一种特异性中和辅助性 T 细胞 TGF-β 信号的双特异性抗体、其药物组合及其用途

技术领域

本发明涉及生物技术领域，特别是涉及一种特异性中和辅助性 T 细胞 TGF-β 信号的双特异性抗体、其药物组合及其用途。

背景技术

肿瘤尤其是恶性肿瘤是当今世界严重危害人类健康的疾病，在各种疾病所导致的死亡中高居第二位。随着近年来环境污染，人们生活压力增大，恶性肿瘤发病率呈逐年上升趋势。而且，恶性肿瘤治疗效果差，尤其是晚期转移率高，预后多不佳。目前临床上采用的常规疗法如放疗、化疗、靶向治疗或手术治疗虽一定程度上缓解了病情，延长了生存时间，但这些方法仍然存在很大的局限性，不仅仅是体现在治疗效果上，而且很多恶性肿瘤病人仍然没有有效的治疗方案，例如胰腺癌等。

TGF-β 于 1981 年首次被鉴别（Robert 等人，PNAS，78：5339-5343.（1981））。转化生长因子-β，因最初其将正常成纤维细胞转化为不依赖锚定生长的细胞的能力，而命名的多功能细胞因子。

TGF-β 家族成员一般有 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3。其中，人 TGF-β 与小鼠 TGF-β 保守性非常高：人 TGF-β1 与小鼠 TGF-β1 只有一个氨基酸的差异，人 TGF-β2 与小鼠 TGF-β2 只有三个氨基酸的差异，人 TGF-β3 与小鼠 TGF-β3 相同。

具有生物学活性的 TGF-β 一般以二聚体的形式错在，当其与细胞表面的 TGF-β Type II 受体（TGF-βRII）结合后，就会与临近的 TGF-β type I 受体（TGF-βRI）结合，共同形成六聚体。随后，由于 TGF-β 的结合，TGF-βRII 丝氨酸/苏氨酸激酶的活性被激活。此时，TGF-βRII 使 TGF-βRI 上一些关键的丝氨酸被磷酸化，激活了其丝氨酸/苏氨酸激酶的活性。这个磷酸化过程会持续向下游进行，使临近的 regulatory SMAD（R-SMAD）被磷酸化，主要包括 SMAD2，3，9 等等（通常 R-SMAD 会被 SARA 蛋白固定在细胞膜内部）。被磷酸化的 R-SMAD 对于细胞质游离的 Co-SMAD（如 SMAD4）有着极高的亲和力，于是形成了 R-SAMD-Co-SMAD 聚合物。它将进入细胞核，与转录因子共同结合到 DNA 上，启动下游基因的表达（Sporn 等，Science，233：532（1986））。

然而，TGF-β 并不能直接作用于细胞表面的受体。在正常情况下，只有少量的游离态 TGF-β 可以与受体结合，而大多数 TGF-β 都是与 latency-associated peptide (LAP) 结合，不具有活性。TGF-β 共有四种形态，只有当 TGF-β-LAP 聚体被肿瘤微环境中的蛋白酶（由肿瘤细胞分泌）剪切，形成游离态，才能激活 TGF-β。关于 TGF-β 及其作用的一般性综述可参见相应的文献（Joan Massague，TGF-β in Cancer. Cell，134(2):215-230（2008））。

TGF-β 是一类重要的细胞因子。TGF-β 信号通路能够调控细胞的生长，分化以及细胞凋亡，是细胞维持正常功能不可或缺的重要部分。然而，TGF-β 却能操控肿瘤微环境，具有致癌作用。恶性肿瘤细胞会大量分泌 TGF-β 蛋白，一方面让癌细胞加速成长和扩散，另一方面令癌细胞绕过免疫系统的攻击。

TGF-β 在肿瘤发生、发展中具有双重作用。最初的研究发现, TGF-β 抑制造血细

胞上皮细胞和的增殖，促进细胞凋亡。随后的实验又证明 TGF-β 对多种上皮性肿瘤细胞(如胃癌、肺癌、结肠癌、肝癌、肾癌及前列腺癌)的体外增殖起负调控作用，其信号传导通路中任何蛋白发生突变都将使肿瘤细胞具有选择性生长优势，导致肿瘤的发生。由于这种增殖抑制特性，TGF-β 一度被认为是最有潜力的癌症治疗药物靶点。但随着研究的深入，人们又发现 TGF-β 在肿瘤进展期能够促进肿瘤侵袭和转移。因此有学者提出 TGF-β 在肿瘤的发生、发展中是一把“双刃剑”（俞清翔，转化生长因子 β 与肿瘤转移的研究进展，世界华人消化杂志，14(25):2538-2541（2016））。

TGF-β 对肿瘤生长的影响不仅体现在对肿瘤细胞的直接作用上，TGF-β 还能够抑制免疫系统对于癌细胞的杀伤。TGF-β 能够诱导调控性 T 细胞（Treg），使之对效应性 T 细胞（effector T cell）产生抑制作用。另外，TGF-β 能够直接作用于辅助性 T 细胞（helper T cell），B 细胞，NK 细胞，巨噬细胞以及树突状细胞（dendritic cell,，DC），抑制它们的免疫活性（Eduard Battle & Joan Massague，Transformating Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer. Immunity，50(4):924-940（2019））。

根据 TGF-β 在肿瘤生长中的作用，人们开发出了很多抑制 TGF-β 信号通路的抗体或者小分子化合物，但近二十多年过去了，没有一个靶向 TGF-β 的药物取得临床上的成功。靶向 TGF-β 通路的化学小分子抑制剂本身有很大的毒性，比如一些 TGF-βRI 化学小分子抑制剂具有很强的心脏毒性。而中和 TGF-β 活性的抗体分子，相对化学小分子来说，不容易渗透进细胞内，因此其安全性有很大的优势，但并没有显示出临床有效性。

CAT192 是一个人 IgG4 单克隆抗体，主要中和 TGF-β1 的活性，对 TGF-β2 和 TGF-β3 没有中和能力。该抗体最初由美国剑桥抗体公司（Cambridge Antibody Technology，CAT）通过噬菌体展示技术分离得到。2000 年，CAT 公司与美国 Genzyme 公司签署合作协议共同开发 TGF-β 抗体。2004 年，CAT 和 Genzyme 公司共同宣布 CAT192 在治疗硬皮症（scleroderma）的 I/II 期临床实验中，在各种剂量使用上都是安全的，但并没有显示出有效性。临床有效性实验的失败导致 CAT192 被 Genzyme 公司放弃，转而以开发另外一种 TGF-β 中和抗体 fresolimumab 来替代。目前，fresolimumab 在治疗恶性肿瘤的临床有效性方面仍然进展缓慢。

TGF-β 通路抑制剂药物开发的失败，究其原因可能是因为 TGF-β 通路调控的多样性和复杂性。TGF-β 对肿瘤细胞的双重作用，且肿瘤细胞本身的异质性，导致抑制 TGF-β 对肿瘤生长本身没有多大效果。另一方面，TGF-β 对免疫细胞也具有抑制作用，从而帮助肿瘤细胞逃避免疫系统的监视。虽然抑制 TGF-β 的药物，也能在一定程度上解除 TGF-β 对免疫细胞的抑制，从而抑制肿瘤。但是其效果可能被大量肿瘤细胞消耗药物所稀释。

通过基因工程的方法改造 TGF-β1 抗体，使其特异性地抑制辅助性 T 细胞（CD4 阳性 T 细胞）上的 TGF-β 信号通路，从而解除 TGF-β 对免疫细胞的抑制，使其发挥抗肿瘤作用。

双功能抗体也称作双特异性抗体（Bispecific Antibody），是同时靶向两种不同抗原的特异性抗体，其可以通过免疫分选纯化产生。另外，也可以通过基因工程获得。基因工程在结合位点处优化，合成形式的考量以及产量等方面均有相应的灵活性及优势。目前，其存在形式已经被证明有超过 45 种。目前已开发的多种双特异性

抗体为 IgG-ScFv 形式即 Morrison 模式，由于这种类似于天然存在的 IgG 形式，其在抗体工程、表达和纯化上所具有的优势，已被证明是双功能抗体的一种理想存在形式。

发明内容

鉴于以上所述现有技术的缺点，本发明人总结以往 TGF-β抗体临床失败的教训，通过设计抗 CD4/抗 TGF-β1 双功能抗体，将中和 TGF-β1 抗体特异性靶向到辅助性 T 细胞（CD4 阳性 T 细胞）、从而实现传统 TGF-β1 抗体所不能实现的抗肿瘤功能。

本发明的目的在于提供一种特异性中和辅助性 T 细胞 TGF-β信号的双特异性抗体、其药物组合及其用途，用于解决现有技术中的问题。通过基因工程技术，将中和 TGF-β1 抗体和靶向免疫细胞抗体整合成一个双功能抗体，从而特异性中和免疫细胞上的TGF-β信号。这种类型的双功能抗体能够充分解除TGF-β对免疫细胞的功能抑制，从而更大程度上实现其抗癌功能。

为实现上述目的及其他相关目的，本发明第一方面提供一种双特异性抗体，所述双特异性抗体至少包括第一蛋白链和第二蛋白链，

所述第一蛋白链包括第一蛋白功能区的部分或全部结构，和/或，第二蛋白功能区的部分或全部结构；

所述第一蛋白功能区靶向 CD4，所述第一蛋白功能区为抗 CD4 的抗体或其抗原结合片段；

所述第二蛋白功能区靶向 TGFβ1，所述第二蛋白功能区为抗 TGFβ1 的抗体或其抗原结合片段。

本发明第二方面提供一种分离的核酸分子，编码前述双特异性抗体。

本发明第三方面提供一种载体，包含前述的分离的核酸分子。

本发明第四方面提供一种宿主细胞，所述宿主细胞含有前述分离的核酸分子，或者包含前述载体。

本发明第五方面提供前述双特异性抗体的制备方法，包括如下步骤：在适合表达所述双特异性抗体的条件下，培养如前述的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述双特异性抗体的步骤。

本发明第六方面提供一种偶联物，其包含双特异性抗体以及偶联部分，所述双特异性抗体为前述双特异性抗体，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为化学小分子、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

本发明第七方面提供一种药物组合物，包括治疗有效量的前述双特异性抗体、宿主细胞或偶联物；可选地，所述药物组合物还包含药学上可接受的辅料。

本发明第八方面提供前述的双特异性抗体或者偶联物的在制备预防和/或治疗疾病的药物中用途，其中所述疾病或病况选自下组：癌症、免疫介导的疾病、纤维化疾病、病毒感染性疾病、神经退行性疾病、骨重塑、肾病，及其组合。

本发明第九方面提供前述的双特异性抗体或者偶联物在制备预防和/或治疗恶性肿瘤的药物中的用途；优选地，所述恶性肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌、肾癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、胰腺癌、胃肠道癌、脑癌、肝癌、黑色素瘤和白血病中的一种或多种。

如上所述，本发明特异性中和辅助性 T 细胞 TGF-β信号的双特异性抗体、其药物组合及其用途，具有以下有益效果：

本发明的双特异性抗体具有不同的双特异性抗体组合形式以及相应的亲和力（affinity）、亲和性（avidity）、中和效力、和抗肿瘤效果。本发明中所揭示的一种以高亲和性、亲合力及特异性结合并中和 TGF-β1 的双功能抗体，能在更低的血清浓度下高效结合并中和辅助性 T 细胞的 TGF-β信号，从而实现更好的抑制肿瘤效果。

本发明的双功能抗体 CT101、CT102、CT103、CT104、CT105、CT106、CT107、CT108、CT109、CT110、CT111 以及 CT112 能够很好地特异性与 CD4 结合,也能与 TGF-β1 结合，并且能够有效地阻断 TGF-β1 与 TGF-βRII 的结合，从而特异地解除 TGF-β对辅助性 T 细胞的免疫抑制；

其中，CT102 抑制辅助性 T 细胞 TGF-β1 信号激活的效果最强，其 IC50 值达到 2 pM；CT101 次之，其 IC50 值达到 15 pM。

本发明的 CT102 为最强的中和 TGF-β1 活性的双特异性抗体形式，IgG-(L)-ScFv, 这种形式的抗 CD4/抗 TGF-β1 双功能抗体，其 IC_{50} 能够达到 pM 级别，是其他形式双特异性抗体的 10 倍甚至 100 倍以上。

通过 MC38 结肠癌移植肿瘤模型，本发明人发现即使在很低的用药浓度下，这种 IgG-(L)-ScFv 形式的抗 CD4/抗 TGF-β1 双功能抗体 CT102 也能达到最佳的抗癌效果。

CT102 能够：

有效地结合人辅助性 T 细胞表面的 CD4 分子，解除 TGF-β对辅助性 T 细胞的免疫抑制；

有效地激活辅助性 T 细胞，从而激活一系列免疫细胞，抑制肿瘤的生长；

具有用于制备防治肝癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、肾癌、宫颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、胃癌、结肠癌、直肠癌等恶性肿瘤的药物的潜力。

本发明的双特异性抗体 CT101 能够很好地特异性与 CD4 结合，特异性地结合到辅助性 T 细胞上；与此同时，CT101 也能与 TGFβ1 结合，并且能够十分有效地阻断 TGFβ1 与 TGFβRII 的结合，从而特异地解除 TGFβ对辅助性 T 细胞的免疫抑制。具有用于制备防治肝癌、肺癌、乳腺癌、肾癌、宫颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、结肠癌、直肠癌等恶性肿瘤的药物的作用。

附图说明

图 1：双功能抗体 CT102 的 IgG-(L)-ScFv 形式结构示意图。

图 2：双功能抗体抗 CD4/抗 TGF-β1 的各种双特异性抗体组合形式结构示意图。

图 3：双价抗 TGF-β1 双功能抗体 CT101 和单价抗 TGF-β1 双功能抗体 CT110、CT111、及 CT112 对 HEK293 细胞 TGF-β信号通路的抑制作用。

