PD-1 抗体、其抗原结合片段及其医药用途

技术领域

本发明涉及一种 PD-1 抗体，PD-1 的抗原结合片段，包含所述 PD-1 抗体 CDR 区的嵌合抗体、人源化抗体，以及包含 PD-1 抗体及其抗原结合片段的药物组合物，以及其作为抗癌药物的用途。

背景技术

肿瘤免疫治疗是肿瘤治疗领域一个长时间的热点，其中 T 细胞的肿瘤免疫治疗又处于其核心位置。肿瘤免疫治疗是充分利用、调动肿瘤患者体内的杀伤性 T 细胞，对肿瘤进行杀伤作用，它可能是最有效的也是最安全的治疗肿瘤的途径。与此同时，肿瘤逃逸是肿瘤免疫治疗面临的一个巨大障碍，肿瘤细胞利用其自身对免疫系统的抑制作用促进了肿瘤的快速生长。

肿瘤的免疫逃逸机制与机体对肿瘤的免疫应答之间存在着极为复杂的关系。肿瘤免疫治疗早期肿瘤特异性的杀伤性 T 细胞是有其生物活性的，但随着肿瘤生长后期失去了杀伤的功能。所以肿瘤免疫治疗是为了最大限度的提高患者自身对肿瘤的免疫系统反应，它不但要在体内激活原有的免疫系统反应，更要维持免疫系统反应的持续时间和反应强度，才是免疫治疗肿瘤的关键。

人体内 T 细胞的活化采取了两条信号通路的系统，除了需要通过抗原呈递细胞递呈 MHC-抗原肽给 T 细胞提供第一信号外，还需要一系列协同刺激分子提供第二信号，进而才能使 T 细胞产生正常的免疫应答。这个双信号通路系统对体内免疫系统的平衡起到着至关重要的作用，它严格调控着机体对自身和非自身抗原产生不同的免疫应答。如果缺少协同刺激分子提供的第二信号，将会导致 T 细胞的无应答或持续特异性免疫应答，从而产生耐受。因此，第二信号通路在机体免疫应答的整个过程中起着非常关键的调节作用。

程序性死亡分子 1 (programmed death-l , PD- l)是 1992 年发现的表达在 T 细胞表面的一个蛋白受体，参与到细胞的凋亡过程之中。PD-l 属于 CD28 家族，与细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4(cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA -4)具有 23%的氨基酸同源性，但其表达却与 CTLA 不同，主要表达在活化的 T 细胞、B 细胞和髓系细胞上。PD-1 有两个配体，分别为 PD-L1 和 PD-L2。PD-L1 的主要表达于 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)上，在活化后细胞上的表达能够进行上调。而 PD-L2 的表达相对较局限，主要表达在抗原呈递细胞上.，如活化的巨噬细胞和树突状细胞。

新的研究发现乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑素瘤等人类肿瘤组织中检测到高 PD-L1 蛋白的表达，且 PD-L1 的表达水平和患者的临床及预后紧密相关。

由于 PD-L1 起到着第二信号通路抑制 T 细胞增殖的作用，所以阻断 PD-L1 / PD-1 之间结合成为了肿瘤免疫治疗领域一个非常有潜力的新兴靶点。

目前有多家跨国制药公司在研发针对 PD-1 的单克隆抗体，它通过阻断 PD-L1 / PD-1 之间结合，最大限度的提高患者自身对肿瘤的免疫系统反应，从而达到对肿瘤细胞进行杀伤的目的。如 WO2009114335。BMS 公司和 Merck 公司的 PD-1 单克隆抗体在临床结果中，在非小细胞肺癌、黑素瘤和肾癌中都看到了一定的响应率，而且响应率和肿瘤 PD-L1 的表达有很高的关联性。这表明 PD-1 抗体对肿瘤有着积极疗效。

本发明提供有着高亲和力，高选择性，高生物活性的 PD-1 抗体。

发明内容

本发明提供一种 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其包含：

抗体轻链可变区，所述的抗体轻链可变区至少 1 个选自如以下序列所示的 LCDR：SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO: 8；和

抗体重链可变区，所述的抗体重链可变区至少 1 个选自如以下序列所示的 HCDR：SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明提供一种 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体轻链可变区包含如 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1 。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明提供一种 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体轻链可变区包含如 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR2。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明提供一种 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体轻链可变区包含如 SEQ ID NO:8 LCDR3 区。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明提供一种 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体重链可变区包含如 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明提供一种 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体重链可变区包含如 SEQ ID NO:4 所示的 HCDR2。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明提供一种 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体重链可变区包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR3。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明提供一种 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其所述的抗体轻链可变区包分别如 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1、 LCDR2 和 LCDR3。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明提供一种 PD-1 抗体或其抗原结合片段， 其所述的抗体重链可变区包含分别如 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1、 HCDR2 和 HCDR3。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明提供一种 PD-1 抗体或其抗原结合片

