

抗 PD-1 单克隆抗体及其应用

相关申请的交叉引用

本申请要求 2023 年 10 月 10 日提交的中国专利申请 202311307741.X 和 2024 年 1 月 30 日提交的中国专利申请 202410131767.1 的优先权，上述专利申请的全部内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

本发明涉及抗体药物技术领域，尤其涉及抗 PD-1 单克隆抗体及其应用。

10

技术背景

程序性死亡-1(Programmed death-1; PD-1, 也称为 CD279)是一个主要表达在激活的 T 细胞表面的抑制性受体。某些亚群的 B 细胞，单核细胞和树突状细胞在激活以后也会表达 PD-1。

15

PD-1 属于免疫球蛋白超家族成员，全长 288 个氨基酸，含有一个胞外结构域、一个跨膜结构域和一个胞质结构域。胞外结构域含有一个免疫球蛋白样结构域 (IgV-like domain)，负责与其配体结合。胞质结构域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 (ITSM)，负责信号转导。

20

PD-1 有两个配体，分别是程序性死亡配体-1 (Programmed death ligand 1, PD-L1) 和程序性死亡配体-2 (Programmed death ligand 2, PD-L2)。初始 T 细胞表面不表达 PD-1。当初始 T 细胞表面的 TCR/CD3 复合体和 CD28 分别与 MHC-抗原肽和 CD80/CD86 结合后，TCR/CD3 复合体和 CD28 的胞内区分别被蛋白激酶磷酸化，从而招募一系列信号转导蛋白和启动一系列磷酸化事件，最终导致初始 T 细胞被激活，然后其表面开始上调 PD-1。当 PD-1 与抗原提呈细胞表面的 PD-L1 或 PD-L2 结合后，PD-1 被激活，其胞质结构域被蛋白激酶磷酸化，从而招募蛋白磷酸酶 SHP-2。SHP-2 可以将 CD28 和 TCR/CD3 复合体胞内去磷酸化，从而抑制 T 细胞的激活。

25

作为一个抑制性受体，PD-1 对于免疫反应的抑制和外周耐受的维持起着重要作用。PD-1 基因缺陷会导致自身免疫病的发生。PD-1 基因敲除的 C57BL/6 小鼠会自发地发生狼疮样肾小球性肾炎和关节炎症状 (H Nishimura 等, Immunity. 1999 Aug;11(2):141-51.)。NZB/W F1 小鼠会自发地发生类似人系统性红斑狼疮的症状，是人系统性红斑狼疮研究最常用的小鼠模型。使用小鼠 PD-L1 融合蛋白治疗可以缓解 NZB/W F1 小鼠的蛋白尿症状并且延长小鼠存活时间 (Wenjun Liao 等, Am J Nephrol. 2017;46(5):371-379.)。鸡 II 型胶原可以诱导小鼠产生关节炎症状。胶原诱导的小鼠关节炎模型是人类风湿性关节炎的最常用的疾病模型。使用小鼠 PD-L1 融合蛋白治疗可以缓解 C57BL/6 小鼠的关节炎症状 (Amalia P Raptopoulou 等, Arthritis Rheum. 2010 Jul;62(7):1870-80.)。

30

35

虽然目前已经有多款阻断 PD-1 信号通路的 PD-1 拮抗型抗体（比如帕博利珠单抗，也称为可瑞达）上市并用于治疗多种肿瘤，但是开发能够激活 PD-1 信号通路的 PD-1 激动型抗体用于抑制 T 细胞反应从而治疗炎症和自身免疫性疾病仍然是有必要的。

5 发明内容

本申请发明人通过大量的研究，获得了特异性结合 PD-1 的鼠源抗体，其具备显著的激活 PD-1 信号通路的作用，进一步基于所述鼠源抗体获得了具有 PD-1 结合活性和 PD-1 信号通路激活作用的人源化抗体。本发明的抗体通过激活 PD-1 信号通路能够有效抑制 T 细胞活性，抑制免疫应答或炎症反应，从而发挥防治炎症、过敏和自身免疫相关疾病的作用。此外，本发明的抗体还具有对人和猴 PD-1 的种属交叉结合活性和激活活性，从而有益于在动物模型中开展临床前评价研究等工作。

10

抗体或其抗原结合片段

在第一方面，本申请提供了能够特异性结合 PD-1 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含：

15

如 SEQ ID NO: 7 或 15 所示的重链可变区（VH）中含有的 VH CDR1 或其变体、VH CDR2 或其变体以及 VH CDR3 或其变体；和/或，如 SEQ ID NO: 8 或 16 所示的轻链可变区（VL）中含有的 VL CDR1 或其变体、VL CDR2 或其变体以及 VL CDR3 或其变体；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加，例如保守置换）。在某些实施方案中，所述的置换是保守置换。

20

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

如 SEQ ID NO: 7 或 15 所示的重链可变区（VH）中含有的 3 个 CDR；和/或，如 SEQ ID NO: 8 或 16 所示的轻链可变区（VL）中含有的 3 个 CDR。

在某些实施方案中，所述 VH 中含有的 3 个 CDR 和/或所述 VL 中含有的 3 个 CDR 由

25

Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

包含下述 3 个互补决定区（CDRs）的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO: 1 的 VH CDR1、序列为 SEQ ID NO: 2 的 VH CDR2、序列为 SEQ ID NO: 3 的 VH CDR3；和/或，包含下述 3 个互补决定区（CDRs）的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO: 4 的 VL CDR1、序列为 SEQ ID NO: 5 的 VL CDR2、序列为 SEQ ID NO: 6 的 VL CDR3；其中，所述 CDR 由 Kabat 编号系统定义。

30

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含来源于鼠免疫球蛋白的框架区序列。

35

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

重链可变区（VH），其包含 SEQ ID NO: 7 所示的序列或其变体；和/或，轻链可变区（VL），其包含 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其变体；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加），或具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性。优选地所述的置换、缺失或添加不存在于 CDR 区。

在某些实施方案中，所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：包含如 SEQ ID NO: 7 所示的序列的 VH 和包含如 SEQ ID NO: 8 所示的序列的 VL。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含来源于人免疫球蛋白的框架区序列。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含人胚系抗体基因所编码的氨基酸序列中所包含的框架区。在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：人重链胚系序列的重链框架区，和/或，人轻链胚系序列的轻链框架区。在某些实施方案中，所述人重链胚系序列的重链框架区和/或人轻链胚系序列的轻链框架区可任选地包含从人源残基至鼠源残基的回复突变。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：包含如 SEQ ID NO: 15 所示的序列或其变体的重链可变区（VH）；和/或，包含如 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体的轻链可变区（VL）；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加），或具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性。优选地所述的置换、缺失或添加不存在于 CDR 区。

在某些实施方案中，所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：包含如 SEQ ID NO: 15 所示的重链可变区（VH）；和/或，包含如 SEQ ID NO: 16 所示的轻链可变区（VL）。

30

在第二方面，本申请提供了能够特异性结合 PD-1 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含：

如 SEQ ID NO: 31 或 39 所示的重链可变区（VH）中含有的 VH CDR1 或其变体、VH CDR2 或其变体以及 VH CDR3 或其变体；和/或，如 SEQ ID NO: 32 或 40 所示的轻链可变区（VL）中含有的 VL CDR1 或其变体、VL CDR2 或其变体以及 VL CDR3 或其变体；

35

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加，例如保守置换）。在某些实施方案中，所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

- 5 如 SEQ ID NO: 31 或 39 所示的重链可变区（VH）中含有的 3 个 CDR；和/或，如 SEQ ID NO: 32 或 40 所示的轻链可变区（VL）中含有的 3 个 CDR。

在某些实施方案中，所述 VH 中含有的 3 个 CDR 和/或所述 VL 中含有的 3 个 CDR 由 Kabat、IMGT 或 Chothia 编号系统定义。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

- 10 包含下述 3 个互补决定区（CDRs）的重链可变区（VH）：序列为 SEQ ID NO: 25 的 VH CDR1、序列为 SEQ ID NO: 26 的 VH CDR2、序列为 SEQ ID NO: 27 的 VH CDR3；和/或，包含下述 3 个互补决定区（CDRs）的轻链可变区（VL）：序列为 SEQ ID NO: 28 的 VL CDR1、序列为 SEQ ID NO: 29 的 VL CDR2、序列为 SEQ ID NO: 30 的 VL CDR3；其中，所述 CDR 由 Kabat 编号系统定义。

15

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含来源于鼠免疫球蛋白的框架区序列。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

- 20 重链可变区（VH），其包含 SEQ ID NO: 31 所示的序列或其变体；和/或，轻链可变区（VL），其包含 SEQ ID NO: 32 所示的序列或其变体；

- 25 其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加），或具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性。优选地所述的置换、缺失或添加不存在于 CDR 区。

在某些实施方案中，所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：包含如 SEQ ID NO: 31 所示的序列的 VH 和包含如 SEQ ID NO: 32 所示的序列的 VL。

- 30 在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含来源于人免疫球蛋白的框架区序列。

- 35 在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含人胚系抗体基因所编码的氨基酸序列中所包含的框架区。在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：人重链胚系序列的重链框架区，和/或，人轻链胚系序列的轻链框架区。在某些实施方案中，所述人重链胚系序列的重链框架区和/或人轻链胚系序列的轻链框架区可任选地包含从人

源残基至鼠源残基的回复突变。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：包含如 SEQ ID NO: 39 所示的序列或其变体的重链可变区（VH）；和/或，包含如 SEQ ID NO: 40 所示的序列或其变体的轻链可变区（VL）；

- 5 其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加），或具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性。优选地所述的置换、缺失或添加不存在于 CDR 区。

- 10 在某些实施方案中，所述的置换是保守置换。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：包含如 SEQ ID NO: 39 所示的重链可变区（VH）；和/或，包含如 SEQ ID NO: 40 所示的轻链可变区（VL）。

- 15 在某些实施方案中，在第一方面或第二方面中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含来源于哺乳动物（例如人或鼠）免疫球蛋白的恒定区。

在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的重链包含来源于人免疫球蛋白（例如 IgG，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）的重链恒定区，和/或，所述抗体或其抗原结合片段的轻链包含来源于人免疫球蛋白（例如 κ 或 λ ）的轻链恒定区。

- 20 在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含具备与 Fc 受体（例如 CD32A、CD32B、CD16A 中任意一个或多个）结合活性的重链恒定区。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含野生型人免疫球蛋白的重链恒定区（CH）。在某些示例性实施方案中，所述野生型人免疫球蛋白的重链恒定区序列如 SEQ ID NO: 51 所示。

- 25 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含野生型人免疫球蛋白的轻链恒定区（CL）。在某些示例性实施方案中，所述野生型人免疫球蛋白的轻链恒定区序列如 SEQ ID NO: 53 所示。

在某些示例性实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 51 所示的重链恒定区，和/或 SEQ ID NO: 53 所示的轻链恒定区。

在某些示例性实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

- 30 (1) 包含 SEQ ID NO: 11 所示序列的重链和包含 SEQ ID NO: 12 所示序列的轻链；
(2) 包含 SEQ ID NO: 19 所示序列的重链和包含 SEQ ID NO: 20 所示序列的轻链；
(3) 包含 SEQ ID NO: 35 所示序列的重链和包含 SEQ ID NO: 36 所示序列的轻链；

或，

- (4) 包含 SEQ ID NO: 43 所示序列的重链和包含 SEQ ID NO: 44 所示序列的轻链。
35 在另一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含人免疫球蛋白重链恒定区

(CH)的变体,所述重链恒定区(CH)的变体可以包含一个或多个氨基酸突变或化学修饰以改变本发明抗体的下列中的一个或多个特性:Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能等。可以通过将抗体恒定区中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基或化学修饰,产生功能改变,例如,改变抗体对效应子配体(如

5 FcR或补体C1q)的亲和力,从而改变效应子功能(例如降低或增强)。抗体的Fc区介导几种重要的效应子功能,例如ADCC、吞噬作用、CDC等。

在某些实施方案中,所述变体与其所源自的野生型序列相比可以具有增强的与Fc受体(例如CD32A、CD32B、CD16A中任意一个或多个)的结合能力,例如增强至少1.5倍、至少2倍、或至少2.5倍,例如通过表面等离子共振技术检测。

10 在某些实施方案中,所述变体为人IgG1或IgG4重链恒定区变体,其在根据EU编号的以下位置中一个或多个包含置换:239、268。在某些实施方案中,所述置换为S239D/H268D。在某些实施方案中,所述置换为S239D/Q268D。

在某些示例性实施方案中,所述人免疫球蛋白重链恒定区变体具有如SEQ ID NO: 52所示的序列。

15 在某些示例性实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO: 52所示的重链恒定区,和/或SEQ ID NO: 53所示的轻链恒定区。

