

# (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  
2020年7月16日 (16.07.2020)



(10) 国际公布号  
**WO 2020/143720 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*C07K 19/00* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*C12N 15/62* (2006.01) *A61K 51/10* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*C12P 21/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/071213

(22) 国际申请日: 2020年1月9日 (09.01.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201910023522.6 2019年1月10日 (10.01.2019) CN

(71) 申请人: 北京比洋生物技术有限公司 (BEIJING BEYOND BIOTECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN];

中国北京市大兴区亦庄经济技术开发区西环南路18号汇龙森C座308室, Beijing 100176 (CN)。

(72) 发明人: 胡品良 (HU, Pinliang); 中国北京市大兴区亦庄经济技术开发区西环南路18号汇龙森C座308室, Beijing 100176 (CN)。 邹敬 (ZOU, Jing); 中国北京市大兴区亦庄经济技术开发区西环南路18号汇龙森C座308室, Beijing 100176 (CN)。 洪伟东 (HONG, Weidong); 中国北京市大兴区亦庄经济技术开发区西环南路18号汇龙森C座308室, Beijing 100176 (CN)。 何芸 (HE, Yun); 中国北京市大兴区亦庄经济技术开发区西环南路18号汇龙森C座308室, Beijing 100176 (CN)。 白洁 (BAI, Jie); 中国北京市大兴区亦庄经济技术开发区西环南路18号汇龙森C座308室, Beijing 100176 (CN)。 宋凌云 (SONG, Lingyun); 中国北京市大兴区亦庄经济技术开发区西环南路18号汇龙森C座308室,

(54) Title: MULTI-TARGET FUSION PROTEIN USED FOR BLOCKING VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH AND ACTIVATING T CELLS, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAME

(54) 发明名称: 阻断血管内皮细胞生长且活化T细胞的多靶向融合蛋白和包含其的药物组合物

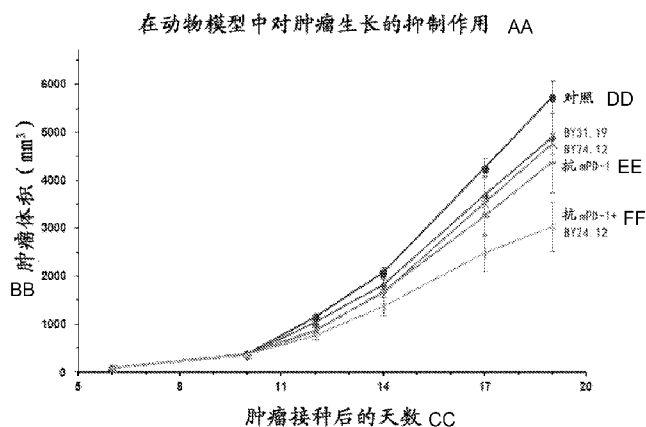


图4

AA Inhibitory effect on tumor growth in animal model  
BB Tumor volume (mm<sup>3</sup>)  
CC Number of days after tumor inoculation  
DD Comparison  
EE Anti-mPD1  
FF Anti-mPD1+

(57) Abstract: The present invention provides a multi-target fusion protein, used for blocking vascular endothelial growth and activating T cells, comprising (i) a vascular endothelial growth repression domain; (ii) an Fc region of immunoglobulin; and (iii) CD80 extracellular domain (ECD). The present invention also provides a polynucleotide coding for the multi-target fusion protein, a carrier comprising the polynucleotide, a host cell comprising the polynucleotide or the carrier, and a pharmaceutical composition comprising the multi-target



WO 2020/143720 A1

Beijing 100176 (CN)。 杨文第(YANG, Wendi); 中国北京市大兴区亦庄经济技术开发区西环南路18号汇龙森C座308室, Beijing 100176 (CN)。

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

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

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, 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))。
- 包括说明书序列列表部分(细则5.2(a))。

fusion protein and an anti-PD1 antibody. The multi-target fusion protein and pharmaceutical composition thereof may treat or prevent cancers in human subjects.

(57) 摘要: 本发明提供了一种阻断血管内皮细胞生长且活化T细胞的多靶向融合蛋白, 其包含(i)血管内皮生长抑制结构域; (ii)免疫球蛋白Fc结构域; 和(iii)CD80胞外结构域(ECD)。本发明还提供了编码所述多靶向融合蛋白的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、包含所述多核苷酸或载体的宿主细胞、以及包含所述多靶向融合蛋白和抗PD-1抗体的药物组合物。本发明的所述多靶向融合蛋白和药物组合物能够在个体中治疗或预防癌性疾病。

## 阻断血管内皮细胞生长且活化T细胞的多靶向融合蛋白和 包含其的药物组合物

### 技术领域

本发明总体上涉及医药生物技术领域。具体地，本发明涉及包含(i)血管内皮细胞生长抑制剂结构域；(ii)免疫球蛋白Fc结构域；和(iii) CD80胞外结构域(ECD)的多靶向融合蛋白、编码所述多靶向融合蛋白的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、包含所述多核苷酸或载体的宿主细胞、以及包含所述多靶向融合蛋白和抗PD-1抗体的药物组合物。本发明的所述多靶向融合蛋白和药物组合物能够在个体中治疗或预防癌性疾病。

### 背景技术

肿瘤微环境是肿瘤细胞赖以生存和发展的复杂环境，由细胞成分和非细胞成分组成，其中细胞成分包括肿瘤细胞本身、免疫细胞、内皮细胞等；非细胞成分包括细胞因子、趋化因子等。随着对肿瘤的研究，人们认识到了肿瘤的生成、生长、转移受到肿瘤微环境的调控。肿瘤微环境决定了肿瘤细胞是否得以优势生长。

在肿瘤微环境中，通常存在 T 淋巴细胞活性的抑制，导致 T 淋巴细胞不能有效发挥对肿瘤的杀伤效应(Yao S, Zhu Y 和 Chen L., *Advances in targeting cell surface signaling molecules for immune modulation.*, *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(2):130-146)，例如，肿瘤细胞通过表达 PD-L1，由此利用免疫检查点的抑制性信号通路（即，PD-1 / PD-L1 抑制性信号通路）来抑制 T 淋巴细胞活性，其中所述 PD-L1 在正常人体组织是不表达的。

以前认为 PD-1 与其配体 PD-L1 结合后，通过抑制 T 细胞受体 (TCR) /主要组织相容性复合物 (MHC) 来实现对 T 淋巴细胞激活的抑制，但近来 Hui 等的研究表明，PD-1 和 CD28 共定位于 T 淋巴细胞膜，PD-1 介导的免疫抑制作用靶标主要为 CD28，而非 TCR，具体而言，PD-1 结合 PD-L1 后快速募集 Shp2 磷脂酶，Shp2 磷脂酶优先地使 CD28 去磷酸化，这强于对 TCR 的去磷酸化，从而通过失活 CD28 信号传导来抑制 T 细胞功能 (Hui E.等人, *T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition*, *Science*, 2017, 355(6332):1428-1433)。

Kamphorst AO 等人证实了 CD28 共刺激信号的激活是 T 细胞“再激活”的重要条件之一 (Kamphorst AO 等人, *Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent*, *Science*, 2017, 355(6332): 1423-1427)。CD28/B7 (即，T 淋巴细胞表面的共刺激分子 CD28 与 CD86(也称为 B7-2)或 CD80(也称为 B7-1)结合的)共刺激途径的活化对于荷瘤小鼠和慢性病毒感染期间抗 PD-1 抗体的治疗效果至关重要，如果用抗 B7 抗体阻断 B7 分子与 CD28 的结合，则抗 PD-1 抗体对肿瘤的抑制作用显著降低。另有研究表明，可溶性 CD80 在小鼠肿瘤系统中具有体内治疗功效 (Horn LA 等人, *Soluble CD80 Protein*

Delays Tumor Growth and Promotes Tumor-Infiltrating Lymphocytes, *Cancer Immunol Res.* 2018; 6(1):59-68)。在肿瘤微环境中 CD80 和 CD86 低表达或不表达，这也是造成肿瘤免疫逃避的重要机制之一。

另外，在 T 细胞表面表达的 CTLA-4 和 T 细胞表面的共刺激分子 CD28 具有高度的同源性，它们拥有相同的配体 CD86(B7-2)或 CD80(B7-1)。CTLA-4 与 B7 分子结合通常会抑制 T 细胞的活化，因此阻断免疫检查点 B7/CTLA-4 通路可以增强肿瘤特异性 T 细胞激活作用。

另一方面，在肿瘤微环境中，肿瘤细胞还通过释放促血管生成因子，例如血管内皮细胞生长因子(Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF))，导致 VEGF 数量激增，VEGF 通过与其细胞表面受体 VEGFR 结合介导了血管内皮细胞的分裂增殖和迁移、提高了血管通透性、抑制肿瘤细胞凋亡，为肿瘤的生长和转移提供了良好的微环境。

目前，已批准上市了用来阻断 PD-1 / PD-L1 抑制性信号通路、阻断 B7/CTLA-4 通路、或阻断 VEGF / VEGFR 通路的单靶向肿瘤治疗药物，它们分别例如为抗 PD-1 抗体药物，如百时美施贵宝(BMS)公司的纳武单抗(Nivolumab)和默克(Merck)公司的派姆单抗(Pembrolizumab); 百时美施贵宝(BMS)公司的抗 CTLA-4 抗体伊匹单抗(Ipilimumab, 商品名为 Yervoy); 基因泰克(Genentech)公司的人鼠嵌合抗 VEGF 抗体贝伐单抗(Bevacizumab, 商品名 Avastin); Sanofi-aventis 公司和 Regeneron 公司研制的作为 VEGF-Trap 的阿柏西普(aflibercept)等。但是，有相当一部分的肿瘤患者对单靶向肿瘤治疗无应答或产生耐药性，例如，目前抗 PD-1 和 PD-L1 抗体药物平均的治疗有效率仅为 20%左右，肺癌的五年生存率仅 16%。因此，在许多情况下，需要采用多靶向疗法来避免患者对单靶向肿瘤治疗无应答或产生耐药性的问题。

由于多靶向融合蛋白能够同时特异性靶向参与肿瘤发生和发展的多种信号传导通路，因此，存在研发能够通过阻断血管内皮细胞生长且活化 T 细胞来改善肿瘤微环境的多靶向融合蛋白、以及将所述多靶向融合蛋白与其他抗癌药联用的需要。

## 发明概述

本发明人通过锐意研究，开发了一组阻断血管内皮细胞生长且活化 T 细胞的多靶向融合蛋白，其包含(i)血管内皮生长抑制剂结构域；(ii)免疫球蛋白 Fc 结构域；和(iii) CD80 胞外结构域(ECD)。所述多靶向融合蛋白能够从两个方面改善肿瘤微环境，并提高肿瘤免疫治疗效果，其中对肿瘤微环境的改善一方面是通过所述多靶向融合蛋白的 CD80 胞外结构域(ECD)与 CD28、PD-L1 和 CTLA-4 的特异性结合实现的，具体而言，通过 CD80 胞外结构域结合 PD-L1 这一免疫检查点，缓解 PD-1 / PD-L1 抑制性信号通路，给免疫系统“松刹车”；通过 CD80 胞外结构域结合 CTLA-4 而发挥同抗 CTLA-4 抗体伊匹单抗同样的抑制调节性 T 细胞(Treg)的功能；通过 CD80 胞外结构域结合 CD28 来活化 CD28/B7 共刺激途径，并激活 T 淋巴细胞，

为淋巴细胞的激活“加油门”；对肿瘤微环境的改善另一方面是通过所述多靶向融合蛋白的血管内皮细胞生长抑制剂结构域阻断 VEGF / VEGFR 通路来抑制肿瘤新生血管的生成，使肿瘤组织血管正常化，从而更多的淋巴细胞浸润到肿瘤组织，以及解除 VEGFs 对免疫细胞的抑制作用。

在一个实施方案中，本发明的多靶向融合蛋白包含(i)衍生自抗 VEGF 抗体和 / 或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段和 / 或 VEGFR 胞外受体功能区；(ii)免疫球蛋白 Fc 结构域；和 (iii) CD80 胞外结构域 (ECD)。

所述多靶向融合蛋白中包含的衍生自抗 VEGF 抗体的抗原结合片段可以衍生自任何抗 VEGF 抗体的抗原结合片段，只要是能够结合 VEGF，并由此阻断或抑制 VEGF 与其受体 VEGFR 结合的抗体即可。所述抗 VEGF 抗体包括现有技术中已知的抗 VEGF 抗体和将来研发出的抗 VEGF 抗体。在一个实施方案中，所述抗 VEGF 抗体的抗原结合片段是抗 VEGF 抗体的 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、单链 Fv；优选地，所述抗 VEGF 抗体的抗原结合片段包含选自 SEQ ID NO: 1/2 和 3/4 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部 6 个重链 CDR 与轻链 CDR，或者与所述全部 6 个重链 CDR 与轻链 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列；更优选地，所述抗 VEGF 抗体的抗原结合片段包含选自 SEQ ID NO: 1/2 和 3/4 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列；最优选地，所述抗 VEGF 抗体的抗原结合片段是 Bevacizumab 或 Ranibizumab 的 Fab。

所述多靶向融合蛋白中包含的衍生自抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段可以衍生自任何抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段，只要是能够结合 VEGFR，并由此阻断或抑制 VEGF 与其受体 VEGFR 结合的抗体即可。所述抗 VEGFR 抗体包括现有技术中已知的抗 VEGFR 抗体和将来研发出的抗 VEGFR 抗体。在一个实施方案中，所述抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段是抗 VEGFR 抗体的 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、单链 Fv；优选地，所述抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 5/6 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部 6 个重链 CDR 与轻链 CDR，或者与所述全部 6 个重链 CDR 与轻链 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列；更优选地，所述抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 5/6 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列；最优选地，所述抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段是 Ramucirumab 的 Fab。

所述多靶向融合蛋白中包含的 VEGFR 胞外受体功能区可以是任何 VEGFR 胞外受体功能区，只要是能够结合 VEGF，并由此阻断或抑制 VEGF 与其受体 VEGFR 结合的 VEGFR 胞外

受体功能区即可。优选地，所述 VEGFR 胞外受体功能区包含 VEGFR1 的免疫球蛋白样结构域 2 和 VEGFR2 的免疫球蛋白样结构域 3；或者所述 VEGFR 胞外受体功能区包含 VEGFR1 的免疫球蛋白样结构域 2 以及 VEGFR2 的免疫球蛋白样结构域 3 和 VEGFR2 的免疫球蛋白样结构域 4；或者所述 VEGFR 胞外受体功能区包含 VEGFR1 的免疫球蛋白样结构域 2；更优选地，所述 VEGFR 胞外受体功能区具有任一选自 SEQ ID NO: 7-9 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 7-9 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多同一性的氨基酸序列。

所述多靶向融合蛋白中包含的(ii)免疫球蛋白 Fc 结构域可以是任何免疫球蛋白 Fc 结构域，特别地，所述(ii)是人免疫球蛋白 Fc 结构域。在一个实施方案中，所述免疫球蛋白 Fc 结构域是 IgG 类抗体的 Fc 结构域，特别地是 IgG<sub>1</sub> 亚类、IgG<sub>2</sub> 亚类、IgG<sub>4</sub> 亚类抗体的 Fc 结构域。在一个优选的实施方案中，包含于本发明多靶向融合蛋白中的所述免疫球蛋白 Fc 结构域是 IgG<sub>1</sub> 亚类抗体的 Fc 结构域，特别地是人 IgG<sub>1</sub> 亚类抗体的 Fc 结构域。在一个优选的实施方案中，包含于本发明多靶向融合蛋白中的所述免疫球蛋白 Fc 结构域是 IgG<sub>4</sub> 亚类抗体的 Fc 结构域，特别地是人 IgG<sub>4</sub> 亚类抗体的 Fc 结构域。在一些实施方案中，本发明多靶向融合蛋白中的(ii)免疫球蛋白 Fc 结构域包含 SEQ ID NO: 10、11 或 12 所示氨基酸序列的 Fc 结构域，或者包含与 SEQ ID NO: 10、11 或 12 所示氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性的 Fc 结构域。

