

(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
2018 年 11 月 15 日 (15.11.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/205985 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) **A61K 38/17** (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

C07K 14/495 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/086451

(22) 国际申请日: 2018 年 5 月 11 日 (11.05.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201710334292.6 2017年5月12日 (12.05.2017) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL

CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(72) 发明人: 顾津明 (GU, Jinming); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。罗肖 (LUO, Xiao); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康 (TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼19层, Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,

(54) Title: FUSION PROTEIN CONTAINING TGF- β RECEPTOR AND MEDICINAL USES THEREOF

(54) 发明名称: 含有TGF- β 受体的融合蛋白及其医药用途

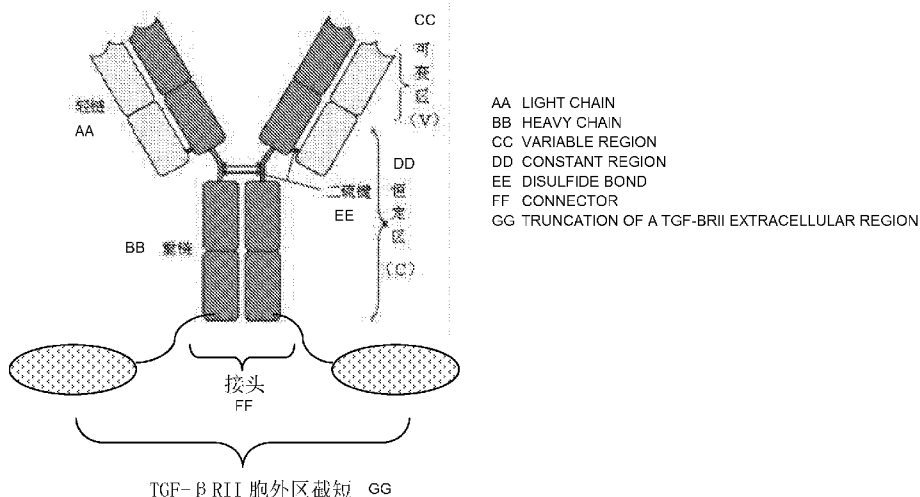


图 1

(57) Abstract: Provided are a fusion protein containing a TGF- β receptor and medicinal uses thereof. Also provided are a dual-functional fusion protein comprising a targeted part of a PD-L1 antibody and a TGF- β RII extracellular region, a pharmaceutical composition containing the fusion protein containing the TGF- β receptor, and uses thereof the preparation of anticancer drugs.

(57) 摘要: 提供了含有TGF- β 受体的融合蛋白及其医药用途。进一步提供了包含所述PD-L1抗体靶向部分和TGF- β RII胞外区的双功能融合蛋白, 以及包含所述含有TGF- β 受体融合蛋白的药物组合物, 以及其制备抗癌药物的用途。

JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

含有 TGF- β 受体的融合蛋白及其医药用途

技术领域

5 本发明涉及肿瘤免疫治疗药物领域。具体地说，本发明涉及用于癌症治疗的融合蛋白，包括包含靶向分子和免疫调节因子如 TGF- β RII 的融合蛋白。更具体地涉及靶向分子 PD-L1 抗体和免疫调节因子如 TGF- β RII 的融合蛋白，包含其的药物组合物，以及其作为抗癌药物的应用。

10 背景技术

在肿瘤治疗中，人们早已认识到化疗所带来的高毒性及可导致耐药性癌细胞产生的负面影响。即使是靶向性针对与肿瘤生存生长相关的过度表达或激活的蛋白的治疗手段，仍会有癌细胞通过变异来减少或逃脱对靶向性治疗所针对通路的依赖，并利用其它的通路继续生存。肿瘤免疫治疗近年来备受关注，是肿瘤治疗领域的焦点，较难产生耐药性是该疗法的突出优势。肿瘤免疫治疗主要通过免疫学原理和方法，提高肿瘤细胞的免疫原性和对效应细胞杀伤的敏感性，激发和增强机体抗肿瘤免疫应答，并应用免疫细胞和效应分子输注宿主体内，协同机体免疫系统杀伤肿瘤、抑制肿瘤生长。

程序性死亡受体 1 (programmed death 1, PD-1) 为 CD28 超家族成员。PD-1 20 表达于活化的 T 细胞，B 细胞及髓系细胞，其有两个配体，即程序性死亡配体-1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 和 PD-L2。PD-L1 与 T 细胞上的受体 PD-1 相互作用，在免疫应答的负调控方面发挥着重要作用。在许多人类肿瘤组织中均可检测到 PD-L1 蛋白的表达，肿瘤部位的微环境可诱导肿瘤细胞上的 PD-L1 的表达，表达的 PD-L1 有利于肿瘤的发生和生长，诱导抗肿瘤 T 细胞的凋亡。

25 PD-1/PD-L1 通路抑制剂可以阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合，阻断负向调控信号，使 T 细胞恢复活性，从而增强免疫应答，因此，以 PD-1/PD-L1 为靶点的免疫调节对肿瘤抑制有重要的意义。

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 属于调节细胞生长和分化的 TGF- β 超家族。TGF- β 通过异源四聚体受体复合物传递信号，这个受体复合物是由两个 I 型和两个 II 型的跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体组成。

30

TGF- β 是一种多功能的细胞因子，以细胞或背景依赖的方式发挥肿瘤抑制或肿瘤促进的作用。TGF- β 信号的肿瘤抑制作用源于其诱导多个基因表达的能力。当肿瘤发展过程中引入突变或表观遗传修饰时，癌细胞逐渐耐受 TGF- β 信号的抑制作用，最终导致肿瘤的发展。

35 研究发现阻断 TGF- β 信号传导通路能够减少肿瘤的转移。运用截短的 Smad2/3 显负性突变体抑制乳腺肿瘤细胞系的 TGF- β 信号通路，结果发现肿瘤细胞的转移

能力被抑制。结肠癌的微卫星不稳定性研究发现，TGF- β RII 无活性的突变，使转移减少，增加了患者术后的存活率。但总体而言，抑制 TGF- β 信号通路的抑制剂单用在临床治疗中效果微弱，可能跟 TGF- β 主要在肿瘤细胞内异常性高表达及信号通路抑制剂的生物利用度有关。

5 因此，在靶向中和肿瘤微环境的 TGF- β 基础上抑制 PD-1/PD-L1 通路，可以使 T 细胞恢复活性，增强免疫应答，更有效地提高抑治肿瘤发生和发展的效果。本申请人在先的 PCT 申请 PCT/CN2016/104320 提供了一种 PD-L1 抗体。

目前已有抗体/TGF- β 受体融合蛋白公开，如 WO2006074451A2、WO2009152610A1、WO2011109789A2、WO2013164694A1、WO2014164427A1、
10 WO2015077540A2、WO9309228A1、WO9409815A1、WO2015077540A2、WO2015118175A2。但一些融合蛋白仍存在不稳定或表达量不高的问题。在实际生产和临床应用上仍需进一步开发具有更优性能的产品。本发明提供一种更利于生产，性能更稳定的技术方案。

15 发明内容

本发明提供一种含有 TGF- β 受体的融合蛋白，包含靶向部分和 TGF- β 受体部分，其中，所述的 TGF- β 受体部分为 TGF- β RII 胞外区的 N 端截短形式。

在本发明一个优选的实施方案中，TGF- β RII 胞外区的 N 端截短形式选自在 TGF- β RII 胞外区的 N 端上有 26 个以下连续氨基酸的缺失，优选 14-26 个连续氨基酸的缺失，更优选 14-21 个连续氨基酸的缺失；最优选包含 14-21 个连续氨基酸的
20 缺失，非限制性实施例包括 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示的序列。

在本发明一个优选的实施方案中，TGF- β RII 胞外区的序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的靶向部分为细胞特异性靶向部分；
25 优选的，所述的靶向部分为癌细胞特异性靶向部分。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的癌细胞特异性靶向部分选自抗体或其抗原结合片段、生长因子、激素、肽、受体或细胞因子。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段选自全长抗体、嵌合抗体、Fab'、Fab、F(ab')₂、单结构域抗体(DAB)、Fv、scFv、小抗体、
30 双特异性抗体、三特异性抗体或其混合物。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段结合选自以下一种或多种多肽或蛋白：HER2、HER3、免疫检验点分子、CD33、VEGF、VEGFR、VEGFR-2、CD152、TNF、IL-1、IL-5、IL-17、IL-6R、IL-1、IL-2R、BLYS、PCSK9、EGFR、c-Met、CD2、CD3、CD11a、CD19、CD30、CD38、
35 CD20、CD52、CD60、CD80、CD86、TNF- α 、IL-12、IL-17、IL-23、IL-6、IL-1 β 、RSVF、IgE、RANK、BLYS、 α 4 β 7、PD-1、CCR4、SLAMF7、GD2、

CD21、CD79b、IL20R α 、CD22、CD79a、CD72、IGF-1R 和 RANKL；优选所述的抗体或其抗原结合片段结合免疫检验点分子。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的抗体为 PD-L1 抗体；优选的，所述的 PD-L1 抗体选自：MSB0010718C、MEDI4736、BMS-936559、MPDL3280A 的 PD-L1 抗体，或包含 1 个或多个选自以下的 CDR 区序列或 CDR 区序列的突变序列的抗体：

	HCDR1:	SYWMH	SEQ ID NO: 1
	HCDR2:	RI X ₁ PNSG X ₂ TSYNEKFKN	SEQ ID NO: 2
	HCDR3:	GGSSYDYFDY	SEQ ID NO: 3
10	LCDR1:	RASESVSIHGTHLMH	SEQ ID NO: 4
	LCDR2:	AASNLES	SEQ ID NO: 5
	LCDR3:	QQSFEDPLT	SEQ ID NO: 6;

其中X₁选自H或G，优选为G；X₂选自G或F，优选为F。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段为嵌合抗体或其功能片段、人源化抗体或其功能片段、或人抗体或其或其功能片段。

在本发明一个优选的实施方案中，所述人源化抗体的重链可变区具有如 SEQ ID NO: 7 所示的序列，优选具有如 SEQ ID NO: 9 所示的序列。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的人源化抗体进一步包括序列 SEQ ID NO: 11 所示的重链。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的人源化抗体包含 SEQ ID NO: 8 或 10 所示的抗体轻链可变区序列或轻链可变区的突变序列。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的人源化抗体包含序列 SEQ ID NO: 12 所示的轻链。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白如通式 (I) 所示：

Ab-L- TGF- β RII ECD (I)

其中 TGF- β RII ECD 为 TGF- β RII 胞外区的截短形式；

Ab 为抗体；

L 为连接序列。

在本发明一个优选的实施方案中，所述的连接序列 L 为 (G₄S)_xG，其中 x 为 3-6，优选为 4-5。

本发明进一步提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的如上所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

