

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年6月9日 (09.06.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/116480 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/094631

(22) 国际申请日: 2021年5月19日 (19.05.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202011406572.1 2020年12月4日 (04.12.2020) CN

(71) 申请人: 启愈生物技术(上海)有限公司(QUREBIO LTD) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区张衡路1227号、哈雷路1118号孵化楼第二层204室、206室、207室王哲, Shanghai 201220 (CN)。

(72) 发明人: 屈向东 (QU, Xiangdong); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区张衡路1227号、哈雷路1118号孵化楼第二层204室、206室、207室, Shanghai 200120 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

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: TRIFUNCTIONAL FUSION PROTEIN CONTAINING TUMOR-ASSOCIATED ANTIGEN (TAA) ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 含有肿瘤相关抗原TAA抗体的三功能融合蛋白及其应用

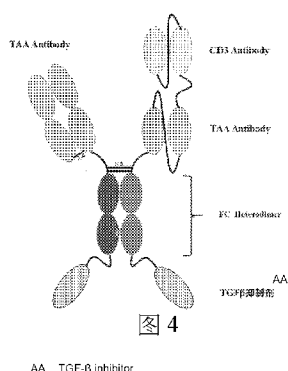


图 4

(57) Abstract: Provided are a trifunctional fusion protein containing a tumor-associated antigen (TAA) antibody, a TGF- β inhibitor, and a CD3 antibody, and an application thereof. By introducing a TGF- β inhibitor into antibody molecules, the trifunctional fusion protein can specifically target the antibody molecules to tumors by means of a TAA antibody having high affinity; an anti-CD3 antibody can play a T cell killing role; and the TGF- β inhibitor can block a TGF- β signal, thereby promoting the infiltration and activation of the T cells in a tumor microenvironment.

(57) 摘要: 提供含有肿瘤相关抗原TAA抗体、TGF- β 抑制剂、CD3抗体的三功能融合蛋白及其应用。三功能融合蛋白通过在抗体分子中引入TGF- β 抑制剂,除了能够通过高亲和力的TAA抗体将抗体分子特异性的靶向肿瘤,而且抗CD3抗体可以发挥T细胞杀伤作用,同时TGF- β 抑制剂可以阻断TGF- β 信号,促进肿瘤微环境中T细胞的浸润和激活。



WO 2022/116480 A1

含有肿瘤相关抗原TAA抗体的三功能融合蛋白及其应用

技术领域

本发明涉及一种含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白，本发明还涉及该三功能融合蛋白的应用，属于生物医药领域。

背景技术

1. 肿瘤微环境

肿瘤微环境（TME）是肿瘤周围的环境，包括血管、免疫细胞、成纤维细胞、信号分子和细胞外基质（ECM）。肿瘤与周围的微环境密切相关并且不断相互作用，肿瘤可以通过释放细胞外信号，促进肿瘤血管生成，诱导免疫耐受影响微环境，而微环境中的免疫细胞也可以影响肿瘤细胞的生长和分化。

（1）血管

据统计，80-90%的癌症是腺癌，或者上皮组织来源的癌症。这类肿瘤不会发生血管化，导致只有新生血管生成后肿瘤直径生长到大于 2mm。血管新生作用在肿瘤微环境中上调，供给肿瘤细胞营养，其形成的脉管系统与正常组织多有不同，主要体现在通透性增强与滞留效应（Enhanced permeability and retention effect, EPR）和低氧环境两方面。

（2）免疫细胞

骨髓来源抑制细胞（MDSC）是一类具有抑制 T 细胞反应潜力的异质细胞群体的统称。它们可以通过调节伤口的修复和炎症在肿瘤中迅速扩增，这一现象在绝大多部分肿瘤部位可观察到的炎症反应都有关系。肿瘤相关巨噬细胞（TAM）是 MDSC 中的研究热点之一。TAM 能够响应与肿瘤相关的炎症反应被招募到肿瘤中，但与正常巨噬细胞不同，TAM 没有细胞毒性作用，因此 TAM 是慢性炎症反应和癌症之间有密切联系的重要证据。在体外实验中，可以通过对巨噬细胞祖细胞给予不同的免疫调节细胞因子（如白介素 4（IL-4）和白介素 13（IL-13））来诱导 TAM。TAM 聚集在肿瘤的坏死区域，通过分泌 IL-10 使肿瘤细胞逃逸正常免疫细胞的监控，并通过分泌血管内皮生长因子（VEGF）和一氧化氮合酶（NOS）促进血管新生，通过分泌表皮生长因子（EGF）重构 ECM 促进肿瘤生长。TAM 的 NF- κ B 信号通路受到抑制，因此在肿瘤微环境中表现出慢性炎症反应。TAMs 的增加与预后不良有关。TAMs 代表了新型癌症治疗的潜在目标。

中性粒细胞是多形核免疫细胞，它是先天免疫系统的重要组成部分。中性粒细胞在肿瘤和某些癌症（例如肺腺癌）中富集，被认为与预后恶化有关。在某些实体瘤患者中，血液中的中性粒细胞数量（和髓样细胞前体）可以增加。在小鼠中进行的实验表明，与肿瘤相关的中性粒细胞促进肿瘤生长，但也有研究表明得出相反结论。

肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）是穿透肿瘤的淋巴细胞。TIL 与造血干细胞有共同的起源，但在发育上出

现分化。肿瘤细胞可以通过分泌含有死亡配体 FasL 和 TRAIL 等的外泌体来诱导活化的 T 淋巴细胞凋亡，并通过相同的方法关闭 NK 细胞的正常细胞毒性反应。

(3) 成纤维细胞

腺癌相关的成纤维细胞 (carcinoma associated-fibroblast, CAF) 是来源不同的成纤维细胞群体，它们的功能被肿瘤细胞“盗版” (pirate) 并且导致肿瘤发生。CAF 细胞通常来源于周围基质的正常成纤维细胞，也可以来自周细胞、平滑肌细胞、纤维细胞，间充质干细胞，或通过 EMT 作用及 EndMT 作用转化生成。在体外实验中，CAF 没有抑制肿瘤细胞生长的作用，反而可以通过分泌 VEGF，成纤维细胞生长因子 (FGFs)、血小板衍生生长因子 (PDGF) 以及其他促血管生成的信号来诱导血管新生，从而促进肿瘤生长。CAF 还能分泌 TGF- β 促进 EMT，而肿瘤细胞可以通过 EMT 发生转移、参与抑制细胞毒性 T 细胞和 NKT 细胞。CAF 作为成纤维细胞还能够对 ECM 进行改造 (remodeling)，使其包含更多的旁分泌生存信号，例如 IGF-1 和 IGF-2，从而促进周围肿瘤细胞的生存。有研究证实 CAF 与逆向 Warburg 效应相关，CAF 能够进行有氧糖酵解并将乳酸喂入肿瘤细胞。

2. TGF-beta

转化生长因子 β (TGF- β) 是属于转化生长因子超家族 (transform growth factor superfamily) 的多功能细胞因子。TGF- β s 只在脊椎动物中存在，包括三种亚型：TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3，以及其他信号蛋白。TGF- β 是脊椎动物心脏、眼睛、上颌等多个器官和组织正常发育所必需的成分，还具有人类和其他高等脊椎动物的长期生存所必需的调节适应性免疫系统和协调伤口愈合功能。

TGF- β 三种亚型的一级结构相似度较高，同源性达到 70-80%。TGF- β 1 有 390 个氨基酸，TGF- β 2 和 TGF- β 3 各自则包含 412 个氨基酸，它们在 N-端都具有从细胞分泌所必须的信号肽，一个 LAP 结构域和一个由 112-114 个氨基酸残基组成的 C 末端区域，这一肽段经蛋白水解作用从原区域释放后成为成熟的 TGF- β 分子，成熟的 TGF- β 蛋白二聚体化生成 25 KDa 的活性蛋白。TGF- β s 都具有 9 个半胱氨酸残基，其中 8 个在分子内形成二硫键，从而形成 TGF- β 超家族的半胱氨酸结 (cysteine knot) 结构特征。第 9 个半胱氨酸与另一个 TGF- β 蛋白的对应半胱氨酸形成二硫键，从而形成具有功能的二聚体。

所有白细胞都能生成非活性形式 TGF- β 蛋白，此时 TGF- β 与 LTBP (latent TGF-beta binding protein) 和 LAP (latency-associated peptide) 以形成复合物的方式分泌，而血清蛋白酶 (如纤溶酶) 可催化复合物中活性 TGF- β 的释放。活性 TGF- β 释放这一生理现象常发生在巨噬细胞表面：炎症刺激信号激活巨噬细胞，促进纤溶酶的激活，导致非活性 TGF- β 复合物通过其配体血小板反应蛋白 1 (TSP-1) 与 CD36 结合，最终增强活性 TGF- β 的释放。巨噬细胞还可以吞噬浆细胞分泌的 IgG 结合型非活性 TGF- β 复合物的方式将活性 TGF- β 释放到细胞外液中。

TGF- β 以细胞或组织特异的方式激活，包括蛋白酶、整合蛋白 (integrin)、pH 及活性氧等。TGF- β 激活因子紊乱会导致 TGF- β 信号失调，引起多种并发症，包括炎症反应、自身免疫性疾病、组织纤维化、肿瘤和白内障。

信号通路及生物学功能：

活化的 TGF- β 释放后再与其他因子形成丝氨酸/苏氨酸激酶复合物，最终与 TGF- β 受体结合，激活下游信号通路。TGF- β 受体由 1 型受体亚基和 2 型受体亚基组成。当 TGF- β 与受体结合后，2 型受体激酶磷酸化并激活 1 型受体激酶，从而激活信号级联反应。TGF- β 受体下游信号通路可分为经典通路 (SMAD

pathway) 和 DAXX 依赖凋亡通路 (DAXX pathway)。

(1) 经典通路: 活化的 TGF- β 复合物与 TGF- β 受体的 2 型受体亚基结合, 然后募集并磷酸化 1 型受体, 后者募集并磷酸化受体调节的 SMAD 蛋白 (R-SMAD)。R-SMAD 再与 coSMAD 蛋白 (common SMAD, 哺乳动物中为 SMAD4) 结合形成异源二聚体并进入细胞核, 作为转录因子发挥调控基因表达的作用。SMAD 途径受反馈抑制作用的调节, SMAD6 和 SMAD7 可能会阻断 I 型受体亚基。也有大量研究发现经由 SMAD-3 的依赖 TGF- β 信号发挥免疫抑制功能, 因此常常被认为与肿瘤发生有关。

(2) TGF- β 能够诱导人淋巴细胞和肝细胞凋亡或程序性细胞死亡, 而在 TGF- β 缺失的小鼠中则会由于淋巴细胞过度增殖导致自身免疫失调。死亡相关蛋白 6 (death-associated protein 6, DAXX) 能够与死亡受体 Fas 结合导致凋亡, 同时 DAXX 还能与 2 型 TGF- β 受体 C 末端结合, 随后 DAXX 被同源结构域相互作用蛋白激酶 2 (homeodomain-interacting protein kinase 2, HIPK2) 磷酸化, 激活凋亡信号诱导激酶 1 (apoptosis signal-inducing kinase 1, ASK1), ASK1 随后激活 Jun 氨基-末端激酶 (Jun amino-terminal kinase, JNK) 途径, 最终导致凋亡。

