

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2022年2月3日 (03.02.2022)



(10) 国际公布号  
**WO 2022/022660 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/109438

(22) 国际申请日: 2021年7月30日 (30.07.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202010755954.9 2020年7月31日 (31.07.2020) CN  
202110831575.8 2021年7月22日 (22.07.2021) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(72) 发明人: 莫希叶乐 (MO, Xiyele); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。颜贞 (YAN, Zhen); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。刘洵 (LIU, Xun); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼19层程伟 (David W. Cheng), Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2 (a))。

(54) Title: ANTI-PD-1 ANTIBODY PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗PD-1抗体药物组合物及其用途

(57) Abstract: The present disclosure relates to an anti-PD-1 antibody pharmaceutical composition and use thereof. Specifically, the present disclosure provides a pharmaceutical composition, comprising an anti-PD-1 antibody and a buffer solution.

(57) 摘要: 本披露涉及抗PD-1抗体药物组合物及其用途。具体地, 本披露提供一种药物组合物, 其包含抗PD-1抗体以及缓冲液。



WO 2022/022660 A1

## 抗 PD-1 抗体药物组合物及其用途

### 技术领域

- 5           本披露属于药物制剂领域，具体涉及包含抗 PD-1 抗体的药物组合物，以及其作为药物的用途。

### 背景技术

- 这里的陈述仅是提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。
- 10           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，对肿瘤进行杀伤的治疗方法。与此同时，肿瘤细胞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。在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，但随着肿瘤生长在后期失去了杀伤的功能。

- 人体内 T 细胞的活化采取了两条信号通路系统，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着至关重要的作用，它严格调控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-1, PD-1) 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-1 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 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。

          抗 PD-1 抗体可通过阻断 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。

### 发明内容

- 35           本披露提供抗 PD-1 抗体药物组合物及其用途。
- 一方面，本披露提供一种药物组合物，其包含抗 PD-1 抗体以及缓冲液，其中，

所述缓冲液为醋酸盐缓冲液、组氨酸盐缓冲液或琥珀酸盐缓冲液。优选地，所述缓冲液的 pH 为约 4.5 至约 6.0，优选 pH 为约 4.7 至约 5.7，更优选 pH 为约 5.2；所述醋酸盐缓冲液优选为醋酸-醋酸钠缓冲液，所述组氨酸盐缓冲液优选为组氨酸-醋酸盐缓冲液，所述琥珀酸盐缓冲液优选为琥珀酸-琥珀酸钠缓冲液；所述抗 PD-1 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含：如 SEQ ID NO: 65 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 66 所示的 HCDR2，和如 SEQ ID NO: 67 所示的 HCDR3，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 68 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR2，和如 SEQ ID NO: 69 所示的 LCDR3；优选地，其中所述抗 PD-1 抗体的重链可变区包含：如 SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR2，和如 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR3，轻链可变区包含：如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR2，和如 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR3。具体序列见下表 1：

表 1. 抗体 CDR 序列

重链		轻链	
HCDR1	DYE X <sub>1</sub> H, 其中, X <sub>1</sub> 选自 I 或 M; (SEQ ID NO: 65)	LCDR1	RSSQSX <sub>13</sub> VHSX <sub>14</sub> X <sub>15</sub> X <sub>16</sub> T YLE, 其中, X <sub>13</sub> 选自 I 或 L, X <sub>14</sub> 选自 N、Q、L、T 或 D, X <sub>15</sub> 选自 G、A 或 V, X <sub>16</sub> 选 自 N 或 K; (SEQ ID NO: 68)
HCDR2	LX <sub>2</sub> DPETGGX <sub>3</sub> VYNQKFKX <sub>4</sub> , 其中, X <sub>2</sub> 选自 F 或 I, X <sub>3</sub> 选自 I 或 T, X <sub>4</sub> 选 自 G 或 D; (SEQ ID NO: 66)	LCDR2	KVSNRFS; (SEQ ID NO: 12)
HCDR3	EX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> YX <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> DWYFDV, 其中, X <sub>5</sub> 选自 G 或 R, X <sub>6</sub> 为 F 或空 缺, X <sub>7</sub> 为 S 或空缺, X <sub>8</sub> 为 Y 或空缺, X <sub>9</sub> 为 G 或空缺, X <sub>10</sub> 为 S 或空缺, X <sub>11</sub> 选自 N 或 T, X <sub>12</sub> 选自 R 或 S; (SEQ ID NO: 67)	LCDR3	FQGSHPYX <sub>17</sub> , 其中, X <sub>17</sub> 选自 A 或 T; (SEQ ID NO: 69)

15 在一些可选的实施方案中，在前述药物组合物中，所述抗 PD-1 抗体的重链可变区包含序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR1，序列如 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR2，和序列如 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR3；所述轻链可变区包含序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR2，序列如 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR3，和序列如通式 RSSQSX<sub>13</sub>VHSX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>TYLE (SEQ ID NO: 68) 所示的 LCDR1，其中  
20 X<sub>13</sub> 选自 L, X<sub>14</sub> 选自 N、Q、L、T 或 D, X<sub>15</sub> 选自 G、A 或 V, X<sub>16</sub> 选自 N。

在一些可选的实施方案中，在前述药物组合物中，所述抗 PD-1 抗体是选自如下 (a) 至 (e) 任一项所述的抗 PD-1 抗体：

(a) 一种抗 PD-1 抗体，其包含序列分别如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和序列分别如 SEQ ID NO:

12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR2 和 LCDR3, 和序列如 SEQ ID NO: 11、47、48、49、50、51 或 52 所示的 LCDR1;

(b) 一种抗 PD-1 抗体, 其包含序列分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和序列分别如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

(c) 一种抗 PD-1 抗体, 其包含序列分别如 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和序列分别如 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

(d) 一种抗 PD-1 抗体, 其包含序列分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和序列分别如 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR2 和 LCDR3, 以及序列如 SEQ ID NO: 11、47、48、49、50、51 或 52 所示的 LCDR1; 和

(e) 所述重链可变区包含序列分别如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和所述轻链可变区包含序列分别如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, 在前述药物组合物中, 所述抗 PD-1 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中所述的重链可变区包含序列分别如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和所述轻链可变区包含序列分别如 SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, 在前述药物组合物中, 所述抗 PD-1 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中所述的重链可变区包含序列分别如 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和所述轻链可变区包含序列分别如 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, 在本披露的前述药物组合物中, 所述抗 PD-1 抗体以等于或小于  $10^{-7}$ M 解离平衡常数 (KD 值) 与人 PD-1 结合, 在一些实施方案中, 以等于或小于  $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M 或  $10^{-11}$ M 解离平衡常数与人 PD-1 结合。所述 KD 值通过表面等离子共振技术 (Biacore) 所测定; 例如, 通过本披露的测试例 1 所述方法进行检测。

在一些实施方案中, 在前述药物组合物中, 所述缓冲液的 pH 值为约 4.5 至约 6.0, 优选为 4.5 至 6.0; 在一些实施方案中, 所述缓冲液 pH 值为约 4.7 至约 5.7, 优选为 4.7 至 5.7; 在另一些实施方案中, 所述缓冲液 pH 值为约 5.2, 优选为 5.2; 在另一些实施方案中, 所述缓冲液为 pH 为约 4.7 至约 5.7 的醋酸盐缓冲液; 在另一些实施方案中, 所述缓冲液为 pH 为 5.2 的醋酸盐缓冲液。在另一些实施方案中,

缓冲液的 pH 值非限制的实施例包括约 4.5、约 4.6、约 4.7、约 4.8、约 4.9、约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4、约 5.5、约 5.6、约 5.7、约 5.8、约 5.9、约 6.0，以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中，前述药物组合物的 pH 值与其缓冲液 pH 值一致或几乎一致（本领域技术人员公知，在制备药物制剂的过程中，有的会存在 pH 漂移（制剂 pH 与缓冲液 pH 存在一些差值，称为 pH 漂移值），pH 的漂移值通常在 $\pm 0.3$  范围内，如无特别说明，本披露药物组合物的 pH 漂移值在 $\pm 0.3$  范围内，优选在 $\pm 0.2$  范围内，更优选在 $\pm 0.1$  范围内）。

在一些实施方案中，在前述的药物组合物中，所述缓冲液浓度为大约 5mM 至大约 30mM，优选为 5mM 至 30mM；在一些实施方案中，缓冲液浓度为大约 5mM 至大约 15mM，优选 5mM 至 15mM；在一些实施方案中，缓冲液浓度为大约 10mM，优选 10mM。缓冲液浓度的非限制性实施例包括约 5mM、约 7mM、约 8mM、约 9mM、约 10mM、约 11mM、约 12mM、约 13mM、约 14mM、约 15mM、约 16mM、约 18mM、约 20mM、约 25mM、约 30mM，以及这些点值之间的任一范围。

在一些实施方案中，在前述的药物组合物中，所述抗 PD-1 抗体浓度为大约 1mg/mL 至大约 150mg/mL，优选 1mg/mL 至 150mg/mL；在一些实施方案中，抗 PD-1 抗体浓度为大约 90mg/mL 至大约 150mg/mL，优选 90mg/mL 至 150mg/mL；在一些实施方案中，抗 PD-1 抗体浓度为大约 100mg/mL 至大约 120mg/mL。在一些实施方案中，抗 PD-1 抗体浓度为大约 100mg/mL。在一些实施方案中，抗 PD-1 抗体浓度为 100mg/mL。抗 PD-1 抗体浓度非限制性实施例包括：大约 1mg/mL、大约 10mg/mL、大约 20mg/mL、大约 30mg/mL、大约 40mg/mL、大约 50mg/mL、大约 60mg/mL、大约 70mg/mL、大约 80mg/mL、大约 90mg/mL、大约 100mg/mL、大约 110mg/mL、大约 120mg/mL、大约 130mg/mL、大约 140mg/mL、大约 150mg/mL，以及这些点值之间的任一范围。

在一些实施方案中，前述的药物组合物还包括渗透压调节剂。在一些实施方案中，渗透压调节剂为糖（包括单糖，二糖，三糖，多糖，糖醇，还原性糖，非还原性糖等等）、氨基酸（包括精氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、组氨酸等等）或盐类（氯化钠、氯化钾、氯化钙等）。在一些实施方案中，所述糖选自：葡萄糖，蔗糖，海藻糖，乳糖，果糖，麦芽糖，右旋糖苷，甘油，赤藻糖醇，丙三醇，阿拉伯糖醇，木糖醇，山梨糖醇（也称山梨醇），甘露醇，密里二糖，松三糖，蜜三糖，甘露三糖，水苏糖，麦芽糖，乳果糖，麦芽酮糖，麦芽糖醇，乳糖醇和异-麦芽酮糖。在一些实施方案中，所述的糖是非还原性二糖；在一些实施方案中，所述的糖优选为海藻糖或蔗糖，最优选为蔗糖。在一些实施方案中，所述渗透压调节剂选自由蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精氨酸、甘氨酸和氯化钠组成的组中的一种或多种。在一些实施方案中，渗透压调节剂浓度优选为大约 50mg/mL 至大约 100mg/mL，更优选为大约 70mg/mL 至大约 90mg/mL；最优选为大约 80mg/mL。在一些实施方案中，渗透压调节剂浓度非限制性实施例包括约 50mg/mL、约 60mg/mL、约

65mg/mL、约 70mg/mL、约 75mg/mL、约 80mg/mL、约 85mg/mL、约 90mg/mL、约 95mg/mL、约 100mg/mL，以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中，前述药物组合物为等渗制剂。在一些实施方案中，所述渗透压调节剂使前述药物组合物渗透压控制在 280-320mOsm，优选渗透压控制在约 300 mOsm。在一些实施方案中，所述渗透压调节剂优选大约 70mg/mL 至大约 90mg/mL 蔗糖，最优选为大约 80mg/mL 蔗糖。

在一些实施方案中，前述药物组合物还包括表面活性剂，所述表面活性剂可选自聚山梨酯 20（也称吐温 20）、聚山梨酯 80（也称吐温 80）、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲基胺、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇和乙烯与丙烯二醇的共聚物等等。优选的表面活性剂是聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20，更优选为聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，在前述的药物组合物中，所述表面活性剂的浓度为大约 0.1mg/mL 至大约 1.0mg/mL，优选为大约 0.2mg/mL 至大约 0.8mg/mL；在一些实施方案中，表面活性剂的浓度为大约 0.4mg/mL 至大约 0.8mg/mL，优选大约 0.6mg/mL 至大约 0.8mg/mL；在一些实施方案中，表面活性剂的浓度为大约 0.6mg/mL，优选 0.6mg/mL。非限制性实施例包括约 0.1mg/mL、约 0.2mg/mL、约 0.3mg/mL、约 0.4mg/mL、约 0.45mg/mL、约 0.5mg/mL、约 0.55mg/mL、约 0.6mg/mL、约 0.7mg/mL、约 0.8mg/mL、约 0.9mg/mL、约 1.0mg/mL，以及这些点值之间的任一范围。

在一些实施方案中，前述药物组合物中的抗 PD-1 抗体是鼠源抗体、嵌合抗体、全人抗体，或人源化抗体。

在一些实施方案中，前述药物组合物中的抗 PD-1 抗体为人源化抗体。在一些实施方案中，所述人源化抗体包含来源自人抗体的框架区或其框架区变体。在一些实施方案中，所述框架区变体为在人抗体的轻链框架区和/或重链框架区基础上分别具有至多 11 个氨基酸的回复突变。在一些实施方案中，所述框架区变体与来源自人抗体的框架区相比，包含选自以下 (f) 至 (h) 任一所述的突变：

(f)轻链可变区中包含 2G 氨基酸回复突变，和/或重链可变区中包含选自 27Y、48I、67T、69L、82F 和 93T 中的一个或多个氨基酸回复突变；

(g)轻链可变区中包含 2V 氨基酸回复突变，和/或重链可变区中包含选自 26D、27F、30T、38K、43H、48I、66K、67A、69L、82F 和 93T 中的一个或多个氨

基酸回复突变；和

(h) 轻链可变区中包含选自 42G、44V 和 71Y 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或重链可变区中包含 1K 和/或 94S 氨基酸回复突变。

5 在一些实施方案中，前述药物组合物中的抗 PD-1 抗体包含选自如下所述的抗体可变区：

(a2) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和包含选自 27Y、48I、67T、69L、82F 和 93T 中的一个或多个氨基酸回复突变的重链框架区，和

10 轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR2 和 LCDR3，和如 SEQ ID NO: 11、47、48、49、50、51 或 52 所示的 LCDR1，和包含 2G 氨基酸回复突变的轻链框架区；

(b2) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和包含选自 26D、27F、30T、38K、43H、48I、66K、67A、69L、82F 和 93T 中的一个或多个氨基酸回复突变的  
15 重链框架区；和

轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，和包含 2V 氨基酸回复突变的轻链框架区；

(c2) 重链可变区，其包含序列分别如 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和包含 1K 和/或 94S 氨基酸  
20 回复突变的重链框架区，和

轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，和包含选自 42G、44V 和 71Y 中的一个或多个氨基酸回复突变的轻链框架区。

25 在一些实施方案中，前述药物组合物中的抗 PD-1 抗体包含选自如下(i)至(o)任一所述的抗体可变区；

(i) 重链可变区，其序列如 SEQ ID NO:4 所示或与 SEQ ID NO: 4 具有至少 90%序列同一性，和/或

轻链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 5 所示或与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90%序列同一性；

30 (j) 重链可变区，其序列如 SEQ ID NO:6 所示或与 SEQ ID NO: 6 具有至少 90%序列同一性，和/或

轻链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 7 所示或与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90%序列同一性；

35 (k) 重链可变区，其序列如 SEQ ID NO:19 所示或与 SEQ ID NO: 19 具有至少 90%序列同一性，和/或

轻链可变区，其序列如 SEQ ID NO: 20 所示或与 SEQ ID NO: 20 具有至少

90%序列同一性;

(l) 重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO:27、30、31 或 32 所示, 或与 SEQ ID NO: 27、30、31 或 32 具有至少 90%序列同一性, 和/或

轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 28、29、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63 或 64 所示, 或与 SEQ ID NO: 28、29、34、35、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63 或 64 具有至少 90%序列同一性;

(m) 重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO:33、36、37、38、39 或 40 所示, 或与 SEQ ID NO:33、36、37、38、39 或 40 具有至少 90%序列同一性, 和/或

轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 34、35、28、29、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63 或 64 所示, 或与 SEQ ID NO: 34、35、28、29、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63 或 64 具有至少 90%序列同一性;

(n)重链可变区,其序列如 SEQ ID NO:41、45 或 46 所示,或与 SEQ ID NO:41、45 或 46 具有至少 90%序列同一性, 和/或

轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 42、43 或 44 所示, 或与 SEQ ID NO: 42、43 或 44 具有至少 90%序列同一性;

(o) 重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO:70 所示或与 SEQ ID NO: 70 具有至少 90%序列同一性, 和/或

轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 71 所示或与 SEQ ID NO: 71 具有至少 90%序列同一性; 和

(p) 重链可变区, 其序列如 SEQ ID NO:27、30、31 或 32 所示, 或与 SEQ ID NO:27、30、31 或 32 具有至少 90%序列同一性, 和/或

轻链可变区, 其序列如 SEQ ID NO: 34 或 35 所示, 或与 SEQ ID NO: 34 或 35 具有至少 90%序列同一性;

其中, 序列 SEQ ID NO: 70 和 SEQ ID NO: 71 为通式, 具体序列见表 2:

表 2. 抗体可变区序列

<p>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASX<sub>18</sub>X<sub>19</sub>TFX<sub>20</sub>  <u>DYEX<sub>1</sub>HWVX<sub>21</sub>QAPGX<sub>22</sub>GLEWX<sub>23</sub>GLX<sub>2</sub>DPETGGX<sub>3</sub></u>  <u>VYNQKFKX<sub>4</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>TX<sub>26</sub>TADKSTSTAYMEX<sub>27</sub>SSL</u>  <u>RSEDTAVYYCX<sub>28</sub>REX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>YX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>DWYF</u>  <u>DVWGQGTTVTVSS</u>, 其中, X<sub>1</sub>选自 I 或 M, X<sub>2</sub>选自 F 或 I, X<sub>3</sub>选自 I 或 T, X<sub>4</sub>选自 G 或 D, X<sub>5</sub>选自 G 或 R, X<sub>6</sub>为 F 或缺, X<sub>7</sub>为 S 或缺, X<sub>8</sub>为 Y 或缺, X<sub>9</sub>为 G 或缺, X<sub>10</sub>为 S 或缺, X<sub>11</sub>选自 N 或 T, X<sub>12</sub>选自 R 或 S, X<sub>18</sub>选自 G 或 D, X<sub>19</sub>选自 G、F 或 Y, X<sub>20</sub>选自 S 或 T, X<sub>21</sub>选自 R 或 K, X<sub>22</sub>选自 Q 或 H, X<sub>23</sub>选自 M 或 I, X<sub>24</sub>选自 R 或 K, X<sub>25</sub>选自 V、A 或 T, X<sub>26</sub>选自 R 或 K, X<sub>27</sub>选自 L 或 F, X<sub>28</sub>选自 A 或 T (SEQ ID NO: 70)</p>	<p>DX<sub>29</sub>VMTQTPLSLPVTGPGEPA  SISCRSSQX<sub>13</sub>VHSX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>  <u>TYLEWYLQKPGQSPQLLIYK</u>  <u>VSNRFGVDPDRFSGSGSGTD</u>  <u>FTLKISRVEAEDVGVYYCFQ</u>  <u>GSHVPYX<sub>17</sub>FGGGTKVEIK</u>,  其中, X<sub>13</sub>选自 I 或 L, X<sub>14</sub>选自 N、Q、L、T 或 D, X<sub>15</sub>选自 G、A 或 V, X<sub>16</sub>选自 N 或 K, X<sub>17</sub>选自 A 或 T, X<sub>29</sub>选自 I、V 或 G (SEQ ID NO: 71)</p>
---	--

在一些实施方案中, 在前述药物组合物中, 所述的抗 PD-1 抗体的重链可变区如 SEQ ID NO: 27 所示或与 SEQ ID NO: 27 具有至少 90%的同一性, 且所述抗



PD-1 抗体的轻链可变区序列如 SEQ ID NO: 55 所示或与 SEQ ID NO: 55 具有至少 90% 的序列同一性。

在一些实施方案中，在前述药物组合物中，所述的抗 PD-1 抗体的重链可变区如 SEQ ID NO: 46 所示或与 SEQ ID NO: 46 具有至少 90% 的同一性，且所述抗 PD-1 抗体的轻链可变区序列如 SEQ ID NO: 43 所示或与 SEQ ID NO: 43 具有至少 90% 的序列同一性。

前述的“至少 90% 同一性”包含具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性。

在另外一些实施方案中，在前述药物组合物中，所述的抗 PD-1 抗体进一步包含抗体重链恒定区和/或抗体轻链恒定区；在另外一些实施方案中，所述抗体重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的恒定区及其常规变体，所述抗体轻链恒定区选自人抗体  $\kappa$  和  $\lambda$  链的恒定区及其常规变体；在另外一些实施方案中，所述抗体重链恒定区包含引入 S228P、F234A 和 L235A 中的一个或多个突变的 IgG4 的重链恒定区，例如含 S228P、F234A 和 L235A 三个氨基酸突变；在另外一些实施方案中，所述抗体包含序列如 SEQ ID NO:72 或如 SEQ ID NO:79 所示的重链恒定区和序列如 SEQ ID NO:73 所示的轻链恒定区。

