

(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
2022 年 1 月 27 日 (27.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/017487 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 38/16 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/108065

(22) 国际申请日: 2021 年 7 月 23 日 (23.07.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202010721371.4 2020 年 7 月 24 日 (24.07.2020) CN

(71) 申请人: 迈威 (上海) 生物科技股份有限公司
(MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.)

[CN/CN]; 中国上海市浦东新区李冰路 576 号 (张江创想园) 3 号楼 4 楼, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人: 张锦超(ZHANG, Jinchao); 中国上海市浦东新区李冰路 576 号 (张江创想园) 3 号楼 4 楼, Shanghai 201210 (CN)。王双(WANG, Shuang); 中国上海市浦东新区李冰路 576 号 (张江创想园) 3 号楼 4 楼, Shanghai 201210 (CN)。焦莎莎(JIAO, Shasha); 中国上海市浦东新区李冰路 576 号 (张江创想园) 3 号楼 4 楼, Shanghai 201210 (CN)。张畅(ZHANG, Chang); 中国上海市浦东新区李冰路 576 号 (张江创想园) 3 号楼 4 楼, Shanghai 201210 (CN)。王荣娟(WANG, Rongjuan); 中国上海市浦东新区李冰路 576 号 (张江创想园) 3 号楼 4 楼, Shanghai 201210 (CN)。曾大地(ZENG,

(54) Title: TGF- β RII MUTANT AND FUSION PROTEIN THEREOF

(54) 发明名称: TGF- β RII 突变体及其融合蛋白

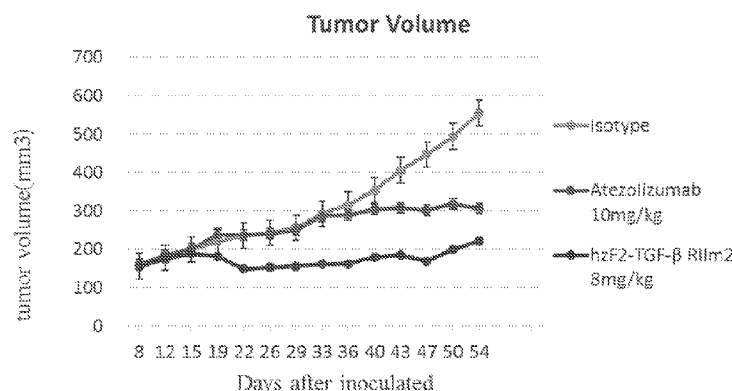


图 23

(57) Abstract: In view of the technical problem that TGF- β RII and a fusion protein thereof are prone to degradation and breakage during the process of recombinant expression, provided are a TGF- β RII mutant and a fusion protein thereof. Compared with the extracellular region of the wild-type TGF- β RII of SEQ ID NO: 6, the TGF- β RII mutant has a mutation selected from Gln at position 6, Asp at position 12, and Gly at position 20. The TGF- β RII mutant is capable of binding to TGF- β . Compared to wild-type TGF- β RII, the TGF- β RII mutant has less breakage and/or degradation during recombinant expression. It is convenient for large-scale production of antibodies/the TGF- β RII bifunctional protein with a more stable quality.

(57) 摘要: 针对TGF- β RII及其融合蛋白重组表达过程中易发生降解、断裂的技术问题, 提供一种TGF- β RII突变体及其融合蛋白, 所述TGF- β RII突变体与SEQ ID NO:6所述野生型TGF- β RII胞外区相比, 在选自第6位Gln、第12位Asp、第20位Gly处存在突变。TGF- β RII突变体能够结合TGF- β 。与野生型TGF- β RII相比, 所述TGF- β RII突变体在重组表达时具有更少的断裂和/或降解。便于大规模生产、质量更稳定的抗体/TGF- β RII双功能蛋白。

Dadi); 中国上海市浦东新区李冰路576号 (张江创想园) 3号楼4楼, Shanghai 201210 (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。

(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))。

TGF- β RII 突变体及其融合蛋白

本专利申请要求于 2020-07-24 日提交的申请号为 202010721371.4 的中国专利申请 5 的优先权益，在此将其全部内容引入作为参考。

技术领域

本发明涉及生物制药领域，特别是肿瘤治疗性蛋白药物领域，具体而言，本发明涉及一种 TGF- β RII 突变体、其融合蛋白及应用。

10

背景技术

程序性死亡因子配体 1 (PD-L1) 又称分化簇 274 (CD274) 或 B7 同源蛋白 1 (B7- H1)，属于 B7 家族成员，由 CD274 基因编码。成熟的 PD-L1 蛋白大小为 40kDa，是由 272 个氨基酸组成的一型跨膜蛋白，诱导表达于激活的 T 15 细胞、B 细胞、树突细胞、巨噬细胞、间充质干细胞、骨髓来源的肥大细胞和非造血细胞的表面上，在肿瘤组织上广泛表达，如肺癌，肝癌，膀胱癌等。在干扰素及其他炎症因子刺激应答的肿瘤组织和其他组织中都可能会迅速上调。PD-L1 的受体为程序性死亡蛋白 1 (PD-1)，也被称为 CD279，是 T 细胞受体 CD28 家族的成员，表达于多种免疫细胞，如激活的 T 细胞、B 细胞及单核细胞等表面。PD-L1 与其受体 PD-1 结合后，可诱导 T 细胞凋亡、20 失能、耗竭，进而抑制肿瘤抗原特异性 T 细胞的激活、增殖和抗肿瘤功能，实现肿瘤免疫逃逸。PD-1/PD-L1 阻断型抗体可以解除 PD-L1 的免疫抑制作用，增强体内免疫细胞如 T 细胞等对肿瘤细胞的识别和杀伤，从而达到杀灭肿瘤的作用。目前，全球范围内已上市多个靶向 PD-1/PD-L1 的抗体类药物，25 在临床上对黑色素瘤、肺癌、肾癌、霍奇金淋巴瘤、头颈鳞癌和尿路上皮癌等多种肿瘤显示出不错的治疗效果。但是，PD-1/PD-L1 治疗性抗体还存在一些问题，最主要的问题是临床上单独使用有效率偏低，对于绝大多数癌种来说，如果不加选择地单独使用，有效率平均只有 10%-20%。因此需要开发更加有效的抗体类药物分子以满足临床需求。

30 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是 TGF- β 超家族的一员，主要功能是调节细胞的生长和分化。TGF- β 在细胞表面有高亲和

力受体(TGF- β R),分为3个亚型:TGF- β RI、TGF- β RII、TGF- β RIII。TGF- β 通过与细胞膜表面具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的 TGF- β RII 结合形成复合物后,再与 TGF- β RI 形成复合物,进而传导信号,引起相应信号通路的激活,从而起到调节细胞增殖、分化和凋亡的功能。在肿瘤微环境中, 5 TGF- β 具有调控调节性 T 细胞(Tregs)发育,抑制 DC 细胞的成熟,抑制 B 细胞产生 IgA,抑制 NK 细胞的激活等作用,进而产生免疫抑制,促进肿瘤细胞生长以及转移。通过阻断 TGF- β 与其主要受体 TGF- β RII 结合,可以抑制 TGF- β 的促肿瘤活性。因此开发 TGF- β 阻断型药物是肿瘤治疗的一个重要方向。

10 目前以 TGF- β 通路为靶点的小分子抑制剂和大分子蛋白药物多个处于临床研究阶段,并且在与 PD-1/PD-L1 抗体药物联用方面有多个临床试验在进行中(表 1),且有文献对联用的机制进行了深入的探索。(Nature. 2018 Feb 22. doi: 10.1038/nature25492 ; Nature. 2018 Feb 22. doi: 10.1038/nature25501)。因此开发可以阻断 PD-1/PD-L1 和 TGF- β /TGF- β -R 15 双通路的疗法或药物,有望进一步解决肿瘤微环境免疫抑制的难题。

在 TGF- β 阻断剂与 PD-1/PD-L1 抑制剂联用的基础上,进一步发展了同时阻断 PD-1/PD-L1 和 TGF- β /TGF- β -R 双通路的药物。Merck& GSK 的 PD-L1 抗体与 TGF- β RII 形成的双功能抗体 M7824 的临床数据显示其对多种实体瘤具有确切的临床治疗效果(NCT02699515、NCT02517398、 20 NCT03427411)。针对 M7824 的结构 Merck 申请了多项专利,见 WO2015118175A2。陆续一些类似结构的双功能抗体,如恒瑞的 SHR-1701 也进入临床试验阶段(CTR20182404\CTR20181823)。目前已有抗体/TGF- β RII 融合蛋白公开的专利,如 WO2006074451A2、W02009152610A1、WO9309228A1、WO9409815A1、WO2015118175A2 等,但一些融合蛋白存 25 在不稳定的问题。在实际生产和应用中,仍需要开发更稳定和表达更高的抗体/TGF- β R 融合蛋白。

尽管 M7824 具有良好的抗肿瘤效果,但在生产过程中存在 TGF β RII 断裂的问题,为其在生产过程中的工艺和质量控制带来一定的难度。针对这一问题,恒瑞医药对 TGF β RII 进行了截断体的设计,专利 WO2018/205985 30 A1 研究发现,将 TGF β RII 的 N 端前 26 位氨基酸的截断体,尤其是 14-21 位氨基酸的缺失,可保持对 TGF β RII 的生理学功能,且具有更好的稳定性。抗体/TGF β RII 融合蛋白中与抗体部分相比 TGF β RII 部分的分子较小,

在融合蛋白中 TGF β RII 的功能易受到抗体分子的干扰甚至屏蔽,即使采用柔性 linker 也仅是一定程度上缓解该状况。将 TGF β RII 的 N 端截短则会进一步加剧抗体/TGF β RII 融合蛋白分子中两个功能部分之间分子大小的差异程度。

5 发明内容

本发明要解决的技术问题是:现有技术中抗体/TGF β RII 融合蛋白在生产过程中容易发生断裂和降解、使用 N 端截断的 TGF β RII 则会进一步加剧抗体/TGF β RII 融合蛋白两个功能部分的分子大小差异。

本发明经过研究发现抗体/TGF- β RII 融合蛋白存在不稳定的问题主要原因可能在于: C 末端通过连接肽连接 TGF- β RII 后,抗体与 TGF- β RII 之间会发生断裂,导致融合蛋白结构不完整,从而影响了融合蛋白的纯度和质量均一性,进而引发药物安全性和有效性方面的问题。在此基础上提供了一种对 TGF β RII 进行突变改造的技术方案,既克服抗体/TGF β RII 融合蛋白易断裂和降解的缺陷、又兼顾两个功能部分的分子大小均衡,提供一种更便于大规模生产、质量更稳定的 TGF- β RII 融合蛋白。具体而言:

一方面,本发明提供一种 TGF- β RII 突变体,其特征在于与野生型 TGF- β RII 相比,所述 TGF- β RII 突变体在一个或多个选自由以下位点所组成的组中的氨基酸残基位点处存在突变:第 6 位、第 12 位、第 20 位;其中,所述野生型 TGF- β RII 的氨基酸残基编码顺序根据 SEQ ID NO:6 确定。

进一步,本发明所述 TGF- β RII 突变体,其中所述突变体相对于野生型 TGF- β RII 具有选自下组中的一种或几种突变:Q6N, D12T, G20T。

进一步,本发明所述 TGF- β RII 突变体,其能够结合 TGF- β ,所述 TGF- β 包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3。

更进一步,本发明所述 TGF- β RII 突变体,其中与野生型 TGF- β RII 相比,所述 TGF- β RII 突变体在重组表达时具有更少的断裂和/或降解。

第二方面,本发明提供一种融合蛋白,其包括两个或更多个功能片段,其中至少一个功能片段具有如本发明第一方面所述 TGF- β RII 突变体的氨基酸序列。

进一步,本发明所述的融合蛋白,其中所述两个或更多个功能片段各自独立的发挥功能;

可选的,各功能片段之间通过多肽接头(Linker)连接。

进一步,本发明所述融合蛋白,其中所述功能片段还包括抗体或其抗原

结合部分、受体或其配体结合部分、细胞因子或其片段、细胞毒素或其变体、标记物或示踪物等。

更进一步，本发明所述融合蛋白，其中所述功能片段特异性结合选自以下组中的靶点：肿瘤或癌症免疫治疗靶点、慢性感染性疾病免疫治疗靶点、自身免疫性疾病治疗靶点。

更进一步，本发明所述融合蛋白，其中所述靶点包括包括表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR)、血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)、成纤维细胞生长因子受体 (FGFR)、胰岛素受体 (InsR)、布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK)、HER2、CTLA、CD20、CD52、CD30、CD33、CD133、PD-1、PD-L1、Src、Abl、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (PKB/Akt)、雷帕霉素靶体蛋白 (mTOR)、丝苏氨酸蛋白激酶 Ras、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、STAT1、STAT3、STAT5 等。

第三方面，本发明提供一种多功能活性分子，其具有两种或更多种功能活性，其中至少一种功能活性为 TGF- β 结合活性，且所述 TGF- β 结合活性由具有如本发明第一方面所述 TGF- β RII 突变体的氨基酸序列的多肽片段带来。

进一步，本发明所述多功能活性分子，其中，所述功能活性还包括抗原结合活性、配体结合活性、细胞因子活性、细胞毒性、标记活性。

进一步，本发明所述多功能活性分子，其特征在于所述功能活性还包括对以下分子的结合活性，表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR)、血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)、成纤维细胞生长因子受体 (FGFR)、胰岛素受体 (InsR)、布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK)、HER2、CTLA、CD20、CD52、CD30、CD33、CD133、PD-1、PD-L1、Src、Abl、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (PKB/Akt)、雷帕霉素靶体蛋白 (mTOR)、丝苏氨酸蛋白激酶 Ras、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、STAT1、STAT3、STAT5 等。

第四方面，本发明提供一种抗体-TGF- β RII 缀合分子，其中所述抗体靶向肿瘤治疗靶点，所述 TGF- β RII 具有本发明第一方面所述 TGF- β RII 突变体的氨基酸序列。

进一步，本发明所述抗体-TGF- β RII 缀合分子，其中所述抗体特异性靶向表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR)、血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)、成纤维细胞生长因子受体 (FGFR)、胰

胰岛素受体 (InsR)、布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK)、HER2、CTLA、CD20、CD52、CD30、CD33、CD133、PD-1、PD-L1、Src、Abl、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (PKB/Akt)、雷帕霉素靶体蛋白 (mTOR)、丝苏氨酸蛋白激酶 Ras、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、STAT1、STAT3、STAT5；优选 EGFR、
5 VEGFR、PDGFR、FGFR、HER2、CTLA、CD20、CD133、PD-1、PD-L1。

进一步，本发明所述抗体-TGF- β RII 缀合分子，其中所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、纳米抗体。本发明提供的抗体或其片段可以为单克隆抗体、单链抗体、单域抗体、双功能抗体、纳米抗体、完全或部分人源化的抗体或者嵌合抗体等任意形式；或者，
10 所述抗体或其片段为半抗体或半抗体的抗原结合片段，例如 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv；关于本发明提供的抗体的片段，优选地，所述片段为抗体的能够特异性结合 PD-1 的任何片段。本发明所述抗体或其抗原结合片段，其为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv。

15 优选的，本发明的抗体为 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM，更优选为 IgG1。抗体的片段选自所述抗体的 scFv、Fab、F(ab')₂ 或 Fv 片段。

优选地，所述抗体或其片段还包含人或鼠的恒定区，优选包含人或鼠的轻链恒定区 (CL) 和/或重链恒定区 (CH)；更优选地，所述抗体或其片段包含选自 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的重链恒定区和/或 κ 或 λ 型轻链恒定
20 区。根据本发明的具体实施方式，所述抗体为单克隆抗体，优选为鼠源、嵌合或人源化的单克隆抗体；更优选地，所述单克隆抗体的重链恒定区为 IgG1 或 IgG4 亚型。

进一步，本发明所述抗体-TGF- β RII 缀合分子，其中所述抗体为抗人 PD-L1 抗体或其抗原结合片段，其中抗人 PD-L1 抗体或其抗原结合片段的重
25 链具有 CDR1 为 SEQ ID NO:25、CDR2 为 SEQ ID NO:26、CDR3 为 SEQ ID NO:27，轻链具有 CDR1 为 SEQ ID NO:28、CDR2 为 SEQ ID NO:29、CDR3 为 SEQ ID NO:30。

