

PD-1 结合分子及其应用

5 技术领域

本发明涉及生物医学或生物制药技术领域，更具体地涉及一种 PD-1 结合分子及其应用。

背景技术

10 程序性死亡受体-1 蛋白，又称作 PD-1 (programmed death 1)，是一种表达在 T 细胞表面并起免疫抑制作用的跨膜蛋白。PD-1 有两个配体分子，分别为 PD-L1 和 PD-L2，PD-L1 和 PD-L2 在抗原呈递细胞上有较高水平的表达。当 PD-L1 和 PD-L2 与 PD-1 结合后会对 T 细胞的功能活性起到负调控的作用，肿瘤细胞通常能够高表达 PD-L1 或者 PD-L2 来实现“免疫逃逸” (Lee L 等，J Clin Pharmacol. 2016 Feb;56(2):157-69)。所以，PD-1 药物通过对免疫系统的正向调控作用来实现对肿瘤的杀伤。现在，PD-1 也是免疫检查点抑制剂疗法的代名词。

凭借在黑色素瘤治疗中的突出疗效，FDA 在 2014 年和 2015 年先后批准两个 PD-1 单克隆抗体 Pembrolizumab (Keytruda)和 Nivolumab (Opdivo)，目前适应症已经覆盖了近 20 种实体瘤 (Prasad V 等，Semin Oncol. 2017 Apr;44(2):132-135.)。目前
20 国内已有 4 款 PD-1 单抗药物上市，分别是恒瑞的卡瑞利珠单抗 (Camrelizumab)、百济神州的替雷利珠单抗 (Tislelizumab)、信达的信迪利单抗 (Sintilimab) 和君实的特瑞普利单抗 (Toripalimab)。

研究发现，传统的 scfv 抗体在 T 细胞中表达量低，难以充分发挥 PD-1 抑制剂的效果，这主要是由于 scfv 抗体本身易聚集、折叠易错配、热稳定性低等性质导致的 (Martin N 等，Macromol Biosci. 2017 Feb;17(2))。而纳米抗体则具有易表达、稳定性高、亲和力高等天然优势，根据纳米抗体自身优势和 PD-1 生物学机制，开发 PD-1
25 纳米抗体具有非常广阔的应用前景。开发一种新型抗 PD-1 单域抗体，使其具有较好的特异性、阻断活性、临床药效，并且生产简便、成本低、减轻用药负担，已经成为亟待解决的问题。

30

发明内容

本发明的目的在于提供一种新型抗 PD-1 结合分子及其应用。

本发明第一方面提供一种 PD-1 结合分子，包含抗 PD-1 单域抗体，所述单域抗体的互补决定区 CDR 包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中 CDR1 包括 SEQ ID NO:1 所示的序列、CDR2 包括 SEQ ID NO:2 所示的序列、和 CDR3 包括 SEQ ID NO:3 所示的序列。

在一个或多个实施方案中，SEQ ID NO:1 是 $GX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ ，其中， X_1 为 D、F、G、H、L 或 R， X_2 为 P、S 或 T， X_3 为 A、F、I、L、N、R、S 或 V， X_4 为 D、F、G、L、M、N 或 S， X_5 为 A、D、F、G、I、N、R、S 或 T， X_6 为 D、F、H、I、L、S、V、W 或 Y， X_7 为 A、D、E、G、N、P、S 或 T。示例性地，CDR1 包括 SEQ ID NO:4-39、320 中任一所示的序列。

优选地，SEQ ID NO:1 是 $GX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ ，其中， X_1 为 D、F、G、H、L 或 R， X_2 为 P、S 或 T， X_3 为 F 或 S， X_4 为 F 或 S， X_5 为 G、I 或 T， X_6 为 S 或 Y， X_7 为 A 或 D。示例性地，CDR1 包括 SEQ ID NO:16、19、36-39、320 中任一所示的序列。

更优选地，SEQ ID NO:1 是 $GX_1X_2X_3X_4IX_6X_7$ ，其中， X_1 为 D 或 R， X_2 为 P 或 T， X_3 为 S 或 F， X_4 为 F 或 S， X_6 为 S 或 Y， X_7 为 A 或 D。示例性地，CDR1 包括 SEQ ID NO:16 或 19 所示的序列。

或者更优选地，SEQ ID NO:1 是 $GX_1X_2FSX_5YX_7$ ，其中， X_1 为 G、F、H、L 或 R， X_2 为 P、S 或 T， X_5 为 G、I 或 T， X_7 为 A 或 D。示例性地，CDR1 包括 SEQ ID NO:19、36-39、320 中任一所示的序列。

在一个或多个实施方案中，SEQ ID NO:2 是 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ ，其中， X_1 为 I、L、S、T 或 V， X_2 为 A、N、S 或 T， X_3 为 F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、W 或 Y， X_4 为 A、D、G、H、N、R、S 或 T， X_5 为 A、D、G、N、R、S 或无， X_6 为 G 或 R、S 或 T， X_7 为 D、E、I、L、M、N、R、S、T 或 V， X_8 为 A、K、M、Q 或 T， X_9 为 A 或无。示例性地，CDR2 包括 SEQ ID NO:40-75 中任一所示的序列。

优选地，SEQ ID NO:2 是 $X_1X_2X_3X_4X_5GX_7TX_9$ ，其中， X_1 为 I 或 V， X_2 为 N、S 或 T， X_3 为 F、L 或 N， X_4 为 A、G、S 或 T， X_5 为 R 或无， X_7 为 D、N、I 或 T， X_9 为无。示例性地，CDR2 包括 SEQ ID NO:52、53、55、72-75 中任一所示的序列。

更优选地，SEQ ID NO:2 是 $IX_2X_3X_4X_5GX_7TX_9$ ， X_2 为 N、S 或 T， X_3 为 L 或 N，

X₄ 为 A、S 或 T, X₅ 为 R 或无, X₇ 为 D、I 或 N, X₉ 为无。示例性地, CDR2 包括 SEQ ID NO:52、53、55、72、73 中任一所示的序列。

或者更优选地, SEQ ID NO:2 是 X₁X₂X₃X₄RGX₇TX₉, 其中, X₁ 为 I 或 V, X₂ 为 N、S 或 T, X₃ 为 F 或 L, X₄ 为 A、G 或 S, X₇ 为 D、N 或 T, X₉ 为无。或者,
5 CDR2 包括 SEQ ID NO:55 或其变体, 所述变体包含选自以下的一个或多个氨基酸变化: X₁ 的 I 突变为 V, X₂ 的 N 突变为 S 或 T, X₃ 的 L 突变为 F, X₄ 的 S 突变为 A 或 G, X₇ 的 D 突变为 N 或 T。示例性地, CDR2 包括 SEQ ID NO: 53、55、72-75 中任一所示的序列。

在一个或多个实施方案中, SEQ ID NO:3 是
10 X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂, 其中, X₁ 是 A、E、G、N、R、S、T 或 V, X₂ 是 A、G、I、K、L、P、R、T 或 V, X₃ 是 A、D、E、G、K、N、P、R、S、V 或 Y, X₄ 是 A、C、D、E、G、I、K、L、R、S、T、V 或 Y, X₅ 是 A、C、D、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、W 或 Y, X₆ 是 A、C、D、E、G、I、K、L、M、P、Q、R、S 或 Y, X₇ 是 A、C、D、F、G、H、I、N、P、R、
15 S、T、V 或 Y, X₈ 是 A、C、D、E、G、I、R、S、T、V、W、Y 或无, X₉ 是 A、D、E、F、G、I、L、P、R、S、V、W、Y 或无, X₁₀ 是 C、D、F、G、K、L、N、P、R、S、T、V、W、Y 或无, X₁₁ 是 D、F、G、H、I、K、L、N、P、S、T、V、Y 或无, X₁₂ 是 A、D、G、H、I、L、M、P、R、S、T、V、Y 或无, X₁₃ 是 C、D、E、H、P、R、S、T、V、Y 或无, X₁₄ 是 A、D、E、F、H、I、L、P、R、T、Y 或无, X₁₅ 是 A、
20 D、E、G、N、Q、R、S、T、V、Y 或无, X₁₆ 是 A、D、E、F、G、H、M、P、S、V、Y 或无, X₁₇ 是 A、D、E、H、N、Q、R、T、Y 或无, X₁₈ 是 D、E、R、S、Y 或无, X₁₉ 是 N、S、Y 或无, X₂₀ 是 D、E、Y 或无, X₂₁ 是 E、N、Y 或无, X₂₂ 是 Y 或无。示例性地, CDR3 包括 SEQ ID NO: 76-183 中任一所示的序列。

优选地, SEQ ID NO:3 是
25 X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂, 其中, X₁ 是 E、G、N 或 V, X₂ 是 A、G、I、L 或 V, X₃ 是 A、D、E、G、N、V 或 Y, X₄ 是 A、G、I、K、R 或 S, X₅ 是 C、I、L、P、Q、R 或 W, X₆ 是 E、K、P、Q 或 R, X₇ 是 C、D、H、N、P 或 Y, X₈ 是 E、G、R、V 或 W, X₉ 是 F、G、L、S、V 或 W, X₁₀ 是 C、D、G、L、R、S 或 V, X₁₁ 是 F、G、I、L、N、S、T 或 V, X₁₂ 是 H、L、P、R、S、
30 T 或 Y, X₁₃ 是 D、H、P、S、T 或 V, X₁₄ 是 E、F、H、I、L、P 或 R, X₁₅ 是 A、S 或 V, X₁₆ 是 A、D、E、G、H 或 V, X₁₇ 是 H、N、Q、R 或 Y, X₁₈-X₂₂ 是无。示例

性地, CDR3 包括 SEQ ID NO: 76、87、108-183 中任一所示的序列。

更 优 选 地 , SEQ ID NO:3 是
X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂, 其中, X₁ 是 E、G
或 V, X₂ 是 A、G、I、L 或 V, X₃ 是 A、D、E、G、N、V 或 Y, X₄ 是 G、I、K、R
5 或 S, X₅ 是 C、I、L、Q、R 或 W, X₆ 是 E、K、P、Q 或 R, X₇ 是 C、D、H、N 或
Y, X₈ 是 E、G、R、V 或 W, X₉ 是 F、L、S、V 或 W, X₁₀ 是 C、D、G、R、S 或 V,
X₁₁ 是 F、I、L、N、S、T 或 V, X₁₂ 是 H、L、P、R、S 或 T, X₁₃ 是 H、P、S、T 或
V, X₁₄ 是 F、H、I、L、P 或 R, X₁₅ 是 A、S 或 V, X₁₆ 是 A、D、E、G、H 或 V,
X₁₇ 是 H、N、Q、R 或 Y, X₁₈-X₂₂ 是无。或者, CDR3 包括 SEQ ID NO:87 所示的序
10 列或其变体, 所述变体包含选自以下的一个或多个氨基酸变化: X₁ 的 G 突变为 E、G
或 V, X₂ 的 V 突变为 A、G、I 或 V, X₃ 的 D 突变为 A、E、G、N、V 或 Y, X₄ 的 R
突变为 G、I、K 或 S, X₅ 的 R 突变为 C、I、L、Q 或 W, X₆ 的 Q 突变为 E、K、P
或 R, X₇ 的 Y 突变为 C、D、H 或 N, X₈ 的 G 突变为 E、R、V 或 W, X₉ 的 L 突
变为 F、S、V 或 W, X₁₀ 的 G 突变为 C、D、R、S 或 V, X₁₁ 的 I 突变为 F、L、N、S、
15 T 或 V, X₁₂ 的 P 突变为 H、L、R、S 或 T, X₁₃ 的 P 突变为 H、S、T 或 V, X₁₄ 的 L
突变为 F、H、I、P 或 R, X₁₅ 的 A 突变为 S 或 V, X₁₆ 的 D 突变为 A、E、G、H 或
V, X₁₇ 的 H 突变为 N、Q、R 或 Y。示例性地, CDR3 包括 SEQ ID NO: 87、108-183
中任一所示的序列。

在一个或多个实施方案中, CDR1 包括 SEQ ID NO:4-39、320 中任一所示的序
20 列, CDR2 包括 SEQ ID NO:40-75 中任一所示的序列, CDR3 包括 SEQ ID NO: 76-183
中任一所示的序列。

在一个或多个实施方案中, CDR1 包括 SEQ ID NO:16、19、36-39、320 中任一
所示的序列, CDR2 包括 SEQ ID NO:52、53、55、72-75 中任一所示的序列, CDR3
包括 SEQ ID NO: 76、87、108-183 中任一所示的序列。

25 在一个或多个实施方案中, CDR1 包括 SEQ ID NO:16 或 19 所示的序列, CDR2
包括 SEQ ID NO:52、53、55、72、73 中任一所示的序列, CDR3 包括 SEQ ID NO: 87、
108-111、113-134、136-146、148-154、156-163、165-168、172、173、177-183 中任
一所示的序列。

