

一种双特异性抗体及其应用

技术领域

[01] 本发明涉及抗体领域,具体涉及一种靶向 PD-1 和 VEGF 的双特异性抗体及其应用。

5 背景技术

[02] 程序性死亡受体 1 (programmed death receptor-1, PD-1) 属于免疫球蛋白 CD28/B7 超家族,为免疫抑制性受体。PD-1 与 PD-L1 结合时,通过发生磷脂酰肌醇-3-激酶的磷酸化、蛋白激酶 B 的进一步激活、刺激性 T 细胞信号通路的活化、葡萄糖代谢以及干扰素的分泌等,导致 T 细胞活化的下游信号受阻,进而有效抑制 T 细胞的转录,最终抑制 T 细胞的免疫功能,在免疫应答的负性调控方面发挥着重要作用。由于 PD-1 抗体的广谱抗肿瘤药效,目前已经上市了多款重磅药物,如在 2014 年 12 月 22 日于美国获批的 O 药(商品名:Opdivo;通用名:Nivolumab),其首批适应症为黑色素瘤,随后非小细胞肺癌、肾细胞癌、霍奇金淋巴瘤、头颈部鳞状细胞癌、结直肠癌、肝细胞癌、尿路上皮癌、10 结直肠癌、肝细胞癌、食道癌、食管鳞状细胞癌、胸膜间皮瘤、食道腺癌、胃食管交界处癌、胃癌等适应症又相继在美国获批上市。但根据现有临床数据汇总(包括了来自 160 个临床的 28304 名患者数据)分析(文献 1: Efficacy of PD-1/PD-L1 blockade monotherapy in clinical trials, Bin Zhao, Hong Zhao, et al, Ther Adv Med Oncol. 2020 年,第 12 卷,1-22 页),总体上,在接受了 PD-1/PD-L1 15 单药治疗的 22165 名患者中共计 4747 名患者出现了治疗效果[客观缓解率(ORR), 20.21%; 95%置信区间(CI), 18.34-22.15%]。在 19,418 名癌症患者中,总共观察到 862 例完全缓解(CR)。CR 的总发生率为 3.85% (95%CI, 3.06-4.73%)。并且 ORR 在不同的癌症类型和 PD-L1 表达状态下有显著差异。也就是说与 PD-1/PD-L1 单药治疗相关的疗效在不同的癌症类型和 PD-L1 表达上 20 有很大的差异并且还存在巨大的未满足的临床需求。

[03] 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 又称血管通透因子(vascular permeability factor, VPF), 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子, 具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用, 有资料表明, VEGF 在病理性血管生成中发挥着重要作用, 能够诱导某些病理的发生和进展, 如肿瘤的生长和转移、黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、炎症过程(如类风湿关节炎)、缺血过程(心肌缺血)、子痫前期等(文献 2: Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. Yamazaki Y., Morita T., Mol. Divers. 2006 年 11 月, 第 10 卷第 4 期, 第 515-527 页)。与血管内皮生长因子进行特异性结合的高亲和力受体称为血管内皮生长因子受体(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, VEGFR), 其是一种酪氨酸激酶受体, 在血管生成和细胞迁移所必需的许多信号转导途径中发挥关键作用, 其与 VEGF 结合后启动信号级联进而刺激血管的生成, 因此, VEGF/VEGFR 是一个十分重要的靶点, 因为它们几乎只在内皮细胞中表达, 并且在许多肿瘤内皮类型中高度上调。目前, 在癌症或其他病理过程中, 使用抗 VEGF/VEGFR 疗法阻断血管生成被认为是极其重要的。抑制血管内皮生长因子/血管内皮生长因子受体是目前治疗部分癌症(如肾细胞癌、肝细胞癌等)的主要治疗方法。

[04] 现阶段有多项临床试验正在探索血管内皮生长因子/血管内皮生长因子受体和免疫检查点抑制剂在联合阻断癌症治疗中的安全性和有效性。有一些前期研究表明, 与单纯的 VEGFR 抑制或免疫抑制相比, 联合应用免疫检查点抑制剂和 VEGFR 抑制剂治疗患者可能获得较好的治疗效果 (<https://www.obroncology.com/article/combining-immune-checkpoint-and-vegf-inhibitors-improves-survival-in-pretreated-nsclc>), 然而, 这种有利结果所带来的风险是尚不清楚的(文献 3: Combining Immune Checkpoint and VEGFR Inhibition in Favorable Risk and Elderly Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. Varkaris A, Xu W, Davis RB, Healy B, McDermott DF. Clin Genitourin Cancer. 2020 年 6 月, 第 18 卷第 3 期, 第 179-184 页)。在一些 VEGFR/ICI 双重阻断的临床试验中(如派姆单抗(pembrolizumab)/帕唑帕尼(pazopanib)联合组、纳武单

抗 (nivolumab) /舒尼替尼 (sunitinib) 联合组、纳武单抗 (nivolumab) /帕唑帕尼 (pazopanib) 联合组等), 其在早期临床研究阶段均表现出了良好的治疗效果 (文献 4: A Phase I/II Study to Assess the Safety and Efficacy of Pazopanib and Pembrolizumab Combination Therapy in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. Chowdhury S, Infante JR, et al. Clin Genitourin Cancer. 2021 rh 10 月, 第 19 卷第 5 期, 第 434-446 页。文献 5: Nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558, ONO-4538) in combination with sunitinib or pazopanib in patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). Amin, A. et al. Journal of Clinical Oncology. 32, (suppl.), 2014 年 5 月 20 日, 摘要 5010), 然而在后续的高剂量组中却出现了严重的毒副作用。在纳武单抗/舒尼替尼联合组和纳武单抗/帕唑帕尼联合组中, 分别有 73%和 60%的患者经历了 3 级或更严重的治疗相关毒性。此外, 纳武单抗/舒尼替尼联合组中还出现了 23%的不良事件, 进而导致了治疗的中断, 纳武单抗/帕唑帕尼联合组中也出现了 20%的不良事件导致了治疗的中断。同样, 派姆单抗/帕唑帕尼联合组也出现了与高剂量相关的肝毒性, 这些组合均被认为不适合在 3 期试验中进行试验而被迫终止。另外, 在另一些 VEGFR/ICI 双重阻断的临床试验 (如贝伐珠单抗 (Bevacizumab) 联合阿替利珠单抗 (Atezolizumab) 的 III 期临床试验中 (文献 6: IMmotion151: a randomized phase III study of atezolizumab plus bevacizumab vs sunitinib in untreated metastatic renal cell carcinoma (mRCC), Motzer, R. J. et al. Journal of Clinical Oncology. 36, abstr. 578 (2018).)) 也报道了积极的疗效数据, 在该试验中, 患者的缓解率有所提高, 然而根据 MSKCC 的标准, 该临床试验中仅有 20%的意向治疗患者具有有利风险, 其主要原因在于联合治疗的同时也增加了患者的毒副作用。

[05]除了联合治疗的探索外, 目前也有多个以血管内皮生长因子/血管内皮生长因子受体和 PD-1 为靶点的双特异性抗体还在艰难探索中, 如中山康方生物医药有限公司的 AK112 (见中国专利申请 CN109053895), 但截止到目前, 全球尚无以血管内皮生长因子/血管内皮生长因子受体和免疫检查点为靶点的双特异性抗体获批上市, 仍存在具大的临床需求及开发挑战。

发明内容

[06] 本发明人通过创造性的研究，基于经过多轮筛选及优化后获得的靶向 VEGF 的 VHH，并以 VHH 为结合功能区模块元件，结合 PD-1 抗体，开发了一种靶向 PD-1 和 VEGF 的双特异性抗体，其包含：

5 [07] (a) 靶向 PD-1 的第一结合功能区；

[08] (b) 靶向 VEGF 的第二结合功能区；

[09] 其中：

[10] 所述靶向 PD-1 的第一结合功能区为抗 PD-1 的抗体 (Ab) 或抗原结合片段 (Ab') ；

10 [11] 所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区包含以下氨基酸序列所限定的 CDR1-3 的 VHH 域：

CDR1	SEQ ID NO: 1
CDR2	SEQ ID NO: 2 或与 SEQ ID NO: 2 相比具有 1 或 2 个氨基酸突变
CDR3	SEQ ID NO: 3

[12] 进一步的，所述的 CDR2 中的突变位点在第 58 位和/或 65 位。

[13] 进一步的，所述的 CDR2 中的突变为 N58Y 和/或 D65G 突变。

[14] 优选的，所述的 CDR2 中的突变为 N58Y 和 D65G 突变。

15 [15] 优选的，所述的 CDR2 突变后的氨基酸序列与 SEQ ID NO:24 所述的氨基酸序列一致。

[16] 优选的，所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区的 VHH 域的 CDR1-3 的组合为：

CDR1	SEQ ID NO: 1
CDR2	SEQ ID NO: 2
CDR3	SEQ ID NO: 3

或

CDR1	SEQ ID NO: 1
CDR2	SEQ ID NO: 24
CDR3	SEQ ID NO: 3

[17] 进一步的，所述的 VHH 域为人源化 VHH 域。

[18] 进一步的，所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区还包括：

1) 与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列具有 1 个或 2 个氨基酸突变的框架区结构域 FR1；和/或

2) 与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列具有 1 个氨基酸突变的框架区结构域 FR2；和/或