在一些实施方案中，在前述药物组合物中，所述的抗 PD-1 抗体包含如 SEQ ID NO: 78 所示或与 SEQ ID NO: 78 具有至少 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99% 或 100% 序列同一性的轻链和如 SEQ ID NO: 77 或 82 所示或与 SEQ ID NO: 77 或 82 具有至少 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99% 或 100% 序列同一性的重链；或包含如 SEQ ID NO: 75 所示或与 SEQ ID NO: 75 具有至少 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99% 或 100% 序列同一性的轻链和如 SEQ ID NO: 74、76、80 或 81 所示或与 SEQ ID NO: 74、76、80 或 81 具有至少 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99% 或 100% 序列同一性的重链。

在一些实施方案中，在前述药物组合物中，所述的抗 PD-1 抗体包含：如 SEQ ID: 74 所示的重链和如 SEQ ID: 75 所示的轻链；或如 SEQ ID: 77 所示的重链和如 SEQ ID: 78 所示的轻链。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：

- a) 浓度为大约 1mg/mL 至大约 150mg/mL 的抗 PD-1 抗体，
- b) 浓度为大约 5mM 至大约 30mM，pH 为大约 4.5 至约 6.0 的醋酸盐缓冲液，
- c) 浓度为大约 50mg/mL 至大约 100mg/mL 的渗透压调节剂，所述渗透压调节剂选自蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精氨酸、甘氨酸和氯化钠；
- d) 浓度为大约 0.2mg/mL 至大约 0.8mg/mL 的聚山梨酯；

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：

A1)浓度为大约 90mg/mL 至大约 150mg/mL 的抗 PD-1 抗体，

B1)浓度为大约 10mM 至大约 30mM，pH 为大约 4.7 至约 5.7 的醋酸盐缓冲液，

C1)浓度为大约 70mg/mL 至大约 90mg/mL 的蔗糖，和

5 D1)浓度为大约 0.6mg/mL 至大约 0.8mg/mL 的聚山梨酯 80；

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 120mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

10 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

15 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

20 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.7 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的组氨酸-醋酸盐缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

25 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 30mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 120mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.2mg/mL 聚山梨酯 80。

30 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.4mg/mL 聚山梨酯 80。

35 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.8mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋

酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 20。

5 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 海藻糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

10 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 50mg/mL 山梨醇，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 100 mM 精氨酸，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

15 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 100 mM 甘氨酸，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

20 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 100 mM NaCl，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 20mM 的 pH 为大约 5.7 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 150mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

25 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 21.9mM 的 pH 为大约 4.7 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 120mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 4.7 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 90mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

30 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 20mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 120mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

35 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 20mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 90mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.7 的醋

酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 150mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

5 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 30mM 的 pH 为大约 4.7 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 90mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 4.7 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 150mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

10 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 30mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 150mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.7 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 90mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

15 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：大约 30mM 的 pH 为大约 5.7 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 107.7mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

20 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：pH 为 5.2 的 10mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为 120mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为 70mg/mL 蔗糖，和浓度为 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，前述药物组合物包含：pH 为 5.2 的 10mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为 120mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为 90mg/mL 蔗糖，和浓度为 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

25 在一些实施方案中，前述药物组合物包含：pH 为 5.2 的 10mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为 120mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为 80mg/mL 蔗糖，和浓度为 0.6mg/mL 聚山梨酯 80；其中，所述抗 PD-1 抗体具有如 SEQ ID: 74 所示的重链，和如 SEQ ID: 75 所示的轻链。在一些实施方案中，本披露提供一种制备前述的药物组合物的方法，所述方法包括将抗 PD-1 抗体原液经缓冲液置换的步骤，在一些实施方案中，所述缓冲液选自醋酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液或琥珀酸盐缓冲液。

30 本披露还提供一种冻干制剂，其复溶后可形成前述任一项所述的药物组合物。

在一些实施方案中，本披露提供一种含抗 PD-1 抗体的冻干制剂，所述冻干制剂通过将前述的药物组合物经冷冻干燥获得。在可选的实施方案中，前述制备其中所述冷冻干燥依次包括预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。

35 在一些实施方案中，本披露提供一种含抗 PD-1 抗体的冻干制剂，所述冻干制剂经复溶可形成前述的药物组合物。

在一些实施方案中，本披露提供一种冻干制剂，所述冻干制剂为前面任一项

所述的药物组合物的冻干形式。

在一些实施方案中，前述药物组合物或冻干制剂为稳定制剂，在一些实施方案中，前述药物组合物或冻干制剂在冷藏温度(2-8°C)条件下保存 6 个月时，SEC 单体百分比下降不超过 5%。在一些实施方案中，前述药物组合物或冻干制剂于 2-8°C 5 稳定至少 3 个月，至少 6 个月，至少 12 个月，至少 18 个月或至少 24 个月。在一些实施方案中，前述药物组合物在 4°C 条件下放置 6 个月，制剂 SEC 单体百分比下降不超过 2% (例如小于 2%，小于 1%、小于 0.8%、小于 0.5%甚至更小)；在一些实施方案中，所述药物组合物在强制降解条件(40°C M1)下，相比 D0 时的 SEC 值， SEC 下降幅度小于或等于约 10%；优选小于或等于约 9%、约 8%、约 7%、 10 约 6%、约 5%、约 4%、约 3%、约 2%或约 1%；更优选 SEC 下降幅度为 1.1%-2.7% 之间。在一些实施方案中，前述药物组合物在 4°C 条件下放置 6 个月,制剂 SEC 单体百分比大于 94% (例如大于 94.5%、95%、98%)。

在一些实施方案中，本披露提供一种含抗 PD-1 抗体的复溶溶液，所述复溶溶液通过将前述的冻干制剂经复溶获得。其复溶所用溶液包括但不限于注射用水、 15 生理盐水或葡萄糖溶液，优选注射用水。

在一些实施方案中，本披露提供一种复溶溶液，所述复溶溶液为前面任一项所述的冻干制剂的复溶形式。

在一些实施方案中，本披露提供一种制品，其包括容器，该容器中装有如前所述的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液。在一些实施方案中，该容器为中性硼 20 硅玻璃管制注射剂瓶。

本披露还提供前述的药物组合物、冻干制剂、复溶溶液或制品在制备用于治疗/预防疾病或病症的药物中的用途。

本披露还提供作为治疗/预防疾病或病症的药物的前述药物组合物、冻干制剂、复溶溶液或制品。

25 本披露还提供一种治疗或预防疾病或病症的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量或预防有效量的前述药物组合物、冻干制剂、复溶溶液或制品。

在一些实施方案中，前面任一项所述疾病或病症是 PD-1 相关的疾病或病症。在一些实施方案中，前面任一项所述疾病为肿瘤。在另一些实施方案中，前面任一项所述疾病选自：头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多 30 形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌、恶性胸膜间皮瘤、肺癌、乳腺癌、肝癌、肝细胞瘤、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、皮肤癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、骨癌、软骨肉瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、 35 骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、鳞状细胞癌、尤因氏肉瘤、全身性轻链淀粉样变性和梅克尔细胞癌；在其中一些实施方案中，所述淋巴瘤选自：何杰金

淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤和淋巴浆细胞性淋巴瘤，所述肺癌选自：非小细胞肺癌和小细胞肺癌，所述白血病选自：慢性髓细胞样白血病、急性髓细胞样白血病、淋巴细胞白血病、成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和髓样细胞白血病；在另一些实施方案中，所述疾病选自：PD-L1 阳性的黑色素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、肠癌和结肠癌；在另一些实施方案中，所述疾病选自：黑色素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、肠癌和结肠癌。

10

### 附图说明

- 图 1: 抗 PD-1 抗体阻断 PD-1 与其配体的结合测试结果；  
图 2: 抗 PD-1 抗体对 PBMC 细胞分泌 IFN $\gamma$  的影响；  
图 3: 抗 PD-1 抗体对小鼠结肠癌 MC38 移植瘤的疗效；  
15 图 4: 抗 PD-1 抗体对小鼠结肠癌 MC38 肿瘤体积的影响；  
图 5: 抗 PD-1 抗体制剂的 DOE 拟合图。

### 具体实施方式

#### 术语

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

“缓冲液”或“缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲液。将 pH 控制在适当范围中的缓冲液的例子包括醋酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、葡萄糖酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液、草酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、25 柠檬酸盐缓冲液、酒石酸盐缓冲液、延胡索酸盐缓冲液、甘氨酸甘氨酸缓冲液和其它有机酸缓冲液。

“醋酸盐缓冲剂”或“醋酸盐缓冲液”，是包括醋酸根离子的缓冲液。醋酸盐缓冲液的示例包括醋酸-醋酸钠、组氨酸-醋酸盐、醋酸-醋酸钾、醋酸-醋酸钙、醋酸-30 醋酸镁等。本披露在一些实施方案中，醋酸盐缓冲液是醋酸-醋酸钠缓冲液（也称醋酸钠盐，简写 AA）。

“组氨酸盐缓冲剂”或“组氨酸缓冲液”，是包含组氨酸离子的缓冲液。组氨酸缓冲液的示例包括组氨酸-盐酸盐，组氨酸-醋酸盐，组氨酸-磷酸盐，组氨酸-硫酸盐等缓冲液。本披露在一些实施方案中，缓冲液是组氨酸-醋酸盐缓冲液（也称组氨酸醋酸盐，简写 His-AA）。35

“琥珀酸盐缓冲剂”或“琥珀酸盐缓冲液”，是包括琥珀酸离子的缓冲液。琥珀

酸盐缓冲液的示例包括琥珀酸-琥珀酸钠、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙缓冲液等。本披露在一些实施方案中，琥珀酸盐缓冲液是琥珀酸-琥珀酸钠缓冲液（也称琥珀酸钠盐，简写 SA）。

“枸橼酸盐缓冲剂”或“枸橼酸盐缓冲液”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁缓冲液等。优选的枸橼酸盐缓冲剂是枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液（也称枸橼酸钠盐，简写 CA）。

渗透压调节剂是指用于调节溶液渗透压的物质。渗透压调节剂的实例包括但不限于，糖类（包括单糖，二糖，三糖，多糖，糖醇，还原性糖，非还原性糖等等）、氨基酸（包括精氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、组氨酸等等）、盐类（氯化钠、氯化钾、氯化钙等）。在一些实施方案中，渗透压调节剂为糖，所述糖选自：葡萄糖，蔗糖，海藻糖，乳糖，果糖，麦芽糖，右旋糖苷，甘油，赤藻糖醇，丙三醇，阿拉伯糖醇，木糖醇，山梨糖醇（也称山梨醇），甘露醇，密里二糖，松三糖，蜜三糖，甘露三糖，水苏糖，麦芽糖，乳果糖，麦芽酮糖，山梨醇，麦芽糖醇，乳糖醇和异-麦芽酮糖；在一些实施方案中，糖是非还原性二糖；在一些实施方案中，所述的糖优选为海藻糖或蔗糖，最优选为蔗糖。在一些实施方案中，所述渗透压调节剂为氨基酸，优选精氨酸、甘氨酸；在一些实施方案中，所述渗透压调节剂为盐类，优选氯化钠。

“等渗”表示制剂具有与人血液基本上相同的渗透压。等渗可以通过本领域公知方法测定，例如可以采用蒸汽压力或冰冻型渗压计测定。当给药途径为皮下注射时，药物组合物渗透压优选控制在 280-320mOsm，渗透压调节剂优选 70 -90mg/mL 蔗糖；更优选药物制剂渗透压控制在 300 mOsm 左右，渗透压调节剂优选含量 80mg/mL 的蔗糖。

“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，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的保持抗体活性成分的稳定性，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。本文中，“药物组合物”和“制剂”并不互相排斥。

“置换”是指溶解抗体蛋白的溶剂体系的置换，例如，使用稳定制剂的缓冲体系经物理操作方式将含抗体蛋白的高盐或高渗溶剂体系置换，从而使抗体蛋白存在于稳定制剂中。所称物理操作方式包括但不限于超滤、透析或离心后复溶。

本披露的药物组合物或制剂可通过本领域公知的方法制备。示例性的，抗体药物组合物或制剂的制备：第一步：取一定量的纯化的抗体溶液，用不含抗体的缓冲剂（如 pH5.2 的 10mM 的醋酸钠盐缓冲液）进行溶剂置换（优选超滤），经超滤膜至少 6 倍体积置换，抗体浓缩到约 130 mg/mL。加入一定体积的蔗糖母液，混匀，使最终蔗糖浓度为 80mg/mL。加入一定体积的聚山梨酯 80 母液，混匀，使最终聚山梨酯 80 浓度为 0.6mg/mL。加 pH5.2 的 10mM 醋酸钠盐缓冲液定容，使

抗体浓度为 120mg/mL (其他待测试制剂或稳定性制剂可参照相似步骤进行配制)。产品经过滤后中控取样检测无菌。将原液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤芯, 收集滤液。第二步: 调节装量, 将滤液灌装于西林瓶中, 加塞, 分别于灌装开始、灌装中间、灌装结束时取样中控检测装量差异。第三步: 开启轧盖机, 加铝盖, 进行轧盖。第四步: 目检, 确认产品无装量不准等缺陷。打印、粘贴西林瓶标签; 打印纸盒标签, 折叠纸盒, 装盒, 贴纸盒标签。

本披露中所述药物组合物的溶液形式, 若无特殊说明, 其中的溶剂为水。

“冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。冻干制剂可通过将药物组合物或液体或溶液制剂经冷冻干燥获得。通过冷冻制剂和随后在适于一次干燥的温度使水升华, 进行冷冻干燥。在此条件下, 产物温度低于制剂的低共熔点或分解温度。在通常约 50-250 毫托范围的合适压力下, 通常, 一次干燥的存放温度范围为约-30 至 25 $^{\circ}\text{C}$  (假设产物在一次干燥过程中保持冷冻)。制剂、容纳样品的容器 (例如, 玻璃小瓶) 的大小和类型以及液体的体积决定了干燥所需的时间, 所述时间的范围可为几小时至几天 (例如 40-60 小时)。二次干燥阶段可在约 0-40 $^{\circ}\text{C}$  进行, 这主要取决于容器的类型和大小以及采用的蛋白的类型。二次干燥时间由产物中的期望残余湿度水平决定, 通常需要至少约 5 小时。通常, 低压冻干的制剂的含水量小于约 5%, 优选小于约 3%。压力可与在一次干燥步骤中应用的压力相同, 优选的, 二次干燥的压力低于一次干燥。冷冻干燥条件可以随制剂和小瓶大小而变化。

本披露的表面活性剂可选自聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲基胺、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇和乙烯与丙烯二醇的共聚物等等。优选的表面活性剂是聚山梨酯 80 或聚山梨酯 20, 更优选为聚山梨酯 80。

本文所用术语“约”或“大约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内, 所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如, 在本领域每一次实行中“约”可意味着在 1 内或超过 1 的标准差。或者, “约”或“大约”可意味着至多 20% 的范围。例如在“约”或“大约”后具体数值的基础上  $\pm 20\%$ 、 $\pm 19\%$ 、 $\pm 18\%$ 、 $\pm 17\%$ 、 $\pm 16\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 14\%$ 、 $\pm 13\%$ 、 $\pm 12\%$ 、 $\pm 11\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$  或更小, 该范围取决于本领域技术人员通常采用的测定方法、技术条件、检测试剂和/或检测仪器, 这样



的范围是本领域公知的。此外，特别对于生物学系统或过程而言，该术语可意味着至多一个数量级或数值的至多 5 倍。除非另外说明，否则当具体值在本申请和权利要求中出现时，“约”或“大约”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

5 本披露所述的药物组合物能够达到稳定的效果，其中的抗体在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合物，优选地，药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术，可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。例如，稳定药物抗体制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂：在冷藏温度(2-8°C)保存例如至少 3 个月、  
10 优选 6 个月、更优选 1 年，且甚至更优选地最长达 2 年。稳定制剂，例如，通过视觉分析，药物抗体制剂是无色的，或澄清至稍微乳白色；所述制剂的浓度、pH 和重量克分子渗透压浓度具有不超过±10%变化；通常观察到不超过约 10%、优选不超过约 5%的截短；通常形成不超过约 10%、优选不超过约 5%的聚集等。在  
15 一些实施方案中，本披露中的药物组合物或冻干制剂于 2-8°C 稳定至少 3 个月，至少 6 个月，至少 12 个月，至少 18 个月或至少 24 个月。在一些实施方案中，可通过观察制剂在强制降解（例如 40°C M1）、加速条件下（例如 25°C M6），振摇 D7（例如 25°C，300rpm，振摇 10 天）、多次冻融等条件下的制剂外观、SEC、非还原 CE-SDS 和 iCIEF 等指标来检测制剂的相对稳定性。

20 如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过 UV 光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)和动态光散射（DLS）测得，抗体没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法（其确定蛋白三级结构）和通过 FTIR 光谱法（其确定蛋白二级结构）来评价。

25 如果抗体没有显示出显著的化学改变，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白，可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短(通过诸如尺寸排阻色谱法和 SDS-PAGE 等方法来评价)、氧化(通过诸如与质谱法或 MALDI/TOF/MS 结合的肽谱法等方法来评价)、脱酰胺作用(通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽  
30 谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价)和异构化(通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等等来评价)。

如果抗体在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的生物活性”。抗体的生物活性可以例如通过抗原结合测定来确定。

35 术语“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 序列可以 GenBank 登录号 U64863 找到。

术语“程序性死亡配体-1(PD-L1)”是 PD-1 的两种细胞表面糖蛋白配体之一 (另一种为 PD-L2)，它在与 PD-1 结合时下调 T 细胞活化和细胞因子分泌。如本文中使用的术语“PD-L1”包括人 PD-L1(hPD-L1)，hPD-L1 的变体、同种型、和种间同源物，以及 5 种与 hPD-L1 具有至少一个共同表位的类似物。完整的 hPD-L1 序列可以用 GenBank 登录号 Q9NZQ7 查到。

术语“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。示例性的细胞因子包括：人 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-17 和 IL-5。

本披露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。

本披露所述的“抗体”在本文中以最广意义使用，并且包括不同的抗体结构，包括，但不限于，单克隆抗体，多克隆抗体，鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要它们显示所需的抗原结合活性和特异性即可。本披露所述“抗体”包含“全长抗体”及其“抗原结合片段”。本披露的一些实施例中所述抗 PD-1 抗体为国际专利申请 PCT/CN2020/074098 所述的抗 PD-1 抗体，例如“Hu23-11.IgG4AA”抗体。本披露将国际专利申请 PCT/CN2020/074098 的全部内容引入本申请。

术语“全长抗体”、“完整抗体”、“完全抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用，指基本上完整形式的抗体，与下文定义的抗原结合片段相区分。

术语“抗原结合片段”或“功能片段”是完整抗体的保持特异性结合抗原(例如，PD-1) 的能力的一个或更多个片段。抗原结合片段的实例包括但不限于(i)Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii)F(ab')<sub>2</sub> 片段，包含通过较链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段，(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段；(v) 单结构域或 dAb 片段(Ward 等人，(1989)Nature341 : 544-546)，其由 VH 结构域组成。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码，但可使用重组方法，通过合成的接头连接它们，从而使得其能够产生为其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单个蛋白质链(称为单链 Fv(scFv)；参见，例如，Bird 等人(1988)Science242 :423-426；和 Huston 等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883)。此类单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。在一些实施方案中，本披露的抗原结合片段包

括 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、单链抗体 (scFv)、二聚化的 V 区 (双抗体)、二硫键稳定化的 V 区 (dsFv) 等。

5 抗体重链和轻链中靠近 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(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。

10 术语“互补决定区”、“CDR”或“高变区”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。通常,每个重链可变区中存在三个 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3),每个轻链可变区中存在三个 CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定 CDR 的氨基酸序列边界,包括“Kabat”编号规则(参见 Kabat 等(1991)，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第 5 版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)、“Chothia”  
15 编号规则(参见 Al-Lazikani 等人,(1997)JMB 273:927-948)和 ImMunoGenTics(IMG T)编号规则(Lefranc M.P.,Immunologist,7,132-136(1999); Lefranc, M.P.等,Dev. Comp. Immunol.,27,55-77(2003)等。例如,对于经典格式,遵循 Kabat 规则,所述重链可变域(VH)中的 CDR 氨基酸残基编号为 31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3);轻链可变域(VL)中的 CDR 氨基酸残基编号为 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)。遵循 Chothia  
20 规则,VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和 95-102(HCDR3);并且 VL 中的氨基酸残基编号为 26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和 91-96(LCDR3)。通过组合 Kabat 和 Chothia 两者的 CDR 定义,CDR 由人 VH 中的氨基酸残基 26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)和人 VL 中的氨基酸残基 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)构成。遵循 IMG T 规  
25 则,VH 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 26-35(CDR1)、51-57(CDR2)和 93-102(CDR3),VL 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 27-32(CDR1)、50-52(CDR2)和 89-97(CDR3)。遵循 IMG T 规则,抗体的 CDR 区可以使用程序 IMG T/DomainGap Align 确定。遵循 AbM 规则,VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32 (HCDR1)、50-58  
30 (HCDR2)和 95-102(HCDR3);并且 VL 中的氨基酸残基编号为 24-34(LCDR1)、50-56 (LCDR2)和 89-97 (LCDR3)。除非另有说明,本披露实施例涉及的抗体可变区和 CDR 序列均适用“Kabat”编号规则。

35 本披露中所述人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区的“常规变体”是指现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体,示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区变体,具体替换如现有技术已知的 YTE 突变,

L234A 和/或 L235A 突变, S228P 突变, 和/或获得 knob-into-hole 结构的突变(使得抗体重链具有 knob-Fc 和 hole-Fc 组合), 这些突变已被证实使得抗体具有新的性能, 但不改变抗体可变区的功能。

