



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110291109 B

(45) 授权公告日 2023. 01. 31

(21) 申请号 201880002948.7	(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理 事务所(普通合伙) 11436 专利代理师 程淼
(22) 申请日 2018.01.19	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110291109 A	(51) Int.Cl.
(43) 申请公布日 2019.09.27	<i>C07K 16/28</i> (2006.01)
(66) 本国优先权数据 201710046148.2 2017.01.20 CN	<i>C12N 15/13</i> (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.01.29	<i>C12N 15/63</i> (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/CN2018/073437 2018.01.19	<i>C12N 5/10</i> (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/133842 ZH 2018.07.26	<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
(73) 专利权人 大有华夏生物医药集团有限公司 地址 100005 北京市东城区东单三条8-2号 8层	<i>A61P 31/00</i> (2006.01)
	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
	<i>A61P 37/00</i> (2006.01)
(72) 发明人 陈列平 罗利群	(56) 对比文件
	CN 105026428 A, 2015.11.04
	CN 106008714 A, 2016.10.12
	CN 102264762 A, 2011.11.30
	审查员 刘树柏
	权利要求书2页 说明书15页 附图6页

(54) 发明名称

人程序性死亡受体PD-1的单克隆抗体及其片段

(57) 摘要

本发明提供了针对人PD-1的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,包含表2中所列的重链CDR1、CDR2和CDR3以及表2中所列的轻链CDR1、CDR2和CDR3。

1. 针对人PD-1的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段, 包含: 表2中所列的重链CDR1、CDR2和CDR3, 以及表2中所列的轻链CDR1、CDR2和CDR3。

2. 权利要求1的单克隆抗体或其抗原结合片段, 包含: (i) SEQ ID NO:3所示的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:4所示的轻链氨基酸序列; 或(ii) 不包含信号肽部分的SEQ ID NO:3所示的重链氨基酸序列和不包含信号肽部分的SEQ ID NO:4所示的轻链氨基酸序列。

3. 针对人PD-1的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段, 包含:

(1) 选自SEQ ID NO:13、14、15和16的重链氨基酸序列或不包含信号肽部分的SEQ ID NO:13、14、15和16的重链氨基酸序列; 以及

(2) 选自SEQ ID NO:17、18、19和20的轻链氨基酸序列或不包含信号肽部分的SEQ ID NO:17、18、19和20的轻链氨基酸序列;

其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段是人源化的。

4. 权利要求3的单克隆抗体或其抗原结合片段, 包含: SEQ ID NO:13所示的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:17所示的轻链氨基酸序列。

5. 权利要求1-4中任一项的单克隆抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段选自: Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂和双抗体。

6. 编码权利要求1-5中任一项的抗体或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。

7. 权利要求6的分离的多核苷酸, 其中, 重链编码序列如SEQ ID NO:1所示, 轻链编码序列如SEQ ID NO:2所示。

8. 权利要求6的分离的多核苷酸, 该多核苷酸编码人源化抗体或其抗原结合片段, 并且其中:

重链编码序列选自SEQ ID NO:5、6、7和8,

轻链编码序列选自SEQ ID NO:9、10、11和12。

9. 包含权利要求6-8中任一项的分离的多核苷酸的表达载体。

10. 包含权利要求9的表达载体的宿主细胞。

11. 药物组合物, 包含权利要求1-5中任一项的抗体或其抗原结合片段以及可药用载体。

12. 权利要求1-5中任一项的抗体或其抗原结合片段在制备提高免疫细胞活性的药物中的用途。

13. 权利要求1-5中任一项的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗疾病的药物中的用途, 其中所述疾病选自: 癌症、感染性疾病、移植排斥、自身免疫性疾病和神经疾病。

14. 权利要求13的用途, 其中权利要求1-5中任一项的抗体或其抗原结合片段以治疗有效量给予需要治疗的受试者。

15. 权利要求13的用途, 其中所述药物与其他药物或其他疗法进行联合应用。

16. 权利要求15的用途, 其中所述其他疗法选自: 化疗、放疗、靶向治疗、基因治疗、细胞治疗、干细胞治疗。

17. 权利要求1-5中任一项的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列在制备调节细胞功能的药物中的用途。

18. 权利要求17的用途, 其中编码所述权利要求1-5中任一项的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列被递送至所述细胞中。

19. 权利要求17或18的用途,其中所述用途包括在制备用于基因治疗、CAR-T治疗或CRISPR治疗的药物中的用途。

人程序性死亡受体PD-1的单克隆抗体及其片段

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药领域,具体而言,涉及针对人PD-1的单克隆抗体及其在疾病治疗中的应用。

背景技术

[0002] 程序性死亡受体1 (PD-1) 是在激活的T细胞和B细胞上表达的免疫抑制性受体。阻断PD-1与其配体之一PD-L1间的相互作用提高肿瘤特异性CD8⁺T细胞的免疫性,因此有助于免疫系统清除肿瘤细胞。*Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway*, Vassiliki A. Boussiotis, NEJM n engl j med 375;18 nejm.org November 3, 2016中详细综述了PD-1及相关研究。

[0003] 在文献中已确定了PD-1在癌症中的作用。业已在人的很多原发性肿瘤中发现PD-1 (在肿瘤浸润淋巴细胞上) 和/或PD-L1 (在肿瘤细胞上)。这样的组织包括肺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、结肠癌、神经胶质瘤、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食道癌、胃癌、口腔鳞状细胞癌、尿道上皮细胞癌和胰腺癌以及头颈肿瘤。

[0004] 阻断PD-1/PD-L1的相互作用可导致肿瘤特异性T细胞的免疫性提高,因此,有助于由免疫系统清除肿瘤细胞。

[0005] PCT国际申请PCT/US2008/007463披露了一种针对人程序性死亡受体PD-1的抗体。

[0006] PD-1/PD-L1途径是开发癌症治疗的抗体疗法的被充分证实的靶标。抗PD-1抗体还可用于慢性病毒性感染。最近,有研究显示PD-1在来自HIV感染的个体的T细胞中高度表达。

发明内容

[0007] 本发明提供了针对人PD-1的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,包含:表2中所列的重链CDR1、CDR2和CDR3,以及表2中所列的轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0008] 在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:(i) SEQ ID NO:3所示的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:4所示的轻链氨基酸序列;或(ii) 不包含信号肽部分的SEQ ID NO:3所示的重链氨基酸序列和不包含信号肽部分的SEQ ID NO:4所示的轻链氨基酸序列。

[0009] 其中,SEQ ID NO:3所示的重链氨基酸序列的第1位-第19位(即, MNFGLSLIFLVVLKGVLC)是信号肽部分;SEQ ID NO:4所示的轻链氨基酸序列的第1位-第20位(即, MEKDTLLWVLLWVPGSTG)是信号肽部分。

[0010] 信号肽是出于方便纯化等目的而加入的,并非抗体结构中必不可少的部分。本领域技术人员可以理解,在本发明的抗体或抗体片段中,信号肽是任选的,也就是说,可以包含信号肽,也可以不包含信号肽。

[0011] 本发明还提供了针对人PD-1的人源化的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0012] (1) 选自SEQ ID NO:13、14、15和16的重链氨基酸序列或不包含信号肽部分的SEQ ID NO:13、14、15和16的重链氨基酸序列;以及

[0013] (2) 选自SEQ ID NO:17、18、19和20的轻链氨基酸序列或不包含信号肽部分的SEQ ID NO:17、18、19和20的轻链氨基酸序列。

[0014] 其中,SEQ ID NO:13、14、15和16所示的重链氨基酸序列的第1位-第24位(即,MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYG)是信号肽部分;SEQ ID NO:17、18、19和20所示的轻链氨基酸序列的第1位-第20位(即,METDTLLLWVLLLWVPGSTG)是信号肽部分。

[0015] 在一些实施方案中,所述抗原结合片段选自:Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂和双抗体。

[0016] 本发明提供了编码所述抗体或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。

[0017] 在一些实施方案中,所述多核苷酸的重链编码序列如SEQ ID NO:1所示,轻链编码序列如SEQ ID NO:2所示。

[0018] 在一些实施方案中,所述多核苷酸编码人源化抗体或其抗原结合片段,并且重链编码序列选自SEQ ID NO:5、6、7和8,轻链编码序列选自SEQ ID NO:9、10、11和12。

[0019] 本发明提供了包含所述分离的多核苷酸的表达载体,以及包含所述表达载体的宿主细胞。

[0020] 本发明提供了药物组合物,包含所述抗体或其抗原结合片段以及可药用载体。

[0021] 本发明提供了提高免疫细胞活性的方法,包括使免疫细胞与所述抗体或其抗原结合片段接触。

[0022] 本发明提供了治疗疾病的方法,所述方法包括将治疗有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段给予需要治疗的受试者。

[0023] 在一些实施方案中,其中所述疾病选自癌症、感染性疾病、移植排斥、自身免疫性疾病和神经疾病。在一些实施方案中,所述方法包括对受试者联合应用其他药物或疗法,包括化疗、放疗、靶向治疗、基因治疗、细胞治疗、干细胞治疗。

[0024] 本发明提供了所述抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗疾病的药物中的用途,其中所述疾病选自:癌症、感染性疾病、移植排斥、自身免疫性疾病和神经疾病。

[0025] 本发明提供了调节细胞功能的方法,包括将编码本发明的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列递送至所述细胞中。

[0026] 在一些实施方案中,所述方法用于基因治疗、CAR-T治疗或CRISPR治疗。

[0027] 在一些实施方案中,利用敲除了PD-1基因的小鼠来产生抗人PD-1单抗,亲和力更高,阻断效果更好,细胞杀伤活力更高。试验结果表明这种方法能够得到高亲和力的单克隆抗体。其亲和力比目前上市的PD-1抗体亲和力高出大约4-7倍,体外阻断PD-L1/PD-1的相互作用非常有效。同时体外抑制肿瘤生长活性也有所提高。