段，其中所述的抗体轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1、 LCDR2 和 LCDR3；且其中所述的抗体重链可变区包含分别如 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1、 HCDR2 和 HCDR3。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体为鼠源抗体或其片段。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的鼠源抗体或其片段，其抗体轻链可变区进一步包含鼠源 κ、λ 链或其变体的轻链 FR 区。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的鼠源抗体或其片段，其进一步包含鼠源 κ、λ 链或其变体的轻链恒定区。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的鼠源抗体或其片段，其抗体重链可变区进一步包含鼠源 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 或其变体的重链 FR 区。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的鼠源抗体或其片段，其进一步包含鼠源 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 或其变体的重链恒定区。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体为嵌合抗体或其片段。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 嵌合抗体或其片段，其中所述的嵌合抗体轻链可变区序列为：SEQ ID NO:10。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 嵌合抗体或其片段，其中所述的嵌合抗体重链可变区序列为：SEQ ID NO:9。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 嵌合抗体或其片段，其进一步包含人源 κ、λ 链或其变体的轻链恒定区。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 嵌合抗体或其片段，其进一步包含人源 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变后无 ADCC（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用）毒性的 IgG1。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体为人源化抗体或其片段。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 人源化抗体或其片段，其人源化抗体轻链可变区进一步包含人源 κ、λ 链或其变体的轻链 FR 区。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 人源化抗体或其片段，其中所述人源化抗体轻链可变区上的轻链 FR 区序列，来源于如 SEQ ID NO:14 所示的人种系轻链 IGKV1-39 和 JK4 的组合序列；其包含人种系轻链 IGKV1-39 的 FR1，FR2，FR3 区和 JK4 的 FR4 区。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 人源化抗体或其片段，其中所述人源化抗体轻链序列为如 SEQ ID NO:12 所示的序列，或其变体。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 人源化抗体或其片段，其中所述人源化抗体轻链可变区变体优选在轻链可变区有 0-10 的氨基酸变化；所述人源化抗体轻链可变区上的可变区序列变体的氨基酸变化优选为 A43S。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 人源化抗体或其片段，其进一步包含人源 κ、λ 链或其变体的轻链恒定区。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 人源化抗体或其片段，其人源化抗体重链可变区进一步包含人源 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 或其变体的重链 FR 区。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 人源化抗体或其片段，其中所述人源化抗体重链可变区上的重链 FR 区序列，来源于人种系重链 IgHV3-7 和 JH6 的组合序列 ：SEQ ID NO:13；包含人种系重链 IgHV3-7 的 FR1，FR2，FR3 区和 JH6 的 FR4 区。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 人源化抗体或其片段，其中所述人源化抗体重链序列为如 SEQ ID NO:11 所示的序列，或其变体；所述变体优选在重链可变区有 0-10 的氨基酸变化；更优选为 G44R 的氨基酸变化。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 人源化抗体或其片段，其进一步包含人源 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG2 或 IgG4 重链恒定区。因为 IgG2 或 IgG4 没有 ADCC 毒性，或者使用氨基酸突变后无 ADCC（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用）毒性的 IgG1。所述的变体优选 ADCC 效应功能降低或缺失的重链恒定区突变，更优选 IgG1 的 N297A，L234A，L235A； IgG2/4chimera，IgG4 的 F235E,或 L234A/E235A 突变。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗原结合片段为 Fab、Fv、sFv、$F(ab')_2$。

本发明进一步提供一种编码如上所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段的 DNA 分子。

本发明进一步提供一种含有如上所述的 DNA 分子的表达载体。

本发明进一步提供一种用如上所述的表达载体转化的宿主细胞。

在本发明一个优选的实施方案中，根据本发明提供的宿主细胞，其中所述的宿主细胞为细菌，优选为大肠杆菌。

在本发明一个优选的实施方案中，本发明提供的宿主细胞为酵母菌，优选为毕赤酵母。

本发明进一步提供一种药物组合物，其含有根据本发明所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段和可药用的赋形剂、稀释或载体。

本发明进一步提供一种根据本发明所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段、或包含其的的药物组合物，在制备用于治疗 PD-1 介导的疾病或病症的药物中的用途；

其中所述的疾病优选为癌症；更优选为表达 PD-L1 的癌症；所述的癌症最优选为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑素瘤；最优选为非小细胞肺癌、黑素瘤和肾癌。

本发明进一步提供一种治疗和预防 PD-1 介导的疾病或病症的方法，该方法包括给予所需患者治疗有效量的根据本发明所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段、或包含其的的药物组合物；其中所述的疾病优选为癌症；更优选为表达 PD-L1 的癌症；所述的癌症最优选为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌；最优选为非小细胞肺癌、黑素瘤和肾癌。

附图说明：

图 1 ： 人外周血单个核细胞增殖试验。显示待测PD-1抗体mAb005可以有效的刺激人外周血单个核细胞的增殖，EC50为83 ng/ml。

图 2： 人外周血单个核细胞细胞因子IFN-γ分泌试验。显示待测PD-1抗体mAb005可以在刺激PBMC增殖的同时，有效的刺激其细胞因子IFN-γ的分泌，EC50为13 ng/ml。

图3：本发明PD-1抗体H005-1对胶质瘤细胞生长的抑制效果。

图4：治疗后的肿瘤体积变化图。

图5：治疗后的小鼠体重变化图。

发明详述

一、术语

为了更容易理解本发明，以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义，否则本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