3) 与 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列具有 1-5 个氨基酸突变的框架区结构域 FR3；和/或

4) 与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列具有 1 个氨基酸突变的框架区结构域 FR4。

[19] 更进一步的，FR1 结构域中所述的 1 个或 2 个氨基酸突变在第 1 位和/或 5 位；进一步优选为 Q1E 和/或 Q5L 突变。

[20] 更进一步的，FR2 结构域中所述的 1 个氨基酸突变在第 49 位；进一步优选为 A49S 突变。

[21] 更进一步的，FR3 结构域中所述的 1-5 个氨基酸突变选自第 74 位，82B 位，83 位，84 位和 89 位中的 1 个或 2 个或 3 个或 4 个或 5 个；所述突变进一步优选自 D74S，V(82B)S，K83R，P84A 和 M89V 中的 1 位或 2 位或 3 位或 4 位或 5 位。

[22] 更进一步的，FR4 结构域中所述的 1 个氨基酸突变在第 108 位；所述突变进一步优选为 Q108L。

[23] 更进一步的，所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区还包括：

- 1) 与 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR1；和/或
- 2) 与 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR2；和/或
- 3) 与 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR3；和/或
- 4) 与 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR4。

[24] 进一步的，所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区包括以下氨基酸限定的框架区组合：

FR1	SEQ ID NO: 4
FR2	SEQ ID NO: 5
FR3	SEQ ID NO: 6
FR4	SEQ ID NO: 7

或

FR1	SEQ ID NO: 9
FR2	SEQ ID NO: 10
FR3	SEQ ID NO: 11
FR4	SEQ ID NO: 12

或

FR1	SEQ ID NO: 9
FR2	SEQ ID NO: 5
FR3	SEQ ID NO: 11
FR4	SEQ ID NO: 12

[25] 进一步的，所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区的氨基酸序列与 SEQ ID

[26] 进一步优选的, 所述突变选自以下突变组合:

突变组合 1	Q1E+Q5L+A49S+N58Y+D65G+D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V+Q108L
突变组合 2	Q1E+Q5L+N58Y+D65G+D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V+Q108L

[27] 进一步优选的, 所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列一致。

10 表 1 #6 号株 VHH 各结构区序列 (Kabat 系统)

CDR1 (SEQ ID NO: 1)	TSTMS
CDR2 (SEQ ID NO: 2)	FITSAGATTNYADSVKD
CDR3 (SEQ ID NO: 3)	LVTLWNVY
FR1 (SEQ ID NO: 4)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
FR2 (SEQ ID NO: 5)	WYRQAPGKERELVA
FR3 (SEQ ID NO: 6)	RFTMSRDNDKNTVYLQMNVLKPEDTAMYYCRA
FR4 (SEQ ID NO: 7)	WGQGTQVTVSS
#6 号株 VHH 序列 (SEQ ID NO: 8)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSTMSWYRQAPGKE RELVAFITSAGATTNYADSVKDRFTMSRDNDKNTVYLQMNVLKP EDTAMYYCRALVTLWNVYWGQGTQVTVSS

表 2 #48 号株 VHH 各结构区序列 (Kabat 系统)

CDR1 (SEQ ID NO: 1)	TSTMS
CDR2 (SEQ ID NO: 24)	FITSAGATTYYADSVKG
CDR3 (SEQ ID NO: 3)	LVTLWNVY

FR1 (SEQ ID NO: 9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
FR2 (SEQ ID NO: 10)	WYRQAPGKERELVS
FR3 (SEQ ID NO: 11)	RFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCRA
FR4 (SEQ ID NO: 12)	WGQGTLVTVSS
#48 号株 VHH 序列 (SEQ ID NO: 13)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSTMSWYRQAPGKE RELVSFITSAGATTYYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRA EDTAVYYCRALVTLWNVYWGQGTLVTVSS

表 3 #49 号株 VHH 各结构区序列 (Kabat 系统)

CDR1 (SEQ ID NO: 1)	TSTMS
CDR2 (SEQ ID NO: 24)	FITSAGATTYYADSVKG
CDR3 (SEQ ID NO: 3)	LVTLWNVY
FR1 (SEQ ID NO: 9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
FR2 (SEQ ID NO: 5)	WYRQAPGKERELVA
FR3 (SEQ ID NO: 11)	RFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCRA
FR4 (SEQ ID NO: 12)	WGQGTLVTVSS
#49 号株 VHH 序列 (SEQ ID NO: 14)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSTMSWYRQAPGKE RELVAFITSAGATTYYADSVKGRFTMSRDNSKNTVYLQMNSLRA EDTAVYYCRALVTLWNVYWGQGTLVTVSS

[28] 进一步的, 所述的抗 PD-1 的抗体 (Ab) 或抗原结合片段 (Ab') 为人源化抗体或抗原结合片段、嵌合抗体或抗原结合片段、人抗体或抗原结合片段。

5 [29] 进一步的, 所述的抗 PD-1 的抗体 (Ab) 或抗原结合片段 (Ab') 为 IgG 类抗体。

[30] 更进一步的, 所述的抗 PD-1 的抗体 (Ab) 或抗原结合片段 (Ab') 类型为 IgG1、IgG2、或 IgG4。

10 [31] 进一步的, 所述靶向 PD-1 的第一结合功能区具有与纳武单抗 (Nivolumab, Opdivo) 或帕博利珠单抗 (Pembrolizumab, Keytruda) 单抗相同的轻链和/或重链 CDR 氨基酸序列。

- [32] 进一步的,所述靶向PD-1的第一结合功能区具有与纳武单抗(Nivolumab, Opdivo)或帕博利珠单抗(Pembrolizumab, Keytruda)抗体相同的重链可变区氨基酸序列。
- [33] 进一步的,所述靶向PD-1的第一结合功能区具有与纳武单抗(Nivolumab, Opdivo)或帕博利珠单抗(Pembrolizumab, Keytruda)抗体相同的轻链可变区氨基酸序列。
- [34] 进一步的,所述的靶向PD-1的第一结合功能区的重链部分还包括重链恒定区CH1结构域(CH1)、铰链区(Hinge)、重链恒定区CH2结构域(CH2)、重链恒定区CH3结构域(CH3)中的一个或者多个。
- [35] 进一步的,所述的靶向PD-1的第一结合功能区还包括轻链恒定区结构域(CL)。
- [36] 进一步的,所述的抗PD-1的抗体包括重链部分和轻链部分,其中所述的重链部分从N端到C端依次包括重链可变区结构域(VH)、重链恒定区CH1结构域(CH1)、铰链区(Hinge)、重链恒定区CH2结构域(CH2)、重链恒定区CH3结构域(CH3),且所述的轻链部分从N端到C端依次包括轻链可变区结构域(VL)和轻链恒定区结构域(CL)。
- [37] 进一步的,所述抗PD-1的抗体的Fc结构域(即铰链区、重链恒定区CH2结构域、重链恒定区CH3结构域)为IgG1Fc结构域或其沉默型IgG1突变。
- [38] 进一步的,所述的Fc结构域与SEQ ID NO: 15所示的氨基酸序列一致或与SEQ ID NO: 15所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性氨基酸序列。

表4 Fc结构域氨基酸序列

SEQ ID NO: 15	EPKSCDKTHT CPPCPAPEAE GAPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF	60
	NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPSSIEKT	120
	ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT	180
	PVLDSDGSEF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP G	231

[39] 进一步的,所述靶向PD-1的第一结合功能区具有选自如下氨基酸序列的

轻链和重链组合：

1) 与 SEQ ID NO：16 所示的氨基酸序列一致的重链；和/或与 SEQ ID NO：17 所示的氨基酸序列一致的轻链；或

2) 与 SEQ ID NO：18 所示的氨基酸序列一致的重链；和/或与 SEQ ID NO：19 所示的氨基酸序列一致的轻链。

表 5 第一结合功能区优选氨基酸序列

SEQ ID NO：16	QVQLVESGGG VVQPGRSRLR DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRY	60
	ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLLV VSSASTKGPS	120
	VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFFAVL QSSGLYSLSS	180
	VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA EGAPSVFLFP	240
	PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS	300
	VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS	360
	LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS	420
	CSVMHEALHN HYTQKSLSL PG	442
SEQ ID NO：17	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQK QAPRLLIYD ASNRATGIPA	60
	RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQ SSNWPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP	120
	SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT	180
	LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE	214
SEQ ID NO：18	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF	60
	NEKFKNRVTL TTDSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFYD GQGTITVTVSS	120
	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFFAVLQSS	180
	GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAEGA	240
	PSVFLFPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300
	STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE	360
	MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW	420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG	449
SEQ ID NO：19	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QKPGQAPRL LIYLASYLES	60
	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAV YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF	120
	IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL	180
	STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC	218

