

(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4月7日 (07.04.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/068919 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/122062

(22) 国际申请日: 2021年9月30日 (30.09.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202011068655.4 2020年9月30日 (30.09.2020) CN

(71) 申请人: 正大天晴康方(上海)生物医药科技有限公司(CTTQ-AKESO (SHANGHAI) BIOMED. TECH. CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市宝山区石太路2288号3幢A1001室, Shanghai 201908 (CN)。

(72) 发明人: 夏瑜(XIA, Yu); 中国广东省中山市火炬开发区神农路6号, Guangdong 528437 (CN)。王忠民(WANG, Zhongmin); 中国广东省中山市火炬开发区神农路6号, Guangdong 528437 (CN)。张鹏(ZHANG, Peng); 中国广东省中山市火炬开发区神农路6号, Guangdong 528437 (CN)。李百勇(LI, Baiyong); 中国广东省中山市火炬开发区神农路6号, Guangdong 528437 (CN)。

(74) 代理人: 北京科穗律师事务所(BEIJING C&S LAW FIRM); 中国北京市海淀区西三环北路87号3层310311B, Beijing 100089 (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: PEPTIDE BINDING TO PD-1 ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 结合PD-1抗体的肽及其应用

(57) Abstract: Provided is a peptide binding to an anti-PD-1 antibody or an antigen binding fragment thereof, comprising structural units 1 and 2, wherein the structural unit 1 comprises amino acid at positions 58-85 of a PD-1 protein, and the structural unit 2 comprises amino acid at positions 130-132 of the PD-1 protein.

(57) 摘要: 提供了结合抗PD-1抗体或其抗原结合片段的肽, 其包含结构单元1和2, 其中结构单元1包含PD-1蛋白的58位-85位的氨基酸, 结构单元2包含PD-1蛋白的130-132位的氨基酸。



WO 2022/068919 A1

结合 PD-1 抗体的肽及其应用

技术领域

本发明属于免疫学领域。具体涉及结合 PD-1 抗体的肽及其应用。

背景技术

细胞表面聚糖在癌症中起着重要作用，例如细胞信号和通讯，肿瘤细胞的解离和侵袭，细胞与基质的相互作用，肿瘤血管生成，免疫调节和转移形成以及免疫监测 (Varki A. (2017). *Glycobiology*, 27, 3-49.)。糖基化有助于肿瘤细胞逃脱免疫监视 (Okada M. et al. (2017). *Cell Rep.*, 20, 1017-1028.) (Liu CY. et al. (2011). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 11332-11337.) (Potapenko O.I. et al. (2010). *Mol. Oncol.*, 4, 98-118.)。

PD-1 的细胞外免疫球蛋白可变 (IgV) 域中有四个报道的糖基化位点，分别是 N49, N58, N74 和 N116 (Chen D. et al. (2019). *iScience*, 14, 113-124.) (Na Z. et al. (2017). *Cell Res.*, 27, 147-150.) (Okada M. et al. (2017). *Cell Rep.*, 20, 1017-1028)。据报道，在哺乳动物 (Tan SH. et al. (2017). *Nat Commun.*, 8, 14369) 细胞的 PD-1 的 N58 氨基酸残基位于 PD-1 的 BC 环上，其糖基化程度很高，多数情况下其核心部分的聚糖是由两个 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNac, NAG) 和一个岩藻糖 (Fucose, FUC) 组成。岩藻糖糖基化与癌症有关 (Pinho, 2015)，肿瘤中耗竭 T 细胞往往为高度核心岩藻糖基化的 (Okada M. et al. (2017). *Cell Rep.*, 20, 1017-1028)。在一些癌症，例如肺癌和乳腺癌中，观察到核心岩藻糖基化 (FUT8) 的过表达 (Liu CY. et al. (2011). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 11332-11337) (Potapenko O.I. et al. (2010). *Mol. Oncol.*, 4, 98-118)。核心岩藻糖基化的丧失可降低细胞表面 PD-1 的表达，进而增强 T 细胞活化 (Okada M. et al. (2017). *Cell Rep.*, 20, 1017-1028)。

PD-1 表面的糖基可能会与抗 PD-1 抗体相互作用，增强的两者的结合活性，进而表现为更好的临床结果 (Fessas H. et al. (2017). *Semin. Oncol.*, 44, 136-140)。

发明内容

本发明人发现，PD-1 蛋白（PD-1 Genbank ID: NP_005009，SEQ ID NO:1）的 T59、E61、S62、E84、D85 位氨基酸与抗 PD-1 抗体例如 14C12H1L1-Fab 重链的 Y32、D33、S52、G54、Y57、Y100 位氨基酸，PD-1 蛋白的 P130、K131、A132 位氨基酸与抗 PD-1 抗体例如 14C12H1L1-Fab 轻链的 F325、E324、D323 位氨基酸发生相互作用。由此完成了本发明。

具体地，本发明涉及以下几个方面：

1. 肽，优选结合抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段，所述肽包含结构单元 1 和结构单元 2，其中结构单元 1 包含选自以下各项组成的组的 PD-1 蛋白片段：PD-1 蛋白的 28 位-86 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:10 所示），28 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:11 所示），29 位-86 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:12 所示），29 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:13 所示），58 位-86 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:14 所示）、58 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:15 所示），59 位-86 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:16 所示）和 59 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:17 所示），

结构单元 2 包含选自以下各项组成的组的 PD-1 蛋白片段：PD-1 蛋白的 127 位-133 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:18 所示），127 位-132 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:19 所示），128 位-133 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:20 所示），和 128 位-132 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:21 所示）。

2. 权利要求 1 所述的肽，所述肽包含结构单元 1 和结构单元 2，其中结构单元 1 包含 PD-1 蛋白的 29 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:11 所示）或 58 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:15 所示），结构单元 2 包含 PD-1 蛋白的 128 位-132 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:21 所示）或 130-132 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:3 所示），优选结构单元 1 包含 PD-1 蛋白的 58 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:15 所示），结构单元 2 包含 PD-1 蛋白的 130-132 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:3 所示）。

3. 项目 1 或 2 所述的肽，其中 PD-1 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

4. 项目 1-3 任一项所述的肽，其中结构单元 1 包含 SEQ ID NO:2

或 SEQ ID NO:10-17 任一项所示的序列，结构单元 2 包含 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:18-21 任一项所示的序列，优选结构单元 1 包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，结构单元 2 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列。

5. 项目 1-4 任一项所述的肽，其中所述抗 PD-1 抗体的抗原结合片段为 Fab 片段、Fab'、(Fab')₂、Fab'-SH、Fab/c、Fv、单链抗体（例如，scFv）。

6. 项目 5 所述的肽，其中所述 Fab 片段的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示。

7. 项目 1-6 任一项所述的肽，其中 PD-1 蛋白的 T59、E61、S62、E84、D85 氨基酸与抗 PD-1 抗体（例如 14C12H1L1-Fab）重链的 Y32、D33、S52、G54、Y57、Y100 位氨基酸结合，PD-1 蛋白的 P130、K131、A132 氨基酸与抗 PD-1 抗体轻链的 F325、E324、D323 位氨基酸结合，PD-1 蛋白的 N58 糖基化侧链与抗 PD-1 抗体（例如 14C12H1L1-Fab）重链氨基酸（例如 S31、G53、G54 和 R56）结合。

8. 项目 7 所述的肽，其中所述糖基化侧链包含甘露糖，N-乙酰氨基葡萄糖；岩藻糖和 β -D-甘露糖。

9. 项目 1-8 任一项所述的肽在筛选结合 PD-1 的抗体或其抗原结合片段中的用途。

10. SEQ ID NO:1 所示的 PD-1 蛋白的 D29, T59, E61, S62, K78, E84, D85, L128, P130, A132 或其组合在筛选结合 PD-1 的抗体或其抗原结合片段中的用途。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，是指通常由两对多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构

域 CL 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区 (FR) 的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL) 分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG (例如，IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 (Nature, 256:495 ,1975)，但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S. Patent 4,816,567)。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，人源免疫球蛋白（受体抗体）的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体（供体抗体）的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段，其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源（例如，小鼠、大鼠或兔）抗体。此外，受体抗体的构架区 (FR) 的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换，或被其他抗体的氨基酸残基替换，以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容，可参见例如，Jones et al., Nature, 321:522 525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323 329 (1988); Presta, Curr. Op.

