



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114072426 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 26

(21) 申请号 202080048963.2
(22) 申请日 2020.07.08
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114072426 A

(72) 发明人 殷刘松 李中道 周铁林 方卓
(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼 唐莉

(43) 申请公布日 2022.02.18
(66) 本国优先权数据
201910609431.0 2019.07.08 CN

(51) Int. Cl.
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.01.04
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2020/100845 2020.07.08

(56) 对比文件
CN 109897111 A, 2019.06.18
WO 2019179434 A1, 2019.09.26
TW 201922781 A, 2019.06.16

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/004480 ZH 2021.01.14

审查员 张锦广

(73) 专利权人 南京金斯瑞生物科技有限公司
地址 211100 江苏省南京市江宁科学园雍
熙路28号

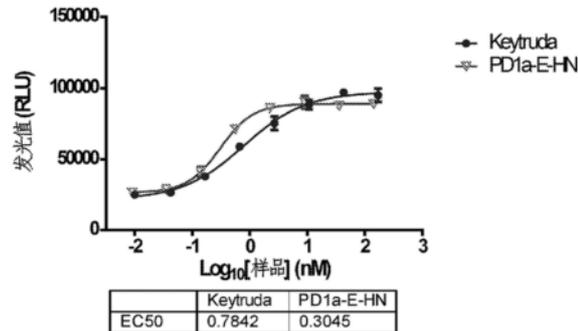
权利要求书2页 说明书21页 附图3页

(54) 发明名称

抗CD47/抗PD-1双特异抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及抗CD47/抗PD-1双特异抗体及其制备方法和应用,所述双特异性抗体包括(a)第一抗原结合部分,包括重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中V_H和V_L形成特异性结合CD47的抗原结合位点;以及(b)第二抗原结合部分,包含特异性结合PD-1的单域抗体(sdAb);其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分相互融合。本发明涉及的双特异抗体能同时阻断两种肿瘤免疫逃逸的方式,因此在肿瘤免疫治疗方面具有较好的效果。



1. 一种分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述双特异性抗原结合蛋白或其片段包括(a)第一抗原结合部分,包括重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合CD47的抗原结合位点;以及(b)第二抗原结合部分,包括特异性结合PD-1的单域抗体(sdAb);其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分相互融合;其中

所述第一抗原结合部分的 V_H 包括重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1、HCDR2和HCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35所示,所述第一抗原结合部分的 V_L 包括轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示;和

所述第二抗原结合部分的单域抗体包括互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中所述CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:39所示、所述CDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示、所述CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示,或所述CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示、所述CDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示、所述CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示。

2. 如权利要求1所述分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第一抗原结合部分是一种全长抗体,包括两条重链和两条轻链,所述重链包括 V_H ,所述轻链包括 V_L 。

3. 如权利要求1所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第二抗原结合部分的C端融合至第一抗原结合部分至少一条重链的N端或第一抗原结合部分至少一条轻链的N端。

4. 如权利要求1所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第二抗原结合部分的N端融合至第一抗原结合部分至少一条重链的C端或第一抗原结合部分至少一条轻链的C端。

5. 如权利要求1所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第一抗原结合部分与第二抗原结合部分是通过肽键或肽接头融合的。

6. 如权利要求5所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述肽接头选自突变的人IgG1铰链区或GS接头。

7. 如权利要求6所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述肽接头的氨基酸序列如SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:48所示。

8. 如权利要求2所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第一抗原结合部分的重链包含SEQ ID NO:4所示氨基酸序列,所述第一抗原结合部分的轻链包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列。

9. 如权利要求1所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第二抗原结合部分包含SEQ ID NO:30或32所示的氨基酸序列。

10. 如权利要求1所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第一抗原结合部分包含人、人源化或嵌合抗体或其片段,所述第二抗原结合部分的单域抗体是骆驼源的、嵌合的、人源化的或人的。

11. 如权利要求1所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述双特异性抗原结合蛋白或其片段包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条重链的C端,其中重链融合多肽包含SEQ ID NO:8、10或24所示氨基酸序列,轻链多肽包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列。

12. 如权利要求1所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述双特异性抗原

结合蛋白或其片段包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的C端融合至抗CD47抗体两条重链的N端,其中重链融合多肽包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14所示氨基酸序列,轻链多肽包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列。

13. 如权利要求1 所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述双特异性抗原结合蛋白或其片段包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条轻链的C端,其中轻链融合多肽包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:18所示氨基酸序列,重链多肽包含SEQ ID NO:4所示氨基酸序列。

14. 如权利要求1 所述的分离的双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述双特异性抗原结合蛋白或其片段包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的C端融合至抗CD47抗体两条轻链的N端,其中轻链融合多肽包含SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22所示氨基酸序列,重链多肽包含SEQ ID NO:4所示氨基酸序列。

15. 一种编码权利要求1-14中任一项所述的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的分离的多核苷酸。

16. 包含权利要求15所述分离多核苷酸的载体。

17. 包含权利要求15所述分离的多核苷酸或权利要求16所述载体的宿主细胞。

18. 一种生产分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的方法,包括在适合的条件下,培养权利要求17所述的宿主细胞,从细胞或细胞培养液中回收抗体或其片段。

19. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-14中任一项所述双特异性抗原结合蛋白或其片段和药学上可接受的载体。

20. 如权利要求1-14中任一项所述抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段、权利要求15所述多核苷酸、权利要求16所述载体以及权利要求17所述宿主细胞在制备与CD47和/或PD-1异常表达相关疾病的药物中的应用。

21. 如权利要求20所述的应用,所述与CD47和/或PD-1异常表达相关疾病是癌症。

22. 如权利要求21所述的应用,所述癌症为实体瘤。

抗CD47/抗PD-1双特异抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于抗体领域,具体涉及双特异性抗体及其制备方法和应用,所述双特异性抗体包含第一抗原结合部分特异性结合CD47,第二抗原结合部分特异性结合PD-1。

背景技术

[0002] 哺乳动物的免疫系统是一套宿主防御系统,使其免受微生物感染和防止癌症发生(Chen et al.,*Frontiers Immunol.*9:320(2018))。免疫系统遍布全身,是一个及其复杂的网络系统,由不同的免疫细胞,特定的组织和器官组成并发挥协同效应。当免疫系统正常发挥功能时,宿主体内病变的细胞就会被从健康的细胞中识别出来并被清除掉,从而保证机体内环境的稳定。因此,保持免疫系统的完整性,对于维持我们自身的健康至关重要。相反地,免疫系统的失控会导致自身免疫疾病,炎症和癌症等(Ribas et al.,*Cancer Discovery* 5:915-9(2015);Yao and Chen,*Eur.J.Immunol.*43:576-9(2013))。免疫系统可以分为两类,即体液免疫和细胞介导的免疫。抗体和其他生物大分子调控体液免疫。与之相对,细胞免疫的调节是通过细胞层面实现的,涉及到巨噬细胞,自然杀伤细胞和抗原特异性杀伤T细胞的活化。

[0003] 活化和抑制免疫应答主要是由两条独立的信号通路调节的(Gorentla and Zhong,*J.Clin.Cell.Immunol.*(2012);Huse,*J.Cell Sci.*122:1269-73(2009);Mizota et al.,*J.Anesthesia* 27:80-7(2013))。第一信号是抗原介导的。当T细胞受体特异性的识别并结合抗原呈递细胞(APC)表面MHC提呈的抗原肽时,产生第一信号。第二信号则由抗原呈递细胞和T细胞表面表达的共刺激分子间的相互作用提供。当第一、第二信号依次被活化后,T细胞才可以杀伤肿瘤。若缺乏第二信号,T细胞将进入无反应状态或免疫耐受,甚至引起细胞程序性死亡。

[0004] 如上所述,第二信号通路对于活化免疫细胞非常重要。具体来讲,共刺激和共抑制受体参与了第二信号通路,对抗原-受体的呈递进行免疫应答和调节,在保持自身抗原免疫耐受的同时,平衡阳性和阴性信号,最大限度地提高对入侵者的免疫反应(Chen and Flies,*Nat.Rev.Immunol.*13:227-42(2013);Ewing et al.,*Int.J Cardiol.*168:1965-74(2013);Liu et al.,*Immunol Invest.*45:813-31(2016);Shen et al.,*Frontiers in Biosci.*24:96-132(2019);Zhang and Vignali,*Immunity* 44:1034-51(2016))。

[0005] CD28是CD28家族的一员,是一种主要的T细胞共刺激受体,在初始CD4⁺和CD8⁺T细胞上组成性表达。CD28受体的配体包括CD80、CD86、程序性死亡1配体(PD-L1)、程序性死亡2配体(PD-L2)等。其中PD-L1是一种跨膜蛋白,它与PD-1的抑制性检查点分子结合,通过传递抑制的“不要找到我”信号来抑制适应性免疫反应。PD-1/PD-L1信号通路在免疫耐受的发展中起着至关重要的作用,防止免疫系统的过度反应,从而避免自身免疫疾病的发生。然而,这通常在癌症进展过程中被解除管制,允许肿瘤细胞通过伪装成健康组织来绕过保护机制。过量表达PD-L1的肿瘤细胞通过激活PD-1/PD-L1抑制信号通路,可逃避T细胞介导的死亡,抑制抗肿瘤适应性免疫反应。人类肿瘤相关巨噬细胞(TAMS)中的PD-1过度表达也被证明能

抑制吞噬和肿瘤免疫。目前,阻断PD-1/PD-L1相互作用的抗PD-1或抗PD-L1单克隆抗体在癌症治疗中效果显著。尽管美国食品和药物管理局批准keytruda、opdivo和tecentriq等抗PD-1或抗PD-L1单克隆抗体用于治疗晚期癌症,但这些抗肿瘤药物只对部分患者产生反应,这暗示着单一的抑制性信号通路的阻断不足以激活免疫应答,还存在着其他机制抑制免疫系统。

[0006] CD47,也被称为整合素相关蛋白,是由CD47基因编码的跨膜蛋白,属于免疫球蛋白超家族。CD47广泛表达于正常细胞表面,可与信号调节蛋白 α (SIRP α)、血小板反应素(TSP1)以及整合素(integrin)相互作用,从而介导细胞凋亡、增殖、免疫等反应。CD47是一种先天免疫检测点受体,与主要表达在巨噬细胞核树突状细胞上的SIRP α 结合后,向巨噬细胞释放出“不要吃我”的信号,抑制吞噬作用,从而避免机体免疫系统攻击。癌细胞通过上调CD47的表达来防止吞噬作用,从而逃避免疫监视。CD47在血液和实体肿瘤中过度表达,这与临床治疗预后差有高度相关性。因此,利用抗CD47抗体或高亲和力SIRP α 变体来阻断CD47-SIRP α 信号通路已成为促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的一种潜在策略。然而,鉴于CD47的广泛表达,抗CD47抗体有很高的风险结合健康细胞,尤其是红细胞,增加血液毒性的风险。同时,越来越多的研究表明,单独阻断CD47并不足以在免疫活性宿主中产生抗肿瘤免疫。此外,斯坦福大学的研究人员报道,SIRP α 治疗干扰CD47/SIRP α 通路不会诱导吞噬作用(Sockolosky et al., PNAS 113:E2646-2654 (2016))。因此,考虑到癌症治疗的有效性和安全性,抗CD47抗体需要进一步的优化以提高肿瘤靶向特异性。

