(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111423512 B
(45)授权公告日 2024.01.05

(21)申请号 201910023522.6
(22)申请日 2019.01.10
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111423512 A
(43)申请公布日 2020.07.17
(73)专利权人 北京比洋生物技术有限公司
地址 100176 北京市大兴区亦庄经济技术开发区西环南路18号汇龙森C座308室
(72)发明人 胡品良 邹敬 洪伟东 何芸 白洁 宋凌云 杨文第
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 胡志君 黄革生
(51)Int.Cl.
*C07K 19/00*(2006.01)
*A61K 39/395*(2006.01)
*A61K 47/64*(2017.01)
*A61P 35/00*(2006.01)

(56)对比文件
US 2009304693 A1,2009.12.10
CN 103167879 A,2013.06.19
CN 109053895 A,2018.12.21
CN 107922470 A,2018.04.17
WO 2015112900 A1,2015.07.30
CN 103502464 A,2014.01.08
CN 109069638 A,2018.12.21
US 2017275353 A1,2017.09.28
CN 104159926 A,2014.11.19

审查员 杨啸天

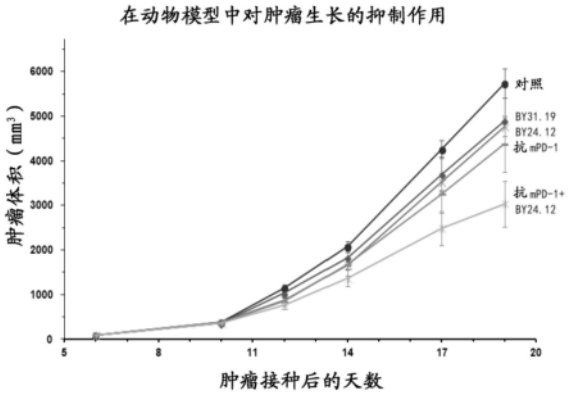
权利要求书2页 说明书33页
序列表（电子公布） 附图4页

(54)发明名称

# 阻断血管内皮细胞生长且活化T细胞的多靶向融合蛋白和包含其的药物组合物

(57)摘要

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




CN 111423512 B

1.一种阻断血管内皮细胞生长且活化T细胞的多靶向融合蛋白,所述多靶向融合蛋白从N端至C端包含

(i)血管内皮生长抑制剂结构域,其是

抗VEGF抗体的Fab,包含SEQ ID NO:1/2的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部6个重链CDR与轻链CDR;或者

抗VEGFR抗体的Fab,包含SEQ ID NO:5/6的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部6个重链CDR与轻链CDR;

(ii)人免疫球蛋白Fc结构域;和

(iii)人CD80胞外结构域,为SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的人CD80 IgV或SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的人CD80 IgVIgC;

或者,所述多靶向融合蛋白从N端至C端包含

(iii)人CD80胞外结构域,为SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的人CD80 IgV或SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的人CD80 IgVIgC;

(ii)人免疫球蛋白Fc结构域;和

(i)血管内皮生长抑制剂结构域,其是VEGFR胞外受体功能区,为SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的VEGFR1免疫球蛋白样结构域2和VEGFR2免疫球蛋白样结构域3。

2.根据权利要求1所述的多靶向融合蛋白,其中所述(i)包含SEQ ID NO:1/2或5/6的成对重链可变区序列/轻链可变区序列。

3.根据权利要求2所述的多靶向融合蛋白,其中所述(i)是Bevacizumab或Ramucirumab的Fab。

4.根据权利要求1所述的多靶向融合蛋白,其中所述(ii)是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc结构域。

5.根据权利要求4所述的多靶向融合蛋白,其中所述(ii)是SEQ ID NO:10、11或12所示氨基酸序列的Fc结构域。

6.根据权利要求1所述的多靶向融合蛋白,其还包含所述(i)、(ii)和/或(iii)之间的选自SEQ ID NO:20－46的肽接头。

7.根据权利要求4所述的多靶向融合蛋白,其中所述$IgG_4$的Fc结构域中第S228位置处包含氨基酸置换S228P。

8.根据权利要求1－7中任一项所述的多靶向融合蛋白,其选自

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

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

(3)SEQ ID NO:88的融合蛋白亚基的融合蛋白。

9.多核苷酸,其编码权利要求1－8中任一项所述的多靶向融合蛋白。

10.载体,所述载体包含权利要求9所述的多核苷酸。

11.根据权利要求10所述的载体,其是具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶表达载体。

12.微生物和适于产生蛋白质的哺乳动物宿主细胞系,其包含权利要求9所述的多核苷酸或权利要求10或11所述的载体。

13.根据权利要求12所述的微生物和适于产生蛋白质的哺乳动物宿主细胞系,其中所述宿主细胞系是CHO、HEK293或NSO细胞系。

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

15.药物组合物,其包含权利要求1－8中任一项所述的多靶向融合蛋白和抗PD-1抗体,其中所述抗PD-1抗体包含选自SEQ ID NO:47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70和71/72的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部6个重链CDR与轻链CDR。

16.根据权利要求15所述的药物组合物,其中所述抗PD-1抗体包含选自SEQ ID NO:47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70和71/72的成对重链可变区序列/轻链可变区序列。

17.根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述抗PD-1抗体选自纳武单抗(Nivolumab)、pidilizumab和派姆单抗(Pembrolizumab)。

18.权利要求1－8中任一项所述的多靶向融合蛋白、权利要求15－17中任一项所述的药物组合物的用途,用于制备在个体中治疗癌性疾病的药物,其中所述癌性疾病是黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、食管癌、胃肠道间质肿瘤、肾癌、肝癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、头颈部肿瘤、胃癌、淋巴瘤。

19.根据权利要求18所述的用途,其中所述癌性疾病是结肠癌或三阴性乳腺癌。

# 阻断血管内皮细胞生长且活化T细胞的多靶向融合蛋白和包含其的药物组合物

## 技术领域

[0001] 本发明总体上涉及医药生物技术领域。具体地，本发明涉及包含(i)血管内皮细胞生长抑制剂结构域；(ii)免疫球蛋白Fc结构域；和(iii)CD80胞外结构域(ECD)的多靶向融合蛋白、编码所述多靶向融合蛋白的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、包含所述多核苷酸或载体的宿主细胞、以及包含所述多靶向融合蛋白和抗PD-1抗体的药物组合物。本发明的所述多靶向融合蛋白和药物组合物能够在个体中治疗或预防癌性疾病。

## 背景技术

[0002] 肿瘤微环境是肿瘤细胞赖以生存和发展的复杂环境，由细胞成分和非细胞成分组成，其中细胞成分包括肿瘤细胞本身、免疫细胞、内皮细胞等；非细胞成分包括细胞因子、趋化因子等。随着对肿瘤的研究，人们认识到了肿瘤的生成、生长、转移受到肿瘤微环境的调控。肿瘤微环境决定了肿瘤细胞是否得以优势生长。

[0003] 在肿瘤微环境中，通常存在T淋巴细胞活性的抑制，导致T淋巴细胞不能有效发挥对肿瘤的杀伤效应(Yao S,Zhu Y和Chen L.,Advances in targeting cell surface signaling molecules for immune modulation.,Nat Rev Drug Discov,2013,12(2):130-146)，例如，肿瘤细胞通过表达PD-L1，由此利用免疫检查点的抑制性信号通路(即，PD-1/PD-L1抑制性信号通路)来抑制T淋巴细胞活性，其中所述PD-L1在正常人体组织是不表达的。

[0004] 以前认为PD-1与其配体PD-L1结合后，通过抑制T细胞受体(TCR)/主要组织相容性复合物(MHC)来实现对T淋巴细胞激活的抑制，但近来Hui等的研究表明，PD-1和CD28共定位于T淋巴细胞膜，PD-1介导的免疫抑制作用靶标主要为CD28，而非TCR，具体而言，PD-1结合PD-L1后快速募集Shp2磷脂酶，Shp2磷脂酶优先地使CD28去磷酸化，这强于对TCR的去磷酸化，从而通过失活CD28信号传导来抑制T细胞功能(Hui E.等人,T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition,Science,2017,355(6332):1428-1433)。

[0005] Kamphorst AO等人证实了CD28共刺激信号的激活是T细胞“再激活”的重要条件之一(Kamphorst AO等人,Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent,Science,2017,355(6332):1423-1427)。CD28/B7(即，T淋巴细胞表面的共刺激分子CD28与CD86(也称为B7-2)或CD80(也称为B7-1)结合的)共刺激途径的活化对于荷瘤小鼠和慢性病毒感染期间抗PD-1抗体的治疗效果至关重要，如果用抗B7抗体阻断B7分子与CD28的结合，则抗PD-1抗体对肿瘤的抑制作用显著降低。另有研究表明，可溶性CD80在小鼠肿瘤系统中具有体内治疗功效(Horn LA等人,Soluble CD80 Protein Delays Tumor Growth and Promotes Tumor-Infiltrating Lymphocytes,Cancer Immunol Res.2018;6(1):59-68)。在肿瘤微环境中CD80和CD86低表达或不表达，这也是造成肿瘤免疫逃避的重要机制之一。

[0006] 另外，在T细胞表面表达的CTLA-4和T细胞表面的共刺激分子CD28具有高度的同源性，它们拥有相同的配体CD86(B7-2)或CD80(B7-1)。CTLA-4与B7分子结合通常会抑制T细胞的活化，因此阻断免疫检查点B7/CTLA-4通路可以增强肿瘤特异性T细胞激活作用。

[0007] 另一方面，在肿瘤微环境中，肿瘤细胞还通过释放促血管生成因子，例如血管内皮细胞生长因子(Vascular Endothelial Cell Growth Factor(VEGF))，导致VEGF数量激增，VEGF通过与其细胞表面受体VEGFR结合介导了血管内皮细胞的分裂增殖和迁移、提高了血管通透性、抑制肿瘤细胞凋亡，为肿瘤的生长和转移提供了良好的微环境。

[0008] 目前，已批准上市了用来阻断PD-1/PD-L1抑制性信号通路、阻断B7/CTLA-4通路、或阻断VEGF/VEGFR通路的单靶向肿瘤治疗药物，它们分别例如为抗PD-1抗体药物，如百时美施贵宝(BMS)公司的纳武单抗(Nivolumab)和默克(Merck)公司的派姆单抗(Pembrolizumab)；百时美施贵宝(BMS)公司的抗CTLA-4抗体伊匹单抗(Ipilimumab，商品名为Yervoy)；基因泰克(Genentech)公司的人鼠嵌合抗VEGF抗体贝伐单抗(Bevacizumab，商品名Avastin)；Sanofi-aventis公司和Regeneron公司研制的作为VEGF-Trap的阿柏西普(aflibercept)等。但是，有相当一部分的肿瘤患者对单靶向肿瘤治疗无应答或产生耐药性，例如，目前抗PD-1和PD-L1抗体药物平均的治疗有效率仅为20％左右，肺癌的五年生存率仅16％。因此，在许多情况下，需要采用多靶向疗法来避免患者对单靶向肿瘤治疗无应答或产生耐药性的问题。

[0009] 由于多靶向融合蛋白能够同时特异性靶向参与肿瘤发生和发展的多种信号传导通路，因此，存在研发能够通过阻断血管内皮细胞生长且活化T细胞来改善肿瘤微环境的多靶向融合蛋白、以及将所述多靶向融合蛋白与其他抗癌药联用的需要。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明人通过锐意研究，开发了一组阻断血管内皮细胞生长且活化T细胞的多靶向融合蛋白，其包含(i)血管内皮生长抑制剂结构域；(ii)免疫球蛋白Fc结构域；和(iii)CD80胞外结构域(ECD)。所述多靶向融合蛋白能够从两个方面改善肿瘤微环境，并提高肿瘤免疫治疗效果，其中对肿瘤微环境的改善一方面是通过所述多靶向融合蛋白的CD80胞外结构域(ECD)与CD28、PD-L1和CTLA-4的特异性结合实现的，具体而言，通过CD80胞外结构域结合PD-L1这一免疫检查点，缓解PD-1/PD-L1抑制性信号通路，给免疫系统“松刹车”；通过CD80胞外结构域结合CTLA-4而发挥同抗CTLA-4抗体伊匹单抗同样的抑制调节性T细胞(Treg)的功能；通过CD80胞外结构域结合CD28来活化CD28/B7共刺激途径，并激活T淋巴细胞，为淋巴细胞的激活“加油门”；对肿瘤微环境的改善另一方面是通过所述多靶向融合蛋白的血管内皮细胞生长抑制剂结构域阻断VEGF/VEGFR通路来抑制肿瘤新生血管的生成，使肿瘤组织血管正常化，从而更多的淋巴细胞侵润到肿瘤组织，以及解除VEGFs对免疫细胞的抑制作用。

[0012] 在一个实施方案中，本发明的多靶向融合蛋白包含(i)衍生自抗VEGF抗体和/或抗VEGFR抗体的抗原结合片段和/或VEGFR胞外受体功能区；(ii)免疫球蛋白Fc结构域；和(iii)CD80胞外结构域(ECD)。

[0013] 所述多靶向融合蛋白中包含的衍生自抗VEGF抗体的抗原结合片段可以衍生自任何抗VEGF抗体的抗原结合片段，只要是能够结合VEGF，并由此阻断或抑制VEGF与其受体VEGFR结合的抗体即可。所述抗VEGF抗体包括现有技术中已知的抗VEGF抗体和将来研发出

的抗VEGF抗体。在一个实施方案中，所述抗VEGF抗体的抗原结合片段是抗VEGF抗体的Fab、Fab'、F(ab')$_2$、Fv、单链Fv；优选地，所述抗VEGF抗体的抗原结合片段包含选自SEQ ID NO：1/2和3/4的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部6个重链CDR与轻链CDR，或者与所述全部6个重链CDR与轻链CDR中的一个或多个CDR具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化(例如，氨基酸置换或缺失)的序列；更优选地，所述抗VEGF抗体的抗原结合片段包含选自SEQ ID NO:1/2和3/4的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多序列同一性的序列；最优选地，所述抗VEGF抗体的抗原结合片段是Bevacizumab或Ranibizumab的Fab。

