I873080

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I873080 B**

(45)公告日： 中華民國 114 (2025) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：107116108 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 05 月 11 日

(51)Int. Cl.： *C07K14/705 (2006.01)* *C07K16/30 (2006.01)*
A61K38/17 (2006.01) *A61K39/395 (2006.01)*
C12N15/12 (2006.01) *C12N15/63 (2006.01)*

(30)優先權：2017/05/12 中國大陸 201710334292.6

(71)申請人：大陸商江蘇恆瑞醫藥股份有限公司 (中國大陸) JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)
中國大陸
大陸商上海恆瑞醫藥有限公司 (中國大陸) SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：顧津明 GU, JINMING (CN) ；羅肖 LUO, XIAO (CN) ；陶維康 TAO, WEIKANG (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 105121474A CN 105658672A

WO 2015/118175A2

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：8 共 75 頁

(54)名稱

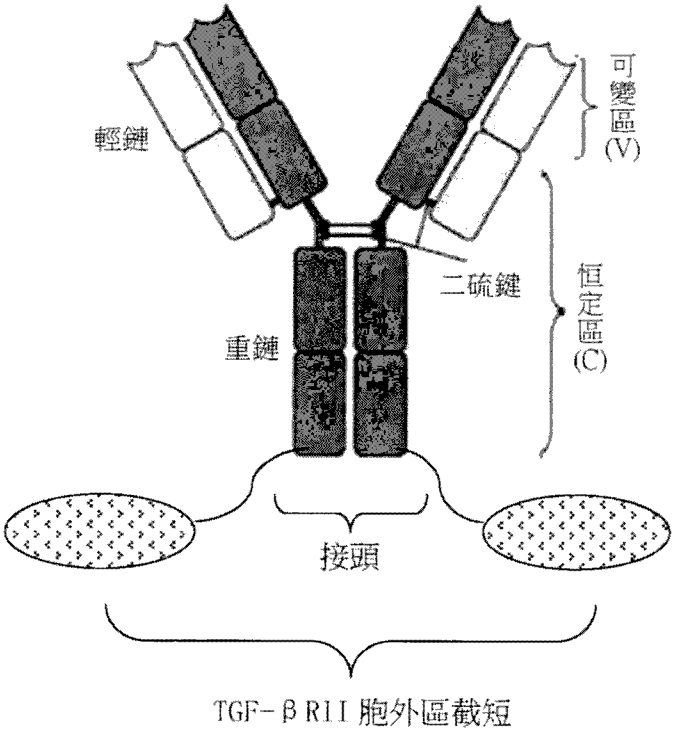
含有ＴＧＦ-β受體的融合蛋白及其醫藥用途

(57)摘要

本發明涉及含有 TGF-β 受體的融合蛋白及其醫藥用途。進一步地，本發明涉及包含該 PD-L1 抗體靶向部分和 TGF-βRII 胞外區的雙功能融合蛋白，以及包含該含有 TGF-β 受體融合蛋白的醫藥組成物，以及其作為抗癌藥物的用途。

The present invention relates to a fusion protein containing TGF-β receptor and pharmaceutical use thereof. Further, the present invention relates to a bifunctional fusion protein comprising the PD-L1 antibody targeting portion and the TGF-βRII extracellular region, and a pharmaceutical composition comprising the TGF-β receptor fusion protein, and the use thereof as anti-cancer drug.

指定代表圖：



【第1圖】

公告本

I873080

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

含有 TGF-β 受體的融合蛋白及其醫藥用途

FUSION PROTEIN CANTAINING TGF-β RECEPTOR AND MEDICAL APPLICATION USE THEREOF

【中文】

本發明涉及含有 TGF-β 受體的融合蛋白及其醫藥用途。進一步地，本發明涉及包含該 PD-L1 抗體靶向部分和 TGF-βRII 胞外區的雙功能融合蛋白，以及包含該含有 TGF-β 受體融合蛋白的醫藥組成物，以及其作為抗癌藥物的用途。

【英文】

The present invention relates to a fusion protein containing TGF-β receptor and pharmaceutical use thereof. Further, the present invention relates to a bifunctional fusion protein comprising the PD-L1 antibody targeting portion and the TGF-βRII extracellular region, and a pharmaceutical composition comprising the TGF-β receptor fusion protein, and the use thereof as anti-cancer drug.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

該代表圖無元件符號及其所代表之意義。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無化學式。

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】（中文/英文）

含有 TGF-β 受體的融合蛋白及其醫藥用途

FUSION PROTEIN CANTAINING TGF-β RECEPTOR AND MEDICAL APPLICATION USE THEREOF

【技術領域】

本發明涉及腫瘤免疫治療藥物領域。具體地說，本發明涉及用於癌症治療的融合蛋白，包括包含靶向分子和免疫調節因子如 TGF-βRII 的融合蛋白。更具體地涉及靶向分子 PD-L1 抗體和免疫調節因子如 TGF-βRII 的融合蛋白，包含其的醫藥組成物，以及其作為抗癌藥物的應用。

【先前技術】

在腫瘤治療中，人們早已認識到化療所帶來的高毒性及可導致耐藥性癌細胞產生的負面影響。即使是靶向性針對與腫瘤生存生長相關的過度表達或啟動的蛋白的治療手段，仍會有癌細胞藉由變異來減少或逃脫對靶向性治療所針對通路的依賴，並利用其它的通路繼續生存。腫瘤免疫治療近年來備受關注，是腫瘤治療領域的焦點，較難產生耐藥性是該療法的突出優勢。腫瘤免疫治療主要藉由免疫學原理和方法，提高腫瘤細胞的免疫原性和對效應細胞殺傷的敏感性，激發和增強機體抗腫瘤免疫應答，並應用免疫細胞和效應分子輸注宿主體內，協同機體免疫系統殺傷腫瘤、抑制腫瘤生長。

程式性死亡受體 1(programmed death 1, PD-1)為 CD28 超家族成員。PD-1 表達於活化的 T 細胞，B 細胞及髓系細胞，其有兩個配體，即程式性死亡配體-1(programmed death ligand 1, PD-L1)和 PD-L2。PD-L1 與 T 細胞上的受體 PD-1 相互作用，在免疫應答的負調控方面發揮著重要作用。在許多人類腫瘤組織中均可檢測到 PD-L1 蛋白的表達，腫瘤部位的微環境可誘導腫瘤細胞上的 PD-L1 的表達，表達的 PD-L1 有利於腫瘤的發生和生長，誘導抗腫瘤 T 細胞的凋亡。PD-1/PD-L1 通路抑制劑可以阻斷 PD-1 與 PD-L1 的結合，阻斷負向調控信號，使 T 細胞恢復活性，從而增強免疫應答，因此，以 PD-1/PD-L1 為靶點的免疫調節對腫瘤抑制有重要的意義。

轉化生長因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)屬於調節細胞生長和分化的 TGF-β 超家族。TGF-β 藉由異源四聚體受體複合物傳遞信號，這個受體複合物是由兩個 I 型和兩個 II 型的跨膜絲胺酸/蘇胺酸激酶受體組成。

TGF-β 是一種多功能的細胞因子，以細胞或背景依賴的方式發揮腫瘤抑制或腫瘤促進的作用。TGF-β 信號的腫瘤抑制作用源於其誘導多個基因表達的能力。當腫瘤發展過程中引入突變或表觀遺傳修飾時，癌細胞逐漸耐受 TGF-β 信號的抑制作用，最終導致腫瘤的發展。

研究發現阻斷 TGF-β 信號傳導通路能夠減少腫瘤的轉移。運用截短的 Smad2/3 顯負性突變體抑制乳腺腫瘤細胞系的 TGF-β 信號通路，結果發現腫瘤細胞的轉移能力被抑

制。結腸癌的微小衛星體不穩定性研究發現，TGF-βRII 無活性的突變，使轉移減少，增加了患者術後的存活率。但總體而言，抑制 TGF-β 信號通路的抑制劑單用在臨床治療中效果微弱，可能跟 TGF-β 主要在腫瘤細胞內異常性高表達及信號通路抑制劑的生物利用度有關。

因此，在靶向中和腫瘤微環境的 TGF-β 基礎上抑制 PD-1/PD-L1 通路，可以使 T 細胞恢復活性，增強免疫應答，更有效地提高抑治腫瘤發生和發展的效果。本申請人在先的 PCT 申請 PCT/CN2016/104320 提供了一種 PD-L1 抗體。

目前已有抗體/TGF-β 受體融合蛋白公開，如 WO2006074451A2、WO2009152610A1、WO2011109789A2、WO2013164694A1、WO2014164427A1、WO2015077540A2、WO9309228A1、WO9409815A1、WO2015077540A2、WO2015118175A2。但一些融合蛋白仍存在不穩定或表達量不高的問題。在實際生產和臨床應用上仍需進一步開發具有更優性能的產品。本發明提供一種更利於生產，性能更穩定的技術方案。

【發明內容】

本發明提供一種含有 TGF-β 受體的融合蛋白，包含靶向部分和 TGF-β 受體部分，其中，該 TGF-β 受體部分為 TGF-βRII 胞外區的 N 端截短形式。

在本發明一個較佳的實施方案中，TGF-βRII 胞外區的 N 端截短形式選自在 TGF-βRII 胞外區的 N 端上有 26 個以

下連續胺基酸的缺失，較佳 14-26 個連續胺基酸的缺失，更佳 14-21 個連續胺基酸的缺失；最佳包含 14-21 個連續胺基酸的缺失，非限制性實施例包括 SEQ ID NO：14 或 SEQ ID NO：15 所示的序列。

在本發明一個較佳的實施方案中，TGF-βRII 胞外區的序列如 SEQ ID NO：13 所示。

在本發明一個較佳的實施方案中，該靶向部分為細胞特異性靶向部分；較佳的，該靶向部分為癌細胞特異性靶向部分。

在本發明一個較佳的實施方案中，該癌細胞特異性靶向部分選自抗體或其抗原結合片段、生長因子、激素、肽、受體或細胞因子。

在本發明一個較佳的實施方案中，該抗體或其抗原結合片段選自全長抗體、嵌合抗體、Fab'、Fab、$F(ab')_2$、單結構域抗體(DAB)、Fv、scFv、小抗體、雙特異性抗體、三特異性抗體或其混合物。

在本發明一個較佳的實施方案中，該抗體或其抗原結合片段結合選自以下一種或多種多肽或蛋白：HER2、HER3、免疫檢驗點分子、CD33、VEGF、VEGFR、VEGFR-2、CD152、TNF、IL-1、IL-5、IL-17、IL-6R、IL-1、IL-2R、BLYS、PCSK9、EGFR、c-Met、CD2、CD3、CD11a、CD19、CD30、CD38、CD20、CD52、CD60、CD80、CD86、TNF-α、IL-12、IL-17、IL-23、IL-6、IL-1β、RSVF、IgE、RANK、BLyS、α4β7、PD-1、CCR4、SLAMF7、GD2、CD21、CD79b、

IL20Rα、CD22、CD79a、CD72、IGF-1R 和 RANKL；較佳該抗體或其抗原結合片段結合免疫檢驗點分子。

在本發明一個較佳的實施方案中，所述的抗體為 PD-L1 抗體；較佳的，該 PD-L1 抗體選自：MSB0010718C、MEDI4736、BMS-936559、MPDL3280A 的 PD-L1 抗體，或包含 1 個或多個選自以下的 CDR 區序列或 CDR 區序列的突變序列的抗體：

HCDR1：	SYWMH	SEQ ID NO：1
HCDR2：	RI X_1PNSG X_2TSYNEKFKN	SEQ ID NO：2
HCDR3：	GGSSYDYFDY	SEQ ID NO：3
LCDR1：	RASESVSIHGTHLMH	SEQ ID NO：4
LCDR2：	AASNLES	SEQ ID NO：5
LCDR3：	QQSFEDPLT	SEQ ID NO：6；

