



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107840887 B

(45) 授权公告日 2022.03.25

(21) 申请号 201610840595.0

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2016.09.21

C07K 16/28 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 15/13 (2006.01)

申请公布号 CN 107840887 A

A01K 67/027 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.03.27

C12N 5/10 (2006.01)

(73) 专利权人 基石药业(苏州)有限公司

A61K 39/395 (2006.01)

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区

A61P 35/00 (2006.01)

星湖街218号生物纳米园A1楼北楼二  
楼E168单元

A61P 37/02 (2006.01)

专利权人 拓石药业(上海)有限公司  
基石药业

(56) 对比文件

(72) 发明人 郑勇 李竞 根纳迪·戈洛洛波夫  
李栋 徐建清 王卓智

CN 105315373 A, 2016.02.10

(74) 专利代理机构 北京奉思知识产权代理有限  
公司 11464

WO 2015088847 A1, 2015.06.18

代理人 吴立 邹轶蛟

CN 105061597 A, 2015.11.18

(54) 发明名称

AU 2009290543 A1, 2011.04.14

一种新的PD-1单克隆抗体

CN 105531288 A, 2016.04.27

(57) 摘要

CN 103242448 A, 2013.08.14

本发明提供了PD-1的单克隆抗体，特别是  
PD-1人单克隆抗体，该抗体以高亲和力特异性结合于PD-1并且包括重链和轻链。本发明还提供了  
编码本发明抗体的核酸序列、克隆或表达载体、  
宿主细胞、用于表达或分离抗体的方法、包含本  
发明的抗体的免疫偶联物和治疗组合物。本发明  
进一步提供了PD-1抗体治疗各种癌症的用途。

CN 102892786 A, 2013.01.23

审查员 张范范

权利要求书3页 说明书33页

序列表11页 附图16页

1. 一种抗体或其抗原结合片段, 其包含:

包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区; 以及

包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,

所述抗体特异性结合PD-1,

所述抗体或其抗原结合片段包含:

a) 重链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:10、重链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:11、重链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:12,

轻链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:14、轻链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:19、轻链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:21;

b) 重链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:10、重链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:11、重链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:13,

轻链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:14、轻链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:19、轻链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:21;

c) 重链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:10、重链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:11、重链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:13,

轻链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:15、轻链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:19、轻链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:21;

或

d) 重链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:10、重链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:11、重链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:13,

轻链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:16、轻链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:19、轻链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:21。

2. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段, 其结合于PD-1的一个表位, 所述表位包含: SEQ ID NO:24上第128、129、130、131和132位点氨基酸和第35、64、82、83位中至少一个氨基酸。

3. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段, 其结合于人PD-1和鼠PD-1的一个表位, 其中, 所述表位包含SEQ ID NO:24上第128、129、130、131和132位点氨基酸。

4. 如权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述鼠PD-1是小鼠或大鼠PD-1。

5. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

a) 重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区的氨基酸序列为与SEQ ID NO:1具有至少70%、80%、90%或95%的同源性的序列, 所述轻链可变区的氨基酸序列为与SEQ ID NO:3具有至少70%、80%、90%或95%的同源性的序列;

b) 重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区的氨基酸序列为与SEQ ID NO:2具有至少70%、80%、90%或95%的同源性的序列, 所述轻链可变区的氨基酸序列为与SEQ ID NO:3具有至少70%、80%、90%或95%的同源性的序列;

c) 重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区的氨基酸序列为与SEQ ID NO:2具有至少70%、80%、90%或95%的同源性的序列, 所述轻链可变区的氨基酸序列为与SEQ ID NO:4具有至少70%、80%、90%或95%的同源性的序列;

或

d) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:2具有至少70%、80%、90%或95%的同源性的序列,所述轻链可变区的氨基酸序列为与SEQ ID NO:5具有至少70%、80%、90%或95%的同源性的序列;

其中所述抗体特异性结合PD-1。

6. 如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其包含:

a) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:1,所述轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:3;

b) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,所述轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:3;

c) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,所述轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:4;

或

d) 重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,所述轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:5;

其中所述抗体特异性结合PD-1。

7. 如权利要求1至6任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体

a) 结合于人PD-1, $K_D$ 为2.15E-10M以下;并且

b) 结合于鼠PD-1, $K_D$ 为1.67E-08M以下。

8. 如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体具有下列性质中的至少一种:

a) 结合于人PD-1, $K_D$ 为4.32E-10M至2.15E-10M,并且结合于小鼠PD-1, $K_D$ 为5.39E-08M至1.67E-08M;

b) 实质上不结合于人CD28、CTLA-4;

c) 增加T细胞的增殖;

d) 增加干扰素- $\gamma$ 的产生;或

e) 增加白细胞介素-2的分泌。

9. 如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体或人抗体。

10. 一种核酸分子,其编码如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

11. 一种克隆或表达载体,其包含如权利要求10所述的核酸分子。

12. 一种宿主细胞,其包含一个以上如权利要求11所述的克隆或表达载体。

13. 一种用于生产如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的过程,包括培养如权利要求12所述的宿主细胞,并且分离所述抗体。

14. 一种药物组合物,包含如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,以及一种以上药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

15. 一种免疫偶联物,包含连接至治疗剂的如权利要求1至6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

16. 一种药物组合物,其包含权利要求15所述的免疫偶联物和药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

17. 一种用于制备抗PD-1抗体或其抗原结合片段的方法,包括:

(a) 提供:

i) 重链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:10、重链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:11、重链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:12,

轻链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:14、轻链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:19、轻链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:21;

ii) 重链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:10、重链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:11、重链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:13,

轻链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:14、轻链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:19、轻链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:21;

iii) 重链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:10、重链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:11、重链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:13,

轻链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:15、轻链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:19、轻链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:21;

或

iv) 重链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:10、重链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:11、重链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:13,

轻链可变区CDR1序列为SEQ ID NO:16、轻链可变区CDR2序列为SEQ ID NO:19、轻链可变区CDR3序列为SEQ ID NO:21;

(b) 表达抗体序列成为蛋白质。

18. 如权利要求1至6中任一项所述的抗体在制备用于治疗或预防癌症的药物中的应用。

19. 如权利要求18所述的应用,其中所述癌症选自由黑素瘤、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、子宫癌、卵巢癌和直肠癌所组成的组中的癌症。

20. 如权利要求19所述的应用,其中所述黑素瘤为皮肤或眼内恶性黑素瘤。

21. 如权利要求18所述的应用,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

## 一种新的PD-1单克隆抗体

### 技术领域

[0001] 本发明主要涉及PD-1单克隆抗体及其组合物,以及使用抗PD-1抗体对人类疾病的免疫治疗。

### 背景技术

[0002] 越来越多的临床前和临床结果的证据表明,靶向免疫检查点正在成为最有希望治疗癌症患者的方法。程序性细胞死亡分子1(PD-1)其为与CD28具有同源性的免疫球蛋白超家族的抑制性成员,在活化的B细胞、T细胞和骨髓细胞中表达(Agata et al, supra; Okazaki et al (2002) Curr. Opin. Immunol. 14:391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8)并在调节免疫系统中的激活和抑制信号中发挥重要作用(Okazaki, Taku et al. 2007 International Immunology 19:813-824)。事实上,PD-1是在凋亡细胞的差异表达筛选中被发现的(Ishida et al (1992) EMBO J 11:3887-95)。

[0003] PD-1的结构为单体I型跨膜蛋白,属于Ig基因超家族(Agata et al. (1996) bit Immunol 8:765-72),其由一个免疫球蛋白可变区样细胞外结构域和含有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)和免疫受体酪氨酸转换基序(ITS M)的细胞质结构域组成。尽管与CTLA-4的结构相似,但PD-1缺少与B7-1和B7-2结合的MYPPPY基序。PD-1有两个已知的配体,PD-L1(B7-H1、CD274)和PD-L2(B7-DC、CD273),这两个配体是表达在细胞表面的B7家族成员(Freeman et al (2000) J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al (2001) Nat Immunol 2: 261-8; Carter et al (2002) Eur J Immunol 32:634-43)。与B7同源的PD-L1和PD-L2结合于PD-1,但却不结合其他的CD28家族成员。

[0004] PD-1,作为免疫检查点蛋白之一,是CD28具有同源性的免疫球蛋白超家族的抑制性成员,在活化的B细胞、T细胞和骨髓细胞中表达(Agata et al, supra; Okazaki et al. (2002) Curr Opin Immunol 14:391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8),并且在限制T细胞激活中发挥重要作用,这为肿瘤细胞逃脱免疫监视提供了重要的免疫抗病机制。PD-1的诱导T细胞无反应性或无反应的状态,从而导致在细胞内暂时无法产生最佳水平的效应细胞因子。PD-1也可以通过其抑制生存信号的能力诱导T细胞的细胞凋亡。PD-1缺陷动物形成各种自身免疫表型,包括自身免疫性心肌病和关节炎和肾炎狼疮样综合症(Nishimura et al. (1999) Immunity 11:141-51; Nishimura et al. (2001) Science 291:319-22)。此外,已经发现PD-1在自身免疫性脑脊髓炎、全身性红斑狼疮、移植物抗宿主病(GVHD)、I型糖尿病和类风湿性关节炎中具有重要作用(Salama et al. (2003) J Exp Med 198:71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004) Hum Mol Genet 13:R143; Nielsen et al. (2004) Lupus 11:510)。在小鼠的B细胞肿瘤系,PD-1的ITS M被证明对于阻断BCR介导的Ca<sup>2+</sup>-flux和酪氨酸下游效应分子的磷酸化是必不可少的(Okazaki et al. (2001) PNAS 98:13866-71)。

[0005] 表达在活化的T细胞上PD-1和表达在肿瘤细胞上的PD-L1之间的相互作用,会负调节免疫反应并减少抗肿瘤免疫力。PD-L1表达在多种人类癌症中(Dong et al (2002)

Nat.Med 8:787-9)。在食管癌、胰腺癌和其它类型的癌症中,PD-L1在肿瘤中的表达与生存期降低相关,突出说明该途径是肿瘤免疫治疗中有希望的新靶点。一些研究组已表明,PD-1-PD-L1相互作用会恶化疾病,导致肿瘤浸润淋巴细胞的减少、T细胞受体介导的增殖的减少和癌性细胞的免疫逃避(Dong et al.(2003) J.Mol.Med.81:281-7;Blank et al.(2005) Cancer Immunol.Immunother.54:307-314;Konishi et al.(2004) Clin.Cancer Res.10: 5094-100)。通过抑制PD-L1和PD-1的局部相互作用可使免疫抑制逆转,PD-1与PD-L2的相互作用被阻断时,其效果累积。

[0006] 制药公司已经开发了多种针对PD-1/PD-L1通路的药物,如百时美施贵宝公司(BMS)、默克公司、罗氏公司和葛兰素史克公司(GSK)等。临床试验的数据显示了在各种肿瘤类型的患者中持久的临床活性和良好的安全性的早期证据。目前,国际上已批准了3个针对PD-1/PD-L1通路的抗体药物,分别是BMS的Nivolumab、默克的Pembrolizumab以及罗氏的Atezolizumab。Nivolumab是BMS开发的抗PD-1药物,其正在被投入到下一代领域的中心阶段。目前在6个后期研究中,在研究的5个癌症组中的3个中,治疗促使了肿瘤的缩小,其中包括72例肺癌患者中的18%、98例黑色素瘤患者中的接近三分之一和33例肾癌患者中的27%。由默克公司研制的Pembrolizumab是全人源单克隆IgG4抗体,其作用于PD-1,其在针对皮肤癌获得的令人印象深刻的IB数据达到了FDA的新突破指标。阶段性IB研究的结果显示在85例癌症患者中有51%的抗肿瘤反应,9%得到完全响应。同时,Pembrolizumab在头颈癌、胃癌和尿路上皮癌患者中的总反应率分别为21.4%、22.2%和27.6%。罗氏的Atezolizumab是作用于PD-L1的全人源单克隆IgG1抗体,研究证明其在140例携带各种大小的肿瘤的晚期癌症患者中缩小了29例(21%)患者的肿瘤,且在肿瘤细胞表面高表达PD-L1的晚期尿路上皮癌患者中显示出了较高的肿瘤抑制效果(27%)。

[0007] 现有的治疗方法不都是尽如人意的。大部分PD-1抗体药物与小鼠PD-1蛋白并无结合,这就限制了抗体药物在临床前的动物实验中的应用,而且由于其抗体序列大多来源于对小鼠的免疫,严重的免疫原性反应降低了抗体药物用于人体的治疗效果。与小鼠PD-1具有交叉反应性的人源化抗体克服了这些缺点,并且在体内表现更好的容忍性和更高的有效性。因此,仍需要新型抗PD-1的抗体。

## 发明内容

[0008] 本发明提供了分离的抗体,特别是单克隆抗体或人单克隆抗体。

[0009] 一方面,本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段,其结合于PD-1的一个表位,所述表位包含:SEQ ID NO:24上第128、129、130、131和132位点氨基酸和第35、64、82、83位中至少一个氨基酸。

[0010] 本发明还提供了一种抗体或其抗原结合片段,其结合于人PD-1和鼠PD-1的一个表位,其中,所述表位包括SEQ ID NO:24上第128、129、130、131和132位点氨基酸。

[0011] 如上所述的抗体或其抗原结合片段,其中鼠PD-1是小鼠或大鼠PD-1。

[0012] 在一些实施方案中,上述的抗体或其抗原结合片段中所述抗体

[0013] a)结合于人PD-1,K<sub>D</sub>为2.15E-10M以下;并且

[0014] b)结合于鼠PD-1,K<sub>D</sub>为1.67E-08M以下。

[0015] 在一些实施方案中,上述抗体具有下列性质中的至少一种:

- [0016] a) 结合于人PD-1,  $K_D$ 为4.32E-10M至2.15E-10M, 并且结合于小鼠PD-1,  $K_D$ 为5.39E-08M至1.67E-08M;
- [0017] b) 实质上不结合于人CD28、CTLA-4;
- [0018] c) 增加T细胞的增殖;
- [0019] d) 增加干扰素- $\gamma$ 的产生; 或
- [0020] e) 增加白细胞介素-2的分泌。
- [0021] 本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段, 其包含一个氨基酸序列, 所述氨基酸序列与选自由SEQ ID N0s:1、2、3、4、5、6、7、8和9所组成的组中的序列具有至少70%、80%、90%或95%的同源性,
- [0022] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0023] 本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段, 其包含一个氨基酸序列, 所述氨基酸序列选自由SEQ ID N0s:1、2、3、4、5、6、7、8和9所组成的组中的序列,
- [0024] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0025] 本发明提供了一种抗体, 或其抗原结合片段, 包含:
- [0026] a) 重链可变区, 其氨基酸序列与选自由SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所组成的组中的序列具有至少70%、80%、90%或95%的同源性; 以及
- [0027] b) 轻链可变区, 其氨基酸序列与选自由SEQ ID N0s:3、4、5、6、7、8和9所组成的组中的序列具有至少70%、80%、90%或95%的同源性,
- [0028] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0029] 本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段, 包含:
- [0030] a) 重链可变区, 其氨基酸序列选自由SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2组成的组中的序列; 以及
- [0031] b) 轻链可变区, 其氨基酸序列选自由SEQ ID N0s:3、4、5、6、7、8和9所组成的组中的序列,
- [0032] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0033] 在一些具体实施方案中, 所述抗体包含:
- [0034] a) 重链可变区, 其氨基酸序列选自SEQ ID NO:1所示的序列; 以及
- [0035] b) 轻链可变区, 其氨基酸序列选自SEQ ID NO:3所示的序列,
- [0036] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0037] 或在一些具体实施方案中, 所述抗体包含:
- [0038] a) 重链可变区, 其氨基酸序列选自SEQ ID NO:2所示的序列; 以及
- [0039] b) 轻链可变区, 其氨基酸序列选自SEQ ID NO:3所示的序列,
- [0040] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0041] 或在一些具体实施方案中, 所述抗体其包含:
- [0042] a) 重链可变区, 其氨基酸序列选自SEQ ID NO:2所示的序列; 以及
- [0043] b) 轻链可变区, 其氨基酸序列选自SEQ ID NO:4所示的序列,
- [0044] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0045] 或在一些具体实施方案中, 所述抗体包含:
- [0046] a) 重链可变区, 其氨基酸序列选自SEQ ID NO:2所示的序列; 以及

- [0047] b) 轻链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:5所示的序列,
- [0048] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0049] 或在一些具体实施方案中,所述抗体包含:
- [0050] a) 重链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:1所示的序列;以及
- [0051] b) 轻链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:6所示的序列,
- [0052] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0053] 或在一些具体实施方案中,所述抗体包含:
- [0054] a) 重链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:1所示的序列;以及
- [0055] b) 轻链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:5所示的序列,
- [0056] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0057] 或在一些具体实施方案中,所述抗体包含:
- [0058] a) 重链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:2所示的序列;以及
- [0059] b) 轻链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:6所示的序列,
- [0060] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0061] 或在一些具体实施方案中,所述抗体包含:
- [0062] a) 重链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:2所示的序列;以及
- [0063] b) 轻链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:7所示的序列,
- [0064] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0065] 或在一些具体实施方案中,所述抗体包含:
- [0066] a) 重链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:1所示的序列;以及
- [0067] b) 轻链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:8所示的序列,
- [0068] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0069] 或在一些具体实施方案中,所述抗体包含:
- [0070] a) 重链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:2所示的序列;以及
- [0071] b) 轻链可变区,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:9所示的序列,
- [0072] 其中所述抗体特异性结合PD-1。
- [0073] 具体序列详见表1和序列表信息:
- [0074] 表1抗体的重链、轻链具体序列

抗体		SEQ ID NO	氨基酸序列
1H6	重链	1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTTYYISWVR QAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAILGYFDYWGQGTMVTVS S
	轻链	3	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGGTYLY WFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCMQLTHWPYTFGQGTKLEIK
2E5	重链	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTTYYISWVR QAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAIGYFDYWGQGTMVTVS S
	轻链	3	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGGTYLY WFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCMQLTHWPYTFGQGTKLEIK

[0076]	2G4	重链	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTYYISWVR QAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWQQGTMVTVS S
		轻链	4	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGTYLY WFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDEGVVYYCMQLTHWPYTFGQGKLEIK
	2C2	重链	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTYYISWVR QAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWQQGTMVTVS S
		轻链	5	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGATYLY WFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDEGVVYYCMQLTHWPYTFGQGKLEIK
	A6W	重链	1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTYYISWVR QAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWQQGTMVTVS S
		轻链	6	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGNTYLY WFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDEGVVYYCMQLTHWPYTFGQGKLEIK
	1G10	重链	1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTYYISWVR QAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWQQGTMVTVS S
		轻链	5	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGATYLY WFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDEGVVYYCMQLTHWPYTFGQGKLEIK
	2B1	重链	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTYYISWVR QAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWQQGTMVTVS S
		轻链	6	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGNTYLY WFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDEGVVYYCMQLTHWPYTFGQGKLEIK
	LII	重链	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTYYISWVR QAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWQQGTMVTVS S
		轻链	7	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGNTYLY WFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDEGVVYYCMQLTHAPYTFGQGKLEIK
	5C4	重链	1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTYYISWVR QAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWQQGTMVTVS S
		轻链	8	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGQTYLY WFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDEGVVYYCMQLTHEPYTFGQGKLEIK
	8C10	重链	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTYYISWVR QAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWQQGTMVTVS S
		轻链	9	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGQTYLY WFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDEGVVYYCMQLHENYTFGQGKLEIK