本发明进一步提供一种编码如上所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白的 DNA 分子。

本发明进一步提供一种含有如上所述的 DNA 分子的表达载体。

本发明进一步提供一种用如上所述的表达载体转化的宿主细胞，所述宿主细胞选自细菌、酵母菌和哺乳动物细胞；优选哺乳动物细胞。

5 本发明进一步提供一种所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白或包含其的药物组合物，在制备用于肿瘤治疗的药物中的用途；优选在制备用于治疗 PD-L1 介导的肿瘤的药物中的用途；更优选为表达 PD-L1 的癌症。

本发明进一步提供一种治疗和预防肿瘤的方法，包括给予所需患者治疗有效量的本发明所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白或包含其的药物组合物。

10 本发明进一步提供一种截短的 TGF- β R2 胞外区，其中所述的 TGF- β R2 胞外区的截短选自在 SEQ ID NO: 13 的 N 端上有 26 个以下连续氨基酸的缺失，优选 N 端 14-26 个连续氨基酸的缺失，更优选 N 端 14-21 个连续氨基酸的缺失；最优选包含 14-21 个连续氨基酸的缺失，非限制性实施例包括 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示的序列。

15 本发明进一步提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的本发明所述的截短的 TGF- β R2 胞外区，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

本发明进一步提供一种本发明所述的截短的 TGF- β R2 胞外区或包含其的药物组合物，在制备用于治疗、抑制癌细胞增殖或转移的疾病或病症的药物中的用途。

20 本发明进一步提供一种治疗和预防肿瘤的方法，包括给予所需患者治疗有效量的本发明所述的截短的 TGF- β R2 胞外区或包含其的药物组合物。

本公开中所述肿瘤或癌症选自以下部位的肿瘤或癌症：结直肠、乳腺、卵巢、胰腺、胃、前列腺、肾、宫颈、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺、子宫内膜、子宫、膀胱、神经内分泌、头部颈部、肝、鼻咽、睾丸、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、隆突性皮肤纤维肉瘤、梅克尔细胞癌、成胶质细胞瘤、胶质瘤、肉瘤、间皮瘤，和骨髓增生异常综合征。

25

附图说明

图 1：融合蛋白结构示意图。

图 2：融合蛋白体外结合人源 TGF- β 1 的结果。

30 图 3：融合蛋白体外结合人源 TGF- β 1 的结果。

图 4：融合蛋白体外结合人源 PD-L1 的结果。

图 5：融合蛋白体外检测 PD-1/PD-L1 通路阻断实验结果。

图 6：融合蛋白以剂量依赖性形式抑制 TGF β 诱导的 pSMAD3 报告物活性。

图 7：融合蛋白样品均能够增强激活的 T 淋巴细胞分泌细胞因子 IFN- γ 。

35 图 8：融合蛋白对荷瘤小鼠瘤重的影响。

具体实施方式

一、术语

为了更容易理解本发明，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

本发明所述的“抗体”指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

在本发明中，本发明所述的抗体轻链可进一步包含轻链恒定区，所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ 、 λ 链或其变体。

在本发明中，本发明所述的抗体重链可进一步包含重链恒定区，所述的重链恒定区包含人源或鼠源的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体。

抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区（Fv 区）；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区。可变区包括 3 个高变区（HVR）和 4 个序列相对保守的骨架区（FR）。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区（CDR）。每条轻链可变区（LCVR）和重链可变区（HCVR）由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。本发明所述的抗体或抗原结合片段的 LCVR 区和 HCVR 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号规则（LCDR1-3, HCDE2-3），或者符合 kabat 和 chothia 的编号规则（HCDR1）。

本发明的抗体包括选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体的全长抗体，优选人源化抗体。

术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的对人 PD-L1 的单克隆抗体。制备时用 PD-L1 抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本发明一个优选的实施方案中，所述的鼠源 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链恒定区。

术语“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗

体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从小鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆人抗体的恒定区基因，将小鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入人载体中，最后在真核工业系统或原核工业系统中表达嵌合抗体分子。在本发明一个优选的实施方案中，所述的 PD-L1 嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的 PD-L1 嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区。人抗体的恒定区可选自人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变后无 ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, 抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用) 毒性的 IgG4。

术语“人源化抗体(humanized antibody)”，也称为 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody)，是指将小鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量小鼠蛋白成分，从而诱导的强烈的抗体可变抗体反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库（在因特网 www.mrcpe.com.ac.uk/vbase 可获得），以及在 Kabat, E.A.等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。本发明的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。

术语“人抗体”与“人源抗体”可以互换使用，是指有一或多个可变区和恒定区来源于人免疫球蛋白序列。其中一个优选的方式是所有的可变区和恒定区均来自于人免疫球蛋白序列，即“完全人源抗体”或“全人抗体”。这些抗体可以通过多种方式制备获得，包括通过噬菌体展示技术，从人 PBMC、脾脏、淋巴结组织分离 B 细胞，构建天然单链噬菌体人抗体库，或者通过免疫可表达人抗体轻重链的转基因小鼠，筛选获得的抗体。

本发明中所述的“抗体或其抗原结合”或“功能片段”，指具有抗原结合活性的 Fab 片段，Fab' 片段，F(ab')₂ 片段，以及与抗体结合的 Fv 片段 ScFv 片段。Fv 片段含有抗体重链可变区和轻链可变区，但没有恒定区，并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般地，Fv 抗体还包含在 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，且能够形成抗原结合所需的结构。也可以用不同的连接物将两个抗体可变区连接成一条多肽链，称为单链抗体(single chain antibody)或单链 Fv(sFv)。本发明的术语“与 PD-L1 结合”，指能与人 PD-L1 相互作用。本发明的术语“抗原结合位点”指抗原上不连续的，由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

本发明中所述的“ADCC”，即 antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用，是指表达 Fc 受体的细胞通过识别抗体的 Fc 段直接杀伤被抗体包被的靶细胞。可通过对 IgG 上 Fc 段的修饰，降低或消除抗体的 ADCC 效应功能。所述的修饰指在抗体的重链恒定区进行突变，如选自 IgG1 的 N297A、L234A、L235A；IgG2/4 嵌合体，IgG4 的 F234A/L235A 突变。

本发明所述的“突变序列”中的“突变”包括但不限于“回复突变”、“保守修饰”或“保守置换或取代”。本公开中所述的“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第 224 页，（第 4 版））。另外，结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。

本发明所述的“突变序列”是指对本发明的核苷酸序列和氨基酸序列进行适当的替换、插入或缺失等突变修饰情况下，得到的与本发明的核苷酸序列和氨基酸序列具有不同百分比序列同一性程度的核苷酸序列和氨基酸序列。

本发明中所述“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。本发明中的序列同一性可以至少为 85%、90%或 95%，优选至少为 95%。非限制性实施例包括 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%，100%。两个序列之间的序列比较和同一性百分比测定可以通过 National Center For Biotechnology Institute 网站上可得的 BLASTN/BLASTP 算法的默认设置来进行。

本发明所述的“PD-L1抗体或其抗原结合蛋白”可包括本领域中所述的任何抗 PD-L1抗体或其抗原结合片段。抗PD-L1抗体可以是市售可得的或已通过文献公开的PD-L1抗体。包括但不限于，如PD-L1抗体 BMS-936559，MPDL3280A，MEDI4736，MSB0010718C（参见US2014341917、US20130034559、US8779108）等。抗体可以是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体，或人抗体。抗体片段包括具有抗原结合活性的Fab片段，Fab'片段，F(ab')₂片段，以及与抗体结合的Fv片段和ScFv片段。

本发明示例性的 PD-L1 抗体制备过程参见（PCT/CN2016/104320）包括如下所述的重链可变区的 CDR 序列：

HCDR1:	SYWMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2:	RI X ₁ PNSG X ₂ TSYNEKFKN	SEQ ID NO: 2
HCDR3:	GGSSYDYFDY	SEQ ID NO: 3

在可选的实施方式中，X₁选自H或G，X₂选自G或F。

在另一个实施方式中，本发明示例性的PD-L1抗体进一步包括如下所述的轻链可变区的CDR序列：

LCDR1选自： RASESVSIHGTHLMH SEQ ID NO: 4
 LCDR2选自： AASNLES SEQ ID NO: 5
 5 LCDR3选自： QQSFEDPLT SEQ ID NO: 6;

在另一个实施方式中，本发明对上述的CDR区采用CDR移植策略进行抗体人源化，人源化构架的人源化轻链模板为IGKV7-3*01和hjk2.1，人源化重链模板为IGHV1-46*01和hjh6.1，人源化可变区序列如下：

人源化重链可变区

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIX₁P
NSGX₂TSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGGSSYDYFDY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 7

人源化轻链可变区

15 DIVLTQSPASLAIVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPLLIYAASN
LESQVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 8

注：顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为FR序列，下划线为CDR序列。

20 在另一个实施方式中，对本发明人源化抗体的回复突变设计，见下表1：

表 1

VL		VH	
VL.1	植入	VH.1	植入
VL.1A	Y91F	VH.1A	T74K
VL.1B	Y91F,G72E	VH.1B	T74K, R72V, M48I, M70L
VL.1C	Y91F,G72E, T22S	VH.1C	T74K, R72V, M48I, M70L, R38Q
		VH.1D	T74K, R72V, M48I, M70L, R38Q, L83F
		VH.1E	T74K, R72V, M48I, M70L, R38Q, L83F, V68A, V79A

注：如 Y91F 表示依照 Kabat 编号系统，将 91 位 Y 突变回 F。

“植入”代表鼠抗体 CDR 植入人种系 FR 区序列。

25 表中各种轻重链的突变组合可得到新的人源化抗体。

本发明的另一方面，提供一种人源化克隆构建的实施例，如下：

设计引物 PCR 搭建各人源化抗体 VH/VK 基因片段，再与表达载体 pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)进行同源重组，构建抗体全长表达载体 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。

30 1、引物设计：利用在线软件 DNABWorks (v3.2.2) (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>) 设计多条引物合成 VH/VK 含重组所需基因片段：5'-30bp 信号肽 + VH/VK + 30bp CH1/CL-3'。

2、片段拼接：按照 TaKaRa 公司 Primer STAR GXL DNA 聚合酶操作说明书，用上面设计的多条引物，分两步 PCR 扩增得到 VH/VK 含重组所需基因片段。

3、表达载体 pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)构建及酶切

利用一些特殊的限制性内切酶，如 BsmBI，识别序列与酶切位点不同的特性设计构建表达载体 pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)。BsmBI 酶切载体，切胶回收备用。

4、重组构建表达载体 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr

VH/VK 含重组所需基因片段与 BsmBI 酶切回收表达载体 pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)按 3:1 比例分别加入 DH5H 感受态细胞中，0℃冰浴 30min，42℃热击 90s，加入 5 倍体积 LB 介质，37℃孵育 45min，涂布 LB-Amp 平板，37℃培养过夜，挑取单克隆送测序得到各目的克隆。

