抗 PD-1/抗 HER2 天然抗体结构样异源二聚体形式双特异抗体及其制备

相关申请的交叉引用

本申请要求 2016 年 11 月 18 日提交的中国专利申请号 201611016435.0 的优先权，其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

本发明涉及抗 PD-1/抗 HER2 天然抗体结构样异源二聚体形式双特异抗体及其制备。具体而言，本发明提供了一种具有天然 IgG 特点、并且没有重轻链错配的高度稳定的异源二聚体形式的抗 PD-1/抗 HER2 双特异抗体及其制备方法。

背景技术

单克隆抗体是只作用于单一抗原表位的高度特异性抗体，已被广泛用于许多疾病的治疗，例如，癌症、炎症和自身免疫性疾病、感染性疾病。但是，此类治疗分子如果单独使用，没有一种能够显示出足够的药效，这是由于疾病的复杂性，如癌症或炎症性疾病通常涉及多种疾病介导的分子通路以及信号通路之间的相叉作用。在这些情况下，靶向单一的分子不能提供最佳的治疗效果，而同时阻断多个靶点或者同一靶点的多个位点的分子能够改善治疗效果。同时，使用多特异性如双特异性分子的双靶向治疗可以简化新药开发过程，因为它是单一分子。和使用多个单特异分子的联合用药相比，对于患者和医疗工作者都是更方便的。

许多不同形式的双特异抗体或双功能分子在该领域已被报道。最初的双特异抗体是应用化学方法使用双功能偶联试剂将两个现有的 IgG 分子、Fab’或(Fab’)2 片段连接起来。但是，这种化学偶联的双特异抗体存在很多的局限性，例如生产的工作强度，纯化异源偶联物、去除同源偶联物及原单特异抗体或片段的复杂性和低收率。

用于产生双特异性抗体的另一种方法是使用杂种-杂交瘤（或四源杂交瘤）技术，其是通过体细胞融合两种分泌不同抗体的杂交瘤细胞系而生产的。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机配对，仅有抗体混合物的 1/10 是所需要的功能性双特异性抗体，这使纯化过程复杂并使生产收率减少。

WO2013060867 描述了一种大规模生产异二聚体双特异抗体的方法，该方法先还原

两种混合的同源二聚体形式抗体，然后通过在这两种同源二聚体抗体的 CH3 区引入不对称氨基酸突变从而促使不同抗体的 Fab 臂发生交换，最后通过氧化铰链区的链间二硫键形成稳定的双特异抗体。

WO2009089004 描述了一种制备异源二聚体蛋白的方法，该方法通过突变 CH3-CH3 界面处的氨基酸为带电荷氨基酸，从而通过静电作用力促进异源二聚体形成，而不利于同源二聚体形成。

US5731168 描述了一种利用“杵－臼”策略来制备异源二聚体 IgG 的方法。该方法将第一条链 CH3 区界面处的小氨基酸替换成大氨基酸，从而形成“杵”；同时将第二条链上 CH3 界面处相应的大氨基酸突变成小氨基酸，从而形成“臼”。杵和臼的相互作用有利于异源二聚体 IgG 的形成，而不利于同源二聚体的形成。

WO2012058768 描述了一种稳定的和高特异的异源二聚体 IgG 制备方法。该方法组合采用阴性和阳性设计以及结构和计算机模型指导的蛋白工程技术来突变 IgG1 CH3 结构域的多个氨基酸，从而形成稳定的并且同源二聚体杂质含量低的异源二聚体 IgG。

程序性死亡受体-1(programmed death-1，PD-1)是近期炙手可热的免疫检查点(immune checkpoint)，主要参与 T 细胞的活化调控，可以调节免疫应答的强弱程度和持续时间。在正常情况下，PD-1 可以介导和维持机体组织的自身免疫耐受，防止在炎症反应过程中免疫系统过度活化伤害自身组织，对避免自身免疫性疾病的发生具有积极作用；在病理情况下，其参与肿瘤免疫以及多种自身免疫病的发生发展过程(Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(3):307-13. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2014 Mar;7(1):1-17. Trends Mol Med. 2015 Jan;21(1):24-33. Immunity. 2013 Jul 25;39(1):61-73. J Clin Oncol. 2015 Jun 10;33(17):1974-82.)。

PD-1 属于 CD28 家族成员，但不同于 CD28 家族其它成员如 CTLA4 能以二硫键形成共价二聚体，PD-1 以单体形式存在。PD-1 的结构主要包括胞外免疫球蛋白可变区样结构域、疏水的跨膜区和胞内区，其胞内区含有两个独立的磷酸化作用位点，分别为免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)和免疫受体酪氨酸转移基序(ITSM)。PD-1 主要诱导性表达于活化的 T 细胞表面，也表达于 B 细胞、NK 细胞、单核细胞、DC 细胞。PD-1 的配体包括 PD-L1(programmed death ligand 1)、PD-L2(programmed death ligand 2)，其配体属于 B7 家族，其中 PD-L1 诱导性表达于多种免疫细胞表面包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、DC 细胞、以及内皮细胞、表皮细胞等，而 PD-L2 仅诱导性表达于一些免疫细胞，包括巨噬细胞、DC 细胞、B 细胞(Autoimmun Rev, 2013, 12(11): 1091-1100. Front

Immunol, 2013, 4: 481. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264. Trends Mol Med. 2015 Jan;21(1):24-33.)。

在二十世纪 80 年代，Denis Slamon 首次在 189 个原发性乳腺癌病例中发现 HER2（人表皮生长因子受体 2）基因在 30%的病例中都过度扩增，并表明 HER2 与总存活率及复发时间密切相关 (Salman DJ, 等人，Science, 235:177-182, 1985)。目前的研究表明，大约 25~30%的乳腺癌病人中的 HER2 都是过表达的 (Revillion F, 等人，Eur J Cancer, 34:791-808, 1998)，并且其与肿瘤的恶性生长程度相关 (Wright C, 等人，Cancer Res, 49:2087-2090, 1989)。

曲妥珠单抗（Trastuzumab）是一个抗 HER2 胞外区的人源化单克隆抗体 (Carter P, 等人，PNAS, 89(10):4285-4289, 1992)。然而其在临床应用中的抗肿瘤效果往往没有临床前实验那么好，所以通常需要与化疗药等联合用药 (Slamon DJ, 等人，N Engl J Med, 344:783-792, 2001)。

设计一种可以募集效应细胞的双功能抗体是提高抗体效能的有效手段。目前为止，研究最多的是利用 CD3 分子的功能。通过 CD3 分子将杀伤性 T 细胞激活，可以有效地清除目的肿瘤 (Haas C, 等人，Immunobiology, 214: 441-453, 2009)。其中 Micormet 公司开发的一种重组双功能 T 细胞激动抗体为 BiTE，具有很好的前景，但是其最大的问题在于血浆半衰期非常短，人体半衰期仅为 1 小时 (Loffler A, 等人，Blood, 95:2098-2103)。这是由 BiTE 本身的结构所导致的，其由两个单链抗体片段组成，分子量仅 60kDa，并且缺失了抗体分子中对延长半衰期有重要作用的 Fc 片段。

卡妥索单抗（Catumaxomab）是另一种具有前景的多功能抗体，是一种靶向 CD3 及 EpCAM 的杂合 Ig 分子，目前该产品已经被批准用于腹水癌的治疗 (Jager M, 等人，Cancer Res, 72:24-32, 2012)。另一种处于临床二期的多功能抗体为厄妥索单抗（Ertumaxomab），其靶向 CD3 及 HER2。这种杂合抗体的一条重链及轻链来源于大鼠的 IgG，靶向 CD3；另一条重链及轻链来源于小鼠的 IgG，靶向 HER2。由此而带来的问题就是这种产品的生产非常困难，因为，为了获得表达双功能厄妥索抗体的细胞系，首先要获得一株表达 CD3 抗体的二倍体杂交瘤，以及一株表达 HER2 抗体的二倍体杂交瘤，然后将两株杂交瘤再次杂交，获得四倍体杂交瘤，其可以表达抗 CD3 以及 HER2 的双功能抗体。而生产普通的单个靶点的抗体，只需要获得一株二倍体杂交瘤，与此相比较，双功能抗体的生产过程更复杂，而且四倍体杂交瘤的获得更加困难，并且由于其鼠源的来源，导致其免疫原性很高。