发明内容

[0007] 一方面,本发明提供了一种分离的双特异性结合蛋白,所述蛋白包括第一抗原结合部分特异性结合CD47和第二抗原结合部分特异性结合PD-1。具体地,本发明提供一种分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述双特异性抗原结合蛋白或其片段包括(a)第一抗原结合部分,包括重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合CD47的抗原结合位点;以及(b)第二抗原结合部分,包括特异性结合PD-1的单域抗体(sdAb);其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分相互融合。

[0008] 在一些实施方案中,所述第一抗原结合部分的 V_H 包括重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1、HCDR2和HCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35所示或所示序列分别包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)突变的序列;所述第一抗原结合部分的 V_L 包括轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示或所示序列分别包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)突变的序列。在一些实施方案中,所述第一抗原结合部分的 V_H 包括重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1、HCDR2和HCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35所示或所示序列分别包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)取代的序列;所述第一抗原结合部分的 V_L 包括轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示或所示序列分别包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)取代的序列。在一些具体实施方案中,所述第一抗原结合部分的 V_H 包括重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1、HCDR2和HCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:

34和SEQ ID NO:35所示;所述第一抗原结合部分的 V_L 包括轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,所述LCDR1、LCDR2和LCDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示。

[0009] 在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分的单域抗体包括互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:39或42所示或所示序列包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)突变的序列、所述CDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:40或43所示或所示序列包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)突变的序列和所述CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:41或44所示或所示序列包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)突变的序列。在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分的单域抗体包括互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:39或42所示或所示序列包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)取代的序列、所述CDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:40或43所示或所示序列包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)取代的序列和所述CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:41或44所示或所示序列包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)取代的序列。在一些具体实施方案中,所述第二抗原结合部分的单域抗体包括互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO:39或42所示,所述CDR2氨基酸序列如SEQ ID NO:40或43所示和所述CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO:41或44所示。在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分的单域抗体包括互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41所示或所示序列分别包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)取代的序列。在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分的单域抗体包括互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44所示或所示序列分别包含至多三个氨基酸(3个、2个或1个)取代的序列。在一些具体实施方案中,所述第二抗原结合部分的单域抗体包括互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41所示。在一些具体实施方案中,所述第二抗原结合部分的单域抗体包括互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44所示。

[0010] 在一些实施方案中,所述第一抗原结合部分是一种全长抗体,包括两条重链和两条轻链,所述重链包括 V_H ,所述轻链包括 V_L 。

[0011] 在一些实施方案中,所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分是融合的。在一些具体的实施方案中,所述第二抗原结合部分的C端融合至第一抗原结合部分至少一条重链的N端或第一抗原结合部分至少一条轻链的N端。在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分的N端融合至第一抗原结合部分至少一条重链的C端或第一抗原结合部分至少一条轻链的C端。

[0012] 在一些实施方案中,所述第一抗原结合部分与第二抗原结合部分是通过肽键或肽接头融合的。在一些实施方案中,所述肽接头选自突变的人IgG1铰链区或GS接头。在一些优选实施方案中,所述肽接头的氨基酸序列如SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:48所示。

[0013] 在一些实施方案中,所述第一抗原的结合部分的重链包含与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列,所述第一抗原结合部分的轻链包含与SEQ ID NO:6所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、

97%、98%或99%一致性的序列。在一些实施方案中,所述第一抗原结合部分的重链包含与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列至少95%一致性的序列,所述第一抗原结合部分的轻链包含与SEQ ID NO:6所示氨基酸序列至少95%一致性的序列。在一些具体实施方案中,所述第一抗原结合部分的重链包含如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列,所述第一抗原结合部分的轻链包含如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分包含与SEQ ID NO:30或32所示的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列。在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分包含与SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列至少95%一致性的序列。在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分包含与SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列至少95%一致性的序列。在一些具体的实施方案中,所述第二抗原结合部分包含如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一些具体的实施方案中,所述第二抗原结合部分包含如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第一抗原结合部分的重链包含与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列,所述第一抗原结合部分的轻链包含与SEQ ID NO:6所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列;以及所述第二抗原结合部分包含与SEQ ID NO:30或32所示的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列。在一些实施方案中,提供了一种分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第一抗原结合部分的重链包含与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列,所述第一抗原结合部分的轻链包含与SEQ ID NO:6所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列;以及所述第二抗原结合部分包含与SEQ ID NOs:30所示的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第一抗原结合部分的重链包含如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列,所述第一抗原结合部分的轻链包含如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列;以及所述第二抗原结合部分包含如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第一抗原结合部分的重链包含与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列,所述第一抗原结合部分的轻链包含与SEQ ID NO:6所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列;以及所述第二抗原结合部分包含与SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,所述第一抗原结合部分的重链包含如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列,所述第一抗原结合部分的轻链包含如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列;以及所述第二抗原结合部分包含如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,所述第一抗原结合部分包含人、人源化或嵌合抗体或其片段。在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分包含特异性结合PD-1的单域抗体,所述单域抗体是骆驼源的、嵌合的、人源化的或人的。

[0017] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条重链的C端,其中重链融合多肽包含与SEQ ID NO:8、10或24所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列,轻链多肽包含与SEQ ID NO:6所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条重链的C端,其中重链融合多肽包含如SEQ ID NO:8、10或12所示的氨基酸序列,轻链多肽包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条重链的C端,其中重链融合多肽包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,轻链多肽包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条重链的C端,其中重链融合多肽包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,轻链多肽包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条重链的C端,其中重链融合多肽包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,轻链多肽包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,提供了又一种分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的C端融合至抗CD47抗体两条重链的N端,其中重链融合多肽包含与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列,轻链多肽包含与SEQ ID NO:6所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的C端融合至抗CD47抗体两条重链的N端,其中重链融合多肽包含如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,轻链多肽包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的C端融合至抗CD47抗体两条重链的N端,其中重链融合多肽包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,轻链多肽包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的C端融合至抗CD47抗体两条重链的N端,其中重链融合多肽包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,轻链多肽包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施方案中,提供了一种分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条轻链的C端,其中轻链融合多肽包含与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:18所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列,重链多肽包含与SEQ ID

NO:4所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条轻链的C端,其中轻链融合多肽包含如SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,重链多肽包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条轻链的C端,其中轻链融合多肽包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,重链多肽包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的N端融合至抗CD47抗体两条轻链的C端,其中轻链融合多肽包含如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,重链多肽包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方案中,提供了又一种分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的C端融合至抗CD47抗体两条轻链的N端,其中轻链融合多肽包含与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列,重链多肽包含与SEQ ID NO:4所示氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的C端融合至抗CD47抗体两条轻链的N端,其中轻链融合多肽包含如SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,重链多肽包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的C端融合至抗CD47抗体两条轻链的N端,其中轻链融合多肽包含如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列,重链多肽包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中,所述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段,包括抗CD47抗体和抗PD-1单域抗体,所述抗PD-1单域抗体的C端融合至抗CD47抗体两条轻链的N端,其中轻链融合多肽包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,重链多肽包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0021] 另一方面,本发明提供了一种编码上述抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的分离的多核苷酸。根据本领域技术人员公知的,改变(如,替换、删除等)编码蛋白的序列不会改变蛋白的氨基酸。在一些实施方案中,编码上述抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的轻链融合蛋白包含与SEQ ID NO:7、9、11、13或23所示核苷酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列,编码上述抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的轻链包含SEQ ID NO:5所示核苷酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列。在一些具体实施方案中,编码上述抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的轻链融合蛋白包含如SEQ ID NO:7、9、11、13或23所示核苷酸序列,编码上述抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的轻链融合蛋白包含如SEQ ID NO:5所示核苷酸序列。在一些实施方案中,编码上述抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的轻链融合蛋白包含与SEQ ID NO:15、17、19或21所示核苷酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列,编码上述抗CD47/抗

PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的重链包含SEQ ID NO:3所示核苷酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的序列。在一些具体实施方案中,编码上述抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的轻链融合蛋白包含如SEQ ID NOs:15、17、19或21所示核苷酸序列,编码上述抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的轻链包含如SEQ ID NO:3所示核苷酸序列。

[0022] 进一步,提供了包含上述编码分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的分离多核苷酸的载体。本领域技术人员公知的载体,如质粒、噬菌体载体或病毒载体。在一些具体实施方案中,所述载体是重组表达载体,如质粒。这些载体包括任意元件以支撑其常规表达载体的功能,如,包括启动子、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择性标记以及复制起点。其中启动子可以是常规启动子、诱导启动子或可抑制启动子。本领域公知许多表达载体能够将核酸传递至细胞内,并且能用于在细胞内产生抗体或其抗原结合片段。根据本发明实施例中的方法,常规的克隆技术或人工基因合成均可用于产生重组表达载体。

[0023] 进一步,提供了包含上述分离的多核苷酸或载体的宿主细胞。在本发明从任何本领域常规的宿主细胞均可用于抗体或其抗原结合片段的表达。在一些实施方案中,所述宿主细胞是E.coli TG1或BL21(用于表达如scFv或Fab抗体),CHO-DG44、CHO-3E7、CHO-K1或者HEK293。按照特定实施例,通过常规方法(如化学转染、热转染或电转染等方法)将重组表达载体转染入宿主细胞,稳定整合到宿主细胞基因组,因此能有效表达重组的核酸。

[0024] 另一方面,本发明提供了一种生产分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段的方法,包括在适合的条件下,培养包含编码本发明双特异性抗原结合蛋白或其片段的多核苷酸的宿主细胞,从细胞或细胞培养液中回收抗体或其片段。表达抗体或其片段的可以从细胞中获取或者本领域常规的方法进行提取纯化。

[0025] 另一方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含上述分离的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段和药学上可接受的载体。所述“药学上可接受的载体”指可以安全地进行施用的固体或液体稀释剂、填充剂、抗氧化剂、稳定剂等物质,这些物质适合于人和/或动物给药而无过度的不良副反应,同时适合于维持位于其中的药物或活性剂的活力。依照给药途径,可以施用本领域众所周知的各种不同的载体,包括,但不限于糖类、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽糖、明胶、滑石、硫酸钙、植物油、合成油、多元醇、藻酸、磷酸缓冲液、乳化剂、等渗盐水、和/或无热原水等。本发明所提供的药物组合物可以制成粉末、注射剂等临床可接受的剂型。可以使用任何适当的途径向受试者施用本发明的药物组合物,例如可通过口服、静脉内输注、肌肉内注射、皮下注射、腹膜下、直肠、舌下,或经吸入、透皮等途径给药。