[0014] 所述多靶向融合蛋白中包含的衍生自抗VEGFR抗体的抗原结合片段可以衍生自任何抗VEGFR抗体的抗原结合片段，只要是能够结合VEGFR，并由此阻断或抑制VEGF与其受体VEGFR结合的抗体即可。所述抗VEGFR抗体包括现有技术中已知的抗VEGFR抗体和将来研发出的抗VEGFR抗体。在一个实施方案中，所述抗VEGFR抗体的抗原结合片段是抗VEGFR抗体的Fab、Fab'、F(ab')$_2$、Fv、单链Fv；优选地，所述抗VEGFR抗体的抗原结合片段包含SEQ ID NO：5/6的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部6个重链CDR与轻链CDR，或者与所述全部6个重链CDR与轻链CDR中的一个或多个CDR具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化(例如，氨基酸置换或缺失)的序列；更优选地，所述抗VEGFR抗体的抗原结合片段包含SEQ ID NO:5/6的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多序列同一性的序列；最优选地，所述抗VEGFR抗体的抗原结合片段是Ramucirumab的Fab。

[0015] 所述多靶向融合蛋白中包含的VEGFR胞外受体功能区可以是任何VEGFR胞外受体功能区，只要是能够结合VEGF，并由此阻断或抑制VEGF与其受体VEGFR结合的VEGFR胞外受体功能区即可。优选地，所述VEGFR胞外受体功能区包含VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2和VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3；或者所述VEGFR胞外受体功能区包含VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2以及VEGFR2的免疫球蛋白样结构域3和VEGFR2的免疫球蛋白样结构域4；或者所述VEGFR胞外受体功能区包含VEGFR1的免疫球蛋白样结构域2；更优选地，所述VEGFR胞外受体功能区具有任一选自SEQ ID NO:7－9所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7－9所示的氨基酸序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多同一性的氨基酸序列。

[0016] 所述多靶向融合蛋白中包含的(ii)免疫球蛋白Fc结构域可以是任何免疫球蛋白Fc结构域，特别地，所述(ii)是人免疫球蛋白Fc结构域。在一个实施方案中，所述免疫球蛋白Fc结构域是IgG类抗体的Fc结构域，特别地是IgG$_1$亚类、IgG$_2$亚类、IgG$_4$亚类抗体的Fc结构域。在一个优选的实施方案中，包含于本发明多靶向融合蛋白中的所述免疫球蛋白Fc结构域是IgG$_1$亚类抗体的Fc结构域，特别地是人IgG$_1$亚类抗体的Fc结构域。在一个优选的实施方案中，包含于本发明多靶向融合蛋白中的所述免疫球蛋白Fc结构域是IgG$_4$亚类抗体的Fc结构域，特别地是人IgG$_4$亚类抗体的Fc结构域。在一些实施方案中，本发明多靶向融合蛋白中的(ii)免疫球蛋白Fc结构域包含SEQ ID NO:10、11或12所示氨基酸序列的Fc结构域，或者包含与SEQ ID NO:10、11或12所示氨基酸序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、

96％、97％、98％、99％或更多序列同一性的Fc结构域。

[0017] 所述多靶向融合蛋白中包含的(iii)CD80 ECD是CD80的胞外结构域的一部分。在一个实施方案中，所述CD80 ECD包含CD80免疫球蛋白V(IgV)区(CD80-IgV)。在一个实施方案中，所述CD80 ECD包含CD80免疫球蛋白V区和C区(CD80-IgVIgC)。在一个实施方案中，所述CD80 ECD是人CD80 ECD，优选地所述CD80 ECD包含人CD80 IgV。在一个具体实施方案中，所述CD80-IgV具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中，所述CD80-IgVIgC具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多同一性的氨基酸序列。

[0018] 在一个实施方案中，所述多靶向融合蛋白还包含所述(i)、(ii)和/或(iii)之间的肽接头；优选地，所述肽接头包含一个或多个氨基酸，更优选地包含至少5个氨基酸，最优选地包含选自SEQ ID NO:20－46的肽接头。

[0019] 在一个实施方案中，所述多靶向融合蛋白从N端至C端以(i)、(ii)和(iii)的顺序；(iii)、(i)和(ii)的顺序；或者(iii)、(ii)和(i)的顺序有效连接。

[0020] 在一些实施方案中，本发明的多靶向融合蛋白包含

[0021] (a)全长抗VEGF抗体、全长抗VEGFR抗体或者全长抗VEGF和VEGFR双特异性抗体；和在所述抗体的两条重链中的每一重链的C端有效连接的一个CD80 ECD；

[0022] (b)全长抗VEGF抗体、全长抗VEGFR抗体或者全长抗VEGF和VEGFR双特异性抗体；在所述抗体的两条重链中的每一重链的N端有效连接的一个CD80 ECD；和在所述抗体的两条轻链中的每一轻链的N端有效连接的一个CD80 ECD；

[0023] (c)CD80 ECD；在CD80 ECD的C端有效连接的二聚体形式的免疫球蛋白Fc结构域；和在所述二聚体形式的免疫球蛋白Fc结构域的C端有效连接的衍生自抗VEGF抗体和/或抗VEGFR抗体的抗原结合片段；

[0024] 或者

[0025] (d)CD80 ECD；在CD80 ECD的C端有效连接的二聚体形式的免疫球蛋白Fc结构域；和在所述二聚体形式的免疫球蛋白Fc结构域的C端有效连接的VEGFR胞外受体功能区；

[0026] 优选地，所述抗体是IgG类抗体，特别地是$IgG_1$亚类、$IgG_2$亚类、$IgG_4$亚类抗体，更特别地是$IgG_4$亚类抗体；还优选地，所述$IgG_4$亚类抗体在Fc结构域中第S228位置处包含氨基酸置换，更优选地是氨基酸置换S228P；进一步优选地，所述抗体的轻链型别为κ型或λ型，优选地为κ型；

[0027] 优选地，所述全长抗VEGF抗体是Bevacizumab，所述全长抗VEGFR抗体是Ramucirumab。

[0028] 在一些实施方案中，本发明的多靶向融合蛋白选自

[0029] (1)包含SEQ ID NO:80的融合蛋白第一亚基和SEQ ID NO:82的融合蛋白第二亚基的融合蛋白；

[0030] (2)包含SEQ ID NO:84的融合蛋白第一亚基和SEQ ID NO:86的融合蛋白第二亚基的融合蛋白；

[0031] (3)包含SEQ ID NO:88的融合蛋白亚基的融合蛋白。

[0032] 本发明还提供了编码本发明的多靶向融合蛋白的多核苷酸、包含编码本发明多靶向融合蛋白的多核苷酸的载体，优选地表达载体，最优选地具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶表达载体。在另一方面，本发明提供了包含本发明多核苷酸或载体的宿主细胞。在一个实施方案中，所述宿主细胞是CHO、HEK293或NSO细胞。本发明也提供了一种用于产生本发明多靶向融合蛋白的方法，包括步骤(i)在适于表达本发明的多靶向融合蛋白的条件下培养本发明的宿主细胞，和(ii)回收本发明的多靶向融合蛋白。

[0033] 在另一方面，本发明还提供了本发明的多靶向融合蛋白与抗PD-1抗体组合的药物组合物。本发明的多靶向融合蛋白与抗PD-1抗体联用时显示出了较好的协同性，由此能够更好地实现抑制肿瘤生长的目的。

[0034] 当与本发明的多靶向融合蛋白组合使用时，抗PD-1抗体可以是任何抗PD-1抗体，只要是能够抑制或减少PD-1与其配体结合的抗体即可，包括现有技术中已知的抗PD-1抗体和将来研发出的抗PD-1抗体。在一些实施方案中，所述抗PD-1抗体包含选自SEQ ID NO:47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70和71/72的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部6个重链CDR与轻链CDR，或者与所述全部6个重链CDR与轻链CDR中的一个或多个CDR具有一个、两个、三个、四个、或五个氨基酸变化(例如，氨基酸置换或缺失)的序列；进一步优选地，所述抗PD-1抗体包含选自SEQ ID NO:47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70和71/72的成对重链可变区序列/轻链可变区序列，或与所述成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多序列同一性的序列；最优选地，所述抗PD-1抗体选自纳武单抗(Nivolumab)、pidilizumab和派姆单抗(Pembrolizumab)。

[0035] 在又一个方面，本发明提供了本发明的多靶向融合蛋白、药物组合物的用途，用于制备在个体中治疗或预防癌性疾病(例如，实体瘤和软组织瘤)的药物，优选地，癌性疾病是黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、食管癌、胃肠道间质肿瘤(GIST)、肾癌(例如，肾细胞癌)、肝癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、头颈部肿瘤、胃癌、血液学恶性病(例如，淋巴瘤)；特别地，所述疾病是结肠癌或三阴性乳腺癌；优选地，其中所述个体是哺乳动物，更优选地是人。

[0036] 除非另外限定，否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入本文作为参考。此外，本文中所述的材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

[0037] 附图简述

[0038] 结合以下附图一起阅读时，将更好地理解以下详细描述的本发明的优选实施方案。出于说明本发明的目的，图中显示了目前优选的实施方案。然而，应当理解本发明不限于图中所示实施方案的精确安排和手段。

[0039] 图1A和B提供了本发明的多靶向融合蛋白的示意图，其中图1A例示了从N端至C端包含抗体的抗原结合片段、免疫球蛋白Fc结构域和CD80 ECD的多靶向融合蛋白的结构示意图；图1B例示了从N端至C端包含CD80 ECD、免疫球蛋白Fc结构域和VEGFR胞外受体功能区的

融合蛋白的结构示意图。

[0040] 图2:显示了实施例2中制备并纯化的本发明的各目的蛋白在还原剂(5mM 1,4-二硫苏糖醇)存在下通过SDS-PAGE电泳并用考马斯蓝染色后的结果。泳道1:蛋白分子量标准标志物;泳道2:融合蛋白BY24.4;泳道3:融合蛋白BY24.5;泳道4:融合蛋白BY24.12;泳道5:融合蛋白BY31.19;泳道6:抗体BY18.1

[0041] 图3:显示了在实施例5的混合淋巴细胞反应(MLR)中本发明的多靶向融合蛋白及其与抗PD-1抗体组合后对IFN-γ分泌的影响。柱1:BY18.1组;柱2:BY24.4组;柱3:BY18.1+BY24.4组;柱4:BY24.5组;柱5:BY18.1+BY24.5组;柱6:BY24.12组;柱7:BY18.1+BY24.12组。

[0042] 图4:显示了在实施例6的动物模型中本发明的多靶向融合蛋白及其与抗PD-1抗体组合后对抗肿瘤生长的抑制作用。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明提供了阻断血管内皮细胞生长且活化T细胞的多靶向融合蛋白和包含所述多靶向融合蛋白的药物组合物。本发明还提供了用于产生该多靶向融合蛋白的方法,以及该多靶向融合蛋白或药物组合物在个体中治疗或预防癌性疾病中的用途。

[0045] 除非下文中另外定义,否则本说明书中的术语如本领域通常所用那样使用。

[0046] I.定义

[0047] 术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小5%的下限和比指定数字数值大5%的上限的范围内的数字数值。

[0048] 如本文中所用,术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤,但是不排除任意其他要素、整数或步骤。

[0049] “PD-1/PD-L1抑制性信号通路”、“PD-1/PD-L1信号通路”、“PD-1/PD-L1信号传导途径”、“PD-1/PD-L1途径”在本文中可以互换使用,是指任何通过PD-1与PD-L1结合而引发的细胞内信号传导途径。

[0050] 本文所用的“缓解”、“干扰”、“抑制”或“阻断”PD-1/PD-L1抑制性信号传导途径可以互换使用,是指(i)干扰PD-1和PD-L1之间的相互作用;和/或(ii)导致PD-1/PD-L1信号传导途径的至少一种生物学功能的抑制。由本发明的多靶向融合蛋白与PD-L1特异性结合后导致的“缓解”、“干扰”、“抑制”或“阻断”PD-1/PD-L1信号传导途径不需要是完全的缓解、干扰、抑制或阻断。

[0051] 在本文中“CD28/B7信号传导途径”、“CD28/B7共刺激途径”、“CD28/B7通路”可以互换使用,是指(i)通过CD28与CD80结合而刺激细胞活化的信号传导途径;和/或(ii)通过CD28与CD86结合而刺激细胞活化的信号传导途径。

[0052] “CD80”和“CD86”均为跨膜糖蛋白,属结构高度相似的免疫球蛋白超家族(IgSF)成员,亦统称B7分子。CD80和CD86胞外区有一个免疫球蛋白V(IgV)区和免疫球蛋白C(IgC)区构成。成熟CD80分子由254个氨基酸组成,其中胞外区由208个氨基酸、跨膜区25个氨基酸和胞内区21个氨基酸。类似地,成熟CD86分子由303个氨基酸组成,其中胞外区由222个氨基酸、跨膜区20个氨基酸和胞内区61个氨基酸。CD80,亦称B7.1,表达于T细胞、B细胞、树突细胞和单核细胞的表面,通过其免疫球蛋白V(IgV)区以较低亲和力结合CD28、PD-L1和CTLA-4,其中CD80与CD28的结合亲和力为4μM;CD80与PD-L1的结合亲和力为～1.7μM;CD80与CTLA-4的结合亲和力为0.2μM(Butte MJ等人,Programmed death-1 ligand 1 interacts

specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses,Immunity,2007年7月;27(1):111-122)。CD86结合CD28和CTLA-4,但不结合PD-L1。