[0077] 另一方面,本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段,包含互补决定区(CDR),其氨基酸序列选自由SEQ ID N0s:10-23所组成的组中的序列,

[0078] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0079] 另一方面,本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段,其包含:包含CDR1,CDR2和CDR3序列的重链可变区;以及包含CDR1,CDR2和CDR3序列的轻链可变区,

[0080] 其中重链可变区CDR3序列包含选自由SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13所组成的组中的氨基酸序列及其保守性修饰，

[0081] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0082] 上述抗体的轻链可变区CDR3序列优选包含选自由SEQ ID NOS:20、21、22和23所组成的组中的氨基酸序列及其保守性修饰。

[0083] 上述抗体的重链可变区CDR2序列优选包含选自由SEQ ID NO:11所组成的组中的氨基酸序列及其保守性修饰。

[0084] 上述抗体的轻链可变区CDR2序列优选包含选自由SEQ ID NO:19所组成的组中的氨基酸序列及其保守性修饰。

[0085] 上述抗体的重链可变区CDR1序列优选包含选自由SEQ ID NO:10所组成的组中的氨基酸序列及其保守性修饰。

[0086] 上述抗体的轻链可变区CDR1序列优选包含选自由SEQ ID NOS:14、15、16、17和18所组成的组中的氨基酸序列及其保守性修饰。

[0087] 在一些具体实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0088] 包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区;以及

[0089] 包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中

[0090] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,

[0091] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,

[0092] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自由SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13所组成的组中所示的氨基酸序列,

[0093] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自由SEQ ID NO:14-18所组成的组中所示的氨基酸序列,

[0094] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,

[0095] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自由SEQ ID NO:20-23所组成的组中所示的氨基酸序列,

[0096] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0097] 在一些具体实施方案中,所述抗体包含:

[0098] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,

[0099] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,

[0100] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,

[0101] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,

[0102] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,

[0103] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,

[0104] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0105] 在一些具体实施方案中,所述抗体包含:

[0106] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,

[0107] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,

[0108] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,

[0109] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,

[0110] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,

[0111] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,

[0112] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0113] 在一些具体实施方案中,所述抗体包含:

[0114] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,

[0115] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,

[0116] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,

[0117] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,

[0118] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,

[0119] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,

[0120] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0121] 在一些具体实施方案中,所述抗体包含:

[0122] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,

[0123] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,

[0124] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,

[0125] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,

[0126] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,

[0127] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,

[0128] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0129] 在一些具体实施方案中,所述抗体包含:

[0130] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,

[0131] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,

[0132] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,

[0133] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,

[0134] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,

[0135] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,

[0136] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0137] 在一些具体实施方案中,所述抗体包含:

[0138] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,

[0139] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,

[0140] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,

[0141] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,

[0142] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,

[0143] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,

[0144] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0145] 在一些具体实施方案中,所述抗体包含:

[0146] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,

[0147] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,

[0148] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,

[0149] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,  
[0150] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,  
[0151] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,  
[0152] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0153] 在一些具体实施方案中,所述抗体包含:

[0154] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,  
[0155] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,  
[0156] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,  
[0157] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,  
[0158] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,  
[0159] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,  
[0160] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0161] 在一些具体实施方案中,所述抗体包含:

[0162] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,  
[0163] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,  
[0164] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,  
[0165] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,  
[0166] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,  
[0167] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列,  
[0168] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0169] 在一些具体实施方案中,所述抗体包含:

[0170] a) 重链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,  
[0171] b) 重链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,  
[0172] c) 重链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,  
[0173] d) 轻链可变区CDR1,序列包含选自SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,  
[0174] e) 轻链可变区CDR2,序列包含选自SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,  
[0175] f) 轻链可变区CDR3,序列包含选自SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列,  
[0176] 其中所述抗体特异性结合PD-1。

[0177] 具体CDR序列详见表2和序列表信息:

[0178] 表2抗体的重链、轻链具体序列

抗体		SEQ ID NO	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3
IH6	重链	10	TYYIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	12	LGYFDY
	轻链	14	RSSQSLLSDGGTYLY	19	LVSTLGS	21	MQLTHWPYT
2E5	重链	10	TYYIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	轻链	14	RSSQSLLSDGGTYLY	19	LVSTLGS	21	MQLTHWPYT
2G4	重链	10	TYYIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	轻链	15	RSSQSLLSDGTYLY	19	LVSTLGS	21	MQLTHWPYT
2C2	重链	10	TYYIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	轻链	16	RSSQSLLSDGATYLY	19	LVSTLGS	21	MQLTHWPYT
A6 W	重链	10	TYYIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	12	LGYFDY
	轻链	17	RSSQSLLSDGNTYLY	19	LVSTLGS	21	MQLTHWPYT
IG1 0	重链	10	TYYIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	12	LGYFDY
	轻链	16	RSSQSLLSDGATYLY	19	LVSTLGS	21	MQLTHWPYT
2B1	重链	10	TYYIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	轻链	17	RSSQSLLSDGNTYLY	19	LVSTLGS	21	MQLTHWPYT
LII	重链	10	TYYIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	轻链	17	RSSQSLLSDGNTYLY	19	LVSTLGS	22	MQLTHAPYT
5C4	重链	10	TYYIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	12	LGYFDY
	轻链	18	RSSQSLLSDGQTYLY	19	LVSTLGS	23	MQLTHEPYT
8C1 0	重链	10	TYYIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	轻链	18	RSSQSLLSDGQTYLY	19	LVSTLGS	20	MQLTHENYT

- [0180] 在一些实施方案中,所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体或人抗体。
- [0181] 在一些实施方案中,其中所述抗体显示下列性质中的至少一种:
- [0182] a)结合人PD-1的 $K_D$ 为2.15E-10M以下,并且结合小鼠PD-1的 $K_D$ 为1.67E-08M以下;
- [0183] b)实质上不结合人CD28、CTLA-4;
- [0184] c)增加T细胞增殖;
- [0185] d)增加干扰素- $\gamma$ 的产生;或
- [0186] e)增加白细胞介素-2的分泌。
- [0187] 再一方面,本发明提供了一种核酸分子,其编码如本发明中所述的抗体或其抗原结合片段。
- [0188] 本发明提供了一种克隆或表达载体,其包含本发明所述的编码抗体或其抗原结合片段的核酸分子。
- [0189] 本发明提供了一种宿主细胞,其包含如一个以上上述克隆或表达载体。
- [0190] 在另一个方面,本发明提供了一种用于生产本发明中任一种抗体的过程,包括培养本发明中所述的宿主细胞,并且分离抗体。
- [0191] 上述抗体,其制备方法是通过将人类PD-1的细胞外结构域和小鼠PD-1的细胞外结构域免疫接种SD大鼠而实现的。
- [0192] 本发明提供了一种转基因大鼠,包含人免疫球蛋白重链和轻链转基因,其中所述大鼠表达本发明中所述的任一抗体。
- [0193] 本发明提供了一种从上述大鼠中获得的杂交瘤,其特征在于,所述杂交瘤产生所

述抗体。

[0194] 再一方面，本发明还提供了一种药物组合物，其包含本发明中所述的任一抗体或其抗原结合片段，以及一种以上药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0195] 本发明还提供了一种免疫偶联物，包含连接至治疗剂的本发明中所述的任一抗体或其抗原结合片段。

[0196] 本发明还提供了一种药物组合物，其包含上述免疫偶联物和药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0197] 本发明还提供了一种用于制备抗PD-1抗体或其抗原结合片段的方法，包括：

[0198] (a) 提供：

[0199] (i) 包含重链可变区抗体序列，其包含选自SEQ ID N0:10的CDR1序列，选自SEQ ID N0:11的CDR2序列以及选自SEQ ID N0:12或SEQ ID N0:13的CDR3序列；和/或

[0200] (ii) 包含轻链可变区抗体序列，其包含选自由SEQ ID N0s:14,15,16,17和18所组成的组中的CDR1序列，选自SEQ ID:19的CDR2序列以及选自由SEQ ID N0s:20、21、22和23所组成的组中的CDR3序列；并且

[0201] (b) 表达改变抗体序列成为蛋白质。

[0202] 本发明还提供了一种调节受试者的免疫应答的方法，包括给受试者施用本发明中所述的任一抗体或其抗原结合片段。

[0203] 本发明还提供了如本发明中所述的任一种抗体在制备治疗或预防免疫病症或癌症的药物中的应用。

[0204] 本发明还提供了一种抑制受试者中肿瘤细胞的生长的方法，包括向受试者施用治疗有效量的本发明中所述的任一抗体或其抗原结合片段，以抑制肿瘤细胞生长。

[0205] 在本发明中，上述肿瘤细胞选自由黑素瘤、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌和直肠癌所组成的组中的癌症。

[0206] 在本发明中，上述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

[0207] 发明的有益效果

[0208] 本发明的有益效果在通过专有的杂交瘤技术产生抗PD-1的人源化抗体。在本发明报道的抗体具有高结合亲和力；特异性结合人和小鼠PD-1蛋白，没有家族交叉反应；有效调节免疫反应，包括增强T细胞增殖和增加细胞因子IFN- $\gamma$  和IL-2的产生。

[0209] 新型抗PD-1的抗体来源于对大鼠的免疫，其与小鼠PD-1蛋白的结合克服了临床前实验不能用于小鼠动物模型的不足；且抗体序列经过人源化改造之后，其人源化程度接近100%，大大降低了药物用于人体的不良反应。

## 附图说明

[0210] 图1是示出16个杂交瘤抗体与细胞表面人PD-1或小鼠PD-1的结合的图。图1A显示了16个杂交瘤抗体与细胞表面人PD-1的结合；图1B显示杂交瘤抗体与细胞表面小鼠PD-1的结合。

[0211] 图2是示出第一轮突变文库筛选的结果。高亲和性克隆的序列和分析突变用于第二轮突变。

[0212] 图3A示出了人源化抗体与细胞表面人PD-1的结合曲线图,抗体以2.20~2.78nM的EC50特异性地与人PD-1结合。图3B示出人源化抗体与细胞表面小鼠PD-1的结合曲线图,抗体以11.8~15.1nM的EC50特异性地与小鼠PD-1结合。图3C示出人源化抗体与活化的食蟹猴PBMC的结合曲线图。同型对照是人IgG4 kappa。下同。

[0213] 图4示出了抗体与人、小鼠、食蟹猴PD-1的物种交叉反应试验ELISA的结果,人源化PD-1抗体与人、食蟹猴和小鼠的PD-1蛋白以剂量依赖的形式结合。图4A是人源化PD-1抗体与人PD-1蛋白的结合;图4B是人源化PD-1抗体与小鼠PD-1蛋白的结合;图4C是人源化PD-1抗体与食蟹猴PD-1蛋白的结合

[0214] 图5显示了人源化抗体与PD-1同家族的CD28和CTLA-4蛋白的交叉反应结果。结果显示,抗体特异性结合PD-1,但不与PD-1同家族的CD28和CTLA-4结合。

[0215] 图6A示出人源化抗体阻断人PD-L1与CHO-S细胞表面的人PD-1的结合,图6B示出人源化抗体阻断小鼠PD-L1与293F细胞表面的小鼠PD-1的结合。

[0216] 图7示出人源化抗体阻断人PD-L2与PD-1蛋白的结合,且阻断作用具有剂量依赖性。

[0217] 图8A-8B示出抗原表位测试结果显示人源化PD-1抗体与对照抗体结合于相同或相近的抗原表位。图8A示出与对照抗体1 (WBP305BMK1) 竞争的表位,图8B示出与对照抗体2 (Keytruda) 竞争的表位。

[0218] 图9示出抗PD-1抗体与人/小鼠PD-1的交叉反应性;2μg/mL的每种抗体在96孔平板中包被过夜,并用hPD-1/mPD-1-His蛋白孵育,然后加入HRP-抗His抗体进行检测。

[0219] 图10示出了映射在HPD-1结构的热点残基。(A) hPD-L1结合位点,从文献Zak et al. 2015获得的数据;(B-C) 抗体W3052\_r16.88.9和Keytruda分别的结合表位,数据来自表8;图片的颜色用于帮助区分表位之间的差异。

[0220] 图11示出人和鼠的PD-1之间的比较。其明显的结构的差异(BC环和C'D环(或MPD-1的C"链))被标记为橙色。(A) hPD-1 (PDB代码4ZQK) 的结构。根据其NMR结构 (PDB代码2M2D) 缺少的循环(Asp85-Asp92)而重塑。(B) mPD-1 (PDB代码3BIK) 的结构

[0221] 图12示出人同种混合淋巴细胞反应(allo-MLR)的结果,表明抗PD-1抗体能够增强人CD4<sup>+</sup>T细胞的功能。图12A所示,所有待测的抗PD-1抗体以剂量依赖的方式增加了人IL-2的分泌。图12B示出了抗PD-1抗体以剂量依赖的方式增加了人IFN-γ的分泌。图12C所示,所有待测的抗PD-1抗体均以剂量依赖的方式提高人CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖水平。

[0222] 图13示出小鼠同种混合淋巴细胞反应的结果,表明抗PD-1抗体能够增强小鼠CD4<sup>+</sup>T细胞的功能。图13A示出所有待测的抗PD-1抗体以剂量依赖的方式增加了小鼠IL-2的分泌。图13B示出了抗PD-1抗体以剂量依赖的方式增加了小鼠IFN-γ的分泌。图13C所示,所有待测的抗PD-1抗体均以剂量依赖的方式提高小鼠CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖水平。

[0223] 图14示出人同种混合淋巴细胞反应的结果,表明PD-1抗体能够增强人CD4<sup>+</sup>T细胞的功能。图14A显示了人源化PD-1抗体提高了在特异性T细胞响应中IFN-γ的产生。图14B显示了人源化PD-1抗体增加了CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖。

[0224] 图15证明了PD-1抗体可以逆转Treg的抑制功能。图15A显示PD-1抗体恢复了IFN-γ的分泌。图15B显示PD-1抗体恢复了效应T细胞的增殖。

[0225] 图16示出的ADCC试验结果,证明了抗PD-1抗体不介导活化CD4<sup>+</sup>T细胞的ADCC活性。

- [0226] 图17示出的CDC试验结果,证明了抗PD-1抗体不介导活化CD4<sup>+</sup>T细胞的CDC活性。
- [0227] 图18示出不同组别的老鼠体重变化。CloudmanS91同系移植瘤模型荷瘤鼠在给予2E5后的体重变化。数据点代表组内平均体重,误差线代表标准误(SEM)。
- [0228] 图19示出相对体重变化(%)。相对体重变化基于开始给药时动物体重计算得出。数据点代表组内平均体重变化百分比,误差线代表标准误(SEM)。
- [0229] 图20示出CloudmanS91同系移植瘤模型荷瘤鼠在给予2E5后的肿瘤生长曲线。数据点代表组内平均肿瘤体积,误差线代表标准误(SEM)。
- [0230] 图21示出CloudmanS91同系移植瘤模型荷瘤鼠在给予2E5后的生存曲线。

## 具体实施方式

[0231] 下面通过具体实施方式及实验数据对本发明作进一步的说明。尽管为了清楚的目的,在下文中使用了专用术语,但这些术语并不意味着定义或限制本发明的范围。

[0232] 如本文中所使用,术语“程序性死亡1”、“程序性细胞死亡1”、“蛋白PD-1”、“PD-1”、“PD1”、“PDCD1”、“hPD-1”和“hPD-F”可互换使用,并且包括变体、同种型、人PD-1的物种同源物和具有PD-1的至少一个共同表位的类似物。

[0233] 如本文中所使用,术语“抗体”包括完整抗体和任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或其单链。“抗体”是指包含至少两条重链(H)和两条轻链(L)并通过二硫键相互连接的,或其抗原结合部分的蛋白质。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域,CH1,CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区的。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可以进一步细分成高变区,称为互补决定区(CDR),与更保守的称为构架区(FR)的区域散布。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端以下面的顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。

[0234] 术语“抗体”,在本申请中所用的是指免疫球蛋白或其片段或它们的衍生物,并且包括其包含的抗原结合位点的任何多肽,而不管其是否是在体外或体内产生。该术语包括,但不限于,多克隆、单克隆、单特异性的、多特异性的、非特异性的、人源化、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂合的、突变的、嫁接的抗体。术语“抗体”还包括抗体片段例如Fab、F(ab')<sup>2</sup>、Fv、scFv、Fd、dAb和其它保留抗原结合功能的抗体片段,即,能够与PD-1的特异性结合。通常情况下,这样的片段将包括抗原结合片段。

[0235] 术语“抗原结合片段”、“抗原结合结构域”和“结合片段”是指一种抗体分子,其包含负责具体的抗体和抗原之间的结合的氨基酸。例如,其中的抗原是大的,抗原结合片段只结合抗原的一部分。即抗原分子中负责与抗原结合片段特异性相互作用的部分被称为“表位”或“抗原决定簇”。

[0236] 抗原结合片段通常包括抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH),然而,它不一定必须包括两者。例如,一个所谓的Fd抗体片段仅由VH结构域组成,但仍保留了完整抗体的一些抗原结合功能。

[0237] 上述术语“表位”定义为抗原决定簇,其特异性结合/识别结合片段。结合片段可以特异性与针对靶结构独特的构象或连续表位进行结合/反应,例如人类PD-1和鼠PD-1(小鼠或大鼠)。构象或不连续表位的特征在于多肽抗原在一级序列中是分离的两个或多个离散

的氨基酸残基,但多肽折叠成天然蛋白/抗原时是一起聚集在分子的表面上的。表位的两个或多个离散的氨基酸残基存在于一个或多个多肽链的独立部分。当多肽链折叠成三维结构,这些残基聚集在分子表面以构成表位。与此相反,由两个或多个离散的氨基酸残基组成的连续或线性表位,其存在于多肽链的单个线性区段。

[0238] 术语“结合PD-1的表位”是指抗体特异性结合PD-1的特定表位,其可通过直链氨基酸序列或PD-1的部分三维结构来定义结合。结合是指,对于PD-1的部分中的抗体的亲和力比其对其他相关多肽的亲和力显着更大。术语“基本上更大的亲和力”是指与其他相关多肽的亲和力相比,在对PD-1的部分的亲和性呈可测量的增加。优选地,对PD-1的特定部分的亲和力相比其他蛋白质至少是1.5倍,2倍,5倍10倍,100倍, $10^3$ 倍, $10^4$ 倍, $10^5$ 倍, $10^6$ 倍或更大。优选地,结合亲和力是通过酶联免疫吸附测定(ELISA),或通过荧光激活细胞分选(FACS)分析或表面等离子体共振(SPR)测定的。更优选地,结合特异性由荧光激活细胞分选(FACS)分析得到。

