(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
2019 年 7 月 4 日 (04.07.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/129054 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 37/02* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/123886

(22) 国际申请日: 2018 年 12 月 26 日 (26.12.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201711448490.1 2017年12月27日 (27.12.2017) CN
201811525053.X 2018年12月13日 (13.12.2018) CN

(71) 申请人: 信达生物制药（苏州）有限公司 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 缪小牛 (MIAO, Xiaoniu); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 匡智慧 (KUANG, Zhihui); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 胡化静 (HU, Huajing); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 倪海晴 (NI, Haiqing); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 刘军建 (LIU, Junjian); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所 (ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (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,

(54) **Title:** TRIABODY, PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 三链抗体、其制备方法及其用途

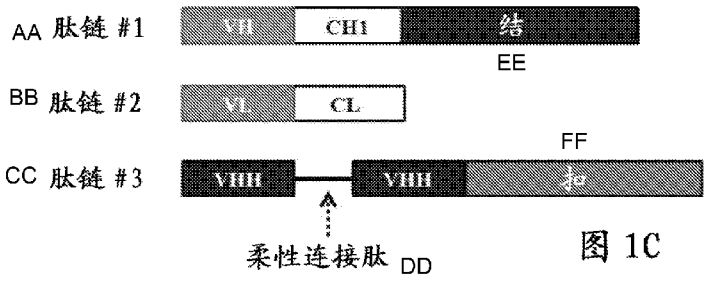


图 1C

AA PEPTIDE CHAIN #1
BB PEPTIDE CHAIN #2
CC PEPTIDE CHAIN #3
DD FLEXIBLE LINKER
EE KNOT
FF BUCKLE

(57) **Abstract:** Provided is a novel and artificially designed triabody comprising three polypeptide chains, wherein the first polypeptide chain comprises a first heavy chain variable domain, the second polypeptide chain comprises a first light chain variable domain, the first heavy chain variable domain is paired with the first light chain variable domain to form a first antigen binding site; and the third polypeptide chain comprises a second single domain antigen binding site and a third single domain antigen binding site. Provided are also a polynucleotide encoding the triabody, a vector comprising the polynucleotide, host cells comprising the polynucleotide or the vector, an immunoconjugate comprising the triabody, a pharmaceutical composition comprising the triabody or the immunoconjugate thereof, and use of the triabody in immunotherapy, prevention and/or diagnosis of a disease.

WO 2019/129054 A1

[见续页]

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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, 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)。

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))。

(57) 摘要：本发明提供了一种新型的经人工设计的包含三条多肽链的三链抗体，其中第一多肽链包含第一重链可变结构域，第二多肽链包含第一轻链可变结构域，所述第一重链可变结构域与第一轻链可变结构域配对形成第一抗原结合位点；且第三多肽链包含单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点。本发明还提供了编码所述三链抗体的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、包含所述多核苷酸或载体的宿主细胞、包含所述三链抗体的免疫缀合物和包含所述三链抗体或其免疫缀合物的药物组合物、以及所述三链抗体在疾病的免疫治疗、预防和/或诊断上的用途。

三链抗体、其制备方法及其用途

发明领域

本发明总体上涉及免疫学和抗体工程领域。具体而言，本发明涉及一种新型的经人工设计的三链抗体、编码所述三链抗体的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、包含所述多核苷酸或载体的宿主细胞、包含所述三链抗体的免疫缀合物和包含所述三链抗体或其免疫缀合物的药物组合物、以及所述三链抗体在疾病的免疫治疗、预防和/或诊断上的用途。

发明背景

抗体分子能够与其相应的抗原发生靶向性的特异性结合，正日益成为针对各种疾病（例如，癌症、自身免疫病、炎性疾病、感染性疾病等）的重要的治疗剂、预防剂和/或诊断剂。但是，仅针对一种靶点的单特异性抗体在临床应用上存在一些局限性。患者在接受单特异性抗体治疗后可能产生耐药性或无应答。随着对癌症和其他多种疾病的研究，认识到了往往有多种信号转导通路参与疾病的发生和发展，单一靶点的免疫疗法在许多疾病中通常并不足以发挥对疾病的治疗作用。

由于多特异性抗体（例如，双特异性抗体）能够特异性结合不同抗原，当一种抗原位于特定的免疫细胞上，另一种抗原位于疾病细胞上时，多特异性抗体（例如，双特异性抗体）可以将特定的免疫细胞重新定向至疾病细胞，以增强免疫细胞对疾病细胞的杀伤力。另外，多特异性抗体（例如，双特异性抗体）也能够设计为同时作用于两种或多种不同介质的信号转导通路。这些优势特性为多特异性抗体（例如，双特异性抗体）开辟了广阔的应用前景。

已经通过抗体工程开发了若干多特异性抗体（例如，双特异性抗体）样式并且研究了它们在疾病应用上的适用性。目前，批准上市的2个双特异性抗体产品分别是Micromet公司和Amgen公司开发的Blinatumomab以及Trion Pharma公司开发的Catumaxomab。Blinatumomab是第1个在美国获批上市的用于治疗B细胞非霍奇金淋巴瘤（NHL）和B前体急性淋巴细胞白血病（ALL）的一种分子量约55KDa的单链双特异性抗体，由分别针对CD19分子和针对CD3分子的两种单链Fv分子通过柔性连接肽融合而成，其利用几乎在所有的B淋巴细胞肿瘤中都表达的CD19和在T细胞上表达的CD3，使T细胞与靶向细胞（肿瘤细胞）紧密联结在一起，T细胞释放穿孔素和粒端酶进入突触间隙，引起肿瘤细胞发生一系列化学反应，从而消灭肿瘤细胞（Nagorsen D.和Baeuerle P.A., Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab, Exp Cell Res, 2011, 317: 1255-1260）。Catumaxomab是由两个分别源自亲本小鼠IgG2a同种型和大鼠IgG2b同种型的半抗体组成的嵌合体，其中每个半抗体具有一条轻链和一条重链，抗CD3大鼠IgG2b半抗体用于T细胞识别，抗肿瘤细胞表面抗原EpCAM（上皮细胞黏附分子）的小鼠IgG2a半抗体用于肿瘤细胞识别（Chelius D等人，Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab, MAbs, 2010, 2: 309-319）。Catumaxomab（Removab®）于2009年4月在欧洲获准用于治疗由EpCAM阳性上皮源性转移瘤所引起的恶性腹水。

多特异性抗体（例如，双特异性抗体）根据不同的组成部分以及构建方式，可以分为许多种类。例如，根据多特异性抗体结构的左右对称性，可分为对称结构和不对称结构；根据多特异性抗体有无 IgG 的 Fc 区，分为完整抗体和抗体片段；根据多特异性抗体中抗原结合位点的数量分为二价、三价、四价或更多价的抗体等。

不同的多特异性抗体设计各有利弊，例如，虽然 Blinatumomab 可以通过重组中国仓鼠卵巢（CHO）细胞进行大规模培养生产，但是容易形成聚集物、在体内半衰期很短，实际使用的时候需要额外配备连续输液装置；Catumaxomab 生产工艺复杂且鼠异源抗体比较容易在人体产生免疫原性问题。此外，四链免疫球蛋白(Ig)样多特异性抗体中非相关重链和轻链的不想要配对导致无活性抗原结合位点和/或其他无功能的不想要的副产物的形成，这在抗体的临床规模生产和治疗性应用中也是一个问题(Klein, C.等人, Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies, mAbs, 2012, 4: 653-663)。理论上，两条重链能够按四种不同的组合方式缔合，并且这些重链中每一者均可以按随机方式与轻链缔合，产生 2^4(=总计 16)种可能的链组合。在这 16 种理论上可能的组合当中，实际上发现了 10 种组合，但其中仅一种组合对应于所需功能性的多特异性抗体。难以从复杂混合物分离出所需的一种多特异性抗体和理论上最大 12.5%的固有不良产率致使在细胞表达体系中产生四链 Ig 样多特异性抗体是困难的。

本发明的新型抗体样式克服了上述弊端。本发明提供了一种新的多特异性抗体样式，所述抗体样式因各条链之间的正确偶合或配对而以增加的产率容易地产生，易于在体外的培养细胞中表达，不需要复杂的生产工艺。此外，本发明的多特异性抗体样式能够保持该多特异性抗体中的各抗原结合位点与相应的不同表位结合的亲和力，且在结合不同表位的时候互相之间不会产生空间位阻的干扰，具有好的成药性。进一步地，本发明的多特异性抗体样式是物理稳定的和生物学稳定的，这允许该抗体具有更好的生产性和可发展性。

发明概述

本文公开了通过抗体工程方法构建的一种新型的包含三条多肽链的三链抗体。所述三链抗体能够以高亲和力和高特异性与一种或多种抗原结合，优选地，与两种以上的抗原结合。本发明还提供了编码所述三链抗体的核酸分子、用于产生所述三链抗体的表达载体、宿主细胞和方法。本发明还提供了包含本发明的所述三链抗体的免疫缀合物和包含所述三链抗体或其免疫缀合物的药物组合物。本文公开的三链抗体可以单独或与其他药物或其他治疗模式联合用来治疗、预防和/或诊断疾病，如自身免疫病、急性和慢性炎性疾病、感染性疾病(例如，慢性传染病或败血症)、肿瘤等。

因此，在一个方面，本发明提供了具有以下一个或多个特性的三链抗体：

(a)以高亲和力，例如以至少约 $10^7\ M^{-1}$、优选地约 $10^8\ M^{-1}$ 和更优选地约 $10^9\ M^{-1}$ 或更强的亲和力常数与一种或多种抗原特异性结合；

(b) 易于在体外的培养细胞中表达，且三条链之间能够正确偶合或配对；

(c) 具有良好的物理稳定性，特别地，具有良好的长期热稳定性；且能长时间保持生物学

活性；和

(d) 在与一种或多种抗原特异性结合后，通过对各抗原所参与的信号传导通路的作用发挥生物学功能；

本发明的三链抗体至少是三价抗体（即，至少具有三个抗原结合位点）。在一个实施方案中，所述三链抗体是(1+2 样式)的三价抗体，其第一多肽链包含第一重链可变结构域，第二多肽链包含第一轻链可变结构域，所述第一重链可变结构域与第一轻链可变结构域配对（下文中缩写为 VH1/VL1 对）形成第一抗原结合位点；且第三多肽链包含单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点。

在一个实施方案中，本发明的三链抗体包含的一个抗原结合位点靶向第一抗原，另两个结合位点分别各自靶向第二抗原的相同或者不同表位。在一个实施方案中，本发明的三链抗体包含的三个抗原结合位点靶向三种不同的抗原。在一个实施方案中，本发明的三链抗体包含的三个抗原结合位点靶向相同的抗原。

在一个实施方案中，本发明提供了这样的包含三条多肽链的三链抗体，其中第一多肽链包含第一重链可变结构域和免疫球蛋白 CH1 结构域，第二多肽链包含第一轻链可变结构域和免疫球蛋白 CL 结构域，所述第一重链可变结构域与第一轻链可变结构域配对形成第一抗原结合位点；且第三多肽链包含单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点，其中所述第三多肽链的单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点之间具有或者不具有连接肽。

在一个实施方案中，所述第三多肽链的单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点之间具有包含甘氨酸（G）和丝氨酸（S）残基的连接肽，例如，包含 1－7 个 GGGGS 重复的连接肽，优选地，包含 4 个 GGGGS 重复的连接肽。

在一个优选的实施方案中，本发明三链抗体中的所述第三多肽链不包含免疫球蛋白 CH1 结构域；所述单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点分别选自天然缺乏轻链的抗体的重链可变结构域（如骆驼科(Camelidae)物种中天然存在的重链抗体的重链可变结构域）、鱼类中称为新型抗原受体(new antigen receptor, NAR)的免疫球蛋白（如鲨鱼血清中天然存在的 IgNAR）中的单结构域抗原结合位点、和衍生自它们的经重组的单结构域抗原结合位点。从天然缺乏轻链的重链抗体衍生的重链可变结构域在本文中称作 VHH，以将其与四链免疫球蛋白的常规 VH 区分开。这种 VHH 分子可以衍生自骆驼科物种(例如骆驼、羊驼、单峰驼、驼羊和原驼)中产生的抗体。除骆驼科之外的其他物种也可以产生天然缺乏轻链的重链抗体，这类 VHH 也处于本发明的范围内。

在一个实施方案中，在本发明三链抗体的所述第三多肽链中，所述单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点分别是第一 VHH 和第二 VHH，所述第一 VHH 和第二 VHH 的序列相同或者不同，且结合相同或者不同的抗原，或者结合相同抗原上的不同抗原表位。

又在一个实施方案中，本发明提供了这样的包含三条多肽链的三链抗体，其中第一多肽链从 N 端至 C 端包含第一重链可变结构域、免疫球蛋白 CH1 结构域和 Fc 结构域；第二多肽

链从 N 端至 C 端包含第一轻链可变结构域和免疫球蛋白 CL 结构域；且第三多肽链从 N 端至 C 端包含单结构域第二抗原结合位点、单结构域第三抗原结合位点和 Fc 结构域，优选地，所述免疫球蛋白是 IgG1、IgG2 或 IgG4 免疫球蛋白，更优选地，所述免疫球蛋白是人 IgG1 免疫球蛋白。

在本发明提供的包含三条多肽链的三链抗体中，发明人还设计了能够稳定三链抗体结构和有利于各条链之间的正确偶合或配对的氨基酸残基。例如，在三链抗体的第一多肽链和第三多肽链的 Fc 结构域中包含具有“CPPC”氨基酸残基的铰链区，从而所述第一多肽链和第三多肽链彼此通过所述铰链区处氨基酸残基之间形成的二硫键稳定缔合。在一个实施方案中，本发明三链抗体的第一多肽链和第三多肽链在各自的 Fc 结构域中分别包含 Y349C 和 S354C 或者分别包含 S354C 和 Y349C(根据 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)的 EU 索引进行编号，下文中称为“EU 编号”)，由此，第一多肽链和第三多肽链在 Fc 区进一步形成链间二硫键，以稳定第一多肽链和第三多肽链的正确配对。

在一个实施方案中，本发明三链抗体的第一多肽链和/或第三多肽链在 Fc 结构域中包含影响抗体效应子功能的氨基酸突变。在一个具体实施方案中，所述效应子功能是抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一个实施方案中，所述氨基酸突变存在于 Fc 区的 CH2 结构域，例如，所述三链抗体包含在第一多肽链和/或第三多肽链第 234 和 235 位置(EU 编号)处的氨基酸置换。在一个具体实施方案中，所述氨基酸置换是 L234A 和 L235A (下文中称为“LALA 突变”)。

在一个实施方案中，本发明三链抗体的第一多肽链和第三多肽链各自的 Fc 结构域中分别包含凸起(“结(knob)”)或空穴(“扣(hole)”)，并且第一多肽链 Fc 结构域中的所述凸起或空穴可分别置于第三多肽链 Fc 结构域中的所述空穴或凸起中，由此所述第一多肽链和第三多肽链彼此形成“结入扣(knob-in-hole)”的稳定缔合。在一个实施方案中，在所述第一多肽链和第三多肽链之一条链中包含氨基酸置换 T366W，并且在所述第一多肽链和第三多肽链之另一条链中包含氨基酸置换 T366S、L368A 和 Y407V(EU 编号)。由此一条链中的凸起能够置于另一条链中的空穴中，促进第一多肽链和第三多肽链的正确配对。

在一个实施方案中，本发明三链抗体的第一多肽链和第二多肽链的免疫球蛋白 CH1 结构域和 CL 结构域中分别包含凸起或空穴，并且 CH1 结构域中的所述凸起或空穴可分别置于 CL 结构域中的所述空穴或凸起中，从而所述第一多肽链和第二多肽链彼此也形成“结入扣”的稳定缔合。

本发明的三链抗体中的第一抗原结合位点、第二抗原结合位点和第三抗原结合位点可以结合相同抗原或者不同抗原上的表位。例如，所述第一抗原结合位点结合第一抗原的表位，所述第二抗原结合位点和第三抗原结合位点结合第二抗原上的相同或者不同表位，由此，所述三链抗体是针对第一抗原和第二抗原的双特异性抗体。当所述第一抗原结合位点结合第一抗原的表位，所述第二抗原结合位点和第三抗原结合位点分别结合第二抗原的表位和第三抗原的表位时，所述三链抗体是三特异性抗体。不特别地限制本发明的三链抗体特异性结合的

抗原类型，抗原可以是例如细胞因子、生长因子、激素、信号传导蛋白、炎性介质、配体、细胞表面受体或其片段。

在一个实施方案中，本发明的三链抗体特异性结合的抗原选自肿瘤相关抗原、免疫检查点分子、免疫系统中的共刺激分子，以及这些分子的配体和／或受体，例如，CD47、PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、和 4-1BB (CD137)。

本发明例示了如下所述的几种三链双特异性抗体。

i) 在一个实施方案中，本发明的三链抗体是抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体，所述抗体能够以至少约 $10^7\ M^{-1}$、优选地约 $10^8\ M^{-1}$ 和更优选地约 $10^9\ M^{-1}$ 或更强的亲和力常数与肿瘤细胞表面的 CD47 结合，由此阻断 CD47 与巨噬细胞表面 SIRPα 的结合，促进肿瘤组织浸润区的巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用；并以至少约 $10^7\ M^{-1}$、优选地约 $10^8\ M^{-1}$ 和更优选地约 $10^9\ M^{-1}$ 或更强的亲和力常数与肿瘤细胞表面的 PD-L1 结合，由此抑制 T 细胞上的 PD-1 与肿瘤细胞表面 PD-L1 的结合，诱导 T 细胞活化并发挥抗肿瘤作用。

在一个实施方案中，本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 CD47 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的第一 VHH 和第二 VHH。

在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 CD47 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 CD47 抗体 ADI-29341 的 GSIEHYYWS（SEQ ID NO: 3）所示的 VH CDR1、YIYYSGSTNYNPSLKS（SEQ ID NO: 4）所示的 VH CDR2、ARGKTGSAA（SEQ ID NO: 5）所示的 VH CDR3、RASQGISRWLA（SEQ ID NO: 10）所示的 VL CDR1、AASSLQS（SEQ ID NO: 11）所示的 VL CDR2 和 QQTVSFPIT（SEQ ID NO: 12）所示的 VL CDR3，或与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。又在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 CD47 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 CD47 抗体 ADI-29341 的 SEQ ID NO: 2/9 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列。

在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 17 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3，或者与所述 3 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。又在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 15 和／或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，本发明的三链抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 1 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 8 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 14 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或

更高同一)的序列。

又在一个实施方案中，本发明的三链抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 1 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 8 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 22 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

ii) 在一个实施方案中，本发明的三链抗体是抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体，所述抗体能够以至少约 10^7 M^{-1}、优选地约 10^8 M^{-1} 和更优选地约 10^9 M^{-1} 或更强的亲和力常数与 T 细胞表面的 4-1BB 结合，活化 4-1BB/4-1BB 配体的共刺激信号传导通路，诱导 T 细胞的活化、增殖及抗凋亡；并以至少约 10^7 M^{-1}、优选地约 10^8 M^{-1} 和更优选地约 10^9 M^{-1} 或更强的亲和力常数与肿瘤细胞表面的 PD-L1 结合，由此抑制 T 细胞上的 PD-1 与肿瘤细胞表面 PD-L1 的结合，诱导 T 细胞活化并发挥抗肿瘤作用。

在一个实施方案中，本发明的抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 4-1BB 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的第一 VHH 和第二 VHH。

在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 4-1BB 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 4-1BB 抗体 BMS-663513 的 SEQ ID NO: 26/28 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部 6 个重链互补决定区（CDR）与轻链 CDR，或者与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 4-1BB 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 4-1BB 抗体 BMS-663513 的 SEQ ID NO: 26/28 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列。

在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 17 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3，或者与所述 3 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。又在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 15 和／或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，本发明的三链抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 25 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 27 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 14 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

又在一个实施方案中，本发明的三链抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 25 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 27 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 22 所示的第三多肽链，

或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

iii) 在一个实施方案中，本发明的三链抗体是抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体，所述抗体能够以至少约 10^7 M^{-1}、优选地约 10^8 M^{-1} 和更优选地约 10^9 M^{-1} 或更强的亲和力常数与 T 细胞表面的 LAG-3 结合，抑制 T 细胞中的 LAG-3 抑制性信号传导通路，由此恢复了 CD8+效应 T 细胞并减少了 Treg 群体；并以至少约 10^7 M^{-1}、优选地约 10^8 M^{-1} 和更优选地约 10^9 M^{-1} 或更强的亲和力常数与肿瘤细胞表面的 PD-L1 结合，由此抑制 T 细胞上的 PD-1 与肿瘤细胞表面 PD-L1 的结合，诱导 T 细胞活化并发挥抗肿瘤作用。

在一个实施方案中，本发明的抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的第一 VHH 和第二 VHH。

在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 LAG-3 抗体 ADI-31853 的 GSIYSESYYWG（SEQ ID NO: 31）所示的 VH CDR1、 SIVYSGYTYYNPSLKS（SEQ ID NO: 32）所示的 VH CDR2、ARVRTWDAAFDI（SEQ ID NO: 33）所示的 VH CDR3、QASQDISNYLN（SEQ ID NO: 36）所示的 VL CDR1、DASNLET（SEQ ID NO: 37）所示的 VL CDR2 和 QQVLELPPWT（SEQ ID NO: 38）所示的 VL CDR3，或与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 LAG-3 抗体 ADI-31853 的 SEQ ID NO: 30/35 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列。

在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 17 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3，或者与所述 3 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。又在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 15 和／或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，本发明的三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 29 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 34 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 14 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

又在一个实施方案中，本发明的三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 29 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 34 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 22 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%

或更高同一)的序列。

在第二方面，本发明提供了编码本发明三链抗体中的第一多肽链、第二多肽链和／或第三多肽链的多核苷酸。

在第三方面，本发明提供了包含编码本发明三链抗体中的第一多肽链、第二多肽链和／或第三多肽链的多核苷酸的载体，优选地表达载体。

在第四方面，本发明提供了包含本发明多核苷酸或载体的宿主细胞。例如，所述宿主细胞是哺乳动物细胞，优选地是 CHO 细胞、HEK293 细胞；所述宿主细胞是原核细胞，优选地是大肠杆菌细胞。

在第五方面，本发明提供了用于产生本发明三链抗体的方法，所述方法包括步骤(i) 在适于表达所述三链抗体的条件下培养本发明的宿主细胞，和(ii) 从所述宿主细胞或所述培养基回收所述三链抗体。

在第六方面，本发明提供了包含本发明三链抗体的免疫缀合物和包含所述三链抗体或其免疫缀合物的药物组合物。本文公开的三链抗体可以单独或与其他药物或其他治疗模式联合用来治疗、预防和/或诊断疾病，如自身免疫病、急性和慢性炎性疾病、感染性疾病(例如，慢性传染病或败血症)、肿瘤等。

在第七方面，本发明提供了本发明的三链抗体、免疫缀合物和药物组合物的用途，用作在个体中治疗和／或预防疾病的药物或用作疾病的诊断工具，或用于在有需求的受试者中增加造血干细胞植入。优选地，所述个体是哺乳动物，更优选地是人。在一个实施方案中，所述疾病是自身免疫病、急性和慢性炎性疾病、感染性疾病(例如，慢性传染病或败血症)、肿瘤。

除非另外限定，否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入。此外，本文中所述的材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

附图简述

结合以下附图一起阅读时，将更好地理解以下详细描述的本发明的优选实施方案。出于说明本发明的目的，图中显示了目前优选的实施方案。然而，应当理解本发明不限于图中所示实施方案的精确安排和手段。

图 1A－1C 例示了本发明三链抗体的结构。图 1A 例示了一种本发明的三链抗体，其中第一多肽链与第二多肽链配对形成第一抗原结合位点，第三多肽链包含单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点，且在第三多肽链的单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点之间具有柔性连接肽。图 1B 例示了另一种本发明的三链抗体，其中第一多肽链与第二多肽链配对形成第一抗原结合位点，第三多肽链包含单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点，且在第三多肽链的单结构域第二抗原结合位点和单结构

域第三抗原结合位点之间不具有柔性连接肽。图 1C 例示了本发明三链抗体的各条肽链从 N 端到 C 端的结构，其中虚线箭头指示的第三多肽链中的柔性连接肽根据需要（例如，根据与特异性结合的表位的亲和力、空间位阻的情况）在本发明的三链抗体中可以有，也可以没有。

图 2A 和图 2B 分别显示了利用大小排阻层析 (size exclusion chromatography; SEC)检测的本发明制备的两种抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 的纯度。

图 3 显示了通过动力学结合测定法获得的本发明抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL、以及作为对照的抗 PD-L1 人源化 Nb-Fc 抗体、抗 CD47 抗体 ADI 29341 的动力学结合曲线、以及 k_{on}、k_{dis} 和 K_D 数据。

图 4A 显示了通过 FACS 检测的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL、以及作为对照的抗 PD-L1 人源化 Nb-Fc 抗体与过量表达 PD-L1 的 CHO-S 细胞的结合。图 4B 显示了通过 FACS 检测的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL、以及作为阳性对照的抗 CD47 抗体 ADI 29341、作为阴性对照的 IgG1 抗体与过量表达 CD47 的 CHO-S 细胞的结合。图中横轴表示抗体浓度、纵轴表示平均荧光强度（MFI）。

图 5 显示了通过 PEG 沉淀法测定的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL、以及作为阳性对照的抗体修美乐(Humira，也称为阿达木单抗，是一种抗 TNF α 的人源化单克隆抗体)的物理稳定性和可溶性。

图 6 显示了抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 的长期热稳定性。将所述抗体在 40℃放置 0、1、3、7、10、20、30 天后，通过 SEC-HPLC 测定了抗体纯度。

图 7A 显示了抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 在第 0 天时和在 40℃放置 30 天时分别与过量表达 PD-L1 的 CHO-S 细胞的结合。图 7B 显示了抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 在第 0 天时和在 40℃放置 30 天时分别与过量表达 CD47 的 CHO-S 细胞的结合。横轴表示抗体浓度、纵轴表示平均荧光强度（MFI）。

