PD-1 结合蛋白及医药用途

技术领域

本公开涉及 PD-1 结合蛋白，具体涉及抗 PD-1 抗体及其用于治疗炎性或自身免疫性疾病的方法和制药用途。

背景技术

程序性死亡 1(Programmed Cell death-1，PD-1) (也称为程序性细胞死亡 1)是一种 268 个氨基酸的 I 型跨膜蛋白，属于 CD28/CTLA-4 家族 T 细胞调节剂的成员，是主要表达于 T 细胞以及其他免疫细胞上的细胞表面受体蛋白质。PD-1 具有两种配位体 PD-L1 及 PD-L2，其与细胞表面受体相互作用。PD-1 与其配体 PD-L1 或 PD-L2 结合后，会下调 T 细胞的功能，包括降低 T 细胞的活化、分化、增殖和细胞因子的分泌等。

PD-1 通路为免疫系统天然存在的负反馈调节机制，通过激活 PD-1 通路治疗免疫障碍的机制新颖，同时具有广泛的疾病治疗潜力。本公开提供了高结构的抗 PD-1 抗体，更好的激活 PD-1 信号通路，抑制 T 细胞活性，从而提高治疗 T 细胞介导的炎性或自身免疫性疾病的效果。

发明内容

本公开提供了 PD-1 结合蛋白及其编码核酸、载体、宿主细胞、药物组合物，及其用于治疗炎性或自身免疫性疾病的方法和相关制药用途。

PD-1 结合蛋白

一方面，本公开提供 PD-1 结合蛋白，其包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO：2 和 24-29 中任一项所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。所述免疫球蛋白单一可变结构是特异性结合 PD-1 蛋白或其表位。

一些实施方案中，提供 PD-1 结合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 包含分别如 SEQ ID NO：3-5 所示的氨基酸序列。其是根据 Kabat 编号系统定义的 CDR。

一些实施方案中，所述 PD-1 结合蛋白中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含前述 CDR1、CDR2 和 CDR3 中任意 1 个、2 个或 3 个的组合。

一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域为骆驼来源的；一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO:2 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域为人源化改造和/或亲和力

成熟改造的。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白中所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO：24-29 中任一所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO:27 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白中所述免疫球蛋白单一可变结构域与 SEQ ID NO：24-29 任一相比有一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个等)氨基酸突变。

一些具体的实施方案中，上述氨基酸突变为氨基酸的替换、取代、修饰、缺失和/或添加(例如氨基酸的保守性置换)，所述突变不影响或基本不影响特异性结合 PD-1 的功能。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白中包含或为特异性结合 PD-1 蛋白或其表位的抗体。一些具体实施方案中，所述抗体为骆驼抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白为线性抗体、单链抗体、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体、多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二- scFv、串联三-scFv)或前述任一种的抗原结合片段、缀合物。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域是单域抗体或 VHH。

一些实施方案中，本公开提供 PD-1 结合蛋白，其包含一个或多个(例如 2、3、4、5、6、7、8 个)前述免疫球蛋白单一可变结构域，其中任意两个所述免疫球蛋白单一可变结构域可以是相同或不同的，可以形成二聚体或多聚体分子。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白还包含免疫球蛋白 Fc 区。一些实施方案中，所述 PD-1 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区。例如，所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 区。本公开中的 PD-1 结合蛋白可以具有野生型 IgG 或其变体的 Fc 区。

一些实施方案中，所述 Fc 有 C220 位突变，例如 C220A。

一些实施方案中，所述 Fc 区是增加效应器功能的 Fc 区，例如，增加抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)具有增加的效应子功能的。

示例性 IgG1 Fc 区包括具有以下取代：239D；239E；239K， 241A； 262A；264D； 264L； 264A； 264S； 265A； 265S；265V；296A；296A；301A；332E；239D/332E；239D/330S/332E；239D/330L/332E；298A/333A/334A；247I/339D；247I/339Q；280H/290S；280H/290S/298D；280H/290S/298V；243L/292P/300L；243L/292P/300L/396L；243L/292P/300L/305I/396L；236A/239D/332E；326A/333A；

326W/333S； 290E/298G/299A； 290N/298G/299A； 290E/298G/299A/326E； 或290N/298G/299A/326E；或任何上述位置的任意组合。所述突变根据 EU 编号系统定义。

示例性 IgG1 Fc 区包括具有以下取代：S239D；S239E；S239K，F241A；V262A；V264D；V264L；V264A；V264S；D265A；D265S；D265V；F296A；Y296A；R301A； I332E； S239D/I332E； S239D/A330S/I332E； S239D/A330L/I332E； S298A/D333A/K334A ； P247I/A339D ； P247I/A339Q ； D280H/K290S ； D280H/K290S/S298D ； D280H/K290S/S298V ； F243L/R292P/Y300L ； F243L/R292P/Y300L/P396L ； F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L ； G236A/S239D/I332E； K326A/E333A； K326W/E333S； K290E/S298G/T299A； K290N/S298G/T299A ； K290E/S298G/T299A/K326E ； 或K290N/S298G/T299A/K326E，或任何上述位置的任意组合。

一些实施方案中，所述 Fc 区是减弱效应器功能的 Fc 区，例如，减弱的 ADCC、ADCP 和/或 CDC。具有减少的效应子功能的示例性 Fc 区包括具有以下取代的那些： N297A 或 N297Q(IgG1)； L234A/L235A(IgG1)； V234A/G237A(IgG2)；L235A/G237A/E318A(IgG4) ； H268Q/V309L/A330S/A331S(IgG2) ；C220S/C226S/C229S/P238S(IgG1) ； C226S/C229S/E233P/L234V/L235A(IgG1) ；L234F/L235E/P331S(IgG1)；或 S267E/L328F(IgG1)。

一些实施方案中，Fc 区为带有 C220A 突变的人 IgG1-Fc。

一些实施方案中，Fc 区包含如 SEQ ID NO：6 或 45 所示的氨基酸序列。一些具体的实施方案中，所述 PD-1 结合蛋白包含如 SEQ ID NO：6 所示的 Fc 区。

一些实施方案中，提供 PD-1 结合蛋白，其包含如 SEQ ID NO：7 或 30、48 任一项所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。在一些具体实施方案中，所述 PD-1 结合蛋白包含如 SEQ ID NO：30 所示的氨基酸序列。

一些实施方案中，提供抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其与前述本公开的 PD-1 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域结合或竞争结合相同的表位。

一些实施方案中，提供抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其不与前述本公开的 PD-1 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域结合或竞争结合相同的表位。

一些实施方案中，提供抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其阻断前述本公开的 PD-1 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域与 PD-1(例如人 PD-1)的结合。

一些实施方案中，提供抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其与 PD-1(例如人 PD-1)的结合被前述本公开的 PD-1 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域阻断。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白，具有选自以下至少一项的活性：

(a) 以≤10^{-7} 的 K_D 值与人 PD-1 或其表位结合；

(b) 不会阻断或几乎不阻断 PD-L1 与 PD-1 的信号通路；

(c) 激活 PD-1 信号通路；

(d) 抑制 T 细胞释放细胞因子的活性，例如抑制 T 细胞分泌 IFNγ 的活性；

(e) 抑制 T 细胞增殖，例如抑制记忆 CD8+T 细胞增殖；

(f) 减少表达 PD-1 的 T 细胞；

(g) 使表达 PD-1 的 T 细胞维持低水平。

一些实施方案中，本公开的前述 PD-1 结合蛋白结合 PD-1 的 K_D 值可以 $\leq 1\times10^{-7}$M，例如$\leq 1\times10^{-8}$M，或$\leq 1\times10^{-9}$M，或$\leq 1\times10^{-10}$M。

另一方面，本公开提供 PD-1 结合蛋白，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：8 和 31-36 中任一项所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和，所述 VL 包含 SEQ ID NO：9 和 37-42 所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。所述 VH 和 VL 是特异性结合 PD-1 抗原或其表位。

一些实施方案中，提供 PD-1 结合蛋白，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)；

所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其分别包含如 SEQ ID NO：10-12 所示的氨基酸序列；和，

所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其分别包含如 SEQ ID NO：13-15 所示的氨基酸序列。所述 CDR 是根据 Kabat 编号系统定义的 CDR。

一些实施方案中，所述 PD-1 结合蛋白的 VH 包含如 SEQ ID NO：10-12 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 中的任意 1 个、2 个或 3 个，和/或所述 VL 包含如 SEQ ID NO：13-15 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 中的任意 1 个、2 个或 3 个。

一些实施方案中，所述 PD-1 结合蛋白为抗 PD-1 抗体。

一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)为鼠源的；一些具体实施方案中，所述 VH 包含如 SEQ ID NO：8 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和 VL 分别如 SEQ ID NO：9 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体为人源化改造的。一些具体实施方案中，人源化改造过程使用的人种系重链模板 IGHV1-3，和/或，人种系轻链模板 IGkV1-16。

一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、或人源化抗体或其抗原结合片段。一些具体实施方案中，所述人源化抗体的人种系重链模板 IGHV1-3，和/或，人种系轻链模板 IGkV1-16。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白的 VH 包含如 SEQ ID NO：8 和 31-36

中任一项所示，或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；和/或，所述 VL 包含如 SEQ ID NO：9 和 37-42 中任一项所示，或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白包含 VH 和 VL，其中：

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：35 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：41 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：31 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：37 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：31 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：38 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：31 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：31 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：37 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：38 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：37 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基

酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：38 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：35 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：35 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：42 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：36 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；或

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：36 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

一些具体实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白包含 VH 和 VL，其中：

所述 VH 包含如 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列,和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：41 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列,和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：37 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列,和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：38 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列,和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列,和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO:32 所示的氨基酸序列,和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：37 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO:32 所示的氨基酸序列,和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：38 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：37 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：38 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：35 所示的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：35 所示的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：42 所示的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：36 所示的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示的氨基酸序列；或

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：36 所示的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白中所述 VH 与 SEQ ID NO：31-36 任一相比有一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸突变，和/或所述 VL 与 SEQ ID NO：37-42 任一相比有一个或多个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸突变。