在某些示例性实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

- (1) 包含SEQ ID NO: 23所示序列的重链和包含SEQ ID NO: 20所示序列的轻链;或
- (2) 包含SEQ ID NO: 47所示序列的重链和包含SEQ ID NO: 44所示序列的轻链。

20

在某些实施方案中,在第一方面或第二方面中,所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、di-scFv、(scFv)₂、双抗体(diabody)和单域抗体(sdAb);和/或,所述抗体为鼠源抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

25

第三方面,本申请还提供了分离的核酸分子,其编码如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段,或其重链可变区和/或轻链可变区,或其重链和/或轻链。

在某些实施方案中,所述分离的核酸分子包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的重链或重链可变区的第一核苷酸序列和编码所述抗体或其抗原结合片段的轻链或轻链

30 可变区的第二核苷酸序列,其中所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列存在于相同或不同的分离的核酸分子上。当所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列存在于不同的分离的核酸分子上时,本发明所述的分离的核酸分子包含含有所述第一核苷酸序列的第一核酸分子以及含有所述第二核苷酸序列的第二核酸分子。

在某些实施方案中,所述分离的核酸分子包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段

35 的重链可变区的第一核苷酸序列,以及编码其轻链可变区的第二核苷酸序列,其中:

(i) 所述第一核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 9 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；所述第二核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 10 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；

5 (ii) 所述第一核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 17 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；所述第二核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 18 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；

10 (iii) 所述第一核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 33 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；所述第二核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 34 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；或，

(iv) 所述第一核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 41 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；所述第二核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 42 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列。

在某些实施方案中，所述分离的核酸分子包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的重链的第一核苷酸序列，以及编码其轻链的第二核苷酸序列，其中：

20 (i) 所述第一核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 13 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；所述第二核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 14 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；

(ii) 所述第一核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 21 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；所述第二核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 22 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；

30 (iii) 所述第一核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 24 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；所述第二核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 22 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；

(iv) 所述第一核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 37 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；所述第二核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 38 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；

35 (v) 所述第一核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 45 所示的序列或与其相比具有至少大约

85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；所述第二核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 46 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；或，

(vi) 所述第一核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 48 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列；所述第二核苷酸序列包含：SEQ ID NO: 46 所示的序列或与其相比具有至少大约 85%、90%、95%、99%或更高序列同一性的序列，或它们的简并序列。

第四方面，本申请还提供了载体，其包含如上所述的分离的核酸分子。在某些实施方案中，所述载体为克隆载体或表达载体。

在某些实施方案中，所述载体包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的重链或重链可变区的第一核苷酸序列和编码所述抗体或其抗原结合片段的轻链或轻链可变区的第二核苷酸序列，其中所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列存在于相同或不同的载体上。当所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列存在于不同的载体上时，本发明所述的载体包含含有所述第一核苷酸序列的第一载体以及含有所述第二核苷酸序列的第二载体。

第五方面，本申请还提供了宿主细胞，其包含如上所述的分离的核酸分子或载体。

此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如细菌细胞（如大肠杆菌细胞），以及真核细胞例如真菌细胞（例如酵母细胞），昆虫细胞，植物细胞和动物细胞（如哺乳动物细胞，例如小鼠细胞、人细胞等）。在某些实施方案中，所述宿主细胞是哺乳动物细胞，例如 CHO 细胞。

本发明的抗体可以本领域已知的各种方法来制备，例如通过基因工程重组技术来获得。例如，通过化学合成或 PCR 扩增获得编码本发明抗体的重链和轻链基因的 DNA 分子。将所得 DNA 分子插入表达载体内，然后转染宿主细胞。然后，在特定条件下培养转染后的宿主细胞，并表达本发明的抗体。

本发明的抗原结合片段可以通过水解完整的抗体分子获得（参见 Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)）。另外，这些抗原结合片段也可以直接由重组宿主细胞产生（reviewed in Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)）。比如，Fab' 片段可以直接从宿主细胞中获得；可以将 Fab' 片段化学偶联形成 F(ab')₂ 片段(Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992))。另外，Fv、Fab 或 F(ab')₂ 片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中直接分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备这些抗原结合片段的其它技术。

第六方面，本申请还提供了制备如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养如上所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

5

抗体衍生

本发明的抗体或其抗原结合片段可进行衍生化，例如被连接至另一个分子（例如另一个多肽或蛋白）。通常，抗体或其抗原结合片段的衍生化（例如，标记）不会不利影响其对 PD-1 的结合。因此，本发明的抗体或其抗原结合片段还意欲包括此类衍生化的形式。

10 例如，可以将本发明的抗体或其抗原结合片段功能性连接（通过化学偶合、基因融合、非共价连接或其它方式）于一个或多个其它分子基团，例如另一个抗体（例如，形成双特异性抗体），检测试剂，药用试剂，和/或能够介导抗体或抗原结合片段与另一个分子结合的蛋白或多肽（例如，抗生物素蛋白或多组氨酸标签）。

15 第七方面，本申请还提供了双特异性或多特异性分子，其包含如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方案中，所述双特异性或多特异性分子特异性结合 PD-1，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标。

在某些实施方案中，所述双特异性或多特异性分子还包含至少一种具有针对第二靶标的第二结合特异性的分子（例如第二抗体）。

20 第八方面，本申请还提供了免疫缀合物，其包含如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段以及连接于所述抗体或其抗原结合片段的治疗剂。

在某些实施方案中，所述治疗剂选自细胞毒剂。

药物组合物

25 第九方面，本申请还提供了药物组合物，其包含如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段、如第三方面所述的分离的核酸分子、如第四方面所述的载体、如第五方面所述的宿主细胞、如第七方面所述的双特异性或多特异性分子或如第八方面所述的免疫缀合物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些实施方案中，所述药物组合物还包含另外的药学活性剂。

30 在某些实施方案中，所述另外的药学活性剂为免疫抑制剂。

在某些实施方案中，所述另外的药学活性剂为用于治疗自身免疫性疾病、过敏性疾病、移植物抗宿主病、移植排斥或淋巴瘤（如 T 细胞淋巴瘤）的药物。

在某些实施方案中，在所述药物组合物中，本发明的抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性分子或免疫缀合物与所述另外的药
35 学活性剂可以作为分离的组分或作为混合的组分提供。因此，本发明的抗体或其抗原结

合片段、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性分子或免疫缀合物与所述的药学活性剂可以同时、分开或相继施用。

在某些实施方案中，所述药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性分子或免疫缀合物。“预防有效量”是指，足以预防，阻止，或延迟疾病的发生的量。“治疗有效量”是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。治疗有效量可根据如下因素发生变化：待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

10

治疗用途

本发明的抗体或其抗原结合片段能够增强 PD-1 与 PD-L1/PD-L2 的结合，激活 PD-1 信号通路，进而抑制 T 细胞活性。由此提供了以下治疗应用。

在一个方面，本申请提供了激活 PD-1 信号通路的方法，其包括使用如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段、如第三方面所述的分离的核酸分子、如第四方面所述的载体、如第五方面所述的宿主细胞、如第七方面所述的双特异性或多特异性分子、如第八方面所述的免疫缀合物或如第九方面所述的药物组合物。在某些实施方案中，所述方法包括将所述抗体或其抗原结合片段与细胞在体外接触，以激活所述细胞中的 PD-1 信号通路。在某些实施方案中，所述方法包括将所述抗体或其抗原结合片段施用给有此需要的受试者，以激活其体内的 PD-1 信号通路，从而抑制免疫应答或炎症反应。

另一方面，本申请提供了如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段、如第三方面所述的分离的核酸分子、如第四方面所述的载体、如第五方面所述的宿主细胞、如第七方面所述的双特异性或多特异性分子、如第八方面所述的免疫缀合物或如第九方面所述的药物组合物在制备 PD-1 信号通路激活剂中的用途。

在一个方面，本申请提供了抑制免疫细胞活性的方法，其包括使用如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段、如第三方面所述的分离的核酸分子、如第四方面所述的载体、如第五方面所述的宿主细胞、如第七方面所述的双特异性或多特异性分子、如第八方面所述的免疫缀合物或如第九方面所述的药物组合物。在某些实施方案中，所述方法包括将所述抗体或其抗原结合片段与细胞（例如 T 细胞）在体外接触，以抑制其免疫活性。在某些实施方案中，所述方法包括将所述抗体或其抗原结合片段施用给有此需要的受试者，以抑制其体内的免疫细胞活性，从而抑制免疫应答或炎症反应。

另一方面，本申请提供了如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段、如第三方面所述的分离的核酸分子、如第四方面所述的载体、如第五方面所述的宿主细胞、如第七方面所述的双特异性或多特异性分子、如第八方面所述的免疫缀合物或如第九方面所述的药物组合物在制备免疫抑制剂（例如 T 细胞活性抑制剂）中的用途。

在一个方面，本申请提供了用于在受试者中预防和/或治疗疾病的方法，其包括：给有此需要的受试者施用有效量的如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段、如第三方面所述的分离的核酸分子、如第四方面所述的载体、如第五方面所述的宿主细胞、如第七方面所述的双特异性或多特异性分子、如第八方面所述的免疫缀合物或如第九方面所述的药物组合物。

另一方面，本申请提供了所述抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物或药物组合物在制备用于在受试者中预防和/或治疗疾病的药物中的用途。

在某些实施方案中，所述疾病将得益于 PD-1 信号通路的激活。在某些实施方案中，所述疾病以 PD-1/PD-L1 信号通路的失活为特征。在某些实施方案中，所述疾病将得益于免疫应答或炎症反应的抑制。

在某些实施方案中，所述疾病选自自身免疫性疾病、过敏性疾病、移植物抗宿主病、移植排斥、淋巴瘤或其任意组合。

在某些实施方案中，所述自身免疫性疾病选自关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、狼疮、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、银屑病、白癜风、斑秃、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、I 型糖尿病、多发性硬化症、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、乳糜泄、硬皮病、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、强直性脊柱炎、重症肌无力、干燥综合症、IgA 肾病、IgG4 相关疾病(IgG4-Related Disease)、血管炎、ANCA 相关血管炎、葡萄膜炎、天疱疮、类天疱疮或自身免疫性溶血性贫血。

在某些实施方案中，所述过敏性疾病选自特发性血小板减少性紫癜、特应性皮炎、哮喘、变态反应性鼻炎、药物变态反应、食物变态反应、过敏反应、变态反应性结膜炎、荨麻疹、嗜酸性粒细胞鼻窦炎、嗜酸性粒细胞消化器官疾病或变态反应性支气管肺曲霉病。

在某些实施方案中，所述淋巴瘤为 T 细胞淋巴瘤。

在某些实施方案中，上述任一方面中所述受试者为哺乳动物。在某些实施方案中，所述受试者为人。在某些实施方案中，所述受试者为非人灵长类，例如食蟹猴。

在某些实施方案中，上述任一方面中所述抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性分子、免疫缀合物或药物组合物单独使用，或与另外的药学活性剂联合使用，例如同时或相继施用。在某些实施方案中，所述另外的药学活性剂为免疫抑制剂。在某些实施方案中，所述另外的药学活性剂为用于治疗自身免疫性疾病、过敏性疾病、移植物抗宿主病、移植排斥或淋巴瘤（如 T 细胞淋巴瘤）的药物。

上述任一方面中，本申请的抗体或其抗原结合片段或药物组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。本发明的抗体或其抗

原结合片段或药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的抗体或其抗原结合片段，以及任选地，同时掺入其他期望的成分（包括但不限于，pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合），随后过滤除菌。此外，可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂（例如，通过真空干燥或冷冻干燥）以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中，例如注射用水（WFI）、抑菌性注射用水（BWFI）、氯化钠溶液（例如 0.9%NaCl）、葡萄糖溶液（例如 5%葡萄糖）、含有表面活性剂的溶液（例如 0.01%聚山梨醇 20）、pH 缓冲溶液（例如磷酸盐缓冲溶液）、Ringer 氏溶液及其任意组合。

上述任一方面中，本申请的抗体或其抗原结合片段或药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，包括但不限于，口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、腹股沟、膀胱内、局部（如，粉剂、药膏或滴剂），或鼻腔途径。但是，对于许多治疗用途而言，优选的给药途径/方式是胃肠外给药（例如静脉注射或推注，皮下注射，腹膜内注射，肌肉注射）。技术人员应理解，给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在某些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段或药物组合物通过静脉注射或推注给予。

检测用途

本发明的抗体或其抗原结合片段能够特异性结合 PD-1，由此提供了以下检测应用。

在一个方面，本申请提供了缀合物，其包含如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段，以及与所述抗体或其抗原结合片段连接的可检测的标记。

在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

另一方面，本申请提供了试剂盒，其包括如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段或如上所述的缀合物。

