(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120051494 A
(43)申请公布日 2025.05.27

(21)申请号 202380069893.2
(22)申请日 2023.09.25
(66)本国优先权数据
202211204407.7 2022.09.29 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/121074 2023.09.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/067474 ZH 2024.04.04
(71)申请人 上海宏成药业有限公司
地址 201308 上海市浦东新区芙蓉花路500弄2号楼1-2层
(72)发明人 苏云鹏 李勇 尹巧汕 庄伟亮 宋飞 随瑞瑞 吴峰 姜殿东 奚悦 许金玲 杨临川 梁绍勤
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 陈迎春 黄革生
(51)Int.Cl.
*C07K 16/46*(2006.01)
*A61K 39/395*(2006.01)
*C07K 16/18*(2006.01)

(54)发明名称

靶向PD-1,CTLA-4和VEGF的三特异性抗体及其应用

(57)摘要

一种特异性结合PD-1,CTLA-4和VEGF的三特异性抗体,还涉及包含该三特异性抗体的组合物及其在肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病或血管发生相关疾病治疗中的应用。

CN 120051494 A

(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
2024 年 4 月 4 日 (04.04.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/067474 A1

(51) 国际专利分类号:
*C07K 16/46* (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
*A61K 39/395* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/121074

(22) 国际申请日: 2023 年 9 月 25 日 (25.09.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202211204407.7 2022年9月29日 (29.09.2022) CN

(71) 申请人:上海宏成药业有限公司(**HC BIOPHARMA, INC.**) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区芙蓉花路500弄2号楼1-2层, Shanghai 201308 (CN)。

(72) 发明人:苏云鹏(**SU, Yunpeng**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。李勇(**LI, Yong**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。尹巧汕(**YIN, Qiaoshan**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。庄伟亮(**ZHUANG, Weiliang**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。宋飞(**SONG, Fei**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。随瑞瑞(**SUI, Ruirui**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。吴峰(**WU, Feng**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。姜殿东(**JIANG, Diandong**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。奚悦(**XI, Yue**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。许金玲(**XU, Jinling**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。杨临川(**YANG, Linchuan**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (CN)。梁绍勤(**LIANG, Shaoqin**); 中国上海市浦东新区张衡路1227号2号楼3楼, Shanghai 201203 (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, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

WO 2024/067474 A1

(54) **Title:** TRISPECIFIC ANTIBODY TARGETING PD-1, CTLA-4, AND VEGF AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向PD-1，CTLA-4和VEGF的三特异性抗体及其应用

(57) **Abstract:** A trispecific antibody specifically binding to PD-1, CTLA-4, and VEGF. The present invention also relates to a composition comprising the trispecific antibody and use thereof in treating tumors, autoimmune diseases, infectious diseases, or angiogenesis-related diseases.

(57) 摘要: 一种特异性结合PD-1，CTLA-4和VEGF的三特异性抗体，还涉及包含该三特异性抗体的组合物及其在肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病或血管发生相关疾病治疗中的应用。

# 靶向 PD-1，CTLA-4 和 VEGF 的三特异性抗体及其应用

## 技术领域

本发明属于生物医药领域，具体涉及一种靶向 PD-1，CTLA-4 和 VEGF 的三特异性抗体及其在肿瘤治疗中的应用。

## 背景技术

虽然免疫疗法显著地增强了对疾病(例如癌症)的治疗能力，但是由于疾病的复杂性，临床研究中发现，很多患者不能对单特异疗法产生足够的应答。肿瘤微环境由肿瘤细胞、免疫细胞、血管细胞等细胞以及细胞外基质中的非细胞成分组成，各个组分之间的相互作用限制了宿主的抗肿瘤免疫及对肿瘤生长的控制。研究人员期望通过开发针对不同细胞、不同靶点的联合疗法以期达到更好的治疗效果。例如阻断免疫检查点 PD-1 的抗体纳武单抗（Nivolumab）和阻断 CTLA-4 的抗体伊匹单抗（Ipilimumab）的联合使用在临床前和临床上可以激起更强的免疫反应，比阻断单个免疫检查点具有更好的治疗效果（The efficacy and safety of combined immune checkpoint inhibitors (nivolumab plus ipilimumab): a systematic review and meta-analysis, Jingjie Chen et.al., World J Surg Oncol, 2020 Jul 3;18(1):150）。但是上述联合治疗同时增加了用药成本，还增加了多种副作用，具有更高的毒性，这可能与伊匹单抗对调节性 T 细胞（Treg）的清除有关（Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination，Celine Boutros et.al., Nat Rev Clin Oncol, 2016 Aug;13(8):473-86）。

免疫检查点 PD-1 和 CTLA-4 在不同免疫细胞上具有不同的表达模式、二者介导的信号相互作用抑制抗肿瘤免疫，因此，同时阻断 PD-1 和 CTLA-4 可以通过多种机制促进抗肿瘤免疫（PD-L1:CD80 *Cis*-Heterodimer Triggers the Co-stimulatory Receptor CD28 While Repressing the Inhibitory PD-1 and CTLA-4 Pathways, Yunlong Zhao et.al., Immunity. 2019 Dec 17; 51(6): 1059–1073.e9）。同时靶向 PD-1 和 CTLA-4 的双特异性抗体不但可以同时阻断 PD-1 和 CTLA-4 的信号通路，还可以通过诱导 PD-1 的内吞导致其降解，在 PD-1 和 CTLA-4 共表达细胞上（如肿瘤微环境中的耗竭 T 细胞），增强阻断 CTLA-4 与 CD80 的相互作用等机制促进抗肿瘤免疫，并且在临床上对免疫检查点抑制剂无效的病人显示出疗效（Development and Preliminary Clinical Activity of PD-1-Guided CTLA-4 Blocking Bispecific DART Molecule, Alexey Berezhnoy et al., Cell Rep Med. 2020 Dec 22; 1(9): 100163， Design and Efficacy of a Monovalent Bispecific PD-1/CTLA4 Antibody That Enhances CTLA-4 Blockade on PD-1$^{+}$ Activated T Cells, Dovedi SJ et al., Cancer Discovery, 08 Jan 2021, 11(5):1100-1117）。

血管生成因子可以通过直接抑制抗原呈递细胞和免疫效应细胞的功能，和通过增强调节性 T 细胞（Treg）等免疫抑制细胞的功能来驱动免疫抑制，而免疫抑制细胞通过分泌细胞因子等促进血管生成。免疫反应和血管生成之间相互影响，均在肿瘤发生、发展中发挥重要作用。研

究发现，免疫检查点抑制剂可以促进肿瘤组织中的血管正常化（The Intersection between Tumor Angiogenesis and Immune Suppression，Rahma OE et al., Clin Cancer Res (2019) 25 (18): 5449–5457），抗血管生成也可以改善肿瘤微环境中的抗肿瘤免疫（Antiangiogenic therapy reverses the immunosuppressive breast cancer microenvironment，Wuzhen Chen et al., Biomark Res. 2021 Jul 22;9(1):59）。抗 PD-L1 抗体阿替利珠单抗（atezolizumab）和贝伐单抗（bevacizumab）的联合用药在不可切除的肝癌中效果显著（Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma，Richard S Finn et al., N Engl J Med.，2020 May 14;382(20):1894-1905），被 FDA 批准用于不可切除的肝癌的治疗。其他免疫检查点抑制剂（包括抗 PD-1/PD-L1 抗体）和抗血管生成抑制剂（包括抗 VEGF 抗体和其他阻断 VEGF 信号的小分子抑制剂）的联合使用在临床上也取得积极的效果（Combination of Anti-Angiogenics and Checkpoint Inhibitors for Renal Cell Carcinoma: Is the Whole Greater Than the Sum of Its Parts?，Eric Jonasch et al., Cancers (Basel). 2022 Jan 27;14(3):644）。同时阻断免疫检查点和血管生成的双特异性抗体在临床前动物模型中显示出比联合使用更好的药效（A Novel Bispecific Antibody Targeting PD-L1 and VEGF With Combined Anti-Tumor Activities，Xiaopei Cui，Front Immunol. 2021 Dec 2;12:778978）。最近研究发现，抗 PD-L1 抗体阿替利珠单抗（atezolizumab）和贝伐单抗（bevacizumab）的联合用药在治疗肝癌时，Treg 与效应 T 细胞的比例较高的病人联合用药的效果较差（Molecular correlates of clinical response and resistance to atezolizumab in combination with bevacizumab in advanced hepatocellular carcinoma. Andrew X Zhu et al. Nat Med. 2022 Aug;28(8):1599-1611）。这说明同时靶向 T 细胞、Treg 细胞和血管生成可能会给临床上提供新的治疗思路。

因此，同时靶向多个靶标的多特异性抗体，例如双特异性和三特异性抗体为临床治疗复杂疾病提供了巨大的希望。然而，本领域已经认识到，简单地将两个以上抗体或蛋白质连接在一起，通常不会引起协同效应，甚至会产生不利影响。因此双特异性或三特异性抗体，特别是三特异性抗体，在设计上面临巨大的挑战，需要考虑大量的可变因素，包括分子的相容性，抗体的亲和力、稳定性和药学特性。

本发明通过提供可以同时阻断两个主要的免疫检查点和一个主要的血管生成途径的三特异性抗体，在一定程度上解决了上述问题并满足了市场的需求。本发明提供的三特异性抗体可以在肿瘤微环境中，同时靶向 PD-1、CTLA-4 和 VEGF，同时阻断免疫抑制和血管生成，调控肿瘤微环境中的免疫反应与血管生成，从而实现三个抗体联合使用的治疗效果。

## 发明内容

本发明提供了新型的同时靶向 PD-1、CTLA-4 和 VEGF 的三特异性抗体，所述三特异性抗体同时保留了各抗原结合位点的良好的抗原结合特异性、选择性并由此具有良好的生物活性。在体外药效研究中，本发明的三特异性抗体具有与抗 PD-1 抗体和抗 CTLA-4 抗体联合使

用类似的免疫激活活性，且与贝伐单抗具有类似的阻断 VEGF 的活性。在体内多种肿瘤（如黑色素瘤、肺癌、结肠癌、肝癌等）的治疗中，本发明的三特异性抗体具有与抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体和贝伐单抗联合使用相当甚至更优的抗肿瘤活性。相比单一疗法和联合用药，靶向 PD-1、CTLA-4 和 VEGF 的三特异性抗体具有如下优势：

1. 三特异性抗体可以协同抑制肿瘤细胞增殖，比任一单抗具有更好的治疗效果
2. 针对各个靶点具有 2 价的抗原结合位点数，因此比具有 1 价抗原结合位点的多特异性抗体具有更强的亲和力；
3. 改善受试者针对单克隆抗体的低免疫应答性；
4. 采用没有或具有较弱 ADCC 功能的 FC 减少或降低抗 CTLA-4 单克隆抗体由于 Treg 清除导致的毒副作用；
5. 通过 PD-1 介导的导向作用，增加三特异性抗体在肿瘤与外周分布的比例，降低 CTLA-4 和 VEGF 靶向的毒性；
6. 三特异性抗体可以通过 CTLA-4 介导的内吞作用降解细胞表面的 PD-1 抗原；
7. 减少给药频率和降低由联合给药造成的不适；
8. 具有增加的稳定性；和
9. 延长抑制肿瘤有效期。

总体而言，本发明提供的三特异性抗体分子可以识别 3 个靶点，与 3 个抗体联合使用相比可以显著降低费用；三特异性抗体分子针对每个靶标的两个相同的抗原结合位点基本上保留了相应天然 2 价抗体对靶点的结合能力，可以在肿瘤局部发挥协同效应。此外，本发明提供的三特异性抗体具有良好的纯度和热稳定性，都非常有利于下游的进一步开发和大规模生产。

因此，本发明主要涉及如下方面：

第一方面，本发明提供了一种同时靶向 PD-1、CTLA-4 和 VEGF 的三特异性抗体，所述抗体包含第一、第二、第三抗原结合位点，其中所述第一、第二、第三抗原结合位点结合互不相同的，彼此独立地选自 PD-1，CTLA-4 和 VEGF 的第一、第二、第三抗原。

在一个实施方案中，本发明提供的三特异性抗体包含二聚化的 Fc 区，所述第一、第二和第三抗原结合位点中的一个或者多个连接在二聚化 Fc 区的 N 端和/或 C 端。

在本发明提供的三特异性抗体的再一个实施方案中，所述第一、第二和第三抗原结合位点可以是 Fab，scFv，或 VHH 的形式。在一个具体的实施方案中，识别抗原 CTLA-4 的抗原结合位点是 scFv 或 VHH 的形式。

在本发明提供的三特异性抗体的一个具体的实施方案中，结合 PD-1 的抗原结合位点包含如下重链 CDR（HCDR）和/或轻链 CDR（LCDR）：包含 SEQ ID NO:1 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:2 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:3 所示序列或

由其组成的 HCDR3；和/或包含 SEQ ID NO:4 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:5 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:6 所示序列或由其组成的 LCDR3。

在本发明提供的三特异性抗体的一个具体的实施方案中，结合 PD-1 的抗原结合位点包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:7 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:7 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:8 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:8 所示的序列组成。

在本发明提供的三特异性抗体的一个具体的实施方案中，结合 CTLA-4 的抗原结合位点包含如下 HCDR 和/或 LCDR：包含 SEQ ID NO:17 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:18 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:19 所示序列或由其组成的 HCDR3；和/或包含 SEQ ID NO:20 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:21 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:22 所示序列或由其组成的 LCDR3。

在本发明提供的三特异性抗体的另一个具体的实施方案中，结合 CTLA-4 的抗原结合位点是 VHH，并包含如下 HCDR：包含 SEQ ID NO:12 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:13 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:14 所示序列或由其组成的 HCDR3。

在本发明提供的三特异性抗体的一个具体的实施方案中，结合 CTLA-4 的抗原结合位点包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:15 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:15 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:15 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:16 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:16 所示的序列组成。

在本发明提供的三特异性抗体的一个具体的实施方案中，结合 CTLA-4 的抗原结合位点包含单个 VH 结构域(VHH)，所述 VHH 包含 SEQ ID NO:11 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:11 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:11 所示的序列组成。

在一个本发明提供的三特异性抗体的具体的实施方案中，结合 VEGF 的抗原结合位点包含如下 HCDR 和/或 LCDR：包含 SEQ ID NO:26 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:27 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:28 所示序列或由其组成的 HCDR3；和/或包含 SEQ ID NO:29 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:30 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:31 所示序列或由其组成的 LCDR3。

在本发明提供的三特异性抗体的一个具体的实施方案中，结合 VEGF 的抗原结合位点包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:24 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:24 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:24 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:25 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:25 所示的序列组成。

在本发明提供的三特异性抗体的一个实施方案中，所述第一、第二、第三抗原结合位点包含：

1）结合 PD-1 的抗原结合位点，其具有包含 SEQ ID NO:1 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:2 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:3 所示序列或由其组成的 HCDR3；和包含 SEQ ID NO:4 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:5 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:6 所示序列或由其组成的 LCDR3；

2）结合 CTLA-4 的抗原结合位点，其具有

i）包含 SEQ ID NO:17 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:18 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:19 所示序列或由其组成的 HCDR3；和包含 SEQ ID NO:20 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:21 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:22 所示序列或由其组成的 LCDR3；或

ii）包含 SEQ ID NO:12 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:13 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:14 所示序列或由其组成的 HCDR3；和

3）结合 VEGF 的抗原结合位点，其具有包含 SEQ ID NO:26 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:27 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:28 所示序列或由其组成的 HCDR3；和包含 SEQ ID NO:29 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:30 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:31 所示序列或由其组成的 LCDR3。

在本发明提供的三特异性抗体的一个实施方案中，所述第一、第二、第三抗原结合位点包含：

1）结合 PD-1 的抗原结合位点，其包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:7 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:7 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:8 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:8 所示的序列组成；

2）结合 CTLA-4 的抗原结合位点，其包含

i）重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:15 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:15 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%

或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:15 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:16 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:16 所示的序列组成；或

ii）包含 SEQ ID NO:11 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:11 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:11 所示的序列组成；和

3）结合 VEGF 的抗原结合位点，其包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:24 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:24 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:24 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:25 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:25 所示的序列组成。

在本发明提供的三特异性抗体的一个实施方案中，抗原结合位点包含一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加或其任意组合，在一个优选的实施方案中，所述取代发生在框架区（FR 区），在一个更优选的实施方案中，所述取代是重链可变区的 G44C、轻链可变区的 Q100C 或 G100C（按照 Kabat 编号）。

在本发明提供的三特异性抗体的一个实施方案中，包含同二聚化的 Fc 区或异二聚化的 Fc 区，所述 Fc 区可以是具有天然序列或变体序列的免疫球蛋白 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 的 Fc 区。在一个优选的实施方案中，Fc 区包含修饰，例如 Fc 区包含杵臼结构。在一个更优选的实施方案中，Fc 区包含选自 S228P、S354C、T366W、T366S、L368A、Y394C、Y407V、H435R、Y436F、K447A 的取代（依照 EU 编号系统）。在一个实施方案中，Fc 区衍生自 SEQ ID NO:33、34 或 35 所示的重链恒定区序列。

在本发明提供的三特异性抗体的一个实施方案中，所述第一、第二、第三抗原结合位点之间，或者所述第一、第二、第三抗原结合位点与 Fc 区之间通过接头/铰链区连接。在一个优选的实施方案中，所述接头包含氨基酸序列 $(G_4S)_n$，其中 n 是等于或大于 1 的整数。在一个优选实施方案中，接头由氨基酸序列$(G_4S)_3$ 或$(G_4S)_4$ 组成。在一个优选的实施方案中，所述接头具有 SEQ ID NO:9 所示的序列。

一个实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含第一、第二、第三抗原结合位点，且由两条相同的重链和两条相同的轻链组成，所述重链和轻链具有选自如下的结构：

1）重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc-VHH-ScFv 的结构，

轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；

2）重链，其从 N 端到 C 端包含 ScFv-VH-CH1-Fc-VHH 的结构，

轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；

3）重链，其从 N 端到 C 端包含 VHH-VH-CH1-Fc- ScFv 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；
4）重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc -ScFv-VHH 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；
5）重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc -ScFv 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL-VHH 的结构；
6）重链，其从 N 端到 C 端包含 ScFv-VH-CH1-Fc-ScFv 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；
7）重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc-ScFv 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VHH-VL-CL 的结构；或
8）重链，其从 N 端到 C 端包含 ScFv-VHH-VH-CH1-Fc 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；
其中 Fc 表示免疫球蛋白重链的 Fc 区，其中包含 Fc 区的两条重链藉由 Fc 区同二聚化，
其中 CH1 表示免疫球蛋白重链 CH1 结构域，CL 表示免疫球蛋白轻链 CL 结构域，
其中 VH-CH1 和 VL-CL 相互配对形成 Fab，
其中第一、第二、第三抗原结合位点为 Fab、VHH 和/或 ScFv 的形式，且分别结合互不相同的，彼此独立地的抗原 PD-1，CTLA-4 和 VEGF。

在一个优选的实施方案中，相邻的抗原结合位点之间通过接头连接，优选地，抗原结合位点与 Fc 通过接头/铰链区连接。

另一个实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含第一、第二、第三抗原结合位点，且由具有如下结构的三条链组成：
1）第一重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc-ScFv 的结构，
2）第二重链，其从 N 端到 C 端包含 VHH-Fc-ScFv 的结构，和
3）轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构，
其中 Fc 为包含杵臼结构的免疫球蛋白重链的 Fc 区，其中包含 Fc 区的两条重链藉由 Fc 区异二聚化，
其中 CH1 表示免疫球蛋白重链 CH1 结构域，CL 表示免疫球蛋白轻链 CL 结构域，
其中 VH-CH1 和 VL-CL 相互配对形成 Fab，
其中第一、第二、第三抗原结合位点为 Fab、VHH 和/或 ScFv 的形式，且分别结合互不相同的，彼此独立地的抗原 PD-1，CTLA-4 和 VEGF。

在一个优选的实施方案中，相邻的抗原结合位点之间通过接头连接，优选地，抗原结合位点与 Fc 通过接头/铰链区连接。

再一个实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含第一、第二、第三抗原结合

位点，且由具有如下结构的三条链组成：

1）第一重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc-ScFv2 的结构，

2）第二重链，其从 N 端到 C 端包含 ScFv1-Fc-ScFv2 的结构，

3）轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构，

其中 Fc 为包含杵臼结构的免疫球蛋白重链的 Fc 区，其中包含 Fc 区的两条重链藉由 Fc 区异二聚化，

其中 CH1 表示免疫球蛋白重链 CH1 结构域，CL 表示免疫球蛋白轻链 CL 结构域，

其中 VH-CH1 和 VL-CL 相互配对形成 Fab，

其中第一、第二、第三抗原结合位点为 Fab、ScFv1 和/或 ScFv2 的形式，且分别结合互不相同的，彼此独立地的抗原 PD-1，CTLA-4 和 VEGF。

在一个优选的实施方案中，相邻的抗原结合位点之间通过接头连接，优选地，抗原结合位点与 Fc 通过接头/铰链区连接。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含第一、第二、第三抗原结合位点，且由具有如下结构的两条链组成：

1）第一重链，其从 N 端到 C 端包含 ScFv1-Fc-ScFv2 的结构，

2）第二重链，其从 N 端到 C 端包含 VHH-Fc-ScFv2 的结构，

其中 Fc 为包含杵臼结构的免疫球蛋白重链的 Fc 区，其中包含 Fc 区的两条重链藉由 Fc 区异二聚化，

其中第一、第二、第三抗原结合位点为 VHH、ScFv1 和/或 ScFv2 的形式，且分别结合互不相同的，彼此独立地的抗原 PD-1，CTLA-4 和 VEGF。

在一个优选的实施方案中，相邻的抗原结合位点之间通过接头连接，优选地，抗原结合位点与 Fc 通过接头/铰链区连接。

在一个优选的实施方案中，上述三特异性抗体的第一、第二、第三抗原结合位点包含：

1）结合 PD-1 的抗原结合位点，其具有包含 SEQ ID NO:1 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:2 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:3 所示序列或由其组成的 HCDR3；和包含 SEQ ID NO:4 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:5 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:6 所示序列或由其组成的 LCDR3；

2）结合 CTLA-4 的抗原结合位点，其具有

i）包含 SEQ ID NO:17 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:18 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:19 所示序列或由其组成的 HCDR3；和包含 SEQ ID NO:20 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:21 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:22 所示序列或由其组成的 LCDR3；或

ii）包含 SEQ ID NO:12 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:13 所示序列

或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:14 所示序列或由其组成的 HCDR3；和

3）结合 VEGF 的抗原结合位点，其具有包含 SEQ ID NO:26 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:27 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:28 所示序列或由其组成的 HCDR3；和包含 SEQ ID NO:29 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:30 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:31 所示序列或由其组成的 LCDR3。

在一个优选的实施方案中，上述三特异性抗体的第一、第二、第三抗原结合位点包含：

1）结合 PD-1 的抗原结合位点，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:7 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:7 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:8 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:8 所示的序列组成；

2）结合 CTLA-4 的抗原结合位点，其包含

i）重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:15 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:15 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:15 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:16 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:16 所示的序列组成；或

ii）包含 SEQ ID NO:11 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:11 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:11 所示的序列组成；和

3）结合 VEGF 的抗原结合位点，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:24 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:24 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:24 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:25 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:25 所示的序列组成。

在一个优选的实施方案中，上述第一、第二、第三抗原结合位点包含在框架区（FR 区）中的取代。在一个更优选的实施方案中，所述取代是重链可变区的 G44C、轻链可变区的 Q100C 或 G100C（按照 Kabat 编号）。

在一个优选的实施方案中，上述三特异性抗体的 Fc 区来自 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区。在一个优选的实施方案中，Fc 区包含修饰，例如 Fc 区包含杵臼结构。在一个更优选的实施方案中，Fc 区包含选自 S228P、S354C、T366W、T366S、L368A、Y394C、Y407V、H435R、Y436F、

K447A 的取代（依照 EU 编号系统）。在一个优选的实施方案中，Fc 区衍生自 SEQ ID NO:33、34 或 35 所示的重链恒定区序列。

在一个优选的实施方案中，所述接头包含氨基酸序列 $(G_4S)_n$，其中 n 是等于或大于 1 的整数。在一个优选实施方案中，接头由氨基酸序列$(G_4S)_3$或$(G_4S)_4$组成。在一个优选的实施方案中，所述接头具有 SEQ ID NO:9 所示的序列。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含：

1）包含 SEQ ID NO:37 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 38 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

2）包含 SEQ ID NO:39 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 40 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

3）包含 SEQ ID NO:41 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 42 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

4）包含 SEQ ID NO:43 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 44 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

5）包含 SEQ ID NO:45 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 46 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

6）包含 SEQ ID NO:47 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 48 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

7）包含 SEQ ID NO:49 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 50 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

8）包含 SEQ ID NO:59 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 60 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

9）包含 SEQ ID NO:61 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 62 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

10）包含 SEQ ID NO:63 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO:64 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

11）包含 SEQ ID NO:65 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 66 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

12）包含 SEQ ID NO:67 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 68 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

13）包含 SEQ ID NO:69 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 70 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

14）包含 SEQ ID NO:71 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 72 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

15）包含 SEQ ID NO:73 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 74 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

16）包含 SEQ ID NO:75 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 76 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含：

1）包含 SEQ ID NO:51 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一重链，包含 SEQ ID NO: 53 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第二重链，和包含 SEQ ID NO: 52 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；或

2）包含 SEQ ID NO:56 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一重链，包含 SEQ ID NO: 58 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第二重链，和包含 SEQ ID NO: 57 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含：

包含 SEQ ID NO:54 或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第一重链，和包含 SEQ ID NO: 55 或与其具有至少 90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的第二重链。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含：

1）包含 SEQ ID NO:37 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 38 或由其组成的轻链；或

2）包含 SEQ ID NO:39 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 40 或由其组成的轻链；或

3）包含 SEQ ID NO:41 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 42 或由其组成的轻链；或

4）包含 SEQ ID NO:43 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 44 或由其组成的轻链；或

5）包含 SEQ ID NO:45 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 46 或由其组成的轻链；或

6）包含 SEQ ID NO:47 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 48 或由其组成的轻链；或

7）包含 SEQ ID NO:49 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 50 或由其组成的轻链；或

8）包含 SEQ ID NO:59 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 60 或由其组成的轻链；或

9）包含 SEQ ID NO:61 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 62 或由其组成的轻链；或

10）包含 SEQ ID NO:63 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO:64 或由其组成的轻链；或

11）包含 SEQ ID NO:65 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 66 或由其组成的轻链；或

12）包含 SEQ ID NO:67 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 68 或由其组成的轻链；或

13）包含 SEQ ID NO:69 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 70 或由其组成的轻链；或

14）包含 SEQ ID NO:71 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 72 或由其组成的轻链；或

15）包含 SEQ ID NO:73 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 74 或由其组成的轻链；或

16）包含 SEQ ID NO:75 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 76 或由其组成的轻链。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含：

1）包含 SEQ ID NO:51 或由其组成的第一重链，包含 SEQ ID NO: 53 或由其组成的第二重链，和包含 SEQ ID NO: 52 或由其组成的轻链；或

2）包含 SEQ ID NO:56 或由其组成的第一重链，包含 SEQ ID NO: 58 或由其组成的第二重链，和包含 SEQ ID NO: 57 或由其组成的轻链。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了一种三特异性抗体，其包含：

包含 SEQ ID NO:54 或由其组成的第一重链，和包含 SEQ ID NO: 55 或由其组成的第二重链。

第二个方面，本发明提供了编码本发明三特异性抗体分子的多核苷酸；包含所述多核苷酸

的载体；包含本发明多核苷酸或载体的宿主细胞。

在一个实施方案中，所述载体优选是表达载体。

在一个实施方案中，所述宿主细胞可以是本领域通用的原核细胞和真核细胞。

在一个实施方案中，本发明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，提供了包含本发明载体的宿主细胞。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 （HEK293 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 （HepG2）、CHO 细胞、NSO 细胞、骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0 等。在一个优选的实施方案中，所述宿主细胞是 CHO、HEK293 或 NSO 细胞。

第三个方面，本发明提供了一种用于产生本发明三双特异性抗体的方法，包括步骤 （i）在适于表达本发明第一方面中公开的三特异性抗体的条件下培养本发明第二方面中公开的宿主细胞，任选地，（ii） 回收本发明的三特异性抗体。

第四个方面，本发明提供了一种包含本发明三特异性抗体分子的药物组合物。

在一个实施方案中，本发明提供的药物组合物还包含其它治疗剂，以及任选的药用辅料；优选地，所述其它治疗剂选自化疗剂、细胞毒性剂等。

第五个方面，本发明提供了本发明三特异性抗体、药物组合物的用途，用于治疗、预防和/或诊断癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或血管发生相关疾病。