一些具体的实施方案中，上述氨基酸突变为氨基酸的替换、取代、修饰、缺失和/或添加(例如氨基酸的保守性置换)，所述突变不影响或基本不影响特异性结合 PD-1 的功能。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白中包含或为特异性结合 PD-1 蛋白或其表位的抗体。一些具体实施方案中，所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白中包含特异性结合 PD-1 的 Fab、Fab'、$F(ab')_2$、单链抗体(scFv)。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白还包含免疫球蛋白 Fc 区。一些实施方案中，所述 PD-1 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区。例如，所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 区。本公开中的 PD-1 结合蛋白可以具有野生型 IgG 或其变体

的 Fc 区。

一些实施方案中，所述 Fc 区是增加效应器功能的 Fc 区，例如，增加抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)具有增加的效应子功能的。

示例性 IgG1 Fc 区包括具有以下取代：239D；239E；239K， 241A； 262A；264D； 264L； 264A； 264S； 265A； 265S；265V；296A；296A；301A；332E；239D/332E；239D/330S/332E；239D/330L/332E；298A/333A/334A；247I/339D；247I/339Q；280H/290S；280H/290S/298D；280H/290S/298V；243L/292P/300L；243L/292P/300L/396L；243L/292P/300L/305I/396L；236A/239D/332E；326A/333A；326W/333S； 290E/298G/299A； 290N/298G/299A； 290E/298G/299A/326E； 或290N/298G/299A/326E；或任何上述位置的任意组合。所述突变根据 EU 编号系统定义。

示例性 IgG1 Fc 区包括具有以下取代：S239D；S239E；S239K，F241A；V262A；V264D；V264L；V264A；V264S；D265A；D265S；D265V；F296A；Y296A；R301A； I332E； S239D/I332E； S239D/A330S/I332E； S239D/A330L/I332E； S298A/D333A/K334A ； P247I/A339D ； P247I/A339Q ； D280H/K290S ； D280H/K290S/S298D ； D280H/K290S/S298V ； F243L/R292P/Y300L ； F243L/R292P/Y300L/P396L ； F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L ； G236A/S239D/I332E； K326A/E333A； K326W/E333S； K290E/S298G/T299A； K290N/S298G/T299A ； K290E/S298G/T299A/K326E ； 或K290N/S298G/T299A/K326E，或任何上述位置的任意组合。

一些实施方案中，所述 Fc 区是减弱效应器功能的 Fc 区，例如，减弱的 ADCC、ADCP 和/或 CDC。具有减少的效应子功能的示例性 Fc 区包括具有以下取代的那些： N297A 或 N297Q(IgG1)； L234A/L235A(IgG1)； V234A/G237A(IgG2)； L235A/G237A/E318A(IgG4) ； H268Q/V309L/A330S/A331S(IgG2) ； C220S/C226S/C229S/P238S(IgG1) ； C226S/C229S/E233P/L234V/L235A(IgG1) ； L234F/L235E/P331S(IgG1)；或 S267E/L328F(IgG1)。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区，所述 Fc 区如 SEQ ID NO：6 或 45 所示，或与 SEQ ID NO：6 或 45 任一具有至少 80%、至少 90%序列同一性。一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区，所述 Fc 区如 SEQ ID NO：45 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白还包含重链恒定区和轻链恒定区。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白还包含人 IgG1 重链恒定区和人 κ 轻链恒定区优选地。

一些实施方案中，人 IgG1 重链恒定区具有 SEQ ID NO：16 所示的氨基酸序

列；并且所述人 κ 轻链恒定区具有 SEQ ID NO：17 所示的氨基酸序列。

一些实施方案中，提供 PD-1 结合蛋白，其包括重链和轻链。其中，所述重链包含如 SEQ ID NO：16 所示或与之具有至少 90%序列同一性的恒定区序列，所述轻链包含如 SEQ ID NO：17 所示或与之具有至少 90%序列同一性的恒定区序列。

一些实施方案中，提供 PD-1 结合蛋白，其包括重链和轻链。其中，所述重链包含如 SEQ ID NO：18 或 43 任一所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；和/或所述轻链包含如 SEQ ID NO：19 或 44 任一所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，提供 PD-1 结合蛋白，其包括重链和轻链，所述重链包含如 SEQ ID NO：43 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含如 SEQ ID NO：44 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

在一些具体实施方案中，所述重链包含如 SEQ ID NO：43 所示的氨基酸序列，和/或，所述轻链包含如 SEQ ID NO：44 所示的氨基酸序列。

一些实施方案中，提供 PD-1 结合蛋白，其包括重链和轻链，所述重链包含如 SEQ ID NO：49 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述轻链包含如 SEQ ID NO：50 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白中包含的 Fc 区可以使所述结合蛋白形成二聚体分子。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白中包含的 Fc 区可以延长所述结合蛋白的体内半衰期。

一些实施方案中，本公开的 PD-1 结合蛋白为抗 PD-1 抗体，或包含所述抗体的缀合物、融合蛋白。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白，具有选自以下至少一项的活性：

(a) 以≤10^{-7} 的 K_D 值与人 PD-1 或其表位结合；

(b) 不阻断或几乎不阻断 PD-L1 与 PD-1 的信号通路；

(c) 激活 PD-1 信号通路；

(d) 抑制 T 细胞释放细胞因子的活性，例如抑制 T 细胞分泌 IFNγ 的活性；

(e) 抑制 T 细胞增殖，例如抑制记忆 CD8+T 细胞增殖；

(f) 减少表达 PD-1 的 T 细胞；

(g) 使表达 PD-1 的 T 细胞维持低水平。

一些实施方案中，本公开的前述 PD-1 结合蛋白结合 PD-1 的 K_D 值可以≤1×10^{-7}M，例如≤1×10^{-8}M，或≤1×10^{-9}M，或≤1×10^{-10}M。

一些实施方案中，提供抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其与前述本公开的 PD-1 结合蛋白结合或竞争结合相同的表位。

一些实施方案中，提供抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其不与前述本公开的

PD-1 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域结合或竞争结合相同的表位。

一些实施方案中，提供抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其阻断前述本公开的 PD-1 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域与 PD-1(例如人 PD-1)的结合。

一些实施方案中，提供抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其与 PD-1(例如人 PD-1)的结合被前述本公开的 PD-1 结合蛋白中的免疫球蛋白单一可变结构域阻断。

本公开中，“至少 80%(序列)同一性”涵盖至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、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%(序列)同一性；”至少 90%(序列)同一性”涵盖至少 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%(序列)同一性。

多核苷酸和载体

本公开提供编码本公开的 PD-1 结合蛋白的多核苷酸。本公开的多核苷酸可为 RNA、DNA 或 cDNA。根据本公开的一些实施方案，本公开的多核苷酸是基本上分离的多核苷酸。

本公开的多核苷酸也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可尤其为表达载体，即可提供 PD-1 结合蛋白体外和/或体内(即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中)表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的多核苷酸，其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、增强子、终止子等)。针对在特定宿主中的表达，对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的 PD-1 结合蛋白的表达有用或必需的调控元件及其他元件，例如为启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的多核苷酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式(例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术)制备或获得，和/或可从适合的天然来源加以分离。

宿主细胞

本公开提供表达或能够表达一种或多种本公开的 PD-1 结合蛋白和/或含有本公开的核酸或载体的重组宿主细胞。一些实施方案中，宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属

(*Aspergillus*)的物种的细胞；或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而，本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

本公开的细胞不能发育成完成的植株或动物个体。

生产或制备方法

本公开提供制备本公开的PD-1结合蛋白的方法，所述方法通常包含以下步骤：

- 在允许表达本公开的结合蛋白的条件下培养本公开的宿主细胞；及
- 从培养物回收由所述宿主细胞表达的结合蛋白；及
- 任选地，包括进一步纯化和/或修饰本公开的结合蛋白。

本公开的 PD-1 结合蛋白可在如上所述细胞中以细胞内方式(例如在细胞质中、在周质中或在包涵体中)产生，接着从宿主细胞分离且任选进一步纯化；或其可以细胞外方式(例如在培养宿主细胞的培养基中)产生，接着自培养基分离且任选进一步纯化。

用于重组产生多肽的方法及试剂，例如特定适合表达载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。类似地，适用于制造本公开的结合蛋白或抗体的分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。生产和纯化抗体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)。本公开工程化的抗体也可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。表达载体可以稳定地转染细胞。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。通过表达与人源抗原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、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。也可以用常规方法去除可溶的混合物和多聚体，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。

然而，本公开的 PD-1 结合蛋白也可以通过本领域已知的其它产生蛋白质的方法获得，例如化学合成，包括固相或液相合成。

组合物/药物组合物

本公开提供组合物，包含前述 PD-1 结合蛋白。

例如，提供药物组合物，其含有治疗、缓解或预防有效量的如上所述的 PD-1 结合蛋白和至少一种可药用的赋形剂、稀释或载体。

在一些具体实施方式中，所述药物组合物单位计量中可含有 0.01 至 99 重量%的 PD-1 结合蛋白，或药物组合物单位剂量中含 PD-1 结合蛋白的量为 0.1-2000mg，在一些具体实施方式中为 1-1000mg。

一些实施方案中，提供产品或药盒，其含有至少一个容器，各自独立地包含前述 PD-1 结合蛋白。可选地，药盒包含容器和标签。容器例如瓶、注射器和试管。容器容纳有效于治疗病症的组合物。容器上或与容器相连的标签表明所述组合物用于治疗所选病症。组合物中含有前述 PD-1 结合蛋白。

治疗疾病的方法和制药用途

本公开提供前述 PD-1 结合蛋白、多核苷酸、组合物(包括药物组合物)用于治疗、缓解、预防、诊断疾病或病症的方法。

一些实施方案中，提供改善、缓解、治疗或预防疾病的方法，包括向受试者施用改善、缓解、治疗或预防有效量的前述 PD-1 结合蛋白、多核苷酸或组合物(包括药物组合物)。

一些实施方案中，提供本公开的 PD-1 结合蛋白在制备改善、缓解、治疗或预防疾病的药物的用途。

一些实施方案中，前述疾病为炎症或免疫性疾病。

一些实施方案中，所述炎症或免疫性疾病选自以下或其组合：移植物抗宿主病(GvHD)、移植排斥反应、类风湿关节炎(RA)、关节炎(CIA)。

一些实施方案中，提供抑制 T 细胞活性的方法，包含向有需要的受试者施用有效量的前述 PD-1 结合蛋白、多核苷酸或组合物(包括药物组合物)。

一些具体实施方案中，所述抑制 T 细胞活性选自以下至少一项的特征：

(a) 抑制 T 细胞释放细胞因子的活性，例如抑制 T 细胞分泌 IFNγ 的活性；

(b) 抑制 T 细胞增殖，例如抑制记忆 CD8+T 细胞增殖；

(c) 减少 PD-1 阳性的 T 细胞，例如减少 PD-1 高表达的 T 细胞。

检测和试剂盒

本公开提供 PD-1 结合蛋白、多核苷酸、组合物的检测用途。本公开还提供用于体内或体外检测 PD-1 的方法、系统或装置，其包括用本公开的前述结合蛋白、多核苷酸、组合物处理样品。