所述多靶向融合蛋白中包含的(iii) CD80 ECD 是 CD80 的胞外结构域的一部分。在一个实施方案中，所述 CD80 ECD 包含 CD80 免疫球蛋白 V(IgV)区 (CD80-IgV)。在一个实施方案中，所述 CD80 ECD 包含 CD80 免疫球蛋白 V 区和 C 区 (CD80-IgVIgC)。在一个实施方案中，所述 CD80 ECD 是人 CD80 ECD，优选地所述 CD80 ECD 包含人 CD80 IgV。在一个具体实施方案中，所述 CD80-IgV 具有 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中，所述 CD80-IgVIgC 具有 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多同一性的氨基酸序列。

在一个实施方案中，所述多靶向融合蛋白还包含所述(i)、(ii)和/或(iii)之间的肽接头；优选地，所述肽接头包含一个或多个氨基酸，更优选地包含至少 5 个氨基酸，最优选地包含选自 SEQ ID NO: 20-46 的肽接头。

在一个实施方案中，所述多靶向融合蛋白从 N 端至 C 端以(i)、(ii)和(iii)的顺序；(iii)、(i)和(ii)的顺序；或者(iii)、(ii)和(i)的顺序有效连接。

在一些实施方案中，本发明的多靶向融合蛋白包含

(a) 全长抗 VEGF 抗体、全长抗 VEGFR 抗体或者全长抗 VEGF 和 VEGFR 双特异性抗体；和在所述抗体的两条重链中的每一重链的 C 端有效连接的一个 CD80 ECD；

(b) 全长抗 VEGF 抗体、全长抗 VEGFR 抗体或者全长抗 VEGF 和 VEGFR 双特异性抗体；在所述抗体的两条重链中的每一重链的 N 端有效连接的一个 CD80 ECD；和在所述抗体的两条轻链中的每一轻链的 N 端有效连接的一个 CD80 ECD；

(c) CD80 ECD；在 CD80 ECD 的 C 端有效连接的二聚体形式的免疫球蛋白 Fc 结构域；和在所述二聚体形式的免疫球蛋白 Fc 结构域的 C 端有效连接的衍生自抗 VEGF 抗体和 / 或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段；

或者

(d) CD80 ECD；在 CD80 ECD 的 C 端有效连接的二聚体形式的免疫球蛋白 Fc 结构域；和在所述二聚体形式的免疫球蛋白 Fc 结构域的 C 端有效连接的 VEGFR 胞外受体功能区；

优选地，所述抗体是 IgG 类抗体，特别地是 IgG<sub>1</sub> 亚类、IgG<sub>2</sub> 亚类、IgG<sub>4</sub> 亚类抗体，更特别地是 IgG<sub>4</sub> 亚类抗体；还优选地，所述 IgG<sub>4</sub> 亚类抗体在 Fc 结构域中第 S228 位置处包含氨基酸置换，更优选地是氨基酸置换 S228P；进一步优选地，所述抗体的轻链型别为 κ 型或 λ 型，优选地为 κ 型；

优选地，所述全长抗 VEGF 抗体是 Bevacizumab，所述全长抗 VEGFR 抗体是 Ramucirumab。

在一些实施方案中，本发明的多靶向融合蛋白选自

(1) 包含 SEQ ID NO: 80 的融合蛋白第一亚基和 SEQ ID NO: 82 的融合蛋白第二亚基的融合蛋白；

(2) 包含 SEQ ID NO: 84 的融合蛋白第一亚基和 SEQ ID NO: 86 的融合蛋白第二亚基的融合蛋白；

(3) 包含 SEQ ID NO: 88 的融合蛋白亚基的融合蛋白。

本发明还提供了编码本发明的多靶向融合蛋白的多核苷酸、包含编码本发明多靶向融合蛋白的多核苷酸的载体，优选地表达载体，最优选地具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶表达载体。在另一方面，本发明提供了包含本发明多核苷酸或载体的宿主细胞。在一个实施方案中，所述宿主细胞是 CHO、HEK293 或 NSO 细胞。本发明也提供了一种用于产生本发明多靶向融合蛋白的方法，包括步骤(i)在适于表达本发明的多靶向融合蛋白的条件下培养本发明的宿主细胞，和(ii)回收本发明的多靶向融合蛋白。

在另一方面，本发明还提供了本发明的多靶向融合蛋白与抗 PD-1 抗体组合的药物组合物。本发明的多靶向融合蛋白与抗 PD-1 抗体联用时显示出了较好的协同性，由此能够更好地实现抑制肿瘤生长的目的。

当与本发明的多靶向融合蛋白组合使用时，抗 PD-1 抗体可以是任何抗 PD-1 抗体，只要是能够抑制或减少 PD-1 与其配体结合的抗体即可，包括现有技术中已知的抗 PD-1 抗体和将来研发出的抗 PD-1 抗体。在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体包含选自 SEQ ID NO: 47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70 和 71/72 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部 6 个重链 CDR 与轻

链 CDR，或者与所述全部 6 个重链 CDR 与轻链 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列；进一步优选地，所述抗 PD-1 抗体包含选自 SEQ ID NO: 47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70 和 71/72 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性的序列；最优选地，所述抗 PD-1 抗体选自纳武单抗(Nivolumab)、pidilizumab 和派姆单抗 (Pembrolizumab)。

在又一个方面，本发明提供了本发明的多靶向融合蛋白、药物组合物的用途，用于制备在个体中治疗或预防癌性疾病(例如，实体瘤和软组织瘤)的药物，优选地，癌性疾病是黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、食管癌、胃肠道间质肿瘤(GIST)、肾癌(例如，肾细胞癌)、肝癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、头颈部肿瘤、胃癌、血液学恶性病(例如，淋巴瘤)；特别地，所述疾病是结肠癌或三阴性乳腺癌；优选地，其中所述个体是哺乳动物，更优选地是人。

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

## 附图简述

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

图 1A 和 B 提供了本发明的多靶向融合蛋白的示意图，其中图 1A 例示了从 N 端至 C 端包含抗体的抗原结合片段、免疫球蛋白 Fc 结构域和 CD80 ECD 的多靶向融合蛋白的结构示意图；图 1B 例示了从 N 端至 C 端包含 CD80 ECD、免疫球蛋白 Fc 结构域和 VEGFR 胞外受体功能区的融合蛋白的结构示意图。

图2: 显示了实施例2中制备并纯化的本发明的各目的蛋白在还原剂(5 mM 1,4-二硫苏糖醇)存在下通过SDS-PAGE电泳并用考马斯蓝染色后的结果。泳道1: 蛋白分子量标准标志物；泳道2: 融合蛋白BY24.4；泳道3: 融合蛋白BY24.5；泳道4: 融合蛋白BY24.12；泳道5: 融合蛋白BY31.19；泳道6: 抗体BY18.1

图3: 显示了在实施例5的混合淋巴细胞反应 (MLR) 中本发明的多靶向融合蛋白及其与抗PD-1抗体组合后对 IFN- $\gamma$  分泌的影响。柱1: BY18.1组；柱2: BY24.4组；柱3: BY18.1+BY24.4组；柱4: BY24.5组；柱5: BY18.1+BY24.5组；柱6: BY24.12组；柱7: BY18.1+BY24.12

组。

图 4: 显示了在实施例 6 的动物模型中本发明的多靶向融合蛋白及其与抗 PD-1 抗体组合后对抗肿瘤生长的抑制作用。

## 发明详述

本发明提供了阻断血管内皮细胞生长且活化 T 细胞的多靶向融合蛋白和包含所述多靶向融合蛋白的药物组合物。本发明还提供了用于产生该多靶向融合蛋白的方法, 以及该多靶向融合蛋白或药物组合物在个体中治疗或预防癌性疾病中的用途。

除非下文中另外定义, 否则本说明书中的术语如本领域通常所用那样使用。

### I. 定义

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

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

“PD-1 / PD-L1 抑制性信号通路”、“PD-1 / PD-L1 信号通路”、“PD-1 / PD-L1 信号传导途径”、“PD-1 / PD-L1 途径”在本文中可以互换使用, 是指任何通过 PD-1 与 PD-L1 结合而引发的细胞内信号传导途径。

本文所用的“缓解”、“干扰”、“抑制”或“阻断”PD-1 / PD-L1 抑制性信号传导途径可以互换使用, 是指(i)干扰 PD-1 和 PD-L1 之间的相互作用; 和/或(ii)导致 PD-1 / PD-L1 信号传导途径的至少一种生物学功能的抑制。由本发明的多靶向融合蛋白与 PD-L1 特异性结合后导致的“缓解”、“干扰”、“抑制”或“阻断”PD-1 / PD-L1 信号传导途径不需要是完全的缓解、干扰、抑制或阻断。

在本文中“CD28/B7 信号传导途径”、“CD28/B7 共刺激途径”、“CD28/B7 通路”可以互换使用, 是指(i)通过 CD28 与 CD80 结合而刺激细胞活化的信号传导途径; 和/或(ii)通过 CD28 与 CD86 结合而刺激细胞活化的信号传导途径。

“CD80”和“CD86”均为跨膜糖蛋白, 属结构高度相似的免疫球蛋白超家族(IgSF)成员, 亦统称 B7 分子。CD80 和 CD86 胞外区有一个免疫球蛋白 V(IgV)区和免疫球蛋白 C(IgC)区构成。成熟 CD80 分子由 254 个氨基酸组成, 其中胞外区由 208 个氨基酸、跨膜区 25 个氨基酸和胞内区 21 个氨基酸。类似地, 成熟 CD86 分子由 303 个氨基酸组成, 其中胞外区由 222 个氨基酸、跨膜区 20 个氨基酸和胞内区 61 个氨基酸。CD80, 亦称 B7.1, 表达于 T 细胞、B 细胞、树突细胞和单核细胞的表面, 通过其免疫球蛋白 V(IgV)区以较低亲和力结合 CD28、PD-L1 和 CTLA-4, 其中 CD80 与 CD28 的结合亲和力为 4  $\mu$ M; CD80 与 PD-L1 的结合亲和力为 ~1.7  $\mu$ M; CD80 与 CTLA-4 的结合亲和力为 0.2  $\mu$ M (Butte MJ 等人, Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses, Immunity,

2007年7月; 27(1): 111-122)。CD86结合CD28和CTLA-4, 但不结合PD-L1。

可溶性CD80(例如, CD80-Fc)能够通过CD28/B7共刺激途径对T淋巴细胞产生持续的激活作用, 并刺激产生干扰素。实验表明, CD80-Fc在体外维持T淋巴细胞产生干扰素, 甚至比抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体更有效。在体内抑制肿瘤生长方面, 可溶性CD80(例如, CD80-Fc)的抑瘤效果比抗PD-L1抗体更有效(Ostrand-Rosenberg S等人, Novel strategies for inhibiting PD-1 pathway-mediated immune suppression while simultaneously delivering activating signals to tumor-reactive T cells, *Cancer Immunol Immunother.*, 2015年10月; 64(10): 1287-93)。CD80-Fc能通过结合PD-L1来抑制PD-1/PD-L1途径介导的免疫抑制, 并向通过CD28/B7共刺激途径激活的T细胞递送共刺激信号, 从而增强T淋巴细胞活化。总之, CD80-Fc可以缓解PD-1/PD-L1途径的免疫抑制作用, 同时激活肿瘤免疫反应性T细胞。虽然可溶性CD86(例如, CD86-Fc)也可激活CD28, 甚至可产生CD80-Fc的3-5倍激活效应, 但由于CD86不结合PD-L1, 最终CD80-Fc对T淋巴细胞的激活作用强于CD86-Fc(Haile ST等人, Soluble CD80 restores T cell activation and overcomes tumor cell programmed death ligand 1-mediated immune suppression., *J Immunol.*, 2013年9月1日; 191(5): 2829-36)。根据已有的研究表明CD80-Fc具有如下作用: (i) CD80-Fc单独使用时, 抑制肿瘤的效果好于PD-L1抗体(AACR ANNUAL MEETING, 2018年4月14-18日, 美国, 伊利诺伊州, 芝加哥); (ii) CD80-Fc促进淋巴细胞浸润肿瘤组织, 且效果好于PD-L1抗体(Horn LA等人, Soluble CD80 Protein Delays Tumor Growth and Promotes Tumor-Infiltrating Lymphocytes, *Cancer Immunol Res.*, 2018年1月; 6(1): 59-68); (iii) CD80-Fc单独使用时, 抑制肿瘤的效果好于PD-1/PD-L1途径的抑制剂, 并且与PD-1抗体联用时有协同作用。Five Prime公司甚至认为CD80-Fc优于GITRL、OX40L和4-1BBL等T细胞激动剂。由于看到了CD80-Fc良好的免疫治疗效果, Five Prime Therapeutics, Inc.的CD80-Fc项目FPT155计划在最近开展临床试验。

在本文中“B7/CTLA-4通路”、“B7/CTLA-4信号传导途径”可以互换使用, 是指(i)通过CD80与CTLA-4结合而引起的信号传导途径; 和/或(ii)通过CD86与CTLA-4结合而引起的信号传导途径。

在本文中“VEGF/VEGFR通路”、“VEGF/VEGFR信号传导途径”可以互换使用, 是指通过VEGF家族中的一种或多种与细胞表面受体VEGFR家族中的一种或多种结合介导的信号传导途径。VEGF家族包含六种密切相关的多肽, 分别是高度保守的同源二聚体糖蛋白, 有六个亚型: VEGF-A、-B、-C、-D、-E、和胎盘生长因子(placental growth factor (PLGF)), 分子量从35至44kDa不等。VEGF-A(包括其剪接物如VEGF<sub>165</sub>)的表达与一些实体瘤的微血管密度具有相关性, 并且组织中VEGF-A的浓度与乳腺癌、肺癌、前列腺癌和结肠癌等实体瘤的预后有关。每个VEGF家族成员的生物活性通过细胞表面VEGF受体(VEGFR)家族中的一种或多种介导, 所述VEGFR家族包括VEGFR1(也称为Flt-1)、VEGFR2(也称为KDR、Flk-1)、VEGFR3(也称为Flt-4)等, 其中VEGFR1、VEGFR2与血管的生成关系密切, VEGF-C/D

/ VEGFR3 则与淋巴管生成密切相关。VEGF 家族的主要生物学功能包括: (1) 选择性促进血管内皮细胞有丝分裂, 刺激内皮细胞增殖并促进血管形成; (2) 提高血管尤其是微小血管的通透性, 使血浆大分子外渗沉积在血管外的基质中, 为肿瘤细胞的生长和新生毛细血管网的建立提供营养; (3) 促进肿瘤的增殖和转移, 所述肿瘤的增殖和转移依赖 VEGF 家族使血管内皮细胞分泌胶原酶和纤溶酶原, 借以降解血管基底膜, 同时, 肿瘤组织内部新形成的微血管基膜不完善, 这种性质使肿瘤易于进入血循环; (4) VEGF 可作为一种免疫抑制分子, 抑制机体的免疫反应, 促进恶性肿瘤的浸润与转移 (Lapeyre-Prost A 等人, Immunomodulatory Activity of VEGF in Cancer, *Int Rev Cell Mol Biol.*, 2017; 330: 295-342); (5) 其他作用: VEGF 家族可诱导上皮细胞出现间隙及开窗现象, 可活化上皮细胞的胞质小泡及细胞器; VEGF 家族直接刺激内皮细胞释放蛋白水解酶, 降解基质, 释放更多的 VEGF 家族分子, 加速肿瘤的发展, 细胞外蛋白酶又可激活细胞外基质的结合性和 VEGF 家族的释放; VEGF 家族通过增加血管通透性使血浆蛋白 (包括纤维蛋白原) 释放, 形成纤维素网络, 为肿瘤生长、发展和转移提供了良好的基质; VEGF 家族促进异常血管的生成, 阻碍免疫细胞浸润等作用。

临床研究显示利用抗 VEGF 单克隆抗体、抗 VEGFR 单克隆抗体、或可溶性 VEGFR 能够阻断 VEGF 家族与其受体的结合, 并阻碍 VEGF 家族信号通路的传导。基因泰克 (Genentech) 公司研发的贝伐单抗 (Bevacizumab, 商品名 Avastin) 是一种重组的人鼠嵌合抗 VEGF 抗体, 可通过阻断 VEGF-A 与 VEGFR 的结合, 使 VEGFR 无法活化, 由此发挥抗血管生成的作用。贝伐单抗目前用于转移性结直肠癌、肺癌、乳癌、胰脏癌、肾脏癌等的治疗。Sanofi-aventis 公司和 Regeneron 公司研制的阿柏西普 (aflibercept) 是一种 VEGF-Trap, 其是将 VEGFR1 胞外第 2 个结构域和 VEGFR2 胞外第 3 个结构域与人 IgG1 恒定区融合获得的一种融合蛋白, 能通过抑制血管生成而对一部分肿瘤患者发挥抗肿瘤作用。