图 8 显示了基于 MOA 法检测的本发明抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL、以及作为阳性对照的抗 PD-L1 人源化 Nb-Fc 抗体、作为阴性对照的 IgG1 抗体对 PD-1/PD-L1 信号传导通路的影响。

图 9 显示了抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL、以及作为阳性对照的抗 CD47 抗体 ADI 29341 促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力。

图 10 显示了抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC、抗 CD47 抗体 Hu5F9（对应于 US2015/0183874 A1 中的“5F9”抗体）和 IgG1 对照抗体对红细胞凝集的影响。

图 11 显示了当肿瘤细胞和人红细胞共同孵育时，选择性结合到肿瘤细胞表面的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 比例。

图 12 显示了利用 SEC 检测的本发明制备的抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-P4 的纯度。

图 13A 显示了通过 FACS 检测的抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-P4、以及作为阳性对照的抗 4-1BB 抗体 BMS-663513 与过量表达 4-1BB 的 CHO-S 细胞的结合。图 13B 显示

了通过FACS检测的抗4-1BB/PD-L1双特异性抗体Kh2NF-P4、以及作为阳性对照的抗PD-L1人源化Nb-Fc抗体与过量表达PD-L1的CHO-S细胞的结合。图中横轴表示抗体浓度、纵轴表示平均荧光强度（MFI）。

图14显示了利用SEC检测的本发明制备的抗LAG-3/PD-L1双特异性抗体Kh2NF-PL的纯度。

图15A显示了通过FACS检测的抗LAG-3/PD-L1双特异性抗体Kh2NF-PL、以及作为阳性对照的抗PD-L1人源化Nb-Fc抗体与过量表达PD-L1的CHO-S细胞的结合。图15B显示了通过FACS检测的抗LAG-3/PD-L1双特异性抗体Kh2NF-PL、以及作为阳性对照的抗LAG-3抗体ADI-31853与过量表达LAG-3的HEK293细胞的结合。图中横轴表示抗体浓度、纵轴表示平均荧光强度（MFI）。

图16显示了与抗LAG-3抗体ADI-31853、抗PD-L1人源化Nb-Fc抗体、抗LAG-3抗体ADI-31853 + 抗PD-L1人源化Nb-Fc抗体、IgG4对照抗体比较，抗LAG-3/PD-L1双特异性抗体Kh2NF-PL体外激活T细胞的作用。

图17显示了与h-IgG相比，抗PD-L1人源化Nb-Fc抗体、抗CD47抗体ADI 29341、抗PD-L1人源化Nb-Fc抗体与抗CD47抗体ADI 29341联合用药、抗CD47/PD-L1双特异性抗体Kh2NF-PC在Raji-PD-L1/NOD-SCID小鼠模型中的肿瘤抑制活性。

发明详述

I. 定义

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小5%的下限和比指定数字数值大5%的上限的范围内的数字数值。

如本文中所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。

术语“抗体”在本文中以最广意义使用，指包含抗原结合位点的蛋白质，涵盖各种结构的天然抗体和人工抗体，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)、单链抗体、三链抗体、完整抗体和抗体片段。

术语“全抗体”、“全长抗体”、“完全抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地用来指包含由二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文中缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由3个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH区和VL区可以进一步再划分为超变区（为互补决定区(CDR)，其间插有较保守的区域（为构架区(FR)）。每个VH和VL由三个CDR和4个FR组成，从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是显示出多种效应子功能。

“互补决定区”或“CDR区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环（“超变环”）和/或含有抗原接触残基（“抗原接触点”）的区域。CDR主

要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派系统的任一种或其组合确定，所述指派系统包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人. (1989) Nature 342: 877-883，Al-Lazikani 等人，“Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))，基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath)，Contact (University College London)，国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/上)，以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。

然而，应该注意，基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此，在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体，其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列，但是由于应用了不同的方案（例如不同的指派系统规则或组合）而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

具有不同特异性(即，针对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的 CDR。然而，尽管 CDR 在抗体与抗体之间是不同的，但是 CDR 内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用 Kabat, Chothia, AbM、Contact 和 North 方法中的至少两种，可以确定最小重叠区域，从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。最小结合单位可以是 CDR 的一个子部分。正如本领域技术人员明了，通过抗体的结构和蛋白折叠，可以确定 CDR 序列其余部分的残基。因此，本发明也考虑本文所给出的任何 CDR 的变体。例如，在一个 CDR 的变体中，最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变，而根据 Kabat 或 Chothia 定义的其余 CDR 残基可以被保守氨基酸残基替代。

术语“抗原结合片段”是比完整或完全抗体的氨基酸残基数要少的完整或完全抗体的一部分或一段，其能结合抗原或与完整抗体(即与抗原结合片段所来源的完整抗体)竞争结合抗原。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于 Fab、Fab’、$F(ab')_2$、Fv、单链 Fv、双体抗体(diabody)、单结构域抗体(sdAb)。所述 Fab 片段是一种由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段，例如，通过木瓜蛋白酶消化完全抗体能够获得 Fab 片段。此外，通过胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化完全抗体产生 $F(ab')_2$，其为 Fab’的二聚体，是二价的抗体片段。$F(ab')_2$ 可以在中性条件下通过破坏铰链区中的二硫键而被还原，因此将 $F(ab')_2$ 二聚体转化为 Fab'单体。Fab'单体基本上是具有铰链区的 Fab 片段(其它抗体片段的更详细的描述请参见：基础免疫学(Fundamental Immunology), W. E. Paul 编辑, Raven Press, N.Y. (1993))。所述 Fv 片段由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成。另外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由独立的基因编码，但是使用重组

方法，可以将它们通过能够使这两个结构域作为单条蛋白链产生的合成性连接肽连接，在所述单条蛋白链中 VL 区和 VH 区配对以形成单链 Fv。可以通过化学方法、重组 DNA 方法或蛋白酶消化法获得所述抗体片段。

术语“单结构域抗体”（sdAb）或“单可变结构域（SVD）抗体”通常指这样的抗体，其中单个可变结构域（例如，重链可变结构域（VH）或轻链可变结构域（VL）、衍生自骆驼科重链抗体的重链可变结构域、衍生自鱼类 IgNAR 的 VH 样单结构域（v-NAR））即可赋予抗原结合。即，该单个可变结构域不需要与另一可变结构域相互作用以识别靶抗原。单结构域抗体的实例包括源自骆驼科（美洲驼和骆驼）和软骨鱼（例如护士鲨）的单结构域抗体（WO 2005/035572）。

术语“骆驼化的人 VH 结构域”是指将衍生自骆驼科 VHH 的关键元件转移到人 VH 结构域上导致人 VH 结构域不再需要与 VL 结构域配对来识别靶抗原，经骆驼化的人 VH 结构域单独即可赋予抗原结合特异性。

如本文所用的术语“结合位点”或“抗原结合位点”表示抗体分子中与抗原实际结合的区域，包括由抗体轻链可变结构域(VL)和抗体重链可变结构域(VH)组成的 VH/VL 对、衍生自骆驼科重链抗体的重链可变结构域、来自鲨鱼科动物的 IgNAR 的 VH 样单结构域（v-NAR）、骆驼化的人 VH 结构域、人源化的骆驼科抗体重链可变结构域。在本发明的实施方案中，本发明的三链抗体包含至少三个抗原结合位点，例如，包含第一个抗原结合位点（也称为“第一抗原结合位点”）、第二个抗原结合位点（也称为“第二抗原结合位点”）、第三个抗原结合位点（也称为“第三抗原结合位点”）。

术语“单结构域抗原结合位点”表示抗体分子的以单个可变结构域（例如，重链可变结构域（VH）、轻链可变结构域（VL）、衍生自骆驼科重链抗体的重链可变结构域、来自鲨鱼科动物的 IgNAR 的 v-NAR、骆驼化的人 VH 结构域、人源化的骆驼科抗体重链可变结构域、和它们的经重组的单结构域）与抗原实际结合的区域。在本发明的一个实施方案中，本发明的三链抗体包含两个单结构域抗原结合位点，分别称为“单结构域第二抗原结合位点”和“单结构域第三抗原结合位点”。

如本文所用，术语“单特异性”抗体指具有一个或多个结合位点的抗体，所述位点的每一个与相同抗原的相同表位结合。

如本文所用，术语“多特异性”抗体指具有至少两个抗原结合位点的抗体，所述至少两个抗原结合位点中的每一个抗原结合位点与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。本文提供的抗体通常是多特异性抗体，例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同抗原表位具有结合特异性的抗体。在一个实施方案中，本文提供了这样的双特异性抗体，其具有针对第一抗原和第二抗原的结合特异性。

术语“免疫球蛋白分子”指具有天然存在抗体的结构的蛋白质。例如，IgG 类免疫球蛋白是由二硫键键合的两条轻链和两条重链组成的约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白。从 N 端至 C 端，每条免疫球蛋白重链具有一个重链可变区(VH)，也称作重链可变结构域，随后是三个重链恒定结构域(CH1、CH2 和 CH3)。类似地，从 N 端至 C 端，每条免疫球蛋白轻链具有

一个轻链可变区(VL)，也称作轻链可变结构域，随后是一个轻链恒定结构域(CL)。免疫球蛋白的重链可以归属5个类别之一，称作α(IgA)、δ(IgD)、ε(IgE)、γ(IgG)或μ(IgM)，其中某些类别可以进一步划分成亚类，例如γ_1(IgG1)、γ_2(IgG2)、γ_3(IgG_3)、γ_4(IgG_4)、α_1(IgA_1)和α_2(IgA_2)。免疫球蛋白的轻链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列而划分成两种类型之一，称作κ和λ。免疫球蛋白基本上由借助免疫球蛋白铰链区连接的两个Fab分子和一个Fc结构域组成。

术语"Fc结构域"或"Fc区"在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。天然的免疫球蛋白"Fc结构域"包含两个或三个恒定结构域，即CH2结构域、CH3结构域和可选的CH4结构域。例如，在天然抗体中，免疫球蛋白Fc结构域包含源自IgG、IgA和IgD类抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(CH2结构域和CH3结构域)；或者包含源自IgM和IgE类抗体的两条重链的第二、第三和第四恒定结构域(CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域)。除非本文中另外说明，否则Fc区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interes，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述的EU编号体系（也称作EU索引）进行编号。

术语"效应子功能"指随免疫球蛋白同种型变动的归因于免疫球蛋白Fc区的那些生物学活性。免疫球蛋白效应子功能的例子包括：C1q结合和补体依赖的细胞毒性(CDC)、Fc受体结合作用、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞摄取抗原、下调细胞表面受体(例如B细胞受体)和B细胞活化。

术语"嵌合抗体"是这样的抗体分子，其中(a)将恒定区或其部分改变、替换或交换，从而抗原结合位点与不同的或改变的类别、效应子功能和/或物种的恒定区或赋予嵌合抗体新性能的完全不同的分子(例如，酶、毒素、激素、生长因子、药物)等连接；或(b)将可变区或其部分用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。例如，小鼠抗体可以通过将其恒定区更换为来自人免疫球蛋白的恒定区进行修饰。由于更换为人类恒定区，该嵌合抗体可以保留其在识别抗原方面的特异性，同时如与原始小鼠抗体相比，具有在人类中降低的抗原性。

"人源化抗体"是一种保留非人类抗体(例如小鼠单克隆抗体)的抗原特异性反应性，同时作为治疗药对人施用时免疫原性较低的抗体。这可以例如通过保留非人类抗原结合位点并且抗体的剩余部分替换成它们的人类相应部分(即，恒定区以及可变区中不参与结合的部分为人类抗体的相应部分)来实现。参见，例如Padlan, Anatomy of the antibody molecule，Mol. Immun., 1994，31: 169-217。人类抗体工程化技术的其他例子包括但不限于US 5,766,886中公开的Xoma技术。

术语"...价"抗体指抗体分子中存在的抗原结合位点的数目。"二价"、"三价"和"四价"抗体指抗体分子中分别存在2个抗原结合位点、3个结合位点和4个结合位点。在一个实施方案中，本文中报道的双特异性抗体是"三价的"。

术语"柔性连接肽"或"连接肽"是指由氨基酸组成的连接肽，例如单独或组合使用的甘氨

酸和/或丝氨酸残基，以连接抗体中的各个可变结构域。在一个实施方案中，柔性连接肽是Gly/Ser连接肽，包括氨基酸序列$(Gly_4Ser)_n$，其中n是等于或大于1的正整数，例如，n是1－7中的正整数。在一个实施方案中，所述柔性连接肽是$(Gly_4Ser)_4$ (SEQ ID NO:20)。还包括在本发明范围内的是WO2012/138475中描述的连接肽，其通过引用并入本文。

如本文所用，术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗原结合位点与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法测定。

“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶物Y的亲和力可以通常由解离常数(K_D)代表，解离常数是解离速率常数和缔合速率常数(分别是k_{dis}和k_{on})的比例。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的ForteBio动力学结合测定法。

术语“抗原”是指引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫细胞的活化，或两者兼有。技术人员将理解，任何大分子，包括基本上所有的蛋白质或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以衍生自重组或基因组DNA。在本文的一些实施方案中，第一抗原、第二抗原、第三抗原是三种不同的抗原。

术语“肿瘤相关抗原”或“癌症抗原”可互换地指与正常细胞相比，优选在癌细胞表面完全或作为片段(例如，MHC/肽)表达的分子(通常为蛋白质、碳水化合物或脂质)，并且所述分子可用在药剂对癌细胞的优先靶向中。在一些实施方案中，肿瘤相关抗原是与正常细胞相比在肿瘤细胞中过表达的细胞表面分子，例如与正常细胞相比1倍过量表达、2倍过量表达、3倍过量表达或更多倍过量表达。在一些实施方案中，肿瘤相关抗原是在肿瘤细胞中不适当地合成的细胞表面分子，例如与正常细胞上表达的分子相比含有缺失、添加或突变的分子。在一些实施方案中，肿瘤相关抗原仅在肿瘤细胞的细胞表面完整表达或作为片段表达，并且不在正常细胞的表面上合成或表达。现有技术中公开了诸多肿瘤相关抗原，例如，表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、肿瘤相关的糖蛋白72(TAG72)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EPCAM)、白介素11受体α(IL-11Ra)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、表皮生长因子受体(EGFR)、神经细胞粘附分子(NCAM)、胰岛素样生长因子1受体(IGF-I受体)、黑素瘤相关抗原1(MAGE-A1)、CD72、CD47等。

术语“免疫检查点”意指免疫系统中存在的一类抑制性信号分子，通过调节外周组织中免疫反应的持续性和强度避免组织损伤，并参与维持对于自身抗原的耐受(Pardoll DM., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264)。研究发现，肿瘤细胞能够逃避体内免疫系统而失控增殖的原因之一是利用了免疫检查点的抑制性信号通路，由此抑制T淋巴细胞活性，使得T淋巴细胞不能有效发挥对肿瘤的杀伤效应(Yao S, Zhu Y和Chen L., Advances in targeting cell surface signaling molecules for immune modulation. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(2):130-146)。免疫检查点分子包括但不限于程序性死亡1 (PD-1)、PD-L1、PD-L2、细胞毒T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4)和LAG-3，它们直接抑制免疫细胞。免疫检查点分子，例如，PD-L1和LAG-3，可以调节(例如，协同地调节)T

细胞功能以促进肿瘤免疫逃避。

术语“共刺激分子”是指T细胞上的与共刺激配体特异性结合从而介导T细胞的共刺激反应(例如但不限于增殖)的相应结合配偶体。共刺激分子是除抗原受体或其配体之外的有助于有效免疫应答的细胞表面分子。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM 蛋白)、激活NK细胞受体、OX40、CD40、4-1BB(即CD137)、CD27和CD28。在一些实施方案中，“共刺激分子”是4-1BB(即CD137)、CD27和/或CD28。

术语“细胞因子”是由一种细胞群释放，作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子、白介素(IL)，诸如IL-1，IL-1α，IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，IL-7，IL-8，IL-9，IL-11，IL-12，IL-15；肿瘤坏死因子，诸如TNF-α或TNF-β；及其它多肽因子，包括LIF和kit配体(KL)和γ-干扰素。如本文中使用的，术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等效物，包括通过人工合成产生的小分子实体，及其药剂学可接受的衍生物和盐。

“免疫缀合物”是与一个或多个异源分子(包括但不限于细胞毒性剂)缀合的抗体。

如本文所用，术语“细胞毒性剂”指抑制或阻止细胞功能和/或造成细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如，At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}和Lu的放射性同位素)；化疗药或药物(例如，甲氨蝶呤、阿霉素、长春碱类生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、佐柔比星或其他嵌入剂)；生长抑制剂；酶及其片段如溶核酶；抗生素；毒素如细菌源、真菌源、植物源或动物源的小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段和/或变体；和下文公开的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。

氨基酸序列的“同一性百分数(%)”是指将候选序列与本说明书中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后，并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时，候选序列中与本说明书中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。

对于多肽序列，“保守性修饰”包括对多肽序列的置换、缺失或添加，它们导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。这类保守性修饰的变体相对于本发明的多态性变体、物种间同源物和等位基因而言是附加的并且不排斥它们。以下8组含有互为保守替换的氨基酸：1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)；5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；和8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参阅例如，Creighton, Proteins(1984))。在一些实施方案中，术语“保守序列修饰”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。

术语“N端”指N端的最末氨基酸，术语“C端”指C端的最末氨基酸。

术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细

胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明三链抗体的任何类型的细胞系统。宿主细胞包括培养的细胞，也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。

术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体，其包含有效连接要表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件；用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中。表达载体包括本领域已知的所有那些，包括被掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如，裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

术语“个体”或“受试者”可互换地使用，是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。特别地，个体是人。

术语“治疗”指意欲改变正在接受治疗的个体中疾病之天然过程的临床介入。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态，以及缓解或改善预后。在一些实施方案中，本发明的三链抗体用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。

术语“抗肿瘤作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果，包括但不限于例如，肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。术语“肿瘤”和“癌症”在本文中互换地使用，涵盖实体瘤和液体肿瘤。

术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括但不限于鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)，肺癌(包括小细胞肺癌，非小细胞肺癌，肺的腺癌，和肺的鳞癌)，腹膜癌，肝细胞癌，胃癌(包括胃肠癌和胃肠基质癌)，胰腺癌，成胶质细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，尿道癌，肝瘤，乳腺癌，结肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝癌，肛门癌，阴茎癌，黑素瘤，浅表扩散性黑素瘤，恶性雀斑样痣黑素瘤，肢端黑素瘤，结节性黑素瘤，多发性骨髓瘤和 B 细胞淋巴瘤，慢性淋巴细胞性白血病(CLL)，急性成淋巴细胞性白血病(ALL)，毛细胞性白血病，慢性成髓细胞性白血病，和移植后淋巴增殖性病症(PTLD)，以及与瘢痣病(phakomatoses)，水肿(诸如与脑瘤有关的)和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖，脑瘤和脑癌，以及头颈癌，及相关转移。在某些实施方案中，适合于通过本发明的抗体来治疗的癌症包括肺癌（例如非小细胞肺癌）、肝癌、胃癌或结肠癌，包括那些癌症的转移性形式。

术语“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。

术语“感染性疾病”是指病原体引发的疾病，包括例如病毒感染、细菌感染、寄生虫感染或真菌感染。

II. 本发明的三链抗体

本发明提供了一种新型的三链抗体，其能够用于多种疾病的免疫治疗、预防和／或诊断。本发明的三链抗体至少包含 3 个抗原结合位点，其能够作为单特异性抗体或多特异性（例如双特异性）抗体发挥作用，优选地，其能够作为多特异性（例如双特异性）抗体发挥作用。

在产生具有多条多肽链的单特异性或多特异性（例如双特异性）抗体时，通常会发生不希望的链间错配、抗体亲和力降低、稳定性降低等问题。本申请构建的三链抗体能够避免这些常见问题。

本申请所构建的三链抗体平台是包含三条多肽链的三链抗体，其中第一多肽链包含第一重链可变结构域，第二多肽链包含第一轻链可变结构域，所述第一重链可变结构域与第一轻链可变结构域配对(VH1/VL1 对)形成第一抗原结合位点；且第三多肽链包含单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点。

在一个实施方案中，本发明三链抗体的第三多肽链中的单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点之间不具有连接肽。

在另一个实施方案中，本发明三链抗体的第三多肽链中的单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点之间具有连接肽。不特别地限制所述连接肽的类型。在实施方案中，所述连接肽是具有 1 至 100 个、特别地 1 至 50 个、更特别地 1 至 20 个氨基酸长度的氨基酸序列的肽。在一些实施方案中，所述肽连接肽是(GxS)n 或(GxS)nGm，其中 G =甘氨酸，S =丝氨酸并且 x =1－4 中的任一整数，n=1－7 中的任一整数，以及 m=0－3 中的任一整数。在一个具体实施方案中，所述连接肽是$(G_4S)_4$(SEQ ID: NO: 20)。

本发明三链抗体的第三多肽链中的单结构域抗原结合位点是能够以较高亲和力特异性结合靶抗原表位的单个可变结构域，例如，重链可变结构域（VH）、轻链可变结构域（VL）、衍生自骆驼科重链抗体的重链可变结构域、来自鲨鱼科动物的 IgNAR 的 v-NAR、骆驼化的人 VH 结构域、人源化的骆驼科抗体重链可变结构域、和它们的经重组的单结构域。在一个实施方案中，本发明三链抗体的第三多肽链中的两个单结构域抗原结合位点是衍生自骆驼科重链抗体的重链可变结构域、骆驼化的人 VH 结构域和／或人源化的骆驼科抗体重链可变结构域。

现有技术中已经对从骆驼科物种(例如骆驼、羊驼、单峰驼、驼羊和原驼)获得的抗体蛋白的大小、结构和针对人类受试者的抗原性进行了表征。在自然界中来自骆驼科哺乳动物家族的某些 IgG 抗体缺少轻链，并且因此在结构上区别于来自其他动物的具有两条重链和两条轻链的常见四链抗体结构。参见 PCT/EP 93/02214(1994 年 3 月 3 日公布的 WO 94/04678)。

可以通过基因工程方法获得骆驼科重链抗体的对靶抗原具有高亲和力的重链可变结构域(该区域也称为 VHH)。参见 1998 年 6 月 2 日授予的美国专利号 5,759,808。与其他非人源抗体片段一样，骆驼科 VHH 的氨基酸序列可以重组地改变以获得更逼真模仿人序列的序列，即，“人源化”，由此降低骆驼科 VHH 对人类的抗原性。另外，也可以将衍生自骆驼科 VHH 的关键元件转移到人 VH 结构域上，获得骆驼化的人 VH 结构域。在本发明的一个实施方案中，本发明三链抗体的第三多肽链中的单结构域抗原结合位点是人源化 VHH，其具有 SEQ ID

NO: 16 所示的氨基酸序列。

VHH 的分子量是人 IgG 分子的分子量的十分之一，并且具有仅数纳米的物理直径。VHH 本身具有极高的热稳定性、对极端 pH 和蛋白酶解消化稳定和抗原性低，因此，所述结构对本发明三链抗体的稳定性、对人受试者的低抗原性做出了贡献。

在一个实施方案中，本发明三链抗体的第一多肽链包含第一重链可变结构域和免疫球蛋白 CH1 结构域，第二多肽链包含第一轻链可变结构域和免疫球蛋白 CL 结构域；且第三多肽链包含单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点。不特别地限制 CH1 结构域、CL 结构域所来源的免疫球蛋白的类、亚类、型和亚型。优选地，所述 CH1 结构域、CL 结构域均来自人免疫球蛋白的相应部分或具有与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，本发明的三链抗体还包含具有延长体内半寿期的组分。许多因素可能影响蛋白质的体内半寿期。例如，肾过滤、肝脏中代谢、遭蛋白水解酶(蛋白酶)降解和免疫原性反应(例如，抗体的蛋白质中和作用和被巨噬细胞和树状细胞摄取)。多种策略可用于延长本发明三链抗体的半寿期。例如，通过化学连接聚乙二醇(PEG)、聚唾液酸(PSA)化、羟乙基淀粉(HES)化、偶联白蛋白、免疫球蛋白 Fc 等。

为了使抗体聚乙二醇化，一般使该三链抗体与聚乙二醇(PEG)如 PEG 的活性酯或醛衍生物在其中一个或多个 PEG 基团变得与该三链抗体连接的条件下反应。可以通过与反应性 PEG 分子(或类似的反应性水溶聚合物)的酰化反应或烷基化反应实施 PEG 化。如本文所用，术语“聚乙二醇”包括已经用来衍生化其他蛋白质的任何形式的 PEG，如单(C_1-C_{10})烷氧基或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中，待聚乙二醇化的抗体是无糖基化的抗体。使用导致抗体生物学活性丧失最少的直链或分枝 PEG 衍生化。可以通过 SDS-PAGE 和质谱法密切监测缀合程度以确保 PEG 分子与抗体正确缀合。未反应的 PEG 可以通过大小排阻层析或通过离子交换层析与抗体-PEG 缀合物分离。可使用本领域技术人员熟知的方法，测试 PEG 衍生的抗体的结合活性。聚乙二醇化蛋白质的方法为本领域已知，并可应用于本发明的抗体。见例如，Nishimura 等人的 EP 0 154 316。

聚唾液酸化是使用天然聚合物聚唾液酸(PSA)来延长治疗性肽和蛋白质的有效寿命并改善其稳定性的另一项技术。PSA 是唾液酸(一种糖)的聚合物。当用于蛋白质和治疗肽药物递送时，聚唾液酸对缀合物提供保护性微环境。这增加治疗性蛋白在循环中的有效寿命并防止它被免疫系统识别。

抗体的羟乙基淀粉(“HES”)化也能延长抗体的循环半寿期，导致增加的生物学活性。通过变动不同参数，如 HES 的分子量，可以制备广泛类型的 HES 免疫缀合物。

也可以向本发明的三链抗体引入 IgG 恒定结构域或免疫球蛋白 Fc 结构域，产生具有增加的体内半寿期的抗体。参见，例如，国际公开号 WO98/23289；国际公开号 WO97/34631；和美国专利号 6 277 375。

