

权 利 要 求

1. 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；

其中：

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

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。

2. 根据权利要求 1 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。

3. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其中，

所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，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。

4. 根据权利要求 3 所述的双特异性抗体, 其中,

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 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,

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。

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

6. 根据权利要求 3 或 4 所述的双特异性抗体, 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。

7. 根据权利要求 3 或 4 所述的双特异性抗体, 其中,

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

8. 根据权利要求 3 或 4 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。

9. 根据权利要求 3 或 4 所述的双特异性抗体，其中，
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。
10. 根据权利要求 1 或 2 所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区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。
11. 根据权利要求 1 或 2 所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为 1 个、2 个或者 2 个以上。
12. 根据权利要求 1 或 2 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，
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。
13. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体。
14. 一种载体，其包含权利要求 13 所述的分离的核酸分子。
15. 一种宿主细胞，其包含权利要求 13 所述的分离的核酸分子，或者权利要求 14 所述的载体。
16. 制备权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体的方法，其包括在合适的条件下培养权利要求 15 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。

17. 偶联物，其包括双特异性抗体以及偶联部分，其中，所述双特异性抗体为权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

18. 试剂盒，其包含权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体，或者包含权利要求 17 所述的偶联物；

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。

19. 权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 VEGFA 和/或 PD-1 在样品中的存在或其水平。

20. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者包含权利要求 17 所述的偶联物；可选地，其还包括药学上可接受的辅料。

21. 权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 17 所述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。

22. 权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 17 所述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，

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；
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，
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。

23. 一种在体内或在体外的方法，包括施加细胞以有效量的权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 17 所述的偶联物的步骤，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，
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
促进 T 淋巴细胞中 IL-2 分泌的方法。

24. 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权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 17 所述的偶联物的步骤；

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、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。

25. 根据权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 17 所述的偶联物，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。

26. 根据权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 17 所述的偶联物，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，
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，
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。