

抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体及其用途

技术领域

本发明属于肿瘤治疗和分子免疫学领域，涉及一种抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性
5 抗体及其用途。具体地，本发明涉及一种突变的抗 CTLA4-抗 PD-1 的双特异性抗体。

背景技术

跨膜受体 PD-1（程序性细胞死亡-1）是 CD28 基因家族成员之一，在活化的 T
细胞，B 细胞以及骨髓系细胞都有表达。PD-1 的配体 PDL1（Programmed cell death
10 1 ligand 1，亦简称为 PDL-1）和 PDL2（Programmed cell death 1 ligand 2，亦简称
为 PDL-2）均属于 B7 超家族，其中 PDL1 在多种细胞都有表达，包括 T 细胞，B 细
胞以及内皮细胞和上皮细胞，PDL2 则仅表达于抗原呈递细胞如树突状细胞和巨噬细
胞。

PD-1/PDL1 信号通路在调节免疫耐受、微生物感染及肿瘤免疫逃逸中发挥重要
15 作用。PD-1 的表达主要在 T 细胞等免疫细胞，而 PD-1 的配体 PDL1 主要在许多
人类肿瘤组织呈高表达。阻断 PD-1/PDL1 信号通路可使被抑制的 T 细胞激活，进而攻
击癌细胞。阻断 PD-1/PDL1 信号可以促进肿瘤抗原特异性 T 细胞的增殖，发挥杀伤
肿瘤细胞的作用，进而抑制局部肿瘤生长 (Julie R et al., 2012, N Engl J
Med. 366:2455-2465)。另外，高表达 PDL1 的肿瘤伴随着很难被检测到的癌症
20 (Hamanishi et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:3360-5)。一种实施有效的方法
是通过体内注射抗 PD-1 抗体对 PD-1 的表达进行调控。由于 PD-1 抗体的广谱抗肿瘤
前景和惊人的药效，业界普遍认为针对 PD-1 通路的抗体将带来治疗多种肿瘤治疗的
突破性的进展：用于治疗非小细胞性肺癌，肾细胞癌，卵巢癌，黑色素瘤 (Homet M.
B., Parisi G., et al., 2015, Semin Oncol. 42(3):466-473)，白血病以及贫血病 (Held SA,
25 Heine A, et al., 2013, Curr Cancer Drug Targets. 13(7):768-74)。

细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4，亦
简称为 CTLA4) 与 CD28 分子在基因结构、染色体定位、序列的同源性及其基因表达
具有十分相近的关系，都是共刺激分子 B7 的受体，主要表达于被激活 T 细胞表面。
CTLA4 与 B7 结合后能抑制小鼠和人 T 细胞的激活，在 T 细胞活化中起负调节作用。

30 CTLA4 抗体（或抗 CTLA4 单克隆抗体）或 CTLA4 配体可以阻止 CTLA4 与其

天然配体结合，从而封闭 CTLA4 对 T 细胞负性调节信号的传导，增强 T 细胞对各种抗原的反应性，在这方面体内与体外研究结果基本一致。目前已有 CTLA4 单克隆抗体处于临床试验阶段或被批准用于治疗前列腺癌，膀胱癌，结肠直肠癌，胃肠道癌，肝癌，恶性黑色素瘤等 (Grosso JF., Jure-Kunkel MN., 2013, *Cancer Immun.*13:5.)。

- 5 白细胞介素 2 (IL-2) 由 T 细胞产生，是调节 T 细胞亚群的生长因子，也是调控免疫应答的重要因子，并可促进活化 B 细胞增殖，参与抗体反应、造血和肿瘤监视。重组的人 IL-2 已经被美国 FDA 批准用于治疗恶性肿瘤(包括黑色素瘤、肾肿瘤等)，同时正在进行治疗慢性病毒感染的临床研究 (Chavez, A.R., et al., 2009, *Ann N Y Acad Sci*, 1182: p. 14-27)。CTLA4 及 CTLA4 抗体作为 T 细胞功能状况的重要影响
- 10 因素，通过干预机体免疫微环境。体外和体内试验实验中，CTLA4 抗体可特异地解除 CTLA4 对机体免疫抑制，激活 T 细胞，诱导 IL-2 产生，在抗肿瘤及寄生虫等疾病的基因治疗中有广泛应用前景。

CTLA4 抗体可对疾病产生特异性治疗作用，并发挥较高疗效，补充传统用药的不足，由此开辟基因治疗的新途径。

- 15 双特异性抗体 (Bispecific Antibody) 亦称为双功能抗体，是同时靶向两种不同抗原的特异性药物，其可通过免疫分选纯化生产。另外，也可通过基因工程获得。基因工程方法在结合位点优化，合成形式的考量以及产量等方面都具有相应的灵活性，所以具有一定的优势。目前，其存在形式已被证明有超过 45 种 (Dafne Müller, Kontermann R E. 2010, *BioDrugs*, 24(2):89-98)。目前已开发的多种双特异性抗体为
- 20 IgG-scFv 形式即 Morrison 模式 (Coloma MJ, Morrison SL. 1997, *Nat Biotechnol.* 15:159-163)，由于这种类似于天然存在的 IgG 形式，其在抗体工程、表达和纯化上所具有的优势，已被证明是双功能抗体的其中一种理想存在形式 (Miller BR, Demarest SJ, et al., 2010, *Protein Eng Des Sel*; 23:549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A. 2011. *MAbs*; 3:299-309)。

- 25 ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 即抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用，是指抗体的 Fab 段结合病毒感染的细胞或肿瘤细胞的抗原表位，其 Fc 段与杀伤细胞 (NK 细胞、巨噬细胞等) 表面的 Fc 受体 (Fc Receptor, FcR) 结合，介导杀伤细胞直接杀伤靶细胞。

- CDC (complement dependent cytotoxicity) 即补体依赖的细胞毒性，是指当抗
- 30 体与细胞膜表面相应抗原特异性结合后，形成复合物而激活补体系统，进而在靶细胞

表面形成 MAC, 导致靶细胞溶解。补体能导致多种细菌和其他病原生物细胞的溶解, 是机体抵抗病原生物感染的重要防御机制。

5 Fc 受体是表达在特定免疫细胞表面, 用于识别抗体 Fc 区域介导免疫应答的免疫球蛋白家族蛋白。抗体 Fab 区域识别抗原后, 其抗体 Fc 区域与免疫细胞 (如杀伤细胞) 上的 Fc 受体结合, 启动免疫细胞的应答功能, 如吞噬作用及 ADCC。

根据 Fc 受体识别抗体类型及表达细胞的不同, Fc 受体主要分为 FcγR、FcαR 和 FcεR 三种类型, FcγR 又可分为 FcγRI (亦称为 CD64)、FcγRII (亦称为 CD32)、FcγRIII (亦称为 CD16) 和 FcRn (亦称为 Neonatal Fc receptor) 四种亚型。其中 FcγRI、FcγRII、FcγRIII 与 ADCC 效应密切相关。FcγRIII 是介导 ADCC 的最主要分子, 在不同细胞类型中具有高度同源的 FcγRIIIa 和 FcγRIIIb 两种亚型, 在 FcγRIIIa 人群中存在单核多态性 (SNP) 位点引起的高亲和力 FcγRIIIa 亚型, 分别称为 FcγRIIIa_V158 和低亲和力 FcγRIIIa_F158 两个亚型。FcγRI 对 IgG 的 Fc 区域具有较高的亲和力, 参与 ADCC 过程; FcγRII 有 FcγRIIa, FcγRIIb 和 FcγRIIc (亦分别称为 CD32a, CD32b, CD32c) 三个亚型, 其中 FcγRIIa 具有 ADCC 活性; FcγRIIa 15 在人群中存在由于单核苷酸突变导致的两种亚型, 分别称为 FcγRIIa_H131 和 FcγRIIa_R131; FcγRIIb 为抑制性受体, FcγRIIb 是典型的抑制性 FcγR, 可抑制附近的 ITAM 通路。例如, 免疫复合物与 BCR 结合后, Fc 段会结合同一细胞上的 FcγRIIb, 负性调节 B 细胞激活, 减少抗体、细胞因子的分泌 (Hogarth PM, Pietersz GA. 2012, NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 11(4):311-331)。

20 IgG 家族包含四个成员, IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4, 它们重链恒定区的可结晶片段 (fragment crystallizable, Fc) 区域存在氨基酸的差异, 导致它们与 FcγRs 的亲和力各不相同。IgG1 是人体内最多的亚型, 也是单抗药物中用的最多的亚型, IgG1 能够结合各种 FcγRs, 能够引发 ADCC 以及 CDC 效应。IgG2 与 FcγRs 的亲和力最弱, 但是 IgG2 仍能够通过 FcγRIIIa 的结合引发单核细胞介导的 ADCC。IgG3 与 FcγRs 25 的结合能力最强, 能引发 ADCC, 且 CDC 效应比 IgG1 更强。IgG4 分子与 FcγRI 之外的 FcγRs 结合较弱, IgG4 分子引起 CDC 和 NK 细胞介导的 ADCC 的可能性较低; 然而, IgG4 亚型抗体可通过与 FcγRI 的结合介导 ADCP 效应, 靶向于免疫细胞的抗体药物存在 ADCP 效应可能会导致免疫细胞损伤, 具有影响药物药理学负面效应。目前, 尚需要开发新的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体, 以减少或消除抗体介导的 30 ADCC、ADCP 和/或 CDC 活性对抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体所结合的免疫细胞

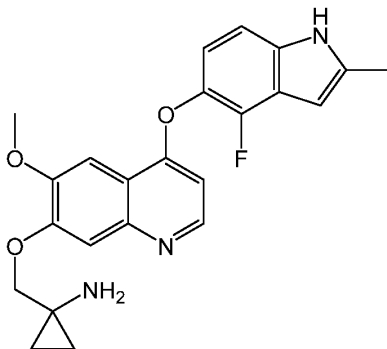
造成的损伤，提高抗体药物药效。

化疗药物目前主要分为下述九类(赫捷等.临床肿瘤学.北京:人民卫生出版社, 2016: 230-237) 第一类为直接与 DNA 结合, 阻止 DNA 复制的药物, 包括各种烷化剂、丝裂霉素和博来霉素、达卡巴嗪、铂类药物如顺铂和卡铂、喜树碱类药物及其衍生物; 第二类为阻止核酸生物合成的药物, 这类药物主要影响瘤细胞的酶系, 使 DNA 和 RNA 的前体物合成受阻, 从而抑制 DNA 或 RNA 形成, 主要包括甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、羟基脲和阿糖胞苷等, 主要作用于 S 期细胞, 属抗代谢类化疗药, 为周期特异性抗癌药; 第三类为影响转录的化疗药物, 主要药理作用是插入 DNA 双螺旋与其形成非共价结合, 从而干扰 DNA 上的遗传信息转录到依赖 DNA 的 mRNA 上, 导致模板功能受到损害、转录受阻, 主要包括。第四类为影响微管蛋白和有丝分裂的药物主要包括长春碱类、鬼臼毒素类和紫杉醇类等植物药; 第五类为影响核糖体功能, 阻止蛋白质合成的药物以二尖杉酯碱类植物药为代表, 它能抑制蛋白质合成的起始阶段, 使核糖体分解并释出新生肽链, 但不能阻止 mRNA 和 tRNA 与核糖体的结合这类药可使核 DNA 和胞质 RNA 减少、多聚核糖体解聚, 并抑制有丝分裂; 第六类为影响细胞膜的植物凝集素如刀豆素(Con-A)和植物凝集素(PHA)等可以和细胞膜上的糖蛋白受体结合, 从而影响瘤细胞的 DNA 合成, 阻止瘤细胞分裂; 第七类为诱导细胞凋亡(apoptosis)的药物, 如三氧化二砷等; 第八类为激素类主要通过调节内分泌治疗肿瘤, 包括雌激素类、抗雌激素类、孕激素类、雄激素类、抗雄激素类、肾上腺皮质激素类、抗肾上腺皮质激素类(包括氯苯二氯乙烷和氨鲁米特); 第九类为抗肿瘤靶点治疗, 包括单克隆抗体、表皮生长因子信号传导抑制剂(如针对受体酪氨酸激酶通路的靶向药物)、泛素蛋白酶体抑制剂、血管生成抑制剂等。

安罗替尼(Anlotinib)是一种喹啉衍生物类酪氨酸激酶抑制剂, 其作为多靶点酪氨酸激酶抑制剂(TKI)在影响肿瘤血管生成和增殖信号传导方面发挥作用, 主要靶点包括: 受体酪氨酸激酶血管内皮生长因子受体(VEGFR) 1 至 3, 表皮生长因子受体(EGFR), 成纤维细胞生长因子受体(FGFR) 1 至 4, 血小板衍生生长因子受体(PDGFR) α 和 β , 以及干细胞因子受体(SCFR) 7、8 和 9。一项 2 期试验显示, 安罗替尼可改善无进展生存期, 并具有总体生存的潜在益处(Han B, et al. Br J Cancer. 2018; 118 (5): 654-661)。一项多中心、双盲、3 期随机临床试验显示, 在中国患者中, 安罗替尼导致延长的总生存期和无进展生存期, 这一发现表明, 安罗替尼耐受性良好, 是晚期 NSCLC 患者潜在的三线或进一步治疗(Han B, et al. JAMA