在一个实施方案中，本发明提供了第一方面所述的任何抗体、第二方面所述的任何多核苷酸或载体或宿主细胞、第四方面所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗、预防和/或诊断癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或血管发生相关疾病。

在一个实施方案中，本发明提供了第一方面所述的任何抗体、第二方面所述的任何多核苷酸或载体或宿主细胞、第四方面所述的药物组合物用于治疗、预防和/或诊断。

在一个实施方案中，本发明提供了第一方面所述的任何抗体、第二方面所述的任何多核苷酸或载体或宿主细胞、第四方面所述的药物组合物用于治疗、预防和/或诊断癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或血管发生相关疾病。

在一个实施方案中，所述癌症例如是肺癌（例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌）、乳腺癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、黑素瘤, 结肠癌、直肠癌, 卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、胰腺腺癌、基底细胞癌、食道癌、胆管癌、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌、脑癌、胃癌、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、睾丸癌、多发性骨髓瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤等实体瘤和白血病、淋

巴瘤（例如霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、急性 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤）等血液瘤。

第六个方面，本发明提供了治疗、预防和/或诊断癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或血管发生相关疾病的方法，包括将有效量的本发明的三特异性抗体，或本发明的药物组合物施用给有需要的患者。

在一个实施方案中，所述癌症例如是肺癌（例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌）、乳腺癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、黑素瘤, 结肠癌、直肠癌, 卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、胰腺腺癌、基底细胞癌、食道癌、胆管癌、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌、脑癌、胃癌、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、睾丸癌、多发性骨髓瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤等实体瘤和白血病、淋巴瘤（例如霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、急性 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤）等血液瘤。

**附图说明**

图 1 显示了本申请构建的三特异性抗体的结构示意图。

图 2 显示了三特异性抗体与细胞表面 PD-1 结合的活性。采用 FACS 检测三特异性抗体与 293T-hPD-1 细胞的结合活性，图 A 和图 B 分别为实验 FACS#1 和 FACS#2。

图 3 显示了三特异性抗体与细胞表面 CTLA-4 结合的活性。采用 FACS 检测三特异性抗体与 CHO-hCTLA-4 细胞的结合活性，图 A 和图 B 分别为实验 FACS#3 和 FACS#4

图 4 显示了三特异性抗体与活化的 T 细胞结合的活性。图 A 显示了三特异性抗体及抗 PD-1 抗体与 T 细胞的结合活性；图 B 显示了抗 CTLA-4 抗体与 T 细胞结合的活性。

图 5 显示了三特异性抗体结合 293T-hPD-1-hCTLA-4 细胞（共表达 PD-1 和 CTLA-4）后与游离 VEGFA 的结合活性。

图 6 显示了三特异性抗体与活化的 T 细胞结合后与游离的 VEGFA 的结合活性。

图 7 显示了三特异性抗体促进 SEB 刺激 PBMC 分泌 IL-2 的能力。图 A 和 B 分别显示来自供者 Lot#A10Z707023 和 Lot#A 10Z647018 的 PBMC 经 SEB 和抗体处理 3 天后分泌 IL-2 的结果。

图 8 显示了三特异性抗体促进 MLR 中 IL-2 的分泌。MLR 中加入三特异性抗体或对照抗体，4 天后检测 IL-2 的分泌。图 A：DC 供者：Lot#Z0160，PBMC 供者 Lot#Z0177，4 天后检测 IL-2 的分泌；图 B：DC 供者： Lot#Z0160，PBMC 供者 Lot#Z0182。

图 9 显示了不同浓度的三特异性抗体在含有不同比例的 Treg 的 MLR 中增加 IL-2 的分泌。A-C 中测试抗体的浓度分别为：500、50 和 5 nM，MLR 中处理 4 天后检测 IL-2 的分泌。

图 10 显示了三特异性抗体抑制 VEGFA 诱导人脐静脉内皮细胞的增殖。

图 11 显示了三特异性抗体 HC010-F8 抑制人 PBMC 人源化小鼠中人黑素瘤 A375 的生长。

图 12 显示了三特异性抗体 HC010-F8 在人 PBMC 人源化人黑素瘤 A375 小鼠模型中不影

响小鼠的体重。

图 13 显示了三特异性抗体结合人 PD-1 后与 VEGFA（图 A）和 CTLA-4(图 B)的结合。

图 14 显示了三特异性抗体结合细胞表面人 PD-1 后与 VEGFA（图 A）和 CTLA-4(图 B)的结合。

图 15 显示了三特异性抗体结合细胞表面人 CTLA-4 后与 PD-1（图 A）和 VEGF(图 B)的结合。

图 16 显示了三特异性抗体 HC010-F8 和 HC010-F23 抑制人 PBMC 人源化小鼠中人黑素瘤 A375 的生长。

图 17 显示了三特异性抗体 HC010-F8 和 HC010-F23 在人 PBMC 人源化人黑素瘤 A375 小鼠模型中不影响小鼠的体重。

图 18 显示了三特异性抗体抑制小鼠中人非小细胞肺癌 A549 细胞的活性。

图 19 显示了三特异性抗体抑制小鼠中人非小细胞肺癌 H1299 细胞的活性。

图 20 显示了三特异性抗体抑制小鼠中人肝癌 Huh7 细胞的活性。

## 发明详述

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。

### 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。

术语“抗原结合位点”与“抗原结合结构域”可以互换使用，表示抗体分子中与抗原实际结合的区域。抗原结合位点包括但不限于 Fv、Fab 片段、Fab'、Fab'-SH，F(ab')2、单链抗体分子(例如 scFv)、VHH 等形式。

术语“免疫球蛋白”指具有天然存在抗体的结构的蛋白质，在本申请中通常可以与术语“抗体”互换使用。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)。在 IgG 分子中，通常重链的 VH-CH1 与轻链的 VL-CL 配对形成特异性结合抗原的 Fab 片段。因此，一个 IgG 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 分子和两个二聚化的 Fc 区组成。免疫球蛋白的重链可以基于其恒定区的类型，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 γ1(IgG1)、γ2(IgG2)、γ3(IgG3)、γ4(IgG4)、α1(IgA1)和 α2(IgA2)。免疫球蛋白的轻链也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。

术语抗体的“可变区”或“可变结构域”指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。抗体的可变区可以进一步再划分为超变区(即，互补决定区(CDR))和间插在超变区之间的较为保守的区域(即，构架区(FR))。在 IgG 类免疫球蛋白的情况下，重链可变区或轻链可变区从 N 端至 C 端依次分别包括 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。在重链抗体(在本文中也称作纳米抗体) 的情况下，例如来自骆驼科重链抗体，抗原结合位点由单个 VH 结构域(即，“VHH”结构域)组成。天然重链抗体的 VHH 与天然的 IgG 抗体的重链可变区一样，具有相似的结构，即包含四个保守的框架区 （FR）和三个互补决定区 （CDR）。

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。

与抗体相关的表述“价”是指，抗体分子中的抗原结合位点的总数，或具有相同抗原结合特异性的抗原结合位点的数目。例如，6 价抗体是指不论结合的表位是否相同，该抗体分子包含总共 6 个抗原结合位点，优选地，在本发明中，所述 6 价抗体具有三种不同的抗原结合特异性，其中针对每一种抗原结合特异性，分别存在 2 个相同的抗原结合位点。

“重链恒定区结构域”或“重链恒定区”指来自或获自或衍生自免疫球蛋白重链的恒定区结构域，包括从 N 端至 C 端顺序共价连接的重链恒定区 CH1，CH2，CH3，和任选地重链恒定区 CH4。在大多数情况下，重链恒定区 CH1 和 CH2 之间通过重链铰链区连接，但在适宜时，也可以通过柔性接头连接。在本发明的一些实施方案中，本发明抗体分子的重链恒定区包含 CH1- Hinge -CH2-CH3。重链恒定区结构域可以根据抗体分子的预期功能进行选择。例如，恒定结构域可以是 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 结构域，尤其是人 IgG 的免疫球蛋白恒定结构域，例如，人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定结构域。

在本发明的多特异性抗体中，包含 Fc 结构域的链为重链，而不含 Fc 结构域的链为轻链。在本发明的一些实施方案中，本发明的抗体分子由两条相同的重链和两条相同的轻链组成。在本发明的另一些实施方案中，本发明的抗体分子包含两条不同的重链。

术语“Fc 结构域”或“Fc 区”指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 Fc 区和变体 Fc 区。可用于本发明抗体中的 Fc 结构域包括但不限于，具有天然序列或变体序列的 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 的 Fc 结构域。Fc 结构域的 C 末端 447 位的赖氨酸残基（依照 EU 编号系统）可以存在或者缺失。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。

可以利用已知的多种方法，对 Fc 结构域、包含 Fc 结构域的融合蛋白（例如抗体）进行修饰，例如以用于降低免疫原性、提高稳定性、溶解性、功能和临床益处的其他修饰。此类修饰包括但不限于下列修饰：可以通过修饰氨基酸残基 K447 以增加 IgG 稳定性，优选氨基酸取代 K447A；可以通过修饰氨基酸残基 S228 以解决 IgG4 的异质性问题，优选氨基酸取代 S228P；增加抗体稳定性的杵臼结构（knobs-into-holes），其中杵（knob）可发生在氨基酸残基 S354、T366 处，臼（hole）可发生在氨基酸残基 Y394、T366、L368、Y407 处，优选杵可是如下氨基酸取代 S354C、T366W，臼是如下氨基酸取代 Y394C、T366S、L368A、Y407V；减少同源二聚体的臼（hole）结构，修饰可发生在氨基酸残基 H435、Y436，优选氨基酸取代 H435R、Y436F。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR” 或“高变区”，是抗体可变结构域中在序列上高度可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。

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，由此抑制了 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。免疫检查点分子包括但不限于程序性死亡 1 (PD-1)、细胞程序性死亡-配体 1（PD-L1）、PD-L2、细胞毒 T 淋巴细胞抗原 4 (CTLA-4)、LAG-3 和 TIM-3。

术语“PD-1”是指表达于 T 细胞表面的程序性细胞死亡蛋白 1，其配体 PD-L1 或 PD-L2 表达于包括许多癌细胞的多种细胞类型表面。当 PD-1 与配体（PD-L1 或 PD-L2）结合后，通过募集 SHP-2 而抑制 T 细胞的活化，由此抑制 T 细胞增殖和效应功能，例如 IFN-γ 的产生和细胞毒活性。癌细胞也通过其表面的配体 PD-L1 或 PD-L2 以该机制抑制 T 细胞对其攻击从而产生免疫逃避。本文所用的术语“PD-1”包括人 PD-1，人 PD-1 变体、同种型和物种同源物。

术语“人 PD-1”指由野生型人 PD-1 基因编码的人 PD-1 蛋白，人 PD-1 例如公开在 GenBank 登录号 NM_005018.2 中。

术语“CTLA-4”，即细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4，通过与配体 CD80（也称为 B7-1）

和 CD86（也称为 B7-2）结合，抑制免疫反应。CTLA-4 通过多种方式抑制免疫反应：例如 1）与 T 细胞共刺激受体 CD28 竞争其配体 CD80 和 CD86，从而阻断共刺激；2）发出抑制 T 细胞活化的负面信号。CTLA-4 抑制剂通过抑制 CTLA-4 分子，则能使 T 细胞大量增殖、攻击肿瘤细胞。本文所用的术语“CTLA-4”包括人“CTLA-4”，人 CTLA-4 变体、同种型和物种同源物。人 CTLA-4 例如公开在 GenBank 登录号 AAB59385 中。

PD-1 和 CTLA-4 是同属于 CD28 家族的免疫检查点，均在活化的 T 细胞上表达，但两者在免疫应答的不同阶段、不同免疫细胞上表达存在一定差异。PD-1 抑制剂与 CTLA-4 抑制剂对不同免疫细胞的活化存在差异，除了均可以活化耗竭的 T 细胞外，PD-1 抑制剂主要活化细胞毒性 T 细胞和 Treg，而 CTLA-4 抑制剂主要活化 Th1 效应 T 细胞和 Tfh 细胞 （PMID: 35241833）。与 PD-1 敲除和 CTLA-4 敲除小鼠的表型类似，PD-1 抑制剂的毒性低于 CTLA-4 抑制剂，而 CTLA-4 抑制剂往往具有较大的毒性，这可能与其对外周的 Treg 的清除有关，例如用于治疗晚期黑素瘤的抗 CTLA-4 抗体伊匹单抗（Ipilimumab）由于具有严重的毒副作用，限制了其在临床上的广泛使用。

术语“VEGF”指血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor），又称血管通透因子（vascular permeability factor，VPF），是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子，具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用。VEGF 是一个家族，包括 VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD、VEGFE 和胎盘生长因子 (PGF)。

术语“VEGFA (血管内皮生长因子 A)”是一种高度保守的 27 kDa 二聚体糖蛋白，由内皮细胞以及肿瘤等多种细胞分泌。VEGFA 因可变剪接产生的常见亚型有 VEGFA121、VEGFA165、VEGFA189 和 VEGFA206，分别含有 121、165、189 和 206 个氨基酸。VEGFA 包括人 VEGFA，例如，登录号 UniProt NO.: P15692 下的人 VEGFA 蛋白。VEGFA 是实体瘤生长过程中血管生成的关键性调节因子，因此，靶向 VEGFA 的治疗方案是目前肿瘤学的重点之一，贝伐单抗是首个批准上市的 VEGFA 抑制剂。在本申请通篇内容中，VEGF 通常指 VEGFA，例如 VEGF165 通常指 VEGFA165。

术语“$EC_{50}$”，也被称为“半数有效浓度”，是指在特定的暴露时间后诱导在基线和最大值之间的 50%的应答的药物、抗体或毒剂的浓度。在本申请的上下文中，$EC_{50}$ 的单位为“nM”。

术语“$IC_{50}$”，也被称为“半抑制浓度”，指某一药物或者物质（抑制剂）在抑制某些生物过程（或者是包含在此过程中的某些物质，比如酶，细胞受体或是微生物）的 50%时的浓度。

术语“柔性接头”或“接头”或“连接肽”可互换使用，是指由氨基酸组成的短氨基酸序列，例如单独或组合使用的甘氨酸（G）和/或丝氨酸（S）和/或苏氨酸残基（T），或来自免疫球蛋白的铰链区。

可以用于本发明中的接头可以容易地被本领域技术人员确定。例如，接头包含氨基酸序列$(G_4S)_n$，其中 n 是等于或大于 1 的整数。在一个优选实施方案中，连接子由氨基酸序列$(G_4S)_3$或$(G_4S)_4$组成。可以用于本发明抗体分子的接头还可以是，例如但不限于，如下氨基酸序列：

$(G_3S)2$、$(G_4S)_2$、$(G_3S)_3$、$(G_4S)_3$、$(G_3S)_4$、$(G_4S)_4$、$(G_3S)_5$、$(G_4S)_5$、$(G_3S)_6$、$(G_4S)_6$、GGG、DGGGS、TGEKP、GGRR、EGKSSGSGSESKVD、KESGSVSSEQLAQFRSLD、GGRRGGGS、LRQRDGERP、LRQKDGGGSERP 和 GSTSGSGK PGSGEGSTKG。

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。

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。在一些实施方案中，本发明考虑本发明抗体分子的变体，所述变体相对于在本文中具体公开的抗体分子及其序列而言具有相当程度的同一性，例如同一性为至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%或 99%或更高。所述变体可以包含保守性修饰。

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“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抗体分子的任何类型的细胞系统，包括真核细胞，例如，哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞；和原核细胞，例如，大肠杆菌细胞。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“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”指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。例如所述癌症是肺癌（例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌）、乳腺癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、黑素瘤，结肠癌、直肠癌，卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、胰腺腺癌、基底细胞癌、食道癌、胆道癌、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌、脑癌、胃癌、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、睾丸癌、多发性骨髓瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤等实体瘤和白血病、淋巴瘤（例如霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、急性 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤）等血液瘤。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乳腺癌，胃癌，卵巢癌，胃食管交界处癌，膀胱癌，小肠癌和壶腹癌，食道癌、肺癌和宫颈癌。包括那些癌症的转移性形式。在一些实施方案中，本发明尤其提供了可用于肿瘤/癌症治疗的多特异性抗体、及其在所述肿瘤/癌症中的治疗应用。

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，本发明的抗体分子用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。

术语“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。在一些实施方式中，具有癌症家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常，在癌症的背景中，术语“预防”是指在癌症的病征或症状发生前，特别是在具有癌症风险的受试者中发生前的药物施用。

术语“有效量”指本发明的抗体或组合物的这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。有效量可以由作为本领域技术人员的主治医师通过考虑以下多种因素来容易地确定：诸如哺乳动物的物种；体重、年龄和一般健康状况；涉及的具体疾病；疾病的程度或严重性；个体患者的应答；施用的具体抗体；施用模式；施用制剂的生物利用率特征；选择的给药方案；和任何伴随疗法的使用。

术语“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。抗体或抗体片段或组合物的治疗有效量可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量和抗体或抗体部分在个体中激发所需反应的能力而变动。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或抗体片段或组合物的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数 （例如肿瘤生长率、肿瘤体积等） 至少约 20%、更优选地至少约 40%、甚至更优选地至少约 50%、60%或 70%和仍更优选地至少约 80%或 90%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价化合物抑制可度量参数 （例如，癌症）的能力。

术语“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，由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量将小

于治疗有效量。

术语“药物组合物”指这样的组合物，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

**II．本发明的抗体的生产和纯化**

为了生产本发明的三特异性抗体，可以例如通过固态肽合成（例如 Merrifield 固相合成）或重组生产的方法获得本发明的抗体的各个多肽链，并在适宜条件下使其装配。

在重组生产的情况下，可以将编码所述抗体的任意一条多肽链和/或多条多肽链的多核苷酸分离并插入一个或多个载体中以便随后可以在宿主细胞中进行克隆和/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进行验证，例如通过测序的方法。在一个实施方案中，提供了编码本发明抗体三特异性的一条或多条多肽链的多核苷酸。在再一实施方案中，本发明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。因此，在一个实施方案中，本发明提供用于生产本发明三特异性抗体的方法，所述方法包括：在适于表达三特异性抗体的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞；和在适于所述多肽链装配为所述三特异性抗体的条件下使多肽链装配产生所述抗体。

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）。

通过本文所述方法制备的抗体，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。在纯化后，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抗体的物理/化学特性和/或生物学活性。

**III. 药物组合物、药物联合和试剂盒**

在一个方面，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）。在一些实施方案中，本发明抗体是药物组合物中的唯一活性成分。在另一些实施方案中，药物组合物可以包含本文所述的抗体与一种以上治疗剂。

在另一方面，本发明也提供包含本文所述的抗体与一种以上治疗剂的药物联合。

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。

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。

在另一个方面，本发明提供了包含本文所述抗体或组合物的试剂盒。试剂盒还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等。

**IV. 本发明抗体和组合物的用途和治疗方法**

本发明结合 PD-1/CTLA-4/VEGF 的三特异性抗体适于用作抗肿瘤、抗血管发生、抗自身免疫病、抗感染药物。在一些实施方案中，根据本发明的三特异性抗体用于癌症治疗，例如黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌、膀胱癌、霍奇金淋巴瘤、头颈癌、卵巢癌和脑癌。

**实施例**

以下实施例旨在仅对本发明进行举例说明，因此并不应被视为以任何方式限制本发明。

**实施例 1. 抗 PD-1/CTLA-4/VEGF 三特异性抗体的构建、表达与纯化**

**1.1 三特异性抗体的序列及结构**

本申请基于抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体和抗 VEGFA 抗体构建了可以识别 PD-1、CTLA-4 和 VEGF 的三特异性抗体，其中抗 PD-1 抗体为自研抗体 CQ1-3/1-11；抗 CTLA-4 抗体为已公开的纳米抗体 202F1(申请号：CN202111229808.3，序列号：9)或伊匹单抗，其阻断 CD80 与 CTLA-4 的结合；抗 VEGFA 抗体为贝伐单抗(Bevacizumab)，其阻断 VEGF 与 VEGFR-2（KDR）的结合，各个单抗的可变区序列见表 1。在三特异性抗体中抗 PD-1 抗体和抗 VEGFA 抗体可以采用其 Fab 或 scFv 的形式，相应序列参见表 1。各个抗体片段之间可以采用本领域常用的接头序列进行连接，例如采用$(G_4S)_4$（GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:9)）接头。现有技术中公开的人 hIgG1 或 hIgG4 的恒定区序列可以用于构建本申请的三特异性抗体，例如，三特异性抗体的恒定区序列为表 2 所示的 hIgG1 或 hIgG4（S228P）序列。构建的三特异性抗体的结构及序列如表 3 所示。

表 1. 抗 PD-1 抗体 CQ1-3/1-11、抗 CTLA-4 抗体 202F1 和抗 VEGFA 抗体贝伐单抗的可变区序列及相应 ScFv 结构的序列（粗体表示按照 Kabat 编码规则确定的 CDR 序列，下划线表示相应氨基酸残基的取代）

| 抗体名称 | 重链可变区 | 轻链可变区 |
|---|---|---|
| CQ1-3/1-11 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFS**SYGMS**WVRQAPGKGLEWVS**TIS GGGRDTYYPDSVKG**RFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGI TWFAD**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)<br>CDR1: **SYGMS** (SEQ ID NO:1)<br>CDR2: **TISGGGRDTYYPDSVKG** (SEQ ID NO:2)<br>CDR3: **QNGITWFAD** (SEQ ID NO:3) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC **RASESVDNYGISFMN**WYQQKP GKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C**QQSKEVPWT**FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)<br>CDR1: **RASESVDNYGISFM** (SEQ ID NO:4)<br>CDR2: **AASNQGS** (SEQ ID NO:5)<br>CDR3: **QQSKEVPWT** (SEQ ID NO:6) |
| 具有修饰的 CQ1-3/1-11-ScFv 描述：CQ1-3/1-11-HV(G44C)_$(G_4S)_4$_CQ1-3/1-11-LV(G100C) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFS**SYGMS**WVRQAPGK<u>C</u>LEWVS**TIS GGGRDTYYPDSVKG**RFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGI TWFAD**WGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**W YQQKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC **QQSKEVPWT**FG<u>C</u>GTKVEIK (SEQ ID NO:10) | |
| 抗 CTLA-4 纳米抗体 (202F1) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG SIFS**INHMA**WYRQAPGKQRELVA**GV NSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAV AA**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:11)<br>CDR1: **INHMA** (SEQ ID NO:12)<br>CDR2: **GVNSRGTTNYVDSVKG** (SEQ ID NO:13) | |

| | | |
|---|---|---|
| | CDR3: **LGGAVAA** (SEQ ID NO:14) | |
| 抗 CTLA-4 抗体(伊匹单抗) | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFS**SYTMH**WVRQAPGKGLEWVT**FI SYDGNNKYYADSVK**GRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR**TGW LGPFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)<br>CDR1: **SYTMH** (SEQ ID NO:17)<br>CDR2: **FISYDGNNKYYADSVK** (SEQ ID NO:18)<br>CDR3: **TGWLGPFDY** (SEQ ID NO:19) | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**R ASQSVGSSYLA**WYQQKPGQAP RLLIY**GAFSRAT**GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQ YGSSP**WTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:16)<br>CDR1: **RASQSVGSSYLA** (SEQ ID NO:20)<br>CDR2: **GAFSRAT** (SEQ ID NO:21)<br>CDR3: **QQYGSSP** (SEQ ID NO:22) |
| 具有修饰的伊匹单抗-ScFv<br><br>描述：伊匹单抗-HV(G44C)_$(G_4S)_4$_伊匹单抗-LV(Q100C) | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFS**SYTMH**WVRQAPGK<u>C</u>LEWVT**FI SYDGNNKYYADSVK**GRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAIYYCART**GW LGPFDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSP GERATLSC**RASQSVGSSYLA**WYQQK PGQAPRLLIY**GAFSRAT**GIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYGS SPWT**FG<u>C</u>GTKVEIK (SEQ ID NO:23) | |
| 贝伐单抗 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG YTFT**NYGMN**WVRQAPGKGLEWVG **WINTYTGEPTYAADFK**RRFTFSLDTS KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YP HYYGSSHWYFDV**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:24)<br>CDR1: **NYGMN** (SEQ ID NO:26)<br>CDR2: **WINTYTGEPTYAADFK** (SEQ ID NO:27)<br>CDR3: **YPHYYGSSHWYFDV** (SEQ ID NO:28) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**S ASQDISNYLN**WYQQKPGKAPK VLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYC**QQYS TVP**WTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:25)<br>CDR1: **SASQDISNYLN** (SEQ ID NO:29)<br>CDR2: **FTSSLHS** (SEQ ID NO:30)<br>CDR3: **QQYSTVP** (SEQ ID NO:31) |

| | | |
|---|---|---|
| 具有修饰的贝伐单抗-ScFv<br><br>描述：贝伐单抗-HV(G44C)_$(G_4S)_4$_贝伐单抗-LV(Q100C) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG YTFT**NYGMN**WVRQAPGK<u>C</u>LEWVG **WINTYTGEPTYAADFK**RRFTFSLDTS KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YP HYYGSSHWYFDV**WGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYL** **N**WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C**QQYSTVP**WTFG<u>C</u>GTKVEIK (SEQ ID NO:32) | |

表 2. hIgG1 及 hIgG4 恒定区

| |
|---|
| hIgG1 抗体的重链恒定区 |
| ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:33) |
| 具有修饰 S228P 的 hIgG4 的重链恒定区(命名为 hIgG4-1，下划线表示相应氨基酸残基的取代） |
| ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP<u>P</u>CPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:34) |
| 具有修饰 S228P、K447A 的 hIgG4 的重链恒定区（命名为 hIgG4-2，下划线表示相应氨基酸残基的取代） |
| ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP<u>P</u>CPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN |

| |
|---|
| VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGA (SEQ ID NO:35) |
| 轻链恒定区（kappa 链） |
| RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:36) |