进一步，本发明所述抗体-TGF- β RII 缀合分子，其中所述抗体为抗人 PD-L1 纳米抗体，抗人 PD-L1 纳米抗体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:20。

30 进一步，本发明所述抗体-TGF- β RII 缀合分子，其特征在于所述 TGF- β RII 通过连接肽与抗人 PD-L1 抗体连接，其中所述连接肽优选包括 (G₄S)_n，其中 n 为 1-4 的整数。

第五方面，本发明提供一种组合物，包含本发明第一方面所述的 TGF- β RII 突变体、本发明第二方面所述所述融合蛋白、本发明第三方面所述多功能活性分子、或本发明第四方面所述所述缀合物，以及药学上可接受的辅料。

第六方面，本发明提供一种核酸，其编码本发明第一方面所述的 TGF- β RII 突变体、本发明第二方面所述所述融合蛋白、本发明第三方面所述多功能活性分子、或本发明第四方面所述所述缀合物。

第七方面，本发明提供一种重组载体，其包括本发明第六方面所述的核酸。

第八方面，本发明提供一种重组宿主细胞，其包括本发明第六方面所述的核酸、或本发明第七方面所述重组载体。

第九方面，本发明提供一种制备产品的方法，其特征在于利用本发明第六方面所述核酸、第七方面所述重组载体、或第八方面所述重组宿主细胞，制备 TGF- β RII 突变体、其融合蛋白、其多功能活性分子、或其缀合物。

第十方面，本发明提供一种降低或消除重组蛋白降解或断裂的方法，所述重组蛋白包括 TGF- β RII 片段，所述方法包括对重组蛋白的 TGF- β RII 片段的编码区进行突变，使其编码的 TGF- β RII 相对于野生型 TGF- β RII 在一个或多个选自由以下位点所组成的组中的氨基酸残基位点处引入突变：第 6 位、第 12 位、第 20 位；所述野生型 TGF- β RII 的氨基酸残基编码顺序根据 SEQ ID NO:6 确定。

进一步，本发明所述降低或消除重组蛋白降解或断裂的方法，其中，所述 TGF- β RII 片段相对于野生型 TGF- β RII 具有选自下组中的一种或几种突变：Q6N，D12T，G20T。

第十一方面，本发明提供一种治疗疾病的方法，其包括对需要的受试者给予有效量选自下组的产品：本发明第一方面所述的 TGF- β RII 突变体、第二方面所述所述融合蛋白、第三方面所述多功能活性分子、第四方面所述所述缀合物、第五方面所述组合物、第六方面所述核酸、第七方面所述重组载体、或第八方面所述重组细胞。

进一步，本发明所述的方法，其中所述方法用于预防或治疗肿瘤或癌症、慢性感染性疾病、自身免疫性疾病。

进一步，本发明所述的方法，其中所述肿瘤或癌症优选咽鳞癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、肝癌、尿路上皮癌、结直肠癌、胃癌。

第十二方面，本发明提供一种产品在制备治疗药物中的用途，其中所述

产品包括本发明第一方面所述的 TGF- β RII 突变体、第二方面所述所述融合蛋白、第三方面所述多功能活性分子、第四方面所述所述缀合物、第五方面所述组合物、第六方面所述核酸、第七方面所述重组载体、或第八方面所述重组细胞。

5 进一步, 本发明所述制备治疗药物的用途, 其中所述药物用于预防或治疗肿瘤或癌症、慢性感染性疾病、自身免疫性疾病。

进一步, 本发明所述制备治疗药物的用途, 其中其中所述肿瘤或癌症优选咽鳞癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、肝癌、尿路上皮癌、结直肠癌、胃癌。

为更好理解本发明, 首先定义一些术语。其他定义则贯穿具体实施方式
10 部分而列出。

本文中的术语“抗体”意在包括全长抗体及其任何抗原结合片段(即, 抗原结合部分)或单链。全长抗体是包含至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白, 重链和轻链由二硫键连接。各重链由重链可变区(简称 VH)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域构成, 即 CH1、CH2 和 CH3。各轻链
15 由轻链可变区(简称 VL)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域 CL 构成。VH 和 VL 区还可以划分为称作互补决定区(CDR)的高变区, 其由较为保守的框架区(FR)区分隔开。各 VH 和 VL 由三个 CDR 以及四个 FR 构成, 从氨基端到羧基端以 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 的顺序排布。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以
20 介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合, 包括多种免疫系统细胞(例如, 效应细胞)和传统补系统的第一组分(C1q)。

本文所用的术语“分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。

本文中的术语, 抗体的“抗原结合片段”(或简称为抗体部分), 是指抗
25 体的保持有特异结合抗原能力的一个或多个片段。已证实, 抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来实施。包含在抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的例子包括(i)Fab 片段, 由 VL、VH、CL 和 CH1 构成的单价片段; (ii)F(ab')₂ 片段, 包含铰链区二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii)由 VH 和 CH1 构成的 Fd 片段; (iv)由抗体单臂 VL 和 VH 构成的 Fv 片段;
30 (v)由 VH 构成的 dAb 片段(Ward et al., (1989)Nature 341: 544-546); (vi)分离的互补决定区(CDR); 以及(vii)纳米抗体, 一种包含单可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由不

同的基因编码，它们可以通过重组法经由使两者成为单蛋白链的合成接头而连接，其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子(称为单链 Fc(scFv)；参见例如 Bird et al. , (1988)Science 242 : 423-426 ; and Huston et al. , (1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85: 5879-5883)。这些单链抗体也意在包括在
5 术语涵义中。这些抗体片段可以通过本领域技术人员已知的常用技术而得到，且片段可以通过与完整抗体相同的方式进行功能筛选。

本发明的抗原结合片段包括能够特异性结合抗原的那些。抗体结合片段的实例包括例如但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、单链 Fv (scFv) 片段和单结构域片段。

10 Fab 片段含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域 (CH1)。Fab' 片段与 Fab 片段的不同之处在于在重链 CH1 结构域的羧基末端处的少数残基的添加，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。通过切割在 F(ab')₂ 胃蛋白酶消化产物的铰链半胱氨酸处的二硫键产生 Fab' 片段。抗体片段的另外化学偶联是本领域普通技术人员已知的。Fab 和 F(ab')₂ 片段缺乏完
15 整抗体的片段可结晶 (Fc) 区，从动物的循环中更快速地清除，并且可能具有比完整抗体更少的非特异性组织结合(参见例如, Wahl 等人, 1983, J. Nucl. Med. 24:316)。

如本领域通常理解的，“Fc”区是不包含抗原特异性结合区的抗体的片段可结晶恒定区。在 IgG、IgA 和 IgD 抗体同种型中，Fc 区由两个相同的蛋
20 白质片段组成，衍生自抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域（分别为 CH2 和 CH3 结构域）。IgM 和 IgE Fc 区在每条多肽链中含有三个重链恒定结构域 (CH2、CH3 和 CH4 结构域)。

“Fv”片段是含有完整靶识别和结合位点的抗体的最小片段。该区域由以紧密的非共价结合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体 (VH-VL
25 二聚体) 组成。在该构型中，每个可变结构域的三个 CDR 相互作用，以限定在 VH-VL 二聚体的表面上的靶结合位点。通常，六个 CDR 对抗体赋予靶结合特异性。然而，在一些情况下，甚至单个可变结构域（或仅包含对于靶特异性的三个 CDR 的 Fv 的一半）可以具有识别且结合靶的能力，尽管其亲和力和力低于整个结合位点。

30 “单链 Fv”或“scFv”抗体结合片段包含抗体的 VH 和 VL 结构域，其中这些结构域存在于单条多肽链中。一般地，Fv 多肽进一步包含在 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，其致使 scFv 能够形成有利于靶结合的结构。

“单结构域片段”由对抗原显示出足够亲和力的单个 VH 或 VL 结构域组成。在一个具体实施方案中，单结构域片段是骆驼化的（参见例如，Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25 - 38）。

本发明的抗体包括衍生化抗体。例如，衍生化抗体通常通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团的衍生化、蛋白酶解切割、与细胞配体或其它蛋白质的连接来修饰。可以通过已知技术进行众多化学修饰中的任一种，所述技术包括但不限于特定的化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。另外，衍生物可以含有一种或多种非天然氨基酸，例如，使用 ambrx 技术（参见例如，Wolfson, 2006, Chem.Biol. 13 (10) :1011-2）。

多肽接头，也叫多肽连接臂、多肽 Linker，是用于连接两种功能活性分子的多肽类分子。融合蛋白中两种活性成分能够分别形成正确的空间结构、更好的发挥生物学功能，与连接融合蛋白中两种成分的接头序列密切相关。重组生成的融合蛋白要求插入融合蛋白中的 Linker 不能影响目的蛋白各自的功能。

针对 Linker 序列的设计和选择已有诸多相关的研究。目前的研究主要有两种，即（1）螺旋形式的 Linker 如[A(EAAAK)_nA]；（2）低疏水、低电荷效应的接头，包括可形成螺旋状的不同长度的肽链、柔性 Linker、葡萄糖球菌蛋白 A 等。Linker 的长度是另一重要因素，Linker 长度过长则使融合蛋白对蛋白酶比较敏感，导致活性融合蛋白在生产过程中产量下降；应用较短的 Linker 则可导致两个融合分子相距太近、影响蛋白功能。

与现有技术相比，本发明的技术方案具有以下优点：

第一、本发明通过重组抗体/TGF-β RII 融合蛋白的质谱分析结果，结合生物信息学分析确定了抗体/TGF-β RII 融合蛋白分子断裂、降解的位点，进一步通过设计氨基酸位点突变验证了所述断裂、降解位点，从而克服了抗体/TGF-β RII 融合蛋白重组表达过程中易发生降解的技术问题。

第二、本发明通过定点突变改造 TGF-β RII，不改变其氨基酸数量和长度，从而避免了与抗体等多亚基蛋白融合/缀合时分子量差异过大而导致的功能屏蔽或丧失。本发明对第 6、12、20 位氨基酸定点突变的 TGF-β RII 作为融合蛋白的组件不仅保持了对 TGF-β 的特异性结合活性，能够有效结合 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3；而且还保留了 TGF-β R 的生物学功能，在体内也能够阻断 TGF-β 与 TGF-β R 的结合，抑制 TGF-β 的促肿瘤活性，取得抗

肿瘤的效应功能。

第三、本发明还对与 TGF- β RII 融合的抗体进行了改造和选择，采用分子量相对较小的纳米抗体通过 linker 与 TGF- β RII 融合，既降低了双功能融合蛋白中两个组件大小的差异，同时也降低了重组双功能蛋白结构的复杂性，提供一种便于大规模生产、质量稳定的抗体/TGF- β RII 双功能蛋白及其制备方法。

附图说明

以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

图 1：12% 还原聚丙烯酰胺凝胶（SDS-page）电泳检测 H182-MUT4-TGF- β RII 融合蛋白 9-14 天表达细胞培养上清结果图。

图 2a：12%还原聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 H182-MUT4-TGF- β RII 融合蛋白突变体上清，其中：

原始： H182-MUT4-TGF- β RII 细胞培养上清；
m1： H182-MUT4-TGF- β RII m1 细胞培养上清；
m2： H182-MUT4-TGF- β RII m2 细胞培养上清；
m3： H182-MUT4-TGF- β RII m3 细胞培养上清。

图 2b：12%还原聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 H182-MUT4-TGF- β RII 融合蛋白突变体纯化后蛋白，其中：

原始： H182-MUT4-TGF- β RII 纯化蛋白；
m1： H182-MUT4-TGF- β RII m1 纯化蛋白；
m2： H182-MUT4-TGF- β RII m2 纯化蛋白；
m3： H182-MUT4-TGF- β RII m3 纯化蛋白。

图 3：H182-MUT4-TGF- β RII 重组蛋白 SEC-HPLC 分析结果图。

图 4a：H182-MUT4-TGF- β RII m1 重组蛋白 SEC-HPLC 分析结果图。

图 4b：H182-MUT4-TGF- β RII m2 重组蛋白 SEC-HPLC 分析结果图。

图 4c：H182-MUT4-TGF- β RII m3 重组蛋白 SEC-HPLC 分析结果图。

图 5：H182-MUT4-TGF- β RII m2 蛋白高温放置样品 SEC-HPLC 分析结果图。

红色线条：H182-MUT4-TGF- β RII m2-40C，样品瓶 1:A,1；进样 1；
通道 2489 ChA；

绿色线条：H182-MUT4-TGF- β RII m2-40C-1W，样品瓶 1:A,2；进样 1；通道 2489 ChA；

蓝色线条: H182-MUT4-TGF- β RIIIm2-40C-2W, 样品瓶 1:A,3; 进样 1; 通道 2489 ChA;

灰色线条: H182-MUT4-TGF- β RIIIm2-40C-3W, 样品瓶 1:A,4; 进样 1; 通道 2489 ChA。

5 图 6: H182-MUT4-TGF- β RIIIm2 蛋白反复冻融样品 SEC-HPLC 分析结果图。

红色线条: H182-MUT4-TGF- β RIIIm2-20C, 样品瓶 1:A,5; 进样 1; 通道 2489 ChA;

10 绿色线条: H182-MUT4-TGF- β RIIIm2-20C-冻融 1 次, 样品瓶 1:A,6; 进样 1; 通道 2489 ChA;

蓝色线条: H182-MUT4-TGF- β RIIIm2-20C-冻融 2 次, 样品瓶 1:A,7; 进样 1; 通道 2489 ChA;

灰色线条: H182-MUT4-TGF- β RIIIm2-20C-冻融 3 次, 样品瓶 1:A,8; 进样 1; 通道 2489 ChA。

15 图 7: 12%还原聚丙烯酰胺凝胶电泳检测抗人 PD-L1 抗体/TGF- β RII 融合蛋白 10、15 天培养上清。

图 8: M7824 15 天培养上清纯化后蛋白 SEC-HPLC 分析结果图。

图 9: hzF2-TGF- β RIIIm2 15 天培养上清纯化后蛋白 SEC-HPLC 分析结果图。

20 图 10: hzF2-TGF- β RIIIm2 对人 PD-L1 胞外区重组蛋白亲和力分析结果图。

图 11: M7824 对人 PD-L1 胞外区重组蛋白亲和力分析结果图。

图 12: hzF2-TGF- β RIIIm2 对人 TGF- β 1 重组蛋白亲和力分析结果图。

25 图 13: M7824 对人 TGF- β 1 重组蛋白亲和力分析结果图。

图 14: ELISA 检测 hzF2-TGF- β RIIIm2 融合蛋白对人 PD-L1 胞外区重组蛋白结合活性结果图。

图 15: ELISA 检测 hzF2-TGF- β RIIIm2 融合蛋白对人 TGF- β 1 重组蛋白结合活性结果图。

30 图 16: ELISA 检测 hzF2-TGF- β RIIIm2 融合蛋白对人 TGF- β 2 重组蛋白结合活性结果图。

图 17: ELISA 检测 hzF2-TGF- β RIIIm2 融合蛋白对人 TGF- β 3 重组

蛋白结合活性结果图。

图 18: FACS 检测 hzF2-TGF- β RII_{m2} 融合蛋白对细胞表面天然 PD-L1 蛋白结合活性结果图。

图 19: ELISA 检测 hzF2-TGF- β RII_{m2} 融合蛋白对人 PD-L1 与其受体 PD-1 结合的抑制作用。

图 20: hzF2-TGF- β RII_{m2} 融合蛋白的生物学活性检测。

图 21: PBMC 免疫重建小鼠皮下移植瘤体积统计。

图 22: PBMC 免疫重建小鼠皮下移植瘤重统计。

图 23: hzF2-TGF- β RII_{m2} 融合蛋白在人 CD34+脐带血干细胞人源化小鼠皮下接种 HCC827 肿瘤模型上的抗肿瘤活性评价结果图。

具体实施方式

本发明针对 TGF- β RII 及其融合蛋白重组表达过程中易发生降解、断裂的技术问题,提供一种 TGF- β RII 突变体及其融合蛋白,所述 TGF- β RII 突变体与 SEQ ID NO:6 所述野生型 TGF- β RII 胞外区相比,在选自第 6 位 Gln、第 12 位 Asp、第 20 位 Gly 处存在突变。TGF- β RII 突变体能够结合 TGF- β 。与野生型 TGF- β RII 相比,所述 TGF- β RII 突变体在重组表达时具有更少的断裂和/或降解。便于大规模生产、质量更稳定的抗体/TGF- β RII 双功能蛋白及其融合蛋白。以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的药材原料、试剂材料等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

