

抗 PD-1-抗 VEGFA 的双功能抗体、其药物组合物及其用途

技术领域

本发明属于肿瘤治疗和免疫学生物学领域，涉及一种抗 PD-1-抗 VEGFA 的双功能
5 抗体、其药物组合及其用途。具体地，本发明涉及一种抗人 PD-1-抗人 VEGFA 的双功能
抗体、其药物组合及其用途。

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，在各种疾病所致死亡中
10 高居第二位。而且近年来，其发病率呈明显上升趋势。恶性肿瘤治疗效果差，晚期转移
率高，预后多不佳。目前临床上所采用的常规治疗方法如放、化疗和手术治疗虽然在很
大程度上缓解了病痛，延长了生存时间，但这些方法均存在很大的局限性，其疗效难以
进一步提高。

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
15 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
20 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。
25 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）：146-148（2016））。

5 VEGFR2 是血管发生和构建的主要调节者，与 VEGFR1 相比 VEGFR-2 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）：179-213.（2007）），VEGFA 与 VEGFR2 结合后通过下游 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
10 内皮细胞增殖（Takahashi T 等人，Oncogene，18（13）：2221-2230.（1999））。

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
15 优生与遗传杂志，24（5）：146-148（2016））。

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》，2014 年 9 月第 22 卷，第 9 期，第 2231-3 页）。

20 目前已经有多种靶向人 VEGF 特别是 VEGFA 的人源化单克隆抗体，如贝伐单抗（Bevacizumab），其于 2004 年期间陆续被美国食品药品监督管理局批准用于治疗非小细胞肺癌、肾细胞癌、宫颈癌、转移性结直肠癌等多种肿瘤。

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
25 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肿瘤细。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，且多种原发性肿瘤组织在免疫组化分析中均表现为 PD-L1 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。

此外，抗 PD-1 的抗体还可用于治疗病毒慢性感染。病毒慢性感染往往伴随着病毒特异性的效应 T 细胞功能丧失和数量的减少。通过注射 PD-1 抗体可阻断 PD-1 和 PD-L1 的相互作用，从而有效抑制效应 T 细胞在病毒慢性感染中的耗竭。

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)，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.* 2013 Sep;13(7):768-74)。

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、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., *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)。

目前,尚需要开发一种同时靶向 PD-1 和 VEGF(例如 VEGFA)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,基于已上市的 VEGFA 单抗 Avastin
5 (Bevacizumab)和之前得到的 14C12H1L1(请参见中国专利公开 CN106977602A),
获得了能够同时结合 VEGFA 和 PD-1,并阻断 VEGFA 与 VEGFR2 结合、阻断 PD-1 与
PD-L1 结合的人源化双功能抗体,命名为 VP101。

本发明人惊奇地发现,VP101 能够:

10 有效地结合人免疫细胞表面的 PD-1,解除 PD-L1 和 PD-1 介导的免疫抑制,促进人
免疫细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2;

有效地抑制 VEGFA 诱导的血管内皮细胞的增殖,从而抑制肿瘤诱发的血管发生;
和/或

具有用于制备防治肝癌、肺癌、黑色素瘤、肾肿瘤、卵巢癌、淋巴瘤等恶性肿瘤的
药物的潜力。

15 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 VEGFA 的第一蛋白功能区,和

靶向 PD-1 的第二蛋白功能区;

20 优选地,

所述第一蛋白功能区为抗 VEGFA 的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗 VEGFA
的抗体的重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 15-17 所示的 HCDR1-
HCDR3,其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 18-20 所示的 LCDR1-
LCDR3;和

25 所述第二蛋白功能区为抗 PD-1 的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗 PD-1 的抗
体的重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 21-23 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: 24-26 所示的 LCDR1-LCDR3。

在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,

所述抗 VEGFA 的抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、

互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体；

和/或，

所述抗 PD-1 的抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

5 在本发明的一些实施方式中，所述双特异性抗体为 IgG-scFv 模式。

在本发明的一些实施方式中，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 15—17 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 18—20 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述第二蛋白功能区为单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 21—23 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 24—26 所示的 LCDR1—LCDR3；

或者，

所述第一蛋白功能区为单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 21—23 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 24—26 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 15—17 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 18—20 所示的 LCDR1—LCDR3。

在本发明一个具体的实施方式中，本发明涉及一种双特异性抗体，其包括：

靶向 VEGFA 的第一蛋白功能区，和

20 靶向 PD-1 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，其重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 15—17 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 18—20 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述第二蛋白功能区为单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 21—23 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 24—26 所示的 LCDR1—LCDR3；

或者，

所述第一蛋白功能区为单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 21—23 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 24—26

所示的 LCDR1—LCDR3；和所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 15—17 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 18—20 所示的 LCDR1—LCDR3。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，

- 5 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，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: 9 所示；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；

或者，

- 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；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；和重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，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。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，

- 15 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。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，

所述的免疫球蛋白，其恒定区来自人抗体；

优选地，所述免疫球蛋白的恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，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。

- 25 在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区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)_m，m 为正整数，例如 1、2、3、4、5 或 6。其中，GGGGS (SEQ ID NO: 14) 为 Linker 的构成单元。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和

第二蛋白功能区独立地为 1 个、2 个或者 2 个以上。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述免疫球蛋白为 1 个；所述单链抗体为 2 个，并且优选为两个相同的单链抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述免疫球蛋白为 IgG、
5 IgA、IgD、IgE 或 IgM；优选为 IgG，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端。由于免疫球蛋白由两条重链，因此，一个免疫球蛋白分子连接有两个单链抗体分子。优选地，两个单链抗体分子相同。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体为两条，
10 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。

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,
15 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。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述的双特异性抗体以小于 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
20 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，所述的双特异性抗体，其中，

所述的双特异性抗体以小于 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，

25 所述的双特异性抗体以小于 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。

本发明的另一方面涉及一种分离的核酸分子，其编码本发明中任一项所述的双特异

性抗体。

本发明还涉及一种载体，其包含本发明的分离的核酸分子。

本发明还涉及一种宿主细胞，其包含本发明的分离的核酸分子，或者包含本发明的载体。

5

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体的方法，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。

10 本发明的再一方面涉及一种偶联物，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中任一项所述的双特异性抗体，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

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

15 优选地，所述试剂盒还包含第二抗体，其能够特异性结合所述双特异性抗体；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中任一项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 VEGFA 和/或 PD-1 在样品中的存在或其水平。

20

本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明中任一项所述的双特异性抗体或者包含本发明的偶联物；可选地，其还包括药学上可接受的辅料。

25 本发明的双特异性抗体或者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 and 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液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射液：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。

- 5 此外, 本发明的双特异性抗体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, 10 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 15 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, 肌肉注射)。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。

- 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 20 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 本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备预防和/或治疗恶性肿瘤的药物中的用途; 优选地, 所述恶性肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌例如非小细胞性肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌和白血病。

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

(1)

检测样品中的 VEGFA 水平的药物或试剂，
5 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，
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；

10 和/或

(2)

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，
15 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。

在本发明的一个实施方案中，所述用途是非治疗目的的和/或非诊断目的的。

20 本发明的再一方面涉及一种在体内或在体外的方法，包括施加细胞以有效量的本发明任一项所述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：

(1)

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，
25 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方法，或者
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，
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
5 促进 T 淋巴细胞中 IL-2 分泌的方法。
在本发明的一个实施方案中，所述体外方法是非治疗目的的和/或非诊断目的的。

本发明的体外实验中，抗 VEGFA 抗体及抗 VEGFA-抗 PD-1 双功能抗体均能抑制 HUVEC 细胞增殖，抗 PD-1 抗体及抗 VEGFA-抗 PD-1 双功能抗体均能促进 IFN γ 和/或
10 IL-2 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双特异性抗体或者本发明的偶联物的步骤；优选地，所述恶性肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌例如非小细胞性肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、
15 胶质瘤、黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌和白血病。

本发明的双特异性抗体的治疗或预防有效量的典型非极限范围是 0.02—50mg/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，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
20 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。

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/或治疗恶性肿瘤；优选地，所述恶性肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌例如非小细胞性肺癌、肝癌、卵
25 巢癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌和白血病。

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：

(1)

检测样品中的 VEGFA 水平，
阻断 VEGFA 与 VEGFR2 结合，
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，
5 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，
10 下调 PD-1 的活性或其水平，
解除 PD-1 对机体免疫抑制，
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。

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)
20 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.