30 在一个或多个实施方案中, CDR1 包括 SEQ ID NO:19、36-39、320 中任一所示
的序列, CDR2 包括 SEQ ID NO: 53、55、72-75 中任一所示的序列, CDR3 包括 SEQ
ID NO: 87、108-183 中任一所示的序列。

在一个或多个实施方案中，CDR1 包括 SEQ ID NO:5、7、10、14-16、19、26、27、29、30、33 中任一所示的序列，CDR2 包括 SEQ ID NO: 41、47、50-52、55、56、61-66 中任一所示的序列，CDR3 包括 SEQ ID NO: 76、77、85-87、93、94、97、99-101、104 中任一所示的序列。

- 5 在一个或多个实施方案中，所述单域抗体含有以下组 a1 到组 a136 中任一组所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3：

CDR1	CDR2	CDR3	组
4	40	76	a1
5	41	77	a2
6	42	78	a3
7	43	76	a4
8	44	79	a5
9	45	80	a6
10	46	81	a7
11	47	82	a8
12	48	83	a9
13	49	84	a10
10	50	85	a11
14	47	76	a12
15	51	86	a13
16	52	76	a14
17	53	87	a15
18	54	88	a16
19	55	87	a17
20	56	82	a18
21	57	89	a19
22	58	90	a20
23	59	91	a21
14	47	76	a22
24	60	92	a23
25	40	76	a24
26	61	93	a25
27	62	94	a26
24	60	95	a27
28	41	96	a28
10	63	97	a29
5	41	98	a30
29	64	99	a31
7	65	100	a32
30	66	101	a33
31	67	102	a34

32	68	103	a35
33	56	104	a36
34	69	105	a37
35	70	106	a38
7	71	107	a39
16	52	76	a40
16	52	76	a41
16	52	76	a42
16	52	76	a43
16	52	76	a44
19	72	87	a45
19	72	87	a46
19	72	87	a47
19	73	87	a48
19	53	87	a49
19	53	87	a50
19	53	108	a51
19	53	109	a52
19	53	110	a53
19	53	111	a54
36	74	112	a55
19	53	113	a56
19	53	114	a57
19	53	115	a58
19	53	116	a59
19	53	117	a60
19	53	118	a61
19	53	119	a62
19	53	120	a63
19	53	121	a64
19	53	122	a65
19	53	123	a66
19	53	124	a67
19	53	125	a68
19	53	126	a69
19	53	127	a70
19	53	128	a71
19	53	129	a72
19	53	130	a73
19	53	131	a74
19	53	132	a75
19	53	133	a76
19	53	134	a77
37	75	135	a78
19	53	136	a79
19	53	137	a80

19	53	138	a81
19	53	139	a82
19	53	140	a83
19	53	141	a84
19	53	142	a85
19	53	143	a86
19	53	144	a87
19	53	145	a88
19	53	146	a89
38	53	147	a90
19	53	148	a91
19	53	149	a92
19	53	150	a93
19	53	151	a94
19	53	152	a95
19	53	153	a96
19	53	154	a97
39	53	155	a98
19	53	156	a99
19	53	157	a100
19	53	158	a101
19	53	159	a102
19	53	160	a103
19	53	161	a104
19	53	162	a105
19	53	163	a106
37	53	164	a107
19	53	165	a108
19	53	166	a109
19	53	167	a110
19	53	168	a111
36	74	169	a112
38	53	170	a113
37	53	171	a114
19	53	172	a115
19	53	173	a116
38	53	174	a117
38	53	175	a118
36	74	176	a119
19	53	177	a120
19	53	178	a121
19	53	179	a122
19	53	180	a123
19	53	181	a124
19	53	182	a125
19	53	183	a126

37	75	135	a127
37	75	135	a128
37	75	135	a129
37	75	135	a130
37	75	135	a131
37	75	135	a132
37	75	135	a133
37	75	135	a134
320	75	135	a135
37	75	135	a136

在一个或多个实施方案中，所述单域抗体 VHH 的 FR1 可选自表 1 中各抗体编号的 VHH 的 FR1，VHH 的 FR2 可选自表 1 中各抗体编号的 VHH 的 FR2，VHH 的 FR3 可选自表 1 中各抗体编号的 VHH 的 FR3，VHH 的 FR4 可选自表 1 中各抗体编号的 VHH 的 FR4。

在一个或多个实施方案中，所述单域抗体的 FR 区为选自 SEQ ID NO: 184-319 的任一 VHH 的 FR 区。

在一个或多个实施方案中，所述单域抗体 VHH 如 SEQ ID NO: 184-319 中任一所示。优选地，所述单域抗体如 SEQ ID NO: 197、200、223-319 中任一所示。

10 在一个或多个实施方案中，所述 PD-1 结合分子是包含一条、两条或多条本文所述的抗 PD-1 单域抗体的单价或多价单域抗体、多特异性单域抗体、重链抗体或其抗原结合片段、抗体或其抗原结合片段。

在一个或多个实施方案中，所述多价单域抗体或多特异性单域抗体通过连接子连接多个单域抗体。所述连接子由选自 G 和 S 的 1-15 个氨基酸组成。

15 在一个或多个实施方案中，所述重链抗体的抗原结合片段是单链重链抗体。

在一个或多个实施方案中，所述重链抗体是骆驼重链抗体或软骨鱼重链抗体。

在一个或多个实施方案中，所述重链抗体还包含重链恒定区。

20 在一个或多个实施方案中，所述重链恒定区是骆驼重链抗体的恒定区，包含 CH2 和 CH3。在一个或多个实施方案中，所述 CH2 和 CH3 是人 IgG Fc 的 CH2 和 CH3，例如 IgG4 的 CH2 和 CH3。优选地，所述重链恒定区如 SEQ ID NO: 321 所示。

在一个或多个实施方案中，所述重链恒定区是软骨鱼重链抗体的恒定区，包含 CH1、CH2、CH3、CH4 和 CH5。

在一个或多个实施方案中，所述抗体是包含所述抗 PD-1 单域抗体作为重链可变结构域的抗体。

在一个或多个实施方案中，所述抗体还包含轻链可变结构域、重链恒定域和轻链恒定域。

在一个或多个实施方案中，抗体的抗原结合片段选自 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv。

- 5 在一个或多个实施方案中，本发明任一实施方案所述的结合分子为嵌合抗体或完全人抗体；优选为完全人抗体。

本发明还提供多核苷酸，选自：

(1) 本文任一实施方案所述单域抗体或本文所述抗体或其抗原结合片段的编码序列；

(2) (1) 的互补序列；

- 10 (3) (1) 或 (2) 中任一序列的 5-50bp 的片段。

在一个或多个实施方案中，所述片段是引物。

在一个或多个实施方案中，所述多核苷酸的序列如 SEQ ID NO:322 或 323 所示。

本发明还提供一种核酸构建物，包含本文所述的多核苷酸。

在一个或多个实施方案中，所述核酸构建物是重组载体或表达载体。

- 15 本发明还提供含本文任一实施方案所述 PD-1 结合分子的噬菌体。

在一个或多个实施方案中，所述 PD-1 结合分子展示于所述噬菌体表面。

本发明还提供一种宿主细胞，选自：

(1) 表达和/或分泌本文任一实施方案所述 PD-1 结合分子；

(2) 包含本文所述的多核苷酸；和/或

- 20 (3) 包含本文所述的核酸构建物。

本发明还提供一种产生 PD-1 结合分子的方法，包括：在适合产生 PD-1 结合分子（例如单价或多价单域抗体、多特异性单域抗体、重链抗体、抗体或其抗原结合片段）的条件下培养本文所述的宿主细胞，和任选的从培养物中纯化所述 PD-1 结合分子。

- 25 本发明还提供一种药物组合物，包含本文任一实施方案所述 PD-1 结合分子、多核苷酸、核酸构建物、噬菌体或宿主细胞，和药学上可接受的辅料。

在一个或多个实施方案中，所述药物组合物用于治疗癌症。

在一个或多个实施方案中，所述癌症是 PD-1 相关癌症。优选地，所述癌症选自：黑色素瘤、肺癌、头颈部癌、肾细胞癌、泌尿道上皮癌、非霍奇金淋巴瘤等。

- 30 本发明还提供本文任一实施方案所述 PD-1 结合分子在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

在一个或多个实施方案中,所述癌症是 PD-1 相关癌症。优选地,所述癌症选自:黑色素瘤、肺癌、头颈部癌、肾细胞癌、泌尿道上皮癌、非霍奇金淋巴瘤等。

本发明还提供一种治疗或预防癌症的方法,所述方法包括给予需要的患者治疗有效量的本发明任一实施方案所述的 PD-1 结合分子,或含有本发明任一实施方案所述

5 所述的 PD-1 结合分子的药物组合物。

在一个或多个实施方案中,所述癌症是 PD-1 相关癌症。优选地,所述癌症选自:黑色素瘤、肺癌、头颈部癌、肾细胞癌、泌尿道上皮癌、非霍奇金淋巴瘤等。

本发明还提供一种检测 PD-1 的试剂盒,用于评估药物治疗效果或诊断癌症,所述的试剂盒包含本文任一实施方案所述 PD-1 结合分子、多核苷酸、核酸构建物、噬

10 菌体或宿主细胞。

在一个或多个实施方案中,所述试剂盒还包括用于检测 PD-1 与单域抗体、抗体或其抗原结合片段的结合的试剂。例如通过酶联免疫反应法检测所述结合的试剂。

在一个或多个实施方案中,所述检测结合的试剂是能与 PD-1 结合分子连接的可检测标记物,例如生物素。所述的可检测标记物被连接于所述 PD-1 结合分子或分离

15 地存在于试剂盒中。

本发明还提供一种检测样品中 PD-1 存在情况的非诊断性方法,所述方法包括:以本文任一实施方案所述 PD-1 结合分子与样品孵育,和检测 PD-1 与单域抗体、抗体或其抗原结合片段的结合,从而确定样品中 PD-1 存在情况。所述检测是酶联免疫反应法检测。

20 本发明还提供本文任一实施方案所述 PD-1 结合分子在制备用于检测样品中 PD-1、评估药物治疗效果或诊断癌症的试剂盒中的用途。

附图说明

图 1 为针对 PD-1 蛋白的羊驼抗血清效价检测。

25 图 2 为针对 PD-1 过表达细胞株的羊驼抗血清效价检测。

图 3 抗 PD-1 抗体对荧光素酶报告基因激活作用。同型对照(阴性对照)的氨基酸序列如 CN106046152A 中的 SEQ ID NO.:2 所示。

图 4 在混合淋巴细胞反应(MLR)中 PD-1 抗体对 IFN- γ 分泌量的影响。同型对照同图 3。

30 图 5 在混合淋巴细胞反应(MLR)中 PD-1 抗体对 IL-2 分泌量的影响。同型对照同图 3。

图 6 为 NB182 抗体与 5300 种膜蛋白交叉反应结果。

图 7 为 NB194 抗体与 5300 种膜蛋白交叉反应结果。

图 8 显示 NB194 突变体的亲和力和功能活性也有提升。EC50 的单位为 nM。。

5 具体实施方式

本发明人经过广泛而深入地研究，经过大量的筛选，发现一类包含抗 PD-1 单域抗体的 PD-1 结合分子，实验结果表明，本发明结合分子能够特异性识别 PD-1，以高亲和力与 PD-1 结合，具有良好的功能活性，能促进 T 细胞分泌细胞因子，并且无组织交叉反应。本发明单域抗体生成简便。

- 10 具体地，本发明利用人源的 PD-1 蛋白免疫羊驼，获得高质量的免疫单域抗体基因文库。然后将 PD-1 蛋白偶联在酶标板上，利用噬菌体展示技术筛选免疫单域抗体基因库，从而获得了 PD-1 特异性的单域抗体基因。再将此基因转至哺乳动物细胞中，从而获得了能在哺乳动物细胞中高效表达的、且特异性高的单域抗体株。然后通过 ELISA、流式细胞术、膜蛋白交叉反应、表位竞争试验等方法鉴定出高亲和力、高特异性、高功能活性、低组织交叉反应的单域抗体。
- 15

抗体

本文中，“PD-1 结合分子”是特异性结合 PD-1 的蛋白质，包括但不限于，抗体、抗体的抗原结合片段、重链抗体、纳米抗体、微型抗体、亲和体、受体的靶结合区、细胞粘附分子、配体、酶、细胞因子、和趋化因子。

- 20 本文中，术语“抗体”包括单克隆抗体(包括全长抗体，其具有免疫球蛋白 Fc 区)，具有多表位特异性的抗体组合物，多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，双抗体和单链分子，以及抗体片段，尤其是抗原结合片段，例如，Fab，F(ab')₂ 和 Fv。本文中，术语“免疫球蛋白”(Ig)和“抗体”可互换地使用。

