抗 CTLA4-抗 PD-1 双功能抗体、其药物组合物及其用途

技术领域

本发明属于肿瘤治疗和分子免疫学领域，涉及一种抗 CTLA4-抗 PD-1 双功能抗体、其药物组合物及其用途。具体地，本发明涉及一种抗 CTLA4-抗 PD-1 的单克隆抗体。

背景技术

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

CTLA4 mAb 或 CTLA4 配体可以阻止 CTLA4 与其天然配体结合，从而封闭 CTLA4 对 T 细胞负性调节信号的传导，增强 T 细胞对各种抗原的反应性，在这方面体内与体外研究结果基本一致。目前已有 CTLA4 mAb 处于临床试验阶段用于治疗前列腺癌，膀胱癌，结肠直肠癌，胃肠道癌，肝癌，恶性黑色素瘤等（Grosso JF., Jure-Kunkel MN., CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research.Cancer Immun. 2013; 13:5. Epub 2013 Jan 22）。

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

CTLA4 及 CTLA4 mAb 作为 T 细胞功能状况的重要影响因素，通过干预机体免疫微环境，可对疾病产生特异性治疗作用，并发挥较高疗效，补充传统用药的不足，由此开辟基因治疗的新途径。CTLA4 及 CTLA4 mAb 应用于试验及临床各阶段：如在自身免疫性疾病中有效抑制哮喘动物模型的气道高反应性、阻止风湿性疾病的发展以及在同种异体移植中介导机体免疫耐受等。但同时，尽管生物基因治疗在短期临床试验研究中未发

现不良反应，我们亦应注意到其长期应用所存在的潜在影响，如 CTLA4 mAb 过度阻断 CTLA4-B7 信号则可导致自身免疫性疾病的发生。由于抗体可以特异结合其配体并导致靶细胞溶解或阻断病理进程，所以抗体尤其人源性抗体药物的开发利用对人类恶性肿瘤及其他免疫性疾病临床治疗有重要意义。

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

T 细胞对清除病毒感染起着非常重要的作用，但 T 细胞抗病毒反应通常与免疫病理相关。PD-1 在负调节 T 细胞的活化过程中起着非常重要的作用，PD-1 介导的对 T 细胞负调节作用可减少促感染过程引起的组织损伤，但是阻断或抑制 PD-1 的负调节作用可导致自身免疫性疾病，例如，PD-1 基因敲除小鼠能更有效的清除胰腺病毒感染，但是却导致了更严重的肝脏损伤（Isai et al., 2003, J. Exp. Med. 198:39-50）。另外，高表达 PD-1 的肿瘤伴随着很难被检测到的癌症(Hamanishi et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:3360-5)。一种实施有效的方法是通过体内注射抗体对 PD-1 的表达进行调控。

由于 PD-1 抗体的广谱抗肿瘤前景和惊人的药效，业界普遍认为针对 PD-1 通路的抗体将带来治疗多种肿瘤治疗的突破性的进展：用于治疗非小细胞性肺癌，肾细胞癌，卵巢癌，黑色素瘤 (Homet M. B., Parisi G., et al., Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol. 2015 Jun;42(3):466-473)，白血病以及贫血病 (Held SA, Heine A, et al., Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets. 2013 Sep;13(7):768-74)。在 2012 年和 2013 年的美国癌症协会（AACR）年会以及美国临床肿瘤协会（ASCO）年会上揭晓的前所未有的临床药效数据后，既成为全球制药行业最炙手可热的在研新药。

此外，干扰素 γ（IFNγ），主要由自然杀伤细胞（NK），自然杀伤 T 细胞（NKT）先天产生，和由 CD4 Th1 细胞和 CD8 细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）这些效应 T 细胞经由特定抗原刺激后产生。IFNγ 作为一种重要的先天性和获得性免疫细胞因子在对抗或抑制肿瘤，病毒，某些细菌和原虫性疾病感染起着重要作用。同时，IFNγ 能激活巨噬细胞，诱导 II 类主要组织相容性复合体（MHC）的表达激活免疫反应控制肿瘤的发展（SchoenbornJR, Wilson CB. Regulation of Interferon-γ During Innate and Adaptive

Immune Responses. Advances in Immunology 2007; 96: 41-101）。

单克隆抗体目前已被用于治疗癌症，炎症和感染性疾病和其它疾病，大部分是单特异性的，然而，有些疾病在成因上以及体内的影响因素通常是多方面的，包括在不同的信号通路中，不同的蛋白、细胞因子和受体等的上调或者下调，抑制或促进体内机能作用。因此，多种不同的因素阻断可以改善治疗效果。这可以通过组合不同的药物，或者使用替代合不同药物如采用多特异性抗体的多重靶向策略来实现。

双功能抗体亦称为双特异性抗体（Bispecific Antibody），是同时靶向结合两种不同抗原的特异性药物，其可通过免疫分选纯化生产。另外，也可通过基因工程获得，基因工程在结合位点优化，合成形式的考量以及产量等方面都具有相应的灵活性，所以具有一定的优势。目前，其存在形式已被证明有超过 45 种 (Müller D, Kontermann RE. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. BioDrugs 2010; 24:89-98)。目前已开发的多种双特异性抗体为 IgG-ScFv 形式即 Morrison 模式（1997 Coloma MJ, Morrison SL. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. Nat Biotechnol.Nature Biotechnology, 1997;15:159-163），由于这种类似于天然存在的 IgG 形式，其在抗体工程、表达和纯化上所具有的优势，已被证明是双功能抗体的其中一种理想存在形式 (Miller BR, Demarest SJ, et al., Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. Protein Eng Des Sel 2010; 23:549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A. Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways. MAbs 2011; 3:299-309)。

然而，目前市场上甚至还没有靶向同一类细胞上两个以上靶点的双功能抗体，目前世界上有的是针对两种不同细胞表面分子的抗体。需要开发同时抗 PD-1 和 CTLA4 的双功能抗体药物。

发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，利用哺乳动物细胞表达系统分别表达出重组的 CTLA4 和 PD-1 作为抗原免疫小鼠，经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。发明人通过进行对大量样本的筛选，分别得到了如下的杂交瘤细胞株：

杂交瘤细胞株 LT002（CTLA4-4G10），其于 2015 年 6 月 16 日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C201587；以及

杂交瘤细胞株 LT003（PD-1-14C12），其于 2015 年 6 月 16 日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2015105。

本发明人惊奇地发现：

杂交瘤细胞株 LT002 能够分泌产生与 CTLA4 特异性结合的特异性单克隆抗体（命名为 4G10），并且该单克隆抗体能够十分有效地阻断 CTLA4 与 B7 的结合；

杂交瘤细胞株 LT003 能够分泌产生与 PD-1 特异性结合的特异性单克隆抗体（命名为 14C12），并且该单克隆抗体能够十分有效地阻断 PD-1 与 PDL1 的结合。

进一步地，本发明人创造性地制得了抗 CTLA4 的人源化抗体（分别命名为 4G10H1L1、4G10H3L3、4G10H4L3 和 8D2H14L2）和抗 PD-1 的人源化抗体（命名为 14C12H1L1）。

进一步地，本发明人创造性地将两类人源化抗体进行蛋白重组融合成新的抗体，获得了能够结合 CTLA4 和 PD-1，阻断 CTLA4 与 B7、PD-1 与 PDL1 的结合的人源化双功能抗体（分别命名为 BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 和 BiAb010），能有效地结合人 T 细胞，并且激活 T 细胞，诱导人淋巴细胞分泌 IFN-γ 和 IL-2；具有用于制备防治肺癌、黑色素瘤、肾肿瘤、卵巢癌、白血病等癌症的药物的潜力。

由此提供了下述发明：

本发明的一个方面涉及一种双特异性抗体，其包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 CTLA4 的第二蛋白功能区。

在本发明的一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接；优选地，所述连接片段为(GGGGS)n，n 为正整数，例如 1、2、3、4、5 或 6。

在本发明的一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中，

所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为免疫球蛋白或其抗原结合片段，例如半抗体、Fab、$F(ab')_2$ 或单链抗体；

优选地，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第二蛋白功能区为单链抗体；或者

优选地，所述第一蛋白功能区为单链抗体，所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白。

在本发明的一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和

第二蛋白功能区独立地为 1 个、2 个或者 2 个以上。

在本发明的一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中，所述免疫球蛋白为 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM；优选为 IgG，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

在本发明的一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端。由于免疫球蛋白由两条重链，因此，一个免疫球蛋白分子连接有两个单链抗体分子。优选地，两个单链抗体分子相同。

在本发明的一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中：

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 29－31 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32－34 的 CDR；和/或

所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35－37 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 37 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42－44 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38－40 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45－47 的 CDR；

在本发明的另一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中：

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35－37 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 37 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42－44 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38－40 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45－47 的 CDR；和/或

所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 29－31 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32－34 的 CDR。

在本发明的一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中：

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 20；所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 22；和/或

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 25；所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:27；

在本发明的另一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中：

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、

SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 25；所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:27；和/或

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 20；所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 22。

在本发明的一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中，

所述的免疫球蛋白包括非-CDR 区，且所述非-CDR 区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。

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

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

本发明还涉及一种双特异性抗体，其重链可变区包含：

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 29—31 的 CDR、

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35—37 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 37 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42—44 的 CDR，和

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32—34 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38—40 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR；

并且其轻链可变区包含：

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32—34 的 CDR，

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38—40 的 CDR，或者

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR；

优选地，轻链可变区的 CDR 与重链可变区包含的 CDR 不相同。

本发明的另一方面涉及分离的核酸分子，其包含能够编码抗体重链可变区的核酸序列，其中，

所述抗体的重链可变区包含：

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 29—31 的 CDR、

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35—37 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 37 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42—44 的 CDR，和

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32—34 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38—40 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR。

本发明还涉及分离的核酸分子，其包含能够编码抗体轻链可变区的核酸序列，其中，

所述抗体轻链可变区包含：

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32—34 的 CDR，

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38—40 的 CDR，或者

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR。

本发明的再一方面涉及一种载体，其包含本发明的分离的核酸分子。

本发明的再一方面涉及一种宿主细胞，其包含本发明的分离的核酸分子，或者本发明的载体。

本发明的再一方面涉及制备本发明的双特异性抗体的方法，其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述双特异性抗体的步骤。

本发明的再一方面涉及偶联物，其包括双特异性抗体以及偶联部分，其中，所述双特异性抗体为本发明的双特异性抗体，所述偶联部分为可检测的标记；具体地，所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

本发明的再一方面涉及试剂盒，其包括本发明的双特异性抗体，或者包括本发明的偶联物；

具体地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述双特异性抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

本发明的再一方面涉及本发明的双特异性抗体在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 CTLA4 和/PD-1 在样品中的存在或其水平。

本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物；可选地，其还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

本发明的再一方面涉及本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备预防和/或治疗肿瘤或者贫血病的药物中的用途，或者在制备诊断肿瘤或者贫血病的药物中的用途；具体地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