如本文所用, 术语“特异性结合”意指对抗原或目的分子的结合具有选择性并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。所述特异性结合可以通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或本领域技术人员熟悉的其他技术, 例如表面等离子体共振 (SPR) 技术 (在 BIAcore 仪上分析) (Liljebblad 等人, Analysis of agalacto-IgG in rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance, *Glyco J.*, 2000, 17, 323-329) 测量。

术语“血管内皮生长抑制剂结构域”指阻断 VEGF / VEGFR 信号传导的血管内皮生长抑制剂的部分, 所述部分是发挥抑制血管内皮生长的区域。血管内皮生长抑制剂结构域可以由例如一个或多个抗 VEGF 抗体的可变结构域 (也称作抗体可变区)、一个或多个抗 VEGFR 抗体的可变结构域、或 VEGFR 胞外受体功能区提供。

术语“调节性 T 细胞 (Treg)”代表对维持自我耐受性至关重要的特定 T 淋巴细胞亚群。具有阻抑物功能的所述 Treg 细胞能通过细胞内表达转录因子 FOXP3 以及其他细胞标志物如 CD127<sup>低</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、LAP、CD39<sup>+</sup>、PD-1<sup>+</sup>、GARP 等与其他 T 淋巴细胞区分。

“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子 X

对其配偶物 Y 的亲合力可以通常由解离常数( $K_D$ )代表, 解离常数是解离速率常数和缔合速率常数(分别是  $k_{off}$  和  $k_{on}$ )的比例。亲合力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是表面等离子体共振法(SPR)。

术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如, 双特异性抗体), 只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。抗体可以是任何型和亚型(例如, IgM、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgA1 和 IgA2)的完整抗体(例如, 具有两个全长的轻链和两个全长的重链)。

术语“全抗体”、“全长抗体”、“完全抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地用来指一种抗体, 所述抗体具有基本上与天然抗体结构相似的结构。

术语“抗体重链”指以其天然存在构象在抗体分子中存在的两种类型多肽链中的较大者, 其在正常情况下决定抗体所属的类别。

术语“抗体轻链”指以其天然存在构象在抗体分子中存在的两种类型多肽链中的较小者。 $\kappa$  轻链和 $\lambda$ 轻链指两个主要的抗体轻链型别。

“双特异性抗体”是具有两个不同的重链/轻链对且具有两个不同的结合部位的人工杂合抗体。可以通过多种方法, 包括杂交瘤融合或 Fab' 片段的连接制备双特异抗体。

术语抗体的“抗原结合片段”是比完整或完全抗体或抗体链更少的氨基酸残基的抗体或抗体链的一部分或一段, 其能结合抗原或与完整抗体(即与抗原结合片段所来源的完整抗体)竞争结合抗原。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fv、单链 Fv。所述 Fab 片段是一种由  $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$  和  $CH1$  结构域组成的单价片段, 例如, 通过木瓜蛋白酶消化完全抗体能够获得 Fab 片段。此外, 通过胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化完全抗体产生  $F(ab')_2$ , 其为 Fab' 的二聚体, 是双价片段。 $F(ab')_2$  可以在中性条件下通过破坏铰链区中的二硫键而被还原, 因此将  $F(ab')_2$  二聚体转化为 Fab' 单体。Fab' 单体基本上是具有铰链区的 Fab 片段(其它抗体片段的更详细的描述请参见: 基础免疫学(Fundamental Immunology), W. E. Paul 编辑, Raven Press, N.Y. (1993))。所述 Fv 片段由抗体单臂的  $V_L$  和  $V_H$  结构域组成。另外, 虽然 Fv 片段的两个结构域  $V_L$  和  $V_H$  由独立的基因编码, 但是使用重组方法, 可以将它们通过能够使这两个结构域作为单条蛋白链产生的合成性接头连接, 在所述单条蛋白链中  $V_L$  区和  $V_H$  区配对以形成单链 Fv。可以通过化学方法、重组 DNA 方法或蛋白酶消化法获得所述抗体片段。

术语“免疫球蛋白”指具有天然存在抗体的结构的蛋白质。例如, IgG 类免疫球蛋白是由二硫键结合的两条轻链和两条重链组成的约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白。从 N 端至 C 端, 每条免疫球蛋白重链具有一个可变区( $V_H$ ), 也称作可变重链域或重链可变结构域, 随后是三个恒定结构域( $CH1$ 、 $CH2$  和  $CH3$ ), 也称作重链恒定区。类似地, 从 N 端至 C 端, 每条免疫球蛋白轻链具有一个可变区( $V_L$ ), 也称作可变轻链域或轻链可变结构域, 随后一个恒定轻链( $C_L$ )结构域, 也称作轻链恒定区。免疫球蛋白的重链可以归属 5 个类别之一, 称作  $\alpha$  (IgA)、

$\delta$  (IgD)、 $\epsilon$  (IgE)、 $\gamma$  (IgG)或 $\mu$  (IgM)，其中某些类别可以进一步划分成亚类，例如 $\gamma_1$ (IgG1)、 $\gamma_2$ (IgG2)、 $\gamma_3$ (IgG3)、 $\gamma_4$ (IgG4)、 $\alpha_1$ (IgA<sub>1</sub>)和 $\alpha_2$ (IgA<sub>2</sub>)。免疫球蛋白的轻链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列而划分成两种型之一，称作 $\kappa$ 和 $\lambda$ 。免疫球蛋白基本上由借助免疫球蛋白铰链区连接的两个 Fab 分子和一个 Fc 结构域组成。

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

“人免疫球蛋白”是这样一种免疫球蛋白，其拥有对应于人或人细胞产生的免疫球蛋白的氨基酸序列或从利用人免疫球蛋白库或其他编码人免疫球蛋白的序列的非人来源衍生。

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

术语“有效连接”意指指定的各组分处于一种允许它们以预期的方式起作用的关系。

术语“N 端”指 N 端的最末氨基酸，术语“C 端”指 C 端的最末氨基酸。

术语“融合”指将两个或多个组分由肽键直接连接或借助一个或多个肽接头有效连接。

术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明多靶向融合蛋白的任何类型的细胞系统。宿主细胞包括培养的细胞，也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。

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

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

术语“抗肿瘤作用”指可以通过多种手段展示的生物学术效果，包括但不限于例如，肿瘤体

积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。术语“肿瘤”、“癌症”和“癌性疾病”在本文中互换地使用，涵盖实体瘤和液体肿瘤。

## II. 多靶向融合蛋白

本发明提供了一种新型的多靶向融合蛋白，其包含(i)血管内皮生长抑制剂结构域；(ii)免疫球蛋白 Fc 结构域；和(iii) CD80 胞外结构域 (ECD)。

在一些实施方案中，所述(i)、(ii)和/或(iii)任选地通过肽接头有效连接。

在一些实施方案中，本发明的多靶向融合蛋白是由二硫键键合的两个融合蛋白第一亚基和两个融合蛋白第二亚基组成的异四聚体糖蛋白。

在一些实施方案中，本发明的多靶向融合蛋白是由二硫键键合的同二聚体或异二聚体糖蛋白。

本发明的多靶向融合蛋白阻断血管内皮细胞生长且活化 T 淋巴细胞。该多靶向融合蛋白一方面能够通过阻断 VEGF / VEGFR 通路来阻断血管内皮细胞生长，另一方面能够通过活化 CD28/B7 共刺激途径、抑制 PD-1 / PD-L1 抑制性信号通路、由 B7/CTLA-4 信号传导途径抑制调节性 T 细胞 (Treg) 功能来活化 T 淋巴细胞，从而改善肿瘤微环境，并提高肿瘤免疫治疗效果。

在一些实施方案中，本发明的多靶向融合蛋白以  $10^{-8}$  M 或更小、例如以  $10^{-9}$  M 至  $10^{-12}$  M 的解离常数( $K_D$ )与 VEGF 或 VEGFR 结合；且与 CD28、PD-L1 和 CTLA-4 特异性结合。

以下对本发明多靶向融合蛋白的各组分别进行描述。

### - 血管内皮生长抑制剂结构域

本发明多靶向融合蛋白中的“血管内皮生长抑制剂结构域”能够特异性结合 VEGF 和/或 VEGFR，包括但不限于衍生自抗 VEGF 抗体和/或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段和/或 VEGFR 胞外受体功能区。

在一个实施方案中，本发明多靶向融合蛋白中包含的衍生自抗 VEGF 抗体和/或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段使得本发明的多靶向融合蛋白能够以高亲和力，例如以  $10^{-8}$  M 或更小、优选地以  $10^{-9}$  M 至  $10^{-12}$  M 的  $K_D$  与 VEGF 和/或 VEGFR 特异性结合，并由此阻断 VEGF 与其受体 VEGFR 结合所介导的信号传导途径。

本文在下表 1 中提供了本发明多靶向融合蛋白中包含的抗 VEGF 抗体或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段中成对重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的例子。在一些实施方案中，本发明多靶向融合蛋白中的抗原结合片段包含与表 1 中抗 VEGF 抗体和/或抗 VEGFR 抗体的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的氨基酸序列基本上同一的序列，例如，与表 1 中所示的成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。

表 1. 抗 VEGF 抗体或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段中重链可变区和轻链可变区序列的例子

可变区	氨基酸序列	序列编号 (SEQ ID NO: )
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGW INTYTGEPYAAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YGSSHWYFDVWGQG	1
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQG	2
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGW INTYTGEPYAAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYY YGTSHWYFDVWGQG	3
VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQG	4
VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDI WGQG	5
VL	DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQGIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYDASN LDTGVPSRFSGSGSGTYFTLTISLQAEDFAVYFCQQAQAFPPTFGGG	6

在一个实施方案中,本发明多靶向融合蛋白中的抗原结合片段包含选自 SEQ ID NO: 1/2、3/4 和 5/6 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部 6 个重链互补决定区 (CDR) 与轻链 CDR。用于鉴定重链可变区与轻链可变区的氨基酸序列中的 CDR 的方法及技术为本领域中已知的,且可用于鉴定本文公开的特定重链可变区及/或轻链可变区的氨基酸序列中的 CDR。可用于鉴定 CDR 边界的示例性公知技术包括例如 Kabat 界定法、Chothia 界定法以及 AbM 界定法。参见,例如 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani 等人, Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); 以及 Martin AC 等人, Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989)。

作为本发明多靶向融合蛋白中的抗原结合片段来源的抗 VEGF 抗体或抗 VEGFR 抗体可以基于其轻链恒定区的氨基酸序列而划分为 κ 型或 λ 型, 优选为 κ 型。

本文在下表 2 中提供了抗 VEGF 抗体或抗 VEGFR 抗体轻链恒定区的氨基酸序列的例子。

表 2. 抗体的轻链恒定区序列的例子

轻链型别	恒定区氨基酸序列
κ 型	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS

	QESVTEQDSKDSFYSLSSSTLTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)
λ 型	TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 16)

作为本发明多靶向融合蛋白中的抗原结合片段来源的抗 VEGF 抗体或抗 VEGFR 抗体基于其重链恒定区的氨基酸序列优选地是 IgG 类抗体，特别地是 IgG<sub>1</sub> 亚类、IgG<sub>2</sub> 亚类、IgG<sub>4</sub> 亚类抗体，更特别地是 IgG<sub>4</sub> 亚类抗体。优选地，所述 IgG<sub>4</sub> 亚类抗体在 Fc 区中第 S228 位置处包含防止发生臂交换 (arm-exchange) 的氨基酸置换，特别地是氨基酸置换 S228P。

本文在下表 3 中提供了抗体重链恒定区的氨基酸序列的例子。

表 3. 抗体的重链恒定区序列的例子

重链类别	恒定区氨基酸序列
IgG1	TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYIT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)
IgG2	TTVTVSTASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPV AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDK KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18)
IgG4	TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19)

在一个实施方案中，本发明多靶向融合蛋白中包含的 VEGFR 胞外受体功能区是 VEGFR 的胞外结构域的一部分或其组合。VEGFR 受体是位于细胞表面的一种酪氨酸激酶受体，其胞外区由 7 个免疫球蛋白(Ig)样结构域组成。例如，人 VEGFR1 包含编号为 1、2、3、4、5、6 和 7 的七个 Ig 样结构域，Ig 样结构域 1 在胞外结构域的 N 端，Ig 样结构域 7 在胞外结构域

的 C 端。除非本文另外指出，否则 Ig 样结构域从 VEGFR 蛋白的 N 端至 C 端顺序编号。在一些实施方案中，VEGFR 胞外受体功能区包含选自 VEGFR1、VEGFR2 和 VEGFR3 的一种或多种 VEGFR 的至少一个 Ig 样结构域。在一些方面，VEGFR 胞外受体功能区包含 VEGFR 的至少 1、2、3、4、5、6 个但不超过 7 个 Ig 样结构域。在另一方面，VEGFR 胞外受体功能区包含 VEGFR 的 1 至 7、1 至 6、1 至 5、1 至 4、1 至 3 或 1 至 2 个 Ig 样结构域。

本文还考虑了包含两种或多种 VEGFR 的至少一个 Ig 样结构域的 VEGFR 胞外受体功能区。在一些实施方案中，VEGFR 胞外受体功能区包含来自两种或多种选自 VEGFR1、VEGFR2 和 VEGFR3 的 VEGFR 的至少一个 Ig 样结构域。本文考虑了包含每种 VEGFR 的七个 Ig 样结构域的任意组合的 VEGFR 胞外受体功能区。例如，VEGFR 胞外受体功能区可以包含 VEGFR1(例如人 VEGFR1)的 Ig 样结构域 2 和 VEGFR2(例如人 VEGFR2)的 Ig 样结构域 3。在另一实施方案中，VEGFR 胞外受体功能区可以包含 VEGFR1(例如人 VEGFR1)的 Ig 样结构域 1-3、VEGFR1 (例如人 VEGFR1)的 Ig 样结构域 2-3、VEGFR2(例如人 VEGFR2) 的 Ig 样结构域 1-3、VEGFR1(例如人 VEGFR1)的 Ig 样结构域 2 和 VEGFR2(例如人 VEGFR2)的 Ig 样结构域 3-4，或 VEGFR1(例如人 VEGFR1)的 Ig 样结构域 2 和 VEGFR3(例如人 VEGFR3)的 Ig 样结构域 3。这些 Ig 样结构域和其他可以用作 VEGFR 胞外受体功能区的部分的 Ig 样结构域的更详细描述见美国专利号 7531173; Yu DC 等, Soluble vascular endothelial growth factor decoy receptor FP3 exerts potent antiangiogenic effects, Mol. Ther., 2012, 20(3): 938-947 和 Holash, J.等, VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects, PNAS, 2002, 99(17): 11393-11398, 全部文献在此以其整体引入作为参考。在一些实施方案中，VEGFR 胞外受体功能区具有任一选自表 4 中 SEQ ID NO: 7-9 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 7-9 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多同一性的氨基酸序列。

表 4 多靶向融合蛋白中的 VEGFR 胞外受体功能区氨基酸序列的例子

VEGFR 胞外受体功能区	氨基酸序列
VEGFR1-D2/VEGFR2-D3	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELS VGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLST LTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (SEQ ID NO: 7)
VEGFR1-D2/VEGFR2-D3-D4	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELS VGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLST LTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVG ERVRIPAKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSRDGTGNYTVILT

	NPISKEKQSHVVSLVVYVPPGPGD (SEQ ID NO: 8)
VEGFR1-D2	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIW DSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLTHRQTNT (SEQ ID NO: 9)

本发明多靶向融合蛋白中的 VEGFR 胞外受体功能区能够以高的亲和力，例如以  $10^{-8}$  M 或更小、优选地以  $10^{-9}$  M 至  $10^{-12}$  M 的  $K_D$ ，与 VEGF 家族特异性结合，并由此抑制 VEGF 家族与细胞表面 VEGFR 的结合和随后的信号传导。

- 免疫球蛋白 Fc 结构域

本发明多靶向融合蛋白中的“免疫球蛋白 Fc 结构域”包含天然存在的免疫球蛋白 Fc 结构域的全部氨基酸残基或包含天然存在的免疫球蛋白 Fc 结构域的一部分氨基酸残基。免疫球蛋白 Fc 结构域对本发明的多靶向融合蛋白提供有利的药代动力学特性，包括但不限于长血清半寿期。另外，免疫球蛋白 Fc 结构域还使得通过例如蛋白 A 亲和层析纯化本发明的多靶向融合蛋白成为可能。