图 4：双价抗 TGF-β1 双功能抗体 CT101 和单价抗 TGF-β1 双功能抗体 CT110、CT111、及 CT112 对稳定表达人 CD4 分子的 HEK293 细胞 TGF-β信号通路的抑制作用。

图 5：各种双价抗 TGF-β1 双功能抗体对稳定表达人 CD4 分子的 HEK293 细胞 TGF-β信号通路的抑制作用。

图 6：双价抗 TGF-β1 双功能抗体 CT101、CT102 以及单价抗 TGF-β1 双功能抗

体 CT111、CT112 与 CD4 结合的动力学特征参数检测结果。

图 7：双价抗 TGF-β1 双功能抗体 CT101、CT102 以及单价抗 TGF-β1 双功能抗体 CT111、CT112 与 TGF-β1 结合的动力学特征参数检测结果。

图 8：双价抗 TGF-β1 双功能抗体 CT101、CT102 以及单价抗 TGF-β1 双功能抗体 CT111、CT112 结合 CD4 与 TGF-β1 的示意图。

图 9：CT101、CT102、TGF-β1 抗体以及对照抗体的结构示意图。

图 10：FACS 流式细胞术检测 CT101、CT102、TGF-β1 抗体以及对照抗体在人源化 CD4 小鼠体内与 CD4 T 细胞的结合情况。

图 11： 药代动力学测试的结果，以确定双功能抗体 CT101、CT102 在单剂量 200μg 尾静脉注射后的半衰期。

图 12： 药代动力学测试的结果，以确定双功能抗体 CT101、CT102 在单剂量 20μg 尾静脉注射后的半衰期。

图 13：200μg 每剂量（共 4 剂量，5 天/次）的抗体治疗对 MC38 结肠癌移植肿瘤的抑制效果。治疗抗体有对照抗体、TGF-β1 抗体、以及双功能抗体 CT101 和 CT102。

图 14: 20μg 每剂量（共 4 剂量，5 天/次）的抗体治疗对 MC38 结肠癌移植肿瘤的抑制效果。治疗抗体有对照抗体、TGF-β1 抗体、以及双功能抗体 CT101 和 CT102。

图 15：不同的抗体治疗对 EMT-6 乳腺癌移植肿瘤的抑制效果。治疗抗体有对照 IgG、抗 TGFβ抗体、抗 CD8/抗 TGFβ双功能抗体、抗 CD64/抗 TGFβ双功能抗体以及抗 CD4/抗 TGFβ双功能抗体。

图 16：双功能抗体 CT101 的 IgG-ScFv 形式（Morrison 模式）结构示意图。

图 17：双功能抗体 CT101 的 IgG-ScFv 形式（Morrison 模式）氨基酸序列,其中下划线部分的氨基酸为抗体的重链或轻链 CDR 区域。

图 18：双功能抗体 CT101（IgG-ScFv 形式）的 SDS-PAGE 检测结果。左图为还原型蛋白电泳结果，右图为非还原型蛋白电泳结果。

图 19：双功能抗体 CT101（IgG-ScFv 形式）流经分子筛的高效液相色谱图。

图 20：双功能抗体 CT101 与 CD4 结合的动力学特征参数检测结果。

图 21：双功能抗体 CT101 与 TGFβ1 结合的动力学特征参数检测结果。

图 22：间接 ELISA 法检测双功能抗体 CT101、抗 TGFβ1 抗体 CAT192 与 TGFβ1 蛋白的结合常数 EC50。

图 23：间接 ELISA 法检测双功能抗体 CT101、抗 CD4 抗体 Ibalizumab 与 CD4 蛋白的结合常数 EC50。

图 24：竞争 ELISA 方法检测双功能抗体 CT101、抗 TGFβ1 抗体 CAT192 与 TGFβRII 竞争结合 TGFβ1 的活性。

图 25：FACS 流式细胞术检测双功能抗体 CT101、抗 CD4 抗体 Ibalizumab 与 HEK293-CD4 细胞表面 CD4 蛋白的结合常数 EC50。

图 26：双功能抗体 CT101 和抗 TGFβ1 抗体 CAT192 对 HEK293 细胞 TGFβ信号通路的抑制作用。

图 27：双功能抗体 CT101 和抗 TGFβ1 抗体 CAT192 对稳定表达人 CD4 分子的 HEK293 细胞 TGFβ信号通路的抑制作用。

图 28： 不同的抗体治疗对 MC38 结肠癌移植肿瘤的抑制效果。治疗抗体有对

照 IgG、抗 TGFβ1 抗体 CAT192、抗 PD-L1 抗体 atezolizumab、atezolizumab 联合 CAT192 以及双功能抗体 CT101。

具体实施方式

以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式，本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用，本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用，在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

在进一步描述本发明具体实施方式之前，应理解，本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案；还应当理解，本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案，而不是为了限制本发明的保护范围；在本发明说明书和权利要求书中，除非文中另外明确指出，单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

当实施例给出数值范围时，应理解，除非本发明另有说明，每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义，本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外，根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载，还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

本发明一实施例的双特异性抗体，所述双特异性抗体至少包括第一蛋白链和第二蛋白链，

所述第一蛋白链包括第一蛋白功能区的部分或全部结构，和/或，第二蛋白功能区的部分或全部结构。

所述第一蛋白功能区靶向 CD4，所述第一蛋白功能区为抗 CD4 的抗体或其抗原结合片段；

所述第二蛋白功能区靶向 TGFβ1，所述第二蛋白功能区为抗 TGFβ1 的抗体或其抗原结合片段。

所述抗 CD4 的抗体的重链可变区（VH）包括可变重链互补决定区 1（HCDR1）、可变重链互补决定区 2（HCDR2）、及可变重链互补决定区 3（HCDR3）。所述抗 CD4 的抗体的轻链可变区（VL）包括可变轻链互补决定区 1（LCDR1）、可变轻链互补决定区 2（LCDR2）、及可变轻链互补决定区 3（LCDR3）。

所述第一蛋白功能区的重链可变区（VH）包含氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:53—SEQ ID NO:55 所示的 HCDR1-HCDR3，其轻链可变区（VL）包含氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:58 所示的 LCDR1-LCDR3；

所述抗 TGFβ1 的抗体的轻链可变区（VL）包括可变轻链互补决定区 1（LCDR1）、可变轻链互补决定区 2（LCDR2）、及可变轻链互补决定区 3（LCDR3），

所述抗 TGFβ1 的抗体的重链可变区（VH）包括可变重链互补决定区 1（HCDR1）、可变重链互补决定区 2（HCDR2）、及可变重链互补决定区 3（HCDR3），

所述第二蛋白功能区的重链可变区（VH）包含氨基酸序列为 SEQ ID NO:59 所

示的HCDR1，氨基酸序列为SEQ ID NO:60所示的HCDR2，氨基酸序列为SEQ ID NO:61- SEQ ID NO:63任一个或多个所示的HCDR3，其轻链可变区（VL）包含氨基酸序列分别为SEQ ID NO:65—SEQ ID NO:67所示的LCDR1-LCDR3。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述抗 CD4 的抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab’、F(ab’)2、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体（ScFv）、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述抗 TGFβ1 的抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab’、F(ab’)2、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体（ScFv）、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白(IgG)，其重链可变区（VH）包括SEQ ID NO:1中所示的VH域氨基酸序列；且其轻链可变区（VL）包括SEQ ID NO:2中所示的VL域氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第二蛋白功能区为单链抗体或Fab，其重链可变区（VH）包括SEQ ID NO:3、SEQ ID NO：4或SEQ ID NO:5中任一所示的VH氨基酸序列；且其轻链可变区（VL）包括SEQ ID NO:6中所示的VL氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第一蛋白功能区的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:76所示，所述第一蛋白功能区的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:78所示；

和，

所述第二蛋白功能区为单链抗体或 Fab，所述第二蛋白功能区的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:80所示；所述第二蛋白功能区的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:82所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其存在形式不限于IgG-ScFv/Fab形式，也可以为其他双特异性抗体存在形式。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接；优选地，所述连接片段为(GGGGS)m, m为正整数，例如1、2、3、4、5或6。具体可以为SEQ ID NO:7所示的连接片段。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述的免疫球蛋白，其恒定区来自人抗体。优选地，所述免疫球蛋白的恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。

在本发明的一些实施方式中，所述第一蛋白链从N末端至C末端具有下式：

轻链可变区-轻链恒定区-（连接片段）m-重链可变区-（连接片段）n-轻链可变区，

所述第二蛋白链从N端至C端具有下式：

重链可变区-重链恒定区-铰链-Fc区，

优选地，所述连接片段为GGGGS，其中m是0或正整数，n是0或正整数。

在本发明的一些实施方式中，所述第一蛋白链的轻链可变区-轻链恒定区与第

二蛋白链的重链可变区-重链恒定区相互结合形成蛋白链组，两条蛋白链组形成二聚体。

在本发明的一些实施方式中，所述第一蛋白链 N 端的轻链可变区包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列，所述的第一蛋白链的重链可变区包含 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO：4 或 SEQ ID NO:5 中任一所示的氨基酸序列，所述的第一蛋白链 C 端的轻链可变区包括 SEQ ID NO:6 中所示的氨基酸序列；且所述第二蛋白链的重链可变区包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其所述第一蛋白链包含 SEQ ID NO:15 中所示的氨基酸序列；且其所述第二蛋白链包含 SEQ ID NO:16 中所示的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:23 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:24 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链和第四蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示，所述第四蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:26 所示；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:27 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链和第四蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:29 所示，所述第四蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:30 所示；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:37 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:38 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:39 所示；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:40 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:41 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID

NO:42 所示；

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:44 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链和第四蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:45 所示，所述第四蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:46 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其所述抗体能选择性地结合人 CD4 以及 TGF-β1 分子。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，

所述的免疫球蛋白，其恒定区来自于人抗体；

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

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，

所述的免疫球蛋白，其重链恒定区为人 IgG1 chain C region 或人 IgG4 chain C region, 并且其轻链恒定区为人 Ig kappa chain C region。

在本发明的一些实施方式中，所述免疫球蛋白的恒定区是人源化的，例如，重链恒定区均采用 IgG4 chain C region，ACCESSION:P01861；轻链恒定区均采用 Ig kappa chain C region，ACCESSION:P01834。

在本发明的一些实施方式中，所述轻链恒定区包含如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述重链恒定区包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述铰链区包含如 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述 Fc 区包含如 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接；

优选地，所述连接片段为(GGGGS)m, m 为正整数，例如 1、2、3、4、5 或 6。其中，GGGGS(SEQ ID NO:8)为 Linker 的构成单元。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为 1 个、2 个或者 2 个以上。

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

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

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

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

在本发明的一些实施方式中，所述单链抗体的 VH 与 VL 之间存在二硫键。在抗体的 VH 和 VL 之间引入二硫键的方法是本领域熟知的，例如可参见美国专利申

请 US5747654；Rajagopal 等人，Prot.Engin.10(1997)1453-1459； Reiter 等人，Nature Biotechnology 14(1996)1239-1245 ； Webber 等人， Molecular Immunology 32(1995)249-258； Reiter 等人， Immunity 2(1995)281-287； Reiter 等人， JBC 269(1994)18327-18331；Reiter 等人，Inter. J. of Cancer 58(1994)142-149；或, Reiter 等人，Cancer Res. 54(1994)2714-2718；其通过引用并入本文。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述的双特异性抗体以小于 10^{-9} M 或更小的 Kd 结合 CD4 蛋白和/或 TGF-β1 蛋白；优选地，所述 Kd 通过 Biacore 分子相互作用仪测得。

在本发明的一些实施方式中所述的双特异性抗体，其所述抗体在 TGF-β1 报告基因荧光素酶活性测定中具有针对人 TGF-β1 的低于 5nM 的 IC_{50}。

在本发明的一些实施方式中所述的双特异性抗体，其所述抗体在 TGF-β1 报告基因荧光素酶活性测定中具有针对人 TGF-β1 的低于 5pM 的 IC_{50}。

本发明的另一方面涉及一种分离的核酸分子，其编码本发明中任一所述的双特异性抗体。

本发明还涉及一种载体，其包含本发明的分离的核酸分子。

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

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体的方法，其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述双特异性抗体的步骤。

本发明的再一方面涉及一种偶联物，其包含双特异性抗体以及偶联部分，其中，所述双特异性抗体为本发明中任一项所述的双特异性抗体，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为小分子化合物、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

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

本发明的双特异性抗体或者本发明的药物组合物可以配制成药学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。本发明的药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的双特异性抗体，以及任选地，同时掺入其他期望的成分(包括但不限于，pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合)，随后过滤除菌。此外，可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如，通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中，例如无菌无热原水。此外，本发明的双特异性抗体可以以单位剂量形式存在于药物组合物中，以便于施用。在某些实施方案中，所述单位剂量为至少 1mg，至少 5mg，至少 10mg，至少 15mg，至少 20mg，至少 25mg，至少 30mg，至少 45mg，至少 50mg，至少 75mg，或至少 100mg。在所述药物组合物为液体(例如，注射剂)剂型的情况下，其可以包含浓度至少为

0.1mg/ml，如至少 0.25mg/ml，至少 0.5mg/ml，至少 1mg/ml，至少 2.5mg/ml，至少 5mg/ml，至少 8mg/ml，至少 10mg/ml，至少 15mg/ml，至少 25mg/ml，至少 50mg/ml，至少 75mg/ml，或至少 100mg/ml 的本发明的双特异性抗体。

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

本发明所提供的双特异性抗体或药物组合物可以单独使用或联合使用，也可以与另外的药学活性剂(例如肿瘤化疗药物)联合使用。这种另外的药学活性剂可以在施用本发明的双特异性抗体或本发明的药物组合物之前、同时或之后施用。
在本发明中，可调整给药方案以获得最佳目的反应(例如治疗或预防反应)。例如，可以单次给药，可以在一段时间内多次给药，或者可以随治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物的在制备预防和/或治疗疾病的药物中用途，其中所述疾病或病况选自下组：癌症、免疫介导的疾病、纤维化疾病、病毒感染性疾病、神经退行性疾病、骨重塑、肾病，及其组合。