Oncol. 2018 Nov; 4 (11) : 1569-1575)。

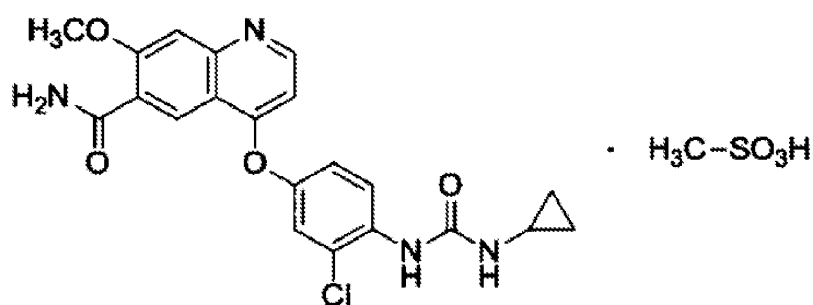
文献 WO2008112407 在实施例 24 中公开了一种喹啉衍生物类的酪氨酸激酶抑制剂 1-[[[4-(4-氟-2-甲基-1H-吡咯-5-基)氧基-6-甲氧基喹啉-7-基]氧基]甲基]环丙胺及其制备方法，它的结构式如下面的式 I 所示。盐酸安罗替尼是式 I 化合物的盐酸盐。



式 I

仑伐替尼（又称乐伐替尼，lenvatinib）是由日本卫材公司开发的一种口服多酪氨酸激酶抑制剂，可抑制 VEGFR1(FLT1)、VEGFR2(KDR)和 VEGFR3(FLT4)的激酶活性的多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂。除正常细胞功能外，仑伐替尼还抑制与病理性血管发生、肿瘤生长和癌症进展有关的其他受体酪氨酸激酶，包括成纤维细胞生长因子(FGF)受体 FGFR1、FGFR2、FGFR3 和 FGFR4；转染重排受体(RET)、KIT、和血小板衍生性生长因子受体 α (PDGFR α)。仑伐替尼还在肝细胞癌细胞系中展示出抗增殖活性，该抗增殖活性取决于活化的 FGFR 信号传导以及对抑制 FGF 受体底物 2 α (FRS2 α)磷酸化的同时抑制。

文献美国专利 7,612,208 实例 368 中披露了仑伐替尼化合物结构，为 4-(3-氯-4(环丙基氨基羰基)氨基苯氧基)-7-甲氧基-6-喹啉甲酰胺。文献美国专利号 7,253,286 的披露了仑伐替尼的甲烷磺酸盐形式(即，甲磺酸盐)，仑伐替尼甲磺酸盐的化学名为 4-[3-氯-4-(环丙基脒基)苯氧基]-7-甲氧基喹啉-6-甲酰胺甲烷磺酸盐，下面提供了其化学结构(式 II)：



式 II

然而,很多种肿瘤患者在接受化疗药物治疗后疾病仍无法得到长期控制,5 年生存率仍然很低。因此,开发更低毒性、更有效的治疗手段或者联合给药治疗方案具有巨大的临床意义。

5 发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动,对抗 CTLA4-抗 PD-1 抗体结构的 Fc 端进行相应的改造,降低 Fc 区域与 Fc 受体的结合,从而降低对免疫细胞的 ADCC、ADCP 和/或 CDC 毒副作用,增加抗 CTLA4-抗 PD-1 抗体药物的药物效能。

由此提供了下述发明:

10

本发明的一个方面涉及一种双特异性抗体,其包括:

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区,和

靶向 CTLA4 的第二蛋白功能区;

其中,所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白,所述第二蛋白功能区为单链抗体;或者,

15

所述第一蛋白功能区为单链抗体,所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白;

其中,

所述的免疫球蛋白,其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 27-29 所示的 HCDR1-HCDR3,其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 30-32 所示的 LCDR1-LCDR3;和所述的单链抗体,其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 33-35 所示的 HCDR1-HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 36-38 所示的 LCDR1-LCDR3;

20

或者,

所述的免疫球蛋白,其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 33-35 所示

的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 36—38 所示的 LCDR1—LCDR3; 和所述的单链抗体, 其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 27—29 所示的 HCDR1—HCDR3, 其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 30—32 所示的 LCDR1—LCDR3;

5 所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型;

其中, 按照 EU 编号系统 (EU numbering system), 所述免疫球蛋白的重链恒定区在 234 位点、235 位点和 237 位点中的任意 2 个位点或 3 个位点发生突变, 并且突变后, 双特异性抗体与 FcγRIIIa 和/或 C1q 的亲和力常数相比突变前降低; 优选地, 所述亲和力常数通过 Fortebio Octet 分子相互作用仪测得。

10 在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 发生上述突变后, 双特异性抗体与 FcγRIIIa、FcγRI、FcγRIIa_H131、FcγRIIIa_V158 和/或 FcγRIIb 的亲和力常数相比突变前降低; 优选地, 所述亲和力常数通过 Fortebio Octet 分子相互作用仪测得。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 按照 EU 编号系统, 所述免疫球蛋白的重链恒定区在第 234 位点、235 位点和/或 237 位点具有如下突变:

L234A 和 L235A; 或者

L234A 和 G237A; 或者

L235A 和 G237A;

20 或者

L234A、L235A、G237A。

本发明中, 如果没有特别说明, 位点之前的字母表示突变前的氨基酸, 位点之后的字母表示突变后的氨基酸。

25 本发明还涉及一种双特异性抗体, 其包括:

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区, 和

靶向 CTLA4 的第二蛋白功能区;

其中, 所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白, 所述第二蛋白功能区为单链抗体; 或者, 所述第一蛋白功能区为单链抗体, 所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白;

30 其中,

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 27—29 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 30—32 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 33—35 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 36—38 所示的 LCDR1—LCDR3；

或者，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 33—35 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 36—38 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 27—29 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 30—32 所示的 LCDR1—LCDR3；

所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型；

其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区在第 234 位点、235 位点和/或 237 位点具有如下突变：

L234A 和 L235A；或者
L234A 和 G237A；或者
L235A 和 G237A；或者
L234A、L235A、G237A。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区还具有选自如下的一个或多个突变：

N297A、D265A、D270A、P238D、L328E、E233D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、G236R、G236A、L328R、A330S、P331S、H268A、E318A 和 K320A。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其为 IgG-scFv 形式即 Morrison 模式。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO:

18; 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 20; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 43; 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 42 和 SEQ ID NO: 44;

或者,

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 43; 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 42 和 SEQ ID NO: 44; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 18; 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 20。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其选自如下的 (1) — (20) 中的任一项:

(1)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示;

(2)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示;

(3)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示;

(4)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示;

(5)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示;

(6)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示;

(7)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示;

(8)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示;

(9)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示;

(10)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示;

(11)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示;

(12)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示;

(13)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示;

(14)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示;

(15)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示;

(16)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示;

(17)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示;

(18)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示;

(19)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示;

以及,

(20)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体:

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示, 并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述免疫球蛋白或其抗原结合片段以大于大约 10^{-7} M，例如大于大约 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M 或 10^{-3} M 或更大的亲和力常数结合 FcγRIIIa_F158、FcγRI、FcγRIIa_H131、FcγRIIIa_V158 和/或 FcγRIIb；优选地，所述亲和力常数通过 ForteBio Octet 分子相互作用仪测得；

优选地，所述免疫球蛋白或其抗原结合片段与 FcγRIIIa_F158、FcγRI、FcγRIIa_H131、FcγRIIIa_V158 和/或 FcγRIIb 没有结合信号或者结合信号小于 0.1nm；优选地，所述结合信号是指通过 ForteBio Octet 分子相互作用仪测得的响应值。

10 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述免疫球蛋白或其抗原结合片段以大于大约 10^{-9} M，例如大于大约 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M 或 10^{-5} M 或更大的亲和力常数结合 C1q；优选地，所述亲和力常数通过 ForteBio Octet 分子相互作用仪测得；

优选地，所述免疫球蛋白或其抗原结合片段与 C1q 没有结合信号或者结合信号小于 0.1nm；优选地，所述结合信号是指通过 ForteBio Octet 分子相互作用仪测得的响应值。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区与所述第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接；和/或所述单链抗体的重链可变区与所述单链抗体的轻链可变区直接连接或者通过连接片段连接

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述连接片段为(GGGGS) n ， n 为正整数；优选地， n 为 1、2、3、4、5 或 6。

25 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为 1 个、2 个或者 2 个以上。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区为 1 个，和第二蛋白功能区为 2 个。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端。由于免疫球蛋白由两条重链，因此，一个免疫球蛋白分子连接有两个单链抗体分子。优选地，两个单链抗体分子相同。优选地，所述单链抗体通过前述连接片段与免疫球蛋白的重链的 C 末端形成酰胺键连接。

5

在本发明的一个或多个实施方案中，所述免疫球蛋白的恒定区是人源化的，例如，重链恒定区均采用 **Ig gamma-1 chain C region**，**ACCESSION: P01857**；轻链恒定区均采用 **Ig kappa chain C region**，**ACCESSION: P01834**。

10 在本发明的一个或多个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中，所述的双特异性抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的 K_D 结合 **CTLA4** 蛋白和/或 **PD-1** 蛋白。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述双特异性抗体为单克隆抗体。

15

在本发明的一个或多个实施方案中，所述双特异性抗体为人源化抗体。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的双特异性抗体，其包括：

靶向 **PD-1** 的第一蛋白功能区，和

20 靶向 **CTLA4** 的第二蛋白功能区；

所述第一蛋白功能区为 1 个，所述第二蛋白功能区为 2 个；

其中，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第二蛋白功能区为单链抗体；

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 40** 所示，并且其轻链的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 24** 所示；

25 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 43** 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 44** 所示；

所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端；

所述第一蛋白功能区与所述第二蛋白功能区通过第一连接片段连接；并且所述单链抗体的重链可变区与所述单链抗体的轻链可变区通过第二连接片段连接；所述第一

30 连接片段和所述第二连接片段相同或不同；

优选地,所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列独立地选自 SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26;

优选地,所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列均如 SEQ ID NO: 26 所示。

5

本发明的另一方面涉及一种分离的核酸分子,其编码本发明中任一项所述的双特异性抗体。

本发明还涉及一种载体,其包含本发明的分离的核酸分子。

10

本发明还涉及一种宿主细胞,其包含本发明的分离的核酸分子,或者本发明的载体。

15 本发明的再一方面涉及一种偶联物,其包括抗体或其抗原结合片段以及偶联部分,其中,所述免疫球蛋白为本发明中任一项所述的双特异性抗体,所述偶联部分为可检测的标记;优选地,所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

20 本发明的再一方面涉及一种试剂盒,其包括本发明中任一项所述的双特异性抗体,或者包括本发明的偶联物;

优选地,所述试剂盒还包括第二抗体,其特异性识别所述免疫球蛋白或其抗原结合片段;任选地,所述第二抗体还包括可检测的标记,例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

25 本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测 PD-1 和/或 CTLA4 在样品中的存在或其水平。

30 本发明的再一方面涉及一种药物组合物,其包含本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物;可选地,所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/

或赋形剂。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的药物组合物，其还包含一种或多种肿瘤化疗药物；

优选地，所述肿瘤化疗药物为酪氨酸激酶抑制剂；更优选地，所述肿瘤化疗药物为安罗替尼或其可药用盐（例如盐酸盐），或者仑伐替尼或其可药用盐（例如甲烷磺酸盐）。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的药物组合物，其中，所述药物组合物的单位剂量，按照其中的所述双特异性抗体的质量计算，为 100mg-1000mg、200mg-800mg、200mg-500mg、300mg-600mg、400mg-500mg 或者 450mg。

10

本发明的再一方面涉及一种组合产品，其包含独立包装的第一产品和第二产品，其中，

所述第一产品包含本发明中任一项所述的双特异性抗体、本发明的偶联物或者本发明中任一项所述的药物组合物；

15 所述第二产品包含一种或多种肿瘤化疗药物；优选地，所述肿瘤化疗药物为酪氨酸激酶抑制剂；更优选地，所述肿瘤化疗药物为安罗替尼或其可药用盐（例如盐酸盐），或者仑伐替尼或其可药用盐（例如甲烷磺酸盐）；

优选地，所述第一产品和所述第二产品还独立地包含一种或多种药学上可接受的辅料；

20 优选地，所述组合产品还包含产品说明书。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的组合产品，其中，所述第一产品的单位剂量，按照其中的所述双特异性抗体的质量计算，为 100mg-1000mg、200mg-800mg、200mg-500mg、300mg-600mg、400mg-500mg 或者 450mg。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的组合产品，其中，所述第二产品的单位剂量，按照其中的所述活性成分的质量计算，为 0.1mg-100mg、0.5mg-50mg、0.5mg-10mg、1mg-10mg、2mg-8mg 或者 1mg-5mg。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述的组合产品，其中，所述第二产品的单位剂量，按照其中的所述活性成分的质量计算，为 1mg-20mg、2mg-15mg、4mg-12mg 或者 8mg-12mg。

30

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体、本发明的偶联物、本发明任一项所述的药物组合物或者本发明任一项所述的组合产品在制备治疗和/或预防肿瘤或者贫血病的药物中的用途，或者在制备用于制备诊断肿瘤或者贫血病的药物中的用途；优选地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、
5 直肠癌、胃癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、白血病、乳腺癌、间皮瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、淋巴瘤和鼻咽癌中的一种或多种；

优选地，所述肿瘤为具有 MSI-H/dMMR 表型的实体瘤；优选地，为具有 MSI-H/dMMR 表型的结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、胃癌、间皮瘤、肉瘤、肾上腺皮质癌、恶性黑色素瘤或卵巢生殖细胞肿瘤；
10 优选地，所述肺癌选自非小细胞性肺癌、小细胞性肺癌和肺鳞癌中的一种或多种；
优选地，所述胃癌为胃腺癌或食管结合部腺癌。

MSI (microsatellite instability) 是微卫星不稳定性。微卫星 (Microsatellite) 是遍布于人类基因组中的短串联重复序列，有单核苷酸、双核苷酸或高位核苷酸的重复，
15 重复次数 10-50 次。与正常细胞相比，某些异常组织细胞，如肿瘤，内的微卫星由于重复单位的插入或缺失而导致微卫星长度的改变，就叫做 MSI。根据 MSI 不稳定性程度，可分为微卫星高度不稳定型 (MSI-H)、微卫星低度不稳定型 (MSI-L) 和微卫星稳定型 (MSS)。造成 MSI 的主要原因是 DNA 错配修复 (mismatch repair, MMR) 功能缺陷。人类错配修复基因 (MMR 基因) 经转录翻译后可表达相应的错配
20 修复蛋白，如果任一 MMR 蛋白表达缺失可造成细胞的错配修复功能缺陷，则对 DNA 复制过程中的碱基错配丧失修复功能而造成累积，导致微卫星不稳定 (MSI) 的发生，约 15% 的结直肠癌是经由 MSI 途径引发的。最早发现于结直肠癌，也可发生于胃癌、子宫内膜癌、肾上腺皮质肿瘤等 (Baretti M 等人, Pharmacol Ther. 2018;189:45 - 62.)，后续研究在间皮瘤、肉瘤、肾上腺皮质癌、恶性黑色素瘤和卵巢生殖细胞肿瘤中亦发
25 现 MSI-H/dMMR 特征。

MSI-H 和 dMMR 代表两种不同检测方法所产生的结果，dMMR 与 MSI-H 在生物学上具有一致性，称为 MSI-H/dMMR 或者 MSI-high/dMMR，MSI-L 和 MSS 则是 MMR 正常 (proficient mismatch repair, pMMR) 的表型。dMMR 检测方法是基于肿瘤标本 (包括手术标本、穿刺标本) 进行 MSH2、MLH1、MSH6 以及 PMS2
30 四个错配基因的免疫组化蛋白检测，若四个蛋白里面任何一个蛋白表达缺失则为

dMMR；如四个蛋白均为阳性表达则肿瘤为 pMMR，即错配修复功能完整。MSI 的检测为肿瘤细胞和体细胞重复 DNA 序列（微卫星序列）的长度进行一一配对检测，并比较长度。当使用 PCR 方法并基于美国 NCI 标准检测 5 个标准位点时，如果其中有两个或两个以上位点不一致则为不稳定，定义为 MSI-H，如果一个位点不一致则称为 MSI-L（微卫星低度不稳定），如 5 个位点均一致则为 MSS。高通量测序（High-throughput sequencing）（或称下一代测序，Next-generation sequencing technology, NGS）亦可作为检测微卫星不稳定性的方法。当选用更多的微卫星位点，如多于 5 个或者其他一些微卫星位点，进行 PCR 检测时，通常≥30%的位点不一致就叫 MSI-H，所有位点都一致就定义为 MSS，在 0 到 30%之间是 MSI-L。

10

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备如下药物中的用途：

- 阻断 PD-1 与 PDL1 结合的药物，
- 下调 PD-1 活性或水平的药物，
- 15 解除 PD-1 对机体的免疫抑制的药物，或者
- 提高 T 淋巴细胞中 IFN- γ 和/或 IL-2 表达的药物；
- 和/或
- 阻断 CTLA4 与 B7 结合的药物，
- 下调 CTLA4 活性或 CTLA4 水平的药物，
- 20 解除 CTLA4 对机体的免疫抑制的药物，或者
- 提高 T 淋巴细胞中 IL-2 表达的药物。

本发明的再一方面涉及一种预防和/或治疗和/或辅助治疗和/或诊断肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的双特异性抗体、本发明的偶联物、本发明任一项所述的药物组合物或者本发明任一项所述的组合产品的步骤；

25 优选地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、胃癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、白血病、乳腺癌、间皮瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、淋巴瘤和鼻咽癌和中的一种或多种；

- 优选地，所述肺癌选自非小细胞性肺癌、小细胞性肺癌和肺鳞癌中的一种或多种；
- 30 优选地，所述胃癌为胃腺癌或食管结合部腺癌；

优选地，所述肿瘤为具有 MSI-H/dMMR 表型的实体瘤；优选地，所述肿瘤选自具有 MSI-H/dMMR 表型的下述肿瘤中的一种或多种：

结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、胃癌、间皮瘤、肉瘤、肾上腺皮质癌、恶性黑色素瘤和卵巢生殖细胞肿瘤。

- 5 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的方法，其中，所述给予有需求的受试者以有效量的抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体的步骤为在手术治疗之前或之后，和/或在放射治疗之前或之后。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的方法，其中，

- 抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体的单次给药剂量为每千克体重0.1-100mg，优选
10 1-10mg（例如1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg或10 mg）；
或者，抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体的单次给药剂量为每位受试者10-1000mg（例如
大约100mg、大约150mg、大约200 mg、大约250 mg、大约300 mg、大约350 mg、大
约400 mg、大约450 mg、大约500 mg、大约600 mg、大约700 mg、大约800 mg、大
约900 mg或大约1000 mg），优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg或
15 200mg；

优选地，每3天、4天、5天、6天、10天、1周、2周或3周给药一次；

优选地，给药方式为静脉滴注或静脉注射。

- 在一些方案中，抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体的施用治疗以2周（14天）或3
周（21天）为一个周期，优选在每个周期第一天（D1）静脉给予抗CTLA4-抗PD-1
20 双特异性抗体。例如，所述抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体以每两周一次（q2w）或
者每三周一次（q3w）的频率施用。

- 根据本发明中任一项所述的双特异性抗体、本发明的偶联物、本发明任一项所述
的药物组合物或者本发明任一项所述的组合产品，其用于预防和/治疗和/或辅助治疗
25 和/或诊断肿瘤；优选地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠
癌、直肠癌、胃癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、白血病、乳腺癌、间皮瘤、宫颈癌、子宫
内膜癌、淋巴瘤和鼻咽癌和中的一种或多种；

优选地，所述肺癌选自非小细胞性肺癌、小细胞性肺癌和肺鳞癌中的一种或多种；

优选地，所述胃癌为胃腺癌或食管结合部腺癌；

- 30 优选地，所述肿瘤为具有 MSI-H/dMMR 表型的实体瘤；优选地，所述肿瘤选自

具有 MSI-H/dMMR 表型的下述肿瘤中的一种或多种：

结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、胃癌、间皮瘤、肉瘤、肾上腺皮质癌、恶性黑色素瘤和卵巢生殖细胞肿瘤。

根据本发明中任一项所述的双特异性抗体或者偶联物，其用于：

5 阻断 PD-1 与 PDL1 结合，
下调 PD-1 活性或水平，
解除 PD-1 对的机体免疫抑制，或者
提高 T 淋巴细胞中 IFN- γ 表达；
和/或

10 阻断 CTLA4 与 B7 结合，
下调 CTLA4 活性或 CTLA4 水平，
解除 CTLA4 对机体的免疫抑制，或者
提高 T 淋巴细胞中 IL-2 表达。

15 抗体治疗药物，特别是单克隆抗体（mAB）已在多种疾病的治疗中取得了良好的疗效。获取这些治疗性抗体的传统实验方法是采用抗原免疫动物，在免疫动物体内获取靶向抗原的抗体，或通过亲和力成熟的方法来改进那些与抗原的亲和力较低的抗体。

轻链和重链的可变区决定抗原的结合；每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区（CDR）（重链(H)的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链（L）的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3；其由 Kabat 等人命名，见 *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991)*, 第 1-3 卷, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md）。

通过本领域技术人员所熟知的技术手段，例如通过 VBASE2 数据库分析下面的
25 （1）-（13）项中的单克隆抗体序列的 CDR 区的氨基酸序列，结果如下：

（1）14C12

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

30 HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 27)

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 28)

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 29)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 30)

5 **LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 31)**

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 32)

(2) 14C12H1L1

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示。

10 其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 14C12 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 14C12 相同。

(3) 4G10

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；

15 其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 33)

HCDR2: INPYNNIT (SEQ ID NO: 34)

HCDR3: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 35)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

20 **LCDR1: TGAVTTSNF (SEQ ID NO: 36)**

LCDR2: GTN (SEQ ID NO: 37)

LCDR3: ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 38)

(4) 4G10H1L1

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示；

25 其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 4G10 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 4G10 相同。

(5) 4G10H3L3

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示；

30

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 4G10 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 4G10 相同。

(6) BiAb001(M)

其重链可变区涉及的 9 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

- 5 **HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 27)**
 HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 28)
 HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 29)
 HCDR4: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 33)
 HCDR5: INPYNNIT (SEQ ID NO: 34)
10 **HCDR6: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 35)**
 HCDR7: TGAVTTSNF (SEQ ID NO: 36)
 HCDR8: GTN (SEQ ID NO: 37)
 HCDR9: ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 38)

其轻链可变区涉及的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

- 15 **LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 30)**
 LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 31)
 LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 32)

(7) BiAb002(M)

其重链可变区涉及的 9 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001(M)相同。

- 20 其轻链可变区涉及的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001(M)相同。

(8) BiAb003(M)

其重链可变区涉及的 9 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001(M)相同。

其轻链可变区涉及的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001(M)相同。

(9) BiAb004(M)

- 25 其重链可变区涉及的 9 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001(M)相同。

其轻链可变区涉及的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001(M)相同。

本发明的抗体 BiAb004 (hG1TM) 在 BiAb004(M)非可变区引入氨基酸突变。按照 EU 编号系统在 234、235 和 237 位点引入氨基酸突变：

- 通过在其重链铰链区域第 234 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变(L234A)，
30 第 235 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变 (L235A)，第 237 号位点引进了甘氨酸

酸到丙氨酸的点突变 (G237A) 获得 BiAb004 (hG1TM)。

在本发明中, 除非另有说明, 否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且, 本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时, 为了更好地理解本
5 发明, 下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的, 当提及 CTLA4 蛋白 (Cytotoxic T- Lymphocyte Antigen 4) 的氨基酸序列时, 其包括 CTLA4 蛋白的全长, 或者 CTLA4 的胞外片段 CTLA4ECD 或者包含 CTLA4ECD 的片段; 还包括 CTLA4ECD 的融合蛋白, 例如与小鼠或人 IgG
10 的 Fc 蛋白片段 (mFc 或 hFc) 进行融合的片段。然而, 本领域技术人员理解, 在 CTLA4 蛋白的氨基酸序列中, 可天然产生或人工引入突变或变异 (包括但不限于置换, 缺失和/或添加), 而不影响其生物学功能。因此, 在本发明中, 术语“CTLA4 蛋白”应包括所有此类序列, 包括其天然或人工的变体。并且, 当描述 CTLA4 蛋白的序列片段时, 其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

如本文中所使用的, 当提及 PD-1 蛋白 (NCBI GenBank: NM_005018) 的氨基酸序列时, 其包括 PD-1 蛋白的全长, 或者 PD-1 的胞外片段 PD-1ECD 或者包含 PD-1ECD 的片段; 还包括 PD-1ECD 的融合蛋白, 例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段 (mFc 或 hFc) 进行融合的片段。然而, 本领域技术人员理解, 在 PD-1 蛋白的氨基酸序列中, 可天然产生或人工引入突变或变异 (包括但不限于置换, 缺失和/或添
20 加), 而不影响其生物学功能。因此, 在本发明中, 术语“添加), 蛋白”应包括所有此类序列, 包括其天然或人工的变体。并且, 当描述 PD-1 蛋白的序列片段时, 其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

如本文中所使用的, 如果没有特别说明, 所述 B7 为 B7-1 和/或 B7-2; 其具体蛋白序列为现有技术中已知序列, 可以参考现有文献或者 GenBank 中公开的序列。例如, B7-1 (CD80, NCBI Gene ID: 941); B7-2 (CD86, NCBI Gene ID: 942)。
25

如本文中所使用的, 术语 EC₅₀ 是指半数最大效应浓度 (concentration for 50% of maximal effect), 是指能引起 50% 最大效应的浓度。

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。从一般意义上, 重链可以理
30 解为抗体中分子量较大的多肽链, 轻链是指抗体中分子量较小的多肽链。轻链可分类

为 κ 和 λ 轻链。重链通常可分类为 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“基酸区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“基酸区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由 3 个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 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。 V_H 和 V_L 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 V_H 和 V_L 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(V_H 和 V_L)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。特别地，重链还可以包含 3 个以上 CDR，例如 6、9、或 12 个。例如在本发明的双功能抗体中，重链可以是 IgG 抗体的重链的 C 端连接另一个抗体的 scFv，这种情况下重链含有 9 个 CDR。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。

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

在本文中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“抗体”时，其不仅包括完整抗体，而且包括抗体的抗原结合片段。

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断，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 (Kohler et al., 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)。