进一步，本发明的三链抗体可以与白蛋白(例如，人血清白蛋白；HSA)缀合以使抗体在体内更稳定或具有较长的体内半寿期。这些技术是本领域熟知的，参见，例如，国际公开号

WO 01/77137; 和欧洲专利号 EP 413,622。

在一个实施方案中，本发明的三链抗体包含 Fc 区，以延长本发明抗体的体内半寿期。

又在一个具体实施方案中，在本发明三链抗体的第一多肽链和第三多肽链的 Fc 结构域中分别包含具有“CPPC”氨基酸残基的铰链区，和／或分别包含 Y349C 和 S354C(根据 Kabat 的“EU 编号”)，由此，第一多肽链和第三多肽链在 Fc 区形成链间二硫键，这也促成了本发明的三链抗体的第一多肽链和第三多肽链的正确配对。

在一个实施方案中，本发明的三链抗体使用了“结入扣”技术(参见例如 John B.B.Ridgway 等人，‘Knobs-into-holes’ engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Engineering*, 1996.9(7): p. 617-21; Shane Atwell 等人，Stable heterodimers form remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J.Mol.Biol*, 1997.270: p. 26-35)，该技术可在本发明三链抗体的不同链之间改造界面，以促进本发明三链抗体的各条链正确缔合。通常，该技术涉及在一条链的界面引入“凸起”，在欲与之配对的另一条链的界面引入相应的“空穴”，使得凸起可置于空穴中。第一个优选的界面包含一条链的重链恒定结构域的 CH3 结构域和欲与之配对的另一条链的重链恒定结构域的 CH3 结构域。可通过将来自一条链的重链恒定结构域的CH3结构域的界面的小氨基酸侧链替换为较大的侧链（例如酪氨酸或色氨酸）来构建凸起。通过将大氨基酸侧链替换为较小的侧链（例如丙氨酸或苏氨酸），在欲配对的另一条链的重链恒定结构域的 CH3 结构域的界面构建与凸起相同或相似大小的补偿性空穴。第二个优选的界面包含轻链的 CL 结构域和重链的 CH1 结构域，在此处可按如上所述构建凸起-空穴相互作用。

在一个实施方案中，本发明三链抗体的 Fc 区包含对 Fc 受体的结合亲和力的修饰。在一个实施方案中，所述 Fc 受体是 Fcγ 受体，特别地是人 Fcγ 受体。在一个实施方案中，所述 Fc 受体是活化性 Fc 受体。在一个实施方案中，所述修饰减少本发明三链抗体的的效应子功能。在一个具体实施方案中，所述效应子功能是抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一个实施方案中，所述修饰在所述免疫球蛋白分子 Fc 区内，特别地在其 CH2 区内。在一个实施方案中，所述免疫球蛋白分子包含在免疫球蛋白重链第 329 位置(EU 编号)处的氨基酸置换。在一个具体实施方案中，所述氨基酸置换是 P329G。在一个实施方案中，本发明三链抗体包含在免疫球蛋白重链第 234 和 235 位置(EU 编号)处的氨基酸置换。在一个具体实施方案中，所述氨基酸置换是 L234A 和 L235A (LALA 突变)(Armour KL 等人，Recombinant human IgG molecules lacking Fcgamma receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol*, 1999. 29(8): 2613-24)。在一个实施方案中，本发明三链抗体包含在免疫球蛋白重链第 234、235 和 329 位置处(EU 编号)的氨基酸置换。在一个具体实施方案中，所述免疫球蛋白分子包含免疫球蛋白重链中的氨基酸置换 L234A、L235A 和 P329G(EU 编号)。

如图 1A 中的示意图所示，本发明的示例性三链抗体是三价三链抗体，其中第一多肽链中的第一重链可变结构域和第二多肽链中的第一轻链可变结构域配对形成第一抗原结合位点；第三多肽链包含单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点，且在所述单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点之间具有连接肽。

如图 1B 中的示意图所示，本发明的示例性三链抗体是三价三链抗体，其中第一多肽链中的第一重链可变结构域和第二多肽链中的第一轻链可变结构域配对形成第一抗原结合位点；第三多肽链包含单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点，且在所述单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点之间不具有连接肽。

i) 在一个实施方案中，三链抗体是抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体或多特异性抗体。

PD-L1 (也称作分化抗原簇 274 (CD274)或 B7 同源物 1 (B7-H1))，是 40 kDa I 型跨膜蛋白。PD-L1 与活化的 T 细胞上存在的其受体 PD-1 结合，下调 T 细胞活化(Latchman 等人，2001 Nat Immunol 2: 261-8; Carter 等人，2002 Eur J Immunol 32: 634-43)。已经在许多癌中发现了 PD-L1 表达，包括人肺癌、卵巢癌、结肠癌和多种骨髓瘤等，并且 PD-L1 表达经常与癌的预后不良相关(Iwai 等人 (2002) *PNAS* 99:12293-7; Ohigashi 等人 (2005) *Clin Cancer Res* 11:2947-53; Okazaki 等人 (2007) *Intern. Immun.* 19:813-24; Thompson 等人 (2006) *Cancer Res.* 66:3381-5)。已经提出通过抑制 PD1 与 PD-L1 的局部相互作用可以在一部分肿瘤患者中逆转免疫抑制。

罗氏(Roche)研发的抗 PD-L1 抗体 Atezolizumab、德国默克(Merck KGaA)和美国辉瑞(Pfizer)合作开发的抗 PD-L1 抗体 Avelumab、阿斯利康研发的 Durvalumab 显示了对部分肿瘤患者的治疗效果。其它抗 PD-L1 抗体包括 YW243.55.S70 (重链和轻链可变区显示在 WO2010/077634 中的 SEQ ID NOs 20 和 21 中)和 WO2007/005874 中公开的抗 PD-L1 抗体等。

CD47首先被鉴定为整联蛋白相关蛋白(integrin-associated protein，IAP)（Brown E.J.等人，Integrin-associated protein (CD47) and its ligands, Trends Cell Biol., 2001, 11 (3): 130-135），是一种表达在细胞表面的肿瘤相关抗原。CD47与主要由巨噬细胞和树突细胞表达的一种作为其配体的细胞表面免疫球蛋白SIRPα相互作用，产生一系列的级联反应，并由此抑制巨噬细胞和树突细胞对表达CD47的细胞的摄取和吞噬作用。

在正常组织中普遍存在CD47表达，例如，CD47表达在有活力的红细胞表面。CD47的一部分功能是保护有活力的红细胞免受吞噬作用(Oldenborg P.A.等人, Role of CD47 as a marker of self on red blood cells, Science, 2000, 288 (5473): 2051-2054)。此外，在肿瘤中已经观察到CD47的过度表达。表达的CD47通过与巨噬细胞表面的SIRPα结合，释放“不要吃我”的信号，由此抑制肿瘤组织浸润区的巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用。随后，由于肿瘤细胞被抗原呈递细胞(APC)的摄取减少，间接导致了T细胞活化下降；此外，幼稚T细胞上的CD47激活促进免疫抑制性的调节T细胞Tregs的形成和抑制Th1效应细胞的形成（Avice M.N.等人, CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors, J. Immunol., 2000年10月，165 (8): 4624-4631）。

目前已经有报道了多个抗 CD47 抗体，例如美国专利 US2015/0183874 A1 报道了衍生自 B6H12 的人 IgG1 型嵌合单克隆抗体和通过 CDR 移植产生的人源化 B6H12 抗体。中国专利申请号 CN201710759828.9 报导了一种可以特异性结合 CD47 的单克隆抗体“ADI-29341”。

本发明的三链抗CD47/PD-L1双特异性抗体或多特异性抗体至少同时靶向CD47和PD-L1的抗体，且三个抗原结合位点分别结合 CD47 和/或 PD-L1 分子。如上所述，虽然 CD47 在癌细胞上过度表达，但是 CD47 在许多正常组织中的表达导致仅以 CD47 为靶点的抗体通常与

正常血液系统细胞的非特异性结合，引起了抗原沉默（antigen sink）现象。本发明的抗CD47/PD-L1双特异性抗体同时靶向CD47和肿瘤细胞上的PD-L1，通过与肿瘤细胞上PD-L1的特异性结合促进了本发明的抗CD47/PD-L1双特异性抗体对肿瘤细胞的选择性结合，避免了与许多正常组织中表达的CD47结合，由此本发明的三链抗CD47/PD-L1双特异性抗体在增强吞噬作用的同时减少了副作用。

在一个实施方案中，本发明的三链抗CD47/PD-L1双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合PD-L1或CD47的含VH1／VL1对的第一抗原结合位点以及第三多肽链上的特异性结合PD-L1或CD47的单结构域第二抗原结合位点和特异性结合PD-L1或CD47的单结构域第三抗原结合位点。在一个实施方案中，所述三链抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合CD47的含VH1／VL1对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合PD-L1的第一VHH和第二VHH。在另一个实施方案中，所述三链抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合PD-L1的含VH1／VL1对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合CD47的第一VHH和第二VHH。

对于所述特异性结合PD-L1或CD47的含VH1／VL1对的第一抗原结合位点，“VH1／VL1对”包含衍生自任何现有技术中报导的抗PD-L1抗体（例如，上文中例举的抗PD-L1抗体）和将来研发出的抗PD-L1抗体VH1／VL1对的6个CDR或与所述6个CDR中的一个或多个CDR具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列；或者包含衍生自任何现有技术中报导的抗CD47抗体（例如，上文中例举的抗CD47抗体）和将来研发出的抗CD47抗体VH1／VL1对的6个CDR或与所述6个CDR中的一个或多个CDR具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。

对于所述特异性结合PD-L1或CD47的单结构域抗原结合位点，其包含特异性结合PD-L1或CD47的重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)、来自骆驼科血清的天然不含轻链的仅由两条重链组成的骆驼抗体中的重链可变结构域、来自鲨鱼科动物的IgNAR的VH样单结构域、骆驼化的人VH结构域、人源化的骆驼科抗体重链可变结构域。

在一个实施方案中，本发明的三链抗CD47/PD-L1双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合CD47的含VH1／VL1对的第一抗原结合位点以及第三多肽链上的特异性结合PD-L1的单结构域第二和第三抗原结合位点，其中所述特异性结合PD-L1的单结构域第二和第三抗原结合位点结合PD-L1上的相同表位或者不同表位。

在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合CD47的含VH1／VL1对的第一抗原结合位点包含衍生自抗CD47抗体ADI-29341的GSIEHYYWS（SEQ ID NO: 3）所示的VH CDR1、YIYYSGSTNYNPSLKS（SEQ ID NO: 4）所示的VH CDR2、ARGKTGSAA（SEQ ID NO: 5）所示的VH CDR3、RASQGISRWLA（SEQ ID NO: 10）所示的VL CDR1、AASSLQS（SEQ ID NO: 11）所示的VL CDR2和QQTVSFPIT（SEQ ID NO: 12）所示的VL CDR3，或与所述6个CDR中的一个或多个CDR具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。

在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合CD47的含VH1／VL1对的第一抗原结合位点包含衍生自抗CD47抗体ADI-29341的SEQ ID NO: 2/9的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列。

在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合PD-L1的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含SEQ ID NO: 17所示的CDR1、SEQ ID NO: 18所示的CDR2和SEQ ID NO: 19所示的CDR3，或者与所述3个CDR中的一个或多个CDR具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。又在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合PD-L1的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含SEQ ID NO: 15和／或SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

不特别地限制本发明三链抗体中第一多肽链和第三多肽链中免疫球蛋白的重链恒定区的类型，优选地是IgG1、IgG2或IgG4免疫球蛋白的重链恒定区，或与之基本上同一(例如，至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。更优选地，所述重链恒定区是人IgG1免疫球蛋白的重链恒定区，或与之基本上同一(例如，至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，本发明的三链抗CD47/PD-L1双特异性抗体包含IgG4(例如，人IgG4)中使用的重链恒定区。在又一个实施方案中，本发明的三链抗CD47/PD-L1双特异性抗体包含用于IgG1(例如，人IgG1)的重链恒定区。例如，在三链抗体的第一多肽链和第三多肽链的Fc结构域中分别包含具有“CPPC”氨基酸残基的铰链区，和／或分别包含Y349C和S354C(根据Kabat的“EU编号”)，由此，第一多肽链和第三多肽链在Fc区形成链间二硫键，由此，稳定第一多肽链和第三多肽链的正确配对。

在一个实施方案中，本发明三链抗体的第一多肽链和/或第三多肽链在Fc结构域中包含影响抗体效应子功能的氨基酸突变。在一个具体实施方案中，所述氨基酸置换是LALA突变。

在又一个实施方案中，本发明三链抗CD47/PD-L1双特异性抗体的第二多肽链包含κ轻链恒定区或者λ轻链恒定区，例如，人κ轻链恒定区或者人λ轻链恒定区。在一个实施方案中，轻链恒定区包含在SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，本发明三链抗CD47/PD-L1双特异性抗体的第一多肽链和第三多肽链各自的Fc结构域中分别包含“结入扣”的稳定缔合。在一个实施方案中，在所述第一多肽链和第三多肽链之一条链中包含氨基酸置换T366W，并且在所述第一多肽链和第三多肽链之另一条链中包含氨基酸置换T366S、L368A和Y407V(EU编号)。由此一条链中的凸起能够置于另一条链中的空穴中，促进第一多肽链和第三多肽链的正确配对。

在一个实施方案中，本发明三链抗CD47/PD-L1双特异性抗体的第一多肽链和第二多肽链的免疫球蛋白CH1结构域和CL结构域中分别包含凸起或空穴，并且CH1结构域中的所述

凸起或空穴可分别置于 CL 结构域中的所述空穴或凸起中，从而所述第一多肽链和第二多肽链彼此也形成“结入扣”的稳定缔合。

在一个实施方案中，本发明的三链抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 1 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 8 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 14 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

又在一个实施方案中，本发明的三链抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 1 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 8 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 22 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

本发明的三链抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体能够同时与 PD-L1 和 CD47 蛋白结合，且维持了亲本抗体的亲和力常数，由此，能够阻断 SIRPα/CD47 信号传导通路和阻断 PD1/PD-L1 信号传导通路。

在一些实施方案中，与 SIRPα/CD47 信号传导通路和 PD1/PD-L1 信号传导通路相关的病症是各种血液病和实体瘤，包括但不限于急性骨髓性白血病（AML），慢性骨髓性白血病，急性淋巴细胞白血病（ALL），非霍奇金淋巴瘤（NHL），多发性骨髓瘤（MM）、淋巴瘤、乳腺癌、胃癌、肺癌、食管癌、肠癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、胰腺癌、膀胱癌、神经胶质瘤、黑素瘤和其他实体瘤。另外，通过阻断 SIRPα/CD47 信号传导通路能够增进 NOD 小鼠系中的人干细胞植入(WO 2009/046541)，因此，本发明的三链抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体还具有用于人干细胞移植中的潜在益处。

中国专利号 ZL201080064426.3 公开了阻断 SIRPα/CD47 信号传导通路的四价 CD47-抗体恒定区融合蛋白能够治疗、预防或诊断由 SIRPα+细胞介导的自身免疫病和炎性病症，例如，过敏性哮喘或溃疡性结肠炎。这些病症包括急性和慢性炎性病症、变态反应和过敏性疾病、自身免疫病、局部缺血性病症、严重感染、和细胞或组织或器官移植物排斥，包括非人组织移植物(异种移植物)，因此，本发明的三链抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体预期在这些疾病的治疗、预防或诊断也能够发挥作用。

ii) 在一个实施方案中，三链抗体是抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体或多特异性抗体。

PD-L1 是一种免疫检查点抑制分子。肿瘤细胞上表达的 PD-L1 通过与 T 淋巴细胞上的 PD-1 结合而活化 PD-1／PD-L1 信号传导途径，由此抑制 T 淋巴细胞活性，使得 T 淋巴细胞不能有效发挥对肿瘤的杀伤效应，这是肿瘤细胞能够逃避体内免疫系统而失控增殖的原因之一(Yao S, Zhu Y 和 Chen L.，Advances in targeting cell surface signaling molecules for immune modulation. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(2):130-146)。

4-1BB（也称为CD137，TNFRSF9）是活化诱导的表达在活化的T细胞和自然杀伤（NK）细胞上的共刺激受体，是肿瘤坏死因子受体超家族成员之一。4-1BB具有如GenBank登录号AAA62478.2提供的氨基酸序列，或来自非人类物种例如小鼠、啮齿类动物、猴子、猿等的等同氨基酸序列。在T细胞上4-1BB连接(4-1BB ligation)触发信号级联，其导致抗凋亡分子的上

调、细胞因子分泌和增强的效应子功能。在具有降低的细胞毒性能力的功能失调的T细胞中，4-1BB连接显示恢复效应子功能的有效能力(Li SY, Liu Y. Immunotherapy of melanoma with the immune costimulatory monoclonal antibodies targeting CD137. *Clin Pharmacol*, 2013, 5(Suppl 1): 47–53)。在NK细胞上，4-1BB信号传导可以增加抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。

已开发了针对 4-1BB 的激动性单克隆抗体，以利用 4-1BB 信号传导用于癌症免疫疗法(Ye Q, Song DG, Poussin M, Yamamoto T, Best A, Li C 等人，CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(1):44–55)。多种诱导的肿瘤模型和自发肿瘤模型的临床前结果表明，用激动性抗体靶向 4-1BB 可导致肿瘤清除和持久的抗肿瘤免疫性。WO2004010947A2 公开了结合人 4-1BB 并允许人 4-1BB 结合至人 4-1BB 配体的人源化抗 4-1BB 单克隆抗体。

WO2016/061142 中一般性地提及了将抗 PD-L1 抗体分子与 4-1BB 受体靶向剂(例如，刺激经 4-1BB (CD-137)的信号传导的抗体，例如，PF-2566)一起施用。

由于在肿瘤免疫中，靶向多个靶点的治疗方案能够相互协同，对于防止肿瘤的免疫逃逸是有利的，目前靶向肿瘤免疫中的不同靶点的抗体的共施用也进入了临床试验中。但是，共施用需要注射两个独立的抗体产品或需要单次注射两种不同抗体的联合制剂。尽管两次注射允许给药量和时程的灵活性，但是它造成了患者不便依从和疼痛。另外，尽管联合制剂可能提供在给药量方面的某种灵活性，但通常难以找到在溶液中允许两种抗体的化学和物理稳定性的配制条件，原因在于两种抗体的分子特征不同。何况共施用和联合制剂两种不同抗体的疗法可能增加患者和/或付款人的额外花费，因此，需要治疗肿瘤的备选免疫疗法，并且优选地这类备选免疫疗法涉及双特异性抗体。

本发明的抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体或多特异性抗体是至少同时靶向 4-1BB 和 PD-L1 的抗体，且三个抗原结合位点分别结合 4-1BB 和/或 PD-L1 分子，能够通过阻断 PD-1 / PD-L1 信号传导途径且活化 T 细胞和自然杀伤（NK）细胞中的 4-1BB / 4-1BB 配体信号传导途径。在一个实施方案中，所述三链抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 PD-L1 或 4-1BB 的含 VH1 / VL1 对的第一抗原结合位点以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 或 4-1BB 的单结构域第二抗原结合位点和特异性结合 PD-L1 或 4-1BB 的单结构域第三抗原结合位点。在一个实施方案中，所述三链抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 4-1BB 的含 VH1 / VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的第一 VHH 和第二 VHH。在另一个实施方案中，所述三链抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 PD-L1 的含 VH1 / VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 4-1BB 的第一 VHH 和第二 VHH。

对于所述特异性结合 PD-L1 或 4-1BB 的含 VH1 / VL1 对的第一抗原结合位点，“VH1 / VL1 对”包含衍生自任何现有技术中报导的抗 PD-L1 抗体（例如，上文中例举的抗 PD-L1 抗体）和将来研发出的抗 PD-L1 抗体 VH1 / VL1 对的 6 个 CDR 或与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）

的序列；或者包含衍生自任何现有技术中报导的抗 4-1BB 抗体（例如，上文中例举的抗 4-1BB 抗体）和将来研发出的抗 4-1BB 抗体 VH1／VL1 对的 6 个 CDR 或与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。

对于所述特异性结合 PD-L1 或 4-1BB 的单结构域抗原结合位点，其包含特异性结合 PD-L1 或 4-1BB 的重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)、来自骆驼科血清的天然不含轻链的仅由两条重链组成的骆驼抗体中的重链可变结构域、来自鲨鱼科动物的 IgNAR 的 VH 样单结构域、骆驼化的人 VH 结构域、人源化的骆驼科抗体重链可变结构域。

在一个实施方案中，本发明的三链抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 4-1BB 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点，其中所述特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点结合 PD-L1 上的相同表位或者不同表位。

在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 4-1BB 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 4-1BB 抗体 BMS-663513 的 SEQ ID NO: 26/28 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部 6 个重链互补决定区（CDR）与轻链 CDR，或者与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。

在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 4-1BB 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 4-1BB 抗体 BMS-663513 的 SEQ ID NO: 26/28 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列。

在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 17 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3，或者与所述 3 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。又在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 15 和／或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

不特别地限制本发明三链抗 4-1BB /PD-L1 双特异性抗体中第一多肽链和第三多肽链中免疫球蛋白的重链恒定区的类型，优选地是 IgG1、IgG2 或 IgG4 免疫球蛋白的重链恒定区，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。更优选地，所述重链恒定区是人 IgG1 免疫球蛋白的重链恒定区，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，本发明的三链抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体包含 IgG4(例如，人 IgG4)中使用的重链恒定区。在又一个实施方案中，本发明的三链抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体包含用于 IgG1(例如，人 IgG1)的重链恒定区。例如，在三链抗体的第一多肽链和第三多肽链的

Fc 结构域中分别包含具有“CPPC”氨基酸残基的铰链区，和／或分别包含 Y349C 和 S354C(根据 Kabat 的“EU 编号”)，由此，第一多肽链和第三多肽链在 Fc 区形成链间二硫键，由此，稳定第一多肽链和第三多肽链的正确配对。

在一个实施方案中，本发明三链抗 4-1BB /PD-L1 双特异性抗体的第一多肽链和/或第三多肽链在 Fc 结构域中包含影响抗体效应子功能的氨基酸突变。在一个具体实施方案中，所述氨基酸置换是 LALA 突变。

在又一个实施方案中，本发明三链抗 4-1BB /PD-L1 双特异性抗体的第二多肽链包含 κ 轻链恒定区或者 λ 轻链恒定区，例如，人 κ 轻链恒定区或者人 λ 轻链恒定区。在一个实施方案中，轻链恒定区包含在 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，本发明三链抗 4-1BB /PD-L1 双特异性抗体的第一多肽链和第三多肽链各自的 Fc 结构域中分别包含“结入扣”的稳定缔合。在一个实施方案中，在所述第一多肽链和第三多肽链之一条链中包含氨基酸置换 T366W，并且在所述第一多肽链和第三多肽链之另一条链中包含氨基酸置换 T366S、L368A 和 Y407V(EU 编号)。由此一条链中的凸起能够置于另一条链中的空穴中，促进第一多肽链和第三多肽链的正确配对。

在一个实施方案中，本发明三链抗 4-1BB /PD-L1 双特异性抗体的第一多肽链和第二多肽链的免疫球蛋白 CH1 结构域和 CL 结构域中分别包含凸起或空穴，并且 CH1 结构域中的所述凸起或空穴可分别置于 CL 结构域中的所述空穴或凸起中，从而所述第一多肽链和第二多肽链彼此也形成“结入扣”的稳定缔合。

在一个实施方案中，本发明的三链抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 25 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 27 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 14 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

又在一个实施方案中，本发明的三链抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 25 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 27 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 22 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

本发明的三链抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体能够同时与 PD-L1 和 4-1BB 蛋白结合，且维持了亲本抗体的亲和力常数，由此，能够阻断 PD-1／PD-L1 信号传导途径且活化 T 细胞和自然杀伤（NK）细胞中的 4-1BB／4-1BB 配体信号传导途径。本发明的三链抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体能够用于与所述信号传导途径相关的疾病的治疗、预防或诊断。

iii) 在一个实施方案中，三链抗体是抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体或多特异性抗体。

本实施方案涉及阻断 PD-1／PD-L1 信号传导途径和作用于 LAG-3 信号传导途径的一种抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体或多特异性抗体。

LAG-3(淋巴细胞活化基因-3，也称为 CD223)是在活化的 T 细胞和 B 细胞上表达的细胞表面分子，是具有免疫抑制活性的细胞消耗标志物，已经显示所述细胞表面分子在 CD8+ T

细胞消耗中发挥作用。

II 类组织相容性复合体（MHC-II）是 LAG-3 的配体，也已经确定了 LAG-3 的其他配体（例如 L-选择素和半乳凝素-3）（Anderson A.C.等人, Lag-3, tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation, Immunity, 2016, 44 (5): 989-1004; Kouo T.等人，Galectin-3 shapes antitumor immune responses by suppressing $CD8^+$ T cells via LAG-3 and inhibiting expansion of plasmacytoid dendritic cells，*Cancer Immunol Res.* 2015 April ; 3(4): 412–423）。

在癌症中，表达LAG-3的调节性T细胞（Regulatory T cells，Tregs）具有增强的抑制抗肿瘤活性，而表达LAG-3的细胞毒CD8+ T细胞具有降低的增殖速率和效应细胞因子产生(Scurr M.等人, Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP^+ $Foxp3^-$ T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than $Foxp3^+$ regulatory T cells, Mucosal Immunol. 2014, 7 (2): 428-439）。由金属蛋白酶切割并分泌在细胞微环境中的LAG-3的剪接变体与抗原呈递细胞上的MHC-II结合时具有免疫激活作用（Casati C.等人, Soluble human LAG-3 molecule amplifies the in vitro generation of type 1 tumor-specific immunity, Clinical Cancer Research. American Association for Cancer Research; 2006, 66 (8): 4450-4460）。

