

抗体在抗肿瘤治疗中的用途

技术领域

本发明属于分子免疫学领域，具体涉及一类抗血管内皮生长因子受体 VEGFR2 的单克隆抗体或抗 VEGF 的单克隆抗体联合抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体在治疗肿瘤中的应用。

背景技术

肿瘤是危害人类健康的重大疾病，亟需开发有效的治疗手段和药物。

血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 是一种特异作用于血管内皮细胞的生长因子的受体，又称作 KDR 或 FLK1。目前发现的 VEGFR 主要有 5 种：VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、NP-1 和 NP-2，其中 VEGFR-1 和 VEGFR2 主要存在于血管内皮细胞，VEGFR3 主要存在于淋巴管内皮细胞。NP-1 和 NP-2 不仅在内皮细胞表达，还表达于某些肿瘤细胞内。但 VEGF 促血管内皮细胞增殖等生物活性的发挥主要是通过 VEGFR2 结合实现。

新生血管的形成在人类的多种疾病中发挥重要作用，如视网膜病变、关节炎、子宫内膜异位症等。肿瘤的生长通常也会伴随着新生血管的形成，早在 1971 年，J.Folkman 就提出可通过阻断肿瘤血管的生成来抑制肿瘤的生长及转移，近年来，研究发现，越来越多的恶性肿瘤其发展、转移、预后与血管内皮细胞生长因子及其受体家族相关。因此，以 VEGF 及其受体为靶点的抗肿瘤治疗再次受到关注，在受体家族中，以对 VEGFR-2 为靶点的研究最为广泛。

PD-1 (PD-1) 是一种由活化的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞表达的关键免疫检查点受体并介导免疫抑制，其配体至少包括 PD-L1 和 PD-L2。抗 PD-1 抗体特异性地结合程序性死亡受体-1 (programmed death-1, PD-1) 并阻断抑制 PD-1/PD-1 配体途径 (Topalian 等人 (2012a) N Engl J Med 366: 2443-54)。

PD-L1 (Programmed death-ligand 1) 又称为 CD274 或 B7-H1，是由 CD274 基因编码的 40kDa 的 1 型跨膜蛋白，是 PD-1 的一个配体，

PD-L1 不仅在淋巴和非淋巴组织中的白细胞和非造血细胞上广泛分布，而且还在各种癌细胞中广泛分布，在多种肿瘤细胞表面高表达，而且肿瘤的恶性程度以及不良预后与 PD-L1 的表达水平密切相关。PD-L1 和 PD-1 两者都属于免疫球蛋白超家族并且都有两个细胞外 Ig 结构域。PD-L1 与程序性死亡受体-1 (PD-1) 和 B7-1 (CD80) 的结合界面是在 IgV 样结构域上 (Lin 等 (2008) PNAS 105: 3011-3016)。PD-L1 含有保守的短的细胞内尾区 (约 30 个氨基酸)，PD-1 含有两个基于细胞质酪氨酸的信号基序，即基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) 和基于免疫受体酪氨酸的转换基序 (ITSM)。在 T 细胞刺激之后，PD-1 将酪氨酸磷酸酶 SHP-2 募集到其胞质尾区内的 ITSM 基序，导致参与 CD3+ T 细胞信号传导级联的效应分子 (诸如 CD3 ζ 、PKC θ 和 ZAP70) 的去磷酸化 (Freeman 等 (2000) J Exp Med 192: 1027-34; Latchman 等 (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter 等 (2002) Eur J Immunol 32: 634-43)。有临床数据表明 PD-L1 的高肿瘤表达与增加的肿瘤侵袭性和较差的预后相关联。

PD-1/PD-L1 是一个重要的特异性免疫检查点，PD-1/PD-L1 复合物的形成传输抑制信号并负调节 T 细胞免疫应答；它抑制 TCR 介导的 T 细胞活化、细胞因子产生和 T 细胞增殖 (Fife 等 (2011) Nature Immunology 10: 1185-1193)；诱导同源抗原特异性 T 细胞之中的衰竭或无反应性 (Hofmeyer 等 (2011) Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011: 1-9)；促进 Th1 细胞分化成 Foxp3+调节性 T 细胞 (Armanath 等 (2011) Science TransMed 3: 1-13; Francisco 等 (2009) J.Exp.Med. 206: 3015-3029)；并诱导效应 T 细胞的凋亡。PD-L1 基因的破坏导致上调的 T 细胞应答和自身反应性 T 细胞的产生 (Latchman 等 (2004) PNAS 101: 10691-10696)。PD-1 或 PD-L1 的抗体阻断导致增加的抗肿瘤免疫性 (Iwai 等 (2002) PNAS 99: 12293-12297)。

CTLA-4 也是一个具有代表性的特异性免疫检查点蛋白之一。CTLA-4 是首个应用于临床的靶点，抗 CTLA-4 抗体可促进 T 细胞活化，提高其抗肿瘤效果。Ipilimumab 是首个被证实可以提高经治转移性黑色素瘤患者总生存率且获 FDA 批准上市的 CTLA-4 免疫检查点抑制剂。

目前的研究表明 CTLA-4 抑制 T 细胞的反应主要是通过两种途径：一是通过与 CD28 竞争性的结合 B7 或者招募磷酸酶到 CTLA-4 的胞内结构域部分从而降低 TCR (T cell receptor) 和 CD28 的信号。另一种是降低 CD80 和 CD86 在抗原呈递细胞 (APC) 的表达水平或者通过转胞吞作用 (transendocytosis) 将它们从 APC 移除，这样就减少了 CD28 参与进行 T 细胞激活。此外，CTLA-4 还会介导树突细胞结合 CD80/CD86 并诱导色氨酸降解酶 IDO 的表达，从而导致 TCR 的抑制。CTLA-4 抗体通过结合 CTLA-4 来减少 Treg，激活 TCR

PD-1 抗体和 CTLA-4 (细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4) 抗体药物的联合用药在多种肿瘤上显示出药效优于 PD-1 抗体单药。然而联合用药药效的提升始终伴随更高的毒性，应用受到了很大限制。

贝伐珠单抗 (Bevacizumab) 是一种抗血管生成的靶向药物，通过与血管内皮生长因子 (VEGF) 结合，阻碍血管的生长，抑制肿瘤的转移，是一种广谱抗癌药。上市以来，贝伐单抗主要被获批用于治疗各种类型的癌症，如脑癌 (如侵袭性脑癌，例如胶质母细胞瘤)、肾癌、肺癌 (如转移性非鳞状非小细胞肺癌)、结肠癌、直肠癌、宫颈癌 (如转移性宫颈癌)、子宫内膜癌、卵巢癌 (如晚期卵巢癌) 或输卵管癌、肾癌等。

发明内容

本发明人发现抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体联合 VEGFR2 的单克隆抗体或联合抗 VEGF 的单克隆抗体能够有效地防治肿瘤，毒副作用较低。由此提供了下述发明。

具体地，本发明涉及：

1. 抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，其优选用于治疗肿瘤，优选所述抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体与组分 A 联合施用，其中所述组分 A 选自抗 VEGFR2 单克隆抗体或其抗原结合片段，抗 VEGF 单克隆抗体或其抗原结合片段，或其组合，

其中

(1) 所述抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 CTLA4 的第二蛋白功能区；

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，其包含 SEQ ID NO:14 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 27—29 所示的 HCDR1—HCDR3），和 SEQ ID NO:16 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 30—32 所示的 LCDR1—LCDR3）；和所述的单链抗体，其包含 SEQ ID NO:2 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 33—35 所示的 HCDR1—HCDR3）和 SEQ ID NO:4 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 36—38 所示的 LCDR1—LCDR3）；

或者，

所述的免疫球蛋白，其包含 SEQ ID NO:2 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 33—35 所示的 HCDR1—HCDR3）和 SEQ ID NO:4 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 36—38 所示的 LCDR1—LCDR3）；和所述的单链抗体，其包含 SEQ ID NO:14 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 27—29 所示的 HCDR1—HCDR3），和 SEQ ID NO:16 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 30—32 所示的 LCDR1—LCDR3）；

(2) 所述抗 VEGFR2 单克隆抗体包含 SEQ ID NO:50 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 53-55 所示的 HCDR1—HCDR3）和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 56-58 所示的 LCDR1—LCDR3）；或

(3) 所述抗 VEGF 单克隆抗体包含 SEQ ID NO:60 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 63-65 所示的 HCDR1—HCDR3）和 SEQ ID NO:62 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3（优

选分别如 SEQ ID NOs: 66-68 所示的 LCDR1—LCDR3)。

2. 根据项目 1 所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体, 其中,

(1) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 18 或其变体; 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: 16、SEQ ID NO: 20 或其变体; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43 或其变体; 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: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44 或其变体;

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: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43 或其变体; 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: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44 或其变体; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 18 或其变体; 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: 16、SEQ ID NO: 20 或其变体;

(2) 所述抗 VEGFR2 单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 50 所示的序列或其变体; 并且所述抗 VEGFR2 单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 52 所示的序列或其变体; 或

(3) 所述抗 VEGF 单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 60 所示的序列或其变体; 并且所述抗 VEGF 单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 62 所示的序列或其变体。

3. 根据项目 1 至 2 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体, 其中, 所述双特异性抗体选自如下的 (1) — (20) 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为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 所示的序列或其变体, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4 所示的序列或其变

体；

(2)所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体;和,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6 所示的序列或其变体,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其变体;

(3)所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体;和,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 所示的序列或其变体,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12 所示的序列或其变体;

(4)所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体;和,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 所示的序列或其变体,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4 所示的序列或其变体;

(5)所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体;和,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6 所示的序列或其变体,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其变体;

(6)所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体;和,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 所示的序列或其变体,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12 所示的序列或其变

体；

(7) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 所示的序列或其变体, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4 所示的序列或其变体; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体;

(8) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 所示的序列或其变体, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4 所示的序列或其变体; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体;

(9) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6 所示的序列或其变体, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其变体; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体;

(10) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6 所示的序列或其变体, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其变体; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体;

(11) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 所示的序列或其变体, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12 所示的序列或其变体; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或

其变体；

(12) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体；

(13) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 41 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42 所示的序列或其变体；

(14) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 44 所示的序列或其变体；

(15) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 41 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42 所示的序列或其变体；

(16) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 44 所示的序列或

其变体；

(17) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 41 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；

(18) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 44 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；

(19) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 41 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体；

以及，

(20) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 44 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体，

其中所述变体与对应序列具有至少 60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少 99%同源性。

4. 根据项目 1 至 3 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗

体，其中，

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 40 所示的序列或其变体，并且其轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 24 所示的序列或其变体，其中所述变体序列与对应序列具有至少 60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少 99% 同源性。

5. 根据项目 1 至 4 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区与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单链抗体的轻链可变区直接连接或者通过连接片段连接。

6. 根据项目 5 所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，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。