[0026] 另一方面,本发明提供了一种治疗患有或有风险患有与CD47和/或PD-1异常表达相关疾病的受试者的方法,包括给受试者施用有效量的任何上述的药物组合物。

[0027] 另一方面,本发明提供了所述抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白或其片段、多核苷酸、载体、宿主细胞在制备与CD47和/或PD-1异常表达相关疾病的药物中的应用。

[0028] 在一些实施方案中,所述与CD47和/或PD-1相关的疾病是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是实体瘤,例如结直肠癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈癌、霍奇金淋巴瘤、肝细胞癌、晚

期肾癌、尿路上皮癌和宫颈癌等。在优选地实施方案中,所述癌症是实体瘤,例如胰腺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、乳腺癌、胃癌、结直肠癌、头颈癌、霍奇金淋巴瘤、肝细胞癌、晚期肾癌、尿路上皮癌和宫颈癌。

[0029] 在一些实施方案中,上述方法进一步包括给个体施用额外的肿瘤治疗,例如手术、放射治疗、化疗、免疫疗法、激素疗法或其组合。

[0030] 本发明中,PD-1单域抗体以特定的连接方式连接至抗CD47单克隆抗体的重链或轻链的末端,所产生的抗CD47/抗PD-1双特异性抗原结合蛋白对PD-1抗原的亲合力明显增加,同时,这种双特异抗体对PD-1阻断的生物活性也明显增强,这说明双特异抗体对PD-1抗原亲和力的增加能增强相应的生物活性。同时,这种双特异抗体也能阻断CD47信号通路,所以能同时阻断两种肿瘤免疫逃逸方式。

[0031] 术语解释

[0032] “抗原结合蛋白片段”意即抗体的片段及抗体类似物,其通常包括至少部分母体抗体(parental antibody)的抗原结合区或可变区(例如一个或多个CDR)。抗体片段保留母体抗体的至少某些结合特异性。例如,能够结合CD47或其部分的抗原结合蛋白片段,包括但不限于sdAb(单域抗体)、Fab(例如,抗体经木瓜蛋白酶消化而得到)、F(ab')₂(例如,通过胃蛋白酶消化得到)、Fv或scFv(例如通过分子生物学技术得到)。

[0033] “单域抗体(sdAb)”是指具有三个互补决定区(CDRs)的单抗原结合多肽。这些单域抗体单独能够结合抗原而不用配对相应包含CDR的多肽。在一些情况下,单域抗体是从骆驼的重链抗体中人工工程制作出来的,称为“V_HH区段”。软骨鱼也有重链抗体(IgNAR,免疫球蛋白新抗原感受器Immunoglobulin new antigen receptor的缩写),从该类抗体也可以制作出称为“V_{NAR}区段”的单域抗体。骆驼科sdAb是公知的一种最小的抗原结合抗体片段(参见e.g.,Hamers-Casterman et al.,Nature 363:446-8(1993);Greenberg et al.,Nature 374:168-73(1995);Hassanzadeh-Ghassabeh et al.,Nanomedicine(Lond),8:1013-26(2013))。基本的V_HH从N端到C端具有如下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1到FR4分别是框架区1到4,和CDR1到CDR3是指互补决定区1到3。本发明中涉及的抗PD-1单域抗体是指能特异性结合PD-1的单域抗体,特别是结合人PD-1的单域抗体。本发明所述的抗PD-1单域抗体可选自专利申请PCT/CN2019/071691中具体描述的抗PD-1单域抗体。本发明所述抗PD-1单域抗体的构建、表达、提取及纯化方法可参考专利申请PCT/CN2019/071691。

[0034] “全长抗体”是指具有四条全长链的抗体,包括包含Fc区的重链和轻链。本发明中涉及的抗CD47抗体是指能特异性结合CD47的抗体,特别是结合人CD47的抗体。本发明所述抗CD47抗体可选自PCT/CN2019/072929中具体描述的抗CD47抗体。本发明所述抗CD47抗体的构建、表达、提取及纯化方法可参考专利申请PCT/CN2019/072929。

[0035] “突变”是指抗原结合蛋白或蛋白片段包含一个或多个(数个)位置的一个或多个(数个)氨基酸残基的变更,即取代、插入和/或缺失的多肽。取代是指用不同的氨基酸替代占据某位置的氨基酸;缺失是指除去占据某位置的氨基酸;而插入是指在占据某位置的氨基酸邻接处且在之后添加1-5个氨基酸。

[0036] “氨基酸序列一致性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分,候选序列中与特定肽或多肽

序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。可以本领域技术范围内的多种方式进行序列对比以测定百分比氨基酸序列同一性,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MegaAlign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可决定测量对比的适宜参数,包括对所比较的序列全长获得最大对比所需的任何算法。

[0037] “GS接头”是指甘氨酸(G)和丝氨酸(S)的GS组合,用于将多个蛋白连接在一起形成融合蛋白。常用的GS组合是(GGGGS)_n,通过改变n的大小来改变接头序列的长度,其中,大部分GS组合采用(GGGGS)₃。同时,甘氨酸和丝氨酸还可以通过其他组合产生不同的接头序列,比如在本发明中使用的G15-linker,GS组合为GGGSGGGSGGGGS。

附图说明

- [0038] 图1显示了流式细胞仪测定样品与表达人PD-1的CHO-K1细胞之间的亲和力;
- [0039] 图2显示了流式细胞仪测定样品与表达CD47的CHO-K1细胞之间的亲和力;
- [0040] 图3显示了PD-1/PD-L1阻断生物测定系统测定样品的PD-1阻断活性;
- [0041] 图4显示了PD-1/PD-L1阻断生物测定系统测定样品的PD-1阻断活性;
- [0042] 图5显示了抗CD47抗体的细胞吞噬实验测试双特异抗体PD1a-E-HN的活性。

具体实施方式

[0043] 下面结合具体实施方式,详细描述本发明。应理解,这些实施方式仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。除非另有说明,下文描述的实施例的方法和材料均为可以通过市场购买获得的常规产品。

[0044] 实施例1构建和表达抗CD47/抗PD-1双特异性抗体

[0045] 我们使用抗CD47单克隆抗体(mAb)(抗体的CDR区及全长的核苷酸及氨基酸序列见表1)和2个PD-1单域抗体(sdAb)(抗体的CDR区及全长的核苷酸及氨基酸序列见表2),设计了一系列抗CD47/抗PD-1双特异性抗体,其中PD-1单域抗体通过两种接头序列(E-linker:EPKSSDKTHTSPSP或G15-linker:GGGSGGGSGGGGS)分别融合到抗CD47单克隆抗体重链或轻链的N或C端。每个双特异抗体结构由两条相同的融合多肽链和两条相同的天然多肽链组成,表达每个多肽链的DNA序列插入EcoRI和HindIII限制位点之间的pTT5载体上。每个质粒还包括分泌到生长培养基的蛋白质的分泌信号序列。将PD-1单域抗体融合到具有位点突变(S28P和L235E)的IgG4-Fc部分的N端,作为体外生物活性测定的对照。表达双特异抗体蛋白的质粒如表3所示。

[0046] 表1:抗CD47单克隆抗体的DNA和氨基酸序列

[0047]

	DNA 序列					SEQ ID NO:
抗 CD47 抗体的重链 DNA 序列	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGATCCAGC GTGAAGGTGAGCTGCAAGGCTAGCGGCTACTCTTTCACCCACCATTGGATCC ACTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCATGATCG ACGTTCCGATAGCGAGACAAGACTGTCTCAGAAGTTAAGGACCCGCTGAC CATCACAGCCGATAAGTCTACCTCCACAGCTTACATGGAGCTGTCTCCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTAATAATTGTGCTAGGCTGGGCCGGTACTATT TCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGAGCTCTGCCAGCACAAA GGGCCCTTCCGTGTTCCCACTGGCTCCCTGCTCCAGAAGCACATCTGAGTCCA CCGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCAGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGCACCCTGACATCTGGCGTGACACCTTCCAGCTGTG CTGCAGTCCAGCGGCCTGTAATCCCTGTCTCCGTGGTGACAGTGCCCAGCTC TTCCCTGGGCACCAAGACATATACCTGCAACGTGGACCATAAGCCTTCCAAT ACCAAGGTGGATAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGACCACCTTGGCCACCA TGTCAGCTCCTGAGTTTGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCTCCAAA GCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACACCTGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGTCTCAGGAGGATCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATG GCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCAAGAGAGGAGCAGTTTAATT CCACATACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCTGCTGCATCAGGATTGGCTGAA CGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCAGCTCTATC GAGAAGACAATCAGCAAGGCTAAGGGACAGCCTAGGGAGCCACAGGTGTAC ACCCTGCCCTTCTCAGGAGGAGATGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCT GTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCTAA TGGCCAGCCCGAGAACAATTACAAGACCACACCACCCGTGCTGGACTCTGAT GGCTCCTTCTTCTGTATTCTAGGCTGACAGTGGATAAGTCCCGTGGCAGG AGGGCAACGTGTTTAGCTGCTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATT TACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCTGGGCAAG					3
抗 CD47 抗体的重链氨基酸序列 H0	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTHHWIHWVRQAPGQGLEWMGMID ASDSETRLSQQKFKDRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLGRYYFDY WGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPAPEFEGGPPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHLEALH NHYTQKSLSLSLGK					4
抗 CD47 抗体的轻链 DNA 序列	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACACTGTCTCTGTCCCCAGGAGAGA GGGCCACCCTGAGCTGCCGGGCTTCTGAGAACGTGGGCACATACATCTCCTG GTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCTAGGCTGCTGATCTACGGCGTACG AATAGATATAACCGCATCCCTGCTCGCTCAGCGGATCTGGATCCGGCACAG ACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGGAGCCAGAGGATTTCCCGTGTACTA TTGTGGCGAGTCTACGGCCACCTGTATAACCTTGGCGGGCCACAAAGGTG GAGATCAAGCGAACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTTGTGTGCTGCTGTAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCCAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT					5
抗 CD47 抗体的轻链氨基酸序列 L0	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASENVGTYSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRY TGIPARFSGSGSDFDLITISSLEPEDFAVYYCGESYGHLYTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC					6
	CDR1 序列	SEQ ID NO:	CDR2 序列	SEQ ID NO:	CDR3 序列	SEQ ID NO:
抗 CD47	GYSFTHHWIH	33	MIDASDSETRLSQQKFKD	34	LGRYYFDY	35

	抗体重链 CDR 序列					
[0048]	抗 CD47 抗体轻链 CDR 序列	RASENVGTYIS	36	GASNRYT	37	GESYGHLYT 38