[0239] 本文中所描述的术语“交叉反应性”指的对人类和鼠相同靶分子的抗原片段的结合。因此,“交叉反应性”应被理解为与在不同物种中表达的相同分子X之间种属间反应。识别人PD-1、鼠PD-1(小鼠或大鼠)的单克隆抗体的交叉反应特异性可通过FACS分析确定。

[0240] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类动物、羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。除非指出时,术语“患者”或“受试者”可以互换使用。

[0241] 术语“治疗”和“治疗方法”是指治疗性治疗和预防性/预防措施。那些需要治疗的包括已具有特定医学病症,以及那些可能最终获得该病症的个体。

[0242] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0243] 实施例:

[0244] 实施例1实验材料准备

[0245] 1.抗原制备

[0246] 合成编码PD-1及PD-L1全长或胞外区的DNA,分别将其插入表达载体pcDNA3.3中。在大量抽提质粒DNA后测序验证插入DNA片段序列。融合蛋白PD-1胞外区及PD-L1胞外区含有不同标签,包括人源Fc,鼠源Fc及His标签等,通过将PD-1胞外区基因序列转染至CHO-S或HEK293细胞中表达得到。细胞瞬时转染5天后,收集细胞培养基上清,纯化及量化融合蛋白以用作免疫接种及筛选。

[0247] 2.稳定细胞系的建立

[0248] 为获得抗体筛选验证工具,制备了PD-1及PD-L1转染细胞系。简略地说,利用Lipofectamine 2000转染试剂根据生产商提供的实验步骤将包含PD-1或PD-L1全长的pcDNA3.3载体表达质粒转染进CHO-K1或293F细胞内。转染48-72小时后,将转染细胞培养在含有杀稻瘟菌素或G418的培养基内对染色体内插入PD-1或PD-L1基因的细胞进行筛选。同时,对细胞进行PD-1及PD-L1表达检验。一旦表达得到验证,即通过有限稀释法挑选单克隆并进行扩大化培养。建立的单克隆细胞系随后维持培养在含有较低剂量杀稻瘟菌素或G418抗生素的培养基内。

[0249] 实施例2抗体杂交瘤的产生

[0250] 1.免疫

[0251] 6至8周龄的雌性SD大鼠每只经由足底注射在10 $\mu$ g人PD-1胞外区蛋白和10 $\mu$ g小鼠PD-1胞外区(TiterMax中)蛋白致敏,随后每周分别用在磷酸铝凝胶佐剂中的人PD-1胞外区蛋白或小鼠PD-1胞外区蛋白经足底各免疫一次直至适合融合。免疫期间,每两周通过ELISA或FACS方法检测抗PD-1抗体的血清滴度。

[0252] 2. 细胞融合

[0253] 当抗体滴度达到足够高时,对大鼠给予最后的不含佐剂的免疫原(人PD-1胞外区蛋白和小鼠PD-1胞外区蛋白)激发(用等体积磷酸盐缓冲液(PBS)代替佐剂)。在融合前一周复苏SP2/0细胞,融合前以1:2传代至融合前一天,并保持细胞的指数生长。融合当天,在无菌条件下取出SD大鼠的淋巴结,并尽快将淋巴结处理成单细胞悬液,与骨髓瘤细胞SP2/0按1:1的比例混匀,用蛋白酶溶液处理后用胎牛血清终止反应,并用ECF溶液替换原溶液。细胞混合液经ECF溶液洗涤重悬,ECF中细胞密度为 $2 \times 10^6$ 个细胞/毫升。用BTX 2000电融合仪电融合后,立刻将细胞悬液从融合舱室中转移至含有更多溶媒的无菌试管中,在37℃孵育箱中孵育至少24小时。然后混合细胞悬液并按照 $1 \times 10^4$ 个细胞每孔的密度进行96孔板铺板。将融合后的细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下进行培养。当克隆培养7-14天后,克隆长至足够大时,从96孔板每孔转移100 $\mu$ L上清液用于抗体筛选测试。

[0254] 3. 杂交瘤上清液的第一次和第二次以及竞争确认筛选

[0255] 使用ELISA方法作为第一轮筛选方法以测试杂交瘤上清液与人PD-1蛋白或小鼠PD-1蛋白的结合。简言之,用1 $\mu$ g/mL的人PD-1胞外区蛋白或小鼠PD-1胞外区蛋白在4℃包被酶标板(Nunc)过夜。在封闭和洗涤后,将所述杂交瘤上清液转移至所述包被的酶标板并在室温下孵育1小时。之后洗涤所述酶标板并随后用山羊抗大鼠IgG Fc HRP(Bethyl)的二抗孵育1小时。洗涤后,加入TMB底物显色后用2M HCl终止反应。使用酶标仪(Molecular Device)读取450nm处的吸收光值。

[0256] 为了确认PD-1抗体与在细胞膜上表达的构象PD-1分子的天然结合,在人PD-1转染的CHO-S细胞系或小鼠PD-1转染的293F细胞系上进行FACS分析作为第二轮筛选。以 $1 \times 10^5$ 细胞每孔的密度将表达人PD-1的CHO-S细胞或表达小鼠PD-1的293F细胞转移至96孔U形底平板(Corning),随后将所述杂交瘤上清液转移至所述平板并在4℃条件下孵育1小时。用1×PBS/1%BSA洗液洗涤后,加入山羊抗大鼠FITC二抗(Jackson Immunoresearch Lab)并在4℃条件下与细胞避光孵育1小时。之后洗涤细胞并在1×PBS/1%BSA中重悬或在4%福尔马林中固定细胞,并以流式细胞仪(BD)和FlowJo软件进行结果分析。使用相同方法分别进行杂交瘤上清液与母本CHO-S细胞系或293F细胞系的结合。

[0257] 测试抗体对人PD-1/PD-L1结合阻断活性,作为确认筛选以选择潜在的目标抗体。通过FACS分析,测试所选择的杂交瘤上清液对配体PD-L1与转染人PD-1的CHO-S细胞的结合的阻断能力。以 $1 \times 10^5$ 细胞每孔的密度将表达人PD-1的CHO-S细胞转移至96孔U形底平板(Corning)中。随后将所述杂交瘤上清液转移至所述平板并在4℃条件下孵育1小时。用1×PBS/1%BSA洗液洗涤后,加入小鼠Fc融合的人PD-L1胞外区蛋白或小鼠Fc融合的小鼠PD-L1胞外区蛋白并在4℃条件下孵育1小时。洗涤后,加入山羊抗小鼠Fc FITC二抗(与大鼠IgG Fc没有交叉反应性,Jackson Immunoresearch Lab)并在4℃条件下与细胞避光孵育1小时。之后洗涤细胞并在1×PBS/1%BSA中重悬或在4%福尔马林中固定细胞,并以流式细胞仪(BD)和FlowJo软件进行结果分析。

[0258] 图1显示了16个杂交瘤抗体与细胞表面人PD-1或小鼠PD-1的结合,图1A显示了16个杂交瘤抗体与细胞表面人PD-1的结合;图1B显示杂交瘤抗体与细胞表面小鼠PD-1的结合。

[0259] 4. 杂交瘤亚克隆

[0260] 一旦通过第一轮、第二轮和竞争确认筛选验证了特异性结合和阻断之后,挑选阳性杂交瘤细胞系进行亚克隆。简言之,对于每个杂交瘤细胞系,将细胞计数并在克隆培养基中稀释至5细胞每孔、1细胞每孔和0.5细胞每孔。96孔板每孔加入200 $\mu$ L稀释后的克隆培养基,一个平板为5细胞每孔,一个平板为1细胞每孔,四个平板为0.5细胞每孔。将所有平板置于37°C、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养,直至所有细胞可以通过ELISA或FACS方法进行检测。检测方法同上所述,挑选阳性单克隆进行扩大培养,纯化的抗体进行下一步表征分析。

[0261] 5. 亚型测试

[0262] 用50 $\mu$ L每孔的山羊抗大鼠IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG或IgM抗体以1 $\mu$ g/mL的浓度分别包被酶标板(Nunc)过夜。封闭后,将50 $\mu$ L的杂交瘤上清液样品加入到每孔,室温孵育2小时。使用山羊抗大鼠IgG kappa或lambda轻链-HRP(Bethyl)的二抗作为检测抗体。使用TMB底物进行显色,用2M的HCl终止反应。用酶标仪(Molecular Device)读取450nM处的吸收光值。

[0263] 表3显示16个杂交瘤抗体的亚型结果,其中7个抗体为多克隆,其余9个抗体均为IgG2a kappa亚型。考虑到抗PD-1抗体需要避免在体内的ADCC及CDC作用,在人源化之后将抗体构建为人IgG4 kappa亚型。

[0264] 表3杂交瘤抗体的亚型

序号	抗体	kappa			
		IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM
1	W3052_r16.6.25	-	-	+	弱
2	W3052_r16.14.6	+	+	-	-
3	W3052_r16.14.16	-	+	-	+
4	W3052_r16.16.14	+	+	-	+
5	W3052_r16.53.26	+	+	-	-
6	W3052_r16.68.22	-	+	-	-
7	W3052_r16.68.41	-	+	-	-
8	W3052_r16.81.3	-	-	+	+
9	W3052_r16.88.9	-	+	-	-
10	W3052_r16.88.21	弱	+	-	-
11	W3052_r16.88.29	-	弱	-	-
12	W3052_r16.88.32	-	+	-	-
13	W3052_r16.114.2		+		
14	W3052_r16.114.8	-	+	-	-
15	W3052_r16.114.15	-	+	-	-
16	W3052_r16.114.39	-	+	-	-

[0265]

[0266] 实施例3抗体杂交瘤细胞测序、抗体的人源化构建和亲和力成熟

[0267] 1. 杂交瘤细胞抗体测序

[0268] 利用Trizol试剂分离单克隆杂交瘤细胞RNA。PD-1嵌合抗体的VH及VL段通过下述方法扩增：首先利用反转录酶通过如下方法将RNA反转录为cDNA，

[0269] 反应体系(20μL)

	10×RT 缓冲液	2.0 μL
	25×dNTP 混合物 (100 mM)	0.8 μL
	10×RT 随机引物/oligo dT/特异性引物	2.0 μL
[0270]	MultiScribe™ 反转录酶	1.0 μL
	RNA 酶抑制剂	1.0 μL
	RNA	2 μg
	去核酸酶的水 加至	20.0 μL

## [0271] 反应条件

[0272]		第一步	第二步	第三步	第四步
	温度 (°C)	25	37	85	4
	时间	10分钟	120分钟	5	∞

[0273] 所得cDNA作为模板,利用感兴趣基因的特异性引物进行以下PCR扩增。PCR反应操作如下:

	cDNA	1 μL
	Ex PCR 缓冲液	5 μL
	dNTP	2 μL
[0274]	ExTaq	0.5 μL
	P1 (25 pM)	0.5 μL
	P2 (25 pM)	0.5 μL
	ddH <sub>2</sub> O	40.5 μL

## [0275] 反应条件:

	94°C 3 分钟	
[0276]	94°C 30 秒	
	60°C 30 秒	}
		循环 30 次
	72°C 1 分钟	

## [0277] 72°C 10 分钟

[0278] 连接所得PCR反应产物(10μL)至pMD18-T载体。10μL连接产物转化至Top10感受态细胞内。利用M13-48及M13-47引物,采用PCR验证阳性克隆后测序。

[0279] 2.人源化抗体分子构建

[0280] 根据与PD-1结合的高亲和性和特异性选择来自杂交瘤的大鼠抗人PD-1抗体进行人源化,用于提高大鼠来源的抗体序列与人的抗体序列的同源程度。所述人源化使用称为CDR移植的技术进行。利用KABAT系统和IMGT系统进行抗体可变区基因的FR区和CDR区的划分。在抗体数据库中,结合序列同源性和结构相似性的比对结果,选择相近的人源的抗体可

变区的FR1-3区基因对鼠源的FR1-3区基因进行置换,选择结构最相近的人源的JH和JK基因对鼠源的FR4区基因进行置换。在验证模板序列和优化密码子后,将重链可变区和轻链可变区扩增并克隆进表达载体,进而表达人源化抗体。

[0281] 根据杂交瘤抗体与人和小鼠PD-1蛋白的结合能力的强弱,挑选W3052\_r16.88.9和W3052\_r16.81.3两个抗体进行人源化。经过人源化改造之后,综合不同抗体的人源化程度以及与人和小鼠PD-1蛋白的结合能力的强弱,挑选来源于亲本杂交瘤抗体W3052\_r16.88.9的人源化抗体W3052\_r16.88-z9-IgG4(42720)进行亲和力成熟(表4)。

[0282] 表4

抗体编号	FR1		FR2	FR3	FR4		人源化 分数		
	W3052_r1 6.88.hAb1 40798	WBP305_r1 6.88-hVH1- m	IGHV1-6 9*06	100%	100%	93.30%	IGHJ3 *01	100%	99.16%
[0283]									

	WBP305_r1 6.88-VL1	IGKV2-2 9*02	100%	100%	100%	IGKJ2 *01	100%	
W3052_r1 6.88.hAb2 40764	WBP305_r1 6.88-hVH2	IGHV1-6 9*06	100%	(IGHV 1-8*01) 100%	93.30%	IGHJ3 *01	100%	99.16%
	WBP305_r1 6.88-VL1	IGKV2-2 9*02	100%	100%	100%	IGKJ2 *01	100%	
W3052_r1 6.88.hAb3 40766	WBP305_r1 6.88-hVH3	IGHV1-6 9*06	100%	85.70%	93.30%	IGHJ3 *01	100%	97.38%
	WBP305_r1 6.88-VL1	IGKV2-2 9*02	100%	100%	100%	IGKJ2 *01	100%	
[0284] W3052_r1 6.88.hAb4 40770	WBP305_r1 6.88-hVH1	IGHV1-6 9*06	100%	100%	93.30%	IGHJ3 *01	100%	99.16%
	WBP305_r1 6.88-VL2	IGKV2-3 0*01	100%	100%	100%	IGKJ2 *01	100%	
W3052_r1 6.88.hAb5 40773	WBP305_r1 6.88-hVH2-m	IGHV1-6 9*06	100%	(IGHV 1-8*01) 100%	93.30%	IGHJ3 *01	100%	99.16%
	WBP305_r1 6.88-VL2	IGKV2-3 0*01	100%	100%	100%	IGKJ2 *01	100%	
W3052_r1 6.88.hAb6 40800	WBP305_r1 6.88-hVH3-m	IGHV1-6 9*06	100%	85.70%	93.30%	IGHJ3 *01	100%	97.38%
	WBP305_r1 6.88-VL2	IGKV2-3 0*01	100%	100%	100%	IGKJ2 *01	100%	
W3052_r1 6.88-z7-Ig G4 42691	WBP305_r1 6.88-hVH1	IGHV1-6 9*06	100%	100%	100%	IGHJ3 *01	100%	100%

	WBP305_r1 6.88-VL1	IGKV2-2 9*02	100%	100%	100%	IGKJ2 *01	100%	
W3052_r1 6.88-z8-Ig G4 42715	WBP305_r1 6.88-hVH2	IGHV1-6 9*06	100%	(IGHV 1-8*01) 100%	100%	IGHJ3 *01	100%	100%
	WBP305_r1 6.88-VL2	IGKV2-3 0*01	100%	100%	100%	IGKJ2 *01	100%	
W3052_r1 6.88-z9-Ig G4 42720	WBP305_r1 6.88-hVH3	IGHV1-6 9*06	100%	85.70%	100%	IGHJ3 *01	100%	98.20%
	WBP305_r1 6.88-VL2	IGKV2-3 0*01	100%	100%	100%	IGKJ2 *01	100%	
[0285] W3052_r1 6.81.hAb1 40779	WBP305_r1 6.81-VH1	IGHV3-7 *03	100%	100%	100%	IGHJ1 *01	100%	100%
	WBP305_r1 6.81-VL1	IGKV1D- 16*02	100%	100%	100%	IGKJ4 *01	100%	
W3052_r1 6.81.hAb2 40781	WBP305_r1 6.81-VH2	IGHV3-9 *01	100%	100%	100%	IGHJ1 *01	100%	100%
	WBP305_r1 6.81-VL1	IGKV1D- 16*02	100%	100%	100%	IGKJ4 *01	100%	
W3052_r1 6.81.hAb3 40784	WBP305_r1 6.81-VH1	IGHV3-7 *03	100%	100%	100%	IGHJ1 *01	100%	100%
	WBP305_r1 6.81-VL2	IGKV1-3 9*01	100%	100%	100%	IGKJ4 *01	100%	
W3052_r1 6.81.hAb4 40787	WBP305_r1 6.81-VH2	IGHV3-9 *01	100%	100%	100%	IGHJ1 *01	100%	100%

[0286]		WBP305_r1 6.81-VL2	IGKV1-3 9*01	100%	100%	100%	IGKJ4 *01	100%	
--------	--	-----------------------	-----------------	------	------	------	--------------	------	--

[0287] 3. 亲和力成熟

[0288] 通过杂交突变的方法将人源化抗体的重链CDR3区、轻链CDR1区和CDR3区的每一个氨基酸分别突变为其它20个氨基酸。用含有编码20个氨基酸的NNS密码子的DNA引物向每个目标的CDR的位置引入突变。在杂交突变反应使用单个简并引物。简要地说，各个简并引物是磷酸化的，然后以10:1的比例与尿苷化(uridylated)的ssDNA使用。将混合物加热至85°C、5分钟，然后在1小时内冷却至55°C。此后，加入T4连接酶和T4 DNA聚合酶，并将混合物在37°C孵育1.5小时。VH和VL的CDR的合成产品，分别合并。通常情况下，将200ng合并文库DNA电转化入BL21，以形成BL21菌苔或生产scFv片段的菌斑。

[0289] 主要筛选包括使用生长在96孔板(深孔)的细菌的周质提取物(PE)的单点ELISA(SPE)测定的。简言之，该捕获ELISA包括用pH 9.2包被缓冲液(200毫摩尔碳酸钠/碳酸氢钠)中的抗c-myc的抗体包被96孔Maxisorp免疫板的各孔4°C过夜。第二天，用酪蛋白将板在室温下封闭1小时。然后scFv的PE加入到板中并在室温下温育1小时。洗涤后，将生物素化的抗原蛋白被加入到孔中，并将该混合物温育在室温下1小时。随后用链霉亲和素-HRP偶合物在室温下温育1小时。用TMB底物检测HRP活性，并用2M盐酸终止反应。用酶标仪(Molecular Device)读取450nm处的吸收光值。挑取在450nm呈现的吸光度值高于母本抗体的克隆再次进行ELISA检测进行确认，结果为阳性。对重复表现比亲本抗体信号更大的克隆进行测序。有CDR改变的克隆的scFv蛋白质浓度然后通过定量scFv ELISA方法确定，其中用已知的浓度的scFv作为参照。所述scFv蛋白质浓度用ELISA信号与参照的scFv产生的信号进行比较来确定。为了确定突变的scFv与亲本抗体的相对结合亲和力，再重复一次标准化的scFv浓度下的所有阳性变体的结合测定法。