附图说明

[0028] 图1显示了PD-1抗体与PD-1蛋白的结合活性。

[0029] 图2显示了PD-1抗体对PD-1蛋白与PD-L1蛋白结合的阻断效应。

[0030] 图3显示了不同抗体竞争结合实验结果。

[0031] 图4显示了DNA重组抗体的结合和阻断作用。

[0032] 图5显示了人源化抗体的与PD-1蛋白的结合活性

[0033] 图6显示了人源化抗体的阻断作用。

- [0034] 图7显示了人源化母本抗体不同突变体亲和力比较。
- [0035] 图8显示了人源化PD-1抗体和食蟹猴淋巴细胞PD-1蛋白结合。
- [0036] 图9显示了人源化PD-1抗体体外增强效应细胞杀伤肿瘤细胞。
- [0037] 图10显示了人源化PD-1抗体阻断人淋巴细胞的PD-1的诱导表达。
- [0038] 图11显示了自研PD-1抗体与上市PD-1抗体动力学和亲和力比较。
- [0039] 图12显示了体外抑制肿瘤生长作用比较。

具体实施方式

[0040] “抗体”是指表现出所需生物学活性(例如抑制配体与其受体的结合或通过抑制配体诱导的受体信号转导)的抗体的任何形式。因此,“抗体”以其最广泛的意义来使用,并明确包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

[0041] “抗体片段”和“抗原结合片段”在本文中可互换使用,意指抗体的抗原结合片段及抗体类似物,其通常包括至少部分母体抗体(parental antibody)的抗原结合区或可变区(例如一个或多个CDR)。抗体片段保留母体抗体的至少某些结合特异性。优选地,抗体片段保留至少50%、70%、80%、90%、95%或100%或更多的母体抗体对靶标的结合亲和力。抗体片段实例包括但不限于:Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(linear antibody);单链抗体分子,例如sc-Fv、单抗体(技术来自Genmab);纳米抗体(技术来自Domantis);结构域抗体(技术来自Ablynx);和由抗体片段形成的多特异性抗体。工程改造的抗体变体综述于Holliger和Hudson(2005)Nat.Biotechnol.23:1126-1136中。

[0042] “Fab片段”由一条轻链和一条重链的C_H1及可变区组成。Fab分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。

[0043] “Fc”区含有包含抗体的C_H1和C_H2结构域的两个重链片段。两个重链片段由两个或多个二硫键并通过CH3结构域的疏水作用保持在一起。

[0044] “Fab'片段”含有一条轻链和包含V_H结构域和C_H1结构域以及C_H1和C_H2结构域之间区域的一条重链的部分,由此可在两个Fab'片段的两条重链之间形成链间二硫键以形成F(ab')₂分子。

[0045] “F(ab')₂片段”含有两条轻链和两条包含C_H1和C_H2结构域之间的恒定区的部分的重链,由此在两条重链间形成链间二硫键。因此,F(ab')₂片段由通过两条重链间的二硫键保持在一起的两个Fab'片段组成。

[0046] “Fv区”包含来自重链和轻链二者的可变区,但缺少恒定区。

[0047] “单链Fv抗体”(或“scFv抗体”)是指包含抗体的V_H和V_L结构域的抗体片段,其中这些结构域存在于单个多肽链中。一般而言,Fv多肽另外在V_H和V_L结构域之间包含多肽接头,该接头使得scFv能形成用于抗原结合的所需结构。参见国际专利申请WO 88/01649。

[0048] “双抗体”为具有两个抗原结合位点的小抗体片段。所述片段包含在相同的多肽链中与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H)(V_H-V_L或V_L-V_H)。通过使用短至不能在同一链的两个结构域之间配对的接头,迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点。

[0049] 术语“嵌合”抗体指这样的抗体以及表现出所需生物学活性的所述抗体的片段:其

中部分重链和/或轻链与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体相应的序列等同或同源,同时所述链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体相应的序列等同或同源(参见例如美国专利第4,816,567号和Morrison等,1984、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855)。

[0050] 非人类(例如鼠)抗体的“人源化”形式为含有最小限度的来源于非人类免疫球蛋白序列的嵌合抗体。一般而言,人源化抗体包含至少一个且通常为两个可变结构域的几乎全部,其中全部或几乎全部超变环对应于非人类免疫球蛋白的超变环,全部或几乎全部FR区为人免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体还任选包含至少部分免疫球蛋白(通常为人免疫球蛋白)恒定区(Fc)。更详细的资料参见Jones et al,Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al,Nature 332:323-329(1988)。

[0051] “分离的”抗体为业已被鉴定并与其天然环境组分相分离的抗体。在一些实施方案中,将所述抗体纯化到以下程度:(1)超过95%重量的抗体,最优选超过99%重量,其由Lowry法测定;(2)足以通过用旋杯式测序仪获得N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)通过在还原或非还原条件下用考马斯蓝或优选银染色的SDS-PAGE确定为同质。

[0052] “分离的”核酸分子为被鉴定并与至少一种污染性核酸分子(通常在抗体核酸的天然来源中与其缔合)分离的核酸分子。因此,分离的核酸分子与在其天然细胞中存在的核酸分子有区别。

[0053] 本文所用术语“单克隆抗体”是指从基本上同种抗体群中获得的抗体,即除了可能少量存在的可能的天然突变体外,构成所述群的各个抗体是一致的。单克隆抗体具有高度特异性,可针对单个的抗原位点。此外,与通常包括针对多个不同的决定簇(表位)的多种不同抗体的常规(多克隆)抗体制备物相反,每种单克隆抗体仅针对抗原上的单个决定簇。修饰语“单克隆”表示从基本上同种抗体群获得的抗体的特性,不能理解为需要通过任何特定方法来制备所述抗体。本文单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体。

[0054] 关于抗体及其应用的更多介绍参见中国专利申请CN201510367410.4,在此通过援引将其全部内容并入本文。

[0055] 本文所用术语“免疫细胞”包括具有造血的起源并在免疫应答中起作用的细胞。免疫细胞包括:淋巴细胞,例如B细胞和T细胞;天然杀伤细胞;髓样细胞,例如单核细胞、巨噬细胞、嗜曙红细胞、肥大细胞、嗜碱细胞和粒细胞。

[0056] 本文所用序列“变体”是指在一个或多个氨基酸残基处不同于所示的序列但基本保留其生物学活性的序列。例如,变体可以保留原序列至少50%,优选至少70%,甚至90%的生物学活性。

[0057] 本文所用术语“约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内,所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如,“约”或“基本上包含”可意味着不超过20%的范围,优选不超过10%,更优选不超过5%。除非另外说明,否则当具体值在本文中出现时,“约”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

[0058] 当用“给予”和“治疗”提及动物、人、细胞或受试者时,是指将外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、细胞或受试者接触。“给予”和“治疗”可指例如治疗方法、药动

学方法、诊断方法、研究方法和实验方法。“给予”和“治疗”还意味着例如通过试剂、诊断剂、疗法、联合用药或通过其他细胞对细胞进行体外和离体治疗。

[0059] 本文所使用的术语“治疗有效量”指的是足以在受试者体内引起临床医师所期望的生物学或医学反应的活性化合物的量。本发明抗体的“治疗有效量”可由本领域技术人员根据给药途径、受试者的体重、年龄、病情等因素而确定。例如，典型的周总剂量可以为至少0.05 μ g/kg体重，典型地为至少1 μ g/kg体重。

[0060] 本发明所提供的药物可以制成粉末、注射剂等临床可接受的剂型。可以使用任何适当的途径给受试者施用本发明的药物组合物，例如可通过口服、静脉内输注、肌肉内注射、皮下注射、腹膜下、直肠、舌下，或经吸入、透皮等途径给药。

[0061] 本发明的药物制剂包含本发明PD-1抗体或其抗原结合片段以及可药用载体。为了制备药物组合物或无菌组合物，让抗体或其片段与可药用载体（或赋形剂）混合。

[0062] 本发明药物组合物还可含有其它药剂，包括但不限于细胞毒剂、细胞生长抑制剂、抗血管形成药物或抗代谢药物、靶向肿瘤药物、免疫刺激剂或免疫调节剂或与细胞毒剂、细胞生长抑制剂或其它毒性药物缀合的抗体。也可与其它治疗形式（例如手术、化疗及放射）一起施用所述药物组合物。

[0063] 与人PD-1特异性结合的本发明抗体或抗原结合片段可用于增加、提高、刺激或上调免疫应答。本发明抗体及抗体片段尤其适用于治疗罹患可通过提高T细胞介导的免疫应答来治疗的疾病的受治疗者。优选的受治疗者包括需要提高免疫应答的人患者。

[0064] 本发明抗体或抗原结合片段可用于治疗癌症（即抑制肿瘤细胞的生长或存活）。可用本发明抗体抑制其生长的优选的癌症包括通常对免疫疗法有反应的癌症，但还包括迄今与免疫疗法尚无关联的癌症。用于治疗的优选癌症的非限制性实例包括黑素瘤（例如恶性转移性黑素瘤）、肾癌（例如透明细胞癌）、前列腺癌（例如激素难控制的前列腺腺癌）、胰腺腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌（例如非小细胞肺癌）、食道癌、头颈鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤和其它恶性肿瘤。另外，本发明包括可用本发明抗体抑制其生长的难治性或复发性癌。

[0065] 本发明抗体或其抗原结合片段可单独使用或与以下其它物质联合使用：抗肿瘤药或免疫原剂（例如减弱的癌细胞、肿瘤抗原（包括重组蛋白质、肽和糖类分子）、抗原呈递细胞例如用来源于肿瘤的抗原或核酸刺激的树突细胞、免疫刺激细胞因子（例如IL-2、IFN α 2、GM-CSF）和用编码免疫刺激细胞因子（例如但不限于GM-CSF）的基因转染的细胞；标准癌症治疗（例如化疗、放疗或手术）；或其它抗体（包括但不限于针对以下物质的抗体：VEGF、EGFR、Her2/neu、VEGF受体、其它生长因子受体、CD20、CD40、CTLA-4、OX-40、4-1BB和ICOS）。

[0066] 本发明抗体或其抗原结合片段还可用于防止或治疗感染和感染性疾病。抗体或其抗原结合片段可单独使用，或与疫苗联合使用，以刺激针对病原体、毒素和自体抗原的免疫应答。抗体或其抗原结合片段可用于刺激对感染人的病毒的免疫应答，这些病毒例如但不限于人免疫缺陷病毒、甲、乙、丙型肝炎病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、人巨细胞病毒、人乳头瘤病毒、疱疹病毒。抗体或其抗原结合片段可用于刺激对细菌或真菌寄生虫及其它病原体引起的感染的免疫应答。