表 3. 三特异性抗体的结构及序列（下划线表示相应氨基酸残基的取代）

| 抗体名称 | 重链序列 | 轻链序列 |
|---|---|---|
| F6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W VRQAPGKGLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD** WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGA GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ GTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN** WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN** WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK | DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC**RASESVDNYGI SFMN**WYQQKPGKAPK LLIY**AASNQGS**GVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYC**QQSKEVP WT**FGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO:38) |

| | | |
|---|---|---|
| | (SEQ ID NO:37) | |
| F7 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKGLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY<br>SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES<br>KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS<br>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF<br>LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY<br>RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ<br>GTLVTVSS (SEQ ID NO:39) | DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**RASESVDNYGI**<br>**SFMN**WYQQKPGKAPK<br>LLIY**AASNQGS**GVPSRF<br>SGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYC**QQSKEVP**<br>**WT**FGGGTKVEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGT<br>ASVVCLLNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQSGNSQ<br>ESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSF<br>NRGEC<br>(SEQ ID NO:40) |
| F8 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKCLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM<br>TQSPSSLSASVGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**WYQ<br>QKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQPEDFATYYC**QQSKEVPWT**FGCGTKVEIK | DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**F**<br>**TSSLHS**GVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISSLQPEDFA<br>TYYC**QQYSTVP**WTFG<br>QGTKVEIKRTVAAPSV |

| | | |
|---|---|---|
| | GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKGLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE<br>STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL<br>QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV<br>DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ<br>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH<br>YTQKSLSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY<br>RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ<br>GTLVTVSS (SEQ ID NO:41) | FIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQES<br>VTEQDSKDSTYSLSSTL<br>TLSKADYEKHKVYACE<br>VTHQGLSSPVTKSFNR<br>GEC<br>(SEQ ID NO:42) |
| F9 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY<br>RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ<br>GTLVTVSS<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKGLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY<br>SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES<br>KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS<br>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL | DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**RASESVDNYGI**<br>**SFMN**WYQQKPGKAPK<br>LLIY**AASNQGS**GVPSRF<br>SGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYC**QQSKEVP**<br>**WT**FGGGTKVEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGT<br>ASVVCLLNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQSGNSQ<br>ESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSF<br>NRGEC<br>(SEQ ID NO:44) |

| | | |
|---|---|---|
| | VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF<br>LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:43) | |
| F10 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKGLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY<br>SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES<br>KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS<br>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF<br>LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS | DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**RASESVDNYGI**<br>**SFMN**WYQQKPGKAPK<br>LLIY**AASNQGS**GVPSRF<br>SGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYC**QQSKEVP**<br>**WT**FGGGTKVEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGT<br>ASVVCLLNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQSGNSQ<br>ESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSF<br>NRGEC<br>(SEQ ID NO:46) |

| | | |
|---|---|---|
| | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY<br>RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ<br>GTLVTVSS (SEQ ID NO:45) | |
| F11 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKGLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY<br>SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES<br>KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS<br>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF<br>LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:47) | DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**RASESVDNYGI**<br>**SFMN**WYQQKPGKAPK<br>LLIY**AASNQGS**GVPSRF<br>SGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYC**QQSKEVP**<br>**WT**FGGGTKVEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGT<br>ASVVCLLNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQSGNSQ<br>ESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSF<br>NRGECGGGGS<br>GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLLESGGGLVQPGG<br>SLRLSCAASGSIFS**INH**<br>**MA**WYRQAPGKQRELV<br>A**GVNSRGTTNYVDSV**<br>**KG**RFTISRDNSKNTLY<br>LQMNSLRAEDTAVYY<br>CRA**LGGAVAA**WGQGT<br>LVTVSS (SEQ ID NO:48) |
| F12 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY<br>RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ<br>GTLVTVSS<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKGLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF | DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**F**<br>**TSSLHS**GVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISSLQPEDFA<br>TYYC**QQYSTVP**WTFG<br>QGTKVEIKRTVAAPSV |

| | | |
|---|---|---|
| | SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS HWYFDV**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W VRQAPGKCLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD** WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**WYQ QKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQSKEVPWT**FGCGTKVEIK (SEQ ID NO:49) | FIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNR GEC<br>(SEQ ID NO:50) |
| F13 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W VRQAPGKGLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD** WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS | DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC**RASESVDNYGI SFMN**WYQQKPGKAPK LLIY**AASNQGS**GVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYC**QQSKEVP WT**FGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC |

| | | |
|---|---|---|
| | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:51) | (SEQ ID NO:52) |
| | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY<br>RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ<br>GTLVTVSS<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP<br>EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR<br>EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br>PSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLS<br>CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS<br>FFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQK<br>SLSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:53) | |
| F14 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKCLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM<br>TQSPSSLSASVGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**WYQ | 无 |

| | | |
|---|---|---|
| | QKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQPEDFATYYC**QQSKEVPWT**FGCGTKVEIK<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP<br>EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR<br>EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br>PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLW<br>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS<br>FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK<br>SLSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:54) | |
| | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY<br>RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ<br>GTLVTVSS<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP<br>EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR<br>EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br>PSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLS<br>CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS<br>FFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQK<br>SLSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF | |

| | | |
|---|---|---|
| | SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:55) | |
| F15 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYTMH**W<br>VRQAPGKGLEWVT**FISYDGNNKYYADSVK**GRFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR**TGWLGPFDY**<br>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY<br>SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES<br>KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS<br>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWC<br>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF<br>FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:56) | EIVLTQSPGTLSLSPGE<br>RATLSC**RASQSVGSSY**<br>**LA**WYQQKPGQAPRLLI<br>Y**GAFSRAT**GIPDRFSGS<br>GSGTDFTLTISRLEPED<br>FAVYYC**QQYGSSP**WT<br>FGQGTKVEIKRTVAAP<br>SVFIFPPSDEQLKSGTA<br>SVVCLLNNFYPREAKV<br>QWKVDNALQSGNSQE<br>SVTEQDSKDSTYSLSST<br>LTLSKADYEKHKVYAC<br>EVTHQGLSSPVTKSFN<br>RGEC (SEQ ID NO:57) |
| | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKCLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM<br>TQSPSSLSASVGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**WYQ<br>QKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI | |

| | | |
|---|---|---|
| | SSLQPEDFATYYC**QQSKEVPWT**FGCGTKVEIK<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP<br>EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR<br>EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br>PSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLS<br>CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS<br>FFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQK<br>SLSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:58) | |
| F16 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKGLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY<br>SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES<br>KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE | DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**RASESVDNYGI**<br>**SFMN**WYQQKPGKAPK<br>LLIY**AASNQGS**GVPSRF<br>SGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYC**QQSKEVP**<br>**WT**FGGGTKVEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGT<br>ASVVCLLNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQSGNSQ<br>ESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSF<br>NRGEC<br>(SEQ ID NO:60) |

| | | |
|---|---|---|
| | QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGA GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYTMH**W VRQAPGKCLEWVT**FISYDGNNKYYADSVK**GRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCART**GWLGPFDY** WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLT QSPGTLSLSPGERATLSC**RASQSVGSSYLA**WYQQKPG QAPRLLIY**GAFSRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYC**QQYGSSPWT**FGCGTKVEIK (SEQ ID NO:59) | |
| F17 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W VRQAPGKCLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD** WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**WYQ QKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQSKEVPWT**FGCGTKVEIK GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN** WVRQAPGKGLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS HWYFDV**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH | DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC**SASQDISNYLN** WYQQKPGKAPKVLIY**F TSSLHS**GVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFA TYYC**QQYSTVP**WTFG QGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:62) |

| | | |
|---|---|---|
| | YTQKSLSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYTMH**W<br>VRQAPGKCLEWVT**FISYDGNNKYYADSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCART**GWLGPFDY**<br>WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLT<br>QSPGTLSLSPGERATLSC**RASQSVGSSYLA**WYQQKPG<br>QAPRLLIY**GAFSRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP<br>EDFAVYYC**QQYGSSPWT**FGCGTKVEIK (SEQ ID NO:61) | |
| F18 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKCLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM<br>TQSPSSLSASVGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**WYQ<br>QKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQPEDFATYYC**QQSKEVPWT**FGCGTKVEIK<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYTMH**W<br>VRQAPGKGLEWVT**FISYDGNNKYYADSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCART**GWLGPFDY**<br>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY<br>SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES<br>KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS<br>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF<br>LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF | EIVLTQSPGTLSLSPGE<br>RATLSC**RASQSVGSSY**<br>**LA**WYQQKPGQAPRLLI<br>Y**GAFSRAT**GIPDRFSGS<br>GSGTDFTLTISRLEPED<br>FAVYYC**QQYGSSP**WT<br>FGQGTKVEIKRTVAAP<br>SVFIFPPSDEQLKSGTA<br>SVVCLLNNFYPREAKV<br>QWKVDNALQSGNSQE<br>SVTEQDSKDSTYSLSST<br>LTLSKADYEKHKVYAC<br>EVTHQGLSSPVTKSFN<br>RGEC (SEQ ID NO:64) |

| | | |
|---|---|---|
| | SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:63) | |
| F19 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKGLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY<br>SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES<br>KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS<br>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF<br>LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKCLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:65) | EVQLLESGGGLVQPGG<br>SLRLSCAASGSIFS**INH**<br>**MA**WYRQAPGKQRELV<br>A**GVNSRGTTNYVDSV**<br>**KG**RFTISRDNSKNTLY<br>LQMNSLRAEDTAVYY<br>CRA**LGGAVAA**WGQGT<br>LVTVSS GGGGS<br>GGGGSGGGGSGGGGS<br>DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**RASESVDNYGI**<br>**SFMN**WYQQKPGKAPK<br>LLIY**AASNQGS**GVPSRF<br>SGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYC**QQSKEVP**<br>**WT**FGGGTKVEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGT<br>ASVVCLLNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQSGNSQ<br>ESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSF<br>NRGEC (SEQ ID NO:66) |
| F20 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKGLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE<br>STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL | EVQLLESGGGLVQPGG<br>SLRLSCAASGSIFS**INH**<br>**MA**WYRQAPGKQRELV<br>A**GVNSRGTTNYVDSV**<br>**KG**RFTISRDNSKNTLY |

| | | |
|---|---|---|
| | QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV<br>DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ<br>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH<br>YTQKSLSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKCLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM<br>TQSPSSLSASVGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**WYQ<br>QKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQPEDFATYYC**QQSKEVPWT**FGCGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:67) | LQMNSLRAEDTAVYY<br>CRA**LGGAVAA**WGQGT<br>LVTVSS<br>GGGGS<br>GGGGSGGGGSGGGGS<br>DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**F**<br>**TSSLHS**GVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISSLQPEDFA<br>TYYC**QQYSTVP**WTFG<br>QGTKVEIKRTVAAPSV<br>FIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQES<br>VTEQDSKDSTYSLSSTL<br>TLSKADYEKHKVYACE<br>VTHQGLSSPVTKSFNR<br>GEC (SEQ ID NO:68) |
| F21 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY<br>RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ<br>GTLVTVSS<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKGLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY<br>SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES<br>KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS<br>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL | DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**RASESVDNYGI**<br>**SFMN**WYQQKPGKAPK<br>LLIY**AASNQGS**GVPSRF<br>SGSGSGTDFTLTISSLQP<br>EDFATYYC**QQSKEVP**<br>**WT**FGGGTKVEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGT<br>ASVVCLLNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQSGNSQ<br>ESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSF<br>NRGEC<br>(SEQ ID NO:70) |

| | | |
|---|---|---|
| | VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF<br>LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL<br>SLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKGLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG<br>GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**FTSSLHS**GVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYC**QQYSTVP**WTFGQGTKVEIK<br>(SEQ ID NO:69) | |
| F22 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN**<br>WVRQAPGKGLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF<br>SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS**<br>**HWYFDV**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE<br>STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL<br>QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV<br>DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ<br>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH<br>YTQKSLSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY<br>RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ<br>GTLVTVSS<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKCLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD** | DIQMTQSPSSLSASVGD<br>RVTITC**SASQDISNYLN**<br>WYQQKPGKAPKVLIY**F**<br>**TSSLHS**GVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISSLQPEDFA<br>TYYC**QQYSTVP**WTFG<br>QGTKVEIKRTVAAPSV<br>FIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQES<br>VTEQDSKDSTYSLSSTL<br>TLSKADYEKHKVYACE<br>VTHQGLSSPVTKSFNR<br>GEC (SEQ ID NO:72) |

| | | |
|---|---|---|
| | WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**WYQ QKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQSKEVPWT**FGCGTKVEIK (SEQ ID NO:71) | |
| F23 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W VRQAPGKCLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD** WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**WYQ QKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQSKEVPWT**FGCGTKVEIK GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ GTLVTVSS GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN** WVRQAPGKGLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS HWYFDV**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGA (SEQ ID NO:73) | DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC**SASQDISNYLN** WYQQKPGKAPKVLIY**F TSSLHS**GVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFA TYYC**QQYSTVP**WTFG QGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:74) |
| F24 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**NYGMN** WVRQAPGKGLEWVG**WINTYTGEPTYAADFK**RRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**YPHYYGSS** | DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC**SASQDISNYLN** WYQQKPGKAPKVLIY**F** |

| | | |
|---|---|---|
| | **HWYFDV**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE<br>STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL<br>QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV<br>DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ<br>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH<br>YTQKSLSLSLGA<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYGMS**W<br>VRQAPGKCLEWVS**TISGGGRDTYYPDSVKG**RFTISR<br>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**QNGITWFAD**<br>WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM<br>TQSPSSLSASVGDRVTITC**RASESVDNYGISFMN**WYQ<br>QKPGKAPKLLIY**AASNQGS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQPEDFATYYC**QQSKEVPWT**FGCGTKVEIK<br>GGGGS GGGGSGGGGSGGGGS<br>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFS**INHMA**WY<br>RQAPGKQRELVA**GVNSRGTTNYVDSVKG**RFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRA**LGGAVAA**WGQ<br>GTLVTVSS (SEQ ID NO:75) | **TSSLHS**GVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISSLQPEDFA<br>TYYC**QQYSTVP**WTFG<br>QGTKVEIKRTVAAPSV<br>FIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQES<br>VTEQDSKDSTYSLSSTL<br>TLSKADYEKHKVYACE<br>VTHQGLSSPVTKSFNR<br>GEC (SEQ ID NO:76) |

**1.2 三特异性抗体的表达和纯化**

按照表 3 中三特异性抗体的序列，合成相应序列的多核苷酸，并将其插入到表达载体 pCDNA3.1 中。测序正确后进行表达。具体方法如下：用编码如表 3 所示相应三特异性抗体的轻链和重链的表达质粒各 100 μg 共转染 200 mL 细胞密度为 $3\times10^6$ 细胞/mL 的 expiCHO 细胞（Gibco，货号：A29129），在 37℃，二氧化碳培养摇床中培养 7 天，离心收集上清液，并用 0.22μM 滤膜过滤上清液，将过滤后的上清液转移至含有 2 mL protein A 层析填料 MabSelect PrismA（cytiva，货号：17549802）的 protein A 层析柱（预先用 5 个柱体积的 PBS 溶液进行平衡）进行亲和层析。样品保留时间至少 2 分钟，然后用 10-15 倍柱体积的 PBS 溶液清洗层析柱以去除非特异性吸附的杂质，再用 4 mL 的 20 mM Na-Citrate, pH3.2 的洗脱液洗脱目的蛋白，最后用 1M Tris 调节洗脱液的 pH 至 5.0-6.0。离心过滤后用紫外分光光度计检测蛋白质浓度，

根据浓度计算相对表达量，并利用尺寸排阻层析联合高效液相色谱（Dionex, Ultimate 3000）检测蛋白质纯度。检测的各个三特异性抗体的相应表达量和纯度见表 4。

关于本申请使用的对照抗体，如下构建并根据上述方法进行相应表达和纯化，针对具体抗体对具体表达和纯化的相应参数进行调整属于本领域技术人员的常规知识范畴：

将表 1 中抗 PD-1 抗体（CQ1-3/1-11）的重链可变区与表 2 中的 hIgG4-1 恒定区序列融合，得到全长重链；并将 CQ1-3/1-11 的轻链可变区与表 2 中的轻链恒定区序列融合得到全长轻链，由此获得的全长抗体命名为 CQ1-3/1-11-hIgG4 抗体，或简称为 CQ1-3/1-11。

将表 1 中抗 CTLA-4 抗体(202F1)的重链可变区与表 2 中的 hIgG4-1 恒定区序列融合，得到全长重链；并将 202F1 的轻链可变区与表 2 中的轻链恒定区序列融合得到全长轻链，由此获得的全长抗体命名为 202F1-hIgG4 抗体。

将表 1 中抗体 202F1 的重链可变区与表 2 中的 hIgG1 恒定区序列融合，并与上述相应全长轻链组装得到全长抗体，命名为 202F1-hIgG1。

将表 1 中伊匹单抗的可变区与表 2 中的 hIgG1 恒定区序列融合并与相应全长轻链组装，得到伊匹单抗。

将表 1 中贝伐单抗的可变区与表 2 中的 hIgG1 恒定区序列融合并与相应全长轻链组装，得到贝伐单抗。

关于本申请使用的各个抗体的相应 scFv，根据表 1 中公开的序列按照上述方法进行相应表达和纯化，针对具体抗体对具体表达和纯化的相应参数进行调整属于本领域技术人员的常规知识范畴。

**表 4 三特异性的表达量和纯度**

| 抗体名称 | 表达量，mg/100mL | SEC 检测主峰纯度，% |
|---|---|---|
| H010-F6 | 1.28 | 91.77 |
| H010-F7 | 1.74 | 87.53 |
| H010-F8 | 3.42 | 88.71 |
| H010-F9 | 2.28 | 92.99 |
| H010-F10 | 1.62 | 86.02 |
| H010-F11 | 2.14 | 83.59 |
| H010-F12 | 3.10 | 80.76 |
| H010-F13 | 1.24 | 82.48 |
| H010-F14 | 0.90 | 85.17 |
| H010-F15 | 0.94 | 96.04 |
| H010-F16 | 0.82 | 62.96 |
| H010-F17 | 1.66 | 65.61 |

| | | |
|---|---|---|
| H010-F18 | 0.56 | 80.80 |
| H010-F19 | 3.28 | 39.91 |
| H010-F20 | 4.34 | 55.50 |
| H010-F21 | 0.26 | 57.60 |
| H010-F22 | 2.62 | 82.06 |
| H010-F23 | 3.50 | 96.93 |
| H010-F24 | 2.88 | 95.42 |

**实施例 2. 抗 PD-1/CTLA-4/VEGF 三特异性抗体的结合活性和理化性质分析**

**2.1 三特异性抗体与 PD-1 的结合活性**

分别采用酶联免疫吸附测定（ELISA）和流式细胞术（FACS）检测三特异性抗体与 PD-1 蛋白和细胞表面的 PD-1 抗原的结合活性。

ELISA 测定三特异性抗体与 PD-1 蛋白的结合活性：分别用 1 μg/mL 人 PD-1 蛋白(Acro，货号：PD1-H5221)包被高吸附 96 孔酶标板，4℃孵育过夜。第二天，PBST 溶液洗板 3 次后用 1% BSA-PBS 溶液 37℃封闭板 1 小时，同时用 1% BSA-PBS 溶液配制抗体 3 倍梯度稀释液，起始浓度为 10 nM，将各个梯度浓度的抗体以 100 μL/孔加入到封闭好的 96 孔酶标板中，一式三份，37℃孵育 1 小时。之后用 0.05% PBST 溶液洗板 3 次，100 μL/孔向酶标板中加入经 1:5000 稀释的标记 HRP 的二抗(Sigma，货号：A0170)，37℃孵育 1 小时。0.05% PBST 溶液洗板 3 次，TMB 显色，用酶标仪检测 96 孔酶标板在 450nm 处的吸光值，利用四参数模型对 $OD_{450}$ 值进行拟合，计算各抗体与 PD-1 结合的 $EC_{50}$ 值，结果如表 5 所示。

FACS 检测三特异性抗体与细胞表面 PD-1 抗原的结合活性：使用胰酶（Gibco，25200072）消化过表达 PD-1 的 293T 细胞（293T-hPD-1，康源博创，KC-0204），用含 2%胎牛血清（FBS）的 PBS（FACS 缓冲液）清洗细胞 2 次，重悬到 FACS 缓冲液中，以约 $1x10^5$ 个细胞/孔加入到 96 孔板中。300 g 离心 5 分钟后，舍弃上清。用 FACS 缓冲液 3 倍梯度稀释抗体，获得 2 个梯度系列 FACS#1 和 FACS#2，起始浓度分别为 200 nM (表 5，FACS#1)或 100 nM (表 5，FACS#2，图 2)。然后以 100 μL/孔加入 96 孔板中，一式三份，混匀，4℃孵育 60 分钟。离心并用 FACS 缓冲液洗板 3 次， 100 μL/孔加入经 1:800 稀释的 AF647-anti-hIgG(H+L)（Jackson，货号：109-605-003），4℃孵育 50 分钟。用 FACS 缓冲液洗板 3 次后，100 μL/孔加 FACS 缓冲液重悬细胞，在流式细胞仪（BECKMAN COULTER cytoFLEX）上检测荧光信号。利用四参数模型对结合活性进行拟合，计算各抗体与 PD-1 结合的 $EC_{50}$ 值，结果如表 5 和图 2 所示。

为了对比自研抗体 CQ1-3/1-11 与相应商用抗体的性能，申请人以相同方法检测了抗体 CQ1-3/1-11-hIgG4 和抗体派姆单抗与细胞表面 PD-1 抗原的结合活性，结果表明自研抗体 CQ1-3/1-11 与派姆单抗具有相当的结合细胞表面 PD-1 的能力，$EC_{50}$ 值分别为 4.34 nM 和 5.05 nM。

**表 5 三特异性抗体与 PD-1、CTLA-4 和 VEGFA 的结合活性（$EC_{50}$, nM）**

| | PD-1 结合活性 | | | CTLA-4 结合活性 | | | VEGFA 结合活性 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 实验方法 | ELISA | FACS#1 | FACS#2 | ELISA | FACS#3 | FACS#4 | ELISA |
| CQ1-3/1-11 | 0.041 | 2.800 | 1.119 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 202F1-hIgG1 | N/A | N/A | N/A | 0.078 | 1.713 | 1.046 | N/A |
| 202F1-hIgG4 | N/A | N/A | N/A | NT | 2.313 | NT | N/A |
| 伊匹单抗 | N/A | N/A | N/A | 0.010 | NT | NT | N/A |
| 贝伐单抗 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | 0.020 |
| HC010-F6 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F7 | 0.085 | NT | NT | 0.059 | NT | NT | 0.081 |
| HC010-F8 | 0.080 | 2.390 | 1.811 | 0.127 | 4.924 | 4.294 | 0.072 |
| HC010-F9 | 0.082 | 3.531 | NT | 0.031 | 2.803 | NT | 0.111 |
| HC010-F10 | 0.093 | 5.773 | 2.365 | 0.093 | 6.187 | 4.862 | 0.121 |
| HC010-F11 | 0.114 | NT | NT | 0.044 | NT | NT | 0.125 |
| HC010-F12 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F13 | 0.307 | NT | NT | 0.438 | NT | NT | 0.098 |
| HC010-F14 | 0.472 | NT | NT | 0.734 | NT | NT | 0.096 |
| HC010-F15 | 0.712 | NT | NT | 0.527 | NT | NT | 0.087 |
| HC010-F16 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F17 | 0.033 | NT | NT | 0.077 | NT | NT | 0.072 |
| HC010-F18 | 0.040 | NT | NT | 0.029 | NT | NT | 0.120 |
| HC010-F19 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F20 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F21 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F22 | NT | NT | 3.445 | NT | 8.920 | 8.920 | NT |
| HC010-F23 | NT | NT | 2.126 | NT | 5.429 | 5.429 | NT |
| HC010-F24 | NT | NT | 7.910 | NT | 6.499 | 6.499 | NT |
| HIgG4 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |

N/A 不适用，NT 没有检测；FACS #1-#4 指不同的实验批次，hIgG4（泰州市百英生物科技有限公司，货号：B107804）为与本申请抗体无关的阴性对照。

**2.2 三特异性抗体与 CTLA-4 的结合活性**

分别采用如2.1节所公开的ELISA和FACS方法检测三特异性抗体与CTLA-4蛋白和细胞表面CTLA-4抗原的结合活性。

其中采用的人CTLA-4蛋白购买自Acro，货号：CT4-H52H9，结果如表5所示。

在FACS检测中，采用过表达人CTLA-4的CHOK1细胞（CHO-hCTLA-4，吉满生物，GM-C18989），以约$2x10^5$细胞/孔加入到96孔U底板中。用FACS 缓冲液3倍梯度稀释抗体，起始浓度分别为200 nM 。结果如表5和图3所示。

**2.3 三特异性抗体与VEGFA的结合活性**

采用如2.1节所述的ELISA方法检测三特异性抗体与VEGFA蛋白的结合活性。其中采用的人VEGF165-his蛋白购自Acro，货号：VE5-H5248。阳性对照抗体贝伐单抗购自Roche，货号：0210008H1545，结果如表5所示。

**2.4 三特异性抗体与活化的T细胞的结合活性**

活化的T细胞表面上调PD-1和CTLA-4的表达，采用人外周血T细胞经抗CD3和抗CD28抗体活化后检测三特异性抗体与活化后 T 细胞的结合活性。抗 PD-1 抗体派姆单抗（permbrolizumab，默沙东，货号：S028905），纳武单抗（百英生物，货号：B6924），信迪利单抗（sintilimab，百英生物，货号：B682101）和卡瑞利珠单抗（camrelizumab，百英生物，货号：B852001）及抗CTLA-4抗体伊匹单抗作为阳性对照。

在37℃水浴锅中快速复苏人外周血单个核细胞（PBMC，妙顺(上海)生物科技有限公司，货号：A19K154025），使用T细胞分离液重悬细胞并计数。400g离心10分钟后去上清，用T细胞分离液重悬至$5x10^7$个细胞/mL。根据T细胞分离试剂盒（Stemcell，货号：19051）的步骤分离T细胞，将得到的T细胞用培养基重悬。采用NucleoCounter NC-200对细胞计数，调整 T 细胞密度至约 $1x10^6$ 个细胞/mL。加入含有抗 CD3 和抗 CD28 抗体的 dynabeads (Invitrogen™，货号：11132D)和10 ng/mL的hIL-2（Peprotech，货号：200-02），放于37℃，5% $CO_2$培养箱中培养3天。将活化的T细胞去掉dynabeads和上清并重悬到FACS缓冲液中，细胞密度调整为约$1x10^6$个细胞/mL，将100 μL细胞液加入96孔U底板中，$1x10^5$细胞/孔。500 g离心5分钟后，舍弃上清，加入100 μL用FACS缓冲液3倍梯度稀释的本申请的三特异性抗体，起始浓度为200 nM，一式三份。混匀后4℃孵育60分钟。离心并用FACS缓冲液洗3次后，100 μL/孔加入PE anti-human IgG Fc （Biolegend，货号：366903），4℃孵育50分钟。FACS缓冲液洗3次后，100 μL/孔加入BV421 anti-human CD3 antibody(OKT3)（Biolegend，货号：317344），4℃孵育50分钟。FACS 缓冲液洗3次后，70 μL/孔加入PBS溶液重悬细胞，在流式细胞仪（BDCelesta）上检测CD3 T细胞上的荧光信号。利用四参数模型对结合活性进行拟合，计算各抗体与T细胞结合的$EC_{50}$值。

如图4和表6所示，商业抗PD-1抗体派姆单抗、纳武单抗、信迪利单抗和卡瑞利珠单抗

均可以剂量依赖的方式结合上述活化的 T 细胞，此外，商业抗 CTLA-4 抗体伊匹单抗也以剂量依赖的方式与活化的 T 细胞结合，表明经本实施例方法所活化的 T 细胞表面表达 PD-1 和 CTLA-4。由于伊匹单抗结合细胞表面 CTLA-4 的平均荧光强度（MFI）低于抗 PD-1 抗体与细胞表面 PD-1 的 MFI，这可能与 CTLA-4 在活化的 T 细胞表面表达量较低有关。

如图 4 和表 6 所示，本申请制备的三特异性抗体 HC010-F8 和 HC010-F23 均能以剂量依赖的方式结合活化的 T 细胞，结合能力优于抗 CTLA-4 抗体伊匹单抗和 202F1。

**表 6 特异性抗体与活化的 T 细胞的结合活性**

| 抗体名称 | $EC_{50}$, nM |
|---|---|
| HC010-F8 | 0.498 |
| HC010-F23 | 0.375 |
| CQ1-3/1-11 | 0.244 |
| 派姆单抗 | 0.082 |
| 纳武单抗 | 0.122 |
| 信迪利单抗 | 0.231 |
| 卡瑞利珠单抗 | 0.473 |
| 伊匹单抗 | 1.274 |
| 202F1-hIgG4 | 1.463 |
| hIgG1 | N/A |
| hIgG4 | N/A |

N/A 不适用，hIgG1 和 hIgG4 为与本申请抗体无关的阴性对照。

**2.5 三特异性抗体同时与 PD-1、CTLA-4 和 VEGFA 的结合活性**

**2.5.1 三特异性抗体与 PD-1 蛋白结合后与 CTLA-4 或 VEGFA 的结合**

用 1 μg/mL 的人 PD1-his(Acro，货号 PD1-H5221)，包被高吸附 96 孔酶标板，4℃孵育过夜。PBST 溶液洗板后用 300 μL/孔的 1% BSA-PBS 在 37℃下封闭 2 小时。同时用 1% BSA-PBS 溶液配制抗体 3 倍梯度稀释液，起始浓度为 20 nM。洗板后，每孔 100 μL 加入各个梯度稀释的抗体，一式三份，37℃孵育 1 小时。之后用 0.05% PBST 溶液机洗酶标板 3 次，一份以 100 μL/孔向各孔加入 1 μg/mL Biotinylated-hCTLA4（Acro, 货号：CT4-H82E3）检测三特异性抗体与 PD-1 蛋白结合后与 CTLA-4 的结合活性；一份以 100 μL/孔向各孔加入 1 μg/mL Biotinylated-hVEGF165（Acro, 货号：VE5-H82Q0）检测三特异性抗体与 PD-1 蛋白结合后与 VEGF 的结合活性。最后一份加入 hIgG4 作为阴性对照。37℃孵育 1 小时后用 PBST 溶液机洗酶标板 3 次，以 100 μL 每孔向板中加入经 1:5000 稀释的 Streptavidin-HRP（BD pharmingen，货号 554066），37℃孵育 45 分钟。PBST 机洗酶标板 3 次，TMB 显色，用酶标仪检测 96 孔酶

标板在 450 nm 的吸光值，利用四参数模型进行拟合，计算抗体的 $EC_{50}$ 值。

结果如图 13 所示，三特异性抗体 HC010-F8 和 HC010-F23 与人 PD1 结合后仍能与人 VEGF（图 13A，$EC_{50}$ 分别为 0.049 和 0.054 nM）或人 CTLA-4（图 13B，$EC_{50}$ 分别为 0.105 和 0.250 nM）结合，且其同时结合活性具有剂量依赖性。