其中 X_1 選自 H 或 G，較佳為 G；X_2 選自 G 或 F，較佳為 F。

在本發明一個較佳的實施方案中，該抗體或其抗原結合片段為嵌合抗體或其功能片段、人源化抗體或其功能片段、或人抗體或其或其功能片段。

在本發明一個較佳的實施方案中，該人源化抗體的重鏈可變區具有如 SEQ ID NO：7 所示的序列，較佳具有如 SEQ ID NO：9 所示的序列。

在本發明一個較佳的實施方案中，該人源化抗體進一步包括序列 SEQ ID NO：11 所示的重鏈。

在本發明一個較佳的實施方案中，該人源化抗體包含

SEQ ID NO：8 或 10 所示的抗體輕鏈可變區序列或輕鏈可變區的突變序列。

在本發明一個較佳的實施方案中，該人源化抗體包含序列 SEQ ID NO：12 所示的輕鏈。

在本發明一個較佳的實施方案中，該含有 TGF-β 受體的融合蛋白如通式(I)所示：

Ab-L- TGF-βRII ECD (I)

其中 TGF-βRII ECD 為 TGF-βRII 胞外區的截短形式；

Ab 為抗體；

L 為連接序列。

在本發明一個較佳的實施方案中，該連接序列 L 為 $(G_4S)_xG$，其中 x 為 3-6，較佳為 4-5。

本發明進一步提供一種醫藥組成物，其含有治療有效量的如上所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，以及一種或多種藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。

本發明進一步提供一種編碼如上所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白的 DNA 分子。

本發明進一步提供一種含有如上所述的 DNA 分子的表達載體。

本發明進一步提供一種用如上所述的表達載體轉化的宿主細胞，該宿主細胞選自細菌、酵母菌和哺乳動物細胞；較佳哺乳動物細胞。

本發明進一步提供一種該含有 TGF-β 受體的融合蛋白或包含其的醫藥組成物，在製備用於腫瘤治療的藥物中的

用途；較佳在製備用於治療 PD-L1 介導的腫瘤的藥物中的用途；更佳為表達 PD-L1 的癌症。

本發明進一步提供一種治療和預防腫瘤的方法，包括給予所需患者治療有效量的本發明所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白或包含其的醫藥組成物。

本發明進一步提供一種截短的 TGF-βRII 胞外區，其中該 TGF-βRII 胞外區的截短選自在 SEQ ID NO：13 的 N 端上有 26 個以下連續胺基酸的缺失，較佳 N 端 14-26 個連續胺基酸的缺失，更佳 N 端 14-21 個連續胺基酸的缺失；最佳包含 14-21 個連續胺基酸的缺失，非限制性實施例包括 SEQ ID NO：14 或 SEQ ID NO：15 所示的序列。

本發明進一步提供一種醫藥組成物，其含有治療有效量的本發明所述的截短的 TGF-βRII 胞外區，以及一種或多種藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。

本發明進一步提供一種本發明所述的截短的 TGF-βRII 胞外區或包含其的醫藥組成物，在製備用於治療、抑制癌細胞增殖或轉移的疾病或病症的藥物中的用途。

本發明進一步提供一種治療和預防腫瘤的方法，包括給予所需患者治療有效量的本發明所述的截短的 TGF-βRII 胞外區或包含其的醫藥組成物。

本公開中所述腫瘤或癌症選自以下部位的腫瘤或癌症：結直腸、乳腺、卵巢、胰腺、胃、前列腺、腎、宮頸、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲狀腺、子宮內膜、子宮、膀胱、神經內分泌、頭部頸部、肝、鼻咽、睾丸、小細胞肺

癌、非小細胞肺癌、黑素瘤、基底細胞皮膚癌、鱗狀細胞皮膚癌、隆突性皮膚纖維肉瘤、梅克爾細胞癌、成膠質細胞瘤、膠質瘤、肉瘤、間皮瘤，和骨髓增生異常綜合征。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為融合蛋白結構示意圖。

第 2 圖為融合蛋白體外結合人源 TGF-β1 的結果。

第 3 圖為融合蛋白體外結合人源 TGF-β1 的結果。

第 4 圖為融合蛋白體外結合人源 PD-L1 的結果。

第 5 圖為融合蛋白體外檢測 PD-1/PD-L1 通路阻斷實驗結果。

第 6 圖為融合蛋白以劑量依賴性形式抑制 TGFß 誘導的 pSMAD3 報告物活性。

第 7 圖為融合蛋白樣品均能夠增強啟動的 T 淋巴細胞分泌細胞因子 IFN-γ。

第 8 圖為融合蛋白對荷瘤小鼠瘤重的影響。

【實施方式】

一、術語

為了更容易理解本發明，以下具體定義了某些技術和科學術語。除非在本文中另有明確定義，本文使用的所有其它技術和科學術語都具有本發明所屬領域的一般技術人員通常理解的含義。

本發明所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如 J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

本發明所述的“抗體”指免疫球蛋白，是由兩條相同的

重鏈和兩條相同的輕鏈藉由鏈間二硫鍵連接而成的四肽鏈結構。免疫球蛋白重鏈恆定區的胺基酸組成和排列順序不同，故其抗原性也不同。據此，可將免疫球蛋白分為五類，或稱為免疫球蛋白的同種型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相應的重鏈分別為 μ 鏈、δ 鏈、γ 鏈、α 鏈、和 ε 鏈。同一類 Ig 根據其鉸鏈區胺基酸組成和重鏈二硫鍵的數目和位置的差別，又可分為不同的亞類，如 IgG 可分為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。輕鏈藉由恆定區的不同分為 κ 鏈或 λ 鏈。五類 Ig 中每類 Ig 都可以有 κ 鏈或 λ 鏈。

在本發明中，本發明所述的抗體輕鏈可進一步包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含人源或鼠源的 κ、λ 鏈或其變體。

在本發明中，本發明所述的抗體重鏈可進一步包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含人源或鼠源的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體。

抗體重鏈和輕鏈靠近 N 端的約 110 個胺基酸的序列變化很大，為可變區(Fv 區)；靠近 C 端的其餘胺基酸序列相對穩定，為恆定區。可變區包括 3 個高變區(HVR)和 4 個序列相對保守的骨架區(FR)。3 個高變區決定抗體的特異性，又稱為互補性決定區(CDR)。每條輕鏈可變區(LCVR)和重鏈可變區(HCVR)由 3 個 CDR 區 4 個 FR 區組成，從胺基端到羧基端依次排列的順序為：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。輕鏈的 3 個 CDR 區指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重鏈的 3 個 CDR 區指 HCDR1、HCDR2

和 HCDR3。本發明所述的抗體或抗原結合片段的 LCVR 區和 HCVR 區的 CDR 胺基酸殘基在數量和位置符合已知的 Kabat 編號規則(LCDR1-3，HCDE2-3)，或者符合 kabat 和 chothia 的編號規則(HCDR1)。

本發明的抗體包括選自鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體的全長抗體，較佳人源化抗體。

術語“鼠源抗體”在本發明中為根據本領域知識和技能製備的對人 PD-L1 的單株抗體。製備時用 PD-L1 抗原注射試驗對象，然後分離表達具有所需序列或功能特性的抗體的融合瘤。在本發明一個較佳的實施方案中，該鼠源 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，可進一步包含鼠源 κ、λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區，或進一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其變體的重鏈恆定區。

術語“嵌合抗體(chimeric antibody)”，是將鼠源性抗體的可變區與人抗體的恆定區融合而成的抗體，可以減輕鼠源性抗體誘發的免疫應答反應。建立嵌合抗體，要先建立分泌鼠源性特異性單抗的融合瘤，然後從小鼠融合瘤細胞中選殖可變區基因，再根據需要選殖人抗體的恆定區基因，將小鼠可變區基因與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入人載體中，最後在真核工業系統或原核工業系統中表達嵌合抗體分子。在本發明一個較佳的實施方案中，該 PD-L1 嵌合抗體的抗體輕鏈進一步包含人源 κ、λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區。該 PD-L1 嵌合抗體的抗體重鏈進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體的重鏈恆定區。

人抗體的恆定區可選自人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區，較佳包含人源 IgG2 或 IgG4 重鏈恆定區，或者使用胺基酸突變後無 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴的細胞介導的細胞毒作用)毒性的 IgG4。

術語“人源化抗體(humanized antibody)”，也稱為 CDR 接枝抗體(CDR-grafted antibody)，是指將小鼠的 CDR 序列接枝到人的抗體可變區框架，即不同類型的人種系抗體構架序列中產生的抗體。可以克服嵌合抗體由於攜帶大量小鼠蛋白成分，從而誘導的強烈的抗體可變抗體反應。此類構架序列可以從包括種系抗體基因序列的公共 DNA 數據庫或公開的參考文獻獲得。如人重鏈和輕鏈可變區基因的種系 DNA 序列可以在“VBase”人種系序列數據庫(在因特網 www.mrccpe.com.ac.uk/vbase 可獲得)，以及在 Kabat，E.A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版中找到。為避免免疫原性下降的同時，引起的活性下降，可對所述的人抗體可變區框架序列進行最少反向突變或回復突變，以保持活性。本發明的人源化抗體也包括進一步由噬菌體展示對 CDR 進行親和力成熟後的人源化抗體。

術語“人抗體”與“人源抗體”可以互換使用，是指有一或多個可變區和恆定區來源於人免疫球蛋白序列。其中一個較佳的方式是所有的可變區和恆定區均來自於人免疫球蛋白序列，即“完全人源抗體”或“全人抗體”。這些抗體可

以藉由多種方式製備獲得，包括藉由噬菌體展示技術，從人 PBMC、脾臟、淋巴結組織分離 B 細胞，構建天然單鏈噬菌體人抗體庫，或者藉由免疫可表達人抗體輕重鏈的轉基因小鼠，篩選獲得的抗體。

本發明中所述的“抗體或其抗原結合”或“功能片段”，指具有抗原結合活性的 Fab 片段，Fab‘片段，F(ab’)2 片段，以及與抗體結合的 Fv 片段 ScFv 片段。Fv 片段含有抗體重鏈可變區和輕鏈可變區，但沒有恆定區，並具有全部抗原結合位點的最小抗體片段。一般地，Fv 抗體還包含在 VH 和 VL 結構域之間的多肽接頭，且能夠形成抗原結合所需的結構。也可以用不同的連接物將兩個抗體可變區連接成一條多肽鏈，稱為單鏈抗體(single chain antibody)或單鏈 Fv(sFv)。本發明的術語“與 PD-L1 結合”，指能與人 PD-L1 相互作用。本發明的術語“抗原結合位點”指抗原上不連續的，由本發明抗體或抗原結合片段識別的三維空間位點。

本發明中所述的“ADCC”，即 antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴的細胞介導的細胞毒作用，是指表達 Fc 受體的細胞藉由識別抗體的 Fc 段直接殺傷被抗體包被的靶細胞。可藉由對 IgG 上 Fc 段的修飾，降低或消除抗體的 ADCC 效應功能。該修飾指在抗體的重鏈恆定區進行突變，如選自 IgG1 的 N297A、L234A、L235A；IgG2/4 嵌合體，IgG4 的 F234A/L235A 突變。

本發明所述的“突變序列”中的“突變”包括但不限於“回復突變”、“保守修飾”或“保守置換或取代”。本公開中

所述的“保守修飾”或“保守置換或取代”是指具有類似特徵(例如電荷、側鏈大小、疏水性/親水性、主鏈構象和剛性等)的其它胺基酸置換蛋白中的胺基酸，使得可頻繁進行改變而不改變蛋白的生物學活性。本領域技術人員知曉，一般而言，多肽的非必需區域中的單個胺基酸置換基本上不改變生物學活性(參見例如 Watson 等(1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224頁，(第 4 版))。另外，結構或功能類似的胺基酸的置換不大可能破環生物學活性。