7. 根据项目 1 至 6 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 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。

8. 根据项目 1 至 7 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，其中，所述单链抗体（优选重链可变区）连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端。

9. 根据项目 1 至 8 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，其中，

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 A 突变，所述 A 突变选自如下突变组合之一：

L234A 和 L235A；或者

L234A 和 G237A；或者

L235A 和 G237A；或者

L234A、L235A、G237A；或者

按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有 B 突变，所述 B 突变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；

或者，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有 A 突变和 B 突变的组合；

或者

所述抗 VEGFR2 单克隆抗体或所述抗 VEGF 单克隆抗体的重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION P01857，轻链恒定区为：Ig kappa chain C region，ACCESSION: P01834。

10. 根据项目 1 至 9 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，

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 CTLA4 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为 SEQ ID NO: 40 所示的序列或其变体，并且其轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 24 所示的序列或其变体，其中所述变体与对应序列具有至少 60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少 99%同源性；

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 44 所示的序列或其变体，其中所述变体与对应序列具有至少 60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少 99%同源性；

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: 25 和 SEQ ID NO: 26；

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: 26 所示，

优选地，所述抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体轻链序列如 SEQ ID NO:72 所示，重链序列如 SEQ ID NO:70 所示，

优选地，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、Fab/c、互补决定区（CDR）片段、单链抗体（例如，scFv）、双价抗体或结构域抗体。

11. 药物组合物，用于治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤），其包含有效量的项目 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体和项目 1-10 任一项中定义的组分 A，，优选所述药物组合物为固体形式或液体形式，优选地，抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体和组分 A 的质量比选自（1：5）-（5：1），例如：1：5、1：4、1：3、1：2、1：1、2：1、3：1、4：1 或 5：1；任选地，所述药物组合物还包含一种或多种化疗药物（优选所述化疗药为烷化剂，抗代谢药物，抗生素，植物类药物和/或激素类药物，铂类药物（如顺铂、卡铂、奥沙利铂），阿霉素类，环磷酰胺，紫杉醇，白蛋白紫杉醇，脂质体紫杉醇，多烯紫杉醇，依托泊苷，吉西他滨，培美曲塞，卡培他滨，奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利，长春碱类，他莫昔芬，甲地孕酮，戈舍瑞林，门冬酰胺酶和/或氟尿嘧啶类抗肿瘤药）。

12. 项目 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体在制备用于预防和/或治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤）的药物或试剂盒中的应用，优选所述药物或试剂盒还包含项目 1-10 任一项中定义的组分 A，

任选地，所述药物或试剂盒还包含一种或多种用于治疗肿瘤的药物（优选所述药物为化疗剂或生长抑制剂（如烷化剂、蒽环类、抗激素剂、芳香酶抑制剂、抗雄激素剂、蛋白激酶抑制剂、脂质激酶抑制剂、反义寡核苷酸、核酶、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒剂或抗肿瘤抗生素、蛋白酶体抑制剂、抗微管剂、EGFR 拮抗剂、VEGF 拮抗剂、血管生成素 2 拮抗剂、类视色素、酪氨酸激酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其组合）、靶向治疗剂（如 B-raf 抑制剂、MEK 抑制剂、K-ras 抑制剂、c-Met 抑制剂、Alk 抑制剂、磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂、Akt 抑制剂、mTOR 抑制剂、VEGF 抑制剂、PARP 抑制剂、双磷脂酰肌醇 3-激酶/mTOR 抑制剂及其组合）、抗体-药物缀合物（如美登新碱、单甲基 auristatin E、加利车霉素、esperamicin 和放射性同位素螯合剂）、表达嵌合抗原受体的 T 细胞、抗体或其抗原结合片段、血管生成抑制剂、抗肿瘤剂、癌症疫苗、佐剂及其组合、烷化剂、抗代谢药物、抗生素、植物类药物和/或激素类药物、铂类药物（如顺铂、卡铂、奥沙利铂）、阿霉素类、环磷酰胺、紫杉醇、白蛋白紫杉醇、脂质体紫杉醇、多烯紫杉醇、依托泊苷、吉西他滨、培美曲塞、卡培他滨、奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、长春碱类、他莫昔芬、甲地孕酮、戈舍瑞林、门冬酰胺酶和/或氟尿嘧啶类抗肿瘤药）。

13. 预防和/或治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤）的方法，包括给受试者施用治疗有效量的项目 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，联合施用项目 1-10 任一项中定义的组分 A，更优选地，进一步联合施用一种或多种用于治疗肿瘤的药物（优选所述药物为化疗剂或生长抑制剂（如烷化剂、蒽环类、抗激素剂、芳香酶抑制剂、抗雄激素剂、蛋白激酶抑制剂、脂质激酶抑制剂、反义寡核苷酸、核酶、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒剂或抗肿瘤抗生素、蛋白酶体抑制剂、抗微管剂、EGFR 拮抗剂、VEGF 拮抗剂、血管生成素 2 拮抗剂、类视色素、酪氨酸激酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其组合）、靶向治疗剂（如 B-raf 抑制剂、MEK 抑制剂、K-ras 抑制剂、c-Met 抑制剂、Alk 抑制剂、磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂、Akt 抑制剂、mTOR 抑制剂、VEGF 抑制剂、PARP 抑制剂、双磷脂酰肌醇 3-激酶/mTOR 抑制剂及其组合）、抗体-药物缀合

物（如美登新碱、单甲基 auristatin E、加利车霉素、esperamicin 和放射性同位素螯合剂）、表达嵌合抗原受体的 T 细胞、抗体或其抗原结合片段、血管生成抑制剂、抗肿瘤剂、癌症疫苗、佐剂及其组合，抗代谢药物，抗生素、植物类药物和/或激素类药物、铂类药物（如顺铂、卡铂、奥沙利铂）、阿霉素类、环磷酰胺、紫杉醇（如白蛋白紫杉醇、脂质体紫杉醇，多烯紫杉醇）、依托泊苷、吉西他滨、培美曲塞、卡培他滨、奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、长春碱类、他莫昔芬、甲地孕酮、戈舍瑞林、门冬酰胺酶和/或氟尿嘧啶类抗肿瘤药），优选地，所述抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体、所述组分 A 和肿瘤化疗药物同时或顺序施用。

14. 试剂盒，用于预防和/或治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤），其含有(a)第一药物组合物，含有项目 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体作为活性成分；和 (b) 第二药物组合物，其中含有项目 1-10 任一项中定义的组分 A 作为活性成分；和任选地(c) 一种或多种用于治疗肿瘤的药物（优选所述药物为化疗剂或生长抑制剂（如烷化剂、蒽环类、抗激素剂、芳香酶抑制剂、抗雄激素剂、蛋白激酶抑制剂、脂质激酶抑制剂、反义寡核苷酸、核酶、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒剂或抗肿瘤抗生素、蛋白酶体抑制剂、抗微管剂、EGFR 拮抗剂、VEGF 拮抗剂、血管生成素 2 拮抗剂、类视色素、酪氨酸激酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其组合）、靶向治疗剂（如 B-raf 抑制剂、MEK 抑制剂、K-ras 抑制剂、c-Met 抑制剂、Alk 抑制剂、磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂、Akt 抑制剂、mTOR 抑制剂、VEGF 抑制剂、PARP 抑制剂、双磷脂酰肌醇 3-激酶/mTOR 抑制剂及其组合）、抗体-药物缀合物（如美登新碱、单甲基 auristatin E、加利车霉素、esperamicin 和放射性同位素螯合剂）、表达嵌合抗原受体的 T 细胞、抗体或其抗原结合片段、血管生成抑制剂、抗肿瘤剂、癌症疫苗、佐剂及其组合、烷化剂、抗代谢药物、抗生素、植物类药物和/或激素类药物、铂类药物（如顺铂、卡铂、奥沙利铂）、阿霉素类、环磷酰胺、紫杉醇（如白蛋白紫杉醇，脂质体紫杉醇，多烯紫杉醇）、依托泊苷、吉西他滨、培美曲塞、卡培他滨、奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、长春碱类、他莫昔芬、甲地孕

酮、戈舍瑞林、门冬酰胺酶和/或氟尿嘧啶类抗肿瘤药）。

15. 单位制剂，优选用于治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤），其中，所述单位制剂包含：1~1000mg（优选 10-1000mg，优选 50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg 或 200mg）的项目 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，1~1000mg（优选 10-1000mg，优选 50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg 或 200mg）的项目 1-10 任一项中定义的组分 A 和任选地一种或多种用于治疗肿瘤的药物（优选所述药物为化疗剂或生长抑制剂（如烷化剂、蒽环类、抗激素剂、芳香酶抑制剂、抗雄激素剂、蛋白激酶抑制剂、脂质激酶抑制剂、反义寡核苷酸、核酶、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒剂或抗肿瘤抗生素、蛋白酶体抑制剂、抗微管剂、EGFR 拮抗剂、VEGF 拮抗剂、血管生成素 2 拮抗剂、类视色素、酪氨酸激酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其组合）、靶向治疗剂（如 B-raf 抑制剂、MEK 抑制剂、K-ras 抑制剂、c-Met 抑制剂、Alk 抑制剂、磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂、Akt 抑制剂、mTOR 抑制剂、VEGF 抑制剂、PARP 抑制剂、双磷脂酰肌醇 3-激酶/mTOR 抑制剂及其组合）、抗体-药物缀合物（如美登新碱、单甲基 auristatin E、加利车霉素、esperamicin 和放射性同位素螯合剂）、表达嵌合抗原受体的 T 细胞、抗体或其抗原结合片段、血管生成抑制剂、抗肿瘤剂、癌症疫苗、佐剂及其组合、烷化剂、抗代谢药物、抗生素、植物类药物和/或激素类药物、铂类药物（如顺铂、卡铂、奥沙利铂）、阿霉素类、环磷酰胺、紫杉醇（如白蛋白紫杉醇、脂质体紫杉醇、多烯紫杉醇）、依托泊苷、吉西他滨、培美曲塞、卡培他滨、奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、长春碱类、他莫昔芬、甲地孕酮、戈舍瑞林、门冬酰胺酶和/或氟尿嘧啶类抗肿瘤药）；其中，所述抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体、组分 A 和化疗药分别单独包装。

16. 用于预防或治疗癌症或肿瘤的方法，其中，向有需要的受试者给予一份或多份项目 15 所述的单位制剂，优选地，所述单位制剂中的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，组分 A 和化疗药各自分开施用。

17. 单次药物剂量单元，优选用于治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤），其包含 0.1-10000mg（优选 1-1000mg，优选 50-500mg、100-400mg、

150-300mg、150-250mg、200mg或100mg)的项目1-10任一项所述的抗CTLA4抗PD-1双特异性抗体, 0.1-10000mg(优选1-1000mg, 优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg或100mg)的项目1-10任一项中定义的组分A。