- 基本的 4 链抗体单元是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的异四聚体糖蛋白。IgM 抗体由 5 个基本的异四聚体单元及称作 J 链的另外多肽组成，包含 10 个抗原结合位点；而 IgA 抗体包含 2-5 个基本的 4 链单元，其可与 J 链组合聚合形成多价装配物。在 IgG 的情况中，4 链单元通常约 150,000 道尔顿。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而两条重链通过一个或多个二硫键彼此相连，二硫键的数目取决于重链的同种型。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫桥。每条重链在 N-末端具有可变结构域(VH)，接着是三个(对于每种 α 和 γ 链，CH1、CH2 和 CH3)和四个(对于 μ 和 ε 同种型，CH1、CH2、CH3 和 CH4)恒定结构域(CH)
- 25
- 30

以及位于 CH1 结构域与 CH2 结构域之间的绞链区 (Hinge)。每条轻链在 N-末端具有可变结构域 (VL)，接着是其另一端的恒定结构域 (CL)。VL 与 VH 排列在一起，而 CL 与重链的第一恒定结构域 (CH1) 排列在一起。特定的氨基酸残基被认为在轻链和重链可变结构域之间形成界面。成对的 VH 和 VL 一起形成一个抗原结合位点。关于不同类别抗体的结构和性质，参见如 Basic and Clinical Immunology, 第八版，Daniel P. Sties, Abba I. Terr 和 Tristram G. Parslow 编辑, Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 第 71 页和第 6 章。来自任何脊椎动物物种的轻链，根据其恒定结构域氨基酸序列，可归入两种称作 κ 和 λ 的截然不同型中的一种。根据其重链恒定结构域 (CH) 氨基酸序列，免疫球蛋白可归入不同的类或同种型。有五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，分别具有称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。根据 CH 序列和功能的相对较小差异， γ 和 α 类可进一步分为亚类，例如人表达下列亚类: IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

本文所述“重链抗体”是源自骆驼科生物或软骨鱼科生物的抗体。相比上述 4 链抗体，重链抗体缺失轻链和重链恒定区 1 (CH1)，仅包含 2 条由可变区 (VHH) 和其他恒定区组成重链，可变区通过类似绞链区结构与恒定区相连。骆驼科重链抗体的每条重链包含 1 个可变区 (VHH) 和 2 个恒定区 (CH2 和 CH3)，软骨鱼科重链抗体的每条重链含有 1 个可变区和 5 个恒定区 (CH1-CH5)。重链抗体的抗原结合片段包括 VHH 和单链重链抗体。通过与人 IgG Fc 的恒定区融合，重链抗体可以具有人 IgG Fc 的 CH2 和 CH3。

如本文所用，术语“单域抗体”、“抗 PD-1 单域抗体”、“重链抗体的重链可变区结构域”、“VHH”、“纳米抗体”可互换使用，均指特异性识别和结合于 PD-1 的单域抗体。单域抗体是重链抗体的可变区。通常，单域抗体含有三个 CDR 和四个 FR。优选地，本发明的单域抗体具有 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 2 所示的 CDR2、和 SEQ ID NO: 3 所示的 CDR3。单域抗体是最小的功能性抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区 1(CH1)的抗体后，再克隆抗体重链的可变区，构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体。

包含两条或多条单域抗体的结合分子是多价单域抗体；包含两条或多条不同特异性单域抗体的结合分子是多特异性单域抗体。多价单域抗体或多特异性单域抗体通过连接子连接多个单域抗体。所述连接子通常由选自 G 和 S 的 1-15 个氨基酸组成。

本文中，重链抗体和抗体旨在区分抗体的不同组合方式。由于二者的结构具有相似性，下述针对抗体的结构描述除涉及轻链外也均适用于重链抗体。

抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可分别称为“VH”和“VL”。这些结构域通常是抗体的最可变的部位（相对于相同类型的其它抗体）并含有抗原结合位点。

术语“可变的”指可变结构域中的某些区段在抗体序列中差异广泛的情况。可变结构域介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而，变异性并非均匀分布于可变结构域跨越的全部氨基酸。相反，其集中在三个称为高变区（HVR）的区段（在轻链和重链可变结构域中均有），即分别为重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3（重链抗体中可简称为 CDR1、CDR2、CDR3）以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。可变结构域中更为高度保守的部分称为构架区（FR）。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR 区（FR1、FR2、FR3 和 FR4），它们大多采取 β -折叠构象，通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠结构一部分的三个 HVR 连接。每条链中的 HVR 通过 FR 区非常接近的保持在一起，并与另一条链的 HVR 一起促成抗体的抗原结合位点的形成。通常，轻链可变区的结构为 FR1-LCDR1-FR2-LCDR2-FR3-LCDR3-FR4，重链可变区的结构为 FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如在抗体依赖性细胞介导的细胞毒性中抗体的参与。

“Fc 区”（可结晶片段区域）或“Fc 结构域”或“Fc”是指抗体重链的 C-末端区域，其介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，包括与位于免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）上的 Fc 受体的结合，或者与经典补体系统的第一组分（C1q）的结合。在 IgG、IgA 和 IgD 抗体同种型中，Fc 区由来自抗体两条重链的 CH2 结构域和 CH3 结构域的两个相同的蛋白片段构成；IgM 和 IgE 的 Fc 区在每个多肽链中包含三个重链恒定结构域（CH 结构域 2-4）。虽然免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可以变化，但是人 IgG 重链 Fc 区通常定义为从重链位置 C226 或 P230 的氨基酸残基到羧基端的序列段，其中该编号是根据 EU 索引，如在 Kabat 中一样。如本文所使用的，Fc 区可以是天然序列 Fc 或变体 Fc。

“抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段优选为抗体的抗原结合片段。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子；scFv-Fc 片段；由抗体片段形成的多特异性抗体；以及通过化学修饰或通过掺入脂质体中应能够增加半衰期的任何片段。用木瓜蛋白酶消化抗体产生称作“Fab”片段的两个相同的抗原结合片段，和一个残余“Fc”片段，其名称反映了它易于结晶的能力。Fab 片段由完整轻链及重链可变结构

域（VH）和一条重链第一恒定结构域（CH1）组成。每个 Fab 片段在抗原结合方面是单价的，即其具有单个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生一个较大 F(ab')₂ 片段，它粗略相当于两个通过二硫键相连的 Fab 片段，具有不同抗原结合活性且仍能够交联抗原。Fab' 片段因在 CH1 结构域的羧基末端增加了一些另外的残基（包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸）而与 Fab 片段有所不同。F(ab')₂ 抗体片段最初是作为成对 Fab' 片段生成的，在 Fab' 片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。Fc 片段包含通过二硫键保持在一起的两条重链的羧基末端部分。抗体的效应子功能是由 Fc 区中的序列决定的，该区还是由在某些类型细胞上发现的 Fc 受体（FcR）所识别的区。

10 “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该片段由紧密、非共价结合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。从这两个结构域的折叠中突出了六个高变环（重链和轻链各 3 个环），贡献出抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体以抗原结合特异性。然而，即使是单个可变结构域（或只包含对抗原特异的三个 HVR 的半个 Fv）也具有识别和结合抗原的能力，尽管亲合力低于完整结合位点。15 “单链 Fv”也可缩写为“sFv”或“scFv”，是包含抗体 VH 和 VL 结构域的连接成一条多肽链的抗体片段。优选的是，sFv 多肽在 VH 和 VL 结构域之间还包含多肽接头，使得 sFv 形成期望的抗原结合结构。

本文中，术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体中获得的抗体，即除了可能以少量存在的可能的天然出现的突变和/或翻译后修饰（例如异构化、酰胺化）20 之外，构成群体的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的，针对单个抗原位点。与多克隆抗体制剂（其典型地包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体）相比，每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除它们的特异性外，单克隆抗体的优势在于它们通过杂交瘤培养合成，未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征，不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。25 例如，将根据本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术来生成，包括例如杂交瘤法、噬菌体展示法、重组 DNA 法、及用于从具有部分或整个人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物生成人或人样抗体的技术、单细胞测序法。

单克隆抗体在本文中也包括“嵌合”抗体，其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，30 以及此类抗体的片段，只要它们展现出期望的生物学活性。

非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。因此，“人源化抗体”通常指可变结构域构架区与在人抗体中发现的序列交换的非人抗体。通常在人源化抗体中，整个抗体（除 CDR 以外）由人来源的多核苷酸编码或与这种抗体相同（除 CDR 以外）。CDR（其中一些或全部由源自非人生物体的核酸编码）被移植到人抗体可变区的 β -折叠骨架中以产生抗体，其特异性由被移植的 CDR 来决定。这类抗体的产生方法本领域周知，例如使用具有基因工程免疫系统的小鼠而产生。本发明中，抗体、单域抗体、重链抗体等均包括各所述抗体的经人源化的变体。

“人抗体”指这样的抗体，其具有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成人抗体的任何技术产生。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术来生成，包括噬菌体展示文库。

在一些实施方案中，本发明还提供与本发明的任何抗 PD-1 单域抗体结合人 PD-1 上相同表位的单域抗体、重链抗体、抗体或其抗原结合片段，即能够与本发明的任何单域抗体交叉竞争与 PD-1 的结合的单域抗体、重链抗体、抗体或其抗原结合片段。

本发明中，抗 PD-1 单域抗体的 CDR1 包括 SEQ ID NO:1 所示的序列，SEQ ID NO:1 是 $GX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ ，其中， X_1 为 D、F、G、H、L 或 R， X_2 为 P、S 或 T， X_3 为 A、F、I、L、N、R、S 或 V， X_4 为 D、F、G、L、M、N 或 S， X_5 为 A、D、F、G、I、N、R、S 或 T， X_6 为 D、F、H、I、L、S、V、W 或 Y， X_7 为 A、D、E、G、N、P、S 或 T。示例性地，CDR1 包括 SEQ ID NO:4-39、320 中任一所示的序列。

抗 PD-1 单域抗体的 CDR2 包括 SEQ ID NO:2 所示的序列，SEQ ID NO:2 是 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ ，其中， X_1 为 I、L、S、T 或 V， X_2 为 A、N、S 或 T， X_3 为 F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、W 或 Y， X_4 为 A、D、G、H、N、R、S 或 T， X_5 为 A、D、G、N、R、S 或无， X_6 为 G 或 R、S 或 T， X_7 为 D、E、I、L、M、N、R、S、T 或 V， X_8 为 A、K、M、Q 或 T， X_9 为 A 或无。示例性地，CDR2 包括 SEQ ID NO:40-75 中任一所示的序列。

抗 PD-1 单域抗体的 CDR3 包括 SEQ ID NO:3 所示的序列，SEQ ID NO:3 是 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}$ ，其中， X_1 是 A、E、G、N、R、S、T 或 V， X_2 是 A、G、I、K、L、P、R、T 或 V， X_3 是 A、D、E、G、K、N、P、R、S、V 或 Y， X_4 是 A、C、D、E、G、I、K、L、R、S、T、V 或 Y， X_5 是 A、C、D、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、W 或 Y， X_6 是 A、C、D、

E、G、I、K、L、M、P、Q、R、S 或 Y, X₇ 是 A、C、D、F、G、H、I、N、P、R、S、T、V 或 Y, X₈ 是 A、C、D、E、G、I、R、S、T、V、W、Y 或无, X₉ 是 A、D、E、F、G、I、L、P、R、S、V、W、Y 或无, X₁₀ 是 C、D、F、G、K、L、N、P、R、S、T、V、W、Y 或无, X₁₁ 是 D、F、G、H、I、K、L、N、P、S、T、V、Y 或无, X₁₂ 是 A、D、G、H、I、L、M、P、R、S、T、V、Y 或无, X₁₃ 是 C、D、E、H、P、R、S、T、V、Y 或无, X₁₄ 是 A、D、E、F、H、I、L、P、R、T、Y 或无, X₁₅ 是 A、D、E、G、N、Q、R、S、T、V、Y 或无, X₁₆ 是 A、D、E、F、G、H、M、P、S、V、Y 或无, X₁₇ 是 A、D、E、H、N、Q、R、T、Y 或无, X₁₈ 是 D、E、R、S、Y 或无, X₁₉ 是 N、S、Y 或无, X₂₀ 是 D、E、Y 或无, X₂₁ 是 E、N、Y 或无, X₂₂ 是 Y 或无。示例性地, CDR3 包括 SEQ ID NO: 76-183 中任一所示的序列。