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

本发明的再一方面涉及一种预防和/或治疗恶性肿瘤的方法，包括给予受试者有效量的本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物的步骤；优选地，所述肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、肾癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌和白血病。

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

在本发明中，所述受试者可以为啮齿类动物，如小鼠，或灵长类动物，例如人，食蟹猴。

本发明中任一项所述的双特异性抗体或者偶联物，其用于预防和/或治疗恶性肿瘤；优选地，所述肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、黑色素瘤、肾癌、胰腺癌、皮肤癌、胶质瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌和白血病。

抗体治疗药物，特别是单克隆抗体(Monoclonal Antibody, mAb)已在多种疾病的

治疗中取得了良好的疗效。获取这些治疗性抗体的传统实验方法是采用抗原免疫动物，在免疫动物体内获取靶向抗原的抗体，或通过亲和力成熟的方法来改进那些与抗原的亲和力较低的抗体。然而，这些方法需要大量时间和精力，大多数时候也并不能针对抗原上的特定表位。

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)。

通过本领域技术人员所熟知的技术手段，例如通过 VBASE2 数据库分析下面的(1)-(13)项中的单克隆抗体序列的 CDR 区的氨基酸序列，结果如下：

(1)双功能抗体抗 CD4/抗 TGF-β1 的第一蛋白功能区：

重链可变区(VH)的氨基酸序如 SEQ ID NO:1 所示，轻链可变区(VL)的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1:GYTFTSYVIH(SEQ ID NO:53)

HCDR2:YINPYNDGTDYDEKFKG(SEQ ID NO:54)

HCDR3:EKDNYATGAWFA (SEQ ID NO:55)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1:KSSQSLLYSTNQKNYLA(SEQ ID NO:56)

LCDR2:WASTRES(SEQ ID NO:57)

LCDR3:QQYYSYRT (SEQ ID NO:58)

(2) 双功能抗体抗 CD4/抗 TGF-β1 的第二蛋白功能区：

重链可变区的氨基酸序如 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、及 SEQ ID NO:5 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1:SYGMH(SEQ ID NO:59)

HCDR2:VISYDGSIKYYADSVKG(SEQ ID NO:60)

HCDR3:TGEYSGYDTDPQYS(SEQ ID NO:61)或 TGEYSGYDTSGVEL(SEQ ID NO:62)或 TGFYSGYDTPASPD(SEQ ID NO:63)

HCDR3 共有序列:$TGX_1YSGYDTX_2X_3X_4X_5X_6$(SEQ ID NO:64)

其中：X1 可以是任意氨基酸（优选为 E 或 F），

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1:RSSQGIGDDLG(SEQ ID NO:65)

LCDR2:GTSTLQS(SEQ ID NO:66)

LCDR3:LQDSNYPLT(SEQ ID NO:67)

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，当提及 TGF-β1 蛋白(GenBank ID：NP_000651.3)的氨基酸序列时，其包括 TGF-β1 蛋白的全长。然而，本领域技术人员理解，在 TGF-β1 蛋

白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换，缺失和/或添加)，而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“TGF-β1 蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。在本发明的一个实施方案中，TGF-β1 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:51 的下划线部分所示。

如本文中所使用的，当提及 CD4 蛋白(cluster differentiation 4,NCBIGenBank:NP_000607.1)的氨基酸序列时，其包括 CD4 蛋白的全长，还包括 CD4 的胞外片段,可溶性 CD4 分子（soluble CD4，sCD4）。然而，本领域技术人员理解，在 CD4 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换，缺失和/或添加)，而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“CD4 蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。在本发明的一个实施方案中，CD4 的胞外片段 sCD4 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 的下划线部分所示。

如本文中所使用的，术语 EC_{50} 是指半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect)，是指能引起 50%最大效应的浓度。

如本文中所使用的，术语 IC_{50} 是指半最大抑制浓度(concentration for 50% of maximal inhibition)，是指能引起 50%最大抑制的浓度。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，是指通常由两对多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。从一般意义上，重链可以理解为抗体中分子量较大的多肽链，轻链是指抗体中分子量较小的多肽链。轻链可分类为κ和λ轻链。重链通常可分类为μ、δ、γ、α或ε，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of ImmunologicalInterest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987and 1991))，或 Chothia&Lesk(1987)J.Mol.Biol.196:901-917；Chothia 等人(1989)Nature 342:878-883 的定义。特别地，重链还可以包含 3 个以上 CDR，例如 6、9、或 12 个。例如在本发明的双功能抗体中，重链可以是 IgG 抗体的重链的 C 端连接另一个抗体的 ScFv，这种情况下重链含有 9 个 CDR。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的，术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽，其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合，其也被称为“抗原结合部分”。通常参见，Fundamental

Immunology,Ch.7(Paul,W.,ed.,第 2 版，Raven Press,N.Y.(1989)，其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下，抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如，scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

如本文中所使用的，术语“Fd 片段”意指由 VH 和 CH1 结构域组成的抗体片段；术语“Fv 片段”意指由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成的抗体片段；术语“dAb 片段”意指由 VH 结构域组成的抗体片段(Ward 等人,Nature 341:544-546(1989))；术语“Fab 片段”意指由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的抗体片段；术语“F(ab')2 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。

在一些情况下，抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如,scFv)，其中 VL 和 VH 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见，例如,Bird 等人,Science 242:423-426(1988) 和 Huston 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988))。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH2-VL-接头-VH-COOH 或 NH2-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列$(GGGGS)_4$ 的接头，但也可使用其变体(Holliger 等人(1993)，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan 等人(1995)，Protein Eng.8:725-731，Choi 等人(2001)，Eur.J.Immunol.31:94-106，Hu 等人(1996)，Cancer Res.56:3055-3061，Kipriyanov 等人(1999)，J.Mol.Biol.293:41-56 和 Roovers 等人(2001)，Cancer Immunol.描述。

在一些情况下，抗体的抗原结合片段是双抗体，即，双价抗体，其中 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见，例如,Holliger P.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)，和 Poljak R.J.等人,Structure 2:1121-1123(1994))。

可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体获得抗体的抗原结合片段(例如，上述抗体片段)，并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

在本文中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“抗体”时，其不仅包括完整抗体，而且包括抗体的抗原结合片段。

如本文中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片断，也即除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得(Nature,256:495,1975)，但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S.P 4,816,567)。

如本文中所使用的，术语“嵌合抗体”是指这样的抗体，其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体(其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类)，而轻

链或/和重链的另一部分源自另一个抗体(其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类)，但无论如何，其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S.P 4,816,567to Cabilly etal. ； Morrison et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851 6855(1984))。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体(供体抗体)的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段，其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如，小鼠、大鼠或兔)抗体。此外，受体抗体的构架区(FR)的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换，或被其他抗体的氨基酸残基替换，以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容，可参见例如，Jones et al.,Nature,321:522 525(1986) ； Reichmann etal.,Nature,332:323 329(1988) ； Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593 596(1992) ； 和 Clark,Immunol.Today 21:397 402(2000)。

如本文中所使用的，术语“表位”是指，抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，表位通常以独特的空间构象包括至少 3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14 或 15 个连续或非连续的氨基酸，其可以是“线性的”或“构象的”。参见，例如，EpitopeMapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第 66 卷，G.E.Morris，Ed.(1996)。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

如本文中所使用的，术语“分离的”或“被分离的”指的是，从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或 P1 来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如 SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括

但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体(或对某抗原具有特异性的抗体)是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、10^{-7} M、10^{-8} M、10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力(Kd)结合该抗原。在本发明的一些实施方案中，术语“靶向”是指特异性结合。

如本文中所使用的，术语“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、10^{-7} M、10^{-8} M、10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数(Kd)结合抗原，例如，如使用表面等离子体共振术(SPR)在 Biacore 仪中测定的。

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，甘氨酸可用 G 或 Gly 表示，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

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

如本文中所使用的，术语“佐剂”是指非特异性免疫增强剂，当其与抗原一起或预先递送入机体时，其可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。佐剂有很多种，包括但不限于铝佐剂(例如氢氧化铝)、弗氏佐剂(例如完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂)、短小棒状杆菌、脂多糖、细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物试验中最常用的佐剂。氢氧化铝佐剂则在临床实验中使用较多。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

制备例 1：重组蛋白 CD4-His 的表达和纯化

1.构建 pCMV-CD4-His 质粒

以 CD4 human cDNA (Genewiz 公司合成)为模板进行 PCR 扩增并用普通 DNA 产物纯化试剂盒纯化回收 CD4-His 片段。将回收后的 CD4-His 片段与表达载体 pCMV 使用 NheI 和 XbaI 酶切，胶回收目的基因片段和线性表达载体，通过 T4 连

接酶连接，并将全部连接产物转化 DH5α 化学感受态细胞，涂布带有 Amp 的 Agar 平板，挑选分离良好的单菌落进行菌落 PCR 鉴定，将 PCR 鉴定结果为阳性的克隆子接种到 LB 培养基培养，并取菌液送广州英俊公司测序验证。测序结果比对显示，阳性重组子插入序列完全正确。

2.重组蛋白 CD4-His 的表达和纯化

按照 lipofectamin 转染试剂盒(购自 Invitrogen 公司)方法将重组质粒 pCMV-CD4-his 转染 HEK293F 细胞(购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 Binding Buffer A (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) 后上样至 HisTrap 柱，用 Elution Buffer (20 mM HEPES,150 mM NaCl, 0.5 M Immidazole, pH 7.4)线性洗脱蛋白，初纯样品用 HiTrap Desalting 柱换液至 Binding Buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 9.0)并上样至 HiTrap Q 柱，用 Elution Buffer B (50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 9.0)线性洗脱蛋白、回收目标样品并换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

制得了融合蛋白 CD4-His。

CD4-His 的氨基酸序列如下(371aa)：

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKL NDRADSRRSLWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDT HLLQGQSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSVSQLELQDSGTWTCTVL QNQKKVEFKIDIVVLAFQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQA ERASSSKSWITFDLKNKEVSVKRVTQDPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGN LTLALEAKTGKLHQEVNLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEA KVSKREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLESNIKVLPTWHHHHHH(SEQ ID NO:49)

编码重组 CD4-His 蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO:50 所示。

制备例 2：重组 TGF-β1 的制备

1.构建 pCMV-TGF-β1-His 质粒

以 TGF-β1 human cDNA (Genewiz 公司合成)为模板进行 PCR 扩增并用普通 DNA 产物纯化试剂盒纯化回收 TGF-β1-His 片段。将回收后的 TGF-β1-His 片段与表达载体 pCMV 使用 NheI 和 XbaI 酶切，胶回收目的基因片段和线性表达载体，通过 T4 连接酶连接，并将全部连接产物转化 DH5α 化学感受态细胞，涂布带有 Amp 的 Agar 平板，挑选分离良好的单菌落进行菌落 PCR 鉴定，将 PCR 鉴定结果为阳性的克隆子接种到 LB 培养基培养，并取菌液送广州英俊公司测序验证。测序结果比对显示，阳性重组子插入序列完全正确。

2.融合蛋白 TGF-β1-His 的表达和纯化

按照 lipofectamin 转染试剂盒(购自 Invitrogen 公司)方法将重组质粒 pCMV-TGF-β1-his 转染 HEK293F 细胞(购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 Binding Buffer A (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) 后上样至 HisTrap 柱，用 Elution Buffer (20 mM HEPES,150 mM NaCl, 0.5 M Immidazole, pH 7.4)线性洗脱蛋白，初纯样品用 HiTrap Desalting 柱换液至 Binding Buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 9.0)并上样至 HiTrap Q 柱，用 Elution Buffer B (50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 9.0)线性洗脱蛋白、回收目标样品并换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

制得了融合蛋白 TGF-β1-His。

TGF-β1-His 的氨基酸序列如下(118aa)：

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYI WSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMI VRSCKCSHHHHHH(SEQ ID NO:51)

编码重组 TGF-β1-His 蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO:52 所示。

制备例 3：TGF-β1 抗体(ScFv-IgG4)的制备

TGF-β1 抗体的重链可变区和轻链可变区(来源于 metelimumab)通过$(GGGGS)_3$接头连接在一起，组成 ScFv 形式，然后与 Fc 恒定区通过铰链连接在一起，组成 ScFv-IgG。Fc 恒定区采用 Ig gamma-4 chain C region，ACCESSION:P01861。编码抗 TGF-β1 抗体的核苷酸序列由上海生工合成。

将编码 TGF-β1 抗体的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 TGF-β1 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

制得了 TGF-β1 抗体（ScFv-IgG4）。

编码 TGF-β1 抗体的氨基酸序列：(475bp)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY DTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSL QPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKSGSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:68）

制备例 4：对照抗体（ScFv-IgG4）的制备

对照抗体的重链可变区和轻链可变区通过$(GGGGS)_3$接头连接在一起，组成 ScFv 形式，然后与 Fc 恒定区通过铰链连接在一起，组成 ScFv-IgG。Fc 恒定区采用 Ig gamma-4 chain C region，ACCESSION:P01861。对照抗体的核苷酸序列由上海生工合成。

将编码对照抗体的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得对照抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码对照抗体的氨基酸序列：(475aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG
WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYY
GSSHWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKSGSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK （SEQ ID NO:69）

制得了对照抗体（ScFv-IgG4）。

制备例 5：双功能抗体 CT101 的制备

双功能抗体 CT101 的第一蛋白链由 Ibalizumab 的轻链组成，其第二蛋白链由 Ibalizumab 的重链通过$(GGGGS)_3$接头与抗 TGF-β1 ScFv 连接在一起，最终两条蛋白链组成 IgG-(H)-ScFv 形式。

将编码双功能抗体 CT101 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT101 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT101 第一蛋白链的氨基酸序列：

(219aa)
DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGTKLEI
KGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
（SEQ ID NO:13）