如本文中所使用的，术语“表位”是指，抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，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，其可以是“线性的”或“构象的”。参见，例如，*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, 第 66 卷，G. E. Morris, Ed. (1996)。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子（例如抗体）之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

如本文中所使用的，术语“分离的”或“被分离的”指的是，从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的，术语“大肠杆菌表达系统”是指由大肠杆菌(菌株)与载体组成的表达系统，其中大肠杆菌（菌株）来源于市场上可得到的菌株，例如但不限于：GI698, ER2566, BL21(DE3), B834(DE3), BLR(DE3)。

如本文中所使用的，术语“载体（vector）”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达

载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。

5 可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

10 如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力（ K_D ）结合该抗原。在本发明的一些实施方案中，术语“靶向”是指特异性结合。

如本文中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数（ K_D ）结合抗原，例如，如使用表面等离子体共振术（SPR）在 BIACORE 仪中测得，或通过 Fortebio Octet 分子相互作用仪测得。

25 如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例

如 **Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995**），并且包括但不限于：**pH** 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，**pH** 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 **Tween-80**；

5 离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

如本文中所使用的，术语“佐剂”是指非特异性免疫增强剂，当其与抗原一起或预先递送入机体时，其可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。佐剂有很多种，包括但不限于铝佐剂（例如氢氧化铝）、弗氏佐剂（例如完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂）、短小棒状杆菌、脂多糖、细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物试验中最常用的佐剂。氢氧化铝佐剂则在临床实验中使用较多。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如 **CTLA4** 与 **B7** 结合或者 **CTLA4** 活性过高相关的疾病如肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如 **CTLA4** 与 **B7** 结合或者 **CTLA4** 活性过高相关的疾病如肿瘤）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

“复发性”癌症是在对初始治疗（例如手术）产生应答后，在初始部位或远处部位再生的癌症。“局部复发性”癌症是在治疗后，在与先前治疗的癌症相同的位置出现的癌症。

“转移性”癌症是指从身体的一部分（例如肺部）扩散到身体的另一部分的癌症。

如本文中所使用的，术语“完全消除”是指通过现有的仪器设备（例如 **Fortebio Octet** 分子相互作用仪）检测显示没有结合信号或结合信号极低。在本发明的一个实施方案中，没有结合信号或结合信号极低是指结合信号（即响应值或 **Response**）低于 **0.1nm**。

在本发明中，如果没有特别说明，所述“第一”（例如第一蛋白功能区、第一连接片段或者第一产品）和“第二”（例如第二蛋白功能区、第二连接片段或者第二产品）是为了指代上的区分或表述上的清楚，并不具有典型的次序上的含义。

30 本发明中，如果没有特别说明，“大约”或者“约”是指在所修饰的数值或者物理量

的 10%、20%或 30%的范围内上下浮动，例如，大约 100 分钟或约 100 分钟，可以是 90 分钟-110 分钟、80 分钟-120 分钟或者 70 分钟-130 分钟。

发明的有益效果

5 本发明实现了如下的（1）至（3）项中所述技术效果中的一项或多项：

（1）本发明人对于本发明的抗体的 Fc 端的改造完全消除了 BiAb004(hG1TM)与 Fc 受体 FcγRI、FcγRIIa_H131、FcγRIIIa_V158 和/或 FcγRIIIa_F158 的结合活性，进而消除了 ADCC 活性和/或 ADCP 活性。

（2）本发明人对于本发明的抗体的 Fc 端的改造完全消除了与补体 C1q 的结合活
10 性，进而完全地消除了 CDC 活性。

（3）本发明的抗体具有用于制备预防、治疗肿瘤的药物潜力。

附图说明

图 1：BiAb004(hG1TM)与 FcγRI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每
15 对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM，25nM，12.5nM，6.25nM，3.12nM。

图 2：BiAb004(hG1WT) FcγRI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM，25nM，12.5nM，6.25nM，3.12nM。

图 3：BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM，250nM，125nM，62.5nM，31.25nM。

20 图 4：BiAb004(hG1WT)与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM，250nM，125nM，62.5nM，31.25nM。

图 5：BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM，250nM，125nM，62.5nM，31.25nM。

25 图 6：BiAb004(hG1WT)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM，250nM，125nM，62.5nM，31.25nM。

图 7：BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM，100nM，50nM，25nM，12.5nM。

图 8：BiAb004(hG1WT)与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM，100nM，50nM，25nM，12.5nM。

图 9: BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM, 100nM, 50nM, 25nM, 12.5nM。

图 10: BiAb004(hG1 WT)与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM, 100nM, 50nM, 25nM, 12.5nM。

5 图 11: BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIb 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM, 100nM, 50nM, 25nM, 12.5nM。

图 12: BiAb004(hG1WT)与 FcγRIIb 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM, 100nM, 50nM, 25nM, 12.5nM。

10 图 13: BiAb004(hG1TM)与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 20nM, 10nM, 5nM, 2.5nM, 1.25nM。

图 14: BiAb004(hG1WT)与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗原的浓度分别为 20nM, 10nM, 5nM, 2.5nM, 1.25nM。

图 15: 5C10H2L2-IgG1mt 与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗原的浓度分别为 20nM、10nM、5nM、2.5nM、1.25nM。

15 图 16: BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)对表达 CTLA-4 和 PD-1 抗原的 293T-CTLA4-PD1 细胞的 ADCC 活性检测。

图 17: BiAb004 (hG1TM)联合仑伐替尼抑制人肺癌 HCC827 细胞皮下接种肿瘤的增长。

20 图 18: BiAb004 (hG1TM)抑制 C57BL/6-hPDL1/hPDL1/hCD73 小鼠中结肠癌 MC38-hPDL1/hCD73 皮下移植瘤的增长。

图 19: BiAb004 (hG1TM)对 CHO-K1-PD1 的抗体介导的细胞吞噬的活性。

图 20: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人胃癌细胞 KATO III 细胞的免疫反应。

25 图 21: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人宫颈癌细胞 Hela 细胞的免疫反应。

图 22: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人 T 淋巴细胞瘤细胞 Jurkat 细胞的免疫反应。

图 23: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 细胞的免疫反应。

图 24: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞的免疫反应。

图 25: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人间皮瘤细胞 NCI-H2452 细胞的免疫反应。

5 图 26: BiAb004 (hG1TM)联合安罗替尼显著增强免疫细胞对人非小细胞肺癌肺癌细胞(人肺腺癌细胞)A549 细胞的免疫反应。

图 27: BiAb004 (hG1TM)联合安罗替尼显著增强免疫细胞对人小细胞肺癌细胞 NCI-H446 细胞的免疫反应。

10 图 28: BiAb004 (hG1TM)联合安罗替尼显著增强免疫细胞对人肺鳞癌细胞 NCI-H226 细胞的免疫反应。

图 29: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对 MSI-h/dMMR 表型的人结肠癌细胞 SW48 细胞的免疫反应。

图 30: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对非 MSI-h/dMMR 表型的人结肠癌细胞 SW 837 细胞的免疫反应。

15

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（例如参考 J.萨姆布鲁克等

20 等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）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。

在本发明的下述实施例中：

BALB/c 小鼠购自广东省医学实验动物中心。

25 人外周血单核细胞均为在中山康方生物医药有限公司分离制备，且经提供者知情同意。

Raji-PDL1 为中山康方生物医药有限公司基于人 B 细胞系细胞 Raji 细胞通过转染构建的表达有人 PD-L1 的细胞。

Ficoll-PaqueTM PLUS（或 Ficoll-Paque PLUS）购自 GE Healthcare。

30 Human IL-2 ELISA Kit 购自达科为生物技术股份有限公司。

RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、Trypsin-EDTA (0.25%) phenol red、Blasticidin 均来源于 Gibco。

金黄色葡萄球菌肠毒素抗原 (SEB) 来源于德诺泰克。

FBS 来源于 Excell bio。

5 丝裂霉素 C (MMC) 来源于 Stressmarq。

同型对照抗体为人抗鸡蛋溶酶体抗体 (human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, 即 anti-HEL 抗体, 或者 human IgG, 简称 hIgG) 的序列来自于 Acierno 等人发表的 Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies 中 Fab F10.6.6 序列的可变区序列 (Acierno 等人, J Mol Biol. 10 2007; 374(1): 130-146.)。

实施例中所使用的安罗替尼为安罗替尼 (Anlotinib) 的盐酸盐, 商品名称福可维®, 通用名称盐酸安罗替尼, 来源于正大天晴药业集团股份有限公司。

实施例中所使用的仑伐替尼 (Lenvatinib, 又译为: 乐伐替尼) 为甲磺酸仑伐替尼, 商品名为乐卫玛®, 来源于卫材 (中国) 药业有限公司。

15

制备例 1: 抗 CTLA4 的抗体的序列设计

抗 CTLA4 的抗体 4G10 及其人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 的重链和轻链的氨基酸序列、以及编码核酸序列分别与中国专利公开 CN 106967172A 中的 4G10、4G10H1L1、4G10H3L3 相同。

20 (1) 4G10 的重链可变区序列和轻链可变区序列

重链可变区的核酸序列: (372 bp)

CAGGTCAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCT
TCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACC
ATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAATGGATTGGACTT
25 ATTAATCCTTACAATAATATTACTAACTACAACCAGAAGTTCATGGGCAAGG
CCACATTTACTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAACTCCTCA
GACTGACATCTGAAGACTCTGGAGTCTATTTCTGTGCAAGACTCGACTATA
GGTCTTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGA
CACCCCCATCTGTCTAT (SEQ ID NO: 1)

30 其编码的氨基酸序列: (124 aa)

**QVKLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIG
LINPYNITNYNQKFMGKATFTVDKSSSTAYMELLRLTSEDSGVYFCARLDYRS
YWGGQGLTVTVSAAKTTPPSVY (SEQ ID NO: 2)**

5 轻链可变区的核酸序列: (378 bp)

**CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAA
ACAGTCACACTCACTTGTCTGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAAC
TTTGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTATTCTACTAGTCTAATAG
GTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCCTGCCAGATTCTCAGGCTCCC
10 TGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGAT
GAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCATTGGGTGTTCCGT
GGAGGAACCAAACCTGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTC
ACCCTGTTTCAAGGGCAATTCTGC (SEQ ID NO: 3)**

其编码的氨基酸序列: (126 aa)

15 **QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNFWVQEKPDHLFTSLIG
GTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGT
KLTVLGQPKSSPSVTLFQQQFC (SEQ ID NO: 4)**

(2) 人源化单克隆抗体 4G10H1L1 的重链可变区序列和轻链可变区序列

20 重链可变区 (4G10H1V) 的核酸序列: (345 bp)

**CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCCGAGCTGGTGAAGCCCGGCGC
CTCCATGAAGATCTCTTGCAAGGCCAGCGGATACAGTTTCACTGGCTATAC
CATGAACTGGGTCAAACAGGCTCCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGGC
TGATTAATCCTTACAACAACATCACCAACTACAACCAGAAGTTCATGGGAA
25 AAGCAACCTTTACAGTGGACAAGAGCATTTCACAGCCTACATGGAACTGA
GCCGGCTGACTTCAGACGATAGCGGGGTCTATTTTTGTGCAAGGCTGGATT
ATCGCTCTTACTGGGGGCAGGGAACCTCTGGTCACTGTCTCCGCT (SEQ ID
NO: 5)**

其编码的氨基酸序列: (115 aa)

30 **QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQGLEWIG**

LINPYNNITNYNQKFMGKATFTVDKSISTAYMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRS
YWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 6)

轻链可变区 (4G10L1V) 的核酸序列: (327 bp)

5 CAGGCTGTCGTCACCTCAGGAACCTTCACTGACTGTGAGCCCAGGAGGA
ACTGTCACCCTGACATGCGGAAGCTCCACCGGAGCAGTGACCACATCCAAC
TTCGCCAATTGGGTCCAGGAAAAGCCAGGCCAGGCATTTTCGATCCCTGATC
GGAGGCACAAACAATCGGGCTTCTTGGGTGCCCCGCAAGATTCTCAGGAAGC
CTGCTGGGGGGAAAAGCCGCTCTGACCATTAGTGGCGCTCAGCCTGAGGA
10 CGAAGCCGAGTACTTCTGCGCTCTGTGGTATAGCAACCACTGGGTGTTTGG
CGGGGGAACAAAGCTGACTGTGCTG (SEQ ID NO: 7)

其编码的氨基酸序列: (109 aa)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNFANWVQEKPQAFRSLIG
GTNNRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGG
15 TKLTVL (SEQ ID NO: 8)

(3) 人源化单克隆抗体 4G10H3L3 的重链可变区序列和轻链可变区序列

重链可变区 (4G10H3V) 的核酸序列: (345 bp)

CAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCGC
20 CTCAGTGAAGGTCAGCTGCAAGGCCAGCGGGTACAGTTTCACTGGATATAC
CATGAACTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCCAGGGGCTGGAGTGGATCGGCC
TGATTAACCCTTACAACAACATCACTAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGGA
GAGTGACCTTTACAGTGGACACCAGCATTTCACAGCCTACATGGAACTGT
CCCGGCTGAGATCTGACGATACAGGCGTGTACTTCTGCGCTAGGCTGGATT
25 ACCGCAGCTATTGGGGACAGGGCACACTGGTGACTGTCAGCGCA (SEQ ID
NO: 9)

其编码的氨基酸序列 (4G10H3V): (115 aa)

QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIG
LINPYNNITNYAQKFQGRVTFTVDTISISTAYMELSRLRSDDTGVIYFCARLDYRS
30 YWGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 10)

轻链可变区（4G10L3V）的核酸序列：（327 bp）

CAGGCTGTCGTCACCTCAGGAACCTTCACTGACCGTGTCTCCTGGCGGG
ACTGTCACCCTGACATGCGGCAGCTCCACAGGGGCGGTGACCACAAGTAAC
5 TTCCCAAATTGGGTCCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCCCGGAGTCTGATC
GGAGGCACCAACAACAAGGCCAGCTGGACACCCGCACGGTTCAGCGGCAG
CCTGCTGGGCGGCAAGGCCGCTCTGACAATTAGCGGAGCCCAGCCTGAGG
ACGAAGCCGAGTACTATTGCGCTCTGTGGTACTCCAACCACTGGGTGTTCG
GCGGCGGCACCAAGCTGACTGTGCTG（SEQ ID NO: 11）

10 其编码的氨基酸序列（4G10L3V）：（109 aa）

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIG
GTNNKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWFVGGG
TKLTVL（SEQ ID NO: 12）

15 制备例 2：抗 PD-1 的抗体 14C12 及其人源化抗体 14C12H1L1 的序列设计

抗 PD-1 的抗体 14C12 及其人源化抗体 14C12H1L1 的重链和轻链的氨基酸序列、
以及编码核酸序列分别与中国专利公开 CN 106967172A 中的 14C12、14C12H1L1 相
同。

（1）14C12 的重链可变区序列和轻链可变区序列

20 重链可变区的核酸序列：（354 bp）

GAGGTCAAACCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCGGCGG
GTCACTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGAC
ATGTCATGGGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTGCTACT
ATCAGCGGAGGCGGGCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGA
25 TTCACAATTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTA
GTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCG
AAGCATGGTTTGCCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCTGCC
（SEQ ID NO: 13）

其编码的氨基酸序列：（118 aa）

30 EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAT

ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAW
FAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 14)

轻链可变区的核酸序列: (321 bp)

5 GACATTAAGATGACACAGTCCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCG
AGCGAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTC
TTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGC
CAATAGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGG
GCAGGATTACTCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATC
10 TACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAA
AACTGGAAGTGAAG (SEQ ID NO: 15)

其编码的氨基酸序列: (107 aa)

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRA
NRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL
15 K (SEQ ID NO: 16)

(2) 人源化单克隆抗体 14C12H1L1 的重链可变区序列和轻链可变区序列、重链序列和轻链序列

重链可变区的核酸序列: (354 bp)

20 GAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGG
GTCAGTGCAGCTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGA
CATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTA
CTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCC
GGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGA
25 ACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACG
GGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTA
GT (SEQ ID NO: 17)

其编码的氨基酸序列: (118 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVA
30 TISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDALYYCANRYGE

AWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 18)

轻链可变区的核酸序列: (321 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGC
5 GACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTG
AGCTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGG
GCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGC
GGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCA
ACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGG
10 ACAAACCTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 19)

其编码的氨基酸序列: (107 aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRA
NRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLE
LK (SEQ ID NO: 20)

15

14C12H1L1 重链 (14C12H1) 的 DNA 序列: (1344 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGG
GTCAGTGCAGCTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGAC
ATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACT
20 ATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGG
TTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACA
GCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGG
AAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCGAGGGAACCTGGTGACAGTCTCTAGTG
CCAGCACCAAAGGACCTAGCGTGTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCAC
25 CAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGA
ACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATAC
ATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTC
ACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAAC
CACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGC
30 GACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCC

CTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAG
AACCCCTGAAGTCACCTGTGTCTGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGA
GGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAAC
CAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT
5 GACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
GTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAA
AGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGA
ACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTAC
10 AAGACCACCCCTCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCA
AGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCA
GCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCT
GAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO: 21)

其编码的氨基酸序列: (448 aa)

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVAT
ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEA
WFAYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
20 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22)

25 14C12H1L1 轻链 (14C12L1) 的 DNA 序列: (642 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCG
ACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAG
CTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGC
TAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGG
30 ACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAAC

CTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACA
 AAAGTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCC
 CTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGA
 ACAATTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAAGTGACAGTGGAAAGGTCGATAACGCCC
 5 TGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATA
 GCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAA
 GCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGT
 GACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT (SEQ ID NO: 23)

其编码的氨基酸序列: (214 aa)

10 DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRAN
 RLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO: 24)

15

制备例 3: 双功能抗体 BiAb001(M)、BiAb002(M)、BiAb003(M)和 BiAb004(M)的序列设计

双功能抗体 BiAb001(M)、BiAb002(M)、BiAb003(M)和 BiAb004(M)的结构模式属于 Morrison 模式 (IgG-scFv), 即在一个 IgG 抗体的两条重链的 C 端均通过连接
 20 片段连接另一个抗体的 scFv 片段, 其重链和轻链的设计组成如下面的表 A。

表 A: BiAb001(M)、BiAb002(M)、BiAb003(M)和 BiAb004(M)的序列设计

双功能抗体	免疫球蛋白部分		连接片段	scFv 部分
	重链	轻链		
BiAb001(M)	14C12H1	14C12L1	Linker1	4G10H1V(M)- Linker2 -4G10L1V(M)
BiAb002(M)	14C12H1	14C12L1	Linker2	4G10H1V(M)- Linker2 -4G10L1V(M)
BiAb003(M)	14C12H1	14C12L1	Linker1	4G10H3V(M)- Linker2 -4G10L3V(M)
BiAb004(M)	14C12H1	14C12L1	Linker2	4G10H3V(M)- Linker2 -4G10L3V(M)

上面的表 A 中:

Linker1 的氨基酸序列为(GGGGS)3 (SEQ ID NO: 25)

Linker2 的氨基酸序列为(GGGGS)4 (SEQ ID NO: 26)

5 另外, 上述的表 A 中, BiAb001(M)、BiAb002(M)、BiAb003(M)和 BiAb004(M)抗体的 scFv 片段中的 4G10H1V(M)、4G10L1V(M)、4G10H3V(M)、4G10L3V(M)是分别在 4G10H1V、4G10L1V、4G10H3V、4G10L3V 基础上对其骨架区中个别氨基酸进行了突变, 有效地优化了抗体的结构, 提高了其有效性。

(1) 4G10H1V(M): (115 aa, 基于 4G10H1V 所做的氨基酸序列突变位点用下
10 划线标出)

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQCLEWIG
LINPYNITNYNQKFMGKATFTVDKSISTAYMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRS
YWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 41)

(2) 4G10L1V(M): (110 aa, 基于 4G10L1V 所做的氨基酸序列突变位点用下
15 划线标出)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPANWVQEKPGQAFRSLIG
GTNNRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGCG
TKLTVLR (SEQ ID NO: 42)

(3) 4G10H3V(M): (115 aa, 基于 4G10H3V 所做的氨基酸序列突变位点用下
20 划线标出)

QVQLVESGAELVKKPGASVKVSCASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIG
LINPYNITNYAQKFQGRVTFTVDTSISTAYMELSRLRSDDTGVIYFCARLDYRS
YWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 43)

(4) 4G10L3V(M): (110 aa, 基于 4G10L3V 所做的氨基酸序列突变位点用下
25 划线标出)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIG
GTNNKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCG
TKLTVLR (SEQ ID NO: 44)

30 为了与下文中的突变后的抗体相区分, 在本发明实施例中 BiAb004(M)亦称为

BiAb004(hG1WT)。上述的 BiAb004(M)作为“野生型”，其采用 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION: P01857 作为重链恒定区，Ig kappa chain C region，ACCESSION: P01834 为轻链恒定区。

5 制备例 4：基于人源化双功能抗体 BiAb004 的非可变区氨基酸突变设计

本发明人在制备例 3 所获得的 BiAb004(hG1WT)的基础上，通过在其重链的第 234 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变（L234A），第 235 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变（L235A），第 237 号位点引进了甘氨酸到丙氨酸的点突变（G237A），获得了 BiAb004(hG1TM)。

10 BiAb004(hG1TM) 中的免疫球蛋白部分的重链的 DNA 序列：（1344 bp，突变位点用下划线标出）

GAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCCGGCGGGT
CACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATG
TCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTC
15 AGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAA
TCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGG
CTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTT
GCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAG
GGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACC
20 GCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAG
CTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGC
AAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGC
CTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAA
GGTGGACAAGAAAGTGAGGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCC
25 CCCTGTCTCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGCCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCC
CAAACCCAAGGACACCTCATGATCAGCAGAACCCTGAAGTCACCTGTGTGCG
TCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTGCGAT
GGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAAC
CCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAAC
30 GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGA

GAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACAC
TGCCTCCCTCCAGGGACGAACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTG
GTCAAGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACA
GCCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCT
5 TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAA
CGTGTTCCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGA
AAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO: 39)

BiAb004(hG1TM) 中的免疫球蛋白部分的重链的氨基酸序列: (448 aa, 突变位
10 点用下划线标出)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVAT
ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEA
WFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
15 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

20 BiAb004(hG1TM) 和 BiAb004(hG1WT)轻链的 DNA 序列相同, 其编码的氨基酸
序列也相同, 具体序列见制备例 3。

实验例 1: BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)的受体 FcγRI 亲和力检测

Fc 受体 FcγRI 又名 (CD64) 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合, 参与抗体依赖细胞介
25 导的细胞毒作用 (ADCC)。治疗性单克隆抗体与 Fc 受体结合的能力影响到该抗体的
安全性和有效性。

本实验使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 BiAb004(hG1WT) 和
BiAb004(hG1TM)与 FcγRI 的亲和力常数, 以评价各抗体的潜在的 ADCC、ADCP 活
性。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体与 FcγRI 的亲和力常数实验方法简
述如下：样品稀释缓冲液为 PBS, 0.02%Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4 的溶液。HIS1K
传感器上加入浓度为 1 μg/mL 的 FcγRI (购自 Sinobio) 溶液, 固定时间 50s, 以使得
FcγRI 固定于传感器表面。抗体与 FcγRI 的结合和解离参数的测定均在缓冲液中进行,
5 抗体浓度为 3.12—50nM(两倍梯度稀释)。固定有抗原的传感器在缓冲液中平衡 60s 后
测定固定在传感器上的 FcγRI 与各抗体的结合, 时间 120s; FcγRI 与抗体的解离测定
时间为 120s。检测温度为 30 °C, 频率为 0.3Hz。数据以 1:1 模型拟合分析, 以得到各
抗体和 FcγRI 的亲和力常数。

FcγRI 与 BiAb004(hG1TM)和 BiAb004(hG1WT)的亲和力常数测定结果如下面的
10 表 1 以及图 1、图 2 所示。

表 1: BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 FcγRI 结合的动力学参数

Sample ID	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	S E (k _{on})	k _{dis} (1/s)	S E(k _{dis})	R _{max} (nm)
BiAb004 (hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004 (hG1WT)	5.92E-09	3.06E+05	8.35E+03	1.81E-03	5.75E-05	0.53-0.62

结果显示, BiAb004(hG1WT)可以与 FcγRI 结合, 亲和力常数为 5.92E-09M; 而
BiAb004(hG1TM)由于与 FcγRI 没有结合信号或信号极低, 故未能获得相应数据, 认
为其不与 FcγRI 结合。

15 结果表明, 相对于 BiAb004(hG1WT), BiAb004(hG1TM)被有效的消除了其与
FcγRI 的结合活性。

实验例 2: FcγRIIIa_V158 与 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)的亲和力常数测定

20 Fc 受体 FcγRIIIa_V158 (又名 CD16a_V158), 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合, 介
导 ADCC 效应。

实验中使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 BiAb004(hG1WT), 和
BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数, 以评价各抗体的 ADCC 活性。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数实
25 验方法简述如下: 样品稀释缓冲液为 PBS, 0.02%Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4。5μg/mL
的 FcγRIIIa_V158 固定在 HIS1K 传感器上, 时间 120s, 传感器在缓冲液中平衡 60s,

固定在传感器上的 FcγRIIIa_V158 与各抗体结合, 抗体浓度为 31.25—500nM (两倍稀释), 时间 60s, 抗体在缓冲液中解离, 时间 60s。传感器使用 10mM 甘氨酸, pH1.5 再生, 时间 5s, 重复 4 次。检测温度为 30 °C, 频率为 0.3Hz。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

- 5 FcγRIIIa_V158 与 BiAb004(hG1TM)和 BiAb004(hG1WT)的亲和力常数测定结果如下面的表 2 以及图 3、图 4 所示。

表 2: BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIIa_V158 结合的动力学参数

Sample ID	K _D (M)	kon(1/Ms)	S E (kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
BiAb004(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004(hG1WT)	1.77E-07	1.21E+05	1.64E+04	2.14E-02	3.71E-03	1.56-1.61

- 结果显示, BiAb004(hG1WT)可以与 FcγRI_V158 结合, 亲和力常数为 1.77E-07M; 而 BiAb004(hG1TM)由于与 FcγRIIIa_V158 没有结合信号或信号极低, 故未能获得相应数据, 认为其不与 FcγRIIIa_V158 结合。

结果表明, 相对于 BiAb004(hG1WT), BiAb004(hG1TM)被有效的消除了其与 FcγRIIIa_V158 的结合活性。

- 15 实验例 3: FcγRIIIa_F158 与 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)的亲和力常数测定