在一个或多个实施方案中, 单域抗体是 NB182、NB194 或其变体, CDR1 包括 SEQ ID NO:16、19、36-39、320 中任一所示的序列, CDR2 包括 SEQ ID NO:52、53、55、72-75 所示的序列, CDR3 包括 SEQ ID NO: 76、87、108-183 中任一所示的序列。或者, CDR1 包括 SEQ ID NO:16 或 19 所示的序列, CDR2 包括 SEQ ID NO:52、53、55、72、73 所示的序列, CDR3 包括 SEQ ID NO: 87、108-111、113-134、136-146、148-154、156-163、165-168、172、173、177-183 中任一所示的序列。或者 CDR1 包括 SEQ ID NO: 19、36-39、320 中任一所示的序列, CDR2 包括 SEQ ID NO: 53、55、72-75 中任一所示的序列, CDR3 包括 SEQ ID NO: 87、108-183 中任一所示的序列。

在一个或多个实施方案中, 所述单域抗体含有表 1 中组 a1 到组 a136 中任一组合所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3:

表 1

抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3	VHH	组
NB139	4	40	76	184	a1
NB147	5	41	77	185	a2
NB148	6	42	78	186	a3
NB153	7	43	76	187	a4
NB154	8	44	79	188	a5
NB159	9	45	80	189	a6
NB164	10	46	81	190	a7
NB166	11	47	82	191	a8
NB169	12	48	83	192	a9
NB170	13	49	84	193	a10
NB171	10	50	85	194	a11
NB172	14	47	76	195	a12
NB173	15	51	86	196	a13
NB182	16	52	76	197	a14

NB189	17	53	87	198	a15
NB192	18	54	88	199	a16
NB194	19	55	87	200	a17
NB195	20	56	82	201	a18
NB196	21	57	89	202	a19
NB197	22	58	90	203	a20
NB200	23	59	91	204	a21
NB202	14	47	76	205	a22
NB205	24	60	92	206	a23
NB209	25	40	76	207	a24
NB211	26	61	93	208	a25
NB215	27	62	94	209	a26
NB216	24	60	95	210	a27
NB218	28	41	96	211	a28
NB220	10	63	97	212	a29
NB221	5	41	98	213	a30
NB222	29	64	99	214	a31
NB223	7	65	100	215	a32
NB532	30	66	101	216	a33
NB548	31	67	102	217	a34
NB733	32	68	103	218	a35
NB734	33	56	104	219	a36
NB735	34	69	105	220	a37
NB754	35	70	106	221	a38
NB755	7	71	107	222	a39
NB182-z1	16	52	76	223	a40
NB182-z2	16	52	76	224	a41
NB182-z3	16	52	76	225	a42
NB182-z4	16	52	76	226	a43
NB182-z5	16	52	76	227	a44
NB194-z1	19	72	87	228	a45
NB194-z2	19	72	87	229	a46
NB194-z3	19	72	87	230	a47
NB194-z4	19	73	87	231	a48
NB194-z5	19	53	87	232	a49
NB194-P01	19	53	87	233	a50
NB194-P02	19	53	108	234	a51
NB194-P03	19	53	109	235	a52
NB194-P04	19	53	110	236	a53
NB194-P05	19	53	111	237	a54
NB194-P06	36	74	112	238	a55
NB194-P07	19	53	113	239	a56
NB194-P08	19	53	114	240	a57
NB194-P09	19	53	115	241	a58
NB194-P10	19	53	116	242	a59
NB194-P11	19	53	117	243	a60

NB194-P12	19	53	118	244	a61
NB194-P13	19	53	119	245	a62
NB194-P14	19	53	120	246	a63
NB194-P15	19	53	121	247	a64
NB194-P16	19	53	122	248	a65
NB194-P17	19	53	123	249	a66
NB194-P18	19	53	124	250	a67
NB194-P19	19	53	125	251	a68
NB194-P20	19	53	126	252	a69
NB194-P21	19	53	127	253	a70
NB194-P22	19	53	128	254	a71
NB194-P23	19	53	129	255	a72
NB194-P24	19	53	130	256	a73
NB194-P25	19	53	131	257	a74
NB194-P26	19	53	132	258	a75
NB194-P27	19	53	133	259	a76
NB194-P28	19	53	134	260	a77
NB194-P29	37	75	135	261	a78
NB194-P30	19	53	136	262	a79
NB194-P31	19	53	137	263	a80
NB194-P32	19	53	138	264	a81
NB194-P33	19	53	139	265	a82
NB194-P34	19	53	140	266	a83
NB194-P35	19	53	141	267	a84
NB194-P36	19	53	142	268	a85
NB194-P37	19	53	143	269	a86
NB194-P38	19	53	144	270	a87
NB194-P39	19	53	145	271	a88
NB194-P40	19	53	146	272	a89
NB194-P41	38	53	147	273	a90
NB194-P42	19	53	148	274	a91
NB194-P43	19	53	149	275	a92
NB194-P44	19	53	150	276	a93
NB194-P45	19	53	151	277	a94
NB194-P46	19	53	152	278	a95
NB194-P47	19	53	153	279	a96
NB194-P48	19	53	154	280	a97
NB194-P49	39	53	155	281	a98
NB194-P50	19	53	156	282	a99
NB194-P51	19	53	157	283	a100
NB194-P52	19	53	158	284	a101
NB194-P53	19	53	159	285	a102
NB194-P54	19	53	160	286	a103
NB194-P55	19	53	161	287	a104
NB194-P56	19	53	162	288	a105
NB194-P57	19	53	163	289	a106

NB194-P58	37	53	164	290	a107
NB194-P59	19	53	165	291	a108
NB194-P60	19	53	166	292	a109
NB194-P61	19	53	167	293	a110
NB194-P62	19	53	168	294	a111
NB194-P63	36	74	169	295	a112
NB194-P64	38	53	170	296	a113
NB194-P65	37	53	171	297	a114
NB194-P66	19	53	172	298	a115
NB194-P67	19	53	173	299	a116
NB194-P68	38	53	174	300	a117
NB194-P69	38	53	175	301	a118
NB194-P70	36	74	176	302	a119
NB194-P71	19	53	177	303	a120
NB194-P72	19	53	178	304	a121
NB194-P73	19	53	179	305	a122
NB194-P74	19	53	180	306	a123
NB194-P75	19	53	181	307	a124
NB194-P76	19	53	182	308	a125
NB194-P77	19	53	183	309	a126
NB194-P29-z1	37	75	135	310	a127
NB194-P29-z2	37	75	135	311	a128
NB194-P29-z3	37	75	135	312	a129
NB194-P29-z4	37	75	135	313	a130
NB194-P29-z5	37	75	135	314	a131
NB194-P29-z6	37	75	135	315	a132
NB194-P29-z7	37	75	135	316	a133
NB194-P29-z8	37	75	135	317	a134
NB194-P29-z9	320	75	135	318	a135
NB194-P29-z10	37	75	135	319	a136

优选含有选自以下的任一组所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3: a14、a17、a40-a136，或者优选含有选自以下的任一组所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3: a14、a40-a44，或者优选含有选自以下的任一组所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3: a17、a45-a136。

- 5 在一个或多个实施方案中，所述单域抗体 VHH 的 FR1 可选自表 1 中各抗体编号的 VHH 的 FR1，VHH 的 FR2 可选自表 1 中各抗体编号的 VHH 的 FR2，VHH 的 FR3 可选自表 1 中各抗体编号的 VHH 的 FR3，VHH 的 FR4 可选自表 1 中各抗体编号的 VHH 的 FR4。

- 10 在优选的实施方案中，所述单域抗体的 FR 区为选自 SEQ ID NO: 184-319 的任一 VHH 的 FR 区。进一步优选地，这类抗体的 CDR 选自前述组 a1 到组 a136 中的任

一组所示的 CDR。在一个或多个实施方案中，所述单域抗体 VHH 如 SEQ ID NO: 184-319 中任一所示。优选地，所述单域抗体如 SEQ ID NO: 197、200、223-319 中任一所示。

5 本文所述 PD-1 结合分子可以是包含一条、两条或多条本文所述的抗 PD-1 单域抗体的单价或多价单域抗体、多特异性单域抗体、重链抗体或其抗原结合片段、抗体或其抗原结合片段。所述重链抗体还包含重链恒定区，例如骆驼重链抗体或软骨鱼重链抗体的恒定区。优选地，所述重链恒定区如 SEQ ID NO: 321 所示。

10 本发明还包括所述抗体衍生物和类似物。“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的衍生物或类似物可以是(i)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(ii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iii)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与 6His 标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

15 在不实质性影响抗体活性的前提下，本领域技术人员可以对本发明的序列改变一个或更多个(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个或更多个)氨基酸，以获得所述抗体或其功能性片段序列的变体。这些变体包括(但并不限于): 一个或多个(通常为 1-50 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 20 个以内，较佳地为 10 个以内，更佳地为 5 个以内)氨基酸。在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行保守性取代时，通常不会改变蛋白质的功能。如在可变区的 FR 和/或 CDR 区中将具有类似性质的氨基酸进行取代。可进行保守性取代的氨基酸残基为本领域所周知。这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的。又比如，在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。它们都被视为包
20
25 括在本发明保护的范围内。

本文所述抗体的变异形式包括: 同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

30 在一些实施方案中，本发明所述变体的序列可以与其来源序列有至少有 95%、96%、97%、98%或 99%的一致性。本发明所述的序列一致性可以使用序列分析软件测量。例如使用缺省参数的计算机程序 BLAST，尤其是 BLASTP 或 TBLASTN。本

发明还包括那些具有带 CDR 的抗体重链可变区的分子，只要其 CDR 与此处鉴定的 CDR 具有 90% 以上(较佳地 95% 以上，最佳地 98% 以上)的同源性。

可采用本领域常规的方法制备本发明的抗体，如本领域熟知的杂交瘤技术。可采用本领域常规的方法制备本发明的重链抗体，如本领域熟知的噬菌体展示技术。或者，本发明的抗体或重链抗体可在其他细胞系中表达。可用编码本发明抗体的序列转化合适的哺乳动物宿主细胞。转化可采用任何已知的方法进行，例如包括将多核苷酸包装在病毒（或病毒载体中）并用病毒（或载体）转导宿主细胞。所用的转化程序取决于将转化的宿主。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞中的方法为本领域所熟知，包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多核苷酸囊封在脂质体中和将 DNA 直接微注射至核中等。可用于表达的宿主的哺乳动物细胞系为本领域所熟知，包括但不限于可从美国典型培养物保藏中心（ATCC）获得的多种永生化细胞系，包括但不限于中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾（BHK）细胞、猴肾细胞（COS）、人肝细胞癌细胞（例如，HepG2）等。尤其优选的细胞系通过确定哪些细胞系具有高表达水平并产生具有基本 PD-1 结合特性的抗体来进行选择。

核酸

本发明还提供了编码上述抗体或其片段的多核苷酸。本文提供编码重链可变区、轻链可变区、重链、轻链以及各 CDR 的多核苷酸。本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。

如本领域技术人员将了解，由于遗传密码的简并性，可制得极大量的核酸，它们全部编码本发明的抗体或其抗原结合片段。因此，在已鉴定特定氨基酸序列的情况下，本领域技术人员可通过以不改变编码蛋白质的氨基酸序列的方式简单地修饰一个或多个密码子的序列来制得任何数量的不同的核酸。所以，本发明还涉及与上述多核苷酸序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，较佳地至少 70%，更佳地至少 80% 相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严谨条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严谨条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 $0.2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, 60°C；或(2)杂交时加有变性剂，如 50% (v/v) 甲酰胺，0.1% 小牛血清/0.1% Ficoll，42°C 等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90% 以上，更好是 95% 以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外，还可将重链的编码序列和表达标签(如 6His)融合在一起，形成融合蛋白。

5 一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段，或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

所以，本发明还涉及包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的核酸构建物，例如表达载体和重组载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。载体通常含有用于质粒维系和用于克隆与表达外源性核苷酸序列的序列。所述序列(在某些实施方案中总称为“侧翼序列”)通常包括一个或多个
15 以下核苷酸序列：启动子、一个或多个增强子序列、复制起点、转录终止序列、含有供体和受体剪接位点的完全内含子序列、编码用于多肽分泌的前导序列的序列、核糖体结合位点、聚腺苷酸化序列、用于插入编码将要表达的抗体的核酸的多连接子区和可选标记元件。示例性的载体可参见 CN105154473A 和 CN111206043A，这些文献通过引用全文纳入本文。

