

一种双特异性融合蛋白及其应用

技术领域

[01] 本发明涉及一种具有新型结构的双特异性融合蛋白及其应用, 本发明还涉及编码或制备上述融合蛋白的多核苷酸、核酸构建体、宿主细胞。

背景技术

[02] 随着生物技术的发展, 抗体作为成熟的治疗药物, 在肿瘤和免疫疾病治疗领域发挥着重要的作用。目前, 大部分已上市的抗体药物针对单一抗原, 只能作用于一个靶分子。然而, 复杂疾病在本质上往往是多因素的, 涉及疾病介质的过度表达或相互协同作用, 或不同受体的上调, 包括其信号网络中分子相互作用。因此, 调控多信号途径, 可以提高治疗性抗体的疗效。使用双靶向策略的双特异性抗体(Bispecific antibody, BsAbs)治疗已成为肿瘤和免疫疾病治疗的有效手段之一(Kontermann R. Dual targeting strategies with bispecific antibodies[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2012, 4(2): 182-197.)。

[03] 双特异性抗体能够特异性结合两种不同的抗原或抗原表位 (Carter P. Bispecific human IgG by design[J]. Journal of immunological methods, 2001, 248(1-2): 7-15.)。早在 20 世纪 80 年代, Morrison 等首先通过将不同特异性的单链抗体使用柔性肽段连接后融合表达的方式制备了第一个真正意义上的抗葡聚糖和丹磺酰基的四价双特异性抗体(Coloma M J, Morrison S L. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies[J]. Nature biotechnology, 1997, 15(2): 159.)。但是由于抗体制备技术瓶颈和信号通路基础研究的不足, 双特异性抗体的发展一直受到阻碍。随着对疾病发病机制的深入了解, 同时治疗性单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)相关技术的飞速发展大大提高了抗体的构建、表达和纯化技术, 使双特异性抗体发展具备了克服限制因素的技术和动力。目前双特异性或多特异性抗体发挥作用的机理主要有以下几种: (1)桥连细胞(Bridging cells(in trans));(2)受体抑制或受体活化 (Receptor inhibition(in-cis) or Receptor activation(in-cis)); (3)辅助因子模拟(Co-factor mimetic); (4)背驮劫持法 (PIgGyback approaches)(Aran F. Labrijn, et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline, Nature Reviews Drug Discovery volume 18, pages585-608(2019))。

[04] 双特异性抗体开发中,对于分子结构形式的选择非常重要。不同的双特异性抗体设计各有利弊,但是以临床治疗为目的的双特异性抗体设计都要解决如下问题:第一,保证两对(或以上)不同轻链与重链的正确偶合或配对;第二,保持每个单克隆抗体各自结合域的独立性,同时结合不同表位的时候互相之间不会产生空间位阻的干扰;第三,抗体分子要易于用哺乳动物细胞进行表达,不需要复杂的蛋白修饰工艺;第四,有较好的成药性,如高热稳定性、高化学稳定性、高溶解性、不易聚合、低黏性、高表达量、合适的半衰期等(Spiess C, Zhai Q, Carter P J. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies[J]. Molecular immunology, 2015, 67(2): 95-106.)。

[05] 根据不同的分子结构形式(即组成部分以及构建方式),双特异性抗体可以分为许多种类,例如根据结构左右对称性分为对称结构和不对称结构,根据有无Fc区可以分为含有Fc区的双特异性抗体和不含Fc区的双特异性抗体,以及根据抗原结合区域的数量构型分为两价、三价、四价或更多价的构型等。目前双特异性抗体已经发展出几十种结构(Spiess C, Zhai Q, Carter P J. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies[J]. Molecular immunology, 2015, 67(2): 95-106.),这几十种双特异性抗体结构多样,大致细化为5类,包括IgG样双特异性抗体、含附加功能区的IgG样双特异性抗体、串联不同抗原结合片段的双特异性抗体、融合蛋白型双特异性抗体、化学偶联双特异性抗体。其中,IgG样双特异性抗体的构建主要是采用重组DNA技术进行结构改造,构建后的IgG样双特异性抗体具有完整的可结晶片段(即Fc片段),在结合不同抗原的同时,仍保留了Fc片段介导的ADCC(抗体介导的细胞毒性效应、antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)和CDC(补体介导的细胞毒性效应、complement-dependent cytotoxicity)等功能,同时该类抗体也保留了通过与新生儿Fc受体(neonatal Fc receptor,FcRn)结合延长抗体体内半衰期的特点(Ridgway J B B, Presta L G, Carter P. 'Knobs-into-holes'engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 1996, 9(7): 617-621.);含附加功能区的IgG样双特异性抗体一般是在传统IgG抗体的基础上,通过融合蛋白的方式,在重链和/或轻链上增加其他特异性的抗原结合片段(即附加功能区,如单域抗体、单链抗体等)(LaFleur D, Abramyan D, Kanakaraj P, et al. Monoclonal antibody therapeutics with up to five specificities: functional enhancement through fusion of target-specific

peptides[C]//MAbs. Taylor & Francis, 2013, 5(2): 208-218.); 串联不同抗原结合片段的双特异性抗体是通过连接肽将不同的 Fab、单链抗体、单域抗体或抗原结合片段等以一定的排列顺序连接起来而获得的(Stork R, Müller D, Kontermann R E. A novel tri-functional antibody fusion protein with improved pharmacokinetic properties generated by fusing a bispecific single-chain diabody with an albumin-binding domain from streptococcal protein G[J]. Protein Engineering, Design & Selection, 2007, 20(11): 569-576.); 融合蛋白型双特异性抗体通过多肽片段等连接子将不同特异性的抗体/抗体片段(IgG、Fab、scFv 等)连接形成的可同时结合 2 个或以上抗原的蛋白分子; 化学偶联双特异性抗体同融合蛋白型双特异性抗体类似, 在化学偶联型双特异性抗体中, 首先需分别制备 2 个抗体/抗体片段, 之后通过化学键将两者偶联或将两者同时与载体蛋白偶联。

[06] 此外, 随着信号通路基础研究和双抗发挥作用机理拓展, 可供用于双特异性抗体选择的靶点及组合也越来越多, 如 PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、FGL1、TIM-3、Galectin-9、TIGIT、CD155 以及 TGF- β 受体(TGF- β R)、CD80、CD86、VEGFR、VEGF-trap、FGL1、CD70、4-1BBL、OX40L、SIRP α ; 以及肿瘤抗原包括 Claudin 18.2、HER-2、Mesothelin、BCMA、SSTR2、GPCR5D、PSMA、FCRH5、CD33、CD123、CD20、A33、CEA、CD28、DLL3、EGFR、VEGFR、VEGFR2、VEGF-A、Nectin-4、FGFR、C-met、RANKL、PDGF、PDGFR、PDGFR α 、DLL4、Ang-1、Ang-2 等。通过免疫检查点靶点或肿瘤靶点与其他抵制癌细胞发展或激活 T 细胞相关靶点组合或是多个免疫检查点靶点组合使用, 极大的提升了治疗肿瘤等恶性疾病的可能性。在早期, 临床上将两个单独的检查点抗体联用提高疗效。例如, 与单独使用 ipilimumab 治疗相比, 用 ipilimumab(抗 CTLA4)+nivolumab(抗 PD1)治疗黑色素瘤患者可提高生存率。目前, 四种 PD-1 $\times$ CTLA4bsAb 的安全性和早期疗效正在早期临床试验中进行评估。阻断两种免疫检查点抑制剂的概念也在临床上被用于其他靶标组合, 如 PD-1 $\times$ LAG 3、PD-1 $\times$ TIM3 和 PD-L1 $\times$ CTLA 4。(Wolchok, J. D. et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma, N.Engl. J. Med. 377(14): 1345–1356,(2017); Dovedi, S. J. et al. MEDI5752: A novel bispecific antibody that preferentially targets CTLA-4 on PD-1 expressing T-cells. Cancer Res.78(13), Supplement.Abstract 2776: (2018). Hedvat, M. et al. Simultaneous checkpoint —checkpoint or checkpoint — costimulatory receptortargeting with bispecific antibodies promotes enhanced human T cell activation [abstract P664].Presented at

the 2018 Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) (2018); Aran F. Labrijn, et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline, Nature Reviews Drug Discovery volume 18, pages 585–608 (2019)。

[07] 目前,大多数双特异性抗体尚处于临床或临床前研究阶段,仅有三个双特异性抗体获批上市,它们分别是 Trion Pharma 公司的 Catumaxomab(2017 年因商业因素下市), Amgen 公司的 Blinatumomab 和罗氏的 Emicizumab。Catumaxomab 是一个 Triomab 结构形式的 IgG 样双特异性抗体,靶向作用于 T 细胞和上皮细胞黏附分子(EpCAM)过表达的肿瘤细胞,通过 T 细胞活化、抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、补体介导的细胞毒作用(complement-dependent cytotoxicity, CDC)来抑制肿瘤细胞,2009 年被 EMA 批准用于标准治疗无效或不可行的 EpCAM 阳性肿瘤所致的恶性腹水的治疗,该药也是第一个被获批上市的双特异性抗体。Blinatumomab 为不含 Fc 区双特异性抗体,采用 BiTE(bispecific T cell engager)结构形式。Blinatumomab 抗 CD3 部分结合 T 细胞,通过抗 CD19 部分结合恶性和正常 B 细胞,从而诱导 T 细胞介导的肿瘤细胞杀伤作用,2014 年被 FDA 批准用于治疗费城染色体阴性前体 B 细胞急性淋巴性白血病。Emicizumab 是一种经修饰的人源化双特异性 IgG4 单抗,可以结合因子 IXa 和因子 X。该抗体采用“Knobs-into-Holes(KiH)”进行 Fc 设计、“Common Light Chain-IgG(CLC-IgG)”进行 LC 设计和“Multidimensional Optimization(多维优化)”进行可变区优化,2017 年被 FDA 批准用于存在 VIII 因子抑制物的 A 型血友病的常规预防。

表 1 已获批上市(含已下市)的双特异性抗体

双特异性抗体	商品名	在研单位	首次获批时间
Catumaxomab	Removab	Trion Pharma	2009 年(EMA) (2017 年下市)
Blinatumomab	Blincyto	Amgen	2014 年(FDA)
Emicizumab	Hemlibra	罗氏	2017 年(FDA)

[08] 尽管目前已有几十种双特异性抗体/平台及 3 个已上市药物的研发经验,但由于双特异性抗体结构形式复杂,作用特点多样,其发展相对一般抗体而言存在更多的问题和挑战。例如 IgG 样双特异性抗体在制备过程中面临着重链-重链或者重链-轻链错配的问题,其中最为典型的就

Catumaxomab, 虽然 Catumaxomab 是第一个批准上市的双特异性抗体, 但同时也具有非常明显的局限性, 主要体现在 Triomab 抗体复杂的生产工艺以及异源抗体比较容易产生的免疫原性问题, 2017 年该药因商业因素下市; 再比如串联不同抗原结合片段的双特异性抗体由于缺乏恒定区, 特别是缺乏 Fc 片段, 半衰期较短, 而且其表达量和表达后的细胞内稳定性一般低于传统 IgG(Stork R, Müller D, Kontermann R E. A novel tri-functional antibody fusion protein with improved pharmacokinetic properties generated by fusing a bispecific single-chain diabody with an albumin-binding domain from streptococcal protein G[J]. Protein Engineering, Design & Selection, 2007, 20(11): 569-576.)。同时, 多数的该类抗体在纯化过程中难以采用亲和纯化手段, 因此其纯化工艺和成品中的杂质分析也较传统 IgG 复杂(Tan P H, Sandmaier B M, Stayton P S. Contributions of a highly conserved VH/VL hydrogen bonding interaction to scFv folding stability and refolding efficiency[J]. Biophysical journal, 1998, 75(3): 1473-1482.), 其中最典型的的就是 Blinatumomab, Blinatumomab 由于没有 Fc 片段, 分子量较小, 在血液中的半衰期只有 1.25 ± 0.63 h, 远远比一个完整的抗体半衰期短, 且需要连续给予 4 周的静脉注射才能达到有效剂量, 并且试剂使用的时候需要额外配备连续输液装置, 再加上生产时, 稳定性差和聚集体容易形成, 也影响产品的质量和增加生产成本。目前的双特异性抗体, 存在表达量低、稳定性差、生产工艺复杂且研发成本明显高于单克隆抗体等多种问题, 这些都局限了双特异性抗体的发展。因此, 亟需开辟具有新结构的双特异性抗体, 为临床提供更多的选择。