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
25 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: 5 所示, 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO: 15)

5 HCDR2: INTYTGEP (SEQ ID NO: 16)

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO: 17)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO: 18)

LCDR2: FTS (SEQ ID NO: 19)

10 LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO: 20)

(2) 14C12H1L1

重链可变区的氨基酸序如 SEQ ID NO: 9 所示, 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

15 HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 21)

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 22)

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 23)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 24)

20 LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 25)

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 26)

(3) VP101

其重链的 9 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO: 15)

25 HCDR2: INTYTGEP (SEQ ID NO: 16)

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO: 17)

HCDR4: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 21)

HCDR5: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 22)

HCDR6: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 23)

HCDR7: QDINTY (SEQ ID NO: 24)

HCDR8: RAN (SEQ ID NO: 25)

HCDR9: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 26)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

5 **LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO: 18)**

LCDR2: FTS (SEQ ID NO: 19)

LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO: 20)

10 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 VEGFA 蛋白（GenBank ID: NP_001165097.1）的氨基酸序列时，其包括 VEGFA 蛋白的全长，还包括 VEGFA 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 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，VEGFA 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 的下划线部分所示（不含末尾的 6 个 His，共 302 个氨基酸）。

25 如本文中所使用的，当提及 VEGFR2 蛋白（亦称为 KDR, GenBank ID: NP_002244）的氨基酸序列时，其包括 VEGFR2 蛋白的全长，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）进行融合的片段。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: 4** 的波浪线部分所示（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**；
5 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**, **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
10 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
15 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
20 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
25 （**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 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 (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: $\text{NH}_2\text{-V}_\text{L}\text{-接头-V}_\text{H}\text{-COOH}$ 或 $\text{NH}_2\text{-V}_\text{H}\text{-接头-V}_\text{L}\text{-COOH}$ 。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.,
5 *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
10 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
15 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
20 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
25 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 to 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*, 332:323-329 (1988); 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。

- 5 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。
- 10

发明的有益效果

- 15 本发明的双特异性抗体 VP101 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；VP101 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。

附图说明

- 20 图 1：双功能抗体 VP101 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 μ g；还原型蛋白电泳上样缓冲液样品抗体，1 μ g；Marker，5 μ l；BSA，1 μ g。

- 25 图 2：抗体 VP101 与 PD-1 结合的动力学特征参数检测结果。
图 3：抗体 BsAbB7 与 PD-1 结合的动力学特征参数检测结果。
图 4：抗体 BsAbB8 与 PD-1 结合的动力学特征参数检测结果。
图 5：抗体 14C12H1L1 与 PD-1 结合的动力学特征参数检测结果。
图 6：抗体 Nivolumab 与 PD-1 结合的动力学特征参数检测结果。
图 7：抗体 VP101 与 VEGF 结合的动力学特征参数检测结果。

- 图 8: 抗体 BsAbB7 与 VEGF 结合的动力学特征参数检测结果。
- 图 9: 抗体 BsAbB8 与 VEGF 结合的动力学特征参数检测结果。
- 图 10: 抗体 Bevacizumab 与 VEGF 结合的动力学特征参数检测结果。
- 图 11: 采用间接 ELISA 方法检测抗体 VP101 与 VEGFA 的结合活性。
- 5 图 12: 采用间接 ELISA 方法检测抗体 VP101, BsAbB7, BsAbB8, Bevacizumab 与 VEGFA-his 的结合活性。
- 图 13: 采用间接 ELISA 方法检测抗体 VP101 与 PD-1 的结合活性。
- 图 14: 采用间接 ELISA 方法抗体 VP101, BsAbB7, BsAbB8、14C12H1L1, Nivolumab 与 PD-1 的结合活性。
- 10 图 15: 采用竞争 ELISA 方法检测抗体 VP101 与 VEGFR2 竞争结合 VEGFA 的活性。
- 图 16: 采用竞争 ELISA 方法检测抗体 VP101 与 PD-L1 竞争结合 PD-1 的活性。
- 图 17: FACS 法检测抗体 14C12H1L1、VP101 与 293T-PD-1 细胞表面蛋白 PD-1 结合 EC_{50} 。
- 图 18: FACS 法检测 VP101、BsAbB7、BsAbB8 与 293T-PD-1 细胞表面蛋白 PD-1
- 15 结合 EC_{50} 。
- 图 19: FACS 法检测抗体 14C12H1L1、VP101 与 PD-L1 竞争结合 293T-PD-1 细胞表面蛋白 PD-1 的活性。
- 图 20: FACS 法检测抗体 14C12H1L1、VP101、BsAbB7、BsAbB8、14C12H1L1、Nivolumab 与 PD-L1 竞争结合 293T-PD-1 细胞表面蛋白 PD-1 的活性。
- 20 图 21: 抗体 VP101、BsAbB7、BsAbB8 阻断 VEGF 激活 NFAT 信号通路的中和生物活性检测
- 图 22: Bevacizumab、VP101 对 HUVEC 细胞增殖的影响。
- 图 23: VP101 对 DC 和 PBMC 混合培养体系中 $IFN-\gamma$ 分泌的影响。
- 图 24: VP101、BsAbB7、BsAbB8 对 DC 和 PBMC 混合培养体系中 $IFN-\gamma$ 的分泌的
- 25 影响。
- 图 25: VP101、BsAbB7、BsAbB8 对 DC 和 PBMC 混合培养体系中 IL-2 的分泌的影响。
- 图 26: ELISA 法检测抗体 14C12H1L1、VP101 对 PBMC、Raji-PD-L1 细胞混合培养所诱导的细胞因子 IL-2 的分泌的影响。

图 27: ELISA 法检测抗体 14C12H1L1、VP101 对 PBMC、Raji-PD-L1 细胞混合培养所诱导的细胞因子 IFN- γ 的分泌的影响。

图 28: ELISA 法检测抗体 14C12H1L1、VP101、BsAbB7、BsAbB8 对 PBMC、Raji-PD-L1 细胞混合培养所诱导的细胞因子 IFN- γ 的分泌的影响。

5 图 29: ELISA 法检测抗体 14C12H1L1、VP101、BsAbB7、BsAbB8 对 PBMC、Raji-PD-L1 细胞混合培养所诱导的细胞因子 IL-2 的分泌的影响。

图 30: 不同浓度 VP101 对肿瘤生长的抑制作用。

图 31: 不同浓度 VP101 对小鼠体重的影响。

10 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。

15 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 4 进行制备。

20 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，对照抗体 BsAbB7、BsAbB8 的氨基酸序列分别与中国专利公开 CN105175545A 中的 BsAbB7、BsAbB8 的氨基酸序列相同。

25

制备例 1: 融合蛋白 PD-1-mFc、PD-1-hFc 和 PD-L1-hFc 的制备

融合蛋白 PD-1-mFc、PD-1-hFc 和 PD-L1-hFc 的制备以及 SDS-PAGE 电泳检测完全参照中国专利公开 CN106632674A 的制备例 1 进行。

其中，本制备例中的融合蛋白 PD-1-mFc、PD-1-hFc 和 PD-L1-hFc 的氨基酸序列及

其编码核酸序列分别与中国专利公开 CN106632674A 的制备例 1 中的 PD-1-mFc、PD-1-hFc 和 PDL-1-hFc 相同。

制得了融合蛋白 PD-1-mFc、PD-1-hFc 和 PD-L1-hFc。

5 制备例 2: 融合蛋白 VEGFA-His 的表达和纯化

1. 构建 VEGFA-His 质粒

以 VEGFA human cDNA (购自 Origene 公司) 为模板进行 PCR 扩增并用普通 DNA 产物纯化试剂盒纯化回收 hVEGFA-His 片段。将回收后的 hVEGFA-His 片段与表达载体 pcDNA3.1 使用 XbaI&HindIII-HF 酶切, 胶回收目的基因片段和线性表达载体, 通过 T4 连接酶连接, 并将全部连接产物转化 DH5a 化学感受态细胞, 涂布带有 Amp 的 Agar 平板, 挑选分离良好的单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 将 PCR 鉴定结果为阳性的克隆子接种到 LB 培养基培养, 并取菌液送广州英俊公司测序验证。测序结果比对显示, 阳性重组子插入序列完全正确。

