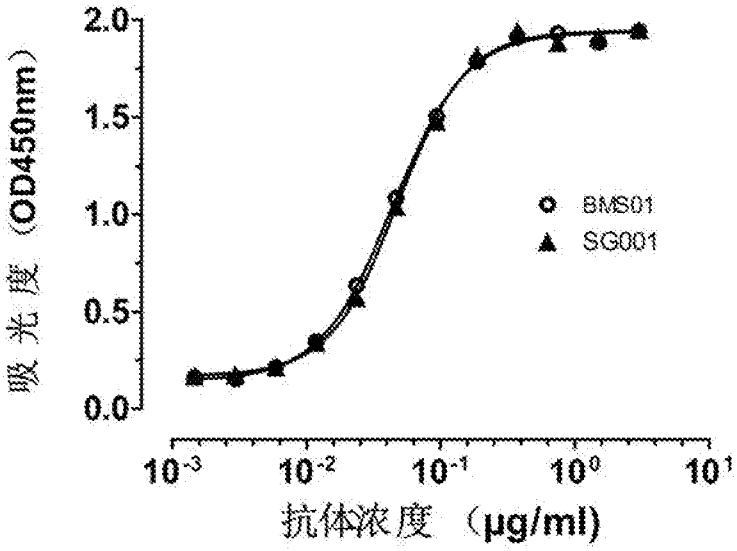

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
吸光度（OD450nm）
BMS01
SG001
10-3
10-2
10-1
100
101
抗体浓度（μg/ml）