Fc 受体 FcγRIIIa_F158 (又名 CD16a_F158) 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合, 介导 ADCC。

- 20 本实验使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 BiAb004 (hG1WT), 和 BiAb004 (hG1TM)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数, 以评价各抗体的 ADCC 活性。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数实验方法简述如下: 样品稀释缓冲液为 PBS, 0.02%Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4。5μg/mL 的 FcγRIIIa_F158 固定在 HIS1K 传感器上, 时间 120s, 传感器在缓冲液中平衡 60s, 固定在传感器上的 FcγRIIIa_F158 与

各抗体结合，抗体浓度为 31.25 - 500nM (两倍稀释)，时间 60s，抗体在缓冲液中解离，时间 60s。传感器使用 10mM 甘氨酸，pH1.5 再生，时间 5s，重复 4 次。检测温度为 30 °C，频率为 0.3Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。

FcγRIIIa_F158 与 BiAb004(hG1TM)和 BiAb004(hG1WT)的亲和力常数测定结果如下面表 3 以及图 5、图 6 所示。

表 3: BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIIa_F158 结合的动力学参数

Sample ID	K _D (M)	kon(1/Ms)	S E(kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
BiAb004(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004(hG1WT)	2.21E-07	1.12E+05	1.39E+04	2.47E-02	3.43E-03	0.39-0.64

结果显示，BiAb004(hG1WT)可以与 FcγRIIIa_F158 结合，亲和力常数为 2.21E-07M；而 BiAb004(hG1TM)由于与 FcγRIIIa_F158 没有结合信号或信号极低没有结合，故未能获得相应数据，认为其不与 FcγRIII_F158 结合。

结果表明，相对于 BiAb004(hG1WT)，BiAb004(hG1TM)被有效的消除了其与 FcγRIIIa_F158 的结合活性。

实验例 4: FcγRIIa_H131 与 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)的亲和力常数测定

Fc 受体 FcγRIIa_H131 又名 (CD32a_H131) 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，介导 ADCC。

本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数，以评价各抗体的 ADCC 活性。

ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数实验方法简述如下：固化物稀释液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4，分析物稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4。5μg/mL 的 FcγRIIa_H131 固定在 NTA 传感器上，固定高度约为 1.0nm，传感器在 PBS，0.02%Tween-20，0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4 缓冲液中平衡 300s 以封闭传感器，固定在传感器上的 FcγRIIa_H131 与抗体结合，抗

体浓度为 12.5 - 200nM (两倍梯度稀释), 时间 60s, 抗体在缓冲液中解离, 时间 60s。传感器使用 10mM Glycine, pH1.7 和 10mM 硫酸镍再生。检测温度为 30 °C, 频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

FcγRIIa_H131 与 **BiAb004(hG1TM)**和 **BiAb004(hG1WT)**的亲和力常数测定结果如下面的表 4 以及图 7、图 8 所示。

表 4: **BiAb004(hG1WT)**和 **BiAb004(hG1TM)**与 **FcγRIIa_H131** 结合的动力学参数

Sample ID	K _D (M)	kon(1/Ms)	S E (kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
BiAb004(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004(hG1WT)	2.22E-08	3.83E+05	4.03E+04	8.49E-03	7.44E-04	0.96-1.63

结果显示, **BiAb004(hG1WT)**可以与 **FcγRIIa_H131** 结合, 亲和力常数为 2.22E-08M; 而 **BiAb004(hG1TM)**由于与 **FcγRIIa_H131** 没有结合信号或信号极低, 故未能获得相应数据, 认为其不与 **FcγRIIa_H131** 结合。

结果表明, 相对于 **BiAb004(hG1WT)**, **BiAb004(hG1TM)**被有效的消除了其与 **FcγRIIa_H131** 的结合活性。

实验例 5: **FcγRIIa_R131** 与 **BiAb004(hG1WT)**和 **BiAb004(hG1TM)**的亲和力常数测定

Fc 受体 **FcγRIIa_R131** (又名 **CD32a_R131**) 可与 **IgG** 抗体的 **Fc** 端结合, 介导 **ADCC**。

本实验使用 **Fortebio Octet** 分子相互作用仪检测 **BiAb004(hG1WT)** 和 **BiAb004(hG1TM)**与 **FcγRIIa_R131** 的亲和力常数, 以评价各抗体的 **ADCC** 活性。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 **BiAb004(hG1WT)**和 **BiAb004(hG1TM)**的亲和力常数实验方法简述如下: 固化物稀释液为 **PBS, 0.02%Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4**, 分析物稀释缓冲液为 **PBS, 0.02%Tween-20, 0.02%casein, 0.1%BSA, pH7.4**。5μg/mL 的 **FcγRIIa_R131** 固定在 **NTA** 传感器上, 固定高度约为 1.0nm, 传感器在 **PBS, 0.02%Tween-20, 0.02%casein, 0.1%BSA, pH7.4** 缓冲液中平衡 300s 以封闭传感器, 固定在传感器上的 **FcγRIIa_R131** 与抗体结合, 抗体浓度为 12.5 - 200nM (两倍梯度稀释), 时间 60s, 抗体在缓冲液中解离, 时间 60s。传感器使用 10mM Glycine, pH1.7 和 10mM 硫酸镍再生。检测温度为 30 °C, 频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析,

得到亲和力常数。

FcγRIIa_R131 与 BiAb004(hG1TM)和 BiAb004(hG1WT)的亲和力常数测定结果如下面的表 5 以及图 9、图 10 所示。

表 5: BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)
与 FcγRIIa_R131 结合的动力学参数

Sample ID	K _D (M)	kon(1/Ms)	S E(kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
BiAb004(hG1TM)	4.20E-08	3.72E+05	4.19E+04	1.56E-02	8.99E-04	0.16-0.36
BiAb004(hG1WT)	1.43E-08	3.58E+05	3.13E+04	5.10E-03	5.87E-04	0.66-1.34

结果显示, BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM))均可以与 FcγRIIa_R131 结合, 亲和力常数分别为 1.43E-08M, 4.20E-08M。

结果表明, BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIa_R131 均有结合活性。但图 9 和图 10 的结果显示, BiAb004(hG1WT)的结合信号高度较高, 亲和力也强于 BiAb004(hG1TM)。

实验例 6: FcγRIIb 与 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)的亲和力常数测定

Fc 受体 FcγRIIb (又名 CD32b) 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合, 负性调控免疫细胞的功能, 抑制免疫细胞的激活、增殖, 抑制细胞因子的分泌等。

本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIb 的亲和力常数, 以评价 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 Fc 受体的结合能力。

ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 FcγRIIb 的亲和力常数实验方法简述如下: 固化物稀释液为 PBS, 0.02%Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4, 分析物稀释缓冲液为 PBS, 0.02%Tween-20, 0.02%casein, 0.1%BSA, pH7.4。5 μg/mL 的 FcγRIIb 固定在 NTA 传感器上, 固定高度约为 1.0nm, 传感器在 PBS, 0.02%Tween-20, 0.02%casein, 0.1%BSA, pH7.4 缓冲液中平衡 300s 以封闭传感器, 固定在传感器上的 FcγRIIb 与抗体结合, 抗体浓度为 12.5 - 200nM (两倍梯度稀释), 时间 60s, 抗体在缓冲液中解离, 时间 60s。传感器使用 10mM Glycine, pH1.7 和 10mM 硫酸镍再生。检测温度为 30 °C, 频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析,

得到亲和力常数。

FcγRIIb 与 BiAb004(hG1TM)和 BiAb004(hG1WT)的亲和力常数测定结果如下面的表 6 以及图 11、图 12 所示。

表 6: BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)

5 与 FcγRIIb 结合的动力学参数

Sample ID	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	S E (k _{on})	k _{dis} (1/s)	S E(k _{dis})	R _{max} (nm)
BiAb004(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004(hG1WT)	5.61E-08	2.07E+05	1.54E+04	1.16E-02	4.33E-04	0.68-0.83

结果显示, BiAb004(hG1WT)可以与 FcγRIIb 结合, 亲和力常数分别为 5.61E-08M; 而 BiAb004(hG1TM)由于与 FcγRIIb 没有结合信号或信号极低, 故未能获得相应数据, 认为其不与 FcγRIIb 结合。

结果表明, 相对于 BiAb004(hG1WT), BiAb004(hG1TM)被有效的消除了其与
10 FcγRIIb 的结合活性。

实验例 7: C1q 与 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)的亲和力测定

血清补体 C1q 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合, 介导 CDC 效应。治疗性单克隆抗体与 C1q 结合的能力影响到该抗体的安全性和有效性。

15 本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测了 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)与 C1q 的亲和力常数, 以评价各抗体的 CDC 活性。实验例中采用抗 PDL1 抗体 5C10H2L2-IgG1mt 作为对照抗体, 其制备方法参照 PCT 公开 WO2017148424A1。

20 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体与 C1q 的亲和力常数实验方法简述如下: 样品稀释缓冲液为 PBS, 0.02% Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4。50μg/mL 的抗体固定在 FAB2G 传感器上, 固定高度约为 2.0nm, 传感器在缓冲液中平衡 60s, 固定在传感器上的抗体与抗原 C1q 结合, 抗原浓度为 1.25 - 20 nM (两倍梯度稀释), 时间 60s, 抗原抗体在缓冲液中解离, 时间 60s。传感器使用 10mM 甘氨酸, pH1.7 再生, 时间 5s, 重复 4 次。样品板震动速率为 1000 rpm, 检测温度为 30 度, 检测频率为 0.6Hz。
25 数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。数据采集软件为 ForteBio Data Acquisition

7.0, 数据分析软件为 Fortebio Data Analysis 7.0。

C1q 与 BiAb004(hG1TM)、BiAb004(hG1WT)以及 5C10H2L2-IgG1mt 的亲和力常数测定结果如下面的表 7 以及图 13、图 14、图 15 所示。

5 表 7: BiAb004(hG1WT)、BiAb004(hG1TM)和 5C10H2L2-IgG1mt 与 C1q 结合的动力学参数

Sample ID	K _D (M)	kon(1/Ms)	S E (kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
BiAb004 (hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BiAb004 (hG1WT)	2.53E-09	2.05E+06	2.10E+05	5.17E-03	5.81E-04	0.05-0.23
5C10H2L2-IgG1mt	4.43E-09	2.38E+06	4.21E+05	1.05E-02	1.10E-03	0.19-0.26

结果显示 BiAb004 (hG1WT))可以与 C1q 结合, 亲和力常数为 2.53E-09M; 而 BiAb004 (hG1TM)由于与 C1q 没有结合信号或信号极低, 故未能获得相应数据, 认为其不与 C1q 结合。

10 结果表明, 相对于 BiAb004 (hG1WT), BiAb004 (hG1TM)被有效的消除了其与 C1q 的结合活性。

实验例 8: BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)对表达 CTLA4 和 PD-1 抗原的 293T-CTLA4-PD1 细胞的 ADCC 活性检测

15 ADCC 效应是指具有杀伤活性的效应免疫细胞通过其表面表达的 Fc 受体 (FcR) 识别结合于靶细胞抗原上抗体的 Fc 段, 直接杀伤靶细胞。为检测抗 CTLA4-抗 PD-1 的双功能抗体 BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)的 ADCC 效应, 发明人构建了表达有 PD-1 和 CTLA4 抗原的 293T-CTLA4-PD1 细胞和原代 PBMC 共培养体系以检测抗体的 ADCC 活性。

20 BiAb004(hG1WT) 和 BiAb004(hG1TM)) 对表达 CTLA4 和 PD-1 抗原的 293T-CTLA4-PD1 细胞的 ADCC 活性检测, 方法具体如下:

按 Ficoll 外周血单个核细胞分离操作说明书分离获得正常人 PBMC, 分离后的 PBMC 用 RPMI-1640 完全培养基重悬, AO/PI 染色计数, 冻存。实验前一天, 复苏 PBMC, 计细胞数及活率, 于 37 °C、5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中孵育过夜; 实验当

天, 收集 293T-CTLA4-PD1 细胞、PBMC, 800rpm 或 1200rpm 离心 5min 后, 再用 RPMI-1640(含 1%FBS) (以下称培养基)重悬细胞, 洗涤细胞 2 次; 计细胞数及活率, 用培养基将细胞浓度调整到合适范围, 根据试验设计, 在 96 孔板中加入 100 μ l 293T-CTLA4-PD1 细胞 3.0E+04/孔; 加入 50 μ l 抗体室温预孵育 1 小时; 1 小时后加入 50 μ l PBMC, 9.0E+05/孔, 充分混匀; 37 °C、5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中孵育 4hrs。250xg 离心 5min; 小心吸取 100 μ l 细胞上清 (注意不要吸到板底细胞) 于新的 96 孔平底微量板中, 根据 Cytotoxicity Detection Kit 说明书每孔加入 100 μ l 现配的反应液, 室温避光孵育 30min。分别于 490nm 和 650nm 处测量 OD 值, 根据 ADCC (%) = (实验组-阴性对照组) / (靶细胞 LDH 最大释放-靶细胞 LDH 自发释放) $\times$ 100% 计算各组 ADCC 百分数。

BiAb004(hG1WT) 和 BiAb004(hG1TM) 对表达 CTLA4 和 PD-1 抗原的 293T-CTLA4-PD1 细胞的 ADCC 活性用 ADCC 百分数表示, 结果如图 16 所示。

