

(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
2021 年 11 月 4 日 (04.11.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/218895 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) *C07K 1/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2021/089837
- (22) 国际申请日: 2021 年 4 月 26 日 (26.04.2021)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202010359751.8 2020 年 4 月 29 日 (29.04.2020) CN
- (71) 申请人: 正大天晴药业集团股份有限公司 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。
- (72) 发明人: 赵伟(ZHAO, Wei); 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。李盈淳(LI, Yingchun); 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。吕海丽(LV, Haili); 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。谢联香(XIE, Lianxiang); 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。张哲文(ZHANG, Zhewen); 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。

秦宇(QIN, Yu); 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。张喜全(ZHANG, Xiquan); 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。程艳菊(CHENG, Yanju); 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。吕鹏(LV, Peng); 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。李田田(LI, Tiantian); 中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。

(74) 代理人: 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 (INSIGHT INTELLECTUAL PROPERTY LIMITED); 中国北京市朝阳区建外大街光华东里 8 号中海广场中楼 7 层, Beijing 100020 (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, IT, 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。

(54) Title: BIFUNCTIONAL PROTEIN AGAINST PD-1 AND TGF- β

(54) 发明名称: 针对 PD-1 和 TGF- β 的双功能蛋白

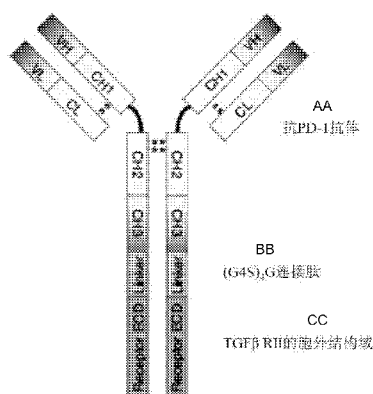


图 1

AA Anti-PD-1 antibody
BB linker peptide
CC Extracellular domain of TGF β R1

(57) Abstract: Provided in the present application are a bifunctional protein which can bind to PD-1 (programmed death receptor-1) and TGF- β (transforming growth factor- β), the medical use of the bifunctional protein, and a preparation method therefor.

(57) 摘要: 本申请提供了能够结合 PD-1(程序性死亡受体-1)和 TGF- β (转化生长因子- β)的双功能蛋白, 以及该双功能蛋白的医学用途和制备方法。

(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))。

针对PD-1和TGF- β 的双功能蛋白

相关申请的引用

本申请要求于2020年4月29日提交的中国专利申请202010359751.8号的优先权，通过援引加入的方式将其内容整体并入本文，并用于所有目的。

技术领域

本申请大体涉及抗体药物领域，特别是恶性肿瘤的治疗。具体而言，本申请提供了能够结合PD-1（程序性死亡受体-1）和TGF- β （转化生长因子- β ）的双功能蛋白，以及该双功能蛋白的医学用途。

背景技术

T细胞表达许多重要的膜蛋白免疫分子，其中PD-1（Programmed Death-1，程序性死亡受体-1，也称为CD279）蛋白，属于免疫球蛋白超家族中CD28家族，其配体（PD-L1、PD-L2）属于B7家族。PD-L1与PD-1结合后负调控T细胞免疫功能，是重要的外周T细胞抑制性免疫检查点。正常人体组织中低表达PD-L1，以维持免疫耐受、避免自身免疫反应。但肿瘤细胞通过高表达PD-L1（或释放PD-L1可溶性变体、外泌体）抑制T细胞免疫功能，形成免疫抑制型肿瘤免疫微环境。通过阻断PD-1/PD-L1信号通路，可以恢复T细胞免疫功能，对肿瘤细胞进行识别和杀伤。

TGF- β （transforming growth factor- β ，转化生长因子- β ）是一类具有多功能生物活性的细胞因子，能够通过调节细胞的增殖、分化、凋亡、粘附、侵袭和微环境来调节机体的生理过程。典型的TGF- β 信号通路首先是TGF- β 与II型TGF- β 受体（TGF- β RII）结合，然后与I型TGF- β 受体（TGF- β RI）形成复合物使之激活，TGF- β RI磷酸化激活R-Smad（Smad1、2、3、5、8）成员，R-Smad再与Co-Smad（Smad4）结合形成复合物转入细胞核内调控靶基因的转录。

在肿瘤微环境中，TGF- β 的高表达往往与侵袭、转移、免疫逃逸、治疗抵抗和较差的预后相关联（David Charles J *et al.*, TGF- β Tumor Suppression through a Lethal EMT.[J]. Cell,2016,164(5)）。还有研究表明，TGF- β 很可能通过诱导Treg细胞和抑制效应T细胞破坏肿瘤微环境，加速肿瘤的进展（Shen Yinan *et al.*, TGF- β regulates hepatocellular carcinoma progression by inducing Treg cell polarization.[J]. Cellular physiology and biochemistry,2015,35(4)）。还有学者认为，TGF- β 信号传导是导致患者产生抗PD-(L)1药物耐药性的原因。

目前，以TGF- β 和PD-1/PD-L1作为联合靶点的研究已有报道，但是由于此研究方向具有良好前景，进一步的研究是亟需的。

发明内容

第一方面，本申请提供了双功能蛋白，其包含PD-1（程序性死亡受体-1）结合部和TGF- β

(转化生长因子- β) 结合部。

在一些实施方案中,PD-1 结合部为抗 PD-1 抗体或抗原结合片段。在一些实施方中,PD-1 结合部为针对 PD-1 的全长抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段或单链 Fv 片段(scFv)。

在一些实施方案中,抗 PD-1 抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含氨基酸序列为 GFAFSSYD (SEQ ID NO: 1) 的 HCDR1,氨基酸序列为 ISGGGRYT (SEQ ID NO: 2) 的 HCDR2 和氨基酸序列为 ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 3) 的 HCDR3,所述轻链可变区包含氨基酸序列为 QDINTY (SEQ ID NO: 4) 的 LCDR1,氨基酸序列为 RAN (SEQ ID NO: 5) 的 LCDR2 和氨基酸序列为 LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 6) 的 LCDR3。在一些实施方案中,所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示,和/或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示。在一些实施方案中,抗 PD-1 抗体或抗原结合片段还包含重链恒定区和轻链恒定区,所述重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示或者为 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的变体,例如 C 末端残基 A 替换为 K 的 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列,和/或所述轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示或者为 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的变体。

在另一些实施方案中,抗 PD-1 抗体或抗原结合片段选自:纳武利尤单抗(Nivolumab)、帕博利珠单抗(Pembrolizumab)、Durvalumab、特瑞普利单抗(JS-001)、信迪利单抗(ICI308)、卡瑞利珠单抗(Camrelizumab)、替雷利珠单抗(BGB-A317)、AK105(康方生物)、杰诺单抗(GB226)、丽珠单抗(LZM009)、HLX-10、BAT-1306、AK103(HX008)、AK104(康方生物)、CS1003、SCT-H10A、F520、SG001、GLS-010,或以上抗体的抗原结合片段。

在一些实施方案中,TGF- β 结合部为 TGF- β 受体或 TGF- β 受体的结合结构域。在一些实施方中,TGF- β 结合部为 TGF- β 受体的胞外结构域或胞外结构域的结合片段。在一些具体实施方案中,TGF- β 结合部为人 TGF- β RII 同种型 B 胞外结构域多肽,其包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中,TGF- β 结合部为人 TGF- β RII 同种型 B 胞外结构域多肽的变体,例如是与 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的多肽或肽段,或任何文本所述的片段。

在一些实施方案中,TGF- β 结合部为抗 TGF- β 抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,TGF- β 结合部为针对 TGF- β 的全长抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段或单链 Fv 片段(scFv)。

在一些实施方案中,PD-1结合部和TGF- β 结合部之间通过柔性连接子连接。在一些实施方中,所述柔性连接子为GGGS型连接子。在一些具体实施方案中,所述柔性连接子为SEQ ID NO: 12所示的连接子。

在一些实施方案中,双功能蛋白包含:(1)两个完全相同的第一多肽,第一多肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列具有至少 80%的同一性;和(2)两个完全相同的第二多肽,第二多肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列具有至少 80%的同一性。

第二方面,本申请提供了编码第一方面的双功能蛋白的核酸分子。

第三方面,本申请提供了药物组合物,其包含第一方面的双功能蛋白,以及药学上可接

受的赋形剂、稀释剂或载体。

在一些实施方案中,所述药物组合物用于预防或治疗恶性肿瘤。在一些具体实施方案中,恶性肿瘤选自结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌恶性肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、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/或骨髓增生异常综合征。在一些具体实施方案中,所述恶性肿瘤是原位的,转移性的,复发性的,和/或难治性的。