图 3

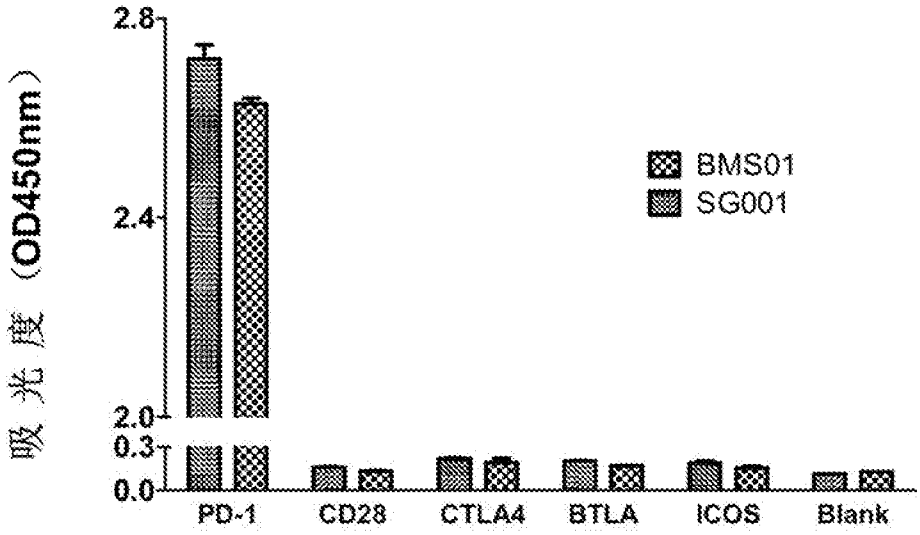

2.8
2.4
2.0
0.3
0.0
吸光度（OD450nm）
BMS01
SG001
PD-1
CD28
CTLA4
BTLA
ICOS
Blank

图 4

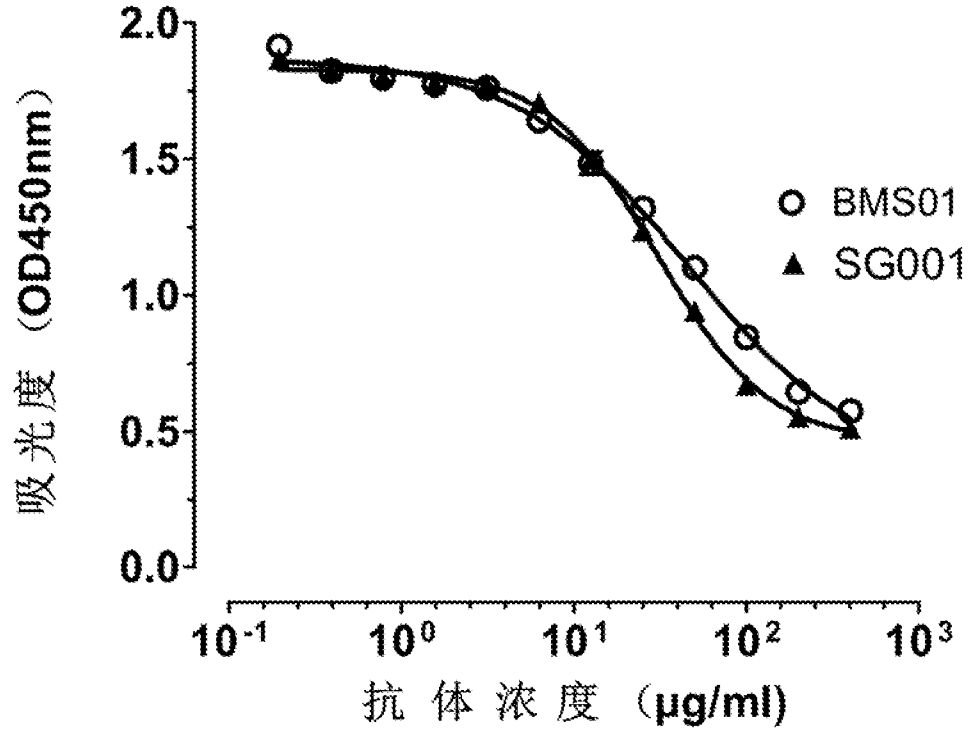

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
吸光度（OD450nm）
BMS01
SG001
10-1
100
101
102
103
抗体浓度（μg/ml）

图 5

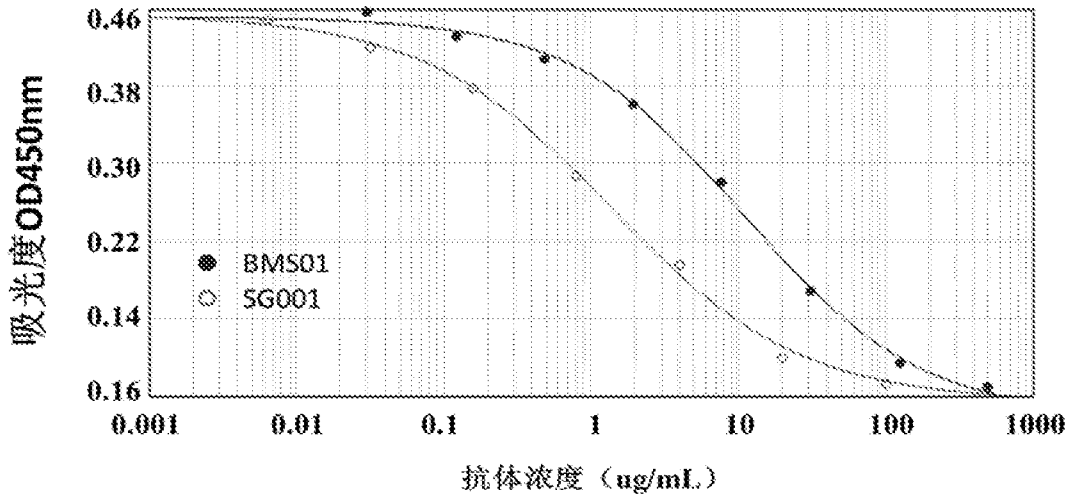

0.46
0.38
0.30
0.22
0.14
0.16
吸光度OD450nm
BMS01
SG001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度（ug/mL）