本發明所述的“突變序列”是指對本發明的核苷酸序列和胺基酸序列進行適當的替換、插入或缺失等突變修飾情況下，得到的與本發明的核苷酸序列和胺基酸序列具有不同百分比序列同一性程度的核苷酸序列和胺基酸序列。

本發明中所述“同一性”是指兩個多核苷酸序列之間或兩個多肽之間的序列相似性。本發明中的序列同一性可以至少為 85%、90%或 95%，較佳至少為 95%。非限制性實施例包括 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%，100%。兩個序列之間的序列比較和同一性百分比測定可以藉由 National Center For Biotechnology Institute 網站上可得的 BLASTN/BLASTP 演算法的預設設置來進行。

本發明所述的“PD-L1 抗體或其抗原結合蛋白”可包括本領域中所述的任何抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段。抗 PD-L1 抗體可以是市售可得的或已藉由文獻公開的 PD-L1

抗體。包括但不限於，如 PD-L1 抗體 BMS-936559，MPDL3280A，MEDI4736，MSB0010718C(參見 US2014341917、US20130034559、US8779108)等。抗體可以是單株抗體、嵌合抗體、人源化抗體，或人抗體。抗體片段包括具有抗原結合活性的 Fab 片段，Fab'片段，$F(ab')_2$ 片段，以及與抗體結合的 Fv 片段和 ScFv 片段。

本發明示例性的 PD-L1 抗體製備過程參見(PCT/CN2016/104320)包括如下所述的重鏈可變區的 CDR 序列：

HCDR1： SYWMH SEQ ID NO：1

HCDR2： RI X_1PNSG X_2TSYNEKFKN SEQ ID NO：2

HCDR3： GGSSYDYFDY SEQ ID NO：3

在可選的實施方式中，X_1 選自 H 或 G，X_2 選自 G 或 F。

在另一個實施方式中，本發明示例性的 PD-L1 抗體進一步包括如下所述的輕鏈可變區的 CDR 序列：

LCDR1 選自： RASESVSIHGTHLMH SEQ ID NO：4

LCDR2 選自： AASNLES SEQ ID NO：5

LCDR3 選自： QQSFEDPLT SEQ ID NO：6；

在另一個實施方式中，本發明對上述的 CDR 區採用 CDR 移植策略進行抗體人源化，人源化構架的人源化輕鏈模板為 IGKV7-3*01 和 hjk2.1，人源化重鏈模板為 IGHV1-46*01 和 hjh6.1，人源化可變區序列如下：

人源化重鏈可變區

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT<u>SYWMH</u>*WVRQA*

*PGQGLEWMG*RIX$_1$PNSGX$_2$TSYNEKFKN*RVTMTRDTSTSTV*

*YMELSSLRSEDTAVYYCAR*GGSSYDYFDY*WGQGTTVTVSS*

SEQ ID NO：7

人源化輕鏈可變區

*DIVLTQSPASLAVSPGQRATITC*RASESVSIHGTHLMH*WYQQ*

*KPGQPPKLLIY*AASNLES*GVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEA*

*NDTANYYC*QQSFEDPLT*FGQGTKLEIK*

SEQ ID NO：8

注：順序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為 FR 序列，下加底線為 CDR 序列。

在另一個實施方式中，對本發明人源化抗體的回復突變設計，見下表 1：

表 1

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

注：如 Y91F 表示依照 Kabat 編號系統，將 91 位置 Y 突變回 F。

“植入”代表鼠抗體 CDR 植入人種系 FR 區序列。

表中各種輕重鏈的突變組合可得到新的人源化抗體。

本發明的另一方面，提供一種人源化選殖構建的實施例，如下：

設計引子 PCR 搭建各人源化抗體 VH/VK 基因片段，

再與表達載體 pHr(帶信號肽及恆定區基因(CH1-FC/CL)片段)進行同源重組，構建抗體全長表達載體 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。

1、引子設計：利用線上軟體 DNAWorks (v3.2.2) (http://helixweb.nih.gov/dnaworks/) 設計多條引子合成 VH/VK 含重組所需基因片段：5'-30bp 信號肽 + VH/VK + 30bp CH1/CL-3'。

2、片段接合：按照 TaKaRa 公司 Primer STAR GXL DNA 聚合酶操作說明書，用上面設計的多條引子，分兩步 PCR 擴增得到 VH/VK 含重組所需基因片段。

3、表達載體 pHr(帶信號肽及恆定區基因(CH1-FC/CL)片段)構建及酶切

利用一些特殊的限制性內切酶，如 BsmBI，識別序列與酶切位點不同的特性設計構建表達載體 pHr(帶信號肽及恆定區基因(CH1-FC/CL)片段)。BsmBI 酶切載體，切膠回收備用。

4、重組構建表達載體 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr

VH/VK 含重組所需基因片段與 BsmBI 酶切回收表達載體 pHr(帶信號肽及恆定區基因(CH1-FC/CL)片段)按 3:1 比例分別加入 DH5H 感受態細胞中，0℃ 冰浴 30min，42℃ 熱擊 90s，加入 5 倍體積 LB 介質，37℃ 孵育 45min，塗布 LB-Amp 平板，37℃ 培養過夜，挑取單株送測序得到各目的純株。

5、根據本實施例的設計方案構建質粒，然後表達純化蛋白，用檢測例 SPR 測定所得蛋白親和力。

6、最終用 BIACORE 測試人源化回復突變體與人源 PD-L1-his 或融合瘤抗體的親和力，篩選得到的人源化回復突變位點的選擇及序列組合如下：

重鏈可變區：

*QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT*SYWMH*WVRQA*

*PGQGLEWMG*RIGPNSGFTSYNEKFKN*RVTMTRDTSTSTVYM*

*ELSSLRSEDTAVYYCAR*GGSSYDYFDY*WGQGTTVTVSS*

SEQ ID NO：9

其中，CDR2 為 SEQ ID NO：7 的 X_1 為 G，X_2 為 F。

輕鏈可變區：

*DIVLTQSPASLAVSPGQRATITC*RASESVSIHGTHLMH*WYQQ*

*KPGQPPKLLIY*AASNLES*GVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAE*

*DTANYYC*QQSFEDPLT*FGQGTKLEIK*

SEQ ID NO：10

註：順序為 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜體為 FR 序列；下加底線為 CDR 序列。

本發明的另一方面，提供一種構建和表達抗 PD-L1 人源 IgG4 類型的實施例，並進一步用於融合蛋白構建的 PD-L1 抗體。該 PD-L1 抗體也可用作本發明中的測試例對照分子。

由於 PD-L1 在活化 T 細胞中也有表達，如果採用野生型 IgG1 恆定區會引起 Fc 介導的效應作用，比如 ADCC 和 CDC，從而導致活化 T 細胞的消減。本發明選擇突變 IgG4 以得到無 ADCC 和 CDC 的抗體。將親和力成熟得到的純

株轉換成 IgG4 類型，IgG4 的核心鉸鏈區包含 S228P 突變。並進一步引入 F234A 和 L235A 突變(mAbs 4:3, 310-318; May/June 2012)。同時，為防止抗體重鏈 C 末端在引入連接肽連接 TGF-βRII 胞外區時發生斷裂，又將 PD-L1 抗體重鏈的最後一位 K 突變成 A，以增加融合蛋白的穩定性。本發明用於融合蛋白構建的的 PD-L1 抗體序列如下：

PD-L1 抗體重鏈序列：IgG4(AA) (S228P)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVR
QAPGQGLEWMGRIGPNSGFTSYNEKFKNRVTMTRDTSTST
VYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSSYDYFDYWGQGTTVTV
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT
YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSLGA

SEQ ID NO：11

PD-L1 抗體輕鏈序列

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQ
QKPGQPPKLLIYAASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPV
EAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP

PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO：12

注：劃線部分為抗體重鏈或輕鏈的可變區序列，或編碼其的核苷酸序列；未劃線部分為抗體恆定區序列及其相應的編碼核苷酸序列。

本發明中所述的融合蛋白是一種藉由 DNA 重組得到的兩個基因共表達的蛋白產物。現有技術中熟知生產和純化抗體和抗原結合片段的方法，如冷泉港的抗體實驗技術指南，5-8 章和 15 章。例如，小鼠可以用人 PD-L1 或其片段免疫，所得到的抗體能被覆性、純化，並且可以用常規的方法進行胺基酸測序。抗原結合片段同樣可以用常規方法製備。發明所述的抗體或抗原結合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 區加上一個或多個人源 FR 區。人 FR 種系序列可以藉由比對 IMGT 人類抗體可變區種系基因資料庫和 MOE 軟體，從 ImMunoGeneTics(IMGT)的網站 http://imgt.cines.fr 得到，或者從免疫球蛋白雜誌，2001ISBN012441351 上獲得。

本發明工程化的抗體或抗原結合片段可用常規方法製備和純化。比如，編碼重鏈和輕鏈的 cDNA 序列，可以選殖並重組至 GS 表達載體。重組的免疫球蛋白表達載體可以穩定地轉染 CHO 細胞。作為一種更推薦的現有技術，哺乳動物類表達系統會導致抗體的糖基化，特別是在 Fc 區的

高度保守 N 端位點。藉由表達與人 PD-L1 特異性結合的抗體得到穩定的純株。陽性的純株在生物反應器的無血清培養基中擴大培養以生產抗體。分泌了抗體的培養液可以用常規技術純化。比如，用含調整過的緩衝液的 A 或 G Sepharose FF 管柱進行純化。洗去非特異性結合的組分。再用 PH 梯度法洗脫結合的抗體，用 SDS-PAGE 檢測抗體片段，收集。抗體可用常規方法進行過濾濃縮。可溶的混合物和多聚體，也可以用常規方法去除，比如分子篩、離子交換。得到的產物需立即冷凍，如-70℃，或者凍乾。

本發明所述的"免疫調節分子"可用於削弱癌細胞的免疫耐受性。本發明採用 TGF-βRII 胞外結構域的截短形式作為融合蛋白中免疫調節分子部分。"TGF-β 受體 II (TGF-βRII)"以高親和力結合配體 TGF-β1 和 3。TGF-β RII/TGF-β 複合物招募 TGF-β RI 以形成信號轉導複合物 (Won 等，Cancer Res.1999; 59:1273-7)。TGF-βRII 的胞外結構域是 TGF-βRII 細胞外自 N 端開始的一段長 136 個胺基酸殘基的肽段，其中一個示例性的例子如 SEQ ID NO：13 所示。其他長度約為 136 個胺基酸，並且來源於人的具有 TGF-βRII 的胞外區的能夠與 TGF-β1 和 3 相結合的變體同樣同樣屬於本發明 TGF-βRII 的胞外結構域的範圍。本發明研究發現，TGF-βRII 胞外結構域 N 端連續截短形式的結構和功能較未截短分子穩定。含 TGF-βRII 胞外結構域 N 端未截短(SEQ ID NO：13 所示的 1-136 多肽)形式的融合蛋白容易斷裂。尤其是在其 N 端作 26 個以下胺基酸的截

短後更為穩定，較佳 14-26 個胺基酸的截短，更佳 N 端 14-21 個胺基酸截短形式，具有更高的表達量，最佳截短 N 端 19 或 21 個連續胺基酸。

“給予”和“處理”當應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組合物與動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。“給予”和“處理”可以指例如治療、藥物代謝動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中該流體與細胞接觸。“給予”和“處理”還意指藉由試劑、診斷、結合組成物或藉由另一種細胞體外和離體處理例如細胞。“處理”當應用於人、獸醫學或研究受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