在某些实施方案中，所述试剂盒包含如上所述的缀合物。

在某些实施方案中，所述试剂盒包含如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段，以及特异性识别所述抗体或其抗原结合片段的第二抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

另一方面，本申请还提供了用于检测 PD-1 在样品中的存在或其水平的方法，其包括使用如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段或如上所述的缀合物。

在某些实施方案中，所述方法用于治疗目的，诊断目的，或者非治疗非诊断目的。

在某些实施方案中，所述方法是免疫学检测，例如免疫印迹法、酶免疫测定法（例如 ELISA）、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。

在某些实施方案中，所述方法包括：(1) 将所述样品与本发明的抗体或其抗原结合片段接触；(2) 检测抗原-抗体免疫复合物的形成或检测所述免疫复合物的量。所述免疫复合物的形成表明存在 PD-1 或表达 PD-1 的细胞。在某些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记，或使用带有可检测的标记的第二抗体来检测所述抗体或其抗原结合片段。

另一方面，本申请还提供了诊断与 PD-1 相关的疾病的方法，其包括使用如上所述的方法检测来自受试者的样品中 PD-1 的水平。在某些实施方案中，所述方法还包括将来自受试者的样品中的 PD-1 水平与参照值（例如健康对照）比较，以诊断所述受试者是否患有所述疾病。

在某些实施方案中，所述与 PD-1 相关的疾病以 PD-1/PD-L1 信号通路的失活为特征，当与参照值相比（例如与健康对照相比）PD-1 的水平减少时，表明所述受试者患有该与 PD-1 相关的疾病。在某些实施方案中，所述与 PD-1 相关的疾病为自身免疫性疾病、过敏性疾病、移植物抗宿主病、移植排斥、淋巴瘤或其组合。在某些实施方案中，所述淋巴瘤为 T 细胞淋巴瘤。

在某些实施方案中，所述与 PD-1 相关的疾病以 PD-1/PD-L1 信号通路的过度激活为特征，当与参照值相比（例如与健康对照相比）PD-1 的水平升高时，表明所述受试者患有该与 PD-1 相关的疾病。在某些实施方案中，所述与 PD-1 相关的疾病为肿瘤。

在某些实施方案中，所述样品可以选自尿液、血液、血清、血浆、唾液、腹水、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织缔合的细胞(即游离细胞)、组织(例如手术切除的肿瘤组织、活体组织切片或细针抽吸组织)、组织学制备物等。

在某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人或非人灵长类（如食蟹猴）。

另一方面，本申请还提供了如第一方面或第二方面所述的抗体或其抗原结合片段或如上所述的缀合物在制备检测试剂中的用途，所述检测试剂用于检测 PD-1 在样品中的存在或其水平和/或诊断与 PD-1 相关的疾病。

在某些实施方案中，所述检测试剂通过如上所述的检测方法来检测 PD-1 在样品中的存在或其水平。

在某些实施方案中，所述检测试剂通过如上所述的检测方法来检测 PD-1 在样品中的存在或其水平从而诊断与 PD-1 相关的疾病。

术语定义

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子生物学、生物化学、核酸化

学、免疫学等操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

当本文使用术语“例如”、“如”、“诸如”、“包括”、“包含”或其变体时，这些术语将不被认为是限制性术语，而将被解释为表示“但不限于”或“不限于”。

- 5 除非本文另外指明或根据上下文明显矛盾，否则术语“一个”和“一种”以及“该”和类似指称物在描述本发明的上下文中（尤其在以下权利要求的上下文中）应被解释成覆盖单数和复数。

如本文中所使用的，术语“程序性死亡-1 (Programmed death-1; PD-1)”是指主要表达在激活的 T 细胞表面的抑制性受体，负责信号转导。PD-1 信号通路的激活会抑制 T 细胞
10 的活性。人类 PD-1 蛋白编码基因序列可参见 NCBI 登录号：NM_005018.3。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指能够特异性结合靶抗原的源自免疫球蛋白的分子，所述源自免疫球蛋白的分子通过位于其可变区中的至少一个抗原结合位点来结合所述靶抗原。当提及术语“抗体”时，除非上下文明确指出，其不仅包括完整抗体，而且包括能够特异性结合靶抗原的抗原结合片段。“完整抗体”典型地由两对多肽链（每对
15 具有一条轻链(LC)和一条重链(HC)）组成。抗体轻链可分类为 κ (kappa) 和 λ (lambda) 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区
20 (VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。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，如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为框架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、
25 CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。

- 30 如本文中所使用的，术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区中负责抗原结合的氨基酸残基。在重链和轻链的可变区中各含有三个 CDR，命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。这些 CDR 的精确边界可根据本领域已知的各种编号系统进行定义，例如可按照 Kabat 编号系统 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)、Chothia 编号系统
35 (Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883)

或 IMGT 编号系统 (Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003) 中的定义。对于给定的抗体, 本领域技术人员将容易地鉴别各编号系统所定义的 CDR。并且, 不同编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的 (例如, 可参见 Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003)。

5 在本发明中, 本发明的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 可根据本领域已知的各种编号系统确定。在某些实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 优选地通过 Kabat 编号系统确定。

如本文中所使用的, 术语“框架区”或“FR”残基是指, 抗体可变区中除了如上定义的 CDR 残基以外的那些氨基酸残基。

10 术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如, 其包括, 重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG (例如, IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的, 术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽, 其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力, 和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合, 其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989), 其以其全文通过引用合并入本文, 用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。抗原结合片段的非限制性实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、di-scFv、双抗体 (diabody)、单域抗体 (single domain antibody) 和这样的多肽, 其包含
15 足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。工程改造的抗体变体综述于 Holliger 等, 2005; Nat Biotechnol, 23: 1126-1136 中。

如本文中所使用的, 术语“Fd”意指由 VH 和 CH1 结构域组成的抗体片段; 术语“Fab 片段”意指由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的抗体片段; 术语“F(ab')₂ 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段; 术语“Fab' 片段”意指
25 还原连接 F(ab')₂ 片段中两个重链片段的二硫键后所获片段, 由一条完整的轻链和重链的 Fd 片段 (由 VH 和 CH1 结构域组成) 组成。

如本文中所使用的, 术语“Fv”意指由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成的抗体片段。Fv 片段通常被认为是, 能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为, 六个 CDR 赋予抗体的抗原结合特异性。然而, 即便是一个可变区 (例如 Fd 片段, 其仅仅含
30 有三个对抗原特异的 CDR) 也能够识别并结合抗原, 尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

如本文中所使用的, 术语“Fc”意指, 由抗体的第一重链的第二、第三恒定区与第二重链的第二、第三恒定区经二硫键结合而形成的抗体片段。抗体的 Fc 片段具有多种不同的功能, 但不参与抗原的结合。由 Fc 结构域介导的“效应子功能”包括 Fc 受体结合;
35 Clq 结合和补体依赖性细胞毒性(CDC); 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC); 噬菌作

用；对细胞表面受体(例如 B 细胞受体)的下调；和 B 细胞活化等。Fc 结构域既可以包括天然 Fc 区，也可以包括变异 Fc 区。天然 Fc 区包含与自然界中发现的 Fc 区的氨基酸序列一致的氨基酸序列，例如天然序列人类 Fc 区包括天然序列人类 IgG1 Fc 区；天然序列人类 IgG2 Fc 区；天然序列人类 IgG3 Fc 区；及天然序列人类 IgG4 Fc 区，以及其天然存在的变
5 异体。变异 Fc 区包含因至少一个氨基酸修饰而与天然序列 Fc 区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。在一些实施方案中，变异 Fc 区可具备相比于天然 Fc 区改变的效应子功能（例如 Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能）。

如本文中所使用的，术语“scFv”是指，包含 VL 和 VH 结构域的单个多肽链，其中所述 VL 和 VH 通过接头（linker）相连。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-VL-接头-
10 VH-COOH 或 NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄ 的接头，但也可使用其变体。在一些情况下，scFv 的 VH 与 VL 之间还可以存在二硫键。在本发明的某些实施方案中，scFv 可形成 di-scFv，其指的是两个或两个以上单个 scFv 串联而形成抗体。在本发明的某些实施方案中，scFv 可形成(scFv)₂，其指的是两个或两个以上单个 scFv 并联而形成抗体。

如本文中所使用的，术语“双抗体”意指，其 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位（参见，例如，Holliger P 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)，和 Poljak R. J 等人, Structure 2:1121-1123 (1994)）。

如本文中所使用的，术语“单域抗体（single-domain antibody, sdAb）”具有本领域技术人员通常理解的含义，其是指由单个单体可变抗体结构域（例如单个重链可变区）所组成的抗体片段，其保持特异性结合全长抗体所结合的同抗原的能力。

如本文中所使用的，术语“双特异性抗体”是指对两种不同抗原（或表位）具有结合特异性的抗体。术语“多特异性抗体”是指对至少两种以上（例如三种或四种）不同抗原（或表位）具有结合特异性的抗体。双特异性抗体或多特异性抗体包含对不同抗原
25 （或表位）具有结合特异性的多个抗原结合结构域，从而能够结合至少两个不同的结合位点和/或靶分子。双特异性抗体或多特异性抗体所包含的各个抗原结合结构域可以各自独立地选自全长抗体（例如 IgG 抗体）或其抗原结合片段（例如 Fv 片段、Fab 片段、F(ab')₂ 片段或 scFv）。在一些情况下，各个抗原结合结构域通过肽接头连接。

上述各个抗体片段均保持了特异性结合全长抗体所结合的同抗原的能力，和/或与
30 全长抗体竞争对抗原的特异性结合。

可使用本领域技术人员已知的常规技术（例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法）从给定的抗体（例如本发明提供的抗体）获得抗体的抗原结合片段（例如，上述抗体片段），并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，经基因工程改造的非人源抗体，其
35 氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言，人源化抗体的全部或

部分 CDR 区来自于非人源抗体（供体抗体），全部或部分的非 CDR 区（例如，可变区 FR 和/或恒定区）来自于人源免疫球蛋白（受体抗体）。在某些实施方案中，人源化抗体的 CDR 区来自于非人源抗体（供体抗体），全部或部分的非 CDR 区（例如，可变区 FR 和/或恒定区）来自于人源免疫球蛋白（受体抗体）。人源化抗体通常保留了供体抗体的预期性质，包括但不限于，抗原特异性、亲和性、反应性等。在本申请中，供体抗体可以是有预期性质（例如，抗原特异性、亲和性、反应性等）的鼠源抗体。为制备人源化抗体，可以使用本领域已知的方法将供体抗体的 CDR 区插入人源框架序列。在一些情形中，所述人源框架序列可以包含由相应非人类残基替换的氨基酸突变。此外，人源化抗体还可包含在初始供体抗体可变区（例如，轻链可变区或重链可变区）或人源框架序列中均未发现的残基，以进一步改进或优化该人源化抗体的性能。

如本文中所使用的，术语“嵌合抗体（Chimeric antibody）”是指，这样的抗体，其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体（其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类），且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体（其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类），但无论如何，其仍保留对目标抗原的结合活性。在某些实施方案中，术语“嵌合抗体”可包括这样的抗体，其中抗体的重链可变区和轻链可变区来自第一抗体，而抗体的重链恒定区和轻链恒定区来自第二抗体。

如本文中所使用的，术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。为了测定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性，为了最佳比较目的将序列进行比对（例如，可在第一氨基酸序列或核酸序列中引入缺口以与第二氨基酸或核酸序列最佳比对）。然后比较对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，则分子在该位置上是同一的。两个序列之间的百分比同一性是由序列所共享的同一性位置的数目的函数（即，百分比同一性=同一重叠位置的数目/位置的总数×100%）。在某些实施方案中，两个序列长度相同。

两个序列之间的百分比同一性的测定还可使用数学算法来实现。用于两个序列的比較的数学算法的一个非限制性实例是 Karlin 和 Altschul 的算法，1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268，如同 Karlin 和 Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877 中改进的。将这样的算法整合至 Altschul 等人, 1990, J. Mol. Biol. 215:403 的 NBLAST 和 XBLAST 程序中。

如本文中所使用的，术语“变体”，在多肽的情境中(包括多肽)也指包含已通过引入氨基酸残基置换、缺失或添加改变的氨基酸序列的多肽或肽。在某些情况下，术语“变体”还指已被修饰（即，通过将任何类型的分子共价连接至多肽或肽）的多肽或肽。例如，但非限制性地，多肽可以被修饰，例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团进行的衍生化、蛋白水解切割、连接至细胞配体或其它蛋白质等。衍生多肽或肽可使用本领域技术人员已知的技术通过化学修饰来产生，所述

技术包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外，变体具有与其所源自的多肽或肽相似、相同或改善的功能。

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。特异性结合相互作用的强度或亲和力可以该相互作用的平衡解离常数(K_D)表示。在本发明中，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。