第四方面,本申请提供了第一方面的双功能蛋白或第二方面的核酸分子在制备用于预防或治疗恶性肿瘤的药物中的用途。

在一些实施方案中,恶性肿瘤选自结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌恶性肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、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/或骨髓增生异常综合征。在一些具体实施方案中,所述恶性肿瘤是原位的,转移性的,复发性的,和/或难治性的。

第五方面,本申请提供了预防或治疗恶性肿瘤的方法,包括向患有恶性肿瘤的个体给予第一方面的双功能蛋白或第三方面的药物组合物。

在一些实施方案中,恶性肿瘤选自结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌恶性肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、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/或骨髓增生异常综合征。在一些具体实施方案中,所述恶性肿瘤是原位的,转移性的,复发性的,和/或难治性的。

第六方面,本申请提供了制备双功能蛋白的方法,所述双功能蛋白包含PD-1(程序性死亡受体-1)结合部和TGF- β (转化生长因子- β)结合部,并且包括第一方面所述的双功能蛋白,所述方法包括以下步骤:

将包含编码所述双功能蛋白的核酸分子的表达载体引入宿主细胞,并在允许蛋白表达的条件下,培养所述宿主细胞;以及

收集细胞培养物和/或上清,并分离和纯化所述双功能蛋白。

附图说明

图1显示了本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的结构示意图。

图2显示了报告基因法检测本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的PD-1端的生物学活性的结果,其中以纳武利尤单抗(Nivolumab)作为对照样品。

图3显示了酶联免疫吸附测定方法检测本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的TGF β 结合活性的结果。

序列说明

SEQ ID NO:1-3为本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的抗PD-1抗体部分的重链可变区的CDR1-CDR3的序列。

SEQ ID NO:4-6为本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的抗PD-1抗体部分的轻链可变区的CDR1-CDR3的序列。

SEQ ID NO:7和8分别为本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的抗PD-1抗体部分的重链可变区和轻链可变区的序列。

SEQ ID NO:9和10分别为本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的抗PD-1抗体部分的重链恒定区和轻链恒定区的序列。

SEQ ID NO:11为本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的TGF- β 结合部，即，人TGF- β R_{II}同种型B胞外结构域多肽。

SEQ ID NO:12为本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的抗PD-1抗体部分和TGF- β 结合部之间的柔性连接子。

SEQ ID NO:13为本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的重链部分序列，重链部分由抗PD-1抗体部分的重链、柔性连接子（SEQ ID NO:12）和人TGF- β R_{II}同种型B胞外结构域多肽（SEQ ID NO:11）组成。

SEQ ID NO:14为本申请的示例性PD-1/TGF β 双功能蛋白的轻链部分序列，轻链部分由抗PD-1抗体部分的轻链组成。

SEQ ID NO:15为SEQ ID NO:13的编码核酸序列（不包含信号肽的编码序列）。

SEQ ID NO:16为SEQ ID NO:14的编码核酸序列（不包含信号肽的编码序列）。

SEQ ID NO:17和18分别为对照PD1单抗纳武利尤单抗（Nivolumab）的重链和轻链的序列。

SEQ ID NO:19和14分别为另一对照PD1单抗（来自中国专利申请201610705763.5号（CN106977602））的重链和轻链的序列。

SEQ ID NO:20和18为作为双功能蛋白对照物的纳武利尤单抗/TGF- β R_{II}双功能蛋白的重链部分序列和轻链部分序列，重链部分由纳武利尤单抗的重链（SEQ ID NO:17的C末端氨基酸残基由K突变为A）、柔性连接子（SEQ ID NO:12）和人TGF- β R_{II}同种型B胞外结构域多肽（SEQ ID NO:11）组成，轻链部分由纳武利尤单抗的轻链组成。

SEQ ID NO:21和22为实验对照物IgG1蛋白的重链和轻链的序列。

发明详述

定义

提供以下定义和方法用以更好地界定本申请以及在本申请实践中指导本领域普通技术人员。除非另外指明，本申请中所用的术语具有本领域技术人员通常所理解的含义。本文所引用的所有专利文献、学术论文及其他公开出版物，其中的全部内容整体并入本文作为参考。

如本文所用术语“抗体”，是指能够经由至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区中的

抗原识别位点特异性结合到靶标的免疫球蛋白分子。靶标包括但不限于碳水化合物、多聚核苷酸、脂质、多肽等。本文所使用的“抗体”不仅包括完整的(即全长的)抗体,而且还包括其抗原结合片段(例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、其变异体、包含抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、双抗体、线性抗体、单链抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)及任何其他包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的修改配置,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体及共价修饰的抗体。

通常,完整或全长的抗体包含两个重链和两个轻链。每个重链含有重链可变区(VH)和第一、第二及第三恒定区(CH1、CH2 及 CH3)。每个轻链含有轻链可变区(VL)和恒定区(CL)。全长的抗体可以是任何种类的抗体,例如 IgD、IgE、IgG、IgA 或 IgM(或上述的子类),但抗体不需要属于任何特定的类别。根据重链的恒定区的抗体氨基酸序列,可以将免疫球蛋白指定为不同的类别。通常,免疫球蛋白有五种主要的类别: IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM,而且这些类别中有几个可以再被进一步区分成子类(同型),例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、以及 μ 。不同类别的免疫球蛋白的子单元结构和三维结构是公知的。

本文所用术语“抗原结合片段”是指抗体结构中决定抗原结合能力的部分。本领域技术人员能够理解,抗体结构中决定抗原结合能力的主要部分是 CDR,因此 CDR 也是抗原结合片段的核心组成部分。抗原结合域可以包含重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)或上述两者。VH 和 VL 中的每个通常含有三个互补决定区 CDR1、CDR2 及 CDR3。

本领域技术人员公知,互补决定区(CDR,通常有 CDR1、CDR2 及 CDR3)是可变区中对抗体的亲和力和特异性影响最大的区域。VH 或 VL 的 CDR 序列有两种常见的定义方式,即 Chothia 定义和 kabat 定义。(参阅例如 Kabat, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); A1-Lazikani 等人, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); 以及 Martin 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989)。对于给定抗体的可变区序列,可以根据 Chothia 定义或者 Kabat 定义来确定 VH 和 VL 序列中的 CDR 序列。

对于给定抗体的可变区序列,可以通过多种方式分析可变区序列中的 CDR 序列,例如可以利用在线软件 Abysis 确定(<http://www.abysis.org/>)。

抗原结合片段的实例包括但不限于:(1)Fab 片段,其可以是具有 VL-CL 链和 VH-CH1 链的单价片段;(2)F(ab')₂ 片段,其可以是具有两个 Fab' 片段的二价片段,该两个 Fab' 片段由铰链区的二硫桥(即 Fab' 的二聚物)连接;(3)具有抗体的单臂的 VL 和 VH 域的 Fv 片段;(4)单链 Fv(scFv),其可以由 VH 域和 VL 域经由胜肽连接符组成的单一多胜肽链;以及(5)(scFv)₂,其可以包含两个由胜肽连接符连接的 VH 域和两个 VL 域,该两个 VL 域是经由二硫桥与该两个 VH 域组合。

本文所用术语“Fab 片段”、“Fab 部分”或类似的术语是指完整的抗体用木瓜蛋白酶处理后产生的能够与抗原结合的抗体片段,包括完整的轻链(VL-CL)、重链可变区和 CH1 片段(VH-CH1)。

本文所用术语“单链抗体(scFv, single chain fragment variable)”是指一般利用基因工

程技术构建的单链结构的抗体，包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的一条多肽链。在重链可变区和轻链可变区之间通常会设计一段柔性的连接肽(linker)以便重链可变区和轻链可变区可以折叠成为能够结合抗原的正确构象。

如本文所用术语“Fc 片段”、“Fc 结构域”、“Fc 部分”或类似的术语是指抗体重链恒定区的一部分，包括铰链区(hinge)、恒定区的 CH2 片段和 CH3 片段。

如本文所用术语“特异性结合”，是指两个分子之间的非随机结合反应，例如抗体至抗原表位的结合。

如本文所用术语“单克隆抗体”指由基本同质的抗体群体获得的抗体，即，除了可能在少量个体中存在自然发生的突变以外，组成群体的各个抗体是相同的。本文所述单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体，其中重链和/或轻链的一部分与来源于具体物种或属于具体抗体类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源，而重链和/或轻链的余下部分与来源于另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源，并且还包括这样的抗体的片段，只要它们能表现出所期望的生物学活性。