[40] 进一步的，所述第二结合功能区结合在所述第一结合功能区的 C 端或 N 端。

[41] 进一步的，所述的 VHH 域直接或者通过肽接头连接与所述抗体(Ab)或抗原结合片段(Ab')重链部分的 C 端或者 N 端。

[42] 进一步的，所述的肽接头为柔性肽接头。

[43] 进一步的，所述的肽接头包含一个或多个氨基酸。

[44] 进一步的, 所述的肽接头包含至少 5 个氨基酸。

[45] 优选的, 所述的肽接头的氨基酸序列为: (GGGGS)_n, 其中所述 n 等于 1、2、3 或 4。

[46] 进一步的, 所述的双特异性抗体为二价、三价或四价双特异性抗体。

5 [47] 进一步的, 所述双特异性抗体包含如 SEQ ID NO: 20 所示的重链和如 SEQ ID NO: 21 所示的轻链组合或者包含如 SEQ ID NO: 22 所示的重链和如 SEQ ID NO: 23 所示的轻链组合。

表 6 优选的双抗氨基酸序列

● #10	
重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 20) :	
QVQLVESGGG VVQPGRSRLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY	60
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLLV VSSASTKGPS	120
VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS	180
VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA EGAPSVFLFP	240
PKPKDTLMIS RTPVTCVVV DVSLEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS	300
VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS	360
LTCLVKGFPY SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS	420
CSTMHEALHN HYTKSLSLS PGEVQLLESG GGLVQPGGSL RLSCAASGFT FSTSTMSWYR	480
QAPGKERELV SFITSAGATT YYADSVKGRF TMSRDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCRA	540
LVTLWNVYWG QGTLLTVSS	559
轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 21) :	
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA	60
RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP	120
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT	180
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	214
● #16	
重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 22) :	
QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF	60
NEKFKNRVTL TTDSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTITVTVSS	120
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS	180
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKHTCP PCPAPEAEGA	240
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE	360
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW	420
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTTFST	480
STMSWYRQAP GKERELVSFI TSAGATTYYA DSVKGRFTMS RDNSKNTVYL QMNSLRAEDT	540
AVYYCRALVT LWNVYWGQGT LVTVSS	566

轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 23) :		
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES	60	
GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF	120	
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS	180	
STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC	218	

[48] 本发明还涉及一种靶向 VEGF 的 VHH 域, 所述的 VHH 域包含以下氨基酸序列所限定的 CDR1-3:

CDR1	SEQ ID NO: 1
CDR2	SEQ ID NO: 2 或与 SEQ ID NO: 2 相比具有 1 或 2 个氨基酸突变
CDR3	SEQ ID NO: 3

[49] 进一步的, 所述的 CDR2 中的突变位点在第 58 位和/或 65 位。

[50] 再进一步的, 所述的 CDR2 中的突变为 N58Y 和/或 D65G 突变。

5 [51] 进一步的, 所述的 VHH 域为人源化 VHH 域。

[52] 进一步的, 所述的 VHH 域还包括:

1) 与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列具有 1 个或 2 个氨基酸突变的框架区结构域 FR1; 和/或

2) 与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列具有 1 个氨基酸突变的框架区结构域 FR2; 和/或

3) 与 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列具有 1-3 个氨基酸突变的框架区结构域 FR3; 和/或

4) 或与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列具有 1 个氨基酸突变的框架区结构域 FR4。

15 [53] 更进一步的, FR1 结构域中所述的 1 个或 2 个氨基酸突变在第 1 位和/或 5 位; 进一步优选为 Q1E 和/或 Q5L 突变。

[54] 更进一步的, FR2 结构域中所述的 1 个氨基酸突变在第 49 位; 进一步优选为 A49S 突变。

[55]更进一步的，FR3 结构域中所述的 1-5 个氨基酸突变选自第 74 位，82B 位，83 位，84 位和 89 位中的 1 个或 2 个或 3 个或 4 个或 5 个；所述突变进一步优选自 D74S，V(82B)S，K83R，P84A 和 M89V 中的 1 位或 2 位或 3 位或 4 位或 5 位。

5 [56]更进一步的，FR4 结构域中所述的 1 个氨基酸突变在第 108 位；所述突变进一步优选为 Q108L。

[57]更进一步的，所述的靶向 VEGF 的 VHH 域还包括：

1) 与 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR1；和/或

10 2) 与 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR2；和/或

3) 与 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR3；和/或

15 4) 与 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR4。

[58]进一步的，所述的 VHH 域包括以下氨基酸限定的框架区组合：

FR1	SEQ ID NO: 4
FR2	SEQ ID NO: 5
FR3	SEQ ID NO: 6
FR4	SEQ ID NO: 7

或

FR1	SEQ ID NO: 9
FR2	SEQ ID NO: 10
FR3	SEQ ID NO: 11
FR4	SEQ ID NO: 12

或

FR1	SEQ ID NO: 9
FR2	SEQ ID NO: 5
FR3	SEQ ID NO: 11
FR4	SEQ ID NO: 12

[59] 进一步的，所述 VHH 域的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列相比具有 1-11 个（1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个，10 个或 11 个）氨基酸位点突变。进一步的，所述突变位点优选自第 1、5、49、58、65、74、82B、83，84，89 或 108 位。进一步的，所述突变优选自 Q1E，Q5L，A49S，N58Y，D65G，D74S，V(82B)S，K83R，P84A，M89V，Q108L 中的 1-11 个（1 个，2 个，3 个，4 个，5 个，6 个，7 个，8 个，9 个，10 个或 11 个）。进一步优选的，所述突变选自以下突变组合：

突变组合 1	Q1E+Q5L+A49S+N58Y+D65G+D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V+Q108L
突变组合 2	Q1E+Q5L+N58Y+D65G+D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V+Q108L

[60] 进一步优选的，所述的 VHH 域的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列一致。

[61] 本发明还涉及所述的 VHH 域在构建重组蛋白中的应用。

[62] 本发明还涉及一种包括所述的靶向 VEGF 的 VHH 域的重组蛋白。

[63] 进一步的，所述重组蛋白包括双特异抗体、多特异性抗体、抗体药物偶联物。

[64] 本发明还涉及一种多核苷酸，所述的多核苷酸编码前述任一项所述的双特异性抗体、多特异抗体、重组蛋白或者 VHH 域。

[65] 本发明还涉及一种表达载体，所述的表达载体包含上述任一项所述的多核苷酸。

[66] 本发明还涉及一种宿主细胞，所述的宿主细胞包含上述任一项所述的表达载体，或其基因组中整合有上述任一项所述的多核苷酸。

[67] 本发明还涉及一种药物组合物，所述的药物组合物包含上述任一项所述的 VHH 域、双特异性抗体、多特异性抗体或重组蛋白及其药学上可接受的载体。

[68] 本发明还涉及上述任一项所述的双特异性抗体、多特异抗体、重组蛋白或者 VHH 域在制备治疗癌症的药物中的用途。

5 [69] 本发明还涉及一种治疗癌症的方法，其包括向有需要的受试者施用有效量的上述任一项所述的 VHH 域、或双特异性抗体、多特异性抗体或重组蛋白。

[70] 进一步的，上述任一项所述的用途或者治疗方法中，所述的癌症选自结肠直肠癌。

10 [71] 本发明所带来的有益效果为，本发明所筛选优化的靶向 VEGF 的 VHH 域结构稳定，热稳定性高，与人 VEGF-A 和小鼠 VEGF-A 均具有高的结合活性，利于同步在动物模型验证，从而提高药物开发成功率，同时具有高的蛋白表达及利于纯化等特点。本发明中基于该 VHH 域开发的双抗，具有独特的双抗结构形式，人源化程度高，不含有人工增加的多余序列，并且能够在高表达 VEGF 的肿瘤局部富集的潜力，从而更有针对性的发挥抑瘤效果，起到更为有效的肿瘤抑制效果，解决 PD-1/PD-L1 抑制剂药效不足的问题。

15

附图说明

[72] 图 1 多轮组合突变改造后抗体与 VEGF 结合情况；

[73] 图 2 双特异性抗体结构示意图；

[74] 图 3 待测抗体在 MLR 反应中释放白细胞介素 2 (IL-2) 量；

20 [75] 图 4 待测抗体在 MLR 反应中释放 γ 干扰素 (IFN- γ) 量；

[76] 图 5 待测抗体抑制 HUVEC 细胞增殖的相对抑制率；

[77] 图 6 待测抗体抑制 HUVEC 细胞的迁移；

[78] 图 7 ELISA 法定量经 VEGF 磁珠结合后剩余抗体的量；

[79] 图 8 待测抗体治疗小鼠荷瘤模型的肿瘤体积。

具体实施方式

【定义】

[80] 除非相反地特别说明，否则本发明的实践将采用本领域技术范围内的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和重组 DNA 技术的常规方法或与本发明
5 所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。其中许多出于说明性目的在下文进行描述，此类技术在文献中作出了充分地说明。

[81] 如本发明所用，术语“抗体”指呈其基本上完整形式的抗体，如与抗体片段相对。具体地讲，本发明所涉及的“抗体”优选为完整形式的抗体，其结构为具有
10 4 条多肽链的对称结构，4 条多肽链分别为 2 条重链 (H 链) 和 2 条轻链 (L 链)，链间由二硫键和非共价键联结形成一个由 4 条多肽链构成的单体分子。

[82] 如本发明所用，术语“抗原结合片段”包含完整抗体的一部分，优选完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段的示例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段等。