一些实施方案中，体外检测方法、系统或装置可能例如包括：

(1)使样品与 PD-1 结合蛋白、多核苷酸、组合物接触；

(2)检测在前述结合蛋白、多核苷酸和样品之间形成的复合物；和/或

(3)使参比样品(例如，对照样品)与结合蛋白、核酸接触；和

(4)通过与参比样品比较，确定复合物形成的程度。如与对照样品或受试者中

相比，样品或受试者中复合物形成的变化(例如，统计学上的显著变化)表示样品中存在 PD-1。

另一些实施方案中，体内检测方法、系统或装置可以包括：

(1)向受试者施用前述结合蛋白、多核苷酸；和

(2)检测在结合前述结合蛋白、多核苷酸和受试者之间复合物的形成。

检测可以包括确定形成复合物的位置或时间。用可检测物质对前述结合蛋白、多核苷酸标记，通过对所述标记检测以实现对能结合的蛋白、多核苷酸的物质(例如 PD-1)的检测。合适的可检测物质包括多种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。可以通过测量与 PD-1 结合或不结合的物质或使其可视化，检测结合蛋白、多核苷酸与 PD-1 的复合物形成。可以使用常规检测测定法，例如，酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或组织免疫组织化学。出于检测目的，本公开的结合蛋白、多核苷酸可以用荧光团发色团标记。一些实施方案中，还提供包含上述多核苷酸、结合蛋白的诊断试剂，以及提供相关诊断用途。

一些实施方案中，还提供试剂盒，所述试剂盒包含前述结合蛋白、多核苷酸，还可以包含诊断使用说明。试剂盒还可以含有至少一种额外的试剂，如标记物或额外的诊断剂。对于体内使用，所述结合蛋白可以配制为药物组合物。

附图说明

图 1A 和图 1B 分别为抗体 2E1-A06 和抗体 113.3 对 PD-L1 的拮抗实验，Camrelizumab 为阳性对照，Peresolimab 和 IgG1 为阴性对照。其中图 1A 为抗体 2E1-A06 的结果，图 1B 为抗体 113.3 的结果。

图 2A 和图 2B 分别为抗体 2E1-A06 和抗体 113.3 激活 PD-1 信号通路的 Jurkat 报告基因实验，IgG1 为阴性对照。其中图 2A 为抗体 2E1-A06 的结果，图 2B 为抗体 113.3 的结果。

图 3 为抗体 2E1-A06-H4 和 113.3 Hbk2L1+4 对 PD-L1 的拮抗性实验，Camrelizumab 为阳性对照，Peresolimab 和 IgG1 为阴性对照。

图 4 为抗体 2E1-A06-H4 和 113.3 Hbk2L1+4 在 PBMC 激活实验体系中的抑制活性，Peresolimab 为阳性对照。

图 5 为抗体 2E1-A06-H4 和 113.3 Hbk2L1+4 在 CMV recall 实验体系中的抑制活性，Peresolimab 为阳性对照，IgG1 为阴性对照。

图 6 为抗体 2E1-A06-H4 的抗体依赖细胞介导的细胞毒性活性(ADCC)实验，Peresolimab 为阳性对照，IgG1 为阴性对照。

图 7 为抗 PD-1 抗体在移植物抗宿主病(GvHD)小鼠模型中的活性评价实验流程。

图 8A、图 8B 为移植物抗宿主病(GvHD)小鼠模型中抗体 2E1-A06-H4 的给药结果，Peresolimab 和模型组 (Isotype)为对照。其中图 8A 为小鼠平均体重变化比

例，图 8B 为小鼠平均疾病排斥评分。

图 9 为抗 PD-1 抗体在胶原诱导的关节炎(CIA)小鼠模型中的活性评价实验流程。

具体实施方式

术语定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本公开中另有明确定义，本公开使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

“程序性死亡 1”、“细胞程序性死亡 1”、“蛋白 PD-1”、 “PD-1”、“PDCD1”和“hPD-1”可互换使用，且包括人 PD-1 的变体、同种型、物种同源物、以及与 PD-1 具有至少一个共同表位的类似物。完整的 PD-1 序列为 GenBank Accession # NP_005009.2。

“与 PD-1 结合”，指能与 PD-1 或其表位相互作用，所述 PD-1 或其表位可以是人源的。“抗原结合位点”指抗原上不连续的，由本公开抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

“PD-1 结合蛋白”涵盖任何能够特异性结合 PD-1 的蛋白或其表位的任何分子。PD-1 结合蛋白可以包括针对 PD-1 的如本公开定义的抗体或其缀合物。PD-1 结合蛋白还涵盖免疫球蛋白超家族抗体(IgSF)或 CDR 移植分子。本公开的“PD-1 结合蛋白”可以包含至少一个结合 PD-1 的免疫球蛋白单一可变结构域(如 VHH)。在一些实施方案中，“PD-1 结合蛋白”可以包含 2、3、4 或更多个结合 PD-1 的免疫球蛋白单一可变结构域(如 VHH)。本公开的 PD-1 结合蛋白除包含 PD-1 的免疫球蛋白单一可变结构域外，也可包含连接子和/或具有效应功能的部分，例如半衰期延长部分(如结合血清白蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域)、和/或融合配偶体(如血清白蛋白)和/或缀合的聚合物(如 PEG)和/或 Fc 区。本公开的“PD-1 结合蛋白”可以包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，例如 Fab、Fab’、F(ab’)2、单链抗体(scFv)、或 IgG 抗体。

本公开的“PD-1 结合蛋白”或“抗 PD-1 抗体”可以例如以缀合的方式包含一个或多个效应分子。所述“效应分子”包括例如小分子化合物、多肽或多肽片段、生物活性蛋白(例如酶)、其它抗体或抗体片段、合成或天然存在的聚合物、核酸及其片段(例如 DNA、RNA 及其片段)、放射性核素等。

“细胞因子”是由一个细胞群体释放的、作为细胞间介质作用于其它细胞的蛋白质的一般术语。这样的细胞因子的例子包括淋巴因子、单核因子、趋化因子和传统的多肽激素。示例性的细胞因子如 IFNγ。

“抗体”涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体(例如双特异性抗体)，全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段，

或抗原结合部分)，只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白，是由两条重链和两条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 链、α 链和 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。

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 个序列相对保守的框架区(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(VL)和重链可变区(VH)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。

“抗原结合片段”涵盖单链抗体(即全长重链和轻链)；Fab、修饰的 Fab、Fab’、修饰的 Fab’、F(ab’)2、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体(例如 VH 或 VL 或 VHH)、scFv、二价或三价或四价抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一种的表位结合片段(参见例如 Holliger and Hudson,2005,Nature Biotech.23(9)：1126-1136；Adair and Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3)209-217)。

产生和制备这些抗原结合片段的方法在本领域是公知的(参见例如 Verma 等人,1998,Journal ofImmunological Methods,216,165-181)。Fab-Fv 形式首先公开于 WO2009/040562，其二硫键稳定化形式 Fab-dsFv 首先公开于 WO2010/035012。本公开的抗原结合片段还包括描述于 WO2005/003169、WO2005/003170 和 WO2005/003171 中的 Fab 和 Fab’片段。多价抗体可包含多特异性例如双特异性或可以是单特异性的(参见例如 WO92/22583 和 WO05/113605)，后者的一个示例是描述于 WO 92/22583 中的 Tri-Fab(或 TFM)。

对于 CDR 的确定或定义，能够通过分辨抗体的结构和/或分辨抗体-配体复合物的结构，来完成对 CDR 的确定性描绘和对结合位点的残基的鉴定。这可通过本领域技术人员已知的各种技术中的任一种，例如 X 射线晶体学来实现。多种分析方法可用于鉴定 CDR，包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统、AbM 编号系统、IMGT 编号系统、接触定义、构象定义。

Kabat 编号系统是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定 CDR 区域(参见例如 Johnson&Wu，2000，Nucleic Acids Res.，28：214-8)。Chothia 编号系统与

Kabat 编号系统类似，但 Chothia 编号系统考虑了某些结构环区域的位置。(参见例如 Chothia 等，1986，J.Mol.Biol.，196：901-17；Chothia 等人，1989，Nature，342：877-83)。AbM 编号系统使用建模抗体结构的由 Oxford Molecular Group 生产的计算机程序集成套件(参见例如 Martin 等，1989，ProcNatl Acad Sci(USA)，86：9268-9272；“AbMTM，A Computer Program for ModelingVariable Regions of Antibodies，”Oxford，UK；Oxford Molecular，Ltd)。AbM 编号系统使用知识数据库和从头开始方法的组合，从基本序列建模抗体的三级结构(参见 Samudrala 等，1999，在 PROTEINS，Structure，Function and Genetics Suppl.，3：194-198 中的“Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined HierarchicalApproach”描述的那些)。接触定义基于可用复杂晶体结构的分析(参见例如 MacCallum 等，1996，J.Mol.Biol.，5：732-45)。构象定义中，CDR 的位置可鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基(参见例如 Makabe 等，2008，Journal ofBiological Chemistry，283：1156-1166)。另外其它的 CDR 边界定义可能不严格遵循上述方法之一，但仍然与 Kabat CDR 的至少一部分重叠。根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验结果，CDR 的边界可缩短或延长。如本公开使用的，CDR 可指通过本领域已知的任何方法(包括方法的组合)定义的 CDR。各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的。

本公开的抗体的 VL 区和 VH 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号系统。

本公开的抗体可以是多克隆的、单克隆的、异种的、同种异体的、同基因的或其经过修饰的形式，其中单克隆抗体尤其适用于多个实施例中。一般来说，本公开的抗体是重组抗体。

如本文所用的“重组”泛指例如细胞或核酸、蛋白质或载体等产品，表示所述细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质而加以修饰。例如，重组细胞表达天然(非重组)细胞形式内不存在的基因或表达原本异常表达、低表达或完全不表达的天然基因。