发明内容

[09] 针对上述问题, 本发明提供了一种具有新型结构的双特异性融合蛋白, 它属于含附加功能区的 IgG 样双特异性融合蛋白。具体的, 所述的融合蛋白是在全长的免疫球蛋白 G(IgG) 的铰链区通过可选的肽接头插入第二结合结构域, 所述 IgG 的 Fab 区为所述融合蛋白的第一结合结构域; 插入第二结合结构域后的所述 IgG 的重链为所述融合蛋白的重链, 所述 IgG 的轻链为所述融合蛋白的轻链; 所述第二结合结构域选自人受体、配体、所述受体或配体的胞外区片段、结合结构域片段或片段组合; 其中, 所述受体或配体为在天然信号通路中会形成二聚化或多聚化结构以活化或抑制信号通路的受体或配体, 且所述第二结合结构域与所述第一结合结构域靶向不同的靶点。我们将具有上述结构的双特异性融合蛋白命名为

Hibody(Hinge-insersion bispecific antibody)结构融合蛋白(下称 Hibody 结构融合蛋白或 Hibody)。

[10] 进一步地, 所述第一结合结构域靶向结合免疫检查点分子或肿瘤抗原。

5 [11] 进一步地, 所述免疫检查点分子包括 PD-1(*Programmed cell death protein 1*)、PD-L1(*Programmed cell death 1 ligand 1*)、CTLA-4(*Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*)、LAG-3(*Lymphocyte activation gene-3*)、FGL1(*Fibrinogen-like protein 1*)、TIM-3(*T cell immunoglobulin-3*)、Galectin-9、TIGIT(*T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*)、CD155、
10 CD47; 所述肿瘤抗原包括 Claudin 18.2、Her-2(*Human epidermal growth factor receptor-2*)、Mesothelin、BCMA(*B Cell Maturation Antigen*)、SSTR2(*Somatostatin receptor 2*)、GPCR5D(*G-protein coupled receptor family C group 5 member D*)、PSMA(*Prostate specific membrane antigen*)、FcRH5(*Fc receptor-like protein 5*)、CD33、CD123、CD20、A33、CEA(*Carcino-embryonic antigen*)、CD28、DLL3(*Delta-like protein 3*)、EGFR(*Epidermal growth factor receptor*)、
15 VEGFR(*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)、VEGFR2(*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*)、VEGF-A(*Vascular endothelial growth factor- A*)、Nectin-4、FGFR(*Fibroblast growth factor receptors*)、C-met、RANKL(*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*)、PDGF(*Platelet Derived Growth Factor*)、PDGFR(*Platelet Derived Growth Factor Receptor*)、PDGFR α (*Platelet Derived Growth Factor Receptor α*)、DLL4(*Delta-like ligand 4*)、Ang-1(*Angiopoietin-1*)、Ang-2(*Angiopoietin-2*)。

[12] 进一步地, 所述第二结合结构域靶向结合人
TGF- β (*Transforming growth factor- β*)、CTLA-4、VEGF、LAG3、CD27、
25 4-1BB(*CD137*)、OX40(*CD134*)、CD47、FGL1(*Fibrinogen Like Protein 1*)、TLT-2(*Trem-like transcript 2*)、CD28、HGF(*Hepatocyte growth factor*)、CSF1(*Colony-stimulating factor 1*)、CXCL1(*CXC chemokine ligand 1*)、CXCL2(*CXC chemokine ligand 2*)、CXCL3(*CXC chemokine ligand 3*)、CXCL5(*CXC chemokine ligand 5*)、CXCL6(*CXC chemokine ligand 6*)、CXCL7(*CXC chemokine ligand 7*)、CXCL8(*CXC chemokine ligand 8*)、CXCL9(*CXC chemokine ligand 9*)、
30 CXCL10(*CXC chemokine ligand 10*)、CXCL12(*CXC chemokine ligand 12*)、GITR(*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*)、EGF(*Epidermal Growth Factor*)、ICOSL(*Inducible co-stimulator ligand*)。

[13] 进一步地, 所述受体或配体为人 TGF- β 受体(TGF- β R)、CD80、CD86、VEGFR、VEGF-trap、FGL1、CD70、4-1BBL、OX40L、SIRP α (Signal regulatory protein α)、B7-H3(CD276)、C-met、CSF1R(Colony-stimulating factor 1 receptor)、CXCR2(CXC chemokine receptor 2)、CXCR3(CXC chemokine receptor 3)、CXCR4(CXC chemokine receptor 4)、GITRL(Glucocorticoid-induced TNF receptor ligand)、EGFR、ICOS(Inducible co-stimulator)。

[14] 其中, CD80 和 CD86 均是跨膜糖蛋白, 属免疫球蛋白超家族(IgSF)成员。成熟的 CD80 分子由 254 个氨基酸组成, 其中胞外结构域(ECD)208 个氨基酸、跨膜结构域 25 个氨基酸和胞内结构域 21 个氨基酸。类似地, 成熟 CD86 分子由 303 个氨基酸组成, 其中胞外结构域 222 个氨基酸、跨膜结构域 20 个氨基酸和胞内结构域 61 个氨基酸。CD80 和 CD86 的胞外结构域包含免疫球蛋白 V(IgV)区和免疫球蛋白 C(IgC)区, CD80 和 CD86 通过免疫球蛋白 V(IgV)区与其配体 CD28 和 CTLA-4 结合。在 CD80 和 CD86 与 CD28 结合的情形, CD80 和 CD86 对于抗原诱导 T 细胞活化、增殖和效应功能的产生具有重要的调节作用, 是正调节因子; 而在 CD80 和 CD86 与 CTLA-4 结合的情形, CD80 和 CD86 下调免疫应答, 是负性调节因子。因此, CD80 和 CD86 是 T 淋巴细胞活化时的协同刺激因子, 在自身免疫监控、体液免疫应答及移植反应中发挥重要作用。采用 CD28 的配体 CD80 作为激活因子, 活化 T 细胞, 与采用激动性抗 CD28 抗体活化 T 细胞不同, 其不会引发严重的细胞因子风暴, 从而大大降低了危及患者生命情形的可能性。

[15] 在一些实施方案中, CD80 ECD 选自人 CD80(诸如 SEQ ID NO:134 的人 CD80)或来自 CD80 同种型 2 或同种型 3 的人 CD80 ECD(SEQ ID NO:135 和 136)。所述 CD80ECD 包含 CD80 免疫球蛋白 V(IgV)区(CD80-IgV, SEQ ID NO:133)。在一个实施方案中, 所述 CD80ECD 包含人 CD80 免疫球蛋白 V 区和 C 区(CD80-IgVlgC, SEQ ID NO:32)。在一个实施方案中, 所述 CD80ECD 是人 CD80ECD, 在一个实施方案中, 所述 CD80ECD 包含人 CD80IgV。

[16] CD80-IgV(SEQ ID NO: 133):

VIHVTKEVKE VATLSCGHN V SVEELAQT RI YWQKEKKMVL TMMSGDMNIW PEYKNRTIFD 60

ITNNLSIVIL ALRPSDEGTY ECVVLKYEKD AFKREHLAEV TLSVKADFPT PS 112

[17] CD80-IgVlgC(SEQ ID NO: 32):

VIHVTKEVKE VATLSCGHN V SVEELAQT RI YWQKEKKMVL TMMSGDMNIW PEYKNRTIFD 60

ITNNLSIVIL ALRPSDEGTY ECVVLKYEKD AFKREHLAEV TLSVKADFPT PSISDFEIPT 120

SNIRRIICST SGGFPEPHLS WLENGEELNA INTTVSQDPE TELYAVSSKL DFNMTTNHSF 180
MCLIKYGHRLR VNQTFNWN 198

[18] CD80 同种型 1(SEQ ID NO: 134):

MGHTRRQGT SPSKCPYLNFF QLLVLAGLSH FCSGVIHVT EVKEVATLSC GHNVSVEELA 60
5 QTRIWQKEK KMLVTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPD EGTYESCVVLK 120
YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIIRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE 180
ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHRLVNQTFN WNTTKQEHFP 240
DNLLPSWAIT LISVNGIFVI CCLTYCFAPR CRERRRNERL RRESVRPV 288

[19] CD80 同种型 2(SEQ ID NO: 135):

MGHTRRQGT SPSKCPYLNFF QLLVLAGLSH FCSGVIHVT EVKEVATLSC GHNVSVEELA 60
10 QTRIWQKEK KMLVTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPD EGTYESCVVLK 120
YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIIRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE 180
ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHRLVNQTFN WNTSFAPRCR 240
ERRRNERLRR ESVRPV 256

[20] CD80 同种型 3(SEQ ID NO: 136):

MGHTRRQGT SPSKCPYLNFF QLLVLAGLSH FCSGVIHVT EVKEVATLSC GHNVSVEELA 60
QTRIWQKEK KMLVTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPD EGTYESCVVLK 120
YEKDAFKREH LAEVTLSVKG FAPRCRERRR NERLRRESVR PV 162

[21] 进一步地，所述第一结合结构域和所述第二结合结构域选自以下组合：
20

[22] (1)所述第一结合结构域靶向结合 PD-L1，所述第二结合结构域靶向结合人 TGF- β 、VEGF、FGL1、CD47、CD155、HGF、CSF1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、EGF 或 ICOSL；或

[23] (2)所述第一结合结构域靶向结合 PD-1，所述第二结合结构域靶向结合人 CTLA-4、VEGF、HGF、EGF、CD28、LAG3、CD27、4-1BB 或 OX40；或
25

[24] (3)所述第一结合结构域靶向结合 CTLA-4，所述第二结合结构域靶向结合人 CD28、VEGF、HGF、EGF、LAG3、CD27、4-1BB 或 OX40；或