[0053] 可溶性CD80(例如,CD80-Fc)能够通过CD28/B7共刺激途径对T淋巴细胞产生持续的激活作用,并刺激产生干扰素。实验表明,CD80-Fc在体外维持T淋巴细胞产生干扰素,甚至比抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体更有效。在体内抑制肿瘤生长方面,可溶性CD80(例如,CD80-Fc)的抑瘤效果比抗PD-L1抗体更有效(Ostrand-Rosenberg S等人,Novel strategies for inhibiting PD-1 pathway-mediated immune suppression while simultaneously delivering activating signals to tumor-reactive T cells,Cancer Immunol Immunother.,2015年10月;64(10):1287-93)。CD80-Fc能通过结合PD-L1来抑制PD-1/PD-L1途径介导的免疫抑制,并向通过CD28/B7共刺激途径激活的T细胞递送共刺激信号,从而增强T淋巴细胞活化。总之,CD80-Fc可以缓解PD-1/PD-L1途径的免疫抑制作用,同时激活肿瘤免疫反应性T细胞。虽然可溶性CD86(例如,CD86-Fc)也可激活CD28,甚至可产生CD80-Fc的3-5倍激活效应,但由于CD86不结合PD-L1,最终CD80-Fc对T淋巴细胞的激活作用强于CD86-Fc(Haile ST等人,Soluble CD80restores T cell activation and overcomes tumor cell programmed death ligand 1-mediated immune suppression.,J Immunol.,2013年9月1日;191(5):2829-36)。根据已有的研究表明CD80-Fc具有如下作用:(i)CD80-Fc单独使用时,抑制肿瘤的效果好于PD-L1抗体(AACR ANNUAL MEETING,2018年4月14-18日,美国,伊利诺伊州,芝加哥);(ii)CD80-Fc促进淋巴细胞侵润肿瘤组织,且效果好于PD-L1抗体(Horn LA等人,Soluble CD80 Protein Delays Tumor Growth and Promotes Tumor-Infiltrating Lymphocytes,Cancer Immunol Res.,2018年1月;6(1):59-68);(iii)CD80-Fc单独使用时,抑制肿瘤的效果好于PD-1/PD-L1途径的抑制剂,并且与PD-1抗体联用时有协同作用。Five Prime公司甚至认为CD80-Fc优于GITRL、OX40L和4-1BBL等T细胞激动剂。由于看到了CD80-Fc良好的免疫治疗效果,Five Prime Therapeutics,Inc.的CD80-Fc项目FPT155计划在最近开展临床试验。

[0054] 在本文中“B7/CTLA-4通路”、“B7/CTLA-4信号传导途径”可以互换使用,是指(i)通过CD80与CTLA-4结合而引起的信号传导途径;和/或(ii)通过CD86与CTLA-4结合而引起的信号传导途径。

[0055] 在本文中“VEGF/VEGFR通路”、“VEGF/VEGFR信号传导途径”可以互换使用,是指通过VEGF家族中的一种或多种与细胞表面受体VEGFR家族中的一种或多种结合介导的信号传导途径。VEGF家族包含六种密切相关的多肽,分别是高度保守的同源二聚体糖蛋白,有六个亚型:VEGF-A、-B、-C、-D、-E、和胎盘生长因子(placental growth factor(PLGF)),分子量从35至44kDa不等。VEGF-A(包括其剪接物如$VEGF_{165}$)的表达与一些实体瘤的微血管密度具有相关性,并且组织中VEGF-A的浓度与乳腺癌、肺癌、前列腺癌和结肠癌等实体瘤的预后有关。每个VEGF家族成员的生物学活性通过细胞表面VEGF受体(VEGFR)家族中的一种或多种介导,所述VEGFR家族包括VEGFR1(也称为Flt-1)、VEGFR2(也称为KDR、Flk-1)、VEGFR3(也称为Flt-4)等,其中VEGFR1、VEGFR2与血管的生成关系密切,VEGF-C/D/VEGFR3则与淋巴管生成密切相关。VEGF家族的主要生物学功能包括:(1)选择性促进血管内皮细胞有丝分裂,刺激内皮细胞增殖并促进血管形成;(2)提高血管尤其是微小血管的通透性,使血浆大分子外

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

[0056] 临床研究显示利用抗VEGF单克隆抗体、抗VEGFR单克隆抗体、或可溶性VEGFR能够阻断VEGF家族与其受体的结合,并阻碍VEGF家族信号通路的传导。基因泰克(Genentech)公司研发的贝伐单抗(Bevacizumab,商品名Avastin)是一种重组的人鼠嵌合抗VEGF抗体,可通过阻断VEGF-A与VEGFR的结合,使VEGFR无法活化,由此发挥抗血管生成的作用。贝伐单抗目前用于转移性结直肠癌、肺癌、乳癌、胰脏癌、肾脏癌等的治疗。Sanofi-aventis公司和Regeneron公司研制的阿柏西普(aflibercept)是一种VEGF-Trap,其是将VEGFR1胞外第2个结构域和VEGFR2胞外第3个结构域与人IgG1恒定区融合获得的一种融合蛋白,能通过抑制血管生成而对一部分肿瘤患者发挥抗肿瘤作用。

[0057] 如本文所用,术语“特异性结合”意指对抗原或目的分子的结合具有选择性并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。所述特异性结合可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或本领域技术人员熟悉的其他技术,例如表面等离子体共振(SPR)技术(在BIAcore仪上分析)(Liljeblad等人,Analysis of agalacto-IgG in rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance,Glyco J.,2000,17,323-329)测量。

[0058] 术语“血管内皮生长抑制剂结构域”指阻断VEGF/VEGFR信号传导的血管内皮生长抑制剂的部分,所述部分是发挥抑制血管内皮生长的区域。血管内皮生长抑制剂结构域可以由例如一个或多个抗VEGF抗体的可变结构域(也称作抗体可变区)、一个或多个抗VEGFR抗体的可变结构域、或VEGFR胞外受体功能区提供。

[0059] 术语“调节性T细胞(Treg)”代表对维持自我耐受性至关重要的特定T淋巴细胞亚群。具有阻抑物功能的所述Treg细胞能通过细胞内表达转录因子FOXP3以及其他细胞标志物如$CD127^{低}$、$CTLA\text{-}4^{+}$、LAP、$CD39^{+}$、$PD\text{-}1^{+}$、GARP等与其他T淋巴细胞区分。

[0060] “亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶物Y的亲和力可以通常由解离常数($K_D$)代表,解离常数是解离速率常数和缔合速率常数(分别是$k_{off}$和$k_{on}$)的比例。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是表面等离子体共振法(SPR)。

[0061] 术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体),只要它们显示出所需的抗原结合活性即可。抗体可以是任何型和亚型(例如,IgM、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgA1和IgA2)的完整抗体(例如,具有两个全长的轻链和两个全长的重链)。

[0062] 术语“全抗体”、“全长抗体”、“完全抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地用来指一种抗体,所述抗体具有基本上与天然抗体结构相似的结构。

[0063] 术语“抗体重链”指以其天然存在构象在抗体分子中存在的两种类型多肽链中的较大者,其在正常情况下决定抗体所属的类别。

[0064] 术语“抗体轻链”指以其天然存在构象在抗体分子中存在的两种类型多肽链中的较小者。κ轻链和λ轻链指两个主要的抗体轻链型别。

[0065] “双特异性抗体”是具有两个不同的重链/轻链对且具有两个不同的结合部位的人工杂合抗体。可以通过多种方法,包括杂交瘤融合或Fab’片段的连接制备双特异抗体。

[0066] 术语抗体的“抗原结合片段”是比完整或完全抗体或抗体链更少的氨基酸残基的抗体或抗体链的一部分或一段,其能结合抗原或与完整抗体(即与抗原结合片段所来源的完整抗体)竞争结合抗原。可以通过重组DNA技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于Fab、Fab’、$F(ab')_2$、Fv、单链Fv。所述Fab片段是一种由$V_L$、$V_H$、$C_L$和CH1结构域组成的单价片段,例如,通过木瓜蛋白酶消化完全抗体能够获得Fab片段。此外,通过胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化完全抗体产生$F(ab')_2$,其为Fab’的二聚体,是双价片段。$F(ab')_2$可以在中性条件下通过破坏铰链区中的二硫键而被还原,因此将$F(ab')_2$二聚体转化为Fab’单体。Fab’单体基本上是具有铰链区的Fab片段(其它抗体片段的更详细的描述请参见:基础免疫学(Fundamental Immunology),W.E.Paul编辑,Raven Press,N.Y.(1993))。所述Fv片段由抗体单臂的$V_L$和$V_H$结构域组成。另外,虽然Fv片段的两个结构域$V_L$和$V_H$由独立的基因编码,但是使用重组方法,可以将它们通过能够使这两个结构域作为单条蛋白链产生的合成性接头连接,在所述单条蛋白链中$V_L$区和$V_H$区配对以形成单链Fv。可以通过化学方法、重组DNA方法或蛋白酶消化法获得所述抗体片段。

[0067] 术语“免疫球蛋白”指具有天然存在抗体的结构的蛋白质。例如,IgG类免疫球蛋白是由二硫键结合的两条轻链和两条重链组成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。从N端至C端,每条免疫球蛋白重链具有一个可变区(VH),也称作可变重链域或重链可变结构域,随后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3),也称作重链恒定区。类似地,从N端至C端,每条免疫球蛋白轻链具有一个可变区(VL),也称作可变轻链域或轻链可变结构域,随后一个恒定轻链(CL)结构域,也称作轻链恒定区。免疫球蛋白的重链可以归属5个类别之一,称作α(IgA)、δ(IgD)、ε(IgE)、γ(IgG)或μ(IgM),其中某些类别可以进一步划分成亚类,例如$\gamma_1$(IgG1)、$\gamma_2$(IgG2)、$\gamma_3$($IgG_3$)、$\gamma_4$($IgG_4$)、$\alpha_1$($IgA_1$)和$\alpha_2$($IgA_2$)。免疫球蛋白的轻链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列而划分成两种型之一,称作κ和λ。免疫球蛋白基本上由借助免疫球蛋白铰链区连接的两个Fab分子和一个Fc结构域组成。

[0068] 术语“Fc结构域”或“Fc区”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。天然的免疫球蛋白“Fc结构域”包含两个或三个恒定结构域,即CH2结构域、CH3结构域和可选的CH4结构域。例如,在天然抗体中,免疫球蛋白Fc结构域包含源自IgG、IgA和IgD类抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(CH2结构域和CH3结构域);或者包含源自IgM和IgE类抗体的两条重链的第二、第三和第四恒定结构域(CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域)。除非本文中另外说明,否则Fc区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interes,第5版,Public Health Service,National Institutes of

Health,Bethesda,MD,1991中所述的EU编号体系(也称作EU索引)进行编号。

[0069] “人免疫球蛋白”是这样一种免疫球蛋白,其拥有对应于人或人细胞产生的免疫球蛋白的氨基酸序列或从利用人免疫球蛋白库或其他编码人免疫球蛋白的序列的非人来源衍生。

[0070] 氨基酸序列的“同一性百分数(%)”是指将候选序列与本说明书中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后,并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时,候选序列中与本说明书中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。

[0071] 术语“有效连接”意指指定的各组分处于一种允许它们以预期的方式起作用的关系。

[0072] 术语“N端”指N端的最末氨基酸,术语“C端”指C端的最末氨基酸。

[0073] 术语“融合”指将两个或多个组分由肽键直接连接或借助一个或多个肽接头有效连接。

[0074] 术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明多靶向融合蛋白的任何类型的细胞系统。宿主细胞包括培养的细胞,也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。

[0075] 术语“个体”或“受试者”可互换地使用,是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如,奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如,人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。特别地,个体是人。

[0076] 术语“治疗”指意欲改变正在接受治疗的个体中疾病之天然过程的临床介入。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态,以及缓解或改善预后。在一些实施方案中,本发明的多靶向融合蛋白或药物组合物用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。

[0077] 术语“抗肿瘤作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果,包括但不限于例如,肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。术语“肿瘤”、“癌症”和“癌性疾病”在本文中互换地使用,涵盖实体瘤和液体肿瘤。

[0078] II.多靶向融合蛋白

[0079] 本发明提供了一种新型的多靶向融合蛋白,其包含(i)血管内皮生长抑制剂结构域;(ii)免疫球蛋白Fc结构域;和(iii)CD80胞外结构域(ECD)。

[0080] 在一些实施方案中,所述(i)、(ii)和/或(iii)任选地通过肽接头有效连接。

[0081] 在一些实施方案中,本发明的多靶向融合蛋白是由二硫键键合的两个融合蛋白第一亚基和两个融合蛋白第二亚基组成的异四聚体糖蛋白。

[0082] 在一些实施方案中,本发明的多靶向融合蛋白是由二硫键键合的同二聚体或异二聚体糖蛋白。

[0083] 本发明的多靶向融合蛋白阻断血管内皮细胞生长且活化T淋巴细胞。该多靶向融合蛋白一方面能够通过阻断VEGF/VEGFR通路来阻断血管内皮细胞生长,另一方面能够通过活化CD28/B7共刺激途径、抑制PD-1/PD-L1抑制性信号通路、由B7/CTLA-4信号传导途径抑

制调节性T细胞(Treg)功能来活化T淋巴细胞,从而改善肿瘤微环境,并提高肿瘤免疫治疗效果。

[0084] 在一些实施方案中,本发明的多靶向融合蛋白以$10^{-8}$M或更小、例如以$10^{-9}$M至$10^{-12}$M的解离常数($K_D$)与VEGF或VEGFR结合;且与CD28、PD-L1和CTLA-4特异性结合。

[0085] 以下对本发明多靶向融合蛋白的各组分分别进行描述。

[0086] 一血管内皮生长抑制剂结构域

[0087] 本发明多靶向融合蛋白中的"血管内皮生长抑制剂结构域"能够特异性结合VEGF和/或VEGFR,包括但不限于衍生自抗VEGF抗体和/或抗VEGFR抗体的抗原结合片段和/或VEGFR胞外受体功能区。

[0088] 在一个实施方案中,本发明多靶向融合蛋白中包含的衍生自抗VEGF抗体和/或抗VEGFR抗体的抗原结合片段使得本发明的多靶向融合蛋白能够以高亲和力,例如以$10^{-8}$M或更小、优选地以$10^{-9}$M至$10^{-12}$M的$K_D$与VEGF和/或VEGFR特异性结合,并由此阻断VEGF与其受体VEGFR结合所介导的信号传导途径。

[0089] 本文在下表1中提供了本发明多靶向融合蛋白中包含的抗VEGF抗体或抗VEGFR抗体的抗原结合片段中成对重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的例子。在一些实施方案中,本发明多靶向融合蛋白中的抗原结合片段包含与表1中抗VEGF抗体和/或抗VEGFR抗体的重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)的氨基酸序列基本上同一的序列,例如,与表1中所示的成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。

[0090] 表1.抗VEGF抗体或抗VEGFR抗体的抗原结合片段中重链可变区和轻链可变区序列的例子

[0091]

| 可变区 | 氨基酸序列 | 序列编号(SEQ ID NO:) |
|---|---|---|
| VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGW INTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YGSSHWYFDVWGQG | 1 |
| VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQG | 2 |
| VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGW INTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYY | 3 |

[0092]

| | | |
|---|---|---|
| | YGTSHWYFDVWGQG | |
| VL | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSL HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQG | 4 |
| VH | EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIS SSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDI WGQG | 5 |
| VL | DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQGIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYDASN LDTGVPSRFSGSGSGTYFTLTISSLQAEDFAVYFCQQAKAFPPTFGGG | 6 |

