

含有抗 PD-1-抗 VEGFA 双特异性抗体的药物组合及其用途

技术领域

本发明属于肿瘤治疗和免疫学生物学领域，涉及一种含有抗 PD-1-抗 VEGFA 双特异性抗体的药物组合及其用途。具体地，本发明涉及一种含有抗人 PD-1-抗人 VEGFA 双特异性抗体的药物组合及其用途。

背景技术

肿瘤尤其是恶性肿瘤是当今世界严重危害人类健康的疾病。肿瘤的生长有两个明显不同的阶段，即从无血管的缓慢生长期转为有血管的快速增殖期，血管的生成使肿瘤能获得足够的营养而完成血管切换期，如果没有血管的生成，原发肿瘤的生长不超过 1—2mm，转移则无法实现。

血管内皮生长因子（VEGF）是一类能促进内皮细胞分裂增殖、促进新生血管的形成、提高血管通透性的生长因子，它与细胞表面的血管内皮生长因子受体结合，通过激活酪氨酸激酶信号转导途径发挥功能。在肿瘤组织中，肿瘤细胞、肿瘤侵入的巨噬细胞和肥大细胞能分泌高水平的 VEGF，以旁分泌的形式刺激肿瘤血管内皮细胞，促进内皮细胞增殖、迁移，诱导血管形成，促进肿瘤持续生长，并提高血管通透性，引起周围组织纤维蛋白沉着，促进单核细胞、成纤维细胞内皮细胞浸润，有利于肿瘤基质形成和肿瘤细胞进入新生血管，促进肿瘤转移，因而抑制肿瘤血管生成被认为是当前最具有前途的肿瘤治疗方法之一。VEGF 家族包括：VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD 和 PIGF。血管内皮生长因子受体（VEGFR）包括 VEGFR1（又称 Flt1）、VEGFR2（又称 KDR 或 Flk1）、VEGFR3（又称 Flt4）和 Neuropilin-1（NRP-1）。其中，前三种受体在结构上类似，都属于酪氨酸激酶超家族，均由膜外区、跨膜片段及膜内区三部分构成，其中膜外区由免疫球蛋白样结构域组成，膜内区属酪氨酸激酶区。VEGFR1 和 VEGFR2 主要位于血管内皮细胞表面，VEGFR3 主要位于淋巴管内皮细胞表面。

VEGF 家族分子对于几种受体有不同的亲和力。VEGFA 主要与 VEGFR1、VEGFR2 和 NRP-1 结合发挥作用。VEGFR1 是最早发现的受体，在正常生理情况下 VEGFR1 与 VEGFA 的亲和力比 VEGFR2 与 VEGFA 的亲和力高，但是其胞内段酪氨酸酶活性比 VEGFR2 低（马莉，中国优生与遗传杂志，24（5）（2016）：146-148）。

VEGFR2 是血管发生和构建的主要调节者，与 VEGFR1 相比 VEGFR2 具有很高的酪氨酸激酶活性。VEGFR2 与配体 VEGFA 结合后介导血管内皮细胞的增殖、分化等行为，以及血管的形成过程和血管的通透性（Roskoski R Jr.等人，*Crit Rev Oncol Hematol*, 62 (3) (2007) : 179-213.），VEGFA 与 VEGFR2 结合后通过下游
5 PLC- γ -PKC-Raf-MEK-MAPK 信号传导通路介导胞内相关蛋白基因转录表达，促进血管内皮细胞增殖（Takahashi T 等人，*Oncogene*, 18 (13) (1999) : 2221-2230.）。

VEGFR3 属于酪氨酸激酶家族成员之一，主要表达在胚胎时期的血管内皮细胞和成年期的淋巴管内皮细胞，VEGFC 和 VEGFD 与 VEGFR3 结合以刺激淋巴管内皮细胞的增殖与迁移，促进淋巴管的新生；NRP-1 是一种非酪氨酸激酶跨膜蛋白，不能独立转导
10 生物信号，而与 VEGF 酪氨酸激酶受体形成复合物后才能介导信号传导。（马莉，中国优生与遗传杂志，24 (5) (2016) : 146-148）。

VEGFA 与 VEGFR2 主要参与调控血管生成，VEGFA 与 VEGFR2 结合前后会引发上下游通路中众多中间信号形成级联反应，最终以内皮细胞增殖、存活、迁移、通透性增加及浸润到周围组织等不同形式改变其生理功能（董宏超等人，《现代肿瘤医学》，
15 第 22 卷，第 9 期 2014 年 9 月，第 2231-3 页）。

细胞程序性死亡受体-1（Programmed cell death protein, PD-1），又被称为 CD279，是 I 型跨膜糖蛋白膜表面受体，属于 CD28 免疫球蛋白超家族，普遍表达于 T 细胞，B 细胞以及髓样细胞。PD-1 有两个天然配体，PD-L1 和 PD-L2。PD-L1 和 PD-L2 均属于 B7 超家族，组成性地或诱导性地表达于多种细胞膜表面，包括非造血系统细胞以及多种
20 肿瘤细胞。PD-L1 主要表达于 T 细胞、B 细胞、DC 以及微血管内皮细胞和多种肿瘤细胞。PD-L2 则仅表达于抗原呈递细胞如树突状细胞和巨噬细胞。PD-1 与其配体的相互作用可抑制淋巴的活化，抑制 T 细胞的增殖以及 IL-2、IFN- γ 等细胞因子的分泌。

有大量研究表明肿瘤微环境可保护肿瘤细胞免受免疫细胞的破坏，而肿瘤微环境中浸润的淋巴细胞 PD-1 表达上调，且多种原发肿瘤组织在免疫组化分析中均表现为 PD-L1
25 阳性，如肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、结肠癌、胶质瘤等。同时，PD-L1 在肿瘤的表达与癌症患者的不良预后显著相关。阻断 PD-1 与其配体的相互作用可促进肿瘤特异性的 T 细胞免疫，提高肿瘤细胞的免疫清除效率。大量临床试验表明，靶向 PD-1 或 PD-L1 的抗体可促进 CD8+T 细胞浸润到肿瘤组织，上调抗肿瘤的免疫效应因子，如 IL-2、IFN- γ ，颗粒酶 B 以及穿孔素，从而有效抑制肿瘤的生长。

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.* Jun;42(3) (2015):466-473), 淋巴瘤以及贫血(Held SA, Heine A, et al., *Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML.* *Curr Cancer Drug Targets.* Sep;13(7) (2013):768-74)、微卫星高度不稳定性 (MSI-H) 或错配修复缺陷 (dMMR) 肿瘤(多款抗 PD-1 抗体药物已受 FDA 等批注用于治疗具有 MSI-H/dMMR 特征的肿瘤)。

目前抗血管生成疗法和免疫检查点抑制剂的联用在很多肿瘤中展现出了良好的疗效。抗 VEGF 抗体，如 Bevacizumab，和抗 PD-1/PD-L1 抗体的联用，如 Nivolumab、Pembrolizumab、Atezolizumab 等，在卵巢癌(Joyce F. Liu et al., *JAMA Oncol.* 2019;5(12):1731-1738.)、非小细胞肺癌 (包括 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌) (Manegold C, et al., *J Thorac Oncol.* 2017 Feb;12(2):194-207.)、肾细胞癌 (Dudek AZ et al., *J Clin Oncol.* 2018;36 (suppl; abstr 4558).)、肝细胞癌 (Stein S et al., *J Clin Oncol.* 2018, 36(15_suppl):4074.; FDA 于 2020 年批注 Bevacizumab 联合 Atezolizumab 治疗肝细胞癌)、直肠癌 (包括 MSI-H/dMMR 和非 MSI-H/dMMR 类型) (Bendell JC et al. American Society of Clinical Oncology; May 29–June 2, 2015; Chicago, IL. 2015; abstract 704; Hochster HS et al. American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium; January 19–21, 2017; San Francisco, CA. 2017; abstract 673.)、乳腺癌 (Yukinori Ozaki et al., *AACR; Cancer Res* 2020;80(4 Suppl):Abstract nr PD1-03.)；VEGFR2 抗体和 PD-1 抗体药物联用在胃及胃食管结合部腺癌亦展现了良好的抗肿瘤效果 (Herbst RS et al., *Lancet Oncol.* 2019;20(8):1109-1123.)；PD-1 抗体 (Pembrolizumab) 和血管生成抑制剂 (Lenvatinib) 联用方案在治疗子宫内膜癌中展现出了良好的疗效，于 2019 年被 FDA 批准用于治疗子宫内膜癌。对于黑色素瘤 (PD-1 抗体 Nivolumab 和 Pembrolizumab 已被 FDA 批准用于治疗黑色素瘤)、宫颈癌 (Krishnansu S. et al., *N Engl J Med* 2014; 370:734-743.)、胶质瘤、前列腺癌 (Antonarakis ES. et al., *J Clin Oncol.* 2020 Feb 10;38(5):395-405.)、尿路上皮癌 (Joaquim Bellmunt. et al., *N Engl J Med* 2017; 376:1015-1026; FDA 于 2017 年批注 Nivolumab 用于治疗膀胱癌)、食管癌 (Kato K et al., *Lancet Oncol.* 2019;20(11):1506–17.)、间皮瘤 (Scherpereel A et al., *Lancet Oncol.* 2019;20(2):239-253.) 等肿瘤，PD-1/PDL-1 抗体展现出了良好的疗效，考虑到 PD-1 通路

与 VEGF 通路的在肿瘤发生中的协同作用，可以预期同时阻断 PD-1 及 VEGF 通路的药物将会有更好的抗肿瘤效果。

多聚 ADP 核糖聚合酶(Poly ADP-ribose Polymerase, PARP)属于 PARP 酶家族，包括 PARP-1、PARP-2、PARP-3 和 Vault-PARP。PARP 在 DNA 修复通路中起关键作用。

- 5 DNA 损伤断裂时会激活 PARP，它作为 DNA 损伤的一种分子感受器，具有识别、结合到 DNA 断裂位置的功能，进而激活、催化受体蛋白的聚 ADP 核糖基化作用，参与 DNA 的修复过程。

- PARP 抑制剂可通过介导合成致死来发挥抗肿瘤效应。除了 PARP 介导的 DNA 修复，还存在其他 DNA 修复机制。同源重组 (Homologous Recombination)，是指发生在非姐妹染色单体之间或同一染色体上含有同源序列的 DNA 分子之间或分子之内的重新组合。
- 10 DNA 同源重组修复 (Homologous Recombination Repair, HRR) 是 DNA 双链损伤的重要修复方式，BRCA1 和 BRCA2 是该过程的关键蛋白，如果 BRCA 基因出现突变导致 BRCA1 和 BRCA2 蛋白失去功能，就会引起 HRR 功能异常，即 HRD (Homologous Recombination Deficiency)。其它 HRR 相关基因如 PALB2, ATM,
- 15 BRCA1/2, CHEK2, BARD1, BRIP1, Mre11, CDK12, RAD50, NBS1, RAD51C, RAD51D 及 PALB2 等异常、或 BRCA1 基因启动子发生甲基化、以及其它暂未明确的原因，上述都会引起 HRD，导致基因组不稳定 (Lord CJ, Ashworth A. Science. 2017;355(6330):1152-1158.)。癌症和肿瘤基因图谱(TCGA)研究发现超过 50%高级别浆液性卵巢癌存在 HRD (同源重组修复缺陷)。其中包括 BRCA1/2 胚系突变 (15%)，
- 20 BRCA1/2 体细胞突变 (6%)，表观遗传改变的 BRCA1 启动子甲基化 (11%)，EMS1 扩增 (8%)，PTEN 突变 (7%)，RAD51C 甲基化 (3%)，ATM 或 ATR 突变 (2%) 及其他 HRD 基因突变 (5%) (Turner NC. N Engl J Med. 2017;377(25):2490-2492)。

- 合成致死 (Synthetic lethality) 是指两个非致死基因同时失活导致细胞死亡的现象。PARP 抑制剂可以与 PARP1 或 PARP2 催化位点的结合，导致 PARP 蛋白无法从 DNA
- 25 损伤位点上脱落，进而导致 DNA 复制叉停滞和 DNA 复制无法顺利进行，如果当 PARP 被抑制而 HRR 相关蛋白又有缺陷时，就导致了合成致死。

对于携带特定 DNA 修复缺陷 (如 BRCA1 或 BRCA2 种系基因突变) 的肿瘤细胞，抑制 PARP 可阻碍肿瘤细胞的 DNA 修复，利用合成致死促进肿瘤细胞的死亡。

PARP 抑制剂 (PARPi) 在卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌和胰腺癌等癌症的临床研究

表现出良好的疗效，已获批用于携带有同源修复缺陷的卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌和乳腺癌等癌症的治疗（J. Mateo et al. Ann Oncol. 2019 Sep 1;30(9):1437-1447.），PARPi在胰腺癌、前列腺癌中也已展示出良好的药效。对于未携带DNA修复缺陷（如BRCA1或BRCA2种系基因突变）的肿瘤，PARPi依然表现出抗肿瘤效果。尼拉帕利在NOVA
5 临床研究中，与安慰剂对比，无论患者是否携带有同源重组修复缺陷基因突变，其PFS均得到显著延长（Mirza MR et al. N Engl J Med 2016; 375(22): 2154-2164.），其它PARPi，如奥拉帕利、芦卡帕利等，亦在不携带有同源重组修复缺陷基因突变的肿瘤患者中展现出了良好的药效（J. Mateo et al. Ann Oncol. 2019 Sep 1;30(9):1437-1447.）。