编码双功能抗体 CT101 第二蛋白链的氨基酸序列：(709aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC
AASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILL
IYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRL
EIK（SEQ ID NO:14）

制得了双功能抗体 CT101。

制备例 6：双功能抗体 CT102 的制备

双功能抗体 CT102 的第一蛋白链由 Ibalizumab 的轻链通过$(GGGGS)_3$接头与抗 TGF-β1 ScFv 连接在一起，其第二蛋白链由 Ibalizumab 的重链组成，最终两条蛋白链组成 IgG-(L)-ScFv 形式。

将编码双功能抗体 CT102 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT102 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT102 第一蛋白链的氨基酸序列：(479aa)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
ECGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHW
VRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS
PSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK（SEQ ID NO:15）

编码双功能抗体 CT102 第二蛋白链的氨基酸序列：(449aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:16）

制得了双功能抗体 CT102。

制备例 7：双功能抗体 CT103 的制备

双功能抗体 CT103 的第一蛋白链由 Ibalizumab 的轻链组成，其第二蛋白链由抗 TGF-β1 ScFv 通过$(GGGGS)_3$接头与 Ibalizumab 的重链连接在一起，最终两条蛋白链组成 ScFv-(H)-IgG 形式。

将编码双功能抗体 CT103 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT103 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization

buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT103 第一蛋白链的氨基酸序列：(219aa)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC（SEQ ID NO:17）

编码双功能抗体 CT103 第二蛋白链的氨基酸序列：(709aa)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTIT
CRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSL
QPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGPE
VVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEK
FKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
K（SEQ ID NO:18）

制得了双功能抗体 CT103。

制备例 8：双功能抗体 CT104 的制备

双功能抗体 CT104 的第一蛋白链由抗 TGF-β1 ScFv 通过$(GGGGS)_3$ 接头与 Ibalizumab 的轻链连接在一起，其第二蛋白链由 Ibalizumab 的重链组成，最终两条蛋白链组成 ScFv-(L)-IgG 形式。

将编码双功能抗体 CT104 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT104 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT104 第一蛋白链的氨基酸序列：(479aa)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTIT
CRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSL
QPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSL
AVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGTKLEIKGTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
（SEQ ID NO:19）

编码双功能抗体 CT104 第二蛋白链的氨基酸序列：(449aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:20）

制得了双功能抗体 CT104。

制备例 9：双功能抗体 CT105 的制备

双功能抗体CT105的第一蛋白链由抗TGF-β1抗体的轻链可变区通过$(GGGGS)_1$接头与 Ibalizumab 的轻链连接在一起，其第二蛋白链由抗 TGF-β1 抗体的重链可变区与 Ibalizumab 的重链组成，最终两条蛋白链组成 DVD-IgG 形式。

将编码双功能抗体 CT105 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT105 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT105 第一蛋白链的氨基酸序列：(331aa)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGG
GSDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKL
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC（SEQ ID NO:21）

编码双功能抗体 CT105 第二蛋白链的氨基酸序列：(449aa)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSQVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFT
SYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELS
SLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS
TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD

KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:22）

制得了双功能抗体 CT105。

制备例 10：双功能抗体 CT106 的制备

双功能抗体 CT106 的第一蛋白链由 Ibalizumab 的轻链组成，其第二蛋白链由 Ibalizumab 的重链组成（Fc 区引入 S354C/T366W/R409A Knob 突变），其第三蛋白链由串联的抗 TGF-β1 抗体的重链可变区与轻链恒定区组合（crossmab 形式），以及 Fc 恒定区 IgG4（引入 Y349C/T366S/L368A/F405K/Y407V Hole 突变）组成，其第四蛋白链由抗 TGF-β1 抗体的轻链可变区与重链恒定区 CH1 通过 crossmab 形式组成，最终四条蛋白链组成 sFab-IgG 形式。

将编码双功能抗体 CT106 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT106 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT106 第一蛋白链的氨基酸序列：(219aa)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC（SEQ ID NO:23）

编码双功能抗体 CT106 第二蛋白链的氨基酸序列：(449aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:24）

编码双功能抗体 CT106 第三蛋白链的氨基酸序列：(698aa)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQ

GLSSPVTKSFNRGECSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS
YGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSKYGPPCPPCPAPEFLG

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFKLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID
NO:25）

编码双功能抗体 CT106 第四蛋白链的氨基酸序列：(210aa)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES（SEQ ID NO:26)

制得了双功能抗体 CT106。

制备例 11：双功能抗体 CT107 的制备

双功能抗体 CT107 的第一蛋白链由抗 TGF-β1 抗体的轻链可变区与重链恒定区 CH1 通过 crossmab 形式组成, 其第二蛋白链由抗 TGF-β1 抗体的重链可变区与轻链恒定区组合（crossmab 形式），以及 Fc 恒定区 IgG4（Fc 区引入 S354C/T366W/R409A Knob 突变）组成，其第三蛋白链由 Ibalizumab 重链可变区与重链恒定区 CH1 组合，抗 TGF-β1 抗体的重链可变区与轻链恒定区组合（crossmab 形式），以及 Fc 恒定区 IgG4（Fc 区引入 Y349C/T366S/L368A/F405K/Y407V Hole 突变）组成，其第四蛋白链由 Ibalizumab 的轻链组成，最终四条蛋白链组成 Fab-IgG 形式。

将编码双功能抗体 CT107 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT107 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT107 第一蛋白链的氨基酸序列：(210aa)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES（SEQ ID NO:27）

编码双功能抗体 CT107 第二蛋白链的氨基酸序列：(460aa)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQ

GLSSPVTKSFNRGECSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSL
WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQE
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:28）

编码双功能抗体 CT107 第三蛋白链的氨基酸序列：(687aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAP
GKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEE
MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFKLVSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:29）

编码双功能抗体 CT107 第四蛋白链的氨基酸序列：(219aa)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC（SEQ ID NO:30)

制得了双功能抗体 CT107。

制备例 12：双功能抗体 CT108 的制备

双功能抗体 CT108 的第一蛋白链由 Ibalizumab 的轻链组成，其第二条链由抗 TGF-β1 抗体的轻链可变区与重链恒定区 CH1 通过 crossmab 形式组成，其第三蛋白链由 Ibalizumab 重链可变区与重链恒定区 CH1 组合，抗 TGF-β1 抗体的重链可变区与轻链恒定区组合（crossmab 形式），以及 Fc 恒定区 IgG4 组成，最终三条蛋白链组成 Fab-IgG 形式。

将编码双功能抗体 CT108 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT108 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT108 第一蛋白链的氨基酸序列：(219aa)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC（SEQ ID NO:31）

编码双功能抗体 CT108 第二蛋白链的氨基酸序列：(210aa)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES（SEQ ID NO:32）

编码双功能抗体 CT108 第三蛋白链的氨基酸序列：(687aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD

KRVESGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:33）

制得了双功能抗体 CT108。

制备例 13：双功能抗体 CT109 的制备

双功能抗体 CT109 的第一蛋白链由 Ibalizumab 的轻链组成，其第二条链由抗 TGF-β1 抗体的轻链可变区与重链恒定区 CH1 通过 crossmab 形式组成，其第三蛋白链由 Ibalizumab 的重链，以及抗 TGF-β1 抗体的重链可变区与轻链恒定区组合（crossmab 形式）组成，最终三条蛋白链组成 IgG-Fab 形式。

将编码双功能抗体 CT109 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT109 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT109 第一蛋白链的氨基酸序列：(219aa)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGTKLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO:34）

编码双功能抗体 CT109 第二蛋白链的氨基酸序列：(210aa)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES（SEQ ID NO:35）

编码双功能抗体 CT109 第三蛋白链的氨基酸序列：(696aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT

VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK

PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGG
SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG
KELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO:36）

制得了双功能抗体 CT109。

制备例 14：双功能抗体 CT110 的制备

双功能抗体 CT110 的第一蛋白链由 Ibalizumab 的轻链组成，其第二蛋白链由 Ibalizumab 的重链（Fc 区引入 S354C/T366W/R409A Knob 突变）通过（GGGGS）$_1$ 接头与抗 TGF-β1 抗体的重链可变区组成，其第三蛋白链由 Ibalizumab 的重链（Fc 区引入 Y349C/T366S/L368A/F405K/Y407V Hole 突变）通过（GGGGS）$_1$ 接头与抗 TGF-β1 抗体的轻链可变区组成，最终三条蛋白链组成 IgG-Fv 形式。

将编码双功能抗体 CT110 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT110 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT110 第一蛋白链的氨基酸序列：(219aa)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC（SEQ ID NO:37）

编码双功能抗体 CT110 第二蛋白链的氨基酸序列：(577aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY
GMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL

RAEDTAVYYCARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSS（SEQ ID NO:38）

编码双功能抗体 CT110 第三蛋白链的氨基酸序列：(561aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFKLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLG
WYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQ
DSNYPLTFGGGTRLEIK（SEQ ID NO:39）

制得了双功能抗体 CT110。

制备例 15：双功能抗体 CT111 的制备

双功能抗体 CT111 的第一蛋白链由 Ibalizumab 的轻链组成，其第二蛋白链由 Ibalizumab 的重链（Fc 区引入 S354C/T366W/R409A Knob 突变）组成，其第三蛋白链由抗 TGF-β1 ScFv 通过铰链与 Fc 恒定区 IgG4(Fc 区引入 Y349C/T366S/L368A/F405K/Y407V Hole 突变)连接组成，最终三条蛋白链组成 Fab-Fc-ScFv 形式。

将编码双功能抗体 CT111 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT111 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT111 第一蛋白链的氨基酸序列：(219aa)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC（SEQ ID NO:40）

编码双功能抗体 CT111 第二蛋白链的氨基酸序列：(449aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQEGNVFSCSVMH

EALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:41）

编码双功能抗体 CT111 第三蛋白链的氨基酸序列：(471aa)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTIT
CRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSL
QPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEM
TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFKLVSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:42）

制得了双功能抗体 CT111。

制备例 16：双功能抗体 CT112 的制备

双功能抗体 CT112 的第一蛋白链由 Ibalizumab 的轻链组成，其第二蛋白链由 Ibalizumab 重链（Fc 区引入 S354C/T366W/R409A Knob 突变）组成，其第三蛋白链由抗 TGF-β1 抗体的重链可变区与轻链恒定区组合（crossmab 形式），以及 Fc 恒定区 IgG4（Fc 区引入 S354C/T366W/R409A Knob 突变）组成，其第四蛋白链由抗 TGF-β1 抗体的轻链可变区与重链恒定区 CH1 组合（crossmab 形式）组成，最终四条蛋白链组成 IgG Crossmab 形式。

将编码双功能抗体 CT112 的核苷酸序列克隆到 pCMV 载体中，获得 CT112 抗体的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞 (购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 1 x Binding Buffer (20 mM Na_3PO_4, pH 7.0) 后上样至 Protein G 柱，用 Elution Buffer (10 mM Tris-Glycine, pH 2.7)洗脱蛋白至 Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0)。回收目标样品换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

编码双功能抗体 CT112 第一蛋白链的氨基酸序列：(219aa)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC（SEQ ID NO:43）

编码双功能抗体 CT112 第二蛋白链的氨基酸序列：(449aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:44）

编码双功能抗体 CT112 第三蛋白链的氨基酸序列：(460aa)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQ

GLSSPVTKSFNRGECSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLS
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFKLVSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:45）

编码双功能抗体 CT112 第四蛋白链的氨基酸序列：(210aa)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES（SEQ ID NO:46）

制得了双功能抗体 CT112。

制备例 17：重组 TGFβ1 的制备

1.构建 pCMV-TGFβ1-His 质粒

以 TGFβ1 human cDNA (Genewiz 公司合成)为模板进行 PCR 扩增并用普通 DNA 产物纯化试剂盒纯化回收 TGFβ1-His 片段。将回收后的 TGFβ1-His 片段与表达载体 pCMV 使用 NheI 和 XbaI 酶切，胶回收目的基因片段和线性表达载体，通过 T4 连接酶连接，并将全部连接产物转化 DH5α 化学感受态细胞，涂布带有 Amp 的 Agar 平板，挑选分离良好的单菌落进行菌落 PCR 鉴定，将 PCR 鉴定结果为阳性的克隆子接种到 LB 培养基培养，并取菌液送广州英俊公司测序验证。测序结果比对显示，阳性重组子插入序列完全正确。

2.融合蛋白 TGFβ1-His 的表达和纯化

按照 lipofectamin 转染试剂盒(购自 Invitrogen 公司)方法将重组质粒 pCMV-TGFβ1-his 转染 HEK293F 细胞(购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 Binding Buffer A (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) 后上样至 HisTrap 柱，用 Elution Buffer (20 mM HEPES,150 mM NaCl, 0.5 M Immidazole, pH 7.4)线性洗脱蛋白，初纯样品用 HiTrap Desalting 柱换液至 Binding Buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 9.0)并上样至 HiTrap Q 柱，用 Elution Buffer B (50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 9.0)线性洗脱蛋白、回收目标样品并换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

制得了融合蛋白 TGFβ1-His。

TGFβ1-His 的氨基酸序列如下(118aa)：

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYI
WSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMI
VRSCKCSHHHHHH(SEQ ID NO:70)

其中，下划线部分为 TGFβ1 的氨基酸序列。

编码 TGFβ1-His 的核酸序列

GCCCTGGATACCAACTATTGCTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGCTGTGT

GCGGCAGCTGTACATTGACTTTAGGAAGGACCTGGGTTGGAAGTGGATCCAC
GAGCCCAAGGGCTACCATGCCAACTTCTGCCTCGGGCCCTGCCCCTACATTTG
GAGCCTGGACACGCAGTACAGCAAGGTCCTGGCCCTGTACAACCAGCATAAC
CCGGGCGCCTCGGCGGCGCCGTGCTGCGTGCCGCAGGCGCTGGAGCCGCTGC
CCATCGTGTACTACGTGGGCCGCAAGCCCAAGGTGGAGCAGCTGTCCAACAT
GATCGTGCGCTCCTGCAAGTGCAGCCATCATCATCATCATCAT（SEQ ID NO:71）

