

一种双特异性抗体及其用途

本申请要求申请日为 2020/6/30 的中国专利申请 202010618149.1 的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明涉及生物制药领域，尤其涉及一种双特异性抗体，特别是靶向 B7-H4 和 4-1BB 的双特异性抗体及其用途。

背景技术

B7-H4 (VTCN1, B7h.5, B7S1, B7x) 是一种隶属于 B7/CD28 超家族的跨膜蛋白。B7-H4 蛋白表达于激活的 T 细胞和 B 细胞、单核细胞和树突状细胞，有可能负调控 T 细胞的免疫应答。

尽管 B7-H4 mRNA 表达广泛，B7-H4 蛋白在大多数正常组织中无表达。但是，B7-H4 过表达于乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌的肿瘤细胞表面。乳腺癌是全球范围第二大的恶性肿瘤，且发病率逐渐上升。女性癌症患者中乳腺癌患者约占四分之一。美国乳腺癌患者 2019 年新增病例 32 万，总人数约 380 万，中国乳腺癌患者每年新增病例约 30 万，预估 2021 年患者人数达 250 万。卵巢癌、子宫内膜癌为女性生殖系统常见的恶性肿瘤。在中国，每年约 5 万女性确诊为卵巢癌，约 2 万死于卵巢癌，卵巢癌的死亡率占妇科恶性肿瘤之首。子宫内膜癌每年近 20 万的新发病例，在导致死亡的妇科恶性肿瘤中排三位。

B7-H4 还过表达于非小细胞肺癌和肾癌。肺癌为最常见的癌症之一，其中，非小细胞肺癌占肺癌的近 80%。无论在全球还是在中国，肺癌的发病率和致死率都居首位。2018 年全球肺癌新增病例约 200 万，死亡人数 176 万；中国每年新增病例约 78 万，死亡人数约 63 万。肾癌发病率较低，中国肾癌年发病患者约 7 万。

B7-H4 作为这些肿瘤的一个新兴靶点，近年来受到关注。B7-H4 抗体可以通过多种机制作用于肿瘤细胞，但是 B7-H4 抗体的研发方向主要集中在单克隆抗体和 ADC 上，目前尚无双特异性抗体疗法。

4-1BB(TNFRSF9, CD137) 是一种隶属于 TNF 受体超家族的跨膜蛋白。4-1BB 是在多种细胞上表达的共刺激分子，为免疫活性的多功能调节剂。其诱导表达于活化的 T 细胞、NK 细胞和单核细胞、树突状细胞、巨噬细胞、肿瘤相关血管内皮细胞等。其配体为 4-1BBL，主要表达在专职 APC 细胞（如单核巨噬细胞、DC 细胞、B 细胞）、活化的 T 细

胞及一些肿瘤细胞上。抗 4-1BB 激动性抗体可抑制肿瘤，但是 4-1BB 抗体的研发方向主要集中在单克隆抗体以及同时靶向 PD-L1 和 4-1BB 的抗体。目前，尚无处于临床开发阶段的靶向 B7-H4 和 4-1BB 的双特异性抗体。

百时美施贵宝(BMS)公司的 urelumab (BMS-663513)为抗 4-1BB 抗体的全人源 IgG4 抗体，是最早进入临床试验的抗 4-1BB 抗体。Urelumab 最初的临床结果发表于 2008 年，尽管有在部分患者上观察到令人鼓舞的疗效，但数据显示 Urelumab 具有肝毒性，且与靶标和剂量有关。严重的是，临床试验中有两位患者因肝毒性死亡，导致 Urelumab 作为单药的临床试验被终止。而靶向 PD-L1 和 4-1BB 的双特异性抗体目前还在临床一期阶段，且在肿瘤细胞上 PD-L1 的表达与 B7-H4 的表达重叠很少。因此，急需研发更加安全有效的同时靶向人的 B7-H4 和 4-1BB、并能结合食蟹猴的 B7-H4 和 4-1BB 的双特异性抗体。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是为克服现有技术中缺乏安全有效的同时靶向人的 B7-H4 和 4-1BB、并能结合食蟹猴的 B7-H4 和 4-1BB 的双特异性抗体的缺陷，提供一种双特异性抗体，特别是靶向 B7-H4 和 4-1BB 的双特异性抗体及其应用。

为解决上述技术问题，本发明提供以下技术方案。

本发明的第一方面提供一种双特异性抗体，其包括靶向 B7-H4 的抗原结合结构域和靶向 4-1BB 的抗原结合结构域。

较佳地，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域含有序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 46 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 HCDR3；序列如 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 59 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR3；或者，序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 60 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 HCDR3；优选包含序列如 SEQ ID NO: 142 所示、如 SEQ ID NO: 159 所示或者如 SEQ ID NO: 160 所示的 VH；更优选包含序列如 SEQ ID NO: 174 所示、如 SEQ ID NO: 191 所示或者如 SEQ ID NO: 192 所示的重链；

更佳地，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域还含有 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述的 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 112 或者 113 所示，所述的 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 118 所示，所述的 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 131~133 中任一一个所示；

进一步更佳地，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域还含有序列如 SEQ ID NO: 112

所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 131 所示的 LCDR3；序列如 SEQ ID NO: 113 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 132 所示的 LCDR3；或者序列如 SEQ ID NO: 112 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR3；优选还含有序列如 SEQ ID NO: 166~169 任一个所示的 VL；更优选还含有序列如 SEQ ID NO: 198~201 任一个所示的轻链。

在如上所述的双特异性抗体中：

所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域较佳地含有序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 46 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 HCDR3，序列如 SEQ ID NO: 112 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 131 所示的 LCDR3；序列如 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 59 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 98 所示的 HCDR3，序列如 SEQ ID NO: 113 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 132 所示的 LCDR3；或者，序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、序列如 SEQ ID NO: 60 所示的 HCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 HCDR3，序列如 SEQ ID NO: 112 所示的 LCDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 LCDR2 以及序列如 SEQ ID NO: 133 所示的 LCDR3。

更佳地，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域含有序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 166 所示的 VL；序列如 SEQ ID NO: 159 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 167 所示的 VL；序列如 SEQ ID NO: 160 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 168 所示的 VL；或者序列如 SEQ ID NO: 159 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 169 所示的 VL。

进一步更佳地，所述靶向 B7-H4 的抗原结合结构域含有序列如 SEQ ID NO: 174 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 198 所示的轻链；序列如 SEQ ID NO: 191 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 199 所示的轻链；序列如 SEQ ID NO: 192 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 200 所示的轻链；或者，序列如 SEQ ID NO: 191 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 201 所示的轻链。

关于所述靶向 B7-H4 的抗原结合结构域，其形式优选单个 VH、串联 VH、ScFv、Fab 或者 IgG 的形式。其中，所述的串联 VH 较佳地为 2 个以上 VH 串联，如 2 个、3 个或者 4 个。当为 IgG 形式时，其含有的恒定区较佳地来自含有突变 L234A、L235A 和 P329G 的人 IgG1 或者含有突变 L234A 和 L235A 的人 IgG1。

关于如上所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域,其含有 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 优选如下所述:

所述的 HCDR1 的序列如 SEQ ID NO: 19 或其变体 1、或者 SEQ ID NO: 14 所示,所述的 HCDR2 的序列如 SEQ ID NO: 49 或其变体 2、SEQ ID NO: 51 或者 SEQ ID NO: 43 所示,所述的 HCDR3 的序列如 SEQ ID NO: 86 或其变体、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 89 或者 SEQ ID NO: 81 所示; 其中:

所述的变体 1 的突变包括 T3I、S6N/R 以及 Y7F 中的一个或多个; 较佳地,所述变体 1 的序列优选如序列表中 SEQ ID NO: 17~18 以及 SEQ ID NO: 20~22 中任一个所示;

所述变体 2 的突变包括 S1N/D、G2S/A、S3D/G、G5D/F/S/V 以及 S6T/N/D 中的一个或多个; 所述变体 2 的序列优选如序列表中 SEQ ID NO: 47~48、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 52~58 以及 SEQ ID NO: 61 中的任一个所示;

所述的变体 3 的突变包括 G2R/D/A/K、S3A/T、S4G/N/A/T/H、E5T/V/M/G、T6A、D7G/S、H9Y/S、Y10H、Y11F、N12G/D 以及 V13I/M/T 中的一个或多个; 所述变体 3 的氨基酸序列优选如序列表中 SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 87~88 以及 SEQ ID NO: 90~95 中的任一个所示。

在具体实施方案中,所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域含有: 序列分别如 SEQ ID NO: 17、47 和 85 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;

或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 18、48 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 87 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 19、50 和 88 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 20、51 和 89 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 18、52 和 90 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 90 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 21、53 和 91 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 21、54 和 92 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 19、55 和 93 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 19、49 和 94 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 22、56 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 18、57 和 95 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 19、58 和 96 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;

或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 18、61 和 95 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
或者, 序列分别如 SEQ ID NO: 14、43 和 81 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;
较佳地, 所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域含有一个或者多个序列如 SEQ ID NO: 143~157、139、284 或者 161 所示的重链可变区。

更佳地, 所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列如 SEQ ID NO: 175~189、193、285 或者 171 所示的重链。

进一步更佳地, 所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域还包含序列分别如 SEQ ID NO: 109、118 和 128 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 较佳地, 包含序列如 SEQ ID NO: 163 所示的轻链可变区; 更佳地, 包含序列如 SEQ ID NO: 195 所示的轻链。

本发明中如上所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域可为本领域中的常规形式, 例如: 单个 VH 或者串联 VH 的形式、HCAb 的形式或者 ScFv 的形式; 所述的串联 VH 较佳地为 2 个以上 VH 串联, 如 2 个、3 个或者 4 个。

在本发明一具体实施方案中, 所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 109、118 和 128 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 14、43 和 81 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;

或者, 所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 113、118 和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 23、59 和 98 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 109、118 和 128 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 14、43 和 81 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;

所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 17、47 和 85 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;

所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、48 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3;

或者, 所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118

和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 87 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 19、50 和 88 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 20、51 和 89 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、52 和 90 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 21、53 和 91 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 21、54 和 92 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 19、55 和 93 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 19、49 和 94 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 22、56 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 131 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、46 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、57 和 95 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 133 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、60 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 17、47 和 85 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 133 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、60 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、48 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 133 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、60 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 133 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、60 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 19、49 和 94 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 112、118 和 133 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 16、60 和 84 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如

SEQ ID NO: 18、61 和 95 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 113、118 和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 23、59 和 98 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、48 和 86 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 113、118 和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 23、59 和 98 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 19、58 和 96 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 113、118 和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 23、59 和 98 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、57 和 95 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或者，所述的靶向 B7-H4 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 113、118 和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 和序列分别如 SEQ ID NO: 23、59 和 98 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述的靶向 4-1BB 的抗原结合结构域包含序列分别如 SEQ ID NO: 18、49 和 90 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

关于本发明所述的双特异性抗体，在本发明的具体实施方案中：

所述靶向 B7-H4 的抗原结构域为 IgG 的形式，所述靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为单个 VH 的形式；

或者，所述靶向 B7-H4 的抗原结构域为 IgG 的形式，所述靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为 ScFv 的形式；

或者，所述靶向 B7-H4 的抗原结构域为 IgG 的形式，所述靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为 2 个或者 3 个 VH 串联的形式；

或者，所述靶向 B7-H4 的抗原结构域为 Fab 的形式，所述靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为 HCAb 的形式或者为 HCAb 的形式和 VH 的形式（HCAb-VH 形式）；

或者，所述靶向 B7-H4 的抗原结构域为 Fab 的形式，所述靶向 4-1BB 的抗原结合结构域为 VH 的形式，所述 VH 的形式优选单个 VH、2 个或者 3 个 VH 串联的形式。

更具体地：

所述的双特异性抗体为如下形式：

（1）IgG 的 C 端连接有 ScFv，所述 ScFv 的 VH 连接于所述 C 端；较佳地，该形式

的双特异性抗体的多肽链 1 如式：VL_{B7-H4}-CL 所示，多肽链 2 如式：VH_{B7-H4}-CH1-铰链-CH2-CH3-接头-VH_{4-1BB}-接头-VL_{4-1BB} 所示；

(2) IgG 的 C 端连接有 VH 或者串联 VH；较佳地，该形式的双特异性抗体的多肽链 1 如式：VL_{B7-H4}-CL 所示，多肽链 2 如式：VH_{B7-H4}-CH1-铰链-CH2-CH3-接头-(VH_{4-1BB})_n 所示；

(3) HCAb 的 N 端连接有 Fab；较佳地，该形式的双特异性抗体的多肽链 1 如式：VH_{B7-H4}-CH1 所示，多肽链 2 如式：VL_{B7-H4}-CL-接头-VH_{4-1BB}-接头-CH2-CH3 所示；

(4) HCAb 的 N 端连接有 Fab，所述 Fab 的 C 端连接有 VH；较佳地，该形式的双特异性抗体的多肽链 1 如式：VH_{B7-H4}-CH1 所示，多肽链 2 如式：VL_{B7-H4}-CL-接头-VH_{4-1BB}-接头-CH2-CH3-VH_{4-1BB} 所示；

或者，(5) Fc 的 2 个 CH2 的 N 端分别连接有 Fab，以及 VH 或者串联 VH；较佳地，该形式的双特异性抗体含三条多肽链：

多肽链 1 如式：VL_{B7-H4}-CL 所示；

多肽链 2 如式：VH_{B7-H4}-CH1-铰链-CH2-CH3 所示；

多肽链 3 如式：VH_{4-1BB}-接头-CH2-CH3 或者 (VH_{4-1BB})_n-接头-CH2-CH3 所示；

其中，连接不同结构域的所述接头序列相同或者不同。

其中：所述 IgG 或者 HCAb 的 Fc 含有突变，优选含有如下突变之一：

1) 为 IgG1 时，根据 EU 编号的 L234A 和 L235A，可选地还含有 P329G、YTE 或者 DHS；其中，YTE 指的是 M252Y/S254T/T256E，DHS 指 309 位 L 突变为 D，311 位 Q 突变为 H，434 位 N 突变为 S。

2) 为 IgG1 时，根据 EU 编号的第 233~235 位的缺失；

3) 为 IgG1 时，根据 EU 编号的 L234A 和 G237A；

4) 为 IgG4 时，根据 EU 编号的 S228P 和 FALA；FALA 指 234 位 F 突变位 A，235 位 L 突变为 A；

5) 为 IgG1 时，根据 EU 编号的 N297A。

如上所述的铰链和所述的接头可为本领域常规，较佳地：所述的接头选自由 SEQ ID NO: 241~261、282 以及 288~289 构成的群组；其中：

形式 (1) 的接头优选含有如 SEQ ID NO: 245 所示的序列；

形式 (2) 的接头优选含有如 SEQ ID NO: 243、245~247 以及 SEQ ID NO: 288~289 任一所示的序列；

形式 (3) 的接头优选含有如 SEQ ID NO: 250 所示的序列；

形式（4）的接头优选含有如 SEQ ID NO: 282 所示的序列；

形式（5）的接头优选含有如 SEQ ID NO: 245 所示的序列。

在本发明一较佳实施例中，所述多肽链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 198 所示，且所述多肽链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 202~215 中任一个所示；

或者，所述多肽链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 201 所示，且所述多肽链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 217、230、238、240、226、262 或者 239 所示；

或者，所述多肽链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 200 所示，且所述多肽链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 218~225、235~237、263~268、274~281、286 以及 287 中任一个所示；

或者，所述多肽链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 201 所示，所述多肽链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 227 所示，且所述多肽链 3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 228、229、231 或者 232 所示；

或者，所述多肽链 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 233 所示，且所述多肽链 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 234、269~273 中的任一个所示。

本发明的第二方面提供一种分离的核酸，其编码如上第一方面所述的双特异性抗体。

本发明的第三方面提供一种包含如第二方面所述的分离的核酸的表达载体。

本发明的第四方面提供一种宿主细胞，其包含如第三方面所述的表达载体；优选地，所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。

本发明的第五方面提供一种双特异性抗体的制备方法，其包含培养如第四方面所述的宿主细胞，从培养物中获得所述双特异性抗体。

本发明的第六方面提供一种药物组合物，其包含如本发明第一方面所述的双特异性抗体。

本发明的第七方面提供如第一方面所述的双特异性抗体、第六方面所述的药物组合物在制备防治（预防和/或治疗）4-1BB 和/或 B7-H4 相关的疾病的药物中的应用。

其中所述的疾病优选癌症，所述的癌症优选乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、黑色素瘤、肺癌、胃癌、肝癌、食管癌、宫颈癌、头颈部肿瘤、胆管癌、胆囊癌、膀胱癌、肉瘤或者结直肠癌。较佳地，所述的癌症优选乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌或胆管癌。更佳地，所述的癌症优选乳腺癌。