另外，由于抗 CD3 的抗体最明显的副反应是导致体内的细胞因子在短时间内增高，也称为细胞因子风暴。因此需要开发一种新的同时将免疫细胞招募至肿瘤细胞表面的双功能抗体。

发明内容

本发明的第一方面涉及一种异源二聚体形式的双特异抗体，其包含能与 PD-1 特异性结合的第一个抗原结合功能区和能与 HER2 特异性结合的第二个抗原结合功能区，其中所述双特异抗体包含通过一个或多个二硫键链间连接的第一 Fc 链及第二 Fc 链，该第一 Fc 链和第二 Fc 链通过共价键或连接体分别连接到 PD-1 抗原结合功能区和 HER2 抗原结合功能区上；并且第一 Fc 链和第二 Fc 链在如下位置包含 5 个氨基酸的替换，

1）第一 Fc 链上 366 位及 399 位氨基酸替换，第二 Fc 链上 351 位、407 位及 409 位氨基酸的替换；或者

2）第一 Fc 链上 366 位及 409 位氨基酸替换，第二 Fc 链上 351 位、399 位及 407 位氨基酸替换；

包含上述氨基酸替换的第一 Fc 链与第二 Fc 链更倾向于互相形成异源二聚体而不倾向于各自形成同源二聚体，

其中氨基酸位置根据 Kabat EU 指数编号系统编号。

在一些实施方案中，第一 Fc 链及第二 Fc 链氨基酸替换如下，

a）351 位上替换为甘氨酸、酪氨酸、缬氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、谷氨酸，赖氨酸或色氨酸;

b）366 位上替换为亮氨酸、脯氨酸、色氨酸或缬氨酸;

c）399 位上替换为半胱氨酸、天冬酰胺、异亮氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸或丙氨酸；

d）407 位上替换为亮氨酸、丙氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸，苏氨酸或组氨酸; 和

e）409 位上替换为半胱氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺或精氨酸。

在一些实施方案中，氨基酸替换包括：

a）第一 Fc 链 T366L 及 D399R 替换，第二 Fc 链 L351E、Y407L 及 K409V 替换；

b）第一 Fc 链 T366L 及 D399C 替换，第二 Fc 链 L351G、Y407L 及 K409C 替换；

c）第一 Fc 链 T366L 及 D399C 替换，第二 Fc 链 L351Y、Y407A 及 K409P 替换；

d）第一 Fc 链 T366P 及 D399N 替换，第二 Fc 链 L351V、Y407P 及 K409S 替换；

e）第一 Fc 链 T366W 及 D399G 替换，第二 Fc 链 L351D、Y407P 及 K409S 替换；

f）第一 Fc 链 T366P 及 D399I 替换，第二 Fc 链 L351P、Y407F 及 K409F 替换；

g) 第一 Fc 链 T366V 及 D399T 替换，第二 Fc 链 L351K、Y407T 及 K409Q 替换；

h) 第一 Fc 链 T366L 及 D399A 替换，第二 Fc 链 L351W、Y407H 及 K409R 替换。

在一些实施方案中，氨基酸替换包括：

a）第一 Fc 链 T366L 及 K409V 替换，第二 Fc 链 L351E、Y407L 及 D399R 替换；

b）第一 Fc 链 T366L 及 K409C 替换，第二 Fc 链 L351G、Y407L 及 D399C 替换；

c）第一 Fc 链 T366L 及 K409P 替换，第二 Fc 链 L351Y、Y407A 及 D399C 替换；

d）第一 Fc 链 T366P 及 K409S 替换，第二 Fc 链 L351V、Y407P 及 D399N 替换；

e）第一 Fc 链 T366W 及 K409S 替换，第二 Fc 链 L351D、Y407P 及 D399G 替换；

f）第一 Fc 链 T366P 及 K409F 替换，第二 Fc 链 L351P、Y407F 及 D399I 替换；

g) 第一 Fc 链 T366V 及 K409Q 替换，第二 Fc 链 L351K、Y407T 及 D399T 替换；

h) 第一 Fc 链 T366L 及 K409R 替换，第二 Fc 链 L351W、Y407H 及 D399A 替换。

在一些实施方案中，第一 Fc 链的氨基酸替换为 T366L 和 D399R，第二 Fc 链的氨基酸替换为 L351E、Y407L 和 K409V。

在一些实施方案中，Fc 链来源于 IgG。

在一些实施方案中，PD-1 和 HER2 抗原结合功能区是 Fab 片段或 scFv 片段。

在一些实施方案中，PD-1 和 HER2 抗原结合功能区都是 Fab 片段。

在一些实施方案中，PD-1 和 HER2 抗原结合功能区一个是 Fab 片段，另一个是 scFv。

在一些实施方案中，Fab 片段包含不同的第一重链可变区及第二重链可变区，以及不同的第一轻链可变区及第二轻链可变区。

在一些实施方案中，双特异抗体的氨基酸序列选自：SEQ ID NO. 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18。

本发明的第二方面涉及一种分离的多核苷酸，其编码如第一方面所述的异源二聚体形式的双特异抗体。

在一些实施方案中，多核苷酸的序列选自：SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15 和 17。

本发明的第三方面涉及一种重组表达载体，其包含第二方面所述的分离的多核苷酸。

在一些实施方案中，表达载体为基于 pCDNA 改造得到的质粒载体 X0GC。

本发明的第四方面涉及一种宿主细胞，其包含第二方面所述的分离的多核苷酸，或第三方面所述的重组表达载体。

在一些实施方案中，宿主细胞选自人胚肾细胞 HEK293 或以 HEK293 细胞为基础改造而得到的 HEK293T、HEK293F、HEK293E、仓鼠卵巢细胞 CHO 或以 CHO 细胞为基础改造而得到的 CHO-S、CHO-dhfr$^-$、CHO/DG44、ExpiCHO。

本发明的第五方面涉及一种组合物，其包含第一方面所述的异源二聚体形式的双特异抗体或第二方面所述的分离的多核苷酸或第三方面所述的重组表达载体或第四方面所述的宿主细胞，及药学上可接受的载体。

本发明的第六方面涉及一种生产如第一方面所述的异源二聚体形式的双特异抗体的方法，其包括步骤：

1）将第二方面所述的分离的多核苷酸或第三方面所述的重组表达载体分别在宿主细胞中进行表达；

2）将在宿主细胞中分别表达的蛋白进行还原；以及

3）将还原的蛋白混合，然后将混合物进行氧化。

在一些实施方案中，宿主细胞选自人胚肾细胞 HEK293 或以 HEK293 细胞为基础改造而得到的 HEK293T、HEK293F、HEK293F、仓鼠卵巢细胞 CHO 或以 CHO 细胞为基础改造而得到的 CHO-S、CHO-dhfr$^-$、CHO/DG44、ExpiCHO。

在一些实施方案中，还原步骤包括 1）加入还原剂，所述还原剂选自：2-巯基乙胺、二硫苏糖醇、三（2-羧乙基）膦或其他化学衍生物，2）在 0.1mM 或更高浓度二硫苏糖醇存在下在 4℃条件下进行还原反应最少 3 小时，3）去除还原剂，如通过脱盐进行。

在一些实施方案中，氧化步骤包括 1）在空气中氧化，也包括加入氧化剂，所述氧化剂选自：L-脱氢抗坏血酸或其他化学衍生物，2）在 0.5mM 或更高浓度 L-脱氢抗坏血酸存在下在 4℃条件下进行氧化反应最少 5 小时。

在一些实施方案中，所述的方法还包括分离纯化的步骤。

本发明的第七方面涉及第一方面所述的异源二聚体形式的双特异抗体和/或第二方面所述的分离的多核苷酸和/或第三方面所述的重组表达载体和/或第四方面所述的宿主细胞和/或第五方面所述的组合物在制备用于预防和/或治疗受试者疾病的药物中的用途。

本发明的第八方面涉及第一方面所述的异源二聚体形式的双特异抗体和/或第二方面所述的分离的多核苷酸和/或第三方面所述的重组表达载体和/或第四方面所述的宿主细胞和/或第五方面所述的组合物，其用做用于预防和/或治疗受试者疾病的药物。

本发明的第九方面涉及一种预防和/或治疗疾病的方法，包括将第一方面所述的异源二聚体形式的双特异抗体和/或第二方面所述的分离的多核苷酸和/或第三方面所述的重组表达载体和/或第四方面所述的宿主细胞和/或第五方面所述的组合物施予有需求的受试者。

在一些实施方案中，受试者是哺乳动物，优选地，人类受试者。

在一些实施方案中，所述疾病选自如下肿瘤：白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、脑肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、黑色素瘤。

本发明将 PD-1 作为免疫细胞招募的分子，HER2 作为肿瘤细胞的靶向分子，设计了一种全新的抗 PD-1/抗 HER2 天然抗体结构样异源二聚体形式双特异抗体，其具有天然 IgG 特点，并且没有重轻链错配，是高度稳定的异源二聚体形式的抗 PD-1/抗 HER2 双特异抗体。该双特异抗体能同时结合两种靶分子 PD-1 和 HER2 并且在治疗复杂疾病方面会更有效。

附图说明

图 1：示出了异源二聚体抗体分子的单体的洗脱峰。

图 2：示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的结构。

图 3. 示出了一条重链和一条轻链的半抗体分子结构图。

图 4. 示出了一条重链和一条轻链的半抗体分子的 SEC 分析结果。其中 A 图和 B 图分别表示抗 HER2 半抗体分子和抗 PD-1 半抗体分子的结果。

图 5. 示出了抗 PD-1，抗 HER2 抗体半抗体分子氧化产物的 SDS-PAGE 分析结果。

图 6. 示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的洗脱峰。

图 7. 示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的 SDS-PAGE 分析结果。

图 8. 示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的 SEC 分析结果。

图 9. 示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的稳定性实验。

图 10. 示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的稳定性实验。

图 11. 示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的 Her2 结合活性，PD-1 结合活性。其中 A 图和 B 图分别表示 HER2 结合活性和 PD-1 结合活性。

图 12. 示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子与高表达 PD-1 的 CHO/PD-1 细

胞和高表达 HER2 的 SK-BR-3 细胞的同时结合。其中 A 图到 D 图分别表示 HER2 单抗、PD-1 单抗、HER2 单抗+PD-1 单抗和抗 PD-1_{BJHM}/抗 HER2 的同时结合。

图 13. 示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子封闭 PD-1/PD-L1 结合，PD-1/PD-L2 结合的活性。其中 A 图和 B 图分别表示 PD-1/PD-L1 和 PD-1/PD-L2 的结合封闭活性。

图 14. 示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子促进细胞因子 IL-2 的分泌。

图 15. 示出了抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的药时曲线。

具体实施方式

定义：

共价连接是指异源二聚体形式的双特异抗体中，两个 Fc 链之间，任一个 Fc 链及与其相连接的抗原结合功能区之间，是通过共价键而连接成为一个分子。其中 Fc 链包含通过一个或多个通过共价连接（如二硫键链）而连接的第一抗原结合功能区及第二抗原结合功能区；该第一 Fc 链及第二 Fc 链分别通过共价连接（如亚胺键或酰胺键）而连接到一个抗原结合功能区上；

抗原结合功能区是指可以与目标分子如抗原发生特异性相互作用的区域，其作用具有高度选择性，识别一种目标分子的序列通常不能识别其他分子序列。代表性的抗原结合功能区包括：抗体的可变区、抗体可变区的结构变构体、受体的结合域、配体结合域或酶结合域。

一个或多个二硫键链间连接是指第一 Fc 链及第二 Fc 链通过一个或多个二硫键链间连接，形成异源二聚体片段。在本发明中，一个或多个二硫键的形成可以是第一 Fc 链及第二 Fc 链或者第一 Fc 链及第二 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区在同一个细胞内合成时形成，也可以是第一 Fc 链及第二 Fc 链或者第一 Fc 链及第二 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区在不同细胞内分别合成，之后通过体外还原氧化的方法形成。

第一 Fc 链及第二 Fc 链是指通过共价连接而组成结合片段，共价连接包括二硫键，每条链至少包含免疫球蛋白重链恒定区的一部分；并且该第一 Fc 链及第二 Fc 链在氨基酸序列上是不同的，至少包括了一位氨基酸的不同。在此发明中的第一 Fc 链及第二 Fc 链，相同链之间存在强烈的相互排斥作用，而不同链之间存在吸引作用，因此当在细胞内共同表达时，第一 Fc 链及第二 Fc 链，或者第一 Fc 链及第二 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区，更倾向于形成异源二聚体。将第一 Fc 链及第二 Fc 链，或者第一 Fc 链及

第二 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区分别在两个宿主细胞内表达时，第一 Fc 链或者第一 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区不倾向于形成同源二聚体，第二 Fc 链或者第二 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区不倾向于形成同源二聚体。在本发明中，当第一 Fc 链及第二 Fc 链，或者第一 Fc 链及第二 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区分别在两个宿主细胞内表达时，并且在存在还原剂时，同源二聚体的比例低于 50%，即单体（一条 Fc 链或者一条 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区）比例大于 50%。

免疫球蛋白是具有四条多肽链的对称结构，其中两条较长、相对分子量较大的相同的重链，含 450~550 个氨基酸残基，相对分子质量在 55000~70000Da 之间；两条较短、相对分子量较小的相同的轻链（L 链），含约 210 个氨基酸残基，相对分子质量约 24000Da。不同的免疫球蛋白重链和轻链在靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，称为可变区（variable region ，V 区），而靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，称为恒定区（constant region ，C 区）。重链中可变区约占重链长度的 1/4，恒定区约占重链长度的 3/4。对于已知五种 Ig 来说， IgG（γ）、IgA（α）、IgD（δ）、IgM（μ）和 IgE（ε），其中前三类 Ig 的 H 链内有三个恒定区，即 CH1、CH2 和 CH3 组成。后两类（IgM 和 IgE）的 H 链中有一个 VH 区和四个恒定区，即 CH1 至 CH4。恒定区既是免疫球蛋白分子的骨架，又是激活免疫反应的部位之一。

本发明中的恒定区一部分至少包括了第一 Fc 链和第二 Fc 链相互作用的区域，该区域对于 IgG 来说，是位于 CH3 区域的一部分氨基酸，至少包括 GLN347、TYR349、THR 350、LEU 351、SER 354、ARG 355、ASP 356、GLU 357、LYS 360、SER 364、THR 366、LEU 368、LYS 370、ASN390、LYS392、THR394、PRO395、VAL 397、ASP399、SER400、PHE405、TYR407、LYS409、LYS439。

第一 Fc 链及第二 Fc 链分别通过共价键或连接体连接到一个抗原结合功能区上是指第一 Fc 链及第二 Fc 链分别通过共价键或连接体连接到一个抗体的抗原结合片段，或可以识别抗原的单链抗体，或可以识别抗原的其他抗体片段变构体，或可以识别配体的受体，或可以识别受体的配体，其中所述共价键是指是化学键的一种，两个或多个原子共同使用它们的外层电子，在理想情况下达到电子饱和的状态，由此组成比较稳定的化学结构叫做共价键，或者说共价键是原子间通过共用电子对所形成的相互作用。同一种的元素的原子或不同元素的都可以通过共价键结合，对于本发明的第一 Fc 链及第二 Fc 链间的共价键，包括但不限于一分子氨基酸的氨基与另一分子氨基酸的羧基脱水反应形成的酰胺键，或者乙二醇或聚乙二醇或其他化合物或其多聚物的醛基与一分子氨基酸的氨