[0093] 在一个实施方案中，本发明多靶向融合蛋白中的抗原结合片段包含选自SEQ ID NO:1/2、3/4和5/6的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部6个重链互补决定区(CDR)与轻链CDR。用于鉴定重链可变区与轻链可变区的氨基酸序列中的CDR的方法及技术为本领域中已知的，且可用于鉴定本文公开的特定重链可变区及/或轻链可变区的氨基酸序列中的CDR。可用于鉴定CDR边界的示例性公知技术包括例如Kabat界定法、Chothia界定法以及AbM界定法。参见，例如Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991);Al-Lazikani等人，Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins.,J.Mol.Biol.273:927-948(1997);以及Martin AC等人，Modeling antibody hypervariable loops:a combined algorithm,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:9268-9272(1989)。

[0094] 作为本发明多靶向融合蛋白中的抗原结合片段来源的抗VEGF抗体或抗VEGFR抗体可以基于其轻链恒定区的氨基酸序列而划分为κ型或λ型，优选为κ型。

[0095] 本文在下表2中提供了抗VEGF抗体或抗VEGFR抗体轻链恒定区的氨基酸序列的例子。

[0096] 表2.抗体的轻链恒定区序列的例子

[0097]

| 轻链型别 | 恒定区氨基酸序列 |
|---|---|
| κ 型 | TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO：15） |
| λ 型 | TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS（SEQ ID NO：16） |

[0098] 作为本发明多靶向融合蛋白中的抗原结合片段来源的抗VEGF抗体或抗VEGFR抗体基于其重链恒定区的氨基酸序列优选地是IgG类抗体，特别地是$IgG_1$亚类、$IgG_2$亚类、$IgG_4$亚类抗体，更特别地是$IgG_4$亚类抗体。优选地，所述$IgG_4$亚类抗体在Fc区中第S228位置处包含防止发生臂交换(arm-exchange)的氨基酸置换，特别地是氨基酸置换S228P。

[0099] 本文在下表3中提供了抗体重链恒定区的氨基酸序列的例子。

[0100] 表3.抗体的重链恒定区序列的例子

[0101]

| 重链类别 | 恒定区氨基酸序列 |
|---|---|
| IgG1 | TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：17） |
| IgG2 | TTVTVSTASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPV AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：18） |
| IgG4 | TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO：19） |

[0102] 在一个实施方案中，本发明多靶向融合蛋白中包含的VEGFR胞外受体功能区是VEGFR的胞外结构域的一部分或其组合。VEGFR受体是位于细胞表面的一种酪氨酸激酶受体，其胞外区由7个免疫球蛋白(Ig)样结构域组成。例如，人VEGFR1包含编号为1、2、3、4、5、6和7的七个Ig样结构域，Ig样结构域1在胞外结构域的N端，Ig样结构域7在胞外结构域的C端。除非本文另外指出，否则Ig样结构域从VEGFR蛋白的N端至C端顺序编号。在一些实施方案中，VEGFR胞外受体功能区包含选自VEGFR1、VEGFR2和VEGFR3的一种或多种VEGFR的至少一个Ig样结构域。在一些方面，VEGFR胞外受体功能区包含VEGFR的至少1、2、3、4、5、6个但不超过7个Ig样结构域。在另一方面，VEGFR胞外受体功能区包含VEGFR的1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2个Ig样结构域。

[0103] 本文还考虑了包含两种或多种VEGFR的至少一个Ig样结构域的VEGFR胞外受体功能区。在一些实施方案中，VEGFR胞外受体功能区包含来自两种或多种选自VEGFR1、VEGFR2和VEGFR3的VEGFR的至少一个Ig样结构域。本文考虑了包含每种VEGFR的七个Ig样结构域的任意组合的VEGFR胞外受体功能区。例如，VEGFR胞外受体功能区可以包含VEGFR1(例如人VEGFR1)的Ig样结构域2和VEGFR2(例如人VEGFR2)的Ig样结构域3。在另一实施方案中，VEGFR胞外受体功能区可以包含VEGFR1(例如人VEGFR1)的Ig样结构域1-3、VEGFR1(例如人VEGFR1)的Ig样结构域2-3、VEGFR2(例如人VEGFR2)的Ig样结构域1-3、VEGFR1(例如人VEGFR1)的Ig样结构域2和VEGFR2(例如人VEGFR2)的Ig样结构域3-4，或VEGFR1(例如人VEGFR1)的Ig样结构域2和VEGFR3(例如人VEGFR3)的Ig样结构域3。这些Ig样结构域和其他可以用作VEGFR胞外受体功能区的部分的Ig样结构域的更详细描述见美国专利号7531173；Yu DC等，Soluble vascular endothelial growth factor decoy receptor FP3 exerts

potent antiangiogenic effects,Mol.Ther.,2012,20(3):938-947和Holash,J.等,VEGF-Trap:a VEGF blocker with potent antitumor effects,PNAS,2002,99(17):11393-11398,全部文献在此以其整体引入作为参考。在一些实施方案中,VEGFR胞外受体功能区具有任一选自表4中SEQ ID NO:7－9所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7－9所示的氨基酸序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多同一性的氨基酸序列。

[0104] 表4多靶向融合蛋白中的VEGFR胞外受体功能区氨基酸序列的例子

[0105]

| VEGFR胞外受体功能区 | 氨基酸序列 |
|---|---|
| VEGFR1-D2/VEGFR2-D3 | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELS VGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLST LTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK（SEQ ID NO：7） |
| VEGFR1-D2/VEGFR2-D3-D4 | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELS VGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLST LTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVG ERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSERDTGNYTVILT NPISKEKQSHVVSLVVYVPPGPGD（SEQ ID NO：8） |
| VEGFR1-D2 | SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNT （SEQ ID NO：9） |

[0106] 本发明多靶向融合蛋白中的VEGFR胞外受体功能区能够以高的亲和力,例如以$10^{-8}$M或更小、优选地以$10^{-9}$M至$10^{-12}$M的$K_D$,与VEGF家族特异性结合,并由此抑制VEGF家族与细胞表面VEGFR的结合和随后的信号传导。

[0107] －免疫球蛋白Fc结构域

[0108] 本发明多靶向融合蛋白中的“免疫球蛋白Fc结构域”包含天然存在的免疫球蛋白Fc结构域的全部氨基酸残基或包含天然存在的免疫球蛋白Fc结构域的一部分氨基酸残基。免疫球蛋白Fc结构域对本发明的多靶向融合蛋白提供有利的药代动力学特性,包括但不限于长血清半寿期。另外,免疫球蛋白Fc结构域还使得通过例如蛋白A亲和层析纯化本发明的多靶向融合蛋白成为可能。

[0109] 免疫球蛋白Fc结构域通常是二聚体分子。可以通过木瓜蛋白酶消化或胰蛋白酶消化完整(全长)免疫球蛋白来产生或可以重组产生免疫球蛋白Fc结构域,其包含CH2结构域、CH3结构域和可选的CH4结构域。

[0110] 在一个实施方案中,IgG Fc区包含IgG CH2结构域和IgG CH3结构域。优选地,免疫球蛋白Fc结构域具有表5中SEQ ID NO:10－12所示的氨基酸序列或者具有与SEQ ID NO:10－12所示的氨基酸序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多同一性的氨基酸序列。

[0111] 表5多靶向融合蛋白中的免疫球蛋白Fc结构域氨基酸序列的例子

[0112]

| 名称 | 氨基酸序列 |
| --- | --- |
| IgG1 Fc | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：10） |
| IgG2 Fc | DKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：11） |
| IgG4 Fc | DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO：12） |

[0113] 除了如SEQ ID NO:10－12所定义的序列之外,IgG Fc区还可以包含对SEQ ID NO:10－12进行额外的序列修饰后获得的肽序列,例如对SEQ ID NO:10－12中的氨基酸残基进行一个或多个氨基酸替换、缺失或衍生后获得的肽序列。在一个实施方案中,在IgG Fc区中第S228位置处包含防止发生臂交换(arm-exchange)的氨基酸置换,特别地是氨基酸置换S228P。在一个实施方案中,IgG4 Fc区包含氨基酸置换S228P。

[0114] －CD80的胞外结构域(ECD)

[0115] 本发明多靶向融合蛋白中的“CD80的胞外结构域(ECD)”包含天然存在的CD80ECD的全部氨基酸残基或包含天然存在的CD80ECD的一部分氨基酸残基。在一些实施方案中,所述CD80ECD包含CD80 IgV,优选地,所述CD80 ECD包含人CD80 IgV,更优选地,所述CD80ECD具有表6中SEQ ID NO:13或14所示的氨基酸序列。

[0116] 表6多靶向融合蛋白中的CD80ECD氨基酸序列的例子

[0117]

| 名称 | 氨基酸序列 |
| --- | --- |
| CD80-IgV | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEY KNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFP TPS（SEQ ID NO：13） |
| CD80-IgVIgC | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEY KNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFP TPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSS KLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDN（SEQ ID NO：14） |

[0118] 除了如SEQ ID NO:13和14所定义的序列之外,CD80ECD还可以包含对SEQ ID NO:13和14进行额外的序列修饰后获得的肽序列,例如对SEQ ID NO:13和14中的氨基酸残基进行一个或多个保守性替换、缺失或衍生后获得的肽序列,只要具有与未修饰的肽基本上相同的活性或功能即可。经修饰的肽将保留与未修饰肽相关的活性或功能。经修饰的肽通常具有与未修饰序列的氨基酸序列基本上同源的氨基酸序列,例如,与SEQ ID NO:13或14所

示的氨基酸序列具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多同一性的氨基酸序列。

[0119] 一肽接头

[0120] 本发明的多靶向融合蛋白中将(i)血管内皮生长抑制剂结构域;(ii)免疫球蛋白Fc结构域;和(iii)CD80 ECD任选地有效连接的“肽接头”是一个或多个氨基酸、一般约2－20个氨基酸的肽。本领域已知或本文中描述了肽接头。

[0121] 在一些实施方案中,所述肽接头包含至少5个氨基酸,优选地包含选自AKTTPKLEEGEFSEAR(SEQ ID NO:20);AKTTPKLEEGEFSEARV(SEQ ID NO:21);AKTTPKLGG(SEQ ID NO:22);SAKTTPKLGG(SEQ ID NO:23);SAKTTP(SEQ ID NO:24);RADAAP(SEQ ID NO:25);RADAAPTVS(SEQ ID NO:26);RADAAAAGGPGS(SEQ ID NO:27);RADAAAA(SEQ ID NO:28);SAKTTPKLEEGEFSEARV(SEQ ID NO:29);ADAAP(SEQ ID NO:30);DAAPTVSIFPP(SEQ ID NO:31);TVAAP(SEQ ID NO:32);TVAAPSVFIFPP(SEQ ID NO:33);QPKAAP(SEQ ID NO:34);QPKAAPSVTLFPP(SEQ ID NO:35);AKTTPP(SEQ ID NO:36);AKTTPPSVTPLAP(SEQ ID NO:37);AKTTAP(SEQ ID NO:38);AKTTAPSVYPLAP(SEQ ID NO:39);ASTKGP(SEQ ID NO:40);ASTKGPSVFPLAP(SEQ ID NO:41);GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:42);GENKVEYAPALMALS(SEQ ID NO:43);GPAKELTPLKEAKVS(SEQ ID NO:44);GHEAAAVMQVQYPAS(SEQ ID NO:45);GGGGSGGGGSGGGGSA(SEQ ID NO:46)的肽接头。

[0122] 一多靶向融合蛋白

[0123] 本文提供了按任意顺序包含(i)血管内皮生长抑制剂结构域;(ii)免疫球蛋白Fc结构域;和(iii)CD80 ECD的多靶向融合蛋白,包括但不限于多靶向融合蛋白从N端至C端以(i)、(ii)和(iii)的顺序;(iii)、(i)和(ii)的顺序;或者(iii)、(ii)和(i)的顺序有效连接。

[0124] 在一个实施方案中,所述多靶向融合蛋白从N端至C端包含全长抗VEGF抗体、全长抗VEGFR抗体或者全长抗VEGF和VEGFR双特异性抗体;和在所述抗体的两条重链中的每一重链的C端有效连接的一个CD80 ECD。

[0125] 在另一个实施方案中,所述多靶向融合蛋白包含全长抗VEGF抗体、全长抗VEGFR抗体或者全长抗VEGF和VEGFR双特异性抗体;在所述抗体的两条重链中的每一重链的N端有效连接的一个CD80 ECD;和在所述抗体的两条轻链中的每一轻链的N端有效连接的一个CD80 ECD。

[0126] 在又一个实施方案中,所述多靶向融合蛋白从N端至C端包含CD80 ECD;在CD80 ECD的C端有效连接的二聚体形式的免疫球蛋白Fc结构域;和在所述二聚体形式的免疫球蛋白Fc结构域的C端有效连接的衍生自抗VEGF抗体和/或抗VEGFR抗体的抗原结合片段。

[0127] 在又一个实施方案中,所述多靶向融合蛋白从N端至C端包含CD80 ECD;在CD80 ECD的C端有效连接的二聚体形式的免疫球蛋白Fc结构域;和在所述二聚体形式的免疫球蛋白Fc结构域的C端有效连接的VEGFR胞外受体功能区。

[0128] III.本发明的多靶向融合蛋白的生产和纯化

[0129] 本发明的多靶向融合蛋白可以例如通过固态肽合成(例如Merrifield固相合成)或重组生产获得。为了重组生产,将编码所述多靶向融合蛋白的各亚基的多核苷酸分离并插入一个或多个载体中以便进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。使用常规方法,可以轻易

地分离所述多核苷酸并将其测序。在一个实施方案中，提供了包含本发明的一种或多种多核苷酸的载体，优选地表达载体。

[0130] 可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。表达载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在一个优选的实施方案中，使用了具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体。

[0131] 一旦已经制备了用于表达的包含本发明的一种或多种多核苷酸的表达载体，则可以将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中。多种技术可以用来实现这个目的，例如，原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质体的转染或其他常规技术。