本发明的第八方面提供一种嵌合抗原受体，其包含第一方面所述的双特异性抗体。

本发明的第九方面提供一种抗体药物偶联物，其包含细胞毒性剂，以及如第一方面所述的双特异性抗体；优选地，所述细胞毒性剂为 MMAF 或 MMAE。

本发明的第十方面提供一种试剂盒，其包括第一方面所述的双特异性抗体、第八方面所述的嵌合抗原受体、第九方面所述的抗体药物偶联物和/或第六方面所述的药物组合物；

优选地，所述试剂盒还包括(i)施用抗体或其抗原结合片段或抗体药物偶联物或药物组合物的装置；和/或(ii)使用说明。

本发明的第十一方面提供一种套装药盒，其包含药盒 A 和药盒 B，其中：

所述药盒 A 含有第一方面所述的双特异性抗体、第八方面所述的嵌合抗原受体、第九方面所述的抗体药物偶联物和/或第六方面所述的药物组合物；

所述药盒 B 含有其他抗肿瘤抗体或者包含所述其他抗肿瘤抗体的药物组合物，和/或由激素制剂、靶向小分子制剂、蛋白酶体抑制剂、成像剂、诊断剂、化疗剂、溶瘤药物、细胞毒性剂、细胞因子、共刺激分子的激活剂、抑制性分子的抑制剂以及疫苗组成的群组中的一种或多种。

本发明的第十二方面涉及一种诊断、治疗和/或预防 4-1BB 和/或 B7-H4 介导的疾病或病症的方法，所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的如第一方面所述的双特异性抗体、第八方面所述的嵌合抗原受体、第九方面所述的抗体药物偶联物和/或第六方面所述的药物组合物，或者使用第十一方面所述的套装药盒治疗有需要的患者。

其中，所述的疾病或病症较佳地为肿瘤，优选乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、黑色素瘤、肺癌、胃癌、肝癌、食管癌、宫颈癌、头颈部肿瘤、胆管癌、胆囊癌、膀胱癌、肉瘤或者结直肠癌；较佳地，所述的癌症优选乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌或胆管癌；更佳地，所述的癌症优选乳腺癌。

本发明的第十三方面涉及一种免疫检测或者测定 4-1BB 或者 B7-H4 的方法，其包括使用第一方面所述的双特异性抗体、第八方面所述的嵌合抗原受体、第九方面所述的抗体药物偶联物和/或第六方面所述的药物组合物检测样品；优选地，所述检测为非诊断和/或治疗目的的。

本发明的第十四方面涉及一种联合疗法，其包括分别向有需要的患者施用第一方面所述的双特异性抗体、第八方面所述的嵌合抗原受体、第九方面所述的抗体药物偶联物和/或第六方面所述的药物组合物，和第二治疗剂；所述第二治疗剂较佳地包含其他抗肿瘤抗体或者包含所述其他抗肿瘤抗体的药物组合物，和/或由激素制剂、靶向小分子制剂、蛋白酶体抑制剂、成像剂、诊断剂、化疗剂、溶瘤药物、细胞毒性剂、细胞因子、共刺激分子的激活剂、抑制性分子的抑制剂以及疫苗组成的群组中的一种或多种。

需知：本发明中关于“变体 1”、“变体 2”和“变体 3”中的数字没有特殊含义，仅

为区分相同术语。

本发明的 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体是一种特有的 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体，具有一个或两个或三个与 4-1BB 结合的位点；双特异性抗体的两个蛋白功能区均具有良好的结合食蟹猴的活性。

本发明的积极进步效果在于：

1、本发明的 4-1BB 抗体是一种全新的仅含“重链”的全人抗体，具有与人 4-1BB 和食蟹猴 4-1BB 结合的活性。该 4-1BB 重链抗体的大小只有传统 IgG 抗体的一半，由于不含轻链的这一特点，使得该抗体可以用于双特异性抗体，并解决了轻链错配和异源二聚化的问题。

2、本发明的 B7-H4 抗体是一种全新的全人抗体，具有与人 B7-H4 和食蟹猴 B7-H4 结合的活性。

3、本发明的双特异性抗体具有一个或两个或三个与 4-1BB 结合的位点，优化了 4-1BB 端的活性。

4、本发明通过靶向 B7-H4 特异性结合肿瘤细胞，降低 4-1BB 激活引起的毒性。

5、本发明是一种带有人 Fc 片段的双特异性抗体结构，保留了 Fc 与 FcRn 的结合作用，从而具有较长的半衰期。

附图说明

图 1 中(A)为 FACS 检测 B7-H4 单抗在高表达 B7-H4 的 SK-BR-3 细胞系上的体外结合；(B)为 FACS 检测 B7-H4 单抗在高表达食蟹猴 B7-H4 的 CHO-K1-食蟹猴 B7-H4 细胞系上的体外结合；(C)为 FACS 检测 B7-H4 单抗在高表达鼠 B7-H4 的 CHO-K1-鼠 B7-H4 细胞系上的体外结合。

图 2-(A)-(I)为 FACS 检测 4-1BB 单抗在高表达人 4-1BB 的 CHO-K1-人 4-1BB 细胞系上的体外结合。

图 3-(A)-(H) 为 FACS 检测 4-1BB 单抗在高表达食蟹猴 4-1BB 的 CHO-K1-食蟹猴 4-1BB 细胞系上的体外结合。

图 4-(A)-(E) 为 4-1BB 单抗激活 4-1BB 通路并诱导激活 T 细胞的功能。

图 5-(A)-(I)为 B7-H4×4-1BB 双特异性分子的结构示意图。

图 6-(A)-(L) 为 FACS 检测 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体在过表达人 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株上的体外结合。

图 7-(A)-(C) 为 FACS 检测 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体在过表达食蟹猴 4-1BB 的

CHO-K1 细胞株上的体外结合。

图 8-(A)-(K) 为 FACS 检测 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在高表达 B7-H4 的 SK-BR-3 细胞系上的体外结合。

图 9-(A)-(E)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在 B7-H4 高表达细胞系 SK-BR-3 存在时的 T 细胞激活实验以及细胞因子 IFN- γ 的释放。

图 10-(A)-(N)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在 B7-H4 高表达细胞系 SK-BR-3 存在时的 T 细胞激活实验以及细胞因子 IL-2 的释放。

图 11-(A)-(B)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体对 T 细胞的激活不依赖 Fc γ R 的存在。

图 12-(A)-(B)为 FACS 检测肿瘤细胞表面的 B7-H4 表达量。

图 13-(A)-(H)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双抗对 T 细胞激活特异性依赖 B7-H4 的表达。

图 14-(A)-(H)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双抗 PR003334 和 PR003335 及 PR004282 的血清稳定性。

图 15-(A)-(C)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双抗 PR004282 与人、猴及小鼠的 4-1BB 的体外结合。

图 16-(A)-(C)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双抗 PR004282 与人、猴及小鼠的 B7H4 的体外结合。

图 17 为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双抗 PR004282 与 SK-BR-3 及 CHO-K1/4-1BB 的体外同时结合。

图 18-(A)-(B)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双抗 PR004282 与体外激活的人、猴 Pan T 细胞的体外结合。

图 19-(A)-(B)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双抗 PR004282 与 B7 家族成员或 TNFR 家族其他成员的交叉反应结果

图 20-(A)-(C)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双抗 PR004282 的 ADCC 效应结果。

图 21-(A)-(C) 为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 的非特异性细胞因子的释放检测结果。

图 22-(A)-(F)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR003334 和 PR003335 及 PR004282 在野生型小鼠的药代动力学数据。

图 23 为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在正常猴体内的药代动力学数据(单剂量)。

图 24-(A)-(B)为 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR003334 在 BALB/c-hCD137 / CT26-B7-H4 小鼠模型中的抗肿瘤药效。

图 25-(A)-(B)为 B7-H4 × 4-1BB 双特异性抗体 PR003338 在 MDA-MB-468 异种移植小鼠模型中的抗肿瘤药效。

图 26-(A)-(B)为 B7-H4 × 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在 OVCAR3 异种移植小鼠模型中的抗肿瘤药效。

图 27-(A)-(I)为 B7-H4 × 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在 BALB/c-hCD137 / CT26-B7-H4 小鼠模型中的抗肿瘤药效和记忆性免疫效应结果。

图 28-(A)-(B) 为 B7-H4 × 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 的抗肿瘤药效的特异性结果。

具体实施方式

下面通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

在本申请中，术语“抗体”通常是指包含结合抗原的部分的蛋白质，以及任选地允许结合抗原的部分采用促进抗体与抗原结合的构象的支架或骨架部分。可典型地包含抗体轻链可变区（VL）、抗体重链可变区（VH）或上述两者。例如本申请中的“重链抗体”不含 VL 区，仅含 VH 区。VH 或 VL 区可进一步被区分为称为互补决定区（CDR）的高变区，它们散布在称为框架区（FR）的更保守的区域中。每个 VH 或 VL 可由三个 CDR 和四个 FR 区构成，它们从氨基端至羧基端可按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的实例包括但不限于全长抗体、重链抗体（HCAb）、抗原结合片段（Fab，Fab’、F(ab)2、Fv 片段、F(ab’)2、scFv、di-scFv 和/或 dAb）、免疫缀合物、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、抗体片段、抗体衍生物、抗体类似物或融合蛋白等，只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。

在本申请中，术语“可变”通常是指这样的事实，即抗体的可变结构域的序列的某些部分变化强烈，它形成各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，变异性并非均匀地分布在抗体的整个可变区中。它集中在轻链和重链可变区中的三个区段，称为 CDR 或高变区（HVR），FR 为可变域中更高度保守的部分。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR 区，大部分采用 β -折叠构型，通过三个 CDRs 连接，形成环连接，并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的 CDRs 通过 FR 区紧密靠近在一起，并与来自另一条链的 CDR 一起形成抗体的抗原结合位点，恒定区不直接参与抗体与

抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

在本申请中,术语“全人源抗体”通常是指将人类编码抗体的基因全部转移至基因工程改造的抗体基因缺失动物中,使动物表达的抗体。抗体所有部分(包括抗体的可变区和恒定区)均由人类来源的基因所编码。全人源抗体可以大大减少异源抗体对人体造成的免疫副反应。本领域获得全人源抗体的方法可以有噬菌体展示技术、转基因小鼠技术等。

在本申请中,术语“核酸”是指 DNA 分子和 RNA 分子。其可以是单链或双链的,但优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

在本申请中,术语“特异性结合”通常是指抗体通过其抗原结合域与表位结合,并且该结合需要抗原结合域和表位之间的一些互补性。根据该定义,当抗体相比于其将结合随机的,不相关的表位而言更容易通过其抗原结合域与表位结合时,抗体被称为“特异性结合”该抗原。

在本申请中,术语“Fab”通常指常规抗体(例如 IgG)中与抗原结合的部分,包括抗体的重链可变区 VH、轻链可变区 VL 和重链恒定区结构域 CH1 以及轻链恒定区 CL。在常规抗体中,VH 的 C 端与 CH1 的 N 端联结形成重链 Fd 片段,VL 的 C 端与 CL 的 N 端联结形成轻链,CH1 的 C 端又进一步与重链的铰链区和其他恒定区结构域联结形成重链。在一些实施例中,“Fab”也指 Fab 的变体结构。例如,在某些实施例中,VH 的 C 端与 CL 的 N 端联结形成一个多肽链,VL 的 C 端与 CH1 的 N 端联结形成另一个多肽链,形成 Fab(cross VH/VL) 的结构;在某些实施例中,Fab 的 CH1 不与铰链区联结,而是 CL 的 C 端与重链的铰链区联结,形成 Fab(cross Fd/LC) 的结构。

在本申请中,术语“VH”通常指抗体的重链可变区 VH 结构域,即可以是人或者其他动物的常规抗体(H2L2 结构)的重链可变区 VH,也可以是骆驼科等动物的重链抗体(HCAb 结构)的重链可变区 VHH,还可以是利用 Harbour HCAb 转基因小鼠产生的全人源重链抗体(HCAb 结构)的重链可变区 VH。

在本领域中,可以通过多种方法来定义抗体的 CDR,例如基于序列可变性的 Kabat 定义规则(参见,Kabat 等人,免疫学的蛋白质序列,第五版,美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(1991))和基于结构环区域位置的 Chothia 定义规则(参见,A1-Lazikani 等人,JMol Biol 273:927-48,1997)。本申请还可使用包含 Kabat 定义和 Chothia 定义的 Combined 定义规则确定可变结构域序列和全长抗体序列中的氨基酸残基(表 1)。在本发

明中，根据 Chothia 定义确定各序列。

表 1. 本申请抗体可用的 CDR 定义方法（可参见 <http://bioinf.org.uk/abs/>）

CDR 区	Kabat 定义	Chothia 定义	Combined 定义
LCDR1	L24--L34	L24--L34	L24--L34
LCDR2	L50--L56	L50--L56	L50--L56
LCDR3	L89--L97	L89--L97	L89--L97
HCDR1	H31--H35	H26--H32	H26--H35
HCDR2	H50--H65	H52--H56	H50--H65
HCDR3	H95--H102	H95--H102	H95--H102

其中，Laa-Lbb 可以指从抗体轻链的 N 端开始，第 aa 位（Chothia 编码规则）至第 bb 位（Chothia 编码规则）的氨基酸序列；Haa-Hbb 可以指从抗体重链的 N 端开始，第 aa 位（Chothia 编码规则）至第 bb 位（Chothia 编码规则）的氨基酸序列。例如，L24-L34 可以指从抗体轻链 N 端开始，按照 Chothia 编码规则的从第 24 位至第 34 位的氨基酸序列；H26-H32 可以指从抗体重链 N 端开始，按照 Chothia 编码规则的从第 26 位至第 32 位的氨基酸序列。本发明使用 Chothia 编码规则来定义抗体的 CDR。

抗体 Fc 结构域介导的效应子功能如 ADCC 和 CDC 也有非常重要的生物学功能，不同的 IgG 亚型有着不同的 ADCC 或 CDC 功能，例如 IgG1 和 IgG3 有较强的 ADCC 和 CDC 作用，而 IgG2 和 IgG4 的作用相对较弱。另外，通过氨基酸突变或者修饰来改变 Fc 与 Fc 受体的结合能力也可以调节 Fc 原有的效应子功能。例如，IgG1 中的“LALA”双突变体（L234A/L235A）能够显著降低与 FcγRIIIA（CD16A）的亲和力，进而降低 ADCC 作用。另外，P329G 突变能够显著降低与多种 Fcγ 受体的结合（参见，Schlothauer T, Herter S, Koller CF, Grau-Richards S, Steinhart V, Spick C, Kubbies M, Klein C, Umaña P, Mössner E. Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. *Protein EngDes Sel*. 2016 Oct;29(10):457-466. doi: 10.1093/protein/gzw040. Epub 2016 Aug 29. PubMed PMID: 27578889）。在申请中，为了减少 B7-H4 × 4-1BB 双特异性抗体与 Fcγ 受体的结合，这些抗体的 Fc 引入了“LALA”双突变体（L234A/L235A）或者“LALAPG”三突变体（L234A/L235A/P329G）。

实施例 1. 抗体的序列分析、表达纯化、和理化性质表征分析

1.1 抗体的序列分析和优化

抗体的重链可变结构域序列来源于染色体上重链基因群的胚系基因 V、D、J 基因片段的基因重排和体细胞高频突变等事件；轻链可变结构域序列来源于轻链基因群的胚系

基因 V、J 基因片段的基因重排和体细胞高频突变等事件。基因重排和体细胞高频突变是增加抗体多样性的主要因素。来源于相同胚系 V 基因片段的抗体也可能产生不同的序列，但总体上相似性较高。利用一些算法，例如 IMGT/DomainGapAlign (<http://imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>) 或者 NCBI/IgBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) 可以从抗体的可变结构域序列推测出其发生基因重排时可能的胚系基因片段。