- [25] (4)所述第一结合结构域靶向结合 LAG-3, 所述第二结合结构域靶向结合人 CD28、VEGF、HGF、EGF、CTLA-4、CD27、4-1BB 或 OX40; 或
- [26] (5)所述第一结合结构域靶向结合 FGL1, 所述第二结合结构域靶向结合人 TGF- β 、VEGF、CD47、CD155、HGF、CSF1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、EGF 或 ICOSL; 或
- [27] (6)所述第一结合结构域靶向结合 TIM-3, 所述第二结合结构域靶向结合人 VEGF、HGF、EGF、LAG3、CD27、4-1BB 或 OX40; 或
- [28] (7)所述第一结合结构域靶向结合 Galectin-9, 所述第二结合结构域靶向结合人 TGF- β 、VEGF、CD47、CD155、HGF、CSF1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、EGF 或 ICOSL; 或
- [29] (8)所述第一结合结构域靶向结合 TIGIT, 所述第二结合结构域靶向结合人 TGF- β 、HGF、EGF 或 VEGF; 或
- [30] (9)所述第一结合结构域靶向结合 CD155, 所述第二结合结构域靶向结合人 TGF- β 、VEGF、HGF、EGF、CD47 或 CD155; 或
- [31] (10)所述第一结合结构域靶向结合 Claudin 18.2、HER-2、mesothelin、BCMA、SSTR2、GPCR5D、PSMA、FCRH5、CD33、CD123、CD20、A33、CEA、CD28、DLL3、EGFR、VEGFR、VEGFR2、VEGF-A、Nectin-4、FGFR、C-met、RANKL、PDGF、PDGFR、PDGFR α 、DLL-4、Ang-1、Ang-2, 所述第二结合结构域靶向结合人 CTLA-4, TGF- β 、VEGF、FGL1、LAG3、4-1BB、OX40、CD27、CD28、CD47、CD155、HGF、CSF1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、EGF 或 ICOSL。
- [32] 进一步地, 所述第一结合结构域和所述受体、配体选自以下组合:
- [33] (1)所述第一结合结构域靶向结合 PD-L1, 所述受体、配体选自 TGF- β RII、VEGFR、LAG-3、SIRP α 、TIGIT、C-MET、CSF1R、CXCR2、CXCR3、CXCR4、EGFR 或 ICOS; 或
- [34] (2)所述第一结合结构域靶向结合 PD-1, 所述受体、配体选自人 CD80、CD86、VEGFR、c-MET、EGFR、FGL1、CD70、4-1BBL 或 OX40L; 或
- [35] (3)所述第一结合结构域靶向结合 CTLA-4, 所述受体、配体选自人 CD80、CD86、VEGFR、c-MET、EGFR、FGL1、CD70、4-1BBL 或 OX40L; 或

[36] (4)所述第一结合结构域靶向结合 LAG-3, 所述受体、配体选自人 VEGFR、c-MET、EGFR、CD80、CD86、CD70、4-1BBL 或 OX40L; 或

[37] (5)所述第一结合结构域靶向结合 FGL1, 所述受体、配体选自人 TGF- β R_{II}、VEGFR、SIRP α 、TIGIT、c-MET、CSF1R、CXCR2、CXCR3、CXCR4、EGFR 或 ICOS; 或

[38] (6)所述第一结合结构域靶向结合 TIM-3, 所述受体、配体选自人 VEGFR、c-MET、EGFR、FGL1、CD70、4-1BBL 或 OX40L; 或

[39] (7)所述第一结合结构域靶向结合 Galectin-9, 所述受体、配体选自人 TGF- β R_{II}、VEGFR、SIRP α 、TIGIT、c-MET、CSF1R、CXCR2、CXCR3、CXCR4、EGFR 或 ICOS; 或

[40] (8)所述第一结合结构域靶向结合 TIGIT, 所述受体、配体选自人 TGF- β R_{II}、c-MET、EGFR 或 VEGFR; 或

[41] (9)所述第一结合结构域靶向结合 CD155, 所述受体、配体选自人 TGF- β R_{II}、VEGFR、c-MET、EGFR、SIRP α 或 TIGIT; 或

[42] (10)所述第一结合结构域靶向结合 Claudin 18.2、HER-2、mesothelin、BCMA、SSTR2、GPCR5D、PSMA、FCRH5、CD33、CD123、CD20、A33、CEA、CD28、DLL3、EGFR、VEGFR、VEGFR2、Nectin-4、FGFR、c-MET、RANKL、PDGF、PDGFR、PDGFR α 、DLL4、Ang-1 或 Ang-2, 所述受体、配体选自人 CTLA-4, CD80, CD86, TGF- β R_{II}、VEGFR、FGL1、LAG3、4-1BB、OX40、CD27、CD28、CD70、c-MET、SIRP α 、TIGIT、CSF1R、CXCR2、CXCR3、CXCR4、EGFR 或 ICOS。

[43] 进一步地, 所述受体、配体的片段包括受体或配体的胞外区片段、结合结构域片段。

[44] 进一步地, 所述第一结合结构域靶向结合 PD-L1; 所述第二结合结构域为人 TGF- β R_{II} 片段; 或所述第一结合结构域靶向结合 PD-1, 所述第二结合结构域包含人 CD80 ECD、CD80 IgV 区、人 CD80IgVIgC、VEGFR1 ECD、VEGFR2 ECD 或 VEGFR1 的第 2 个细胞外区域和 VEGFR2 的第 3 个细胞外区域组合; 或所述第一结合结构域靶向结合 Claudin 18.2 或 HER-2、EGFR, 所述第二结合结构域选自人 CD80 ECD、CD80 IgV 区、人 CD80IgVIgC、VEGFR1 ECD、VEGFR2 ECD 或 VEGFR1 的第 2 个细胞外区域和 VEGFR2 的第 3 个细胞外区域组合。

[45] 进一步地, 所述第二结合结构域选自:

[46] (1)包含 SEQ ID NO:31、131 或 132 所示序列的人 TGF- β RII 或包含与 SEQ ID NO:31、131 或 132 所示序列相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列或与 SEQ ID NO:31、131 或 132 所示序列相比具有 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸替换或缺失后的氨基酸序列; 或

[47] (2)包含 SEQ ID NO:32 或 133 所示序列的 CD80 ECD 或包含与 SEQ ID NO:32 或 133 所示序列相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列或与 SEQ ID NO:32 或 133 所示序列相比具有 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸替换或缺失后的氨基酸序列; 或

[48] (3)包含 SEQ ID NO:33 所示序列的 VEGFR1 的第 2 个细胞外区域和 VEGFR2 的第 3 个细胞外区域片段组合或包含与 SEQ ID NO:33 所示序列相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列或与 SEQ ID NO:33 所示序列相比具有 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个氨基酸替换或缺失后的氨基酸序列。

[49] 进一步地, 所述第二结合结构域的 C 端或/和 N 端带有肽接头, 所述肽接头由 2-30 个氨基酸组成。

[50] 进一步地, 所述肽接头可为:

- (1) (GGGGS)_n; 或
- (2) AKTTPKLEEGEFSEAR(SEQ ID NO: 80); 或
- (3) AKTTPKLEEGEFSEARV(SEQ ID NO: 81); 或
- (4) AKTTPKLGG(SEQ ID NO: 82); 或
- (5) SAKTTPKLGG(SEQ ID NO: 83); 或
- (6) SAKTTP(SEQ ID NO: 84); 或
- (7) RADAAP(SEQ ID NO: 85); 或
- (8) RADAAPTVS(SEQ ID NO: 86); 或
- (9) RADAAAAGGPGS(SEQ ID NO: 87); 或
- (10) RADAAAAA(SEQ ID NO: 88); 或

- (11) SAKTTPKLEEGEFSEARV(SEQ ID NO: 89); 或
(12) ADAAP(SEQ ID NO: 90); 或
(13) DAAPTVSIFPP(SEQ ID NO: 91) ; 或
(14) TVAAP(SEQ ID NO: 92) ; 或
5 (15) TVAAPSVFIFPP(SEQ ID NO: 93) ; 或
(16) QPKAAP(SEQ ID NO: 94) ; 或
(17) QPKAAPSVTLFPP(SEQ ID NO: 95); 或
(18) AKTTPP(SEQ ID NO: 96); 或
(19) AKTTPPSVTPLAP(SEQ ID NO: 97); 或
10 (20) AKTTAP (SEQ ID NO: 98) ; 或
(21) AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 99) ; 或
(22) ASTKGP (SEQ ID NO: 100) ; 或
(23) ASTKGPSVFPLAP(SEQ ID NO: 101); 或
(24) GENKVEYAPALMALS(SEQ ID NO: 102) ; 或
15 (25) GPAKELTPLKEAKVS(SEQ ID NO: 103) ; 或
(26) GHEAAVMQVQYPAS(SEQ ID NO: 104) ; 或
(27) GGGGSGGGGSGGGGSA(SEQ ID NO: 105),

其中所述 n 等于 1、2、3 或 4;

当 n=1 时, 所述的(GGGGS)_n 为 GGGGS(SEQ ID NO: 120);

20 当 n=2 时, 所述的(GGGGS)_n 为 GGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 121) 或 (GGGGS)₂;

当 n=3 时, 所述的(GGGGS)_n 为 GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 122) 或(GGGGS)₃;

25 当 n=4 时, 所述的(GGGGS)_n 为 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 123)或(GGGGS)₄。

[51] 进一步地, 插入的所述第二结合结构域的大小不超过 235、240、250、260、270、280、290 或 300 个氨基酸。

[52] 进一步地, 所述第二结合结构域的插入位点位于铰链区的中前部, 插入位点不影响免疫球蛋白的二硫键的形成。其中, 所述铰链区的中前部通常是指 231A 之前的部分。进一步地, 所述插入位点前后铰链区的部分氨基酸被替换或缺失, 例如, 所述铰链区含有 D221G 和/或 C220V 突变。

5 [53] 进一步地, 所述 IgG 选自哺乳动物 IgG、人源化 IgG 和人 IgG, 所述哺乳动物包括小鼠、大鼠; 优选的, 所述 IgG 为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。

[54] 进一步地, 所述的融合蛋白的 Fc 区是无糖基化的或脱糖基化的或具有降低的岩藻糖基化或是无岩藻糖基化的。

[55] 进一步地, 所述 IgG 为 Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab、
10 Nivolumab、Pembrolizumab、Cemiplimab、Ipilimumab。优选的, 所述 IgG 为 Atezolizumab, 所述 IgG 的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:106 所示, 所述 IgG 的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:107 所示; 或所述 IgG 为 Avelumab, 所述 IgG 的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:108 所示, 所述 IgG 的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:109 所示; 或所述 IgG 为 Durvalumab, 所述 IgG 的重
15 链氨基酸序列如 SEQ ID NO:110 所示, 所述 IgG 的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:111 所示; 或所述 IgG 为 Nivolumab, 所述 IgG 的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:112 所示, 所述 IgG 的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:113 所示; 或所述 IgG 为 Pembrolizumab, 所述 IgG 的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:114 所示, 所述 IgG 的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:115 所示; 或所述 IgG 为
20 Ipilimumab, 所述 IgG 的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:116 所示, 所述 IgG 的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:117 所示; 或所述 IgG 为 Cemiplimab, 所述 IgG 的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:118 所示, 所述 IgG 的轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:119 所示。

[56] 具体的, 本发明提供了一种具有第一结合结构域靶向人 PD-L1 的
25 Hibody 结构融合蛋白, 所述 IgG 的 Fab 中重链可变区的 CDR 和/或所述轻链可变区的 CDR 与如下序列限定的抗体具有相同的 CDR 序列或在如下序列限定的抗体的 CDR 上进行 1-2 个氨基酸替换, 所述序列限定的抗体为:

[57] (1)重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:66 所示; 和/或

[58] (2)轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:67 所示。

30 [59] 进一步地, 所述 IgG 的 Fab 中重链可变区的 CDR 和/或所述轻链可变区的 CDR 如下所示:

[60] (1)重链可变区 CDR1 氨基酸序列选自 SEQ ID NO:1-5 及对 SEQ ID NO:

- 1-5 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；CDR2 氨基酸序列选自 SEQ ID NO:6-10 及对 SEQ ID NO: 6-10 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；CDR3 氨基酸序列选自 SEQ ID NO:11-15 及对 SEQ ID NO: 11-15 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或
- 5 [61] (2)轻链可变区 CDR1 氨基酸序列选自 SEQ ID NO:16-20 及对 SEQ ID NO: 16-20 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；CDR2 氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 21-25 及对 SEQ ID NO: 21-25 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；CDR3 氨基酸序列选自 SEQ ID NO:26-30 及对 SEQ ID NO: 26-30 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列。
- 10 [62] 在特定实施方案中，根据采用不同的测定方法或系统认定，相应重链和轻链可变区的互补决定区 CDR 1-3 如表 2 所示。