在黑素瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、造血癌、头颈癌患者中已经报道了LAG-3+肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）(Demeure C.E.等人, T Lymphocytes infiltrating various tumour types express the MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 (LAG-3): role of LAG-3/MHC class II interactions in cell-cell contacts, Eur. J. Cancer, 2001, 37 (13): 1709-1718)。在多种癌症小鼠模型中基于抗体的LAG-3阻断恢复了CD8+效应T细胞并减少了Treg群体。

本发明人已开发了一种抑制 LAG-3 信号传导通路的单克隆抗体，为抗 LAG-3 抗体 ADI-31853，具有 SEQ ID NO: 30/35 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列。

本发明的三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体或多特异性抗体至少同时靶向 LAG-3 和 PD-L1 的抗体，且三个抗原结合位点分别结合 LAG-3 和/或 PD-L1 分子。在一个实施方案中，所述三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 PD-L1 或 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 或 LAG-3 的单结构域第二抗原结合位点和特异性结合 PD-L1 或 LAG-3 的单结构域第三抗原结合位点。在一个实施方案中，所述三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的第一 VHH 和第二 VHH。在另一个实施方案中，所述三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 PD-L1 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 LAG-3 的第一 VHH 和第二 VHH。

对于所述特异性结合 PD-L1 或 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，“VH1／VL1 对”包含衍生自任何现有技术中报导的抗 PD-L1 抗体（例如，上文中例举的抗 PD-L1 抗体）和将来研发出的抗 PD-L1 抗体 VH1／VL1 对的 6 个 CDR 或与所述 6 个 CDR 中的一个

或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列；或者包含衍生自任何现有技术中报导的抗 LAG-3 抗体（例如，上文中例举的抗 LAG-3 抗体）和将来研发出的抗 LAG-3 抗体 VH1／VL1 对的 6 个 CDR 或与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。

对于所述特异性结合 PD-L1 或 LAG-3 的单结构域抗原结合位点，其包含特异性结合 PD-L1 或 LAG-3 的重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)、来自骆驼科血清的天然不含轻链的仅由两条重链组成的骆驼抗体中的重链可变结构域、来自鲨鱼科动物的 IgNAR 的 VH 样单结构域、骆驼化的人 VH 结构域、人源化的骆驼科抗体重链可变结构域。

在一个实施方案中，本发明的三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点，其中所述特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点结合 PD-L1 上的相同表位或者不同表位。

在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 LAG-3 抗体 ADI-31853 的 GSIYSESYYWG（SEQ ID NO: 31）所示的 VH CDR1、 SIVYSGYTYYNPSLKS（SEQ ID NO: 32）所示的 VH CDR2、ARVRTWDAAFDI（SEQ ID NO: 33）所示的 VH CDR3、QASQDISNYLN（SEQ ID NO: 36）所示的 VL CDR1、DASNLET（SEQ ID NO: 37）所示的 VL CDR2 和 QQVLELPPWT（SEQ ID NO: 38）所示的 VL CDR3，或与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。在一个实施方案中，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 LAG-3 抗体 ADI-31853 的 SEQ ID NO: 30/35 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列。

在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 17 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3，或者与所述 3 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列。又在一个实施方案中，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 15 和／或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

不特别地限制本发明三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体中第一多肽链和第三多肽链中免疫球蛋白的重链恒定区的类型，优选地是 IgG1、IgG2 或 IgG4 免疫球蛋白的重链恒定区，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。更优选地，所述重链恒定区是人 IgG1 免疫球蛋白的重链恒定区，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，本发明的三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含 IgG4(例如，人 IgG4)中使用的重链恒定区。在又一个实施方案中，本发明的三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含用于 IgG1(例如，人 IgG1)的重链恒定区。例如，在三链抗体的第一多肽链和第三多肽链的 Fc 结构域中分别包含具有“CPPC”氨基酸残基的铰链区，和／或分别包含 Y349C 和 S354C(根据 Kabat 的“EU 编号”)，由此，第一多肽链和第三多肽链在 Fc 区形成链间二硫键，由此，稳定第一多肽链和第三多肽链的正确配对。

在一个实施方案中，本发明三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体的第一多肽链和/或第三多肽链在 Fc 结构域中包含影响抗体效应子功能的氨基酸突变。在一个具体实施方案中，所述氨基酸置换是 LALA 突变。

在又一个实施方案中，本发明三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体的第二多肽链包含 κ 轻链恒定区或者 λ 轻链恒定区，例如，人 κ 轻链恒定区或者人 λ 轻链恒定区。在一个实施方案中，轻链恒定区包含在 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列。

在一个实施方案中，本发明三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体的第一多肽链和第三多肽链各自的 Fc 结构域中分别包含“结入扣”的稳定缔合。在一个实施方案中，在所述第一多肽链和第三多肽链之一条链中包含氨基酸置换 T366W，并且在所述第一多肽链和第三多肽链之另一条链中包含氨基酸置换 T366S、L368A 和 Y407V(EU 编号)。由此一条链中的凸起能够置于另一条链中的空穴中，促进第一多肽链和第三多肽链的正确配对。

在一个实施方案中，本发明三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体的第一多肽链和第二多肽链的免疫球蛋白 CH1 结构域和 CL 结构域中分别包含凸起或空穴，并且 CH1 结构域中的所述凸起或空穴可分别置于 CL 结构域中的所述空穴或凸起中，从而所述第一多肽链和第二多肽链彼此也形成“结入扣”的稳定缔合。

在一个实施方案中，本发明的三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 29 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 34 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 14 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

又在一个实施方案中，本发明的三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 29 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 34 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 22 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

本发明的三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体能够同时与 PD-L1 和 LAG-3 蛋白结合，且维持了亲本抗体的亲和力常数，由此，能够通过阻断 PD-1／PD-L1 信号传导途径且阻断 LAG-3 信号传导途径。本发明的三链抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体能够用于与所述信号传导途径相关的疾病的治疗、预防或诊断。

III. 本发明的三链抗体变体

在某些实施方案中，构思了本文例示的双特异性抗体的氨基酸序列变体。例如，可能想

要改善双特异性抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。可以通过向编码双特异性抗体的核苷酸序列引入适宜修饰或通过肽合成制备双特异性抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如，从抗体的氨基酸序列内部缺失残基和/或将残基插入所述氨基酸序列中和/或置换所述氨基酸序列中的残基。可以产生缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体，只要所述最终构建体拥有想要的特征，例如抗原结合作用。

表 1 中在“保守性置换”标题下显示保守性置换。表 1 中在“示例性置换”标题下显示并且参考氨基酸侧链类别如下文进一步描述更明显的变化。可以将氨基酸置换引入目的抗体中并且对产物筛选所需的活性，例如，保留/改善的抗原结合作用或降低的免疫原性。

表 1

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu，Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

氨基酸可以根据常见的侧链特性分组：

(1)疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu; Ile;

(2)中性亲水：Cys、Ser、Thr、Asn; Gln;

(3)酸性：Asp、Glu;

(4)碱性：His、Lys、Arg;

((5)影响链方向的残基：Gly、Pro;

(6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守性置换将使这些分类之一的成员交换为另一个分类的成员。

IV. 免疫缀合物

本发明的三链抗体能够重组融合于或化学缀合(包括共价和非共价缀合)至异源蛋白或多肽以产生融合蛋白。蛋白质、多肽或肽与抗体融合或缀合的方法是本领域已知的。参见，例如，美国专利号 5,336,603、5,622,929 和 EP 367,166。

另外，本发明的三链抗体可以与标记序列(如肽)融合以促进纯化。在优选的实施方案中，标记氨基酸序列是六组氨酸肽，如 pQE 载体(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)等中提供的标签，它们中的许多是可商业获得的。如 Gentz 等人, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 中所述，例如，六组氨酸提供融合蛋白的便利纯化。用于纯化的其他肽标签包括但不限于血凝素("HA")标签，其对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson 等人, 1984, Cell 37:767)和"flag"标签。

在其他实施方案中，本发明的三链抗体与诊断剂或可检测剂缀合。这类抗体可以作为临床检验方法的部分(如确定特定疗法的效力)，用于监测或预测疾病或病症的发作、形成、进展和/或严重性。可以通过将抗体与可检测物质偶联实现这类诊断和检测，所述可检测物质包括但不限于多种酶，如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶；辅基，如但不限于链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素；荧光物质，如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光物质，如但不限于鲁米诺；生物发光物质，如但不限于萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白；放射性物质，如但不限于碘(^{131}I、^{125}I、^{123}I 和 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^{3}H)、铟(^{115}In、^{113}In、^{112}In 和 ^{111}In)、锝(^{99}Tc)、铊(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga、^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、^{153}Sm、^{177}Lu、^{159}Gd、^{149}Pm、^{140}La、^{175}Yb、^{166}Ho、^{90}Y、47Sc、^{186}Re、^{188}Re、^{142}Pr、^{105}Rh、^{97}Ru、^{68}Ge、^{57}Co、^{65}Zn、^{85}Sr、^{32}P、^{153}Gd、^{169}Yb、^{51}Cr、^{54} Mn、^{75}Se、^{113}Sn 和 ^{117}Tin；和用于各种正电子发射成像术中的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

本发明还包括与治疗性部分缀合的三链抗体的用途。三链抗体可缀合到治疗性部分，如细胞毒素（例如细胞生长抑制剂或细胞杀伤剂），治疗剂或放射性金属离子，例如 α 发射体。术语"细胞毒素"或"细胞毒性剂"包括有害于细胞的任何物质。

另外，三链抗体可以与调节给定生物学反应的治疗性部分或药物部分缀合。治疗性部分或药物部分不得解释为限于经典的化学治疗药。例如，药物部分可以是拥有所需生物学活性的蛋白质、肽或多肽。这类蛋白质可以例如包括毒素如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素、霍乱毒素、或白喉毒素；蛋白质如肿瘤坏死因子、α-干扰素、β-干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤维蛋白溶酶原激活物、凋亡剂、抗血管生成剂或生物学反应调节物，例如淋巴因子。

另外，抗体可以缀合至治疗性部分如放射性金属离子，如 α-发射体如 ^{213}Bi 或可用于使放

射金属离子(包括但不限于 ^{131}In、^{131}LU、^{131}Y、^{131}Ho、^{131}Sm)缀合至多肽的大环螯合剂。在某些实施方案中，大环螯合剂是 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)，其可通过接头分子附着到抗体上。这类接头分子是本领域公知的并且在 Denardo 等人, 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90 中描述，所述文献每篇通过引用的方式完整并入。

用于治疗性部分与抗体缀合的技术是熟知的，参见，例如 Arnon 等人, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy"，引自 Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld 等人 (编著)，第 243-256 页(Alan R. Liss, Inc. 1985)。

抗体也可以连接至固相支持物，所述支持物特别可用于免疫测定法或靶抗原的纯化。此类固相支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

V. 本发明的三链抗体的生产和纯化

本发明的三链抗体可以例如通过固态肽合成(例如 Merrifield 固相合成)或重组生产获得。为了重组生产，将编码所述三链抗体的第一多肽链的多核苷酸、第二多肽链的多核苷酸和/或第三多肽链的多核苷酸分离并插入一个或多个载体中以便进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。使用常规方法，可以轻易地分离所述多核苷酸并将其测序。在一个实施方案中，提供了包含本发明的一种或多种多核苷酸的载体，优选地表达载体。

可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。表达载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

一旦已经制备了用于表达的包含本发明的一种或多种多核苷酸的表达载体，则可以将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中。多种技术可以用来实现这个目的，例如，原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质体的转染或其他常规技术。

在一个实施方案中，提供了包含一种或多种本发明多核苷酸的宿主细胞。在一些实施方案中，提供了包含本发明表达载体的宿主细胞。如本文所用，术语"宿主细胞"指可以工程化以产生本发明的三链抗体的任何种类的细胞系统。适于复制和支持本发明的三链抗体表达的宿主细胞是本领域熟知的。根据需要，这类细胞可以用特定表达载体转染或转导，并且可以培育大量含有载体的细胞用于接种大规模发酵器以获得足够量的本发明三链抗体用于临床应用。合适的宿主细胞包括原核微生物，如大肠杆菌，真核微生物如丝状真菌或酵母，或各种真核细胞，如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、昆虫细胞等。可以使用适于悬浮培养的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7); 人胚肾系(HEK 293 或 293F 细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝脏细胞(Hep G2)、CHO 细胞、NSO 细胞、骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0 等。适于产生蛋白质的哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如 Yazaki 和 Wu，Methods in Molecular Biology，第 248 卷(B.K.C. Lo 编著，Humana Press，Totowa，NJ)，第 255-268 页(2003)。在一个优选的实施方案中，所述宿主细胞是 CHO、HEK293 或 NSO 细胞。

本领域已知在这些宿主细胞系统中表达外源基因的标准技术。在一个实施方案中，提供了产生本发明的三链抗体的方法，其中所述方法包括在适于表达所述三链抗体的条件下培养如本文中提供的宿主细胞，所述宿主细胞包含编码所述三链抗体的多核苷酸，并且从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述三链抗体。

如本文所述制备的三链抗体可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于如净电荷、疏水性、亲水性等因素，并且这些对本领域技术人员是显而易见的。

可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的三链抗体的纯度，所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。可以通过本领域已知的多种测定法，鉴定、筛选或表征本文提供的三链抗体的物理/化学特性和/或生物学活性。

VI. 药物组合物和试剂盒

在另一个方面，本发明提供了组合物，例如，药物组合物，所述组合物包含与可药用载体配制在一起的本文所述的三链抗体。如本文所用，“可药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。本发明的药物组合物适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、直肠、脊髓或表皮施用(例如，通过注射或输注)。

本文中还公开了本文所述的三链抗体与一种以上治疗剂组合后获得的组合物，所述治疗剂选自以下类别(i)-(iii)中的一个、两个或全部类别：(i)增强抗原呈递(例如，肿瘤抗原呈递)的药物；(ii)增强效应细胞反应(例如，B 细胞和/或 T 细胞活化和/或动员)的药物；或(iii)减少免疫抑制的药物。

本发明的组合物可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型，如液态溶液剂(例如，可注射用溶液剂和可输注溶液剂)、分散体剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。常见的优选组合物处于可注射用溶液剂或可输注溶液剂形式。优选的施用模式是肠胃外(例如，静脉内、皮下、腹腔(i.p.)、肌内)注射。在一个优选实施方案中，通过静脉内输注或注射施用三链抗体。在另一个优选实施方案中，通过肌内、腹腔或皮下注射施用三链抗体。

如本文所用的短语“肠胃外施用“和“肠胃外方式施用”意指除了肠施用和局部施用之外的施用模式，通常通过注射施用，并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、皮内、腹腔、经气管、皮下注射和输注。

治疗性组合物一般应当是无菌的并且在制造和储存条件下稳定。可以将组合物配制为溶液、微乳液、分散体、脂质体或冻干形式。可以通过将活性化合物(即三链抗体)以要求的量加入适宜的溶剂中，随后过滤消毒，制备无菌可注射溶液剂。通常，通过将所述活性化合物并入无菌溶媒中来制备分散体，所述无菌溶媒含有基础分散介质和其他成分。可以使用包衣剂如卵磷脂等。在分散体的情况下，可以通过使用表面活性剂来维持溶液剂的适宜流动性。可以通过在组合物中包含延迟吸收的物质例如单硬脂酸盐和明胶而引起可注射组合物的延长吸收。

在某些实施方案中，可以口服施用本发明的三链抗体，例如随惰性稀释剂或可食用载体

一起经口施用。本发明的三链抗体也可以封闭在硬壳或软壳明胶胶囊中、压缩成片剂或直接掺入受试者的膳食中。对于口服治疗施用，所述化合物可以随赋形剂一起掺入并且以可摄取的片剂、颊用片剂、锭剂(troche)、胶囊剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂(wafer)等形式使用。为了通过非肠胃外施用方法施用本发明的三链抗体，可能需要将所述三链抗体与防止其失活的材料包衣或随这种材料共施用。还可以用本领域已知的医疗装置施用治疗组合物。

本发明的药物组合物可以包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明所述三链抗体。“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量等变动治疗有效量。治疗有效量是任何有毒或有害作用不及治疗有益作用的量。相对于未治疗的受试者，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤生长率)至少约 20%、更优选地至少约 40%、甚至更优选地至少约 60%和仍更优选地至少约 80%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价本发明的三链抗体抑制可度量参数(例如，肿瘤体积)的能力。

“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在受试者中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量小于治疗有效量。

包含本文所述三链抗体的试剂盒也处于本发明的范围内。试剂盒可以包含一个或多个其他要素，例如包括：使用说明书；其他试剂，例如标记物或用于偶联的试剂；可药用载体；和用于施用至受试者的装置或其他材料。

VII. 三链抗体的用途

本文公开的三链抗体具有体外和体内诊断用途以及治疗性和预防性用途。例如，可以将这些分子施用至体外或离体的培养细胞或施用至受试者，例如，人类受试者，以治疗、预防和/或诊断多种抗原相关的疾病，例如癌症、自身免疫病、急性和慢性炎性疾病、感染性疾病(例如，慢性传染病或败血症)。

在一个方面，本发明提供了体外或体内检测生物样品，例如血清、精液或尿或组织活检样品(例如，来自过度增生性或癌性病灶)中存在相关抗原的诊断方法。该诊断方法包括：(i)在允许相互作用发生的条件下使样品(和任选地，对照样品)与如本文所述的三链抗体接触或向受试者施用所述三链抗体和(ii)检测所述三链抗体和样品(和任选地，对照样品)之间复合物的形成。复合物的形成表示存在相关抗原，并且可以显示本文所述治疗和／或预防的适用性或需求。

在一些实施方案中，在治疗之前，例如，在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测相关抗原。可以使用的检测方法包括免疫组织化学、免疫细胞化学、FACS、ELISA 测定、PCR 技术(例如，RT-PCR)或体内成像技术。一般地，体内和体外检测方法中所用的三链抗体直接或间接地用可检测物质标记以促进检测结合的或未结合的结合物。合适的可检测物质包括多种生物学活性酶、辅基、荧光物质、发光物质、顺磁(例如，核磁共振活性)物质和放射性物质。

在一些实施方案中，体内确定相关抗原的水平和/或分布，例如，以非侵入方式确定(例如，

通过使用合适的成像技术(例如，正电子发射断层摄影术(PET)扫描)检测可检测物标记的本发明三链抗体。在一个实施方案中，例如，通过检测用 PET 试剂(例如，^{18}F-氟脱氧葡萄糖(FDG))以可检测方式标记的本发明三链抗体，体内测定相关抗原的水平和/或分布。

在一个实施方案中，本发明提供了包含本文所述三链抗体和使用说明书的诊断试剂盒。

在另一个方面，本发明涉及使用三链抗体体内用来治疗或预防需要在受试者中调节免疫应答的疾病，从而抑制或减少相关疾病如癌性肿瘤、自身免疫病、急性和慢性炎性疾病、感染性疾病(例如，慢性传染病或败血症)的出现或复发。可以单独使用本发明的三链抗体。备选地，三链抗体可以与其他癌症治疗剂／预防剂组合施用。当本发明的三链抗体与一种或多种其他药物组合施用时，这种组合可以按任何顺序施用或者同时施用。

因此，在一个实施方案中，本发明提供一种调节受试者中免疫应答的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的三链抗体。在另一个实施方案中，本发明提供一种防止受试者中疾病出现或者复发的方法，所述方法包括向受试者施用预防有效量的本文所述的三链抗体。

在一些实施方案中，用三链抗体治疗和／或预防的癌包括但不限于实体瘤、血液学癌(例如，白血病、淋巴瘤、骨髓瘤，例如，多发性骨髓瘤)及转移性病灶。在一个实施方案中，癌是实体瘤。实体瘤的例子包括恶性肿瘤，例如，多个器官系统的肉瘤和癌，如侵袭肺、乳房、卵巢、淋巴样、胃肠道的(例如，结肠)、肛门、生殖器和生殖泌尿道(例如，肾、膀胱上皮、膀胱细胞、前列腺)、咽、CNS (例如，脑、神经的或神经胶质细胞)、头和颈、皮肤(例如，黑素瘤)、鼻咽(例如，分化或未分化的转移性或局部复发性鼻咽癌)和胰的那些癌、以及腺癌，包括恶性肿瘤，如结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。

在一些实施方案中，癌选自黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、食管癌、胃肠道间质肿瘤(GIST)、肾癌(例如，肾细胞癌)、肝癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、头颈部肿瘤、胃癌、血液学恶性病(例如，淋巴瘤)。

在一些实施方案中，用三链抗体治疗和／或预防的感染性疾病包括目前不存在有效疫苗的病原体或常规疫苗对其未及完全有效的病原体。这些包括但不限于 HIV、(甲型、乙型和丙型)肝炎、流感、疱疹、贾弟鞭毛虫(Giardia)、疟疾、利什曼原虫(Leishmania)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)。本发明例示的三链抗体对 PD-L1 阻断作用特别可用来对抗随感染过程推移出现变异抗原的病原体(如 HIV)所建立的感染。这些变异抗原在施用抗人 PD-L1 抗体时能够被视为外来抗原，由此，本发明例示的三链抗体能够通过 PD-L1 激发不受负向信号抑制的强烈 T 细胞反应。

在一些实施方案中，用本发明的三链抗体治疗和／或预防炎性和自身免疫性疾病及移植物抗宿主病(GvHD)，来下调免疫系统。可以通过施用本发明三链抗体治疗和／或预防的自身免疫疾病的例子包括但不限于斑秃、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎节段性回肠炎、红斑狼疮、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎等。可以通过施用本发明三链抗体治疗和／或预防的炎性疾病的例子包括但不限于哮喘、脑炎、炎性肠病、过敏性疾病、败血性休克、肺纤维化、关节炎

和因慢性病毒性或细菌性感染产生的慢性炎症。

描述以下实施例以辅助对本发明的理解。不意在且不应当以任何方式将实施例解释成限制本发明的保护范围。

实施例

实施例 1. 抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的构建、表达、纯化、性质鉴定及药效试验

实施例 1.1. 抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的构建

在本实施例中，构建了 2 种抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体，分别命名为(1) 双特异性抗体 Kh2NF-PC，其结构示意图如图 1A 所示；和(2) 双特异性抗体 Kh2NF-PC-NL，其结构示意图如图 1B 所示。

从图 1A 的结构示意图可见，双特异性抗体 Kh2NF-PC 由 3 条多肽链组成，肽链#1 具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，其包含衍生自抗 CD47 抗体 ADI29341 的 SEQ ID NO: 2 所示的 VH 氨基酸序列、在所述 VH 氨基酸序列 C 端的衍生自人 IgG1 的 SEQ ID NO: 6 所示 CH1 氨基酸序列、以及在所述 CH1 氨基酸序列 C 端的衍生自人 IgG1 的 SEQ ID NO: 7 所示 Fc 区氨基酸序列；肽链#2 具有 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列，其包含衍生自抗 CD47 抗体 ADI29341 的 SEQ ID NO: 9 所示 VL 氨基酸序列、以及在所述 VL 氨基酸序列 C 端的 SEQ ID NO: 13 所示人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列；且肽链#3 具有 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列，其包含 SEQ ID NO: 16 所示的第一和第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列、在所述第一和第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列之间的 SEQ ID NO: 20 所示连接肽氨基酸序列、以及在所述第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列 C 端的衍生自人 IgG1 的 SEQ ID NO: 21 所示 Fc 区氨基酸序列。

从图 1B 的结构示意图可见，Kh2NF-PC-NL 也由 3 条多肽链组成，肽链#1 具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，肽链#2 具有 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列，且肽链#3 从 N 端至 C 端具有 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列，所述肽链#3 包含 SEQ ID NO: 16 所示的第一和第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列（在所述第一和第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列之间无连接肽）：以及在所述第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列 C 端的衍生自 IgG1 的 SEQ ID NO: 21 所示的 Fc 区氨基酸序列。

如下构建抗 CD47/PD-L1 的双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 的三条链：将 CD47 抗体 ADI-29341 的 VH C 端连接于人 IgG1 的恒定区 N 端获得肽链#1，其中 Fc 区包含 LALA 突变，以减弱本发明抗体的效应子功能，且包含“结入扣”突变，以与肽链#3 稳定缔合；肽链#2 衍生自 ADI-29341 的 VL 和人 κ 轻链恒定区；肽链#3 包含串联的第一和第二抗 PD-L1 VHH，在所述两个抗 PD-L1 VHH 之间无连接肽（在双特异性抗体 Kh2NF-PC-NL 的情形）或以 20 个氨基酸残基$(G_4S)_4$的柔性肽连接（在双特异性抗体 Kh2NF-PC 的情形），将第二抗 PD-L1 VHH C 端连接至衍生自 IgG1 的 Fc 区氨基酸序列 N 端获得肽链#3，其中 Fc 区包含 LALA 突变，以减弱本发明抗体的效应子功能，且包含“结入扣”突变，以与肽链#1 稳定缔合。

实施例 1.2. 抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的表达和纯化

在本实施例中，将编码实施例 1.1 中构建的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和

Kh2NF-PC-NL 的各三条链的核苷酸序列均通过多克隆位点连接入市售的真核表达载体 pTT5，在真核细胞中进行表达和纯化，获得了双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL。具体操作如下。

委托苏州金唯智生物科技有限公司(Genewiz)合成了双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 的上述各三条链的编码核苷酸序列。分别将所合成的三条链的编码核苷酸序列用限制性内切酶 XbaI（New England Biolabs）和 NotI（New England Biolabs）酶切，然后在 T4 DNA 连接酶(New England Biolabs)的作用下分别与同样经 XbaI 和 NotI 双酶切的载体 pTT5 连接，获得三个分别含有所述三条编码核苷酸序列的重组载体。