本发明人还通过动物实验发现，本发明的双特异性抗体 **BiAb004** 能够有效地降低 **PD-1 HuGEMM** 小鼠（人 **PD-1** 转基因小鼠）右侧皮下接种 **MC38** 肿瘤细胞的生长，表现为显著性地抑制 **PD-1 HuGEMM MC38** 荷瘤鼠的肿瘤体积的增加。

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

检测样品中的 **CTLA4** 水平的药物，

阻断 **CTLA4** 与 **B7** 结合的药物，

调节（例如下调）**CTLA4** 活性或 **CTLA4** 水平的药物，

解除 **CTLA4** 对机体免疫抑制的药物，

激活 **T** 淋巴细胞的药物，或者

提高 **T** 淋巴细胞中 **IL-2** 表达的药物；

和/或

阻断 **PD-1** 与 **PDL1** 结合的药物，

调节（例如下调）**PD-1** 活性或水平的药物，

解除 **PD-1** 对机体免疫抑制的药物，或者

提高 **T** 淋巴细胞中 **IFN-γ**表达的药物。

本发明的再一方面涉及一种在体内或体外方法，包括施加细胞或者给予有需求的受试者以有效量的本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物的步骤，所述方法选自如下：

检测样品中的 **CTLA4** 水平的方法，

阻断 **CTLA4** 与 **B7** 结合的方法，

调节（下调）**CTLA4** 活性或 **CTLA4** 水平的方法物，

解除 **CTLA4** 对机体免疫抑制的方法，

激活 T 淋巴细胞的方法，或者

提高 T 淋巴细胞中 IL-2 表达的方法；

和/或

阻断 PD-1 与 PDL1 结合的方法，

调节（例如下调）PD-1 活性或水平的方法，

解除 PD-1 对机体免疫抑制的方法，或者

提高 T 淋巴细胞中 IFN-γ表达的方法。

本发明的体外实验中，抗 CTLA4 抗体、抗 PD-1 抗体及抗 CTLA4-抗 PD-1 双功能抗体均能诱导 IFNγ 的分泌激活免疫反应。

本发明的再一方面涉及一种预防和/或治疗肿瘤或者贫血病的方法，或者一种诊断肿瘤或者贫血病的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物的步骤；具体地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

根据本发明中任一项所述的双特异性抗体或者偶联物，其用于预防和/治疗肿瘤或者贫血病，或者用于诊断肿瘤或者贫血病；具体地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

根据本发明中任一项所述的双特异性抗体或者偶联物，其用于：

阻断 CTLA4 与 B7 结合，

调节（例如下调）CTLA4 活性或 CTLA4 水平，

解除 CTLA4 对机体免疫抑制的，或者

激活 T 淋巴细胞的药物或者提高 T 淋巴细胞中 IL-2 表达；

和/或

阻断 PD-1 与 PDL1 结合，

调节（例如下调）PD-1 活性或水平，

解除 PD-1 对机体免疫抑制，或者

提高 T 淋巴细胞中 IFN-γ表达。

抗体治疗药物，特别是单克隆抗体（MAB）已在多种疾病的治疗中取得了良好的疗效。获取这些治疗性抗体的传统实验方法是采用抗原免疫动物，在免疫动物体内获取靶向抗原的抗体，或通过亲和力成熟的方法来改进那些与抗原的亲和力较低的抗体。然而，这些方法需要大量时间和精力，大多数时候也并不能针对抗原上的特定表位。

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

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

（1）14C12

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 29)

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 30)

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 31)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 32)

LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 33)

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 34)

（2）14C12H1L1

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 14C12 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 14C12 相同。

（3）4G10

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

NO: 4 所示；

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 35)

HCDR2: INPYNNIT (SEQ ID NO: 36)

HCDR3: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 37)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: TGAVTTSNF (SEQ ID NO: 38)

LCDR2: GTN (SEQ ID NO: 39)

LCDR3: ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 40)

（4）4G10H1L1

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

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 4G10 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 4G10 相同。

（5）4G10H3L3

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

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 4G10 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 4G10 相同。

（6）4G10H4L3

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 35)

HCDR2: INPYNDIT (SEQ ID NO: 41)

HCDR3: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 37)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 4G10 相同。

（7）8D2H14L2

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ

ID NO: 27 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1: GFTFSDNW(SEQ ID NO: 42)

HCDR2: IRNKPYNYET(SEQ ID NO: 43)

HCDR3: TAQFAY(SEQ ID NO: 44)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: ENIYGG(SEQ ID NO: 45)

LCDR2: GAT(SEQ ID NO: 46)

LCDR3: QNVLRSPFTF(SEQ ID NO: 47)

（8）BiAb001

其重链可变区的 9 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 29)

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 30)

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 31)

HCDR4: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 35)

HCDR5: INPYNNIT (SEQ ID NO: 36)

HCDR6: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 37)

HCDR7: TGAVTTSNF (SEQ ID NO: 38)

HCDR8: GTN (SEQ ID NO: 39)

HCDR9: ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 40)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 32)

LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 33)

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 34)

（9）BiAb002

其重链可变区的 9 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001 相同。

（10）BiAb003

其重链可变区的 9 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001 相同。

（11）BiAb004

其重链可变区的 9 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001 相同。

（12）BiAb007

其重链可变区的 9 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 29)

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 30)

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 31)

HCDR4: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 35)

HCDR5: INPYNDIT (SEQ ID NO: 41)

HCDR6: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 37)

HCDR7: TGAVTTSNF (SEQ ID NO: 38)

HCDR8: GTN (SEQ ID NO: 39)

HCDR9: ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 40)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001 相同。

（13）BiAb010

其重链可变区的 9 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 29)

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 30)

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 31)

HCDR4: GFTFSDNW(SEQ ID NO: 42)

HCDR5: IRNKPYNYET(SEQ ID NO: 43)

HCDR6: TAQFAY(SEQ ID NO: 44)

HCDR7: ENIYGG(SEQ ID NO: 45)

HCDR8: GAT(SEQ ID NO: 46)

HCDR9: QNVLRSPFTF(SEQ ID NO: 47)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列与 BiAb001 相同。

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

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

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

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

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

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，是指通常由两对多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。从一般意义上，重链可以理解为抗体中分子量较大的多肽链，轻链是指抗体中分子量较小的多肽链。轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链通常可分类为 μ、δ、γ、α 或 ε，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、

IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由 3 个结构域(C_H1、C_H2 和 C_H3)组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区（FR）的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))，或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。特别地，重链还可以包含 3 个以上 CDR，例如 6、9、或 12 个。例如在本发明的双功能抗体中，重链可以是 IgG 抗体的重链的 C 端连接另一个抗体的 ScFv，这种情况下重链含有 9 个 CDR。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG (例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的，术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽，其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合，其也被称为“抗原结合部分”。通常参见，Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版，Raven Press, N.Y. (1989)，其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下，抗原结合片段包括 Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体（例如，scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

如本文中所使用的，术语“Fd 片段”意指由 V_H 和 C_H1 结构域组成的抗体片段；术语“Fv 片段”意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段；术语“dAb 片段”意指由 V_H 结构域组成的抗体片段(Ward 等人, Nature 341:544-546 (1989))；术语“Fab 片段”意指由 V_L、V_H、C_L 和 C_H1 结构域组成的抗体片段；术语“$F(ab')_2$ 片段”意指包含通过铰链区

上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。

在一些情况下，抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如, scFv)，其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见，例如，Bird 等人，Science 242:423-426 (1988)和 Huston 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988))。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH_2-V_L-接头-V_H-COOH 或 NH_2-V_H-接头-V_L-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列$(GGGGS)_4$的接头，但也可使用其变体(Holliger 等人(1993)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan 等人(1995)，Protein Eng. 8:725-731，Choi 等人(2001)，Eur. J. Immunol. 31: 94-106，Hu 等人(1996)，Cancer Res. 56:3055-3061，Kipriyanov 等人(1999)，J. Mol. Biol. 293:41-56 和 Roovers 等人(2001)，Cancer Immunol.描述。

在一些情况下，抗体的抗原结合片段是双抗体，即，双价抗体，其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见，例如, Holliger P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)，和 Poljak R. J.等人, Structure 2:1121-1123 (1994))。

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

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

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

如本文中所使用的，术语“嵌合抗体”是指这样的抗体，其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体（其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类），且轻链或/和重

链的另一部分源自另一个抗体（其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类），但无论如何，其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S.P 4,816,567 to Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 6855 (1984))。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，人源免疫球蛋白（受体抗体）的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体（供体抗体）的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段，其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源（例如，小鼠、大鼠或兔）抗体。此外，受体抗体的构架区（FR）的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换，或被其他抗体的氨基酸残基替换，以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容，可参见例如，Jones et al., Nature, 321:522 525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323 329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593 596 (1992);和 Clark, Immunol. Today 21: 397 402 (2000)。

如本文中所使用的，术语“表位”是指，抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，表位通常以独特的空间构象包括至少 3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14 或 15 个连续或非连续的氨基酸，其可以是“线性的”或“构象的”。参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第 66 卷，G. E. Morris，Ed. (1996)。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子（例如抗体）之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

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

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

如本文中所使用的，术语“载体（vector）”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

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

如本文中所使用的，术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时（例如，两个 DNA 分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据，或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据），那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目×100 的函数。例如，如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配，那么这两个序列具有 60%的同一性。例如，DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 共有 50%的同一性(总共 6 个位置中有 3 个位置匹配)。通常，在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用，例如，可通过计算机程序例如 Align 程序（DNAstar, Inc.）方便地进行的 Needleman 等人（1970）*J. Mol. Biol.* 48：443-453 的方法来实现。还可使用已整合入 ALIGN 程序(版本 2.0)的 E. Meyers 和 W. Miller (Comput. Appl Biosci.，4:11-17 (1988))的算法，使用 PAM120 权重残基表（weight residue table）、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外，可使用已整合入 GCG 软件包(可在 www.gcg.com 上获得)的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch (J Mol Biol. 48:444-453 (1970))算法，使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵以及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重（gap weight）

和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

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

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

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

如本文中所使用的，术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”可互换使用，并且当提及术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”时，其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。例如，当提及杂交瘤细胞株 LT002 或 LT003 时，其还指杂交瘤细胞株 LT002 或 LT003 的亚克隆和后代细胞。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995），并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80；离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

如本文中所使用的，术语“佐剂”是指非特异性免疫增强剂，当其与抗原一起或预先递送入机体时，其可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。佐剂有很多种，包括但不限于铝佐剂（例如氢氧化铝）、弗氏佐剂（例如完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐

剂）、短小棒状杆菌、脂多糖、细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物试验中最常用的佐剂。氢氧化铝佐剂则在临床实验中使用较多。

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

发明的有益效果

本发明涉及的单克隆抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 能够很好地特异性与 CTLA4 结合，并且能够十分有效地阻断 CLTA4 与 B7 的结合，特异地解除 CTLA4 对机体免疫抑制，激活 T 淋巴细胞。