2. 融合蛋白 VEGFA-His 的表达和纯化

按照 lipofectamin 转染试剂盒 (购自 Invitrogen 公司) 方法将重组质粒 VEGFA-his 转染 293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司) 7 天后, 将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 Binding Buffer A 后上样至 HisTrap 柱, 用 Elution Buffer A 线性洗脱蛋白, 初纯样品用 HiTrap Desalting 柱换液至 Binding Buffer B 并上样至 HiTrap Q 柱, 用 Elution Buffer B 线性洗脱蛋白、回收目标样品并换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

制得了融合蛋白 VEGFA-His。

VEGFA-His 的氨基酸序列如下 (171aa):

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVP
LMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPK
 25 KDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCD
KPRRHHHHHH (SEQ ID NO: 1)

其中, 下划线部分为 VEGFA 的氨基酸序列。

编码 VEGFA-His 的核酸序列 (513bp)

GCACCCATGGCCGAGGGCGGCGGCCAGAACACCACGAGGTGGTGAAGT

TCATGGACGTGTACCAGAGAAGCTACTGCCACCCCATCGAGACCCTGGTGGGA
 CATCTTCCAGGAGTACCCCGACGAGATCGAGTACATCTTCAAGCCCAGCTGCG
 TGCCCCCTGATGAGATGCGGCGGCTGCTGCAACGACGAGGGCCTGGAGTGCGT
 GCCCACCGAGGAGAGCAACATCACCATGCAGATCATGAGAATCAAGCCCCAC
 5 CAGGGCCAGCACATCGGCGAGATGAGCTTCCTGCAGCACAACAAGTGCGAGT
 GCAGACCCAAGAAGGACAGAGCCAGACAGGAGAACCCCTGCGGCCCTGCAG
 CGAGAGAAGAAAGCACCTGTTCGTGCAGGACCCCCAGACCTGCAAGTGCAGC
 TGCAAGAACACCGACAGCAGATGCAAGGCCAGACAGCTGGAGCTGAACGAGA
 GAACCTGCAGATGCGACAAGCCCAGAAGACATCATCACCATCACCAC (SEQ ID
 10 NO: 2)

制备例 3: 融合蛋白 VEGFR2-hFc 的表达和纯化

1. 基因 VEGFR2-hFc 的合成:

对基因 VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, NCBI GenBank:
 15 NP_002244) 的胞外片段 VEGFR2 ECD 所对应的氨基酸分别与 TEV 及人 IgG 的 Fc 蛋
 白片段 (hFc) 进行融合设计 (SEQ ID NO: 3)。委托金斯瑞公司合成相应的编码核酸
 序列 (SEQ ID NO: 4)。

VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, NCBI GenBank:
 NP_002244;

20 hFc: Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857, 106-330;

融合蛋白 VEGFR2- hFc 的氨基酸序列: (998aa)

MQSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITC
RGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTECSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRE
TDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCAR
 25 YPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVG
YRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRD
LKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVA
FGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIME
VSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLLVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGTQTTLT

CTVYAIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEV
 NKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITL
 QPDMQPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPOPLPIHVGE LPTPVCKNLDTL
 WKLNATMFSNSTNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLE
 5 RVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNR
 NLTIRRVRKEDGLYTCQACSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLESRENLYFQGTHTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENN
 10 YKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK (SEQ ID NO: 3)

其中，带波浪下划线的为 VEGFR2 的 ECD 部分，加边框部分为 TEV 酶切位点，带实线下划线的为 hFc 部分。

编码融合蛋白 VEGFR2- hFc 的核酸序列：(2997bp)

15 ATGCAGAGCAAGGTGCTGCTGGCCGTCGCCCTGTGGCTCTGCGTGGAGA
 CCCGGGCGCCTCTGTGGGTTTGCCTAGTGTTTCTCTTGATCTGCCCAGGCTC
 AGCATACAAAAAGACATACTTACAATTAAGGCTAATACAACCTCTTCAAATTACT
 TGCAGGGGACAGAGGGACTTGGACTGGCTTTGGCCCAATAATCAGAGTGGCA
 GTGAGCAAAGGGTGGAGGTGACTGAGTGCAGCGATGGCCTCTTCTGTAAGAC
 20 ACTCACAATTCCAAAAGTGATCGGAAATGACACTGGAGCCTACAAGTGCTTCT
 ACCGGGAACTGACTTGGCCTCGGTCATTTATGTCTATGTTCAAGATTACAGA
 TCTCCATTTATTGCTTCTGTAGTGACCAACATGGAGTCGTGTACATTACTGAG
 AACAAAAACAAAACCTGTGGTGATTCCATGTCTCGGGTCCATTTCAAATCTCAA
 CGTGTCACCTTTGTGCAAGATACCCAGAAAAGAGATTTGTTCTCTGATGGTAACA
 25 GAATTTCTCTGGGACAGCAAGAAGGGCTTTACTATTCCTCCAGCTACATGATCAGC
 TATGCTGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAAAATTAATGATGAAAGTTACCAGTC
 TATTATGTACATAGTTGTCGTTGTAGGGTATAGGATTTATGATGTGGTTCTGA
 GTCCGTCTCATGGAATTGAACTATCTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGT
 ACAGCAAGAACTGAACTAAATGTGGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCCTTC

TTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTG
GGAGTGAGATGAAGAAATTTTTGAGCACCTTAACCTATAGATGGTGTAACCCGG
AGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGA
AGAACAGCACATTTGTCAGGGTCCATGAAAAACCTTTTGTTGCTTTTGGAAGT
5 GGCATGGAATCTCTGGTGGAAGCCACGGTGGGGGAGCGTGTGAGAATCCCTG
CGAAGTACCTTGGTTACCCACCCCCAGAAATAAAATGGTATAAAAATGGAATA
CCCCTTGAGTCCAATCACACAATTAAAGCGGGGCATGTACTGACGATTATGGA
AGTGAGTGAAAGAGACACAGGAAATTACACTGTCATCCTTACCAATCCCATT
CAAAGGAGAAGCAGAGCCATGTGGTCTCTCTGGTTGTGTATGTCCCACCCCAG
10 ATTGGTGAGAAATCTCTAATCTCTCCTGTGGATTCTTACCAGTACGGCACCAC
TCAAACGCTGACATGTACGGTCTATGCCATTCTCCCCGCATCACATCCACT
GGTATTGGCAGTTGGAGGAAGAGTGCGCCAACGAGCCCAGCCAAGCTGTCTC
AGTGACAAACCCATACCCTTGTGAAGAATGGAGAAGTGTGGAGGACTTCCAG
GGAGGAAATAAAATTGAAGTTAATAAAAATCAATTTGCTCTAATTGAAGGAAA
15 AAACAAAACCTGTAAGTACCCTTGTTATCCAAGCGGCAAATGTGTCAGCTTTGT
ACAAATGTGAAGCGGTCAACAAAGTCGGGAGAGGAGAGAGGGTGATCTCCTT
CCACGTGACCAGGGGTCCTGAAATTACTTTGCAACCTGACATGCAGCCCACTG
AGCAGGAGAGCGTGTCTTTGTGGTGCCTGCAGACAGATCTACGTTTGAGAAC
CTCACATGGTACAAGCTTGGCCACAGCCTCTGCCAATCCATGTGGGAGAGTT
20 GCCCACACCTGTTTGCAAGAACTTGGATACTCTTTGGAAATTGAATGCCACCA
TGTTCTCTAATAGCACAAATGACATTTTGATCATGGAGCTTAAGAATGCATCCT
TGCAGGACCAAGGAGACTATGTCTGCCTTGCTCAAGACAGGAAGACCAAGAA
AAGACATTGCGTGGTCAGGCAGCTCACAGTCCTAGAGCGTGTGGCACCCACG
ATCACAGGAAACCTGGAGAATCAGACGACAAGTATTGGGGAAAGCATCGAAG
25 TCTCATGCACGGCATCTGGGAATCCCCCTCCACAGATCATGTGGTTTAAAGAT
AATGAGACCCTTGTAGAAGACTCAGGCATTGTATTGAAGGATGGGAACCGGA
ACCTCACTATCCGCAGAGTGAGGAAGGAGGACGAAGGCCTCTACACCTGCCA
GGCATGCAGTGTCTTGGCTGTGCAAAAGTGGAGGCATTTTTCATAATAGAAG
GTGCCCAGGAAAAGACGAACCTTGAATCTAGAGAAAACCTGTATTTTCAGGGC

ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG
TCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
5 GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG
CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
10 GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC
GTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAATGA
 (SEQ ID NO: 4)

15 其中，带波浪下划线的为 VEGFR2 的 ECD 部分，加边框为 TEV 酶切位点，带实线下划线的为 hFc 部分。

2. pUC57simple-VEGFR2-hFc 质粒的构建：

将金斯瑞公司合成的 VEGFR2-hFc 编码基因克隆到 pUC57simple （金斯瑞公司提供）表达载体中，获得 pUC57simple-VEGFR2-hFc 质粒。

20 3. pcDNA3.1-VEGFR2-hFc 重组质粒的构建：

将质粒 pUC57simple-VEGFR2-hFc 进行酶切（Xba I 和 BamH I），电泳回收得到的融合基因片段 VEGFR2-hFc 与 pcDNA3.1 表达载体（购自 Invitrogen 公司）进行连接反应，获得 pcDNA3.1-VEGFR2-hFc，转染感受态大肠杆菌细胞 DH5a（购自 TIANGEN 公司），转染和培养按照说明书进行。筛选得到阳性的 pcDNA3.1-VEGFR2-hFc 克隆菌落，按照常规方法扩增大肠杆菌，然后采用试剂盒（购自天根生化科技（北京）有限公司，DP103-03）并按照试剂盒的说明书提取得到 pcDNA3.1-VEGFR2-hFc 重组质粒。

4. 重组质粒 pcDNA3.1-VEGFR2-hFc 转染 293F 细胞

按照 lipofectamin 转染试剂盒（购自 Invitrogen 公司）方法将重组质粒 pcDNA3.1-VEGFR2-hFc 转染 293F 细胞（购自 Invitrogen 公司）。

5. VEGFR2-hFc 蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测

将重组质粒 pcDNA3.1-VEGFR2-hFc 转染 293F 细胞 7 天后，将培养液通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤以及 Mabselect SuRe 柱进行纯化得到 VEGFR2-hFc 融合蛋白样品，并取部分样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

5 制得了融合蛋白 VEGFR2-hFc。

制备例 4：抗 VEGFA 的抗体 Bevacizumab 的制备

10 上市的 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 重链可变区的氨基酸序列：(123 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGW
INTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSS
HWYFDVWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 5)

15 编码 Bevacizumab 重链可变区的核酸序列：(369 bp)

GAGGTGCAGCTGGTCCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGT
CTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATG
AATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCA
ACACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTCACC
20 TTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCG
AGCTGAGGACACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGA
GCAGCCATTGGTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAG
CAGC (SEQ ID NO: 6)

25 Bevacizumab 轻链可变区的氨基酸序列：(107 aa)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 7)

编码 Bevacizumab 轻链可变区的核酸序列：(321 bp)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGA
 CAGGGTCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACCTACCTGAATT
 GGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGC
 TCCCTGCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCG
 5 ACTTTACTCTGACCATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTCGCTACATACTATT
 GCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGA
 GATCAAG (SEQ ID NO: 8)

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

10 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)。

15 制备例 5: 抗 PD-1 的人源化抗体 14C12H1L1 的制备和检测

完全参照中国专利公开 CN106977602A 中实施例 3—4 的记载进行。

人源化抗体 14C12H1L1 的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列以及其编码核酸
 序列也与中国专利公开 CN106977602A 中实施例 3—4 所记载的相同, 在此亦提供如下:

人源化抗体 14C12H1L1 重链可变区的氨基酸序列: (118 aa)

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATIS
 GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFA
 YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 9)

编码人源化抗体 14C12H1L1 重链可变区的核酸序列: (354 bp)

GAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGT
 25 CACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATG
 TCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCT
 CAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCAC
 AATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGA
 GGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATG

GTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 10)

人源化抗体 14C12H1L1 轻链可变区的氨基酸序列: (107 aa)

5 DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
(SEQ ID NO: 11)

编码人源化抗体 14C12H1L1 轻链可变区的核酸序列: (321 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGA
10 CAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCT
GGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAA
TAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAG
GACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTA
TTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGG
15 AGCTGAAG (SEQ ID NO: 12)

制得了抗 PD-1 的人源化抗体 14C12H1L1。

制备例 6: 人抗鸡蛋溶酶体抗体 hIgG 的制备和鉴定

人抗鸡蛋溶酶体抗体(human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, anti-HEL, 即 human IgG,
20 简称 hIgG),其序列来自于 Acierno 等人发表的 Affinity maturation increases the stability
and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies 研究中 Fab F10.6.6 序列的可变
区序列 (Acierno 等人. J Mol Biol. 2007; 374(1): 130-46.)。制备方法如下:

委托南京金斯瑞生物对 human IgG 抗体的重轻链(全序列或可变区)基因进行氨基
酸的密码子优化和基因合成, 参照《分子克隆实验指南(第三版)》介绍的标准技术,
25 采用 PCR、酶切、DNA 胶回收、连接转化、菌落 PCR 或酶切鉴定等标准的分子克隆技
术将重轻链基因分别亚克隆到哺乳动物表达系统的抗体重链表达载体和抗体轻链表达载
体, 并进一步对重组表达载体的重轻链基因进行测序分析。测序验证正确后, 大量制备
去内毒素级别的表达质粒并将重轻链表达质粒瞬时共转染 HEK293 细胞进行重组抗体的
表达。培养 7 天后收集细胞培养液, 进行 rProtein A 柱(GE)亲和纯化, 收获的抗体样

品用 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 标准分析技术对其进行质量鉴定。
制得了 hIgG。用于下面的实施例 8—9。

实施例 1：双功能抗体 VP101 的重链和轻链的序列设计、制备和检测

5 1. 序列设计

本发明中的双功能抗体 VP101 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：VP101 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	
VP101	Bevacizumab-H	Linker1	14C12H1v-Linker1-14C12L1v	Bevacizumab-L

10 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制备例中记载的相应序列。

（2）Linker 1 的氨基酸序列为 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 13）

15 2. 抗体 VP101 的表达和纯化

分别将 VP101 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 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
20 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。

2. 抗体 VP101 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。VP101 的电泳图如图 1 所示，还原型蛋白样品目
25

标蛋白在 75kD 和 25kD 处，非还原型蛋白样品（单个抗体）目标蛋白在 200kD 处。

以下的实验中用到的人源化抗体 VP101，如果没有特别说明，均为参照本实施例的方法制得。

5 **实施例 2：人源化抗体 VP101 的动力学参数测定**

1. 人源化抗体 VP101 与 PD-1-mFc 结合的动力学参数测定

样品稀释缓冲液为 PBS，0.02% Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。5 $\mu\text{g/mL}$ 抗体固定在 AHC 传感器上，固定高度约为 0.4 nm，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的抗体与 PD-1-mFc 结合，PD-1-mFc 浓度为 0.62-50 nM（三倍梯度稀释），时间 120 s，
10 抗原抗体在缓冲液中解离，时间 300 s。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。抗体 VP101、BsAbB7、BsAbB8、14C12 H1L1 和对照抗体 Nivolumab 与 PD-1-mFc 结合的动力学参数见表 2，动力学特征参数检测结果分别如图 2、图 3、图 4、图 5 和图 6 所示。