18. 项目1-10任一项所述的抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体, 项目11所述的药物组合物, 项目12所述的应用, 项目13所述的方法, 项目14所述的试剂盒, 项目15所述的单位制剂, 或, 项目16所述的方法, 其中

所述肿瘤选自如下的一种或多种:

宫颈癌(如转移性宫颈癌)、肺癌如非小细胞肺癌(例如鳞状非小细胞肺癌或非鳞状非小细胞肺癌)、食管癌、食管鳞癌、回盲部腺癌、壶腹部腺癌、小细胞肺癌、胃癌(例如晚期胃癌、胃腺癌或胃食管结合部腺癌)、肾癌、肾癌子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、前列腺癌、甲状腺癌、腹膜癌、腺癌、胰腺癌、胶质瘤、头颈癌、骨癌、睾丸癌、白血病、骨髓瘤、淋巴瘤、肉瘤、间皮瘤、肝细胞癌、结肠癌、胆癌、胆管癌、直肠癌、结肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌(如晚期卵巢癌)或输卵管癌、大细胞神经内分泌癌、尿路上皮癌(例如上尿路上皮癌或膀胱癌)、乳腺癌、三阴乳腺癌、外周T细胞淋巴瘤、黑色素瘤、鼻咽癌, 以及高度微卫星不稳定型(MSI-H)或错配修复缺陷型(dMMR)实体瘤、脑癌(如侵袭性脑癌, 例如胶质母细胞瘤)、卵巢癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺瘤、粘液性或浆液性囊腺瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、绒毛膜上皮癌、恶性葡萄胎、恶性支持细胞-间质细胞瘤、恶性颗粒细胞瘤、无性细胞瘤。

19. 项目1-10任一项所述的抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体, 项目11所述的药物组合物, 项目12所述的应用, 项目13所述的方法, 项目14所述的试剂盒, 项目15所述的单位制剂, 或, 项目16所述的方法, 其中所述抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体, 组分A和/或所述化疗药为适于静脉注射或静脉滴注的形式, 优选液体的形式。

20. 根据项目13或16所述的方法, 其中, 所述给受试者施用有效量的抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体的步骤为在手术治疗之前或之后,

和/或在放射治疗之前或之后。

21. 根据项目13或16所述的方法，其中，

抗CTLA4抗PD-1双特异性抗体的单次给药剂量为每千克体重0.1-100mg，优选1-10mg；或者，抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体的单次给药剂量为每位受试者10-1000mg，优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg或100mg；

组分A的单次给药剂量为每千克体重0.1-100mg，优选1-10mg；或者，组分A的单次给药剂量为每位受试者10-1000mg，优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg或100mg，

优选地，每天两次至约每隔一天一次给药、或每3天、4天、5天、6天、10天、1周、2周或3周给药一次；

优选地，给药方式为静脉滴注或静脉注射。

在一些实施方案中，所述抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体、抗VEGFR2单克隆抗体或抗VEGF单克隆抗体以1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、21mg/kg、22mg/kg、23mg/kg、24mg/kg、25mg/kg体重的剂量施用。

在一些实施方案中，所述抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体、抗VEGFR2单克隆抗体或抗VEGF单克隆抗体以能够有效治疗所述癌症的一个或多个统一剂量施用。在一些具体实施方式中，所述统一剂量在大约1mg至大约1000mg的范围内。在一些具体实施方式中，所述统一剂量选自大约100mg、大约150mg、大约200mg、大约250mg、大约300mg、大约350mg、大约400mg、大约450mg、大约500mg、大约600mg、大约700mg、大约800mg、大约900mg、或大约1000mg。

在一些实施方案中，抗CTLA4-抗PD-1双特异性抗体、抗VEGFR2单克隆抗体或抗VEGF单克隆抗体的施用治疗以2周（14天）或3周（21天）为一个周期，优选在每个周期第一天（D1）静脉给予抗PD-1和CTLA4双特异性抗体。即，所述抗PD-1和CTLA4双特异性抗体以每两周一次（q2w）或者每三周一次（q3w）的频率施用。

本发明还提供抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体、抗 VEGFR2 单克隆抗体和抗 VEGF 单克隆抗体在制备用于治疗癌症的包括含有固定剂量的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体、抗 VEGFR2 单克隆抗体（或抗 VEGF 单克隆抗体）的容器的制品中的用途。在一些具体实施方式中，所述容器是安瓿瓶。所述固定剂量选自大约 10mg、大约 20 mg、大约 30 mg、大约 40 mg、大约 50 mg、大约 60 mg、大约 100 mg、大约 150 mg、大约 200 mg、大约 250 mg、大约 300 mg、大约 350mg、大约 400 mg、大约 500 mg、或大约 1000 mg。在一些具体实施方式中，所述制品进一步包括指导使用者为癌症病人施用所述固定剂量的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体、抗 VEGFR2 单克隆抗体或抗 VEGF 单克隆抗体的包装插页或药品说明书。在一些具体实施方式中，所述制品包括 1 个或 1 个以上的安瓿瓶，所述安瓿瓶含有大约 50 mg、100 mg、200 mg、300 mg、350 mg、400 mg、500 mg 或 600 mg 的、抗 VEGFR2 单克隆抗体或抗 VEGF 单克隆抗体。在一些具体实施方式中，所述制品以 50mg/5mL/瓶、100mg/10mL/瓶、200mg/10mL/瓶、或 350mg/35mL/瓶的抗 PD-1 和 CTLA4 双特异性抗体、抗 VEGFR2 单克隆抗体或抗 VEGF 单克隆抗体溶液的形式进行包装。

化疗药的用量是本领域的普通技术人员可以确定的。如对于铂类化疗药，以顺铂为例，顺铂的单次给药剂量按照 Calvert 公式计算：

顺铂剂量（mg）=所设定的曲线下的面积即 AUC（mg/ml/min）× [肌酐清除率（ml/min）+25]，其中，AUC 取值为 4-7，优选 5；

每 2-6 周给药一次，优选每 3 周或每 4 周给药一次；

和/或

给药方式为静脉滴注或静脉注射。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述化疗剂或生长抑制剂选自烷化剂、蒽环类、抗激素剂、芳香酶抑制剂、抗雄激素剂、蛋白激酶抑制剂、脂质激酶抑制剂、反义寡核苷酸、核酶、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒剂或抗肿瘤抗生素、蛋白酶体抑制剂、抗微管剂、EGFR 拮抗剂、VEGF 拮抗剂、血管生成素 2 拮抗剂、类视色素、酪氨酸激酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其组合。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述靶向治疗剂选自 B-raf 抑制剂、MEK 抑制剂、K-ras 抑制剂、c-Met 抑制剂、Alk 抑制剂、磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂、Akt 抑制剂、mTOR 抑制剂、VEGF 抑制剂、PARP 抑制剂、双磷脂酰肌醇 3-激酶/mTOR 抑制剂及其组合。

在本发明的一个或多个实施方案中，所述抗体-药物缀合物包含选自下组的药物：美登新碱、单甲基 auristatin E、加利车霉素、esperamicin 和放射性同位素螯合剂。

本发明中，一些表述具有如下含义：

药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗上有效的剂量”是当单独使用或与另一种治疗剂联合使用时保护主体免于疾病发作或促进疾病消退的药物的任何量，所述疾病消退通过疾病症状的严重程度的降低、无疾病症状阶段的频率和持续时间的增加、或由疾病折磨引起的损伤或失能的预防来证明。使用熟练的从业人员已知的多种方法可以评价治疗剂的促进疾病消退的能力，诸如在临床试验期间在人主体中，在预测对于人类的效力的动物模型系统中，或通过在体外测定法中测定所述药剂的活性。

药物的“预防有效量”是指，其为当单独地或与抗肿瘤剂联合施用给处于发生癌症的风险的主体（例如，具有恶化前病症的主体）或具有癌症复发的风险的主体时，抑制癌症的发生或复发的任何药物量。在某些实施方案中，预防有效量完全阻止癌症的发生或复发。“抑制”癌症的发生或复发是指减少癌症的发生或复发的可能性，或完全阻止癌症的发生或复发。

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

“复发性”癌症是在对初始治疗（例如手术）产生应答后，在初始部位或远处部位再生的癌症。“局部复发性”癌症是在治疗后，在与先前治疗的癌症相同的位置出现的癌症。

“转移性”癌症是指从身体的一部分（例如肺部）扩散到身体的另一部分的癌症。

轻链和重链的可变区决定抗原的结合：每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区（CDR）（重链(H)的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链(L)的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3；其由 Kabat 等人命名，见 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), 第 1-3 卷, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md）。在已知抗体重链和轻链可变区序列的情况下，目前有多种确定抗体 CDR 区的方法，包括 Kabat, IMGT, Chothia 和 AbM 编号系统。然而，每种关于抗体或其变体的 CDR 的定义的应用都将在本文定义和使用的术语的范围内。如果给定该抗体的可变区氨基酸序列，则本领域技术人员通常可确定特定 CDR，而不依赖于该序列自身之外的任何实验数据。

药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗上有效的剂量”是当单独使用或与另一种治疗剂联合使用时保护主体免于疾病发作或促进疾病消退的药物的任何量，所述疾病消退通过疾病症状的严重程度的降低、无疾病症状阶段的频率和持续时间的增加、或由疾病折磨引起的损伤或失能的预防来证明。使用熟练的从业人员已知的多种方法可以评价治疗剂的促进疾病消退的能力，诸如在临床试验期间在人主体中，在预测对于人类的效力的动物模型系统中，或通过在体外测定法中测定所述药剂的活性。

药物的“预防有效量”是指，其为当单独地或与抗肿瘤剂联合施用给处于发生癌症的风险的主体（例如，具有恶化前病症的主体）或具有癌症复发的风险的主体时，抑制癌症的发生或复发的任何药物量。在某些实施方案中，预防有效量完全阻止癌症的发生或复发。“抑制”癌症的发生或复发是指减少癌症的发生或复发的可能性，或完全阻止癌症的发生或复发。

“复发性”癌症是在对初始治疗（例如手术）产生应答后，在初始部

位或远处部位再生的癌症。“局部复发性”癌症是在治疗后，在与先前治疗的癌症相同的位置出现的癌症。

“转移性”癌症是指从身体的一部分（例如肺部）扩散到身体的另一部分的癌症。

术语“单次药物剂量单元”表示在给药方案时刻，（优选按照受试者每 kg 体重）待给药于受试者的包含本发明所述的抗 CTLA4 抗 PD-1 双特异性抗体、抗 VEGFR2 抗体或抗 VEGF 抗体的单次药物剂型，如注射剂，例如置于安瓿瓶中。在本发明的具体实施方案中，给药方案例如包括根据每天两次至约每隔一天一次的给药周期来给药单次药物剂量单元，或者每 3 天、4 天、5 天、6 天、10 天、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周或 6 周给药一次。