所述三个重组载体经测序验证正确后用于随后的表达。

将 HEK293 细胞(购自 Invitrogen 公司)传代培养于 Expi293 细胞培养液（购自 Invitrogen 公司）中。转染前一天离心细胞培养物，获得细胞沉淀，用新鲜的 Expi293 细胞培养液悬浮细胞，将细胞密度调整为 1×10^6 个细胞/ml。继续培养 HEK293 细胞，使得转染当天的培养物中细胞密度约为 2×10^6 个细胞/ml。取 HEK293 细胞悬浮液终体积 1/10 的 F17 培养基（购自 Gibco 公司，产品目录号 A13835-01）作为转染缓冲液。向每毫升转染缓冲液中加入 10μg 的 1: 1: 1 摩尔比率的上述制备的分别包含编码肽链#1、肽链#2 或肽链#3 的核苷酸序列的重组质粒，混匀，再加入聚乙烯亚胺(polyethylenimine（PEI）)（Polysciences，目录号：23966）30ug，混匀，室温温育 10 分钟后，将 PEI/DNA 混合物轻柔倒入 HEK293 细胞悬浮液中。轻轻混匀，置于 8%CO_2、36.5℃过夜培养。

过夜培养后，向培养瓶中补加转染后培养物体积 1/50 的浓度为 200 g/L 的 FEED（Sigma，目录号：H6784-100G）和转染后培养物体积 1/50 的浓度为 200 g/L 的葡萄糖溶液，轻轻混匀，置于 8%CO_2、36.5℃继续培养。20 小时后，加入 VPA（Gibco，目录号：11140-050）至终浓度为 2 mM/L。连续培养至第 7 天或者细胞活力≤60%时，收集培养物，以 7500 转／分钟离心 30 分钟，取细胞上清，使用 SARTOPORE(Sartorius，目录号：5441307H4)过滤后，在 *AKTApure* 系统(GE Healthcare)上通过亲和层析和离子交换层析进行纯化。

具体的亲和层析纯化操作步骤为：选用 MabSelect SuRe（GE Healthcare，目录号：17-5438-03）亲和层析柱，并置于 *AKTApure* 系统内。用 0.1 M NaOH 对装备有 MabSelect SuRe 亲和层析柱的 *AKTApure* 系统过夜除内毒，然后用 5 倍柱体积的结合缓冲液（Tris 20 mM，NaCl 150 mM，pH 7.2）清洗系统以及平衡柱子。将上述过滤后的细胞上清通过柱子。用 5 至 10 倍柱体积的结合缓冲液再平衡，使用 *AKTApure* 系统配备的紫外检测装置监测至紫外走平。然后，用洗脱缓冲液（柠檬酸+柠檬酸钠 100 mM，pH 3.5）洗脱抗体，根据紫外吸收值来收集样品。每 1 ml 的收集液加 80 ul 的中和缓冲液（Tris-HCl 2M）中和备用于进一步的离子交换层析。

具体的离子交换层析纯化操作步骤为：选用 Superdex 200 Increase 10/300 GL(GE Healthcare，目录号：10245605)离子交换层析柱，并置于 *AKTApure* 系统内。用 0.1 M NaOH 对装备有 Superdex 200 Increase 10/300 GL 离子交换层析柱的 *AKTApure* 系统过夜除内毒。然后，用蒸馏水清洗系统以及柱子。使用 5-10 倍柱体积的上样缓冲液(柠檬酸+柠檬酸钠 100 mM,

pH 5.0）平衡柱子，直至电导以及 pH 稳定。将所获得的置有样品的中和缓冲液（Tris-HCl 2M）进行缓冲液交换，交换为上样缓冲液，然后上样；使用 5 倍柱体积的上样缓冲液再平衡。以洗脱缓冲液 2(柠檬酸+柠檬酸钠 100mM, NaCl 1 M, pH 5.0)的含量为 0-100%的梯度进行线性洗脱，共洗脱 20 个柱体积，根据紫外吸收值来收集样品。

利用大小排阻层析 (size exclusion chromatography; SEC)检测收集的各级分管中样品的纯度。根据 SEC 结果将纯度大于 95%的级分管中的样品合并。SEC 结果如图 2A 和图 2B 所示，双特异性抗体 Kh2NF-PC 纯度为 97.76％，Kh2NF-PC-NL 纯度为 97.86％。

将纯化后的双特异性抗体溶液使用 15 ml 超滤离心管，4500 转／分钟离心 30 分钟。使用 PBS 将蛋白稀释后继续离心，4500 转／分钟离心 30 分钟，重复该操作 2 次，以更换缓冲液。将更换缓冲液后的抗体合并，测抗体浓度。

实施例 1.3. 测定抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的解离常数

使用 Octet 系统(ForteBio 公司生产)通过动力学结合测定法确定本发明上述两种示例性抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 结合 CD47 和 PD-L1 的平衡解离常数（K_D）。按照文献中报导的方法（Estep, P 等人，High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. *MAbs*, 2013，5(2): p. 270-278）进行 ForteBio 亲和力测定。简言之，在实验开始前半个小时，将 AHC 传感器（Pall，目录号：1506091）浸泡于 SD 缓冲液（PBS 1×，BSA 0.1%，吐温 20 0.05%）中于室温平衡。向 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板（Greiner）的孔中分别加入 100 μl 的 SD 缓冲液作为空白对照(用于扣除背景)、100 μl 100nM 纯化的双特异性抗体 Kh2NF-PC、Kh2NF-PC-NL 和作为对照的抗 PD-L1 人源化 Nb-Fc 抗体(PCT/CN2017/095884)、抗 CD47 抗体 ADI 29341、100 μl 稀释于 SD 缓冲液中作为抗原的 rh PD-L1(100 nM)和 h CD47(100 nM) （Acrobiosystems）的溶液。将抗人 IgG Fc 生物传感器 AHC 浸没于分别含所述抗体溶液的孔中，在室温浸没 600 秒上样。随后将传感器在 SD 缓冲液中洗涤至达到基线，然后浸没于含 100 ul 抗原溶液的孔中，监测抗体与抗原的缔合。随后将传感器转移至含有 100 ul SD 缓冲液的孔，监测抗体解离。转速为 400 转／分钟，温度为 30℃。通过 Octet 分析软件(ForteBio)拟合经背景校正的缔合曲线和解离曲线，产生缔合(k_{on})和解离(k_{dis})速率常数，它们随后用来计算平衡解离常数(K_D)。表 2、表 3 和图 3 中显示了抗体的 k_{on}、k_{dis} 和 K_D 数据。

表 2. 通过 ForteBio 动力学结合测定法确定的抗体对 rh PD-L1 的解离常数(K_D)

抗体名称	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{dis} (s^{-1})	K_D (M)
人源化 Nb-Fc	2.33E+05	3.71E -03	1.60E-08
Kh2NF-PC-NL	2.28E+05	3.67E -03	1.61E-08
Kh2NF-PC	2.12E+05	4.09E -03	1.92E-08
ADI 29341	N.B.	N.B.	N.B.

注：N.B: 不可检测到.

表 3. 通过 ForteBio 动力学结合测定法确定的抗体对 h CD47 的解离常数(K_D)

抗体名称	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{dis} (s^{-1})	K_D (M)
人源化 Nb-Fc	N.B.	N.B.	N.B.
Kh2NF-PC-NL	1.19E+06	1.28E -03	1.07E-09
Kh2NF-PC	1.18E+06	1.55E -03	1.31E-09
ADI 29341	7.74E+05	1.80E -03	2.32E-09

通过以上数据可见，本发明的双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 能够同时和溶液中的 PD-L1 和 CD47 蛋白结合，且维持了亲本抗体的亲和力常数。

实施例 1.4. 本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体与过量表达 CD47 或 PD-L1 的 CHO 细胞的结合分析

通过 FACS 测量本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 与过量表达 CD47 或 PD-L1 的 CHO 细胞的结合。

简而言之，使用 ExpiCHO™ Expression System Kit (Invitrogen，目录号：A29133)，根据制造商的说明书实施如下操作：将携带克隆至多克隆位点 MCS 的人 PD-L1 cDNA（Sino Biological）的 pCHO1.0 载体（Invitrogen）转染至中国仓鼠卵巢癌细胞（CHO-S）（Invitrogen），产生过量表达人 PD-L1 的 CHO 细胞（CHO-S-PD-L1 细胞）。将 CHO-S-PD-L1 细胞计数，用细胞培养基稀释至 1×10^6 个细胞/ml,，向 U 型底 96 孔板中以 100 µl/孔加入。在离心机上以 400 g 离心 5 分钟，去除细胞培养基。分别将 100 µl 系列稀释的本发明的双特异性抗体 Kh2NF-PC、Kh2NF-PC-NL 和作为对照的人源化 Nb-Fc 加入 U 型板并重悬细胞，冰上静置 30 分钟。400 g 离心 5 分钟，去除上清，通过用 PBS 洗涤细胞，移除未结合的抗体。400 g 离心 5 分钟，去除 PBS。每孔加入 100 µl 1:200 稀释的 PE 缀合的抗人 Fc 抗体（Jackson Immuno Research），冰上避光孵育 30 分钟。400 g 离心 5 分钟，去除上清。通过用 PBS 洗涤细胞，移除未结合的 PE 缀合的抗人 Fc 抗体。用 100 µl PBS 重悬细胞，通过 FACS 检测抗体与细胞的结合。结果见图 4A。

由图 4A 可见，本发明的双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 均能够与细胞表面表达的 PD-L1 相结合，并维持了亲本抗体的结合 EC50。

同样地，通过将携带克隆至多克隆位点 MCS 的人 CD47 cDNA（Sino Biological）的 pCHO1.0 载体（Invitrogen）转染至中国仓鼠卵巢癌细胞（CHO-S）（Invitrogen），产生过量表达人 CD47 的 CHO-S 细胞（CHO-S-CD47 细胞）。

对 CHO-CD47 实施 FACS 检测，除了使用的细胞不同和使用 ADI 29341 抗体作为阳性对照抗体、IgG1 作为阴性对照抗体之外，其余实验操作均与上述 CHO-S-PD-L1 细胞的 FACS 检测一样。本申请中使用的 IgG1 阴性对照具有 SEQ ID NO: 23 所示的重链(HC)氨基酸序列和 SEQ ID NO: 24 所示的轻链(LC)氨基酸序列。

结果如图 4B 所示。由图 4B 可见，本发明的双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL

均能够与细胞表面表达的 CD47 相结合，并维持了亲本抗体的结合 EC50。

实施例 1.5. 本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的可溶性检测

聚乙二醇（PEG）是一种极性非离子型沉淀剂。通过 PEG 沉淀法（Li li 等人，Application of a PEG precipitation method for solubility screening: A tool for developing high protein concentration formulations. *Protein Science*, 2013.22: p. 1118-23），检测了本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体在不同浓度的 PEG 中的溶解情况。

将本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 溶液分别浓缩至 5 mg/ml 浓度。向 96 孔细胞培养板中加入 40 μl/孔的所述双特异性抗体。使用修美乐(Humira)作为阳性对照。在 96 孔细胞培养板从左到右的第 1 至 11 纵列中分别加入 30%PEG6000（Sigma，目录号：81255-250G）26.7 μl、40 μl、46.7 μl、53.3 μl、60 μl、66.7 μl、73.3 μl、80 μl、86.7 μl、93.3 μl、100 μl。将每孔用 PBS 补足至总体积 200 μl，由此，每孔中抗体的终浓度均为 1 mg/ml，且 96 孔细胞培养板从左到右的第 1 至 11 纵列中 PEG 浓度梯度分别为 4%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%。室温放置 1 小时。测定 OD500 nm 处的吸光度。实验结果如图 5 所示。

由图 5 可见，本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 与修美乐具有相似的可溶性。

实施例 1.6 本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的热稳定性检测

差示扫描荧光法（differential scanning fluorimetry；DSF）能够根据蛋白质图谱中的荧光变化过程提供有关蛋白质结构稳定性的信息，检测蛋白的构型变化，获得蛋白质的熔解温度（T_m）。本实施例采用 DSF 法测定了本发明抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的 T_m 值。

将本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 溶液分别用 PBS 溶液稀释至 1 mg/ml。

向 4 μl SYPRO Orange Protein Gel Stain（Gibco，目录号：S6650）中加入 196 μl PBS，将 SYPRO Orange Protein Gel Stain 稀释 50 倍。

向 96 孔 PCR 板（Nunc）中加入 50 μl 的上述浓度为 1 mg/ml 的双特异性抗体，并加入 10 μl 的上述 50 倍稀释的 SYPRO Orange Protein Gel Stain，然后加入 40 μl 水。置于 7500 Real Time PCR 系统（Themro Fisher）进行检测。设置系统温度为每分钟升高 0.5 度，荧光曲线绝对值出现峰值时对应的温度即为该蛋白质的 Tm。

实验结果如下表 4 所示。本发明的双特异性抗体出现三个 T_m 值，且均>55°C，因此，具有较好的热稳定性。

表 4.

	Tm1	Tm2	Tm3
Kh2NF-PC	57.80	64.05	76.95
Kh2NF-PC-NL	55.90	62.54	76.76

进一步地，将本发明的双特异性抗体在 40℃放置 10、20、30 天之后，研究了其纯度及生物学活性的变化，进行了抗体的长期热稳定性评价。具体而言，将本发明的抗 CD47/PD-L1

双特异性抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 溶液在 PBS 中分别浓缩至 5 mg/ml 浓度，然后以 200 μl/管分装于 EP 管中，避光置于 40℃。

于第 0、1、3、7、10、20、30 天各取一管进行 SEC-HPLC 测定本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体在 40℃放置后的纯度。实验结果如图 6 所示。本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体即使在 40℃放置长达 30 天，依然具有高的抗体纯度。

此外，如上述实施例 1.4 所述的那样，检测第 0 天和 30 天时本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体与表达 CD47 或 PD-L1 的 CHO-S 细胞的结合活性。实验结果如图 7A 和 7B 所示。

由图 6、图 7A 和 7B 可见，本发明的双特异性抗体具有较好的长期热稳定性，且保持了生物学活性。

实施例 1.7. 基于 MOA 法检测本发明双特异性抗体的抗 PD-L1 活性

考虑到对抗体的探索应该建立在对其作用机制（mechanisms of action ； MOA）的了解和生物学活性的基础上，本实施例使用 PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay, Cell Propagation Model（Promega 公司），研究了本发明的双特异性抗体的抗 PD-L1 生物学活性。

Promega 公司的 PD-1 / PD-L1 Blockade Bioassay 是一种生物学相关的基于 MOA 的测定法，用于测定能够阻断 PD-1 / PD-L1 相互作用的抗体的效力和稳定性。该测定法由两种基因工程细胞系组成:

•PD-1 效应细胞: 稳定表达人 PD-1 和由活化的 T 细胞的核因子(nuclear factor of activated T cells; NFAT）诱导表达萤光素酶的 Jurkat T 细胞。

•PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞: 稳定表达人 PD-L1 的 CHO-K1 细胞和以抗原非依赖性方式活化相应 TCR 的细胞表面蛋白。

PD-1 与 PD-L1 结合可以阻断 NFAT 下游信号的转导，从而抑制萤光素酶的表达，当加入 PD-1 抗体或者 PD-L1 抗体时，这种阻断效应被反转，萤光素酶表达，从而检测到荧光信号。该检测法灵敏度、特异性、准确度都很好，且稳定性很好。

根据制造商的产品说明书进行检测。在实施 MOA 法前 1－2 天传代培养 PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞。弃培养上清，PBS（Gibco）洗细胞。加入适量胰蛋白酶（Gibco）于 37℃ /5% CO_2 消化 3 至 5 分钟。然后，加入 4 倍胰蛋白酶体积的培养基，将细胞转移至 50 ml 离心管并计数。取所需体积细胞，230 g 离心 10 分钟。加入 RPMI 1640 培养基（Gibco），重悬细胞至 4×10^5 个细胞/ml。以 100 μl /孔将细胞悬液加入 96 孔白色细胞培养板（Nunclon），加入 PBS 溶液补充至 200 μl/孔。细胞于 37℃/5% CO_2 培养箱中培养过夜。

同样地，在实施 MOA 法前 1－2 天传代培养 PD-1 效应细胞。计数后取所需体积细胞，170 g 离心 5 分钟。用测试缓冲液（RPMI 1640 培养基+1%FBS）重悬细胞至 1.25×10^6 个细胞/ml。

弃去 95 μl/孔 PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞培养上清。然后，分别加入 40 μl 各受试抗体、作为对照的抗 PD-L1 人源化 Nb-Fc 抗体、IgG1 阴性对照。加入 40 μl 上述制备的 PD-1 效应细胞至检测板的孔中。于 37℃/5% CO_2 培养箱中培养 6 小时。

将 Bio-Glo™缓冲液(Promega 公司)融化，加入 Bio-Glo™ 底物，混匀。将所获得的 Bio-Glo™

试剂以 80 μl/孔加入上述培养 6 小时后的检测板的孔中。室温放置 5 至 10 分钟，读取荧光信号值。

结果如图 8 所示，本发明的双特异性抗体可以解除 PD-1/PD-L1 相互作用对 NFAT 信号通路的抑制作用，且活性优于作为抗 PD-L1 抗体的人源化 Nb-Fc 抗体单独使用。

实施例 1.8. 本发明的双特异性抗体促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力检测

在基于流式细胞术的测定法中测量本发明的抗体 Kh2NF-PC 和 Kh2NF-PC-NL 促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力。

对取自捐赠者的新鲜血液进行密度梯度离心，得到外周血单个核细胞（PBMC）。从分离的 PBMC 中按照 EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit(美国 Stemcell 公司)说明书的方案，纯化得到 CD14 阳性的单个核细胞。简言之，加入 10ng/mL 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF，R&D Systems）贴壁培养连续 7 天；其中在第 5 天加入 20 ng/mL 干扰素-γ（IFN-γ，AcroBiosystem）刺激 1 小时，随后再加入 100 ng/mL 脂多糖（LPS，Sigma）刺激 48 小时，将外周血单个核细胞中的前体细胞诱导分化为巨噬细胞。

将人 PD-L1 通过电穿孔法转入肿瘤细胞 CCRF-CEM（购自 ATCC）中构建成为靶肿瘤细胞 CCRF-CEM-PD-L1。将靶肿瘤细胞 CCRF-CEM-PD-L1 按照 CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Invitrogen，目录号：C34554)的说明，用荧光染料羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯（carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester，CFSE）进行荧光标记。将标记好的肿瘤细胞与上述已经完成诱导分化的巨噬细胞按照 4:1 的细胞数比例共培养，同时加入不同浓度的受试抗体在 37℃孵育 3 小时。然后将细胞洗涤至少两次，加入别藻青蛋白（allophycocyanin，APC）标记的 CD14 抗体（购自 BD），在含 0.1％BSA 的 PBS 中冰上（避光）孵育 30 分钟。将细胞用 PBS 洗涤至少两次并通过流式细胞术进行分析。被吞噬的细胞群体为活细胞中 CD14 阳性并且荧光染料 CFSE 也为阳性的细胞群体。实验结果如图 9 所示。

从图 9 可见，抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体可以有效诱导巨噬细胞对 CD47 和 PD-L1 共表达的靶细胞发挥吞噬作用，其诱导活性和抗 CD47 单克隆抗体相似。

实施例 1.9 本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体促进红细胞凝集活性的检测

现有技术已知大多数的抗 CD47 抗体具有促进红细胞凝集的副作用，因而这些抗 CD47 抗体的治疗应用受到限制。为此，发明人进一步研究了本发明抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的红细胞凝集作用。具体检测方法如下：

采集新鲜人类血液，用 PBS 洗三次后制备成 10%人类红细胞悬液，将人类红细胞与受试抗体（最高浓度为 60ug/ml，三倍系列稀释，总共获得 11 个稀释后浓度）在 37°C 孵育 2-6 小时，该反应在 96 孔圆底板中进行。反应结束后拍照并判断结果。结果判定标准为如果红细胞沉于孔底，平铺呈网状，则发生了红细胞凝集反应（参见图 10 中 Hu5F9（US2015/0183874 A1 中的“5F9”抗体）的结果），如果红细胞未发生凝集反应，则红细胞将呈点状沉于孔底（参见图 10 中的 IgG1 对照）。

在如以上测定法所述进行的实验中，血凝反应结果如图 10 所示。本发明抗体 Kh2NF-PC 的红细胞凝集活性很弱，其促进红细胞凝集的活性明显低于对照组 Hu5F9。可见，本发明的

抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体具有显著降低的红细胞凝集作用，因此在临床治疗中具有显著降低的副作用，可以广泛应用于多种癌症的治疗中。

实施例 1.10 本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体对肿瘤细胞的选择性结合活性研究

人体内正常红细胞表面表达 CD47 蛋白，大多数抗 CD47 单克隆抗体会结合到正常红细胞上，这是造成抗 CD47 单克隆抗体副作用的主要原因之一。本实施例将肿瘤细胞和人红细胞共同孵育，检测了本发明的双特异性抗体对肿瘤细胞的选择性结合性质。具体实验过程如下：

取捐赠者新鲜血液 50 ml，添加 2.5 倍体积的 PBS 溶液，然后轻轻加入到 FiColl（Thermo）12.5 ml 中，分成 4 管，400 g 离心 30 分钟，以零减速度停止离心。去除上层血清及 PBMC，获得最下层的红细胞。

将肿瘤细胞 H292（ATCC）按照 CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Invitrogen，目录号：C34554)的说明，用荧光染料 CFSE 进行荧光标记。将标记好的肿瘤细胞与上述分离出来的人红细胞按照 1:20 的细胞数比例共培养，同时加入不同浓度的受试抗体在 4℃孵育 30 分钟。然后将细胞用 PBS 洗涤至少两次，加入别藻青蛋白（APC）标记的人 Fc 抗体（购自 Biolegend，目录号：409306），在含 0.1％BSA 的 PBS 中冰上（避光）孵育 30 分钟。将细胞用 PBS 洗涤至少两次并通过流式细胞术进行分析。

实验结果如表 5 和图 11 所示，在 1.111 nM 至 0.041nM 的抗体浓度下，本发明的双特异性抗体 Kh2NF-PC 及 Kh2NF-PC-NL 相比较抗 CD47 单克隆抗体 ADI-29341 更倾向于结合肿瘤细胞（在 0.12 nM 时，Kh2NF-PC 及 Kh2NF-PC-NL 分别有 88.51%及 83.24%结合于 H292 细胞表面，而 ADI-29341 只有 5.74%结合于 H292 细胞表面）。

表 5. 抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体结合于 H292 细胞的比例

抗体浓度（nM）	10.000	3.333	1.111	0.370	0.123	0.041	0.014
ADI-29341	3.90%	8.42%	6.15%	14.37%	5.74%	17.68%	3.59%
Kh2NF-PC	12.53%	12.10%	22.98%	44.47%	88.51%	81.97%	14.93%
Kh2NF-PC-NL	11.27%	13.22%	40.95%	61.60%	83.24%	46.32%	1.41%

实施例 1.11 本发明的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的体内抗肿瘤作用

在本实施例中，通过使用 Raji-PD-L1 细胞接种 NOD-SCID 小鼠来产生荷瘤小鼠，并测定了本发明的 CD47/PD-L1 抗体的抗肿瘤作用。

NOD-SCID 小鼠：

雌性 NOD-SCID 小鼠（42-62 天龄）购自北京维通利华实验动物技术有限公司。等级为 SPF 级，数量为 100 只，质检单位为北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证编号为 NO.11400700284978。所述小鼠在到达后驯化 7 天，随后开始研究。

培养细胞和接种小鼠:

将携带克隆至多克隆位点 MCS 的人 PD-L1 cDNA（Sino Biological）的 pCHO1.0 载体（Invitrogen）转染入购自 ATCC 的 Raji 宿主细胞，经压力筛选获得稳定表达人 PD-L1 的 Raji 细胞（Raji-PD-L1 细胞）。将 Raji-PD-L1 细胞进行常规传代培养，以用于后续的小鼠体内实验。

离心收集培养的 Raji-PD-L1 细胞，用 1×PBS 分散细胞，将细胞密度为 10×10^6 个/ml 的 Raji-PD-L1 细胞与 Matrigel 胶（Corning，目录号：356231）1:1 混合，制备成细胞密度为 5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 NOD-SCID 小鼠右侧腹部区域中来建立 Raji-PD-L1 荷瘤小鼠模型。

荷瘤小鼠的分组和给药:

肿瘤细胞接种 8 天后检测各只小鼠的荷瘤体积，挑选出荷瘤体积在 50.56 mm^3 ~ 115.39mm^3 范围内的小鼠并按荷瘤体积大小蛇形分组（每组 6 只小鼠），给药剂量和给药方式如表 6 所示。使用 h-IgG（购自 Equitech-Bio，批号：160308-02，规格为 1g/瓶，用 PBS 配制成 10 mg/ml）用作阴性对照。具体而言，分别在 Raji-PD-L1 细胞接种后第 8、10、12、14、16、18、20 天给药，每周 2-3 次监测小鼠瘤体积和小鼠体重。监测至 33 天后结束。接种后第 33 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：TGI%=100% * (h-IgG 对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(h-IgG 对照组肿瘤体积–h-IgG 对照组给药前肿瘤体积)。h-IgG 对照组给药前肿瘤平均体积为 80.86 mm^3。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

表 6. 实验设计表

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	0.2mg/kg	Q2Dx7	腹腔注射
人源化 Nb-Fc	0.1mg/kg	Q2Dx7	腹腔注射
ADI-29341	0.05mg/kg	Q2Dx7	腹腔注射
人源化 Nb-Fc + ADI-29341	0.1mg/kg +0.1mg/kg	Q2Dx7	腹腔注射
Kh2NF-PC	0.17mg/kg	Q2Dx7	腹腔注射

*每隔 2 天给药，共 7 次

肿瘤抑制率结果如图 17 和表 7 所示:在接种后第 33 天,与 h-IgG 对比，ADI-29341 0.1mg/kg 单药肿瘤抑制率为 88%；ADI-29341 0.1mg/kg 与人源化 Nb-Fc 0.1mg/kg 联合用药的肿瘤抑制率为 107%；抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 0.17mg/kg 的肿瘤抑制率为 111%，肿瘤抑制效果均明显优于人源化 Nb-Fc 0.1mg/kg 的 10%肿瘤抑制率，且抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 具有最佳的肿瘤抑制效果。对小鼠体重检测的结果是各组小鼠的体重之间无显著性差异。