[83] 如本发明所用，术语“人源化抗体或抗原结合片段”是人免疫球蛋白(受体
15 抗体)，其中来自受体的 HVR 的残基被来自具有期望的特异性、亲和力、和/或能力的非人物种(供体抗体)，诸如小鼠、大鼠、兔子或非人灵长类动物的 HVR 的残基替代。在一些情况下，人免疫球蛋白的框架(“FR”)残基被相应的非人残基替代。此外，人源化抗体或抗原结合片段可包含不存于受体抗体或供体抗体中的残基。可进行这些修改以进一步改善抗体性能，诸如结合亲和力。一般来讲，
20 人源化抗体或抗原结合片段将包含至少一个，并且通常两个可变结构域的基本上全部，其中全部或基本上全部高变环对应于非人免疫球蛋白序列的那些，并且全部或基本上全部的 FR 区域是人免疫球蛋白序列的那些，但 FR 区域可包括一个或多个单独的 FR 残基取代基，所述取代基改善抗体性能，诸如结合亲和力、异构化、免疫原性等。人源化抗体任选地还将包含通常为人免疫球蛋白的免疫
25 球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分。对于其它细节，参见，例如，Jones 等人，

Nature 321: 522-525(1986); Riechmann 等人, Nature 332: 323-329(1988); 和 Presta, Curr.Op.Struct.Biol.2: 593-596(1992)。还可参见, 例如, Vaswani 和 Hamilton, Ann.Allergy, Asthma&Immunol.1: 105-115(1998); Harris, Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995); Hurle 和 Gross, Curr.Op.Biotech.5: 428-433(1994); 和美国专利 6, 982, 321 和 7, 087, 409。

[84] 如本发明所用, 术语“人抗体”是具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列和/或使用用于制备人抗体的技术中的任一种所制备的抗体。人抗体的该定义明确地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可使用本领域已知的多种技术, 包括噬菌体展示文库来制备人抗体。Hoogenboom 和 Winter, J.Mol.Biol., 227: 381(1991); Marks 等人, J.Mol.Biol., 222: 581(1991)。还可用于制备人单克隆抗体的是描述于下列文献中的方法: Cole 等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R.Liss, 第 77 页(1985); Boerner 等人, J.Immunol., 147(1): 86-95(1991)。还可参见 van Dijk 和 van de Winkel, Curr.Opin.Pharmacol., 5: 368-74(2001)。人抗体可通过将抗原施用于转基因动物来制备, 所述转基因动物已被修饰以产生响应于抗原攻击的此类抗体, 但其内源性基因座已被禁用, 例如免疫异源小鼠(参见, 例如, 关于 XENOMOUSE™ 技术的美国专利 6, 075, 181 和 6, 150, 584)。还可参见, 例如, Li 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 103: 3557-3562(2006), 其关于经由人 B 细胞杂交瘤技术产生的人抗体。

[85] 如本发明所用, 术语“CDR”(即互补性决定区)用于指高变区, 如由 Kabat 系统所定义的。参见 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)。关于 CDR 还存在其他定义形式, 如 IMGT、Chothia、AbM、Contact 等。

[86] 除非另外指明, 本发明涉及的免疫球蛋白残基的编号是 Kabat 索引编号。

[87] 如本发明所用, 术语“Fc 结构域”一般包括铰链区、重链恒定区 CH2 结构域、重链恒定区 CH3 结构域(即 Hinge-CH2-CH3), Fc 结构域常以二硫键的形

式形成二聚体。目前最常用的融合伴侣为免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段，抗体 Fc 是抗体恒定区的一部分（包括铰链区-CH2-CH3，而不包括抗体恒定区的 CH1 部分）。与 Fc 段融合后通过增加分子量、FcRn 介导的再循环机制增加融合分子的稳定性、延长体内半衰期，同时可利用 Fc 段介导 ADCC、CDC 等各种生物学功能，但此类融合蛋白没有抗体的可变区，其药理和药效主要取决于与 Fc 融合的功能分子。人免疫球蛋白 G 有 4 个亚型，不同免疫球蛋白 G 亚型的生物学活性有所差异。目前应用最多的是 IgG1 类抗体，近年来随着新适应症的拓展、新作用机制抗体药物的出现，细胞毒性较低的 IgG2、IgG4 亚型类得到重视。在本发明中，所述的“Fc 结构域”优选为 IgG1 类抗体的 Fc 结构域或 IgG4 类抗体的 Fc 结构域。

[88] 如本发明所用，术语“特异性”是指选择性识别针对抗原特定表位的抗原结合蛋白或抗体。例如，天然抗体是单特异性的。如本发明所用，术语“双特异性”或者“多特异性”表示抗原结合蛋白或抗体具有两个或更多个抗原结合位点，其中至少两个结合不同抗原或相同抗原的不同表位。

[89] 如本文所用，术语“二价”、“三价”、“四价”代表“化合价”，即表示在抗原结合蛋白或抗体分子中存在的结合位点的指定数量，因此，术语“二价”、“三价”、“四价”表示在抗原结合蛋白或抗体分子中分别存在两个结合位点、三个结合位点、四个结合位点。

[90]“VHH 结构域”（variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody），亦称为 VHH、VHH 域、VHH 抗体片段，最初来源为“重链抗体”(heavy-chain antibody, hcAb，即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白可变域（C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature, 1993 年 6 月 3 日，第 363 卷，第 446-448 页）。用术语“VHH 域”将这类可变域与存在于常规由 2 条轻链和 2 条重链组成的抗体（以下简称常规抗体）中的重链可变域(其在本文中称为“VH 域”或“VH 域”)以及存在于常规抗体中的轻链可变域(其在本文中称为“VL 域”或“VL 域”)进行区分。VHH 域特异

性结合表位而无需其他抗原结合域(此与常规抗体中的 VH 或 VL 域相反, 常规抗体中由 VL 域与 VH 域一起组合识别表位)。VHH 域为由单一免疫球蛋白域形成的抗原识别单元。

[91]本文中, 术语“重链单域抗体 (single domain antibody, sdAb)”、“VHH 域”、“VHH”、“VHH 结构域”、“VHH 抗体片段”、“VHH 抗体”以及 Nanobody 及“Nanobody 结构域”可互换使用。

[92] 如本文所用, 术语“同一性”为在比对序列和引入缺口(如果需要)以实现最大序列同一性百分比之后, 候选序列中与特定肽或多肽序列中氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比, 但不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分。用于确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现, 例如, 使用公众可获得的计算机软件, 诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 MEGALIGN™(DNASTAR)软件。本领域的技术人员可确定用于测量比对的适当参数, 包括在被比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[93] 如本发明所用, 术语“治疗”是指被设计用于改变临床病理学过程中治疗的个体或细胞的自然进程的临床干预。期望的治疗效果包括减小疾病进展速度、改善或缓解疾病状态、以及缓解或改善预后。例如, 如果减轻或消除与治疗的疾病或病症(诸如癌症、炎症或自身免疫疾病)相关联的一种或多种症状。

[94] 如本发明所用, “有效量”是指有效治疗受试者的疾病或病症的药剂或药物的量。在癌症的情况下, 本申请的提供的抗 VEGF 单域抗体结合片段、双特异性抗体、多特异性抗原结合构建体、药物组合物、免疫偶联物的有效量可降低癌细胞的数量; 降低肿瘤尺寸; 抑制(即, 缓慢至一定程度并优选阻止)癌细胞浸润到周边器官中; 抑制(即, 缓慢至一定程度并优选阻止)肿瘤癌细胞转移; 在一定程度上, 抑制肿瘤生长; 和/或在一定程度上缓解与癌症相关联的一种或多种症状。如临床环境中所理解的, 药物、化合物或药物组合物的有效量可以或可以不与另一种药物、化合物或药物组合物结合实现。因此, 可在施用一种或多种治疗剂的情况下考虑“有效量”, 并且如果与一种或多种其它药剂结合, 则可认

为以有效量给出单一药剂，可实现或实现期望的结果。

[95] 如本发明所用，“受试者”优选为哺乳动物，包括但不限于人、牛、马、猫科动物、犬科动物、啮齿动物、或灵长类。在一些实施方案中，所述个体为人。

【具体实施例】

5 [96] 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，下面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 1 靶向 VEGF VHH 筛选开发

[97] 分别将 500 μg 人、小鼠 VEGF-A 蛋白与等体积佐剂混匀制备免疫原共进行 4 次免疫 2 岁雌性羊驼，每次间隔 2 周。免疫后采集高免血分离外周血单个核细胞，提取 RNA，经 RT-PCR 扩增得到纳米抗体可变区基因。经酶切、连接、电转获得 VEGF-A 免疫抗体库。

10

[98] 针对所制备的 VEGF-A 免疫抗体库，分别采用免疫管固相淘选和磁珠液相筛选的方式各进行 2 轮淘选，挑取单克隆进行 ELISA 检测。将阳性克隆测序，最终获得 81 株不同的抗体基因。将获得的 81 株均构建出 VHH-Fc 的 DNA 片段，测序无误后，转染 293T 细胞进行真核表达并收集表达上清，用于 ELISA 特异性检测。经检测，发现 6 号株（#6）为唯一一个同时具有人和鼠 VEGF-A 优良结合能力的抗体（见表 7 及表 8）。