[0290] 确定对结合抗原是有利的VH和VL的点突变进一步结合以获得另外的结合协同作用。该组合突变体表达为scFv，并使用捕捉ELISA筛选。挑选吸光度值高于母本抗体的克隆进行测序并进一步通过ELISA方法确定其亲和力。

[0291] 图2是第一轮突变文库筛选的结果。经亲和力成熟第二轮筛选后获得2E5、2G4、1G10、2C2、2B1、8C10、1H6、5C4、A6W和L1I共10个人源化抗体，其与人、食蟹猴和小鼠的亲和力数据和具体CDR序列如表5所示。

[0292] 表5是第二轮突变文库筛选结果。其中综合这些抗体与人、食蟹猴和小鼠的PD-1的亲和力结果，挑选1H6、2E5、2G4和2C2四个抗体进行进一步表征。

[0293] 表5

抗体	重链可变区 CDR3	轻链可变区 CDR1	轻链可变区 CDR3	Bmax (人)	Kd (人)	Bmax (小鼠)	Kd (小鼠)	Bmax (食蟹猴)	Kd (食蟹猴)	
[0294]	2E5	I	LDSDGGTYLYW	MQLTHWPYTFGQ	3.279	0.0675	0.4696	0.0443	1.72	0.1088
	2G4	I	LDSDGSTYLYW	MQLTHWPYTFGQ	3.371	0.0708	0.4793	0.0426	1.718	0.1057
	1G10	L	LDSDGATYLYW	MQLTHWPYTFGQ	2.600	0.0711	0.2997	0.0718	1.082	0.1224
	2C2	I	LDSDGATYLYW	MQLTHWPYTFGQ	3.175	0.082	0.416	0.049	1.668	0.116
	2B1	I	LDSDGNTYLYW	MQLTHWPYTFGQ	3.019	0.0912	0.3393	0.0346	1.207	0.1142
	8C10	I	LDSDGQTYLYW	MQLTHENYTFGQ	2.307	0.104	0.437	0.038	1.109	0.280
	1H6	L	LDSDGGTYLYW	MQLTHWPYTFGQ	3.348	0.1114	0.2213	0.0466	0.3171	0.0977
	5C4	L	LDSDGQTYLYW	MQLTHEPYTFGQ	2.649	0.236	0.164	0.027	0.258	0.292
	A6W	L	LDSDGNTYLYW	MQLTHWPYTFGQ	2.571	0.2885	0.1736	0.0294	0.0787	0.0016
	LII	I	LDSDGNTYLYW	MQLTHAPYTFGQ	1.048	1.8370	0.1048	0.0050	0.05175	N/A

[0295] 4. 抗体纯化

[0296] 使用含有亲和力成熟的人源化抗体的DNA载体转染293F细胞, 用于抗体的表达和生产。在293F细胞培养上清液中的抗体使用蛋白A亲和层析柱纯化。

[0297] 实施例4人源化抗体的表征

[0298] 1. 与人、小鼠、食蟹猴PD-1的结合实验

[0299] 1.1 FACS测定的结合实验

[0300] 为了检验抗体与细胞表面PD-1蛋白的结合能力, 将不同浓度的抗体与表达人PD-1的CHO-S细胞或表达小鼠PD-1的293F细胞或活化的食蟹猴PBMC在4℃条件下孵育1小时。洗涤后, 使用FITC标记的山羊抗人IgG Fc二抗(Jackson Immunoresearch Lab)检测抗体与细胞的结合。随后用流式细胞仪(BD)和FlowJo软件进行结果分析。具体实验步骤见实施例2的第3部分。

[0301] 图3A显示人源化抗体与细胞表面人PD-1的结合曲线, 抗体以2.20~2.78nM的EC50特异性地与人PD-1结合。图3B显示人源化抗体与细胞表面小鼠PD-1的结合曲线, 抗体以11.8~15.1nM的EC50特异性地与小鼠PD-1结合。图3C显示人源化抗体与活化的食蟹猴PBMC的结合具有剂量依赖的关系。同型对照是人IgG4 kappa。下同。

[0302] 1.2 与人、小鼠、食蟹猴PD-1的物种交叉反应试验

[0303] 用ELISA方法测定抗体对食蟹猴和小鼠PD-1蛋白的交叉反应。将1μg/mL的人、食蟹猴和小鼠的PD-1胞外区蛋白(Sino Biological)分别包被酶标板(Nunc)于4℃过夜。封闭后, 将人源化抗体加入板中并在室温孵育1小时。用山羊抗人IgG Fc-HRP(Bethyl)作为二抗检测抗体与包被的抗原的结合。使用TMB底物进行显色, 用2M HC1终止反应。用酶标仪(Molecular Device)读取450nm处的吸收光值。

[0304] 图4示出了抗体与人、小鼠、食蟹猴PD-1的物种交叉反应试验ELISA的结果, 人源化PD-1抗体与人、食蟹猴和小鼠的PD-1蛋白以剂量依赖的形式结合。图4A是人源化PD-1抗体

与人PD-1蛋白的结合;图4B是人源化PD-1抗体与小鼠PD-1蛋白的结合;图4C是人源化PD-1抗体与食蟹猴PD-1蛋白的结合

[0305] 2与PD-1家族CD28、CTLA4的交叉反应试验

[0306] 用FACS方法检测人源化抗体与PD-1同家族的CD28和CTLA-4蛋白的交叉反应。简言之,将构建好的表达人PD-1的CHO-S细胞、表达人CD28的CHO-K1细胞或表达人CTLA-4的293F细胞接种于96孔U型底的板(BD)中,细胞密度为每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞。将测试抗体稀释到洗涤液(1×PBS/1%BSA)并与表达人PD-1的CHO-S细胞、表达人CD28的CHO-K1细胞或表达人CTLA-4的293F细胞在4℃下分别孵育1小时。洗涤细胞后,加入FITC标记的山羊抗人IgG Fc(Jackson Immunoresearch Lab)二抗,4℃下避光孵育1小时。然后洗涤细胞一次,用1×PBS/1%BSA重悬细胞,用流式细胞仪(BD)和FlowJo软件进行结果分析。

[0307] 图5显示了人源化抗体与PD-1同家族的CD28和CTLA-4蛋白的交叉反应结果。结果显示,抗体特异性结合PD-1,但不与PD-1同家族的CD28和CTLA-4结合。

[0308] 3. 竞争实验

[0309] 3.1用FACS检测PD-1抗体封闭PD-L1结合PD-1的能力

[0310] 为了检验人源化抗体是否能够阻断PD-L1与PD-1的结合,将表达人PD-1的CHO-S细胞或表达小鼠PD-1的293F细胞在4℃下与不同浓度的抗体孵育1小时。将未结合的抗体洗掉,然后分别加入小鼠Fc标记的人或小鼠PD-L1蛋白。4℃孵育1小时后,使用FITC标记的山羊抗小鼠IgG Fc二抗(Jackson Immunoresearch Lab)检测配体PD-L1与表达PD-1的细胞的结合,随后用流式细胞仪(BD)和FlowJo软件进行结果分析。

[0311] 3.2用ELISA方法检测人源化抗体是否能够阻断PD-L2与PD-1的结合

[0312] 简言之,用1μg/ml的人PD-1胞外区蛋白在4℃包被酶标板(Nunc)过夜。在封闭和洗涤后,稀释不同浓度的人源化抗体与恒定浓度的His标签的PD-L2胞外区蛋白预先混合后加入到所述包被的酶标板并在室温下孵育1小时。之后洗涤所述酶标板并随后加入山羊抗His HRP(GenScript)的二抗孵育1小时。洗涤后,加入TMB底物显色后用2M HC1终止反应。使用酶标仪(Molecular Device)读取450nm处的吸收光值。

[0313] 图6A显示了人源化抗体阻断人PD-L1与CHO-S细胞表面的人PD-1的结合,图6B显示了人源化抗体阻断小鼠PD-L1与293F细胞表面的小鼠PD-1的结合。图7显示了人源化抗体阻断人PD-L2与PD-1蛋白的结合,且阻断作用具有剂量依赖性。

[0314] 4. 表面等离子共振(SPR)测定的亲和力试验

[0315] 通过SPR法使用ProteOn XPR36(Bio-Rad)对抗体与PD-1的亲和性和结合动力学进行表征。将蛋白A蛋白(Sigma)通过胺偶联固定于GLM传感芯片上(Bio-Rad)。使纯化的抗体流过传感器芯片并被蛋白A捕获。将芯片旋转90°并用电泳缓冲液洗涤(1×PBS/0.01%Tween20,Bio-Rad)直至基线稳定。使7个浓度的人PD-1蛋白和电泳缓冲液以流速30μL/分钟流经所述抗体流动单元,先为结合相流动180s,随后解离相300s。在每次运行后用pH 1.5的H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>再生所述芯片。使用ProteOn软件将结合和解离曲线拟合至1:1的Langmuir结合模型。抗体与小鼠PD-1蛋白的亲和力测试方法同上。

[0316] 表6显示的是表面等离子体共振检测的人源化PD-1抗体对重组人或重组小鼠PD-1的亲和力的结果。对照抗体1(WBP305BMK1)根据BMS专利US9084776B2中的5C4序列合成,即BMS公司已上市抗PD-1药物Opdivo;对照抗体2(Keytruda)为Merck公司已上市抗PD-1药物

Keytruda。下同。如表6A所示,通过使用表面等离子体共振检测的人源化PD-1抗体对重组人PD-1的亲和力为从1.43E-8到5.64E-9mol/L。与WBP305BMK1和Keytruda相比,本申请中抗体的 $K_D$ 值更小,说明了2E5、2G4、2C2有更好的结合人PD-1的能力。如表6B所示,通过使用表面等离子体共振检测的人源化PD-1抗体对重组小鼠PD-1的亲和力为从9.37E-9到3.89E-9mol/L。

[0317] 表6A

分析物	抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	U-value
[0318] hPD-1.His	1H6	6.44E+05	9.18E-03	1.43E-08	0.05	1
	2E5	5.97E+05	3.66E-03	6.13E-09	0.14	1
	2G4	6.63E+05	4.70E-03	7.09E-09	0.10	1
	2C2	7.33E+05	4.14E-03	5.64E-09	0.03	1
	W3052-16.88.z9-IgG4 (42720)	3.82E+06	1.36E-01	3.56E-08	0.03	5
	WBP305BMK1	4.02E+05	1.35E-03	3.37E-09	0.01	1
	Keytruda	8.79E+05	2.28E-03	2.59E-09	0.07	1

[0319] 表6B

分析物	抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )	U-value
[0320] mPD-1.His	1H6	3.20E+05	3.00E-03	9.37E-09	0.06	1
	2E5	3.23E+05	1.29E-03	3.99E-09	0.01	1
	2G4	3.34E+05	1.30E-03	3.89E-09	0.01	1
	2C2	2.21E+05	1.53E-03	6.92E-09	0.19	1
	W3052-16.88.z9-IgG4 (42720)	1.95E+05	8.09E-03	4.16E-08	0.01	1

##### [0321] 5.FACS测定抗PD-1抗体与细胞表面PD-1分子的亲和力试验

[0322] 将表达人PD-1的CHO-S细胞或表达小鼠PD-1的293F细胞以每孔 $1 \times 10^5$ 个细胞密度接种于96孔U型底的板(BD)中。将测试抗体用洗涤液(1×PBS/1%BSA)以1:2系列稀释,并与细胞在4℃下孵育1小时。加入山羊抗人IgG Fc-FITC二抗(每摩尔IgG中3.0摩尔FITC, Jackson Immunoresearch Lab)并在4℃下避光孵育1小时。随后洗涤一次细胞并在1×PBS/1%BSA中重悬,使用流式细胞术(BD)分析。基于quantitative beads Quantum<sup>TM</sup> MESF Kit (Bangs Laboratories, Inc.), 荧光强度将被转换为与相关分子/细胞。使用Graphpad Prism5计算 $K_D$ 。

[0323] 如表7A-7B所示,通过使用FACS方法检测的人源化PD-1抗体对CHO-S细胞表面人PD-1的亲和力,结果显示人源化PD-1抗体对CHO-S细胞表面人PD-1的亲和力从3.80E-10到2.15E-10mol/L。人源化PD-1抗体对293F细胞表面小鼠PD-1的亲和力为从5.39E-08到1.74E-08mol/L。

[0324] 表7A

抗体	Best fit-KD (M)
1H6	2.15E-10
2E5	2.30E-10
2G4	3.80E-10
2C2	2.64E-10
母本抗体 W3052-16.88.z9-IgG4 (42720)	4.32E-10
对照抗体 1 WBP305BMK1	2.62E-10
对照抗体 2 Keytruda	1.79E-10

[0326] 表7B

抗体	Best fit-KD (M)
1H6	5.39E-08
2E5	2.90E-08
2G4	3.51E-08
2C2	1.74E-08
母本抗体 W3052-16.88.z9-IgG4 (42720)	1.67E-08

[0328] 6. 抗原表位测试

[0329] FACS测定抗原表位竞争试验:该实验主要是为了找出所述抗体是否结合相同、相近或完全不同的抗原表位。为了检查人源化抗体与对照抗体是否结合相同的抗原表位,将表达人PD-1的CHO-S细胞与测试抗体(用洗涤缓冲液系列稀释)和生物素标记的对照抗体A或B(1μg/mL)的混合液在4℃下孵育1小时。洗涤细胞,加入PE连接的链霉亲和素作为二抗,4℃下孵育30分钟。洗涤细胞一次并用1×PBS/1%BSA重悬细胞,随后用流式细胞仪(BD)和FlowJo软件进行结果分析。

[0330] 图8A-8B结果显示抗原表位测试结果显示人源化PD-1抗体与对照抗体结合于相同或相近的抗原表位。图8A显示与对照抗体1(WBP305BMK1)竞争的表位,图8B显示与对照抗体2(Keytruda)竞争的表位。

[0331] 此外,还进一步对人源PD-1(hPD-1)进行了丙氨酸扫描实验以评测其对抗体结合的影响。将hPD-1中的丙氨酸残基突变成甘氨酸密码子,并将其余残基突变成丙氨酸。利用两步连续PCR法对hPD-1胞外域每个残基进行点突变替换。第一步PCR以含有hPD-1胞外域及C-端His标签编码序列的pcDNA3.3-hPD-1\_ECD.His质粒为模板,使用了QuikChange lightning多点突变试剂盒(Agilent technologies,Palo Alto,CA)及突变引物。在突变链合成反应后,利用DpnI核酸内切酶酶解母版。第二步PCR扩增了包含有CMV启动子,PD-1胞外

结构域(ECD), His标签及单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核昔激酶(TK)聚腺昔酸化的线性DNA并将其在HEK293F细胞中瞬时表达(Life Technologies, Gaithersburg, MD)。

[0332] 用单克隆抗体W3052\_r16.88.9及Keytruda包被的板进行免疫酶联吸附(ELISA)结合试验。在与含有定量的PD-1突变体或人源/鼠源His-标签PD-1胞外结构域蛋白(Sino Biological,中国)的上清结合后,加入HRP耦联的抗His抗体作为检测抗体。将吸光度根据对照突变体的平均吸光度进行标准化。在对结合改变倍数设定了额外的临界值(<0.55)后,发现最终决定簇的抗原表位残基。

[0333] 针对抗体W3052\_r16.88.9及Keytruda对人源及鼠源PD-1的结合作用进行了检测(图9)。我们的首位抗体W3052\_r16.88.9被发现可同时结合hPD-1及鼠源PD-1(mPD-1),而Keytruda仅结合hPD-1(图9)。该W3052\_r16.88.9特有的功能性交叉反应可以帮助在药物安全性评估的临床前研究中提供更多动物模型的选择。为探究上述观察到的结合行为的成因,我们进行了抗原表位图谱鉴定。

[0334] 表8显示了30个点替换的hPD-1突变体显著降低了和抗体的结合。通过对在hPD-1晶体结构(PDB码3RRQ及4ZQK)上所有这些残基的位置检验,发现一些氨基酸(如Val1144、Leu142、Val1110、Met108、Cys123等)被完全包埋在蛋白质内,不可能与抗体形成直接接触。所发现的结合性降低极有可能是由丙氨酸替代后引起的hPD-1结构不稳定甚或是结构坍塌导致。根据抗原结构分析,一些残基并不参与结合作用,但是预计会响应hPD-1的结构稳定性,如V144及L142。此外可同时影响两个抗体的突变被认为是假热点,并从列表中移除。在对结合改变倍数设定了额外的临界值(<0.55)后,最终确定的抗原残基列于表9。其中,9个位置对应W3052\_r16.88.9,5个对应Keytruda。

[0335] 表9中W3052\_r16.88.9及Keytruda的抗原氨基酸比较显示仅有两个残基热点存在重合,其余的看上去非常分散,显示两抗体在hPD-1结合及hPD-L1封闭上采用了不同机制。读取图8中的残基ID并不能直接阐释该机制。因此,为更好的进行显示及比较,所有表9中的数据及hPD-L1结合位点均在hPD-1晶体结构中进行了映射比对(图10)

[0336] 表8.PD-1点突变对抗体结合的影响

	PD-1			PD-1		
	残基号	W3052_r16.88.9		残基号	Keytruda	
		改变倍数 <sup>a</sup>	SD		改变倍数 <sup>a</sup>	SD
[0337]	V 144	0.09	0.01	P 89	0.18	0.02
	L 142	0.21	0.01	D 85	0.38	0.01
	K 131	0.27	0.02	V 144	0.4	0.01
	P 35	0.31	0	R 94	0.46	0.04
	A 129	0.34	0	F 106	0.47	0.05
	V 64	0.34	0	K 78	0.48	0
	P 83	0.38	0.03	P 83	0.5	0.01

	L 128	0.39	0.01	D 92	0.5	0.02
	<u>S 137</u>	0.42	0.01	<u>P 39</u>	0.54	0
	<u>F 95</u>	0.42	0.01	A 81	0.57	0.01
	P 130	0.44	0.01	<u>C 123</u>	0.57	0.01
	<u>C 123</u>	0.44	0.01	N 66	0.57	0.03
	<u>R 94</u>	0.49	0.04	<u>L 142</u>	0.59	0.01
	<u>M 108</u>	0.49	0.02	F 82	0.61	0.03
	<u>D 117</u>	0.51	0.01	<u>F 95</u>	0.61	0.04
	F 82	0.53	0.02	<u>F 52</u>	0.63	0.01
	A 132	0.54	0.02	<u>M 108</u>	0.64	0.06
	<u>V 110</u>	0.54	0.02	L 128	0.68	0.01
[0338]	<u>N 49</u>	0.55	0.01	I 126	0.72	0.01
	<u>W 67</u>	0.55	0.01	<u>A 113</u>	0.72	0.01
	E 61	0.56	0.04	<u>V 110</u>	0.73	0.04
	N 102	0.57	0.04	G 47	0.73	0.01
	<u>P 39</u>	0.57	0.01	<u>D 117</u>	0.73	0.07
	I 126	0.59	0.04	N 49	0.73	0
	<u>A 113</u>	0.6	0.01	S 87	0.74	0.06
	<u>F 52</u>	0.61	0.02	L 42	0.76	0.01
	H 155	0.62	0.04	N 102	0.76	0.01
	R 86	0.64	0.08	W 67	0.81	0.01
	A 149	0.64	0	P 101	0.81	0.04
	G 47	0.64	0.03	A 80	0.82	0.01