表 7. 第 33 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积(mm^3)	肿瘤抑制率(%)	肿瘤完全消失数(只)
h-IgG	628.98	N/A	N/A
人源化 Nb-Fc 0.1mg/kg	573.65	10%	2
ADI-29341 0.1mg/kg	144.57	88%	1
人源化 Nb-Fc + ADI-29341 0.1+0.1mg/kg	40.34	107%	3
Kh2NF-PC 0.17mg/kg	22.86	111%	3

实施例 2. 抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体的构建、表达、纯化及性质鉴定

实施例 2.1. 抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体的构建

在本实施例中，构建了抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体，命名为双特异性抗体 Kh2NF-P4，其结构示意图如图 1A 所示。

从图 1A 的结构示意图可见，双特异性抗体 Kh2NF-P4 由 3 条多肽链组成，肽链#1 具有 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列，其包含衍生自抗 4-1BB 抗体 BMS-663513 的 SEQ ID NO: 26 所示 VH 氨基酸序列、在所述 VH 氨基酸序列 C 端的衍生自人 IgG1 的 SEQ ID NO: 6 所示的 CH1 氨基酸序列；以及在所述 CH1 氨基酸序列 C 端的衍生自人 IgG1 的 SEQ ID NO: 7 所示的 Fc 区氨基酸序列；肽链#2 具有 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列，其包含衍生自抗 4-1BB 抗体 BMS-663513 的 SEQ ID NO: 28 所示 VL 氨基酸序列、以及在所述 VL 氨基酸序列 C 端的 SEQ ID NO: 13 所示的人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列；且肽链#3 具有 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列，其包含 SEQ ID NO: 16 所示的第一和第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列；在所述第一和第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列之间的 SEQ ID NO: 20 所示的连接肽氨基酸序列；以及在所述第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列 C 端的衍生自人 IgG1 的 SEQ ID NO: 21 所示的 Fc 区氨基酸序列。

如下构建抗 4-1BB/PD-L1 的双特异性抗体 Kh2NF-P4 的三条链：将 4-1BB 抗体 BMS-663513 的 VH C 端连接于人 IgG1 的恒定区 N 端获得肽链#1，其中 Fc 区包含 LALA 突变，以减弱本发明抗体的效应子功能，且包含“结入扣”突变，以与肽链#3 稳定缔合；肽链#2 衍生自 BMS-663513 的 VL 和人 κ 轻链恒定区；肽链#3 包含串联的第一和第二抗 PD-L1 VHH，在所述两个抗 PD-L1 VHH 之间以 20 个氨基酸残基$(G_4S)_4$ 的柔性肽连接，将第二抗 PD-L1 VHH C 端连接至衍生自 IgG1 的 Fc 区氨基酸序列 N 端获得肽链#3，其中 Fc 区包含 LALA 突变，以减弱本发明抗体的效应子功能，且包含“结入扣”突变，以与肽链#1 稳定缔合。

实施例 2.2. 抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体的表达和纯化

在本实施例中，将编码实施例 2.1 中构建的抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-P4 的各三条链的核苷酸序列均通过多克隆位点连接入真核表达载体 pTT5 (Biotechnology Research Institute; Montreal, Canada)，在真核细胞中进行表达和纯化，获得了双特异性抗体 Kh2NF-P4。

质粒转染、抗4-1BB/PD-L1双特异性抗体Kh2NF-P4的表达和纯化操作同上述实施例1.2。双特异性抗体Kh2NF-P4的SEC结果如图12所示，纯度为98.42%。

实施例2.3. 本发明的抗4-1BB/PD-L1双特异性抗体与表达4-1BB或PD-L1的CHO细胞的结合分析

基本如上述实施例1.4所述，通过FACS测量本发明的抗4-1BB/PD-L1双特异性抗体Kh2NF-P4与表达4-1BB或PD-L1的CHO细胞的结合。简而言之，将CHO-S-PD-L1细胞计数，用细胞培养基稀释至1×10^6个细胞/ml,，向U型底96孔板中以100 µl/孔加入。在离心机上以400 g离心5分钟，去除细胞培养基。分别将100 µl系列稀释的本发明的双特异性抗体Kh2NF-P4和作为对照的人源化Nb-Fc加入U型板并重悬细胞，冰上静置30分钟。400 g离心5分钟，去除上清，通过用PBS洗涤细胞，移除未结合的抗体。400 g离心5分钟，去除PBS。每孔加入100 µl 1:200稀释的PE缀合的抗人Fc抗体（Jackson Immuno Research），冰上避光孵育30分钟。400 g离心5分钟，去除上清。通过用PBS洗涤细胞，移除未结合的PE缀合的抗人Fc抗体。用100 µl PBS重悬细胞，通过FACS检测抗体与细胞的结合。结果见图13B。

由图13B可见，本发明的双特异性抗体Kh2NF-P4能够与细胞表面表达的PD-L1相结合，且结合能力和亲本抗体相似。

同样地，通过将携带克隆至多克隆位点MCS的人4-1BB cDNA（Sino Biological）的pCHO1.0载体（Invitrogen）转染入中国仓鼠卵巢癌细胞（CHO-S）（Invitrogen），产生过量表达人4-1BB的CHO-S细胞（CHO-S-4-1BB细胞）。对CHO-S-4-1BB实施FACS检测，除了使用的细胞不同和使用的抗体对照是BMS-663513抗体之外，其余实验操作均与上述CHO-S-PD-L1细胞的FACS检测一样。结果见图13A。

由图13A可见，本发明的双特异性抗体Kh2NF-P4能够与细胞表面表达的4-1BB相结合，且结合能力和亲本抗体相似。

实施例3. 抗LAG-3/PD-L1双特异性抗体的构建、表达、纯化及性质鉴定

实施例3.1. 抗LAG-3/PD-L1双特异性抗体的构建

在本实施例中，构建了抗LAG-3/PD-L1双特异性抗体，命名为双特异性抗体Kh2NF-PL，其结构示意图如图1B所示。

从图1B的结构示意图可见，双特异性抗体Kh2NF-PL由3条多肽链组成，肽链#1具有SEQ ID NO: 29所示的氨基酸序列，其包含衍生自抗LAG-3抗体ADI-31853的SEQ ID NO: 30所示VH氨基酸序列、在所述VH氨基酸序列C端的衍生自人IgG1的SEQ ID NO: 6所示的CH1氨基酸序列、以及在所述CH1氨基酸序列C端的衍生自人IgG1的SEQ ID NO: 7所示的Fc区氨基酸序列；肽链#2具有SEQ ID NO: 34所示的氨基酸序列，其包含衍生自抗LAG-3抗体ADI-31853的SEQ ID NO: 35所示VL氨基酸序列、以及在所述VL氨基酸序列C端的SEQ ID NO: 13所示的人κ轻链恒定区(CL)氨基酸序列；且肽链#3具有SEQ ID NO: 22所示的氨基酸序列，其包含SEQ ID NO: 16所示的第一和第二抗PD-L1 VHH氨基酸序列，在所述

第一和第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列之间无连接肽氨基酸序列；以及在所述第二抗 PD-L1 VHH 氨基酸序列 C 端的衍生自人 IgG1 的 SEQ ID NO: 21 所示的 Fc 区氨基酸序列。

如下构建本发明抗 LAG-3/PD-L1 的双特异性抗体 Kh2NF-PL 的三条链：将 LAG-3 抗体 ADI-31853 的 VH C 端连接于人 IgG1 的恒定区 N 端获得肽链#1，其中 Fc 区包含 LALA 突变，以减弱本发明抗体的效应子功能，且包含“结入扣”突变，以与肽链#3 稳定缔合；肽链#2 衍生自 ADI-31853 的 VL 和人 κ 轻链恒定区；肽链#3 包含串联的第一和第二抗 PD-L1 VHH，在所述两个抗 PD-L1 VHH 之间无连接肽，将第二抗 PD-L1 VHH C 端连接至衍生自 IgG1 的 Fc 区氨基酸序列 N 端获得肽链#3，其中 Fc 区包含 LALA 突变，以减弱本发明抗体的效应子功能，且包含“结入扣”突变，以与肽链#1 稳定缔合。

实施例 3.2. 抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体的表达和纯化

在本实施例中，将编码实施例 3.1 中构建的抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PL 的各三条链的核苷酸序列均通过多克隆位点连接入真核表达载体 pTT5 (Biotechnology Research Institute; Montreal, Canada)，在真核细胞中进行表达和纯化，获得了双特异性抗体 Kh2NF-PL。

质粒转染、抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PL 的表达和纯化操作同上述实施例 1.2。双特异性抗体 Kh2NF-PL 的 SEC 结果如图 14 所示，纯度为 97.84％。

实施例 3.3. 本发明的抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体与表达 LAG-3 或 PD-L1 的细胞的结合分析

基本如上述实施例 1.4 所述，通过 FACS 测量本发明的抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PL 与表达 LAG-3 或 PD-L1 的细胞的结合。简而言之，将 CHO-S-PD-L1 细胞计数，用细胞培养基稀释至 1×10^6 个细胞/ml,，向 U 型底 96 孔板中以 100 μl/孔加入。在离心机上以 400 g 离心 5 分钟，去除细胞培养基。分别将 100 μl 系列稀释的本发明的双特异性抗体 Kh2NF-PL 和作为对照的抗 PD-L1 人源化 Nb-Fc 抗体加入 U 型板并重悬细胞，冰上静置 30 分钟。400 g 离心 5 分钟，去除上清，通过用 PBS 洗涤细胞，移除未结合的抗体。400 g 离心 5 分钟，去除 PBS。每孔加入 100 μl 1:200 稀释的 PE 缀合的抗人 Fc 抗体（Jackson Immuno Research），冰上避光孵育 30 分钟。400 g 离心 5 分钟，去除上清。通过用 PBS 洗涤细胞，移除未结合的 PE 缀合的抗人 Fc 抗体。用 100 μl PBS 重悬细胞，通过 FACS 检测抗体与细胞的结合。结果见图 15A。

由图 15A 可见，本发明的双特异性抗体 Kh2NF-PL 能够与细胞表面表达的 PD-L1 相结合，且结合能力和亲本抗体相似。

通过将携带克隆至多克隆位点 MCS 的人 LAG-3 cDNA（Sino Biological）的 pCHO1.0 载体（Invitrogen）转染至 HEK293 细胞中（Invitrogen），产生过量表达人 LAG-3 的 HEK293 细胞（293-LAG-3 细胞）。

同样地，对 293-LAG-3 细胞实施 FACS 检测，除了使用的细胞不同和使用的抗体对照是抗 LAG-3 抗体 ADI-31853 之外，其余实验操作均与上述 CHO-S-PD-L1 细胞的 FACS 检测一样。结果见图 15B。

由图 15B 可见，本发明的双特异性抗体 Kh2NF-PL 能够与细胞表面表达的 LAG-3 相结合，

且结合能力和亲本抗体相似。

实施例 3.4 本发明的抗 LAG-3/PD-L1 双特异抗体对人 T 细胞的激活实验

本实施例使用混合淋巴细胞实验检测了本发明的抗 LAG-3/PD-L1 双特异抗体对人 T 细胞的激活作用，具体实验过程如下。

取捐赠者新鲜血液 50 ml，添加 2.5 倍体积的 PBS 溶液，然后轻轻加入到 FiColl（Thermo）12.5 ml 中，分成 4 管，400 g 离心 30 分钟，以零减速度停止离心。吸取中间白色条带至 PBS 中，用 PBS 洗 2 次，获得分离的 PBMC。

向 50ml 分离的 PBMC 细胞添加 5 ml T 细胞培养基 X-VIVO 15 (LONZA)，在培养箱中 37℃、6% CO_2 贴壁培养 2 小时，吸取悬浮细胞液用于实施 CD4+细胞分离。另外，对于吸取悬浮细胞液后剩下的细胞，向其添加 3 ml 树状细胞（DC）培养基（X-VIVO 15（Lonza） 99%，人 AB 血清（Access） 1%，HEPES 10 mM，β -Me 50 μM，IL-4（R&D Systems）1000U/ml，GM-CSF（R&D Systems） 1000U/ml），培养 2 天后再添加 3 ml DC 培养基，培养到第 5 天时，添加 rTNF α（R&D Systems）(1000 U/ml)，IL-1 β（R&D Systems）(5 ng/ml)，IL-6（R&D Systems） (10 ng/ml) 和 1 μM PGE2（R&D Systems）培养 2 天，获得分离的 DC 细胞，用作混合淋巴细胞反应（MLR）中使用的 DC 细胞。

按照 Untouched CD4+ T cell Isolation Kit (Invitrogen，目录号 11346D)的说明书，实施 CD4+细胞分离。简而言之，上述将 PBMC 静置培养 2 小时后吸取的悬浮细胞液置于 20 ml 离心管中，200 g 离心 10 分钟，向细胞沉淀物中加入 500 μl 分离液、100 μl AB 型血清、100 μl 试剂盒中配备的纯化抗体，4℃孵育 20 分钟，用分离液清洗一次，再加入 500 μl 珠缓冲液孵育 15 分钟，磁场去除珠，用 T 细胞培养基洗一次，使用 8 ml 培养基重悬细胞，37℃、6% CO_2 培养获得的 CD4+细胞。

将 1×10^7 个 CD4+细胞重悬于 4 ml X-VIVO 15 培养基(LONZA)中，以 1:1 加入 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28（Invitrogen），培养三天，对 CD4+细胞实施珠刺激。

如下实施混合淋巴细胞反应（MLR）。在 96 孔细胞培养板（Nunc）中，将上述分离的 DC 细胞与经珠刺激的 CD4+细胞混合，每孔体积 200 μl，DC 细胞 10000 个，CD4+细胞 100000 个，加入系列稀释的抗体和 1 nM SEE（Toxin technology），使用本机构内自制的 IgG4 抗体作为阴性对照，混合培养 3 天，使用 IL2 试剂盒（Cisbio 公司）检测 IL2 浓度。所述 IgG4 对照抗体具有 SEQ ID NO: 39 所示的重链(HC)氨基酸序列和 SEQ ID NO: 40 所示的轻链(LC)氨基酸序列。

实验结果如图 16 所示，本发明的双特异性抗体可以在体外激活 T 细胞，其激活效果比抗 PD-L1 或抗 LAG-3 抗体单独使用更强。本发明的双特异性抗体体外对 T 细胞的激活作用与抗 PD-L1 和抗 LAG-3 抗体联合使用相似。

尽管已经出于说明本发明的目的显示了某些代表性实施方案和细节，但是本领域技术人员显而易见的是可以对它们进行多种变化和修改而不脱离主题发明的范围。在这个方面，本发明范围仅由以下权利要求限定。

权 利 要 求

1．包含三条多肽链的三链抗体，其中第一多肽链包含第一重链可变结构域，第二多肽链包含第一轻链可变结构域，所述第一重链可变结构域与第一轻链可变结构域配对形成第一抗原结合位点；且第三多肽链包含单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点。

2. 根据权利要求 1 所述的三链抗体，其中所述第一多肽链包含第一重链可变结构域和免疫球蛋白 CH1 结构域，第二多肽链包含第一轻链可变结构域和免疫球蛋白 CL 结构域。

3. 根据权利要求 1 和 2 所述的三链抗体，其中所述第三多肽链的单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点之间具有或者不具有连接肽，

优选地，所述第三多肽链不包含免疫球蛋白 CH1 结构域。

4. 根据权利要求 1－3 中任一项所述的三链抗体，其中所述单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点分别选自重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)、天然缺乏轻链的抗体的重链可变结构域（例如，骆驼科物种中天然存在的重链抗体的重链可变结构域）、鱼类中称为新型抗原受体(NAR)的免疫球蛋白（如鲨鱼血清中天然存在的 IgNAR）中的 VH 样单结构域、和重组的单结构域抗原结合位点（例如，骆驼化的人 VH 结构域、人源化的骆驼科抗体重链可变结构域），例如，所述单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点分别选自骆驼科物种中天然存在的重链抗体的重链可变结构域、骆驼化的人 VH 结构域和人源化的骆驼科抗体重链可变结构域（它们简称为称为“VHH”），由此，所述单结构域第二抗原结合位点和单结构域第三抗原结合位点分别是第一 VHH 和第二 VHH，所述第一 VHH 和第二 VHH 的序列相同或者不同，且结合相同或者不同的抗原表位。

5. 根据权利要求 1－4 中任一项所述的三链抗体，其中第一多肽链从 N 端至 C 端包含第一重链可变结构域、免疫球蛋白 CH1 结构域和 Fc 结构域；第二多肽链从 N 端至 C 端包含第一轻链可变结构域和免疫球蛋白 CL 结构域；且第三多肽链从 N 端至 C 端包含单结构域第二抗原结合位点、单结构域第三抗原结合位点和 Fc 结构域，优选地，所述免疫球蛋白是 IgG1、IgG2 或 IgG4 免疫球蛋白，更优选地，所述免疫球蛋白是人 IgG1 免疫球蛋白。

6. 根据权利要求 5 所述的三链抗体，其中所述第一多肽链和第三多肽链的 Fc 结构域包含免疫球蛋白恒定部分的铰链区，并且所述第一多肽链和第三多肽链彼此通过所述铰链区处的二硫键稳定缔合，例如，在所述三链抗体的第一多肽链和第三多肽链的 Fc 结构域中包含具有“CPPC”氨基酸残基的铰链区，从而所述第一多肽链和第三多肽链彼此通过所述铰链区处氨基酸残基之间形成的二硫键稳定缔合；

优选地，所述第一多肽链和第三多肽链在各自的 Fc 结构域中还分别包含 Y349C 和 S354C 或者 S354C 和 Y349C (根据 Kabat 的“EU 编号”)，从而所述第一多肽链和第三多肽链在 Fc 区进一步形成链间二硫键。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的三链抗体，其中所述第一多肽链和/或第三多肽链在 Fc 结构域中包含影响抗体效应子功能的突变，例如，LALA 突变。

8. 根据权利要求 5－7 中任一项所述的三链抗体，其中所述第一多肽链和第三多肽链在各自的 Fc 结构域中分别包含凸起或空穴，并且第一多肽链 Fc 结构域中的所述凸起或空穴可分别置于第三多肽链 Fc 结构域中的所述空穴或凸起中，由此所述第一多肽链和第三多肽链彼此形成“结入扣”的稳定缔合。

9. 根据权利要求 2－8 中任一项所述的三链抗体，其中所述免疫球蛋白 CH1 结构域和 CL 结构域中分别包含凸起或空穴，并且 CH1 结构域中的所述凸起或空穴可分别置于 CL 结构域中的所述空穴或凸起中，由此所述第一多肽链和第二多肽链彼此形成“结入扣”的稳定缔合。

10. 根据权利要求 1－9 中任一项所述的三链抗体，其中所述第一抗原结合位点、第二抗原结合位点和第三抗原结合位点结合相同抗原或者不同抗原上的表位，

例如，所述第一抗原结合位点结合第一抗原的表位，所述第二抗原结合位点和第三抗原结合位点结合第二抗原上的相同或者不同表位，由此，所述三链抗体是针对第一抗原和第二抗原的双特异性抗体；

所述第一抗原结合位点结合第一抗原的表位，所述第二抗原结合位点和第三抗原结合位点分别结合第二抗原的表位和第三抗原的表位，由此，所述三链抗体是三特异性抗体。

11. 根据权利要求 3－10 中任一项所述的三链抗体，其中所述连接肽包含甘氨酸（G）和丝氨酸（S）残基，例如，包含 GGGGS 重复，优选地，包含 4 个 GGGGS 重复。

12.根据权利要求 1－11 中任一项所述的三链抗体，其中所述抗原是细胞因子、生长因子、激素、信号传导蛋白、炎性介质、配体、细胞表面受体或其片段。

13. 根据权利要求 12 所述的三链抗体，其中所述抗原选自肿瘤相关抗原、免疫检查点分子和免疫系统中的共刺激分子，以及这些分子的配体和／或受体。

14. 根据权利要求 13 所述的三链抗体，其中所述抗原选自 CD47、PD1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、和 4-1BB (CD137) 。

15. 根据权利要求 1－14 中任一项所述的三链抗体，其中所述三链抗体是抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体，且三个抗原结合位点分别结合 CD47 和/或 PD-L1 分子，

例如，所述三链抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 CD47 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的第一 VHH 和第二 VHH；或者包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 PD-L1 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 CD47 的第一 VHH 和第二 VHH；

优选地，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 CD47 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 CD47 抗体 ADI-29341 的 GSIEHYYWS（SEQ ID NO: 3）所示的 VH CDR1、YIYYSGSTNYNPSLKS（SEQ ID NO: 4）所示的 VH CDR2、ARGKTGSAA（SEQ ID NO: 5）所示的 VH CDR3、RASQGISRWLA（SEQ ID NO: 10）所示的 VL CDR1、AASSLQS（SEQ ID NO: 11）所示的 VL CDR2 和 QQTVSFPIT（SEQ ID NO: 12）所示的 VL CDR3，或与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列；所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 17 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ

ID NO: 19 所示的 CDR3，或者与所述 3 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列，

更优选地，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 CD47 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 CD47 抗体 ADI-29341 的 SEQ ID NO: 2/9 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 15 和／或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少 90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列，

最优选地，所述三链抗体包含 SEQ ID NO: 1 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 8 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 22 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

16. 根据权利要求 1－14 中任一项所述的三链抗体，其中所述三链抗体是抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体，且三个抗原结合位点分别结合 4-1BB 和/或 PD-L1 分子，

例如，所述三链抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 4-1BB 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的第一 VHH 和第二 VHH；或者包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 PD-L1 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 4-1BB 的第一 VHH 和第二 VHH;

优选地，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 4-1BB 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自 SEQ ID NO: 26/28 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部 6 个重链互补决定区（CDR）与轻链 CDR，或者与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列；所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 17 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3，或者与所述 3 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列，

更优选地，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 4-1BB 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自 SEQ ID NO: 26/28 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 15 和／或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列，

最优选地，所述三链抗体包含 SEQ ID NO: 25 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 27 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 22 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

17. 根据权利要求 1－14 中任一项所述的三链抗体，其中所述三链抗体是抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体，且三个抗原结合位点分别结合 LAG-3 和/或 PD-L1 分子，

例如，所述三链抗体包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的第一 VHH 和第二 VHH；或者包含第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 PD-L1 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点，以及第三多肽链上的特异性结合 LAG-3 的第一 VHH 和第二 VHH；

优选地，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自抗 LAG-3 抗体 ADI-31853 的 GSIYSESYYWG（SEQ ID NO: 31）所示的 VH CDR1、 SIVYSGYTYYNPSLKS（SEQ ID NO: 32）所示的 VH CDR2、ARVRTWDAAFDI（SEQ ID NO: 33）所示的 VH CDR3、QASQDISNYLN（SEQ ID NO: 36）所示的 VL CDR1、DASNLET（SEQ ID NO: 37）所示的 VL CDR2 和 QQVLELPPWT（SEQ ID NO: 38）所示的 VL CDR3，或与所述 6 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列；所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 17 所示的 CDR1、SEQ ID NO: 18 所示的 CDR2 和 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR3，或者与所述 3 个 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列，

更优选地，所述第一多肽链和第二多肽链上的特异性结合 LAG-3 的含 VH1／VL1 对的第一抗原结合位点包含衍生自 SEQ ID NO: 30/35 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99%或更多序列同一性的序列，所述第三多肽链上的特异性结合 PD-L1 的单结构域第二和第三抗原结合位点均包含 SEQ ID NO: 15 和／或 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，或与之基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多同一)的序列，

最优选地，所述三链抗体包含 SEQ ID NO: 29 所示的第一多肽链、SEQ ID NO: 34 所示的第二多肽链、和 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 22 所示的第三多肽链，或与任一所述序列基本上同一(例如，至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一)的序列。

18. 多核苷酸，其编码权利要求 1－17 中任一项所述的三链抗体中的第一多肽链、第二多肽链和／或第三多肽链。

19. 载体，优选地表达载体，其包含编码权利要求 1－17 中任一项所述的三链抗体中的第一多肽链、第二多肽链和／或第三多肽链的多核苷酸。

20. 宿主细胞，其包含权利要求 18 所述的多核苷酸或权利要求 19 所述的载体，例如，所述宿主细胞是哺乳动物细胞，优选地是 CHO 细胞、HEK293 细胞；所述宿主细胞是原核细胞，优选地是大肠杆菌细胞。

21. 用于生产权利要求 1－17 中任一项所述的三链抗体的方法，所述方法包括步骤(i)在适于表达所述三链抗体的条件下培养权利要求 20 所述的宿主细胞，和(ii) 从所述宿主细胞或所述培养基回收所述三链抗体。

22. 药物组合物，其包含权利要求 1－17 中任一项所述的三链抗体和可药用载体。

23. 根据权利要求 22 所述的药物组合物，其还包含至少一种其他有效成分。

24. 根据权利要求 1－17 中任一项所述的三链抗体和权利要求 22－23 所述的药物组合物的用途，用作在个体中治疗和／或预防疾病的药物或用作疾病的诊断工具，优选地，所述个体是哺乳动物，更优选地是人。

25. 根据权利要求 24 所述的用途，用于自身免疫病、急性和慢性炎性疾病、感染性疾病(例如，慢性传染病或败血症)、肿瘤的治疗和／或预防或诊断，例如，所述肿瘤选自实体瘤、血液学癌(例如，白血病、淋巴瘤、骨髓瘤，例如，多发性骨髓瘤)和转移性病灶。