本发明涉及的单克隆抗体 14C12H1L1 能够很好地特异性与 CTLA4 结合，并且能够十分有效地阻断 CLTA4 与 B7 的结合，特异地解除 CTLA4 对机体免疫抑制，激活 T 淋巴细胞。

本发明的双功能抗体具有应用于制备抗肿瘤例如抗黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌或白血病的药物的潜力。

附图说明

图 1：单克隆鼠源抗体 4G10 的 SDS-PAGE 检测结果。从左至右的 4 个泳道的样品及其上样量依次为：非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μg；还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μg；Marker，5 μl；BSA，1 μg。

图 2：单克隆人源化抗体 4G10H1L1 的 SDS-PAGE 检测结果。从左至右的 3 个泳道的样品及其上样量依次为：非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μg；还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μg；Marker，5 μl。

图 3：单克隆人源化抗体 4G10H3L3 的 SDS-PAGE 检测结果。

从左至右的 2 个泳道的样品及其上样量依次为：还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μg；Marker，5 μl。

图 4：单克隆人源化抗体 14C12H1L1 的 SDS-PAGE 检测结果。从左至右的 4 个泳道的样品及其上样量依次为：非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μg；还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μg；Marker，5 μl；BSA，1 μg。

图 5：双功能抗体 BiAb001 的 SDS-PAGE 检测结果。泳道样品及其上样量为：Marker，5 μl；1，Non-reduced：非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg；2，Reduced：还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1μg； 3，BSA，1 μg。

图 6：双功能抗体 BiAb002 的 SDS-PAGE 检测结果。泳道样品及其上样量为：Marker，5 μl；1，Non-reduced：非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg；2，Reduced：还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg； 3，BSA，1 μg。

图 7：双功能抗体 BiAb003 的 SDS-PAGE 检测结果。泳道样品及其上样量为：Marker，5 μl；1，Non-reduced：非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg；2，Reduced：还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg； 3，BSA，1 μg。

图 8：双功能抗体 BiAb004 的 SDS-PAGE 检测结果。泳道样品及其上样量为：Marker，5 μl；1，Non-reduced：非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg；2，Reduced：还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg； 3，BSA，1 μg。

图 9：双功能抗体 BiAb007 的 SDS-PAGE 检测结果。泳道样品及其上样量为：Marker，5 μl；1，Non-reduced：非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg；2，Reduced：还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg； 3，BSA，1 μg。

图 10：双功能抗体 BiAb0010 的 SDS-PAGE 检测结果。泳道样品及其上样量为：Marker，5 μl；1，Non-reduced：非还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg；2，Reduced：还原型蛋白电泳上样缓冲液样品，1 μg； 3，BSA，1 μg

图 11：抗体 4G10 的动力学特征参数检测结果。

图 12：抗体 4G10H1L1 的动力学特征参数检测结果。

图 13：抗体 4G10H3L3 的动力学特征参数检测结果。

图 14：抗体 4G10H4L3 的动力学特征参数检测结果。

图 15：抗体 14C12 的动力学特征参数检测结果。

图 16：抗体 14C12H1L1 的动力学特征参数检测结果。

图 17：CTLA4 和抗体 BIAb001 的动力学特征参数检测结果。

图 18：CTLA4 和抗体 BIAb002 的动力学特征参数检测结果。

图 19：CTLA4 和抗体 BIAb003 的动力学特征参数检测结果。

图 20：CTLA4 和抗体 BIAb004 的动力学特征参数检测结果。

图 21：CTLA4 和抗体 BIAb007 的动力学特征参数检测结果。

图 22：PD-1 和抗体 BIAb001 的动力学特征参数检测结果。

图 23： PD-1 和抗体 BIAb002 的动力学特征参数检测结果。

图 24: PD-1 和抗体 BIAb003 的动力学特征参数检测结果。

图 25: PD-1 和抗体 BIAb004 的动力学特征参数检测结果。

图 26: PD-1 和抗体 BIAb007 的动力学特征参数检测结果。

图 27：PD-1 和抗体 BIAb010 的动力学特征参数检测结果。

图 28：采用间接 ELISA 方法检测抗体 4G10H1L1 和 4G10H3L3 与抗原 CTLA4 的结合。

图 29：采用竞争 ELISA 方法检测抗体 4G10H1L1 和 4G10H3L3 与 B7 竞争结合抗原 CTLA4 的结合活性。

图 30：采用间接 ELISA 方法检测抗体 14C12、14C12H1L1 与 PD-1 的结合。

图 31：采用竞争 ELISA 方法检测抗体 14C12、14C12H1L1 与 PDL1 的竞争结合 PD-1。

图 32：采用间接 ELISA 方法检测抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003 和 BiAb004 与 CTLA4 的结合。

图 33：采用间接 ELISA 方法检测抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003 和 BiAb004 与 PD-1 的结合。

图 34：采用竞争 ELISA 方法检测抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003 和 BiAb004 与 B7 竞争结合 CTLA4。

图 35：采用竞争 ELISA 方法检测抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003 和 BiAb004 与 PDL1 竞争结合 PD-1。

图 36：抗体 4G10H1L1 与 293T-CTLA4 细胞表面蛋白 CTLA4 的结合 EC_{50}。

图 37：抗体 4G10H3L3 与 293T-CTLA4 细胞表面蛋白 CTLA4 的结合 EC_{50}。

图 38：抗体 14C12H1L1 与 293T-PD-1 细胞表面蛋白 PD-1 结合 EC_{50}。

图 39：抗体 BiAb001 与 293T-CTLA4 细胞表面蛋白 CTLA4 结合 EC_{50}。

图 40：抗体 BiAb002 与 293T-CTLA4 细胞表面蛋白 CTLA4 结合 EC_{50}。

图 41：抗体 BiAb003 与 293T-CTLA4 细胞的表面蛋白 CTLA4 结合 EC_{50}。

图 42：抗体 BiAb004 与 293T-CTLA4 细胞的表面蛋白 CTLA4 结合 EC_{50}。

图 43：抗体 BiAb001 与 293T-PD-1 细胞的表面蛋白 PD-1 结合 EC_{50}。

图 44：抗体 BiAb002 与 293T-PD-1 细胞的表面蛋白 PD-1 结合 EC_{50}。

图 45：抗体 BiAb003 与 293T-PD-1 细胞的表面蛋白 PD-1 结合 EC_{50}。

图 46：抗体 BiAb004 与 293T-PD-1 细胞的表面蛋白 PD-1 结合 EC_{50}。

图 47：抗体 4G10H3L3 与 T 细胞表面抗原 CTLA4 的结合活性。

图 48：抗体 14C12H1L1 与 T 细胞表面抗原 PD-1 的结合活性。

图 49：抗体 BiAb003 和 BiAb004 与 T 细胞的结合活性，并与抗体 14C12H1L1 和 4G10H3L3 进行对比。

图 50：抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 对混合淋巴细胞的细胞因子 IFN-γ 分泌的影响。

图 51：抗体 14C12H1L1 对混合淋巴细胞的细胞因子 IFN-γ 分泌的影响。

图 52：抗体 BiAb001、BiAb002 对混合淋巴细胞的细胞因子 IFN-γ 分泌的影响，并与抗体 14C12H1L1、4G10H1L1 进行对比。

图 53：抗体 BiAb003、BiAb004 对混合淋巴细胞的细胞因子 IFN-γ 分泌的影响，并与抗体 14C12H1L1、4G10H3L3 进行对比。

图 54：抗体 4G10H3L3 对混合淋巴细胞细胞因子 IL-2 分泌的影响。

图 55：抗体 14C12H1L1 对混合淋巴细胞的 IL-2 分泌的影响。

图 56：抗体 BiAb003、BiAb004 对混合淋巴细胞的细胞因子 IL-2 分泌的影响，并与抗体 14C12H1L1、4G10H3L3 进行对比。

图 57：抗体 4G10H1L1 和 4G10H3L3 对混合 PBMC、MDA-MB-231 和 Raji 细胞共培养所诱导的细胞因子 IL-2 的分泌的影响。

图 58：抗体 14C12H1L1 对混合 PBMC、MDA-MB-231 和 Raji 细胞共培养所诱导的细胞因子 IL-2 的分泌的影响。

图 59：抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004 对混合 PBMC、MDA-MB-231 和 Raji 细胞共培养所诱导的细胞因子 IL-2 的分泌的影响，并与抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 和 14C12H1L1 进行比较。

图 60：抗体 BiAb004 对 PD-1 HuGEMM MC38 荷瘤鼠的肿瘤体积的影响。

关于生物材料保藏的说明：

杂交瘤细胞株 LT002（CTLA4-4G10），其于 2015 年 6 月 16 日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C201587，保藏地址为中国.武汉.武汉大学，邮编：430072。

杂交瘤细胞株 LT003（PD-1-14C12），其于 2015 年 6 月 16 日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2015105，保藏地址为中国.武汉.武汉大学，邮编：430072。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市场购买获得的常规产品。

在下面的实施例中，使用的 T 细胞来自中山康方生物医药有限公司；使用的 BALB/C 小鼠购自广东省医学实验动物中心；使用的 PD-1 HuGEMM 小鼠来源于南京银河生物医药有限公司；使用的 MC38 细胞来源于上海复旦 IBS 细胞资源中心。

实施例 1：抗 CTLA4 的抗体 4G10 的制备

1. 杂交瘤细胞株 LT002 的制备

制备抗 CTLA4 抗体所用的抗原 CTLA4-mFc 是人 CTLA4(GenbankID: NP_005205.2) 胞外区与鼠 IgG1Fc 的融合蛋白。取免疫 BALB/C 小鼠（购自广东医学实验动物中心）的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞，参考目前已确立的方法（例如，Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000）。

用 TEV 蛋白酶酶切融合蛋白 CTLA4-mFc，并过柱纯化获得 CTLA4 蛋白。用 CTLA4 蛋白作为抗原包被酶标板，进行间接 ELISA 法筛选，得到分泌与 CTLA4 特异性结合的

新的抗体的杂交瘤细胞。对间接 ELISA 筛选得到的杂交瘤细胞，通过竞争 ELISA 筛选出能够分泌与配体 B7-1（CD80, NCBI Gene ID: 941）、B7-2（CD86, NCBI Gene ID: 942）竞争结合 CTLA4 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株，并经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株。将该杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株 LT002（CTLA4-4G10），其分泌的单克隆抗体命名为 4G10。

杂交瘤细胞株 LT002（CTLA4-4G10），其于 2015 年 6 月 16 日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C201587，保藏地址为中国.武汉.武汉大学，邮编：430072。

2. 抗 CTLA4 的抗体 4G10 的制备

用含 10%的低 IgG 胎牛血清的 IMDM 培养基对上面制得的 LT002 细胞株进行培养（IMDM 培养基，内含 1%青链霉素，于 5% CO_2，37°C 细胞培养箱中进行培养），7 天后收集细胞培养上清，通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤以及 HiTrap protein A HP 柱进行纯化，制得抗体 4G10。纯化后 4G10 样品进行 SDS-PAGE 电泳检测，结果如图 1 所示。