TGF- β 经典信号通路可以使不同下游底物和调节蛋白的激活, 诱导免疫细胞的增殖、激活、分化和趋化性, 因此在癌症、自身免疫疾病和传染性领域领域中一直都是研究热点。

(1) 对 T 淋巴细胞的作用

TGF- β 在 T 细胞调节和分化中起至关重要的作用。TGF- β 1 能够诱导 CD4 + T 向诱导型 Treg (iTreg) 和分泌促炎性细胞因子的 Th17 细胞分化。TGF- β 1 可以促使活化的 Th 细胞上调表达 Foxp3 以及分化为 Treg。在小鼠模型中, TGF- β 1 的这一诱导作用被证实与年龄有关。同时也有研究表明, 在体外实验中中和 TGF- β 1 可抑制 Th 细胞向 Th17 细胞的分化, 换句话说, TGF- β 1 在 Th17 细胞生成中发挥了与它作为抗炎性细胞因子的这一传统观念相反的作用, 但这也暗示了 TGF- β 1 可以通过调节炎性细胞和抑炎细胞这两种细胞类型之间平衡, 维持自身免疫稳态。

(2) 对 B 淋巴细胞的作用

TGF- β 能够抑制 B 细胞增殖, 目前确切机制尚不明确, 但是有数据表明 TGF- β 可以通过诱导转录因子 Id3, 诱导 p21 上调, 同时还能抑制其他关键调控基因——例如 c-myc 和 ATM——来抑制 B 细胞增殖。CD40 是激活先天免疫应答的关键表面分子, 它可以通过诱导 Smad7 表达解除上文所述由 TGF- β 诱导的 B 细胞的生长抑制。TGF- β 还能阻断 B 细胞活化, 在人和小鼠中促进 B 细胞的 IgA 类转换, 抑制抗体生成。

(3) 对巨噬细胞的作用

目前普遍认为 TGF- β 刺激静息状态的单核细胞, 抑制活化的巨噬细胞。对于单核细胞而言, TGF- β 具有化学吸引作用及促炎症反应。但也有报道指出 TGF- β 可通过抑制 NF- κ B 信号通路下调单核细胞和巨噬细胞中促炎性细胞因子的产生。TGF- β 的这种看似矛盾的作用暗示了 TGF- β 的作用高度依赖于免疫细胞当时所处的环境。

TGF- β 表达上调起到免疫抑制功能, 通常与许多恶性肿瘤发生相关。在许多自身免疫疾病中 TGF- β 也可能通过免疫抑制功能的失调参与。

(1) 肿瘤

在正常细胞中, TGF- β 通过信号通路使其在 G1 期停止细胞周期和增殖, 诱导分化或促进细胞凋亡。

但在许多肿瘤细胞中，TGF- β 信号通路的发生突变，而 TGF- β 失去对细胞的控制。肿瘤细胞增殖，伴随着周围的基质细胞（成纤维细胞）增殖，这两种细胞均增加其 TGF- β 的产生。这些 TGF- β 作用于周围的基质细胞、免疫细胞、内皮细胞和平滑肌细胞，抑制免疫反应，促进血管生成，从而使肿瘤具有更强侵入性。TGF- β 还可以将能够通过炎症反应攻击肿瘤细胞的（免疫）效应 T 细胞转化为调节性（抑制）T 细胞，从而抑制炎症反应。在正常组织中，不同细胞分别表达粘附分子和分泌细胞因子，组织完整性可以通过细胞和细胞之间的反馈作用得到维持，但在肿瘤组织中这些反馈机制受到破坏。当 TGF- β 信号无法控制肿瘤细胞中的 NF- κ B 活性后，恶性肿瘤细胞能够在已经活化的免疫细胞存在情况下依然得以生存。

(2) 肥胖和糖尿病

TGF- β / SMAD3 信号通路在调节葡萄糖和能量代谢稳态中非常重要，而这也可能在糖尿病性肾病中起作用。在自发肥胖小鼠中，TGF- β 信号缺失通过炎症信号诱导了肥胖产生。

在 IL-2 存在下，由 TGF- β 诱导的 iTreg 通过 Foxp3 和 IL-10 介导的应答反应抑制了实验性自身免疫性脑脊髓炎（EAE）的发展，而 EAE 是一种多发性硬化症（MS）的动物模型。这表明 TGF- β 和 iTreg 可能在 MS 的调节和治疗中发挥作用。在临床上，多发性硬化的患者中的确观察到 TGF- β 水平降低。TGF- β 在调节 Th17 细胞凋亡中的作用也许可以解释其在多发性硬化中的作用：TGF- β 水平降低后，Th17 细胞无法被凋亡，而过多分泌的 TNF- α ，通过 TNFR1 诱导少突胶质和神经元的脱髓因此，MS 期间 TGF- β 水平降低也可能阻止神经元的髓鞘再生。

3. CD3 靶点相关

T 淋巴细胞(T lymphocyte)简称 T 细胞，是由来源于骨髓的淋巴干细胞，在胸腺中分化、发育成熟后，通过淋巴和血液循环而分布到全身的免疫器官和组织中发挥免疫功能。T 细胞是一种高效的杀伤细胞，能迅速消灭病毒感染细胞和癌细胞。T 细胞杀伤作用需要免疫突触的形成，而这一过程高度依赖于 TCR 识别抗原递呈细胞表面 MHC 分子与所递呈的抗原肽形成的复合物。激活的免疫突触将释放细胞毒素和细胞因子起到杀伤作用。在免疫突触形成过程中，受 T 细胞与靶细胞之间距离的限制，双特异性抗体定向 T 细胞就要模拟免疫突触的形成，一端通过靶向 CD3 来实现桥连 T 细胞 TCR 受体，另一端桥连靶细胞通过靶向靶细胞表面抗原来实现。

双特异性抗体将细胞毒性 t 细胞导向癌细胞的基本原理在 1985 年首次被描述。双特异性抗体介导的 T 细胞重定向杀伤肿瘤细胞被认为是最有希望的癌症治疗策略。2009 年，全球首个双特异性抗体药物 Removab 获得欧盟药品管理局（EMA）批准上市，适应症为标准治疗无效或不可行的因 EpCAM 阳性肿瘤所致的恶性腹水。Catumaxomab (anti-CD3 and anti-EpCAM) 做为第一例被 FDA 批准的双抗，想要达到的应用目标是“一个三功能”的双特异性抗体，它除了桥连的肿瘤靶细胞和 T 细胞，也可以结合 Fc γ 受体阳性效应细胞、巨噬细胞等。作为第一个被 FDA 批准的 T cell recruiter 类双抗，catumaxomab 具有里程碑式的意义。事实上，在对有腹水的卵巢癌和其它癌患者的治疗中，catumaxomab 的确显示了良好的疗效。但在这一过程中，细胞因子风暴引起的发热、恶心、呕吐等副作用多有出现，同时，在第 0, 3, 7 和 10 天分别进行 10, 20, 50, 150 μ g 四次注射后，70%的患者出现了 Human anti-mouse antibody /human anti-rat antibody (HAMA/HARA)。这些副作用可能和以下因素相关：双抗对 CD3 较高的亲和力导致的未结合肿瘤细胞时就低活化 T 细胞所引起的细胞因子风暴；双抗在结合肿瘤细胞后过度活化 T 细胞引起的细胞因子风暴；EpCAM 在某些正常组织上也有相当量的表达引起的双抗对正常组织的潜在非特异性杀伤。

Blinatumomab 是第二例 FDA 批准的 T cell recruiter 类双抗。它的设计利用了 BiTE® 技术。这一双抗把抗 CD19 和 CD3 的两个单抗的 ScFV 用一个“GGGGS”连在一起，通过 T cell mediated lysis, cytotoxicity by released cytokines 来治疗适应症（复发型 ph-ALL）。由于去除了 Fc，这一双抗没有 ADCC 和 CDC 功能。因为分子量小，半衰期短，所以只有小于 1% 的受治疗患者有 ADA 反应。但由于有 T cell activation，依然有相当一部分患者有细胞因子风暴引起的副作用。同时，由于 Blinatumomab 的血清半衰期只有 1.25±0.63 小时，所以静脉用药时需要使用 infusion bump。这在临床使用上有一定的不便之处。Blinatumomab 的应用需求中的安全性和有效性平衡需求通过所选的技术平台和结构模式得到了一定的满足，但是在成药性部分的 PK 需求上则未得到满足。这也是 BiTE® 平台在临床应用上的最大局限。

近年来，罗氏、强生、安进、辉瑞、武田等跨国制药企业纷纷投入巨资，不断加码双特异性抗体领域的开发布局。目前，双特异性抗体的设计多种多样，从 25KD 的纳米抗体到 ≥150KD 的 IgG 样融合蛋白。小分子量结构的好处是能让桥连细胞的距离更接近，以及更好的肿瘤组织渗透性。IgG 样的设计有利于抗体的半衰期以及 Fc 引起的杀伤效应。

发明的公开

现有技术中缺乏含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF-β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白，本发明的目的是提供含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF-β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白及其应用。

为了达到上述目的，本发明提供了一种含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF-β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白。

可选地，上述融合蛋白具有如下结构通式：

{[TAA 抗体]_n, [CD3 抗体]_x, [TGF-β 抑制分子]_m}，其中 n>=1, x=1, m>=1；

其中，

所述[TAA]_n 是指：以单价或多价结合肿瘤相关抗原的抗体或多肽片段；

所述[CD3]_x 是指：以单价结合 CD3 的抗体或多肽片段；

所述[TGF-β 抑制分子]_m 是指：以单价或多价结合 TGF-β 的抗体或多肽片段。

可选地，所述 TAA 抗体的靶点包括：CD20、CD19、CD38、CD30、CD52、slamf7、GD2、CD24、CD47、CD133、CD239、CD276、CEA、Epcam、Trop2、TAG72、MUC1、MUC16、mesothelin、folr1、CLDN18.2、PDL1、EGFR、EGFR VIII、C-MET、HER2、FGFR2、FGFR3、PSMA、PSCA、EphA2、ADAM17、17-A1、NKG2D ligands、MCSP、LGR5、SSEA3、SLC34A2、BCMA 或 GPNMB；

所述 CD3 抗体的靶点包括：OKT3、SP34 或 UCTH1；

所述 TGF-β 抑制剂包括：人 TGF-βRII 胞外区及其衍生物或人 TGF-βRI 胞外区及其衍生物。

可选地，所述融合蛋白还包含 FC 段；所述 FC 段选自 Human IgG1 FC、Human IgG2 FC、Human IgG3 FC、Human IgG4 FC 或其变异体；所述 FC 段包含 A 链和 B 链，所述变异体包括以下形式：