在本发明中，如果没有特别说明，所述“第一”（例如第一蛋白功能区、第一连接片段）和“第二”（例如第二蛋白功能区、第二连接片段）是为了指代上的区分或表述上的清楚，并不具有典型的次序上的含义。

附图说明

图 1. 混合淋巴细胞反应 MLR 检测抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体 Cadonilimab 与抗 VEGFR2 抗体 HpL3 联用促 INF- γ 分泌的生物活性检测结果。

图 2. 混合淋巴细胞反应 MLR 检测 Cadonilimab 联合贝伐珠单抗促 PBMC 活化分泌 IL-2 的生物活性检测结果。

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，但是本领域技术人员将会理解，下列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条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

在本发明的下述实施例中，所用到同型对照抗体 anti-HEL 为靶向人抗鸡蛋溶酶体 (HEL) 的抗体，这些抗体的可变区序列来自于 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.其中重链可变区序列为 SEQ ID No:45 所示,轻链可变区序列如 SEQ ID NO:47 所示), hIgG1WT (即 anti-HEL) 的恒定区片段采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857 作为重链恒定区 (SEQ ID NO:46), Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834 为轻链恒定区 (SEQ ID NO:48); anti-HEL 为在中山康方生物医药有限公司实验室制备而成。

实施例中所使用的贝伐珠单抗(Bevacizumab, 抗 VEGF 单克隆抗体)为罗氏制药生产的商品化药物。

制备例 1: 抗 CTLA4 的抗体的序列设计

抗 CTLA4 的抗体 4G10 及其人源化抗体 4G10H1L1、4G10H3L3 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 4G10、4G10H1L1、4G10H3L3 相同。

(1) 4G10 的重链可变区序列和轻链可变区序列

重链可变区的核酸序列: (372 bp, SEQ ID NO: 1)

其编码的氨基酸序列: (124 aa, SEQ ID NO: 2)

轻链可变区的核酸序列: (378 bp, SEQ ID NO: 3)

其编码的氨基酸序列: (126 aa, SEQ ID NO: 4)

(2) 人源化单克隆抗体 4G10H1L1 的重链可变区序列和轻链可变区序列

重链可变区 (4G10H1V) 的核酸序列: (345 bp, SEQ ID NO: 5)

其编码的氨基酸序列: (115 aa, SEQ ID NO: 6)

轻链可变区 (4G10L1V) 的核酸序列: (327 bp, SEQ ID NO: 7)

其编码的氨基酸序列: (109 aa, SEQ ID NO: 8)

(3) 人源化单克隆抗体 4G10H3L3 的重链可变区序列和轻链可变区序列

重链可变区 (4G10H3V) 的核酸序列: (345bp, SEQ ID NO:9)

其编码的重链可变区氨基酸序列 (4G10H3V): (115 aa, SEQ ID

NO: 10)

轻链可变区 (4G10L3V) 的核酸序列: (327 bp, SEQ ID NO: 11)

其编码的氨基酸序列 (4G10L3V): (109 aa, SEQ ID NO: 12)

制备例 2: 抗 PD-1 的抗体 14C12 及其人源化抗体 14C12H1L1 的序列设计

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

重链可变区的核酸序列: (354 bp, SEQ ID NO: 13)

其编码的氨基酸序列: (118 aa, SEQ ID NO: 14)

轻链可变区的核酸序列: (321 bp, SEQ ID NO: 15)

其编码的氨基酸序列: (107 aa, SEQ ID NO: 16)

(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

重链可变区的核酸序列: (354 bp, SEQ ID NO: 17)

其编码的氨基酸序列: (118 aa, SEQ ID NO: 18)

轻链可变区的核酸序列: (321 bp, SEQ ID NO: 19)

其编码的氨基酸序列: (107 aa, SEQ ID NO: 20)

14C12H1L1 重链 (14C12H1) 的 DNA 序列: (1344 bp, SEQ ID NO: 21)

其编码的氨基酸序列: (448 aa, SEQ ID NO: 22)

14C12H1L1 轻链 (14C12L1) 的 DNA 序列: (642 bp, SEQ ID NO: 23)

其编码的氨基酸序列: (214 aa, SEQ ID NO: 24)

制备例 3: 双功能抗体 CP001(M)、CP002(M)、CP003(M)和 CP004(M)的序列设计

双功能抗体 CP001(M)、CP002(M)、CP003(M)和 CP004(M)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 端均通过连接片段连接另一个抗体的 scFv 片段，其重链和轻链的设计组成如下面的表 A。

表 A：CP001(M)、CP002(M)、CP003(M)和 CP004(M)的序列设计

双 功 能 抗 体	免疫球蛋白部分		连接片段	scFv 部分
	重链	轻链		
CP001(M)	14C12H1	14C12L1	Linker1	4G10H1V(M)- Linker2 -4G10L1V(M)
CP002(M)	14C12H1	14C12L1	Linker2	4G10H1V(M)- Linker2 -4G10L1V(M)
CP003(M)	14C12H1	14C12L1	Linker1	4G10H3V(M)- Linker2 -4G10L3V(M)
CP004(M)	14C12H1	14C12L1	Linker2	4G10H3V(M)- Linker2 -4G10L3V(M)

上面的表 A 中：

Linker1 的氨基酸序列为(GGGGS)3 （SEQ ID NO: 25）

Linker2 的氨基酸序列为(GGGGS)4 （SEQ ID NO: 26）

另外，上述的表 A 中，CP001(M)、CP002(M)、CP003(M)和 CP004(M)抗体的 scFv 片段中的 4G10H1V(M)、4G10L1V(M)、4G10H3V(M)、4G10L3V(M)是分别在 4G10H1V、4G10L1V、4G10H3V、4G10L3V 基础上对其骨架区中个别氨基酸进行了突变，有效地优化了抗体的结构，提高了其有效性。

（1）4G10H1V(M)：（115 aa，基于 4G10H1V 所做的氨基酸序列突变位点用下划线标出，SEQ ID NO: 41）

（2）4G10L1V(M)：（110 aa，基于 4G10L1V 所做的氨基酸序列突变位点用下划线标出，SEQ ID NO: 42）

（3）4G10H3V(M)：（115 aa，基于 4G10H3V 所做的氨基酸序列突变位点用下划线标出，SEQ ID NO: 43）

（4）4G10L3V(M)：（110 aa，基于 4G10L3V 所做的氨基酸序列突变位点用下划线标出，SEQ ID NO: 44）

为了与下述的突变后的抗体相区分，在本发明实施例中 CP004(M) 亦称为 CP004(hG1WT)。上述的 CP004(M) 作为“野生型”，其采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCSSION: P01857 作为重链恒定区， Ig kappa chain C region, ACCSSION: P01834 为轻链恒定区。

制备例 4: 基于人源化双功能抗体 CP004 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 CP004(hG1WT) 的基础上，通过在其重链的第 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)，第 237 号位点引进了甘氨酸到丙氨酸的点突变 (G237A)，获得了 CP004(hG1TM)。

CP004(hG1TM) 中的免疫球蛋白部分的重链的 DNA 序列：(1344 bp, 突变位点用下划线标出，SEQ ID NO: 39)

CP004(hG1TM) 中的免疫球蛋白部分的重链的氨基酸序列：(448 aa, 突变位点用下划线标出，SEQ ID NO: 40)

CP004(hG1TM) 和 CP004(hG1WT) 轻链的 DNA 序列相同，其编码的氨基酸序列也相同，具体序列见制备例 3。

制备例 5: 抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体 Cadonilimab 的制备

抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体 Cadonilimab (即 CP004(hG1TM)) 的结构模式属于 Morrison 模式 (IgG-scFv)，即在一个免疫球蛋白部分 (IgG) 抗体的两条重链的 C 端均通过连接片段连接另一个抗体的 scFv 片段的 VH 端，其免疫球蛋白部分基于 PD-1 抗体，scFv 片段基于抗 CTLA-4 抗体，中间由连接片段链接。

本实施例所述的抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体 Cadonilimab 抗体 (即 CP004(hG1TM)) 轻链序列 (SEQ ID NO: 72) 和重链序列 (SEQ ID NO: 70) 序列来源于 WHO Drug Information, Proposed INN: List 124 (WHO Drug Information, 2020; 34(4) : 947-949)，制备方法如下述。

将候选单克隆抗体的重链编码基因的 DNA 序列，包括恒定区和可变区，和轻链编码基因的 DNA 序列，包括恒定区和可变区，分别克隆到 pUC57simple (金斯瑞公司提供) 载体中，分别获得 pUC57simple-H, pUC57simple-L 质粒。

分别将以上质粒进行酶切 (HindIII&EcoRI)，电泳回收得到的重链、

轻链分别亚克隆到表达载体 pcDNA3.1 中（购自 Invitrogen 公司），提取重组质粒，按 pcDNA3.1-H + pcDNA3.1-L 进行组合共转染 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，使用蛋白纯化液相色谱系统（AKTA Purifier 10，GE）进行纯化。

将纯化后的样品，即抗体 Cadonilimab，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，还原型蛋白样品目标蛋白在 70kD 和 30KD 处，非还原型蛋白样品（单个抗体）目标蛋白在 200kD 处。与理论大小符合，由此得到纯化的抗体。

制备例 6：抗 VEGFR2 抗体 HpL3 的制备

本实施例所述的抗 VEGFR2 抗体 HpL3 的抗体轻链可变区和重链可变区序列及制备方法均引自申请号为 CN201610573836.X 的专利《一类抗血管内皮生长因子受体 VEGFR2 的单克隆抗体及其编码基因和应用》。

HpL3 的重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示，其编码基因的 DNA 序列如 SEQ ID NO:49 所示，重链可变区 CDR1-3 的序列分别如 SEQ ID NO:53-55 所示。

HpL3 的轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示，其编码基因的 DNA 序列如 SEQ ID NO: 51 所示，轻链可变区 CDR1-3 的序列分别如 SEQ ID NO:56-58 所示。

HpL3 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

将候选单克隆抗体的重链编码基因的 DNA 序列，包括恒定区和可变区，和轻链编码基因的 DNA 序列，包括恒定区和可变区，分别克隆到 pUC57simple（金斯瑞公司提供）载体中，分别获得 pUC57simple-PCABH，pUC57simple-L3 质粒。

分别将以上质粒进行酶切（HindIII&EcoRI），电泳回收得到的重链、轻链分别亚克隆到表达载体 pcDNA3.1 中（购自 Invitrogen 公司），提取重组质粒，按 pcDNA3.1-PCABH + pcDNA3.1-L3 进行组合共转染 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，使用蛋白纯化液相色谱系统（AKTA Purifier 10，GE）进行纯化。

将纯化后的样品，即抗体 HpL3，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，还原型蛋白样品目标蛋白在 45kD 和 30kD 处，非还原型蛋白样品（单个抗体）目标蛋白在 150kD 处。与理论大小符合，由此得到纯化的单克隆抗体。