如本文所用的术语“同一性”是指两个多核酸序列之间或两个多肽序列之间的序列相似性。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。

如本文所用的术语“治疗”包括治疗性治疗以及防范性治疗或预防性措施，通过给予受试者治疗剂来减少所述疾病、紊乱，或病症（例如，癌症或肿瘤）的至少一种症状或缓解症状的发展。

如本文所用的术语“EC₅₀”，又称半数有效浓度，是指在规定暴露时间后，能达到 50%最大效应的浓度。

第一方面，本申请提供了双功能蛋白，其包含PD-1（程序性死亡受体-1）结合部和TGF- β （转化生长因子- β ）结合部。

在一些实施方案中，PD-1 结合部为抗 PD-1 抗体或抗原结合片段。在一些实施方中，PD-1 结合部为针对 PD-1 的全长抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段或单链 Fv 片段(scFv)。

在一些实施方案中，抗 PD-1 抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列为 GFAFSSYD (SEQ ID NO: 1) 的 HCDR1，氨基酸序列为 ISGGGRYT (SEQ ID NO: 2) 的 HCDR2 和氨基酸序列为 ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 3) 的 HCDR3，所述轻链可变区包含氨基酸序列为 QDINTY (SEQ ID NO: 4) 的 LCDR1，氨基酸序列为 RAN (SEQ ID NO: 5) 的 LCDR2 和氨基酸序列为 LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 6) 的 LCDR3。在一些实施方案中，所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，和/或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示。在一些实施方案中，抗 PD-1 抗体或抗原结合片段还包含重链恒定区和轻链恒定区，所述重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，和/或所述轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

在一些实施方案中，重链恒定区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 9 的变体，和/或所述轻链恒定区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 10 的变体。在一些具体实施方案中，重链恒定区的氨基酸序列为 C 末端残基 A 替换为 K 的 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列。对于抗体恒定区

的改造是本领域技术人员知晓的。在一些实施方案中，重链恒定区可以选择 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 或其他类别，尽管 IgG1 是优选的。在一些实施方案中，抗体恒定区可包含修饰，例如氨基酸的插入、缺失、取代或化学修饰。在一些实施方案中，所述恒定区的任意氨基酸残基可用任意同种异型 (allotype) 的氨基酸残基取代，优选地，用 G1m(3) 和/或 nG1m(1) 的氨基酸残基取代。在一些实施方案中，恒定区包含改变效应功能的突变，例如，将抗体重链恒定区 C 末端的赖氨酸残基 (K) (常见于野生型 IgG1 型抗体) 突变为疏水性氨基酸，如丙氨酸 (A) 或亮氨酸 (L)，减少蛋白酶的水解切割，增加血清半衰期，这种改造也特别适合于抗体重链 C 端进一步融合其他部分的情形。本申请的示例性 PD-1/TGF β 双功能蛋白中抗 PD-1 抗体部分的重链恒定区的 C 端残基进行了相应处理。

在一些实施方案中，TGF- β 结合部为 TGF- β 受体或 TGF- β 受体的结合结构域。在一些实施方案中，TGF- β 结合部为 TGF- β 受体的胞外结构域或胞外结构域的结合片段。在一些具体实施方案中，TGF- β 结合部为人 TGF- β R2 同种型 B 胞外结构域多肽，其包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。在一些具体实施方案中，TGF- β 结合部为人 TGF- β R2 同种型 B 胞外结构域多肽的变体，例如是与 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性的多肽或肽段，或任何文本所述的片段。

在一些实施方案中，TGF- β 结合部为抗 TGF- β 抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，TGF- β 结合部为针对 TGF- β 的全长抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段或单链 Fv 片段 (scFv)。

在一些实施方案中，PD-1 结合部和 TGF- β 结合部之间通过柔性连接子连接。在一些实施方案中，所述柔性连接子为 GGGGS 型连接子。在一些具体实施方案中，所述柔性连接子为 SEQ ID NO: 12 所示的连接子。

在某些实施方案中，所述双功能蛋白包含：(1) 两个完全相同的第一多肽，第一多肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列具有至少 80% (例如 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 的同一性；和 (2) 两个完全相同的第二多肽，第二多肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列具有至少 80% (例如 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 的同一性。

作为非限制性实例，本申请的双功能蛋白 (即，PD-1/TGF β 双功能蛋白，后文中又称为“PD1/TGF β R2 融合蛋白”或“PD1/TGF β R2”) 可以由抗 PD-1 抗体 (其重链可变区、轻链可变区、重链恒定区、轻链恒定区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、8、9、10 所示)、柔性连接子 (SEQ ID NO: 12) 和人 TGF- β R2 同种型 B 胞外结构域多肽 (SEQ ID NO: 11) 组成，其分子结构示意图可参见图 1。如图 1 所示，PD1/TGF β R2 以天然抗 PD-1 抗体为基础，在重链恒定区的 CH3 末端依次延伸出柔性连接子和人 TGF- β R2 同种型 B 胞外结构域多肽。

PD1/TGF β R2 是本申请的示例性双功能蛋白，其相对于已报道的纳武利尤单抗/TGF- β R2 融合蛋白具有更高的 TGF β 结合活性和 PD-1 端生物学活性，甚至更优的肿瘤抑制效

果。此外，其相对于现有的PD-1抗体（例如纳武利尤单抗（Nivolumab））的具有更低的细胞毒性和副作用。鉴于现有的PD-1抗体的细胞毒性和副作用较大，PD1/TGFβRII更低的细胞毒性和副作用使得以更高的剂量施用从而更好地抑制和消耗TGFβ成为可能，剂量安全窗更为理想，有利于高剂量施用和临床应用。

第二方面，本申请提供了编码第一方面的双功能蛋白的核酸分子。

第三方面，本申请提供了药物组合物，其包含第一方面的双功能蛋白，以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

在一些实施方案中，所述药物组合物用于预防或治疗恶性肿瘤。在一些具体实施方案中，恶性肿瘤选自结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌恶性肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、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/或骨髓增生异常综合征。在一些具体实施方案中，所述恶性肿瘤是原位的，转移性的，复发性的，和/或难治性的。

在一些实施方案中，药物组合物还可包含润滑剂，如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油；润湿剂；乳化剂；悬浮剂；防腐剂，如苯甲酸、山梨酸和丙酸钙；增甜剂和/或调味剂等。

在一些实施方案中，可将本申请中的药物组合物配制为片剂、丸剂、粉剂、锭剂、酏剂、悬液、乳剂、溶液、糖浆、栓剂或胶囊等形式。

在一些实施方案中，可以利用任何生理上可接受的给药方式递送本申请的药物组合物，这些给药方式包括但不限于：口服给药、肠胃外给药、经鼻给药、直肠给药、腹膜内给药、血管内注射、皮下给药、经皮给药、吸入给药等。

在一些实施方案中，可以通过混合具有所需纯度的试剂与视情况的药学上可接受的载体、赋形剂等，以冻干制剂或水溶液的形式配制用于治疗用途的药物组合物用于存储。

第四方面，本申请提供了第一方面的双功能蛋白或第二方面的核酸分子在制备用于预防或治疗恶性肿瘤的药物中的用途。

在一些实施方案中，恶性肿瘤选自结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌恶性肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、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/或骨髓增生异常综合征。在一些具体实施方案中，所述恶性肿瘤是原位的，转移性的，复发性的，和/或难治性的。

第五方面，本申请提供了预防或治疗恶性肿瘤的方法，包括向患有恶性肿瘤的个体给予第一方面的双功能蛋白或第三方面的药物组合物。

在一些实施方案中，恶性肿瘤选自结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、

神经内分泌恶性肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、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/或骨髓增生异常综合征。在一些具体实施方案中，所述恶性肿瘤是原位的，转移性的，复发性的，和/或难治性的。

第六方面，本申请提供了制备双功能蛋白的方法，所述双功能蛋白包含PD-1（程序性死亡受体-1）结合部和TGF- β （转化生长因子- β ）结合部，所述方法包括以下步骤：

将包含编码所述双功能蛋白的核酸分子的表达载体引入宿主细胞，并在允许蛋白表达的条件下，培养所述宿主细胞；以及

收集细胞培养物和/或上清，并分离和纯化所述双功能蛋白。

在不矛盾的情况下，第一方面所述的实施方案和技术特征也适用于第六方面。

在一些实施方案中，所述宿主细胞为哺乳动物细胞，例如CHO细胞。

在一些实施方案中，收集细胞培养物的离心后上清液。

在一些实施方案中，纯化双功能蛋白包括使用亲和层析、阴离子交换层析、阳离子交换层析中的一种或多种。在亲和层析的一些实施方案中，洗脱液中包含蔗糖或甘油。本申请的发明人发现，添加蔗糖或甘油的洗脱液有利于减少融合蛋白的降解。