组合	FC	异源二聚体突变 (Eu numbering)
1	FC-A链	T366Y
	FC-B链	Y407T
2	FC-A链	T366W
	FC-B链	T366S/L368A/Y407V
3	FC-A链	S354C/T366W
	FC-B链	Y349C/T366S/L368A/Y407V
4	FC-A链	S364H/F405A
	FC-B链	Y349T/T394F
5	FC-A链	T350V/L351Y/F405A/Y407V
	FC-B链	T350V/T366L/K392L/T394W
6	FC-A链	K392D/K409D
	FC-B链	E356K/D399K
7	FC-A链	D221E/P228E/L368E
	FC-B链	D221R/P228R/K409R
8	FC-A链	K360E/K409W
	FC-B链	Q347R/D399V/F405T
9	FC-A链	K360E/K409W/Y349C
	FC-B链	Q347R/D399V/F405T/S354C
10	FC-A链	K370E/K409W
	FC-B链	E357N/D399V/F405T
11	FC-A链	F405L
	FC-B链	K409R
12	FC-A链	K360D/D399M/Y407A
	FC-B链	E345R/Q347R/T366V/K409V
13	FC-A链	Y349S/K370Y/T366M/K409V
	FC-B链	E356G/E357D/S364Q/Y407A
14	FC-A链	L351D/L368E
	FC-B链	L351K/T366K
15	FC-A链	G Q PFRPEVHLLPPSREEM TKN Q VSLTCLARG FYPKD A VEW ESNG Q PEN NYKTTPSRQ E PSQ G TTTFA VTSKLTVD KSRW Q Q G NVFSCSVM HEALHNHYTQ KTSL
	FC-B链	G Q PREPQ VYTLPPPSEELALNELVTLTCLVKG FYPSD A VEW LQ G SQ ELPREKYLW APV LD SD G SFFLYS LRVA AED W KKG D TFCSCSVM HEALHNHYTQ KSLDR
16	FC-A链	L368D/K370S
	FC-B链	E357Q/S364K
17	FC-A链	S354C/T366W/ K409A
	FC-B链	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ F405K
18	FC-A链	S354C/T366W/ F405K/K360E/Q347E
	FC-B链	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ Q347R/T394W
19	FC-A链	T366W/ K409A
	FC-B链	T366S/ L368G/Y407A/F405K
20	FC-A链	knobs (T366W/ F405K)
	FC-B链	holes (T366S/ L368G/Y407A/K409A)
21	FC-A链	Q347A/S364K/T366V/K370T/K392Y/F405S/Y407V/K409W/T411N
	FC-B链	Q347E/Y349A/L351F/S364T/T366V//K370T/T394D/V397L/D399E/D401Q/F405A/Y407 S/K409R/T411R
22	FC-A链	K274Q/N276K/Y300F/A339T/Q347A/S364K/T366V/K370T/N384S/K392Y/V397M/ F405S/Y407V/K409W/T411N/V422I/H435R/Y436F
	FC-B链	Q347E/Y349A/L351F/S364T/T366V//K370T/T394D/V397L/D399E/D401Q/F405A/Y407 S/K409R/T411R

可选地，所述三功能融合蛋白包含：FC段、TAA抗体、2个TGF- β 抑制剂、CD3抗体；所述TAA抗体包含：第一TAA抗体和第二TAA抗体，所述第一TAA抗体包含Fab结构域，所述第二TAA抗体和CD3抗体为scFv；所述FC段包含A链和B链；所述A链的N端与所述第一TAA抗体连接，C端与

一个 TGF- β 抑制剂连接；所述 B 链的 N 端与所述第二 TAA 抗体连接，C 端与另一个 TGF- β 抑制剂连接；所述 CD3 抗体连接于所述第二 TAA 抗体。

可选地，所述 TAA 抗体的靶点选择 CLDN18.2，所述 CD3 抗体的靶点选择 OKT3；所述 TGF- β 抑制剂选择人 TGF- β RII 胞外区。

可选地，所述融合蛋白由 SEQ ID NO:13、14、15 融合得到。

可选地，所述的融合蛋白还包含：连接序列，所述连接序列包含 1 个或多个 G4S。

本发明还提供了上述的含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白在制备抑制或治疗癌症的药物中的应用。

所述的癌症包括：骨髓癌、淋巴瘤、白血病、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、隆突性皮肤纤维肉瘤、梅克尔细胞癌、成胶质细胞瘤、胶质瘤、肉瘤、间皮瘤，或骨髓增生异常综合症，或者来自如下部位的癌症或肿瘤：结直肠、乳腺、卵巢、胰腺、胃、前列腺、肾、宫颈、甲状腺、子宫内膜、子宫、膀胱、神经内分泌、头部颈部、肝、鼻咽或睾丸。

相对于现有技术，本发明具有以下有益效果：

(1) 本发明的三功能融合蛋白通过在抗体分子中引入 TGF- β 抑制剂，除了能够通过高亲和力的 TAA 将抗体分子特异性的靶向肿瘤，抗 CD3 抗体可以发挥 T 细胞杀伤作用，同时 TGF- β 抑制剂可以阻断 TGF- β 信号，促进肿瘤微环境中 T 细胞的浸润和激活。

(2) 本发明可以通过降低抗 CD3 抗体亲和力等方式，调节抗 CD3 抗体起效剂量，使之与 TGF- β RII 起效剂量相当。

(3) 本发明的三功能融合蛋白同时融合 FC 蛋白，解决 BiTE 抗体半衰期短的问题。

附图的简要说明

图 1 是本发明的三功能融合蛋白的结构示意一。

图 2 是本发明的三功能融合蛋白的结构示意二。

图 3 是本发明的三功能融合蛋白的结构示意三。

图 4 是本发明的三功能融合蛋白的结构示意四。

图 5 是克隆构建方法的示意图。

图 6 是 FACS 检测 QP146134233424 等样品结合 CHOS-CLDN18.2 细胞实验的结果。

图 7 是 FACS 检测 QP146134233424 等样品结合 Jurkat 细胞实验的结果。

图 8 是 QP146134233424 等样品抑制 TGF β 诱导的 SMAD3 磷酸化信号通路实验的结果。

图 9 是 QP146134233424 介导的 T 细胞杀伤人胃癌细胞 NUGC4-CLDN18.2 细胞的结果。

图 10 是 QP146134233424 介导的 PBMC 杀伤人胃癌细胞 NUGC4-CLDN18.2 细胞的结果。

图 11 是 QP146134233424 在 HCC827-CLDN18.2 的 Mixeno 动物药效模型中对肿瘤生长的抑制作用。

实现本发明的最佳方式

以下结合具体实施方式来对本发明的技术方案做进一步的说明。

本实施方式中未注明具体条件的实验方法，通常是按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。如分子克隆、实验室手册、冷泉港实验室、当代分子生物学方法、细胞生物学等等。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由3个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。

术语“Fab片段”为抗原结合片段(fragment of antigen binding, Fab)，意指由VL、VH、CL和CH1结构域组成的抗体片段。

本文中Fc段、Fc片段和Fc具有相同的含义。术语“Fc”是指可结晶片段(fragment crystallizable)，通常由一对CH2和CH3结构域组成，无抗原结合活性，是抗体与效应分子或细胞表面Fc受体相互作用的部位。因为Fc可由两条链组成，为便于描述，本文中将Fc片段的两条链描述为A链和B链，A链和B链可以具有相同的结构，或者分别进行突变，本发明并不做特别限定。

肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)，是指在肿瘤细胞或正常细胞上存在的抗原分子，包括：胚胎性蛋白、糖蛋白抗原、鳞状细胞抗原等，常用于临床肿瘤的诊断。肿瘤相关抗原并非肿瘤细胞所特有，正常细胞可微量合成，而在肿瘤细胞增殖时高度表达，因此称为“相关抗原”。

本发明的含有肿瘤相关抗原TAA抗体、TGF- β 抑制剂、CD3抗体的三功能融合蛋白，TAA将分子特异性的靶向肿瘤，通过在抗体分子中引入TGF- β 抑制剂，可以阻断TGF- β 信号，促进肿瘤微环境中T细胞的浸润和激活，抗CD3抗体则可以发挥T细胞杀伤作用。

本发明对于肿瘤相关抗原TAA抗体、TGF- β 抑制剂、CD3抗体的结构并无特殊限制。

结合肿瘤相关抗原TAA的抗体或多肽片段可以是单价或多价分子，结合的肿瘤抗原或其特异突变包括但不限于CD20、CD19、CD38、CD30、CD52、slamf7、GD2、CD24、CD47、CD133、CD239、CD276等表面抗原，以及CEA、Epcam、Trop2、TAG72、MUC1、MUC16、mesothelin、folr1、CLDN18.2、PDL1、EGFR、EGFR VIII、C-MET、HER2、FGFR2、FGFR3、PSMA、PSCA、EphA2、ADAM17、17-A1、NKG2D ligands、MCSP、LGR5、SSEA3、SLC34A2、BCMA、GPNMB等靶点，抗体形式包括Fab、ScFv、VHH或多肽片段。

抗CD3抗体为单价，抗CD3抗体包括但不限于OKT3、SP34、UCTH1及其衍生物或其它结合CD3的特异抗体、抗体片段、单域抗体、纳米抗体以及它们的人源化形式。

TGF- β 抑制剂为能抑制TGF β 通路的单价或者多价多肽分子，包括但不限于人TGF β RII胞外区及其保持与人TGF β 结合的衍生物、人TGF β RI胞外区及其保持与人TGF β 结合的衍生物、能抑制TGF β 通路的TGF β 或者TGF β 受体的抗体或多肽片段或其组合。

本发明的三功能融合蛋白还包括连接序列，连接序列为免疫原性低的氨基酸序列，连接序列将组成三功能融合蛋白的各组成部分进行连接，在具体实施时，可选择合适的连接序列，例如(GS) n 、(GSGGS) n 、(GGGS) n 、(GGGG) n ， n 通常不大于5。

组成三功能抗体的组成部分可选择嵌合、人源化、全人源或单链抗体的形式。

一、融合蛋白的克隆和表达

1. 克隆构建方法：

1.1 如表 1 所示设计克隆，构建全长表达载体。表 1 所设计的蛋白为 CLDN18.2、TGF β RII、OKT3 三功能融合蛋白，TAA 抗体的靶点选择 CLDN18.2（或称为 claudin18.2），TGF- β 抑制剂选择人 TGF β RII，CD3 抗体的靶点选择 OKT3。FC 片段选择人 IgG4。

表 1 中共设计了 7 种蛋白，蛋白编号分别为：QP32133212、QP34133414、QP34153416、QP34173418、QP34193420、QP34213422、QP146134233424。为描述方便，7 种蛋白分别简写为蛋白-1、蛋白-2、蛋白-3、蛋白-4、蛋白-5、蛋白-6、蛋白-7。采用 Knob-into-Hole (KiH) 技术使抗体 Fc 片段突变，获得重链正确装配的异源二聚体。其中蛋白-1 与蛋白-2 结构类似，但是 FC 片段的两条链上突变形成的“hole”结构和“knob”结构的位置相反。蛋白-3 和蛋白-4、蛋白-5 和蛋白-6 同理。