5 本披露的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人抗体, 优选人源化抗体。

术语“鼠源抗体”在本披露中为根据本领域知识和技能制备的针对人 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。在本披露一个优选的实施方案中, 所述的鼠源抗 PD-1 抗体, 可进一步包含鼠源  $\kappa$ 、 $\lambda$  链或其变体的轻链恒定区, 或进一步包含鼠源 IgG1、  
10 IgG2、IgG3 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。通常, 建立嵌合抗体, 先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤, 然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因, 再根据需要克隆人抗体的恒定区基因, 将鼠可变区基因与人恒定区  
15 基因连接成嵌合基因后插入表达载体中, 最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体。在本披露一个优选的实施方案中, 所述的 PD-1 嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源  $\kappa$ 、 $\lambda$  链或其变体的轻链恒定区。所述的 PD-1 嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区, 优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区, 或者使用氨基酸突变(例如 L234A 和/或 L235A  
20 突变, 和/或 S228P 突变)的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体。

术语“人源化抗体(humanized antibody)”, 也称为 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody), 是指将鼠的 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框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分, 从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA  
25 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.mrcpe.com.ac.uk/vbase](http://www.mrcpe.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。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。本披露的人源化抗体也包括进一步由酵母菌展示对 CDR 进行亲和力和成熟突变后的人源化抗体。  
30

本披露中“人抗体”(HuMAb)、“人源抗体”、“全人抗体”、“完全人抗体”可以互换使用, 其氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列、或衍生自利用人抗体组库或其它人抗体编码序列的非人来源的氨基酸序列。该人抗体的定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。在一些技术方案中, 完全  
35 人抗体可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建, 或者由体外活化的 B 细胞构建, 所有的这些都是本领域已知的。

术语“氨基酸差异”或“氨基酸突变”是指相较于原蛋白质或多肽，变体蛋白质或多肽存在氨基酸的改变或突变，包括在原蛋白质或多肽的基础上发生 1 个、2 个、3 个或更多个氨基酸的插入、缺失或替换。

术语“抗体框架”或“FR 区”，是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲，其是不具有 CDR 的可变结构域。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位(例如，PD-1 分子上的特定部位)。表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸。参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, G.E.Morris, Ed.(1996)。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常，抗体以大约小于  $10^{-7}$ M，例如大约小于  $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M 或更小的亲和力(KD) 结合。

术语“KD”或“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常，本披露的抗体以小于大约  $10^{-7}$ M，例如小于大约  $10^{-8}$ M 或  $10^{-9}$ M 的解离平衡常数(KD) 结合 PD-1, 例如，如使用表面等离子体共振(SPR) 技术在 BIACORE 仪中测定的。

当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的情况中时，意指在抗原结合蛋白之间竞争，其通过以下测定法来测定：在所述测定法中，待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫学功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如 PD-1 抗原或其片段)的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争，这些测定例如：固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahli 等，1983, Methods in Enzymology 9: 242-253); 固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Kirkland 等，1986, J.Immunol.137: 3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如 Harlow 和 Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual(抗体, 实验室手册), Cold Spring Harbor Press); 用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA(参见例如 Morel 等，1988, Molec.Immunol.25: 7-15); 固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Cheung, 等，1990, Virology176: 546-552); 和直接标记的 RIA(Moldenhauer 等，1990, Scand.J.Immunol.32: 77-82)。通常所述测定法涉及使用结合有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白任一种的固态表面或细胞的纯化的抗原。通过测量在所测抗原结合蛋白存在下结合固态表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常所测抗原结合蛋白过量存在。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括：结合与参考抗原结合蛋白同一表位的抗原结合蛋白；和结合充分接近参考抗原结合蛋白的结合表位的

邻近表位的抗原结合蛋白，所述两个表位在空间上互相妨碍发生结合。在本文实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时，其将抑制(例如降低)至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或 75%或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下，结合被抑制至少 80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或 97%或更多。

本文中使用的术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的，优选是双链 DNA 或单链 mRNA 或修饰的 mRNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。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有效地连接至所述编码序列。

术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中，载体是“质粒”，其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。在另一个实施方案中，载体是病毒载体，其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如，具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组，从而随宿主基因组一起复制(例如，非附加型哺乳动物载体)。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8 章和 15 章。例如，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 区加上一个或多个个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件，从 ImMunoGeneTics(IMGT)的网站 <http://imgt.cines.fr> 得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001 ISBN012441351 上获得。

术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae)的成员，例如大肠杆菌(*Escherichia coli*) 或沙门氏菌(*Salmonella*) 的菌株；芽孢杆菌科(Bacillaceae) 例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)；肺炎球菌(*Pneumococcus*)；链球菌(*Streptococcus*) 和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO(中国仓鼠卵巢细胞系) 和 NS0 细胞。

本披露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，编码重链和轻链的 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 端位点。通过表达与人 PD-1 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 柱进行纯化。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  
5 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。

“施用”、“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。“施用”、“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。“施用”、“给予”和“处  
10 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，例如包含本披露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，以诱导这类症状退化或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。尽管本披露的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个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  
20 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  
30 224 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。示例性保守取代于下表“示例性氨基酸保守取代”中陈述。

表 3. 示例性氨基酸保守取代

原始残基	保守取代
Ala(A)	Gly; Ser
Arg(R)	Lys; His
Asn(N)	Gln; His; Asp

Asp(D)	Glu; Asn
Cys(C)	Ser; Ala; Val
Gln(Q)	Asn; Glu
Glu(E)	Asp; Gln
Gly(G)	Ala
His(H)	Asn; Gln
Ile(I)	Leu; Val
Leu(L)	Ile; Val
Lys(K)	Arg; His
Met(M)	Leu; Ile; Tyr
Phe(F)	Tyr; Met; Leu
Pro(P)	Ala
Ser(S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe
Tyr(Y)	Trp; Phe
Val(V)	Ile; Leu

“有效量”或“有效剂量”指指获得任一种或多种有益的或所需的治疗结果所必需的药物、化合物或药物组合物的量。对于预防用途，有益的或所需的结果包括消除或降低风险、减轻严重性或延迟病症的发作，包括病症、其并发症和在病症的发展过程中呈现的中间病理表型的生物化学、组织学和/或行为症状。对于治疗应用，有益的或所需的结果包括临床结果，诸如减少各种本披露靶抗原相关病症的发病率或改善所述病症的一个或更多个症状，减少治疗病症所需的其它药剂的剂量，增强另一种药剂的疗效，和/或延缓患者的本披露靶抗原相关病症的进展。

“外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。“内源性”指根据情况在细胞、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  $\times 100$  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；如果两个序列中的 100 个位置有 95 个匹配或同源，那么两个序列为 95%同源。通常，当比对两个序列时进行比较以给出最大百分比同源性。例如，可以通过 BLAST 算法执行比较，其中选择算法的参数以在各个参考序列的整个长度上给出各个序列之间的最大匹配。以下参考文献涉及经常用于序列分析的 BLAST 算法：BLAST 算法 (BLAST ALGORITHMS)：Altschul, S.F.等人, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Gish, W.等人, (1993) *Nature Genet.* 3:266-272; Madden, T.L.等人, (1996) *Meth. Enzymol.* 266:131-141; Altschul, S.F.等人, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Zhang, J.等人, (1997) *Genome Res.* 7:649-656。其他如 NCBI BLAST 提供的常规 BLAST 算法也



为本领域技术人员所熟知。

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. Quant. 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。

“分离的”指纯化状态，并且在这种情况下意味着在指定的分子基本上不含其他生物分子，例如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物或其他材料，例如细胞碎片和生长培养基。通常，术语“分离的”并不意图指完全不存在这些材料或不存在水、缓冲液或盐，除非它们以显著干扰如本文所述的化合物的实验或治疗用途的量存在。

“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。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。

此外，本披露包括用于治疗与目标抗原（例如 PD-1）阳性细胞相关的疾病的药剂，所述药剂包含本披露的抗 PD-1 抗体作为活性成分。

本披露中与 PD-1 相关的疾病没有限制，只要它是与 PD-1 相关的疾病即可，例如利用本披露的分子诱导的治疗反应可通过结合人类 PD-1，然后阻遏 PD-1 与其配体 PD-L1、PD-L2 的结合，或杀伤过表达 PD-1 的肿瘤细胞。因此，当处于适于治疗应用的制备物和制剂中时，本披露的分子对这样一些人是非常有用的，他们患有肿瘤或癌症，优选黑色素瘤、结肠癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、非小细胞肺癌、膀胱癌等。

此外，本披露涉及用于免疫检测或测定目标抗原（例如 PD-1）的方法、用于免疫检测或测定目标抗原（例如 PD-1）的试剂、用于免疫检测或测定表达目标抗

原（例如 PD-1）的细胞的方法和用于诊断与目标抗原（例如 PD-1）阳性细胞相关的疾病的诊断剂，其包含本披露的特异性识别目标抗原（例如人 PD-1）并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的抗体或抗体片段作为活性成分。

5 在本披露中，用于检测或测定目标抗原（例如 PD-1）的量的方法可以是任何已知方法。例如，它包括免疫检测或测定方法。

免疫检测或测定方法是使用标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。免疫检测或测定方法的实例包括放射性物质标记的免疫抗体方法（RIA）、酶免疫测定法（EIA 或 ELISA）、荧光免疫测定法（FIA）、发光免疫测定法、蛋白质免疫印迹法、物理化学方法等。

10 上述与 PD-1 阳性细胞相关的疾病可以通过用本披露的抗体或抗体片段检测或测定表达 PD-1 的细胞来诊断。

为了检测表达多肽的细胞，可以使用已知的免疫检测方法，并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外，可以使用利用 FMAT8100HTS 系统（Applied Biosystem）的荧光抗体染色法等。

15 在本披露中，对用于检测或测定目标抗原（例如 PD-1）的活体样品没有特别限制，只要它具有包含表达目标抗原（例如 PD-1）的细胞的可能性即可，例如组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

根据所需的诊断方法，含有本披露的单克隆抗体或其抗体片段的诊断剂还可以含有用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测反应的试剂。用于执行抗原-抗体反应的试剂包括缓冲剂、盐等。用于检测的试剂包括通常用于免疫检测或测定方法的试剂，例如识别所述单克隆抗体、其抗体片段或其结合物的标记的第二抗体和与所述标记对应的底物等。

在一些技术方案中，抗原的制备如下：

25 设计并合成人 PD-1-IgG1Fc 融合蛋白，N 端为人 PD-1 胞外区 150 个氨基酸，C 端为人 IgG1 的 Fc 段（hIgG1Fc）。经 Protein A 的亲合柱纯化，可获得高纯度的重组 PD-1-Fc 蛋白，用于检测抗 PD-1 抗体与抗原的结合。

人 PD-1-IgG1Fc（SEQ ID NO: 1）：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNAT  
FTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGR  
30 DFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPS  
PSPRPAGQFQTLVEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS  
35 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

注释：下划线部分为信号肽，正体部分为人 PD-1 胞外区，斜体部分为 hIgG1Fc

(信号肽+胞外区+hIgG1Fc)。

人 PD-1-his (SEQ ID NO: 2) :

MEFGLSWLFLVAILKGVQCPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNAT  
FTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGR  
5 DFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPS  
PSPRPAGQFQTLVGSSDYKDDDDKHHHHHHH。

转染细胞核酸编码的 PD-1 抗原 (SEQ ID NO: 3) :

MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGD  
NATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLP  
10 NGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTA  
HPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQ  
PLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSS  
PARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL。

在一些技术方案中, 抗人 PD-1 抗体可通过免疫小鼠产生, 也可通过抗人 PD-1  
15 噬菌体小鼠免疫文库获得。

通过免疫小鼠制备抗人 PD-1 抗体的方法如下:

1. 免疫: 实验用 SJL 白小鼠, 雌性, 6-8 周龄和 Balb/c 白小鼠, 雌性, 6-8  
周龄。饲养环境: SPF 级。小鼠购进后, 实验室环境饲养 1 周, 12/12 小时光/暗  
周期调节, 温度 20-25°C; 湿度 40-60%。将已适应环境的小鼠按不同方案免疫,  
20 每组 6-10 只。免疫抗原可以是纯化的重组蛋白 PD-1-IgG1Fc(见 SEQ ID NO: 1)、  
PD-1-his (见 SEQ ID NO: 2)、或 PD-1 作为抗原 (见 SEQ ID NO: 3) 转染的  
Jurkat/CHO-PD-1 细胞, 可以使用单独一种抗原配合不同的免疫佐剂或者不同类型  
免疫原交叉免疫。免疫部位可以是腹腔或者背部皮下, 或者两种位置交替免疫。  
免疫佐剂 TiterMax® Gold Adjuvant(以下简称 Titermax, 购自 Sigma 货号 T2684)  
25 与 Imject Alum Adjuvant (以下简称 Alum, 购自 Pierce 货号 77161) 交叉免疫。  
抗原与佐剂 (Titermax) 比例为 1:1, 抗原与佐剂 (Alum) 比例为 3:1, 25-50µg/  
只 (首免), 50µg/只 (加强免疫), 或是 1×10<sup>7</sup> 个 Jurkat/CHO-PD-1 细胞/只。第  
0 天腹腔内注射 25-50µg/只的乳化后抗原, 首免后每周一次或是每两周一次,  
Titermax 和 Alum 交替使用, 共 5-8 次。

30 2. 细胞融合: 选择血清中抗体滴度高的小鼠进行脾细胞融合, 将冲刺免疫 72h  
(“h”是“小时”的缩写, 下同) 后的小鼠眼球放血, 拉颈处死, 放入 75%乙醇  
中消毒。采用优化的 PEG 介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞  
(中国科学院) 进行融合得到杂交瘤细胞。融合好的杂交瘤细胞用 HAT 完全培  
养基 (含 20% FBS、1×HAT 和 1×OPI 的 RPMI-1640 培养基) 重悬, 分装于 96  
35 孔细胞培养板中 (1×10<sup>5</sup>/150µL/孔), 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 孵育, 种板 10-30 块左右。  
融合后的第 5 天加入 HAT 完全培养基, 50µL/孔, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 孵育。融合后

第 7 天至 8 天, 根据细胞生长密度, 全换液, 200 $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 孵育。

3. 杂交瘤细胞筛选: 融合后第 7-9 天, 根据细胞生长密度, 进行抗体与 PD-1 结合的 ELISA 方法检测, 并将检测的阳性孔细胞进行 PD-1/PDL1 结合的阻断 ELISA 检测, 阳性孔换液, 并根据细胞密度及时扩大至 24 孔板中。移入 24 孔板的细胞株经过复测后进行保种和第一次亚克隆。第一次亚克隆筛选为阳性的进行保种, 并进行第二次或第三次亚克隆, 直至获得单细胞克隆。多次融合获得有阻断 PD-1 与 PDL1 结合效果的杂交瘤细胞。

通过抗人 PD-1 噬菌体小鼠免疫文库获得抗人 PD-1 抗体的方法如下:

1. 构建抗人 PD-1 噬菌体小鼠免疫文库: 选择血清中抗体滴度高的小鼠的脾脏, 用 Trizol (Invitrogen Cat No.15596-018) 提取组织总 RNA。使用 PrimeScript<sup>TM</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (Takara Cat No.6210A) 进行反转录获得 cDNA。根据 IMGT 数据库设计并合成构建文库的引物。通过三轮 PCR 反应, 获得单链抗体片段。将单链抗体片段和经过改造的建库载体 pCantab5E (Amersham Biosciences/GE Cat No. 27-9400-01) 用 SfiI (NEB Cat No.#R0123L) 进行酶切, 电泳后用 E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega Cat No.D2500-02) 进行纯化回收。然后用 T4 DNA 连接酶 (NEB Cat No.#M0202L) 16 $^{\circ}$ C 连接 16-18 小时, 再用上述试剂盒进行纯化回收, 最后用去离子水洗脱。取 1 $\mu$ g 连接产物与 1 支电转化感受态 TG1 (Lucigen Cat No.60502-2) 混合, 电转化仪 (Bio Rad Micropulser) 参数设置至 2.5 kV, 200 $\Omega$ , 25  $\mu$ F, 进行电转化。重复转化 10 次, 涂平板, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 16-18 小时。将所有菌落刮洗下来混和在一起, 加入终浓度为 15%的甘油, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2. 抗人 PD-1 噬菌体小鼠免疫文库的筛选: 将包装好的抗人 PD-1 噬菌体免疫文库 ( $1 \times 10^{12}$  -  $1 \times 10^{13}$ ) 与 100  $\mu$ L 链菌素微珠 (Milenvi Biotec, Auburn, CA) 加入 1mL 含 2%脱脂牛奶-磷酸盐缓冲液 (缩写 MPBS) 中于室温下孵育 1 小时, 放置在磁力架上, 取上清。上清加入 10 $\mu$ g/mL 生物素化的人 PD-1-ECD-his 蛋白 (购自 Sino Biological) 中于室温下孵育 1 小时, 再加入 100 $\mu$ L 链霉亲和素包被的磁珠 (1mL MPBS 预孵育) 于室温下孵育 1 小时。并使其负载于磁力架系统上用于分选, 吸去上清。加入 1mL PBST (含 0.1% Tween-20 的磷酸盐缓冲液), 翻转多次, 吸尽后再加入新鲜洗液, 重复 11 次, 以去除未结合的抗体片段, 加入 0.5 mL 洗脱液 (50 $\mu$ L 10mg/mL trypsin stock solution (存储液) 加入 450 $\mu$ L PBS 中)。室温下摇晃 15min (“min”是“分钟”的缩写, 下同)。放置在磁力架上, 吸出上清至一新 EP 管中。TG1 接入 2YT 培养基中扩增至培养细菌密度 OD<sub>600</sub>=0.4 时。每管加入 1.75 mL TG1(OD<sub>600</sub>=0.4), 并加入 250 $\mu$ L 洗脱后噬菌体 (phage), 37 $^{\circ}$ C 水浴中静置孵育 30min, 梯度稀释涂板, 用于测试滴度。其余 TG1 溶液离心, 涂板, 37 $^{\circ}$ C 过夜孵育。

噬菌体小鼠免疫文库利用生物素化的人 PD-1-ECD-his 抗原, 经过 2-3 轮

MACS 筛选（链霉素磁珠，Invitrogen），最终获得具有结合 PD-1 和阻断 PD-1 与 PD-L1 结合的单克隆，测序验证，得到抗体的可变区序列。

在一些技术方案中，抗体或抗原蛋白的纯化方法如下：

1. 杂交瘤上清分离纯化/ProteinG 亲和层析：

5 对于小鼠杂交瘤上清纯化首选 ProteinG 进行亲和层析，将培养所得杂交瘤离心取上清，根据上清体积加入 10-15% 体积的 1M Tris-HCl (pH8.0-8.5) 调节上清 pH。ProteinG 柱利用 6M 盐酸胍洗 3-5 倍柱体积，然后利用纯水清洗 3-5 倍柱体积；利用如 1×PBS (pH7.4) 缓冲体系作为平衡缓冲液对层析柱平衡 3-5 倍柱体积；细胞上清利用低流速上样结合，控制流速使保留时间约 1min 或更长时间；利用  
10 1×PBS (pH7.4) 洗涤层析柱 3-5 倍柱体积至紫外吸收回落至基线；利用 0.1M 醋酸/醋酸钠 (pH3.0) 缓冲液进行样品洗脱，根据紫外检测收集洗脱峰，洗脱产物利用 1M Tris-HCl (pH8.0) 快速调节 pH 至 5-6 暂存。对于洗脱产物可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换，如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系，或者利用分子排阻如 G-25 脱盐替换成所需的缓冲体系，或者  
15 利用如 Superdex 200 等高分辨率分子排阻柱去除洗脱产物中的聚体成分以提高样品纯度。

2. Protein A 亲和层析纯化蛋白或抗体：

首先将表达抗原蛋白或者抗体的细胞培养上清进行高速离心收取上清。ProteinA 亲和柱利用 6M 盐酸胍洗 3-5 倍柱体积，然后利用纯水清洗 3-5 倍柱体积。  
20 利用如 1×PBS (pH7.4) 缓冲体系作为平衡缓冲液对层析柱平衡 3-5 倍柱体积。细胞上清利用低流速上样结合，控制流速使保留时间约 1min 或更长时间，结合完毕后利用 1×PBS (pH7.4) 洗涤层析柱 3-5 倍柱体积至紫外吸收回落至基线。利用 0.1M 醋酸/醋酸钠 (pH3.0-3.5) 缓冲液进行样品洗脱，根据紫外检测收集洗脱峰，洗脱产物利用 1M Tris-HCl (pH8.0) 快速调节 pH 至 5-6 暂存。对于洗脱产物可  
25 以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换，如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系，或者利用分子排阻如 G-25 脱盐替换成所需的缓冲体系，或者利用如 Superdex 200 等高分辨率分子排阻柱去除洗脱产物中的聚体成分以提高样品纯度。

30 以下结合实施例用于进一步描述本披露，但这些实施例并非限制着本披露的范围。本披露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. 抗人 PD-1 鼠源抗体获得**

35 将经前述方法获得的抗人 PD-1 鼠源抗体进行抗原结合实验，筛选得到多株活性良好的抗体：其中包括 M23、M32 和 M33，将单细胞克隆扩培养，提取 RNA，

利用 mouse-Ig 的简并引物进行反转录扩增 (RT-PCR)，得到抗体的可变区序列。将该鼠抗体可变区序列与人抗体恒定区序列连接，克隆并重组表达出该鼠单克隆抗体的嵌合抗体，进行体外活性实验，确认所得到的单克隆抗体可变区序列正确。