目前已经获批上市的PARP抑制剂共有四款，分别是阿斯利康的奥拉帕利
10 (Olaparib)、美国克洛维斯肿瘤公司的芦卡帕利(Rucaparib)、Tesarco公司的尼拉帕利(Niraparib)以及辉瑞的他拉唑帕利(Talazoparib)。中国恒瑞医药的氟唑帕利(Fluzoparib)在中国获批用于既往经过二线及以上化疗的伴有胚系BRCA突变的铂敏感复发性卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌患者的治疗。此外，尚有veliparib ER、ABT-472、ABT-767、Stenoparib、AST-6828、AG-PD、ANG-2864、ANG-3038、ANG-3186、AZD-5305、AZ-0108、
15 AZD-2461、AMXI-5001、AMXI-2001、AMXI-3001、AMXI-7001、AMXI-9001、pamiparib、ZYTP-1、CK-102、XZ-120312、YHP-743、iobenguane I 131、rucaparib camsylate、CVL-218、CPH-101、CPH-102、CBX-11、CBX-15、minocycline、DB-207、DPS-102、E-7016、iobenguane I 131、MK-2512、HCX-014、HWH-340、IDX-1197、IDX-1197、senaparib、IMP-04100、IMP-04111、IMP-04149、IMP-04249、IMP-04307、IMP-04356、
20 JPI-289、JPI-547、JPI-283、fluzoparib、GT-1620、iobenguane I 131、DR-2313、MP-124、H-10、NT-125、BGP-15、NMSP-293、NMSP-293、NMSP-118、NMSP-648、NMSP-914、DB-207、NUV-1156、NUV-1176、JPI-289、Stenoparib、OX-401、NU-1025、NU-1085、PLX-376、R-554、RBN-2397、RBN-012759、PJ-34、INO-1001、WW-46、BSI-401、iniparib、SOMCL-9112、SC-10914、HTMC-0435、SRX-3128、TSL-1502、PJ-34、CEP-8983、
25 CK-102、THG-009、talazoparib SR、L-2286、mitoparib、WB-1340等在研发中。

双功能抗体亦称为双特异性抗体(Bispecific Antibody)，是同时靶向两种不同抗原的特异性药物，其可通过免疫分选纯化生产。另外，也可通过基因工程获得，基因工程在结合位点优化，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 (Coloma M. J., Morrison S. L. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. *Nat Biotechnol.*, 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、
5 表达和纯化上所具有的优势，已被证明是双功能抗体的一种理想存在形式 (Miller B. R., Demarest S. J., et al., *Protein Eng Des Sel* 2010; 23:549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A. *MAbs* 2011; 3:299-309)。

临床前研究发现，PARPi 可以触发免疫系统对基于新抗原和非新抗原的肿瘤细胞识别，提示其与免疫检查点抑制剂联用可能获得更好的疗效 (Mateo J et al. *Ann Oncol.*
10 2019;30(9):1437-1447.)。抑制 PARP 诱导肿瘤细胞提高 PD-L1 的表达，形成免疫抑制从而削弱 PARPi 的疗效，因此，抑制 PARP 的同时阻断 PD-(L)1 可避免形成免疫抑制，从而使得 PARPi 和 PD-(L)1 抑制剂发挥更强的抗肿瘤活性 (Jiao S et al. *Clin Cancer Res.* 2017;23(14):3711-3720.)。另一方面，对于肿瘤细胞来说，相关基因突变导致其特定 DNA 修复缺陷，DNA 损伤的积累使得肿瘤细胞与正常细胞差别增大，更容易被免疫系统识别，
15 且肿瘤变异越多，其生存就越依赖对免疫系统的抑制。因此 PARPi 与 PD-1 药物联合用药具有一定理论基础。除 PD-1 外，如抗 PD-1/VEGFA 双特异性抗体，同时还阻断在肿瘤微环境中 PD-1 的表达具有很强的相关性的 VEGF-A，通过抑制血管生成等机制遏制肿瘤进展。

开发更有效的治疗手段或者联合给药治疗方案具有巨大的临床意义。

20

发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，开展了抗 PD-1-抗 VEGFA 抗体和 PARP 抑制剂联合应用在肿瘤治疗中的研究，发现二者的联用具有良好的治疗和/或预防肿瘤特别是恶性肿瘤的效果。由此提供了下述发明：

25

本发明的一个方面涉及一种药物组合，其包括至少一种双特异性抗体，以及至少一种 PARP 抑制剂；

其中，所述双特异性抗体包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区；

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

其中，

5 所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；

10 或者，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；

所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型；

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

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的药物组合，其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有如下突变：

L234A 和 L235A；或者

L234A 和 G237A；或者

25 L235A 和 G237A；

或者

L234A、L235A、G237A。

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

本发明还涉及一种药物组合，其包括至少一种双特异性抗体，以及至少一种 PARP 抑制剂；

其中，所述双特异性抗体包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

5 靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区；

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

其中，

10 所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；

或者，

15 所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；

20 所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型。

本发明还涉及一种药物组合，其包括至少一种双特异性抗体，以及至少一种 PARP 抑制剂；

其中，所述双特异性抗体包括：

25 靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区；

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

其中，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；

或者，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；

所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型；

其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有如下突变组合之一：

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

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的药物组合，其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有或还具有选自如下的一个或多个突变：

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

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的药物组合，其中，

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 9；并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 17；

或者，

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 9; 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 17; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示; 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的药物组合, 其选自如下的 (1) — (12) 中的任一项:

(1)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示;

(2)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示;

(3)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示;

(4)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示;

(5)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免

疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；

(6)

- 5 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示；

(7)

- 10 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

(8)

- 15 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

(9)

- 20 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

(10)

- 25 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

(11)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 以及

5 (12)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

10 在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的药物组合:

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示, 并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的药物组合, 其中, 所述双特异性抗体为 IgG-scFv 形式即 Morrison 模式。

15 在本发明的一些实施方式中, 所述的药物组合, 其中,

所述免疫球蛋白的重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区, 并且所述免疫球蛋白的轻链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的轻链恒定区。

在本发明的一些实施方式中, 所述的药物组合, 其中,

20 所述的免疫球蛋白, 其重链恒定区为人 Ig gamma-1 chain C region 或人 Ig gamma-4 chain C region, 并且其轻链恒定区为人 Ig kappa chain C region。

在本发明的一些实施方案中, 所述免疫球蛋白的恒定区是人源化的, 例如, 重链恒定区采用 Ig gamma-1 chain C region, **ACCESSION: P01857**; 轻链恒定区采用 Ig kappa chain C region, **ACCESSION: P01834**; 或者

25 所述免疫球蛋白的重链恒定区采用 Ig gamma-4 chain C region, **ACCESSION: P01861.1**; 轻链恒定区采用 Ig kappa chain C region, **ACCESSION: P01834**。

在本发明的一个实施方式中, 重链恒定区 Ig gamma-1 chain C region (**ACCESSION: P01857**) 的氨基酸序列如下:

**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC**

PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 (SEQ ID NO: 40)

在本发明的一个实施方式中,重链恒定区 Ig gamma-4 chain C region (ACCESSION: P01861.1) 的氨基酸序列如下:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSC
10 PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO: 41)

15 在本发明的一个实施方式中,轻链恒定区 Ig kappa chain C region (ACCESSION: P01834) 的氨基酸序列如下:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 42)

20 在本发明的一些实施方式中,所述的药物组合,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。

在本发明的一些实施方式中,所述的药物组合,其中,所述单链抗体为两条,每条单链抗体的一端分别连接在免疫球蛋白的两条重链的 C 末端或 N 末端。

25 在本发明的一些实施方式中,所述单链抗体的 V_H 与 V_L 之间存在二硫键。在抗体的 V_H 和 V_L 之间引入二硫键的方法是本领域熟知的,例如可参见美国专利 US5,747,654; Rajagopal et. al, Prot. Engin. 10(1997)1453-1459; Reiter et. al, Nat. Biotechnol. 14(1996)1239-1245; Reiter et. al, Protein Engineering 8(1995)1323-1331; Webber et. al, Molecular Immunology 32(1995)249-258; Reiter et. al, Immunity 2(1995)281-287; Reiter

et. al, JBC 269(1994)18327-18331; Reiter et. al, Inter. J. of Cancer 58(1994)142-149;
或者 Reiter et. al, Cancer Res.54(1994)2714-2718; 其通过引用并入本文。

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

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的药物组合, 其中, 所述连接片段为
(GGGS) n , n 为正整数; 优选地, n 为 1、2、3、4、5 或 6。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的药物组合, 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。

10 在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的药物组合, 其中, 所述单链抗体连接
在免疫球蛋白的重链的 C 末端。

本发明还涉及一种药物组合, 其包括至少一种双特异性抗体, 以及至少一种 PARP
抑制剂;

其中, 所述双特异性抗体包括:

15 靶向 PD-1 的第一蛋白功能区, 和

靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区;

所述第一蛋白功能区为 1 个, 所述第二蛋白功能区为 2 个;

其中, 所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白, 所述第二蛋白功能区为单链抗体;

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示, 并且其轻链的氨基
20 酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示;

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述单链
抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示;

所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端;

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

优选地, 所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列独立地选自 SEQ ID
NO: 18 和 SEQ ID NO: 19;

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

18 所示。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的药物组合，其中，所述双特异性抗体或其抗原结合片段以小于大约 10^{-6} M，例如小于大约 10^{-7} M、 10^{-8} M 或 10^{-9} M 或更小的亲和力常数结合 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ ；优选地，所述亲和力常数通过 Fortebio Octet 分子相互作用仪测得。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的药物组合，其中，所述双特异性抗体或其抗原结合片段以小于大约 10^{-9} M，例如小于大约 10^{-7} M、 10^{-8} M 或 10^{-9} M 或更小的亲和力常数结合 C1q ；优选地，所述亲和力常数通过 Fortebio Octet 分子相互作用仪测得。

在本发明的一些实施方式中，所述的药物组合，其中，所述的双特异性抗体或其抗原结合片段以小于 10^{-5} M，例如小于 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的 K_D 结合 VEGFA 蛋白和/或 PD-1 蛋白；优选地，所述 K_D 通过 Fortebio 分子相互作用仪测得。

在本发明的一些实施方式中，所述的药物组合，其中，
所述的双特异性抗体或其抗原结合片段以小于 1 nM、小于 0.5 nM、小于 0.2 nM、小于 0.15 nM 或小于 0.14 nM 的 EC_{50} 结合 VEGFA 蛋白；优选地，所述 EC_{50} 通过间接 ELISA 方法测得；

和/或，

所述的双特异性抗体或其抗原结合片段以小于 1 nM、小于 0.5 nM、小于 0.2 nM、小于 0.17 nM、小于 0.16 nM 或小于 0.15 nM 的 EC_{50} 结合 PD-1 蛋白；优选地，所述 EC_{50} 通过间接 ELISA 方法测得。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述双特异性抗体为单克隆抗体。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述双特异性抗体为人源化抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述的药物组合，其中，所述 PARP 抑制剂选自奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、veliparib ER、ABT-472、ABT-767、Stenoparib、AST-6828、AG-PD、ANG-2864、ANG-3038、ANG-3186、AZD-5305、AZ-0108、AZD-2461、AMXI-5001、AMXI-2001、AMXI-3001、AMXI-7001、AMXI-9001、pamiparib、ZYTP-1、CK-102、XZ-120312、YHP-743、iobenguane I 131、rucaparib camsylate、CVL-218、CPH-101、CPH-102、CBX-11、CBX-15、minocycline、DB-207、

DPS-102、E-7016、iobenguane I 131、MK-2512、HCX-014、HWH-340、IDX-1197、
IDX-1197、senaparib、IMP-04100、IMP-04111、IMP-04149、IMP-04249、IMP-04307、
IMP-04356、JPI-289、JPI-547、JPI-283、fluzoparib、GT-1620、iobenguane I 131、
DR-2313、MP-124、H-10、NT-125、BGP-15、NMSP-293、NMSP-293、NMSP-118、
5 NMSP-648、NMSP-914、DB-207、NUV-1156、NUV-1176、JPI-289、Stenoparib、
OX-401、NU-1025、NU-1085、PLX-376、R-554、RBN-2397、RBN-012759、PJ-34、
INO-1001、WW-46、BSI-401、iniparib、SOMCL-9112、SC-10914、HTMC-0435、
SRX-3128、TSL-1502、PJ-34、CEP-8983、CK-102、THG-009、talazoparib SR、L-2286、
mitoparib 和 WB-1340 中的一种或多种。

10 在本发明的一些实施方式中，所述的药物组合，其还包含一种或多种肿瘤化疗药物；
优选地，所述肿瘤化疗药物选自拓扑异构酶 II(TOP2)抑制剂，优选地，所述拓扑
异构酶 II(TOP2)抑制剂是依托泊苷；