“治療”意指給予患者內用或外用治療劑，例如包含本發明的任一種結合化合物的組成物，該患者具有一種或多種疾病症狀，而已知該治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療患者或群體中以有效緩解一種或多種疾病症狀的量給予治療劑，以誘導這類症狀退化或抑制這類症狀發展到任何臨床右測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量(也稱作“治療有效量”)可根據多種因素變化，例如患者的疾病狀態、年齡和體重，以及藥物在患者產生需要療效的能力。藉由醫生或其它專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否已被減輕。儘管本發明的實

施方案(例如治療方法或製品)在緩解每個目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計學檢驗方法如 Student t 檢驗、卡方檢驗、依據 Mann 和 Whitney 的 U 檢驗、Kruskal-Wallis 檢驗(H 檢驗)、Jonckheere-Terpstra 核對總和 Wilcoxon 檢驗確定，其在統計學顯著數目的患者中應當減輕目標疾病症狀。

“保守修飾”或“保守置換或取代”是指具有類似特徵(例如電荷、側鏈大小、疏水性/親水性、主鏈構象和剛性等)的其它胺基酸置換蛋白中的胺基酸，使得可頻繁進行改變而不改變蛋白的生物學活性。本領域技術人員知曉，一般而言，多肽的非必需區域中的單個胺基酸置換基本上不改變生物學活性(參見例如 Watson 等(1987) Molecular Biology of the Gene,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224頁，(第 4 版))。另外，結構或功能類似的胺基酸的置換不大可能破環生物學活性。

“有效量”包含足以改善或預防醫學疾病的症狀或病症的量。有效量還意指足以允許或促進診斷的量。用於特定患者或獸醫學受試者的有效量可依據以下因素而變化：例如，待治療的病症、患者的總體健康情況、給藥的方法途徑和劑量以及副作用嚴重性。有效量可以是避免顯著副作用或毒性作用的最大劑量或給藥方案。

“外源性”指根據情況在生物、細胞或人體外產生的物質。“內源性”指根據情況在細胞、生物或人體內產生的物質。

“同源性”是指兩個多核苷酸序列之間或兩個多肽之間的序列相似性。當兩個比較序列中的位置均被相同鹼基或胺基酸單體亞基佔據時，例如如果兩個 DNA 分子的每一個位置都被腺嘌呤佔據時，那麼該分子在該位置是同源的。兩個序列之間的同源性百分率是兩個序列共有的匹配或同源位置數除以比較的位置數×100 的函數。例如，在序列最佳比對時，如果兩個序列中的 10 個位置有 6 個匹配或同源，那麼兩個序列為 60%同源。一般而言，當比對兩個序列而得到最大的同源性百分率時進行比較。

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

本文使用的表述“細胞”、“細胞系”和“細胞培養物”可互換使用，並且所有這類名稱都包括繼代。因此，單詞“轉化體”和“轉化細胞”包括原代受試細胞和由其衍生的培養物，而不考慮轉移數目。還應當理解的是，由於故意或非有意的突變，所有後代在 DNA 含量方面不可能精確相同。包括具有與最初轉化細胞中篩選的相同的功能或生物學活性的突變後代。在意指不同名稱的情況下，其由上下文清楚可見。

本文使用的“聚合酶鏈式反應”或“PCR”是指其中微量

的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美國專利號 4,683,195 中所述擴增的程式或技術。一般來說，需要獲得來自目的地區域末端或之外的序列資訊，使得可以設計寡核苷酸引子；這些引子在序列方面與待擴增模板的對應鏈相同或相似。2 個引子的 5'末端核苷酸可以與待擴增材料的末端一致。PCR 可用於擴增特定的 RNA 序列、來自總基因組 DNA 的特定 DNA 序列和由總細胞 RNA 轉錄的 cDNA、噬菌體或質粒序列等。一般參見 Mullis 等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Ouant. Biol. 51:263; Erlich 編輯，(1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被視為用於擴增核酸測試樣品的核酸聚合酶反應法的一個實例，但不是唯一的實例，所述方法包括使用作為引子的已知核酸和核酸聚合酶，以擴增或產生核酸的特定部分。

"視需要"或"視需要地"意味著隨後所描述地事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。例如，"視需要包含 1-3 個抗體重鏈可變區"意味著特定序列的抗體重鏈可變區可以但不必須存在。

"醫藥組成物"表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前體藥物與其他化學組分的混合物，所述其他組分例如生理學/可藥用的載體和賦形劑。醫藥組成物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

二、實施例與測試例

以下結合實施例進一步描述本發明，但這些實施例並非限制著本發明的範圍。

本發明實施例或測試例中未註明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件，或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。參見 Sambrook 等，分子選殖，實驗室手冊，冷泉港實驗室；當代分子生物學方法，Ausubel 等著，Greene 出版協會，Wiley Interscience，NY。未注明具體來源的試劑，為市場購買的常規試劑。

實施例

實施例 1：融合蛋白 PD-L1/TGF-β trap 選殖和表達

採用 TGF-βRII 胞外結構域(SEQ ID NO：13 的全長或截短形式)作為融合蛋白中免疫調節分子部分，將 PD-L1 抗體作為融合蛋白的靶向部分，形成 PD-L1 抗體/TGF-βRII 胞外區融合蛋白(PD-L1/TGF-β trap)。研究發現，TGF-βRII 胞外結構域截短形式的結構和功能較為穩定，尤其是在其 N 端作 26 個以下胺基酸的截短後更為穩定，較佳 14-26 個胺基酸的截短，更佳 N 端截短 14-21 個連續胺基酸的形式，具有更高的表達量和穩定的結構，更佳 N 端截短 14、19 或 21 個連續胺基酸的形式。本發明 TGF-βRII 胞外結構域及其截短形式的非限制性實施例序列如下：

TGF-βRII 胞外結構域序列：ECD(1-136)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST
CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETV
CHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSS

DECNDNIIFSEEYNTSNPD

SEQ ID NO：13

TGF-βRII 胞外結構域序列在 N 端有 19 個胺基酸的截短或缺失：ECD(20-136)

GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEK PQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

SEQ ID NO：14

TGF-βRII 胞外結構域序列在 N 端有 21 個胺基酸的截短或缺失：ECD(22-136)

VKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQ EVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKC IMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

SEQ ID NO：15

TGF-βRII 胞外結構域序列在 N 端有 14 個胺基酸的截短或缺失：ECD(15-136)

VTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTS NPD

SEQ ID NO：16

利用同源重組技術將本發明 PD-L1 抗體的重鏈 C 末端胺基酸藉由 $(G_4S)_xG$ 連接不同長度 TGF-βRII 胞外區，與輕鏈一起，藉由 293 表達系統進行常規表達，得到如表 2 所

示的融合蛋白：

表 2：PD-L1 抗體/TGF-βRII 胞外區融合蛋白

融合蛋白例	序列描述	N 端連續胺基酸缺失數
融合蛋白 1	Ab-$(G_4S)_4$G-ECD(1-136)	未缺失
融合蛋白 2	Ab-$(G_4S)_3$G-ECD(15-136)	14
融合蛋白 3	Ab-$(G_4S)_3$G-ECD(15-136, N19A)	14
融合蛋白 4	Ab-$(G_4S)_3$G-ECD(20-136)	19
融合蛋白 5	Ab-$(G_4S)_3$G-ECD(22-136)	21
融合蛋白 6	Ab-$(G_4S)_3$G-ECD(27-136)	26
融合蛋白 7	Ab-$(G4S)_4$G-ECD(15-136)	14
融合蛋白 8	Ab-$(G4S)_4$G-ECD(15-136, N19A)	14
融合蛋白 9	Ab-$(G4S)_4$G-ECD(20-136)	19
融合蛋白 10	Ab-$(G4S)_4$G-ECD(22-136)	21
融合蛋白 11	Ab-$(G4S)_4$G-ECD(27-136)	26
融合蛋白 12	Ab-$(G_4S)_5$G-ECD(15-136)	14
融合蛋白 13	Ab-$(G_4S)_5$G-ECD(15-136, N19A)	14
融合蛋白 14	Ab-$(G_4S)_5$G-ECD(20-136)	19
融合蛋白 15	Ab-$(G_4S)_5$G-ECD(22-136)	21
融合蛋白 16	Ab-$(G_4S)_5$G-ECD(27-136)	26
融合蛋白 17	Ab-$(G_4S)_6$G-ECD(27-136)	26

註：Ab 為本發明所述 PD-L1 抗體，序列描述中 ECD(n-136)為 TGF-βRII 胞外區的全長或截短形式，n 為 TGF-βRII 胞外區截短後的胺基酸起始位置數。本發明融合蛋白結構如第 1 圖所示；N19A 表示表示 TGF-βRII 胞外區的第 19 位置胺基酸突變為 A。

編碼 PD-L1 抗體的核苷酸序列、編碼 TGF-βRII 胞外

區的核苷酸序列、接頭蛋白片段($(G_4S)_xG$)的核苷酸序列藉由所屬領域常規技術手段獲得。利用同源重組技術將PD-L1抗體的C末端核苷酸藉由接頭蛋白連接不同長度TGF-βRII胞外區的N末端核苷酸，選殖到Phr-BsmbI載體上。重組的PD-L1/TGF-β trap在293細胞表達，藉由實施例2進行純化。純化的蛋白可用於下述各實施例實驗中。

實施例2：PD-L1/TGF-β trap融合蛋白純化

細胞培養液高速離心後收集上清，利用親合層析進行第一步純化。層析介質為與Fc相互作用的Protein A或者衍生填料，如GE的Mabselect。平衡緩衝液為1xPBS (137mmol/L NaCl，2.7mmol/L KCl，10mmol/L Na_2HPO_4，2mmol/L KH_2PO_4，pH7.4)，平衡5倍管柱體積後，將細胞上清上樣結合，流速控制為樣品在管柱上保留時間≥1min。上樣結束後，用1xPBS(pH7.4)沖洗管柱，直至A280紫外吸收降至基線。然後用0.1M甘胺酸(pH3.0)的洗脫緩衝液沖洗層析管柱，根據A280紫外吸收峰收集洗脫峰，收集的洗脫樣品用1M Tris(pH8.5)中和。

將上述中和後的洗脫樣品超濾濃縮後進行體積排阻層析，緩衝液為1xPBS，層析管柱為XK26/60 Superdex200 (GE)，流速控制在4ml/min，上樣體積小於5ml，根據A280紫外吸收合併目的蛋白峰。收集的蛋白經SEC-HPLC鑒定純度大於95%，經LC-MS鑒定為正確後分裝備用。得到PD-L1/TGF-β trap。

以下用生化測試方法驗證本發明性能及有益效果。

體外活性生物學評價

測試例 1：ELISA 檢測 PD-L1/TGF-β trap 體外結合 TGF-β1 實驗：

檢測流程描述如下：

a. 以 1 μg/ml 濃度的人源 TGF-β1 (8915LC, CST)為抗原按 100 μl/孔包被 96 孔板，4℃過夜。

b. 250 μl 1×PBST 洗滌 3 次，加入 250 μl 5% 牛奶 PBS, 37℃封閉 2 小時。

c. 250 μl 1×PBST 洗滌 3 次，加入梯度稀釋的 PD-L1/TGF-β trap，TGF-β trap 和陽性對照，37℃孵育 1 小時。

d. 250 μl 1×PBST 洗滌 3 次。

e. 每孔加入 100 μl Anti-human FC antibody-HRP (1:4000)，37℃孵育 40 分鐘。

f. 每孔加入 100 μl TMB，室溫孵育 10 分鐘後加入 100 μl 1M H_2SO_4 終止反應。

g. 酶標儀上檢測 450nm 測吸收值，Graphpad Prism5 分析資料。

融合蛋白體外結合人源 TGF-β1 的結果如第 2 圖、第 3 圖所示。ELISA 顯示表 2 中融合蛋白 1 未保留對人源 TGF-β1 的結合活性。質譜分析結果顯示融合蛋白 1(即 TGF-βRII 胞外區非截短形式(1-136))不穩定，容易在重鏈 TGF-βRII 部分斷裂，陽性對照同樣存在相同情況，而融合蛋白 7、9、10、12-15 等 TGFβRII 胞外區 N 端截短形式的