测得鼠源抗体 M23、M32 和 M33 的可变区序列如下：

5 鼠源抗体 M23 的重链可变区 (SEQ ID NO: 4) :

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPIHGLEWIGL  
IDPETGGTVYNQKFKDKTILTADKSSSTAYMEFRSLTSEDSAVYHCTRERFSYY  
GSTSDWYFDVWGTGTTVTVSS。

鼠源抗体 M23 的轻链可变区 (SEQ ID NO: 5) :

10 DGLMTQTPLSLPVSLGDHASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKL  
LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPYTFGGG  
TKLEIK。

鼠源抗体 M32 的重链可变区 (SEQ ID NO: 6) :

15 QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASDFTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGL  
FDPETGGIVYNQKFKGKAILTADKSSNTAYMEFRSLTSEDSAVYYCTREGYNR  
DWYFDVWGTGTTVTVSS。

鼠源抗体 M32 的轻链可变区 (SEQ ID NO: 7) :

20 DVLMQTPLSLPSLVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKL  
LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPYAFGGG  
TKLEIK。

鼠源抗体 M33 的重链可变区： (SEQ ID NO: 19)

KVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVA  
TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTALYYCASPYGH  
GYFDVWGTGTTVTVSS。

25 鼠源抗体 M33 的轻链可变区： (SEQ ID NO: 20)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNFLNWYQQKPDGTVKLLIYYT  
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQOGNTLPWTFGGGTKLEI  
K。

30 备注：上述抗体的重链可变区和轻链可变区序列中，下划线为 Kabat 编号系统确定的 CDR 序列，依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

表 4. 鼠源抗体 M23、M32 和 M33 重链及轻链 CDR 区序列

抗体名称	重链		轻链	
	M23	HCDR1	DYEMH (SEQ ID NO: 8)	LCDR1
HCDR2		LIDPETGGTVYNQKFKD (SEQ ID NO: 9)	LCDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO: 12)
HCDR3		ERFSYYGSTSDWYFDV (SEQ ID NO: 10)	LCDR3	FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 13)

M32	HCDR1	DYEIH (SEQ ID NO: 14)	LCDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO: 17)
	HCDR2	LFDPETGGIVYNQKFKG (SEQ ID NO: 15)	LCDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO: 12)
	HCDR3	EGYNRDWYFDV (SEQ ID NO: 16)	LCDR3	FQGSHPYPA (SEQ ID NO: 18)
M33	HCDR1	SYAMS (SEQ ID NO: 21)	LCDR1	RASQDINNFLN (SEQ ID NO: 24)
	HCDR2	TISGGGVDITYYQDNVQG (SEQ ID NO: 22)	LCDR2	YTSSLHS (SEQ ID NO: 25)
	HCDR3	PYGHGYFDV (SEQ ID NO: 23)	LCDR3	QQGNTLPWT (SEQ ID NO: 26)

备注：表中的抗体 CDR 序列是根据 Kabat 编号系统确定。

## 实施例 2. 抗人 PD-1 单克隆抗体的人源化

通过比对 IMGT 人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和 MOE 软件分析，分别挑选与 M23, M32, M33 的轻重链序列同一性高的人种系重轻链可变区种系基因作为模板，将这 3 个鼠源抗体的 CDR 分别移植到相应的人源抗体模板中，分别构建其对应的人源化抗体。

### 1. 鼠源抗体 M23 人源化

#### 1.1 鼠源抗体 M23 人源化构架选择

鼠源抗体 M23 的人源化轻链模板为 IGKV2-40\*01 和 IGKJ4\*01，人源化重链模板为 IGHV1-69\*02 和 IGHJ6\*01，人源化改造后可变区序列如下（下划线为 CDR 序列）：

Hu23VH-CDR 嫁接：（SEQ ID NO: 27）

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWM  
GLIDPETGGTVYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARERFS  
YYGSTSDWYFDVWVGQGTITVTVSS。

Hu23VL-CDR 嫁接：（SEQ ID NO: 28）

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPYPTFGGGT  
KVEIK。

#### 1.2 鼠源抗体 M23 的人源化模板选择和回复突变设计

表 5. 鼠源抗体 M23 的人源化抗体的回复突变

VL		VH	
Hu23VL1	嫁接	Hu23VH1	嫁接
Hu23VL2	I2G	Hu23VH2	G27Y I69L
		Hu23VH3	G27Y M48I V67T I69L L82F

		Hu23VH4	G27Y M48I V67T I69L L82F A93T
--	--	---------	----------------------------------

注：嫁接（Grafted）代表鼠抗体 CDR 植入人种系 FR 区序列，氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释，如 I2G 表示依照 Kabat 编号系统，将 Kabat 编号的第 2 位 I 突变回 G。

M23 的人源化抗体轻/重链可变区序列如下：

- 5 > Hu23VL1 (同 Hu23VL-CDR grafted) : (SEQ ID NO: 28)  
DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG  
TKVEIK。
- 10 > Hu23VL2 (SEQ ID NO: 29)  
DGVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQL  
LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGG  
GTKVEIK。
- 15 > Hu23VH1 (同 Hu23VH-CDR grafted) : (SEQ ID NO: 27)  
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSYEMHWVRQAPGQGLEWM  
GLIDPETGGTVYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARERFS  
YYGSTSDWYFDVWGQGTTVTVSS。
- 20 > Hu23VH2 (SEQ ID NO: 30)  
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSYEMHWVRQAPGQGLEWM  
GLIDPETGGTVYNQKFKDRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARERFS  
YYGSTSDWYFDVWGQGTTVTVSS。
- 25 > Hu23VH3 (SEQ ID NO: 31)  
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSYEMHWVRQAPGQGLEWIG  
LIDPETGGTVYNQKFKDRITLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCARERFSY  
YGSTSDWYFDVWGQGTTVTVSS。
- > Hu23VH4 (SEQ ID NO: 32)  
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSYEMHWVRQAPGQGLEWIG  
LIDPETGGTVYNQKFKDRITLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCTRERFSY  
YGSTSDWYFDVWGQGTTVTVSS。

1.3 鼠源抗体 M23 的人源化序列组合

30 鼠源抗体 M23 的人源化后获得的抗体及其可变区组合见下表。

表 6. 人源化 Hu23 抗体可变区组合

	VL		
VH		Hu23VL1	Hu23VL2
Hu23VH1		Hu23-1	Hu23-5
Hu23VH2		Hu23-2	Hu23-6
Hu23VH3		Hu23-3	Hu23-7
Hu23VH4		Hu23-4	Hu23-8



备注：“Hu23-1”指代抗体轻链可变区为 Hu23VL1 且重链可变区为 Hu23VH1 的抗体，其它依此类推。

上表中所指代的抗体轻/重链可变区组合（例如 Hu23-1）可以分别与抗体轻/重链恒定区连接形成全长抗体；在本披露中如无明确说明时，形成全长抗体时轻链可变区与 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接形成抗体轻链，重链可变区与 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 重链恒定区或 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接形成抗体重链，并以表中指代抗体轻/重链可变区组合的名称（例如 Hu23-1）加后缀“.IgG4AA”表示与 IgG4-AA 重链恒定区连接形成的全长抗体，加后缀“.IgG4P”表示与 IgG4-P 重链恒定区连接形成的全长抗体，例如，“Hu23-1.IgG4AA”表示由 Hu23VH1 重链可变区和如 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu23VL1 轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。“Hu23-1.IgG4P”表示由 Hu23VH1 重链可变区和如 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu23VL1 轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。

2. 鼠源抗体 M32 人源化

2.1 鼠源抗体 M32 人源化构架选择

鼠源抗体 M32 的人源化轻链模板为 IGKV2-40\*01 和 IGKJ4\*01，人源化重链模板为 IGHV1-69\*02 和 IGHJ6\*01，人源化可变区序列如下(下划线为 CDR 序列)：

Hu32VH-CDR 嫁接：（SEQ ID NO: 33）IGHV1-69\*02 和 IGHJ6\*01  
 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSDYEIHWVRQAPGQGLEWMG  
LDPETGGIVYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGYNR  
DWYFDVWGQGTTVTVSS。

Hu32VL-CDR 嫁接：（SEQ ID NO: 34）

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYAFGGGT  
 KVEIK。

2.2 鼠源抗体 M32 的人源化模板选择和回复突变设计

表 7. 鼠源抗体 M32 的人源化抗体的回复突变

VL		VH	
Hu32VL1	嫁接	Hu32VH1	嫁接
Hu32VL2	I2V	Hu32VH2	G27F、I69L、A93T
		Hu32VH3	G26D、G27F、I69L、A93T
		Hu32V	G27F、M48I、V67A、I69L、L82F、A93T

	H4	
	Hu32V H5	G26D、G27F、S30T、M48I、V67A、I69L、L82F、A93T
	Hu32V H6	G26D、G27F、S30T、R38K、Q43H、M48I、R66K、V67A、I69L、L82F、A93T

注：嫁接（Grafted）代表鼠抗体 CDR 植入人种系 FR 区序列。氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释，如 I2V 表示依照 Kabat 编号系统，将 Kabat 编号的第 2 位 I 突变回 V。

鼠源抗体 M32 的人源化抗体轻重链可变区序列如下：

5 > Hu32VL1 (同 Hu32VL-CDR 嫁接)：（SEQ ID NO： 34）

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYAFGGGT  
KVEIK。

> Hu32VL2 （SEQ ID NO： 35）

10 DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYAFGGG  
TKVEIK。

> Hu32VH1 (同 Hu32VH-CDR grafted)：（SEQ ID NO： 33）

15 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWMG  
LFDPETGGIVYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGYNR  
DWYFDVWGQGTTVTVSS。

> Hu32VH2 （SEQ ID NO： 36）

20 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWMG  
LFDPETGGIVYNQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREGYN  
RDWYFDVWGQGTTVTVSS。

> Hu32VH3 （SEQ ID NO： 37）

25 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASDFTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWMG  
LFDPETGGIVYNQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREGYN  
RDWYFDVWGQGTTVTVSS。

> Hu32VH4 （SEQ ID NO： 38）

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWIGL  
FDPETGGIVYNQKFKGRATLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCTREGYNR  
DWYFDVWGQGTTVTVSS。

> Hu32VH5 （SEQ ID NO： 39）

30 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASDFTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWIGL  
FDPETGGIVYNQKFKGRATLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCTREGYNR  
DWYFDVWGQGTTVTVSS。

> Hu32VH6 （SEQ ID NO： 40）

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASDF TFDYEIHWVKQAPGHGLEWIGL  
 FDPETGGIVYNQKFKGKATLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCTREGYNR  
 DWYFDVWGQGTTVTVSS。

2.3 鼠源抗体 M32 的人源化序列组合

5 鼠源抗体 M32 的人源化后获得的抗体及其可变区组合。

表 8. 人源化抗体 Hu32 轻/重链可变区组合

VH \ VL	Hu32VL1	Hu32VL2
Hu32VH1	Hu32-1	Hu32-7
Hu32VH2	Hu32-2	Hu32-8
Hu32VH3	Hu32-3	Hu32-9
Hu32VH4	Hu32-4	Hu32-10
Hu32VH5	Hu32-5	Hu32-11
Hu32VH6	Hu32-6	Hu32-12

备注：表中例如“Hu32-1”指代抗体轻链可变区为 Hu32VL1 且重链可变区为 Hu32VH1 的抗体轻/重链可变区组合，其它依此类推。

10 上表中所指代的抗体轻/重链可变区组合（例如 Hu32-1）可以分别与抗体轻/重链恒定区连接形成全长抗体；在本披露中如无明确说明时，形成全长抗体时轻链可变区与 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接形成抗体轻链，重链可变区与 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 重链恒定区或 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接形成抗体重链，并以表中指代抗体轻/重链可变区组合的名称（例如 Hu32-1）加后缀“.IgG4AA”表示与 IgG4-AA 重链恒定区连接形成的全长抗体，加后缀“.IgG4P”表示与 IgG4-P 重链恒定区连接形成的全长抗体，例如，  
 15 “Hu32-1.IgG4AA”表示由 Hu32VH1 重链可变区和如 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu32VL1 轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。“Hu32-1.IgG4P”表示由 Hu32VH1 重链可变区和如 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu32VL1 轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。  
 20

3. 鼠源抗体 M33 人源化

3.1 鼠源抗体 M33 人源化构架选择

25 鼠源抗体 M33 的人源化轻链模板为 IGKV1-39\*01 和 IGKJ4\*01，人源化重链模板为 IGHV3-7 和 IGHJ6\*01，人源化可变区序列如下：

Hu33VH-CDR 嫁接（SEQ ID NO: 41）：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA  
TISGGGVDTYYQDNVQGRFRTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPYG  
HGYFDVWGQGTTVTVSS。

Hu33VL-CDR 嫁接 (SEQ ID NO: 42) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWFYQQKPGKAPKLLIYYT  
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEI  
 K。

5 3.2 鼠源抗体 M33 的人源化模板选择和回复突变设计

表 9. 鼠源抗体 M33 人源化抗体的回复突变

VL		VH	
Hu33VL1	Grafted	Hu33VH1	Grafted
Hu33VL2	F71Y	Hu33VH2	R94S
Hu33VL3	K42G P44V F71Y	Hu33VH3	E1K R94S

注：嫁接 (Grafted) 代表鼠抗体 CDR 植入人种系 FR 区序列。氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释，如 F71Y 表示依照 Kabat 编号系统，将 Kabat 编号的  
 10 第 71 位 F 突变回 Y。

鼠源抗体 M33 的人源化抗体轻链可变区和重链可变区序列如下：

> Hu33VL1 (同 Hu33VL-CDR grafted): (SEQ ID NO: 42)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWFYQQKPGKAPKLLIYYT  
 15 SSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEI  
 K。

> Hu33VL2 (SEQ ID NO: 43)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWFYQQKPGKAPKLLIYYT  
 20 SSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEI  
 K。

> Hu33VL3 (SEQ ID NO: 44)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWFYQQKPGGAVKLLIYYT  
 25 SSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEI  
 K。

> Hu33VH1 (同 Hu33VH-CDR grafted): (SEQ ID NO: 41)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA  
 25 TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPYG  
 HGYFDVWGQGTTVTVSS。

> Hu33VH2 (SEQ ID NO: 45)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA  
 30 TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASP YGH  
 GYFDVWGQGTTVTVSS。

> Hu33VH3 (SEQ ID NO: 46)

KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA

TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASP YGH  
GYFDVWGQGTTVTVSS。

3.3 鼠源抗体 M33 的人源化序列组合

表 10. 人源化抗体轻重链可变区组合

VH \ VL	Hu33VL1	Hu33VL2	Hu33VL3
Hu33VH1	Hu33-1	Hu33-4	Hu33-7
Hu33VH2	Hu33-2	Hu33-5	Hu33-8
Hu33VH3	Hu33-3	Hu33-6	Hu33-9

5 备注：表中例如“Hu33-6”指代抗体轻链可变区为 Hu33VL2 且重链可变区为 Hu33VH3 的抗体轻/重链可变区组合，其它依此类推。

上表中所指代的抗体轻/重链可变区组合（例如 Hu33-6）可以分别与抗体轻/重链恒定区连接形成全长抗体；在本披露中如无明确说明时，形成全长抗体时轻链可变区与 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接形成抗体轻链，重链可变区与 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 重链恒定区或 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接形成抗体重链，并以表中指代抗体轻/重链可变区组合的名称（例如 Hu33-6）加后缀“IgG4AA”表示与 IgG4-AA 重链恒定区连接形成的全长抗体，加后缀“IgG4P”表示与 IgG4-P 重链恒定区连接形成的全长抗体，例如，“Hu33-6.IgG4AA”，表示由 Hu33VH3 重链可变区和如 SEQ ID NO: 72 所示的  
15 IgG4-AA 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu33VL2 轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。“Hu33-6.IgG4P”，表示由 Hu33VH3 重链可变区和如 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu33VL2 轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。

20 4. 人源化抗体的突变体

4.1 Hu23 人源化抗体的突变抗体

通过计算机模拟，对 Hu23 人源化抗体的轻链 LCDR1（SEQ ID NO: 11）的特定定位点氨基酸进行定点突变，具体突变见表 11：

表 11. Hu23 轻链 LCDR1 的突变序列：

名称	序列（SEQ ID NO）
Hu23LCDR1（N28Q）	RSSQSLVHSQGNTYLE （SEQ ID NO: 47）
Hu23LCDR1（N28L）	RSSQSLVHSLGNTYLE （SEQ ID NO: 48）
Hu23LCDR1（N28T）	RSSQSLVHSTGNTYLE （SEQ ID NO: 49）
Hu23LCDR1（N28D）	RSSQSLVHSDGNTYLE （SEQ ID NO: 50）
Hu23LCDR1（G29A）	RSSQSLVHSNANTYLE （SEQ ID NO: 51）
Hu23LCDR1（G29V）	RSSQSLVHSNVNTYLE

	(SEQ ID NO: 52)
--	-----------------

注：Hu23LCDR1 (N28Q) 表示对 Hu23 人源化抗体轻链可变区 Hu23VL1 或 Hu23VL2 的 Kabat 编号规则第 28 位 N 突变为 Q 的 LCDR1 突变序列, Hu23LCDR1 (G29A) 表示对 Hu23 人源化抗体轻链可变区 Hu23VL1 或 Hu23VL2 的 Kabat 编号规则第 29 位 G 突变为 A 的 LCDR1 突变序列 (由 Kabat 编号系统确定 CDR)。

5 LCDR1 突变后的 Hu23 人源化抗体轻链可变区序列如下：

>Hu23VL1(N28Q)序列为：

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSQGNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG  
TKVEIK (SEQ ID NO: 53)

10 >Hu23VL1(N28L)序列为：

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSLGNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG  
TKVEIK (SEQ ID NO: 54)

>Hu23VL1(N28T)序列为：

15 DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG  
TKVEIK (SEQ ID NO: 55)

>Hu23VL1(N28D)序列为：

20 DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSDGNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG  
TKVEIK (SEQ ID NO: 56)

>Hu23VL1(G29A)序列为：

25 DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSNANTYLEWYLQKPGQSPQLL  
IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG  
TKVEIK (SEQ ID NO: 57)

>Hu23VL1(G29V)序列为：

30 DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSNVNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG  
TKVEIK (SEQ ID NO: 58)

>Hu23VL2(N28Q)序列为：

DGVMQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSQGNTYLEWYLQKPGQSPQL  
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGG  
GTKVEIK (SEQ ID NO: 59)

>Hu23VL2(N28L)序列为：

35 DGVMQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSLGNTYLEWYLQKPGQSPQL  
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGG  
GTKVEIK (SEQ ID NO: 60)

- >Hu23VL2(N28T)序列为：  
 DGVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQL  
 LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGG  
 GTKVEIK (SEQ ID NO: 61)
- 5 >Hu23VL2(N28D)序列为：  
 DGVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSDGNTYLEWYLQKPGQSPQL  
 LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGG  
 GTKVEIK (SEQ ID NO: 62)
- >Hu23VL2(G29A)序列为：  
 10 DGVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNANTYLEWYLQKPGQSPQL  
 LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGG  
 GTKVEIK (SEQ ID NO: 63)
- >Hu23VL2(G29V)序列为：  
 15 DGVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNVNTYLEWYLQKPGQSPQL  
 LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGG  
 GTKVEIK (SEQ ID NO: 64)

表 12. Hu23 人源化抗体轻/重链可变区组合

VL \ VH	Hu23VH1	Hu23VH2	Hu23VH3	Hu23VH4
Hu23VL1(N28Q)	Hu23-9	Hu23-21	Hu23-33	Hu23-45
Hu23VL1(N28L)	Hu23-10	Hu23-22	Hu23-34	Hu23-46
Hu23VL1(N28T)	Hu23-11	Hu23-23	Hu23-35	Hu23-47
Hu23VL1(N28D)	Hu23-12	Hu23-24	Hu23-36	Hu23-48
Hu23VL1(G29A)	Hu23-13	Hu23-25	Hu23-37	Hu23-49
Hu23VL1(G29V)	Hu23-14	Hu23-26	Hu23-38	Hu23-50
Hu23VL2(N28Q)	Hu23-15	Hu23-27	Hu23-39	Hu23-51
Hu23VL2(N28L)	Hu23-16	Hu23-28	Hu23-40	Hu23-52
Hu23VL2(N28T)	Hu23-17	Hu23-29	Hu23-41	Hu23-53
Hu23VL2(N28D)	Hu23-18	Hu23-30	Hu23-42	Hu23-54
Hu23VL2(G29A)	Hu23-19	Hu23-31	Hu23-43	Hu23-55
Hu23VL2(G29V)	Hu23-20	Hu23-32	Hu23-44	Hu23-56

备注：表中例如“Hu23-11”指代抗体轻链可变区为 Hu23VL1(N28T)且重链可变区为 Hu23VH1 的抗体轻/重链可变区组合，其它依此类推。

- 20 上表中所指代的抗体轻/重链可变区组合（例如 Hu23-11）可以分别与抗体轻/重链恒定区连接形成全长抗体；在本披露中如无明确说明时，形成全长抗体时轻链可变区与 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接形成抗体轻链，重链可变区与 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 重链恒定区或 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接形成抗体重链，并以表中指代抗体轻/重链可变区组合的名称（例如 Hu23-11）加后缀“IgG4AA”表示与 IgG4-AA 重链恒定区连接形成的全长抗体，加后缀“IgG4P”表示与 IgG4-P 重链恒定区连接形成的全长抗体，例如，
- 25 “Hu23-11.IgG4AA”，表示由 Hu23VH1 重链可变区和如 SEQ ID NO: 72 所示的