20 宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS7、293 细胞的动物细胞等。

在某些实施方案中，宿主细胞可以是本领域周知的各种功能细胞，例如各种杀
25 伤性细胞，包括但不限于细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)、树突状细胞刺激的细胞因子诱导的杀伤细胞(DC-CIK)、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)、 $\gamma \delta$ T 细胞、自然杀伤细胞(NK)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子激活杀伤细胞(LAK)、CD3AK 细胞(抗 CD3 单抗的杀伤细胞)和 CAR-T/TCR-T 细胞。在某些实施方案中，所述杀伤性细胞为 T 细胞或 NK 细胞。示例性的 NK 细胞包括但不限于原代 NK 细胞、NK 细胞株(如
30 NK92)和 NKT 细胞。在某些实施方案中，所述 NK 细胞为原代 NK 细胞。示例性的 T 细胞包括但不限于外周血 T 淋巴细胞、细胞毒杀伤 T 细胞(CTL)、辅助 T 细胞、抑制

/调节性 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞以及细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)等混合细胞群体的 T 细胞。在某些实施方案中,所述 T 细胞为外周血 T 淋巴细胞与源自 TIL 的 T 细胞。

在某些实施方案中,宿主细胞含有表达嵌合抗原受体(CAR)的编码序列和/或
5 表达嵌合抗原受体。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获,用 CaCl_2 法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的 DNA 转染方法:磷酸
10 钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔,脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

15 在上面的方法中的多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相
20 层析技术及这些方法的结合。

治疗用途和药物组合物

通过构建纳米抗体文库,发明人发现并表达纯化 126 个可以结合 PD-1 的纳米抗体及其变体。通过蛋白水平亲和力检测、细胞水平亲和力检测、肿瘤细胞 PD-1 结合检测、表位竞争实验和组织交叉反应验证了这些抗体的对抗原和细胞的结合能力和药
25 物安全性。

本文所述的抗体的所有方面都可用于制备用以预防或治疗本文所述各种病况和疾病的药物,所述病况和疾病尤其病况与表达 PD-1 的细胞相关的疾病或病况。在一些实施方案中,所述病况和疾病是癌症,包括但不限于:黑色素瘤、肺癌、头颈部癌、肾细胞癌、泌尿道上皮癌、非霍奇金淋巴瘤等。

30 本文的药物组合物含有本文所述结合分子,以及药学上可接受的辅料,包括但不限于稀释剂、载剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。辅料优选地在所采用的

剂量和浓度下对接受者无毒。这类辅料包括(但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。在某些实施方案中, 药物组合物可含有用于改善、维持或保留例如组合物的 pH、渗透性、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸收或渗透的物质。这些物质为现有技术已知。可视预期的施用途径、递送方式和所需的剂量来确定最佳的药物组合物。

用于体内施用的药物组合物通常以无菌制剂的形式提供。通过经无菌过滤膜过滤来实现灭菌。在组合物冻干时, 可在冻干和复水之前或之后使用此方法进行灭菌。可选择本发明的药物组合物用于肠胃外递送。用于肠胃外施用的组合物可以冻干形式或在溶液中储存。例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。肠胃外组合物通常放在具有无菌进入孔的容器中, 例如具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液带或小瓶。或者, 可选择组合物用于吸入或通过消化道(诸如经口)递送。所述药学上可接受的组合物的制备在本领域的技术内。其它药物组合物将为本领域技术人员显而易见, 包括在持续或控制释放递送配制物中包含抗体的配制物。用于配制多种其它持续或可控传递方式的技术(诸如脂质体载剂、生物易蚀微粒或多孔珠粒和积存注射)也为本领域技术人员所知。

药物组合物一经配制, 就以溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体、晶体或以脱水或冻干粉末的形式储存在无菌小瓶中。所述配制物可储存成即用形式或在施用前复水的形式(例如, 冻干)。本发明还提供用于产生单剂量施用单位的试剂盒。本发明的试剂盒可各自含有具有干燥蛋白的第一容器和具有含水配制物的第二容器。在本发明的某些实施方案中, 提供含有单腔和多腔预填充注射器(例如, 液体注射器和冻干注射器)的试剂盒。

本发明也提供通过施用本发明任一实施方案所述的结合分子或其药物组合物来治疗患者(尤其是患者的 PD-1 相关疾病)的方法。本文中, 术语“患者”、“受试者”、“个体”、“对象”在本文中可互换使用, 包括任何生物体, 优选动物, 更优选哺乳动物(例如大鼠、小鼠、狗、猫、兔等), 且最优选的是人。“治疗”指向受试者采用本文所述治疗方案以达到至少一种阳性治疗效果(比如, 癌症细胞数目减少、肿瘤体积减小、癌细胞浸润至周边器官的速率降低或肿瘤转移或肿瘤生长的速率降低)。有效治疗患者的治疗方案可根据多种因素(比如患者的疾病状态、年龄、体重及疗法激发受试者的抗癌反应的能力)而变。

将采用的含有本发明结合分子的药物组合物的治疗有效量将取决于例如治疗程度和目标。本领域技术人员将了解, 用于治疗的适当剂量水平将部分取决于所递送的

分子、适应症、施用途和患者的体重、体表或器官大小)和/或状况(年龄和一般健康状况)而变化。在某些实施方案中,临床医生可滴定剂量并改变施用途来获得最佳的治疗效果。例如每天约 10 微克/千克体重-约 50 毫克/千克体重。

给药频率将取决于所用配制物中结合分子的药代动力学参数。临床医生典型地施用组合物直到达到实现所需效果的剂量。组合物因此可作为单次剂量施用,或随时间以作为两次或多次剂量(可含有或不含有相同量的所需分子)施用,或通过植入装置或导管以连续输液的方式施用。

药物组合物的施用途是根据已知方法,例如经口、通过静脉内、腹膜内、脑内(脑实质内)、脑室内、肌肉内、眼内、动脉内、门静脉或病灶内途径注射;通过持续释放系统或通过植入装置。

诊断、检测和试剂盒

本发明的结合分子因其与 PD-1 的高亲和力可用于测定,例如结合测定来检测和/或定量在组织或细胞中表达的 PD-1。结合分子例如单域抗体可用在进一步研究 PD-1 在疾病中的作用的研究中。检测 PD-1 的方法大致如下:获得细胞和/或组织样本;检测样本中 PD-1 的水平。

本发明的 PD-1 结合分子可用于诊断目的,用来检测、诊断或监控与 PD-1 相关的疾病和/或病况。本发明提供使用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法检测样本中 PD-1 的存在。可以体内或体外进行 PD-1 的检测。适用于检测 PD-1 的存在的方法实例包括 ELISA、FACS、RIA 等。

对于诊断应用来说,通常用可检测的标记基团来标记结合分子例如单域抗体。合适的标记基团包括(但不限于)以下:放射性同位素或放射性核素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光基团(例如, FITC、罗丹明、镧系元素磷光体)、酶促基团(例如,辣根过氧化物酶、 β 根半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光基团、生物素基团或由二级报告体识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、用于二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)、MRI(磁共振成像)或 CT(电子计算机 X 射线断层扫描技术)造影剂。用于标记蛋白质的各种方法在本领域中已知且可用来进行本发明。

本发明的另一方面提供检测与本发明的抗体竞争结合 PD-1 的测试分子的存在的方法。一种所述测定的实例将涉及在存在或不存在测试分子的情形下检测含有一定量 PD-1 的溶液中的游离抗体的量。游离抗体(即,未结合 PD-1 的抗体)的量增加将表示测试分子能与该抗体竞争结合 PD-1。在一个实施方案中,用标记基团标记抗体。

或者, 标记测试分子并在存在或不存在抗体的情形下监控游离测试分子的量。

本发明还提供了用于检测 PD-1 水平的检测试剂盒, 该试剂盒包括识别 PD-1 蛋白的抗体, 用于溶解样本的裂解介质, 检测所需的通用试剂和缓冲液, 如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

5 本发明具体包含如下任一项所示的实施方案:

1、一种 PD-1 结合分子, 包含抗 PD-1 单域抗体, 所述单域抗体的互补决定区 CDR 包含 CDR1、CDR2 和 CDR3, 其中 CDR1 包括 SEQ ID NO:1 所示的序列、CDR2 包括 SEQ ID NO:2 所示的序列、和 CDR3 包括 SEQ ID NO:3 所示的序列, 其中,

SEQ ID NO:1 是 $GX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, 其中, X_1 为 D、F、G、H、L 或 R, X_2 为 P、S 或 T, X_3 为 A、F、I、L、N、R、S 或 V, X_4 为 D、F、G、L、M、N 或 S, X_5 为 A、D、F、G、I、N、R、S 或 T, X_6 为 D、F、H、I、L、S、V、W 或 Y, X_7 为 A、D、E、G、N、P、S 或 T; 优选地, SEQ ID NO:1 是 $GX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, 其中, X_1 为 D、F、G、H、L 或 R, X_2 为 P、S 或 T, X_3 为 F 或 S, X_4 为 F 或 S, X_5 为 G、I 或 T, X_6 为 S 或 Y, X_7 为 A 或 D,

15 SEQ ID NO:2 是 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$, 其中, X_1 为 I、L、S、T 或 V, X_2 为 A、N、S 或 T, X_3 为 F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、W 或 Y, X_4 为 A、D、G、H、N、R、S 或 T, X_5 为 A、D、G、N、R、S 或无, X_6 为 G 或 R、S 或 T, X_7 为 D、E、I、L、M、N、R、S、T 或 V, X_8 为 A、K、M、Q 或 T, X_9 为 A 或无; 优选地, SEQ ID NO:2 是 $X_1X_2X_3X_4X_5GX_7TX_9$, 其中, X_1 为 I 或 V, X_2 为 N、S 或 T, X_3 为 F、L 或 N, X_4 为 A、G、S 或 T, X_5 为 R 或无, X_7 为 D、N、I 或 T, X_9 为无,

20 SEQ ID NO:3 是 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}$, 其中, X_1 是 A、E、G、N、R、S、T 或 V, X_2 是 A、G、I、K、L、P、R、T 或 V, X_3 是 A、D、E、G、K、N、P、R、S、V 或 Y, X_4 是 A、C、D、E、G、I、K、L、R、S、T、V 或 Y, X_5 是 A、C、D、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、W 或 Y, X_6 是 A、C、D、E、G、I、K、L、M、P、Q、R、S 或 Y, X_7 是 A、C、D、F、G、H、I、N、P、R、S、T、V 或 Y, X_8 是 A、C、D、E、G、I、R、S、T、V、W、Y 或无, X_9 是 A、D、E、F、G、I、L、P、R、S、V、W、Y 或无, X_{10} 是 C、D、F、G、K、L、N、P、R、S、T、V、W、Y 或无, X_{11} 是 D、F、G、H、I、K、L、N、P、S、T、V、Y 或无, X_{12} 是 A、D、G、H、I、L、M、P、R、S、T、V、Y 或无, X_{13} 是 C、D、E、H、P、R、S、T、V、Y 或无, X_{14} 是 A、D、E、F、H、I、L、P、R、T、Y 或无, X_{15} 是 A、D、E、G、N、Q、R、S、T、V、Y 或无, X_{16} 是 A、D、E、F、G、H、M、P、S、V、Y 或无, X_{17} 是 A、D、E、H、N、Q、R、T、Y 或无, X_{18} 是 D、E、R、S、Y 或无, X_{19} 是 N、S、Y 或无, X_{20} 是 D、E、Y 或无, X_{21} 是 E、

N、Y 或无，X₂₂ 是 Y 或无；优选地，SEQ ID NO:3 是

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂，其中，X₁ 是 E、G、N 或 V，X₂ 是 A、G、I、L 或 V，X₃ 是 A、D、E、G、N、V 或 Y，X₄ 是 A、G、I、K、R 或 S，X₅ 是 C、I、L、P、Q、R 或 W，X₆ 是 E、K、P、Q 或 R，X₇ 是 C、D、H、N、P 或 Y，X₈ 是 E、G、R、V 或 W，X₉ 是 F、G、L、S、V 或 W，X₁₀ 是 C、D、G、L、R、S 或 V，X₁₁ 是 F、G、I、L、N、S、T 或 V，X₁₂ 是 H、L、P、R、S、T 或 Y，X₁₃ 是 D、H、P、S、T 或 V，X₁₄ 是 E、F、H、I、L、P 或 R，X₁₅ 是 A、S 或 V，X₁₆ 是 A、D、E、G、H 或 V，X₁₇ 是 H、N、Q、R 或 Y，X₁₈-X₂₂ 是无。

2、如项目 1 所述的 PD-1 结合分子，其特征在于，所述单域抗体的 CDR1 包括 SEQ ID NO:4-39、320 中任一所示的序列，CDR2 包括 SEQ ID NO:40-75 中任一所示的序列，和 CDR3 包括 SEQ ID NO: 76-183 中任一所示的序列，

优选地，所述单域抗体含有表 1 的组 a1 到组 a136 中任一组所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

3、如项目 1 或 2 所述的 PD-1 结合分子，其特征在于，
所述单域抗体的 FR 区包含选自 SEQ ID NO: 184-319 的任一 VHH 的 FR 区，和/或