[0339] <sup>a</sup>结合作用改变倍数为多个丙氨酸沉默替代的相对值

[0340] 表9.潜在抗原表位的发现

	PD-1 对 r16.88.9	残基位置	PD-1 对 Keytruda	残基位置
[0341]	P 35	A	K 78	C'
	V 64	C	P 83	C'
	F 82	C'	D 85	C''

	P 83	C'	P 89	C''
	L 128	FG	D 92	C''D
[0342]	A 129	FG		
	P 130	FG		
	K 131	FG		
	A 132	FG		

[0343] 临界值:改变倍数<0.55

[0344] \*mPD-1中观察到的C''链不存在于hPD-1结构中。此β-折叠片层结构在hPD-1中被一个无结构环状区替代。为更便于跟mPD-1进行比对,我们仍用C''标记该区域。

[0345] 虽然都具有hPD-1结合及hPD-L1封闭功能,两个研究的抗体W3052\_r16.88.9及Keytruda有明显相异的抗原表位(图10B,10C)。Keytruda抗原表位主要由C' D环状区所贡献(对应mPD-1C''链),与PD-L1结合位点完全不相交。这提示Keytruda的hPD-L1封闭功能更依赖于其抗体大小造成的空间位阻效应。相对而言,表面图谱结果显示W3052\_r16.88.9的抗原表位由多区域分布的热点组成,并与hPD-L1的结合位点有直接重叠(图10A,10B)。W3052\_r16.88.9通过与hPD-L1竞争其共有结合位点封闭hPD-L1。此外,W3052\_r16.88.9不与C' D灵活性环状区(或mPD-1对应的C''链)相互作用,该区在人源及鼠源PD-1中显示出很大结构偏差(图11)。它的主要作用点在FG环状区(Lin et al. (2008) PNAS 105:3011-3016)上。这解释了为何W3052\_r16.88.9可以结合两种来源PD-1,而Keytruda仅能结合人源PD-1(图9)。由于该特有的功能性交叉反应,W3052\_r16.88.9的临床前安全评估可在小鼠模型中开展,从而极大的简化及加速其开发过程。总而言之,W3052\_r16.88.9预测会比Keytruda更具功能性及开发性。

[0346] 7.通过细胞实验测定PD-1抗体的体外功能

[0347] 为了估测人源化抗体调节T细胞响应(包括细胞因子产生和细胞增殖)的能力,使用经亲和力成熟的人源化PD-1抗体以及对照抗体进行了以下三个实验。

[0348] 7.1同种异体混合淋巴细胞反应MLR用于检测抗体对T细胞功能的作用

[0349] 人DC细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞和全部T细胞的分离:使用Ficoll-Paque PLUS (GE) 梯度离心从健康供体新鲜分离人PBMC细胞。使用人单核细胞富集试剂盒(StemCell),根据说明从健康供体中分离单核细胞。在包含rhGM-CSF和rhIL-4的培养基培养细胞5-7天以诱导成树突细胞(DC)。MLR之前18至24小时,添加1μg/mL LPS至培养基以诱导DC细胞的成熟。使用人CD4<sup>+</sup>T细胞富集试剂盒(StemCell),根据说明书分离人CD4<sup>+</sup>T细胞。使用小鼠CD4<sup>+</sup>T细胞富集试剂盒(StemCell),根据说明书从Balb/c小鼠的脾脏分离小鼠CD4<sup>+</sup>T细胞。从C57BL/6小鼠的骨髓细胞经过包含rmGM-CSF和rmIL-4的培养基培养5-7天诱导为DC细胞。MLR之前18至24小时,添加1μg/mL LPS至培养基以诱导DC细胞的成熟。

[0350] 简言之,主要的树突细胞(DC)刺激MLR在含有10%FCS和1%的抗生素的200微升RPMI1640的96-孔U形底组织培养板中进行。在存在或不存在测试抗体或基准的抗体的条件下,DC细胞和1×10<sup>5</sup>个CD4<sup>+</sup>T细胞混合,DC细胞与T细胞比例在1:10和1:200之间(从166.75nM以下至0.00667nM,通常共六个浓度)。要确定抗PD-1对T细胞功能的效果时,测定细胞因子的产生和T细胞增殖。所示结果代表至少进行了五次实验。

[0351] 因子检测:通过使用匹配的抗体采用酶联免疫吸附测定(ELISA)测定人IFN- $\gamma$ 和IL-2。将平板分别预包被有特异于人IFN- $\gamma$ 的捕获抗体(cat#Pierce-M700A)或IL-2(cat#R&D-MAB602)。生物素偶联的抗IFN- $\gamma$ 抗体(cat#Pierce-M701B)或抗IL-2抗体(cat#R&D-BAF202)用作检测抗体。

[0352] 如图12A所示,所有待测的抗PD-1抗体以剂量依赖的方式增加了IL-2的分泌。图12B示出了抗PD-1抗体以剂量依赖的方式增加了IFN- $\gamma$ 的分泌。

[0353] 增殖实验:3H胸昔(cat#PerkinElmer-NET027001MC)用0.9%NaCl溶液1:20进行稀释,以每孔0.5uCi加入到细胞培养板中。3H-胸昔掺入增殖细胞测定之前,该板在5%CO<sub>2</sub>,在37°C条件下培养16到18小时。如图12C所示,所有待测的抗PD-1抗体均以剂量依赖的方式提高T细胞的增殖水平。

[0354] 为了检测所述人源化抗PD-1抗体对MLR中的小鼠T细胞增殖的作用,人源化抗体对MLR中的小鼠IL-2和IFN- $\gamma$ 的产生以及小鼠T细胞增殖的作用检测方法同上所述。如图13A所示,所有待测的抗PD-1抗体以剂量依赖的方式增加了IL-2的分泌。图13B示出了抗PD-1抗体以剂量依赖的方式增加了IFN- $\gamma$ 的分泌。图13C所示,所有待测的抗PD-1抗体均以剂量依赖的方式提高T细胞的增殖水平。

[0355] 7.2自体抗原特异性免疫应答下PD-1抗体对细胞增殖和因子产生的作用

[0356] 从相同的CMV+供体中分离CD4 $^{+}$ T细胞和DC细胞。简言之,CD4 $^{+}$ T细胞从PBMC中纯化,并在CMV pp65多肽和低剂量IL-2(20U/mL)存在下培养。同时依照前述方法通过培养单核细胞获得DC。5天后,用pp65多肽加入DC细胞于37°C预孵育1小时,随后在人源化抗体或对照抗体存在或不存在条件下,将DC加入至CD4 $^{+}$ T细胞。在第5天用ELISA方法测定培养上清液中的IFN- $\gamma$ 水平。CMVpp65特异性CD4 $^{+}$ T细胞的增殖通过如前所述的3H胸昔掺入法测定。

[0357] 图14A-14B显示了人同种混合淋巴细胞反应(MLR)的结果,证明PD-1抗体可以增强人CD4 $^{+}$ T细胞的功能。图14A显示了人源化PD-1抗体提高了在特异性T细胞响应中IFN- $\gamma$ 的产生。图14B显示了人源化PD-1抗体增加了使用CMV pp65多肽负载的自体DC浓度依赖的CMV+CD4 $^{+}$ T细胞的增殖。

[0358] 7.3人抗PD-1抗体对调节性T细胞(Treg)的抑制功能

[0359] 调节性T细胞(Treg)是T细胞的一类亚群,是关键免疫调节因子,在维持自身耐受中起到重要作用。CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg细胞与肿瘤相关,这是由于在多发性癌症患者中发现Treg数量增加,并与较差的预后相关。为了直接估测PD-1人源化抗体在抑制Treg抑制功能中的作用,在人源化抗体或对照抗体存在或不存在条件下,比较Treg的功能。简言之,CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg细胞和CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T细胞通过抗CD25特异性微磁珠(StemCell)方法和产品说明书分离,用2000个DC细胞、 $1 \times 10^5$ 个CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg细胞和 $1 \times 10^5$ 个CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T细胞、PD-1抗体在96孔板中共培养。平板在37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下共培养5天。用前述方法测量IFN- $\gamma$ 细胞因子的产生和T细胞增殖。

[0360] 图15证明了PD-1抗体可以逆转Treg的抑制功能。图15A显示PD-1抗体恢复了IFN- $\gamma$ 的分泌。图15B显示PD-1抗体恢复了效应T细胞的增殖。

[0361] 8.ADCC/CDC测试

[0362] 由于人PD-1表达于多种细胞类型,为了将对健康PD-1阳性免疫细胞的不需要的毒性减小到最低,验证了选择的人源化PD-1抗体没有ADCC和CDC功能。

[0363] 8.1 ADCC检测

[0364] 将靶细胞(活化的CD4<sup>+</sup>T细胞)和不同浓度的人源化抗体在96孔板中预孵育30分钟,随后以效应细胞/靶细胞50:1的比例加入PBMC(效应细胞)。将所述96孔板在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育6小时。通过细胞LDH毒性检测试剂盒(罗氏)测定靶细胞的裂解。使用酶标仪(Molecular Device)读取492nm处的吸收光值。赫赛汀(罗氏)和人乳腺癌细胞系SK-Br-3(HER2阳性)作为阳性对照。

[0365] 图16显示,利用PBMC作为天然杀伤细胞(NK)的来源并将表达高水平PD-1的活化的CD4<sup>+</sup>T细胞作为靶细胞,人源化PD-1抗体不介导ADCC作用。

[0366] 8.2 CDC检测

[0367] 将靶细胞(活化的CD4<sup>+</sup>T细胞)、稀释的人血清补体(Quidel-A112)和不同浓度的人源化抗体在96孔板中混合。将所述96孔板在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育4小时。使用CellTiterGlo(Promega-G7573)测定靶细胞裂解。利妥昔单抗(罗氏)和人CD20阳性细胞系Ramos作为阳性对照。

[0368] 图17显示了靶细胞(活化的CD4+T细胞)、稀释的人血清补体(Quidel-A112)和不同浓度的人源化PD-1抗体混合孵育4小时后,使用CellTiterGlo(Promega-G7573)测定靶细胞的裂解。数据显示人源化PD-1抗体不介导CDC作用。

[0369] 实施例5人PD-1单克隆抗体在体内肿瘤模型中的治疗

[0370] 1.实验设计

[0371] 表10.2E5体内药效实验动物分组及给药方案

组别	N <sup>1</sup>	化合物治疗	剂量 (mg/kg)	给药体积 参数 (μL/g) <sup>2</sup>	给药途径	给药频次
[0372]	1	6	Vehicle	--	IP	Q3D×5
	3	6	2E5	1 mg/kg	IP	Q3D×5
	4	6	2E5	3 mg/kg	IP	Q3D×5
	5	6	2E5	10 mg/kg	IP	Q3D×5

[0373] 注:

[0374] 1.N:每组小鼠数目

[0375] 2.给药容积:根据小鼠体重10μL/g。如果体重下降超过15%,给药方案应做出相应调整。

[0376] 2.实验方法与步骤

[0377] 2.1细胞培养

[0378] 细胞培养:鼠黑色素瘤CloudmanS91细胞(ATCC-CCL-53.1)体外单层培养,培养条件为F-12K培养基中加2.5%胎牛血清和15%马血清,100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养培养。一周两次用胰酶-EDTA进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为80% -

90%，数量到达要求时，收取细胞、计数、接种。

[0379] 2.2肿瘤细胞接种

[0380] 将0.1mL ( $5 \times 10^5$ 个) CloudmanS91细胞皮下接种于每只小鼠的右后背，肿瘤平均体积达到约64mm<sup>3</sup>时开始分组给药。实验分组和给药方案见表10。

[0381] 2.3肿瘤测量和实验指标

[0382] 实验指标是考察肿瘤生长是否被抑制、延缓或治愈。每周三次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为： $V = 0.5a \times b^2$ , a和b分别表示肿瘤的长径和短径。

[0383] 化合物的抑瘤疗效能TGI (%) 或相对肿瘤增殖率T/C (%) 评价。TGI (%) , 反映肿瘤生长抑制率。TGI (%) 的计算 :  $TGI (\%) = [(1 - (某处理组给药结束时平均瘤体积 - 该处理组开始给药时平均瘤体积)) / (溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积 - 溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积)] \times 100\%$ 。

[0384] 相对肿瘤增殖率T/C (%) : 计算公式如下 :  $T/C \% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$  ( $T_{RTV}$ : 治疗组RTV;  $C_{RTV}$ : 阴性对照组RTV)。根据肿瘤测量的结果计算出相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV), 计算公式为 $RTV = V_t / V_0$ , 其中 $V_0$ 是分组给药时(即d0) 测量所得平均肿瘤体积,  $V_t$ 为某一次测量时的平均肿瘤体积,  $T_{RTV}$ 与 $C_{RTV}$ 取同一天数据。

[0385] T-C(天) 反映肿瘤生长延迟指标, T表示用药组肿瘤达到预先设定体积时(如300mm<sup>3</sup>) 所用的平均天数, C表示对照组肿瘤达到相同体积时所用的平均天数。

[0386] 绘制生存曲线, 动物生存时间定义为从给药到动物死亡的时间或从给药到肿瘤体积达到2000mm<sup>3</sup>的时间, 满足其中一点即认定动物死亡。计算每组动物的中位生存期(天)。通过比较治疗组和模型对照组的中位生存期, 计算生存期的延长(ILS), 表示为超过模型对照组生存期的百分比。

[0387] 2.4统计分析

[0388] 统计分析, 包括每个组的每个时间点的肿瘤体积的平均值和标准误(SEM) (具体数据见表11)。整个实验在给药后37天结束, 各组动物在给药后第13天开始陆续安乐死, 因此以开始给药后第13天的肿瘤体积进行统计学分析评估组间差异。两组间比较用T-test进行分析, 三组或多组间比较用one-way ANOVA进行分析, 如果F值有显著性差异, 应用Games-Howell法进行检验。如果F值无显著性差异, 应用Dunnet (2-sided) 法进行分析。用SPSS 17.0进行所有数据分析。p<0.05认为有显著性差异。采用Kaplan-Meier方法Log-rank检验对动物生存时间进行分析。

[0389] 3.实验结果

[0390] 3.1死亡率、发病率及体重变化情况

[0391] 实验动物的体重作为间接测定药物毒性的参考指标。2E5对CloudmanS91细胞皮下同系移植肿瘤雌性DBA/2小鼠模型的体重影响如图18和图19所示。在此模型中所有给药组均未显示有显著性体重下降(图18)。因此, 2E5在小鼠黑色素瘤CloudmanS91模型中无明显毒性。

[0392] 3.2肿瘤体积

[0393] 给予CloudmanS91细胞皮下同系移植肿瘤雌性DBA/2小鼠模型2E5治疗后各组肿瘤体积变化如表11所示。

[0394] 表11.各组不同时间点的瘤体积

Days	Vehicle	Tumor volume ( $\text{mm}^3$ ) <sup>a</sup>		
		2E5 1 mg/kg	2E5 3 mg/kg	2E5 10 mg/kg
		0 <sup>b</sup>	66 ± 9	65 ± 8
[0395]	2	142 ± 23	129 ± 10	110 ± 10
	4	251 ± 39	231 ± 34	162 ± 9
	6	345 ± 65	339 ± 61	200 ± 13
	9	599 ± 66	597 ± 100	281 ± 38
	11	1,026 ± 173	943 ± 307	335 ± 66
	13	1,626 ± 262	1,089 ± 365	361 ± 81
				614 ± 273

[0396] 注:

[0397] a. 平均值±SEM,

[0398] b. 给药后天数。

[0399] 3.3肿瘤生长曲线

[0400] 肿瘤生长曲线如图20所示。

[0401] 3.4抗肿瘤药效评价指标

[0402] 表12.2E5对CloudmanS91同系移植瘤模型的抑瘤药效评价(基于给药后第13天肿瘤体积计算得出)

组别	肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ ) <sup>a</sup> (第13天)	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI <sup>b</sup> (%)	T-C (天数) ( $300 \text{ mm}^3$ )	p值 <sup>c</sup>
[0403]	Vehicle	1,626 ± 262	--	--	--
	2E5 (1 mg/kg)	1,089 ± 365	68.1	34.4	0
	2E5 (3 mg/kg)	361 ± 81	22.9	81.0	5
	2E5 (10 mg/kg)	614 ± 273	39.4	64.7	5

[0404] 注:

[0405] a. 平均值±SEM。

[0406] b. 肿瘤生长抑制由T/C和TGI (%) = [1 - (T13-T0) / (V13-V0)] × 100计算。

[0407] c. p值根据肿瘤体积计算。

[0408] 3.5生存曲线

[0409] 各组动物的生存曲线如图21所示。

[0410] 3.6生存时间

[0411] 表13.2E5对CloudmanS91同系移植瘤模型动物生存期的影响

组别	中位生存期 (天数)	生存期延长 (%)	Log Rank
			P值 <sup>a</sup>
[0412]	Vehicle	16	—
	2E5 1 mg/kg	20	25
	2E5 3 mg/kg	N/A <sup>b</sup>	N/A
	2E5 10 mg/kg	32	100

[0413] 注:a.p值表示每个给药组与溶媒对照组比较。

[0414] b. 实验结束时,2E5 3mg/kg组动物存活率为66.7%。

[0415] 4. 实验结果及讨论

[0416] 在本实验中,我们评价了2E5在CloudmanS91同系移植瘤模型中的体内药效。各组在不同时间点的瘤体积如表11,表12及图20所示,生存期如图21及表13所示。开始给药后13天,溶剂对照组荷瘤鼠的瘤体积达到 $1,626\text{mm}^3$ 。受试物2E5的1mg/kg组与溶剂对照组相比有微弱的抑瘤作用,瘤体积为 $1,089\text{mm}^3$  ( $T/C=68.1\%$ ,  $TGI=34.4\%$ ,  $p=0.367$ ) ,肿瘤延迟生长天数为0天。2E5的3mg/kg组与溶剂对照组相比具有显著的抑瘤作用,瘤体积为 $361\text{mm}^3$  ( $T/C=22.9\%$ ,  $TGI=81.0\%$ ,  $p=0.008$ ) ,肿瘤延迟生长天数为5天。2E5的10mg/kg组与溶剂对照组相比也具有显著的抑瘤作用,瘤体积为 $614\text{mm}^3$  ( $T/C=39.4\%$ ,  $TGI=64.7\%$ ,  $p=0.036$ ) ,肿瘤延迟生长天数为5天。