15 **表 2：人源化抗体 VP101、BsAbB7、BsAbB8、14C12 H1L1 和**

对照抗体 Nivolumab 与 PD-1-mFc 结合的动力学参数

Sample ID	K_D (M)	$k_{on}(1/Ms)$	S E (k_{on})	$k_{dis}(1/s)$	S E(k_{dis})	Rmax (nm)
VP101	1.68E-10	3.22E+05	1.44E+04	5.40E-05	3.16E-05	0.14-0.28
BsAbB7	1.62E-10	3.27E+05	2.60E+04	5.30E-05	6.24E-05	0.01-0.11
BsAbB8	4.06E-10	3.39E+05	2.04E+04	1.37E-04	4.61E-05	0.01-0.13
14C12H1L1	1.64E-10	4.55E+05	1.61E+04	7.47E-05	2.98E-05	0.24-0.28
Nivolumab	2.32E-10	5.85E+05	2.03E+04	1.36E-04	3.47E-05	0.02-0.14

K_D 为亲和力常数； k_{on} 为抗原抗体结合速率； k_{dis} 为抗原抗体解离速率； $K_D=k_{dis}/k_{on}$ 。

结果表明，抗体 VP101 和 BsAbB7 与 PD-1-mFc 亲和力相当；VP101 与 PD-1-mFc 的亲和力常数显著小于 BsAbB8，提示 VP101 具有更好的结合活性；VP101 与 PD-1-mFc
20 的解离速率常数显著小于 BsAbB8 和 14C12H1L1，提示 VP101 与抗原结合更为稳定，解离速率慢于 14C12H1L1 和 BsAbB8。

2. 人源化抗体 VP101 与 VEGF-His 结合的动力学参数测定

样品稀释缓冲液为 PBS, 0.02% Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4。1 $\mu\text{g/mL}$ VEGF-his 固定在 HIS1K 传感器上,时间 20 s,传感器在缓冲液中平衡 60s,固定在传感器上的 VEGF 与抗体结合,抗体浓度为 12.34-1000 nM (三倍梯度稀释),时间 120 s,抗原抗体在缓冲液中解离,时间 300 s。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

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

抗体 VP101、BsAbB7、BsAbB8 和对照抗体 Bevacizumab 与 VEGF-His 结合的动力学参数见表 3, 动力学特征参数检测结果分别如图 7、图 8、图 9 和图 10 所示。

表 3: 抗体 VP101、BsAbB7、BsAbB8 和

对照抗体 Bevacizumab 与 VEGF-His 结合的动力学参数

Sample ID	K_D (M)	$k_{on}(1/Ms)$	S E (kon)	$k_{dis}(1/s)$	S E(kdis)	Rmax (nm)
VP101	5.21E-10	1.55E+05	9.67E+03	8.05E-05	4.66E-05	0.39-0.60
BsAbB7	5.14E-10	1.57E+05	9.67E+03	8.05E-05	4.83E-05	0.36-0.53
BsAbB8	6.33E-10	1.71E+05	1.07E+04	1.08E-04	4.64E-05	0.39-0.56
Bevacizumab	7.24E-10	1.23E+05	7.09E+03	8.90E-05	4.53E-05	0.29-0.41

10 结果表明, 抗体 VP101 和 BsAbB7 与抗原亲和力相当, 且亲和力常数显著小于 BsAbB8和对照抗体 Bevacizumab,提示 VP101 具有更好的结合活性;VP101 与 VEGF-His 的解离速率常数显著小于 BsAbB8, 提示 VP101 与抗原结合更为稳定, 解离速率慢于 BsAbB8。

15 实施例 3: ELISA 方法检测抗体 VP101 与抗原的结合活性

1. 间接 ELISA 方法测定抗体 VP101 与抗原 VEGFA-his 的结合活性
方法具体如下:

20 用 VEGFA-His 包被酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 小时。洗板后, 1%BSA 封闭 2 小时。洗板后加入梯度稀释的抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟。洗板后加入酶标记的羊抗人 IgG 二抗工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟。洗板后加入 TMB 显色液避光显色 5min, 加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中, 选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

检测抗体 VP101 与抗原 VEGFA-his 结合的结果如图 11 所示。各剂量的光吸收强度见表 4。以抗体浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标进行曲线拟合, 计算抗体的结合 EC_{50} ,

结果如下表 4 所示。

表 4：双功能抗体分别与 VEGFA-his 的结合（间接 ELISA）

抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	包被:VEGFA-His (1 $\mu\text{g/mL}$)			
	VP101		Bevacizumab	
1.0000	3.045	2.943	2.798	2.974
0.3333	3.037	2.861	2.816	2.993
0.1111	2.901	2.689	2.653	2.700
0.0370	2.597	2.460	2.445	2.555
0.0123	2.013	1.914	1.998	2.074
0.0041	1.115	1.086	1.446	1.363
0.0014	0.524	0.496	0.640	0.729
0.0000	0.099	0.091	0.094	0.083
二抗	羊抗人 IgG(H+L), HRP (1:5000)			
EC ₅₀ (nM)	0.036		0.035	

结果显示，抗体 VP101 能有效地结合 VEGFA 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，这两者与人 VEGFA 的结合活性相当。

5

2. 间接 ELISA 方法测定抗体 VP101、BsAbB7、BsAbB8 与抗原 VEGFA-his 的结合活性

方法具体如下：

用 VEGFA-His 包被酶标板，4℃ 孵育过夜。洗板后，1% BSA（PBS 溶解）封闭 2 小时。洗板后加入梯度稀释的抗体，37℃ 孵育 30 分钟。洗板后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG，Fc（Jackson，109-035-098）工作液，37℃ 孵育 30 分钟。洗板后加入 TMB（Neogen，308177）避光显色 5min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

15 抗体 VP101 与抗原 VEGFA-his 结合的结果如图 12 所示。各剂量的光吸收强度见表

5. 以抗体浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标进行曲线拟合，计算抗体的结合 EC_{50} ，结果如下表 5 所示。

表 5: VP101, BsAbB7, BsAbB8, Bevacizumab 与 VEGFA-his 的结合活性（间接 ELISA）

抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	抗体包被: VEGFA-His 1 $\mu\text{g/mL}$							
	VP101		BsAbB7		BsAbB8		Bevacizumab	
1.000	3.112	3.090	3.074	3.081	3.070	3.093	3.137	3.138
0.333	3.026	2.961	2.954	2.941	2.946	2.968	3.075	3.086
0.111	2.802	2.684	2.575	2.621	2.631	2.618	2.965	2.999
0.037	1.972	1.876	1.656	1.668	1.756	1.709	2.504	2.503
0.012	0.994	0.915	0.754	0.764	0.809	0.814	1.476	1.454
0.004	0.436	0.391	0.317	0.332	0.347	0.339	0.711	0.700
0.001	0.197	0.177	0.151	0.155	0.159	0.155	0.318	0.311
0	0.083	0.063	0.086	0.076	0.095	0.072	0.066	0.064
二抗	辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG Fc,HRP(1:5000)							
$EC_{50}(\text{nM})$	0.130		0.171		0.159		0.092	

5 结果显示，抗体 VP101, BsAbB7, BsAbB8, Bevacizumab 均能有效地结合 VEGF 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系，抗体 VP101 与人 VEGF 的结合活性比 BsAbB7 和 BsAbB8 强。

3. 间接 ELISA 方法分别测定抗体 VP101 与抗原 PD-1 的结合活性
方法具体如下：

10 以人 PD-1-mFc 包被酶标板，4℃ 过夜，用 1%的 BSA 于 37℃ 封闭 2 h 后，分别加入抗体，37℃ 孵育 30 min，洗板拍干，加入 HRP 标记羊抗人 IgG(H+L)二抗(Jackson, 109-035-088)，37℃ 孵育 30 min。洗板拍干，加入 TMB (Neogen, 308177) 进行显色反应 5 min，加入终止液终止显色。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

15 检测抗体 VP101 与抗原 PD-1 结合结果如图 13 所示。各剂量的光吸收强度见表 6。通过对结合的抗体 VP101 进行定量分析，曲线模拟抗体的结合效率 EC_{50} ，如下表 6 所示。