实施例 1. 混合淋巴细胞反应 MLR 检测抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体 Cadonilimab 与抗 VEGFR2 抗体 HpL3 联用促 $\text{INF-}\gamma$ 分泌的生物活性

Raji-PDL1 细胞的制备：

人 PD-L1 过表达慢病毒载体 plenti6.3/V5-PDL1FL-BSD 经病毒包装后感染 Raji 细胞，经 10ug/ml BSD（杀稻瘟菌素，Blasticidin）加药筛选后，获得抗药性细胞株 Raji-PDL1。plenti6.3/V5-PDL1FL-BSD 由供应商南京金斯瑞合成基因 PDL1FL（PDL1，Genebank ID: NP_054862.1），然后通过酶切连接到 plenti6.3/V5-BSD（Invitrogen 货号 k531520）上获得。

实验前两天，复苏 PBMC（分离自正常人外周血），完全培养基培养于 37℃，5%二氧化碳培养箱；2h 后，待 PBMC 状态恢复，添加 SEB（终浓度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）（Toxin technology，货号：BT202）刺激两天；实验当天，收集 Raji-PDL1 细胞，离心重悬计数（用 1640+10%FBS 重悬），调整细胞密度至 $2 \times 10^6/\text{mL}$ ，加入 MMC（Mito-mycin C，终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，丝裂霉素 C，厂家：Stressmarq，货号：SIH-246）于 37℃，5%二氧化碳培养箱处理 1 小时；收集 SEB 刺激两天后的 PBMC 以及 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞，用 1640 基础培养基洗涤两次，完全培养基重悬细胞计数，按 PBMC $1 \times 10^5/\text{孔}$ 、Raji-PDL1 $1 \times 10^5/\text{孔}$ （各 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ）接种到 96 孔 U 型板中（3799）；按实验设计加药，并设置空白对照和阴性对照，共培养 3 天（体系终体积为 200 μL ）；3 天后，250xg 离心 5min（Beckman 离心机），收集细胞上清，达科为试剂盒检测 $\text{INF-}\gamma$ 含量。

如图 1 所示，在 PBMC、Raji-PDL1 细胞混合培养体系中，加入 Cadonilimab 和 HpL3 抗体均能显著诱导 PBMC 进一步分泌 $\text{INF-}\gamma$ ，具有显著剂量依赖关系，促 $\text{INF-}\gamma$ 分泌活性水平方面，与 Cadonilimab 和 HpL3 抗体单药相比，Cadonilimab 和 HpL3 联用具有更佳的促 $\text{INF-}\gamma$ 分泌潜能。

实施例 2. 混合淋巴细胞反应 MLR 检测 Cadonilimab 联合贝伐珠单抗促 PBMC 活化分泌 IL-2 的生物活性

实验前两天，复苏 PBMC（分离自健康志愿者知情同意后自愿捐献的外周血），完全培养基培养于 37℃，5%二氧化碳培养箱；2h 后，待 PBMC 状态恢复，添加 SEB（终浓度 0.5μg/mL）（Toxin technology，货号：BT202）刺激两天；实验当天，收集 Raji-PDL1（康方生物构建）细胞，离心重悬计数（用 1640+10%FBS 重悬），调整细胞密度至 2×10^6 /mL，加入 MMC（Mito-mycin C，终浓度为 2μg/mL）（丝裂霉素 C，厂家：Stressmarq，货号：SIH-246）于 37℃，5%二氧化碳培养箱处理 1 小时；收集 SEB 刺激两天后的 PBMC 以及 MMC 处理后的 Raji-PDL1 细胞，用 1640 基础培养基洗涤两次，分析培养基重悬细胞计数，按 PBMC 1×10^5 /孔、Raji-PDL1 1×10^5 /孔（各 40μL/孔）接种到 96 孔 U 型板中（3799）；常规消化收集 HeLa 细胞（购自中国科学院），按 2×10^4 /孔（40μL/孔）接种到 96 孔 U 型板中（3799）；按实验设计加药，并设置阴性对照和同型对照，共培养 3 天（体系终体积为 200μL）；3 天后，250xg 离心 5min（Beckman 离心机），收集细胞上清，达科为试剂盒检测 IL-2 含量。

如图 2 所示，在 PBMC、Raji-PDL1、HeLa（宫颈癌）细胞以及 VEGF（批号：20180126-1，康方生物生产）的混合培养体系中，加入 Cadonilimab 和贝伐珠单抗均能显著诱导 PBMC 进一步分泌 IL-2，具有显著剂量依赖关系，促 IL-2 分泌活性水平方面，与 Cadonilimab 和贝伐珠单抗单药相比，Cadonilimab 和贝伐珠单抗联用具有更佳的促 IL-2 分泌潜能。

贝伐珠单抗的重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:60 所示，其编码基因的 DNA 序列如 SEQ ID NO:59 所示，重链可变区 CDR1-3 的序列分别如 SEQ ID NO:63-65 所示。贝伐珠单抗的轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 62 所示，其编码基因的 DNA 序列如 SEQ ID NO: 61 所示，轻链可变区 CDR1-3 的序列分别如 SEQ ID NO:66-68 所示。

序列表：

SEQ ID No.1: 4G10重链可变区的核酸序列

caggctcaagctgcaggagctctggacctgagctggtgaagcctggagcttcaatgaagatatcctgcaaggctctggttact
cattcactggctacacatgaactgggtgaagcagagccatggaaagaaccttgaatggattggacttattaatcctacaataatatta
ctaactacaaccagaagttcatgggcaaggccacattactgtagacaagtcacccagcacagcctacatggaactcctcagactgac
atctgaagactctggagctatttctgtgcaagactcgactataggtcttattggggccaagggaactctggtcactgtctctgcagccaa
aacgacacccccatctgtct at

SEQ ID No.2: 4G10 重链可变区的氨基酸序列

QVKLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLIN
PYNNTNYNQKFMGKATFTVDKSSSTAYMELLRLTSEDSGVYFCARLDYRSYWGQG
TLVTVSAAKTTPPSVY

SEQ ID No.3: 4G10 轻链可变区的核酸序列

caggctgttgtgactcaggaatctgcactcaccacatcacctggtgaacagtcacactcactgtcgctcaagtactggggc
tgttacaactagtaacttggcaactgggtccaagaaaaaccagatcatttactactgtctaataggtggtaccaacaaccgagctcc
aggtgttctgccagattctcaggctccctgattggagacaaggctgccctcaccatcacaggggcacagactgaggatgaggcaa
tatatttctgtgctctatggtacagcaaccattgggtgttcggtggaggaaactgactgtcctaggccagcccaagtcttcgccat
cagtcacctgtttcaagggaattctgc

SEQ ID No.4: 4G10 轻链可变区的氨基酸序列

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNFANWVQEKPDHLFTSLIGGTN
NRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG
QPKSSPSVTLFQGQFC

SEQ ID No.5: 4G10H1L1 重链可变区的核酸序列

caggctgcagctggtggagctctggggccgagctggtgaagcccgccgctccatgaagatctcttgaaggccagcggat
acagtttactggctataccatgaactgggtcaaacaggctccaggacagggaactggagtgatcgggctgattaatccttacaaca
acatcaccaactacaaccagaagttcatgggaaaagcaacctttacagtggacaagagcatttccacagcctacatggaactgagcc
ggctgacttcagacgatagcgggtctattttgtgcaaggctggattatcgtcttactgggggcagggaaactctggtcactgtctcc
gct

SEQ ID No.6: 4G10H1L1 重链可变区的氨基酸序列

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQGLEWIGLIN
PYNNTNYNQKFMGKATFTVDKSISTAYMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQG

TLVTVSA

SEQ ID No.7: 4G10H1L1 轻链可变区的核酸序列

caggctgctgctcactcaggaaccttcactgactgtgagcccaggaggaactgtcacctgacatgcggaagctccaccgg
agcagtgaccacatccaacttcgccaattgggtccaggaaaagccaggccaggcatttcgatccctgatcggaggcacaacaatc
gggcttctgggtgcccgaagattctcaggaagcctgtggtgggggaaaagccgctctgaccattagtgcgctcagcctgaggac
gaagccgagtacttctgcgctctgtgtatagcaaccactgggtgttggcggggaacaagctgactgtgctg

SEQ ID No.8: 4G10H1L1 轻链可变区的氨基酸序列

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNPFANWVQKPGQAFRSLIGGT
NNRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTV
L

SEQ ID No.9: 4G10H3L3 重链可变区的核酸序列

caggctgcagctggtcagctctggggccgaagtgaagaaccggcgccctcagtgaggtcagctgcaaggccagcggg
tacagtttctggtatatacatgaactgggtccgacaggcccttgccaggggctgagtggtatcgccctgattaaccttacaac
aacatcactaactacgcacagaagtccaggggagagtacctttacagtgacaccagcatttcacagcctac
atggaactgtcccgctgagatctgacgatacaggcgtgtacttctgcgctaggctggattaccgcagctattggggacagggcaca
ctggtgactgtcagcgca

SEQ ID No.10: 4G10H3L3 重链可变区的氨基酸序列

QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYSTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLI
NPYNNITNYAQKFQGRVFTFTVDTISITAYMELSRRLSDDTGVIYFCARLDYRSYWGQ
GTLVTVSA

SEQ ID No.11: 4G10H3L3 轻链可变区的核酸序列

caggctgctgctcactcaggaaccttcactgaccgtgtctcctggcgaggactgtcacctgacatgcggcagctccacaggg
gccgtgaccacaagtaacttccaaattgggtccagcagaagccaggacaggctccccggagtctgatcggaggcaccacaaca
aggccagctggacaccgcacggttcagcggcagcctgtggcgggcaaggccgctctgacaattagcggagcccagcctgag
gacgaagccgagtactattgcgctctgtgtactccaaccactgggtgttcggcgggcgccaccaagctgactgtgctg

SEQ ID No.12: 4G10H3L3 轻链可变区的氨基酸序列

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNFPNWWVQKPGQAPRSLIGGT
NNKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTV
L

SEQ ID No.13: 14C12 重链可变区的核酸序列

gaggtcaaactggtggagagcggcgggcggtggtgaagcccgcggtcactgaaactgagctgcgccgtccggc
ttgccttagctcctacgacatgtcatgggtgaggcagaccctgagaagcgctggaatgggtcgctactatcagcggaggcgg
gcgatacactactatcctgactctgtcaaaggagattcacaattagtcgggataacgccagaaatactctgtatctgcagatgtcta
gtctgcgggtccgaggatacagctctgtactattgtgcaaaccggtacggcgaagcatggttgcctattggggacagggcaccctgg
tgacagtctctgcc