[0049] 表2:PD-1单域抗体的DNA和氨基酸序列

	序列	SEQ ID NO:				
[0050]	PD-1a 单域抗体的 DNA 序列	29				
	PD-1a 单域抗体氨基酸序列	30				
	PD-1b 单域抗体的 DNA 序列	31				
	PD-1b 单域抗体氨基酸序列	32				
	CDR1 序列	SEQ ID NO: 39	CDR2 序列	SEQ ID NO: 40	CDR3 序列	SEQ ID NO: 41
	PD-1a 单域抗体 CDR 氨基酸序列	GNIYNRNF MG	AIYTGTSRITYYADSVKG		DLRDGFWDTGWNT	
	PD-1b 单域抗体 CDR 氨基酸序列	GNIYNRNF MG	AIYTGTSRITYYADSVKG		DLREGFWDTGWNT	

[0051] CHO-3E7宿主细胞在转染了表达质粒后,在37℃和100rpm的培养箱中培养6天。采用离心法提取上清液,用Protein A柱纯化双特异抗体蛋白。

[0052] 如上所述,抗CD47单克隆抗体由重链H0和轻链L0组成.PD-1单域抗体通过两种接头序列(E-linker:EPKSSDKTHTSPSP或G15-linker:GGGSGGGSGGGGS)连接到抗CD47单克隆抗体重链或轻链的N或C端,从而产生一系列不同的双特异抗体.首先使用E-linker接头序列构建产生以下融合蛋白:(1)将两个单域抗体PD1a和PD1b分别与H0重链的C端融合,产生新的多肽,分别称为H1和H2;(2).将两个单域抗体PD1a和PD1b分别与H0重链的N端融合,形成新的多肽,分别称为H3和H4;(3).将两个单域抗体PD1a和PD1b分别与L0轻链的C端融合,形成新的多肽,分别称为L1和L2;(4).将两个单域抗体PD1a和PD1b分别与L0轻链的N端融合,形成新的多肽,分别称为L3和L4.类似地,接着使用G15-linker接头序列构建产生以下融合蛋白:将单域抗体PD1a与H0重链的C端融合,产生新的多肽,称为H5。

[0053] 将这些构建的重链融合蛋白H1,H2,H3,H4和H5,分别与未经改造的亲本轻链多肽链L0组合,或者将这些构建的轻链融合蛋白L1,L2,L3和L4,分别与未经改造的重链多肽链H0组合从而产生一系列双特异抗体。将重链融合蛋白H1与亲本轻链L0组合产生双特异抗体PD1a-E-HC,将重链融合蛋白H2与亲本轻链L0组合产生双特异抗体PD1b-E-HC,将重链融合蛋白H3与亲本轻链L0组合产生双特异抗体PD1a-E-HN,将重链融合蛋白H4与亲本轻链L0组合产生双特异抗体PD1b-E-HN,将重链融合蛋白H5与亲本轻链L0组合产生双特异抗体PD1a-G15-HC,将轻链融合蛋白L1与亲本重链H0组合产生双特异抗体PD1a-E-LC,将轻链融合蛋白L2与亲本重链H0组合产生双特异抗体PD1b-E-LC,将轻链融合蛋白L3与亲本重链H0组合产生双特异抗体PD1a-E-LN,将轻链融合蛋白L4与亲本重链H0组合产生双特异抗体PD1b-E-LN。

[0054] 通过位点突变(S228P和L235E)将人的IgG4的Fc改造,然后将两个单域抗体PD1a和PD1b分别与人的IgG4的Fc部分的N端连接,产生了新的融合蛋白H6和H7,从而构建了Fc融合蛋白sdAb-PD1a-IgG4PE和sdAb-PD1b-IgG4PE。

[0055] 表3:构建双特异抗体的质粒和蛋白

蛋白	组件	质粒	氨基酸 SEQ ID NO:
CD47	H0	pTT5-CD47HC	4
	L0	pTT5-CD47LC	6
PD1a-E-HC	H1	pTT5-CD47HC-E-PD1a	8
	L0	pTT5-CD47LC	6
PD1b-E-HC	H2	pTT5-CD47HC-E-PD1b	10
	L0	pTT5-CD47LC	6
PD1a-E-HN	H3	pTT5-PD1a-E-CD47HC	12
	L0	pTT5-CD47LC	6
PD1b-E-HN	H4	pTT5-PD1b-E-CD47HC	14
	L0	pTT5-CD47LC	6
PD1a-E-LC	L1	pTT5-CD47LC-E-PD1a	16
	H0	pTT5-CD47HC	4
PD1b-E-LC	L2	pTT5-CD47LC-E-PD1b	18
	H0	pTT5-CD47HC	4
PD1a-E-LN	L3	pTT5-PD1a-E-CD47LC	20
	H0	pTT5-CD47HC	4
PD1b-E-LN	L4	pTT5-PD1b-E-CD47LC	22
	H0	pTT5-CD47HC	4
PD1a-G15-HC	H5	pTT5-CD47HC-G15-PD1a	24
	L0	pTT5-CD47LC	6
sdAb-PD1a-IgG4PE	H6	pTT5-sdAb-PD1a-IgG4PE	26
sdAb-PD1b-IgG4PE	H7	pTT5-sdAb-PD1b-IgG4PE	28

[0056] [0057] 分泌信号肽的DNA序列(SEQ ID NO:1)

[0058] ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGTGCACTCC

[0059] 分泌信号肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)

[0060] MGWSCIIFLVATATGVHS

[0061] 多肽链H0的DNA序列(SEQ ID NO:3)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGATCCAGCGTGAAGGTGAGCTGC
 AAGGCTAGCGGCTACTCTTTCACCCACCATTGGATCCACTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGACAGGGAC
 TGGAGTGGATGGGCATGATCGACGCTTCCGATAGCGAGACAAGACTGTCTCAGAAGTTAAGGACC
 GCGTGACCATCACAGCCGATAAGTCTACCTCCACAGCTTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGATCCGA
 GGACACCGCCGTGTAATAATTGTGCTAGGCTGGGCCGGTACTATTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACC
 ACAGTGACAGTGAGCTCTGCCAGCACAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCACTGGCTCCCTGCTCCAGAA
 GCACATCTGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCAGTGACCGT
 GTCTTGGAACAGCGGCGCCCTGACATCTGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGC
 CTGTACTCCCTGTCTTCCGTGGTGCAGTGCCAGCTCTTCCCTGGGCACCAAGACATATACCTGCA
 ACGTGGACCATAAGCCTTCCAATACCAAGGTGGATAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGACCACCT
 GCCCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTTGGAGGGAGGACCATCCGTGTTCCCTGTTTCCCAAAGCCTAA
 GGACACCCTGATGATCAGCCGGACACCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCAGGAGGA
 TCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCAAG
 AGAGGAGCAGTTTAATTCCACATAACCGCGTGGTGGCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 AACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCAGCTCTATCGAGAAGACAATC
 AGCAAGGCTAAGGGACAGCCTAAGGGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCTTCTCAGGAGGAGATG
 ACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCTGTGGAGT
 GGGAGTCTAATGGCCAGCCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCACCCGTGCTGGACTCTGATGGCT
 CCTTCTTTCTGTATTCTAGGCTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTGTTTAGCTG
 CTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTATACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCTGGGCAAG

[0062]

多肽链H0的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)

EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYSFTHHWIHWVRQAPGQGLEWMGMIDASDSETRLSQKFKDR
 VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLGRYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
 STAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPS
 NTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVY
 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK

[0064]

多肽链L0的DNA序列 (SEQ ID NO:5)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACACTGTCTCTGTCCCCAGGAGAGAGGGCCACCCTGAGCT
 GCCGGGCTCTGAGAACGTGGGCACATACATCTCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCTA
 GGCTGCTGATCTACGGCGCTAGCAATAGATATAACGGCATCCCTGCTCGCTTACAGCGGATCTGGATC
 CGGCACAGACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGGAGCCAGAGGATTTCCGCGTACTATTGTGGC
 GAGTCTACGGCCACCTGTATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAGCGAACGGTGGCT
 GCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTG
 CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
 GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA
 CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAGG
 GCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0066]

多肽链L0的氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASENVGTYISWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGIPARFSGSGSGTDF
 LTISSELPEDFAVYYCGESYGHLYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GEC

[0068]

多肽链H1的DNA序列 (SEQ ID NO:7)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGATCCAGCGTGAAGGTGAGCTGC
 AAGGCTAGCGGCTACTCTTTCACCCACCATTGGATCCACTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGACAGGGAC
 TGGAGTGGATGGGCATGATCGACGCTTCCGATAGCGAGACAAGACTGTCTCAGAAGTTAAGGACC
 GCGTGACCATCACAGCCGATAAGTCTACCTCCACAGCTTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGATCCGA
 GGACACCGCCGTGTAATAATTGTGCTAGGCTGGGCCGGTACTATTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACC
 ACAGTGACAGTGAGCTCTGCCAGCACAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCACTGGCTCCCTGCTCCAGAA
 GCACATCTGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCAGTGACCGT
 GTCTTGGAACAGCGGCGCCCTGACATCTGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGC
 CTGTACTCCCTGTCTTCCGTGGTGCAGTGCCAGCTCTTCCCTGGGCACCAAGACATATACCTGCA

[0070]

ACGTGGACCATAAGCCTTCCAATACCAAGGTGGATAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGACCACCT
 GCCCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTTGGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAA
 GGACACCCTGATGATCAGCCGGACACCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCAGGAGGA
 TCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCAAG
 AGAGGAGCAGTTTAATTCCACATAACCGCGTGGTGAGCGTGTGACCGTGTGCATCAGGATTGGCTG
 AACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCAGCTCTATCGAGAAGACAATC
 AGCAAGGCTAAGGGACAGCCTAGGGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCTTCTCAGGAGGAGATG
 ACAAAGAACCAGGTGCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCTGTGGAGT
 GGGAGTCTAATGGCCAGCCCAGAAACAATTACAAGACCACACCACCCGTGCTGGACTCTGATGGCT
 CCTTCTTTCTGTATTCTAGGCTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTGTTTAGCTG
 CTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTATAACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCTGGGCAAG
 GAACCTAAGTCTAGCGACAAAACCTCATAACAGCCCCCTAGTCCAGAAGTGCAGCTGGTGGAACTCT
 GCGCGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGTGTCCGGCAACATCTACA
 ACCGGAACCTCATGGGCTGGTCCGGCAGGCCCCGGAAAAGGCCGGAAGGCGTGTCCGCCATCT
 ACEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKISKAKGQPREPQVY
 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLKGKEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA
 VSGNIYNRNFMGWFRQAPGKREGVSAIYTGTSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY
 CAADLRDGFWDVTGVWNTWGQGLVTVSS

[0071]

[0072] 多肽链H1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)

EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYSFTHHWIHWVRQAPGQGLEWMGMIDASDSETRLSQKFKDR
 VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLGRYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
 STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPS
 NTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKISKAKGQPREPQVY
 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLKGKEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA
 VSGNIYNRNFMGWFRQAPGKREGVSAIYTGTSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY
 CAADLRDGFWDVTGVWNTWGQGLVTVSS

[0073]

[0074] 多肽链H2的DNA序列 (SEQ ID NO:9)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGATCCAGCGTGAAGGTGAGCTGC
 AAGGCTAGCGGCTACTCTTCCACCCACCATTGGATCCACTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGACAGGGAC
 TGGAGTGGATGGGCATGATCGACGCTCCGATAGCGAGACAAGACTGTCTCAGAAGTTAAGGACC
 GCGTGACCATCACAGCCGATAAGTCTACCTCCACAGCTTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGATCCGA
 GGACACCGCCGTGACTATTGTGCTAGGCTGGGCCGGTACTATTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACC
 ACAGTGACAGTGCAGCTCTGCCAGCACAAGGGCCCTTCCGTGTTCCACTGGCTCCCTGCTCCAGAA
 GCACATCTGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCAGTGACCGT
 GTCTTGGAACAGCGGCGCCCTGACATCTGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGC
 CTGTACTCCCTGTCTTCCGTGGTGCAGTGCACAGCTTCCCTGGGCACCAAGACATACCTGCA
 CTGTGGACCATAAGCCTTCCAATACCAAGGTGATAAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGACCACCTT
 GCCCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTTGGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAA
 GGACACCCTGATGATCAGCCGGACACCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCAGGAGGA
 TCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCAAG
 AGAGGAGCAGTTTAATTCCACATAACCGCGTGGTGAGCGTGTGACCGTGTGCATCAGGATTGGCTG
 AACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCAGCTCTATCGAGAAGACAATC
 AGCAAGGCTAAGGGACAGCCTAGGGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCTTCTCAGGAGGAGATG
 ACAAAGAACCAGGTGCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCTGTGGAGT
 GGGAGTCTAATGGCCAGCCCAGAAACAATTACAAGACCACACCACCCGTGCTGGACTCTGATGGCT
 CCTTCTTTCTGTATTCTAGGCTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTGTTTAGCTG
 CTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTATAACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCTGGGCAAG
 GAACCTAAGTCTAGCGACAAAACCTCATAACAGCCCCCTAGTCCAGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCT
 GGCGGTGGCCCTGGTTACAGCCCGGCGGCTCCCTGCGGCTGAGCTGCGCCGTGTCCGGCAACATCTACA
 ACAGAAACTTCATGGGCTGGTTTAGACAGGCTCCTGGCAAGGGACTGGAAGGCGTGTCCGCCATCT
 ACACCGGCACCTCTCGGACTTACTACGCGGACTCTGTCAAGGGCAGATTACCATCTCCCGGGACAA
 CTCCAAGAACACAGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATACCCGTGTGTACTACTG
 CGCTGCTGATCTGAGAGAGGGCTTCTGGGACACCGGCGTGTGGAATACCTGGGGCCAGGGCACCT
 GGTGACCGTGTCTTCT

[0075]

[0076] 多肽链H2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:10)

EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYSFTHHWIHWVRQAPGQGLEWMGMIDASDSETRLSQKFKDR
 VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLGRYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE

[0077]

[0078] STAALGLCLKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPS
 NTKVDKRVESKYGPPPCPPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVY
 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKEPKSSDKTHTSPSPPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGN
 IYNRNFMGWFRQAPGKLEGVSAIYTGTSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYY
 CAADLREGFWDGTGVWNTWGQGLTVTVSS

[0079] 多肽链H3的DNA序列 (SEQ ID NO:11)

GAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGCGGACTGGTGCAGCTGGCGGCTCTCTGCGGCTGTCTTGTG
 CCGTGTCCGGCAACATCTACAACCGAACTTCATGGGCTGGTTCGGCAGGCCCGGAAAAGGCC
 GCGAAGGCGTGTCCGCCATCTACACGGGCACCTCCAGAACATATTACGCCGACAGCGTGAAAGGTA
 GATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCGTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGAGACCAG
 AGGACACAGCTGTGTACTATTGCGCTGCTGATCTGAGGGATGGCTTCTGGGACACCGGCGTGTGAA
 CACCTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACTGTGTCTTCCGAACCTAAGTCTAGCGACAAAACCTCATAAC
 AGCCCCCTAGTCCAGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGATCCAGC
 GTGAAGGTGAGCTGCAAGGCTAGCGGCTACTTTTACCCACCATTGGATCCACTGGGTGAGGCAGG
 CTCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCATGATCGACGCTTCCGATAGCGAGACAAGACTGTCTC
 AGAAGTTTAAGGACCGCGTGACCATCACAGCCGATAAGTCTACCTCCACAGCTTACATGGAGCTGTC
 TTCCCTGAGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCTAGGCTGGGCCGGTACTATTTTCGATTATT
 GGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGAGCTCTGCCAGCACAAAGGGCCCTCCCGTGTCCCACTGG
 CTCCCTGCTCCAGAAGCACATCTGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCC
 TGAGCCAGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCCCTGACATCTGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTG
 CTGACGTCCAGCGGCTGTACTCCCTGTCTTCCGTGGTGACAGTGCCACCTTCCCTGGGCAACA
 AGACATATACCTGCAACGTGGACCATAAGCCTTCCAATACCAAGGTGGATAAGAGGGTGGAGAGCA
 AGTACGGACCACCTTGCCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTTGAAGGAGGACCATCCGTGTTCTCTGTT
 TCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACACCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGGA
 CGTGTCTCAGGAGGATCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGC
 TAAGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTAATTCCACATACCGCGTGGTGAGCGTGTGACCGTGTGCT
 GCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCCTGCCAGCTC
 TACGAGAAGCAATCAGCAAGGCTAAGGGACAGCTAGGGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCTGCCCC
 TTCTCAGGAGGAGATGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGC
 GACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCGAGAACAATTACAAGACCACACCACCCGTG
 CTGGACTCTGATGGCTCTTCTTTCTGTATTCTAGGCTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGGAGG
 GCAACGTGTTAGCTGCTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTATACCCAGAAGTCCCTGAG
 CCTGTCTCTGGGCAAG

[0081] 多肽链H3的氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGNIYNRNFMGWFRQAPGKREGVSAIYTGTSRTYYADSVKGRFT
 ISRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAADLRDGFWDGTGVWNTWGQGLTVVSSSEPKSSDKTHTSPSP
 PEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSFTHHWIHWVRQAPGQGLEWMGMIDASDSETRLSQKFKDR
 VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLGRYFYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
 [0082] STAALGLCLKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPS
 NTKVDKRVESKYGPPPCPPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVY
 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0083] 多肽链H4的DNA序列 (SEQ ID NO:13)

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTTCAGCCCGGCGGCTCCCTGCGGCTGAGCTGCG
 CCGTGTCCGGCAACATCTACAACAGAACTTCATGGGCTGGTTAGACAGGCTCCTGGCAAGGGACT
 GGAAGGCGTGTCCGCCATCTACACCGGCACCTCTCGGACTTACTACGCCGACTCTGTCAAGGGCAGA
 TTCACCATCTCCCGGACAACCTCAAGAACACAGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
 GATACCGCTGTGTACTACTGCGTCTGATCTGAGAGAGGGCTTCTGGGACACCGGCGTGTGGAATA
 CCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGAACCTAAGTCTAGCGACAAAACCTCATAACCAG
 [0084] CCCCCCTAGTCCAGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGATCCAGCGT
 GAAGGTGAGCTGCAAGGCTAGCGGCTACTTTTACCCACCATTGGATCCACTGGGTGAGCAGGCT
 CTTGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCATGATCGACGCTTCCGATAGCGAGACAAGACTGTCTCAG
 AAGTTTAAGGACCGCGTGACCATCACAGCCGATAAGTCTACCTCCACAGCTTACATGGAGCTGTCTT
 CCCTGAGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCTAGGCTGGGCCGGTACTATTTTCGATTATTG
 GGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGAGCTCTGCCAGCACAAAGGGCCCTCCCGTGTCCCACTGGC
 TCCCTGCTCCAGAAGCACATCTGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCT

GAGCCAGTGACCGTGTCTCTGGAACAGCGGCGCCCTGACATCTGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGC
 TGCAGTCCAGCGGCTGTACTCCCTGTCTTCCGTGGTGACAGTGCCAGCTCTTCCCTGGGCACCAA
 GACATATACCTGCAACGTGGACCATAAGCCTTCCAATACCAAGGTGGATAAGAGGGTGGAGAGCAA
 GTACGGACCACCTTGCCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTTGGAGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTC
 CTCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAACCGGACACCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACG
 TGTCTCAGGAGGATCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCTA
 AGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTTAATCCACATACCCGCGTGGTGAGCGTGTGACCGTGTGC
 ATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCAGCTCTA
 TCGAGAAGACAATCAGCAAGGCTAAGGGACAGCCTAGGGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTT
 CTCAGGAGGAGATGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCG
 ACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCCAGAAACAATTACAAGACCACACCACCGTGC
 TGGACTCTGATGGCTCCTTCTTTCTGTATTCTAGGCTGACAGTGGATAAGTCCCAGTGGCAGGAGGG
 CAACGTGTTAGCTGCTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTATACCCAGAAGTCCCTGAGC
 CTGTCTCTGGGCAAG

[0085]

[0086] 多肽链H4的氨基酸序列 (SEQ ID NO:14)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGNIYNRNFMGWFRQAPGKGLGVSAIYTGTSRITYYADSVKGRFT
 ISRDNSKNTVYLMNSLR AEDTAVYYCAADLREGFWDTGVWNTWGQGLVTVSSEPKSSDKTHTSPPS
 PEVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYSFTHHWIHWVRQAPGQGLEWMGMIDASDSETRLSQKFKDR
 VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLGRYFDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
 STAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPS
 NTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVY
 TLPSPQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
 GNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGK

[0087]

[0088] 多肽链L1的DNA序列 (SEQ ID NO:15)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACACTGTCTCTGTCCCCAGGAGAGAGGGCCACCCTGAGCT
 GCCGGGCTTCTGAGAACGTGGGCACATACATCTCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCTA
 GGCTGCTGATCTACGGCGCTAGCAATAGATATAACGGCATCCCTGCTCGCTTACAGCGGATCTGGATC
 CGGCACAGACTTTACCTGACAATCTCCAGCCTGGAGCCAGAGGATTTCCGCCGTGACTATTGTGGC
 GAGTCTACGGCCACCTGTATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAGCGAACCGTGGCT
 GCACATCTGCTTTCATCTTCCCCTCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATCTGGAATCTGTTGTGTG
 CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
 GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA
 CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
 GCCTGAGCTCGCCCCTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAACCTAAGTCTAGCGACAAAA
 CTCATAACAGCCCCCTAGTCCAGAAGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTG
 CGGGCTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGTGTCGGCAACATCTACAACCGGAACTTCAATGGGCTGGT
 CCGCATCGCCCGGAAAAGGCGGAAAGGCGTGTCCGCCATCTACACGGGCACCTCAGAACACATA
 TTACGCCGACAGCGTGAAGGTAGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCGTGTACCT
 GCAGATGAACCTCCTGAGACCAGAGGACACAGCTGTGTACTATTGCGCTGCTGATCTGAGGGATGG
 CTTCTGGGACACCGCGTGTGGAACACCTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACTGTGTCTTCC

[0089]

[0090] 多肽链L1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:16)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASENVGTYSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGIPARFSGSGSDFT
 LTISSELPEDFAVYYCGESYGHLYTFGGGTKVEIKRTVAAPS FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GECEPKSSDKTHTSPSPPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGNIYNRNFMGWFRQAPGKREGVSAIY
 TGTSRITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCAADLRDGFWD TGWNTWGQGLV
 TVSS

[0091]

[0092] 多肽链L2的DNA序列 (SEQ ID NO:17)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACACTGTCTCTGTCCCCAGGAGAGAGGGCCACCCTGAGCT
 GCCGGGCTTCTGAGAACGTGGGCACATACATCTCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCTA
 GGCTGCTGATCTACGGCGCTAGCAATAGATATAACGGCATCCCTGCTCGCTTACAGCGGATCTGGATC
 CGGCACAGACTTTACCTGACAATCTCCAGCCTGGAGCCAGAGGATTTCCGCCGTGACTATTGTGGC
 GAGTCTACGGCCACCTGTATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAGCGAACCGTGGCT
 GCACATCTGCTTTCATCTTCCCCTCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATCTGGAATCTGTTGTGTG
 CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
 GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA
 CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
 GCCTGAGCTCGCCCCTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAACCTAAGTCTAGCGACAAAA

[0093]

[0094] CTCATACCAGCCCCCTAGTCCAGAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTTCAGCCCCG
CGGCTCCCTGCGGCTGAGCTGCGCCGTGTCCGGCAACATCTACAACAGAACTTCATGGGCTGGTTT
AGACAGGCTCCTGGCAAGGGACTGGAAGGCGTGTCCGCCATCTACACCGGCACCTCTCGGACTTACT
ACGCCGACTCTGTCAAGGGCAGATTACCATCTCCCGGACAACCTCAAGAACACAGTGTATCTGCA
GATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGCTGCTGATCTGAGAGAGGGCTT
CTGGGACACCGGCGTGTGGAATACCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTTCT

[0095] 多肽链L2的氨基酸序列 (SEQ ID NO:18)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASENVGTYSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGIPARFSGSGSGTDF
LTISSLEPEDFAVYYCGESYGHLYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE
[0096] AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GECEPKSSDKTHTSPSPPEVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAVSGNIYRNFMGWFRQAPGKLEGVSAIY
TGTSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNLSRAEDTAVYYCAADLREGFWDTG VVNTWGQGLV
TVSS

[0097] 多肽链L3的DNA序列 (SEQ ID NO:19)

GAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGCGGCTGTCTTGTG
CCGTGTCCGGCAACATCTACAACCGGAACCTTCATGGGCTGGTTCCGGCAGGCCCCCGGAAAAGGCC
GCGAAGGCGTGTCCGCCATCTACACGGGCACCTCCAGAACATATTACGCCGACAGCGTGAAAGGTA
GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCGTGTACCTGCAGATGAACCTCCGAGACCAG
AGGACACAGCTGTGTACTATTGCGCTGCTGATCTGAGGGATGGCTTCTGGGACACCGGCGTGTGAA
CACCTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACTGTGTCTCCGAACTAAGTCTAGCGACAAAACCTCATAACC
AGCCCCCTAGTCCAGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACACTGTCTCTGTCCCCAGGAGAGA
GGGCCACCTGAGCTGCCGGGCTTCTGAGAACGTGGGCACATACATCTCCTGGTATCAGCAGAAGC
[0098] CAGGACAGGCTCCTAGGCTGCTGATCTACGGCGCTAGCAATAGATATACCGGCATCCCTGCTCGCTT
CAGCGGATCTGGATCCGGCACAGACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGGAGCCAGAGGATTTCCGCC
GTGTACTATTGTGGCGAGTCTACGGCCACCTGTATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCA
AGCGAACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
TGCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGAT
AACGCCCTCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0099] 多肽链L3的氨基酸序列 (SEQ ID NO:20)

EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAVSGNIYRNFMGWFRQAPGKREGVSAIYTGTSRTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYQLQMNLSRPEDTAVYYCAADLRDGFWDTG VVNTWGQGLVTVSSEPKSSDKTHTSPPS
[0100] PEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASENVGTYSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGIPARFSGSGSGTDF
TLTISSLEPEDFAVYYCGESYGHLYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

[0101] 多肽链L4的DNA序列 (SEQ ID NO:21)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTTCAGCCCGGCGGCTCCCTGCGGCTGAGCTGCG
CCGTGTCCGGCAACATCTACAACAGAACTTCATGGGCTGGTTAGACAGGCTCCTGGCAAGGGACT
GGAAGGCGTGTCCGCCATCTACACCGGCACCTCTCGGACTTACTACGCCGACTCTGTCAAGGGCAGA
TTCACCATCTCCCGGACAACCTCAAGAACACAGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
GATACCGCTGTGTACTACTGCGCTGCTGATCTGAGAGAGGGCTTCTGGGACACCGGCGTGTGGAATA
CCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTTCTGAACCTAAGTCTAGCGACAAAACCTCATAACCAG
CCCCCTAGTCCAGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACACTGTCTCTGTCCCCAGGAGAGAGG
GCCACCTGAGCTGCCGGGCTTCTGAGAACGTGGGCACATACATCTCCTGGTATCAGCAGAAGCCA
[0102] GGACAGGCTCCTAGGCTGCTGATCTACGGCGCTAGCAATAGATATACCGGCATCCCTGCTCGCTTCA
GCGGATCTGGATCCGGCACAGACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGGAGCCAGAGGATTTCCGCCGT
GTACTATTGTGGCGAGTCTACGGCCACCTGTATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAG
CGAACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT
CCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA
CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG
CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGT
CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0103] 多肽链L4的氨基酸序列 (SEQ ID NO:22)

EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAVSGNIYRNFMGWFRQAPGKLEGVSAIYTGTSRTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYQLQMNLSRAEDTAVYYCAADLREGFWDTG VVNTWGQGLVTVSSEPKSSDKTHTSPPS
[0104] PEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASENVGTYSWYQQKPGQAPRLLIYGASNRYTGIPARFSGSGSGTDF
TLTISSLEPEDFAVYYCGESYGHLYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE

- [0105] AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC
- [0106] 多肽链H5的DNA序列 (SEQ ID NO:23)
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGATCCAGCGTGAAGGTGAGCTGC
AAGGCTAGCGGCTACTCTTTCACCCACCATTGGATCCACTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGACAGGGAC
TGGAGTGGATGGGCATGATCGACGCTTCCGATAGCGAGACAAGACTGTCTCAGAAGTTAAGGACC
GCGTGACCATCACAGCCGATAAGTCTACCTCCACAGCTTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGATCCGA
GGACACCGCGTGTACTATTGTGCTAGGCTGGGCGGTACTATTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACC
ACAGTGACAGTGAAGTCTGCCAGCACAAAGGGCCCTTCCGTGTTCCACTGGCTCCCTGCTCCAGAA
GCACATCTGAGTCCACCGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCAGTACCCTG
TCTCTGGAACAGCGGCGCCCTGACATCTGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGC
CTGTACTCCCTGTCTTCCGTGGTGCAGTGCACAGCTTCCCTGGGCACCAAGACATATACTGCA
ACGTGGACCATAAGCCTTCCAATACCAAGGTGGATAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGACCACCTT
GCCCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTTGAGGGAGGACCATCCGTGTTCCCTGTTTCCCAAAGCCTAA
GGACACCTGTGATCAGCCGGACACCTGAGGTGCCTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGACAATGCTAAGACCAAGCCAAG
[0107] AGAGGAGCAGTTTAATTCCACATAACCGCGTGGTGAAGCGTGTGACCGTGTGATCAGGATTGGCTG
AACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCAGCTCTATCGAGAAGACAATC
AGCAAGGCTAAGGGACAGCCTAGGGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTTCTCAGGAGGAGATG
ACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCTGTGGAGT
GGGAGTCTAATGGCCAGCCCGAGAACAATTACAAGACCACACCACCCGTGCTGGACTCTGATGGCT
CCTTCTTTCTGTATTCTAGGCTGACAGTGGATAAGTCCCCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTTAGCTG
TCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTATACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCTGGGCAAG
GGTGGAGGCGGTAGTGGAGGCGGTGGTTCAGGCGGAGGCGGATCTGAAGTGCAGCTGGTGGAACT
GGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGTGTCCGGCAACATCTACA
ACCGAACTTCATGGGCTGGTCCGGCAGGCCCCCGAAAAGGCCGCAAGGCGTGTCCGCCATCT
ACACGGGCACCTCCAGAACATATTACGCCGACAGCGTGAAAGGTAGATTACCATCTCCAGAGACA
ACGCCAAGAACACCGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGACCAGAGGACACAGCTGTGTACTATT
GCGCTGTGATCTGAGGGATGGCTTCTGGGACACCGCGTGTGGAACACCTGGGGCCAGGGCACAC
TGGTCACTGTGCTTCC
- [0108] 多肽链H5的氨基酸序列 (SEQ ID NO:24)
EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYSFTHHWIHWVRQAPGQGLEWMGMIDASDSETRLSQKFKDR
VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLGRYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
STAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPS
NTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVD
[0109] GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
GNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLKGKGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAVS
GNIYNRNFMGWFRQAPGKREGVSAIYTGTSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRPEDTAV
YYCAADLRDGFWDITGVWNTWGQGLVTVSS
- [0110] 多肽链H6的DNA序列 (SEQ ID NO:25)
GAAGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGCGGCTGTCTTGTG
CCGTGTCCGGCAACATCTACAACCGGAACCTTCATGGGTGGTCCGGCAGGCCCCCGAAAAGGCC
GCGAAGGCGTGTCCGCCATCTACACGGGCACCTCCAGAACATATTACGCCGACAGCGTGAAAGGTA
GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGACCAG
AGGACACAGCTGTGTACTATTGCGTGTCTGATCTGAGGGATGGCTTCTGGGACACCGCGTGTGGAA
CACCTGGGGCCAGGCCACACTGGTCACTGTCTTCCGAGAGCAAGTACGGACCACCTTGGCCACCA
TGTCAGCTCCTGAGTTTGAGGGAGGACCATCCGTGTTCCCTGTTTCCCTCAAAGCCTAAGGACACCC
[0111] TGATGATCAGCCGGACACCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCAGGAGGATCCAGAGG
TGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGACAATGCTAAGACCAAGCCAAGAGAGGAGC
AGTTTAATTCCACATAACCGCGTGGTGAAGCGTGTGACCGTGTGATCAGGATTGGCTGAACGGCAA
GGAGTATAAGTGAAGGTGTCCAATAAGGGCTGCCAGCTCTATCGAGAAGACAATCAGCAAGGC
TAAGGGACAGCCTAGGGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCTTCTCAGGAGGAGATGACAAAGAA
CCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGACATCGTGTGGAGTGGAGTCT
AATGGCCAGCCCAGAAACAATTACAAGACCACACCACCCGTGCTGGACTCTGATGGCTCCTTCTTTC
TGTATTCTAGGCTGACAGTGGATAAGTCCCCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTTAGCTGCTCTGTGAT
GCACGAGGCCCTGCACAATCATTATACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCTGGGCAAG
- [0112] 多肽链H6的氨基酸序列 (SEQ ID NO:26)