以下实施例仅用于说明而非限制本申请范围的目的。

实施例

实施例 1：PD1/TGF β RII 融合蛋白的表达

本实施例构建本申请的 PD1/TGF β RII 融合蛋白，结构示意图如图 1 所示。将编码融合有信号肽的 PD1/TGF β RII 融合蛋白的重链部分（SEQ ID NO: 13）和轻链部分（SEQ ID NO: 14）的核苷酸序列合成后克隆到 pcDNA3.1 表达载体中。采用瞬时或稳定转染的标准方案将 PD1/TGF β RII 融合蛋白的表达载体共转染到 CHO 细胞中，将转染后的细胞放置在含有 8%CO₂ 的 37°C 培养箱中进行培养。

人 TGF- β RII 同种型 B 胞外结构域多肽（SEQ ID NO:11），包含于 SEQ ID NO:13 中：

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQ
EVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPD

连接子的氨基酸序列（SEQ ID NO:12），包含于 SEQ ID NO:13 中：

GGGSGGGSGGGSGGGSG

PD1/TGF β RII 融合蛋白重链的氨基酸序列（SEQ ID NO:13）：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGR
YTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGIPPH
VQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNII
FSEELYNTSNPD

PD1/TGFβRII融合蛋白轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:14) :

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFCTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSG
VPSRFSGSGSGQDYTLTISSLPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

实施例 2: PD1/TGFβRII 融合蛋白的纯化

将实施例 1 获得的细胞培养液经离心后收集上清液, 采用 Protein A 亲和层析进行第一步纯化。平衡缓冲液为 10mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.0。平衡缓冲液冲洗层析柱 3~5 个柱体积后, 将细胞上清液进行上样。上样结束后, 用平衡缓冲液冲洗层析柱。然后用淋洗缓冲液 (0.5mol/L 氯化钠+25mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0) 进行淋洗, 再采用平衡缓冲液平衡 3~5 个柱体积。最后用洗脱缓冲液 (20mmol/L 柠檬酸盐缓冲液+5%蔗糖, pH 3.6) 冲洗层析柱, 收集洗脱样品, 样品用 2M Tris-盐酸缓冲液 (pH 9.5) 中和。

将上述中和后的洗脱样品 (pH 6.0) 进行阴离子交换层析, 平衡缓冲液为 10mmol/L 柠檬酸盐缓冲液+ 10mmol/L 磷酸盐缓冲液+10mmol/L Tris, pH 6.0。平衡缓冲液冲洗层析柱 3~5 个柱体积后, 将上述中和后的洗脱样品进行上样, 收集流穿样品, 上样结束后用平衡缓冲液冲洗层析柱。

将上述阴离子交换层析的流穿样品进行阳离子交换层析。平衡缓冲液为 10mmol/L 柠檬酸+ 10mmol/L 磷酸二氢钠+10mmol/L Tris 缓冲液, pH 5.0。将上述阴离子层析的流穿样品调节 pH 至 5.0 后进行上样, 上样完成后用平衡液冲洗层析柱 3~5 个柱体积。然后用洗脱缓冲液 (10mmol/L 柠檬酸盐+ 10mmol/L 磷酸盐+10mmol/L Tris 缓冲液, pH 9.0) 进行洗脱, 收集洗脱液。

实施例 3: 分子排阻色谱法检测 PD1/TGFβRII 融合蛋白样品

采用凝胶色谱柱对实施例 2 纯化得到的 PD1/TGFβRII 融合蛋白样品的各组分进行分离。用中性 pH 的缓冲液作为流动相进行洗脱, 各分子量组分按照分子量由大到小的顺序依次被洗出。色谱柱为 Thermo MabPac™ SEC-1 300Å, 5μm, 7.8*300mm 规格的凝胶色谱柱, 流动相为 (20mmol/L 磷酸氢二钠+300mmol/L 氯化钠+2%异丙醇溶液, pH=7.4)。用流动相将样品稀释至 1mg/mL 作为供试品溶液, 精密量取供试品溶液 50μL 注入液相色谱仪, 在 280nm 波长处进行检测。流速为 0.5 mL/min, 等度洗脱 35min。

采用面积归一化法对结果进行定量分析。分别计算高分子量杂质、免疫球蛋白单体和低

分子量杂质的峰面积百分比。经检测，PD1/TGFβRII 融合蛋白样品高分子量杂质为 0.19%，免疫球蛋白单体为 99.81%，未检测出低分子量杂质。

以下实施例用到的对照双功能蛋白（纳武利尤单抗/TGF-βRII 融合蛋白）按照相同的流程制备，其中纳武利尤单抗的原有重链恒定区的 C 末端氨基酸残基由 K 改变为 A，与本申请的示例性 PD1/TGFβRII 融合蛋白保持一致。

实施例 4：报告基因法检测 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 PD-1 端生物学活性

检测流程描述如下：取对数生长期的 CHO-PDL1-CD3L 细胞（购买自中国食品药品检定研究院），用 DMED/F12 完全培养基调整活细胞密度至 5×10^5 细胞/mL，按 100μL/孔加入到 96 孔全白板中，置于 37°C，含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养，孵育 16~20 小时。第二天制备 Jurkat-PD-1-NFAT 细胞（购买自中国食品药品检定研究院）悬液，用含 2%FBS 的 1640 基础培养基调整活细胞密度至 2×10^6 细胞/mL。将加入 CHO-PDL1-CD3L 细胞的 96 孔全白板从培养箱中取出，吸弃上清，以 50μL/孔加入 Jurkat-PD-1-NFAT 细胞悬液，然后将参考 PD-1 抗体（纳武利尤单抗，SEQ ID NO:17 和 18 分别为重链和轻链的序列）、本申请实施例 1-3 制备的 PD1/TGFβRII 融合蛋白的梯度稀释液（初始浓度为 200000ng/mL，3 倍梯度稀释，共 11 个稀释梯度）以 50μL/孔加入到上述 96 孔全白板中，置于 37°C，含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养，孵育 4~6 小时。在孵育期间，取出 Bio-Lite 荧光素酶试剂（Vazyme, DD1201-03），室温融化，待孵育结束后，以 100μL/孔加入到上述 96 孔全白板中，室温避光孵育 2~3 分钟，使用多功能读板仪（Thermo, Varioskan Flash）读取 RLU 值。利用 Prism 软件分析实验数据，绘制参比品和测试品的剂量反应曲线，得到参比品和测试品的 EC₅₀ 值，并计算测试品的生物学活性。

$$\text{测试品生物学活性 (\%)} = (\text{参比品 EC}_{50} \text{ 值} / \text{测试品 EC}_{50} \text{ 值}) \times 100\%$$

本申请实施例的 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 PD-1 端生物学活性结果如表 1 和图 2 所示，结果显示保留了与人源 PD-1 的结合能力。

表 1 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 PD-1 端生物学活性

样品	EC ₅₀ 值 (ng/mL)	生物学活性
纳武利尤单抗	113.7	100%
PD1/TGFβRII	157.8	72%

实施例 5：酶联免疫吸附测定方法检测 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 TGFβ 结合活性

检测流程如下：

1) 以 2μg/mL 的人源 TGFβ1 蛋白（Sinobiological, 10804-H08H）为抗原，按 100μL/孔包被高吸附 96 孔板，2~8°C 孵育过夜。

2) 以 250μL/孔 PBST20（含 0.05% Tween 20 的 PBS 溶液）清洗 96 孔板 3 次后，加入 250μL/孔封闭液（含 3% BSA 的 PBS 溶液），25°C 孵育 2 小时。

3) 以 250μL/孔 PBST20 清洗 96 孔板 3 次后, 以 100μL/孔加入梯度稀释的本申请实施例 1-3 制备的 PD1/TGFβRII 融合蛋白 (初始浓度为 4000ng/mL, 4 倍梯度稀释, 共 7 个稀释度), 25℃孵育 2 小时。

6) 以 250μL/孔 PBST20 清洗 96 孔板 3 次后, 每孔加入 100μL 用稀释液 1:3500 稀释的 HRP-羊抗人 IgG 抗体 (PE, NEF802001EA), 25℃孵育 1 小时。

7) 以 250μL/孔 PBST20 清洗 96 孔板 5 次后, 以 100μL/孔加入 TMB 溶液, 25℃避光孵育 5 分钟。

10) 以 100μL/孔加入 1mol/L H₂SO₄ 终止反应, 室温放置 5 分钟。并通过酶标仪 (Thermo Scientific, Varioskan Flash) 检测 450nm/650nm 波长处 OD 值, Graphpad Prism 分析数据。