实施例 2：抗 CTLA4 的抗体 4G10 的序列分析

抗体 4G10 的序列分析

按照培养细胞细菌总 RNA 提取试剂盒（Tiangen，货号 DP430）的方法，从实施例 1 中培养的 LT002 细胞株中提取 mRNA。

按照 Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA，并进行 PCR 扩增。

PCR 扩增产物直接进行 TA 克隆，具体操作参考 pEASY-T1 Cloning Kit （Transgen CT101）试剂盒说明书进行。

将 TA 克隆的产物直接进行测序，测序结果如下：

重链可变区的核酸序列：（372 bp）

CAGGTCAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAATGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATAATATTACTAACTACAACCAGAAGTTCATGGGCAAGGCCACATTTA

CTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAACTCCTCAGACTGACATCT GAAGACTCTGGAGTCTATTTCTGTGCAAGACTCGACTATAGGTCTTATTGGGG CCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCT AT （SEQ ID NO: 1）

其编码的氨基酸序列：（124 aa）

QVKLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLIN PYNNITNYNQKFMGKATFTVDKSSSTAYMELLRLTSEDSGVYFCARLDYRSYWGQ GTLVTVSAAKTTPPSVY （SEQ ID NO: 2）

轻链可变区的核酸序列：（378 bp）

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAAC AGTCACACTCACTTGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACTAGTAACTTTGC CAACTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTCACTAGTCTAATAGGTGGTA CCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGA GACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATA TTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCATTGGGTGTTCGGTGGAGGAACCAAAC TGACTGTCCTAGGCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTTCAAGGG CAATTCTGC（SEQ ID NO: 3）

其编码的氨基酸序列：（126 aa）

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNFANWVQEKPDHLFTSLIGGT NNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTV LGQPKSSPSVTLFQGQFC（SEQ ID NO: 4）

实施例 3：抗 CTLA4 的人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 和 4G10H4L3 的设计和制备

1. 抗 CTLA4 人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 和 4G10H4L3 的轻链和重链序列的设计

根据 CTLA4 蛋白的三维晶体结构（Nat.Struct.Biol. (1997) 4 p.527）以及实施例 2 获得的抗体 4G10 的序列，通过计算机模拟抗体模型，根据模型设计突变，得到抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 和 4G10H4L3 的可变区序列（抗体恒定区序列，来自 NCBI 的数

据库，重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION: P01857，轻链恒定区为 Ig kappa chain C region，ACCESSION: P01834）。

设计的可变区序列如下：

（1）人源化单克隆抗体 4G10H1L1 的重链和轻链序列

重链可变区的核酸序列：（345 bp）

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCCGAGCTGGTGAAGCCCGGCGCCT CCATGAAGATCTCTTGCAAGGCCAGCGGATACAGTTTCACTGGCTATACCATG AACTGGGTCAAACAGGCTCCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGGCTGATTA ATCCTTACAACAACATCACCAACTACAACCAGAAGTTCATGGGAAAAGCAACC TTTACAGTGGACAAGAGCATTTCCACAGCCTACATGGAACTGAGCCGGCTGAC TTCAGACGATAGCGGGGTCTATTTTTGTGCAAGGCTGGATTATCGCTCTTACT GGGGGCAGGGAACTCTGGTCACTGTCTCCGCT（SEQ ID NO: 5）

其编码的氨基酸序列：（115 aa）

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQGLEWIGLIN PYNNITNYNQKFMGKATFTVDKSISTAYMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQ GTLVTVSA（SEQ ID NO: 6）

轻链可变区的核酸序列：（327 bp）

CAGGCTGTCGTCACTCAGGAACCTTCACTGACTGTGAGCCCAGGAGGAAC TGTCACCCTGACATGCGGAAGCTCCACCGGAGCAGTGACCACATCCAACTTCG CCAATTGGGTCCAGGAAAAGCCAGGCCAGGCATTTCGATCCCTGATCGGAGGC ACAAACAATCGGGCTTCTTGGGTGCCCGCAAGATTCTCAGGAAGCCTGCTGGG GGGAAAAGCCGCTCTGACCATTAGTGGCGCTCAGCCTGAGGACGAAGCCGAG TACTTCTGCGCTCTGTGGTATAGCAACCACTGGGTGTTTGGCGGGGGAACAAA GCTGACTGTGCTG（SEQ ID NO: 7）

其编码的氨基酸序列：（109 aa）

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFANWVQEKPGQAFRSLIGGT NNRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLT VL（SEQ ID NO: 8）

（2）人源化单克隆抗体 4G10H3L3 的重链和轻链序列

重链可变区的核酸序列：（345 bp）

CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCGCCT
CAGTGAAGGTCAGCTGCAAGGCCAGCGGGTACAGTTTCACTGGATATACCATG
AACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCCAGGGGCTGGAGTGGATCGGCCTGATTA
ACCCTTACAACAACATCACTAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGGAGAGTGACC
TTTACAGTGGACACCAGCATTTCCACAGCCTACATGGAACTGTCCCGGCTGAG
ATCTGACGATACAGGCGTGTACTTCTGCGCTAGGCTGGATTACCGCAGCTATT
GGGGACAGGGCACACTGGTGACTGTCAGCGCA（SEQ ID NO: 9）

其编码的氨基酸序列：（115 aa）

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLI
NPYNNITNYAQKFQGRVTFTVDTSISTAYMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWG
QGTLVTVSA（SEQ ID NO: 10）

轻链可变区的核酸序列：（327 bp）

CAGGCTGTCGTCACTCAGGAACCTTCACTGACCGTGTCTCCTGGCGGGAC
TGTCACCCTGACATGCGGCAGCTCCACAGGGGCCGTGACCACAAGTAACTTCC
CAAATTGGGTCCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCCCGGAGTCTGATCGGAGG
CACCAACAACAAGGCCAGCTGGACACCCGCACGGTTCAGCGGCAGCCTGCTG
GGCGGCAAGGCCGCTCTGACAATTAGCGGAGCCCAGCCTGAGGACGAAGCCG
AGTACTATTGCGCTCTGTGGTACTCCAACCACTGGGTGTTCGGCGGCGGCACC
AAGCTGACTGTGCTG（SEQ ID NO: 11）

其编码的氨基酸序列：（109 aa）

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGT
NNKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLT
VL（SEQ ID NO: 12）

（3）人源化单克隆抗体 4G10H4L3 的重链和轻链序列

重链可变区的核酸序列：（345bp）

CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCGCCT

CAGTGAAGGTCAGCTGCAAGGCCAGCGGGTACAGTTTCACTGGATATACCATG AACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCCAGGGGCTGGAGTGGATCGGCCTGATTA ACCCTTACAACGACATCACTAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGGAGAGTGACC TTTACAGTGGACACCAGCATTTCCACAGCCTACATGGAACTGTCCCGGCTGAG ATCTGACGATACAGGCGTGTACTTCTGCGCTAGGCTGGATTACCGCAGCTATT GGGGACAGGGCACACTGGTGACTGTCAGCGCA（SEQ ID NO: 13）

其编码的氨基酸序列：（115 aa）

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLI NPYNDITNYAQKFQGRVTFTVDTSISTAYMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWG QGTLVTVSA（SEQ ID NO: 14）

轻链可变区的核酸序列同 4G10H3L3 的轻链可变区序列。

2. 人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 和 4G10H4L3 的制备

重链恒定区均采用 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION: P01857；轻链恒定区均采用 Ig kappa chain C region，ACCESSION: P01834。

将 4G10H1L1 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、4G10H3L3 的重链 cDNA 和轻链的 cDNA、以及 4G10H4L3 重链 cDNA 和轻链的 cDNA，分别克隆到 pUC57simple （金斯瑞公司提供）载体中，分别获得 pUC57simple-4G10H1 、 pUC57simple-4G10L1 ； pUC57simple-4G10H3 、 pUC57simple-4G10L3 ； 和 pUC57simple-4G10H4 、 pUC57simple-4G10L3。并分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中。将重组质粒转染 293F 细胞后收集培养液进行纯化获得人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 和 4G10H4L3。纯化后 4G10H1L1 样品进行 SDS-PAGE 电泳检测，结果如图 2 所示。纯化后 4G10H3L3 样品进行 SDS-PAGE 电泳检测，结果如图 3 所示。

实施例 4：抗 PD-1 的抗体 14C12 的制备

1. 杂交瘤细胞株 LT003 的制备

用 PD-1- mFc 融合蛋白作为抗原，取免疫 BALB/C 小鼠（购自广东医学实验动物中心）的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞，参考目前已确立的方法（例如，Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and

Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000）。

用 PD-1-mFc 作为抗原包被酶标板，进行间接 ELISA 法筛选，得到分泌与 PD-1 特异性结合的新的抗体的杂交瘤细胞。

通过竞争 ELISA 筛选出能够分泌与配体 PDL1-hFc（PDL1 Genbank ID:NP_054862.1）竞争结合 PD-1 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株，经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株，并经过有限稀释法得到 LT003 稳定细胞株（PD-1-14C12），其分泌的单克隆抗体命名为 14C12。

杂交瘤细胞株 LT003（PD-1-14C12），其于 2015 年 6 月 16 日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2015105，保藏地址为中国.武汉.武汉大学，邮编：430072。

2. 抗 PD-1 的抗体 14C12 的制备

用含 10%的低 IgG 胎牛血清的 IMDM 培养基对上面制得的 LT003 细胞株进行培养（IMDM 培养基，内含 1%青链霉素，于 5% CO_2，37°C 细胞培养箱中进行培养），7 天后收集细胞培养上清进行纯化，制得抗体 14C12。

实施例 5：抗体 14C12 的序列的获得

抗体 14C12 的序列的获得

按照培养细胞细菌总 RNA 提取试剂盒（Tiangen，货号 DP430）的方法，从实施例 4 制得的杂交瘤细胞株 LT003 中提取 mRNA。

按照 Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA，并进行 PCR 扩增。

PCR 扩增产物直接进行 TA 克隆，具体操作参考 pEASY-T1 Cloning Kit （Transgen CT101）试剂盒说明书进行。

将 TA 克隆的产物直接进行测序，测序结果如下：

重链可变区的核酸序列：（354 bp）

GAGGTCAAACTGGTGGAGAGCGGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCGGCGGGT
CACTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATG
TCATGGGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTCGCTACTATCAG
CGGAGGCGGGCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGATTCACAA

TTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTAGTCTGCGG TCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGCATGGTT TGCCTATTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACAGTCTCTGCC（SEQ ID NO: 15）

其编码的氨基酸序列：（118 aa）

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATIS GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDTALYYCANRYGEAWFAY WGQGTLVTVSA（SEQ ID NO: 16）

轻链可变区的核酸序列：（318 bp）

GACATTAAGATGACACAGTCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGA GCGAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTCTT GGTTTCAGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAAT AGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGGGCAGG ATTACTCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATCTACTATT GCCTGCAGTATGATGAGTTCCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAAAACTGGAA CTG（SEQ ID NO: 17）