基形成酰胺键或亚胺键，其中连接体是可以将两条多肽链通过共价键连接起来的一段氨基酸序列或者一种化合物或者一种化合物的多聚体，其中一段氨基酸序列包括但不限于一段小肽，如 GGGGSGGGGSGGGGS，通过酰胺键将第一 Fc 链或第二 Fc 链，以及可以识别抗原的单链抗体，或可以识别抗原的其他抗体片段结构变构体连接起来

第一 Fc 链与第二 Fc 链更倾向于形成异源二聚体而不倾向于各自形成同源二聚体是指，由于在第一 Fc 链与第二 Fc 链中，相同的多肽链间存在互相排斥的作用，而不同的多肽链间存在吸引作用，因此当在细胞内共同表达时，第一 Fc 链及第二 Fc 链，或者第一 Fc 链及第二 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区，更倾向于形成异源二聚体。将第一 Fc 链及第二 Fc 链，或者第一 Fc 链及第二 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区分别在两个宿主细胞内表达时，第一 Fc 链或者第一 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区不倾向于形成同源二聚体，第二 Fc 链或者第二 Fc 链及其相连接的抗原结合功能区不倾向于形成同源二聚体。

Kabat EU 指数编号系统是指，Kabat 利用一种方法将一个编号指定给抗体序列的每个氨基酸并且这种指定每个残基的编号的方法已经成为本领域的标准方法。Kabat 方案可以延伸到不存在于他的研究中的其它抗体，基于保守的氨基酸，将目标抗体与 Kabat 鉴定的共有序列之一进行比对。

Fc 结构域是指可结晶段（fragment crystallizable,Fc），相当于 Ig 的 CH2 和 CH3 结构域，是 Ig 与效应分子或者细胞相互作用的部位。

IgG 是免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G，IgG)的缩写，是血清主要的抗体成分，根据 IgG 分子中的 r 链抗原性差异，人 IgG 有四个亚型：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。

半抗体分子是指抗体的一条重链与一条轻链形成的结构，其中重链与轻链间可以通过共价键连接，也可以不通过共价键连接，是一种识别抗原的单价抗体结构。

Fab 片段是一种分子识别序列，是抗原结合片段（fragment of antigen binding,Fab），相当于抗体分子的两个臂，由一个完整的轻链和重链的 VH 和 CH1 结构域组成。scFv 是一种分子识别序列，是一种由抗体的轻链可变区与重链可变区通过基因工程改造而得到的抗体片段的结构异构体。膜受体的细胞外区是一种分子识别序列，膜受体通常包括位于细胞外部的可以识别并结合相应抗原或者配体的细胞外区域，将受体锚定在细胞表面的跨膜区，以及在胞内的具有激酶活性或者可以传递信号通路的胞内区。细胞膜受体的配体是指能被膜受体胞外区识别并结合的蛋白质，小肽或化合物。细胞因子包是免疫原、丝裂原或其他刺激剂诱导多种细胞产生的低分子量可溶性蛋白质，具有调节固有免疫和适应性免疫、

血细胞生成、细胞生长、APSC 多能细胞以及损伤组织修复等多种功能。细胞因子可被分为白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子超家族、集落刺激因子、趋化因子、生长因子等。蛋白表达标签指在目标蛋白的 N 端或 C 端加入的一段氨基酸序列，可以是小肽也可以是长的氨基酸，标签的加入可以有利于蛋白质的正确折叠，可以有利于蛋白质的分离纯化，可以有利于降低蛋白质在胞内的降解，常用的标签包括但不限于 HA，SUMO，His，GST，GFP，Flag。

可应用于本发明的异源二聚体形式的双特性抗体中的抗体并无任何限制。优选地，现有技术中已知可以用于治疗和/或预防疾病的抗体均可以用于本发明。

本发明的异源二聚体形式的双特性抗体可具有一个或多个替换、缺失、添加和/或插入。例如，某些氨基酸可以替换在蛋白质结构中的其它氨基酸而没有明显损失与其它多肽(如抗原)或细胞结合的能力。由于结合能力和蛋白性质决定了蛋白的生物功能活性，可以在蛋白序列上进行某些氨基酸序列的替换而不会明显损失它们的生物效用或活性。

在许多情况中，多肽变体含有一个或多个保守替换。“保守替换”是指其中氨基酸被其它具有类似性质的氨基酸所替换，使得肽化学领域中技术人员可预期多肽的二级结构和亲水性质基本上不发生变化。

氨基酸替换通常是基于氨基酸侧链取代基的相对相似性，如它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑了各种前述特征的示例性替换是本领域技术人员公知的并包括：精氨酸和赖氨酸；谷氨酸和天冬氨酸；丝氨酸和苏氨酸；谷氨酰胺和天冬酰胺；以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

本发明使用的术语“同一性”具有本领域通常已知的含义，本领域技术人员也熟知测定不同序列间同一性的规则、标准，是指在序列比对和引入缺口（如果必要的话，以获得最大百分比同源性)后，多核苷酸或多肽序列变体的残基与非变体序列的相同的百分比。。在本发明中，在满足同一性限定的情况下，还需要所获得的变体序列具有母体序列所具有的生物活性。本领域技术人员公知如何利用上述活性筛选变体序列的方法和手段。本领域技术人员可以在本申请公开内容的教导下容易地获得这样的变体序列。在具体实施方式中，多核苷酸和多肽变体与本文所述的多核苷酸或多肽具有至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、或至少约 99%，或至少约 99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或 99.9%的多核苷酸或多肽同一性。由于遗传密码的冗余性，将存在编码相同氨基酸序列的这些序列的变体。

本发明的另一个实施方式中，提供了能够在中度至高度严格条件下与本发明提供的

多核苷酸序列或其片段或其互补序列相杂交的多核苷酸组合物。杂交技术是分子生物学领域公知的。为了说明的目的，用于测试本发明的多核苷酸与其他多核苷酸杂交的合适中等严格条件包括在5×SSC、0.5％SDS、1.0 mM EDTA(pH8.0)的溶液中预洗；在50-60℃、5×SSC、过夜的条件下杂交；再于65℃下20分钟用含0.1％SDS的2×、0.5×和0.2×的SSC各洗涤两次。本领域技术人员理解，可容易地操纵杂交的严格性，例如通过改变杂交溶液的盐含量和/或进行杂交的温度。例如，在另一个实施方式中，合适的高严格杂交条件包括上述的条件，所不同的是杂交温度升高了，例如达到60-65℃或65-70℃。

本发明的宿主细胞可以是用于外源基因表达的所有细胞，包括但不限于大肠杆菌，酵母，昆虫细胞，植物细胞，哺乳动物细胞。

本发明的载体包括可以在任何类型的细胞或生物体中进行复制的载体，包括如质粒、噬菌体、粘粒和迷你染色体。在一些实施方式中，包括本发明多核苷酸的载体是适合于多核苷酸繁殖或复制的载体，或者是适合于表达本发明多肽的载体。这样的载体是本领域已知并可以购买的。

“载体”包括穿梭载体和表达载体。通常，质粒构建体也包括分别用于细菌中质粒复制和选择的复制起点(如复制的ColE1起点)和选择标记(如氨苄青霉素或四环素抗性)。“表达载体”是指包含用于在细菌或真核细胞中表达本发明的抗体包括抗体片段所需要的控制序列或调控元件的载体。