免疫球蛋白 Fc 结构域通常是二聚体分子。可以通过木瓜蛋白酶消化或胰蛋白酶消化完整(全长)免疫球蛋白来产生或可以重组产生免疫球蛋白 Fc 结构域，其包含 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。

在一个实施方案中，IgG Fc 区包含 IgG CH2 结构域和 IgG CH3 结构域。优选地，免疫球蛋白 Fc 结构域具有表 5 中 SEQ ID NO: 10 - 12 所示的氨基酸序列或者具有与 SEQ ID NO: 10 - 12 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的氨基酸序列。

表 5 多靶向融合蛋白中的免疫球蛋白 Fc 结构域氨基酸序列的例子

名称	氨基酸序列
IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)
IgG2 Fc	DKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP MLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)
IgG4 Fc	DKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP

	VLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK ( SEQ ID NO: 12)
--	-----------------------------------------------------------------------

除了如 SEQ ID NO: 10 - 12 所定义的序列之外, IgG Fc 区还可以包含对 SEQ ID NO: 10 - 12 进行额外的序列修饰后获得的肽序列, 例如对 SEQ ID NO: 10 - 12 中的氨基酸残基进行一个或多个氨基酸替换、缺失或衍生后获得的肽序列。在一个实施方案中, 在 IgG Fc 区中第 S228 位置处包含防止发生臂交换( arm-exchange )的氨基酸置换, 特别地是氨基酸置换 S228P。在一个实施方案中, IgG4 Fc 区包含氨基酸置换 S228P。

- CD80 的胞外结构域 (ECD)

本发明多靶向融合蛋白中的“CD80 的胞外结构域 (ECD)”包含天然存在的 CD80ECD 的全部氨基酸残基或包含天然存在的 CD80ECD 的一部分氨基酸残基。在一些实施方案中, 所述 CD80ECD 包含 CD80 IgV, 优选地, 所述 CD80 ECD 包含人 CD80 IgV, 更优选地, 所述 CD80ECD 具有表 6 中 SEQ ID NO: 13 或 14 所示的氨基酸序列。

表 6 多靶向融合蛋白中的 CD80ECD 氨基酸序列的例子

名称	氨基酸序列
CD80-IgV	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEY KNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFP TPS ( SEQ ID NO: 13 )
CD80-IgVIgC	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEY KNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFP TPSISDFEIP TSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSS KLD FNMTTNH SFMCLIKYGH LRVNQTFNWNTTKQEHFPDN ( SEQ ID NO: 14 )

除了如 SEQ ID NO: 13 和 14 所定义的序列之外, CD80ECD 还可以包含对 SEQ ID NO: 13 和 14 进行额外的序列修饰后获得的肽序列, 例如对 SEQ ID NO: 13 和 14 中的氨基酸残基进行一个或多个保守性替换、缺失或衍生后获得的肽序列, 只要具有与未修饰的肽基本上相同的活性或功能即可。经修饰的肽将保留与未修饰肽相关的活性或功能。经修饰的肽通常具有与未修饰序列的氨基酸序列基本上同源的氨基酸序列, 例如, 与 SEQ ID NO: 13 或 14 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多同一性的氨基酸序列。

- 肽接头

本发明的多靶向融合蛋白中将(i)血管内皮生长抑制剂结构域;(ii)免疫球蛋白 Fc 结构域;和(iii) CD80 ECD 任选地有效连接的“肽接头”是一个或多个氨基酸、一般约 2 - 20 个氨基酸的肽。本领域已知或本文中描述了肽接头。

在一些实施方案中, 所述肽接头包含至少 5 个氨基酸, 优选地包含选自



选地表达载体。

可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。表达载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、 $\lambda$ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在一个优选的实施方案中，使用了具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体。

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

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

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

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

可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的多靶向融合蛋白的纯度，所述熟知分析方法包括凝胶电泳、高效液相色谱等。可以通过本领域已知的多种测定法，鉴定、筛选或表征本文提供的多靶向融合蛋白的物理/化学特性和/或生物学活性。

#### IV. 联合疗法

PD-1 是一种免疫抑制蛋白，其有两种配体，分别为 PD-L1 和 PD-L2。已知 PD-1 和 PD-L1 之间的相互作用导致例如肿瘤浸润淋巴细胞的减少和/或癌细胞的免疫逃避。通过抑制 PD-1 与 PD-L1 或 PD-L2 的局部相互作用可以逆转免疫抑制；当 PD-1 与 PD-L2 的相互作用也被阻断时，该效果是相加的(Iwai Y.等人, Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade, *Proc. Nat'l. Acad.Sci. USA*, 2002, 99: 12293-7)。鉴于免疫检查点 PD-1 的信号传导在调节免疫应答中的重要性，本发明开发了用于联合疗法的药物组合物，其包含本发明的多靶向融合蛋白和抗 PD-1 抗体。

与使用本发明多靶向融合蛋白的单一疗法或抗 PD-1 抗体的单一疗法相比，本文所述的用于联合疗法的药物组合物可以提供优越的有益效果，例如增强的抗癌效果、降低的毒性和/或减少的副作用。例如，药物组合物中的本发明多靶向融合蛋白和/或抗 PD-1 抗体可以以比单一疗法施用相比达到相同的治疗效果所需的更低剂量或更短的施用时间施用。因此，本发明还公开了使用用于联合疗法的药物组合物来治疗癌症。可以在本领域已知的细胞模型和动物模型中检测前述药物组合物的有效性。

所述联合疗法中包含的抗 PD-1 抗体可以是任何抗 PD-1 抗体，只要是能够抑制或减少 PD-1 与其配体结合的抗体即可，包括现有技术中已知的抗 PD-1 抗体和将来研发出的抗 PD-1 抗体。抗 PD-1 抗体能够以高的亲和力，例如以  $10^{-8}$  M 或更小、优选地以  $10^{-9}$  M 至  $10^{-12}$  M 的  $K_D$ ，与 PD-1 特异性结合，并由此阻断 PD-1 与配体 PD-L1 和/或 PD-L2 结合所介导的信号传导途径。

本文在下表 7 中提供了本发明联合疗法中包含的抗 PD-1 抗体的成对重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的例子。在一些实施方案中，本发明联合疗法中的抗 PD-1 抗体包含与表 7 中所示的氨基酸序列基本上同一的序列，例如，与表 7 所示的成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。

表 7. 联合疗法中的抗 PD-1 抗体的重链可变区和轻链可变区序列的例子

可变区	氨基酸序列	序列编号 (SEQ ID NO: )
VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSKRYAYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATN DDYWGQG	47
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQG	48
VH	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEW MGGINPSNGGTNFKNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCA	49

	RRDYRFDMGFDYWGQG	
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLI YLASYLESQVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGG G	50
VH	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLQWM GWINTDSGESTYAEFEKGRFVFSLDTSVNTAYLQITSLTAEDTGMFYCVRV GYDALDYWGQG	51
VL	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSARSSVSYMHWFQKPGKAPKLWIYRTS NLASGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSPLTFGGG	52
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVA TISGGGANTYY PDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYFDYWGQG	53
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAPKLLIYTA TSLADGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQVYSIPWTFGGG	54
VH	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLTSGTCVSWIRQPPGKALEWLA TICWEDSKGYNPSLKSRLTISKDTSKNQAVLTMTNMDPVDATYYCARRE DSGYFWFPYWGQG	55
VL	NIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKAGQNVNNYLAWYQQKPGKAPKVLIFN ANSLQTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYNSWTFGGG	56
VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGVHWIRQPPGKLEWLVGI WAGGSTNYPNSLKSRLTISKDNSKQVSLKMSSVTAADTAVYYCARAYG NYWYIDVWGQG	57
VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLINY AFHRFTGVPDRFRSGSGYGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQAYSSPYTFGGG	58
VH	VQLVESGGGVVQPGSRSLRLDCKASGITFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDSSRKYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATN NDYWGQG	59
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSNYLDWYQQKPGKAPKLLIYDA STRATGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQNMQLPLTFGQG	60
VH	DLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWI SAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGR GYSYGIDAFDIWGQG	61
VL	LSYVLTQPPSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKPGQAPVLIYK DSERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDVAVYYCQSDSSGTYVVFEGG	62

	G	
VH	QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWM GVIESETGGTAYNQKFQGRVTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRE GITTVATTYYWYFDVWGQG	63
VL	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQL LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTF GQG	64
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVA TISGGGSDTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ LNYAWFAYWGQG	65
VL	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESDNYGISFMNWYQQKPGQPPKLLI YTSSNKDTGVPARFSGSGSGTDFTLTINPMEAEDTAVYYCQQSKEVPWTF GGG	66
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG LIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAE HSSTGTFDYWGQG	67
VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANHLPTFGGG	68
VH	QLQLQESGPGLVKPSSETLTLTCTVSADSISSITYYVWVIRQPPGKGLEWIG SISYSGSTYYNPSLKSRTVSVSDTSKNQFSLKLNSVAATDTALYYCARHLG YNGRYLPFDYWGQG	69
VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGIFYNYVSWYQQHPGKAPELMIY DVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDVAVYYCQYSSYTNISTWVFG GG	70
VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLTCKASGLTFSSSGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATN NDYWGQG	71
VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYTAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSNWPRTFGQG	72

在一个实施方案中，本发明联合疗法中的抗 PD-1 抗体包含选自 SEQ ID NO: 47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70 和 71/72 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部重链 CDR 与轻链 CDR。用于鉴定重链可变区与轻链可变区的氨基酸序列中的 CDR 的方法及技术为本领域中已知的，且可用于鉴定本文公开的特定重链可变区及/或轻链可变区的氨基酸序列中的 CDR。可用于鉴定

CDR 边界的示例性公知技术包括例如 Kabat 界定法、Chothia 界定法以及 AbM 界定法。参见，例如 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani 等人, Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); 以及 Martin AC 等人, Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989)。

在一个实施方案中，本发明联合疗法中的抗 PD-1 抗体选自纳武单抗(Nivolumab)、pidilizumab 和派姆单抗 (Pembrolizumab)。

本发明的药物组合物可以包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明所述多靶向融合蛋白和抗 PD-1 抗体。“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量等变动治疗有效量。治疗有效量是任何有毒或有害作用不及治疗有益作用的量。相对于未治疗的受试者，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤生长率)至少约 20%、更优选地至少约 40%、甚至更优选地至少约 60%和仍更优选地至少约 80%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价本发明的药物组合物抑制可度量参数(例如，肿瘤体积)的能力。

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

由于在肿瘤免疫中，如在实施例中所证实的那样，本发明联合疗法中的多靶向融合蛋白和抗 PD-1 抗体的治疗方案能够相互协同，因此，本发明的药物组合物对于防止肿瘤的免疫逃逸是有利的。共施用本发明的包含多靶向融合蛋白和抗 PD-1 抗体的药物组合物可以通过分别独立地施用多靶向融合蛋白或抗 PD-1 抗体实施，也可以单次施用多靶向融合蛋白和抗 PD-1 抗体的联合制剂。本发明联合疗法中的多靶向融合蛋白和抗 PD-1 抗体的施用允许给药量和时程的灵活性。

#### V. 多靶向融合蛋白和药物组合物的用途

本文公开的多靶向融合蛋白和药物组合物具有癌症的治疗性和预防性用途。例如，可以将多靶向融合蛋白以及其与抗 PD-1 抗体的组合物施用于体外或离体的培养细胞或施用于受试者，例如，人类受试者，以治疗和/或预防多种癌性疾病。

在一个方面，本发明涉及使用多靶向融合蛋白或本发明的药物组合物体内用来治疗或预防需要在受试者中阻断血管内皮细胞生长且活化 T 细胞的疾病，从而抑制或减少相关疾病如癌性肿瘤的生长或出现、转移或复发。可以单独使用多靶向融合蛋白以抑制癌性肿瘤的生长或者预防其出现。备选地，多靶向融合蛋白可以与其他癌症治疗剂/预防剂(例如，抗 PD-1 抗体)组合施用。当本发明的多靶向融合蛋白与抗 PD-1 抗体施用时，这种组合可以按任何顺序施用或者同时施用。

因此，在一个实施方案中，本发明提供一种抑制受试者中肿瘤细胞生长的方法，所述方

法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多靶向融合蛋白或药物组合物。在另一个实施方案中，本发明提供一种防止受试者中肿瘤细胞出现或者转移或者复发的方法，所述方法包括向受试者施用预防有效量的本文所述的多靶向融合蛋白或药物组合物。

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

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

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

## 实施例

实施例 1、包含目的基因的谷氨酰胺合成酶高效表达载体的构建

(1) 抗 PD1 抗体 BY18.1 的编码核苷酸的合成及表达载体的构建

根据 International Nonproprietary Name (INN) 数据库中编号为 9623 的纳武单抗的氨基酸序列数据，优化为适合在中国仓鼠卵巢癌细胞 (CHO) 中表达的下述核苷酸序列，并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成该核苷酸序列。所述核苷酸序列表达后产生的抗 PD1 抗体在本文中表示为抗体 BY18.1。

抗 PD1 抗体 BY18.1 的轻链 (BY18.1L) 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 73)：

CTCGAGGCCACCATGGAGACCGACACACTCCTCCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGG  
TGCCTGGCTCCACTGGCGAGATTGTGCTGACACAGTCCCCCGCTACTCTGAGCCTGAGC  
CCTGGCGAGAGGGCTACACTGTCTTGCAGAGCTTCTCAGTCCGTGTCTTCTTACCTCGC  
TTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCAAGACTGCTGATCTATGACGCTTCTAAC  
CGCGCTACAGGCATTCTGCTAGGTTTCAGCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACACT  
CACAATTAGCTCTCTTGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCTAGCA  
ACTGGCCTAGAACATTCGGCCAGGGCACTAAGGTGGAGATTAAGAGAACCGTGGCCGC  
CCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGC  
GTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG

ACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGG  
 ACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGC  
 ACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAG  
 CTTCAACCGGGGCGAGTGCTAAGAATTC

抗 PD1 抗体 BY18.1 的轻链 (BY18.1L) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 74) :

METDITLLLWVLLLWVPGSTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ  
 QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFG  
 QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 PD1 抗体 BY18.1 的重链 (BY18.1H) 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 75) :

TCTAGAGCCACCATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTGTGGG  
 TGCCTGGCTCCACAGGCCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCCGGCGGGCGGCGTGGTGCAGCC  
 CGGCAGATCCCTCAGACTGGACTGCAAGGCATCCGGCATTACATTCTCTAACTCTGGA  
 ATGCACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCGTGATTTGGT  
 ACGACGGCTCTAAGAGATACTACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATTAGCAG  
 AGACAACCTCCAAGAACAACACTCTGTTCCCTCCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACC  
 GCTGTGTACTACTGCGCCACCAACGACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACAG  
 TGTCTTCCGCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCCGCTCCA  
 CCTCCGAGTCCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTG  
 ACCGTGTCCTGGAACCTCCGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCT  
 GCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCCTCCTCCCTGGG  
 CACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAG  
 CGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCTTGCCCTGCCCTGAGTTCCTGGG  
 CGGCCCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGCA  
 CCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTGCAGTT  
 CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGCGAGGA  
 GCAGTTCAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGC  
 TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTCCCTCCATCGA  
 GAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCT  
 CCTTCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCT  
 TCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTA  
 CAAGACCACCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTGTACTCCCGCCTGA  
 CCGTGGACAAGTCCCGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGA  
 GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCCCTGGGCAAGTAA

GTCGAC

抗 PD1 抗体 BY18.1 的重链 (BY18.1H) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 76) :

METDTLLLWVLLLWVPGSTGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQ  
 APGKGLEWVAVIWIYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT  
 NDDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP  
 CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT  
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTT  
 LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT  
 VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