SEQ ID No.14: 14C12 重链可变区的氨基酸序列

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAWFAYW
GQGTLVTVSA

SEQ ID No.15: 14C12 轻链可变区的核酸序列

gacattaagatgacacagtccttctcaatgtacgtagcctggcgagcagtgaccttcacatgcaaagcatccag
gacatcaacacatacctgtcttggttcagcagaagccaggcaaaagcccaagaccctgatctaccggccaatagactggtgga
cggggtcccgagcagattctccgatctggcagtgggcaggattactccctgaccatcagctccctggagatgaagacatgggcag
ctactattgcctgcagatgatgagttccctctgaccttggagcaggcacaaaactggaactgaag

SEQ ID No.16: 14C12 轻链可变区的氨基酸序列

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRL
VDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID No.17: 14C12H1L1 重链可变区的核酸序列

gaagtgcagctggtcgagctctgggggagggtggtgcagcccgcggtcactgcgactgagctgcgcagctccggat
tcgccttagctcctacgacatgtcctgggtgcgacaggcaccaggaaaggactggattgggtcgctactatctcaggaggcggg
agatacactactatcctgacagcgtcaaggccggttcacaatctctagagataacagtaagaacaatctgtatctgcagatgaaca
gcctgagggtgaggacaccgactgtactattgtccaaccgctacggggaagcatggttgcctattgggggcagggaaccctg
gtgacagtctctagt

SEQ ID No.18: 14C12H1L1 重链可变区的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATIS
GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAY
WGQGLVTVSS

SEQ ID No.19: 14C12H1L1 轻链可变区的核酸序列

gacattcagatgactcagagccctcctccatgtccgcctctgtggcgacagggtcaccttcacatgccgcgctagtcagg
atatcaacacctacctgagctgggttcagcagaagccagggaaaagccccaagacactgatctaccgggctaataactggtgtctg
gagtcccaagtcggttcagtggtcagggagcggacaggactacactctgacctcagctccctgcagcctgaggacatggcaac
ctactattgcctgcagatgatgagttccactgaccttggcgccgggacaaaactggagctgaag

SEQ ID No.20: 14C12H1L1 轻链可变区的氨基酸序列

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANR
LVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID No.21: 14C12H1L1 重链 (14C12H1) 的 DNA 序列 (1344 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCCGGCGGGTC
ACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTGCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCC
TGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGA
GGCGGGAGATACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTA
GAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGG
ACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTG
GGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGACCTAGCGT
GTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGG
ATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGG
CGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACT
CTATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT
GGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGA
ACTCCTCGGAGGCCCTAGCGTCTTCTCTTTCTCTCCCAAACCAAGGACACCTC
ATGATCAGCAGAACCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAG
GACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCC
AAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGT
GCTGACAGTCCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TGTTCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAG
GCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTCA
CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCAGCGACAT
CGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCC
TCCTGTCTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC
AAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGC
CCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

SEQ ID No.22: 14C12H1L1 重链 (14C12H1) 编码的氨基酸序列 (448 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVAT
ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAW
FAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No.23: 14C12H1L1 轻链 (14C12L1) 的 DNA 序列 (642 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCG
ACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGC
TGTTTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTA
ATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACA
GGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACT
ATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTG
GAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGA
CGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTC
TACCCTAGAGAGGCCAAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGTCCG
GCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTC
CCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGT
ATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTT
AACCGGGGCGAATGT

SEQ ID No.24: 14C12H1L1 轻链 (14C12L1) 编码的氨基酸序列 (214 aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRA
NRLVSGVPSRFSGSGSQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID No.25: Linker1 的氨基酸序列

GGGSGGGSGGGGS

SEQ ID No.26: Linker2 的氨基酸序列

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS

SEQ ID No.27: 14C12 的 HCDR1: GFAFSSYD

SEQ ID No.28: 14C12 的 HCDR2: ISGGGRYT

SEQ ID No.29: 14C12 的 HCDR3: ANRYGEAWFAY

SEQ ID No.30: 14C12 的 LCDR1: QDINTY

SEQ ID No.31: 14C12 的 LCDR2: RAN

SEQ ID No.32: 14C12 的 LCDR3: LQYDEFPLT

SEQ ID No.33: 4G10 的 HCDR1: GYSFTGYT

SEQ ID No.34: 4G10 的 HCDR2: INPYNNIT

SEQ ID No.35: 4G10 的 HCDR3: ARLDYRSY

SEQ ID No.36: 4G10 的 LCDR1: TGA VTTSNF

SEQ ID No.37: 4G10 的 LCDR2: GTN

SEQ ID No.38: 4G10 的 LCDR3: ALWYSNHWV

SEQ ID No.39: CP004(hG1TM) 的免疫球蛋白部分的重链的 DNA 序列, 突变位点用下划线标出

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTC
ACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTGCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCC
TGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGA
GGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTA
GAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGG
ACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTG
GGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGGCCAGCG
TGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCG
GATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCG

GCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGAC
TCTATTCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGA
CCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG
TGGAGCCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCTGTCTCCCG
AAGCTGCTGGAGCCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCTCCCAAACCCAAGGACACCCT
CATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAG
GACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCC
AAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGT
GCTGACAGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TGTCACAAGGCTCTCCCTGCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAG
GCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTCA
CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCAGCGACAT
CGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCGAGAATAACTACAAGACCACCCC
TCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC
AAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGC
CCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAA

SEQ ID No.40: CP004(hG1TM) 中的免疫球蛋白部分的重链的氨基酸序列, 突变位点用下划线标出

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVAT
ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAW
FAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT V L H Q D W L N G K E Y K
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No.41: 4G10H1V(M) 的氨基酸序列, 突变位点用下划线标出

QVQLVESGAELVKPGASMKISKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQCLEWIGL
INPYNNITNYNQKFMGKATFTVDKSISTAYMELSRLTSDDSGVYFCARLDYRSY
WGQGT LVT VSA

SEQ ID No.42: 4G10L1V(M) 的氨基酸序列, 突变位点用下划线标出

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFANWVQEPGQAFRSLIGG
TNNRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWFGCGTK

LTVLR

SEQ ID No.43: 4G10H3V(M) 的氨基酸序列, 突变位点用下划线标出

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIG
LINPYNNITNYAQKFQGRVTFTVDTISISTAYMELSRLRSDDTG VYFCARLDYRSY
WGQGT L V T V S A

SEQ ID No.44: 4G10L3V(M) 的氨基酸序列, 突变位点用下划线标出

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIG
GTNNKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGT
K L T V L R

SEQ ID No: 45: hIgG 的重链可变区序列

EVQLEQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFTTYWIEWIKRPGHSLEWIGEILPG
SDSTYYNEKVKGKVFTADASSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGFYVYWGQG
TTLTVSS

SEQ ID No: 46 hIgG 的重链恒定区序列

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID No: 47 hIgG 的轻链可变区序列

DIELTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSM
SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSGSWPRTFGGGTKLTDIK

SEQ ID No: 48 hIgG 的轻链恒定区序列

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID No: 49 HpL3 重链可变区的核酸序列 (VEGFR2)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGGGGACTGGTGAAGCCCGGCGGGT
CCCTGCGACTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTCAGCTCCTACTCTATGAA
CTGGGTGAGACAGGCCCTGGAAGGCCTGGAGTGGGTCTCTAGTATCTCAAG

CTCCTCTAGTTACATCTACTATGCCGACAGCGTGAAGGGGCGGTTACCATCTCA
AGAGATAACGCTAAAAATAGTCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAA
GACACTGCCGTGTACTATTGTGCTCGCGTCACCGACGCATTTGATATTTGGGGGC
AGGGAACCATGGTGACAGTCTCAAGC (注：下划线表示 CDR 序列)

SEQ ID No: 50 HpL3 重链可变区的氨基酸序列

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSY
IYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGTMTVT
VSS (注：下划线表示 CDR 序列)

SEQ ID No: 51 HpL3 轻链可变区的核酸序列

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCTTCAGTGTCCGCCTCTATCGGCGACC
GGGTCACCATACATGCAGAGCTTCCAGGGCCTCGATAACTGGCTGGGGTGGTA
CCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCCCCAAAGCTGCTGATCTACGACGCTTCCAATCT
GGATACCGGAGTGCCATCTCGATTAGTGGCTCAGGGAGCGGAACATACTTTACT
CTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCTGAGGACTTCGCAGTGTATTTTGCCAGCAGG
CAAAGGCCTTCCCTCCACCTTTGGCGGGGGAACAAAAGTGGACATCAAG (注：
下划线表示 CDR 序列)

SEQ ID No: 52 HpL3 轻链可变区的氨基酸序列

DIQMTQSPSSVSASIGDRVITICRASQGLDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYDASN
LDTGVPSRFSGSGSGTYFTLTISLQAEDFAVYFCQQAKAFPPTFGGGTKVDIK (注：
下划线表示 CDR 序列)

HpL3 重链可变区的 HCDR1-HCDR3

HCDR1 : GFTFSSYS (SEQ ID NO : 53)

HCDR2 : ISSSSSYI (SEQ ID NO : 54)

HCDR3 : ARVTDAFDI (SEQ ID NO : 55)

HpL3 轻链可变区的 LCDR1-LCDR3

LCDR1 : QGLDNW (SEQ ID NO : 56)

LCDR2 : DAS (SEQ ID NO : 57)

LCDR3 : QQA KAFPPT (SEQ ID NO : 58)

SEQ ID No: 59 Bevacizumab 重链可变区的核酸序列 (VEGF)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCTCT
GAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATGAATTGG
GTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCAACACTTA
CACCGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTG

GATACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGAC
ACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTA
TTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGC

SEQ ID No: 60 Bevacizumab 重链可变区的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTY
TGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYF
DVWGQGTLLTVSS

SEQ ID No: 61 Bevacizumab 轻链可变区的核酸序列

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGG
TCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACCTACCTGAATTGGTATCAG
CAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCAC
TCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTG
ACCATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTC
TACCGTGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAG

SEQ ID No: 62 Bevacizumab 轻链可变区的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGV
PSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIK

Bevacizumab 重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO: 63)

HCDR2: INTYTGEF (SEQ ID NO: 64)

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO: 65)

Bevacizumab 轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO: 66)

LCDR2: FTS (SEQ ID NO: 67)

LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO: 68)