其编码的氨基酸序列：（106 aa）

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL（SEQ ID NO: 18）

实施例 6：抗 PD-1 的人源化抗体 14C12H1L1 的设计、制备和检测

1. 人源化抗体 14C12H1L1 的轻链和重链序列的设计

根据 PD-1 蛋白的三维晶体结构（Shinohara T, et al., Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). Genomics 1995, 23 (3): 704–6）以及实施例 5 获得的抗体 14C12 的序列，通过计算机模拟抗体模型，根据模型设计突变，得到抗体 14C12H1L1 的可变区序列。

设计的可变区序列如下：

重链可变区的核酸序列：（354 bp）

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGT

CACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATG
TCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTC
AGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAA
TCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGG
GCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTT
TGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGT （SEQ ID NO: 19）

其编码的氨基酸序列：（118 aa）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATIS
GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFA
YWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO: 20）

轻链可变区的核酸序列：（321 bp）

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGA
CAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCT
GGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAAT
AGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGG
ACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTAT
TGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACTGGA
GCTGAAG（SEQ ID NO: 21）

其编码的氨基酸序列：（107 aa）

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
（SEQ ID NO: 22）

2. 人源化抗体 14C12H1L1 的制备和 SDS-PAGE 电泳检测

重链恒定区采用 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION: P01857；轻链恒定区采用 Ig kappa chain C region，ACCESSION: P01834。

将 14C12H1L1 的重链 cDNA 和轻链的 cDNA 分别克隆到 pcDNA3.1 载体中，获得抗体 14C12H1L1 的重组表达质粒。将重组质粒转染 293F 细胞。将 293F 细胞培养液纯化后进行检测。结果如图 4 所示，还原型蛋白样品目标蛋白大约在 24.5 kD 和 49 KD 处，非

还原型蛋白样品目标蛋白大约在 147 kD 处。

实施例 7：双功能抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 及 BiAb010 的重链和轻链的序列设计、表达和检测

1. 序列设计

本发明中之双功能抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 以及 BiAb010 的结构模式属于 Morrison 模式（IgG-scFv），即在一个 IgG 抗体的两条重链的 C 端均连接另一个抗体的 scFv 片段，其重链和轻链的主要组成设计如下面的表 1。

表 1：BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 及 BiAb010 的重链和轻链的组成设计

双功能抗体编号	重链			轻链
	IgG 部分	连接片段	scFv 部分	
BiAb001	14C12H1	Linker 1	4G10H1$_V$- Linker 2 -4G10L1$_V$	14C12L1
BiAb002	14C12H1	Linker 2	4G10H1$_V$- Linker 2-4G10L1$_V$	14C12L1
BiAb003	14C12H1	Linker 1	4G10H3$_V$- Linker 2 -4G10L3$_V$	14C12L1
BiAb004	14C12H1	Linker 2	4G10H3$_V$- Linker 2 -4G10L3$_V$	14C12L1
BiAb007	14C12H1	Linker 2	4G10H4$_V$- Linker 2 -4G10L3$_V$	14C12L1
BiAb010	14C12H1	Linker 2	8D2H14$_V$- Linker 2 -8D2L2$_V$	14C12L1

上面的表 1 中：

（1）右下角标注“V”的，是指相应重链的可变区或者相应轻链的可变区。没有标注“V”的，相应重链或者轻链为包含恒定区的全长。这些可变区或者全长的氨基酸序列及其编码核酸序列均参照上面的实施例中记载的相应序列。

（2）Linker1 的氨基酸序列为(GGGGS)3 （SEQ ID NO: 23）

Linker2 的氨基酸序列为(GGGGS)4 （SEQ ID NO: 24）

（3）8D2H14L2 的重链可变区（8D2H14$_V$）的氨基酸序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSSRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAPGKGLEWLAQI RNKPYNYETYYSASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWG QGTLVTVSS（SEQ ID NO: 25）

编码 8D2H14$_V$ 的核酸序列：

GAGGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGAA GCTCCCGGCTGTCATGTGCCGCTAGCGGCTTCACCTTTTCCGACAACTGGATG AATTGGGTGCGACAGGCACCAGGCAAAGGACTGGAGTGGCTGGCTCAGATCC GGAACAAGCCCTACAATTATGAAACATACTATAGCGCCTCCGTGAAAGGCCGG TTCACTATTAGTAGAGACGATTCTAAGAACAGCGTGTACCTGCAGATGAATAG CCTGAAGACAGAGGATACTGGCGTCTACTATTGCACAGCACAGTTTGCCTATT GGGGACAGGGCACCCTGGTGACAGTCTCTAGT（SEQ ID NO: 26）

（4）8D2H14L2 的轻链可变区（$8D2L2_V$）的氨基酸序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYGGLNWYQRKPGKSPKLLIYGATNL ASGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQNVLRSPFTFGSGTKLEIK （SEQ ID NO: 27）

编码 $8D2L2_V$ 的核酸序列：

GACATCCAGATGACTCAGAGCCCCTCAAGCCTGTCTGCAAGTGTGGGCGA TAGGGTCACCATCACATGTCGCACCTCCGAAAACATCTACGGGGGACTGAATT GGTATCAGCGCAAGCCCGGCAAATCCCCTAAGCTGCTGATCTACGGCGCTACC AACCTGGCATCTGGGGTGTCCTCTCGATTTTCAGGGAGCGGCAGCGGCACCGA CTATACTCTGACCATTAGTTCACTGCAGCCTGAGGATGTGGCCACATACTATTG CCAGAATGTCCTGAGATCACCATTCACTTTTGGGAGCGGAACCAAACTGGAAA TTAAG（SEQ ID NO: 28）

2. 抗体 BiAb001 的表达和纯化

分别将 BiAb001 的重链 cDNA 序列和轻链的 cDNA 序列克隆到 pUC57simple（金斯瑞公司提供）载体中，分别获得 pUC57simple-BiAb001H 和 pUC57simple- BiAb001L 质粒。

分别将质粒 pUC57simple- BiAb001H 和 pUC57simple- BiAb001L 进行酶切（HindIII&EcoRI），电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中，提取重组质粒共转染 293F 细胞。细胞培养 7 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至 HiTrap MabSelect SuRe 柱，用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白并回收目标样品并换液至 PBS。

将纯化后的样品分别加入还原型蛋白电泳上样缓冲液和非还原型蛋白电泳上样缓冲

液，煮沸后进行 SDS-PAGE 电泳检测。BiAb001 的电泳图如图 5 所示，还原型蛋白样品目标蛋白在 23.6 kD 和 75.8 kD 处，非还原型蛋白样品（单个抗体）目标蛋白在 199 kD 处。

3. 抗体 BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 和 BiAb010 的表达和纯化

按照上述 BiAb001 的表达和纯化方法获得纯化的抗体 BiAb002，BiAb003、BiAb004、BiAb007 和 BiAb010。

将纯化后的样品分别加入还原型蛋白电泳上样缓冲液和非还原型蛋白电泳上样缓冲液，煮沸后进行 SDS-PAGE 电泳检测。BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 和 BiAb010 的电泳图分别如图 6、图 7、图 8、图 9 和图 10 所示，还原型蛋白样品目标蛋白在 23.6 kD 和 75.8 kD 处，非还原型蛋白样品（单个抗体）目标蛋白在 199 kD 处。

实施例 8：抗体的动力学参数测定

使用 Fortebio 分子相互作用仪测定抗原抗体结合的动力学参数。

1. 抗体 4G10 及其人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3、4G10H4L3 与抗原 CTLA4 结合的动力学参数测定

1.1. 用 TEV 蛋白酶酶切 CTLA4-mFc 蛋白，并过柱纯化获得 CTLA4 抗原。

1.2.抗体 4G10 采用氨基偶联的方式固定于 AR2G 传感器表面，经乙醇胺封闭，于 PBST 中平衡后，与抗原 CTLA4 结合，CTLA4 用 PBST 两倍稀释，浓度为 268.1, 134.1, 67, 33.5, 16.8, 8.38, 4.19, 0 nM，于 PBST 中解离。人源化 4G10H1L1、4G10H3L3、4G10H4L3 的检测方法与 4G10 类似，抗原浓度为 180、90、45、22.5、11.25、5.625、2.813、0nM。

1.3 抗体 4G10 及其人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3、4G10H4L3 与抗原结合的动力学参数检测结果如下表 1，动力学特征参数检测结果分别如图 11、图 12、图 13 和图 14 所示。

2. 抗体 14C12 及其人源化抗体 14C12H1L1 与抗原 PD-1 结合的动力学参数测定

2.1. 用 TEV 蛋白酶酶切 PD-1-mFc 蛋白，并过柱纯化获得 PD-1 抗原。

2.2. 抗原 PD-1（抗原浓度为 1 μg/ml）经生物素标记后固定于 SA 传感器表面，于 PBST 中平衡后，分别与抗体 14C12 和 14C12H1L1 结合，抗体用 PBST 从 200nM 往下三倍稀释，于 PBST 中解离。

2.3 抗体 14C12 和 14C12H1L1 与抗原结合的动力学参数检测结果如下表 1，动力学特征参数检测结果分别如图 15，图 16 所示。

3. 抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003、BiAb004、BiAb007 和 BiAb010 与抗原 CTLA4 结合的动力学参数测定

3.1 使用抗原 CTLA4(抗原浓度为 1 μg/ml)经生物素标记后固定于 SA 传感器表面，于 PBST 中平衡后，分别与抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 和 BiAb010 结合，抗体用 PBST 从 200nM 往下三倍稀释，于 PBST 中解离。

3.2 抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 和 BiAb010 与抗原 CTLA4 结合的动力学参数检测结果如下表 1，动力学特征参数检测结果分别如图 17—图 21 所示。

4. 抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 和 BiAb010 与抗原 PD-1 结合的动力学参数测定

4.1 使用抗原 PD-1（抗原浓度为 1 μg/ml）经生物素标记后固定于 SA 传感器表面，于 PBST 中平衡后，分别与抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 和 BiAb010 结合，抗体用 PBST 从 200nM 往下三倍稀释，于 PBST 中解离。

4.2 抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003、BiAb004、BiAb007 和 BiAb010 与抗原 PD-1 结合的动力学参数检测结果如下表 2，动力学特征参数检测结果分别如图 22—图 27 所示。

表 2：抗原抗体结合动力学参数

抗体	抗原	K_D (M)	Kon(1/Ms)	Ko 误差	Kdis(1/s)	Kdis 误差
4G10	CTLA4 1 μg/ml	3.01E-10	3.78E+05	4.36E+03	1.14E-04	5.33E-06
4G10 H1L1		1.52E-09	1.86E+05	3.26E+03	2.82E-04	9.23E-06
4G10 H3L3		4.14E-09	2.09E+05	3.81E+03	8.64E-04	1.11E-05
4G10H4L3		9.67E-10	1.37E+05	2.22E+03	1.32E-04	8.69E-06
14C12	PD-1 1 μg/ml	1.81E-11	3.38E+05	8.23E+03	6.12E-06	1.04E-05
14C12H1L1		2.42E-11	3.17E+05	5.90E+03	7.66E-06	8.70E-06
BIAb001	CTLA4 1 μg/ml	1.67E-10	2.33E+05	4.45E+03	3.89E-05	8.75E-06
BIAb002		9.69E-11	2.37E+05	5.32E+03	2.30E-05	9.97E-06
BIAb003		3.95E-10	3.60E+05	7.10E+03	1.42E-04	9.99E-06
BIAb004		5.66E-10	2.20E+05	3.89E+03	1.24E-04	8.27E-06