制备例 18：重组蛋白 CD4-His 的表达和纯化

1.构建 pCMV-CD4-His 质粒

以 CD4 human cDNA (Genewiz 公司合成)为模板进行 PCR 扩增并用普通 DNA 产物纯化试剂盒纯化回收 CD4-His 片段。将回收后的 CD4-His 片段与表达载体 pCMV 使用 NheI 和 XbaI 酶切，胶回收目的基因片段和线性表达载体，通过 T4 连接酶连接，并将全部连接产物转化 DH5α 化学感受态细胞，涂布带有 Amp 的 Agar 平板，挑选分离良好的单菌落进行菌落 PCR 鉴定，将 PCR 鉴定结果为阳性的克隆子接种到 LB 培养基培养，并取菌液送广州英俊公司测序验证。测序结果比对显示，阳性重组子插入序列完全正确。

2.重组蛋白 CD4-His 的表达和纯化

按照 lipofectamin 转染试剂盒(购自 Invitrogen 公司)方法将重组质粒 pCMV-CD4-his 转染 HEK293F 细胞(购自 Invitrogen 公司)5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩并换液至 Binding Buffer A (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) 后上样至 HisTrap 柱，用 Elution Buffer (20 mM HEPES,150 mM NaCl, 0.5 M Immidazole, pH 7.4)线性洗脱蛋白，初纯样品用 HiTrap Desalting 柱换液至 Binding Buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 9.0)并上样至 HiTrap Q 柱，用 Elution Buffer B (50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 9.0)线性洗脱蛋白、回收目标样品并换液至 PBS。取纯化后样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

制得了融合蛋白 CD4-His。

CD4-His 的氨基酸序列如下(371aa)：

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLN
DRADSRRSLWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHL
LQGQSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSVSQLELQDSGTWTCTVLQN
QKKVEFKIDIVVLAFQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAER
ASSSKSWITFDLKNKEVSVKRVTQDPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTL
ALEAKTGKLHQEVNLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVS
KREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLESNIKVLPTWHHHHHH(SEQ ID NO:
72)

其中，下划线部分为 CD4 的氨基酸序列。

编码 CD4-His 的核酸序列

AAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAAGGGGATACAGTGGAACTGACCTGTA
CAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAAACTCCAACCAGAT
AAAGATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTTAACTAAAGGTCCATCCAAGCTGA
ATGATCGCGCTGACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAAACTTTCCCCT
GATCATCAAGAATCTTAAGATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGG
AGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTCGGATTGACTGCCAACTC
TGACACCCACCTGCTTCAGGGGCAGAGCCTGACCCTGACCTTGGAGAGCCCC

CCTGGTAGTAGCCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAAGGGGTAAAAACATACA
GGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGCACC
TGGACATGCACTGTCTTGCAGAACCAGAAGAAGGTGGAGTTCAAAATAGACA
TCGTGGTGCTAGCTTTCCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGG
GAACAGGTGGAGTTCTCCTTCCCACTCGCCTTTACAGTTGAAAAGCTGACGGG
CAGTGGCGAGCTGTGGTGGCAGGCGGAGAGGGCTTCCTCCTCCAAGTCTTGG
ATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAAGTGTCTGTAAAACGGGTTACCCAGG
ACCCTAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTCCACCTCACCCTGCCCCAG
GCCTTGCCTCAGTATGCTGGCTCTGGAAACCTCACCCTGGCCCTTGAAGCGAA
AACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTGGTGGTGATGAGAGCCACTCAG
CTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGAT
GCTGAGTTTGAAACTGGAGAACAAGGAGGCAAAGGTCTCGAAGCGGGAGAA
GGCGGTGTGGGTGCTGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGT
GACTCGGGACAGGTCCTGCTGGAATCCAACATCAAGGTTCTGCCCACATGGCA
TCATCATCATCATCAT（SEQ ID NO:73）

制备例 19：融合蛋白 TGFβRII-hFc 的表达和纯化

1.基因 TGFβRII-hFc 的合成：

对基因 TGFβRII(Transforming Growth Factor Beta Receptor II,NCBIGenBank:NP_001020018.1)的胞外片段 TGFβRII-ECD 所对应的氨基酸分别与 Thrombin 酶切位点及人 IgG 的 Fc 蛋白片段(hFc)进行融合设计(SEQ ID NO:74)。委托金唯智公司合成相应的编码核酸序列(SEQ ID NO:75)。

TGFβRII: Transforming Growth Factor Beta Receptor II,NCBIGenBank:NP_001020018.1；

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

融合蛋白 TGFβRII-hFc 的氨基酸序列：(370aa)

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKP
GETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLVPRGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:74)

其中，带双下划线的为 TGFβRII 的 ECD 部分，带波浪线的为 Thrombin 酶切位点，带单下划线的为 hFc 部分。

编码融合蛋白 TGFβRII-hFc 的核酸序列：(1110bp).

ACGATCCCACCGCACGTTCAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCAC
TGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACTGTGTAAATTTTGTGATGTGA
GATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACC
TCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATG
ACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCAT
GACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGGAAAAAAA
AAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCTGTAGCTCTGATGAGTGCAATG
ACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACCTGGTGCCG
AGGGGAAGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG

ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT
ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC
AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO:75)

2.pCMV-TGFβRII-hFc 质粒的构建；

将金唯智公司合成的 TGFβRII-hFc 编码基因克隆到 pCMV（本公司拥有）表达载体中，获得 pCMV-TGFβRII-hFc 质粒。

3.重组质粒 pCMV-TGFβRII-hFc 转染 HEK293F 细胞

按照 lipofectamin 转染试剂盒(购自 Invitrogen 公司)方法将重组质粒 pCMV-TGFβRII-hFc 转染 HEK293F 细胞（购自 ThermoFisher Scientific 公司）。

4. TGFβRII-hFc 蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测

将重组质粒 pCMV-TGFβRII-hFc 转染 HEK293F 细胞 5 天后，将培养液通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤以及 ProteinA/G 柱进行纯化得到 TGFβRII-hFc 融合蛋白样品，并取部分样品加入还原型蛋白电泳上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳检测。

制得了融合蛋白 TGFβRII-hFc。

制备例 20：抗 CD4 的抗体 Ibalizumab 的制备

上市的 CD4 单抗 Trogarzo (Ibalizumab)的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列参照美国专利公开 US005871732。编码重链可变区和轻链可变区的核酸序列委托金斯瑞公司合成。

Ibalizumab 重链可变区的氨基酸序列：(122aa)

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:76)

编码 Bevacizumab 重链可变区的核酸序列 ：(366bp)

CAGGTGCAACTGCAACAGTCCGGACCCGAAGTCGTGAAACCAGGAGCTT
CCGTGAAGATGAGCTGCAAAGCATCCGGATACACCTTCACCAGCTACGTGATC
CACTGGGTGAGGCAGAAACCTGGCCAGGGCCTGGACTGGATCGGCTACATCA
ACCCTTACAACGACGGAACCGACTACGACGAGAAATTCAAAGGCAAAGCTAC
CCTGACCAGCGACACCAGCACCTCCACTGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGA
GGTCCGAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTAGGGAGAAGGACAACTACGC
TACCGGCGCTTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACCGTGTCCA
GC (SEQ ID NO:77)

Ibalizumab 轻链可变区的氨基酸序列：(112aa)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT

KLEIK (SEQ ID NO:78)

编码 Ibalizumab 轻链可变区的核酸序列：(336bp)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCCCTGGGCGA
ACGGGTCACCATGAACTGCAAATCTTCCCAGTCCCTGCTGTACTCCACCAACC
AGAAGAACTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGTCCCCCAAACT
GCTCATCTACTGGGCTTCCACCAGGGAAAGCGGCGTGCCTGACAGATTCTCCG
GAAGCGGCAGCGGAACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCTGA
AGACGTGGCTGTCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCTACAGGACCTTCGGCG
GAGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:79)

重链恒定区均采用 Ig gamma-4 chain C region，ACCESSION:P01861；轻链恒定区均采用 Ig kappa chain C region，ACCESSION:P01834。

将 Ibalizumab 的重链 cDNA 和轻链的 cDNA 分别克隆到 pCMV 载体中，获得抗体 Ibalizumab 的重组表达质粒。

将重组质粒转染 HEK293F 细胞。将 HEK293F 细胞培养液纯化后进行检测。

制得了抗 CD4 单抗 Trogarzo (Ibalizumab)。

制备例 21：抗 TGF β 1 的抗体 CAT192 的制备和检测

抗体 CAT192 重链可变区的氨基酸序列：(123aa)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:80)

抗体 CAT192 重链可变区的核酸序列：(369bp)

GAGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGT
CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGAGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATC
ATATGATGGAAGTATTAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
GCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGAACTGGTGAATATAGTGGCTA
CGATACGGACCCCCAGTACTCCTGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA (SEQ ID NO:81)

抗体 CAT192 轻链可变区的氨基酸序列：(107aa)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK (SEQ
ID NO:82)

抗体 CAT192 轻链可变区的核酸序列：(321bp)

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCCGGTCAAGTCAGGGCATTGGAGATGATTTGGGCTG
GTATCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTATCCTCCTGATCTATGGTACATCCAC
TTTACAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATT
TCACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTC
TACAAGATTCCAATTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACACGACTGGAGATT
AAA (SEQ ID NO:83)

制得了抗 TGF β 1 的抗体 CAT192。

实施例 1：双价双抗 CT101 与单价双抗 CT110、CT111、CT112 抑制 TGF-β1 诱导 HEK293 细胞 TGF-β/Smad 信号激活的比较

HEK293 细胞以 1 x 10^5/ml 的浓度接种于 24 孔板，500 μL/孔，于 37℃、5%CO_2 孵箱中培养 24h 后，转染 TGF-β/Smad 启动子活性荧光素酶报告质粒 pSMAD-Luc 以及海参荧光素酶内参质粒 pRL-TK。转染后 24 小时，加入不同浓度的 CT101、CT110、CT111 以及 CT112 抗体继续培养 12 小时。12 小时后，弃培养基，每孔细胞用 100μL 1 x Passive Lysis Buffer(购自 Promega 公司)裂解。取 70μL 裂解液置于酶标板中，加 30μL 底物 1 溶液，立即把酶标板放入酶标仪中，选择 Luminescence 读取酶标板各孔的数值为 An。再加入 30μL 底物 2 溶液，立即把酶标板放入酶标仪中，选择 Luminescence 读取酶标板各孔的数值为 Bn。用 SoftMax Pro 软件对数据进行分析处理。An/Bn 的比值即为 TGF-β/Smad 信号通路的激活倍数。

结果如图 3 所示。结果显示，抗体 CT101、CT110、CT111 以及 CT112 均可有效抑制 TGF-β1 诱导的 TGF-β/Smad 信号通路激活，且呈剂量依赖关系；并且在相同的剂量下，CT101 有效抑制 TGF-β1 诱导的 TGF-β/Smad 信号通路激活的药理学活性稍优于 CT110、CT111 以及 CT112，其 IC_{50} 分别为 250、750、800 以及 1000 pM 左右。

实施例 2：双价双抗 CT101 与单价双抗 CT110、CT111、CT112 抑制 TGF-β1 诱导 HEK293-CD4 细胞 TGF-β/Smad 信号激活的比较

HEK293-CD4 细胞以 1 x 10^5/ml 的浓度接种于 24 孔板，500 μL/孔，于 37℃、5% CO_2 孵箱中培养 24h 后，转染 TGF-β/Smad 启动子活性荧光素酶报告质粒 pSMAD-Luc 以及海参荧光素酶内参质粒 pRL-TK。转染后 24 小时，加入不同浓度的 CT101、CT110、CT111 以及 CT112 抗体继续培养 12 小时。12 小时后，弃培养基，每孔细胞用 100μL 1 x Passive Lysis Buffer(购自 Promega 公司)裂解。取 70μL 裂解液置于酶标板中，加 30μL 底物 1 溶液，立即把酶标板放入酶标仪中，选择 Luminescence 读取酶标板各孔的数值为 An。再加入 30μL 底物 2 溶液，立即把酶标板放入酶标仪中，选择 Luminescence 读取酶标板各孔的数值为 Bn。用 SoftMax Pro 软件对数据进行分析处理。An/Bn 的比值即为 TGF-β/Smad 信号通路的激活倍数。

结果如图 4 所示。结果显示，只有抗体 CT101 抗体能有效抑制 TGF-β1 诱导的 TGF-β/Smad 信号通路激活，且呈剂量依赖关系；而单价双抗 CT110、CT111 以及 CT112 在 0.1-1000 pM 的浓度范围内能剂量依赖性的部分抑制 TGF-β1 活性，但在 1000 pM 浓度以上，对 TGF-β1 活性是剂量依赖性的增强。CT101 有效抑制 TGF-β1 诱导 HEK93-CD4 细胞中 TGF-β/Smad 信号通路激活的 IC_{50} 值为 15 pM。

实施例 3：双抗 CT101、CT102、CT103、CT104、CT105、CT106、CT107、CT108 以及 CT109 抑制 TGF-β1 诱导 HEK293-CD4 细胞 TGF-β/Smad 信号激活的比较

HEK293-CD4 细胞以 1 x 10^5/ml 的浓度接种于 24 孔板，500 μL/孔，于 37℃、5% CO_2 孵箱中培养 24h 后，转染 TGF-β/Smad 启动子活性荧光素酶报告质粒 pSMAD-Luc 以及海参荧光素酶内参质粒 pRL-TK。转染后 24 小时，加入不同浓度的双抗 CT101、CT102、CT103、CT104、CT105、CT106、CT107、CT108 以及 CT109 继续培养 12 小时。12 小时后，弃培养基，每孔细胞用 100μL 1 x Passive Lysis Buffer(购自 Promega 公司)裂解。取 70μL 裂解液置于酶标板中，加 30μL 底物 1 溶液，立即把酶标板放入酶标仪中，选择 Luminescence 读取酶标板各孔的数值为 An。再加入 30μL 底物 2 溶液，立即把酶标板放入酶标仪中，选择 Luminescence 读取酶