两分子间的特异性结合性质可使用本领域公知的方法进行测定。一种方法涉及测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速度。“结合速率常数”(k_a 或 k_{on})和“解离速率常数”(k_{dis} 或 k_{off})两者都可通过浓度及缔合和解离的实际速率而计算得出。 k_{dis}/k_{on} 的比率等于解离常数 K_D 。可用任何有效的方法测量 K_D 、 k_{on} 和 k_{dis} 值。在某些实施方案中，可以使用表面等离子体共振术(SPR)在 Biacore 中来测量解离常数。

如本文中所使用的，本发明所述的可检测的标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。这类标记是本领域熟知的，其实例包括但不限于，酶（例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶，等）、放射性核素（例如， ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P ）、荧光染料（例如，异硫氰酸荧光素（FITC）、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明（TRITC）、荧光蛋白（如藻红蛋白（PE））、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物（例如 Cy7、Alexa 750）、发光物质（例如化学发光试剂，如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、钆衍生物如三联吡啶钆）、磁珠（例如，Dynabeads[®]）、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶，等）珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）的生物素。在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钆衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。在某些实施方案中，可通过不同长度的接头（linker）将如上所述的可检测标记连接至本发明的抗体或其抗原结合片段，以降低潜在的位阻。

如本文中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多聚核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或 P1 来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如 SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件

及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，

5 HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中所使用的，术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如，可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换，例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质，包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、β 分支侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此，优选用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见，例如，Brummell 等人，Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi 等人 Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); 和 Burks 等人 Proc. Natl Acad. Set USA 94:412-417 (1997)，其通过引用并入本文)。

20 本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如，Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))，其以引用的方式并入本文中。在本发明中，术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

25 如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的，并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，稀释剂，维持渗透压的试剂，延迟吸收的试剂，防腐剂，稳定剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、NaCl 及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水，水性缓冲液(如缓冲盐水)，醇和多元醇(如甘油)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂，例如硫柳汞，2-苯氧乙醇，对羟苯甲酸酯，三氯叔丁醇，苯酚，山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义，其能够稳定药物中的活性成分的期望活性，包括但
35 不限于谷氨酸钠，明胶，SPGA，糖类(如山梨醇，甘露醇，淀粉，蔗糖，乳糖，葡聚糖，

或葡萄糖), 氨基酸(如谷氨酸, 甘氨酸), 蛋白质(如干燥乳清, 白蛋白或酪蛋白)或其降解产物(如乳白蛋白水解物)等。在某些示例性实施方案中, 所述药学上可接受的载体或赋形剂包括无菌可注射液体(如水性或非水性悬浮液或溶液)。在某些示例性实施方案中, 此类无菌可注射液体选自注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液(例如 0.9%NaCl)、葡萄糖溶液(例如 5%葡萄糖)、含有表面活性剂的溶液(例如 0.01%聚山梨醇 20)、pH 缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲溶液)、Ringer 氏溶液及其任意组合。

如本文中所使用的, 术语“预防”是指, 为了阻止或延迟疾病或病症或症状在受试者体内的发生而实施的方法。如本文中所使用的, 术语“治疗”是指, 为使表现出疾病症状或被诊断为患有疾病的受试者获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本发明的目的, 有益或所需的临床结果包括(但不限于)减轻症状、缩小疾病的范围、稳定(即, 不再恶化)疾病的状态, 延迟或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状(无论部分或全部), 无论是可检测或是不可检测的。此外, “治疗”还可以指, 与预期的存活期(如, 未接受治疗的存活期)相比, 延长存活期。

如本文中所使用的, 术语“受试者”是指哺乳动物, 例如人或非人灵长类(例如食蟹猴)。在某些实施方案中, 所述受试者患有自身免疫性疾病、过敏性疾病、移植物抗宿主病、移植排斥或淋巴瘤(如 T 细胞淋巴瘤), 或者, 具有患有上述疾病的风险。

如本文中所使用的, 术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如, 预防疾病(例如, 自身免疫性疾病、过敏性疾病、移植物抗宿主病)有效量是指, 足以预防, 阻止, 或延迟所述疾病的发生的量; 治疗疾病有效量是指, 足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如, 对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄, 体重和性别, 药物的施用方式, 以及同时施用的其他治疗等等。

发明的有益效果

本发明提供的抗 PD-1 单克隆抗体不仅不阻断 PD-1 与 PD-L1/PD-L2 的结合, 并且可以增强 PD-1 与 PD-L1/PD-L2 的结合, 激活 PD-1 信号通路, 抑制 T 细胞活性, 从而抑制免疫应答或炎性反应。由此, 本发明的抗 PD-1 单克隆抗体对于炎症、过敏和自身免疫相关疾病的治疗具有重要临床意义。此外, 本发明的抗体具有对人和猴 PD-1 的种属交叉结合活性和激活活性, 从而有益于在动物模型中开展临床前评价研究等工作。

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述, 但是本领域技术人员将理解, 下列附图和实施例仅用于说明本发明, 而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述, 本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得可实施。

- 附图说明
- 图 1：抗 PD-1 嵌合抗体抑制 Jurkat-PD1-NFAT 报告细胞激活测定结果。

图 2：抗 PD-1 人源化抗体与 CHOS-hPD-1 结合测定结果。

图 3：抗 PD-1 人源化抗体与 CHOS-cPD-1 结合测定结果。

5图 4：抗 PD-1 人源化抗体抑制 Jurkat-PD1-NFAT 报告细胞激活测定结果。

图 5：抗 PD-1 人源化抗体抑制原代 T 细胞 IFN- γ 分泌活性测定结果。

图 6：抗 PD-1 人源化抗体的 ADCC 活性测定结果。

图 7：抗 PD-1 人源化抗体阻断或增强 hPD-L1 与 CHOS-hPD-1 结合的测定结果。

图 8：抗 PD-1 人源化抗体阻断或增强 hPD-L2 与 CHOS-hPD-1 结合的测定结果。

10图 9：抗 PD-1 人源化抗体在小鼠 GVHD 模型中药效测定结果。

图 10：抗 PD-1 人源化抗体在人 FcRn 转基因小鼠中药代动力学测定结果。

图 11：抗 PD-1 人源化抗体在小鼠 SLE 模型中药效测定结果。

图 12：抗 PD-1 人源化抗体在小鼠 TNBS-IBD 模型中药效测定结果。

15

序列信息

表 1：本发明涉及的序列的信息描述于下面的表中：

SEQ ID NO:	序列描述
1	B1-1B5-H1L1/1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 重链可变区 CDR1 氨基酸序列 (NYPIE)
2	B1-1B5-H1L1/1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 重链可变区 CDR2 氨基酸序列 (NFHPYNDDTKYNEKFKG)
3	B1-1B5-H1L1/1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 重链可变区 CDR3 氨基酸序列 (EDYGTYGGFAY)
4	B1-1B5-H1L1/1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 轻链可变区 CDR1 氨基酸序列 (RASSSVSSSYLL)
5	B1-1B5-H1L1/1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 轻链可变区 CDR2 氨基酸序列 (STSNLAS)
6	B1-1B5-H1L1/1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 轻链可变区 CDR3 氨基酸序列 (QQYSGYPLT)
7	B1-1B5-H1L1 重链可变区氨基酸序列
8	B1-1B5-H1L1 轻链可变区氨基酸序列
9	B1-1B5-H1L1 重链可变区核苷酸序列
10	B1-1B5-H1L1 轻链可变区核苷酸序列
11	B1-1B5-H1L1 重链氨基酸序列
12	B1-1B5-H1L1 轻链氨基酸序列
13	B1-1B5-H1L1 重链核苷酸序列
14	B1-1B5-H1L1 轻链核苷酸序列
15	1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 重链可变区氨基酸序列
16	1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 轻链可变区氨基酸序列
17	1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 重链可变区核苷酸序列
18	1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 轻链可变区核苷酸序列
19	1B5-zu1-hIgG1 重链氨基酸序列
20	1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 轻链氨基酸序列
21	1B5-zu1-hIgG1 重链核苷酸序列
22	1B5-zu1-hIgG1/1B5-zu1-hIgG1 DD 轻链核苷酸序列
23	1B5-zu1-hIgG1 DD 重链氨基酸序列

24	1B5-zu1-hIgG1 DD 重链核苷酸序列
25	B1-1C4-H1L1/1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 重链可变区 CDR1 氨基酸序列 (SYWIT)
26	B1-1C4-H1L1/1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 重链可变区 CDR2 氨基酸序列 (RIAPGSGSIYYDEMFKD)
27	B1-1C4-H1L1/1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 重链可变区 CDR3 氨基酸序列 (LGNYGWTMDY)
28	B1-1C4-H1L1/1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 轻链可变区 CDR1 氨基酸序列 (KASQSVTNNVA)
29	B1-1C4-H1L1/1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 轻链可变区 CDR2 氨基酸序列 (YVSNRYT)
30	B1-1C4-H1L1/1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 轻链可变区 CDR3 氨基酸序列 (QQDYSSWT)
31	B1-1C4-H1L1 重链可变区氨基酸序列
32	B1-1C4-H1L1 轻链可变区氨基酸序列
33	B1-1C4-H1L1 重链可变区核苷酸序列
34	B1-1C4-H1L1 轻链可变区核苷酸序列
35	B1-1C4-H1L1 重链氨基酸序列
36	B1-1C4-H1L1 轻链氨基酸序列
37	B1-1C4-H1L1 重链核苷酸序列
38	B1-1C4-H1L1 轻链核苷酸序列
39	1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 重链可变区氨基酸序列
40	1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 轻链可变区氨基酸序列
41	1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 重链可变区核苷酸序列
42	1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 轻链可变区核苷酸序列
43	1C4-zu1-hIgG1 重链氨基酸序列
44	1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 轻链氨基酸序列
45	1C4-zu1-hIgG1 重链核苷酸序列
46	1C4-zu1-hIgG1/1C4-zu1-hIgG1 DD 轻链核苷酸序列
47	1C4-zu1-hIgG1 DD 重链氨基酸序列
48	1C4-zu1-hIgG1 DD 重链核苷酸序列
49	Full-length hPD-1 氨基酸序列
50	hPD-1 ECD 氨基酸序列
51	hIgG1 重链恒定区氨基酸序列
52	hIgG1(DD)重链恒定区氨基酸序列
53	人 kappa 轻链恒定区序列
54	cPD-1 氨基酸序列
55	cPD-1 ECD 氨基酸序列

实施例

现在于以下非限制性实施例中描述本发明。

本领域技术人员知晓，实施例以举例方式描述本发明，且不意欲限制本申请所要求保护的5范围。实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1：抗原蛋白的制备

1.1 抗原瞬转表达

10 使用 FreeStyle™293F 细胞(Gibco)在 Expi293 Expression Medium (Gibco)中进行

hPD-1 ECD mIgG1Fc、cPD-1 ECD mIgG1Fc 瞬转表达。转染前 24 小时，在 500mL 细胞培养瓶中接种 $2.5\sim 3\times 10^6$ 细胞/mL 的 Expi293F 细胞 100mL，把培养瓶放置于 37℃，8% CO₂，120 rpm 的摇床中培养。转染前测定细胞密度，达到 $4.5\sim 5.5\times 10^6$ 细胞/mL 时，将细胞密度调为 3×10^6 细胞/mL 并进行转染。转染时先取 320μL 的 ExpiFectamine™ 293 Reagent (Gibco) 加入到 5.68mL Opti-MEM (Life) 中混匀，室温孵育 5 分钟；同时将 hPD-1 ECD mIgG1Fc、cPD-1 ECD mIgG1Fc 的表达质粒各 100μg 使用 Opti-MEM 稀释至 6mL。将上述稀释后的转染试剂及质粒充分混合，室温孵育 10-20 分钟，然后将混合物分别全部加入细胞中，混匀。把培养瓶放置于 37℃，8% CO₂，120rpm 的摇床中培养 5 天。细胞转染后 18-22 小时，加入 600μL ExpiFectamin 293 enhancer 1 和 6mL enhancer 2 (Gibco)。

1.2 抗原纯化

将细胞培养液在 2000g 的条件下离心 20min，收集上清，将上清用 0.22 微米的滤膜过滤。经过 Prisma (Cytiva) 亲和层析(蛋白纯化液相色谱系统：Cytiva, AKTA avant 25)，用 20mM 枸橼酸-枸橼酸钠(pH 3.2)洗脱，然后用 1M Tris base 调节 pH 至中性。纯化样品利用 4~20% 梯度胶进行 SDS-PAGE 测定蛋白质纯度。

