

(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
2015年8月6日 (06.08.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/113494 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/071718

(22) 国际申请日: 2015年1月28日 (28.01.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201410042808.6 2014年1月28日 (28.01.2014) CN

(71) 申请人: 北京韩美药品有限公司 (BEIJING HANMI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市顺义区天竺空港工业区 A 区天柱西路 10 号, Beijing 101312 (CN)。

(72) 发明人: 陈国强 (CHEN, Guoqiang); 中国北京市顺义区天竺空港工业区 A 区天柱西路 10 号由北京韩美药品有限公司转交, Beijing 101312 (CN)。 刘家望 (LIU, Jiawang); 中国北京市顺义区天竺空港工业区 A 区天柱西路 10 号由北京韩美药品有限公司转交, Beijing 101312 (CN)。 宋楠萌 (SONG, Nanmeng); 中国北京市顺义区天竺空港工业区 A 区天柱西路 10 号由北京韩美药品有限公司转交, Beijing 101312 (CN)。 杨亚平 (YANG, Yaping); 中国北京市顺义区天竺空港工业区 A 区天柱西路 10 号由北京韩美药品有限公司转交, Beijing 101312 (CN)。 车美英 (CHA, Mi Young); 中国北京市顺义区天竺

空港工业区 A 区天柱西路 10 号由北京韩美药品有限公司转交, Beijing 101312 (CN)。

(74) 代理人: 北京律智知识产权代理有限公司 (BEIJING INTELLEGAL INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市朝阳区慧忠路 5 号远大中心 B 座 1802, 1803, 1805, Beijing 100101 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))。

(54) Title: BIFUNCTIONAL FUSION PROTEIN, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 双功能融合蛋白及其制备方法和用途

(57) Abstract: The present invention provides a bifunctional fusion protein comprising the extracellular region of CTLA4 and an anti-IL-17 antibody, a gene encoding the protein, a vector comprising the gene, a host cell comprising the vector, and a pharmaceutical composition containing the protein.

(57) 摘要: 本发明提供了包含 CTLA4 胞外区和抗 IL-17 抗体的双功能融合蛋白、编码该蛋白的基因、含有该基因的载体、含有该载体的宿主细胞以及含有该蛋白的药物组合物。



WO 2015/113494 A1

双功能融合蛋白及其制备方法和用途

5 技术领域

本发明涉及双功能融合蛋白及其制备方法和用途。特别的，本发明涉及可同时阻断 B7/CD28 和 IL-17A/IL-17RA 信号通路的双功能重组融合蛋白、编码该双功能融合蛋白的基因、含有该基因的载体、含有该载体的宿主细胞以及含有该双功能融合蛋白的药物组合物。

10

背景技术

调节和抑制 T 细胞功能被视为一种治疗慢性炎症的有效方式。细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA4)，又名 CD152，是一种白细胞分化抗原。CTLA4 和 CD28 的配体均为 B7 分子，而 CTLA4 与 B7 分子结合后诱导 T 细胞无反应性，参与免疫反应的负调节。2005 年上市的用于类风湿性关节炎治疗的阿巴西普 (abatacept, 商品名 Orencia™, 百时美施贵宝公司) 是一种单功能融合蛋白，由 2 个 CTLA4 分子的胞外区 (extracellular domain, ECD) 与人 IgG1 的 Fc 段结合而成，通过竞争性阻断 B7 与 CD28 分子的结合，从而抑制 T 细胞增殖和激活 (Genovese MC, Becker JC, Schiff M, et al. N. Engl. J. Med., 2005, 353: 1114-1123)。

20 白细胞介素 17A (IL-17 或 IL-17A) 是一种促炎性细胞因子，主要产生自 Th17 细胞，是 IL-17 家族中最具代表性的成员 (Miossec P, Kolls JK. Nat. Rev. Drug. Discov., 2012, 11: 763-776)。IL-17A 与其受体 (IL-17RA) 结合后，可诱导多种细胞 (如成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞) 表达炎症性细胞因子以及趋化因子，在机体免疫防御中发挥重要作用 (Lin Y, Ritchea S, Logar A. Immunity, 2009, 31: 799-810)。然而，过高表达的 IL-17A 可引起炎症疾病。类风湿关节炎患者的滑膜组织高表达 IL-17A，并导致重要炎症因子——白细胞介素 6 的产生，但该作用可被 IL-17A 中和抗体抑制 (Chabaud M, Durand JM, Buchs N, et al. Arthritis Rheum. 1999, 42: 963-70)。很多自身免疫疾病的动物模型实验证明，使用抗体中和 IL-17A，可有效抑制炎症的病理发展 (Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, et al. Arthritis Rheum., 2004, 50: 650-659)。目前，尚无 IL-17A 相关抗体药物被批准上市，但有 3 个药物正处于临床研究阶段，分别是 Secukinumab (IL-17A

30

靶向抗体)、Ixekizumab (IL-17A 靶向抗体) 和 Brodalumab (IL-17RA 靶向抗体)。然而, 药物临床研究结果表明, 对于某些慢性炎症疾病如类风湿性关节炎, 这些药物并未表现出预期的治疗效果 (Kellner H, Ther Adv Musculoskelet Dis., 2013, 5: 141-152)。因此, 采用联合给药的治疗模式, 可能会增加某些慢性炎症如类风湿性关节炎患者的临床获益。

5 联合给药需要依次注射两种或多种抗体, 或将抗体做成同一种剂型。然而, 一方面, 依次注射抗体会降低患者的治疗依从性, 并增加疼痛。另一方面, 由于不同抗体的物化性质存在差异, 很难或几乎不太可能将不同抗体做成同一种剂型。

鉴于此, 仍然有必要研究一种同时阻断 B7/CD28 和 IL-17A/IL-17RA 信号通路的新型治疗药物。

10

发明内容

本发明提供一种同时阻断 B7/CD28 和 IL-17A/IL-17RA 信号通路的双功能融合蛋白、编码该双功能融合蛋白的基因、含有该基因的载体、含有该载体的宿主细胞以及含有该双功能融合蛋白的药物组合物。

15 本发明的第一方面涉及一种双功能融合蛋白, 其包含 CTLA4 分子胞外区和中和 IL-17 活性的功能片段, 在一个实施方案中, 所述 IL-17 是 IL-17A。

在一个实施方案中, 所述的双功能融合蛋白还包含连接肽, 其中所述 CTLA4 分子胞外区通过连接肽连接于中和 IL-17 活性的功能片段的 N 端或 C 端, 在一个实施方案中, 所述连接肽的氨基酸序列长度为 1-25 个氨基酸, 例如, 所述连接肽的氨基酸序列长度为
20 20、21、22、23、24 或 25 个氨基酸, 例如, 所述连接肽是 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在一个实施方案中, 中和 IL-17 活性的功能片段是抗 IL-17 抗体或其功能片段、嵌合抗体、人源化抗体、完全人源抗体、单链抗体、双特异性抗体, 在一个实施方案中, CTLA4 分子胞外区通过连接肽连接于抗 IL-17 抗体重链或轻链的 N 端。在某些实施方案中, 抗
25 IL-17 抗体为 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM 抗体或者它们的杂合体, 在某些实施方案中, 抗 IL-17 抗体为 IgG 抗体

在一个实施方案中, 所述 CTLA4 分子胞外区包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列或其功能片段, 或如上述所示的序列经替换、缺失或添加一个或多个氨基酸残基形成的具有同等功能的氨基酸序列, 如 2、3、4、5、10、15、20、30、50 个氨基酸残基, 或与其
30 具有至少 70% 同一性且具有同等功能的氨基酸序列, 如至少约 75%、80%、85%、90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%同一性。

在一个实施方案中，所述抗 IL-17 抗体的重链序列包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列，或如上述所示的序列经替换、缺失或添加一个或多个氨基酸残基形成的具有同等功能的氨基酸序列，如 2、3、4、5、10、15、20、30、50 个氨基酸残基，或与其具有至少 70%同一性且具有同等功能的氨基酸序列，如至少约 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%同一性；所述抗 IL-17 抗体的轻链序列包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列，或如上述所示的序列经替换、缺失或添加一个或多个氨基酸残基形成的具有同等功能的氨基酸序列，如 2、3、4、5、10、15、20、30、50 个氨基酸残基，或与其具有至少 70%同一性且具有同等功能的氨基酸序列，如至少约 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%同一性。

在一个实施方案中，SEQ ID NO: 2 所示的 CTLA4 分子胞外区通过 SEQ ID NO: 3 所示的连接肽连接至 SEQ ID NO: 4 或 12 所示的抗 IL-17 抗体的重链序列的 N 端或连接至 SEQ ID NO: 5 或 13 所示的抗 IL-17 抗体的轻链序列的 N 端。

在一个实施方案中，SEQ ID NO: 2 所示的 CTLA4 分子胞外区通过 SEQ ID NO: 3 所示的连接肽连接至 SEQ ID NO: 4 或 12 所示的抗 IL-17 抗体的重链序列的 C 端或连接至 SEQ ID NO: 5 或 13 所示的抗 IL-17 抗体的轻链序列的 C 端。

在一个实施方案中，所述双功能融合蛋白的氨基酸序列选自下述组合：SEQ ID NO: 5 和 6、SEQ ID NO: 13 和 14、SEQ ID NO: 4 和 19、SEQ ID NO: 24 和 25、SEQ ID NO: 26 和 27、或如上述所示的序列经替换、缺失或添加一个或多个氨基酸残基形成的具有同等功能的氨基酸序列，如 2、3、4、5、10、15、20、30、50 个氨基酸残基，或与其具有至少 70%同一性且具有同等功能的氨基酸序列，如至少约 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%同一性。

本发明的第二方面涉及一种如上所述的双功能融合蛋白的编码基因。

在一个实施方案中，所述的编码基因包含 SEQ ID NO: 7 和 8 或 SEQ ID NO: 15 和 16 所示的核苷酸序列。

在某些实施方案中，所述载体中编码轻链和重链的核酸序列存在于不同的表达框中。

本发明的第三方面涉及一种重组载体，其包含有效连接其中的如上所述的编码基因。

在某些实施方案中，所述的载体为真核细胞表达载体，在某些实施方案中，所述的载体为经改造而具有两个表达框的载体 X0GC。

本发明的第四方面涉及一种宿主细胞，其含有如上所述的重组载体。

5 本发明的第五方面涉及一种制备如上所述的双功能融合蛋白的方法，其包括步骤：

(1) 将如上所述编码基因有效连接至真核表达载体中并转染至宿主细胞进行表达或将如上所述的重组载体转染至宿主细胞进行表达；和

(2) 纯化所述双功能融合蛋白，

10 在一个实施方案中，所述真核表达载体为 X0GC，在一个实施方案中，所述宿主细胞为 HEK293-T 或 CHO 细胞。

本发明的第六方面涉及一种生产如上所述的双功能融合蛋白的方法，其包括在适宜表达条件下培养如上所述的宿主细胞，并分离、纯化表达的蛋白。

本发明的第七方面涉及一种药物组合物，其包含如上所述的双功能融合蛋白或如上所述的方法产生的双功能融合蛋白。

15 在一个实施方案中，如上所述的双功能融合蛋白或如上所述的药物组合物用于预防、治疗或改善类风湿关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩氏病、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、多发性硬化症、自身免疫性脑脊髓炎、肾小球肾炎、特发性血小板减少性紫癜、原发性干燥综合征、痛风、或器官移植。

20 在另一个实施方案中，如上所述的双功能融合蛋白或如上所述的药物组合物用于预防、治疗或改善类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩氏病。

本发明的第八方面涉及如上所述的双功能融合蛋白或者由如上方法产生的双功能融合蛋白或者如上所述的药物组合物在制备用于预防、治疗或改善疾病的药物中的应用。

25 在一个实施方案中，所述疾病为类风湿关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩氏病、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、多发性硬化症、自身免疫性脑脊髓炎、肾小球肾炎、特发性血小板减少性紫癜、原发性干燥综合征、痛风、或器官移植。