Struct. Biol., 2:593 596 (1992);和 Clark, Immunol. Today 21: 397 402 (2000)。

在本发明中, 抗原结合片段包括, 但不限于: Fab 片段、Fab'、(Fab')₂、Fab/c、Fv、Fab'-SH、单链抗体 (例如, scFv)。

如本发明中所使用的, 术语“Fab 片段”由一条轻链和 C_{H1} 以及一条重链的可变区组成。Fab 分子的重链不能与另一条重链分子形成二硫键。

如本发明中所使用的, 术语“Fab' 片段”含有一条轻链和一条重链的部分(其含有 V_H 结构域和 C_{H1} 结构域以及还有 C_{H1} 与 C_{H2} 结构域之间的区域的部分), 以便可在两个 Fab' 片段的两条重链之间形成链间二硫键以形成 F(ab')₂ 分子。

如本发明中所使用的, 术语“F(ab')₂ 片段”含有两条轻链和两条含有 C_{H1} 与 C_{H2} 结构域之间的恒定区的部分的重链, 以便在两条重链之间形成链间二硫键。F(ab')₂ 片段从而由通过两条重链之间的二硫键保持在一起的两个 Fab' 片段组成。

如本发明中所使用的, 术语“Fv 区”包含来自重链和轻链的可变区, 但缺乏恒定区。

如本发明中所使用的, 术语“Fab'-SH”是本文对 Fab' 的命名, 其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基携带游离硫醇基团。

附图说明:

图 1: PD-1 蛋白与 14C12H1L1-Fab 复合物的整体结构模型图。

FAB-HC: 14C12H1L1-Fab 重链部分; FAB-LC: 14C12H1L1-Fab 轻链部分。

图 2: PD-1 蛋白与 14C12H1L1-Fab 重链氨基酸相互作用示意图。

FAB-HC: 14C12H1L1-Fab 重链部分。

图 3: PD-1 蛋白与 14C12H1L1-Fab 轻链氨基酸相互作用示意图。

FAB-LC: 14C12H1L1-Fab 轻链部分。

图 4: PD-1 蛋白 Asn58 糖基化侧链与 14C12H1L1-Fab 重链氨基酸相互作用示意图。MAN: mannose, 甘露糖; NAG: N Acetyl Glucosamine, 乙酰氨基葡萄糖; FUC: Fucose, 岩藻糖; BMA: β-D-mannose, β-D-甘露糖。FAB-HC: 14C12H1L1-Fab 重链部分; FAB-LC: 14C12H1L1-Fab 轻链部分。

图 5: PD-1 与 14C12H1L1-Fab, Pembrolizumab 或 nivolumab 的结合表面。PD-1 蛋白中, 与 14C12H1L1-Fab 接触的残基是 E61、S62 位氨基酸残基, 而与 nivolumab 接触的残基是 V64、N66、Y68、Q75、T76、D77、K78、P83 位氨基酸残基, 由 14C12H1L1-Fab 和 nivolumab 结合的重叠残基是 E84 位氨基酸残基。与 pembrolizumab 接触的残基是 L128、A129 位氨基酸残基, 由 14C12H1L1-FAB 和 pembrolizumab 结合的重叠残基是 T59、P130、A131、K132 位氨基酸残基。D85 位氨基酸残基由于立体结构遮挡未能显示。

图 6: 结合 ELISA 方法检测抗 PD-1 抗体与人 PD-1 蛋白突变体 hPD1(D29A)-mFc、hPD1(E61A)-mFc 的结合活性。

图 7: 结合 ELISA 方法检测抗 PD-1 抗体与人 PD-1 蛋白突变体 hPD1(K78A)-mFc、hPD1(E84A)-mFc 的结合活性。

图 8: 结合 ELISA 方法检测抗 PD-1 抗体与人 PD-1 蛋白突变体 hPD1(L128A)-mFc 的结合活性。

图 9: 抗 PD-1 抗体与人 PD-1 蛋白 hPD1-mFc 结合的动力学特征参数检测结果。

图 10: 抗 PD-1 抗体与人 PD-1 蛋白突变体 hPD1(D29A)-mFc 结合的动力学特征参数检测结果。

图 11: 抗 PD-1 抗体与人 PD-1 蛋白突变体 hPD1(E61A)-mFc 结合的动力学特征参数检测结果。

图 12: 抗 PD-1 抗体与人 PD-1 蛋白突变体 hPD1(K78A)-mFc 结合的动力学特征参数检测结果。

图 13: 抗 PD-1 抗体与人 PD-1 蛋白突变体 hPD1(E84A)-mFc 结合的动力学特征参数检测结果。

图 14: 抗 PD-1 抗体与人 PD-1 蛋白突变体 hPD1(L128A)-mFc 结合的动力学特征参数检测结果。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解, 下面的实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的

范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，为可以通过市场购买获得的常规产品。

主要仪器与试剂

PD-1-his（康方生物生产）

14C12H1L1-Fab-his（康方生物生产）

14C12H1L1（hG1TM）（康方生物生产）

hPD1-mFc：康方生物生产，批号：20181025(hPD-1的Genbank ID: NP_005009, mFc的Genbank ID:P01863)。

hPD1(D29A)-mFc：康方生物生产，批号20191113。

hPD1(E61A)-mFc：康方生物生产，批号20191113。

hPD1(K78A)-mFc：康方生物生产，批号20191113。

hPD1(E84A)-mFc：康方生物生产，批号20191113。

hPD1(L128A)-mFc：康方生物生产，批号20191113。

制备例 1.人 PD1-his 融合蛋白的制备

通过 NCBI 蛋白质数据库查找人 PD-1 的序列（PD-1 Genbank ID: NP_005009），将人 PD-1 胞外区氨基酸序列（1 位氨基酸-170 位氨基酸）与 his 纯化标签序列（SEQ ID NO: 6）进行融合设计，融合蛋白简写命名为“PD1-his”（SEQ ID NO: 7），也表示为“hPD1-his”。

编码融合蛋白的 cDNA 序列来源于委托南京金斯瑞生物进行的氨基酸密码子优化和基因合成，参照《分子克隆实验指南（第二版）》介绍的标准技术，采用 PCR、酶切、胶回收、连接转化、菌落 PCR 或酶切鉴定等标准的分子克隆技术将目的基因亚克隆到哺乳动物细胞表达载体，并进一步对重组表达载体的目的基因进行测序分析。测序验证正确后，中大量制备去内毒素级别的表达质粒并将质粒瞬时转染 HEK293 细胞进行蛋白表达。培养 7 天后收集细胞培养液，采用 MabSelect SuRe 柱料(GE Healthcare)进行亲和纯化。

实施例 1. 人 PD-1 抗原与抗 PD-1 抗体结合表位分析

发明人基于已报道的 PD-1-nivolumab Fab (Tan SH, et al. (2017). Nat Commun., 8, 14369) 和 PD-1-Pembrolizumab Fab (Horita S et al. (2016). Sci Rep., 6, 35297) 的复杂结构, 采用 X 线晶体衍射的方法, 以 2.5Å 的分辨率研究了抗体 14C12H1L1 的 Fab 部分 (14C12H1L1-Fab) 和 PD-1 抗原相互作用, 并比较了三者的差异。

抗体 14C12H1L1-Fab 中的重链部分的氨基酸序列如下, 下划线部分为 CH1, 加粗黑体的为 CDR 区域, 下划线粗斜体的为组氨酸标签 (his-tag):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFAFSSYDMSWVRQAPGKG**
LDWVATIS**GGGRY**TYYPDSVKGRFTISRDN**SKNNLYLQMN**SLRAEDT
ALYYCANRY**GEAWFAYWGQ**GLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS**GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV**
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGG**SHHHHHH**

(SEQ ID NO: 4; 230 aa);

抗体 14C12H1L1-Fab 中的轻链的氨基酸序列如下, 下划线部分为 CL, 加粗黑体的为 CDR 区域:

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRAS**QDINTYLSWFQ**QKPGKSPK
TLIY**RANRLVSGVPSR**FSGSGSGQDYTLTIS**SLQPEDMATYYCLQYDEF**
PLTFGAGTKLELKRTVAAPS**VFIFPPSDEQLKSGTASV**VCLLN**NFYPRE**
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS**SSLT**LSKADY**EKHK**
VYACEVTHQGLSSPVT**KSFNRGEC** (SEQ ID NO: 5; 214 aa)。

发明人出乎意料地发现, 14C12H1L1-Fab 通过区别于 pembrolizumab 和 nivolumab 的方式与 PD-1 结合。尽管三者都阻断了 PD-1 和 PD-L1 之间的结合, 但是, 根据文献报道, pembrolizumab 和 nivolumab 以不依赖糖基化的方式结合至 PD-1 (Tan SH, et al. (2017). Nat Commun., 8, 14369.) 和 PD-1-Pembrolizumab Fab (Horita S et al. (2016). Sci Rep., 6, 35297), 14C12H1L1-Fab 在 PD-1 的 BC 环上显示出与 N58 位链接的糖侧链的大量相互作用。

实验方法: 将 PD1 蛋白, 如 PD-1-His, 与 14C12H1L1-Fab-his 按照 1:2 摩尔比混合, 冰上孵育 2 小时。混合物随后进行分子筛 (Superdex 200

10/300 column, GE Healthcare) 纯化得到 PD-1 蛋白与 14C12H1L1-Fab-his 的复合物, 所使用的缓冲液条件为 20mM HEPES, pH 7.5, 100mM NaCl, 5mM DTT。收取复合物峰进行离心浓缩 (Millipore, MWCO 10 kDa), 最终复合物浓度约为 10mg/ml。将浓缩后的复合物用于晶体初筛, 于 20° 晶体房静置。两周后, 在显微镜下观察晶体板, 选取晶体外形较好的条件进行结晶条件的重复及优化。晶体的生长条件为 PEG II suit F2(0.1M MES, pH 6.5, 20% PEG4000, 0.6M sodium chloride), 防冻剂为 30%EG。SDS-PAGE 显示晶体内容物为 PD1-His+14C12H1L1-Fab-His 复合物。在获取可用晶体后, 通过使用上海同步辐射光源收集分辨率数据为衍射到 2.5Å 的衍射图形。