**2.5.2 三特异性抗体与细胞表面 PD-1 结合后同时与 CTLA-4 和 VEGFA 的结合**

使用胰酶消化获得 293T-hPD-1 细胞，含 2% FBS 的 PBS（FACS 缓冲液）洗涤 2 次后调整细胞密度至约 $6x10^5$ 个细胞/ml，200 μL/孔加入到 96 孔 U 底板中。300 g 离心 5 分钟后，舍弃上清后向各孔加入 100 μL 用 FACS 缓冲液梯度稀释的抗体（起始浓度为 200nM，3 倍梯度稀释，同体积的 FACS buffer 作为阴性对照），一式三份。混匀，4℃孵育 60 分钟。FACS 缓冲液洗 3 次后，以 100 μL/孔向各孔加入由 1 μg/mL Biotin-hVEGF165 与 1 μg/mL hCTLA4-mFc（DIMA BIOTECH, 货号：PME100017）按 1:1 体积比组成的混合物，分别检测三特异性抗体与细胞表面 PD-1 结合后同时与 CTLA-4 和 VEGF 结合的活性。 4℃孵育 60 分钟后 FACS 缓冲液洗 3 次，以 100 μL/孔向各孔加入由 AF647 donkey anti-mIgG(H+L)（1:800 稀释，Invitrogen，货号：A31571）与 PE Streptavidin（1:800 稀释，BD，货号：554061）稀释成的混合物，4℃孵育 50 分钟。用 FACS 缓冲液洗 3 次后，100 μL/孔加入 PBS 溶液重悬细胞，在流式细胞仪（BECKMAN COULTER cytoFLEX）上检测荧光信号。利用四参数模型对结合活性进行拟合，计算各抗体的 $EC_{50}$ 值。

结果如图 14 所示，三特异性抗体 HC010-F8、HC010-F10、HC010-F22、HC010-F23 和 HC010-F24 在与细胞表面的人 PD-1 结合后仍然能够同时与人 VEGF（图 14A ，$EC_{50}$ 分别为 1.413、2.835、2.288、2.223 和 9.151 nM）和人 CTLA-4（图 14AB，$EC_{50}$ 分别为 2.744、3.323、5.196、3.837 和 12.000 nM）结合，且其同时结合活性具有剂量依赖性。

**2.5.3 三特异性抗体与细胞表面 CTLA-4 结合后同时与 PD-1 和 VEGFA 的结合**

使用胰酶消化获得 CHOK1-hCTLA4 细胞，含 2% FBS 的 PBS（FACS 缓冲液）洗涤 2 次后调整细胞密度至约 $8x10^5$ 个细胞/ml，以 200 μL/孔加入到 96 孔 U 底板中。300 g 离心 5 分钟后，舍弃上清后加入 100 μL 用 FACS 缓冲液梯度稀释的抗体（起始浓度为 200nM，3 倍梯度稀释，加入同体积的 FACS buffer 作为阴性对照），一式三份。混匀，4℃孵育 60 分钟。FACS 缓冲液洗 3 次后，以 100 μL/孔向各孔加入由 1 μg/mL hPD1-mFc（Acro, 货号：PD1-H5255）与 1 μg/mL Biotin-hVEGF165 按 1:1 体积比组成的混合物，分别检测三特异性抗体与细胞表面 CTLA-4 结合后同时与 VEGF 和 PD-1 结合的活性。4℃孵育 60 分钟后 FACS 缓冲液洗 3 次，以 100 μL/孔向各孔加入由 AF647 donkey anti-mIgG(H+L)（1:800 稀释）与 PE Streptavidin（1:800 稀释）按 1:1 体积比组成的混合物，4℃孵育 50 分钟。用 FACS 缓冲液洗 3 次后，100 μL/孔加入 PBS 溶液重悬细胞，在流式细胞仪上检测荧光信号。利用四参数模型对结合活性进行拟

合，计算各抗体的 $EC_{50}$ 值。

结果如图 15 所示，三特异性抗体 HC010-F8、HC010-F9 和 HC010-F10 与细胞表面人 CTLA-4 结合后仍同时能与人 PD-1（图 15A，$EC_{50}$ 分别为 1.919、1.533 和 2.734 nM）和人 VEGF（图 15B，$EC_{50}$ 分别为 1.435、1.376 和 1.370 nM）结合，且其同时结合活性具有剂量依赖性。

**2.6 三特异性抗体结合 PD-1 和 CTLA-4 共表达细胞后与游离 VEGFA 的结合活性**

在肿瘤微环境中，三特异性抗体可以通过与免疫细胞上的 PD-1 和 CTLA-4 结合，并与 VEGFA 结合，同时阻断免疫抑制和血管生成，调控肿瘤微环境中的免疫反应与血管生成。本实施例分别采用过表达 PD-1 和 CTLA-4 的 293T 细胞和活化的 T 细胞检测三特异性抗体结合共表达 PD-1 和 CTLA-4 的细胞后与游离 VEGFA 的结合活性。

**2.6.1 三特异性抗体结合 PD-1 和 CTLA-4 共表达细胞后与 VEGFA 的结合**

采用过表达人 PD-1 和人 CTLA-4 的 293T 细胞（293T-hPD-1-hCTLA-4，吉满生物，GM-C19526）检测三特异性抗体结合共表达 PD-1 和 CTLA-4 的细胞后与 VEGFA 的结合活性。293T-hPD-1-hCTLA-4 细胞上 PD-1 的表达水平高于 CTLA-4。三特异性抗体通过抗 PD-1 和 CTLA-4 的臂与 293T-hPD-1-hCTLA-4 细胞结合后，用生物素标记的 VEGFA 检测 293T-hPD-1-hCTLA-4 细胞上结合的三特异性抗体。使用胰酶消化 293T-hPD-1-hCTLA-4 细胞，将分离的细胞重悬到 FACS 缓冲液中，调整细胞密度至约 $1x10^6$ 个细胞/mL，然后每孔 200 μL 加入 96 孔 U 底板中，细胞密度约 $2x10^5$ 细胞/孔。300 g 离心 5 分钟，舍弃上清，加入 100 μL 用 FACS 缓冲液 3 倍梯度稀释的三特异性抗体，起始浓度为 200 nM，加入同体积的 FACS buffer 作为阴性对照。混匀后 4℃孵育 60 分钟。离心并用 FACS 缓冲液洗 3 次，100 μL/孔加入 2 μg/mL Biotin-hVEGF165，4℃孵育 60 分钟。离心并用 FACS 缓冲液洗 3 次，100 μL/孔加入经 1:800 稀释的 PE Streptavidin（BD，货号：554061），4℃孵育 50 分钟。离心并用 FACS 缓冲液洗 3 次后，100 μL/孔加 FACS 缓冲液重悬细胞，在流式细胞仪（BECKMAN COULTER cytoFLEX）上检测荧光信号。利用四参数模型对结合活性进行拟合，计算各抗体结合的 $EC_{50}$ 值。

如图 5 所示，三特异性抗体 HC010-F8、HC010-F9 和 HC010-F10 与 PD-1 和 CTLA-4 共表达细胞结合后仍能与游离的 VEGFA 结合。细胞表面的 HC010-F8、HC010-F9 和 HC010-F10 与 VEGFA 的结合活性的 $EC_{50}$ 分别为 5.057，4.204 和 4.904 nM，表明三特异性抗体与 PD-1 和 CTLA-4 共表达细胞结合后仍与 VEGFA 具有较高的结合活性。

**2.6.2 三特异性抗体结合活化的 T 细胞后与游离的 VEGFA 的结合活性**

采用 2.4 节中活化的 T 细胞，细胞密度调整为 $1x10^6$ 细胞/mL，100 μL 细胞加入 96 孔 U 底板中，$1x10^5$ 细胞/孔。500g 离心 5 分钟后舍弃上清，加入 100 μL 用 FACS 缓冲液 3 倍梯度稀释的抗体，起始浓度为 200 nM，一式三份。混匀后 4℃孵育 60 分钟。离心并用 FACS 缓冲

液洗 3 次，100 μL/孔加入 2 μg/mL Biotinylated Human VEGF165 （Acro，货号：VE5-H82Q0），4℃孵育 50 分钟。FACS 缓冲液洗 3 次后，加入 BV421 anti-human CD3 antibody(OKT3)（Biolegend，货号：317344），与 PE Streptavidin 的混合物，100 μL/孔，4℃孵育 50 分钟。用 FACS 缓冲液洗 3 次后， 70 μL/孔加入 PBS 重悬细胞，在流式细胞仪（BDCelesta）上检测 CD3 T 细胞上的荧光信号。利用四参数模型对结合活性进行拟合，计算各抗体的 $EC_{50}$ 值。

如图 6 所示，三特异性抗体 HC010-F8 和 HC010-F23 与活化的 T 细胞结合后仍能与游离的 VEGFA 结合。T 细胞表面的 HC010-F8 和 HC010-F23 与 VEGFA 的结合活性的 $EC_{50}$ 分别为 0.440 和 0.377 nM，表明三特异性抗体与 PD-1 和 CTLA-4 共表达的 T 细胞结合后仍与 VEGFA 具有较高的结合活性，可以在肿瘤微环境中同时阻断免疫检查点和血管生产。

**2.7 三特异性抗体与人 PD-1、CTLA-4 和 VEGFA 的亲和力测定**

采用 Octet® RED96e（ ForteBio ）检测三特异性抗体与人 PD-1、CTLA-4 和 VEGFA 的亲和力，具体方法如下：将 AHC Sensor 浸泡在 PBST（含 0.02%吐温的 PBS）缓冲液中 10 分钟，活化 Sensor。将配体（待检抗体）用 PBST 缓冲液稀释至 5 μg/mL，将分析物：人 PD1(ACRO, 货号：PD1-H5221)、人 VEGF(ACRO, 货号：VE5-H4210)和人 CTLA4(ACRO, 货号：CT4-H52H9)用 PBST 缓冲液稀释成 100、50、25、12.5 和 6.25 nM 的浓度梯度，并设置中间浓度为质控点，0 nM 为空白对照点。分别按 200 μL/孔添加上述稀释后的配体和分析物至对应的板孔中，一式三份。程序参数设置：加载:180s，缔合:180s，解离:600s，再生: Gly-HCl pH1.5 ，30s，再生 3 次。使用 Data Analysis11.1r 软件在扣除空白（0 浓度点）后使用 1：1 模型拟合曲线，分析计算实验结果。曲线拟合度接受标准：Full R^2≥0.95。

结果如表 7 所示，HC010-F8 和 HC010-F23 分别对人 PD-1、人 VEGF 和人 CTLA-4 具有高亲和力，达到 $10^{-9}$ 的数量级。

**表 7 三特异性抗体与人 PD-1、CTLA-4 和 VEGFA 的亲和力**

| 抗体 / 抗原 | HC010-F8 | HC010-F23 | CQ1-3/1-11 | 202F1 |
|---|---|---|---|---|
| 人 PD-1 | 4.46E-09 | 4.67E-09 | 1.96E-09 | NT |
| 人 CTLA-4 | 4.97E-09 | 1.50E-09 | NT | 2.03E-10 |
| 人 VEGF165 | 5.47E-09 | 9.55E-09 | NT | NT |

NT:没有检测

**实施例 3. 抗 PD-1/CTLA-4/VEGF 三特异性抗体的阻断活性**

**3.1 三特异性抗体阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合活性**

分别采用竞争 ELISA 法和 FACS 检测三特异性抗体阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合活性。

ELISA 检测三特异性抗体阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合活性: 用 1 μg/mL 人 PD-1 蛋白(Acro, PD1-H5257)包被高吸附 96 孔酶标板，4℃孵育过夜，第二天，PBS 溶液洗板 3 次后用 1% BSA-PBS 溶液 37℃封闭 1 小时。将 1% BSA-PBST 稀释液配制的抗体梯度稀释液（起始浓度为 200 nM，3 倍梯度稀释）和 1 μg/mL biotin 标记的 PD-L1 蛋白(Acro, PD1-H82F3) 体积 1:1 进行混合获得抗体-蛋白质混合液， 100 μL 每孔将抗体-蛋白质混合液加入到封闭好的 96 孔酶标板中，37℃孵育 1 小时。 PBST 洗 4 遍后，100 μL 每孔向酶标板中加入经 1:5000 稀释的 Strep-HRP（BD，货号：554066），37℃孵育 1 小时。PBST 洗 4 遍后，TMB 显色，用酶标仪检测 450 nm 和 630 nm 的吸光值，计算 OD450-OD630，利用四参数模型对荧光强度进行拟合，计算各抗体阻断活性的 $IC_{50}$ 值，结果如表 8 所示。

为了对比自研抗体 CQ1-3/1-11 与派姆单抗的性能，申请人以相同方法检测了对照自研抗体 CQ1-3/1-11-hIgG4 阻断细胞表面抗原 PD-1 结合 PD-L1 的活性，结果表明自研抗体 CQ1-3/1-11 与派姆单抗具有相当的阻断能力，$IC_{50}$ 值分别为 3.190 nM 和 3.569 nM。

FACS 检测三特异性抗体阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合活性：采用过表达人 PD-1 的 293T 细胞（293T-hPD-1，康源博创，KC-0204）检测三特异性抗体对人 PD-1 与人 PD-L1 结合的阻断能力。使用胰酶消化获得 293T-hPD-1 细胞，含 2% FBS 的 PBS（FACS 缓冲液）清洗细胞 2 次，重悬到 FACS 缓冲液中。悬浮好的细胞溶液中加入 1 μg/mL biotin-human PDL1（Acro, 货号：PD1-H82F3），50 μL/孔加入 96 孔 U 底板中，约 $1x10^5$ 细胞/孔。加入 50 μL 用 FACS 缓冲液 3 倍梯度稀释的抗体，起始浓度为 200 nM，一式三份。混匀后 4℃孵育 60 分钟。FACS 缓冲液洗 3 次后，100 μL/孔加入经 1:800 稀释的 PE Streptavidin，4℃孵育 50 分钟。FACS 缓冲液洗 3 次后，150 μL/孔加入 PBS 重悬细胞，在流式细胞仪（BECKMAN COULTER cytoFLEX）上检测荧光信号。利用四参数模型对结合活性进行拟合，计算各抗体阻断活性的 $IC_{50}$ 值，结果如表 8 所示，三特异性抗体可以有效阻断 PD-L1 与 293T 细胞表面的 PD-1 的结合。

**表 8 三特异性抗体的阻断活性（$IC_{50}$, nM）**

| | 阻断 PD-1 和 PD-L1 结合 | | 阻断 CD80 和 CTLA-4 结合 | | 阻断 VEGFA 和 KDR 结合 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 抗原 / 抗体 | PD-1-his | 293T-hPD-1 细胞 | CHO-CTLA-4 细胞 | 293T-CTLA-4-PD-1 细胞 | VEGF165-His | VEGF165-His |
| 实验方法 | ELISA | FACS | FACS | FACS | ELISA | 报告细胞 |
| CQ1-3/1-11 | 0.731 | 3.995 | N/A | NT | N/A | N/A |
| 202F1-hIgG4 | N/A | N/A | 10.070 | 4.742 | N/A | N/A |
| 伊匹单抗 | N/A | N/A | NT | 1.590 | N/A | N/A |
| 贝伐单抗 | N/A | N/A | N/A | N/A | 2.901 | 0.433 |
| HC010-F6 | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F7 | 0.433 | 3.700 | NT | 0.055 | NT | 0.336 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HC010-F8 | 0.782 | 5.500 | 13.670 | 0.079 | 4.193 | 0.453 |
| HC010-F9 | 0.923 | 5.000 | NT | ~0.002 | NT | 0.511 |
| HC010-F10 | 0.837 | 4.5 | 22.58 | 0.056 | 6.764 | 0.675 |
| HC010-F11 | 0.830 | 5.575 | NT | 0.076 | NT | 0.665 |
| HC010-F12 | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F13 | 1.631 | 69.89 | NT | 0.066 | NT | 0.602 |
| HC010-F14 | 2.406 | ~ 8464 | NT | 0.116 | NT | NT |
| HC010-F15 | 2.221 | 326.5 | NT | 0.008 | NT | ~ 0.834 |
| HC010-F16 | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F17 | 0.768 | 5.8 | NT | 0.029 | NT | 0.538 |
| HC010-F18 | 0.816 | 9.2 | NT | 0.002 | NT | 0.421 |
| HC010-F19 | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F20 | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F21 | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| HC010-F22 | NT | 8.694 | 113.4 | 0.077 | 5.399 | NT |
| HC010-F23 | NT | 7.404 | 34.82 | 0.096 | 4.905 | NT |
| HC010-F24 | NT | 15.59 | 36.71 | 0.309 | 5.870 | NT |
| 无关 hIgG4 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |

NT:没有检测；N/A 不适用，hIgG4 为阴性对照。

**3.2 三特异性抗体阻断 CD80 与 CTLA-4 的结合活性**

**3.2.1 三特异性抗体阻断 CD80 与 CTLA-4 的结合活性**

采用 CHO-hCTLA-4 细胞检测三特异性抗体对人 CTLA-4 与人 CD80 结合的阻断能力。使用胰酶消化获得 CHO-hCTLA-4 细胞，含 2% FBS 的 PBS（FACS 缓冲液）洗涤 2 次后重悬到 FACS 缓冲液中，200 μL 细胞加入 96 孔 U 底板中，约 $2x10^5$ 细胞/孔。300 g 离心 5 分钟后，舍弃上清。用 FACS 缓冲液溶液配制一系列抗体浓度稀释梯度（起始浓度为 200 nM，3 倍梯度稀释）及 0.6 μg/mL biotin 标记的人 CD80 蛋白（Acro，货号：B71-H82F2）。向 96 孔板中分别加入每孔 50 μL 的抗体及每孔 50 μL 的 biotin-human CD80，混匀，4℃孵育 60 分钟。FACS 缓冲液洗 3 次后，100 μL/孔加入经 1:800 稀释的 PE Streptavidin，4℃孵育 50 分钟。用 FACS 缓冲液洗 3 次后， 150 μL/孔加入 PBS 重悬细胞，在流式细胞仪（BECKMAN COULTER cytoFLEX）上检测荧光信号。利用四参数模型对结合活性进行拟合，计算各抗体阻断活性的 $IC_{50}$ 值，结果如表 8 所示，三特异性抗体可以有效阻断人 CTLA-4 与人 CD80 的结合。

**3.2.2 三特异性抗体阻断 CD80 与 PD-1 和 CTLA-4 共表达细胞上 CTLA-4 的结合活性**

肿瘤微环境中功能耗竭的 T 细胞上共表达 PD-1 和 CTLA-4，且 PD-1 的表达水平高于 CTLA-4。同时靶向 PD-1 和 CTLA-4 的双特异性抗体在 PD-1 和 CTLA-4 共表达的细胞上可以增强抗 CTLA-4 抗体的阻断功能。采用同时过表达人 PD-1 与人 CTLA-4 的 293T 细胞（293T-hPD-1-hCTLA-4，吉满生物，GM-C19526，也称为 293T-CTLA-4-PD-1 细胞）检测三特异性抗体对人 CTLA-4 和人 CD80 结合的阻断能力。使用胰酶消化获得 293T-hPD-1-hCTLA-4 细胞，含 2% FBS 的 PBS（FACS 缓冲液）洗涤 2 次后重悬到 FACS 缓冲液中，200 μL 细胞加入 96 孔 U 底板中，约 $1.4x10^5$ 细胞/孔。300 g 离心 5 分钟后，舍弃上清。用 FACS 缓冲液溶液配制一系列抗体浓度稀释梯度（起始浓度为 400 nM，3 倍梯度稀释）及 2 μg/mL biotin 标记的人 CD80 蛋白。向 96 孔板中分别加入每孔 50 μL 的抗体及每孔 50 μL 的 biotin-human CD80，混匀，4℃孵育 60 分钟。FACS 缓冲液洗 3 次后，100 μL/孔加入经 1:800 稀释的 PE Streptavidin，4℃孵育 50 分钟。用 FACS 缓冲液洗 3 次后， 150 μL/孔加入 PBS 重悬细胞，在流式细胞仪（BECKMAN COULTER cytoFLEX）上检测荧光信号。利用四参数模型对结合活性进行拟合，计算各抗体阻断活性的 $IC_{50}$ 值。

结果如图表 8 所示，与母本抗体相比，三特异性抗体均显著增强对 293T-hPD-1-hCTLA-4 细胞上 CTLA-4 与 CD80 结合的阻断作用。

### 3.3 三特异性抗体阻断 VEGFA 与 KDR (VEGFR2)的结合活性

#### 3.3.1 竞争 ELISA 法检测三特异性抗体阻断 VEGFA 与 KDR (VEGFR2)的结合活性

用 1 μg/mL 的人 VEGF165-His (Acro，货号：VE5-H5248)包被高吸附 96 孔酶标板，37℃孵育 2 小时。洗板后，每孔用 300 μL1% BSA-PBS 在 37℃下封闭 1.5 小时。向酶标板中分别每孔加入 50 μL 梯度稀释的抗体（起始浓度为 400 nM，3 倍梯度稀释）和 50 μL 1.72 μg/mL 的 biotin-human KDR（Acro，货号 KDR-H82E5），37℃孵育 1 小时。用 PBST 溶液洗 3 遍后，100 μL/孔向板中加入经 1:5000 稀释的 Streptavidin-HRP（BD pharmingen，货号 554066），37℃孵育 45 分钟。PBST 洗 3 遍后，TMB 显色，用酶标仪检测 450 nm 的吸光值，利用四参数模型进行拟合，计算抗体阻断活性的 $IC_{50}$ 值，结果如表 8 所示，三特异性抗体对 VEGFA 结合 KDR 的阻断活性与贝伐单抗相当。

#### 3.3.2 报告基因法检测三特异性抗体阻断 VEGF 与 KDR 结合

采用人 VEGFR2-293 报告细胞系（吉满生物，GM-C09057）检测三特异性抗体对人 VEGFA 与人 KDR 结合的阻断能力。人 VEGFR2-293 报告细胞系是基于 NFAT 信号通路构建的荧光素酶（Luciferase）报告基因细胞系。当 VEGF 结合 KDR 受体后，激活 NFAT 信号通路，从而激活荧光素酶的表达。

使用胰酶消化获得 VEGFR2-293 报告细胞，300 g 离心 5 分钟后，舍弃上清。重悬到含 1% FBS 的 DMEM 培养基（测试培养基）中，细胞悬液中加入 0.6 μg/mL hVEGF165-His，将细胞

加入 96 孔底透板中，约 $1x10^4$ 细胞/孔。用测试培养基配制抗体 3 倍稀释梯度，起始浓度为 22.2 nM。加入 96 孔板中，混匀后 37℃孵育 6 小时。加入荧光素酶缓冲液（Promega，货号：G7940）避光孵育 5 分钟，在 Microplate Reader（CLARIOstar Plus）上检测荧光信号。

结果如表 8 所示，三特异性抗体能有效地阻断人 VEGF 与细胞表面人 KDR 的结合，且其阻断效率与母本抗体贝伐单抗相当。

**实施例 4 三特异性抗体体外激活免疫反应及抑制 VEGF 诱导的细胞增殖的功能**

**4.1 三特异性抗体增强 T 细胞的功能**

**4.1.1 三特异性抗体在 SEB 刺激 PBMC 下增强 T 细胞分泌 IL-2**

葡萄球菌肠毒素 B (SEB）是一种超抗原，可以低浓度激活大量的 T 细胞，产生强免疫应答，能直接结合 T 细胞受体和 MHC 分子而无需经过处理加工成抗原肽活化 T 细胞。抗 PD-1 和抗 CTLA-4 抗体能够促进 SEB 刺激 T 细胞表达和分泌 IL-2。

本实验检测了三特异性抗体对 SEB 刺激 T 细胞分泌 IL-2 的影响，以无关的、人抗 HEL 的 hIgG4（泰州市百英生物科技有限公司，货号：B107804）为阴性对照。在 37℃水浴锅中快速复苏 PBMC，使用含 10%FBS（胎牛血清，Gibco, 货号：10091-148）和 1% P/S(Pen-Strep, Gibco, 货号：15140122) 的 RPMI 1640 培养基（Gibco, 货号：A10491-01）重悬细胞。调整 PBMC 的细胞密度为约 $1x10^6$ 细胞/mL，向细胞悬液中添加 SEB（Toxin technology，货号：92815B），使其终浓度为 200 ng/mL。100 μL/孔将混有 SEB 的细胞悬液加入平底 96 孔板中。用培养基 3 倍梯度稀释抗体以及对照抗体，起始浓度为 400 nM，100 μL/孔加入 96 孔板中与细胞混匀，一式三份。放于 37℃，5% $CO_2$ 培养箱中培养 3 天。3 天后取上清，根据说明书采用人 IL-2 检测试剂盒（CisBio，货号：62HIL02PEH ）进行 IL-2 分泌量的检测，在 CLARIOstar Plus 读值。

结果如图 7 所示，三特异性抗体 HC010-F8、HC010-F10、HC010-F22、HC010-F23 和 HC010-F24 均能提升 SEB 刺激 PBMC 分泌 IL-2。

**4.1.2 三特异性抗体在混合淋巴细胞反应（MLR）中增强 T 细胞分泌 IL-2**

来源于不同供体的成熟树突状细胞(dendritic cell, DC)和 PBMC 一起孵育时，DC 会通过激活 PBMC（主要是 T 细胞）促进 IL-2 的表达和分泌。T 细胞上 PD-1 和 CTLA-4 分别会与成熟 DC 上高表达的 PD-L1/PD-L2 和 CD80/CD86 结合，降低 IL-2 细胞因子的表达，免疫检查点抑制剂如抗 PD-1 抗体可以促进 MLR 反应中细胞因子的分泌。

本实验检测了三特异性抗体对 MLR 中 IL-2 分泌的影响。在 37℃水浴锅中快速复苏 DC（Allcells）和 PBMC（Allcells），使用 X-VIVO15（Lonza，货号：04-418Q）培养基重悬细胞。DC 和 PBMC 的细胞密度分别调整至 $1x10^5$ 个/mL 和 $2x10^6$ 个/mL，将 DC 和 PBMC 以 1：1 比例的体积混合，混合后将 200 μL 细胞混合液加入到圆底 96 孔板中。用 X-VIVO15 溶液 5 倍梯度稀释三特异性抗体以及对照抗体，起始浓度为 1000 nM，50 μL/孔加入 96 孔板中与细胞混合，

一式三份。放于 37℃，5% $CO_2$ 培养箱中培养 4 天。4 天后取上清，根据说明书采用人 IL-2 检测试剂盒进行 IL-2 分泌量的检测，在 CLARIOstar Plus 读值。

结果如图 8 所示，三特异性抗体 HC010-F8、HC010-F10、HC010-F22、HC010-F23 和 HC010-F24 均能提升 MLR 中 IL-2 的分泌表达，其活性优于母本抗 CTLA-4 抗体 202F1-hIgG4，与抗 PD-1 抗体 CQ1-3/1-11，202F1-hIgG4 和 CQ1-3/1-11 联用的活性相当。

采用相同的方法比较了抗体 CQ1-3/1-11 和派姆单抗对 MLR 中 IL-2 分泌的影响，结果发现 CQ1-3/1-11 和派姆单抗具有相当的活性。

**4.1.3 三特异性抗体在含有 Treg 的混合淋巴细胞反应（MLR）中增强 T 细胞分泌 IL-2 的活性**

阻断效应 T 细胞上的 PD-1 活性可以促进抗肿瘤免疫，然而由于 Treg 细胞上也表达较高水平的 PD-1，阻断 Treg 上的 PD-1 活性却可以增加 Treg 的抑制功能，从而抑制抗肿瘤免疫，这可能与一些肿瘤病人经抗 PD-1 治疗效果欠佳有关。研究发现，抗 PD-1 抗体和抗 CTLA-4 抗体的联合使用或者抗 PD-1 和 CTLA-4 的双特异性抗体可以在 Treg 存在的情况下增加 T 细胞的活性。因此，本实施例采用含有不同比例 Treg 的 MLR 检测三特异性抗体在 Treg 存在的情况下对免疫细胞的活化性能。