表 2 抗 PD-L1 抗体重链和轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列

类别	系统	CDR1	CDR2	CDR3
重链	Chothia	SEQ ID NO: 1 GFSLSRVY	SEQ ID NO: 6 WGVGT	SEQ ID NO: 11 NWGTADYFDY
	AbM	SEQ ID NO: 2 GFSLSRYSVH	SEQ ID NO: 7 MIWGVGTDD	SEQ ID NO: 12 NWGTADYFDY
	Kabat	SEQ ID NO: 3 RYSVH	SEQ ID NO: 8 MIWGVGTDDYNSALKS	SEQ ID NO: 13 NWGTADYFDY
	Contact	SEQ ID NO: 4 SRYSVH	SEQ ID NO: 9 WLGMIWGVGTDD	SEQ ID NO: 14 ARNWGTADYFD
	IMGT	SEQ ID NO: 5 GFSLSRYS	SEQ ID NO: 10 IWGVGTT	SEQ ID NO: 15 ARNWGTADYFDY
轻链	Chothia	SEQ ID NO: 16 RASKSVHTSGYSYMH	SEQ ID NO: 21 LASNLES	SEQ ID NO: 26 QHSGELPYT
	AbM	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 27

		RASKSVHTSGYSYMH	LASNLES	QHSGELPYT
	Kabat	SEQ ID NO: 18 RASKSVHTSGYSYMH	SEQ ID NO: 23 LASNLES	SEQ ID NO: 28 QHSGELPYT
	Contact	SEQ ID NO: 19 HTSGYSYMHWW	SEQ ID NO: 24 LLIYLASNLE	SEQ ID NO: 29 QHSGELPY
	IMGT	SEQ ID NO: 20 KSVHTSGYSY	SEQ ID NO: 25 LAS	SEQ ID NO: 30 QHSGELPYT

[63] 进一步地，所述融合蛋白含有以下 CDR 序列，

[64] (1)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1, 6, 11 或对 SEQ ID NO: 1, 6, 11 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16, 21, 26 或对 SEQ ID NO: 16, 21, 26 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；或

[65] (2)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2, 7, 12 或对 SEQ ID NO: 2, 7, 12 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 17, 22, 27 或对 SEQ ID NO: 17, 22, 27 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；或

[66] (3)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3, 8, 13 或对 SEQ ID NO: 3, 8, 13 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18, 23, 28 或对 SEQ ID NO: 18, 23, 28 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；或

[67] (4)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4, 9, 14 或对 SEQ ID NO: 4, 9, 14 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 19, 24, 29 或对 SEQ ID NO: 19, 24, 29 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；或

[68] (5)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5, 10, 15 或对 SEQ ID NO: 5, 10, 15 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20, 25, 30 或对 SEQ ID NO: 20, 25, 30 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列。

[69] 进一步地，所述融合蛋白的重链中重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为

SEQ ID NO: 3, 8, 13; 和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18, 23, 28。

[70] 进一步地, 所述融合蛋白的重链可变区和轻链可变区的序列如下所示,

5 [71] (1)重链可变区的序列如 SEQ ID NO:66 所示, 或与 SEQ ID NO:66 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:66 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列; 和/或

[72] (2)轻链可变区的序列如 SEQ ID NO:67 所示, 或与 SEQ ID NO:67 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:67 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、
10 96%、97%、98%、99% 的序列。

[73] 更具体的, 所述融合蛋白的重链和轻链的氨基酸序列如下所示,

[74] (1)所述融合蛋白的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:72 所示或与 SEQ ID NO:72 相比同一性大于 90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列;

[75] (2)所述融合蛋白的轻链氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:73 所示或与
15 SEQ ID NO:73 相比同一性大于 90%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列。

[76] 进一步地, 所述融合蛋白的重链和轻链的氨基酸序列如下所示,

[77] (1)所述融合蛋白的重链氨基酸序列与 SEQ ID NO:72 相比具有 1-15 个氨基酸位点突变或具有替换的肽接头;

[78] (2)所述融合蛋白的轻链氨基酸序列与 SEQ ID NO:73 相比具有 1-10 个
20 氨基酸位点突变。

[79] 具体的, 本发明提供了一种第一结合结构域靶向人 PD-1 的 Hicbody 结构融合蛋白, 其中, 所述 Fab 中重链可变区的 CDR 和/或所述轻链可变区的 CDR 与如下序列限定的抗体具有相同的 CDR 序列或在如下序列限定的抗体的 CDR 上进行 1-2 个氨基酸替换, 所述序列限定的抗体为:

25 [80] (1)重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:64 所示; 和/或

[81] (2)轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO:65 所示。

[82] 进一步地, 融合蛋白中 Fab 中重链可变区的 CDR 和/或所述轻链可变区的 CDR 如下所示:

[83] (1)重链可变区 CDR1 氨基酸序列选自 SEQ ID NO:34-38 及对 SEQ ID NO: 34-38 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列; CDR2 氨基酸序列选自
30

SEQ ID NO:39-43 及对 SEQ ID NO: 39-43 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；CDR3 氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 44-48 及对 SEQ ID NO: 44-48 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或

5 [84] (2) 轻链可变区 CDR1 氨基酸序列选自 SEQ ID NO:49-53 及对 SEQ ID NO: 49-53 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；CDR2 氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 54-58 及对 SEQ ID NO: 54-58 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；CDR3 氨基酸序列选自 SEQ ID NO:59-63 及对 SEQ ID NO: 59-63 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列。

10 [85] 在特定实施方案中，根据采用不同的测定方法或系统认定，相应重链和轻链可变区的互补决定区 CDR 1-3 如表 3 所示。

表 3 抗 PD-1 抗体重链和轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列

类别	系统	CDR1	CDR2	CDR3
重链	Chothia	SEQ ID NO: 34 GITFSNS	SEQ ID NO: 39 WYDGSK	SEQ ID NO: 44 NDDY
	AbM	SEQ ID NO: 35 GITFSNSGMH	SEQ ID NO: 40 VIWYDGSKRY	SEQ ID NO: 45 NDDY
	Kabat	SEQ ID NO: 36 NSGMH	SEQ ID NO: 41 VIWYDGSKRYYADSVKG	SEQ ID NO: 46 NDDY
	Contact	SEQ ID NO: 37 SNSGMH	SEQ ID NO: 42 WVAVIWYDGSKRY	SEQ ID NO: 47 ATNDD
	IMGT	SEQ ID NO: 38 GITFSNSG	SEQ ID NO: 43 IWYDGSKR	SEQ ID NO: 48 ATNDDY
轻链	Chothia	SEQ ID NO: 49 RASQSVSSYLA	SEQ ID NO: 54 DASNRAT	SEQ ID NO: 59 QQSSNWPRT
	AbM	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 60

		RASQSVSSYLA	DASNRAT	QQSSNWPRT
	Kabat	SEQ ID NO: 51 RASQSVSSYLA	SEQ ID NO: 56 DASNRAT	SEQ ID NO: 61 QQSSNWPRT
	Contact	SEQ ID NO: 52 SSYLAWY	SEQ ID NO: 57 LLIYDASNRA	SEQ ID NO: 62 QQSSNWPRT
	IMGT	SEQ ID NO: 53 QSVSSY	SEQ ID NO: 58 DAS	SEQ ID NO: 63 QQSSNWPRT

[86] 进一步地，所述融合蛋白可变区的 CDR1-3 如下所定义，

[87] (1)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 34, 39, 44 或对 SEQ ID NO: 34, 39, 44 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 49, 54, 59 或对 SEQ ID NO: 49, 54, 59 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；或

[88] (2)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35, 40, 45 或对 SEQ ID NO: 35, 40, 45 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 50, 55, 60 或对 SEQ ID NO: 50, 55, 60 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；或

[89] (3)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 36, 41, 46 或对 SEQ ID NO: 36, 41, 46 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 51, 56, 61 或对 SEQ ID NO: 51, 56, 61 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；或

[90] (4)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 37, 42, 47 或对 SEQ ID NO: 37, 42, 47 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 52, 57, 62 或对 SEQ ID NO: 52, 57, 62 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；或

[91] (5)重链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38, 43, 48 或对 SEQ ID NO: 38, 43, 48 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列；和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 53, 58, 63 或对 SEQ ID NO: 53, 58, 63 进行 1 或 2 个氨基酸替换后的氨基酸序列。

[92] 进一步地，所述融合蛋白的可变区 CDR1-3 如下所定义：重链可变区

CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 36, 41, 46; 和/或轻链可变区 CDR 1-3 氨基酸序列为 SEQ ID NO: 51, 56, 61。

[93] 进一步地, 所述融合蛋白的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列如下所示,

5 [94] (1)重链可变区的序列如 SEQ ID NO:64 所示, 或与 SEQ ID NO:64 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:64 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的序列; 和/或

[95] (2)轻链可变区的序列如 SEQ ID NO:65 所示, 或与 SEQ ID NO:65 具有相同的 CDR 1-3 且与 SEQ ID NO:65 相比同一性大于 80%、85%、90%、95%、
10 96%、97%、98%、99%的序列。

[96] 更具体地, 所述融合蛋白的重链和轻链氨基酸序列如下所定义:

[97] (1)所述融合蛋白的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示或与 SEQ ID NO:68 相比同一性大于 90%、95%、96%、97%、98%、99%的序列;

[98] (2)所述融合蛋白的轻链氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:69 所示或与
15 SEQ ID NO:69 相比同一性大于 90%、95%、96%、97%、98%、99%的序列。

[99] 进一步地, 所述融合蛋白的重链和轻链的氨基酸序列如下所示:

[100] (1)所述融合蛋白的重链氨基酸序列与 SEQ ID NO:68 相比具有 1-15 个氨基酸位点突变或具有替换的肽接头;

[101] (2)所述融合蛋白的轻链氨基酸序列与 SEQ ID NO:69 相比具有 1-10 个
20 氨基酸位点突变。

[102] 更具体地, 所述融合蛋白的重链和轻链氨基酸序列如下所定义:

[103] (1)所述融合蛋白的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:70 所示或与 SEQ ID NO:70 相比同一性大于 90%、95%、96%、97%、98%、99%的序列;

[104] (2)所述融合蛋白的轻链氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:71 所示或与
25 SEQ ID NO:71 相比同一性大于 90%、95%、96%、97%、98%、99%的序列。

[105] 进一步地, 所述融合蛋白的重链和轻链的氨基酸序列如下所示:

[106] (1)所述融合蛋白的重链氨基酸序列与 SEQ ID NO:70 相比具有 1-15 个氨基酸位点突变或具有替换的肽接头;

[107] (2)所述融合蛋白的轻链氨基酸序列与 SEQ ID NO:71 相比具有 1-10 个
30 氨基酸位点突变。

[108] 本发明还提供了一种分离的多核苷酸，其编码如上所述的融合蛋白。

[109] 本发明还提供了一种核酸构建体，其包含如上所述的多核苷酸，优选的所述核酸构建体为载体。

[110] 本发明还提供了一种宿主细胞，其包含如上所述的多核苷酸或者核酸构建体或载体，优选的所述细胞是原核细胞、真核细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、大肠杆菌细胞或 CHO 细胞、NS0 细胞、Sp2/0 细胞、BHK 细胞。

[111] 本发明还提供了一种药物组合物，包含如上所述的融合蛋白以及药学上可接受的载体。

[112] 本发明还提供了一种用于治疗肿瘤或癌症的方法，其包括对需要治疗或减轻的受试者施用如上所述的融合蛋白或所述药物组合物的步骤。

[113] 本发明还提供了如上所述的融合蛋白、多核苷酸、核酸构建体或者载体以及药物组合物在制备用于治疗或预防肿瘤或癌症的药物中的用途。所述的肿瘤或癌症包括实体瘤或非实体瘤。