图 6

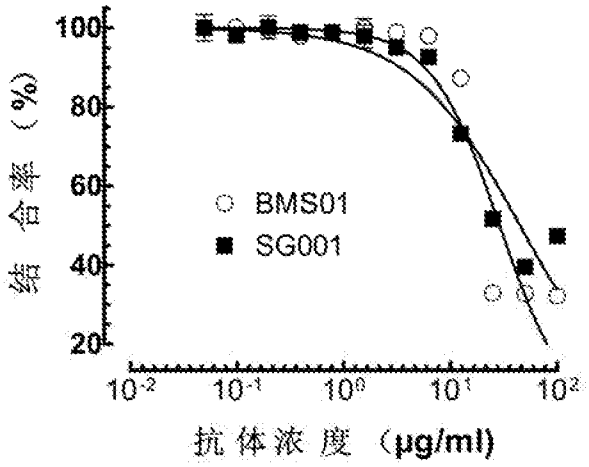

结合率（%）
100
80
60
40
20
BMS01
SG001
10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2}
抗体浓度（μg/ml）

图 7

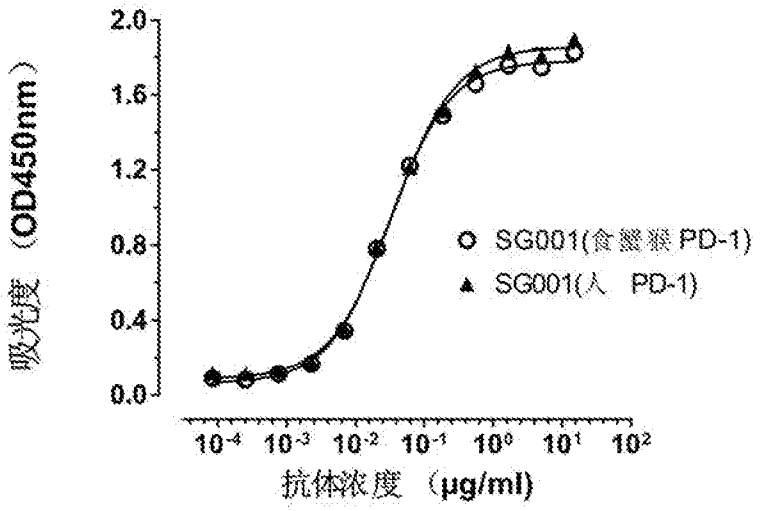

吸光度（OD450nm）
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
SG001(食蟹猴 PD-1)
SG001(人 PD-1)
10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2}
抗体浓度（μg/ml）

图 8A

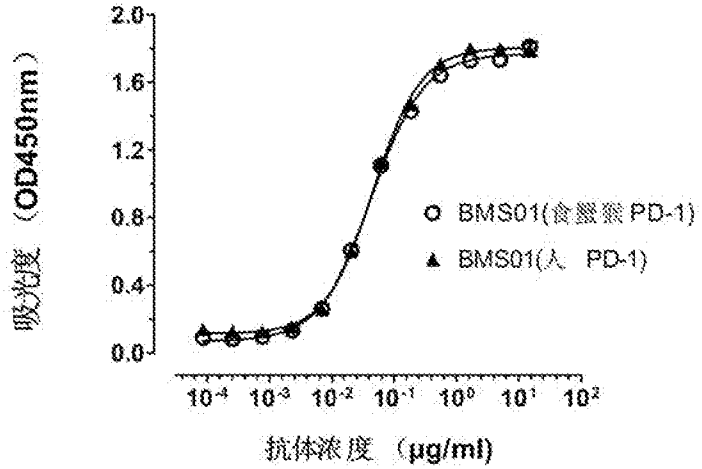

吸光度（OD450nm）
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
BMS01(食蟹猴 PD-1)
BMS01(人 PD-1)
10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2}
抗体浓度（μg/ml）