实施例 1: 抗人 PD-L1 抗体/TGF- β RII 融合蛋白及对照品样品制备

1.1 抗人 PD-L1 抗体/TGF- β RII 融合蛋白的制备

通过 PCR 的方法,将编码 PD-L1 抗体 H182-MUT4 (MW22,来源专利申请号: CN201911419802.5)的重链核苷酸序列 (SEQ ID NO. 1) C 端经连接肽编码核苷酸序列 (SEQ ID NO. 3) 和 TGF- β RII 胞外区编码核苷酸序列 (SEQ ID NO. 5) 连接,获得含 PD-L1 抗体重链-TGF- β RII 编码序列 H182-MUT4-H-TGF- β RII, (SEQ ID NO. 9), 将 H182-MUT4-H-TGF- β RII 编码核苷酸序列和 PD-L1 抗体轻链 (H182-MUT4-L) 编码核苷酸序列 (SEQ

ID NO. 7) 通过酶切连接, 克隆至含有谷氨酰氨合成酶 (GS) 筛选基因的
稳定表达载体中, 构建用于稳定转染的真核表达载体 H182-MUT4-TGF- β RII,
转入大肠杆菌扩增, 分离获得大量 H182-MUT4-TGF- β RII 的真核表达质
粒。将制备好的 H182-MUT4-TGF- β RII 真核表达质粒, 电转染(Nucleofector
5 IIb, Lonza) 悬浮培养的 CHO-K1 细胞, 通过 MSX 加压筛选, 获得稳定表
达 H182-MUT4-TGF- β RII 融合蛋白的细胞。将细胞进行流加培养, 每天观
察细胞密度和活力, 并于第 9 天开始每天收集部分细胞培养上清, 直至细胞
活力<20%时, 将全部细胞培养液经高速离心后收集上清, 并将部分上清利
用 ProA 亲和层析柱对表达上清进行纯化, 获得抗人 PD-L1 抗体/TGF- β RII
10 融合蛋白 H182-MUT4-TGF- β RII。

1.2 抗人 PD-L1 抗体/TGF- β RII 融合蛋白对照品的制备

人工全合成 M7824 轻链和重链-TGF- β RII 基因 (专利 WO2015/118175
A2 序列), 通过酶切连接, 克隆至含有谷氨酰氨合成酶 (GS) 筛选基因的稳
定表达载体中, 构建完成用于稳定转染的真核表达载体, 通过电转染
15 (Nucleofector IIb, Lonza) 悬浮培养的 CHO-K1 细胞, MSX 加压筛选, 获
得稳定表达 M7824 重组蛋白的细胞。培养细胞并进行表达、纯化, 可获得
重组蛋白 M7824 作为对照样品。

实施例 2: H182-MUT4-TGF- β RII 断裂位点分析

20 2.1 H182-MUT4-TGF- β RII SDS-PAGE 电泳分析

将 H182-MUT4-TGF- β RII 表达上清进行还原 SDS-PAGE 电泳分析。结
果显示 (图 1), 电泳中有三条清晰条带, 其中大于 70KDa 的为
H182-MUT4-TGF β RII 重链融合蛋白链, 20-30KDa 之间的为抗 PD-L1 抗体
H182-MUT4 轻链, 而在 50-70KDa 的蛋白 marker 处有一明确蛋白条带, 推
25 测为脱落了 TGF β RII 的 H182-MUT4 重链, 该断裂蛋白条带的比例随着表
达细胞培养时间的延长而增加。M7824 分析结果和 H182-MUT4-TGF β RII
分析结果相似, 同样存在断裂条带的问题。

2.2 H182-MUT4-TGF- β RII 断裂位点质谱分析

收集 SDS-PAGE 电泳中分子量在 50-70KDa 之间的条带, 样品中加入脱
30 色缓冲液进行充分的脱色处理, 然后加入还原缓冲液进行还原处理, 还原处

理后加入胰酶，37℃过夜酶解。最后抽提酶解产物并脱盐处理，最后用 0.1% 甲酸水溶液复溶肽段，以备后续质谱分析。质谱分析时取适量样品肽段使用纳升流速 Easy nLC 1200 色谱系统(Thermo Scientific)进行色谱分离。肽段分离后用 Q-Exactive Plus 质谱仪 (Thermo Scientific) 进行 DDA (数据依赖采集) 质谱分析。最终选用 MaxQuant 1.6.1.0 质谱数据库检索软件进行比对分析。质谱分析结果如下表 1 所示，结果显示，该样品缺失 478 位氨基酸 (含) 以后片段，结合胰酶消化的可能位点在氨基酸 Lys 和 Arg 之后，综合分析认为，H182-MUT4-TGFβ RII 重链可能在 477/478 位氨基酸位置发生了断裂。

表 1. H182-MUT4-TGF-β RII 质谱分析结果

Sequence	Length	Proteins	Start position	End position
VVSVLTVLHQDWLNGK	16	H182-MUT4-H-TGF-β RII	304	319
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	23	H182-MUT4-H-TGF-β RII	419	441
NQVSLTCLVK	10	H182-MUT4-H-TGF-β RII	363	372
FNWYVDGVEVHNAK	14	H182-MUT4-H-TGF-β RII	277	290
DTLMISR	7	H182-MUT4-H-TGF-β RII	251	257
GPSVFPLAPSSK	12	H182-MUT4-H-TGF-β RII	124	135
EVQLVQSGAEVK	12	H182-MUT4-H-TGF-β RII	1	12
VTITADTSTNTAYMELSSLR	20	H182-MUT4-H-TGF-β RII	68	87
DIYMHVWQQAPGK	13	H182-MUT4-H-TGF-β RII	31	43
EPQVYTLPPSR	11	H182-MUT4-H-TGF-β RII	347	357
GLEWMGR	7	H182-MUT4-H-TGF-β RII	44	50
ALPAPIEK	8	H182-MUT4-H-TGF-β RII	329	336
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	26	H182-MUT4-H-TGF-β RII	225	250
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	22	H182-MUT4-H-TGF-β RII	373	394
EPQVYTLPPSRDELTK	16	H182-MUT4-H-TGF-β RII	347	362
TPPVLDSGDSFFLYSK	17	H182-MUT4-H-TGF-β RII	395	411
IDPANANTK	9	H182-MUT4-H-TGF-β RII	51	59
SLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGIPPHVQK	36	H182-MUT4-H-TGF-β RII	442	477
SCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPK	30	H182-MUT4-H-TGF-β RII	221	250

实施例 3：抗人 PD-L1 抗体/TGF-β RII 融合蛋白突变体设计、表达与分析

3.1 抗人 PD-L1 抗体/TGF-β RII 融合蛋白突变体设计与表达

根据对断裂位点的推测，在 TGF-β RII 的 N 端酶切位点前后通过糖基化位点的设计实现对切割位点的保护作用，从而阻止切割的发生，突变体设计见表 2。利用 StarMut 基因定点突变试剂盒 (GenStar, Cat:T111-01)，对抗人 PD-L1 抗体/TGF-β RII 融合蛋白 H182-MUT4-TGF-β RII 表达载体中的 TGF-β RII 胞外区编码核苷酸序列进行定点突变，获得突变体表达质粒，随后表达质粒转入大肠杆菌扩增，获得抗人 PD-L1 抗体/TGF-β RII 突变体

质粒 H182-MUT4-TGF- β RII m1, H182-MUT4-TGF- β RII m2 和 H182-MUT4-TGF- β RII m3。将制备好的 H182-MUT4-TGF- β RII m1, H182-MUT4-TGF- β RII m2 和 H182-MUT4-TGF- β RII m3 质粒, 电转染 (Nucleofector IIb, Lonza) 悬浮培养的 CHO-K1 细胞, 通过 MSX 加压筛选, 5 获得稳定表达 PD-L1 抗体/TGF- β RII 突变体融合蛋白的细胞。将 H182-MUT4-TGF- β RII 及其突变体 H182-MUT4-TGF- β RII m1, H182-MUT4-TGF- β RII m2 和 H182-MUT4-TGF- β RII m3 细胞进行流加培养, 每天观察细胞密度和活力, 直至细胞活力<20%时, 将全部细胞培养液经高速离心后收集上清, 并将部分上清利用 ProA 亲和层析柱对表达上清进行纯化, 10 获得 H182-MUT4-TGF- β RII 融合蛋白及其突变体样品。

表 2. TGF- β RII 胞外区序列突变设计

H182-MUT4-H-TGF- β RII	突变位点
H182-MUT4-H-TGF- β RII m1	G490T
H182-MUT4-H-TGF- β RII m2	Q476N
H182-MUT4-H-TGF- β RII m3	D482T

3.2 H182-MUT4-TGF- β RII 及其突变体 SDS-PAGE 电泳检测

将 H182-MUT4-TGF- β RII 融合蛋白及其突变体样品表达上清及纯化后蛋白进行还原 SDS-PAGE 电泳。结果显示(图 2), H182-MUT4-TGF- β RII 15 突变体蛋白电泳中有两条清晰条带, 其中大于 70KDa 的为 H182-MUT4-TGF- β RII 重链融合蛋白链, 20-30KDa 之间的为抗 PD-L1 抗体 H182-MUT4 轻链, 而在 50-70KDa 处的脱落了 TGF- β RII 的 H182-MUT4 重链条带完全消失。

3.3 H182-MUT4-TGF- β RII 及其突变体 SEC-HPLC 检测

20 将 H182-MUT4-TGF- β RII 及其突变体 H182-MUT4-TGF- β RII m1, H182-MUT4-TGF- β RII m2 和 H182-MUT4-TGF- β RII m3 蛋白样品进行 SEC-HPLC 分析。结果显示, H182-MUT4-TGF- β RII 有明显的降解片段特征峰 (图 3, 表 3), 而经突变改造后, 降解问题得以解决, 降解片段特征峰消失, HPLC 主峰纯度明显增加 (图 4, 表 3)。

25 表 3. 双功能蛋白抗人 PD-L1 抗体/TGF- β RII 融合蛋白 SEC-HPLC 纯度检

测

	SEC-HPLC (%)			
	峰 1	峰 2 (主峰)	峰 3	峰 4
H182-MUT4-TGF- β RII	2.9	59.57	30.76	6.77
H182-MUT4-TGF- β RII _{m1}	1.13	98.87	/	/
H182-MUT4-TGF- β RII _{m2}	1.99	98.01	/	/
H182-MUT4-TGF- β RII _{m3}	0.31	99.69	/	/

实施例 4: 抗人 PD-L1 抗体/TGF- β RII 融合蛋白突变体的稳定性检测

将双功能蛋白 H182-MUT4-TGF- β RII_{m2} 样品在 40°C 条件下放置三周，每周收集一管样品，分析放置稳定性；另外和-20°C反复冻融 3 次，每次收集一管样品，分析冻融稳定性。将处理好的样品与一直放置于 4 度的对照品，经过 SEC-HPLC 测定样品的纯度，验证样品的稳定性。结果如图 5，6 所示，高温放置和反复冻融样品的纯度与对照样品基本一致，产品稳定，未发生断裂。

10

实施例 5: 抗人 PD-L1 抗体/TGF- β RII 融合蛋白的亲合力测定

利用 Fortebio 公司的 Octet QKe system 仪器，采用抗人抗体 Fc 段的捕获抗体（AHC）生物探针捕获抗体 Fc 段的方法测定抗体亲和力。测定时将双功能蛋白 H182-MUT4-TGF- β RII，H182-MUT4-TGF- β RII_{m1}，H182-MUT4-TGF- β RII_{m2}，H182-MUT4-TGF- β RII_{m3}，H182-MUT4，TGF- β RII-hFc（Cat: CC10，近岸科技）用 PBS 缓冲液稀释至 5ug/mL，流经 AHC 探针（Cat: 18-5060，PALL）表面，时间为 120s。分别以人 PD-L1-His 重组蛋白和人 TGF β 1 重组蛋白（Cat: CA59，近岸科技）作为流动相，浓度为 60nM。结合时间为 300s，解离时间为 300s。实验完毕，扣除空白对照响应值，用软件进行 1: 1 Langmuir 结合模式拟合，计算抗原抗体结合的动力学常数。结果如表 4 所示，与 H182-MUT4、TGF- β RII-hFc 相比，双功能蛋白 H182-MUT4-TGF β RII，H182-MUT4-TGF- β RII_{m1}，H182-MUT4-TGF- β RII_{m2} 和 H182-MUT4-TGF- β RII_{m3} 对 PD-L1、TGF β 1 的亲和力无明

20

显改变。

表 4. 双功能蛋白抗人 PD-L1 抗体/TGF- β RII 融合蛋白亲和力测定结果

	KD 值(M)	
	PD-L1	TGF β 1
H182-MUT4-TGF- β RII	3.81E-10	1.45E-09
H182-MUT4-TGF- β RII m1	2.97E-10	1.14E-09
H182-MUT4-TGF- β RII m2	3.05E-10	1.34E-09
H182-MUT4-TGF- β RII m3	3.11E-10	1.22E-09
H182-MUT4	4.33E-10	/
TGF- β RII-hFc	/	1.24E-09

实施例 6: 抗人 PD-L1 纳米抗体/TGF- β RII 突变体融合蛋白的设计与表达

5 通过 PCR 的方法, 将人源化抗人 PD-L1 纳米抗体 hzF2 编码核苷酸序列(来源专利申请号: CN202010324761.8) (SEQ ID NO. 19) C 端经由连接肽编码核苷酸序列 (SEQ ID NO. 2) 连入 TGF- β RII m2 编码核苷酸序列 (SEQ ID NO. 13), 获得含 PD-L1 纳米抗体-TGF- β RII m2 编码核苷酸序列 hzF2-TGF- β RII m2 (SEQ ID NO. 23), 并通过酶切位点, 克隆至含有谷氨酰氨合成酶 (GS) 筛选基因的

10 稳定表达载体中, 构建完成用于稳定转染的真核表达载体 hzF2m9-TGF- β RII m2, 转入大肠杆菌扩增, 分离获得大量含表达 hzF2-TGF- β RII m2 融合蛋白的质粒。将制备好的质粒, 电转染 (Nucleofector IIb, Lonza) 悬浮培养的 CHO-K1 细胞, 通过 MSX 加压筛选, 获得稳定表达 hzF2-TGF- β RII m2 融合蛋白的细胞 hzF2-TGF- β RII m2。培养细胞并进行表达、纯化, 可获得 hzF2-TGF- β RII m2 突变体融合蛋白 hzF2-TGF- β RII m2。

15

实施例 7: hzF2-TGF- β RII m2 融合蛋白的纯度检测

将 M7824 及 hzF2-TGF- β RII m2 细胞进行流加培养, 每天观察细胞密

度和活力，并于培养中期第 10 天收集部分细胞培养液；培养后期细胞活力 <20% 时（15 天），收集剩余细胞培养液；两次培养液分别经高速离心后收集上清，并将上清利用 ProA 亲和层析柱对表达上清进行纯化，定量后，并分装备用。将上述表达上清进行还原 SDS-PAGE 电泳及 SEC-HPLC 检测。

- 5 SDS-PAGE 结果显示(图 7), M7824 电泳中有三条清晰条带，其中大于 70KDa 的为 M7824 重链融合蛋白链, 20-30KDa 之间的为 M7824 轻链, 在 50-70KDa 的蛋白 marker 处有一明确蛋白条带，推测为脱落了 TGF- β RII 的 M7824 重链，且该断裂随培养时间的延迟而比例增加；而 hzF2-TGF- β RII_{m2} 电泳中在 50-70Kda 之间有明确的主带，没有明显的其他蛋白条带。SEC-HPLC
10 鉴定结果如图 8,9 和表 5 所示，M7824 有明显的低分子量的片段峰，而 hzF2-TGF- β RII_{m2}，降解现象得到明显改善。

表 5. 抗人 PD-L1 抗体/TGF- β RII 融合蛋白 SEC-HPLC 纯度检测

	SEC-HPLC (%)			
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
M7824	1.65	50.47	36.57	11.31
hzF2-TGF- β RII _{m2}	3.23	96.08	0.69	