15

实施例 2：基于单个 B 细胞克隆技术的抗 PD-1 单克隆抗体的产生

2.1 小鼠免疫

6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠（斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物许可证号：SCXK（京）2019-0010）饲养在 SPF 级实验室，12/12 小时光/暗周期调节，温度 20-26℃，湿度 40-70%。免疫前取 10 μg hPD-1 ECD mIgG1Fc 或 cPD-1 ECD mIgG1Fc 蛋白与佐剂按照体积 1:1 的比例混合。对 10 只小鼠进行足底免疫。首次免疫使用弗氏完全佐剂，2 天后使用弗氏不完全佐剂进行第二次免疫，每个注射点注射的体积为 25μL。在免疫 3 周后，进行小鼠眼眶采血，通过间接 ELISA 方法检测血清效价，对效价达到 1:200000 及以上的小鼠进行加强免疫。

2.2 浆细胞富集

小鼠加强免疫后 3-5 天，通过颈椎脱臼的方式将小鼠安乐死，在 75% 酒精中浸泡 5min。剪开腹部皮肤和腿部肌肉，在腹部皮肤和腿部肌肉内血管丰富处，用小镊子将对应位置的淋巴结拎起，剪下，除去非淋巴结组织，转至 Gibco RPMI1640 培养基中。剪开小鼠左侧腹胸交接部皮肤和腹膜，暴露脾脏，用小镊子将脾拎起，剪下，除去非脾脏组织，转至 Gibco RPMI1640 培养基中。

小心剥离小鼠腿部肌肉，分别剪下大腿骨和小腿骨，剪去两端软骨，露出红色的骨髓腔，并用无尘布将骨头上的肌肉剔除干净。拿一只 1mL 的无菌注射器，吸取 1mL RPMI1640 培养基，并将无菌针头轻轻插入骨髓腔中，冲洗骨髓腔以获得骨髓。将 40μm 滤网放置于 50mL 离心管内，用移液管吸取骨髓液，慢慢将骨髓液经滤网注入到离心管中，去除残渣。将离心管放置离心机中，离心 10min（400g，4℃）。去上清，加

入 EasySep™ Buffer (STEMCELL Technologies), 充分混匀后, 进行骨髓细胞计数。

用注射器活塞研磨脾脏和淋巴结, 研磨后将细胞经 40μm 滤网过滤, 将细胞悬液分别转入无菌离心管中, 离心后弃上清, 将淋巴细胞用 5mL Gibco RPMI1640 重悬, 备用; 取 10μL 细胞悬液, 进行脾脏和淋巴结细胞计数。然后使用 EasySep™小鼠 CD138 阳性分选试剂盒(STEMCELL Technologies)进行浆细胞富集。

2.3 通过 Beacon 单细胞光导系统筛选特异性结合 PD-1 抗原的浆细胞

将生物素标记的 hPD-1 或 cPD-1 蛋白与 assay beads (Berkeley Lights)进行包被, 然后对包被好的抗原-beads 用 PBS 进行清洗, 备用。将富集后的浆细胞密度调整为 7×10^6 /mL 后导入 OptoSelect 14K 芯片(Berkeley Lights)的 NanoPen 中。将 hPD-1 或 cPD-1 蛋白包被的 assay beads 及浓度为 5μg/mL 的 PE Goat Anti-Mouse IgG 二抗(Jackson)导入芯片的 Channel 中。设置 PE 荧光通道曝光时间为 1000ms, 共 7 个循环, 每个循环周期 6min。实验结束后将 hPD-1 和 cPD-1 蛋白筛选均阳性的浆细胞导出到含有裂解液和矿物油的 96 孔板中。

2.4 浆细胞测序及表达载体构建

使用 Opto Plasma B Discovery cDNA Synthesis Kit(Berkeley Lights)进行 cDNA 合成。然后使用 Opto Plasma B Discovery Sanger Prep Kit (Berkeley Lights)进行 IgG 重链可变区基因、Kappa 链可变区基因扩增。将扩增后得到的重链可变区及轻链可变区片段分别与包含人 IgG1 重链恒定区序列 (SEQ ID NO: 51) 的载体 pcDNA3.4(EBV)-hIgG1CH-S1 以及包含人 IgK 轻链恒定区序列 (SEQ ID NO: 53) 的载体 pcDNA3.4(EBV)-hIgKCL-S1 进行同源重组、转化和测序。

最终获得两株抗 PD-1 嵌合抗体 B1-1B5-H1L1 和 B1-1C4-H1L1, 其序列信息如下表中所示。

表 2: 抗 PD-1 嵌合抗体序列信息

抗体	SEQ ID NO:									
	VH			VH	VL			VL	CH	CL
	CDR1	CDR2	CDR3		CDR1	CDR2	CDR3			
B1-1B5-H1L1	1	2	3	7	4	5	6	8	51	53
B1-1C4-H1L1	25	26	27	31	28	29	30	32	51	53

实施例 3: 重组抗 PD-1 嵌合抗体的制备

3.1 抗体瞬转表达

转染前 24 小时, 在 500mL 细胞培养瓶中接种 $2.5\sim3\times10^6$ 细胞/mL 的 Expi293F 细胞 100mL, 把培养瓶放置于 37℃, 8% CO₂, 120rpm 的摇床中培养。转染前测定细胞密度, 达到 $4.5\sim5.5\times10^6$ 细胞/mL 时, 将细胞密度调为 3×10^6 细胞/mL 并进行转染。在 96 孔 PCR 板中利用 Opti-MEM (Gibco)将质粒稀释为 20ng/μL, 取 40μL 稀释后质粒缓慢加入

到预先装有 50 μ L/孔 Opti-MEM 的 U 底 96 孔板中（质粒总量为 0.8 μ g，轻、重链质粒各 0.4 μ g）；转染时先取 2.5 μ L 的 ExpiFectamine™ 293 Reagent (Gibco) 加入到 50 μ L Opti-MEM 中混匀，室温孵育 5 分钟。将上述稀释后的转染试剂及质粒充分混合，室温孵育 10-20 分钟；将 0.8mL 细胞悬液加至 96 深孔细胞培养板中，空余孔添加 0.8mL PBS。将

5 配制好的转染体系溶液缓慢加入细胞中，将细胞培养板放置于 37°C，8% CO₂，80-85% 湿度的细胞摇床中，900rpm 振荡培养 5 天。细胞转染后 18-22 小时，加入 5 μ L ExpiFectamin 293 enhancer 1 和 50 μ L ExpiFectamin 293 enhancer 2(Gibco)。

3.2 抗体纯化

收集上清至 96 深孔板中，向上清中加入 PrismA 亲和层析介质(Cytiva)，孵育 2h 进行结合。用 20mM PB-150mM NaCl 进行平衡，用 20mM 枸橼酸-枸橼酸钠(pH 3.2)洗脱，

10 然后用 1M Tris base 调节 pH 至中性。纯化样品利用 4~20%梯度胶进行 SDS-PAGE 测定抗体纯度。

实施例 4：抗 PD-1 嵌合抗体与 PD-1 过表达细胞系的结合活性测定

4.1 PD-1 过表达细胞系的制备

将 Homo sapiens PD-1 蛋白编码基因（基因号：NM_005018.3）连接进入 pLVX-hPD-1-IRES-Neo 质粒中，构建 hPD-1 蛋白的慢病毒质粒。将 Mus musculus PD-1 蛋白编码基因（基因号：NM_008798.3）连接进入 pLVX-mPD-1-IRES-Hyg 质粒中，构建 mPD-1 蛋白慢病毒质粒。将 Macaca fascicularis PD-1 蛋白编码基因（基因号：

20 EF443145.1）连接进入 pLVX-cPD-1-IRES-Hyg 质粒中，构建 cPD-1 蛋白的慢病毒质粒。

使用三质粒系统（包膜质粒 pCMV-VSVG、包装质粒 pCMV-dr8.91 及目的质粒 pLVx 主质粒）进行慢病毒包装，然后浓缩，最后获得慢病毒溶液。利用慢病毒溶液感染 CHOS 细胞。感染后通过 500 μ g/mL GENETICIN（Gibco）或 500 μ g/mL Hygromycin B（Invitrogen）对感染细胞进行压力筛选，获得抗性 Pool。利用 FACS 测定细胞表面

25 hPD-1、mPD-1、cPD-1 蛋白表达情况。对鉴定的阳性 Pool 细胞利用有限稀释法进行单克隆化，经过扩培及鉴定分别获得过表达 hPD-1、mPD-1、cPD-1 蛋白的 CHOS-hPD-1、CHOS-mPD-1、CHOS-cPD-1 细胞株。

4.2 抗体与 PD-1 过表达细胞系的结合活性测定

将 CHOS-hPD-1、CHOS-mPD-1、CHOS-cPD-1、CHOS 空细胞用 1%BSA/1 $\times$ PBS 重悬，然后加至 96 孔 U 型孔板中，每孔 2 $\times$ 10⁵ 个细胞。将抗体用 1%BSA/1 $\times$ PBS 分别

30 稀释至 10 μ g/mL，每孔 100 μ L，每个抗体 2 个复孔，同时设置 NC 和 Blank，4°C 孵育 30 分钟。用 1%BSA/1 $\times$ PBS 清洗 2 次，然后加入按照 1：200 比例稀释的 Goat Anti-Human IgG (Jackson) 二抗，每孔 100 μ L，4°C 孵育 30 分钟。用 1%BSA/1 $\times$ PBS 清洗 2 次后，用 50 μ L 1%BSA/1 $\times$ PBS 重悬。细胞在流式细胞仪(BD Canto II)上进行分析。使用 FlowJo 软件

35 件分析测定结果，计算平均荧光强度(MFI)。选择与 CHOS-hPD-1 或 CHOS-cPD-1 结合

MFI 值大于 10 倍 NC 的抗体进行后续实验。

实施例 5：抗 PD-1 嵌合抗体抑制 Jurkat-PD1-NFAT 报告细胞激活的活性测定

Jurkat-PD1-NFAT 细胞（购买于中检院）用含 1% FBS（Gibco，10091-148）的
5 RPMI-1640（Gibco，C11875500BT）实验培养基调整密度为 2×10^6 个/mL，25 μ L/孔接种于 96 孔全白板（CORNING，3917）中，即 5×10^4 个细胞/孔。实验培养基稀释待检抗体，25 μ L/孔加入 96 孔板中，最高浓度为 75nM，4 倍稀释，9 个梯度。THP-1 细胞（购买于 BNCC）用实验培养基调整密度为 1.6×10^6 个/mL，25 μ L/孔接种于 96 孔板，即 4×10^4 个细胞/孔。实验培养基稀释 CD3 抗体(自制)，25 μ L/孔加入对应实验孔中，终浓度
10 度为 0.01nM。实验总体系 100 μ L/孔，置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 6-24 小时。加入 Bright-Lite(诺唯赞，DD1204-02) 100 μ L/孔，避光，室温静置 3min，SpectraMax iD5 多功能酶标仪（Molecular Devices）检测发光值。报告基因抑制率计算公式：Reporter gene inhibition(%) = 100% $\times$ [1-(RLUsample-RLUcell)/(RLUcontrol-RLUcell)]。

结果如图 1 和表 3，抗 PD-1 嵌合抗体 B1-1B5-H1L1 和 B1-1C4-H1L1 呈现剂量依赖
15 的抑制 Jurkat-PD1-NFAT 报告细胞激活，其抑制活性优于阳性对照 P01-hIgG1（参考专利 US20190270818A1，重链序列为：SEQ ID NO: 1；轻链序列为：SEQ ID NO: 2）和 P02-hIgG1（参考专利 WO2020247648A2，重链序列为：SEQ ID NO: 51；轻链序列为：SEQ ID NO: 52），体现于 EC50 比阳性对照 P01-hIgG1 和 P02-hIgG1 小 2-3 倍。两个阳性对照抗体的重链恒定区序列与本申请中的 SEQ ID NO: 51 相同，hIgG1 isotype 为一个
20 不相关的阴性对照抗体。

表 3：抗 PD-1 嵌合抗体抑制 Jurkat-PD1-NFAT 报告细胞激活测定结果

抗体名称	EC50 (nM)
hIgG1 isotype	NA
P01-hIgG1	0.30
P02-hIgG1	0.33
B1-1B5-H1L1	0.12
B1-1C4-H1L1	0.14

实施例 6：抗 PD-1 抗体人源化

将筛选得到的鼠源抗体 B1-1B5-H1L1，B1-1C4-H1L1 和已知的人源抗体数据库进
25 行比对分析，找到同源性最高的种系基因，选择使用其框架区 (采用 Kabat 定义 CDR 和框架区)，然后借助计算机预测模拟，将 CDR 替换为母本抗体中对应的 CDR 序列，再通过回复突变的方式保留母本抗体框架区中对抗原结合具有重要影响的鼠源氨基酸。最终分别生成 B1-1B5-H1L1 和 B1-1C4-H1L1 各自的人源化抗体的可变区 1B5-zu1（重链可变区序列为：SEQ ID NO: 15；轻链可变区序列为：SEQ ID NO: 16）和 1C4-zu1（重