[0067] 本发明抗体或其抗原结合片段还可用于防止或治疗移植排斥、自身免疫性疾病和神经疾病。

[0068] 本文中使用的术语“自身免疫性疾病”是指由自身免疫反应所引起的任何疾病，即，免疫应答针对受试者身体内的物质。

[0069] 应当注意的是由于自身免疫性可以影响受试者的任何器官或组织，例如受试者的大脑、皮肤、肾脏、肺、肝脏、心脏或甲状腺，疾病的临床表现取决于受影响的部位。

[0070] 典型的自身免疫性疾病包括但不限于类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、骨关节炎、斯蒂尔病、青少年关节炎、狼疮、糖尿病、重症肌无力症、桥本甲状腺炎、奥德甲状腺炎、格雷夫斯病、类风湿性关节炎综合征、多发性硬化症、传染性神经元炎、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森病、视性眼阵挛-肌阵挛综合征、强直性脊椎炎、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、自身免疫性肝炎、乳糜泻、古德帕斯彻综合征、特发性血小板减少性紫癜、视神经炎、硬皮病、原发性胆汁性肝硬化、莱特尔综合征、高安动脉炎、颞动脉炎、温型自身免疫性溶血性贫血、韦格纳肉芽肿病、银屑病、全身脱毛、贝赫切特病、慢性疲劳、家族性自主神经功能异常、子宫内膜异位、间质性膀胱炎、神经肌强直、硬皮病和外阴痛等。

[0071] 本文中使用的术语“神经疾病”是指影响中枢神经系统和/或具有在中枢神经系统中的病因的疾病或病症。示例性的神经疾病的具体例子包括但不限于：帕金森病、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、朊病毒病(prion disease)、亨廷顿病(Huntington's disease)、雷特综合征(Rett syndrome)等。

[0072] 本发明抗PD-1抗体或其抗原结合片段可以与其他药物或疗法联合应用，例如与一种或多种其它治疗剂(例如细胞毒剂、放射性毒性剂或免疫抑制剂)联合应用。所述抗体可与所述药剂连接(作为免疫复合体)，或可与治疗剂分开给予，例如可在给予治疗剂之前、之后或同时给予抗体。此外，本发明抗体可与化疗、放疗、靶向治疗、基因治疗、细胞治疗、干细胞治疗等联合应用，尤其是用于癌症的治疗。

[0073] 本发明抗PD-1抗体或其抗原结合片段或其编码基因还可以被导入细胞中，以调节细胞功能或活性，或用于治疗疾病。该方法包括体外应用和体内应用。该方法特别适合用于基因治疗、CAR-T治疗或CRISPR治疗。

[0074] 本发明抗体及抗体片段的非治疗性应用包括：用于流式细胞术分析、免疫组织化学和体外功能分析、蛋白质印迹和ELISA等。本发明抗体还可用作亲和纯化试剂。

[0075] 所述抗体还可用于诊断测定，例如用于检测PD-1在特定的细胞、组织或血清中的表达。为了诊断应用，通常用可检测的部分标记(直接或间接)抗体。可利用众多标记物，其通常分为以下类别：生物素、荧光染料、放射性核苷酸、酶、碘和生物合成标记物。

[0076] 本发明抗体可用于任何已知的测定法中，例如竞争性结合测定法，直接和间接夹心测定法和免疫沉淀测定法。抗体还可用于体内诊断测定。例如用放射性核素(例如¹¹¹In、⁹⁹Tc、⁴C、³¹I、¹²⁵I、³H、³²P、³⁵S或¹⁸F)标记抗体，以便定位抗原或表达抗体的细胞。

[0077] 通过参考以下实施例将更充分地理解本发明。然而，这些实施例不应该理解为限制本发明范围。

[0078] 实施例1产生和筛选PD-1抗体

[0079] 1.产生人PD-1融合蛋白

[0080] 从人外周血单个核细胞(PBMC)利用MACS磁珠(MiltenyiBiotec)分离出T淋巴细胞，提取RNA(RNeasy mini kit, QIAGEN)并获得第一链cDNA(SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen,)并根据人PD-1基因DNA序列(NCBI Reference Sequence:

NM_005018.2)通过PCR反应获得人PD-1分子全长序列。人PD-1融合蛋白是将PD-1分子胞外部分序列插入到一个含有小鼠免疫球蛋白G2aCH2-CH3结构域的表达质粒mIgV (H Dong et al Nat Med.1999;5:1365-1369)中。利用瞬时表达方法将质粒DNA用PEI试剂(Sigma-Aldrich)转染293T细胞产生人PD-1小鼠Ig融合蛋白(hPD-1mIg),细胞分泌上清液经IgA纯化柱(HiTrap Protein A HP,GE healthcare)纯化蛋白并经SDS-PAGE凝胶电泳鉴定确认。

[0081] 2. 构建PD-1稳定表达细胞株

[0082] 为检测和鉴定PD-1抗体,我们构建了人PD-1蛋白稳定表达细胞株。将上述得到的PD-1全长序列插入到pcDNA3.1(-)表达质粒,利用lipofactamin 2000转染试剂(Thermo Fisher Scientific)转染中国仓鼠卵巢成纤维细胞(CHO),经G418筛选得到稳定表达的阳性细胞株(CHO/hPD1)。

[0083] 3. 免疫小鼠

[0084] 取6-8周龄大小的雌性Balb/c小鼠,用hPD-1mIg融合蛋白与福氏完全佐剂(CFA, Sigma)混合乳化液皮下多点接种免疫,每只小鼠80-100 μ g蛋白,3周后用相同融合蛋白与不完全佐剂(IFA, Sigma)乳化液进行加强免疫,共免疫3次。每次在小鼠免疫后2周左右取血清测定抗体效价,血清效价用CHO/hPD1细胞通过流式细胞仪测定。二抗用荧光标记的羊抗鼠IgG(eBioscience)。当血清效价达到足够高时,用80 μ g hPD-1mIg融合蛋白溶于PBS中,腹腔注射加强免疫一次,5天后取出脾脏进行融合。

[0085] 4. 制备和筛选杂交瘤

[0086] 杂交瘤细胞的产生通过免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系(SP2/0-Ag14)在聚乙二醇(PEG1500, Roche)融合剂作用下进行融合,融合后的细胞经过HAT(Sigma Aldrich)选择培养,利用我们实验室建立的高通量转染和筛选系统(S Yao et al. Immunity. 2011; 34(5):729-40.)鉴定培养上清,筛选得到的阳性单克隆抗体再经过流式细胞仪检测确认能够与PD-1阳性表达细胞结合。挑选出的阳性克隆细胞株经过5遍以上有限稀释法进行亚克隆选择,确保是单一来源的阳性克隆。

[0087] 实施例2抗PD-1单抗的特性分析

[0088] 1. 单抗同种型(isotype)的鉴定

[0089] 得到的几株单克隆抗体用小鼠IgG同种型检测试剂盒(Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit, BD Biosciences)进行测定,5个单克隆抗体重链均为IgG1,轻链均为 κ 链。

[0090] 2. 单抗特异性结合的评估

[0091] 1) 种属交叉反应的鉴定显示几株PD-1抗体克隆只和人PD-1蛋白结合,与小鼠PD-1无交叉结合。

[0092] 2) PD-1抗体与PD-1蛋白的结合反应:将我们实验室得到的5个PD-1抗体用流式细胞仪检测和比较和CHO/hPD-1细胞结合活性,结果显示这些抗体与PD-1蛋白都有较强的结合活性(图1)。

[0093] 3) PD-1抗体对PD-1受体蛋白和其配体PD-L1结合的阻断作用:肿瘤细胞上表达PD-L1配体蛋白与其在淋巴细胞表达的PD-1受体结合会诱导产生免疫细胞功能抑制而导致肿瘤逃避宿主免疫系统监视作用,阻断PD-1与PD-L1之间的相互作用是PD-1抗体抗肿瘤免疫治疗的一个重要作用机制。为检测抗体的阻断活性,我们将100ng hPD-1hIg融合蛋白分别与100ng、200ng、400ng和800ng不同剂量的不同PD-1抗体混合,并设mIgG和PBS缓冲液对照

组。4℃孵育30分钟,然后与PD-L1阳性表达细胞(CHO/PD-L1)在4℃作用30分钟,用含1%小牛血清PBS缓冲液离心洗一遍,加入荧光标记的羊抗人IgG,4℃孵育20分钟,洗后用流式细胞仪检测。结果显示2个PD-1抗体没有阻断活性,其余3个抗体都能够以剂量依赖性阻断PD-1与PD-L1蛋白间的结合(图2)。

[0094] 4) 抗体竞争结合实验:为弄清这些PD-1抗体是否识别同一个或不同抗原表位,我们做了抗体竞争结合实验。首先分别用10μg不同PD-1抗体与CHO/hPD-1细胞在4℃孵育30分钟,用含1%小牛血清PBS缓冲液离心洗一遍后加入0.1μg的生物素(Biotin)标记的Ab4或Ab5,4℃孵育20分钟,洗后加入荧光标记的链霉亲和素(Streptavidin,SA;eBioscience),4℃孵育20分钟,洗后用流式细胞仪进行分析。结果显示Ab4和Ab5相互竞争结合同一抗原表位,这两个抗体与Ab3有部分竞争结合,与Ab1和Ab2不存在竞争结合(图3)。