测试品结合活性 (%) = (参比品 EC₅₀ 值/测试品 EC₅₀ 值) × 100%

本申请实施例的 PD1/TGFβRII 融合蛋白体外结合 TGFβ1 的结果如表 2 和图 3 所示, ELISA 结果显示其保留了与 TGFβ 的结合活性。

表 2 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 TGFβ 结合活性

样品	EC ₅₀ 值 (pmol/L)
PD1/TGFβRII	397.6

实施例 6: PD1/TGFβRII 融合蛋白对结肠癌细胞 MC38/hPD-L1 小鼠皮下移植瘤的疗效

C57/PD-1 转基因小鼠 (购买于江苏集萃药康生物科技有限公司) 作为实验小鼠, 每只小鼠皮下接种 3×10⁵ 个 MC38/hPD-L1 细胞, 待肿瘤长到 40~70mm³, 根据肿瘤体积分组, 腹腔注射 (ip) 药物, 每 2 天 1 次, 共 6 次, 注射体积为 0.1 mL/10g 体重, 给药方案见表 3, 给药的当天为 D0。每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径, 通过下列公式计算所得的 T/C% 或抑瘤率 TGI (%) 考察药物对肿瘤生长的影响。实验结束、达到实验终点、或肿瘤体积达到 1500mm³, CO₂ 麻醉处死动物, 随后解剖取瘤并拍照。

肿瘤体积 (V) 计算公式为: $V = 1/2 \times a \times b^2$, 其中 a、b 分别表示长、宽; $T/C(\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$, 其中 T、C 为实验结束时的治疗组小鼠、阴性对照组小鼠的肿瘤体积, T₀、C₀ 为实验开始时的治疗组小鼠、阴性对照组小鼠的肿瘤体积, 根据治疗组小鼠、阴性对照组小鼠的 T/C 值分别计算治疗组、阴性对照组的 T/C 值; 抑瘤率 (TGI)(%) = 100 - T/C(%). 结果如表 4 所示, 本申请实施例 1-3 制备的 PD1/TGFβRII(3.7 mg/kg, IP, 每天 2 次, 共 6 次)在 D19 对 MC38/hPD-L1 小鼠皮下移植瘤的抑瘤率为 74%, 优于对照 PD-1 单抗; 荷瘤小鼠对药物能够较好耐受, 没有明显体重下降等症状发生。

表 3 给药方案

分组	给药剂量 (mg/kg)	给药方式	给药体积 (mL/kg)	给药时间
hIgG4	3.7	腹腔注射	10	D0、2、4、6、8、10
对照 PD-1 单抗	3	腹腔注射	10	D0、2、4、6、8、10
PD1/TGFβRII 融合蛋白	3.7	腹腔注射	10	D0、2、4、6、8、10

表 4 PD1/TGFβRII 对结肠癌细胞 MC38/hPD-L1 皮下移植瘤的疗效

分组	平均肿瘤体积 (mm ³)		%T/C	% TGI	实验开始每组动物数	实验结束每组动物数
	D0	D19	D19	D19		
hIgG4	55.1±0.8	2650.9±431.4	-	-	10	10
对照 PD-1 单抗	53.1±0.9	1115.2±576.3	57	43	10	10
PD1/TGFβRII 融合蛋白	53.3±0.5	537.0±280.9	26	74	10	10

注：hIgG4 (Sino Biological Inc, HG4K) 为阴性对照。对照 PD1 单抗为中国专利申请 201610705763.5 号 (CN106977602) 中的抗体 14C12H1L1, 重链和轻链氨基酸序列分别如本申请 SEQ ID NO:19 和 14 所示。

实施例 7：PD1/TGFβRII 融合蛋白的体外活性检测

参照实施例 1-3 的方法同批次制备本申请的示例性 PD1/TGFβRII 融合蛋白和纳武利尤单抗/TGF-βRII 融合蛋白。参照实施例 4 的报告基因法检测 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 PD-1 端生物学活性，并进行比较，结果表明：本申请的 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 PD-1 端生物学活性优于纳武利尤单抗/TGF-βRII 融合蛋白，结果如表 5 所示。参照实施例 5 的酶联免疫吸附测定方法检测 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 TGFβ 结合活性，并进行比较，结果表明：本申请的 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 TGFβ 结合活性优于纳武利尤单抗/TGF-βRII 融合蛋白，结果如表 6 所示。本实施例和以下实施例中的纳武利尤单抗/TGF-βRII 融合蛋白为内部制备，具有 SEQ ID NO:20 和 18 所示的重链和轻链序列。

表 5 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 PD-1 端生物学活性

样品	EC ₅₀ 值 (ng/mL)	生物学活性
PD1/TGFβRII	282.4	100%
纳武利尤单抗/TGF-βRII	343.8	82%

表 6 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 TGFβ 结合活性

样品	EC ₅₀ 值 (ng/mL)	结合活性
纳武利尤单抗/TGF-βRII	81.48	76%
PD1/TGFβRII	61.74	100%

实施例 8：PD1/TGFβRII 融合蛋白对 MC38/hPD-L1 小鼠移植瘤的疗效

人源化 PD-1 小鼠(购买于百奥赛图公司)作为实验小鼠，每只小鼠右侧腋窝下接种 4×10⁵ 个 MC38/hPD-L1 细胞，待肿瘤长到 100-300mm³，随机分成 3 组，通过腹腔注射 (ip) 药物，共给药 8 次，给药方案见表 7，给药的当天为 D0。每周测 2-3 次瘤体积，并记录小鼠体重。

用游标卡尺测量肿瘤直径，通过下列公式计算 T/C (%) 或肿瘤体积抑制率 (1-T/C) 考察药物对肿瘤生长的影响。实验结束时，CO₂ 麻醉处死动物，随后解剖取瘤并拍照。

肿瘤体积 (TV) 计算公式为：TV = 1/2 × a × b²，其中 a、b 分别表示长、宽；相对肿瘤体积 (RTV) 计算公式为：RTV = (TV_t)/(TV₀)，其中 TV₀ 表示 D0 时小鼠肿瘤体积，TV_t 表示每一次测量时小鼠肿瘤体积；相对肿瘤增殖率 T/C (%) 计算公式为：T/C (%) = T_{RTV}/C_{RTV} × 100%，其中 T_{RTV} 表示治疗组 RTV，C_{RTV} 表示 PBS 组 RTV。

结果如表 8 和 9 所示，PD1/TGFβRII 和纳武利尤单抗/TGF-βRII（如实施例 7 所示同批次制备）在 D23 对 MC38/hPD-L1 移植瘤小鼠的肿瘤体积抑制率分别为 46.8% 和 32.3%，说明本申请的 PD1/TGFβRII 的肿瘤抑制效果优于纳武利尤单抗/TGF-βRII。此外，PD1/TGFβRII 组和纳武利尤单抗/TGF-βRII 组小鼠的体重呈波动上升，说明两种融合蛋白均未引起明显毒性反应。

表 7 给药方案

组别	分组	给药体积 (mL/kg)	给药时间，给药剂量	实验开始每组动物数	实验结束每组动物数
1	PBS	10	D0、3、7、10 (每次给药剂量 4mg/kg) D11 (每次给药剂量 10mg/kg) D14、17、21 (每次给药剂量 20mg/kg)	8	8
2	纳武利尤单抗/TGF-βRII	10	D0、3、7、10 (每次给药剂量 4mg/kg) D11 (每次给药剂量 10mg/kg) D14、17、21 (每次给药剂量 20mg/kg)	8	8
3	PD1/TGFβRII	10	D0、3、7、10 (每次给药剂量 4mg/kg) D11 (每次给药剂量 10mg/kg) D14、17、21 (每次给药剂量 20mg/kg)	8	8

表 8 PD1/TGFβRII 对 MC38/hPD-L1 移植瘤小鼠肿瘤体积 (TV) 的影响

组别	肿瘤体积 (mm ³) 平均值±标准差								
	D0	D3	D6	D9	D11	D14	D17	D20	D23
1	112 ±28	155 ±33	276 ±90	393 ±136	512 ±219	696 ±384	811 ±441	1071 ±776	1291 ±965
2	111 ±20	176 ±57	268 ±96	358 ±129	471 ±181	606 ±238	689 ±252	827 ±358	941 ±330
3	112 ±24	166 ±74	264 ±106	327 ±136	428 ±180	510 ±271	559 ±324	670 ±359	801 ±474