IgG4-AA 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu23VL1(N28T)轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。  
 “Hu23-11.IgG4P”，表示由 Hu23VH1 重链可变区和如 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu23VL1(N28T)轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。

实验结果显示，Hu23LCDR1 (N28Q)、Hu23LCDR1 (N28L)、Hu23LCDR1 (N28T)、Hu23LCDR1 (N28D)、Hu23LCDR1 (G29A)、Hu23LCDR1 (G29V) 位点突变后的人源化抗体均保持与 PD-1 的结合能力 (表 16)。

4.2 Hu32 人源化抗体的突变抗体

经序列分析，M23 来源的系列人源化抗体 Hu23 和 M32 来源的系列人源化抗体 Hu32 的序列同一性较高，将 Hu23 轻链可变区和 Hu32 的重链可变区组合成新的轻重链可变区组合。实验结果显示，包含新组合轻重链可变区的人源化抗体均保持与 PD-1 抗原的结合能力 (表 16)。

表 13. Hu32 和 Hu23 抗体可变区共有序列通式

重链		轻链	
HCDR1	DYEX <sub>1</sub> H, 其中, X <sub>1</sub> 选自 I 或 M; (SEQ ID NO: 65)	LCDR1	RSSQSX <sub>13</sub> VHSX <sub>14</sub> X <sub>15</sub> X <sub>16</sub> T YLE, 其中, X <sub>13</sub> 选自 I 或 L, X <sub>14</sub> 选自 N、Q、L、T 或 D, X <sub>15</sub> 选自 G、A 或 V, X <sub>16</sub> 选 自 N 或 K; (SEQ ID NO: 68)
HCDR2	LX <sub>2</sub> DPETGGX <sub>3</sub> VYNQKFKX <sub>4</sub> , 其中 X <sub>2</sub> 选自 F 或 I, X <sub>3</sub> 选自 I 或 T, 其中 X <sub>4</sub> 选自 G 或 D; (SEQ ID NO: 66)	LCDR2	<u>KVSNRFS</u> ; (SEQ ID NO: 12)
HCDR3	EX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> YX <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> DWYFDV, 其中 X <sub>5</sub> 选自 G 或 R, X <sub>6</sub> 为 F 或缺, X <sub>7</sub> 为 S 或缺, X <sub>8</sub> 为 Y 或缺, X <sub>9</sub> 为 G 或缺, X <sub>10</sub> 为 S 或缺, X <sub>11</sub> 选自 N 或 T, X <sub>12</sub> 选自 R 或 S; (SEQ ID NO: 67)	LCDR3	FQGSHPYX <sub>17</sub> , 其中 X <sub>17</sub> 选自 A 或 T; (SEQ ID NO: 69)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASX <sub>18</sub> X <sub>19</sub> TFX <sub>20</sub> <u>DYEX<sub>1</sub>HWVX<sub>21</sub></u> QAP GX <sub>22</sub> GLEWX <sub>23</sub> <u>GLX<sub>2</sub>DPETGGX<sub>3</sub>VY</u> <u>NQKFKX<sub>4</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>TX<sub>26</sub></u> TADKSTSTAY <u>MEX<sub>27</sub>SSLRSEDVAVYYCX<sub>28</sub>REX<sub>5</sub>X</u> <u><sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>YX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub></u> DWYFDVWGQ GTTVTVSS, 其中, X <sub>1</sub> 选自 I 或 M, X <sub>2</sub> 选自 F 或 I, X <sub>3</sub> 选自 I 或 T, X <sub>4</sub> 选 自 G 或 D, X <sub>5</sub> 选自 G 或 R, X <sub>6</sub> 为 F 或缺, X <sub>7</sub> 为 S 或缺, X <sub>8</sub> 为 Y 或 或缺, X <sub>9</sub> 为 G 或缺, X <sub>10</sub> 为 S 或 或缺, X <sub>11</sub> 选自 N 或 T, X <sub>12</sub> 选自 R	VL	DX <sub>29</sub> VMTQTPLSLPVTTPGE PASISCR <u>RSSQSX<sub>13</sub>VHSX<sub>14</sub></u> <u>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>TYLEWYLQKPGQS</u> PQLLIY <u>KVSNRFS</u> GVDPDR FSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCFQGSHPY <u>X<sub>17</sub>FGGGTKVEIK</u> , 其中, X <sub>13</sub> 选自 I 或 L, X <sub>14</sub> 选自 N、 Q、L、T 或 D, X <sub>15</sub> 选自 G、 A 或 V, X <sub>16</sub> 选自 N 或 K, X <sub>17</sub> 选自 A 或 T, X <sub>29</sub> 选自 I、 V 或 G。



或 S, X <sub>18</sub> 选自 G 或 D, X <sub>19</sub> 选自 G、F 或 Y, X <sub>20</sub> 选自 S 或 T, X <sub>21</sub> 选自 R 或 K, X <sub>22</sub> 选自 Q 或 H, X <sub>23</sub> 选自 M 或 I, X <sub>24</sub> 选自 R 或 K, X <sub>25</sub> 选自 V、A 或 T, X <sub>26</sub> 选自 R 或 K, X <sub>27</sub> 选自 L 或 F, X <sub>28</sub> 选自 A 或 T。 (SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 71)
---	-----------------

表 14. Hu32 重链可变区与 Hu23 轻链可变区的组合

VH \ VL	Hu32VH1	Hu32VH2	Hu32VH3	Hu32VH4	Hu32VH5	Hu32VH6
Hu23VL1(N28Q)	Hu32a-13	Hu32a-27	Hu32a-41	Hu32a-55	Hu32a-69	Hu32a-83
Hu23VL1(N28L)	Hu32a-14	Hu32a-28	Hu32a-42	Hu32a-56	Hu32a-70	Hu32a-84
Hu23VL1(N28T)	Hu32a-15	Hu32a-29	Hu32a-43	Hu32a-57	Hu32a-71	Hu32a-85
Hu23VL1(N28D)	Hu32a-16	Hu32a-30	Hu32a-44	Hu32a-58	Hu32a-72	Hu32a-86
Hu23VL1(G29A)	Hu32a-17	Hu32a-31	Hu32a-45	Hu32a-59	Hu32a-73	Hu32a-87
Hu23VL1(G29V)	Hu32a-18	Hu32a-32	Hu32a-46	Hu32a-60	Hu32a-74	Hu32a-88
Hu23VL2(N28Q)	Hu32a-19	Hu32a-33	Hu32a-47	Hu32a-61	Hu32a-75	Hu32a-89
Hu23VL2(N28L)	Hu32a-20	Hu32a-34	Hu32a-48	Hu32a-62	Hu32a-76	Hu32a-90
Hu23VL2(N28T)	Hu32a-21	Hu32a-35	Hu32a-49	Hu32a-63	Hu32a-77	Hu32a-91
Hu23VL2(N28D)	Hu32a-22	Hu32a-36	Hu32a-50	Hu32a-64	Hu32a-78	Hu32a-92
Hu23VL2(G29A)	Hu32a-23	Hu32a-37	Hu32a-51	Hu32a-65	Hu32a-79	Hu32a-93
Hu23VL2(G29V)	Hu32a-24	Hu32a-38	Hu32a-52	Hu32a-66	Hu32a-80	Hu32a-94
Hu23VL1	Hu32a-25	Hu32a-39	Hu32a-53	Hu32a-67	Hu32a-81	Hu32a-95
Hu23VL2	Hu32a-26	Hu32a-40	Hu32a-54	Hu32a-68	Hu32a-82	Hu32a-96

备注：表中例如“Hu32a-85”指代抗体轻链可变区为 Hu23VL1(N28T)且重链可变区为 Hu32VH6 的抗体轻/重链可变区组合，其它依此类推。

- 5 上表中所指代的抗体轻/重链可变区组合（例如 Hu32a-85）可以分别与抗体轻/重链恒定区连接形成全长抗体；在本披露中如无明确说明时，形成全长抗体时轻链可变区与 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接形成抗体轻链，重链可变区与 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 重链恒定区或 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接形成抗体重链，并以表中指代抗体轻/重链可变区组合的名称（例如 Hu32a-85）加后缀“IgG4AA”表示与 IgG4-AA 重链恒定区连接形成的全长抗体，加后缀“IgG4P”表示与 IgG4-P 重链恒定区连接形成的全长抗体，例如，“Hu32a-85.IgG4AA”，表示由 Hu32VH6 重链可变区和如 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu23VL1(N28T)轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。
- 10 “Hu32a-85.IgG4P”，表示由 Hu32VH6 重链可变区和如 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu23VL1(N28T)轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。

表 15. Hu23 重链可变区与 Hu32 轻链可变区的组合

VH \ VL	Hu23VH1	Hu23VH2	Hu23VH3
---------	---------	---------	---------

Hu32VL1	Hu23a-57	Hu23a-59	Hu23a-61
Hu32VL2	Hu23a-58	Hu23a-60	Hu23a-62

备注：表中例如“Hu23a-57”指代抗体轻链可变区为 Hu32VL1 且重链可变区为 Hu23VH1 的抗体轻/重链可变区组合，其它依此类推。

上表中所指代的抗体轻/重链可变区组合（例如 Hu23a-57）可以分别与抗体轻/重链恒定区连接形成全长抗体；在本披露中如无明确说明时，形成全长抗体时轻链可变区与 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接形成抗体轻链，重链可变区与 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 重链恒定区或 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接形成抗体重链，并以表中指代抗体轻/重链可变区组合的名称（例如 Hu32a-85）加后缀“.IgG4AA”表示与 IgG4-AA 重链恒定区连接形成的全长抗体，加后缀“.IgG4P”表示与 IgG4-P 重链恒定区连接形成的全长抗体，例如，“Hu23a-57.IgG4AA”，表示由 Hu23VH1 重链可变区和如 SEQ ID NO: 72 所示的 IgG4-AA 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu32VL1 轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。“Hu23a-57.IgG4P”，表示由 Hu23VH1 重链可变区和如 SEQ ID NO: 79 所示的 IgG4-P 重链恒定区连接而成的重链，与由 Hu32VL1 轻链可变区和如 SEQ ID NO: 73 所示的 Kappa 链恒定区连接而成的轻链形成的全长抗体。

#### 5. 人源化抗体的筛选

通过 Biacore 进行不同人源化抗体的亲和力检测（方法参见测试例 3），结果见表 16，结果显示不同的人源化抗体保持了对于 PD-1 的结合能力，部分人源化抗体的亲和力甚至和其鼠源抗体基本接近。

表 16. Hu23 人源化抗体与人 PD-1 的亲和力

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
M23	4.57E+04	1.32E-04	2.89E-09
Hu23-1.IgG4AA	3.43E+04	1.10E-04	3.20E-09
Hu23-5.IgG4AA	2.99E+04	1.14E-04	3.82E-09
Hu23-2.IgG4AA	2.74E+04	1.61E-04	5.86E-09
Hu23-6.IgG4AA	2.79E+04	1.55E-04	5.57E-09
Hu23-3.IgG4AA	2.93E+04	1.60E-04	5.46E-09
Hu23-7.IgG4AA	2.77E+04	1.66E-04	5.97E-09
Hu23-4.IgG4AA	4.24E+04	1.44E-04	3.39E-09
Hu23-8.IgG4AA	4.11E+04	1.47E-04	3.56E-09
Hu23-9.IgG4AA	6.16E+04	1.32E-04	2.15E-09
Hu23-10.IgG4AA	5.51E+04	1.53E-04	2.77E-09
Hu23-11.IgG4AA	4.22E+04	1.14E-04	2.71E-09
Hu23-12.IgG4AA	5.45E+04	1.10E-04	2.02E-09
Hu23-13.IgG4AA	4.24E+04	1.22E-04	2.88E-09
Hu23-14.IgG4AA	7.23E+04	1.61E-04	2.22E-09
M32	7.83E+04	4.15E-04	5.3E-09
Hu32a-15.IgG4AA	4.89E+04	2.52E-03	5.14E-08
Hu32a-29.IgG4AA	7.89E+04	6.20E-04	7.86E-09
Hu32a-43.IgG4AA	8.39E+04	6.85E-04	8.16E-09

Hu32a-57.IgG4AA	7.94E+04	6.24E-04	7.85E-09
Hu32a-71.IgG4AA	8.60E+04	3.96E-04	4.61E-09
Hu32a-85.IgG4AA	9.90E+04	3.15E-04	3.18E-09
M33	3.08E+05	2.27E-04	7.37E-10
Hu33-1.IgG4AA	6.61E+04	1.28E-03	1.93E-08
Hu33-4.IgG4AA	8.11E+04	2.55E-03	3.14E-08
Hu33-7.IgG4AA	7.69E+04	2.60E-03	3.38E-08
Hu33-2.IgG4AA	1.35E+05	1.43E-04	1.06E-09
Hu33-5.IgG4AA	1.46E+05	1.35E-04	9.26E-10
Hu33-8.IgG4AA	1.53E+05	1.62E-04	1.06E-09
Hu33-3.IgG4AA	1.25E+05	1.36E-04	1.09E-09
Hu33-6.IgG4AA	1.30E+05	1.40E-04	1.08E-09
Hu33-9.IgG4AA	1.40E+05	1.53E-04	1.09E-09

### 实施例 3. 构建和表达 PD-1 人源化抗体

设计引物 PCR 搭建各人源化抗体 VH/VK 基因片段，再与表达载体 pHr（带信号肽及恒定区基因（CH1-Fc/CL）片段）进行同源重组，构建抗体全长表达载体  
 5 VH-CH1-Fc-pHr/VK-CL-pHr。IgG4-P 代表 S228P（对应于序列 SEQ ID NO: 72 或 SEQ ID NO: 79 的第 108 位）突变，IgG4-AA 代表 F234A（对应于序列 SEQ ID NO: 72 或 SEQ ID NO: 79 的第 114 位）、L235A（对应于序列 SEQ ID NO: 72 或 SEQ ID NO: 79 的第 115 位）和 S228P（对应于序列 SEQ ID NO: 72 或 SEQ ID NO: 79 的第 108 位）突变，IgG4-AA 和 IgG4-P 抗体形式可以通过 IgG4 抗体形式简单  
 10 点突变获得。

IgG4-AA 重链恒定区序列如下（SEQ ID NO: 72）：

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKVDKR VESKYGPP  
 CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYV  
 15 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI  
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK  
 SLSLSLGK。

抗体的轻链（Kappa 链）恒定区序列如下（SEQ ID NO: 73）：

20 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG  
 NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR  
 GEC。

构建的 IgG4AA 形式全长抗体序列示例性列举如下：

Hu23-11.IgG4AA 抗体重链（SEQ ID NO: 74）：

25 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFS DYEMHWVRQAPGQGLEWM  
 GLIDPETGGTVYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARERFS  
 YYGSTSDWYFDVWGQGT T V T VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK  
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCN

VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
 TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL  
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE  
 5 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK。

Hu23-11.IgG4AA 轻链 (SEQ ID NO: 75) :

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
 IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG  
 TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
 10 SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
 NRGEC。

Hu32a-85.IgG4AA 重链 (SEQ ID NO: 76) :

EVQLVQSGAEVVKKPGSSVKVSCKASDFTFTDYEIHWVKQAPGHGLEWIGL  
 FDPETGGIVYNQKFKGKATLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCTREGYNR  
 15 DWYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV  
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKTYTCNVDHKPSN  
 TKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
 VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
 KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
 20 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS  
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK。

Hu32a-85.IgG4AA 的轻链 (同 Hu23-11.IgG4AA 的轻链, SEQ ID NO: 75) :

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
 IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG  
 25 TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
 SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
 NRGEC。

Hu33-6.IgG4AA 重链 (SEQ ID NO: 77) :

KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA  
 30 TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYGH  
 GYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT  
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKTYTCNVDHKPSNT  
 KVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
 SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 35 YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS  
 VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK。

Hu33-6.IgG4AA 轻链 (SEQ ID NO: 78) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWFYQQKPGKAPKLLIYYT

SSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGKVEI  
 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
 QESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
 C。

5 IgG4-P 的重链恒定区序列如下 (SEQ ID NO: 79) :

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKVDKR VESKYGPP  
 CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V  
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI  
 10 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK  
 SLSLSLGK。

构建的 IgG4-P 形式全长抗体序列示例性列举如下:

Hu23-11. IgG4P 抗体重链 (SEQ ID NO: 80) :

15 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWM  
 GLIDPETGGTVYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARERFS  
 YYGSTSDWYFDVWGQGT T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K  
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCN  
 VDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP E V  
 20 T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q  
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL  
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQE  
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK。

Hu23-11. IgG4P 轻链 (同 Hu23-11.IgG4AA 的轻链, SEQ ID NO: 75) :

25 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
 IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYTFGGG  
 TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
 SGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
 NRGEC。

30 Hu32a-85. IgG4P 重链 (SEQ ID NO: 81) :

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASDFTFTDYEIHWVKQAPGHGLEWIGL  
 FDPETGGIVYNQKFKGKATLTADKSTSTAYMEFSSLRSED TAVYYCTREGYNR  
 DWYFDVWGQGT T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V  
 TVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV D HKPSN  
 35 TKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP E V T C V V V D V  
 SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS  
 VMHEALHNHYTQK SLSLSLGK。

Hu32a-85. IgG4P 的轻链（同 Hu23-11.IgG4AA 的轻链，SEQ ID NO: 75）：

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLL  
IYKVSNRFSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYTFGGG  
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
5 SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
NRGEC。

Hu33-6. IgG4P 重链（SEQ ID NO: 82）：

KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA  
TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYGH  
10 GYFDVWVGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT  
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNT  
KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
15 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS  
VMHEALHNHYTQKSLSLGLK。

Hu33-6. IgG4P 轻链（同 Hu33-6.IgG4AA 轻链，SEQ ID NO: 78）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWFYQQKPGKAPKLLIYYT  
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGKVEI  
20 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
C。

### 测试例

#### 测试例 1. 抗 PD-1 抗体在体外与 PD-1 配体的结合和结合阻断 ELISA 实验

25 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抗 PD-1 抗体对于信号通路的阻断活性。

30 本实验中，将 PD-1-His 蛋白（Cat.# 10377H08H，Sino Biological）包被 96 孔板后，分别加入待测的抗 PD-1 抗体（包括抗体：Hu23-11.IgG4AA、Hu32a-85.IgG4AA 和 Hu33-6.IgG4AA，阳性对照抗体：H005-1（参见 WO2015085847 中 H005-1 抗体），进行孵育反应；稍后再 HRP 标记的 goat anti-human IgG(H+L) 抗体（Cat.# 109-035-003，Jackson ImmunoResearch），孵育反应。洗板后，检测 HRP 标记的 goat anti-human IgG(H+L) 结合量，计算得到抗 PD-1 抗体对配体 PD-1 结合的 EC<sub>50</sub>  
35 值。

本实验中，将胞外区与 Fc 融合的 PD-1 蛋白（PD-1-Fc，序列见 SEQ ID NO: 1）包被 96 孔板后，分别加入待测的抗 PD-1 抗体（包括抗体：Hu23-11.IgG4AA、Hu32a-85.IgG4AA 和 Hu33-6.IgG4AA，阳性对照抗体：H005-1（参见 WO2015085847

中 H005-1 抗体), 进行孵育反应; 稍后再加入生物素标记的 PD-L1/PD-L2, 孵育反应。洗板后, 检测生物素标记的 PD-L1/PD-L2 结合量, 计算得到抗 PD-1 抗体对配体 PD-L1/PD-L2 结合阻断的 IC<sub>50</sub> 值。

用 pH 9.6 CB 缓冲液 (1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 2.93g NaHCO<sub>3</sub> 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% tween20) 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抗 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/PD-L2 (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 100μL/孔用 PBST 缓冲液 1:400 稀释的 Streptavidin - Peroxidase Polymer (链霉亲和素-过氧化物酶聚合物), 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。用酶标仪在 450nm 处读取吸收值, 计算抗 PD-1 抗体对配体 PD-L1/PD-L2 结合阻断的 IC<sub>50</sub> 值。数据详见下表 17。

表 17. 本披露的抗 PD-1 抗体和 PD-1 结合及对配体 PD-L1/PD-L2 结合阻断 ELISA

抗体	抗原结合		PD-1 与 PD-L1/PD-L2 结合阻断	
	hu PD-1-his OD 值 MAX	hu PD-1-his EC50 (ng/mL)	Hu PD-1-Fc/PD-L1 IC50 (ng/mL)	Hu PD-1-Fc/PD-L2 IC50 (ng/mL)
Hu23-11.IgG4AA	1.46	237.3	92.35	245.1
Hu32a-85.IgG4AA	1.265	135.9	78.63	205.9
Hu33-6.IgG4AA	1.706	205.6	103.5	207.2
H005-1	1.21	113.1	109.6	225.3

本披露示例性抗 PD-1 抗体 Hu23-11.IgG4AA、Hu32a-85.IgG4AA 和 Hu33-6.IgG4AA 都能够有效阻断 PD-1 与 PD-L1/PD-L2 的结合, 其阻断活性与阳性对照抗体相似。

### 测试例 2. 示例性抗体的配体阻断试验

研究抗体对 PD-1 与 PD-L1 结合的阻断作用。实验过程简单描述如下:

消化 CHOK1/PD-L1 细胞 (Promega), 按照 100 μL/孔加入到 96 孔板中, 放置于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 小时。使用 PBS 稀释对照品和样品至所需浓度。计数 Jurkat/PD-1 细胞 (稳转 PD-1 的 Jurkat 细胞), 按一定比例种 CHOK1/PD-L1 细胞的细胞培养板中 (90 μL/孔) 同时加入 10 μL/孔加入稀释后的抗体 (抗体: Hu23-11.IgG4AA、Hu32a-85.IgG4AA 和 Hu33-6.IgG4AA, 阳性对照抗体: H005-1), 阴性对照 IgG4 蛋白, 抗体梯度稀释浓度为 0.3mg/mL、3 mg/mL、30 mg/mL), 置