本发明所述的抗体指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM，IgD，IgG，IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链， δ 链 γ，α 链，ε 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1，IgG2，IgG3，IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中第每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

在本发明中，本发明所述的抗体轻链可变区可进一步包含轻链恒定区，所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ、λ 链或其变体。

在本发明中，本发明所述的抗体重链可变区可进一步包含重链恒定区，所述

的重链恒定区包含人源或鼠源的 IgG1, 2, 3, 4 或其变体。

抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区（V 区）；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区（C 区）。可变区包括 3 个高变区（HVR）和 4 个序列相对保守的骨架区（FR）。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区（CDR）。每条轻链可变区（LCVR）和重链可变区（HCVR）由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1，LCDR2，和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。发明所述的抗体或抗原结合片段的 LCVR 区和 HCVR 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号规则（LCDR1-3，HCDE2-3），或者符合 kabat 和 chothia 的编号规则（HCDR1）。

术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的对人 PD-1 的单克隆抗体。制备时用 PD-1 抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本发明一个优选的实施方案中，所述的鼠源 PD-1 抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源 κ、λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含鼠源 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区。

术语“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体，要选建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从小鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再要据需要克隆人抗体的恒定区基因，将小鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入人载体中，最后在真核工业系统或原核工业系统中表达嵌合抗体分子。在本发明一个优选的实施方案中，所述的 PD-1 嵌合抗体的抗体轻链可变区进一步包含鼠源 κ、λ 链或其变体的轻链 FR 区，抗体轻链可变区序列如 SEQ ID NO:10 所示。所述的 PD-1 嵌合抗体的抗体重链可变区进一步包含鼠源 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 或其变体的重链 FR 区，抗体重链可变区序列如 SEQ ID NO:10 所示。人抗体的恒定区可选自人源 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变后无 ADCC（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用）毒性的 IgG1。

术语“人源化抗体（humanized antibody）”，也称为 CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody），是指将小鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量小鼠蛋白成分，从而诱导的强烈的抗体可变抗体反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库（在因特网 www.mrccpe.com.ac.uk/vbase 可获得），以及在 Kabat，E.A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版中找到。在本发明一个优选的实施方

案中，所述的PD-1人源化抗体小鼠的CDR序列选自SEQ ID NO:3，4，5，6，7，8。人的抗体可变区框架经过设计选择，其中所述抗体轻链可变区上的轻链FR区序列，来源于人种系轻链IGKV1-39和JK4的组合序列：SEQ ID NO:14，包含人种系轻链IGKV1-39的FR1，FR2，FR3区和JK4的FR4区；其中所述抗体重链可变区上的重链FR区序列，来源于人种系重链IgHV3-7和JH6的组合序列：SEQ ID NO:13；包含人种系重链IgHV3-7的FR1，FR2，FR3区和JH6的FR4区。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区可进行最少反向突变，以保持活性。

本发明中所述的“抗原结合片段”，指具有抗原结合活性的Fab片段，Fab‘片段，F（ab’）2片段，以及与人PD-1结合的Fv片段sFv片段；包含本发明所述抗体的选自SEQ ID NO:3至SEQ ID NO:8中的一个或多个CDR区。Fv片段含有抗体重链可变区和轻链可变区，但没有恒定区，并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般地，Fv抗体还包含在VH和VL结构域之间的多肽接头，且能够形成抗原结合所需的结构。也可以用不同的连接物将两个抗体可变区连接成一条多肽链，称为单链抗体（single chain antibody）或单链Fv（sFv）。本发明的术语“与PD-1结合”，指能与人PD-1相互作用。本发明的术语“抗原结合位点”指抗原上不连续的，由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

本发明中所述的“ADCC”，即antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用，是指表达Fc受体的细胞通过识别抗体的Fc段直接杀伤被抗体包被的靶细胞。可通过对IgG上Fc段的修饰，降低或消除抗体的ADCC效应功能。所述的修饰指在抗体的重链恒定区进行突变，如选自IgG1的N297A，L234A，L235A； IgG2/4chimera，IgG4的F235E,或L234A/E235A突变。

本发明中所述的融合蛋白是一种通过DNA重组，得到的两个基因共表达的蛋白产物。重组PD-1胞外区Fc融合蛋白通过DNA重组，把PD-1胞外区和人抗体Fc片段共表达的融合蛋白。所述的PD-1胞外区，是指PD-1蛋白表达在细胞膜以外的部分，序列见下面SEQID NO:1划线区。

生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法在现有技术中熟知和能找到，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8章和15章。如，小鼠可以用人PD-1或其片段免疫，所得到的抗体能被复性，纯化，并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个人FR区。人FR种系序列可以从ImMunoGeneTics(IMGT)的网站http://imgt.cines.fr得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001ISBN012441351上获得。具体的，本发明所述的抗体或抗原结合片段所用的轻链FR种系包括A3和O2。本发明所述的抗体或抗原结合片段所用的具体的种系重链FR包括VH3-21和VH3-23。

本发明工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码

重链（SEQID NO：11）和轻链（SEQID NO：12）的CDNA序列，可以克隆并重组至GS表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染CHO细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在FC区的高度保守N端。通过表达与人PCSK9特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如，用含调整过的缓冲液的A或G Sepharose FF柱进行过柱。洗去非特异性结合的组分。再用PH梯度法洗脱结合的抗体，用SDS-PAGE检测抗体片段，收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛，离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