其中带下划线部分“METDTLLLWVLLLWVPGSTG”为信号肽序列。

上海捷瑞生物工程有限公司合成了上述 BY18.1L 编码核苷酸序列和 BY18.1H 编码核苷酸序列。分别将 BY18.1L 编码核苷酸用 XhoI-EcoRI 双酶切, 将具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体 (专利授权号: CN104195173B, 获自北京比洋生物技术有限公司) 用 XhoI-EcoRI 双酶切, 再通过连接酶将经 XhoI-EcoRI 双酶切的 BY18.1L 编码核苷酸接入经 XhoI-EcoRI 双酶切的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体, 获得已导入了 BY18.1L 编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体; 然后, 分别将 BY18.1H 编码核苷酸用 XbaI-SalI 双酶切, 将已导入了 BY18.1L 编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体用 XbaI-SalI 双酶切, 再通过连接酶将经 XbaI-SalI 双酶切的 BY18.1H 编码核苷酸接入经 XbaI-SalI 双酶切的已导入了 BY18.1L 编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体, 由此获得了已导入 BY18.1L 编码核苷酸和 BY18.1H 编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体, 经测序验证正确后表达, 获得抗 PD1 抗体 BY18.1。

备选地, 也可以将 BY18.1L 编码核苷酸接入已导入了 BY18.1H 编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体, 表达并获得抗体 BY18.1。

(2) 包含 CD80 胞外结构域和免疫球蛋白 Fc 区的融合蛋白的编码核苷酸的合成及表达载体的构建

根据表 1 中 CD80 胞外结构域的序列、以及表 6 中 IgG4 Fc 序列, 优化为适合在中国仓鼠卵巢癌细胞 (CHO) 中表达的核苷酸序列, 并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成如下 SEQ ID NO: 77 的多核苷酸序列。所述核苷酸序列表达后产生的 CD80-Fc 融合蛋白在本文中也表示为融合蛋白 BY31.19。

融合蛋白 BY31.19 (CD80-Fc, IgG4) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 77)

CTCGAGGCCACCATGGAGACCGACACACTCCTCCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGG  
 TGCCTGGCTCCACTGGCGTCATCCATGTGACCAAAGAGGTCAAAGAAGTCGCAACTCT  
 GTCTTGCGGACACAACGTCTCCGTCGAAGAACTCGCCCAGACTAGAATATATTGGCAG

AAGGAAAAGAAGATGGTGCTCACCATGATGTCCGGCGATATGAACATTTGGCCTGAGT  
 ACAAGAACCGGACAATCTTCGATATTACTAATAACCTGAGTATCGTGATTCTCGCTCTG  
 CGCCCTAGCGACGAGGGCACATACGAGTGTGTGGTGCTGAAGTACGAGAAGGATGCAT  
 TCAAGCGGGAGCACCTCGCAGAGGTGACACTCTCCGTGAAGGCCGACTTCCCAACCCC  
 ATCTGACAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCTTGCCCTGCCCTG  
 AGTTCCTGGGCGGCCCTTCCGTGTTCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATG  
 ATCTCCCGCACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTG  
 AGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC  
 CTCGCGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCAC  
 CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTT  
 CCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTA  
 CACCCTGCCTCCTTCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTG  
 GTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTG  
 AGAACA ACTACAAGACCACCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTGTAC  
 TCCCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGT  
 GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCCCTGGGC  
 TAAGAATTC

融合蛋白 BY31.19 (CD80-Fc, IgG4) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 78)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGVIHVTKEVKEVATLSCGHNSVEELAQTRIWQKEK  
 KMLVTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHL  
 AEVTL SVKADFPTPSDKR VESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
 CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS  
 LSLG

其中氨基酸序列 “METDTLLLWVLLLWVPGSTG” 为信号肽。

使用上述实施例 1(1)相同的方法, 通过 XhoI-EcoRI 双酶切将 BY31.19 编码核苷酸连接至具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体 (专利授权号: CN104195173B, 获自北京比洋生物技术有限公司)。将重组载体测序验证正确后用于 CD80-Fc 融合蛋白表达。所表达的 CD80-Fc 融合蛋白命名为融合蛋白 BY31.19。

(3) 包含抗 VEGF 抗体与 CD80 胞外结构域的融合蛋白 BY24.4 的编码核苷酸的合成及表达载体的构建

根据表 1 中 CD80 胞外结构域的序列、表 2 中抗 VEGF 抗体的重链可变区和轻链可变区序列、表 3 中抗体的重链恒定区序列、表 4 中抗体的轻链恒定区序列、以及 SEQ ID NO: 20

-46 的肽接头序列，优化为适合在中国仓鼠卵巢癌细胞（CHO）中表达的核苷酸序列，并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成如下 SEQ ID NO: 79、81 所示的多核苷酸序列。所述核苷酸序列表达后产生的抗 VEGF 抗体-CD80 融合蛋白在本文中表示为融合蛋白 BY24.4。

融合蛋白 BY24.4 (κ,IgG4) 的第一亚基 (BY24.4L) 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 79) :

CTCGAGGCCACCATGGAGACAGATACTCTGCTGCTCTGGGTCCTGCTGCTGTGGG  
TGCCAGGCAGCACAGGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCCTCCCTGTCTGCCTCC  
GTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGTTCCGCATCCCAGGATATCTCCAACCTACCTGA  
ACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTTTACTTCTTCC  
CTGCATTCCGGCGTGCCCTCCAGGTTCTCTGGCTCCGGGTCTGGAACCGACTTTACT  
GACAATCTCCTCTCTGCAGCCAGAAGACTTTGCCACCTATTACTGCCAGCAGTACTCCA  
CTGTCCCCTGGACCTTCGGGCAAGGAACCAAAAGTGGAAATCAAGAGGACCGTGGCCGC  
CCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCA<sub>g</sub>CG  
TGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA  
CAACGCCCTGCAG<sub>g</sub>AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGA  
CAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAC  
AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCT  
TCAACCGGGGCGAGTGCTAAGAATTC

融合蛋白 BY24.4 (κ,IgG4) 的第一亚基 (BY24.4L) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 80) :

METDLLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQ  
QKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFG  
QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSSTLSLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

融合蛋白 BY24.4 (κ,IgG4) 的第二亚基 (BY24.4H) 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 81) :

TCTAGAGCCACCATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGG  
TGCCAGGCTCTACAGGCGAAGTGCAGCTGGTTCGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAACC  
AGGGGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCCGCTTCTGGATACACCTTTACCAATTACGGC  
ATGAATTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGATGGATCAAC  
ACCTACACCGGCGAGCCCACCTACGCCGCTGACTTTAAGAGGAGGTTACCTTCTCTCT  
GGACACCTCCAAGTCCACCGCTTACCTGCAAATGAACTCTCTGAGGGCTGAAGACACC  
GCCGTGTACTACTGCGCCAAGTACCCCCATTACTACGGGTCCTCCCCTGGTACTTCGA  
CGTGTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCTTCCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCG  
TGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGCTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCCCTGGGCTGC  
CTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACCTCCGGCGCCCTGAC  
CTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTC

CGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACC  
 ACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTG  
 CCCTCCTTGCCCTGCCCTGAGTTCCTGGGCGGCCCTTCCGTGTTCCCTCCTAA  
 GCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGCACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC  
 GTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC  
 ACAACGCCAAGACCAAGCCTCGCGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACCGCGTGGTGTG  
 CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTG  
 TCCAACAAGGGCCTGCCTTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGC  
 CTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCA  
 GGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGG  
 AGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAATAACAAGACCACCCTCCTGTGCTGGACTCCGA  
 CGGCTCCTTCTTCTGTACTCCCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGCTGGCAGGAGGGCA  
 ACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC  
 CTGTCCCTGTCCCTGGGCGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGAGGGCGGCGGA  
 AGTGTGATCCATGTAACAAAAGAAGTGAAGGAAGTGGCTACACTCTCTTGCGGCCACA  
 ACGTGTCCGTGGAGGAACTAGCTCAGACCCGGATCTATTGGCAGAAAGAAAAGAAGA  
 TGGTGCTGACCATGATGTCCGGCGACATGAACATTTGGCCAGAGTACAAGAACCGCAC  
 AATTTTCGACATTACAAACAACCTCTCTATTGTGATTCTGGCTCTCAGGCCTAGCGACG  
 AGGGCACATACGAGTGCGTGGTGTCAAGTACGAGAAGGACGCTTTC AAGCGGGAGC  
 ACCTCGCTGAGGTGACCCTGTCCGTGAAGGCCGACTTCCCTACTCCATCTTAAGTCGAC

融合蛋白 BY24.4 (κ,IgG4) 的第二亚基 (BY24.4H) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 82) :

METDITLLLWVLLLWVPGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN  
 WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVY  
 YCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD  
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNT  
 KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQ  
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE  
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGGGSGGGG  
 SGGGGSVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTIRY WQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEY  
 KNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPS

其中氨基酸序列 “METDITLLLWVLLLWVPGSTIG” 为信号肽。

使用上述实施例 1(1)相同的方法，通过 XhoI-EcoRI 双酶切将 BY24.4L 编码核苷酸连接至具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体 (专利授权号: CN104195173B, 获自北京比

洋生物技术有限公司)；再通过 XbaI-SalI 双酶切将 BY24.4H 编码核苷酸克隆至已连接了 BY24.4L 编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体；或者反之亦然。将重组载体测序验证正确后用于表达。所表达的抗 VEGF 抗体-CD80 融合蛋白命名为融合蛋白 BY24.4。

(4) 包含抗 VEGFR 抗体与 CD80 胞外结构域的融合蛋白 BY24.5 的编码核苷酸的合成及表达载体的构建

根据表 1 中 CD80 胞外结构域的序列、表 2 中抗 VEGFR 抗体的重链可变区和轻链可变区序列、表 3 中抗体的重链恒定区序列、表 4 中抗体的轻链恒定区序列、以及 SEQ ID NO: 20-46 的肽接头序列，优化为适合在中国仓鼠卵巢癌细胞 (CHO) 中表达的核苷酸序列，并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成如下 SEQ ID NO: 83、85 所示的多核苷酸序列。所述核苷酸序列表达后产生的抗 VEGFR 抗体-CD80 融合蛋白在本文中为融合蛋白 BY24.5。

融合蛋白 BY24.5 ( $\kappa$ , IgG4) 的第一亚基 (BY24.5L) 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 83) :

CTCGAGGCCACCATGGAGACAGATACTCTGCTGCTCTGGGTCCTGCTGCTGTGGG  
TGCCAGGCAGCACAGGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTAGCTCCGTGAGCGCCTC  
TATCGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAGAGCTTCTCAGGGCATCGACAACCTGGCTC  
GGCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCAAAGCTGCTGATCTACGACGCCTCTA  
ACCTGGACACCGGCGTGCCATCCCGGTTTCAGCGGCTCTGGCTCCGGCACATACTTCACA  
CTCACAATCTCTTCCCTGCAGGCCGAGGACTTCGCTGTGTACTTCTGCCAGCAGGCTAA  
GGCTTTCCACCTACATTCGGCGGGCGGAACCAAAGTGGAATCAAGAGGACCGTGGCC  
GCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAg  
CGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG  
GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAG  
GACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG  
CACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGA  
GCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAAGAATTC

融合蛋白 BY24.5 ( $\kappa$ , IgG4) 的第一亚基 (BY24.5L) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 84) :

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQGIDNWLGWYQ  
QKPGKAPKLLIYDASNLDTGVPSTRFSGSGSGTYFTLTISSLQAEDFAVYFCQQAKAFPPTFG  
GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

融合蛋白 BY24.5 ( $\kappa$ , IgG4) 的第二亚基 (BY24.5H) 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 85) :

TCTAGAGCCACCATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGG  
TGCCAGGCTCTACAGGCGAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGGGCGGCCTCGTGAAGCC  
AGGCGGCTCCCTCAGACTGTCTTGCGCTGCTAGCGGCTTCACATTCTTCCCTACTCTAT

GAACTGGGTGAGACAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCAGCATCTCTTCC  
 TCTAGCTCTTACATCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCAGCCGGG  
 ACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGC  
 TGTGTACTACTGCGCTAGAGTGACCGACGCTTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACTCTCG  
 TGACAGTGTCTTCCGCCTCCACCAAGGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCC  
 GCTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAG  
 CCTGTGACCGTGTCCCTGGAACCTCCGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGC  
 CGTGTGCAGTCTTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGAACCGTGCCTTCCCTCCTC  
 CCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTG  
 GACAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCTTGCCCTGCCCCTGAGTT  
 CCTGGGCGGCCCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCT  
 CCCGCACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCTGAGGT  
 GCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGC  
 GAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGG  
 ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTCCCTC  
 CATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACC  
 CTGCCTCCTTCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGA  
 AGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAA  
 CAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTGTACTCCC  
 GCCTGACCGTGGACAAGTCCCCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGAT  
 GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCCCTGGGCGGC  
 GGAGGATCTGGCGGCCGGAGGCAGTGGAGGCGGCCGGAAGTGTGATCCATGTAACAAAA  
 GAAGTGAAGGAAGTGGCTACTCTCTTGGCGGCCACAACGTGTCCGTGGAGGAAGTAG  
 CTCAGACCCGGATCTATTGGCAGAAAGAAAAGAAGATGGTGTGACCATGATGTCCGG  
 CGACATGAACATTTGGCCAGAGTACAAGAACCGCACAATTTTCGACATTACAAACAAC  
 CTCTCTATTGTGATTCTGGCTCTCAGGCCTAGCGACGAGGGCACATACGAGTGCCTGGT  
 GCTCAAGTACGAGAAGGACGCTTTCAAGCGGGAGCACCTCGCTGAGGTGACCCTGTCC  
 GTGAAGGCCGACTTCCCTACTCCATCTTAAGTCGAC

融合蛋白 BY24.5 (κ,IgG4) 的第二亚基 (BY24.5H) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 86) :

METDITLLLWVLLLWVPGSTGEVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW  
 VRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA  
 RVTDAFDIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG  
 PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEV

HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR  
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF  
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSSLGSGGGSGGGSGGGSGGGSVIHVT  
KEVKEVATLSCGHNVSVLELAQTRIWQKEKMKVLTMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNN  
LSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPS

其中氨基酸序列“METDTLLLVVLLLWVPGSTG”为信号肽。

使用上述实施例 1(1)相同的方法，通过 XhoI-EcoRI 双酶切将 BY24.5L 编码核苷酸连接至具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体（专利授权号：CN104195173B，获自北京比洋生物技术有限公司）；再通过 XbaI-SalI 双酶切将 BY24.5H 编码核苷酸克隆至已连接了 BY24.5L 编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体；或者反之亦然。将重组载体测序验证正确后用于表达。所表达的抗 VEGFR 抗体-CD80 融合蛋白命名为融合蛋白 BY24.5。

(5) 包含 CD80 胞外结构域、免疫球蛋白 Fc 区和 VEGFR 胞外受体功能区的融合蛋白的编码核苷酸的合成及表达载体的构建

根据表 1 中 CD80 胞外结构域的序列、表 6 IgG4 Fc 序列、和表 5 中 VEGFR 功能区序列（VEGFR1-D2/VEGFR2-D3），优化为适合在中国仓鼠卵巢癌细胞（CHO）中表达的核苷酸序列，并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成如下 SEQ ID NO: 87 所示的多核苷酸序列。所述核苷酸序列表达后产生的 CD80-Fc-VEGFR 融合蛋白在本文中也表示为融合蛋白 BY24.12。

融合蛋白 BY24.12（CD80-Fc-VEGFR）的核苷酸序列（SEQ ID NO: 87）

CTCGAGGCCACCGCCACCATGGAGACCGACACACTCCTCCTGTGGGTGCTGCTGC  
TGTGGGTGCCTGGCTCCACTGGCGTCATCCATGTGACCAAAGAGGTCAAAGAAGTCGC  
AACTCTGTCTTGC GGACACAACGTCTCCGTCGAAGA ACTCGCCAGACTAGAATATATT  
GGCAGAAGGAAAAGAAGATGGTGCTCACCATGATGTCCGGCGATATGAACATTTGGCC  
TGAGTACAAGAACCGGACAATCTTCGATATTACTAATAACCTGAGTATCGTGATTCTCG  
CTCTGCGCCCTAGCGACGAGGGCACATACGAGTGTGTGGTGCTGAAGTACGAGAAGGA  
TGCATTCAAGCGGGAGCACCTCGCAGAGGTGACACTCTCCGTGAAGGCCGACTTCCCA  
ACCCCATCTGACAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCTTGCCCTGC  
CCCTGAGTTCCTGGGCGGCCCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCC  
TGATGATCTCCCGCACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGA  
CCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC  
AAGCCTCGCGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGC  
TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCC  
TGCCTTCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCA

GGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC  
 TGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCC  
 AGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC  
 CTGTACTCCCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTCCT  
 GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCC  
 CTGGGCGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGAGGCGGCGGAAGTGCTTCCGAC  
 ACCGGCCGCCCTTTCGTGGAGATGTACTCCGAGATCCCTGAGATCATCCACATGACCG  
 AGGGCCGCGAGCTGGTGTATCCCTTGCCGCGTGACCTCCCCTAACATCACCGTGACCCTG  
 AAGAAGTTCCTCTGGACACCCTGATCCCTGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACTCCC  
 GCAAGGGCTTCATCATCTCCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCGA  
 GGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAAC  
 ACCATCATCGACGTGGTGTCTGCCCTTCCCACGGCATCGAGCTGTCCGTGGGCGAGA  
 AGCTGGTGTGAACTGCACCGCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTG  
 GGAGTACCCTTCTCCAAGCACCAAGACAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACC  
 CAGTCCGGCTCCGAGATGAAGAAGTTCCTGTCCACCCTGACCATCGACGGCGTGACCC  
 GCTCCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCTCCTCCGGCCTGATGACCAAGAAGAA  
 CTCCACCTTCGTGCGCGTGCACGAGTAAGAATTC

融合蛋白 BY24.12 (CD80-Fc-VEGFR) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 88)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGVVIHVTKEVKEVATLSCGHNSVEELAQTRIWQKEK  
 KMVLTMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHL  
 AEVTL SVKADFPTPSDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
 VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
 CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS  
 LSLGGGSGGGGSGGGGSASDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKF  
 PLDTLIPDGKRIIWDSRKGFHISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQNTNTHIDVVLSP  
 SHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSKHKHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLST  
 LTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHE

使用上述实施例 1(1)相同的方法, 通过 XhoI-EcoRI 双酶切将 BY24.12 编码核苷酸连接至具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体(专利授权号: CN104195173B, 获自北京比洋生物技术有限公司)。将重组载体测序验证正确后用于蛋白表达。所表达的融合蛋白命名为融合蛋白 BY24.12。

实施例 2、目的蛋白的表达和纯化

## (1)目的蛋白的瞬时表达

将 293F(购自 Invitrogen 公司, 目录号: 11625-019)细胞悬浮培养于无血清 CD 293 培养液(购自 Invitrogen 公司, 目录号: 11913-019)中。转染前离心细胞培养物, 获得细胞沉淀, 用新鲜的无血清 CD 293 培养液悬浮细胞, 将细胞浓度调整为  $1 \times 10^6$  个细胞/ml。将细胞悬浮液置于摇瓶中。以 100ml 细胞悬浮液为例, 分别将实施例 1 制备的包含目的基因的每一种重组表达载体质粒各 DNA 250ug 和聚乙烯亚胺(polyethylenimine(PEI))(Sigma, 目录号: 408727) 500ug 加入 1ml 无血清 CD 293 培养液中混匀, 室温静置 8 分钟后, 将 PEI /DNA 混悬液逐滴加入放置有 100ml 细胞悬浮液的摇瓶中。轻轻混匀, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 摇床培养(120 转/分钟)。5 天后收集培养上清。

## (2)表达蛋白的纯化

用 pH 7.4 PBS 溶液平衡的 HiTrap MabSelect SuRe 1ml 柱(GE Healthcare Life Sciences 产品, 目录号: 11-0034-93)纯化上述实施例 2(1)收集的培养上清中存在的目的蛋白。简而言之, 用 pH 7.4 的 PBS 溶液以 10 个柱床体积平衡 HiTrap MabSelect SuRe 1ml 柱, 流速为 0.5ml/分钟; 将上述实施例 2(1)收集的培养上清用 0.45μm 滤膜过滤后, 载样至用 pH 7.4 PBS 溶液平衡的 HiTrap MabSelect SuRe 1ml 柱; 装载上清液后, 将该柱首先用 pH 7.4 的 PBS 溶液以流速 0.5ml/分钟洗涤 5-10 个柱床体积, 并随后用 100mM 柠檬酸缓冲液(pH 4.0)以流速 0.5ml/分钟洗脱。收集洗脱峰, 目的蛋白 BY18.1、BY31.19、BY24.4、BY24.5、BY24.12 分别存在于洗脱峰中。

在还原剂(5 mM 1,4-二硫苏糖醇)存在下通过 SDS-PAGE 电泳并用考马斯蓝染色, 分别分析各目的蛋白 BY18.1、BY31.19、BY24.4、BY24.5、BY24.12 的纯度和分子量。结果如下表 8 所示, 其中给出了分子量理论预测值和实际测定值。因真核表达系统中存在对蛋白质的糖基化作用, 故分子量实际测定值略高于理论预测值。

表 8 经纯化的表达蛋白的分子量大小

蛋白质名称	亚单位	理论预测分子量大小 (kDa)	实际分子量大小 (kDa)
融合蛋白 BY24.4	第一亚基	23	27
	第二亚基	62	70
融合蛋白 BY24.5	第一亚基	23	27
	第二亚基	74	70
融合蛋白 BY24.12	任一亚单位	63	72
融合蛋白 BY31.19	任一亚单位	40	45
抗体 BY18.1	轻链	23	27
	重链	48	50

实施例 3、使用 ELISA 方法检测特异性结合作用

分别将重组人 CD28(北京义翘神州生物技术有限公司产品, 目录号: 50103 -M08H)、重组人 PD-L1 (北京百普赛斯生物科技有限公司, 目录号: PD1-H5229) 和重组人 CTLA-4(北京义翘神州生物技术有限公司产品, 目录号: 11159-H08H)稀释至 0.5 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml 和 1.0 $\mu$ g/ml 并包被 96 孔 ELISA 板 (Corning 公司, 货号: 42592)。将上述实施例 2(2)纯化的融合蛋白 BY24.4、BY24.5、BY24.12、和 BY31.19 稀释至 2000 $\mu$ g/ml, 然后进行 3 倍系列稀释, 共稀释 16 个梯度, 对每个浓度梯度进行复孔检测。将稀释样品 50 $\mu$ l 分别加入上述经重组人 CD28、重组人 CTLA-4 或重组人 PD-L1 包被的 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。洗涤 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人二级抗体(北京中衫金桥公司产品, 产品号: ZDR-5301), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗涤 3 次后, 加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色液(北京康为世纪生物科技有限公司, 产品号: CW0050) 50 $\mu$ l/孔。10 分钟后, 加入 2N 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色。使用 ELISA 读数仪在 450nm 处测定每孔的吸光度 OD 值。

应用 GraphPad Prism 5 软件, 将融合蛋白 BY24.4、BY24.5、BY24.12、和 BY31.19 的蛋白质浓度对吸光度 OD 值作图, 并且拟合数据以产生融合蛋白介导的特异性结合作用的半数最大有效浓度 EC50 值。结果如下表 9 所示。

表 9 各融合蛋白对人 PD-L1、人 CD28 和人 CTLA-4 的结合作用

蛋白质名称	hPD-L1 的结合 EC50 ( $\mu$ g/ml)	hCD28 的结合 EC50 ( $\mu$ g/ml)	hCTLA-4 的结合 EC50 ( $\mu$ g/ml)
融合蛋白 BY24.4	6.352	23.05	2.270
融合蛋白 BY24.5	5.167	35.07	3.751
融合蛋白 BY24.12	3.748	13.16	2.890
融合蛋白 BY31.19	2.20	24.33	1.924

ELISA 结果显示, 本发明的多靶向融合蛋白 BY24.4、BY24.5、BY24.12 和作为阳性对照的 BY31.19 均能结合重组人 PD-L1、重组人 CD28 和 CTLA-4。各融合蛋白对 CTLA-4 的结合能力最强, PD-L1 次之, 结合 CD28 最弱。

实施例 4、使用 Biacore T100 测定本发明的目的蛋白对靶标的亲和力

在 BIAcore<sup>®</sup> T100 仪器(GE Healthcare Biosciences AB, 瑞典)上于 25 $^{\circ}$ C 进行表面等离子体共振测量。

首先, 通过酰胺偶联将抗 IgG 抗体 (GE Healthcare Life Sciences, 目录号: BR-1008-39) 共价固定在 CM5 芯片上。使用 60  $\mu$ l N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 60  $\mu$ l N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化 CM5 芯片, 然后将 5  $\mu$ l 抗 IgG 抗体加 95  $\mu$ l 稀释缓冲液 HBST (0.1M HEPES, 1.5M NaCl, pH7.4, 加 0.005%吐温 20) 经 0.2 $\mu$ m 滤膜过滤后,

通过酰胺偶联将抗 IgG 抗体共价固定在 CM5 芯片上, 产生约 9000-14000 共振单位(RU)的捕获系统。使用 120  $\mu$ l 乙醇胺封闭 CM5 芯片。

然后, 将实施例 2 制备的本发明的各目的蛋白分别稀释为 5 $\mu$ g/ml, 以流速 10 $\mu$ L/分钟注射该稀释液 2 分钟, 实施例 2 制备的本发明的各目的蛋白通过各自的 Fc 区非共价地捕获到 CM5 芯片表面上。通过与 EDC/NHS 交联来稳定所得的复合物, 以避免在测量和再生期间的基线漂移。

分别将结合抗原 PD-1(北京义翘神州生物技术有限公司产品, 目录号: 10377-H08H)、VEGF<sub>165</sub>(北京义翘神州生物技术有限公司产品, 目录号: 11066-HNAH)、鼠 VEGF164 (北京义翘神州生物技术有限公司产品, 目录号: 50159-MNAB) 和 VEGFR2 (北京义翘神州生物技术有限公司产品, 目录号: 10012-H02H1) 配制为如下浓度梯度: 7nM、22nM、66nM、200nM、600nM。通过以流速 30  $\mu$ l/分钟注射每个浓度 180 秒, 解离时间 600 秒, 测量结合。通过用 3M MgCl<sub>2</sub> 溶液以流速 10 $\mu$ L/分钟洗涤 30 秒使表面再生。使用 BIA 评价软件(BIAevaluation 4.1 software, 来自 GE Healthcare Biosciences AB, 瑞典)进行数据分析, 获得下表 10 所示的亲和力数据。

表 10 各目的蛋白质与靶标的结合

目的蛋白名称	靶标	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
融合蛋白 BY24.4	VEGF-A	2.221E+6	3.407E-5	1.534E-11
融合蛋白 BY 24.5	VEGFR2	6.82 E+5	5.57 E-5	8.17 E-11
融合蛋白 BY24.12	VEGF-A (人)	3.15 E+6	1.25 E-4	3.98 E-11
融合蛋白 BY24.12	VEGF-A (鼠)	9.18 E+5	3.13 E-5	3.41E-11
抗体 BY18.1	PD-1	6.66 E+5	1.58 E-3	2.37E-9

融合蛋白 BY24.4、BY24.5、BY24.12 与各自靶标的 KD(M)均低于 10<sup>-9</sup>M, 说明它们与各自靶标均有有较高亲和力, 尤其是融合蛋白 BY24.12 可以结合鼠和人 VEGF-A, 二者均以高亲和力结合并且差异不是很大。

实施例 5、混合淋巴细胞反应 (MLR) 中本发明的目的蛋白及其组合物对 IFN- $\gamma$  分泌的影响

自北京时合生物科技有限公司购得 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞和树突状细胞 (DC), 所述 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞和树突状细胞 (DC) 来源于不同的健康人。将 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞和树突状细胞 (DC) 分别按 1  $\times$  10<sup>5</sup> 个细胞/孔和 1  $\times$  10<sup>4</sup> 个细胞/孔铺种在 96 孔细胞培养板中。实验分为 7 组, 分别为 BY18.1 组 (1.0 $\mu$ g/ml)、BY24.4 组 (1.14 $\mu$ g/ml)、BY24.4 (1.14 $\mu$ g/ml)+BY18.1 (1.0 $\mu$ g/ml)

组、BY24.5(1.14 $\mu$ g/ml)组、BY24.5(1.14 $\mu$ g/ml)+BY18.1(1.0 $\mu$ g/ml)组、BY24.12(0.84 $\mu$ g/ml)组和BY24.12(0.84 $\mu$ g/ml)+BY18.1(1.0 $\mu$ g/ml)组。每组3个复孔,按要求加入抗体BY18.1、融合蛋白BY24.4、BY24.5、BY24.12、或抗体BY18.1与各融合蛋白BY24.4、BY24.5、BY24.12的组合至所示的终浓度。最后补加含10%胎牛血清的1640培养基,使终体积为200 $\mu$ l。37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>培养。

培养5天后,这7个实验组的成团细胞均较多,并有相当部分的梭状和贴壁细胞出现。取培养上清,用依科赛生物科技有限公司IFN- $\gamma$ 试剂盒(货号:EH008-96 ELISA)检测各组IFN- $\gamma$ 表达水平。

检测结果如下:与抗体BY18.1组(2221.8 $\pm$ 364.5 pg/ml)相比较,单独的融合蛋白BY24.4组(924.1 $\pm$ 221.9 pg/ml)、BY24.5组(760.1 $\pm$ 286.8 pg/ml)和BY24.12组(793.4 $\pm$ 139.2 pg/ml)的IFN- $\gamma$ 分泌均显著地低于抗体BY18.1组( $P < 0.01$ );但融合蛋白BY24.4、BY24.5和BY24.12分别加入BY18.1后,IFN- $\gamma$ 分泌均明显增高,各组的IFN- $\gamma$ 分泌分别为:BY24.4+BY18.1组(3494.2 $\pm$ 364.5pg/ml)、BY24.5+BY18.1组(3523.8 $\pm$ 465.1pg/ml)和BY24.12+BY18.1组(3801.8 $\pm$ 702.2pg/ml)。由此可见,融合蛋白BY24.4、BY24.5和BY24.12分别与BY18.1组合能够导致IFN- $\gamma$ 的分泌显著增加( $P < 0.01$ ),并且表明了抗体BY18.1(PD-1抗体)与本发明的多靶向融合蛋白BY24.4、BY24.5和BY24.12的组合对IFN- $\gamma$ 的分泌有明显协同作用。

#### 实施例6、本发明的多靶向融合蛋白与PD-1抗体的协同作用

本实施例的主要目的是探讨本发明的多靶向融合蛋白与PD-1抗体在体内抗肿瘤方面的协同作用,因此PD-1抗体和各融合蛋白的剂量均采用的是低剂量,因为高剂量有可能对肿瘤抑制效果较好而观察不到PD-1抗体和各融合蛋白相互间的协同作用。

将RPMI-1640培养基中的小鼠源结肠癌细胞CT26(ATCC)接种于约18g,6周龄雌性BALB/c小鼠右侧前肋部皮下,100 $\mu$ l/小鼠,接种量为 $1 \times 10^6$ 个细胞/小鼠。将小鼠源结肠癌细胞CT26接种的时间设定为第0天。当平均肿瘤体积达到93mm<sup>3</sup>左右时,将荷瘤小鼠随机分组,每组6只小鼠,共5组。根据分子量大小计算摩尔量,以等同的摩尔量施用融合蛋白BY31.19、BY24.12和抗mPD-1抗体。具体而言,分组和施用剂量分别为:溶媒(PBS)对照组;融合蛋白BY31.19(1.6 mg/kg)组;融合蛋白BY24.12(2.5mg/kg)组;抗mPD-1(3.0mg/kg,购自BioXcell,克隆号:RMP1-14,产品号:BE0146)组;融合蛋白BY24.12(2.5mg/kg)+抗mPD-1(3mg/kg)组。一周给药2次。每周对肿瘤体积进行3次测量,在进行肿瘤体积测量的同时,称量小鼠体重,记录小鼠体重和肿瘤体积的变化与给药时间的关系。实验结束时,将小鼠安乐死,采集血清和肿瘤,血清冻存至-80 $^{\circ}$ C保存,肿瘤在称重拍照后经福尔马林固定和石蜡包埋(FFPE)制备成组织样本备用。对各数据进行统计学分析并计算各治疗组与溶媒对照组的相对肿瘤体积比值(T/C)% (即:(给药组肿瘤体积变化的均值/PBS溶媒对照组肿瘤体积变化的均值)  $\times$  100%) 和肿瘤生长抑制率(Tumor Growth Inhibition %),为(1-T/C)%。