于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 5 小时。取出细胞培养板, 置于室温放置 5 分钟, 然后每孔加入 50 μL Bio-Glo™ Reagent, 室温孵育 5 分钟, 读板。实验结果见附图 1。

结果表明, 本披露中示例性的抗 PD-1 抗体 Hu23-11.IgG4AA、Hu32a-85.IgG4AA 和 Hu33-6.IgG4AA 能够有效阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合。

5

### 测试例 3. 示例性抗体的 BIAcore 抗体亲和力实验

用 Protein A 生物传感芯片(Cat. # 29127556, GE)亲和捕获 IgG, human PD-1 抗原(Cat.# 10377H08H, Sino Biological)、Cyno PD-1 抗原(购自 Sino Biological) 流过芯片表面, Biacore T200 仪器实时检测 PD-1 抗体和抗原 PD-1 反应信号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后, 用 10 mM Glycine-HCl pH1.5 的缓冲液将生物传感芯片洗净再生。实验缓冲体系为 1×HBS-EP 缓冲溶液 (Cat# BR-1001-88, GE)。实验结束后用 GE Biacore T200 Evaluation version 3.0 软件以 (1:1) Langmuir 模型拟合数据, 得出亲和力数值, 结果见表 18。

表 18. 抗 PD-1 抗体与人 PD-1 和猴 PD-1 的亲和力

抗体	抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Hu23-11.IgG4AA	hPD-1-His	6.06E+04	1.13E-04	1.86E-09
	Cyno PD-1	4.79E+04	1.26E-04	2.62E-09
Hu32a-85.IgG4AA	hPD-1-His	8.56E+04	2.78E-04	3.25E-09
	Cyno PD-1	1.16E+05	4.75E-04	4.11E-09
Hu33-6.IgG4AA	hPD-1-His	1.24E+05	1.14E-04	9.18E-10
	Cyno PD-1	2.51E+05	2.41E-04	9.60E-10

结果显示, 本披露示例性的抗 PD-1 抗体 Hu23-11.IgG4AA、Hu32a-85.IgG4AA 和 Hu33-6.IgG4AA 均能够与人 PD-1 和猴 PD-1 结合。

15

### 测试例 4. 抗体在 PBMC-T 淋巴细胞激活实验中对细胞 IFN $\gamma$ 的分泌作用

为了研究抗 PD-1 抗体对人原代 T 淋巴细胞功能的影响, 收集和纯化人外周血单核细胞 (PBMC), 采用结核菌素 (TB) 体外刺激 5 天后, 检测细胞因子 IFN $\gamma$  分泌水平。实验过程简单描述如下:

20

新鲜血液利用 Ficoll-Hypaque (17-5442-02, GE), 密度梯度离心 (Stem Cell Technologies) 得到 PBMC, 于 RPMI 1640 (SH30809.01, GE) 培养基中培养, 该培养基中添加 10% (v/v) FBS (10099-141, Gibco), 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

25

新鲜分离纯化的 PBMC 以 RPMI 1640 培养基调整密度为  $2 \times 10^6$  个/mL, 20mL 细胞悬液中加入 40μL 结核菌素 (97-8800, Synbiotics), 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 5 天。第 5 天, 收集上述培养的细胞离心, 重悬至新鲜的 RPMI 1640 培养基中, 调整密度为  $1.1 \times 10^6$  个/mL, 接种至 96 孔细胞培养板, 每孔 90μL。同时加入梯度稀释的抗体样品 (包括本披露的抗体: Hu23-11.IgG4AA、Hu32a-85.IgG4AA 和 Hu33-6.IgG4AA, 阳性对照抗体 H005-1, 和阴性对照 IgG4 蛋白, 抗体梯度稀

30

释浓度为 0.3mg/mL、3 mg/mL、30 mg/mL), 用 PBS (B320, 上海源培生物科



技股份有限公司) 稀释, 每孔 10μL。细胞培养板置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 3 天。取出细胞培养板, 离心 (4000rpm, 10min) 收集细胞培养上清, 采用 ELISA 的方法 (人 IFN-γ 检测试剂盒(EHC102g.96, 欣博盛)), 检测 IFN-γ 的水平。具体操作参考试剂说明书。

5 试验结果见图 2, 结果表明本披露的抗 PD-1 抗体 Hu23-11.IgG4AA、Hu32a-85.IgG4AA、和 Hu33-6.IgG4AA 均能有效激活 IFN-γ 的分泌。

**测试例 5.抗 PD-1 抗体在转基因 PD-1 小鼠结肠癌模型 MC38 中的作用**

10 将 MC38 细胞 5×10<sup>5</sup> 细胞/小鼠/100μL 接种于 90 只 hPD-1 TG 小鼠 (百奥赛图) 右肋部皮下, 10 天后去除肿瘤体积过大过小的动物, 按平均肿瘤体积约 120mm<sup>3</sup> 将小鼠随机分为: 空白对照 Vehicle (PBS)、阳性对照 H005-1 3mpk、Hu32a-85.IgG4AA 1mpk、Hu32a-85.IgG4AA 3mpk、Hu23-11.IgG4AA 1mpk、Hu23-11.IgG4AA 3mpk、Hu33-6.IgG4AA 3mpk 共 7 组, 每组 8 只。Day0 (第 0 天) 起每周三次腹腔注射各组抗体, 第一周给药结束后发现肿瘤被明显抑制, 第二、15 三周调整给药频率为每周一次, 共给药 5 次。每周 2 次监测肿瘤体积、动物重量并记录数据。当肿瘤体积超过 2000mm<sup>3</sup> 或多数肿瘤出现破溃或体重下降 20%时, 将荷瘤动物进行安乐死作为实验终点。

$$\text{肿瘤体积 (TV)} = 1/2 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$$

$$\text{肿瘤增殖率 (T/C\%)} = (T-T_0)/(C-C_0) \times 100\%$$

20 抑瘤率 (TGI%) = 1 - T/C %

其中, T、T<sub>0</sub> 分别表示抗体给药组试验结束和试验开始时的肿瘤体积, C、C<sub>0</sub> 分别表示空白对照组试验结束和试验开始时的肿瘤体积。

试验结果见表 19 和附图 3, 试验结果表明, 与空白对照相比, 本披露的抗体均能显著抑制小鼠结肠癌 MC38 移植瘤的生长, 其中抑瘤率最高的是 25 Hu32a-85.IgG4AA-3mpk 组, 末次测量时抑瘤率为 77.64%。当给药频率为一周三次给药 3 次, 在第七天检测时, 结果显示本披露的抗体的抑瘤率均明显优于阳性对照抗体 H005-1; 其后给药频率降为一周一次, 给药 2 次后(Day21), 本披露的抗体间药效逐渐拉开差距, 且表现出剂量依赖性, 其中 Hu32a-85.IgG4AA 明显优于同等剂量的 H005-1 (p<0.05)。而且荷瘤小鼠对抗 PD-1 抗体均能很好耐受, 在 30 整个给药过程中体重平稳上升, 无明显药物致体重减轻等症状发生。

表 19. 抗 PD-1 抗体对小鼠结肠癌 MC38 的抑瘤率影响 (mm<sup>3</sup>)

首次给药后天数	H005-1	Hu32a-85.IgG4AA		Hu23-11.IgG4AA		Hu33-6.IgG4AA
	3mpk	1mpk	3mpk	1mpk	3mpk	3mpk
21	46.82%	67.12%	77.64%	45.12%	75.32%	59.31%

### 测试例 6. 抗 PD-1 抗体在转基因 PD-1 小鼠结肠癌模型 MC38 中的作用

转基因 PD-1 小鼠来源于购买的转基因 PD-1 小鼠 (ISIS INNOVATION LIMITED, University Offices, Wellington Square, Oxford OX1 2JD, England) 在 Cephim Biosciences, Inc. 培育的第五代小鼠。将 MC38 细胞以  $5 \times 10^5$  个/100 $\mu$ L/只 5 接种到 hPD-1 转基因小鼠 (雌雄各半) 右肋后部皮下, 待小鼠平均肿瘤体积达到 80-100mm<sup>3</sup> 之间时, 去除体重、肿瘤过大和过小的动物, 按照肿瘤体积大小将荷瘤小鼠随机分为 5 组 (每组 8 只): 阴性对照 hIgG control 30mpk、H005-1 10mpk、H005-1 30mpk、Hu33-6.IgG4AA 10mpk、Hu33-6.IgG4AA 30mpk。分组给药日期设定为 Day 0。分组后腹腔给予各药物, 给药周期 22 天, 每两天给药一次, 共 11 10 次。每周测 2 次瘤体积, 称体重, 记录数据。各组动物体重、肿瘤体积均用平均值 $\pm$ 标准差 (Mean  $\pm$  SEM) 表示, 并用 Graphpad Prism 5 和 Excel 软件作图, 使用 student t test 统计分析。

$$\text{肿瘤体积 (TV)} = 0.5236 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$$

$$\text{肿瘤增殖率 T/C\%} = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100\%$$

$$\text{抑瘤率 \%TGI} = 1 - T/C\%$$

其中, T、T<sub>0</sub> 分别表示抗体给药组试验结束和试验开始时的肿瘤体积, C、C<sub>0</sub> 分别表示空白对照组试验结束和试验开始时的肿瘤体积。

试验结果见表 20 和附图 4 所示, 试验结果表明, 与对照组相比, 本披露的抗体能显著抑制小鼠结肠癌 MC38 移植瘤的生长, 其中抑瘤率最高的是 20 Hu33-6.IgG4AA 30mpk 组, 第 20 天测量时抑瘤率为 80.4%。在低剂量组 (10mpk), Hu33-6.IgG4AA-10mpk 的药效好于阳性对照 H005-1-10mpk。

表 20. 抗 PD-1 抗体对小鼠结肠癌 MC38 肿瘤体积影响

首次给药后天数	hIgG control 组	H005-1 10 mpk 组	H005-1 30 mpk 组	Hu33-6.IgG4AA 10 mpk 组	Hu33-6.IgG4AA 30 mpk 组
0	96.2	96.1	95.3	94.7	94.5
20	1797.2	794.0	434.9	550.1	352.8
23		1034.2	534.1	632.4	387.6

备注: 表中各组肿瘤平均体积的单位为: mm<sup>3</sup>。

### 25 测试例 7. 抗 PD-1 抗体食蟹猴的药代动力学试验

实验用食蟹猴, 雄性, 6 只, 2-5 岁, 2-5 公斤。购于广东前沿生物科技有限公司, 许可证号: SCXK (粤) 2015-0037, 动物合格证号: 44613900000219。

饲养环境: 室温控制在 18 $^{\circ}$ C - 26 $^{\circ}$ C, 相对湿度在 40% - 70%, 光照 12 小时明暗交替。除了需要禁食的情况外, 无限量获取饲料和水。

30 动物给药前称重, 体重介于 2.81-3.52 kg 之间。使用注射泵于前肢或后肢皮下静脉输注给药, 各组给药剂量均为 1 mg/kg (1mpk), 单次静脉注射给药, 给药速度 0.1 mL/kg/min, 给药时间约 30 min。动物于给药前, 静脉输注开始后 5 min、0.25 h、

0.5 h (给药结束即刻), 1h、2h、4h、8 h, 1d、2d、3d、4d、5d、7d、10d、13d、14d、21d 和 28 d, 于后肢静脉采集全血, 分离血清。其中给药前, 静脉输注开始后 14d, 21d, 28 d 采集全血约 2 mL, 其余采血点采集全血约 1mL。用 ELISA 检测血清中的血药浓度, 进行 PK 分析, 结果见表 21。

5 表 21. 人源化抗 PD-1 抗体食蟹猴药代动力学

	Hu23-11.IgG4AA	Hu33-6.IgG4AA
t1/2( day)	5.5±0.7	4.6±1.3
Cmax(µg/mL)	23.75±2.29	21.47±2.13
AUC (h*µg/mL)	2775±241	2319±518
CL (mL/day/kg)	8.7±0.7	10.7±2.3
Vz(mL/kg)	69±3.6	67.9±3.4

结果显示, Hu23-11.IgG4AA 和 Hu33-6.IgG4AA 的药代动力学活性良好。

10 以下通过示例性试验配制抗 PD-1 抗体稳定制剂, 以下制剂实施中的抗 PD-1 抗体为前述的 Hu23-11.IgG4AA, 制备过程中使用的设备及结果计算方法如下:

SEC 分子排阻色谱法: 根据凝胶孔隙的孔径大小与高分子样品分子的线团尺寸间的相对关系而对溶质进行分离的分析的方法。SEC 单体含量百分比=A 单体/A 总\*100% (A 单体为样品中主峰单体的峰面积, A 总为所有峰面积之和)。SEC 测定用仪器: 安捷伦 1260; 柱子: waters, XBrige BEH200Å SEC(300×7.8mm 3.5µm)。

15 CE 毛细管凝胶电泳: 将凝胶移到毛细管中作为支持介质进行的一种电泳, 并在一定的电压下根据样品分子量的大小进行分离的方法。非还原 CE (NR-CE) 纯度百分比=A 主峰/A 总\*100% (A 主峰为样品中主峰的峰面积, A 总为所有峰面积之和。CE 测定用仪器: Beckman, 型号 plus800。

20 iCIEF 成像毛细管等点聚焦电泳 (简称 iCE): 根据蛋白质等电点 pI 不同进行分离的技术。iCIEF 中性峰含量百分比=中性峰面积/总面积\*100% (总面积为酸性峰、中性峰和碱性峰面积之和)。iCIEF 测定所用仪器: simple protein, 型号 muarice。

渗透压: 冰点法测定渗透压, 以冰点下降值与溶液的摩尔浓度成正比例关系为基础, 采用高灵敏度感温元件, 测定溶液结冰点, 通过电量转化为渗透压。仪器厂家罗泽 Loser, 型号 OM815。

25

### 测试例 8: 抗 PD-1 抗体制剂缓冲体系和 pH 筛选

使用下列缓冲液, 配制含 80 mg/mL 蔗糖和 0.6mg/mL 聚山梨酯 80 (PS80), 蛋白浓度为 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体 (Hu23-11.IgG4AA) 制剂, 其中缓冲液如下:

- 30 1) 10mM 醋酸钠盐 (简称: AA), pH 5.0;  
2) 10mM 醋酸钠盐, pH 5.2;

- 3) 10mM 醋酸钠盐, pH 5.5;
- 4) 10mM 醋酸钠盐, pH5.7;
- 5) 10mM 琥珀酸钠盐 (简称: SA), pH5.2;
- 6) 10mM 枸橼酸钠盐 (简称: CA), pH5.2;

5 制备完成的制剂过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。考察样品在强制降解条件下 (40°C M1, 也即 40°C 高温条件下放置 1 个月) 和加速条件下 (25°C M6, 也即 25°C 温度条件下放置 6 个月) 的稳定性, 并以外观、SEC 和非还原 CE-SDS 为评价指标, 考察制剂稳定性。实验结果见表 22。

40°C M1 强制降解条件下, AA 和 SA 缓冲体系的蛋白制剂外观优于 CA 体系;  
10 pH5.2-5.7 的 AA 缓冲体系的蛋白制剂纯度项优于 pH5.0 AA 缓冲体系和 pH5.2 SA 缓冲体系; 25°C M6 加速条件下, 外观组间无显著性差异。

表 22. pH 和缓冲体系筛选实验结果

序号	条件	外观	SEC 单体 (%)	非还原 CE-SDS (%)
01	D0	澄明	95.6	94.5
	40°C M1	澄明	89.0	85.1
	25°C M6	浑浊	91.0	91.3
02	D0	澄明	95.5	94.5
	40°C M1	澄明	90.2	87.3
	25°C M6	浑浊	92.6	92.0
03	D0	澄明	95.5	94.6
	40°C M1	澄明	90.5	88.4
	25°C M6	浑浊	91.5	91.2
04	D0	澄明	95.5	94.7
	40°C M1	澄明	91.0	87.1
	25°C M6	浑浊	91.6	92.5
05	D0	澄明	95.5	94.6
	40°C M1	澄明	88.3	84.7
	25°C M6	浑浊	91.0	91.1
06	D0	澄明	95.4	94.9
	40°C M1	浑浊	91.8	86.1
	25°C M6	浑浊	93.2	92.4

备注: D0 表示实验开始时, “M”表示月, 例如 M1 表示一个月。

15 另外, 对另一批次抗 PD-1 抗体 (Hu23-11.IgG4AA), 使用下列缓冲液, 配制含 80 mg/mL 蔗糖和 0.6mg/mL 聚山梨酯 80 (PS80), 蛋白浓度为 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体 (Hu23-11.IgG4AA) 制剂, 其中缓冲液如下:

- 1) 10mM 醋酸钠盐, pH 5.2;
- 2) 10mM 琥珀酸钠盐, pH5.2;

3) 10mM 组氨酸醋酸盐 (简称: His-AA), pH5.2;

制备完成的制剂过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。考察样品在加速条件下(25°C M6, 也即 25°C 温度条件下放置 6 个月) 的稳定性, 考察制剂 SEC 和 iCIEF 指标, 考察制剂稳定性。实验结果见表 23。

- 5 25°C M6 加速条件下, pH5.2 AA 和 pH5.2 His-AA 的 SEC/iCIEF 数据高于 pH 5.2 SA 组, pH5.2 AA 缓冲体系的 iCIEF 略高于 pH5.2 His-AA 缓冲体系。综合考虑, 制剂缓冲体系优选醋酸盐和组氨酸盐缓冲体系, 优选 AA 或 His-AA 缓冲体系。

表 23. pH 和缓冲体系筛选实验结果

序号	条件	SEC 单体 (%)	中性峰 iCIEF (%)
01	D0	99.6	54.4
	25°C M6	97.0	42.7
02	D0	99.2	54.6
	25°C M6	95.8	39.1
03	D0	99.7	54.0
	25°C M6	97.5	40.7

- 10 备注: 表中“D”表示天, D0 表示实验开始时, “M”表示月, 例如 M1 表示一个月。

#### 测试例 9: 抗 PD-1 抗体制剂缓冲体系离子强度筛选

使用缓冲体系离子强度分别为 10 mM 和 30 mM 的 pH5.2 的醋酸钠盐, 配制含 80 mg/mL 蔗糖, 0.6mg/mL 聚山梨酯 80, 蛋白浓度为 120mg/mL 的抗 PD-1 抗体 (Hu23-11.IgG4AA) 制剂。辅料组方:

- 15 1) 10mM pH5.2 AA, 0.6mg/mL PS80 和 80 mg/mL 蔗糖;  
2) 30mM pH5.2 AA, 0.6mg/mL PS80 和 80 mg/mL 蔗糖;

制备完成的制剂过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。考察样品在强制降解条件下(40°C M1) 的稳定性, 并以 SEC 为评价指标, 考察制剂稳定性。实验结果见表 24。

- 20 实验数据显示, 在 40°C M1 强制降解条件下, 10mM 离子强度组的 SEC 数据略高于 30mM 离子强度组, 因此 pH5.2 醋酸钠盐缓冲体系的离子强度优选 10mM。

表 24. 离子强度筛选实验结果

组别	条件	SEC 单体 (%)
01	D0	97.4
	40°C M1	91.7
02	D0	97.1
	40°C M1	89.4

备注: 表中“D”表示天, D0 表示实验开始时, “M”表示月, 例如 M1 表示一个

月。

### 测试例 10: 抗 PD-1 抗体制剂中表面活性剂筛选

在 pH5.2 的 10 mM 醋酸钠盐缓冲液中制备含下列 1) - 5) 不同浓度吐温 80 的抗 PD-1 抗体 (Hu23-11.IgG4AA) 制剂。其中蛋白浓度为 100mg/mL, 其它辅

5 料如下:

1) 80 mg/mL 蔗糖, 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80 (PS80);

2) 80 mg/mL 蔗糖, 0.4 mg/mL PS80;

3) 80 mg/mL 蔗糖, 0.6 mg/mL PS80;

4) 80 mg/mL 蔗糖, 0.8 mg/mL PS80;

10 5) 80 mg/mL 蔗糖, 0.6 mg/mL 聚山梨酯 20 (PS20)。

制备完成的制剂过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。将样品进行振摇 (25°C, 300rpm, 10 天) 和长期稳定性 (2-8°C 6 个月) 实验, 以外观、SEC、非还原 CE-SDS 为评价指标, 考察制剂稳定性。实验结果见表 25。

实验结果显示, 在振摇 D10 条件下, 0.6 mg/mL PS80、0.8 mg/mL PS80 和 0.6  
15 mg/mL PS20 组的外观优于出现大量颗粒的 0.2 mg/mL PS80 和 0.4 mg/mL PS80 组; 在 2-8°C 条件下放置 6 个月时, 从外观看 0.6 mg/mL PS80、0.8 mg/mL PS80 优于出现浑浊的 0.6 mg/mL PS20 组, 纯度项组间无显著差异。因此表面活性剂选择聚山梨酯 80, 浓度优选 0.6 mg/mL。

表 25. 制剂中表面活性剂筛选实验结果

序号	条件	外观	SEC 单体(%)	非还原 CE-SDS (%)
01	D0	澄明	95.5	95.1
	振摇 D10	大量颗粒	N/A	N/A
	4°C M6	澄明	94.8	95.7
02	D0	澄明	95.4	94.6
	振摇 D10	大量颗粒	N/A	N/A
	4°C M6	澄明	95.0	96.2
03	D0	澄明	95.5	94.4
	振摇 D10	少量颗粒	N/A	N/A
	4°C M6	澄明	94.7	95.8
04	D0	澄明	95.5	94.5
	振摇 D10	少量颗粒	N/A	N/A
	4°C M6	澄明	94.6	95.7
05	D0	澄明	95.5	94.6
	振摇 D10	少量颗粒	N/A	N/A
	4°C M6	浑浊	95.0	96.2