优选地，所述肿瘤化疗药物选自紫杉醇类药物，优选地，所述紫杉醇类药物选自紫
杉醇、白蛋白紫杉醇、脂质体紫杉醇和多烯紫杉醇（多西他赛）；

15 优选地，所述肿瘤化疗药物选自铂类药物，优选地，所述铂类药物选自顺铂、卡
铂和奥沙利铂；

优选地，所述肿瘤化疗药物选自吉西他滨、培美曲塞和卡培他滨中的一种或多种。

在本发明的一些实施方式中，所述的药物组合，其中，所述药物组合为固定组合，
20 例如呈固体药物组合物形式或液体药物组合物形式；或者

所述药物组合是非固定组合，例如所述双特异性抗体、PARP 抑制剂和肿瘤化疗
药物各自呈药物组合物形式。

在本发明的一些实施方式中，所述的药物组合，其中，所述药物组合物还包括药学
上可接受的载体和/或赋形剂。

25

本发明的药物组合物可以配制成药学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混
悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包
括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预
期的给药方式和治疗用途。本发明的药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳

定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的双特异性抗体，以及任选地，同时掺入其他期望的成分(包括但不限于，pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合)，随后过滤除菌。此外，可以
5 将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如，通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中，例如无菌无热原水。

此外，本发明的双特异性抗体或者 PARP 抑制剂可以以单位剂量形式存在于药物组合物中，以便于施用。在某些实施方案中，所述单位剂量为至少 1mg，至少 5mg，至少 10mg，至少 15mg，至少 20mg，至少 25mg，至少 30mg，至少 45mg，至少 50mg，至
10 少 75mg，或至少 100mg。在所述药物组合物为液体(例如，注射剂)剂型的情况下，其可以包含浓度至少为 0.1mg/ml，如至少 0.25mg/ml，至少 0.5mg/ml，至少 1mg/ml，至少 2.5mg/ml，至少 5mg/ml，至少 8mg/ml，至少 10mg/ml，至少 15mg/ml，至少 25mg/ml，至少 50mg/ml，至少 75mg/ml，或至少 100mg/ml 的本发明的双特异性抗体。

本发明的双特异性抗体或药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，包括但不限于，口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部(如，粉剂、药膏或滴剂)，或鼻腔途径。但是，对于许多治疗用途而言，优选的给药途径/方式是胃肠外给药(例如静脉注射，皮下注射，腹膜内注射，肌内注射)。技术人员应理解，给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在一个优选的实施方案中，本发明的双特异性抗体或药物组合物通过静脉输注或注射给予。
15

20 本发明所提供的双特异性抗体或药物组合物可以单独使用或联合使用，也可以与另外的药学活性剂(例如肿瘤化疗药物)联合使用。这种另外的药学活性剂可以在施用本发明的双特异性抗体或本发明的药物组合物之前、同时或之后施用。

在本发明中，可调整给药方案以获得最佳目的反应(例如治疗或预防反应)。例如，可以单次给药，可以在一段时间内多次给药，或者可以随治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。
25

本发明的双特异性抗体是本发明中任一项所述的双特异性抗体，是抗 PD-1-抗 VEGFA 双特异性抗体。

本发明的另一方面涉及一种药盒产品，其包含本发明中任一项所述的药物组合，以及产品说明书。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的药物组合或者本发明的药盒产品在制备治疗和/或预防恶性肿瘤的药物中的用途；

5 优选地，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、宫颈癌、输卵管癌、腹膜癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、脑癌、食管癌例如食管鳞癌、微卫星高度不稳定性（MSI-H）或错配修复缺陷（dMMR）癌、尿路上皮癌、间皮瘤、胃腺癌、胃食管结合部腺癌、白血病、骨髓瘤、甲状腺癌、头颈癌、骨癌、胆道癌和睾丸癌；

10 优选地，所述肿瘤为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为不存在同源重组介导的修复功能缺陷的肿瘤；

优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；

优选地，所述非小细胞性肺癌为 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述非小细胞性肺癌为不携带 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌；

15 优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌；

优选地，所述腹膜癌为原发性腹膜癌；

20 优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的卵巢癌；

优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的输卵管癌；

25 优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的腹膜癌；

优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的乳腺癌。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的药物组合或者本发明的药盒产品在制备如下药物中的用途：

(1)

检测样品中的 VEGFA 水平的药物或试剂，

阻断 VEGFA 与 VEGFR2 结合的药物或试剂，

下调 VEGFA 的活性或其水平的药物或试剂，

5 解除 VEGFA 对血管内皮细胞增殖的刺激作用的药物或试剂，

抑制血管内皮细胞增殖的药物或试剂，或者

阻断肿瘤血管生成的药物或试剂；

和/或

(2)

10 阻断 PD-1 与 PD-L1 结合的药物或试剂，

下调 PD-1 的活性或其水平的药物或试剂，

解除 PD-1 对机体免疫抑制的药物或试剂，

促进 T 淋巴细胞中 IFN- γ 分泌的药物或试剂，或者

促进 T 淋巴细胞中 IL-2 分泌的药物或试剂。

15 本发明的体外实验中，抗 VEGFA 抗体及抗 VEGFA-抗 PD-1 双特异性抗体均能抑制 HUVEC 细胞增殖，抗 PD-1 抗体及抗 VEGFA-抗 PD-1 双特异性抗体均能促进 IFN γ 和/或 IL-2 的分泌激活免疫反应。

本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防恶性肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的药物组合或者本发明的药盒产品的步骤；

20 优选地，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、宫颈癌、输卵管癌、腹膜癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、脑癌、食管癌如食管鳞癌、微卫星高度不稳定性 (MSI-H) 或错配修复缺陷 (dMMR) 癌、尿路上皮癌、间皮瘤、胃腺癌、胃食管结合部腺癌、白血病、骨髓瘤、甲状腺癌、头颈癌、骨癌、胆道癌和睾丸癌；

25 优选地，所述肿瘤为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为不存在同源重组介导的修复功能缺陷的肿瘤；

优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；

优选地,所述非小细胞性肺癌为 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌;

优选地,所述非小细胞性肺癌为不携带 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌;

优选地,所述肝癌为肝细胞癌;

优选地,所述肾肿瘤为肾细胞癌;

5 优选地,所述乳腺癌为三阴性乳腺癌;

优选地,所述尿路上皮癌为膀胱癌;

优选地,所述腹膜癌为原发性腹膜癌;

优选地,所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷(例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变)的卵巢癌;

10 优选地,所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷(例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变)的输卵管癌;

优选地,所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷(例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变)的腹膜癌;

15 优选地,所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷(例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变)的乳腺癌。

在本发明的一些实施方式中,所述的治疗和/或预防恶性肿瘤的方法,其中,在手术之前或之后给药,和/或在放疗之前或之后给药。

在本发明的一些实施方式中,所述的治疗和/或预防恶性肿瘤的方法,其中,所述双
20 特异性抗体的单次给药剂量为每千克体重 0.1-100mg, 优选每千克体重 5-50mg 或 5-15mg;

每 3 天、4 天、5 天、6 天、10 天、1 周、2 周或 3 周给药一次;

和/或

给药方式为静脉滴注或静脉注射。

在本发明的一些实施方式中,所述的治疗和/或预防恶性肿瘤的方法,其中, PARP
25 抑制剂的单次给药剂量为每千克体重 0.1-100mg, 优选每千克体重 5-50mg 或 5-15mg;

每 3 天、4 天、5 天、6 天、10 天、1 周、2 周或 3 周给药一次;

和/或

给药方式为静脉滴注或静脉注射。

在本发明的一些实施方式中,所述的治疗和/或预防恶性肿瘤的方法,其中,所述双

特异性抗体与 PARP 抑制剂同时给药或者不同时给药。

- 本发明的双特异性抗体和/或 PARP 抑制剂的治疗或预防有效量的典型非极限范围是 0.02—100mg/kg，例如 0.1—50mg/kg，0.1—25mg/kg，或 1—10mg/kg。应注意的是，剂量可随需要治疗的症状的类型和严重性不同而发生变化。此外，本领域技术人员理解，
- 5 对于任一特定患者，特定的给药方案应根据患者需要和医生的专业评价而随时间调整；此处给出的剂量范围只用于举例说明目的，而不限定本发明药物组合物的使用或范围。

在本发明中，所述受试者可以为哺乳动物，例如人。

本发明的再一方面涉及一种在体内或在体外的方法，其选自：

(1)

- 10 检测样品中的 VEGFA 水平的方法，
阻断 VEGFA 与 VEGFR2 结合的方法，
下调 VEGFA 的活性或其水平的方法，
解除 VEGFA 对血管内皮细胞增殖的刺激作用的方法，
抑制血管内皮细胞增殖的药物或试剂的方法，或者
- 15 阻断肿瘤血管生成的方法；
和/或

(2)

- 阻断 PD-1 与 PD-L1 结合的方法，
下调 PD-1 的活性或其水平的方法，
- 20 解除 PD-1 对机体免疫抑制的方法，
促进 T 淋巴细胞中 IFN- γ 分泌的方法，或者
促进 T 淋巴细胞中 IL-2 分泌的方法。

- 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的药物组合或者药盒产品，其用于治疗
- 25 和/或预防恶性肿瘤；

优选地，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、宫颈癌、输卵管癌、腹膜癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、脑癌、食管癌例如食管鳞癌、微卫星高度不稳定性 (MSI-H) 或错配修复缺陷 (dMMR) 癌、尿路上皮癌、间皮瘤、胃腺癌、胃食管

结合部腺癌、白血病、骨髓瘤、甲状腺癌、头颈癌、骨癌、胆道癌和睾丸癌；

优选地，所述肿瘤为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为不存在同源重组介导的修复功能缺陷的肿瘤；

5 优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；

优选地，所述非小细胞性肺癌为 **EGFR** 和/或 **ALK** 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述非小细胞性肺癌为不携带 **EGFR** 和/或 **ALK** 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

10 优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌；

优选地，所述腹膜癌为原发性腹膜癌；

优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的卵巢癌；

15 优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的输卵管癌；

优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的腹膜癌；

20 优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的乳腺癌。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的药物组合或者药盒产品，其用于：

(1)

检测样品中的 **VEGFA** 水平，

阻断 **VEGFA** 与 **VEGFR2** 结合，

25 下调 **VEGFA** 的活性或其水平，

解除 **VEGFA** 对血管内皮细胞增殖的刺激作用，

抑制血管内皮细胞增殖，或者

阻断肿瘤血管生成；

和/或

(2)

阻断 PD-1 与 PD-L1 结合，

下调 PD-1 的活性或其水平，

解除 PD-1 对机体免疫抑制，

- 5 促进 T 淋巴细胞中 IFN- γ 分泌，或者
促进 T 淋巴细胞中 IL-2 分泌。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的药物组合中的双特异性抗体在制备
治疗和/或预防恶性肿瘤的药物中的用途，其中，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、输卵管癌、

- 10 腹膜癌和乳腺癌；

优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/
BRCA2 突变）的卵巢癌；

优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/
或 BRCA2 突变）的输卵管癌；

- 15 优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/
BRCA2 突变）的腹膜癌；

优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/
BRCA2 突变）的乳腺癌。

- 20 本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防恶性肿瘤的方法，包括给予有需求的受
试者以有效量的本发明中任一项所述的药物组合中的双特异性抗体的步骤，其中，所
述恶性肿瘤选自卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌和乳腺癌；

优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/
BRCA2 突变）的卵巢癌；

- 25 优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/
或 BRCA2 突变）的输卵管癌；

优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/
BRCA2 突变）的腹膜癌；

优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/

BRCA2 突变) 的乳腺癌。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的药物组合中的双特异性抗体，其用于治疗和/或预防恶性肿瘤，其中，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌和乳腺癌；

优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的卵巢癌；

优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的输卵管癌；

10 优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的腹膜癌；

优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的乳腺癌。

15 抗体治疗药物，特别是单克隆抗体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，或通过亲和力和成熟的方法来改进那些与抗原的亲和力较低的抗体。

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

25 优选地，CDR 也可以由 IMGT 编号系统定义，请参见 Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. “IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF.” Nucleic acids research 38.suppl_1 (2009): D301-D307。

通过本领域技术人员所熟知的技术手段，例如通过 VBASE2 数据库特别是根据 IMGT 定义分析下面的 (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) Bevacizumab

重链可变区的氨基酸序如 SEQ ID NO: 1 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

5 HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO: 28)
 HCDR2: INTYTGEP (SEQ ID NO: 29)
 HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO: 30)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

 LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO: 31)
10 LCDR2: FTS (SEQ ID NO: 32)
 LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO: 33)

(2) 14C12、14C12H1L1 或 14C12H1L1(M)

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

 HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 34)
15 HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 35)
 HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 36)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

 LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 37)
 LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 38)
20 LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 39)

(3) VP101(hG1WT)或 VP101(hG1DM)

其重链的 9 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

 HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO: 28)
 HCDR2: INTYTGEP (SEQ ID NO: 29)
25 HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO: 30)
 HCDR4: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 34)
 HCDR5: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 35)
 HCDR6: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 36)
 HCDR7: QDINTY (SEQ ID NO: 37)

HCDR8: RAN (SEQ ID NO: 38)

HCDR9: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 39)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO: 31)

5 **LCDR2: FTS (SEQ ID NO: 32)**

LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO: 33)。

本发明的抗体 VP101(hG1DM)在 VP101(hG1WT)非可变区引入氨基酸突变。按照 EU 编号系统在 234、235 位点引入氨基酸突变：

10 通过在其重链铰链区域第 234 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变 (L234A)，第 235 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变 (L235A)，获得 VP101 (hG1DM)。