复苏冻存的三个不同健康供者的 PBMC（Allcells）、成熟的 DC（Allcells）和活化后的 Treg（Allcells）。用 RPMI 1640 完全培养基（Gibco, 货号：61870-036）分别调整 PBMC 和 DC 细胞密度至 $2\times10^6$ 个细胞/mL 和 $0.1\times10^6$ 个细胞/mL，分别每孔 50 μL 放入 U 底 96 孔板中。用 RPMI 1640 完全培养基调整 Treg 细胞密度至 $0.5\times10^6$ 细胞/mL，并依次 2 倍梯度稀释成 $0.25\times10^6$、$0.125\times10^6$ 和 $0.0625\times10^6$ 个细胞/mL，将不同密度的 Treg 细胞每孔 50 μL 分别放入上述 96 孔板中。用 RPMI 1640 完全培养基分别 4 倍梯度稀释抗体 HC010-F8、HC010-F23、CQ1-3/1-11、202F1、贝伐单抗、CQ1-3/1-11 和 202F1-hIgG4 的联合、CQ1-3/1-11 和 202F1-hIgG4 和贝伐单抗的联合和无关同种型抗体，起始浓度为 2000 nM；再用培养基将梯度稀释的样本进行 1:10 倍稀释，每孔 50 μL 分别放入上述 96 孔板中，一式三份。置 37℃、5% $CO_2$ 条件下培养 4 天。4 天后，离心取上清，根据说明书用 hIL-2 HTRF（Cisbio，货号：62HIL02PEH）检测 IL-2 的释放量。

结果如图 9 所示，在含有较高比例的 Treg 时，MLR 中 IL-2 的释放量受到抑制。三特异性抗体 HC010-F8 和 HC010-F23 可以增加 IL-2 的释放，增加效果与 CQ1-3/1-11 和 202F1-hIgG4 联合使用组、贝伐单抗与 CQ1-3/1-11 和 202F1-hIgG4 联合使用组基本相当。

**4.2 三特异性抗体抑制 VEGF 诱导人脐静脉内皮细胞（HUVEC）细胞的增殖**

人脐静脉内皮细胞（HUVEC）由于表达 VEGF 的受体，因此受 VEGF 诱导而增殖，可以用来评价诸如贝伐单抗等抗 VEGF 的抗体抑制 VEGFA 的促血管生成作用。本实施例也采用

HUVEC（ATCC，CRL-1730）来检测三特异性抗体对 VEGF 功能的抑制。使用胰酶消化获得 HUVEC 细胞，重悬到含 10% FBS 的 F-12K 培养基（Gibco，货号：21127-022）中，调整细胞密度至 $1x10^5$ 个细胞/mL，将 50 μL 细胞液加入 96 孔透明底板中，约 $5x10^3$ 细胞/孔。用测试培养基液配制梯度稀释的抗体（起始浓度为 200 nM，3 倍梯度稀释）及 0.4 μg/mL 人 VEGFA 165 蛋白，向 96 孔板中分别加入每孔 25 μL 的抗体及每孔 25 μL 的人 VEGFA165，混匀，37℃孵育五天。五天后，60 μL/孔加入 CellTiter-Glo（Promega，货号：G7572），在 Microplate Reader（CLARIOstar Plus）上检测荧光信号。利用四参数模型进行拟合，计算抗体抑制活性的 $IC_{50}$ 值。

如图 10 所示，三特异性抗体 HC010-F8 和 HC010-F23 均能有效地阻断 VEGFA 诱导的 HUVEC 细胞增殖，其阻断活性的 $IC_{50}$ 分别为 0.860 和 0.828 nM，母本抗体贝伐单抗阻断活性的 $IC_{50}$ 为 0.367 nM，hIgG1 和 hIgG 4 是与本申请抗体无关的阴性对照抗体。

**实施例 5 三特异性抗体的体内药效**

**5.1 三特异性抗体 HC010-F8 诱导持久的抗肿瘤效果**

人黑色素瘤 A375 细胞培养在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养液中。当 A375 细胞生长密度达到 60-80%时，复苏 PBMC （Allcells，货号：FPB004F-C）,然后用 RPMI1640 培养基将 PBMC 重悬，调整 PBMC 的细胞密度至 $3\times10^6$ 个细胞/mL，与 Mitomycin C 处理后的 A375 细胞共培养。PBMC 与 A375 共培养 5 天后，收取 PBMC 与新鲜消化下来的 A375 细胞。以 PBMC $5\times10^5$ 个细胞/只小鼠，A375 细胞 $4\times10^6$ 个细胞/只小鼠，接种于 NCG 雌性小鼠 (购自江苏集萃药康生物科技有限公司)右侧皮下，接种体积 0.2 mL/只小鼠，含 50% Matrigel（BD，货号:354234）。在细胞接种当天随机分为 4 组（每组 5 只小鼠），分别皮下注射三特异性抗体 HC010-F8（1 和 5 mg/kg）、三个单抗联合用药 CQ1-3/1-11（0.65 mg/kg），伊匹单抗（0.35 mg/kg）和贝伐单抗（0.65 mg/kg）或阴性对照（PBS），每周给药 2 次，给药 3 周。肿瘤体积使用游标卡尺每周两次测量，肿瘤体积计算公式为 $V = 0.5 \times a \times b^2$，a，b 分别代表肿瘤的长径和宽径。

结果如图 11 所示，抗体 HC010-F8 在 1 mg/kg 和 5 mg/kg 都有效地抑制了肿瘤的生长。在停止给药之后，抗体 HC010-F8 的两个治疗组（1 和 5 mg/kg）和联合用药组相对于阴性对照组均延缓了肿瘤的再生，且 HC010-F8（1 和 5 mg/kg）的抑瘤效果均优于 CQ1-3/1-11，伊匹单抗和贝伐单抗的联合用药组。

在本次实验中，所有给药组的小鼠均无行为异常和体重下降表现（图 12），表明荷瘤小鼠对该受试剂量下的药物具有良好的耐受性。

**5.2 三特异性抗体 HC010-F8 和 HC010-F23 诱导抗肿瘤效果**

人黑色素瘤 A375 细胞培养在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养液中。当 A375 细胞生长密度达到 60-80%时，复苏 PBMC，然后用 RPMI1640 培养基将 PBMC 重悬，调整 PBMC

的细胞密度至 $3\times10^6$ 个细胞/mL，与 Mitomycin C 处理后的 A375 细胞共培养。PBMC 与 A375 共培养 5 天后，收取 PBMC 与新鲜消化下来的 A375 细胞。以 PBMC $5\times10^5$ 个细胞/只小鼠，A375 细胞 $4\times10^6$ 个细胞/只小鼠，接种于 NCG 雌性小鼠右侧皮下，接种体积 0.2 mL/只小鼠，含 50% Matrigel。肿瘤接种后第 10 天，当平均肿瘤体积约为约 80 $mm^3$ 时，将小鼠随机分为 4 组（每组 6 只小鼠），分别皮下注射三个单抗联合用药组（0.35 mg/kg 的 202F1-hIgG4，0.65mg/kg 的 CQ1-3/1-11 和 0.65 mg/kg 的 bevacizumab）、HC-010 F8（1mg/kg）组、HC010-F23（1mg/kg）组和阴性对照（PBS）组，每周给药 2 次，给药 3 周。肿瘤体积使用游标卡尺每周两次测量，肿瘤体积按上述公式进行计算。

结果如图 16 所示，相较于阴性对照组，抗体 HC010-F8（1 mg/kg）和 HC010-F23（1 mg/kg）和联合用药组都有效的抑制了肿瘤的生长。

在本次实验中，所有给药组的小鼠均无行为异常和体重下降表现（图 17），表明荷瘤小鼠对该受试剂量下的药物具有良好的耐受性。

无论在给药期还是停药期，本申请三特异性抗体对肿瘤的优异抑制性使得其在肿瘤治疗领域具有广阔的应用前景，其不仅可以有效抑制肿瘤，而且延长了抑瘤期。

**5.3 三特异性抗体在人 $CD34^+$ HSC 人源化小鼠中抑制非小细胞肺癌 A549 的生长**

用人造血细胞 $hCD34^+$ HSC 移植到经过辐照的 NCG 鼠体内做免疫重建得到人 $CD34^+$ HSC 人源化小鼠(集萃药康)。人非小细胞肺癌 A549 细胞接种于人 $CD34^+$ HSC 人源化小鼠的右侧皮下，接种体积 0.2 mL/只小鼠，含 30% Matrigel。当平均肿瘤体积约为约 100 $mm^3$ 时，将小鼠随机分组，分别皮下注射三特异性抗体 HC010-F8（5mg/kg）、HC010-F23（5mg/kg）,对照抗体帕博利珠单抗（3.25mg/kg）和贝伐单抗（3.25mg/kg）以及阴性对照（PBS），每周给药 2 次，给药 4 周。肿瘤体积使用游标卡尺每周两次测量，肿瘤体积按上述公式进行计算。实验终点收获肿瘤样本，用解剖实验室剪刀将其切碎，并根据制造商的说明，使用人类肿瘤解离试剂盒（Miltenyi Biotech）结合 gentleMACS 解离器（Miltenyi Biotec）酶解肿瘤组织，细胞悬液通过 70 μm MACS 智能过滤器过滤得到单细胞悬液。用流式细胞仪检测对免疫细胞亚群和功能生物标志物进行分析。

HC010-F8 和 HC010-F23 相对于阴性对照组显著地抑制了肿瘤的生长，并且肿瘤抑制率也与帕博利珠单抗或贝伐单抗给药组相当甚至更优。在停药恢复期，本发明抗体的肿瘤抑制率优于帕博利珠单抗或贝伐单抗给药组（图 18）。

**5.4 三特异性抗体在人 PBMC 人源化小鼠模型中抑制人非小细胞肺癌 H1299 的生长**

人非小细胞肺癌 H1299 细胞接种于人 PBMC 人源化小鼠 (集萃药康)右侧皮下，接种体积 0.2 mL/只小鼠，含 30% Matrigel。当平均肿瘤体积约为约 100 $mm^3$ 时，将小鼠随机分组，分别皮下注射三特异性抗体 HC010-F8（1-10mg/kg）、HC010-F23（1-10mg/kg）、对照抗体（1-10mg/kg）和阴性对照（PBS），每周给药 2 次，给药 4 周。肿瘤体积使用游标卡尺每周两次测量，肿瘤

体积按上述公式进行计算。

HC010-F8 和 HC010-F23 相对于阴性对照组有效地抑制了肿瘤的生长。

发明人继续将人非小细胞肺癌 H1299 细胞接种于人 PBMC 人源化小鼠 (百奥赛图)右侧皮下, 接种 7 天后，每只动物注射 $4.5\times10^6$ 个/0.1 mL 的 PBMC(人外周血单核细胞)。当平均肿瘤体积达到 120 $mm^3$ 时，根据小鼠肿瘤体积和体重选择合适的小鼠入组，每组 9 只，共 7 组，分别为：G1：PBS、G2：帕博利珠单抗（10 mg/kg）、G3：贝伐单抗（10 mg/kg）、G4：HC010-F8（15 mg/kg）、G5：抗 PD-1/VEGFA 双特异性抗体 AK112（13 mg/kg）、G6：Ipilimumab（10mg/kg）和 G7：帕博利珠单抗（10mg/kg）+贝伐单抗（10mg/kg）+Ipilimumab（10mg/kg）。所有组均在分组当天开始进行给药，每周给药 2 次，各组共给药 6 次。给药和观察期间每周测量 2 次小鼠体重和肿瘤体积，计算肿瘤体积生长抑制率（$TGI_{TV}$）。

在实验结束时，G1 溶媒对照组(PBS)的平均肿瘤体积为 1303±188 $mm^3$，G2-G7 治疗组的平均肿瘤体积分别为：640±59 $mm^3$、582±96 $mm^3$、407±72 $mm^3$、406±44 $mm^3$ 、603±92 $mm^3$ 和 363±55 $mm^3$。各治疗组对应的 $TGI_{TV}$ 分别是：57.40%、60.97%、75.70%、75.72%、59.06% 和 79.60%。和溶媒对照组相比，G2-G7 组对肿瘤均有显著的抑制效果（$P$<0.001）。 因此，HC010-F8 单药的肿瘤抑制率明显优于帕博利珠单抗，贝伐单抗和 Ipilimumab 单药给药组，并且和 AK112 以及帕博利珠单抗+ 贝伐单抗+ipilimumab 联合用药的药效相当（图 19）。

**5.5 三特异性抗体在人 PBMC 人源化小鼠模型中抑制人非小细胞肺癌 NCI-H292 的生长**

人非小细胞肺癌 NCI-H292 细胞接种于人 PBMC 人源化小鼠 (集萃药康)右侧皮下, 接种体积 0.2 mL/只小鼠，含 30% Matrigel。当平均肿瘤体积约为约 100 $mm^3$ 时，将小鼠随机分组，分别皮下注射三特异性抗体 HC010-F8（1-10mg/kg）、HC010-F23（1-10mg/kg）、对照抗体（1-10mg/kg）和阴性对照（PBS），每周给药 2 次，给药 4 周。肿瘤体积使用游标卡尺每周两次测量，肿瘤体积按上述公式进行计算。

HC010-F8 和 HC010-F23 相对于阴性对照组有效地抑制了肿瘤的生长。

**5.6 三特异性抗体在人 PBMC 人源化小鼠模型中抑制人结直肠癌 HT29 的生长**

人直肠癌 HT29 细胞接种于人 PBMC 人源化小鼠 (南模生物)右侧皮下, 接种体积 0.1 mL/只小鼠，含 30% Matrigel。当平均肿瘤体积约为约 100 $mm^3$ 时，将小鼠随机分组，分别皮下注射三特异性抗体 HC010-F8（1-10mg/kg）、HC010-F23（1-10mg/kg）、对照抗体（1-10mg/kg）和阴性对照（PBS），每周给药 2 次，给药 4 周。肿瘤体积使用游标卡尺每周两次测量，肿瘤体积按上述公式进行计算。

HC010-F8 和 HC010-F23 相对于阴性对照组有效地抑制了肿瘤的生长。

之后，发明人继续检测本发明的三特异性抗体的活性以及剂量依赖性。

人直肠癌 HT29 细胞接种于人 PBMC 人源化 M-NSG 小鼠 (南模生物)右侧皮下, 接种体积 0.1 mL/只小鼠，含 30% Matrigel。当平均肿瘤体积约为 100 $mm^3$ 时，将小鼠随机分组，包括第

1 组：PBS, i.p., BIW *7 times 组 （以下简称 G1）、第 2 组：帕博利珠单抗, 3.25 mg/kg, i.p., BIW *7 times 组 （以下简称 G2）、第 3 组：贝伐单抗, 3.25 mg/kg, i.p., BIW *7 times 组 （以下简称 G3）、第 4 组：抗 CTLA-4 抗体 Ipilimumab, 3.25 mg/kg, i.p., BIW *7 times 组 （以下简称 G4）、第 5 组： HC010-F8, 1 mg/kg, i.p., BIW *7 times 组 （以下简称 G5）、第 6 组： HC010-F8, 5 mg/kg, i.p., BIW *7 times 组（以下简称 G6）、第 7 组：HC010-F8, 20 mg/kg, i.p., BIW *7 times 组 （以下简称 G7）、第 8 组： 帕博利珠单抗 + 贝伐单抗 3.25 mg/kg + 3.25 mg/kg, i.p., BIW *7 times 组 （以下简称 G8）、第 9 组： 帕博利珠单抗 + Ipilimumab, 3.25 mg/kg + 3.25 mg/kg, i.p., BIW *7 times 组（以下简称 G9）和第 10 组：帕博利珠单抗 + Ipilimumab +贝伐单抗, 3.25 mg/kg + 3.25 mg/kg + 3.25 mg/kg, i.p., BIW *7 times 组（以下简称 G10）。

给药后的第 17 天结束实验，此时对照组 G1 平均肿瘤体积为 644.77±61.57 $mm^3$，G2、G4 和 G9 平均肿瘤体积分别为 498.68±48.30 $mm^3$，638.72±70.69 $mm^3$ 和 489.19±47.40 $mm^3$。肿瘤体积抑制率（TGI）分别为 26.72%，1.03%和 28.42%。与对照组比较，无统计学差异（$P$>0.05）。G3 组的平均肿瘤体积为 400.50±62.73 $mm^3$，肿瘤体积抑制率（TGI）为 44.68%，与对照组比较，有统计学差异（$P$ ＜0.05）。G5、G6、G7、G8 和 G10 的平均肿瘤体积分别为 403.54±45.88 $mm^3$、312.48±38.02 $mm^3$、270.45±33.25 $mm^3$、293.13±36.08 $mm^3$ 和 313.65±25.23 $mm^3$，肿瘤体积抑制率（TGI）分别为 44.26%、60.91%、68.59%、64.42%和 60.63%，与对照组比较，有显著统计学差异（$P$＜0.01）。结果参见表 9。

表 9

| 组别 | 受试品 | 肿瘤体积<br>给药后第 17 天（$mm^3$） | TGI<br>(%) | $P$ value |
|---|---|---|---|---|
| G1 | PBS | 644.77±61.57 | -- | -- |
| G2 | 帕博利珠单抗 | 498.69±48.30 | 26.72 | ns |
| G3 | 贝伐单抗 | 400.50±62.73 | 44.68 | * |
| G4 | Ipilimumab | 638.72±70.69 | 1.03 | ns |
| G5 | HC010-F8_1mg/kg | 403.54±45.88 | 44.26 | ** |
| G6 | HC010-F8_5mg/kg | 312.48±38.02 | 60.91 | *** |
| G7 | HC010-F8_20mg/kg | 270.45±33.25 | 68.59 | *** |
| G8 | 帕博利珠单抗++贝伐单抗 | 293.13±36.08 | 64.42 | *** |
| G9 | 帕博利珠单抗+ Ipilimumab | 489.19±47.40 | 28.42 | ns |
| G10 | 帕博利珠单抗+ Ipilimumab+<br>贝伐单抗 | 313.65±25.23 | 60.63 | *** |

ns= not significant; *p<0.05， **p<0.01， ***p<0.001

结论：在本实验条件下，1、5 和 20 mg/kg 的测试药物 HC010-F8 以剂量依赖的方式在 PBMC 人源化 M-NSG 小鼠的结直肠癌 HT-29 模型上具有显著的抗肿瘤效果。相对于溶媒对照组（PBS）， HC010-F8 在 1mg/kg 及以上剂量就展现明显的药效。HC010-F8 在 5mg/kg 的肿瘤抑制率（60.91%）要好于帕博利珠单抗（26.72%），贝伐单抗（44.68%）和 Ipilimumab（1.03%）

单药给药。HC010-F8 在 5mg/kg 剂量下的抗肿瘤效果优于帕博利珠单抗+ ipilimumab 的双免疫联合用药。

**5.7 三特异性抗体在人 PBMC 人源化小鼠模型中抑制人肝癌 HepG2 的生长**

人肝癌 HepG2 细胞接种于人 PBMC 人源化小鼠 (南模生物)右侧皮下, 接种体积 0.2 mL/只小鼠，含 30% Matrigel。当平均肿瘤体积约为约 150-200 $mm^3$ 时，将小鼠随机分组，分别皮下注射三特异性抗体 HC010-F8（1-10mg/kg）、HC010-F23（1-10mg/kg）、对照抗体（1-10mg/kg）和阴性对照（PBS），每周给药 2 次，给药 4 周。肿瘤体积使用游标卡尺每周两次测量，肿瘤体积按上述公式进行计算。

HC010-F8 和 HC010-F23 相对于阴性对照组有效地抑制了肿瘤的生长。

**5.8 三特异性抗体在人 PBMC 人源化小鼠模型中抑制人肝癌 Huh7 的生长**

人肝细胞癌 Huh7 细胞接种于人 PBMC 人源化 NCG 小鼠 （集萃药康）皮下，接种剂量：5×10^6 cells/100 μL/只(添加康宁基质胶 1：1)。平均肿瘤体积达到 77.20 $mm^3$ 时入组，将 24 只小鼠根据肿瘤体积随机分成 3 组，每组 8 只，分别为帕博利珠单抗（3.25 mg/kg）、HC010-F8（5 mg/kg）和溶媒 PBS 对照组(*i.p.*)给药，每周给药 2 次共 6 次，观测 20 天，根据肿瘤抑制率和体重等观察指标进行药物药效评价。

本试验在给药开始后第 20 天到达终点，PBS 组平均肿瘤体积是 2124.08 $mm^3$，帕博利珠单抗组（3.25 mg/kg）平均肿瘤体积是 2099.87 $mm^3$，HC010-F8（5 mg/kg）平均肿瘤体积是 1014.72 $mm^3$；与 PBS 对照组相比，HC010-F8 对肿瘤生长抑制有显著性差异（$P$<0.0001），而帕博利珠单抗几乎没有肿瘤抑制作用。和帕博利珠单抗相比，HC010-F8 有显著的抗肿瘤作用（$P$<0.0001）（参见图 20）。试验过程中，未出现和受试物毒性相关的动物死亡。结论：在人肝细胞癌 Huh7 的小鼠肿瘤模型中，HC010-F8 具有显著的抗肿瘤效果,而帕博利珠单抗没有展现明显的肿瘤抑制作用。动物对 HC010-F8 在 5 mg/kg 的剂量具有良好的耐受性。

**5.9 三特异性抗体替代抗体在人 PD-1 和人 CTLA-4 双靶点人源化小鼠肿瘤模型中的药效**

三特异性抗体不识别小鼠的 PD-1、CTLA-4 和 VEGFA，将 HC010-F8 和 HC010-F23 中抗 VEGF 的序列替换为（US20110159009A1 和 Wei-Ching Liang et al. Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. J Biol Chem. 2006 Jan 13;281(2):951-61. doi: 10.1074/jbc.M508199200. Epub 2005 Nov 7.）中报道的抗 VEGFA 的序列（B20.4.1），表达出可以识别小鼠 VEGF 的替代抗体。B20.4.1 与 HC010-F8、HC010-F23 中使用的贝伐单抗具有类似的结合和阻断活性。

分别在人 PD-1 和人 CTLA-4 双靶点人源化小鼠（B-hPD-1/hCTLA4，百奥塞图)结直肠癌 MC38 肿瘤模型和肝癌 Hepa1-6 肿瘤模型中评价三特异性抗体替代抗体的抗肿瘤活性。当平均

肿瘤体积约为约 100 $mm^3$ 时，将小鼠随机分组，分别皮下注射三特异性抗体 HC010-F8 的替代抗体（1-10mg/kg）、HC010-F23 的替代抗体（1-10mg/kg）、对照抗体（1-10mg/kg）和阴性对照（PBS），每周给药 2 次，给药 4 周。

结果发现 HC010-F8 的替代抗体和 HC010-F23 的替代抗体在人 PD-1 和人 CTLA-4 双靶点人源化小鼠（B-hPD-1/hCTLA4，百奥塞图)结直肠癌 MC38 肿瘤模型和肝癌 Hepa1-6 肿瘤模型均具有良好的抗肿瘤活性。

**实施例 6 三特异性抗体的稳定性研究**

在抗体制备领域中，基于天然抗体改造获得的各种抗体衍生物（例如多特异性抗体）经常面临稳定性的问题，获得具有优良稳定性的抗体衍生物在抗体的制备，运输，存储等方面具有重要的意义。本实施例检测了本申请获得的三特异性抗体的稳定性，通过在升高的温度（40℃）加速下，研究了三特异性抗体的热稳定性。具体而言，分别将各个三特异性抗体置换至 20mM His-HCl，pH5.5, 230 mM trehalose,0.01% tween 80 制剂缓冲液中。然后将样本在 40℃孵育 0，1，2 和 4 周后，采用高效液相色谱（Dionex, Ultimate 3000）检测尺寸排阻层析（SEC）和非还原毛细管凝胶电泳（NR-CE-SDS）。结果如表 9 所示，在 40℃中孵育 4 周后，三特异性抗体 HC010-F8、HC010-F22 的 SEC 纯度变化较小，主峰（MP%）的下降均小于 5%，HC010-F10、HC010-F23 的主峰下降了约 10%。在 40℃中孵育 4 周后，三特异性抗体 NR-CE-SDS 中主峰下降了 6.6%到 13.2%，表明本申请构建、表达的三特异性抗体具有良好的稳定性。

表 9.三特异性抗体的热稳定性研究

| 样本 | 40 ℃ 孵（周）<br>检测项 | | 0 | 1 | 2 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HC010-F8 | SEC | HMW% | 8.24 | 7.77 | 8.09 | 8.63 |
| | | MP% | 88.71 | 89.00 | 88.57 | 90.37 |
| | | LMW% | 3.05 | 3.22 | 3.35 | 1.00 |
| | NR-CE-SDS | HMW% | 9.6 | 9.5 | 8.7 | 8.6 |
| | | MP% | 87.9 | 85.6 | 84.0 | 79.3 |
| | | LMW% | 2.8 | 4.9 | 7.2 | 12.1 |
| HC010-F10 | SEC | HMW% | 4.02 | 3.30 | 6.48 | 9.58 |
| | | MP% | 86.02 | 85.64 | 81.62 | 75.60 |
| | | LMW% | 9.97 | 11.06 | 11.90 | 14.83 |
| | NR-CE-SDS | HMW% | 0.9 | 0.8 | 1.2 | 2.5 |
| | | MP% | 87.0 | 86.0 | 84.7 | 80.4 |
| | | LMW% | 12.0 | 13.1 | 14.2 | 17.0 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HC010-F22 | SEC | HMW% | 5.6 | 5.8 | 6.4 | 7.0 |
| | | MP% | 80.2 | 79.2 | 81.3 | 80.2 |
| | | LMW% | 14.2 | 15.0 | 12.3 | 12.9 |
| | NR-CE-SDS | HMW% | 15.8 | 15.6 | 15.5 | 14.7 |
| | | MP% | 80.4 | 79.7 | 73.1 | 67.6 |
| | | LMW% | 3.8 | 4.6 | 11.4 | 17.6 |
| HC010-F23 | SEC | HMW% | 3.0 | 3.4 | 3.9 | 4.4 |
| | | MP% | 96.7 | 96.1 | 91.7 | 86.4 |
| | | LMW% | 0.3 | 0.4 | 4.5 | 9.2 |
| | NR-CE-SDS | HMW% | 3.8 | 3.8 | 4.0 | 4.7 |
| | | MP% | 89.2 | 86.8 | 83.0 | 76.0 |
| | | LMW% | 6.9 | 9.3 | 13.1 | 19.3 |

# 权利要求

1. 一种三特异性抗体，其包含第一、第二、第三抗原结合位点，其中所述第一、第二、第三抗原结合位点结合互不相同的，彼此独立地选自 PD-1，CTLA-4 和 VEGF 的第一、第二、第三抗原。

2. 权利要求 1 所述的三特异性抗体，其包含第一、第二、第三抗原结合位点且由两条相同的重链和两条相同的轻链组成，所述重链和轻链具有选自如下的结构：

1）重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc-VHH-ScFv 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；或

2）重链，其从 N 端到 C 端包含 ScFv-VH-CH1-Fc-VHH 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；或

3）重链，其从 N 端到 C 端包含 VHH-VH-CH1-Fc- ScFv 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；或

4）重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc -ScFv-VHH 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；或

5）重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc -ScFv 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL-VHH 的结构；或

6）重链，其从 N 端到 C 端包含 ScFv-VH-CH1-Fc-ScFv 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；或

7）重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc-ScFv 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VHH-VL-CL 的结构；或

8）重链，其从 N 端到 C 端包含 ScFv-VHH-VH-CH1-Fc 的结构，
轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构；