20 备注: 表中“D”表示天, 例如 D10 表示 10 天; D0 表示实验开始时, “M”表示月, 例如 M6 表示六个月。

### 测试例 11: 抗 PD-1 抗体制剂中渗透压调节剂筛选

在含下列 1) - 7) 不同种类辅料及 pH5.2 的 10 mM 醋酸钠盐缓冲液中, 制备蛋白浓度为 100mg/mL 的抗 PD-1 抗体 (Hu23-11.IgG4AA) 制剂。具体辅料如下:

- 1) 0.6mg/mL 聚山梨酯 80 (PS80);
- 5 2) 80 mg/mL 蔗糖, 0.6mg/mL PS80;
- 3) 80 mg/mL 海藻糖, 0.6mg/mL PS80;
- 4) 50 mg/mL 山梨醇, 0.6mg/mL PS80;
- 5) 100 mM 精氨酸, 0.6mg/mL PS80;
- 6) 100 mM 甘氨酸, 0.6mg/mL PS80;
- 10 7) 100 mM NaCl, 0.6mg/mL PS80;

制备完成的制剂过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。考察样品在强制降解条件下 (40°C D22 (40°C 高温条件下放置 22 天)) 的稳定性, 并以外观、SEC 和非还原 CE-SDS 为评价指标, 考察制剂稳定性。实验结果见表 26。

- 40°C D22 强制降解条件下, 各组间外观无显著性差异; 从纯度项数据看, 80 mg/mL 蔗糖、80 mg/mL 海藻糖和 50 mg/mL 山梨醇组制剂的 SEC 和非还原 CE-SDS 略高于其他组别, 而这三组制剂间纯度项无显著性差异。当给药途径为皮下注射, 制剂渗透压控制在 280-320mOsm, 因此, 蔗糖含量优选 70 -90mg/mL。含 80 mg/mL 蔗糖制剂的渗透压为 300 mOsm 左右, 蔗糖含量优选 80mg/mL。

表 26. 制剂中渗透压筛选实验结果

序号	条件	外观	SEC 单体 (%)	非还原 CE-SDS (%)
01	D0	澄明	97.0	95.5
	40°C D22	澄明	90.2	87.8
02	D0	澄明	97.0	95.5
	40°C D22	澄明	91.3	89.7
03	D0	澄明	97.0	95.2
	40°C D22	澄明	91.2	89.6
04	D0	澄明	97.0	95.2
	40°C D22	澄明	92.0	90.0
05	D0	澄明	97.0	95.3
	40°C D22	澄明	91.8	87.4
06	D0	澄明	97.0	95.5
	40°C D22	澄明	90.1	88.9
07	D0	澄明	96.9	95.5
	40°C D22	澄明	91.0	87.7

20 备注: 表中“D”表示天, 例如 D22 表示 22 天; D0 表示实验开始时。

### 测试例 12: 抗 PD-1 抗体制剂蛋白浓度筛选

使用缓冲体系为pH5.2的10 mM 醋酸钠盐,配制含80 mg/mL 蔗糖,0.6mg/mL 聚山梨酯 80 (PS80), 蛋白浓度为100mg/mL 或120mg/mL 的抗PD-1 抗体 (Hu23-11.IgG4AA) 制剂。

- 1) 100mg/mL 蛋白浓度, 0.6mg/mL PS80 和 80 mg/mL 蔗糖;  
5 2) 120mg/mL 蛋白浓度, 0.6mg/mL PS80 和 80 mg/mL 蔗糖;

将每种制剂过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。考察样品在强制降解条件下(40°C M1) 的稳定性, 并以外观、SEC、非还原 CE-SDS 和 ICE 为评价指标, 考察制剂稳定性。实验结果见表 27。

- 10 实验数据显示, 在 40°C M1 强制降解条件下, 100mg/mL 和 120mg/mL 的制剂组的外观和纯度项无显著差异。

表 27. 不同浓度制剂对比实验结果

组别	条件	外观	SEC 单体 (%)	非还原 CE-SDS (%)	ICE 中性峰 (%)
01	D0	澄明	95.5	94.5	55.1
	40°C M1	澄明	90.2	87.3	39.6
02	D0	澄明	95.6	94.0	55.2
	40°C M1	澄明	90.1	86.6	39.9

备注: 表中“D”表示天, D0 表示实验开始时, “M”表示月, 例如 M1 表示一个月。

### 测试例 13: 抗 PD-1 抗体制剂稳定性实验

- 15 制备含蛋白浓度 120 mg/mL, 10mM 醋酸钠盐 pH5.2, 80 mg/mL 蔗糖, 0.6 mg/mL PS80 的抗 PD-1 抗体 (Hu23-11.IgG4AA) 制剂。

将制备好的制剂过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。考察样品在强制降解条件(40°C M1)、冻融 5 次和振摇 D7(25°C, 300rpm)下的稳定性, 并以外观、SEC、非还原 CE-SDS 和 IEC 为评价指标, 考察制剂稳定性。实验结果见表 28。

- 20 实验结果显示, 最终处方制剂从外观看在各强制降解条件下保持澄明; 从纯度项数据看, 在冻融五次或进行振摇 7 天(25°C, 300rpm)下无显著变化, 较 D0 40°C M1 强制降解条件下 SEC 下降 1.9%, NR-CE 下降 2.5%和 IEC 下降 14.8%, 具有较好的稳定性。

表 28. 制剂稳定性实验结果

条件	外观	SEC 单体 (%)	非还原 CE-SDS (%)	IEC 中性峰 (%)
D0	澄明	99.1	90.9	63.7
冻融 5 次	澄明	99.1	90.8	62.3
振摇 D7	澄明	98.8	91.9	62.2
40°C M1	澄明	97.2	88.4	48.9

- 25 备注: 表中“D”表示天, D0 表示实验开始时, “M”表示月, 例如 M1 表示一个月。

另外, 还观察了制剂在 25°C M6 (25°C 温度条件下放置 6 个月) 加速降解条



件下以及 4℃M6（4℃温度条件下放置 6 个月）条件下的制剂的稳定性，实验结果见表 29，实验结果显示，4℃M6 长期条件下本披露的制剂具有良好的稳定性，即使在 25℃M6 加速降解条件下本披露的制剂仍有良好的稳定性，相比 D0，制剂的 SEC 仅下降 2.2%，非还原 CE-SDS 仅降 2.7%，IEC 下降 9.3%。

5

表 29. 制剂稳定性实验结果

条件	外观	SEC 单体 (%)	非还原 CE-SDS (%)	IEC 中性峰 (%)
D0	澄明	99.1	90.9	63.7
25℃M6	澄明	96.9	88.2	54.4
4℃M6	澄明	98.1	91.0	62.8

#### 测试例 14: 抗 PD-1 抗体制剂处方优化实验

以醋酸钠盐的离子强度、pH 值和蛋白浓度为变量进行 DOE 实验设计，DOE 实验因子及水平设为离子强度 10-30mM、pH4.7-5.7、抗 PD-1 抗体（Hu23-11.IgG4AA）浓度 90-150mg/mL，设计一系列处方（见表 30），通过 40℃高温条件下放置一个月的强制降解实验，以外观、SEC、IEC 为评价指标，采用最小二乘法对结果进行统计分析，结果见表 31 和图 5。

结果显示，40℃高温条件下放置一个月，各处方外观均澄明，纯度项 SEC 下降幅度为 1.1%-2.7%之间、iCIEF 下降幅度为 5.6%-8.5%之间，在强制降解条件下的下降幅度可接受范围之内，并且组间差异在仪器的检测误差范围内。因此抗 PD-1 抗体样品在蛋白浓度 90-150mg/mL，离子强度 10-30Mm 和 pH4.7-5.7，范围内均具有良好的稳定性。将数据进行拟合，观察到低离子强度时纯度项处于更安全的范围，因此可优选：蛋白浓度 120mg/mL，离子强度 10mM，pH5.2。

15

表 30. DOE 处方筛选实验处方设计

组别	pH	蛋白浓度 (mg/mL)	离子强度 (mM)
1	5.7	150	20
2	4.7	120	21.9
3	5.2	120	10
4	4.7	90	10
5	5.2	120	20
6	5.2	90	20
7	5.7	150	10
8	4.7	90	30
9	4.7	150	10
10	5.2	150	30
11	5.7	90	10
12	5.7	107.7	30

注：所有处方均加入 80mg/mL 蔗糖和 0.6 mg/mL PS80。

20

表 31. DOE 筛选实验结果

组别	条件	外观	SEC 单体 (%)	SEC 单体下降幅度 (%)	iCIEF 中性峰 (%)	iCIEF 中性峰下降幅度 (%)
01	D0	澄明	98.7	N	59.6	N
	40°C M1	澄明	96.6	2.1	52.6	7.0
02	D0	澄明	99.1	N	60.4	N
	40°C M1	澄明	96.7	2.4	51.9	8.5
03	D0	澄明	98.9	N	60.0	N
	40°C M1	澄明	97.1	1.8	52.8	7.2
04	D0	澄明	99.2	N	59.8	N
	40°C M1	澄明	97.6	1.6	54.2	5.6
05	D0	澄明	98.9	N	60.2	N
	40°C M1	澄明	96.7	2.2	52.5	7.7
06	D0	澄明	99.1	N	60.1	N
	40°C M1	澄明	97.3	1.8	53.4	6.7
07	D0	澄明	98.7	N	59.3	N
	40°C M1	澄明	96.6	2.1	53.4	5.9
08	D0	澄明	99.2	N	59.4	N
	40°C M1	澄明	97.0	2.2	52.4	7.0
09	D0	澄明	99.1	N	59.9	N
	40°C M1	澄明	96.8	2.3	52.5	7.4
10	D0	澄明	98.9	N	59.9	N
	40°C M1	澄明	96.2	2.7	52.3	7.6
11	D0	澄明	98.7	N	59.6	N
	40°C M1	澄明	97.6	1.1	53.3	6.3
12	D0	澄明	98.7	N	60.7	N
	40°C M1	澄明	97.3	1.4	52.8	7.9

备注：表中“D”表示天，D0 表示实验开始时，“M”表示月，例如 M1 表示一个月；N 表示本表不适用；SEC 单体下降幅度 (%) = 40°C M1 时制剂 SEC 单体 (%) 与 D0 时制剂 SEC 单体 (%) 的差值；iCIEF 中性峰下降幅度 (%) = 40°C M1 时制剂 iCIEF 中性峰 (%) 与 D0 时制剂 iCIEF 中性峰 (%) 的差值。

5

### 测试例 15: 抗 PD-1 抗体制剂的冻干

在 10mM AA pH5.2 的缓冲液中制备包含 100 mg/mL 抗体, 80 mg/mL 蔗糖, 0.6 mg/mL PS80 的抗 PD-1 抗体 (Hu23-11.IgG4AA) 制剂, 将制剂样品进行冻干, 冻干程序为预冻、一次干燥和二次干燥 (参数见表 32)。冻干程序结束后, 真空加塞。复溶样品进行冻干前后对比。结果表明, 复溶溶液可保持液体制剂良好的性能。

10

表 32. 冻干程序

冻干程序	设定温度	设定时间 (min)	保持时间(min)	真空度(mBar)
预冻	5°C	10	60	N/A

	-45°C	50	120	N/A
一次干燥	-10°C	120	1800	0.10
二次干燥	25°C	60	1	0.10
二次干燥	25°C	1	360	0.01

虽然为了清楚的理解，已经借助于附图和实例详细描述了上述发明，但是描述和实例不应当解释为限制本披露的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

权利要求书:

1. 一种药物组合物, 其包含抗 PD-1 抗体以及缓冲液, 其中,  
所述缓冲液为醋酸盐缓冲液、组氨酸盐缓冲液或琥珀酸盐缓冲液, 优选地,  
5 所述缓冲液的 pH 为约 4.5 至约 6.0, 优选 pH 为约 4.7 至约 5.7, 更优选 pH 为约 5.2;  
所述醋酸盐缓冲液优选为醋酸-醋酸钠缓冲液, 所述组氨酸盐缓冲液优选为组氨酸-  
醋酸盐缓冲液, 所述琥珀酸盐缓冲液优选为琥珀酸-琥珀酸钠缓冲液;  
所述抗 PD-1 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含: 如 SEQ  
ID NO: 65 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 66 所示的 HCDR2, 和如 SEQ ID NO:  
10 67 所示的 HCDR3, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 68 所示的 LCDR1, 如 SEQ  
ID NO: 12 所示的 LCDR2, 和如 SEQ ID NO: 69 所示的 LCDR3; 优选地, 其中  
所述抗 PD-1 抗体的重链可变区包含: 如 SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID  
NO: 9 所示的 HCDR2, 和如 SEQ ID NO: 10 所示的 HCDR3, 轻链可变区包含:  
如 SEQ ID NO: 49 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR2, 和如 SEQ  
15 ID NO: 13 所示的 LCDR3。
2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物, 其中所述缓冲液浓度为大约 5mM 至大  
约 30mM, 优选为大约 10mM 至大约 30mM, 更优选为大约 10mM。
- 20 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物, 其中所述抗 PD-1 抗体浓度为大约  
1mg/mL 至大约 150mg/mL, 优选为大约 90mg/mL 至大约 150mg/mL, 更优选为大  
约 120mg/mL 或大约 100mg/mL。
- 25 4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的药物组合物, 其还包括表面活性剂,  
所述表面活性剂优选为聚山梨酯, 更优选为聚山梨酯 80; 表面活性剂的浓度优选  
为大约 0.2mg/mL 至大约 0.8mg/mL, 更优选为大约 0.6mg/mL 至大约 0.8mg/mL,  
最优选为大约 0.6mg/mL。
- 30 5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的药物组合物, 其还包括渗透压调节剂,  
优选地, 所述渗透压调节剂为糖、氨基酸和/或盐; 更优选地, 所述渗透压调节剂  
选自由蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精氨酸、甘氨酸和氯化钠组成的组中的一种或  
更多种; 所述渗透压调节剂浓度优选为大约 50mg/mL 至大约 100mg/mL, 更优选  
为大约 70mg/mL 至大约 90mg/mL; 最优选为大约 80mg/mL。
- 35 6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 PD-1 抗体的  
重链可变区如 SEQ ID NO: 27 所示或与 SEQ ID NO: 27 具有至少 90% 序列同一性,  
和轻链可变区如 SEQ ID NO: 55 所示或与 SEQ ID NO: 55 具有至少 90% 序列同一

性；优选地，所述抗 PD-1 抗体具有如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区，和如 SEQ ID NO: 55 所示的轻链可变区。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PD-1 抗体包含重链恒定区和/或轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区及其常规变体，所述轻链恒定区选自人抗体  $\kappa$  和  $\lambda$  链恒定区及其常规变体；更优选地，所述抗 PD-1 抗体包含如 SEQ ID NO: 72 所示的重链恒定区和如 SEQ ID NO: 73 所示的轻链恒定区；最优选地，所述抗 PD-1 抗体包含：如 SEQ ID: 74 所示或与 SEQ ID NO: 74 具有至少 85% 序列同一性的重链，和如 SEQ ID: 75 所示或与 SEQ ID NO: 75 具有至少 85% 序列同一性的轻链。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物组合物，其包含：  
a) 浓度为大约 1mg/mL 至大约 150mg/mL 的抗 PD-1 抗体，  
b) 浓度为大约 5mM 至大约 30mM，pH 为大约 4.5 至约 6.0 的醋酸盐缓冲液，  
c) 浓度为大约 50mg/mL 至大约 100mg/mL 的渗透压调节剂，所述渗透压调节剂选自蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精氨酸、甘氨酸和氯化钠；  
d) 浓度为大约 0.2mg/mL 至大约 0.8mg/mL 的聚山梨酯；  
优选地，所述的药物组合物包含：  
A1) 浓度为大约 90mg/mL 至大约 150mg/mL 的抗 PD-1 抗体，  
B1) 浓度为大约 10mM 至大约 30mM，pH 为大约 4.7 至约 5.7 的醋酸盐缓冲液，  
C1) 浓度为大约 70mg/mL 至大约 90mg/mL 的蔗糖，和  
D1) 浓度为大约 0.6mg/mL 至大约 0.8mg/mL 的聚山梨酯 80；  
更优选地，所述的药物组合物包含：大约 10mM 的 pH 为大约 5.2 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为大约 120mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为大约 80mg/mL 蔗糖，和浓度为大约 0.6mg/mL 聚山梨酯 80。

9. 一种药物组合物，其包含：pH 为 5.2 的 10mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液，浓度为 120mg/mL 的抗 PD-1 抗体，浓度为 80mg/mL 蔗糖，和浓度为 0.6mg/mL 聚山梨酯 80；其中，所述抗 PD-1 抗体具有如 SEQ ID: 74 所示的重链，和如 SEQ ID: 75 所示的轻链。

10. 制备如权利要求 1 至 9 中任一项所述的药物组合物的方法，所述方法包括将抗 PD-1 抗体原液经缓冲液置换的步骤。

11. 一种含抗 PD-1 抗体的冻干制剂，所述冻干制剂通过将权利要求 1 至 9 中任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。

12. 一种含抗 PD-1 抗体的复溶溶液, 所述复溶溶液通过将权利要求 11 所述的冻干制剂经复溶获得。

13. 一种含抗 PD-1 抗体的冻干制剂, 所述冻干制剂经复溶可形成如权利要求 5 1 至 9 中任一项所述的药物组合物。

14. 一种制品, 其包括容器, 该容器中装有如权利要求 1 至 9 中任一项所述的药物组合物、如权利要求 11 或 13 所述的冻干制剂或如权利要求 12 所述的复溶溶液。

10

15. 一种治疗或预防疾病或病症的方法, 所述方法包括向受试者施用有效量的如权利要求 1 至 9 中任一项所述的药物组合物, 或如权利要求 11 或 13 所述的冻干制剂, 或如权利要求 12 所述的复溶溶液, 或如权利要求 14 所述的制品; 优选地, 其中所述疾病或病症为肿瘤; 更优选地, 所述疾病选自: 头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌、恶性胸膜间皮瘤、肺癌、乳腺癌、肝癌、肝细胞瘤、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、皮肤癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、骨癌、软骨肉瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、鳞状细胞癌、尤因氏肉瘤、全身性轻链淀粉样变性和梅克尔细胞癌; 最优选地, 所述疾病选自: PD-L1 阳性的黑色素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、肠癌和结肠癌; 可选的, 所述疾病为与 PD-1 相关的疾病。