本发明的载体可以是用于外源基因表达的所有载体，包括但不限于质粒载体，其中质粒载体至少包含复制起始位点、启动子、目的基因、多克隆位点、筛选标记基因，优选地，本发明所述载体包括但不限于基于pCDNA改造得到的质粒载体，比如X0GC载体。

本发明的受试者包括禽类、爬行动物、哺乳动物等。优选地，哺乳动物包括啮齿类动物、灵长类动物，优选地，灵长类动物包括人。

本发明所涉及的疾病的范围包括但不限于肿瘤，优选的，所述肿瘤包括：白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、脑肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、黑色素瘤。

药学上可接受的载体是指是指药学领域常规的药物载体，例如：稀释剂、赋形剂和水等，填充剂如淀粉、蔗糖，乳糖、微晶纤维素等；粘合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮；润湿剂如甘油；崩解剂如羧甲基淀粉钠，羟丙纤维素，交联羧

甲基纤维素，琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠；吸收促进剂如季铵化合物；表面活性剂如十六烷醇，十二烷基硫酸钠；吸附载体如高龄土和皂粘土；润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和镁、微粉硅胶和聚乙二醇等。另外还可以在组合物中加入其它辅剂如香味剂、甜味剂等。

下面将通过下述非限制性实施例进一步说明本发明，本领域技术人员公知，在不背离本发明精神的情况下，可以对本发明做出许多修改，这样的修改也落入本发明的范围。

下述实验方法如无特别说明，均为常规方法，所使用的实验材料如无特别说明，均可容易地从商业公司获取。本发明下述实施例中使用的各种抗体均来源于商业途径的标准抗体。

实施例 1　抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的载体构建

构建分别含抗人 PD-1(Pem)的抗体重链和轻链的 X0GC 表达载体 ，其中抗体可变区序列来源于 http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=9798。轻链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示；轻链恒定区核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示；重链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示；重链恒定区核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示。通过 PCR 的方法分别扩增轻链可变区以及轻链恒定区，重链可变区以及重链恒定区。本申请中所有 PCR 反应均使用 NEB 公司的 Phusion 超保真 DNA 聚合酶（F-530L）。PCR 引物根据碱基互补原则以及酶切位点的需要进行常规设计。反应体系均为：H_2O 8.9μl， 5×Phusion 超保真 DNA 聚合酶缓冲液 4μl，1mM dNTP 4μl，上游引物 1μl，下游引物 1μl，Phusion 超保真 DNA 聚合酶 0.1μl，模板 1μl。将可变区及恒定区 PCR 产物，经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后用 DNA 回收试剂盒（Promega，A9282，下同）回收相应片段。以回收的可变区片段与恒定区片段作为模板，使用可变区上游引物及恒定区下游引物，再进行一轮 PCR 反应，然后再回收相应片段，得到重链和轻链的全长片段。将 X0GC 载体及全长片段，用 EcoRI（NEB，货号 R3101L）及 HindIII（NEB，货号 R3104L）酶切，酶切反应体系为：10×缓冲液 3 2μl，EcoRI 及 HindIII 各 0.5μl，胶回收获得的全长片段 3μl，H_2O 14.5μl。酶切体系于 37℃条件下反应 3 小时。将酶切产物用 T4DNA 连接酶（NEB，货号 M0202V）连接（下同），反应体系为：10×连接酶缓冲液 2μl，连接酶 0.5μl，胶回收获得的全长片段 3μl，胶回收获得的 X0GC 载体 3μl，H_2O 11.5μl。连接于室温反应 12 小时。将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α（天根，CB104，下同）。获得抗体重链和轻链的 X0GC 表达载体，分别用于在真核细胞中表达抗体的重链和轻链。

本发明同时分别构建了另一种抗人 PD-1(BJHM)的抗体重链和轻链的 X0GC 表达载体 。其中轻链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO.15 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示；轻链恒定区核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示；重链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO.17 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示；重链恒定区核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示。获得抗体重链和轻链的 X0GC 表达载体，分别用于在真核细胞中表达抗体的重链和轻链。

分别构建抗人 HER2 的抗体重链和轻链的 X0GC 表达载体，其中抗体可变区序列来源于 http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072，重链恒定区为人 IgG1（Fc2）。轻链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示；轻链恒定区核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示；重链可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示；重链恒定区核苷酸序列如 SEQ ID NO.7 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。获得抗体重链和轻链的 X0GC 表达载体，分别用于在真核细胞中表达抗体的重链和轻链。

实施例 2　抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的表达

分别将含抗人 PD-1 抗体的重链和轻链的表达载体转染 293F 细胞（FreeStyle™ 293-F Cells, 货号 R79007, invitrogen），另外分别将含抗人 HER2 抗体的重链和轻链的表达载体也转染 293F 细胞。转染前一天接种细胞，转染当天将细胞离心收集细胞，将细胞重悬于新鲜的 FreeStyle™ 293 表达培养基（FreeStyle™ 293 Expression Medium，货号 12338001，Gibco）中，细胞密度为 $200*10^5$ 细胞/mL。按照转染体积加入质粒，终浓度为 36.67ug/mL，轻轻混匀；然后加入线性 PEI（聚乙烯亚胺，线形，M.W. 25000，货号 43896，Alfa Aesar），终浓度为 55ug/mL，轻轻混匀。之后放入细胞培养箱，120rpm 摇床 37℃培养 1 小时。之后加入 19 倍转染体积的新鲜培养基。继续 120rpm 摇床 37℃培养。离心收集转染 5~6 天的细胞培养上清。

通过 ELISA 的方法测定表达量。在应用层析柱纯化之前，以 0.2 μm 滤膜过滤以去除沉淀物。此步骤在 4℃下进行。

实施例 3.　抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子表达产物的纯化

采用 AKTA explorer 100 型蛋白纯化系统（GE Healthcare）以及亲和色谱柱 rProtein A Sepharose Fast Flow（16 mm I.D.，22 ml，GE Healthcare）于 4℃下进行纯化。首先以流动

相 A（20 mM 磷酸钠缓冲液，150 mM 氯化钠，pH 7.4）平衡色谱柱，在基线稳定后将经过上述处理的细胞上清液进行上样，流速为 5 ml/min，并在上样后以流动相 A 进行平衡。样品分别为抗 PD-1 表达产物和抗 Her2 表达产物。之后，首先以流动相 B1（含有 0.5 M 精氨酸的流动相 A）冲洗 5 个柱体积；然后以流动相 B2（100 mM 柠檬酸，pH 3.0）洗脱 5 个柱体积，收集洗脱峰即为目的蛋白峰；以上洗脱步骤流速都为 5 ml/min。抗 PD-1-Fc1 的洗脱峰色谱图如图 1 所示，抗 HER2-Fc2 的洗脱峰与之类似（结果未包括）。收集标示的洗脱峰（图示灰色区域），并通过滴加 1 M 醋酸钠溶液将 pH 调至 5.0。

实施例 4. 抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的纯化

抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的结构如图 2 所示。

将上述 rProtein A Sepharose Fast Flow（16 mm I.D.，22 ml，GE Healthcare）方法获得的抗 PD-1 和抗 Her2 表达产物，进行体外重组以获得异源二聚体。首先将上述纯化收集的蛋白溶液通过超滤浓缩管超滤浓缩（标称截留分子量 10KDa），将溶液置换为磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS）PBS（pH=7.4）。将获得的抗 PD-1 和抗 HER2 表达产物分别加所述 PBS 调整到 1mg/ml, 加入 1/200 倍终体积的 1M DTT，DTT 终浓度分别为 5mM，在 4℃条件下进行还原（3-8 小时），通过还原的过程，二硫键被打开，抗 PD-1 和抗 HER2 表达产物中含有的少量的抗体同源二聚体分子的铰链区二硫键也打开，形成了含有一条重链和一条轻链的半抗体分子，结构如图 3 所示。还原的样品经流动相缓冲液中包含 1mM DTT 还原剂的 SEC-HPLC 分析，结果如图 4 所示，抗 PD-1 和抗 HER2 同源二聚体分子重量比例均小于 10%，相应地半抗体分子重量比例均大于 90%。