[0417] 整个实验过程中,溶剂对照组荷瘤鼠的中位生存期为16天。与溶媒对照组相比,受试物2E5的1mg/kg组荷瘤鼠的中位生存期为20天,生存期延长了25% ( $p=0.077$ ) ;受试物2E5的3mg/kg组荷瘤鼠的存活率为66.7% ( $p=0.001$ ) 。受试物2E5的10mg/kg组荷瘤鼠的中位生存期为32天,生存期延长了100% ( $p=0.022$ ) 。

[0418] 2E5受试物对荷瘤鼠的体重变化影响如图19。荷瘤鼠对受试药物2E5在所有剂量下都显示出良好的耐受性,所有治疗组均无明显体重下降。归纳以上所述,本实验中,受试物2E5的3mg/kg组和10mg/kg组对CloudmanS91皮下同系移植瘤模型均有显著的抗肿瘤作用,但是没有剂量依赖性,3mg/kg剂量组抗肿瘤作用好于10mg/kg剂量组。

[0419] 以上,基于本发明的实施方式进行了说明,但本发明不限定于此,本领域的技术人员应该明白,在本发明的主旨的范围内能够以进行变形和变更的方式实施,这样的变形和变更的方式,理应属于本发明的保护范围。

## 序列表

<110> 上海药明生物技术有限公司

<120> 一种新的 PD-1 单克隆抗体

<130> FPI160393-68

<160> 24

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr  
[0001] 20 25 30

Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Tyr Leu  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Met Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ile Leu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 2

<211> 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 2

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10				15		

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Thr	Tyr
				20				25				30			

Tyr	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Tyr	Leu
					35			40				45			

Gly	Tyr	Ile	Asn	Met	Gly	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
			50			55			60						

Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75				80		

Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85			90				95			

[0002]	Ala	Ile	Ile	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr
					100			105				110				

Val	Ser	Ser
	115	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 3

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5				10				15			

Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser
				20				25				30			

Asp	Gly	Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
				35				40			45				

Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Thr	Leu	Gly	Ser	Gly	Val	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

50	55	60
----	----	----

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Leu		
85	90	95

Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		
1	5	10

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser		
[0003]	20	25

Asp Gly Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
35	40	45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Gly Ser Gly Val Pro		
50	55	60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Leu		
85	90	95

Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Ala Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Gly Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Leu  
 85 90 95

Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

[0004] <210> 6  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 6

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Gly Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Leu  
 85 90 95

Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 7  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 7

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Gly Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

[0005]

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Leu  
 85 90 95

Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 8  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 8

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Gln Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Gly Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Leu  
85 90 95

Thr His Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

[0006] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30

Asp Gly Gln Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Gly Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Leu  
85 90 95

Thr His Glu Asn Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Thr Tyr Tyr Ile Ser

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 11

Tyr Ile Asn Met Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 12

[0007] <211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 12

Leu Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 13

Ile Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 14

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 15

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

[0008]

<400> 16

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Ala Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 17

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 18

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Gln Thr Tyr Leu Tyr  
 1 5 10 15

<210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 19

Leu Val Ser Thr Leu Gly Ser  
 1 5

<210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 20

[0009] Met Gln Leu Thr His Glu Asn Tyr Thr  
 1 5

<210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 21

Met Gln Leu Thr His Trp Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 22

Met Gln Leu Thr His Ala Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 23  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 23

Met Gln Leu Thr His Glu Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 24  
 <211> 288  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens (智人)

<400> 24

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln  
 1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp  
 [0010] 20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp  
 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val  
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala  
 65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg  
 85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg  
 100 105 110

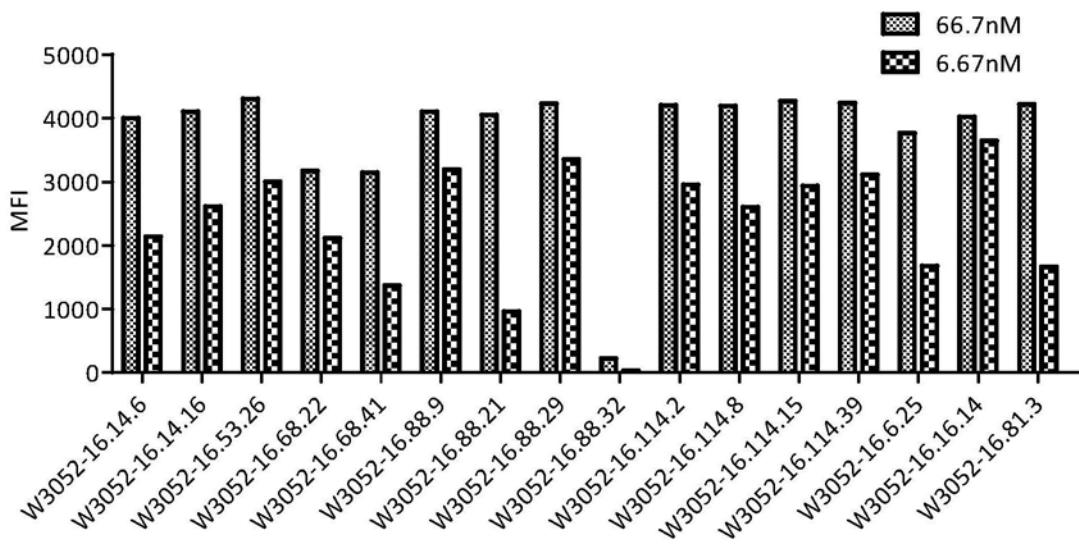
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu  
 115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val  
 130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

145	150	155	160
Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly			
165	170	175	
Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys			
180	185	190	
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro			
195	200	205	
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly			
[0011] 210	215	220	
Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro			
225	230	235	240
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly			
245	250	255	
Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg			
260	265	270	
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu			
275	280	285	

A



B

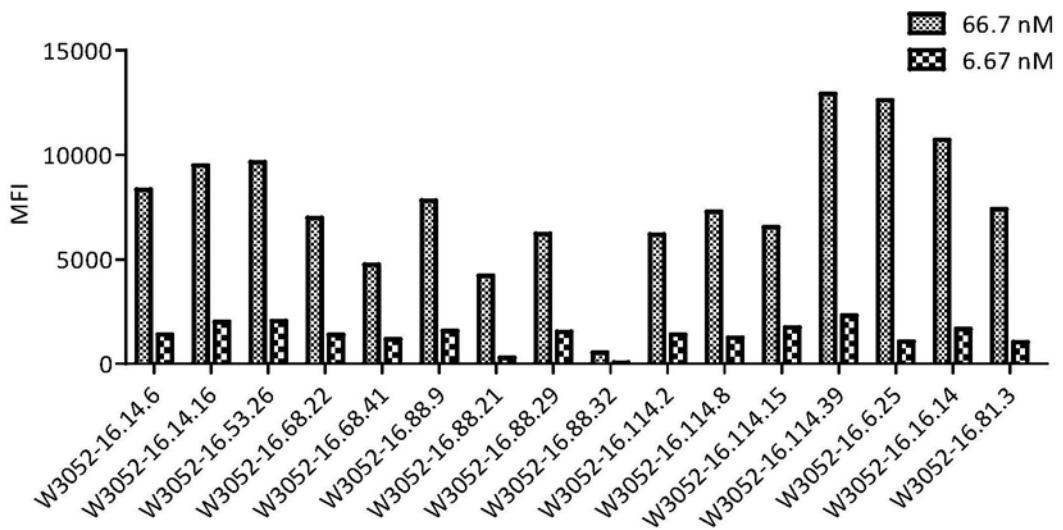


图1

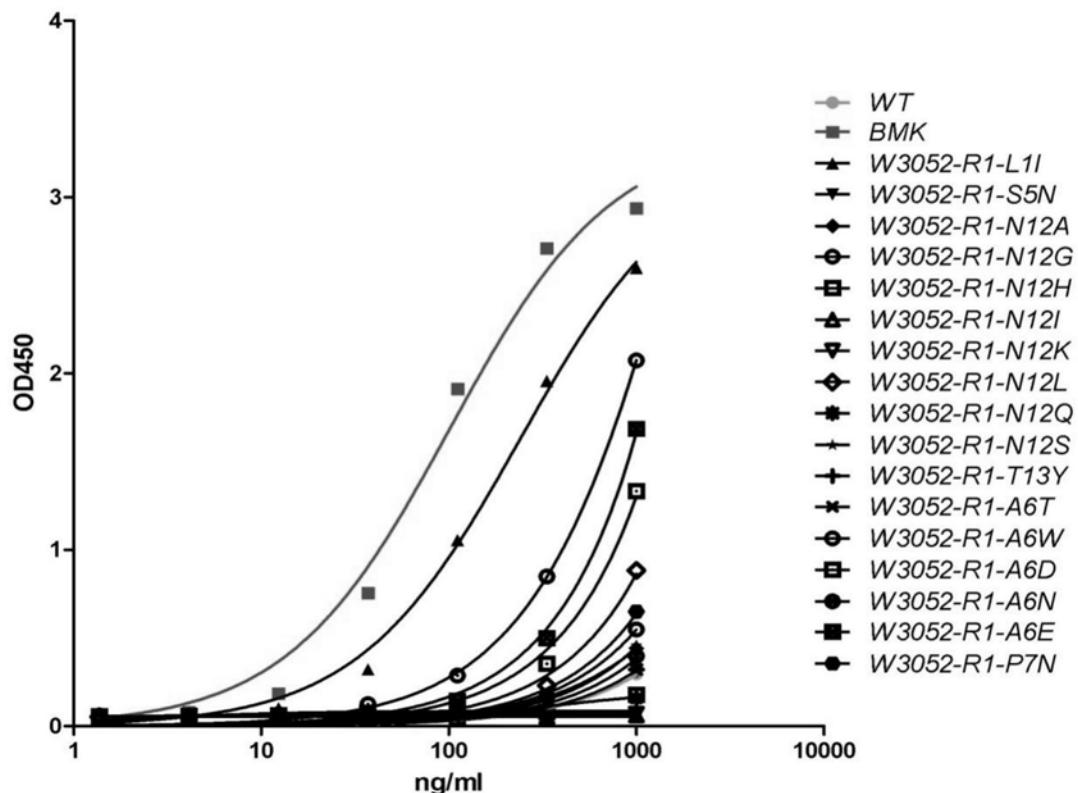
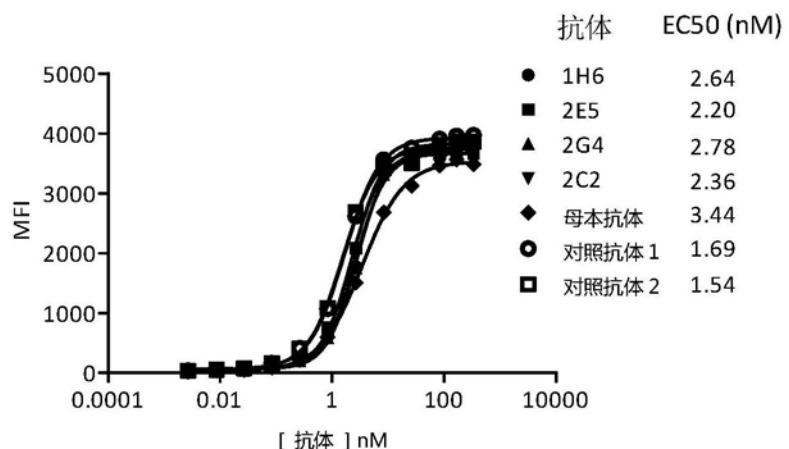
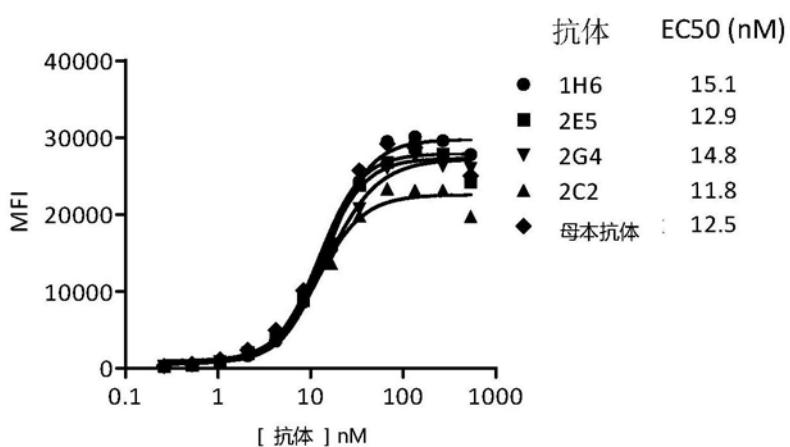


图2

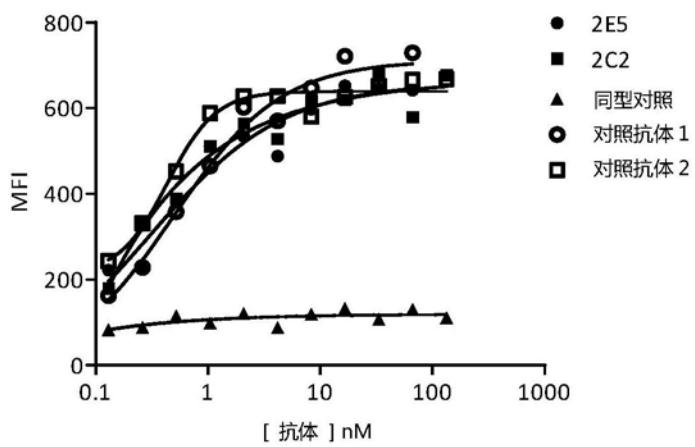
A



B



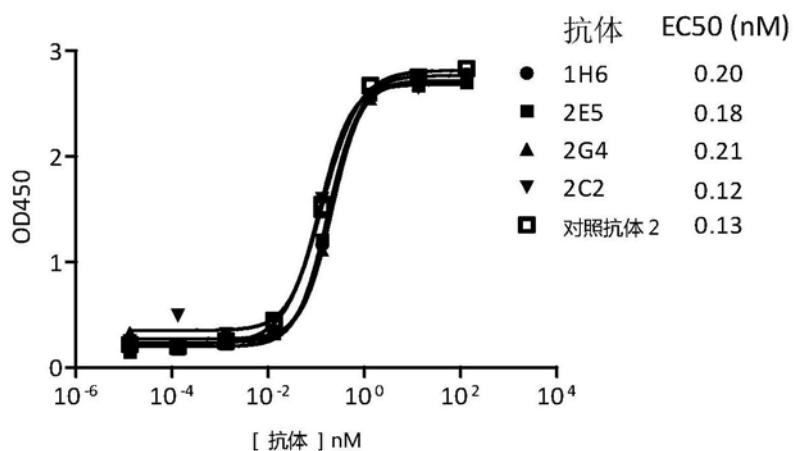
C



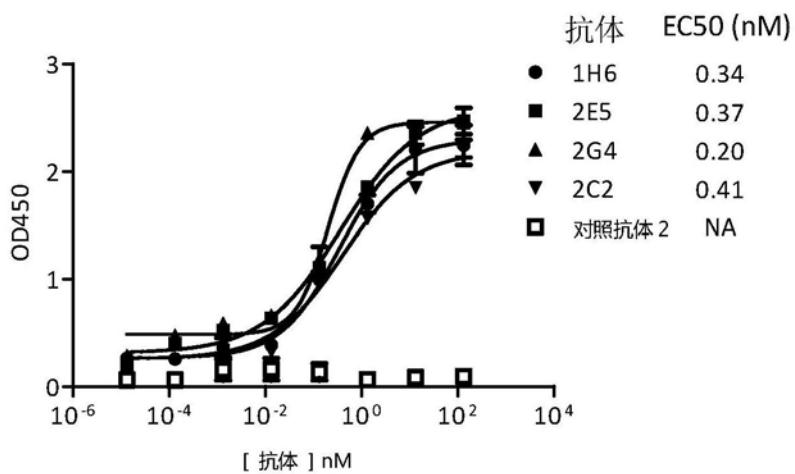
注：同型对照为人 IgG4 kappa 亚型无关抗体。

图3

A



B



C

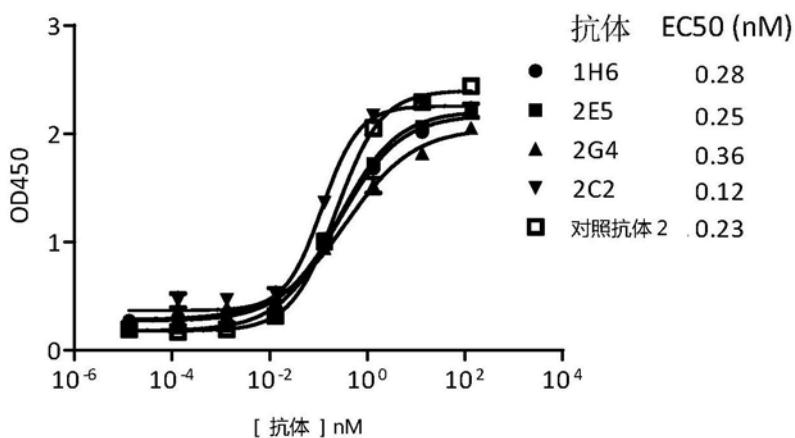


图4

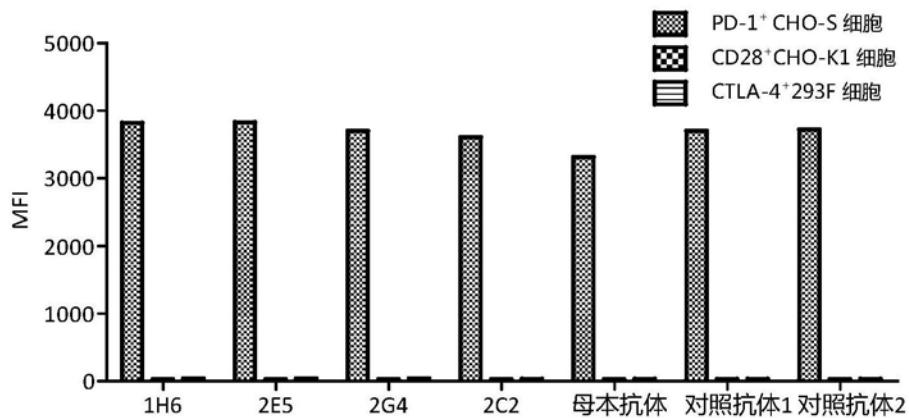
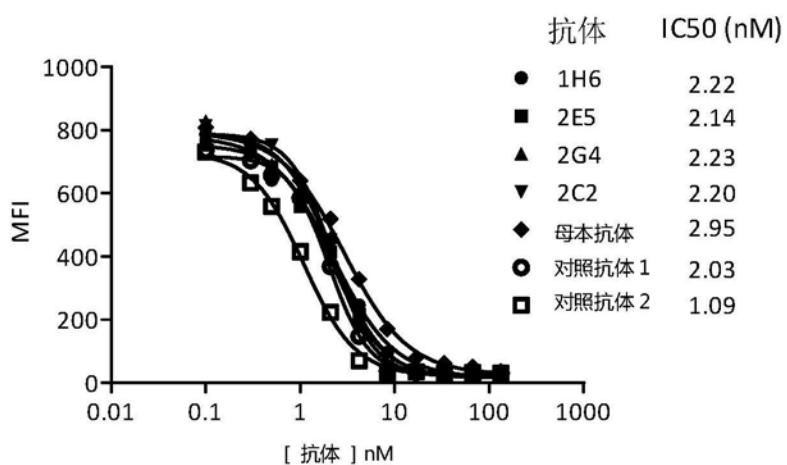