5、根据本实施例的设计方案构建质粒，然后表达纯化蛋白，用检测例 SPR 测定所得蛋白亲和力。

6、最终用 BIACORE 测试人源化回复突变体与人源 PD-L1-his 或杂交瘤抗体的亲和力，筛选得到的人源化回复突变位点的选择及序列组合如下：

重链可变区：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIGPN
SGETSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGGSSYDYFDYWG
QGTTVTVSS

20 SEQ ID NO: 9

其中，CDR2 为 SEQ ID NO: 7 的 X₁ 为 G，X₂ 为 F。

轻链可变区：

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASN
LESQVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFTFGQGTKLEIK

25 SEQ ID NO: 10

注：顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列；下划线为 CDR 序列。

本发明的另一方面，提供一种构建和表达抗PD-L1人源IgG4类型的实施例，并进一步用于融合蛋白构建的PD-L1抗体。该PD-L1抗体也可用作本发明中的测试例对照分子。

由于 PD-L1 在活化 T 细胞中也有表达，如果采用野生型 IgG1 恒定区会引起 Fc 介导的效应作用，比如 ADCC 和 CDC，从而导致活化 T 细胞的消减。本发明选择突变 IgG4 以得到无 ADCC 和 CDC 的抗体。将亲合力成熟得到的克隆转换成 IgG4 类型，IgG4 的核心铰链区包含 S228P 突变。并进一步引入 F234A 和 L235A 突变 (mAbs 4:3, 310-318; May/June 2012)。同时，为防止抗体重链 C 末端在引入连接肽连接 TGF-βRII 胞外区时发生断裂，又将 PD-L1 抗体重链的最后一位 K 突

变成 A，以增加融合蛋白的稳定性。本发明用于融合蛋白构建的 PD-L1 抗体序列如下：

PD-L1 抗体重链序列：IgG4(AA) (S228P)

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRI
GPNSGFTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED
TAVYYCARGGSSYD
YFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VDKRVESKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
10 YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLA

SEQ ID NO: 11

PD-L1 抗体轻链序列

15 DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLIYA
ASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLE
IKRTVAAPS FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

20 SEQ ID NO: 12

注：划线部分为抗体重链或轻链的可变区序列，或编码其的核苷酸序列；未划线部分为抗体恒定区序列及其相应的编码核苷酸序列。

本发明中所述的融合蛋白是一种通过 DNA 重组得到的两个基因共表达的蛋白产物。现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8 章和 15 章。例如，小鼠可以用人 PD-L1 或其片段免疫，所得到的抗体能被复性、纯化，并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或多个个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件，从 ImMunoGeneTics(IMGT)的网站
30 <http://imgt.cines.fr> 得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001 ISBN 012441351 上获得。

本发明工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至 GS 表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。通过表达与人
35 PD-L1 特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如，用含调整过的缓冲液的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 PH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测抗体片段，收集。抗体

可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

本发明所述的“免疫调节分子”可用于削弱癌细胞的免疫耐受性。本发明采用 TGF-βRII 胞外结构域的截短形式作为融合蛋白中免疫调节分子部分。“TGF-β 受体 II (TGF-βRII)”以高亲和力结合配体 TGF-β1 和 3。TGF-βRII/ TGF-β 复合物招募 TGF-βRI 以形成信号转导复合物 (Won 等, Cancer Res.1999;59:1273-7)。TGF-βRII 的胞外结构域是 TGF-βRII 细胞外自 N 端开始的一段长 136 个氨基酸残基的肽段，其中一个示例性的例子如 SEQ ID NO: 13 所示。其他长度约为 136 个氨基酸，并且来源于人的具有 TGF-βRII 的胞外区的能够与 TGF-β1 和 3 相结合的变体同样属于本发明 TGF-βRII 的胞外结构域的范围。本发明研究发现，TGF-βRII 胞外结构域 N 端连续截短形式的结构和功能较未截短分子稳定。含 TGF-βRII 胞外结构域 N 端未截短 (SEQ ID NO: 13 所示的 1-136 多肽) 形式的融合蛋白容易断裂。尤其是在其 N 端作 26 个以下氨基酸的截短后更为稳定，优选 14-26 个氨基酸的截短，更优选 N 端 14-21 个氨基酸截短形式，具有更高的表达量，最优选截短 N 端 19 或 21 个连续氨基酸。

“给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，例如包含本发明的任一种结合化合物的组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本发明的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频

繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页，（第 4 版））。另外，结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。

5 “有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：例如，待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

10 “外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。“内源性”指根据情况在细胞、生物或人体内产生的物质。

“同源性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100$ 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

“免疫检验点（immune checkpoint）分子”包括刺激性免疫检验点分子和抑制性免疫检验点分子，示例性分子包括 CD27、CD28、CD40、CD40L、CD122、OX40、OX40L、GITR、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR（Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor）、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA 等。

25 本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括后代。因此，单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物，而不考虑转移数目。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下，其由上下文清楚可见。

30 本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美国专利号 4,683,195 中所述扩增的程序或技术。一般来说，需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息，使得可以设计寡核苷酸引物；这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2 个引物的 5' 末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR 可用于扩增特定的 RNA 序列、来自总基因组 DNA 的特定 DNA 序列和由总细胞 RNA 转录的 cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见 Mullis 等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich 编辑，35 (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被视为用于扩

增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个实例，但不是唯一的实例，所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶，以扩增或产生核酸的特定部分。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如，“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

二、实施例与测试例

以下结合实施例进一步描述本发明，但这些实施例并非限制着本发明的范围。

本发明实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience，NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例

实施例 1：融合蛋白 PD-L1/TGF- β trap 克隆和表达

采用 TGF- β RII 胞外结构域（SEQ ID NO：13 的全长或截短形式）作为融合蛋白中免疫调节分子部分，将 PD-L1 抗体作为融合蛋白的靶向部分，形成 PD-L1 抗体/TGF- β RII 胞外区融合蛋白（PD-L1/TGF- β trap）。研究发现，TGF- β RII 胞外结构域截短形式的结构和功能较为稳定，尤其是在其 N 端作 26 个以下氨基酸的截短后更为稳定，优选 14-26 个氨基酸的截短，更优选 N 端截短 14-21 个连续氨基酸的形式，具有更高的表达量和稳定的结构，更优选 N 端截短 14、19 或 21 个连续氨基酸的形式。本发明 TGF- β RII 胞外结构域及其截短形式的非限制性实施例序列如下：

TGF- β RII 胞外结构域序列：ECD(1-136)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

SEQ ID NO：13

TGF- β RII 胞外结构域序列在 N 端有 19 个氨基酸的截短或缺失：ECD(20-136)

GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

SEQ ID NO：14

TGF- β RII 胞外结构域序列在 N 端有 21 个氨基酸的截短或缺失：ECD(22-136)

VKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVVCVAVWRKNDENIT
LETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE
EYNTSNPD

SEQ ID NO: 15

- 5 TGF-βRII 胞外结构域序列在 N 端有 14 个氨基酸的截短或缺失: ECD(15-136)
VTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVVCVAVW
RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKKPGETFFMCSCSSDEC
NDNIIFSEYNTSNPD

SEQ ID NO: 16

- 10 利用同源重组技术将本发明 PD-L1 抗体的重链 C 末端氨基酸通过 (G₄S)_xG 连接不同长度 TGF-βRII 胞外区, 与轻链一起, 通过 293 表达系统进行常规表达, 得到如表 2 所示的融合蛋白:

表 2: PD-L1 抗体/TGF-βRII 胞外区融合蛋白

融合蛋白例	序列描述	N 端连续氨基酸缺失数
融合蛋白 1	Ab-(G ₄ S) ₄ G-ECD(1-136)	未缺失
融合蛋白 2	Ab-(G ₄ S) ₃ G-ECD(15-136)	14
融合蛋白 3	Ab-(G ₄ S) ₃ G-ECD(15-136, N19A)	14
融合蛋白 4	Ab-(G ₄ S) ₃ G-ECD(20-136)	19
融合蛋白 5	Ab-(G ₄ S) ₃ G-ECD(22-136)	21
融合蛋白 6	Ab-(G ₄ S) ₃ G-ECD(27-136)	26
融合蛋白 7	Ab-(G ₄ S) ₄ G-ECD(15-136)	14
融合蛋白 8	Ab-(G ₄ S) ₄ G-ECD(15-136, N19A)	14
融合蛋白 9	Ab-(G ₄ S) ₄ G-ECD(20-136)	19
融合蛋白 10	Ab-(G ₄ S) ₄ G-ECD(22-136)	21
融合蛋白 11	Ab-(G ₄ S) ₄ G-ECD(27-136)	26
融合蛋白 12	Ab-(G ₄ S) ₅ G-ECD(15-136)	14
融合蛋白 13	Ab-(G ₄ S) ₅ G-ECD(15-136, N19A)	14
融合蛋白 14	Ab-(G ₄ S) ₅ G-ECD(20-136)	19
融合蛋白 15	Ab-(G ₄ S) ₅ G-ECD(22-136)	21
融合蛋白 16	Ab-(G ₄ S) ₅ G-ECD(27-136)	26
融合蛋白 17	Ab-(G ₄ S) ₆ G-ECD(27-136)	26

- 15 注: Ab 为本发明所述 PD-L1 抗体, 序列描述中 ECD (n-136) 为 TGF-βRII 胞外区的全长或截短形式, n 为 TGF-βRII 胞外区截短后的氨基酸起始位数。本发明融合蛋白结构如图 1 所示; N19A 表示表示 TGF-βRII 胞外区的第 19 位氨基酸突变为 A。

编码 PD-L1 抗体的核苷酸序列、编码 TGF- β RII 胞外区的核苷酸序列、接头蛋白片段 $((G_4S)_xG)$ 的核苷酸序列通过所属领域常规技术手段获得。利用同源重组技术将 PD-L1 抗体的 C 末端核苷酸通过接头蛋白连接不同长度 TGF- β RII 胞外区的 N 末端核苷酸，克隆到 Phr-BsmBI 载体上。重组的 PD-L1/TGF- β trap 在 293 5 细胞表达，通过实施例 2 进行纯化。纯化的蛋白可用于下述各实施例实验中。

实施例 2：PD-L1/TGF- β trap 融合蛋白纯化

细胞培养液高速离心后收集上清，利用亲和层析进行第一步纯化。层析介质为与 Fc 相互作用的 Protein A 或者衍生填料，如 GE 的 Mabselect。平衡缓冲液为 10 1 $\times$ PBS (137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 10mmol/L Na₂HPO₄, 2mmol/L KH₂PO₄, pH7.4)，平衡 5 倍柱体积后，将细胞上清上样结合，流速控制为样品在柱上保留时间 ≥ 1 min。上样结束后，用 1 $\times$ PBS (pH7.4) 冲洗柱子，直至 A280 紫外吸收降至基线。然后用 0.1M 甘氨酸 (pH3.0) 的洗脱缓冲液冲洗层析柱，根据 A280 紫外吸收峰收集洗脱峰，收集的洗脱样品用 1M Tris (pH8.5) 中和。