实施例 8: hzF2-TGF- β RII_{m2} 融合蛋白的亲合力分析

- 15 利用 Fortebio 公司的 Octet QKe system 仪器，采用抗人抗体 Fc 段的捕获抗体（AHC）生物探针捕获抗体 Fc 段的方法测定抗体亲和力。测定时将抗体（hzF2-TGF- β RII_{m2} 和 M7824）用 PBS 缓冲液稀释至 4ug/mL，流经 AHC 探针（Cat:18-0015, PALL）表面，时间为 120s。人 PD-L1-his 重组蛋白（序列号：NP_054862.1, 19aa-238aa）、人 TGF- β 1(Cat: CA59, Novoprotein)
20 作为流动相，结合时间为 300s，解离时间为 300s。实验完毕，扣除空白对照响应值，用软件进行 1: 1 Langmuir 结合模式拟合，计算抗原抗体结合的动力学常数。

- 结果显示 hzF2-TGF- β RII_{m2} 及对照抗体 M7824 与人 PD-L1 重组蛋白的反应曲线如图 10, 11 所示，与人 TGF- β 1 重组蛋白的反应曲线如图 12,
25 13 所示。拟合曲线并计算亲和力， hzF2-TGF- β RII_{m2} 对 PD-L1 亲和力

(KD) 为 $1.58 \times 10^{-9} \text{M}$, 对 TGF- β 1 亲和力 (KD) 为 $2.46 \times 10^{-9} \text{M}$; M7824 对 PD-L1 亲和力 (KD) 为 $3.21 \times 10^{-9} \text{M}$, 对 TGF- β 1 亲和力 (KD) 为 $2.81 \times 10^{-9} \text{M}$ 。详细动力学参数如下表,6 所示。结果表明 hzF2-TGF- β RIIIm2 与人 PD-L1、TGF- β 1 具有高亲和力。

5 表 6. hzF2-TGF- β RIIIm2 融合蛋白的亲和力测定结果

	PD-L1-			TGF- β 1		
	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
hzF2-TGF- β RIIIm2	1.58×10^{-9}	4.35×10^5	6.87×10^{-4}	2.46×10^{-9}	1.15×10^5	2.83×10^{-4}
M7824	3.21×10^{-9}	2.05×10^5	6.59×10^{-4}	2.81×10^{-9}	1.19×10^5	3.33×10^{-4}

实施例 9: ELISA 检测 hzF2-TGF- β RIIIm2 融合蛋白的结合活性

将人 PD-L1-his 重组蛋白 (序列号: NP_054862.1, 19aa-238aa)、人 TGF- β 1 (Cat: CA59, Novoprotein)、人 TGF- β 2 (Cat: CJ79, Novoprotein)、人 TGF- β 3 (Cat: CJ44, Novoprotein), 浓度 $1 \mu\text{g/mL}$, 4°C 包被过夜, 用 5% BSA 于 37°C 恒温培养箱封闭 60 min。将 hzF2-TGF- β RIIIm2 和对照抗体 M7824 以及同型对照 NC-hIgG1 (起始浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$, 3 倍连续稀释, 12 个梯度), 37°C 恒温培养箱反应 60 min 后, PBST 洗板 4 次; 然后加入 1:5000 稀释的 HRP-anti-human Fc (Cat: 109-035-098, Jackson Immuno Research), 反应 45min, PBST 洗板 4 次, 加入 TMB (Cat: ME142, 北京泰天河生物) 底物显色 15 min, 2M HCl 终止后读板。读取并记录波长 450 nm 下孔板的吸光度值。

结果显示 hzF2-TGF- β RIIIm2 对人 PD-L1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 的结合活性与 M7824 基本相当, 半数有效结合浓度 (EC50) 值分别为 0.261nM, 0.394nM, 18.045nM 和 1.121nM; 而 M7824 对人 PD-L1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 的半数有效结合浓度 (EC50) 值分别为 0.209nM, 0.472nM, 18.172nM 和 0.981nM (图 14-17)。

实施例 10: FACS 检测 hzF2-TGF- β RIIIm2 融合蛋白的结合活性

将天然表达人 PD-L1 的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 以 $2 \times 10^4 \text{cells/样}$ 品加入至 96 孔细胞培养板, 加入 5% BSA 封闭细胞, 室温孵育 30min, 直接加入 hzF2-TGF- β RIIIm2 和对照抗体 M7824 以及同型对照 NC-hIgG1 (起

始浓度为 10nM, 3 倍连续稀释, 12 个梯度), 冰上孵育 1h; 冰冷 PBS (含 0.05% 吐温) 洗涤细胞 2 遍; 然后加入 1:200 稀释的 Goat Anti human IgG Fc-FITC (Cat: F9512, Sigma), 冰上孵育 45min, 冰冷 PBS (含 0.05% 吐温) 洗涤细胞 2 遍, 重悬于 200 μ L PBS 中, 流式细胞仪检测平均荧光强度 (MFI) 值。

结果显示 hzF2-TGF- β RIIIm2 和 M7824 对细胞表面的 PD-L1 半数有效结合浓度 (EC50) 值分别为 0.0717nM 和 0.197nM (图 18)。

实施例 11: ELISA 检测 hzF2-TGF- β RIIIm2 融合蛋白的阻断活性

将人 PD-1-hFc 重组蛋白 (序列号: NP_005009.2, 21aa-167aa), 浓度 1 μ g/mL, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜, 用 5% BSA 于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱封闭 60 min。加入 50 μ l hzF2-TGF- β RIIIm2 和对照抗体 M7824 以及同型对照 NC-hIgG1 (起始浓度为 60nM, 1.5 倍连续稀释, 12 个梯度), 然后再加 50 μ l 浓度为 1 μ g/ml PD-L1-mFc (序列号: NP_054862.1, 19aa-238aa), 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱反应 60min 后, PBST 洗板 4 次; 然后加入 1:5000 稀释的 HRP-anti-mouse Fc (Cat: 115-035-071, Jackson Immuno Research), 反应 45min, PBST 洗板 4 次, 加入 TMB (Cat: ME142, 北京泰天河生物) 底物显色 15 min, 2M HCl 终止后读板。读取并记录波长 450 nm 下孔板的吸光度值。

结果显示 hzF2-TGF- β RIIIm2 可以有效阻断重组人 PD-L1 与其受体 PD-1 的结合作用。通过 ELISA 测定了 hzF2m9-TGF- β RIIIm2 和 M7824 对人 PD-L1 与其受体 PD-1 结合的竞争抑制效应, 其半数有效抑制浓度 (IC50) 值分别 7.533nM 和 6.935nM (图 19)。

实施例 12: hzF2-TGF- β RIIIm2 融合蛋白阻断 PD-L1 与其受体 PD1 结合的细胞学活性观察

取重组表达人 PD-L1 和 anti-CD3-ScFv 的 CHO 细胞 (CHO-PD-L1-CD3L, 江苏泰康生物医药有限公司), 以 5000cells/孔接入 96 孔细胞培养板 (Cat: 3917, Corning), 细胞培养箱中培养过夜后, 弃上清, 加入 hzF2-TGF- β RIIIm2 和对照抗体 M7824 (起始浓度为 5 μ g/mL, 2.5 倍连续稀释, 8 个梯度), 25 μ l/孔, 和 50 μ l 重组表达人 PD-1 和荧光素酶 (luciferase) 的 Jurkat 细胞 (1×10^6 cells/ml) (Jurkat-PD1-NFAT, 江苏泰康生物医药有限公司) 悬液, 置于细胞培养箱孵育 6 h 后。向细胞培养板中加入 Bio-Turbo 萤火虫荧光素酶

- 底物 (Cat: RA-GL03, 江苏瑞安), 125 μ l/孔, 将细胞板置于微孔板恒温振荡器中, 800 rpm 避光孵育 5 min。设置多功能酶标仪为 Luminescence 模式, Intergration 选择 500 (仪器默认值), 读取 RLU, 检测结果如图 20 所示。hzF2-TGF- β RIIm2 和对照抗体 M7824, 对 PD-L1/PD1 通路的阻断效果 EC50 分别为 10.122nM 和 8.537nM。

表 7. hzF2-TGF- β RIIm2 融合蛋白的生物学活性检测

序号	名称	EC ₅₀ (nM)	相对生物学活性%
1	M7824	10.122	N/A
2	hzF2-TGF- β RIIm2	8.537	119

实施例 13: hzF2-TGF- β RIIm2 融合蛋白在 PBMC 免疫重建小鼠皮下移植人咽鳞癌 Fadu 模型中的抗肿瘤药效

- 将人咽鳞癌细胞 (FaDu), 以 5×10^6 个/0.1mL 浓度接种于 5-6 周龄雄性 NCG 小鼠的右侧胁肋部皮下, 人 PBMC 以 2×10^6 /只接种至小鼠体内。待肿瘤生长到 40-60 mm³ 时, 将肿瘤体积符合要求的小鼠随机分组, 每组 6 只, 共分为 2 组, 分别给予 hzF2-TGF- β RIIm2 和同型对照 hIgG1, 给药方案见表 8。结果如图 21、图 22 所示, hzF2-TGF- β RIIm2 明显抑制肿瘤生长, 具有明确的抗肿瘤药效, 瘤重抑瘤率 (TGI, Tumor weight) 达到 53%。

表 8. PBMC 免疫重建小鼠皮下移植瘤模型给药方案

组别	动物数	治疗	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药周期
1	6	hzF2-TGF- β RIIm2	8	i. p.	BIW $\times$ 5
2	6	hIgG1	10	i. p.	BIW $\times$ 5

注: 给药容积按 10 μ l/g 体重, 出现体重下降 15-20% 时可调节给药量;
i.p.: 腹腔注射; BIW $\times$ 5: 每周给药 2 次, 共给药 5 次。

- ### 实施例 14: hzF2-TGF- β RIIm2 融合蛋白在人 CD34+脐带血干细胞人源化小鼠皮下接种 HCC827 肿瘤模型上的抗肿瘤活性评价

复苏培养人非小细胞肺癌 HCC827 细胞株, 用 RPMI 1640 培养基 (添加

灭活的 10% FBS,) 在 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养传代, 将处于对数生长期的肿瘤细胞用于体内肿瘤的接种。20 只合格的雌性 human CD34+ 脐带血干细胞人源化小鼠, 经 1 周适应性饲养后, 接种人非小细胞肺癌 HCC827 细胞, 接种肿瘤细胞后, 观察瘤体积及体重, 选择肿瘤体积均在 120-200 mm³ 之间的小鼠, 依据其肿瘤体积和体重随机分为 3 组, 每组 5 只。分组当天开始给药。给药开始日期视为第 0 天。给药及分组信息见表 9。本实验检测了在等摩尔量的情况下, 受试药 hzF2-TGF- β RIIIm2 和对照药 Atezolizumab 单独用药, 在人 CD34+脐带血干细胞人源化小鼠皮下接种 HCC827 肿瘤模型上的抗肿瘤药效。结果显示(图 23, 表 10), hzF2-TGF- β RIIIm2 8mg/kg、Atezolizumab 10mg/kg 单独用药均显示出很强的药效, hzF2-TGF- β RIIIm2 组的瘤体积抑瘤率 (TGI, Tv) 可以达到 80%以上, 优于 Atezolizumab。

表 9. 分组及给药信息表

组	动物只数	测试药物	剂量(mg/kg)	给药途径	给药周期
1	6	Isotype	10	i. p.	每周两次
2	5	Atezolizumab	10	i. p.	每周两次
3	5	hzF2-TGF- β RIIIm2	8	i. p.	每周两次

表 10. 受试药在人 CD34+脐带血干细胞人源化小鼠皮下 HCC827 模型中的抑瘤效果

处理方式	PG-D0 TV (mm ³)	PG-D46 TV (mm ³)	TGI (%)	$\Delta T/\Delta C$ (%)	p 值
Isotype	155.96	555.37	--	--	--
Atezolizumab 10mg/kg	160.89	306.73	63.48%	36.52%	0.1586504
hzF2-TGF- β RIIIm2 8 mg/kg	155.78	221.70	83.50%	16.50%	0.000377

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明, 本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形, 只要不脱离本发明的精神, 均应属于本发明所附权利要求的范围。

权 利 要 求 书

1. 一种 TGF- β RII 突变体, 其特征在于与野生型 TGF- β RII 相比, 所述 TGF- β RII 突变体在一个或多个选自由以下位点所组成的组中的氨基酸残基位点处存在突变: 第 6 位、第 12 位、第 20 位; 其中, 所述野生型 TGF- β RII 的氨基酸残基编码顺序根据 SEQ ID NO:6 确定。

2. 如权利要求 1 所述 TGF- β RII 突变体, 其特征在于所述突变体相对于野生型 TGF- β RII 具有选自下组中的一种或几种突变: Q6N, D12T, G20T。

3. 如权利要求 1 所述 TGF- β RII 突变体, 其特征在于其能够结合 TGF- β , 所述 TGF- β 包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3。

4. 如权利要求 1 所述 TGF- β RII 突变体, 其特征在于与野生型 TGF- β RII 相比, 所述 TGF- β RII 突变体在重组表达时具有更少的断裂和/或降解。

5. 一种融合蛋白, 其包括两个或更多个功能片段, 其中至少一个功能片段具有权利要求 1-4 任一所述 TGF- β RII 突变体的氨基酸序列。

6. 如权利要求 5 所述的融合蛋白, 其特征在于所述两个或更多个功能片段各自独立的发挥功能; 可选的, 各功能片段之间通过多肽接头 (Linker) 连接。

7. 如权利要求 5-6 任一所述融合蛋白, 其特征在于所述功能片段还包括抗体或其抗原结合部分、受体或其配体结合部分、细胞因子或其片段、细胞毒素或其变体、标记物或示踪物等。

8. 如权利要求 5-6 任一所述融合蛋白, 其特征在于所述功能片段特异性结合选自以下组中的靶点: 肿瘤或癌症免疫治疗靶点、慢性感染性疾病免疫治疗靶点、自身免疫性疾病治疗靶点。

9. 如权利要求 8 所述融合蛋白, 其特征在于所述靶点包括包括表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR)、血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)、成纤维细胞生长因子受体 (FGFR)、胰岛素受体 (InsR)、布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK)、HER2、CTLA、CD20、CD52、CD30、CD33、CD133、PD-1、PD-L1、Src、Abl、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (PKB/Akt)、雷帕霉素靶体蛋白 (mTOR)、丝苏氨酸蛋白激酶 Ras、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、STAT1、STAT3、STAT5 等。

10. 一种多功能活性分子, 其具有两种或更多种功能活性, 其中至少一种功能活性为 TGF- β 结合活性, 且所述 TGF- β 结合活性由具有权利要求 1-4

任一所述 TGF- β RII 突变体的氨基酸序列的多肽片段带来。

11. 如权利要求 10 所述多功能活性分子, 其特征在于, 所述功能活性还包括抗原结合活性、配体结合活性、细胞因子活性、细胞毒性、标记活性。

12. 如权利要求 10-11 任一所述多功能活性分子, 其特征在于所述功能活性还包括对以下分子的结合活性, 表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR)、血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)、成纤维细胞生长因子受体 (FGFR)、胰岛素受体 (InsR)、布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK)、HER2、CTLA、CD20、CD52、CD30、CD33、CD133、PD-1、PD-L1、Src、Abl、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (PKB/Akt)、雷帕霉素靶体蛋白 (mTOR)、丝苏氨酸蛋白激酶 Ras、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、STAT1、STAT3、STAT5 等。

13. 一种抗体-TGF- β RII 缀合分子, 其中所述抗体靶向肿瘤治疗靶点, 所述 TGF- β RII 具有权利要求 1-4 任一所述 TGF- β RII 突变体的氨基酸序列。

14. 如权利要求 13 所述抗体-TGF- β RII 缀合分子, 其中所述抗体特异性靶向表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR)、血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)、成纤维细胞生长因子受体 (FGFR)、胰岛素受体 (InsR)、布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK)、HER2、CTLA、CD20、CD52、CD30、CD33、CD133、PD-1、PD-L1、Src、Abl、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (PKB/Akt)、雷帕霉素靶体蛋白 (mTOR)、丝苏氨酸蛋白激酶 Ras、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、STAT1、STAT3、STAT5; 优选 EGFR、VEGFR、PDGFR、FGFR、HER2、CTLA、CD20、CD133、PD-1、PD-L1。

15. 如权利要求 13 所述抗体-TGF- β RII 缀合分子, 其中所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、纳米抗体。

16. 如权利要求 13 所述抗体-TGF- β RII 缀合分子, 其中所述抗体为抗人 PD-L1 抗体或其抗原结合片段, 其中抗人 PD-L1 抗体或其抗原结合片段的重链具有 CDR1 为 SEQ ID NO:25、CDR2 为 SEQ ID NO:26、CDR3 为 SEQ ID NO:27, 轻链具有 CDR1 为 SEQ ID NO:28、CDR2 为 SEQ ID NO:29、CDR3 为 SEQ ID NO:30。