数据解析流程如下: 采用 DIALS 对数据进行指标化、积分处理。用 Aimless 分析、合并处理数据, 随机选取 5% 数据进行 Rfree 估测。采用 Molrep 分子置换程序分两步来寻找相位解。经过序列比对, 14C12H1L1-Fab 与 PDB 数据库中 6foe 的序列同源性高达 85%, 所以用 6foe 寻找 14C12H1L1-Fab-his 的解, 然后固定 14C12H1L1-Fab-his 的位置, 用 PD-1 单体的结构 (PDB: 3rre) 来寻找 PD-1 的解。解析结果为一个不对称单位里包含一个 PD1-his 单体和一个 14C12H1L1-Fab-his 片段。随后采用 REFMAC5 在倒易空间中进行模型修正。采用 COOT 对蛋白模型在实空间进行修正。模型与电子密度图吻合良好, 晶体学 R 因子和 Rfree 分别为 0.21 和 0.27 (图 5), 结构模型的立体化学参数处在合理范围内。

结构分析结果如图 1-5 所示。

实施例 2. 抗 PD-1 抗体 14C12H1L1 (hG1TM) 抗原结合表位的氨基酸定点突变研究

根据 Nivolumab 抗体结合位点, 选择了人 PD-1 蛋白 29 位天冬氨酸、61 位谷氨酸、78 位赖氨酸、84 位谷氨酸、128 位亮氨酸 5 个氨基酸位点突变为丙氨酸 [Lee, J.Y., et al., Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. Nature Communications, 2016. 7(1): p. 13354.], 这些突变体分别记为 hPD1(D29A)-mFc、hPD1(E61A)-mFc、hPD1(K78A)-mFc、hPD1(E84A)-mFc、hPD1(L128A)-mFc 采用结合 ELISA 以及 Fortebio Kinetics 方法检测抗 PD-1 抗体与这些突变

体的结合活性，实验用未突变的 PD1-mFc 蛋白作为对照对比。

1、结合 ELISA 方法检测抗 PD-1 抗体 14C12H1L1 (hG1TM) 与人 PD-1 蛋白突变体的结合活性

用包被缓冲液将 PD-1 抗原稀释成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，每孔 50 μL 加入酶标板中，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 PBST 洗板后每孔加入 300 μL 1%BSA (PBS)，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。洗板后用 PBST 将抗 PD-1 抗体 (14C12H1L1 (hG1TM)) 稀释成 0.3333 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为起始浓度，在酶标板上进行 1 : 3 往下稀释为 0.1111 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，0.0370 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，0.0123 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，0.0041 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，0.0014 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，0.0005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共 7 个梯度浓度，另设空白对照，均做 2 个复孔，每孔 100 μL ，混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。洗板后每孔加入 50 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG(H+L)二抗(Jackson)工作液，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，用 PBST 洗板后加入每孔 50 μL TMB，置于室温避光显色 5 min 后，每孔加入 50 μL 终止液 (2 M H_2SO_4 溶液) 终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450 nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro6.2.1 软件对数据进行分析处理。以抗体浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标进行 4-parameter 拟合曲线作图，得到抗体的结合 EC50 值。

检测结果见表 1 和图 6-8 所示，人 PD-1 蛋白五个突变体 D29A、E61A、K78A、E84A、L128A 与抗 PD-1 抗体结合 EC50 分别为 0.021nM、 2.47×10^{12} nM、0.023nM、0.022nM、4.207nM。E61A 和 L128A 两个突变体与抗 PD-1 抗体的结合能力明显降低。

表 1 抗 PD-1 抗体与人 PD-1 突变体的结合 ELISA EC50 结果

	突变体	抗 PD-1 抗体结合 EC50 (nM)
酶标板 1	PD1-mFc	0.021
	hPD1(D29A)-mFc	0.021
	hPD1(E61A)-mFc	2.47×10^{12}
酶标板 2	PD1-mFc	0.022
	hPD1(K78A)-mFc	0.023
	hPD1(E84A)-mFc	0.022
酶标板 3	PD1-mFc	0.023
	hPD1(L128A)-mFc	4.207

2. Fortebio Kinetics 方法检测抗 PD-1 抗体 14C12H1L1 (hG1TM) 与人 PD-1 蛋白突变体的结合活性

首先将抗 PD-1 抗体用 PBS (含 0.02%Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4) 稀释至 5 μ g/mL 后固定于 AHC 传感器 (Fortebio) 表面, 时间为 120 s, 传感器在缓冲液中平衡 60 s, 固定在传感器上的抗 PD-1 抗体与各 PD1-mFc 突变体结合, 浓度为 1.24-100 nM (三倍稀释), 时间 120 s, 蛋白在缓冲液中解离, 时间 300 s。检测温度为 37 $^{\circ}$ C, 检测频率为 0.3 Hz, 样品板震动速率为 1000 rpm。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

抗 PD-1 抗体与各 PD-1 突变体结合结果见图 9-14 和表 2 所示, 人 PD-1 蛋白五个突变体 D29A、E61A、K78A、E84A、L128A 与抗 PD-1 抗体结合亲和力常数分别为 4.25E-10M、3.30E-08M、1.31E-10M、6.65E-10M、7.68E-09M。与结合 ELISA 结果一致, E61A 和 L128A 两个突变体与抗 PD-1 抗体的结合能力明显降低。

表 2 抗 PD-1 抗体与人 PD-1 突变体的 Fortebio Kinetics 结果

	分析物 最高信号 高度 (nm)	KD (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
PD1-mFc	0.37	4.35E-10	2.98E+05	8.85E+03	1.29E-04	2.83E-05	0.22-0.45
hPD1(D29A)-mFc	0.33	4.25E-10	2.92E+05	7.63E+03	1.24E-04	2.34E-05	0.35-0.47
hPD1(E61A)-mFc	0.12	3.30E-08	2.32E+05	1.57E+04	7.65E-03	1.31E-04	0.10-0.19
hPD1(K78A)-mFc	0.33	1.31E-10	3.60E+05	1.40E+04	4.73E-05	3.53E-05	0.34-0.44
hPD1(E84A)-mFc	0.27	6.65E-10	2.35E+05	1.01E+04	1.56E-04	3.75E-05	0.13-0.30
hPD1(L128A)-mFc	0.07	7.68E-09	6.39E+05	1.15E+05	4.91E-03	2.82E-04	0.04-0.14

序列表:

<110> 正大天晴康方（上海）生物医药科技有限公司

<120> 结合 PD-1 抗体的肽及其应用

<130> IB206166

<160> 21

<170> PatentIn version 3.3

PD-1 (SEQ ID NO:1) :人 PD1 (1-170) 序列

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEG
DNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRF
RVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQIKESLRAELR
VTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV

结构单元 1 (SEQ ID NO:2) : 人 PD1 (58-85)

NTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPED

结构单元 1 (SEQ ID NO:10) 人 PD1 (28-86)

PDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT
DKLAAFPEDR

结构单元 1 (SEQ ID NO:11) 人 PD1 (28-85)

PDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT
DKLAAFPED

结构单元 1 (SEQ ID NO:12) 人 PD1 (29-86)

DRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT
DKLAAFPEDR

结构单元 1 (SEQ ID NO:13) 人 PD1 (29-85)

DRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNHWYRMSPSNQTDKLAAPED

结构单元 1 (SEQ ID NO:14) 人 PD1 (58-86)

NTSESFVLNHWYRMSPSNQTDKLAAPEDR

结构单元 1 (SEQ ID NO:15) 人 PD1 (58-85)

NTSESFVLNHWYRMSPSNQTDKLAAPED

结构单元 1 (SEQ ID NO:16) 人 PD1 (59-86)

TSESFVLNHWYRMSPSNQTDKLAAPEDR

结构单元 1 (SEQ ID NO:17) 人 PD1 (59-85)

TSESFVLNHWYRMSPSNQTDKLAAPED

结构单元 2 (SEQ ID NO:3) : 人 PD1 (130-132)

PKA

结构单元 2 (SEQ ID NO:18) : 人 PD1 (127-133)

SLAPKAQ

结构单元 2 (SEQ ID NO:19) : 人 PD1 (127-132)

SLAPKA

结构单元 2 (SEQ ID NO:20) : 人 PD1 (128-133)

LAPKAQ

结构单元 2 (SEQ ID NO:21) : 人 PD1 (128-132)

LAPKA

14C12H1L1 (hG1TM) -Fab-HC-his (SEQ ID NO:4) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDW
 VATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYC
 ANRYGEAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGSHHHHHH

注：下划线为 CDR 序列

14C12H1L1 (hG1TM) -Fab-LC (SEQ ID NO:5) :

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIY
 RANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTF
 GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

注：下划线为 CDR 序列

His-tag (SEQ ID NO:6) :

HHHHHH

人 PD1 (1-170) -His*6 融合蛋白序列 (SEQ ID NO:7) :

MQIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEG
 DNATFTCSFSNTSEFVLN WYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRF
 RVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR
 VTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQTLVHHHHHH

14C12H1L1 (hG1TM) 重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDW
 VATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYC
 ANRYGEAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL

GTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

14C12H1L1 (hG1TM) 轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:9) :

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIY
RANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTF
GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

权 利 要 求

1. 肽，优选结合抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段，所述肽包含结构单元 1 和结构单元 2，其中结构单元 1 包含选自以下各项组成的组的 PD-1 蛋白片段：PD-1 蛋白的 28 位-86 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:10 所示），28 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:11 所示），29 位-86 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:12 所示），29 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:13 所示），58 位-86 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:14 所示）、58 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:15 所示），59 位-86 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:16 所示）和 59 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:17 所示），