15 将上述中和后的洗脱样品超滤浓缩后进行体积排阻层析，缓冲液为 1 $\times$ PBS，层析柱为 XK26/60 Superdex200 (GE)，流速控制在 4ml/min，上样体积小于 5ml，根据 A280 紫外吸收合并目的蛋白峰。收集的蛋白经 SEC-HPLC 鉴定纯度大于 95%，经 LC-MS 鉴定为正确后分装备用。得到 PD-L1/TGF- β trap。

20 以下用生化测试方法验证本发明性能及有益效果。

体外活性生物学评价

测试例 1：ELISA 检测 PD-L1/TGF- β trap 体外结合 TGF- β 1 实验：

检测流程描述如下：

- 25 a. 以 1 μ g/ml 浓度的人源 TGF- β 1 (8915LC, CST) 为抗原按 100 μ l/孔包被 96 孔板，4 $^{\circ}$ C 过夜。
- b. 250 μ l 1 $\times$ PBST 洗涤 3 次，加入 250 μ l 5% 牛奶 PBS, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时。
- c. 250 μ l 1 $\times$ PBST 洗涤 3 次，加入梯度稀释的 PD-L1/TGF- β trap, TGF- β trap 和阳性对照，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- d. 250 μ l 1 $\times$ PBST 洗涤 3 次。
- 30 e. 每孔加入 100 μ l Anti-human FC antibody-HRP (1:4000)，37 $^{\circ}$ C 孵育 40 分钟。
- f. 每孔加入 100 μ l TMB, 室温孵育 10 分钟后加入 100 μ l 1M H₂SO₄ 终止反应。
- g. 酶标仪上检测 450nm 测吸收值，Graphpad Prism5 分析数据。

融合蛋白体外结合人源 TGF- β 1 的结果如图 2、图 3 所示。ELISA 显示表 2 中融合蛋白 1 未保留对人源 TGF- β 1 的结合活性。质谱分析结果显示融合蛋白 1 (即 35 TGF- β RII 胞外区非截短形式 (1-136)) 不稳定，容易在重链 TGF- β RII 部分断裂，

阳性对照同样存在相同情况，而融合蛋白 7、9、10、12-15 等 TGF β RII 胞外区 N 端截短形式的融合蛋白对于结合至人源 TGF- β 1 是具有特异性的。

测试例 2：ELISA 检测 PD-L1/TGF- β trap 体外结合 PD-L1 实验：

5 检测用抗原：PD-L1-His

FTVTVPKDLVVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEE
DLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYK
RITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGK
TTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHP
10 NEREQKLISEEDLHHHHHH

SEQ ID NO: 17

检测流程描述如下：

- a. 以 5 μ g/ml 浓度的人源 PD-L1-His(SEQ ID NO: 17)为抗原按 100 μ l/孔包被 96 孔板，4 $^{\circ}$ C 过夜。
- 15 b. 250 μ l 1 $\times$ PBST 洗涤 3 次，加入 250 μ l 5% 牛奶 PBS 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时。
- c. 250 μ l 1 $\times$ PBST 洗涤 3 次，加入梯度稀释的 PD-L1/TGF- β trap，PD-L1 抗体为阳性对照，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- d. 250 μ l 1 $\times$ PBST 洗涤 3 次。
- e. 每孔加入 100 μ l 抗人 FC 抗体-HRP (1:4000)，37 $^{\circ}$ C 孵育 40 分钟。
- 20 f. 每孔加入 100 μ l TMB，室温孵育 10 分钟后加入 100 μ l 1M H₂SO₄ 终止反应。
- g. 酶标仪上检测 450nm 测吸收值，Graphpad Prism5 分析数据。

本发明融合蛋白体外结合人源 PD-L1 的结果如图 4 所示。ELISA 显示融合蛋白均保留了对人源 PD-L1 的结合活性。

25

测试例 3：体外检测 PD-1/PD-L1 通路阻断实验

1、测试目的：

为了研究 PD-L1/TGF- β trap 对 PD-1/PD-L1 信号通路的阻断作用，采用来自 Promaga 公司构建的分别带有人源 PD-1 和 PD-L1 受体分子的细胞，进行基于细胞
30 水平上的抗体阻断实验。

2、测试样品：

① PD-L1 抗体：SEQ ID NO: 11，SEQ ID NO: 12；

② 对照 1(20T-Fc)：ECD(20-136)-Fc，TGF- β RII 胞外区截短片 ECD(20-136)与 Fc 的融合蛋白

35 序列如下：

GAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENIT
LETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE

EYNTSNPDAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
 5 CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

SEQ ID NO: 18;

③ 对照 2(22T-Fc): ECD(22-136)-Fc, TGF- β RII 胞外区截短片段 ECD(22-136)
 与 Fc 的融合蛋白

序列如下:

10 VKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLET
 VCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYN
 TSNPDAESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
 15 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLGLG

SEQ ID NO: 19;

④ 融合蛋白 9, 融合蛋白 15;

⑤ 人 IgG: 空白对照, 从混合的正常人血清中, 利用传统的亲和层析方法如
 20 ProteinA 纯化获得的人免疫球蛋白;

⑥ 阳性对照 (M7824, 参考专利 WO2015118175 制备): PD-L1 抗体/TGF- β RII
 胞外区融合蛋白

PD-L1 抗体轻链的氨基酸序列

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVS
 25 NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTV
 LGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG
 VETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:20

PD-L1 抗体重链/TGF- β RII 胞外区 (1-136) 的 H 链的氨基酸序列:

30 EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPS
 GGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTV
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 35 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGIPPHVQKS
 VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV

AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCS
SDECNDNIIFSEEYNTSNPD

SEQ ID NO:21。

3、测试过程

5 取 CHO/PD-L1 细胞（CS187108, Promega），消化并用 F-12 Nutrient Mixture (Ham)完全培养基重悬细胞，根据细胞计数结果使用完全培养基调整细胞密度至 $4 \times 10^5/\text{mL}$ ，将细胞悬液转移至加样槽中，使用多道移液器以 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到 96 孔板中，放置于 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ 培养箱培养 20~24 h；第二天制备 Jurkat/PD-1（CS187102, Promega）细胞悬液，根据细胞计数结果使用分析培养基重悬细胞，
10 并调整细胞密度至 $1.25 \times 10^6/\text{mL}$ ；将加入 CHO/PD-L1 细胞的细胞培养板从培养箱中取出，使用多道移液器每孔取出 $95 \mu\text{L}$ 培养液，按照 $40 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入梯度稀释的融合蛋白，以及 PD-L1 抗体及阳性对照（M7824），然后将 Jurkat/PD-1 细胞悬液转移至加样槽中，以 $40 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到细胞培养板中，置于 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ 培养箱培养 5~6 h。在蛋白孵育期间，将 Bio-Glo™ Reagent 取出使其温度恢复至室温。取出细胞培养板，置于室温放置 5~10 min，然后每孔加入 $40 \mu\text{L}$ Bio-Glo™ Reagent，置于
15 安全柜中孵育 5~10 min，使用多功能酶标仪读取化学发光信号值。

4、结果

如图 5 所示，本发明融合蛋白 9 同阳性分子一样均能够有效地阻断表达有 PD-1 分子的 Jurkat 细胞同 CHO/PD-L1 细胞结合，并且有药物浓度剂量依赖效应。融合
20 蛋白 15 与融合蛋白 9 有相同水平的阻断能力。

测试例 4：Biacore 检测体外结合亲和力和动力学实验

通过 Biacore T200（GE）测定待测分子与人或鼠源 TGF- β 1 或人源 PD-L1 蛋白的亲和力，实验过程描述如下：

25 用 Protein A 芯片亲和捕获一定量的 PD-L1/TGF- β trap，然后于芯片表面流经人或鼠源 TGF- β 1（8915LC, CST）或人源 PD-L1（Sino Biological），利用 Biacore 实时检测反应信号，从而获得结合和解离曲线，然后用甘氨酸-盐酸(pH 1.5, GE)将生物芯片洗净再生。实验中用到的缓冲溶液为 HBS-EP Buffer（GE）。实验得到的数据用 BIAevaluation version 4.1 软件（GE）以(1:1) Langmuir 模型进行拟合，得
30 出如表 3 所示的亲和力数值。

表 3：本发明融合蛋白与 TGF- β 1 或人源 PD-L1 的体外亲和力

融合蛋白*	亲和对象	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
融合蛋白 9	人源 TGF- β 1	1.73E7	7.28E-4	4.22E-11
融合蛋白 15		2.69E7	6.08E-4	2.26E-11
融合蛋白 9	鼠源 TGF- β 1	4.33E7	1.33E-3	3.07E-11
融合蛋白 15		3.57E7	1.22E-3	3.42E-11

融合蛋白 9	人源 PD-L1	1.97E6	1.24E-4	6.31E-11
融合蛋白 15		2.00E6	1.24E-4	6.10E-11

*对应序号的融合蛋白形式见表 2。

融合蛋白结合活性见表 3，结果表明，本发明融合蛋白 9 和 15 均对人，小鼠 TGF- β 1 以及人 PD-L1 具极高的亲和力。

5 测试例 5: SMAD3 报告基因抑制实验

1、测试目的

该实验通过 HepG2 细胞表达带荧光素酶报告基因的 Smad3 结合原件 (SBE) 来研究 PD-L1/TGF- β trap 对 TGF- β 1 诱导 Smad3 活化的抑制作用，根据 IC50 大小评价 PD-L1/TGF- β trap 的体外活性。

10 2、测试样品：融合蛋白 9、阳性对照 (M7824)

3、测试过程

HepG2 细胞使用含有 10% FBS 的 MEM 完全培养基 (GE, SH30243.01) 培养，每 3 天传代一次。实验第一天以每孔 25,000 个细胞的密度接种于 96 孔板 (Corning, 3903)，在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 小时。第二天，弃去细胞培养板中的培养基，每孔转染 100ng 3TP-Lux 质粒。细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养 24 小时。加入待测样品前 6 小时，弃去 96 孔板中完全培养基，每孔加入 80 μ L 不完全培养基 (MEM+0.5%FBS)。6 小时后再加入 10 μ L 使用不完全培养基配制的人 TGF- β 1 (R&D, 240-B-010) 溶液，终浓度为 2 ng/mL 和 10 μ L 待测样品，终浓度为 500、50、5、0.5、0.05、0.005、0.0005 和 0nM，以人 TGF- β 1 溶剂为对照，细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养 18h。然后每孔加入 100 μ L 配制好的荧光素酶底物 ONE-Glo™ Luciferase Assay system (promega, E6110)，室温避光放置 10 分钟，然后使用 Victor3 多功能酶标仪 (Perkin Elmer) 读取发光信号值。待测样品的 IC50 值使用数据处理软件 Graphpad Prism5.0 计算得到。