表 6: 双功能抗体与 PD-1 的结合（间接 ELISA）

抗体稀释梯度	抗体包被: PD-1-mFc 0.5 $\mu\text{g/ml}$		
	VP101	Nivolumab	14C12 H1L1

0.333 μ g/ml	3.109	3.063	3.137	3.130	3.298	3.278
1:3	3.016	2.926	3.139	3.140	3.245	3.352
1:9	2.461	2.513	2.802	2.758	3.104	3.155
1:27	1.638	1.675	1.949	1.810	2.352	2.549
1:81	0.787	0.791	0.933	0.990	1.382	1.421
1:243	0.301	0.656	0.348	0.375	0.612	0.596
1:729	0.136	0.145	0.159	0.162	0.253	0.247
0	0.068	0.056	0.053	0.053	0.053	0.053
EC ₅₀ (nM)	0.06		0.061		0.037	

结果显示, 抗体 VP101 能有效地结合 PD-1 蛋白, 并且其结合效率呈剂量依赖关系。

4. 间接 ELISA 方法测定抗体 VP101、BsAbB7、BsAbB8 与抗原 PD-1 的结合活性方法具体如下:

- 5 以人 PD-1-mFc 包被酶标板, 4℃ 过夜, 用 1% BSA (PBS 溶解) 于 37℃ 封闭 2 h 后, 分别加入抗体, 37℃ 孵育 30 min, 洗板拍干, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG,Fc (Jackson, 109-035-098), 37℃ 孵育 30 min。洗板拍干, 加入 TMB (Neogen, 308177) 进行显色反应 5 min, 加入终止液终止显色。立即把酶标板放入酶标仪中, 选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

检测抗体 VP101 与抗原 PD-1 结合结果如图 14 所示。各剂量的光吸收强度见表 7。通过对结合的抗体 VP101 进行定量分析, 曲线模拟抗体的结合效率 EC₅₀, 如下表 7 所示。

表 7: 抗体 VP101, BsAbB7, BsAbB8, 14C12H1L1, Nivolumab 与 PD-1 的结合活性 (间接 ELISA)

抗体浓度 (μ g/mL)	抗原包被: PD-1-mFc 0.5 μ g/mL									
	VP101		BsAbB7		BsAbB8		14C12 H1L1		Nivolumab	
0.333	2.717	2.709	2.732	2.755	2.716	2.715	2.947	2.966	2.823	2.824
0.111	2.507	2.381	2.318	2.321	2.377	2.409	2.923	2.967	2.747	2.758
0.037	1.709	1.616	1.491	1.457	1.522	1.549	2.656	2.694	2.208	2.293
0.012	0.916	0.822	0.732	0.711	0.797	0.775	2.049	2.060	1.348	1.389
0.004	0.413	0.394	0.333	0.321	0.368	0.351	1.139	1.132	0.629	0.638
0.001	0.195	0.191	0.167	0.174	0.181	0.174	0.552	0.541	0.295	0.295
0.000	0.140	0.123	0.110	0.103	0.117	0.118	0.254	0.248	0.152	0.157

0.000	0.099	0.095	0.089	0.074	0.100	0.081	0.083	0.075	0.078	0.084
二抗	辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG Fc,HRP(1:5000)									
EC ₅₀ (nM)	0.146	0.199	0.173	0.045	0.095					

结果显示, 抗体 VP101 能有效地结合 PD-1 蛋白, 并且其结合效率呈剂量依赖关系, 抗体 VP101 与人 PD-1 的结合活显著比 BsAbB7 和 BsAbB8 要强。

5. 竞争 ELISA 方法分别测定抗体 VP101 与 VEGFR2 竞争结合抗原 VEGFA 的活性

具体方法如下:

用 VEGF-His 包被酶标板, 37℃ 孵育 2 小时 37℃ 孵育 2 小时。洗板后, 1% BSA 于 37℃ 封闭 1 小时。洗板后加入梯度稀释的抗体和人 VEGFR2 ECD-mFc-bio (终浓度为 0.02μg/ml), 室温孵育 2 小时。洗板后加入 HRP 标记链霉亲和素 SA-HRP (1:4000) 工作液, 37℃ 孵育 30 分钟。洗板后加入 TMB 显色液避光显色 5min, 加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中, 选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

检测结果如图 15 所示。各剂量的吸光强度见表 8。通过对结合的抗体进行光吸收吸光强度定量分析, 曲线模拟抗体的结合效率获得结合 EC₅₀ (表 8)。

表 8: 竞争 ELISA 检测抗体与

VEGFR2-mFc 竞争结合抗原 VEGFA-His

包被: VEGF-His (2 μg/mL)				
抗体浓度(μg/mL)	VP101		Bevacizumab	
10.000	0.133	0.133	0.103	0.104
3.333	0.161	0.149	0.114	0.109
1.111	0.624	0.563	0.374	0.351
0.370	1.055	1.051	0.905	0.982
0.123	1.059	1.075	0.964	1.049
0.041	1.137	1.068	1.062	1.141
0.014	1.106	1.138	1.010	1.169

0.000	1.155	1.131	1.173	1.153
受体	VEGFR2 ECD-mFc-bio, 0.02 μ g/ml			
二抗	SA-HRP (1:4000)			
EC ₅₀ (nM)	5.324		5.086	

结果显示, 抗体 VP101 能有效地结合抗原 VEGFA, 抑制 VEGFR2 结合 VEGFA, 其抑制 VEGFR2 结合 VEGFA 的效率呈剂量依赖关系。

6. 竞争 ELISA 方法分别测定抗体 VP101 与 PD-L1 的竞争结合抗原 PD-1

5 具体方法如下:

用 PD-1-hFc 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与 PD-L1-hFc 混合 10 min (稀释浓度见表 10), 37℃ 孵育 30 min 后, 洗板拍干。加入酶标二抗, 37℃ 孵育 30 min。洗板拍干, 加入 TMB 进行显色反应 5 min, 加入终止液终止显色。立即把酶标板放入酶标仪中, 选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值
10 (见表 10)。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

检测结果如图 16 所示。各剂量的吸光强度见表 9。通过对结合的抗体 VP101 和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 EC₅₀ (表 9)。

表 9: 竞争 ELISA 检测双功能抗体与 PD-L1 的竞争结合 PD-1

抗体稀释 梯度	抗原包被: PD-1-hFc 0.5 μ g/ml					
	VP101		Nivolumab		14C12 H1L1	
5 μ g/ml	0.096	0.063	0.058	0.058	0.062	0.063
1:3	0.064	0.077	0.059	0.059	0.061	0.064
1:9	0.166	0.160	0.061	0.062	0.066	0.071
1:27	0.867	0.848	0.284	0.335	0.262	0.193
1:81	1.217	1.149	0.973	1.007	0.968	0.882
1:243	1.196	1.949	1.139	1.144	1.122	1.051
1:729	1.183	1.250	1.127	1.185	1.052	1.059
0	1.153	1.276	0.960	1.071	1.027	1.024
受体	PD-L1-mFc 0.3 μ g/ml					
二抗	羊抗鼠 IgG(H+L), HRP conjugated (1:5000)					
EC ₅₀ (nM)	1.216		0.842		0.745	

结果显示, 抗体 VP101 能有效地结合抗原 PD-1, 抑制配体 PD-L1 结合 PD-1, 其抑制 PD-L1 结合 PD-1 的效率呈剂量依赖关系。
15

实施例 4：抗体 VP101 对细胞膜表面抗原的结合

首先构建表达 PD-1 抗原的 293T，然后采用流式细胞术分析验证抗体对细胞膜表面抗原的特异性结合能力。

1. 构建表达 PD-1 抗原的 293T 细胞

5 PD-1 的载体 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 PD-1 的克隆群体 293T-PD-1 细胞。

2. 检测抗体对细胞表面抗原的结合

10 采用常规胰酶消化方法上述步骤获得的表达抗原的 293T-PD-1，并使每个收集管内细胞数为 2×10^5 ，用 PBSA（1% BSA）配制抗体浓度梯度稀释液，冰上与 293T-PD-1 细胞孵育 2 小时，每管加入 100 μ L FITC 羊抗人 IgG（1：500）冰上孵育 1 小时，用 PBS 洗涤，加入 300 μ L PBSA 重悬细胞，在流式细胞仪上用 FITC 通道检测荧光信号(MFI)。