15

表 7 #6 与人 VEGF-A 结合能力

VHH 编号	EC50 (ng/mL)
#6	9.331
Bevacizumab	36.56

表 8 #6 与小鼠 VEGF-A 结合能力

VHH 编号	EC50 (ng/mL)
#6	6.46
Bevacizumab	-

[99]对#6 进行测序氨基酸序列如下所示：

SEQ ID No: 8（加粗加下划线区域分别为 CDR1-3（Kabat 编码））

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTFST**TSTMSWYRQAPGKERELVAFITSAGATTNYADSVKDRFT
MSRDNDKNTVY**LQMNVLKPEDTAMYYCRA**LVTLWNVYWGQGTQVTVSS

表 9 #6 氨基酸序列位置编号（Kabat 编码）

Q	V	Q	L	Q	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	T	S	T	M	S	W	Y	R	Q	A	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
P	G	K	E	R	E	L	V	A	F	I	T	S	A	G	A	T	T	N	Y	A	D	S	V	K	D	R	F	T	M	S	R	D	N	D	K	N	T	V	Y
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
L	Q	M	N	V	L	K	P	E	D	T	A	M	Y	Y	C	R	A	L	V	T	L	W	N	V	Y	W	G	Q	G	T	Q	V	T	V	S	S			
80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113			

实施例 2 VEGF VHH 初始序列的人源化及稳定性优化

[100] 为进一步提高 6 号株 VHH 的热稳定和人源化程度，结合结构生物学蛋白结构模拟，经过五轮序列优化和改造，得到两个热稳定性好的且具有高人源化的 VHH 序列。

#6（SEQ ID NO: 8）：

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTFST**TSTMSWYRQAPGKERELVAFITSAGATTNYADSVKDRFT
MSRDNDKNTVY**LQMNVLKPEDTAMYYCRA**LVTLWNVYWGQGTQVTVSS

#48（SEQ ID NO: 13）：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTFST**TSTMSWYRQAPGKERELVSFIT**SAGATT**YYADSVK**GRFT**
MSRDN**S**KNTVY**LQMN**SLRAEDT**A**VYYCRA**L**VT**LWN**VYWGQGT**L**VT**VSS**

#49（SEQ ID NO: 14）：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTFST**TSTMSWYRQAPGKERELVAFITSAGATTYYADSVK**GRFT**
MSRDN**S**KNTVY**LQMN**SLRAEDT**A**VYYCRA**L**VT**LWN**VYWGQGT**L**VT**VSS**

表 10 多轮序列优化氨基酸突变位点（采用表 9 中 Kabat 系统位置）

编号	相对于#6 号 VHH 序列突变位点	与#6 号 VHH 序列同一性比较
#48	Q1E+Q5L+A49S+N58Y+D65G+D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V+Q108L	106/117(91%)
#49	Q1E+Q5L+N58Y+D65G+D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V+Q108L	107/117(91%)

- [101] 对于#48 序列, 其中 Q1E+Q5L 位于 FR1 区, A49S 位于 FR2 区, N58Y+D65G 位于 CDR2 区, D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V 位于 FR3 区, Q108L 位于 FR4 区。
- [102] 对于#49 序列, 其中 Q1E+Q5L 位于 FR1 区, N58Y+D65G 位于 CDR2 区, D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V 位于 FR3 区, Q108L 位于 FR4 区。
- [103] 通过 VEGF 结合能力检测和热稳定性检测, 结果显示, #48、#49 均表现出了与#6 相当的良好的结合 VEGF 的能力 (参见图 1)。热稳定性结果显示组合突变热稳定性有近 10°C 的提高, Tm 值分别为 64.1°C 和 64.7°C。
- 实施例 3 候选双抗分子结构筛选及对照品的构建**
- [104] 基于#48 VHH 和抗 PD-1 抗体纳武单抗 (Nivolumab, Opdivo) 或帕博利珠单抗 (Pembrolizumab, Keytruda) 的抗原结合区片段为基础进行了多种双抗结构形式评估筛选, 经活性、表达及稳定性等综合效果评估, 确定采用图 2 所示的双抗结构。并进一步构建的#10、#16 双抗分子进行进一步评估。价数均为二价+二价 (2+2), Fc 采用功能沉默型 IgG1 突变 (AEASS), 构建后分子的氨基酸序列如表 11 所示。

表 11 构建后分子的氨基酸序列

● #10			
重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 20) :			
QVQLVESGGG	VVQPGSLRL	DCKASGITFS	NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWDGSKRYY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLF	LQMNSLRAED	TAVYYCATND DYWGQGLVT VSSASTKGPS 120
VFPLAPSSKS	TSGGTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180
VVTVPSSSLG	TQTYICNVNH	KPSNTKVDKK	VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA EGAPSVFLFP 240
PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK	FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS 300
VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS	NKALPSSIEK	TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS 360
LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS 420
CSVMHEALHN	HYTQKSLSL	S	PGEVQLLESG GGLVQPGGSL RLSCAASGFT FSTSTMSWYR 480
QAPGKERELV	SFITSAGATT	YYADSVKGRF	TMSRDNKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCRA 540
LVTLWNVYWG	QGTTLTVSS		559

轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 21) :		
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA	60	
RFSGSGSGTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP	120	
SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT	180	
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	214	
● #16		
重链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 22) :		
QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF	60	
NEKFKNRVTL TDSSTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFQYV GQGTITVTVSS	120	
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS	180	
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAEGA	240	
PSVFLFPPKP KDTLMISRT EIVTCVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300	
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE	360	
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW	420	
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFST	480	
STMSWYRQAP GKRELVSFI TSAGATTYYA DSVKGRFTMS RDNSKNTVYL QMNSLRAEDT	540	
AVYYCRALVT LWNVYWGQGT LVTVSS	566	
轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 23) :		
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES	60	
GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF	120	
IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLSL	180	
STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC	218	

[105] 对照采用靶向 PD-1 和 VEGF 的双抗 AK112 类似物 (根据重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 25 及轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 26 自行表达制备)。

SEQ ID NO: 25:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFRRF
 5 TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
 10 VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV
 QPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNKNNLYL
 QMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQTQSPSS
 MSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPE
 DMTYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

15 SEQ ID NO: 26:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDF
 LTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

C

实施例 4 与人 PD-1 和人 VEGF 的结合情况

[106] 使用 ELISA 方法检测抗体与人 PD-1 的结合情况，将 1μg/mL 的人 PD-1（ACRO 公司，His 标签）包被于酶标板过夜后封闭，加入梯度稀释的双抗样品以及对照抗体进行孵育后洗涤，再加入 HRP 标记的抗人 IgG Fc 的二抗孵育后洗涤，加入 TMB 显示液显色后于酶标仪上读取 OD450 吸光度值（参见表 12）。使用 ELISA 方法检测抗体与人 VEGF 的结合情况，将 50ng/mL 的人 VEGF（ACRO 公司，His 标签）包被于酶标板过夜后封闭，加入梯度稀释的待测样品以及对照抗体进行孵育后洗涤，再加入 HRP 标记的抗人 IgG Fc 的二抗孵育后洗涤，加入 TMB 显示液显色后于酶标仪上读取 OD450 吸光度值（参见表 13）。从 ELISA 实验结果可见，#10、#16 结合人 PD-1 的能力与 Opdivo 和 Keytruda 相当，但 Top 信号值要更高，结合能力要强于对照 AK112 类似物。#10 和#16 与 VEGF 结合的模式很独特，相比于#48 与 VEGF 的结合能力，#10 和#16 结合 VEGF 的能力略有下降，Top 吸光值约为#48 的一半，显示基于结构生物学的优化改变了#10 和#16 结合 VEGF 的状态，从而可实现更多的药物富集，而 AK112 类似物中抗 VEGF 部分使用的是 Bevacizumab 抗体片段，在 VEGF 结合方面表现出于 Bevacizumab 类似的特征。（对照品均为内部表达纯化获得）

表 12 待测抗体与人 PD-1 的结合情况

蛋白分子	分子量（kD）	EC50(nM)	TOP OD
#10	169.3	0.114	2.64
#16	171.9	0.114	2.579
O 药	143	0.1	2.271
K 药	146	0.102	2.324
AK112 类似物	201.5	0.528	2.19
Bevacizumab	146.29	-	0.151

表 13 待测抗体与人 VEGF 的结合情况

蛋白分子	分子量 (kD)	EC50(nM)	TOP OD
#10	169.3	0.366	1.752
#16	171.9	0.579	1.745
#48	76.46	0.608	3.091
O 药	143	-	0.048
AK112 类似物	201.5	0.64	2.683
Bevacizumab	146.29	0.374	3.157

实施例 5 双重结合人 VEGF 和人 PD-1 的能力

[107] 进一步验证#10、#16、AK112 类似物双重结合人 VEGF 和人 PD-1 的能力，将 50ng/mL 的人 VEGF（Sino Biological 公司，无标签）包被于 96 孔 ELISA 板上过夜，洗涤封闭 1 小时，加入梯度稀释的待测抗体继续孵育 2 小时，再加入 1μg/mL 的人 PD-1（ACRO 公司，His 标签）孵育 2 小时，洗涤后加入 HRP 标记的抗 His 抗体孵育 1 小时后，加入 TMB 显色液显色后于酶标仪上读取 OD450nm 的吸光度值。结果如表 14 显示，单一靶向抗体不能同时结合两个靶点，#10、#16 和 AK112 类似物均具有双重结合人 VEGF 和人 PD-1 的能力，EC50 值分别为 0.279nM，0.326nM 和 0.254nM。