[0095] 实施例3抗PD-1抗体的序列测定和人源化

[0096] 为了将PD-1抗体能够用于临床肿瘤治疗,我们根据上述抗体活性的测试结果选择了Ab4进行序列测定和人源化。

[0097] 1. 单克隆抗体序列测定

[0098] 首先利用RNA纯化试剂盒(RAeasy Mini Kit,Qiagen 74104,QIAshredder,Qiagen 79654)从杂交瘤细胞提取和纯化总RNA。然后用试剂盒(SMARTer RACE cDNA Amplification Kit,Clontech)并按公司试剂操作手册将RNA反转录合成第一链cDNA链。利用5' RACE技术,用试剂盒提供的通用引物UPM(universal primer)作为上游引物,和根据小鼠IgG1重链可变区和轻链κ链基因序列设计的基因特异引物GSP(genespecific primer)作为下游引物,以SMART第一链cDNA为模板进行PCR循环。然后将PCR产物分别连接到T载体(Zero Blunt TOP0 PCR Cloning Kit,Invitrogen K2875-J10)。挑选克隆进行序列测定和分析,分别得到抗体的轻链和重链可变区序列,再根据重链可变区序列和小鼠IgG1序列设计引物,通过PCR获得重链全长序列,利用VBASE2对序列进行分析,确定了该抗体轻、重链的氨基酸序列以及相应的CDR区域(见表2)。其DNA编码序列参见表1。

[0099] 2. 单克隆抗体DNA重组序列和抗体表达

[0100] 为确保克隆抗体序列的正确性,分别把抗体的轻、重链全长序列插入到pcDNA3.1(-)表达质粒中,并通过瞬转293T细胞得到蛋白产物,经纯化和鉴定确认蛋白产物与原抗体一样能够和PD-1蛋白结合(图4A)并能够阻断PD-1蛋白与PD-L1的结合(图4.B)。

[0101] 3. 抗体序列人源化

[0102] 为了使抗体能够应用临床病人治疗,对抗体序列进行了人源化改造。首先将抗体重链的Fc部分换为人IgG4序列,并将IgG铰链区4的CPSCP换为IgG1的CPPCP(S228P),同时把抗体轻链换成人的κ链,得到人鼠嵌合的母本抗体(Chimeric Ab)。在确认母本抗体的功能活性后对重链可变区和轻链可变区序列进行人源化改造,将所得到的3个人源化重链变异体(表3序列6-8,表4序列14-16)、3个人源化轻链变异体(表3序列10-12,表4序列18-20)互相组合,共得到9个不同的变异体序列(Variants 1至Variants 9)。将1个母本和9个变异体序列分别克隆到高表达载体中,用瞬时转染293细胞得到抗体上清,纯化后的抗体经SDS-PAGE胶蛋白电泳和测序验证确认正确。抗体的DNA和氨基酸序列见表3、表4。其中,Variants 1的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:6,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:10;Variants 2的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:6,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:11;Variants 3的重链氨基酸序

列为SEQ ID NO:6,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:12;Variants 4的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:7,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:10;Variants 5的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:7,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:11;Variants 6的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:7,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:12;Variants 7的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:8,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:10;Variants 8的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:8,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:11;Variants 9的重链氨基酸序列为SEQ ID NO:8,轻链氨基酸序列为SEQ ID NO:12。

[0103] 实施例4人源化抗体的特性和功能

[0104] 1.人源化抗体的与PD-1蛋白的结合活性:对嵌合母本和突变抗体进行测试和比较,取CHO/hPD-1细胞悬于含1%小牛血清的PBS并分装于流式管中,分别加入不同剂量的母本和突变体抗体,4℃孵育30分钟,用含1%小牛血清PBS缓冲液离心洗一遍后加入荧光标记的羊抗人IgG二抗(eBioscience),4℃孵育20分钟洗后用流式细胞仪进行分析。结果显示所有人源化突变体均可与PD-1蛋白结合,与嵌合母本抗体比较,部分突变抗体的结合能力更高,有的相对要低一些(图5)。

[0105] 2.人源化抗体对PD-1受体蛋白和其配体PD-L1结合的阻断作用:用400ng、300ng、200ng、100ng和50ng不同PD-1抗体分别与100ng hPD-1mIg融合蛋白混合,设hIgG和PBS缓冲液对照组,4℃孵育30分钟,然后与PD-L1阳性表达细胞(CHO/PD-L1)作用30分钟,用含1%小牛血清PBS缓冲液离心洗一遍后加入荧光标记的羊抗鼠IgG-,4℃孵育20分钟,洗后用流式细胞仪检测。结果显示所有人源化突变体抗体都能够阻断PD-1与PD-L1蛋白间的结合并呈剂量依赖性,部分突变体的阻断作用高于母本抗体(图6)。

[0106] 3.人源化抗体亲和力;利用Biacore仪器(Biacore T100,GE Healthcare Life Sciences)对母本抗体和突变体抗体进行了亲和力的分析比较。将蛋白抗原hPD-1mIg偶联在CM5芯片表面,检测抗体作为分析物(流动相),检测相互作用。结果显示突变体抗体与母本抗体比较,结合速率(K_a)差异不大,解离速率(K_d)有2个突变体较嵌合抗体略慢,亲和力(KD)母本抗体为 $9.89E-11M$,具有较强的亲和力,有2个突变体KD值与嵌合抗体接近(图7)。

[0107] 实施例5人源化抗体其它生物功能特性

[0108] 1.人源化PD-1抗体与食蟹猴的淋巴细胞PD-1蛋白交叉结合:为今后临床前的毒理测试需要,我们测试PD-1抗体能否结合猴子PD-1蛋白。取食蟹猴的外周单个核细胞,用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞悬于10%小牛血清RPMI 1640培养液里,加入包被 $1\mu g/ml$ 抗人CD3抗体的24孔培养板中或加入没有包被抗体的24孔培养板中,培养液中加入 $10ng/ml$ 抗hIFN γ 和50imL hIL2,5%CO₂,37℃条件培养2天。收获细胞用PBS洗1遍,加入PD-1抗体,4℃孵育30分钟,洗后再加入荧光标记的抗人IgG,4℃孵育20分钟,洗后用流式细胞仪检测。结果显示人源化PD-1抗体能够和食蟹猴淋巴细胞PD-1蛋白结合(图8)。

[0109] 2.体外抗肿瘤作用:我们根据PD-1抗肿瘤作用的机理设计了一个体外模型。首先利用从人外周血淋巴细胞(PBMC)分离出的CD8+淋巴细胞,与经过放射线照射的转染hB7-1的人黑色素瘤细胞(624Me1/B7-1)共培养,产生能够杀伤624Me1瘤细胞的同种异体细胞毒性淋巴细胞(alloCD8+CTL)。然后将allo CTL效应细胞和624Me1瘤细胞按一定比例混合后,加入PD-1抗体或对照蛋白培养5天,用0.5%结晶紫染色细胞后,用酶标仪读取OD(450nm)值,根据瘤细胞存活计算杀伤活性,结果显示部分人源化的PD-1突变体抗体体外能够增强效应细胞杀伤肿瘤细胞的功能(图9,E:T=效应细胞(Effect cells):靶细胞(target

cells))。

[0110] 3. 人源化PD-1抗体抑制人淋巴细胞PD-1的表达: 肿瘤细胞表达PD-L1可诱导周边的淋巴细胞表达PD-1而导致淋巴细胞活性受抑制而不能杀伤肿瘤细胞, 我们利用体外模型模拟这种情况, 检测在加入PD-1抗体后能否抑制人淋巴细胞PD-1的表达从而恢复淋巴细胞的正常功能。我们将转染PD-L1的人黑色素瘤细胞(624Me1/hPD-L1)与alloCD8+CTL按比例混合加入24孔培养板, 并在培养液中分别加入10 μ g/ml不同PD-1抗体和对照蛋白, 培养4天后, 用荧光标记的PD-1和CD8抗体染色细胞后用流式细胞仪检测淋巴细胞上PD-1的表达情况。结果显示培养液和hIgG对照组的CD8+淋巴细胞表达PD-1表达阳性, 而加入母本抗体和突变抗体的各组CD8+淋巴细胞PD-1蛋白均为阴性(图10), 说明加入PD-1抗体后能抑制淋巴细胞表面的PD-1表达。

[0111] 实施例6人源化PD-1抗体与商业化抗体功能比较

[0112] 我们选择了目前已获批在临床治疗肿瘤病人的2个厂家的商业化PD-1抗体和我们的抗体做基本特性的比较, 包括Keytruda (penbrolizumab) (Merck&CO., INC), 100mg/4ml, Lot M023694Exp 2017JUL13; Opdivo (nivolumab) (Bristol-Myers Squibb), 100mg/10ml, Lot AAK5824Exp 02.2018; Opdivo (nivolumab) (Bristol-Myers Squibb), 40mg/4ml, Lot AAK2713Exp10.2017。

[0113] 6.1抗体动力学和亲和力比较:

[0114] 抗体动力学和亲和力比较我们使用Biacore T200仪器 (GE Healthcare Life Sciences), 在GE公司技术工程师操作下, 检测了自研的PD-1抗体FMU100 (即, Variant 3) 与3个上市抗体对PD-1mFc蛋白的动力学和亲和力的差异。将PD1-mFc蛋白分别偶联在CM5芯片的4通道 (33RU), 自研和商品抗体作为分析物 (流动相), 检测相互作用。经摸索后, 将PD1抗体均稀释到50nM作为最高浓度; 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50nM进行浓度梯度进样, 使用Glycine pH1.7作为再生条件。测试结果显示结合速率 K_a 差异不大, 自研抗体较商品抗体稍低; 解离速率 K_d , 自研抗体较商品抗体慢10倍; 亲和力 K_D , 自研抗体较商品抗体高4-7倍 (图11)。

[0115] 6.2体外抑制肿瘤生长作用比较

[0116] 如前所述, 将alloCD8+CTL效应细胞和624Me1瘤细胞按一定比例混合后, 加入自研PD-1抗体和3个上市抗体或对照蛋白共培养5天, 用0.5%结晶紫染色细胞后, 用酶标仪读取OD (450nm) 值, 根据瘤细胞存活计算杀伤活性, 结果显示自研的PD-1抗体和3个上市抗体体外都能够增强效应细胞杀伤肿瘤细胞的功能, 自研的抗体增强作用高于2个上市抗体 (图12, E:T=效应细胞 (Effect cells): 靶细胞 (target cells))。

[0117] 表1. PD-1单克隆抗体DNA序列 (对应于Ab4)

[0118] 重链序列 (SEQ ID NO:1)