表 9 PD1/TGFβRII 对 MC38/hPD-L1 移植瘤小鼠的肿瘤体积抑制率

组别	T/C (%)								抑制率 1-T/C
	D3	D6	D9	D11	D14	D17	D20	D23	D23
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	110.4%	93.3%	86.9%	85.9%	80.7%	79.7%	70.8%	67.7%	32.3%
3	100.7%	93.3%	80.6%	77.8%	66.3%	62.4%	54.4%	53.2%	46.8%

实施例 9：电化学发光方法检测 PD1/TGFβRII 融合蛋白刺激细胞因子分泌

用 RPMI1640 完全培养基调整 PBMC 细胞浓度至约 2×10^6 细胞/mL，按 100μL/孔加入到 96 孔细胞培养板中。用 RPMI1640 完全培养基分别稀释 IgG1 蛋白 (SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22 分别为重链和轻链的序列，内部制备)、LPS (SIGMA, L4391-1MG)、本申请的 PD1/TGFβRII 融合蛋白，配制成 900 μg/mL 的 IgG1 蛋白；1 μg/mL 的 LPS；10μg/mL、100μg/mL、900μg/mL 的 PD1/TGFβRII 融合蛋白，将 RPMI1640 完全培养基作为阴性对照。将上述配制好的溶液分别取 100μL 加入到 96 孔细胞培养板中，充分混匀，于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱内培养。48 小时取出 96 孔板中的细胞上清，采用 V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (human) 试剂盒 (MSD, K15049D-2) 检测细胞因子 IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α 和 IFN-γ 的含量，并通过超敏多因子电化学发光仪进行检测 (MSD, QuickPlexSQ120)，结果如表 10 所示。

表 10 电化学发光方法检测各测试样品刺激细胞因子分泌的结果

分组	IL-2 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)
RPMI1640 完全 培养基	9.28 ±5.14	2.86 ±0.61	2118.44 ±315.51	0.65 ±0.32	2.90 ±1.17	2.23 ±0.91
IgG1 蛋白	13.72 ±6.58	3.11 ±0.90	3065.51 ±599.37	0.38 ±0.00	3.37 ±0.91	3.42 ±2.99
LPS	23.42 ±2.34	2892.00 ±0.00	9792.00 ±0.00	167.79 ±28.95	1456.00 ±0.00	2039.78 ±227.63
PD1/TGFβRII (终 浓度 450μg/mL)	10.97 ±1.93	4.02 ±0.35	2613.21 ±322.13	0.38 ±0.00	3.15 ±0.39	39.36 ±31.46
PD1/TGFβRII (终 浓度 50μg/mL)	6.59 ±0.25	3.26 ±0.37	2188.06 ±474.45	0.47 ±0.15	2.78 ±0.42	14.02 ±10.96
PD1/TGFβRII (终 浓度 5μg/mL)	7.90 ±3.47	3.09 ±0.24	2434.95 ±221.71	0.38 ±0.00	2.65 ±0.22	1.70 ±0.00

由上表结果可以看出，本申请的 PD1/TGFβRII 融合蛋白表现出引起细胞因子风暴的低可能性，因此，当向受试者给予时基本上不会存在过度激活免疫系统而引发全身性炎症的风险。

实施例 10：PD1/TGFβRII 融合蛋白对食蟹猴的毒性试验

单次给药毒性：本试验共 4 只食蟹猴，每组 2 只，雌雄各半，设 2 个组，分别单次静脉注射 200、500mg/kg 本申请的 PD1/TGFβRII 融合蛋白，观察 14 天。试验期间对一般观察和体重、摄食量、体温、II 导联心电图及血压、血液学、血液生化、尿液等指标进行检测，试验结束时进行大体解剖观察。

给药后，各组雄猴可见摄食量一过性降低，至试验第 8~9 天可恢复。试验第 14 天，各组雄猴可见 RBC、HGB、HCT 降低。除此之外，其余指标均未见明显异常改变。在单次给药毒性试验中，食蟹猴单次静脉注射 200、500mg/kg 本申请的 PD1/TGFβRII 融合蛋白，MTD 为 500 mg/kg。

重复给药毒性：本试验共使用 40 只食蟹猴，分为 4 组，每组 10 只，雌雄各半，分别为空白对照组和 15、50、150 mg/kg 本申请的 PD1/TGFβRII 融合蛋白组。每周 1 次、连续给药 4 周（共 5 次），停药恢复观察 4 周。

给药第 15 天和给药结束时，50 mg/kg 组的雄猴以及 150 mg/kg 组的雄、雌猴均可见 RBC、HGB、HCT 降低，RET、RET%代偿性升高；给药第 15 天，50 mg/kg 组的雌猴也可见上述改变。

给药结束时，50 mg/kg 组的 1 只雄猴大体解剖可见心脏心包粘连。组织病理学检查：150 mg/kg 组食蟹猴可见轻微~轻度大脑脑膜及脉络丛、小脑脑膜及脉络丛、脊髓脊膜、甲状腺、心脏、垂体单核细胞浸润，轻微~中度心脏、肝脏、膀胱、附睾、精囊腺血管/血管周围炎；50 mg/kg 组食蟹猴可见轻微~中度大脑脑膜、坐骨神经、甲状腺、心脏、垂体单核细胞浸润，轻微~中度心脏、膀胱、十二指肠、回肠、直肠、输卵管、阴道、子宫血管/血管周围炎；15 mg/kg 组食蟹猴可见轻微~轻度大脑脑膜及脉络丛、小脑脉络丛、坐骨神经、甲状腺、心脏单核细胞浸润，轻度心脏血管/血管周围炎。另外，50、150 mg/kg 组分别有 1 只食蟹猴可见轻度股骨坏死、骺板增厚，轻微~轻度股骨干骺端骨小梁、破骨细胞增多。

此外，未见死亡或濒死动物，各组食蟹猴一般状态良好，体重、摄食量、体温、II 导联心电图、呼吸频率、血生化、眼科检查、尿液检查、骨髓涂片、脏器重量及系数、IgA、IgM、IgG、C3、C4、CIC、淋巴细胞亚群等免疫相关指标、TSH、T3、T4、脏器重量及系数均未见明显异常改变。

在重复给药毒性试验中，食蟹猴静脉注射 15、50、150 mg/kg 本申请的 PD1/TGFβRII 融合蛋白（每周给药 1 次、连续 4 周，共给药 5 次），HNSTD 为 150 mg/kg。根据 European Medicines Agency 中纳武利尤单抗（Nivolumab）的 Assessment report 披露信息推理认为纳武利尤单抗的 HNSTD 应当为 50 mg/kg，远低于本申请的 PD1/TGFβRII 融合蛋白的 HNSTD。由此可见，本申请的 PD1/TGFβRII 融合蛋白表现出低的毒性，因此可以预期所述融合蛋白能够在临床上表现出良好的安全性。

虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

权 利 要 求 书

1. 双功能蛋白，其包含PD-1（程序性死亡受体-1）结合部和TGF- β （转化生长因子- β ）结合部。
2. 如权利要求1所述的双功能蛋白，其中所述PD-1结合部为抗PD-1抗体或抗原结合片段，例如，全长抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段或单链Fv片段(scFv)。
3. 如权利要求2所述的双功能蛋白，其中所述抗PD-1抗体或抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列为GFAFSSYD（SEQ ID NO: 1）的HCDR1，氨基酸序列为ISGGGRYT（SEQ ID NO: 2）的HCDR2和氨基酸序列为ANRYGEAWFAY（SEQ ID NO: 3）的HCDR3，所述轻链可变区包含氨基酸序列为QDINTY（SEQ ID NO: 4）的LCDR1，氨基酸序列为RAN（SEQ ID NO: 5）的LCDR2和氨基酸序列为LQYDEFPLT（SEQ ID NO: 6）的LCDR3。
4. 如权利要求3所述的双功能蛋白，其中所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示，和/或所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示。
5. 如权利要求3或4所述的双功能蛋白，其中所述抗PD-1抗体或抗原结合片段还包含重链恒定区和轻链恒定区，所述重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示或者为SEQ ID NO: 9所示氨基酸序列的变体，例如C末端残基A替换为K的SEQ ID NO: 9所示氨基酸序列，和/或所述轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示或者为SEQ ID NO: 10所示氨基酸序列的变体。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的双功能蛋白，其中所述TGF- β 结合部为TGF- β 受体或TGF- β 受体的结合结构域，例如TGF- β 受体的胞外结构域或胞外结构域的结合片段，或者针对TGF- β 的抗体或抗原结合片段，例如，全长抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段或单链Fv片段(scFv)。
7. 如权利要求6所述的双功能蛋白，其中所述TGF- β 结合部为人TGF- β RII同种型B胞外结构域多肽，其包含SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的双功能蛋白，其中所述PD-1结合部和TGF- β 结合部之间通过柔性连接子连接，例如GGGGS型连接子，例如SEQ ID NO: 12所示的连接子。
9. 如权利要求1-8中任一项所述的双功能蛋白，其中所述双功能蛋白包含：(1)两个完全相同的第一多肽，第一多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列具有至少80%的同一性；和(2)两个完全相同的第二多肽，第二多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列具有至少80%的同一性。
10. 核酸分子，其编码权利要求1-9中任一项所述的双功能蛋白。
11. 药物组合物，其包含权利要求1-9中任一项所述的双功能蛋白，以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。
12. 如权利要求11所述的药物组合物，其用于预防或治疗恶性肿瘤，所述恶性肿瘤选自