本发明的第九方面涉及一种预防、治疗或改善疾病的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的如上所述的双功能融合蛋白、如上所述方法生产的双功能融合蛋白或如上所述的药物组合物的步骤。

30 在一个实施方案中，所述疾病为类风湿关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩氏病、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、多发性硬化症、自身免疫性脑脊髓炎、肾

小球肾炎、特发性血小板减少性紫癜、原发性干燥综合征、痛风、或器官移植。

本发明的第十方面涉及一种试剂盒，其包含如上所述的双功能融合蛋白、如上所述的核酸分子、如上所述的载体或如上所述的宿主细胞。

本发明具有以下几方面优点：

5 本发明的实验结果表明，本发明的双功能融合蛋白表达量高，体外实验中强烈抑制炎症细胞因子的分泌，动物模型中能有效地抑制关节炎症的发展。本领域技术人员知晓，几个不同作用机理的药物联合使用或融合使用可能会出现拮抗、无关、累加或协同等不同的效果，两种或更多种药物联合使用或融合使用到底呈现何种相互作用只能通过具体的实验研究、付出大量劳动的情况下才能确定。虽然现有技术中有可能组合使用

10 CTLA4 分子和抗 IL-17 抗体治疗了类风湿关节炎，但由于人类机体的复杂性，尤其是对类风湿关节炎这样的发病机理极其复杂、发病机理尚未完全洞悉的全身性、免疫性疾病，药物即使联合使用或融合使用也罕有实现各个不同作用机理药物所能实现的治疗效果的完全累加或协同的效果，很多都呈现组合无关甚或拮抗的效果。本发明的双功能融合蛋白实现的

15 对类风湿关节炎的增强的治疗效果为类风湿关节炎患者、尤其是中重度类风湿关节炎患者的治疗提供了一种治疗效果可能更加优异的候选药物。同时，本发明的双功能融合蛋白同时作用于治疗类风湿关节炎的两个不同的靶点，降低了单一靶点治疗失败或效果不佳的机率，具有重要的经济意义和社会效益。与使用单功能的蛋白（例如 CTLA4-Fc）情况相比，本发明可降低生产成本，并减少临床给药体积和频率，提高受试者顺从性，在免疫性疾病的预防和治疗上具有巨大的应用前景。

20

附图说明

图 1. A 和 B 分别显示了 Protein A 亲和色谱法纯化本发明实施方式中的双功能融合蛋白 A 和 B。

25 图 2. A 和 B 分别显示了离子交换色谱法纯化本发明实施方式中的双功能融合蛋白 A 和 B。

图 3. A 和 B 分别显示了高效液相排阻色谱法分析本发明实施方式中的双功能融合蛋白 A 和 B 的单体纯度。

图 4. 双功能融合蛋白 A 和 C 与人 IL-17A 的结合力。

图 5. 双功能融合蛋白 A 和 C 与小鼠 IL-17A 的结合力。

30 图 6. 双功能融合蛋白 A 抑制 IL-17A 诱导的 HT-29 细胞分泌 GRO α 。

图 7. 混合淋巴细胞反应测定双功能融合蛋白 B 的免疫抑制活性。

图 8. 双功能融合蛋白 A 人源化类似物对大鼠 CIA 关节炎炎症指数的降低作用。

具体实施方式

5 本发明的一个目的在于提供一种双功能融合蛋白，其包含 CTLA4 分子胞外区和中和 IL-17 活性的功能片段。CTLA4 分子胞外区与中和 IL-17 活性的功能片段有效连接，保持其各自的空间结构并发挥其各自的生理活性。所述 CTLA4 分子胞外区与中和 IL-17 活性的功能片段可以在不影响其各自功能的情况下直接融合在一起，且 CTLA4 分子胞外区连接在中和 IL-17 活性的功能片段的 N 端或 C 端，也可以在其间加入其它间隔序列，如连
10 接肽。

本领域技术人员知晓，虽然本发明在限定所述双功能融合蛋白时所用限定语为“包括”，但其并不意味着可以在所述双功能融合蛋白中任意加入与其功能不相关的其他序列。在制备复杂组成的融合蛋白如所述双功能融合蛋白时，为了保证融合蛋白各个组成成分的空间结构、生物活性、细胞表达水平，以及为了将所述各种组分适当的融合在一起，或为
15 了增强所述融合蛋白的抗水解能力，本领域技术人员在制备所述融合蛋白时，会根据需要在各个组分之间或所述融合蛋白的两端加入一个或多个额外的氨基酸残基，因此，如果用封闭式的表述来限定所述双功能融合蛋白将不能真实地覆盖这些情形。

本发明所用的术语“CTLA4 分子胞外区”是指细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA4) 的胞外区。在某个实施方案中，人 CTLA4 蛋白的胞外区 (ECD) 序列如 SEQ ID NO: 2 所示，其为人 CTLA4 蛋白的第 37-161 位氨基酸序列 (Genbank 登录号 NM_005214.4)。
20

在某些实施方案中，本发明所用的术语“中和 IL-17 活性的功能片段”是指靶向 IL-17 的免疫球蛋白或其修饰物、功能等同物、功能片段或变体。在某些实施方案中，中和 IL-17 活性的功能片段为靶向 IL-17 的 IgG 抗体。在某些实施方案中，所述 IgG 为嵌合的、人源化的或全人的 IgG。在某些实施方案中，所述修饰物可以是化学修饰物，如酰基化、烷基化、PEG 化产物，只要这些修饰物保留了靶向 IL-17 的能力即可。在某些实施方案中，所述功能等同物是指能够实现所述免疫球蛋白靶向结合 IL-17 能力的其他多肽片段。在某些实施方案中，所述功能片段是指保留了靶向 IL-17 的能力的蛋白质片段，如单一结构域抗体、单链抗体、单链可变片段 (scFv)、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段。在某些实施方案中，所
25

述变体是指通过在一个或多个（几个）位置的一个或多个改变，即取代、插入和/或缺失而从亲本蛋白衍生的多肽。

在某些实施方案中，所述连接片段长度为 5-30 个氨基酸，在某些实施方案中，所述连接片段长度为 25 个氨基酸，在某些实施方案中，所述连接片段的序列为
5 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS。本发明所用的连接片段并无特殊限制，只要其起到间隔融合蛋白的两个组分，使各个组分能正确形成其各自的空间结构、保留其生物活性、细胞表达水平即可。

在某些实施方案中，所述双功能融合蛋白的氨基酸序列选自下述组合：SEQ ID NO：5 和 6、SEQ ID NO：13 和 14、SEQ ID NO：4 和 19、SEQ ID NO：24 和 25、SEQ ID NO：
10 26 和 27、或如上述所示的序列经替换、缺失或添加一个或多个氨基酸残基形成的具有同等功能的氨基酸序列，如 1、2、3、4、5、10、15、20、30、50 个氨基酸残基，或与其具有至少 70% 同一性且具有同等功能的氨基酸序列，如至少约 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6% 同一性。氨基酸的保守氨基酸是本领域公知的。

15 本发明使用的术语“同一性”具有本领域通常已知的含义，本领域技术人员也熟知测定不同序列间同一性的规则、标准。本发明用不同程度同一性限定的序列还必须要同时具有 CTLA4 分子胞外区或中和 IL-17 的活性。本领域技术人员公知如何利用上述活性筛选变体序列的方法和手段。本领域技术人员可以在本申请公开内容的教导下容易地获得这样的变体序列。

20 在一个实施方案中，本发明涉及一种编码基因，其包含编码如上所述的双功能融合蛋白的核苷酸序列。

本领域技术人员知晓，虽然本发明在限定所述编码基因时所用限定语为“包括”，但其并不意味着可以在所述编码基因两端任意加入与其功能不相关的其他序列。本领域技术人员知晓，为了满足重组操作的要求，需要在所述编码基因的两端添加合适的限制性内切
25 酶的酶切位点，或者额外增加启动密码子、终止密码子等，因此，如果用封闭式的表述来限定所述编码基因将不能真实地覆盖这些情形。

本领域技术人员公知，在不改变所编码的氨基酸的情况下，所述编码基因序列中的一个或多个密码子可以进行等义替换，如一个或几个密码子，如 1、2、3、4、5、6、8、9、10、15、20、30、40、50 个密码子。密码子使用表是本领域公知的。

在一个实施方案中，本发明涉及一种重组载体，其包含有效连接其中的如上所述的编码基因。所述重组载体为重组表达载体，可以是原核表达载体也可以是真核表达载体，但优选真核表达载体，更优选用于哺乳动物真核表达的重组表达载体。

5 本发明所用的术语“有效连接”是指这样的连接方式，其中所述编码基因置于载体的适当位置，使得所述编码基因正确地、顺利地复制、转录或表达。

在一个实施方案中，本发明涉及一种宿主细胞，其转化或转染有如上所述的重组载体，所述宿主细胞包括哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母菌细胞、昆虫细胞和植物细胞。

在一个优选的实施方案中，所述的宿主细胞包含 CHO 细胞、HEK293 细胞、NSO 细胞和 SP 2/0 细胞。

10 在一个实施方案中，本发明涉及一种生产所述双功能融合蛋白的方法，其包括在适宜的多肽表达条件下培养上述宿主细胞，并从细胞培养基中分离、纯化表达的多肽。优选地，所述纯化后的多肽的纯度为大于 50%，更优选地，大于 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或 99.9%。

15 在一个实施方案中，本发明涉及一种药物组合物，其包含如上所述的双功能融合蛋白和一种药学上可接受的载体。所述双功能融合蛋白可以是所述药物组合物的唯一活性成分，也可以是所述药物组合物活性成分之一，其他活性成分为可以与所述双功能融合蛋白组合使用的其他治疗剂。

在一个优选的实施方案中，本发明的药物组合物包含单次给药的剂型、局部给药的剂型和全身给药剂型。

20 在一个实施方案中，本发明涉及所述的双功能融合蛋白或如上所述的药物组合物用于预防、治疗或改善类风湿关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩氏病、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、多发性硬化症、自身免疫性脑脊髓炎、肾小球肾炎、特发性血小板减少性紫癜、原发性干燥综合征、痛风、或器官移植。在某些实施方案中，如上所述的双功能融合蛋白或如上所述的药物组合物用于预防、治疗或改善类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩氏病。

25 在某些实施方案中，本发明涉及预防、治疗或改善疾病的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的如上所述的双功能融合蛋白、如上所述方法生产的双功能融合蛋白或如上所述的药物组合物的步骤。

在一个实施方案中，所述疾病为类风湿关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩氏病、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、多发性硬化症、自身免疫性脑脊髓炎、肾小球肾炎、特发性血小板减少性紫癜、原发性干燥综合征、痛风、或器官移植。

5 本发明所用的术语“治疗有效量”是指在给药时，可以在受试者体内发挥药理作用的剂量。“治疗有效量”可以由本领域技术人员根据患者的情况如年龄、体重、疾病状态等容易地确定。

在一个实施方案中，本发明涉及如上所述的双功能融合蛋白或者由如上方法产生的双功能融合蛋白或者如上所述的药物组合物在制备用于预防、治疗或改善疾病的药物中的应用。

10 在一个实施方案中，所述疾病为类风湿关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩氏病、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、多发性硬化症、自身免疫性脑脊髓炎、肾小球肾炎、特发性血小板减少性紫癜、原发性干燥综合征、痛风、或器官移植。

本领域技术人员知晓，虽然本发明上述内容中列出了本发明所述的双功能融合蛋白所能预防、治疗或改善的病状，但本发明的双功能融合蛋白所能处理的病状并不仅限于上述列出的具体病状，任何可以通过同时阻断 B7/CD28 和 IL-17A/IL-17RA 信号通路而获得预防、治疗或改善益处的病状都包括在本发明的保护范围之内。