结构单元 2 包含选自以下各项组成的组的 PD-1 蛋白片段：PD-1 蛋白的 127 位-133 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:18 所示），127 位-132 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:19 所示），128 位-133 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:20 所示），和 128 位-132 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:21 所示）。

2. 权利要求 1 所述的肽，所述肽包含结构单元 1 和结构单元 2，其中结构单元 1 包含 PD-1 蛋白的 29 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:11 所示）或 58 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:15 所示），结构单元 2 包含 PD-1 蛋白的 128 位-132 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:21 所示）或 130-132 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:3 所示），优选结构单元 1 包含 PD-1 蛋白的 58 位-85 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:15 所示），结构单元 2 包含 PD-1 蛋白的 130-132 位的氨基酸（如 SEQ ID NO:3 所示）。

3. 权利要求 1 或 2 所述的肽，其中 PD-1 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的肽，其中结构单元 1 包含 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:10-17 任一项所示的序列，结构单元 2 包含 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:18-21 任一项所示的序列，优选结构单元 1 包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，结构单元 2 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列。

5. 权利要求 1-4 任一项所述的肽，其中所述抗 PD-1 抗体的抗原结合片段为 Fab 片段、Fab'、(Fab')₂、Fab'-SH、Fab/c、Fv、单链抗体（例如，scFv）。

6. 权利要求 5 所述的肽，其中所述 Fab 片段的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示。

7. 权利要求 1-6 任一项所述的肽，其中 PD-1 蛋白的 T59、E61、S62、E84、D85 氨基酸与抗 PD-1 抗体（例如 14C12H1L1-Fab）重链的 Y32、D33、S52、G54、Y57、Y100 位氨基酸结合，PD-1 蛋白的 P130、K131、A132 氨基酸与抗 PD-1 抗体轻链的 F325、E324、D323 位氨基酸结合，PD-1 蛋白的 N58 糖基化侧链与抗 PD-1 抗体（例如 14C12H1L1-Fab）重链氨基酸（例如 S31、G53、G54 和 R56）结合。