蛋白质或多肽氨基酸链在细胞中翻译合成后有时会引入化学修饰，称为翻译后修饰 (PTM)。对于抗体而言，一些 PTM 的位点是非常保守的，例如，在人的 IgG1 抗体的恒定结构域的第 297 位 (EU 编号) 的保守的氨基酸天冬酰胺 Asn 通常会发生糖基化修饰形成糖链，而该糖链结构对于抗体结构和相关的效应功能是至关重要的。但是，如果在抗体的可变结构域尤其是抗原结合区域 (如 CDR) 中存在 PTM，那么这些 PTM 的存在有可能会对抗原的结合有较大的影响，也可能对抗体的物理化学性质带来变化。例如，糖基化、脱酰胺、异构化、氧化等都可能增加抗体分子的不稳定性或异质性，从而增加抗体开发的难度和风险。因而避免一些潜在的 PTM 对于治疗性抗体的开发是非常重要的。随着经验的积累，人们发现一些 PTM 是和氨基酸序列的组成尤其是相邻氨基酸组成的“模式”是高度相关的，这样使得可以从蛋白质的一级氨基酸序列预测出潜在的 PTM。例如，N-x-S/T (第一位是天冬酰胺，第二位是非脯氨酸以外的任意氨基酸，第三位是丝氨酸或者苏氨酸) 的序列模式预测出 N-连接糖基化位点。引起 PTM 的氨基酸序列模式有可能来源于胚系基因序列，例如人胚系基因片段 IGHV3-33 天然地在 FR3 区域存在糖基化模式 NST；也可能来源于体细胞高频突变。例如，NGS 或 NLT 可能是糖基化位点，NS 可能是脱酰胺位点，DG 可能引起天冬氨酸的异构化。

可以通过氨基酸突变来破坏 PTM 的氨基酸序列模式，从而降低或者去除特定 PTM 的形成。根据抗体序列和 PTM 序列模式的不同，有不同的突变设计方法。一种方法是将“热点”氨基酸 (如 NS 模式中的 N 或 S) 替换成物理化学性质相似的氨基酸 (如把 N 突变为 Q)。如果 PTM 序列模式来源于体细胞高频突变，而并不存在于胚系基因序列中，那么另一种方法可以是把该序列模式替换成对应的胚系基因序列。实际操作中，对同一个 PTM 序列模式可能采用多种突变设计方法。

1.2 抗体的表达和纯化

本实施例介绍了利用哺乳动物宿主细胞 (例如，人胚肾细胞 HEK293 或中国仓鼠卵巢细胞 CHO 及其衍生细胞)、瞬时转染表达和亲和捕获分离等技术来制备抗体的一般方法。本方法适用于含有 Fc 区的目标抗体；目标抗体可以由一条或多条蛋白质多肽链组成；

可以来源于一个或多个表达质粒。

将抗体多肽链的氨基酸序列通过密码子优化方法转换成核苷酸序列；合成编码的核苷酸序列并克隆到与宿主细胞兼容的表达载体上。将编码抗体多肽链的质粒按照特定比例同时转染哺乳动物宿主细胞，利用常规的重组蛋白表达和纯化技术，可以得到具有正确折叠和多肽链组装的重组抗体。具体地，将 FreeStyle™ 293-F 细胞 (Thermo, #R79007) 在 FreeStyle™ F17 Expression Medium 培养基 (Thermo, #A1383504) 中扩增。瞬时转染开始之前，调节细胞浓度至 $6-8 \times 10^5$ 细胞/ml，于 37℃ 8% CO₂ 摇床中培养 24 小时，细胞浓度在 1.2×10^6 细胞/ml。准备 30 ml 培养的细胞。将编码抗体多肽链的质粒按照一定比例混合共计 30 µg 质粒（质粒与细胞的比例为 1 µg : 1 ml）溶解于 1.5 ml Opti-MEM 减血清培养基 (Thermo, #31985088)，并用 0.22 µm 滤膜过滤除菌。再取 1.5 ml Opti-MEM 溶入 1 mg/ml PEI (Polysciences, #23966-2) 120 µl，静置 5 分钟。把 PEI 缓慢加入质粒中，室温孵育 10 分钟，边摇晃培养瓶边缓慢滴入质粒 PEI 混合溶液，于 37℃ 8% CO₂ 摇床中培养 5 天。5 天后观测细胞活率。收集培养物，以 3300g 转速离心 10 分钟后取上清；然后将上清高速离心去除杂质。用 PBS pH7.4 缓冲液平衡含有 MabSelect™ (GE Healthcare, #71-5020-91) 的重力柱 (Bio-Rad, #7311550)，2-5 倍柱体积冲洗。将上清样品过柱；用 5-10 倍柱体积的 PBS 缓冲液冲洗柱子，再用 pH3.5 的 0.1M 甘氨酸洗脱目的蛋白，随后用 pH8.0 的 Tris-HCl 调节至中性，最后用超滤管 (Millipore, #UFC901024) 浓缩换液至 PBS 缓冲液或者含有其他成分的缓冲液，得到纯化的重组抗体溶液。最后用 NanoDrop (Thermo, NanoDrop™ One) 测定浓度，分装、存储备用。

1.3 利用 SEC-HPLC 分析蛋白纯度和聚体

本实施例使用分析型分子尺寸排阻层析色谱法 (SEC) 来分析蛋白样品的纯度和聚体形式。将分析型色谱柱 TSKgel G3000SWxl (Tosoh Bioscience, #08541, 5 µm, 7.8 mm × 30 cm) 连接到高压液相色谱仪 HPLC (Agilent Technologies, Agilent 1260 Infinity II)，用 PBS 缓冲液室温下平衡至少 1 小时。适量蛋白样品（至少 10 µg）用 0.22 µm 滤膜过滤后注入系统，并设定 HPLC 程序：用 PBS 缓冲液将样品以 1.0 ml/分钟 的流速流过色谱柱，最长时间为 25 分钟。HPLC 将生成分析报告，报告出样品内不同分子尺寸组份的滞留时间。

1.4 利用 DSF 测定蛋白分子的热稳定性

差示扫描荧光法 (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) 是一种常用的高通量的测定蛋白质热稳定性的方法。它使用实时荧光定量 PCR 仪器通过监测与去折叠的蛋白分子结合的染料的荧光强度的变化，来反映蛋白质的变性的过程，从而反映出蛋白分子的热

稳定性。本实施例利用 DSF 方法来测定蛋白分子热变性温度 (T_m)。10 μ g 蛋白加入 96-孔 PCR 板 (Thermo, #AB-0700/W), 接着加入 2 μ l 100 $\times$ 稀释的染料 SYPRO™ (Invitrogen, #2008138), 然后加入缓冲液使得终体积为 40 μ l 每孔。将 PCR 板密封, 放置于实时荧光定量 PCR 仪器 (Bio-Rad CFX96 PCR System), 先于 25 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟, 然后以 0.2 $^{\circ}$ C/0.2 分钟 的梯度逐渐从 25 $^{\circ}$ C 升温至 95 $^{\circ}$ C, 在测试结束时将温度降至 25 $^{\circ}$ C。使用 FRET 扫描模式并使用 Bio-Rad CFX Maestro 软件进行数据分析并计算出样品的 T_m 。

实施例 2. 抗 B7-H4 全人源抗体的获得

Harbour H2L2 小鼠 (Harbour Antibodies BV) 是一种携带人免疫球蛋白免疫库的转基因小鼠, 其产生的抗体具有完整的人的抗体可变结构域和大鼠恒定结构域。

用可溶的重组人 B7-H4-ECD-mFc 融合蛋白 (Sino Biological, #10738-H05H) 对 Harbour H2L2 小鼠进行多轮免疫, 或者用过表达人 B7-H4 的 CHO-K1 细胞转染 mCD40L 后, 与免疫佐剂混合成免疫原试剂后对 Harbour H2L2 小鼠进行多轮免疫。

当检测小鼠血清中 B7-H4 特异的抗体滴度达到一定的水平后, 将小鼠的脾细胞取出。通过杂交瘤融合技术, B 细胞克隆技术和噬菌体库技术进行筛选, 对筛选获得的单克隆抗体进行进一步的鉴定, 根据其对 B7-H4 的结合能力、食蟹猴 B7-H4 的结合能力等参数, 选出 2 个克隆 80C8-2E9 和 1025_B-1H11。利用常规的测序手段获得编码抗体分子可变结构域的核苷酸序列以及对应的氨基酸序列。然后对候选抗体分子进行序列分析和优化, 得到数个变体序列。将抗体的 VL 和 VH 序列与相应的人的 κ 轻链恒定区和 IgG1 重链恒定区序列进行融合表达, 得到重组全人源抗体分子。

本实例中抗 B7-H4 的重组全人源 IgG 抗体列于表 2。

表 2. 抗 B7-H4 H2L2 抗体的序列编号 (CDR 都是按照 Chothia 规则定义)

抗体编号	备注	轻链	重链	VL	VH	LC DR1	LC DR2	LC DR3	HC DR1	HC DR2	HC DR3
PR001476	80C8-2E9 克隆	198	174	166	142	112	118	131	16	46	84
PR002037	1025_B-1H11 克隆	199	191	167	159	113	118	132	23	59	98
PR002408	PR001476 变体	200	192	168	160	112	118	133	16	60	84
PR002410	PR002037 变体	201	191	169	159	113	118	132	23	59	98

另外根据专利查询, (来自专利 WO2016040724A1), 又称 1D11.v1.9varC2, 设计了对照抗体 1, 在后续实验中作为对照:

表 3. B7-H4 对照抗体的序列编号 (SEQ ID NO:)

抗体名称	抗体编号	轻链	重链	VL	VH	LCD R1	LCD R2	LCD R3	HC DR1	HC DR2	HC DR3
阳性对照 1	PR000157	194	170	162	138	108	117	127	13	42	80

2.1 FACS 检测抗人 B7-H4 H2L2 单抗在细胞水平的结合能力

本实施例是为了研究抗人 B7-H4 的 H2L2 单抗体外结合人/食蟹猴/小鼠 B7-H4 的活性。采用过表达食蟹猴 B7-H4 的 CHO-K1 细胞株 (CHO-K1/cyno B7-H4, 和铂自制)、过表达小鼠 B7-H4 的 CHO-K1 细胞株 (CHO-K1/m B7-H4, 和铂自制) 和高表达人 B7-H4 的细胞系 SK-BR-3(ATCC® HTB-30) 进行细胞水平上的抗体结合实验。简言之, 消化 CHO-K1/cyno B7-H4 细胞、CHO-K1/m B7-H4 细胞或 SK-BR-3 细胞, 并用含 2% BSA 的 PBS 重悬。将细胞密度分别调整为 1×10^6 细胞/mL。以 100 μ L 细胞/孔接种于 96 孔 V 底板 (Corning, #3894), 随后加入 100 μ L/孔, 2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的待测抗体。将细胞放置于 4°C, 避光孵育 2 小时。之后, 加入 100 μ L/孔预冷含 2%BSA 的 PBS 漂洗细胞两次, 于 500 g、4°C 下离心 5 分钟, 弃上清。再加入 100 μ L/孔荧光二抗 (Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson, #109-545-06, 1:500 稀释), 4°C, 避光孵育 1 小时。用 100 μ L/孔预冷含 2% BSA 的 PBS 洗涤细胞两次, 于 500 g、4°C 下离心 5 分钟, 弃上清。最后, 200 μ L/孔预冷含 2%BSA 的 PBS 重悬细胞, 使用 ACEA Novocyte3000 流式细胞仪读取荧光发光信号值。

如图 1-(A)所示: B7-H4 抗体在高表达 B7-H4 的 SK-BR-3 细胞系上的体外结合; PR001476 和 PR002408 与 SK-BR-3 细胞系结合活性优于对照抗体 1。

如图 1-(B)所示: B7-H4 抗体在高表达食蟹猴 B7-H4 的 CHO-K1-食蟹猴 B7-H4 细胞系上的体外结合; PR001476 和 PR002408 与 CHO-K1-食蟹猴 B7-H4 细胞系结合活性优于对照抗体 1。

如图 1-(C)所示: B7-H4 抗体在高表达鼠 B7-H4 的 CHO-K1-鼠 B7-H4 细胞系上的体外结合; PR002410 与 CHO-K1-鼠 B7-H4 细胞系结合活性与对照抗体 1 没有显著差异。

实施例 3. 4-1BB 全人源抗体的获得

3.1 抗 4-1BB 全人源 HCAb 抗体的获得

Harbour HCAb 小鼠 (Harbour Antibodies BV, WO2010/109165A2) 是一种携带人免疫球蛋白免疫库的转基因小鼠, 能够产生仅有重链的抗体, 该抗体的大小只有传统 IgG

抗体的一半。其产生的抗体仅具有人的抗体重链可变结构域和小鼠 Fc 恒定结构域。

用可溶的重组人 4-1BB-Fc 融合蛋白 (睿智化学) 或者过表达了人 4-1BB 的 NIH-3T3 细胞 (睿智化学) 对 Harbour HCAb 小鼠进行多轮免疫。当检测小鼠血清中 4-1BB 特异的抗体滴度达到一定的水平后, 将小鼠的脾细胞取出分离 B 细胞, 用 BD FACS AriaII Cell Sorter 分选 CD138 阳性的浆细胞和人 4-1BB 抗原阳性的 B 细胞群。用常规的分子生物学手段从浆细胞中扩增人 VH 基因, 并将扩增的人 VH 基因片段构建到编码人 IgG1 抗体重链 Fc 区域序列的哺乳动物细胞表达质粒 pCAG 载体中。质粒转染哺乳动物宿主细胞 (如人胚肾细胞 HEK293) 进行表达, 得到全人源 HCAb 抗体上清。用 FACS 测试 HCAb 抗体上清与高表达人 4-1BB 的 CHO-K1 细胞 CHO-K1/hu4-1BB 的结合, 鉴定出阳性 HCAb 抗体。对这些 HCAb 抗体进行进一步的鉴定, 根据其对 4-1BB 的结合能力、食蟹猴 4-1BB 的结合能力、T 细胞激活能力等参数, 优选出数个候选 HCAb 抗体分子。然后对候选 HCAb 抗体分子进行序列分析和优化, 得到数个变体序列。将 HCAb 抗体的 VH 序列和人的 IgG1 重链 Fc 序列进行融合表达, 得到全人源重组 HCAb 抗体分子。其中, PR004469 是 PR001838 的 PTM 的变体, PR007381 为 PR004469 的胚系化变体, 具体突变位点见表 5。

表 4. 抗 4-1BB 的重组全人源 HCAb 抗体的序列表

抗体编号	重链	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
PR001758	175	143	17	47	85
PR001760	176	144	18	48	86
PR001763	177	145	18	49	87
PR001764	178	146	19	50	88
PR001767	179	147	20	51	89
PR001768	180	148	18	52	90
PR001771	181	149	18	49	90
PR001774	182	150	21	53	91
PR001780	183	151	21	54	92
PR001781	184	152	19	55	93
PR001830	185	153	18	49	86
PR001833	186	154	19	49	94
PR001836	187	155	22	56	86
PR001838	188	156	18	57	95
PR001840	189	157	19	58	96
PR001842	190	158	19	49	97
PR004469	193	161	18	61	95
PR007381	285	284	18	61	95

表 5. 4-1BB HCAb 序列的突变位点设计

初始抗体	变体	可变区突变	重组抗体亚型
PR001838	PR004469	G53A	人 IgG1
PR001838	PR007381	F37V, P40A, E42G, T43K, K46E, G53A	人 IgG1

3.2 抗 4-1BB 全人源 H2L2 抗体的获得

Harbour H2L2 小鼠 (Harbour Antibodies BV) 是一种携带人免疫球蛋白免疫库的转基因小鼠, 其产生的抗体具有完整的人的抗体可变结构域和大鼠恒定结构域。用可溶的重组人 4-1BB-Fc 融合蛋白对 Harbour H2L2 小鼠进行多轮免疫。当检测小鼠血清中 4-1BB 特异的抗体滴度达到一定的水平后, 将小鼠的脾细胞取出并与骨髓瘤细胞系融合得到杂交瘤细胞; 对杂交瘤细胞经过多轮筛选和克隆之后, 分离出表达抗-4-1BB 单克隆抗体分子的杂交瘤细胞株。利用常规的杂交瘤测序手段获得编码抗体分子可变结构域的核苷酸序列以及对应的氨基酸序列。然后对候选抗体分子进行序列分析和优化, 得到数个变体序列。将抗体的 VL 和 VH 序列与相应的人的 κ 轻链恒定区和 IgG1 重链恒定区序列进行融合表达, 得到重组全人源抗体分子。

表 6. 抗 4-1BB 的重组全人源 IgG 抗体序列表

抗体编号	轻链	重链	VL	VH	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
PR000448	195	171	163	139	109	118	128	14	43	81

另外根据专利查询, 设计了对照抗体, 在后续实验中作为对照:

表 7. 对照抗体序列表

抗体名称	抗体编号	轻链	重链	VL	VH	LCD R1	LCD R2	LCD R3	HC DR1	HC DR2	HC DR3
urelumab 类似物	PR000628	197	173	165	141	111	120	130	14	45	83
utomilumab 类似物	PR000483	196	172	164	140	110	119	129	15	44	82

3.3 FACS 检测抗人 4-1BB 单抗在细胞水平的结合能力

本实施例是为了研究抗人 4-1BB 的 HCAb 和 H2L2 单抗体外结合人和食蟹猴 4-1BB 的活性。采用过表达人 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株 (CHO-K1-hu 4-1BB, Genescript)、过表达食蟹猴 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株 (CHO-K1-cyno 4-1BB, Genescript) 进行细胞水平上的