图 6 显示融合蛋白 9 以剂量依赖性形式抑制 TGF β 诱导的 pSMAD3 报告物活性，且与阳性对照 M7824 具有相当的药效和 IC50(抑制最大活性的 50%所需的浓度)。PD-L1 抗体的测试结果显示其不具有抑制作用 (IC50>500 nM)。

测试例 6: 体外检测结核杆菌素 (TB) 刺激 PBMC 释放 IFN γ 实验

1、测试目的

30 为了研究 PD-L1/TGF- β trap 对 T 淋巴细胞的激活作用，收集和纯化人外周血单核细胞 (PBMC)，采用结核杆菌素 (TB) 体外刺激 5 天，检测 IFN γ 细胞因子的分泌水平。

2、测试样品：①Human IgG；②PD-L1 抗体；③融合蛋白 9；④对照 1 (20T-Fc)：ECD(20-136)-Fc；⑤PD-L1 抗体+对照 1 (20T-Fc)。

3、测试过程

新鲜分离纯化的 PBMC，15mL 约 3×10^7 个，加入 20 μ L 结核菌素，37℃、5% CO₂ 培养箱培养 5 天。第 6 天，收集上述培养的细胞离心，用 PBS 洗一次，重悬至新鲜的培养基中，调整密度为 1×10^6 个每毫升，接种至 96 孔细胞培养板，每孔 90 μ L。将不同浓度的抗体分别加入上述 96 孔细胞培养板的对应孔中，每孔 10 μ L，对照组和空白组分别加入 10 μ L PBS。细胞培养板置于 37℃，5% CO₂ 培养箱孵育 3 天。取出细胞培养板，离心（4000rpm，10min）每孔取上清，10 倍稀释后，采用 ELISA 的方法（人 IFN- γ 检测试剂盒，欣博盛，EHC102g.96）检测 IFN- γ 的水平。具体操作参考试剂说明书。结果如图所示，PD-L1/TGF- β trap 融合蛋白样品均能够增强激活的 T 淋巴细胞分泌细胞因子 IFN- γ ，并且有药物浓度剂量效应。

表4

抗体	EC50 (nM)	IFN γ 的最大分泌(pg/ml)	IFN γ 的最小分泌(pg/ml)	倍数(IFN γ 的分泌)
PD-L1抗体	0.05	2684	737	3.6
融合蛋白9	0.12	3422	638	5.4
对照1（20T-Fc）	>50	780	490	1.6
PD-L1抗体+对照1	0.054	2879	746	3.9
人IgG	>50	375	298	1.2
空白对照	/	536	536	1

4、结果

如图7、表4所示，融合蛋白9能够剂量依赖地增强激活的T淋巴细胞分泌细胞因子IFN- γ ，并且具有比PD-L1抗体，20T-FC更强的激活作用。

药代动力学评价

测试例7：

实验用 SD 大鼠 3 只，雌性，12/12 小时光/暗调节，温度 24 $\pm$ 3℃恒温，湿度 50-60 %，自由进食饮水。购自杰思捷实验动物有限公司。实验当天对 SD 大鼠分别尾静脉注射融合蛋白，给药剂量为 6 mg/kg，注射体积为 5 ml/kg。

取血时间点为：第 1 天给药后 15 min、7h、24h（第 2 天），第 3 天，第 4 天，第 6 天，第 8 天，第 10 天，第 15 天，于大鼠眼底静脉取血，每次 200 μ l(相当于取血清 100 μ l)；收集的血样在室温下置放半小时至凝集，然后 4℃ 下 10000 x g 离心 10 分钟。收集上清，立即放置-80℃ 贮存。用 ELISA 检测血清中的融合蛋白浓度。

检测流程描述如下：

- a. 以 2 μg/ml 浓度的人源 PD-L1-His 为抗原按 100 μl/孔包被 96 孔板, 4℃ 过夜。
- b. 250 μl 1×PBST 洗涤 4 次, 加入 250 μl 5% 牛奶 PBS, 37℃ 封闭 3 小时。
- c. 250 μl 1×PBST 洗涤 4 次, 加入 100 μl 梯度稀释的待测血清, 以融合蛋白 9 为阳性对照, 37℃ 孵育 1 小时。
- 5d. 250 μl 1×PBST 洗涤 5 次。
- e. 每孔加入 100 μl 生物素化的抗人源 TGF-βRII 的抗体(R&D) , 37℃ 孵育 1 小时。
- f. 250 μl 1×PBST 洗涤 5 次。
- g. 每孔加入 100 μl TMB, 室温孵育 10 分钟后加入 100 μl 1M H₂SO₄ 终止反应。
- 10h. 酶标仪上检测 450nm 测吸收值, Graphpad Prism5 分析数据。

表 5: 融合蛋白在 SD 大鼠中的 T1/2

受试药物	给药方式	T1/2 (平均值±SD, h)
融合蛋白 9	IV (6 mg/kg)	236±10

参见表 5, PK 分析结果表明, 本发明融合蛋白分子融合蛋白 9 在大鼠体内的半衰期约为 236 h (9.8 天)。

15

体内活性生物学评价

测试例 8: PD-L1/TGF-β trap 对人乳腺癌 MDA-MB-231 小鼠皮下移植瘤的疗效

20

本实验应用的小鼠品系为 NOD/SCID 雌性小鼠（卡文斯），实验使用的人外周血单个核细胞从新鲜采集的血液中提取获得，提取方法如下：将肝素抗凝处理的静脉血与同体积含 2% FBS 的 PBS 混合，混匀后将 25ml 稀释后的血液缓慢加入到含 15ml 淋巴细胞分离液的离心管中，室温下 1200g 离心 10 分钟，吸取淋巴细胞层转移到另一个离心管，加入 PBS 清洗细胞，室温下 300g 离心 8 分钟，重复一次后，用含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞，将细胞加入到事先包被好 CD3 抗体（OKT3, 40ng/ml）的 6 孔板中，每孔 2×10⁶ 个细胞（2ml），置于 37℃ 培养箱中培养 4 天。

实验样品：

- 25
- ①空白对照：PBS；②融合蛋白 9-4.8mpk；③融合蛋白 9-24mpk；④PD-L1 抗体-4mpk；⑤PD-L1 抗体-20mpk；⑥ PD-L1 抗体-4mpk +对照 1（20T-Fc）-2.14mpk；⑦对照 1（20T-Fc）-2.14mpk。

30

将 MDA-MB-231 细胞重悬于无血清 RPMI-1640 培养基中，与等体积基质胶混合后 100μl（2.3×10⁶）接种于 NOD/SCID 小鼠右肋部皮下，11 天后去除肿瘤体积过大过小动物后，将小鼠随机分组，每组 9 只。将 5×10⁵ 个刺激后的 PBMC（60μl）注射到肿瘤组织中，剩余的 PBMC 停止刺激并继续培养，1 周后将 5×10⁶ 个 PBMC

(100μl) 腹腔注射到荷瘤小鼠体内，视为第 1 轮注射。整个实验周期，进行 2 轮半、共 5 次 PBMC 注射。首次瘤内注射当日开始腹腔给药，一周三次，共给药 14 次，给药方式见表 6。每周 2 次测量瘤体积，称体重。实验结果见表 7。实验结束后将荷瘤小鼠安乐死并剥瘤称重。

5

表6： 试验分组及给药情况

组别	给药剂量
①空白对照： PBS	0
②融合蛋白 9-4.8mpk	4.8 mg/kg
③融合蛋白 9-24mpk	24mg/kg
④PD-L1 抗体-4mpk	4mg/kg
⑤PD-L1 抗体-20mpk	20mg/kg
⑥PD-L1 抗体-4mpk +对照 1-2.14mpk	4 mg/kg +2.14 mg/kg
⑦对照 1-2.14mpk	2.14mg/kg

表7： 融合蛋白9对MDA-MB-231小鼠皮下移植瘤的疗效

组别	第 0 天	第 25 天		第 32 天		第 33 天	
	平均值 ±SEM	平均值±SEM	%TGI	平均值±SEM	%TGI	平均值±SEM	P(对比 PBS)
	(V mm³)	(V mm³)		(V mm³)		(TW g)	(TW)
①空白对照： PBS	62.5±2.9	623.4±43.3	-	941.1±54.9	-	0.859±0.063	-
②融合蛋白 9-4.8mpk	62.6±3.5	414.6±17.1***	37.24%	618.9±28.7***	36.68%	0.454±0.025***	2.06E-05
③融合蛋白 9-24mpk	62.7±3.3	329.8±22.5***	52.38%	495.3±42.6***	50.76%	0.367±0.026***	2.20E-06
④PD-L1 抗体-4mpk	63.1±3.5	454.4±40.8*	30.24%	722.8±65.8*	24.91%	0.592±0.052**	0.0050
⑤PD-L1 抗体-20mpk	62.6±3.3	466.4±17.2**	28.01%	741.8±32.9**	22.70%	0.650±0.033**	0.0100
⑥ PD-L1 抗体-4mpk +对照 1-2.14mpk	62.6±3.3	447.5±29.6**	31.38%	669.2±45.3**	30.96%	0.566±0.039**	0.0012
⑦对照 1-2.14mpk	60.7±3.3	601.5±30.9	3.58%	861.7±34.2	8.83%	0.652±0.041*	0.0178

第 0 天：第一次给药时间；* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ 通过 student t 检验与 PBS 对比。

实验结果如图 8 显示，抗体融合蛋白 9（4.8、24mg/kg）能明显抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 小鼠皮下移植瘤的生长，高低剂量间呈现剂量依赖关系，且优于各自等同摩尔剂量的参比药物 PD-L1 抗体（4、20mg/kg）、TGF-βRII 对照分子 20T-FC（2.14mg/kg）和联用组（PD-L1 抗体-4mg/kg+20T-FC -2.14mg/kg）。各剂量的融合蛋白 9 从给药后 14d 开始，就一直保持理想的抑瘤效果，且其高剂量与 PD-L1 抗体-20mpk 相比,优势非常明显（ $p<0.05$ ）；给药后 25d，各抗体抑瘤效果最好，融合蛋白 9 和 PDL-1 抗体低、高剂量与联用组的抑瘤率分别为 37.24%、52.38%、30.24%、28.01%、31.38%；给药后 32 天，融合蛋白 9 的抑瘤作用仍十分明显，低高剂量