17. 如权利要求 13 所述抗体-TGF- β RII 缀合分子, 其中所述抗体为抗人 PD-L1 纳米抗体, 抗人 PD-L1 纳米抗体的氨基酸序列为 SEQ ID NO:20。

18. 如权利要求 16-17 任一所述抗体-TGF- β RII 缀合分子, 其特征在于

所述 TGF- β RII 通过连接肽与抗人 PD-L1 抗体连接,其中所述连接肽优选包括(G₄S)_n,其中 n 为 1-4 的整数。

19. 一种组合物,包含权利要求 1-4 任一所述的 TGF- β RII 突变体、权利要求 5-9 任一所述融合蛋白、权利要求 10-12 任一多功能活性分子、或权利要求 13-18 任一所述缀合物,以及药学上可接受的辅料。

20. 一种核酸,其编码权利要求 1-4 任一所述的 TGF- β RII 突变体、权利要求 5-9 任一所述融合蛋白、权利要求 10-12 任一多功能活性分子、或权利要求 13-18 任一所述缀合物。

21. 一种重组载体或重组宿主细胞,其包括权利要求 20 所述核酸。

22. 一种制备产品的方法,其特征在于利用权利要求 20 所述核酸、或权利要求 21 所述重组载体或重组宿主细胞,制备 TGF- β RII 突变体、其融合蛋白、其多功能活性分子、或其缀合物。

23. 一种降低或消除重组蛋白降解或断裂的方法,所述重组蛋白包括 TGF- β RII 片段,所述方法包括对重组蛋白的 TGF- β RII 片段的编码区进行突变,使其编码的 TGF- β RII 相对于野生型 TGF- β RII 在一个或多个选自由以下位点所组成的组中的氨基酸残基位点处引入突变:第 6 位、第 12 位、第 20 位;所述野生型 TGF- β RII 的氨基酸残基编码顺序根据 SEQ ID NO:6 确定。

24. 如权利要求 23 所述降低或消除重组蛋白降解或断裂的方法,其特征在于 TGF- β RII 片段相对于野生型 TGF- β RII 具有选自下组中的一种或几种突变:Q6N, D12T, G20T。

25. 一种治疗疾病的方法,其包括对需要的受试者给予有效量选自下组的产品:权利要求 1-4 任一所述的 TGF- β RII 突变体、权利要求 5-9 任一所述融合蛋白、权利要求 10-12 任一多功能活性分子、权利要求 13-18 任一所述缀合物、权利要求 19 的组合物、权利要求 20 的核酸、权利要求 21 的重组载体或重组宿主细胞。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其中所述方法用于预防或治疗肿瘤或癌症、慢性感染性疾病、自身免疫性疾病。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其中所述肿瘤或癌症优选咽鳞癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、肝癌、尿路上皮癌、结直肠癌、胃癌。

28. 一种产品在制备治疗药物中的用途,所述产品包括:权利要求 1-4 任一所述的 TGF- β RII 突变体、权利要求 5-9 任一所述融合蛋白、权利要求

10-12 任一多功能活性分子、权利要求 13-18 任一所述缀合物、权利要求 19 的组合物、权利要求 20 的核酸、权利要求 21 的重组载体或重组宿主细胞。

29. 如权利要求 28 所述的用途，其中所述药物用于预防或治疗肿瘤或癌症、慢性感染性疾病、自身免疫性疾病。

30. 如权利要求 29 所述的用途，其中所述肿瘤或癌症优选咽鳞癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、肝癌、尿路上皮癌、结直肠癌、胃癌。