[114] 本发明还提供了一种诊断试剂盒，其包含如上所述的融合蛋白。

[115] 本发明还提供了一种融合蛋白的生产方法，该方法包括：在允许如上所述的核酸构建体表达的条件下培养所述的宿主细胞，并从培养物中回收产生的融合蛋白。

[116] 本发明提供的 Hibody 结构融合蛋白，由于第二结合结构域插入在铰链区，因此具备与 IgG 相同的表达和生产优势，可以与现有的 IgG 表达平台以及纯化平台无缝接入，极大地降低了后继开发成本，相对于现有的双特异抗体平台构建的双特异性抗体，Hibody 平台构建的双特异性抗体表达量更高、且无轻重链错配的问题，也极大地降低了抗体生产成本。此外，我们惊奇的发现，在两条铰链区插入一定范围大小的第二结合结构域不仅不影响融合蛋白 Fab 区的结合活性以及蛋白的稳定性，且进一步提升了稳定性以及获得了更高的半衰期，更显著的是，第二结合结构域与靶向结合位点的结合活性相对于其对应可溶性天然结合片段的单体与相应靶点的结合活性相比，有了显著的提高，其原因可能在于由于选择的作为第二结合结构域的受体或配体其在天然信号通路中会形成二聚化或多聚化结构以活化或抑制信号通路，而当其插入到铰链区后，其在铰链区的空间位置关系促使形成了相应受体或配体或其片段的二聚化，从而通过模仿天然信号通路，获得了更显著提高的结合活性，进而使得该融合蛋白相对于使用可溶性的受体或配体或结合片段，其活化或抑制能力得到了极大的提

升。另外，通过两个结合结构域的合理组合，可以灵活选择受体抑制或受体活化的作用靶标，起到有效的协同作用效果，相对于两个靶点药物单独给药或现有技术的双特异性抗体，具有更为显著的疾病治疗效果，能够有效的治疗或控制疾病进程，尤其是在各种肿瘤、癌症中。

5 [117] 附图说明

[118] 图 1 Hibody 结构融合蛋白示意图。

[119] 图 2 为 Hib-PDV 及其对照组对小鼠结肠癌模型肿瘤抑制曲线。

[120] 图 3 为 Hib-PDC 及其对照组对小鼠结肠癌肿瘤抑制曲线。

10 [121] 图 4 为 Hib-PLT 及其对照组在 10 ~ 100 nM 水平浓度促细胞分泌 IFN- γ 因子水平对照图。

具体实施方式

定义

15 [122] 除非另有定义，在此所使用的所有技术和科学术语具有与本发明涉及领域的普通技术人员通常所理解的相同的意义。专业人员具体可参考《细胞与分子生物学词典》(The Dictionary of Cell and Molecular Biology)，第三版，1999，学术出版社(Academic Press)；《生物医学与分子生物学简明词典》(the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology)，Juo, Pei-Show，第二版，2002，CRC 出版社；以及《生物化学与分子生物学牛津词典》(the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology)，修订版，2000，牛津大学出版社(Oxford University Press)。

20 [123] 本发明涉及的氨基酸可以通过它们的通常已知的三字母符号或通过由 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号表示。同样地，核苷酸可以通过它们的普遍公认的单字母代码表示。

25 [124] 在本发明中，抗体可变域的互补决定区(CDR)测定或编号方法包括本领域熟知的 IMGT、Kabat (如在卡巴特(Kabat)等人的免疫学关注的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)，第 5 版，公共卫生服务(Public Health Service)，国家卫生研究所(National Institutes of Health)，马里兰州贝塞斯达(Bethesda MD.)(1991)中所阐述的)、Chothia、AbM 以及 Contact 法。

30 [125] 对本发明来说，两种核酸或者氨基酸序列间的“一致性”、“同一性”或

“相似性”是指，在最佳比对(最优比对)后所获得的、待比较的两序列之间相同核苷酸或相同氨基酸残基的百分数，该百分数是纯粹统计学的并且两种序列间的差异随机分布并覆盖其全长。两种核酸或者氨基酸序列之间的序列比较通常是在以最优方式使它们匹配以后，通过比较这些序列而进行，所述比较能够通过区段或者通过“比较窗”实施。除了能够手工实施外，用于比较序列的最优比对，还能够通过 Smith 和 Waterman(1981)[Ad.App.Math.2:482]的局部同源性算法、通过 Neddleman 和 Wunsch 的(1970)[J.Mol.Biol.48: 443]局部同源性算法、通过 Pearson 和 Lipman 的(1988)[Proc. Natl.Acad.Sci.USA 85: 2444]相似性搜索方法、通过使用这些算法的计算机软件实施 (GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575Science Dr., Madison, WI, 或者通过 BLAST N or BLAST P 比较软件)。

[126] 如广义定义的那样，本发明涉及的免疫球蛋白(immunoglobulin)指具有抗体活性的动物蛋白，由两条相同的轻链和两条相同的重链所组成，是一类重要的免疫效应分子，由高等动物免疫系统淋巴细胞产生的蛋白质，经抗原的诱导可以转化为抗体。因结构不同可分为 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE 5 种。优选的，本发明涉及的免疫球蛋白为 IgG。

[127] 如广义定义的那样，本发明涉及的受体是一类存在于胞膜或胞内的，能与细胞外专一信号分子结合进而激活细胞内一系列生物化学反应，使细胞对外界刺激产生相应的效应的特殊蛋白质。与受体结合的生物活性物质统称为配体(ligand)。受体与配体结合即发生分子构象变化，从而引起细胞反应，如介导细胞间信号转导、细胞间黏合、胞吞等过程。

[128] 本发明涉及的双特异性融合蛋白是基于免疫球蛋白结构的基础上在其铰链区中插入有第二结合结构域，因此本发明涉及的双特异性融合蛋白具有两个结合结构域。

实施例

[129] 下面将通过实施例对本发明进行进一步的阐述，需要说明的是，以下实施例是对本发明进行进一步的阐述和解释，而不应被看作是对本发明的限制。

[130] 实施例 1 蛋白的构建

[131] 本实施例采用本领域常规方法构建以下蛋白分子，并按照本领域常规

方法瞬时或稳定表达：

- 5
- ①

三个 Hibody 双特异性融合蛋白：Hib-PLT、Hib-PDC、Hib-PDV；
- ②

对照蛋白 1-3：按照 WO2015/118175 中双功能分子结构构建；
- ③

其他对照蛋白：TGF-β -R-His、VEGF-R-His、CD80-His、PD-L1 对照抗体。

表 4 融合蛋白靶点组合

融合蛋白代号	第一结合结构域靶点	第二结合结构域靶点	插入的第二结合结构域片段	肽接头
Hib-PLT	PD-L1	TGF-β	TGF-βR II 胞外区片段	(GGGGS) ₃
Hib-PDC	PD-1	CD28	CD80	(GGGGS) ₃
Hib-PDV	PD-1	VEGF	VEGFR1 的第 2 个细胞外区域和 VEGFR2 的第 3 个细胞外区域组合	(GGGGS) ₃
对照蛋白 1	PD-L1	TGF-β	TGF-βR II 胞外区片段	(GGGGS) ₃
对照蛋白 2	PD-1	CD28	CD80	(GGGGS) ₃
对照蛋白 3	PD-1	VEGF	VEGFR1 的第 2 个细胞外区域和 VEGFR2 的第 3 个细胞外区域组合	(GGGGS) ₃

● 融合蛋白 Hib-PLT 重链和轻链的核酸序列及氨基酸序列如下所示：

[132] 融合蛋白 Hib-PLT 重链核酸序列(SEQ ID NO: 78):

10

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGACCAGGACTGGTGAAGCCATCCGAGACCCTGAGCCTGACCTGTACAG
TGTCCGGCTTCAGCCTGTCTAGGTACAGCGTGCACTGGATCAGACAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGG
CTGGGCATGATCTGGGGCGTGGGCACCACAGACTACAACCTCTGCTCTGAAGTCCAGACTGACCATCAGCAA
GGATACATCTAAGAATCAGTTCAGCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACCGCCGCTGACACAGCCGTGTACTATTG
CGCTCGCAACTGGGGCACC GCCGACTACTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTTCCG
15CTAGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAG
CGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA

AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAGGCGGGGAGGCAGCGGCGGAGGAAGCGGGGGCGGA
 GGTAGCACCATCCCTCCACACGTGCAGAAGAGCGTGAACAATGACATGATCGTCACCGACAACAACGGCG
CCGTCAAGTTCCCCAGCTGTGCAAATTCTGCGACGTGAGGTTCTCCACGTGCGACAACCAGAAGAGCTG
TATGAGCAACTGCAGCATCACATCCATCTGCGAAAAACCCAGGAAGTGTGCGTCGCCGTCTGGCGGAAG
 5 AACGACGAGAACATCACACTGGAGACCGTGTGCCACGACCCCAAAGTGCCTACCACGACTTCATCCTGG
AGGACGCCGCCAGCCCAAAGTGCATCATGAAAGAGAAGAAGAAGCCGGGCGAGACTTTCTTCATGTGCT
CCTGCAGCTCCGACGAGTGCAACGATAATATCATCTTCAGCGAAGAATACAACACATCTAACCCAGACGGGA
 GGGGGCGGATCCGGGGGCGGCGGAAGCGGCGGGGGGGGCGAGCACTCACACATGCCACCGTGCCAGC
 ACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCG
 10 GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
 GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAA
 CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
 15 TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTC
 CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
 GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
 TCTCCGGGTAAATGA

[133] 说明：下划线加粗序列为 TGF- β R II 核酸序列。

20 [134] 融合蛋白 Hib-PLT 重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 72):

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGFSLs RYSVHWIRQP PGKGLEWLGM IWGVGTTDYN 60
 SALKSRLTIS KDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARNWG TADYFDYWGQ GTTVTVSSAS 120
 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180
 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKGGGGSGG GGSGGGGSTI 240
 25 PPHVQKSVNN DMIVTDNNGA VKFPQLCKFC DVRFSTCDNQ KSCMSNCSIT SICEKPQEV 300
 VAVWRKNDEN ITLETVCHDP KLPYHDFILE DAASPKCIMK EKKKPGETFF MCSCSSDECN 360
 DNIIFSEEYN TSNPDGGGGS GGGGSGGGGS THTCPPCPAP ELLGPFSVFL FPPKPKDTLM 420
 ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD 480
 WLNQKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF 540

YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSGD SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL 600

HNHYTQKSLS LSPGK 615

[135] 说明：加粗加框片段为铰链区序列，斜体为肽接头，下划线加粗序列为 TGF- β R II 氨基酸序列。

5 [136] 融合蛋白 Hib-PLT 轻链核酸序列(SEQ ID NO: 79):

GATATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCTTCCCTGGCCGTGTCCCCAGGACAGAGGGCCACCATCACATGTCGG
GCTTCCAAGAGCGTGACACAAGCGGCTACTCTTATATGCATTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCT
AAGCTGCTGATCTATCTGGCTTCCAACCTGGAGAGCGGAGTGCCAGCTAGGTTCTCTGGCTCCGGCAGCGG
CACCGACTTTACCCTGACAATCAATCCTGTGGAGGCCAACGATACAGCTAATTACTATTGCCAGCACTCCGGA
10 GAGCTGCCATACCTTCGGCGGAGGCACAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG
AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAG
15 GGGAGAGTGTTAG

[137] 融合蛋白 Hib-PLT 轻链氨基酸序列(SEQ ID NO: 73):

DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASKSVH TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60
GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCQHSSELPHY TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFPYPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS 180
20 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC 218