本发明的抗体指单克隆抗体。本发明所述的单克隆抗体或mAb，指由单一的克隆细胞株得到的抗体，所述的细胞株不限于真核的，原核的或噬菌体的克隆细胞株。单克隆抗体或抗原结合片段可以用如杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术，合成技术（如CDR-grafting），或其它现有技术进行重组得到。

“给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，诸如包含本发明的任一种结合化合物的组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床右测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽本发明的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个患都有的目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如Student t检验、卡方检验、依据Mann和Whitney的U检验、Kruskal-Wallis检验（H检验）、Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon检验确定，其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使

得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene,The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页，（第 4 版））。另外，结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。

整个说明书和权利要求书中使用的术语“基本上由……组成”或其变形表示包括所有所述元件或元件组，并且任选包括与所述元件类似或不同性质的其它元件，所述其它元件非显著改变指定给药方案、方法或组合物的基本性质或新性质。作为非限制性例子，基本上由所提及的氨基酸序列组成的结合化合物还可以包括一种或多种氨基酸，其不显著影响结合化合物的性质。

“有效量”包含足以改善或预防医字病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

“外源性”指要据背景在生物、细胞或人体外产生的物质。“内源性”指根据背景在细胞、生物或人体内产生的物质。

“同源性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源怀百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括后代。因此，单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物，而不考虑转移数目。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下，其由上下文清楚可见。

本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美国专利号 4,683,195 中所述扩增的程序或技术。一般来说，需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息，使得可以设计寡核苷酸引物；这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2 个引物的 5’末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR 可用于扩增特定的 RNA 序列、来自总基因组 DNA 的特定 DNA 序列和由总细胞 RNA 转录的 cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见 Mullis 等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Ouant. Biol. 51:263; Erlich 编辑，

(1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被视为用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个实例，但不是唯一的实例，所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶，以扩增或产生核酸的特定部分。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

具体实施方式

以下结合实施例进一步描述本发明，但这些实施例并非限制着本发明的范围。本发明实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1：抗体的制备

生成针对人PD-1 的鼠源单克隆抗体，用纯化的重组PD-1胞外区Fc融合蛋白（PD-1 Fc）(SEQID NO:1)；或PD-1 (SEQID NO:2)转染的CHO 细胞作为抗原，免疫Balb/C小鼠和SJL小鼠。人PD-1抗原购自ORIGENE ,货号SC117011， NCBI Reference Sequence: NM_005018.1。

PD-1 Fc，重组 PD-1 胞外区 Fc 融合蛋白 (SEQ ID NO：1)：

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRCPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATF
TCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF
HMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR
PAGQFQTLVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

PD-1，转染细胞的 PD-1 抗原(SEQ ID NO：2)：

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT
CSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH
MSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRP
AGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAV
PVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGP
RSAQPLRPEDGHCSWPL。

对于使用PD-1胞外区Fc融合蛋白的免疫，使用的纯化抗原分别为高剂量（50ug）和低剂量(10ug)， PD-1 转染的CHO 细胞免疫为0.5-1×10^7个细胞。用完全弗氏佐剂分别于第0,14,35天进行3次免疫，通过眼窝后放血监测免疫应答。通过ELISA 筛选血浆，获取有抗PD-1 人免疫球蛋白滴度的小鼠。于第56天，对有最高的抗PD-1 人免疫球蛋白滴度的小鼠进行加强免疫。3天后，处死小鼠并取出脾来进行融合。融合后的杂交瘤细胞进行抗体筛选，得到鼠单抗mAb005。鼠单抗mAb005的重链和轻链可变区序列如下：

mAb005 HCVR

EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYMMSWVRQTPEKRLEWVATISG GGANTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTALYYCARQLYYFDYW GQGTTLTVSS SEQID NO：9

mAb005 LCVR

DIQMTQSPASQSASLGEGVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKSPQLLIYTATSLA DGVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVTYYCQQVYSIPWTFGGGTKLEIK SEQID NO：10

其含有下列CDR序列：

名称	序列	编号
HCDR1	SYMMS	SEQID NO：3
HCDR2	TISGGGANTYYPDSVKG	SEQID NO：4
HCDR3	QLYYFDY	SEQID NO：5
LCDR1	LASQTIGTWLT	SEQID NO：6
LCDR2	TATSLAD	SEQID NO：7
LCDR3	QQVYSIPWT	SEQID NO：8

实施例2：抗体的筛选

PD-1抗体体外ELISA结合实验：

PD-1抗体是通过和PD-1胞外区的结合，从而阻断PD-1和其配体的信号通路。体外的ELISA实验被用来检测PD-1抗体的结合特性。生物素标记的PD-1胞外区FC融合蛋白(PD-1 FC)通过和中和亲和素的结合，包被到96孔板中，抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和PD-1的结合特性。