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
15 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 VEGFA 蛋白的氨基酸序列时，其包括但不限于 VEGFA 蛋白 (GenBank ID: NP_001165097.1) 的全长，还包括 VEGFA 的融合蛋白，例如与
20 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 VEGFA 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“VEGFA 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 VEGFA 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。在本发明的一个实施方案中，
25 VEGFA 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 的下划线部分所示 (不含末尾的 6 个 His，共 302 个氨基酸)。

如本文中所使用的，当提及 VEGFR2 蛋白 (亦称为 KDR) 的氨基酸序列时，其包括但不限于 VEGFR2 蛋白 (GenBank ID: NP_002244) 的全长，或者 VEGFR2 的胞外片段 VEGFR2-ECD 或者包含 VEGFR2-ECD 的片段；还包括 VEGFR2-ECD 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。然而, 本领域技术人员理解, 在 VEGFR2 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“VEGFR2 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 VEGFR2 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。在本发明的一个实施方案中, VEGFR2 的胞外片段 VEGFR2-ECD 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示 (766 个氨基酸)。

如本文中所使用的, 如果没有特别说明, 所述 VEGFR 为 VEGFR1 和/或 VEGFR2; 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, VEGFR1 (VEGFR1, NCBI Gene ID: 2321); VEGFR2 (VEGFR2, NCBI Gene ID: 3791)。

如本文中所使用的, 当提及 PD-1 蛋白 (Programmed cell death protein 1) 的氨基酸序列时, 其包括但不限于 PD-1 蛋白 (NCBI GenBank: NP_005009.2) 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。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, 术语 EC₅₀ 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可以遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或者 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196(1987):901-917; Chothia et al. Nature 342(1989): 878-883 或者 IMGT 编号系统定义, 见 Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." Nucleic acids research 38.suppl_1 (2009): D301-D307.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。例如在本发明的双特异性抗体中,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)。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂方法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)和具有足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分的多肽。

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 (1989):544-546);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 (1988):423-426 和 Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988):5879-5883)。此类 scFv 分子可具有一般结构: NH₂-V_L-接头-V_H-COOH 或 NH₂-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, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993): 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan et al., Protein Eng. 8 (1995):725-731, Choi et al., Eur. J. Immunol. 31 (2001): 94-106, Hu et al., Cancer Res. 56 (1996):3055-3061, Kipriyanov et al., J. Mol. Biol. 293 (1999):41-56 和 Roovers et al., Cancer Immunol. (2001)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. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993):6444-6448, 和 Poljak R. J. et al., Structure 2 (1994):1121-1123)。

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。

20 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. Patent 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),而轻链或/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. Patent 4,816,567 Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (1984):6851-6855)。

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 (1986):522-525; Reichmann et al., Nature, (1988) 332:323 329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2 (1992):593-596;和 Clark, Immunol. Today 21 (2000): 397-402。

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“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 仪中测定或 ForteBio 分子相互作用仪中测定的。

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“药学上可接受的辅料”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 PD-1 与 PD-L1 结合或者 VEGF 表达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 PD-1 与 PD-L1 结合或者 VEGF 表达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

本发明实现了如下的（1）至（6）项中所述技术效果中的任意一项或者任意多项：

（1）本发明对抗体 Fc 端的改造完全消除了 VP101(hG1WT)与 Fc 受体 FcγRI、FcγRIIIa_F158 的结合活性，进而完全的消除了 ADCC 活性。

（2）本发明对抗体 Fc 端的改造完全消除了 VP101(hG1WT)与补体 C1q 的结合活性，进而完全地消除了 CDC 活性。

（3）本发明的双特异性抗体能够很好地特异性与 VEGFA 结合，并且能够十分有效地阻断 VEGFA 与 VEGFR2 的结合，特异地解除 VEGFA 对机体免疫抑制以及对血管形成的促进作用。

（4）本发明的双特异性抗体能够很好地与 PD-1 特异性结合，并且能够十分有效地阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合，特异地解除 PD-1 对机体免疫抑制，激活免疫反应。

（5）PARPi 和本发明双特异性抗体联合给药对肿瘤特别是乳腺癌或卵巢癌的治疗效

果显著优于单用 PARPi 或双特异性抗体。

(6) PARPi 和本发明双特异性抗体之间具有协同作用,取得了治疗或预防肿瘤协同效果。

5 附图说明

图 1: VP101(hG1DM)与 FcγRI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.12nM。

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

10 图 3: Nivolumab 与 FcγRI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.12nM。

图 4: VP101(hG1WT)与 FcγRI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.12nM。

15 图 5: VP101(hG4WT)与 FcγRI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.12nM。

图 6: VP101(hG1DM)与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

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

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

图 9: VP101(hG1WT)与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

25 图 10: VP101(hG4WT)与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 11: VP101(hG1DM)与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 12: Bevacizumab 与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 13: Nivolumab 与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 14: VP101(hG1WT)与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

5 图 15: VP101(hG4WT)与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 16: VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

10 图 17: Bevacizumab 与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 18: Nivolumab 与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 19: VP101(hG1WT)与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

15 图 20: VP101(hG4WT)与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 21: VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗原的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

20 图 22: Bevacizumab 与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 23: Nivolumab 与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 24: VP101(hG1WT)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

25 图 25: VP101(hG4WT)与 FcγRIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 26: VP101(hG1DM)与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM。

图 27: Bevacizumab 与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线

中加入抗体的浓度分别为 10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM。

图 28: Nivolumab 与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM。

图 29: VP101(hG1WT)与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM。

图 30: VP101(hG4WT)与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗原的浓度分别为 10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM。

图 31: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)在表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 靶细胞体系的 ADCC 活性检测结果。

图 32: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)在表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 靶细胞体系的 CDC 活性检测结果。

图 33: ELISA 法检测抗体 VP101(hG1DM)对 PBMC、Raji-PDL1 细胞混合培养所诱导的细胞因子 IFN- γ 的分泌的影响。

图 34: ELISA 法检测抗体 VP101(hG1DM)对 PBMC、Raji-PDL1 细胞混合培养所诱导的细胞因子 IL-2 的分泌的影响。

图 35: VP101(hG1DM)在表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 靶细胞体系的 ADCP 活性检测结果。

图 36: VP101(hG1DM)在乳垫肿瘤移植模型中抑制乳腺癌肿瘤细胞增殖活性的结果。

图 37: PARPi 和 VP101(hG1DM)联用抑制卵巢癌细胞迁移的结果。

图 38: PARPi 和 VP101(hG1DM)联用对乳腺癌皮下移植肿瘤模型中小鼠皮下移植瘤体积的效果。

图 39: PARPi 和 VP101(hG1DM)联用对乳腺癌皮下移植肿瘤模型中小鼠体重的效果。

图 40: PARPi 和 VP101(hG1DM)联用对卵巢癌皮下移植肿瘤模型中小鼠皮下移植瘤体积的效果。

图 41: PARPi 和 VP101(hG1DM)联用对卵巢癌皮下移植肿瘤模型中小鼠体重的效果。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，
5 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。

在本发明的下述实施例中，所用的同靶点已上市药物抗体 **Bevacizumab**（商品名 **Avastin®**）作为对照抗体，购自豪夫迈·罗氏有限公司 **Roche**，或者也可以参照制备例 1
10 进行制备。

在本发明的下述实施例中，所用的同靶点已上市药物抗体 **Nivolumab**（商品名 **Opdivo®**）作为对照抗体，购自百时美施贵宝公司 **BMS**。

在本发明的下述实施例中，所用的 **PARP** 抑制剂奥拉帕利 **Olaparib**，购自 **selleckchem** 公司。

15 在本发明的下述实施例中，所用同型对照抗体为人抗鸡蛋溶酶体（**human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, anti-HEL**，即 **human IgG**，简称 **hIgG**），其可变区序列来自于 **Acierno** 等人发表的 **Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies**（**Acierno** 等人. **J Mol Biol.** 2007; 374(1): 130-46.。实施例中所用到的 **hIgG1DM** 和 **hIgG4WT** 即是 **anti-HEL** 带有 **hG1DM** 和 **hG4WT** 恒定区序列的同型
20 对照抗体，在中山康方生物医药有限公司实验室制备而成。

在本发明的下述实施例中，所用的乳腺癌细胞 **MDA-MB-231**、**SNU-251** 卵巢癌细胞和 **SK-OV-3** 细胞均存在 **BRCA1** 突变和 **BRCA2** 突变。

制备例 1：抗 VEGFA 的抗体 **Bevacizumab** 的制备

25 上市的抗 VEGFA 单抗 **Avastin**（**Bevacizumab**）的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列参照中国专利公开 **CN1259962A**。编码重链可变区和轻链可变区的核酸序列委托金斯瑞公司合成。

Bevacizumab 重链可变区（**Bevacizumab-Hv**）的氨基酸序列：（123 aa）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGW

INTYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSS
HWYFDVWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

编码 Bevacizumab 重链可变区的核酸序列: (369 bp)

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGT
5 CTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATG
AATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCA
ACACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTCACC
TTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCG
AGCTGAGGACACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGA
10 GCAGCCATTGGTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAG
CAGC (SEQ ID NO: 2)

Bevacizumab 轻链可变区 (Bevacizumab-Lv) 的氨基酸序列: (107 aa)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSL
15 HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 3)

编码 Bevacizumab 轻链可变区的核酸序列: (321 bp)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGA
CAGGGTCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACCTACCTGAATT
20 GGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGC
TCCCTGCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCG
ACTTTACTCTGACCATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATACTATT
GCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGA
GATCAAG (SEQ ID NO: 4)

25 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 Bevacizumab 的重链 cDNA 和轻链的 cDNA 分别克隆到 pcDNA3.1 载体中, 获得
抗体 Bevacizumab 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。

制得了抗 VEGFA 单抗 Avastin (Bevacizumab)。

制备例 2：抗 PD-1 的抗体 14C12、其人源化抗体 14C12H1L1 以及突变体 14C12H1L1(M)的序列设计

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

 (1) 14C12 的重链可变区序列和轻链可变区序列

 14C12 的重链可变区的氨基酸序列：(118 aa)

10 EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAT
ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAW
FAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 5)

 编码 14C12 的重链可变区的核酸序列：(354 bp)

 GAGGTCAAACCTGGTGGAGAGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCGGCGG
15 GTCACTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGAC
ATGTCATGGGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTCGCTACT
ATCAGCGGAGGCGGGCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGA
TTCACAATTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTA
GTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCG
20 AAGCATGGTTTGCCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCTGCC
(SEQ ID NO: 6)

 14C12 的轻链可变区的氨基酸序列：(107 aa)

 DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRA
25 NRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL
K (SEQ ID NO: 7)

 编码 14C12 的轻链可变区的核酸序列：(321 bp)

 GACATTAAGATGACACAGTCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCG
AGCGAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTC

TTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGCCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGC
CAATAGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGG
GCAGGATTACTCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATC
TACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAA
5 AACTGGAAGTGAAG (SEQ ID NO: 8)

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

14C12H1L1 重链可变区的氨基酸序列: (118 aa)

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVA
TISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGE
AWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 9)

编码 14C12H1L1 重链可变区的核酸序列: (354 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGG
15 GTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGA
CATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTA
CTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCC
GGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGA
ACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACG
20 GGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTA
GT (SEQ ID NO: 10)

14C12H1L1 轻链可变区的氨基酸序列: (107 aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRA
25 NRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLE
LK (SEQ ID NO: 11)

编码 14C12H1L1 轻链可变区的核酸序列: (321 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGC
GACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTG

AGCTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGG
GCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGC
GGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCA
ACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGG
5 ACAAAACTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 12)

14C12H1L1 重链 (14C12H1) 的氨基酸序列: (448 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVAT
ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEA
10 WFAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
15 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)

编码 14C12H1L1 重链 (14C12H1) 的核酸序列: (1344 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGG
GTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGAC
20 ATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACT
ATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGG
TTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACA
GCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGG
AAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGTG
25 CCAGCACCAAAGGACCTAGCGTGTTTCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCAC
CAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGA
ACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATAC
ATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTC
ACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAAC

CACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCCAAATCCTGC
GACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCC
CTAGCGTCTTCTCTTTCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAG
AACCCCTGAAGTCACCTGTGTCTGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGA
5 GGTGAAATTCAACTGGTATGTCTGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAAC
CAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT
GACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
GTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAA
AGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGA
10 ACTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTAC
AAGACCACCCCTCCTGTCTCTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACAGCA
AGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCA
GCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCT
15 GAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO: 14)

14C12H1L1 轻链 (14C12L1) 的氨基酸序列: (214 aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRAN
RLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
20 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
(SEQ ID NO: 15)

编码 14C12H1L1 轻链 (14C12L1) 的核酸序列: (642 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCG
25 ACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAG
CTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGC
TAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGG
ACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAAC
CTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACA

AAACTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCC
CTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGA
ACAATTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAAGTGCAGTGGAAAGGTCGATAACGCCC
TGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATA
5 GCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAA
GCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGT
GACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT (SEQ ID NO: 16)