SEQ ID No.69 CP004(hG1TM)重链的核酸序列

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGACAGCCCGCGGGTCACT
GCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTG
GGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAG
GCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTA
GAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGGCTGAG
GACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTAT
TGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGTgccagcaccaaggccagcgtgttctctc

gccccctctccaaaagcaccagcggaggaaccgctgctctcggatgtctggtgaaggactactccctgaaccggtcacctgag
ctggaatagcggcgctctgacaagcggagtcctacattccctgctgtgctgcaaagcagcggactctattccctgtccagcgtcgtc
acagtgtcccagcagcagcctgggcacccagacctacatctgtaacgtcaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaaa
gtggagcccaaatcctgcgacaagacacacacctgtccccctgtcctgctcccgaaGCTGCTggagCccctagcgtcttct
cttctctccaaacccaagacacctcatgatcagcagaaccctgaagtcacctgtgctgctggtgagtgatgacccatgaggacc
cgaggtgaaattcaactggtatgtcgtggtgaggtgcacaacgcaaaaccaagcccaggagggaacagtacaactccacc
tacagggtggtgtcctgctgacagtcctccaccaggactgggtgaacggcaaggagtacaagtgaaggtgtccaacaaggctct
ccctgccccattgagaagaccatcagcaaggccaaaggccaaccaggaggagccccaggtctatactgcctccctccaggagg
gaactcaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtcaagggttttatcccagcgacatcgccgtcagtgaggagtgcaacgg
acagcccgagaataactacaagaccacctctgtcctcgactccgacggctccttctctgtacagcAAACTGACCGT
GGATAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCATGTTCCGTGATGCACGA
GGCACTGCACAACCACTATAACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTACCAAGGAAAAGG
AGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGCGGAAGTGGAGGCGGAGGATCAGGAGGGGGA
GGATCTCAGGTGCAGCTGGTCGAATCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCGC
TTCCGTGAAGGTCTCTTGCAAAGCATCAGGCTACAGCTTCACAGGGTATACTAT
GAACTGGGTGCGGCAGGCACCTGGACAGTGTCTGGAATGGATCGGCCTGATTA
ACCCATACAACAACATCACTAATACTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCCGGGTGACTT
TTACCGTGGACACTAGCATTTCCACCGCTTACATGGAGCTGAGTCGGCTGAGAT
CAGACGATACCGGCGTGTATTTTTGCGCAAGGCTGGATTACAGAAGTTATTGGG
GACAGGGAACACTTGTTACAGTCTCTGCTGGAGGAGGCGGATCTGGAGGAGGA
GGATCTGGCGGAGGAGGCAGTGGAGGAGGAGGATCACAGGCTGTGGTTACTCA
GGAACCAAGCCTGACCGTGAGCCCCGGAGGCACAGTCACTCTGACCTGTGGGA
GCTCCACAGGAGCTGTGACCACATCTAACTTCCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGC
CAGGACAGGCACCTCGATCCCTGATCGGGGGAACCAACAACAAGGCCAGCTGG
ACACCCGCCAGATTTTCTGGCAGTCTGCTGGGCGGGAAGCCGCTCTGACCATT
AGCGGCGCTCAGCCTGAGGACGAAGCAGAGTACTATTGCGCCCTGTGGTATAGT
AATCATTGGGTGTTTCGGGTGTGGGACAAAACCTGACCGTGCTGAGA

SEQ ID No.70 CP004(hG1TM)重链的氨基酸序列（全长）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATIS
GGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFA
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKS

LSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYS
FTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINPYNNITNYAQKFQGRVTFTVDTSTAYMELS
RLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLTVTSAGGGSGGGSGGGSGGGSGQAV
VTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNEPNWVQQKPGQAPRSLIGGTNNKASW
TPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR (注: 下
划线表示 CDR 序列)

SEQ ID No.71 CP004(hG1TM) 轻链的核酸序列

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGG
GTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTT
CAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACT
GGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACA
CTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGC
AGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAGC
GAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAA
ATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGC
AAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGA
GTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGA
CTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACAC
ATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT

SEQ ID No.72 CP004(hG1TM) 轻链的氨基酸序列 (全长)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSG
VPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSLTTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

权 利 要 求

1. 抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，其优选用于治疗肿瘤，优选所述抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体与组分 A 联合施用，所述组分 A 选自抗 VEGFR2 单克隆抗体或其抗原结合片段，抗 VEGF 单克隆抗体或其抗原结合片段，或其组合，

其中

(1)所述抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 CTLA4 的第二蛋白功能区；

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，其包含 SEQ ID NO:14 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 27—29 所示的 HCDR1—HCDR3），和 SEQ ID NO:16 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 30—32 所示的 LCDR1—LCDR3）；和所述的单链抗体，其包含 SEQ ID NO:2 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 33—35 所示的 HCDR1—HCDR3）和 SEQ ID NO:4 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 36—38 所示的 LCDR1—LCDR3）；

或者，

所述的免疫球蛋白，其包含 SEQ ID NO:2 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 33—35 所示的 HCDR1—HCDR3）和 SEQ ID NO:4 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 36—38 所示的 LCDR1—LCDR3）；和所述的单链抗体，其包含 SEQ ID NO:14 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3（优选分别如 SEQ ID NOs: 27—29 所示的 HCDR1—HCDR3），和 SEQ

ID NO:16 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3 (优选分别如 SEQ ID NOs: 30-32 所示的 LCDR1-LCDR3) ;

(2) 所述抗 VEGFR2 单克隆抗体包含 SEQ ID NO:50 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3 (优选分别如 SEQ ID NOs: 53-55 所示的 HCDR1-HCDR3) 和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3 (优选分别如 SEQ ID NOs: 56-58 所示的 LCDR1-LCDR3) ; 或

(3) 所述抗 VEGF 单克隆抗体包含 SEQ ID NO:60 所示的重链可变区中的 HCDR1-HCDR3 (优选分别如 SEQ ID NOs: 63-65 所示的 HCDR1-HCDR3) 和 SEQ ID NO:62 所示的轻链可变区中的 LCDR1-LCDR3 (优选分别如 SEQ ID NOs: 66-68 所示的 LCDR1-LCDR3) 。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体, 其中,

(1) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体; 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: 16、SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体; 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: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44 所示的序列或其变体;

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: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体; 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: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44 所示的序列或其变体; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体; 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: 16、SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体;

(2) 所述抗 VEGFR2 单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为

SEQ ID NO: 50 所示的序列或其变体；并且所述抗 VEGFR2 单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 52 所示的序列或其变体；或

(3) 所述抗 VEGF 单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 60 所示的序列或其变体；并且所述抗 VEGF 单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 62 所示的序列或其变体，

其中所述变体的序列与对应序列具有至少 60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少 99% 同源性。

3. 根据权利要求 1 至 2 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，其中，所述双特异性抗体选自如下的 (1) — (20) 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为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4 所示的序列或其变体；

(2) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其变体；

(3) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12 所示的序列或其变体；

(4) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18

所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体;和,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 所示的序列或其变体,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4 所示的序列或其变体;

(5)所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体;和,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6 所示的序列或其变体,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其变体;

(6)所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示序列或其变体;和,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 所示的序列或其变体,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12 所示的序列或其变体;

(7)所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4 所示的序列或其变体;和,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体;

(8)所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 4 所示的序列或其变体;和,所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体,并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体;

(9)所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6 所示的序列或其变体,并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列

为 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；

(10) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体；

(11) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；

(12) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 12 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体；

(13) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 41 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42 所示的序列或其变体；

(14) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸

序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 44 所示的序列或其变体；

(15) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 41 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42 所示的序列或其变体；

(16) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 44 所示的序列或其变体；

(17) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 41 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 42 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；

(18) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 44 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 14 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 16 所示的序列或其变体；

(19) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 41 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸

序列为 SEQ ID NO: 42 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体；

以及，

(20) 所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 43 所示的序列或其变体，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 44 所示的序列或其变体；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 18 所示的序列或其变体，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列或其变体，

其中所述变体的序列与对应序列具有至少 60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少 99% 同源性。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，其中，

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 40 所示的序列或其变体，并且其轻链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 24 所示的序列或其变体，其中所述变体的序列与对应序列具有至少 60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少 99% 同源性。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，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。

6. 根据权利要求 5 所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，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。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 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。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，其中，所述单链抗体（优选重链可变区）连接在免疫球蛋白的重链，优选连接在免疫球蛋白重链的 C 末端。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，其中，

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 A 突变，所述 A 突变选自如下突变组合之一：

L234A 和 L235A；或者

L234A 和 G237A；或者

L235A 和 G237A；或者

L234A、L235A、G237A；或者

按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有 B 突变，所述 B 突变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；或者

或者，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有 A 突变和 B 突变的组合；

所述抗 VEGFR2 单克隆抗体或所述抗 VEGF 单克隆抗体的重链恒定区为 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION P01857，轻链恒定区为：Ig kappa chain C region，ACCESSION: P01834。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，

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 CTLA4 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: 40 或与其具有至少 60%，70%，80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%同源性的序列所示，并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 或与其具有至少 60%，70%，80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%同源性的序列所示；

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 或与其具有至少 60%，70%，80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%同源性的序列所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 或与其具有至少 60%，70%，80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%同源性的序列所示；

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: 25 和 SEQ ID NO: 26；

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: 26 所示，

优选地，所述抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体轻链序列如 SEQ ID NO: 72 所示，重链序列如 SEQ ID NO: 70 所示，

优选地，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、Fab/c、互补决定区（CDR）片段、单链抗体（例如，scFv）、双价抗体或

结构域抗体。

11. 药物组合物，用于治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤），其包含有效量的权利要求 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体和权利要求 1-10 任一项中定义的组分 A，优选地，抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体和组分 A 的质量比选自（1：5）-（5：1），例如：1：5、1：4、1：3、1：2、1：1、2：1、3：1、4：1 或 5：1；优选所述药物组合物为固体形式或液体形式，任选地，所述药物组合物还包含一种或多种化疗药物（优选所述化疗药为烷化剂，抗代谢药物，抗生素，植物类药物和/或激素类药物，铂类药物如顺铂、卡铂、奥沙利铂，阿霉素类，环磷酰胺，紫杉醇（如白蛋白紫杉醇，脂质体紫杉醇，多烯紫杉醇），依托泊苷，吉西他滨，培美曲塞，卡培他滨，奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利，长春碱类，他莫昔芬，甲地孕酮，戈舍瑞林，门冬酰胺酶和/或氟尿嘧啶类抗肿瘤药）。

12. 权利要求 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体在制备用于预防和/或治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤）的药物或试剂盒中的应用，优选所述药物或试剂盒还包含权利要求 1-10 任一项中定义的组分 A，任选地，所述药物或试剂盒还包含一种或多种用于治疗肿瘤的药物（优选所述药物为化疗剂或生长抑制剂（如烷化剂、蒽环类、抗激素剂、芳香酶抑制剂、抗雄激素剂、蛋白激酶抑制剂、脂质激酶抑制剂、反义寡核苷酸、核酶、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒剂或抗肿瘤抗生素、蛋白酶体抑制剂、抗微管剂、EGFR 拮抗剂、VEGF 拮抗剂、血管生成素 2 拮抗剂、类视色素、酪氨酸激酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其组合），靶向治疗剂（如 B-raf 抑制剂、MEK 抑制剂、K-ras 抑制剂、c-Met 抑制剂、Alk 抑制剂、磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂、Akt 抑制剂、mTOR 抑制剂、VEGF 抑制剂、PARP 抑制剂、双磷脂酰肌醇 3-激酶/mTOR 抑制剂及其组合）、抗体-药物缀合物（如美登新碱、单甲基 auristatin E、加利车霉素、esperamicin 和放射性同位素螯合剂）、表达嵌合抗原受体的 T 细胞、抗体或其抗原结合片段、血管生成抑制剂、抗肿瘤剂、癌症疫苗、佐剂及其组合、烷化剂、抗代谢药物、抗生素、植物类药物和/或激素类药物、铂类药物(如顺铂、卡铂、奥沙利铂)、阿霉素类、环磷酰胺、紫