蛋白-1 和蛋白-2 的结构可参阅图 1。图 1 所示的融合蛋白中，FC 片段的两条链的 C 端各融合一个 TGF- β 抑制剂，FC 片段其中一条链的 N 端融合抗 CLDN18.2 抗体的 VH 和 VL 结构域，另一条链的 N 端融合抗 OKT3 抗体的 VH 和 VL 结构域，FC 片段 N 端融合的抗体片段均为单链抗体（scFv）形式，即 VH 和 VL 结构域通过连接序列连接形成单链。

蛋白-3 和蛋白-4 的结构可参阅图 2。图 2 所示的融合蛋白中，FC 片段其中一条链的 N 端融合抗 CLDN18.2 抗体的 VH 和 VL 结构域，另一条链的 N 端融合抗 OKT3 抗体的 VH 和 VL 结构域，抗 CLDN18.2 抗体以及抗 OKT3 抗体的 VH 和 VL 结构域分别通过连接序列连接形成单链。2 个 TGF- β 抑制剂分别融合到抗 CLDN18.2 抗体和抗 OKT3 抗体的 N 端。

蛋白-5 和蛋白-6 的结构可参阅图 3。图 3 所示的融合蛋白中，FC 片段的两条链的 N 端各融合一个 TGF- β 抑制剂，FC 片段其中一条链的 C 端融合抗 OKT3 抗体的 VH 和 VL 结构域，另一条链的 C 端融合抗 CLDN18.2 抗体的 VH 和 VL 结构域，FC 片段 C 端的抗体片段均为单链抗体形式。

蛋白-7 的结构可参阅图 4。蛋白-7 在克隆设计时，共设计了 3 条多肽链，蛋白形成图 4 所示的结构。图 4 所示的融合蛋白中，FC 片段其中一条链的 N 端融合抗 CLDN18.2 抗体的 Fab 片段（包括 VH、VL、CH1、CL 结构域）；FC 片段另一条链的 N 端融合抗 CLDN18.2 抗体的 VH 和 VL 结构域，抗 OKT3 抗体（VH 和 VL 结构域）融合到抗 CLDN18.2 抗体的 N 端，抗 CLDN18.2 抗体以及抗 OKT3 抗体均为 scFv。FC 的 C 端分别融合 TGF- β 抑制剂。图 4 所示的蛋白质结构融合有 2 个针对相同靶点的 TAA 抗体，一些实施例中，可以选择 2 个针对不同靶点的 TAA 抗体。

与 CD3 亲和力较强的抗 CD3 抗体容易导致细胞毒性。可通过选择与 CD3 亲和力适中的抗 CD3 抗体，调节抗 CD3 抗体起效剂量，使之与 TGF- β RII 起效剂量相当。图 1 所示的结构可通过选择与 CD3 亲和力适中的抗 CD3 抗体。图 2 中抗 CD3 抗体位于融合蛋白内部，图 3 中抗 CD3 抗体位于 FC 片段的 C 端，这两种结构都有利于降低与 CD3 亲和力。

表 1：融合蛋白的克隆设计

克隆构建		克隆编号	蛋白编号	蛋白序号
SEQ ID NO:1	CLDN18.2 VH-VL-FC(hIgG4-hole)-TGF β RII	QD3213	QP32133212	蛋白-1
SEQ ID NO:2	OKT3 VH-VL-FC(hIgG4-knob)-TGF β RII	QD3212		

SEQ ID NO:3	CLDN18.2 VH-VL-FC(hIgG4-knob)-TGFβRII	QD3413	QP34133414	蛋白-2
SEQ ID NO:4	OKT3 VH-VL-FC(hIgG4-hole)-TGFβRII	QD3414		
SEQ ID NO:5	TGFβRII-CLDN18.2 VH-VL-FC(hIgG4-hole)	QD3415	QP34153416	蛋白-3
SEQ ID NO:6	TGFβRII-OKT3 VH-VL-FC(hIgG4-knob)	QD3416		
SEQ ID NO:7	TGFβRII-CLDN18.2 VH-VL-FC(hIgG4-knob)	QD3417	QP34173418	蛋白-4
SEQ ID NO:8	TGFβRII-OKT3 VH-VL-FC(hIgG4-hole)	QD3418		
SEQ ID NO:9	TGFβRII-FC(hIgG4-hole)-CLDN18.2 VL-VH	QD3419	QP34193420	蛋白-5
SEQ ID NO:10	TGFβRII-FC(hIgG4-knob)-OKT3 VL-VH	QD3420		
SEQ ID NO:11	TGFβRII-FC(hIgG4-knob)-CLDN18.2 VL-VH	QD3421	QP34213422	蛋白-6
SEQ ID NO:12	TGFβRII-FC(hIgG4-hole)-OKT3 VL-VH	QD3422		
SEQ ID NO:13	CLDN18.2 VL-CL	QD1461	QP146134233 424	蛋白-7
SEQ ID NO:14	CLDN18.2 VH-CH1-FC(hIgG4-hole)-TGFβRII	QD3423		
SEQ ID NO:15	OKT3 VH-VL-CLDN18.2 VH-VL-FC(hIgG4-knob)-TGFβRII	QD3424		

本发明的序列表还涉及以下序列信息：SEQ ID NO:16 为 TGFβRII(ECD)，SEQ ID NO:17 为 FC-Hole，SEQ ID NO:18 为 FC-knob，SEQ ID NO:19 为 OKT3-VH，SEQ ID NO:20 为 OKT3-VL。

1.2 引物设计：

利用在线软件DNAAworks，v3.2.4，<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>，如图 5 所示，设计多条引物合成重组所需基因片段。

1.3 片段拼接：

按照 TaKaRa 公司 Primer STAR GXL DNA 聚合酶操作说明书，用上面设计的多条引物，PCR 扩增得到重组所需基因片段。

第一步 PCR：PCR 反应体系 50 μL 包括 10 μL PrimerSTAR GXL Buffer (5×)；4 μL dNTP Mixture (2.5 mmol · L⁻¹)；引物如上所示各 1 μL；1 μL PrimeSTAR GXL DNA Polymerase。PCR 反应条件为 98 °C 2 min，98 °C 20 s，55 °C 15 s，68 °C 30 s，30 个循环；68 °C 5 min。

第二步 PCR：以第一步 PCR 产物为模板，首尾两条引物进行 PCR 扩增，条件同第一步。PCR 搭建扩增目的片段。

1.4 表达载体 pQD 构建及酶切：

利用一些特殊的限制性内切酶，如 BsmBI 识别序列与酶切位点不同的特性，设计构建带有信号肽片

段的表达载体，表达载体记为 pQD。使用 BsmBI 酶切载体，切胶回收备用。

1.5 重组构建表达载体：

重组目的基因片段与 BsmBI 酶切回收带有信号肽片段的表达载体 pQD，按 3:1 比例分别加入 DH5 α 感受态细胞中，0 $^{\circ}$ C 冰浴 30min，42 $^{\circ}$ C 热击 90s，加入 5 倍体积 LB medium，37 $^{\circ}$ C 孵育 45min，涂布 LB-Amp 平板，37 $^{\circ}$ C 培养过夜，挑取单克隆送测序得到各目的克隆。

2. 蛋白表达：

293E 细胞培养密度维持在 $(0.2\sim 3)\times 10^6/\text{ml}$ 之间，转染前一天待转染细胞离心换液，调整细胞密度为 $(0.5\sim 0.8)\times 10^6/\text{ml}$ 。转染当天，293E 细胞密度为 $1\sim 1.5\times 10^6/\text{ml}$ 。准备质粒和转染试剂 PEI，需转染质粒量为 100 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 细胞，使用 PEI 和质粒的质量比为 2:1。将质粒和 PEI 进行混匀，静置 15 min，不宜超过 20 min。将质粒和 PEI 混合物缓慢加入 293E 的细胞中，放入 8% CO₂，120rpm，37 $^{\circ}$ C 的摇床中培养。转染第二天，加入 2mM VPA，10 \times 补料培养基，补料培养基包含 2mM 葡萄糖+0.2mM L-Glutamin。转染第五到六天，水平离心机 4700rpm 离心 20min 收集细胞上清纯化。

二、融合蛋白的纯化

1. 蛋白亲和层析法：

细胞培养液经过高速离心后取上清，利用 GE 的 Protein A 层析柱进行亲和层析。层析使用平衡缓冲液为 1 \times PBS(pH7.4)，细胞上清上样结合后利用 PBS 洗涤至紫外线回到基线，然后利用洗脱缓冲液 0.1M 甘氨酸(pH3.0)洗脱目的蛋白，利用 Tris 调节 pH 至中性保存。

2. 蛋白离子交换层析：

将亲和层析所得产物调节 pH 至低于或者高于 pI 1~2 个 pH 单位，适当稀释以控制样本电导在 5ms/cm 以下。利用合适的对应 pH 缓冲液如磷酸缓冲液、醋酸缓冲液等条件，用常规的离子交换层析方法如阴离子交换或者阳离子交换进行对应 pH 条件下 NaCl 梯度洗脱，根据 SDS-PAGE 选择目的蛋白所在的收集管合并保存。

3. 蛋白体积排阻层析：

将离子交换所得产物超滤浓缩后进行体积排阻层析，如利用 GE 的 Superdex200 凝胶进行分离，以去除可能的聚体及其它成分，获得高纯度的目的产物。所得蛋白纯度分析可以通过 SDS-PAGE 及 SEC-HPLC 检测进行分析。蛋白浓度通过紫外分光光度法测定。

如表 2 所示，融合蛋白 293 瞬时转染表达量均约在 10-76mg/L 之间。

表2：融合蛋白的瞬转表达量（mg/L）

蛋白名称	蛋白产量 (mg/L)
QP32133212	9.90
QP34133414	24.81
QP34153416	76.30
QP34173418	66.01
QP34193420	39.49
QP34213422	32.03
QP146134233424	19.71

三、FACS 检测样品 CLDN18.2 结合活性

实验步骤:

种 1E5/well 细胞 CHOS-CLDN18.2 于 U 型 96 孔板, 冰 PBS 洗一遍, 1200rpm, 离心 3min; 清洗结束后, 按 200 μ L/孔加入 3%FBS/PBS 封闭液, 冰上孵育 1h。封闭结束后, 1200rpm 离心 3min 后, 甩掉上清, 孵育不同浓度样品, 冰上孵育 2h, 冰 PBS 洗 3 遍; 孵育 PE-anti human FC 抗体, 按照 1:200 稀释比例, 50 μ L/孔, 充分混匀后, 冰上 1h, 冰 PBS 洗 3 遍。PBS 200 μ L/孔重悬细胞, FACS 仪器读取平均荧光值, 使用 graphpad prism 软件分析结果。结果如图 6 所示。

四、FACS 检测 CD3 抗体活性

实验步骤:

种 1E5/well Jurkat 细胞于 U 型 96 孔板, 冰 PBS 洗一遍, 1200rpm, 离心 3min; 清洗结束后, 按 200 μ L/孔加入 3%FBS/PBS 封闭液, 冰上孵育 1h。封闭结束后, 1200rpm 离心 3min 后, 甩掉上清, 孵育不同浓度样品, 冰上孵育 2h, 冰 PBS 洗 3 遍; 孵育 PE-anti human FC 抗体, 按照 1:200 稀释比例, 50 μ L/孔, 充分混匀后, 冰上 1h, 冰 PBS 洗 3 遍。PBS 200 μ L/孔重悬细胞, FACS 仪器读取平均荧光值, 使用 graphpad prism 软件分析结果。结果如图 7 所示。

五、SMAD3 报告基因抑制实验

实验目的: 确定 TGFBR2 片段能抑制 TGF β 诱导的 SMAD3 磷酸化。

实验步骤:

本实验中 TGFBR2 功能通过 HepG2/4T1 细胞表达带 SMAD3-荧光素酶报告基因来确定。

HepG2 细胞使用含 10%FBS 的 MEM 完全培养基培养, 每 2~3 天传代一次。实验第一天以每孔 25000 个细胞的密度接种于 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 条件培养 24h。第二天弃细胞培养板中培养基, 每孔转染 100ng 3TP-Lux 质粒。细胞在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 条件下继续培养 24h。加入待测样品前 6h, 弃去 96 孔板中完全培养基, 每孔加入 80 μ L 不完全培养基 (MEM+0.5%FBS)。6 小时后再加入 10 μ L 使用不完全培养基配制的人 TGF- β 1 溶液, 终浓度为 2ng/ml 和 10 μ L 待测样品, 终浓度为 500、50、5、0.5、0.05、0.005、0.0005 和 0nM, 以人 TGF- β 1 溶剂为对照, 细胞在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 条件下继续培养 18h。然后每孔加入 100 μ L 配制好的荧光素底物 ONE-GloTM Luciferase Assay system (promega, E6110), 室温避光放置 10 分钟, 然后使用多功能

酶标仪读取发光信号值。待测样品的 IC50 值使用数据处理软件 Graphpad Prism5.0 计算得到。结果如图 8 所示。

六、T 细胞杀伤肿瘤细胞的细胞毒性检测

由以上结果可知，QP146134233424（蛋白-7）的效果最好，因此选择蛋白-7 进行细胞毒性检测。

实验目的：确定本发明的待测分子可以实现一端通过靶向 CD3 来实现桥连 T 细胞 TCR 受体，另一端桥连靶细胞通过靶向靶细胞表面抗原，实现激活 T 细胞杀伤靶细胞功能。

实验方法：

选择靶细胞为高表达 CLDN18.2 的人胃癌细胞系 NUGC4-CLDN18.2。效应细胞为从人 PBMC 中分选出的人 CD4+T 细胞（EasySep™ Human CD4+T Cell Isolation Kit, Stemcell 17952），用 RPMI-1640+20% FBS 复苏 PBMC，过 37 μm 细胞筛网，用 EasySep™ Buffer 将细胞重悬为 5×10^7 cells/ml，加入 CD4+ T Cell Isolation Cocktail，50 μl/ml，室温孵育 5 min；振荡混匀 Magnetic Particles 30 s，加入管内，50 μl/ml，混匀，室温孵育 5 min，加入 EasySep™ Buffer 使管内液体总体积为 2.5 ml，轻轻上下吹打混匀 2-3 次，将管子放入磁极内，室温孵育 2.5min。将管子颠倒 2~3s，将含有 CD4+ T 细胞的悬液倒入一个新的 15 ml 离心管，不要抖动或吸掉管口残留的液滴，将细胞悬液 $300 \times g$ 离心 5 min，收集细胞即为 CD4+T 细胞。按照 E:T 比例 5: 1，再加入不同浓度抗体，37°C，5% CO₂ 培养 48h，用 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay（Promega，G1780 -1000 assays）检测细胞培养上清中的 LDH，定量细胞毒百分比。靶细胞的最大裂解率（100%）为 1% Triton X-100 处理靶细胞使细胞裂解释放全部 LDH。设置靶细胞自发、效应细胞自发、靶细胞+效应细胞自发等对照孔。按照公式杀伤百分比 = $[(\text{实验孔释放} - \text{效应细胞自发释放} - \text{靶细胞自发释放}) / (\text{靶细胞最大裂解} - \text{靶细胞自发释放})] \times 100$ 分析数据。结果如图 9 所示。由图 9 可知，QP146134233424（蛋白-7）具有较好的激活 T 细胞杀伤靶细胞的功能。

七、抗体介导的 PBMC 杀伤肿瘤细胞的细胞毒性检测

实验方法：

选择靶细胞为高表达 CLDN18.2 的人胃癌细胞系 NUGC4-CLDN18.2。效应细胞为人 PBMC。按照 E:T 比例 10: 1，再加入不同浓度抗体，37°C，5% CO₂ 培养 48h，用 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay（Promega，G1780 -1000 assays）检测细胞培养上清中的 LDH，定量细胞毒百分比。靶细胞的最大裂解率（100%）为 1% Triton X-100 处理靶细胞使细胞裂解释放全部 LDH。设置靶细胞自发、效应细胞自发、靶细胞+效应细胞自发等对照孔。按照公式杀伤百分比 = $[(\text{实验孔释放} - \text{效应细胞自发释放} - \text{靶细胞自发释放}) / (\text{靶细胞最大裂解} - \text{靶细胞自发释放})] \times 100$ 分析数据。结果如图 10 所示。结果表明，采用 QP146134233424（蛋白-7），可获得良好的杀伤肿瘤细胞的功能。

八、动物药效

在免疫重建鼠模型中评价抗 claudin18.2-TGFβR II -CD3 融合蛋白对肿瘤生长的抑制作用。

由于 CD3 抗体不能识别小鼠 CD3，因此采用免疫重建鼠模型（PBMC-graft NCG）评价 claudin18.2-TGFβR II -CD3 融合蛋白对表达 claudin18.2 的肿瘤细胞的生长抑制作用。HCC827- claudin18.2 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 + 1x sodium pyruvate + 2mM glutamax + 1mg/ml G-418 培养液中。收集指数生长期的 HCC827 细胞，PBS 重悬至适合浓度接种。每只实验小鼠于右侧背部皮下接种 5×10^6 HCC827 细胞，定期观察肿瘤生长情况，待肿瘤生长至平均体积约 100mm^3 时根据肿瘤大小和小鼠体重随

机分组给药。肿瘤细胞接种当天定义为第 0 天。G1 组为空白对照，注射 PBS 缓冲液。分组当天，G2 G3 组每只小鼠腹腔注射 PBMC，注射量为 5×10^6 /鼠。PBMC 注射后，开始给药。给药方案如下：

组别	动物数	处理组	剂量 (mg/kg)	给药方式	给药周期
1	9	w/o PBMC+vehicle	--	i.p.	Q7D×3
2	9	PBMC+vehicle	--	i.p.	Q7D×3
3	9	PBMC+QP146134233424	10	i.p.	Q7D×3

给药体积为 $10 \mu\text{l/g}$ 体重。

每周观察 2 次小鼠体重和肿瘤体积，用游标卡尺测量肿瘤长短径，并按公式肿瘤体积 (mm^3) = $0.5 \times (a \times b^2)$ 计算 记录肿瘤生长情况，绘制肿瘤生长曲线。结果如图 11 所示。结果表明，使用 QP146134233424 (蛋白-7) 可获得较好的抑制肿瘤的效果。

由以上结果可知，本发明将肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体三功能融合蛋白设计具有可行性，本发明还验证了 QP146134233424 具有较好的抑制肿瘤的效果。本发明的三功能融合并不限于上述实施例所列的形式，任何将肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体三功能融合蛋白均应列入本发明的保护范围。

权利要求

1. 一种含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白。
2. 根据权利要求 1 所述的含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白，其特征在于，具有如下结构通式：
 {[TAA 抗体] n , [CD3 抗体] x , [TGF- β 抑制分子] m }，其中 $n \geq 1$, $x = 1$, $m \geq 1$ ；
 其中，
 所述[TAA] n 是指：以单价或多价结合肿瘤相关抗原的抗体或多肽片段；
 所述[CD3] x 是指：以单价结合 CD3 的抗体或多肽片段；
 所述[TGF- β 抑制分子] m 是指：以单价或多价结合 TGF- β 的抗体或多肽片段。
3. 根据权利要求 1 所述的含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白，其特征在于，所述 TAA 抗体的靶点包括：CD20、CD19、CD38、CD30、CD52、slamf7、GD2、CD24、CD47、CD133、CD239、CD276、CEA、Epcam、Trop2、TAG72、MUC1、MUC16、mesothelin、folr1、CLDN18.2、PDL1、EGFR、EGFR VIII、C-MET、HER2、FGFR2、FGFR3、PSMA、PSCA、EphA2、ADAM17、17-A1、NKG2D ligands、MCSP、LGR5、SSEA3、SLC34A2、BCMA 或 GPNMB；
 所述 CD3 抗体的靶点包括：OKT3、SP34 或 UCTH1；
 所述 TGF- β 抑制剂包括：人 TGF- β RII 胞外区及其衍生物或人 TGF- β RI 胞外区及其衍生物。
4. 根据权利要求 1 所述的含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白还包含 FC 段；所述 FC 段选自 Human IgG1 FC、Human IgG2 FC、Human IgG3 FC、Human IgG4 FC 或其变异体；所述 FC 段包含 A 链和 B 链，所述变异体包括以下形式：