8. 权利要求 7 所述的肽，其中所述糖基化侧链包含甘露糖，N-乙酰氨基葡萄糖；岩藻糖和 β -D-甘露糖。

9. 权利要求 1-8 任一项所述的肽在筛选结合 PD-1 的抗体或其抗原结合片段中的用途。

10. SEQ ID NO:1 所示的 PD-1 蛋白的 D29，T59，E61，S62，K78，E84，D85，L128，P130，A132 或其组合在筛选结合 PD-1 的抗体或其抗原结合片段中的用途。

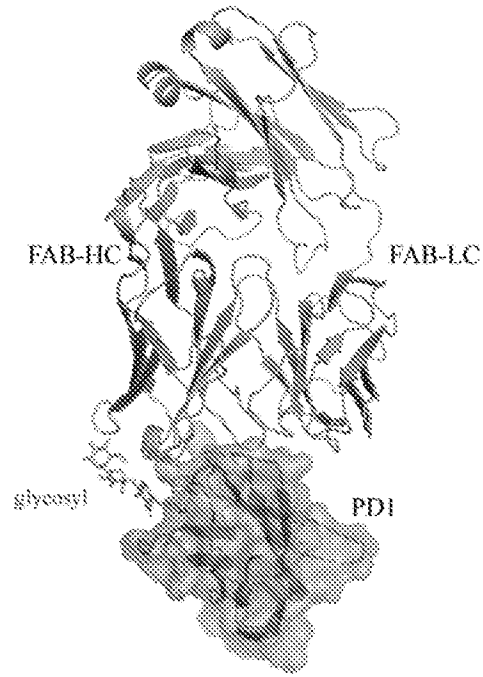


图 1

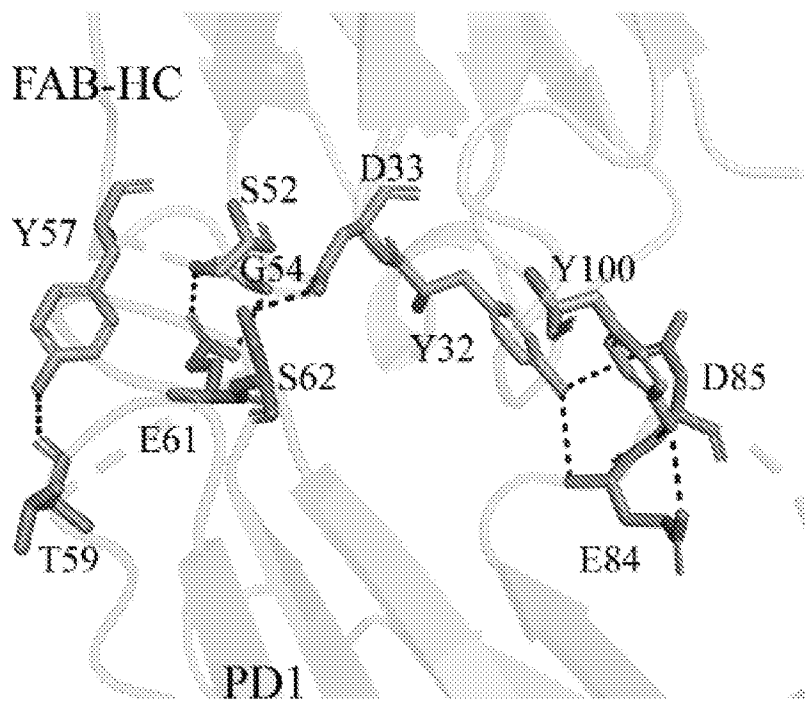


图 2

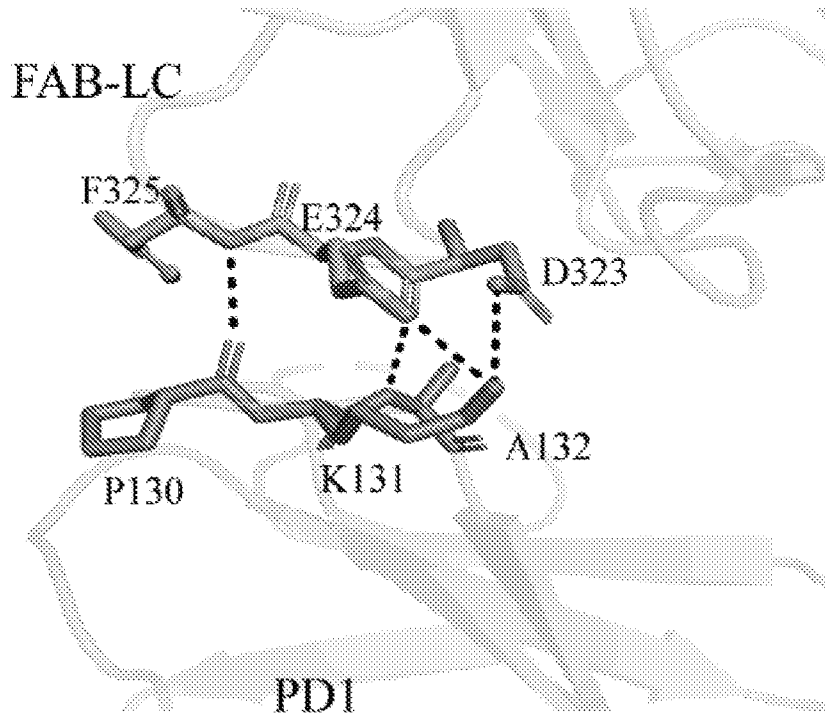


图 3

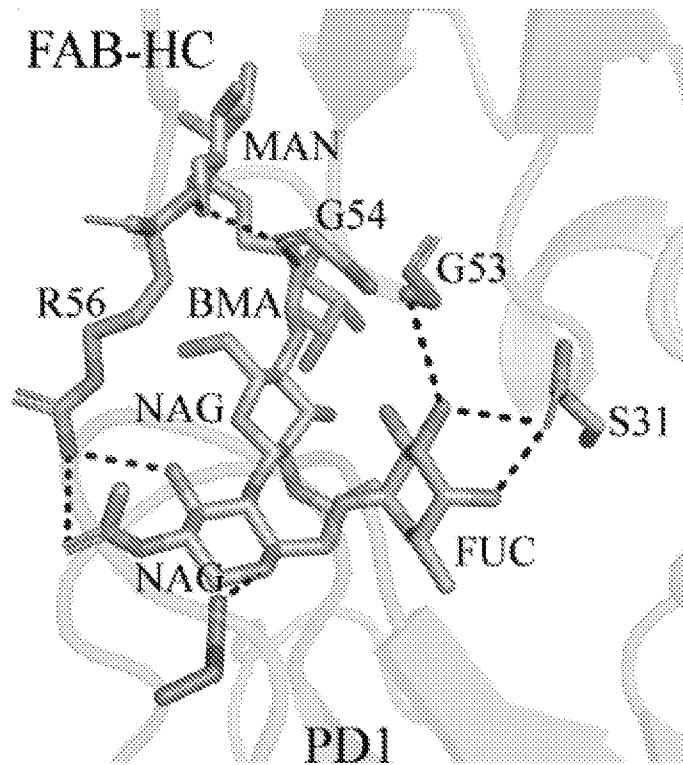


图 4

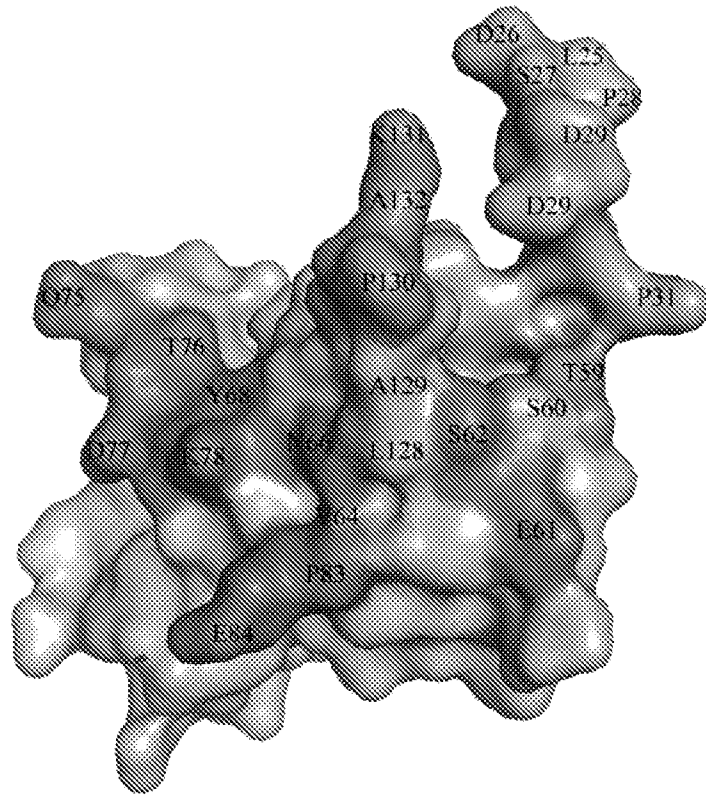


图 5

Curve Fit: A Parameter $y = \frac{A \cdot x^B}{1 + (\frac{x}{C})^D}$

- 聚丙烯酰胺(凝胶)
- ▲ 聚丙烯酰胺(凝胶)
- 聚丙烯酰胺(凝胶)

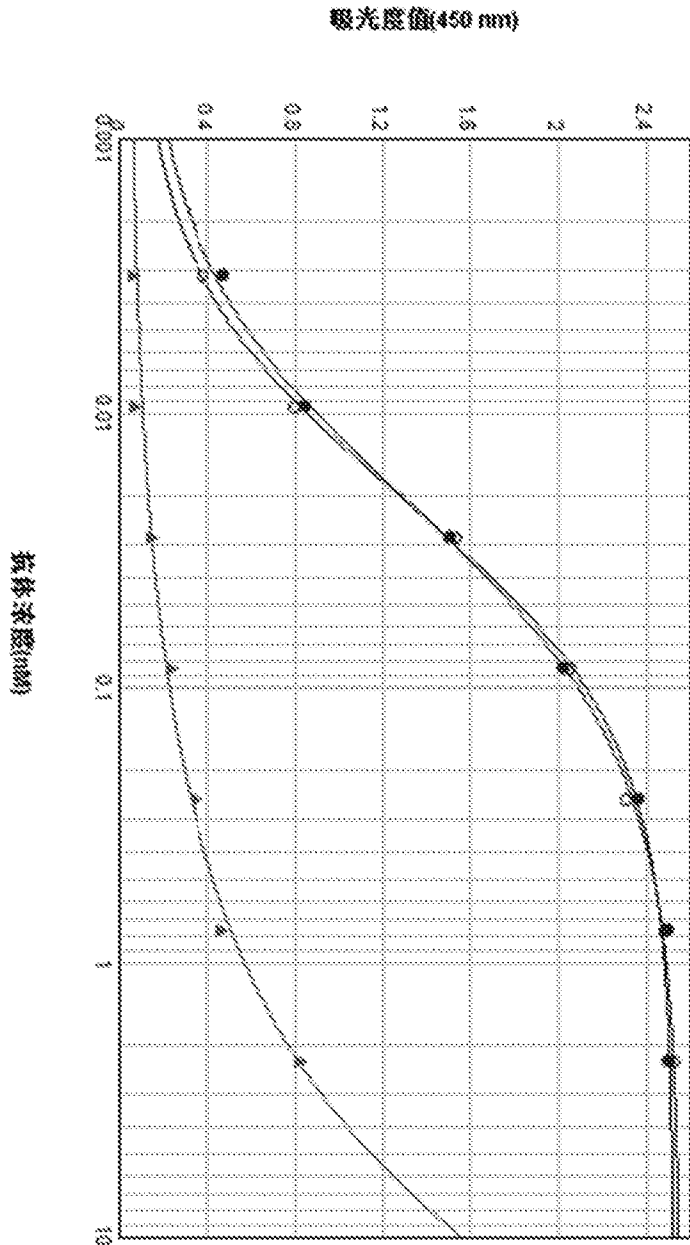
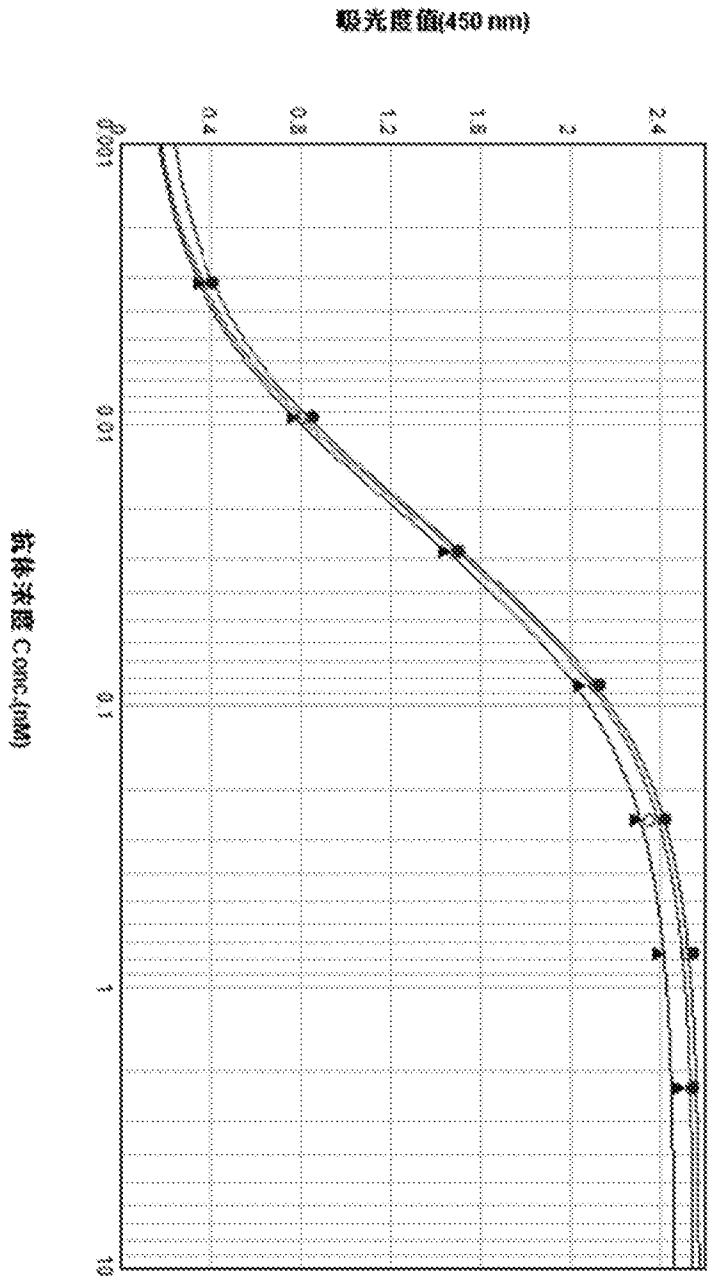


图6



- BPO1(K78A)-mFc_14C12M11(I6G17M)
- ▲ BPO1(E26A)-mFc_14C12M11(I6G17M)
- P01-mFc_14C12M11(I6G17M)