抗体结合实验。简言之，消化细胞 CHO-K1-hu 4-1BB 和 CHO-K1-cyno 4-1BB 细胞，并用 DMEM 完全培养基重悬，将细胞密度分别调整为 1×10^6 细胞/mL。以 100 μ L 细胞/孔接种于 96 孔 V 底板（Corning, #: 3894），随后加入 100 μ L /孔，2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的待测抗体。将细胞放置于 4℃，避光孵育 1 小时。之后，加入 100 μ L /孔预冷 PBS 漂洗细胞两次，于 500 g、4℃ 下离心 5 分钟，弃上清。再加入 100 μ L /孔荧光二抗（Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson, #: 109-545-06, 1:500 稀释），4℃，避光孵育 30 分钟。用 100 μ L /孔预冷 PBS 洗涤细胞两次，于 500 g、4℃ 下离心 5 分钟，弃上清。最后，200 μ L /孔预冷 PBS 重悬细胞，使用 BD FACS CANTOII 读取荧光发光信号值。

图 2-(A)-(I)：4-1BB 抗体在高表达人 4-1BB 的 CHO-K1-人 4-1BB 细胞系上的体外结合；

图 3-(A)-(H)：4-1BB 抗体在高表达食蟹猴 4-1BB 的 CHO-K1-食蟹猴 4-1BB 细胞系上的体外结合。

如图 2-(A)-(I)所示，本发明的抗 4-1BB 的抗体均能结合人 4-1BB，且检测到的抗体结合能力与抗体浓度成正相关关系递增。与参照抗体（Urelumab 和 Utomilumab）相比，这些抗体能以较低的浓度更灵敏地结合人 4-1BB，与参照抗体 Utomilumab 和 Urelumab 的 EC₅₀ 相当。

如图 3-(A)-(H)所示，本发明的抗 4-1BB 的抗体均能结合猴 4-1BB，且检测到的抗体结合能力与抗体浓度成正相关关系递增。与参照抗体 Tab（Utomilumab）相比，这些抗体能以较低的浓度更灵敏地结合猴 4-1BB，与参照抗体 Utomilumab 的 EC₅₀ 相当或更优。而参照抗体 Urelumab 不具有与猴 4-1BB 交叉结合的活性。

3.4 抗原结合蛋白能在体外激活 4-1BB 通路

使用 10 μ g/ml 的丝裂霉素（北京中生瑞泰科技，#10107409001）处理过表达人 CD32b 的 CHO-K1 细胞（CHO-K1/CD32b, Genscript, # M00600），30 分钟 37℃。然后用含 10%FBS 的 F-12K 培养液，洗涤 4 次。把处理过的细胞放入 96 孔板里，每孔 1.5×10^4 个，37℃ 保温箱培养过夜。第二天，使用 MACS 试剂盒（Miltenyi Biotec, #130-096-535）从人 PBMC 里分离人 CD3 阳性 T 细胞。首先确定细胞数量，然后根据细胞数量加入相应量的 MACS 缓冲液和 Pan-T 细胞生物素抗体，混匀，4℃ 静置 5 分钟。然后加入相应量微磁珠，4℃ 静置 10 分钟。通过 LS 柱的是 CD3 阳性的 T 细胞。将前一天 96 孔板的培养液洗掉，加入纯化的 T 细胞，每孔 1×10^5 个。然后加入相应浓度的 4-1BB 抗体或者是对照抗体，加入 OKT3（eBiosciences, #16-0037-85）并且使其最终浓度达到 0.3 μ g/ml。37℃ 保温箱培

养 72 小时。72 小时后，收取上清液，使用 ELISA 试剂盒（Invitrogen，#88-7316-88）来检测 IFN- γ 的含量。在 96 平底板里加入包被抗体，4℃ 过夜。第二天加入 ELISA 缓冲液，室温 1 小时。加入收取的上清液，室温培养 2 小时。洗板 2 次，加入检测抗体，室温 1 小时。洗板两次，加入 HRP-链霉亲和素，室温孵育 1 小时。然后加入 TMB 底物，稍后加入 ELISA 终止液（BBI，#E661006-0200）。酶标仪（PerkinElmer，#Enspire）读取 450nm 和 570nm 吸光值（OD₄₅₀-OD₅₇₀），计算 IFN- γ 浓度。

结果如图 4-(A)-(E)：4-1BB 抗体具有激活 4-1BB 通路，并诱导激活 T 细胞的功能。PR001758, PR001760, PR001764, PR001771, PR001774, PR001780, PR001781, PR001830, PR001833, PR001836, PR001838, PR001840, PR000448 激活作用均比 utomilumab 更强，表现为 IFN- γ 的信号高于 utomilumab。

实施例 4. B7-H4×4-1BB 双特异性抗体的制备

自实施例 2 所选的抗 B7-H4 抗体和自实施例 3 所选的抗 4-1BB 抗体组合用于制备双特异性抗体，可以同时结合两个靶点，其中一端可以识别肿瘤细胞表面特异表达的 B7-H4，而另一端可以结合 T 细胞上的 4-1BB 分子。当 B7-H4×4-1BB 双抗分子结合到肿瘤细胞表面后，可以招募并激活肿瘤细胞附近的 T 细胞，从而杀死肿瘤细胞。

本实施例制备的 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体包括多种分子结构：

图 7-(A)-(I)是本发明的双特异性分子的结构示意图。

4.1 构建 IgG-scFv 四价对称结构的双特异性抗体

利用抗 B7-H4 的 H2L2 抗体和抗 4-1BB 的 H2L2 抗体构建 IgG-scFv 四价对称结构的双特异性抗体。IgG-scFv 四价对称结构（如图 5-（A）所示）的结合蛋白包含两条多肽链：多肽链 1，也称短链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL；多肽链 2，也称长链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_A-CH1-h-CH2-CH3-L1-VH_B-L2-VL_B。h 是 IgG 抗体的铰链区或衍生序列。多肽链 2 的连接肽 L1 和连接肽 L2 可以是表 8 中所列序列。

4.2 构建 IgG-VH 四价对称结构的双特异性抗体

利用抗 B7-H4 的 H2L2 抗体和抗 4-1BB 的 HCAb 抗体构建 IgG-VH 四价对称结构的双特异性抗体。IgG-VH 四价对称结构（如图 5-（B）所示）的结合蛋白包含两条多肽链：多肽链 1，也称短链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL；多肽链 2，也称长链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_A-CH1-h-CH2-CH3-L-VH_B。h 是 IgG 抗体的铰链区或衍生序列。在一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 与 VH_B 直接融合联结，即 L 的长

度为 0。在另一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 经由连接肽 L 联结到 VH_B；L 可以是表 8 中所列序列。

4.3 构建 IgG-VH-VH 六价对称结构的双特异性抗体

利用抗 B7-H4 的 H2L2 抗体和抗 4-1BB 的 HCAb 抗体构建 IgG-VH-VH 六价对称结构的双特异性抗体。IgG-VH-VH 六价对称结构（如图 5-（C）所示）的结合蛋白包含两条多肽链：多肽链 1，也称短链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL；多肽链 2，也称长链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_A-CH1-h-CH2-CH3-L1-VH_B-L2-VH_B。h 是 IgG 抗体的铰链区或衍生序列。在一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 与 VH_B 直接融合联结，即 L 的长度为 0。在另一个实施方案中，多肽链 2 的连接肽 L1 和 L2 可以是表 8 中所列序列。

4.4 构建 Fab-HCAb 结构的双特异性抗体分子

利用抗 B7-H4 的 H2L2 抗体和抗 4-1BB 的 HCAb 抗体构建 Fab-HCAb 对称结构的双特异性抗体，包含两种不同的结构 Fab(CL)-VH-Fc（如图 5-（D）所示）Fab(CH)-VH-Fc（如图 5-（E）所示）。Fab(CL)-VH-Fc 的结合蛋白包含两条多肽链，多肽链 1，也称短链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_A-CH1；多肽链 2，也称长链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL-L1-VH_B-L2-CH2-CH3。多肽链 2 的连接肽 L1 和 L2 可以是表 8 中所列序列。Fab(CH)-VH-Fc 的结合蛋白包含两条多肽链，多肽链 1，也称短链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL；多肽链 2，也称长链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_A-CH1-L1-VH_B-L2-CH2-CH3。多肽链 2 的连接肽 L1 和 L2 可以是表 8 中所列序列。

4.5 构建 Fab-Fc-VH(n) 非对称结构

利用抗 B7-H4 的 H2L2 抗体和抗 4-1BB 的 HCAb 抗体构建 Fab-Fc-VH(n)非对称结构的双特异性抗体。Fab-Fc-VH(n)非对称结构（如图 5-（F）（G）（H）所示）的结合蛋白包含三条多肽链，多肽链 1，也称短链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL；多肽链 2，也称长链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_A-CH1-h-CH2-CH3；多肽链 3，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_B-h-CH2-CH3，或者多肽链 3，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_B-L-VH_B-h-CH2-CH3，或者多肽链 3，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_B-L1-VH_B-L2-VH_B-h-CH2-CH3。h 是 IgG 抗体的铰链区或衍生序列。多肽链 3 的连接肽 L1 和 L2 可以是表 8 中所列序列。

为了将具有错配的重链（例如抗 4-1BB 抗体的两条重链或者抗 B7-H4 的两条重链的

错配)的副产物形成最小化,使用了突变的异源二聚体 Fc 区,其携带“knob-hole”突变和改造的二硫键,如 WO2009080251 和 WO2009080252 中所述。

4.6 构建 Fab-VH-Fc-VH 对称结构

利用抗 B7-H4 的 H2L2 抗体和抗 4-1BB 的 HCAb 抗体构建 Fab-VH-Fc-VH 对称结构的双特异性抗体。Fab-VH-Fc-VH 对称结构(如图 5-(I)所示)的结合蛋白包含两条多肽链,多肽链 1,也称短链,从氨基末端到羧基末端,其包含 VL_A-CL;多肽链 2,也称长链,从氨基末端到羧基末端,其包含 VH_A-CH1-L1-VH_B-CH1-h-CH2-CH3-VHB。h 是 IgG 抗体的铰链区或衍生序列。多肽链 3 的连接肽 L1 和 L2 可以是表 8 中所列序列。表 11-(B)中的 PR007379 涉及到的 PR002408(H:gm)与 PR002408 的 CDR 相同,可变区 VH 的 FR2 有 2 个突变,分别为 T69I, E101G。

表 8. 连接肽序列表

连接肽名字	连接肽长度	连接肽序列	序列编号 SEQ ID NO:
GS_4	4	GSGS	241
GS_5	5	GGGGS	242
GS_6	6	GGSGGS	243
GS_7	7	GGGGSGS	244
GS_15	15	GGGGSGGGSGGGGS	245
GS_20	20	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	246
GS_25	25	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	247
人 IgG1 铰链	15	EPKSCDKTHTCPPCP	248
人 IgG1 铰链 (C220S)	15	EPKSSDKTHTCPPCP	249
H1_15	15	EPKSSDKTHTPPPPP	250
G5-LH	15	GGGGGDKTHTCPPCP	251
H1_15-RT	17	EPKSSDKTHTPPPPRT	252
L-GS_15-RT	18	LGGGGSGGGSGGGGSRT	253
L-H1_15-RT	18	LEPKSSDKTHTPPPPRT	254
KL-H1_15-RT	19	KLEPKSSDKTHTPPPPRT	255
KL-H1_15-AS	19	KLEPKSSDKTHTPPPPAS	256
RT-GS_5-KL	9	RTGGGGSKL	257
RT-GS_15-KL	19	RTGGGGSGGGSGGGGSKL	258

RT-GS_25-KL	29	RTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS KL	259
EPKSSD	6	EPKSSD	260
AS-GS_15	17	ASGGGGSGGGSGGGGS	261
H2_13	13	ERKCCVECP	282
GS_2	2	GS	
(G2S)2	6	GGSGGS	288
(G4S)2	10	GGGGSGGGGS	289

本发明所得双抗分子的多肽链的氨基酸序列在序列表中如下所示。

表 9. 本发明所得双抗分子序列表

抗体编号	多肽链 1	多肽链 2	多肽链 3
PR002789	198	202	
PR002972	201	217	
PR002790	198	203	
PR002791	198	204	
PR002792	198	205	
PR002793	198	206	
PR002794	198	207	
PR002795	198	208	
PR002798	198	209	
PR002800	198	210	
PR002801	198	211	
PR002802	198	212	
PR002804	198	213	
PR002805	198	214	
PR002806	198	215	
PR002808	198	216	
PR003334	200	218	
PR003335	200	219	
PR003336	200	220	
PR003337	200	221	
PR003338	200	222	
PR004162	201	230	
PR004357	201	238	
PR004359	201	240	
PR004280	200	235	
PR004281	200	236	
PR004282	200	237	
PR003487	200	223	
PR003488	200	224	

PR003489	200	225	
PR004158	201	226	
PR004358	201	239	
PR004160	201	227	228
PR004161	201	227	229
PR004181	201	227	231
PR004182	201	227	232
PR004279	233	234	
PR004995	201	262	
PR005183	200	263	
PR005184	200	264	
PR005185	200	265	
PR005186	200	266	
PR005187	200	267	
PR005188	200	268	
PR005189	233	269	
PR005190	233	270	
PR005827	200	274	
PR005828	200	275	
PR005829	200	276	
PR005830	200	277	
PR005649	233	271	
PR005650	233	272	
PR005651	233	273	
PR005838	200	278	
PR005839	200	279	
PR005866	200	280	
PR007165	200	281	
PR007379	200	286	
PR007380	200	287	

B7-H4×4-1BB 双特异性抗体为的抗原结构域的 CDR 序列编号如下表所示，表 10 中 1#序号为结合 B7-H4 的抗原结构域，2#序号为结合 4-1BB 的抗原结构域。

表 10. 双抗的抗原结合结构域的 CDR 序列编号(SEQ ID NO:)

结构编号	抗体编号	抗原结合域序号	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
A	PR002789	#1	112	118	131	16	46	84
		#2	109	118	128	14	43	81
A	PR002972	#1	113	118	132	23	59	98
		#2	109	118	128	14	43	81
B	PR002790	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				17	47	85
B	PR002791	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				18	48	86

B	PR002792	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				18	49	87
B	PR002793	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				19	50	88
B	PR002794	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				20	51	89
B	PR002795	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				18	52	90
B	PR002798	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				21	53	91
B	PR002800	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				21	54	92
B	PR002801	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				19	55	93
B	PR002802	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				18	49	86
B	PR002804	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				19	49	94
B	PR002805	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				22	56	86
B	PR002806	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				18	57	95
B	PR002808	#1	112	118	131	16	46	84
		#2				19	49	97
B	PR003334	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				17	47	85
B	PR003335	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				18	48	86
B	PR003336	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				18	49	86
B	PR003337	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				19	49	94
B	PR003338, PR004280, PR004281, PR004282, PR005183, PR005184, PR005185, PR005186, PR005187, PR005188, PR005827, PR005828, PR005829, PR005830, PR005838,	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				18	61	95

	PR005839, PR005866							
B	PR004162	#1	113	118	132	23	59	98
		#2				18	48	86
B	PR004357	#1	113	118	132	23	59	98
		#2				19	58	96
B	PR004359	#1	113	118	132	23	59	98
		#2				18	57	95
B	PR004995	#1	113	118	132	23	59	98
		#2				18	61	95
C	PR003487, PR003488, PR003489	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				18	48	86
C	PR004158	#1	113	118	132	23	59	98
		#2				18	48	86
C	PR004358	#1	113	118	132	23	59	98
		#2				19	58	96
D	PR004279, PR005189, PR005649	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				18	48	86
D	PR005190	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				18	61	95
E	PR007165	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				18	48	86
G	PR004160	#1	113	118	132	23	59	98
		#2				18	48	86
H	PR004161	#1	113	118	132	23	59	98
		#2				18	48	86
H	PR004181	#1	113	118	132	23	59	98
		#2				18	49	90
H	PR004182	#1	113	118	132	23	59	98
		#2				19	58	96
I	PR005650	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				18	48	86
I	PR005651	#1	112	118	133	16	60	84
		#2				18	61	95

表 11-(A)-(F)是本发明的双特异性抗体分子结构信息。

表 11-(A):具有 IgG-scFv 对称结构的 B7-H4 × 4-1BB 双抗分子

双抗分子	B7-H4 抗体 (IgG)	4-1BB 抗体 (scFv)	scFv 端结构	第一连接肽 (Fc 和 scFv 之间)	第二连接肽 (VH _B 和 VL _B 之间)	Fc 类型 (突变)	第一连接肽长度	第二连接肽长度
PR002789	PR001476	PR000448	VH-连接肽-VL	H1 ₁₅ -RT	GS ₁₅	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17	15
PR002972	PR002410	PR000448	VH-连接肽-VL	H1 ₁₅ -RT	GS ₁₅	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17	15