组 %TGI 分别为 36.68%和 50.76%，且瘤体积与对照组相比都存在统计学差异（ $p < 0.05$ ）。

测试例 9：PD-L1/TGF- β trap 的物理稳定性

5 本测试例用于检测融合蛋白融合蛋白 9 和融合蛋白 15 的稳定性。

利用 DSC（Differential scanning calorimetry，差示扫描量热法）检测不同抗体的热稳定性，比较了不同的缓冲体系下的稳定性情况，不同缓冲体系如 10mM 醋酸盐/135mM NaCl（pH 5.5）和 10mM 醋酸盐/9%海藻糖（pH 5.5）。

10 将样品置换到对应缓冲液中，控制样品浓度在 50mg/ml 左右，利用 MicroCal* VP-Capillary DSC（Malvern）进行检测。检测前，将各个样品及空白缓冲液用真空脱气器脱气 1~2min。样品板每个孔加入 400 μ l 样品或空白缓冲液（仪器上样量为 300 μ l）。最后两对孔板分别加入 14% Decon 90 和 ddH₂O，以备清洗用，样品板加样完毕后，套上塑料软盖板。扫描温度从 25℃开始到 100℃结束，扫描速率 60℃/h。具体结果如下表 8 所示，在两个测试体系中融合蛋白 9、融合蛋白 15 均表现

15 了良好的热稳定性。

表 8

样品	缓冲液	Tm-起始（℃）	TM（℃）
融合蛋白 9	10mM 醋酸盐/135mM NaCl	57.99	66.33
	10mM 醋酸盐/9% 海藻糖	58.64	67.83
融合蛋白 15	10mM 醋酸盐/135mM NaCl	57.33	66.17
	10mM 醋酸盐/9% 海藻糖	57.41	67.44

通过 SEC-HPLC 监测样品纯度考察一定浓度条件下周期性稳定性，示例性的条件比如将样品浓度控制在约 50mg/ml，在 10mM 醋酸盐/135mM NaCl（pH 5.5）比较在比如-80℃反复冻融 5 次及 40℃保存一个月的稳定性情况。利用 Xbridge protein BEH SEC 200A（Waters）HPLC 柱子检测。检测结果如下表 9 所示，两个融合蛋白均表现出良好的稳定性。

表 9

	融合蛋白 9（ $\Delta\%$ ）	融合蛋白 15（ $\Delta\%$ ）
40℃	3.39%	1.8%
-80℃冻融	1.44%	1.39%

注： $\Delta\%$ 表示变化率。

测试例 10：融合蛋白的化学稳定性

脱酰胺修饰是抗体中可能影响后期稳定性的一种常见的化学修饰，尤其是 CDR 区域的部分氨基酸高度脱酰胺修饰一般选择尽量避免或者突变降低。取 1600μg 待测抗体溶于 200μl 10mM 醋酸盐/135mM NaCl (pH 5.5) 中，40℃恒温箱存放；分别于 0、14、28 天取样，用于酶解实验。将 100μg 不同时间点取样的样品溶于 100μl 0.2 M His-HCl, 8 M Gμa-HCl, pH 6.0 溶液中，加 3μl 0.1g/mL DTT, 50℃水浴 1 小时，后用 0.02 M His-HCl, pH 6.0 的溶液超滤两次，加入 3μL 0.25mg/ mL 的胰蛋白酶, 37℃水浴酶解过夜。Agilent 6530 Q-TOF 进行 LC-MS 检测脱酰胺修饰情况，结果如下表 10 所示。

表 10

样品	重链	修饰位点	第 0 天	第 14 天	第 28 天
融合蛋白 9	重链	N314	2.38%	2.28%	2.45%
		N324	0.20%	3.60%	7.88%
融合蛋白 15	重链	N314	2.87%	2.86%	2.87%
		N324	0.00%	3.61%	7.93%

备注：N 代表检测到修饰的天冬酰胺，数字代表所处轻链或者重链 N 端开始计数所处的位置。百分含量代表 LC-MS 检测到的脱酰胺修饰占该位点所处全部肽段信号的比例。

质谱检测结果显示两个融合蛋白都没有明显的脱酰胺修饰位点，提示其后期化学稳定性良好。

权利要求书:

1. 一种含有 TGF- β 受体的融合蛋白, 包含靶向部分和 TGF- β 受体部分, 其中, 所述的 TGF- β 受体部分为 TGF- β RII 胞外区的 N 端截短形式。

2. 根据权利要求 1 所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白, 其中所述的 TGF- β RII 胞外区的 N 端截短形式选自在 TGF- β RII 胞外区的 N 端上有 26 个以下连续氨基酸的缺失, 优选 14-26 个连续氨基酸的缺失, 更优选 14-21 个连续氨基酸的缺失, 最优选 14、19 或 21 个连续氨基酸的缺失。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白, 其中所述的 TGF- β RII 胞外区的序列如 SEQ ID NO: 13 所示; 最优选包含 SEQ ID NO: 14、15 或 16 所示的序列。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白, 其中所述的靶向部分为细胞特异性靶向部分; 优选的, 所述的靶向部分为癌细胞特异性靶向部分。

5. 根据权利要求 4 所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白, 其中所述的癌细胞特异性靶向部分选自抗体或其抗原结合片段、生长因子、激素、肽、受体或细胞因子。

6. 根据权利要求 5 所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白, 其中所述的抗体或其抗原结合片段选自全长抗体、嵌合抗体、Fab'、Fab、F(ab')₂、单结构域抗体、Fv、scFv、小抗体、双特异性抗体、三特异性抗体或其混合物。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白, 其中所述的抗体或其抗原结合片段结合选自以下一种或多种多肽或蛋白: HER2、HER3、免疫检验点分子、CD33、VEGF、VEGFR、VEGFR-2、CD152、TNF、IL-1、IL-5、IL-17、IL-6R、IL-1、IL-2R、BLYS、PCSK9、EGFR、c-Met、CD2、CD3、CD11a、CD19、CD30、CD38、CD20、CD52、CD60、CD80、CD86、TNF- α 、IL-12、IL-17、IL-23、IL-6、IL-1 β 、RSVF、IgE、RANK、BLyS、 α 4 β 7、PD-1、CCR4、SLAMF7、GD2、CD21、CD79b、IL20R α 、CD22、CD79a、CD72、IGF-1R 和 RANKL; 优选所述的抗体或其抗原结合片段结合免疫检验点分子。

8. 根据权利要求 5-7 中任一项所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白, 其中所述的抗体为 PD-L1 抗体; 优选的, 所述的 PD-L1 抗体选自: MSB0010718C、MEDI4736、

BMS-936559、MPDL3280A 的 PD-L1 抗体，或包含 1 个或多个选自以下的 CDR 区序列或 CDR 区序列的突变序列的抗体：

如SEQ ID NO： 1所示的HCDR1；

如SEQ ID NO： 2所示的HCDR2；

5 如SEQ ID NO： 3所示的HCDR3；

如SEQ ID NO： 4所示的LCDR1；

如SEQ ID NO： 5所示的LCDR2；

如SEQ ID NO： 6所示的LCDR3。

10 9. 根据权利要求 5-8 中任一项所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白，其中所述的抗体或其抗原结合片段为嵌合抗体或其功能片段、人源化抗体或其功能片段、或人抗体或其功能片段。

15 10. 根据权利要求 9 所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白，其中所述人源化抗体的重链可变区具有如 SEQ ID NO： 7 所示的序列，优选具有如 SEQ ID NO： 9 所示的序列。

11. 根据权利要求 9 所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白，其中所述的人源化抗体进一步包括序列 SEQ ID NO： 11 所示的重链。

20

12. 根据权利要求 9 所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白，其中所述的人源化抗体包含 SEQ ID NO： 8 或 10 所示的轻链可变区序列或轻链可变区的突变序列。

25 13. 根据权利要求 9 所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白，其中所述的人源化抗体包含序列 SEQ ID NO： 12 所示的轻链。

14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白，其中所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白如通式 (I) 所示：

Ab-L- TGF- β RII ECD (I)

30 其中 TGF- β RII ECD 为 TGF- β RII 胞外区的截短形式；

Ab 为抗体；

L 为连接序列。

35 15. 根据权利要求 14 所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白，其中所述的连接序列为 $(G_4S)_xG$ ，其中 x 为 3-6，优选为 4-5。

16. 一种药物组合物，其含有治疗有效量的根据权利要求 1 至 15 中任一项所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

5 17. 一种 DNA 分子，其编码根据权利要求 1-15 中任一项所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白。

18. 一种表达载体，其含有根据权利要求 17 所述的 DNA 分子。

10 19. 一种宿主细胞，其含有根据权利要求 18 所述的表达载体，所述宿主细胞选自细菌、酵母菌和哺乳动物细胞；优选哺乳动物细胞。

20. 根据权利要求 1 至 15 中任一项所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白或根据
权利要求 16 所述的药物组合物，在制备用于肿瘤治疗的药物中的用途；优选在制
15 备用于治疗 PD-L1 介导的肿瘤的药物中的用途；更优选为表达 PD-L1 的癌症。

21. 一种治疗和预防肿瘤的方法，包括给予所需患者治疗有效量的根据权利
要求 1 至 15 中任一项所述的含有 TGF- β 受体的融合蛋白或根据权利要求 16 所述
20 的药物组合物。

22. 一种截短的 TGF- β RII 胞外区，其中所述的 TGF- β RII 胞外区的截短选自
在 SEQ ID NO: 13 的 N 端上有 26 个以下连续氨基酸的缺失，优选 N 端 14-26 个
连续氨基酸的缺失，更优选 N 端 14-21 个连续氨基酸的缺失；最优选包含 SEQ ID
NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示的序列。

25 23. 一种药物组合物，其含有治疗有效量的根据权利要求 22 所述的截短的
TGF- β RII 胞外区，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

24. 根据权利要求 22 所述的截短的 TGF- β RII 胞外区或根据权利要求 23 所述
30 的药物组合物，在制备用于治疗、抑制癌细胞增殖或转移的疾病或病症的药物中的
用途。

25. 一种治疗和预防肿瘤的方法，包括给予所需患者治疗有效量的根据权利
要求 22 所述的截短的 TGF- β RII 胞外区或根据权利要求 23 所述的药物组合物。