用PBS缓冲液将用于和生物素结合的中和亲和素稀释至1μg/ml，以100μl/孔的体积加于96孔板中，于4℃放置16h-20h。将96孔板中PBS缓冲液吸掉，用PBST（PH7.4 PBS 含0.05% tweeen20）缓冲液洗板1次后，加入120μl/孔 PBST/1% milk，室温孵育1h进行封闭。移去封闭液，用PBST缓冲液洗板1次后，加入用PBST/1% milk稀释的1μg/ml的生物素标记 PD1-FC，置室温孵育1h。移去封闭液，用PBST缓冲液洗板3次后，加入用 PBST/1% milk稀释至合适浓度的待测PD-1抗体，置室

温孵育1.5h。移去反应体系，用PBST洗板3次后，以100μl/孔加入用 PBST/1% milk稀释HRP标记的抗鼠抗体二抗（The Jackson Laboratory），室温孵育1h。用PBST洗板3次后，加入100μl/孔TMB，于室温孵育5-10min。加入100μl/孔 1M H_2SO_4终止反应。用 NOVOStar 酶标仪在 450nm 处读取吸收值，计算ELISA结合EC_{50}值。

待测抗体	ELISA, EC50,nM	
	human PD-1	cyno PD-1
mAb005	0.25	0.27

结合结果显示抗体mAb005对人源PD-1 Fc（human PD-1）和食蟹猴PD-1 Fc（cyno PD-1）都有着非常高的结合活性。

PD-1抗体体外PD-1配体结合阻断实验：

肿瘤细胞表面的PD-L1通过和T细胞表面的PD-1的结合，从而对T细胞的增殖起到抑制的效果。PD-1的抗体能通过和PD-1的结合，而阻断PD-L1/PD-1的信号通路，进而刺激T细胞的增殖。PD-1/PD-L1的结合阻断实验用于检测PD-1抗体对于信号通路的阻断活性。

本实验中，将胞外区与FC融合的PD-1蛋白（PD-1-FC）包被96孔板后，加入待测的PD-1抗体，进行孵育反应；稍后再加入生物素标记的PD-L1，孵育反应。洗板后，检测生物素标记的PD-L1结合量，计算得到PD-1抗体对配体PD-L1结合阻断的IC_{50}值。

用PH 9.6 CB 缓冲液（1.59g Na_2CO_3和2.93g $NaHCO_3$溶于 1L 蒸馏水）将PD-1-FC 稀释至1μg/ml，以100μl/孔的体积加于96孔板中，于4℃放置16h-20h。将96孔板中PBS缓冲液吸掉，用 PBST（PH7.4 PBS含0.05% tweeen20）缓冲液洗板1次后，加入120μl/孔PBST/1% milk，室温孵育1h进行封闭。移去封闭液，用PBST缓冲液洗板1次后，加入90μl 用样品稀释液（PH7.4 PBS含5%BSA，0.05% Tween20）稀释至合适浓度的待测PD-1抗体，置4℃预孵育1h。以10μl/孔的体积加入10×浓度的生物素标记 PD-L1（北京义翘神州生物技术有限公司）（10μg/ml），在振荡器上振荡、混匀后，置37℃孵育1h。移去反应体系，用PBST洗板6次后，加入100ul/孔用 PBST 缓冲液1:400稀释的 Streptavidin – Peroxidase Polymer，室温振荡孵育50分钟。用 PBST洗板6次后，加入100μl/孔TMB，于室温孵育5-10min。加入100μl/孔 1M H_2SO_4终止反应。用NOVOStar 酶标仪在450nm处读取吸收值，计算PD-1抗体对配体PD-L1结合阻断的IC_{50}值。

待测抗体	LBB assay
	IC50,nM
mAb005	1.13

实验结果显示抗体mAb005能非常有效的阻断PD-L1与PD-1之间的结合。

实施例3：PD-1抗体体外结合选择性实验

为检测PD-1抗体对于PD-1同一家族其他蛋白的特异结合活性，human CTLA4, human CD28被用于进行结合检测。同时，为了检测PD-1抗体对于人/猴以外的不同种属的差异性，小鼠的PD-1也进行了结合检测。

用PBS缓冲液将选择性结合蛋白：human PD-1, human ICOS，human CTLA4, human CD28, mouse PD-1，（北京义翘神州生物技术有限公司），稀释至 1μg/ml，以 100μl/孔的体积加于96孔板中，于4℃放置16h-20h。将96孔板中PBS缓冲液吸掉，用 PBST（PH7.4 PBS含0.05% tweeen20）缓冲液洗板1次后，加入120μl/孔 PBST/1% milk，室温孵育1h进行封闭。移去封闭液，用PBST缓冲液洗板3次后，加入待测PD-1抗体，置室温孵育1.5h。移去反应体系，用PBST洗板3次后，以100μl/孔加入用 PBST/1% milk稀释HRP标记的抗鼠抗体二抗（The Jackson Laboratory），室温孵育1小时。用PBST洗板3次后，加入 100μl/孔TMB，于室温孵育5-10min。加入100μl/孔 1M H_2SO_4终止反应。用 NOVOStar酶标仪在450nm处读取吸收值。

待测抗体	human PD1-FC	mouse PD1-Fc	human ICOS/Fc	human CTLA4	human CD28
mAb005	2.64	0.07	0.15	0.17	0.12