[108] 改变 VEGF 和 PD-1 结合的顺序进行双重 ELISA 检测，将 1μg/mL 的人 PD-1（ACRO 公司，His 标签）包被于 96 孔 ELISA 板上过夜，洗涤封闭 1 小时，加入梯度稀释的特异性抗体继续孵育 2 小时，再加入 50ng/mL 的生物素标记的人 VEGF（ACRO 公司，生物素化蛋白）孵育 2 小时，洗涤后加入 HRP 标记的链霉亲和素（Streptavidin）孵育 1 小时后，加入 TMB 显色液显色后于酶标仪上读取 OD450nm 的吸光度值。结果如表 14 显示，单一靶向抗体不能同时结合两个靶点，#10、#16 和 AK112 类似物均具有双重结合人 PD-1 和人 VEGF 的能力，EC50 值分别为 0.114nM，0.117nM 和 0.634nM。依据 EC50 值比较，#10、#16 双重结合人 PD-1 和人 VEGF 的能力强于竞品 AK112 类似物 5-6 倍。

表 14 待测抗体与人 PD-1、人 VEGF 双重结合情况

蛋白分子	分子量(kD)	EC50(nM)	TOP OD
------	---------	----------	--------

#10	169.3	0.114	3.571
#16	171.9	0.117	3.649
#48	76.46	-	0.061
O 药	143	-	0.048
AK112 类似物	201.5	0.634	3.415
Bevacizumab	146.29	-	0.067

实施例 6 不同种属抗原的结合情况

[109] 使用 ELISA 方法检测候选分子和竞品不同种属抗原的结合情况。猴源的 VEGF 序列和人源 VEGF 序列完全一致，候选抗体结合猴 VEGF 的能力同结合人 VEGF 的能力。使用 ELISA 方法检测抗体与猴 PD-1 的结合情况，将 1μg/mL 的猴 PD-1（ACRO 公司，His 标签）包被于酶标板过夜后封闭，加入梯度稀释的待测样品以及对照抗体进行孵育后洗涤，再加入 HRP 标记的抗人 IgG Fc 的二抗孵育后洗涤，加入 TMB 显示液显色后于酶标仪上读取 OD450 吸光度值（表 15）。与结合人 PD-1 的结果一致，#10、#16 结合猴 PD-1 的能力与 Opdivo 和 Keytruda 相当，强于竞品 AK112 类似物。

表 15 待测抗体与猴 PD-1 的结合情况

蛋白分子	分子量(kD)	EC50(nM)	TOP OD
#10	169.3	0.229	3.359
#16	171.9	0.171	3.376
O 药	143	0.153	2.987
K 药	146	0.187	3.078
AK112 类似物	201.5	1.704	2.561
Bevacizumab	146.29	-	0.127

实施例 7 阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合能力

[110] 进一步检测待测抗体阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合能力。将 1μg/mL 的人 PD-1（ACRO 公司，Fc 标签）包被于 ELISA 板过夜，洗涤封闭后加入梯度稀释抗体与人 PD-L1（Sino Biological 公司，His 标签）的混合液孵育 2 小时后，加入 HRP 标记的抗 His 抗体孵育 1 小时后，加入 TMB 显示液显色后于酶标仪上

读取 OD450 吸光度值（表 16）。如结果所示，除了只结合 VEGF 的#48，其余抗体均可以阻断 PD-1 和 PD-L1 的结合，且阻断活性相当。

表 16 待测抗体阻断人 PD-1 与人 PD-L1 结合能力检测

蛋白分子	IC50(nM)
#10	2.419
#16	2.529
#48	-
O 药	1.947
K 药	2.13
AK112 类似物	2.898

实施例 8 阻断 VEGF 与 VEGFR1 以及 VEGFR2 的结合能力

5 [111] 检测待测抗体阻断 VEGF 与 VEGFR1 以及 VEGFR2 的结合能力。将 2μg/mL 的人 VEGFR1 和 5μg/mL 的人 VEGFR2（自行构建表达，Fc 标签）分别包被于 ELISA 板过夜，洗涤封闭后分别加入梯度稀释抗体与人 VEGF（ACRO 公司，生物素化蛋白）的混合液孵育 2 小时，洗涤后分别加入 HRP 标记的链霉亲和素（Streptavidin）孵育 1 小时后，分别加入 TMB 显色液显色后于酶标仪上
10 读取 OD450nm 的吸光度值。结果显示#10 和#16 阻断 VEGF 和 VEGFR1 结合的能力更强，IC50 值分别为 0.491nM 和 0.507nM，优于#48 的阻断能力，体现出构建的双抗空间结构的改变产生的优势。而竞品 AK112 类似物的阻断能力和 Bevacizumab 的阻断能力相当，IC50 值分别为 4.610nM 和 5.647nM。此外，检测结果显示#10 和#16 阻断 VEGF 和 VEGFR2 结合的能力更强，IC50 值分别为
15 3.643nM 和 3.249nM，优于#48 的阻断能力（IC50 值 5.841nM），体现出双抗空间结构的改变产生的优势。而竞品 AK112 类似物的阻断能力和 Bevacizumab 的阻断能力相当，IC50 值分别为 6.481nM 和 6.637nM。

实施例 9 使用混合淋巴细胞反应（MLR）方法来验证阻断 PD-1 后的 T 细胞的反应

20 [112] 在细胞水平进一步比较待测候选分子和竞品 AK112 类似物的功能。使用

混合淋巴细胞反应（MLR）方法来验证阻断 PD-1 后的 T 细胞的反应，将 2×10^4 个来源于一个供体的 DC 细胞与 2×10^5 个来源于另一个供体的 CD4+T 细胞按等体积混合后，加入梯度稀释的待测抗体后供体培养 72 小时后收集细胞培养上清，使用 ELISA 定量试剂盒测定细胞上清中释放 IL-2（图 3）和 $\text{FN}\gamma$ （图 4）的含量。

5 结果显示#10 和#16 在 MLR 反应中促进 CD4+T 细胞释放 IL-2 和 $\text{IFN}\gamma$ 的均高于竞品 AK112 类似物的量，从而对于 T 细胞的作用更强。

实施例 10 使用血管内皮细胞（HUVEC）增殖抑制试验来检测待测抗体抑制 VEGF 刺激 HUVEC 细胞增殖的能力

[113] 在 96 孔细胞板上加入 5×10^3 个 HUVEC 细胞/孔于含有 1%FBS 的培养基中于 37°C、5%二氧化碳培养箱中培养过夜，次日移除培养基加入 70ng/mL 的 VEGF 和梯度稀释的待测抗体以及竞品 AK112 类似物，将反应板放置于 37°C、5%二氧化碳培养箱中培养 4 天后，加入 CTG 试剂后于酶标仪读取相对荧光信号值，将含有 1%FBS 的 ECM 培养基并加有 VEGF 刺激细胞组（未加抗体）的荧光值定义对应抑制率为 0，将只加入 PBS 组（没有含 1%FBS 的 ECM 培养基，也未加 VEGF 刺激和抗体）的抑制率定义为 100%，将相对抑制率拟合成曲线，如图 5 所示，#10 和#16 的最大抑制率约为 60%，而 AK112 类似物的最大抑制率约为 40%，#10 和#16 的抑制率要高于竞品 AK112 类似物。

10

15

实施例 11 抑制 HUVEC 细胞迁移的能力

[114] 使用 8 μm 孔径的 Transwell 小室去检测待测抗体抑制 HUVEC 细胞迁移的能力，Transwell 由上室和下室两部分组成，在上室中加入 5×10^3 个 HUVEC 细胞/孔，于 37°C、5%二氧化碳培养箱中培养 30 分钟，在下室中加入 200ng/mL 的 VEGF 和不同浓度的待测抗体及竞品 AK112 类似物对照，每组三个复孔，于 37°C、5%二氧化碳培养箱中培养 24 小时后，使用 4%的多聚甲醛固定后用结晶紫染色，拍照后统计迁移至上室背面的细胞数，细胞数越少说明抑制率越高，图 6 结果显示#10 和#16 的抑制率要高于竞品 AK112 类似物。

20

25

实施例 12 增加抗体富集的特性

[115] 结构生物学模拟显示#10 的构象可能改变了抗 VEGF 纳米抗体结合 VEGF 的模式，可以通过二聚体 VEGF 蛋白进行抗体富集，为了验证#10 增加抗体富集的特性，将偶联人 VEGF 蛋白的磁珠(ACRO 公司)用 PBS 分别稀释至 250ng/mL、125ng/mL 和 50ng/mL，各加入 10nM 的#10、#16 和竞品 AK112 类似物孵育 1 小时后置于磁铁上两分钟，吸取上清进行 ELISA 法蛋白定量。结果如图 7 所示，#10 和#16 剩余的抗体量少于竞品 AK112 类似物的量，表明含有 VEGF 的磁珠富集的双抗更多。该定量 ELISA 实验是为了验证抗体与 VEGF 交联的程度，先将抗体与 VEGF 磁珠交联，未交联部分的抗体用 ELISA 方法检测剩余量。结果显示，#10 和#16 与 VEGF 交联的程度均大于竞品 AK112 类似物。与结构生物学模拟结果相互佐证，将可以通过 VEGF 在肿瘤局部的高表达实现在肿瘤局部的富集，也显示了#10、#16 双抗的差异化特征和治疗潜力。

实施例 13 动物模型药效

[116] 为了评估待测抗体在小鼠模型中的药效，选择转入人 PD-1 的 Balb/c 小鼠，接种野生型 CT26 肿瘤细胞（结肠癌细胞），因为 Bevacizumab 和 AK112 类似物均不结合小鼠的 VEGF，未添加这两组，选择能够结合人 VEGF 和小鼠 VEGF 的 VEGF Trap（由 VEGFR1 第二结构域和 VEGFR2 第三结构域和人 IgGFc 组成的融合蛋白）作为对照，一共设计 6 个组别。实验设计、剂量、给药方式等见表 17。

表 17 动物模型药效实验设计

试验组	药物	小鼠数量	使用剂量 (mg/kg)	给药频率	给药方式
1	空白载体 (PBS)	8	0	D0、D4、D7、D11	i.p.
2	O 药	8	7.5	D0、D4、D7、D11	i.p.
3	VEGF-Trap	8	5	D0、D4、D7、D11	i.p.
4	O 药 +VEGF-Trap	8	7.5+5	D0、D4、D7、D11	i.p.