(3) 14C12H1L1(M)的重链可变区序列和轻链可变区序列

10 以 14C12H1L1 为基础对其骨架区(轻链)中个别氨基酸进行了突变得到
14C12H1L1(M)。

14C12H1L1(M)的重链可变区 14C12H1(M):

与 14C12H1L1 的重链可变区 14C12H1 相同,即氨基酸序列如 SEQ ID NO:
9 所示。

15

14C12H1L1(M) 的轻链可变区 14C12L1(M): (108 aa, 基于 14C12H1L1
所做的氨基酸序列突变位点用下划线标出)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTL
IYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTF
20 GAGTKLELKR (SEQ ID NO: 17)

制备例 3: 双特异性抗体的序列设计

1. 序列设计

25 本发明中的双特异性抗体的结构模式属于 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。

在上述 Bevacizumab 的基础上,以上述 14C12H1L1(M)的重链可变区及
轻链可变区的氨基酸序列作为 ScFv 片段部分的 VP101 抗体,称为 VP101(M)。
相对于 14C12H1L1, 14C12H1L1(M)有效地优化了双特异性抗体的结构,提

高了其有效性。

表 1: VP101(M)和 VP101(G4M)的重链和轻链的组成设计

双特异性抗体 编号	免疫球蛋白部分		连接片段	scFv 部分
	重链	轻链		
VP101(M)	Bevacizumab-H	Bevacizumab-L	Linker1	14C12H1(M)v- Linker1-14C12L1(M)v
VP101(G4M)	Bevacizumab-G4H	Bevacizumab-L	Linker1	14C12H1(M)v- Linker1-14C12L1(M)v

上面的表 1 中：

5 （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制备例中记载的相应序列。

 （2）Linker1 的氨基酸序列为：GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 18）

10 可选地，氨基酸序列 GGGGSGGGGSGGGGS（SEQ ID NO:19）可作为替换前述 Linker1 的 Linker 2。

 （3）Bevacizumab-H 其采用 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION: P01857 作为重链恒定区。

 （4）Bevacizumab-G4H 其采用 Ig gamma-4 chain C region，ACCESSION: 15 P01861.1 作为重链恒定区。

2. 抗体 VP101(M)的表达和纯化

 分别将 VP101(M)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-VP101H 20 和 pUC57simple-VP101L 质粒。

 分别将质粒 pUC57simple-VP101H 和 pUC57simple-VP101L 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抗体 VP101，并换液至 PBS。

3. 抗体 VP101(M)的检测

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。

为了与制备例 4 中的突变后的抗体相区分，在本发明中亦将 VP101(M)称为 VP101(hG1WT)。上述的 VP101 (M)作为“野生型”，其采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857 作为重链恒定区，Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834 为轻链恒定区。

VP101 (hG1WT)中的免疫球蛋白部分的重链的氨基酸序列：（453aa）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGL
EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVY
YCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
15 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
20 NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 20)

编码 VP101 (hG1WT)中的免疫球蛋白部分的重链的核酸序列：（1359bp）

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGG
CGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAA
25 CTATGGAATGAATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGT
GGGTCGGCTGGATCAACACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCC
GACTTTAAGCGGCGGTTCACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCACT
GCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTA
CTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTT

TGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCA
CCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCA
GCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTG
AACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTC
5 CATAATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCC
AGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT
GGAGCCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCCTGTCCTGC
TCCCGAACTCCTCGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCCCAAACC
10 CAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTGCT
CGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGT
CGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAAC
AGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG
15 GCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAA
CCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTC
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAA
CTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
20 GTACAGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACG
TGTTCTCTTGTTCCGTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATTATACCC
AGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG (SEQ ID NO: 21)

为了与制备例 4 中的突变后的抗体相区分,在本发明中亦将 VP101(G4M)
25 称为 VP101(hG4WT)。上述的 VP101 (G4M)作为“野生型”,其采用 Ig gamma-4
chain C region, ACCESSION: P01861.1 作为重链恒定区, Ig kappa chain C
region, ACCESSION: P01834 为轻链恒定区。

VP101 (hG4WT) 中的免疫球蛋白部分的重链的氨基酸序列: (450aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGL

EWVGVWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVY
YCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL
5 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGK (SEQ ID NO: 22)

10 编码 VP101 (hG4WT) 中的免疫球蛋白部分的重链的核酸序列: (1350bp)

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGG
CGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAA
CTATGGAATGAATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGT
GGGTTCGGCTGGATCAACACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCC
15 GACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCACT
GCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTA
CTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTT
TGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCA
CCAAAGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCT
20 CCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACA
CCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA
25 GTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAG
TTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCCTAAACCAAGGAC
ACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCA

ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT
GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC
CCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAA
5 GAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
GCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAG
10 TCTCTGAGCCTGTCCCTCGGCAAG (SEQ ID NO: 23)

制备例 4：基于人源化双特异性抗体 VP101(hG1WT)的非可变区氨基酸突变设计

本发明人在制备例 3 所获得的 VP101(hG1WT)的基础上，通过在其重链
15 的第 234 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变 (L234A)，第 235 号位点
引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变 (L235A)，获得了 VP101 (hG1DM)。

VP101(hG1DM)中的免疫球蛋白部分的重链的氨基酸序列：(453 aa，突
变位点用下划线标出)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGL
20 EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVY
YCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
25 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24)

编码 VP101 (hG1DM) 中的免疫球蛋白部分的重链的核酸序列：(1359

bp，突变位点用下划线标出)

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGG
CGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAA
CTATGGAATGAATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGT
5 GGGTCGGCTGGATCAACACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCC
GACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCACT
GCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTA
CTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTT
TGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCA
10 CCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCA
GCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTG
AACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTC
CATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCC
AGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT
15 CTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT
GGAGCCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCCTGTCCTGC
TCCCGAAGGCTGCTGAGGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCCCAAACC
CAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTGCT
CGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGT
20 CGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAAC
AGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG
GCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAA
CCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTC
25 ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAA
CTACAAGACCACCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
GTACAGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACG

TGTTCTCTTGTTCCGTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATTATACCC
AGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG (SEQ ID NO: 25)

VP101 (hG1DM) 、VP101 (hG1WT)以及 VP101 (hG4WT)的免疫球蛋白部分的轻链氨基酸序列相同，其编码核酸序列也相同。

5 VP101(hG1DM)中的免疫球蛋白部分的轻链的氨基酸序列：(214 aa)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLII
YFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFG
QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ

10 GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 26)

编码 VP101 (hG1DM) 中的免疫球蛋白部分的轻链的核酸序列：(642 bp)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTG
GGCGACAGGGTCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAAC
TACCTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTG
15 ATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGC
GGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACCATTCTAGTCTGCAG
CCTGAGGATTTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCGTGCCA
TGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAGCGGACCGTGCC
CGCTCCCAGTGTCTTCATTTTTTCCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAATC
20 CGGGACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCTAGAGA
GGCAAAAGTGCAAGTGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGAGTGGAATT
CACAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTATAGTC
TGTC AAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCTGACTACGAAAAGCATAAAG
TGTATGCATGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTCACCA
25 AGTCATTCAACAGAGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 27)

实施例 1: FcγRI 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

Fc 受体 FcγRI 又名 (CD64) 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，参与抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。治疗性单克隆抗体与 Fc 受体结合的能力

影响到该抗体的安全性和有效性。

本实验使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRI 的亲和力常数，以评价各抗体的 ADCC 活性。

Fortebio Octet分子相互作用仪检测相应抗体与 FcγRI的亲和力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS，0.02% Tween-20，0.1% BSA，pH7.4。1 μg/mL 的 FcγRIa 固定在 HIS1K 传感器上，时间 50s，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 CD64 与各抗体结合，抗体浓度为 3.12-50 nM (两倍稀释)，时间 120s，抗体在缓冲液中解离，时间 120s。传感器使用 10mM 甘氨酸，pH1.5 再生，时间 5s，重复 4 次。检测温度为 30℃，频率为 0.3Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。

FcγRI 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 1 和图 1—图 5 所示。

表 1: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 FcγRI 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Bevacizumab	3.68E-09	6.61E+05	2.07E+04	2.44E-03	9.02E-05	0.46-0.49
Nivolumab	6.20E-09	6.98E+05	2.22E+04	4.32E-03	9.88E-05	0.48-0.53
VP101(hG1WT)	3.95E-09	5.67E+05	1.82E+04	2.24E-03	9.02E-05	0.68-0.80
VP101(hG4WT)	8.52E-09	6.28E+05	2.12E+04	5.35E-03	1.07E-04	0.61-0.65

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，VP101(hG1WT)可以与 FcγRI 结合，亲和力常数为 3.95E-09M；VP101(hG4WT)可以与 FcγRI 结合，亲和力常数为 8.52E-09M；Bevacizumab 可以与 FcγRI 结合，亲和力常数为 3.68E-09M；Nivolumab 可以与 FcγRI 结合，亲和力常数为 6.20E-09M；而 VP101(hG1DM)由于与 FcγRI 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故而未能获得相应数据。

结果表明，除 VP101(hG1DM)与 FcγRI 没有结合外，其他抗体与 FcγRI 的亲合力均相近。VP101(hG1DM)的结合活性被有效地消除。

实施例 2：FcγRIIa_H131 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲合力

常数测定

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

本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIa_H131 的亲合力常数，以评价各抗体的 ADCC 活性。

ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIa_H131 的亲合力常数实验方法简述如下：固化物稀释液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4，分析物稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4。5 μg/mL 的 FcγRIIa_H131 固定在 NTA 传感器上，固定时间为 60s，传感器在 PBS，0.02%Tween-20，0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4 缓冲液中平衡 600s 以封闭传感器，固定在传感器上的 FcγRIIa_H131 与抗体结合，抗体浓度为 12.5-200 nM（两倍梯度稀释），时间 60s，抗体在缓冲液中解离，时间 60s。传感器使用 10mM Glycine，pH1.7 和 10 mM 硫酸镍再生。检测温度为 30℃，频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲合力常数。

FcγRIIa_H131 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲合力常数测定结果如表 2 和图 6—图 10 所示。

表 2：VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 FcγRIIa_H131 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/s)	SE(k _{dis})	R _{max} (nm)
VP101(hG1DM)	3.57E-08	1.15E+05	1.01E+04	4.11E-03	3.27E-04	0.41-0.53
Bevacizumab	6.44E-08	2.10E+05	1.78E+04	1.36E-02	5.14E-04	0.49-0.68

Nivolumab	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	2.28E-08	2.41E+05	1.48E+04	5.50E-03	3.49E-04	1.40-1.52
VP101(hG4WT)	3.68E-08	2.13E+05	2.43E+04	7.83E-03	6.65E-04	0.41-0.57

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，VP101(hG1WT)可以与 FcγRIIa_H131 结合，亲和力常数为 2.28E-08M；VP101(hG4WT)可以与 FcγRIIa_H131 结合，亲和力常数为 3.68E-08M；
 5 Bevacizumab 可以与 FcγRIIa_H131 结合，亲和力常数为 6.44E-08M；VP101(hG1DM) 可以与 FcγRIIa_H131 结合，亲和力常数为 3.57E-08M；而 Nivolumab 由于与 FcγRIIa_H131 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故而未能获得相应数据。

结果表明，除 Nivolumab 与 FcγRIIa_H131 没有结合外，其他抗体与
 10 FcγRIIa_H131 均有结合，其亲和力从强到弱依次为：VP101(hG1WT)、VP101(hG1DM)、VP101(hG4WT)、Bevacizumab。

实施例 3：FcγRIIa_R131 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

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

本实验使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数，以评价各抗体的 ADCC 活性。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数实验方法简述如下：固化物稀释液为 PBS，0.02%Tween-20，
 20 0.1%BSA，pH7.4，分析物稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4。5 μg/mL 的 FcγRIIa_R131 固定在 NTA 传感器上，固定时间为 60s，传感器在 PBS，0.02%Tween-20，0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4 缓冲液中平衡 600s 以封闭传感器，固定在传感器上的 FcγRIIa_R131 与抗体
 25 结合，抗体浓度为 12.5-200 nM（两倍梯度稀释），时间 60s，抗体在缓冲液

中解离，时间 60s。传感器使用 10mM Glycine, pH1.7 和 10 mM 硫酸镍再生。检测温度为 30℃，频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。

5 FcγRIIa_R131 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 3 和图 11—图 15 所示。

表 3: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 FcγRIIa_R131 结合的动力学参数

抗体	KD (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
VP101(hG1DM)	3.35E-08	1.20E+05	9.72E+03	4.03E-03	3.08E-04	0.57-0.69
Bevacizumab	5.16E-08	2.59E+05	1.72E+04	1.33E-02	4.52E-04	0.42-0.69
Nivolumab	6.93E-08	4.78E+05	1.09E+05	3.31E-02	2.54E-03	0.08-0.16
VP101(hG1WT)	2.42E-08	2.14E+05	1.30E+04	5.17E-03	3.28E-04	1.75-1.92
VP101(hG4WT)	3.57E-08	1.99E+05	1.23E+04	7.09E-03	3.40E-04	0.81-1.05

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

10 结果显示，VP101(hG1WT)可以与 FcγRIIa_R131 结合，亲和力常数为 2.42E-08M；VP101(hG4WT)可以与 FcγRIIa_R131 结合，亲和力常数为 3.57E-08 M；Bevacizumab 可以与 FcγRIIa_R131 结合，亲和力常数为 5.16E-08 M；Nivolumab 可以与 FcγRIIa_R131 结合，亲和力常数为 6.93E-08 M；VP101(hG1DM)可以与 FcγRIIa_R131 结合，亲和力常数为 3.35E-08M。