结果显示，抗体mAb005对PD-1家族的其他蛋白没有特异的结合活性。同时，mAb对鼠源的PD-1也没有种属交叉活性。

实施例4：PD-1抗体体外细胞结合实验

FACS （fluorescence-activated cell sorter 荧光活性细胞分选）是一个用于检测蛋白和细胞结合的试验方法。本测试用于检测本发明的PD-1抗体和细胞表面表达的天然PD-1结合活性。本测试所用的细胞为PD-1高表达的CHO细胞（见实施例1中，PD-1 (SEQID NO:2)转染的CHO 细胞）。

将PD-1高表达的CHO细胞以1000 rpm的转速离心5分钟，收集沉淀并用10-15 ml的预冷的流式缓冲液悬浮，细胞计数。用50ml的离心管中以1000 rpm的转速离心5分钟收集细胞，丢掉上清，沉淀用预冷封闭缓冲液重悬，密度为0.5-1.0×10^7 细胞/毫升。于4℃ 孵育30分钟后，重悬以每孔100μl加入到96孔板。96孔板在1500rpm的转速下离心5分钟后，弃上清。向每个孔加入100μl一抗，将细胞重悬，4℃ 避光孵育60分钟。离心弃上清，加入100μl的 1:400稀释的FITC标记二抗（BD Biosciences）。将细胞重悬，4℃避光孵育60分钟。用流式缓冲液洗两次细胞，并用1%的多聚甲醛重悬细胞进行固定，进行流式检测。

待测抗体	MFI			
	50nM	**5nM**	**0.5nM**	**0.05nM**
mAb005	468	319	71.2	14

结果显示抗体mAb005同样可以结合细胞表面的PD-1。

实施例5：体外结合亲和力和动力学实验

Biacore方法是一个公认的客观检测蛋白相互间亲和力和动力学的检测方法。我们通过Biacore（GE）分析本发明待测PD-1 抗体表征亲和力及结合动力学。

利用由 Biacore 提供的试剂盒，采用标准氨基偶联法将本发明待测PD-1抗体共价连接至CM5（GE）芯片上。然后将将稀释于同样缓冲液中的一系列浓度梯度的PD-1 His蛋白(北京义翘神州生物技术有限公司)于前后各个循环进样，进样后均以试剂盒内配再生试剂再生。追踪抗原-抗体结合动力学3分钟并追踪解离动力学10分钟。使用 GE 的 BIAevaluation软件以1:1（Langmuir）结合模型分析所得数据，以此法测定的ka (kon)、kd (koff)和KD值显示于下表。

待测抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
mAb005	1.057E+5	3.769E-4	3.566E-9

结果显示抗体mAb005对PD-1的结合达到了Kd 3.57 nM。

实施例6：体外细胞学实验

新鲜人外周血单个核细胞（PBMC）在抗体作用下的增殖试验，用来对抗体mAb005进行细胞活性的检测。

新鲜人PBMC调整细胞密度为2×10^6/ml，每孔2ml接种于6孔板，37 ℃, 5%CO_2培养箱中放置6小时，将悬浮细胞吸走，向贴壁细胞中加入2ml含有100ng/ml GM-CSF（粒细胞集落刺激生物因子） 和 100 ng/ml IL-4 的 RPMI1640培养基，培养2天后每孔再加入1ml含有100ng/ml GM-CSF 和100 ng/ml IL-4的RPMI1640培养基，继续培养2天后，每孔加入100ng/ml TNF-α（肿瘤坏死因子-a），继续培养2天得到成熟树突细胞。将上述树突细胞及同种异体的T 细胞分别离心重悬成浓度为1×10^6/ml 和1×10^5/ml，于96孔板中每孔各加入100μl，抗体用PBS按一定倍数稀释成不同浓度梯度96孔板中每孔加入20μl，37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养5天，取100μl用CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay试剂盒检测细胞增殖， 结果见图1，显示待测PD-1抗体mAb005可以有效的刺激人外周血单个核细胞的增殖，EC50为83 ng/ml。剩余样品检测细胞因子IFN-γ的分泌，结果见图2，显示待测PD-1抗体mAb005可以在刺激PBMC增殖的同时，有效的刺激其细胞因子IFN-γ的分泌，EC50为13 ng/ml。

实施例7：小鼠抗体人源化实验

参照mAb005的抗体轻链可变区序列（mAb005 LCVR，SEQID NO：10）和重链可变区序列（mAb005 HCVR，SEQID NO：9）， 在Germline数据库中选取与其非CDR区匹配最好的人源化模板。其中抗体重链的模版为IgHV3-7/JH6，选择人种系轻链IGKV1-39的FR1，FR2，FR3，和JK4的FR4区，序列为SEQ ID NO：13；轻链的模版为IGKV1-39/JK4，选择人种系轻链IGKV1-39的FR1，FR2，FR3，和JK4的FR4，序列为SEQ ID NO：14。

人种系重链模版（SEQ ID NO：13）：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGQGTTVTVSS；

人种系轻链模板（SEQ ID NO：14）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFGGGTKVEIK。