标板各孔的数值为Bn。用SoftMax Pro软件对数据进行分析处理。An/Bn的比值即为TGF-β/Smad信号通路的激活倍数。

结果如图5所示。结果显示，双抗CT101、CT102、CT103、CT104、CT105、CT106、CT107、CT108以及CT109均能有效抑制TGF-β1诱导的TGF-β/Smad信号通路激活，且呈剂量依赖关系；并且在相同的剂量下，CT102有效抑制TGF-β1诱导的TGF-β/Smad信号通路激活的药理学活性远胜于其他抗体，其IC_{50}值低至2 pM。其他双抗CT101、CT103、CT104、CT105、CT106、CT107、CT108以及CT109有效抑制TGF-β1诱导的TGF-β/Smad信号通路激活的IC_{50}值分别是15 pM、2500 pM、2400 pM、2500 pM、300 pM、2600 pM、2700 pM以及50 pM。

实施例4：抗体CT101、CT102、CT111以及CT112的动力学参数测定

1.双功能抗体CT101、CT102、CT111以及CT112与CD4结合的动力学参数测定

采用Biacore分子相互作用仪检测抗体CT101、CT102、CT111以及CT112与人CD4的亲和力常数。以HBS-EP作为缓冲液，采用Bicaore标准氨基偶联方式将人CD4固定于CM5芯片表面。抗体CT101、CT102、CT111以及CT112与人CD4结合，抗体CT101、CT102、CT111以及CT112浓度为250nM，流速为30μl/min，结合时间为120s，解离时间为880s。芯片使用10mM甘氨酸，pH2.7再生，流速为30μl/min，时间为120s。数据以1:1模型拟合分析，得到亲和力常数。使用Biacore Control 2.0软件进行数据采集，Biacore T200 Evaluation 2.0软件进行数据分析。抗体CT101、CT102、CT111以及CT112与人CD4结合的动力学参数见表1，抗体CT101、CT102、CT111以及CT112与人CD4结合的动力学特征参数检测结果分别如图6所示。

表1：抗体CT101、CT102、CT111以及CT112与 人CD4分子结合的动力学参数

抗体名称	Kon (10^4/Ms)	Koff (10^{-5}/s)	Kd (Koff/Kon,nM)
CT101	3.8	0.03	0.01
CT102	4.0	0.03	0.01
CT103	2.9	0.09	0.03
CT104	3.0	0.09	0.03

Kd为亲和力常数；Kon为抗原抗体结合速率；Koff为抗原抗体解离速率；Kd＝Koff/Kon。

结果表明，双价抗体CT101、CT102与抗原CD4有较好的亲和力，且亲和力稍优于单价抗体CT111、抗体CT112。

2. 抗体CT101、CT102、CT111以及CT112与TGF-β1结合的动力学参数测定

采用Biacore分子相互作用仪检测抗体CT101、CT102、CT111以及CT112与人TGF-β1的亲和力常数。以HBS-EP作为缓冲液，采用Bicaore标准氨基偶联方式将人TGF-β1固定于CM5芯片表面。抗体抗体CT101、CT102、CT111以及CT112与人TGF-β1结合，抗体抗体CT101、CT102、CT111以及CT112浓度为250nM，流速为30μl/min，结合时间为120s，解离时间为880s。芯片使用10mM甘氨酸，pH2.7再生，流速为30μl/min，时间为120s。数据以1:1模型拟合分析，得到亲和

力常数。使用 Biacore Control 2.0 软件进行数据采集，Biacore T200 Evaluation 2.0 软件进行数据分析。抗体 CT101、CT102、CT111 以及 CT112 与人 TGF-β1 结合的动力学参数见表 2，抗体 CT101、CT102、CT111 以及 CT112 与人 TGF-β1 结合的动力学特征参数检测结果分别如图 7 所示。

表 2：抗体 CT101、CT102、CT111 以及 CT112 与 TGF-β1 结合的动力学参数

抗体名称	Kon (10^4/Ms)	Koff (10^{-5}/s)	Kd (Koff/Kon,nM)
CT101	2.8	2.1	0.75
CT102	2.6	1.9	0.73
CT111	2.9	5.8	2.00
CT112	3.0	5.9	1.97

结果表明，双价抗体 CT101、CT102 与抗原 TGF-β1 均有较好的亲和力，且亲和力稍优于单价抗体 CT111、CT112。

实施例 5：CT101、CT102、TGF-β1 抗体以及对照抗体对人源化 CD4 小鼠辅助性 T 细胞的结合

人源化 CD4 小鼠，其 CD4 辅助性 T 细胞上特异性表达人 CD4 分子，采用流式细胞术分析验证抗体在体内对 CD4 辅助性 T 细胞的特异性结合能力。

将 200μg 的 CT101、CT102、TGF-β1 抗体以及对照抗体通过尾静脉注射到人源化 CD4 小鼠体内。4 小时后，安乐死处死小鼠，并取出小鼠的淋巴结，匀浆器碾碎后过滤组织碎片，收集细胞后置于冰上与抗体混合液孵育半小时。抗体混合液为 FITC 偶联大鼠抗小鼠 CD45 IgG（1：400），APC 偶联大鼠抗小鼠 TCRβ IgG（1：200），APC-Cy7 偶联大鼠抗小鼠 CD4 IgG（1：200）,PE-Cy7 偶联大鼠抗小鼠 CD8 IgG（1：200），PE 偶联羊抗人 Fc IgG（1：400）稀释在 1 x FACS buffer (1% BSA, 2mM EDTA, 0.1%叠氮钠)。用 PBS 洗涤，加入 200μL PBS 重悬细胞，在流式细胞仪上检测荧光信号(MFI,mean fluorescent intensity)。

结果如图 10 所示，抗体 CT101、CT102 均能通过结合 CD4 分子有效地附着在辅助性 T 细胞上，因此能特异性抑制辅助性 T 细胞上的 TGF-β 信号通路激活。而 TGF-β1 抗体以及对照抗体不能结合 CD4 分子，因此不能附着在辅助性 T 细胞上。

实施例 6：高剂量静脉注射情况下 CT101、CT102 在人源化 CD4 小鼠体内的药物代谢

为检测高剂量尾静脉注射情况下 CT101 以及 CT102 在人源化 CD4 小鼠体内的药物代谢，通过尾静脉将 200μg 的 CT101 或 CT102 抗体注射到 8-10 周龄人源化 CD4 小鼠体内，然后取血检测抗体的血清浓度，且每间隔 24 小时取血检测抗体的血清浓度。

ELISA 方法测定血清中抗体 CT101、CT102 的浓度，方法具体如下：

用 CD4-His 包被酶标板，37℃孵育 3 小时。洗板后，1%BSA 封闭 1 小时。洗板后加入稀释的血清，37℃孵育 60 分钟。洗板后加入酶标记的驴抗人 IgG 二抗工作液，37℃孵育 30 分钟。洗板后加入 TMB 显色液避光显色 5min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 软件对数据进行分析处理。

高剂量静脉注射抗体 CT101 与 CT102 的药物代谢结果如图 11 所示。以抗体注射后时间为横坐标，血清浓度为纵坐标进行曲线拟合，计算抗体 CT101 以及 CT102

的半衰期 $t_{1/2}$ 均为 60 小时。

实施例 7：低剂量静脉注射情况下 CT101、CT102 在人源化 CD4 小鼠体内的药物代谢

为检测低剂量尾静脉注射情况下 CT101 以及 CT102 在人源化 CD4 小鼠体内的药物代谢，通过尾静脉将 20μg 的 CT101 或 CT102 抗体注射到 8-10 周龄人源化 CD4 小鼠体内，然后取血检测抗体的血清浓度，且每间隔 24 小时取血检测抗体的血清浓度。

ELISA 方法测定血清中抗体 CT101、CT102 的浓度，方法具体如下：

用 CD4-His 包被酶标板，37℃孵育 3 小时。洗板后，1%BSA 封闭 1 小时。洗板后加入稀释的血清，37℃孵育 60 分钟。洗板后加入酶标记的驴抗人 IgG 二抗工作液，37℃孵育 30 分钟。洗板后加入 TMB 显色液避光显色 5min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 软件对数据进行分析处理。

低剂量静脉注射抗体 CT101 与 CT102 的药物代谢结果如图 12 所示。以抗体注射后时间为横坐标，血清浓度为纵坐标进行曲线拟合，计算抗体 CT101 以及 CT102 的半衰期 $t_{1/2}$ 分别为 30，32 小时。

实施例 8：高剂量抗体治疗抑制体内肿瘤生长的实验

为检测高剂量下 CT101、CT102、TGF-β1 抗体以及对照抗体的体内抑瘤活性，首先用 MC38 结肠癌细胞，接种于到 8-10 周龄的雌性人源化 CD4 小鼠皮下。然后每 5 天给药依次，每次尾静脉注射 200μg，一共给药 4 次。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积。

结果图 13 所示。结果表明：在高剂量情况下，相比对照抗体和 TGF-β1 抗体，CT101 和 CT102 对小鼠肿瘤生长均具有抑制效果，而且两者的抑瘤效果相当。

实施例 9：低剂量抗体治疗抑制体内肿瘤生长的实验

为检测低剂量下 CT101、CT102、TGF-β1 抗体以及对照抗体的体内抑瘤活性，首先用 MC38 结肠癌细胞，接种于到 8-10 周龄的雌性人源化 CD4 小鼠皮下。然后每 5 天给药依次，每次尾静脉注射 20μg，一共给药 4 次。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积。

结果图 14 所示。结果表明：在低剂量情况下，相比对照抗体和 TGF-β1 抗体，CT101 和 CT102 对小鼠肿瘤生长均具有抑制效果，但是 CT102 的抑瘤效果要胜于 CT101。

实施例 9：不同双功能抗体体内抑制肿瘤生长实验

为检测不同双功能抗体的体内抑瘤活性，首先用 EMT-6 乳腺癌细胞，接种于到 6－8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠皮下。然后每 5 天给药一次，每次尾静脉注射 50 μg，一共给药 5 次。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积。

结果图 15 所示。结果表明：与对照抗体 IgG 以及抗 TGFβ(克隆 1D11）抗体对比，抗 CD4/抗 TGFβ 对小鼠肿瘤具有最强的抑制效果，抗 CD64/抗 TGFβ 效果次之，抗 CD8/抗 TGFβ 则相交于抗 TGFβ 抗体没有明显效果。

实施例 2：双功能抗体 CT101 的重链和轻链的序列设计、制备和检测

1.序列设计

本发明中的双功能抗体 CT101 的结构模式属于 Morrison 模式(IgG-scFv)，即在一个 IgG 抗体的两条重链的 C 端均连接另一个抗体的 scFv 片段，其重链和轻链的主要组成设计以及序列信息如图 16 和图 17。

2.抗体 CT101 的表达和纯化

分别将 CT101 的重链 cDNA 序列和轻链的 cDNA 序列克隆到 pCMV 载体中，提取重组质粒共转染 HEK293F 细胞。细胞培养 5 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至 ProteinA/G 柱，用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白并回收目标样品抗体 CT101，并换液至 PBS。

2.抗体 CT101 的检测

将纯化后的抗体 CT101 分别加入还原型蛋白电泳上样缓冲液和非还原型蛋白电泳上样缓冲液，煮沸后进行 SDS-PAGE 电泳检测。CT101 的电泳图如图 18 所示，还原型蛋白样品目标蛋白在 75kD 和 25kD 处，非还原型蛋白样品(单个抗体)目标蛋白在 200kD 处。

3.抗体 CT101 的高效液相色谱分析

将纯化后的抗体 CT101 流经 AKTA 纯化仪上的 Superdex S200 10/300 GL 柱子(通用公司)，使用 PBS 溶液以 0.5 mL/分钟流经系统。抗体 CT101 的高效液相色谱图如图 19 所示，CT101 主要以单体形式存在（90%），另外，还有 10%以多聚体的形式存在。

以下的实验中用到的人源化抗体 CT101，如果没有特别说明，均为参照本实施例的方法制得。

实施例 10：抗体 CT101 的动力学参数测定

1.双功能抗体 CT101 与 CD4 结合的动力学参数测定

采用 Biacore 分子相互作用仪检测抗体 CT101 与人 CD4 的亲和力常数。以 HBS-EP 作为缓冲液，采用 Bicaore 标准氨基偶联方式将人 CD4 固定于 CM5 芯片表面。抗体 CT101 与人 CD4 结合，抗体 CT101 浓度为 8-250nM(两倍稀释)，流速为 30μl/min，结合时间为 120s，解离时间为 880s。芯片使用 10mM 甘氨酸，pH2.7 再生，流速为 30μl/min，时间为 120s。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。使用 Biacore Control 2.0 软件进行数据采集，Biacore T200 Evaluation 2.0 软件进行数据分析。抗体 CT101、 Ibalizumab 与人 CD4 结合的动力学参数见表 1，抗体 CT101 与人 CD4 结合的动力学特征参数检测结果分别如图 20 所示。

表 1：人源化抗体 CT101、Ibalizumab 与 人 CD4 分子结合的动力学参数

抗体名称	Kon (10^4/Ms)	Koff (10^{-5}/s)	Kd (Koff/Kon,nM)
CT101	3.8	0.03	0.01
Ibalizumab	3.0	0.15	0.05