图 8B

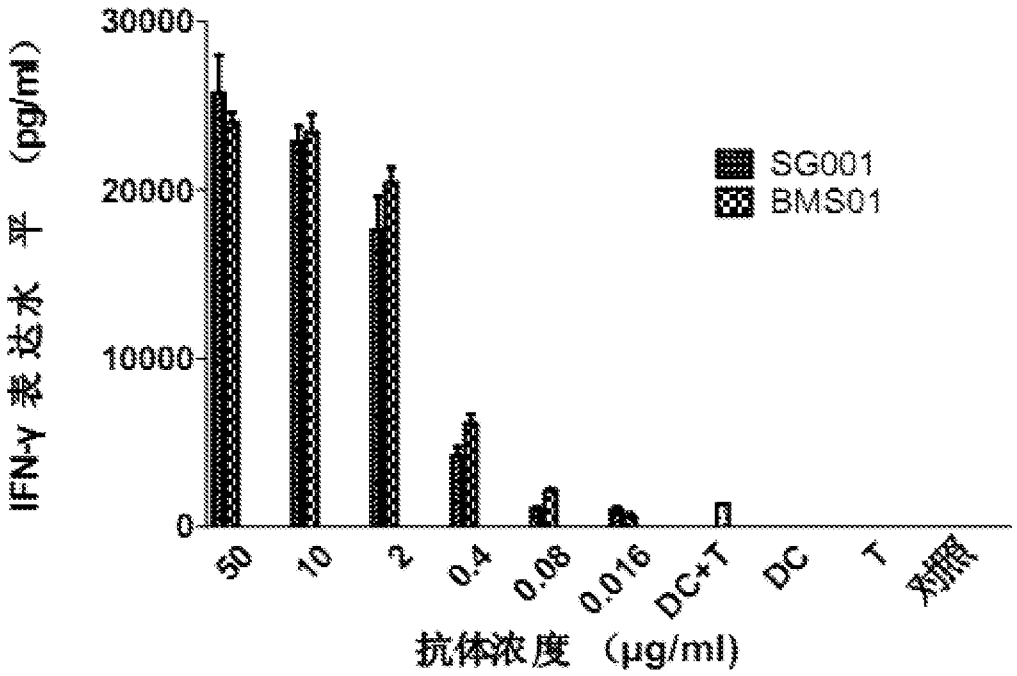

30000
20000
10000
0
IFN-γ 表达水平 （pg/ml）
SG001
BMS01
50
10
2
0.4
0.08
0.016
DC+T
DC
T
对照
抗体浓度 （μg/ml）