[0132] 在一个实施方案中，提供了包含一种或多种本发明多核苷酸的宿主细胞。在一些实施方案中，提供了包含本发明表达载体的宿主细胞。如本文所用，术语“宿主细胞”指可以工程化以产生本发明的多靶向融合蛋白的任何种类的细胞系统。适于复制和支持本发明的多靶向融合蛋白表达的宿主细胞是本领域熟知的。根据需要，这类细胞可以用特定表达载体转染或转导，并且可以培育大量含有载体的细胞用于接种大规模发酵器以获得足够量的本发明多靶向融合蛋白用于临床应用。合适的宿主细胞包括原核微生物，如大肠杆菌，真核微生物如丝状真菌或酵母，或各种真核细胞，如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、昆虫细胞等。可以使用适于悬浮培养的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括SV40转化的猴肾CV1系(COS-7)；人胚肾系(HEK 293或293F细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝脏细胞(Hep G2)、CHO细胞、NSO细胞、骨髓瘤细胞系如YO、NSO、P3X63和Sp2/0等。适于产生蛋白质的哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编著,Humana Press,Totowa,NJ)，第255-268页(2003)。在一个优选的实施方案中，所述宿主细胞是CHO、HEK293或NSO细胞。

[0133] 本领域已知在这些宿主细胞系统中表达外源基因的标准技术。在一个实施方案中，提供了产生本发明的多靶向融合蛋白的方法，其中所述方法包括在适于表达所述多靶向融合蛋白的条件下培养如本文中提供的宿主细胞，所述宿主细胞包含编码所述多靶向融合蛋白的多核苷酸，并且从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述多靶向融合蛋白。

[0134] 如本文所述制备的多靶向融合蛋白可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于如净电荷、疏水性、亲水性等因素，并且这些对本领域技术人员是显而易见的。

[0135] 可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的多靶向融合蛋白的纯度，所述熟知分析方法包括凝胶电泳、高效液相色谱等。可以通过本领域已知的多种测定法，鉴定、筛选或表征本文提供的多靶向融合蛋白的物理/化学特性和/或生物学活性。

[0136] IV.联合疗法

[0137] PD-1是一种免疫抑制蛋白，其有两种配体，分别为PD-L1和PD-L2。已知PD-1和PD-L1之间的相互作用导致例如肿瘤浸润淋巴细胞的减少和/或癌细胞的免疫逃避。通过抑制PD-1与PD-L1或PD-L2的局部相互作用可以逆转免疫抑制；当PD-1与PD-L2的相互作用也被阻断时，该效果是相加的(Iwai Y.等人,Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade,

Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,2002,99:12293-7)。鉴于免疫检查点PD-1的信号传导在调节免疫应答中的重要性,本发明开发了用于联合疗法的药物组合物,其包含本发明的多靶向融合蛋白和抗PD-1抗体。

[0138] 与使用本发明多靶向融合蛋白的单一疗法或抗PD-1抗体的单一疗法相比,本文所述的用于联合疗法的药物组合物可以提供优越的有益效果,例如增强的抗癌效果、降低的毒性和/或减少的副作用。例如,药物组合物中的本发明多靶向融合蛋白和/或抗PD-1抗体可以以比单一疗法施用相比达到相同的治疗效果所需的更低剂量或更短的施用时间施用。因此,本发明还公开了使用用于联合疗法的药物组合物来治疗癌症。可以在本领域已知的细胞模型和动物模型中检测前述药物组合物的有效性。

[0139] 所述联合疗法中包含的抗PD-1抗体可以是任何抗PD-1抗体,只要是能够抑制或减少PD-1与其配体结合的抗体即可,包括现有技术中已知的抗PD-1抗体和将来研发出的抗PD-1抗体。抗PD-1抗体能够以高的亲和力,例如以$10^{-8}$M或更小、优选地以$10^{-9}$M至$10^{-12}$M的$K_D$,与PD-1特异性结合,并由此阻断PD-1与配体PD-L1和/或PD-L2结合所介导的信号传导途径径。

[0140] 本文在下表7中提供了本发明联合疗法中包含的抗PD-1抗体的成对重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的例子。在一些实施方案中,本发明联合疗法中的抗PD-1抗体包含与表7中所示的氨基酸序列基本上同一的序列,例如,与表7所示的成对重链可变区序列/轻链可变区序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列。

[0141] 表7.联合疗法中的抗PD-1抗体的重链可变区和轻链可变区序列的例子

[0142]

| 可变区 | 氨基酸序列 | 序列编号（SEQ ID NO：） |
|---|---|---|
| VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQG | 47 |
| VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQG | 48 |
| VH | QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG | 49 |
| VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGG | 50 |
| VH | QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEEFKGRFVFSLDTSVNTAYLQITSLTAEDTGMYFCVRVGYDALDYWGQG | 51 |
| VL | EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSARSSVSYMHWFQQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTSYCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGG | 52 |
| VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGANTYY PDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDYWGQG | 53 |
| VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAPKLLIYTATSLADGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGG | 54 |
| VH | QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGTCVSWIRQPPGKALEWLATICWEDSKGYNPSLKSRLTISKDTSKNQAVLTMTNMDPVDTATYYCARREDSGYFWFPYWGQG | 55 |

[0143]

| | | |
|---|---|---|
| VL | NIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAGQNVNNYLAWYQQKPGKAPKVLIFN ANSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSWTTFGGG | 56 |
| VH | QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVHWIRQPPGKGLEWLGVI WAGGSTNYNPSLKSRLTISKDNSKSQVSLKMSSVTAADTAVYYCARAYG NYWYIDVWGQG | 57 |
| VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLINY AFHRFTGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQAYSSPYTFGGG | 58 |
| VH | VQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDSSRKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATN NDYWGQG | 59 |
| VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSNYLDWYQQKPGKAPKLLIYDA STRATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNMQLPLTFGQG | 60 |
| VH | DLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWI SAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGR GYSYGIDAFDIWGQG | 61 |
| VL | LSYVLTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKPGQAPVLVIYK DSERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCQSADSSGTYVVFGG G | 62 |
| VH | QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWM GVIESETGGTAYNQKFQGRVTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRE GITTVATTYYWYFDVWGQG | 63 |
| VL | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQL LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTF GQG | 64 |
| VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVA TISGGGSDTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ LNYAWFAYWGQG | 65 |
| VL | DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVDNYGISFMNWYQQKPGQPPKLLI YTSSNKDTGVPARFSGSGSGTDFTLTINPMEAEDTAVYYCQQSKEVPWTF GGG | 66 |
| VH | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG LIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAE HSSTGTFDYWGQG | 67 |
| VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGG | 68 |

[0144]

| | | |
|---|---|---|
| VH | QLQLQESGPGLVKPSETLTLTCTVSADSISSTTYYWVWIRQPPGKGLEWIG SISYSGSTYYNPSLKSRVTVSVDTSKNQFSLKLNSVAATDTALYYCARHLG YNGRYLPFDYWGQG | 69 |
| VL | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGFYNYVSWYQQHPGKAPELMIY DVSNRPSGVSDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTNISTWVFG GG | 70 |
| VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLTCKASGLTFSSSGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATN NDYWGQG | 71 |
| VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYTAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNWPRTFGQG | 72 |

[0145] 在一个实施方案中，本发明联合疗法中的抗PD-1抗体包含选自SEQ ID NO:47/48、49/50、51/52、53/54、55/56、57/58、59/60、61/62、63/64、65/66、67/68、69/70和71/72的成对重链可变区序列/轻链可变区序列中所含的全部重链CDR与轻链CDR。用于鉴定重链可变区与轻链可变区的氨基酸序列中的CDR的方法及技术为本领域中已知的，且可用于鉴定本文公开的特定重链可变区及/或轻链可变区的氨基酸序列中的CDR。可用于鉴定CDR边界的示例性公知技术包括例如Kabat界定法、Chothia界定法以及AbM界定法。参见，例如Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991);Al-Lazikani等人,Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins.,J.Mol.Biol.273:927-948(1997);以及Martin AC等人,Modeling antibody hypervariable loops:a combined algorithm, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:9268-9272(1989)。

[0146] 在一个实施方案中，本发明联合疗法中的抗PD-1抗体选自纳武单抗(Nivolumab)、pidilizumab和派姆单抗(Pembrolizumab)。

[0147] 本发明的药物组合物可以包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明所述多靶向融合蛋白和抗PD-1抗体。“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量等变动治疗有效量。治疗有效量是任何有毒或有害作用不及治疗有益作用的量。相对于未治疗的受试者，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤生长率)至少约20％、更优选地至少约40％、甚至更优选地至少约60％和仍更优选地至少约80％。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价本发明的药物组合物抑制可度量参数(例如，肿瘤体积)的能力。

[0148] “预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在受试者中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量小于治疗有效量。

[0149] 由于在肿瘤免疫中，如在实施例中所证实的那样，本发明联合疗法中的多靶向融合蛋白和抗PD-1抗体的治疗方案能够相互协同，因此，本发明的药物组合物对于防止肿瘤的免疫逃逸是有利的。共施用本发明的包含多靶向融合蛋白和抗PD-1抗体的药物组合物可以通过分别独立地施用多靶向融合蛋白或抗PD-1抗体实施，也可以单次施用多靶向融合蛋白和抗PD-1抗体的联合制剂。本发明联合疗法中的多靶向融合蛋白和抗PD-1抗体的施用允

许给药量和时程的灵活性。

[0150] V.多靶向融合蛋白和药物组合物的用途

[0151] 本文公开的多靶向融合蛋白和药物组合物具有癌症的治疗性和预防性用途。例如,可以将多靶向融合蛋白以及其与抗PD-1抗体的组合物施用至体外或离体的培养细胞或施用至受试者,例如,人类受试者,以治疗和/或预防多种癌性疾病。

[0152] 在一个方面,本发明涉及使用多靶向融合蛋白或本发明的药物组合物体内用来治疗或预防需要在受试者中阻断血管内皮细胞生长且活化T细胞的疾病,从而抑制或减少相关疾病如癌性肿瘤的生长或出现、转移或复发。可以单独使用多靶向融合蛋白以抑制癌性肿瘤的生长或者预防其出现。备选地,多靶向融合蛋白可以与其他癌症治疗剂/预防剂(例如,抗PD-1抗体)组合施用。当本发明的多靶向融合蛋白与抗PD-1抗体施用时,这种组合可以按任何顺序施用或者同时施用。

[0153] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种抑制受试者中肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多靶向融合蛋白或药物组合物。在另一个实施方案中,本发明提供一种防止受试者中肿瘤细胞出现或者转移或者复发的方法,所述方法包括向受试者施用预防有效量的本文所述的多靶向融合蛋白或药物组合物。

[0154] 在一些实施方案中,用多靶向融合蛋白或药物组合物治疗和/或预防的癌包括但不限于实体瘤、血液学癌(例如,白血病、淋巴瘤、骨髓瘤,例如,多发性骨髓瘤)及转移性病灶。在一个实施方案中,癌是实体瘤。实体瘤的例子包括恶性肿瘤,例如,多个器官系统的肉瘤和癌,如侵袭肺、乳房、卵巢、淋巴样、胃肠道的(例如,结肠)、肛门、生殖器和生殖泌尿道(例如,肾、膀胱上皮、膀胱细胞、前列腺)、咽、CNS(例如,脑、神经的或神经胶质细胞)、头和颈、皮肤(例如,黑素瘤)、鼻咽(例如,分化或未分化的转移性或局部复发性鼻咽癌)和胰的那些癌、以及腺癌,包括恶性肿瘤,如结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。

[0155] 在一些实施方案中,癌选自黑素瘤、乳腺癌、结肠癌、食管癌、胃肠道间质肿瘤(GIST)、肾癌(例如,肾细胞癌)、肝癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、头颈部肿瘤、胃癌、血液学恶性病(例如,淋巴瘤)。

[0156] 描述以下实施例以辅助对本发明的理解。不意在且不应当以任何方式将实施例解释成限制本发明的保护范围。

## 实施例

[0157] 实施例1、包含目的基因的谷氨酰胺合成酶高效表达载体的构建

[0158] (1)抗PD1抗体BY18.1的编码核苷酸的合成及表达载体的构建

[0159] 根据International Nonproprietary Name(INN)数据库中编号为9623的纳武单抗的氨基酸序列数据,优化为适合在中国仓鼠卵巢癌细胞(CHO)中表达的下述核苷酸序列,并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成该核苷酸序列。所述核苷酸序列表达后产生的抗PD1抗体在本文中表示为抗体BY18.1。

[0160] 抗PD1抗体BY18.1的轻链(BY18.1L)核苷酸序列(SEQ ID NO:73):

[0161] CTCGAGGCCACCATGGAGACCGACACACTCCTCCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCTGGCTCCACTGGCGAGATTGTGCTGACACAGTCCCCCGCTACTCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGGGCTACACTGTCTTGCAGAGC

TTCTCAGTCCGTGTCTTCTTACCTCGCTTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCAAGACTGCTGATCTATGACG
CTTCTAACCGCGCTACAGGCATTCCTGCTAGGTTCAGCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACACTCACAATTAGC
TCTCTTGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCTAGCAACTGGCCTAGAACATTCGGCCAGGGCAC
TAAGGTGGAGATTAAGAGAACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTG
GCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC
CTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCT
GACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCG
TGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAAGAATTC

[0162] 抗PD1抗体BY18.1的轻链(BY18.1L)氨基酸序列(SEQ ID NO:74)：

[0163] METDTLLLWVLLLWVPGSTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

[0164] 抗PD1抗体BY18.1的重链(BY18.1H)核苷酸序列(SEQ ID NO:75)：

[0165] TCTAGAGCCACCATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTGTGGGTGCCTGGCTCCACA
GGCCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGGCAGATCCCTCAGACTGGACTGCAAGGCATC
CGGCATTACATTCTCTAACTCTGGAATGCACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGGCCGTGA
TTTGGTACGACGGCTCTAAGAGATACTACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATTAGCAGAGACAACTCCAAG
AACACTCTGTTCCTCCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCACCAACGACGACTA
CTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACAGTGTCTTCCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCT
CCCGCTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCC
TGGAACTCCGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTC
CTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACA
CCAAGGTGGACAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCTTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGC
CCTTCCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGCACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGT
GGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGA
CCAAGCCTCGCGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG
AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAA
GGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA
CCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTAC
AAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGCTG
GCAGGAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCC
TGTCCCTGGGCAAGTAAGTCGAC

[0166] 抗PD1抗体BY18.1的重链(BY18.1H)氨基酸序列(SEQ ID NO:76)：

[0167] METDTLLLWVLLLWVPGSTGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVA
VIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP
CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS
NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS

LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK

[0168] 其中带下划线部分“METDTLLLWVLLLWVPGSTG”为信号肽序列。

[0169] 上海捷瑞生物工程有限公司合成了上述BY18.1L编码核苷酸序列和BY18.1H编码核苷酸序列。分别将BY18.1L编码核苷酸用XhoI-EcoRI双酶切,将具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体(专利授权号:CN104195173B,获自北京比洋生物技术有限公司)用XhoI-EcoRI双酶切,再通过连接酶将经XhoI-EcoRI双酶切的BY18.1L编码核苷酸连接入经XhoI-EcoRI双酶切的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体,获得已导入了BY18.1L编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体;然后,分别将BY18.1H编码核苷酸用XbaI-SalI双酶切,将已导入了BY18.1L编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体用XbaI-SalI双酶切,再通过连接酶将经XbaI-SalI双酶切的BY18.1H编码核苷酸连接入经XbaI-SalI双酶切的已导入了BY18.1L编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体,由此获得了已导入BY18.1L编码核苷酸和BY18.1H编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体,经测序验证正确后表达,获得抗PD1抗体BY18.1。

[0170] 备选地,也可以将BY18.1L编码核苷酸连接入已导入了BY18.1H编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体,表达并获得抗体BY18.1。

[0171] (2)包含CD80胞外结构域和免疫球蛋白Fc区的融合蛋白的编码核苷酸的合成及表达载体的构建

[0172] 根据表1中CD80胞外结构域的序列、以及表6中IgG4 Fc序列,优化为适合在中国仓鼠卵巢癌细胞(CHO)中表达的核苷酸序列,并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成如下SEQ ID NO:77的多核苷酸序列。所述核苷酸序列表达后产生的CD80-Fc融合蛋白在本文中也表示为融合蛋白BY31.19。

[0173] 融合蛋白BY31.19(CD80-Fc,IgG4)的核苷酸序列(SEQ ID NO:77)

[0174] CTCGAGGCCACCATGGAGACCGACACACTCCTCCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCTGGCTCCACT GGCGTCATCCATGTGACCAAAGAGGTCAAAGAAGTCGCAACTCTGTCTTGCGGACACAACGTCTCCGTCGAAGAACT CGCCCAGACTAGAATATATTGGCAGAAGGAAAAGAAGATGGTGCTCACCATGATGTCCGGCGATATGAACATTTGGC CTGAGTACAAGAACCGGACAATCTTCGATATTACTAATAACCTGAGTATCGTGATTCTCGCTCTGCGCCCTAGCGAC GAGGGCACATACGAGTGTGTGGTGCTGAAGTACGAGAAGGATGCATTCAAGCGGGAGCACCTCGCAGAGGTGACACT CTCCGTGAAGGCCGACTTCCCAACCCCATCTGACAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCTTGCC CTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGC ACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGCGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTCCTCCATC GAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCAGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCA ACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCCGC CTGACCGTGGACAAGTCCCGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCCCTGGGCTAAGAATTC

[0175] 融合蛋白BY31.19(CD80-Fc,IgG4)的氨基酸序列(SEQ ID NO:78)

[0176] METDTLLLWVLLLWVPGSTGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNI WPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPSDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

[0177] 其中氨基酸序列“METDTLLLWVLLLWVPGSTG”为信号肽。

[0178] 使用上述实施例1(1)相同的方法,通过XhoI-EcoRI双酶切将BY31.19编码核苷酸连接至具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体(专利授权号:CN104195173B,获自北京比洋生物技术有限公司)。将重组载体测序验证正确后用于CD80-Fc融合蛋白表达。所表达的CD80-Fc融合蛋白命名为融合蛋白BY31.19。

[0179] (3)包含抗VEGF抗体与CD80胞外结构域的融合蛋白BY24.4的编码核苷酸的合成及表达载体的构建

[0180] 根据表1中CD80胞外结构域的序列、表2中抗VEGF抗体的重链可变区和轻链可变区序列、表3中抗体的重链恒定区序列、表4中抗体的轻链恒定区序列、以及SEQ ID NO:20－46的肽接头序列,优化为适合在中国仓鼠卵巢癌细胞(CHO)中表达的核苷酸序列,并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成如下SEQ ID NO:79、81所示的多核苷酸序列。所述核苷酸序列表达后产生的抗VEGF抗体-CD80融合蛋白在本文中表示为融合蛋白BY24.4。

[0181] 融合蛋白BY24.4(κ,IgG4)的第一亚基(BY24.4L)核苷酸序列(SEQ ID NO:79):

[0182] CTCGAGGCCACCATGGAGACAGATACTCTGCTGCTCTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAGCAC AGGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCCTCCCTGTCTGCCTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGTTCC GCATCCCAGGATATCTCCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCCCCCAAGGTGCTGATCTACT TTACTTCTTCCCTGCATTCCGGCGTGCCCTCCAGGTTCTCTGGCTCCGGGTCTGGAACCGACTTTACACTGACAAT CTCCTCTCTGCAGCCAGAAGACTTTGCCACCTATTACTGCCAGCAGTACTCCACTGTCCCCTGGACCTTCGGGCAA GGAACCAAAGTGGAAATCAAGAGGACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGTCTGGCACCGCCAgCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA CAACGCCCTGCAgAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGC AGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTC TAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAAGAATTC

[0183] 融合蛋白BY24.4(κ,IgG4)的第一亚基(BY24.4L)氨基酸序列(SEQ ID NO:80):

[0184] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLI YFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[0185] 融合蛋白BY24.4(κ,IgG4)的第二亚基(BY24.4H)核苷酸序列(SEQ ID NO:81):

[0186] TCTAGAGCCACCATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCTCTACA GGCGAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAACCAGGGGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCCGCTTC TGGATACACCTTTACCAATTACGGCATGAATTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGATGGA TCAACACCTACACCGGCGAGCCCACCTACGCCGCTGACTTTAAGAGGAGGTTCACCTTCTCTCTGGACACCTCCAAG

TCCACCGCTTACCTGCAAATGAACTCTCTGAGGGCTGAAGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTACCCCCATTA
CTACGGGTCCTCCCACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACAGTGTCTTCCGCCTCCACCAAGG
GCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGCTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAG
GACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCCGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGT
GCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACA
CCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCT
CCTTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGAT
CTCCCGCACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGCGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCC
GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTC
CTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCAGG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTA
CTCCCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGC
ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCCCTGGGCGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGAGGCGGC
GGAAGTGTGATCCATGTAACAAAAGAAGTGAAGGAAGTGGCTACACTCTCTTGCGGCCACAACGTGTCCGTGGAGGA
ACTAGCTCAGACCCGGATCTATTGGCAGAAAGAAAAGAAGATGGTGCTGACCATGATGTCCGGCGACATGAACATTT
GGCCAGAGTACAAGAACCGCACAATTTTCGACATTACAAACAACCTCTCTATTGTGATTCTGGCTCTCAGGCCTAGC
GACGAGGGCACATACGAGTGCGTGGTGCTCAAGTACGAGAAGGACGCTTTCAAGCGGGAGCACCTCGCTGAGGTGAC
CCTGTCCGTGAAGGCCGACTTCCCTACTCCATCTTAAGTCGAC

[0187] 融合蛋白BY24.4(κ,IgG4)的第二亚基(BY24.4H)氨基酸序列(SEQ ID NO:82)：

[0188] METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVG
WINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT
YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSLGGGGSGGGGSGGGGSVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMN
IWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPS

[0189] 其中氨基酸序列“METDTLLLWVLLLWVPGSTG”为信号肽。

[0190] 使用上述实施例1(1)相同的方法,通过XhoI-EcoRI双酶切将BY24.4L编码核苷酸连接至具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体(专利授权号:CN104195173B,获自北京比洋生物技术有限公司);再通过XbaI-SalI双酶切将BY24.4H编码核苷酸克隆至已连接了BY24.4L编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体;或者反之亦然。将重组载体测序验证正确后用于表达。所表达的抗VEGF抗体-CD80融合蛋白命名为融合蛋白BY24.4。

[0191] (4)包含抗VEGFR抗体与CD80胞外结构域的融合蛋白BY24.5的编码核苷酸的合成及表达载体的构建

[0192] 根据表1中CD80胞外结构域的序列、表2中抗VEGFR抗体的重链可变区和轻链可变

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

[0193] 融合蛋白BY24.5(κ,IgG4)的第一亚基(BY24.5L)核苷酸序列(SEQ ID NO:83)：

[0194] CTCGAGGCCACCATGGAGACAGATACTCTGCTGCTCTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAGCAC
AGGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTAGCTCCGTGAGCGCCTCTATCGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAGA
GCTTCTCAGGGCATCGACAACTGGCTCGGCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACG
ACGCCTCTAACCTGGACACCGGCGTGCCATCCCGGTTCAGCGGCTCTGGCTCCGGCACATACTTCACACTCACAAT
CTCTTCCCTGCAGGCCGAGGACTTCGCTGTGTACTTCTGCCAGCAGGCTAAGGCTTTCCCACCTACATTCGGCGGC
GGAACCAAAGTGGAAATCAAGAGGACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGA
AGTCTGGCACCGCCAgCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA
CAACGCCCTGCAgAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGC
AGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTC
TAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAAGAATTC

[0195] 融合蛋白BY24.5(κ,IgG4)的第一亚基(BY24.5L)氨基酸序列(SEQ ID NO:84)：

[0196] METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQGIDNWLGWYQQKPGKAPKLLIY
DASNLDTGVPSRFSGSGSGTYFTLTISSLQAEDFAVYFCQQAKAFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

[0197] 融合蛋白BY24.5(κ,IgG4)的第二亚基(BY24.5H)核苷酸序列(SEQ ID NO:85)：

[0198] TCTAGAGCCACCATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCTCTACA
GGCGAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGGCGGCCTCGTGAAGCCAGGCGGCTCCCTCAGACTGTCTTGCGCTGCTAG
CGGCTTCACATTCTCTTCCTACTCTATGAACTGGGTGAGACAGGCTCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCAGCA
TCTCTTCCTCTAGCTCTTACATCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCAGCCGGGACAACGCCAAG
AACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTAGAGTGACCGACGC
TTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACTCTCGTGACAGTGTCTTCCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGG
CCCCTTGCTCCCGCTCCACCTCCGAGTCCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTG
ACCGTGTCCTGGAACTCCGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTA
CTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGC
CTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCTTGCCCTGCCCCTGAGTTC
CTGGGCGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGCACCCCTGAGGTGAC
CTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACA
ACGCCAAGACCAAGCCTCGCGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTCCTCCATCGAGAAGACCATCTC
CAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
TGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAG
AACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCCGCCTGACCGTGGACAA
GTCCCGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT

CCCTGTCCCTGTCCCTGGGCGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGAGGCGGCGGAAGTGTGATCCATGTAACA
AAAGAAGTGAAGGAAGTGGCTACACTCTCTTGCGGCCACAACGTGTCCGTGGAGGAACTAGCTCAGACCCGGATCTA
TTGGCAGAAAGAAAAGAAGATGGTGCTGACCATGATGTCCGGCGACATGAACATTTGGCCAGAGTACAAGAACCGCA
CAATTTTCGACATTACAAACAACCTCTCTATTGTGATTCTGGCTCTCAGGCCTAGCGACGAGGGCACATACGAGTGC
GTGGTGCTCAAGTACGAGAAGGACGCTTTCAAGCGGGAGCACCTCGCTGAGGTGACCCTGTCCGTGAAGGCCGACTT
CCCTACTCCATCTTAAGTCGAC

[0199] 融合蛋白BY24.5(κ,IgG4)的第二亚基(BY24.5H)氨基酸序列(SEQ ID NO:86)：

[0200] METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS
SISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGGGGSGGGGSGGGGSVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKN
RTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPS

[0201] 其中氨基酸序列“METDTLLLWVLLLWVPGSTG”为信号肽。

[0202] 使用上述实施例1(1)相同的方法,通过XhoI-EcoRI双酶切将BY24.5L编码核苷酸连接至具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体(专利授权号:CN104195173B,获自北京比洋生物技术有限公司);再通过XbaI-SalI双酶切将BY24.5H编码核苷酸克隆至已连接了BY24.5L编码核苷酸的具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体;或者反之亦然。将重组载体测序验证正确后用于表达。所表达的抗VEGFR抗体-CD80融合蛋白命名为融合蛋白BY24.5。

[0203] (5)包含CD80胞外结构域、免疫球蛋白Fc区和VEGFR胞外受体功能区的融合蛋白的编码核苷酸的合成及表达载体的构建

[0204] 根据表1中CD80胞外结构域的序列、表6 IgG4 Fc序列、和表5中VEGFR功能区序列(VEGFR1-D2/VEGFR2-D3),优化为适合在中国仓鼠卵巢癌细胞(CHO)中表达的核苷酸序列,并委托上海捷瑞生物工程有限公司合成如下SEQ ID NO:87所示的多核苷酸序列。所述核苷酸序列表达后产生的CD80-Fc-VEGFR融合蛋白在本文中也表示为融合蛋白BY24.12。

[0205] 融合蛋白BY24.12(CD80-Fc-VEGFR)的核苷酸序列(SEQ ID NO:87)

[0206] CTCGAGGCCACCGCCACCATGGAGACCGACACACTCCTCCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCTGGC
TCCACTGGCGTCATCCATGTGACCAAAGAGGTCAAAGAAGTCGCAACTCTGTCTTGCGGACACAACGTCTCCGTCGA
AGAACTCGCCCAGACTAGAATATATTGGCAGAAGGAAAAGAAGATGGTGCTCACCATGATGTCCGGCGATATGAACA
TTTGGCCTGAGTACAAGAACCGGACAATCTTCGATATTACTAATAACCTGAGTATCGTGATTCTCGCTCTGCGCCCT
AGCGACGAGGGCACATACGAGTGTGTGGTGCTGAAGTACGAGAAGGATGCATTCAAGCGGGAGCACCTCGCAGAGGT
GACACTCTCCGTGAAGGCCGACTTCCCAACCCCATCTGACAAGCGCGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTC
CTTGCCCTGCCCCTGAGTTCCTGGGCGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATC
TCCCGCACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGT
GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGCGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTACCGCGTGGTGTCCG
TGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTCC

TCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCAGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTAC
TCCCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCA
CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCCCTGGGCGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGAGGCGGCG
GAAGTGCTTCCGACACCGGCCGCCCTTTCGTGGAGATGTACTCCGAGATCCCTGAGATCATCCACATGACCGAGGGC
CGCGAGCTGGTGATCCCTTGCCGCGTGACCTCCCCTAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCTCTGGACACCCT
GATCCCTGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACTCCCGCAAGGGCTTCATCATCTCCAACGCCACCTACAAGGAGATCG
GCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACC
ATCATCGACGTGGTGCTGTCCCCTTCCCACGGCATCGAGCTGTCCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCACCGC
CCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCTTCCTCCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGA
ACCGCGACCTGAAGACCCAGTCCGGCTCCGAGATGAAGAAGTTCCTGTCCACCCTGACCATCGACGGCGTGACCCGC
TCCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCTCCTCCGGCCTGATGACCAAGAAGAACTCCACCTTCGTGCGCGTGCA
CGAGTAAGAATTC

[0207] 融合蛋白BY24.12(CD80-Fc-VEGFR)的氨基酸序列(SEQ ID NO:88)

[0208] METDTLLLWVLLLWVPGSTGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNI
WPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPSDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGGGSGGGGSGGGG
SASDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIG
LLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVN
RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHE

[0209] 使用上述实施例1(1)相同的方法,通过XhoI-EcoRI双酶切将BY24.12编码核苷酸连接至具有双表达盒的谷氨酰胺合成酶高效表达载体(专利授权号:CN104195173B,获自北京比洋生物技术有限公司)。将重组载体测序验证正确后用于蛋白表达。所表达的融合蛋白命名为融合蛋白BY24.12。

[0210] 实施例2、目的蛋白的表达和纯化

[0211] (1)目的蛋白的瞬时表达

[0212] 将293F(购自Invitrogen公司,目录号:11625-019)细胞悬浮培养于无血清CD 293培养液(购自Invitrogen公司,目录号:11913-019)中。转染前离心细胞培养物,获得细胞沉淀,用新鲜的无血清CD 293培养液悬浮细胞,将细胞浓度调整为$1\times10^6$个细胞/ml。将细胞悬浮液置于摇瓶中。以100ml细胞悬浮液为例,分别将实施例1制备的包含目的基因的每一种重组表达载体质粒各DNA 250ug和聚乙烯亚胺(polyethylenimine(PEI))(Sigma,目录号:408727)500ug加入1ml无血清CD 293培养液中混匀,室温静置8分钟后,将PEI/DNA混悬液逐滴加入放置有100ml细胞悬浮液的摇瓶中。轻轻混匀,置于5%$CO_2$、37℃摇床培养(120转/分钟)。5天后收集培养上清。

[0213] (2)表达蛋白的纯化

[0214] 用pH 7.4PBS溶液平衡的HiTrap MabSelect SuRe 1ml柱(GE Healthcare Life

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

[0215] 在还原剂(5mM 1,4-二硫苏糖醇)存在下通过SDS-PAGE电泳并用考马斯蓝染色,分别分析各目的蛋白BY18.1、BY31.19、BY24.4、BY24.5、BY24.12的纯度和分子量。结果如下表8所示,其中给出了分子量理论预测值和实际测定值。因真核表达系统中存在对蛋白质的糖基化作用,故分子量实际测定值略高于理论预测值。

[0216] 表8经纯化的表达蛋白的分子量大小

[0217]

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

[0218]

[0219] 实施例3、使用ELISA方法检测特异性结合作用

[0220] 分别将重组人CD28(北京义翘神州生物技术有限公司产品,目录号:50103-M08H)、重组人PD-L1(北京百普赛斯生物科技有限公司,目录号:PD1-H5229)和重组人CTLA-4(北京义翘神州生物技术有限公司产品,目录号:11159-H08H)稀释至0.5μg/ml、0.25μg/ml和1.0μg/ml并包被96孔ELISA板(Corning公司,货号:42592)。将上述实施例2(2)纯化的融合蛋白BY24.4、BY24.5、BY24.12、和BY31.19稀释至2000μg/ml,然后进行3倍系列稀释,共稀释16个梯度,对每个浓度梯度进行复孔检测。将稀释样品50μl分别加入上述经重组人CD28、重组人CTLA-4或重组人PD-L1包被的96孔板中,37℃孵育2小时。洗涤3次后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人二级抗体(北京中衫金桥公司产品,产品号:ZDR-5301),37℃孵育1小时。洗涤3次后,加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色液(北京康为世纪生物科技有限公司,产品号:CW0050)50μl/孔。10分钟后,加入2N的$H_2SO_4$终止显色。使用ELISA读数仪在450nm处测定每孔的吸光度OD值。

[0221] 应用GraphPadPrism5软件,将融合蛋白BY24.4、BY24.5、BY24.12、和BY31.19的蛋白质浓度对吸光度OD值作图,并且拟合数据以产生融合蛋白介导的特异性结合作用的半数最大有效浓度EC50值。结果如下表9所示。

[0222] 表9各融合蛋白对人PD-L1、人CD28和人CTLA-4的结合作用

[0223]

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

[0224] ELISA结果显示,本发明的多靶向融合蛋白BY24.4、BY24.5、BY24.12和作为阳性对照的BY31.19均能结合重组人PD-L1、重组人CD28和CTLA-4。各融合蛋白对CTLA-4的结合能力最强,PD-L1次之,结合CD28最弱。

[0225] 实施例4、使用Biacore T100测定本发明的目的蛋白对靶标的亲和力

[0226] 在BIAcore® T100仪器(GE Healthcare Biosciences AB,瑞典)上于25℃进行表面等离子体共振测量。

[0227] 首先,通过酰胺偶联将抗IgG抗体(GE Healthcare Life Sciences,目录号:BR-1008-39)共价固定在CM5芯片上。使用60μl N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和60μl N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化CM5芯片,然后将5μl抗IgG抗体加95μl稀释缓冲液HBST(0.1M HEPES,1.5M NaCl,pH7.4,加0.005%吐温20)经0.2um滤膜过滤后,通过酰胺偶联将抗IgG抗体共价固定在CM5芯片上,产生约9000-14000共振单位(RU)的捕获系统。使用120μl乙醇胺封闭CM5芯片。

[0228] 然后,将实施例2制备的本发明的各目的蛋白分别稀释为5μg/ml,以流速10μL/分钟注射该稀释液2分钟,实施例2制备的本发明的各目的蛋白通过各自的Fc区非共价地捕获到CM5芯片表面上。通过与EDC/NHS交联来稳定所得的复合物,以避免在测量和再生期间的基线漂移。

[0229] 分别将结合抗原PD-1(北京义翘神州生物技术有限公司产品,目录号:10377-H08H)、$VEGF_{165}$(北京义翘神州生物技术有限公司产品,目录号:11066-HNAH)、鼠VEGF164(北京义翘神州生物技术有限公司产品,目录号:50159-MNAB)和VEGFR2(北京义翘神州生物技术有限公司产品,目录号:10012-H02H1)配制为如下浓度梯度:7nM、22nm、66nM、200nM、600nM。通过以流速30μl/分钟注射每个浓度180秒,解离时间600秒,测量结合。通过用3M $MgCl_2$溶液以流速10μL/分钟洗涤30秒使表面再生。使用BIA评价软件(BIAevaluation 4.1software,来自GE Healthcare Biosciences AB,瑞典)进行数据分析,获得下表10所示的亲和力数据。

[0230] 表10各目的蛋白质与靶标的结合

[0231]

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

[0232] 融合蛋白BY24.4、BY24.5、BY24.12与各自靶标的KD(M)均低于$10^{-9}$M,说明它们与各自靶标均有有较高亲和力,尤其是融合蛋白BY24.12可以结合鼠和人VEGF-A,二者均以高亲和力结合并且差异不是很大。

[0233] 实施例5、混合淋巴细胞反应(MLR)中本发明的目的蛋白及其组合物对IFN-γ分泌的影响

[0234] 自北京时合生物科技有限公司购得$CD4^+$T淋巴细胞和树突状细胞(DC),所述$CD4^+$T淋巴细胞和树突状细胞(DC)来源于不同的健康人。将$CD4^+$T淋巴细胞和树突状细胞(DC)分别按$1\times10^5$个细胞/孔和$1\times10^4$个细胞/孔铺种在96孔细胞培养板中。实验分为7组,分别为BY18.1组(1.0μg/ml)、BY24.4组(1.14μg/ml)、BY24.4(1.14μg/ml)+BY18.1(1.0μg/ml)组、BY24.5(1.14μg/ml)组、BY24.5(1.14μg/ml)+BY18.1(1.0μg/ml)组、BY24.12(0.84μg/ml)组和BY24.12(0.84μg/ml)+BY18.1(1.0μg/ml)组。每组3个复孔,按要求加入抗体BY18.1、融合蛋白BY24.4、BY24.5、BY24.12、或抗体BY18.1与各融合蛋白BY24.4、BY24.5、BY24.12的组合至所示的终浓度。最后补加含10％胎牛血清的1640培养基,使终体积为200μl。37℃,5％$CO_2$培养。

[0235] 培养5天后,这7个实验组的成团细胞均较多,并有相当部分的梭状和贴壁细胞出现。取培养上清,用依科赛生物科技有限公司IFN-γ试剂盒(货号:EH008-96ELISA)检测各组IFN-γ表达水平。

[0236] 检测结果如下:与抗体BY18.1组(2221.8±364.5pg/ml)相比较,单独的融合蛋白BY24.4组(924.1±221.9pg/ml)、BY24.5组(760.1±286.8pg/ml)和BY24.12组(793.4±139.2pg/ml)的IFN-γ分泌均显著地低于抗体BY18.1组(P<0.01);但融合蛋白BY24.4、BY24.5和BY24.12分别加入BY18.1后,IFN-γ分泌均明显增高,各组的IFN-γ分泌分别为:BY24.4+BY18.1组(3494.2±364.5pg/ml)、BY24.5+BY18.1组(3523.8±465.1pg/ml)和BY24.12+BY18.1组(3801.8±702.2pg/ml)。由此可见,融合蛋白BY24.4、BY24.5和BY24.12分别与BY18.1组合能够导致IFN-γ的分泌显著增加(P<0.01),并且表明了抗体BY18.1(PD-1抗体)与本发明的多靶向融合蛋白BY24.4、BY24.5和BY24.12的组合对IFN-γ的分泌有明显协同作用。

[0237] 实施例6、本发明的多靶向融合蛋白与PD-1抗体的协同作用

[0238] 本实施例的主要目的是探讨本发明的多靶向融合蛋白与PD-1抗体在体内抗肿瘤方面的协同作用,因此PD-1抗体和各融合蛋白的剂量均采用的是低剂量,因为高剂量有可

能对肿瘤抑制效果较好而观察不到PD-1抗体和各融合蛋白相互间的协同作用。

[0239] 将RPMI-1640培养基中的小鼠源结肠癌细胞CT26(ATCC)接种于约18g,6周龄雌性BALB/c小鼠右侧前肋部皮下,100μl/小鼠,接种量为$1x10^6$个细胞/小鼠。将小鼠源结肠癌细胞CT26接种的时间设定为第0天。当平均肿瘤体积达到$93mm^3$左右时,将荷瘤小鼠随机分组,每组6只小鼠,共5组。根据分子量大小计算摩尔量,以等同的摩尔量施用融合蛋白BY31.19、BY24.12和抗mPD-1抗体。具体而言,分组和施用剂量分别为:溶媒(PBS)对照组;融合蛋白BY31.19(1.6mg/kg)组;融合蛋白BY24.12(2.5mg/kg,)组;抗mPD-1(3.0mg/kg,购自BioXcell,克隆号:RMP1-14,产品号:BE0146)组;融合蛋白BY24.12(2.5mg/kg)+抗mPD-1(3mg/kg)组。一周给药2次。每周对肿瘤体积进行3次测量,在进行肿瘤体积测量的同时,称量小鼠体重,记录小鼠体重和肿瘤体积的变化与给药时间的关系。实验结束时,将小鼠安乐死,采集血清和肿瘤,血清冻存至-80℃保存,肿瘤在称重拍照后经福尔马林固定和石蜡包埋(FFPE)制备成组织样本备用。对各数据进行统计学分析并计算各治疗组与溶媒对照组的相对肿瘤体积比值(T/C)%(即:(给药组肿瘤体积变化的均值/PBS溶媒对照组肿瘤体积变化的均值)x 100%)和肿瘤生长抑制率(Tumor Growth Inhibition%),为(1-T/C)%。

[0240] 在实验结束时,BY31.19组、BY24.12组、PD-1组、BY24.12+抗mPD-1组的肿瘤生长抑制率(TGI%)分别为15%、17%、24%、和47%(以瘤体积计),均有不同程度的抑制作用。免疫融合蛋白BY24.12与PD-1抗体联合使用时对肿瘤的抑制作用显著好于BY24.12和PD-1单独使用时的肿瘤抑制作用,因此二者之间存在协同作用。