15 结果表明，抗体与 FcγRIIa_R131 均有结合，其亲和力从强到弱依次为：VP101(hG1WT)、VP101(hG1DM)、VP101(hG4WT)、Bevacizumab、Nivolumab。

20 实施例 4: FcγRIIb 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

Fc 受体 FcγRIIb（又名 CD32b）可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，参与调控

免疫细胞的功能。

本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIb 的亲合力常数，以评价 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 Fc 受体的结合能力。

- 5 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIb 的亲合力常数实验方法简述如下：固化物稀释液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4，分析物稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4。5 μg/mL 的 hFCGR2B-his 固定在 NTA 传感器上，固定时间为 60s，传感器在 PBS，0.02%Tween-20，
10 0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4 缓冲液中平衡 600s 以封闭传感器，固定在传感器上的 hFCGR2B-his 与抗体结合，抗体浓度为 12.5-200 nM（两倍梯度稀释），时间 60s，抗体在缓冲液中解离，时间 60s。传感器使用 10mM Glycine，pH1.7 和 10 mM 硫酸镍再生。检测温度为 30℃，频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲合力常数。

15

实施例 5: FcγRIIIa_V158 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲合力常数测定

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

- 20 实验中使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_V158 的亲合力常数，以评价各抗体的 ADCC 活性。

- 25 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体与 FcγRIIIa_V158 的亲合力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。5 μg/mL 的 FcγRIIIa_V158 固定在 HIS1K 传感器上，时间 120s，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 hFcGR3A(V158)-his 与各抗体结合，抗体浓度为 31.25-500 nM (两倍稀释)，时间 60s，抗体在缓冲液中解离，时间 60s。传感器使用 10mM 甘氨酸，pH1.5 再生，时间 5s，重复 4 次。检测温度为 30℃，频率为 0.3Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲合力常数。

FcγRIIIa_V158 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 4 和图 16—图 20 所示。

表 4: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 FcγRIIIa_V158 结合的力学参数

抗体	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/s)	SE(k _{dis})	R _{max} (nm)
VP101(hG1DM)	1.34E-07	6.05E+05	2.36E+05	8.11E-02	7.42E-03	0.07-0.21
Bevacizumab	2.76E-08	5.06E+05	1.14E+05	1.39E-02	1.41E-03	0.13-0.51
Nivolumab	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	4.35E-08	2.39E+05	3.14E+04	1.04E-02	8.73E-04	0.80-1.22
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

5 N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，VP101(hG1WT)可以与 FcγRIIIa_V158 结合，亲和力常数为 4.35E-08M；VP101(hG1DM)可以与 FcγRIIIa_V158 结合，亲和力常数为 1.34E-07M；Bevacizumab 可以与 FcγRIIIa_V158 结合，亲和力常数为 2.76E-08M；而 Nivolumab、
10 VP101(hG4WT)由于与 FcγRIIIa_V158 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故而未能获得相应数据。

结果表明，除 Nivolumab 、VP101(hG4WT)与 FcγRIIIa_V158 没有结合外，其他抗体与 FcγRIIIa_V158 均有结合，其亲和力从强到弱依次为：Bevacizumab、VP101(hG1WT)、VP101(hG1DM)。

15

实施例 6: FcγRIIIa_F158 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

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

20 本实验使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数，以评价各抗体的 ADCC 活

性。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS, 0.02%Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4。5 μg/mL 的 FcγRIIIa_F158 固定在 HIS1K 传感器上, 时间 120s, 传感器在缓冲液中平衡 60s, 固定在传感器上的 hFcGR3A(F158)-his 与各抗体结合, 抗体浓度为 31.25-500 nM (两倍稀释), 时间 60s, 抗体在缓冲液中解离, 时间 60s。传感器使用 10mM 甘氨酸, pH1.5 再生, 时间 5s, 重复 4 次。检测温度为 30℃, 频率为 0.3Hz。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

FcγRIIIa_F158 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 5 和图 21—图 25 所示。

表 5: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 FcγRIIIa_F158 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Bevacizumab	9.32E-08	2.64E+05	7.16E+04	2.46E-02	2.09E-03	0.08-0.20
Nivolumab	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	7.41E-08	2.47E+05	5.20E+04	1.83E-02	1.55E-03	0.15-0.48
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低, 没有对结果进行分析, 故未能获得相应数据。

结果显示, VP101(hG1WT)可以与 FcγRIIIa_F158 结合, 亲和力常数为 7.41E-08M; Bevacizumab 可以与 FcγRIIIa_F158 结合, 亲和力常数为 9.32E-08M; 而 Nivolumab、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)由于与 FcγRIIIa_F158 没有结合或结合信号极低, 没有对结果进行分析, 故而未能获得相应数据。

结果表明, 除 Nivolumab、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_F158 没有结合外, 其他抗体与 FcγRIIIa_F158 均有结合, 其亲和力

从强到弱依次为：VP101(hG1WT)、Bevacizumab。

实施例 7：C1q 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

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

本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测了 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 C1q 的亲和力常数，以评价各抗体的 CDC 活性。

ForteBio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体与 C1q 的亲和力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液分别为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。50 µg/mL 的抗体固定在 FAB2G 传感器上，固定高度约为 2.0 nm，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的抗体与 C1q 结合，C1q 浓度为 0.625 nM - 10 nM（两倍稀释），时间 60s，抗原抗体在缓冲液中解离，时间 60s。传感器使用 10mM 甘氨酸，pH1.7 再生，时间 5s，重复 4 次。样品板震动速率为 1000 rpm，检测温度为 30 度，检测频率为 0.6 Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。数据采集软件为 ForteBio Data Acquisition 7.0，数据分析软件为 ForteBio Data Analysis 7.0。

C1q 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 6 和图 26—图 30 所示。

表 6: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 C1q 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Bevacizumab	1.14E-09	6.52E+06	5.64E+05	7.40E-03	5.58E-04	0.51-0.63
Nivolumab	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	9.76E-10	5.73E+06	5.49E+05	5.59E-03	6.12E-04	0.32-0.51
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示, VP101(hG1WT)可以与 C1q 结合, 亲和力常数为 $9.76\text{E-}10\text{M}$; Bevacizumab 可以与 C1q 结合, 亲和力常数为 $1.14\text{E-}09\text{M}$; 而 Nivolumab、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)由于与 C1q 没有结合或结合信号极低, 没有对结果进行分析, 故而未能获得相应数据。

- 5 结果表明, 除 Nivolumab、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_F158 没有结合外, 其他抗体与 C1q 均有结合, VP101(hG1WT)与 Bevacizumab 的亲和力相近。

10 实施例 8: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 ADCC 活性检测

为检测抗体 VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM)在细胞水平的 ADCC 效应, 发明人构建了表达有 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞, 并建立了正常人 PBMC 与靶细胞共培养的体系用于检测抗体在细胞学水平的 ADCC 活性。

- 15 VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 ADCC 活性检测, 方法具体如下:

- 实验首先构建了人 PD-1 过表达载体 pCDH-CMV-PD1FL-Puro (pCDH-CMV-Puro 购自优宝生物), 表达载体经病毒包装后感染 CHO-K1 细胞, 用 Puromycin ($2\mu\text{g/mL}$) 加药筛选后, 获得抗药性稳定表达膜 PD-1 蛋白的 CHO-K1-PD1 稳定细胞系。按 Ficoll 外周血单个核细胞分离液操作说明书分离获得正常人 PBMC, 分离后的
- 20 PBMC 用 1640 完全培养基重悬, 台盼蓝染色计细胞数及活率, 于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中孵育过夜; 次日, 分别收集 CHO-K1-PD1 细胞和 PBMC, 离心去上清后, 用 RPMI-1640(含 1%BSA) (以下称分析培养基)重悬细胞沉淀, 离心洗涤 2 次细胞; 计细胞数及活率, 用分析培养基将细胞浓度调整到合适范围, 根据试验设计, 在 96 孔板中加入 CHO-K1-PD1 细胞悬液,
- 25 30000/孔; 加入 $50\mu\text{l}$ 抗体, 混匀室温预孵育 1h; 预孵育后, 加入 PBMC, 90 万/ $50\mu\text{l}$ /孔, 充分混匀; 37°C 、5% CO_2 的培养箱中孵育 4hrs。4hrs 后, 取出 96 孔板, $250\times\text{g}$ 离心 5min; 小心转移 $100\mu\text{l}$ 细胞上清 (注意不要吸到板底细胞) 至新的 96 孔平底微量板中, 根据 Cytotoxicity Detection Kit 说明书每孔加入 $100\mu\text{l}$ 现配的反应液, 室温避光孵育 30min。分别于 490nm 和 650nm 处

测量 OD 值，各组 OD 值=OD_{490nm}-OD_{650nm}。根据 ADCC (%) = (实验组-阴性对照组) / (靶细胞 LDH 最大释放-靶细胞 LDH 自发释放) × 100% 计算各组 ADCC 活性。

VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 ADCC 活性检测结果用 ADCC%表示，结果如图 31 所示。

结果显示，在 PBMC 与 CHO-K1-PD1 混合培养体系中，阳性对照 14C12H1L1(G1WT)具有显著 ADCC 活性，表明 ADCC 体系正常。与同型对照抗体 hIgG1DM 相比，VP101 (hG1WT)显示出显著 ADCC 活性，且呈现剂量相关性，而 VP101(G1DM)未见 ADCC 活性。结果表明，在 VP101 (hG1WT)基础上突变产生的 VP101 (hG1DM)在细胞学水平无 ADCC 活性，ADCC 效应已消除。

实施例 9：VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 CDC 活性检测

为检测抗体 VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM) 在细胞学水平的 CDC 效应，发明人构建了表达有 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞（构建方法见实施例 8），并建立了靶细胞与正常人补体血清共培养的体系以检测抗体在细胞学水平的 CDC 活性。

VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 CDC 活性检测，方法具体如下：

检测当天，胰酶消化收集 CHO-K1-PD1 细胞，170×g 离心 5min 后，再用 RPMI-1640(含 1%BSA) (以下称分析培养基)重悬细胞沉淀，重复离心洗涤 2 次；计细胞数及活率，用分析培养基将细胞浓度调整到合适范围，根据试验设计，在 96 孔板中加入 CHO-K1-PD1 细胞悬液，30000/孔；加入 50μl 抗体，混匀，室温预孵育 10min；预孵育后，加入正常人补体血清（终浓度为 2%），50μL/孔，充分混匀，置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 4 小时。4 小时后，250×g 离心 5min；小心吸取 100μl 细胞上清（注意不要吸到板底细胞）并转移至新的平底 96 孔板中，根据 Cytotoxicity Detection Kit 说明书每孔加入 100μl 现配的反应液，室温避光孵育 30min。分别于 490nm 和 650nm 处测量

OD 值, 各组 OD 值=OD_{490 nm}-OD_{650 nm}。根据 $CDC(\%) = (\text{实验组} - \text{阴性对照组}) / (\text{靶细胞 LDH 最大释放} - \text{靶细胞 LDH 自发释放}) \times 100\%$ 计算各组 CDC 活性。

VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 CDC 活性检测结果用 CDC%表示, 结果如图 32 所示。

- 5 结果显示, 在正常人补体血清与 CHO-K1-PD1 混合培养体系中, 阳性对照抗体 14C12H1L1(G1WT)与同型对照抗体 hIgG1DM 组相比, CDC%具有显著差异, 表明本 CDC 检测体系正常。而在同等剂量水平下, 与同型对照相比, VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM)的 CDC%均无显著性差异。

10 实施例 10: 外周血单核细胞与 Raji-PDL1 细胞混合培养体系 (MLR) 中检测 VP101(hG1DM)的药效学活性

- 实验首先构建了人 PD-L1 过表达载体 plenti6.3-PD-L1-BSD (plenti6.3-BSD 购自 invitrogen), 表达载体经病毒包装后感染 Raji 细胞, 用 BSD (10 μ g/mL) 加药筛选后, 获得稳定表达膜 PD-L1 蛋白的 Raji-PDL1 稳定细胞系。按 Ficoll 外周血单个核细胞分离液操作说明书分离获得正常人 PBMC, 分离后的 PBMC 用 1640 完全培养基重悬、计数、冻存。复苏 PBMC, 加入 SEB (金黄色葡萄球菌肠毒素抗原) 刺激培养两天。两天后收集对数期 Raji-PDL1 细胞, 并加入丝裂霉素 C (Sigma, 工作浓度为 25 μ g/mL) 于培养箱处理 60min, 离心洗涤丝裂霉素 C 处理后的 Raji-PDL1 细胞, 同时收集并洗涤 SEB 刺激两天后的 PBMC, 在有抗体或无抗体条件下, 按照细胞数 1:1 的比例进行混合培养。3 天后, 离心收集上清, ELISA 检测上清中 IL-2 和 IFN- γ 浓度。
- 15 20