- [0119] ATGGAATTTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGCTCTGTTTTAAAGGTGTCCTGTGTGAAGTGAAGTTGGTGGAGTCT
GGGGGAGGTTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATACC
ATGTCTTGGAATTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAAGTCATGGTGGTGGTGACACCTAC
TATCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGT
CTGAAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACATAGTGGTTACGAGAGGGGATATTACTATGTTATGGAT
TACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGA
TCTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC
TGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCcCAGCTGTCTGTGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGC
TCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTGCCCCACCCGGCCAGCAGCACCAG
GTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTC
ATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTGTGGTAGACATCAGC
AAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAG
GAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTC
AAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCGAAGGCT
CCACAGGTGTACACCATTCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGAC
TTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGAATGGGCGACCCAGCGGAGAACTACAAGAACTCAGCCCATC
ATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTC
ACCTGCTCTGTGTACATGAGGGCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA
- [0120] 轻链序列 (SEQ ID NO:2)
ATGGAGAAAGACACACTCCTGCTATGGGTCTGCTTCTCTGGGTTCAGGTTCCACAGGTGACATTGTGCTGACCCAA
TTTCCAACCTCTTTGGCTGTGTCTTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGATTACTAT
GGCTTAGTTTATAAACTGGTTCCAACAGAAACAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAAACCAG
GGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTTGGTGCCAGTGGCTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCATCCTATGGAGGAG
GATGATACTGCAATGTATTTCTGTGAGCAAAAGTAAGGAGGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATC
AAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTC
GTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGC
GTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGAC
GAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTAA
- [0121] MNFGLSLIFLVLVKGVLCVVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGTFSSYFMSWIRQTPEKRLEWVAYISRGGSUTY
signal Peptide CDR1 CDR2
YPDVTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLLKSEDAMYYCARHSGYERSTYVMDXWGQTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPG
CDR3
SAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTK
CH1 (constant region1)
[0124] VDKKEVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPRE
Hinge CH2 (constant region2)
EQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDQVSLTCMITD
FFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK
CH3 (constant region3)
- [0125] 轻链序列 (SEQ ID NO:4)
MEKDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQFPTSLAVSLGQRATISCRASESVDYXGFEINWFQKPGQPPKLLIYAAENQ
signal Peptide CDR1 CDR2
[0126] GSGVPARFGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQGSKEVFWTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPESSEQLTSGGASV
CDR3
VCFLNNFYPKDINVKKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSP
Kappa Constant Region
- [0127] 表3.PD-1单克隆抗体母本和人源化变异体DNA序列
- [0128] 单克隆抗体母本重链hIgG4-S228P (SEQ ID NO:5)

- [0129] ATGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCGAAGTG
AAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACT
TTCAGTAGCTATACCATGTCTTGGATTCCGCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTAGTCATGGT
GGTGGTGACACCTACTATCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAATGCCAAGAACACCCGTGTAC
CTGCCAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACATAGTGGTTACGAGAGGGGATAT
TACTATGTTTATGGATTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTACCCTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTT
CCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAA
CCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGTCTGCAGAGCAGCGGC
CTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCAT
AAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCTCCTTGCCTGTCTCCTGAA
TTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGACACCCGAAGTC
ACCTGCGTCGTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCAT
AACGCCAAAACCAAGCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCTGTCTCGTGTCTCACCGTCCTGCATCAG
GATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCC
AAGGCTAAGGGCCAACTCGGGAGCCCCAAGTGATATACCCTCCCTCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAAGTG
AGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAAC
AACTACAAGACCACACCCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCC
CGGTGGCAAGAGGGAACGTGTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTC
TCCCTGAGCCTCGGCAAGTAG
- [0130] 人源化重链变异体1 (SEQ ID NO:6)
ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCGAAGTG
CAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCACC
TTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTTACATCTCTCACGGC
GGAGGCGACACCTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGAACCTCCAAGAACACCCGTGTAC
CTGCAGATGAACCTCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTCGGCACTCTGGCTACGAGCGGGGCTAC
TACTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTT
CCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAA
CCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGTCTGCAGAGCAGCGGC
CTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCAT
AAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCTCCTTGCCTGTCTCCTGAA
TTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGACACCCGAAGTC
ACCTGCGTCGTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCAT
AACGCCAAAACCAAGCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCTGTCTCGTGTCTCACCGTCCTGCATCAG
GATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCC
AAGGCTAAGGGCCAACTCGGGAGCCCCAAGTGATATACCCTCCCTCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAAGTG
AGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAAC
AACTACAAGACCACACCCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCC
CGGTGGCAAGAGGGAACGTGTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTC
TCCCTGAGCCTCGGCAAGTAG
- [0131] 人源化重链变异体2 (SEQ ID NO:7)
ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCGAAGTG
CAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCACC
TTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTTACATCTCTCACGGC
GGAGGCGACACCTACTACCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGAACCTCCAAGAACACCCGTGTAC
CTGCAGATGAACCTCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTCGGCACTCTGGCTACGAGCGGGGCTAC
TACTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTT
CCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAA
CCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGTCTGCAGAGCAGCGGC
CTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCAT
AAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCTCCTTGCCTGTCTCCTGAA
TTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGACACCCGAAGTC
ACCTGCGTCGTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCAT
AACGCCAAAACCAAGCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCTGTCTCGTGTCTCACCGTCCTGCATCAG
GATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCC
AAGGCTAAGGGCCAACTCGGGAGCCCCAAGTGATATACCCTCCCTCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAAGTG
AGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAAC
AACTACAAGACCACACCCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCC
CGGTGGCAAGAGGGAACGTGTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTC
TCCCTGAGCCTCGGCAAGTAG
- [0132] 人源化重链变异体3 (SEQ ID NO:8)
ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCGAAGTG
CAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCACC
TTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTTACATCTCTCACGGC
GGAGGCGACACCTACTACCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGAACCTCCAAGAACACCCGTGTAC
CTGCAGATGAACCTCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTCGGCACTCTGGCTACGAGCGGGGCTAC
TACTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTT
CCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAA
CCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGCTGTCTGCAGAGCAGCGGC
CTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCAT
AAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCTCCTTGCCTGTCTCCTGAA
TTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGACACCCGAAGTC
ACCTGCGTCGTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCAT
AACGCCAAAACCAAGCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCTGTCTCGTGTCTCACCGTCCTGCATCAG
GATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCC
AAGGCTAAGGGCCAACTCGGGAGCCCCAAGTGATATACCCTCCCTCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAAGTG
AGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAAC
AACTACAAGACCACACCCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCC
CGGTGGCAAGAGGGAACGTGTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTC
TCCCTGAGCCTCGGCAAGTAG

- ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCGAAGTG
AAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGCCGCTCCGGCTTCACC
TTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATCTCTCACGGC
GGAGGCGACACCTACTACCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTACCATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACCTGTAC
CTGCAGATGAATCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCTGTACTACTGTGCTCGGCACTCTGGCTACGAGCGGGGTAC
TACTACGTGATGGACTACTGGGGCAAGGGCACCCGTGACCTGTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGT
CCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAGCACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAA
CCCGTCACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCGTGTCTGCAGAGCAGCGGC
CTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGAACAAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCAT
AAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCTCCTTGCCCTGCTCCTGAA
TTTCTCGGAGGCCCTCCGTCTTCTGTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCTCCCGACACCCGAAGTC
ACCTGCGCTCGTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCAT
AACGCCAAAACCAAGCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCTGTCTCGTGTCCGTGCTCACCGTCTGCATCAG
GATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCC
AAGGCTAAGGGCCACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCCTCCCTCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAAGTG
AGCCTGACCTGCCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAAC
AACTACAAGACCACACCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAATCC
CGGTGGCAAGAGGGAACGTGTTACGTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTC
TCCCTGAGCCTCGGCAAGTAG
- [0136] 单克隆抗体母本kappa轻链 (SEQ ID NO:9)
- ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCCGGCTCCACCGGAGACATTGTGCTGACCCAA
TTTCCAATTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGAGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTTGATTACTAT
GGCTTTAGTTTATAAACTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAACCAG
GGATCCGGGTCCCTGCCAGGTTTGGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCATCCTATGGAGGAG
GATGATACTGCAATGATTTCTGTGAGCAAAAGTAAAGAGGTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCCAACAGCTGGAAATC
AAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTG
GTGTGCTGTGTAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC
AGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTGAGCAAGGCC
GACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
CGGGCGGAGTGCTAA
- [0137] 人源化轻链变异体1 (SEQ ID NO:10)
- ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCCGGCTCCACCGGAGACATCGTGATGACCCAG
TCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCTCCTCGAGTCCGTGGACTACTAC
GGCTTCTCCTTCCTGAACTGGTTCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCCAAACCGC
GAGTCTGGCGTGCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTTACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCC
GAGGATGTGGCCGTGTAATACTGTCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATC
AAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTG
GTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC
AGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTGAGCAAGGCC
GACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
CGGGCGGAGTGCTAA
- [0138] 人源化轻链变异体2 (SEQ ID NO:11)
- ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCCGGCTCCACCGGAGACATCGTGATGACCCAG
TCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGGCTCCGAGTCCGTGGACTACTAC
GGCTTCTCCTTCCTGAACTGGTTCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCCAAACCGC
GAGTCTGGCGTGCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTTACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCC
GAGGATGTGGCCGTGTAATACTGTCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATC
AAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTG
GTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC
AGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTGAGCAAGGCC
GACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
CGGGCGGAGTGCTAA
- [0139] 人源化轻链变异体3 (SEQ ID NO:12)
- ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCCGGCTCCACCGGAGACATCCAGCTGACCCAG
TCCCCGACTCCCTGTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGGCTCCGAGTCCGTGGACTACTAC
GGCTTCTCCTTCCTGAACTGGTTCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCCAAACCGC
CAGTCTGGCGTGCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTTACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCC
GAGGATGTGGCCGTGTAATACTGTCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATC
AAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTG
GTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC
AGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTGAGCAAGGCC
GACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
CGGGCGGAGTGCTAA
- [0140] 表4.PD-1单克隆抗体母本和人源化变异体氨基酸序列