表 11-(B): 具有 IgG-VH 四价对称结构的 B7-H4 × 4-1BB 双抗分子

双抗分子	B7-H4 抗体 (IgG)	4-1BB 抗体 (VH _B)	VH _B 相对 IgG 位置	连接肽 (VH _B 和 IgG 之间)	Fc 类型 (突变)	连接肽长度
PR002790	PR001476	PR001758	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002791	PR001476	PR001760	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002792	PR001476	PR001763	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002793	PR001476	PR001764	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002794	PR001476	PR001767	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002795	PR001476	PR001768	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002798	PR001476	PR001774	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002800	PR001476	PR001780	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002801	PR001476	PR001781	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002802	PR001476	PR001830	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002804	PR001476	PR001833	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002805	PR001476	PR001836	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002806	PR001476	PR001838	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR002808	PR001476	PR001842	重链 C 端	H1 ₁₅ -RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17

PR003334	PR002408	PR001758	重链 C 端	H1_15-RT	人 IgG1 (L234A, L235A)	17
PR003335	PR002408	PR001760	重链 C 端	H1_15-RT	人 IgG1 (L234A, L235A)	17
PR003336	PR002408	PR001830	重链 C 端	H1_15-RT	人 IgG1 (L234A, L235A)	17
PR003337	PR002408	PR001833	重链 C 端	H1_15-RT	人 IgG1 (L234A, L235A)	17
PR003338	PR002408	PR004469	重链 C 端	H1_15-RT	人 IgG1 (L234A, L235A)	17
PR004162	PR002410	PR001760	重链 C 端	H1_15-RT	人 IgG1 (L234A, L235A)	17
PR004357	PR002410	PR001840	重链 C 端	H1_15-RT	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17
PR004359	PR002410	PR001838	重链 C 端	H1_15-RT	人 IgG1 (L234A, L235A)	17
PR004280	PR002408	PR004469	重链 C 端	EPKSSD	人 IgG1 (L234A, L235A)	6
PR004281	PR002408	PR004469	重链 C 端	无	人 IgG1 (L234A, L235A)	0
PR004282	PR002408	PR004469	重链 C 端	GS_6	人 IgG1 (L234A, L235A)	6
PR004995	PR002410	PR004469	重链 C 端	无	人 IgG1 (L234A, L235A)	0
PR005183	PR002408	PR004469	重链 C 端	无	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	0
PR005184	PR002408	PR004469	重链 C 端	无	人 IgG1 (del233-235)	0
PR005185	PR002408	PR004469	重链 C 端	无	人 hIgG4(S228P,FALA)	0
PR005186	PR002408	PR004469	重链 C 端	无	人 IgG1 (L234A, G237A)	0
PR005187	PR002408	PR004469	重链 C 端	无	人 IgG1 (LALA,YTE)	0
PR005188	PR002408	PR004469	重链 C 端	无	人 IgG1 (LALA,DHS)	0
PR005827	PR002408	PR004469	重链 C 端	(G4S)2	人 IgG1 (L234A, L235A)	10
PR005828	PR002408	PR004469	重链 C 端	GS_15	人 IgG1 (L234A, L235A)	15
PR005829	PR002408	PR004469	重链 C 端	GS_20	人 IgG1 (L234A, L235A)	20
PR005830	PR002408	PR004469	重链 C 端	GS_25	人 IgG1 (L234A, L235A)	25
PR005838	PR002408	PR004469	重链 C 端	GS_6	人 IgG1 (L234A, L235A, G237A)	6
PR005839	PR002408	PR004469	重链 C 端	GS_6	人 IgG1 (L234A, G237A)	6
PR005866	PR002408	PR004469	重链 C 端	(G4S)2	人 IgG1 (N297A)	10

PR007379	PR002408 (H:gm)	PR004469 VH	重链 C 端	(G2S)2	人 IgG1 (L234A, L235A)	6
PR007380	PR002408 (H:gm)	PR004469- VH_gm	重链 C 端	(G2S)2	人 IgG1 (L234A, L235A)	6

表 11-(C):具有 IgG-VH-VH 六价对称结构的 B7-H4 x 4-1BB 双抗分子

双抗分子	B7-H4 抗体 (IgG)	4-1BB 抗体 (VH_B)	VH_B 相对 IgG 位置	第一连接肽 (VH_B 和 IgG 之间)	第二连接肽 (VH_B 和 VH_B 之间)	Fc 类型 (突变)	第一连接肽长度	第二连接肽长度
PR003487	PR002408	PR001760	重链 C 端	H1_15-RT	无	人 IgG1 (L234A, L235A)	17	0
PR003488	PR002408	PR001760	重链 C 端	H1_15-RT	GS_5	人 IgG1 (L234A, L235A)	17	5
PR003489	PR002408	PR001760	重链 C 端	H1_15-RT	GS_15	人 IgG1 (L234A, L235A)	17	15
PR004158	PR002410	PR001760	重链 C 端	H1_15-RT	GS_5	人 IgG1 (L234A, L235A)	17	5
PR004358	PR002410	PR001840	重链 C 端	H1_15-RT	GS_5	人 IgG1 (L234A, L235A, P329G)	17	5

表 11-(D):具有 Fab-HCAb 四价对称结构的 B7-H4 x 4-1BB 双抗分子

双抗分子	B7-H4 抗体 (IgG)	4-1BB 抗体 (VH_B)	第一连接肽 (Fab 和 VH_B 之间)	第二连接肽 (VH_B 和 CH2 之间)	Fc 类型 (突变)	第一连接肽长度	第二连接肽长度
PR004279	PR002408	PR001760	H1_15	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (L234A, L235A)	15	15
PR005189	PR002408	PR001760	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (L234A, L235A)	0	15
PR005190	PR002408	PR004469	H1_15	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (L234A, L235A)	15	15
PR005649	PR002408	PR001760	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (L234A, L235A)	0	15

PR007165	PR002408	PR001760	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (L234A, L235A)	0	15
----------	----------	----------	---	-------------------	-----------------------	---	----

表 11-(E):具有 Fab-Fc-VH(n)非对称结构的 B7-H4 x 4-1BB 双抗分子

双抗分子	B7-H4 抗体 (IgG)	4-1BB 抗体 (VH_B)	VH_B 重复数 n	第一连接肽	第二连接肽	Fab 端的 Fc 类型 (突变)	VH_B 端的 Fc 类型 (突变)	第一连接肽长度	第二连接肽长度
PR004160	PR002410	PR001760	2	GS_15	无	人 IgG1 (knob, LALA)	人 IgG1 (hole, LALA)	15	0
PR004161	PR002410	PR001760	3	GS_15	AS-GS_15	人 IgG1 (knob, LALA)	人 IgG1 (hole, LALA)	15	17
PR004181	PR002410	PR001771	3	GS_15	GS_15	人 IgG1 (knob, LALA)	人 IgG1 (hole, LALA)	15	15
PR004182	PR002410	PR001840	3	GS_15	GS_15	人 IgG1 (knob, LALA)	人 IgG1 (hole, LALA)	15	15

表 11-(F):具有 Fab-VH-Fc-VH 结构的 B7-H4 x 4-1BB 双抗分子

双抗分子	B7-H4 抗体 (IgG)	4-1BB 抗体 (VH_B)	第一连接肽	第二连接肽	Fc 类型 (突变)	第一连接肽长度	第二连接肽长度
PR005650	PR002408	PR001760	无	无	人 IgG1 (L234A, L235A)	0	0
PR005651	PR002408	PR004469	无	无	人 IgG1 (L234A, L235A)	0	0

表 12-(A)-(F) 是本发明的双特异性抗体的蛋白表达和物理化学性质。

表 12-(A) :IgG-scFv 对称结构的双抗分子蛋白的表达和物理化学性质

双抗分子	表达体系和体积	质粒转染比例 (短链 : 长链)	第一步纯化后产量 (mg/L)	HPLC-SEC 纯度 (%)	DSF Tm1 (°C)
PR002789	HEK293F (30ml)	3:2	23	59	51.4
PR002972	HEK293F (30ml)	3:2		59	50.6

表 12-(B):IgG-VH 对称结构的双抗分子蛋白的表达和物理化学性质

双抗分子	表达体系和体积	质粒转染比例 (短链 : 长链)	第一步纯化后 产量 (mg/L)	HPLC-SEC 纯 度 (%)
PR002790	Expi293F (10ml)	3:2	74	95
PR002791	Expi293F (10ml)	3:2	60	95
PR002792	Expi293F (10ml)	3:2	52	92
PR002793	Expi293F (10ml)	3:2	49	92
PR002794	Expi293F (10ml)	3:2	47	94
PR002795	Expi293F (10ml)	3:2	69	93
PR002798	Expi293F (10ml)	3:2	67	94
PR002800	Expi293F (10ml)	3:2	73	85
PR002801	Expi293F (10ml)	3:2	57	89
PR002802	Expi293F (10ml)	3:2	33	76
PR002804	Expi293F (10ml)	3:2	26	83
PR002805	Expi293F (10ml)	3:2	3	83
PR002806	Expi293F (10ml)	3:2	20	88
PR002808	Expi293F (10ml)	3:2	16	71
PR003334	Expi-CHOs(200ml)	3:2	38.2	98
PR003335	Expi-CHOs(200ml)	3:2	68.9	99
PR003336	HEK293-F (30ml)	3:2	66.47	91
PR003337	HEK293-F (30ml)	3:2	91.41	93
PR003338	HEK293-F (30ml)	3:2	74.6	98
PR004162	HEK293-F (30ml)	3:2	57	44.81
PR004357	HEK293-F (30ml)	3:2	66	47.53
PR004359	HEK293-F (30ml)	3:2	81	96.82
PR004280	HEK293-F (30ml)	3:2	39.5	98.63
PR004281	HEK293-F (30ml)	3:2	28.5	98.73
PR004282	HEK293-F (30ml)	3:2	34.25	99.09
PR004995	293-6E(40ml)	3:2	42	95.69
PR005183	Expi-CHOs(1000ml)	3:2	89.6	99.916
PR005184	293-6E(40ml)	3:2	7.15	90.77
PR005185	293-6E(40ml)	3:2	7.425	89.1
PR005186	293-6E(40ml)	3:2	10.5	83.89
PR005187	293-6E(40ml)	3:2	8	97.86
PR005188	293-6E(40ml)	3:2	10.15	94.19
PR005827	HEK293-F (100ml)	3:2	35.2	99.526
PR005828	HEK293-F (100ml)	3:2	38.4	99.311
PR005829	HEK293-F (100ml)	3:2	31.8	99.457
PR005830	HEK293-F (100ml)	3:2	27.3	99.680
PR005838	Expi-CHOs(2000ml)	3:2	11.5	98.833
PR005839	Expi-CHOs(2000ml)	3:2	33.2	98.104
PR005866	Expi-CHOs(2000ml)	3:2	5.3	98.241
PR007379	HEK293-F (40ml)	3:2	33.5	98.625
PR007380	HEK293-F (40ml)	3:2	38.0	98.453

表 12-(C) :IgG-VH-VH 六价对称结构的双抗分子蛋白的表达和物理化学性质

双抗分子	表达体系和体积	质粒转染比例 (短链 : 长链)	第一步纯化后 产量 (mg/L)	HPLC-SEC 纯度 (%)
PR003487	HEK293-F (30ml)	3:2	19	84
PR003488	HEK293-F (30ml)	3:2	17.39	85
PR003489	HEK293-F (30ml)	3:2	16.03	76
PR004158	HEK293-F (30ml)	3:2	31.92	63
PR004358	HEK293-F (30ml)	3:2	18.9	98.72

表 12-(D):Fab-HCAb 四价对称结构的双抗分子蛋白的表达和物理化学性质

双抗分子	表达体系和体积	质粒转染比例 (短链 : 长链)	第一步纯化后 产量 (mg/L)	HPLC-SEC 纯度 (%)
PR004279	HEK293-F (30ml)	3:2	11.375	79.18
PR005189	HEK293-F (100ml)	3:2	4	97.59
PR005649	HEK293-F (100ml)	3:2	30.4	91.928
PR007165	HEK293-F (100ml)	3:2	39	94.70

表 12-(E):Fab-Fc-VH(n)非对称结构的双抗分子蛋白的表达和物理化学性质

双抗分子	表达体系和体 积	质粒转染比 例 (短链 : 长链)	第一 步 纯 化 后 产 量 (mg/L)	HPLC- SEC 纯 度 (%)	DSF T _m 1 (°C)
PR004160	HEK293-F (30ml)	1:1:1	29.36	89.41	64.4
PR004161	HEK293-F (30ml)	1:1:1	31.62	85.47	63.0
PR004181	HEK293-F (30ml)	1:1:1	87.25	87.19	64.2
PR004182	HEK293-F (30ml)	1:1:1	24.75	79.14	51

表 12-(F):具有 Fab-VH-Fc-VH 对称结构的双抗分子蛋白的表达和物理化学性质

双抗分子	表达体系和体积	质粒转染比 例 (短 链 : 长链)	第一步纯化后 产量 (mg/L)	HPLC-SEC 纯 度 (%)
PR005650	HEK293-F (100ml)	3:2	21.5	97.476
PR005651	HEK293-F (100ml)	3:2	18.2	98.129

实施例 5. FACS 检测 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体在过表达人和食蟹猴 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株上的体外结合

本实施例为了研究 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体 4-1BB 臂体外结合人和食蟹猴 4-1BB

的活性。采用过表达人 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株(CHO-K1/hu 4-1BB, Genscript, #M00538)和过表达食蟹猴 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株(CHO-K1/cyno 4-1BB, Genscript, #M00569)进行细胞水平上的抗体结合实验。简言之,消化细胞 CHO-K1/hu 4-1BB 和 CHO-K1/cyno 4-1BB 细胞,并用 F12K 完全培养基重悬,用 PBS 洗涤一次。用 PBS 将细胞密度分别调整为 1×10^6 细胞/ml。以 100 μ L 细胞/孔接种于 96 孔 V 底板(Corning, #3894),随后加入 100 μ L /孔,2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的待测抗体。将细胞放置于 4 $^{\circ}$ C,避光孵育 1 小时。之后,加入 100 μ L /孔预冷 PBS 漂洗细胞两次,于 500 g、4 $^{\circ}$ C 下离心 5 分钟,弃上清。再加入 100 μ L /孔荧光二抗(Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson ImmunoResearch, #:109-545-06, 1:500 稀释)或者(Alexa Fluor[®] 647, Goat Anti-Human IgG, Fc γ fragment specific, Jackson ImmunoResearch, #: 109-605-098, 1:1000 稀释),4 $^{\circ}$ C,避光孵育 30 分钟。用 100 μ L /孔预冷 PBS 洗涤细胞两次,于 500 g、4 $^{\circ}$ C 下离心 5 分钟,弃上清。最后,200 μ L /孔预冷 PBS 重悬细胞,使用 BD FACS CANTOII 或艾森 ACEA NovoCyte 系列流式细胞仪读取荧光发光信号值。

图 6-(A)-(L): B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在过表达人 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株上的体外结合;

图 7-(A)-(C): B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在过表达食蟹猴 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株上的体外结合;

如图 6-(A)-(L)所示,本实例中的 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体均与过表达人 4-1BB 的 CHO-K1 细胞特异性结合。PR002789, PR002972, PR003334, PR003335, PR003336, PR003337, PR003338, PR004160, PR004161, PR004158, PR004162, PR004357, PR004359, PR004279, PR004280, PR004281, PR004282, PR005829 等与人 4-1BB 的结合强于阳性对照 Urelumab。具体表现为,抗体 PR003335 结合曲线的 Span 值约为 Urelumab 的 1.5 倍, MFI 最大值高于 Urelumab。

如图 7-(A)-(C)所示,本实例中的 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体均与过表达猴 4-1BB 的 CHO-K1 细胞特异性结合。而参照抗体 Urelumab 不具有与猴 4-1BB 交叉结合的活性。

实施例 6. FACS 检测 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在高表达 B7-H4 的 SK-BR-3 细胞系上的体外结合

本实施例为了研究 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 B7-H4 臂的结合人 B7-H4 的活性。采用高表达 B7-H4 的 SK-BR-3 细胞系进行与人 B7-H4 细胞水平结合实验。简言之,收集 SK-BR-3 细胞悬液,将细胞密度分别调整为 2×10^6 细胞/mL。以 50 μ L 细胞/孔接种于 96