图 9

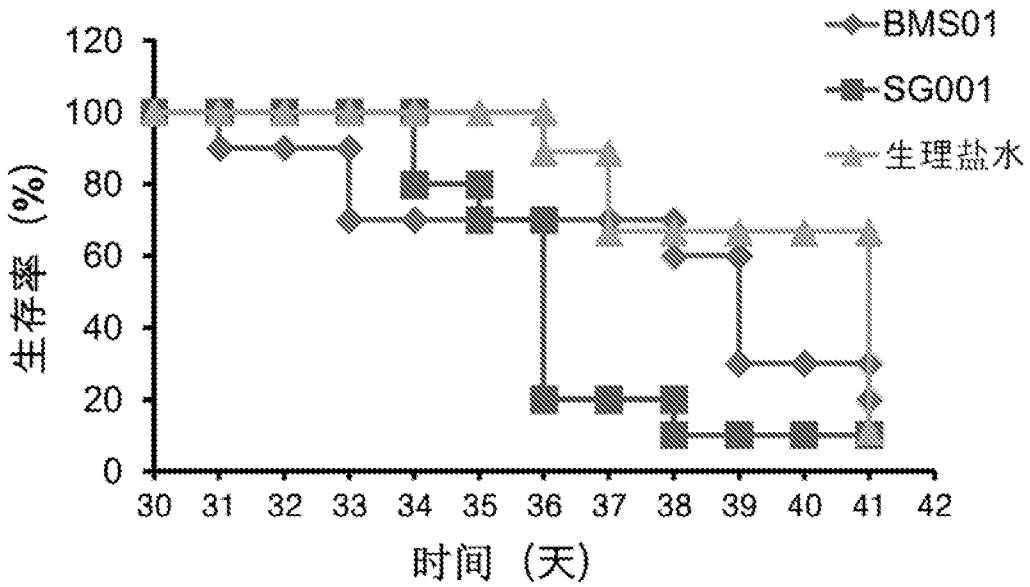

BMS01
SG001
生理盐水
120
100
80
60
40
20
0
生存率（%）
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
时间（天）

图 10

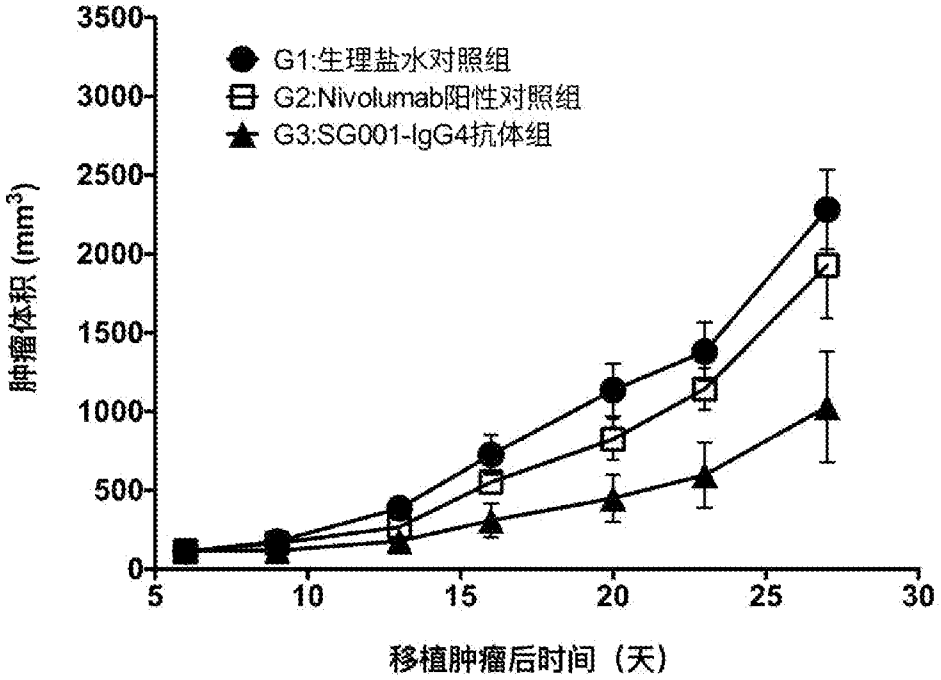

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
30
肿瘤体积 (mm3)
移植肿瘤后时间（天）
G1:生理盐水对照组
G2:Nivolumab阳性对照组
G3:SG001-IgG4抗体组

图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/110790

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/110790

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12P 21/02 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 37/04 (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; C12P; A61K; A6P

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)
VEN, CNABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, WANFANG, EBI, NCBI, UNIPROT, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of Knowledge, PLBMED, PD-1, programmed cell death 1, antibod+, bind??? affinity, antigen-binding fragment?, CDR, monoclonal antibody, Kd, pharmaceutical composition, medicament, treat+, cancer, chronic viral infection, scFv, dsFv, SEQ ID NO: 1-14