- [0147] 单克隆抗体母本重链hIgG4-S228P (SEQ ID NO:13)
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTM^{CDR1}MSWIRQTPEKRLEWVAYSHGGGDTYYPDTV^{CDR2}
signal Peptide
KGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYC^{CDR3}ARHSGYERGYYVMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV^{CDR1}DH^{Hinge}KPSNTKV^{CDR2}DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG^{CDR3}GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
CH2 (constant region2)
KVS^{CDR1}NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL^{CDR2}
TVDKSRWQEGNVFSCSV^{CDR3}MHEALHNHYTQKSLSLGLK
- [0149] 人源化重链变异体1 (SEQ ID NO:14)
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTM^{CDR1}MSWVRQAPGKGLEWVSYS^{CDR2}SHG
GGDYYPADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYERGYYVMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF^{CDR3}
- [0150] PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV^{CDR1}DH^{Hinge}KPSNTKV^{CDR2}DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG^{CDR3}GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV^{CDR1}MHEALHNHYTQKSL^{CDR2}
SLSLGLK
- [0151] 人源化重链变异体2 (SEQ ID NO:15)
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTM^{CDR1}MSWVRQAPGKGLEWVSYS^{CDR2}SHG
GGDYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYERGYYVMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF^{CDR3}
- [0152] PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV^{CDR1}DH^{Hinge}KPSNTKV^{CDR2}DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG^{CDR3}GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV^{CDR1}MHEALHNHYTQKSL^{CDR2}
SLSLGLK
- [0153] 人源化重链变异体3 (SEQ ID NO:16)
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVKLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTM^{CDR1}MSWVRQAPGKGLEWVSYS^{CDR2}SHG
GGDYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYERGYYVMDYWGKGTTVTVSSASTKGPSVF^{CDR3}
- [0154] PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV^{CDR1}DH^{Hinge}KPSNTKV^{CDR2}DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG^{CDR3}GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV^{CDR1}MHEALHNHYTQKSL^{CDR2}
SLSLGLK
- [0155] 单克隆抗体母本kappa轻链 (SEQ ID NO:17)
METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVLTQFPTSLAVSLGQRATISCRASESV^{CDR1}DDYYGFSEINWFQQKPGQPPKLLIYAAS^{CDR2}NO
signal Peptide
GSGVPARFGSGSGTD^{CDR3}FTSLNIHPMEEDDTAM^{CDR1}YFC^{CDR2}QQSK^{CDR3}EVFW^{CDR1}FGGGTKLEIKRTVAAPSVFI^{CDR2}PPSDEQLKSGTASV^{CDR3}
VCLLN^{CDR1}NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK^{CDR2}STYLS^{CDR3}STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
Kappa Constant Region
RGEC
- [0157] 人源化轻链变异体1 (SEQ ID NO:18)
METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESV^{CDR1}DDYYGFSEINWFQQKPGQPPKLLIYAAS^{CDR2}NR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT^{CDR3}ISS^{CDR1}LQAEDVAVYYC^{CDR2}QQSK^{CDR3}EVFW^{CDR1}FGGGTKLEIKRTVAAPSVFI^{CDR2}PPSDEQLKSGTASV^{CDR3}
VCLLN^{CDR1}NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK^{CDR2}STYLS^{CDR3}STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC
- [0159] 人源化轻链变异体2 (SEQ ID NO:19)

- METDTLLLWVLLWVPGSTGDI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKAS ESVDYFGFS FLNWFQQKPGQPPKLLIY ASNR
CDR1 CDR2
- [0160] ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QSSKEVPWF FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
CDR3
VCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGE C
- [0161] 人源化轻链变异体3 (SEQ ID NO:20)
METDTLLLWVLLWVPGSTGDI QLTQSPDSLAVSLGERATINCKAS ESVDYFGFS FLNWFQQKPGQPPKLLIY ASNR
CDR1 CDR2
- [0162] QSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QSSKEVPWF FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
CDR3
VCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGE C

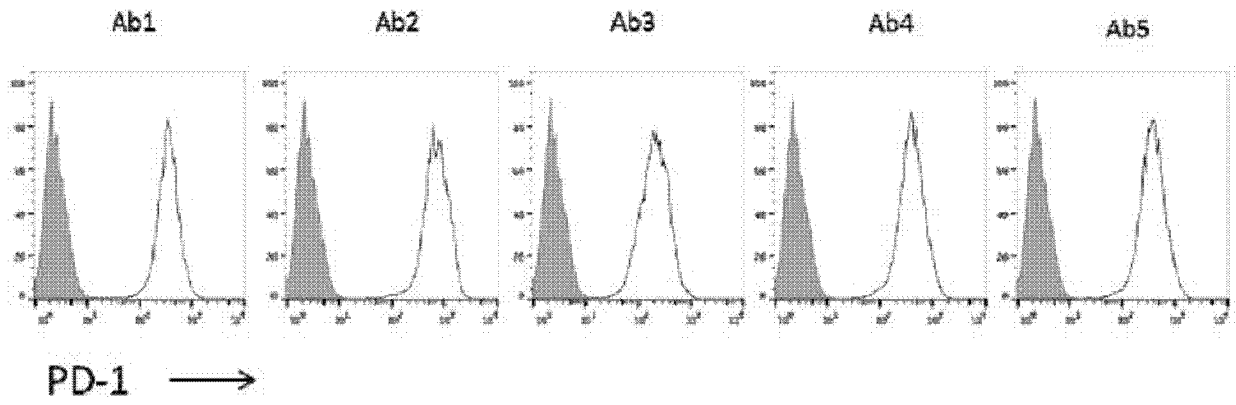


图1

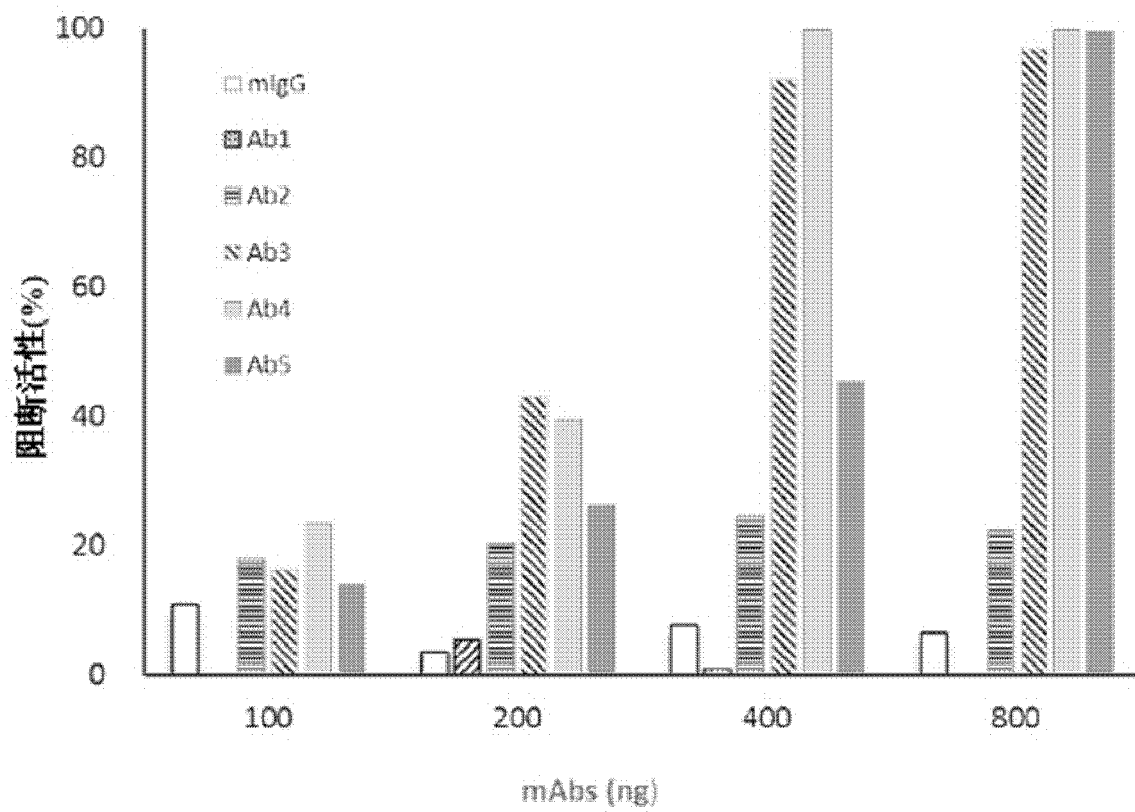


图2

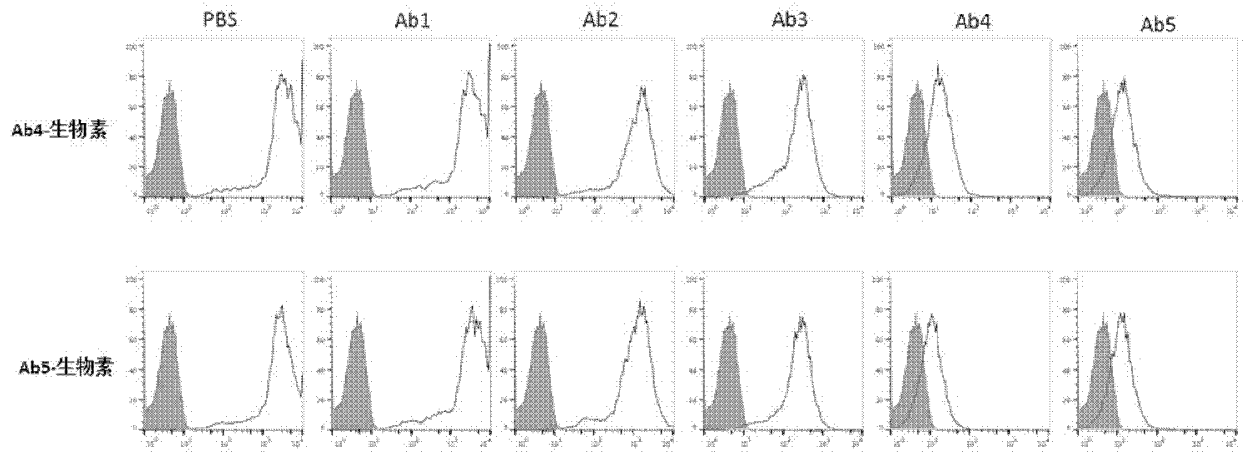
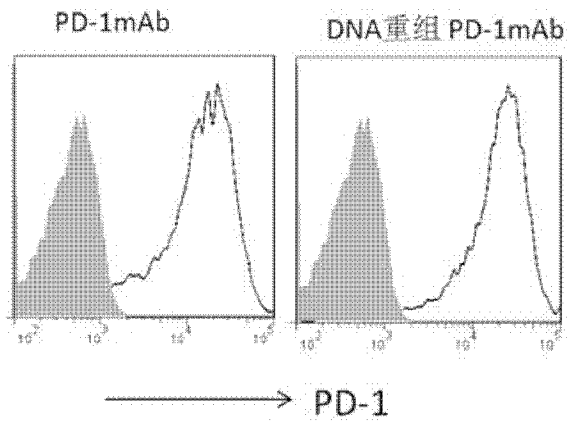