多肽或蛋白的“结构域”是指折叠蛋白结构，其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言，结构域负责蛋白的单个功能性质，且在许多情况下可添加、移除或转移至其它蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

“免疫球蛋白结构域”是指抗体链的球形区域。免疫球蛋白结构域的特征在于其维持抗体分子的折叠特征。

“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由“框架区 1”或“FR1”、“框架区 2”或“FR2”、“框架区 3”或“FR3”、及“框架区 4”或“FR4”的四个“框架区”、“互补决定区 1”或“CDR1”、“互补决定区 2”或“CDR2”、及“互补决定区 3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”组成的免疫球蛋白结构域。因此，免疫球蛋白可变结构域的一

般结构或序列可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予其对抗原的特异性。

“抗体框架(FR)”，是指可变结构域的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。

“免疫球蛋白单一可变结构域”通常用于指可以在不与其他可变结构域相互作用的情况下(例如在没有如常规四链单克隆抗体的 VH 和 VL 结构域之间所需要的 VH/VL 相互作用的情况下)，形成功能性抗原结合位点的免疫球蛋白可变结构域(其可以是重链或轻链结构域，包括 VH、VHH 或 VL 结构域)。“免疫球蛋白单一可变结构域”的实例包括纳米抗体(包括 VHH、人源化 VHH 和/或骆驼化 VH，例如骆驼化人 VH)、IgNAR、结构域、作为 VH 结构域或衍生自 VH 结构域的(单结构域)抗体(诸如 dAbs™)和作为 VL 结构域或衍生自 VL 结构域的(单结构域)抗体(诸如 dAbs™)。基于和/或衍生自重链可变结构域(诸如 VH 或 VHH 结构域)的免疫球蛋白单一可变结构域通常是优选的。免疫球蛋白单一可变结构域的一个具体实例为如下文定义的“VHH 结构域”(或简称为“VHH”)。

“VHH 结构域”，亦称为重链单域抗体、VHH、V_HH 结构域、VHH 抗体片段、VHH 抗体、纳米抗体，是称为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域(Hamers-Casterman C，Atarhouch T，Muyldermans S，Robinson G，Hamers C，Songa EB，Bendahman N，Hamers R.:“Naturally occurring antibodies devoid of light chains”；Nature363，446-448(1993))。使用术语“VHH 结构域”以将所述 VHH 与存在于常规四肽链结构抗体中的 VH 以及 VL 进行区分。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(然而，常规四肽链结构抗体中，表位由 VL 结构域与 VH 结构域一起识别)。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。术语“重链单域抗体”、“VHH 结构域”、“VHH”、“V_{HH} 结构域”、“VHH 抗体片段”、“VHH 抗体”、“Nanobody®”以及“Nanobody®结构域”(“Nanobody”为 Ablynx N.V.公司，Ghent，Belgium 的商标)可互换使用。“VHH 结构域”包括但不限于经骆驼科动物产生的天然抗体，也可以是骆驼科动物产生的抗体后再经人源化的，也可以是经噬菌体体展示技术筛选获得的。VHH 结构域中的氨基酸残基的总数将通常在 110 至 120 范围内，常常介于 112 与 115 之间。然而应注意较小及较长序列也可适于本公开所述的目的。获得结合特定抗原或表位的 VHH 的方法，先前已公开于以下文献中：R.van der Linden et al.，Journal of Immunological Methods，240(2000)185-195；Li et al.，J Biol Chem.，287(2012)13713-13721；Deffar et al.，African Journal of Biotechnology Vol.8(12)，pp.2645-2652，17June，2009 和 WO94/04678。

如本领域中对于 VH 结构域及 VHH 结构域所公知的，各 CDR 中的氨基酸残基的总数可能不同，且可能不对应于由 Kabat 编号指示的氨基酸残基的总数(即根

据 Kabat 编号的一个或多个位置可能在实际序列中未被占据，或实际序列可能含有多于 Kabat 编号所允许数目的氨基酸残基)。这意味着一般而言，根据 Kabat 的编号可能对应或可能不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。VHH 的其它编号系统或编码规则包括 Chothia、IMGT、AbM。

“人源化抗体(humanized antibody)”，也称为 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody)，是指将非人 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量非人蛋白成分，从而诱导的强烈的免疫应答反应。为避免在免疫原性下降的同时引起活性的下降，可对所述的全人抗体可变区可进行最少反向突变，以保持活性。“人源化”的例子包括可将源自骆驼科的 VHH 结构域通过以人常规四肽链结构抗体 VH 结构域中相应位置处存在的一个或多个氨基酸残基置换原始 VHH 序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基而“人源化”(本公开中亦称为“序列优化”，除人源化外，“序列优化”也可涵盖通过提供 VHH 改良性质的一个或多个突变对序列进行的其它修饰，例如移除潜在的翻译后修饰位点)。人源化 VHH 结构域可含有一个或多个完全人框架区序列。“人源化”的又一例子包括将小鼠的 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异源蛋白成分，从而诱导的强烈的抗体可变抗体反应。人源化方法例如蛋白表面氨基酸人源化(resurfacing)及抗体人源化通用框架移植法(CDR grafting to a universal framework)，即将 CDR“移植”于其它“支架”(包括但不限于人支架或非免疫球蛋白支架)上。适于所述 CDR 移植的支架及技术在本领域中是已知的。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，以及在 Kabat，E.A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版中找到。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。此外，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框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。

“亲和力成熟的”抗体指与亲本抗体相比，在一个或多个高变区(HVR)中具有一处或多处改变的抗体，此类改变导致该抗体对抗原的亲和力改善。例如，“亲和力成熟”的 PD-1 结合蛋白或抗 PD-1 抗体，在一个或多个 CDR 中具有一个或多个变化，所述变化导致对抗原的亲和力相比于其亲本抗体有所增加。亲和力成熟的抗体可通过例如由以下所述的本领域中已知的方法来制备：Marks 等人，1992，Biotechnology 10：779-783 或 Barbas 等人，1994，Proc.Nat.Acad.Sci，USA 91：3809-3813.；Shier 等人，1995，Gene 169：147-155；Yelton 等人，1995，Immunol.155：1994-2004；Jackson 等人，1995，J.Immunol.154(7)：3310-9；及 Hawkins 等人，1992，J.MoI.Biol.226(3)：889896；KS Johnson 及 RE Hawkins，“Affinity maturation of antibodies using phage display”，Oxford University Press 1996。

“全人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本公开的全人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变)。“全人抗体”不包括“人源化抗体”。

通常，“特异性结合”、“选择性结合”是指结合蛋白与抗原上的表位结合。本公开的 PD-1 结合蛋白在 Biacore 或 KinExA 或 Fortibio 测定中测量为 10^{-7} 至 10^{-10} 摩尔/升(M)、或 10^{-8} 至 10^{-10} M、或 10^{-9} 至 10^{-10} M、或更低的解离常数(K_D)结合所要结合的抗原(即 PD-1)或其表位。任何大于 10^{-4}M 的 K_D 值一般都视为指示非特异性结合。结合蛋白对抗原或表位的特异性结合可以以已知的任何适合方式来测定，包括例如本公开所述的表面等离子体共振术(SPR)测定。

“表位”是指抗原上与免疫球蛋白或抗体结合的位点。表位可以由相邻的氨基酸、或通过蛋白质的三级折叠而并列的不相邻的氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保持，而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理后丧失。表位通常以独特的空间构象包括至少 3-15 个氨基酸。确定表位与给定的抗体结合的方法在本领域中是熟知的，包括免疫印迹和免疫沉淀检测分析等。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本公开所述的技术，例如 X 射线晶体分析法和二维核磁共振等。

“结合亲和力”或“亲和力”在本公开中用作两个分子(例如抗体或其部分与抗原)之间的非共价相互作用的强度量度。两个分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数(K_D)来量化。可通过使用例如表面等离子共振(SPR)方法(Biacore)测量复合物形成和解离的动力学来确定 K_D。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数分别被称为结合速率常数 ka(或 kon)和解离速率常数 kd(或 koff)。K_D 通过方程 K_D＝kd/ka 与 ka 和 kd 有关。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定，并且甚至可通过例如 Caceci 等人(1984，Byte 9：340-362)中所述的那些方法对于复杂混合物进行计算。例如，可使用双重过滤硝化纤维素滤器结合测定如 Wong&Lohman(1993，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90：5428-5432)中公开的那种来确定 K_D。评估抗体针对靶抗原的结合能力的其它标准测定是本领域已知的，包括例如 ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析、以及本公开例举的其它测定。抗体的结合动力学和结合亲和力也可通过本领域已知的标准测定，例如表面等离子共振(SPR)，例如通过使用 Biacore™ 系统或 KinExA 来评价。可通过比较各个抗体/抗原复合物的 K_D 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲和力，例如，不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较。类似地，相互作用的特异性可通过确定和比较目的相互作用(例如抗体和抗原之间的特异性相互作用)的 K_D 值与非目的相互作用(例如已知不结合 PD-1 的对照抗体)的 K_D 值进行评价。

“保守性置换”指置换为具有与原始氨基酸残基相似的特性的另一个氨基酸残

基。例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有碱性侧链，并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性，在于它们具有酸性侧链。此外，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性，在于它们具有不带电荷极性侧链，并且丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性，在于它们具有非极性侧链。另外，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有芳族侧链。因此，本领域技术人员将显而易见，甚至当置换如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时，它将不显示特性的特定变化。

“同源性”、“同一性”或“序列同一性”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核苷酸或氨基酸单体占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被相同核苷酸占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性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。

“核酸”或“多核苷酸”在本文可互换使用，指的是单链或双链的任何 DNA 分子或 RNA 分子以及在单链的情况下它的互补序列的分子，例如双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“可操作连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子可操作地连接至所述编码序列。

“宿主细胞”包括各个细胞或细胞培养物，其可为或已是用于掺入多核苷酸插入片段的载体的接受者。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，并且由于天然、偶然或有意的突变，子代不一定与亲本细胞完全相同(在形态学或基因组 DNA 互补体中)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染和/或转化的细胞。“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其后代。还应当理解的是，由于有意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。该术语包括与最初转化中筛选的细胞具有相同的功能或生物学活性的突变后代。

“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。“抑制生长”(例如涉及细胞)旨在包括细胞生长任何可测量的降低。