将鼠源抗体CDR区移植到选择的人源化模板上，替换人源模板的CDR区，再与IgG4恒定区重组，得到人源化的抗体H005-1。然后，以鼠源抗体的三维结构为基础，对包埋残基、与CDR区有直接相互作用的残基，以及对VL和VH的构象有重要影响的残基进行回复突变，得到人源化之后的抗体H005-2，H005-3，H005-4，序列见下表。

抗体表达

H005-1 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGANTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQID NO：11

H005-1 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAPKLLIYTATSLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQID NO：12

鼠源CDR区移植的人源化抗体H005-1的HC序列为（SEQID NO：11），人源化抗体LC序列为（SEQID NO：12）。对可能影响抗体活性的位点进行点突变，其序列为：

	HC	LC
H005-1	SEQID NO：11	SEQID NO：12
H005-2	SEQID NO：11, G44R	SEQID NO：12
H005-3	SEQID NO：11	SEQID NO：12 ,A43S
H005-4	SEQID NO：11 ,G44R	SEQID NO：12 ,A43S

根据各人源化抗体轻链和重链的氨基酸序列(SEQ NO 11, SEQ NO 12及其变体)合成cDNA，用BamHI和XhoI消化后，将cDNA片段通过BamHI / XhoI酶切位点插入到pcDNA3.1表达载体（Life Technologies Cat. No. V790-20 ）中。将表达载体和转染试剂PEI（Polysciences, Inc. Cat. No. 23966）以1:2 的比例转染HEK293细胞（Life Technologies Cat. No. 11625019），并置于CO_2孵育箱中孵育4-5天。表达的抗体通过离心回收后，按常规方法进行抗体纯化，得到本发明的人源化抗体。

实施例8：人源化抗体活性数据

对人源化的抗体在体外进行了ELISA结合实验（方法步骤同实施例2），配体结合阻断实验（方法步骤同实施例2），亲和力动力学实验（方法步骤同实施例5），结果显示于下表：

待测抗体	ELISA, EC50,nM	LBB assay, IC50,nM	KD(M)
H005-1	0.11	1.27	2.79E-09
H005-2	0.14	1.27	2.98E-09
H005-3	0.15	1.33	2.45E-09
H005-4	0.14	1.36	3.89E-09

试验结果显示人源化的抗体 H005-1, H005-2, H005-3, H005-4 都保持了和 PD-1 的结合活性，它们的亲和力动力学 KD 分别为 2.79，2.98,2.45,3.89 nM。同时所有人源化抗体也能有效的对 PD-L1/PD-1 通路产生阻断活性。

实施例 9 ：PD-1 抗体对肿瘤细胞生长的抑制

一、实验材料：

U87MG 细胞（胶质瘤细胞）：购自中科院细胞库，货号 TCHu138；

PBMC 细胞(外周血单个核细胞)来自上海血液中心；

CD3: 购自 Miltenyi Biotec 货号 130-093-387；

CD28: 购自 Miltenyi Biotec 货号 130-093-375；

Cell Counting Kit-8：购自同仁化学，货号 CK04 ；

mIgG(阴性对照)：购自 SANTA CRUZ 货号：sc-2025；使用浓度为 1660ng/ml。

二、实验方法：

1. U87MG 细胞培养在含有 10% FBS、1% P/S 的 EMEM 培养基中，96 孔板中每孔加入 1×10^4 个细胞。

2. 抗体 H005-1 用 PBS 按一定倍数稀释成不同浓度梯度(如图 3 横坐标所示)，96 孔板中每孔加入 10ul，37℃、5%CO_2 培养箱中培养 4 小时。

3. 细胞贴壁后每孔加入 80ul PBMC 细胞悬液，细胞密度为 2×10^4 个/孔，每孔分别加入 10ul CD3 和 CD28 抗体，CD3 和 CD28 抗体终浓度均为 500ng/ml。

4. 37℃，5% CO_2 培养箱中培养 72 小时，每孔加入 10ul CCK8 显色，2 小时后检测 OD450。

三、实验结果：

结果如图 3 所示，与 mIgG(阴性对照)相比，不同浓度 PD-1 抗体（H005-1）对 U87MG 细胞生长有明显的抑制效果，最高浓度抑制率约为 30%。

实施例 10：H005-1对结核菌素刺激的PBMC增殖活性

对人源化的抗体 H005-1 在体外对结核菌素刺激的 PBMC 的增殖活性进行检测。

取 15ml 新鲜 PBMC 细胞，约 3×10^7 个，加入 20μl 结核菌素(上海碧优生物科技，cat#97-8800)，37℃、5% CO_2 培养箱培养 5 天。第 6 天，取上述培养的细胞离心，重悬至新鲜的培养基中，调整密度为 5×10^5 个/ml。在 96 孔细胞培养板中加入 190μl 重悬后的细胞，将人源化抗体 H005-1 加入上述 96 孔细胞培养板的对应孔中，每孔 10μl，对照组和空白组分别加入 10μl PBS。细胞培养板置于 37℃，5% CO_2 培养箱孵育 72 小时后检测 PBMC 细胞增殖(Promega，cat#G7571)和 IFN-γ 的分泌(Neo Bioscience，cat#EHC102g)。结果如下：