孔 V 底板 (Corning, # 3894), 随后加入 50 μL /孔, 2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的待测抗体。将细胞放置于 4 $^{\circ}\text{C}$, 避光孵育 2 小时。之后, 加入 100 μL /孔预冷 PBS 漂洗细胞两次, 于 500g、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 5 分钟, 弃上清。再加入 100 μL /孔荧光二抗 (Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson ImmunoResearch, #:109-605-098, 1:1000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$, 避光孵育 1 小时。用 100 μL /孔预冷 PBS 洗涤细胞两次, 于 500 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 5 分钟, 弃上清。最后, 200 μL /孔预冷 FACS 重悬细胞, 使用 ACEA Novocyte3000 读取荧光发光信号值。

图 8-(A)-(K): B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在高表达 B7-H4 的 SK-BR-3 细胞系上的体外结合;

如图 8-(A)-(K)中所示, 本实例中 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体均与 SK-BR-3 细胞系上人 B7-H4 特异性结合, 结合曲线 EC50 大多为 0.1-10 nM。

实施例 7. B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在 B7-H4 高表达细胞系 SK-BR-3 存在时的 T 细胞激活实验以及细胞因子的释放

为了研究 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体体外介导靶 T 细胞的激活能力, 采用人 pan T 细胞作为效应细胞, 高表达 B7-H4 的细胞系 SK-BR-3 作为介导交联的细胞进行体外激活实验以及细胞因子释放的检测。具体的, 将 96 孔平底板 (Corning, #3599) 用 OKT3 包板, 将 pan T 的密度调整为 2×10^6 细胞/mL, SK-BR-3 的密度调整为 2×10^5 细胞/mL, 以两种细胞悬液各 50 μL 细胞/孔接种于 96 孔平底板 (Corning, #3599), 随后加入 50 μL /孔, 3 倍于终浓度的不同梯度稀释的待测抗体, 其中抗体最高终浓度为 100nM 或 30 nM 或 20nM 或 6nM, 每个抗体共 6 或 3 个或 2 个浓度, 最终效靶比为 10:1, 设置两个重复。同时, 在板内设置同型 IgG 对照组。96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱孵育 2 天或 3 天。孵育完成后, 取上清液, 加入 96 孔板 (Corning, #3599), 于 500 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 5 分钟。孵育 2 天的上清, 用于检测细胞因子 IL-2 的释放或者孵育 3 天的上清检测 IFN- γ 的释放。ELISA 检测方法参照 IL-2 (IL-2 Human Uncoated ELISA Kit, Thermo, #88-7025-88) 试剂盒和 IFN γ (IFN γ Human Uncoated ELISA Kit, Thermo, #88-7316-88) 操作说明。

图 9-(A)-(E): B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在 B7-H4 高表达细胞系 SK-BR-3 存在时激活 4-1BB 通路, 并诱导激活 T 细胞释放 IFN- γ 。

图 10-(A)-(N): B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在 B7-H4 高表达细胞系 SK-BR-3 存在时激活 4-1BB 通路, 并诱导激活 T 细胞释放 IL-2。

如图 9-(A)-(E)和图 10-(A)-(N)所示,在高表达 B7-H4 的细胞系 SK-BR-3 存在时, B7-H4×4-1BB 双特异性抗体能够介导的 T 细胞激活。并且 PR002790、PR002791、PR002802、PR002804、PR002806、PR003334、PR003335、PR003336、PR003337、PR003338、PR003487、PR003488、PR003489、PR004158、PR004160、PR004161、PR004162、PR004181、PR004182、PR004279、PR004280、PR004281、PR004282、PR004357、PR004358、PR004359 对 4-1BB 通路的激活优于或相当于 Urelumab。具体表现为产生的细胞因子 IFN- γ 或 IL-2 高于 Urelumab。

不同的 linker 长度也会影响双抗对 T 细胞的激活,比如 PR004281 和 PR004282 表现优于 PR003338 和 Urelumab(图 10-K)。

带有不同抗原表位的 B7H4 臂会影响双抗对 T 细胞的激活,比如 PR004281 和 PR004282 表现优于 PR004995 和 Urelumab(图 10-L)。

带有不同的 Fc 突变位点会影响双抗对 T 细胞的激活,如 PR005185、PR005186 及 PR004282 优于 Urelumab(图 10-M)。

实施例 8. B7-H4×4-1BB 双特异性抗体对 T 细胞的激活不依赖于 Fc γ R 细胞

为了研究 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体活性是否依赖于 Fc γ R 的表达。采用人 pan T 细胞作为效应细胞,高表达 Fc γ RIIb 的细胞系 CHO-K1/CD32b 或高表达 Fc γ RI 的细胞系 CHO-K1/CD64 作为介导交联的细胞进行体外激活实验以及细胞因子释放的检测。具体的,将 96 孔平底板(Corning, #3599)用 OKT3 包板,将 pan T 的密度调整为 2×10^6 细胞/mL, Fc γ R 细胞的密度调整为 2×10^5 细胞/mL,以两种细胞悬液各 50 μ L 细胞/孔接种于 96 孔平底板(Corning, #3599),随后加入 100 μ L/孔,2 倍于终浓度的不同梯度稀释的待测抗体,最终效靶比为 10:1,设置两个重复。同时,在板内设置同型 IgG 对照组。96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱孵育 2 天。孵育完成后,取 100 μ L 上清液,加入 96 孔板(Corning, #3894),于 500 g、4 $^{\circ}$ C 下离心 5 分钟,取上清,用于检测细胞因子 IL-2 的释放。ELISA 检测方法参照 IL-2 (IL-2 Human Uncoated ELISA Kit, Thermo, #88-7025-88) 试剂盒操作说明。

图 11-(A)-(B): B7-H4×4-1BB 双抗对 T 细胞激活特异性不依赖 Fc γ R 的表达。(A)高表达 Fc γ RIIb 的细胞系 CHO-K1/CD32b 细胞存在时, B7-H4×4-1BB 双特异性抗体 PR004282 介导的 T 细胞激活和同型 IgG 对照相当。(B)高表达 Fc γ RI 的细胞系 CHO-K1/CD64 细胞存在时, B7-H4×4-1BB 双特异性抗体 PR004282 介导的 T 细胞激活和同型 IgG 对照相当。

实施例 9. B7-H4×4-1BB 双特异性抗体对 T 细胞的激活依赖于 B7-H4 的表达

为了研究 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体活性是否依赖于 B7-H4 表达。采用人 pan T 细胞作为效应细胞,高表达 B7-H4 的细胞系 SK-BR-3 和 MDA-MB-468 细胞以及不表达 B7-H4 的 COV644 和 JIMT-1 及 MDA-MB-231 细胞作为介导交联的细胞进行体外激活实验以及细胞因子释放的检测。具体的,将 96 孔平底板 (Corning, #3599) 用 OKT3 包板,将 pan T 的密度调整为 2×10^6 细胞/mL,肿瘤细胞的密度调整为 2×10^5 细胞/mL,以两种细胞悬液各 50 μ L 细胞/孔接种于 96 孔平底板 (Corning, #3599),随后加入 50 μ L/孔,3 倍于终浓度的待测抗体,最终效靶比为 10: 1,设置两个重复。同时,在板内设置同型 IgG 对照组。96 孔板置于 37 °C 二氧化碳培养箱孵育 2 天。孵育完成后,取 100 μ L 上清液,加入 96 孔板 (Corning, #3894),于 500 g、4°C 下离心 5 分钟,取上清,用于检测细胞因子 IL-2 的释放 ELISA 检测方法参照 IL-2 (IL-2 Human Uncoated ELISA Kit, Thermo, #88-7025-88) 试剂盒操作说明。

图 12: FACS 检测肿瘤细胞表面的 B7-H4 表达量。图 12-(A)用 B7-H4 阳性对照抗体 1 检测肿瘤细胞表面的 B7-H4 表达量。图 12-(B)用 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体检测肿瘤细胞表面的 B7-H4 表达量。如图所示,SK-BR-3 和 MDA-MB-468 是高表达 B7-H4 的肿瘤细胞,JIMT-1 和 COV644 及 MDA-MB-231 是不表达 B7-H4 的肿瘤细胞。

图 13-(A)-(H): B7-H4×4-1BB 双抗对 T 细胞激活特异性依赖 B7-H4 的表达。(A),(B) 高表达 B7-H4 的细胞系 SK-BR-3 或 MDA-MB-468 细胞存在时,B7-H4×4-1BB 双特异性抗体 PR003334 介导的 T 细胞激活优于阳性对照。(C),(D)不表达 B7-H4 的细胞系 COV644 或 JIMT-1 细胞存在时,PR003334 介导的 T 细胞激活程度与同型 IgG 对照相当。(E),(F) 高表达 B7-H4 的细胞系 SK-BR-3 细胞存在时,B7-H4 × 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 介导的 T 细胞激活优于阳性对照 Urelumab。(G),(H) 不表达 B7-H4 的细胞系 JIMT-1 或 MDA-MB-231 细胞存在时,PR004282 介导的 T 细胞激活程度与同型 IgG 对照相当。

实施例 10. B7-H4 × 4-1BB 双特异性抗体的血清稳定性研究

为了研究 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体在高浓度人血清中的稳定性,PR0003334 和 PR0003335 用 90%人血清进行梯度稀释,初始浓度为 100 nM,1:3 梯度稀释 8 个浓度点。分成 6 份样本,分别在 37 度孵育 0 天、1 天、2 天、4 天、7 天、14 天后,液氮速冻后放置于-70 度保存。FACS 检测 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体在高浓度血清中 37 度放置不同时间后,与高表达 B7-H4 的 SK-BR-3 细胞系和 CHO-K1-hu4-1BB 细胞的体外结合,参照实施例 3.3 和实施例 6。

PR0004282 用 95%人血清进行梯度稀释, 分成 5 管, 分别在 37 度孵育 0 天、1 天、2 天、4 天、7 天、14 天后, 液氮速冻后放置于-80 度保存。在高浓度人血清中 37 度放置不同时间后的 PR004282 用 FACS 方法检测与 B7H4+细胞和 4-1BB+细胞的体外结合, 过程如下:

消化 CHO-K1/h4-1BB、CHO-K1/cyno4-1BB、CHO-K1/hB7H4 及 CHO-K1/cynoB7H4 细胞, 并用 DMEM 完全培养基重悬, 用 PBS 洗涤后将细胞密度分别调整为 1×10^6 细胞/mL。以 100 μ L 细胞/孔接种于 96 孔 V 底板 (Corning, #3894), 随后加入 100 μ L /孔, 2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的待测人血清处理后 PR004282 抗体(不同处理时间的抗体的每个剂量均含有 4.5%人血清)。将细胞放置于 4℃, 避光孵育 2 小时。再加入 100 μ L /孔预冷含 2%FBS 的 PBS 漂洗细胞两次, 于 500 g、4℃下离心 5 分钟, 弃上清。再加入 100 μ L /孔荧光二抗 (Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcy Fragment Specific, Jackson, #109-545-06, 1:1000 稀释), 4℃, 避光孵育 1 小时。用 100 μ L /孔预冷含 2%FBS 的 PBS 洗涤细胞两次, 于 500 g、4℃下离心 5 分钟, 弃上清。最后, 200 μ L /孔预冷含 2%FBS 的 PBS 重悬细胞, 使用艾森 ACEA NovoCyte 系列流式细胞仪读取荧光发光信号值。

图 14-(A-D): B7-H4 $\times$ 4-1BB 双抗 PR003334 和 PR003335 的血清稳定性。在不同的人血清孵育时间, PR003334 和 PR003335 在 90%血清中与高表达 B7-H4 的 SK-BR-3 细胞和 CHO-K1-人 4-1BB 细胞的结合没有改变, 说明 PR003334 和 PR003335 具有很好的血清稳定性。

图 14-(E-H) :B7-H4 $\times$ 4-1BB 双抗 PR004282 的血清稳定性。在不同的血清孵育时间, PR004282 在 95%血清中与高表达 B7H4 或 4-1BB 的 CHO-K1 细胞的结合没有改变, 说明 PR004282 具有很好的血清稳定性。

实施例 11. FACS 检测 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在 4-1BB+细胞水平的结合能力

本实施例是为了研究 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 体外结合人/食蟹猴/小鼠 4-1BB 的活性。采用过表达人 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株 (CHO-K1/h4-1BB, Genscript, #M00538)、食蟹猴 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株 (CHO-K1/cyno4-1BB, Genscript, #M00569)、过表达小鼠 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株 (CHO-K1/m4-1BB, Genscript, #M00568) 进行细胞水平上的抗体结合实验。简言之, 消化 CHO-K1/h4-1BB 细胞、CHO-K1/cyno 4-1BB 细胞及 CHO-K1/m 4-1BB 细胞, 并用含 2% FBS 的 PBS 重悬。将细胞密度分别调整为 1×10^6

细胞/mL。以 100 μ L 细胞/孔接种于 96 孔 V 底板 (Corning, #3894), 随后加入 100 μ L /孔, 2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的待测抗体。将细胞放置于 4 $^{\circ}$ C, 避光孵育 2 小时。之后, 加入 100 μ L /孔预冷含 2%FBS 的 PBS 的 FACS 缓冲液漂洗细胞两次, 于 500 g、4 $^{\circ}$ C 下离心 5 分钟, 弃上清。再加入 100 μ L /孔荧光二抗 (Alexa Fluor $^{\circ}$ 647, Goat Anti-Human IgG, Fc γ fragment specific, Jackson ImmunoResearch, #109-605-098, 1:1000 稀释), 4 $^{\circ}$ C, 避光孵育 1 小时。用 100 μ L /孔预冷 FACS 缓冲液洗涤细胞两次, 于 500 g、4 $^{\circ}$ C 下离心 5 分钟, 弃上清。最后, 200 μ L /孔预冷 FACS 缓冲液重悬细胞, 使用 ACEA Novocyte3000 流式细胞仪读取荧光发光信号值。

如图 15-(A)所示: B7-H4/4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在高表达人 4-1BB 的 CHO-K1 细胞系上的体外结合情况; PR004282 与 CHO-K1/h4-1BB 细胞系结合活性优于对照抗体 Urelumab。

如图 15-(B)所示: PR004282 在高表达食蟹猴 4-1BB 的 CHO-K1 细胞系上的体外结合情况; PR004282 可以结合猴 4-1BB, 而 Urelumab 不具有与猴的交叉反应。

如图 15-(C)所示: PR004282 在高表达鼠 4-1BB 的 CHO-K1 细胞系上的体外结合情况; PR004282 不具有小鼠 4-1BB 结合能力。

实施例 12. FACS 检测 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在 B7H4+细胞水平的结合能力

本实施例是为了研究 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 体外结合人/食蟹猴/小鼠 B7-H4 的活性。采用过表达人 B7H4 的 CHO-K1 细胞株 (CHO-K1/hB7-H4, 和铂自制)、食蟹猴 B7-H4 的 CHO-K1 细胞株 (CHO-K1/cynoB7-H4, 和铂自制)、过表达小鼠 B7-H4 的 CHO-K1 细胞株 (CHO-K1/mB7-H4, 和铂自制) 进行细胞水平上的抗体结合实验。简言之, 消化 CHO-K1/hB7H4 细胞、CHO-K1/cyno B7-H4 细胞及 CHO-K1/mB7-H4 细胞, 并用含 2%FBS 的 PBS 重悬。将细胞密度分别调整为 1×10^6 细胞/mL。以 100 μ L 细胞/孔接种于 96 孔 V 底板 (Corning, #3894), 随后加入 100 μ L /孔, 2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的待测抗体。将细胞放置于 4 $^{\circ}$ C, 避光孵育 2 小时。之后, 加入 100 μ L /孔预冷含 2%FBS 的 PBS 漂洗细胞两次, 于 500 g、4 $^{\circ}$ C 下离心 5 分钟, 弃上清。再加入 100 μ L /孔荧光二抗 (Alexa Fluor $^{\circ}$ 647, Goat Anti-Human IgG, Fc γ fragment specific, Jackson ImmunoResearch, #109-605-098, 1:1000 稀释), 4 $^{\circ}$ C, 避光孵育 1 小时。用 100 μ L /孔预冷含 2%FBS 的 PBS 洗涤细胞两次, 于 500 g、4 $^{\circ}$ C 下离心 5 分钟, 弃上清。最后, 200 μ L /孔预冷含 2% BSA 的 PBS 重悬细胞, 使用 ACEA Novocyte3000 流式细胞仪读取荧光发

光信号值。

如图 16-(A)所示: B7-H4/4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在高表达人 B7-H4 的 CHO-K1 细胞系上的体外结合; PR004282 与 CHO-K1/hB7H4 细胞系结合活性高于 B7H4 单抗抗体 PR002408。