结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌恶性肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、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/或骨髓增生异常综合征；并且任选地，所述恶性肿瘤是原位的，转移性的，复发性的，和/或难治性的。

13. 权利要求1-9中任一项所述的双功能蛋白或权利要求10所述的核酸分子在制备用于预防或治疗恶性肿瘤的药物中的用途，所述恶性肿瘤选自结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌恶性肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、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/或骨髓增生异常综合征；并且任选地，所述恶性肿瘤是原位的，转移性的，复发性的，和/或难治性的。

14. 预防或治疗恶性肿瘤的方法，包括向患有恶性肿瘤的个体给予权利要求1-9中任一项所述的双功能蛋白或权利要求11所述的药物组合物，所述恶性肿瘤选自结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌恶性肿瘤、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、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/或骨髓增生异常综合征；并且任选地，所述恶性肿瘤是原位的，转移性的，复发性的，和/或难治性的。

15. 制备权利要求1-9中任一项的双功能蛋白或权利要求11的药物组合物的方法，所述方法包括以下步骤：

将包含编码所述双功能蛋白的核酸分子的表达载体引入宿主细胞，并在允许蛋白表达的条件下，培养所述宿主细胞；

收集细胞培养物和/或上清，并分离和纯化所述双功能蛋白；以及

任选地，将分离和纯化的双功能蛋白与药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体进行配制。

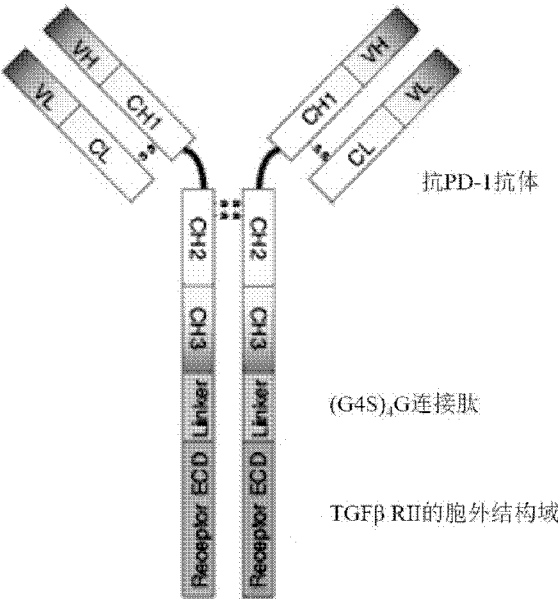


图 1

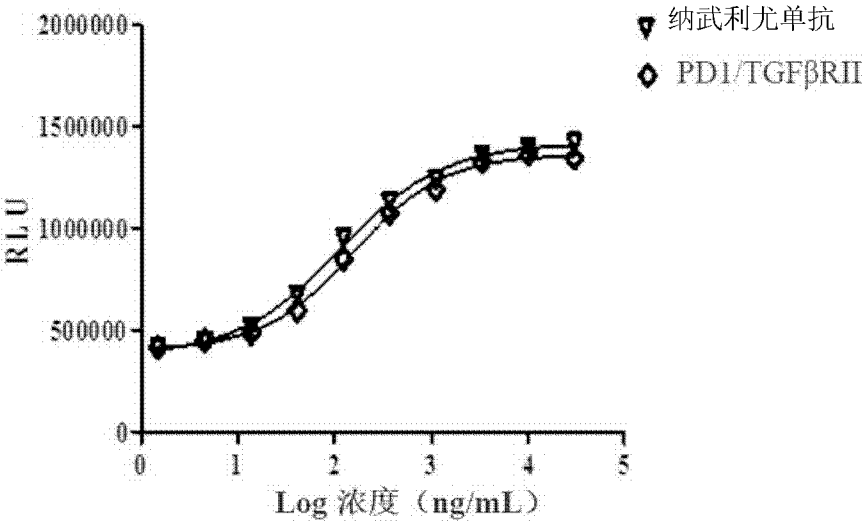


图 2

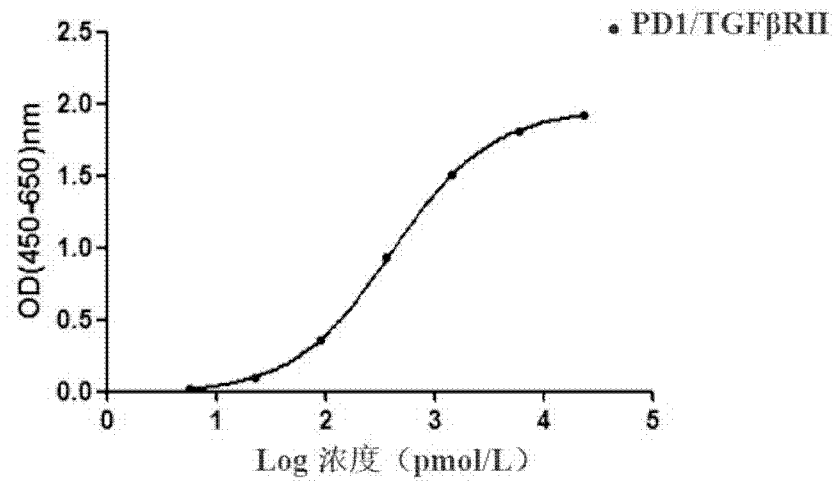


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/089837

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C07K 1/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

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

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

CNABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ISI Web of Science; CA and Search Terms: PD-1, 程序性死亡受体, TGF, 转化生长因子, TGFBR, transforming growth factor beta, programmed cell death, 抗体, antibody +etc.; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; Genbank; EMBL; STN and search sequence: SEQ ID NOs: 1-22 etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020014285 A2 (INTREXON CORPORATION) 16 January 2020 (2020-01-16) see the abstract, claims 1-120, description, paragraphs [0318]-[0322] and [0479]-[0508], table 4, and embodiments 1-16	1, 2, 6-8, 10-15
Y	WO 2020014285 A2 (INTREXON CORPORATION) 16 January 2020 (2020-01-16) see the abstract, claims 1-120, description, paragraphs [0318]-[0322] and [0479]-[0508], table 4, and embodiments 1-16	3-5, 9
Y	CN 106977602 A (ZHONGSHAN AKESO BIOPHARMA, INC. et al.) 25 July 2017 (2017-07-25) see the abstract, claims 1-19, and SEQ ID NOs: 6 and 8	3-5, 9
X	WO 2019211489 A1 (MERCK PATENT GMBH) 07 November 2019 (2019-11-07) see the abstract, claims 1-90, description, page 2, paragraph 4 to page 10, paragraph 2 and page 15, paragraph 3 to page 32, paragraph 4, and SEQ ID NO: 13	1, 2, 6-8, 10-15
Y	WO 2019211489 A1 (MERCK PATENT GMBH) 07 November 2019 (2019-11-07) see the abstract, claims 1-90, description, page 2, paragraph 4 to page 10, paragraph 2 and page 15, paragraph 3 to page 32, paragraph 4, and SEQ ID NO: 13	3-5, 9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

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

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

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 July 2021

Date of mailing of the international search report

29 July 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/089837**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110734498 A (SHANGHAI KEQI PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 31 January 2020 (2020-01-31) see the abstract, claims 1-9, and SEQ ID NOs: 1 and 2	1, 2, 6-8, 10-15
Y	CN 110734498 A (SHANGHAI KEQI PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 31 January 2020 (2020-01-31) see the abstract, claims 1-9, and SEQ ID NOs: 1 and 2	3-5, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/089837

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/089837

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.: **14**
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 therapy.
 - [2] For easier search and written opinion, claim 14 is anticipated as "the use of the bifunctional protein of any one of claims 1-9 or the pharmaceutical composition of claim 11 in the preparation of a drug for the prevention or treatment of a malignancy, said malignancy being selected from".
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/089837