BiAb007		2.72E-10	1.58E+06	5.17E+04	4.28E-04	1.12E-05
BiAb010		3.22E-10	1.08E+06	1.99E+04	3.47E-04	7.28E-06
BIAb001	PD-1 1 μg/ml	4.16E-11	2.97E+05	4.96E+03	1.24E-05	8.36E-06
BIAb002		3.33E-11	2.20E+05	5.93E+03	7.32E-06	1.15E-05
BIAb003		4.12E-11	2.64E+05	5.49E+03	1.09E-05	9.82E-06
BIAb004		4.82E-11	2.47E+05	5.45E+03	1.19E-05	9.61E-06
BiAb007		1.40E-11	4.52E+05	9.23E+03	6.30E-06	7.85E-06
BiAb010		2.97E-11	2.28E+05	4.40E+03	6.79E-06	8.70E-06

K_D 为亲和力常数；kon 为抗原抗体结合速率；kdis 为抗原抗体解离速率；K_D=kdis/kon。

结果表明：

抗体 4G10 及其人源化抗体均与抗原有较好的亲和力。14C12 和 14C12H1L1 与抗原 PD-1 均有较好的亲和力。

双功能抗体均具有与抗原 CTLA4 和 PD-1 较好的亲和力。

实施例 9：ELISA 方法检测抗体与抗原的结合活性

1. 人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 与抗原 CTLA4 的结合活性

1.1 采用间接 ELISA 方法分别测定人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 与 CTLA4 的结合活性。

酶标板中加入抗原孵育，4℃过夜，用 1%的 BSA 37℃封闭 2 h 后，分别加入抗体，37℃孵育 30 min，加入 HRP 标记羊抗人 IgG（H+L）二抗（Jackson，109-035-088），用 TMB（Neogen，308177）进行显色反应 5 min，并在酶标仪中检测 450nm 波长吸光度。

检测结果如图 28 所示。由图可见，人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 能有效地结合 CTLA4 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 3。通过对结合的抗体进行荧光定量分析，曲线模拟计算获得抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 的结合效率 EC_{50} 分别为 0.048 和 0.067nM。

表 3：间接 ELISA 检测 4G10H1L1、4G10H3L3 与 CTLA4 的结合

抗原包被 CTLA4 0.5 μg/ml		
抗体梯度稀释	4G10 H1L1	4G10 H3L3

6 μg/ml	2.926	2.946	2.809	2.764
1:5	2.784	2.732	2.729	2.739
1:25	2.729	2.688	2.668	2.617
1:125	2.490	2.469	2.367	2.309
1:625	1.736	1.709	1.498	1.357
1:3126	0.607	0.663	0.513	0.432
1:16525	0.198	0.225	0.175	0.149
1:78125	0.096	0.115	0.089	0.087
1:390625	0.075	0.087	0.075	0.072
1:1953125	0.071	0.090	0.066	0.077
1:9765625	0.066	0.087	0.078	0.089
0	0.073	0.079	0.079	0.068
二抗	羊抗人 IgG，HRP(1:5000)			

1.2. 采用竞争 ELISA 方法分别检测人源化抗体 4G10H1L1，4G10H3L3 与 B7 竞争结合抗原 CTLA4 的结合活性

用 B7/1-hFc（B7/1Genbank ID:NP_005182.1）包被酶标板 4℃过夜，1% BSA 封闭 2 h 后加入抗体分别和 CTLA4-mFc 的抗原抗体混合液（稀释浓度见表 4），37℃孵育 30 min 后加入酶标二抗孵育 1 h，37℃孵育 30 min。在酶标仪上检测 450 nm 的吸光值（见表 4）。

检测抗体与与 B7-1 竞争结合抗原 CTLA4 的结果如图 29 所示。由图可见，抗体 4G10H1L1 和 4G10H3L3 能有效地与 B7-1 竞争结合 CTLA4 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 4。通过对结合的抗体 4G10H1L1 和 4G10H3L3 进行荧光定量分析，曲线模拟结合效率 EC_{50} 分别为 1.297 nM 和 1.229 nM。

表 4：竞争 ELISA 检测 4G10H1L1、4G10H3L3 与 B7 竞争结合人 CTLA4 的结合效率

抗原包被：B7/1-hFc 0.5 μg/ml					
抗体梯度稀释	4G10H1L1		4G10H3L3		受体
3 μg/ml	0.132	0.121	0.146	0.185	CTLA4-mFc
1:3	0.120	0.170	0.159	0.182	0.3μg/ml

1:9	0.260	0.343	0.382	0.340	
1:27	0.399	0.593	0.570	0.507	
1:81	0.565	0.614	0.642	0.642	
1:243	0.628	0.753	0.784	0.773	
1:729	0.573	0.760	0.768	0.702	
1:2187	0.553	0.824	0.741	0.788	
1:6561	0.661	0.844	0.824	0.679	
1:19683	0.555	0.834	0.742	0.699	
1:59049	0.552	0.725	0.773	0.770	
0	0.610	0.665	0.822	0.717	
二抗	羊抗鼠 IgG，HRP(1:5000)				

2. ELISA 方法检测单克隆抗体 14C12 及其人源化抗体 14C12H1L1 与抗原 PD-1 的结合活性

2.1. 采用间接 ELISA 方法分别测定单克隆重组抗体 14C12 和 14C12H1L1 分别与 PD-1 的结合活性，方法具体如下：

酶标板中加入 PD-1-mFc 孵育，4℃过夜，用 1%的 BSA 37℃封闭 2 h 后，分别加入抗体，37℃孵育 30 min，加入 HRP 标记羊抗人 IgG（H+L）二抗（Jackson，109-035-088），用 TMB（Neogen，308177）进行显色反应 5 min，并在酶标仪中检测 450nm 波长吸光度。

检测抗体 14C12，14C12H1L1 与抗原 PD-1 结合结果如图 30 所示。由图可见，抗体 14C12 和 14C12H1L1 均能有效地结合 PD-1 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 5。通过对结合的抗体 14C12 和 14C12H1L1 进行荧光定量分析，曲线模拟 14C12 和 14C12H1L1 抗体的结合效率 EC_{50} 分别为 0.175 nM 和 0.043 nM。

表 5：抗体 14C12 和 14C12H1L1 分别与 PD-1 的结合（间接 ELISA）

	抗原包被： PD-1-mFc （0.5μg/mL）			
抗体浓度（μg/mL）	14C12		14C12H1L1	
1	2.463	2.439	2.643	2.557
0.3	2.572	2.380	2.734	2.586
0.1	2.118	2.126	2.633	2.535

0.03	1.607	1.438	2.384	2.335
0.01	0.930	0.809	1.892	1.839
0.003	0.407	0.346	1.115	1.011
0.001	0.167	0.150	0.503	0.455
0	0.062	0.047	0.068	0.064
二抗	HRP 标记羊抗鼠二抗			

2.2. 采用竞争 ELISA 方法分别测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体 14C12 及人源化抗体 14C12H1L1 与 PDL1 的竞争结合抗原 PD-1，方法具体如下：

用 PD-1-hFc 或 PD-1-mFc 包被酶标板 4℃过夜，1% BSA 封闭 2 h 后，分别将不同浓度的抗体 14C12 和 14C12H1L1 与 PDL1-hFc 和 PDL1-mFc 混合 10 min（稀释浓度见表 6），37℃孵育 30 min 后加入酶标二抗 37℃孵育 30 min。在酶标仪上检测 450 nm 的吸光值（见表 6）。

检测抗体 14C12 及人源化抗体 14C12H1L1 与抗原 PD-1 结合结果如图 31 所示。由图可见，14C12 及人源化抗体 14C12H1L1 均能有效地与 PDL1 竞争结合 PD-1 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 6。通过对结合的抗体 14C12 及人源化抗体 14C12H1L1 进行荧光定量分析，曲线模拟抗体 14C12 及 14C12H1L1 的结合效率 EC_{50} 分别为：0.853 nM 和 0.37 nM。

表 6：抗体 14C12 及 14C12H1L1 与 PDL1 竞争结合 PD-1 ELISA

抗体浓度（μg/mL）	抗原包被：PD-1-mFc 0.2μg/mL			
	14C12		14C12H1L1	
1.5μg/ml	0.111	0.088	0.135	0.113
1:3	0.100	0.116	0.130	0.131
1:9	0.645	0.643	0.260	0.185
1:27	1.463	1.614	0.257	0.218
1:81	1.841	1.686	0.355	0.350
1:243	1.983	1.769	0.399	0.364
1:729	1.789	1.770	0.417	0.411

0	1.791	1.790	0.430	0.402
PDL1-hFc 2μg/ml				
二抗	HRP 标记羊抗鼠二抗			

3. ELISA 方法检测抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 与抗原的结合活性

3.1. 间接 ELISA 方法分别测定抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 分别与抗原 CTLA4 的结合活性，方法参照本实施例中 1.1。

检测抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 与抗原 PD-1 结合结果如图 32 所示。由图可见，抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 均能有效地结合 PD-1 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 7。通过对结合的抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 进行荧光定量分析，曲线模拟抗体的结合效率 EC_{50}，如下表 7 所示。

表 7：双功能抗体分别与 CTLA4 的结合（间接 ELISA）

抗体梯度稀释	抗原：CTLA4 0.5 μg/ml							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
6μg/ml	2.425	2.098	2.334	2.120	2.179	2.076	2.243	2.251
1:3	2.299	2.234	2.204	2.257	2.141	2.138	2.198	2.319
1:9	2.265	2.188	2.168	2.186	2.012	2.086	2.207	2.254
1:27	2.245	2.215	2.174	2.043	1.814	1.811	1.982	1.907
1:81	1.859	1.856	1.717	1.609	1.438	1.410	1.534	1.640
1:243	1.494	1.511	1.221	1.136	0.933	0.899	1.070	1.108
1:729	0.818	0.922	0.644	0.610	0.451	0.414	0.567	0.548
0	0.048	0.048	0.048	0.047	0.047	0.045	0.049	0.050
二抗：羊抗人 IgG，HRP(1:5000)								
EC_{50} (nM)	0.105		0.12		0.189		0.154	

3.2. 间接 ELISA 方法分别测定抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 分别与抗原 PD-1 的结合活性，方法参照本实施例中 2.1。