其中 Fc 表示免疫球蛋白重链的 Fc 区，包含 Fc 区的两条重链藉由 Fc 区同二聚化，

其中 CH1 表示免疫球蛋白重链 CH1 结构域，CL 表示免疫球蛋白轻链 CL 结构域，

其中 VH-CH1 和 VL-CL 相互配对形成 Fab，

其中第一、第二、第三抗原结合位点为 Fab、VHH 或 ScFv 的形式，且分别结合互不相同的，彼此独立地的抗原 PD-1，CTLA-4 和 VEGF。

3. 权利要求 1 所述的三特异性抗体，其包含第一、第二、第三抗原结合位点且由具有如下结构的三条链组成：

1）第一重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc-ScFv 的结构，

2）第二重链，其从 N 端到 C 端包含 VHH -Fc-ScFv 的结构，和

3）轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构，

其中 Fc 为免疫球蛋白重链的 Fc 区，其中包含 Fc 区的两条重链藉由 Fc 区二聚化，

其中 CH1 表示免疫球蛋白重链 CH1 结构域，CL 表示免疫球蛋白轻链 CL 结构域，

其中 VH-CH1 和 VL-CL 相互配对形成 Fab，

其中第一、第二、第三抗原结合位点为 Fab、VHH 或 ScFv 的形式，且分别结合互不相同的，彼此独立地的抗原 PD-1，CTLA-4 和 VEGF。

4. 权利要求 1 所述的三特异性抗体，其包含第一、第二、第三抗原结合位点且由具有如下结构的三条链组成：

1）第一重链，其从 N 端到 C 端包含 VH-CH1-Fc-ScFv2 的结构，

2）第二重链，其从 N 端到 C 端包含 ScFv1-Fc-ScFv2 的结构，

3）轻链，其从 N 端到 C 端包含 VL-CL 的结构，

其中 Fc 为免疫球蛋白重链的 Fc 区，其中包含 Fc 区的两条重链藉由 Fc 区二聚化，

其中 CH1 表示免疫球蛋白重链 CH1 结构域，CL 表示免疫球蛋白轻链 CL 结构域，

其中 VH-CH1 和 VL-CL 相互配对形成 Fab，

其中第一、第二、第三抗原结合位点为 Fab、ScFv1 或 ScFv2 的形式，且分别结合互不相同的，彼此独立地的抗原 PD-1，CTLA-4 和 VEGF。

5 权利要求 1 所述的三特异性抗体，其包含第一、第二、第三抗原结合位点且由具有如下结构的两条链组成：

1）第一重链，其从 N 端到 C 端包含 ScFv1-Fc-ScFv2 的结构，

2）第二重链，其从 N 端到 C 端包含 VHH-Fc-ScFv2 的结构，

其中 Fc 为免疫球蛋白重链的 Fc 区，其中包含 Fc 区的两条重链藉由 Fc 区二聚化，

其中第一、第二、第三抗原结合位点为 VHH、ScFv1 或 ScFv2 的形式，且分别结合互不相同的，彼此独立地的抗原 PD-1，CTLA-4 和 VEGF。

6. 权利要求 1-5 中所述的三特异性抗体，其中所述第一、第二、第三抗原结合位点包含：

1）结合 PD-1 的抗原结合位点，其具有包含 SEQ ID NO:1 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:2 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:3 所示序列或由其组成的 HCDR3；和包含 SEQ ID NO:4 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:5 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:6 所示序列或由其组成的 LCDR3；

2）结合 CTLA-4 的抗原结合位点，其具有

i）包含 SEQ ID NO:17 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:18 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:19 所示序列或由其组成的 HCDR3；和包含 SEQ ID NO:20 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:21 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:22 所示序列或由其组成的 LCDR3；或

ii）包含 SEQ ID NO:12 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:13 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:14 所示序列或由其组成的 HCDR3；

和

3）结合 VEGF 的抗原结合位点，其具有包含 SEQ ID NO:26 所示序列或由其组成的 HCDR1，包含 SEQ ID NO:27 所示序列或由其组成的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO:28 所示序列或由其组成的 HCDR3；和包含 SEQ ID NO:29 所示序列或由其组成的 LCDR1，包含 SEQ ID NO:30 所示序列或由其组成的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO:31 所示序列或由其组成的 LCDR3。

**7.** 权利要求 1-6 中所述的三特异性抗体，所述第一、第二、第三抗原结合位点包含在 FR 区中的取代，优选地，所述取代是重链可变区的 G44C、轻链可变区的 Q100C 或 G100C（按照 Kabat 编号）。

8. 权利要求 1-7 中所述的三特异性抗体，其中所述第一、第二、第三抗原结合位点包含：

1）结合 PD-1 的抗原结合位点，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:7 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:7 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:8 具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:8 所示的序列组成；

2）结合 CTLA-4 的抗原结合位点，其包含

i）重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:15 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:15 具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:15 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:16 具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:16 所示的序列组成；或

ii）包含 SEQ ID NO:11 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:11 具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:11 所示的序列组成；

和

3）结合 VEGF 的抗原结合位点，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:24 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:24 具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:24 所示的序列组成，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示的序列，或包含与 SEQ ID NO:25 具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:25 所示的序列组成。

9. 权利要求 1-8 中所述的三特异性抗体，其中相邻的抗原结合位点之间通过接头连接，抗原结合位点与 Fc 区之间通过接头/铰链区连接。

10. 权利要求 9 所述的三特异性抗体，其中所述接头包含氨基酸序列 $(G_4S)_n$，其中 n 是等于或大于 1 的整数，优选地，接头由氨基酸序列$(G_4S)_3$ 或$(G_4S)_4$ 组成，优选所述接头具有 SEQ

ID NO:9 所示的序列，所述铰链区为来自免疫球蛋白的铰链区，优选来自 IgG 的铰链区。

11. 权利要求 1-8 中所述的三特异性抗体，其中所述 Fc 区来自免疫球蛋白 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区，优选地，Fc 区衍生自 SEQ ID NO:33、34 或 35 所示的重链恒定区序列，优选地，Fc 区包含修饰，例如 Fc 区包含杵臼结构。

12. 权利要求 11 所述的三特异性抗体，其中所述 Fc 区包含选自 S228P、S354C、T366W、T366S、L368A、Y394C、Y407V、H435R、Y436F、K447A 的取代（依照 EU 编号系统）。

13. 权利要求 1 或 2 所述的三特异性抗体，其包含：

1）包含 SEQ ID NO:37 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 38 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

2）包含 SEQ ID NO:39 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 40 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

3）包含 SEQ ID NO:41 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 42 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

4）包含 SEQ ID NO:43 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 44 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

5）包含 SEQ ID NO:45 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 46 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

6）包含 SEQ ID NO:47 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 48 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

7）包含 SEQ ID NO:49 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 50 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

8）包含 SEQ ID NO:59 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 60 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

9）包含 SEQ ID NO:61 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 62 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

10）包含 SEQ ID NO:63 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO:64 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

11）包含 SEQ ID NO:65 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 66 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

12）包含 SEQ ID NO:67 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 68 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

13）包含 SEQ ID NO:69 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 70 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

14）包含 SEQ ID NO:71 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 72 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

15）包含 SEQ ID NO:73 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 74 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链；或

16）包含 SEQ ID NO:75 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的重链，和包含 SEQ ID NO: 76 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链。

14. 权利要求 3 所述的三特异性抗体，其包含：

包含 SEQ ID NO:51 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的第一重链，

包含 SEQ ID NO: 53 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的第二重链，和

包含 SEQ ID NO: 52 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链。

15. 权利要求 4 所述的三特异性抗体，其包含：

包含 SEQ ID NO:56 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的第一重链，

包含 SEQ ID NO: 58 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的第二重链，和

包含 SEQ ID NO: 57 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的轻链。

16. 权利要求 5 所述的三特异性抗体，其包含：

包含 SEQ ID NO:54 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的第一重链，和

包含 SEQ ID NO: 55 或与其具有至少 90%同一性的氨基酸序列的第二重链。

17. 权利要求 1、2 或 13 所述的三特异性抗体，其包含：

1）包含 SEQ ID NO:37 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 38 或由其组成的轻链；或

2）包含 SEQ ID NO:39 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 40 或由其组成的轻链；或

3）包含 SEQ ID NO:41 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 42 或由其组成的轻链；或

4）包含 SEQ ID NO:43 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 44 或由其组成的轻链；或

5）包含 SEQ ID NO:45 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 46 或由其组成的轻链；或

6）包含 SEQ ID NO:47 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 48 或由其组成的轻链；或

7）包含 SEQ ID NO:49 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 50 或由其组成的轻链；或

8）包含 SEQ ID NO:59 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 60 或由其组成的轻链；或

9）包含 SEQ ID NO:61 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 62 或由其组成的轻链；或

10）包含 SEQ ID NO:63 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO:64 或由其组成的轻链；

或

11）包含 SEQ ID NO:65 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 66 或由其组成的轻链；

或

12）包含 SEQ ID NO:67 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 68 或由其组成的轻链；

或

13）包含 SEQ ID NO:69 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 70 或由其组成的轻链；

或

14）包含 SEQ ID NO:71 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 72 或由其组成的轻链；

或

15）包含 SEQ ID NO:73 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 74 或由其组成的轻链；

或

16）包含 SEQ ID NO:75 或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO: 76 或由其组成的轻链。

18. 权利要求 1、3 或 14 所述的三特异性抗体，其包含：
包含 SEQ ID NO:51 或由其组成的第一重链，
包含 SEQ ID NO: 53 或由其组成的第二重链，和
包含 SEQ ID NO: 52 或由其组成的轻链。

19. 权利要求 1、4 或 15 所述的三特异性抗体，其包含：
包含 SEQ ID NO:56 或由其组成的第一重链，
包含 SEQ ID NO: 58 或由其组成的第二重链，和
包含 SEQ ID NO: 57 或由其组成的轻链。

20. 权利要求 1、5 或 16 所述的三特异性抗体，其包含：
包含 SEQ ID NO:54 或由其组成的第一重链，和
包含 SEQ ID NO: 55 或由其组成的第二重链。

21. 多核苷酸，其编码权利要求 1-20 中任一项所述的三特异性抗体。

22. 载体，其包含权利要求 21 的多核苷酸，优选地，所述载体是表达载体。

23. 宿主细胞，其包含权利要求 21 所述的多核苷酸或权利要求 22 所述的载体，例如，所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

24. 用于生产权利要求 1-20 中任一项所述的三特异性抗体的方法，所述方法包括：

在适于表达所述抗体的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞；和在适于所述多肽链装配为所述抗体的条件下使多肽链装配产生所述抗体。

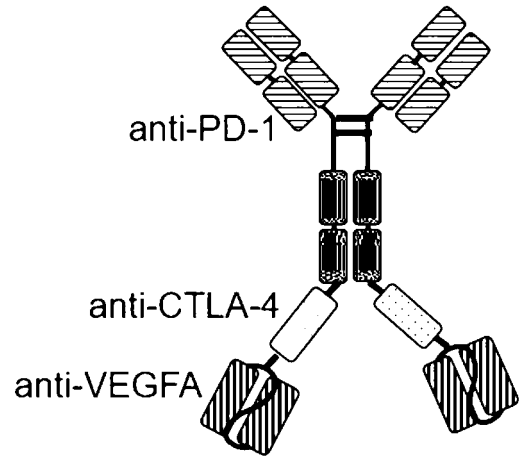
25. 药物组合物，其包含权利要求 1-20 中任一项所述的三特异性抗体和可药用载体。

26. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的多特异性抗体或权利要求 25 的药物组合物在制备用于在个体中治疗和／或预防癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或血管发生相关疾病的药物中的用途，或在制备用于癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或血管发生相关疾病诊断的试剂中的用途。

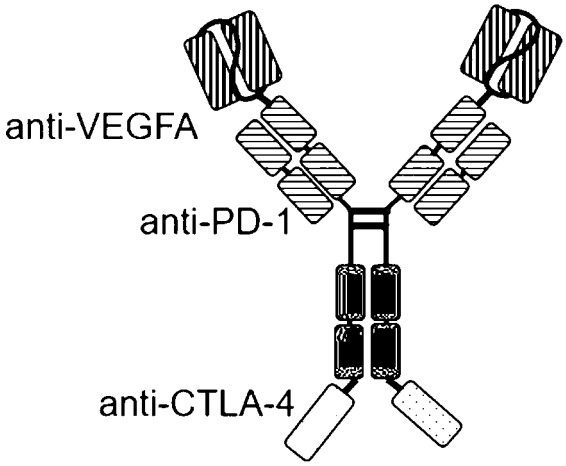
27. 权利要求 26 的用途，其中所述癌症选自肺癌（例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌）、乳腺癌、肝癌 、膀胱癌, 乳腺癌、黑素瘤, 结肠癌、直肠癌, 卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、胰腺腺癌、基底细胞癌、食道癌、胆管癌、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌、脑癌、胃癌、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、睾丸癌、多发性骨髓瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤等实体瘤和白血病、淋巴瘤（例如霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、急性 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤）等血液瘤。

28. 一种治疗、预防和/或诊断癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或血管发生相关疾病的方法，包括将有效量的权利要求 1-20 中任一项所述的三特异性抗体，或权利要求 25 的药物组合物施用给有需要的患者。

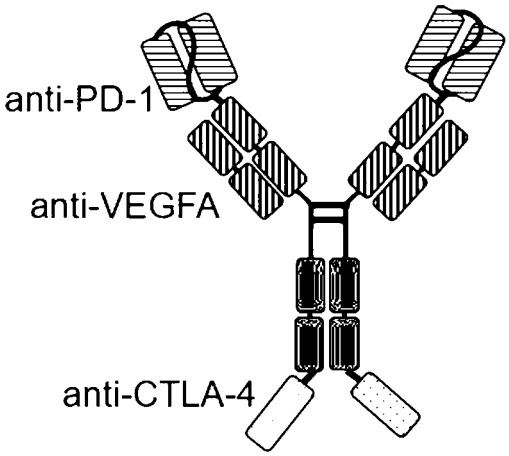
29. 权利要求 28 的方法，其中所述癌症选自肺癌（例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌）、乳腺癌、肝癌 、膀胱癌, 乳腺癌、黑素瘤, 结肠癌、直肠癌, 卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、胰腺腺癌、基底细胞癌、食道癌、胆管癌、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌、脑癌、胃癌、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌、睾丸癌、多发性骨髓瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤等实体瘤和白血病、淋巴瘤（例如霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、急性 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤）等血液瘤。



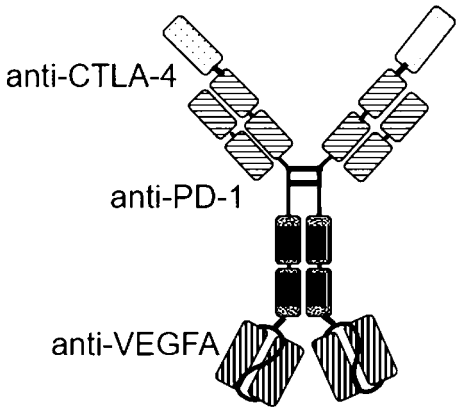

F6



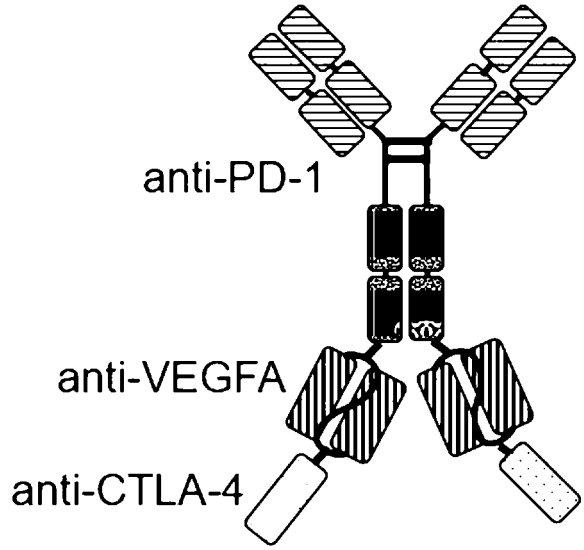

F7



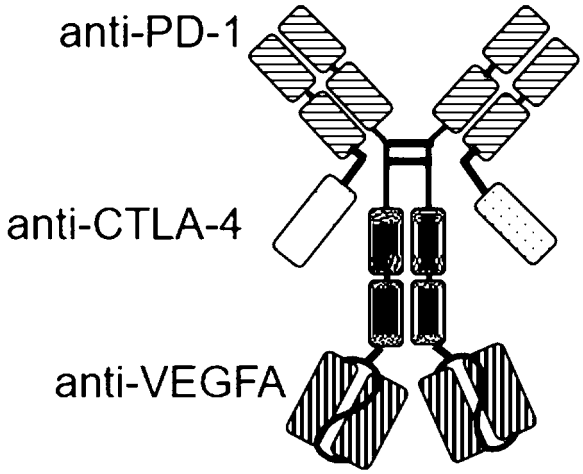

F8



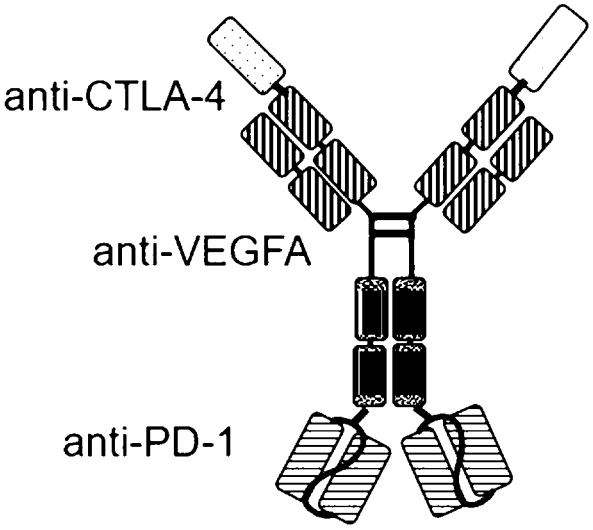

F9



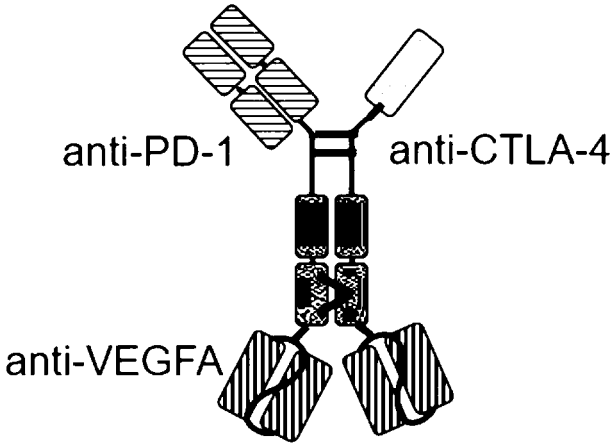

F10



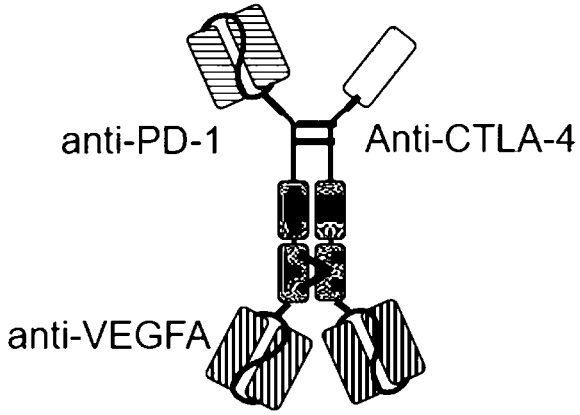

F11



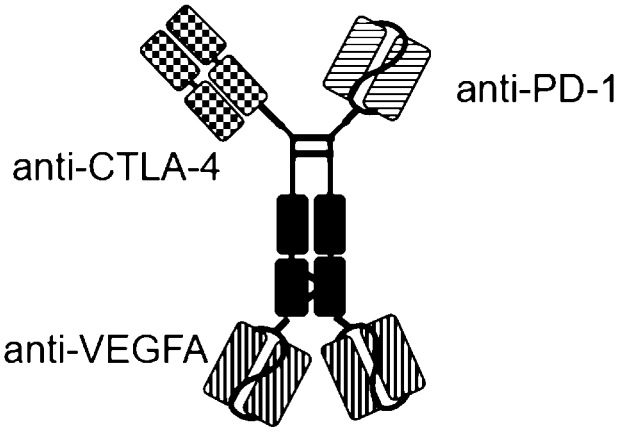

F12



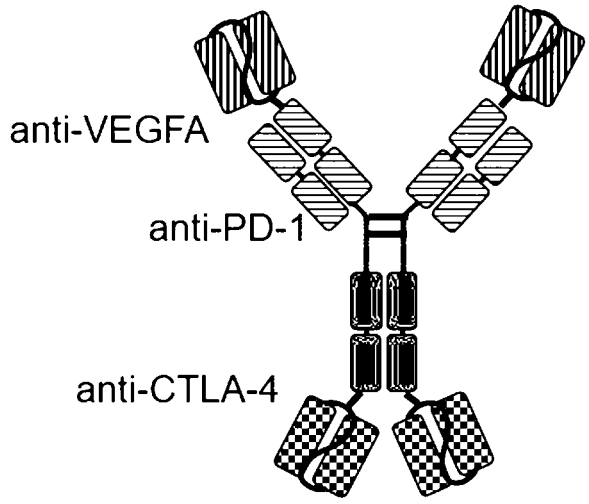

F13



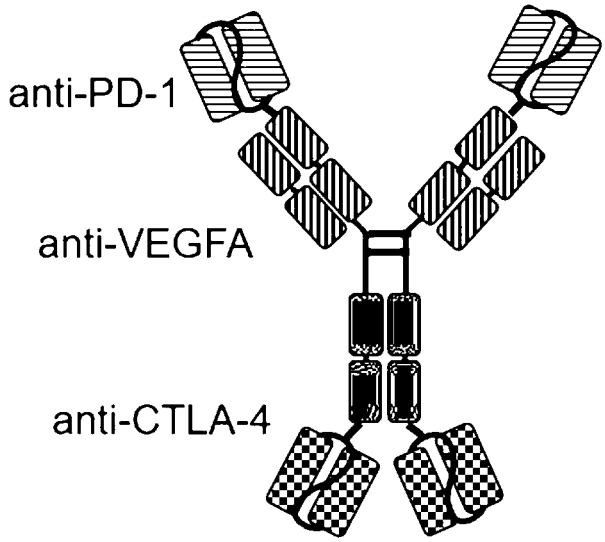

F14



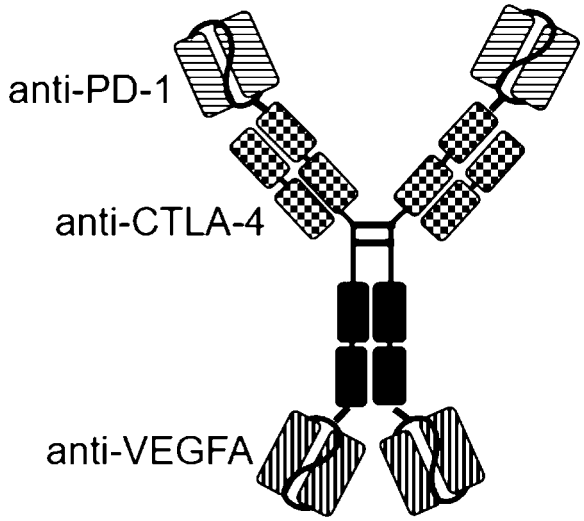

F15



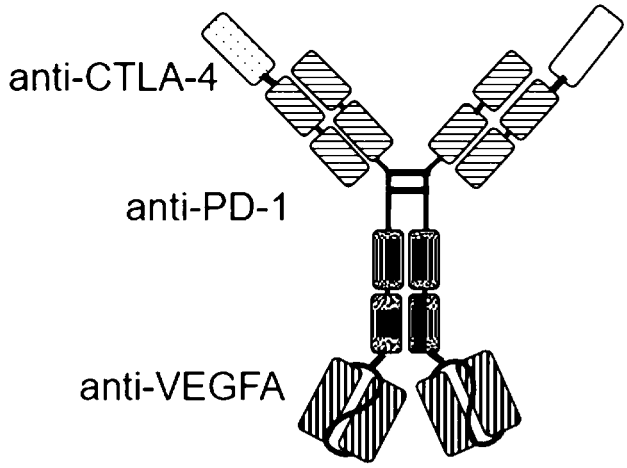

F16



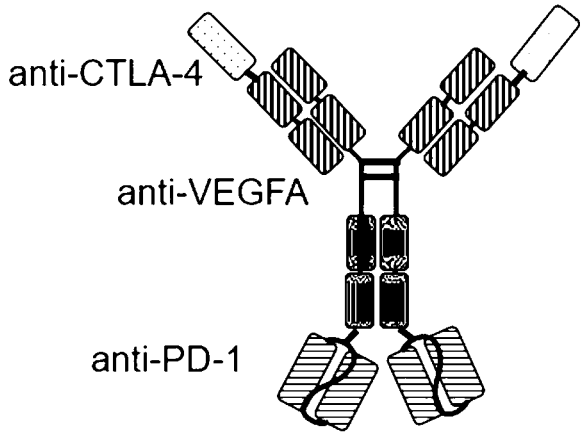

F17



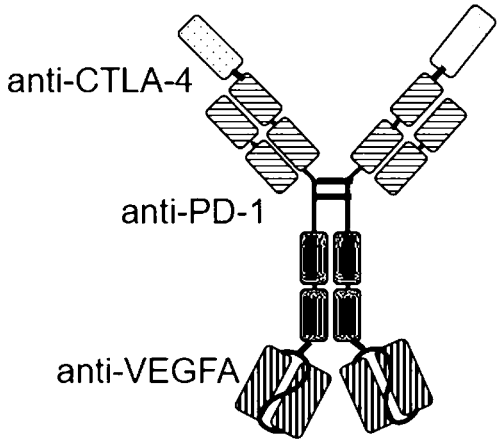

F18



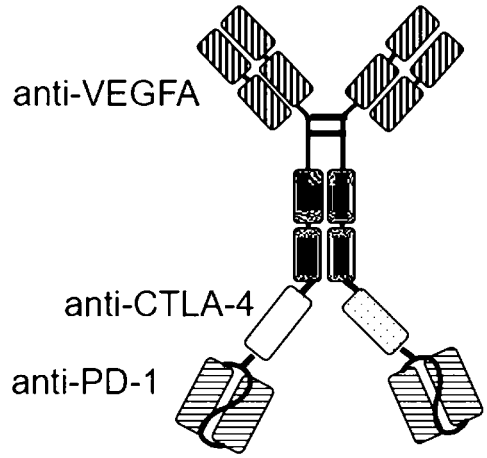

F19



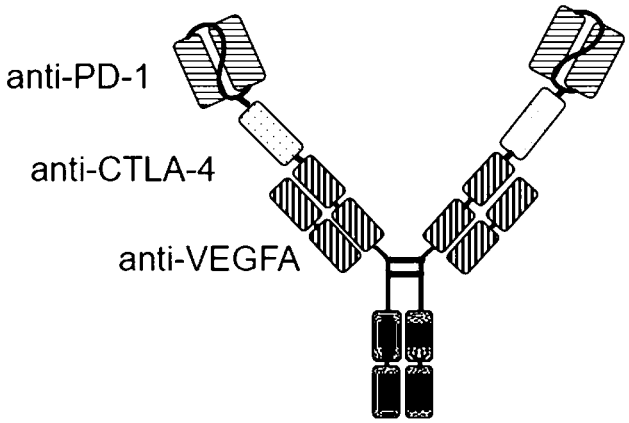

F20



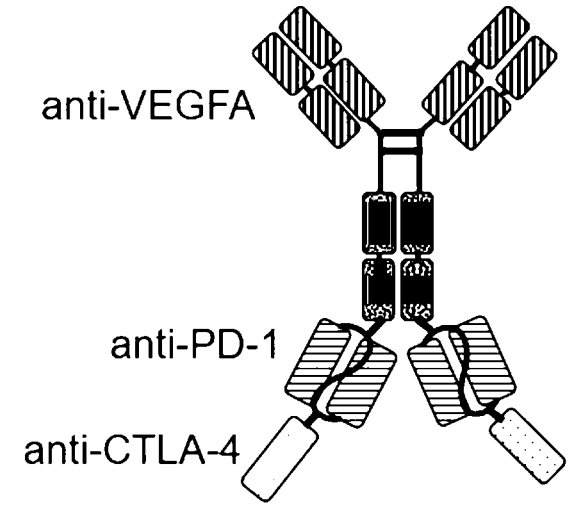

F21




F22




F23




F24

图 1

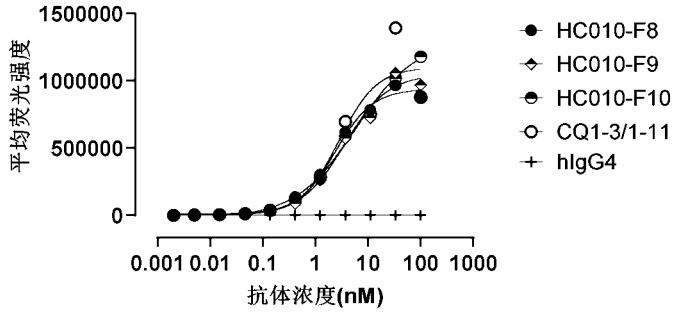



图 2A

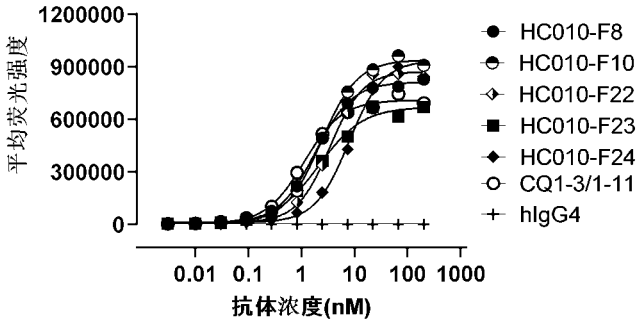



图 2B

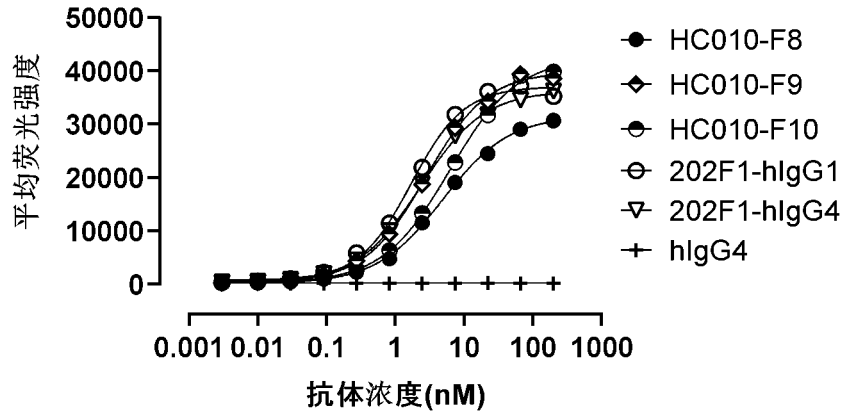

50000
40000
30000
20000
10000
0
平均荧光强度
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
抗体浓度(nM)
HC010-F8
HC010-F9
HC010-F10
202F1-hIgG1
202F1-hIgG4
hIgG4