● 融合蛋白 Hib-PDC 重链和轻链的核酸序列及氨基酸序列如下所示：

[138] 融合蛋白 Hib-PDC 重链核酸序列(SEQ ID NO: 74):

CAGGTGCAGCTCGTGGAGAGCGGGGAGGCGTCGTCCAGCCTGGCCGTAGCCTGCGGCTGGACTGTAAG
25 GCTAGCGGAATCACGTTCAAGCAACAGCGGAATGCACTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTCGAAT
GGGTCGCCGTGATCTGGTACGACGGGAGCAAGAGATACTACGCAGATTCAGTGAAGGGCCGTTTCACAATC
AGCCGTGACAACTCGAAGAACACACTGTTCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAAGACACAGCAGTCT
ACTACTGCGCTACAAATGACGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTGAGCTCAGCTTCCACCAAG
GGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT

GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC
 ACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
 TTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG
 AGTCCGGTGGCGGCGGAAGCGGCGGCGGAGGCAGCGGCGGAGGCGGCAGCGTGATCCATGTCACGAAG
 5 GAGGTCAAAGAAGTGGCCACCCTCAGCTGCGGTACAACGTCAGCGTGGAAGAGTTGGCCAGACCAGA
ATCTACTGGCAGAAGGAGAAGAAGATGGTCTTGACCATGATGAGCGGCGACATGAACATCTGGCCAGAGT
ACAAGAATAGAACTATCTTCGACATACCAATAACCTGAGCATCGTGATCCTCGCTTTCGCTCCGAGCGACG
AAGGCACCTACGAGTGCGTAGTGCTAAAGTACGAGAAAGACGCCTTCAAGCGGGAGCACCTGGCAGAAG
TAACCCTGAGCGTGAAGGCAGACTTCCCAACGCCTAGCATCTCCGACTTCGAGATCCCCACAAGCAACATC
 10 CGGCGGATCATCTGTAGCACCTCCGGGGGTTTCCCCGAGCCTCACCTGTCCTGGCTCGAGAACGGCGAGG
AGCTGAACGCCATCAACACCACCGTGAGCCAGGACCCGAGACAGAACTGTACGCCGTGAGCTCCAAGCT
CGACTTCAACATGACCACAAATCACAGCTTCATGTGCCTCATCAAGTACGGACACCTGCGGGTGAATCAGA
CGTTCAACTGGAAACGGCGGGGGGGGGTAGCGGCGGCGGGGGGCTCAGGTGGGGGGGGGCTCAAAATATGGT
 CCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAACCC
 15 AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCC
 CGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
 CAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGC
 AGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
 20 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTG
 GACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA
 CACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATAG

[139] 说明：下划线加粗序列为 CD80 核酸序列。

25 [140] 融合蛋白 Hib-PDC 重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 68):

QVQLVESGGG VVQPGSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY	60
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGLVT VSSASTKGPS	120
VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS	180
VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESGGGGSGG GSGGGGS <u>VI HVTKEVKEVA</u>	240

	<u>TLSCGHNVS</u> <u>V EELAQ</u> <u>TRIW QKEK</u> <u>MVLT</u> <u>MSGDMNI</u> <u>WPE YKNRTIFDIT</u> <u>NNLSIVILAL</u>	300
	<u>RPSDEGTYEC</u> <u>VVLKYEKDAF</u> <u>KREHLAEVTL</u> <u>SVKADF</u> <u>TPS ISDFEIP</u> <u>TSN IRRICSTSG</u>	360
	<u>GFPEPHLSWL</u> <u>ENGEELNAIN</u> <u>TTVSQDPETE</u> <u>LYAVSSKLDF</u> <u>NMTTNHSFMC</u> <u>LIKYGHLRVN</u>	420
	<u>QTFNWN</u> <i>GGGG SGGGGSGGGG</i> <i>SKYGPPCPPC</i> <i>PAPEFLGGPS</i> <i>VFLFPPKPKD</i> <i>TLMISRTPEV</i>	480
5	TCVVVDVSQ E DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY	540
	KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV	600
	EWESNGQFEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK	660
	SLSLSLGK	668

[141] 说明：斜体为肽接头，下划线加粗序列为 CD80 氨基酸序列。

10 [142] 融合蛋白 Hib-PDC 轻链核酸序列(SEQ ID NO: 75):

	GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCACTCTGTCACTGTCCCAGGAGAAAGGGCTACTCTGCTTGCCG	
	GGCAAGCCAGTCTGTCTCCAGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGACAGGCTCCTAGACTGCTGAT	
	CTACGACGCAAGTAACAGAGCCACCGGCATCCCCGCACGCTTCAGTGGCTCAGGCTCCGGAACAGACTTTA	
	CTCTGACCATCTCTAGTCTGGAGCCTGAAGATTTGCGCGTGTACTATTGTCAGCAGAGCTCTAATTGGCCTAG	
15	AACCTTCGCCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC	
	ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC	
	AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACA	
	GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT	
	CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT	
20	AG	

[143] 融合蛋白 Hib-PDC 轻链氨基酸序列(SEQ ID NO: 69):

	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA	60
	RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP	120
	SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT	180
25	LSKADYEEKH VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	214

● 融合蛋白 Hib-PDV 重链和轻链的核酸序列及氨基酸序列如下所示：

[144] 融合蛋白 Hib-PDV 重链核酸序列(SEQ ID NO: 76):

CAGGTGCAGCTCGTGGAGAGCGGGGAGGCGTCGTCCAGCCTGGCCGTAGCCTGCGGCTGGACTGTAAG

GCTAGCGGAATCACGTTGAGCAACAGCGGAATGCACTGGGTCAGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTCGAAT
GGGTCGCCGTGATCTGGTACGACGGGAGCAAGAGATACTACGCAGATTAGTGAAGGGCCGTTTCACAATC
AGCCGTGACAACTCGAAGAACACACTGTTCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAAGACACAGCAGTCT
ACTACTGCGCTACAAATGACGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTGAGCTCAGCTTCCACCAAG
5 GGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC
ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
TTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG
AGTCCGGTGGCGGGCGGAAGCGGCGGAGGCAGCGGCGGAGGCGGCAGCGGTAGACCATTCTGAGAG
10 ATGTACAGCGAAATCCCCGAAATCATCCACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATCCCCTGCCGGTTAC
GTCACCTAACATCACTGTTACTCTGAAGAAGTTCCCACTCGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATCAT
CTGGGACAGCAGAAAAGGGCTTCATCATCTCAAATGCAACGTACAAAAGAAATCGGACTCCTGACCTGTGAA
GCAACAGTCAATGGACATTTGTATAAGACAACTATCTCACACATCGACAGACCAATACAATCATCGATGTG
GTTCTGAGCCCGTCTCATGGAATCGAACTATCTGTTGGAGAAAAGCTCGTCCTGAATTGTACAGCAAGAAC
15 TGAACTGAATGTGGGAATCGACTTCAACTGGGAATACCTTCTTGAAGCATCAGCATAAGAACTCGTAA
ACCGAGACCTAAAGACCCAGTCTGGGAGCGAGATGAAGAAATCTTGAGCACCTGACTATCGATGGTGT
AACCCGGAGCGACCAGGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGCGGGCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCAC
ATTCGTCAGGGTCCATGAACCCGGCGGGGGGGGTAGCGGCGGCGGGGGGCTCAGGTGGGGGGGGCTCAA
AATATGGTCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCC
20 AAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG
AAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
GGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAC
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
CAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
25 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCT
AACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATAG

[145] 说明：下划线加粗序列为 VEGFR 核酸序列。

[146] 融合蛋白 Hib-PDV 重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 70):

QQQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLLV VSSASTKGPS 120
 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180
 5 VVTVPSSSLG TKYTCNVDH KPSNTKVDKR VESGGGGSGG GGSGGGSGR PFVEMYSEIP 240
EIIHMTGRE LVIPCRVTSP NITVTLLKKFP LDTLIPDGKR IIWDSRKGF IISNATYKEIG 300
LLTCEATVNG HLYKTNLYTH RQNTNIIDVV LSPSHGIELS VGEKLVLNCT ARTELNVGID 360
FNWEYPSSKH QHKKLVRDL KTQSGSEMKK FLSTLTIDGV TRSDQGLYTC AASSGLMTKK 420
NSTFVRVHEP GGGGSGGGGS GGGGSKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR 480
 10 TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN 540
 GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS 600
 DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNH 660
 YTQKSLSLSL GK 672

[147] 说明：斜体为肽接头，下划线加粗序列为 VEGF 氨基酸序列。

15 [148] 融合蛋白 Hib-PDV 轻链核酸序列(SEQ ID NO: 77):

GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCAGCCACTCTGTCACTGTCCCCAGGAGAAAGGGCTACTCTGTCTTGCCG
 GGCAAGCCAGTCTGTCTCCAGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGACAGGCTCCTAGACTGCTGAT
 CTACGACGCAAGTAACAGAGCCACCGGCATCCCCGCACGCTTCAGTGGCTCAGGCTCCGGAACAGACTTTA
 CTCTGACCATCTCTAGTCTGGAGCCTGAAGATTCGCCGTGTACTATTGTCAGCAGAGCTCTAATTGGCCTAG
 20 AACCTTCGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC
 ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC
 AAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACA
 GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT
 CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT
 25 AG

[149] 融合蛋白 Hib-PDV 轻链氨基酸序列(SEQ ID NO: 71):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60
 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNPWPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180

LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

214

● 对照蛋白 1 的重链和轻链氨基酸序列

[150] 对照蛋白 1 的重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 124):

5 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGFSL S RYSVHWIRQP PGKGLEWLG M IWGVGTTDYN 60

SALKSRLTIS KDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARNWG TADYFDYWGQ GTT VTVSSAS 120

TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180

YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240

VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300

10 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360

KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420

GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKGG *GGSGGGGSGG* *GGSTIPPHVQ KSVNNDMIVT* 480

DNNGAVKFPQ LCKFCDVRF S TCDNQKSCMS NCSITSICEK PQEVCVAVWR KNDENITLET 540

VCHDPKLPYH DFILEDAASP KCIMKEKKK GETFFMCSCS SDECNDNIIF SEEYNTSNPD 600

15 [151] 说明: 斜体为肽接头, 下划线加粗序列为 TGF- β RII 氨基酸序列。

[152] 对照蛋白 1 的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO: 125):

DIVLTQSPAS LAVSPGQRAT ITCRASKSVH TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60

GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEANDTANY YCQHS GELPY TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120

IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS 180

20 STLTL SKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC 218

● 对照蛋白 2 的重链和轻链氨基酸序列

[153] 对照蛋白 2 的重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 126):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60

25 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGT LVT VSSASTKGPS 120

VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180

VVTVPSSSLG TKTYTCNV DH KPSNTKVDKR VESKYGP PCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240

KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300

VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360

	LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSEFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV	420
	MHEALHNHYT QKSLSLGLK <i>GGGSGGGG</i> <i>GGGS</i> <u>VIHVT KEVKEVATLS CGHNVSEEL</u>	480
	<u>AQTRIYWQKE KKMVLTMMSG DMNIWPEYKN RTIFDITNNL SIVILALRPS DEGTYECVVL</u>	540
	<u>KYEKDAFKRE HLAEVTLVK ADFPTPSISD FEIPTSNIIR IICSTSGGFP EPHLSWLENG</u>	600
5	<u>EELNAINTTV SQDPETELYA VSSKLDNMT TNHSFMCLIK YGHLRVNQTF NWN</u>	653

[154] 说明：斜体为肽接头，下划线加粗序列为 CD80 氨基酸序列。

[155] 对照蛋白 2 的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO: 127):

	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA	60
	RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP	120
10	SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT	180
	LSKADYEEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	214