融合蛋白對於結合至人源 TGF-β1 是具有特異性的。

測試例 2：ELISA 檢測 PD-L1/TGF-β trap 體外結合 PD-L1 實驗：

檢測用抗原：PD-L1-His

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWE
MEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNA
ALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNK
INQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSG
KTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEE
NHTAELVIPELPLAHPPNEREQKLISEEDLHHHHHH

SEQ ID NO：17

檢測流程描述如下：

a. 以 5 μg/ml 濃度的人源 PD-L1-His(SEQ ID NO：17)為抗原按 100 μl/孔包被 96 孔板，4℃過夜。

b. 250 μl 1×PBST 洗滌 3 次，加入 250 μl 5% 牛奶 PBS 37℃封閉 2 小時。

c. 250 μl 1×PBST 洗滌 3 次，加入梯度稀釋的 PD-L1/TGF-β trap，PD-L1 抗體為陽性對照，37℃孵育 1 小時。

d. 250 μl 1×PBST 洗滌 3 次。

e. 每孔加入 100 μl 抗人 FC 抗體-HRP (1:4000)，37℃孵育 40 分鐘。

f. 每孔加入 100 μl TMB，室溫孵育 10 分鐘後加入 100 μl 1M H_2SO_4 終止反應。

g. 酶標儀上檢測 450nm 測吸收值，Graphpad Prism5 分析資料。

本發明融合蛋白體外結合人源 PD-L1 的結果如第 4 圖所示。ELISA 顯示融合蛋白均保留了對人源 PD-L1 的結合活性。

測試例 3：體外檢測 PD-1/PD-L1 通路阻斷實驗

1、測試目的：

為了研究 PD-L1/TGF-β trap 對 PD-1/PD-L1 信號通路的阻斷作用，採用來自 Promaga 公司構建的分別帶有人源 PD-1 和 PD-L1 受體分子的細胞，進行基於細胞水準上的抗體阻斷實驗。

2、測試樣品：

① PD-L1 抗體：SEQ ID NO：11，SEQ ID NO：12；

② 對照 1(20T-Fc)：ECD(20-136)-Fc，TGF-βRII 胞外區截短片段 ECD(20-136)與 Fc 的融合蛋白

序列如下：

GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV
CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIM
KEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDAESKY
GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF

SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

SEQ ID NO：18；

③ 對照 2(22T-Fc)：ECD(22-136)-Fc，TGF-βRII 胞外區截短片段 ECD(22-136)與 Fc 的融合蛋白

序列如下：

VKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCV
AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKE
KKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDAESKYGP
PCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

SEQ ID NO：19；

④ 融合蛋白 9，融合蛋白 15；

⑤ 人 IgG：空白對照，從混合的正常人血清中，利用傳統的親和層析方法如 ProteinA 純化獲得的人免疫球蛋白；

⑥ 陽性對照(M7824，參考專利 WO2015118175 製備)：PD-L1 抗體/TGF-βRII 胞外區融合蛋白

PD-L1 抗體輕鏈的胺基酸序列

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ
HPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ

AEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTL
FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKA
GVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH
EGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:20

PD-L1 抗體重鏈/TGF-βRII 胞外區(1-136)的 H 鏈的胺基酸序列：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQA
PGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGIPPHVQKSV
NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNC
SITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFI
LEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEY
NTSNPD

SEQ ID NO:21。

3、測試過程

取 CHO/PD-L1 細胞(CS187108, Promega)，消化並用 F-12 Nutrient Mixture (Ham)完全培養基重懸細胞，根據細胞計數結果使用完全培養基調整細胞密度至 4×10^5/mL，將細胞懸液轉移至加樣槽中，使用多道移液器以 100 μL/孔加入到 96 孔板中，放置於 37℃，5%CO_2 培養箱培養 20~24 h；第二天製備 Jurkat/PD-1(CS187102，Promega)細胞懸液，根據細胞計數結果使用分析培養基重懸細胞，並調整細胞密度至 1.25×10^6/mL；將加入 CHO/PD-L1 細胞的細胞培養板從培養箱中取出，使用多道移液器每孔取出 95 μL 培養液，按照 40 μL/孔加入梯度稀釋的融合蛋白，以及 PD-L1 抗體及陽性對照(M7824)，然後將 Jurkat/PD-1 細胞懸液轉移至加樣槽中，以 40 μL/孔加入到細胞培養板中，置於 37℃，5%CO_2 培養箱培養 5~6 h。在蛋白孵育期間，將 Bio-Glo™ Reagent 取出使其溫度恢復至室溫。取出細胞培養板，置於室溫放置 5~10 min，然後每孔加入 40 μL Bio-Glo™ Reagent，置於安全櫃中孵育 5~10 min，使用多功能酶標儀讀取化學發光信號值。

4、結果

如第 5 圖所示，本發明融合蛋白 9 同陽性分子一樣均能夠有效地阻斷表達有 PD-1 分子的 Jurkat 細胞同 CHO/PD-L1 細胞結合，並且有藥物濃度劑量依賴效應。融合蛋白 15 與融合蛋白 9 有相同水準的阻斷能力。

測試例 4：Biacore 檢測體外結合親和力和動力學實驗

藉由 Biacore T200(GE)測定待測分子與人或鼠源 TGF-β1 或人源 PD-L1 蛋白的親和力，實驗過程描述如下：

用 Protein A 晶片親和捕獲一定量的 PD-L1/TGF-β trap，然後於晶片表面流經人或鼠源 TGF-β1(8915LC, CST)或人源 PD-L1(Sino Biological)，利用 Biacore 即時檢測反應信號，從而獲得結合和解離曲線，然後用甘胺酸-鹽酸(pH 1.5，GE)將生物晶片洗淨再生。實驗中用到的緩衝溶液為 HBS-EP Buffer(GE)。實驗得到的資料用 BIAevaluation version 4.1 軟體(GE)以(1:1) Langmuir 模型進行擬合，得出如表 3 所示的親和力數值。

表 3：本發明融合蛋白與 TGF-β1 或人源 PD-L1 的體外親和力

融合蛋白*	親和對象	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
融合蛋白 9	人源 TGF-β1	1.73E7	7.28E-4	4.22E-11
融合蛋白 15		2.69E7	6.08E-4	2.26E-11
融合蛋白 9	鼠源 TGF-β1	4.33E7	1.33E-3	3.07E-11
融合蛋白 15		3.57E7	1.22E-3	3.42E-11
融合蛋白 9	人源 PD-L1	1.97E6	1.24E-4	6.31E-11
融合蛋白 15		2.00E6	1.24E-4	6.10E-11

*對應序號的融合蛋白形式見表 2。

融合蛋白結合活性見表 3，結果表明，本發明融合蛋白 9 和 15 均對人，小鼠 TGF-β1 以及人 PD-L1 具極高的親和力。

測試例 5：SMAD3 報告基因抑制實驗

1、測試目的

該實驗藉由 HepG2 細胞表達帶螢光素酶報告基因的 Smad3 結合原件(SBE)來研究 PD-L1/TGF-β trap 對 TGF-β1 誘導 Smad3 活化的抑制作用，根據 IC50 大小評價 PD-L1/TGF-β trap 的體外活性。

2、測試樣品：融合蛋白 9、陽性對照(M7824)

3、測試過程

HepG2 細胞使用含有 10% FBS 的 MEM 完全培養基(GE，SH30243.01)培養，每 3 天傳代一次。實驗第一天以每孔 25,000 個細胞的密度接種於 96 孔板(Corning，3903)，在 37℃、5% CO_2 條件下培養 24 小時。第二天，棄去細胞培養板中的培養基，每孔轉染 100ng 3TP-Lux 質粒。細胞在 37℃、5% CO_2 條件下繼續培養 24 小時。加入待測樣品前 6 小時，棄去 96 孔板中完全培養基，每孔加入 80 μL 不完全培養基(MEM+0.5%FBS)。6 小時後再加入 10 μL 使用不完全培養基配製的人 TGF-β1(R&D，240-B-010)溶液，終濃度為 2 ng/mL 和 10 μL 待測樣品，終濃度為 500、50、5、0.5、0.05、0.005、0.0005 和 0nM，以人 TGF-β1 溶劑為對照，細胞在 37℃、5% CO_2 條件下繼續培養 18h。然後每孔加入 100 μL 配製好的螢光素酶底物 ONE-GloTM Luciferase Assay system(promega，E6110)，室溫避光放置 10 分鐘，然後使用 Victor3 多功能酶標儀(Perkin Elmer)讀取發光信號值。待測樣品的 IC50 值使用資料處理軟體 Graphpad Prism5.0 計算得到。

第 6 圖顯示融合蛋白 9 以劑量依賴性形式抑制 TGF β 誘導的 pSMAD3 報告物活性，且與陽性對照 M7824 具有相當的功效和 IC50(抑制最大活性的 50%所需的濃度)。PD-L1 抗體的測試結果顯示其不具有抑制作用(IC50＞500 nM)。

測試例 6：體外檢測結核桿菌素(TB)刺激 PBMC 釋放 IFNγ 實驗

1、測試目的

為了研究 PD-L1/TGF-β trap 對 T 淋巴細胞的啟動作用，收集和純化人外周血單核細胞(PBMC)，採用結核桿菌素(TB)體外刺激 5 天，檢測 IFNγ 細胞因子的分泌水準。

2、測試樣品：①Human IgG；②PD-L1 抗體；③融合蛋白 9；④對照 1(20T-Fc)：ECD(20-136)-Fc；⑤PD-L1 抗體+對照 1(20T-Fc)。

3、測試過程

新鮮分離純化的 PBMC，15mL 約 3×10^7 個，加入 20μL 結核菌素，37℃、5% CO_2 培養箱培養 5 天。第 6 天，收集上述培養的細胞離心，用 PBS 洗一次，重懸至新鮮的培養基中，調整密度為 1×10^6 個每毫升，接種至 96 孔細胞培養板，每孔 90μL。將不同濃度的抗體分別加入上述 96 孔細胞培養板的對應孔中，每孔 10μL，對照組和空白組分別加入 10μL PBS。細胞培養板置於 37℃，5% CO_2 培養箱孵育 3 天。取出細胞培養板，離心(4000rpm，10min)每孔取上清，10 倍稀釋後，採用 ELISA 的方法(人 IFN-γ 檢測試劑

盒，欣博盛， EHC102g.96)檢測 IFN-γ 的水準。具體操作參考試劑說明書。結果如圖所示，PD-L1/TGF-β trap 融合蛋白樣品均能夠增強啟動的 T 淋巴細胞分泌細胞因子 IFN-γ，並且有藥物濃度劑量效應。

表 4

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

4、結果

如第 7 圖、表 4 所示，融合蛋白 9 能夠劑量依賴地增強啟動的 T 淋巴細胞分泌細胞因子 IFN-γ，並且具有比 PD-L1 抗體，20T-FC 更強的啟動作用。

藥物代謝動力學評價

測試例 7：

實驗用 SD 大鼠 3 隻，雌性，12/12 小時光/暗調節，溫度 24±3℃ 恆溫，濕度 50-60 %，自由進食飲水。購自傑思捷實驗動物有限公司。實驗當天對 SD 大鼠分別尾靜脈注射融合蛋白，給藥劑量為 6 mg/kg，注射體積為 5 ml/kg。