“炎性或自身免疫性疾病”是指由免疫系统的不适当激活导致的疾病或病症，其可以包括炎性疾病或病症、自身免疫性疾病或障碍。一些实施方案中，“炎性疾病”或“炎性病症”其中是指哺乳动物免疫系统的组分引起、介导或以其他方式促成导致哺乳动物发病的炎性反应的疾病或病症。一些实施方案中，“自身免疫性疾病”或“自身免疫性障碍”是指由于对自身组织有反应性的免疫细胞的不适当激活而导致的那些疾病或障碍。

“免疫应答”包括T细胞介导的和/或B细胞介导的免疫应答。示例性免疫应答包括 T 细胞应答，例如细胞因子的产生和细胞毒性。此外，术语免疫应答包括受T细胞活化间接影响的免疫应答，例如抗体产生(体液应答)和细胞因子反应性细胞(例如巨噬细胞)的活化。

“下调”是指相比于不存在治疗或化合物时受试者中的应答水平，和/或相比于在其他方面相同但未治疗的受试者中的应答水平，受试者中的免疫应答水平的可检测降低。

“给予”、“施用”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，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”、“施用”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。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”意指给予受试者内用或外用治疗剂，例如包含本公开的任一种结合蛋白或其药物组合物作为治疗剂，所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种免疫障碍，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试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能测量的程度。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，例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试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。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或产品)在缓解某个受试者中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受试者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学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。用于受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、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。本公开的受试者可以是动物或人类受试者。

“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的场合。“和/或”应视为特定揭示两种指定特征或组分中的每一者具有或不具有另一者。因此，诸如本公开中“A 和/或 B”的词组中所

用的术语“和/或”包括“A 及 B”、“A 或 B”、“A”(单独)及“B”(单独)。除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不仅限于”的意义。

本公开的“受试者”、“患者”意指哺乳动物，尤其灵长类动物，尤其是人。

实施例

以下结合实施例用于进一步描述本公开，但这些实施例并非限制本公开的范围。

本公开实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience，NY。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 PD-1 纳米抗体(VHH)的筛选和制备

1.1 筛选抗原、检测抗原的序列和制备

程序性死亡受体 1(PD-1)是一种重要的免疫抑制分子。选择在 C 端带有 his 标签的人 PD-1 蛋白的胞外区片段(Leu25 - Gln167)作为免疫原对动物(骆驼)进行免疫。本公开使用的重组人 PD-1 蛋白序列、来源和用途如表 1。所述蛋白试剂可用于下述各实施例实验中。

表 1. 重组蛋白氨基酸序列来源及用途

名称	氨基酸序列起止	ACRO 公司货号	用途
human-PD-1-His	Leu 25 - Gln 167 (Accession#NP_005009.2)	PD1-H5221	骆驼免疫 噬菌体展示固相磁珠筛选
cyno-PD-1-His	Leu 25 - Gln 167 Accession # B0LAJ3	PD1-C52H5	ELISA 筛选阳性克隆

完整 PD-1 蛋白序列描述如下：其中 1-23aa 为信号肽，24-170aa 为 PD-1 的胞外区(下划线)，171-191aa 为跨膜区，192-288aa 为胞内区。

>人 PD-1 氨基酸序列

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATF
TCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF
HMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSP
RPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDP

SAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGS ADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO：1)

1.2 免疫、构建噬菌体文库和淘选

羊驼经四次免疫后检测血清效价。效价合格后，分离 PBMC，提取总 RNA，检测纯度，反转录为 DNA，用于后续扩增抗体基因。将纯化载体与 VHH 目的片段酶切连接。电转，挑选克隆，获得噬菌体文库。

以固相包被 PD-1 抗原，胰蛋白酶洗脱的方法进行筛选，洗脱特异噬菌体。经三轮淘选，从第二、三轮滴度测定平板随机挑选 384 个克隆，采用噬菌体 ELISA 筛选阳性克隆，检测 450 nm 下光密度。根据测序结果，进行氨基酸序列比对和进化树分析，最终得到 25 条独特序列。

检测上述抗体的活性，包括：测定抗体对 PD-1 信号通路的激活活性，使用 CMV recall 实验体系测定的抗体对记忆 T 细胞的抑制活性，使用 PBMC 激活实验体系测定的抗体抑制 T 细胞释放细胞因子的活性，使用 FACS 测定抗体对人、猴 PD-1 结合。并检测抗体的成药性(聚体、断裂、加速稳定性、翻译后修饰(PTM)等)。从中筛选活性和成药性具有显著优势的抗 PD-1 抗体，得到 2E1-A06-VHH 继续进行后续试验。

其中 2E1-A06-VHH 序列如下：

>2E1-A06-VHH

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCATSGYVIS*RNCMA*WFRQAPGKEREWVA*LTPG GGTTYYTNSVKG*RFTDSQDKNTVYLQMTSLKPEDTAMYYCAA*RIGFGYCTGTDR DYTH*WGQGTQVTVSS

(SEQ ID NO：2)

其中下划线是根据 Kabat 编号系统确定的 CDR 序列，具体见表 2

表 2. 2E1-A06-VHH 的 CDR 序列(根据 Kabat 编号系统)

抗体	名称	序列	编号
2E1-A06-VHH	CDR1	RNCMA	SEQ ID NO:3
	CDR2	LTPGGGTTYYTNSVKG	SEQ ID NO:4
	CDR3	RIGFGYCTGTDRDYTH	SEQ ID NO:5

1.3 纳米抗体的制备

将获得的 2E1-A06-VHH 与野生型 IgG1-Fc 或带有突变的 IgG1-Fc 融合，得到纳米抗体。例如，将 2E1-A06-VHH 与带有 C220A(根据 EU numbering 系统命名编号)突变的人野生型 IgG1-Fc(Glu216-Lys447)融合，得到 VHH-Fc 嵌合抗体。其中，带有 C220A 突变的人野生型 IgG1-Fc 的序列如下：

>人野生型 IgG1-Fc(Glu216-Lys447)，带有 C220A 突变

EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO：6)

>人野生型 IgG1-Fc

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO：45)

2E1-A06 抗体序列如下：

>2E1-A06

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCATSGYVISRNCMAWFRQAPGKEREWVALTP
GGGTTYYTNSVKGRFTDSQDKNTVYLQMTSLKPEDTAMYYCAARIGFGYCTG
TDRDYTHWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO：7)

其中下划线为带有 C220A 突变的人 IgG1 Fc。

合成上述抗体的编码基因序列，亚克隆至 pcDNA3.1 表达载体中。将表达载体和转染试剂 PEI 以 1：2 的比例转染 CHO 细胞，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上清后，按常规方法进行抗体纯化，经检测，获得目的抗体。

实施例 2. 抗 PD-1 单克隆抗体(IgG)的筛选和制备

2.1 筛选抗原、检测抗原的序列和制备

带 His 标签的人 PD-1(h-PD-1-His)重组蛋白、带 His 标签的猴 PD-1(cyno-PD-1-His)重组蛋白均为购买自 Acrobiosystems 公司的纯化商业蛋白试剂，其各自的序列来源见表 3。所述蛋白试剂可用于下述各实施例实验中。

表 3. 重组蛋白氨基酸序列来源及用途

名称	氨基酸序列起止	ACRO 公司货号	用途

human-PD-1-His	Leu 25 - Gln 167 (Accession#NP_005009.2)	PD1-H5221	小鼠免疫 杂交瘤融合筛选
cyno-PD-1-His	Leu 25 - Gln 167 Accession # B0LAJ3	PD1-C52H5	杂交瘤融合筛选

2.2 抗体杂交瘤的制备及筛选

抗人 PD-1 单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用 Balb/C 小鼠，6 至 8 周龄。饲养环境：SPF 级。

免疫抗原为带 His 标签的人 PD-1 重组蛋白(h-PD-1-His，用磷酸盐缓冲液配置成 1 ug/uL)。用弗氏佐剂乳化：首次用弗氏完全佐剂(CFA)，其余使用弗氏不完全佐剂。免疫注射时间为第 0，14，28，42，70 天。于第 21，35，49，63，77 天采血进行血检，用 ELISA 方法检测小鼠血清，确定小鼠血清中的抗体滴度。

在第 3 次免疫以后，选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平稳的小鼠进行脾细胞融合，融合前 3 天加强免疫。采用电融合将淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞进行融合得到杂交瘤细胞，通过对杂交瘤上清进行体外活性筛选。对体外活性好的克隆进行测序，根据测序结果对序列进行序列比对和进化树分析，最终得到鼠源单抗序列。单抗 m113.3 的重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)序列如下：

>m113.3-HCVR

QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT*DYYIN*WVKQKPGQGLEWIG*WIYPGSGNTKYNEKFKG*KATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCAR*YSNFFMDY*WGQGASVTVSS

(SEQ ID NO：8)

>m113.3-LCVR

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC*RASQEISGYLS*WLQQKPDGTIKRLIY*VASTLHS*GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYC*LQYASYPYT*FGGGTKLEIK

(SEQ ID NO：9)

其中下划线是根据 Kabat 编号系统确定的 CDR 序列，见表 4

表 4. m113.3 的 CDR 序列(根据 Kabat 编号系统)

抗体	名称	序列	编号
m113.3	HCDR1	DYYIN	SEQ ID NO:10
	HCDR2	WIYPGSGNTKYNEKFKG	SEQ ID NO:11
	HCDR3	YSNFFMDY	SEQ ID NO:12
	LCDR1	RASQEISGYLS	SEQ ID NO:13
	LCDR2	VASTLHS	SEQ ID NO:14
	LCDR3	LQYASYPYT	SEQ ID NO:15

2.3 抗 PD-1 单克隆抗体的制备

将获得的重链可变区和轻链可变区，分别与人 IgG1 重链恒定区和人 κ 轻链恒定区连接，构建人-鼠嵌合的全长抗体 113.3。序列如下：

>人 IgG1 重链恒定区

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV*EPKSCDKTHT*
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO：16)

>人 κ 轻链恒定区

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO：17)

>113.3-HC

QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQKPGQGLEWIGWIYPG
SGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCARYSNFFMDYW
GQGASVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO：18)

>113.3-LC

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIYVASTLH
SGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYASYPYTFGGGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO：19)

Peresolimab 是礼来公司研发的一款 PD-1 激动剂，作为后续实施例中的对照抗体，其重、轻链序列如下：

>Peresolimab HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYSLSKYDMSWVRQAPGKGLEWMGIIY
TSGYTDYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGNPYYTN
GFNSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK

VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO：20)

>Peresolimab LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSPNNLLAWYQQKPGKAPKLLIYGASDL
PSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNNYYVGPVSYAFGGGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

(SEQ ID NO：21)

Camrelizumab 是恒瑞医药研发的一款 PD-1 拮抗剂，能够阻断 PD-L1 与 PD-1 的结合，并用于抗肿瘤的治疗。作为后续实施例中的对照抗体，其具体序列如下：

>Camrelizumab HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISG
GGANTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO：22)

>Camrelizumab LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAPKLLIYTATSL
ADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO：23)

以上序列中，重链下划线为人 IgG1 Fc 区，轻链下划线为人 Cκ 区。

合成上述抗体的编码基因序列，亚克隆至 pcDNA3.1 表达载体中。将表达载体和转染试剂 PEI 以 1：2 的比例转染 CHO 细胞，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上清后，按常规方法进行抗体纯化，经检测，获得目的抗体。

实施例 3. 抗 PD-1 抗体的亲和力

3.1 抗 PD-1 抗体对 PD-1 蛋白的 SPR 亲和力测定

实验方法：使用 Biacore 8K(GE Healthcare)仪器检测。选用 Protein A 传感器芯片，流动相采用 HBS-EP+缓冲溶液(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% surfactant P20)。用 HBS-EP+缓冲溶液分别配制各待测抗体作为配体，用芯片通道上的 Protein A 蛋白进行捕获。将人 PD-1 抗原蛋白(ACRO，PD1-H5221)作为分析物，用 HBS-EP+缓冲溶液进行配制，分析物从 100 nM 进行 2 倍梯度稀释，共稀释 7 个浓度点，在 30 μL/min 的流速下流过实验通道和参比通道，结合时间 90s，解离时间 500s。再生缓冲液 10 mM Glycine pH 1.5(GE Healthcare，29238268-AA)在 10 μl/min 的流速下运行 30s。采用 Biacore 8K Evaluation 分析软件进行数据处理。检测通道(Fc 2)信号值减去相应参比通道(Fc 1)信号值，得到校正后的信号曲线。亲和动力学曲线按照 1:1 Langmuir 结合模型进行拟合，计算结合速率 Ka 和解离速率 Kd 以及解离常数(即亲合力 KD 值)。

结果显示，抗体 2E1-A06 和 113.3 与人 PD-1 蛋白结合，其亲和力见表 5。

表 5. 抗 PD-1 抗体与 PD-1 重组蛋白的亲和力

抗体	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
2E1-A06	1.11E+05	3.85E-03	3.48E-08
113.3	1.37E+05	1.80E-04	1.31E-09

3.2 抗 PD-1 抗体对 PD-L1 的拮抗性实验

使用 PD-L1 过表达细胞与 Jurkat 报告基因细胞系共孵育的实验体系，检测嵌合抗体对 PD-L1 的拮抗性。

实验方法：将 40,000 个 PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞(Promega)铺板于 96 孔板并培养过夜。第二天，使用 PBS 缓冲液和 1640 培养基洗涤细胞，并加入 50,000 个过表达人 PD-1 的 Jurkat PD-1 NFAT 报告基因细胞，以及不同浓度的待测抗体。细胞置于 37°培养箱中培养 6 小时后，使用 Bright-Glo™(Promega)检测报告基因的表达。

如图 1A 和图 1B 显示，PD-1 拮抗型对照抗体 Camrelizumab 表现出拮抗 PD-L1 的功能，诱导荧光素酶显著表达；而 2E1-A06、113.3 和 Peresolimab 均不会拮抗 PD-L1 与 PD-1 的结合。

3.3 抗 PD-1 抗体激活 PD-1 信号通路的报告基因实验

使用 THP-1 细胞和 Jurkat 报告基因细胞共孵育的实验体系探究嵌合抗体对 PD-1 的激活活性。

实验方法：将 100,000 个过表达人 PD-1 的 Jurkat PD-1 NFAT 报告基因细胞铺板于 96 孔板，并加入不同浓度的待测抗体。同时加入 50,000 个丝裂霉素 C 处理后的过表达 CD32a 的 THP-1 细胞，于 37°孵育 30 分钟。随后加入 2 μg/ml 的 anti-CD3

(Biolegend, OKT3)和 1 μg/ml 的 anti-CD28 (Biolegend)以激活 Jurkat 细胞表达荧光素酶报告基因。共孵育的细胞于 37°继续孵育 5 小时后，使用 Bright-Glo™(Promega)检测报告基因的表达。

如图 2A 和图 2B 显示，2E1-A06 和 113.3 均显著抑制荧光素酶报告基因的表达，表明两个抗体均可显著激活 PD-1 信号通路。

实施例 4. 抗 PD-1 抗体的人源化改造

4.1 抗 PD-1 纳米抗体的人源化

纳米抗体人源化采用 CDR 移植方法。使用 IMGT 或 NCBI 网站，将母本 PD-1 纳米抗体序列与 IMGT 数据库中的全人源种系基因比对，选择与 PD-1 纳米抗体高度同源的人种系基因作为人源化的框架区模板(FR)，移植骆驼母本抗体的 CDR 序列到对应种系基因的框架区(FR)中。

同时，人源化过程中根据对序列和抗体同源建模的结构分析结果，对临近 CDR 区的关键核心残基进行回复突变，最终获得人源化抗体突变体。以下是 2E1-A06-VHH 的人源化序列：

>2E1-A06-VHH-H1
EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGYVISRNCMAWFRQAPGKGREWVALTP
GGGTTYYTNSVKGRFTISRDKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRIGFGYCTGT
DRDYTHWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO：24)

>2E1-A06-VHH-H2
EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGYVISRNCMAWFRQAPGKGREWVALTP
GGGTTYYTNSVKGRFTISQDKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAARIGFGYCTGT
DRDYTHWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO：25)

>2E1-A06-VHH-H3
EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCATSGYVISRNCMAWFRQAPGKEREWVALTP
GGGTTYYTNSVKGRFTDSQDKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAARIGFGYCTG
TDRDYTHWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO：26)

>2E1-A06-VHH-H4
EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCATSGYVISRNCMAWFRQAPGKEREWVALTP
GGGTTYYTNSVKGRFTDSQDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARIGFGYCTG
TDRDYTHWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO：27)

>2E1-A06-VHH-H5
EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGYVISRNCMAWFRQAPGKGREWVALTP

GGGTTYYTNSVKGRFTISQDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAARIGFGYCT
GTDRDYTHWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO：28)

>2E1-A06-VHH-H6

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCATSGYVISRNCMAWFRQAPGKEREWVALTP
GGGTTYYTNSVKGRFTDSQDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAARIGFGYC
TGTDRDYTHWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO：29)

以上序列中，下划线为 CDR(根据 Kabat 系统编号)。

将以上人源化 VHH 分别与带有 C220A(根据 EU numbering 系统命名编号)突变的人野生型 IgG1-Fc(Glu216-Lys447)融合，获得全长序列。例如，2E1-A06-VHH-H4（SEQ ID NO：27）与人野生型 IgG1-Fc(Glu216-Lys447)融合，获得 2E1-A06-H4（SEQ ID NO：30）

>2E1-A06-H4

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCATSGYVISRNCMAWFRQAPGKEREWVALTP
GGGTTYYTNSVKGRFTDSQDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARIGFGYCTG
TDRDYTHWGQGTLVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO：30)

其中下划线为带有 C220A 突变的人 IgG1 Fc 区。

合成上述抗体的编码基因序列，亚克隆至 pcDNA3.1 表达载体中。将表达载体和转染试剂 PEI 以 1：2 的比例转染 CHO 细胞，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上清后，按常规方法进行抗体纯化，经检测，获得目的抗体。

4.2 抗 PD-1 鼠单克隆抗体的人源化

在所获得的鼠单抗 113.3 典型结构的基础上，将重、轻链可变区序列与抗体种系数据库比较，获得同源性高的人种系模板。抗体 113.3 选择人种系重链模板 IGHV1-3、人种系轻链模板 IGkV1-16。将鼠源单抗的 CDR 区移植到选择的人源化模板上，替换人源化模板原来存在的 CDR 区，构建成可变区。然后以鼠源单抗的三维结构为基础，对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基，以及对 VH 和 VL 的构象有重要影响的残基进行回复突变，产生一系列人源化抗体。

113.3 各人源化抗体的重链可变区如下：

>113.3 H1CVR

EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQRLEWMGWIY
PGSGNTKYNEKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYSNFFMD
YWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO：31)

>113.3 H2CVR

EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIY
PGSGNTKYNEKFKGRVTLTVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCARYSNFFMD
YWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO：32)

>113.3 H3CVR

EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIY
PGSGNTKYNEKFKGRVTLTVDTSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARYSNFFMD
YWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO：33)

>113.3 HbkCVR

EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIY
PGSGNTKYNEKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYSNFFMD
YWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO：34)

>113.3 Hbk2CVR

EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIY
PGSGNTKYNEKFKGRVTLTVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCARYSNFFMD
YWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO：35)

>113.3 Hbk3CVR

EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIY
PGSGNTKYNEKFKGRVTLTVDTSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARYSNFFMD
YWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO：36)

以上序列中，下划线为重链 CDR。

113.3 各人源化抗体的轻链可变区如下：

>113.3 L1CVR

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGYLSWFQQKPGKAPKRLIYVASTLH
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYASYPYTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO：37)

>113.3 L2CVR

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGYLSWLQQKPGKAPKRLIYVASTLH

SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYASYPYTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO：38)

>113.3 L3CVR

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQEISGYLSWLQQKPGKTPKRLIYVASTLH
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYASYPYTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO：39)

>113.3 L4CVR

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLTCRASQEISGYLSWLQQKPGKTIKRLIYVASTLH
SGVPSRFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYASYPYTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO：40)

>113.3 L1+4CVR

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGYLSWFQQKPGKAIKRLIYVASTLH
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYASYPYTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO：41)

>113.3 L2+4CVR

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGYLSWLQQKPGKAIKRLIYVASTLH
SGVPSRFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYASYPYTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO：42)

以上序列中，下划线为轻链 CDR。

将上述各重链可变区和轻链可变区，分别与人 IgG1 重链恒定区和人 Cκ 轻链恒定区连接，获得全长序列。

以下示出 113.3 Hbk2L1+4 的重链全长和轻链全长序列作为示例：

>113.3 Hbk2C

EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIY
PGSGNTKYNEKFKGRVTLTVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCARYSNFFMD
YWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO：43)