35

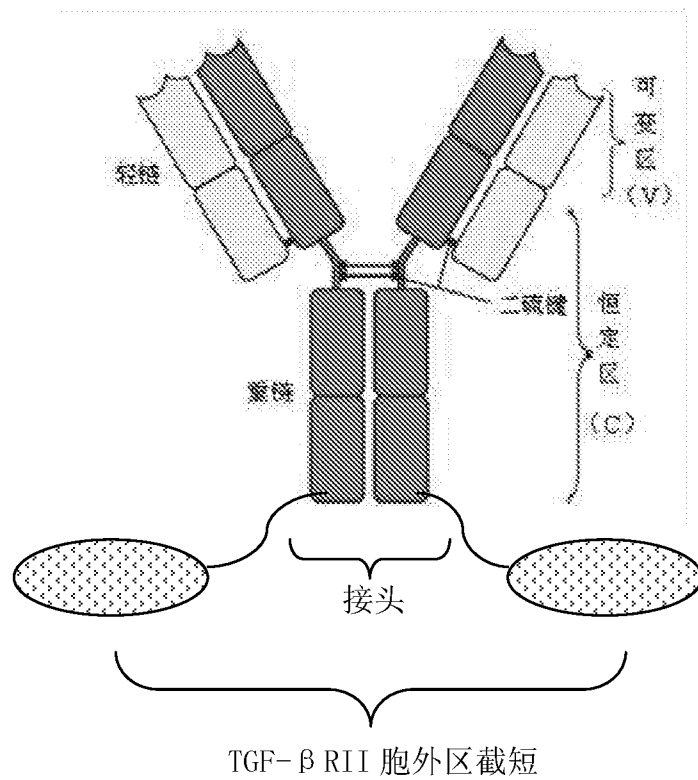


图 1

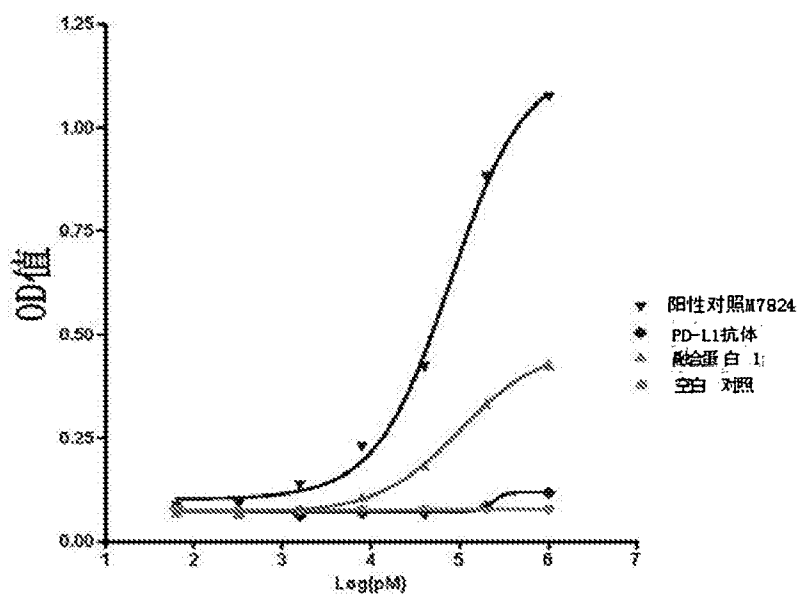


图 2

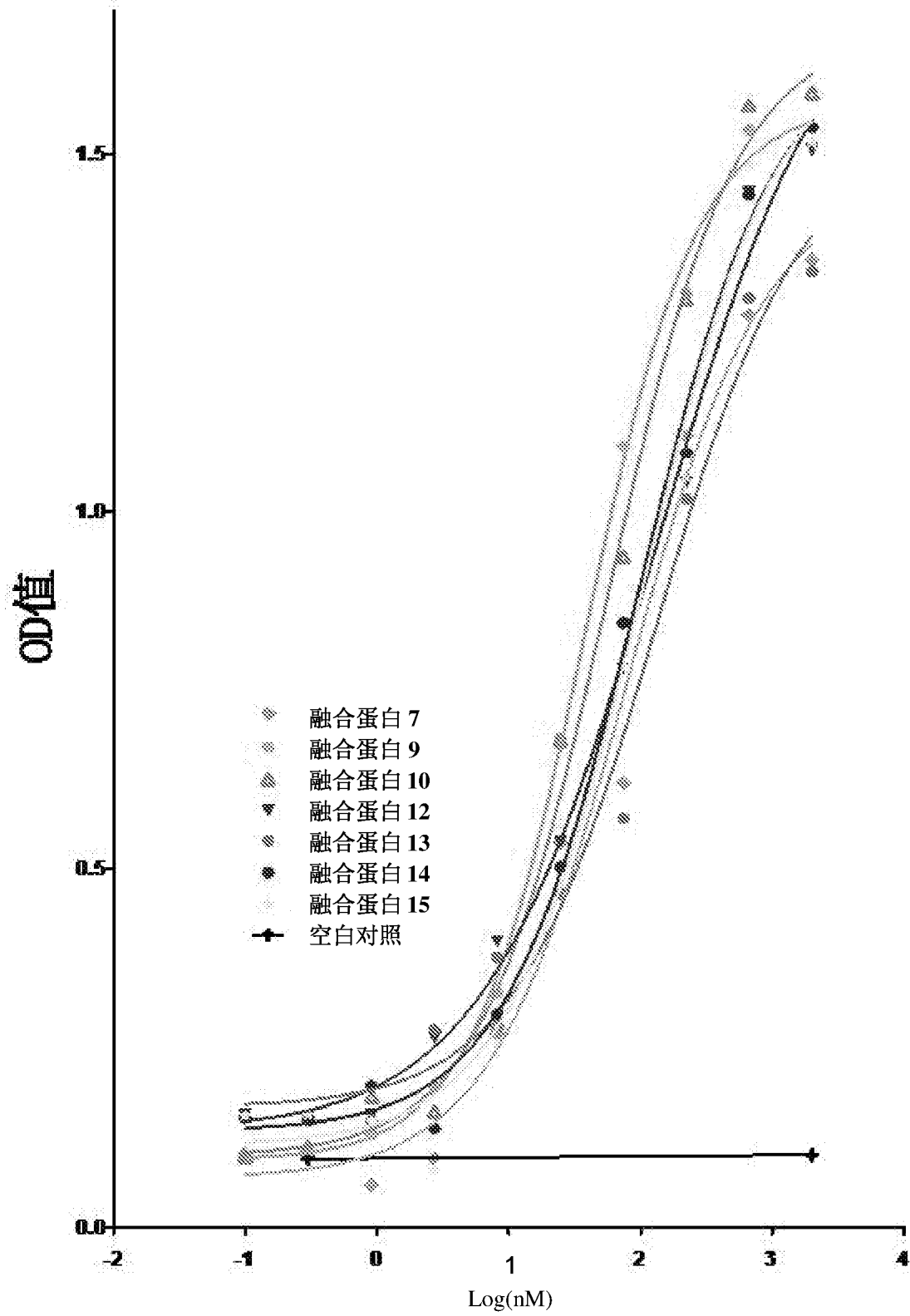


图 3

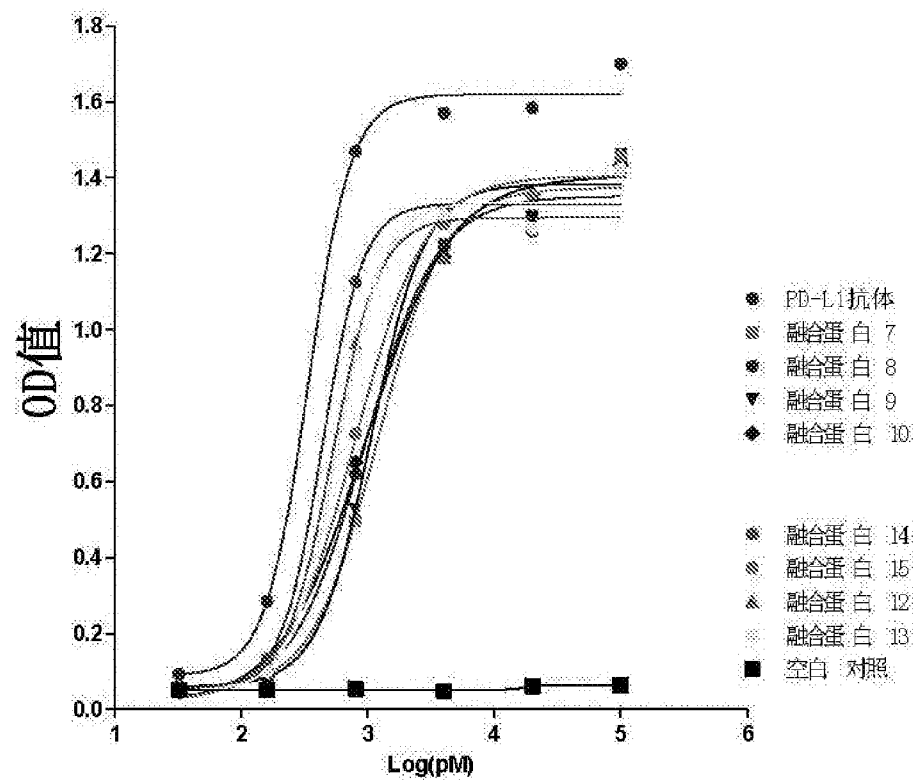


图 4

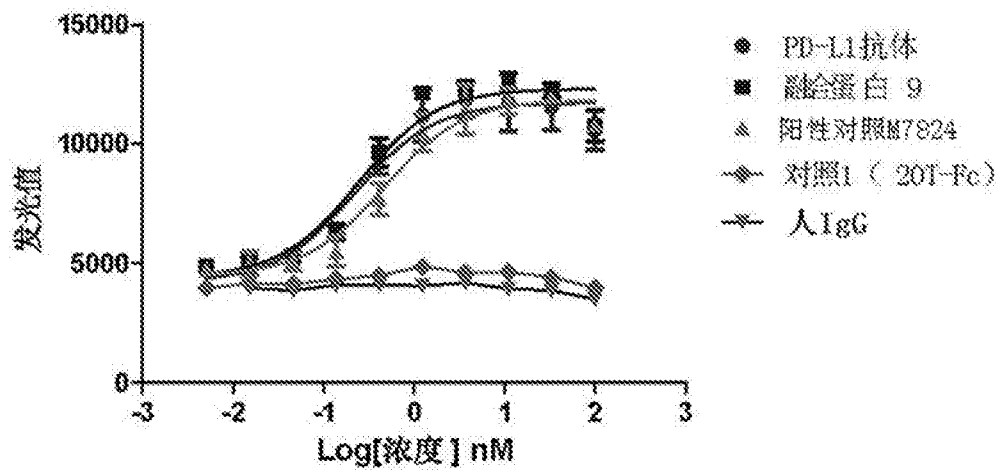


图 5

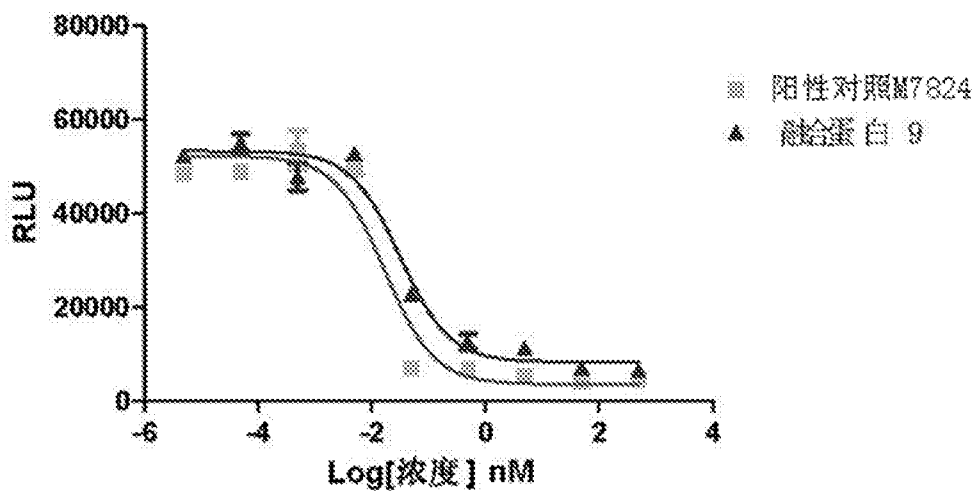


图 6

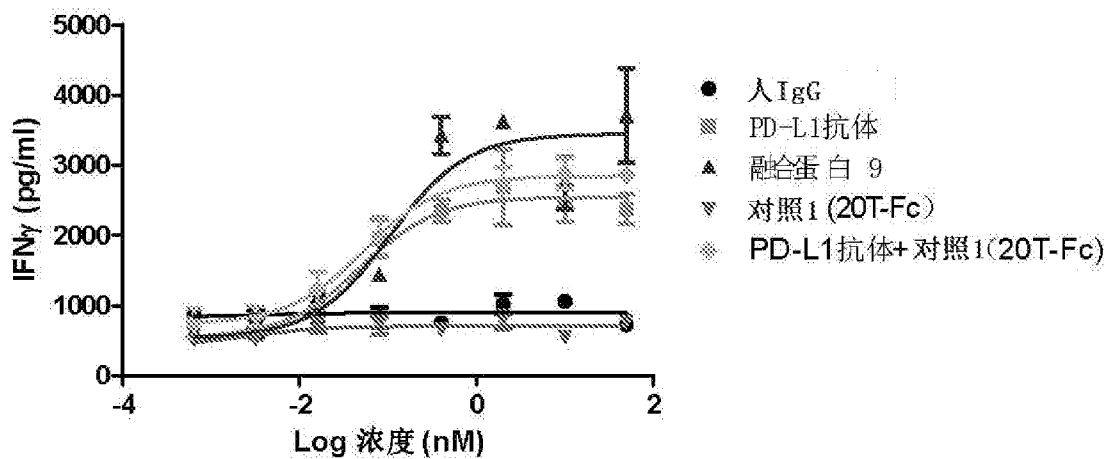


图 7

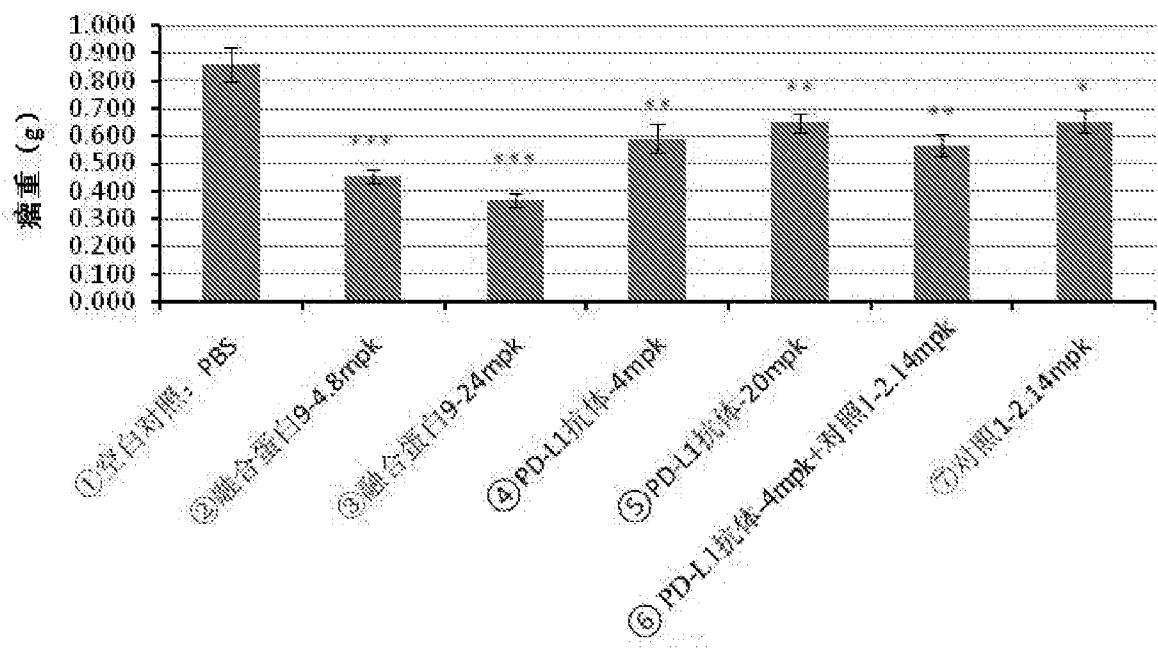


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/086451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00 (2006.01) i; C07K 14/71 (2006.01) i; C07K 14/495 (2006.01) i; A61K 38/17 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI; CNPAT and Keywords: TGF, TGF β , TGF β RII, 受体; 融合蛋白, 融合, DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; EMBASE and Keywords: TGF, TGF β , TGF β RII, receptor, fus+ GenBank; EMBL; STN; Chinese Patent
Biological Sequence Retrieval System: SEQ ID NOs. 1-12

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105658672 A (ACCELERON PHARMA INC.) 08 June 2016 (08.06.2016), claims 1-69, SEQ ID NO: 5	1-3, 16-20, 22-24
Y	CN 105658672 A (ACCELERON PHARMA INC.) 08 June 2016 (08.06.2016), claims 1-69, SEQ ID NO: 5	4-7, 9, 14, 15
A	CN 105658672 A (ACCELERON PHARMA INC.) 08 June 2016 (08.06.2016), claims 1-69, SEQ ID NO: 5	8, 10-13
Y	CN 105121474 A (BIOCON LTD.) 02 December 2015 (02.12.2015), the abstract, claims 1-43, and description, paragraphs [0020]-[0022] and [0028]-[0032]	4-7, 9, 14, 15
A	CN 105121474 A (BIOCON LTD.) 02 December 2015 (02.12.2015), the abstract, claims 1-43, and description, paragraphs [0020]-[0022] and [0028]-[0032]	8, 10-13

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

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 13 July 2018	Date of mailing of the international search report 01 August 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer YUE, Lixi Telephone No. (86-10) 62411096

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/086451

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.: 21 and 25
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv): methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/086451

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105658672 A	08 June 2016	US 9809637 B2	07 November 2017
		AU 2014308751 A1	17 March 2016
		US 2016376341 A1	29 December 2016
		JP 2016528295 A	15 September 2016
		EP 3036262 A1	29 June 2016
		WO 2015027082 A1	26 February 2015
		EP 3036262 A4	01 March 2017
		CA 2921805 A1	26 February 2015
		US 2015056199 A1	26 February 2015
CN 105121474 A	02 December 2015	US 9988456 B2	05 June 2018
		US 2016009807 A1	14 January 2016