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020014285	A2	16 January 2020	IL	279965	D0	01 March 2021
				WO	2020014285	A3	12 March 2020
				US	2020048351	A1	13 February 2020
				AU	2019301070	A1	21 January 2021
				CA	3105750	A1	16 January 2020
				SG	11202100208V	A	25 February 2021
CN	106977602	A	25 July 2017	WO	2018036472	A1	01 March 2018
				JP	2019534034	A	28 November 2019
				MX	2019002268	A	21 October 2019
				CN	106977602	B	25 September 2018
				CA	3034849	A1	01 March 2018
				EA	201990570	A1	30 August 2019
				EP	3505535	A4	15 April 2020
				SG	11201901584U	A	28 March 2019
				US	2019321466	A1	24 October 2019
				EP	3505535	A1	03 July 2019
				BR	112019003775	A2	25 June 2019
				AU	2017316255	A1	11 April 2019
				KR	20190050994	A	14 May 2019
WO	2019211489	A1	07 November 2019	AU	2019264229	A1	03 December 2020
				SG	11202010423V	A	27 November 2020
				TW	202014201	A	16 April 2020
				EP	3787683	A1	10 March 2021
				CN	112512576	A	16 March 2021
				BR	112020022145	A2	26 January 2021
				KR	20210006405	A	18 January 2021
				CA	3099079	A1	07 November 2019
CN	110734498	A	31 January 2020	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/089837

A. 主题的分类 C07K 19/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C07K 1/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																							
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ISI Web of Science; CA和检索词: PD-1, 程序性死亡受体, TGF, 转化生长因子, TGFBR, transforming growth factor beta, programmed cell death, 抗体, antibody等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-22等																							
C. 相关文件 <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>X</td> <td>WO 2020014285 A2 (INTREXON CORP) 2020年 1月 16日 (2020 - 01 - 16) 参见摘要, 权利要求1-120, 说明书第[0318]-[0322]、[0479]-[0508]段, 表4, 实施例1-16</td> <td>1-2、6-8、10-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2020014285 A2 (INTREXON CORP) 2020年 1月 16日 (2020 - 01 - 16) 参见摘要, 权利要求1-120, 说明书第[0318]-[0322]、[0479]-[0508]段, 表4, 实施例1-16</td> <td>3-5、9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 106977602 A (中山康方生物医药有限公司等) 2017年 7月 25日 (2017 - 07 - 25) 参见摘要, 权利要求1-19, SEQ ID NOs: 6和8</td> <td>3-5、9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2019211489 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2019年 11月 7日 (2019 - 11 - 07) 参见摘要, 权利要求1-90, 说明书第2页第4段至第10页第2段、第15页第3段至第32页第4段, SEQ ID NO: 13</td> <td>1-2、6-8、10-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2019211489 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2019年 11月 7日 (2019 - 11 - 07) 参见摘要, 权利要求1-90, 说明书第2页第4段至第10页第2段、第15页第3段至第32页第4段, SEQ ID NO: 13</td> <td>3-5、9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 110734498 A (上海科棋药业科技有限公司) 2020年 1月 31日 (2020 - 01 - 31) 参见摘要, 权利要求1-9, SEQ ID NOs: 1和2</td> <td>1-2、6-8、10-15</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO 2020014285 A2 (INTREXON CORP) 2020年 1月 16日 (2020 - 01 - 16) 参见摘要, 权利要求1-120, 说明书第[0318]-[0322]、[0479]-[0508]段, 表4, 实施例1-16	1-2、6-8、10-15	Y	WO 2020014285 A2 (INTREXON CORP) 2020年 1月 16日 (2020 - 01 - 16) 参见摘要, 权利要求1-120, 说明书第[0318]-[0322]、[0479]-[0508]段, 表4, 实施例1-16	3-5、9	Y	CN 106977602 A (中山康方生物医药有限公司等) 2017年 7月 25日 (2017 - 07 - 25) 参见摘要, 权利要求1-19, SEQ ID NOs: 6和8	3-5、9	X	WO 2019211489 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2019年 11月 7日 (2019 - 11 - 07) 参见摘要, 权利要求1-90, 说明书第2页第4段至第10页第2段、第15页第3段至第32页第4段, SEQ ID NO: 13	1-2、6-8、10-15	Y	WO 2019211489 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2019年 11月 7日 (2019 - 11 - 07) 参见摘要, 权利要求1-90, 说明书第2页第4段至第10页第2段、第15页第3段至第32页第4段, SEQ ID NO: 13	3-5、9	X	CN 110734498 A (上海科棋药业科技有限公司) 2020年 1月 31日 (2020 - 01 - 31) 参见摘要, 权利要求1-9, SEQ ID NOs: 1和2	1-2、6-8、10-15
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	WO 2020014285 A2 (INTREXON CORP) 2020年 1月 16日 (2020 - 01 - 16) 参见摘要, 权利要求1-120, 说明书第[0318]-[0322]、[0479]-[0508]段, 表4, 实施例1-16	1-2、6-8、10-15																					
Y	WO 2020014285 A2 (INTREXON CORP) 2020年 1月 16日 (2020 - 01 - 16) 参见摘要, 权利要求1-120, 说明书第[0318]-[0322]、[0479]-[0508]段, 表4, 实施例1-16	3-5、9																					
Y	CN 106977602 A (中山康方生物医药有限公司等) 2017年 7月 25日 (2017 - 07 - 25) 参见摘要, 权利要求1-19, SEQ ID NOs: 6和8	3-5、9																					
X	WO 2019211489 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2019年 11月 7日 (2019 - 11 - 07) 参见摘要, 权利要求1-90, 说明书第2页第4段至第10页第2段、第15页第3段至第32页第4段, SEQ ID NO: 13	1-2、6-8、10-15																					
Y	WO 2019211489 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2019年 11月 7日 (2019 - 11 - 07) 参见摘要, 权利要求1-90, 说明书第2页第4段至第10页第2段、第15页第3段至第32页第4段, SEQ ID NO: 13	3-5、9																					
X	CN 110734498 A (上海科棋药业科技有限公司) 2020年 1月 31日 (2020 - 01 - 31) 参见摘要, 权利要求1-9, SEQ ID NOs: 1和2	1-2、6-8、10-15																					
☒ 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 2021年 7月 14日		国际检索报告邮寄日期 2021年 7月 29日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 何睿 电话号码 (86-10)-62411106																					

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
Y	CN 110734498 A (上海科棋药业科技有限公司) 2020年 1月 31日 (2020 - 01 - 31) 参见摘要，权利要求1-9，SEQ ID NOs:1和2	3-5、9

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

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

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I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： 14
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1(iv)——处置人体或者动物体的治疗方法。
[2] 为了便于检索和出具书面意见，将权利要求14预期为“权利要求1-9中任一项所述的双功能蛋白或权利要求11所述的药物组合物在制备预防或治疗恶性肿瘤的药物中的用途，所述恶性肿瘤选自……”。
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/CN2021/089837

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	2020014285	A2	2020年 1月 16日	IL	279965	D0	2021年 3月 1日
				WO	2020014285	A3	2020年 3月 12日
				US	2020048351	A1	2020年 2月 13日
				AU	2019301070	A1	2021年 1月 21日
				CA	3105750	A1	2020年 1月 16日
				SG	11202100208V	A	2021年 2月 25日
CN	106977602	A	2017年 7月 25日	WO	2018036472	A1	2018年 3月 1日
				JP	2019534034	A	2019年 11月 28日
				MX	2019002268	A	2019年 10月 21日
				CN	106977602	B	2018年 9月 25日
				CA	3034849	A1	2018年 3月 1日
				EA	201990570	A1	2019年 8月 30日
				EP	3505535	A4	2020年 4月 15日
				SG	11201901584U	A	2019年 3月 28日
				US	2019321466	A1	2019年 10月 24日
				EP	3505535	A1	2019年 7月 3日
				BR	112019003775	A2	2019年 6月 25日
				AU	2017316255	A1	2019年 4月 11日
				KR	20190050994	A	2019年 5月 14日
WO	2019211489	A1	2019年 11月 7日	AU	2019264229	A1	2020年 12月 3日
				SG	11202010423V	A	2020年 11月 27日
				TW	202014201	A	2020年 4月 16日
				EP	3787683	A1	2021年 3月 10日
				CN	112512576	A	2021年 3月 16日
				BR	112020022145	A2	2021年 1月 26日
				KR	20210006405	A	2021年 1月 18日
				CA	3099079	A1	2019年 11月 7日
CN	110734498	A	2020年 1月 31日	无			