Kd 为亲和力常数；Kon 为抗原抗体结合速率；Koff 为抗原抗体解离速率；Kd＝Koff/Kon。

结果表明，抗体 CT101 与抗原有较好的亲和力，且亲和力稍优于对照抗体 Ibalizumab。

2.双功能抗体 CT101 与 TGFβ1 结合的动力学参数测定

采用 Biacore 分子相互作用仪检测抗体 CT101 与人 TGFβ1 的亲和力常数。以 HBS-EP 作为缓冲液，采用 Bicaore 标准氨基偶联方式将人 TGFβ1 固定于 CM5 芯片

表面。抗体 CT101 与人 TGFβ1 结合，抗体 CT101 浓度为 8-250nM(两倍稀释)，流速为 30μl/min，结合时间为 120s，解离时间为 880s。芯片使用 10mM 甘氨酸，pH2.7 再生，流速为 30μl/min，时间为 120s。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。使用 Biacore Control 2.0 软件进行数据采集，Biacore T200 Evaluation 2.0 软件进行数据分析。抗体 CT101、 CAT192 与人 TGFβ1 结合的动力学参数见表 2，抗体 CT101 与人 TGFβ1 结合的动力学特征参数检测结果分别如图 21 所示。

表 2：抗体 CT101 和 CAT192 与 TGFβ1 结合的动力学参数

抗体名称	Kon (10^4/Ms)	Koff (10^{-5}/s)	Kd (Koff/Kon,nM)
CT101	2.8	2.1	0.75
CAT192	3.0	2.4	0.80

结果表明，抗体 CT101、CAT192 与抗原 TGFβ1 均有较好的亲和力。

实施例 11：ELISA 方法检测抗体 CT101 与抗原的结合活性

1.间接 ELISA 方法分别测定抗体 CT101、CAT192 与抗原 TGFβ1-His 的结合活性

方法具体如下：

用 TGFβ1-His 包被酶标板，37℃孵育 3 小时。洗板后，1%BSA 封闭 1 小时。洗板后加入梯度稀释的抗体，37℃孵育 60 分钟。洗板后加入酶标记的驴抗人 IgG 二抗工作液，37℃孵育 30 分钟。洗板后加入 TMB 显色液避光显色 5min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 软件对数据进行分析处理。

检测抗体 CT101 与抗原 TGFβ1-His 结合的结果如图 22 所示。以抗体浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标进行曲线拟合，计算抗体的结合 EC_{50}，结果如下表 3 所示。

表 3：抗体 CT101 和 CAT192 分别与 TGFβ1-his 的结合(间接 ELISA)

	CT101	CAT192
EC_{50}	85.2 pM	84.5 pM

结果显示，抗体 CT101 与 CAT192 均能有效地结合 TGFβ1 蛋白，且其结合效率呈剂量依赖关系。

2.间接 ELISA 方法分别测定抗体 CT101、ibalizumab 与 CD4 的结合活性

方法具体如下：

用 CD4-His 包被酶标板，37℃孵育 3 小时。洗板后，1%BSA 封闭 1 小时。洗板后加入梯度稀释的抗体，37℃孵育 60 分钟。洗板后加入酶标记的驴抗人 IgG 二抗工作液，37℃孵育 30 分钟。洗板后加入 TMB 显色液避光显色 5min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 软件对数据进行分析处理。

检测抗体 CT101 与抗原 CD4 结合结果如图 23 所示。以抗体浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标进行曲线拟合，计算抗体的结合 EC_{50}，结果如下表 4 所示。

表 4：抗体 CT101 和 Ibalizumab 分别与 CD4-his 的结合(间接 ELISA)

	CT101	Ibalizumab
EC_{50}	255.5 pM	250.4 pM

结果显示，抗体 CT101 与 ibalizumab 均能有效地结合 CD4 蛋白，并且其结合效率呈剂量依赖关系。

3.竞争 ELISA 方法分别测定抗体 CT101、CAT192 与 TGFβRII 竞争结合抗原 TGFβ1

的活性。

具体方法如下：

用 TGFβ1-His 包被酶标板，37℃孵育 3 小时。洗板后，1%BSA 于 37℃封闭 1 小时。洗板后加入梯度稀释的抗体和人 TGFβRII-ECD-Fc-biotin(终浓度为 0.1 μg/ml)，室温孵育 2 小时。洗板后加入 HRP 标记链霉亲和素 SA-HRP(1:2000)工作液，37℃孵育 30 分钟。洗板后加入 TMB 显色液避光显色 5min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 软件对数据进行分析处理。

检测结果如图 24 所示。通过对结合的抗体 CT101 进行吸光强度定量分析，曲线模拟抗体的结合效率获得结合 EC_{50}(表 5)。

表 5：竞争 ELISA 检测抗体与 TGFβRII-Fc 竞争结合抗原 TGFβ1-His。

	CT101	CAT192
IC_{50}	105.2 pM	105.5 pM

结果显示，抗体 CT101 和 CAT192 均能有效地结合抗原 TGFβ1，抑制 TGFβRII 结合 TGFβ1，并且抗体抑制 TGFβRII 结合 TGFβ1 的效率呈剂量依赖关系。

实施例 12：抗体 CT101 对细胞膜表面抗原 CD4 的结合

首先构建表达人 CD4 抗原的 HEK293，然后采用流式细胞术分析验证抗体对细胞膜表面抗原 CD4 的特异性结合能力。

1.构建表达 CD4 抗原的 HEK293 细胞

慢病毒载体 pHAGE-CD4-IRES-EGFP 以及辅助质粒 psPAX2、pMD2.G 转染 HEK293 细胞，48 小时后，收集上清，用 0.45μm 的滤膜过滤后感染新的 HEK293 细胞。感染 48 小时后，用流式细胞仪检测 EGFP，从而分选出稳定表达 CD4 的克隆群体 HEK293-CD4 细胞。

2.检测抗体 CT101 对细胞表面抗原的结合

采用常规胰酶消化方法消化上述步骤获得的表达 CD4 抗原的 HEK293-CD4 细胞，并使每个收集管内细胞数为 2×10^5，用 PBS(含 1%BSA)配制抗体浓度梯度稀释液，冰上与 HEK293-CD4 细胞孵育半小时，每管加入 100 μL FITC 偶联羊抗人 IgG(1：200)冰上孵育半小时，用 PBS 洗涤，加入 200 μL PBS 重悬细胞，在流式细胞仪上用 FITC 通道检测荧光信号(MFI,mean fluorescent intensity)。

结果如图 25 所示，通过对结合的 CT101 抗体和 Ibalizumab 进行荧光定量分析和曲线拟合，计算出 CT101 抗体和 ibalizumab 结合 EC_{50} 如表 6 所示。

表 6：FACS 检测 CT101 结合 HEK293T-CD4 表面抗原的荧光强度分析

	CT101	CAT192
EC_{50}	310.5 pM	312.5 pM

结果显示，CT101 抗体能有效地结合 HEK293-CD4 细胞表面 CD4 抗原，其结合效率呈剂量依赖关系，Ibalizumab 对 HEK293-CD4 细胞表面 CD4 抗原的结合活性与 CT101 相似，表明双功能抗体 CT101 的抗 CD4 功能没有因为抗体改造而受到影响。

实施例 13：CT101 抗体抑制 TGFβ1 诱导 HEK93 细胞中 TGFβ/Smad 信号通路激活

HEK293 细胞以 1 x 10^5/ml 的浓度接种于 24 孔板，500 μL/孔，于 37℃、5%CO_2 孵箱中培养 24h 后，转染 TGFβ/Smad 启动子活性荧光素酶报告质粒 pSMAD-Luc 以

及海参荧光素酶内参质粒 pRL-TK。转染后 24 小时，加入不同浓度的 CT101 抗体和 CAT192 抗体继续培养 12 小时。12 小时后，弃培养基，每孔细胞用 100μL 1 x Passive Lysis Buffer(购自 Promega 公司)裂解。取 70μL 裂解液置于酶标板中，加 30μL 底物 1 溶液，立即把酶标板放入酶标仪中，选择 Luminescence 读取酶标板各孔的数值为 An。再加入 30μL 底物 2 溶液，立即把酶标板放入酶标仪中，选择 Luminescence 读取酶标板各孔的数值为 Bn。用 SoftMax Pro 软件对数据进行分析处理。An/Bn 的比值即为 TGFβ/Smad 信号通路的激活倍数。

结果如图 26 所示。结果显示，抗体 CT101、CAT192 均可有效抑制 TGFβ1 诱导的 TGFβ/Smad 信号通路激活，且呈剂量依赖关系；并且在相同的剂量下，CT101 有效抑制 TGFβ1 诱导的 TGFβ/Smad 信号通路激活的药理学活性与 CAT192 类似，其 IC_{50} 均为 250 pM 左右。

实施例 14：CT101 抗体抑制 TGFβ1 诱导 HEK293-CD4 细胞中 TGFβ/Smad 信号通路激活

HEK293-CD4 细胞以 1 x 10^5/ml 的浓度接种于 24 孔板，500 μL/孔，于 37℃、5% CO_2 孵箱中培养 24h 后，转染 TGFβ/Smad 启动子活性荧光素酶报告质粒 pSMAD-Luc 以及海参荧光素酶内参质粒 pRL-TK。转染后 24 小时，加入不同浓度的 CT101 抗体和 CAT192 抗体继续培养 12 小时。12 小时后，弃培养基，每孔细胞用 100μL 1 x Passive Lysis Buffer(购自 Promega 公司)裂解。取 70μL 裂解液置于酶标板中，加 30μL 底物 1 溶液，立即把酶标板放入酶标仪中，选择 Luminescence 读取酶标板各孔的数值为 An。再加入 30μL 底物 2 溶液，立即把酶标板放入酶标仪中，选择 Luminescence 读取酶标板各孔的数值为 Bn。用 SoftMax Pro 软件对数据进行分析处理。An/Bn 的比值即为 TGFβ/Smad 信号通路的激活倍数。

结果如图 27 所示。结果显示，抗体 CT101、CAT192 均可有效抑制 TGFβ1 诱导的 TGFβ/Smad 信号通路激活，且呈剂量依赖关系；并且在相同的剂量下，CT101 有效抑制 TGFβ1 诱导 HEK93-CD4 细胞中 TGFβ/Smad 信号通路激活的药理学活性远高于 CAT192，其 IC_{50} 值分别为 15 pM 和 250 pM。

实施例 15：CT101 体内抑制肿瘤生长实验

为检测 CT101 的体内抑瘤活性，首先用 MC38 结肠癌细胞，接种于到 6—8 周龄的雌性人 CD4 转基因小鼠皮下。然后每 5 天给药依次，每次尾静脉注射 50 μg，一共给药 4 次。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积。

结果图 28 所示。结果表明：相比同型对照抗体 IgG，CAT192，atezolizumab(抗 PDL1 抗体)，抑或是 atezolizumab 联合 CAT192，CT101 对小鼠肿瘤具有更强的抑制效果。

本发明涉及的序列如下：

第一蛋白功能区 VH 域（SEQ ID NO:1）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT GAWFAYWGQGTLVTVSS

第一蛋白功能区 VL 域（SEQ ID NO：2）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT KLEIK

第二蛋白功能区 VH 域 1 型（SEQ ID NO:3）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSS

第二蛋白功能区 VH 域 2 型（SEQ ID NO:4）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTSGVELWGQGTTVTVSS

第二蛋白功能区 VH 域 3 型（SEQ ID NO:5）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGFYSGYD
TPASPDWGQGTTVTVSS

第二蛋白功能区 VL 域(SEQ ID NO:6)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

连接片段（SEQ ID NO:7）

GGGGSGGGGSGGGGS

连接片段构成单元（SEQ ID NO:8）

GGGGS

人 IgG4 κ 轻链 CL 域（SEQ ID NO:9）

GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

人 IgG4 CH1 域（SEQ ID NO:10）

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES

人 IgG4 铰链区（S228P）（SEQ ID NO:11）

KYGPPCPPCPAPEFLGGP

人 IgG4 Fc 区（SEQ ID NO:12）

SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT101 的第一蛋白链（SEQ ID NO:13）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

双功能抗体 CT101 的第二蛋白链（SEQ ID NO:14）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC
AASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILL
IYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRL
EIK

双功能抗体 CT102 的第一蛋白链（SEQ ID NO:15）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
ECGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHW
VRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS
PSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

双功能抗体 CT102 的第二蛋白链（SEQ ID NO:16）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT103 的第一蛋白链（SEQ ID NO:17）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

双功能抗体 CT103 的第二蛋白链（SEQ ID NO:18）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTIT
CRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSL
QPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGPE
VVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEK
FKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
K

双功能抗体 CT104 的第一蛋白链（SEQ ID NO:19）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTIT
CRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSL
QPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSL
AVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGTKLEIKGTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

双功能抗体 CT104 的第二蛋白链（SEQ ID NO:20）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT105 的第一蛋白链（SEQ ID NO:21）

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGG
GSDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKL
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

双功能抗体 CT105 的第二蛋白链（SEQ ID NO:22）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSQVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFT
SYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELS
SLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS
TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD

KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT106 的第一蛋白链（SEQ ID NO:23）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

双功能抗体 CT106 的第二蛋白链（SEQ ID NO:24）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT106 的第三蛋白链（SEQ ID NO:25）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQ

GLSSPVTKSFNRGECSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS
YGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSKYGPPCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFKLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT106 的第四蛋白链（SEQ ID NO:26）

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES

双功能抗体 CT107 的第一蛋白链（SEQ ID NO:27）

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES

双功能抗体 CT107 的第二蛋白链（SEQ ID NO:28）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY

DTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQ

GLSSPVTKSFNRGECSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSL
WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQE
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT107 的第三蛋白链（SEQ ID NO:29）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAP
GKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEE
MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFKLVSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT107 的第四蛋白链（SEQ ID NO:30）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

双功能抗体 CT108 的第一蛋白链（SEQ ID NO:31）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

双功能抗体 CT108 的第二蛋白链（SEQ ID NO:32）

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES

双功能抗体 CT108 的第三蛋白链（SEQ ID NO:33）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAP
GKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT109 的第一蛋白链（SEQ ID NO:34）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