在实验结束时，BY31.19 组、BY24.12 组、PD-1 组、BY24.12 + 抗 mPD-1 组的肿瘤生长抑制率 (TGI%) 分别为 15%、17%、24%、和 47% (以瘤体积计)，均有不同程度的抑制作用。免疫融合蛋白 BY24.12 与 PD-1 抗体联合使用时对肿瘤的抑制作用显著好于 BY24.12 和 PD-1 单独使用时的肿瘤抑制作用，因此二者之间存在协同作用。

各组动物在给药后体重均持续增加，总体状况良好，未见明显异常，各组均无明显停药或动物死亡。

## 权利要求

1. 一种阻断血管内皮细胞生长且活化 T 细胞的多靶向融合蛋白，其包含(i)血管内皮生长抑制剂结构域；(ii)免疫球蛋白 Fc 结构域；和(iii) CD80 胞外结构域 (ECD)。

2. 根据权利要求 1 所述的多靶向融合蛋白，其中所述(i)衍生自抗 VEGF 抗体和/或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段和/或 VEGFR 胞外受体功能区；

优选地，所述抗 VEGF 抗体和/或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段是抗 VEGF 抗体和/或抗 VEGFR 抗体的 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、单链 Fv；更优选地，所述抗 VEGF 抗体和/或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段包含选自 SEQ ID NO: 1/2、3/4 和 5/6 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部 6 个重链 CDR 与轻链 CDR，或者与所述全部 6 个重链 CDR 与轻链 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化（例如，氨基酸置换或缺失）的序列；进一步优选地，所述抗 VEGF 抗体和/或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段包含选自 SEQ ID NO: 1/2、3/4 和 5/6 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列；最优选地，所述抗 VEGF 抗体和/或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段是 Bevacizumab、Ranibizumab 或 Ramucirumab 的 Fab；

优选地，VEGFR 胞外受体功能区包含 VEGFR1 的免疫球蛋白样结构域 2 和 VEGFR2 的免疫球蛋白样结构域 3；或者所述 VEGFR 胞外受体功能区包含 VEGFR1 的免疫球蛋白样结构域 2 以及 VEGFR2 的免疫球蛋白样结构域 3 和 VEGFR2 的免疫球蛋白样结构域 4；或者所述 VEGFR 胞外受体功能区包含 VEGFR1 的免疫球蛋白样结构域 2；更优选地，所述 VEGFR 胞外受体功能区具有任一选自 SEQ ID NO: 7-9 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 7-9 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的多靶向融合蛋白，其中所述(ii)是人免疫球蛋白 Fc 结构域；优选地，所述(ii)是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 结构域；更优选地，所述(ii)包含 SEQ ID NO: 10、11 或 12 所示氨基酸序列的 Fc 结构域，或者包含与 SEQ ID NO: 10、11 或 12 所示氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的 Fc 结构域。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的多靶向融合蛋白，其中所述(iii)包含人 CD80 ECD；优选地，所述(iii)包含人 CD80 IgV 或人 CD80 IgVIgC；更优选地，所述(iii)具有 SEQ ID NO: 13 或 14 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 13 或 14 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的多靶向融合蛋白，其还包含所述(i)、(ii)和/或(iii)之间的肽接头；优选地，所述肽接头包含一个或多个氨基酸，更优选地包含至少 5 个氨基酸，

最优选地包含选自 SEQ ID NO: 20-46 的肽接头。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的多靶向融合蛋白，其中所述融合蛋白从 N 端至 C 端以(i)、(ii)和(iii)的顺序；(iii)、(i)和(ii)的顺序；或者(iii)、(ii)和(i)的顺序有效连接。

7. 根据权利要求 6 所述的多靶向融合蛋白，其包含

(a) 全长抗 VEGF 抗体、全长抗 VEGFR 抗体或者全长抗 VEGF 和 VEGFR 双特异性抗体；和在所述抗体的两条重链中的每一重链的 C 端有效连接的一个 CD80 ECD；

(b) 全长抗 VEGF 抗体、全长抗 VEGFR 抗体或者全长抗 VEGF 和 VEGFR 双特异性抗体；在所述抗体的两条重链中的每一重链的 N 端有效连接的一个 CD80 ECD；和在所述抗体的两条轻链中的每一轻链的 N 端有效连接的一个 CD80 ECD；

(c) CD80 ECD；在 CD80 ECD 的 C 端有效连接的二聚体形式的免疫球蛋白 Fc 结构域；和在所述二聚体形式的免疫球蛋白 Fc 结构域的 C 端有效连接的衍生自抗 VEGF 抗体和 / 或抗 VEGFR 抗体的抗原结合片段；

或者

(d) CD80 ECD；在 CD80 ECD 的 C 端有效连接的二聚体形式的免疫球蛋白 Fc 结构域；和在所述二聚体形式的免疫球蛋白 Fc 结构域的 C 端有效连接的 VEGFR 胞外受体功能区；

优选地，所述抗体是 IgG 类抗体，特别是 IgG<sub>1</sub> 亚类、IgG<sub>2</sub> 亚类、IgG<sub>4</sub> 亚类抗体，更特别是 IgG<sub>4</sub> 亚类抗体；还优选地，所述 IgG<sub>4</sub> 亚类抗体在 Fc 结构域中第 S228 位置处包含氨基酸置换，更优选地是氨基酸置换 S228P；进一步优选地，所述抗体的轻链型别为 κ 型或 λ 型，优选地为 κ 型；

优选地，所述全长抗 VEGF 抗体是 Bevacizumab，所述全长抗 VEGFR 抗体是 Ramucirumab。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的多靶向融合蛋白，其选自

(1) 包含 SEQ ID NO: 80 的融合蛋白第一亚基和 SEQ ID NO: 82 的融合蛋白第二亚基的融合蛋白；

(2) 包含 SEQ ID NO: 84 的融合蛋白第一亚基和 SEQ ID NO: 86 的融合蛋白第二亚基的融合蛋白；

(3) 包含 SEQ ID NO: 88 的融合蛋白亚基的融合蛋白。

9. 多核苷酸，其编码权利要求 1-8 中任一项所述的多靶向融合蛋白。

10. 载体，优选地表达载体，最优选地具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶表达载体，所述载体包含权利要求 9 所述的多核苷酸。

11. 宿主细胞，其包含权利要求 9 所述的多核苷酸或权利要求 10 所述的载体，优选地，所述宿主细胞是 CHO、HEK293 或 NSO 细胞。

12. 用于产生权利要求 1-8 中任一项所述的多靶向融合蛋白的方法,所述方法包括步骤(i)在适于表达所述多靶向融合蛋白的条件下培养权利要求 11 所述的宿主细胞,和(ii)回收所述融合蛋白。

13. 药物组合物,其包含权利要求 1-8 中任一项所述的多靶向融合蛋白和抗 PD-1 抗体,优选地,所述抗 PD-1 抗体包含选自 SEQ ID NO: 47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70 和 71/72 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部 6 个重链 CDR 与轻链 CDR,或者与所述全部 6 个重链 CDR 与轻链 CDR 中的一个或多个 CDR 具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化(例如,氨基酸置换或缺失)的序列;进一步优选地,所述抗 PD-1 抗体包含选自 SEQ ID NO: 47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70 和 71/72 的成对重链可变区序列/轻链可变区序列,或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列;最优选地,所述抗 PD-1 抗体选自纳武单抗(Nivolumab)、pidilizumab 和派姆单抗(Pembrolizumab)。

14. 权利要求 1-8 中任一项所述的多靶向融合蛋白、权利要求 13 所述的药物组合物的用途,用于制备在个体中治疗或预防癌性疾病(例如,实体瘤和软组织瘤)的药物,优选地,癌性疾病是黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、食管癌、胃肠道间质肿瘤(GIST)、肾癌(例如,肾细胞癌)、肝癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、头颈部肿瘤、胃癌、血液学恶性病(例如,淋巴瘤);特别地,所述疾病是结肠癌或三阴性乳腺癌;优选地,其中所述个体是哺乳动物,更优选地是人。