>113.3 L1+4C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGYLSWFQQKPGKAIKRLIYVASTLH
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYASYPYTFGGGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO：44)

以上序列中，重链下划线为人 IgG1 Fc 区，轻链下划线为人 Cκ 区。

将上述人源化的重链全长序列和轻链全长序列分别组合，获得如下人源化分子，见表 6：

表 6. 抗 PD-1 人源化抗体

抗体	重链可变区	轻链可变区
113.3	m113.3-HCVR (SEQ ID NO:8)	m113.3-LCVR (SEQ ID NO:9)
113.3 H1L1	113.3 H1CVR (SEQ ID NO:31)	113.3 L1CVR (SEQ ID NO:37)
113.3 H1L2		113.3 L2CVR (SEQ ID NO:38)
113.3 H1L3		113.3 L3CVR (SEQ ID NO:39)
113.3 H1L4		113.3 L4CVR (SEQ ID NO:40)
113.3 H2L1	113.3 H2CVR (SEQ ID NO:32)	113.3 L1CVR (SEQ ID NO:37)
113.3 H2L2		113.3 L2CVR (SEQ ID NO:38)
113.3 H2L3		113.3 L3CVR (SEQ ID NO:39)
113.3 H2L4		113.3 L4CVR (SEQ ID NO:40)
113.3 H3L1	113.3 H3CVR (SEQ ID NO:33)	113.3 L1CVR (SEQ ID NO:37)
113.3 H3L2		113.3 L2CVR (SEQ ID NO:38)
113.3 H3L3		113.3 L3CVR (SEQ ID NO:39)
113.3 H3L4		113.3 L4CVR (SEQ ID NO:40)
113.3 Hbk2L4	113.3 Hbk2CVR (SEQ ID NO:35)	113.3 L4CVR (SEQ ID NO:40)
113.3 Hbk2L1+4		113.3 L1+4CVR (SEQ ID NO:41)
113.3 Hbk2L2+4		113.3 L2+4CVR (SEQ ID NO:42)
113.3 Hbk3L3	113.3 Hbk3CVR (SEQ ID NO:36)	113.3 L3CVR (SEQ ID NO:39)
113.3 Hbk3L4	113.3 Hbk3CVR (SEQ ID NO:36)	113.3 L4CVR (SEQ ID NO:40)

合成上述抗体的编码基因序列，亚克隆至 pcDNA3.1 表达载体中。将表达载体和转染试剂 PEI 以 1：2 的比例转染 CHO 细胞，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上清后，按常规方法进行抗体纯化，经检测，获得目的抗体。

实施例 5. 抗 PD-1 抗体亲和力测定

SPR 检测抗 PD-1 抗体对重组人 PD-1 蛋白的亲和力。

实验方法：使用 Biacore 8K(GE Healthcare)仪器检测。选用 Protein A 传感器芯

片，流动相采用 HBS-EP+缓冲溶液(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% surfactant P20)。用 HBS-EP+缓冲溶液分别配制各待测抗体作为配体，用芯片通道上的 Protein A 蛋白进行捕获。将人 PD-1 抗原蛋白(ACRO，PD1-H5221)作为分析物，用 HBS-EP+缓冲溶液进行配制，分析物从 100 nM 进行 2 倍梯度稀释，共稀释 7 个浓度点，在 30 μL/min 的流速下流过实验通道和参比通道，结合时间 90s，解离时间 500s。再生缓冲液 10 mM Glycine pH 1.5(GE Healthcare，29238268-AA)在 10 μl/min 的流速下运行 30s。采用 Biacore 8K Evaluation 分析软件进行数据处理。检测通道(Fc 2)信号值减去相应参比通道(Fc 1)信号值，得到校正后的信号曲线。亲和动力学曲线按照 1:1 Langmuir 结合模型进行拟合，计算结合速率 Ka 和解离速率 Kd 以及解离常数(即亲合力 KD 值)。

结果显示，人源化抗体 2E1-A06-H4 和 113.3 Hbk2L1+4 均能结合人 PD-1 蛋白，亲和力见表 7。

表 7. 抗 PD-1 抗体对 PD-1 重组蛋白的亲和力实验结果

抗体	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
2E1-A06-H4	1.49E+05	4.20E-03	2.82E-08
113.3 Hbk2L1+4	9.82E+04	4.34E-04	4.42E-09

实施例 6. 抗 PD-1 抗体的活性测定

6.1 抗 PD-1 抗体对 PD-L1 的拮抗性实验

使用 PD-L1 过表达细胞与 Jurkat 报告基因细胞系共孵育的实验体系检测人源化抗体对 PD-L1 的拮抗性。

实验方法：将 40,000 个 PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞(Promega)铺板于 96 孔板并培养过夜。第二天，使用 PBS 缓冲液和 1640 培养基洗涤细胞，并加入 50,000 个过表达人 PD-1 的 Jurkat PD-1 NFAT 报告基因细胞，以及不同浓度的待测抗体。细胞置于 37°培养箱中培养 6 小时后，使用 Bright-Glo™(Promega)检测报告基因的表达。

结果如图 3 显示，仅 PD-1 拮抗剂 Camrelizumab 诱导荧光素酶报告基因显著表达，2E1-A06-H4、113.3 Hbk2L1+4 和 Peresolimab 均不会阻碍 PD-L1 与 PD-1 的结合。

6.2 抗 PD-1 抗体在 PBMC 激活实验体系中的抑制活性

使用 PBMC 激活实验体系评价人源化抗体抑制 T 细胞释放细胞因子的活性。

实验方法：将 PBMC 与 0.05 μg/mL PHA 孵育 72 小时，并以 200,000 个细胞/孔的密度铺板于预先包被 0.01 μg/mL 的 anti-CD3 和不同浓度人源化抗体的 96 孔板中。同时加入 0.2 μg/mL 的 anti-CD28 进行孵育。37°C培养过夜后，使用 HTRF human IFN gamma kit (Cisbio)检测上清中 IFNγ 的分泌水平。

结果如图 4 显示，2E1-A06-H4 和 113.3 Hbk2L1+4 均剂量依赖性地抑制 IFNγ 分泌，活性显著优于激动剂分子 Peresolimab。本实验结论在 4 个不同 PBMC 捐赠者中得到重复性验证，见表 8。

表 8. 抗 PD-1 抗体在 PBMC 激活实验体系中抑制不同 PBMC 捐赠者 T 细胞分泌 IFNγ 的活性

	2E1-A06-H4	113.3 Hbk2L1+4	Peresolimab
	300 nM 时抑制率		
供体 1	100%	96%	83%
供体 2	100%	99%	62%
供体 3	89%	75%	46%
供体 4	78%	82%	54%

6.3 人源化抗体在 CMV recall 实验体系中的抑制活性

使用 CMV recall 实验体系评价人源化抗体对记忆 T 细胞的抑制活性。

实验方法：200,000 个复苏后的 PBMC 与 3-50 ng/mL 的 CMV peptide pool(Mabtech)和不同浓度的人源化抗体共孵育。培养 5 天后，使用不同荧光标记抗体和荧光二抗 anti-Human IgG Fc (Invitrogen)检测记忆 CD8+ T 细胞中的增殖标志物 Ki67(BD)的表达情况。

结果如图 5 显示，2E1-A06-H4 和 113.3 Hbk2L1+4 均能够抑制记忆 CD8+ T 细胞增殖，抑制活性优于激动剂分子 Peresolimab。本实验结论分别在不同 PBMC 捐赠者中得到重复性验证，见表 9。

表 9. 人源化抗体在 CMV recall 实验体系中抑制不同 PBMC 捐赠者的记忆 T 细胞的活性

最大抑制率	2E1-A06-H4	113.3Hbk2L1+4	Peresolimab
供体 1-实验 1	50%	/	18%
供体 1-实验 2	/	35%	17%
供体 2	66%	51%	31%
供体 3	72%	/	36%

实施例 7. 抗 PD-1 抗体的依赖细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性

使用 ADCC 实验评价人源化抗体介导的 NK 细胞对 PD-1 阳性细胞的杀伤能力。

实验方法：使用分选试剂盒(Stem cell)从新鲜原代人外周血 PBMC 中分选并富集 CD4+ T 细胞，经过预包被 2 μg/mL anti-CD3 和 1 μg/mL anti-CD28 激活 48 小时后，使用 CellTrace™ Violet (Invitrogen)进行避光标记。孵育标记 20 分钟后的 CD4+ T 细胞与 100 nM 待测抗体进行进一步孵育，并加入新鲜原代 NK 细胞(NK:CD4+

T=5:1)，充分混匀后于 37°孵育 4 小时。使用 PI (碧云天)染色检测 CD4+ T 中的凋亡细胞比例。

结果如图 6 或表 10 所示，在两个不同的供体中，2E1-A06-H4 均可诱导 ADCC 杀伤，且杀伤活性均优于 Peresolimab。

表 10. 抗 PD-1 抗体的抗体依赖细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性

最大杀伤比例	2E1-A06-H4	Peresolimab	IgG
供体 1	23%	20%	11%
供体 2	18%	12%	9%

实施例 8. 抗 PD-1 抗体体内功能和效果验证

8.1 抗 PD-1 抗体在移植物抗宿主病(GvHD)模型中的活性评价实验

实验方法：6-8 周龄雌性 NOG 小鼠(维通利华)进行 SPF 环境下的适应性饲养。通过静脉注射原代人外周血 PBMC(5,000,000 个细胞)对平均分组的小鼠进行造模处理。从造模当天开始对各组小鼠进行等摩尔剂量的给药处理，并每周两次检测各小鼠的体重和排斥评分(从皮肤、毛色、姿态和活动度进行评价)，在诱导后 35 天安乐小鼠。具体实验流程如图 7 所示，给药方案如表 11 所示。通过以下方案给药小鼠，并通过小鼠体重变化和排斥评分两个指标评估人源化抗体的激动活性。

表 11. 移植物抗宿主病(GvHD)模型的给药方案

组号	组别	数量	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药时间
1	对照组	3	/	/	/
2	模型组 (Isotype)	5	1	腹腔	一周两次
3	Peresolimab	5	1	腹腔	一周两次
4	2E1-A06-H4	5	0.53	腹腔	一周两次