图 3A

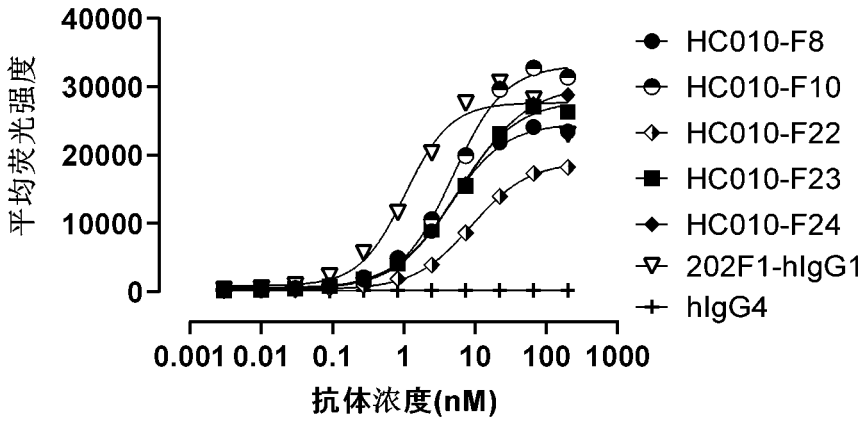

40000
30000
20000
10000
0
平均荧光强度
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
抗体浓度(nM)
HC010-F8
HC010-F10
HC010-F22
HC010-F23
HC010-F24
202F1-hIgG1
hIgG4

图 3B

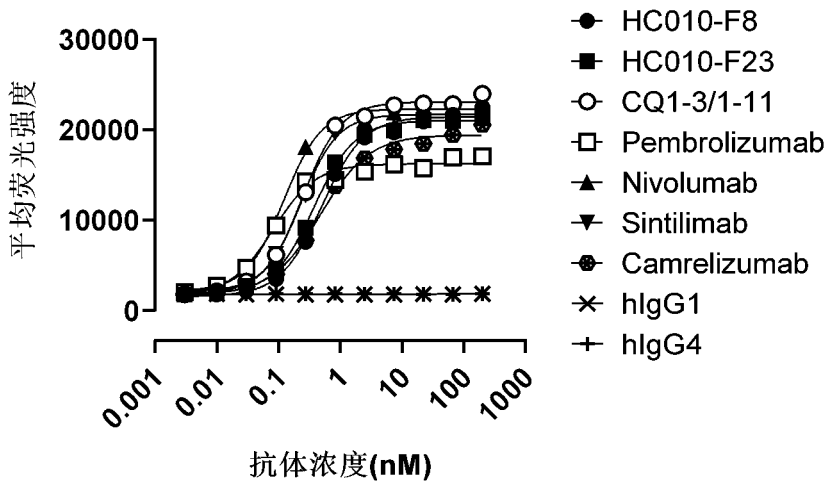

30000
20000
10000
0
平均荧光强度
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)
HC010-F8
HC010-F23
CQ1-3/1-11
Pembrolizumab
Nivolumab
Sintilimab
Camrelizumab
hIgG1
hIgG4

图 4 A

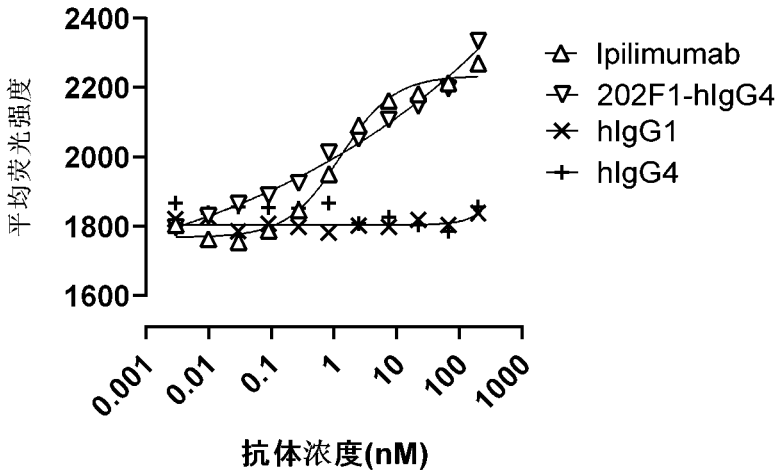

2400
2200
2000
1800
1600
平均荧光强度
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)
Ipilimumab
202F1-hIgG4
hIgG1
hIgG4

图 4 B

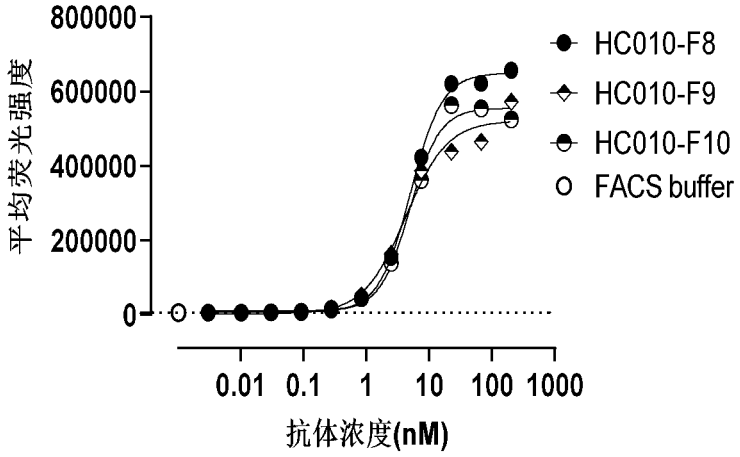

800000
600000
400000
200000
0
平均荧光强度
0.01 0.1 1 10 100 1000
抗体浓度(nM)
HC010-F8
HC010-F9
HC010-F10
FACS buffer

图 5

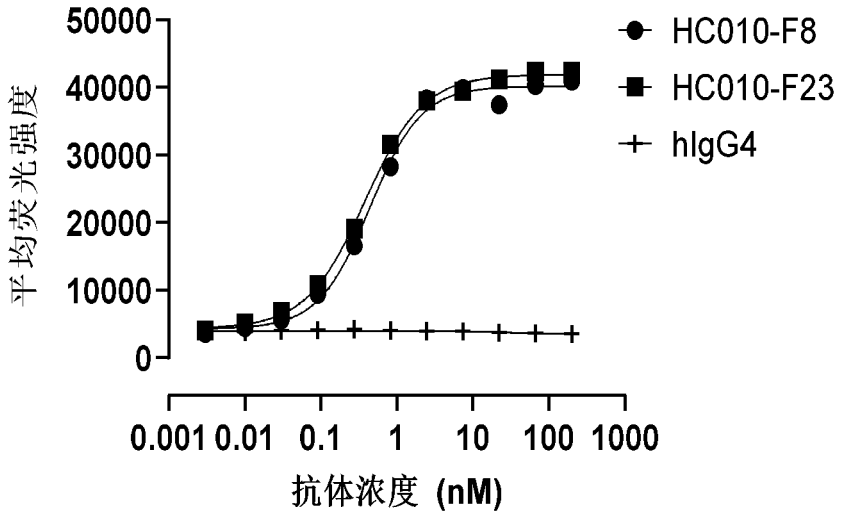

50000
40000
30000
20000
10000
0
平均荧光强度
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
抗体浓度 (nM)
HC010-F8
HC010-F23
hIgG4

图 6

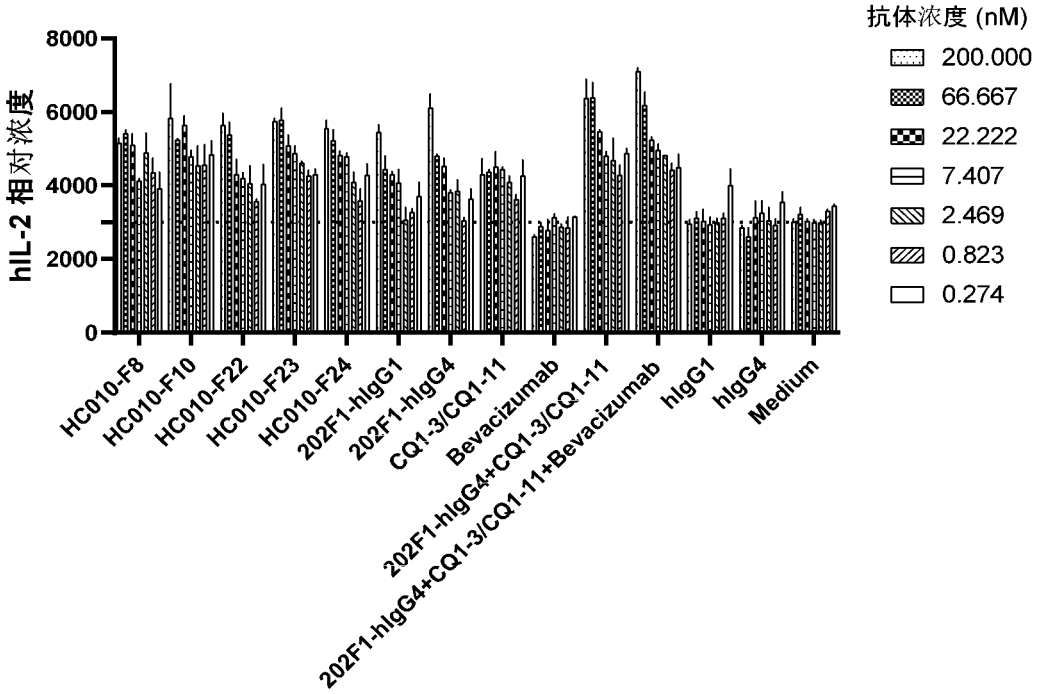

hIL-2 相对浓度
8000
6000
4000
2000
0
抗体浓度 (nM)
200.000
66.667
22.222
7.407
2.469
0.823
0.274
HC010-F8
HC010-F10
HC010-F22
HC010-F23
HC010-F24
202F1-hIgG1
202F1-hIgG4
CQ1-3/CQ1-11
Bevacizumab
202F1-hIgG4+CQ1-3/CQ1-11
202F1-hIgG4+CQ1-3/CQ1-11+Bevacizumab
hIgG1
hIgG4
Medium

图 7A

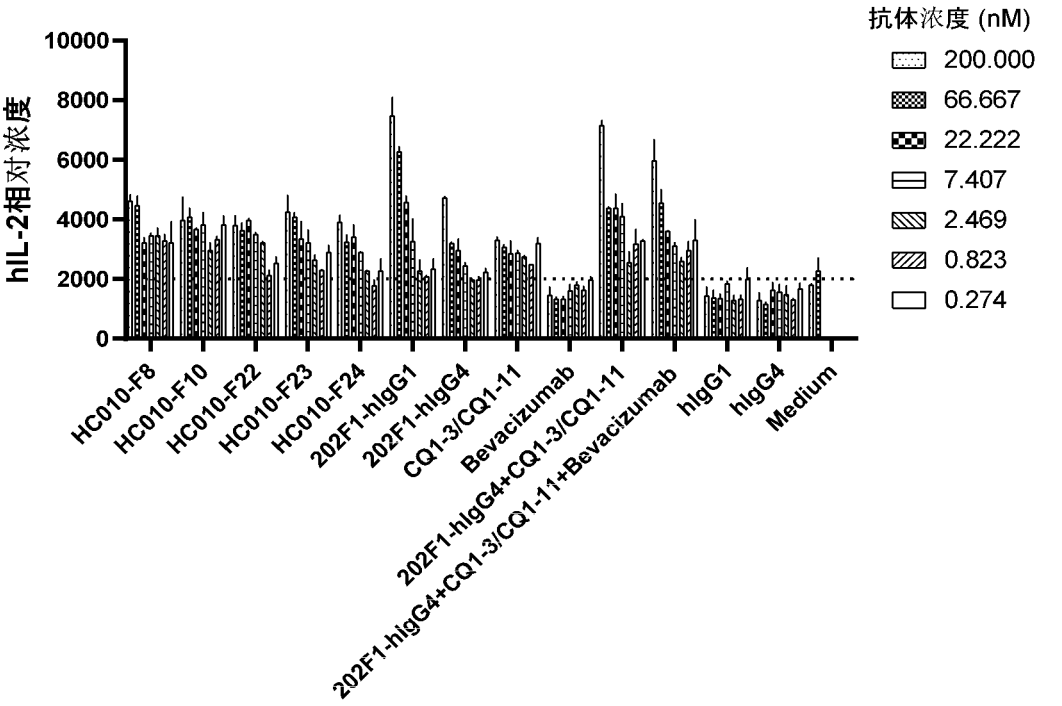

hIL-2相对浓度
10000
8000
6000
4000
2000
0
抗体浓度 (nM)
200.000
66.667
22.222
7.407
2.469
0.823
0.274
HC010-F8
HC010-F10
HC010-F22
HC010-F23
HC010-F24
202F1-hIgG1
202F1-hIgG4
CQ1-3/CQ1-11
Bevacizumab
202F1-hIgG4+CQ1-3/CQ1-11
202F1-hIgG4+CQ1-3/CQ1-11+Bevacizumab
hIgG1
hIgG4
Medium

图 7 B

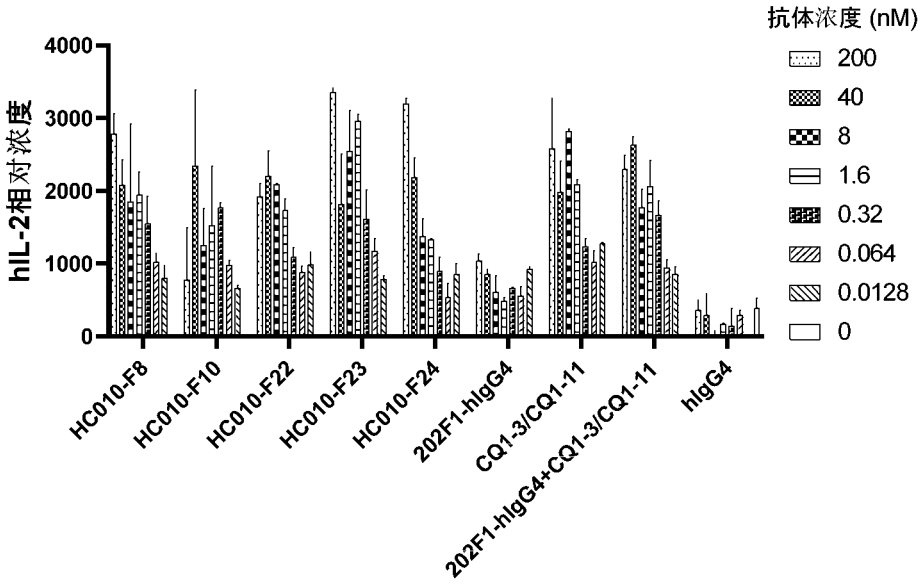

抗体浓度 (nM)
200
40
8
1.6
0.32
0.064
0.0128
0
hIL-2相对浓度
4000
3000
2000
1000
0
HC010-F8
HC010-F10
HC010-F22
HC010-F23
HC010-F24
202F1-hIgG4
CQ1-3/CQ1-11
202F1-hIgG4+CQ1-3/CQ1-11
hIgG4

图 8A

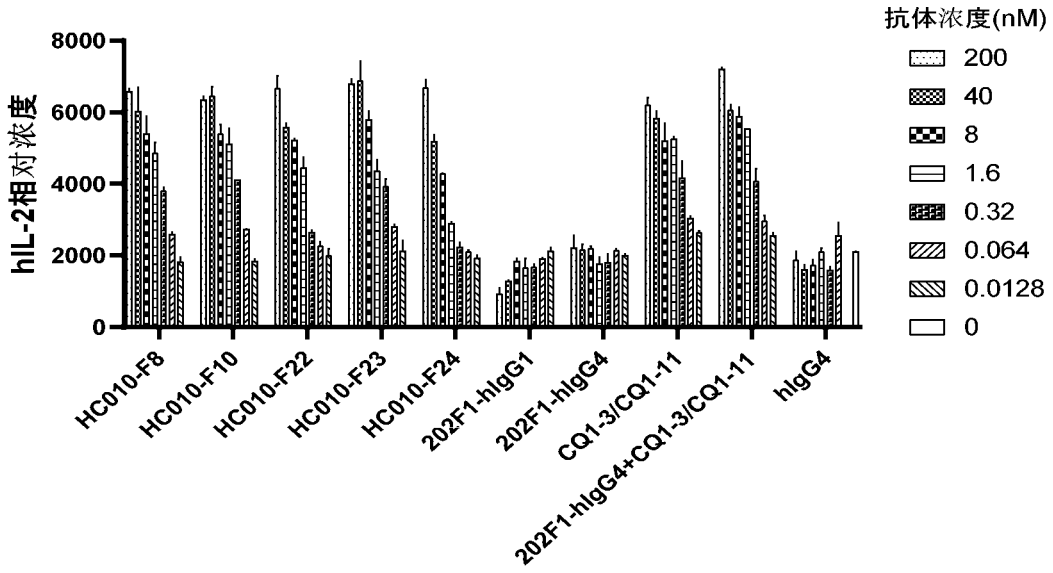

抗体浓度(nM)
200
40
8
1.6
0.32
0.064
0.0128
0
hIL-2相对浓度
8000
6000
4000
2000
0
HC010-F8
HC010-F10
HC010-F22
HC010-F23
HC010-F24
202F1-hIgG1
202F1-hIgG4
CQ1-3/CQ1-11
202F1-hIgG4+CQ1-3/CQ1-11
hIgG4

图 8 B

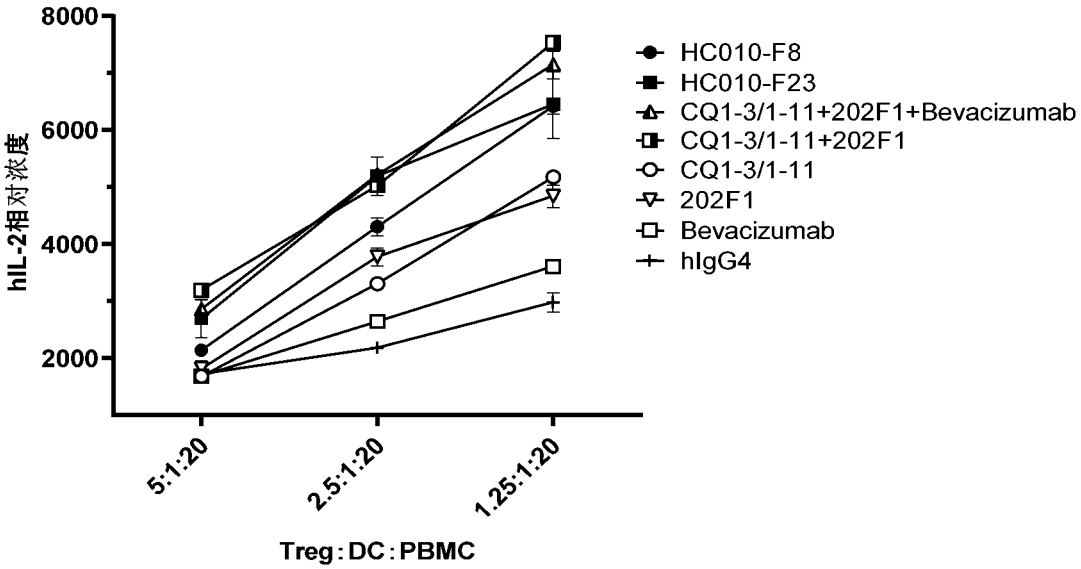

8000
6000
4000
2000
hIL-2相对浓度
5:1:20
2.5:1:20
1.25:1:20
Treg:DC:PBMC
HC010-F8
HC010-F23
CQ1-3/1-11+202F1+Bevacizumab
CQ1-3/1-11+202F1
CQ1-3/1-11
202F1
Bevacizumab
hIgG4

图 9A

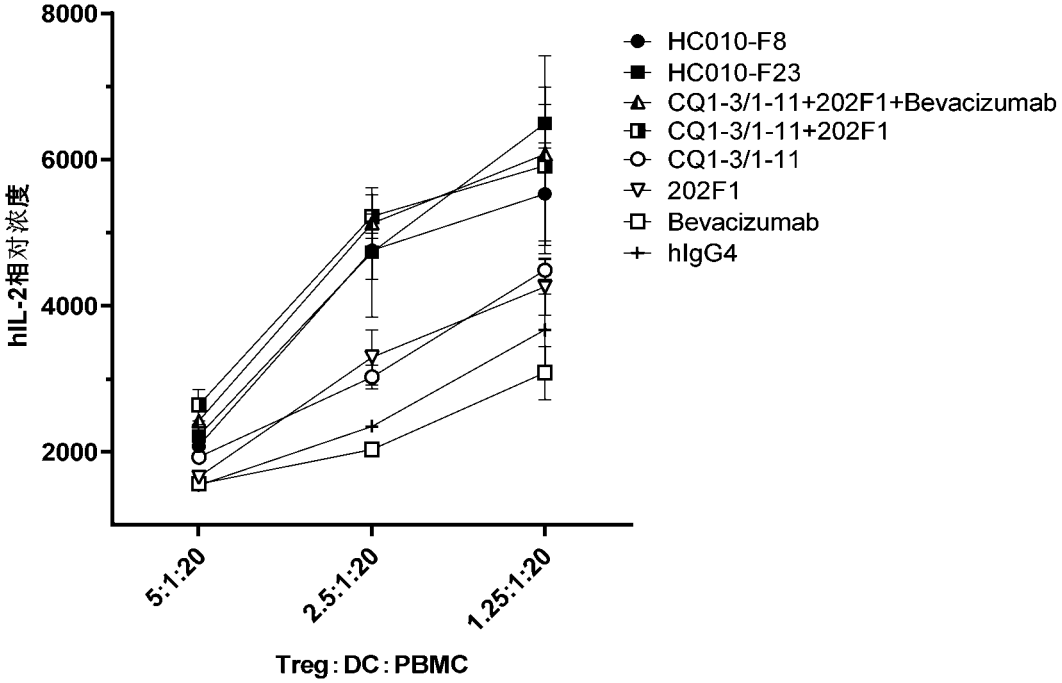

8000
6000
4000
2000
hIL-2相对浓度
5:1:20
2.5:1:20
1.25:1:20
Treg:DC:PBMC
HC010-F8
HC010-F23
CQ1-3/1-11+202F1+Bevacizumab
CQ1-3/1-11+202F1
CQ1-3/1-11
202F1
Bevacizumab
hIgG4

图 9B

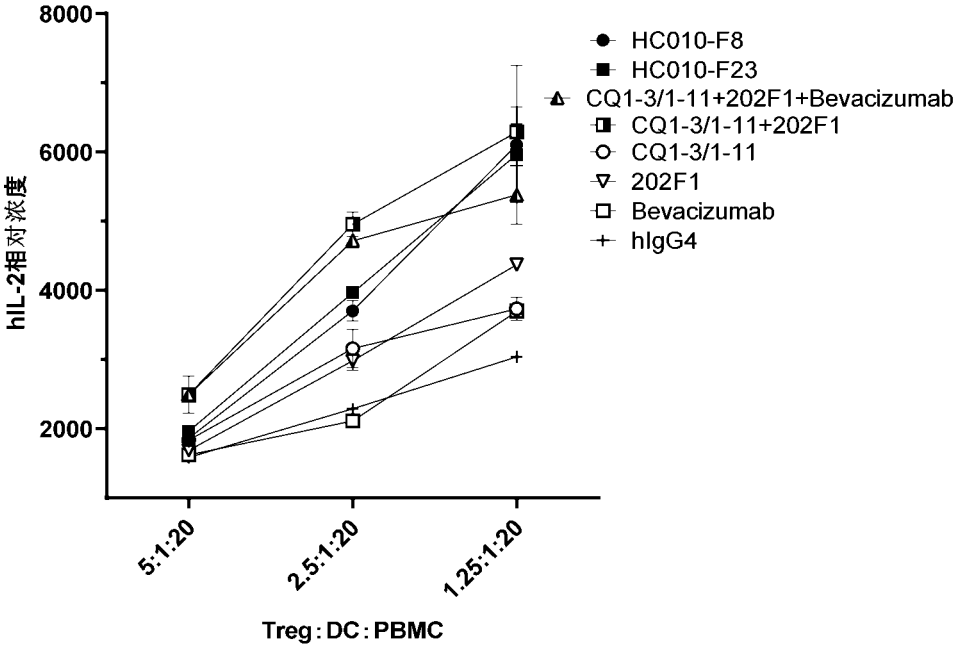

8000
6000
4000
2000
hIL-2相对浓度
HC010-F8
HC010-F23
CQ1-3/1-11+202F1+Bevacizumab
CQ1-3/1-11+202F1
CQ1-3/1-11
202F1
Bevacizumab
hIgG4
5:1:20
2.5:1:20
1.25:1:20
Treg : DC : PBMC

图 9C

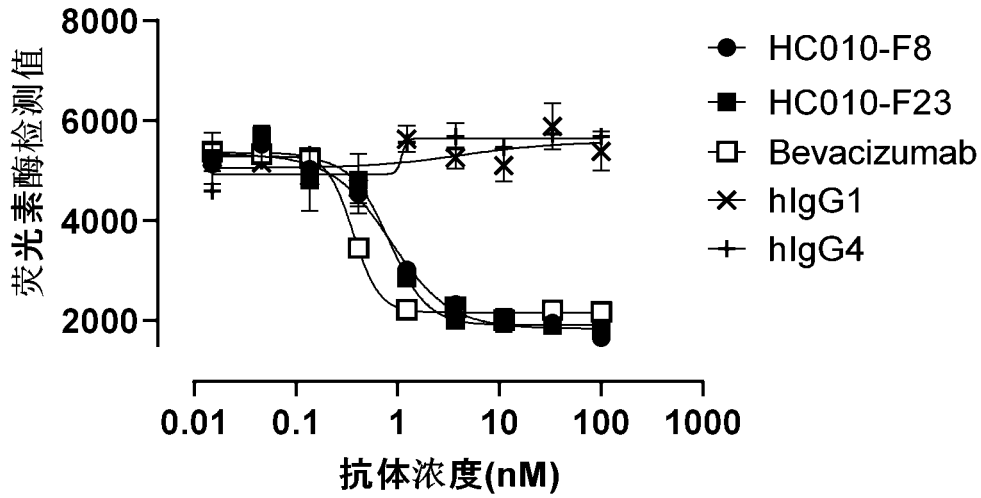

8000
6000
4000
2000
荧光素酶检测值
HC010-F8
HC010-F23
Bevacizumab
hIgG1
hIgG4
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度(nM)