所述单域抗体 VHH 如 SEQ ID NO: 184-319 中任一所示，和/或

所述 PD-1 结合分子是包含一条、两条或多条所述单域抗体的单价或多价单域抗体、多特异性单域抗体、重链抗体或其抗原结合片段、抗体或其抗原结合片段。

4、如项目 3 所述的 PD-1 结合分子，其特征在于，所述 PD-1 结合分子是重链抗体，所述重链抗体还包含重链恒定区，

优选地，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 321 所示序列。

5、一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸选自：

(1) 项目 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子的编码序列；

(2) (1) 的互补序列；

(3) (1) 或 (2) 中任一序列的 5-50bp 的片段。

6、一种核酸构建物，其特征在于，所述核酸构建物包含项目 5 所述的多核苷酸，
优选地，所述核酸构建物是重组载体或表达载体。

7、包含项目 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子的噬菌体，

优选地，所述 PD-1 结合分子展示于所述噬菌体表面。

8、一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞：

(1) 表达和/或分泌项目 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子；和/或

(2) 包含项目 5 所述的多核苷酸；和/或

(3) 包含项目 6 所述的核酸构建物。

9、一种产生 PD-1 结合分子的方法，包括：在适合产生 PD-1 结合分子条件下
5 培养项目 8 所述的宿主细胞，和任选的从培养物中纯化所述 PD-1 结合分子。

10、一种药物组合物，包含项目 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子、项目 5 所述的多核苷酸、项目 6 所述的核酸构建物、项目 7 所述的噬菌体或项目 8 所述的宿主细胞，和药学上可接受的辅料，

优选地，所述药物组合物用于治疗癌症。

10 11、项目 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

12、一种检测 PD-1 的试剂盒，用于评估药物治疗效果或诊断癌症，所述的试剂盒包含项目 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子、项目 5 所述的多核苷酸、项目 6 所述的核酸构建物、项目 7 所述的噬菌体或项目 8 所述的宿主细胞，

15 优选地，所述试剂盒还包括用于检测 PD-1 与单域抗体、抗体或其抗原结合片段的结合的试剂，

更优选地，所述试剂是通过酶联免疫反应法检测所述结合的试剂。

13、一种检测样品中 PD-1 存在情况的非诊断性方法，所述方法包括：以项目 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子与样品孵育，和检测 PD-1 与单域抗体、抗体或其
20 抗原结合片段的结合，从而确定样品中 PD-1 存在情况。

14、项目 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子在制备用于检测样品中 PD-1、评估药物治疗效果或诊断癌症的试剂盒中的用途。

25 下文将以具体实施例的方式阐述本发明。应理解，这些实施例仅仅是阐述性的，并非意图限制本发明的范围。实施例中所用到的方法和材料，除非另有说明，否则均为本领域常规的材料和方法。

实施例

30 实施例 1，羊驼免疫

1.1 免疫原制备：

根据 NCBI 上查询 PD-1 蛋白序列，与人 IgG Fc 片段序列进行融合，委托南京金斯瑞公司进行合成构建 pCDNA3.4 (Thermo) 质粒的真核表达载体，将合成后的质粒利用 EXpiCHO™ (Thermo Fisher) 表达系统表达，表达后用 5 mL 的 Protein A 预装柱 (GE) 进行一步亲和纯化，将纯化后样品置换如 PBS 缓冲液中，经 SDS-PAGE 电泳凝胶与 HPLC 鉴定纯度，ELISA 鉴定活性后，分装冻存于 -80 度冰箱用于后续免疫。

1.2 羊驼免疫：

首次免疫抗原 (PD-1.hFc) 量为 400 µg，与佐剂 (GERBU FAMA) 混匀，选取羊驼背部皮下四点注射免疫，每点免疫量为 1 mL。第二至 7 次免疫：免疫抗原量为 200 µg，选取羊驼背部皮下四点注射免疫，每点免疫量为 1 mL。每次免疫间隔时间为一周。

1.3 免疫血清效价检测：

1.3.1 蛋白水平效价检测

4 度过夜包被 PD-1.His 抗原，封闭洗涤后，将梯度稀释的血清加入 ELISA 板进行孵育后，再使用 anti-llama (抗羊驼) IgG HRP (Abcam) 抗体进行孵育，洗涤后加入 TMB 显色液显色，用 2 M HCl 终止反应，然后用酶标仪检测 OD450 纳米处吸光值。实验结果如图 1 所示，经过 7 次免疫后羊驼效价达到较高水平 (>81000)。

1.3.2 细胞水平效价检测

将 PD-1 转染的 CHO-K1 细胞铺于 96 孔板中，细胞量为 3×10^5 细胞/孔。然后用 3 倍梯度稀释的血清与细胞孵育。孵育、洗涤后，加入 anti-llama IgG PE (Jackson) 抗体孵育，洗涤后用 PBS 重悬细胞，然后用流式细胞仪 (Beckman) 检测荧光强度 (MFI)。经过 7 次免疫后，羊驼在细胞水平效价达到 9000。结果如图 2 所示。

实施例 2，针对于 PD-1 的纳米抗体免疫文库的构建及筛选

(1) 7 次免疫结束后，提取骆驼外周血淋巴细胞 100 mL 并提取总 RNA。RNA 的提取参照 TAKARA 公司 RNAiso 试剂说明书进行。

(2) 以 RNA 为模板，oligo dT 为引物，参照 TAKARA 公司反转录酶说明书合成 cDNA 第一链。

(3) 采用 PrimeSTAR 高保真 DNA 聚合酶，经巢式 PCR 获得重链抗体的可变

区编码基因。用巢式 PCR 扩增重链抗体的可变区片段：

第一轮 PCR：

上游引物：GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGGC

下游引物：GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

- 5 扩增重链抗体引导肽和抗体 CH2 之间的片段，55℃退火，30 个循环；回收约 600 bp 的 DNA 片段，作为第二轮 PCR 的模板。

第二轮 PCR：

上游引物：GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG

下游引物：GGACTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT

- 10 扩增重链抗体 FR1 区和长、短铰链区之间的片段（长片段和短片段），55℃退火，30 个循环，回收目的片段，结果显示该片段的大小约为 500bp，即纳米抗体基因电泳带约为 500bp。

- （4）将噬菌粒 pME207 和 PCR 扩增产物分别用 Sfi I 和 Not I 双酶切（NEB），回收、定量后，以 1：3 摩尔比，用 T4 DNA 连接酶（TaKaRa）连接两个片段，在 16℃，
15 过夜连接。

- （5）连接产物经乙醇沉淀后，溶于 100 μL 无菌水，分十次进行电穿孔转化大肠杆菌 TG1。取 100 μL 电击、培养后的菌液倍比稀释，涂布氨苄青霉素 LB 培养板，计算库容，其余部分全部涂布于氨苄青霉素 2×YT 培养板，37℃，倒置培养 13~16 h。用 10 mL，2×YT 培养基将培养板上的菌苔刮洗后，加入终浓度 25 % 甘油，分装，-80℃
20 保存备用。库容的大小为 4.3×10^9 。为检测文库的插入率，随机选取 48 个克隆做菌落 PCR，结果显示插入率已达到 90% 以上。

- （6）根据计算的库容量结果，接种 10 倍库容量的活细胞于 200mL 的 2×YT(含 2 % 葡萄糖，100 μg/mL 氨苄青霉素)，37℃，200 r/min 培养至 OD600 达 0.5，按感染复数 20：1 加入辅助噬菌体，37℃静置 30 min 后，37℃，200 r/min，30 min。将培养物离心，用 200 mL 的 2×YT(含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 50 μg/mL 卡那霉素)重悬沉淀，37℃，250 r/min 过夜培养后，8000rpm 离心取上清，加入 5×PEG/NaCl 溶液，冰上放置 60 min，8000rpm 离心 30 min，重悬沉淀于 5 mL 的 PBS 中，即得到抗 PD-1 的单域重链抗体（VHH）免疫文库，取 10 μL 测定滴度，其余分装于-80℃保存备用。
25

- （7）将 PD-1 蛋白按 5 μg/mL，100μL 每孔包被在酶标板上，4℃放置过夜，同时

设立负对照。第二天五个孔中分别加入 200 μL , 3%BSA, 室温封闭 2 小时。2 小时后用 PBST(PBS 中含有 0.05%吐温 20)洗 3 遍。洗板后先在每个负筛孔加入 100 μL 用 5%脱脂牛奶预封闭的噬菌体($2\sim 3\times 10^{11}$ tfu 免疫骆驼纳米抗体噬菌展示基因库), 在室温下作用 1.5 小时, 再将负筛后上清转移至目的抗原包被孔中, 室温下作用 1.5 小时。用 PBST(PBS 中含有 0.05%吐温 20)洗 12 遍, 以洗掉不结合的噬菌体。用 Glycine(SIGMA)将与 PD-1 特异性结合的噬菌体解离下, 洗脱的噬菌体经 Tris (Invitrogen, 1 M, PH 8.0) 中和后感染处于对数期的 TG1, 经繁殖扩增, 进行下一轮“吸附-洗脱”。最后洗脱下的噬菌体浸染 TG1, 利用 IPTG (Thermo) 诱导 TG1 表达纳米抗体, 取 TG1 表达的上清做 ELISA 结合检测与阻断 PD-L1.hFc 检测。ELISA 结合检测使用二抗为 anti-c-myc Antibody HRP (抗 c-myc 抗体 HRP) (Bethyl), 阻断 PD-L1 结合检测使用二抗为 Goat anti-Human IgG-Fc Fragment Antibody HRP (羊抗人 IgG-Fc 片段抗体 HRP) (Bethyl)。

(8) 通过序列分析后, 总计得到 39 个可以结合 PD-1 蛋白的纳米抗体, 如下表所示。

克隆编号	ELISA (OD450)		
	克隆与 PD-1 结合	PD-L1 与 PD-1 结合	阴性对照
NB139	3.122	2.394	0.026
NB147	2.627	0.994	0.027
NB148	2.841	2.563	0.026
NB153	3.293	2.052	0.025
NB154	2.608	2.281	0.026
NB159	1.837	2.104	0.065
NB164	2.841	2.001	0.039
NB166	3.388	2.293	0.026
NB169	2.895	2.128	0.026
NB170	2.701	2.015	0.026
NB171	2.781	0.715	0.026
NB172	3.052	2.168	0.027
NB173	2.974	0.794	0.027
NB182	3.081	0.213	0.028
NB189	2.968	2.337	0.035
NB192	2.647	2.240	0.026
NB194	2.835	0.152	0.025
NB195	3.131	2.237	0.027
NB196	3.387	2.491	0.026
NB197	2.659	2.274	0.025

NB200	2.305	2.477	0.025
NB202	3.040	0.723	0.025
NB205	2.248	2.204	0.027
NB209	3.219	2.041	0.026
NB211	2.711	2.211	0.026
NB215	3.289	1.275	0.027
NB216	2.746	2.451	0.026
NB218	2.615	2.318	0.026
NB220	2.378	2.206	0.026
NB221	2.623	2.250	0.026
NB222	3.128	2.227	0.027
NB223	1.298	2.254	0.027
NB532	1.358	2.193	0.026
NB548	2.127	2.429	0.026
NB733	1.033	2.471	0.026
NB734	2.173	1.421	0.026
NB735	1.815	2.437	0.026
NB754	2.036	2.371	0.026
NB755	1.704	2.204	0.025

实施例 3，候选抗体表达纯化

将纳米抗体构建到 pCDNA3.4-IgG4 载体上，然后经 EXpiCHO™ (Thermo Fisher) 表达系统表达，表达一周后收取上清进行 Protein A (GE) 纯化。然后使用 Nanodrop 检测蛋白质量，HPLC 检测蛋白纯度。所得蛋白纯度及产量满足后续试验需要。Keytruda 和 Opdivo 根据 <https://www.drugbank.ca/> 提供的序列制备 IgG4 抗体。

实施例 4，候选抗体表征

蛋白水平亲和力检测：使用表面等离子共振技术 (SPR) 测定抗体对人 PD-1.Fc 抗原的结合动力学和亲和力。将纯化的抗体流经预先固定 protein A 的传感器芯片，抗体被 protein A 捕获，然后将 5 个不同浓度的 PD-1.Fc 蛋白作为流动相，结合时间和解离时间分别为 30min 和 60min。使用 Biacore Evaluation Software 2.0 (GE) 分析结合速率 (k_a)、解离速率 (k_d) 和平衡常数 (KD)。选择上市的 PD-1 抗体药物 Keytruda 和 Opdivo 为对照。结果如下表所示。

样品	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
NB147	5.58E+04	1.53E-04	2.75E-09
NB171	4.97E+04	3.09E-04	6.21E-09
NB173	2.15E+03	1.79E-04	8.31E-08