检测抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 与抗原 PD-1 结合结果如图 33 所示。由图可见，抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 均能有效地结合 PD-1 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 7。通过对结合的抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 进行荧光定量分析，曲线模拟抗体的结合效率 EC_{50}，如下表 8 所示。

表 8：双功能抗体与 CTLA4 的结合（间接 ELISA）

抗体稀释浓度	抗原包被：PD-1-mFc 0.5 μg/ml							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
6μg/ml	2.400	2.360	2.370	2.314	2.332	2.290	2.347	2.343
1:3	2.450	2.426	2.290	2.388	2.271	2.326	2.410	2.458
1:9	2.402	2.457	2.372	2.346	2.279	2.351	2.390	2.505
1:27	2.409	2.467	2.332	2.348	2.350	2.243	2.414	2.396
1:81	2.375	2.254	2.084	1.990	1.996	1.928	2.197	2.175
1:243	1.871	1.725	1.627	1.544	1.414	1.419	1.573	1.560
1:729	1.067	1.047	0.954	0.814	0.746	0.719	0.920	0.865
0	0.085	0.067	0.065	0.068	0.055	0.055	0.056	0.058
二抗：羊抗人 IgG，HRP(1:5000)								

3.3 竞争 ELISA 方法分别测定抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 与 B7/1-hFc 的竞争结合抗原 CTLA4，方法参照本实施例中 1.2。

检测结果如图 34 所示。由图可见，抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 均能有效地结合抗原 CTLA4，抑制 CTLA4 结合 B7/1，并且抗体抑制 CTLA4 结合 B7/1 的效率呈剂量依赖关系，各剂量的吸光强度见表 9。通过对结合的抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003 和 BiAb004 进行吸光强度定量分析，曲线模拟抗体的结合效率获得结合 EC_{50}（表 9）。

表 9：竞争 ELISA 检测抗体与 B7/1-hFc 竞争结合抗原 CTLA4

抗体稀释浓度	抗原包被：B7/1-hFc 0.5 μg/ml							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
3μg/ml	0.076	0.072	0.078	0.095	0.074	0.080	0.095	0.076

1:3	0.081	0.076	0.079	0.079	0.095	0.086	0.097	0.100
1:9	0.748	0.706	1.040	1.031	1.029	1.049	0.907	0.973
1:27	1.153	1.129	1.076	1.152	1.125	1.361	1.010	1.056
1:81	1.121	1.241	1.153	1.315	1.241	1.198	1.121	1.206
1:243	1.261	1.236	1.047	1.266	1.333	1.335	1.231	1.235
1:729	1.063	1.077	1.085	1.337	1.210	1.323	1.157	1.287
0	1.0476	0.9808	0.9131	1.0762	1.067	1.074	1.032	0.966
受体： CTLA4-mFc 0.3μg/ml								
二抗：羊抗鼠 IgG，HRP 标记(1:5000)								
EC_{50} (nM)	2.758		1.797		2.197		2.256	

3.4. 竞争 ELISA 方法分别测定抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 与 PDL1 的竞争结合抗原 PD-1，方法同本实施例中 2.2。

检测结果如图 35 所示。由图可见，抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003 和 BiAb004 均能有效地结合抗原 PD-1，抑制 PD-1 结合其配体 PDL1，并且抗体抑制 PD-1 结合其配体 PDL1 的效率呈剂量依赖关系，各剂量的吸光强度见表 10。通过对结合的抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 进行吸光强度定量分析，曲线模拟抗体的结合效率获得结合 EC_{50}（表 10）。

表 10：竞争 ELISA 检测双功能抗体与 PDL1 的竞争结合 PD-1

抗体浓度	抗原包被：PD-1-hFc 0.5 μg/ml							
	BiAb001		BiAb002		BiAb003		BiAb004	
3μg/ml	0.347	0.348	0.369	0.353	0.074	0.075	0.078	0.075
1:3	0.314	0.326	0.348	0.350	0.071	0.081	0.073	0.074
1:9	0.332	0.330	0.340	0.340	0.095	0.095	0.093	0.095
1:27	0.542	0.775	0.758	0.733	0.695	0.737	0.639	0.643
1:81	1.041	1.009	1.018	1.063	0.983	1.010	0.954	1.019
1:243	1.131	1.117	1.149	1.186	1.070	1.165	1.009	1.082
1:729	1.186	1.129	1.072	1.199	1.093	1.029	1.032	1.080

0	1.2345	1.1091	1.1243	1.1759	1.101	1.140	1.178	1.153
受体： PDL1-mFc 0.3μg/ml								
二抗：羊抗人 IgG，HRP (1:5000)								
EC_{50} (nM)	0.685		0.543		0.665		0.62	

实施例 10：流式细胞仪方法检测抗体与细胞表面抗原的结合活性

首先分别构建表达 CTLA4、PD-1 抗原的宿主细胞 293T，用本发明中制备的人源化抗体分别对改宿主细胞进行标记。然后采用流式细胞术分析验证抗体对细胞表面天然构象的抗原特异性的结合能力。

1. 分别表达 CTLA4、PD-1 抗原的宿主细胞 293T 的构建

CTLA4 或 PD-1 的载体 pLenti6.3- CTLA4、pLenti6.3-PD-1（载体 pLenti6.3 购自 Invitrogen 公司）转染 293T 细胞，经筛选分别获得稳定表达 CTLA4 的克隆群体 293T-CTLA4 细胞和稳定表达 PD-1 的克隆群体 293T- PD-1 细胞。

2. 抗体对细胞表面抗原的结合检测方法

采用常规胰酶消化方法上述步骤获得的表达抗原的宿主细胞，并使每个收集管细胞数为 2×10^5，用 PBS（1% BSA）配制抗体浓度梯度稀释液，冰上与表达相应抗原的 293T 细胞孵育 2 小时，每管加入 100 μL FITC 羊抗人 IgG （1：500）冰上孵育 1 小时用 PBS 洗 3 次后加入 300 μL PBS 重悬细胞，在流式细胞仪上用 FITC 通道检测荧光信号。

2.1 抗体对细胞表面抗原的结合检测结果

人源化抗体 4G10H1L1 和 4G10H3L3 与 293T- CTLA4 细胞的结合结果分别如图 36、图 37 所示。由图可见，4G10H1L1 和 4G10H3L3 抗体能有效地结合宿主细胞 293T- CTLA4 表面的靶标 CTLA4 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 11。通过对结合的 4G10H1L1 和 4G10H3L3 抗体进行荧光定量分析，曲线模拟 4G10H1L1 和 4G10H3L3 抗体的结合效率 EC_{50} 分别为 7.58 nM、10.54 nM。

表 11：流式细胞仪检测 4G10H1L1 和 4G10H3L3 结合 CTLA4 宿主细胞 293T- CTLA4 表面抗原的荧光强度分析

	4G10H1L1	4G10H2L2
抗体浓度 (nM)	荧光强度	
0.01	14.93	15.13

0.1	24.79	47.05
1	106.77	97.27
2.5	272.24	236.66
5	547.76	465.54
10	1080.91	788
20	1568.19	1296.95
50	1652.26	1539.24

2.2 人源化抗体 14C12H1L1 与 293T-PD-1 细胞的结合结果如图 38 所示。由图可见，14C12H1L1 抗体能有效地结合宿主细胞 293T-PD-1 表面的靶标 PD-1 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 12。通过对结合的 14C12H1L1 抗体进行荧光定量分析，曲线模拟 14C12H1L1 抗体的结合效率 EC_{50} 为 1.89 nM。

表 12：流式细胞仪检测 14C12H1L1 结合 PD-1 宿主细胞 293T-PD-1 表面抗原的荧光强度分析

浓度（nM）	0.01	0.1	1	5	10	50
荧光强度	8.32	20.31	174.62	579.41	686.49	669.54

2.3 抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 与 293F-CTLA4 细胞的结合结果分别如图 39、图 40、图 41 和图 42 所示。由图可见，抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 均能有效地结合宿主细胞 293F-CTLA4 表面的靶标 CTLA4 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 13。通过对结合的抗体进行荧光定量分析，曲线模拟抗体的结合效率获得结合 EC_{50}（表 13）。

表 13：流式细胞仪检测抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 结合 293F-CTLA4 细胞表面抗原的荧光强度分析及 EC_{50}

	BIAb001	BIAb002	BIAb003	BIAb004
抗体浓度(nM)	MFI（荧光强度）			
0.0	-	-	12.9	13.0
0.1	10.5	10.5	14.2	15.6

1.0	21.2	20.4	28.7	34.8
2.5	46.8	43.8	49.6	77.4
5.0	92.9	93.5	101.0	129.6
10.0	181.9	171.2	245.3	313.0
20.0	312.8	282.1	487.4	608.6
50.0	469.5	466.5	899.8	1260.8
100.0	423.0	435.3	937.5	1020.6
200.0	381.6	408.2	-	-
EC_{50}(nM)	11.9	13.7	19.9	17.8

2.4 抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 与 293T-PD-1 细胞的结合结果分别如图 43－图 46 所示。由图可见，抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 均能有效地结合宿主细胞 293T-PD-1 表面的靶标 PD-1 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的荧光强度见表 14。通过对结合的抗体进行荧光定量分析，曲线模拟抗体的结合效率获得结合 EC_{50}（表 14）。

表 14：流式细胞仪检测抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003 和 BiAb004 结合 293T-PD-1 细胞表面抗原的荧光强度分析

	BIAb001	BIAb002		BIAb003	BIAb004
抗体浓度/nM	MFI（荧光强度）		抗体浓度/nM	MFI（荧光强度）	
0.01	10.18	11	0.01	8.56	8.89
0.08	13.92	14.09	0.1	14.57	13.46
0.75	36.44	36.11	1	70.76	50.8
1.88	74.27	70.97	2.5	143.24	100.83
3.75	148.28	142.37	5	332.5	204.83
7.5	223.29	204.22	10	632.57	378.31
15	337.03	302.05	20	1026.03	535.69
37.5	358.78	290.92	50	958.92	734.73
			100	943.77	682.25

EC_{50}(nM)	5.69	4.61		7.18	10

3. 抗体与 T 细胞表面抗原 CTLA4 和 PD-1 的结合活性

采用 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare LOT No.:171440-02)分离 PBMC，从 PBMC 中分离得到 $CD4^+$细胞，用 PHA（50μl/ml）刺激三天后用 PBS 洗一次， 加入不同浓度的抗体，冰上孵育 1.5 h。孵育完成后，用 PBS 洗涤一次，加入 FITC-标记抗人二抗 IgG (Jackson immunoresearch lot. 102155)。冰上避光孵育 1 h 后，用 PBS 洗涤一次并用流式细胞仪检测。

其中所用对照抗体 Nivolumab 为抗 PD-1 的抗体，可以商购得到，其信息亦可参考 http://www.drugbank.ca/drugs/DB09035;

对照抗体 Ipilimumab 为抗 CTLA4 的抗体，可以商购得到，其信息亦可参考 http://www.drugbank.ca/drugs/DB06186。