结果显示, 在 PBMC 与 293T-CTLA4-PD1 混合培养体系中, 在同等剂量水平下, BiAb004 (hG1TM) 所诱导的 ADCC 百分数显著低于 BiAb004(hG1WT)。

结果表明, BiAb004(hG1TM) 无 ADCC 活性。

实验例 9: BiAb004(hG1TM)联合仑伐替尼抑制小鼠直结肠癌 MC38 细胞移植瘤增长

小鼠 MC38 细胞系为小鼠直结肠癌细胞系, 已被证实是 MC38 细胞系是研究人类 MSI-high/dMMR 肿瘤的有效模型 (Efremova M 等人. Nat Commun. 2018;9(1):32.)。

收集 MC-38 细胞 (购自上海鹿瑞生物科技有限公司) 将细胞浓度调整为 500 万/ml, 以 200 μ l/只的体积接种于 PD-1 转基因小鼠 (购自上海南方模式生物科技有限公司) 右侧腰窝皮下, 每只 1×10^6 个细胞, 共接种 12 只小鼠。当肿瘤体积达到 60-150mm³ 左右时, 将小鼠按照肿瘤体积平均分成 (各组平均体积大致相同, 平均肿瘤体积大约为 94mm³) 2 组, 模型组以及 BiAb004(hG1TM)联合仑伐替尼组, 每组 6 只小鼠。分组当天记为 D0, 抗体药在 D0、D4、D7、D10、D13 以及 D17 腹腔给药, 共 6 次; 仑伐替尼每天灌胃, 连续 20 天。肿瘤体积通过游标卡尺测量, 分组后每周两次使用游标卡尺测量肿瘤大小, 并根据计算公式 $TV=0.5 \times ab^2$ 计算肿瘤体积, 其中 a 是肿瘤的长径, b 是肿瘤的短径, TV 是肿瘤的体积。具体实验方案见表 8。

表 8: 实验设计

组别	动物数量	模型建立	给药方式
模型组	6	MC-38 细胞 100 万/200 μ l/只，皮下接种	anti-HEL 抗体，即同型对照抗体，1mg/kg，腹腔注射，每周两次，共 6 次
BiAb004(hG1TM)+仑伐替尼组	6		BiAb004(hG1TM) 1.33 mg/kg，腹腔注射，每周两次，共 6 次；仑伐替尼，5mg/kg，灌胃给药，每日一次，共 20 次

本实验中的同型对照抗体为人抗鸡蛋溶酶体抗体(human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, anti-HEL, 即 human IgG, 简称 hIgG)，其序列来自于 Acierno 等人发表的 Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies 中 Fab F10.6.6 序列的可变区序列 (Acierno 等人. J Mol Biol. 2007; 374(1): 130-46)。

实验结果如图 17 所示。

结果显示，BiAb004(hG1TM)与仑伐替尼联用显著抑制了 MC38 肿瘤的生长；BiAb004(hG1TM)与仑伐替尼联用对具有 MSI-high/dMMR 表型的直肠癌和/或结肠癌显著有效。

实验例 10：BiAb004(hG1TM)在 C57BL/6-hPD1/hPDL1/hCD73 小鼠结肠癌 MC38-hPDL1/hCD73 皮下移植模型中的药效学评价

雌性 C57BL/6-hPD1/hPDL1/hCD73 小鼠(购自南京集萃药康生物科技有限公司)，每组 8 只，每只小鼠右前肢皮下接种结肠癌 MC38-hPDL1/hCD73 细胞(购自南京集萃药康生物科技有限公司) (2×10^6 cells/100 μ L/只)。接种当天定义为 D0 天。按体重调整给药体积: 10 μ L/g * 小鼠体重 (g)。Isotype Control 对照抗体(制备方法和来源同实验例 9)或者 BiAb004 (hG1TM)均为腹腔给药；每周给药 2 次，给药 3 周，共计 6 次。实验中持续测量肿瘤，并按照：肿瘤体积 (mm^3) = (肿瘤长 * (肿瘤宽)²) / 2 的公式计算体积。

实验结果如图 18 所示下面的表 9 所示。

表 9：实验方案及分组

组别	剂量(mg/kg)	途径	频率	周期
Isotype Control	10	腹腔注射	每周两次，共给药三周	共 6 次
BiAb004 (hG1TM)	1			

结果显示，相对于同型对照抗体组，BiAb004 (hG1TM)组的肿瘤体积的增长受到抑制，说明 BiAb004 (hG1TM)显著地抑制了小鼠 MC38 细胞的增殖，能够有效地治疗结肠癌和/或直肠癌。

5 实验例 11: BiAb004(hG1WT)及 BiAb004(hG1TM)对 CHO-K1-PD1 的抗体介导的细胞吞噬的活性研究

Zhang 等人(Zhang T 等人. Cancer ImmunolImmunother. 2018;67(7):1079–1090.) 及 Dahan 等人 (Dahan R 等人. Cancer Cell. 2015; 28(3):285-95.) 的研究表明，靶向 PD-1、CTLA-4 等免疫检查点的抗体的 Fc 段与 Fc 受体结合会对抗体介导的抗癌活性产生负面影响，这可能是由于 Fc 依赖性效应子功能诱导的免疫细胞受损，其中抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 是导致免疫细胞损伤的重要机制。

为了检测 BiAb004 (hG1TM)的 ADCP 活性，以鼠源巨噬细胞为效应细胞，过表达相应抗原的细胞系为靶细胞，检测其介导 ADCP 效应。首先无菌取 C57BL/6 小鼠(购自广东省医学实验动物中心)股骨骨髓并经红细胞裂解液冰上裂解 5min，用 DMEM 完全培养基(含 10%FBS)终止裂解，1000 rpm 离心洗涤 2 次。将细胞沉淀用 10 mL DMEM 完全培养基重悬，并添加巨噬细胞集落刺激因子(Macrophage Colony stimulating Factor, M-CSF)至工作浓度为 100 ng/mL，于 37℃和 5%CO₂ 的细胞培养箱诱导培养 7 天，并于第 3 和第 5 天半量换液并补充 M-CSF。细胞于第 7 天诱导完成，经 0.25%胰酶消化，收集巨噬细胞，170xg 离心 5min，弃上清用 DMEM 完全培养基悬浮并计数，调整细胞密度并分装至灭菌 EP 管中，备用。

收集对数期 CHO-K1-CTLA4-PD1 细胞(基于 CHO-K1 细胞同时过表达人 CTLA4 和 PD1 抗原的细胞系，中山康方生物医药有限公司构建)，170xg 离心 5 min，经 PBS 洗涤后并重悬计数并测定活率。羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯 (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE) 用 PBS 稀释至 2.5 μM，取稀释后的 CFSE 重悬细胞(染色密度: 1000 万细胞/mL)，放置细胞培养箱孵育 20 min；加入 6mL 的 DMEM 完全培养基终止染色，170xg 离心 5 min，弃上清；加入 1mL DMEM 完全培养基重悬，

培养箱内孵育 10 min, 并调整至实验密度, 细胞命名为 CHO-K1-PD1-CTLA4-CFSE; 待测抗体用 DMEM 完全培养基稀释。同时设计同型对照抗体 anti-HEL 抗体和培养基分别作为同型对照组和空白对照组。按实验设计将稀释后的抗体和 CHO-K1-PD1-CTLA4-CFSE 细胞加至相应已含巨噬细胞的 1.5mL 的 EP 管中 (终体
5 积 100 μ L, 效应细胞与靶细胞比例为 5 万比 15 万, 抗体工作浓度为 50、5、0.5 nM) 并重悬混匀, 放置 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 2h。每管加 800 μ L 室温含 1% 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 的 PBS 溶液, 1200 $\times$ g 离心 5min, 弃上清; 用 800 μ L 的 1% PBSA 洗涤一次。APC anti-mouse/human CD11b antibody (Biolegend, 货号: 101212) 用
10 1% PBSA 400 倍稀释并按 100 μ L/样本加至相应样本中, 混匀, 冰上孵育 30min, 每个样本用 800 μ L 1% PBSA, 1200 $\times$ g 离心 5min 离心洗涤一次, 弃上清。每管加 200 μ L 1% PBSA 重悬细胞, 转移至流式上样管并用 BD FACSCalibur 流式仪检测分析。上机体系中巨噬细胞为 APC $^{+}$ 阳性, 发生吞噬作用的巨噬细胞则为 APC 和 CFSE 双阳性。以双阳性细胞数与 APC 阳性细胞数比例作为吞噬率, 并以此评价抗体介导的 ADCP 活性。

15 按如下公式计算各组 ADCP 活性, 以 P% 表示:

$$P\% = \frac{\text{发生吞噬作用巨噬细胞细胞数}}{\text{巨噬细胞总数}} \times 100\%$$

结果如图 19 所示。

结果显示, 在具有介导吞噬活性的抗体验证体系下, 与 BiAb004(hG1WT)相比, BiAb004(hG1TM)介导巨噬细胞吞噬 CHO-K1-PD1-CTLA4 细胞活性与同型对照抗体 anti-HEL 抗体相比无显著差异, 表明 BiAb004 (hG1TM)无 ADCP 活性。

20 结果表明, BiAb004(hG1TM)所引入的氨基酸突变能够有效地消除其 ADCP 效应, 获得了意料不到的技术效果。

实验例 12: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人胃癌细胞 KATO III 细胞的免疫反应

25 按照分离液 Ficoll-PaqueTM Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC, 分离后的 PBMC 计数, 冻存。Raji-PDL1、KATO III 细胞 (购自中国科学院上海细胞库) 用 DMEM+10%FBS 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, 0.5 μ g/mL SEB 活化两天。实验当天, Raji-PDL1 细胞用 2 μ g/mL 丝裂霉素 C (MMC) 处理 1 小时。收集 SEB 活化

两天的 PBMC 和 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗涤两次, RPMI 1640+10%FBS 完全培养基重悬计数, Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 收集对数生长期 KATO III 细胞, KATO III 细胞是 5×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板; 按实验设计加入稀释好抗体, 混匀置于 37°C , 5% CO_2 培养箱共培养 3 天。3 天后, 收集细胞培养上清, 按 ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。实验培养基均是 10%FBS+RPMI 1640。

结果如图 20 所示。

结果显示, 相较于 BiAb004(hG1WT), BiAb004(hG1TM)更加显著地增强了免疫细胞对人胃癌细胞 KATO III 细胞的免疫反应, 表现为 IL-2 的分泌水平显著增加, 具有治疗胃癌的潜力。

实验例 13: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人宫颈癌细胞 Hela 细胞的免疫反应

按照分离液 Ficoll-PaqueTM Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC, 分离后的 PBMC 计数, 冻存。Raji-PDL1, Hela 细胞 (购自中国科学院细胞中心) 用 RPMI 1640+10%FBS 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, $0.5\mu\text{g/mL}$ SEB 活化两天。实验当天, Raji-PDL1 细胞用 $2\mu\text{g/mL}$ MMC 处理 1 小时。收集 SEB 活化两天的 PBMC 和 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗涤两次, RPMI 1640+10%FBS 完全培养基重悬计数, Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 收集对数生长期 Hela 细胞, Hela 细胞是 5×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板; 按实验设计加入稀释好抗体, 混匀置于 37°C , 5% CO_2 培养箱共培养 3 天。3 天后, 收集细胞培养上清, 按 ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。实验培养基均是 10%FBS+RPMI 1640。

结果如图 21 所示。

结果显示, 相较于 BiAb004(hG1WT), BiAb004(hG1TM)更加显著地增强了免疫细胞对人宫颈癌细胞 Hela 细胞的免疫反应, 表现为 IL-2 的分泌水平显著增加, 具有治疗宫颈癌的潜力。

实验例 14: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人 T 淋巴细胞瘤细胞 Jurkat 细胞的免疫反应

按照分离液 Ficoll-PaqueTM Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC, 分离后

的 PBMC 计数, 冻存。Raji-PDL1, 人 T 淋巴细胞瘤细胞 Jurkat 细胞 (购自中国科学院细胞中心) 用 RPMI 1640+10%FBS 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, 0.5 μ g/mL SEB 活化两天。实验当天, Raji-PDL1 细胞用 2 μ g/mL MMC 处理 1 小时。收集 SEB 活化两天的 PBMC 和 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗涤两次, RPMI

5 1640+10%FBS 完全培养基重悬计数, Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 收集对数生长期 Jurkat 细胞, Jurkat 细胞是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 按实验设计加入稀释好抗体, 混匀置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱共培养 3 天。3 天后, 收集细胞培养上清, 按 ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。实验培养基均是 10%FBS+RPMI 1640。

10 结果如图 22 所示。

相较于 BiAb004(hG1WT), BiAb004(hG1TM)在消除了 ADCC、CDC 即 ADCP 的基础上, 还显著地增强了免疫细胞对人 T 淋巴细胞瘤细胞 Jurkat 细胞的免疫反应, 表现为 IL-2 的分泌水平显著增加; 与 BiAb004(hG1WT)相比具有相同甚至在 1.34nM 和 20nM 剂量水平具有更高的药理学活性, 具有治疗淋巴瘤的潜力。

15

实验例 15: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 细胞的免疫反应

按照分离液 Ficoll-PaqueTM Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC, 分离后的 PBMC 计数, 冻存。Raji-PDL1, CNE-2Z 细胞 (购自广州吉妮欧生物科技有限公司)