根据本发明的上述技术方案，本发明具有如下有益效果：

1) 将 B7 和 IL-17A 两条信号通路的阻断分子（人 CTLA4 的胞外区和抗 IL-17 抗体）融合入一个分子进行表达和生产，与分别生产 CTLA4 蛋白的胞外区和抗 IL-17 抗体相比，
20 极大地降低了操作方法和生产成本；

2) 将人 CTLA4 蛋白的胞外区和和抗 IL-17 抗体连接，目的蛋白形成四聚体形式，既满足了 CTLA4 胞外区发挥活性需要形成二聚体形式的要求，又保留了抗 IL-17A 抗体的效价仍为二价，因此，目的蛋白的总效价是三价。并且，经过连接方式的筛选对比以及体外结合实验也显示，本发明中的有效连接方式，对 CTLA4 分子的胞外区与其配体 B7 的
25 结合，以及对抗 IL-17 抗体和 IL-17 的结合没有影响；

3) 本发明的双功能蛋白经过进一步改造后，可形成嵌合体或人源化类似物，在保留其结合活性的情况下进一步减小了免疫原性。

4) 疾病模型实验结果显示，双功能融合蛋白能有效地缓解疾病动物模型的炎症反应。

下面将通过下述非限制性实施例进一步说明本发明，本领域技术人员公知，在不背离本发明精神的情况下，可以对本发明做出许多修改，这样的修改也落入本发明的范围。

下述实验方法如无特别说明，均为常规方法，所使用的实验材料如无特别说明，均可容易地从商业公司获取。

5

实施例

实施例 1：双功能融合蛋白 A 的表达载体的构建

(1) 双功能融合蛋白 A 的氨基酸和编码核苷酸序列

表达双功能融合蛋白 A 所用信号肽序列如 SEQ ID NO: 1 所示；人 CTLA4 蛋白的胞
10 外区 (ECD) 序列如 SEQ ID NO: 2 所示，其为人 CTLA4 蛋白的第 37-161 位氨基酸序列
(Genbank 登录号 NM_005214.4)；连接肽为(G₄S)₅，序列如 SEQ ID NO: 3 所示；双功能
融合蛋白 A 中的抗 IL-17A 抗体 (对照抗体 A) 的可变区序列来自专利 US7846443 (大鼠
1D10)，恒定区序列为小鼠 IgG2a 的恒定区序列，即抗 IL-17A 抗体的重链 (hc) 序列如
SEQ ID NO: 4 所示，轻链 (lc) 序列如 SEQ ID NO: 5 所示；人 CTLA4 ECD-连接肽
15 -anti-IL-17A mAb hc-A 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

编码 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸序列的核苷酸序列经过哺乳动物细胞密码子偏好性的
优化，序列如 SEQ ID NO: 7 所示。编码 SEQ ID NO: 5 所示氨基酸序列的核苷酸序列经
过哺乳动物细胞密码子偏好性的优化，序列如 SEQ ID NO: 8 所示。SEQ ID NO: 7 和 SEQ
ID NO: 8 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成，利用 TA 克隆进入 pUC57 载体并将所获
20 得的经过测序验证的阳性克隆分别命名为 pUC57-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-A 和
pUC57-anti-IL-17A mAb lc-A。

(2) 双功能融合蛋白 A 表达载体的构建和转染质粒的准备

用 pUC57-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-A 质粒 (南京金斯瑞生物科技有限公司) 为模
板，通过常规 PCR 扩增信号肽-人 CTLA4 ECD-连接肽-anti-IL-17A mAb hc-A 的编码序列，
25 所用上游引物带有 *Hind* III 酶切位点，序列 CCAAGCTTGCCACCATGGGGGTCCTG
(SEQ ID NO: 9)。下游引物带有 *EcoR* I 酶切位点，序列为
CCGGAATTCTCATTTGCCTGGGGTTCT (SEQ ID NO: 10)。

用 pUC57-anti-IL-17A mAb lc-A 质粒 (南京金斯瑞生物科技有限公司) 为模板，通过
常规 PCR 扩增 anti-IL-17A mAb lc-A 的编码序列，所用上游引物带有 *Hind* III 酶切位点，
30 为 SEQ ID NO: 9。下游引物带有 *EcoR* I 酶切位点，序列为

CCGGAATTCTCAGCACTCATTCCG (SEQ ID NO: 11)。

将扩增得到的信号肽-人 CTLA4 ECD-连接肽-anti-IL-17A mAb hc-A 和 anti-IL-17A mAb lc-A 编码序列 (长度分别是 1881 bp 和 717 bp), 经 1%浓度的琼脂糖凝胶电泳后回收相应片段。将回收获得的基因片段和本公司真核表达载体 X0GC(专利 US20100120089) 用 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切后连接, 获得重组质粒 X0GC-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-A 和 X0GC-anti-IL-17A mAb lc-A, 分别将其转化大肠杆菌 DH5 α , 获得重组菌 DH5 α /X0GC-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-A 和 DH5 α /X0GC-anti-IL-17A mAb lc-A。PCR 筛选阳性克隆并进行 DNA 测序, 验证重组质粒构建正确。

将阳性 DH5 α /X0GC-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-A 和 DH5 α /X0GC-anti-IL-17A mAb lc-A 分别接种至 1L 的 LB/Amp 液体培养基 (组成为 1% 蛋白胨 (BD 公司)、0.5%酵母提取物 (BD 公司)、1% NaCl (国药集团化学试剂有限公司)), 于 37 $^{\circ}$ C、180 rpm 条件下振荡培养过夜。第二天使用无内毒素质粒大提试剂盒 (Qiagen, 12381) 提取质粒用于 HEK293-T (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心) 转染。

15 实施例 2: 双功能融合蛋白 B 的表达载体的构建

(1) 双功能融合蛋白 B 的氨基酸和编码核苷酸序列

表达双功能融合蛋白 B 所用信号肽序列如 SEQ ID NO: 1 所示; 人 CTLA4 蛋白的 ECD 序列如 SEQ ID NO: 2 所示, 其为人 CTLA4 蛋白的第 37-161 位氨基酸序列 (Genbank 登录号 NM_005214.4); 连接肽为(G₄S)₅, 序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 双功能融合蛋白 B 中的抗 IL-17A 抗体的序列来自专利 US7846443 (人源化的 16C10), 其重链 (hc) 序列如 SEQ ID NO: 12 所示, 轻链 (lc) 序列如 SEQ ID NO: 13 所示; 人 CTLA4 ECD-连接肽-anti-IL-17A mAb hc-B 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

编码 SEQ ID NO: 14 所示氨基酸序列的核苷酸序列经过哺乳动物细胞密码子偏好性的优化, 序列如 SEQ ID NO: 15 所示。编码 SEQ ID NO: 13 所示氨基酸序列的核苷酸序列经过哺乳动物细胞密码子偏好性的优化, 序列如 SEQ ID NO: 16 所示。SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 利用 TA 克隆进入 pUC57 载体并将所获得的经过测序验证的阳性克隆分别命名为 pUC57-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-B 和 pUC57-anti-IL-17A mAb lc-B。

(2) 双功能融合蛋白 B 表达载体的构建和转染质粒的准备

30 用 pUC57-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-B 质粒 (南京金斯瑞生物科技有限公司) 为模

板,通过常规 PCR 扩增信号肽-人 CTLA4 ECD-连接肽-anti-IL-17A mAb hc-B 的编码序列,所用上游引物带有 Hind III 酶切位点,序列为 SEQ ID NO: 9。下游引物带有 EcoR I 酶切位点,序列为 CCGGAATTCTCACTTTCCTGGTGACAGACTCA (SEQ ID NO: 17)。

用 pUC57-anti-IL-17A mAb lc-B 质粒(南京金斯瑞生物科技有限公司)为模板,通过
5 常规 PCR 扩增 anti-IL-17A mAb lc-B 的编码序列,所用上游引物带有 Hind III 酶切位点,序列为 SEQ ID NO: 9。下游引物带有 EcoR I 酶切位点,序列为 CCGGAATTCTCAGCACTCGCCCCGGTTG (SEQ ID NO: 18)。

将扩增得到的信号肽-人 CTLA4 ECD-连接肽-anti-IL-17A mAb hc-B 和 anti-IL-17A
10 mAb lc-B 编码序列(长度分别为 1887 bp 和 735 bp),经 1%浓度的琼脂糖凝胶电泳后回收相应片段。将回收获得的基因片段和本公司真核表达载体 X0GC(专利 US20100120089)用 Hind III 和 EcoR I 酶切后连接,获得重组质粒 X0GC-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-B 和 X0GC-anti-IL-17A mAb lc-B,分别将其转化大肠杆菌 DH5 α ,获得重组菌 DH5 α /X0GC-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-B 和 DH5 α /X0GC-anti-IL-17A mAb lc-B。PCR 筛选阳性克隆并进行 DNA 测序,验证重组质粒构建正确。

15 将阳性 DH5 α /X0GC-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-B 和 DH5 α /X0GC-anti-IL-17A mAb lc-B 分别接种至 1L 的 LB/Amp 液体培养基(组成为 1% 蛋白胨(BD 公司)、0.5%酵母提取物(BD 公司)、1% NaCl(国药集团化学试剂有限公司)),于 37 $^{\circ}$ C、180 rpm 条件下振荡培养过夜。第二天使用无内毒素质粒大提试剂盒(Qiagen, 12381)提取质粒用于 HEK293-T 转染。

20

实施例 3: 双功能融合蛋白 A 和 B 的表达

将生长状态良好、活力(活细胞比率,也可以写成“活率”)达到 95%以上的 HEK293-T 细胞以 1.8×10^7 个细胞的接种量接种于十层细胞工厂(NUNC 公司,产品号: 140400),用含 10%胎牛血清(Gibco 公司)的 DMEM 培养基(Corning 公司)培养,细胞工厂反复
25 颠倒混匀后置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养箱内培养 48 小时,细胞贴壁完全,密度达到 80%,即可用于瞬时转染。

将质粒 X0GC-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-A 和 X0GC-anti-IL-17A mAb lc-A 同时转染细胞,用于双功能融合蛋白 A 的表达。将质粒 X0GC-CTLA4-anti-IL-17A mAb hc-B 和 X0GC-anti-IL-17A mAb lc-B 同时转染细胞,用于双功能融合蛋白 B 的表达。用 0.22 μ m
30 滤膜过滤后,各吸取 1330 μ g,加入到 66 ml 无血清 DMEM 培养基中。吸取 2660 μ g 转

染试剂 PEI (Sigma 公司) 加入到 66 ml 无血清 DMEM 培养基中, 分别混匀后, 将获得的 PEI 混合液倒入含有质粒的 DMEM 中, 混匀。室温静置 15 分钟后, 将含有质粒与 PEI 的混合物加入到 1.3 L 的无血清 DMEM 培养基内, 充分混匀后缓慢加入到细胞工厂内。将细胞工厂置于 37°C、5% CO₂ 培养箱内培养。4 小时后, 加入 266 ml Cell Boost 5 (Thermo Fisher 公司), 混匀后继续培养 6 天, 7000 rpm 条件下离心 20 min, 收集上清液用于蛋白纯化。上清液经 ELISA 浓度测定, 双功能融合蛋白 A 和 B 各批次蛋白表达量为 4-8 mg/L。

实施例 4: 双功能融合蛋白 A 和 B 的纯化

来自细胞工厂的上清液经 0.2 μm 滤膜过滤后, 再通过膜包超滤浓缩 (标称截留分子量 10 kDa), 将溶液置换为含 150 mM NaCl 的 20 mM 磷酸盐溶液 (pH 7.4)。在应用层析柱纯化之前, 以 0.2 μm 滤膜过滤以去除沉淀物。此步骤在 4°C 下进行。