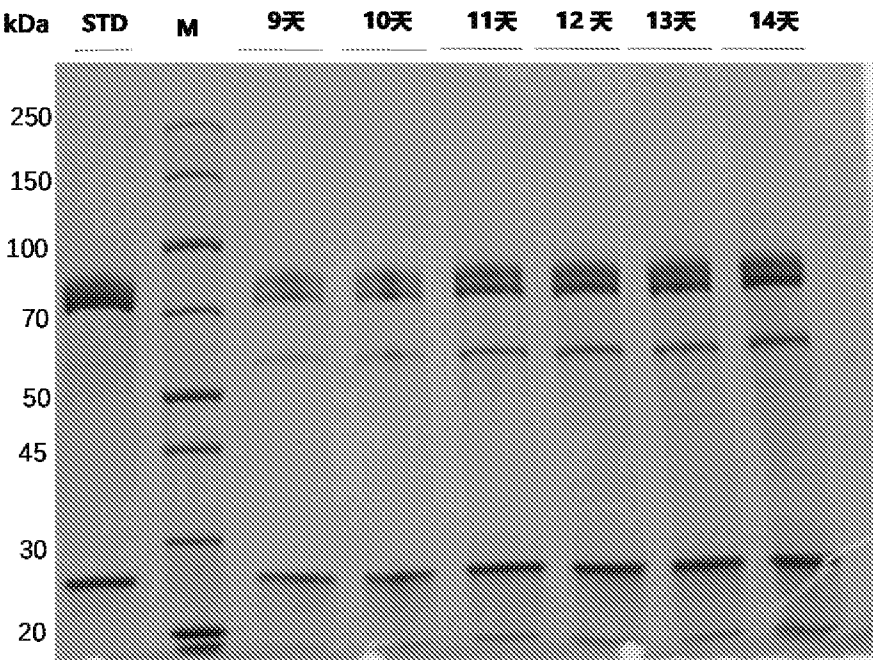


图 1

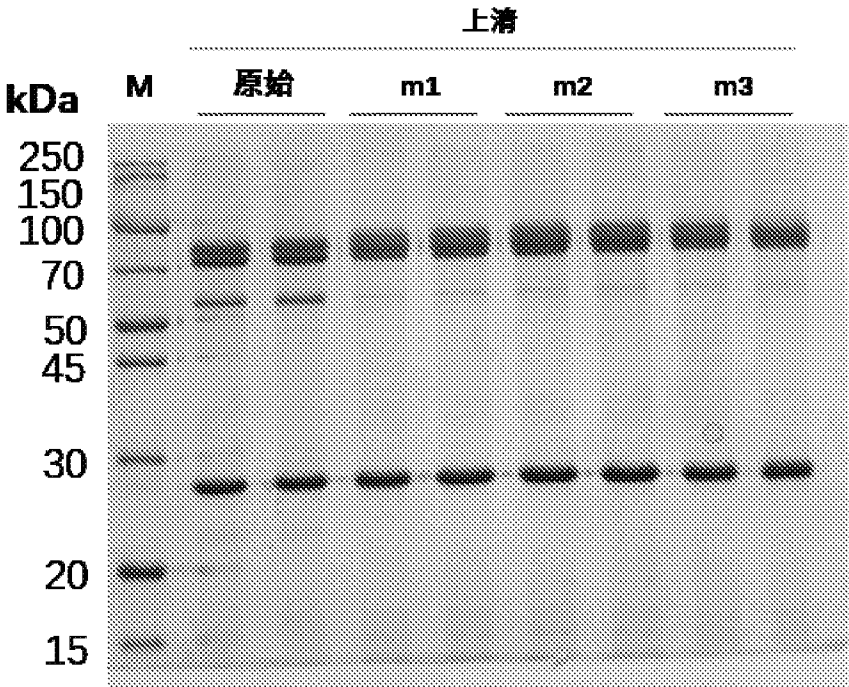


图 2a

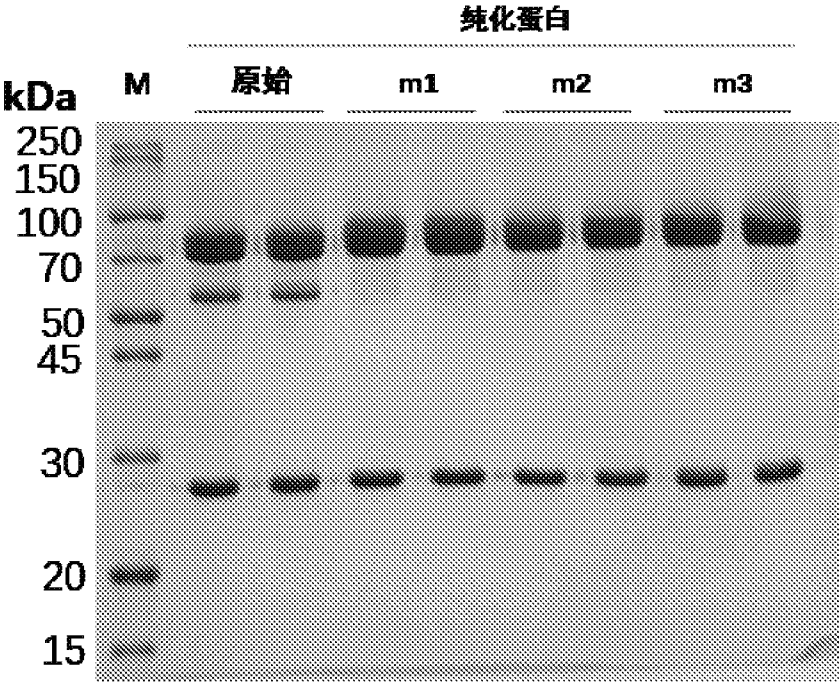


图 2b

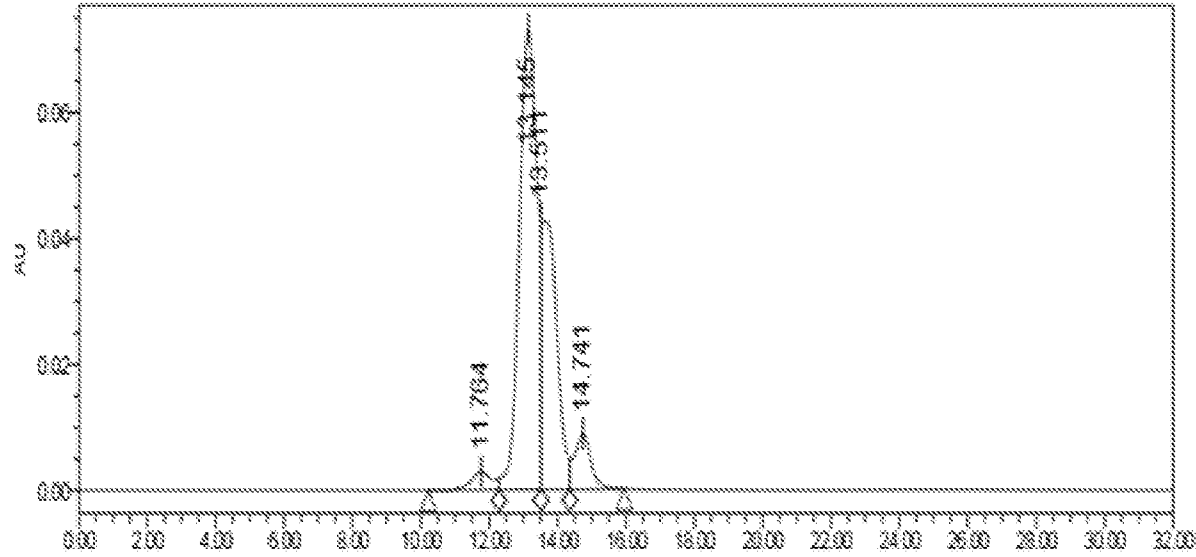


图 3

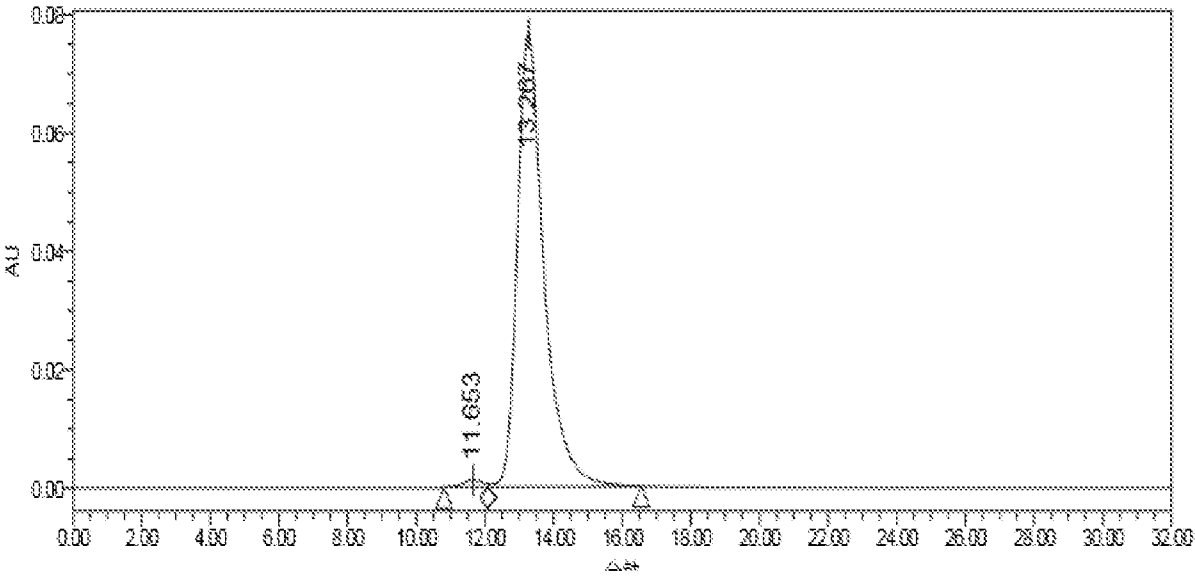


图 4a

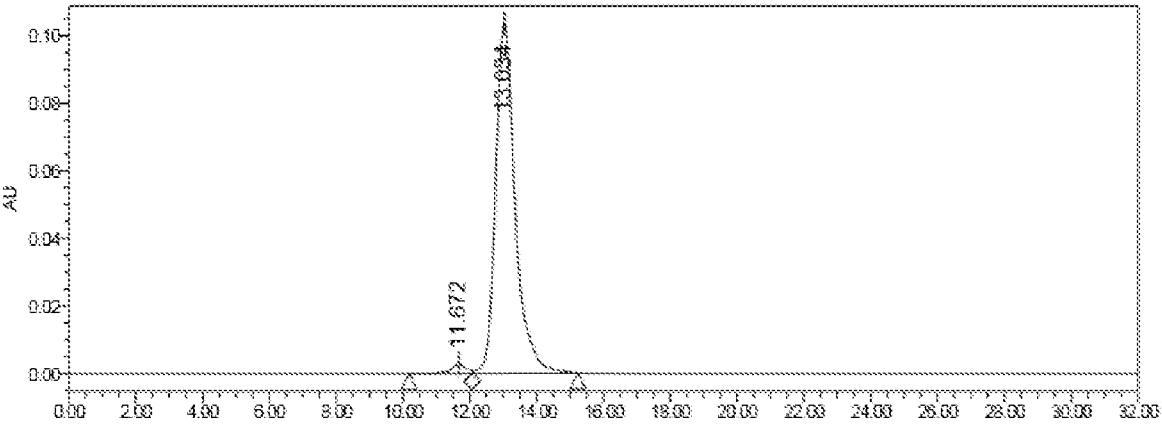


图 4b

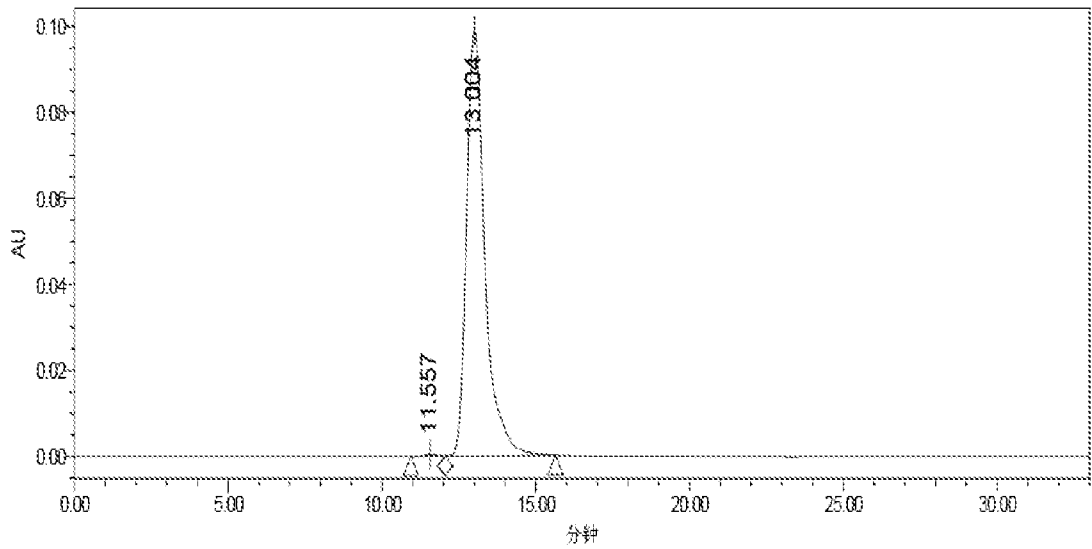


图 4c

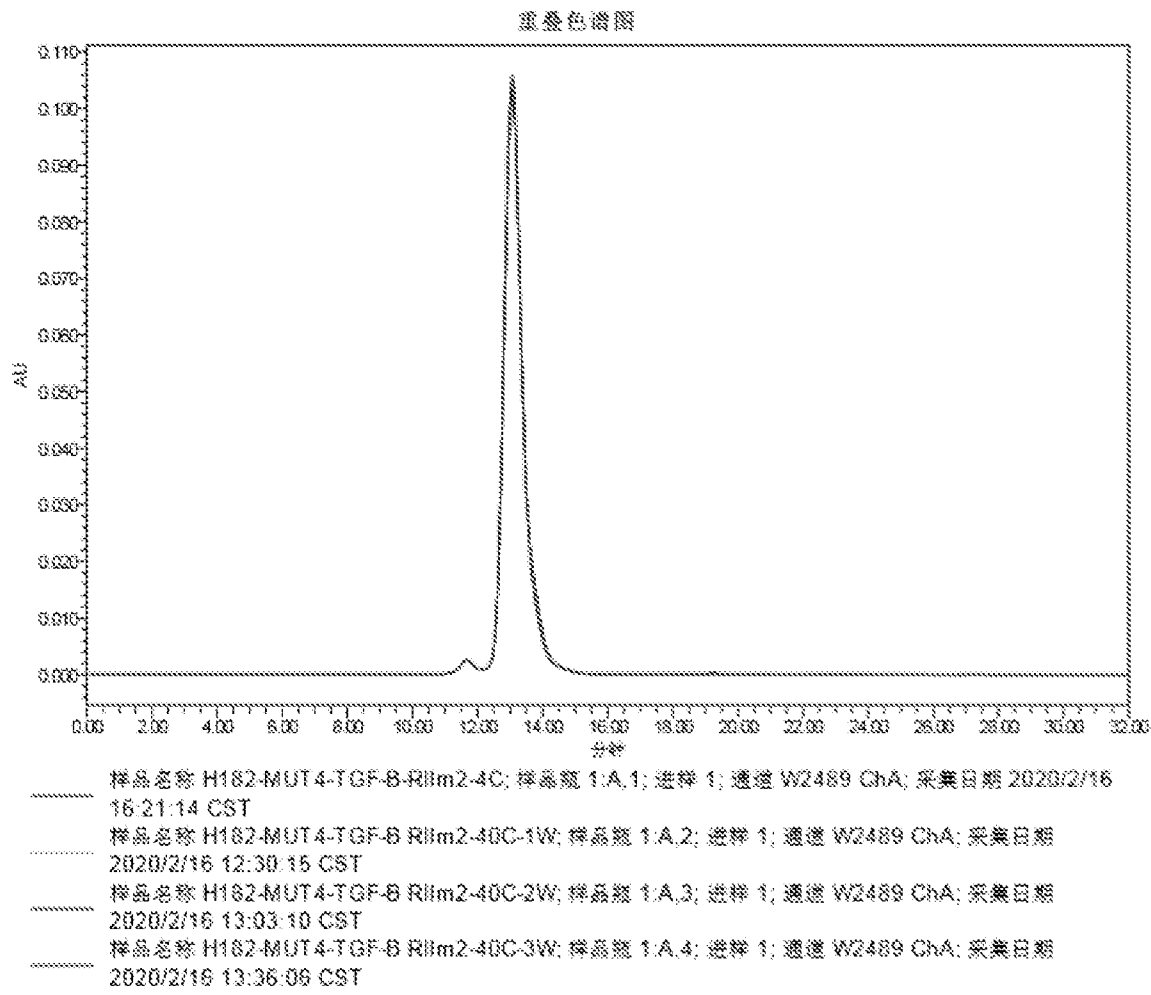


图 5

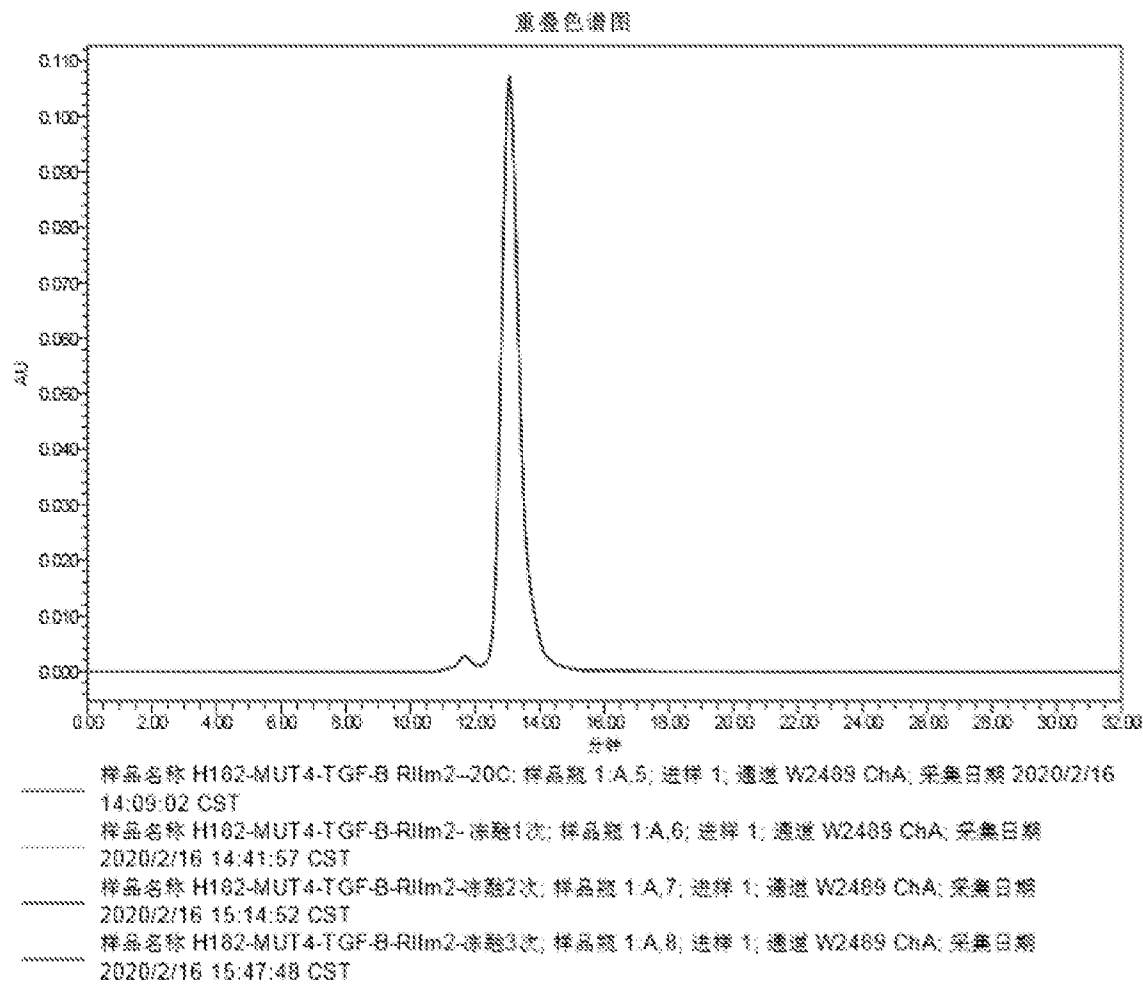


图 6

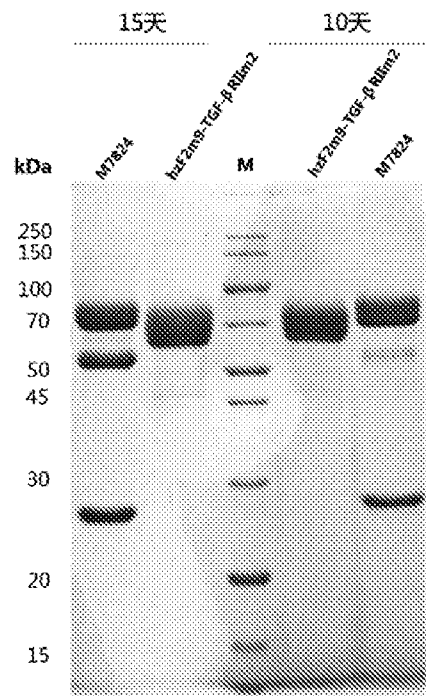


图 7

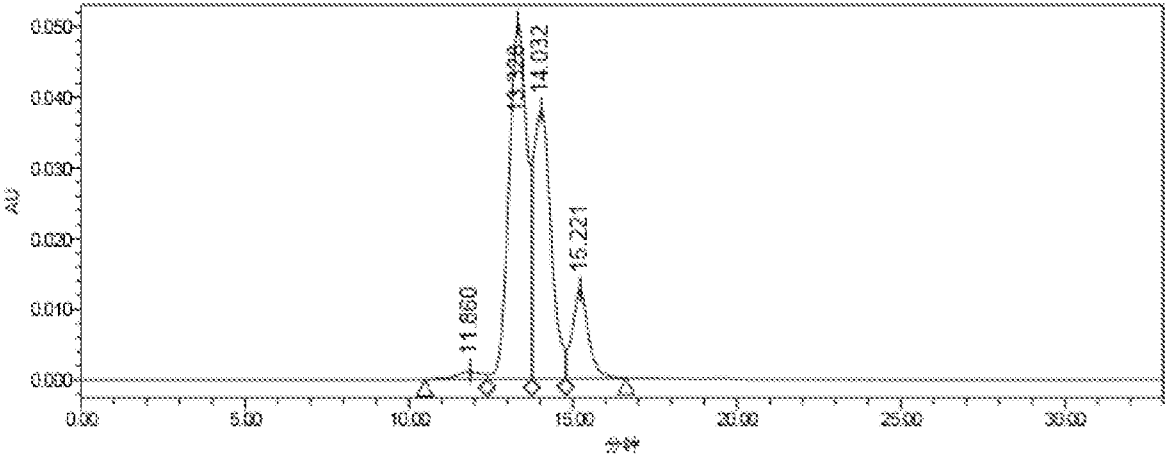


图 8

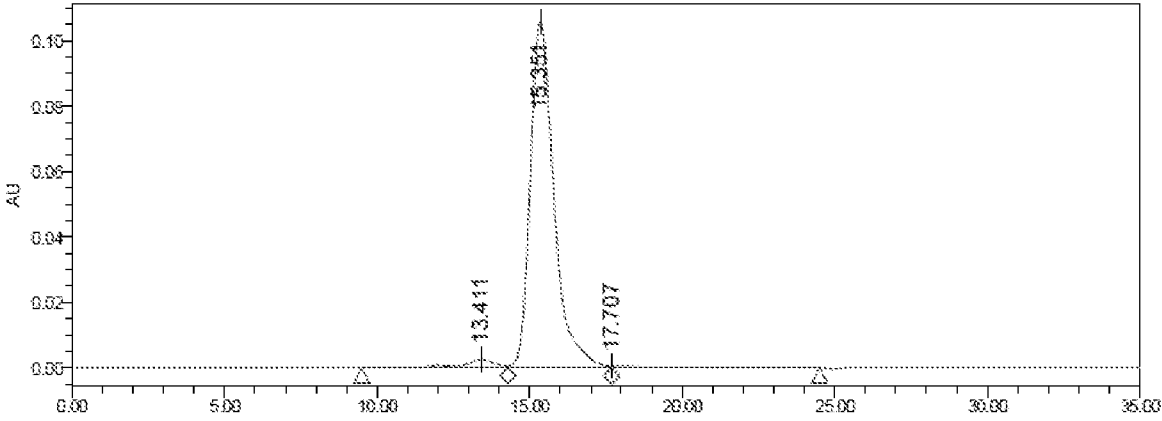


图 9

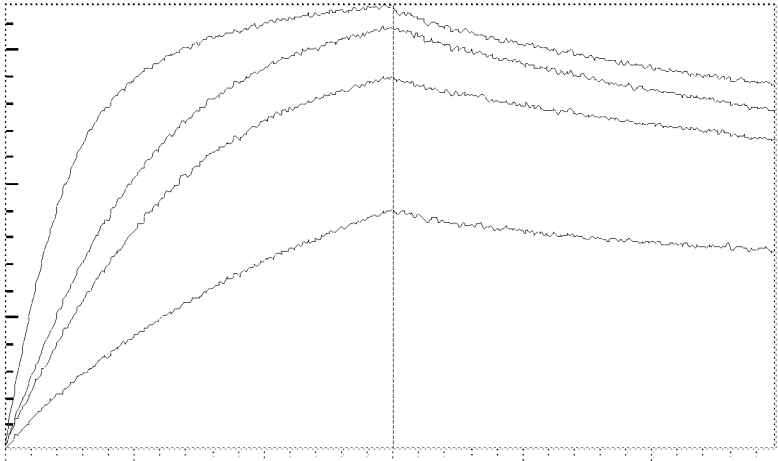


图 10

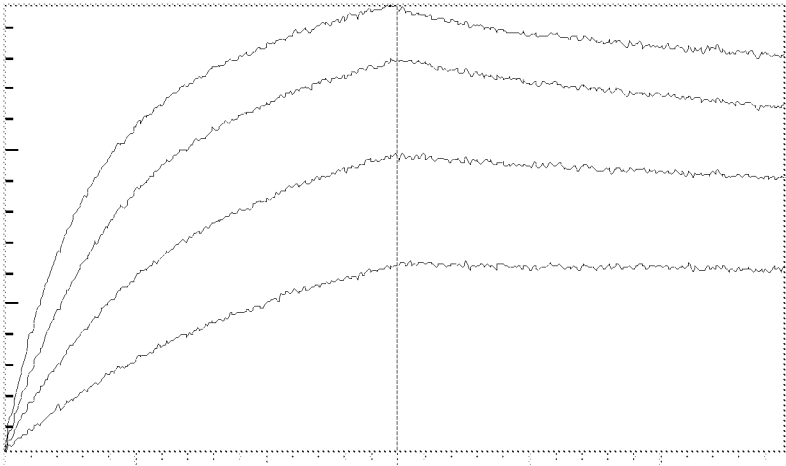


图 11

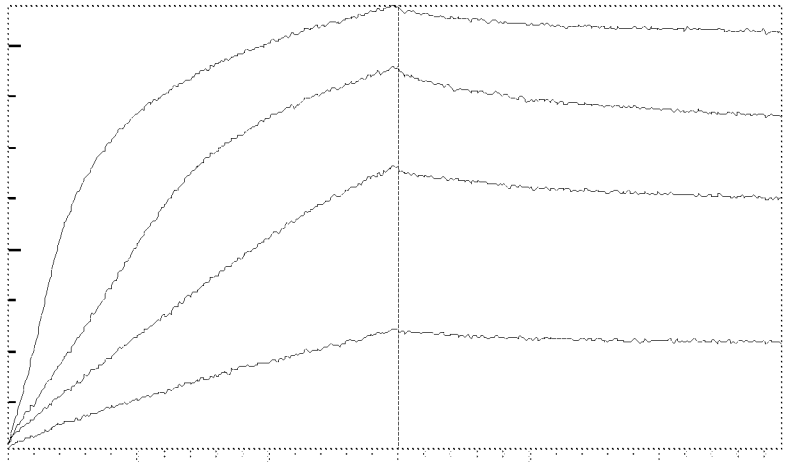


图 12

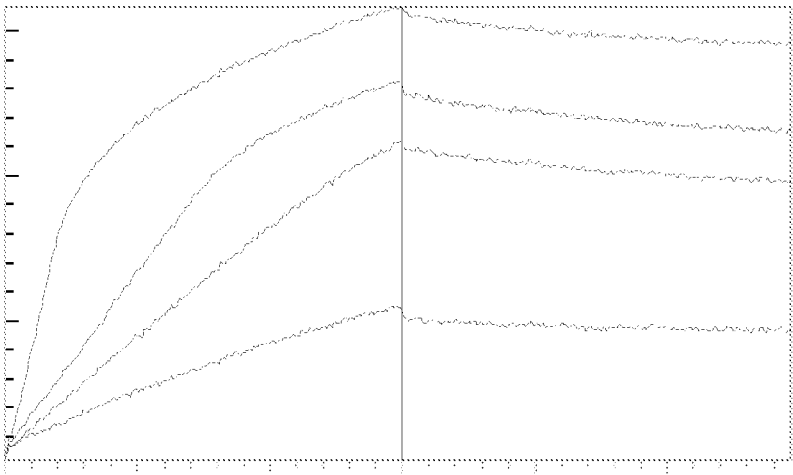


图 13

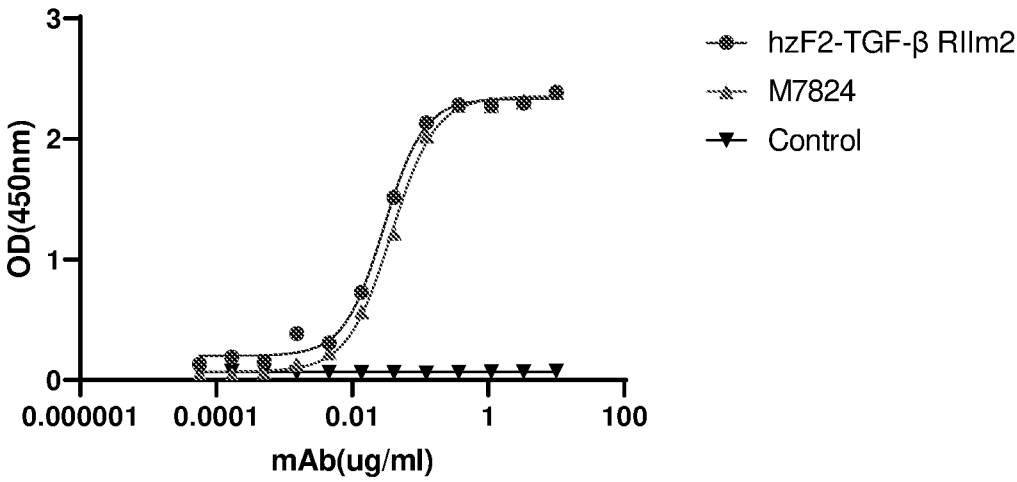


图 14

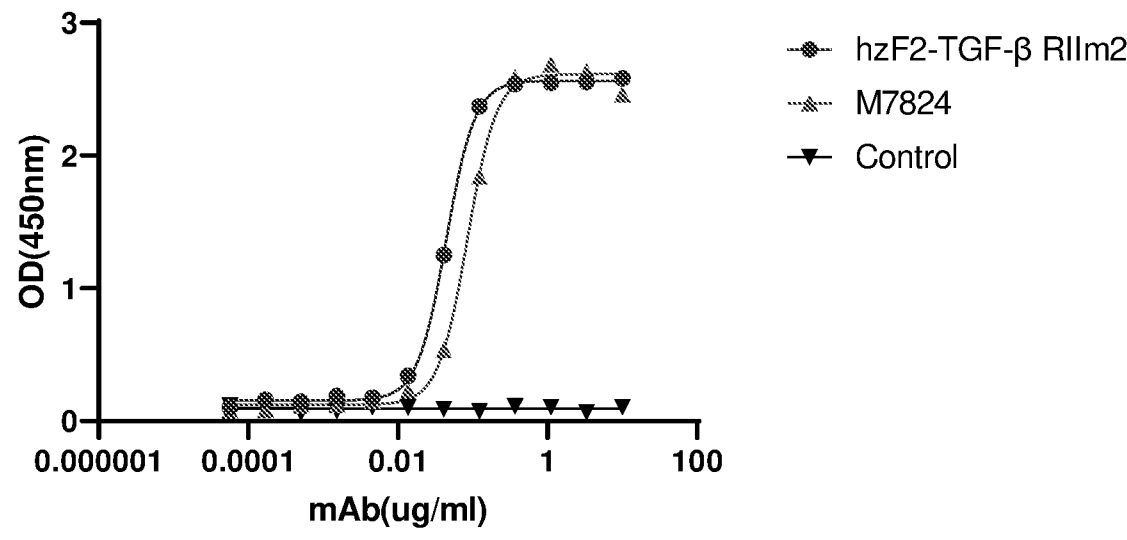


图 15

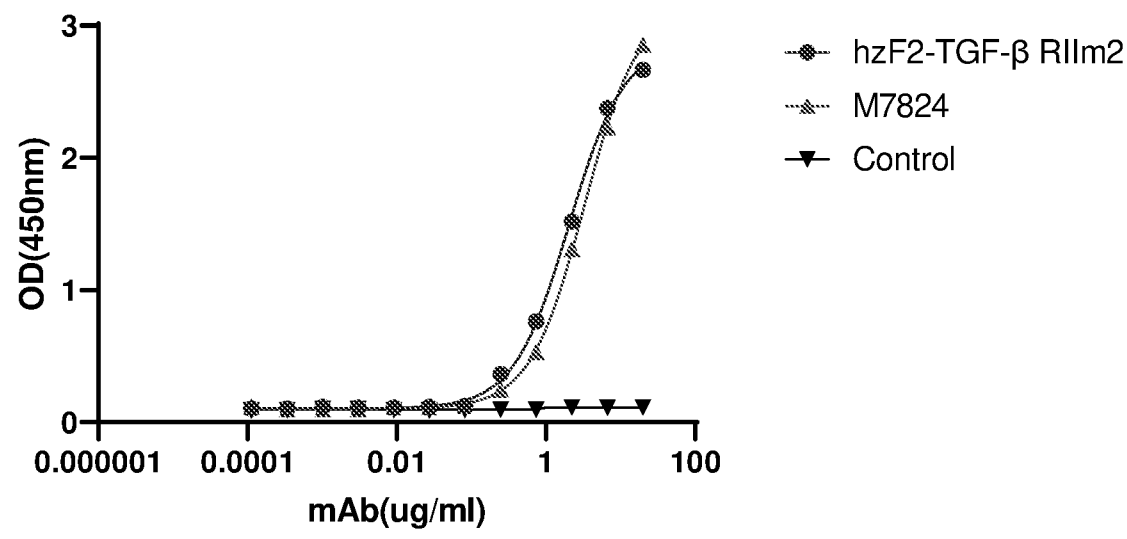


图 16

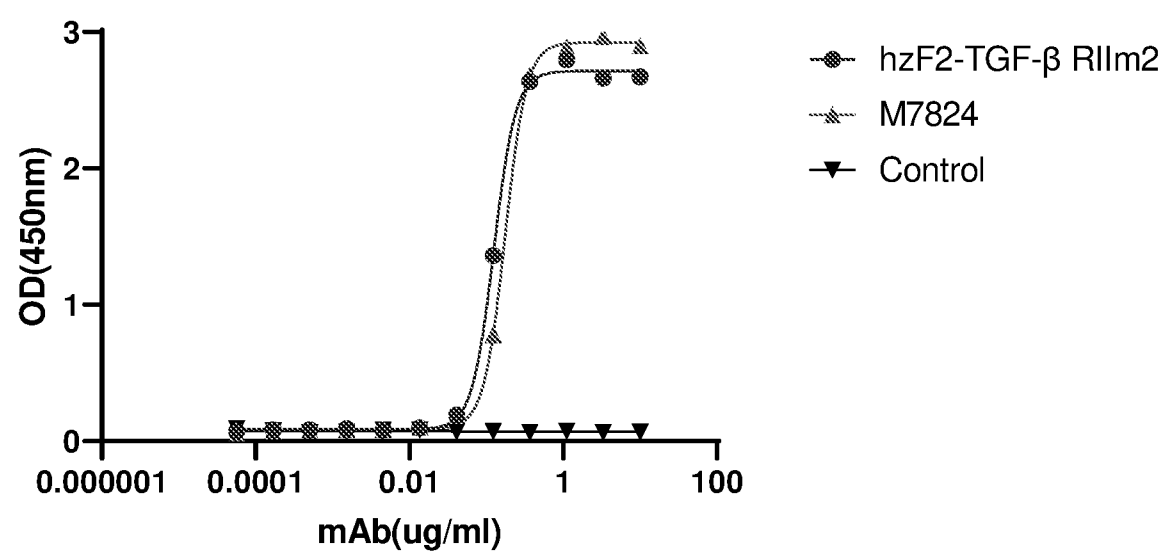


图 17

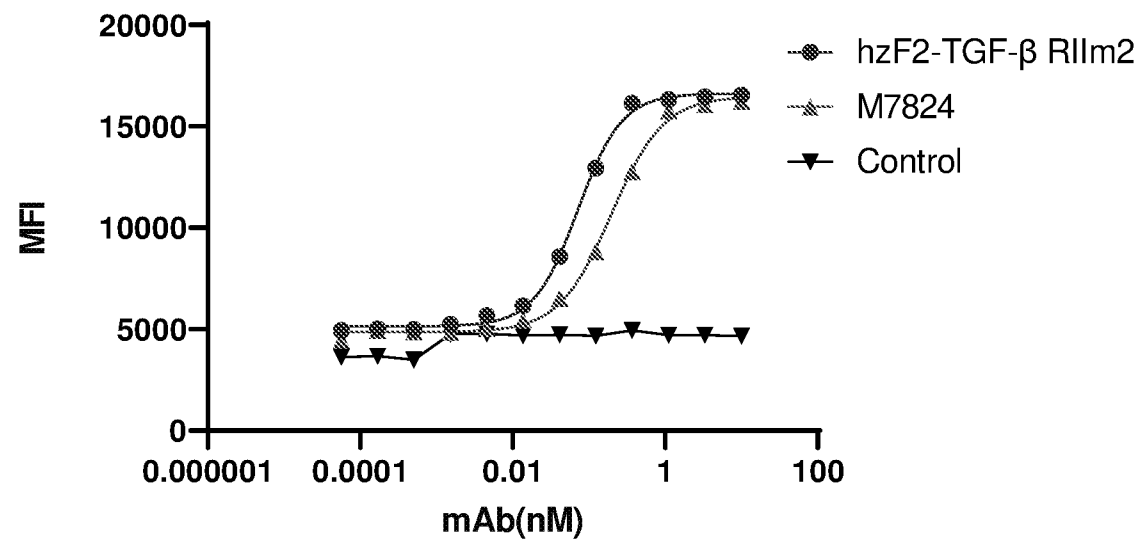


图 18

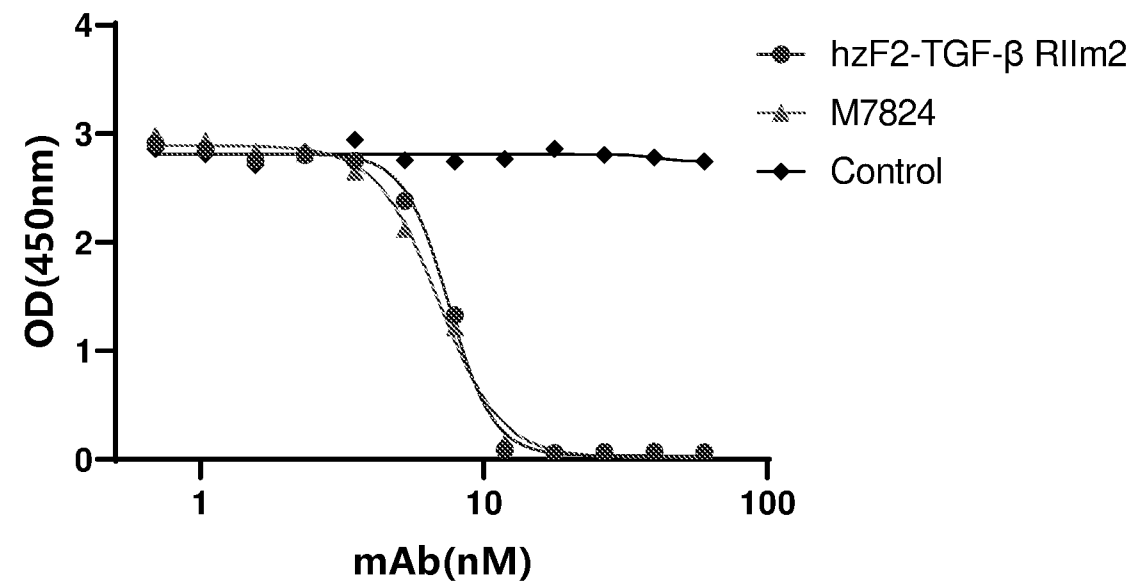


图 19

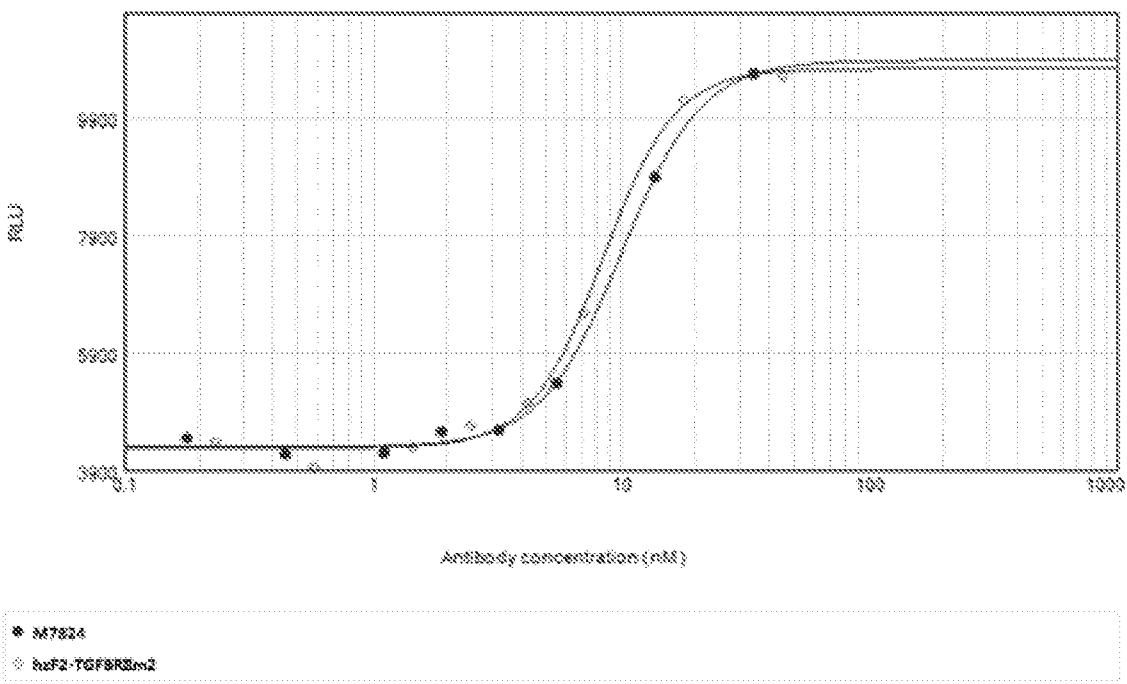


图 20

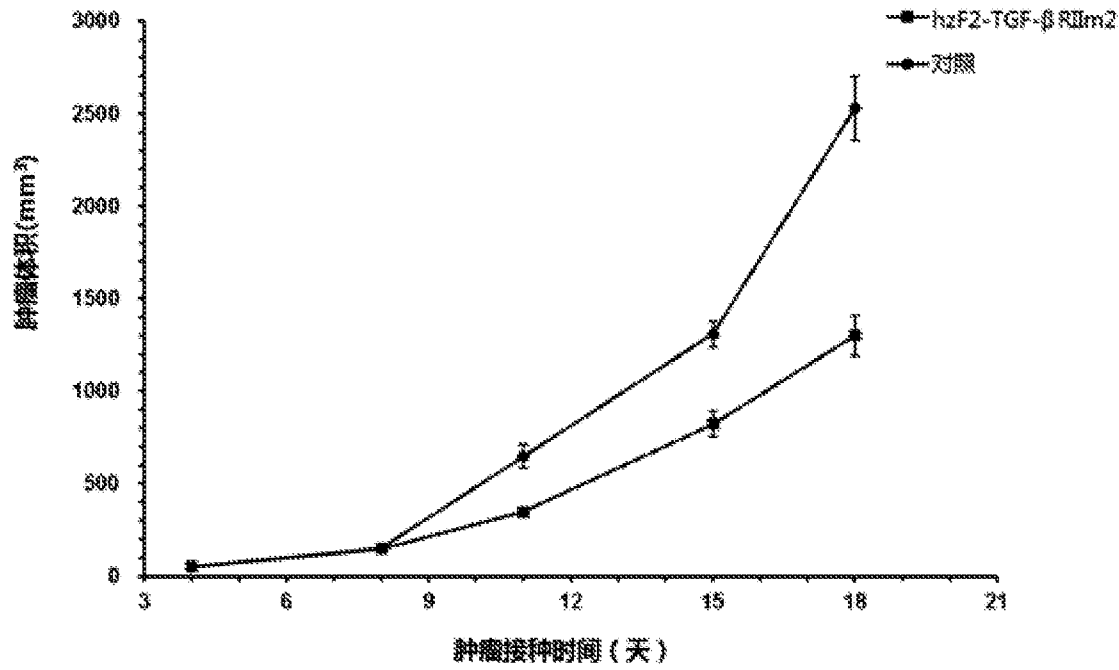


图 21

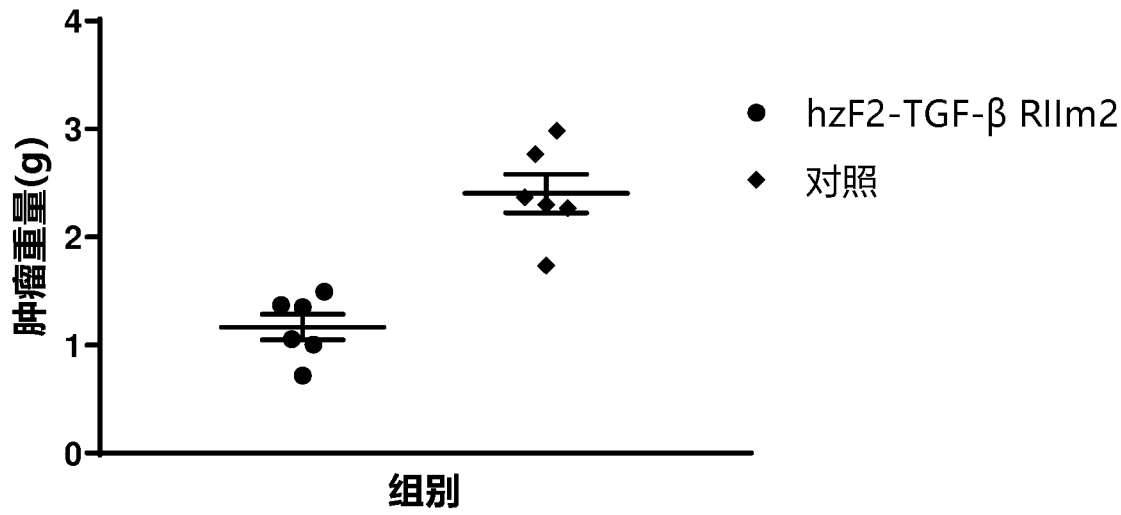


图 22

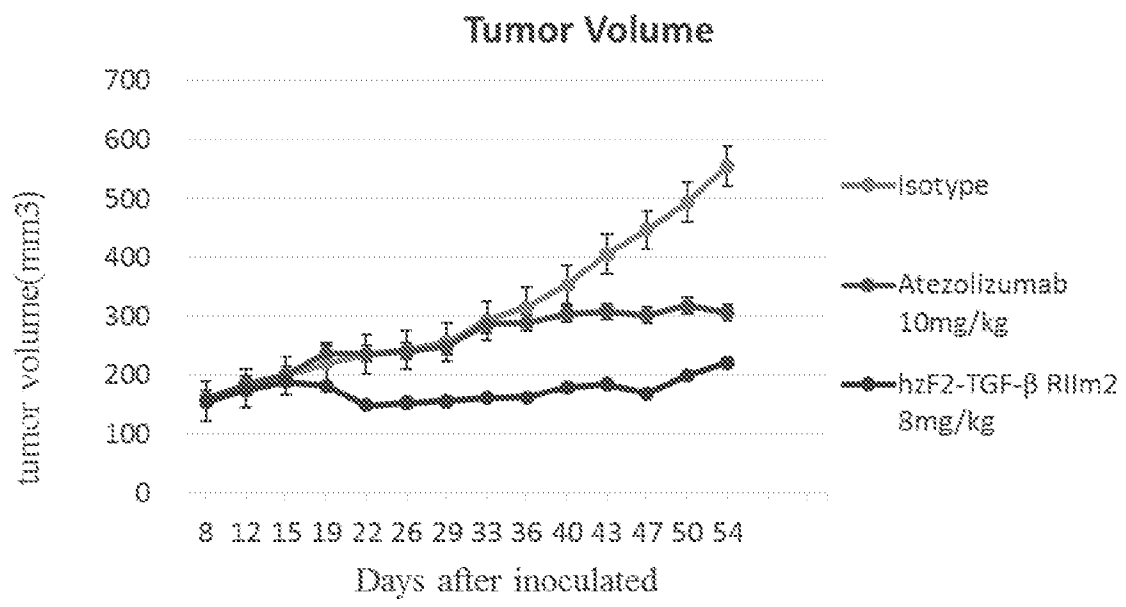


图 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/108065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; C07K 19/00(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)

A61K; C07K; 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, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, ISI web of science, NCBI, blast, genbank, 中国专利生物序列检索系统, STN: 免疫疗法, 免疫检查点, 免疫检查点抑制剂, 联合疗法, 双功能融合蛋白, 双特异性抗体, 迈威(上海)生物科技股份有限公司, 张锦超, 焦莎莎, 张畅, 王荣娟, 曾大地, bifunctional, anti-PD-L1, anti-TGFβ, TGFβreceptor, fusion protein, checkpoint blockade, tumor, microenvironmen, sequence search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 111978412 A (NANJING KAEDI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 24 November 2020 (2020-11-24) sequence table, sequence 16, sequence 19	1
A	WO 2020041607 A1 (MERCK PATENT GMBH) 27 February 2020 (2020-02-27) entire document	1-30
A	CN 112638374 A (MERCK PATENT GMBH) 09 April 2021 (2021-04-09) entire document	1-30
A	WO 2020094122 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 14 May 2020 (2020-05-14) entire document	1-30
A	CN 112118858 A (MERCK PATENT GMBH) 22 December 2020 (2020-12-22) entire document	1-30
A	CN 1257545 A (BIOGEN, INC.) 21 June 2000 (2000-06-21) entire document	1-30



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

11 October 2021

Date of mailing of the international search report

21 October 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/CN2021/108065

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	周姚邑 等 (ZHOU, Yaoyi et al.). "肿瘤免疫检查点抑制剂及其联合疗法的研究进展 (Non-official translation: Research Progress on Immune Checkpoint Inhibitors and Combination Therapy for Treating Tumor)" <i>中国药房 (China Pharmacy)</i> , Vol. 31, No. 7, 21 April 2020 (2020-04-21), pp. 890-896	1-30
A	KNUDSON, K.M. et al. "M7824, a novel bifunctional anti-PD-L1/TGF β Trap fusion protein, promotes anti-tumor efficacy as monotherapy and in combination with vaccine" <i>Oncoimmunology</i> , Vol. 7, No. 5, 31 December 2018 (2018-12-31), e1426519	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/108065