双功能抗体 CT109 的第二蛋白链（SEQ ID NO:35）

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES

双功能抗体 CT109 的第三蛋白链（SEQ ID NO:36）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC
AASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

双功能抗体 CT110 的第一蛋白链（SEQ ID NO:37）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

双功能抗体 CT110 的第二蛋白链（SEQ ID NO:38）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK

VDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG
MHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCARTGEYSGYDTDPQYSWGQGTTVTVSS

双功能抗体 CT110 的第三蛋白链（SEQ ID NO:39）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFKLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLGW
YQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDS
NYPLTFGGGTRLEIK

双功能抗体 CT111 的第一蛋白链（SEQ ID NO:40）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

双功能抗体 CT111 的第二蛋白链（SEQ ID NO:41）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT111 的第三蛋白链（SEQ ID NO:42）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTIT
CRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSL
QPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEM
TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFKLVSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT112 的第一蛋白链（SEQ ID NO:43）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGT
KLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

双功能抗体 CT112 的第二蛋白链（SEQ ID NO:44）

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGY
INPYNDGTDYDEKFKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYAT
GAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VD

KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSALTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT112 的第三蛋白链（SEQ ID NO:45）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSGGSGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQ

GLSSPVTKSFNRGECSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLS
CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFKLVSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

双功能抗体 CT112 的第四蛋白链（SEQ ID NO:46）

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES

TGF-β1 抗体（ScFv-IgG4）的蛋白链（SEQ ID NO:47）

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGY
DTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTIT
CRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSL
QPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKSGSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR
LTVDK

SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

对照抗体（ScFv-IgG4）的蛋白链（SEQ ID NO:48）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG

WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYY
GSSHWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQ

PEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKSGSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

重组 CD4-His 蛋白序列（SEQ ID NO:49）

KKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGSFLTKGPSKLN
DRADSRRSLWDQGNFPLIIKNLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHL
LQGQSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSVSQLELQDSGTWTCTVLQN
QKKVEFKIDIVVLAFQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAER
ASSSKSWITFDLKNKEVSVKRVTQDPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTL
ALEAKTGKLHQEVNLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVS
KREKAVWVLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLESNIKVLPTWHHHHHH

编码重组 CD4-His 蛋白的核苷酸序列（SEQ ID NO:50）

AAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAAGGGGATACAGTGGAACTGACCTGTA
CAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAAAAACTCCAACCAGAT
AAAGATTCTGGGAAATCAGGGCTCCTTCTTAACTAAAGGTCCATCCAAGCTGA
ATGATCGCGCTGACTCAAGAAGAAGCCTTTGGGACCAAGGAAACTTTCCCCT
GATCATCAAGAATCTTAAGATAGAAGACTCAGATACTTACATCTGTGAAGTGG
AGGACCAGAAGGAGGAGGTGCAATTGCTAGTGTTCGGATTGACTGCCAACTC
TGACACCCACCTGCTTCAGGGGCAGAGCCTGACCCTGACCTTGGAGAGCCCC
CCTGGTAGTAGCCCCTCAGTGCAATGTAGGAGTCCAAGGGGTAAAAACATACA
GGGGGGGAAGACCCTCTCCGTGTCTCAGCTGGAGCTCCAGGATAGTGGCACC
TGGACATGCACTGTCTTGCAGAACCAGAAGAAGGTGGAGTTCAAAATAGACA
TCGTGGTGCTAGCTTTCCAGAAGGCCTCCAGCATAGTCTATAAGAAAGAGGGG
GAACAGGTGGAGTTCTCCTTCCCACTCGCCTTTACAGTTGAAAAGCTGACGGG
CAGTGGCGAGCTGTGGTGGCAGGCGGAGAGGGCTTCCTCCTCCAAGTCTTGG
ATCACCTTTGACCTGAAGAACAAGGAAGTGTCTGTAAAACGGGTTACCCAGG
ACCCTAAGCTCCAGATGGGCAAGAAGCTCCCGCTCCACCTCACCCTGCCCCAG
GCCTTGCCTCAGTATGCTGGCTCTGGAAACCTCACCCTGGCCCTTGAAGCGAA
AACAGGAAAGTTGCATCAGGAAGTGAACCTGGTGGTGATGAGAGCCACTCAG
CTCCAGAAAAATTTGACCTGTGAGGTGTGGGGACCCACCTCCCCTAAGCTGAT
GCTGAGTTTGAAACTGGAGAACAAGGAGGCAAAGGTCTCGAAGCGGGAGAA
GGCGGTGTGGGTGCTGAACCCTGAGGCGGGGATGTGGCAGTGTCTGCTGAGT
GACTCGGGACAGGTCCTGCTGGAATCCAACATCAAGGTTCTGCCCACATGGCA
TCATCATCATCATCAT

TGF-β1-His 蛋白序列（SEQ ID NO:51）

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYI
WSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMI
VRSCKCSHHHHHH

编码重组 TGF-β1-His 蛋白的核苷酸序列（SEQ ID NO:52）

GCCCTGGATACCAACTATTGCTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGCTGTGT

GCGGCAGCTGTACATTGACTTTAGGAAGGACCTGGGTTGGAAGTGGATCCAC
GAGCCCAAGGGCTACCATGCCAACTTCTGCCTCGGGCCCTGCCCCTACATTTG
GAGCCTGGACACGCAGTACAGCAAGGTCCTGGCCCTGTACAACCAGCATAAC
CCGGGCGCCTCGGCGGCGCCGTGCTGCGTGCCGCAGGCGCTGGAGCCGCTGC
CCATCGTGTACTACGTGGGCCGCAAGCCCAAGGTGGAGCAGCTGTCCAACAT
GATCGTGCGCTCCTGCAAGTGCAGCCATCATCATCATCATCAT

第一蛋白功能区 HCDR1: (SEQ ID NO:53)

GYTFTSYVIH

第一蛋白功能区 HCDR2: (SEQ ID NO:54)

YINPYNDGTDYDEKFKG

第一蛋白功能区 HCDR3: (SEQ ID NO:55)

EKDNYATGAWFA

第一蛋白功能区 LCDR1: (SEQ ID NO:56)

KSSQSLLYSTNQKNYLA

第一蛋白功能区 LCDR2:WASTRES(SEQ ID NO:57)

WASTRES

第一蛋白功能区 LCDR3: (SEQ ID NO:58)

QQYYSYRT

第二蛋白功能区 HCDR1: (SEQ ID NO:59)

SYGMH

第二蛋白功能区 HCDR2: (SEQ ID NO:60)

VISYDGSIKYYADSVKG

第二蛋白功能区 HCDR3（1 型）: (SEQ ID NO:61)

TGEYSGYDTDPQYS

第二蛋白功能区 HCDR3（2 型）: (SEQ ID NO:62)

TGEYSGYDTSGVEL

第二蛋白功能区 HCDR3（3 型）: (SEQ ID NO:63)

TGFYSGYDTPASPD

第二蛋白功能区 HCDR3 共有序列: (SEQ ID NO:64)

$TGX_1YSGYDTX_2X_3X_4X_5X_6$

第二蛋白功能区 LCDR1：(SEQ ID NO:65)

RSSQGIGDDLG

第二蛋白功能区 LCDR2：(SEQ ID NO:66)

GTSTLQS

第二蛋白功能区 LCDR3: (SEQ ID NO:67)

LQDSNYPLT

编码 TGF-β1 抗体的氨基酸序列：(475aa)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAV
ISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSG
YDTDPQYSWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGDRVTI
TCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS
LQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKSGSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP

PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO:68）

编码对照抗体的氨基酸序列：(475aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG
WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYY
GSSHWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKSGSKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK （SEQ ID NO:69）

尽管本发明的内容就其公开的具体实施方式作出了完整而清晰的描述，但其不仅限于此。对于所属技术领域的人员来说，通过这些表述的指导而对本发明作出修改和替代是有可能发生的，这些改进和替代包含在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

1、一种双特异性抗体，其特征在于，所述双特异性抗体至少包括第一蛋白链和第二蛋白链，
所述第一蛋白链包括第一蛋白功能区的部分或全部结构，和/或，第二蛋白功能区的部分或全部结构；
所述第一蛋白功能区靶向 CD4，所述第一蛋白功能区为抗 CD4 的抗体或其抗原结合片段；
所述第二蛋白功能区靶向 TGFβ1，所述第二蛋白功能区为抗 TGFβ1 的抗体或其抗原结合片段。
2、根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，
所述第一蛋白功能区的重链可变区包含氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:53—SEQ ID NO:55 所示的 HCDR1-HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:58 所示的 LCDR1-LCDR3；
所述第二蛋白功能区的重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO:59 所示的 HCDR1，氨基酸序列为 SEQ ID NO:60 所示的 HCDR2，氨基酸序列为 SEQ ID NO:61- SEQ ID NO:63 任一所示的 HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:65—SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1-LCDR3。
3、根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，
所述抗 CD4 的抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab’、F(ab’)2、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体;
和/或，
所述抗 TGFβ1 的抗体或其抗原结合片段选自 Fab、Fab’、F(ab’)2、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。
4、根据权利要求 1-3 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，其重链可变区包括 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列；且其轻链可变区包括 SEQ ID NO:2 中所示的氨基酸序列；
所述第二蛋白功能区为单链抗体或 Fab，其重链可变区包括 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO：4 或 SEQ ID NO:5 中任一所示的氨基酸序列；且其轻链可变区包括 SEQ ID NO:6 中所示的氨基酸序列。
5、根据权利要求 1-3 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第一蛋白功能区的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:76 所示，所述第一蛋白功能区的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:78 所示；
和，
所述第二蛋白功能区为单链抗体或 Fab，所述第二蛋白功能区的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:80 所示；所述第二蛋白功能区的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:82 所示。
6、根据权利要求 1-5 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，所述双特异性抗体存在形式为 IgG-ScFv/Fab 形式，或其他双特异性抗体存在形式。
7、根据权利要求 1-6 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，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 1-7 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接；
优选地，所述连接片段为(GGGGS)m，m 为正整数，例如 1、2、3、4、5 或 6。

10、根据权利要求 1-9 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第一蛋白链从 N 末端至 C 末端具有下式：
轻链可变区-轻链恒定区-（连接片段）m-重链可变区-（连接片段）n-轻链可变区，
所述第二蛋白链从 N 端至 C 端具有下式：
重链可变区-重链恒定区-铰链-Fc 区，
优选地，所述连接片段为 GGGGS,其中 m 是 0 或正整数，n 是 0 或正整数。
11、根据权利要求 10 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第一蛋白链的轻链可变区-轻链恒定区与第二蛋白链的重链可变区-重链恒定区相互结合形成蛋白链组，两条蛋白链组形成二聚体。
12、根据权利要求 10-11 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第一蛋白链 N 端的轻链可变区包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列，所述的第一蛋白链的重链可变区包含 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO：4 或 SEQ ID NO:5 中任一个或多个所示的氨基酸序列，所述的第一蛋白链 C 端的轻链可变区包括 SEQ ID NO:6 中所示的氨基酸序列；且，
所述第二蛋白链的重链可变区包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。
13、根据权利要求 10-12 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第一蛋白链包含 SEQ ID NO:15 中所示的氨基酸序列；且，
所述第二蛋白链包含 SEQ ID NO:16 中所示的氨基酸序列。
14、根据权利要求 1-13 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，还包括以下特征中的任一项：

a. 所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；

b. 所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示；

c. 所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示；

d. 所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示；

e. 所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:23 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:24 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链和第四蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示，所述第四蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:26 所示；

f. 所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:27 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链和第四蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:29 所示，所述第四蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:30 所示；

g. 所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示；

h. 所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示；

i 所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:37 所示，所述第一蛋白链的氨基酸序列

如 SEQ ID NO:41 所示；所述双特异性抗体还包括第二蛋白链，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:42 所示；

k. 所述第一蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示，所述第二蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:44 所示；所述双特异性抗体还包括第三蛋白链和第四蛋白链，所述第三蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:45 所示，所述第四蛋白链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:46 所示。

15、根据权利要求 1-14 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，所述抗体能选择性地结合人 CD4 以及 TGF-β1 分子。

16、根据权利要求 1-15 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，所述抗体以小于 10^{-9}M 或更小的Kd结合CD4 蛋白和/或TGF-β1 蛋白；优选地，所述Kd通过Biacore分子相互作用仪测得。

17、根据权利要求 1-16 任一所述的双特异性抗体，其特征在于，所述抗体在TGF-β1 报告基因荧光素酶活性测定中具有针对人TGF-β1 的低于 5nM的IC_{50}。

18、根据权利要求 17 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述抗体在TGF-β1 报告基因荧光素酶活性测定中具有针对人TGF-β1 的低于 5pM的IC_{50}。

19、分离的核酸分子，其包含编码权利要求 1-18 任一权利要求所述的抗体蛋白或者其片段的核苷酸序列。

20、一种载体，其特征在于，包含权利要求 19 所述的分离的核酸分子。

21、一种宿主细胞，其特征在于，包含权利要求所述的分离的核酸分子，或者权利要求 20 所述的载体。

22、制备权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的双特异性抗体的方法，其特征在于，在合适的条件下培养权利要求 21 的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述的双特异性抗体的步骤。

23、偶联物，其特征在于，包含双特异性抗体以及偶联部分，其中，所述双特异性抗体为权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的双特异性抗体，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为化学小分子、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

24、一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者包含权利要求 23 所述的偶联物；可选地，其还包含药学上可接受的辅料。

25、权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 23 所述的偶联物的在制备预防和/或治疗疾病的药物中用途，其中所述疾病或病况选自下组：癌症、免疫介导的疾病、纤维化疾病、病毒感染性疾病、神经退行性疾病、骨重塑、肾病，及其组合。

26、权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 23 所述的偶联物在制备预防和/或治疗恶性肿瘤的药物中的用途；优选地，所述恶性肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌、肾癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、胰腺癌、胃肠道癌、脑癌、肝癌、黑色素瘤和白血病中的一种或多种。