20

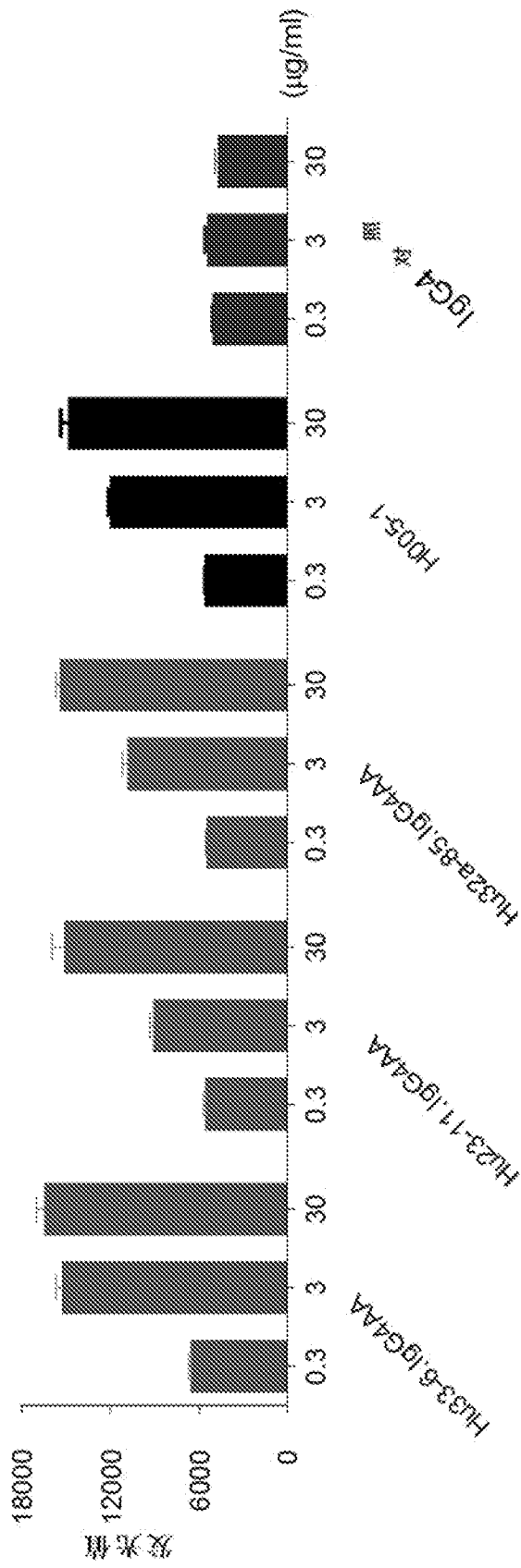


图 1

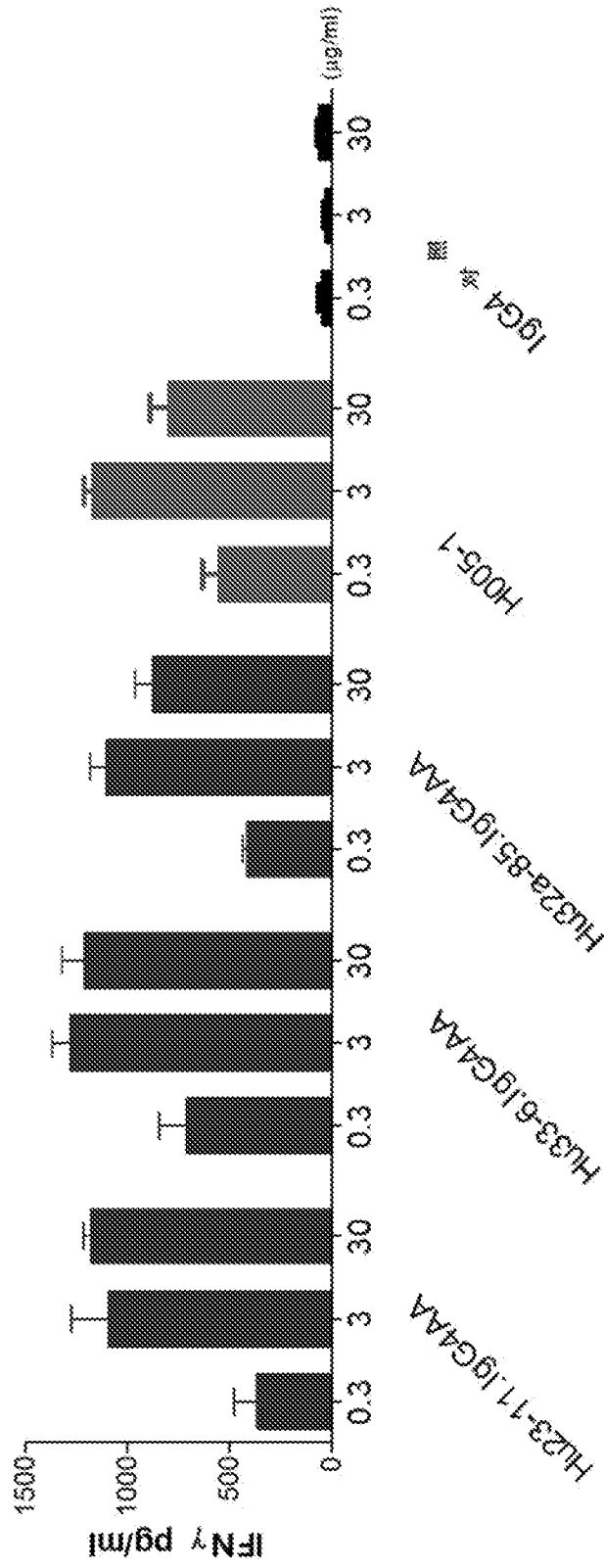
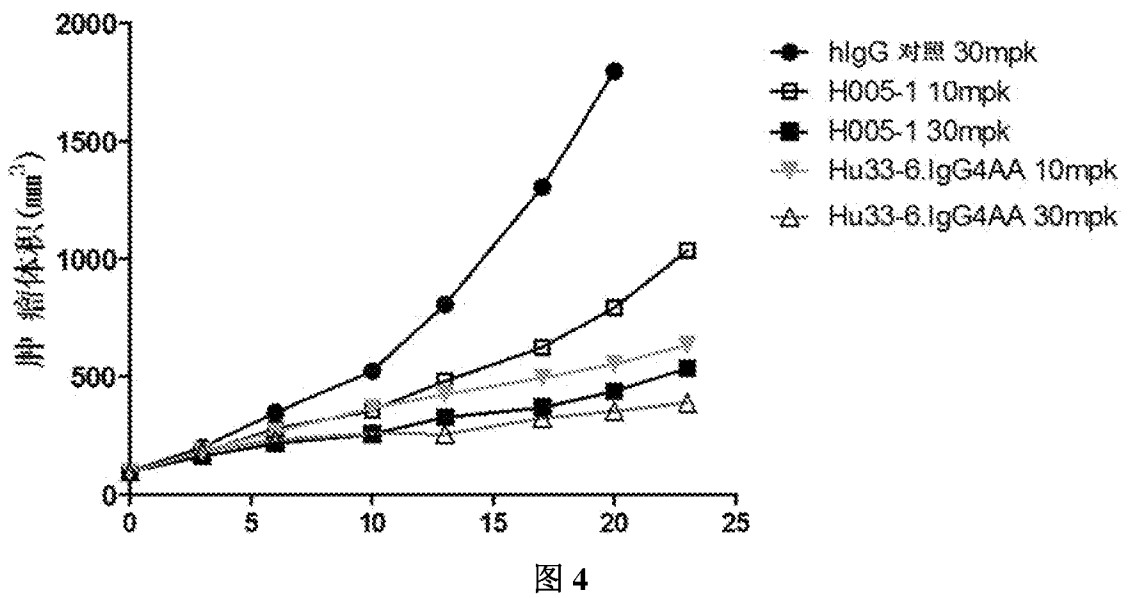
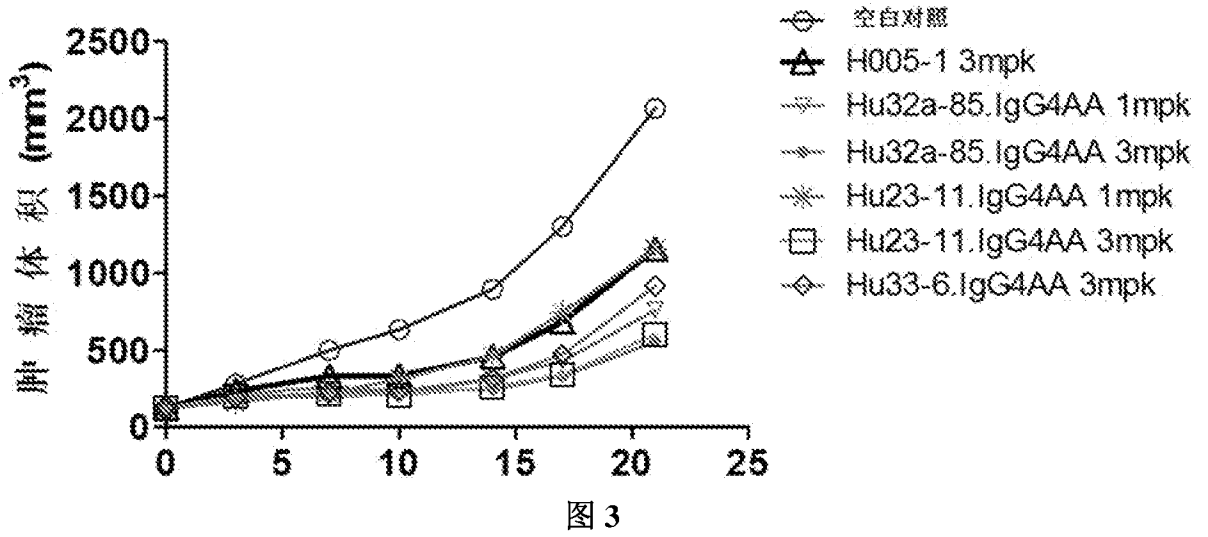


图 2





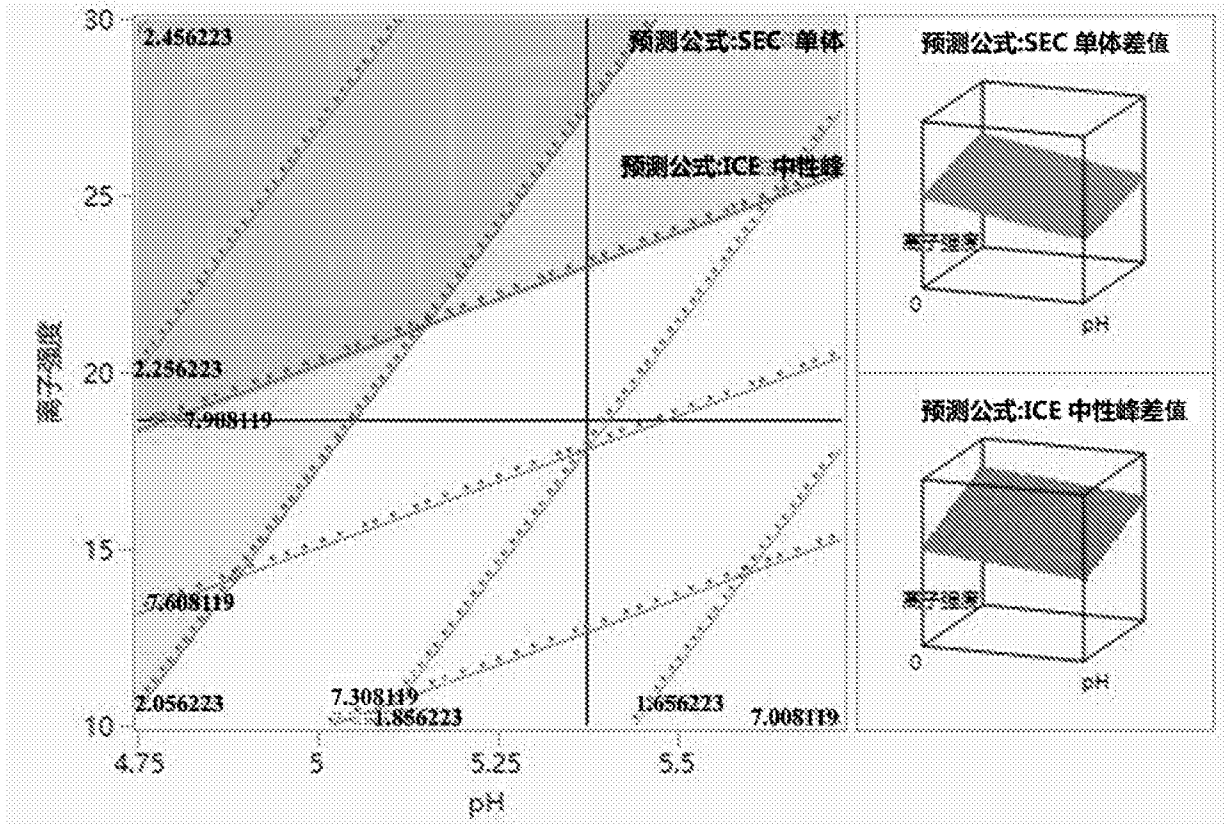


图 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/109438

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CPEA, CNKI, PUBMED, WEB OF SCIENCE, ELSEVIER, 百度学术, GenBank, 中国专利生物序列检索系统: anti-PD-1, PD-1, 抗体, 表面活性剂, 缓冲液, 聚山梨酯80, 蔗糖, 海藻糖, 渗透压调节剂, 等渗剂, antibody, surfactant, buffer, buffering, polysorbate 80, tween, sucrose, trehalose, osmotic, isotonic, search based on SEQ ID NOs: 8-10, 12, 13, 27, 49, 55, 65-69, 74 and 75		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110787292 A (SHANGHAI HENLIUS BIOTECH CO., LTD.) 14 February 2020 (2020-02-14) see entire document	1-15
A	WO 2019206987 A1 (MEDIMMUNE LTD.) 31 October 2019 (2019-10-31) see entire document	1-15
A	CN 109966487 A (SHANGHAI HENLIUS BIOLOGICAL PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 05 July 2019 (2019-07-05) see entire document	1-15
A	WO 2017054646 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 06 April 2017 (2017-04-06) see entire document	1-15
A	CN 110869002 A (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 06 March 2020 (2020-03-06) see entire document	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 October 2021		04 November 2021
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2021/109438**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106390115 A (SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES CO., LTD. et al.) 15 February 2017 (2017-02-15) see entire document	1-15
A	WO 2020097139 A1 (MERCK SHARP & DOHME et al.) 14 May 2020 (2020-05-14) see entire document	1-15
A	CN 110974958 A (BEIJING ORIENTAL 100 TAI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 10 April 2020 (2020-04-10) see entire document	1-15

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 15  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  - [1] Claim 15 relates to a method for treating or preventing diseases or conditions. The subject matters thereof are all subject matters that do not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). The subject matter of claim 15 can be amended by reasonable expectation to be a use of an effective dose of the pharmaceutical composition described in any one of claims 1-9, the lyophilized preparation described in claim 11 or 13, the reconstituted solution described in claim 12, or the product described in claim 14 in preparing a drug for treating or preventing diseases or conditions. The international search is provided on the basis of such reasonable expectation.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/109438**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110787292	A	14 February 2020	CN	110787292	B	24 April 2020
WO	2019206987	A1	31 October 2019	US	2021054079	A1	25 February 2021
				IL	278151	D0	30 November 2020
				BR	112020020390	A2	19 January 2021
				CN	112004553	A	27 November 2020
				AU	2019258330	A1	10 December 2020
				EP	3784279	A1	03 March 2021
				SG	11202010324 T	A	27 November 2020
				AR	115365	A1	13 January 2021
				CA	3096993	A1	31 October 2019
				EA	202092508	A1	16 March 2021
				KR	20210005096	A	13 January 2021
CN	109966487	A	05 July 2019	None			
WO	2017054646	A1	06 April 2017	TW	1721020	B	11 March 2021
				AU	2016329960	A1	26 April 2018
				CA	2999079	A1	06 April 2017
				BR	112018005349	A2	09 October 2018
				CN	106999591	A	01 August 2017
				RU	2018110333	A	28 October 2019
				CN	106999591	B	23 February 2021
				KR	20180054791	A	24 May 2018
				RU	2731418	C2	02 September 2020
				EP	3357508	A1	08 August 2018
				US	2018339045	A1	29 November 2018
				MX	2018003306	A	16 May 2018
				RU	2018110333	A3	30 December 2019
				US	2021000954	A1	07 January 2021
				TW	201711699	A	01 April 2017
				US	10786567	B2	29 September 2020
				EP	3357508	A4	24 April 2019
				JP	2018532730	A	08 November 2018
CN	110869002	A	06 March 2020	PH	12019502484	A1	20 July 2020
				NI	201900112	A	04 February 2020
				JO	P20190260	A1	16 June 2017
				AU	2018263862	A1	21 November 2019
				SG	11201910182 R	A	28 November 2019
				MX	2019013028	A	05 February 2020
				CO	2019012151	A2	07 February 2020
				JP	2020518599	A	25 June 2020
				US	2020147213	A1	14 May 2020
				EP	3618808	A1	11 March 2020
				CA	3062160	A1	08 November 2018
				WO	2018204368	A1	08 November 2018
				PE	20200513	A1	05 March 2020
				EC	SP19078502	A	27 December 2019
				CL	2019003142	A1	10 July 2020
				CR	20190497	A	20 January 2020
				EP	3618808	A4	26 May 2021
				KR	20190142392	A	26 December 2019
				EA	201992590	A1	08 April 2020

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/CN2021/109438</b>
---

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				BR 112019022972 A2	26 May 2020
CN	106390115	A	15 February 2017	None	
WO	2020097139	A1	14 May 2020	AU 2019377456 A1 CA 3118144 A1	27 May 2021 14 May 2020
CN	110974958	A	10 April 2020	CN 110974958 B	21 August 2020



<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K, A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CPEA, CNKI, PUBMED, WEB OF SCIENCE, ELSEVIER, 百度学术, GenBank, 中国专利生物序列检索系统: anti-PD-1, PD-1, 抗体, 表面活性剂, 缓冲液, 聚山梨酯80, 蔗糖, 海藻糖, 渗透压调节剂, 等渗剂, antibody, surfactant, buffer, buffering, polysorbate 80, tween, sucrose, trehalose, osmotic, isotonic, 基于序列SEQ ID NOs: 8-10, 12, 13, 27, 49, 55, 65-69, 74和75的检索</p>																				
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 110787292 A (上海复宏汉霖生物技术股份有限公司) 2020年 2月 14日 (2020 - 02 - 14) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2019206987 A1 (MEDIMMUNE LTD) 2019年 10月 31日 (2019 - 10 - 31) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109966487 A (上海复宏汉霖生物制药有限公司等) 2019年 7月 5日 (2019 - 07 - 05) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017054646 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO等) 2017年 4月 6日 (2017 - 04 - 06) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110869002 A (默沙东公司) 2020年 3月 6日 (2020 - 03 - 06) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 110787292 A (上海复宏汉霖生物技术股份有限公司) 2020年 2月 14日 (2020 - 02 - 14) 参见全文	1-15	A	WO 2019206987 A1 (MEDIMMUNE LTD) 2019年 10月 31日 (2019 - 10 - 31) 参见全文	1-15	A	CN 109966487 A (上海复宏汉霖生物制药有限公司等) 2019年 7月 5日 (2019 - 07 - 05) 参见全文	1-15	A	WO 2017054646 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO等) 2017年 4月 6日 (2017 - 04 - 06) 参见全文	1-15	A	CN 110869002 A (默沙东公司) 2020年 3月 6日 (2020 - 03 - 06) 参见全文	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	CN 110787292 A (上海复宏汉霖生物技术股份有限公司) 2020年 2月 14日 (2020 - 02 - 14) 参见全文	1-15																		
A	WO 2019206987 A1 (MEDIMMUNE LTD) 2019年 10月 31日 (2019 - 10 - 31) 参见全文	1-15																		
A	CN 109966487 A (上海复宏汉霖生物制药有限公司等) 2019年 7月 5日 (2019 - 07 - 05) 参见全文	1-15																		
A	WO 2017054646 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO等) 2017年 4月 6日 (2017 - 04 - 06) 参见全文	1-15																		
A	CN 110869002 A (默沙东公司) 2020年 3月 6日 (2020 - 03 - 06) 参见全文	1-15																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 10月 18日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 11月 4日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>李洋</p> <p>电话号码 62411031</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 106390115 A (上海君实生物医药科技股份有限公司等) 2017年 2月 15日 (2017 - 02 - 15) 参见全文	1-15
A	WO 2020097139 A1 (MERCK SHARP & DOHME等) 2020年 5月 14日 (2020 - 05 - 14) 参见全文	1-15
A	CN 110974958 A (北京东方百泰生物科技有限公司) 2020年 4月 10日 (2020 - 04 - 10) 参见全文	1-15

## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
  - 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
  - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 15  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求15涉及一种治疗或预防疾病或病症的方法。其主题均属于细则39.1(iv)定义的不要求检索的主题。权利要求15的主题可经合理预期修改为有效量的如权利要求1至9中任一项所述的药物组合物，或如权利要求11或13所述的冻干制剂，或如权利要求12所述的复溶溶液，或如权利要求14所述的制品在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的用途。国际检索基于这一合理预期作出。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/109438

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	110787292	A	2020年 2月 14日	CN 110787292 B	2020年 4月 24日
WO	2019206987	A1	2019年 10月 31日	US 2021054079 A1	2021年 2月 25日
				IL 278151 D0	2020年 11月 30日
				BR 112020020390 A2	2021年 1月 19日
				CN 112004553 A	2020年 11月 27日
				AU 2019258330 A1	2020年 12月 10日
				EP 3784279 A1	2021年 3月 3日
				SG 11202010324T A	2020年 11月 27日
				AR 115365 A1	2021年 1月 13日
				CA 3096993 A1	2019年 10月 31日
				EA 202092508 A1	2021年 3月 16日
				KR 20210005096 A	2021年 1月 13日
CN	109966487	A	2019年 7月 5日	无	
WO	2017054646	A1	2017年 4月 6日	TW 1721020 B	2021年 3月 11日
				AU 2016329960 A1	2018年 4月 26日
				CA 2999079 A1	2017年 4月 6日
				BR 112018005349 A2	2018年 10月 9日
				CN 106999591 A	2017年 8月 1日
				RU 2018110333 A	2019年 10月 28日
				CN 106999591 B	2021年 2月 23日
				KR 20180054791 A	2018年 5月 24日
				RU 2731418 C2	2020年 9月 2日
				EP 3357508 A1	2018年 8月 8日
				US 2018339045 A1	2018年 11月 29日
				MX 2018003306 A	2018年 5月 16日
				RU 2018110333 A3	2019年 12月 30日
				US 2021000954 A1	2021年 1月 7日
				TW 201711699 A	2017年 4月 1日
				US 10786567 B2	2020年 9月 29日
				EP 3357508 A4	2019年 4月 24日
				JP 2018532730 A	2018年 11月 8日
CN	110869002	A	2020年 3月 6日	PH 12019502484 A1	2020年 7月 20日
				NI 201900112 A	2020年 2月 4日
				JO P20190260 A1	2017年 6月 16日
				AU 2018263862 A1	2019年 11月 21日
				SG 11201910182R A	2019年 11月 28日
				MX 2019013028 A	2020年 2月 5日
				CO 2019012151 A2	2020年 2月 7日
				JP 2020518599 A	2020年 6月 25日
				US 2020147213 A1	2020年 5月 14日
				EP 3618808 A1	2020年 3月 11日
				CA 3062160 A1	2018年 11月 8日
				WO 2018204368 A1	2018年 11月 8日
				PE 20200513 A1	2020年 3月 5日
				EC SP19078502 A	2019年 12月 27日
				CL 2019003142 A1	2020年 7月 10日
				CR 20190497 A	2020年 1月 20日
				EP 3618808 A4	2021年 5月 26日
				KR 20190142392 A	2019年 12月 26日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/109438

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				EA	201992590	A1	2020年 4月 8日
				BR	112019022972	A2	2020年 5月 26日
CN	106390115	A	2017年 2月 15日	无			
WO	2020097139	A1	2020年 5月 14日	AU	2019377456	A1	2021年 5月 27日
				CA	3118144	A1	2020年 5月 14日
CN	110974958	A	2020年 4月 10日	CN	110974958	B	2020年 8月 21日