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/CN2021/108065**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.: **25-27**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 25-27 relate to a method for treating diseases, so the subject matter of claim 10 is a subject matter that the International Search Authority is not required to search under PCT Rule 39.1: (4) methods of treatment of the human or animal body by surgery or therapy, and diagnosis methods practiced on the human or animal body. The international search has been carried out on the basis of the uses of an effective amount of product in preparing a drug for treating diseases.
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/CN2021/108065

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111978412	A	24 November 2020	CN	111978412	B	30 April 2021
WO	2020041607	A1	27 February 2020	KR	20210046716	A	28 April 2021
				SG	11202101663 W	A	30 March 2021
				CA	3110276	A1	27 February 2020
				BR	112021003093	A2	11 May 2021
				IL	280958	D0	29 April 2021
				AU	2019325593	A1	18 March 2021
CN	112638374	A	09 April 2021	US	2021115145	A1	22 April 2021
				SG	11202013190 Y	A	28 January 2021
				TW	202019405	A	01 June 2020
				KR	20210028219	A	11 March 2021
				CA	3105360	A1	09 January 2020
				BR	112020026902	A2	30 March 2021
				WO	2020009992	A8	13 August 2020
				EP	3817740	A1	12 May 2021
				IL	279862	D0	01 March 2021
				AU	2019299318	A1	21 January 2021
				WO	2020009992	A1	09 January 2020
WO	2020094122	A1	14 May 2020	CN	112512550	A	16 March 2021
				TW	202031279	A	01 September 2020
				AU	2019374363	A1	03 June 2021
				CA	3118415	A1	14 May 2020
CN	112118858	A	22 December 2020	EP	3813868	A1	05 May 2021
				US	2021061899	A1	04 March 2021
				WO	2019222252	A1	21 November 2019
				SG	11202011148V	A	30 December 2020
				BR	112020021082	A2	17 February 2021
				TW	202003577	A	16 January 2020
				KR	20210009339	A	26 January 2021
				CA	3096844	A1	21 November 2019
				AU	2019271065	A1	05 November 2020
CN	1257545	A	21 June 2000	DE	69838061	T2	13 March 2008
				NZ	500284	A	28 September 2001
				US	2005203022	A1	15 September 2005
				PT	975771	E	01 October 2007
				NO	994998	D0	14 October 1999
				CA	2286933	A1	29 October 1998
				IL	132249	D0	19 March 2001
				NO	994998	L	20 December 1999
				JP	2001515360	A	18 September 2001
				EA	199900947	A1	24 April 2000
				AU	737106	B2	09 August 2001
				NO	994998	A	20 December 1999
				DK	0975771	T3	22 October 2007
				EP	0975771	B1	11 July 2007
				AU	7120898	A	13 November 1998
				BR	9808934	A	01 August 2000
				TR	199902878	T2	21 February 2000
				DE	69838061	D1	23 August 2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/108065

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		ES 2289778 T3	01 February 2008
		IS 5217 A	15 October 1999
		EE 9900492 A	15 June 2000
		JP 2008106076 A	08 May 2008
		KR 20010006534 A	26 January 2001
		AT 366816 T	15 August 2007
		WO 9848024 A1	29 October 1998
		PL 336306 A1	19 June 2000
		TR 9902878 T2	21 February 2000
		EP 0975771 A1	02 February 2000

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/108065

A. 主题的分类

A61K 38/16(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; C07K 19/00(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)

A61K; C07K; 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, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, ISI web of science, NCBI, blast, genbank, 中国专利生物序列检索系统, STN:免疫疗法, 免疫检查点, 免疫检查点抑制剂, 联合疗法, 双功能融合蛋白, 双特异性抗体, 迈威(上海)生物科技股份有限公司, 张锦超, 焦莎莎, 张畅, 王荣娟, 曾大地, bifunctional, anti-PD-L1, anti-TGF β , TGF β receptor, fusion protein, checkpoint blockade, tumor, microenvironmen, 序列检索

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
PX	CN 111978412 A (南京凯地生物科技有限公司) 2020年 11月 24日 (2020 - 11 - 24) 序列表序列16, 序列19	1