如图 16-(B)所示: B7-H4 抗体在高表达食蟹猴 B7-H4 的 CHO-K1 细胞系上的体外结合; PR004282 和 PR002408 与 CHO-K1-食蟹猴 B7-H4 细胞系结合活性相当。

如图 16-(C)所示: B7-H4 抗体在高表达鼠 B7-H4 的 CHO-K1 细胞系上的体外结合; PR004282 有微弱的小鼠 B7H4 结合能力。

实施例 13. FACS 检测 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体 PR004282 同时结合 CHO-K1/h4-1BB 和 SK-BR-3 的能力

本实施例是为了研究 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体 PR004282 同时结合 CHO-K1/h4-1BB 和 SK-BR-3 的能力。简言之, 消化 CHO-K1/h4-1BB 细胞和 SK-BR-3 细胞, 并用 PBS 将细胞密度分别调整为 1×10^6 细胞/mL, 用 $0.5 \mu\text{M}$ Far-red (lifetechnologies, #C34572) 对 SK-BR-3, 用 $0.5 \mu\text{M}$ CFSE (lifetechnologies, #C34544) 对 CHO-K1/h4-1BB 细胞在室温染色 5 分钟。离心染色后的细胞, 用 $>20 \text{ ml}$ 的含 1%FBS 培养基洗涤一次。重悬洗涤后的细胞于 FACS 缓冲液中, 并调整细胞密度均为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。在 96 孔 V 型板内 (Corning, #3894) 每孔加入 $50 \mu\text{l}$ SK-BR-3 细胞 (每孔细胞数为 1×10^5) 和 $25 \mu\text{l}$ CHO-K1/h4-1BB (每孔细胞数为 1×10^5) 以及 $25 \mu\text{l}$ 4 倍梯度 FACS 缓冲液稀释的待测抗体, 混匀完全。4℃孵育 1 小时。使用 ACEA Novocyte3000 流式细胞仪, 识别 FITC+ CHO-K1/h4-1BB 细胞和 Alexa647+SK-BR-3 双阳性百分比。数据用 FlowJo 软件 (Tree Star, Ashland, OR) 分析, 双染细胞的百分比用于确定双抗介导的共结合率 = $(Q2/(Q1+Q2))$ 。

图 17 显示仅有 PR004282 具有同时结合 CHO-K1/h4-1BB 和 SK-BR-3 的能力。单抗均无该能力。

实施例 14. FACS 检测 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在原代细胞水平的结合能力

本实施例是为了研究 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体 PR004282 体外结合激活后的人/食蟹猴原代 T 细胞的活性。用非人的灵长目 CD3 分离试剂盒 (Miltenyi, #130-092-012) 从冻存的猴 PBMC (PharmaLegacy, #SC1702051) 分离出猴 CD3+ T 细胞, 用培养基 RPMI1640+10%FBS+1% 丙酮酸钠 (Thermo, #11360-070) +1% 非必需氨基酸溶液

(Thermo, #11140-050)重悬至 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 分别取 1ml 至 6 孔板内, 加入 1ml 含有 20ng/ml PMA(Sigma, #P1585-1MG)和 5nM Ionomycin(Sigma, #407952-5MG)的培养基, 37°C CO_2 培养箱 16h。用人 CD3 分离试剂盒 (Miltenyi, #130-096-535) 从冻存的人 PBMC (Saily, XFB-HP100B) 分离出人 CD3+ T 细胞, 其他操作同猴 CD3+ T 细胞的激活。

激活后的猴 T 细胞密度用含 2% FBS 的 PBS 调整至 1×10^6 细胞/mL, 以 100 μL CD3+ T 细胞/孔接种于 96 孔 V 底板 (Corning, #3894), 随后加入 100 μL /孔, 2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的待测抗体 PR004282/hIgG1/Urelumab/hIgG4, 将细胞放置于 4°C , 避光孵育 2 小时。之后, 加入 100 μL /孔预冷含 2% FBS 的 PBS 漂洗细胞两次, 于 500 g、 4°C 下离心 5 分钟, 弃上清。再加入 100 μL /孔荧光二抗 (Alexa Fluor® 647, Goat Anti-Human IgG, Fc γ fragment specific, Jackson ImmunoResearch, #109-605-098, 1:1000 稀释), 4°C , 避光孵育 1 小时。用 100 μL /孔预冷含 2% FBS 的 PBS 洗涤细胞两次, 于 500 g、 4°C 下离心 5 分钟, 弃上清。最后, 100 μL /孔预冷含 2% FBS 的 PBS 重悬细胞, 使用 ACEA Novocyte3000 流式细胞仪读取荧光发光信号值。

Zombie NIR™ 染料 (Biolegend, #77184) 与激活后的人 T 细胞室温暗处孵育 15-30 分钟, FACS 缓冲液洗涤一次细胞, 将细胞密度分别调整为 1×10^6 细胞/mL。以 100 μL CD3+ T 细胞/孔接种于 96 孔 V 底板 (Corning, #3894), 随后加入 100 μL /孔, 2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的待测抗体 PR004282/hIgG1, 将细胞放置于 4°C , 避光孵育 2 小时。之后, 加入 100 μL /孔预冷含 2% FBS 的 PBS 漂洗细胞两次, 于 500 g、 4°C 下离心 5 分钟, 弃上清。再加入 100 μL /孔荧光二抗 (Alexa Fluor® 488, Goat Anti-Human IgG, Fc γ fragment specific, Jackson ImmunoResearch, #109-545-098, 1:1000 稀释), 4°C , 避光孵育 1 小时。用 100 μL /孔预冷含 2% FBS 的 PBS 洗涤细胞两次, 于 500 g、 4°C 下离心 5 分钟, 弃上清。最后, 100 μL /孔预冷含 2% FBS 的 PBS 重悬细胞, 使用 ACEA Novocyte3000 流式细胞仪读取荧光发光信号值。

如图 18-(A-B)所示: B7-H4/4-1BB 双特异性抗体 PR004282 可以与激活后的人或猴 CD3+ T 细胞结合。

实施例 15. ELISA 检测 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 与 B7 家族或 TNFR 家族其他成员的交叉反应性

15.1 ELISA 检测 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 与 B7 家族其他成员的交叉反应性

将 B7 家族的蛋白 (表 13) 分别用 PBS 稀释为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 加至 96 孔板 (Corning,

#9018) 中, 每孔 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。弃去液体后用 PBST 缓冲液 (pH 7.4, 含 0.05% tween-20) 洗板 3 次, 加入 250 μ l 2% BSA 封闭液, 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 小时。弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液洗板 3 次, 将待测抗原结合蛋白, 稀释成 100nM、10nM 和 1nM 3 个浓度, 每个孔加入 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。PBST 缓冲液清洗 3 次后, 加入稀释 5000 倍的羊抗人 HRP 二抗 (Invitrogen, #A18805), 37 $^{\circ}$ C 条件下, 避光孵育 1 小时。PBST 缓冲液清洗 3 次后, 添加 100 μ l/孔 TMB (Biopanda, #TMB-S-003), 室温避光放置约 30 分钟; 每孔加入 50 μ l/孔终止液 (BBI life sciences, #E661006-0200) 终止反应, 置酶标仪 (PerkinElemer, #Enspire) 中测定 450nm 吸光度 (OD450) 值。

图 19-(A)说明本发明的抗体 PR004282 不与 B7 家族其它成员蛋白发生交叉反应。

表 13. B7 家族其它成员供应商信息

B7 家族其它成员	供应商	目录号	别称
人 B7-1/CD80 蛋白, Fc Tag (HPLC-verified)	Acrobiosystem	B71-H5259	CD80
人 B7-2 / CD86 蛋白, Fc Tag	Acrobiosystem	CD6-H5257	CD86
人 B7-DC/PD-L2/CD273 重组蛋白(Fc Tag)	Sino Biological	H10292-H02H	PD-L2
人 PD-L1/B7-H1 Protein, His Tag (HPLC verified)	Acrobiosystem	PD1-H5229	PD-L1
人 CD275/ICOS 配体重组蛋白 (Fc Tag)	Sino Biological	11559-H02H	ICOS-L
人 B7-H3/CD276 重组蛋白(ECD, Fc Tag)	Sino Biological	11188-H02H	
人 B7H4 Fc 嵌合重组蛋白	R&D	8870-B7-050	B7S1
人 VISTA/B7H5/PD-1H Fc 嵌合重组蛋白	R&D	7126-B7-050	VISTA
人 B7-H6/NCR3LG1 重组蛋白(Fc Tag)	Sino Biological	16140-H02H	
人 B7H7/HLA2 嵌合重组蛋白(Fc Tag)	R&D	8084-B7-050	HLA2

15.2 ELISA 检测 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 与 TNFR 家族其他成员的交叉反应性

将 TNFR 家族的蛋白 (表 14) 分别用 PBS 稀释为 1 μ g/ml, 加至 96 孔板 (Corning, #9018) 中, 每孔 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。弃去液体后用 PBST 缓冲液 (pH 7.4, 含 0.05% tween-20) 洗板 3 次, 加入 250 μ l 2% BSA 封闭液, 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 小时。弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液洗板 3 次, 将待测抗原结合蛋白, 稀释成 100nM、10nM 和 1nM 3 个浓度, 每个孔加入 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 同型抗体作为对照。PBST 缓冲液清洗 3 次后, 加入稀释 5000 倍的羊抗人 HRP 二抗 (Invitrogen, #A18805), 37 $^{\circ}$ C 条件下, 避光孵育 1 小时。PBST 缓冲液清洗 3 次后, 添加 100 μ l/孔 TMB (Biopanda, #TMB-S-003), 室温避光放置约 30 分钟; 每孔加入 50 μ l/孔终止液 (BBI life sciences#E661006-0200) 终止反应, 置酶标仪 (PerkinElemer #Envision) 中测定 450nm 吸光度 (OD450) 值。

表 14. TNFR 家族其它成员供应商信息

TNFR 家族其它成员	供应商	货号
-------------	-----	----

CD30	Acrobiosystems	CD0-H5229
CD27	Acrobiosystems	CD7-H522b
HVEM	Acrobiosystems	HVM-H52E9
GITR	Acrobiosystems	GIR-H5228
OX40	Acrobiosystems	OX0-H5224
4-1BB	Acrobiosystems	41B-H5227
CD40	Sino Biological	10774-H08H

图 19-(B)说明本发明的抗体 PR004282 不与 TNFR 家族其它成员蛋白发生交叉反应。

实施例 16. B7-H4×4-1BB 双特异性抗体 PR004282 的 ADCC 效果检测

16.1 本实施例是通过 ADCC 报告基因细胞系来检测 PR004282 的 ADCC 效果

使用 Jurkat FcγRIIIa-V158/NFAT-Luc 细胞(和铂自制),检测 PR004282 对 CHO-K1/h4-1BB 或 SK-BR-3 的 ADCC 效应的活性。CHO-K1/h4-1BB 或 SK-BR-3 于 300 g 离心 5 分钟,然后用 RPMI1640 + 4 % FBS 血清培养基重悬。将细胞的密度调整到 6×10^5 细胞/ml,在 96 孔板的各孔内加入 50 μl 细胞悬液,于 37℃ 孵育过夜。Jurkat FcγRIIIa-V158/NFAT-Luc 细胞于 400 g 离心 4 分钟,然后用 RPMI1640 + 4 % FBS 血清培养基重悬。将细胞的密度调整到 3×10^6 细胞/ml,在 96 孔板的各孔内加入 50 μl 细胞悬液。抗体用 RPMI1640 + 4 % FBS 培养基稀释,最高终浓度为 100 nM,每个抗体共 4 个浓度,5 倍稀释,设置两个重复,在 96 孔板的各孔内加入 50 μl 抗体稀释液。同时,在板内设置同型 IgG 对照组和空白培养基对照组。细胞与抗体于 37℃ 孵育 5 小时。将 96 孔板于常温静置 30 分钟,加入 60 μl/孔的室温 One-Glo 显色液 (Promega, #E6110)。之后样品避光常温孵育 10 分钟。用 PE Enspire 进行 Luminescence 读值。倍数=抗体孔的 Luminescence 读值/空白培养基对照组的 Luminescence 读值,用 Prism 8 软件作图。PR004469 及 PR003369 (亲和力成熟变体的 B7H4 单抗,具有 ADCC 增强效应,重链序列如 SEQ ID NO: 290 所示,轻链序列如 SEQ ID NO: 291 所示)作为阳性对照, human Iso IgG1(CrownBio, #C0001-4)抗体作为阴性对照。

图 20-(A)-(B)示出 PR004282 对 CHO-K1/h4-1BB 及 SK-BR-3 细胞无明显的 ADCC 活性。而阳性对照 PR004469 及 PR003369 能以剂量依赖的方式分别对 CHO-K1/h4-1BB 或 SK-BR-3 产生较强 ADCC 效应。

16.2 本实施例是为了研究 B7H4/4-1BB 双抗 PR004282 通过 ADCC 效应介导 NK 细胞杀伤靶细胞的活性。

本实验采用人 NK 作为效应细胞,高表达 B7H4 的细胞系 SK-BR-3 作为靶细胞。使用 ACEA 公司的 RTCA 仪器检测靶细胞的电导率反映杀伤效率。96 孔板 E-plate 先用 50 μl

完全培养基平衡。消化 SK-BR-3 细胞，重悬于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基中，稀释至 $4 \times 10^5/\text{ml}$ ，铺板 $50\mu\text{l}/\text{孔}$ 于 E-plate 96 板中，即 $2 \times 10^4/\text{孔}$ ， 37°C 培养过夜。次日用 EasySep™ Human CD56 阳选试剂盒（Stem cell，#17855）分选出 NK，每孔加入新鲜 $50\mu\text{l}$ 含 1×10^5 PBMC 的培液，随后加入 $50\mu\text{l}$ $4\times$ 的浓度梯度稀释的抗体，抗体最高终浓度为 100 nM，每个抗体共 4 个浓度，5 倍稀释，设置两个重复。PR003369 作为阳性对照，human Iso IgG1(CrownBio, C0001-4)抗体作为阴性对照。实时检测靶细胞的电导率，取 24 小时时间点的数据计算靶细胞杀伤效率 = $(1 - \text{样品}/\text{iso 对照}) \times 100\%$ 。

图 20-(C)结果显示 PR004282 与 PR003369 相比，PR004282 没有明显的杀伤。说明 PR004282 对 SK-BR-3 靶细胞不具有 ADCC 活性。

实施例 17. 利用 BLI 方法检测抗体与人、小鼠、食蟹猴 Fcγ 受体蛋白的亲和力

测试使用 Octet Red 96e 分子相互作用分析仪，实验缓冲液为稀释至 1x 的动力学缓冲液（ForteBio，#18-1105）。

设置仪器转动速度为 1000 转/分钟，先将置于一列的 FAB2G 传感器（ForteBio，#18-5125）在测试缓冲液中平衡 10 分钟，然后用 FAB2G 传感器捕获抗体，捕获高度 1 nm；FAB2G 传感器在缓冲液中平衡 120s 后与 2 倍梯度稀释的 Fcγ 受体蛋白结合，设置结合时间 60s、解离时间 30s，蛋白浓度见表 15。最后将 FAB2G 传感器浸入 10 mM 甘氨酸-盐酸 pH 1.5 溶液进行再生，以洗脱结合在传感器上的蛋白。对于抗体与 FcRn 的亲和力测试，在缓冲液 pH6.0 和 7.4 两个条件下分别进行。对于带有 avi 标签的食蟹猴 CD32b 和 CD64，使用 SA 传感器（ForteBio,18-5019）捕获受体蛋白，抗体为分析物。

表 15.Fcγ 受体蛋白信息及分析物浓度

受体蛋白	供应商	货号	浓度
人 CD64	Novo Protein	CM60	800-25
人 CD32a(H)		CS35	8000-500
人 CD32b		C444	8000-250
人 CD16a(V158)		C441	8000-250
人 CD16a (F158)		CS11	8000-250
人 CD16b		CB62	8000-250
人 FcRn		CI01	800-50
小鼠 CD32(C-6his)		C767	8000-250
小鼠 CD16(C-6his)		CS29	4000-250
小鼠 CD64(his)	Acro Biosystems	CD4-M5227	1000-125
食蟹猴 FcRn		FCM-C52W9	800-25
食蟹猴 CD32a		CDA-C52H7	8000-250
食蟹猴 CD32b		CDB-C82E4	3000-187.5

食蟹猴 CD16		FC6-C52H9	2000-125
食蟹猴 CD64		FCA-C82E8	400-12.5

使用 Octet Data Analysis 软件 (Fortebio, 版本 11.0) 进行数据分析时, 以 0nM 为参照孔, 扣除参照信号 (reference subtraction), 选择“1:1 Global fitting”方法进行数据拟合, 计算出蛋白与抗体结合的动力学参数, 得到 kon (1/Ms) 值、kdis (1/s) 值和 KD (M) 值; 对于快结合快解离的相互作用, 选用 “steady state” 方法拟合数据, 得到 KD (M) 值。