● 对照蛋白 3 的重链和轻链氨基酸序列

[156] 对照蛋白 3 的重链氨基酸序列(SEQ ID NO: 128):

15	QVQLVESGGG VVQPGRLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY	60
	ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLLV VSSASTKGPS	120
	VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS	180
	VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP	240
	KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT	300
20	VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC	360
	LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSEFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV	420
	MHEALHNHYT QKSLSLGLK <i>GGGSGGGG</i> <i>GGGS</i> <u>GRPFV EMYSEIPEII HMTGRELVI</u>	480
	<u>PCRVTSPNIT VTLKKFPLDT LIPDGKRIIW DSRKGFISN ATYKEIGLLT CEATVNGHLY</u>	540
	<u>KTNYLTHRQT NTIIDVVLSP SHGIELSVGE KLVNCTART ELNVGIDFNW EYPSSKHQHK</u>	600
25	<u>KLVNRDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRS DQGLYTCAAS SGLMTKKNST FVRVHEP</u>	657

[157] 说明：斜体为肽接头，下划线加粗序列为 VEGFR 氨基酸序列。

[158] 对照蛋白 3 的轻链氨基酸序列(SEQ ID NO: 129):

	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA	60
	RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP	120

SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214

● TGF- β -R-His

- 5 [159] TGF- β -R-His 即 His 标签的 TGF- β R II 胞外区片段, 其中所述的 TGF- β R II 胞外区片段的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 137):

TIPPHVQKSV NNDMIVTDNN GAVKFPQLCK FCDVRFSTCD NQKSCMSNCS ITSICEKPQE 60
VCVAVWRKND ENITLETVCH DPKLPYHDFI LEDAASPCCI MKEKKKPGET FFMCS CSSDE 120
CNDNIIFSEE YNTSNPD 137

10 ● VEGF-R-His 氨基酸序列

- [160] VEGF-R-His 即 His 标签的 VEGFR1 的第 2 个细胞外区域和 VEGFR2 的第 3 个细胞外区域组合片段, 其中所述的 VEGFR1 的第 2 个细胞外区域和 VEGFR2 的第 3 个细胞外区域组合片段的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 130):

GRPFVEMYSE IPEIIHMTG RELVIPCRVT SPNITVTLKK FPLDTLIPDG KRIIWDSRKG 60
15 FIISNATYKE IGLLTCEATV NGHLYKTNLY THRQTNTIID VVLSPSHGIE LSVGEKLVN 120
CTARTELNVG IDFNWEYPSS KHQHKLVNR DLKTQSGSEM KKFLSTLTID GVTRSDQGLY 180
TCAASSGLMT KKNSTFVRVH EP 202

● CD80-His 氨基酸序列

- 20 [161] CD80-His 即 His 标签的 CD80 片段, 其中所述的 CD80 片段的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 32):

VIHVTKEVKE VATLSCGHNV SVEELAQTRI YWQKEKKMVL TMMSGDMNIW PEYKNRTIFD 60
ITNNLSIVIL ALRPSDEGTY ECVVLKYEKD AFKREHLAEV TLSVKADFPT PSISDFEIPT 120
SNIRRIICST SGGFPEPHLS WLENGEELNA INTTVSQDPE TELYAVSSKL DFNMTTNHSF 180
MCLIKYGHLLR VNQTFNWN 198

- 25 [162] 实施例 2 CHO 表达

[163] A. 细胞复苏与扩增:

[164] 复苏 CHO 宿主细胞, 复苏培养体积为 10mL, 培养条件为 37.0℃, 200rpm, 8%CO₂, 80%湿度。复苏后细胞密度 2.82×10⁵ 个/mL, 活率 95.41%。

[165] 细胞扩增培养 72h 后, 活细胞密度为 2.22×10⁶ 个/mL, 活率 98.32%。

- [166] 将细胞以 5×10^5 个/mL 重接进行细胞重接操作, 继续培养 48 小时后活细胞密度为 2×10^6 个/mL, 活率 98.68%。
- [167] 将细胞按照 5×10^5 个/孔铺入 6 孔板, 培养体积 2mL/孔, 置于二氧化碳培养箱(培养条件 37°C , 8% CO_2)过夜培养, 用于次日贴壁转染。
- 5 [168] B.转染
- [169] 转染试剂为 Lipofectamine®LTX Reagent(Invitrogen, 货号 15338-100), 内含 LTX 和 Plus 试剂。
- [170] 转染操作: 将六孔板中培养基进行换液操作, 配制转染复合物: LTX: 9 μl /孔+质粒: 2.5 μg /孔+ plus: 2.5 μl /孔, 将转染复合物按照每孔 250 μl 加入至六孔板中。细胞转染后 5h 对 6 孔板各孔细胞进行换液。转染完成 48h 后取上清, 使用双抗原 ELISA 方法检测上清抗体含量。
- 10 [171] C.批式培养与流加培养
- [172] 转染完成 48h 后将六孔板细胞消化, 收集进入细胞培养管, 按照细胞密度为 3×10^5 个/mL 进行悬浮适应生长, 细胞活率回复至 90%左右时将 Hib-PLT 表达细胞 pool 和对照蛋白 1 表达细胞 pool 进行批式培养, 将 Hib-PDC、对照蛋白 2、Hib-PDV、对照蛋白 3 进行流加培养。
- 15 [173] 批式培养: 按照 3×10^5 个/mL 细胞密度培养在 TPP 细胞培养管中, 体积为 30mL, 培养条件 37.0°C , 200rpm, 8% CO_2 , 80%湿度。每天对细胞活率和代谢进行监测, 至活率<60%结束培养, 取结束培养后的细胞上清液进行浓度检测。
- 20 [174] 流加培养: 按照 3×10^5 个/mL 细胞密度培养在 TPP 细胞培养管中, 体积为 30mL, 培养条件 37.0°C , 200rpm, 8% CO_2 , 80%湿度。按照一定的流加策略(见表 5)给予细胞浓缩培养基, 期间保证 Glc 控制在 2~6g/L。至活率<60%结束培养, 取结束培养后的细胞上清液进行浓度检测。
- 25 [175]

表 5 流加策略

Day 0	$3 \times 10^5/\text{ml}$, 培养体积 30ml
Day 4、6、8、10、12	900 μL CellBoost7A、90 μL CellBoost7B
Day 16	检测 VCD、活率, 留样结束

[176] 表 6 给出了 Hibody 双特异性融合蛋白 Hib-PLT、Hib-PDC、Hib-PDV 及

相应对照蛋白的表达量结果，结果显示，Hib-PLT 与相应对照蛋白相比，其表达量增加的相对值增加了 52.85%；Hib-PDC 与相应对照蛋白相比，其表达量增加的相对值增加了 33.43%；Hib-PDV 与相应对照蛋白相比，其表达量增加的相对值增加了 25.6%，本发明提供的 Hibody 双特异性融合蛋白的表达量均显著优于相应对照蛋白的表达量，本发明提供的双特异性抗体具有意料不到的技术效果。

表 6 双特异性抗体表达量

类别	方式	表达量	增加相对值
Hib-PLT	批式培养	188 mg/L	52.85%
对照蛋白 1	批式培养	123mg/L	
Hib-PDC	流加培养	349.59 mg/L	33.43%
对照蛋白 2	流加培养	262 mg/L	
Hib-PDV	流加培养	243.95 mg/L	25.6%
对照蛋白 3	流加培养	194.22mg/L	

注：增加相对值=(本发明提供的双特异性融合蛋白的表达量-相应对照蛋白表达量)/ 相应对照蛋白表达量。

[177] 实施例 3 结合活性测定

[178] 1.Hib-PLT 结合活性测定：

- (1) 包被抗原：将 TGF-β 1 用包被缓冲液稀释至 2μg/ml，100μl 每孔加入 96 孔板中，2~8℃静置过夜；
- (2) 洗板：以 PBST 为洗脱液，350μl 每孔自动洗板 3 次，洗板完成后将板拍干；
- (3) 封板：以 3%BSA-PBST 为封闭液，300μl 每孔，于 37℃下孵育 2 小时；
- (4) 洗板：以 PBST 为洗脱液，350μl 每孔自动洗板 3 次，洗板完成后将板拍干；
- (5) 加样品：样品各浓度点如下，将各浓度点样品依次以 100μl 每孔加入 96 孔板，每个浓度点平行 2 个复孔，37℃孵育 2 小时；

检测组	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09	S10	S11
Hib-PLT	555.556	55.556	5.556	1.852	0.617	0.206	0.069	0.023	0.008	0.001	0.000
TGF-β -R-His	64516.000	6451.600	645.160	215.053	71.684	23.895	7.965	2.655	0.885	0.088	0.009

(单位: nM)

(6) 洗板: 以 PBST 为洗脱液, 350 μ l 每孔自动洗板 3 次, 洗板完成后将板拍干;

(7) 加二抗:

● Hib-PLT 样品孔: Goat-anti-Human-Fc-HRP 按 1:5000 稀释后, 100 μ l 每孔, 37°C 孵育 2 小时;

● TGF- β -R-His 孔: Anti-His-HRP 按 1: 5000 稀释后, 100 μ l 每孔, 37°C 孵育 2 小时;

(8) 洗板: 以 PBST 为洗脱液, 350 μ l 每孔自动洗板 5 次, 洗板完成后将板拍干;

(9) 显色: TMB 为显色液, 100 μ l 每孔显色 2 分钟;

(10) 终止显色: 2M H₂SO₄ 为终止液, 50 μ l 每孔终止显色;

(11) 读数: MD 酶标仪分别在 450/655nm 处读取吸光值, 以待测样品浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 作 4-PL 曲线, 软件自动给出 EC50 值。

[179] 2.Hib-PDV 结合活性测定:

(1) 包被抗原: 将 VEGF 用包被缓冲液稀释至 1 μ g/ml, 100 μ l 每孔加入 96 孔板中, 2~8°C 静置过夜;

(2) 洗板: 以 PBST 为洗脱液, 350 μ l 每孔自动洗板 3 次, 洗板完成后将板拍干;

(3) 封板: 以 3%BSA-PBST 为封闭液, 300 μ l 每孔, 于 37°C 下孵育 2 小时;

(4) 洗板: 以 PBST 为洗脱液, 350 μ l 每孔自动洗板 3 次, 洗板完成后将板拍干;

(5) 加样品: 样品各浓度点如下, 将各浓度点样品依次以 100 μ l 每孔加入 96 孔板, 每个浓度点平行 2 个复孔, 37°C 孵育 2 小时;

检测组	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09	S10	S11
Hib-PDV	555.556	55.556	5.556	1.852	0.617	0.206	0.069	0.023	0.005	0.001	0.000
VEGFR-His	43478.300	4347.830	434.783	144.928	48.309	16.103	5.368	1.789	0.358	0.036	0.004

(单位: nM)

(6) 洗板: 以 PBST 为洗脱液, 350 μ l 每孔自动洗板 3 次, 洗板完成后将

板拍干；

(7) 加二抗：

● Hib-PDV 样品孔：Goat-anti-Human-Fc-HRP 按 1:5000 稀释后，100 μ l 每孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时；

5 ● VEGFR-His 孔：Anti-His-HRP 按 1: 5000 稀释后，100 μ l 每孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时

(8) 洗板：以 PBST 为洗脱液，350 μ l 每孔自动洗板 5 次，洗板完成后将板拍干；

(9) 显色：TMB 为显色液，100 μ l 每孔显色 2 分钟；

10 (10) 终止显色：2M H₂SO₄ 为终止液，50 μ l 每孔终止显色；

(11) 读数：MD 酶标仪分别在 450/655nm 处读取吸光值，以待测样品浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，作 4-PL 曲线，软件自动给出 EC₅₀ 值。