5	#10	8	8.8	D0、D4、D7、D11	i.p.
6	#16	8	8.9	D0、D4、D7、D11	i.p.

[117] 如图 8 所示，#10 和#16 治疗荷瘤小鼠的抑瘤率分别为 57%和 62%，要高于 Opdivo 单药治疗组 20%的抑瘤率，也高于 VEGF-Trap 单药治疗组 45%的抑瘤率，与 Opdivo 和 VEGF-Trap 联合治疗组的抑瘤率（56%）相当，在第 14 天时，#10 和 16 治疗组的平均肿瘤体积略小于联合治疗组，同时小鼠的体重变化与肿瘤增长的趋势一致，第 14 天时，#10 和#16 的体重变化范围在 10%以内。可见#10 和#16 均有良好的药效和安全性。

实施例 14 #10 分子在免疫重建人源黑色素瘤皮下移植模型中的协同增效研究

[118] 为了评估#10 分子在免疫重建的人源黑色素瘤模型中的协同增效研究，选择免疫缺陷小鼠 B-NDG，接种转入人 PD-L1 的 A375 肿瘤细胞(黑色素瘤细胞)，接种人外周血单个核细胞（huPBMC)重建荷瘤鼠免疫系统。选择抗 PD-1 药物 Opdivo（O 药）以及抗 VEGF 药物 Bevacizumab、#48 作为单靶对照，以及#10 的对照药物 AK112 类似物（AK112 analog，自行表达制备），一共设计 8 个组别，实验设计、剂量、给药方式等见表 18。

表 18 免疫重建人源黑色素瘤皮下移植模型中的协同增效研究实验设计

试验组	药物	小鼠数量	使用剂量(mg/kg)	给药频率	给药方式
1	空白载体	9	--	D0、D3、D7、D10、D14、D17	i.v.
2	#10	9	5.7	D0、D3、D7、D10、D14、D17	i.v.
3	Bevacizumab	9	5	D0、D3、D7、D10、D14、D17	i.v.
4	#48	9	2.6	D0、D3、D7、D10、D14、D17	i.v.
5	Opdivo	9	4.9	D0、D3、D7、D10、D14、D17	i.v.
6	Bevacizumab + Opdivo	9	5+4.9	D0、D3、D7、D10、D14、D17	i.v.

7	#48 + Opdivo	9	2.6+4.9	D0、D3、D7、 D10、D14、D17	i.v.
8	AK112 analog	9	6.8	D0、D3、D7、 D10、D14、D17	i.v.

[119] 21 天进行检测，在本试验体系下，Opdivo 单药治疗组无抗肿瘤作用，#10 分子抑瘤率为 TGI=73%，抑瘤水平显著高于 Bevacizumab 单药治疗组（TGI=53%）、#48 单药治疗组（TGI=57%），及 Opdivo 和#48 联合给药治疗组（TGI=50%）。并且优于 Opdivo 和 Bevacizumab 联合给药治疗组（TGI=68%，以该抑瘤率为基准，#10 分子抑瘤率相对提高 7%）及 AK112 类似物（TGI=64%，以该抑瘤率为基准，#10 分子相对抑瘤率提高 14%）。结果表明本发明的双抗产生了协同增效作用，相对于对照分子具有显著优势。

[120] 以上所揭示的仅是本发明的部分实施例而已，并非是对本发明作其他形式的限制，本领域普通技术人员能够理解，本发明并不限于各个具体实施方式。对本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，可以对本发明进行若干改进和修饰，这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

权 利 要 求 书

1. 一种靶向 PD-1 和 VEGF 的双特异性抗体, 其包含:

(a) 靶向 PD-1 的第一结合功能区;

(b) 靶向 VEGF 的第二结合功能区;

其中:

5 所述靶向 PD-1 的第一结合功能区为抗 PD-1 的抗体或抗原结合片段;

 所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区包含以下氨基酸序列所限定的 CDR1-3 的 VHH 域(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody), 所述的 CDR1 的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列一致, 所述的 CDR2 的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 2 相比具有 1
10 或 2 个氨基酸突变, 所述的 CDR3 的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列一致。

 2. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的 CDR2 中的氨基酸突变位点在第 58 位和/或 65 位。

 3. 根据权利要求 2 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的 CDR2 中的
15 突变为 N58Y 和/或 D65G 突变。

 4. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的 VHH 域为人源化 VHH 域。

 5. 根据权利要求 1 或 3 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区还包括:

- 20 1) 与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列具有 1 个或 2 个氨基酸突变的框架区结构域 FR1; 和/或
- 2) 与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列具有 1 个氨基酸突变的框架区结构域 FR2; 和/或
- 3) 与 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 6 所示

的氨基酸序列具有 1-5 个氨基酸突变的框架区结构域 FR3；和/或

4) 与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列具有 1 个氨基酸突变的框架区结构域 FR4。

5 6. 根据权利要求 5 所述的双特异性抗体，其特征在于，FR1 结构域中所述的 1 个或 2 个氨基酸突变在第 1 位和/或 5 位；进一步优选为 Q1E 和/或 Q5L 突变。

7. 根据权利要求 6 所述的双特异性抗体，其特征在于，FR2 结构域中所述的 1 个氨基酸突变在第 49 位；进一步优选为 A49S 突变。

10 8. 根据权利要求 7 所述的双特异性抗体，其特征在于，FR3 结构域中所述的 1-5 个氨基酸突变选自第 74 位，82B 位，83 位，84 位和 89 位中的 1 个或 2 个或 3 个或 4 个或 5 个；所述突变进一步优选自 D74S，V(82B)S，K83R，P84A 和 M89V 中的 1 位或 2 位或 3 位或 4 位或 5 位。

9. 根据权利要求 8 所述的双特异性抗体，其特征在于，FR4 结构域中所述的 1 个氨基酸突变在第 108 位；所述突变进一步优选为 Q108L。

15 10. 根据权利要求 5-9 任一项所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区还包括：

1) 与 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR1；和/或

20 2) 与 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR2；和/或

3) 与 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR3；和/或

4) 与 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR4。

11. 根据权利要求 10 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区包括以下氨基酸限定的框架区组合:

1) 与 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列一致的 FR1, 与 SEQ ID NO: 5 氨基酸序列一致的 FR2, 与 SEQ ID NO: 6 氨基酸序列一致的 FR3, 以及与 SEQ ID NO: 7 氨基酸序列一致的 FR4;

2) 与 SEQ ID NO: 9 氨基酸序列一致的 FR1, 与 SEQ ID NO: 10 氨基酸序列一致的 FR2, 与 SEQ ID NO: 11 氨基酸序列一致的 FR3, 以及与 SEQ ID NO: 12 氨基酸序列一致的 FR4;

3) 与 SEQ ID NO: 9 氨基酸序列一致的 FR1, 与 SEQ ID NO: 5 氨基酸序列一致的 FR2, 与 SEQ ID NO: 11 氨基酸序列一致的 FR3, 以及与 SEQ ID NO: 12 氨基酸序列一致的 FR4。

12. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列相比具有 1-11 个氨基酸突变。

13. 根据权利要求 12 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述氨基酸突变的位点优选自第 1、5、49、58、65、74、82B、83, 84, 89 或 108 位。

14. 根据权利要求 13 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述氨基酸突变优选自 Q1E, Q5L, A49S, N58Y, D65G, D74S, V(82B)S, K83R, P84A, M89V, Q108L 中的 1-11 个。

15. 根据权利要求 14 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述突变选自以下突变组合:

1) Q1E+Q5L+A49S+N58Y+D65G+D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V+Q108L;

2) Q1E+Q5L+N58Y+D65G+D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V+Q108L。

16. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的靶向 VEGF 的第二结合功能区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID

NO: 14 所示的氨基酸序列一致。

17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的抗 PD-1 的抗体或抗原结合片段为人源化抗体或抗原结合片段、嵌合抗体或抗原结合片段、人抗体或抗原结合片段。

5 18. 根据权利要求 17 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的抗 PD-1 的抗体或抗原结合片段为 IgG 类抗体。

19. 根据权利要求 18 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的抗 PD-1 的抗体或抗原结合片段类型为 IgG1、IgG2、或 IgG4。