IFN- γ 分泌结果如图 33 所示。结果显示, VP101(hG1DM)可有效促进 IFN- γ 的分泌, 活性显著优于 Nivolumab。

IL-2 分泌结果如图 34 所示。结果显示, VP101(hG1DM)可有效促进 IL-2 的分泌, 且呈剂量依赖关系, 活性显著优于 Nivolumab。

25

实施例 11: VP101(hG1DM)不具有对 PD-1 表达阳性细胞的抗体介导的细胞吞噬活性

抗体介导的细胞吞噬 (antibody dependent cellular phagocytosis, ADCP) 是指结合于细胞表面抗原的抗体的 Fc 段与具有吞噬活性的细胞如巨噬细胞的 Fc 受体结合,

进而介导吞噬细胞吞噬结合了抗体的细胞。对于免疫检查点抑制剂抗体，如 PD-1 抗体而言，ADCP 活性的存在将会引起发挥抗肿瘤杀伤作用的表达有 PD-1 的免疫细胞的损伤，进而影响其抗肿瘤活性。

本实验以鼠源巨噬细胞为效应细胞，过表达 PD-1 的 CHO-K1-PD1 细胞系（构建方法见实施例 8）为靶细胞，检测其介导 ADCP 效应。本实验采用流式细胞术检测了 VP101(hG1DM)对表达有 PD-1 的细胞的 ADCP 活性，结果显示其不具备 ADCP 活性，而同靶点已上市的 PD-1 抗体 Nivolumab 具有明显的 ADCP 活性。具体方法如下：

首先在无菌条件下取 C57 小鼠（购自广东省医学实验动物中心）股骨骨髓，并经红细胞裂解液冰上裂解 5min，用 DMEM 完全培养基（含 10%FBS）终止裂解，1000 rpm 离心洗涤 2 次。将细胞团用 10 mL DMEM 完全培养基重悬，并添加 M-CSF 至工作浓度为 100 ng/mL，于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱诱导培养 7 天，其中于第 3 和第 5 天半量换液并补充 M-CSF。细胞于第 7 天诱导完成，经 0.25%胰酶消化，收集巨噬细胞，750xg 离心 5min，弃上清用 DMEM 完全培养基（含 10%FBS）悬浮并计数，调整细胞密度并分装至 96 孔锥底板中，备用。

常规方法收集 CHO-K1-PD1 细胞，170xg 离心 5min，重悬后计数并测定活率，用 PBS 洗涤一次。羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯（carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE）用 PBS 稀释至 2.5μM，取适量稀释后的 CFSE 重悬细胞（染色密度：1000 万细胞/mL），放置培养箱孵育 20min。加入 6mL 的 DMEM 完全培养基（含 10%FBS）终止染色，170xg 离心 5min，弃上清；加入 1mL DMEM 完全培养基，放置培养箱孵育 10min。抗体用 DMEM 完全培养基稀释至 20μg/mL、2μg/mL、0.2μg/mL（工作浓度 10μg/mL、1μg/mL、0.1μg/mL），并设计同型对照抗体 hIgG1DM 和 hIgG4。收集新鲜诱导成熟的巨噬细胞，750xg 离心 5min，弃上清计数，转移至 96 孔锥底板中，1000xg 离心 5min，弃上清；调整 CHO-K1-PD1-CFSE 细胞密度；按实验设计将稀释后的抗体分别与靶细胞按 50μL: 50μL 加至相应已含巨噬细胞的 96 孔锥底板中，重悬混匀，放置 37℃培养箱孵育 2h。每孔加 150μL 常温的 1%PBSA，1000xg 离心 5min，弃上清；用 200μL 的 PBSA 洗涤一次；按 100μL/样本将 APC anti-mouse/human CD11b antibody（用 PBSA 500 倍稀释）加至相应样本中，混匀，冰上孵育 40min。每孔加 150μL 1%PBSA，1000xg 离心 5min，弃上清；每孔用 200μL PBSA 洗涤一次。每孔加 200μL 1%PBSA 重悬，Beckman 流式仪上机。

上机体系中巨噬细胞为 APC+阳性，发生吞噬作用的巨噬细胞则为 APC 和 CFSE 双阳性。以双阳性细胞数与 APC 阳性细胞数比例作为吞噬率，并以此评价抗体介导的 ADCP 活性。按如下公式计算各组 ADCP 活性，以 P%表示：

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

5 结果如图 35 所示。

结果显示,Nivolumab 在巨噬细胞+CHO-K1-PD1 体系中具有明显的 ADCP 效应；VP101(hG1DM)的吞噬率与同型对照抗体相当,表明 VP101(hG1DM)不具有 ADCP 效应。该结果表明，VP101(hG1DM)很可能具有更好的抗肿瘤效果。

10 实施例 12: VP101(hG1DM)单药给药治疗乳腺癌的动物实验

本实验考察了 VP101(hG1DM)移植乳腺癌细胞体内增殖的抗肿瘤活性。研究方案见下表 7。

15 研究中使用的重度免疫缺陷 NCG 小鼠，雌性，5 周龄，购于江苏集萃药康生物科技有限公司。使用的同型对照抗体 hIgG4 由中山康方生物医药有限公司构建，构建方法同前。PBMC 由中山康方生物医药有限公司分离活化，方法同前。

20 将收集的乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞 200 万/50μl/只，乳房垫接种，共接种 12 只小鼠。当体内生长 30 天时，将小鼠按照肿瘤体积平均分成 2 组，阴性对照组，VP101(hG1DM)组。当日接受 PBMC100 万/50μl/只，皮下接种，PBMC 接种当天记为第 0 天，分别在接种当日（第 0 天）、第 7 天、第 14 天、第 21 天给药。肿瘤体积通过游标卡尺测量，分组后每周两次使用游标卡尺测量肿瘤大小，并根据计算公式 $TV=0.5 \times ab^2$ 计算肿瘤体积，其中 a 是肿瘤的长径，b 是肿瘤的短径，TV 是肿瘤的体积。

表 7: VP101(hG1DM)单药给药有效抑制乳腺癌细胞增殖实验方案

组别	动物数	移植瘤接种方案	给药方案
同型对照 抗体	6	乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞 200 万/50μl/只，乳房垫接种	hIgG4, 5mg/kg, 静脉给药, 每周一次，共 4 次

VP101 (hG1DM)	6	PBMC100 万/50 μ l/只，皮下接种	VP101(hG1DM), 5mg/kg, 静脉给药, 每周一次, 共 4 次
------------------	---	-----------------------------	---

实验结果如图 36 所示。结果显示，相较于同型对照抗体，VP101(hG1DM)能够有效地抑制了乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞的体积增长，表现出良好的抗肿瘤特别是抗乳腺癌的效果。

5 实施例 13: PARPi 和 VP101(hG1DM)联合给药治疗抑制卵巢癌细胞的研究

取对数生长期的 SNU-251 卵巢癌细胞(深圳市豪地华拓生物科技有限公司, 货号: HTX2700C), 经胰酶消化制备成单细胞悬液并计数, 调整细胞密度, 按每孔 2×10^5 个接种 6 孔板中, 并在 RPMI 1640 培养基 (Gibco, 货号: 22400-089) 中于 37 °C 培养 24h。

- 10 待细胞生长至 60%-70%后, 将细胞分组给药, 设置对照组、药物组, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 24h。

将 Transwell 小室置于 24 孔板中, 上室加 100 μ L RPMI 1640 培养基, 置于培养箱中平衡 1h; 用胰酶消化上述 6 孔板中细胞, 用无血清培养基制备单细胞悬液, 进行计数, 调整细胞密度至 4×10^4 个/100 μ L, 接种于小室上室, 下室加入 600 μ L 含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 置于 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养 24h;

- 15 培养结束后, 取出 Transwell 小室, 弃去培养基, PBS 固定下室细胞 2min, 然后用 4%多聚甲醛固定下室细胞 20min; PBS 洗涤小室两次;

- 20 500 μ L 0.1%结晶紫染液染色下室细胞 15min, 然后用 PBS 洗净残余染液, 用棉签小心地擦拭掉上室的细胞; 将小室置于玻片在显微镜下选取 3 个视野观察移至下室的细胞, 并拍照。采用 ImgeJ 软件计算细胞数, 按照公式计算细胞的迁移率。

实验结果如图 37 所示。结果显示, 对比同浓度下的单用药 Olaparib 或单用药 VP101(hG1DM), PARP 抑制剂奥拉帕利 (Olaparib) 与 VP101(hG1DM)联用时, 抑制卵巢癌细胞迁移的作用显著增强。

25 实施例 14: PARPi 和 VP101(hG1DM)联合给药治疗乳腺癌的动物实验

为检测 PARP 抑制剂奥拉帕利 (Olaparib) 与抗 PD-1-抗 VEGFA 双功能抗体

VP101(hG1DM)联用的体内抑瘤活性，首先用 MDA-MB-231 细胞（人乳腺癌细胞，购自 ATCC），接种于 5-7 周龄的 NCG 小鼠（购自广东药康生物科技有限公司）皮下，在接种后第 23 天，小鼠根据肿瘤体积随机分成 4 组，每组 6 只。分组当天定义为 D0 天，并于分组当天 D0 天开始奥拉帕利给药。D2 天腹腔注射 400 万活化的 PBMC 并开始 VP101(hG1DM)给药。联合给药组给药方式为：药物单独配制，先后分别给药（无给药顺序和间隔时间特定要求，给完一种药物再给予另外一种药物）。造模与具体给药方式见表 8。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积。

表 8: PARP 抑制剂奥拉帕利 Olaparib 与抗 PD-1-抗 VEGFA 双功能抗体联用治疗 MDA-MB-231 移植瘤 NCG 小鼠模型的给药方案

序号	组别	动物数量	模型建立	给药方式
1	模型组	6	每只小鼠皮下接种 800 万 MDA-MB-231 细胞，在接种后第 25 天腹腔注射 400 万 CD3 活化的 PBMC	hIgG1DM, 2.25mg/kg, 尾静脉给药，每周给药 1 次，共给药 4 次； 10%羟丙基-β-环糊精，每天灌胃给药，连续给药 23 天
2	VP101(hG1DM)	6		VP101(hG1DM),3mg/kg, 尾静脉给药，每周给药 1 次，共给药 4 次
3	奥拉帕利	6		奥拉帕利，50mg/kg，每天灌胃给药，连续给药 23 天
4	VP101(hG1DM)+奥拉帕利	6		VP101(hG1DM),3mg/kg,尾静脉给药，每周给药 1 次，共给药 4 次； 奥拉帕利，50mg/kg，每天灌胃给药，连续给药 23 天

10

结果图 38 所示。结果显示，相比于单用 Olaparib 组和单用 VP101(hG1DM)组，VP101(hG1DM)与 PARP 抑制剂奥拉帕利 Olaparib 联用对小鼠乳腺癌模型展现联合抗肿瘤药效，其联用对肿瘤的抑制优于各受试药单用组。

此外，如图 39 所示，荷瘤鼠对受试药 VP101(hG1DM)和 PARP 抑制剂奥拉帕利 Olaparib 单用和联用的耐受性均良好，各组对荷瘤小鼠体重无影响。

实施例 15: PARPi 和 VP101(hG1DM)联合给药治疗卵巢癌的动物实验

为检测 PARP 抑制剂奥拉帕利（Olaparib）与抗 PD-1-抗 VEGFA 双功能抗体 VP101(hG1DM)联用的体内抑瘤活性，用 SK-OV-3 人卵巢癌细胞（购自 ATCC），接种于 5-7 周龄的 NCG 小鼠（购自广东药康生物科技有限公司）皮下，在接种后第 39 天腹腔注射 300 万活化的 PBMC，小鼠根据肿瘤体积随机分成 4 组，每组 6 只。分组当天定义为 D0 天，并于分组当天 D0 天开始给药。联合给药组给药方式为：药物单独配制，先后分别给药（无给药顺序和间隔时间特定要求，给完一种药物再给予另外一种药物）。造模与具体给药方式见表 9。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积。

表 9: PARP 抑制剂奥拉帕利 Olaparib 与抗 PD-1-抗 VEGFA 双功能抗体联用治疗 SK-OV-3 移植瘤 NCG 小鼠模型的给药方案

序号	组别	动物数量	模型建立	给药方式
1	同型对照组	6	每只小鼠皮下接种 500 万 SK-OV-3 细胞，在接种后第 39 天腹腔注射 300 万 CD3 活化的 PBMC	hIgG1DM, 10mg/kg,尾静脉给药，每周给药 1 次，共给药 3 次（首次给药与 PBMC 混合腹腔接种）
2	VP101(hG1DM)	6		VP101(hG1DM),14mg/kg, 尾静脉给药，每周给药 1 次，共给药 3 次（首次给药与 PBMC 混合腹腔接种）
3	奥拉帕利	6		奥拉帕利，100mg/kg，每天灌胃给药，共给药 20 次(首次单独 PBMC 腹腔接种)
4	VP101(hG1DM)+奥拉帕利	6		VP101(hG1DM),14mg/kg,尾静脉给药，每周给药 1 次，共给药 3 次（首次给药与 PBMC 混合腹腔接种）； 奥拉帕利，100mg/kg，每天灌胃给药，共给药 20 次

10

结果图 40 所示。结果显示，相比于单用 Olaparib 组和单用 VP101(hG1DM)组），VP101(hG1DM)与 PARP 抑制剂奥拉帕利 Olaparib 联用对此小鼠卵巢癌模型展现联合抗肿瘤药效，其联用对肿瘤的抑制优于各受试药单用组。