[180] 3.Hib-PDC 结合活性测定：

15 (1) 包被抗原：将 CTLA-4 Protein 用 1mL 灭菌水复溶，浓度为 200 μ g/mL。用包被缓冲液稀释至 20 μ g/ml，100 μ l 每孔加入 96 孔板中，2~8 $^{\circ}$ C 静置过夜；

(2) 洗板：以 PBST 为洗脱液，350 μ l 每孔自动洗板 3 次，洗板完成后将板拍干；

20 (3) 封板：以 3%BSA-PBST 为封闭液，300 μ l 每孔，于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2h $\pm$ 20min；

(4) 洗板：以 PBST 为洗脱液，350 μ l 每孔自动洗板 3 次，洗板完成后将板拍干；

25 (5) 加样品：PBST 稀释生物素化样品，样品各浓度点如下，将各浓度点样品依次以 100 μ l 每孔加入 96 孔板，每个浓度点平行 2 个复孔，空白孔为 PBST，37 $^{\circ}$ C 孵育 2h $\pm$ 20min；

检测组	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09	S10	S11
Hib-PDC	1000000	100000	10000	3333.333	1111.111	370.370	123.457	41.152	13.717	1.372	0.137
CD80-His	1000000	100000	10000	3333.333	1111.111	370.370	123.457	41.152	13.717	1.372	0.137

(单位：ng/ml)

(6) 洗板：以 PBST 为洗脱液，350μl 每孔自动洗板 3 次，洗板完成后将板拍干；

(7) 加二抗：

- Hib-PDC 样品孔和 CD80-His 孔：Streptavidin-HRP 按 1：2000 稀释后，100μl 每孔，37℃孵育 1h±10min；

(8) 洗板：以 PBST 为洗脱液，350μl 每孔自动洗板 5 次，洗板完成后将板拍干；

(9) 显色：加入 100 μ l/well TMB Double Slow substrate，室温避光显色 6 分钟；

- (10) 终止显色：2M H₂SO₄ 为终止液，50μl 每孔终止显色；

(11) 读数：MD 酶标仪分别在 450/655nm 处读取吸光值，以待测样品浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，作 4-PL 曲线，软件自动给出 EC50 值（见表 7）。

表 7 各检测组 EC50 值

检测组	EC50 值
Hib-PLT	0.164nM
TGF- β -R-His	11.60nM
Hib-PDV	0.061nM
VEGFR-His	2154nM
Hib-PDC	24.36nM
CD80-His	50.69nM

[181] 经结合力测定，Hib-PLT 与 TGF- β 受体单体相比较：Hib-PLT 的 EC50 值为 0.164nM，TGF- β 受体单体的 EC50 值为 11.60nM，Hib-PLT 的结合活性优于 TGF- β 受体单体约 70 倍；Hib-PDV 与 VEGF 受体单体相比较：Hib-PDV 的 EC50 值为 0.061nM，VEGF 受体单体的 EC50 值为 2154nM，Hib-PDV 结合活性优于 VEGF 受体单体约 35311 倍；Hib-PDC 与 CD80 单体相比较：Hib-PDC 的 C50 值为 24.36nM，CD80 单体的 EC50 值为 50.69nM，Hib-PDC 结合活性优于 CD80 单体约 2 倍。即：以本发明提供的双抗模型构建的 Hib-PLT、Hib-PDV、Hib-PDC 的结合力活性均大幅优于其对应单体的结合活性。

[182] 实施例 4 Hib-PDV 对结肠癌 MC38 细胞在 C57BL/6J-hPD-1 小鼠皮下移植瘤疗效

[183] 取 32 只 7 周龄, C57BL/6J 人源化 PD-1 转基因小鼠 (来自上海南方模式生物科技股份有限公司)。在小鼠右侧腹皮下接种 0.1mL 结肠癌 MC38 细胞悬液(1×10^6 cells/只)。待肿瘤生长至约 100mm^3 左右时, 按照肿瘤体积大小随机分组, 分为 Vehicle(PBS)组, Hib-PDV (1.25mg/kg) 组, Hib-PDV (2.5 mg/kg)组与 Hib-PDV (5mg/kg)组, 共 4 组, 每组 8 只荷瘤鼠, 腹腔给药, 每周给药 1 次, 共给药 3 次, 给药期间每周测量 2 次测量肿瘤长径、短径及体重。给药后第 21 天时计算肿瘤抑制率(TGI_{RTV})进行药效评价, 如表 8 所示。

表 8 Hib-PDV 对小鼠结肠癌肿瘤抑制活性研究给药方案

组别	给药组	给药剂量(mg/kg)	给药途径	给药频次	给药体积
1	Vehicle	--	i.p.	QW × 3	10mL/kg
2	Hib-PDV	5	i.p.	QW × 3	10mL/kg
3	Hib-PDV	2.5	i.p.	QW × 3	10mL/kg
4	Hib-PDV	1.25	i.p.	QW × 3	10mL/kg

[184] 计算公式:

[185] 肿瘤体积: $\text{TV} = D_1 \times D_2^2 / 2$, 其中 D_1 、 D_2 分别表示瘤长径、瘤短径;

[186] 相对肿瘤体积: $\text{RTV} = T_{\text{VT}} / T_{\text{V1}}$, 其中 T_{V1} 为给药前肿瘤体积, T_{VT} 为每次测量时肿瘤体积;

[187] 相对肿瘤抑制率: $\text{TGI}_{\text{RTV}}(\%) = (1 - T_{\text{RTV}} / C_{\text{RTV}}) \times 100\%$, T_{RTV} 表示给药组或阳性对照组 RTV, C_{RTV} 表示阴性对照组 RTV。

[188] 结果及结论: Hib-PDV 对小鼠结肠癌模型肿瘤抑制作用分别如表 9 和图 2 所示, 其中表 9 为 Hib-PDV 对小鼠结肠癌模型肿瘤体积以及肿瘤抑制率, 图 2 为给药后的肿瘤生长曲线图。实验结果表明, Hib-PDV 对小鼠结肠癌模型肿瘤有显著的抑制作用。

表 9 Hib-PDV 对小鼠结肠癌模型肿瘤体积以及肿瘤抑制率(mean±SEM)

给药组	肿瘤体积 TV (mm^3)		TGIRTV(%)
	D0	D21	

Vehicle	86+10	1299+174	--
Hib-PDV (5mg/kg)	86+10	675+218	46
Hib-PDV (2.5mg/kg)	86+8	755+305	47
Hib-PDV (1.25mg/kg)	85+8	1088+259	14

[189] 实施例 5 Hib-PDC 对转 hPD-L1 MC38 细胞在 C57BL/6J-hPD-1 小鼠皮下移植瘤药效研究

[190] 取 32 只 7-9 周龄，C57BL/6J 人源化 PD-1 转基因雌性小鼠（来自南方模式），在小鼠右前肢腋下靠背部皮下植入 0.1mL 转 hPD-L1 MC38 细胞悬液(1×10^6 cells/只)。待肿瘤生长至约 100mm³ 左右时，按照肿瘤体积大小随机分组，分为 Vehicle(PBS) 组，Hib-PDC (1.25mg/kg) 组，Hib-PDC(2.5mg/kg)组，Hib-PDC(5mg/kg)共 4 组，每组 8 只荷瘤鼠，腹腔给药，每周给药 1 次，共给药 3 次，给药期间每周测量 2 次肿瘤长径、短径及体重。给药后第 21 天时计算肿瘤抑制率(TGI_{RTV})进行药效评价，如表 10 所示。

表 10 Hib-PDC 对小鼠结肠癌肿瘤抑制活性研究给药方案

组别	给药组	给药剂量(mg/kg)	给药方式	给药体积	给药周期
1	Vehicle(PBS)	--	i.p.	10ml/kg	QW×3 次
2	Hib-PDC	1.25	i.p.	10ml/kg	QW×3 次
3	Hib-PDC	2.5	i.p.	10ml/kg	QW×3 次
4	Hib-PDC	5	i.p.	10ml/kg	QW×3 次

[191] 计算公式：

[192] 肿瘤体积：TV=D1×D2²/2，其中 D1、D2 分别表示瘤长径、瘤短径；

[193] 相对肿瘤体积：RTV=T_{VT}/T_{V1}，其中 T_{V1} 为给药前肿瘤体积，T_{VT} 为每次测量时肿瘤体积；

[194] 相对肿瘤抑制率：TGI_{RTV}(%)=(1-T_{RTV}/C_{RTV})×100%，T_{RTV} 表示给药组或阳性对照组 RTV，C_{RTV} 表示阴性对照组 RTV。

[195] 结果及结论：Hib-PDC 对小鼠结肠癌肿瘤抑制作用分别如表 11 和图 3 所示，其中表 11 为 Hib-PDC 对小鼠结肠癌模型肿瘤体积以及肿瘤抑制

率，图 3 为给药后肿瘤生长曲线。试验结果表明， Hib-PDC 对小鼠结直肠癌皮下移植瘤具有显著的抑瘤作用。

表 11 Hib-PDC 对小鼠结肠癌模型肿瘤体积以及肿瘤抑制率 (mean±SEM)

组别	剂量(mg/kg)	肿瘤体积 TV (mm ³)		TGIRTV(%)
		D0	D21	
PBS	--	101±10	2319±517	--
Hib-PDC	1.25	101±8	1577±211	31
Hib-PDC	2.5	101±9	813±74	63
Hib-PDC	5	101±9	541±179	77

[196] 实施例 6 Hib-PLT 对同种异体淋巴细胞混合反应中细胞因子分泌的影响

[197] 采用 ELISA 法检测细胞上清中细胞因子 IFN- γ 浓度，评价 Hib-PLT 在活化 CD4⁺ T 细胞中的作用。通过 DC 细胞体外快速成熟试剂盒(cat: CT-004, 三一造血) 体外诱导供体一的单核淋巴细胞为成熟树突状细胞，48h 后收集细胞，稀释成 2×10⁵ 个/mL；磁珠富集供体二的 CD4⁺ T 细胞 (EasySep™ Human CD4⁺ T Cell Enrichment Kit, StemCell, cat:19052) 并将其稀释成 1×10⁶ 个/mL；将成熟树突状细胞和 CD4⁺ T 细胞按照体积比为 1:1 的比例混合，混合细胞悬液以每孔 100 μ L 的体积加入 96 孔板； Hib-PLT、PD-L1 对照抗体+TGF- β Trap(联合用药)、PD-L1 对照抗体、TGF- β Trap、人 IgG1 (Biolegend) 以终浓度 0.01 ~ 100 nM 加入含有混合细胞悬液的 96 孔板；置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 120 h, 2000 rpm 离心 5 min, 收集细胞上清 150 ~ 200 μ L; 采用 ELISA 试剂盒 (Human IL-2 Quantikine ELISA Kit, R&D, cat:S2050; Human IFN-gamma Quantikine ELISA Kit, R&D, cat:SIF50C) 检测同种异体淋巴混合反应上清液中的 IFN- γ 因子。单因素方差分析组间差异。

[198] 结果及结论：如图 4 所示， Hib-PLT 在 10 ~ 100 nM 水平浓度，促细胞分泌 IFN- γ 因子水平与 PD-L1 对照抗体和 TGF- β trap 联合用药组相比显著升高 (p<0.05)。结果说明在 10 ~ 100 nM 浓度水平下， Hib-PLT 在混合淋巴反应中促进 CD4⁺ T 细胞活化的作用优于联合用药组。

[199] 本发明已通过各具体实施例作了举例说明。但是，本领域普通技术人员能够理解，本发明并不限于各具体实施方式，普通技术人员在本发明的

范文内可以作出各种改动或变型,并且在本说明书中各处提及的各个技术特征可以相互组合,而仍不背离本发明的精神和范围。这样的改动和变型均在本发明的范围之内。