Curve fit: 4-Parameter $y = \frac{D \cdot \frac{A - D}{1 + (\frac{x}{C})^n}}$

图7

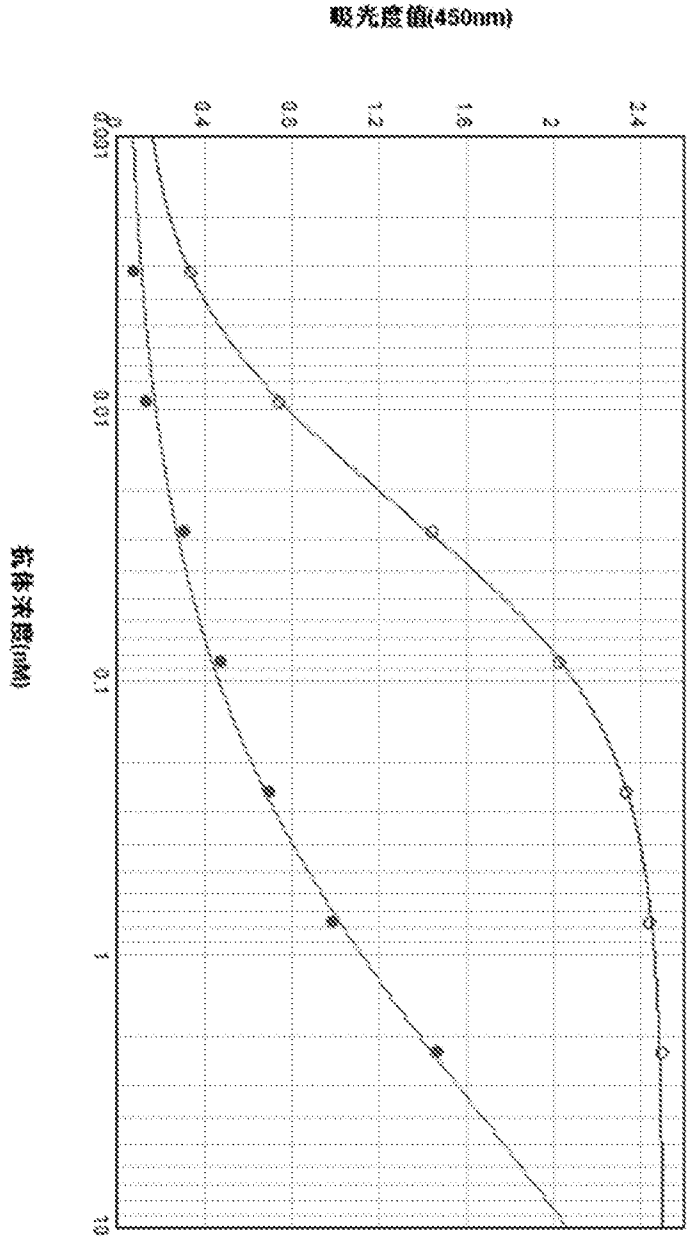


图8

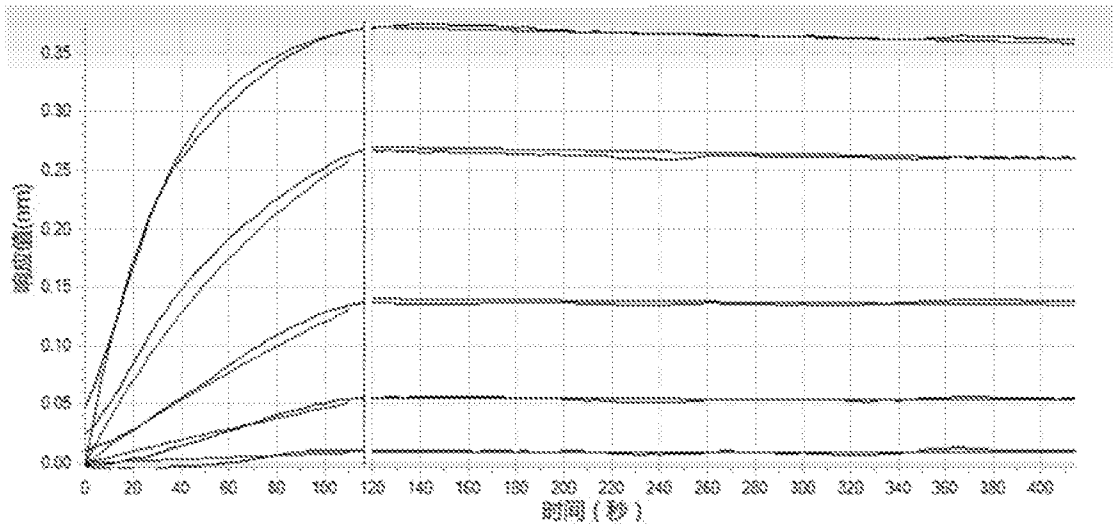


图 9

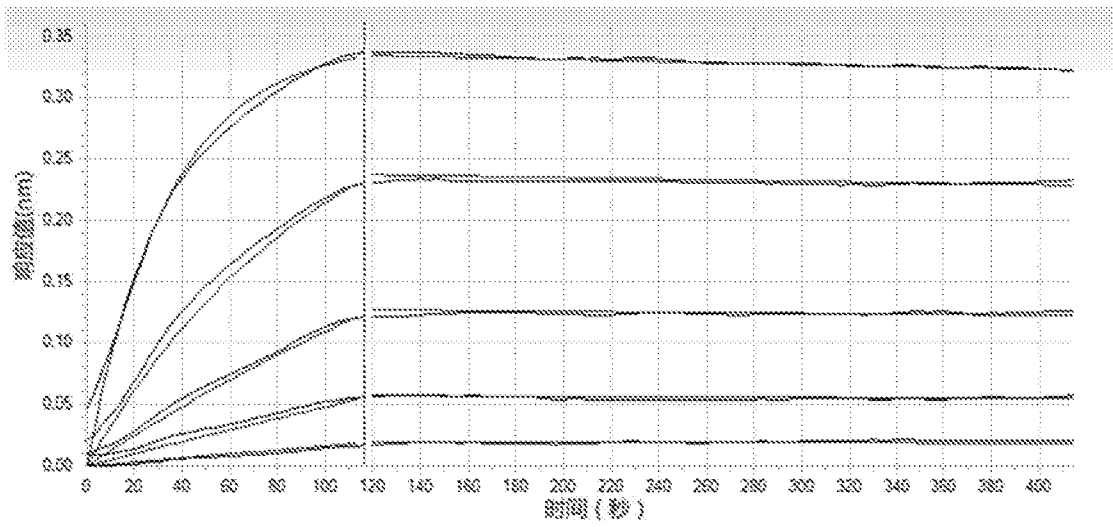


图 10

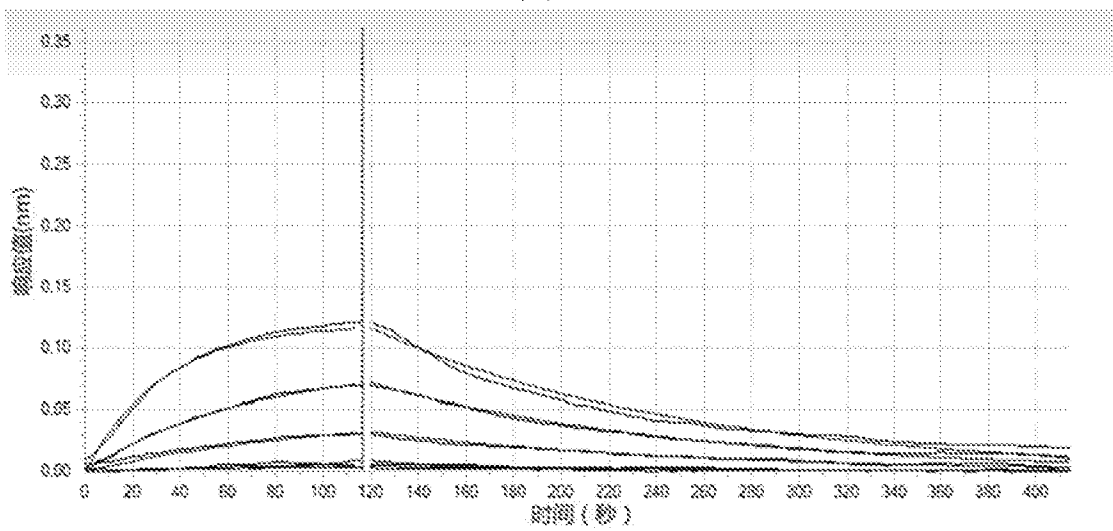


图 11

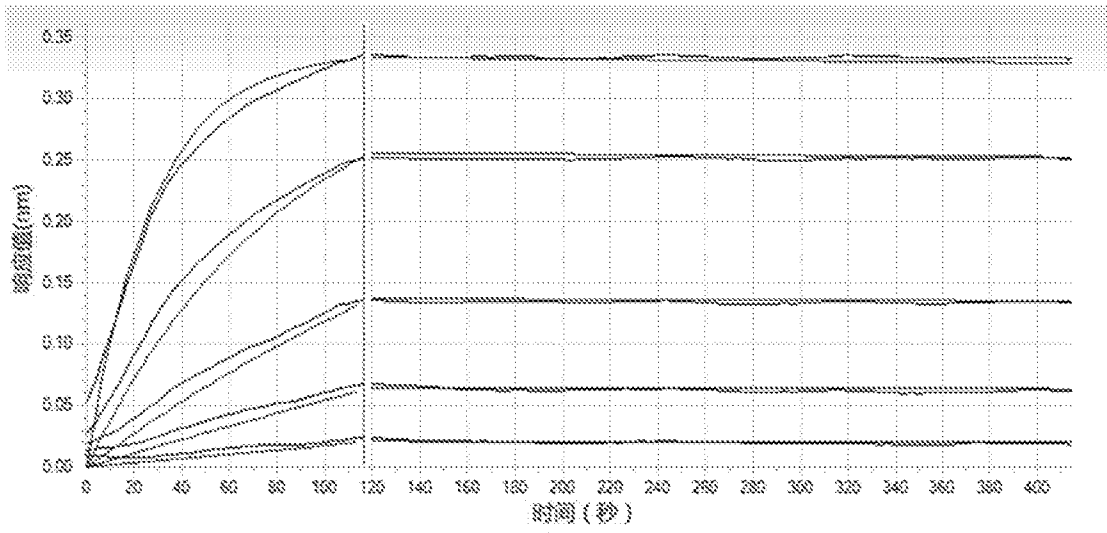


图 12

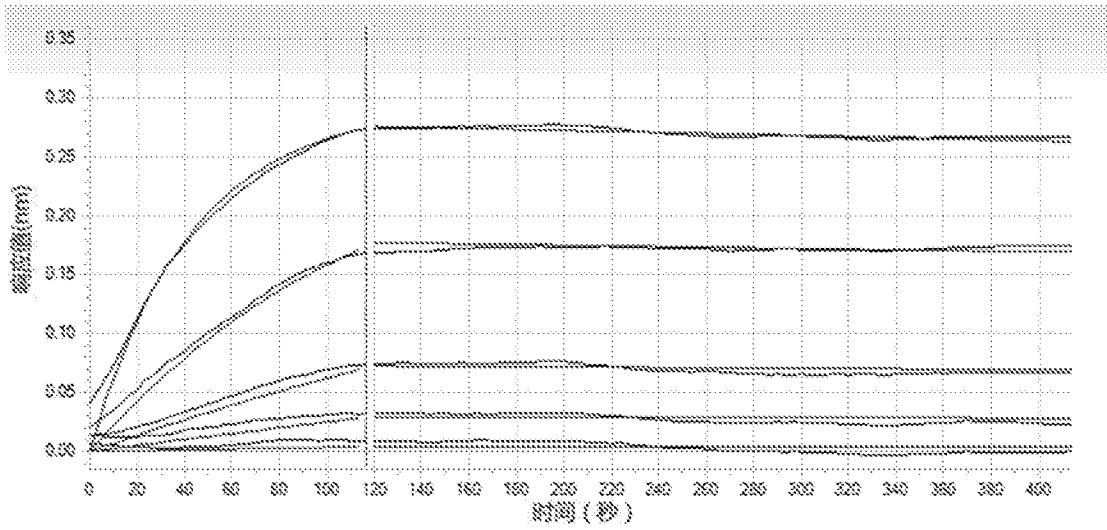


图 13

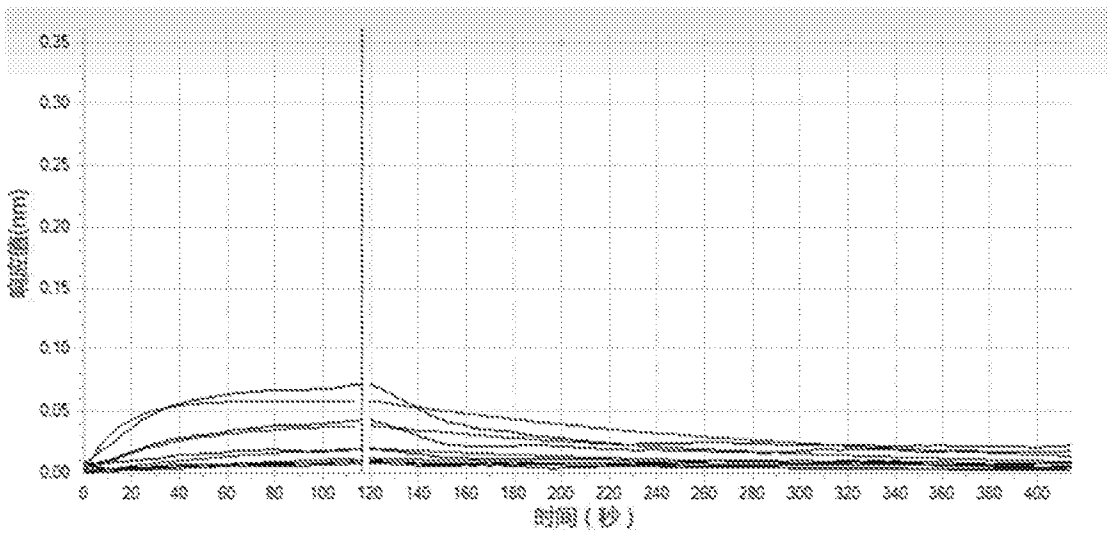


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/122062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; C07K 14/715(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K		
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, DWPI, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 万方数据检索系统, pubmed, baidu, patentics, Genbank, EBI, China Patents Biological Sequence Search System, STN: 抗体, 单抗, 单克隆抗体, 重链可变区, 轻链可变区, 抗原决定簇, 表位, Epitope, heavy chain, light chain, antibody, PD-1, PD1, E61, L128, SEQ ID NOs: 1-5, 10-21		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107840887 A (CSTONE PHARMACEUTICALS (SUZHOU) CO., LTD. et al.) 27 March 2018 (2018-03-27) claim 1, description paragraphs [0234], [0237], [0328]-[0345], sequence table	1-10
X	US 2019270815 A1 (WUXI BIOLOGICS CAYMAN INC. et al.) 05 September 2019 (2019-09-05) claims 18, 34	1-10
X	US 2020002420 A1 (CStone Pharmaceuticals et al.) 02 January 2020 (2020-01-02) claims 1 and 2	1-10
A	US 2019322749 A1 (CRESCENDO BIOLOGICS LIMITED) 24 October 2019 (2019-10-24) entire document	1-10
A	US 2019218297 A1 (STCUBE, INC. et al.) 18 July 2019 (2019-07-18) entire document	1-10
A	US 2018118829 A1 (JOUNCE THERAPEUTICS, INC.) 03 May 2018 (2018-05-03) entire document	1-10
A	US 2019077866 A1 (STCUBE, INC. et al.) 14 March 2019 (2019-03-14) entire document	1-10
<input 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
14 December 2021		31 December 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.

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/122062

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107840887	A	27 March 2018	TW	201825516	A	16 July 2018
				TW	I723220	B	01 April 2021
US	2019270815	A1	05 September 2019	JP	2018527950	A	27 September 2018
				JP	6883579	B2	09 June 2021
				WO	2017025051	A1	16 February 2017
				US	2021355218	A1	18 November 2021
				MA	42626	A	20 June 2018
				CL	2018000370	A1	07 December 2018
				RU	2018108048	A	12 September 2019
				RU	2018108048	A3	31 January 2020
				RU	2729830	C2	12 August 2020
				JP	2021036914	A	11 March 2021
				EP	3334763	A1	20 June 2018
				EP	3334763	A4	03 April 2019
				PH	12018500183	A1	30 July 2018
				IL	257062	D0	29 March 2018
				MX	2018001644	A	09 November 2018
				EC	SP18018842	A	31 October 2018
				CO	2018000992	A2	19 April 2018
				EA	201890468	A1	31 July 2018
				KR	20180030786	A	26 March 2018
				KR	102055396	B1	12 December 2019