采用 AKTA explorer 100 型蛋白纯化系统 (GE Healthcare) 以及亲和色谱柱 rProtein A Sepharose Fast Flow (16 mm I.D., 22 ml, GE Healthcare) 于 4°C 下进行纯化。首先以流动相 A (20 mM 磷酸钠缓冲液, 150 mM 氯化钠, pH 7.4) 平衡色谱柱, 在基线稳定后将经过上述处理的细胞上清液进行上样, 流速为 5 ml/min, 并在上样后以流动相 A 进行冲洗。之后, 首先以流动相 B1 (含有 0.5 M 精氨酸的流动相 A) 冲洗 5 个柱体积; 然后以流动相 B2 (100 mM 柠檬酸, pH 3.0) 洗脱 5 个柱体积, 收集洗脱峰即为目的蛋白峰; 以上洗脱步骤流速都为 5 ml/min。色谱图如图 1A 和 B 所示。收集标示的洗脱峰 (图 1A 和 B 的灰色区域), 并通过滴加 1 M 醋酸钠溶液将 pH 调至 5.0。

采用 AKTA explorer 100 型蛋白纯化系统 (GE Healthcare) 以及强阴离子交换色谱柱 HiTrap Q Sepharose FF (5ml, GE Healthcare) 于 4°C 下进行纯化。首先以流动相 A (20 mM 醋酸钠, pH 5.0) 平衡色谱柱, 在基线稳定后将上一步实验中收集并调整 pH 后的洗脱液进行上样, 流速为 5 ml/min, 收集流穿峰即为目的蛋白峰。上样完毕后, 应用流动相 B (20 mM 醋酸钠, 1 M 氯化钠, pH 5.0) 进行等度洗脱, 流速为 5 ml/min。色谱图如图 2A 和 B 所示。收集标示组分 (图 2A 和 B 的灰色区域), 用超滤管 (标称截留分子量 30 kDa) 浓缩, 在超净工作台用 0.2 μm 滤膜无菌过滤, 然后用紫外分光光度计 (280 nm) 进行定量, 并用高效液相排阻色谱 (SE-HPLC) 进行纯度分析。结果如图 3A 和 B 所示, 双功能融合蛋白 A 和 B 的单体纯度分别为 96.6% 和 97.4%。

30 实施例 5: 双功能融合蛋白的稳定细胞系构建

CHO/DG44(dhfr-)细胞复苏之后传 2-3 代, 当其存活率达到 95%时, 可以用于转染实验。利用 Lipofectamine 2000 转染试剂 (Invitrogen, 11668019) 按照说明书进行 CHO/DG44 细胞的转染。具体地, 将 5 μ g 质粒和 3 mL α -MEM 培养基(SAFC, 51451C)在一个离心管中混合, 同时在另一个离心管里混合 20 μ L 转染剂和 3 mL α -MEM 培养基。在洁净工作台里室温静置 5 分钟后, 将上述稀释的质粒和转染剂混合, 继续静置 30 分钟。然后将 6 mL 混合物缓慢加入 75 cm² 的细胞培养方瓶 (含汇合度为 70~80%的 CHO/DG44 细胞) 中, 然后将方瓶置于细胞培养箱 (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)。培养过夜后, 移去转染试剂混合物, 加入新鲜 α -MEM 培养基, 并添加 10%透析胎牛血清 (Gibco, 30067-334)。然后将方瓶置于细胞培养箱 (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂), 培养 1~2 天。之后在新鲜培养基中加入 1 mg/mL G418 (Cellgro, 61-234 RG), 以此培养基对细胞进行培养, 持续 2 周时间。

为得到单克隆细胞株, 需要进行有限稀释操作实验。具体地, 用添加有 10%透析胎牛血清和 1mg/mL G418 的 α -MEM 培养基, 稀释细胞悬液, 使细胞浓度为 5 个细胞/mL, 将细胞悬液接种于 96 孔板中。将细胞置于细胞培养箱 (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂) 里培养, 直到单细胞长成单独的群落。通过胰酶消化的方法, 挑选由单细胞长成的群落, 传代到 24 孔板中。然后把细胞依次传代到 12 孔板、6 孔板中。当 6 孔板中的单克隆细胞株汇合度达到 90%时, 使用 ELISA 方法测定目的蛋白的表达水平, 并鉴定得到了表达水平较高的克隆: 克隆 52 号 (14 mg/L)、克隆 85 号 (56 mg/L)、克隆 103 号 (59mg/L)。

实施例 6: 双功能融合蛋白的小规模发酵

选择克隆 103 号在 5L 生物反应器 (Sartorius, Bplus twin 5L) 中进行生产。以 5×10^5 细胞密度接种至 Hyclone SFM4CHO 培养基 (4 g/L 葡萄糖, 0.3 g/L 谷氨酰胺)。生物反应器工作体积为 2.4 L, 起始工艺条件为: 37 $^{\circ}$ C、pH 7.1、溶氧 40%-60%、搅拌速度 40 rpm。之后, 搅拌速度每天提高 5 rpm, 并于 5 天后, 以 0.5 $^{\circ}$ C/小时的速度降温, 至 34 $^{\circ}$ C 时停止降温, 并加入 0.3 mM 丁酸钠。两周后, 收获反应器发酵液, 7000rpm 离心 20 分钟, 收获上清液并保存。经 ELISA 测定, 浓度为 240mg/L。

实施例 7: 双功能融合蛋白 A 和 C 与人和小鼠 IL-17A 的结合亲和力

在结合亲和力实验中, 构建一种类似于双功能融合蛋白 A 的双功能融合蛋白 C。双功能融合蛋白 C 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 (CTLA4 ECD-连接肽- anti-IL-17A mAb 1c) 和 SEQ ID NO: 4 所示, 即其 CTLA4 ECD 通过连接肽连接至 anti-IL-17A mAb 的轻

链（即连接至 SEQ ID NO: 5），不同于双功能融合蛋白 A 的 CTLA4 ECD 通过连接肽连接至 anti-IL-17A mAb 的重链（即连接至 SEQ ID NO: 4）。此外，对照抗体 A 作为双功能融合蛋白 A 和 C 的对照抗体，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4（对照抗体 A 的重链）和 SEQ ID NO: 5（对照抗体 A 的轻链）所示，即对照抗体 A 对应于双功能融合蛋白 A 和 C 中的抗 IL-17A 抗体的部分。

该方法具体实施过程如下。用碳酸钠溶液（15 mM 碳酸钠，35 mM 碳酸氢钠，pH 9.6）包被 IL-17A（北京义翘神州，货号 12047-HNAE）或者小鼠 IL-17A（北京义翘神州，货号 51065-MNAE）于 96 孔高吸附酶标板（Corning, 2592）上，包被浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，100 μL 每孔，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。PBST (Sigma, 货号 P-3563) 洗涤该板 5 次。用含 1% BSA 的 PBST 封闭该板，300 μL 每孔，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育至少 1 小时。PBST 洗涤该板 5 次。加入稀释在含 1% BSA 的 PBST 里的特定浓度的待测样品，100 μL 每孔，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。PBST 洗涤该板 5 次。然后加入 1:10000 稀释在含 1% BSA 的 PBST 里的辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 抗体 (Abcam, 货号 Ab7068)，100 μL 每孔，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。PBST 洗涤该板 5 次。加入比色底物 TMB (BD OptEIA, 货号 555214)，100 μL 每孔，室温显色 10 分钟。加入 1M H_2SO_4 ，100 μL 每孔，终止显色。在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度。

结果如图 4 和 5 所示，本发明中的双功能融合蛋白 A 和双功能蛋白 C 具有与其抗原人 IL-17A（图 4）和小鼠 IL-17A（图 5）结合的高亲和力，且亲和力与对照抗体 A 相似。以上结果表明，通过连接肽连接于对照抗体 A 重链或轻链 N 端的 CTLA4 ECD，不会显著影响对照抗体 A 本身与抗原的亲合力。

此外，需要说明的是，本发明中的双功能融合蛋白 B 不能与小鼠 IL-17A 结合，但具有与人 IL-17A 结合的高亲和力（本发明利用 ELISA 方法测得的数值是 $\text{EC}_{50}=103 \text{ pM}$ ），与专利（US7846443）中的数值接近。

实施例 8：CTLA4 的不同连接形式对双功能融合蛋白与 B7 亲和力的影响

为了研究比较 CTLA4 的不同连接形式对双功能融合蛋白与 B7 亲和力的影响，我们构建了具有不同 CTLA4 连接形式的双功能融合蛋白类似物：

（1）双功能融合蛋白 C：序列如前所述，即 SEQ ID NO: 19（CTLA4 ECD-连接肽 - anti-IL-17A mAb lc）和 SEQ ID NO: 4，即其 CTLA4 ECD 通过连接肽连接至 anti-IL-17A mAb 轻链的 N 端（即连接至 SEQ ID NO: 5），不同于双功能融合蛋白 A 的 CTLA4 ECD 通过连接肽连接至 anti-IL-17A mAb 重链的 N 端（即连接至 SEQ ID NO: 4）。

(2) 双功能融合蛋白 D: 所用信号肽序列如 SEQ ID NO: 1 所示; 人 CTLA4 蛋白的胞外区 (ECD) 序列如 SEQ ID NO: 2 所示; 连接肽为(G₄S)₅, 序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 抗 IL-17A 抗体的重链 (hc) 序列如 SEQ ID NO: 4 所示, 轻链 (lc) 序列如 SEQ ID NO: 5 所示; anti-IL-17A mAb hc-A-连接肽-CTLA4 ECD 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示, 即双功能融合蛋白 D 的 CTLA4 通过连接肽连接于对照抗体 A 重链的 C 端。

(3) 双功能融合蛋白 E: 所用信号肽序列如 SEQ ID NO: 1 所示; 人 CTLA4 蛋白的胞外区 (ECD) 序列如 SEQ ID NO: 2 所示; 连接肽为(G₄S)₅, 序列如 SEQ ID NO: 3 所示, 抗 IL-17A 抗体的重链 (hc) 序列如 SEQ ID NO: 4 所示, 轻链 (lc) 序列如 SEQ ID NO: 5 所示; anti-IL-17A mAb lc-A-连接肽-CTLA4 ECD 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示, 即双功能融合蛋白 E 的 CTLA4 通过连接肽连接于对照抗体 A 轻链的 C 端。

CTLA4 ECD 可与其配体 B7 分子结合。在 B7 结合亲和力测定实验中, 用流式细胞术在高表达 B7 分子的 Raji 细胞上测定双功能融合蛋白 A 和 C 以及 D 和 E 与 B7 分子的结合能力。该方法具体实施过程如下。1000 rpm 离心 5 分钟收集 Raji 细胞 (ATCC, 货号 CCL-86)。用含 2% FBS (GIBCO, 货号 10099141) 的 PBS (PromoCell, 货号 C-40232) 洗涤一次。将 Raji 细胞在 EP 管中重悬, 每管 1×10^6 个细胞, 重悬于 200 μ L 含 2% FBS 且含有终浓度为 0.5 nM 的待测样品的冷 PBS 中。EP 管于冰上孵育 30 分钟。用含 2% FBS 的 PBS 洗涤两次。然后再重悬于 200 μ L 含 2% FBS 且含有 FITC 标记的抗小鼠 IgG 抗体 (1:50 稀释) 的冷 PBS 中。冰上避光孵育 30 分钟。用含 2% FBS 的 PBS 洗涤两次。再重悬于 500 μ L 含 2% FBS 的冷 PBS 中, 该细胞悬液于流式细胞仪上进行检测分析。

结果如表 1 所示, 双功能融合蛋白 A 具有与高表达其配体 B7 分子的 Raji 细胞结合的能力, 且结合力显著大于双功能融合蛋白 C、双功能融合蛋白 D 和双功能融合蛋白 E。以上结果表明, CTLA4 ECD 与抗 IL-17A 抗体的不同连接形式可显著影响其与 B7 的结合能力。