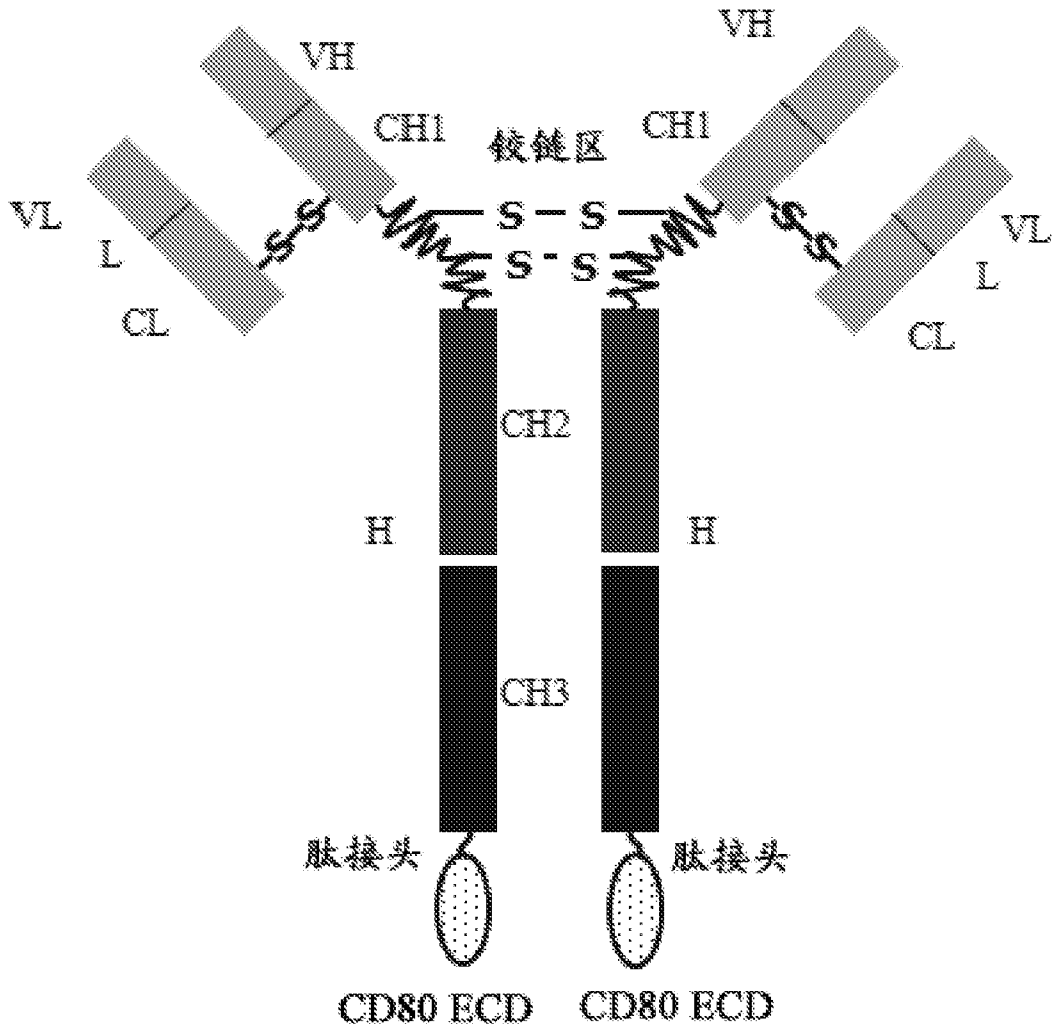


图1A

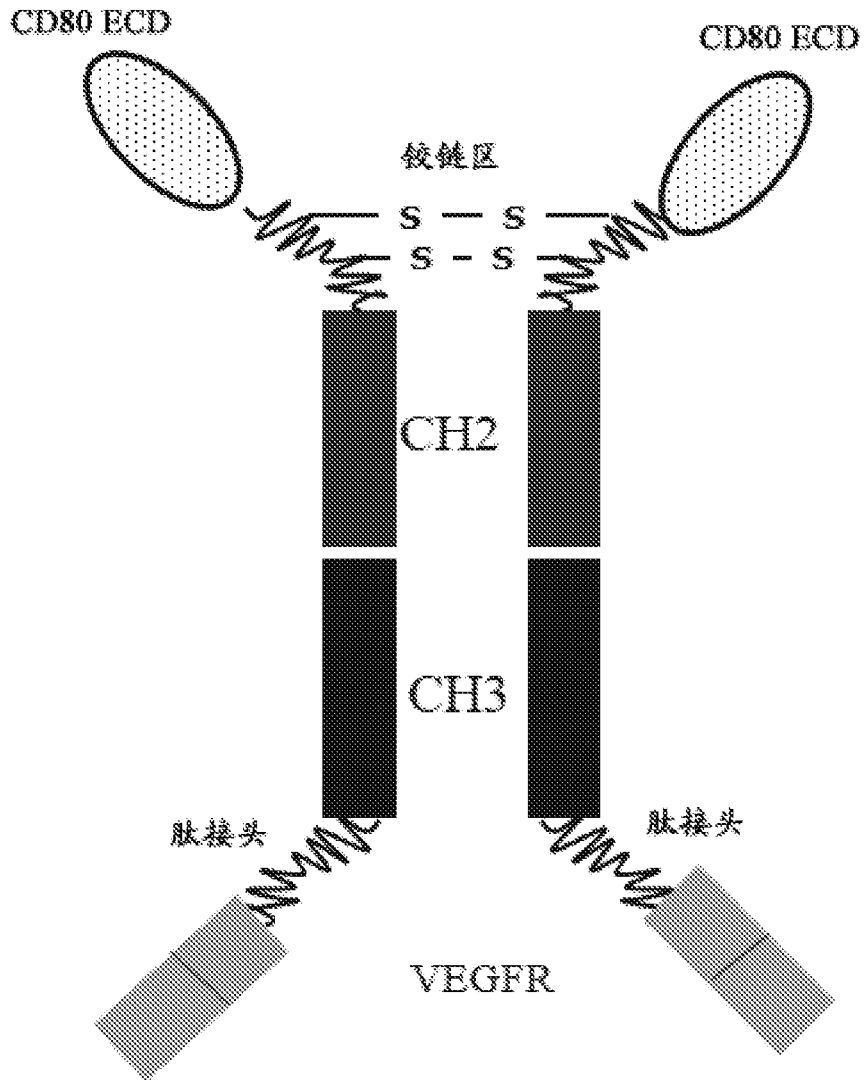


图 1B

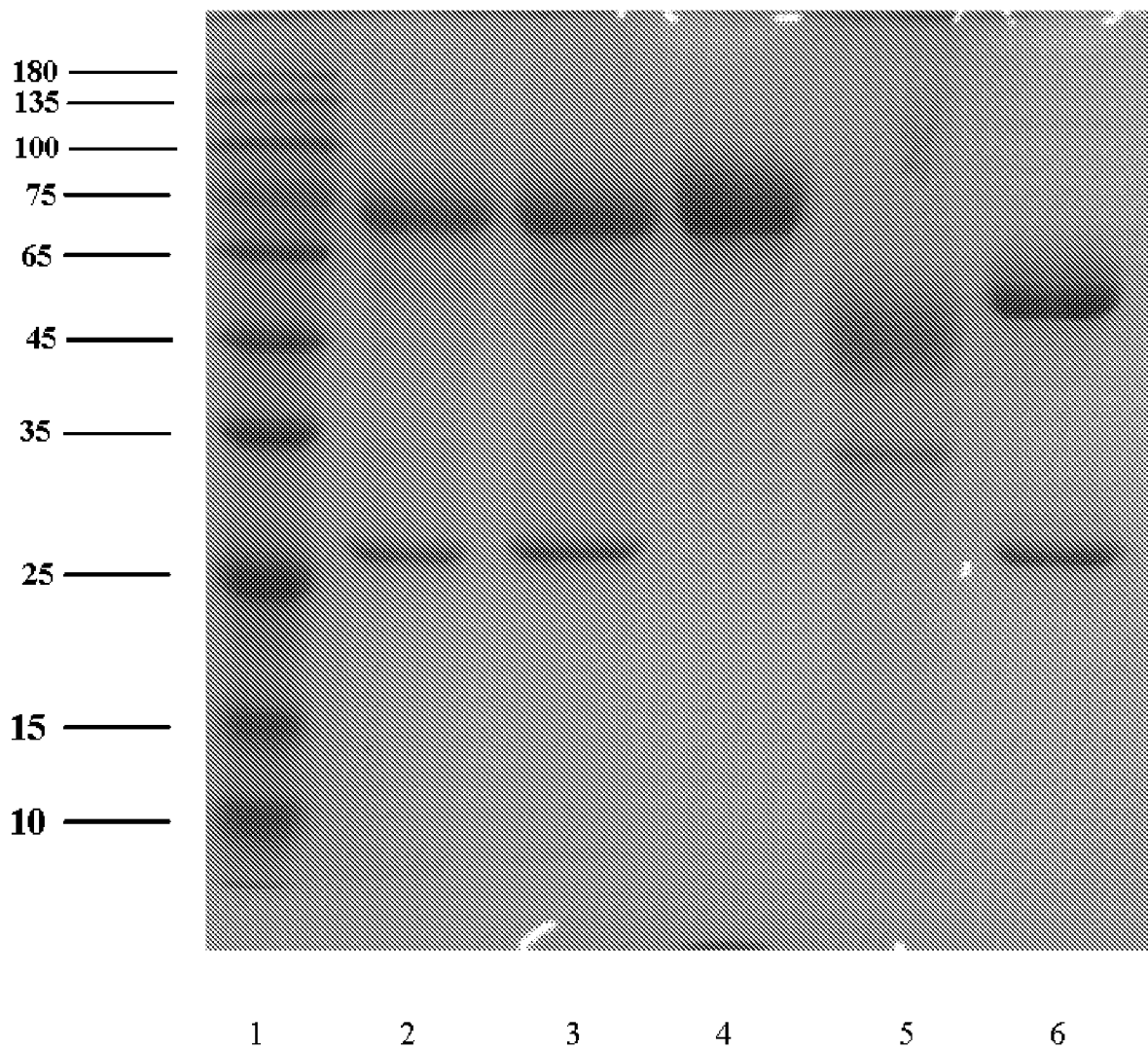


图2

在混合淋巴细胞培养实验中对 IFN- $\gamma$  分泌的影响

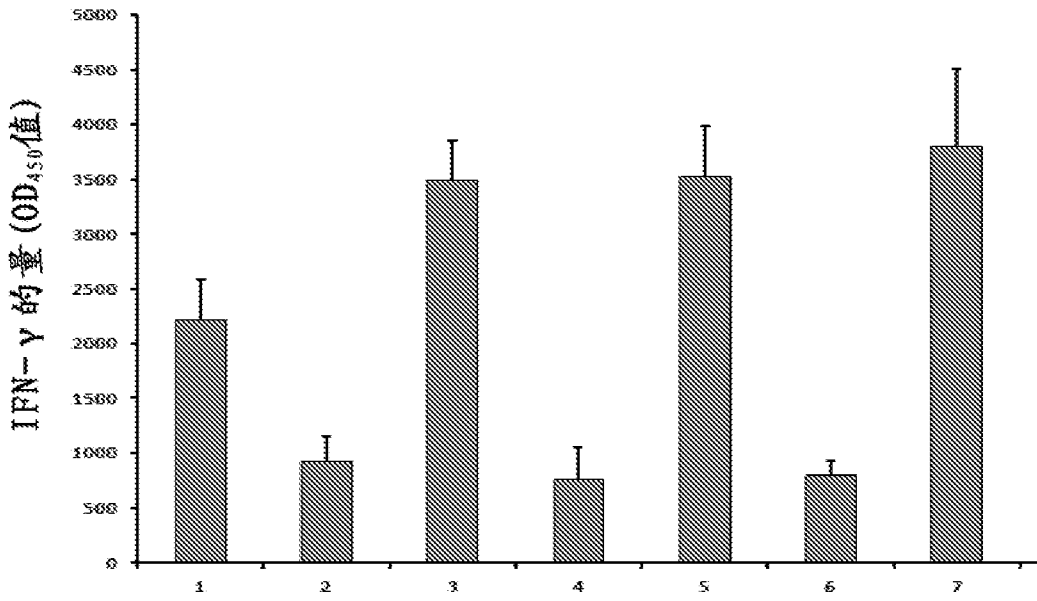


图 3

在动物模型中对肿瘤生长的抑制作用

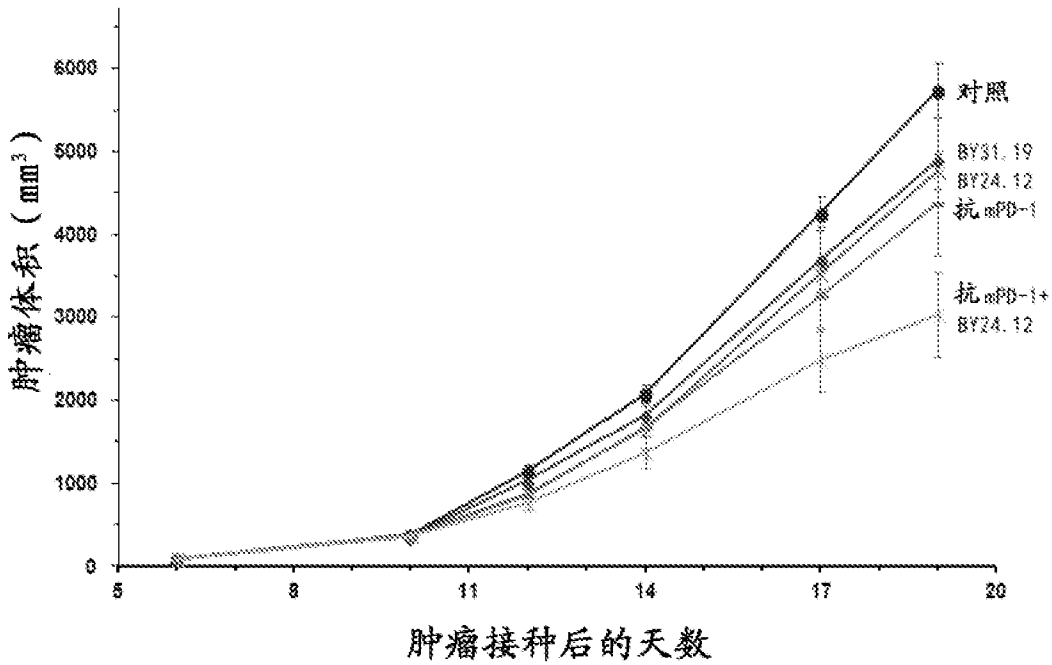


图 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/071213

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 51/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; C12P; 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) 数据库: CNMED; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELESEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 万方; 中国专利生物序列检索系统数据库 检索词: vegf, 血管内皮生长因子, cd80, fc, 抗体, 融合蛋白, 胞外结构域, B7-1, PD-1, vascular endothelial cell growth factor, antibody, fusion protein, extracellular domain, ecd, SEQ ID NOS: 1-88		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010136480 A1 (GLAXO GROUP LTD et al.) 02 December 2010 (2010-12-02) see description, page 1, line 30 to page 2, line 16, page 7, line 1 to page 22, line 41, embodiments, claims	1-14
Y	CN 108884139 A (FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.) 23 November 2018 (2018-11-23) see description, paragraphs 0054-0179, claims	1-14
Y	CN 108623691 A (BEIJING BEYOND BIOTECHNOLOGY CO LTD) 09 October 2018 (2018-10-09) see description, paragraphs 0007-0050, claims, SEQ ID NOS: 1-26, 40-41	2-14
Y	WO 2017218977 A2 (GENENTECH INC. et al.) 21 December 2017 (2017-12-21) see SEQ ID NOS: 1-2, 5-6	2-14
Y	WO 2018191438 A1 (INHIBRX INC) 18 October 2018 (2018-10-18) see SEQ ID NOS: 9, 11	2-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>27 February 2020</b>		Date of mailing of the international search report <b>23 March 2020</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

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

International application No.

**PCT/CN2020/071213**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2010136480	A1	02 December 2010	JP	2012527875	A	12 November 2012
				US	2012070436	A1	22 March 2012
				CA	2763439	A1	02 December 2010
				EP	2435477	A1	04 April 2012
<hr/>							
CN	108884139	A	23 November 2018	IL	258725	D0	28 June 2018
				BR	112018008865	A2	06 November 2018
				CL	2018001172	A1	21 September 2018
				US	2017145071	A1	25 May 2017
				US	10273281	B2	30 April 2019
				EA	201891106	A1	28 December 2018
				CA	3001131	A1	11 May 2017
				SG	11201803009V	A	30 May 2018
				CR	06.03.2018	A	16 October 2018
				PE	20181300	A1	09 August 2018
				PE	13002018	A1	09 August 2018
				JP	2018535204	A	29 November 2018
				MX	2018005517	A	09 November 2018
				US	2019202889	A1	04 July 2019
				TW	201722985	A	01 July 2017
				US	2019194288	A1	27 June 2019
				WO	2017079117	A1	11 May 2017
				BR	112018008865	A8	26 February 2019
				KR	20180069903	A	25 June 2018
				EP	3371208	A1	12 September 2018
				CO	2018004132	A2	30 November 2018
PH	12018500933	A1	19 November 2018				
AU	2016350701	A1	31 May 2018				
<hr/>							
CN	108623691	A	09 October 2018	WO	2018166468	A1	20 September 2018
<hr/>							
WO	2017218977	A2	21 December 2017	AU	2017286676	A1	13 December 2018
				SG	11201810777 W	A	28 December 2018
				IL	263690	D0	31 January 2019
				BR	112018075516	A2	01 October 2019
				KR	20190039929	A	16 April 2019
				AU	2017286676	A8	20 December 2018
				MX	2018015173	A	04 July 2019
				TW	201803902	A	01 February 2018
				CN	109563124	A	02 April 2019
				JP	2019521986	A	08 August 2019
				WO	2017218977	A3	18 January 2018
				CA	3026518	A1	21 December 2017
				AR	108800	A1	26 September 2018
				EP	3472177	A2	24 April 2019
				US	2019256556	A1	22 August 2019
				WO	2017218977	A8	28 March 2019
<hr/>							
WO	2018191438	A1	18 October 2018	US	2019010242	A1	10 January 2019
				TW	201843177	A	16 December 2018
				AU	2018250641	A1	31 October 2019
				CA	3058477	A1	18 October 2018
				SG	11201909160 W	A	30 October 2019
				IL	269826	D0	28 November 2019

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

International application No.

**PCT/CN2020/071213**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/071213

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 51/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; C12P; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>数据库: CNMED; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELSEVEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 万方; 中国专利生物序列检索系统数据库 检索词: vegf, 血管内皮生长因子, cd80, fc, 抗体, 融合蛋白, 胞外结构域, B7-1, PD-1, vascular endothelial cell growth factor, antibody, fusion protein, extracellular domain, ecd, SEQ ID NOS:1-88</p>																				
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2010136480 A1 (GLAXO GROUP LTD等) 2010年 12月 2日 (2010 - 12 - 02) 参见说明书第1页第30行-第2页第16行, 第7页第1行-22页第41行, 实施例, 权利要求书</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108884139 A (戊瑞治疗有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 参见说明书第0054-0179段, 权利要求书</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108623691 A (BEIJING BEYOND BIOTECHNOLOGY CO LTD) 2018年 10月 9日 (2018 - 10 - 09) 参见说明书第0007-0050段, 权利要求书, SEQ ID NOS:1-26, 40-41</td> <td>2-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017218977 A2 (GENENTECH INC等) 2017年 12月 21日 (2017 - 12 - 21) 参见SEQ ID NOS:1-2, 5-6</td> <td>2-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2018191438 A1 (INHIBRX INC) 2018年 10月 18日 (2018 - 10 - 18) 参见SEQ ID NOS:9, 11</td> <td>2-14</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 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          “&amp;” 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	WO 2010136480 A1 (GLAXO GROUP LTD等) 2010年 12月 2日 (2010 - 12 - 02) 参见说明书第1页第30行-第2页第16行, 第7页第1行-22页第41行, 实施例, 权利要求书	1-14	Y	CN 108884139 A (戊瑞治疗有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 参见说明书第0054-0179段, 权利要求书	1-14	Y	CN 108623691 A (BEIJING BEYOND BIOTECHNOLOGY CO LTD) 2018年 10月 9日 (2018 - 10 - 09) 参见说明书第0007-0050段, 权利要求书, SEQ ID NOS:1-26, 40-41	2-14	Y	WO 2017218977 A2 (GENENTECH INC等) 2017年 12月 21日 (2017 - 12 - 21) 参见SEQ ID NOS:1-2, 5-6	2-14	Y	WO 2018191438 A1 (INHIBRX INC) 2018年 10月 18日 (2018 - 10 - 18) 参见SEQ ID NOS:9, 11	2-14
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
Y	WO 2010136480 A1 (GLAXO GROUP LTD等) 2010年 12月 2日 (2010 - 12 - 02) 参见说明书第1页第30行-第2页第16行, 第7页第1行-22页第41行, 实施例, 权利要求书	1-14																		
Y	CN 108884139 A (戊瑞治疗有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 参见说明书第0054-0179段, 权利要求书	1-14																		
Y	CN 108623691 A (BEIJING BEYOND BIOTECHNOLOGY CO LTD) 2018年 10月 9日 (2018 - 10 - 09) 参见说明书第0007-0050段, 权利要求书, SEQ ID NOS:1-26, 40-41	2-14																		
Y	WO 2017218977 A2 (GENENTECH INC等) 2017年 12月 21日 (2017 - 12 - 21) 参见SEQ ID NOS:1-2, 5-6	2-14																		
Y	WO 2018191438 A1 (INHIBRX INC) 2018年 10月 18日 (2018 - 10 - 18) 参见SEQ ID NOS:9, 11	2-14																		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2020年 2月 27日	2020年 3月 23日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																			
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	马岚 电话号码 86-(10)-62412181																			

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/071213

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2010136480	A1	2010年 12月 2日	JP	2012527875	A	2012年 11月 12日
				US	2012070436	A1	2012年 3月 22日
				CA	2763439	A1	2010年 12月 2日
				EP	2435477	A1	2012年 4月 4日
CN	108884139	A	2018年 11月 23日	IL	258725	D0	2018年 6月 28日
				BR	112018008865	A2	2018年 11月 6日
				CL	2018001172	A1	2018年 9月 21日
				US	2017145071	A1	2017年 5月 25日
				US	10273281	B2	2019年 4月 30日
				EA	201891106	A1	2018年 12月 28日
				CA	3001131	A1	2017年 5月 11日
				SG	11201803009V	A	2018年 5月 30日
				CR	20180306	A	2018年 10月 16日
				PE	20181300	A1	2018年 8月 9日
				PE	13002018	A1	2018年 8月 9日
				JP	2018535204	A	2018年 11月 29日
				MX	2018005517	A	2018年 11月 9日
				US	2019202889	A1	2019年 7月 4日
				TW	201722985	A	2017年 7月 1日
				US	2019194288	A1	2019年 6月 27日
				WO	2017079117	A1	2017年 5月 11日
				BR	112018008865	A8	2019年 2月 26日
				KR	20180069903	A	2018年 6月 25日
				EP	3371208	A1	2018年 9月 12日
				CO	2018004132	A2	2018年 11月 30日
PH	12018500933	A1	2018年 11月 19日				
AU	2016350701	A1	2018年 5月 31日				
CN	108623691	A	2018年 10月 9日	WO	2018166468	A1	2018年 9月 20日
WO	2017218977	A2	2017年 12月 21日	AU	2017286676	A1	2018年 12月 13日
				SG	11201810777W	A	2018年 12月 28日
				IL	263690	D0	2019年 1月 31日
				BR	112018075516	A2	2019年 10月 1日
				KR	20190039929	A	2019年 4月 16日
				AU	2017286676	A8	2018年 12月 20日
				MX	2018015173	A	2019年 7月 4日
				TW	201803902	A	2018年 2月 1日
				CN	109563124	A	2019年 4月 2日
				JP	2019521986	A	2019年 8月 8日
				WO	2017218977	A3	2018年 1月 18日
				CA	3026518	A1	2017年 12月 21日
				AR	108800	A1	2018年 9月 26日
				EP	3472177	A2	2019年 4月 24日
				US	2019256556	A1	2019年 8月 22日
				WO	2017218977	A8	2019年 3月 28日
WO	2018191438	A1	2018年 10月 18日	US	2019010242	A1	2019年 1月 10日
				TW	201843177	A	2018年 12月 16日
				AU	2018250641	A1	2019年 10月 31日
				CA	3058477	A1	2018年 10月 18日
				SG	11201909160W	A	2019年 10月 30日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/071213

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)
IL 269826 D0 2019年 11月 28日			