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105669864 A (HANGZHOU SHANGJIAN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 15 June 2016 (15.06.2016), claims 1-14	1-14
X	CN 101213297 B (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.), 13 February 2013 (13.02.2013), abstract, and claims 1-15	1-14
X	WO 2015/119930 A1 (PFIZER INC. et al.), 13 August 2015 (13.08.2015), claim 17, and figure 7	1-14
X	CN 104987421 A (BEYOND BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 21 October 2015 (21.10.2015), embodiment 1	1-14
X	WO 2015/095418 A1 (GENENTECH, INC. et al.), 25 June 2015 (25.06.2015), paragraph 123	1-14
X	WO 2015/095404 A2 (GENENTECH, INC. et al.), 25 June 2015 (25.06.2015), page 28, paragraphs 3-6	1-14

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

* Special categories of cited documents:

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

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

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

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

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 February 2017 (14.02.2017)	**10 March 2017 (10.03.2017)**
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 **JIN, Chunpeng** Telephone No.: (86-10) **62413803**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/110790

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105669864 A	15 June 2016	None	
CN 101213297 B	13 February 2013	ZA 200709631 A	26 November 2008
		ZA 200709631 B	26 November 2008
		SI 2161336 T1	29 November 2013
		CN 101213297 A	02 July 2008
WO 2015/119930 A1	13 August 2015	KR 20160108566 A	19 September 2016
		SG 11201605824X A	30 August 2016
		EP 3102605 A1	14 December 2016
		CA 2937521 A1	13 August 2015
		TW 201615212 A	01 May 2016
		CN 105960415 A	21 September 2016
		AU 2015214390 A1	04 August 2016
CN 104987421 A	21 October 2015	WO 2016180034 A1	17 November 2016
WO 2015/095418 A1	25 June 2015	WO 2015095404 A3	13 August 2015
		WO 2015095404 A2	25 June 2015
		IL 245857 D0	31 July 2016
		CA 2931812 A1	25 June 2015
		CN 105934253 A	07 September 2016
		CN 105828837 A	03 August 2016
		US 2016257752 A1	08 September 2016
		EP 3083686 A2	26 October 2016
		SG 11201604995Y A	28 July 2016
		IL 246228 D0	31 July 2016
		KR 20160089531 A	27 July 2016
		AU 2014364601 A1	07 July 2016
		EP 3083692 A1	26 October 2016
		AU 2014364587 A1	16 June 2016
		SG 11201604956S A	28 July 2016
		CA 2933883 A1	25 June 2015
		KR 20160089524 A	27 July 2016
WO 2015/095404 A2	25 June 2015	WO 2015095404 A3	13 August 2015
		IL 245857 D0	31 July 2016
		CA 2931812 A1	25 June 2015
		WO 2015095418 A1	25 June 2015
		CN 105934253 A	07 September 2016
		CN 105828837 A	03 August 2016
		US 2016257752 A1	08 September 2016
		EP 3083686 A2	26 October 2016
		SG 11201604995Y A	28 July 2016
		IL 246228 D0	31 July 2016
		KR 20160089531 A	27 July 2016
		AU 2014364601 A1	07 July 2016
		EP 3083692 A1	26 October 2016
		AU 2014364587 A1	16 June 2016
		SG 11201604956S A	28 July 2016
		CA 2933883 A1	25 June 2015
		KR 20160089524 A	27 July 2016

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2016/110790

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i；C12N 15/13(2006.01)i；C12P 21/02(2006.01)i；A61K 39/395(2006.01)i；A61P 37/04(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；C12P；A61K；A6P

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）)

VEN,CNABS,CNTXT,EPTXT,USTXT,WOTXT,CNKI,WANFANG,EBI,NCBI,UNIPROT,GOOGLE,BAIDU,ISI Web of Knowledge, PUBMED,PD-1，programmed cell death 1，antibod+，bind??? affinity,antigen-binding fragment?,CDR, monoclonal antibody,Kd,pharmaceutical composition,medicament,treat+,cancer,chronic viral infection, scFv,dsFv,SEQ ID NO:1-14