				UA	124379	C2	08 September 2021
				US	11008391	B2	18 May 2021
				BR	112018002824	A2	06 November 2018
AU	2016305697	A1	22 February 2018				
CA	2993276	A1	16 February 2017				
RU	2020124273	A	03 December 2020				
PE	18 October 2018	A1	26 June 2018				
SG	10201914109V	A	27 February 2020				
US	2020002420	A1	02 January 2020	RU	2019111277	A	23 October 2020
				RU	2019111277	A3	23 October 2020
				RU	2757316	C2	13 October 2021
				JP	2021120378	A	19 August 2021
				EP	3515938	A1	31 July 2019
				EP	3515938	A4	10 June 2020
				WO	2018053709	A1	29 March 2018
				BR	112019005316	A2	03 September 2019
				MX	2019003058	A	28 November 2019
				CA	3037407	A1	29 March 2018
				JP	2019536432	A	19 December 2019
				KR	20210104749	A	25 August 2021
				KR	20190072524	A	25 June 2019
				KR	102273634	B1	07 July 2021
				AU	2016423559	A1	04 April 2019
				AU	2016423559	B2	30 July 2020
				AU	2016423559	C1	19 November 2020
IL	265525	D0	30 May 2019				
US	2019322749	A1	24 October 2019	EP	3565842	A1	13 November 2019
				US	2020239573	A1	30 July 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/122062

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				EP	3565840	A1	13 November 2019
				JP	2020515235	A	28 May 2020
				WO	2018127711	A1	12 July 2018
				WO	2018127710	A1	12 July 2018
				EP	3565841	A1	13 November 2019
				WO	2018127709	A1	12 July 2018
				JP	2020503870	A	06 February 2020
				US	2020239570	A1	30 July 2020
US	2019218297	A1	18 July 2019	CN	109715666	A	03 May 2019
				KR	20190031299	A	25 March 2019
				EP	3487883	A1	29 May 2019
				JP	2019528251	A	10 October 2019
				WO	2018017673	A1	25 January 2018
US	2018118829	A1	03 May 2018	MX	2019004834	A	20 June 2019
				CN	110392694	A	29 October 2019
				IL	266259	D0	30 June 2019
				RU	2019116653	A	03 December 2020
				RU	2019116653	A3	30 April 2021
				MX	318329	B	07 March 2014
				MX	322408	B	24 July 2014
				MX	325745	B	28 November 2014
				SG CN	11201903857	A	30 May 2019
				U			
				CA	3039992	A1	11 May 2018
				WO	2018085358	A1	11 May 2018
				EP	3535298	A1	11 September 2019
				EP	3535298	B1	08 September 2021
				KR	20190088480	A	26 July 2019
				TW	201819411	A	01 June 2018
				JP	2019534008	A	28 November 2019
				ZA	201902455	B	25 November 2020
				AU	2017355401	A1	02 May 2019
				AR	110017	A1	13 February 2019
				BR	112019008494	A2	09 July 2019
				DK	3535298	T3	15 November 2021
				US	2020399374	A1	24 December 2020
				MA	46708	A	05 May 2021
				MA	46708	B1	29 October 2021
				US	10654929	B2	19 May 2020
US	2019077866	A1	14 March 2019	JP	2019509976	A	11 April 2019
				US	10858432	B2	08 December 2020
				KR	20180085793	A	27 July 2018
				EP	3383412	A1	10 October 2018
				EP	3383412	A4	05 June 2019
				US	2021139588	A1	13 May 2021
				CN	109152798	A	04 January 2019
				WO	2017096026	A1	08 June 2017