表 1. 双功能融合蛋白与高表达 B7 分子的 Raji 细胞的结合能力

样品	平均荧光强度 (MFI)
IgG 阴性对照	5
双功能融合蛋白 A	51
双功能融合蛋白 C	28
双功能融合蛋白 D	9

实施例 9：双功能融合蛋白 A 抑制 IL-17A 诱导的 HT-29 细胞分泌 GRO α

人结直肠癌细胞株 HT-29 来自 ATCC。HT-29 细胞在含有 10%胎牛血清 (Gibco, 货号: 10099)的 RPMI-1640 培养基 (Gibco, 货号: 22400)中培养, 置于 37°C、5% CO₂ 细胞
5 孵箱中, 每周传代两次。

抑制 IL-17A 诱导的 GRO α 分泌实验具体操作如下。将待测样品梯度稀释于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中, 每孔 50 μ L 加入细胞培养板 (Corning, 货号 3599) 中。再向细胞培养板中加入稀释于相同完全培养基的浓度为 240 ng/mL 的人 IL-17A, 每孔 50 μ L。置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 小时。然后将 HT-29 细胞重悬在完全培养
10 基中, 接种到 96 孔细胞培养板内, 每孔 100 μ L, 约 20000 个细胞。细胞在 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育培养 48 小时。将细胞培养板 1000 rpm 离心 5 分钟, 取出培养上清。按照说明书, 用 GRO α ELISA 试剂盒 (R&D, 货号 DY275) 测定 GRO α 水平。

结果如图 6 所示, 对照抗体 A 和双功能融合蛋白 A 均可抑制 IL-17A 诱导的 HT-29 细胞分泌 GRO α , IC₅₀ 分别是 532 pM 和 911 pM。

15

实施例 10：双功能融合蛋白 B 抑制人外周血单个核细胞分泌 IL-2

通过混合淋巴细胞反应测定本发明的双功能融合蛋白 B 的免疫抑制活性, 即抑制 T 淋巴细胞活化的活性。简要的说, 取来自两位不同个体的两份人外周血单个核细胞 (PBMC), 其中一份 PBMC 经灭活作为刺激细胞, 另一份 PBMC 作为反应细胞, 混合
20 这两个 PBMC, 刺激细胞即可活化反应细胞的免疫反应, 并大量分泌细胞因子 IL-2。将样品与这个混合 PBMC 体系共孵育, 检测其对 IL-2 分泌的影响。

淋巴细胞混合反应的具体实施方法如下。将两支来自不同个体的不同批号 PBMC (Lonza, 货号 CC-2702)复苏重悬于含 10% 胎牛血清(Gibco, 货号 10099)的 RPMI-1640 (Gibco, 货号 22400) 完全培养基中。一支 PBMC 作为刺激细胞, 一支 PBMC 作为反应
25 细胞。刺激细胞与 50 μ g/ml 的丝裂霉素 C (Wako, 货号 50-07-7) 在 37°C 条件下共孵育 45 分钟, 然后用 DPBS (PromoCell, 货号 C-40232) 洗涤细胞两次, 然后细胞再重悬于 RPMI1640 完全培养基中。刺激细胞和反应细胞均进行计数 (Innovatis Cedex) 和细胞活率测定 (台盼蓝染料, Invitrogen 公司, 货号 15250-061)。然后将反应细胞接种于 96 孔细胞培养板 (Corning, 货号 3799), 每孔 50 μ L, 每孔 1×10^5 个细胞, 再每孔加入 100 μ L

的设定浓度的双功能融合蛋白 B、已上市的阳性对照药物阿巴西普(Orencia™, 百时美施贵宝公司) 或依那西普(益赛普, 上海中信国健药业股份有限公司), 每个样品三个复孔。每孔加入 50 μL 刺激细胞, 每孔 1×10^5 个细胞。将细胞培养板置于 37°C 、5% CO_2 细胞孵箱中孵育。72 小时之后, 每孔取出 100 μL 培养上清, 保存于 -70°C 。按照说明书, 用

5 IL-2 ELISA 试剂盒 (Raybiotech, 货号 ELH-IL2-001) 测定 IL-2 水平。

结果如图 7 所示, 在混合人 PBMC 反应中, 双功能融合蛋白 B、阿巴西普和依那西普抑制 IL-2 分泌的 EC50 分别是 3 nM、12 nM 和 21 nM, 双功能融合蛋白 B 显示出了比已上市的阳性对照药物阿巴西普和依那西普更强的 IL-2 分泌抑制活性。额外的试验也表明, 双功能融合蛋白 A 也表现出了较强的 IL-2 分泌抑制活性, 活性接近于阿巴西普。

10

实施例 11: 双功能融合蛋白 A 的嵌合体与人源化类似物

我们将双功能融合蛋白 A 的恒定区氨基酸序列, 即对照抗体 A 的恒定区氨基酸序列, 替换为人 IgG1 恒定区序列。人 IgG1 重链恒定区序列如 SEQ ID NO: 22 所示, 轻链恒定区序列如 SEQ ID NO: 23 所示。由此得到了双功能融合蛋白 A 嵌合体类似物, 其氨基酸

15 序列如 SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25 所示。该嵌合体类似物可减少鼠源性成分, 从而有效减少蛋白的免疫原性。

此外, 我们进一步对 SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25 进行部分序列改造, 将其可变区域内的骨架区氨基酸进行替换和突变, 以进一步减少鼠源性成分。由此得到的双功能融合蛋白 A 人源化类似物的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 所示。

20 我们将双功能融合蛋白 A、嵌合体及其人源化类似物进行了抗原亲和力测定。结果如表 2 所示, 嵌合体和人源化类似物较好的保留了母体的抗原结合活性。

表 2. 双功能融合蛋白 A、嵌合体和人源化类似物与人 IL-17A 和 B7 的亲合力

蛋白	与 IL-17A 结合的 EC50 (pM)	与 B7 结合的平均荧光强度 (MFI)
双功能融合蛋白 A	201	21
嵌合体	382	20
人源化类似物	460	20

实施例 12: 双功能融合蛋白 A 人源化类似物在 II 型胶原诱导的大鼠关节炎(CIA)模型中的药效研究

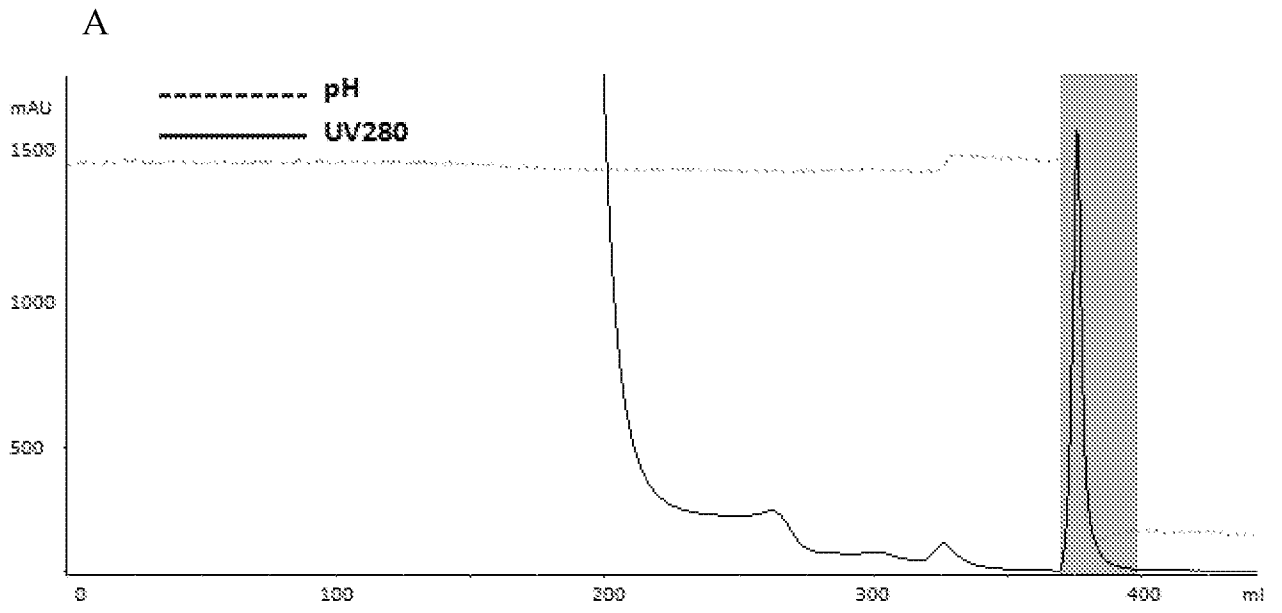
大鼠 CIA 模型是广泛应用于类风湿性关节炎发病机制研究和治疗药物筛选的动物模型。实验动物选用 7 周龄雌性 Wistar 大鼠 (购自北京华阜康生物科技股份有限公司), 适应环境一周后, 随机选取 5 只大鼠作为正常对照大鼠, 其余大鼠用于建立大鼠 CIA 模型。大鼠经初次免疫和加强免疫得到 CIA 模型。初次免疫使用 200 μg II 型牛胶原 (Chondrex, 货号 20022) 与弗氏不完全佐剂 (Sigma-Aldrich, 货号 F5506) 混合形成乳液, 于大鼠尾根部皮内注射。一周以后, 进行加强免疫。加强免疫使用 100 μg II 型牛胶原与弗氏不完全佐剂混合形成乳液, 于大鼠尾根部皮内注射。在加强免疫后观察到大鼠四肢足爪红肿等临床性关节炎症状之后, 随机进行分组, 每组 6 只。

对 CIA 模型大鼠各组分别给药。分别给予药物溶媒 (PBS)、阿巴西普 (272nmol/kg, 分别在第 1、5、8、11 天进行给药)、双功能融合蛋白 A 人源化类似物 (33nmol/kg, 每两天给药一次, 腹腔注射, 共给药 7 次)。给药后, 观察前后四肢足爪病变情况, 并进行关节炎指数评分: 0=无红肿, 1=踝关节或者跗骨关节有红斑、轻微肿胀, 2=从踝关节到跗骨关节均有红斑、轻微肿胀, 3=从踝关节到跗骨关节均有红斑、中等程度肿胀, 4=踝关节、足爪包括趾骨关节均有红斑、严重程度肿胀或者四肢关节僵硬, 大鼠四肢都给予炎症评分, 每只鼠的最大评分为 16 分。