杉醇、白蛋白紫杉醇、脂质体紫杉醇、多烯紫杉醇、依托泊苷、吉西他滨、培美曲塞、卡培他滨、奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、长春碱类、他莫昔芬、甲地孕酮、戈舍瑞林、门冬酰胺酶和/或氟尿嘧啶类抗肿瘤药）。

13. 预防和/或治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤）的方法，包括给受试者施用治疗有效量的权利要求 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，联合施用权利要求 1-10 任一项中定义的组分 A，更优选地，进一步联合施用一种或多种用于治疗肿瘤的药物（优选所述药物为化疗剂或生长抑制剂（如烷化剂、蒽环类、抗激素剂、芳香酶抑制剂、抗雄激素剂、蛋白激酶抑制剂、脂质激酶抑制剂、反义寡核苷酸、核酶、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒剂或抗肿瘤抗生素、蛋白酶体抑制剂、抗微管剂、EGFR 拮抗剂、VEGF 拮抗剂、血管生成素 2 拮抗剂、类视色素、酪氨酸激酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其组合），靶向治疗剂（如 B-raf 抑制剂、MEK 抑制剂、K-ras 抑制剂、c-Met 抑制剂、Alk 抑制剂、磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂、Akt 抑制剂、mTOR 抑制剂、VEGF 抑制剂、PARP 抑制剂、双磷脂酰肌醇 3-激酶/mTOR 抑制剂及其组合）、抗体-药物缀合物（如美登新碱、单甲基 auristatin E、加利车霉素、esperamicin 和放射性同位素螯合剂）、表达嵌合抗原受体的 T 细胞、抗体或其抗原结合片段、血管生成抑制剂、抗肿瘤剂、癌症疫苗、佐剂及其组合、烷化剂、抗代谢药物、抗生素、植物类药物和/或激素类药物、铂类药物（如顺铂、卡铂、奥沙利铂）、阿霉素类、环磷酰胺、紫杉醇（如白蛋白紫杉醇、脂质体紫杉醇、多烯紫杉醇）、依托泊苷、吉西他滨、培美曲塞、卡培他滨、奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、长春碱类、他莫昔芬、甲地孕酮、戈舍瑞林、门冬酰胺酶和/或氟尿嘧啶类抗肿瘤药），优选地，所述抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体、所述组分 A 和肿瘤化疗药物同时或顺序施用。

14. 试剂盒，用于预防和/或治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤），其含有（a）第一药物组合物，含有权利要求 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体作为活性成分；和（b）第二药物组合物，其中含有权利要求 1-10 任一项中定义的组分 A 作为活性成分；和任选地(c)

一种或多种用于治疗肿瘤的药物（优选所述药物为化疗剂或生长抑制剂（如烷化剂、蒽环类、抗激素剂、芳香酶抑制剂、抗雄激素剂、蛋白激酶抑制剂、脂质激酶抑制剂、反义寡核苷酸、核酶、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒剂或抗肿瘤抗生素、蛋白酶体抑制剂、抗微管剂、EGFR 拮抗剂、VEGF 拮抗剂、血管生成素 2 拮抗剂、类视色素、酪氨酸激酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其组合）、靶向治疗剂（如 B-raf 抑制剂、MEK 抑制剂、K-ras 抑制剂、c-Met 抑制剂、Alk 抑制剂、磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂、Akt 抑制剂、mTOR 抑制剂、VEGF 抑制剂、PARP 抑制剂、双磷脂酰肌醇 3-激酶/mTOR 抑制剂及其组合）、抗体-药物缀合物（如美登新碱、单甲基 auristatin E、加利车霉素、esperamicin 和放射性同位素螯合剂）、表达嵌合抗原受体的 T 细胞、抗体或其抗原结合片段、血管生成抑制剂、抗肿瘤剂、癌症疫苗、佐剂及其组合、烷化剂、抗代谢药物、抗生素、植物类药物和/或激素类药物、铂类药物(如顺铂、卡铂、奥沙利铂)、阿霉素类、环磷酰胺、紫杉醇（如白蛋白紫杉醇，脂质体紫杉醇，多烯紫杉醇）、依托泊苷、吉西他滨、培美曲塞、卡培他滨、奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、长春碱类、他莫昔芬、甲地孕酮、戈舍瑞林、门冬酰胺酶和/或氟尿嘧啶类抗肿瘤药）。

15. 单位制剂，优选用于治疗肿瘤（特别是恶性肿瘤），其中，所述单位制剂包含：1~10000mg（优选 10-1000mg，优选 50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg 或 200mg）的权利要求 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，1~10000mg(优选 1-1000mg，优选 50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg 或 100mg) 的权利要求 1-10 任一项中定义的组分 A 和任选地一种或多种用于治疗肿瘤的药物（优选所述药物为化疗剂或生长抑制剂（如烷化剂、蒽环类、抗激素剂、芳香酶抑制剂、抗雄激素剂、蛋白激酶抑制剂、脂质激酶抑制剂、反义寡核苷酸、核酶、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒剂或抗肿瘤抗生素、蛋白酶体抑制剂、抗微管剂、EGFR 拮抗剂、VEGF 拮抗剂、血管生成素 2 拮抗剂、类视色素、酪氨酸激酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其组合）、靶向治疗剂（如 B-raf 抑制剂、MEK 抑制剂、K-ras 抑制剂、c-Met 抑制剂、Alk 抑制剂、磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂、Akt 抑制

剂、mTOR 抑制剂、VEGF 抑制剂、PARP 抑制剂、双磷脂酰肌醇 3-激酶/mTOR 抑制剂及其组合)、抗体-药物缀合物(如美登新碱、单甲基 auristatin E、加利车霉素、esperamicin 和放射性同位素螯合剂)、表达嵌合抗原受体的 T 细胞、抗体或其抗原结合片段、血管生成抑制剂、抗肿瘤剂、癌症疫苗、佐剂及其组合、抗代谢药物、抗生素、植物类药物和/或激素类药物、铂类药物(如顺铂、卡铂、奥沙利铂)、阿霉素类、环磷酰胺、紫杉醇(如白蛋白紫杉醇、脂质体紫杉醇、多烯紫杉醇)、依托泊苷、吉西他滨、培美曲塞、卡培他滨、奥拉帕利、芦卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、长春碱类、他莫昔芬、甲地孕酮、戈舍瑞林、门冬酰胺酶和/或氟尿嘧啶类抗肿瘤药);其中,所述抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体、组分 A 和化疗药分别单独包装。

16. 用于预防或治疗癌症或肿瘤的方法,其中,向有需要的受试者给予一份或多份权利要求 15 所述的单位制剂,优选地,所述单位制剂中的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体,所述组分 A 和化疗药各自分开施用。

17. 单次药物剂量单元,优选用于治疗肿瘤(特别是恶性肿瘤),其包含 0.1-10000mg(优选 1-1000mg,优选 50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg 或 100mg)的权利要求 1-10 任一项所述的抗 CTLA4 抗 PD-1 双特异性抗体,0.1-10000mg(优选 1-1000mg,优选 50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg 或 100mg)的权利要求 1-10 任一项中定义的组分 A。

18. 权利要求 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体,权利要求 11 所述的药物组合物,权利要求 12 所述的应用,权利要求 13 所述的方法,权利要求 14 所述的试剂盒,权利要求 15 所述的单位制剂,或,权利要求 16 所述的方法,其中

所述肿瘤选自如下的一种或多种:

宫颈癌(如转移性宫颈癌)、肺癌如非小细胞肺癌(例如鳞状非小细胞肺癌或非鳞状非小细胞肺癌)、食管癌、食管鳞癌、回盲部腺癌、壶腹部腺癌、小细胞肺癌、胃癌(例如晚期胃癌、胃腺癌或胃食管结合部腺癌)、肾癌、肾癌子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、前列腺癌、甲状腺癌、腹

膜癌、腺癌、胰腺癌、胶质瘤、头颈癌、骨癌、睾丸癌、白血病、骨髓瘤、淋巴瘤、肉瘤、间皮瘤、肝细胞癌、结肠癌、胆癌、胆管癌、直肠癌、结肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌（如晚期卵巢癌）或输卵管癌、大细胞神经内分泌癌、尿路上皮癌（例如上尿路上皮癌或膀胱癌）、乳腺癌、三阴乳腺癌、外周 T 细胞淋巴瘤、黑色素瘤、鼻咽癌，以及高度微卫星不稳定型（MSI-H）或错配修复缺陷型（dMMR）实体瘤、脑癌（如侵袭性脑癌，例如胶质母细胞瘤）、卵巢癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺瘤、粘液性或浆液性囊腺瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、绒毛膜上皮癌、恶性葡萄胎、恶性支持细胞-间质细胞瘤、恶性颗粒细胞瘤、无性细胞瘤。

19. 权利要求 1-10 任一项所述的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，权利要求 11 所述的药物组合物，权利要求 12 所述的应用，权利要求 13 所述的方法，权利要求 14 所述的试剂盒，权利要求 15 所述的单位制剂，或，权利要求 16 所述的方法，其中所述抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体，所述组分 A 和/或所述化疗药为适于静脉注射或静脉滴注的形式，优选液体的形式。

20. 根据权利要求 13 或 16 所述的方法，其中，所述给受试者施用有效量的抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体的步骤为在手术治疗之前或之后，和/或在放射治疗之前或之后。

21. 根据权利要求 13 或 16 所述的方法，其中，

抗 CTLA4 抗 PD-1 双特异性抗体的单次给药剂量为每千克体重 0.1-100mg，优选 1-10mg；或者，抗 CTLA4-抗 PD-1 双特异性抗体的单次给药剂量为每位受试者 10-1000mg，优选 50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg 或 200mg；

组分 A 的单次给药剂量为每千克体重 0.1-100mg，优选 1-10mg；或者，组分 A 的单次给药剂量为每位受试者 10-1000mg，优选 50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg、200mg 或 100mg，

优选地，每天两次至约每隔一天一次给药，或每 3 天、4 天、5 天、6 天、10 天、1 周、2 周、3 周、4 周、5 周或 6 周给药一次；

优选地，给药方式为静脉滴注或静脉注射。