结果如图 8A 和图 8B 以及表 12 显示，2E1-A06-H4 和对照的 PD-1 激动剂 Peresolimab 均显著抑制小鼠体重下降，且抑制排斥评分(将各组数据分别与模型组数据进行统计学差异计算，*，$p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$)。其中，2E1-A06-H4 维持小鼠体重和抑制排斥评分的效果均显著优于对照 Peresolimab(将 2E1-A06-H4 组与 Peresolimab 组数据进行统计学差异计算，#，$p<0.05$; ##, $p<0.01$; ###, $p<0.001$; ####, $p<0.0001$)，表明在本模型中 2E1-A06-H4 相比 Peresolimab 更显著地抑制人 PBMC 激活，具有更优的体内激动活性。

表 12. 移植物抗宿主病(GvHD)模型的平均体重变化比例和平均临床评分

	造模后天数	对照组	模型组	Peresolimab	2E1-A06-H4
体重变化	28	+15.0%	-8.9%	+1.5%	+11.8%

比例	32	+14.3%	-17.6%	-3.1%	+8.0%
	35	+17.2%	-15.5%	-5.3%	+7.8%
临床评分	28	0.0	5.4	2.6	0.6
	32	0.0	7.6	2.6	1.0
	35	0.0	7.6	3.4	1.6

8.2 抗 PD-1 抗体在胶原诱导的关节炎(CIA)小鼠模型中的活性评价实验

为了在小鼠中更好的模拟抗体在人体中的作用机制，我们将 2E1-A06-H4 的 Fc 改为小鼠 IgG2a，命名为 2E1-A06-H4-mIgG2a。Peresolimab 和 113.3 Hbk2L1+4 抗体仅保留 VH 和 VL 序列不变，将重链的 CH1 和 Fc 改为 mIgG2a，轻链恒定区改为小鼠 Kappa，分别命名为 Peresolimab-mIgG2a、113.3 Hbk2L1+4-mIgG2a。具体序列如下：

> Peresolimab-mIgG2a HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYSLSKYDMSWVRQAPGKGLEWMGIIY
TSGYTDYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGNPYYTN
GFNSWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL
TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVD
KKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSE
DDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK
CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP
EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

(SEQ ID NO：46)

> Peresolimab-mIgG2a LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSPNNLLAWYQQKPGKAPKLLIYGASDL
PSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNNYYVGPVSYAFGGGTKVEI
KRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVL
NSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

(SEQ ID NO：47)

>2E1-A06-H4-mIgG2a

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCATSGYVISRNCMAWFRQAPGKEREWVALTP
GGGTTYYTNSVKGRFTDSQDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARIGFGYCTG
TDRDYTHWGQGTLVTVSSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL
MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS
ALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM
TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKL
RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

(SEQ ID NO：48)

>113.3 Hbk2L1+4-mIgG2a HC

EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIY
PGSGNTKYNEKFKGRVTLTVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCARYSNFFMD
YWGQGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW
NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK
IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDD
PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCK
VNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPED
IYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVV
HEGLHNHHTTKSFSRTPGK

(SEQ ID NO：49)

>113.3 Hbk2L1+4-mIgG2a LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGYLSWFQQKPGKAIKRLIYVASTLH
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYASYPYTFGGGTKVEIKRAD
AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWT
DQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

(SEQ ID NO：50)

实验方法：8-9 周龄雄性 C57BL/6 品系的 human PD-1 转基因小鼠(百奥赛图)进行 SPF 环境下的适应性饲养。在第 0 天和第 21 天，对小鼠进行尾根部的皮内注射 0.2 mg II 型胶原与佐剂配制而成的乳剂。从第二次诱导开始，每周三次进行小鼠四肢关节炎评分。在首次诱导后第 30 天，根据小鼠关节炎评分和外周 C 反应蛋白水平对小鼠进行平均分组，并同时开始给药处理。此后，维持每周三次的评分频率，并在第 57 天实验终点时安乐小鼠，检测右后关节的病理变化。具体实验流程如图 9 所示。通过以下方案给药小鼠，并通过小鼠关节炎评分和终点的关节病理评分指标评估人源化抗体的激动活性。

表 13. 胶原诱导的关节炎(CIA)小鼠模型的给药方案

组号	组别	数量	剂量(mg/kg)	给药方式	给药时间
1	对照组	3	/	/	/
2	模型组 (Isotype)	6	20	腹腔	一周两次
3	Peresolimab-mIgG2a	6	20	腹腔	一周两次
4	2E1-A06-H4-mIgG2a	6	3.5	腹腔	一周两次

结果显示，2E1-A06-H4-mIgG2a 显著抑制小鼠关节炎评分，而对照的 Peresolimab-mIgG2a 对疾病总分的改善较弱。对给药后小鼠相比第 30 天分组时的评分变化进行个体分析，发现 2E1-A06-H4-mIgG2a 可诱导大部分动物关节炎评分变化小于 0，表明关节炎缓解，而对照 Peresolimab-mIgG2a 组在发病后期存在个体疾病缓解(表 14)。以上数据表明在小鼠关节炎模型中，2E1-A06-H4-mIgG2a 相比 Peresolimab-mIgG2a 具有明显抑制关节损伤的药效优势。

表 14. 关节炎(CIA)小鼠模型中各组小鼠的关节炎评分和关节炎缓解比例

首次诱导后天数		模型组	Peresolimab-mIgG2a 20 mg/kg	2E1-A06-H4-mIgG2a 3.53 mg/kg
第 30 天	评分	7.00±1.03	6.83±1.01	6.67±0.95
第 53 天	评分	8.67±1.98	7.33±1.31	4.33±0.84
	缓解比例	17%	33%	100%

评分数据为 Mean±SEM；关节炎缓解比例定义为：检测时关节炎评分相比分组给药时关节炎评分变化<0 个体的比例。

权利要求书：

1. PD-1 结合蛋白，其包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO：2 和 24-29 中任一项所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。

2. 根据权利要求 1 所述的 PD-1 结合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别包含如 SEQ ID NO：3-5 所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 PD-1 结合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域为骆驼来源的、经人源化改造的、和/或经亲和力成熟改造的。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一所述的 PD-1 结合蛋白，其中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO：2 和 24-29 中任一所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的 PD-1 结合蛋白，其包含如 SEQ ID NO：30、7 或 48 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的 PD-1 结合蛋白，其中，所述 PD-1 结合蛋白是抗 PD-1 抗体；优选地，所述抗 PD-1 抗体为骆驼抗体、嵌合抗体、人源化抗体或其抗原结合片段。

7. PD-1 结合蛋白，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：8 和 31-36 中任一项所示氨基酸序列中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和，所述 VL 包含 SEQ ID NO：9 和 37-42 中任一项所示氨基酸序列中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，

所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。

8. 根据权利要求 7 所述的 PD-1 结合蛋白，所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别包含 SEQ ID NO：10-12 所示的氨基酸序列；和所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别包含 SEQ ID NO：13-15 所示的氨基酸序列。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的 PD-1 结合蛋白，所述 PD-1 结合蛋白为抗 PD-1 抗体，所述抗 PD-1 抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、或人源化抗体或其抗原结合片段；

优选地，所述人源化抗体使用人种系重链模板 IGHV1-3，和/或，人种系轻链模板 IGkV1-16。

10. 根据权利要求 7 至 9 中任一所述的 PD-1 结合蛋白，其中，

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：8 和 31-36 中任一项所示，或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；和，所述 VL 包含如 SEQ ID NO：9 和 37-42 中任一项所示，或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

优选地，

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：35 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：41 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：31 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：37 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：31 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：38 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：31 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：31 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：37 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：38 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：32 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示或与之具有至少 90%序列同一性

的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：37 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：38 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：33 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：35 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：35 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：42 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：36 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：39 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：36 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：40 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；或，

所述 VH 包含如 SEQ ID NO：8 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和所述 VL 包含如 SEQ ID NO：9 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的 PD-1 结合蛋白，其还包含免疫球蛋白 Fc 区；优选地，所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 区。

12. 根据权利要求 11 所述的 PD-1 结合蛋白，其包括重链和轻链，其中，

所述重链包含如 SEQ ID NO：43 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；和，所述轻链包含如 SEQ ID NO：44 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

所述重链包含如 SEQ ID NO：49 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；和，所述轻链包含如 SEQ ID NO：50 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；或者

所述重链包含如 SEQ ID NO：18 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；和，所述轻链包含如 SEQ ID NO：19 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

13. 多核苷酸，其编码权利要求 1 至 12 任一项所述的 PD-1 结合蛋白。

14. 宿主细胞，其含有权利要求 13 所述的多核苷酸。

15. 药物组合物，其含有权利要求 1 至 12 任一项所述的 PD-1 结合蛋白和至少一种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

16. 制备 PD-1 结合蛋白的方法，包括：

1)培养权利要求 14 所述的宿主细胞，以及

2)从所述宿主细胞中分离所表达的 PD-1 结合蛋白。

17. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的 PD-1 结合蛋白，或权利要求 15 所述的药物组合物在制备治疗炎性或自身免疫性疾病的药物中的用途；

优选地，所述炎性或自身免疫性疾病选自移植物抗宿主病(GvHD)、移植排斥反应、关节炎(CIA)、类风湿关节炎(RA)。

18. 一种治疗炎性或自身免疫性疾病的方法，包括向受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 12 任一项所述的 PD-1 结合蛋白、权利要求 13 的多核苷酸或权利要求 15 的药物组合物；

优选地，所述炎性或自身免疫性疾病选自移植物抗宿主病(GvHD)、移植排斥反应、关节炎(CIA)、或类风湿关节炎(RA)。

19. 一种下调免疫应答的方法，包括向受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 12 任一项所述的 PD-1 结合蛋白、权利要求 13 的多核苷酸或权利要求 15 的药物组合物。

20. 一种抑制 T 细胞活性的方法，包含向有需要的受试者施用有效量的权利要求 1 至 12 任一项所述的 PD-1 结合蛋白、权利要求 13 的多核苷酸或权利要求 15 的药物组合物；

优选地，所述抑制 T 细胞活性选自以下至少一项的特征：

(a) 抑制 T 细胞释放细胞因子的活性，例如抑制 T 细胞分泌 IFNγ 的活性；

(b) 抑制 T 细胞增殖，例如抑制记忆 CD8+T 细胞增殖；

(c) 减少 PD-1 阳性的 T 细胞。