取血時間點為：第 1 天給藥後 15 min、7h、24h (第 2 天)，第 3 天，第 4 天，第 6 天，第 8 天，第 10 天，第 15 天，於大鼠眼底靜脈取血，每次 200 μl(相當於取血清 100 μl)；收集的血樣在室溫下置放半小時至凝集，然後 4℃下 10000 x g 離心 10 分鐘。收集上清，立即放置-80°C 貯存。用 ELISA 檢測血清中的融合蛋白濃度。

檢測流程描述如下：

a. 以 2 μg/ml 濃度的人源 PD-L1-His 為抗原按 100 μl/孔包被 96 孔板，4℃過夜。

b. 250 μl 1×PBST 洗滌 4 次，加入 250 μl 5% 牛奶 PBS, 37℃封閉 3 小時。

c. 250 μl 1×PBST 洗滌 4 次，加入 100 μl 梯度稀釋的待測血清，以融合蛋白 9 為陽性對照，37℃孵育 1 小時。

d. 250 μl 1×PBST 洗滌 5 次。

e. 每孔加入 100 μl 生物素化的抗人源 TGF-βRII 的抗體(R&D)，37℃孵育 1 小時。

f. 250 μl 1×PBST 洗滌 5 次。

g. 每孔加入 100 μl TMB，室溫孵育 10 分鐘後加入 100 μl 1M H_2SO_4 終止反應。

h. 酶標儀上檢測 450nm 測吸收值，Graphpad Prism5 分析資料。

表 5：融合蛋白在 SD 大鼠中的 T1/2

受試藥物	給藥方式	T1/2 (平均值±SD, h)
融合蛋白 9	IV (6 mg/kg)	236±10

參見表 5，PK 分析結果表明，本發明融合蛋白分子融合蛋白 9 在大鼠體內的半衰期約為 236 h (9.8 天)。

體內活性生物學評價

測試例 8：PD-L1/TGF-β trap 對人乳腺癌 MDA-MB-231 小鼠皮下移植瘤的療效

本實驗應用的小鼠品系為 NOD/SCID 雌性小鼠(卡文斯)，實驗使用的人外周血單個核細胞從新鮮採集的血液中提取獲得，提取方法如下：將肝素抗凝處理的靜脈血與同體積含 2% FBS 的 PBS 混合，混勻後將 25ml 稀釋後的血液緩慢加入到含 15ml 淋巴細胞分離液的離心管中，室溫下 1200g 離心 10 分鐘，吸取淋巴細胞層轉移到另一個離心管，加入 PBS 清洗細胞，室溫下 300g 離心 8 分鐘，重複一次後，用含 10%FBS 的 RPMI-1640 培養基重懸細胞，將細胞加入到事先包被好 CD3 抗體(OKT3，40ng/ml)的 6 孔板中，每孔 2×10^6 個細胞(2ml)，置於 37℃ 培養箱中培養 4 天。

實驗樣品：

①空白對照：PBS；②融合蛋白 9-4.8mpk；③融合蛋白 9-24mpk；④PD-L1 抗體-4mpk；⑤PD-L1 抗體-20mpk；

⑥ PD-L1 抗體-4mpk +對照 1(20T-Fc)-2.14mpk；⑦對照 1(20T-Fc)-2.14mpk。

將 MDA-MB-231 細胞重懸於無血清 RPMI-1640 培養基中，與等體積基質膠混合後 100μl(2.3×10^6)接種於 NOD/SCID 小鼠右肋部皮下，11 天後去除腫瘤體積過大過小動物後，將小鼠隨機分組，每組 9 隻。將 5×10^5 個刺激後的 PBMC(60μl)注射到腫瘤組織中，剩餘的 PBMC 停止刺激並繼續培養，1 週後將 5×10^6 個 PBMC(100μl)腹腔注射到荷瘤小鼠體內，視為第 1 輪注射。整個實驗週期，進行 2 輪半、共 5 次 PBMC 注射。首次瘤內注射當日開始腹腔給藥，一週三次，共給藥 14 次，給藥方式見表 6。每週 2 次測量瘤體積，稱體重。實驗結果見表 7。實驗結束後將荷瘤小鼠安樂死並剝瘤稱重。

表 6：試驗分組及給藥情況

組別	給藥劑量
①空白對照：PBS	0
②融合蛋白 9-4.8mpk	4.8 mg/kg
③融合蛋白 9-24mpk	24mg/kg
④PD-L1 抗體-4mpk	4mg/kg
⑤PD-L1 抗體-20mpk	20mg/kg
⑥PD-L1 抗體-4mpk +對照 1-2.14mpk	4 mg/kg +2.14 mg/kg
⑦對照 1-2.14mpk	2.14mg/kg

表 7：融合蛋白 9 對 MDA-MB-231 小鼠皮下移植瘤的療效

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

第 0 天：第一次給藥時間；*$p<0.05$ **$p<0.01$ ***$p<0.001$ 藉由 student t 檢驗與 PBS 對比。

實驗結果如第 8 圖顯示，抗體融合蛋白 9(4.8、24mg/kg)能明顯抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 小鼠皮下移植瘤的生長，高低劑量間呈現劑量依賴關係，且優於各自等同摩爾劑量的參比藥物 PD-L1 抗體(4、20mg/kg)、TGF-βRII 對照分子 20T-FC (2.14mg/kg)和聯用組(PD-L1 抗體-4mg/kg+20T-FC -2.14mg/kg)。各劑量的融合蛋白 9 從給藥後 14d 開始，就一直保持理想的抑瘤效果，且其高劑量與 PD-L1 抗體-20mpk 相比,優勢非常明顯($p<0.05$)；給藥後

25d，各抗體抑瘤效果最好，融合蛋白 9 和 PDL-1 抗體低、高劑量與聯用組的抑瘤率分別為 37.24%、52.38%、30.24%、28.01%、31.38%；給藥後 32 天，融合蛋白 9 的抑瘤作用仍十分明顯，低高劑量組 %TGI 分別為 36.68%和 50.76%，且瘤體積與對照組相比都存在統計學差異($p < 0.05$)。

測試例 9：PD-L1/TGF-β trap 的物理穩定性

本測試例用於檢測融合蛋白融合蛋白 9 和融合蛋白 15 的穩定性。

利用 DSC(Differential scanning calorimetry，差示掃描量熱法)檢測不同抗體的熱穩定性，比較了不同的緩衝體系下的穩定性情況，不同緩衝體系如 10mM 醋酸鹽/135mM NaCl(pH 5.5)和 10mM 醋酸鹽/9%海藻糖(pH 5.5)。

將樣品置換到對應緩衝液中，控制樣品濃度在 50mg/ml 左右，利用 MicroCal* VP-Capillary DSC(Malvern)進行檢測。檢測前，將各個樣品及空白緩衝液用真空脫氣器脫氣 1~2min。樣品板每個孔加入 400μl 樣品或空白緩衝液(儀器上樣量為 300μl)。最後兩對孔板分別加入 14% Decon 90 和 ddH_2O，以備清洗用，樣品板加樣完畢後，套上塑膠軟蓋板。掃描溫度從 25℃開始到 100℃結束，掃描速率 60℃/h。具體結果如下表 8 所示，在兩個測試體系中融合蛋白 9、融合蛋白 15 均表現了良好的熱穩定性。

表 8

樣品	緩衝液	Tm-起始(℃)	TM(℃)
融合蛋白 9	10mM 醋酸鹽 /135mM NaCl	57.99	66.33
	10mM 醋酸鹽 /9% 海藻糖	58.64	67.83
融合蛋白 15	10mM 醋酸鹽 /135mM NaCl	57.33	66.17
	10mM 醋酸鹽 /9% 海藻糖	57.41	67.44

藉由 SEC-HPLC 監測樣品純度考察一定濃度條件下週期性穩定性，示例性的條件比如將樣品濃度控制在約 50mg/ml，在 10mM 醋酸鹽/135mM NaCl(pH 5.5)比較在比如-80℃重複凍融 5 次及 40℃保存一個月的穩定性情況。利用 Xbridge protein BEH SEC 200A(Waters)HPLC 柱子檢測。檢測結果如下表 9 所示，兩個融合蛋白均表現出良好的穩定性。

表 9

	融合蛋白 9(△%)	融合蛋白 15(△%)
40℃	3.39%	1.8%
-80℃凍融	1.44%	1.39%

註：△%表示變化率。

測試例 10：融合蛋白的化學穩定性

脫醯胺修飾是抗體中可能影響後期穩定性的一種常見的化學修飾，尤其是 CDR 區域的部分胺基酸高度脫醯胺修飾一般選擇儘量避免或者突變降低。取 1600μg 待測抗體溶於 200μl 10mM 醋酸鹽/135mM NaCl(pH 5.5)中，40℃恆溫箱存放；分別於 0、14、28 天取樣，用於酶解實驗。將 100μg 不同時間點取樣的樣品溶於 100μl 0.2 M His-HCl，8 M Gμa-HCl，pH 6.0 溶液中，加 3μl 0.1g/mL DTT，50℃水浴 1 小時，後用 0.02 M His-HCl，pH 6.0 的溶液超濾兩次，加入 3μL 0.25mg/ mL 的胰蛋白酶，37℃水浴酶解過夜。Agilent 6530 Q-TOF 進行 LC-MS 檢測脫醯胺修飾情況，結果如下表 10 所示。

表 10

樣品	重鏈	修飾位點	第 0 天	第 14 天	第 28 天
融合蛋白 9	重鏈	N314	2.38%	2.28%	2.45%
		N324	0.20%	3.60%	7.88%
融合蛋白 15	重鏈	N314	2.87%	2.86%	2.87%
		N324	0.00%	3.61%	7.93%

備註：N 代表檢測到修飾的天冬醯胺，數字代表所處輕鏈或者重鏈 N 端開始計數所處的位置。百分含量代表 LC-MS 檢測到的脫醯胺修飾占該位點所處全部肽段信號的比例。

質譜檢測結果顯示兩個融合蛋白都沒有明顯的脫醯胺修飾位點，提示其後期化學穩定性良好。

【符號說明】

無。

第 107116108 號專利申請案
111 年 9 月 20 日修正替換頁

【序列表】

<110> 江蘇恆瑞醫藥股份有限公司
(JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.)
上海恆瑞醫藥有限公司
(SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)

<120> 含有TGF-β受體的融合蛋白及其醫藥用途

<130> 780027CPCT

<150>201710334292.6
<151>2017-05-12

<160> 21

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 1

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抗體HCDR2抗體可變區

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa表示His或Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa表示Gly或Phe

<400> 2

Arg Ile Xaa Pro Asn Ser Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 3

Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile His Gly Thr His Leu Met His
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Gln Gln Ser Phe Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抗體人源化抗體可變區

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (52)..(52)
<223> Xaa表示His或Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> Xaa表示Gly或Phe

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Xaa Pro Asn Ser Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抗體人源化輕鏈可變區

<400> 8

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile His
20 25 30

Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe
85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化回復突變位點PD-L1抗體重鏈可變區

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Gly Pro Asn Ser Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化回復突變位點PD-L1抗體輕鏈可變區

<400> 10

```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile His
            20                  25                  30

Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
    50                  55                  60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65                  70                  75                  80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 11
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抗體重鏈序列

<400> 11

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Gly Pro Asn Ser Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asn Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80
```

```
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
```

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Ala
435 440 445

<210> 12
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抗體輕鏈序列

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile His
20 25 30

Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

```
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65                  70                  75                  80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 13
<211> 136
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<223> TGF-βRII胞外結構域序列: ECD(1-136)

<400> 13

```
Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
1               5                   10                  15