结果如图 17 所示，各浓度的 MFI 值见表 10。通过对结合的 14C12H1L1 抗体进行荧光定量分析和曲线拟合，计算出 VP101 抗体的结合 EC_{50} 为 3.5nM。

15 表 10：FACS 检测 VP101 结合 293T-PD-1 表面抗原的荧光强度分析

抗体 (nM)	0.14	0.41	1.23	3.70	11.11	33.33	100	EC_{50}
Bevacizumab	3.2	2.2	2.0	2.3	2.7	3.8	5.7	-
Nivolumab	33.3	74.9	171.9	357.9	481.9	498.3	478.4	2.1
14C12H1L1	48.1	99.7	201.5	409.0	600.2	655.4	670.8	2.9
VP101	30.8	61.8	135.7	286.9	487.7	534.0	528.6	3.5

结果显示，VP101 抗体能有效地结合 293T-PD-1 宿主细胞表面的 PD-1 抗原，其结合效率呈剂量依赖关系，Bevacizumab 对 293T-PD-1 无结合活性，表明 VP101 对 293T-PD-1 的结合是特异性的。

20 **3. 检测抗体 VP101、BsAbB7、BsAbB8 对细胞表面抗原的结合，方法参照本实施例中步骤 2 所述的实验步骤。**

结果如图 18 所示，各浓度的 MFI 值见表 11。通过对结合的抗体进行荧光定量分析和曲线拟合，计算出 Nivolumab、14C12H1L1、VP101、BsAbB7、BsAbB8 抗体的结合 EC_{50} 分别为 7.853 nM、3.607 nM、7.896 nM、9.943 nM、10.610 nM。

表 11: FACS 检测 VP101、BsAbB7、BsAbB8 结合 293T-PD-1 表面抗原的荧光强度分析

抗体 (nM)	0.014	0.14	0.41	1.23	3.7	11	30	100	EC50(nM)
Bevacizumab	1.89	1.90	2.20	1.92	2.04	2.48	2.80	2.43	-
Nivolumab	3.91	15.30	34.69	94.04	234.34	533.63	640.15	804.69	7.853
14C12H1L1	7.40	29.55	69.16	175.54	422.53	868.45	831.27	813.58	3.607
VP101	3.47	16.16	38.75	93.08	216.76	509.23	810.37	783.58	7.896
BsAbB7	3.85	14.86	37.45	83.78	202.40	465.10	837.61	846.80	9.943
BsAbB8	4.41	16.77	36.86	89.89	210.40	457.91	804.43	863.35	10.610

结果显示, VP101 抗体可呈剂量依赖关系与 293T-PD1 膜表面 PD-1 结合。

Bevacizumab 对 293T-PD-1 无结合活性, 表明 VP101 对 293T-PD-1 的结合是特异性的。

5

实施例 5: 抗体 VP101 对细胞膜表面抗原的竞争性结合

1. 采用竞争流式细胞法测定 VP101 与 PD-L1 竞争结合细胞膜表面抗原 PD-1 的 EC₅₀, 方法具体如下:

取 293T-PD-1 细胞常规消化, 每个样本 30 万细胞, 离心洗涤; 加入相应梯度稀释的
10 抗体, 每管 100 μ L, 冰上孵育 30min; 每管加入 100 μ L PD-L1-mFc, 混匀, 使得最终浓度为 20nM, 冰上孵育 1 小时; 加入 500 μ L 1% PBSA, 5600 rpm 离心 5 min, 去上清; 每管加入 100 μ L 1:500 稀释的 FITC Goat anti mouse 抗体, 混匀后冰上避光孵育 40min; 离心洗涤重悬, 转移至流式上样管, 上机测试。

结果如图 19 所示, 各浓度的 MFI 值见表 12。通过荧光定量分析和曲线拟合, 计算
15 出抗体 VP101、14C12H1L1 的竞争结合 EC₅₀ 分别为 8.33nM、4.37nM。

表 12: FACS 检测 14C12H1L1、VP101

竞争结合 293T-PD-1 表面抗原的荧光强度分析

抗体 (nM)	0.05	0.14	0.41	1.23	3.70	11.11	33.33	100.00	EC ₅₀	R ²
14C12H1L1	288.17	287.29	277.09	237.22	177.80	12.04	10.32	9.87	4.37	0.988
VP101	272.66	264.39	279.11	272.26	239.18	99.29	17.05	14.91	8.33	0.999

结果显示, VP101 抗体能有效地阻断 PDL-1 对 293T-PD-1 宿主细胞表面的 PD-1 的结合, 且呈剂量依赖关系。

2. 采用竞争流式细胞法测定 VP101、BsAbB7、BsAbB8、14C12H1L1、Nivolumab 与 PD-L1 竞争结合细胞膜表面抗原 PD-1 的 EC₅₀，方法参照本实施例中 1 所述的实验步骤。

结果如图 20 所示，各浓度的 MFI 值见表 13。通过荧光定量分析和曲线拟合，计算出抗体 VP101、BsAbB7、BsAbB8、14C12H1L1、Nivolumab 的竞争结合 EC₅₀ 分别为 15.04nM、22.25 nM、19.25 nM、9.21 nM、9.72 nM。

表 13: FACS 检测 VP101、BsAbB7、BsAbB8、14C12H1L1、Nivolumab 竞争结合 293T-PD-1 表面抗原的荧光强度分析

抗体 (nM)	0.14	0.41	1.23	3.7	11.11	33.33	100	300	EC ₅₀	R ²
VP101	1441.94	1380.62	1368.15	1288.34	982.69	112.90	8.49	8.21	15.04	0.9971
BsAbB7	1412.62	1377.27	1339.60	1341.27	1094.35	417.70	9.23	9.18	22.25	0.9985
BsAbB8	1578.36	1521.50	1427.20	1429.85	1137.74	359.69	9.73	9.68	19.25	0.9962
14C12H1L1	1384.08	1551.05	1462.85	1296.64	580.45	12.93	13.37	14.99	9.21	0.9950
Nivolumab	1539.58	1552.37	1483.84	1300.81	713.56	70.92	60.77	56.92	9.72	0.9969

结果显示，抗体 14C12H1L1 活性与 PD-1 单靶点市售抗体 Nivolumab 相当，优于双功能抗体 VP101。抗体 VP101 的活性优于 BsAbB7、BsAbB8。

实施例 6: 抗体 VP101、BsAbB7、BsAbB8 阻断 VEGF 激活 NFAT 信号通路的中和生物活性检测

1. 构建 293T-NFAT-(opv)KDR(C7)细胞

15 KDR(VEGFR2)载体 pCDH-KDRFL(OPV)-GFP-Puro (载体 pCDH-GFP-Puro 购自 优宝生物)、NFAT 载体 pNFAT-luc-hygro (载体 pGL4-luc2P-hygro 购自 Promega 公司) 转染 293T 细胞，经筛选分别获得稳定表达 KDR 和 NFAT 荧光素酶报告基因的克隆群体 293T-NFAT-(opv)KDR(C7)细胞。

2. 收集 293T-NFAT-(opv)KDR(C7)细胞，离心 5min 去上清后，DMEM+10%FBS 培养基重悬细胞，计细胞数及活率，并将细胞浓度调整到合适范围，在黑色的 96 孔板中每孔对应加入 50000 cells/50μL 的细胞悬液；

按实验设计稀释对应抗体(终浓度 300, 100, 10, 2, 0.2, 0.02, 0.002nM)和 VEGF(终

浓度为 30ng/mL), VEGF 靶点的抗体先与 VEGF 室温预孵 1h 后, 再加入到细胞中。设计好空白对照和同型对照(每孔终体积为 100μL), 37℃、5% CO₂ 的二氧化碳培养箱孵育 4 小时; 每孔加入 50μL Luciferase Assay System, 5min 内多标记微孔板检测仪检测相对荧光单位 (Relative Luminescence Units, RLU)。