20 用 RPMI 1640+10%FBS 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, 0.5 μ g/mL SEB 活化两天。实验当天, Raji-PDL1 细胞用 2 μ g/mL MMC 处理 1 小时。收集 SEB 活化两天的 PBMC 和 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗涤两次, RPMI 1640+10%FBS 完全培养基重悬计数, Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 收集对数生长期 NCE-2Z 细胞, NCE-2Z 细胞是 3×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板; 按实验设计加入

25 稀释好抗体, 混匀置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱共培养 3 天。3 天后, 收集细胞培养上清, 按 ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。实验培养基均是 10%FBS+RPMI 1640。

结果如图 23 所示。

结果显示, 相较于 BiAb004(hG1WT), BiAb004(hG1TM)相当的或者更为显著地增强了免疫细胞对人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 细胞的免疫反应, 表现为 IL-2 的分泌水平显著增加, 特别是在 20nM 剂量水平具有显著的优势。

30

以上结果显示, BiAb004(hG1TM)在有效地去除了 ADCC、CDC 及 ADCP 效应的基础上, 与 BiAb004(hG1WT), 还具有更好或相当的药理学活性, 表明其具有治疗人鼻咽癌的潜力。

5 **实验例 16: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞的免疫反应**

按照分离液 Ficoll-Paque™ Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC, 分离后的 PBMC 计数, 冻存。Raji-PDL1, MDA-MB-231 细胞 (购自广州吉妮欧生物科技有限公司) 用 RPMI 1640+10%FBS 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, 0.5μg/mL SEB 活
10 化两天。实验当天, Raji-PDL1 细胞用 2μg/mL MMC 处理 1 小时。收集 SEB 活化两天的 PBMC 和 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗涤两次, RPMI 1640+10%FBS 完全培养基重悬计数, Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 收集对数生长期 MDA-MB-231 细胞, MDA-MB-231 细胞是 3×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板; 按实验设计加入稀释好抗体, 混匀置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱共培养 3 天。3
15 天后, 收集细胞培养上清, 按 ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。实验培养基均是 10%FBS+RPMI 1640。

结果如图 24 所示。

相较于 BiAb004(hG1WT), BiAb004(hG1TM)相等的或者更为显著地增强了免疫细胞对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的免疫反应, 表现为 IL-2 的分泌水平显著增加。

20 以上结果显示, BiAb004(hG1TM)在有效地去除了 ADCC、CDC 及 ADCP 效应的基础上, 与 BiAb004(hG1WT), 还具有更好或相当的药理学活性, 表明其具有治疗人乳腺癌的潜力。

25 **实验例 17: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对人间皮瘤细胞 NCI-H2452 细胞的免疫反应**

按照分离液 Ficoll-Paque™ Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC, 分离后的 PBMC 计数, 冻存。Raji-PDL1, NCI-H2452 细胞 (购自中国科学院上海细胞库) 用 RPMI 1640+10%FBS 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, 0.5μg/mL SEB 活化两天。实验当天, Raji-PDL1 细胞用 2μg/mL MMC 处理 1 小时。收集 SEB 活化两天的 PBMC
30 和 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗涤两次, RPMI 1640+10%FBS 完全培养

基重悬计数, Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 收集对数生长期 NCI-H2452 细胞, NCI-H2452 细胞是 3×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板; 按实验设计加入稀释好抗体, 混匀置于 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱共培养 3 天。3 天后, 收集细胞培养上清, 按 ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。实验培养基均是 $10\%\text{FBS}+\text{RPMI } 1640$ 。

5 结果如图 25 所示。

结果显示, 相较于 BiAb004(hG1WT), BiAb004(hG1TM)更为显著地增强了免疫细胞对人间皮瘤细胞 NCI-H2452 细胞的免疫反应, 表现为 IL-2 的分泌水平显著增加, 具有治疗间皮瘤的潜力。

10 实验例 18: BiAb004 (hG1TM)联合安罗替尼显著增强免疫细胞对人非小细胞肺癌细胞(人肺腺癌细胞)A549 细胞的免疫反应

按照分离液 Ficoll-PaqueTM Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC, 分离后的 PBMC 计数, 冻存。Raji-PDL1 细胞用 $\text{RPMI } 1640+10\%\text{FBS}$ 完全培养基常规培养, A549 细胞用 $\text{DMEM}+10\%\text{FBS}$ 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, $0.5\mu\text{g/mL}$ SEB 活化两天。实验当天, Raji-PDL1 细胞用 $2\mu\text{g/mL}$ MMC 处理 1 小时。收集 SEB 活化两天的 PBMC 和 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗涤两次, $1640+10\%\text{FBS}$ 完全培养基重悬计数, Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 收集对数生长期 A549 细胞 (来源于中国科学院细胞中心), A549 细胞是 5×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板; 按实验设计加入稀释好抗体和安罗替尼, 混匀置于 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱共培养 3 天。3 天后, 收集细胞培养上清, 按 ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。实验培养基均是 $10\%\text{FBS}+\text{RPMI } 1640$ 。

结果如图 26 所示, 相较于 BiAb004(hG1TM)单药、BiAb004(hG1WT)单药、BiAb004(hG1WT)联合盐酸安罗替尼, BiAb004(hG1TM)联合盐酸安罗替尼更为显著地增强了免疫细胞对人非小细胞肺癌细胞(人肺腺癌细胞)A549 细胞的免疫反应, 表现为 IL-2 的分泌水平显著增加, 具有治疗人非小细胞肺癌或人肺腺癌的潜力。

25 实验例 19: BiAb004 (hG1TM)联合安罗替尼显著增强免疫细胞对人小细胞肺癌细胞 NCI-H446 细胞的免疫反应

按照分离液 Ficoll-PaqueTM Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC, 分离后的 PBMC 计数, 冻存。Raji-PDL1, NCI-H446 细胞 (来源于中国科学院上海生命科学研究

究院)用 RPMI 1640+10%FBS 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, 0.5 μ g/mL SEB 活化两天。实验当天, Raji-PDL1 细胞用 2 μ g/mL MMC 处理 1 小时。收集 SEB 活化两天的 PBMC 和 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗涤两次, RPMI 1640+10%FBS 完全培养基重悬计数, Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 收集对数生长期 NCI-H446 细胞(来源于中国科学院上海生命科学研究院), NCI-H446 细胞是 8×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板; 按实验设计加入稀释好抗体和安罗替尼, 混匀置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱共培养 3 天。3 天后, 收集细胞培养上清, 按 ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。实验培养基均是 10%FBS+ RPMI 1640。

结果如图 27 所示。

相较于 BiAb004(hG1TM)单药、BiAb004(hG1WT)单药, 和 BiAb004(hG1WT)联合盐酸安罗替尼, BiAb004(hG1TM)联合盐酸安罗替尼显著地增强了免疫细胞对人小细胞肺癌细胞 NCI-H446 细胞的免疫反应, 表现为 IL-2 的分泌水平显著增加, 具有治疗人小细胞肺癌潜力。

15 实验例 20: BiAb004 (hG1TM)联合安罗替尼显著增强免疫细胞对人肺鳞癌细胞 NCI-H226 细胞的免疫反应

按照分离液 Ficoll-PaqueTM Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC, 分离后的 PBMC 计数, 冻存。Raji-PDL1, NCI-H226 细胞(来源于中国科学院上海生命科学研究院)用 RPMI 1640+10%FBS 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, 0.5 μ g/mL SEB 活化两天。实验当天, Raji-PDL1 细胞用 2 μ g/mL MMC 处理 1 小时。收集 SEB 活化两天的 PBMC 和 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗涤两次, RPMI 1640+10%FBS 完全培养基重悬计数, Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 收集对数生长期 NCI-H226 细胞, NCI-H226 细胞是 5×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板; 按实验设计加入稀释好抗体和安罗替尼, 混匀置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱共培养 3 天。3 天后, 收集细胞培养上清, 按 ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。实验培养基均是 10%FBS+ RPMI 1640。

结果如图 28 所示。

相较于 BiAb004(hG1WT)单药, BiAb004(hG1TM)单药更有效地显著地增强了免疫细胞对人肺鳞癌细胞 NCI-H226 细胞的免疫反应, 表现为 IL-2 的分泌水平显著增加。

并且,相较于 BiAb004(hG1WT)单药、BiAb004(hG1TM)单药, BiAb004(hG1TM)联合盐酸安罗替尼更为显著地增强了免疫细胞对人肺鳞癌细胞细胞 NCI-H226 细胞的免疫反应,并且与 BiAb004(hG1WT)联合盐酸安罗替尼药理学活性相当。

以上结果显示, BiAb004(hG1TM)在有效地去除了 ADCC、CDC 及 ADCP 效应的基础上,与 BiAb004(hG1WT)单药或者 BiAb004(hG1WT)联合安罗替尼相比,还具有更好或相当的药理学活性,表明其具有更好的治疗人肺鳞癌的效果。

实验例 21: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对 MSI-h/dMMR 表型的人结肠癌细胞 SW48 细胞的免疫反应

SW48 细胞为人结肠癌细胞系,被鉴定具有为 MSI-h/dMMR 表型的细胞 (Branch P 等人 (1995). Cancer Res 55 (11): 2304-2309.),被用于检测 BiAb004 (hG1TM)增强免疫细胞对 MSI-h/dMMR 表型的肿瘤的免疫反应。

实验中,按照分离液 Ficoll-Paque™ Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC,分离后的 PBMC 计数,冻存。Raji-PDL1 细胞用 RPMI 1640+10%FBS 完全培养基常规培养,SW48 细胞(来源于广州吉妮欧生物科技有限公司)用 DMEM+10%FBS 完全培养基常规培养。复苏 PBMC,0.5μg/mL SEB 活化两天。实验当天,Raji-PDL1 细胞用 2μg/mL MMC 处理 1 小时。收集 SEB 活化两天的 PBMC 和 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞,PBS 洗涤两次,RPMI 1640+10%FBS 完全培养基重悬计数,Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板;收集对数生长期 SW48 细胞,SW48 细胞是 2×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板;按实验设计加入稀释好抗体,混匀置于 37℃,5%CO₂ 培养箱共培养 3 天。3 天后,收集细胞培养上清,按 ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。实验培养基均是 10%FBS+ RPMI 1640

结果如图 29 所示。

相较于 anti-HEL 抗体,BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)均显著地增强了免疫细胞对 MSI-h/dMMR 表型的人结肠癌细胞 SW48 细胞的免疫反应,表现为 IL-2 的分泌水平显著增加。

以上结果显示, BiAb004(hG1TM)在有效地去除了 ADCC、CDC 及 ADCP 效应的基础上,与 BiAb004(hG1WT)相比,还具有更好或相当的药理学活性,表明其具有治疗 MSI-h/dMMR 表型的实体瘤特别是 MSI-h/dMMR 表型的结肠癌和/或直肠癌的潜力。

**实验例 22: BiAb004 (hG1TM)显著增强免疫细胞对非 MSI-h/dMMR 表型的人直
结肠癌细胞 SW 837 细胞的免疫反应**

SW 837 细胞为非 MSI-h/dMMR (即 MSS) 表型的人直结肠癌细胞 (Guo J 等人,
5 Cancer Res. 2011;71(8):2978-2987.), 在本实施例中用于检测 BiAb004 (hG1TM)增
强免疫细胞对非 MSI-h/dMMR 表型的肿瘤的免疫反应。

按照分离液 Ficoll-PaqueTM Plus 试剂说明书分离健康人外周血 PBMC, 分离后
的 PBMC 计数, 冻存。Raji-PDL1 细胞用 RPMI 1640+10%FBS 完全培养基常规培
养, SW837 细胞 (来源于上海弘顺生物科技有限公司) 用 10%FBS +Leibovitz's L-15
10 (来源于 Gibco) 完全培养基常规培养。复苏 PBMC, 0.5μg/mL SEB 活化两天。实验
当天, Raji-PDL1 细胞用 2μg/mL MMC 处理 1 小时。收集 SEB 活化两天的 PBMC 和
MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗涤两次, RPMI 1640+10%FBS 完全培养基重
悬计数, Raji-PDL1 和 PBMC 均是 1×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔板; 收集对数生长期
SW837 细胞, SW837 细胞是 5×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板; 按实验设计加入稀释好
15 抗体, 混匀置于 37°C, 5%CO₂ 培养箱共培养 3 天。3 天后, 收集细胞培养上清, 按
ELISA KIT 说明书进行 IL-2 检测。

实验培养基均是 10%FBS+RPMI 1640。

结果如图 30 所示。

相较于 anti-HEL 抗体, BiAb004(hG1WT)和 BiAb004(hG1TM)均显著地增强了免
20 疫细胞对非 MSI-h/dMMR 表型的人直结肠癌细胞 SW837 细胞的免疫反应; 其中, 在
高剂量组 BiAb004(hG1TM)的药理学活性优于 BiAb004(hG1WT), 表现为 IL-2 的分泌
水平显著增加。

以上结果显示, BiAb004(hG1TM)在有效地去除了 ADCC、CDC 或 ADCP 效应的
基础上, 与 BiAb004(hG1WT)相比, 还具有更好或相当的药理学活性, 表明其具有治
25 疗非 MSI-h/dMMR 表型的实体瘤特别是非 MSI-h/dMMR 表型的结肠癌和/或直肠癌
的潜力。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 本领域技术人员将会理解。根
据已经公开的所有教导, 可以对那些细节进行各种修改和替换, 这些改变均在本发明
30 的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。