然后将还原的抗 PD-1 和抗 HER2 半抗体分子等摩尔比例混合，在 4℃条件下进行重组反应 24 小时，在重组的过程中，抗 PD-1 和抗 HER2 半抗体分子分子通过 CH2/CH3 的非共价作用力形成了同时含有抗 PD-1 以及抗 HER2 半抗体分子的异源二聚体形式的双特异抗体，之后将蛋白溶液通过超滤浓缩管超滤浓缩（标称截留分子量 10KDa），将溶液置换为磷酸盐溶液（PBS， pH=7.4）终止还原，通过空气或者氧化剂进行氧化反应，使异源二聚体的双特异抗体的二硫键重新形成。氧化反应的条件为加入氧化剂 100mM L-脱氢抗坏血酸，蛋白终浓度 1mg/ml, 氧化剂终浓度 1mM，在 4℃条件下进行氧化，反应进行 24 小时。将上述氧化反应获得的样品进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 5 所示。

上述抗 PD-1 和抗 HER2 半抗体分子经还原氧化得到的异源二聚体分子通过超滤浓缩管超滤浓缩（标称截留分子量 10KDa），将溶液置换为 10 mM 磷酸钠缓冲液，pH 5.8。

采用 AKTA explorer 100 型蛋白纯化系统（GE Healthcare）以及离子色谱柱 Source 15S（16 mm I.D.，17 ml，GE Healthcare）于 4℃下进行纯化。首先以流动相 A（10mM 磷酸钠，pH 7.0）平衡色谱柱，在基线稳定后将经过上述处理的蛋白溶液进行上样，流速为 3ml/min，并在上样后以流动相 A 进行平衡，之后以 A（10 mM 磷酸钠，pH 5.8）到 B（10 mM 磷酸钠，pH 5.8）梯度冲洗 20 个柱体积（0%B-100%B，170min，流速 2ml/min），收集标示的洗脱主峰（如图 6 所示），收集的蛋白溶液通过超滤浓缩管超滤浓缩（标称截留分子量 10KDa），将溶液置换为磷酸盐溶液（PBS， pH=7.4），过滤除菌 4℃保存。将纯化产物通过 SDS-PAGE 方法分析，结果如图 7 所示。经 SEC-HPLC 纯度分析，结果如图 8 所示，纯度为 97.3%。

实施例 5. 抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的稳定性

分别将充分密封的 10mg/mL 和 1mg/mL 的 PD-1/HER2 异源二聚体样品放置于 40℃恒温箱（BINDER KBF240），在相应时间点（基线（第 0 天）、第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天，第 14 天）取 20 μg 样品进行高效排阻液相色谱（SEC-HPLC）分离。上述 SEC-HPLC 条件如下：(1)排阻色谱柱：TSKgel G3000SWxl (Tosoh Bioscience)，5 μm，7.8 mm×30 cm；(2)流动相：5 mM PBS，150 mM NaCl，pH 6.7；(3) 流速：0.6 mL/min；(4)紫外检测波长：280 nm；(5)采集时间：30 min。所用仪器是 Agilent 1200 Infinity 色谱仪，利用 Agilent ChemStation 记录图谱并计算剩余单体的比例。如图 9(10mg/mL)和图 10(1mg/mL)所示，在 40℃实验条件下，所述二聚体不会发生明显的聚集；故认为所述 PD-1/HER2 异源二聚体具备较好的热稳定性。

实施例 6. 抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的体外结合活性

用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 PD-1/HER2 异源二聚体抗体与单个抗原的结合能力。

该方法具体实施过程如下：用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲溶液在 96 孔高吸附酶标板上包被重组人 PD-1（北京义翘神州，货号 10377-H08H）或者人 HER2(北京义翘神州, 货号 10004-H08H)，包被浓度为 1μg/mL，包被量为 100μL 每孔，包被在 4℃过夜进行。PBST 洗涤 5 次。用含 1%BSA 的 PBST 按 300μL/孔封闭，25℃孵育 1 小时。PBST 洗涤 5 次。加入序列稀释在含 1%BSA 的 PBST 里的异源二聚体抗体样品以及对照，每孔加入 100μL，25℃孵育 1 小时。PBST 洗涤 5 次。然后加入 1:2000 稀释在含 1%BSA 的 PBST 里的辣根

过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体 (Chemicon，货号 AP309P)，每孔加入 100μL，25℃孵育 1 小时。PBST 洗涤 5 次。加入比色底物 TMB，100μL/孔，室温显色 10 分钟。加入 1M H2SO4，100μL/孔，终止显色。在酶标仪上读取 450nm 处的吸光度。

结果如图 11 所示，抗 PD-1_{pem}/抗 HER2 和抗 PD-1_{BJHM}/抗 HER2 均具有对 PD-1 和 HER2 的高亲和力，较好的保持了双价单抗的抗原亲和活性。其中抗 PD-1_{BJHM}/抗 HER2 比 PD-1_{pem}/抗 HER2 具有更强的 PD-1 亲和力。

实施例 7. 抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的双靶点抗原同时结合活性

用流式细胞术(FACS)在高表达 PD-1 的 CHO/PD-1 (GenScript, 货号 M00529) 细胞和高表达 HER2 的 SK-BR-3 细胞上测定 PD-1/HER2 异源二聚体抗体与双靶点抗原的同时结合能力。

参照 PKH26 试剂盒（Sigma，货号 SLBH4568V）使用说明书染色 CHO/PD-1 细胞。简要的说，收集 CHO/PD-1 细胞，无血清培养基洗涤一次后，用 PKH26 试剂盒里的 Diluent C 分别将 CHO/PD-1 制备成 2×10^7/mL 细胞悬液，将 PKH26 染料稀释到 4μM, 然后 1:1 混合在一起，此混合悬液的细胞密度为 1×10^7/mL，PKH26 的浓度为 2μM，室温孵育 1 分钟，再用同等体积的 FBS 孵育 1 分钟终止染色。400g 离心 10 分钟，用完全培养基洗涤两次，再重悬于完全培养基备用。参照 CFSE 试剂盒（Life technology，货号 C34554）使用说明书染色 SK-BR-3 细胞。简要的说，用 PBS 稀释 CFSE 到工作浓度 0. 5μM 并在 37℃预热, 1000rpm 离心 5 分钟收集 SK-BR-3 细胞，用预热的 CFSE 工作溶液重悬 SK-BR-3，在 37℃孵育 15 分钟，1000rpm 离心 5 分钟收集细胞，再重悬于完全培养基中，孵育 30 分钟，用完全培养基洗涤一次，再重悬于完全培养基备用。

离心收集以上已经染色的细胞，并用含 2%FBS 的冷 PBS 洗涤一次。将细胞重悬于含 2%FBS 的冷 PBS 中，细胞密度为 5×10^6/mL。将 SK-BR-3 和 CHO/PD-1 按 1:1 混合，然后每个流式管取 100μL(即 2.5×10^5 SK-BR-3 和 2.5×10^5 CHO/PD-1)，再加入 100μL 稀释于含 2%FBS 的冷 PBS 中的异源二聚体抗体样品，对照以及同型对照（人免疫球蛋白，江西博雅生物制药股份有限公司，国药准字 S19993012），终浓度为 5 nM。流式管于冰上孵育 30 分钟。用含 2% FBS 的 PBS 洗涤两次。再重悬于 500μL 冷 PBS 中，该细胞悬液于流式细胞仪上进行检测分析。

结果如表 1 和图 12 所示，通过异源二聚体抗体同时结合高表达 PD-1 的 CHO/PD-1 细胞和高表达 HER2 的 SK-BR-3 细胞，PD-1/HER2 异源二聚体抗体能够引发 SK-BR-3 和

CHO/PD-1 细胞的靠近关联，这是介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的基础。

表 1 诱导靠近关联的细胞比例

样品名称	% 关联细胞
同型对照	1.89
HER2 单抗 (100nM)	1.39
PD-1 单抗 $_{pem}$ (100nM)	1.26
PD-1 单抗 $_{BJHM}$ (100nM)	1.43
PD-1 单抗+HER2 单抗(100nM)	1.45
抗 PD-1_{pem}/抗 HER2 (100nM)	39.71
抗 PD-1_{BJHM}/抗 HER2 (0.1nM)	8.15
抗 PD-1_{BJHM}/抗 HER2 (1nM)	32.79
抗 PD-1_{BJHM}/抗 HER2 (10nM)	36.00
抗 PD-1_{BJHM}/抗 HER2 (100nM)	38.12

实施例 8. 抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子对 PD-1 与配体 PD-L1，PD-L2 结合的阻断活性

用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲溶液在 96 孔高吸附酶标板上包被重组人 PD-1-Fc，包被浓度为 1μg/mL，包被量为 100μL 每孔，包被在 4℃过夜进行。PBST 洗涤 5 次。用含 1%BSA 的 PBST 按 300μL/孔封闭，25℃孵育 1 小时。PBST 洗涤 5 次。加入序列稀释在含 1%BSA 的 PBST 里的异源二聚体抗体样品以及对照，并同时加入终浓度为 1μg/mL 的生物素标记的 PD-L1-Fc 或者终浓度为 4μg/mL 的生物素标记的 PD-L2，100μL/孔，25℃孵育 1 小时。PBST 洗涤 5 次。然后加入 1:1000 稀释在含 1%BSA 的 PBST 里的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (BD，货号 554066)，每孔加入 100μL，25℃孵育 1 小时。PBST 洗涤 5 次。加入比色底物 TMB，100μL/孔，室温显色 10 分钟。加入 1M H2SO4，100μL/孔，终止显色。在酶标仪上读取 450nm 处的吸光度。

结果如图 13 所示，抗 PD-1_{pem}/抗 HER2 和抗 PD-1_{BJHM}/抗 HER2 均能够阻断 PD-1/PD-L1 结合、PD-1/PD-L2 结合，较好的保持了双价单抗的阻断活性。其中抗 PD-1_{BJHM}/抗 HER2 比 PD-1_{pem}/抗 HER2 具有更强的 PD-1 阻断活性。

实施例 9. 抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子的 T 细胞细胞因子分泌增强活性

收集人 PBMC 细胞(Lonza，货号 CC-2702)。将人 PBMC 细胞按细胞密度为 2×10^6/mL，重悬于完全培养基（RPMI 1640 含 10%FBS）中，接种于 96 孔板，每孔 100μL（2×10^5 细胞每孔），再加入用完全培养基序列稀释的 PD-1/HER2 异源二聚体抗体样品以及对照，50μL 每孔。加入稀释在完全培养基中的终浓度为 1μg/mL 的 PHA（Sigma，货号 L-2769），50μL 每孔。将培养板置于 37℃二氧化碳培养箱中孵育。孵育 3 天之后，取出 50μL 孔内上清，用于检测细胞因子 IL-2（RayBiotech, 货号 ELH-IL2）。

如图 14 所示，人 T 细胞在 PHA 的刺激下，会活化分泌 IL-2。加入 PD-1 抗体会增强 T 细胞的活化，促进细胞因子的分泌，而 PD-1/HER2 异源二聚体抗体有与 PD-1 单克隆抗体相似的效应，浓度依赖性地促进细胞因子 IL-2 的分泌。

实施例 10. 抗 PD-1/抗 HER2 异源二聚体抗体分子在大鼠体内的药代动力学研究

实验材料选用雌性 SD 大鼠，6-8 周龄，购自北京华阜康生物科技股份有限公司。大鼠适应环境一周后，随机分组，每组 3 只。各组分别给予 PD-1 单抗、HER2 单抗、PD-1/HER2 异源二聚体抗体，剂量均为 20nmol/kg，静脉注射，单次给药。在 0 点，给药后 5 分钟、30 分钟、1 小时、4 小时、8 小时、24 小时、48 小时、72 小时、96 小时、120 小时、168 小时、216 小时、264 小时、312 小时、360 小时、408 小时、480 小时眼眶采血 0.2mL-0.3mL，不予抗凝，室温放置血样 30 分钟至 1 个小时，待凝血后，3000rpm 离心 10 分钟，得到的血清样品冷冻于-80℃保存，待测。

ELISA 测定血清中 PD-1 单抗、HER2 单抗、PD-1/HER2 异源二聚体抗体的浓度。简要的说，用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲溶液 4℃过夜包被人重组 HER2 蛋白(北京义翘神州, 货号 10004-H08H)，或者重组 PD-1 蛋白(北京义翘神州，货号 10377-H08H)于高吸附酶标板上。PBST 洗涤。为了防止非特异性结合，用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭该板，PBST 洗涤。然后加入用含 10%混合大鼠血清、1% BSA 的 PBST 稀释的待测血清样品孵育，25℃，1 小时，PBST 洗涤该板。加入稀释于含 5%脱脂奶粉的 PBST 中的辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体(Chemicon，货号 AP309P)，25℃，1 小时，PBST 洗涤该板。最后使用比色底物 TMB 进行显色，室温显色 10 分钟。加入 1M H2SO4，终止显色。在酶标仪上读取 450nm 处的吸光度。

结果如图 15 所示，单次静脉注射的剂量为 20nmol/kg 的 PD-1/HER2 异源二聚体抗，在大鼠体内显示出了良好的药代动力学特征。抗 $PD\text{-}1_{BJHM}$/抗 HER2 异源二聚体抗体的药

代参数如下：半衰期 $t_{1/2}$ 为 207 小时；药时曲线下面积 AUC_{last} 为 33448nM.hr；C_0 为 534nM；表观分布容积 V_d 为 148mL/Kg；清除率 CL 为 0. 50mL/hr/kg；平均驻留时间 MRT_{last} 为 159 小时。

权利要求书

1、一种异源二聚体形式的双特异抗体，其包含能与 PD-1 特异性结合的第一个抗原结合功能区和能与 HER2 特异性结合的第二个抗原结合功能区，其中所述双特异抗体包含通过一个或多个二硫键链间连接的第一 Fc 链及第二 Fc 链，该第一 Fc 链和第二 Fc 链通过共价键或连接体分别连接到 PD-1 抗原结合功能区和 HER2 抗原结合功能区上，或者该第一 Fc 链和第二 Fc 链通过共价键或连接体分别连接到 HER2 抗原结合功能区和 PD-1 抗原结合功能区上；并且第一 Fc 链和第二 Fc 链在如下位置包含 5 个氨基酸的替换，

1）第一 Fc 链上 T366 位及 D399 位氨基酸替换，第二 Fc 链上 L351 位、Y407 位及 K409 位氨基酸的替换；或者

2）第一 Fc 链上 T366 位及 K409 位氨基酸替换，第二 Fc 链上 L351 位、D399 位及 Y407 位氨基酸替换；

包含上述氨基酸替换的第一 Fc 链与第二 Fc 链更倾向于互相形成异源二聚体而不倾向于各自形成同源二聚体，

其中氨基酸位置根据 Kabat EU 指数编号系统编号。

2、如权利要求 1 所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其中第一 Fc 链及第二 Fc 链氨基酸替换如下，

a）L351G、L351Y、L351V、L351P、L351D、L351E、L351K 或 L351W;

b）T366L、T366P、T366W 或 T366V;

c）D399C、D399N、D399I、D399G、D399R、D399T 或 D399A；

d）Y407L、Y407A、Y407P、Y407F、Y407T 或 Y407H; 和

e）K409C、K409P、K409S、K409F、K409V、K409Q 或 K409R。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其中氨基酸替换包括：

a）第一 Fc 链 T366L 及 D399R 替换，第二 Fc 链 L351E、Y407L 及 K409V 替换；

b）第一 Fc 链 T366L 及 D399C 替换，第二 Fc 链 L351G、Y407L 及 K409C 替换；

c）第一 Fc 链 T366L 及 D399C 替换，第二 Fc 链 L351Y、Y407A 及 K409P 替换；

d）第一 Fc 链 T366P 及 D399N 替换，第二 Fc 链 L351V、Y407P 及 K409S 替换；

e）第一 Fc 链 T366W 及 D399G 替换，第二 Fc 链 L351D、Y407P 及 K409S 替换；

f）第一 Fc 链 T366P 及 D399I 替换，第二 Fc 链 L351P、Y407F 及 K409F 替换；

g) 第一 Fc 链 T366V 及 D399T 替换，第二 Fc 链 L351K、Y407T 及 K409Q 替换；

h) 第一 Fc 链 T366L 及 D399A 替换，第二 Fc 链 L351W、Y407H 及 K409R 替换。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其中氨基酸替换包括：

a）第一 Fc 链 T366L 及 K409V 替换，第二 Fc 链 L351E、Y407L 及 D399R 替换；

b）第一 Fc 链 T366L 及 K409C 替换，第二 Fc 链 L351G、Y407L 及 D399C 替换；

c）第一 Fc 链 T366L 及 K409P 替换，第二 Fc 链 L351Y、Y407A 及 D399C 替换；

d）第一 Fc 链 T366P 及 K409S 替换，第二 Fc 链 L351V、Y407P 及 D399N 替换；

e）第一 Fc 链 T366W 及 K409S 替换，第二 Fc 链 L351D、Y407P 及 D399G 替换；

f）第一 Fc 链 T366P 及 K409F 替换，第二 Fc 链 L351P、Y407F 及 D399I 替换；

g) 第一 Fc 链 T366V 及 K409Q 替换，第二 Fc 链 L351K、Y407T 及 D399T 替换；

h) 第一 Fc 链 T366L 及 K409R 替换，第二 Fc 链 L351W、Y407H 及 D399A 替换。

5. 如权利要求 1 所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其中第一 Fc 链的氨基酸替换为 T366L 和 D399R，第二 Fc 链的氨基酸替换为 L351E、Y407L 和 K409V。

6. 如权利要求 1-5 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其中 Fc 链来源于 IgG。

7. 如权利要求 1-6 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其中 PD-1 和 HER2 抗原结合功能区是 Fab 片段或 scFv 片段。

8. 如权利要求 1-7 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其中 PD-1 和 HER2 抗原结合功能区都是 Fab 片段。

9. 如权利要求 1-7 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其中 PD-1 和 HER2 抗原结合功能区一个是 Fab 片段，另一个是 scFv。

10. 如权利要求 7-9 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其 Fab 片段包含不同的第一重链可变区及第二重链可变区，以及不同的第一轻链可变区及第二轻链可变区。

11. 如权利要求 1-10 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其中第一 Fc 链及其相连接的 PD-1 抗原结合功能区和第二 Fc 链及其相连接的 HER2 抗原结合功能区，或者第一 Fc 链及其相连接的 HER2 抗原结合功能区和第二 Fc 链及其相连接的 PD-1 抗原结合功能区，在单独存在并且同时存在还原剂时其形成同源二聚体的重量比例均低于 50%。

12. 如权利要求 1-11 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体，其中双特异抗体的氨基酸序列选自：SEQ ID NO.2、4、6、8、10、12、14、16 和 18。

13. 一种分离的多核苷酸，其编码如权利要求 1-12 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体。

14. 如权利要求 13 所述的分离的多核苷酸，其序列选自：SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15 和 17。

15. 一种重组表达载体，其包含权利要求 13 或 14 所述的分离的多核苷酸。

16. 如权利要求 15 所述的重组表达载体，其中表达载体为基于 pCDNA 改造得到的质粒载体 X0GC。

17. 一种宿主细胞，其包含权利要求 13 或 14 所述的分离的多核苷酸，或权利要求 15 或 16 所述的重组表达载体。

18. 如权利要求 17 所述的宿主细胞，其选自人胚肾细胞 HEK293 或以 HEK293 细胞为基础改造而得到的 HEK293T、HEK293E、HEK293F、仓鼠卵巢细胞 CHO 或以 CHO 细胞为基础改造而得到的 CHO-S、CHO-dhfr$^-$、CHO/DG44、ExpiCHO。

19. 一种组合物，其包含权利要求 1-12 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体或权利要求 13 或 14 所述的分离的多核苷酸或权利要求 15 或 16 所述的重组表达载体或权利要求 17 或 18 所述的宿主细胞，及药学上可接受的载体。

20. 一种生产如权利要求 1-12 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体的方法，其包括步骤：

1）将权利要求 13 或 14 所述的分离的多核苷酸或权利要求 15 或 16 所述的重组表达载体分别在宿主细胞中进行表达；

2）将在宿主细胞中分别表达的蛋白分别进行纯化及还原；以及

3）将还原的蛋白混合，然后将混合物进行氧化。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其中宿主细胞选自人胚肾细胞 HEK293 或以 HEK293 细胞为基础改造而得到的 HEK293T、HEK293F、HEK293F、仓鼠卵巢细胞 CHO 或以 CHO 细胞为基础改造而得到的 CHO-S、CHO-dhfr$^-$、CHO/DG44、ExpiCHO。

22. 如权利要求 20 或 21 所述的方法，其中还原步骤包括 1）加入还原剂，所述还原剂选自：2-巯基乙胺、二硫苏糖醇、三（2-羧乙基）膦或其他化学衍生物，2）在 0.1mM 或更高浓度二硫苏糖醇存在下在 4℃条件下进行还原反应最少 3 小时，3）去除还原剂，如通过脱盐进行。

23. 如权利要求 20-22 任一项所述的方法，其中氧化步骤包括 1）在空气中氧化，也包括加入氧化剂，所述氧化剂选自：L-脱氢抗坏血酸或其他化学衍生物，2）在 0.5mM 或更高浓度 L-脱氢抗坏血酸存在下在 4℃条件下进行氧化反应最少 5 小时。

24. 如权利要求 20-23 任一项所述的方法，其还包括分离纯化的步骤。

25. 权利要求 1-12 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体和/或权利要求 13 或 14 所述的分离的多核苷酸和/或权利要求 15 或 16 所述的重组表达载体和/或权利要求 17 或 18 所述的宿主细胞和/或权利要求 19 所述的组合物在制备用于预防和/或治疗受试者疾病的药物中的用途。

26. 权利要求 1-12 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体和/或权利要求 13 或 14 所述的分离的多核苷酸和/或权利要求 15 或 16 所述的重组表达载体和/或权利要求 17 或 18 所述的宿主细胞和/或权利要求 19 所述的组合物，其用做用于预防和/或治疗受试者疾病的药物。

27. 一种预防和/或治疗疾病的方法，包括将权利要求 1-12 任一项所述的异源二聚体形式的双特异抗体和/或权利要求 13 或 14 所述的分离的多核苷酸和/或权利要求 15 或 16 所述的重组表达载体和/或权利要求 17 或 18 所述的宿主细胞和/或权利要求 19 所述的组合物施予有需求的受试者。

28. 如权利要求 25 所述的用途,权利要求 26 所述的异源二聚体形式的双特异抗体、分离的多核苷酸、重组表达载体、宿主细胞或组合物，或权利要求 26 所述的方法，其中受试者是哺乳动物，优选地，人类受试者。

29. 如权利要求 25 所述的用途，权利要求 26 所述的异源二聚体形式的双特异抗体、分离的多核苷酸、重组表达载体、宿主细胞或组合物，或权利要求 27 所述的方法，其中所述疾病选自如下肿瘤：白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、脑肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、前列腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、黑色素瘤。