5 实验结果如图 21 所示, 各抗体 EC₅₀ 见表 14。

表 14: Reporter assay 检测 VP101、BsAbB7、BsAbB8 阻断 VEGF 激活 NFAT 信号通路的中和生物活性检测

Sample	VP101	BsAbB7	BsAbB8	Bevacizumab
EC ₅₀ (nM)	1.2400	1.2170	1.7280	0.7730

结果显示 VP101 的 EC₅₀ 为 1.240nM、BsAbB7 的 EC₅₀ 为 1.217 nM、BsAbB8 的 EC₅₀ 为 1.728 nM, Bevacizumab 的 EC₅₀ 为 0.773 nM, 实验结果说明 VP101 与 BsAbB7 阻断 VEGF 激活 NFAT 信号通路的活性优于 BsAbB8。

实施例 7: VP101 抗体抑制 VEGFA 诱导的 HUVEC 细胞增殖的实验

取生长状态良好的 HUVEC 细胞 (购自 Allcell), 调整细胞浓度为 1.5×10⁴/ml, 接种于 96 孔板, 200μL/孔, 于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养 24h 后, 观察细胞贴壁良好, 弃培养基, 用 2%FBS 的 1640 配制 20nM VEGFA 加入 96 孔板中, 200μl/well; 加入不同浓度的抗体, 继续培养 72h, 72h 后弃培养基, 加 MTT, 4h 后弃 MTT 加 DMSO, 放入酶标仪测定 490nm 处的 OD 值。

结果如图 22 所示。结果显示, 人源化抗体 VP101、Bevacizumab 均可有效抑制 VEGFA 引起的 HUVEC 细胞增殖, 且呈剂量依赖关系; 并且在相同的剂量下, VP101 的抑制 VEGFA 引起的 HUVEC 细胞增殖的药理学活性高于 Bevacizumab。

实施例 8: 在混合淋巴细胞反应促进细胞因子 IFN-γ 和 IL-2 的分泌

1. VP101、14C12H1L1、Nivolumab 在 DC 与 PBMC 混合培养体系中促进 IFN-γ 的分泌

25 采用 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare)分离 PBMC, 将分离出来的 PBMC 加入 IL-4 (Peprotech 200-04, 1000U/ml) 和 GM-CSF (Peprotech 300-03, 1000U/ml) 诱导 6 天后, 额外加入 TNF-α (Peprotech 300-01A, 200U/ml) 诱导 3 天获得成熟 DC 细胞。

共培养当天，采集另一供者外周血分离新鲜 PBMC，将获得的成熟 DC 细胞与另一供者新鲜分离的 PBMC 按 1:10 的比例进行混合培养，同时加入不同浓度的抗体（hIgG 做为对照），共培养 5—6 天后，收集细胞上清，用 ELISA 试剂盒检测 IFN- γ （购自达科为公司）的含量。

- 5 VP101 在 DC 细胞和 PBMC 混合培养体系中对 IFN- γ 的分泌影响如图 23 所示。由图 23 可见，VP101 可有效促进 IFN- γ 的分泌，且呈剂量依赖关系。并且在 30nM 和 300nM 的剂量上，VP101 促进 IFN- γ 分泌的活性高于等剂量 14C12H1L1，在 30nM 剂量水平中促进 IFN- γ 分泌的活性高于等剂量 Nivolumab。

- 10 2. VP101、BsAbB7、BsAbB8 在 DC 与 PBMC 混合培养体系中促进 IL-2 及 IFN- γ 的分泌。

实验方法参考本实施例中的步骤 1，即采用 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare)分离 PBMC，将分离出来的 PBMC 加入 IL-4 (Peprotech 200-04, 1000U/ml) 和 GM-CSF (Peprotech 300-03, 1000U/ml) 诱导 6 天后，额外加入 TNF- α (Peprotech 300-01A, 15 200U/ml) 诱导 3 天获得成熟 DC 细胞。

共培养当天，采集另一供者外周血分离新鲜 PBMC，将获得的成熟 DC 细胞与另一供者新鲜分离的 PBMC 按 1:10 的比例进行混合培养，同时加入不同浓度的抗体（hIgG 做为对照），共培养 5—6 天后，收集细胞上清，用 ELISA 试剂盒检测 IL-2 及 IFN- γ （购自达科为公司）的含量。

- 20 VP101 在 DC 细胞和 PBMC 混合培养体系中对 IFN- γ 的分泌影响如图 24 所示。由图 24 可见，VP101 可有效促进 IFN- γ 的分泌，且呈剂量依赖关系。VP101 促进 IFN- γ 分泌的药理学活性显著优于 BsAbB7、BsAbB8。

VP101 在 DC 细胞和 PBMC 混合培养体系中对 IL-2 的分泌影响如图 25 所示。由图 25 可见，VP101 可有效促进 IL-2 的分泌，且呈剂量依赖关系，VP101 促进 IL-2 的分泌 25 的药理学活性优于 BsAbB7、BsAbB8。

3. VP101、14C12H1L1、Nivolumab 在 PBMC、Raji-PD-L1 混合培养体系促进 IL-2 及 IFN- γ 的分泌

通过慢病毒感染将 PD-L1 稳转 Raji 细胞，加药筛选获得稳定表达 PD-L1 的

Raji-PD-L1 细胞; PBMC 使用 SEB 刺激两天后与丝裂霉素 C 处理的 Raji-PD-L1 混合培养。

结果如图 26、图 27 所示。结果显示, VP101 能有效促进 IL-2 和 IFN- γ 的分泌, 在 300nM 的剂量水平下, VP101 促进 IL-2 分泌的活性显著优于等剂量 14C12H1L1 和 Nivolumab。

其中, 研究的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), 按照前面的制备例 6 制得。

4. VP101、BsAbB7、BsAbB8 在 PBMC、Raji-PD-L1 混合培养体系促进 IL-2 及 IFN- γ 的分泌, 方法参照本实施例中步骤 3 所述的实验方法。

IFN- γ 分泌结果如图 28 所示。结果显示, VP101 可有效促进 IFN- γ 的分泌, 且呈剂量依赖关系。同时, 在相同剂量下 VP101 明显优于 BsAbB7, 而在 3nM 和 30nM 的剂量水平下 VP101 的药理学活性明显优于 BsAbB8。

IL-2 分泌结果如图 29 所示。结果显示, VP101 可有效促进 IL-2 的分泌, 且呈剂量依赖关系。同时, 在 3nM 和 300nM 剂量下 VP101 的药理学活性明显优于 BsAbB7, 而在相同剂量下 VP101 与 BsAbB8 相当。

实施例 9: VP101 体内抑制肿瘤生长的实验

为检测 VP101 的体内抑瘤活性, 首先用 U87MG 细胞(人胶质瘤细胞, 购自 ATCC), 接种于到 5—7 周龄的雌性 Scid Beige 小鼠 (购买自维通利华) 皮下, 造模与具体给药方式见表 15。给药后测量各组肿瘤的长宽, 计算肿瘤体积。

表 15: VP101 治疗 U87MG 移植瘤 Scid Beige 小鼠模型的给药方案

分组	n	肿瘤异种移植 物	给药情况
同型对照 40mg/kg	7	U-87MG, 5 百 万个细胞/鼠, 皮下	同型对照抗体 hIgG, 40mg/kg, 在第 0, 7, 13 天静脉注射
Bevacizumab 30mg/kg	8		Bevacizumab 30mg/kg, 在第 0, 7, 13 天静脉注射

VP101 40mg/kg	7		VP101 40mg/kg, 在第 0, 7, 13 天静脉注射
VP101 4mg/kg	7		VP101 4mg/kg, 在第 0, 7, 13 天静脉注射

结果图 30 所示。结果表明：相比同型对照抗体 hIgG（制备方法同前述制备例 6），**Bevacizumab**、不同剂量 **VP101** 均能有效抑制小鼠肿瘤的生长，且高剂量 **VP101** 对肿瘤的抑制优于低剂量 **VP101**。

此外，如图 31 所示，**VP101** 对荷瘤小鼠体重无影响。

5

尽管本发明的内容就其公开的具体实施方式做出了完整而清晰的描述，但其不仅限于此。对于所属技术领域的人员来说，通过这些表述的指导而对本发明做出修改和替代是有可能发生的，这些改进和替代包含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。