链可变区序列为：SEQ ID NO: 39；轻链可变区序列为：SEQ ID NO: 40)。

实施例 7：抗 PD-1 人源化抗体的制备

7.1 人源化抗体瞬转表达

5 将实施例 6 中所述的人源化抗体的重链可变区和轻链可变区分别连接重链恒定区和轻链恒定区，获得 4 个重链表达载体和 4 个轻链表达载体，将它们进行组合转染用于表达抗体，抗体氨基酸序列及核苷酸序列见表 4。其中 1B5-zu1-hIgG1 DD 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 分别为 1B5-zu1-hIgG1 和 1C4-zu1-hIgG1 的 Fc 区域改造突变体，DD 代表 S239D/H268D 突变体（EU 编号系统），该 Fc 变体的序列如 SEQ ID NO: 52 所示。

10 表 4：抗 PD-1 人源化抗体氨基酸及核苷酸序列

抗体名称	重链氨基酸序列	轻链氨基酸序列	重链核苷酸序列	轻链核苷酸序列
1B5-zu1-hIgG1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
1B5-zu1-hIgG1 DD	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:22
1C4-zu1-hIgG1	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46
1C4-zu1-hIgG1 DD	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:46

转染前 24 小时，在 500mL 细胞培养瓶中接种 $3\sim4\times10^6$ 细胞/mL 的 ExpiCHO-S 细胞 100mL，把培养瓶放置于 37℃，8% CO₂，120rpm 的摇床中培养。转染前测定细胞密度，达到 $6\sim8\times10^6$ 细胞/mL 时，将细胞密度调为 6×10^6 细胞/mL 并进行转染。转染时先将 1B5-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD、1C4-zu1-hIgG1 及 1C4-zu1-hIgG1 DD 分子所
15 用到的表达质粒总量各 100μg（轻、重链表达质粒比为 1:1）用 Opti-PRO SFM 稀释至 4mL；再取 320μL 的 ExpiFectamine CHO Reagent 加入到 3.68mL OptiPRO SFM 中混匀，室温孵育 2 分钟。将上述稀释后的转染试剂及质粒充分混合，室温孵育 2~5 分钟，然后将混合物分别全部加入细胞中，混匀。把培养瓶放置于 37℃，8% CO₂，120rpm 的摇床中培养。细胞转染后 18-22h 向培养体系中加入 600μl ExpiFectamine CHO Enhancer 和
20 16mL ExpiCHO Feed，将培养条件调整为 32℃，5% CO₂，120rpm。转染后第五天加入 16mL ExpiCHO Feed，继续培养 12~14 天。

7.2 人源化抗体纯化

将细胞培养液在 2000g 的条件下离心 20min，收集上清，将上清用 0.22 微米的滤膜过滤。经过 PrismA(Cytiva)亲和层析(蛋白纯化液相色谱系统：Cytiva，AKTA avant 25)，
25 用 20mM 枸橼酸-枸橼酸钠(pH 3.2)洗脱，然后用 1M Tris base 调节 pH 至中性。纯化样品利用 4~20%梯度胶进行 SDS-PAGE 测定抗体纯度。

实施例 8：抗 PD-1 人源化抗体与 PD-1 抗原亲和力测定

使用 Sensor Chip Protein A 生物传感器芯片（Cytiva，29-1275-56），将 1B5-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD、1C4-zu1-hIgG1、1C4-zu1-hIgG1 DD 作为配体固定在芯片
30 上，将不同浓度的抗原 hPD-1 ECD-Avi-His、cPD-1 ECD-Avi-His 以 30μL/min 流速流过

芯片，抗原与抗体进行结合，结合时间为 180s，解离时间为 180s。用 Biacore 8K Evaluation (Cytiva) 进行动力学拟合，获得亲和力常数如下表 5 和表 6。1B5-zu1-hIgG1 和 1B5-zu1-hIgG1 DD 与 hPD-1 ECD-Avi-His 的亲和力相当；1C4-zu1-hIgG1 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 与 hPD-1 ECD-Avi-His 的亲和力相当。1B5-zu1-hIgG1 和 1B5-zu1-hIgG1 DD 与 cPD-1 ECD-Avi-His 的亲和力相当；1C4-zu1-hIgG1 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 与 cPD-1 ECD-Avi-His 的亲和力相当。

表 5：抗 PD-1 人源化抗体与 hPD-1 亲和力测定结果

抗体名称	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
1B5-zu1-hIgG1	2.04E+05	2.40E-03	1.18E-08
1B5-zu1-hIgG1 DD	2.09E+05	2.31E-03	1.11E-08
1C4-zu1-hIgG1	2.36E+05	1.95E-03	8.26E-09
1C4-zu1-hIgG1 DD	2.40E+05	1.94E-03	8.05E-09

表 6：抗 PD-1 人源化抗体与 cPD-1 亲和力测定结果

抗体名称	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
1B5-zu1-hIgG1	2.19E+05	8.41E-03	3.85E-08
1B5-zu1-hIgG1 DD	2.43E+05	8.56E-03	3.51E-08
1C4-zu1-hIgG1	2.51E+05	3.92E-03	1.56E-08
1C4-zu1-hIgG1 DD	2.59E+05	3.93E-03	1.52E-08

10

实施例 9：抗 PD-1 人源化抗体与 Fc 受体亲和力测定

将 anti-His antibody (Cytiva, 28995056) 偶联在 CM5 生物传感芯片 (Cytiva, BR-1005-30) 上，将 hCD32A(167 His, His Tag, Sino Biological, 10374-H08C1)、hCD32B(ECD, His tag, Sino Biological, 10259-H08C)作为配体，将不同浓度的抗体 1B5-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD、1C4-zu1-hIgG1、1C4-zu1-hIgG1 DD 以 30μL/min 流速流过芯片，Fc 受体与抗体进行结合，结合时间为 60s，解离时间为 60s。用 Biacore 8K Evaluation 软件 (Cytiva) 进行拟合，获得亲和力常数如下表 7 和表 8。hCD32A 与 1B5-zu1-hIgG1 DD 或 1C4-zu1-hIgG1 DD 亲和力相比于 1B5-zu1-hIgG1 或 1C4-zu1-hIgG1 提高了 3-4 倍。hCD32B 与 1B5-zu1-hIgG1 DD 或 1C4-zu1-hIgG1 DD 亲和力相比于 1B5-zu1-hIgG1 或 1C4-zu1-hIgG1 提高了 6-9 倍。上述结果表明在 Fc 区引入 DD 突变能够进一步提升抗体与 Fc 受体 hCD32A 和 hCD32B 的亲和力。

表 7：抗 PD-1 人源化抗体与 hCD32A 亲和力测定结果

抗体名称	KD (M)
1B5-zu1-hIgG1	5.43E-06

1B5-zu1-hIgG1 DD	1.47E-06
1C4-zu1-hIgG1	4.94E-06
1C4-zu1-hIgG1 DD	1.61E-06

表 8：抗 PD-1 人源化抗体与 hCD32B 亲和力测定结果

抗体名称	KD (M)
1B5-zu1-hIgG1	1.34E-05
1B5-zu1-hIgG1 DD	1.53E-06
1C4-zu1-hIgG1	1.00E-05
1C4-zu1-hIgG1 DD	1.68E-06

将 anti-His antibody 偶联在 CM5 生物传感芯片上，将自制 hCD16A(158F)-ECD-C-his、hCD16A(158V)-ECD-C-his 作为配体，将不同浓度的抗体 1B5-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD、1C4-zu1-hIgG1、1C4-zu1-hIgG1 DD 以 30μL/min 流速流过芯片，Fc 受体与抗体进行结合，结合时间为 60&90s，解离时间为 60&90s。用 Biacore 8K Evaluation 软件（Cytiva）进行动力学及稳态拟合，获得亲和力常数如下表 9 和表 10。hCD16A(158F)与 1B5-zu1-hIgG1 DD 或 1C4-zu1-hIgG1 DD 亲和力相比于 1B5-zu1-hIgG1 或 1C4-zu1-hIgG1 提高了 3-6 倍。hCD16A(158V)与 1B5-zu1-hIgG1 DD 或 1C4-zu1-hIgG1 DD 亲和力相比于 1B5-zu1-hIgG1 或 1C4-zu1-hIgG1 提高了 3-4 倍。上述结果表明在 Fc 区引入 DD 突变能够进一步提升抗体与 Fc 受体 hCD16A 的亲和力。

表 9：抗 PD-1 人源化抗体与 hCD16A(158F)亲和力测定结果

抗体名称	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
1B5-zu1-hIgG1	9.21E+04	3.00E-02	3.26E-07
1B5-zu1-hIgG1 DD	6.84E+05	3.54E-02	5.18E-08
1C4-zu1-hIgG1	1.12E+05	2.48E-02	2.22E-07
1C4-zu1-hIgG1 DD	6.74E+05	4.23E-02	6.27E-08

表 10：抗 PD-1 人源化抗体与 hCD16A(158V)亲和力测定结果

抗体名称	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
1B5-zu1-hIgG1	9.61E+04	7.98E-03	8.30E-08
1B5-zu1-hIgG1 DD	4.81E+05	1.03E-02	2.15E-08
1C4-zu1-hIgG1	9.66E+04	7.75E-03	8.02E-08
1C4-zu1-hIgG1 DD	4.45E+05	1.13E-02	2.54E-08

实施例 10：抗 PD-1 人源化抗体与 PD-1 过表达细胞系的结合活性测定

将 CHOS-hPD-1 及 CHOS-cPD-1 细胞用 1%BSA/1×PBS 重悬，然后加至 96 孔 U 型孔板中，每孔 2×10⁵ 个细胞。再分别加入最高浓度为 100nM，3 倍稀释，10 个浓度梯度的待检抗体，每孔 100μL，4℃孵育 30 分钟。用 1%BSA/1×PBS 清洗 2 次，加入 1：200 比例稀释的 Goat Anti-Human IgG (Jackson)二抗，每孔 100μL，4℃孵育 30 分钟。用 1%BSA/1×PBS 清洗 2 次后，用 100μL 1%BSA/1×PBS 重悬。细胞在流式细胞仪(BD Canto II)上进行分析。使用 FlowJo 软件分析测定结果。平均荧光强度(MFI)值用于基于 4 参数逻辑回归计算相对 EC50。

抗体与 CHOS-hPD-1 及 CHOS-cPD-1 测定结果分别见图 2、图 3 和表 11。1B5-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD、1C4-zu1-hIgG1、1C4-zu1-hIgG1 DD 能够高效结合 CHOS-hPD-1，且明显强于 P02-hIgG1，略优于 P01-hIgG1。1B5-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD、1C4-zu1-hIgG1、1C4-zu1-hIgG1 DD 能够高效结合 CHOS-cPD-1，且明显强于 P02-hIgG1，略优于 P01-hIgG1。

表 11：抗 PD-1 人源化抗体与 CHOS-hPD-1 及 CHOS-cPD-1 结合测定结果

抗体名称	CHOS-hPD-1 EC50(nM)	CHOS-cPD-1 EC50(nM)
hIgG1 isotype	-	-
hIgG1 DD isotype	-	-
P01-hIgG1	15.87	22.40
P02-hIgG1	35.93	62.40
1B5-zu1-hIgG1	11.93	20.20
1B5-zu1-hIgG1 DD	12.13	19.87
1C4-zu1-hIgG1	14.33	20.27
1C4-zu1-hIgG1 DD	13.67	20.07

实施例 11：抗 PD-1 人源化抗体抑制 Jurkat-PD1-NFAT 报告细胞激活的活性测定

Jurkat-PD1-NFAT 细胞（购买于中检院）用含 1% FBS（Gibco，10091-148）的 RPMI-1640（Gibco，C11875500BT）实验培养基调整密度为 2×10⁶ 个/mL，25μL/孔接种于 96 孔全白板（CORNING，3917）中，即 5×10⁴ 个细胞/孔。实验培养基稀释待检抗体，25μL/孔加入 96 孔板中，最高浓度为 75nM，4 倍稀释，9 个梯度。THP-1 细胞（购买于 BNCC）用实验培养基调整密度为 1.6×10⁶ 个/mL，25μL/孔接种于 96 孔板，即 4×10⁴ 个细胞/孔。实验培养基稀释 CD3 抗体(自制)，25μL/孔加入对应实验孔中，终浓度为 0.01nM。实验总体系 100μL/孔，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 6-24 小时。加入 Bright-Lite (诺唯赞，DD1204-02) 100μL/孔，避光，室温静置 3min，SpectraMax iD5 多功能酶标仪（Molecular Devices）检测发光值。报告基因抑制率计算公式：Reporter gene inhibition(%) = 100%×[1-(RLU_{sample}-RLU_{cell})/(RLU_{control}-RLU_{cell})]。