3.1 人源化抗体 4G10H3L3 与 T 细胞的结合结果如图 47 所示。由图可见，4G10H3L3 抗体能有效地结合 T 细胞表面的靶标 CTLA4 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系。

3.2 人源化抗体 14C12H1L1 与 T 细胞的结合结果如图 48 所示。由图可见，14C12H1L1 抗体能有效地结合 T 细胞表面的靶标 PD-1 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系。

3.3 抗体 BiAb003 和 BiAb004 与 T 细胞的结合与 14C12H1L1 和 4G10H3L3 对比结果如图 49。由图可见，抗体 BiAb003、BiAb004 和 14C12H1L1、4G10H3L3 抗体均能有效地结合 T 细胞表面的靶标 PD-1 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系。并且抗体 BiAb003、BiAb004 和 14C12H1L1 与 T 细胞的结合强于抗体 4G10H3L3，Nivolumab 和 Ipilimumab。荧光强度检测结果如表 15 中。

表 15：抗体 14C12H1L1、4G10H3L3 和 BiAb003 和 BiAb004 与 T 细胞的结合活性

抗体浓度/nM	100	10	1
抗体名称	MFI（荧光强度）		
PBS	8.39	-	-
hIgG	10.15	-	-
Nivolumab	22.88	-	-

Ipilimumab	8.35	-	-
14C12H1L1	48.94	29.93	19.97
4G10H3L3	14.11	9.78	8.62
BIAb003	49.09	23.67	14.65
BIAb004	47.54	22.85	14.66

实施例 11：混合淋巴细胞反应：细胞因子 IFN-γ，IL-2 的分泌

1. 采用 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare LOT No.:171440-02)分离 PBMC，将分离出来的 PBMC 加入 IL-4（Peprotech K2513，1000U/ml）和 GM-CSF（Peprotech H1513，1000U/ml）诱导 6 天后，加入 TNF-α（Peprotech G1513，200U/ml）诱导 3 天获得 DC 细胞。

PBMC 中分离得到 T 细胞，将获得的 DC 细胞与 T 细胞按 1:10 的比例混合培养，同时加入不同比例的抗体（hIgG 做为对照）培养 5-6 天后，采用 ELISA 试剂盒检测 IFN-γ（购自达科为公司）和 IL-2（购自达科为公司）的分泌量。

DC 细胞和 T 细胞混合培养后的 IFN-γ 的分泌检测结果分别如图 50－图 53 所示。DC 细胞和 T 细胞混合培养后的 IL-2 的分泌检测结果分别如图 54－图 56 所示。

由图可见，4G10H1L1、4G10H3L3、14C12H1L1、以及双功能抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003 和 BiAb004 均能有效地诱导混合淋巴细胞分泌 IFN-γ 和 IL-2。其中，抗 PD-1 抗体 14C12H1L1 在浓度为 1 nM 和 10 nM 时，对 IFN-γ 分泌的诱导效果与对照抗体 Nivolumab 在 100 nM 时相当。CTLA4 抗体 4G10H1L1 和 4G10H3L3 在浓度为 100 nM 时对 IFN-γ 分泌的诱导效果强于对照抗体 Ipilimumab（图 52）。

实施例 12：IL-2 的分泌

将分离得到的 PBMC（方法同实施例 10）用 PHA（上海疾控生物科技有限公司，50 μl/mL）刺激 3 天后， 96 孔板中加入刺激成熟的 PBMC(来源于志愿献血者，5×10^4 cells/孔），Raji 细胞（来源于 ATCC, 5×10^4 cells/孔）和 MDA-MB-231 细胞（来源于 ATCC）（1×10^4 cells/孔），同时加入抗体（100 nM）混合均匀共培养。3 天后，采用 ELISA 试剂盒检测 IL-2（购自达科为公司）的分泌量，具体操作按照试剂盒说明书进行。

细胞混合培养后的 IL-2 的分泌检测结果分别如图 57、图 58 和图 59 所示。由图可见，

4G10H1L1、4G10H3L3、14C12H1L1、以及双功能抗体 BiAb001、BiAb002、 BiAb003 和 BiAb004 均能有效地诱导 PBMC 分泌 IL-2。其中，抗 PD-1 抗体 14C12H1L1 对 IL-2 分泌的诱导效果强于对照抗体 Nivolumab（图 58），双功能抗体 BiAb001、BiAb002、BiAb003 和 BiAb004 对 IL-2 分泌的诱导效果与 14C12H1L1+4G10H1L1 或者 14C12H1L1+4G10H3L3 的效果相当（图 59）。

实例 13：抗体 BiAb004 对 PD-1 HuGEMM 小鼠 MC38 肿瘤模型的肿瘤生长影响

在 PD-1 HuGEMM 小鼠（人 PD-1 转基因小鼠，右侧皮下接种 MC38 肿瘤细胞 1×10^6/只），当平均肿瘤体积达到约 144 mm^3 时，根据肿瘤体积将小鼠随机分入 4 个实验组并进行腹腔给药，每组小鼠均为 8 只。具体分组和给药剂量如下：

Isotype Control 组（给药剂量 2.67mg/kg），

BiAb004 高剂量组（给药剂量 2.67mg/kg），

BiAb004 低剂量组（给药剂量 0.267mg/kg），

以上 3 组均按照每周给药 2 次，共给药 5 次。分组给药后，每周两次测量肿瘤大小。

结果如图 60 所示。

结果显示：

BiAb004 高剂量组和 BiAb004 低剂量组的肿瘤体积在统计学上均显著小于 Isotype control 组（$P<0.001$、<0.05）。BiAb004 低剂量组在 PD-1 HuGEMM 小鼠 MC38 肿瘤模型中显示有统计学显著意义的抗肿瘤作用。

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

权 利 要 求

1. 一种双特异性抗体，其包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 CTLA4 的第二蛋白功能区。

2. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接；优选地，所述连接片段为(GGGGS)n，n 为正整数，例如 1、2、3、4、5 或 6。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的双特异性抗体，其中，

所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为免疫球蛋白或其抗原结合片段，例如半抗体、Fab、$F(ab')_2$ 或单链抗体；

优选地，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第二蛋白功能区为单链抗体；或者

优选地，所述第一蛋白功能区为单链抗体，所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为 1 个、2 个或者 2 个以上。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的双特异性抗体，其中，所述免疫球蛋白为 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM；优选为 IgG。

6. 根据权利要求 3 至 5 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端。

7. 根据权利要求 3 至 6 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，

在本发明的一个实施方案中：

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 29－31 的 CDR，

其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32－34 的 CDR；和/或

所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35－37 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 37 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42－44 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38－40 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45－47 的 CDR；

或者

在本发明的另一个实施方案中：

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35－37 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 37 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42－44 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38－40 的 CDR 或者包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45－47 的 CDR；和/或

所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 29－31 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32－34 的 CDR。

8. 根据权利要求 3 至 7 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，

在本发明的一个实施方案中：

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 20；所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 22；和/或

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 25；所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:27；

或者

在本发明的另一个实施方案中：

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 25；所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:27；和/或

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 20；所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 22。

9.根据权利要求 1 至 8 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，

所述的免疫球蛋白包括非-CDR 区，且所述非-CDR 区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，所述的双特异性抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、10^{-7} M、10^{-8} M、10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的 K_D 结合 CTLA4 蛋白和/或 PD-1 蛋白。

11. 分离的核酸分子，其包含能够编码抗体重链可变区的核酸序列，其中，

所述抗体的重链可变区包含：

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 29—31 的 CDR、

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35—37 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 37 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42—44 的 CDR，和

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32—34 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38—40 的 CDR 或者氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR。

12. 分离的核酸分子，其包含能够编码抗体轻链可变区的核酸序列，其中，

所述抗体轻链可变区包含：

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32—34 的 CDR，

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38—40 的 CDR，或者

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR。

13. 一种载体，其包含权利要求 11 和/或 12 所述的分离的核酸分子。

14. 一种宿主细胞，其包含权利要求 11 和/或 12 所述的分离的核酸分子，或者权利要求 13 所述的载体。

15. 制备权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体的方法，其包括在合

适的条件下培养权利要求 14 的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述双特异性抗体的步骤。

16. 偶联物，其包括双特异性抗体以及偶联部分，其中，所述双特异性抗体为权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

17. 试剂盒，其包括权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体，或者包括权利要求 16 所述的偶联物；

优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述双特异性抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

18. 权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 CTLA4 和/PD-1 在样品中的存在或其水平。

19. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 16 所述的偶联物；可选地，其还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

20. 权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 16 所述的偶联物在制备预防和/或治疗肿瘤或者贫血病的药物中的用途，或者用于诊断肿瘤或者贫血病的药物中的用途；优选地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

21. 权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 16 所述的偶联物在制备如下药物中的用途：

检测样品中的 CTLA4 水平的药物，

阻断 CTLA4 与 B7 结合的药物，

调节（例如下调）CTLA4 活性或 CTLA4 水平的药物，

解除 CTLA4 对机体免疫抑制的药物，

激活 T 淋巴细胞的药物，或者

提高 T 淋巴细胞中 IL-2 表达的药物；

和/或

阻断 PD-1 与 PDL1 结合的药物，

调节（例如下调）PD-1 活性或水平的药物，

解除 PD-1 对机体免疫抑制的药物，或者

提高 T 淋巴细胞中 IFN-γ表达的药物。

22. 一种在体内或体外方法，包括施加细胞或者有需求的受试者以有效量的权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 16 所述的偶联物的步骤，所述方法选自如下：

检测样品中的 CTLA4 水平的方法，

阻断 CTLA4 与 B7 结合的方法，

调节（下调）CTLA4 活性或 CTLA4 水平的方法物，

解除 CTLA4 对机体免疫抑制的方法，

激活 T 淋巴细胞的方法，或者

提高 T 淋巴细胞中 IL-2 表达的方法；

和/或

阻断 PD-1 与 PDL1 结合的方法，

调节（例如下调）PD-1 活性或水平的方法，

解除 PD-1 对机体免疫抑制的方法，或者

提高 T 淋巴细胞中 IFN-γ表达的方法。

23. 根据权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 16 所述的偶联物，其用于预防和/或治疗肿瘤或者贫血病，或者用于诊断肿瘤或者贫血病；优选地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。

24. 根据权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 16 所述的偶联物，其用于：

检测样品中的 CTLA4 水平，

阻断 CTLA4 与 B7 结合，

调节（例如下调）CTLA4 活性或 CTLA4 水平，

解除 CTLA4 对机体免疫抑制，

激活 T 淋巴细胞，或者

提高 T 淋巴细胞中 IL-2 表达；

和/或

阻断 PD-1 与 PDL1 结合，

调节（例如下调）PD-1 活性或水平，

解除 PD-1 对机体免疫抑制，或者

提高 T 淋巴细胞中 IFN-γ表达。

25. 一种预防和/或治疗肿瘤或者贫血病的方法，或者一种用于诊断肿瘤或者贫血病的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 16 所述的偶联物的步骤；优选地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃肠道癌、肝癌、非小细胞性肺癌、卵巢癌和白血病。