[0113] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGNIYNRNFMGWFRQAPGKQREGVSAIYTGTSRTYYADSVKGRFT
 ISRDNAKNTVYVYLMNSLRPEDTAVYYCAADLRDGFWDGTVWNTWGQGLVTVSSESKYGPPCPPAP
 EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSLGK

[0114] 多肽链H7的DNA序列 (SEQ ID NO:27)

[0115] GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTTCAGCCCGGCGGCTCCCTGCGGCTGAGCTGCG
 CCGTGTCCGGCAACATCTACAACAGAACTTCATGGGCTGGTTAGACAGGCTCCTGGCAAGGACT
 GGAAGGCGTGTCCGCCATCTACACCGCACCTCTCGGACTTACTACGCCACTCTGTCAAGGGCAGA
 TTCACCATCTCCCGGACAACCTCCAAGAACACAGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG
 GATACCGCTGTGTACTACTGCGCTGCTGATCTGAGAGAGGGCTTCTGGGACACCGGCGTGTGGAATA
 CCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTTCTGAGAGCAAGTACGGACCACCTTGCCCACCATG
 TCCAGCTCCTGAGTTTGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTG
 ATGATCAGCCGGACACCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCAGGAGGATCCAGAGGTG
 CAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCAAGAGAGAGGACGAG
 TTTAATTCCACATAACCGCGTGGTGAGCGTGTGACCGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGG
 AGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCAGCTCTATCGAGAAGACAATCAGCAAGGCTA
 AGGGACAGCCTAGGGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTTCTCAGGAGGAGATGACAAAGAACC
 AGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCTAA
 TGGCCAGCCCGAGAACAATTACAAGACCACACCACCGTGTGACTCTGATGGCTCCTTCTTTCTG
 TATTCTAGGCTGACAGTGGATAAGTCCCAGTGGCAGGAGGGCAACGTGTTTAGCTGCTCTGTGATGC
 ACGAGGCCCTGCACAATCATTATACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCTGGGCAAG

[0116] 多肽链H7的氨基酸序列 (SEQ ID NO:28)

[0117] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGNIYNRNFMGWFRQAPGKQLEGVSAIYTGTSRTYYADSVKGRFT
 ISRDNSKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCAADLREGFWDGTVWNTWGQGLVTVSSESKYGPPCPPAP
 EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSLGK

[0118] 表4: 接头序列和IgG4-Fc序列

	序列	SEQ ID NO:
[0119] E-Linker 接头 DNA 序列	GAACCTAAGTCTAGCGACAAAACATACACCAGCCCCCTAGTCA	45
E-Linker 接头氨基酸序列	EPKSSDKTHTSPSP	46
G15-Linker 接头 DNA 序列	GGTGGAGGCGGTAGTGGAGGCGGTGGTTCAGGCGGAGGCGGATCT	47
G15-Linker 氨基酸序列	GGGSGGGGSGGGGS	48
IgG4 Fc DNA 序列	GAGAGCAAGTACGGACCACCTTGCCCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTTGAGGGAGGACCATCCGTGTTCTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACACCTGAGGTGACCTGCG	49

[0120]	<p>列</p> <p>TGGTGGTGGACGTGTCTCAGGAGGATCCAGAGGTGCAGTTCAA CTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAG CCAAGAGAGGAGCAGTTTAATTCCACATAACCGCGTGGTGAGCG TGCTGACCGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTA TAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCAGCTCTATCGAG AAGACAATCAGCAAGGCTAAGGGACAGCCTAGGGAGCCACAG GTGTACACCCTGCCCCCTTCTCAGGAGGAGATGACAAAGAACC AGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGAC ATCGCTGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCCGAGAACAATT ACAAGACCACACCACCGTGTGGACTCTGATGGCTCCTTCTTT CTGTATTCTAGGCTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGGAGG GCAACGTGTTTAGCTGCTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAT CATTATACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCTGGGCAAG</p>	
	<p>IgG4 Fc 氨基酸 序列</p> <p>ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSL GK</p>	50

[0121] 实施例2 FACS亲和力分析

[0122] 对于构建的一系列双特异抗体,使用流式细胞仪测定这些样品和抗原的亲和力。样品起始浓度为300nM,进行3倍的梯度稀释,然后分别测试不同浓度的样品与CHO-K1细胞上表达的PD-1抗原或者CD47抗原的亲和力。接着用几何平均值生成抗体-抗原结合曲线,并利用GRAPHPAD Prism V6.02软件绘制四个参数的原始数据,并编制最佳拟合值程序对EC₅₀进行分析。

[0123] 对于PD-1抗原的亲和力分析,PD-1单域抗体融合到抗CD47单克隆抗体(mAb)的重链或者轻链的N端或C端时产生的双特异抗体与表达PD-1抗原的CHO-K1细胞上孵育后,通过FACS检测发现,与融合到IgG4 Fc上的PD-1单域抗体对照(sdAb-PD1a-IgG4PE和sdAb-PD1b-IgG4PE)相比,当单域抗体PD1a或PD1b融合到抗CD47单克隆抗体(mAb)的重链或者轻链的N端时产生的双特异抗体与PD-1抗原的亲和力显著高于单域抗体对照。而当单域抗体PD1a或PD1b融合到抗CD47单克隆抗体(mAb)的重链或者轻链的C端时产生的双特异抗体与PD-1抗原的亲和力则低于单域抗体对照或与单域抗体对照相当(图1)。所以,PD-1单域抗体连接到抗CD47单克隆抗体的N端时,会增强PD-1单域抗体与PD-1抗原的结合,而当PD-1单域抗体连接到抗CD47单克隆抗体的C端时,则可能会降低PD-1单域抗体与PD-1抗原的亲和力。

[0124] 对于CD47抗原的亲和力分析,PD-1单域抗体融合到抗CD47单克隆抗体(mAb)的重链或者轻链的末端时产生的双特异抗体与表达CD47抗原的CHO-K1细胞上孵育后,通过FACS检测发现,与CD47单克隆抗体对照相比,当单域抗体PD1a或PD1b融合到CD47单克隆抗体(mAb)的重链或者轻链的C端时产生的双特异抗体与CD47抗原的亲和力显著高于CD47单克隆抗体对照。而当单域抗体PD1a或PD1b融合到CD47单克隆抗体(mAb)的重链或者轻链的N端时产生的双特异抗体与CD47抗原的亲和力则低于CD47单克隆抗体对照(图2)。所以,PD-1单域抗体连接到CD47单克隆抗体的C端时,会增强CD47抗体与CD47抗原的结合,而当PD-1单域抗体连接到CD47单克隆抗体的N端时,则会降低CD47抗体与CD47抗原的亲和力。

[0125] 实施例3体外生物活性测定

[0126] 对于抗CD47/抗PD-1双特异性抗体的体外生物活性测定,由于没有一种能同时检测CD47和PD-1两种阻断剂的分析系统,因此使用Promega检测试剂盒进行PD-1阻断剂的生

物测定,然后使用抗CD47的细胞吞噬实验测试双特异抗体的活性。

[0127] 检测抗CD47/抗PD-1双特异性抗体体外功能的实验使用的是普洛麦格(Promega)的PD-1/PD-L1阻断功能报告基因试剂盒(PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay,普洛麦格试剂盒产品编号为J1250)。该试剂盒检测系统由两种经基因工程改造的细胞系组成。刺激细胞系为PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞,该细胞稳定表达人源PD-L1和一种能以不依赖于抗原方式激活同源TCR的细胞表面蛋白。效应细胞系是一个Jurkat T细胞系,该细胞系稳定表达人源PD-1和NFAT诱导的荧光素酶报告基因。当把两种类型的细胞共同培养时,PD-1/PD-L1相互作用抑制TCR信号转导以及NFAT介导的荧光素酶活性。加入抗PD-1/PD-L1抗体可以阻断PD-1和PD-L1的结合,从而使TCR信号通路激活以及NFAT介导的荧光素酶活性增强并产生化学发光(Luminescence)。

[0128] 首先将效应细胞系Jurkat T细胞铺在96孔板内,随后加入抗CD47/抗PD-1双特异性抗体和刺激细胞系PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞。将该体系在37℃下孵育6个小时。然后加入Bio-Glo™荧光检测试剂,并在室温下孵育5-10分钟。最后使用化学荧光信号读板机读取96孔板中的荧光信号。该实验使用8浓度三复孔的形式,相对荧光值作为y-轴,抗体样品的浓度作为x-轴,画出四参数曲线。使用GraphPad Prism软件分析该曲线并得出抗CD47/抗PD-1双特异性抗体样品的EC₅₀值。

[0129] 对于抗CD47抗体的细胞吞噬实验,首先使用浓度梯度的方法从人体外周血中提取PBMC。再使用全单核细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotech)从PBMC中分离出单核细胞。这些单核细胞在14天的时间内使用GM-CSF刺激成巨噬细胞。在第14天,将HL60细胞用PKH26染料染色并种在96孔培养板中,使用Accutase将MDM从培养皿上消化下来,然后把MDM加入到种有PKH26染过的HL60的培养板中,另外再加入梯度稀释的抗CD47/抗PD-1双特异性抗体样品,并在37℃孵育1个小时,让细胞吞噬反应进行。一个小时后,将MDM从细胞培养皿上消化下来并使用荧光标记的抗CD11b的抗体去染MDM。然后使用BD FACSCalibur流式细胞系分析细胞板中的细胞。吞噬百分比由PKH26和CD11b双阳的细胞数量除以PKH26单阳的细胞数量计算而来。量效曲线图使用吞噬百分比做y轴,抗CD47/抗PD-1双特异性抗体的浓度作为x轴,并使用GraphPadPrism软件分析得出EC₅₀值以及其他曲线参数。