从表 16-18 可以看出, PR004282 的 KD 值均高于对参照抗体 Urelumab, 表明其与人鼠猴 Fcγ 受体蛋白结合较弱。

表 16. PR004282 与人 Fcγ 受体的亲和力

KD(M)	人 Fcγ 受体						
抗体名称	CD64	CD16a(v)	CD16a(F)	CD16b	CD32a (H)	CD32b	FcRn (pH 6.0)
PR002408	2.68E-11	1.23E-07	1.62E-06	3.80E-06	4.40E-07	3.30E-06	2.64E-07
PR004282	1.20E-07	1.52E-06	不结合		>8E-06	不结合	2.35E-07
Urelumab	6.52E-10	2.39E-06			2.80E-06	3.20E-06	1.94E-07

表 17. PR004282 与猴 Fcγ 受体的亲和力

KD (M)	猴 Fcγ 受体					
抗体	CD64	CD32b	CD32a	CD16	FcRn(pH7.4)	FcRn(pH6.0)
PR002408	3.67E-10	1.51E-06	2.10E-06	1.29E-07	不结合	1.59E-07
PR004282	9.77E-08	5.10E-06	不结合	7.47E-07		1.43E-07
Urelumab	1.74E-10	5.97E-07	4.82E-06	8.92E-07		1.39E-07

表 18. PR004282 与小鼠 Fcγ 受体的亲和力

KD (M)	小鼠 Fcγ 受体		
抗体名称	CD16	CD32	CD64
PR002408	1.28E-07	6.10E-07	3.60E-08
PR004282	1.41E-06	>8E-06	不结合
urelumab	7.81E-07	2.10E-06	1.63E-07

实施例 18. B7-H4 × 4-1BB 双特异性抗体的非特异性细胞因子的释放检测

为了评估 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体是否引起细胞因子的非特异性释放。用人 CD14 分离试剂盒 (Mitenyi, #130-050-201) 分离出单核细胞, 将其或同一供体的 PBMC 重悬于含 10%胎牛血清的 RPM1640 完全培养基中, 稀释至 2E6/ml, 铺板 100μl/孔于平底 96 板 (Costar, #3599) 中, 即 2E5/孔, 随后加入 100ul 2x 终浓度的梯度稀释的抗体, 抗体

最高浓度为 300nM, 10 倍稀释, 共三个浓度, 设置两个重复, 37°C 培养过夜。Urelumab 作为阳性对照, Utomilumab 和 human Iso IgG1(CrownBio, C0001-4) 抗体作为阴性对照。孵育 24h 收取上清检测 TNF-a (Thermo, 88-7066-88) 和 IL-6(Thermo, 88-7346-77)的释放, 孵育 72h 收上清检测 IFN-gamma(Thermo,88-7316-77)的释放。

图 21-(A)-(C): B7-H4 × 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 与 PBMC 或单核细胞共孵育后细胞因子的释放情况。不管是 PBMC 还是单核细胞, Urelumab 均表现出较强的 TNF-a 和 IL-6 的释放, IFN-gamma 则仅表现在与 PBMC 共孵育的情况下。而 PR004282 则与 Utomilumab 一样显示出较好的安全性, 不管是与 PBMC 或单核细胞孵育, 均为显示出明显的细胞因子释放。

实施例 19. B7-H4×4-1BB 双特异性抗体在正常小鼠中的药代动力学研究

本实施例测试融合蛋白的药代动力学性能。其方法如下, 选取体重 18~22 克的雌性 C57BL/6 小鼠 6 只, 按 5 mg/kg PR003334 或 5 mg/kg PR003335 或 5mg/kg PR004282 的剂量通过静脉注射给与双特异性抗体药物; 一组 3 只于给药前以及给药后 15 分钟、24 小时 (1 天)、第 4 天、和第 10 天采集全血, 另一组 3 只于只于给药前以及给药后 5 小时、第 2 天、第 7 天、和第 14 天采集全血。将全血静置 30 分钟使其凝固, 随后在 4°C 下以 2,000 rpm 离心 5 分钟并将分离的血清样品在 -80°C 下冻存直至分析。本实施例采用两种 ELISA 方法来定量测定小鼠血清中的药物浓度。ELISA 方法一, 即总体检测方法, 通过包被于 96 孔板的山羊抗人 Fc 多克隆抗体来捕获小鼠血清中的含有人 Fc 的融合蛋白, 然后加入 HRP 标记的山羊抗人 Fc 第二抗体来检测; ELISA 方法二, 即功能结构域检测方法, 通过包被于 96 孔板的人 4-1BB 蛋白来捕获小鼠血清中的含有人 4-1BB HCAb 的双特异性抗体, 然后加入 HRP 标记的山羊抗人 Fc 第二抗体来检测。使用 Phoenix WinNonlin 软件 8.2 版, 选用非房室模型 (NCA) 对血药浓度数据进行分析以评价其药代动力学。

图 22-(A)-(F)和表 19 显示的是 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体 PR003334 和 PR003335 和 PR004282 的药代动力学数据。图 22-(A)结果表明, 总体检测方法下, PR003334 在小鼠体内的半衰期约为 8 天。图 22-(B)功能域检测方法显示, PR003334 在小鼠体内的半衰期约为 9 天。图 22-(C)总体检测方法下, PR003335 在小鼠体内的半衰期约为 14 天。图 22-(D)功能域检测方法显示, PR003335 在小鼠体内的半衰期约为 12 天。图 22-(E)总体检测方法下, PR004282 在小鼠体内的半衰期约为 11 天。图 22-(F)功能域检测方法显示, PR004282 在小鼠体内的半衰期约为 8 天。

表 19. PR003334 和 PR003335 和 PR004282 的药代动力学

	PR003334	PR003334	PR003335	PR003335	PR004282	PR004282
PK 参数	总体检测	功能结构域检测	总体检测	功能结构域检测	总体检测	功能结构域检测
T _{1/2} (hr)	193	218	336	295	274	197
V _d (mL/kg)	76	89	81	81	133	119
AUC _{all} (μg/mL hr)	12,680±428	11,471±497	14,813±683	14,286±560	8,363±102	8,125±150
AUC (%)*	100	90	100	96	100	97
Cl (mL/hr/kg)	0.28	0.28	0.17	0.19	0.36	0.43
C ₀ (μg/mL)	111	114	123	124	71	71

实施例 20. B7H4/4-1BB 双抗 PR004282 在食蟹猴体内的药代动力学研究

本实施例测试 B7-H4/4-1BB 双特异性抗体在食蟹猴体内的药代动力学过程进行研究。具体的，将 PR004282 以 0.9%生理盐水稀释，按照 1 mg/kg 的剂量静脉注射入雄性食蟹猴体内，采集给药前及给药后 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 168, 336, 504, 672, 840, 1008 小时的血样。血样在室温静置 30 分钟后离心分离得到血清，利用建立的特异性 ELISA 方法（总体检测法）检测血清中 B7-H4/4-1BB 双特异性抗体的含量。

图 23 和表 20 所示，B7-H4/4-1BB 双特异性抗体在静脉注射给予食蟹猴后显示出典型的 IgG 样药代动力学曲线。PR004282 在雄性猴体内的半衰期约为 3 天。

表 20. PR004282 在正常猴体内的药代动力学(单剂量)

PK 参数		1 号猴	2 号猴	平均值
C _{max}	μg/mL	32.1	48	40
Terminal t _{1/2}	hr	45.3	82.3	63.8
AUC _{0-last}	hr*μg/mL	1472	2300	1886
AUC _{0-INF}	hr*μg/mL	1574	2932	2253
CL	mL/hr/kg	0.635	0.341	0.488
V _{ss}	mL/kg	35.1	35.5	35.3

实施例 21. BALB/c-hCD137 / CT26-B7-H4 小鼠模型中 B7-H4 × 4-1BB 双特异性抗体的抗肿瘤药效评估

为了评估 B7-H4×4-1BB 双特异性抗体的体内抗肿瘤药效，采用 6-8 周雌性 BALB/c-hCD137 小鼠，然后于肿瘤细胞接种当天每只实验小鼠皮下接种 5×10⁵ CT26/hB7-H4 细

胞。当平均肿瘤体积达到 80 mm^3 时对小鼠进行随机分组，每组 6 只小鼠。分组后将特定浓度经 PBS 稀释的药物以腹腔注射 (i.p.)、每周给药 2 次总共给药 6 次 (BIW*3) 的方式进行给药，以 PBS 为空白对照组。在初次给药当天及之后第 4、7、11、14 和 18 天对肿瘤体积和小鼠体重进行测量。肿瘤大小计算公式：肿瘤体积 (mm^3) = $0.5 \times (\text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径}^2)$ 。

图 24 所示 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在 BALB/c-hCD137 / CT26-B7-H4 小鼠模型中的抗肿瘤药效。如图 24-(A)所示，B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR003334 在 18 mpk 和 6 mpk 浓度下对小鼠均有抑制肿瘤生长的药效。如图 24-(B)所示，受试各组小鼠体重变化均在正常范围内。

实施例 22. MDA-MB-468 异种移植小鼠模型中 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体的抗肿瘤药效评估

为了评估 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体的体内抗肿瘤药效。采用 6-8 周雌性 NCG 小鼠，然后于肿瘤细胞接种当天每只实验小鼠皮下接种 5×10^6 MDA-MB-468 细胞。当平均肿瘤体积达到 120 mm^3 时对小鼠进行随机分组，每组 6 只小鼠。分组后接种人 5×10^6 PBMC 细胞，第二天将特定浓度经 PBS 稀释的药物以腹腔注射 (i.p.)、每周给药 2 次总共给药 6 次 (BIW*3) 的方式进行给药，以同型对照 IgG 为对照组。在初次给药当天及之后第 7、12、15、19、22、26 和 29 天对肿瘤体积和小鼠体重进行测量。肿瘤大小计算公式：肿瘤体积 (mm^3) = $0.5 \times (\text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径}^2)$ 。

图 25 所示 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体在 MDA-MB-468 异种移植小鼠模型中的抗肿瘤药效。如图 25-(A)所示，B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR003338 在 18 mpk 浓度下对小鼠有抑制肿瘤生长的药效，且优于 Urelumab 在 15 mpk 浓度下的药效。如图 25-(B)所示，受试各组小鼠体重变化均在正常范围内。

实施例 23. OVCAR3 异种移植小鼠模型中 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体的抗肿瘤药效评估

为了评估 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体的体内抗肿瘤药效。采用 6-8 周雌性 NCG 小鼠，然后于肿瘤细胞接种当天每只实验小鼠皮下接种 5×10^6 OVCAR3 细胞。当平均肿瘤体积达到 120 mm^3 时对小鼠进行随机分组，每组 6 只小鼠。分组后接种人 5×10^6 PBMC 细胞，第二天将特定浓度经 PBS 稀释的药物以腹腔注射 (i.p.)、每周给药 2 次总共给药 6 次 (BIW*3) 的方式进行给药，以同型对照 IgG 为对照组。在初次给药当天及之后第 7、

12、15、19、22、26 和 29 天对肿瘤体积和小鼠体重进行测量。肿瘤大小计算公式：肿瘤体积 (mm^3) = $0.5 \times (\text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径}^2)$ 。

图 26 所示 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在 OVCAR3 异种移植小鼠模型中的抗肿瘤药效。如图 26-(A) 所示，B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在 18 mpk 浓度下对小鼠有抑制肿瘤生长的药效。如图 26-(B) 所示，受试各组小鼠体重变化均在正常范围内。

实施例 24. BALB/c-hCD137/CT26-hB7-H4 小鼠模型中 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体的抗肿瘤药效和记忆性免疫效应评估

为了评估 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体的体内抗肿瘤药效。采用 6-8 周雌性 BALB/c-hCD137 小鼠，然后于肿瘤细胞接种当天每只实验小鼠皮下接种 5×10^5 CT26-B7-H4 细胞。当平均肿瘤体积达到 80 mm^3 时对小鼠进行随机分组，每组 6 只小鼠。分组后将特定浓度经 PBS 稀释的药物以腹腔注射 (i.p.)、每周给药 2 次总共给药 6 次 (BIW $\times$ 3) 的方式进行给药，以 PBS 为空白对照组，Urelumab 作为阳性对照组。在初次给药当天及之后持续 45 天内一周三次对肿瘤体积和小鼠体重进行测量。肿瘤大小计算公式：肿瘤体积 (mm^3) = $0.5 \times (\text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径}^2)$ 。给药后 45 天对肿瘤消除的小鼠的另一侧皮下接种 5×10^5 CT26/hB7H4 细胞，以同龄小鼠作为新接种对照组。一周三次对肿瘤体积和小鼠体重进行测量，第 66 天处死老鼠。

图 27 所示 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在 BALB/c-hCD137/CT26-B7-H4 小鼠模型中的抗肿瘤药效和记忆性免疫效果。如图 27-(A)-(D) 所示，B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在 1mpk 浓度下对小鼠有抑制肿瘤生长的药效，与 Urelumab 药效相当。如图 27-(E) 所示，受试各组小鼠体重变化均在正常范围内。如图 27--(F)-(I) 所示，肿瘤消除后的小鼠新接种同样的肿瘤后与未接种未打药的同龄的小鼠相比，肿瘤不再生长，说明 PR004282 能够诱导记忆性免疫 T 细胞的产生从而可以持续长效的杀伤肿瘤。

实施例 25. B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体的抗肿瘤药效特异性评估

25.1 JIMT-1 异种移植小鼠模型评估 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体的抗肿瘤药效特异性

采用 6-8 周雌性 NCG 小鼠，然后于肿瘤细胞接种当天每只实验小鼠皮下接种 5×10^6 JIMT-1 细胞。当平均肿瘤体积达到 120 mm^3 时对小鼠进行随机分组，每组 6 只小鼠。分组后接种人 5×10^6 PBMC 细胞，第二天将特定浓度经 PBS 稀释的药物以腹腔注射 (i.p.)、

每周给药 2 次总共给药 6 次 (BIW*3) 的方式进行给药, 以同型对照 IgG 为对照组。在初次给药当天及之后第 7、12、15、19、22、26 和 29 天对肿瘤体积和小鼠体重进行测量。肿瘤大小计算公式: 肿瘤体积 (mm^3) = $0.5 \times (\text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径}^2)$ 。

图 28-(A) PR004282 在 JIMT-1 异种移植小鼠模型中的抗肿瘤药效。如图所示, PR004282 在 18 mpk 浓度下对小鼠无抑制肿瘤生长的药效, 而 Urelumab 在 15mpk 浓度下则显示出一定的药效, JIMT-1 是不表达 B7H4 的细胞, 说明 PR004282 不能杀伤不表达 B7H4 的肿瘤细胞。

25.2 BALB/c-hCD137/CT26 小鼠模型评估 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体的抗肿瘤药效特异性

为了评估 B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体的体内抗肿瘤药效的特异性。采用 6-8 周雌性 BALB/c-hCD137 小鼠, 然后于肿瘤细胞接种当天每只实验小鼠皮下接种 5×10^5 CT26 野生型细胞。当平均肿瘤体积达到 80 mm^3 时对小鼠进行随机分组, 每组 6 只小鼠。分组后将特定浓度经 PBS 稀释的药物以腹腔注射 (i.p.)、每周给药 2 次总共给药 6 次 (BIW*3) 的方式进行给药, 以 PBS 为空白对照组。在初次给药当天及之后第 4、7、11、14 和 18 天对肿瘤体积和小鼠体重进行测量。肿瘤大小计算公式: 肿瘤体积 (mm^3) = $0.5 \times (\text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径}^2)$ 。

图 28-(B): B7-H4 $\times$ 4-1BB 双特异性抗体 PR004282 在 BALB/c-hCD137 / CT26 小鼠模型中没有显示出对小鼠较强的抑制肿瘤生长的药效, 而 Urelumab 显示出很强的药效。由于 CT26 是不表达 B7H4 的细胞, 说明 PR004282 不能杀伤不表达 B7H4 的细胞。另一方面, 根据实施例 24 中的结果, 在 CT26 细胞上过表达 B7H4 以后, 该 CT26-hB7-H4 肿瘤细胞的生长会受到 PR004282 的抑制。结合两个实验可以推论出, PR004282 对肿瘤细胞的杀伤是 B7H4 表达依赖的。

虽然以上描述了本发明的具体实施方式, 但是本领域的技术人员应当理解, 这些仅是举例说明, 在不背离本发明的原理和实质的前提下, 可以对这些实施方式做出多种变更或修改。因此, 本发明的保护范围由所附权利要求书限定。