图3

A. DNA重组 PD-1抗体的结合活性



B. DNA重组 PD-1抗体的阻断作用

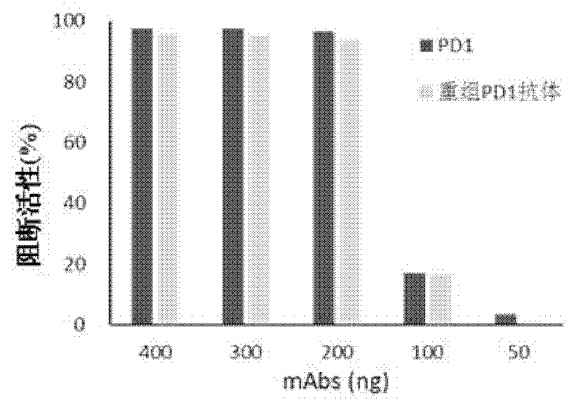


图4

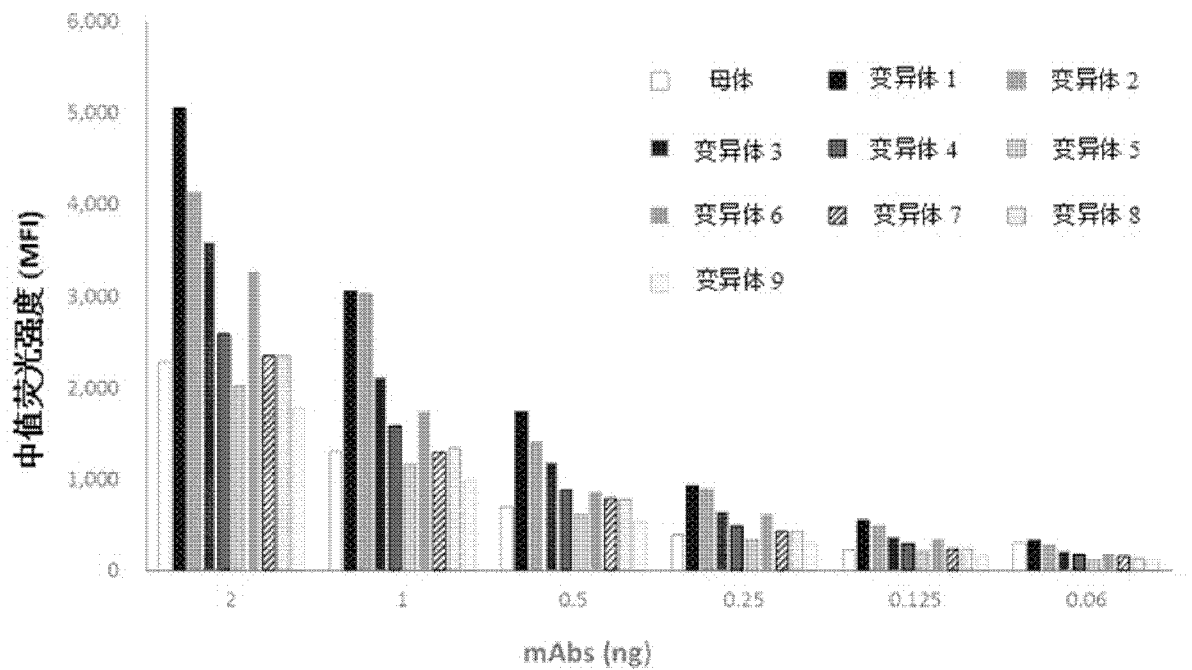


图5

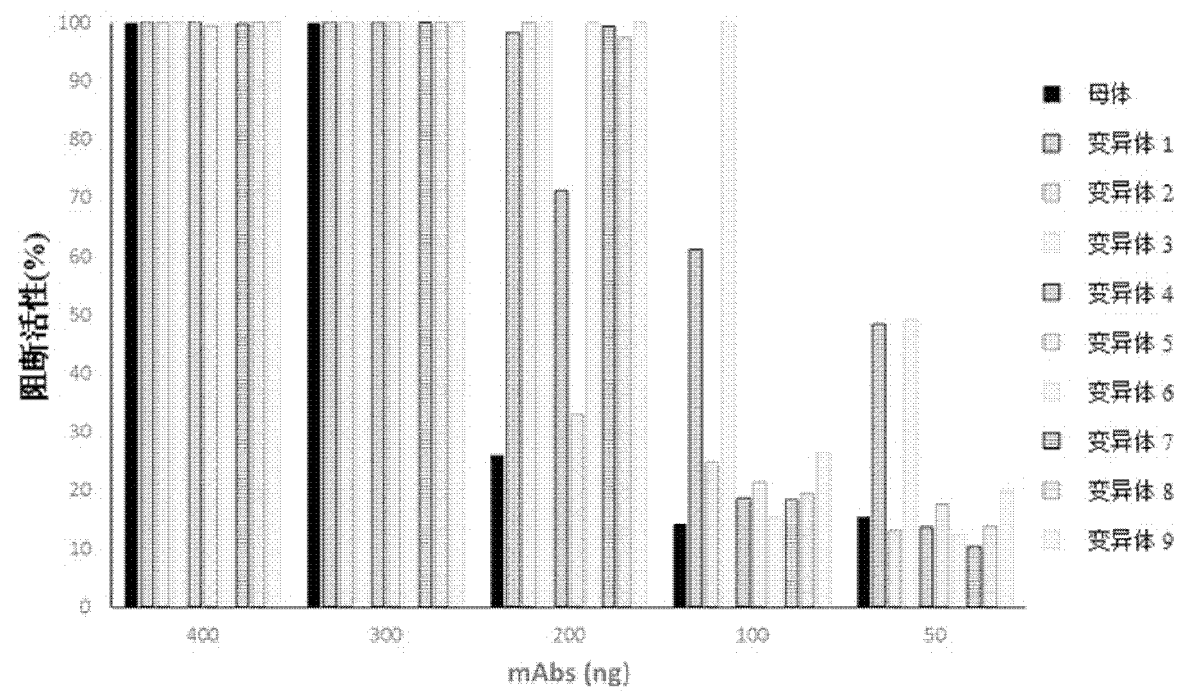


图6

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