26. 根据权利要求 24 所述的三链抗体的用途，用于在有需求的受试者中增加造血干细胞植入。

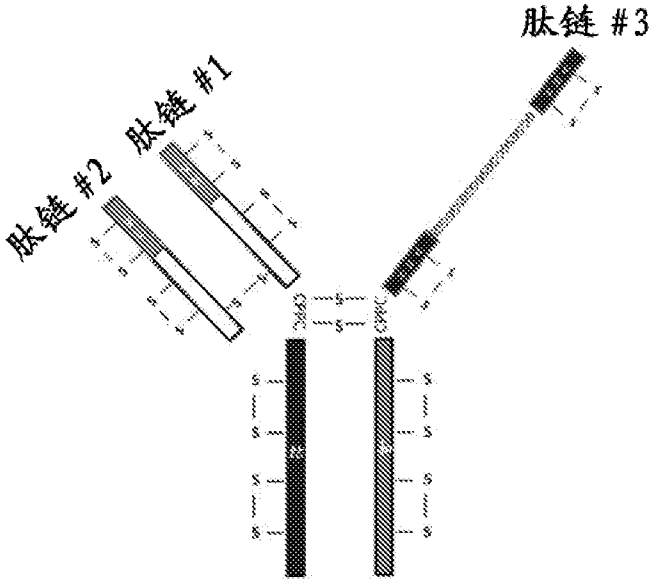


图 1A

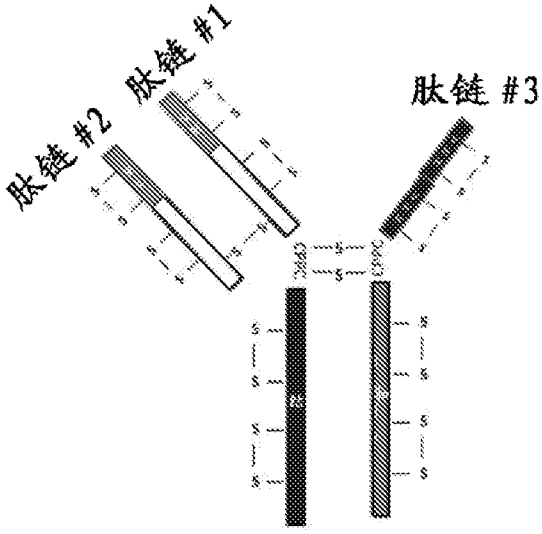


图 1B

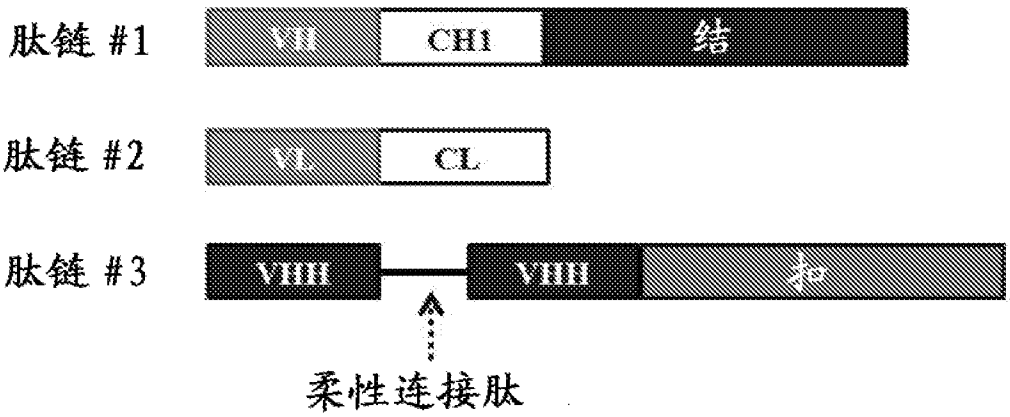


图 1C

抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC 的纯度检测

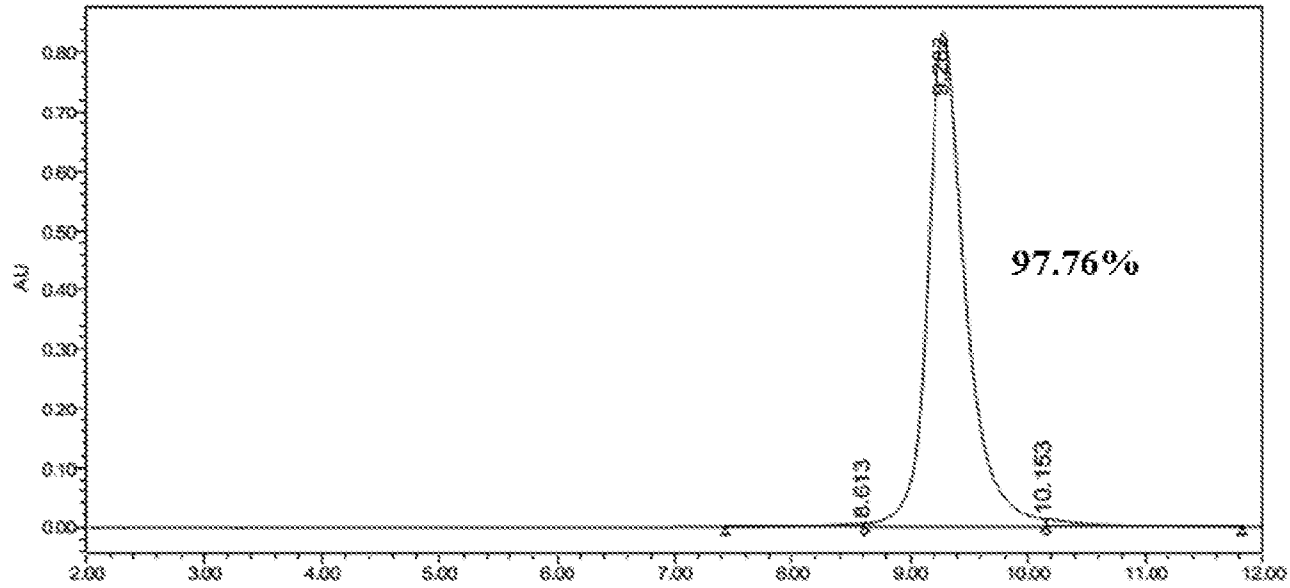


图 2A

抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-PC-NL 的纯度检测

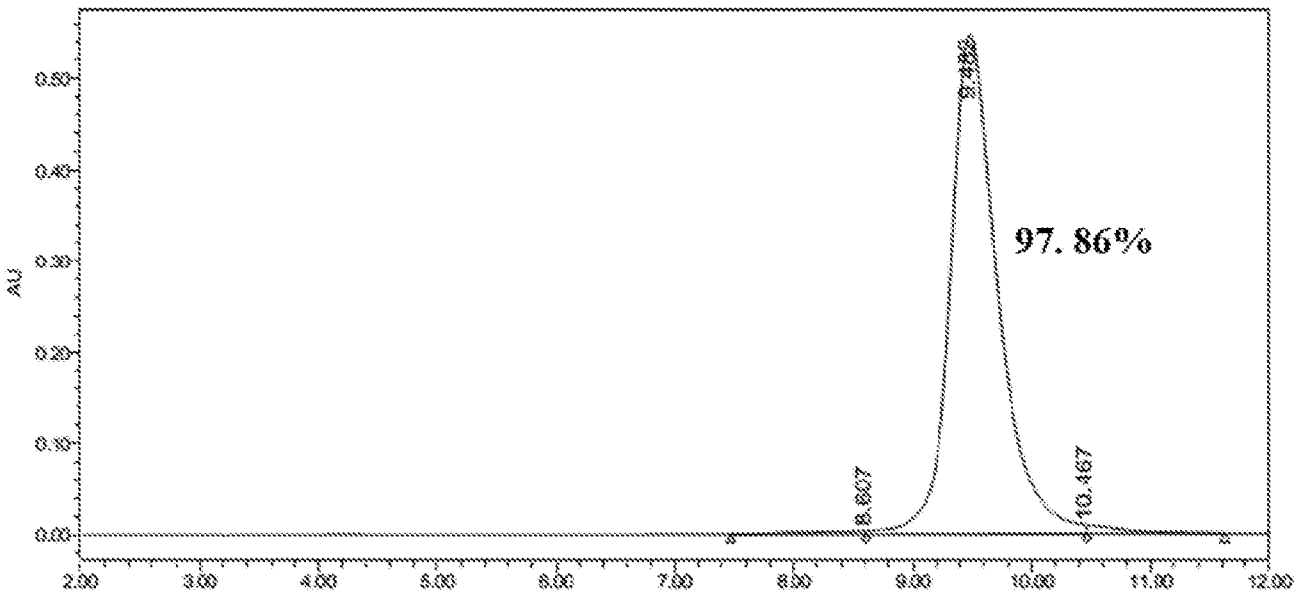


图 2B

抗CD47/PD-L1双特异性抗体的动力学结合测定

蛋白名称	KD (M) IgG在AHC传感器尖上，rh PD-L1 (100nM)在溶液中	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)		KD (M) IgG在AHC传感器尖上，h CD47(100nM)在溶液中	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
人源化 Nb-Fc		1.60E-08	2.33E+05	3.71E-03			N.B.		
KBENF-PC-NL		1.61E-08	2.38E+05	3.67E-03			1.07E-09	1.19E+06	1.28E-03
KB2NF-PC		1.92E-08	2.12E+05	4.09E-03			1.31E-09	1.18E+06	1.55E-03
ADI-29341		N.B.					2.32E-09	7.74E+05	1.80E-03

图3

抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体与过量表达 PD-L1 的 CHO-S 细胞的结合

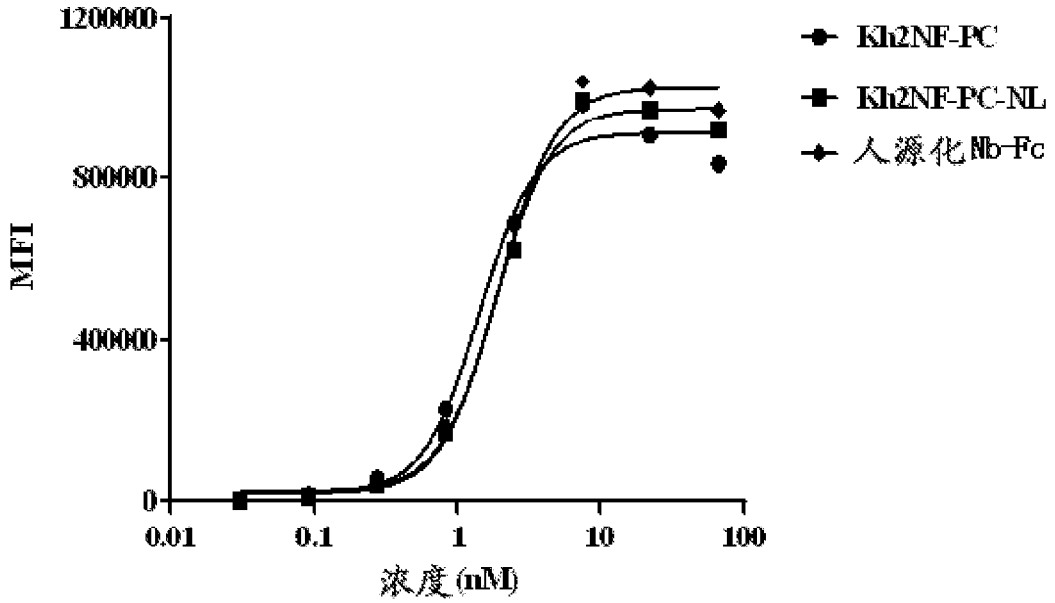


图 4A

抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体与过量表达 CD47 的 CHO-S 细胞的结合

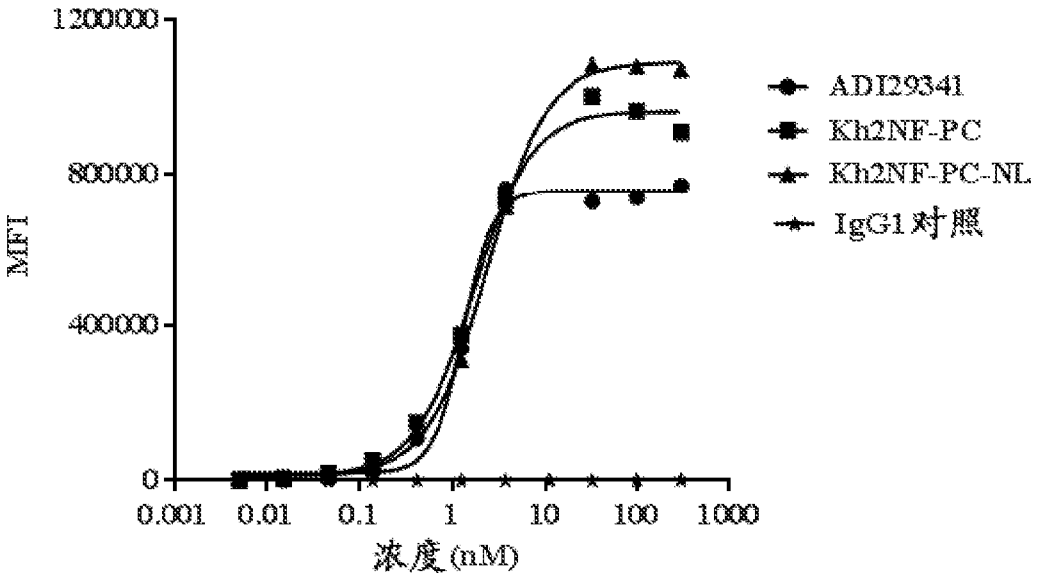


图 4B

抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的可溶性检测

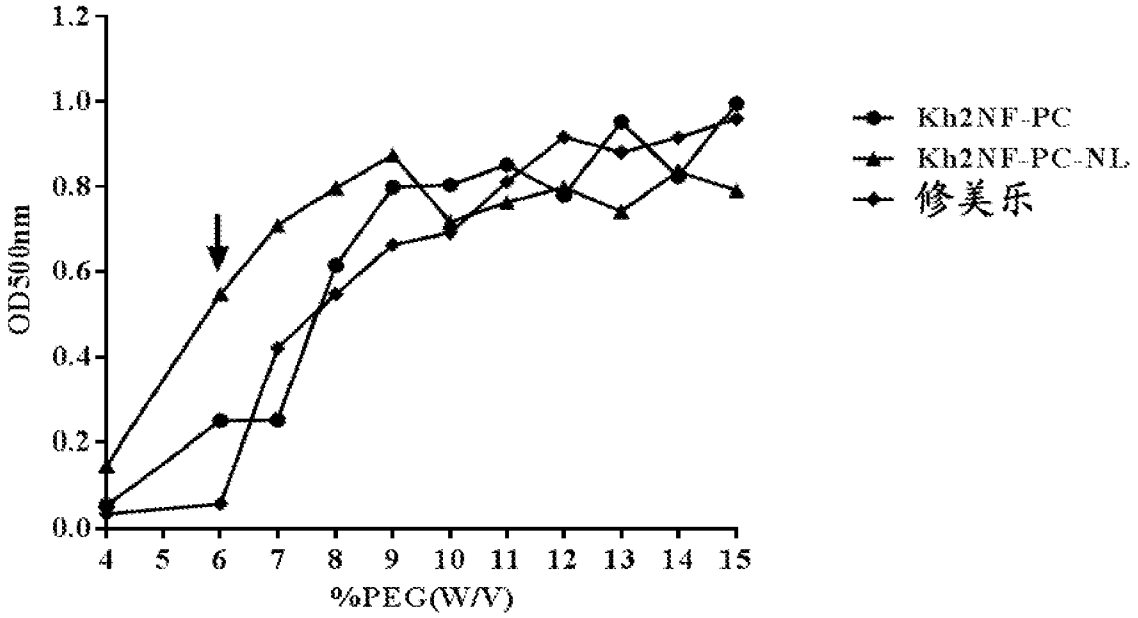


图 5

抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体的热稳定性研究

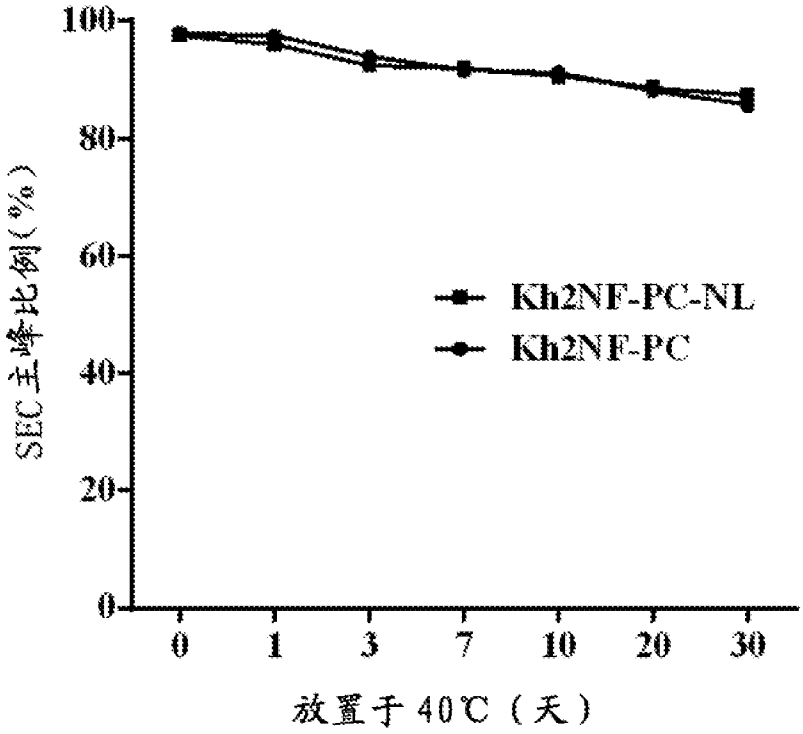


图 6

抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体在第 0 天时和在 40℃放置 30 天时
分别与过量表达 PD-L1 的 CHO-S 细胞的结合

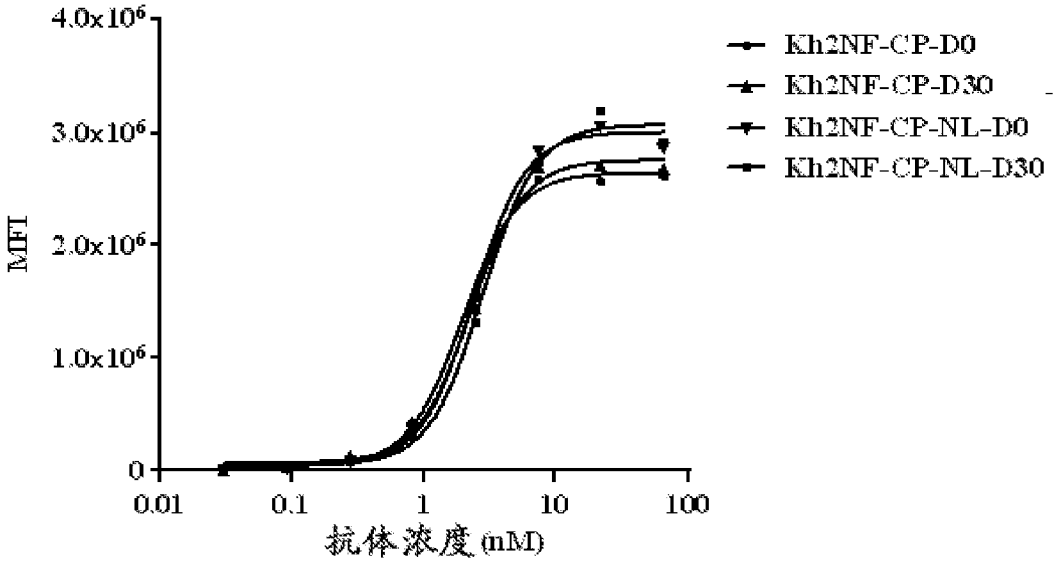


图 7A

抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体在第 0 天时和在 40℃放置 30 天时
分别与过量表达 CD47 的 CHO-S 细胞的结合