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; C07K 14/715(2006.01)i; C07K 16/30(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. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K</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, DWPI, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 万方数据检索系统, pubmed, baidu, patentics, Genbank, EBI, 中国专利生物序列检索系统, STN; 抗体, 单抗, 单克隆抗体, 重链可变区, 轻链可变区, 抗原决定簇, 表位, Epitope, heavy chain, light chain, antibody, PD-1, PD1, E61, L128, SEQ ID NOs: 1-5, 10-21</p>																										
<p>C. 相关文件</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>X</td> <td>CN 107840887 A (基石药业苏州有限公司 等) 2018年3月27日 (2018 - 03 - 27) 权利要求1, 说明书第[0234], [0237], [0328]-[0345]段, 序列表</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2019270815 A1 (WUXI BIOLOGICS CAYMAN INC. 等) 2019年9月5日 (2019 - 09 - 05) 权利要求18, 34</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2020002420 A1 (CStone Pharmaceuticals 等) 2020年1月2日 (2020 - 01 - 02) 权利要求1, 2</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2019322749 A1 (CRESCENDO BIOLOGICS LIMITED) 2019年10月24日 (2019 - 10 - 24) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2019218297 A1 (STCUBE, INC. 等) 2019年7月18日 (2019 - 07 - 18) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2018118829 A1 (Jounce Therapeutics, Inc.) 2018年5月3日 (2018 - 05 - 03) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2019077866 A1 (STCUBE, INC. 等) 2019年3月14日 (2019 - 03 - 14) 全文</td> <td>1-10</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	X	CN 107840887 A (基石药业苏州有限公司 等) 2018年3月27日 (2018 - 03 - 27) 权利要求1, 说明书第[0234], [0237], [0328]-[0345]段, 序列表	1-10	X	US 2019270815 A1 (WUXI BIOLOGICS CAYMAN INC. 等) 2019年9月5日 (2019 - 09 - 05) 权利要求18, 34	1-10	X	US 2020002420 A1 (CStone Pharmaceuticals 等) 2020年1月2日 (2020 - 01 - 02) 权利要求1, 2	1-10	A	US 2019322749 A1 (CRESCENDO BIOLOGICS LIMITED) 2019年10月24日 (2019 - 10 - 24) 全文	1-10	A	US 2019218297 A1 (STCUBE, INC. 等) 2019年7月18日 (2019 - 07 - 18) 全文	1-10	A	US 2018118829 A1 (Jounce Therapeutics, Inc.) 2018年5月3日 (2018 - 05 - 03) 全文	1-10	A	US 2019077866 A1 (STCUBE, INC. 等) 2019年3月14日 (2019 - 03 - 14) 全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
X	CN 107840887 A (基石药业苏州有限公司 等) 2018年3月27日 (2018 - 03 - 27) 权利要求1, 说明书第[0234], [0237], [0328]-[0345]段, 序列表	1-10																								
X	US 2019270815 A1 (WUXI BIOLOGICS CAYMAN INC. 等) 2019年9月5日 (2019 - 09 - 05) 权利要求18, 34	1-10																								
X	US 2020002420 A1 (CStone Pharmaceuticals 等) 2020年1月2日 (2020 - 01 - 02) 权利要求1, 2	1-10																								
A	US 2019322749 A1 (CRESCENDO BIOLOGICS LIMITED) 2019年10月24日 (2019 - 10 - 24) 全文	1-10																								
A	US 2019218297 A1 (STCUBE, INC. 等) 2019年7月18日 (2019 - 07 - 18) 全文	1-10																								
A	US 2018118829 A1 (Jounce Therapeutics, Inc.) 2018年5月3日 (2018 - 05 - 03) 全文	1-10																								
A	US 2019077866 A1 (STCUBE, INC. 等) 2019年3月14日 (2019 - 03 - 14) 全文	1-10																								
<p><input 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>“&” 同族专利的文件</p>																										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年12月14日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年12月31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>李宁</p> <p>电话号码 86-(10)-53961932</p>																								

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:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/122062

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	107840887	A	2018年3月27日	TW	201825516	A	2018年7月16日
				TW	1723220	B	2021年4月1日
US	2019270815	A1	2019年9月5日	JP	2018527950	A	2018年9月27日
				JP	6883579	B2	2021年6月9日
				WO	2017025051	A1	2017年2月16日
				US	2021355218	A1	2021年11月18日
				MA	42626	A	2018年6月20日
				CL	2018000370	A1	2018年12月7日
				RU	2018108048	A	2019年9月12日
				RU	2018108048	A3	2020年1月31日
				RU	2729830	C2	2020年8月12日
				JP	2021036914	A	2021年3月11日
				EP	3334763	A1	2018年6月20日
				EP	3334763	A4	2019年4月3日
				PH	12018500183	A1	2018年7月30日
				IL	257062	D0	2018年3月29日
				MX	2018001644	A	2018年11月9日
				EC	SP18018842	A	2018年10月31日
				CO	2018000992	A2	2018年4月19日
				EA	201890468	A1	2018年7月31日
				KR	20180030786	A	2018年3月26日
				KR	102055396	B1	2019年12月12日
				UA	124379	C2	2021年9月8日
				US	11008391	B2	2021年5月18日
				BR	112018002824	A2	2018年11月6日
				AU	2016305697	A1	2018年2月22日
				CA	2993276	A1	2017年2月16日
				RU	2020124273	A	2020年12月3日
				PE	20181018	A1	2018年6月26日
				SG	10201914109V	A	2020年2月27日
US	2020002420	A1	2020年1月2日	RU	2019111277	A	2020年10月23日
				RU	2019111277	A3	2020年10月23日
				RU	2757316	C2	2021年10月13日
				JP	2021120378	A	2021年8月19日
				EP	3515938	A1	2019年7月31日
				EP	3515938	A4	2020年6月10日
				WO	2018053709	A1	2018年3月29日
				BR	112019005316	A2	2019年9月3日
				MX	2019003058	A	2019年11月28日
				CA	3037407	A1	2018年3月29日
				JP	2019536432	A	2019年12月19日
				KR	20210104749	A	2021年8月25日
				KR	20190072524	A	2019年6月25日
				KR	102273634	B1	2021年7月7日
				AU	2016423559	A1	2019年4月4日
				AU	2016423559	B2	2020年7月30日
				AU	2016423559	C1	2020年11月19日
				IL	265525	D0	2019年5月30日
US	2019322749	A1	2019年10月24日	EP	3565842	A1	2019年11月13日
				US	2020239573	A1	2020年7月30日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/122062

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)
				EP	3565840	A1	2019年11月13日
				JP	2020515235	A	2020年5月28日
				WO	2018127711	A1	2018年7月12日
				WO	2018127710	A1	2018年7月12日
				EP	3565841	A1	2019年11月13日
				WO	2018127709	A1	2018年7月12日
				JP	2020503870	A	2020年2月6日
				US	2020239570	A1	2020年7月30日
US	2019218297	A1	2019年7月18日	CN	109715666	A	2019年5月3日
				KR	20190031299	A	2019年3月25日
				EP	3487883	A1	2019年5月29日
				JP	2019528251	A	2019年10月10日
				WO	2018017673	A1	2018年1月25日
US	2018118829	A1	2018年5月3日	MX	2019004834	A	2019年6月20日
				CN	110392694	A	2019年10月29日
				IL	266259	D0	2019年6月30日
				RU	2019116653	A	2020年12月3日
				RU	2019116653	A3	2021年4月30日
				MX	318329	B	2014年3月7日
				MX	322408	B	2014年7月24日
				MX	325745	B	2014年11月28日
				SG	11201903857U	A	2019年5月30日
				CA	3039992	A1	2018年5月11日
				WO	2018085358	A1	2018年5月11日
				EP	3535298	A1	2019年9月11日
				EP	3535298	B1	2021年9月8日
				KR	20190088480	A	2019年7月26日
				TW	201819411	A	2018年6月1日
				JP	2019534008	A	2019年11月28日
				ZA	201902455	B	2020年11月25日
				AU	2017355401	A1	2019年5月2日
				AR	110017	A1	2019年2月13日
				BR	112019008494	A2	2019年7月9日
				DK	3535298	T3	2021年11月15日
				US	2020399374	A1	2020年12月24日
				MA	46708	A	2021年5月5日
				MA	46708	B1	2021年10月29日
				US	10654929	B2	2020年5月19日
US	2019077866	A1	2019年3月14日	JP	2019509976	A	2019年4月11日
				US	10858432	B2	2020年12月8日
				KR	20180085793	A	2018年7月27日
				EP	3383412	A1	2018年10月10日
				EP	3383412	A4	2019年6月5日
				US	2021139588	A1	2021年5月13日
				CN	109152798	A	2019年1月4日
				WO	2017096026	A1	2017年6月8日