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 105669864 A (杭州尚健生物技术有限公司) 2016年 6月 15日 (2016-06-15) 权利要求1-14	1-14
X	CN 101213297 B (小野药品工业株式会社.等) 2013年 2月 13日 (2013-02-13) 摘要，权利要求1-15	1-14
X	WO 2015/119930 A1 (PFIZER INC.等) 2015年 8月 13日 (2015-08-13) 权利要求17，图7	1-14
X	CN 104987421 A (北京比洋生物技术有限公司) 2015年 10月 21日 (2015-10-21) 实施例1	1-14
X	WO 2015/095418 A1 (GENENTECH, INC.等) 2015年 6月 25日 (2015-06-25) 第123段	1-14
X	WO 2015/095404 A2 (GENENTECH, INC.等) 2015年 6月 25日 (2015-06-25) 第28页第3段-6段	1-14

☐ 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
2017年 2月 14日	2017年 3月 10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) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 靳春鹏 电话号码 (86-10)62413803

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/110790

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐ 纸件形式

☑ 电子形式

b. (提交时间)

☑ 含在申请提交时的国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

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

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/110790

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	105669864	A	2016年 6月 15日	无			
CN	101213297	B	2013年 2月 13日	ZA	200709631	A	2008年 11月 26日
				ZA	200709631	B	2008年 11月 26日
				SI	2161336	T1	2013年 11月 29日
				CN	101213297	A	2008年 7月 2日
WO	2015/119930	A1	2015年 8月 13日	KR	20160108566	A	2016年 9月 19日
				SG	11201605824X	A	2016年 8月 30日
				EP	3102605	A1	2016年 12月 14日
				CA	2937521	A1	2015年 8月 13日
				TW	201615212	A	2016年 5月 1日
				CN	105960415	A	2016年 9月 21日
				AU	2015214390	A1	2016年 8月 4日
CN	104987421	A	2015年 10月 21日	WO	2016180034	A1	2016年 11月 17日
WO	2015/095418	A1	2015年 6月 25日	WO	2015095404	A3	2015年 8月 13日
				WO	2015095404	A2	2015年 6月 25日
				IL	245857	D0	2016年 7月 31日
				CA	2931812	A1	2015年 6月 25日
				CN	105934253	A	2016年 9月 7日
				CN	105828837	A	2016年 8月 3日
				US	2016257752	A1	2016年 9月 8日
				EP	3083686	A2	2016年 10月 26日
				SG	11201604995Y	A	2016年 7月 28日
				IL	246228	D0	2016年 7月 31日
				KR	20160089531	A	2016年 7月 27日
				AU	2014364601	A1	2016年 7月 7日
				EP	3083692	A1	2016年 10月 26日
				AU	2014364587	A1	2016年 6月 16日
				SG	11201604956S	A	2016年 7月 28日
				CA	2933883	A1	2015年 6月 25日
				KR	20160089524	A	2016年 7月 27日
WO	2015/095404	A2	2015年 6月 25日	WO	2015095404	A3	2015年 8月 13日
				IL	245857	D0	2016年 7月 31日
				CA	2931812	A1	2015年 6月 25日
				WO	2015095418	A1	2015年 6月 25日
				CN	105934253	A	2016年 9月 7日
				CN	105828837	A	2016年 8月 3日
				US	2016257752	A1	2016年 9月 8日
				EP	3083686	A2	2016年 10月 26日
				SG	11201604995Y	A	2016年 7月 28日
				IL	246228	D0	2016年 7月 31日
				KR	20160089531	A	2016年 7月 27日
				AU	2014364601	A1	2016年 7月 7日
				EP	3083692	A1	2016年 10月 26日
				AU	2014364587	A1	2016年 6月 16日
				SG	11201604956S	A	2016年 7月 28日
				CA	2933883	A1	2015年 6月 25日
				KR	20160089524	A	2016年 7月 27日