受试样品对结核菌素刺激的 PBMC 增殖和 IFN-γ 分泌的激活作用

Sample	T cell proliferation EC50(ng/ml)	IFN-λ EC50(ng/ml)
H005-1	15.95±17.15	56.87±48.53

注：n=4

实验结果显示人源化的抗体 H005-1 可以很好的激活外源结核菌素刺激下的 PBMC 的增殖以及 IFN-γ 的分泌。

实施例 11：H005-1对U-87MG皮下移植瘤抑制实验

将 U87 细胞（5×10^6 个）100 ul 接种于 SCID-Beige 小鼠右肋部皮下，待 7-10 d 肿瘤长至 80-100 mm^3 后，去除体重、肿瘤过大和过小的，按肿瘤体积将小鼠随机分为 H005-1 10 mg/kg 组和 Human IgG 10 mg/kg 组，每组 7 只（D0）。将经 CD3 抗体刺激 3 天的两种 PBMC 以 1:1 比例混合，以 5×10^5 cells/60 ul 量注射到肿瘤组织中，并开始皮下注射抗体，7 天一次，共给药 3 次。每周测 2 次瘤体积，称鼠重，记录数据。肿瘤体积（V）计算公式为：V＝1/2×a×b2； 其中 a、b 分别表示长、宽。

结果见图 4：治疗后的肿瘤体积变化图，和图 5：治疗后的鼠重变化图，显示抗体 H005-1 可以很好的抑制肿瘤 U87MG 的生长，而且对小鼠的体重没有任何的影响。

权利要求书：

1、一种 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其包含：

抗体轻链可变区，所述的抗体轻链可变区包含至少 1 个选自如以下序列所示的 LCDR：SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO: 8；和

抗体重链可变区，所述的抗体重链可变区包含至少 1 个选自如以下序列所述的 HCDR：SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5。

2、如权利要求 1 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体轻链可变区包含如 SEQ ID NO:6 所示的 LCDR1。

3、如权利要求 1 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体轻链可变区包含如 SEQ ID NO:7 所示的 LCDR2。

4、如权利要求 1 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体轻链可变区包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR3。

5、如权利要求 1 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体重链可变区包含如 SEQ ID NO:3 所示的 HCDR1。

6、如权利要求 1 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体重链可变区包含如 SEQ ID NO:4 所示的 HCDR2。

7、如权利要求 1 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体重链可变区包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR3。

8、如权利要求 1 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段， 其中所述的抗体轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

9、如权利要求 1 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段， 其中所述的抗体重链可变区包含分别如 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

10、如权利要求 1 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；且其中所述的抗体重链可变区包含分别如 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1、 HCDR2 和 HCDR3。

11、如权利要求 1-10 任一项所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体或其片段。

12、如权利要求 1-10 任一项所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体或其抗原结合片段为嵌合抗体或其片段。

13、如权利要求 12 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的嵌合抗体轻链可变区序列为：SEQ ID NO: 10。

14、如权利要求 12 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的嵌合抗体重链可变区序列为：SEQ ID NO:9。

15、如权利要求 1-10 任一项所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或其片段。

16、如权利要求 15 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体轻链可变区上的轻链 FR 区序列，来源于如 SEQ ID NO:14 所示的人种系轻链 IGKV1-39 和 JK4 的组合序列;其包含人种系轻链 IGKV1-39 的 FR1，FR2，FR3 区和 JK4 的 FR4 区。

17、如权利要求 15 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体轻链序列为如 SEQ ID NO:12 所示的序列或其变体；所述的变体优选在轻链可变区有 0-10 的氨基酸变化；更优选为 A43S 的氨基酸变化。

18、如权利要求 15 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体重链可变区进一步包含人源 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 或其变体的重链 FR 区，优选包含人源 IgG2 或 IgG4 重链 FR 区。

19、如权利要求 15 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体重链可变区上的重链 FR 区序列，来源于如 SEQ ID NO:13 所示的人种系重链 IgHV3-7 和 JH6 的组合序列；其包含人种系重链 IgHV3-7 的 FR1， FR2，FR3 区和 JH6 的 FR4 区。

20、如权利要求 15 所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体重链序列为如 SEQ ID NO:11 所示的序列或其变体；所述变体优选在重链可变区有 0-10 的氨基酸变化；更优选为 G44R 的氨基酸变化。

21、一种编码如权利要求 1-20 任一项所述的抗体的 DNA 分子。

22、一种含有如权利要求 21 所述的 DNA 分子的表达载体。

23、一种用如权利要求 22 所述的表达载体转化的宿主细胞。

24、如权利要求 23 所述的宿主细胞，其中所述的宿主细胞为细菌，优选为大肠杆菌。

25、如权利要求 23 所述的宿主细胞，其中所述的宿主细胞为酵母菌，优选为毕赤酵母。

26、一种药物组合物，其含有如权利要求 1 至 20 任一项所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段和可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

27、如权利要求 1 至 20 任一项所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段、如权利要求 26 所述的药物组合物，在制备用于治疗 PD-1 介导的疾病或病症的药物中的用途，其中所述的疾病或病症优选为癌症；更优选为表达 PD-L1 的癌症；最优选为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑素瘤、非小细胞肺癌；最优选为非小细胞肺癌、黑素瘤和肾癌。