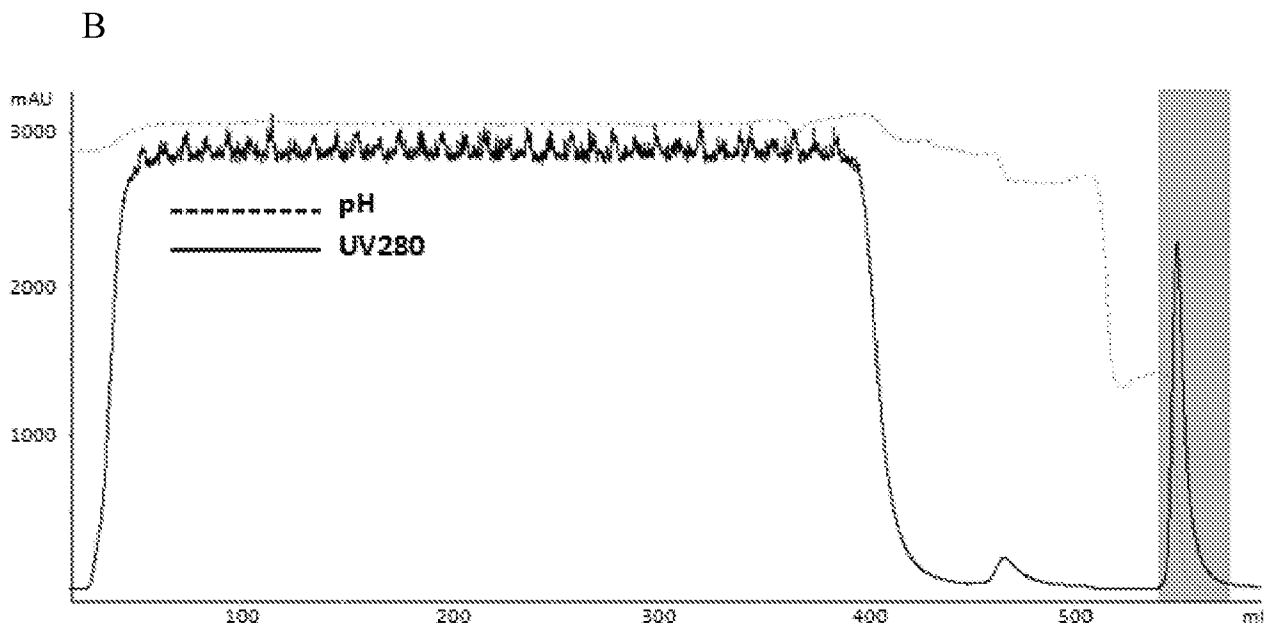
实验结果如图 8 所示, 正常对照组大鼠没有产生炎症反应, 溶媒组的 CIA 模型大鼠产生明显炎症反应, 双功能融合蛋白 A 人源化类似物给药组的 CIA 模型大鼠关节炎指数得到了明显的抑制, 显示出了比阿巴西普给药组更好的炎症缓解效果。

权 利 要 求 书

1. 一种双功能融合蛋白，其包含 CTLA4 分子胞外区和抗 IL-17 抗体，优选地，所述 IL-17 是 IL-17A。
2. 权利要求 1 所述的双功能融合蛋白，其氨基酸序列选自以下序列的组合：
 - 5 a) 如 SEQ ID NO: 5 和 6、SEQ ID NO: 13 和 14、SEQ ID NO: 4 和 19、SEQ ID NO: 24 和 25、SEQ ID NO: 26 和 27 所示的序列；
 - b) 如 SEQ ID NO: 5 和 6、SEQ ID NO: 13 和 14、SEQ ID NO: 4 和 19、SEQ ID NO: 24 和 25、SEQ ID NO: 26 和 27 所示的序列经替换、缺失或添加一个或多个氨基酸残基形成的具有同时阻断 B7 和 IL-17A 信号通路活性的氨基酸序列；或
 - 10 c) 与 SEQ ID NO: 5 和 6、SEQ ID NO: 13 和 14、SEQ ID NO: 4 和 19、SEQ ID NO: 24 和 25、SEQ ID NO: 26 和 27 所示的序列具有至少 70% 同一性并具有同时阻断 B7 和 IL-17A 信号通路活性的氨基酸序列。
3. 一种能够编码权利要求 1-2 任一项所述的双功能融合蛋白的编码基因。
4. 一种重组载体，其包含有效连接其中的权利要求 3 所述的编码基因。
- 15 5. 一种宿主细胞，其含有权利要求 4 所述的重组载体。
6. 一种制备权利要求 1 至 2 任一项所述的双功能融合蛋白的方法，其包括步骤：
 - (1) 将权利要求 3 所述编码基因有效连接至真核表达载体中并转染至宿主细胞进行表达或将权利要求 4 所述的重组载体转染至宿主细胞进行表达；和
 - (2) 纯化所述双功能融合蛋白，
- 20 优选地，所述真核表达载体为 X0GC，优选地，所述宿主细胞为 HEK293-T 或 CHO 细胞。
7. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 2 任一项所述的双功能融合蛋白或权利要求 6 所述的方法产生的双功能融合蛋白。
8. 权利要求 1 至 2 所述的蛋白或者由权利要求 6 产生的蛋白或者权利要求 7 所述的
- 25 药物组合物在制备用于预防、治疗或改善疾病的药物中的应用。
9. 如权利要求 8 所述的应用，所述疾病为类风湿关节炎、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩氏病、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、多发性硬化症、自身免疫性脑脊髓炎、肾小球肾炎、特发性血小板减少性紫癜、原发性干燥综合征、痛风、或器官移植。
10. 一种试剂盒，其包含如权利要求 1 至 2 所述的蛋白、如权利要求 3 所述的编码基
- 30 因、如权利要求 4 所述的重组载体或如权利要求 5 所述的宿主细胞。