组合	FC	异源二聚体突变 (Eu num bering)
1	FC-A链	T366Y
	FC-B链	Y407T
2	FC-A链	T366W
	FC-B链	T366S/L368A/Y407V
3	FC-A链	S354C/T366W
	FC-B链	Y349C/T366S/L368A/Y407V
4	FC-A链	S364H/F405A
	FC-B链	Y349T/T394F
5	FC-A链	T350V/L351Y/F405A/Y407V
	FC-B链	T350V/T366L/K392L/T394W
6	FC-A链	K392D/K409D
	FC-B链	E356K/D399K
7	FC-A链	D221E/P228E/L368E
	FC-B链	D221R/P228R/K409R
8	FC-A链	K360E/K409W
	FC-B链	Q347R/D399V/F405T
9	FC-A链	K360E/K409W/Y349C
	FC-B链	Q347R/D399V/F405T/S354C
10	FC-A链	K370E/K409W
	FC-B链	E357N/D399V/F405T
11	FC-A链	F405L
	FC-B链	K409R
12	FC-A链	K360D/D399M/Y407A
	FC-B链	E345R/Q347R/T366V/K409V
13	FC-A链	Y349S/K370Y/T366M/K409V
	FC-B链	E356G/E357D/S364Q/Y407A
14	FC-A链	L351D/L368E
	FC-B链	L351K/T366K
15	FC-A链	G Q PFRPEVHLLPPSREEM TKN Q VSLTCLARG FYPKD A VEW ESNG Q PEN NYKTTPSRQ E PSQ G TTTFV VTSKLTVD KSRW Q Q G N VFSC SVM HEALHNH YTQ KTSL
	FC-B链	G Q PREPQ VYTLPPPSEELALNELV TLTCLVKG FYPSD A VEW LQ G SQ ELPREKYLW APV LD SD G SFFLYS LRVA AED W KKG D TFPSC SVM HEALHNH YTQ KSLDR
16	FC-A链	L368D/K370S
	FC-B链	E357Q/S364K
17	FC-A链	S354C/T366W/ K409A
	FC-B链	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ F405K
18	FC-A链	S354C/T366W/ F405K/K360E/Q347E
	FC-B链	Y349C/T366S/L368A/Y407V/ Q347R/T394W
19	FC-A链	T366W/ K409A
	FC-B链	T366S/ L368G/Y407A/F405K
20	FC-A链	knobs (T366W/ F405K)
	FC-B链	holes (T366S/ L368G/Y407A/K409A)
21	FC-A链	Q347A/S364K/T366V/K370T/K392Y/F405S/Y407V/K409W/T411N
	FC-B链	Q347E/Y349A/L351F/S364T/T366V//K370T/T394D/V397L/D399E/D401Q/F405A/Y407 S/K409R/T411R
22	FC-A链	K274Q/N276K/Y300F/A339T /Q347A/S364K/T366V/K370T/ N384S/K392Y/V397M / F405S/Y407V/K409W/T411N/ V422I/H435R/Y436F
	FC-B链	Q347E/Y349A/L351F/S364T/T366V//K370T/T394D/V397L/D399E/D401Q/F405A/Y407 S/K409R/T411R

5. 根据权利要求 1 所述的含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF-β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白，其特征在于，所述三功能融合蛋白包含：FC 段、TAA 抗体、2 个 TGF-β 抑制剂、CD3 抗体；

所述 TAA 抗体包含：第一 TAA 抗体和第二 TAA 抗体，所述第一 TAA 抗体包含 Fab 结构域，

所述第二 TAA 抗体和 CD3 抗体为 scFv；

所述 FC 段包含 A 链和 B 链；所述 A 链的 N 端与所述第一 TAA 抗体连接，C 端与一个 TGF- β 抑制剂连接；所述 B 链的 N 端与所述第二 TAA 抗体连接，C 端与另一个 TGF- β 抑制剂连接；所述 CD3 抗体连接于所述第二 TAA 抗体。

6. 根据权利要求 1 所述的含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白，其特征在于，所述 TAA 抗体的靶点选择 CLDN18.2，所述 CD3 抗体的靶点选择 OKT3；所述 TGF- β 抑制剂选择人 TGF- β RII 胞外区。
7. 根据权利要求 6 所述的含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白由 SEQ ID NO:13、14、15 融合得到。
8. 根据权利要求 1 所述的含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白，其特征在于，所述的融合蛋白还包含：连接序列，所述连接序列包含 1 个或多个 G4S。
9. 权利要求 1 至 8 中任意一项所述的含有肿瘤相关抗原 TAA 抗体、TGF- β 抑制剂、CD3 抗体的三功能融合蛋白在制备抑制或治疗癌症的药物中的应用。
10. 根据权利要求 9 所述的应用，其特征在于，所述的癌症包括：骨髓癌、淋巴瘤、白血病、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、隆突性皮肤纤维肉瘤、梅克尔细胞癌、成胶质细胞瘤、胶质瘤、肉瘤、间皮瘤，或骨髓增生异常综合症，或者来自如下部位的癌症或肿瘤：结直肠、乳腺、卵巢、胰腺、胃、前列腺、肾、宫颈、甲状腺、子宫内膜、子宫、膀胱、神经内分泌、头部颈部、肝、鼻咽或睾丸。