A	WO 2020041607 A1 (MERCK PATENT GMBH) 2020年 2月 27日 (2020 - 02 - 27) 全文	1-30
A	CN 112638374 A (默克专利有限公司) 2021年 4月 9日 (2021 - 04 - 09) 全文	1-30
A	WO 2020094122 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2020年 5月 14日 (2020 - 05 - 14) 全文	1-30
A	CN 112118858 A (默克专利有限公司) 2020年 12月 22日 (2020 - 12 - 22) 全文	1-30
A	CN 1257545 A (拜奥根有限公司) 2000年 6月 21日 (2000 - 06 - 21) 全文	1-30
A	周姚邑等. “肿瘤免疫检查点抑制剂及其联合疗法的研究进展” 中国药房, 第31卷, 第7期, 2020年 4月 21日 (2020 - 04 - 21), 890-896页	1-30

☒ 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 10月 11日

国际检索报告邮寄日期

2021年 10月 21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

受权官员

黄蕊

电话号码 86-(10)-53961958

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
A	KNUDSON, K.M. 等. "M7824, a novel bifunctional anti-PD-L1/TGF β Trap fusion protein, promotes anti-tumor efficacy as monotherapy and in combination with vaccine" ONCOIMMUNOLOGY, 第7卷, 第5期, 2018年 12月 31日 (2018 - 12 - 31), e1426519	1-30

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1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 25-27
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求25-27涉及治疗疾病的方法，即权利要求10涉及PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题：（4）通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及在人体或动物体上实施的诊断方法。国际检索基于有效量的产品在制备治疗疾病药物中的用途作出。
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/CN2021/108065

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111978412	A	2020年 11月 24日	CN	111978412	B	2021年 4月 30日
WO	2020041607	A1	2020年 2月 27日	KR	20210046716	A	2021年 4月 28日
				SG	11202101663W	A	2021年 3月 30日
				CA	3110276	A1	2020年 2月 27日
				BR	112021003093	A2	2021年 5月 11日
				IL	280958	D0	2021年 4月 29日
				AU	2019325593	A1	2021年 3月 18日
CN	112638374	A	2021年 4月 9日	US	2021115145	A1	2021年 4月 22日
				SG	11202013190Y	A	2021年 1月 28日
				TW	202019405	A	2020年 6月 1日
				KR	20210028219	A	2021年 3月 11日
				CA	3105360	A1	2020年 1月 9日
				BR	112020026902	A2	2021年 3月 30日
				WO	2020009992	A8	2020年 8月 13日
				EP	3817740	A1	2021年 5月 12日
				IL	279862	D0	2021年 3月 1日
				AU	2019299318	A1	2021年 1月 21日
				WO	2020009992	A1	2020年 1月 9日
WO	2020094122	A1	2020年 5月 14日	CN	112512550	A	2021年 3月 16日
				TW	202031279	A	2020年 9月 1日
				AU	2019374363	A1	2021年 6月 3日
				CA	3118415	A1	2020年 5月 14日
CN	112118858	A	2020年 12月 22日	EP	3813868	A1	2021年 5月 5日
				US	2021061899	A1	2021年 3月 4日
				WO	2019222252	A1	2019年 11月 21日
				SG	11202011148V	A	2020年 12月 30日
				BR	112020021082	A2	2021年 2月 17日
				TW	202003577	A	2020年 1月 16日
				KR	20210009339	A	2021年 1月 26日
				CA	3096844	A1	2019年 11月 21日
				AU	2019271065	A1	2020年 11月 5日
CN	1257545	A	2000年 6月 21日	DE	69838061	T2	2008年 3月 13日
				NZ	500284	A	2001年 9月 28日
				US	2005203022	A1	2005年 9月 15日
				PT	975771	E	2007年 10月 1日
				NO	994998	D0	1999年 10月 14日
				CA	2286933	A1	1998年 10月 29日
				IL	132249	D0	2001年 3月 19日
				NO	994998	L	1999年 12月 20日
				JP	2001515360	A	2001年 9月 18日
				EA	199900947	A1	2000年 4月 24日
				AU	737106	B2	2001年 8月 9日
				NO	994998	A	1999年 12月 20日
				DK	0975771	T3	2007年 10月 22日
				EP	0975771	B1	2007年 7月 11日
				AU	7120898	A	1998年 11月 13日
				BR	9808934	A	2000年 8月 1日
				TR	199902878	T2	2000年 2月 21日
				DE	69838061	D1	2007年 8月 23日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/108065

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)
		ES 2289778 T3	2008年 2月 1日
		IS 5217 A	1999年 10月 15日
		EE 9900492 A	2000年 6月 15日
		JP 2008106076 A	2008年 5月 8日
		KR 20010006534 A	2001年 1月 26日
		AT 366816 T	2007年 8月 15日
		WO 9848024 A1	1998年 10月 29日
		PL 336306 A1	2000年 6月 19日
		TR 9902878 T2	2000年 2月 21日
		EP 0975771 A1	2000年 2月 2日