NB182	7.38E+03	6.40E-05	8.67E-09
NB202	2.06E+05	6.77E-05	3.28E-10
NB211	2.26E+06	3.00E-03	1.33E-09
NB215	4.90E+04	5.08E-04	1.04E-08
NB223	1.35E+05	8.63E-04	6.39E-09
NB194	1.13E+06	7.62E-05	5.62E-10
NB220	1.48E+06	3.23E-04	2.19E-10
NB222	2.05E+06	3.06E-04	1.49E-10
NB532	1.31E+05	9.20E-04	7.03E-09
NB734	2.36E+05	6.88E-05	2.92E-10
其他抗体	2.31E+4 至 5.01E+6	8.11E-03 至 7.95E-5	2.74E-8 至 6.32E-10
Keytruda	1.01E+06	3.33E-04	3.29E-10
Opdivo	7.08E+05	9.48E-05	1.34E-10

实施例 5：不同种属 PD-1 结合

分别将不同种属（人、食蟹猴、鼠科）PD-1 蛋白（ACROBiosystems）包被酶标板，浓度为 1μg/ml，4℃放置过夜。封闭和洗涤后，将稀释好的抗体分别加入酶标板中，室温孵育 2 小时。洗涤后，加入 Goat anti-Human IgG-Fc Fragment Antibody HRP（Bethyl）二抗，室温孵育 1 小时。洗涤后加入 TMB 显色液，然后用 2M HCl 终止反应，使用酶标仪读取 OD450 数值。

实验结果如下表所示，候选抗体、Keytruda 和 Opdivo 均结合人和食蟹猴 PD-1，与鼠科 PD-1 蛋白不结合。

10

样品	ELISA （OD 值）								
	包被人 PD-1 蛋白			包被食蟹猴 PD-1 蛋白			包被鼠科 PD-1 蛋白		
NB182, 0.1μg	2.174	2.130	2.100	2.070	2.075	1.949	0.068	0.071	0.061
NB194, 0.1μg	2.220	1.947	2.108	2.225	2.170	2.097	0.024	0.022	0.024
其他抗体, 0.1μg	0.723-2.231			0.533-2.179			0.020-0.081		
Keytruda, 0.1μg	2.254	2.336	2.184	2.222	2.340	2.319	0.079	0.088	0.090
Opdivo, 0.1μg	2.112	2.144	2.248	1.888	1.795	1.834	0.024	0.023	0.023

实施例 6：CD28 家族蛋白结合测试

分别将 CD28 家族蛋白(CD28,CTLA-4,ICOS 和 PD-1)蛋白(ACROBiosystems)包被酶标板，浓度为 1μg/ml，4℃放置过夜。封闭和洗涤后，将稀释好的抗体分别

加入酶标板中，室温孵育 2 小时。洗涤后，加入羊抗人 IgG-Fc 片段抗体 HRP(Bethyl) 二抗，室温孵育 1 小时。洗涤后加入 TMB 显色液，然后用 2M HCl 终止反应，使用酶标仪读取 OD450 数值。

实验结果如下表所示，候选抗体、Keytruda 和 Opdivo 均只与 PD-1 蛋白结合，与 CD28 家族其它蛋白均不结合。

样品	ELISA (OD 值)											
	CTLA-4			ICOS			CD28			PD-1		
NB182	0.191	0.186	0.185	0.110	0.134	0.111	0.053	0.049	0.047	2.055	2.093	2.287
NB194	0.033	0.028	0.026	0.022	0.021	0.023	0.022	0.022	0.020	2.034	1.957	2.272
其他抗体	0.011-0.108			0.017-0.141			0.019-0.046			0.821-2.346		
Keytruda	0.090	0.086	0.089	0.125	0.107	0.131	0.066	0.054	0.053	2.118	2.209	2.452
Opdivo	0.024	0.022	0.019	0.023	0.021	0.022	0.020	0.021	0.023	2.051	1.999	2.350

实施例 7：表位竞争实验

使用仪器 Biacore T200(GE),检测温度 25℃,缓冲液 1×HBS-EP+(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA 和 0.05% v/v Surfactant P20, GE),流速 30 ul/min。PD-1-His 溶于醋酸盐缓冲液，pH4.0 (Biacore Amine Coupling Kit, GE)，至终浓度 10 µg/ml，按照氨基偶联试剂盒产品说明，将 PD-1-His 固定于 CM5 芯片 (GE) 通道 2 (FC-2)，约 21 RU。通道 1 (FC-1) 做空白对照。用 1×HBS-EP+分别稀释抗体至目标浓度，向上述完成 PD-1 固定的芯片 FC-1 和 FC-2 注入其中一个抗体至饱和水平，随后再注入另外一个抗体至饱和，以评价两个抗体的竞争关系。第二个抗体注射完成后，复合物解离 400s。最后采用 50 mM NaOH 注射 15s 对芯片表面再生。数据处理采用 Biacore Evaluation Software 2.0(GE)，传感图采用双参比扣除，记录 FC2-1 信号。

实验结果如下表所示，NB194 和 NB182 抗体结合的表位与 Keytruda 和 Opdivo 的表位有部分重合。其余抗体的结果与 NB194 和 NB182 抗体类似，均与 Keytruda 和 Opdivo 为表位部分竞争。

第一个抗体	第二个抗体			
	NB194	NB182	Keytruda	Opdivo
NB194	完全竞争	部分竞争	部分竞争	部分竞争
NB182	完全竞争	完全竞争	NA	NA

Keytruda	完全竞争	部分竞争	完全竞争	部分竞争
Opdivo	完全竞争	部分竞争	部分竞争	完全竞争

实施例 8：抗体功能活性测试

1) 报告基因实验。先将 GS/C2-PDL1 (金斯瑞) 靶细胞用无抗生素培养基调整密度至 5×10^5 个/mL, 20 μ L 每孔铺到 384 孔板中培养 16-20h。抗体用
 5 RMPI1640+10%FBS buffer 进行梯度稀释, GS-J2/PD1 (金斯瑞) 效应细胞用无抗生
 素培养基调整密度至 2×10^6 个/mL; 除去 384 孔板中旧培养基, 每孔加入 20 μ L 抗体,
 20 μ L GS-J2/PD1 效应细胞, 培养 6h。最后每孔加入 40 μ L One-Glo 底物反应 10 分
 钟后酶标仪检测。如图 3 所示, 抗体在 Reporter Gene Assay 功能检测方法中具有良好的
 10 的功能活性, 其中 NB182 和 NB194 的 EC50 为 16.3 nM 和 7.0 nM, Keytruda 和 Opdivo
 的 EC50 为 3.3 nM 和 7.3 nM。其余抗体的 EC50 为 1.7 至 75 nM 之间。

2) 混合淋巴细胞反应。抽取 100 毫升健康人的外周血用来做 PBMC 的分离,
 获得的 PBMC 再做 monocyte 的分离, 获得的 monocyte 在九天内被诱导成为成熟的
 树突细胞 DC。第九天, 将 DC 用流式细胞仪做质量检测, 符合诱导成熟的标准后,
 再次取得 100 毫升人体外周血做 PBMC 的分离, 然后把 PBMC 中的 CD4+ T 细胞分
 15 离出来, 使用 5:1 的 E:T 比值来孵育效应细胞和刺激细胞, 并加入待测样品, 8 浓度,
 3 复孔, 稀释倍数为 10 倍, 首浓度为 10-50 ug/ml。孵育 3 天。收集细胞培养的上清,
 检测 IL-2 和 IFN- γ 的释放量。

检测结果如图 4 和图 5 所示, 在一定范围内, NB182 和 NB194 可以以剂量依赖
 的方式促进 T 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ , 并且展现出与 Keytruda 和 Opdivo 相同的功能
 20 效果。其余抗体的结果与 NB182 和 NB194 类似, 均可以以剂量依赖的方式促进 T 细
 胞分泌 IL-2 和 IFN- γ : IL-2 EC50 在 0.115 nM 至 3.278 nM 之间, IFN- γ EC50 在 0.078
 nM 至 1.102 nM 之间。

实施例 9：抗体特异性验证

25 1) 膜蛋白交叉反应

利用美国 Integral molecular 公司开发的膜蛋白阵列筛选平台 (Membrane
 Proteome Array, MPA) 做膜蛋白交叉反应。将人的 5300 种不同膜蛋白通过转染
 HEK293 细胞展示在细胞表面, 通过 FACS 检测抗体在这些蛋白上的结合信号, 以此

评价待检测抗体的特异性。MPA 筛选结果（图 6 和图 7）显示，NB182 和 NB194 抗体只与人的 PD-1 蛋白结合，与其它 5000 多种蛋白均不结合。除 NB171 抗体外，其余抗体也只与人的 PD-1 蛋白结合。

2) 组织交叉反应

- 5 选取 34 种组织做冰冻切片，常温晾干后使用丙酮固定。使用内源性生物素阻断试剂盒（生工，E674001）的试剂 A 和试剂 B 进行封闭，将生物素标记的抗体样品孵育 30min，洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素（Abcam，ab7403）孵育 15min。使用 DAB 显色和苏木素复染，中性塑胶封片，自然风干后待镜检。阳性对照为 Anti-PD-1 抗体（abcam），阴性对照为 IgG4 同型对照。
- 10 NB182 和 NB194 抗体与正常人体淋巴细胞发生特异性结合，包括淋巴结、脾脏、胸腺。除 NB171 抗体外，其余抗体也只与正常人体淋巴细胞发生特异性结合。

序号	器官	NB182	NB194	同型对照
1	肾上腺	-	-	-
2	乳腺	-	-	-
3	眼	-	-	-
4	肾脏	-	-	-
5	胰腺	-	-	-
6	脊髓	-	-	-
7	甲状腺	-	-	-
8	主动脉	-	-	-
9	小脑	-	-	-
10	食管	-	-	-
11	肝脏	-	-	-
12	垂体	-	-	-
13	脾脏	淋巴细胞样阳性染色	淋巴细胞样阳性染色	-
14	输尿管	-	-	-
15	膀胱	-	-	-
16	大脑	-	-	-
17	输卵管	-	-	-
18	肺脏	-	-	-
19	胎盘	-	-	-
20	骨骼肌	-	-	-
21	子宫颈	-	-	-
22	血细胞	-	-	-
23	结肠	-	-	-
24	胃	-	-	-
25	淋巴结	淋巴细胞样阳性染色	淋巴细胞样阳性染色	-

26	前列腺	-	-	-
27	睾丸	-	-	-
28	子宫内膜	-	-	-
29	骨髓	-	-	-
30	十二指肠	-	-	-
31	心脏	-	-	-
32	卵巢	-	-	-
33	皮肤	-	-	-
34	胸腺	淋巴细胞样阳性染色	淋巴细胞样阳性染色	-

实施例 10: 抗体人源化

参考对纳米抗体做人源化的方法 (J. Biol. Chem. 2009; 284 : 3273-3284), 使用 CDR 区移植的方法对 NB182 和 NB194 做人源化。在 IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)数据库筛选与 NB182 和 NB194 同源性较高的种系 (germline) 为模板。使用 Biacore 对将人源化前后的抗体做亲和力检测, 将纯化的抗体流经预先固定 protein A 的传感器芯片, 抗体被 protein A 捕获, 然后将 5 个不同浓度的 PD-1.His 蛋白作为流动相, 结合时间和解离时间分别为 30min 和 60min。使用 Biacore Evaluation Software 2.0 (GE)分析结合速率 (k_a)、解离速率 (k_d) 和平衡常数(KD)。NB182-z1 和 NB182-z2 两个人源化分子与 NB182 亲和力一致, NB182-z3、NB182-z4、NB182-z5 与 NB182 亲和力相似。NB194-z4 和 NB194-z5 两个人源化分子与 NB194 亲和力一致, NB194-z1、NB194-z2、NB194-z3 与 NB194 亲和力相似。

样品	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
NB182	7.38E+03	6.40E-05	8.67E-09
NB182-z1	9.22E+03	7.61E-05	8.25E-09
NB182-z2	5.60E+03	4.59E-05	8.20E-09
NB182-z3	6.00E+03	7.11E-05	1.18E-08
NB182-z4	6.48E+03	9.73E-05	1.50E-08
NB182-z5	6.46E+03	9.07E-05	1.40E-08
NB194	2.12E+05	1.05E-04	4.94E-10
NB194-z1	1.28E+05	1.07E-04	8.37E-10
NB194-z2	9.76E+04	9.88E-05	1.01E-09
NB194-z3	1.41E+05	1.39E-04	9.87E-09
NB194-z4	1.33E+05	7.79E-05	5.86E-10
NB194-z5	1.33E+05	7.92E-05	5.98E-10