20. 根据权利要求 19 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述靶向 PD-1
10 的第一结合功能区具有与纳武单抗或帕博利珠单抗抗体相同的轻链及重链 CDR 氨基酸序列。

21. 根据权利要求 20 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述靶向 PD-1 的第一结合功能区具有与纳武单抗或帕博利珠单抗抗体相同的重链可变区氨基酸序列。

15 22. 根据权利要求 21 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述靶向 PD-1 的第一结合功能区具有与纳武单抗或帕博利珠单抗抗体相同的轻链可变区氨基酸序列。

23. 根据权利要求 22 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的靶向 PD-1 的第一结合功能区的重链部分还包括重链恒定区 CH1 结构域、铰链区、重链恒定区 CH2 结构域、重链恒定区 CH3 结构域中的一个或者多个。
20

24. 根据权利要求 23 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的靶向 PD-1 的第一结合功能区还包括轻链恒定区结构域。

25. 根据权利要求 24 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的抗 PD-1 的抗体包括重链部分和轻链部分, 其中所述的重链部分从 N 端到 C 端依次包括
25 重链可变区结构域、重链恒定区 CH1 结构域、铰链区、重链恒定区 CH2 结构域、

重链恒定区 CH3 结构域, 且所述的轻链部分从 N 端到 C 端依次包括轻链可变区结构域和轻链恒定区结构域。

26. 根据权利要求 25 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述抗 PD-1 的抗体的 Fc 结构域为 IgG1 Fc 结构域或其沉默型 IgG1 突变。

5 27. 根据权利要求 26 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的 Fc 结构域与 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多同一性氨基酸序列。

10 28. 根据权利要求 27 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述靶向 PD-1 的第一结合功能区具有选自如下氨基酸序列的轻链和重链组合:

1) 与 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列一致的重链; 和/或与 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列一致的轻链; 或

2) 与 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列一致的重链; 和/或与 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列一致的轻链。

15 29. 根据权利要求 28 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述第二结合功能区结合在所述第一结合功能区的 C 端或 N 端。

30. 根据权利要求 29 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的 VHH 域直接或者通过肽接头连接与所述抗体或抗原结合片段重链部分的 C 端或者 N 端。

20 31. 根据权利要求 30 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的肽接头为柔性肽接头。

32. 根据权利要求 31 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的肽接头包含一个或多个氨基酸。

33. 根据权利要求 32 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述的肽接头包含至少 5 个氨基酸。

34. 根据权利要求 33 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的肽接头的氨基酸序列为：(GGGGS)_n，其中所述 n 等于 1、2、3 或 4。

35. 根据权利要求 29 或 30 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述的双特异性抗体为二价、三价或四价双特异性抗体。

5 36. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述双特异性抗体包含如 SEQ ID NO: 20 所示的重链和如 SEQ ID NO: 21 所示的轻链组合或者包含如 SEQ ID NO: 22 所示的重链和如 SEQ ID NO: 23 所示的轻链组合。

37. 一种靶向 VEGF 的 VHH 域，其特征在于，所述的 VHH 域包含以下氨基酸序列所限定的 CDR1-3，所述的 CDR1 的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列一致，所述的 CDR2 的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 2 相比具有 1 或 2 个氨基酸突变，所述的 CDR3 的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列一致。

10

38. 根据权利要求 37 所述的 VHH 域，其特征在于，所述的 CDR2 中的突变位点在第 58 位和/或 65 位。

15 39. 根据权利要求 38 所述的 VHH 域，其特征在于，所述的 CDR2 中的突变为 N58Y 和/或 D65G 突变。

40. 根据权利要求 39 所述的 VHH 域，其特征在于，所述的 VHH 域为人源化 VHH 域。

41. 根据权利要求 40 所述的 VHH 域，其特征在于，所述的 VHH 域还包括：

20

1) 与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列具有 1 个或 2 个氨基酸突变的框架区结构域 FR1；和/或

2) 与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列具有 1 个氨基酸突变的框架区结构域 FR2；和/或

3) 与 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列具有 1-5 个氨基酸突变的框架区结构域 FR3; 和/或

4) 或与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列具有 1 个氨基酸突变的框架区结构域 FR4。

5 42. 根据权利要求 41 所述的 VHH 域, 其特征在于, FR1 结构域中所述的 1 个或 2 个氨基酸突变在第 1 位和/或 5 位; 进一步优选为 Q1E 和/或 Q5L 突变; 更进一步的, FR2 结构域中所述的 1 个氨基酸突变在第 49 位; 进一步优选为 A49S 突变。

43. 根据权利要求 42 所述的 VHH 域, 其特征在于, FR3 结构域中所述的 1-5 个氨基酸突变选自第 74 位, 82B 位, 83 位, 84 位和 89 位中的 1 个或 2 个或 3 个或 4 个或 5 个; 所述突变进一步优选自 D74S, V(82B)S, K83R, P84A 和 M89V 中的 1 位或 2 位或 3 位或 4 位或 5 位。

44. 根据权利要求 43 所述的 VHH 域, 其特征在于, FR4 结构域中所述的 1 个氨基酸突变在第 108 位; 所述突变进一步优选为 Q108L。

15 45. 根据权利要求 44 所述的 VHH 域, 其特征在于, 所述的 VHH 域还包括:

1) 与 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR1; 和/或

20 2) 与 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR2; 和/或

3) 与 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR3; 和/或

4) 与 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列一致的框架区结构域 FR4。

46. 根据权利要求 45 所述的 VHH 域，其特征在于，所述的 VHH 域包括以下氨基酸限定的框架区组合：

5 1) 与 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列一致的 FR1，与 SEQ ID NO: 5 氨基酸序列一致的 FR2，与 SEQ ID NO: 6 氨基酸序列一致的 FR3，以及与 SEQ ID NO: 7 氨基酸序列一致的 FR4；

 2) 与 SEQ ID NO: 9 氨基酸序列一致的 FR1，与 SEQ ID NO: 10 氨基酸序列一致的 FR2，与 SEQ ID NO: 11 氨基酸序列一致的 FR3，以及与 SEQ ID NO: 12 氨基酸序列一致的 FR4；

10 3) 与 SEQ ID NO: 9 氨基酸序列一致的 FR1，与 SEQ ID NO: 5 氨基酸序列一致的 FR2，与 SEQ ID NO: 11 氨基酸序列一致的 FR3，以及与 SEQ ID NO: 12 氨基酸序列一致的 FR4。

47. 根据权利要求 37 所述的 VHH 域，其特征在于，所述的 VHH 域的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列一致或与 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列相比具有 1-11 个氨基酸突变。

15 48. 根据权利要求 47 所述的 VHH 域，其特征在于，所述氨基酸突变的位点优选自第 1、5、49、58、65、74、82B、83、84、89 或 108 位。

 49. 根据权利要求 48 所述的 VHH 域，其特征在于，所述氨基酸突变优选自 Q1E, Q5L, A49S, N58Y, D65G, D74S, V(82B)S, K83R, P84A, M89V, Q108L 中的 1-11 个。

20 50. 根据权利要求 49 所述的 VHH 域，其特征在于，所述突变选自以下突变组合：

 1) Q1E+Q5L+A49S+N58Y+D65G+D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V+Q108L；

 2) Q1E+Q5L+N58Y+D65G+D74S+V(82B)S+K83R+P84A+M89V+Q108L。

51. 根据权利要求 50 所述的 VHH 域, 其特征在于, 所述的 VHH 域的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列一致。

52. 权利要求 37-51 中任一项所述的 VHH 域在构建重组蛋白中的应用。

5 53. 一种包括权利要求 37-51 任一项所述的 VHH 域的重组蛋白。

54. 根据权利要求 53 所述的重组蛋白, 其特征在于, 所述重组蛋白包括双特异抗体、多特异性抗体、抗体药物偶联物。

55. 一种多核苷酸, 所述的多核苷酸编码权利要求 1-36 任一项所述的双特异性抗体、或者权利要求 37-51 任一项所述的 VHH 域、或者权利要求 53 所述的重组蛋白、或者权利要求 54 所述的多特异抗体。

56. 一种表达载体, 所述的表达载体包含权利要求 55 所述的多核苷酸。

57. 一种宿主细胞, 所述的宿主细胞包含权利要求 56 所述的表达载体, 或其基因组中整合有权利要求 55 所述的多核苷酸。

58. 一种药物组合物, 所述的药物组合物包含权利要求 1-36 任一项所述的双特异性抗体、或者权利要求 37-51 任一项所述的 VHH 域、或者权利要求 53 所述的重组蛋白、或者权利要求 54 所述的多特异抗体及其药学上可接受的载体。

59. 权利要求 1-36 任一项所述的双特异性抗体、或者权利要求 37-51 任一项所述的 VHH 域、或者权利要求 53 所述的重组蛋白、或者权利要求 54 所述的多特异抗体在制备治疗癌症的药物中的用途。

20 60. 一种治疗癌症的方法, 其包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求 1-36 任一项所述的双特异性抗体、或者权利要求 37-51 任一项所述的 VHH 域、或者权利要求 53 所述的重组蛋白、或者权利要求 54 所述的多特异抗体。

61. 权利要求 59 所述的用途或者权利要求 60 所述的治疗方法中, 所述的癌症选自结直肠癌。