[0130] 基于PD-1/PD-L1阻断剂的生物活性测定结果显示,双特异抗体PD1a-E-HN比PD-1单克隆抗体对照(Keytruda)的生物活性要高(图3)。构建这个双特异抗体的单域抗体PD1a,同时也被融合到IgG4的Fc上,产生融合蛋白sdAb-PD1a-IgG4PE并用于PD-1单域抗体对照。图4结果显示,sdAb-PD1a-IgG4PE比PD-1单克隆抗体对照(Keytruda)的生物活性要低。但是,双特异抗体PD1a-E-HN比PD-1单克隆抗体对照(Keytruda)的生物活性要高,,这说明双特异抗体PD1a-E-HN中的PD-1单域抗体融合在抗CD47单克隆抗体(mAb)的重链N端,可以提升PD-1单域抗体的生物活性。而FACS亲和力分析结果也显示这个双特异抗体与PD-1抗原的亲和力明显高于PD-1单域抗体对照,亲和力和体外生物活性的一致性,进一步证实了这个双特异抗体增强了PD-1单域抗体的活性。

[0131] 抗CD47抗体的细胞吞噬实验结果显示,双特异抗体PD1a-E-HN的EC₅₀值略低于CD47对照抗体(图5)。而FACS亲和力分析结果显示它的亲和力低于抗CD47单克隆抗体对照,这说明亲和力的降低对于这个双特异抗体的抗CD47抗体活性有一定影响,但是也在一定程度上降低了抗CD47抗体的红细胞毒性。

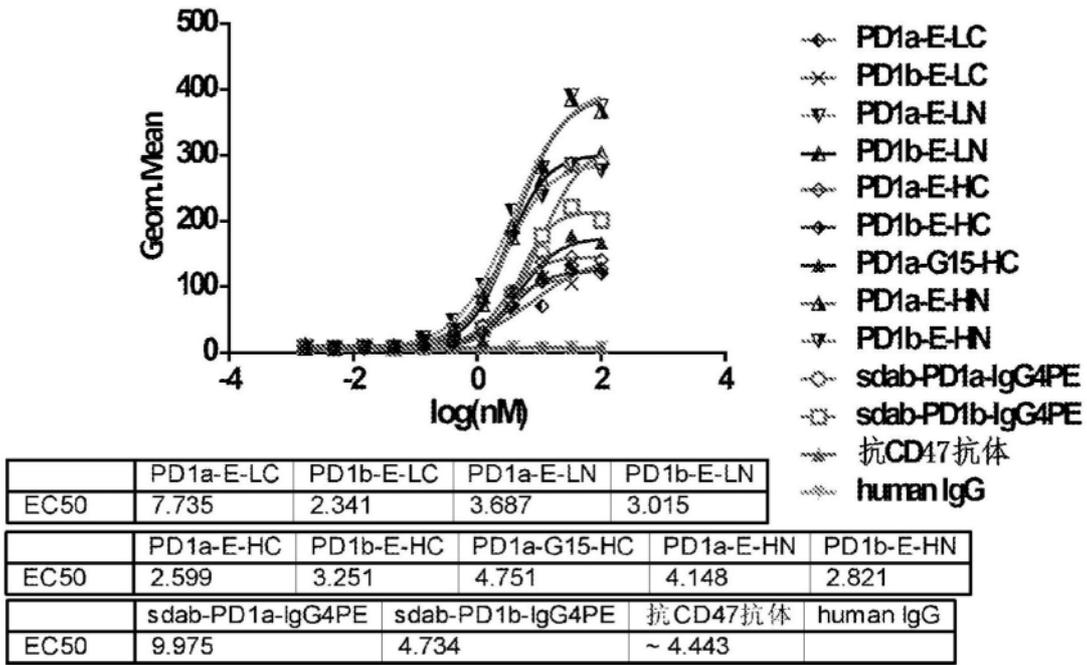


图1

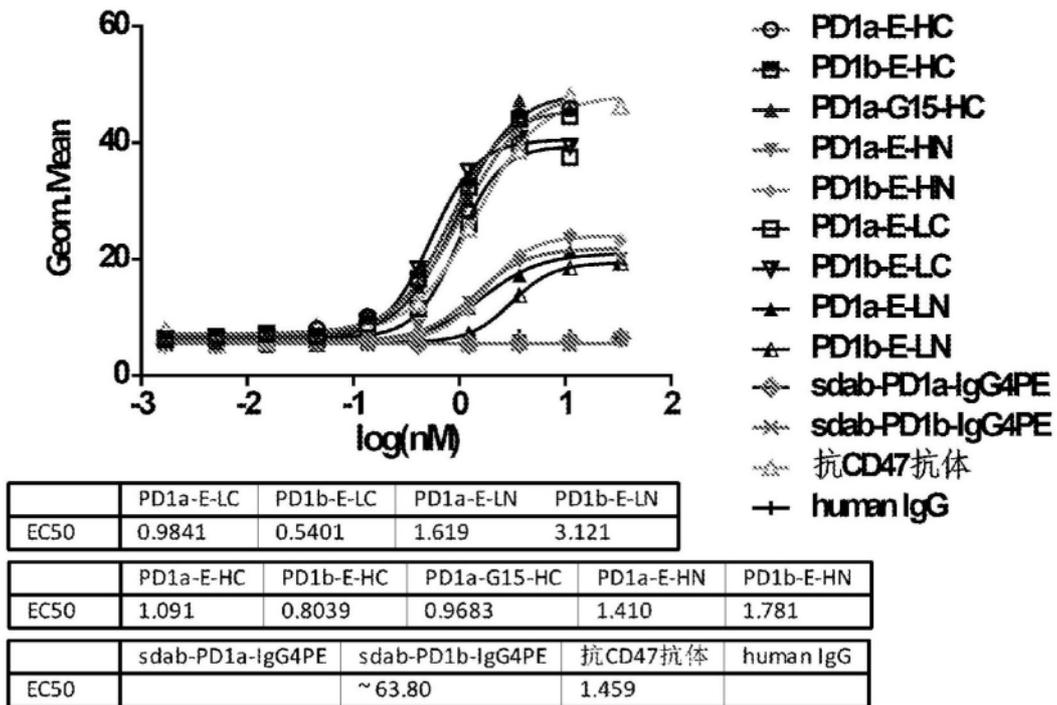


图2

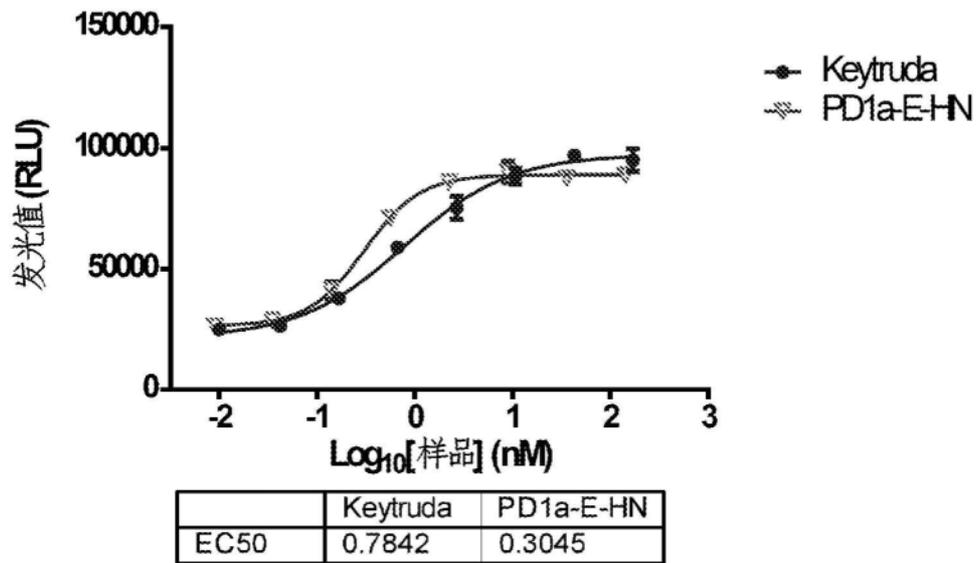


图3

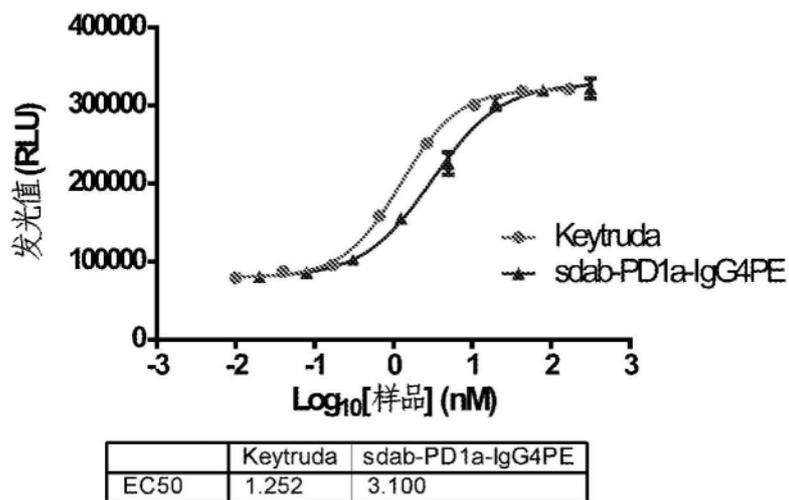


图4

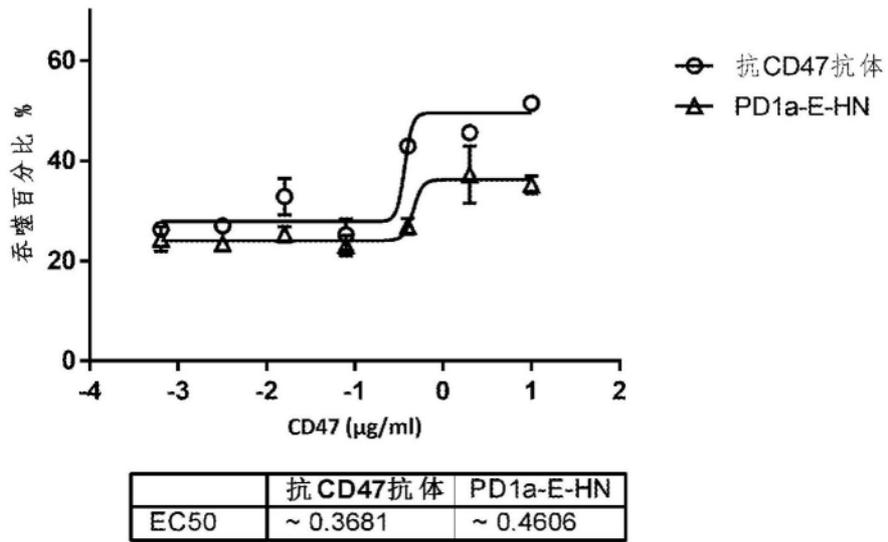


图5