图 10

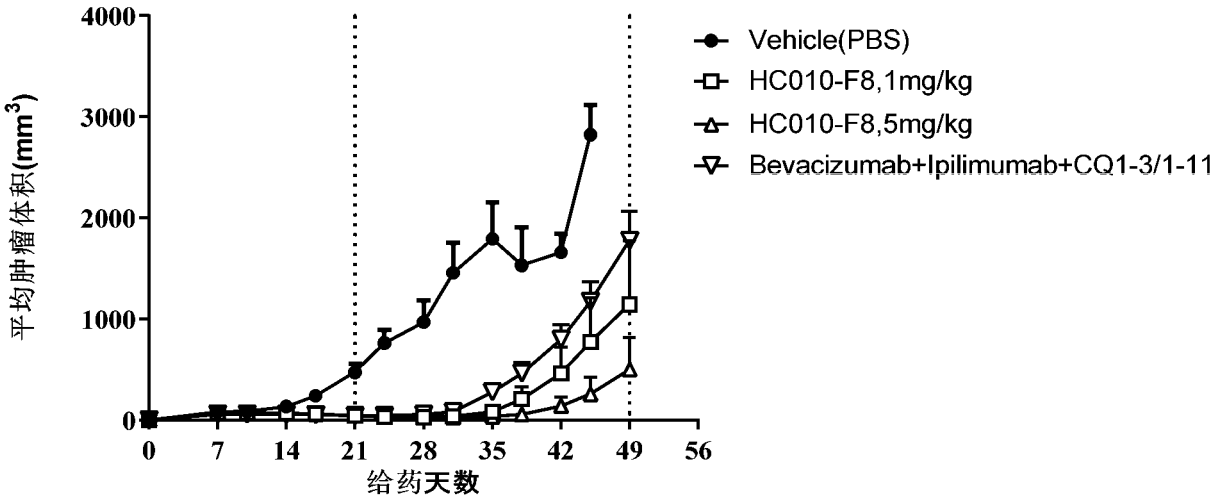

4000
3000
2000
1000
0
平均肿瘤体积(mm3)
0 7 14 21 28 35 42 49 56
给药天数
Vehicle(PBS)
HC010-F8,1mg/kg
HC010-F8,5mg/kg
Bevacizumab+Ipilimumab+CQ1-3/1-11

图 11

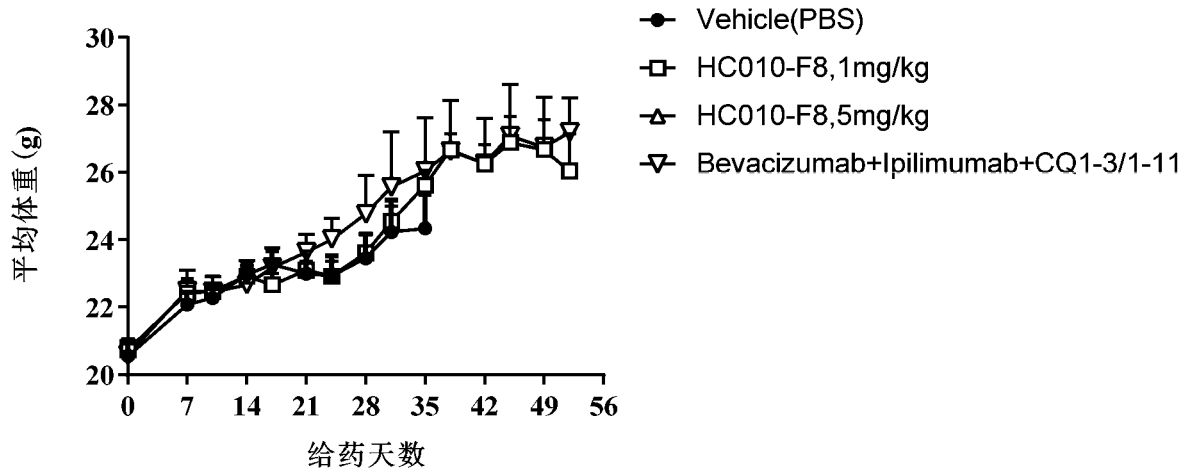

30
28
26
24
22
20
平均体重(g)
0 7 14 21 28 35 42 49 56
给药天数
Vehicle(PBS)
HC010-F8,1mg/kg
HC010-F8,5mg/kg
Bevacizumab+Ipilimumab+CQ1-3/1-11

图 12

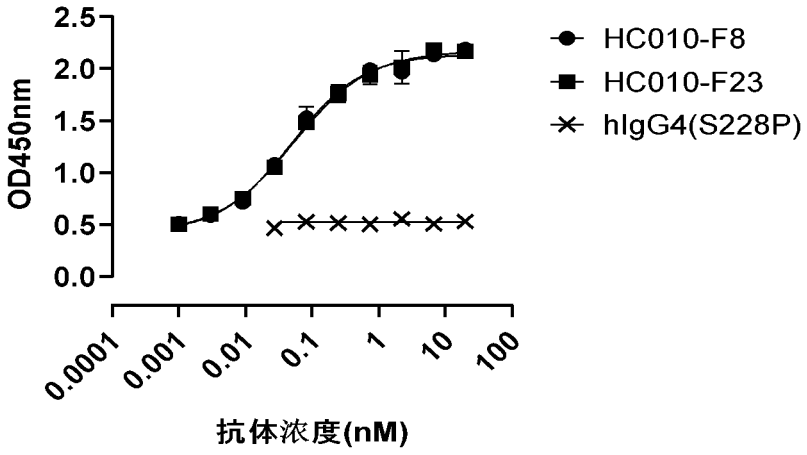

OD450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度(nM)
HC010-F8
HC010-F23
hIgG4(S228P)

图 13A

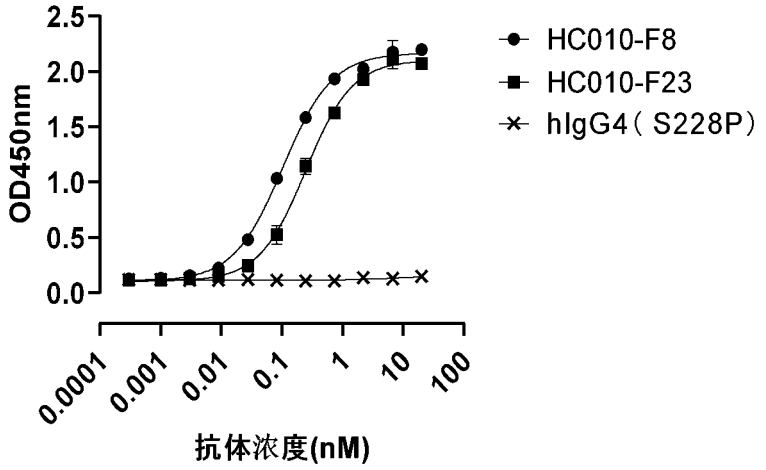

OD450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度(nM)
HC010-F8
HC010-F23
hIgG4（S228P）

图 13 B

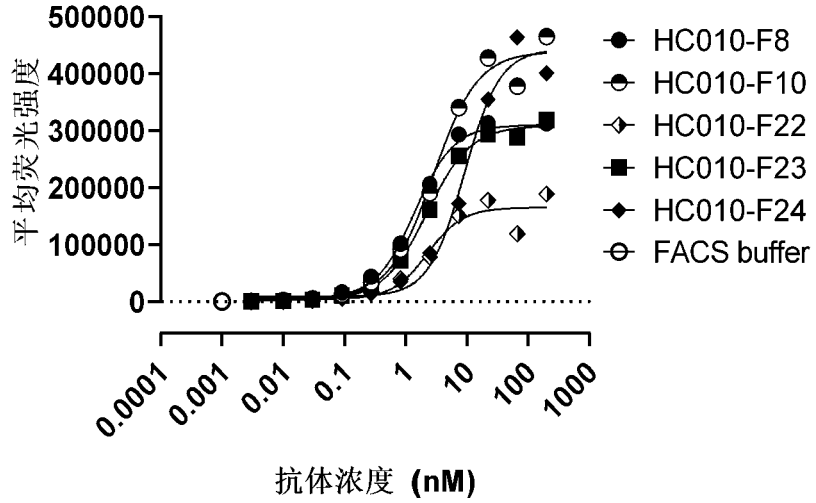

500000
400000
300000
200000
100000
0
平均荧光强度
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体浓度 (nM)
HC010-F8
HC010-F10
HC010-F22
HC010-F23
HC010-F24
FACS buffer

图 14A

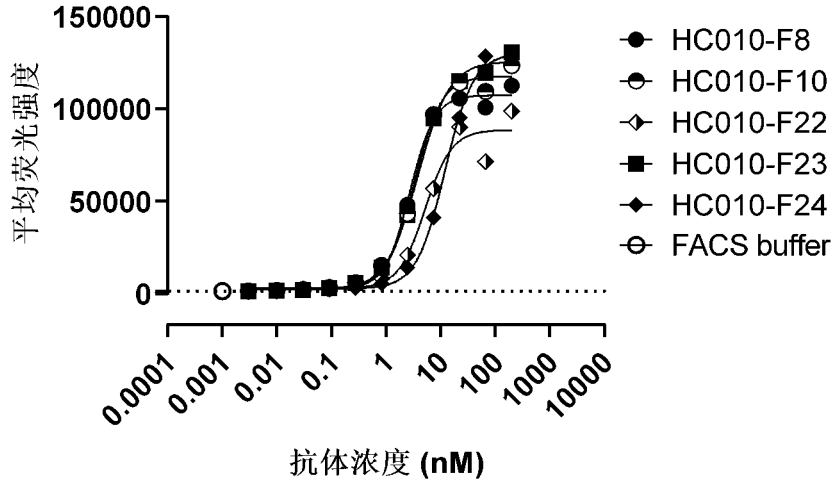

150000
100000
50000
0
平均荧光强度
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度 (nM)
HC010-F8
HC010-F10
HC010-F22
HC010-F23
HC010-F24
FACS buffer

图 14 B

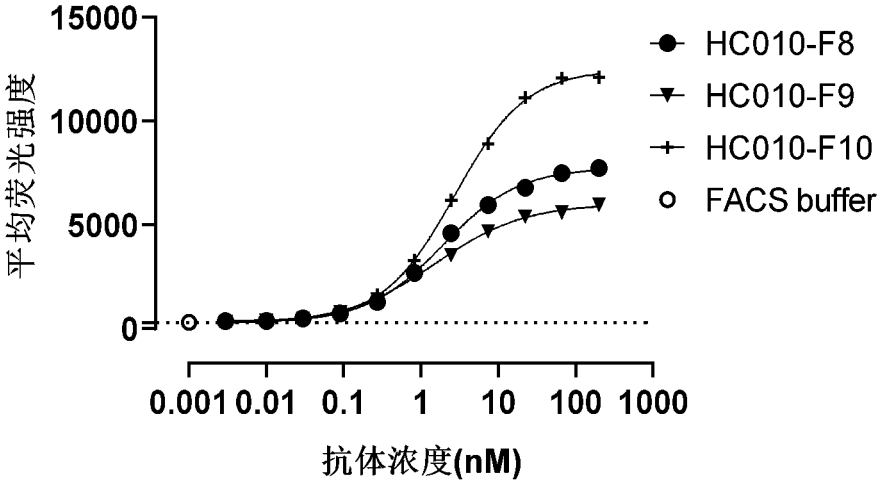

15000
10000
5000
0
平均荧光强度
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
抗体浓度(nM)
HC010-F8
HC010-F9
HC010-F10
FACS buffer

图 15 A

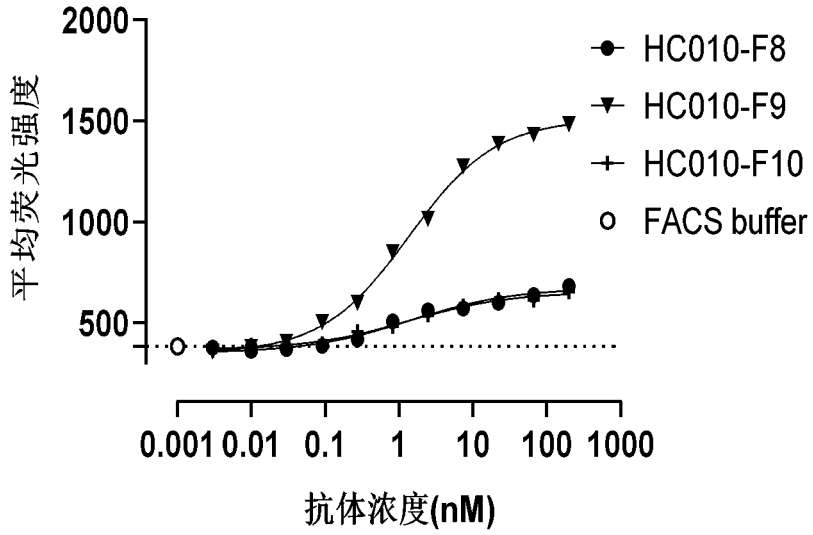

2000
1500
1000
500
平均荧光强度
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
抗体浓度(nM)
HC010-F8
HC010-F9
HC010-F10
FACS buffer

图 15 B

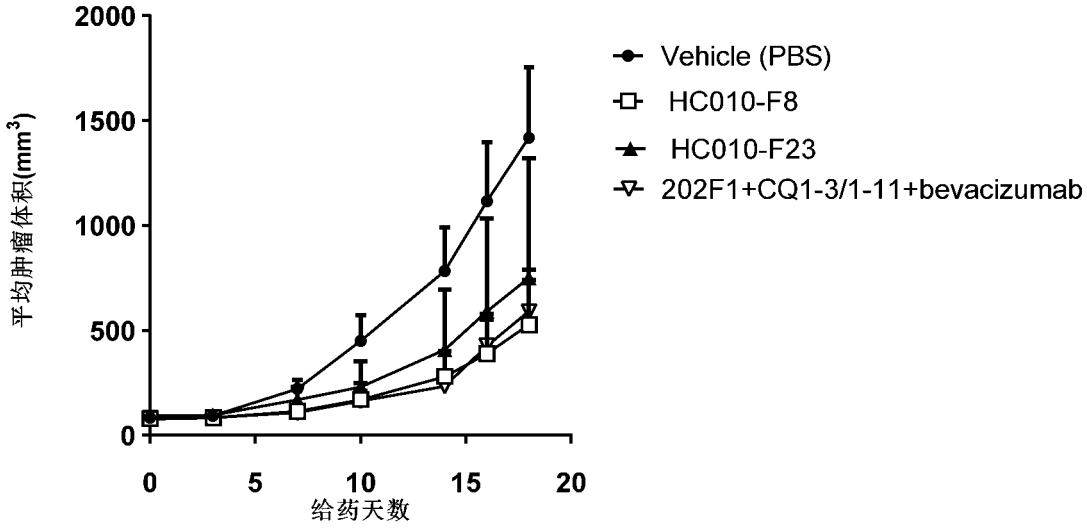

2000
1500
1000
500
0
平均肿瘤体积(mm3)
0
5
10
15
20
给药天数
Vehicle (PBS)
HC010-F8
HC010-F23
202F1+CQ1-3/1-11+bevacizumab

图 16

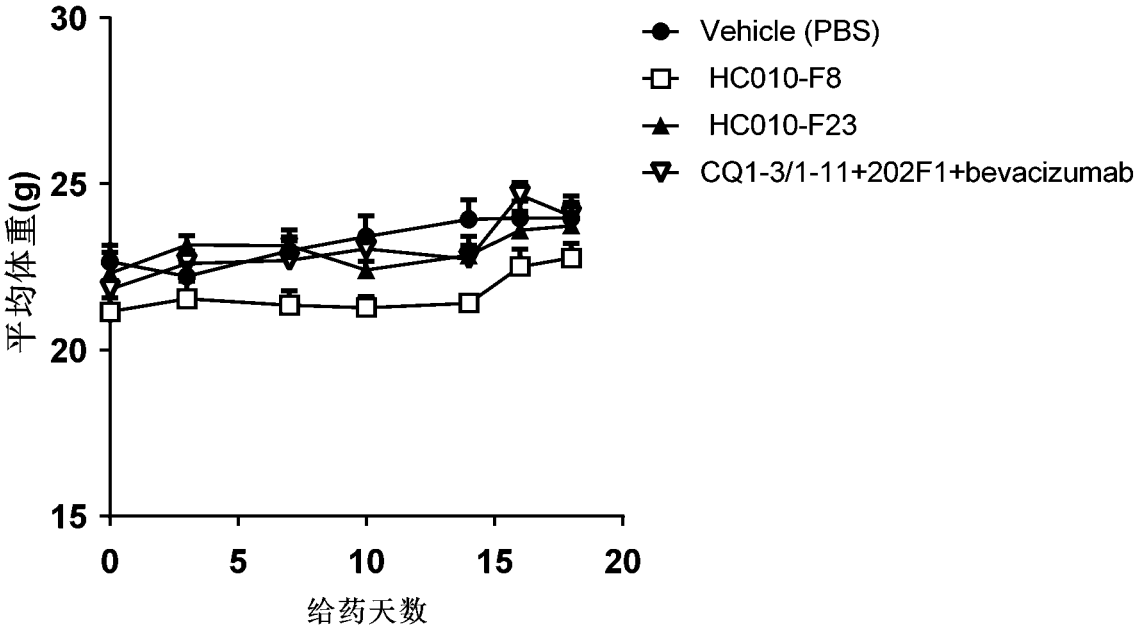

30
25
20
15
平均体重(g)
0
5
10
15
20
给药天数
Vehicle (PBS)
HC010-F8
HC010-F23
CQ1-3/1-11+202F1+bevacizumab

图 17

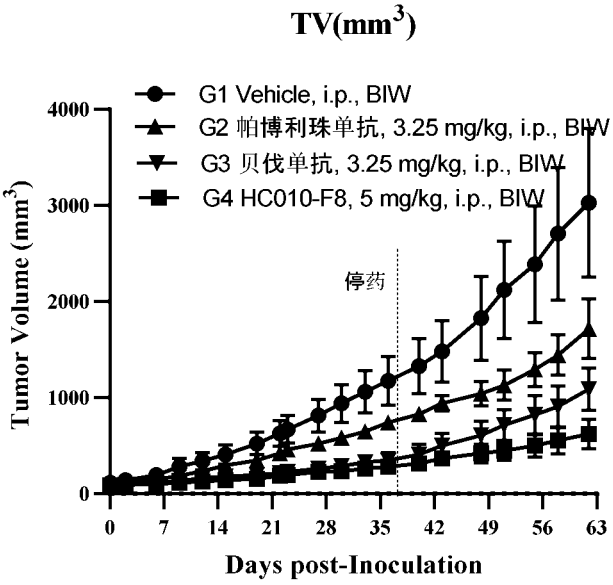
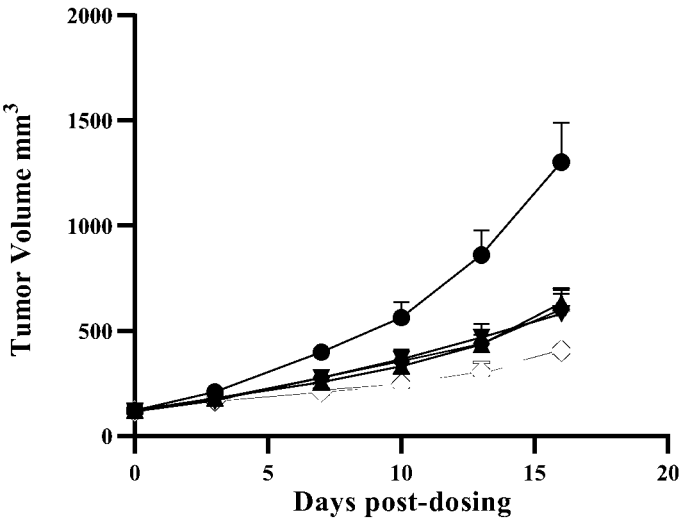



图 18




G1 Vehicle, i.p., BIW
G2 帕博利珠单抗, 10mg/kg, i.p., BIW
G3 贝伐单抗, 10 mg/kg, i.p., BIW
G4 HC010-F8, 15 mg/kg, i.p., BIW
G5 AK112, 13 mg/kg, i.p., BIW
G6 Ipilimumab, 10mg/kg, i.p., BIW
G 7 帕博利珠单抗(10mg/kg)+贝伐单抗(10mg/kg)+Ipilimumab(10 mg/kg), i.p., BIW,

图 19

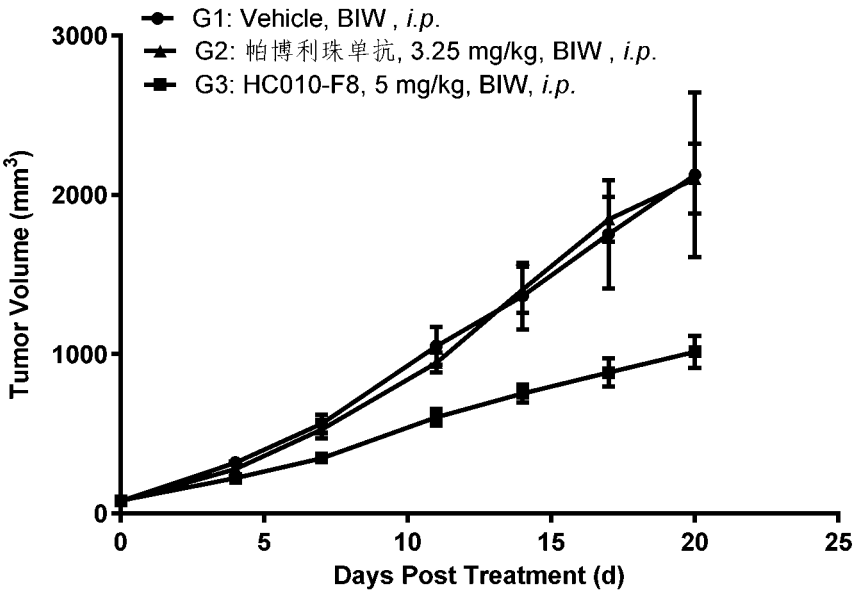

G1: Vehicle, BIW , i.p.
G2: 帕博利珠单抗, 3.25 mg/kg, BIW , i.p.
G3: HC010-F8, 5 mg/kg, BIW, i.p.
Tumor Volume (mm3)
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
Days Post Treatment (d)

图 20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2023/121074**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/46(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; C07K16/18(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)

IPC: C07K, A61K

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)

CNTXT, CNABS, VEN, ENTXT, 万方, WANFANG, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: 三特异性抗体, PD-1, CTLA-4, VEGF, Trispecific antibody

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | US 2017275353 A1 (GENSUN BIOPHARMA INC.) 28 September 2017 (2017-09-28)<br>claim 19, description, paragraphs [0019, 0115-0122] | 1-5, 9-12 (in part), 21-29 (in part) |
| X | CN 110669137 A (BEIJING MIANYI FANGZHOU MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.) 10 January 2020 (2020-01-10)<br>claims 1, 4, description, paragraph [0069] | 1-5, 9-12 (in part), 21-29 (in part) |
| X | CN 113416258 A (GAO, Xin) 21 September 2021 (2021-09-21)<br>claims 1, 4, description, paragraph [0069] | 1-5, 9-12 (in part), 21-29 (in part) |
| A | CN 109069638 A (GENSUN BIOPHARMA INC.) 21 December 2018 (2018-12-21)<br>entire document | 1-29 |
| A | CN 116987196 A (SANYOU BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.) 03 November 2023 (2023-11-03)<br>entire document | 1-29 |
| A | US 2010322933 A1 (TRION PHARMA GMBH) 23 December 2010 (2010-12-23)<br>entire document | 1-29 |

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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 |
|---|---|
| **06 December 2023** | **12 December 2023** |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br>**China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)**<br>**China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** | Authorized officer<br><br>Telephone No. |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
**PCT/CN2023/121074**

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2023/121074**

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **28-29**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 28-29 relate to a method for treatment of a living human or animal body, which falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(IV) for which an international search is not required. In the present report, a search is carried out on the basis of "the use in preparation of a pharmaceutical composition".

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
**Information on patent family members**

International application No.
**PCT/CN2023/121074**

| Patent document cited in search report | | | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | | | Publication date (day/month/year) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| US | 2017275353 | A1 | 28 September 2017 | None | | | |
| CN | 110669137 | A | 10 January 2020 | EP | 3868788 | A1 | 25 August 2021 |
| | | | | EP | 3868788 | A4 | 24 August 2022 |
| | | | | WO | 2021077806 | A1 | 29 April 2021 |
| | | | | AU | 2020371001 | A1 | 10 June 2021 |
| | | | | US | 2021388077 | A1 | 16 December 2021 |
| | | | | KR | 20220087402 | A | 24 June 2022 |
| | | | | JP | 2022553464 | A | 23 December 2022 |
| CN | 113416258 | A | 21 September 2021 | None | | | |
| CN | 109069638 | A | 21 December 2018 | US | 2017275353 | A1 | 28 September 2017 |
| | | | | US | 10894823 | B2 | 19 January 2021 |
| | | | | US | 2021115123 | A1 | 22 April 2021 |
| | | | | EP | 3432927 | A1 | 30 January 2019 |
| | | | | EP | 3432927 | A4 | 20 November 2019 |
| | | | | WO | 2017165681 | A1 | 28 September 2017 |
| CN | 116987196 | A | 03 November 2023 | None | | | |
| US | 2010322933 | A1 | 23 December 2010 | EP | 2192921 | A1 | 09 June 2010 |
| | | | | EP | 2192921 | B1 | 09 November 2016 |
| | | | | US | 8663638 | B2 | 04 March 2014 |
| | | | | WO | 2009030734 | A1 | 12 March 2009 |
| | | | | EP | 2033657 | A1 | 11 March 2009 |

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/121074

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/121074

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项）

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 28−29
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求28−29涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1（Ⅳ）中所列的无需进行国际检索的情形。本报告基于“制备药物组合物中的用途”进行检索。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/121074

A. 主题的分类

C07K16/46(2006.01)i；A61K39/395(2006.01)i；C07K16/18(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)

IPC：C07K，A61K

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））

CNTXT,CNABS,VEN,ENTXT,万方,CNKI,PubMed,GenBank,ISI web of knowledge:三特异性抗体，PD-1，CTLA-4，VEGF，Trispecific antibody

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 | US 2017275353 A1 (GENSUN BIOPHARMA INC) 2017年9月28日 (2017 - 09 - 28)<br>权利要求19，说明书第[0019，0115-0122]段 | 1-5、9-12（部分）、21-29（部分） |
| X | CN 110669137 A (北京免疫方舟医药科技有限公司) 2020年1月10日 (2020 - 01 - 10)<br>权利要求1、4，说明书第[0069]段 | 1-5、9-12（部分）、21-29（部分） |
| X | CN 113416258 A (高新) 2021年9月21日 (2021 - 09 - 21)<br>权利要求1、4，说明书第[0069]段 | 1-5、9-12（部分）、21-29（部分） |
| A | CN 109069638 A (源晟生物制药股份有限公司) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21)<br>全文 | 1-29 |
| A | CN 116987196 A (三优生物医药（上海）有限公司) 2023年11月3日 (2023 - 11 - 03)<br>全文 | 1-29 |
| A | US 2010322933 A1 (TRION PHARMA GMBH) 2010年12月23日 (2010 - 12 - 23)<br>全文 | 1-29 |

☐ 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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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 |
|---|---|
| 2023年12月6日 | 2023年12月12日 |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 | 受权官员<br>刘新蕾<br>电话号码 (+86) 010-53962097 |

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/121074

| 检索报告引用的专利文件 | | | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | | | 公布日<br>(年/月/日) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| US | 2017275353 | A1 | 2017年9月28日 | 无 | | | |
| CN | 110669137 | A | 2020年1月10日 | EP | 3868788 | A1 | 2021年8月25日 |
| | | | | EP | 3868788 | A4 | 2022年8月24日 |
| | | | | WO | 2021077806 | A1 | 2021年4月29日 |
| | | | | AU | 2020371001 | A1 | 2021年6月10日 |
| | | | | US | 2021388077 | A1 | 2021年12月16日 |
| | | | | KR | 20220087402 | A | 2022年6月24日 |
| | | | | JP | 2022553464 | A | 2022年12月23日 |
| CN | 113416258 | A | 2021年9月21日 | 无 | | | |
| CN | 109069638 | A | 2018年12月21日 | US | 2017275353 | A1 | 2017年9月28日 |
| | | | | US | 10894823 | B2 | 2021年1月19日 |
| | | | | US | 2021115123 | A1 | 2021年4月22日 |
| | | | | EP | 3432927 | A1 | 2019年1月30日 |
| | | | | EP | 3432927 | A4 | 2019年11月20日 |
| | | | | WO | 2017165681 | A1 | 2017年9月28日 |
| CN | 116987196 | A | 2023年11月3日 | 无 | | | |
| US | 2010322933 | A1 | 2010年12月23日 | EP | 2192921 | A1 | 2010年6月9日 |
| | | | | EP | 2192921 | B1 | 2016年11月9日 |
| | | | | US | 8663638 | B2 | 2014年3月4日 |
| | | | | WO | 2009030734 | A1 | 2009年3月12日 |
| | | | | EP | 2033657 | A1 | 2009年3月11日 |