图5

A



B

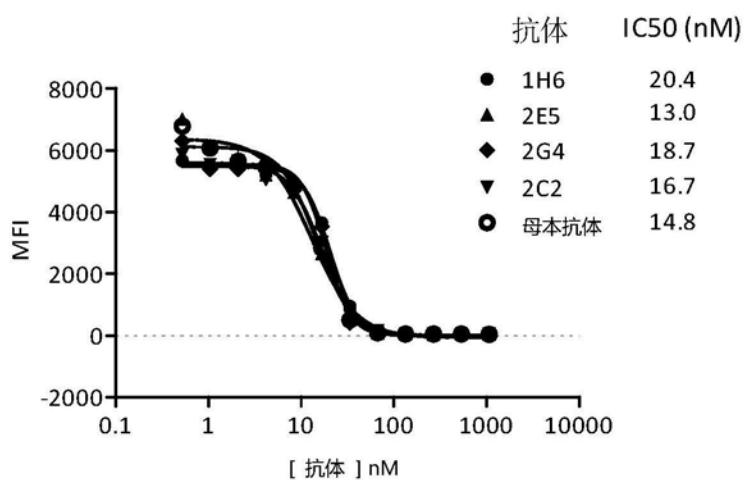
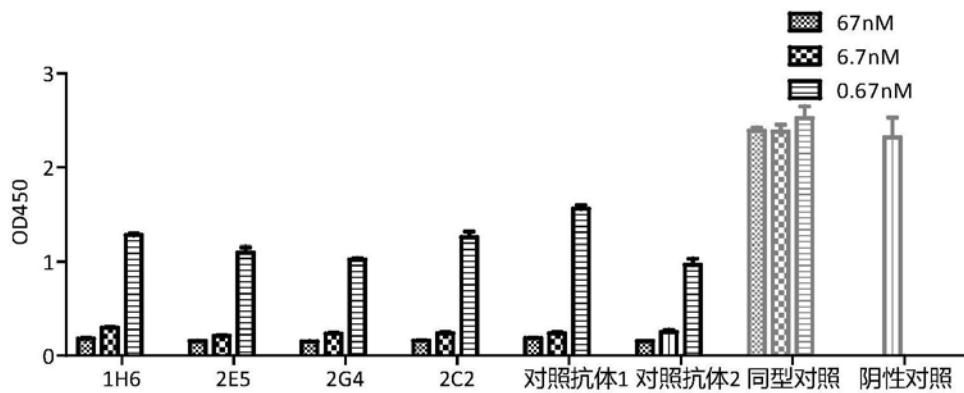


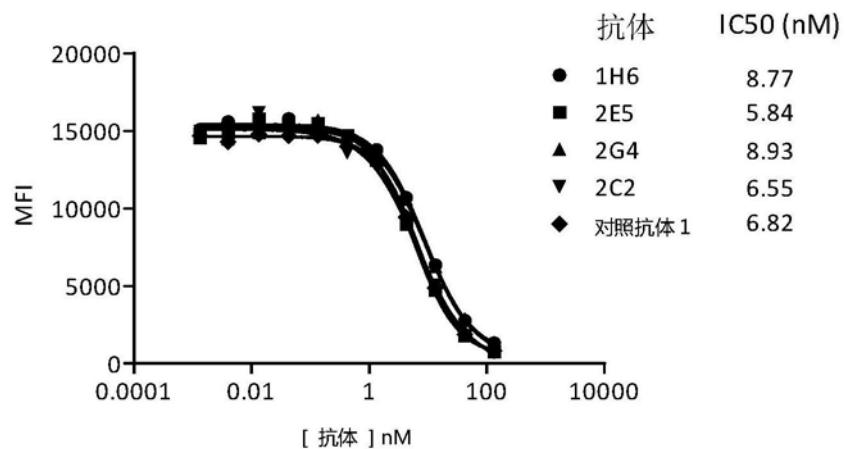
图6



注：阴性对照为不加任何抗体，只加实验缓冲液的对照组。

图7

A



B

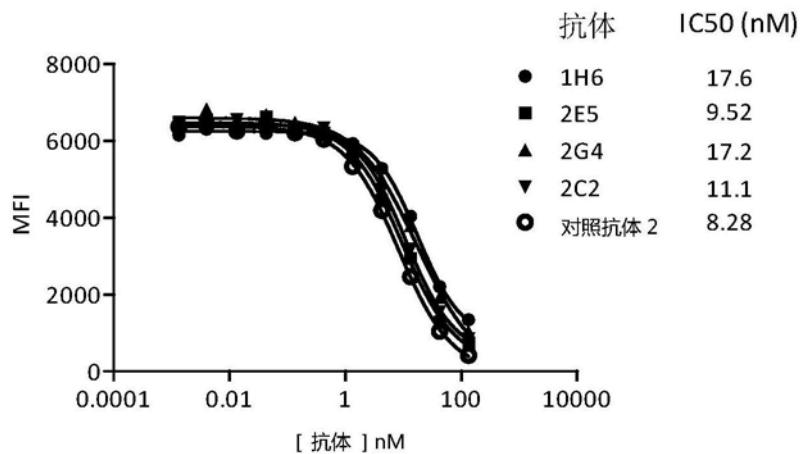


图8

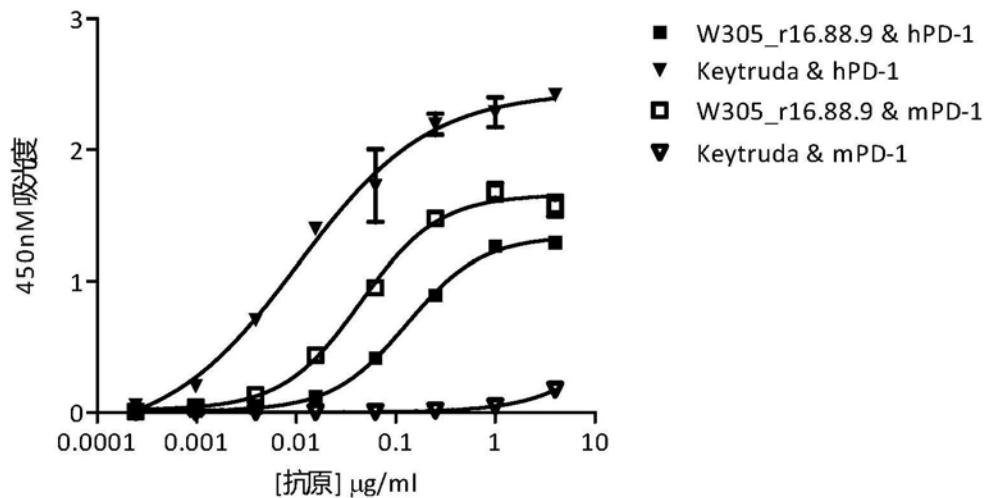


图9

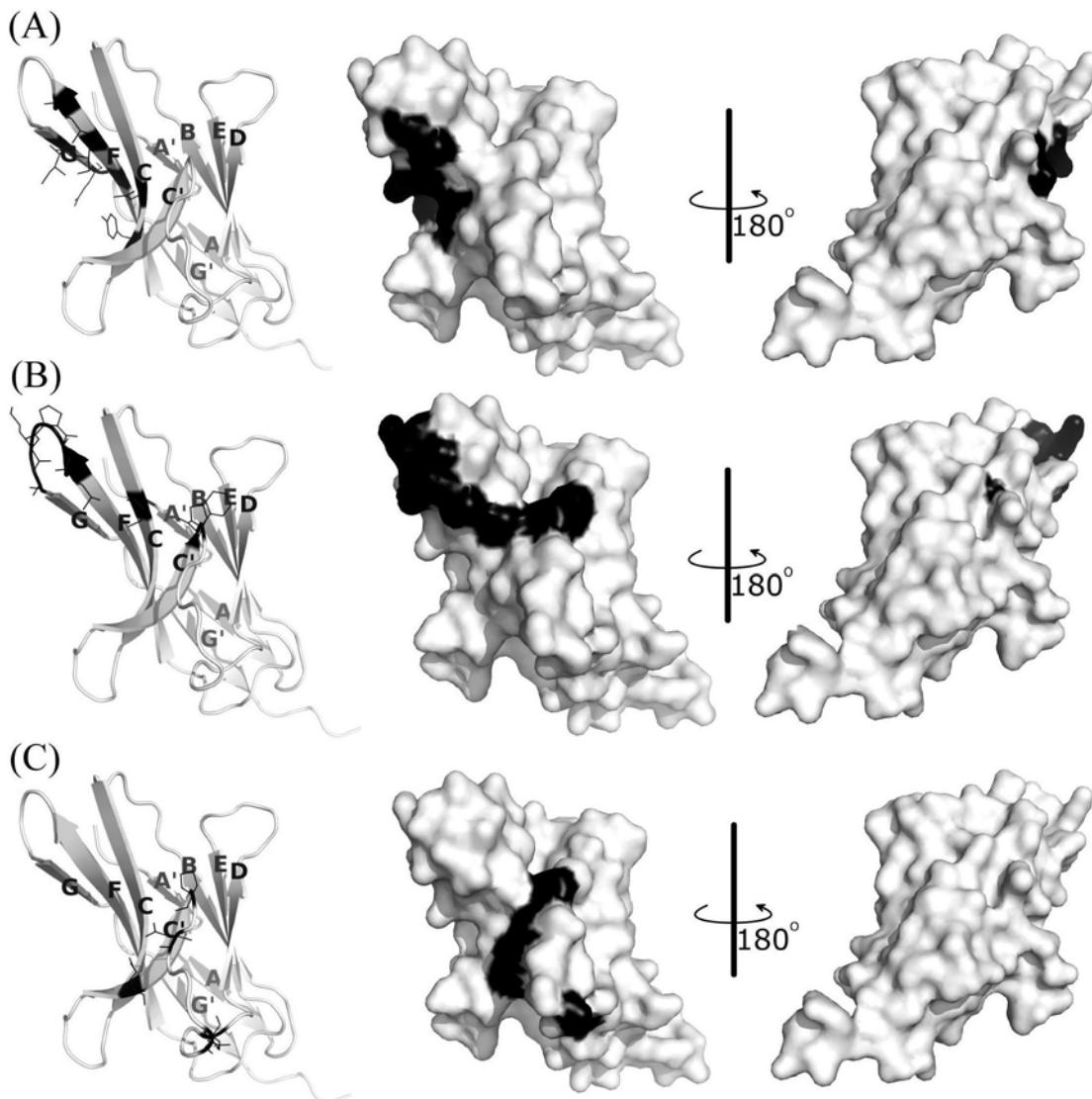


图10

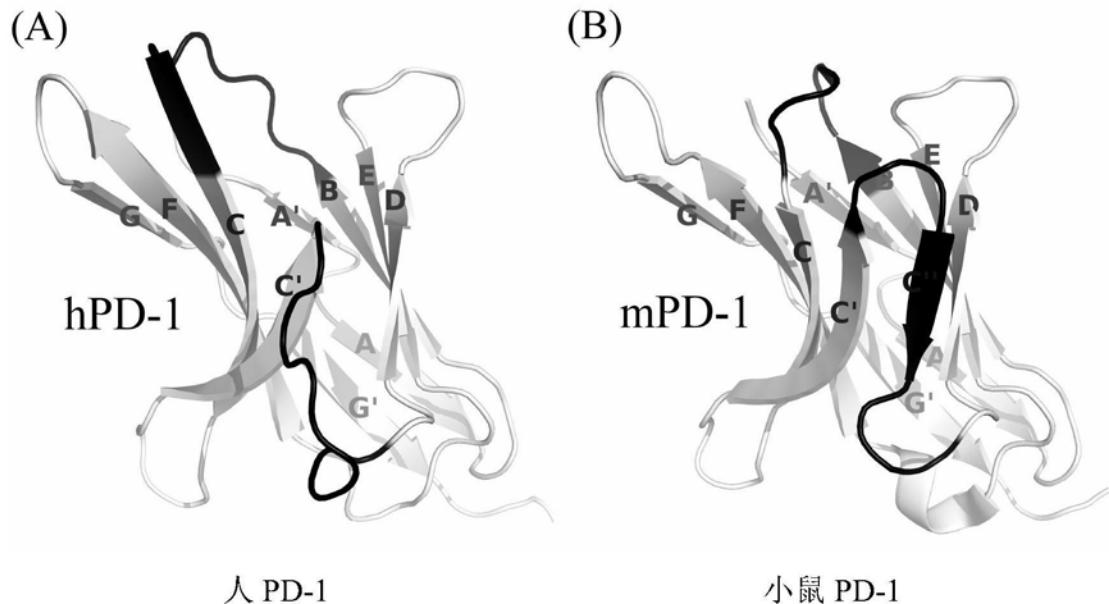
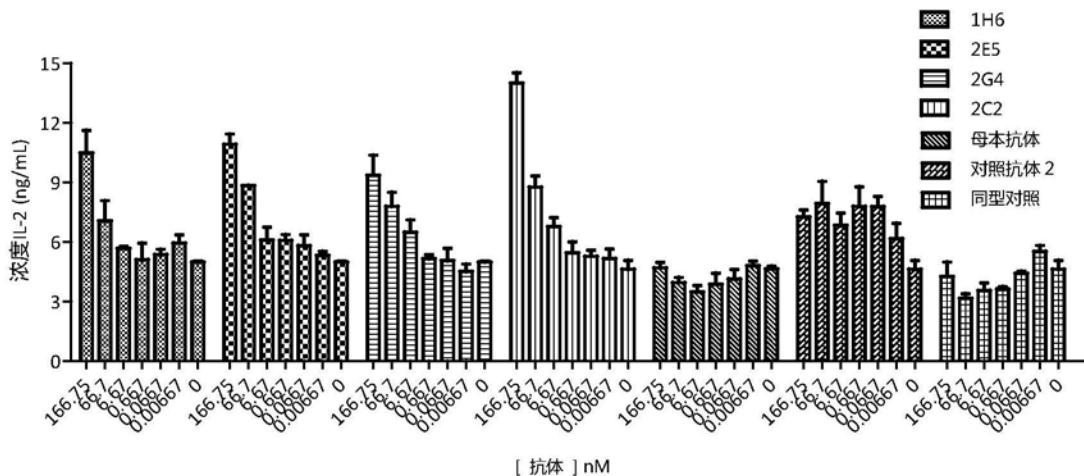
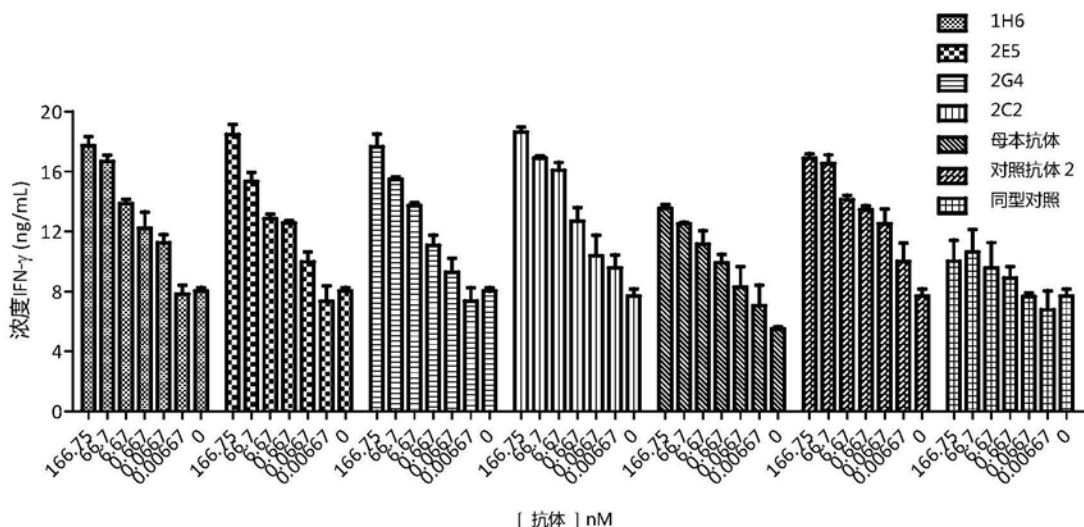


