

权 利 要 求

1. 一种双特异性抗体，其包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区；

其中，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第二蛋白功能区为单链抗体；或者，所述第一蛋白功能区为单链抗体，所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白；

其中，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；

或者，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；

所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型；

其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区在第 234 位点、235 位点和 237 位点中的任意 2 个位点或 3 个位点发生突变，并且突变后，双特异性抗体与 FcγRIIIa 和/或 C1q 的亲和力常数相比突变前降低；优选地，所述亲和力常数通过 Fortebio Octet 分子相互作用仪测得。

2. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有如下突变：

L234A 和 L235A；或者

L234A 和 G237A；或者

L235A 和 G237A;

或者

L234A、L235A、G237A。

3. 一种双特异性抗体, 其包括:

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区, 和

靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区;

其中, 所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白, 所述第二蛋白功能区为单链抗体; 或者, 所述第一蛋白功能区为单链抗体, 所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白;

其中,

所述的免疫球蛋白, 其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3, 其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3; 和所述的单链抗体, 其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3;

或者,

所述的免疫球蛋白, 其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3; 和所述的单链抗体, 其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3, 其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3;

所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型;

其中, 按照 EU 编号系统, 所述免疫球蛋白的重链恒定区具有如下突变组合之一:

L234A 和 L235A; 或者

L234A 和 G237A; 或者

L235A 和 G237A; 或者

L234A、L235A、G237A。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的双特异性抗体, 其中, 按照 EU 编

号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区还具有选自如下的一个或多个突变：

N297A、D265A、D270A、P238D、L328E、E233D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、G236R、G236A、L328R、A330S、P331S、H268A、E318A 和 K320A。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 9；并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 17；

或者，

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 9；并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 17；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其选自如下的(1) — (12) 中的任一项：

(1)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；

(2)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；

(3)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示;

(4)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示;

(5)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示;

(6)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示;

(7)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示;

(8)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示;

基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

(9)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

(10)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

(11)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；以及

(12)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一权利要求所述的双特异性抗体：

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示，并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，所述免疫球蛋白或其抗原结合片段以小于大约 10^{-6} M，例如小于大约 10^{-7} M、 10^{-8} M 或 10^{-9} M 或更小的亲和力常数结合 FcγRI；优选地，所述亲和力常数通过 Fortebio Octet 分子相

互作用仪测得。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，所述免疫球蛋白或其抗原结合片段以小于大约 10^{-9} M，例如小于大约 10^{-7} M、 10^{-8} M 或 10^{-9} M 或更小的亲和力常数结合 C1q；优选地，所述亲和力常数通过 ForteBio Octet 分子相互作用仪测得。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区与所述第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接；和/或所述单链抗体的重链可变区与所述单链抗体的轻链可变区直接连接或者通过连接片段连接。

11. 根据权利要求 10 所述的双特异性抗体，其中，所述连接片段为(GGGGS) n ， n 为正整数；优选地， n 为 1、2、3、4、5 或 6。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一权利要求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。

13. 根据权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端。

14. 一种双特异性抗体，其包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区；

所述第一蛋白功能区为 1 个，所述第二蛋白功能区为 2 个；

其中，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第二蛋白功能区为单链抗体；

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示，并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示；

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示；

所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端；

所述第一蛋白功能区与所述第二蛋白功能区通过第一连接片段连接；并且所述单链抗体的重链可变区与所述单链抗体的轻链可变区通过第二连接片段连接；所述第一连接片段和所述第二连接片段相同或不同；

优选地，所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列独立地选自 SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19；

优选地，所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列均如 SEQ ID NO: 18 所示。

15. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1 至 14 中任一权利要求所述的双特异性抗体。

16. 一种载体，其包含权利要求 15 所述的分离的核酸分子。

17. 一种宿主细胞，其包含权利要求 15 所述的分离的核酸分子，或者包含权利要求 16 所述的载体。

18. 偶联物，其包括抗体或其抗原结合片段以及偶联部分，其中，所述免疫球蛋白为权利要求 1 至 14 中任一权利要求所述的双特异性抗体，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

19. 试剂盒，其包括权利要求 1 至 14 中任一权利要求所述的双特异性抗体，或者包括权利要求 18 所述的偶联物；

优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述免疫球蛋白或其抗原结合片段；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

20. 权利要求 1 至 14 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 18 所述

的偶联物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 PD-1 和/或 VEGFA 在样品中的存在或其水平。

21. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 14 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 18 所述的偶联物；可选地，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

22. 权利要求 1 至 14 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 18 所述的偶联物在制备治疗和/或预防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、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、食管癌、微卫星高度不稳定性（MSI-H）或错配修复缺陷（dMMR）癌、尿路上皮癌、间皮瘤、子宫内膜癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌和白血病；

优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；优选地，所述非小细胞性肺癌为 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌。

23. 一种治疗和/或预防恶性肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求 1 至 14 中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求 18 所述的偶联物的步骤；优选地，所述恶性肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、食管癌、微卫星高度不稳定性（MSI-H）或错配修复缺陷（dMMR）癌、尿路上皮癌、间皮瘤、子宫内膜癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌和白血病；

优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；优选地，所述非小细胞性肺癌为 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌。

24. 根据权利要求 1 至 14 中任一权利要求所述的双特异性抗体，其用于治疗 and/或预防恶性肿瘤；优选地，所述恶性肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、食管癌、微卫星高度不稳定性（MSI-H）或错配修复缺陷（dMMR）癌、尿路上皮癌、间皮瘤、子宫内膜癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌和白血病；

优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；优选地，所述非小细胞性肺癌为 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌。

25. 根据权利要求 18 所述的偶联物，其用于治疗 and/或预防恶性肿瘤；优选地，所述恶性肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、食管癌、微卫星高度不稳定性（MSI-H）或错配修复缺陷（dMMR）癌、尿路上皮癌、间皮瘤、子宫内膜癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌和白血病；

优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；优选地，所述非小细胞性肺癌为 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌。