

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年1月6日 (06.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/002038 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/103065

(22) 国际申请日: 2021年6月29日 (29.06.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010630471.6 2020年6月30日 (30.06.2020) CN

(71) 申请人: 和铂医药(上海)有限责任公司
(**HARBOUR BIOMED (SHANGHAI) CO., LTD**) [CN/
CN]; 中国上海市浦东新区自由贸易试验区蔡伦路
987号6层、7层, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 何云(**HE, Yun**); 中国上海市浦东新区自
由贸易试验区蔡伦路987号6层、7层, Shanghai
201203 (CN)。 石磊(**SHI, Lei**); 中国上海市浦东
新区自由贸易试验区蔡伦路987号6层、7层,
Shanghai 201203 (CN)。 吴晓东(**WU, Xiaodong**);
中国上海市浦东新区自由贸易试验区蔡伦路
987号6层、7层, Shanghai 201203 (CN)。 钟琛
(**ZHONG, Chen**); 中国上海市浦东新区自由贸易
试验区蔡伦路987号6层、7层, Shanghai 201203
(CN)。 黄冰(**HUANG, Bing**); 中国上海市浦东

新区自由贸易试验区蔡伦路987号6层、7层,
Shanghai 201203 (CN)。 戎一平(**RONG, Yiping**);
中国上海市浦东新区自由贸易试验区蔡伦路
987号6层、7层, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (**SHANGHAI
BESHINING LAW OFFICE**); 中国上海市小木桥路
681号外经大厦21楼, Shanghai 200032 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) **Title:** MULTISPECIFIC BINDING PROTEIN OF IMMUNE CELL ENGAGER, PREPARATION THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 免疫细胞衔接器多特异性结合蛋白及其制备和应用

(57) **Abstract:** Provided are a binding protein and an application thereof. The binding protein comprises a first protein function region bound to a targeting domain of an antigen on a target cell, and a second protein function region comprising an effect domain bound to an antigen on an immune effector cell, and is selected from the following structure: the first protein function region is a Fab structure; the second protein function region is a VH structure or a Fab structure; the binding protein comprises the first and second protein function regions from an N-terminus to a C-terminus in sequence. The binding protein can bring immune effector cells and specific target cells closer together, and efficiently and selectively activate the immune effector cells in the microenvironment of specific target cells, thereby enhancing an immune response and reducing the toxic side effects caused by non-specific activation of peripheral immune cells. The binding protein utilizes the cross-linking of costimulatory molecules mediated by target cell antigens and the activation of downstream signal transduction pathways to promote the activation and proliferation of immune cells and improve the effectiveness in killing tumors.

(57) 摘要: 提供了一种结合蛋白及其应用, 结合蛋白包括结合靶细胞上的抗原的靶向域的第一蛋白功能区和所述包括结合免疫效应细胞上的抗原的效应域的第二蛋白功能区; 其选自以下结构: 所述第一蛋白功能区为Fab结构, 所述第二蛋白功能区为VH结构或Fab结构, 所述结合蛋白从N末端至C末端依次为第一和第二蛋白功能区。所述结合蛋白可以将免疫效应细胞和特定靶细胞拉近在一起, 高效地有选择性地激活特定靶细胞微环境中的免疫效应细胞, 进而增强免疫反应, 并减少外周免疫细胞的非特异性活化带来的毒副作用。所述结合蛋白利用靶细胞抗原介导的共刺激分子的交联以及下游信号传导通路的激活, 进而促进免疫细胞的活化和增殖, 提高其杀伤肿瘤的效力。

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

免疫细胞衔接器多特异性结合蛋白及其制备和应用

本申请要求申请日为 2020/6/30 的中国专利申请 202010630471.6 的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明涉及生物制药领域，尤其涉及具有肿瘤靶向功能和免疫细胞重定向能力的用于免疫细胞衔接器的多特异性的结合蛋白及其制备和应用。

背景技术

双特异性抗体 (bispecific antibodies) 和多特异性抗体 (multispecific antibodies) 是一类在天然的单克隆抗体基础上通过蛋白质工程技术制备出的具有两种或者多种不同特异性抗原结合位点的人工抗体。天然的单克隆抗体是单特异性的，即只能识别和结合一种抗原；双特异性抗体可以结合两种不同的抗原或者同一个抗原上的不同表位；而多特异性抗体则可能识别更多的抗原。

近年来，通过调节免疫应答治疗癌症的肿瘤免疫疗法显示出巨大的潜力，使得肿瘤免疫相关的双特异性抗体吸引了越来越多的注意力、技术和资金支持。免疫细胞衔接器多特异性抗体 (multispecific immune cell engager) 分子可以同时识别肿瘤细胞上的特异性抗原和免疫细胞上的 CD3 分子或者其他共刺激分子；进而将免疫细胞和肿瘤细胞拉近在一起，高效地有选择性地激活肿瘤微环境中的免疫细胞，并减少外周免疫细胞的非特异性活化带来的毒副作用。基于靶向 CD3 的双特异性抗体 T 细胞衔接器 (BsTCE, Bispecific T-cell engager) 是一类通过靶向 CD3 和肿瘤靶点的免疫细胞衔接器；在目前全球处于临床阶段或临床前阶段的双特异性抗体项目中，接近一半的双特异性抗体是靶向 CD3 的双特异性抗体。BsTCE 在血液肿瘤疾病领域显示强劲疗效，已经在临床上得到充分验证，例如在 2014 年 FDA 批准上市用于治疗费城染色体阴性 B 细胞淋巴瘤的 Blinatumomab (靶向 CD19×CD3)。但是，BsTCE 在实体肿瘤上的效果还没有得到充分的验证。

T 细胞的活化通常需要 TCR-MHC 之间的相互作用来触发；而靶向 CD3 的免疫细胞衔接器 (CD3BsTCE) 分子以非 MHC 限制的方式来激活 T 细胞，可以克服因肿瘤细胞 MHC 下调或抗原递呈细胞耐受引起的免疫逃逸机制。但是，在没有共刺激信号的情况下，肿瘤微环境中的 T 细胞通路未被完全激活；这可能是 CD3BsTCE 在实体肿瘤上的效果没有被完全发挥出来的原因。另一方面，靶向 T 细胞表面共刺激分子的免疫细胞衔接器分子可引起肿瘤抗原介导的共刺激分子的交联以及下游信号传导通路的激活，为 T 细胞的

完全激活提供了共刺激信号，进而充分活化 T 细胞并促进增殖，提高杀伤肿瘤的效力。

4-1BB (TNFRSF9, CD137) 是一种隶属于 TNF 受体超家族的跨膜蛋白。4-1BB 是在多种免疫细胞上表达的共刺激分子，为免疫活性的多功能调节剂。其诱导表达于活化的 T 细胞、NK 细胞等免疫细胞。4-1BB 通过其配体 4-1BBL 介导的三聚化来激活 T 细胞，促进细胞增殖和细胞因子释放。抗 4-1BB 的激动型抗体具有抑制肿瘤的功能，最早进入临床试验的 4-1BB 抗体是辉瑞的 Utomilumab 和百时美施贵宝 (BMS) 公司的 Urelumab (BMS-663513)。Urelumab 最初的临床结果发表于 2008 年，尽管在部分患者上观察到令人鼓舞的疗效，但数据显示 Urelumab 导致肝脏毒性，且与靶标和剂量有关。Utomilumab 安全性更好，剂量可提高至 10 mg/kg，但治疗效果依然欠佳。4-1BB 靶向性药物开发的核心问题是如何较为合适地通过 4-1BB 激活免疫细胞，在药效和安全性之间达到平衡。

OX40 (TNFRSF4, CD134) 是 TNF 受体超家族成员之一，参与增强 T 细胞受体 (TCR) 触发的 T 细胞反应，是共刺激受体分子。它是一种 50 kD 的跨膜蛋白。OX40 瞬时表达在 TCR 刺激后的人 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞上。但在肿瘤部位，OX40 在 CD4⁺ T 细胞上的表达比在 CD8⁺ T 细胞更高。因此，CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞是 OX40 定向免疫治疗癌症的药物的潜在靶标。OX40 抗体一些临床前研究表明抗 OX40 单抗通过促进 MDSC 的积累和生成 Th2 细胞因子而产生有害的免疫抑制副作用。

由于已知的困难和未被满足的临床需求，亟需开发新型的抗体分子，可以在肿瘤微环境内中利用靶细胞来介导特定免疫细胞的激活，以避免其在外周系统或者正常组织中被激活所带来的毒副作用。同时，这些新型的抗体分子需要有较简单和稳定的分子结构和优秀的药学性能，以满足快速开发和降低生产成本的需求。

人的抗体的基本结构为呈现“Y”型的四聚体形式，包含两个完全相同的重链 (H 链) 和两个完全相同的轻链 (L 链)，也称为“H2L2”。在骆驼科及鲨鱼科动物血清中还天然存在一种缺失轻链的重链抗体 (heavy-chain antibody, HCAb)。来源于骆驼科的重链抗体与常规 H2L2 结构的抗体 (如 IgG 抗体) 相比，除了缺少轻链外，其重链可变区与铰链区之间没有重链恒定结构域 CH1 区，只含有一个重链可变区 (VHH) 和两个重链恒定结构域 (CH2 和 CH3，即 Fc)；其基本结构为重链二聚体。骆驼科动物的重链抗体的 VHH 片段与常规抗体的 VH 特征不同，其单独克隆并表达出来的 VHH 结构具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及与抗原的结合活性，分子量只有约 13 kDa，因此也被称作纳米抗体 (Nanobody) 或单域抗体 (single-domain antibody)。重链抗体或者其衍生的纳米抗体在分子影像、诊断试剂等方面有独特优势，但是其非人源属性及其潜在的免疫原性风险限制了它的治疗性用途，需要经过进一步的抗体工程改造 (例如抗体人源化) 才能使其满

足用于临床治疗的要求。

由于人的抗体的 H2L2 结构中，重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 的缔合保证了抗体的稳定性和可溶性；如果没有 VL 的存在，VH 上的原本由 VL 保护住的疏水性基团将暴露于水性溶剂，使得 VH 易于发生聚集，进而导致抗体可溶性变差，而且也失去了 VL 贡献的抗原结合能力。因此无法从天然来源中获得有用的人源的重链抗体。Harbour HCAb 转基因小鼠（Harbour Antibodies BV）来源于由 Frank Grosveld 等人提出的一种利用转基因动物获得全人源重链抗体的技术（专利申请 WO2007/096779）。Frank Grosveld 等人构建了一种转基因小鼠，其小鼠内源的抗体重链基因座和轻链基因座都被敲除或者失活，使其无法产生小鼠的抗体；然后将人源的抗体重链基因片段（V，D，J 片段）转入该小鼠，利用该小鼠自身的重排和突变机制产生具有人源抗体基因序列的抗体，而且由于没有轻链，产生的抗体就是人源的重链抗体。该转基因小鼠体内可以利用在 VDJ 重排后引入基因突变和自然选择的过程，选择有利于 VH 的溶解性的 VDJ 组合和突变，有效地改善 VH 的溶解性，因此该转基因小鼠体内可以产生天然不存在的人的重链二聚体结构。从该转基因小鼠获得的全人源重链抗体及其衍生的全人源单域抗体都有广阔的应用前景。

重链抗体及其衍生的单域抗体在构建双特异甚至多特异抗体方面有其独特的优势。重链抗体的抗原结合结构域只有常规抗体的抗原结合片段 Fab 的四分之一大小；而且没有轻链，避免了轻链错配的问题；也可以通过融合抗体的可结晶片段 Fc 来提高分子的血清半衰期。所以，利用重链抗体及其衍生的单域抗体，可以构建分子量较小的、多肽链较少的、结构更简单的双特异甚至多特异抗体。而且，全人源重链抗体相较于骆驼科动物的纳米抗体，在免疫原性和成药性方面更有优势。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是为了克服目前用于免疫细胞衔接器的抗体分子的不足，提供了一种用于免疫细胞衔接器的结合蛋白，本发明的结合蛋白为多价的和多特异性的，能够结合两个或更多个抗原、或者两个或更多个表位。本发明还提供了此类多价的和多特异性的结合蛋白的制备方法及其应用，包括使用此类结合蛋白预防或治疗各种疾病、或在体外或体内检测特异性抗原的方法。本发明的结合蛋白可以增强针对特定靶细胞（例如肿瘤细胞）的免疫反应（例如 T 细胞或者 NK 细胞的活性），其可以将免疫效应细胞和特定靶细胞（例如肿瘤细胞）拉近在一起，高效地有选择性地激活特定靶细胞（例如肿瘤细胞）微环境中的免疫效应细胞，进而增强免疫反应（例如促进 T 细胞活化和细胞因子的产生），并减少外周免疫细胞的非特异性活化带来的毒副作用。所述结合蛋白利用靶细胞抗原介导的共刺激分子的交联以及下游信号传导通路的激活，进而促进免疫细胞的活

化和增殖，提高其杀伤肿瘤的效力。本发明的结合蛋白具有优秀的通用性和成药性，在多个不同靶点组合的双抗分子上都显示出优秀的生物学活性、分子稳定性和药学性能。

为了解决上述技术问题，本发明第一方面提供了一种至少含有两个蛋白功能区的结合蛋白，本发明的结合蛋白通常可以被称为“免疫细胞衔接器多特异性结合蛋白”，其包括第一蛋白功能区和第二蛋白功能区；所述第一蛋白功能区包括结合靶细胞上的抗原的靶向域（可以结合一个或者多个靶细胞上的特定的抗原），所述第二蛋白功能区包括结合免疫效应细胞上的抗原的效应域（可以结合一个或者多个免疫效应细胞上的特定的抗原）；

所述的结合蛋白可以为结构（I）：

所述第一蛋白功能区为 Fab 结构，所述第二蛋白功能区为 VH 结构，所述结合蛋白从 N 末端至 C 末端为第一蛋白功能区和第二蛋白功能区；所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接或间接相连。例如为 Fab-VH-Fc（Fab-HCAb）或者 Fab-Fc-VH（IgG-VH）结构。

所述的结合蛋白可以为结构（II）：

所述第一蛋白功能区为 Fab 结构，所述第二蛋白功能区为 Fab 结构，所述结合蛋白从 N 末端至 C 末端为第一蛋白功能区和第二蛋白功能区；所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接或间接相连。例如为 FIT-Ig 结构。

较佳地，所述结合蛋白为（a）单体结构，或（b）由两个单体组成的二聚体结构。

本发明中，所述的单体指含有单个的所述结构（I）或单个的所述结构（II），其通常仅含一个第一蛋白功能区。所述的二聚体结构由两个单体组成，即通常是指含有两个所述的结构（I）或（II），其通常含有两个第一蛋白功能区和至少两个第二蛋白功能区。

较佳地，所述（a）的单体结构中，所述结合蛋白具有两个第二蛋白功能区，其中一个第二蛋白功能区连接于所述第一蛋白功能区的 Fab 结构的重链 CH1 的 C 末端，另一个第二蛋白功能区连接于所述第一蛋白功能区的 Fab 结构的轻链 CL 的 C 末端（例如，图 37(E) 所示）。

较佳地，所述（b）的二聚体结构中，所述结合蛋白通常还包括 Fc。所述的 Fc 可以是位于所述第一蛋白功能区和所述第二蛋白功能区之间（例如如图 1 结构（1）和（2）所示，或如图 37(A) 所示）；或者所述 Fc 还可以是位于所述第二蛋白功能区的 C 末端（例如，如图 1 中的结构（3）、（4）、（8）所示，或如图 37(B-D) 所示）；或者所述 Fc 还可以位于两个第二蛋白功能区之间（例如，如图 1 的结构（6）所示）。所述 Fc 的数量通常可以为 1 个或者更多。本申请中，所述的 Fc 可以是优选为人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4 的重链恒定区，其通常还可以包括 L234A、L235A 和 P329G 中的一个、两个或三个突变，例如包含 L234A 和 L235A 的突变或包含 L234A、L235A 和 P329G 的突变。

更佳地，在每个单体中，所述第一蛋白功能区的数量为 1 个。

更佳地，在每个单体中，所述第二蛋白功能区的数量为 1 个或多个例如为 1、2 或 3 个。

进一步更佳地，所述的结合蛋白通常还可以进一步包括第三蛋白功能区，其中所述第三蛋白功能区通常位于所述结合蛋白或结合蛋白中 Fc 的 C 或 N 末端。其中，所述第三蛋白功能区的数量为 1 个或多个，例如其数量可以为 1、2 或 3 个。所述的第三蛋白功能区结合其他靶细胞上的抗原或者结合靶细胞上的与第一蛋白功能区相同的抗原的不同表位；或者结合其他免疫效应细胞上的抗原或者结合免疫效应细胞上的与第二蛋白功能区相同的抗原的不同表位。所述的第三蛋白功能区优选为一个或多个 VH。

在某一较佳实施例中，所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2，所述多肽链 1 如式：N¹-VL_A-CL-C'所示，所述多肽链 2 如式：N¹-VH_A-CH1-h-CH2-CH3-L-VH_B-C'所示，所述的 L 为连接肽，其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS（例如，图 1 的结构 1 所示）。

在某一较佳实施例中，所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2，所述多肽链 1 如式：N¹-VL_A-CL-C'所示，所述多肽链 2 如式：N¹-VH_A-CH1-h-CH2-CH3-L1-VH_B-L2-VH_B-C'所示，所述的 L1 和 L2 为连接肽，其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS（例如，图 1 的结构 2 所示）。

在某一较佳实施例中，所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2，所述多肽链 1 如式：N¹-VH_A-CH1-C'所示，所述多肽链 2 如式：N¹-VL_A-CL-L1-VH_B-L2-CH2-CH3-C'所示，所述的 L1 和 L2 为连接肽，其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS，所述 L2 的氨基酸序列进一步优选如 SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 262 或 SEQ ID NO: 263 所示（例如，图 1 的结构 3 所示）。

在某一较佳实施例中，所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2，所述多肽链 1 如式：N¹-VL_A-CL-C'所示，所述多肽链 2 如式：N¹-VH_A-CH1-L1-VH_B-L2-CH2-CH3-C'所示，所述的 L1 和 L2 为连接肽，其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS，所述 L2 的氨基酸序列进一步优选如 SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 262 或 SEQ ID NO: 263 所示（例如，图 1 的结构 4 所示）。

在某一较佳实施例中，所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2，所述多肽链 1 如式：N¹-VH_A-CH1-C'所示，所述多肽链 2 如式：N¹-VL_A-CL-L1-VH_B-L2-CH2-CH3-L3-VH_B-C'所示，所述的 L1、L2 和 L3 为连接肽，其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS，所述 L2 的氨基酸序列进一步优选如 SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 262 或 SEQ ID NO: 263 所示（例如，图 1 的结构 5

所示)。

在某一较佳实施例中,所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2,所述多肽链 1 如式: N'-VL_A-CL-C'所示,所述多肽链 2 如式: N'-VH_A-CH1-L1-VH_B-L2-CH2-CH3-L3-VH_B-C'所示,所述的 L1、L2 和 L3 为连接肽,其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS,所述 L2 的氨基酸序列进一步优选如 SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 262 或 SEQ ID NO: 263 所示(例如,图 1 的结构 6 所示)。

在某一较佳实施例中,所述结合蛋白包含多肽链 1、多肽链 2 和多肽链 3,所述多肽链 1 如式: N'-VL_A-CL-L-VH_B-CH1-h-CH2-CH3-C'所示,所述多肽链 2 如式: N'-VH_A-CH1-C'所示,所述多肽链 3 如式: N'-VL_B-CL-C'所示,所述的 L 为连接肽,其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS(例如,图 1 的结构 8 所示)。

其中,上述的 VL_B 和/或 VH_B 分别为所述第二蛋白功能区的 VL 和/或 VH,所述的 VL_A 和/或 VH_A 分别为所述第一蛋白功能区的 VL 和/或 VH;所述的 h 为铰链区或其衍生序列(例如为表 2 中的人 IgG1 铰链、人 IgG1 铰链 (C220S)、人 IgG2 铰链、人 IgG4 铰链、人 IgG4 铰链 (S228P));所述的 CL 是轻链恒定区结构域;所述的 CH1、CH2 和 CH3 分别是重链恒定区的第一、第二和第三结构域;所述的 L 或 L1 或 L2 或 L3 为连接肽。

本发明人在实验过程中发现,针对免疫效应细胞的抗原结合片段(效应域, effector moiety)相对于针对靶细胞(如肿瘤细胞)的抗原结合片段(靶向域, targeting moiety)的位置和距离对于该结合蛋白的功能活性是至关重要的,如图 38 所示结构。

在某些实施方案中,当效应域位于靶向域和 Fc 之间的时候(图 38 中的模式二),特别是如 Fab-HCAb 四价对称结构(即图 1 所述的结构 3 或结构 4)或 FIT-Ig 结构(即图 1 所述结构 8),该结合蛋白具有激活免疫效应细胞的能力。

在某些实施方案中,当效应域位于 Fc 的 C'端的时候(图 38 中的模式一),特别是如 IgG-VH 四价对称结构(即图 1 所述的结构 1)或 IgG-VH(2) 六价对称结构(即图 1 所述的结构 2),该结合蛋白具有激活免疫效应细胞的能力。而当效应域位于靶向域的 N'端的时候(图 38 中的模式三),特别是如 VH-IgG 四价对称结构(即图 1 所述结构 7),该结合蛋白尽管可以结合免疫效应细胞但是不具有激活能力。

在某些实施方案中,效应域可以同时位于靶向域和 Fc 之间以及位于 Fc 的 C'端,以实现多价的结合(可认为是图 38 中的模式一和模式二的叠加,如图 37(C-D) 所示),特别是如 Fab-VH-Fc-VH 六价对称结构(即图 1 所述的结构 5 或结构 6),该结合蛋白具有

激活免疫效应细胞的能力。

本发明中，所述的抗原结合片段是指任何可以与抗原特异结合的蛋白功能区域，既可以是常规抗体（H2L2）的 Fab 区，也可以是重链抗体（HCAb）的 VH 区，或者其他抗原结合形式（例如脂质运载蛋白（lipocalins）、神经细胞粘附分子（NCAM）、纤维结合蛋白（fibronectin）、锚蛋白重复片段蛋白（DARPs）等衍生蛋白结构）。

较佳地，所述靶细胞上的（特定的）抗原为肿瘤抗原和/或共抑制分子（coinhibitory）抗原。

其中，所述的肿瘤抗原可以为本领域常规，例如可以是 CD19、BCMA、TSHR、CD171、CS-1、CLL-1、GD3、Tn Ag、FLT3、CD38、CD123、CD44v6、B7H3、B7H4、KIT、IL-13Ra2、IL-11Ra、PSCA、PSMA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR-beta、SSEA-4、MUC1、EGFR、NCAM、CAIX、LMP2、EphA2、岩藻糖基 GM1（fucosyl GM1）、sLe^x、GM3、TGS5、HMWMAA、GD2、FOLR1、FOLR2、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPCR5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、多聚唾液酸（polysialic acid）、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TAARP、WT1、ETV6-AML、SPA17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、FOSL1、hTERT、ML-IAP、ERG（TMPRSS2 ETS 融合基因）、NA17、PAX3、AR（雄激素受体）、细胞周期蛋白 B1（Cyclin B1）、MYCN、RhoC、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OYTES1、LCK、AKAP-4、SSX2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、CD20、CD30、HER2、ROR1、FLT3、TAAG72、CD22、CD33、GD2、gp100Tn、FAP、酪氨酸酶（tyrosinase）、EPCAM、CEA、IGF-1R、EphB2、间皮素（mesothelin）、钙黏蛋白 17（Cadherin17）、CD32b、EGFRvIII、GPNMB、GPR64、HER3、LRP6、LYPD8、NKG2D、SLC34A2、SLC39A6、SLITRK6、GUCY2C、和/或 TACSTD2 等等；优选为 B7H3、B7H4、PSMA、CLDN18.2、GPC3、HER2、ROR1、CD22、EPCAM、间皮素、EGFRvIII 和/或 TACSTD2。

其中，所述的共抑制分子抗原可以为本领域常规，例如可以为 PD-L1、PD-L2、CTLA4、B7H3、B7H4、VISTA、HHLA2 和/或 CD155 等等，优选为 PD-L1、B7H3、B7H4 和/或 HHLA2。

其中，所述的免疫效应细胞上的（特定的）抗原可以是刺激型（stimulatory）抗原或共刺激分子（costimulatory）抗原，例如可以是 TCR/CD3、CD28、4-1BB、OX40、GITR、CD27、ICOS、CD2、CD40、CD226、CD16、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D 和/或 2B4 等等，优选为 TCR/CD3、CD28、4-1BB、OX40、GITR、CD40、CD226、CD16 和/或 NKp30。

在某些实施方案中，所述的靶细胞上的（特定的）抗原可以是 CLDN18.2、HER2、

B7H4、EPCAM、PSMA 和/或 PD-L1。

在某些实施方案中，所述的免疫效应细胞上的（特定的）抗原可以是 4-1BB 和/或 OX40。

较佳地，所述第一蛋白功能区为靶向 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段、靶向 HER2 的抗体或其抗原结合片段、靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段、靶向 EPCAM 的抗体或其抗原结合片段、靶向 PSMA 的抗体或其抗原结合片段和/或靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段。

较佳地，所述第二蛋白功能区为靶向 OX40 的抗体或其抗原结合片段、和/或靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方案中，所述的靶向 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 55 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 88 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 VL CDR3。

在某些实施方案中，所述的靶向 HER2 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 13 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 42 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 77 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 105 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 117 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 134 所示的 VL CDR3。

在某些实施方案中，所述的靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 40 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 75 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 103 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 117 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 132 所示的 VL CDR3。

在某些实施方案中，所述的靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 43 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 78 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 106 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 119 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 135 所示的 VL CDR3。

在某些实施方案中，所述的靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 86 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如

SEQ ID NO: 110 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 140 所示的 VL CDR3。

在某些实施方案中,所述的靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 21 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 54 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 87 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 111 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 141 所示的 VL CDR3。

在某些实施方案中,所述的靶向 EPCAM 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 47 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 138 所示的 VL CDR3。

在某些实施方案中,所述的靶向 PSMA 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 48 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 82 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 109 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 122 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 139 所示的 VL CDR3。

在某些实施方案中,所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 49 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 83 所示的 VH CDR3。

在某些实施方案中,所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 VH CDR3。

在某些实施方案中,所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 VH CDR3。

在某些实施方案中,所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 90 所示的 VH CDR3。

在某些实施方案中,所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 41 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 76 所示的 VH CDR3,所述

VL 含有如 SEQ ID NO: 104 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 133 所示的 VL CDR3。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 44 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 76 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 104 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 133 所示的 VL CDR3。

在某些实施方案中，所述的靶向 OX40 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH)，所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 85 所示的 VH CDR3。

在某些实施方案中，所述的靶向 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 165 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 179 所示的 VL。

在某些实施方案中，所述的靶向 HER2 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 152 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 170 所示的 VL。

在某些实施方案中，所述的靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 150 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 168 所示的 VL。

在某些实施方案中，所述的靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 153 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 171 所示的 VL。

在某些实施方案中，所述的靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 163 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 177 所示的 VL。

在某些实施方案中，所述的靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 164 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 178 所示的 VL。

在某些实施方案中，所述的靶向 EPCAM 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 157 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 175 所示的 VL。

在某些实施方案中，所述的靶向 PSMA 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 158 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 176 所示的 VL。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 159 所示的 VH。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 160 所示的 VH。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 161 所示的 VH。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 167 所示的 VH。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 151 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 169 所示的 VL。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 154 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 172 所示的 VL。

在某些实施方案中，所述的靶向 OX40 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 162 所示的 VH。

在某些实施方案中，所述的靶向 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 196 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 210 所示的轻链。

在某些实施方案中，所述的靶向 HER2 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 183 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 201 所示的轻链。

在某些实施方案中，所述的靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 181 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 199 所示的轻链。

在某些实施方案中，所述的靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 184 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 202 所示的轻链。

在某些实施方案中，所述的靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 194 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 208 所示的轻链。

在某些实施方案中，所述的靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 195 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 209 所示的轻链。

在某些实施方案中，所述的靶向 EPCAM 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 188 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 206 所示的轻链。

在某些实施方案中，所述的靶向 PSMA 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 189 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 207 所示的轻链。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 190 所示的重链。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 191 所示的重链。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 192 所示的重链。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 198 所示的重链。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 182 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 200 所示的轻链。

在某些实施方案中，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 185 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 203 所示的轻链。

在某些实施方案中，所述的靶向 OX40 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 193 所示的重链。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 105、117 和 134 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 13、42 和 77 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 19、51 和 84 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 110、118 和 140 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 20、53 和 86 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 16、49 和 83 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 110、118 和 140 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 20、53 和 86 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 18、50 和 84 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 110、118 和 140 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 20、53 和 86 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可

变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 18、57 和 90 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 106、119 和 135 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 14、43 和 78 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 16、49 和 83 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 106、119 和 135 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 14、43 和 78 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 18、50 和 84 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 106、119 和 135 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 14、43 和 78 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 19、51 和 84 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 108、121 和 138 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 16、47 和 81 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 16、49 和 83 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL

包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 108、121 和 138 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 16、47 和 81 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 18、50 和 84 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 108、121 和 138 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 16、47 和 81 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 19、51 和 84 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 109、122 和 139 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 17、48 和 82 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 16、49 和 83 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 109、122 和 139 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 17、48 和 82 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 18、50 和 84 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 109、122 和 139 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 17、48 和 82 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 19、51 和 84 所

示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 108、121 和 142 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 22、55 和 88 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 16、49 和 83 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 108、121 和 142 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 22、55 和 88 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 18、50 和 84 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 108、121 和 142 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 22、55 和 88 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 19、51 和 84 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 106、119 和 135 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 14、43 和 78 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 14、52 和 85 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 110、118 和 140 所示的

氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 20、53 和 86 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 14、52 和 85 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 108、121 和 138 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 16、47 和 81 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 14、52 和 85 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 109、122 和 139 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 17、48 和 82 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 14、52 和 85 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 108、121 和 142 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 22、55 和 88 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 14、52 和 85 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 111、118 和 141 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 21、54 和 87 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 18、50 和 84 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 106、119 和 135 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 14、43 和 78 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 104、118 和 133 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 12、41 和 76 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 103、117 和 132 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 11、40 和 75 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 104、118 和 133 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，分别为 SEQ ID NOs: 12、44 和 76 所示的氨基酸序列。所列 CDR 的氨基酸序列按照 Chothia 定义规则所示。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 170 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 152 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 161 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 177 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 163 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 159 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 177 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 163 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ

ID NO: 160 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 177 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 163 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 167 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 171 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 153 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 159 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 171 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 153 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 160 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 171 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 153 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 161 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 175 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 157 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 159 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 175 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 157 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 160 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区 and 第二蛋

白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 175 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 157 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 161 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 176 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 158 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 159 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 176 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 158 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 160 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 176 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 158 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 161 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 179 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 165 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 159 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 179 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 165 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 160 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 179 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 165

所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 161 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 171 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 153 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 162 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 177 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 163 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 162 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 175 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 157 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 162 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 176 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 158 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 162 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 179 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 165 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 162 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 178 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 164 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含重链可变区；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 160 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 171 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 153 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 169 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 151 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述结合蛋白包含两种蛋白功能区：第一蛋白功能区和第二蛋白功能区。其中，所述第一蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 168 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 150 所示的氨基酸序列。所述第二蛋白功能区包含轻链可变区和重链可变区；其轻链可变区 VL 包括如 SEQ ID NO: 172 所示的氨基酸序列；其重链可变区 VH 包括如 SEQ ID NO: 154 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 201 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 214 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 208 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 217 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 208 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 218 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 208 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 219 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 202 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 221 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 202 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 222 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 202 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 223 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 206 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 224 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 206 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 225 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 206 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 226 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含三个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 213 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 212 所示的氨基酸序列；多肽链 3 包括如 SEQ ID NO: 203 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含三个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 216 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 215 所示的氨基酸序列；多肽链 3 包括如 SEQ ID NO: 203 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 237 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 266 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 237 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 267 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 237 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 268 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 237 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 269 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 202 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 270 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 212 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 271 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 208 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 272 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 208 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 273 所示的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的结合蛋白包含两个多肽链。其中，多肽链 1 包括如 SEQ ID NO: 237 所示的氨基酸序列；多肽链 2 包括如 SEQ ID NO: 274 所示的氨基酸序列。

本申请中，所述的 CDR 均可包含在所限序列的基础上进行突变的情形。所述突变为在所述的 VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3 的氨基酸序列的基础上分别具有 3、2 或 1 个氨基酸的插入、缺失或替换。本申请中，在类似“具有 3、2 或 1 个氨基酸的插入、缺失或替换”中“氨基酸突变”是指相较于原氨基酸序列而言，变体的序列存在氨基酸的突变，包括在原氨基酸序列的基础上发生氨基酸的插入、缺失或替换。示例性的解释是对 CDR 的突变可以包含 3 个、2 个或 1 个氨基酸的突变，这些 CDR 之间可以任选地选择相同或不同数目的氨基酸残基进行突变，例如可以是对

CDR1 进行 1 个氨基酸的突变，对 CDR2 和 CDR3 不进行氨基酸突变。

本申请中，所述的 VH、VL、或所述的多肽链均可包含在所限定的序列的基础上进行突变的情形。所述突变为所限定的氨基酸序列上发生了一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或添加，且所述突变的氨基酸序列与所限定的氨基酸序列具有至少 85% 序列同一性，并保持或改善了所述抗体或其抗原结合片段、结合蛋白的结合活性；所述至少 85% 序列同一性优选为至少 90% 序列同一性；更优选为至少 95% 序列同一性；最优选为至少 99% 序列同一性。

为了解决上述技术问题，本发明第二方面提供了一种分离的核酸，其编码如本发明第一方面所述的结合蛋白。

为了解决上述技术问题，本发明第三方面提供了一种重组表达载体，其包含如本发明第二方面所述的分离的核酸。

较佳地，所述表达载体包含真核细胞表达载体和/或原核细胞表达载体。

为了解决上述技术问题，本发明第四方面提供了一种转化体，其包含如本发明第二方面所述的分离的核酸或如本发明第三方面所述的重组表达载体。

较佳地，所述转化体的宿主细胞为原核细胞和/或真核细胞，所述原核细胞优选 *E. coli* 细胞如 TG1、BL21，所述真核细胞优选 HEK293 细胞或 CHO 细胞。

为了解决上述技术问题，本发明第五方面提供了一种结合蛋白的制备方法，其包含培养如本发明第四方面所述的转化体，从培养物中获得结合蛋白。

为了解决上述技术问题，本发明第六方面提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含如本发明第一方面所述的结合蛋白，以及任选地药学上可接受的载体。

较佳地，所述药物组合物还包括其他抗肿瘤抗体作为活性成分。

为了解决上述技术问题，本发明第七方面提供了一种试剂盒，其包括如本发明第一方面所述的结合蛋白和/或如本发明第六方面所述的药物组合物。

较佳地，所述试剂盒还包括(i)施用结合蛋白或药物组合物的装置；和/或(ii)使用说明。

为了解决上述技术问题，本发明第八方面提供了一种套装药盒，所述套装药盒包括药盒一和药盒二，所述药盒一包括如本发明第一方面所述的结合蛋白和/或如本发明第六方面所述的药物组合物，所述药盒二包括其它抗体或药物组合物。所述的药盒一和药盒二可以同时使用，也可以先使用药盒一再使用药盒二，还可以先使用药盒二再使用药盒一，可以根据具体应用时的实际需求而定。即对应于联合用药的情况。

为了解决上述技术问题，本发明第九方面提供了一种给药装置，所述给药装置包括如本发明第一方面所述的结合蛋白和/或如本发明第六方面所述的药物组合物。

较佳地，所述给药装置还包括容纳或将所述合蛋白和/或所述药物组合物施用于受试

者的部件，例如注射器、输液装置或植入式给药装置。

为了解决上述技术问题，本发明第十方面提供了一种如本发明第一方面所述的结合蛋白、如本发明第六方面所述的药物组合物、如本发明第七方面所述的试剂盒、如本发明第八方面所述的套装药盒和/或如本发明第九方面所述的给药装置在制备诊断、预防和/或治疗肿瘤的药物中的应用。

较佳地，所述肿瘤为乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、黑色素瘤、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、食管癌、宫颈癌、头颈部肿瘤、胆管癌、胆囊癌、膀胱癌、肉瘤和/或结直肠癌等等血液瘤或实体瘤。

为了解决上述技术问题，本发明第十一方面提供了一种体外或体内检测特异性抗原的方法，其包括使用如本发明第一方面所述的结合蛋白和/或如本发明第六方面所述的药物组合物进行检测。

为了解决上述技术问题，本发明第十二方面提供了一种诊断、预防和/或治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有需要的患者施用如本发明第一方面所述的结合蛋白、如本发明第六方面所述的药物组合物、如本发明第七方面所述的试剂盒、如本发明第八方面所述的套装药盒和/或如本发明第九方面所述的给药装置的步骤。

较佳地，所述肿瘤为乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、黑色素瘤、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、食管癌、宫颈癌、头颈部肿瘤、胆管癌、胆囊癌、膀胱癌、肉瘤和/或结直肠癌等等血液瘤或实体瘤。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明的积极进步效果在于：

本发明的结合蛋白可以增强针对特定靶细胞（例如肿瘤细胞）的免疫反应（例如 T 细胞或者 NK 细胞的活性），其可以将免疫效应细胞和特定靶细胞（例如肿瘤细胞）拉近在一起，高效地有选择性地激活特定靶细胞（例如肿瘤细胞）微环境中的免疫效应细胞，进而增强免疫反应（例如促进 T 细胞活化和细胞因子的产生），并减少外周免疫细胞的非特异性活化带来的毒副作用。所述结合蛋白利用靶细胞抗原介导的共刺激分子的交联以及下游信号传导通路的激活，进而促进免疫细胞的活化和增殖，提高其杀伤肿瘤的效力。本发明的结合蛋白具有优秀的通用性和成药性，在多个不同靶点组合的双抗分子上都显示出优秀的生物学活性、分子稳定性和药学性能。

附图说明

图 1 为分子结构示意图。

图 2 显示了 PD-L1 × 4-1BB 结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB 的结合活性。

图 3 显示了 B7H4 × 4-1BB 结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB 的结合活性。

图 4 显示了 HER2 × 4-1BB 结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB 的结合活性。

图 5 显示了 EPCAM × 4-1BB 结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB 的结合活性。

图 6 显示了 PSMA × 4-1BB 结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB 的结合活性。

图 7 显示了 CLDN18.2 × 4-1BB 结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB 的结合活性。

图 8 显示了抗体分子结合食蟹猴 4-1BB 细胞 CHO-K1/cyno 4-1BB 的结合活性。

图 9 显示了抗体分子结合食蟹猴 OX40 蛋白的结合活性。

图 10 显示了抗体分子结合人 OX40 细胞 CHO-K1/hu OX40 的结合活性。

图 11 显示了 PD-L1 × 4-1BB 结合人 PD-L1 细胞 CHO-K1/hPD-L1 的结合活性。

图 12 显示了 B7H4 × 4-1BB 结合肿瘤细胞 SK-BR-3 的结合活性。

图 13 显示了 HER2 × 4-1BB 结合肿瘤细胞 SK-BR-3 的结合活性。

图 14 显示了 EPCAM × 4-1BB 结合肿瘤细胞 Capan-2 的结合活性。

图 15 显示了 PSMA × 4-1BB 结合肿瘤细胞 LNCaP 的结合活性。

图 16 显示了 PD-L1 × OX40 结合人 PD-L1 细胞 CHO-K1/hPD-L1 的结合活性。

图 17 显示了 B7H4 × OX40 结合肿瘤细胞 SK-BR-3 的结合活性。

图 18 显示了 EPCAM × OX40 结合肿瘤细胞 Capan-2 的结合活性。

图 19 显示了 PSMA × OX40 结合肿瘤细胞 LNCaP 的结合活性。

图 20 显示了 CLDN18.2 × OX40 结合肿瘤细胞 NUGC-4 的结合活性。

图 21 显示了 CLDN18.2 × 4-1BB 通过 NUGC-4 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 22 显示了 CLDN18.2 × OX40 通过 NUGC-4 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 23 显示了 PSMA × 4-1BB 通过 LNCaP 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 24 显示了 PSMA × OX40 通过 HEK293/hPSMA 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 25 显示了 EPCAM × 4-1BB 通过 Capan-2 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 26 显示了 EPCAM × OX40 通过 Capan-2 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 27 显示了 PD-L1 × 4-1BB 通过 CHO-K1/hPD-L1 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 28 显示了 PD-L1 × 4-1BB 通过 MDA-MB-231 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 29 显示了 PD-L1 × OX40 通过 MDA-MB-231 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 30 显示了 HER2 × 4-1BB 通过 SK-BR-3 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 31 显示了 B7H4 × OX40 通过 CHO-K1/hB7H4 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 32 显示了 B7H4 × 4-1BB 通过 SK-BR-3 细胞介导 T 细胞特异性激活。

图 33 显示了 B7H4 × 4-1BB 对 T 细胞激活特异性依赖 B7H4 的表达：(A) 在高表达 B7H4 的细胞 SK-BR-3 存在时，B7H4 × 4-1BB 可以激活 T 细胞；(B) 在不表达 B7H4 的细胞 JIMT-1 存在时，B7H4 × 4-1BB 不能激活 T 细胞。

图 34 显示了 PD-L1 × 4-1BB 在混合淋巴细胞反应 (MLR) 实验中激活 T 细胞：第一个 MLR 实验中测定的第 5 天的 IFN γ 水平 (A) 和第 3 天的 IL-2 水平 (B)；第二个 MLR 实验中测定的第 5 天的 IFN γ 水平 (C) 和第 3 天的 IL-2 水平 (D)。

图 35 显示了双抗分子在小鼠体内的药代动力学。

图 36 显示了 B7H4 × 4-1BB 在 BALB/c hCD137-KI CT26-hB7H4 肿瘤小鼠模型中的抗肿瘤效果。

图 37 为其他分子结构示意图。

图 38 为靶向域和效应域的组合示意图。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

在本申请中，术语“结合蛋白”或者“抗原结合蛋白”通常是指包含结合抗原的部分的蛋白质，以及任选地允许结合抗原的部分采用促进抗原结合蛋白与抗原结合的构象的支架或骨架部分。可典型地包含抗体轻链可变区 (VL)、抗体重链可变区 (VH) 或上述两者。VH 和 VL 区可进一步被区分为称为互补决定区 (CDR) 的高变区，它们散布在称为框架区 (FR) 的更保守的区域中。每个 VH 和 VL 可由三个 CDR 和四个 FR 区构成，它们从氨基端至羧基端可按以下顺序排列：FR-1、CDR1、FR-2、CDR2、FR-3、CDR3 和 FR-4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。VH 的三个 CDR 分别表示为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，也可表示为 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3；VL 的三个 CDR 分别表示为 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，也可表示为 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3。抗原结合蛋白的实例包括但不限于抗体、抗原结合片段 (Fab, Fab', F(ab)₂, Fv 片段, F(ab')₂, scFv, di-scFv 和/或 dAb)、免疫缀合物、多特异性抗体 (例如双特异性抗体)、抗体片段、抗体衍生物、抗体类似物或融合蛋白等，只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。

在本申请中，所述 CDR 的氨基酸序列均是按照 Chothia 定义规则所示出的。但是，本领域人员公知，在本领域中可以通过多种方法来定义抗体的 CDR，例如基于序列可变性的 Kabat 定义规则 (参见，Kabat 等人，免疫学的蛋白质序列，第五版，美国国立卫生

研究院，贝塞斯达，马里兰州（1991）和基于结构环区域位置的 Chothia 定义规则（参见 JMol Biol 273:927-48,1997）。在本发明的技术方案中，还可以使用包含了 Kabat 定义和 Chothia 定义的 Combined 定义规则来确定可变结构域序列中的氨基酸残基。其中 Combined 定义规则即是将 Kabat 定义和 Chothia 定义的范围相结合，基于此取了一个更大的范围，详见下表。本领域技术人员应当理解的是，除非另有规定，否则术语给定抗体或其区（例如可变区）的“CDR”及“互补决定区”应理解为涵盖如通过本发明描述的上述已知方案中的任何一种界定的互补决定区。虽然本发明中请求保护的范围是基于 Chothia 定义规则所示出的序列，但是根据其他 CDR 的定义规则所对应的氨基酸序列也应当落在本发明的保护范围内。

表-I 本申请抗体 CDR 定义方法

	Kabat	Chothia	Combined
LCDR1	L24--L34	L24--L34	L24-L34
LCDR2	L50--L56	L50--L56	L50-L56
LCDR3	L89--L97	L89--L97	L89-L97
HCDR1	H31--H35	H26--H32	H26-H35
HCDR2	H50--H65	H52--H56	H50-H65
HCDR3	H95--H102	H95--H102	H95-H102

其中，Laa-Lbb 可以指从抗体轻链的 N 端开始，第 aa 位（Chothia 编码规则）至第 bb 位（Chothia 编码规则）的氨基酸序列；Haa-Hbb 可以指从抗体重链的 N 端开始，第 aa 位（Chothia 编码规则）至第 bb 位（Chothia 编码规则）的氨基酸序列。例如，L24-L34 可以指从抗体轻链 N 端开始，按照 Chothia 编码规则的从第 24 位至第 34 位的氨基酸序列；H26-H32 可以指从抗体重链 N 端开始，按照 Chothia 编码规则的从第 26 位至第 32 位的氨基酸序列。本领域技术人员应当知晓的是，在用 Chothia 编码 CDR 时，有些位置会有插入位点的情况（可参见 <http://bioinf.org.uk/abs/>）。

在本申请中，术语“单克隆抗体”通常是指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即集群中的个别抗体是相同的，除了可能存在的少量的自然突变。单克隆抗体通常针对单个抗原位点具有高度特异性。而且，与常规多克隆抗体制剂（通常具有针对不同决定簇的不同抗体）不同，各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性之外，单克隆抗体的优点在于它们可以通过杂交瘤培养合成，不受其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征，并且不被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如，根据本发明使用的单克隆抗体可以在杂交瘤细胞中制备，或者可以通过重组 DNA 方法制备。

在本申请中，术语“全人源抗体”通常是指将人类编码抗体的基因全部转移至基因

工程改造的抗体基因缺失动物中，使动物表达的抗体。抗体所有部分（包括抗体的可变区和恒定区）均由人类来源的基因所编码。全人源抗体可以大大减少异源抗体对人体造成的免疫副反应。本领域获得全人源抗体的方法可以有噬菌体展示技术、转基因小鼠技术等。

在本申请中，术语“特异性结合”通常是指抗体通过其抗原结合域与表位结合，并且该结合需要抗原结合域和表位之间的一些互补性。根据该定义，当抗体相比于其将结合随机的，不相关的表位而言更容易通过其抗原结合域与表位结合时，抗体被称为“特异性结合”该抗原。“表位”是指抗原上与抗原结合蛋白（如抗体）结合的特定的原子基团（例如，糖侧链、磷酸基、磺酰基）或氨基酸。

在本申请中，术语“Fab”通常指常规抗体（例如 IgG）中与抗原结合的部分，包括抗体的重链可变区 VH、轻链可变区 VL 和重链恒定区结构域 CH1 以及轻链恒定区 CL。在常规抗体中，VH 的 C 端与 CH1 的 N 端联结形成重链 Fd 片段，VL 的 C 端与 CL 的 N 端联结形成轻链，CH1 的 C 端又进一步与重链的铰链区和其他恒定区结构域联结形成重链。在一些实施例中，“Fab”也指 Fab 的变体结构。例如，在某些实施例中，VH 的 C 端与 CL 的 N 端联结形成一个多肽链，VL 的 C 端与 CH1 的 N 端联结形成另一个多肽链，形成 Fab(cross VH/VL)的结构；在某些实施例中，Fab 的 CH1 不与铰链区联结，而是 CL 的 C 端与重链的铰链区联结，形成 Fab(cross Fd/LC)的结构。

在本申请中，术语“VH”通常指抗体的重链可变区 VH 结构域，即可以是人或者其他动物的常规抗体（H2L2 结构）的重链可变区 VH，也可以是骆驼科等动物的重链抗体（HCAb 结构）的重链可变区 VHH，还可以是利用 Harbour HCAb 转基因小鼠产生的全人源重链抗体（HCAb 结构）的重链可变区 VH。

在本申请中，术语“抗原结合片段”通常指任何可以与抗原特异结合的蛋白功能区域，既可以是“Fab”，也可以是“VH”，还可以是其他抗原结合形式（例如脂质运载蛋白（lipocalins）、神经细胞粘附分子（NCAM）、纤维结合蛋白（fibronectin）、锚蛋白重复片段蛋白（DARPs）等衍生蛋白结构）。

在本申请中，术语“肿瘤抗原”(tumor antigen)即可以是肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)还可以是肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)。肿瘤特异性抗原是指肿瘤细胞所特有的、不存在于正常细胞或组织上的抗原。肿瘤相关抗原并非肿瘤细胞所特有，也存在于正常细胞或组织，但是肿瘤细胞增殖时高度表达。

在本申请中，术语“靶细胞”是指需要被清除掉的细胞，主要是肿瘤细胞，也可以是免疫抑制性细胞等。

在本申请中，术语“免疫效应细胞”一般指在免疫应答中参与清除异物抗原和行使

效应功能的免疫细胞。如浆细胞、细胞毒性 T 细胞、NK 细胞等等。

在本申请中，术语“共刺激分子”、“共刺激分子抗原”或“刺激性抗原”是指为免疫细胞如 T 或 B 细胞完全活化提供共刺激信号的细胞表面分子及其配体，对免疫细胞活化起到正调节作用。例如 CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD40 等等。

在本申请中，术语“共抑制分子”或“共抑制分子抗原”是一类对免疫细胞的功能起到负调节作用的细胞表面分子及其配体。例如 CTLA-4、PD-L1、PD-1 等等。

在本申请中，术语“效应域”（effector moiety）是指结合免疫效应细胞的抗原结合片段。

在本申请中，术语“靶向域”（targeting moiety）是指结合靶细胞（如肿瘤细胞）的抗原结合片段。

在本申请中，术语“PD-L1”通常是指程序性死亡配体 1 蛋白、其功能变体和/或其功能片段。PD-L1 也称为分化簇 274（CD274）或 B7 同源物 1（B7-H1），并且是由（人类中）CD274 基因编码的蛋白。PD-L1 序列是本领域已知的。例如，示例性的全长人 PD-L1 蛋白的氨基酸序列可在 NCBI 登录号 NP_054862 或 UniProt 登录号 Q9NZQ7 下找到；示例性的全长食蟹猴 PD-L1 蛋白序列可在 NCBI 登录号 XP_005581836 或 Uniprot 登录号 G7PSE7 下找到。

在本申请中，术语“HER2”通常是指受体酪氨酸激酶 erbB-2（也称为 ERBB2）、其功能变体和/或其功能片段。HER2 序列是本领域已知的。例如，示例性的全长的人 HER2 序列可以在 Uniprot 登录号 P04626 中找到；示例性的全长的食蟹猴 HER2 序列可以在 NCBI 登录号 XP_005584091 中找到。

在本申请中，术语“B7H4”通常是指含 V-Set 域 T 细胞激活抑制因子 1（也称为 VTCN1）、其功能变体和/或其功能片段。B7H4 序列是本领域已知的。例如，示例性的全长的人 B7H4 序列可以在 Uniprot 登录号 Q7Z7D3 中找到；示例性的全长的食蟹猴 B7H4 序列可以在 NCBI 登录号 XP_005542249 中找到；示例性的全长的小鼠 B7H4 序列可以在 Uniprot 登录号 Q7TSP5 中找到。

在本申请中，术语“4-1BB”通常是指肿瘤坏死因子受体超家族成员 9（也称为 CD137，4-1BBL 受体）、其功能变体和/或其功能片段。4-1BB 序列是本领域已知的。例如，示例性的全长的人 4-1BB 序列可以在 Uniprot 登录号 Q07011 中找到；示例性的全长的食蟹猴 4-1BB 序列可以在 NCBI 登录号 XP_005544945 中找到。

在本申请中，术语“OX40”通常是指肿瘤坏死因子受体超家族成员 4（也称为 CD134，OX40L 受体）、其功能变体和/或其功能片段。OX40 序列是本领域已知的。例如，示例性的全长的人 OX40 序列可以在 Uniprot 登录号 P43489 中找到；示例性的全长的食蟹猴

OX40 序列可以在 NCBI 登录号 XP_005545179 中找到。

在本申请中，术语“EPCAM”通常是指上皮细胞粘附分子（也称为 CD326）、其功能变体和/或其功能片段。EPCAM 序列是本领域已知的。例如，示例性的全长的人 EPCAM 序列可以在 Uniprot 登录号 P16422 中找到；示例性的全长的食蟹猴或恒河猴 EPCAM 序列可以在 NCBI 登录号 NP_001035118 中找到。

在本申请中，术语“PSMA”通常是指前列腺特异膜抗原（也称为 FOLH1，谷氨酸羧肽酶 2）、其功能变体和/或其功能片段。PSMA 序列是本领域已知的。例如，示例性的全长的人 PSMA 序列可以在 Uniprot 登录号 Q04609 中找到；示例性的全长的食蟹猴 PSMA 序列可以在 NCBI 登录号 XP_005579379 中找到。

在本申请中，术语“Claudin-18”或“CLDN18”通常是指是一种在人类中由 CLDN18 基因编码的蛋白质，属于细胞紧密连接蛋白家族，可以控制层细胞之间的分子流动。Claudin-18 具有两个剪接变体，分别为 Claudin 18.1 和 Claudin 18.2，两者序列之间仅有八个氨基酸的差异。Claudin 18.1 和 Claudin 18.2 的表达分布有所不同，Claudin 18.1 在正常肺的细胞中选择性表达，Claudin 18.2 在正常细胞中表达高度受限，但在多种肿瘤中被激活并高度表达。Claudin-18 序列是本领域已知的。例如，示例性的全长的人 Claudin-18 序列可以在 Uniprot 登录号 P56856 中找到；对应地，剪接变体 Claudin 18.1 的序列是 P56856-1，剪接变体 Claudin 18.2 的序列是 P56856-2。

在本申请中，术语“CLDN18.1”特指“Claudin-18”的剪接变体 Claudin 18.1。

在本申请中，术语“CLDN18.2”特指“Claudin-18”的剪接变体 Claudin 18.2。

实施例

下面通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之内。实施例不包括对传统方法的详细描述，如那些用于构建载体和质粒的方法，将编码蛋白的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒引入宿主细胞的方法。这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的，并且在许多出版物中都有所描述。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

实施例 1 基于重链抗体的免疫细胞衔接器多特异性结合蛋白

本实施例列举了若干种利用全人源重链抗体（HCAb）及其衍生的单域抗体（sdAb）所构建的免疫细胞衔接器多特异性结合蛋白的结构。在有些结构中，结构域和结构域之间用连接肽进行联结。在有些结构中，重链的 Fc 区域引入了氨基酸突变以改变其与 Fc

受体的结合进而改变相关的效应功能或者其他性能。

表 1 和图 1 列出了本申请所涉及的多特异性结合蛋白分子结构，每一个结构会在下文进一步描述。优选结构为结构 1、结构 2 和结构 3。表 2 列出了本申请的结构设计中可能用到的连接肽序列。图 37 列出了基于重链抗体或单域抗体的其他衍生的双（多）特异性抗体分子结构。

表 1 本申请所列举的多特异性结合蛋白分子结构

结构编号	结构模式名称	结构类型	结合价数	对称性	不同的多肽链数目
1	IgG_HC-VH	IgG-VH	四价	对称	2
2	IgG_HC-VH-VH	IgG-VH(2)	六价	对称	2
3	Fab(CL)-VH-Fc	Fab-HCAb	四价	对称	2
4	Fab(CH1)-VH-Fc	Fab-HCAb	四价	对称	2
5	Fab(CL)-VH-Fc-VH	Fab-VH-Fc-VH	六价	对称	2
6	Fab(CH1)-VH-Fc-VH	Fab-VH-Fc-VH	六价	对称	2
7	VH-IgG_HC	VH-IgG	四价	对称	2
8	FIT-Ig	FIT-Ig	四价	对称	3

表 2 连接肽序列

连接肽名字	长度	序列	SEQ ID NO
GS_2	2	GS	
GS_4	4	GSGS	244
GS_5	5	GGGGS	245
GS_7	7	GGGGSGS	246
GS_15	15	GGGGSGGGGSGGGGS	247
GS_20	20	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	248
GS_25	25	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	249
H1_15	15	EPKSSDKTHTPPPPP	250
LH1	10	DKTHTCPPCP	251
G5-LH	15	GGGGGDKTHTCPPCP	252
H1_15-RT	17	EPKSSDKTHTPPPPPRT	253
L-GS_15-RT	18	LGGGGSGGGGSGGGGSRT	254
L-H1_15-RT	18	LEPKSSDKTHTPPPPPRT	255
KL-H1_15-RT	19	KLEPKSSDKTHTPPPPPRT	256
KL-H1_15-AS	19	KLEPKSSDKTHTPPPPPAS	257
RT-GS_5-KL	9	RTGGGGSKL	258

RT-GS_15-KL	19		RTGGGGSGGGGSGGGGSK L	259
RT-GS_25-KL	29		RTGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSKL	260
人 IgG1 铰链	15		EPKSCDKTHTCPPCP	261
人 IgG1 铰链 (C220S)	15		EPKSSDKTHTCPPCP	262
人 IgG2 铰链	12		ERKCCVECP	263
人 IgG4 铰链	12		ESKYGPPCP	264
人 IgG4 铰链 (S228P)	12		ESKYGPPCP	265

实施例 1.1 含有重链抗体 VH 结构域的双特异性结合蛋白结构

本发明提供了一种使用两种亲本单克隆抗体构建双特异性结合蛋白的方法：结合第一抗原的常规抗体 A 和结合第二抗原的重链抗体 B。

如图 1 中结构 (1) 至结构 (7) 所示，Fab 端来源于常规抗体 A，VH_A 和 VL_A 分别为抗体 A 的重链可变区和轻链可变区。VH 端来源于重链抗体 B，VH_B 为重链抗体 B 的重链可变区。CL 是轻链恒定区结构域。CH1、CH2 和 CH3 分别是重链恒定区的第一、第二和第三结构域。h 是 IgG 抗体的铰链区或衍生序列，L 或 L1 或 L2 或 L3 是连接肽。

实施例 1.1.1 结构 (1) : IgG_{HC}-VH

结构 (1) 的结合蛋白包含两条多肽链：多肽链 1，也称短链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL；多肽链 2，也称长链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_A-CH1-h-CH2-CH3-L-VH_B。

在一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 与 VH_B 直接融合联结，即 L 的长度为 0。在另一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 经由连接肽 L 联结到 VH_B；L 可以是表 2 中所列序列。

实施例 1.1.2 结构 (2) : IgG_{HC}-VH-VH

结构 (2) 的结合蛋白包含两条多肽链：多肽链 1，也称短链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL；多肽链 2，也称长链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_A-CH1-h-CH2-CH3-L1-VH_B-L2-VH_B。

在一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 与 VH_B 直接融合联结，即 L1 的长度为 0。在另一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 经由连接肽 L1 联结到 VH_B；L1 可以是表 2 中所列序列。

在一个实施方案中，多肽链 2 的第一个 VH_B 与第二个 VH_B 直接融合联结，即 L2 的长度为 0。在另一个实施方案中，多肽链 2 的第一个 VH_B 经由连接肽 L2 联结到第二

个 VH_B; L2 可以是表 2 中所列序列。

实施例 1.1.3 结构 (3): Fab(CL)-VH-Fc

结构 (3) 的结合蛋白包含两条多肽链: 多肽链 1, 也称短链, 从氨基末端到羧基末端, 其包含 VH_A-CH1; 多肽链 2, 也称长链, 从氨基末端到羧基末端, 其包含 VL_A-CL-L1-VH_B-L2-CH2-CH3。在结构 (3) 中, 抗体 A 的 VL_A 和重链抗体 B 的 VH_B 融合在同一条多肽链上, 这样可以避免 VL_A 和 VH_B 的缔合产生的错配副产物。

多肽链 2 的 VH_B 经由连接肽 L2 联结到 CH2; L2 可以是 IgG 的铰链区或者铰链区衍生的连接肽序列, 或是表 2 中所列序列, 优选为人 IgG1 铰链或者人 IgG1 铰链 (C220S) 或者 G5-LH 的序列。

在一个实施方案中, 多肽链 2 的 CL 与 VH_B 直接融合联结, 即 L1 的长度为 0。在另一个实施方案中, 多肽链 2 的 CL 经由连接肽 L1 联结到 VH_B; L1 可以是表 2 中所列序列。

实施例 1.1.4 结构 (4): Fab(CH1)-VH-Fc

结构 (4) 的结合蛋白包含两条多肽链: 多肽链 1, 也称短链, 从氨基末端到羧基末端, 其包含 VL_A-CL; 多肽链 2, 也称长链, 从氨基末端到羧基末端, 其包含 VH_A-CH1-L1-VH_B-L2-CH2-CH3。

多肽链 2 的 VH_B 经由连接肽 L2 联结到 CH2; L2 可以是 IgG 的铰链区或者铰链区衍生的连接肽序列, 或是表 2 中所列序列, 优选为人 IgG1 铰链或者人 IgG1 铰链 (C220S) 或者 G5-LH 的序列。

在一个实施方案中, 多肽链 2 的 CH1 与 VH_B 直接融合联结, 即 L1 的长度为 0。在另一个实施方案中, 多肽链 2 的 CH1 经由连接肽 L1 联结到 VH_B; L1 可以是表 2 中所列序列。

实施例 1.1.5 结构 (5): Fab(CL)-VH-Fc-VH

结构 (5) 的结合蛋白包含两条多肽链: 多肽链 1, 也称短链, 从氨基末端到羧基末端, 其包含 VH_A-CH1; 多肽链 2, 也称长链, 从氨基末端到羧基末端, 其包含 VL_A-CL-L1-VH_B-L2-CH2-CH3-L3-VH_B。在结构 (5) 中, 抗体 A 的 VL_A 和重链抗体 B 的 VH_B 融合在同一条多肽链上, 这样可以避免 VL_A 和 VH_B 的缔合产生的错配副产物。

多肽链 2 的 VH_B 经由连接肽 L2 联结到 CH2; L2 可以是 IgG 的铰链区或者铰链区衍生的连接肽序列, 或是表 2 中所列序列, 优选为人 IgG1 铰链或者人 IgG1 铰链 (C220S) 或者 G5-LH 的序列。

在一个实施方案中, 多肽链 2 的 CL 与第一个 VH_B 直接融合联结, 即 L1 的长度为 0。在另一个实施方案中, 多肽链 2 的 CL 经由连接肽 L1 联结到第一个 VH_B; L1 可以

是表 2 中所列序列。

在一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 与第二个 VH_B 直接融合联结，即 L3 的长度为 0。在另一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 经由连接肽 L3 联结到第二个 VH_B；L3 可以是表 2 中所列序列。

实施例 1.1.6 结构 (6) : Fab(CH1)-VH-Fc-VH

结构 (6) 的结合蛋白包含两条多肽链：多肽链 1，也称短链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL；多肽链 2，也称长链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_A-CH1-L1-VH_B-L2-CH2-CH3-L3-VH_B。

多肽链 2 的 VH_B 经由连接肽 L2 联结到 CH2；L2 可以是 IgG 的铰链区或者铰链区衍生的连接肽序列，或是表 2 中所列序列，优选为人 IgG1 铰链或者人 IgG1 铰链 (C220S) 或者 G5-LH 的序列。

在一个实施方案中，多肽链 2 的 CH1 与第一个 VH_B 直接融合联结，即 L1 的长度为 0。在另一个实施方案中，多肽链 2 的 CH1 经由连接肽 L1 联结到第一个 VH_B；L1 可以是表 2 中所列序列。

在一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 与第二个 VH_B 直接融合联结，即 L3 的长度为 0。在另一个实施方案中，多肽链 2 的 CH3 经由连接肽 L3 联结到第二个 VH_B；L3 可以是表 2 中所列序列。

实施例 1.1.7 结构 (7) : VH-IgG_HC

结构 (7) 的结合蛋白包含两条多肽链：多肽链 1，也称短链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL；多肽链 2，也称长链，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_B-L-VH_A-CH1-h-CH2-CH3。

在一个实施方案中，多肽链 2 的 VH_B 与 VH_A 直接融合联结，即 L 的长度为 0。在另一个实施方案中，多肽链 2 的 VH_B 经由连接肽 L 联结到 VH_A；L 可以是表 2 中所列序列。

实施例 1.2 FIT-Ig 双特异性结合蛋白结构

FIT-Ig 结构的设计可以参考专利 WO2015/103072A1，结构见图 1 的结构(8) 所示。FIT-Ig 结构的双抗分子可以构建自：结合第一抗原的常规抗体 A 和结合第二抗原的常规抗体 B。

如图 1 的结构 (8) 所示，VH_A 和 VL_A 分别为抗体 A 的重链可变区和轻链可变区。VH_B 和 VL_B 分别为抗体 B 的重链可变区和轻链可变区。CL 是轻链恒定区结构域。CH1、CH2 和 CH3 分别是重链恒定区的第一、第二和第三结构域。h 是 IgG 抗体的铰链区或衍生序列，L 是连接肽。

实施例 1.2.1 结构 (8) : FIT-Ig

结构 (8) 的结合蛋白包含三条多肽链：多肽链 1，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_A-CL-L-VH_B-CH1-h-CH2-CH3；多肽链 2，从氨基末端到羧基末端，其包含 VH_A-CH1；多肽链 3，从氨基末端到羧基末端，其包含 VL_B-CL。

在一个实施方案中，多肽链 1 的 CL 与 VH_B 直接融合联结，即 L 的长度为 0。在另一个实施方案中，多肽链 1 的 CL 经由连接肽 L 联结到 VH_B；L 可以是表 2 中所列序列。

实施例 2 抗体的序列分析、表达纯化、和理化性质表征分析

实施例 2.1 抗体的表达和纯化

本实施例介绍了利用哺乳动物宿主细胞（例如，人胚肾细胞 HEK293 或中国仓鼠卵巢细胞 CHO 及其衍生细胞）、瞬时转染表达和亲和捕获分离等技术来制备抗体的一般方法。本方法适用于含有 Fc 区的目标抗体；目标抗体可以由一条或多条蛋白质多肽链组成；可以来源于一个或多个表达质粒。

将抗体多肽链的氨基酸序列通过密码子优化方法转换成核苷酸序列；合成编码的核苷酸序列并克隆到与宿主细胞兼容的表达载体上。将编码抗体多肽链的质粒按照特定比例同时转染哺乳动物宿主细胞，利用常规的重组蛋白表达和纯化技术，可以得到具有正确折叠和多肽链组装的重组抗体。具体地，将 FreeStyle™ 293-F 细胞 (Thermo, #R79007) 在 FreeStyle™ F17 Expression Medium 培养基 (Thermo, #A1383504) 中扩培。瞬时转染开始之前，调节细胞浓度至 $6 - 8 \times 10^5$ 细胞/ml，于 37°C 8% CO_2 摇床中培养 24 小时，细胞浓度在 1.2×10^6 细胞/ml。准备 30 ml 培养的细胞。将编码抗体多肽链的质粒按照一定比例混合共计 30 μg 质粒（质粒与细胞的比例为 1 μg : 1 ml）溶解于 1.5 ml Opti-MEM 减血清培养基 (Thermo, #31985088)，并用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。再取 1.5 ml Opti-MEM 溶于 1 mg/ml PEI (Polysciences, #23966-2) 120 μl ，静置 5 分钟。把 PEI 缓慢加入质粒中，室温孵育 10 分钟，边摇晃培养瓶边缓慢滴入质粒 PEI 混合溶液，于 37°C 8% CO_2 摇床中培养 5 天。5 天后观测细胞活率。收集培养物，以 3300g 转速离心 10 分钟后取上清；然后将上清高速离心去除杂质。用 PBS pH7.4 缓冲液平衡含有 MabSelect™ (GE Healthcare, #71-5020-91) 的重力柱 (Bio-Rad, #7311550)，2-5 倍柱体积冲洗。将上清样品过柱；用 5-10 倍柱体积的 PBS 缓冲液冲洗柱子，再用 pH3.5 的 0.1M 甘氨酸洗脱目的蛋白，随后用 pH8.0 的 Tris-HCl 调节至中性，最后用超滤管 (Millipore, #UFC901024) 浓缩换液至 PBS 缓冲液或者含有其他成分的缓冲液，得到纯化的重组抗体溶液。最后用 NanoDrop (Thermo, NanoDrop™ One) 测定浓度，分装、存储备用。

实施例 2.2 利用 SEC-HPLC 分析蛋白纯度和聚体

本实施例使用分析型分子尺寸排阻层析色谱法 (SEC) 来分析蛋白样品的纯度和聚体形式。将分析型色谱柱 TSKgel G3000SWxl (Tosoh Bioscience, #08541, 5 μm , 7.8 mm \times 30 cm) 连接到高压液相色谱仪 HPLC (Agilent Technologies, Agilent 1260 Infinity II), 用 PBS 缓冲液室温下平衡至少 1 小时。适量蛋白样品 (至少 10 μg) 用 0.22 μm 滤膜过滤后注入系统, 并设定 HPLC 程序: 用 PBS 缓冲液将样品以 1.0 ml/分钟的流速流过色谱柱, 最长时间为 25 分钟。HPLC 将生成分析报告, 报告出样品内不同分子尺寸组份的滞留时间。

实施例 2.3 利用 Uncle 测定蛋白的分子稳定性和分子聚集性

Uncle (Unchained Labs) 是一个多功能一站式的蛋白稳定性分析平台, 它通过全荧光, 静态光散射 (SLS) 和动态光散 (DLS) 检测方法来表征蛋白质的稳定性。同一组样品可同时得到溶解温度 (T_m), 聚集温度 (T_{agg}) 和粒径 (diameter) 等参数。在本实施例中, 选择 Uncle 的“ T_m & T_{agg} with optional DLS”应用程序进行操作, 取 9 μL 样品加入 Uni 管中, 设置以 0.3 $^{\circ}\text{C}$ /分钟的梯度逐渐从 25 $^{\circ}\text{C}$ 升温至 95 $^{\circ}\text{C}$ 。进行初始和最终 DLS 测量四次采集, 每次采集 5 秒。实验运行结束后, Uncle 分析软件采用重心均值 (BCM) 公式来计算每个样品的 T_m 值; 通过 SLS 在 266 nm 或 473 nm 波长下的荧光强度的曲线 (聚集曲线) 来计算 T_{agg} 值; 样品的粒径和分散度则通过 DLS 相关的函数来计算。

实施例 3 构建靶向共刺激分子的免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白

本实施例列举了数个免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白分子, 其一端可以结合免疫细胞表面的共刺激分子 (如 4-1BB、OX40 等), 其另一端可以结合肿瘤细胞表面的特异性抗原分子 (如 HER2、PSMA、EPCAM、CLDN18.2、B7H4 等) 或免疫细胞表面的共抑制分子 (如 PD-L1 等)。

本实施例构建了数个靶向 4-1BB 和肿瘤抗原 (或共抑制分子) 的免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白分子, 利用肿瘤抗原将 4-1BB 抗体重定向到肿瘤细胞, 特异性激活肿瘤微环境的免疫反应, 从而避免肝脏毒性等副作用。另外, 4-1BB 在 CD8^+ T 细胞和 NK 细胞表面都有高表达, 4-1BB 的激活可以增加细胞毒性 T 细胞对肿瘤的浸润也可以增强 NK 细胞的活性, 使“冷肿瘤”转变为“热肿瘤”。本实施例利用结合 4-1BB 的 HCAb 抗体 PR001758、PR001760、PR001836、PR004469 的抗原结合片段 VH, 以及结合肿瘤抗原 HER2 的 IgG 抗体 Trastuzumab 的抗原结合片段 Fab, 或结合 B7H4 的 IgG 抗体 PR002408、PR002410 的抗原结合片段 Fab, 或结合 EPCAM 的 IgG 抗体 PR001081 的抗原结合片段 Fab, 或结合 PSMA 的 IgG 抗体 PR001331 的抗原结合片段 Fab, 或结合 CLDN18.2 的 IgG 抗体 PR002726 的抗原结合片段 Fab, 或结合 PD-L1 的 IgG 抗体 PR000265 的抗原结合片

段 Fab, 来构建同时靶向 4-1BB 和肿瘤抗原 (或共抑制分子) 的双特异性结合蛋白分子。

本实施例构建了数个靶向 OX40 和肿瘤抗原 (或共抑制分子) 的免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白分子, 利用肿瘤抗原将 OX40 抗体重定向到肿瘤细胞, 特异性激活肿瘤微环境的免疫反应。本实施例利用结合 OX40 的 HCAb 抗体 PR002067 的抗原结合片段 VH, 以及结合肿瘤抗原 EPCAM 的 IgG 抗体 PR001081 的抗原结合片段 Fab, 或结合 PSMA 的 IgG 抗体 PR001331 的抗原结合片段 Fab, 或结合 CLDN18.2 的 IgG 抗体 PR002726 的抗原结合片段 Fab, 或结合 B7H4 的 IgG 抗体 PR002408 的抗原结合片段 Fab, 或结合 PD-L1 的 IgG 抗体 PR000265 的抗原结合片段 Fab, 来构建同时靶向 OX40 和肿瘤抗原 (或共抑制分子) 的双特异性结合蛋白分子。

本实施例中, 抗 4-1BB 的 HCAb 抗体 (PR001758, PR001760, PR001836, PR004469) 以及抗 OX40 的 HCAb 抗体 (PR002067) 是利用 Harbour HCAb 转基因小鼠 (Harbour Antibodies BV) 免疫相关抗原和筛选、优化而得到的。抗 PD-L1 的 IgG 抗体 (PR000265)、抗 EPCAM 的 IgG 抗体 (PR001081)、抗 PSMA 的 IgG 抗体 (PR001331)、抗 CLDN18.2 的 IgG 抗体 (PR002726)、抗 B7H4 的 IgG 抗体 (PR002408, PR002410)、抗 4-1BB 的 IgG 抗体 (PR000197, PR000448) 等是利用 Harbour H2L2 转基因小鼠 (Harbour Antibodies BV) 免疫相关抗原和筛选、优化而得到的。抗 HER2 的 IgG 抗体 Trastuzumab 类似物 (抗体编号 PR000210)、抗 PD-L1 的 IgG 抗体 Atezolizumab 类似物 (抗体编号 PR000151)、抗 4-1BB 的 IgG 抗体 Utomilumab 类似物 (抗体编号 PR000483) 和 Urelumab 类似物 (抗体编号 PR000628)、抗 OX40 的 IgG 抗体 Pogalizumab 类似物 (又名 vonlerolizumab, 抗体编号 PR003475) 等的序列来源于现有文献或公共数据库。这些抗体作为本实施例构建的免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白分子的亲本抗体或者对照抗体分子, 列于表 3, 其相应的氨基酸序列的序列号列于表 10 表 10。

本实施例中, 每一个免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白分子有两种特异性的抗原结合片段, 分别来自结合靶细胞 (如肿瘤细胞) 特异抗原的靶向抗体, 即第一抗原结合片段, 和结合免疫效应细胞特异抗原的激活抗体, 即第二抗原结合片段。表 4、表 5、表 6、和表 7 以及表 8 列出了不同结构的双特异性结合蛋白分子及其对应的抗原结合片段和连接方式, 表中的结构编号对应于表 1 和图 1。表中的突变位点代号是 (AAG: L234A, L235A, P329G; LALA: L234A, L235A)。表 11 列出了双特异性结合蛋白分子的多肽链氨基酸序列的序列编号, 表 12 列出了双特异性结合蛋白分子的第一和第二抗原结合片段相应的 CDR 序列的序列编号。

本实施例中, 设计多个如实施例 1 所述结构的双特异性结合蛋白, 并按照实施例 2 所述方法制备相应蛋白样品并进行分析, 总结于表 9。

表 3 对照分子和亲本单抗

分子编号	抗体
PR000151	抗 PD-L1 单抗 atezolizumab 类似物
PR000265	抗 PD-L1 91G3H5H3(D54E), hIgG1(N297A)
PR000210	抗 HER2 单抗 trastuzumab 类似物
PR001081	抗 EPCAM 单抗 16A8B3 hIgG1
PR001331	抗 PSMA 单抗 2E8A1B1 hIgG1
PR002408	抗 B7H4 单抗 80C8-2E9(H:G55A; L:N92Q) hIgG1
PR002410	抗 B7H4 单抗 B-1H11(L:C87Y) hIgG1
PR002726	抗 CLDN18.2 单抗 13E6F4 hIgG1
PR000628	抗 4-1BB 单抗 urelumab 类似物
PR000483	抗 4-1BB 单抗 utomilumab 类似物
PR003475	抗 OX40 单抗 vonlerolizumab 类似物
PR000197	抗 4-1BB 单抗 79B10G8D4 hIgG4
PR000448	抗 4-1BB 单抗 79B10G8D4(H:N52Q;L:F2I) hIgG4
PR001758	抗 4-1BB 重链抗体 1016P0010B11
PR001760	抗 4-1BB 重链抗体 1016P0011G10
PR001836	抗 4-1BB 重链抗体 1016P0020G4
PR004469	抗 4-1BB 重链抗体 PR001838_G53A
PR002067	抗 OX40 重链抗体 R1026P079E12

表 4 具有 IgG-VH 或 VH-IgG 四价对称结构的双抗分子

结构编号	双抗分子	靶向抗原	靶向抗体	免疫细胞抗原	激活抗体	连接肽	Fc 类型 (突变)
1	PR002827	HER2	PR000210	4-1BB	PR001836	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003334	B7H4	PR002408	4-1BB	PR001758	H1_15-RT	人 IgG1 (LALA)
1	PR003335	B7H4	PR002408	4-1BB	PR001760	H1_15-RT	人 IgG1 (LALA)
1	PR003338	B7H4	PR002408	4-1BB	PR004469	H1_15-RT	人 IgG1 (LALA)
1	PR003549	PD-L1	PR000265	4-1BB	PR001758	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003550	PD-L1	PR000265	4-1BB	PR001760	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003551	PD-L1	PR000265	4-1BB	PR001836	H1_15-RT	人 IgG1

							(AAG)
1	PR003552	EPCAM	PR001081	4-1BB	PR001758	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003553	EPCAM	PR001081	4-1BB	PR001760	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003554	EPCAM	PR001081	4-1BB	PR001836	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003555	PSMA	PR001331	4-1BB	PR001758	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003556	PSMA	PR001331	4-1BB	PR001760	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003557	PSMA	PR001331	4-1BB	PR001836	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003562	CLDN18.2	PR002726	4-1BB	PR001758	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003563	CLDN18.2	PR002726	4-1BB	PR001760	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003564	CLDN18.2	PR002726	4-1BB	PR001836	H1_15-RT	人 IgG1 (AAG)
1	PR003789	PD-L1	PR000265	OX40	PR002067	H1_15	人 IgG1 (AAG)
1	PR004276	B7H4	PR002408	OX40	PR002067	H1_15-RT	人 IgG1 (LALA)
1	PR004283	EPCAM	PR001081	OX40	PR002067	H1_15-RT	人 IgG1 (LALA)
1	PR004284	PSMA	PR001331	OX40	PR002067	H1_15-RT	人 IgG1 (LALA)
1	PR004285	CLDN18.2	PR002726	OX40	PR002067	H1_15-RT	人 IgG1 (LALA)
7	PR004278	B7H4	PR002408	4-1BB	PR001760	GS_15	人 IgG1 (LALA)

表 5 具有 IgG-VH(2)六价对称结构的双抗分子

结构编号	双抗分子	靶向抗原	靶向抗体	免疫细胞抗原	激活抗体	第一连接肽	第二连接肽	Fc 类型 (突变)
2	PR003487	B7H4	PR002408	4-1BB	PR001760	H1_15-RT	无	人 IgG1 (LALA)
2	PR004158	B7H4	PR002410	4-1BB	PR001760	H1_15-RT	GS_5	人 IgG1 (LALA)

表 6 具有 Fab-HCAb 四价对称结构的双抗分子

结构编号	双抗分子	靶向抗原	靶向抗体	免疫细胞抗原	激活抗体	第一连接肽	第二连接肽	Fc 类型 (突变)
3	PR004270	PD-L1	PR000265	4-1BB	PR001760	H1_15	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (LALA)
3	PR004279	B7H4	PR002408	4-1BB	PR001760	H1_15	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (LALA)

3	PR004277	B7H4	PR002408	OX40	PR002067	H1_15	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (LALA)
3	PR005189	B7H4	PR002408	4-1BB	PR001760	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (LALA)
3	PR005649	B7H4	PR002408	4-1BB	PR001760	H1_15	人 IgG2 铰链	人 IgG1 (LALA)
4	PR007163	PD-L1	PR000265	4-1BB	PR001760	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (LALA)
3	PR007164	PD-L1	PR000265	4-1BB	PR001760	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (LALA)
4	PR007165	B7H4	PR002408	4-1BB	PR001760	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (LALA)
4	PR007166	B7H4	PR002408	OX40	PR002067	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (LALA)
3	PR007167	B7H4	PR002408	OX40	PR002067	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	人 IgG1 (LALA)

表 7 具有 Fab-VH-Fc-VH 六价对称结构的 B7H4 × 4-1BB 双抗分子

结构编号	双抗分子	B7H4 抗体	4-1BB 抗体	第一连接肽	第二连接肽	第三连接肽	Fc 类型 (突变)
5	PR005650	PR002408	PR001760	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	无	人 IgG1 (LALA)
5	PR005651	PR002408	PR004469	无	人 IgG1 铰链 (C220S)	无	人 IgG1 (LALA)

表 8 具有 FIT-Ig 对称结构的双抗分子

结构编号	双抗分子	靶向抗原	靶向抗体	免疫细胞抗原	激活抗体	结构说明	Fc 类型 (突变)
8	PR000701	PD-L1	PR000265	4-1BB	PR000197	4-1BB Fab 靠近 Fc; 无连接肽	人 IgG4 (S228P)
8	PR003052	PD-L1	PR000151	4-1BB	PR000448	4-1BB Fab 靠近 Fc; 无连接肽	人 IgG4 (S228P)

表 9 双抗分子蛋白的表达

结构编号	双抗分子	表达体系和体积	第一步纯化后产量 (mg/L)	SEC-HPLC 纯度 (%)
1	PR002827	Expi293F (10ml)	29.5	73.75
1	PR003334	ExpiCHO (200ml)	38.2	97.98
1	PR003335	ExpiCHO (200ml)	68.9	99.29
1	PR003338	HEK293-F (10ml)	74.6	98.02
2	PR003487	HEK293-F (30ml)	19	84
1	PR003549	HEK293-F (30ml)	24.5	98.31
1	PR003550	HEK293-F (30ml)	42.2	95.41
1	PR003551	HEK293-F (30ml)	2.3	99.39
1	PR003552	HEK293-6E (40ml)	44	89.71

1	PR003553	HEK293-6E (40ml)	44.8	88.77
1	PR003554	HEK293-6E (40ml)	6.5	79.47
1	PR003555	HEK293-6E (40ml)	52.8	98.73
1	PR003556	HEK293-6E (40ml)	67.8	98.42
1	PR003557	HEK293-6E (40ml)	9	97.73
1	PR003562	HEK293-F (30ml)	173	97.87
1	PR003563	HEK293-F (30ml)	142.7	95.63
1	PR003564	HEK293-F (30ml)	20	93.72
1	PR003789	HEK293-6E (40ml)	3.3	96.08
1	PR004276	HEK293-6E (40ml)	17.7	95.46
1	PR004283	HEK293-6E (40ml)	27.5	95.42
1	PR004284	HEK293-6E (40ml)	21	99.43
1	PR004285	HEK293-6E (40ml)	60.8	98.15
2	PR004158	HEK293-F (30ml)	31.9	63.09
3	PR004270	HEK293-6E (40ml)	77.5	92.33
3	PR004279	HEK293-F (30ml)	11.4	79.18
3	PR004279	CHO (100ml)	3.6	95.46
3	PR004277	CHO (100ml)	48	93.03
5	PR005650	HEK293 (100ml)	21.5	97.48
5	PR005651	HEK293 (100ml)	18.2	98.13
7	PR004278	HEK293-6E (40ml)	11.5	98.08
8	PR003052	HEK293-6E (40ml)	47.5	87.76

表 10 对照分子和亲本单抗的序列和 CDR 序列的序列编号表

分子编号	轻链	重链	VL	VH	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3
PR000151	199	181	168	150	103	117	132	11	40	75
PR000265	202	184	171	153	106	119	135	14	43	78
PR000210	201	183	170	152	105	117	134	13	42	77
PR001081	206	188	175	157	108	121	138	16	47	81
PR001331	207	189	176	158	109	122	139	17	48	82
PR002408	208	194	177	163	110	118	140	20	53	86
PR002410	209	195	178	164	111	118	141	21	54	87
PR002726	210	196	179	165	108	121	142	22	55	88
PR000628	205	187	174	156	108	121	137	12	46	80
PR000483	204	186	173	155	107	120	136	15	45	79
PR003475	211	197	180	166	112	123	143	23	56	89
PR000197	200	182	169	151	104	118	133	12	41	76

PR000448	203	185	172	154	104	118	133	12	44	76
PR001758		190		159				16	49	83
PR001760		191		160				18	50	84
PR001836		192		161				19	51	84
PR004469		198		167				18	57	90
PR002067		193		162				14	52	85

表 11 本实施例构建的双抗分子的多肽链的序列编号表

结构编号	分子编号	多肽链 1	多肽链 2	多肽链 3
1	PR002827	201	214	
1	PR003334	208	217	
1	PR003335	208	218	
1	PR003338	208	219	
2	PR003487	208	220	
1	PR003549	202	221	
1	PR003550	202	222	
1	PR003551	202	223	
1	PR003552	206	224	
1	PR003553	206	225	
1	PR003554	206	226	
1	PR003555	207	227	
1	PR003556	207	228	
1	PR003557	207	229	
1	PR003562	210	230	
1	PR003563	210	231	
1	PR003564	210	232	
1	PR003789	202	233	
2	PR004158	209	234	
3	PR004270	212	235	
1	PR004276	208	236	
3	PR004277	237	238	
7	PR004278	208	239	
3	PR004279	237	240	
1	PR004283	206	241	
1	PR004284	207	242	
1	PR004285	210	243	

8	PR000701	213	212	203
8	PR003052	216	215	203
3	PR005189	237	266	
3	PR005649	237	267	
5	PR005650	237	268	
5	PR005651	237	269	
4	PR007163	202	270	
3	PR007164	212	271	
4	PR007165	208	272	
4	PR007166	208	273	
3	PR007167	237	274	

表 12 双抗分子的抗原结合片段的 CDR 的序列编号表

分子编号	抗原结合域序号	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
PR002827	#1 (HER2)	105	117	134	13	42	77
	#2 (4-1BB)				19	51	84
PR003334	#1 (B7H4)	110	118	140	20	53	86
	#2 (4-1BB)				16	49	83
PR003335, PR004278, PR003487, PR004279, PR005189, PR005649, PR005650, PR007165	#1 (B7H4)	110	118	140	20	53	86
	#2 (4-1BB)				18	50	84
PR003338, PR005651	#1 (B7H4)	110	118	140	20	53	86
	#2 (4-1BB)				18	57	90
PR003549	#1 (PD-L1)	106	119	135	14	43	78
	#2 (4-1BB)				16	49	83
PR003550, PR004270, PR007163, PR007164	#1 (PD-L1)	106	119	135	14	43	78
	#2 (4-1BB)				18	50	84
PR003551	#1 (PD-L1)	106	119	135	14	43	78
	#2 (4-1BB)				19	51	84
PR003552	#1 (EPCAM)	108	121	138	16	47	81
	#2 (4-1BB)				16	49	83
PR003553	#1 (EPCAM)	108	121	138	16	47	81
	#2 (4-1BB)				18	50	84
PR003554	#1 (EPCAM)	108	121	138	16	47	81
	#2 (4-1BB)				19	51	84
PR003555	#1 (PSMA)	109	122	139	17	48	82

	#2 (4-1BB)				16	49	83
PR003556	#1 (PSMA)	109	122	139	17	48	82
	#2 (4-1BB)				18	50	84
PR003557	#1 (PSMA)	109	122	139	17	48	82
	#2 (4-1BB)				19	51	84
PR003562	#1 (CLDN18.2)	108	121	142	22	55	88
	#2 (4-1BB)				16	49	83
PR003563	#1 (CLDN18.2)	108	121	142	22	55	88
	#2 (4-1BB)				18	50	84
PR003564	#1 (CLDN18.2)	108	121	142	22	55	88
	#2 (4-1BB)				19	51	84
PR003789	#1 (PD-L1)	106	119	135	14	43	78
	#2 (OX40)				14	52	85
PR004276, PR004277, PR007166, PR007167	#1 (B7H4)	110	118	140	20	53	86
	#2 (OX40)				14	52	85
PR004283	#1 (EPCAM)	108	121	138	16	47	81
	#2 (OX40)				14	52	85
PR004284	#1 (PSMA)	109	122	139	17	48	82
	#2 (OX40)				14	52	85
PR004285	#1 (CLDN18.2)	108	121	142	22	55	88
	#2 (OX40)				14	52	85
PR004158	#1 (B7H4)	111	118	141	21	54	87
	#2 (4-1BB)				18	50	84
PR000701	#1 (PD-L1)	106	119	135	14	43	78
	#2 (4-1BB)	104	118	133	12	41	76
PR003052	#1 (PD-L1)	103	117	132	11	40	75
	#2 (4-1BB)	104	118	133	12	44	76

实施例 4 结合 4-1BB

本实施例是为了研究靶向 4-1BB 的抗体和免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白结合 4-1BB 的活性。

利用流式细胞术 FACS 测试结合蛋白与高表达人 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株 CHO-K1/hu 4-1BB (南京金斯瑞, M00538) 和高表达食蟹猴 4-1BB 的 CHO-K1 细胞株 CHO-K1/cyno 4-1BB (南京金斯瑞, M00569) 等细胞的结合能力。具体地, 消化细胞并用完全培养基重悬; 将细胞密度调整为 2×10^6 细胞/mL。接着将细胞以 100 μ L/孔 (2×10^5 细胞/孔) 接种于 96 孔 V 底板 (Corning, #3894), 4°C 下离心 5 分钟, 弃上清。随后将梯度稀释的结合蛋白以 100 μ L/孔加入 96 孔板并混合均匀, 结合蛋白可以从最高终浓度为 200 nM 按

照 3 倍浓度梯度稀释的共 12 个浓度；hIgG1 iso (CrownBio, #C0001) 作为同型对照。将细胞放置于 4°C，避光孵育 1 小时。然后，加入 100 μ L/孔预冷的 FACS 缓冲液（含有 0.5% BSA 的 PBS 缓冲液）漂洗细胞两次，4°C 下 500g 离心 5 分钟，弃上清。接着，再加入 100 μ L/孔荧光二抗 (Goat human IgG (H+L) Alexa Fluor 488 conjunction, Thermo, #A11013, 1 : 1000 稀释)，放置于 4°C，避光孵育 1 小时。随后以 200 μ L/孔加入预冷的 FACS 缓冲液漂洗细胞两次，然后于 4°C 下 500 g 离心 5 分钟，弃上清。最后，以 200 μ L/孔加入预冷的 FACS 缓冲液重悬细胞。使用 BD FACS CANTOII 流式细胞仪或 ACEA NovoCyte 流式细胞仪读取荧光发光信号值，并用软件 FlowJo v10 (FlowJo, LLC) 处理和分析数据。

应用软件 GraphPad Prism 8 进行数据处理和作图分析，通过四参数非线性拟合，得到抗体对靶细胞的结合曲线及 EC50 值等参数。

本实施例中，阳性对照分子为抗 4-1BB 的单抗 Urelumab 或 Utomilumab。

实施例 4.1 结合高表达人 4-1BB 的 CHO-K1/hu 4-1BB

实施例 4.1.1 PD-L1 \times 4-1BB 结合 CHO-K1/hu 4-1BB

图 2 中所示，所有 PD-L1 \times 4-1BB 双抗分子都可以结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB。

图 2 的 (A) 中所示，IgG-VH 四价对称结构的 PD-L1 \times 4-1BB 双抗分子 (PR003549, PR003550, PR003551) 结合人 4-1BB 的能力优于 FIT-Ig 结构的双抗分子 (PR000701, PR003052)，而且在 MFI 最大值上优于阳性对照 Urelumab。

图 2 的 (B) 中所示，Fab-HCAb 对称结构的 PD-L1 \times 4-1BB 双抗分子 (PR004270) 结合人 4-1BB 的能力在 MFI 最大值上优于阳性对照 Urelumab 和 Utomilumab。

图 2 的 (C) 中所示，Fab-HCAb 对称结构的 PD-L1 \times 4-1BB 双抗分子，无论是如实施例 1.1.3 所述的结构 (3) 的分子 (PR007164) 还是如实施例 1.1.4 所述的结构 (4) 的分子 (PR007163)，都有几乎相同的 4-1BB 结合活性，且与亲本单抗 PR001760 的相当。

实施例 4.1.2 B7H4 \times 4-1BB 结合 CHO-K1/hu 4-1BB

图 3 中所示，所有 B7H4 \times 4-1BB 双抗分子都可以结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB。

图 3 的 (A) 中所示，IgG-VH 四价对称结构的 B7H4 \times 4-1BB 双抗分子 (PR003334, PR003335, PR003338) 都可以结合 CHO-K1/hu 4-1BB，且在 MFI 最大值上优于 Urelumab。

图 3 的 (B-C) 中所示，IgG-VH(2) 六价对称结构的 B7H4 \times 4-1BB 双抗分子 (PR003487, PR004158) 都可以结合 CHO-K1/hu 4-1BB。

图 3 的 (D) 中所示，Fab-HCAb 对称结构的 B7H4 \times 4-1BB (PR004279) 和 VH-IgG 结构分子 (PR004278) 的 4-1BB 结合活性略优于 IgG-VH 结构 (PR003335)。

图 3 的 (E) 中所示, Fab-HCAb 对称结构的 B7H4 × 4-1BB 双抗分子, 无论是如实施例 1.1.3 所述的结构 (3) 的分子 (PR005189) 还是如实施例 1.1.4 所述的结构 (4) 的分子 (PR007165), 都有相似的 4-1BB 结合活性, 且与亲本单抗 PR001760 的相当。

图 3 的 (F) 中所示, Fab-HCAb 四价对称结构 (PR005649) 和 Fab-VH-Fc-VH 六价对称结构 (PR005650, PR005651) 都可以结合 CHO-K1/hu 4-1BB, 但是 Fab-HCAb 结构有更高的 MFI 值。

实施例 4.1.3 HER2 × 4-1BB 结合 CHO-K1/hu 4-1BB

图 4 中所示, HER2 × 4-1BB 双抗分子 (PR002827) 可以结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB。

实施例 4.1.4 EPCAM × 4-1BB 结合 CHO-K1/hu 4-1BB

图 5 中所示, 所有 EPCAM × 4-1BB 双抗分子 (PR003552, PR003553, PR003554) 都可以结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB。

实施例 4.1.5 PSMA × 4-1BB 结合 CHO-K1/hu 4-1BB

图 6 中所示, 所有 PSMA × 4-1BB 双抗分子 (PR003555, PR003556, PR003557) 都可以结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB。

实施例 4.1.6 CLDN18.2 × 4-1BB 结合 CHO-K1/hu 4-1BB

图 7 中所示, 所有 CLDN18.2 × 4-1BB 双抗分子 (PR003562, PR003563, PR003564) 都可以结合人 4-1BB 细胞 CHO-K1/hu 4-1BB。

实施例 4.2 结合高表达食蟹猴 4-1BB 的 CHO-K1/cyno 4-1BB

图 8 中所示, 抗 4-1BB 的 HCAb 抗体 (PR001758, PR001760) 和 B7H4 × 4-1BB 双抗分子 (PR003334, PR003335, PR003338) 都可以结合食蟹猴 4-1BB 细胞 CHO-K1/cyno 4-1BB。而 Urelumab 不能结合食蟹猴 4-1BB。

实施例 5 结合 OX40

本实施例是为了研究靶向 OX40 的抗体和免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白结合 OX40 的活性。

实施例 5.1 结合食蟹猴 OX40 蛋白

利用酶联免疫吸附反应 ELISA 测试结合蛋白结合食蟹猴 OX40 重组蛋白的能力。具体地, 首先将 2 μg/mL 的食蟹猴 OX40-His 蛋白 (NovoProtein, #CB17) 以 100 μL/孔包被 96 孔板, 于 4°C 过夜。然后用 PBST 缓冲液 (含有 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液) 漂洗 3 次, 接着加入封闭液 (含有 5% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液) 置于 37°C 孵育 1 小时。然后用 PBST 缓冲液漂洗 3 次。随后以 100 μL/孔加入 3 倍浓度梯度稀释的结合蛋白, 共 8

个浓度，混合均匀，置于 37°C 孵育 1 小时；hIgG1 iso (CrownBio, #C0001) 作为同型对照。然后用 PBST 缓冲液漂洗 3 次。随后以 100 μ L/孔加入 HRP 标记的山羊抗人 IgG (H+L) 二抗 (Invitrogen, A18805, 1:4000 稀释)，置于 37°C 孵育 0.5 小时。然后用 PBST 缓冲液漂洗 3 次。随后以 100 μ L/孔加入 TMB 显色液反应 15 分钟。最后加入终止液中止反应。用 Enspire™ 多功能读板机 (Perkin Elmer, Inc.) 于 450 nm 读取光吸收值 (OD 值)。

应用软件 GraphPad Prism 8 进行数据处理和作图分析，通过四参数非线性拟合，得到抗体对靶细胞的结合曲线及 EC50 值等参数。

图 9 中所示，抗 OX40 的 HCAb 抗体 PR002067 可以结合食蟹猴 OX40，与阳性对照 Pogalizumab 有相似的结合能力。

实施例 5.2 结合高表达人 OX40 的 CHO-K1/hu OX40

采用高表达人 OX40 的 CHO-K1 细胞株 CHO-K1/hu OX40 (南京金斯瑞, #M00561) 进行细胞水平上的抗体结合实验。简言之，消化细胞 CHO-K1/hu OX40 细胞，并用 F12K 完全培养基重悬，将细胞密度分别调整为 1×10^6 细胞/ml。以 100 μ L 细胞/孔接种于 96 孔 V 底板 (Corning, #3894)，随后加入 100 μ l /孔，2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的待测抗体。将细胞放置于 4°C，避光孵育 1 小时。之后，加入 100 μ l /孔预冷 PBS 漂洗细胞两次，于 500 g、4°C 下离心 5 分钟，弃上清。再加入 100 μ l /孔荧光二抗 (Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson ImmunoResearch, #109-545-06, 1:1000 稀释)，4°C，避光孵育 30 分钟。用 100 μ l /孔预冷 PBS 洗涤细胞两次，于 500 g、4°C 下离心 5 分钟，弃上清。最后，200 μ l /孔预冷 PBS 重悬细胞。使用 BD FACS CANTOII 流式细胞仪或 ACEA NovoCyte 流式细胞仪读取荧光发光信号值，并用软件 FlowJo v10 (FlowJo, LLC) 处理和分析数据。

应用软件 GraphPad Prism 8 进行数据处理和作图分析，通过四参数非线性拟合，得到抗体对靶细胞的结合曲线及 EC50 值等参数。

图 10 中所示，所有靶向 OX40 的双抗分子都能结合人 OX40。而且，Fab-HCAb 结构的 B7H4 \times OX40 双抗分子 (PR007166, PR007167) 结合 OX40 的能力与其亲本单抗 PR002067 的相当。

实施例 6 结合肿瘤抗原

本实施例是为了研究免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白与肿瘤抗原的结合活性。在本实施例中，肿瘤抗原分子可以是 HER2、PSMA、EPCAM、CLDN18.2、B7H4 等，或是免疫细胞表面的共抑制分子如 PD-L1 等。

本实施例利用流式细胞术 FACS 测试结合蛋白与高表达特定肿瘤抗原的细胞的结合

能力。简言之，收集细胞悬液，将细胞密度调整为 2×10^6 细胞/mL；接着以 50 μ L 细胞/孔接种于 96 孔 V 底板 (Corning, #3894)。随后以 50 μ L/孔加入 2 倍于终浓度的 3 倍浓度梯度稀释的结合蛋白共 8 个浓度，混合均匀；hIgG1 iso (CrownBio, #C0001) 作为同型对照。将细胞放置于 4 $^{\circ}$ C，避光孵育 2 小时。随后以 100 μ L/孔加入预冷的 PBS 缓冲液漂洗细胞两次，然后于 4 $^{\circ}$ C 下 500 g 离心 5 分钟，弃上清。之后，以 100 μ L/孔加入荧光二抗 (Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson ImmunoResearch, #109-605-098, 1:1000 稀释)，放置于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 小时。随后以 100 μ L/孔加入预冷的 PBS 缓冲液漂洗细胞两次，然后于 4 $^{\circ}$ C 下 500 g 离心 5 分钟，弃上清。最后，以 200 μ L/孔加入预冷的 FACS 缓冲液 (含有 0.5% BSA 的 PBS 缓冲液) 重悬细胞。使用 ACEA NovoCyte 流式细胞仪或者 BD FACS CANTOII 流式细胞仪读取荧光发光信号值，并用软件 FlowJo v10 (FlowJo, LLC) 处理和分析数据。

应用软件 GraphPad Prism 8 进行数据处理和作图分析，通过四参数非线性拟合，得到抗体对靶细胞的结合曲线及 EC50 值等参数。

实施例 6.1 结合 CLDN18.2

本实施例测试靶向 CLDN18.2 的抗体与高表达人 CLDN18.2 的 NUGC-4 细胞 (JCRB, JCRB0834) 的结合能力。本实施例中，阳性对照分子为抗 CLDN18.2 的 IgG 单抗 PR002726，亦为 CLDN18.2 \times 4-1BB 双抗分子和 CLDN18.2 \times OX40 双抗分子的 CLDN18.2 端的亲本单抗。

图 20 中所示，CLDN18.2 \times OX40 双抗分子 (PR004285) 可以结合 NUGC-4 细胞，且结合 EC50 和最大荧光信号和亲本单抗非常接近。

实施例 6.2 结合 HER2

本实施例测试靶向 HER2 的抗体与高表达人 HER2 的细胞 SK-BR-3 (ATCC, HTB-30) 的结合能力。本实施例中，阳性对照分子为抗 HER2 的 IgG 单抗 trastuzumab，亦为 HER2 \times 4-1BB 双抗分子的 HER2 端的亲本单抗。

图 13 中所示，HER2 \times 4-1BB 双抗分子 (PR002827) 可以结合 SK-BR-3 细胞，且结合能力甚至略优于亲本单抗。

实施例 6.3 结合 B7H4

本实施例测试靶向 B7H4 的抗体与高表达人 B7H4 的细胞 SK-BR-3 (ATCC, HTB-30) 的结合能力。B7H4 \times 4-1BB 双抗分子和 B7H4 \times OX40 双抗分子的 B7H4 端的亲本单抗是抗 B7H4 的 IgG 单抗 PR002408 或 PR002410。

图 12 中所示，B7H4 \times 4-1BB 双抗分子都可以结合 SK-BR-3 细胞。

图 12 的(A) 中所示，IgG-VH 四价对称结构的 B7H4 \times 4-1BB 双抗分子 (PR003334,

PR003335, PR003338) 都可以结合 SK-BR-3, 且结合能力相当。

图 12 的 (B-C) 中所示, IgG-VH(2) 六价对称结构的 B7H4 × 4-1BB 双抗分子 (PR003487, PR004158) 都可以结合 SK-BR-3。

图 12 的 (D) 中所示, Fab-HCAb 对称结构的 B7H4 × 4-1BB (PR004279) 的结合能力略优于 VH-IgG_HC 结构 (PR004278)。

图 12 的 (E) 中所示, Fab-HCAb 对称结构的 B7H4 × 4-1BB 双抗分子, 无论是如实施例 1.1.3 所述的结构 (3) 的分子 (PR005189) 还是如实施例 1.1.4 所述的结构 (4) 的分子 (PR007165), 都有几乎相同的结合活性; 说明将 Fab 的 CL 融合到 VH_B 所在的重链上不影响 Fab 端的结合活性。

图 12 的 (F) 中所示, Fab-HCAb 结构的第一连接肽和第二连接肽不会影响 Fab 端的结合活性, 例如 PR005649 使用 H1_15 序列作为第一连接肽和人 IgG2 铰链序列作为第二连接肽, 而 PR005650 的第一连接肽长度为 0 且第二连接肽为人 IgG1 铰链(C220S)的序列。

图 12 的 (F) 中所示, Fab-VH-Fc-VH 六价对称结构的双抗分子 (PR005650, PR005651) 都可以结合 SK-BR-3。

图 17 中所示, 无论何种结构的 B7H4 × OX40 双抗分子, 如结构(1)的分子 (PR004276)、结构(3)的分子 (PR004277, PR007167) 和结构(4)的分子 (PR007166), 其结合 B7H4 的能力都与亲本单抗 PR002408 的相当。

实施例 6.4 结合 PD-L1

本实施例测试靶向 PD-L1 的抗体与高表达人 PD-L1 的 CHO-K1 细胞株 CHO-K1/hPD-L1 (南京金斯瑞, M00543) 的结合能力。本实施例中, 阳性对照分子为抗 PD-L1 的 IgG 单抗 PR000265, 亦为 PD-L1 × 4-1BB 双抗分子和 PD-L1 × OX40 双抗分子的 PD-L1 端的亲本单抗。

图 11 中所示, PD-L1 × 4-1BB 双抗分子都可以结合 CHO-K1/hPD-L1 细胞。

图 11 的 (A) 中所示, IgG-VH 四价对称结构的 PD-L1 × 4-1BB 双抗分子 (PR003549, PR003550, PR003551) 结合 PD-L1 的能力与亲本单抗 PR000265 的相似, 而且其结合 PD-L1 的 EC50 值和 MFI 最大值略优于 FIT-Ig 结构的双抗分子 (PR000701, PR003052)。

图 11 的 (B) 中所示, Fab-HCAb 对称结构的 PD-L1 × 4-1BB 双抗分子 (PR004270) 结合 PD-L1 的能力与亲本单抗相似, 结合的 MFI 最大值比亲本单抗更高。

图 11 的 (C) 中所示, Fab-HCAb 对称结构的 PD-L1 × 4-1BB 双抗分子, 无论是如实施例 1.1.3 所述的结构 (3) 的分子 (PR007164) 还是如实施例 1.1.4 所述的结构 (4) 的分子 (PR007163), 都有几乎相同的 PD-L1 结合活性; 说明将 Fab 的 CL 融合到 VH_B 所

在的重链上不影响 Fab 端的结合活性。

图 16 中所示, PD-L1 × OX40 双抗分子 (PR003789) 可以结合 CHO-K1/hPD-L1 细胞, 且结合 EC50 和最大荧光信号和亲本单抗的几乎相同。

实施例 6.5 结合 EPCAM

本实施例测试靶向 EPCAM 的抗体与高表达人 EPCAM 的细胞 Capan-2 (ATCC, HTB-80) 的结合能力。本实施例中, 阳性对照分子为抗 EPCAM 的 IgG 单抗 PR001081, 亦为 EPCAM × 4-1BB 双抗分子和 EPCAM × OX40 双抗分子的 EPCAM 端的亲本单抗。

图 14 中所示, EPCAM × 4-1BB 双抗分子 (PR003552, PR003553, PR003554) 都可以结合 Capan-2 细胞, 且结合 EC50 和最大荧光信号和亲本单抗的几乎一致。

图 18 中所示, EPCAM × OX40 双抗分子 (PR004283) 可以结合 Capan-2 细胞, 且结合 EC50 和最大荧光信号和亲本单抗非常接近。

实施例 6.6 结合 PSMA

本实施例测试靶向 PSMA 的抗体与高表达人 PSMA 的细胞 LNCaP (南京科佰生物, CBP60364) 的结合能力。本实施例中, 阳性对照分子为抗 PSMA 的 IgG 单抗 PR001331, 亦为 PSMA × 4-1BB 双抗分子和 PSMA × OX40 双抗分子的 PSMA 端的亲本单抗。

图 15 中所示, PSMA × 4-1BB 双抗分子 (PR003555, PR003556, PR003557) 都可以结合 LNCaP 细胞, 且结合 EC50 和最大荧光信号和亲本单抗的几乎一致。

图 19 中所示, PSMA × OX40 双抗分子 (PR004284) 可以结合 LNCaP 细胞, 且结合 EC50 和最大荧光信号和亲本单抗非常接近。

实施例 7 靶细胞介导的 T 细胞的特异性激活

本实施例是为了研究靶向 T 细胞表面共刺激分子的免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白在靶细胞的存下, 通过结合共刺激分子来激活 T 细胞的活性。

本实施例中, 免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白可以是靶向 4-1BB 的双抗分子, 也可以是靶向 OX40 的双抗分子。靶细胞是表达特定抗原 (例如肿瘤抗原) 的细胞, 例如高表达人 PD-L1 的 CHO-K1/hPD-L1 (南京金斯瑞, M00543), 或者高表达人 PD-L1 的 MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26), 或者高表达人 B7H4 的 SK-BR-3 (ATCC, HTB-30), 或者高表达人 B7H4 的 CHO-K1/hB7H4 (和铂医药自制), 或者高表达人 HER2 的 SK-BR-3 (ATCC, HTB-30), 或者高表达人 PSMA 的 LNCaP (南京科佰生物, CBP60364), 或者高表达人 PSMA 的 HEK293/hPSMA (和铂医药自制), 或者高表达人 EPCAM 的 Capan-2 (ATCC, HTB-80), 或者高表达人 CLDN18.2 的 NUGC4 (JCRB, JCRB0834)。效应细胞可以是分离的人 PBMC 或者 T 细胞。

具体的, 首先以 100 μL /孔将 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 CD3 抗体 OKT3 (Thermo, #16-0037-81) 包被于 96 孔板 (Corning, #3599)。接着, 将人 T 细胞 (从人 PBMC 中用 T 细胞分选试剂盒 (Miltenyi, #130-096-535) 分离得到) 的密度调整为 2×10^6 细胞/ mL , 将靶细胞的密度调整为 3×10^5 细胞/ mL , 随后把两种细胞悬液各以 50 μL /孔接种于 96 孔板。然后, 以 100 μL /孔加入不同浓度的结合蛋白, 两个复孔加样; hIgG1 iso (CrownBio, #C0001) 和 hIgG4 iso (CrownBio, #C0045) 作为对照。将 96 孔板置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中孵育 3 天。分别收集培养 48 小时后和 72 小时后的上清液, 用 IL-2 ELISA 试剂盒 (Thermo, #88-7025-88) 检测 48 小时后的上清中 IL-2 浓度, 用 IFN- γ ELISA 试剂盒 (Thermo, #88-7316-77) 检测 72 小时后的上清中 IFN- γ 浓度。ELISA 检测方法参照相关试剂盒操作说明。

应用软件 GraphPad Prism 8 进行数据处理和作图分析。

实施例 7.1 CLDN18.2 靶向介导的 T 细胞激活

图 21 中所示, 在高表达 CLDN18.2 的 NUGC-4 细胞存在时, CLDN18.2 \times 4-1BB 双抗分子 (PR003562, PR003563, PR003564) 可以激活 T 细胞和促进细胞因子 IL-2 的产生, 并呈现抗体浓度梯度依赖。

图 22 中所示, 在 NUGC-4 细胞存在时, 抗 OX40 的 HCAb 单抗 PR002067 和抗 CLDN18.2 的 IgG 单抗 PR002726 都不能激活 T 细胞。CLDN18.2 \times OX40 双抗分子 PR004285 可以激活 T 细胞和促进细胞因子 IL-2 的产生。这说明双抗分子对 T 细胞的激活是依赖于靶细胞的。

实施例 7.2 PSMA 靶向介导的 T 细胞激活

图 23 中所示, 在高表达 PSMA 的 LNCaP 细胞存在时, PSMA \times 4-1BB 双抗分子 (PR003555, PR003556, PR003557) 比 Urelumab 有更强 T 细胞激活能力, 能更好地促进 IL-2 的产生。

图 24 中所示, 在高表达 PSMA 的 HEK293/hPSMA 细胞存在时, 抗 OX40 的 HCAb 单抗 PR002067 和抗 PSMA 的 IgG 单抗 PR001331 都不能激活 T 细胞。PSMA \times OX40 双抗分子 PR004284 可以激活 T 细胞和促进细胞因子 IL-2 的产生。这说明双抗分子对 T 细胞的激活是依赖于靶细胞的。

实施例 7.3 EPCAM 靶向介导的 T 细胞激活

图 25 中所示, 在高表达 EPCAM 的 Capan-2 细胞存在时, EPCAM \times 4-1BB 双抗分子 (PR003552, PR003553, PR003554) 比 Urelumab 有更强 T 细胞激活能力, 能更好地促进 IL-2 的产生。

图 26 中所示, 在 Capan-2 细胞存在时, 抗 OX40 的 HCAb 单抗 PR002067 和抗 EPCAM 的 IgG 单抗 PR001081 都不能激活 T 细胞。EPCAM \times OX40 双抗分子 PR004283

可以激活 T 细胞和促进细胞因子 IL-2 的产生。这说明双抗分子对 T 细胞的激活是依赖于靶细胞的。

实施例 7.4 PD-L1 靶向介导的 T 细胞激活

图 27 中所示, 在高表达 PD-L1 的细胞 CHO-K1/hPD-L1 和 T 细胞混合的系统中, 不依赖于交联的抗 4-1BB 单抗 Urelumab 可以激活 T 细胞释放 IFN- γ , 而依赖于交联的抗 4-1BB 单抗 (PR000448, PR001758, PR001760, PR001836) 则几乎不能激活 T 细胞。FIT-Ig 结构的 PD-L1 \times 4-1BB 双抗分子 (PR003052, PR000701) 和 IgG-VH 四价对称结构的 PD-L1 \times 4-1BB 双抗分子 (PR003549, PR003550, PR003551) 和 Fab-HCAb 结构的 PD-L1 \times 4-1BB 双抗分子 (PR004270) 都能够激活 T 细胞并释放细胞因子。这说明 PD-L1 \times 4-1BB 对 T 细胞的激活是依赖于靶细胞的特异性的激活。而且 IgG-VH 四价对称结构的双抗分子 (PR003549, PR003550) 和 Fab-HCAb 结构的双抗分子 (PR004270) 比 FIT-Ig 结构的双抗分子 (PR003052, PR000701) 能够引起更高的细胞因子释放水平, 显示出更强的 T 细胞激活能力, 且优于 Urelumab。

图 28 中所示, 在高表达 PD-L1 的靶细胞 MDA-MB-231 存在时, IgG-VH 四价对称结构的 PD-L1 \times 4-1BB 双抗分子 (PR003549) 比 Urelumab 有更强 T 细胞激活能力, 能更好地促进细胞因子 IL-2 的产生, 并呈现抗体浓度梯度依赖。

图 29 中所示, 在高表达 PD-L1 的靶细胞 MDA-MB-231 存在时, 抗 OX40 的 HCAb 单抗 PR002067 和抗 PD-L1 的 IgG 单抗 PR000265 都不能激活 T 细胞。PD-L1 \times OX40 双抗分子 PR003789 可以激活 T 细胞和促进细胞因子 IL-2 的产生。这说明双抗分子对 T 细胞的激活是依赖于靶细胞的。

实施例 7.5 HER2 靶向介导的 T 细胞激活

图 30 中所示, 在高表达 HER2 的 SK-BR-3 细胞存在时, HER2 \times 4-1BB 双抗分子 (PR002827) 可以激活 T 细胞和促进细胞因子 IFN- γ 的产生, 并呈现抗体浓度梯度依赖。

实施例 7.6 B7H4 靶向介导的 T 细胞激活

本实施例是为了研究靶向 B7H4 的 B7H4 \times 4-1BB 或 B7H4 \times OX40 双抗分子在靶细胞的存在时激活 T 细胞的能力。靶细胞可以是不同程度表达 B7H4 的细胞, 例如高表达 B7H4 的 SK-BR-3 (ATCC, HTB-30), 或者高表达 B7H4 的 CHO-K1/hB7H4 (和铂医药自制), 或者不表达 B7H4 的 JIMT-1 (DSMZ, ACC 589)。

图 31 中所示, 在高表达 B7H4 的 CHO-K1/hB7H4 细胞存在时, 抗 OX40 的 HCAb 单抗 PR002067 和抗 B7H4 的 IgG 单抗 PR002408 都不能激活 T 细胞; B7H4 \times OX40 双抗分子 PR004276 (IgG-VH 结构) 和 PR004277 (Fab-HCAb 结构) 可以激活 T 细胞和促进细胞因子 IL-2 的产生。这说明双抗分子对 T 细胞的激活是依赖于靶细胞的。

图 32 中所示, 在高表达 B7H4 的 SK-BR-3 细胞存在时, B7H4 × 4-1BB 双抗分子比 Urelumab 有更强 T 细胞激活能力, 能更好地促进 IL-2 的产生。

图 32 的(A-B) 中所示, IgG-VH 四价对称结构的双抗 (PR003334, PR003335, PR003338) 激活 T 细胞的能力比 Urelumab 略强。

图 32 的(C-D) 中所示, IgG-VH(2)六价对称结构的双抗 (PR003487, PR004158) 激活 T 细胞的能力明显强于 IgG-VH 四价的双抗和 Urelumab。

图 32 的 (E) 中所示, Fab-HCAb 对称结构的双抗分子 PR004279 激活 T 细胞的能力比 Urelumab 略强; 当 4-1BB 结合结构域 VH 在 IgG 重链的 C 端时, IgG-VH 结构的双抗分子 PR003335 可以激活 T 细胞; 而当 4-1BB 结合结构域 VH 在 IgG 重链的 N 端时, VH-IgG 结构的双抗分子 PR004278 几乎不能激活 T 细胞, 尽管其可以结合 4-1BB(图 3 (D))。

图 32 的 (F) 中所示, Fab-VH-Fc-VH 六价对称结构的双抗 (PR005650, PR005651) 可以激活 T 细胞。

这说明了, 靶向 4-1BB 的结合结构域处于 Fab 和 Fc 之间的时候 (如 Fab-HCAb 结构, 特别是实施例 1.1.3 和图 1(3) 所述结构), 或者处于 Fc 的 C 端的时候 (如 IgG-VH 结构, 特别是实施例 1.1.1 和图 1(1) 所述结构), 其双抗分子具有交联 4-1BB 并进一步激活 T 细胞的能力; 而当 4-1BB 的结合结构域处于 Fab 的 N 端的时候 (如 VH-IgG 结构, 特别是实施例 1.1.7 和图 1(7) 所述结构), 双抗分子尽管可以结合 4-1BB 但是不能激活 T 细胞。

另一方面, 图 33 显示了 B7H4 × 4-1BB 对 T 细胞激活是特异性依赖 B7H4 的表达。图 33 (A) 中所示, 在高表达 B7H4 的细胞 SK-BR-3 存在时, 双抗分子 PR003334 可以激活 T 细胞; 图 33 (B) 中所示, 在不表达 B7H4 的细胞 JIMT-1 存在时, PR003334 不能激活 T 细胞。然而, Urelumab 则没有靶点特异性, 即使没有 B7H4 的表达, 也可以激活 T 细胞。

实施例 8 混合淋巴细胞反应 (MLR)

本实施例是利用混合淋巴细胞反应 (MLR) 来研究 PD-L1 × 4-1BB 双抗分子对 T 细胞的激活作用。

第一步, 利用 CD14 磁珠 (Miltyni, #130-050-201) 从第一供体 PBMC 细胞 (妙通生物) 中分离单核细胞 (monocytes); 具体操作参照相关试剂盒说明书。然后加入 50 ng/mL 重组人源 IL-4 (PeproTech, #200-02-A) 和 100 ng/mL 重组人源 GM-CSF (PeproTech, #300-03-A), 于 37°C 诱导 7 天后, 获得未成熟的树突状细胞 (iDC 细胞)。继续加入 1 µg/ml 的脂多糖 Lipopolysaccharide (LPS, Sigma, #L6529), 诱导 24 小时后, 获得成熟的树突状细

胞 (mDC 细胞)。第二步, 利用 T 细胞分离试剂盒 (Meltanyi, #130-096-535) 从第二供体 PBMC 细胞 (妙通生物) 中分离得到 T 淋巴细胞。第三步, 将获得的 T 细胞和 mDC 细胞按 5 : 1 比例接种至 96 孔板 (1×10^5 /孔的 T 细胞和 2×10^4 /孔的 mDC 细胞)。随后以 50 μ L/孔加入不同浓度的结合蛋白, 抗体终浓度可以是 (10 nM, 1 nM), 或者是从最高终浓度为 50 nM 按照 3 倍浓度梯度稀释的共 8 个浓度, 两个复孔加样; hIgG1 iso (CrownBio, #C0001) 或者空白孔作为对照。于 37°C, 5% CO₂ 培养箱孵育 5 天。第四步, 分别收集第 3 天和第 5 天的上清液, 用 IL-2 ELISA 试剂盒 (Thermo, #88-7025-88) 检测第 3 天的上清中 IL-2 浓度, 用 IFN- γ ELISA 试剂盒 (Thermo, #88-7316-77) 检测第 5 天的上清中 IFN- γ 浓度。ELISA 检测方法参照相关试剂盒操作说明。

图 34 显示了采用不同的供体 PBMC 的两次独立的 MLR 实验。在这两次 MLR 实验中, 抗 4-1BB 单抗 Urelumab 对 T 细胞的激活作用有限, 产生细胞因子的能力很弱; 抗 PD-L1 单抗 PR000265 有较明显的激活作用; 而 PD-L1 \times 4-1BB 双抗分子可以进一步提高 T 细胞的功能。

在第一个 MLR 实验中(图 34, A-B), IgG-VH 四价对称结构的双抗分子 (PR003549, PR003550, PR003551) 比 FIT-Ig 结构的双抗分子 (PR003052, PR000701) 能够引起更高的细胞因子释放水平, 显示出更强的 T 细胞激活能力; 而且双抗分子优于 PD-L1 单抗。

在第二个 MLR 实验中(图 34, C-D), IgG-VH 四价对称结构的双抗分子 (PR003549, PR003550) 和 Fab-HCAb 结构的双抗分子 (PR004270) 比 FIT-Ig 结构的双抗分子 (PR003052, PR000701) 能够引起更高的细胞因子释放水平, 显示出更强的 T 细胞激活能力; 而且双抗分子优于 PD-L1 单抗。

实施例 9 药代动力学研究

本实施例研究了具有不同结构的免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白分子在小鼠体内的药代动力学性能。

给药和采血: 对于每一个测试结合蛋白分子, 选取体重 18~22 克的雌性 BALB/c 或者 C57BL/6 小鼠 6 只, 按 5 mg/kg 的剂量通过静脉注射给与测试结合蛋白分子。一组 3 只于给药前以及给药后 15 分钟、24 小时 (1 天)、第 4 天、和第 10 天采集全血, 另一组 3 只于只于给药前以及给药后 5 小时、第 2 天、第 7 天、和第 14 天采集全血。将全血静置 30 分钟使其凝固, 随后离心并将分离的血清样品在 -80°C 下冻存直至分析。

分析方法: 采用两种 ELISA 方法来定量测定小鼠血清中的药物浓度。ELISA 方法一, 即 Fc 端检测方法, 通过包被于 96 孔板的山羊抗人 Fc 多克隆抗体来捕获小鼠血清中的含有人 Fc 的抗体, 然后加入 HRP 标记的山羊抗人 Fc 第二抗体来检测。ELISA 方法二, 即

功能结构域检测方法,通过包被于 96 孔板的抗原蛋白来捕获小鼠血清中的特异识别抗原的抗体,然后加入 HRP 标记的山羊抗人 Fc 第二抗体来检测。例如,在本实施例中,使用人 PD-L1 蛋白来捕获双抗分子 PR004270;或使用人 4-1BB 蛋白来捕获双抗分子 PR003334 和 PR003335。使用 Phoenix WinNonlin 软件 8.2 版,选用非房室模型(NCA)分析药代动力学参数。

图 35 和表 13 中所示, Fab-HCAb 结构的双抗分子 PR004270 有与常规 IgG 抗体相似的血清半衰期 $t_{1/2}$ 值, PD-L1 端检测方法显示其 $t_{1/2}$ 值超过 10 天。IgG-VH 结构的双抗分子 PR003334 和 PR003335 有与常规 IgG 抗体相似的药代动力学:在 Fc 端检测方法下, PR003334 和 PR003335 在小鼠体内的血清半衰期 $t_{1/2}$ 值分别约为 8 天和 14 天;在 4-1BB 端检测方法下, PR003334 和 PR003335 在小鼠体内的血清半衰期 $t_{1/2}$ 值分别约为 9 天和 12 天。

表 13 双抗分子在小鼠体内的药代动力学参数

双抗分子	PR003334		PR003335		PR004270	
动物 (数量)	C57BL/6 小鼠 (n=6)		C57BL/6 小鼠 (n=6)		BALB/c 小鼠 (n=6)	
抗体剂量	5 mg/kg, I.V.		5 mg/kg, I.V.		5 mg/kg, I.V.	
PK 参数	Fc 端检测	4-1BB 端检测	Fc 端检测	4-1BB 端检测	Fc 端检测	PD-L1 端检测
$T_{1/2}$ (hour)	193	218	336	295	465.6	256.5
V_d (mL/kg)	76	89	81	81	75.7	83.9
AUC($\mu\text{g}\cdot\text{hour}/\text{mL}$)	12,680	11,471	14,813	14,286	17,536	13,126
Cl (mL/hour/kg)	0.28	0.28	0.17	0.19	0.11	0.23
C_0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	111	114	123	124	119.7	81.7

实施例 10 双抗分子的抗肿瘤药效

本实施例研究了 B7H4 \times 4-1BB 双抗分子 PR003334 在 BALB/c-hCD137/CT26-hB7H4 小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤药效。

实施方法如下:选用 6-8 周雌性 BALB/c-hCD137 小鼠(将 BALB/c 小鼠引入外源人 4-1BB 转基因,集萃药康生物科技),然后将处于对数生长期的 CT26-hB7H4 肿瘤细胞(将小鼠结肠癌细胞 CT26 引入外源人 B7H4 转基因,和铂医药)以 5×10^5 细胞/鼠的剂量接种于实验小鼠腋右侧背部皮下。当平均肿瘤体积达到 80 mm^3 时对小鼠进行随机分组,每

组 6 只小鼠。分组当天，将特定浓度经 PBS 稀释的药物以腹腔注射 (i.p.)、每周给药 2 次总共给药 6 次 (BIW*3) 的方式进行给药，以 PBS 为空白对照组。在初次给药当天及之后第 4、7、11、14 和 18 天对肿瘤体积和小鼠体重进行测量。肿瘤大小计算公式：肿瘤体积 (mm^3) = $0.5 \times (\text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径}^2)$ 。实验结束后将荷瘤小鼠安乐死并剥瘤称重。计算各组小鼠的肿瘤体积、小鼠体重等实验结果以平均值 \pm 标准误差 (Mean \pm SEM) 表示。多组比较采用单因素方差分析 (one way ANOVA) 检验方法比较不同治疗组与对照组相比有无显著性差异。

本实施例中，抗 4-1BB 的单抗 Urelumab 为阳性对照分子。双抗分子 PR003334 的 6 mpk (mg/kg) 剂量与 Urelumab 的 5 mpk 剂量为同摩尔浓度 (根据分子量换算) 的对等剂量；双抗分子 PR003334 的 18 mpk 剂量与 Urelumab 的 15 mpk 剂量为同摩尔浓度的对等剂量。10 mpk 的抗小鼠 PD-1 抗体 (Bio X Cell, clone RMP1-14, #BE0146) 也作为对照分子。PBS 为空白对照组。

图 36 中所示，双抗分子 PR003334 和 Urelumab 在各剂量组都有抑制肿瘤生长的药效且优于 PD-1 抗体 (A)。受试各组小鼠体重变化均在正常范围内 (B)。

实施例 11 利用 UNcle 测试双抗分子的稳定性和理化特性

本实施例利用实施例 2.3 所述方法测试 B7H4 \times 4-1BB 双抗分子 (PR003334, PR003335, PR003338) 的分子稳定性等理化表征。如表 14 中所示，这些双抗分子有良好的稳定性。

表 14 双抗分子在 UNcle 中的测试参数

	PR003334	PR003335	PR003338
T_m ($^{\circ}\text{C}$)	60.32	65.59	62.17
T_{agg} ($^{\circ}\text{C}$) at 266 nm	52.00	50.39	54.14
T_{agg} ($^{\circ}\text{C}$) at 473 nm	/	/	/
Initial SLS at 266 nm (counts $\times 10^4$)	0.26	0.22	0.20
Max SLS at 266 nm (counts $\times 10^4$)	1.00	0.40	0.34
Initial SLS at 473 nm (counts)	< 0	< 0	< 0
Max SLS at 473 nm (counts)	< 0	< 0	< 0
Initial diameter (nm) (25°C)	16.22	16.38	11.74
Final diameter (nm) (95°C)	23.85	17.51	16.52
Initial PDI	0.267	0.229	0.043
Final PDI	0.089	0.194	0.185

实施例 12 总结

本申请构建了数个免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白分子，其一端可以结合免疫细胞表面的共刺激分子（如 4-1BB、OX40 等），其另一端可以结合肿瘤细胞表面的特异性抗原分子（如 HER2、PSMA、EPCAM、CLDN18.2、B7H4 等）或免疫细胞表面的共抑制分子（如 PD-L1 等）。这些双抗分子可以将免疫细胞和肿瘤细胞拉近在一起，高效地有选择性地激活肿瘤微环境中的免疫细胞，并减少外周免疫细胞的非特异性活化带来的毒副作用。双抗分子利用靶细胞抗原介导的共刺激分子的交联以及下游信号传导通路的激活，进而促进免疫细胞的活化和增殖，提高其杀伤肿瘤的效力。

本申请构建了数个不同结构的免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白分子。其中 IgG-VH 对称结构（特别是实施例 1.1.1 和图 1(1) 所述结构）和 Fab-HCAb 对称结构（特别是实施例 1.1.3 和图 1(3) 所述结构）体现出优秀的通用性和成药性，在多个不同靶点组合的双抗分子上，都显示出优秀的生物学活性、分子稳定性和药学性能。

在一些实施例显示了，免疫细胞衔接器双特异性结合蛋白分子对 T 细胞的激活是依赖于靶细胞的。如在实施例 7.6 和图 33 中所体现的，在高表达 B7H4 的细胞 SK-BR-3 存在时，B7H4 × 4-1BB 双抗分子可以特异地激活 T 细胞释放 IL-2；但是，在不表达 B7H4 的细胞 JIMT-1 存在时，B7H4 × 4-1BB 双抗分子不能激活 T 细胞。Urelumab 则没有靶点特异性，即使没有 B7H4 的表达，也可以激活 T 细胞。这可以说明 B7H4 × 4-1BB 双抗分子比 Urelumab 有更好的安全性。

在一些实施例显示了，增加靶向免疫细胞共刺激分子（例如 4-1BB）的抗原结合片段（效应域）的数目可以显著地提高双抗分子的激活免疫细胞的能力，如 IgG-VH(2) 对称结构（特别是实施例 1.1.2 和图 1(2) 所述结构）的双抗分子在实施例 7.6 和图 32(C-D) 中所体现的强力的 T 细胞激活能力。

在一些实施例显示了，靶向免疫细胞共刺激分子（例如 4-1BB）的抗原结合片段（效应域）相对于靶向肿瘤细胞的抗原结合片段（靶向域）的位置和距离对双抗分子的功能活性是至关重要的。如在实施例 7.6 和图 32(E) 中所体现的，当靶向 4-1BB 的结合结构域处于 Fab 和 Fc 之间的时候（如 Fab-HCAb 结构，特别是实施例 1.1.3 和图 1(3) 所述结构），或者处于 Fc 的 C 端的时候（如 IgG-VH 结构，特别是实施例 1.1.1 和图 1(1) 所述结构），其双抗分子具有交联 4-1BB 并进一步激活 T 细胞的能力；而当 4-1BB 的结合结构域处于 Fab 的 N 端的时候（如 VH-IgG 结构，特别是实施例 1.1.7 和图 1(7) 所述结构），双抗分子尽管可以结合 4-1BB 但是不能激活 T 细胞。

基于前面所述的发现，一方面可以在 IgG-VH 结构或者 Fab-HCAb 结构基础上增加靶向免疫细胞共刺激分子的抗原结合片段 VH（如图 37 中黑色结构域所示）的数量来提

高激活免疫细胞的能力；另一方面可以去掉 Fc 区来使分子更小（如图 37 (E) 中 VH 结构域分别连在 Fab 的 CH1 的 C'端和 Fab 的 CL 的 C'端）。图 37 列出了基于重链抗体或单域抗体的其他衍生的双（多）特异性结合蛋白结构。

权利要求

1. 一种至少含有两个蛋白功能区的结合蛋白，其包括第一蛋白功能区和第二蛋白功能区；所述第一蛋白功能区包括结合靶细胞上的抗原的靶向域，所述第二蛋白功能区包括结合免疫效应细胞上的抗原的效应域；

所述的结合蛋白选自以下结构：

(I) 所述第一蛋白功能区为 Fab 结构，所述第二蛋白功能区为 VH 结构，所述结合蛋白从 N 末端至 C 末端为第一蛋白功能区和第二蛋白功能区；

(II) 所述第一蛋白功能区为 Fab 结构，所述第二蛋白功能区为 Fab 结构，所述结合蛋白从 N 末端至 C 末端为第一蛋白功能区和第二蛋白功能区；

较佳地，所述结合蛋白为 (a) 单体结构，或 (b) 由两个单体组成的二聚体结构。

2. 如权利要求 1 所述的结合蛋白，其中，

所述 (a) 的单体结构中，所述结合蛋白具有两个第二蛋白功能区，其中一个第二蛋白功能区连接于所述第一蛋白功能区的 Fab 结构的重链 CH1 的 C 末端，另一个第二蛋白功能区连接于所述第一蛋白功能区的 Fab 结构的轻链 CL 的 C 末端；

所述 (b) 的二聚体结构中，所述结合蛋白还包括 Fc；

较佳地，所述 Fc 位于所述第一蛋白功能区和所述第二蛋白功能区之间；或，所述 Fc 位于所述第二蛋白功能区的 C 末端；或，所述 Fc 位于两个所述第二蛋白功能区之间；

更佳地，每个单体中，所述第一蛋白功能区的数量为 1 个，所述 Fc 的数量为 1 个，所述第二蛋白功能区的数量为 1 个或多个例如为 1、2 或 3 个；

进一步更佳地，所述结合蛋白还包括第三蛋白功能区，其中所述第三蛋白功能区位于所述结合蛋白 C 或 N 末端，或者结合蛋白中 Fc 结构的 C 或 N 末端；

进一步更佳地，所述第三蛋白功能区的数量为 1 个或多个，例如为 1、2 或 3 个。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的结合蛋白，其特征在于，

所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2，所述多肽链 1 如式：N'-VL_A-CL-C'所示，所述多肽链 2 如式：N'-VH_A-CH1-h-CH2-CH3-L-VH_B-C'所示，所述的 L 为连接肽，其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS；

或，所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2，所述多肽链 1 如式：N'-VL_A-CL-C'所示，所述多肽链 2 如式：N'-VH_A-CH1-h-CH2-CH3-L1-VH_B-L2-VH_B-C'所示，所述的 L1 和 L2 为连接肽，其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS；

或,所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2,所述多肽链 1 如式: N'-VH_A-CH1-C'所示,所述多肽链 2 如式: N'-VL_A-CL-L1-VH_B-L2-CH2-CH3-C'所示,所述的 L1 和 L2 为连接肽,其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS,所述 L2 的氨基酸序列进一步优选如 SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 262 或 SEQ ID NO: 263 所示;

或,所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2,所述多肽链 1 如式: N'-VL_A-CL-C'所示,所述多肽链 2 如式: N'-VH_A-CH1-L1-VH_B-L2-CH2-CH3-C'所示,所述的 L1 和 L2 为连接肽,其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS,所述 L2 的氨基酸序列进一步优选如 SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 262 或 SEQ ID NO: 263 所示;

或,所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2,所述多肽链 1 如式: N'-VH_A-CH1-C'所示,所述多肽链 2 如式: N'-VL_A-CL-L1-VH_B-L2-CH2-CH3-L3-VH_B-C'所示,所述的 L1、L2 和 L3 为连接肽,其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS,所述 L2 的氨基酸序列进一步优选如 SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 262 或 SEQ ID NO: 263 所示;

或,所述结合蛋白包含多肽链 1 和多肽链 2,所述多肽链 1 如式: N'-VL_A-CL-C'所示,所述多肽链 2 如式: N'-VH_A-CH1-L1-VH_B-L2-CH2-CH3-L3-VH_B-C'所示,所述的 L1、L2 和 L3 为连接肽,其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NOs: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS,所述 L2 的氨基酸序列进一步优选如 SEQ ID NO: 253、SEQ ID NO: 262 或 SEQ ID NO: 263 所示;

或,所述结合蛋白包含多肽链 1、多肽链 2 和多肽链 3,所述多肽链 1 如式: N'-VL_A-CL-L-VH_B-CH1-h-CH2-CH3-C'所示,所述多肽链 2 如式: N'-VH_A-CH1-C'所示,所述多肽链 3 如式: N'-VL_B-CL-C'所示,所述的 L 为连接肽,其长度优选为 0 或其氨基酸序列优选如 SEQ ID NO: 244-265 任一所示、或其氨基酸序列为 GS;

其中,所述的 VL_B 和/或 VH_B 分别为所述第二蛋白功能区的 VL 和/或 VH,所述的 VL_A 和/或 VH_A 分别为所述第一蛋白功能区的 VL 和/或 VH;所述的 h 为铰链区;所述的 CL 是轻链恒定区结构域;所述的 CH1、CH2 和 CH3 分别是重链恒定区的第一、第二和第三结构域;所述的 L 或 L1 或 L2 或 L3 为连接肽。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的结合蛋白,其特征在于,所述靶细胞上的抗原为肿瘤抗原和/或共抑制分子抗原;

其中,所述肿瘤抗原为 CD19、BCMA、TSHR、CD171、CS-1、CLL-1、GD3、Tn Ag、FLT3、CD38、CD123、CD44v6、B7H3、B7H4、KIT、IL-13Ra2、IL-11Ra、PSCA、PSMA、

PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR-beta、SSEA-4、MUC1、EGFR、NCAM、CAIX、LMP2、EphA2、岩藻糖基 GM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、GD2、FOLR1、FOLR2、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、CLDN18.2、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、多聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TAARP、WT1、ETV6-AML、SPA17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、FOSL1、hTERT、ML-IAP、ERG、NA17、PAX3、AR、细胞周期蛋白 B1、MYCN、RhoC、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TE51、LCK、AKAP-4、SSX2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、CD20、CD30、HER2、ROR1、FLT3、TAAG72、CD22、CD33、GD2、gp100Tn、FAP、酪氨酸酶、EPCAM、CEA、IGF-1R、EphB2、间皮素、钙黏蛋白 17、CD32b、EGFRvIII、GPNMB、GPR64、HER3、LRP6、LYPD8、NKG2D、SLC34A2、SLC39A6、SLITRK6、GUCY2C 或 TACSTD2；优选为 B7H3、B7H4、PSMA、CLDN18.2、GPC3、HER2、ROR1、CD22、EPCAM、间皮素、EGFRvIII 或 TACSTD2；

和/或，所述共抑制分子抗原为 PD-L1、PD-L2、CTLA4、B7H3、B7H4、VISTA、HHLA2 或 CD155，优选为 PD-L1、B7H3、B7H4 或 HHLA2；

和/或，所述免疫效应细胞上的抗原为刺激型抗原或共刺激分子抗原，例如为 TCR/CD3、CD28、4-1BB、OX40、GITR、CD27、ICOS、CD2、CD40、CD226、CD16、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D 或 2B4，优选为 TCR/CD3、CD28、4-1BB、OX40、GITR、CD40、CD226、CD16 或 NKp30；

较佳地：

所述靶细胞上的抗原为 CLDN18.2、HER2、B7H4、EPCAM、PSMA 或 PD-L1；和/或，所述免疫效应细胞上的抗原为 4-1BB 或 OX40。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的结合蛋白，其特征在于，所述第一蛋白功能区为靶向 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段、靶向 HER2 的抗体或其抗原结合片段、靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段、靶向 EPCAM 的抗体或其抗原结合片段、靶向 PSMA 的抗体或其抗原结合片段、和/或靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段；

所述第二蛋白功能区为靶向 OX40 的抗体或其抗原结合片段、或靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段；

较佳地：

所述的靶向 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:22 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:55

所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:88 所示的 VH CDR3, 所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO:121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO:142 所示的 VL CDR3;

所述的靶向 HER2 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:13 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:42 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:77 所示的 VH CDR3, 所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 105 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO:117 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO:134 所示的 VL CDR3;

所述的靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 11 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 40 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 75 所示的 VH CDR3, 所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 103 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 117 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 132 所示的 VL CDR3; 或者, 所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 43 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 78 所示的 VH CDR3, 所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 106 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 119 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 135 所示的 VL CDR3;

所述的靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:20 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:53 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:86 所示的 VH CDR3, 所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 110 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO:118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO:140 所示的 VL CDR3; 或者, 所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:21 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:54 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:87 所示的 VH CDR3, 所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 111 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO:118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO:141 所示的 VL CDR3;

所述的靶向 EPCAM 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:47 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:81 所示的 VH CDR3, 所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO:121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO:138 所示的 VL CDR3;

所述的靶向 PSMA 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:48 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:82 所示的 VH CDR3, 所述 VL 含有如 SEQ ID NO:

109 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO:122 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO:139 所示的 VL CDR3；

所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH)，所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:83 所示的 VH CDR3；或者，所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:50 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:84 所示的 VH CDR3；或者，所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:19 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:51 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:84 所示的 VH CDR3；或者，所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:57 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:90 所示的 VH CDR3；

或者，所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:12 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:41 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:76 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO:104 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO:118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO:133 所示的 VL CDR3；或者，含有序列如 SEQ ID NO:12 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:44 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:76 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO:104 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO:118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO:133 所示的 VL CDR3；

所述的靶向 OX40 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH)，所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:52 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:85 所示的 VH CDR3；

更佳地：

所述的靶向 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO:165 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO:179 所示的 VL；

所述的靶向 HER2 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO:152 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO:170 所示的 VL；

所述的靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO:150 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO:168 所示的 VL；或者含有序列如 SEQ ID NO:153 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO:171 所示的 VL；

所述的靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO:163 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO:177 所示的 VL；或者含有序列如 SEQ ID NO:164 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO:178 所示的 VL；

所述的靶向 EPCAM 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO:157 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 175 所示的 VL;

所述的靶向 PSMA 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO:158 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 176 所示的 VL;

所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO:159 所示的 VH; 或者, 含有序列如 SEQ ID NO: 160 所示的 VH; 或者, 含有序列如 SEQ ID NO: 161 所示的 VH; 或者, 含有序列如 SEQ ID NO: 167 所示的 VH; 或者, 含有序列如 SEQ ID NO: 151 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 169 所示的 VL; 或者, 含有序列如 SEQ ID NO: 154 所示的 VH 和序列如 SEQ ID NO: 172 所示的 VL;

所述的靶向 OX40 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 162 所示的 VH; 进一步更佳地:

所述的靶向 CLDN18.2 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 196 所示的重链和序列如 SEQ ID NO:210 所示的轻链;

所述的靶向 HER2 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 183 所示的重链和序列如 SEQ ID NO:201 所示的轻链;

所述的靶向 PD-L1 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 181 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 199 所示的轻链; 或者含有序列如 SEQ ID NO: 184 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 202 所示的轻链;

所述的靶向 B7H4 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 194 所示的重链和序列如 SEQ ID NO:208 所示的轻链; 或者含有序列如 SEQ ID NO: 195 所示的重链和序列如 SEQ ID NO:209 所示的轻链;

所述的靶向 EPCAM 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 188 所示的重链和序列如 SEQ ID NO:206 所示的轻链;

所述的靶向 PSMA 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 189 所示的重链和序列如 SEQ ID NO:207 所示的轻链;

所述的靶向 4-1BB 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 190 所示的重链; 或者, 含有序列如 SEQ ID NO: 191 所示的重链; 或者, 含有序列如 SEQ ID NO: 192 所示的重链; 或者, 含有序列如 SEQ ID NO: 198 所示的重链; 或者, 含有序列如 SEQ ID NO: 182 所示的重链和序列如 SEQ ID NO:200 所示的轻链; 或者, 含有序列如 SEQ ID NO: 185 所示的重链和序列如 SEQ ID NO:203 所示的轻链;

所述的靶向 OX40 的抗体或其抗原结合片段含有序列如 SEQ ID NO: 193 所示的重链。

6. 如权利要求 1-5 任一项所述的结合蛋白，其特征在于，

所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:13 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:42 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:77 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 105 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 117 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 134 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:19 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 86 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 110 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 140 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 83 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 86 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 110 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 140 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:50 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 86 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 110 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 140 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 57 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:90 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 43 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 78 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 106 所示的 VL

CDR1、序列如 SEQ ID NO: 119 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 135 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 49 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 83 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 43 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 78 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 106 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 119 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 135 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 43 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 78 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 106 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 119 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 135 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:47 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 138 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:83 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:47 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 138 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:84 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:47 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 138 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:84 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:48 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 82 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 109 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 122 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 139 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:83 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:48 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 82 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 109 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 122 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 139 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:84 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:48 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 82 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 109 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 122 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 139 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:84 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 55 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 88 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 VL

CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:49 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:83 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 55 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 88 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:50 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 55 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 88 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:19 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 51 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:43 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:78 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 106 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 119 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 135 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:52 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 85 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 53 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 86 所示的 VH CDR3，所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 110 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 140 所示的 VL CDR3；所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区（VH），所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 85 所示的 VH CDR3；

或，所述第一蛋白功能区包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），所述 VH 含

有序列如 SEQ ID NO:16 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:47 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 81 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 138 所示的 VL CDR3;所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区(VH),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 85 所示的 VH CDR3;

或,所述第一蛋白功能区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:17 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:48 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 82 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 109 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 122 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 139 所示的 VL CDR3;所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区(VH),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 85 所示的 VH CDR3;

或,所述第一蛋白功能区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 22 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 55 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 88 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 108 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 121 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 VL CDR3;所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区(VH),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 52 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 85 所示的 VH CDR3;

或,所述第一蛋白功能区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO: 21 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 54 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 87 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 111 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 141 所示的 VL CDR3;所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区(VH),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:18 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO: 50 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 84 所示的 VH CDR3;

或,所述第一蛋白功能区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:14 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:43 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:78 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 106 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 119 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 135 所示的 VL CDR3;所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述 VH 含

有序列如 SEQ ID NO:12 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:41 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:76 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 104 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 133 所示的 VL CDR3;

或,所述第一蛋白功能区包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:11 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:40 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:75 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 103 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 117 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 132 所示的 VL CDR3;所述第二蛋白功能区含有序列包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL),所述 VH 含有序列如 SEQ ID NO:12 所示的 VH CDR1、序列如 SEQ ID NO:44 所示的 VH CDR2 和序列如 SEQ ID NO:76 所示的 VH CDR3,所述 VL 含有如 SEQ ID NO: 104 所示的 VL CDR1、序列如 SEQ ID NO: 118 所示的 VL CDR2 和序列如 SEQ ID NO: 133 所示的 VL CDR3;

较佳地:

所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:152 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO: 170 所示的 VL;所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:161 所示的 VH;

或,所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:163 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO: 177 所示的 VL;所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:159 所示的 VH;

或,所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:163 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO: 177 所示的 VL;所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:160 所示的 VH;

或,所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:163 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO: 177 所示的 VL;所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:167 所示的 VH;

或,所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:153 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO: 171 所示的 VL;所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:159 所示的 VH;

或,所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:153 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO: 171 所示的 VL;所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:160 所示的 VH;

或,所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:153 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO: 171 所示的 VL;所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:161 所示的 VH;

或,所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:157 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO: 175 所示的 VL;所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:159 所示的 VH;

或,所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:157 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO: 175 所示的 VL;所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:160 所示的 VH;

或,所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:157 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO: 175 所示的 VL;所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:161 所示的 VH;

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:158 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:176 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:159 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:158 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:176 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:160 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:158 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:176 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:161 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:165 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:179 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:159 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:165 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:179 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:160 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:165 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:179 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:161 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:153 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:171 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:162 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:163 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:177 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:162 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:157 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:175 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:162 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:158 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:176 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:162 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:165 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:179 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:162 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:164 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:178 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:160 所示的 VH；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:153 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:171 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:151 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:169 所示的 VL；

或，所述第一蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:150 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:168 所示的 VL；所述第二蛋白功能区含有序列如 SEQ ID NO:154 所示的 VH 以及如 SEQ ID NO:172 所示的 VL；

更佳地，所述的结合蛋白包括以下多肽链：

序列如 SEQ ID NO: 201 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 214 所示的多肽链 2；

- 或，序列如 SEQ ID NO: 208 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 217 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 208 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 218 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 208 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 219 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 202 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 221 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 202 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 222 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 202 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 223 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 206 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 224 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 206 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 225 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 206 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 226 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 207 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 227 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 207 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 228 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 207 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 229 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 210 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 230 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 210 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 231 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 210 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 232 所示的多肽链 2;
- 或，序列如 SEQ ID NO: 202 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 233 所示的多肽链 2;

- 或，序列如 SEQ ID NO: 208 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 236 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 206 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 241 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 207 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 242 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 210 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 243 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 208 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 220 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 209 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 234 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 212 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 235 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 237 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 240 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 237 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 238 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 213 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 212 所示的多肽链 2，以及序列如 SEQ ID NO: 203 所示的多肽链 3；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 216 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 215 所示的多肽链 2，以及序列如 SEQ ID NO: 203 所示的多肽链 3；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 237 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 266 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 237 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 267 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 237 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 268 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 237 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 269 所示的多肽链 2；
- 或，序列如 SEQ ID NO: 202 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 270 所示的多肽链 2；

或，序列如 SEQ ID NO: 212 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 271 所示的多肽链 2；

或，序列如 SEQ ID NO: 208 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 272 所示的多肽链 2；

或，序列如 SEQ ID NO: 208 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 273 所示的多肽链 2；

或，序列如 SEQ ID NO: 237 所示的多肽链 1，序列如 SEQ ID NO: 274 所示的多肽链 2。

7. 一种分离的核酸，其编码如权利要求 1-6 任一项所述的结合蛋白。

8. 一种重组表达载体，其包含如权利要求 7 所述的分离的核酸；

较佳地，所述表达载体包含真核细胞表达载体和/或原核细胞表达载体。

9. 一种转化体，其包含如权利要求 7 所述的分离的核酸或如权利要求 8 所述的重组表达载体；

较佳地，所述转化体的宿主细胞为原核细胞和/或真核细胞，所述原核细胞优选 *E. coli* 细胞如 TG1、BL21，所述真核细胞优选 HEK293 细胞或 CHO 细胞。

10. 一种结合蛋白的制备方法，其包含培养如权利要求 9 中所述的转化体，从培养物中获得结合蛋白。

11. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含如权利要求 1-6 中任一项所述的结合蛋白，以及任选地药学上可接受的载体；

较佳地，所述药物组合物还包括其他抗肿瘤抗体作为活性成分。

12. 一种试剂盒，其包括如权利要求 1-6 任一项所述的结合蛋白和/或如权利要求 11 所述的药物组合物；

较佳地，所述试剂盒还包括(i)施用结合蛋白或药物组合物的装置；和/或(ii)使用说明。

13. 一种套装药盒，其特征在于，所述套装药盒包括药盒一和药盒二，所述药盒一包括如权利要求 1-6 任一项所述的结合蛋白和/或如权利要求 11 所述的药物组合物，所述药盒二包括其它抗体或药物组合物。

14. 一种给药装置，其特征在于，所述给药装置包括如权利要求 1-6 任一项所述的结合蛋白和/或如权利要求 11 所述的药物组合物；

较佳地，所述给药装置还包括容纳或将所述合蛋白和/或所述药物组合物施用于受试者的部件，例如注射器、输液装置或植入式给药装置。

15. 一种如权利要求 1-6 任一项所述的结合蛋白、如权利要求 11 所述的药物组合物、如权利要求 12 所述的试剂盒、如权利要求 13 所述的套装药盒和/或如权利要求 14 所述

的给药装置在制备诊断、预防和/或治疗肿瘤的药物中的应用；

较佳地，所述肿瘤为乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、黑色素瘤、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、食管癌、宫颈癌、头颈部肿瘤、胆管癌、胆囊癌、膀胱癌、肉瘤和/或结直肠癌。

16. 一种体外或体内检测特异性抗原的方法，其包括使用如权利要求 1-6 任一项所述的结合蛋白进行检测。

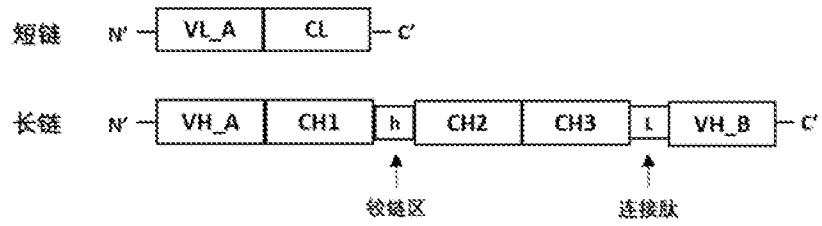
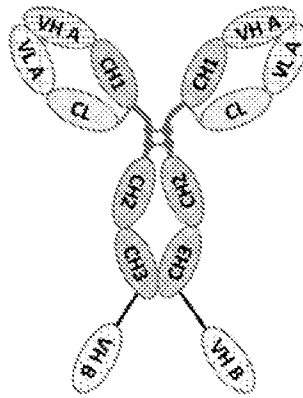
17. 一种诊断、预防和/或治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有需要的患者施用如权利要求 1-6 任一项所述的结合蛋白、如权利要求 11 所述的药物组合物、如权利要求 12 所述的试剂盒、如权利要求 13 所述的套装药盒和/或如权利要求 14 所述的给药装置的步骤；

较佳地，所述的肿瘤选自乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、黑色素瘤、肺癌、胃癌、肝癌、食管癌、宫颈癌、头颈部肿瘤、胆管癌、胆囊癌、膀胱癌、肉瘤、结直肠癌、淋巴瘤和多发性骨髓瘤中的一种或多种。

(1)

结构 (1)

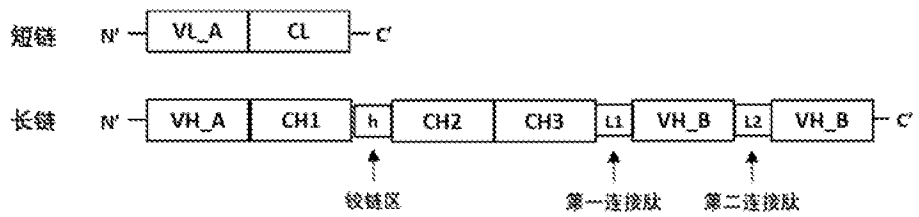
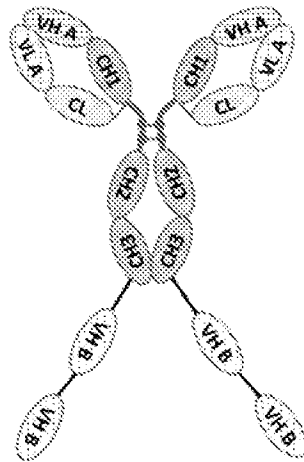
IgG_{HC}-VH



(2)

结构 (2)

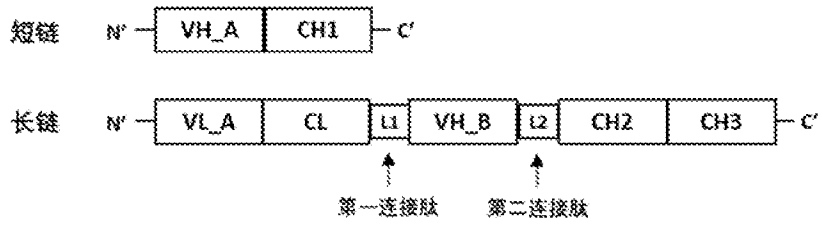
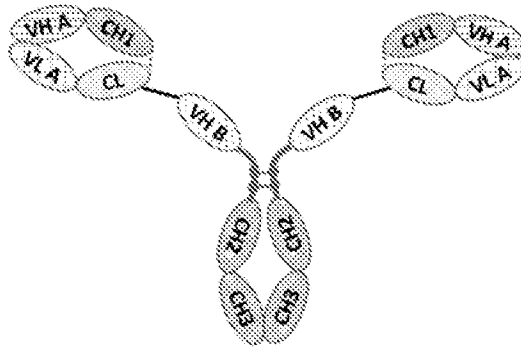
IgG_{HC}-VH-VH



(接下页)

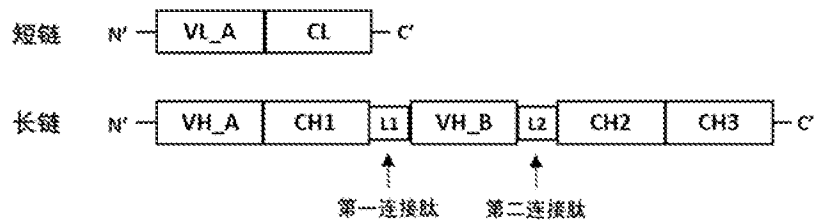
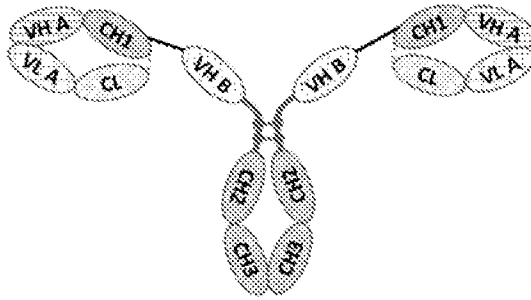
(3)
(续上页)
结构 (3)

Fab(CL)-VH-Fc



(4)
结构 (4)

Fab(CH1)-VH-Fc



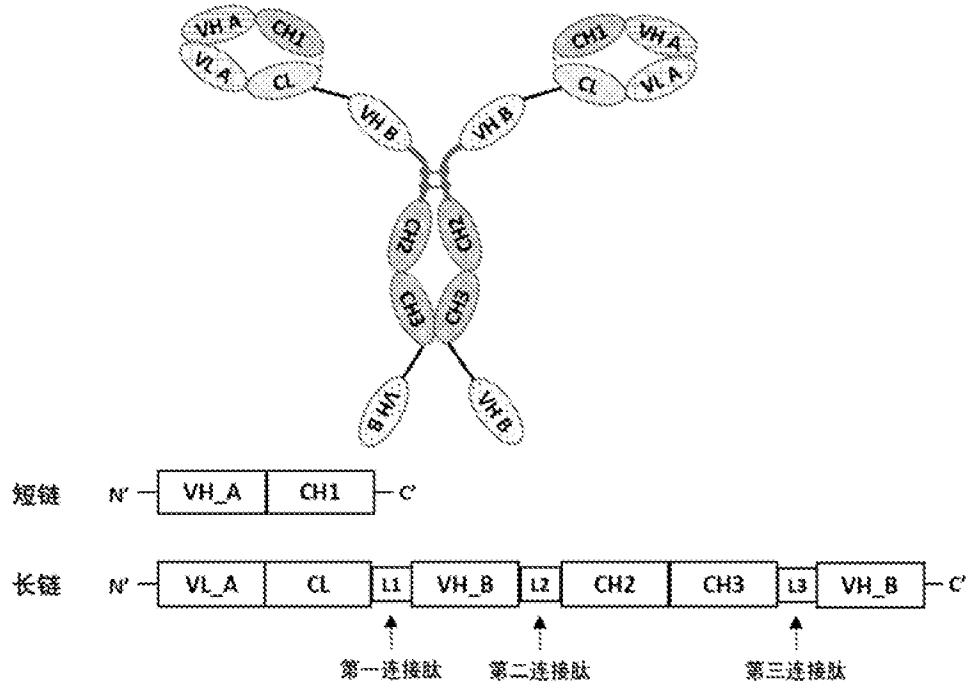
(接下页)

(续上页)

(5)

结构 (5)

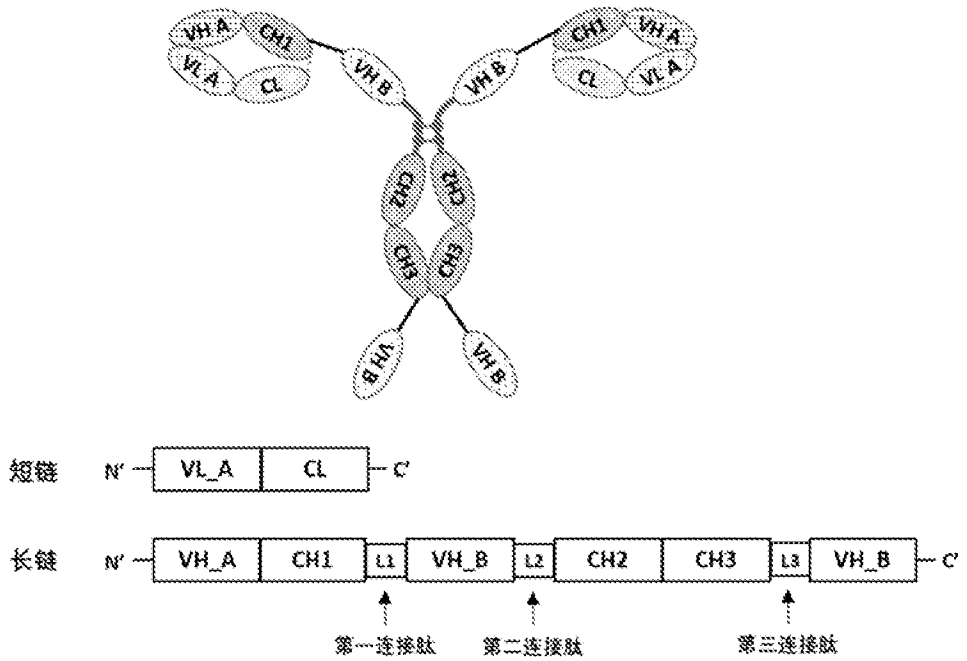
Fab(CL)-VH-Fc-VH



(6)

结构 (6)

Fab(CH1)-VH-Fc-VH



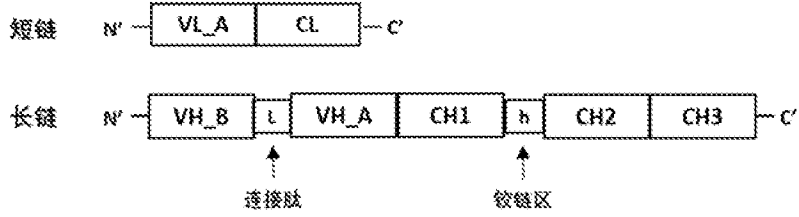
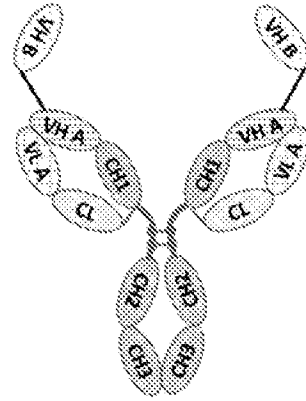
(接下页)

(7)

(续上页)

结构(7)

VH-igG₁HC



(8)

结构(8)

FIT-ig

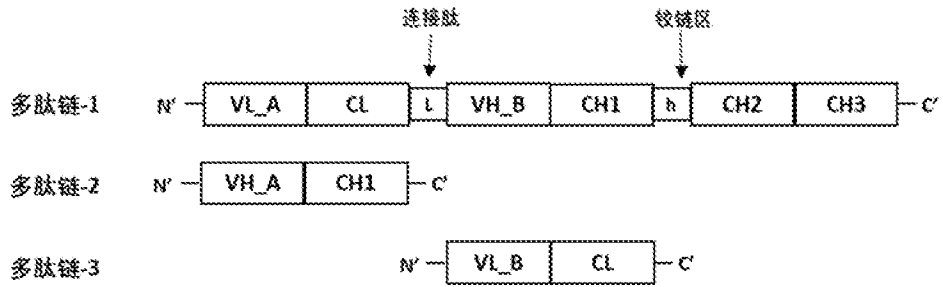
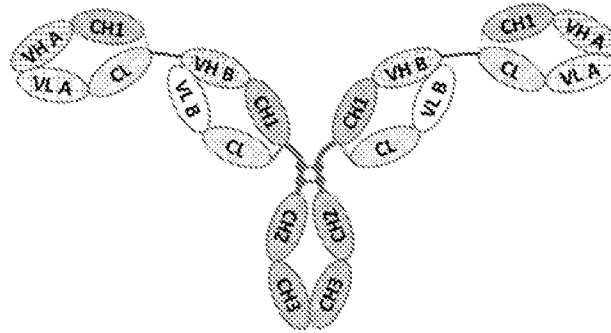


图 1

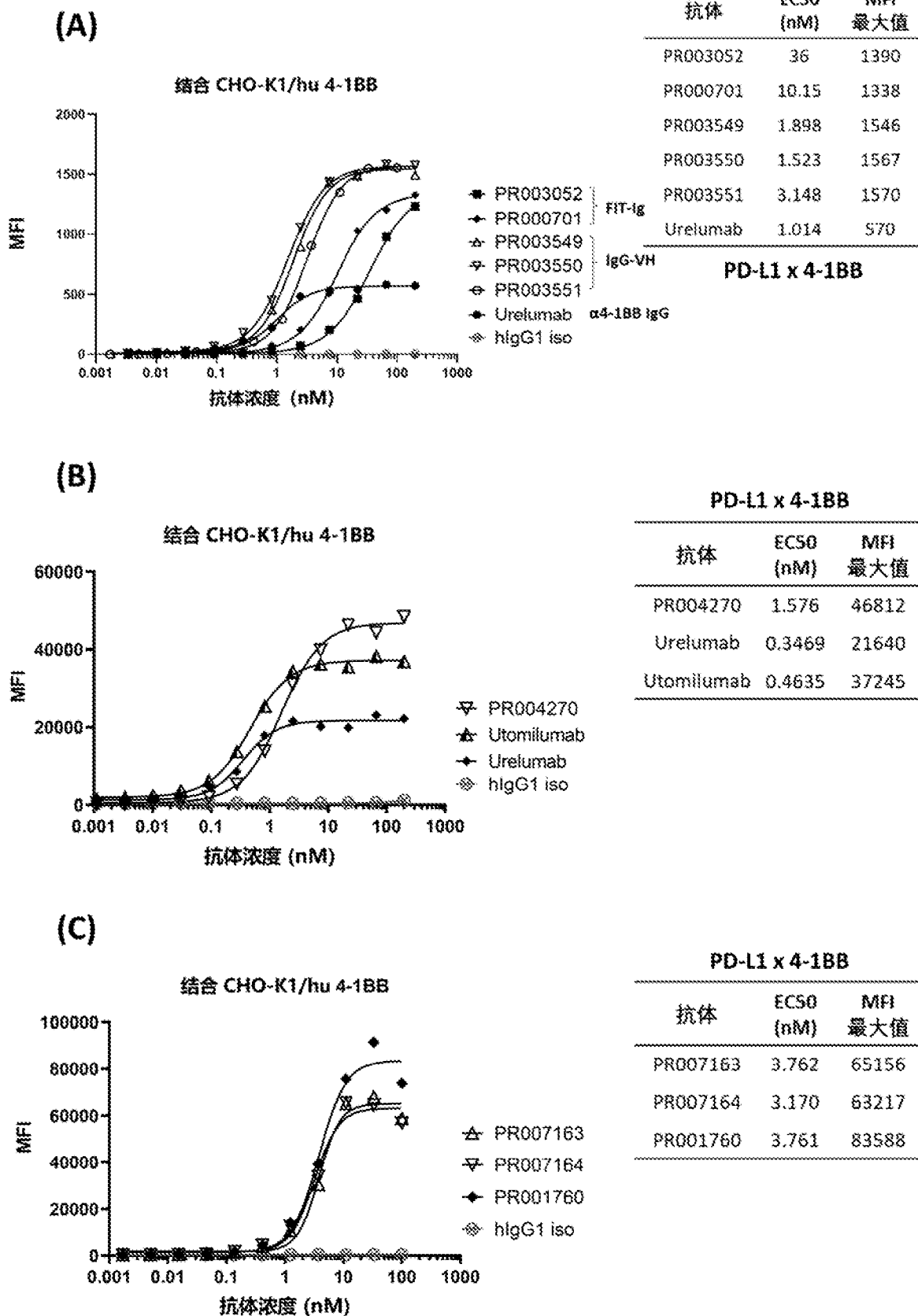
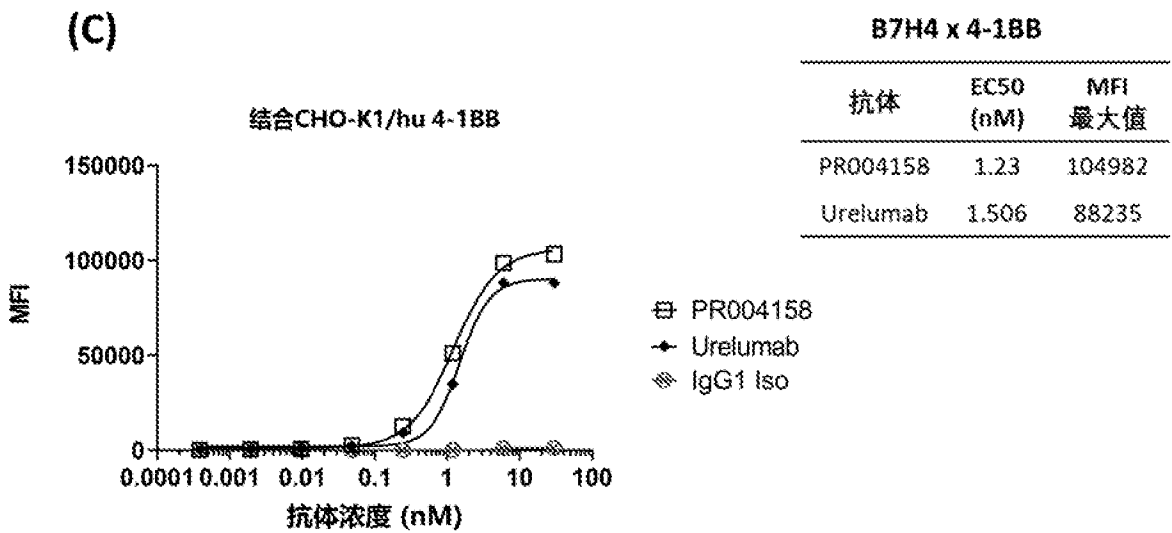
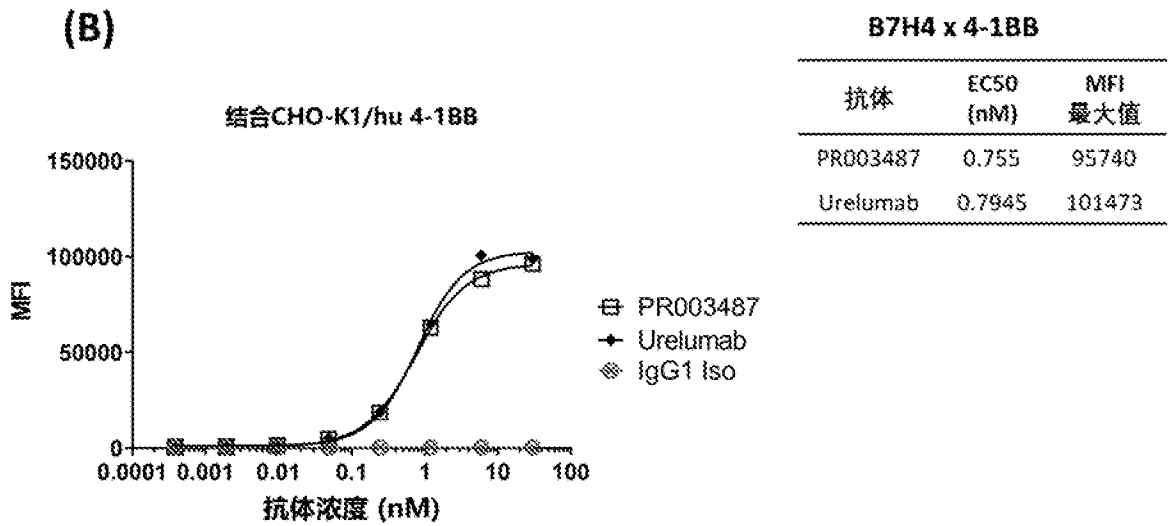
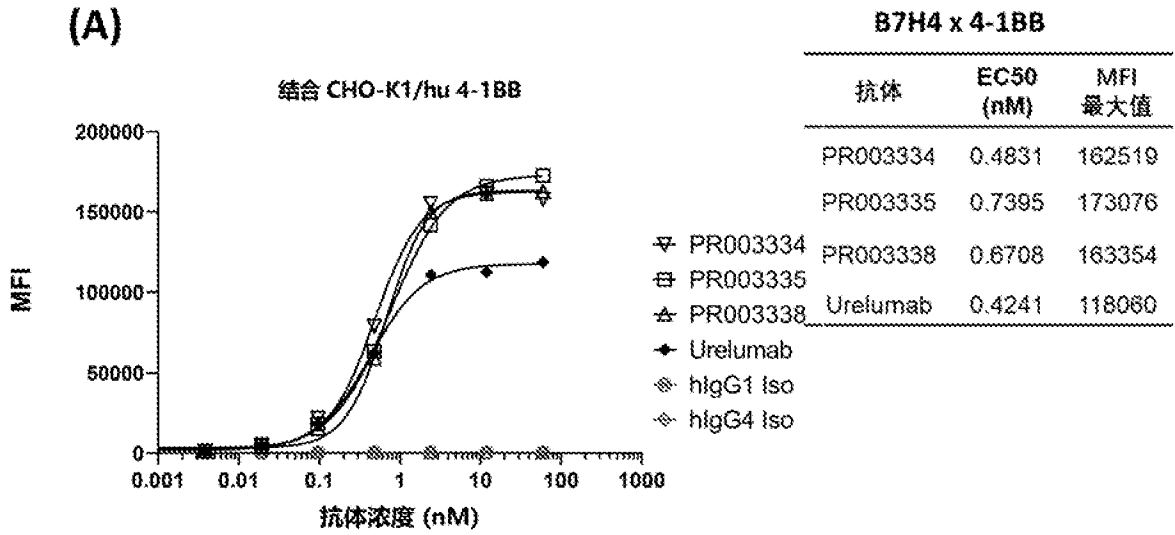


图 2



(接下页)

(续上页)

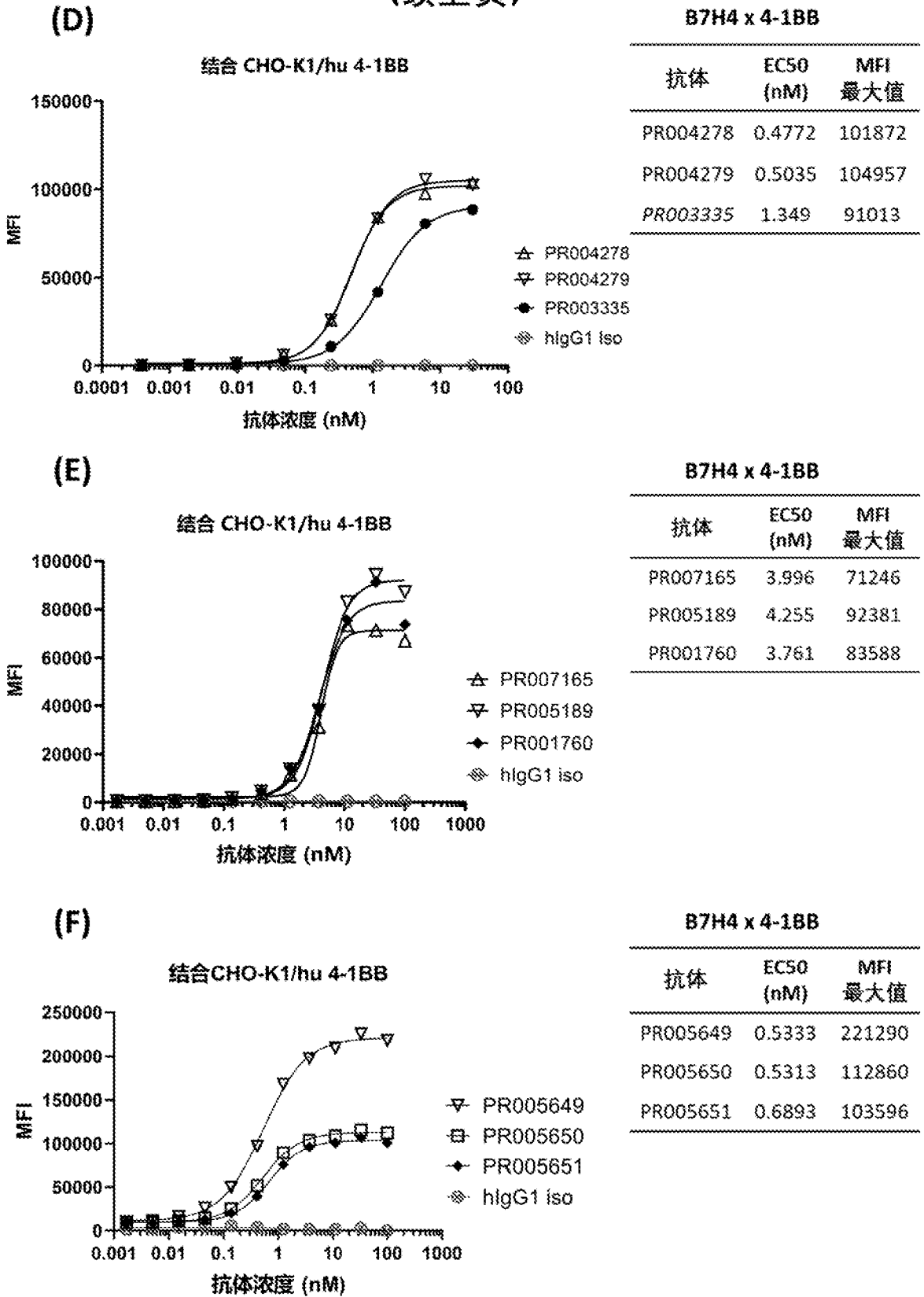
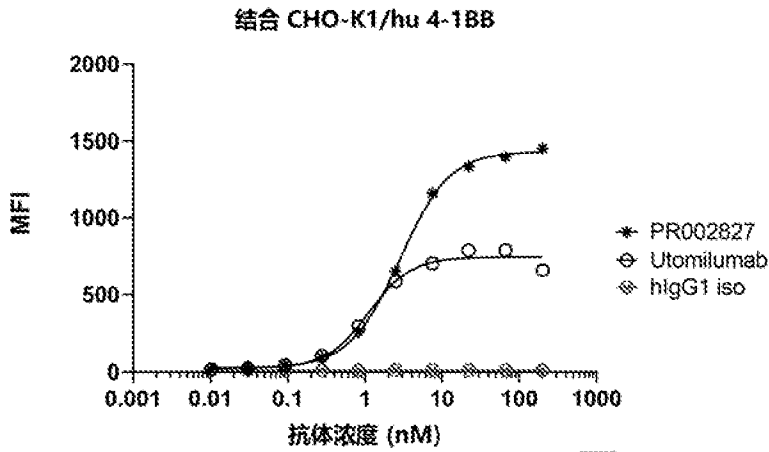


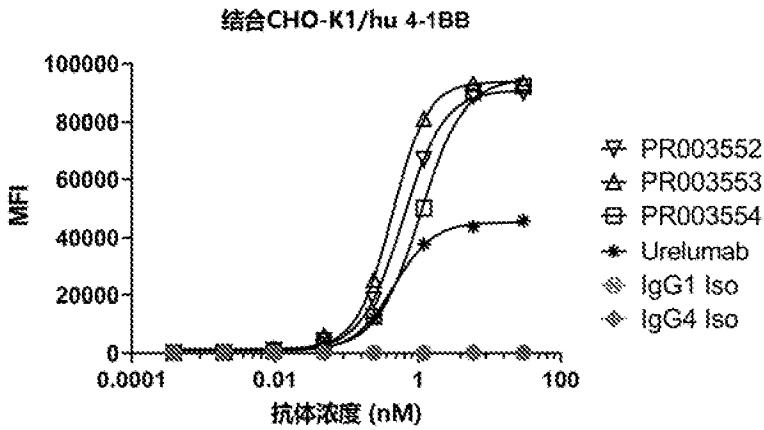
图 3



HER2 x 4-1BB

抗体	EC50 (nM)	MFI 最大值
PR002827	2.798	1434
Utomilumab	1.13	747.7

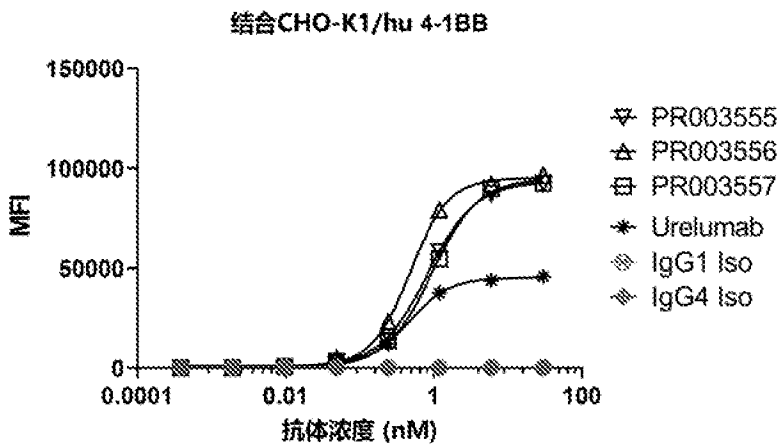
图 4



EPCAM x 4-1BB

抗体	EC50 (nM)	MFI 最大值
PR003552	0.6111	90904
PR003553	0.431	93791
PR003554	1.078	95027
Urelumab	0.459	45376

图 5



PSMA x 4-1BB

抗体	EC50 (nM)	MFI 最大值
PR003555	0.8189	93382
PR003556	0.4765	95198
PR003557	0.9505	94865
Urelumab	0.459	45376

图 6

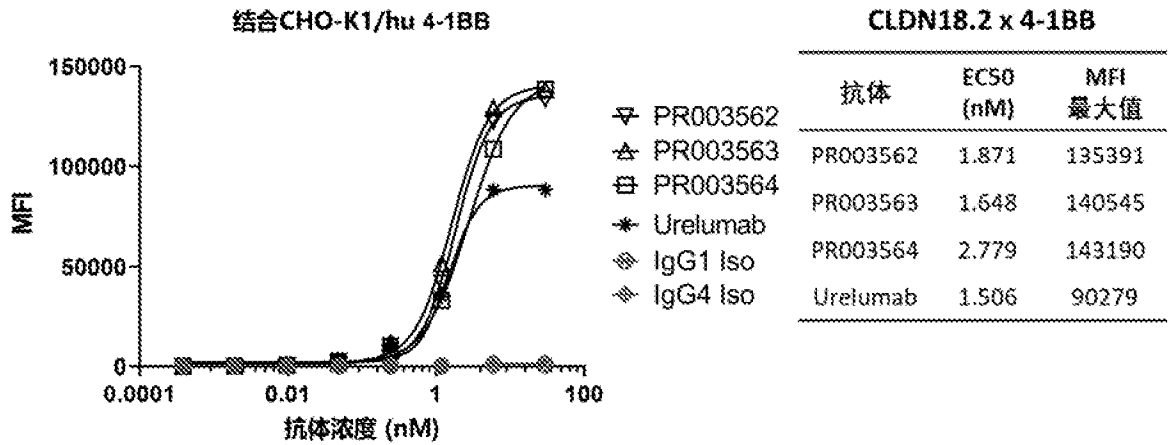
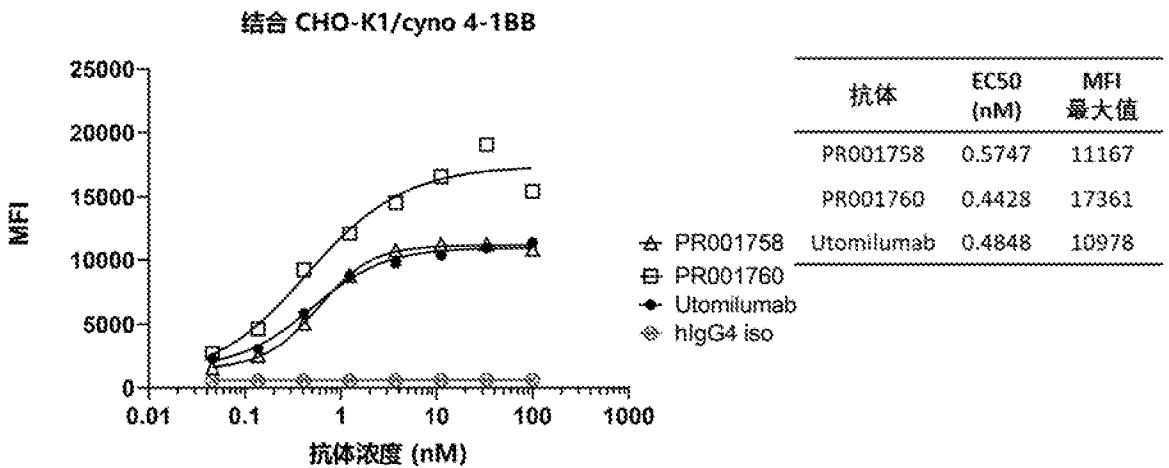


图 7

(A)



(B)

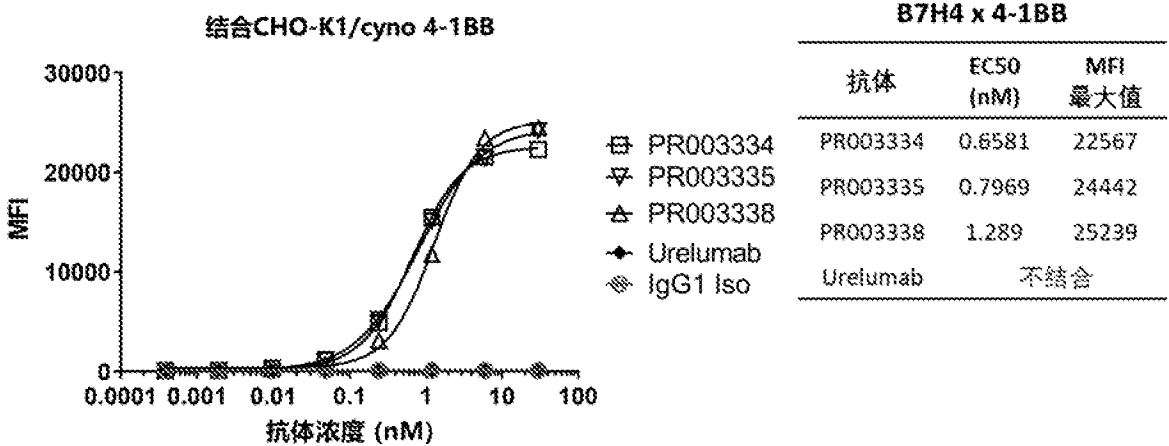
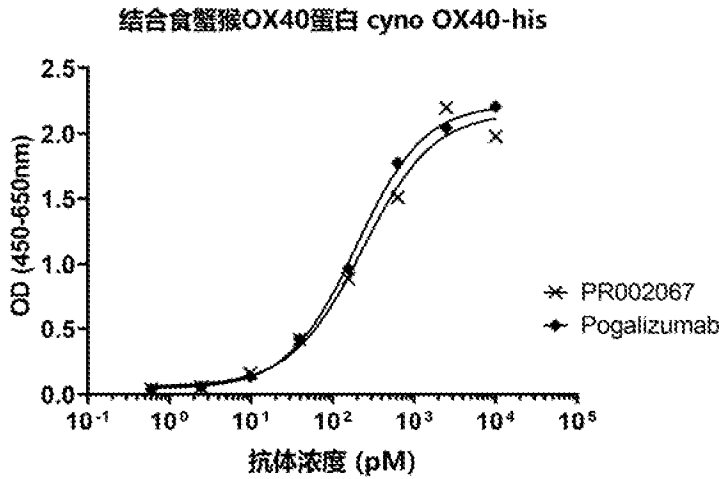
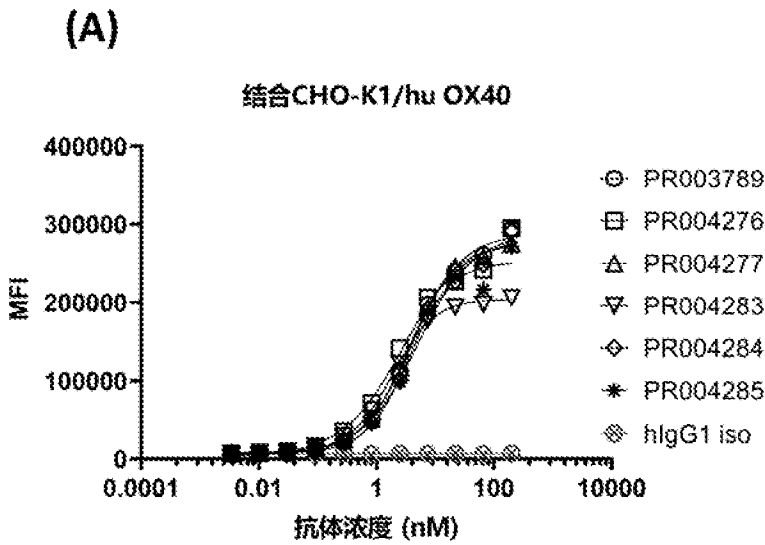


图 8



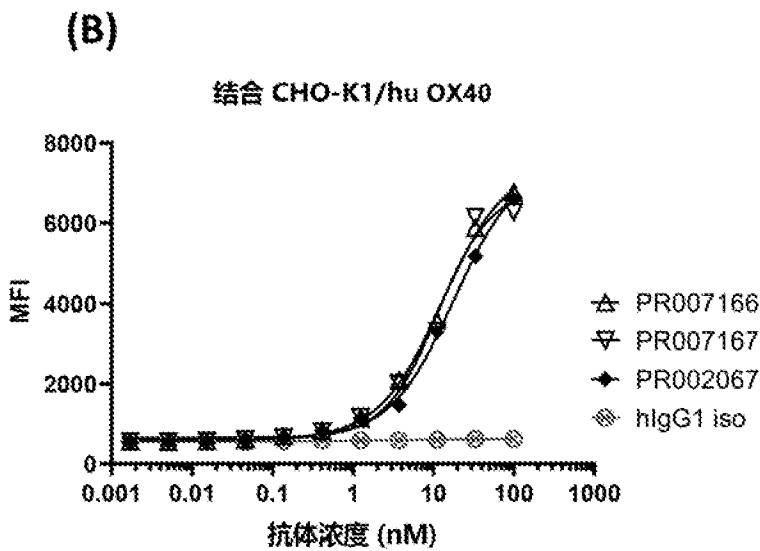
抗体	EC50 (pM)	OD 最大值
PR002067	232.00	2.163
Pogalizumab	194.30	2.225

图 9



TAA x OX40

抗体	EC50 (nM)	MFI 最大值
PR003789	3.977	287338
PR004276	2.799	281894
PR004277	3.458	274396
PR004283	1.809	204612
PR004284	4.955	287445
PR004285	3.548	252325



B7H4 x OX40

抗体	EC50 (nM)	MFI 最大值
PR007166	13.16	7566
PR007167	11.26	6866
PR002067	17.84	7544

图 10

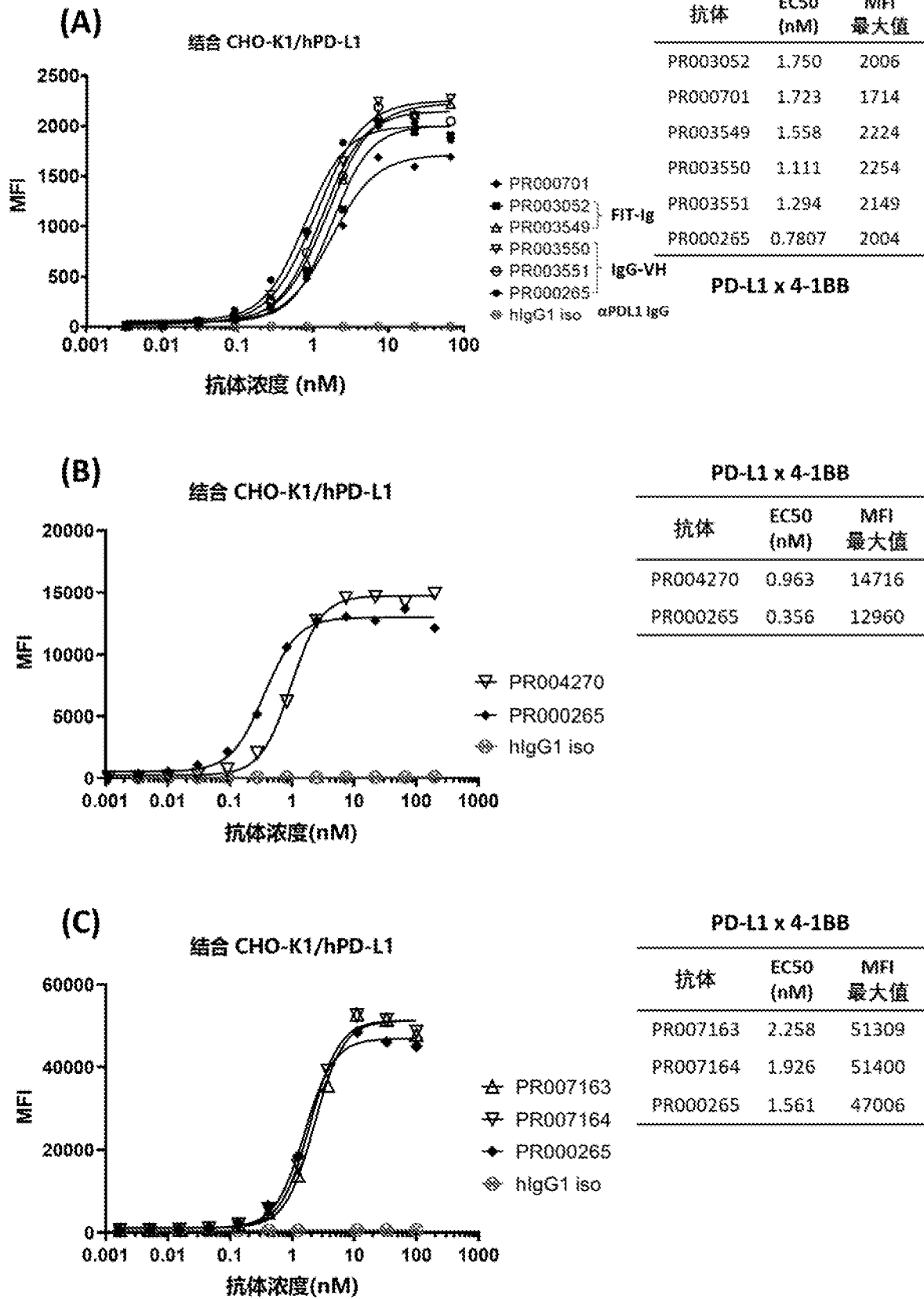
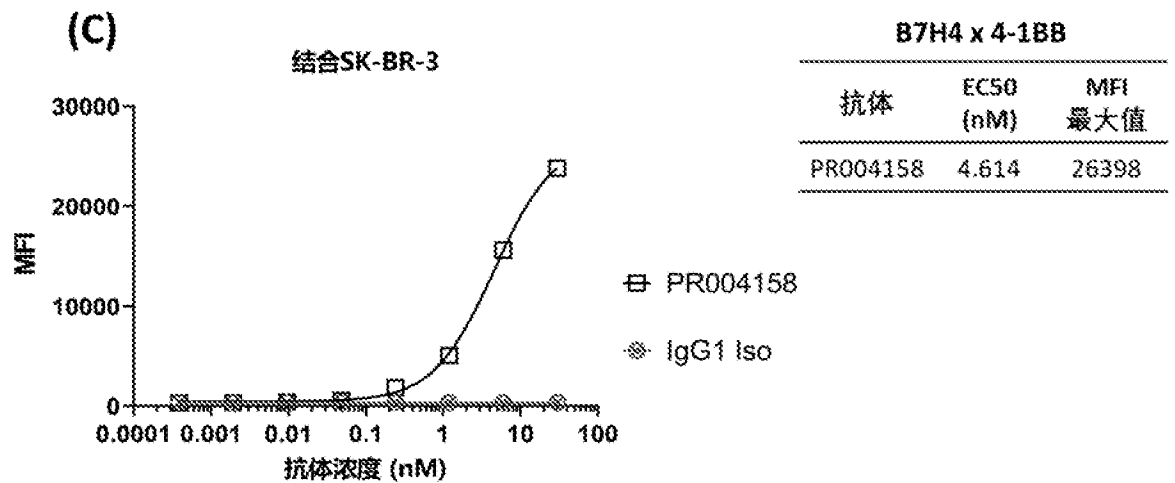
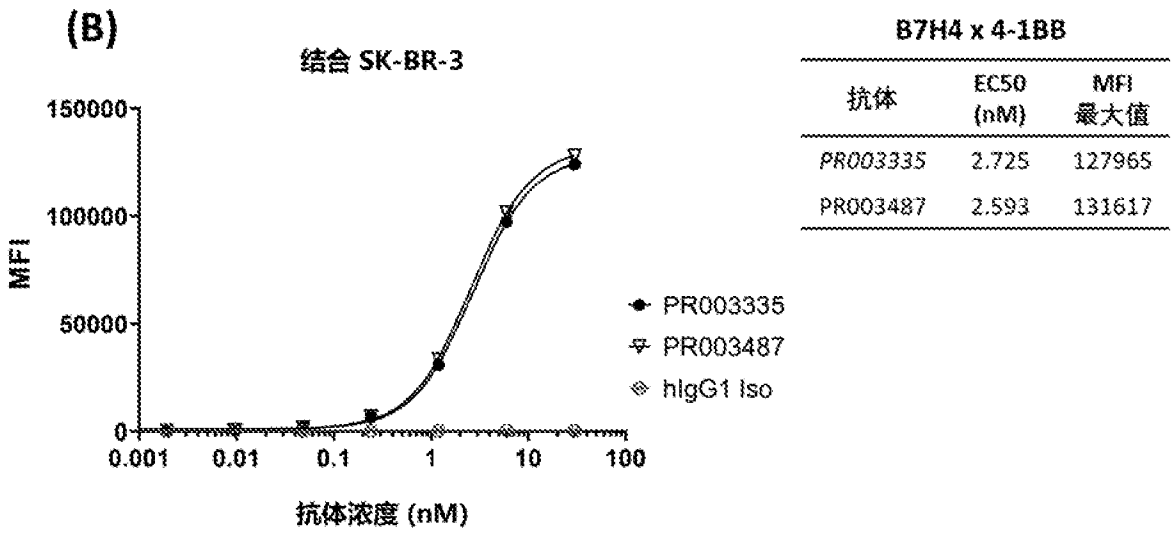
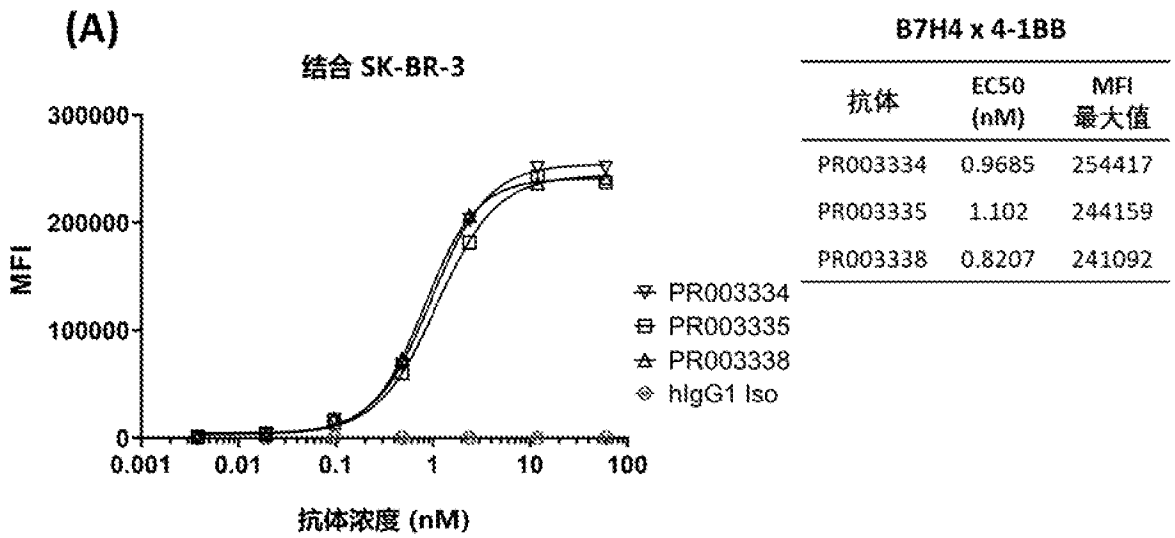


图 11



(接下页)

(续上页)

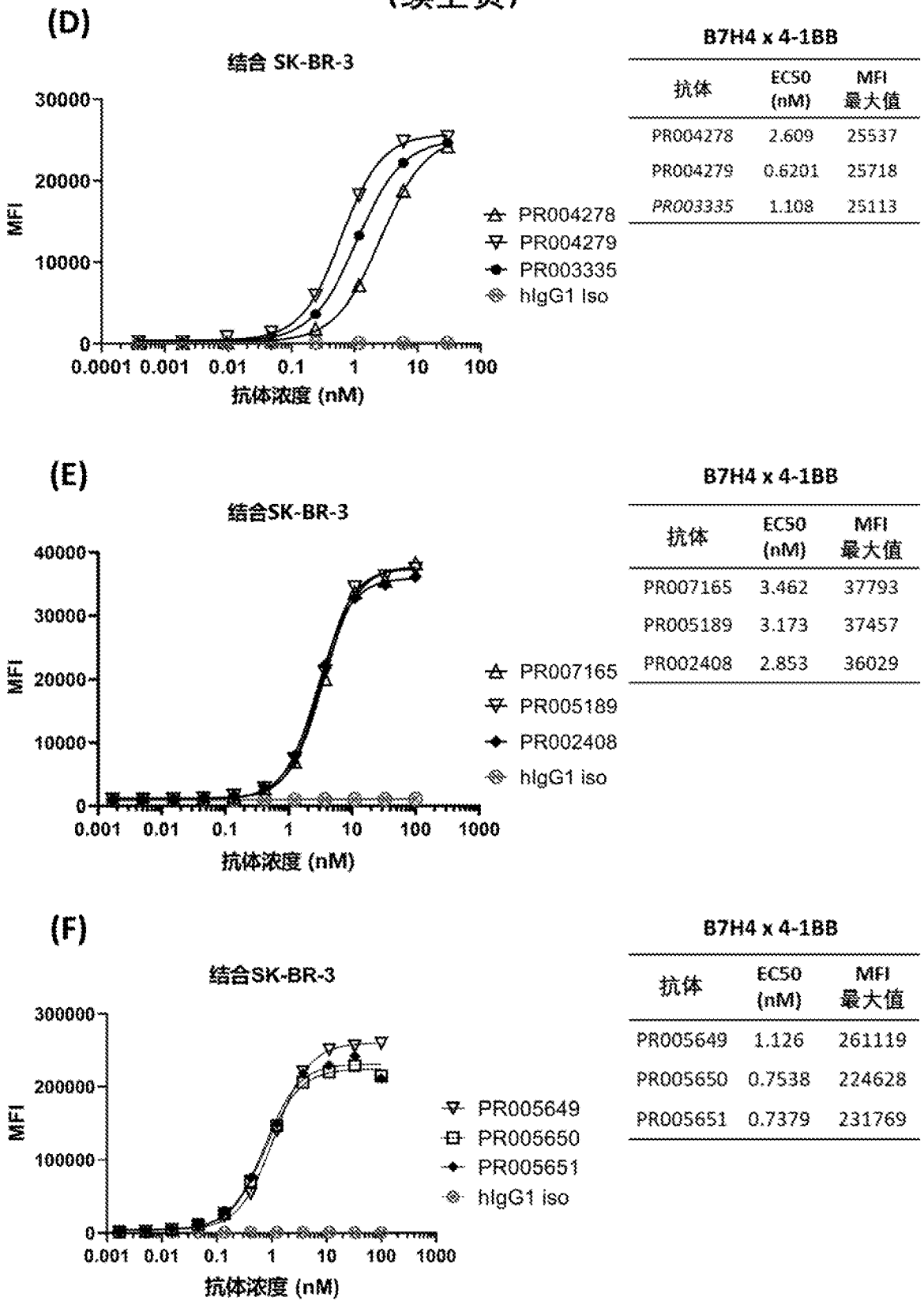


图 12

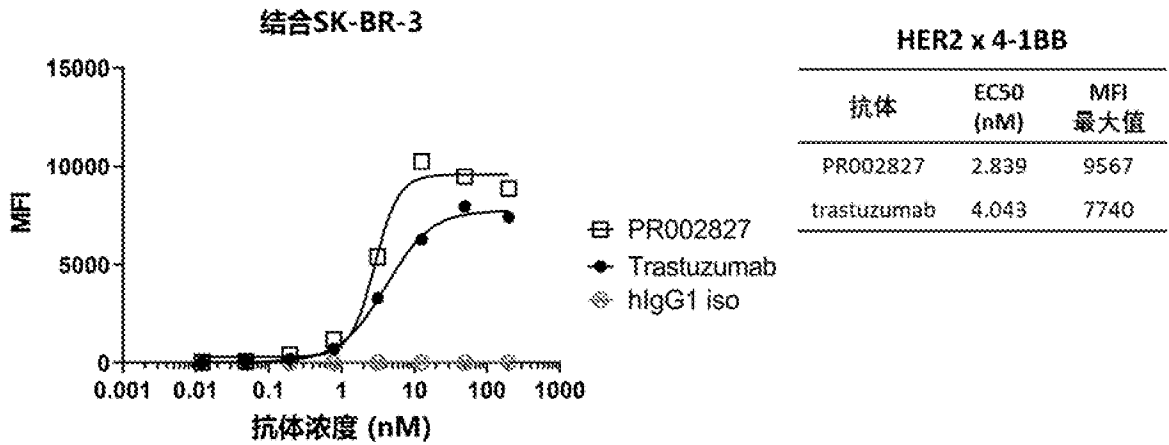


图 13

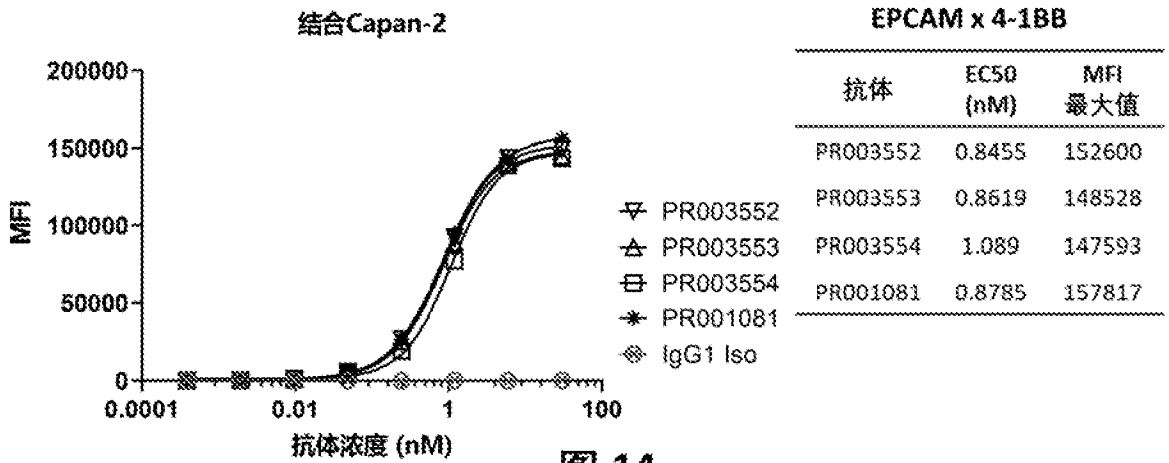


图 14

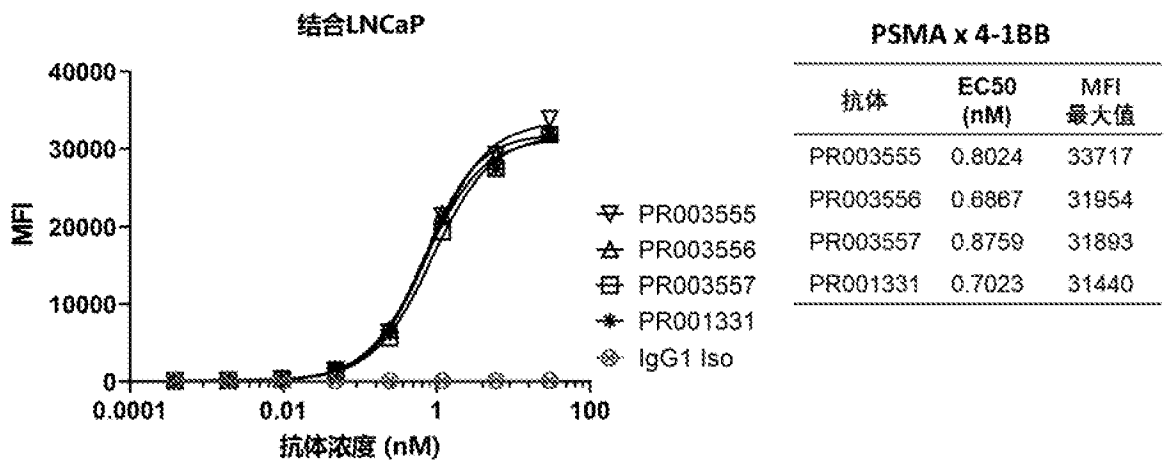


图 15

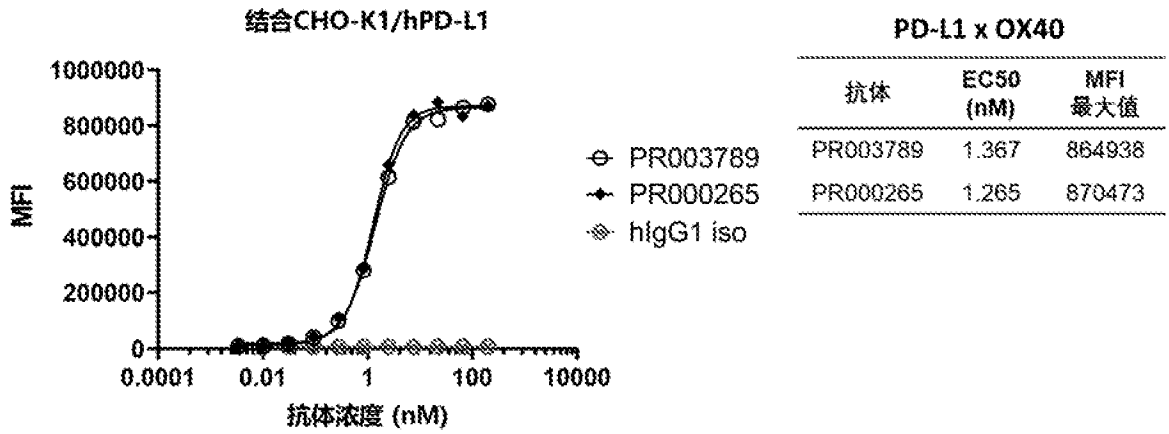


图 16

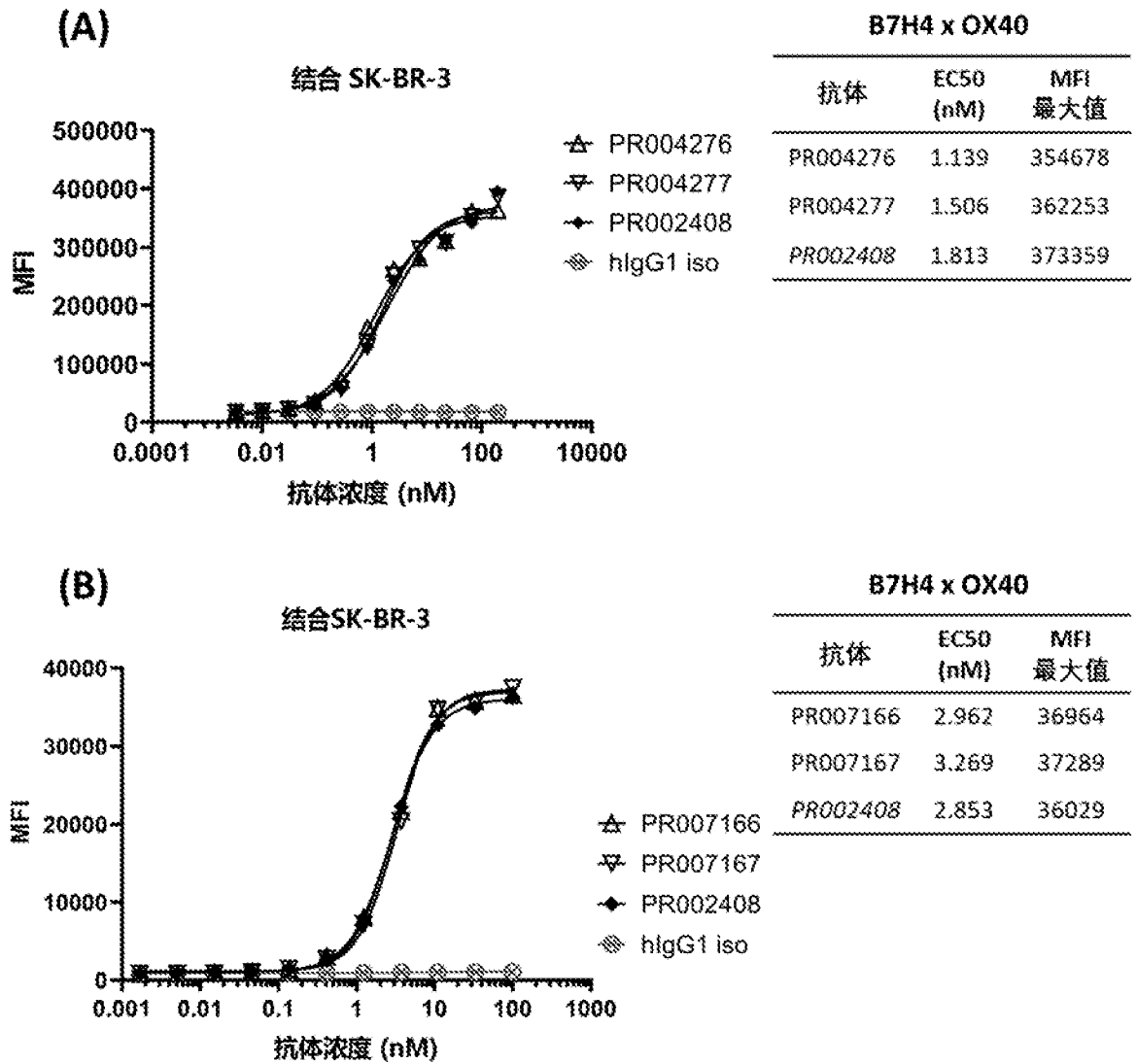


图 17

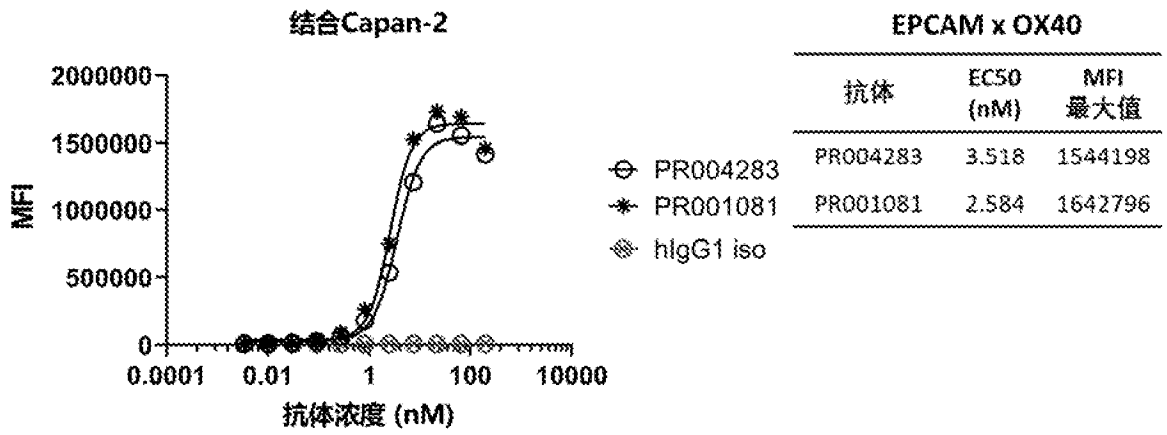


图 18

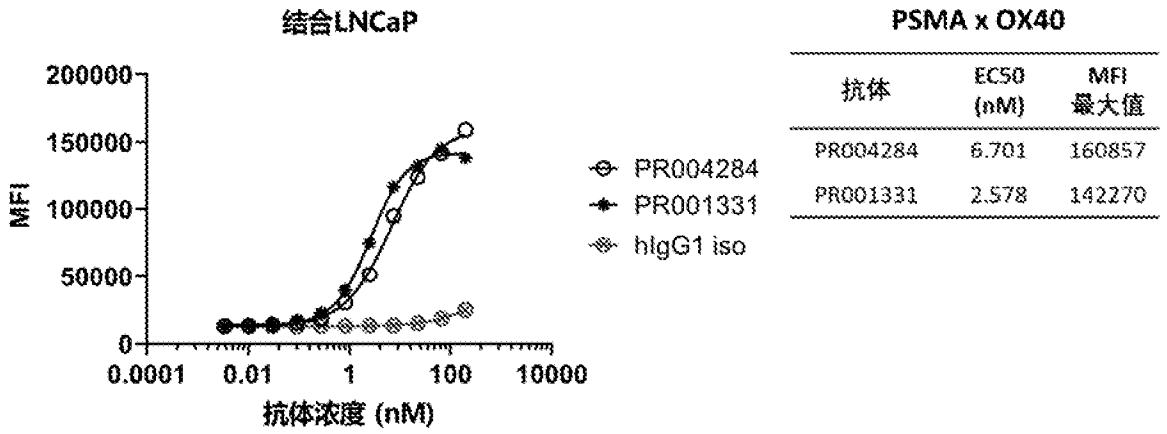


图 19

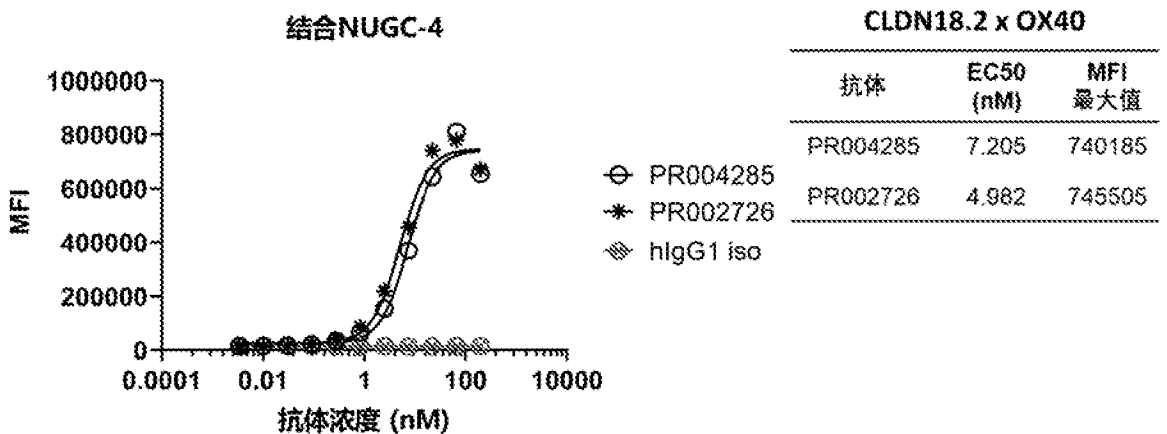


图 20

抗体	EC50 (nM)	IL-2 最大值
PR003562	0.7047	6787
PR003563	0.3847	7056
PR003564	1.075	8587

NUGC-4 + pan T, CLDN18.2 x 4-1BB

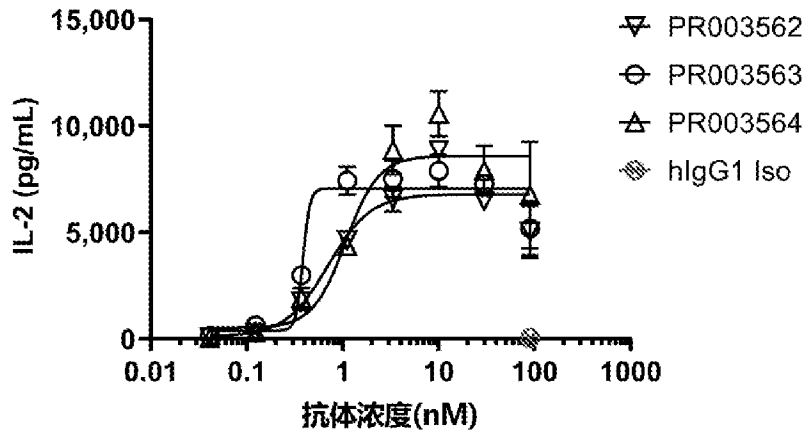


图 21

NUGC-4 + pan T, CLDN18.2 x OX40

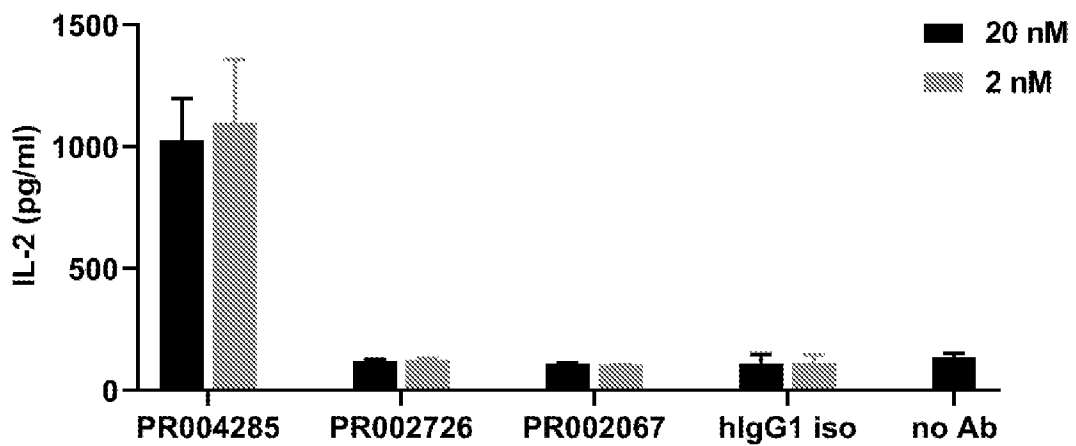


图 22

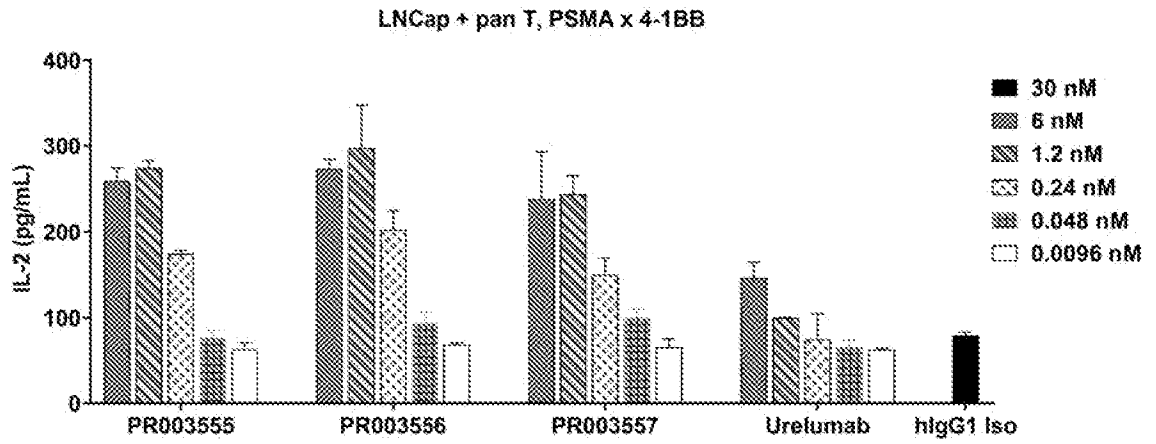


图 23

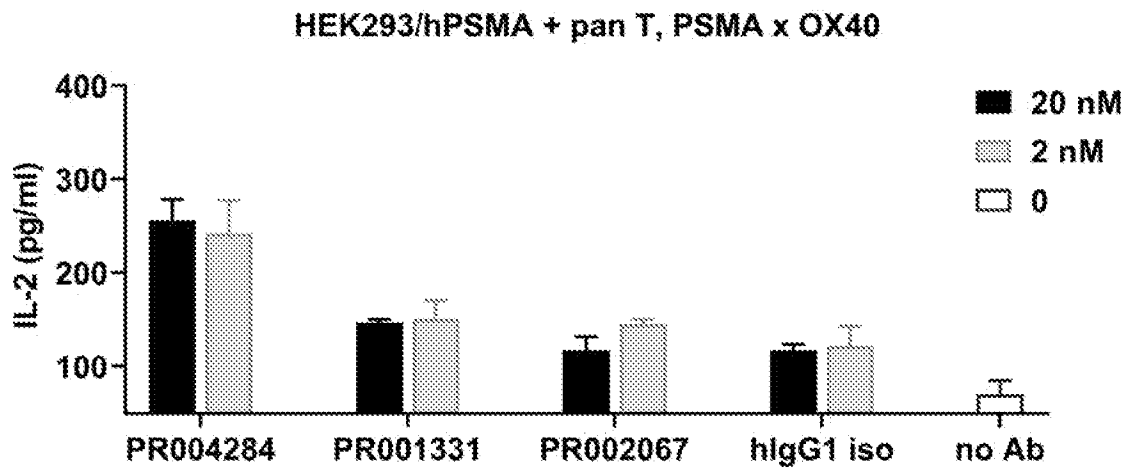


图 24

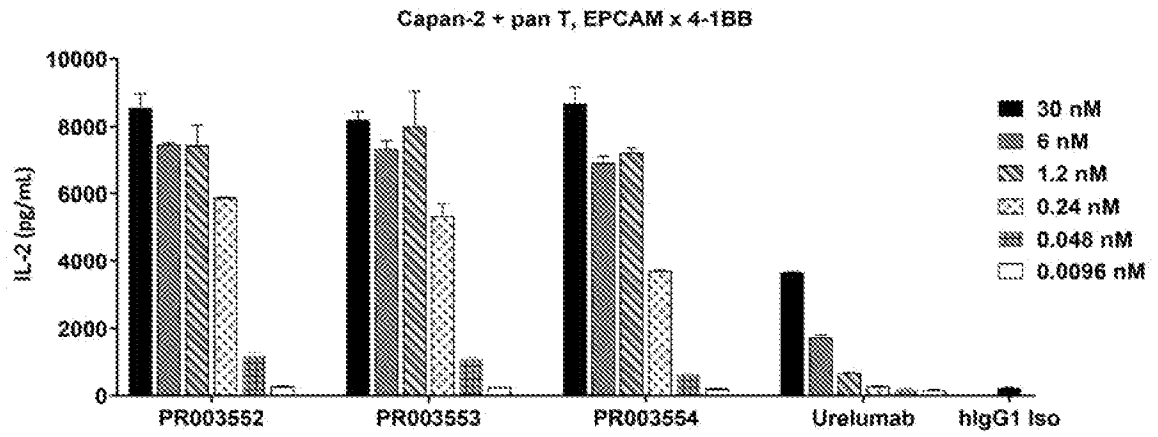


图 25

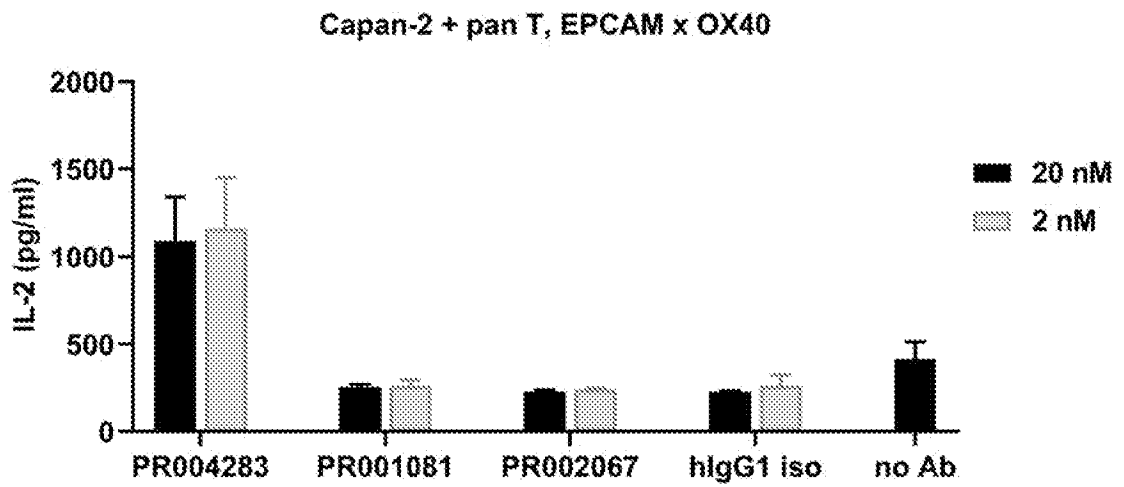
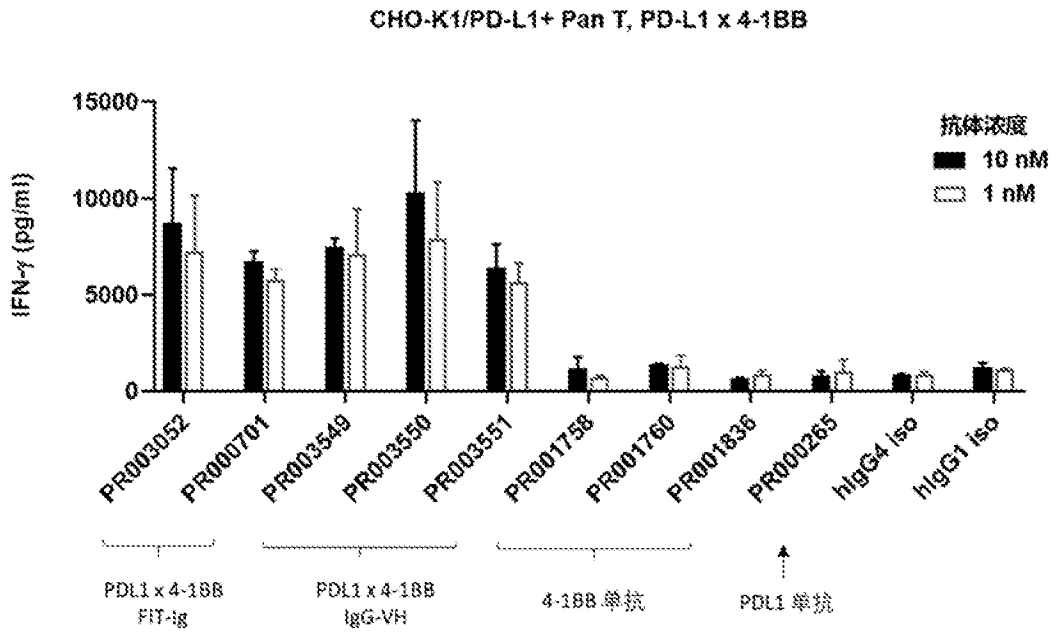


图 26

(A)



(B)

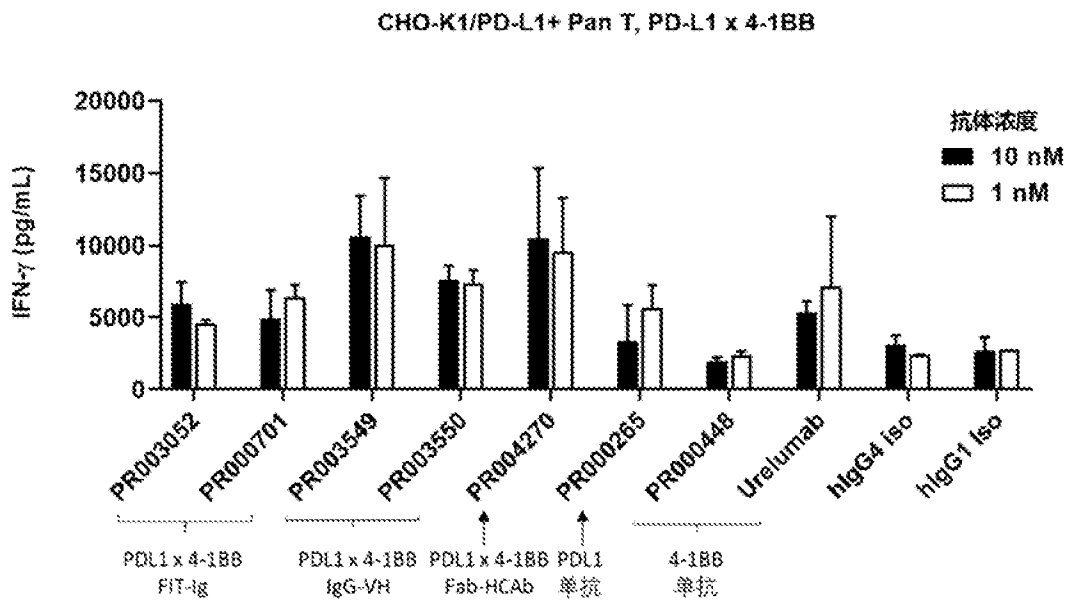


图 27

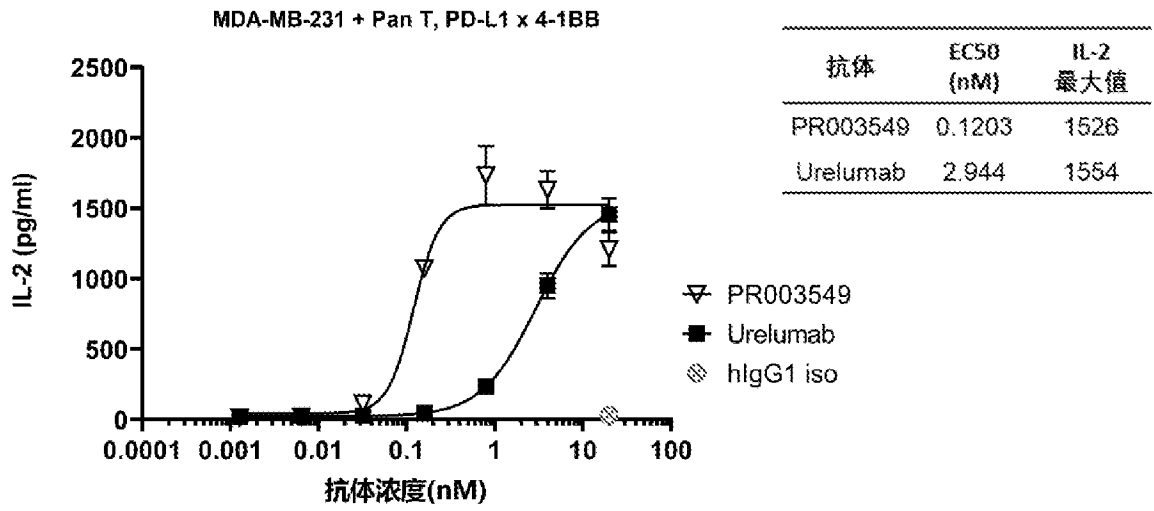


图 28

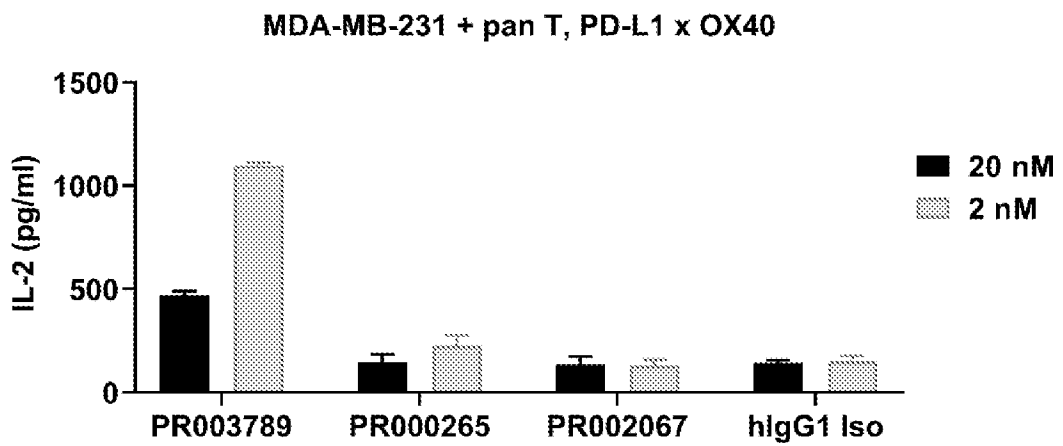


图 29

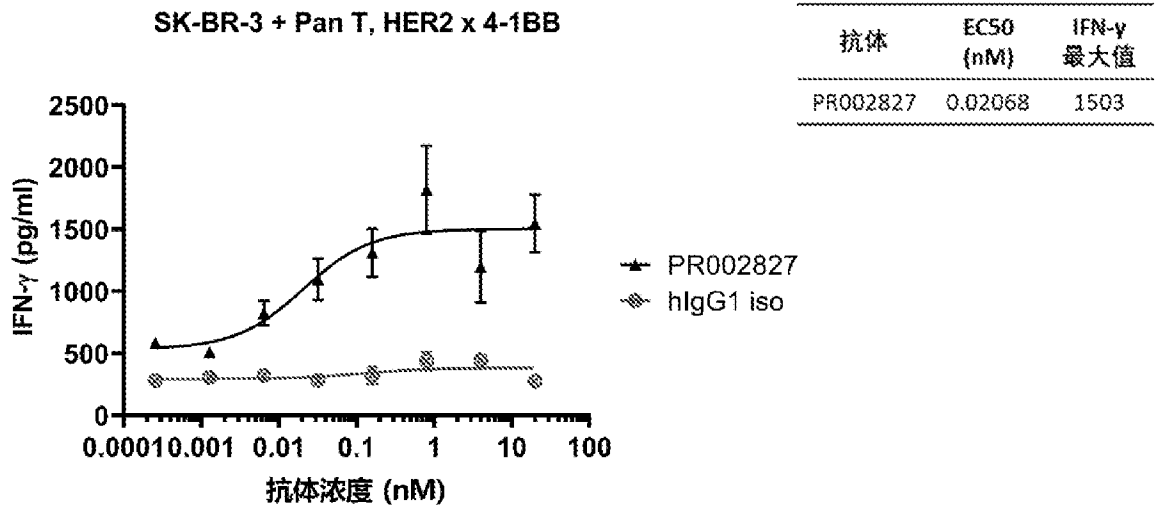


图 30

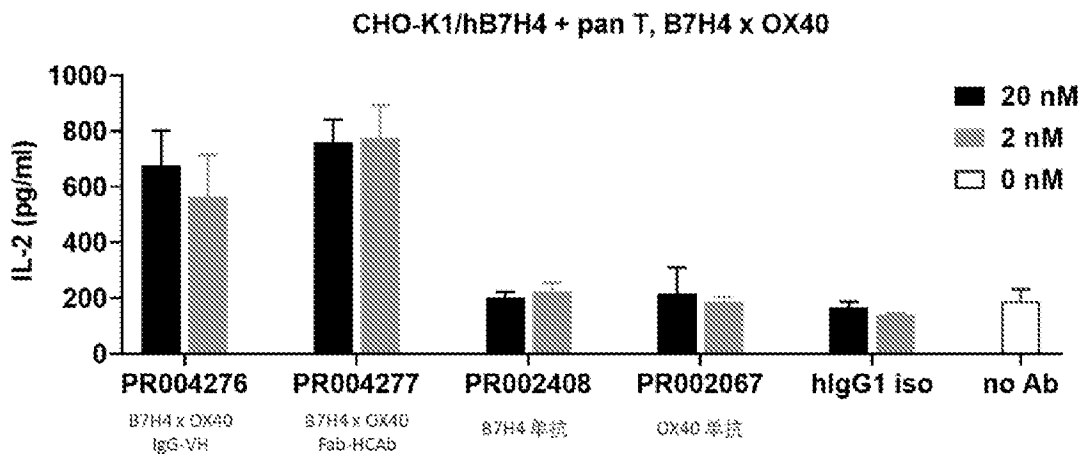
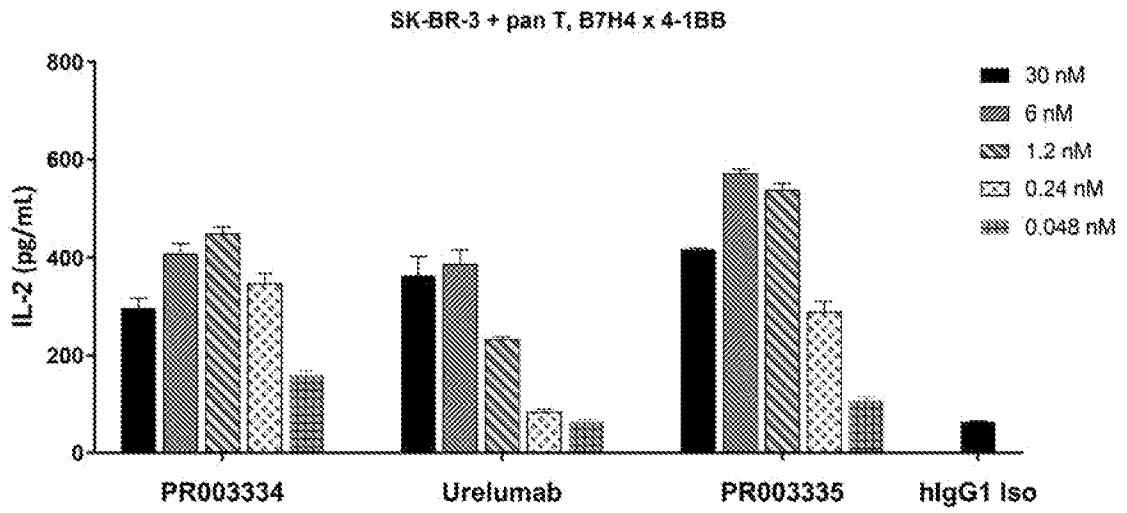
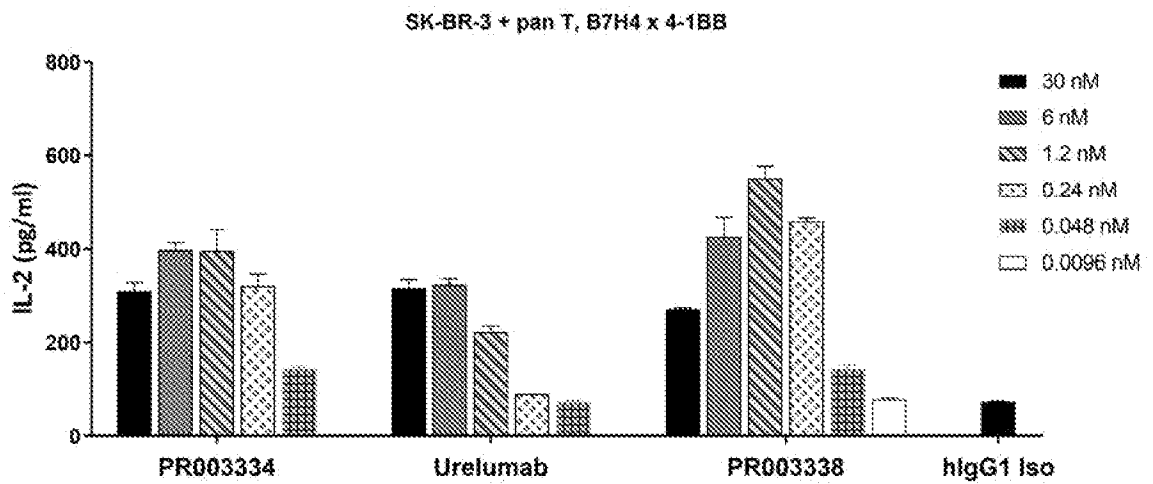


图 31

(A)



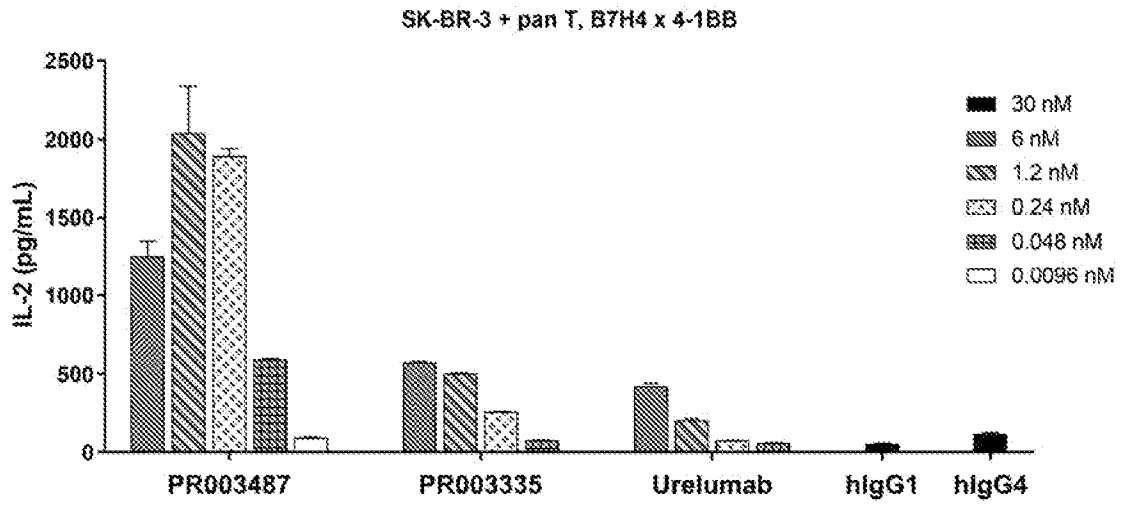
(B)



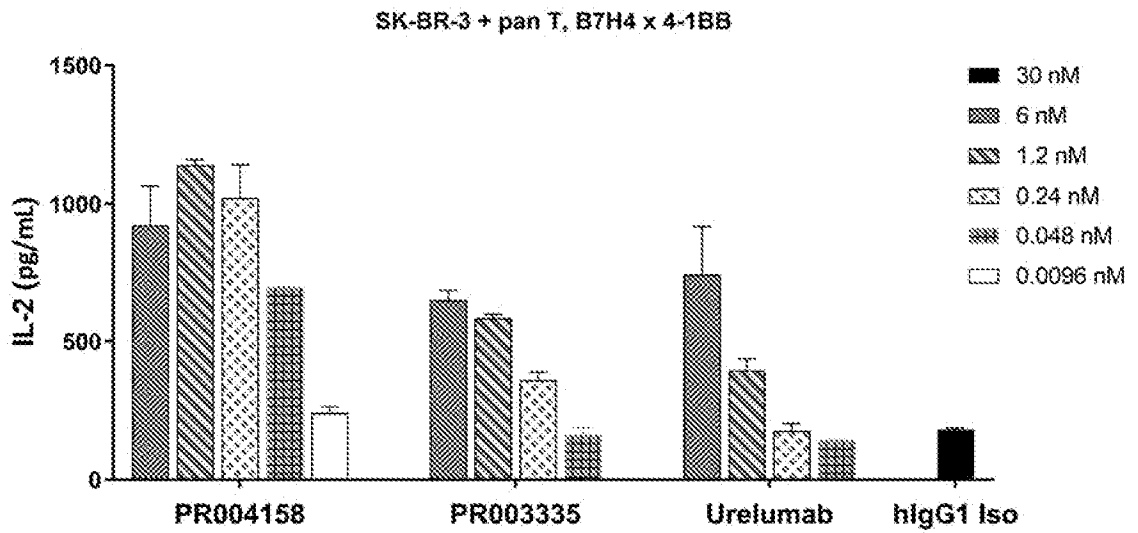
(接下页)

(续上页)

(C)



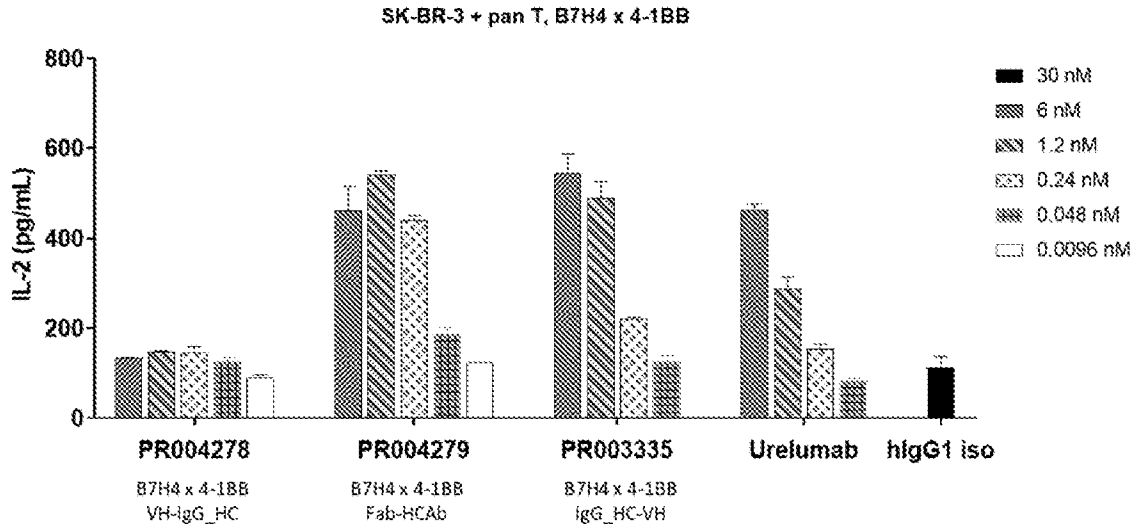
(D)



(接下页)

(续上页)

(E)



(F)

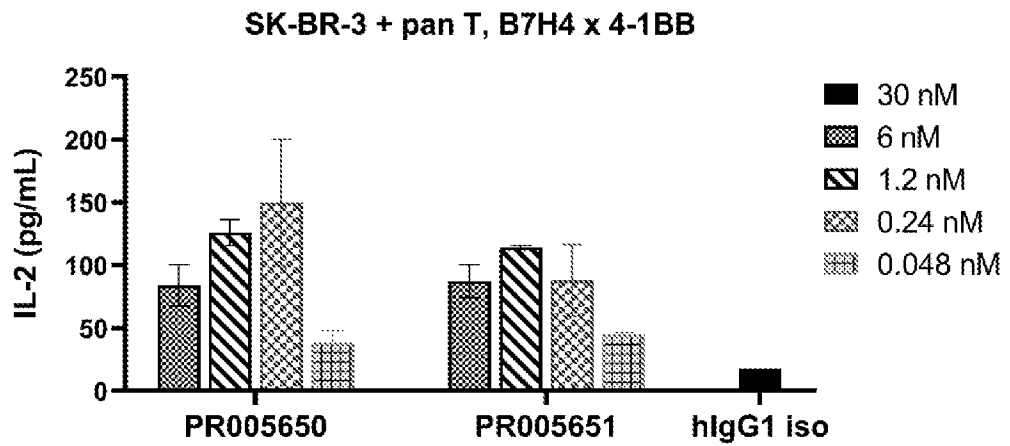
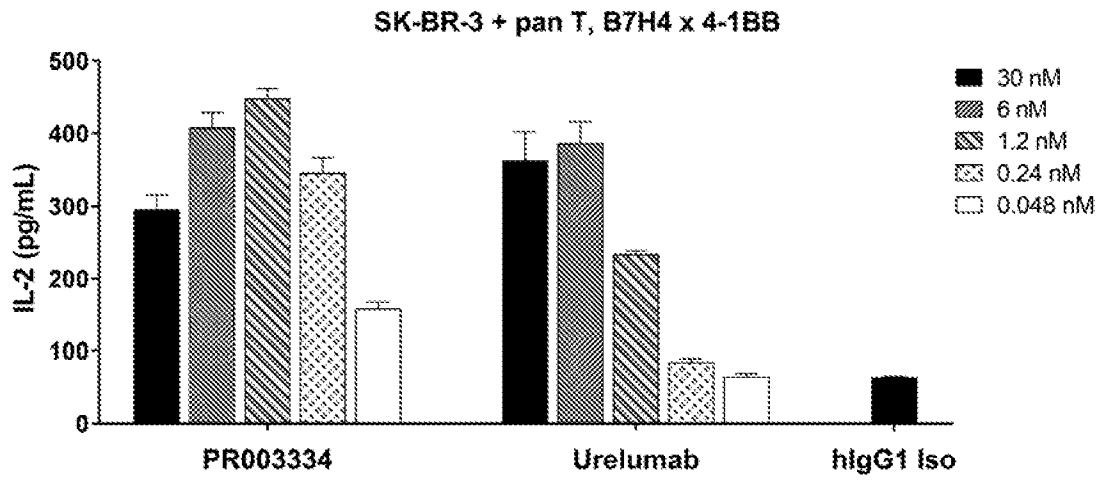


图 32

(A)



(B)

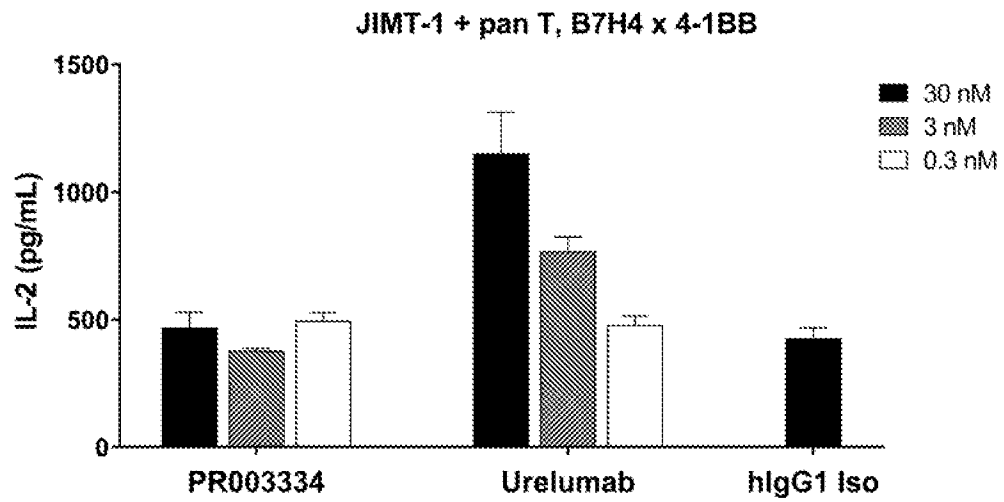
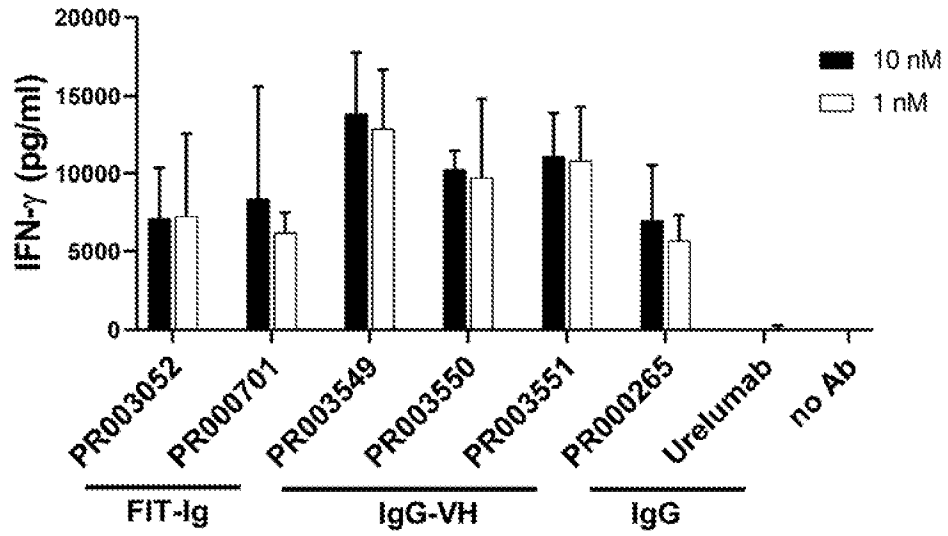
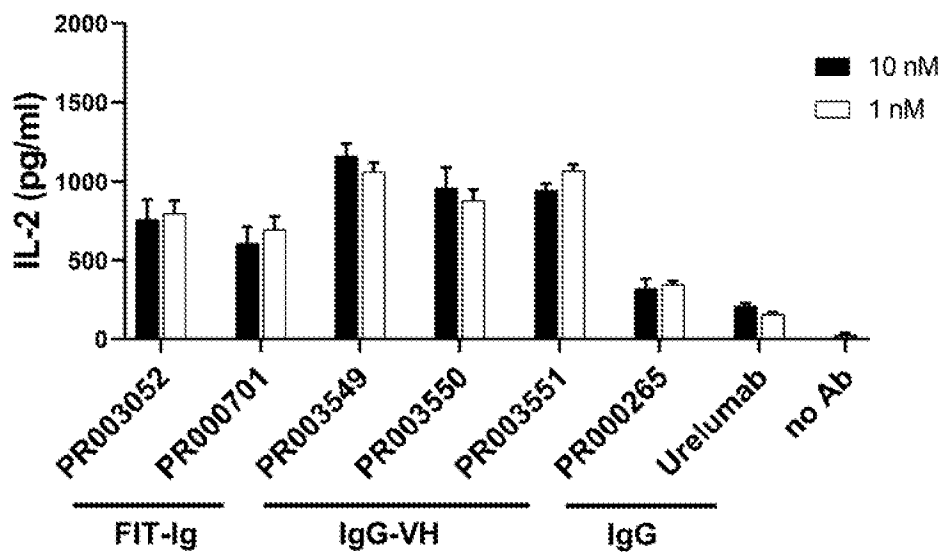


图 33

(A)



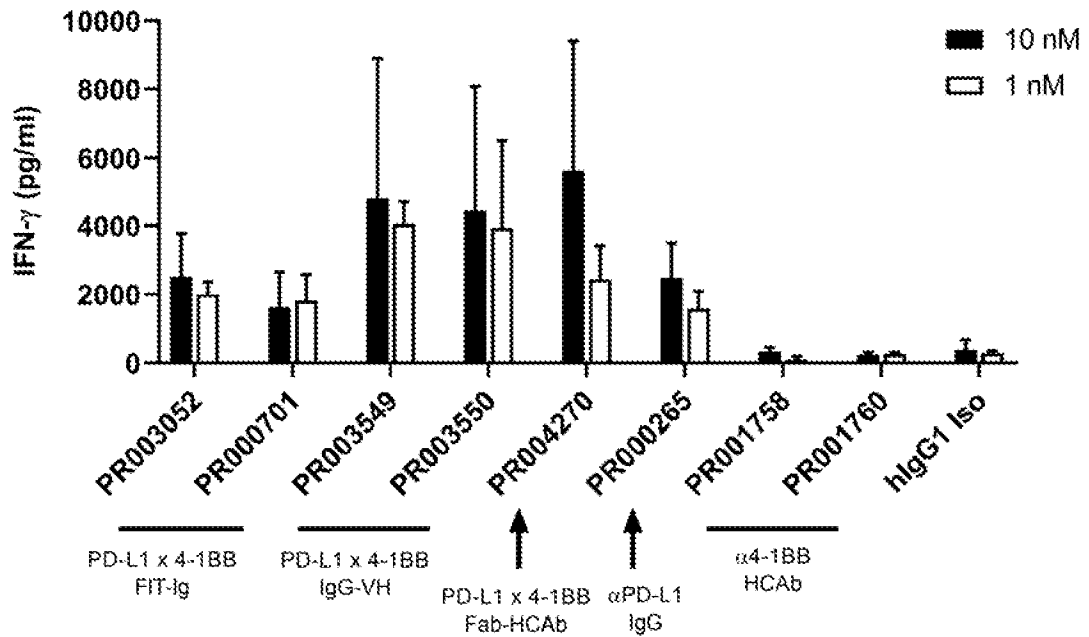
(B)



(接下页)

(续上页)

(C)



(D)

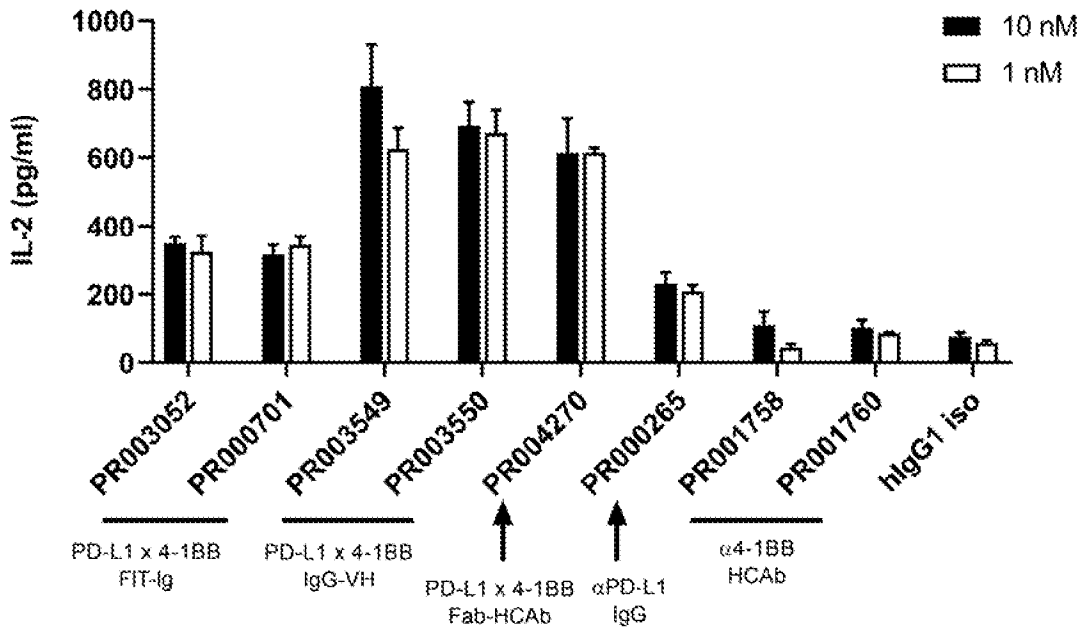


图 34

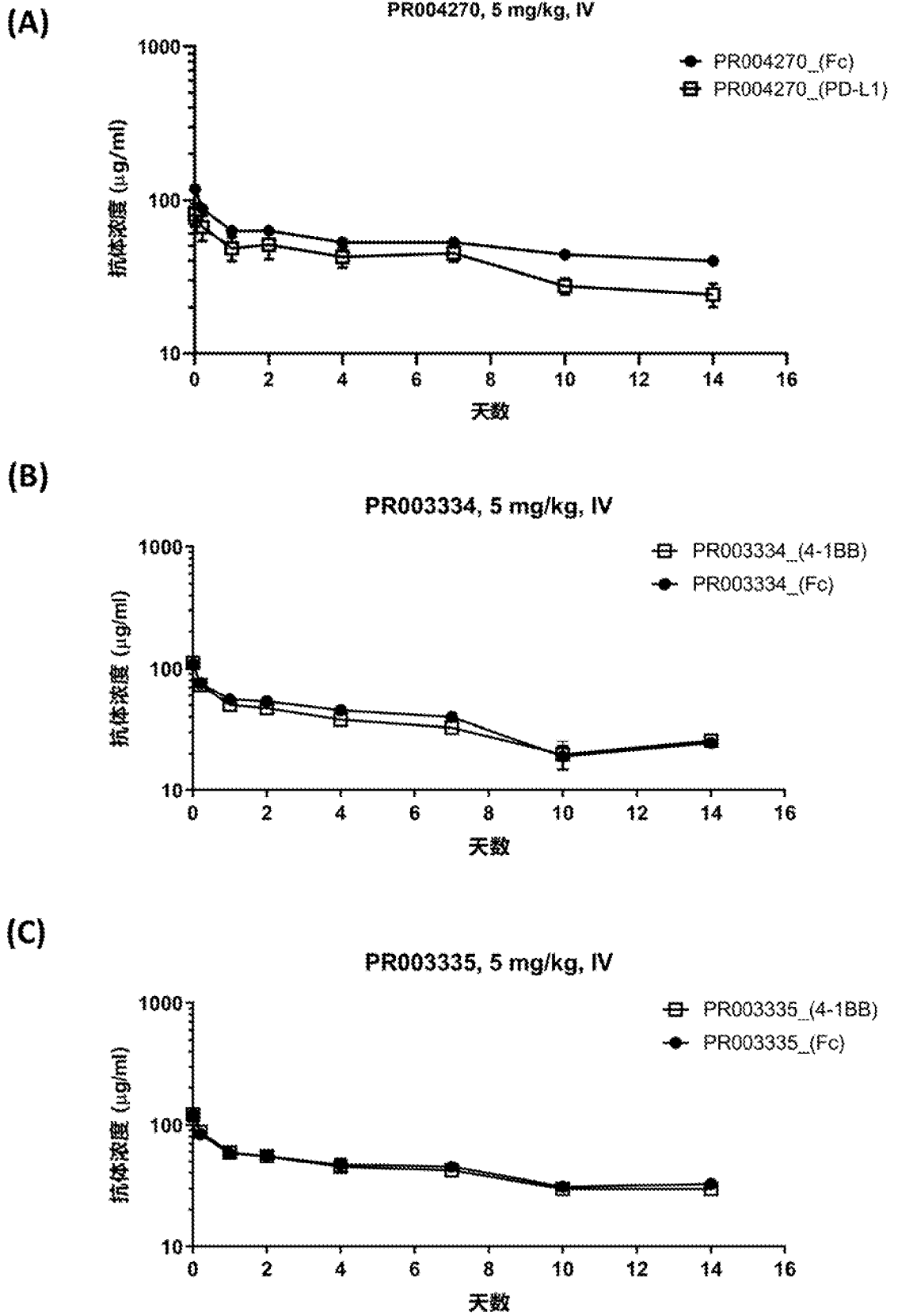
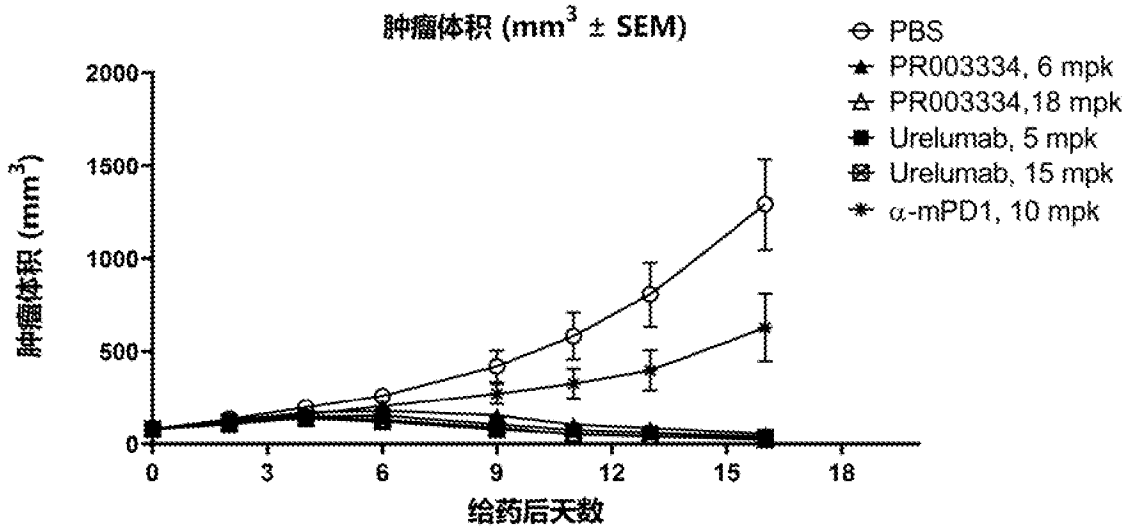


图 35

(A)



(B)

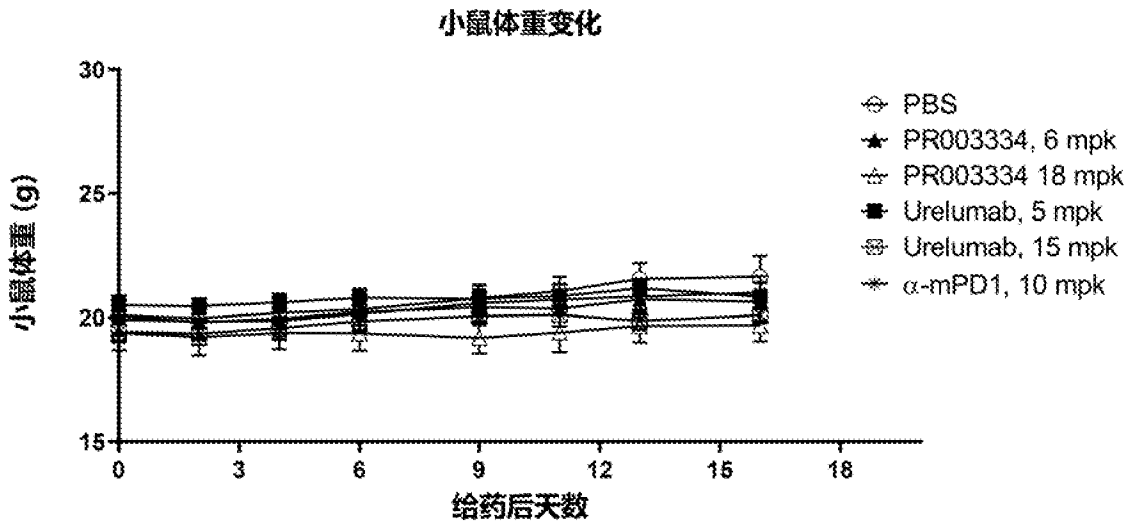


图 36

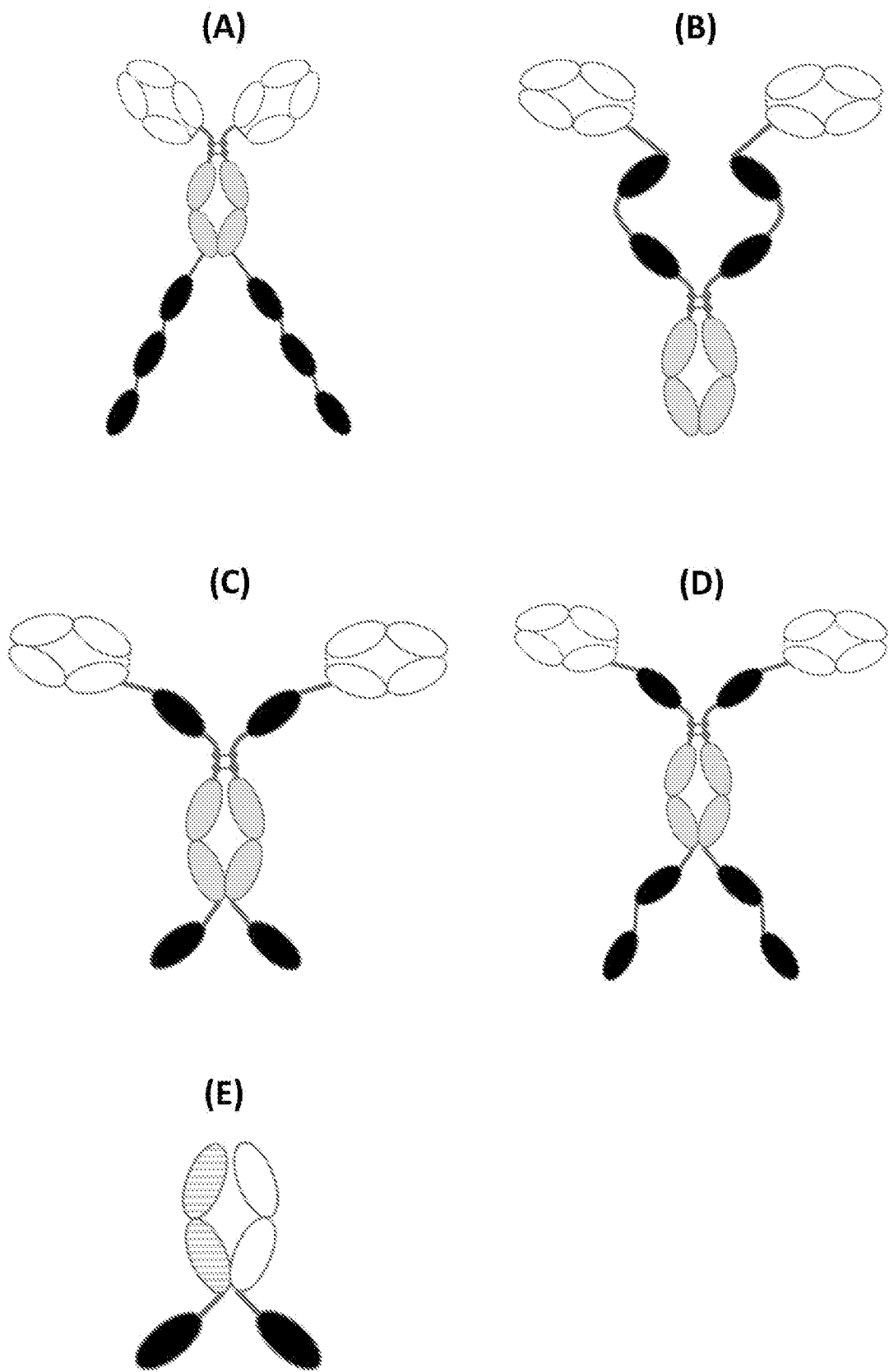
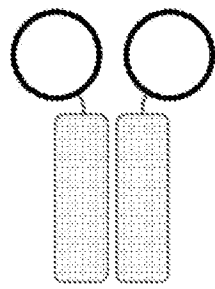
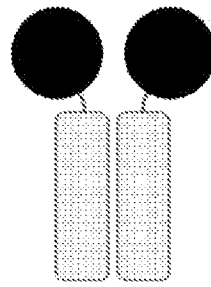


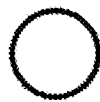
图 37



靶向抗体



激活抗体



结合靶细胞（如肿瘤细胞）的抗原结合片段
（靶向域，targeting moiety）

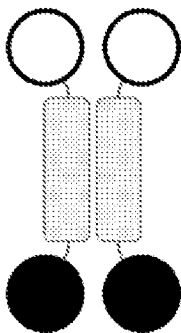


结合免疫效应细胞的抗原结合片段
（效应域，effector moiety）

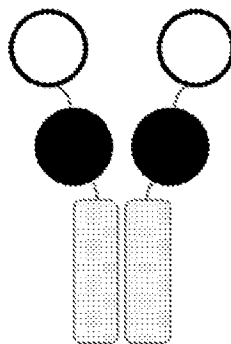


抗体 Fc 片段

模式一



模式二



模式三

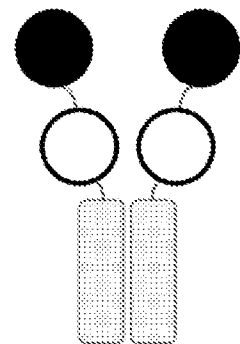


图 38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/103065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) VEN, CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 百度学术, Patents, 中国生物序列检索系统, NCBI Genbank, EBI, STN: applicant, inventor, 双特异性抗体, 多特异性抗体, 免疫细胞衔接器, bispecific antibody+, multispecific antibody+, multispecific immune cell engager, CD3, CLDN18.2, HER2, B7H4, EPCAM, PSMA, PD-L1, 4-1BB, OX40, sequences 181-211		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 111138544 A (ANYUAN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 12 May 2020 (2020-05-12) abstract, claims 1-2, and figure 1	1-5, 7-17
X	CN 111138545 A (ANYUAN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 12 May 2020 (2020-05-12) abstract, and claims 1-28	1-5, 7-17
X	CN 111138542 A (SHANDONG NEW TIME PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 12 May 2020 (2020-05-12) abstract, and claims 1-28	1-5, 7-17
X	WO 2016202457 A1 (NUMAB THERAPEUTICS AG) 22 December 2016 (2016-12-22) abstract, and claims 1-14	1-5, 7-17
X	WO 2020007240 A1 (CENTAURUS BIOPHARMA CO., LTD.) 09 January 2020 (2020-01-09) abstract, and claims 1-16	1-5, 7-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 15 September 2021		Date of mailing of the international search report 29 September 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/103065

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019184909 A1 (INNOVENT BIOLOGICS SUZHOU CO., LTD.) 03 October 2019 (2019-10-03) abstract, and claims 1-24	1-5, 7-17
A	NESSPOR, T.C. et al. "High-Throughput Generation of Bipod (Fab × scFv) Bispecific Antibodies Exploits Differential Chain Expression and Affinity Capture" <i>SCIENTIFIC REPORTS</i> , Vol. 10, 05 May 2020 (2020-05-05), article no. 7557	1-17

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claim 17 relates to methods for diagnosing and treating diseases, and thus the International Search Authority is not required to search under PCT Rule 39.1(iv). A search has been performed on the basis of the subject matter of the claims amended to be the corresponding uses in a drug preparation.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/103065

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111138544	A	12 May 2020	CN	111138545	A	12 May 2020
				WO	2020088605	A1	07 May 2020
				WO	2020088164	A1	07 May 2020
				CA	3118397	A1	07 May 2020
				WO	2020088437	A1	07 May 2020
				WO	2020088403	A1	07 May 2020
				CN	111138546	A	12 May 2020
				CA	3118238	A1	07 May 2020
				WO	2020088608	A1	07 May 2020
				CN	111138542	A	12 May 2020
				CN	111138547	A	12 May 2020
<hr/>							
CN	111138545	A	12 May 2020	WO	2020088605	A1	07 May 2020
				WO	2020088164	A1	07 May 2020
				CA	3118397	A1	07 May 2020
				WO	2020088437	A1	07 May 2020
				WO	2020088403	A1	07 May 2020
				CN	111138546	A	12 May 2020
				CN	111138544	A	12 May 2020
				CA	3118238	A1	07 May 2020
				WO	2020088608	A1	07 May 2020
				CN	111138542	A	12 May 2020
				CN	111138547	A	12 May 2020
<hr/>							
CN	111138542	A	12 May 2020	CN	111138545	A	12 May 2020
				WO	2020088605	A1	07 May 2020
				WO	2020088164	A1	07 May 2020
				CA	3118397	A1	07 May 2020
				WO	2020088437	A1	07 May 2020
				WO	2020088403	A1	07 May 2020
				CN	111138546	A	12 May 2020
				CN	111138544	A	12 May 2020
				CA	3118238	A1	07 May 2020
				WO	2020088608	A1	07 May 2020
				CN	111138542	A	12 May 2020
				CN	111138547	A	12 May 2020
<hr/>							
WO	2016202457	A1	22 December 2016	KR	20180012860	A	06 February 2018
				JP	6839101	B2	03 March 2021
				AU	2016278586	A1	04 January 2018
				CN	107922486	A	17 April 2018
				EP	3307776	A1	18 April 2018
				EA	201890041	A1	31 July 2018
				JP	2018522545	A	16 August 2018
				HK	1245805	A1	31 August 2018
				WO	2016202457	A8	30 November 2017
				US	2018355024	A1	13 December 2018
				MX	2017016188	A	06 July 2018
				IL	256314	D0	28 February 2018
				CA	2989474	A1	22 December 2016
<hr/>							
WO	2020007240	A1	09 January 2020	CN	110669135	A	10 January 2020
				CN	111902428	A	06 November 2020
				EP	3819313	A1	12 May 2021
<hr/>							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/103065

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019184909	A1	03 October 2019	CN	110305210	A	08 October 2019
				EP	3778648	A	17 February 2021
					TW201946655	A	16 December 2019

A. 主题的分类		
C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K; C12N; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
VEN, CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 百度学术, Patents, 中国生物序列检索系统, NCBI Genbank, EBI, STN: 申请人, 发明人, 双特异性抗体, 多特异性抗体, 免疫细胞衔接器, bispecific antibody, multispecific antibody, multispecific immune cell engager, CD3, CLDN18.2, HER2, B7H4, EPCAM, PSMA, PD-L1, 4-1BB, OX40, 序列181-211		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 111138544 A (安源医药科技上海有限公司) 2020年 5月 12日 (2020 - 05 - 12) 摘要, 权利要求1-2, 图1	1-5, 7-17
X	CN 111138545 A (安源医药科技上海有限公司) 2020年 5月 12日 (2020 - 05 - 12) 摘要, 权利要求1-28	1-5, 7-17
X	CN 111138542 A (山东新时代药业有限公司) 2020年 5月 12日 (2020 - 05 - 12) 摘要, 权利要求1-28	1-5, 7-17
X	WO 2016202457 A1 (NUMAB AG) 2016年 12月 22日 (2016 - 12 - 22) 摘要, 权利要求1-14	1-5, 7-17
X	WO 2020007240 A1 (L&L BIOPHARMA CO., LTD.) 2020年 1月 9日 (2020 - 01 - 09) 摘要, 权利要求1-16	1-5, 7-17
X	WO 2019184909 A1 (INNOVENT BIOLOGICS SUZHOU CO., LTD.) 2019年 10月 3日 (2019 - 10 - 03) 摘要, 权利要求1-24	1-5, 7-17
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2021年 9月 15日		2021年 9月 29日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中国 国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		奚静
传真号 (86-10)62019451		电话号码 86-(10)-53961974

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	NESSPOR, T.C. 等. "High-Throughput Generation of Bipod (Fab × scFv) Bispecific Antibodies Exploits Differential Chain Expression and Affinity Capture" SCIENTIFIC REPORTS, 第10卷, 2020年 5月 5日 (2020 - 05 - 05), 第7557篇	1-17

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求: 17
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
[1] 权利要求17的主题涉及疾病的诊断治疗方法, 属于PCT实施细则39.1(iv)规定的国际检索单位无须检索的情形。基于其修改为相应制药用途主题进行了检索。
2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
3. 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/103065

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111138544	A	2020年 5月 12日	CN	111138545	A	2020年 5月 12日
				WO	2020088605	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088164	A1	2020年 5月 7日
				CA	3118397	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088437	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088403	A1	2020年 5月 7日
				CN	111138546	A	2020年 5月 12日
				CA	3118238	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088608	A1	2020年 5月 7日
				CN	111138542	A	2020年 5月 12日
				CN	111138547	A	2020年 5月 12日

CN	111138545	A	2020年 5月 12日	WO	2020088605	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088164	A1	2020年 5月 7日
				CA	3118397	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088437	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088403	A1	2020年 5月 7日
				CN	111138546	A	2020年 5月 12日
				CN	111138544	A	2020年 5月 12日
				CA	3118238	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088608	A1	2020年 5月 7日
				CN	111138542	A	2020年 5月 12日
				CN	111138547	A	2020年 5月 12日

CN	111138542	A	2020年 5月 12日	CN	111138545	A	2020年 5月 12日
				WO	2020088605	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088164	A1	2020年 5月 7日
				CA	3118397	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088437	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088403	A1	2020年 5月 7日
				CN	111138546	A	2020年 5月 12日
				CN	111138544	A	2020年 5月 12日
				CA	3118238	A1	2020年 5月 7日
				WO	2020088608	A1	2020年 5月 7日
				CN	111138542	A	2020年 5月 12日
				CN	111138547	A	2020年 5月 12日

WO	2016202457	A1	2016年 12月 22日	KR	20180012860	A	2018年 2月 6日
				JP	6839101	B2	2021年 3月 3日
				AU	2016278586	A1	2018年 1月 4日
				CN	107922486	A	2018年 4月 17日
				EP	3307776	A1	2018年 4月 18日
				EA	201890041	A1	2018年 7月 31日
				JP	2018522545	A	2018年 8月 16日
				HK	1245805	A1	2018年 8月 31日
				WO	2016202457	A8	2017年 11月 30日
				US	2018355024	A1	2018年 12月 13日
				MX	2017016188	A	2018年 7月 6日
				IL	256314	D0	2018年 2月 28日
				CA	2989474	A1	2016年 12月 22日

WO	2020007240	A1	2020年 1月 9日	CN	110669135	A	2020年 1月 10日
				CN	111902428	A	2020年 11月 6日
				EP	3819313	A1	2021年 5月 12日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/103065

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2019184909	A1	2019年 10月 3日	CN	110305210	A	2019年 10月 8日
				EP	3778648	A	2021年 2月 17日
					TW201946655	A	2019年 12月 16日