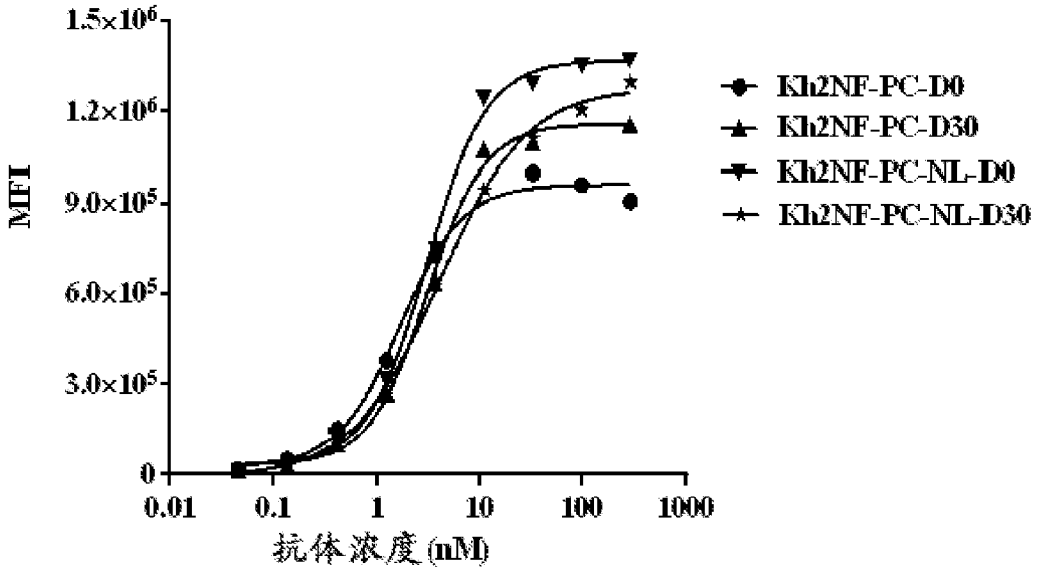


图 7B

MOA 法检测双特异抗体对 PD-1/PD-L1 相互作用的抑制作用

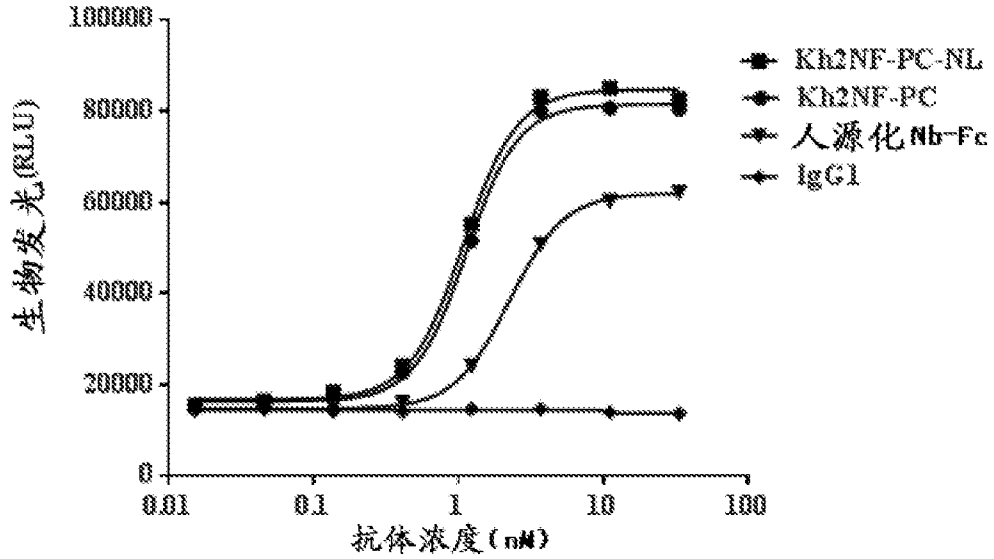


图 8

双特异性抗体诱导巨噬细胞对 CCRF-CEM-PD-L1 细胞的吞噬作用

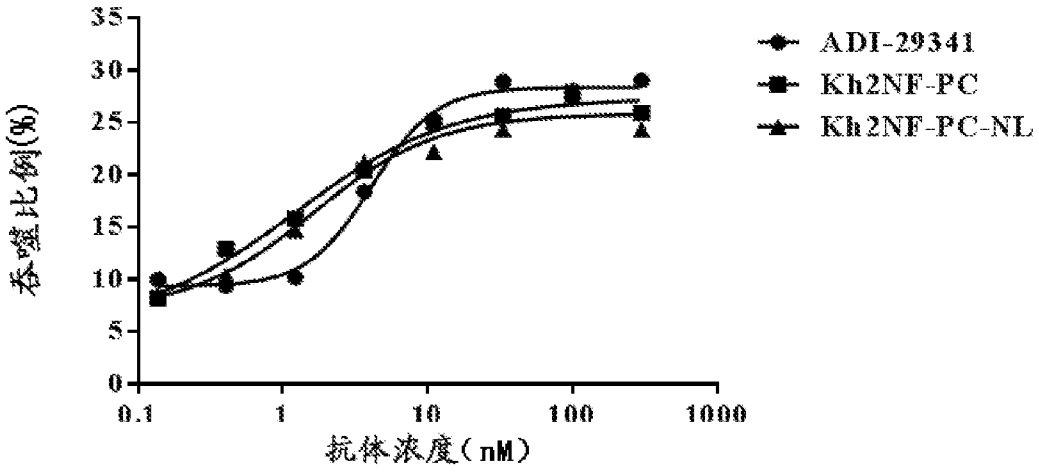


图 9

抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体对红细胞凝集的影响

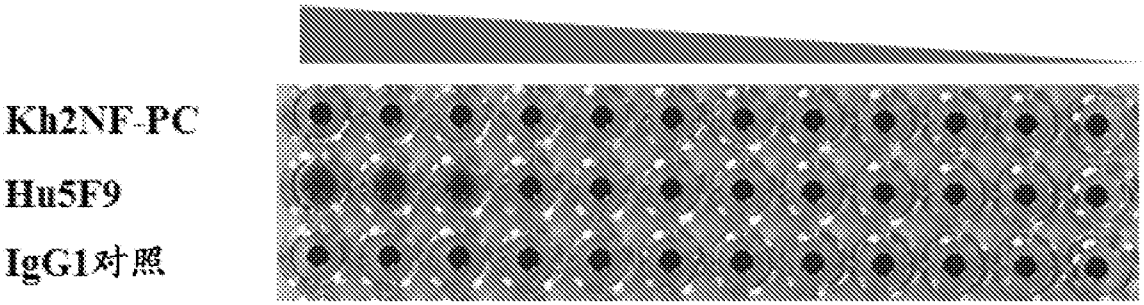


图 10

当肿瘤细胞和人红细胞共同孵育时，选择性结合到肿瘤细胞表面的抗 CD47/PD-L1 双特异性抗体比例

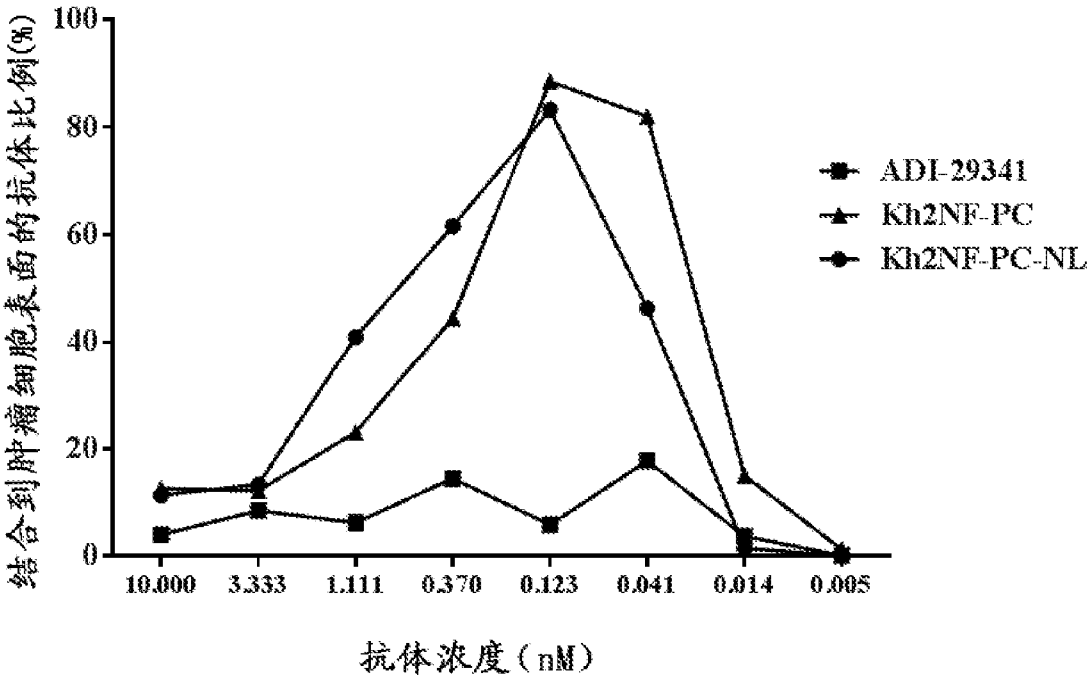


图 11

抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体 Kh2NF-P4 的纯度检测

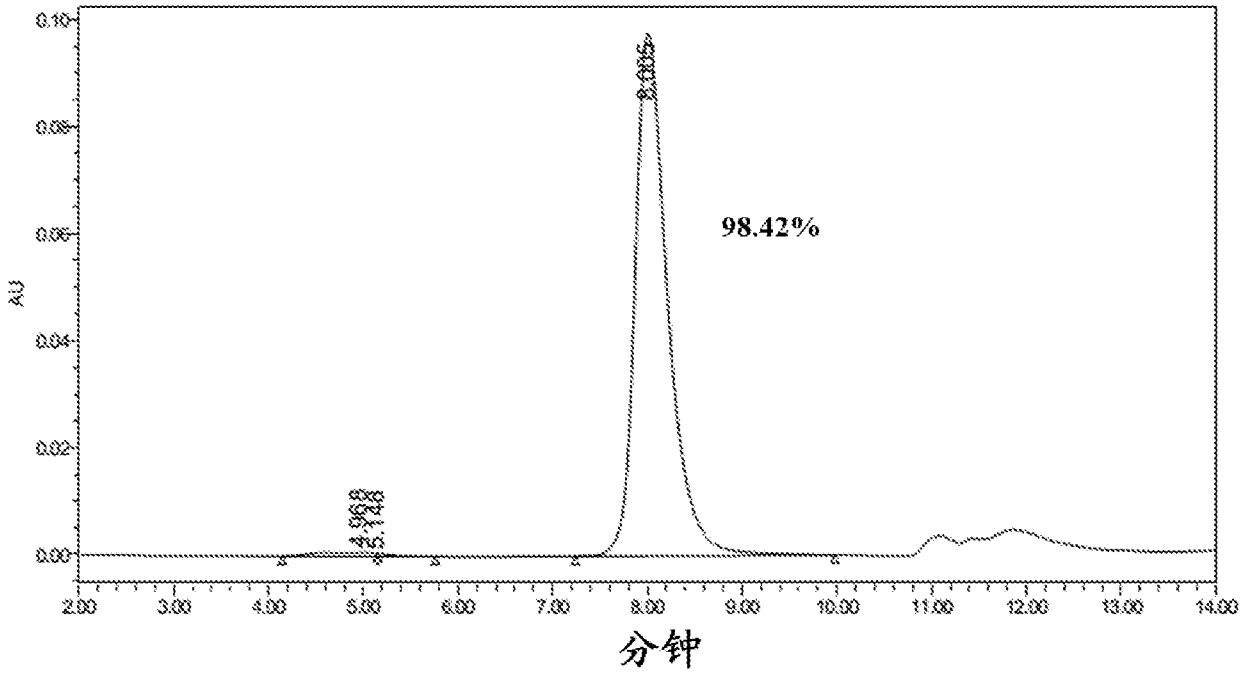


图 12

抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体与过量表达 4-1BB 的 CHO-S 细胞的结合

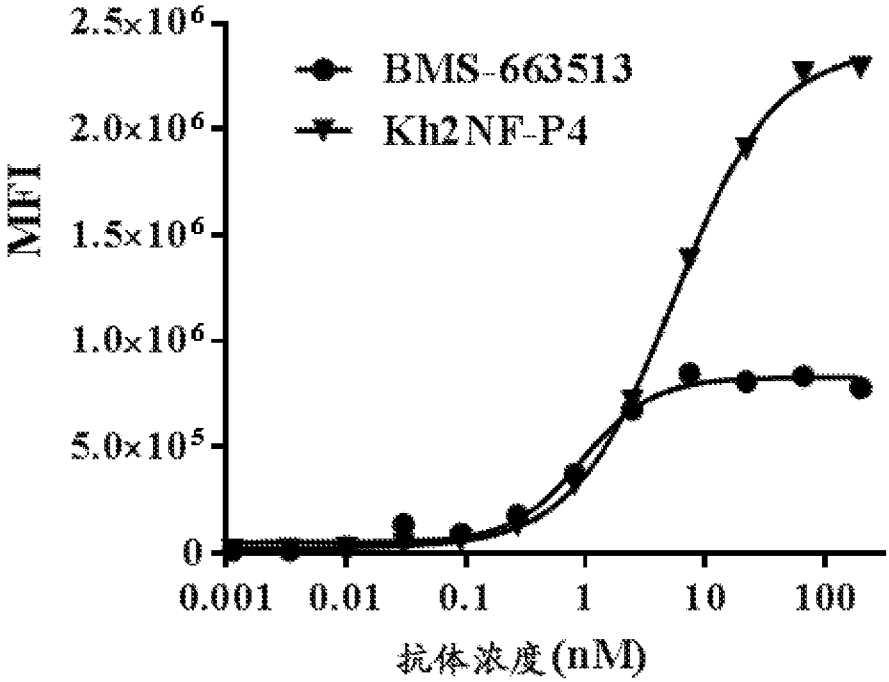


图 13A

抗 4-1BB/PD-L1 双特异性抗体与过量表达 PD-L1 的 CHO-S 细胞的结合

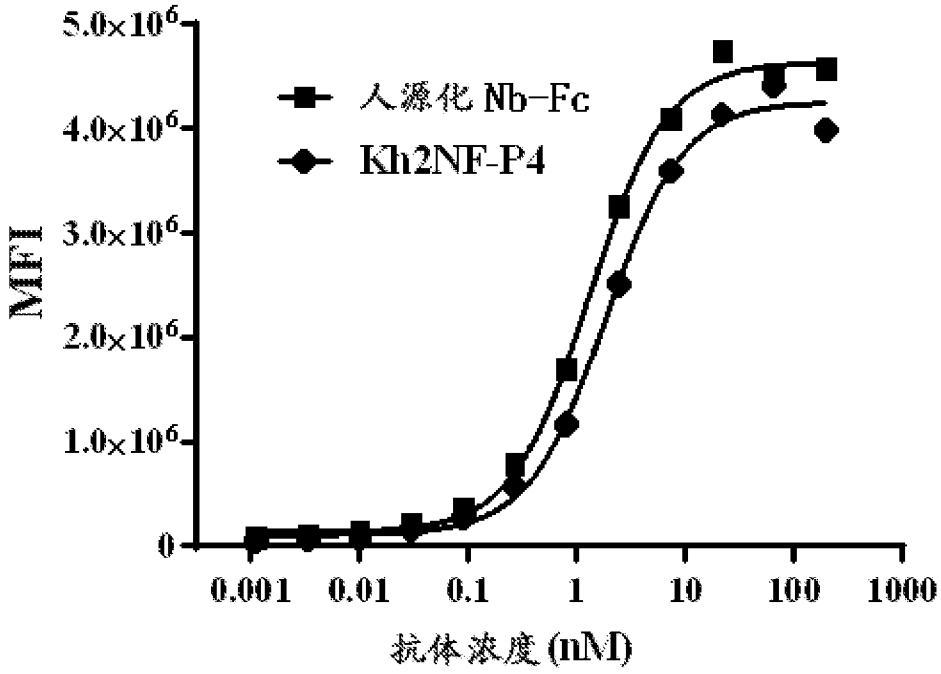


图 13B

抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体的纯度检测

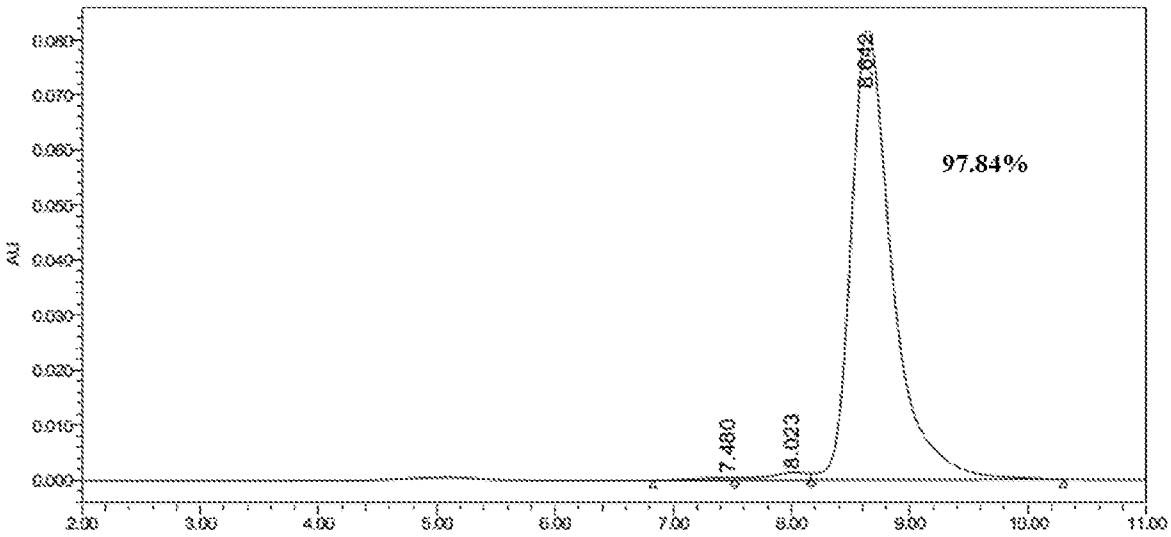


图 14

抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体与过量表达 PD-L1 的 CHO-S 细胞的结合

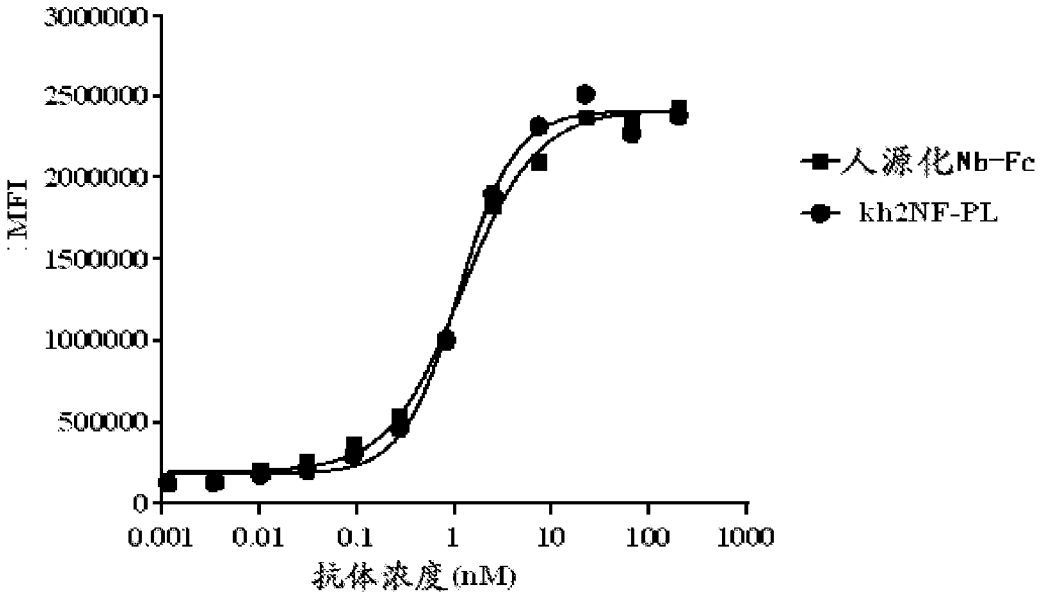


图 15A

抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体与过量表达 LAG-3 的 HEK293 细胞的结合

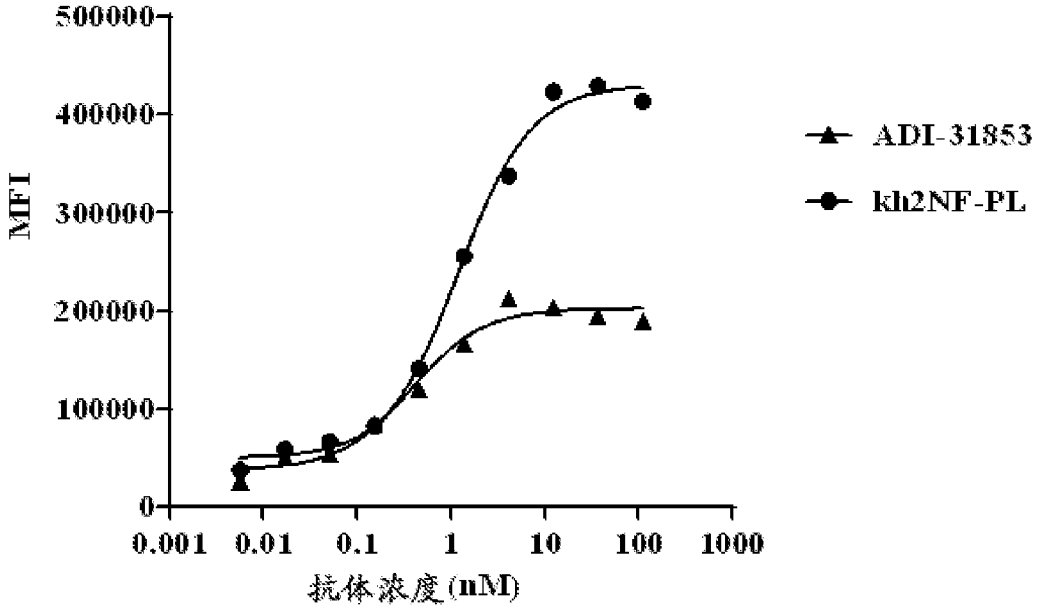


图 15B

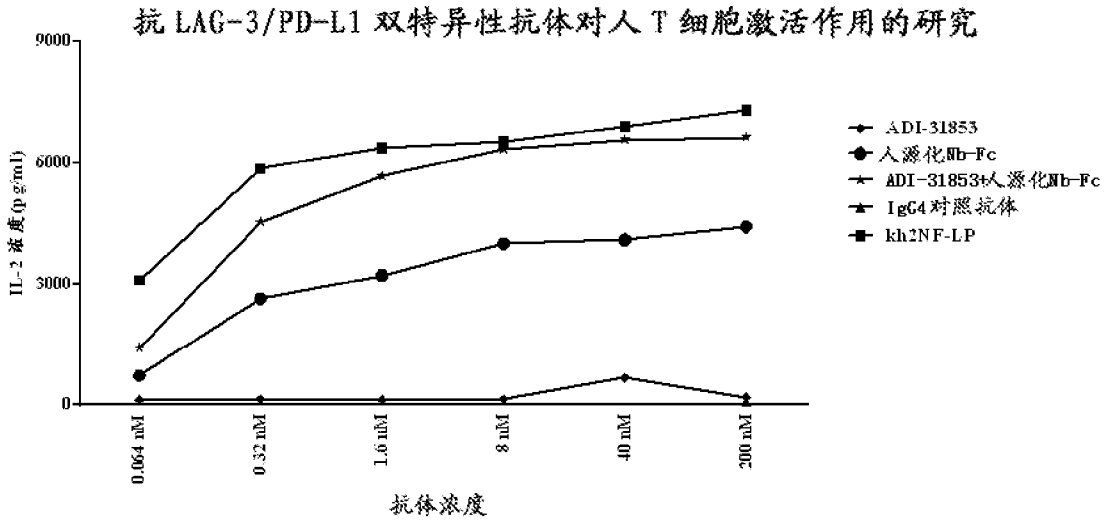

抗 LAG-3/PD-L1 双特异性抗体对人 T 细胞激活作用的研究
IL-2 浓度(pg/ml)
9000
6000
3000
0
0.064 nM
0.32 nM
1.6 nM
8 nM
40 nM
200 nM
抗体浓度
ADI-31853
人源化Nb-Fc
ADI-31853+人源化Nb-Fc
IgG4对照抗体
kh2NF-LP

图 16

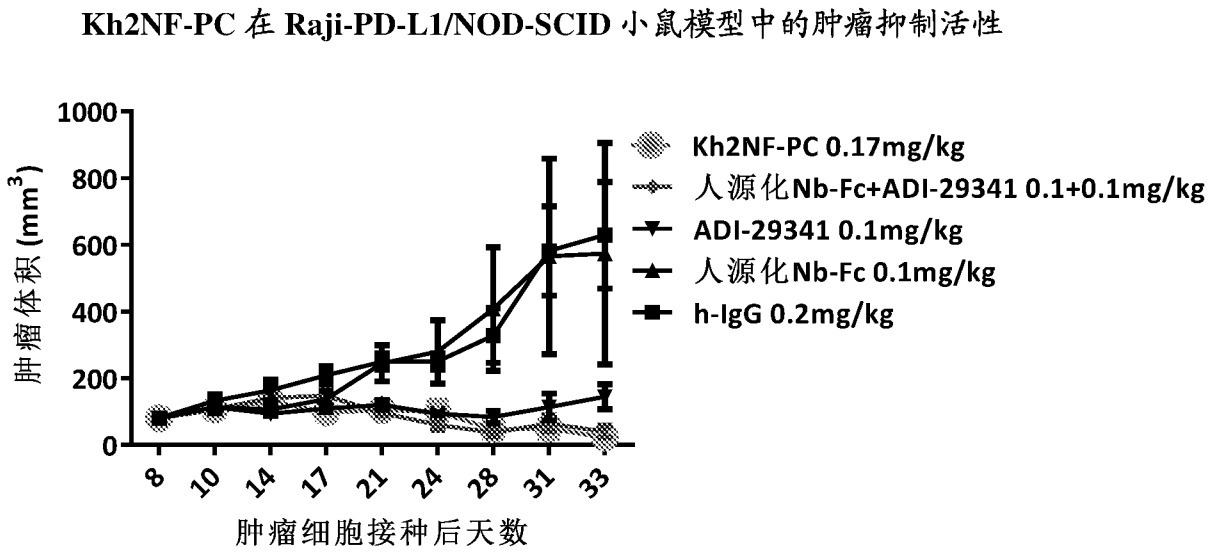

Kh2NF-PC 在 Raji-PD-L1/NOD-SCID 小鼠模型中的肿瘤抑制活性
肿瘤体积 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
8
10
14
17
21
24
28
31
33
肿瘤细胞接种后天数
Kh2NF-PC 0.17mg/kg
人源化Nb-Fc+ADI-29341 0.1+0.1mg/kg
ADI-29341 0.1mg/kg
人源化Nb-Fc 0.1mg/kg
h-IgG 0.2mg/kg

图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/123886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 31/00(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)

CNABS; CNTXT; VEN; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; PUBMED; NCBI; 中国专利生物序列检索系统; NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: 双特异, 多特异, 双靶向, 多靶向, 双功能, 多功能, 异二聚体, 异源二聚体, 双抗, 多抗, 三链抗体, 单结构域, 单域抗体, 纳米抗体, antigen-binding, antibody, diabody, bispecific, multispecific, dual targeting, dualtargeting, bistargeting, multitargeting, bisfunctional, bis-functional, multifunctional, double-functional, triabody, nanobody, single domain, CD47, IAP, mer6, oa3, integrin associated protein, PD-L1, B7-H1, CD274, programmed death ligand 1, LAG-3, 4-1BB, CD223, search based on SEQ ID NO: 1-40

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107459578 A (TAIZHOU MAIBO TAIKE PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 12 December 2017 (2017-12-12) figure 2, and description, paragraphs [0024] and [0025]	1-15, 18-26
PX	刘伯宁 (LIU, Boning). "靶向PD-L1与CD47双功能融合蛋白的制备与抑瘤活性研究 (Construction and Anti-Tumor Effects of a Novel Bispecific Fusion Protein Targeting PD-L1 and CD47)" *中国博士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑 (Medicine & Public Health, China Doctoral Dissertations Full-Text Database),* No. number 6, 15 June 2018 (2018-06-15), ISSN: 1674-022X, page 34	1-15, 18-26
PA	WO 2017220569 A1 (F-STAR DELTA LTD.) 28 December 2017 (2017-12-28) abstract	14, 17-26

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 March 2019	**29 March 2019**
Name and mailing address of the ISA/CN **State Intellectual Property Office of the P. R. China** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TW 201613635 A (PFIZER ET AL.) 16 April 2016 (2016-04-16) abstract, and figure 13	14, 16, 18-26
A	WO 2015048312 A1 (COSTIM PHARMACEUTICALS INC. ET AL.) 02 April 2015 (2015-04-02) claim 34	14, 17-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/123886

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107459578	A	12 December 2017	None			
WO	2017220569	A1	28 December 2017	CA	3027612	A1	28 December 2017
				SG	11201811064T	A	30 January 2019
				TW	201803906	A	01 February 2018
				AU	2017283181	A1	03 January 2019
TW	201613635	A	16 April 2016	WO	2015119923	A1	13 August 2015
				EP	3102604	A1	14 December 2016
				US	2017174773	A1	22 June 2017
WO	2015048312	A1	02 April 2015	EP	3049442	A4	28 June 2017
				US	2016222121	A1	04 August 2016
				EP	3049442	A1	03 August 2016
				HK	1224683	A0	25 August 2017

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2018/123886

A. 主题的分类

C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 31/00(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））

CNABS;CNTXT;VEN;WOTXT;USTXT;EPTXT;CNKI;PUBMED;NCBI;中国专利生物序列检索系统: 双特异，多特异，双靶向，多靶向，双功能，多功能，异二聚体，异源二聚体，双抗，多抗，三链抗体，单结构域，单域抗体，纳米抗体，antigen-binding, antibody, diabody, bispecific, multispecific, dual targeting, dualtargeting, bistargeting, multitargeting, bisfunctional, bis-functional, multifunctional, double-functional, triabody, nanobody, single domain, CD47, IAP, mer6, oa3, integrin associated protein, PD-L1, B7-H1, CD274, programmed death ligand 1, LAG-3, 4-1BB, CD223, 基于SEQ ID NO:1-40的检索

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 107459578 A (泰州迈博太科药业有限公司) 2017年 12月 12日 (2017-12-12) 附图2、说明书第[0024]、[0025]段	1-15、18-26
PX	刘伯宁. "靶向PD-L1与CD47双功能融合蛋白的制备与抑瘤活性研究" 中国博士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 第6期, 2018年 6月 15日 (2018-06-15), ISSN: 1674-022X, 第34页	1-15、18-26
PA	WO 2017220569 A1 (F-STAR DELTA LTD) 2017年 12月 28日 (2017-12-28) 摘要	14、17-26
A	TW 201613635 A (PFIZER等) 2016年 4月 16日 (2016-04-16) 摘要、附图13	14、16、18-26

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 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
2019年 3月 12日	2019年 3月 29日
ISA/CN的名称和邮寄地址 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 传真号 (86-10)62019451	受权官员 薛姣 电话号码 (86-512)88996464

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/123886

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	WO 2015048312 A1 (COSTIM PHARMACEUTICALS INC. 等) 2015年 4月 2日 (2015-04-02) 权利要求34	14、17-26

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/123886

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	107459578	A	2017年 12月 12日	无			
WO	2017220569	A1	2017年 12月 28日	CA	3027612	A1	2017年 12月 28日
				SG	11201811064T	A	2019年 1月 30日
				TW	201803906	A	2018年 2月 1日
				AU	2017283181	A1	2019年 1月 3日
TW	201613635	A	2016年 4月 16日	WO	2015119923	A1	2015年 8月 13日
				EP	3102604	A1	2016年 12月 14日
				US	2017174773	A1	2017年 6月 22日
WO	2015048312	A1	2015年 4月 2日	EP	3049442	A4	2017年 6月 28日
				US	2016222121	A1	2016年 8月 4日
				EP	3049442	A1	2016年 8月 3日
				HK	1224683	A0	2017年 8月 25日