实施例 11：突变型抗体

使用 GeneMorph II 试剂盒（安捷伦，200550）对 NB194 抗体进行点随机突变，然后构建噬菌体抗体库，经过筛选，获得了 77 个突变型抗体（NB194-P1 至 NB194-P77）。

经验证，这些抗体的亲和力和抗体功能活性与 NB194 抗体相似。如下表和图 8 所示，

- 5 NB194-P29 突变的亲和力最高，相比于 NB194，亲和力提高了 5 倍，功能活性也有提升。

样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
NB194	1.39E+05	7.36E-05	5.31E-10
NB194-P29	2.43E+05	2.86E-05	1.18E-10

实施例 12：NB194-P29 人源化

- 10 采用实施例 10 中所述的人源化方式，对 NB194-P29 抗体进行人源化，获得了 10 个人源化分子，所有分子的亲和力均和 NB194-P29 亲和力相近。

样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
NB194-P29	2.90E+05	4.37E-05	1.51E-10
NB194-P29-z1	1.17E+05	3.06E-05	2.63E-10
NB194-P29-z2	1.29E+05	1.66E-05	1.29E-10
NB194-P29-z3	1.86E+05	3.75E-05	2.02E-10
NB194-P29-z4	1.17E+05	2.61E-05	2.22E-10
NB194-P29-z5	1.21E+05	2.43E-05	2.00E-10
NB194-P29-z6	1.13E+05	3.02E-05	2.68E-10
NB194-P29-z7	1.45E+05	2.18E-05	1.50E-10
NB194-P29-z8	1.08E+05	2.54E-05	2.35E-10
NB194-P29-z9	1.24E+05	5.03E-05	4.06E-10
NB194-P29-z10	9.68E+04	1.74E-05	1.79E-10

权 利 要 求 书

1、一种 PD-1 结合分子，包含抗 PD-1 单域抗体，所述单域抗体的互补决定区 CDR 包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中 CDR1 包括 SEQ ID NO:1 所示的序列、CDR2

5 包括 SEQ ID NO:2 所示的序列、和 CDR3 包括 SEQ ID NO:3 所示的序列，其中，

SEQ ID NO:1 是 $GX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ ，其中， X_1 为 D、F、G、H、L 或 R， X_2 为 P、S 或 T， X_3 为 A、F、I、L、N、R、S 或 V， X_4 为 D、F、G、L、M、N 或 S， X_5 为 A、D、F、G、I、N、R、S 或 T， X_6 为 D、F、H、I、L、S、V、W 或 Y， X_7 为 A、D、E、G、N、P、S 或 T；优选地，SEQ ID NO:1 是 $GX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ ，其中， X_1 10 为 D、F、G、H、L 或 R， X_2 为 P、S 或 T， X_3 为 F 或 S， X_4 为 F 或 S， X_5 为 G、I 或 T， X_6 为 S 或 Y， X_7 为 A 或 D，

SEQ ID NO:2 是 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ ，其中， X_1 为 I、L、S、T 或 V， X_2 为 A、N、S 或 T， X_3 为 F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、W 或 Y， X_4 为 A、D、G、H、N、R、S 或 T， X_5 为 A、D、G、N、R、S 或无， X_6 为 G 或 R、S 或 T， X_7 为 D、E、I、L、M、N、R、S、T 或 V， X_8 为 A、K、M、Q 或 T， X_9 为 A 或无；优选地，SEQ ID NO:2 是 $X_1X_2X_3X_4X_5GX_7TX_9$ ，其中， X_1 为 I 或 V， X_2 为 N、S 或 T， X_3 为 F、L 或 N， X_4 为 A、G、S 或 T， X_5 为 R 或无， X_7 为 D、N、I 或 T， X_9 为无，

SEQ ID NO:3 是 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}$ ，其中， X_1 是 A、E、G、N、R、S、T 或 V， X_2 是 A、G、I、K、L、P、R、T 或 V，
20 X_3 是 A、D、E、G、K、N、P、R、S、V 或 Y， X_4 是 A、C、D、E、G、I、K、L、R、S、T、V 或 Y， X_5 是 A、C、D、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、W 或 Y， X_6 是 A、C、D、E、G、I、K、L、M、P、Q、R、S 或 Y， X_7 是 A、C、D、F、G、H、I、N、P、R、S、T、V 或 Y， X_8 是 A、C、D、E、G、I、R、S、T、V、W、Y 或无， X_9 是 A、D、E、F、G、I、L、P、R、S、V、W、Y 或无， X_{10} 是 C、D、F、
25 G 、K、L、N、P、R、S、T、V、W、Y 或无， X_{11} 是 D、F、G、H、I、K、L、N、P、S、T、V、Y 或无， X_{12} 是 A、D、G、H、I、L、M、P、R、S、T、V、Y 或无， X_{13} 是 C、D、E、H、P、R、S、T、V、Y 或无， X_{14} 是 A、D、E、F、H、I、L、P、R、T、Y 或无， X_{15} 是 A、D、E、G、N、Q、R、S、T、V、Y 或无， X_{16} 是 A、D、E、F、G、H、M、P、S、V、Y 或无， X_{17} 是 A、D、E、H、N、Q、R、T、Y 或无，
30 X_{18} 是 D、E、R、S、Y 或无， X_{19} 是 N、S、Y 或无， X_{20} 是 D、E、Y 或无， X_{21} 是 E、N、Y 或无， X_{22} 是 Y 或无；优选地，SEQ ID NO:3 是

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}$ ，其中， X_1 是 E、G、N 或 V， X_2 是 A、G、I、L 或 V， X_3 是 A、D、E、G、N、V 或 Y， X_4 是 A、G、I、

K、R 或 S, X₅ 是 C、I、L、P、Q、R 或 W, X₆ 是 E、K、P、Q 或 R, X₇ 是 C、D、H、N、P 或 Y, X₈ 是 E、G、R、V 或 W, X₉ 是 F、G、L、S、V 或 W, X₁₀ 是 C、D、G、L、R、S 或 V, X₁₁ 是 F、G、I、L、N、S、T 或 V, X₁₂ 是 H、L、P、R、S、T 或 Y, X₁₃ 是 D、H、P、S、T 或 V, X₁₄ 是 E、F、H、I、L、P 或 R, X₁₅ 是 A、S 或 V, X₁₆ 是 A、D、E、G、H 或 V, X₁₇ 是 H、N、Q、R 或 Y, X₁₈-X₂₂ 是无。

- 2、如权利要求 1 所述的 PD-1 结合分子, 其特征在于, 所述单域抗体的 CDR1 包括 SEQ ID NO:4-39、320 中任一所示的序列, CDR2 包括 SEQ ID NO:40-75 中任一所示的序列, 和 CDR3 包括 SEQ ID NO: 76-183 中任一所示的序列,
- 10 优选地, 所述单域抗体含有以下组 a1 到组 a136 中任一组所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3:

CDR1	CDR2	CDR3	组
4	40	76	a1
5	41	77	a2
6	42	78	a3
7	43	76	a4
8	44	79	a5
9	45	80	a6
10	46	81	a7
11	47	82	a8
12	48	83	a9
13	49	84	a10
10	50	85	a11
14	47	76	a12
15	51	86	a13
16	52	76	a14
17	53	87	a15
18	54	88	a16
19	55	87	a17
20	56	82	a18
21	57	89	a19
22	58	90	a20
23	59	91	a21
14	47	76	a22
24	60	92	a23
25	40	76	a24
26	61	93	a25
27	62	94	a26
24	60	95	a27
28	41	96	a28
10	63	97	a29

5	41	98	a30
29	64	99	a31
7	65	100	a32
30	66	101	a33
31	67	102	a34
32	68	103	a35
33	56	104	a36
34	69	105	a37
35	70	106	a38
7	71	107	a39
16	52	76	a40
16	52	76	a41
16	52	76	a42
16	52	76	a43
16	52	76	a44
19	72	87	a45
19	72	87	a46
19	72	87	a47
19	73	87	a48
19	53	87	a49
19	53	87	a50
19	53	108	a51
19	53	109	a52
19	53	110	a53
19	53	111	a54
36	74	112	a55
19	53	113	a56
19	53	114	a57
19	53	115	a58
19	53	116	a59
19	53	117	a60
19	53	118	a61
19	53	119	a62
19	53	120	a63
19	53	121	a64
19	53	122	a65
19	53	123	a66
19	53	124	a67
19	53	125	a68
19	53	126	a69
19	53	127	a70
19	53	128	a71
19	53	129	a72
19	53	130	a73
19	53	131	a74
19	53	132	a75

19	53	133	a76
19	53	134	a77
37	75	135	a78
19	53	136	a79
19	53	137	a80
19	53	138	a81
19	53	139	a82
19	53	140	a83
19	53	141	a84
19	53	142	a85
19	53	143	a86
19	53	144	a87
19	53	145	a88
19	53	146	a89
38	53	147	a90
19	53	148	a91
19	53	149	a92
19	53	150	a93
19	53	151	a94
19	53	152	a95
19	53	153	a96
19	53	154	a97
39	53	155	a98
19	53	156	a99
19	53	157	a100
19	53	158	a101
19	53	159	a102
19	53	160	a103
19	53	161	a104
19	53	162	a105
19	53	163	a106
37	53	164	a107
19	53	165	a108
19	53	166	a109
19	53	167	a110
19	53	168	a111
36	74	169	a112
38	53	170	a113
37	53	171	a114
19	53	172	a115
19	53	173	a116
38	53	174	a117
38	53	175	a118
36	74	176	a119
19	53	177	a120
19	53	178	a121

19	53	179	a122
19	53	180	a123
19	53	181	a124
19	53	182	a125
19	53	183	a126
37	75	135	a127
37	75	135	a128
37	75	135	a129
37	75	135	a130
37	75	135	a131
37	75	135	a132
37	75	135	a133
37	75	135	a134
320	75	135	a135
37	75	135	a136

- 3、如权利要求 1 或 2 所述的 PD-1 结合分子，其特征在于，
所述单域抗体的 FR 区包含选自 SEQ ID NO: 184-319 的任一 VHH 的 FR 区，和
/或
- 5 所述单域抗体 VHH 如 SEQ ID NO: 184-319 中任一所示，和/或
所述 PD-1 结合分子是包含一条、两条或多条所述单域抗体的单价或多价单域抗
体、多特异性单域抗体、重链抗体或其抗原结合片段、抗体或其抗原结合片段。
- 4、如权利要求 3 所述的 PD-1 结合分子，其特征在于，所述 PD-1 结合分子是重
链抗体，所述重链抗体还包含重链恒定区，
- 10 优选地，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 321 所示序列。
- 5、一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸选自：
(1) 权利要求 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子的编码序列；
(2) (1) 的互补序列；
(3) (1) 或 (2) 中任一序列的 5-50bp 的片段。
- 15 6、一种核酸构建物，其特征在于，所述核酸构建物包含权利要求 5 所述的多核
苷酸，
优选地，所述核酸构建物是重组载体或表达载体。
- 7、包含权利要求 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子的噬菌体，
优选地，所述 PD-1 结合分子展示于所述噬菌体表面。
- 20 8、一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞：
(1) 表达和/或分泌权利要求 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子；和/或

(2) 包含权利要求 5 所述的多核苷酸；和/或

(3) 包含权利要求 6 所述的核酸构建物。

9、一种产生 PD-1 结合分子的方法，包括：在适合产生 PD-1 结合分子条件下培养权利要求 8 所述的宿主细胞，和任选的从培养物中纯化所述 PD-1 结合分子。

5 10、一种药物组合物，包含权利要求 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子、权利要求 5 所述的多核苷酸、权利要求 6 所述的核酸构建物、权利要求 7 所述的噬菌体或权利要求 8 所述的宿主细胞，和药学上可接受的辅料，

优选地，所述药物组合物用于治疗癌症。

11、权利要求 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子在制备用于预防或治疗癌症的
10 药物中的用途。

12、一种检测 PD-1 的试剂盒，用于评估药物治疗效果或诊断癌症，所述的试剂盒包含权利要求 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子、权利要求 5 所述的多核苷酸、权利要求 6 所述的核酸构建物、权利要求 7 所述的噬菌体或权利要求 8 所述的宿主细胞，

15 优选地，所述试剂盒还包括用于检测 PD-1 与单域抗体、抗体或其抗原结合片段的结合的试剂，

更优选地，所述试剂是通过酶联免疫反应法检测所述结合的试剂。

13、一种检测样品中 PD-1 存在情况的非诊断性方法，所述方法包括：以权利要求 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子与样品孵育，和检测 PD-1 与单域抗体、抗体或
20 其抗原结合片段的结合，从而确定样品中 PD-1 存在情况。

14、权利要求 1-4 中任一项所述的 PD-1 结合分子在制备用于检测样品中 PD-1、评估药物治疗效果或诊断癌症的试剂盒中的用途。