结果如图 4 和表 12，人源化抗体 1B5-zu1-hIgG1 和 1C4-zu1-hIgG1 抑制 Jurkat-PD1-

NFAT 报告细胞激活的活性优于阳性对照 P01-hIgG1 和 P02-hIgG1，体现于 EC50 减少 2-3 倍。1B5-zu1-hIgG1 DD 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 抑制 Jurkat-PD1-NFAT 报告细胞激活的活性优于 1B5-zu1-hIgG1 和 1C4-zu1-hIgG1，体现于最大抑制率提高约 10%。

表 12：抗 PD-1 人源化抗体抑制 Jurkat-PD1-NFAT 报告细胞激活测定结果

抗体名称	EC50 (nM)
hIgG1 isotype	NA
hIgG1 DD isotype	NA
P01-hIgG1	0.25
P02-hIgG1	0.38
1B5-zu1-hIgG1	0.13
1B5-zu1-hIgG1 DD	0.15
1C4-zu1-hIgG1	0.12
1C4-zu1-hIgG1 DD	0.16

5

实施例 12：抗 PD-1 人源化抗体抑制原代 T 细胞 IFN-γ 分泌的活性测定

人 CD4⁺ T 细胞（儒百生物）用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基调整密度为 1 × 10⁶ 个/mL，2 mL/孔接种于提前包被有 3 μg/mL Anti-Human CD3 抗体（clone OKT3，ACRO，CDE-M120a）的 12 孔板（CORNING，3513）中刺激 3 天。THP-1 细胞用丝裂毒素 C (INALCO，1758-9327) 处理，以抑制细胞增殖：1 × 10⁷ 个/mL THP-1 细胞用 10 μg/mL 丝裂毒素 C 于 37°C 处理 2 小时。THP-1 细胞经培养基清洗 3 遍后，用含 5% 人血清 (恒远生物，HY118-25) 的 RPMI-1640 实验培养基重悬，调整细胞密度为 5 × 10⁵ 个/mL，50 μL/孔接种于 96 孔 U 型板中（NEST，1224B），即 2.5 × 10⁴ 个细胞/孔。待检抗体用含 5% 人血清的 RPMI-1640 实验培养基稀释至 0.25 nM，50 μL/孔加入对应实验孔中。

15 收集活化的 CD4⁺ T 细胞，用实验培养基稀释为 1 × 10⁶ 个/mL，50 μL/孔接种于 96 孔 U 型板中，即 5 × 10⁴ 个细胞/孔。实验培养基稀释 CD3 抗体（自制），50 μL/孔加入对应实验孔中，终浓度为 0.04 nM。总体系 200 μL/孔，置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 18 小时。孵育完成后离心收集上清，ELISA 检测 IFN-γ 分泌情况（R&D Systems, SIF50C），通过 SpectraMax iD5 多功能酶标仪（Molecular Devices）以 450 nm 为检测波长、540 nm 为参

20 比波长读取 OD 值，并根据标准曲线计算 IFN-γ 含量。细胞因子分泌抑制率计算公式：
inhibition(%) = 100% × [1 - (sample-untreated)/(treated-untreated)]。

结果如图 5，1B5-zu1-hIgG1、1C4-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 均能够显著抑制人 CD4⁺ T 细胞分泌 IFN-γ，且活性明显优于阳性对照 P01-hIgG1 和 P02-hIgG1；其中，1B5-zu1-hIgG1 DD 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 抑制人 CD4⁺ T 细胞分泌 IFN-γ 活性更优。

25

实施例 13：抗 PD-1 人源化抗体的 ADCC 活性测定

复苏人 CD56⁺ NK 细胞（上海妙顺）过夜培养，次日收集细胞，用含 1% FBS 的 MEM- α （Gibco, 32561-037）实验培养基稀释 NK 效应细胞， 5×10^4 个细胞/100 μ L/孔接种于 96 孔板（CORNING, 3599）中。实验培养基稀释待检抗体，最高浓度 10nM，10 倍稀释，8 个梯度，50 μ L/孔加入对应实验孔中。实验培养基稀释靶细胞 CHOS-hPD-1，1E4 个细胞/50 μ L/孔接种于 96 孔板中，即效靶比（E:T）=5:1。同时设置最大杀伤组：1% Triton + 靶细胞；最小杀伤组：靶细胞；E+T 组：效应细胞 + 靶细胞。总体系 200 μ L/孔，抗体、靶细胞和效应细胞混合后，培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 小时。用 CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒（Promega, G1780）检测 LDH 释放。离心收集 50 μ L 上清，加入 LDH 底物 50 μ L/孔，室温避光孵育 20min，加入 stop solution 50 μ L/孔，使用 SpectraMax iD5 多功能酶标仪（Molecular Devices）检测 LDH 反应的 OD 值，检测波长 490nm，参比波长 620nm。计算公式： $\%Target\ cell\ lysis = 100\% \times (OD_{Sample} - OD_{E+T}) / (OD_{Maximum\ release} - OD_{Minimum\ release})$ 。

结果如图 6 和表 13，在原代人 NK 细胞介导的 ADCC 实验中，1B5-zu1-hIgG1、1C4-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 均显示了良好的 ADCC 活性，其中 1B5-zu1-hIgG1 DD 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 的 ADCC 活性更优，体现于 EC50 减小 5-12 倍。

表 13：抗 PD-1 人源化抗体的 ADCC 活性测定结果

抗体名称	EC50 (pM)
hIgG1 isotype	NA
hIgG1 DD isotype	NA
1B5-zu1-hIgG1	5.12
1B5-zu1-hIgG1 DD	0.44
1C4-zu1-hIgG1	1.90
1C4-zu1-hIgG1 DD	0.33

实施例 14：抗 PD-1 人源化抗体阻断或增强 PD-1 与 PD-L1 或 PD-L2 结合的活性测定

将 CHOS-hPD-1 细胞用 1%BSA/1 $\times$ PBS 重悬后加至 96 孔 U 型孔板中，每孔 1×10^5 细胞，分别加入最高浓度为 600nM，3 倍稀释，11 个浓度梯度的待检抗体，每孔 50 μ L，4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。分别加入 600nM 的 hPD-L1-hIgG1Fc-Avi(B)或 26.67nM 的 hPD-L2-hIgG1Fc-Avi(B)，每孔 50 μ L，4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。用 1%BSA/1 $\times$ PBS 清洗 2 次后，加入 1：200 比例稀释的 PE-conjugated Streptavidin(BD)二抗，每孔 50 μ L，4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。用 1%BSA/1 $\times$ PBS 清洗 2 次后，用 50 μ L 1%BSA/1 $\times$ PBS 重悬。细胞在流式细胞仪(BD

Canto II)上进行分析。使用 FlowJo 软件分析测定结果。

图 7 的测定结果显示, PD-1 拮抗型抗体 Keytruda-hIgG1 可以显著地阻断 CHOS-hPD-1 与 hPD-L1 的结合, 而 PD-1 激动型抗体 P01-hIgG1 和 P02-hIgG1 不阻断 CHOS-hPD-1 与 hPD-L1 的结合; 令人惊喜的是, PD-1 激动型抗体 1B5-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD、1C4-zu1-hIgG1 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 不但不阻断 CHOS-hPD-1 与 hPD-L1 的结合, 甚至可以不同程度地增强 CHOS-hPD-1 与 hPD-L1 的结合。同样地, 图 8 的测定结果显示, Keytruda-hIgG1 可以显著地阻断 CHOS-hPD-1 与 hPD-L2 的结合, 而 P01-hIgG1、P02-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 和 1B5-zu1-hIgG1 DD 仅微弱地阻断 CHOS-hPD-1 与 hPD-L2 的结合; 令人惊喜的是, 1C4-zu1-hIgG1 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 不但不阻断 CHOS-hPD-1 与 hPD-L2 的结合, 甚至可以增强 CHOS-hPD-1 与 hPD-L2 的结合。

实施例 15: 抗 PD-1 人源化抗体在小鼠 GVHD 模型中药效测定

小鼠移植抗宿主病 (Graft-versus-host disease, GVHD) 模型使用 7-8 周龄雌性免疫缺陷小鼠 NOD.CB17-PrkdcscidII2rgtm1/Bcgen (B-NDG, 购买于百奥赛图, 货号 110586) 造模。造模方法为 1.5×10^7 人外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 尾静脉注射至小鼠体内诱导造模。造模一天后待测抗体以 10 mg/kg 剂量通过腹腔注射进行给药, 给药频率为一周两次, 持续给药六周。造模给药期间每周三次称量动物体重并监测动物发病情况, 根据观察结果进行 GVHD 评分。当监测到动物体重较初始体重下降超过 20%, 对小鼠实施安乐死。

结果如图 9, 与阴性对照组 (Vehicle, hIgG1 isotype, hIgG1 DD isotype) 相比, 1B5-zu1-hIgG1、1C4-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD、1C4-zu1-hIgG1 DD 均可以显著减轻小鼠 GVHD 症状, 并显著优于阳性对照 P01-hIgG1 的药效水平; 1B5-zu1-hIgG1 DD、1C4-zu1-hIgG1 DD 优于阳性对照 P02-hIgG1 的药效水平, 1B5-zu1-hIgG1、1C4-zu1-hIgG1 与阳性对照 P02-hIgG1 的药效水平相当。

实施例 16: 抗 PD-1 人源化抗体在人 FcRn 转基因小鼠中药代动力学测定

人 FcRn 转基因小鼠 (购买于百奥赛图, 货号 110001) 单次给药后 0h、0.083h、24h、48h、72h、120h、168h、240h、336h、408h、504h、576h 和 672h 采集血样, 测定存在于血清中的抗体的浓度。采用 ELISA 方法检测抗体血药浓度。每组动物数 6 只, 雌雄各半, 给药剂量 10 mg/kg, 给药途径为静脉注射。表 14 显示了测定的药物动力学性质, 其中 $T_{1/2}$ 代表半衰期, C_{max} 代表峰值浓度, AUC_{last} 代表从给药时间开始到最后一个时间点的这段时间的曲线下面积, $AUC_{INF-obs}$ 代表从给药开始到理论外推无穷远的时间的曲线下面积, $AUC\text{-}\%Extrap\text{-}obs$ 代表从最后一个点开始到理论外推无穷远的曲线下面积占 $AUC_{INF-obs}$ 的比例, $V_z\text{-}obs$ 代表表观分布容积, $Cl\text{-}obs$ 代表清除率, MRT_{last} 代表平均滞留时间。

结果如图 10 和表 14，1B5-zu1-hIgG1、1B5-zu1-hIgG1 DD、1C4-zu1-hIgG1 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 均比 P02-hIgG1 的半衰期更长；1B5-zu1-hIgG1、1C4-zu1-hIgG1 和 1C4-zu1-hIgG1 DD 比 P01-hIgG1 的半衰期更长。

表 14：抗 PD-1 人源化抗体在人 FcRn 转基因小鼠中药代动力学测定结果

PK Parameter	P01- hIgG1	P02- hIgG1	1B5-zu1- hIgG1	1B5-zu1- hIgG1 DD	1C4-zu1- hIgG1	1C4-zu1- hIgG1 DD
T1/2(hour)	115.36	51.22	241.15	88.19	188.73	169.09
Cmax(μg/ml)	246.29	230.58	240.02	233.27	252.81	149.43
AUClast(hour*μg/ml)	20856.12	11904.90	24817.12	18099.31	27964.64	14983.02
AUCINF-obs(hour*μg/ml)	21345.24	12082.92	28472.69	18422.86	30742.36	16057.57
AUC-%Extrap-obs(%)	2.11	1.57	12.11	1.56	8.71	6.58
Vz-obs(ml/kg)	75.01	62.98	120.65	67.57	87.47	151.87
Cl-obs (ml/hour/kg)	0.48	0.84	0.36	0.56	0.33	0.63
MRTlast(hour)	154.24	99.87	200.76	142.79	195.52	194.20

5

实施例 17：抗 PD-1 人源化抗体在淋巴细胞过继转移诱导的 SLE 小鼠模型中药效测定

淋巴细胞过继转移诱导的 SLE 小鼠模型的特征在于产生一系列自身抗体，包括抗组蛋白和抗双链 DNA 抗体，类似于人类 SLE 中观察到的疾病指症。70 只雄性 BM12 小鼠（Jackson Laboratory, 品系号 001162）根据 8 周龄时的体重随机分为 5 组(N=8)。小鼠均接受了来自 hPD-1 C57BL/6 供体小鼠（6-8 周龄，集萃药康，品系号 T003095）的 5×10^7 淋巴细胞的腹腔注射，实验持续了 25 天。D1 开始给药，每周两次给药频次，Day0/14/25 分别采血分离血清检测 anti-dsDNA 和 anti-histone 水平。