		BR 112015022733 A2	31 October 2017
		WO 2014164427 A1	09 October 2014
		AU 2014249405 A1	29 October 2015
		EP 2970512 A1	20 January 2016
		CA 2902830 A1	09 October 2014
		EP 2970512 A4	09 November 2016
		JP 2016512508 A	28 April 2016
		HK 1217343 A1	06 January 2017
		AU 2018202982 A1	17 May 2018
		AU 2014249405 B2	01 February 2018
		RU 2015140608 A	18 April 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/086451

A. 主题的分类 C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/71(2006.01)i; C07K 14/495(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNKI; CNPAT和检索词: TGF, TGF β , TGF β RII, 受体; 融合蛋白, 融合 DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WO-TXT; JPTXT; ELSEVIER; EMBASE和检索词: TGF, TGF β , TGF β RII, receptor, fus+ GenBank; EMBL; STN; 中国专利生物序列检索系统: SEQ ID NO: 1-12		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 105658672 A (阿塞勒隆制药公司) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 权利要求1-69, SEQ ID NO: 5	1-3, 16-20, 22-24
Y	CN 105658672 A (阿塞勒隆制药公司) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 权利要求1-69, SEQ ID NO: 5	4-7, 9, 14-15
A	CN 105658672 A (阿塞勒隆制药公司) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 权利要求1-69, SEQ ID NO: 5	8, 10-13
Y	CN 105121474 A (比奥孔有限公司) 2015年 12月 2日 (2015 - 12 - 02) 摘要, 权利要求1-43, 说明书第20-22段、第28-32段	4-7, 9, 14-15
A	CN 105121474 A (比奥孔有限公司) 2015年 12月 2日 (2015 - 12 - 02) 摘要, 权利要求1-43, 说明书第20-22段、第28-32段	8, 10-13
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2018年 7月 13日		国际检索报告邮寄日期 2018年 8月 1日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 岳礼溪 电话号码 86-(010)-62411096

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： 21, 25
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT实施细则39.1 (iv) —治疗人体或者动物体的外科手术或者疗法。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/086451

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105658672	A	2016年 6月 8日	US	9809637	B2	2017年 11月 7日
				AU	2014308751	A1	2016年 3月 17日
				US	2016376341	A1	2016年 12月 29日
				JP	2016528295	A	2016年 9月 15日
				EP	3036262	A1	2016年 6月 29日
				WO	2015027082	A1	2015年 2月 26日
				EP	3036262	A4	2017年 3月 1日
				CA	2921805	A1	2015年 2月 26日
				US	2015056199	A1	2015年 2月 26日
CN	105121474	A	2015年 12月 2日	US	9988456	B2	2018年 6月 5日
				US	2016009807	A1	2016年 1月 14日
				BR	112015022733	A2	2017年 10月 31日
				WO	2014164427	A1	2014年 10月 9日
				AU	2014249405	A1	2015年 10月 29日
				EP	2970512	A1	2016年 1月 20日
				CA	2902830	A1	2014年 10月 9日
				EP	2970512	A4	2016年 11月 9日
				JP	2016512508	A	2016年 4月 28日
				HK	1217343	A1	2017年 1月 6日
				AU	2018202982	A1	2018年 5月 17日
				AU	2014249405	B2	2018年 2月 1日
				RU	2015140608	A	2017年 4月 18日