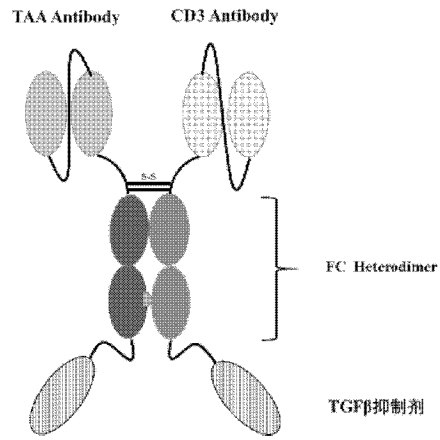


图 1

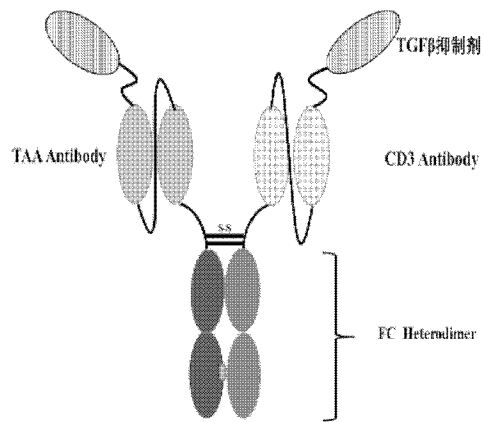


图 2

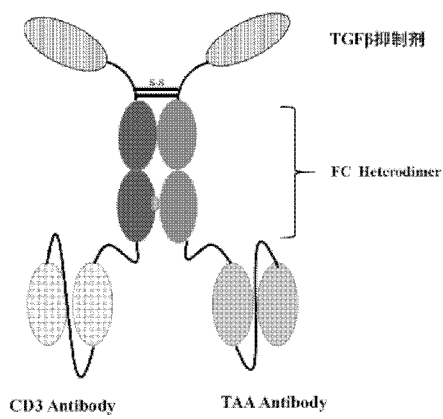


图 3

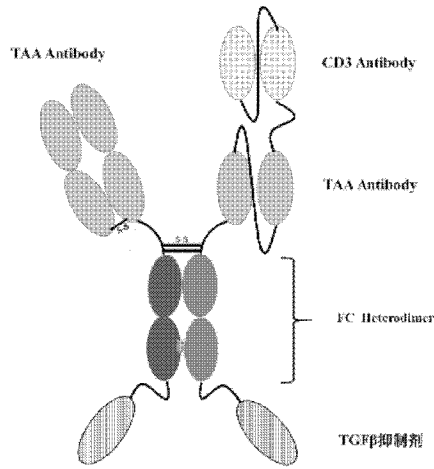


图 4

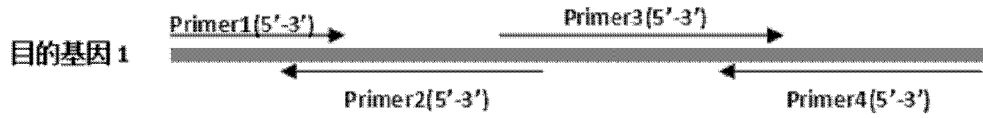


图 5

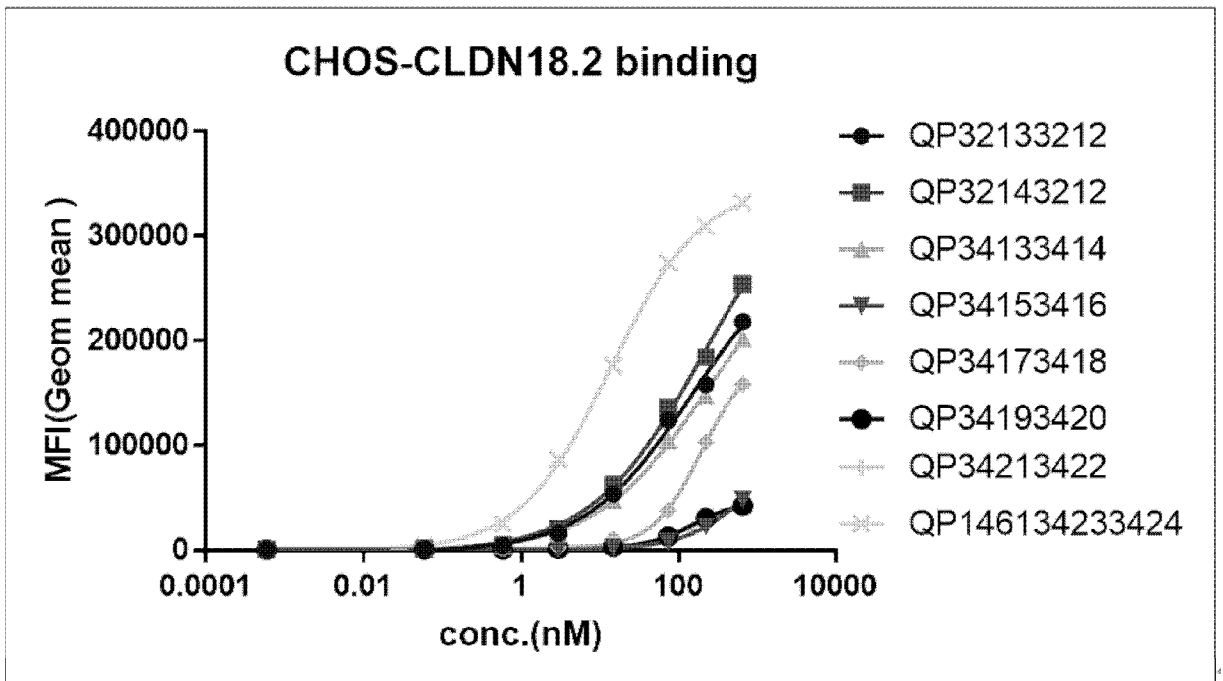


图 6

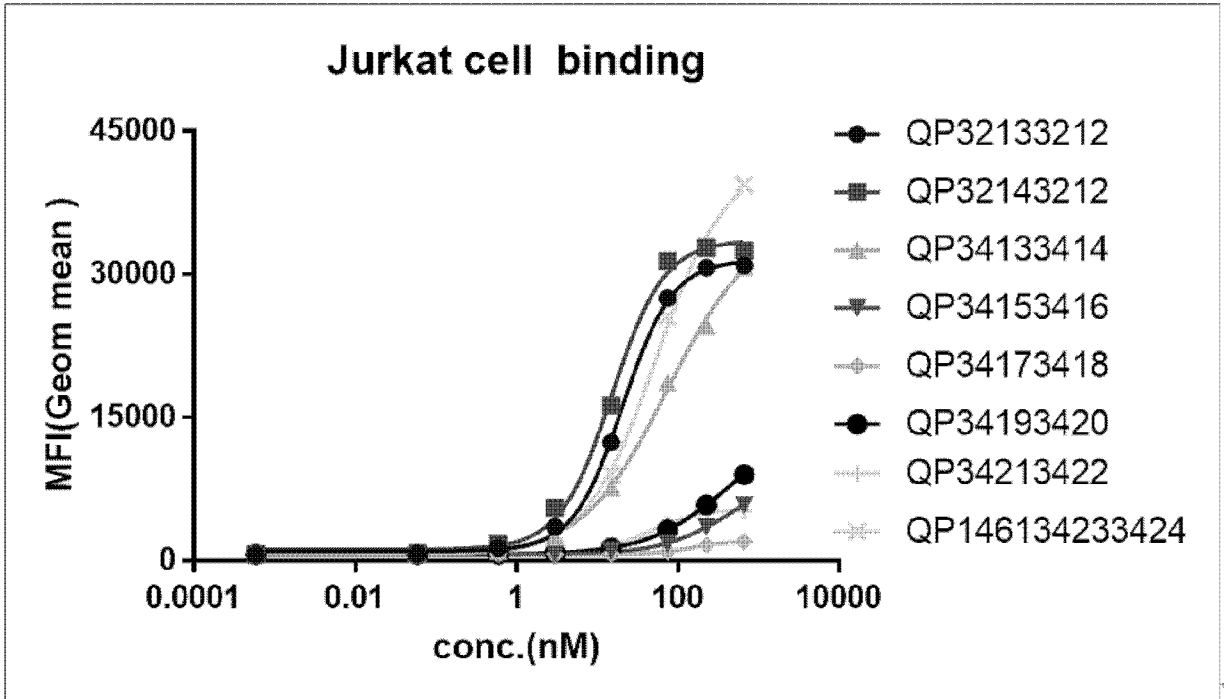


图 7

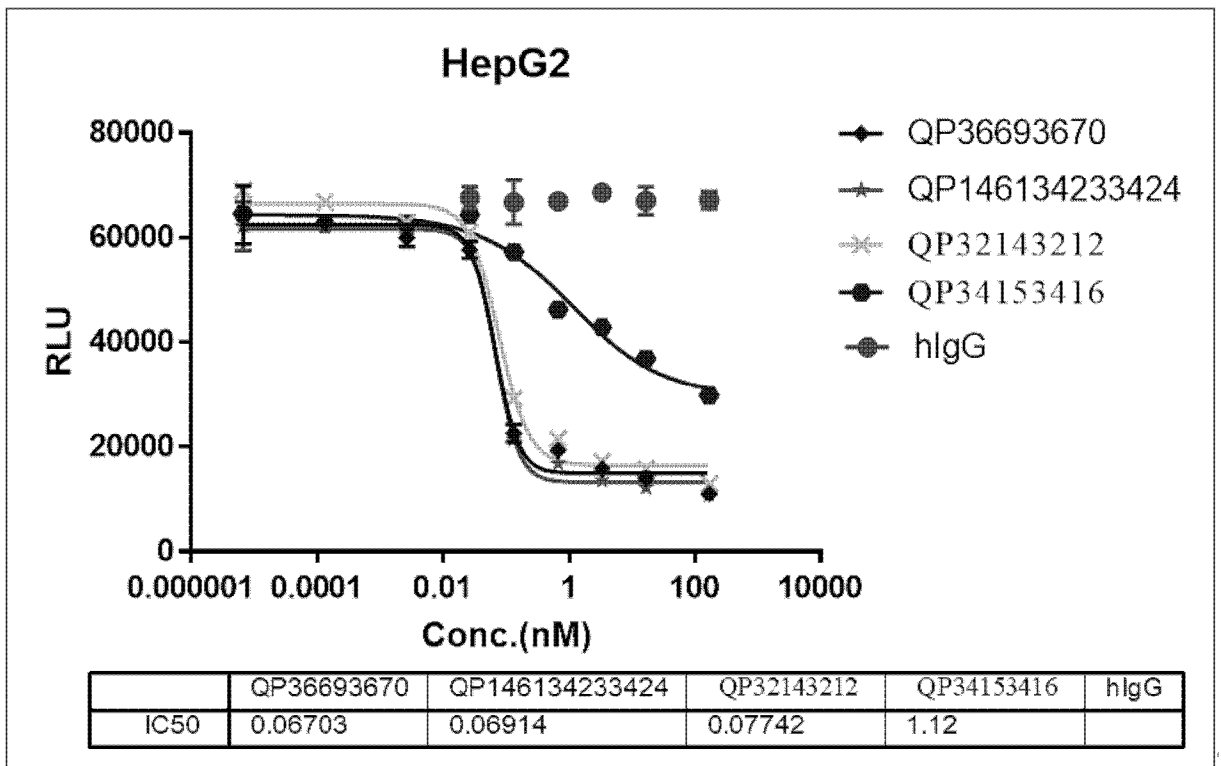


图 8

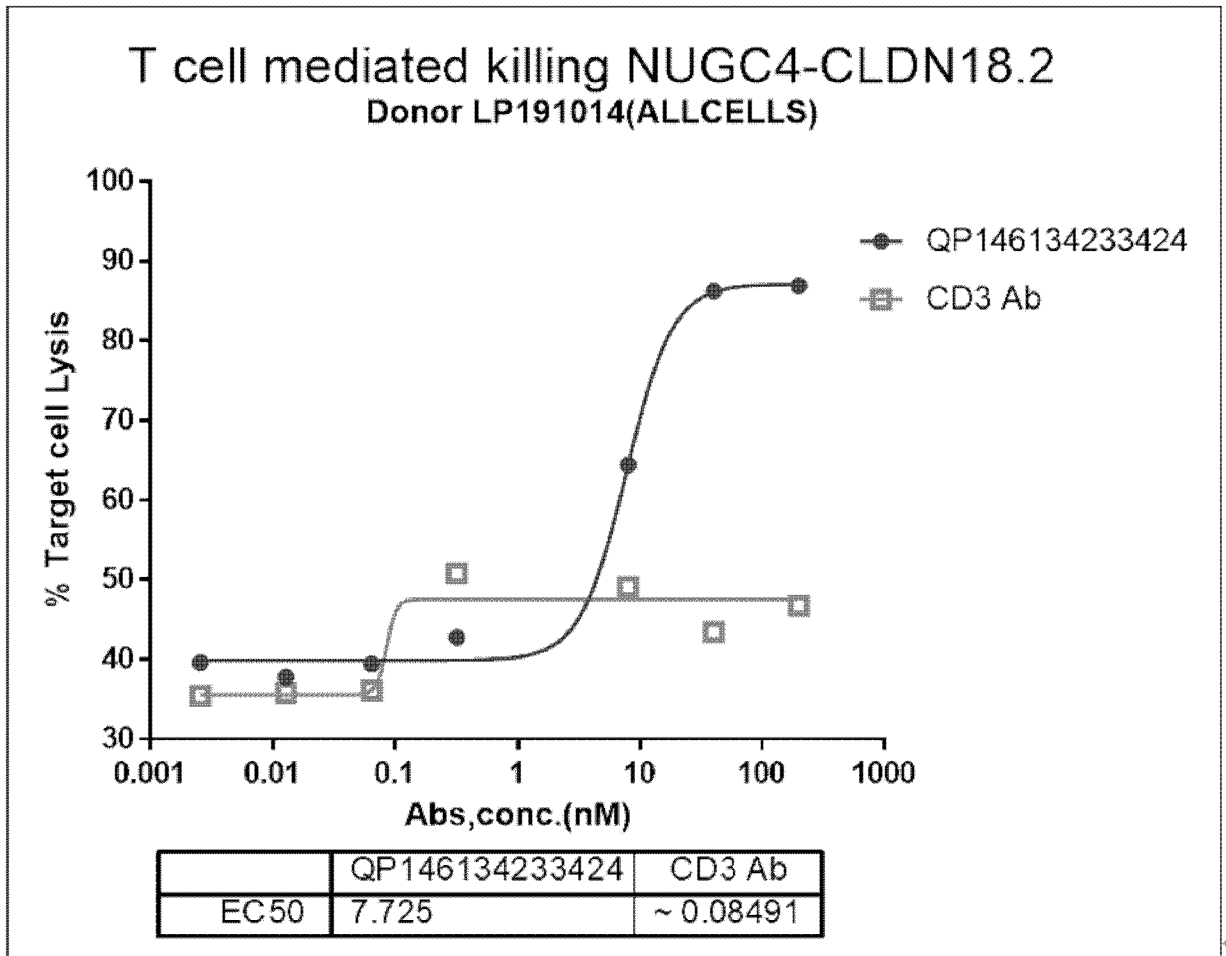


图 9

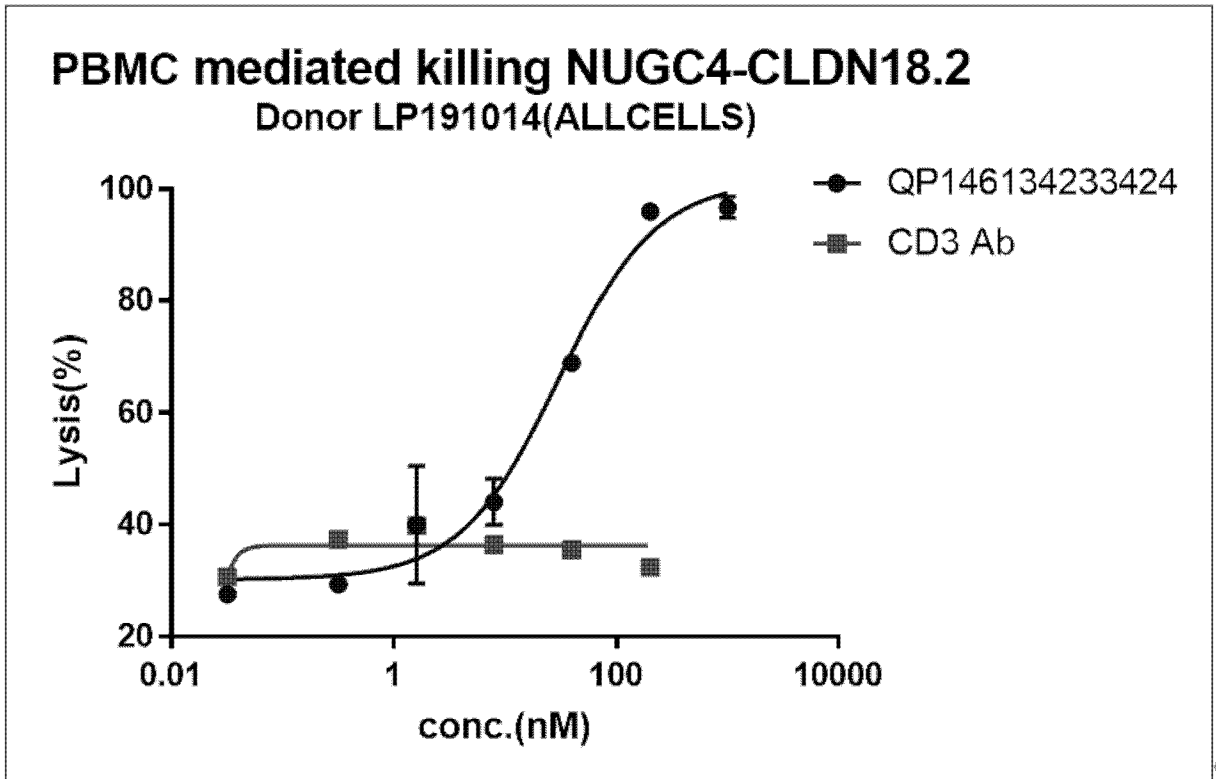
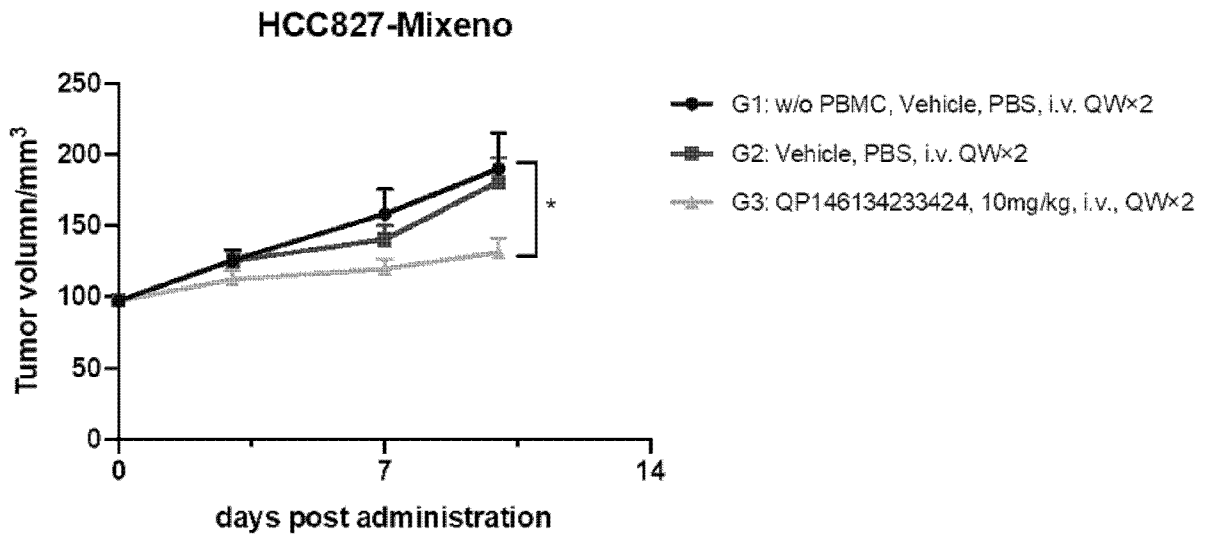