10

如图 11 所示，在淋巴细胞过继转移后第 14 天：1）与阴性对照组（Vehicle）相比，1C4-zu1-hIgG1 20mpk 和 40mpk 可显著降低抗组蛋白抗体（anti-histone）水平；2）与阴性对照组（Vehicle）相比，1C4-zu1-hIgG1 20mpk 和 40mpk 可显著降低抗双链 DNA（anti-dsDNA）抗体水平。在淋巴细胞过继转移后第 25 天：1）与阴性对照组（Vehicle）相比，1C4-zu1-hIgG1 40mpk 可显著降低抗组蛋白抗体（anti-histone）水平；2）与阴性对照组（Vehicle）相比，1C4-zu1-hIgG1 20mpk 和 40mpk 可显著降低抗双链 DNA

15

(anti-dsDNA) 抗体水平。CTX (Cyclophosphamide, 环磷酰胺) 在该模型中起到阳性药的作用。

实施例 18: 抗 PD-1 人源化抗体在 TNBS 诱导的 IBD 小鼠模型中药效测定

5 雌性 hPD-1 BALB/c 小鼠 (6-8 周龄, 集萃药康, 品系号 T002726) 按照体重随机分成 5 组 (N=10): 1 个空白对照组 (Sham 组) 和 4 个 TNBS 诱导的模型组。实验于 day 0 进行免疫干预: 4 组模型组小鼠直肠灌注 0.1 mL 的 1.5% TNBS 溶液; Sham 组小鼠直肠灌注 0.1mL 的 50%乙醇溶液。1C4-zu1-hIgG1 治疗组分别在 day-1、day2、day5 进行腹腔注射给药。Sham 组与溶媒对照组 (Vehicle 组) 小鼠 (day-1 - day 6) 腹腔注射相同体积的溶媒辅料。实验期间每天称量动物体重、进行小鼠粪便性状与隐血评分, 10 并计算疾病活动指数 (DAI)。实验终点 (即 day 6) 将动物安乐死, 采集每组小鼠结肠 (肛门至盲肠), 去除结肠周围脂肪及结缔组织, 拍照, 进行长度测量, 去除内容物和盲肠并称重。

 如图 12 所示, 在 TNBS 诱导的小鼠急性结肠炎模型中, 1C4-zu1-hIgG1 具有良好的 15 药效, 可缓解结肠炎导致的小鼠体重减轻及 DAI 的评分升高, 1C4-zu1-hIgG1 可显著缓解结肠炎导致的结肠缩短。

 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 但本领域技术人员将理解: 根据 20 已经公布的所有教导, 可以对细节进行各种修改和变动, 并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围为由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 能够特异性结合 PD-1 的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 如 SEQ ID NO: 7 或 15 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 VH CDR1 或其变体、VH CDR2 或其变体以及 VH CDR3 或其变体；和/或，如 SEQ ID NO: 8 或 16 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 VL CDR1 或其变体、VL CDR2 或其变体以及 VL CDR3 或其变体；或

(b) 如 SEQ ID NO: 31 或 39 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 VH CDR1 或其变体、VH CDR2 或其变体以及 VH CDR3 或其变体；和/或，如 SEQ ID NO: 32 或 40 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 VL CDR1 或其变体、VL CDR2 或其变体以及 VL CDR3 或其变体；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加，例如保守置换）；优选地，所述的置换是保守置换；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 如 SEQ ID NO: 7 或 15 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR；和/或，如 SEQ ID NO: 8 或 16 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR；或，

(b) 如 SEQ ID NO: 31 或 39 所示的重链可变区 (VH) 中含有的 3 个 CDR；和/或，如 SEQ ID NO: 32 或 40 所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 3 个 CDR。

2. 权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(a) 包含下述 3 个互补决定区 (CDRs) 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 1 的 VH CDR1、序列为 SEQ ID NO: 2 的 VH CDR2、序列为 SEQ ID NO: 3 的 VH CDR3；和/或，包含下述 3 个互补决定区 (CDRs) 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 4 的 VL CDR1、序列为 SEQ ID NO: 5 的 VL CDR2、序列为 SEQ ID NO: 6 的 VL CDR3；或，

(b) 包含下述 3 个互补决定区 (CDRs) 的重链可变区 (VH)：序列为 SEQ ID NO: 25 的 VH CDR1、序列为 SEQ ID NO: 26 的 VH CDR2、序列为 SEQ ID NO: 27 的 VH CDR3；和/或，包含下述 3 个互补决定区 (CDRs) 的轻链可变区 (VL)：序列为 SEQ ID NO: 28 的 VL CDR1、序列为 SEQ ID NO: 29 的 VL CDR2、序列为 SEQ ID NO: 30 的 VL CDR3；

其中，所述 CDR 由 Kabat 编号系统定义。

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含：

(a) 重链可变区 (VH)，其包含 SEQ ID NO: 7 所示的序列或其变体；和/或，轻链可变区 (VL)，其包含 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其变体；或，

(b) 重链可变区 (VH)，其包含 SEQ ID NO: 31 所示的序列或其变体；和/或，轻链可

变区 (VL)，其包含 SEQ ID NO: 32 所示的序列或其变体；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加），或具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性；优选地，所述置换是保守置换；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：包含如 SEQ ID NO: 7 所示的序列的 VH 和包含如 SEQ ID NO: 8 所示的序列的 VL；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：包含如 SEQ ID NO: 31 所示的序列的 VH 和包含如 SEQ ID NO: 32 所示的序列的 VL。

4. 权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含来源于人免疫球蛋白的框架区序列；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：人重链胚系序列的重链框架区，和/或，人轻链胚系序列的轻链框架区。

5. 权利要求 4 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 包含如 SEQ ID NO: 15 所示的序列或其变体的重链可变区 (VH)；和/或，包含如 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体的轻链可变区 (VL)；或，

(b) 包含如 SEQ ID NO: 39 所示的序列或其变体的重链可变区 (VH)；和/或，包含如 SEQ ID NO: 40 所示的序列或其变体的轻链可变区 (VL)；

其中，所述变体与其所源自的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个氨基酸的置换、缺失或添加），或具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性；

优选地，所述的置换是保守置换；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含：

(a) 包含如 SEQ ID NO: 15 所示的重链可变区 (VH)；和/或，包含如 SEQ ID NO: 16 所示的轻链可变区 (VL)；或，

(b) 包含如 SEQ ID NO: 39 所示的重链可变区 (VH)；和/或，包含如 SEQ ID NO: 40 所示的轻链可变区 (VL)。

6. 权利要求 1-5 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含来源于哺乳动物（例如人或鼠）免疫球蛋白的恒定区；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段的重链包含来源于人免疫球蛋白（例如 IgG，如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）的重链恒定区，和/或，所述抗体或其抗原结合片段的轻链包

含来源于人免疫球蛋白（例如 κ 或 λ ）的轻链恒定区。

7. 权利要求 6 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含人免疫球蛋白重链恒定区变体，其与野生型人免疫球蛋白重链恒定区相比具备增强的对 Fc 受体（例如 CD32A、CD32B 和/或 CD16A）的结合活性；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段包含人 IgG1 或 IgG4 重链恒定区变体，所述重链恒定区变体在根据 EU 编号的以下位置中一个或多个包含置换：239、268；优选地，所述置换选自 S239D/H268D 或 S239D/Q268D。

8. 权利要求 6 或 7 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段包含：

- (1) 包含 SEQ ID NO: 11 所示序列的重链和包含 SEQ ID NO: 12 所示序列的轻链；
- (2) 包含 SEQ ID NO: 19 所示序列的重链和包含 SEQ ID NO: 20 所示序列的轻链；
- (3) 包含 SEQ ID NO: 23 所示序列的重链和包含 SEQ ID NO: 20 所示序列的轻链；
- (4) 包含 SEQ ID NO: 35 所示序列的重链和包含 SEQ ID NO: 36 所示序列的轻链；
- (5) 包含 SEQ ID NO: 43 所示序列的重链和包含 SEQ ID NO: 44 所示序列的轻链；

或，

- (6) 包含 SEQ ID NO: 47 所示序列的重链和包含 SEQ ID NO: 44 所示序列的轻链。

9. 权利要求 1-8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、di-scFv、(scFv)₂、双抗体（diabody）和单域抗体（sdAb）；和/或，所述抗体为鼠源抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

10. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或其重链可变区和/或轻链可变区，或其重链和/或轻链。

11. 载体，其包含权利要求 10 所述的分离的核酸分子；优选地，所述载体为克隆载体或表达载体。

12. 宿主细胞，其包含权利要求 10 所述的分离的核酸分子或权利要求 11 所述的载体。

13. 制备权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养权利要求 12 所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

14. 双特异性或多特异性分子，其包含权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述双特异性或多特异性分子特异性结合 PD-1，并且额外地特异性结合一个或多个其他靶标；

优选地，所述双特异性或多特异性分子还包含至少一种具有针对第二靶标的第二结合特异性的分子（例如第二抗体）。

15. 免疫缀合物，其包含权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及连接于所述抗体或其抗原结合片段的治疗剂；

优选地，所述治疗剂是细胞毒剂。

16. 药物组合物，其包含权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 所述的分离的核酸分子、权利要求 11 所述的载体、权利要求 12 所述的宿主细胞、权利要求 14 所述的双特异性或多特异性分子或权利要求 15 所述的免疫缀合物，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂；

优选地，所述药物组合物还包含另外的药学活性剂；

优选地，所述另外的药学活性剂为免疫抑制剂；

优选地，所述另外的药学活性剂为用于治疗自身免疫性疾病、过敏性疾病、移植物抗宿主病、移植排斥或淋巴瘤的药物。

17. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 所述的分离的核酸分子、权利要求 11 所述的载体、权利要求 12 所述的宿主细胞、权利要求 14 所述的双特异性或多特异性分子、权利要求 15 所述的免疫缀合物或权利要求 16 所述的药物组合物在制备 PD-1 信号通路激活剂中的用途。

18. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 所述的分离的核酸分子、权利要求 11 所述的载体、权利要求 12 所述的宿主细胞、权利要求 14 所述的双特异性或多特异性分子、权利要求 15 所述的免疫缀合物或权利要求 16 所述的药物组合物在制备免疫抑制剂（例如 T 细胞活性抑制剂）中的用途。

19. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 所述的分离的核酸分子、权利要求 11 所述的载体、权利要求 12 所述的宿主细胞、权利要求 14 所述的双特异性或多特异性分子、权利要求 15 所述的免疫缀合物或权利要求 16 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于在受试者中预防和/或治疗自身免疫性疾病、过敏性

疾病、移植物抗宿主病、移植排斥或淋巴瘤；

优选地，所述自身免疫性疾病选自关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、狼疮、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、银屑病、白癜风、斑秃、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、I 型糖尿病、多发性硬化症、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、乳糜泄、硬皮病、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、强直性脊柱炎、重症肌无力、干燥综合症、IgA 肾病、IgG4 相关疾病(IgG4-Related Disease)、血管炎、ANCA 相关血管炎、葡萄膜炎、天疱疮、类天疱疮或自身免疫性溶血性贫血；

优选地，所述过敏性疾病选自特发性血小板减少性紫癜、特应性皮炎、哮喘、变态反应性鼻炎、药物变态反应、食物变态反应、过敏反应、变态反应性结膜炎、荨麻疹、嗜酸性粒细胞鼻窦炎、嗜酸性粒细胞消化器官疾病或变态反应性支气管肺曲霉病；

优选地，所述淋巴瘤为 T 细胞淋巴瘤；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人或非人灵长类（例如食蟹猴）；

优选地，所述抗体或其抗原结合片段单独使用，或与另外的药学活性剂联合使用；
优选地，所述另外的药学活性剂为免疫抑制剂；
优选地，所述另外的药学活性剂为用于治疗自身免疫性疾病、过敏性疾病、移植物抗宿主病、移植排斥或淋巴瘤的药物。

20. 缀合物，其包含权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，以及与所述抗体或其抗原结合片段连接的可检测的标记；

优选地，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物、鲁米诺及其衍生物、或钌衍生物）、荧光染料（例如荧光素或荧光蛋白）、放射性核素或生物素。

21. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 20 所述的缀合物在制备检测试剂中的用途，所述检测试剂用于检测 PD-1 在样品中的存在或其水平和/或诊断与 PD-1 相关的疾病；

优选地，所述与 PD-1 相关的疾病选自自身免疫性疾病、过敏性疾病、移植物抗宿主病、移植排斥、淋巴瘤或其任意组合；

优选地，所述与 PD-1 相关的疾病选自肿瘤。