图11

A



B



C

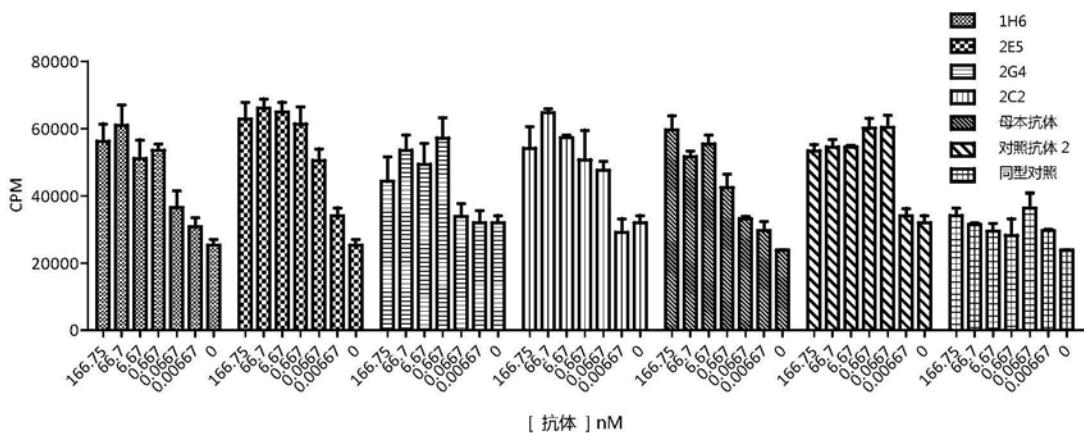
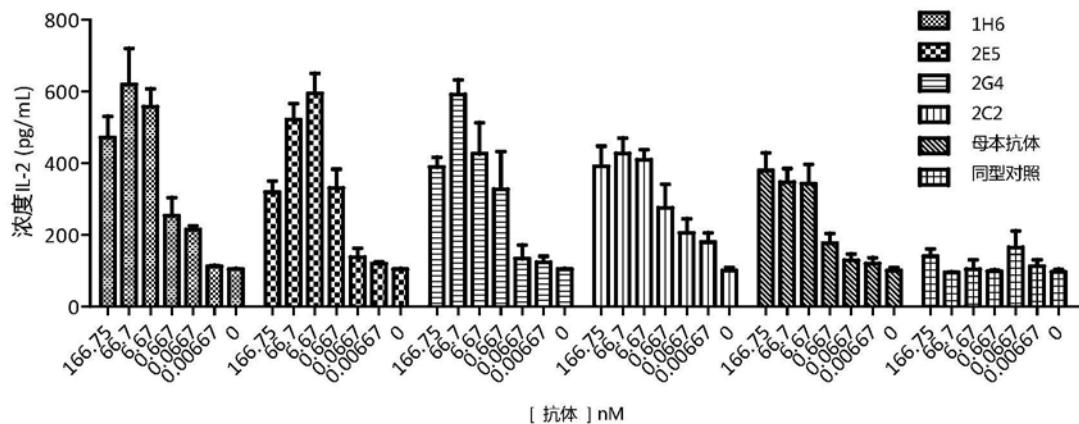
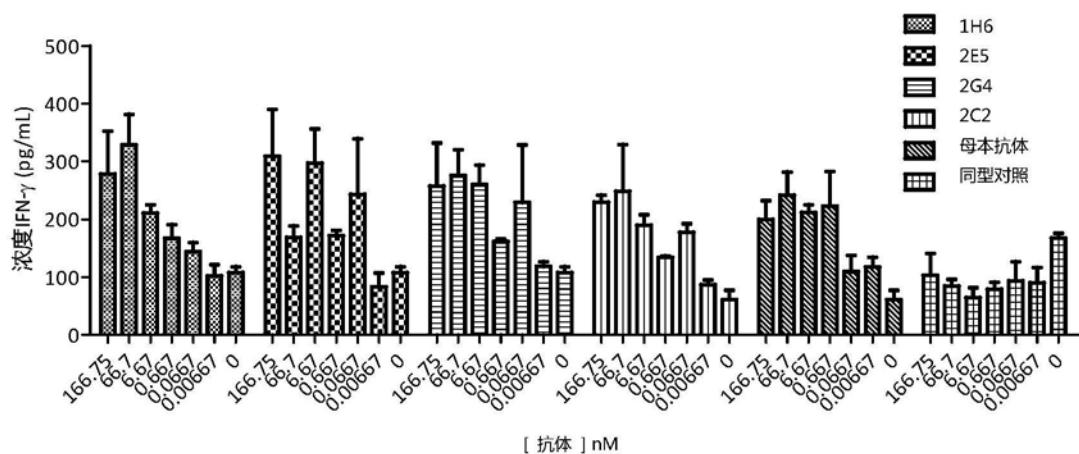


图12

A



B



C

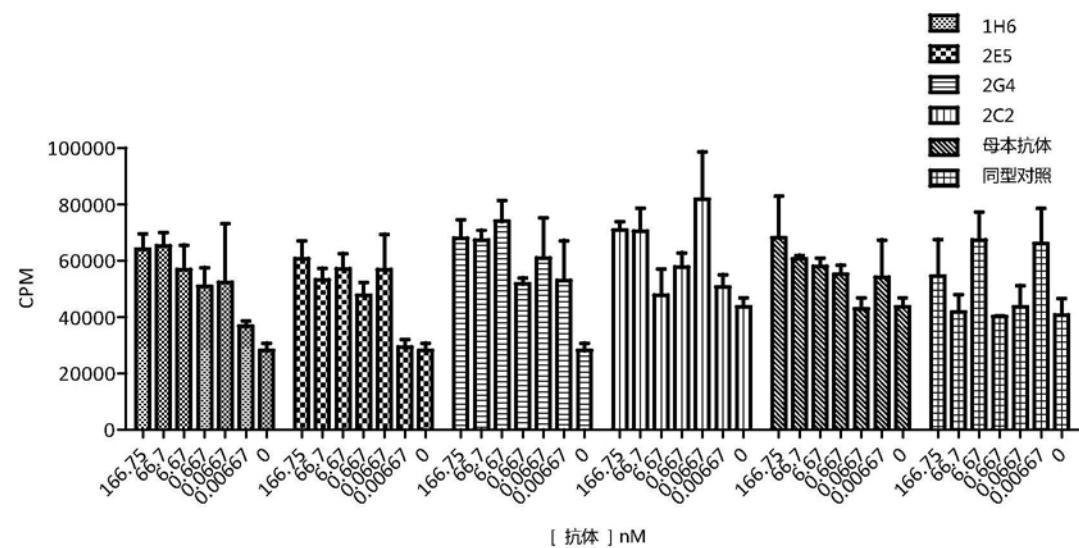
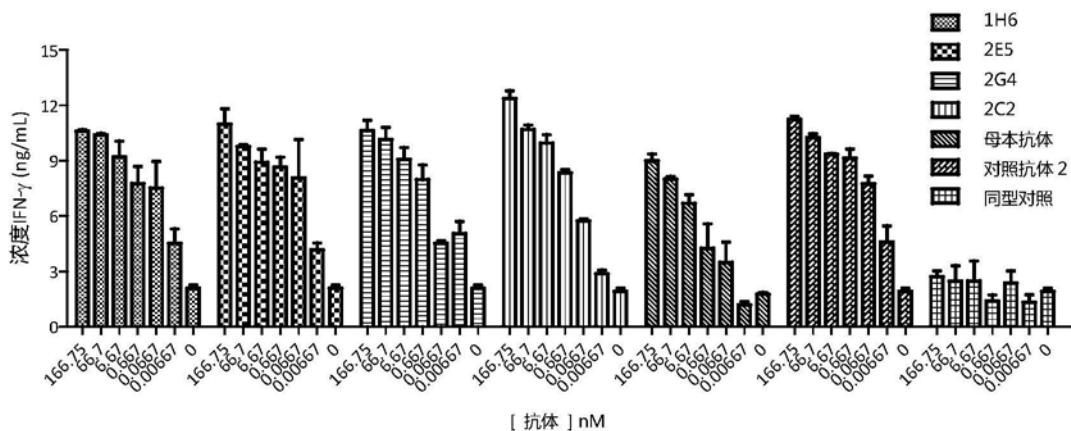


图13

A



B

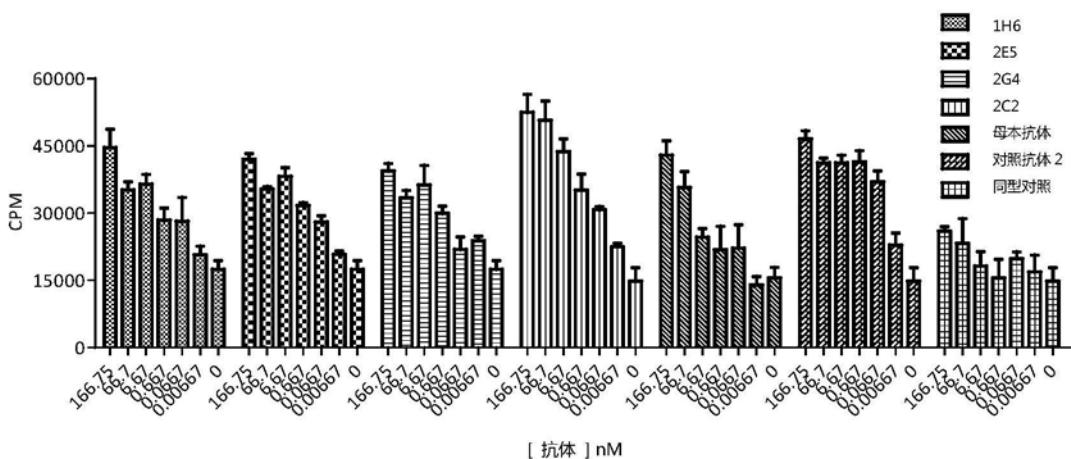
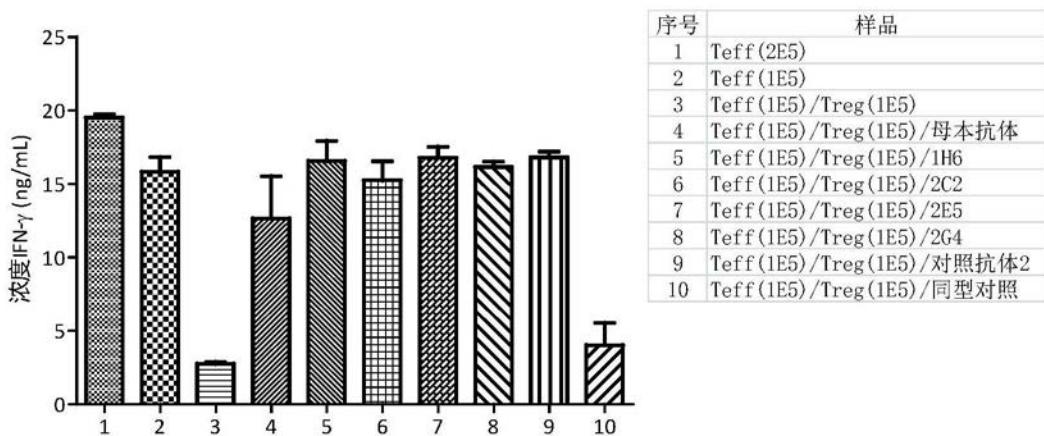


图14

A



B

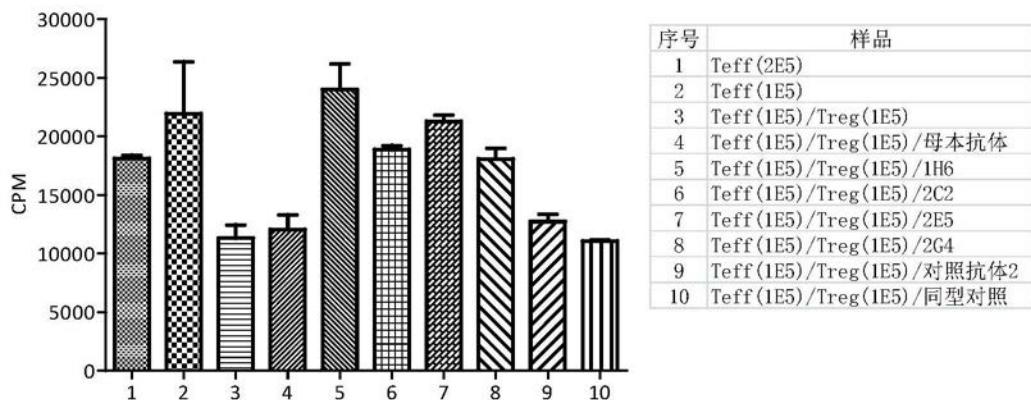


图15

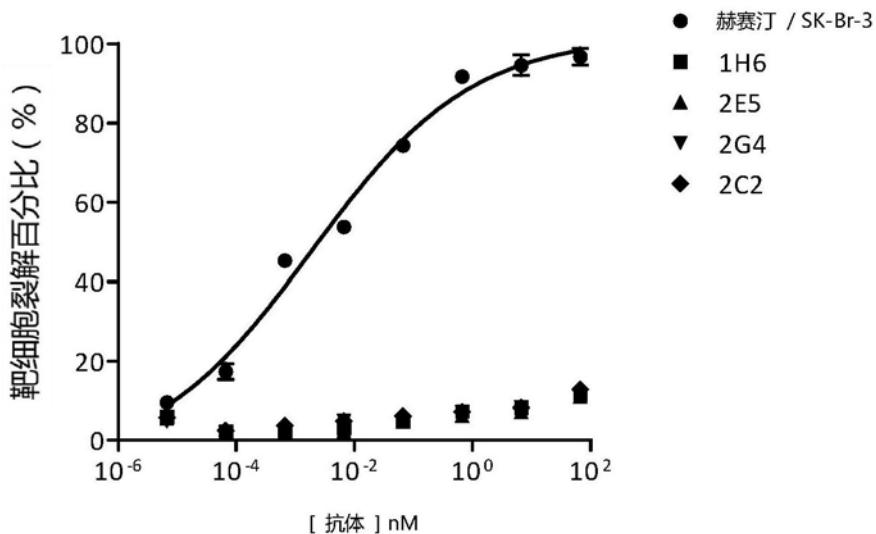


图16

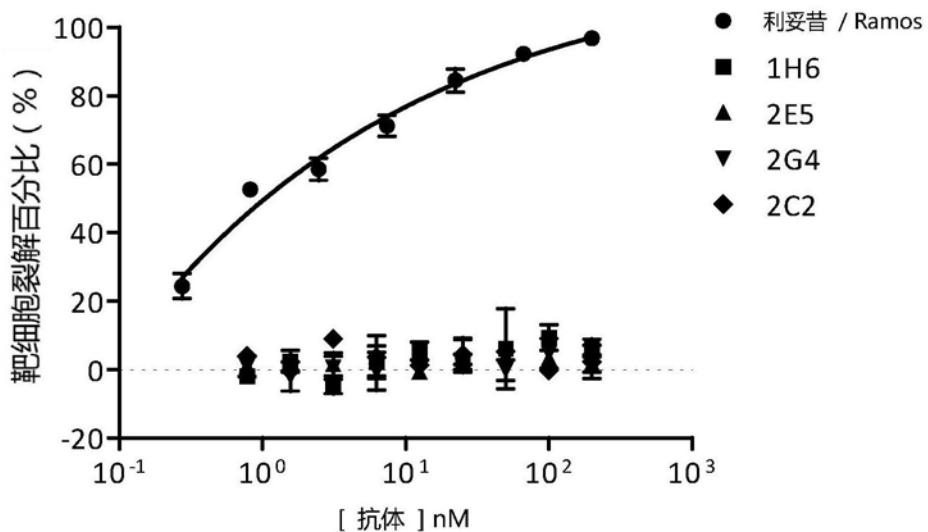


图17

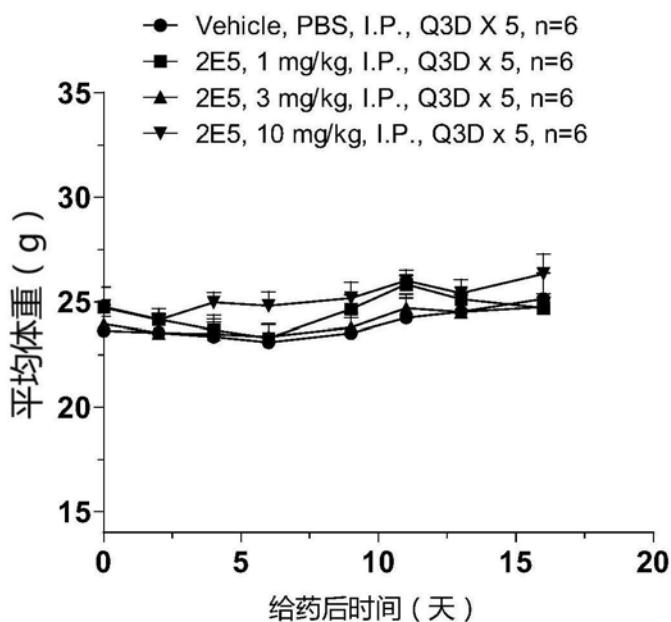


图18

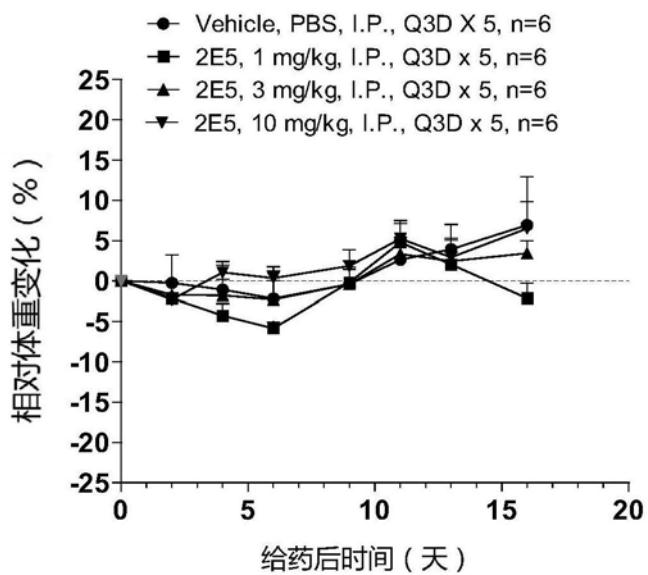


图19

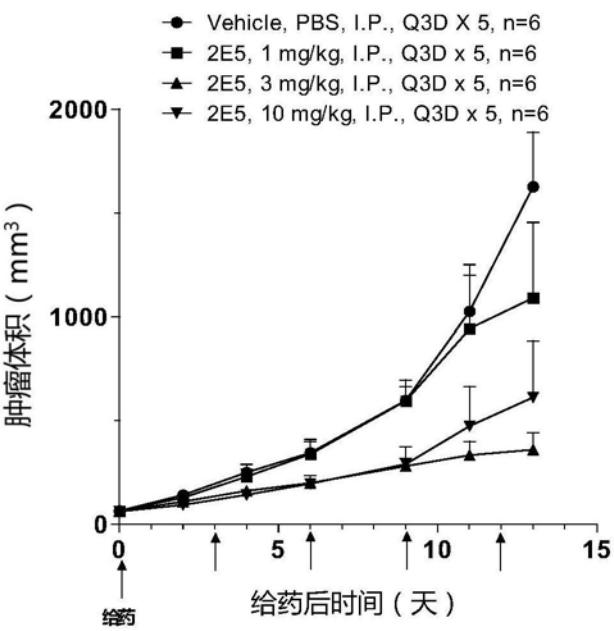


图20

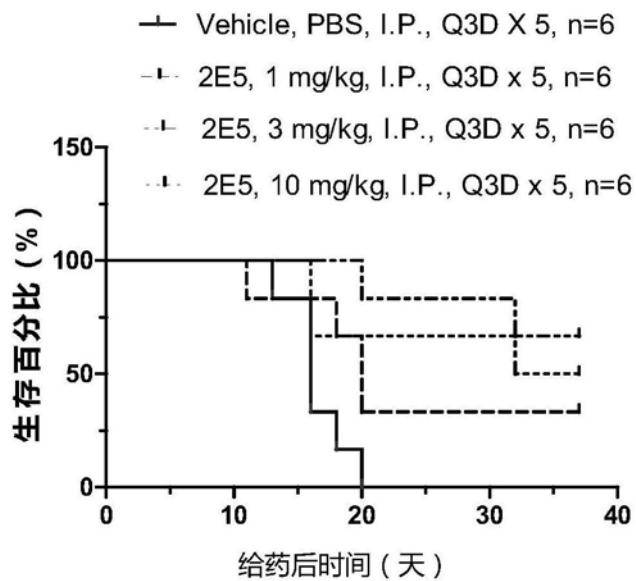


图21