图 10



Groups	D10 Tumor Volume mm ³	D10 TGItv%	P value
w/o PBMC, Vehicle, PBS	190.02 ± 25.28/D10	--	
Vehicle, PBS	180.99 ± 16.43/D10	9.72	
QP146134233424, 10mg/kg	131.34 ± 9.92/D14	63.18	v.s. G1: 0.0462* v.s. G2: 0.0199*

图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/094631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; 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, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE, ISI web of science and search terms: 融合, 抗体, antibody, CD3, TGF- β , 受体, receptor, 肿瘤相关抗原, TAA, trispecific, et al.; GENBANK, EMBL, China Patents Biological Sequence Search System and sequence searched: SEQ ID NOs: 13-15.**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 107207610 A (XENCOR, INC.) 26 September 2017 (2017-09-26) claims 1-72, figures 1A-1C	1-10
Y	CN 110964118 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 07 April 2020 (2020-04-07) abstract, claims 1-9, figure 1	1-10
Y	WO 2018205985 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 15 November 2018 (2018-11-15) abstract, claims 1-25, figure 1	1-10
Y	Guoyun Zhu et al. "Targeting CLDN18.2 by CD3 Bispecific and ADC Modalities for the Treatments of Gastric and Pancreatic Cancer" <i>Scientific Reports</i> , Vol. 9, 10 July 2019 (2019-07-10), pp. 1-11	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

06 August 2021

Date of mailing of the international search report

10 September 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/094631

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/094631

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107207610	A	26 September 2017	JP	2017536829	A	14 December 2017
				AU	2017216517	A1	31 August 2017
				US	10889653	B2	12 January 2021
				AU	2019201923	B2	07 January 2021
				EP	3223845	A2	04 October 2017
				US	2016229924	A1	11 August 2016
				BR	112017011092	A2	26 December 2017
				NZ	732144	A	24 April 2020
				CA	2967426	A1	02 June 2016
				AU	2015353409	B2	09 May 2019
				CL	2017001328	A1	23 March 2018
				JP	2020124209	A	20 August 2020
				EC	SP17040521	A	28 February 2019
				GT	201700112	A	27 November 2018
				IL	252480	D0	31 July 2017
				JP	6696982	B2	20 May 2020
				WO	2016086189	A2	02 June 2016
				AU	2019201923	A1	11 April 2019
				WO	2016086189	A3	09 September 2016
				US	2017081420	A1	23 March 2017
				EA	201791139	A1	30 April 2018
				US	2021102003	A1	08 April 2021
				AU	2015353409	A1	15 June 2017
				US	9850320	B2	26 December 2017
				PH	12017500968	A1	20 November 2017
				MX	2017006966	A	02 May 2018
				AU	2017216517	B2	26 September 2019
				KR	20170084326	A	19 July 2017
				SG	11201704283 P	A	29 June 2017
				US	2018282432	A1	04 October 2018
				PE	20171324	A1	11 September 2017
				US	10913803	B2	09 February 2021
				TN	2017000223	A1	19 October 2018
				CN	110894240	A	20 March 2020

CN	110964118	A	07 April 2020	None			

WO	2018205985	A1	15 November 2018	EP	3623389	A4	20 January 2021
				JP	2020519289	A	02 July 2020
				EP	3623389	A1	18 March 2020
				KR	2020004801	A	14 January 2020
				AU	2018264455	A1	14 November 2019
				US	2020157180	A1	21 May 2020
				TW	201900674	A	01 January 2019
				MX	2019013023	A	18 December 2019
				BR	112019023184	A2	19 May 2020
				CN	110050000	A	23 July 2019
				CA	3061791	A1	29 October 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/094631

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 19/00(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(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; 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, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE, ISI web of science和检索词:融合, 抗体, antibody, CD3, TGF-β, 受体, receptor, 肿瘤相关抗原, TAA, trispecific, 等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NOs: 13-15.</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>Y</td> <td>CN 107207610 A (森科股份有限公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 权利要求1-72, 图1A-1C</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110964118 A (中国药科大学) 2020年 4月 7日 (2020 - 04 - 07) 摘要, 权利要求1-9, 图1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2018205985 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO等) 2018年 11月 15日 (2018 - 11 - 15) 摘要, 权利要求1-25, 图1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Guoyun Zhu等. "Targeting CLDN18.2 by CD3 Bispecific and ADC Modalities for the Treatments of Gastric and Pancreatic Cancer" Scientific Reports, 第9卷, 2019年 7月 10日 (2019 - 07 - 10), 第1-11页</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	Y	CN 107207610 A (森科股份有限公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 权利要求1-72, 图1A-1C	1-10	Y	CN 110964118 A (中国药科大学) 2020年 4月 7日 (2020 - 04 - 07) 摘要, 权利要求1-9, 图1	1-10	Y	WO 2018205985 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO等) 2018年 11月 15日 (2018 - 11 - 15) 摘要, 权利要求1-25, 图1	1-10	Y	Guoyun Zhu等. "Targeting CLDN18.2 by CD3 Bispecific and ADC Modalities for the Treatments of Gastric and Pancreatic Cancer" Scientific Reports, 第9卷, 2019年 7月 10日 (2019 - 07 - 10), 第1-11页	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	CN 107207610 A (森科股份有限公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 权利要求1-72, 图1A-1C	1-10															
Y	CN 110964118 A (中国药科大学) 2020年 4月 7日 (2020 - 04 - 07) 摘要, 权利要求1-9, 图1	1-10															
Y	WO 2018205985 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO等) 2018年 11月 15日 (2018 - 11 - 15) 摘要, 权利要求1-25, 图1	1-10															
Y	Guoyun Zhu等. "Targeting CLDN18.2 by CD3 Bispecific and ADC Modalities for the Treatments of Gastric and Pancreatic Cancer" Scientific Reports, 第9卷, 2019年 7月 10日 (2019 - 07 - 10), 第1-11页	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>2021年 8月 6日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 9月 10日</p>																
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>授权官员</p> <p>李晨</p> <p>电话号码 86-10-62411100</p>																

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
 附件C/ST. 25文本文件形式
 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/094631

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107207610	A	2017年 9月 26日	JP	2017536829	A	2017年 12月 14日
				AU	2017216517	A1	2017年 8月 31日
				US	10889653	B2	2021年 1月 12日
				AU	2019201923	B2	2021年 1月 7日
				EP	3223845	A2	2017年 10月 4日
				US	2016229924	A1	2016年 8月 11日
				BR	112017011092	A2	2017年 12月 26日
				NZ	732144	A	2020年 4月 24日
				CA	2967426	A1	2016年 6月 2日
				AU	2015353409	B2	2019年 5月 9日
				CL	2017001328	A1	2018年 3月 23日
				JP	2020124209	A	2020年 8月 20日
				EC	SP17040521	A	2019年 2月 28日
				GT	201700112	A	2018年 11月 27日
				IL	252480	D0	2017年 7月 31日
				JP	6696982	B2	2020年 5月 20日
				WO	2016086189	A2	2016年 6月 2日
				AU	2019201923	A1	2019年 4月 11日
				WO	2016086189	A3	2016年 9月 9日
				US	2017081420	A1	2017年 3月 23日
				EA	201791139	A1	2018年 4月 30日
				US	2021102003	A1	2021年 4月 8日
				AU	2015353409	A1	2017年 6月 15日
				US	9850320	B2	2017年 12月 26日
				PH	12017500968	A1	2017年 11月 20日
				MX	2017006966	A	2018年 5月 2日
				AU	2017216517	B2	2019年 9月 26日
				KR	20170084326	A	2017年 7月 19日
				SG	11201704283P	A	2017年 6月 29日
				US	2018282432	A1	2018年 10月 4日
				PE	20171324	A1	2017年 9月 11日
				US	10913803	B2	2021年 2月 9日
				TN	2017000223	A1	2018年 10月 19日
				CN	110894240	A	2020年 3月 20日
CN	110964118	A	2020年 4月 7日	无			
WO	2018205985	A1	2018年 11月 15日	EP	3623389	A4	2021年 1月 20日
				JP	2020519289	A	2020年 7月 2日
				EP	3623389	A1	2020年 3月 18日
				KR	20200004801	A	2020年 1月 14日
				AU	2018264455	A1	2019年 11月 14日
				US	2020157180	A1	2020年 5月 21日
				TW	201900674	A	2019年 1月 1日
				MX	2019013023	A	2019年 12月 18日
				BR	112019023184	A2	2020年 5月 19日
				CN	110050000	A	2019年 7月 23日
				CA	3061791	A1	2019年 10月 29日