此外，如图 41 所示，荷瘤鼠对受试药 VP101(hG1DM)和 PARP 抑制剂奥拉帕利 Olaparib 单用和联用的耐受性均良好，各组对荷瘤小鼠体重无影响。

15

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. 一种药物组合，其包括至少一种双特异性抗体，以及至少一种 PARP 抑制剂；

其中，所述双特异性抗体包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区；

其中：

所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第二蛋白功能区为单链抗体；其中，所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；

或者，

所述第一蛋白功能区为单链抗体，所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白；其中，所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；

所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型；

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

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合，其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有如下突变：

L234A 和 L235A；或者

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

3. 一种药物组合, 其包括至少一种双特异性抗体, 以及至少一种 PARP 抑制剂;

其中, 所述双特异性抗体包括:

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区, 和

靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区;

其中:

所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白, 所述第二蛋白功能区为单链抗体; 其中, 所述的免疫球蛋白, 其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34-36 所示的 HCDR1-HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37-39 所示的 LCDR1-LCDR3; 和所述的单链抗体, 其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28-30 所示的 HCDR1-HCDR3, 其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31-33 所示的 LCDR1-LCDR3;

或者,

所述第一蛋白功能区为单链抗体, 所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白; 其中, 所述的免疫球蛋白, 其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28-30 所示的 HCDR1-HCDR3, 其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31-33 所示的 LCDR1-LCDR3; 和所述的单链抗体, 其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34-36 所示的 HCDR1-HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37-39 所示的 LCDR1-LCDR3;

所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型;

并且按照 EU 编号系统, 所述免疫球蛋白的重链恒定区具有如下突变组合之一:

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

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的药物组合，其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区还具有选自如下的一个或多个突变：

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

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一权利要求所述的药物组合，其中，

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 9；并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 17；

或者，

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 9；并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 17；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的药物组合，其选自如下的 (1) – (12) 中的任一项：

(1)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；

(2)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；

基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；

(3)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示；

(4)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；

(5)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；

(6)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示；

(7)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

(8)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；和，所述单链抗体的重

链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示;

(9)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示;

(10)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示;

(11)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 以及

(12)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一权利要求所述的药物组合:

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示, 并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的药物组合, 其中, 所述双特异性抗体或其抗原结合片段以小于大约 10^{-6} M, 例如小于大约 10^{-7} M、 10^{-8} M 或 10^{-9} M 或更

小的亲和力常数结合 **FcγRI**；优选地，所述亲和力常数通过 **Fortebio Octet** 分子相互作用仪测得。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一权利要求所述的药物组合，其中，所述双特异性抗体或其抗原结合片段以小于大约 10^{-9} M，例如小于大约 10^{-7} M、 10^{-8} M 或 10^{-9} M 或更小的亲和力常数结合 **C1q**；优选地，所述亲和力常数通过 **Fortebio Octet** 分子相互作用仪测得。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一权利要求所述的药物组合，其中，所述第一蛋白功能区与所述第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接；和/或所述单链抗体的重链可变区与所述单链抗体的轻链可变区直接连接或者通过连接片段连接。

11. 根据权利要求 10 所述的药物组合，其中，所述连接片段为 **(GGGGS)_n**，**n** 为正整数；优选地，**n** 为 1、2、3、4、5 或 6。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的药物组合，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。

13. 根据权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的药物组合，其中，所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 **C** 末端。

14. 根据权利要求 1 至 13 中任一权利要求所述的方法，其中，所述免疫球蛋白的重链恒定区选自人 **IgG1**、**IgG2**、**IgG3** 或 **IgG4** 的重链恒定区，并且所述免疫球蛋白的轻链恒定区选自人 **IgG1**、**IgG2**、**IgG3** 或 **IgG4** 的轻链恒定区；

优选地，所述免疫球蛋白的重链恒定区为人 **Ig gamma-1 chain C region** 或人 **Ig gamma-4 chain C region**，并且所述免疫球蛋白的轻链恒定区为人 **Ig kappa chain C region**；

优选地，所述免疫球蛋白的重链恒定区为人 **Ig gamma-1 chain C region**，**ACCESSION: P01857**；并且所述免疫球蛋白的轻链恒定区为人 **Ig kappa chain C**

region, **ACCESSION: P01834**; 或者

优选地, 所述免疫球蛋白的重链恒定区为人 **Ig gamma-4 chain C region**, **ACCESSION: P01861.1**; 并且所述免疫球蛋白的轻链恒定区为人 **Ig kappa chain C region**, **ACCESSION: P01834**。

15. 一种药物组合, 其包括至少一种双特异性抗体, 以及至少一种 **PARP** 抑制剂;

其中, 所述双特异性抗体包括:

靶向 **PD-1** 的第一蛋白功能区, 和

靶向 **VEGFA** 的第二蛋白功能区;

所述第一蛋白功能区为 1 个, 所述第二蛋白功能区为 2 个;

其中, 所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白, 所述第二蛋白功能区为单链抗体;

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 24** 所示, 并且其轻链的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 26** 所示;

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 9** 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 **SEQ ID NO: 17** 所示;

所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 **C** 末端;

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

优选地, 所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列独立地选自 **SEQ ID NO: 18** 和 **SEQ ID NO: 19**;

优选地, 所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列均如 **SEQ ID NO: 18** 所示。

16. 根据权利要求 1 至 15 中任一权利要求所述的药物组合, 其中, 所述 **PARP** 抑制剂选自奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、**veliparib** **ER**、**ABT-472**、**ABT-767**、**Stenoparib**、**AST-6828**、**AG-PD**、**ANG-2864**、**ANG-3038**、**ANG-3186**、**AZD-5305**、**AZ-0108**、**AZD-2461**、**AMXI-5001**、**AMXI-2001**、**AMXI-3001**、**AMXI-7001**、**AMXI-9001**、**pamiparib**、**ZYTP-1**、**CK-102**、**XZ-120312**、**YHP-743**、

iobenguane I 131、rucaparib camsylate、CVL-218、CPH-101、CPH-102、CBX-11、CBX-15、minocycline、DB-207、DPS-102、E-7016、iobenguane I 131、MK-2512、HCX-014、HWH-340、IDX-1197、IDX-1197、senaparib、IMP-04100、IMP-04111、IMP-04149、IMP-04249、IMP-04307、IMP-04356、JPI-289、JPI-547、JPI-283、fluzoparib、GT-1620、iobenguane I 131、DR-2313、MP-124、H-10、NT-125、BGP-15、NMSP-293、NMSP-293、NMSP-118、NMSP-648、NMSP-914、DB-207、NUV-1156、NUV-1176、JPI-289、Stenoparib、OX-401、NU-1025、NU-1085、PLX-376、R-554、RBN-2397、RBN-012759、PJ-34、INO-1001、WW-46、BSI-401、iniparib、SOMCL-9112、SC-10914、HTMC-0435、SRX-3128、TSL-1502、PJ-34、CEP-8983、CK-102、THG-009、talazoparib SR、L-2286、mitoparib 和 WB-1340 中的一种或多种。

17. 根据权利要求 1 至 16 中任一权利要求所述的药物组合，其还包含一种或多种肿瘤化疗药物；

优选地，所述肿瘤化疗药物选自拓扑异构酶 II(TOP2)抑制剂，优选地，所述拓扑异构酶 II(TOP2)抑制剂是依托泊苷；

优选地，所述肿瘤化疗药物选自紫杉醇类药物，优选地，所述紫杉醇类药物选自紫杉醇、白蛋白紫杉醇、脂质体紫杉醇和多烯紫杉醇；

优选地，所述肿瘤化疗药物选自铂类药物，优选地，所述铂类药物选自顺铂、卡铂和奥沙利铂；

优选地，所述肿瘤化疗药物选自吉西他滨、培美曲塞和卡培他滨中的一种或多种。

18. 根据权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的药物组合，其中，

所述药物组合为固定组合，例如呈固体药物组合物形式或液体药物组合物形式；或者

所述药物组合是非固定组合，例如所述双特异性抗体及 PARP 抑制剂各自呈药物组合物形式。

19. 根据权利要求 18 所述的药物组合，其中，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

20. 一种药盒产品，其包含权利要求 1 至 19 中任一权利要求所述的药物组合，以及产品说明书。

21. 权利要求 1 至 19 中任一权利要求所述的药物组合或者权利要求 20 所述的药盒产品在制备治疗和/或预防恶性肿瘤的药物中的用途；

优选地，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、宫颈癌、输卵管癌、腹膜癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、脑癌、食管癌例如食管鳞癌、微卫星高度不稳定性（MSI-H）或错配修复缺陷（dMMR）癌、尿路上皮癌、间皮瘤、胃腺癌、胃食管结合部腺癌、白血病、骨髓瘤、甲状腺癌、头颈癌、骨癌、胆道癌和睾丸癌；

优选地，所述肿瘤为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为不存在同源重组介导的修复功能缺陷的肿瘤；

优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；

优选地，所述非小细胞性肺癌为 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述非小细胞性肺癌为不携带 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌；

优选地，所述腹膜癌为原发性腹膜癌；

优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的卵巢癌；

优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的输卵管癌；

优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的腹膜癌；

优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的乳腺癌。

22. 根据权利要求 1 至 19 中任一权利要求所述的药物组合或者权利要求 20 所述的药盒产品，其用于治疗和/或预防恶性肿瘤；

优选地，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、宫颈癌、输卵管癌、腹膜癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、脑癌、食管癌例如食管鳞癌、微卫星高度不稳定性（MSI-H）或错配修复缺陷（dMMR）癌、尿路上皮癌、间皮瘤、胃腺癌、胃食管结合部腺癌、白血病、骨髓瘤、甲状腺癌、头颈癌、骨癌、胆道癌和睾丸癌；

优选地，所述肿瘤为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为不存在同源重组介导的修复功能缺陷的肿瘤；

优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；

优选地，所述非小细胞性肺癌为 **EGFR** 和/或 **ALK** 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述非小细胞性肺癌为不携带 **EGFR** 和/或 **ALK** 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌；

优选地，所述腹膜癌为原发性腹膜癌；

优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的卵巢癌；

优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的输卵管癌；

优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的腹膜癌；

优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的乳腺癌。

23. 一种治疗和/或预防恶性肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求 1 至 19 中任一权利要求所述的药物组合或者权利要求 20 所述的药盒产品的步骤；

优选地，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、宫颈癌、输卵管癌、腹膜癌、胰腺癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、脑癌、食管癌例如食管鳞癌、微卫星高度不稳定性（MSI-H）或错配修复缺陷（dMMR）癌、尿路上皮癌、间皮瘤、胃腺癌、胃食管结合部腺癌、白血病、骨髓瘤、甲状腺癌、头颈癌、骨癌、胆道癌和睾丸癌；

优选地，所述肿瘤为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的肿瘤；

优选地，所述肿瘤为不存在同源重组介导的修复功能缺陷的肿瘤；

优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；

优选地，所述非小细胞性肺癌为 **EGFR** 和/或 **ALK** 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述非小细胞性肺癌为不携带 **EGFR** 和/或 **ALK** 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌；

优选地，所述腹膜癌为原发性腹膜癌；

优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的卵巢癌；

优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的输卵管癌；

优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的腹膜癌；

优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1** 突变和/或 **BRCA2** 突变）的乳腺癌。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中，在手术之前或之后给药，和/或在放疗之前或之后给药。

25. 根据权利要求 23 至 24 中任一权利要求所述的方法，其中，

所述双特异性抗体的单次给药剂量为每千克体重 0.1-100mg，优选每千克体重 5-50mg 或 5-15mg；

每 3 天、4 天、5 天、6 天、10 天、1 周、2 周或 3 周给药一次；

和/或

给药方式为静脉滴注或静脉注射。

26. 根据权利要求 23 至 25 中任一权利要求所述的方法，其中，

PARP 抑制剂的单次给药剂量为每千克体重 0.1-100mg，优选每千克体重 5-50mg 或 5-15mg；

每 3 天、4 天、5 天、6 天、10 天、1 周、2 周或 3 周给药一次；

和/或

给药方式为静脉滴注或静脉注射。

27. 权利要求 1 至 19 中任一权利要求所述的药物组合中的双特异性抗体在制备治疗和/或预防恶性肿瘤的药物中的用途，其中，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌和乳腺癌；

优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的卵巢癌；

优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的输卵管癌；

优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的腹膜癌；

优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的乳腺癌。

28. 一种治疗和/或预防恶性肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求 1 至 19 中任一权利要求所述的药物组合中的双特异性抗体的步骤，其中，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌和乳腺癌；

优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 BRCA1 突变和/或

BRCA2 突变）的卵巢癌；

优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的输卵管癌；**

优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的腹膜癌；**

优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的乳腺癌。**

29. 权利要求 1 至 19 中任一权利要求所述的药物组合中的双特异性抗体，其用于治疗和/或预防恶性肿瘤，其中，所述恶性肿瘤选自卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌和乳腺癌；

优选地，所述卵巢癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的卵巢癌；**

优选地，所述输卵管癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的输卵管癌；**

优选地，所述腹膜癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的腹膜癌；**

优选地，所述乳腺癌为存在同源重组介导的修复功能缺陷（例如 **BRCA1 突变和/或 BRCA2 突变）的乳腺癌。**