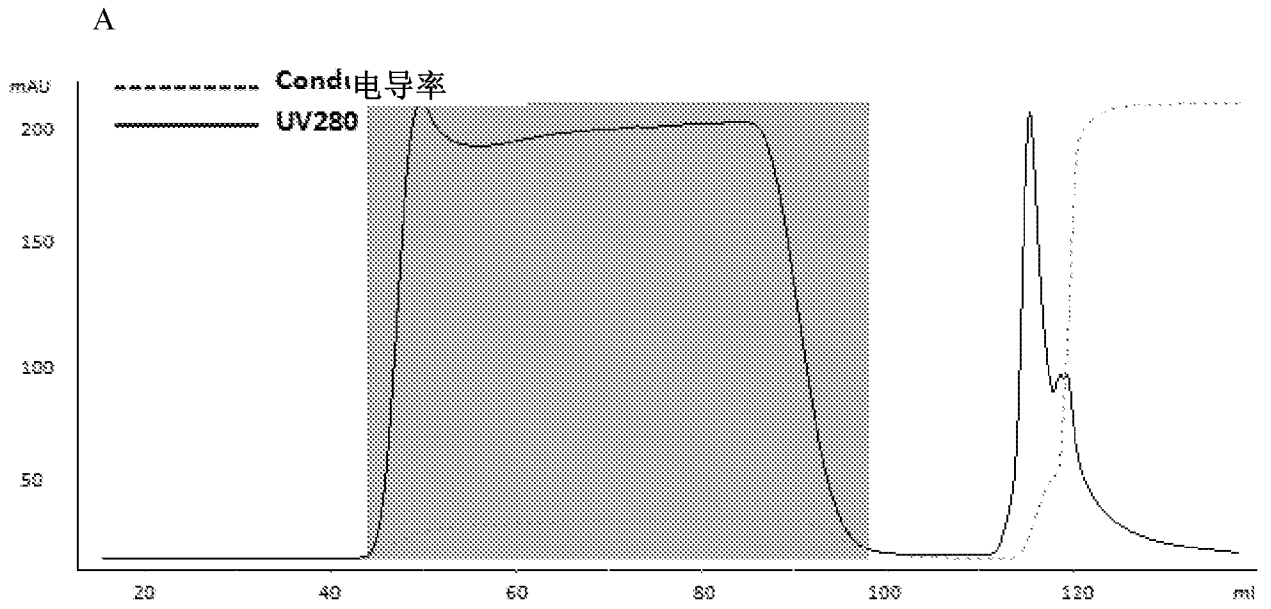


双功能融合蛋白 A

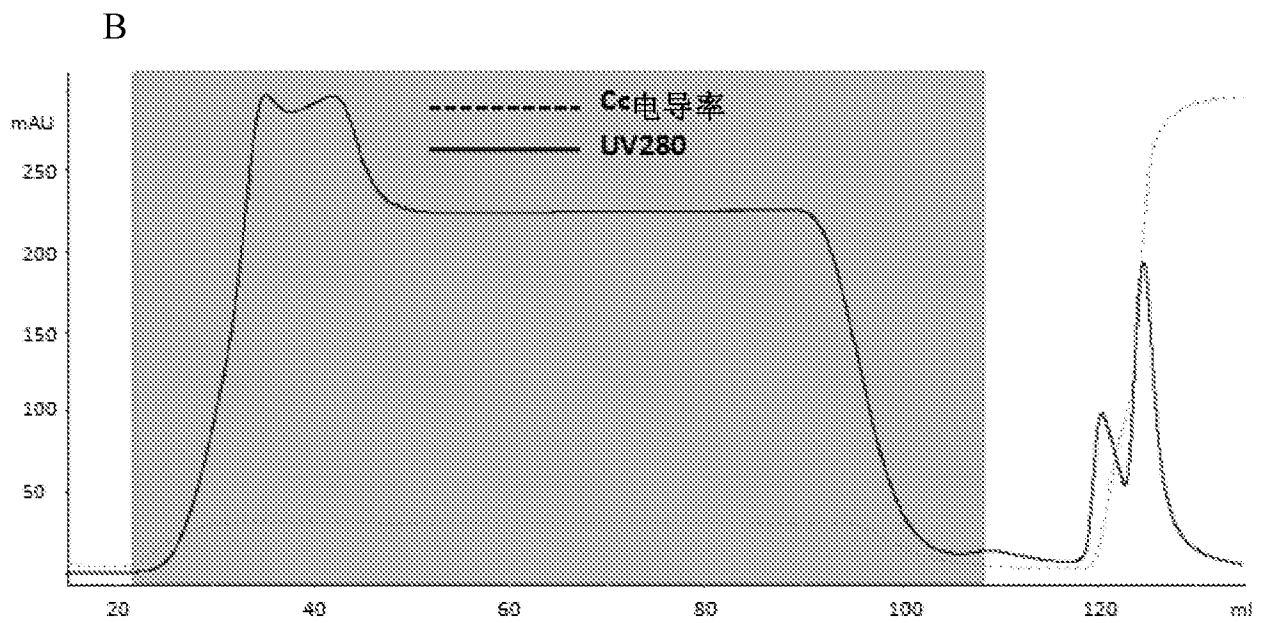


双功能融合蛋白 B

图 1



双功能融合蛋白 A



双功能融合蛋白 B

图 2

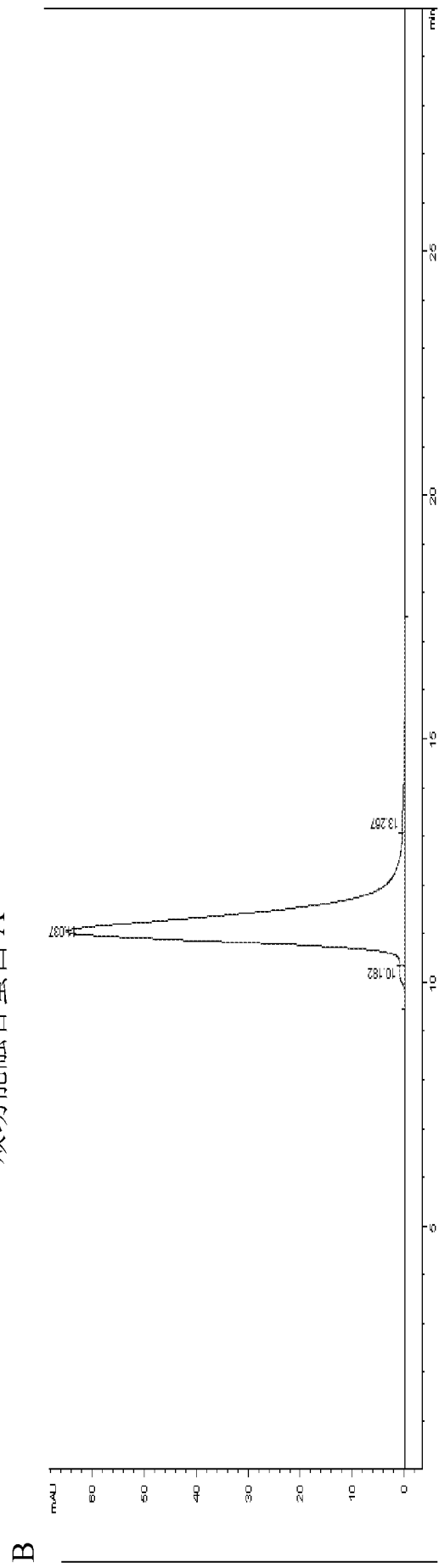
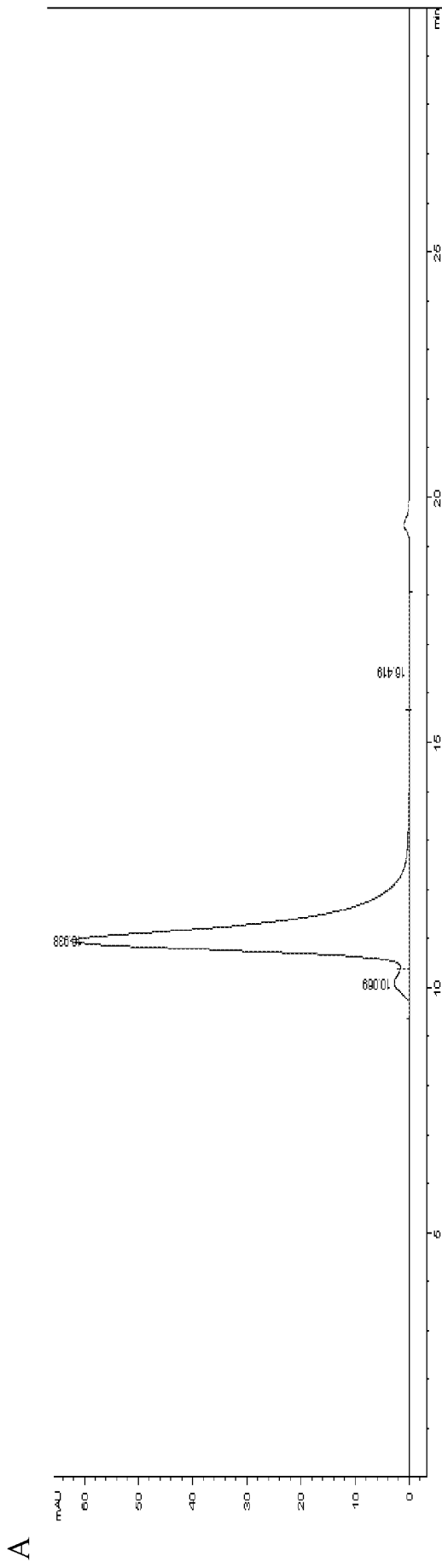
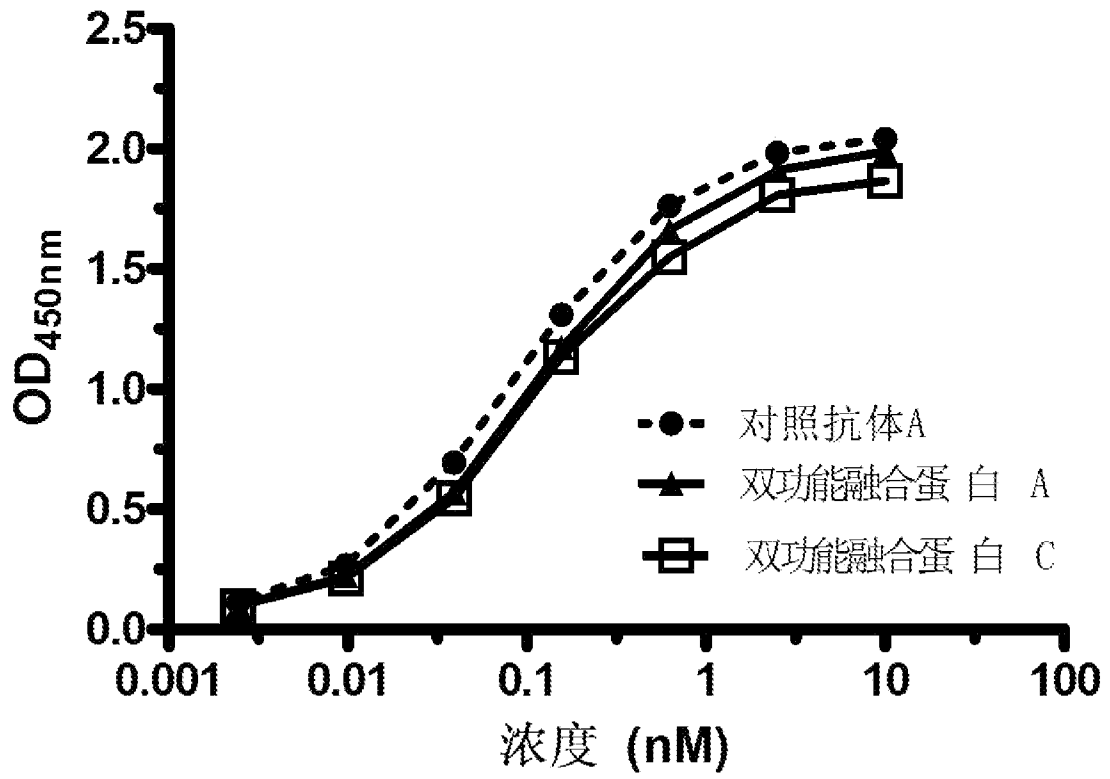
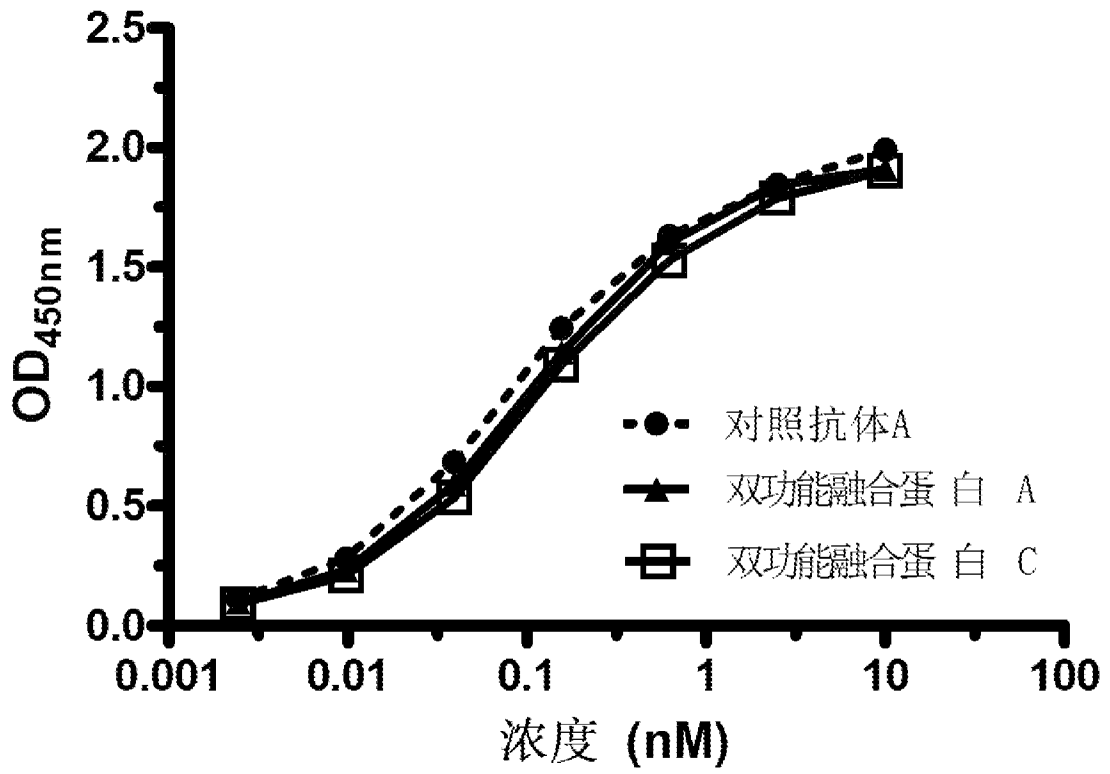


图 3



EC50 (pM)	对照抗体A	双功能融合蛋白 A	双功能融合蛋白 C
	88	116	110

图 4



EC50 (pM)	对照抗体A	双功能融合蛋白 A	双功能融合蛋白 C
	88	108	124

图 5

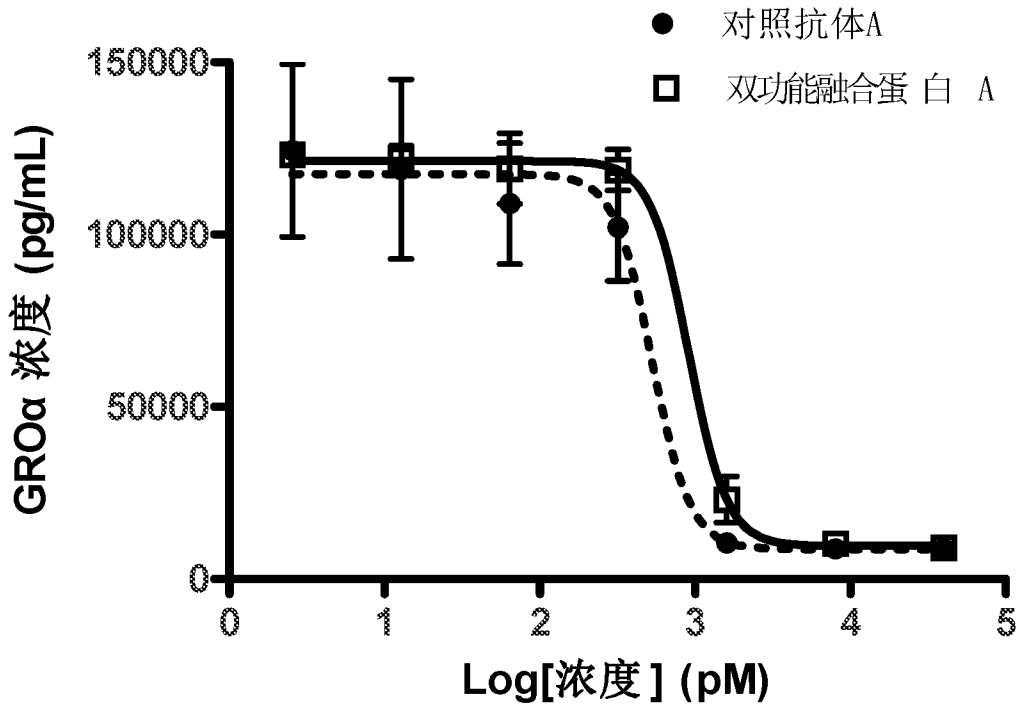
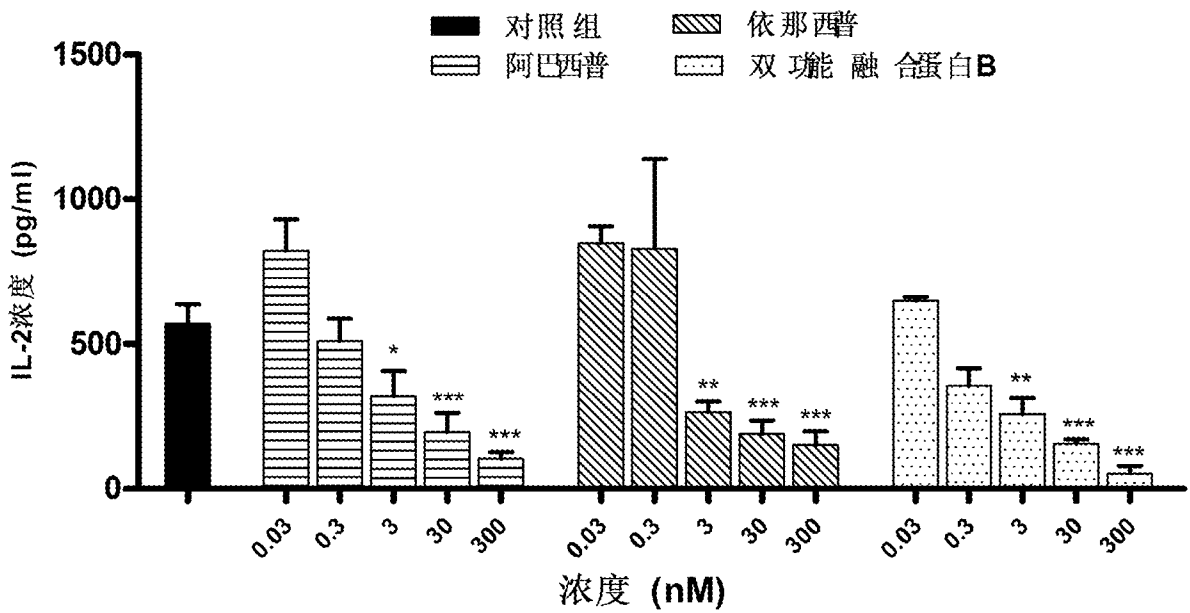