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
            20                  25                  30
```

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
35 40 45

Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val
50 55 60

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
65 70 75 80

Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
85 90 95

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
100 105 110

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
115 120 125

Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
130 135

<210> 14
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TGF-βRII胞外結構域序列在N端有19個胺基酸的截短或缺失：
ECD(20-136)

<400> 14

Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe
1 5 10 15

Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr
20 25 30

Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys
35 40 45

Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu
50 55 60

Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile
65 70 75 80

Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys
85 90 95

Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn
100 105 110

Thr Ser Asn Pro Asp
115

<210> 15
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TGF-βRII胞外結構域序列在N端有21個胺基酸的截短或缺失：
ECD(22-136)

<400> 15

Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr
1 5 10 15

Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile
20 25 30

Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp
35 40 45

Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr
50 55 60

His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys
65 70 75 80

Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser
85 90 95

Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser
100 105 110

Asn Pro Asp
115

<210> 16
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TGF-βRII胞外結構域序列在N端有14個胺基酸的截短或缺失：
ECD(15-136)

<400> 16

Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe
1 5 10 15

Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser
20 25 30

Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val
35 40 45

Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys
50 55 60

His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala
65 70 75 80

Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe
85 90 95

Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe
100 105 110

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
115 120

<210> 17
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 檢測用抗原：PD-L1-His

<400> 17

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

```
Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
     50                  55                  60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65                  70                  75                  80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
                85                  90                  95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
            100                 105                 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
        115                 120                 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
    130                 135                 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145                 150                 155                 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
            180                 185                 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
        195                 200                 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Glu Gln Lys Leu
    210                 215                 220

Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
225                 230                 235
```

<210> 18
<211> 346
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對照1(20T-Fc): ECD(20-136)-Fc, TGF-βRII胞外區截短片段ECD(20-136)與Fc的融合蛋白

<400> 18

```
Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe
1               5                  10                  15

Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr
            20                  25                  30

Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys
        35                  40                  45

Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu
    50                  55                  60

Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile
65                  70                  75                  80

Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys
                85                  90                  95

Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn
            100                 105                 110

Thr Ser Asn Pro Asp Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
        115                 120                 125

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
    130                 135                 140

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
145                 150                 155                 160

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
                165                 170                 175

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
            180                 185                 190

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
        195                 200                 205

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
    210                 215                 220

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
225                 230                 235                 240
```

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
245 250 255

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
260 265 270

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
275 280 285

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
290 295 300

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
305 310 315 320

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
325 330 335

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
340 345

<210> 19
<211> 344
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對照2(22T-Fc): ECD(22-136)-Fc, TGF-βRII胞外區截短片段ECD(22-136)與Fc的融合蛋白

<400> 19

Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr
1 5 10 15

Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile
20 25 30

Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp
35 40 45

Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr
50 55 60

His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys
65 70 75 80

```
Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser
                85                  90                  95

Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser
            100                 105                 110

Asn Pro Asp Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
        115                 120                 125

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
    130                 135                 140

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
145                 150                 155                 160

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
                165                 170                 175

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
            180                 185                 190

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
        195                 200                 205

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
    210                 215                 220

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
225                 230                 235                 240

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
                245                 250                 255

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
            260                 265                 270

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
        275                 280                 285

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
    290                 295                 300

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
```

305 310 315 320

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
325 330 335

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
340

<210> 20
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 陽性對照: PD-L1抗體輕鏈的胺基酸序列

<400> 20

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 21
<211> 607
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抗體重鏈/TGF-βRII胞外區的H鏈的胺基酸序列

<400> 21

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

```
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val
465                 470                 475                 480

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
                485                 490                 495

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln
            500                 505                 510

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
        515                 520                 525

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr
    530                 535                 540

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile
545                 550                 555                 560

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys
                565                 570                 575

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn
            580                 585                 590

Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
        595                 600                 605
```

第 107116108 號專利申請案
113 年 10 月 4 日修正替換頁

申請專利範圍

1. 一種含有 TGF-β 受體的融合蛋白，包含靶向部分和 TGF-β 受體部分，其中，該 TGF-β 受體部分為 TGF-βRII 胞外區的 N 端截短形式；該 TGF-βRII 胞外區的 N 端截短形式為在 TGF-βRII 胞外區的 N 端上有 14、19 或 21 個連續胺基酸的缺失；該 TGF-βRII 胞外區的序列如 SEQ ID NO：13 所示的序列；以及

該靶向部分為 PD-L1 抗體或其抗原結合片段，包含以下的 CDR 區序列：

如 SEQ ID NO：1 所示的 HCDR1；

如 SEQ ID NO：2 所示的 HCDR2；

如 SEQ ID NO：3 所示的 HCDR3；

如 SEQ ID NO：4 所示的 LCDR1；

如 SEQ ID NO：5 所示的 LCDR2；

如 SEQ ID NO：6 所示的 LCDR3。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，其中該 TGF-βRII 胞外區的 N 端截短形式的序列包含 SEQ ID NO：14、15 或 16 所示的序列。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，其中該 PD-L1 抗體或其抗原結合片段為嵌合抗體或其功能片段、人源化抗體或其功能片段、或人抗體或其功能片段。

4. 如申請專利範圍第 3 項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，其中該 PD-L1 人源化抗體的重鏈可變區具有如

SEQ ID NO：7 所示的序列。

5. 如申請專利範圍第 4 項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，其中該 PD-L1 人源化抗體的重鏈可變區具有如 SEQ ID NO：9 所示的序列。

6. 如申請專利範圍第 3 項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，其中該 PD-L1 人源化抗體包括序列 SEQ ID NO：11 所示的重鏈。

7. 如申請專利範圍第 3 項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，其中該 PD-L1 人源化抗體包含 SEQ ID NO：8 或 10 所示的輕鏈可變區序列或輕鏈可變區的突變序列。

8. 如申請專利範圍第 3 項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，其中該 PD-L1 人源化抗體包含序列 SEQ ID NO：12 所示的輕鏈。

9. 如申請專利範圍第 1 項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，其中該含有 TGF-β 受體的融合蛋白如通式(I)所示：

Ab-L- TGF-βRII ECD (I)

其中 TGF-βRII ECD 為 TGF-βRII 胞外區的截短形式；

Ab 為抗體；

L 為連接序列。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，其中該連接序列為 $(G_4S)_xG$，其中 x 為 3-6。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述的含有 TGF-β 受體的融合

蛋白，其中該連接序列為$(G_4S)_xG$，其中 x 為 4-5。

12. 一種醫藥組成物，其含有治療有效量的如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白，以及一種或多種藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑。

13. 一種 DNA 分子，其編碼如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白。

14. 一種表達載體，其含有如申請專利範圍第 13 項所述的 DNA 分子。

15. 一種宿主細胞，其含有如申請專利範圍第 14 項所述的表達載體，該宿主細胞選自細菌、酵母菌和哺乳動物細胞。

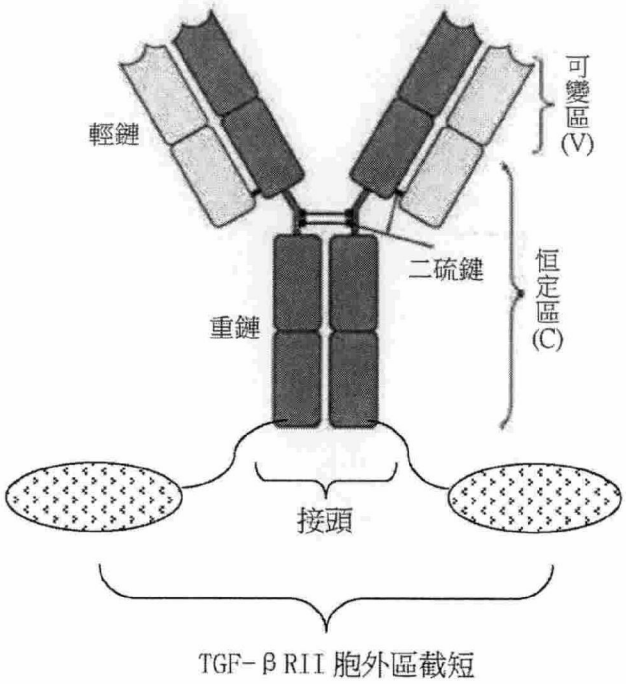
16. 如申請專利範圍第 15 項所述的宿主細胞，其中該宿主細胞為哺乳動物細胞。

17. 一種如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項所述的含有 TGF-β 受體的融合蛋白或如申請專利範圍第 12 項所述的醫藥組成物的用途，其用在製備用於腫瘤治療的藥物。

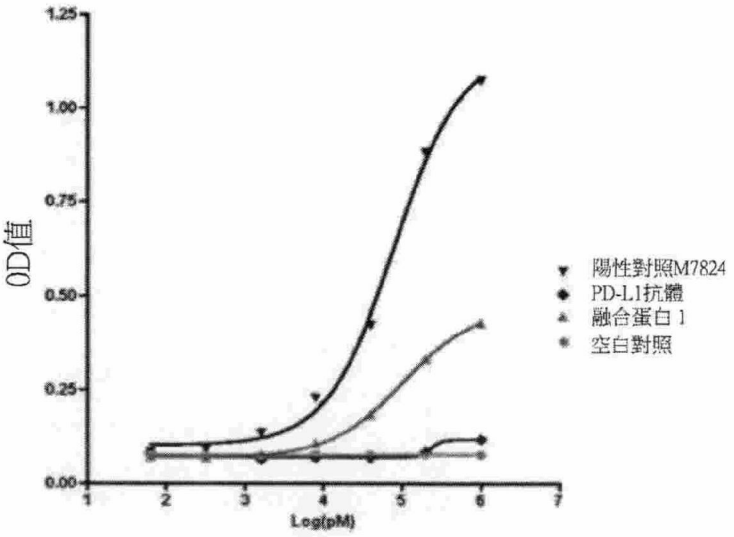
18. 如申請專利範圍第 17 項所述的用途，其用在製備用於治療 PD-L1 介導的腫瘤的藥物。

19. 如申請專利範圍第 17 項所述的用途，其用在製備用於治療表達 PD-L1 的癌症的藥物。

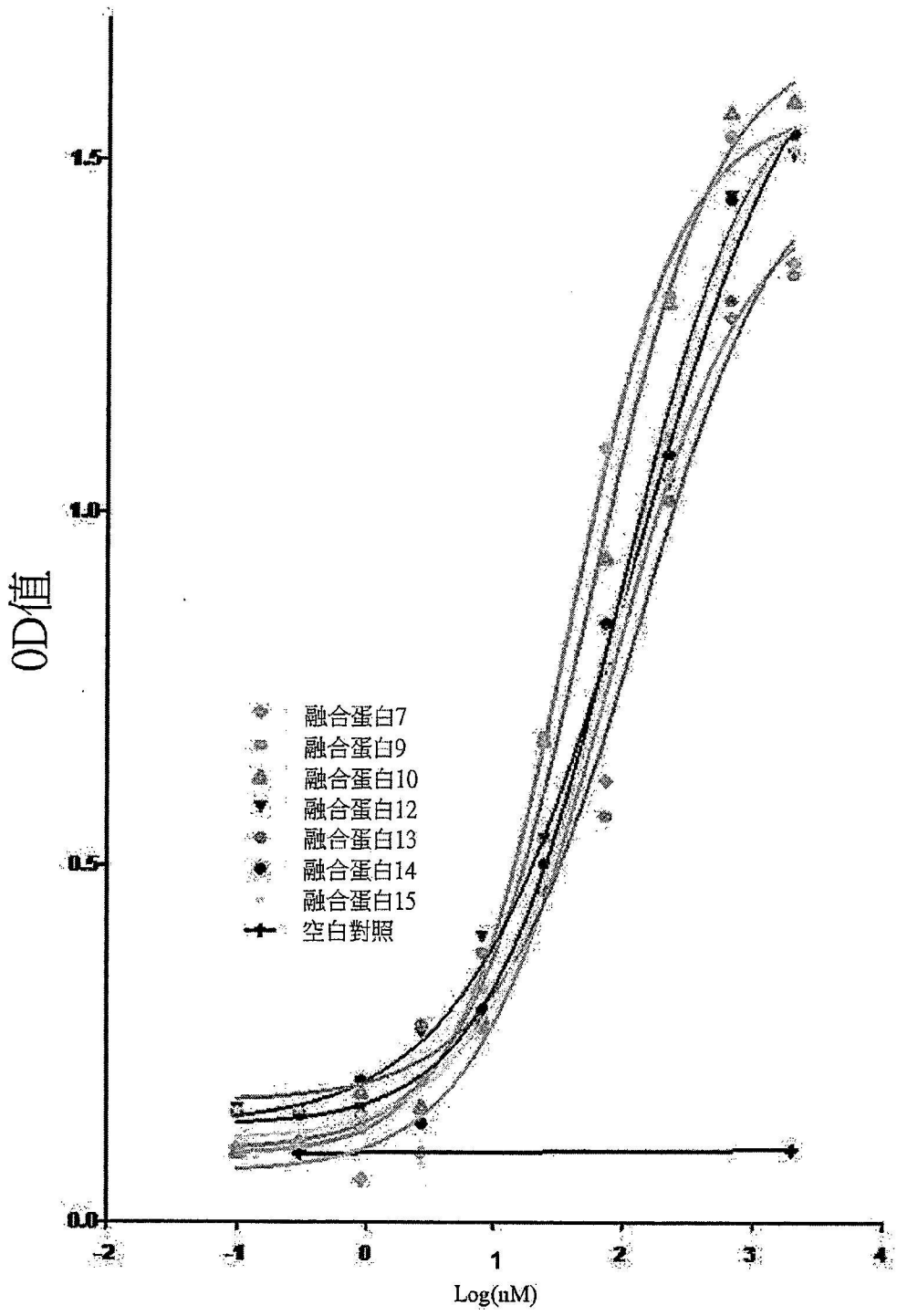
【發明圖式】


可變區(V)
輕鏈
二硫鍵
恒定區(C)
重鏈
接頭
TGF-β RII 胞外區截短

【第1圖】

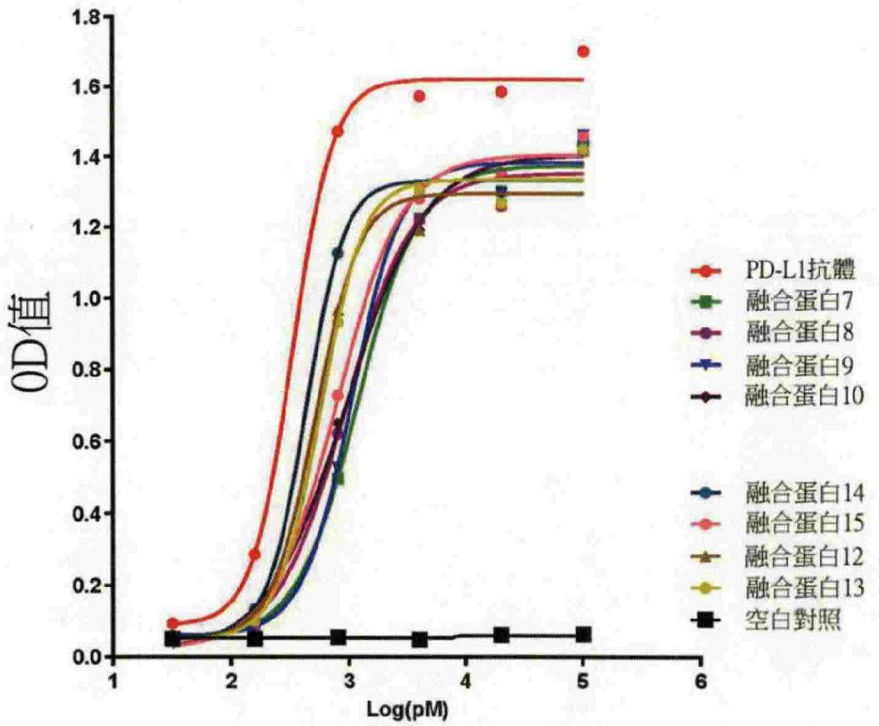

1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
OD值
1
2
3
4
5
6
7
Log(pM)
陽性對照M7824
PD-L1抗體
融合蛋白 1
空白對照

【第2圖】

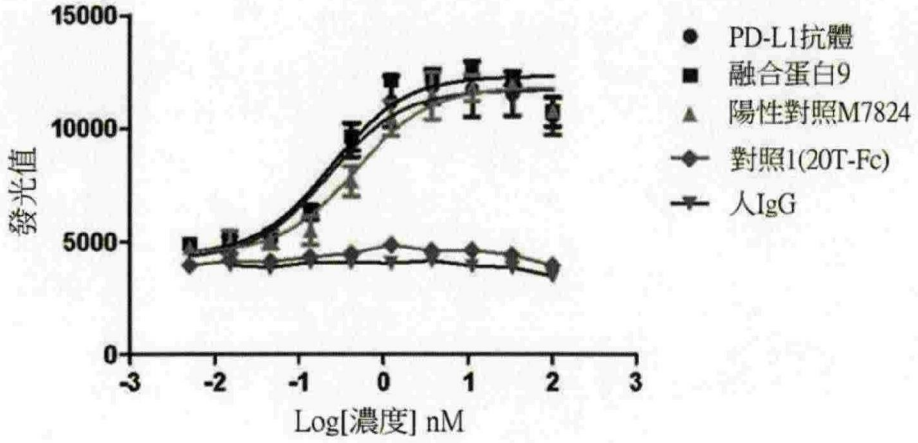

0D值
1.5
1.0
0.5
0.0
-2
-1
0
1
2
3
4
Log(uM)
融合蛋白7
融合蛋白9
融合蛋白10
融合蛋白12
融合蛋白13
融合蛋白14
融合蛋白15
空白對照

【第3圖】

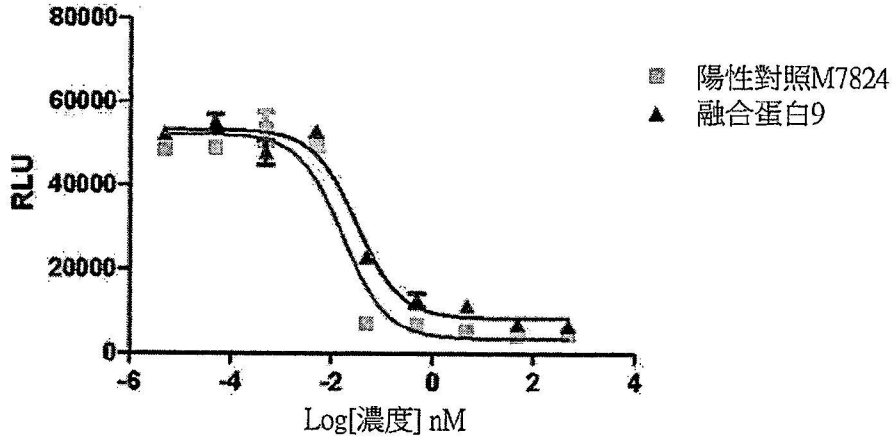
第 107116108 號專利申請案
113 年 10 月 4 日修正替換頁



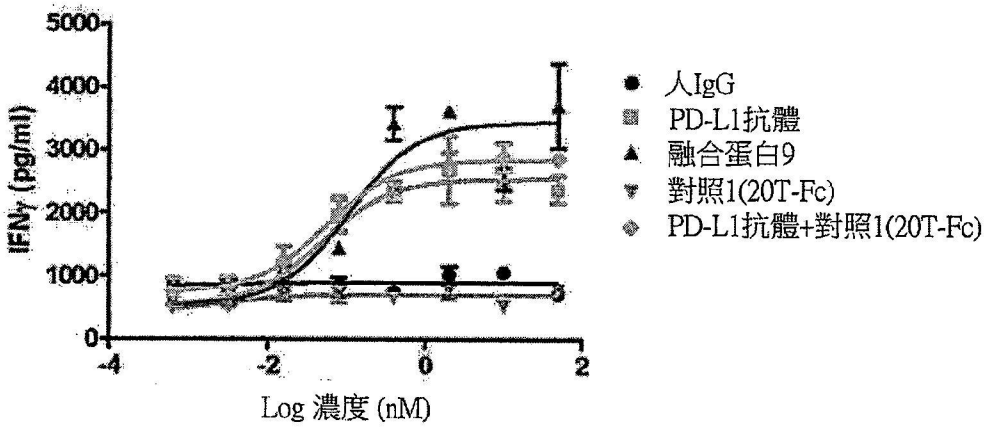
【第4圖】



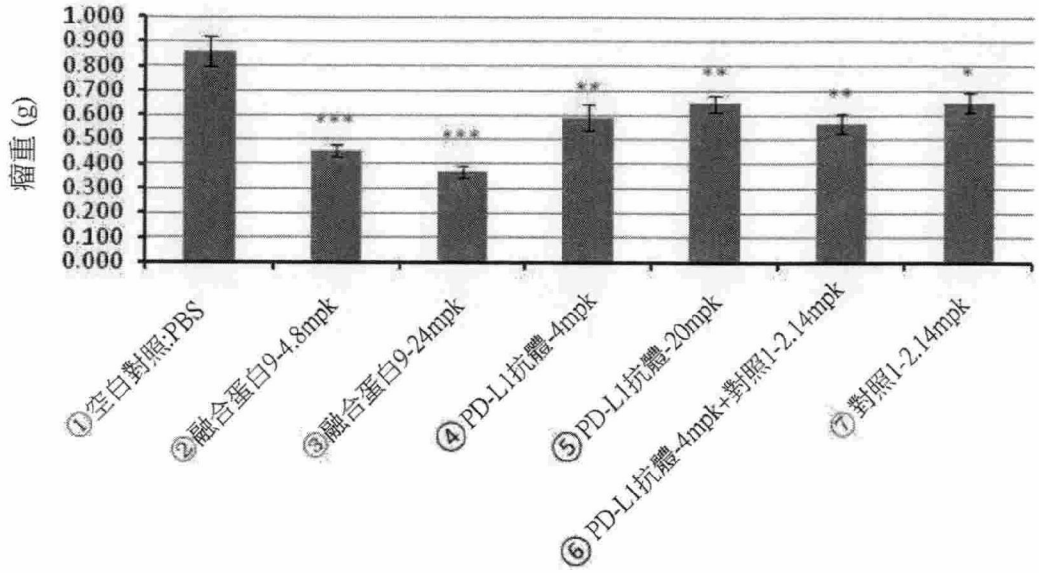
【第5圖】


80000
60000
40000
20000
0
RLU
-6
-4
-2
0
2
4
Log[濃度] nM
陽性對照M7824
融合蛋白9

【第6圖】


5000
4000
3000
2000
1000
0
IFNγ (pg/ml)
-4
-2
0
2
Log 濃度 (nM)
人IgG
PD-L1抗體
融合蛋白9
對照1(20T-Fc)
PD-L1抗體+對照1(20T-Fc)

【第7圖】


腫瘤重 (g)
1.000
0.900
0.800
0.700
0.600
0.500
0.400
0.300
0.200
0.100
0.000
***
***
**
**
**
*
①空白對照:PBS
②融合蛋白9-4.8mpk
③融合蛋白9-24mpk
④PD-L1抗體-4mpk
⑤PD-L1抗體-20mpk
⑥PD-L1抗體-4mpk+對照1-2.14mpk
⑦對照1-2.14mpk

【第8圖】