图7

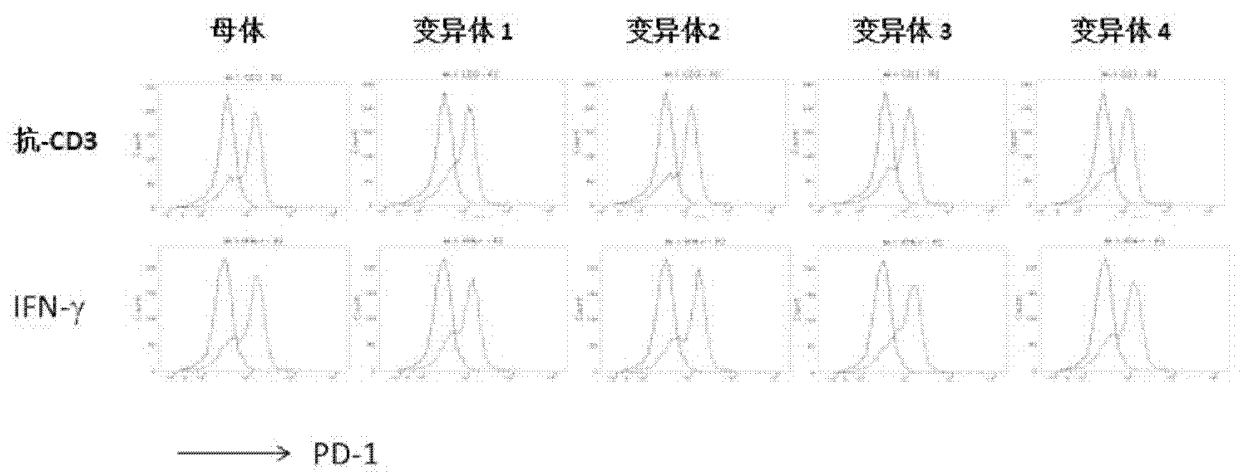


图8

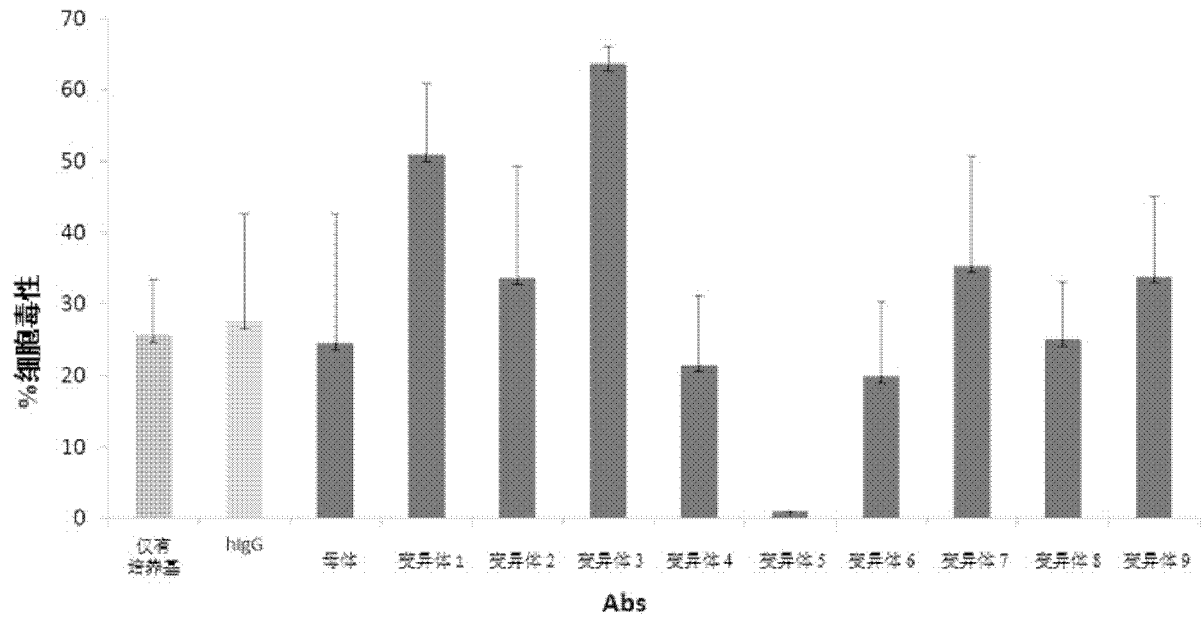


图9

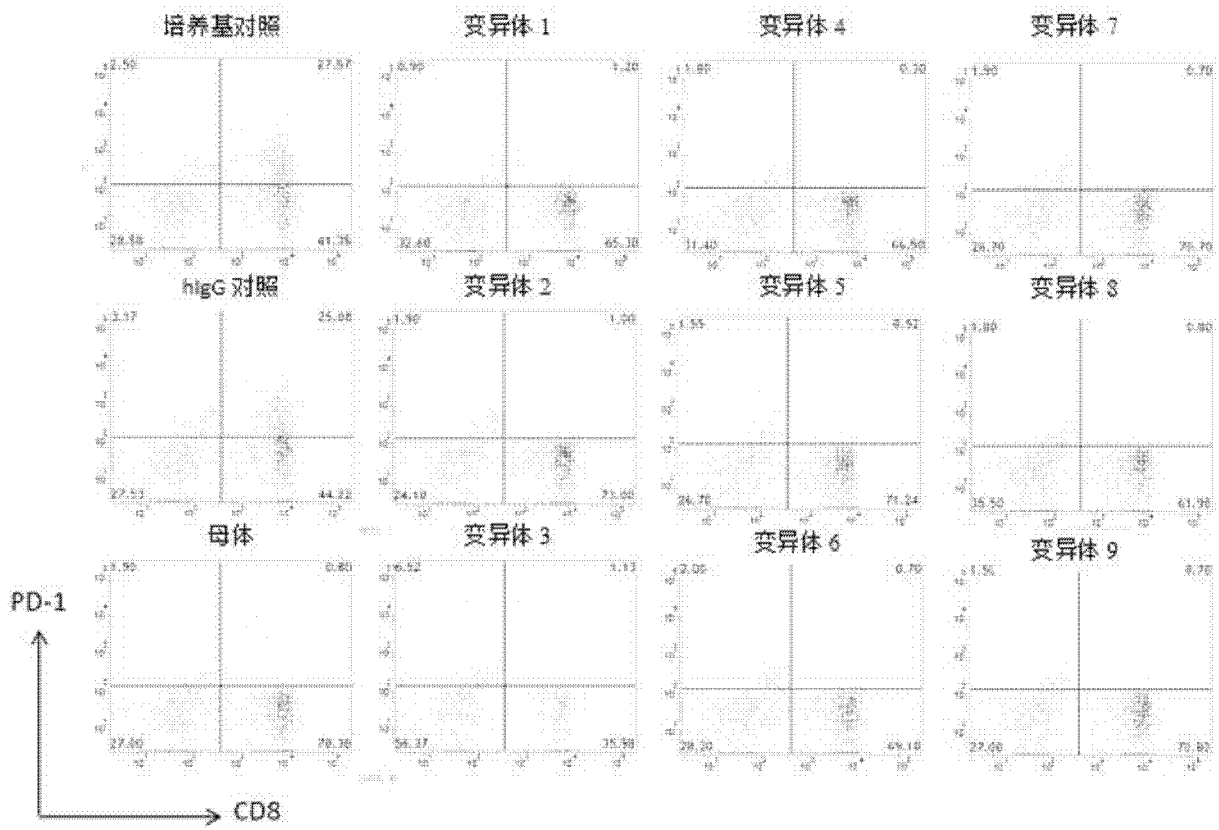


图10

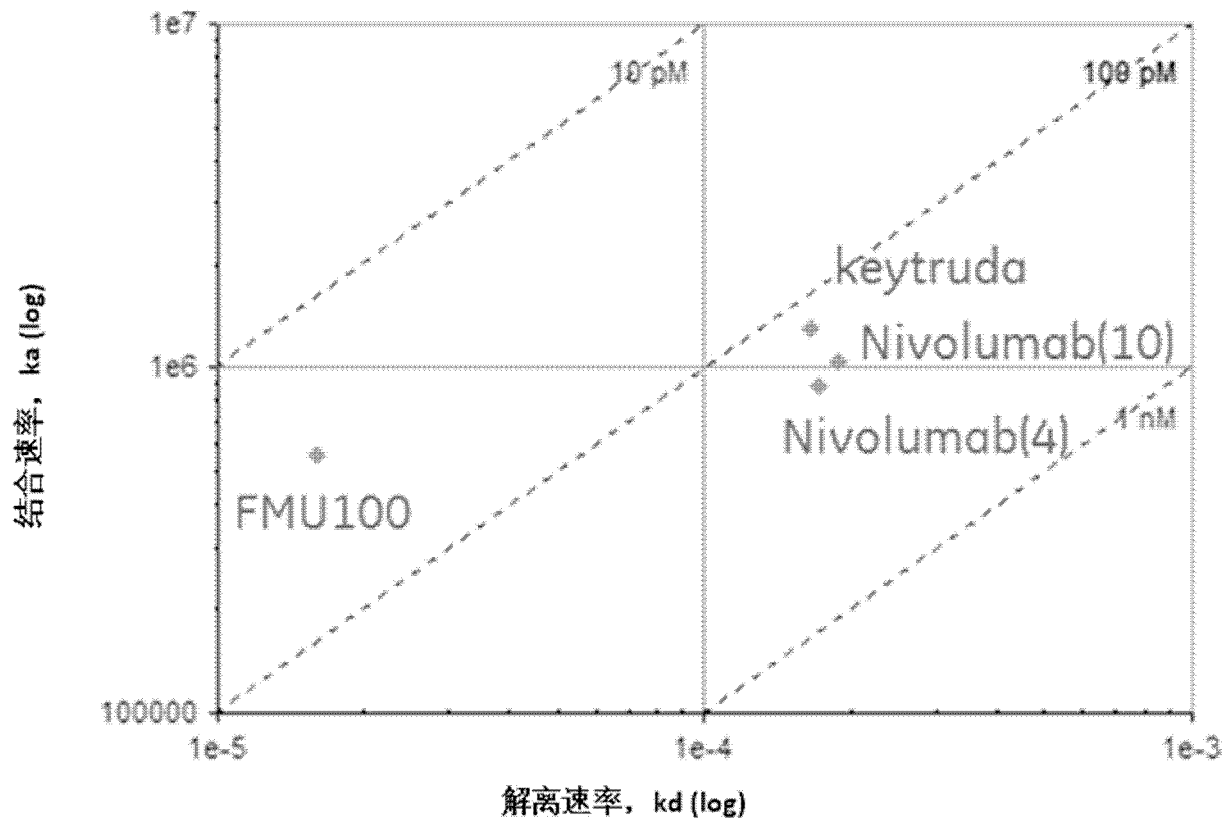


图11

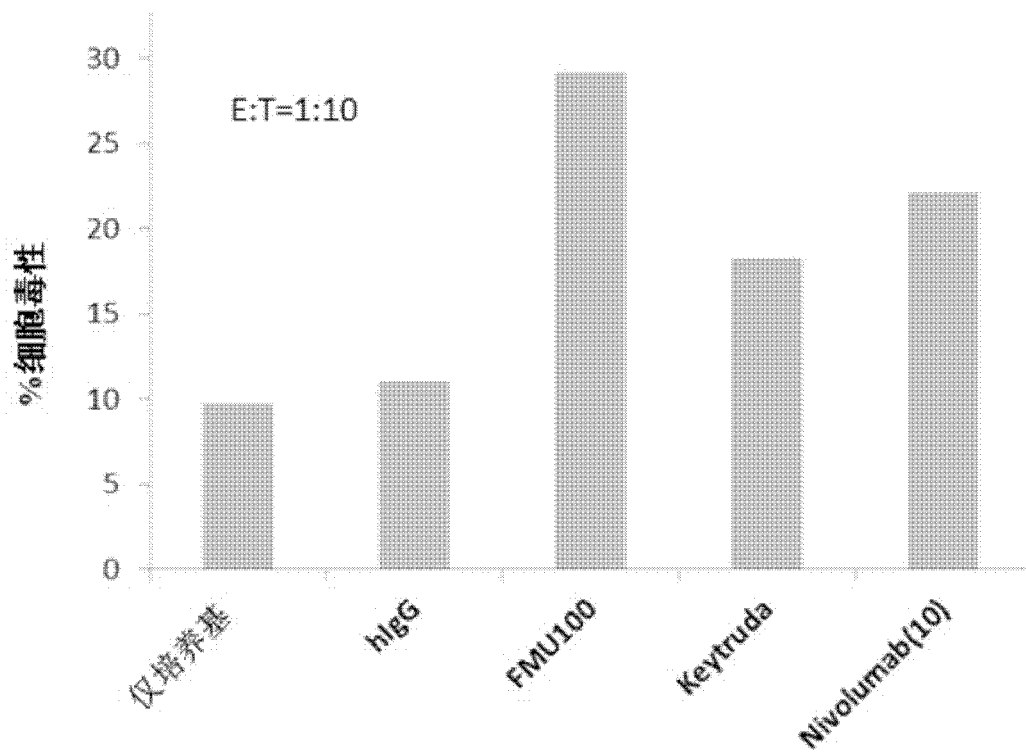


图12