图 6



*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, 与对照组相比

EC50 (nM)	阿巴西普	依那西普	双功能融合蛋白B
	12	21	3

图 7

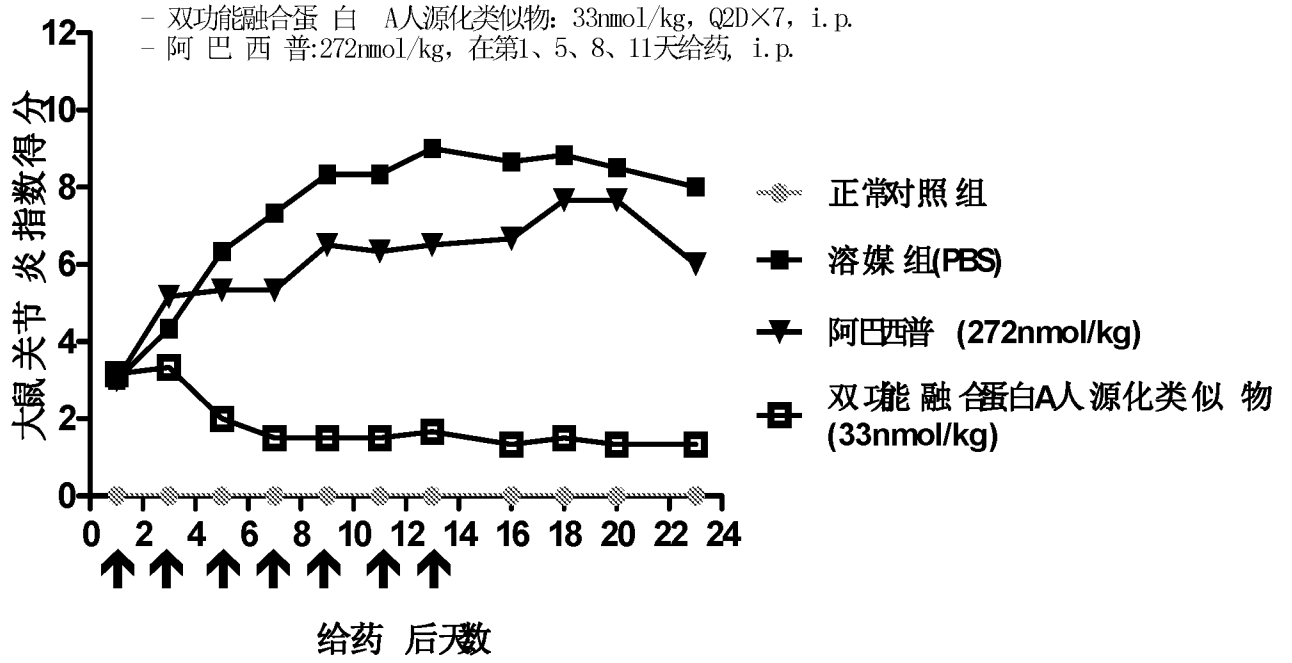


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/071718

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00 (2006.01) i; C07K 16/24 (2006.01) i; C07K 14/705 (2006.01) i; C12N 15/62 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; A61K 38/17 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 37/02 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

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

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

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE and searched terms:
CTLA4, CD152, ECD, extracellular region, extracellular, IL-17, antibody etc. ;

GENBANK, EMBL, Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent and searched sequences: SEQ ID no: 4-6, 13, 14, and 19 and 24-27

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013041029 A1 (IGENIMED PHARMACEUTICALS INC.) 28 March 2013 (28.03.2013) the whole document, especially claims 1-22	1-10
A	WO 2009147362 A1 (IMP INNOVATIONS LTD. et al.) 10 December 2009 (10.12.2009) the whole document, especially claims 1-16	1-10
A	CN 101001645 A (NOVARTIS AG.) 18 July 2007 (18.07.2007) the whole document, especially claims 1-15	1-10

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
13 April 2015

Date of mailing of the international search report
22 April 2015

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer
LI, Chen
Telephone No. (86-10) 62411100

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/071718

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2013041029 A1	28 March 2013	None	
WO 2009147362 A1	10 December 2009	None	
CN 101001645 A	18 July 2007	IL 180717 D0	03 June 2007
		AU 2005268857 C1	19 January 2012
		AU 2005268857 B8	27 May 2010
		US 2010215666 A1	26 August 2010
		ZA 200700242 A	27 August 2008
		AU 2010201689 B2	29 September 2011
		RU 2007108067 A	10 September 2008
		HR P20110758 T1	30 November 2011
		US 2012107325 A1	03 May 2012
		NO 20070985 A	30 March 2007
		EP 1776142 A1	25 April 2007
		KR 20080029018 A	02 April 2008
		KR 100852523 B1	14 August 2008
		EP 2364729 A3	18 January 2012
		SI 2364729 T1	29 August 2014
		PT 2364729 E	01 September 2014
		EP 2364729 A2	14 September 2011
		DK 2364729 T3	21 July 2014
		RU 2011113153 A	20 October 2012
		BRPI 0513078 A	22 April 2008
		PE 04182006 A1	15 June 2006
		MA 28982 B1	01 November 2007
		TWI 359153 B	01 March 2012
		US 8617552 B2	31 December 2013
		US 2014079719 A1	20 March 2014
		EP 2366405 B1	25 February 2015
		SI 1776142 T1	30 November 2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/071718

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		AU 2010201689 A1	20 May 2010
		AU 2005268857 B2	28 January 2010
		AT 517924 T	15 August 2011
		ES 2367440 T3	03 November 2011
		CA 2573586 C	25 June 2013
		DK 1776142 T3	31 October 2011
		IL 180717 A	31 July 2012
		GB 0417487 D0	08 September 2004
		EP 1776142 B1	27 July 2011
		ECSP 077198 A	28 February 2007
		WO 2006013107 A1	09 February 2006
		JP 2008507988 A	21 March 2008
		JP 4682200 B2	11 May 2011
		US 8119131 B2	21 February 2012
		AR 050200 A1	04 October 2006
		PT 1776142 E	06 October 2011
		US 7807155 B2	05 October 2010
		CN 101001645 B	05 September 2012
		AU 2005268857 A1	09 February 2006
		EP 2366405 A3	18 January 2012
		EP 2364729 B1	14 May 2014
		ES 2487533 T3	21 August 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/071718

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 19/00(2006.01)i; C07K 16/24(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词: CTLA4, CD152, ECD, 胞外区, extracellular, IL-17, 抗体, antibody等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NOs: 4-6, 13, 14, 19, 24-27</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2013041029 A1 (IGENIMED PHARMACEUTICALS INC) 2013年 3月 28日 (2013 - 03 - 28) 全文, 特别是权利要求1-22</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2009147362 A1 (IMP INNOVATIONS LTD等) 2009年 12月 10日 (2009 - 12 - 10) 全文, 特别是权利要求1-16</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101001645 A (诺瓦提斯公司) 2007年 7月 18日 (2007 - 07 - 18) 全文, 特别是权利要求1-15</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	WO 2013041029 A1 (IGENIMED PHARMACEUTICALS INC) 2013年 3月 28日 (2013 - 03 - 28) 全文, 特别是权利要求1-22	1-10	A	WO 2009147362 A1 (IMP INNOVATIONS LTD等) 2009年 12月 10日 (2009 - 12 - 10) 全文, 特别是权利要求1-16	1-10	A	CN 101001645 A (诺瓦提斯公司) 2007年 7月 18日 (2007 - 07 - 18) 全文, 特别是权利要求1-15	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
A	WO 2013041029 A1 (IGENIMED PHARMACEUTICALS INC) 2013年 3月 28日 (2013 - 03 - 28) 全文, 特别是权利要求1-22	1-10												
A	WO 2009147362 A1 (IMP INNOVATIONS LTD等) 2009年 12月 10日 (2009 - 12 - 10) 全文, 特别是权利要求1-16	1-10												
A	CN 101001645 A (诺瓦提斯公司) 2007年 7月 18日 (2007 - 07 - 18) 全文, 特别是权利要求1-15	1-10												
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2015年 4月 13日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2015年 4月 22日</p>													
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>受权官员</p> <p>李晨</p> <p>电话号码 (86-10)62411100</p>													

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/071718

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2013041029	A1	2013年 3月 28日	无			
WO	2009147362	A1	2009年 12月 10日	无			
CN	101001645	A	2007年 7月 18日	IL	180717	D0	2007年 6月 3日
				AU	2005268857	C1	2012年 1月 19日
				AU	2005268857	B8	2010年 5月 27日
				US	2010215666	A1	2010年 8月 26日
				ZA	200700242	A	2008年 8月 27日
				AU	2010201689	B2	2011年 9月 29日
				RU	2007108067	A	2008年 9月 10日
				HR	P20110758	T1	2011年 11月 30日
				US	2012107325	A1	2012年 5月 3日
				NO	20070985	A	2007年 3月 30日
				EP	1776142	A1	2007年 4月 25日
				KR	20080029018	A	2008年 4月 2日
				KR	100852523	B1	2008年 8月 14日
				EP	2364729	A3	2012年 1月 18日
				SI	2364729	T1	2014年 8月 29日
				PT	2364729	E	2014年 9月 1日
				EP	2364729	A2	2011年 9月 14日
				DK	2364729	T3	2014年 7月 21日
				RU	2011113153	A	2012年 10月 20日
				BR	PI0513078	A	2008年 4月 22日
				PE	04182006	A1	2006年 6月 15日
				MA	28982	B1	2007年 11月 1日
				TW	I359153	B	2012年 3月 1日
				US	8617552	B2	2013年 12月 31日
				US	2014079719	A1	2014年 3月 20日
				EP	2366405	B1	2015年 2月 25日
				SI	1776142	T1	2011年 11月 30日
				AU	2010201689	A1	2010年 5月 20日
				AU	2005268857	B2	2010年 1月 28日
				AT	517924	T	2011年 8月 15日
				ES	2367440	T3	2011年 11月 3日
				CA	2573586	C	2013年 6月 25日
				DK	1776142	T3	2011年 10月 31日
				IL	180717	A	2012年 7月 31日
				GB	0417487	D0	2004年 9月 8日
				EP	1776142	B1	2011年 7月 27日
				EC	SP077198	A	2007年 2月 28日
				WO	2006013107	A1	2006年 2月 9日
				JP	2008507988	A	2008年 3月 21日
				JP	4682200	B2	2011年 5月 11日
				US	8119131	B2	2012年 2月 21日
				AR	050200	A1	2006年 10月 4日
				PT	1776142	E	2011年 10月 6日
				US	7807155	B2	2010年 10月 5日
				CN	101001645	B	2012年 9月 5日
				AU	2005268857	A1	2006年 2月 9日
				EP	2366405	A3	2012年 1月 18日
				EP	2364729	B1	2014年 5月 14日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/071718

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)
<p>ES 2487533 T3 2014年 8月 21日</p> <hr/>			