[0241] 各组动物在给药后体重均持续增加,总体状况良好,未见明显异常,各组均无明显停药或动物死亡。

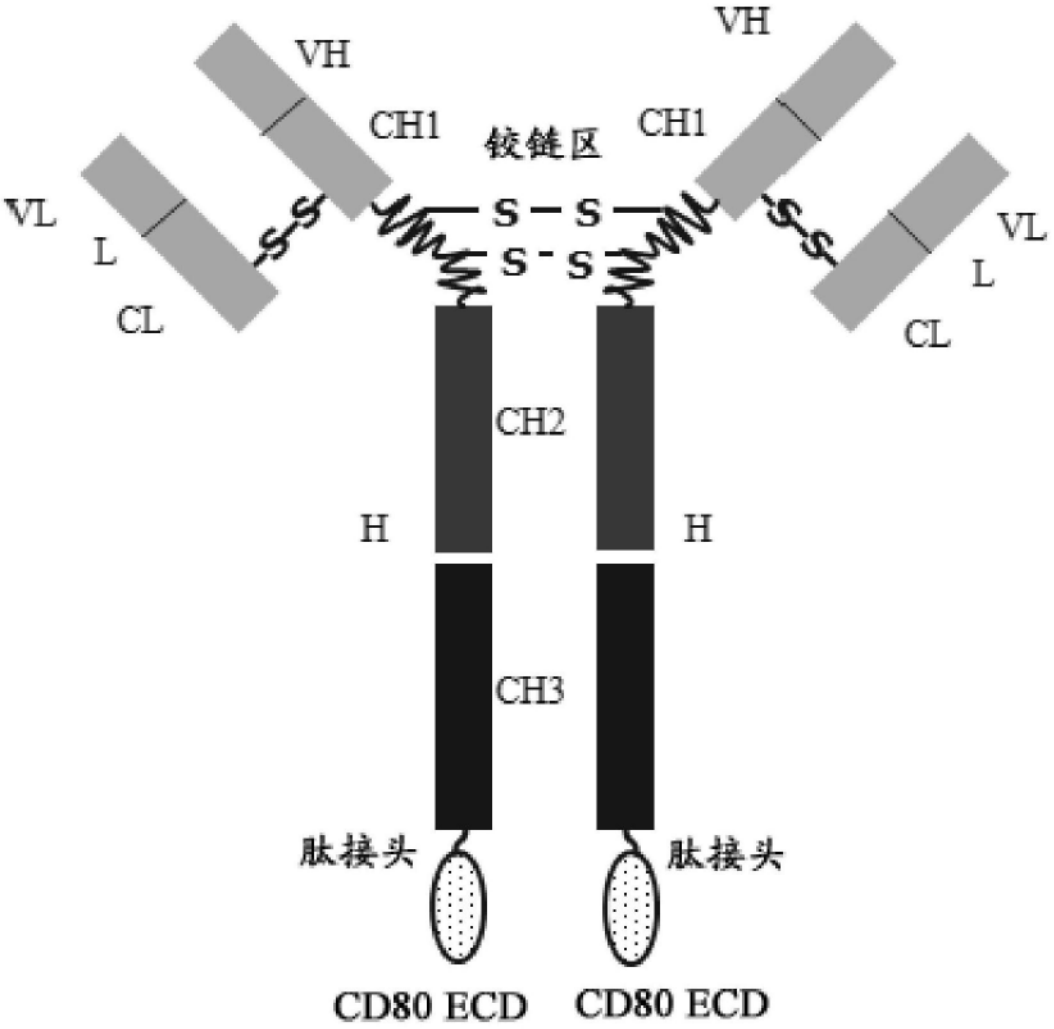

VH
VH
CH1
铰链区
CH1
VL
L
CL
S-S
S-S
S-S
S-S
VL
L
CL
CH2
H
H
CH3
肽接头
肽接头
CD80 ECD
CD80 ECD

图1A

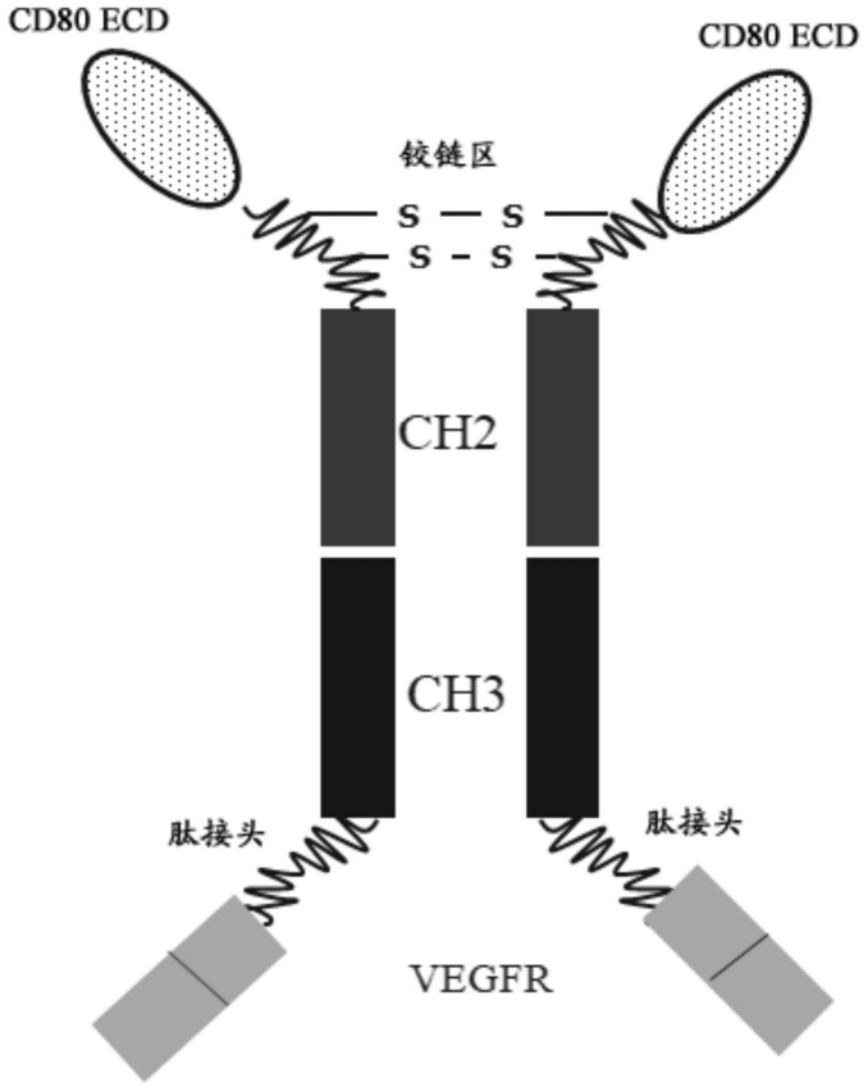



图1B

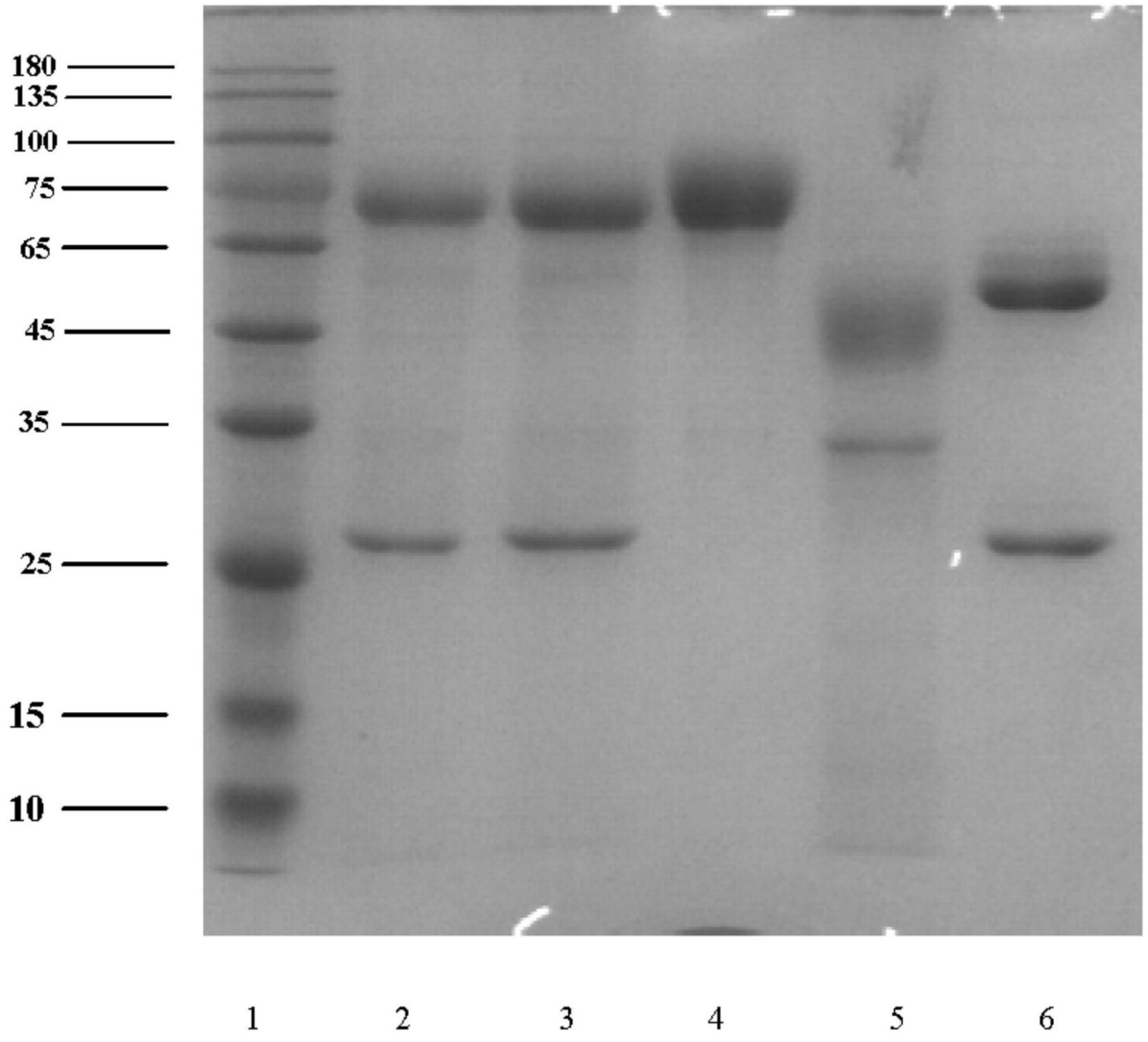



图2

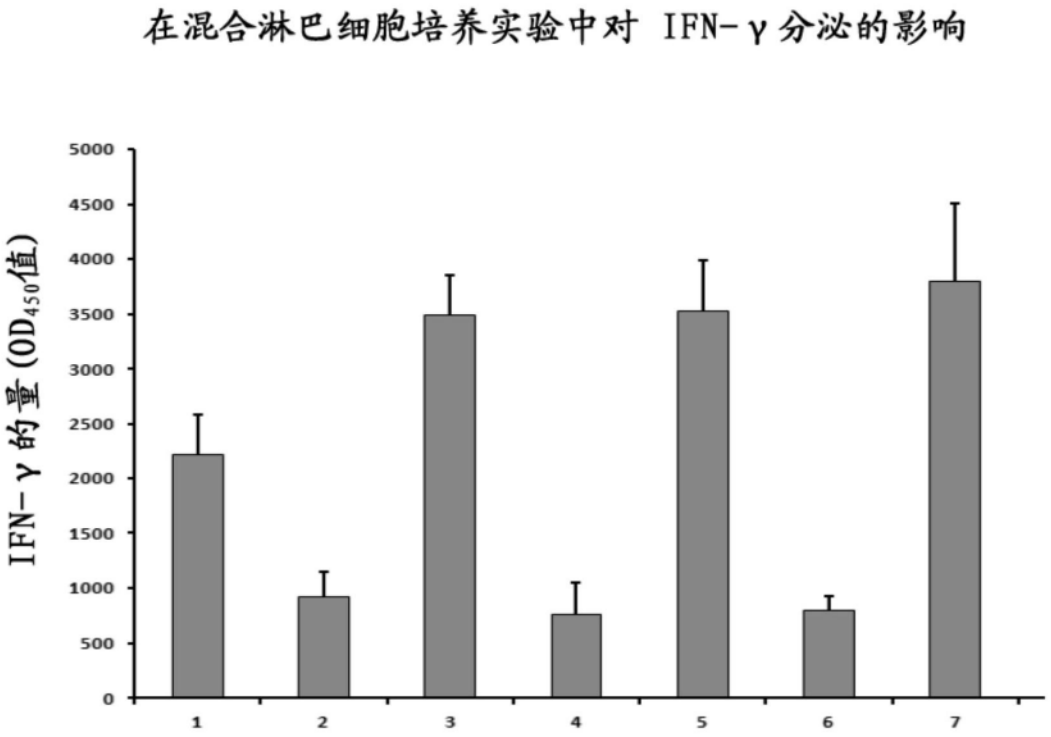

在混合淋巴细胞培养实验中对 IFN-γ分泌的影响
IFN-γ的量(OD450值)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1
2
3
4
5
6
7

图3

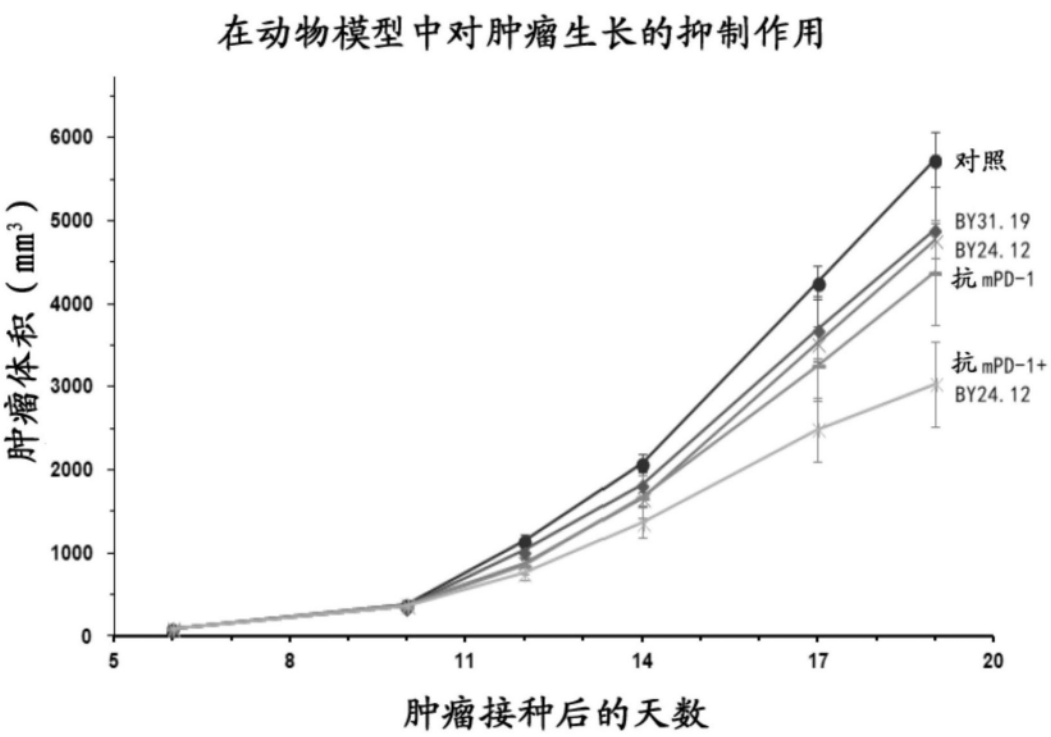

在动物模型中对肿瘤生长的抑制作用
肿瘤体积（mm3）
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
5
8
11
14
17
20
肿瘤接种后的天数
对照
BY31.19
BY24.12
抗mPD-1
抗mPD-1+
BY24.12

图4