



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118974101 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 15

(21) 申请号 202380019539.9

(22) 申请日 2023.01.18

(66) 本国优先权数据

202210114471.X 2022.01.30 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/072903 2023.01.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/143308 ZH 2023.08.03

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72) 发明人 彭华 曹帅帅

(74) 专利代理机构 北京汇知杰知识产权代理有限公司 11587

专利代理师 杨巍 柴春玲

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

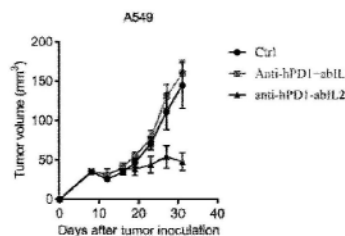
A61K 38/20 (2006.01)

(54) 发明名称

一种PD1抗体与白介素2融合的双功能分子

(57) 摘要

本发明涉及一种PD1抗体与白介素2融合的双功能分子,其包括:由如下第一单体和第二单体构成的异源二聚体:(1)白介素2(IL2)与免疫球蛋白Fc单链连接而成的第一单体;(2)T细胞表面分子PD1的抗体的Fab/ScFv与Fc单链连接而成的第二单体。双功能分子也可以是同源二聚体,同源二聚体单体包括:(1)白介素2功能嵌段;和(2)抗体的单体或抗体的Fab/ScFv与Fc单链连接而成的单体,抗体为T细胞表面分子PD1的抗体。本发明还涉及双功能分子在制备抗肿瘤药物中的应用。



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, CV, 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, ME, 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))。

一种 PD1 抗体与白介素 2 融合的双功能分子

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体的，涉及一种 PD1 抗体与白介素 2 融合的双功能分子。

背景技术

IL-2 细胞因子是 T 细胞的强效生长因子。它通过与存在于 T 和 NK 细胞表面的 IL-2 受体(IL-2R) 结合发挥其活性，从而通过 JAK/STAT5 依赖性途径导致其自身磷酸化，最终触发相应细胞的活化和增殖(1)。IL-2 发挥其持久 CR 的确切机制仍有争议(2)。IL-2 的刺激作用已在成功产生适应性和 CTL 介导的抗肿瘤反应所需的多个途径中得到证实(3)。在 TCR 识别 MHC 中的抗原和共刺激分子 CD28 与 B7 结合之后，IL-2 被认为是 T 细胞克隆扩增和效应器功能所需的第三个基本信号(1, 3)。同样，CD8+ CTL 功能也严重依赖于 IL-2，如它们在 IL-2 或 IL-2R 缺陷小鼠中的效应或细胞毒性功能降低所示(4-6)。IL-2 增加 CTL 向感染或肿瘤的淋巴外部位的运输(1, 7)。IL-2 由 Th1 细胞产生，以响应 DC 的激活，从而导致 CD8 激活和增殖(3)。IL-2 抗肿瘤活性的一个独特机制可能是通过激活自然杀伤(NK)细胞来介导的(8)。

多项 II 期和 III 期试验已在临床上证明 IL-2 在诱导透明细胞 RCC 患者持久 CR 和 PR 方面的功效(9-11)。相比之下，分子靶向治疗未能诱导 CR，也没有治愈癌症。在多项 III 期试验中报告的 IL-2 治疗的 RR (600,000-800,000 IU/kg q8h x 14 为耐受) 范围为 20%至 23.2%，而 CR 范围为 7%-9%(9-11)。在达到 CR 的患者中，绝大多数是持久的，中位生存期超过 10 年(1、15、16)。已经测试了替代方案和减少剂量的 IL-2，但疗效没有任何改善(10-12)。

肿瘤微环境(TME)通常通过增加 Treg 的产生和/或减少 T 细胞生长因子或其信号传导来限制免疫治疗的效果。一个主要挑战是提供足够的细胞因子来重新激活 CTL 或克服 Treg。IL-2 是一种“T 细胞生长因子”，是一种多效性细胞因子，在抗原激活后产生，在免疫反应中起关键作用。IL-2 是细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞的有效诱导剂。因此，它是针对各种癌症的抢手疗法。然而，在抗癌免疫治疗中使用 IL-2 存在两个主要障碍。一些 T 细胞，如 Treg，表达由 CD25(IL-2R α)、CD122(IL-2R β)和 CD132 (常见的细胞因子受体 γ 链) 亚基组成的异源三聚体高亲和力受体。相比之下，未成熟 CD8T 细胞、CD4/CD8 记忆 T 细胞和 NK 细胞表达亲和力较低的二聚体受体(缺乏 CD25 亚基(13,14))。当未成熟 CD8T 细胞被激活时，它们会上调 CD25 的表达(15)。因此，Tregs 可以更好地与效应 T 细胞竞争使用 IL-2。目前，IL-2 免疫疗法需要大剂量给药和多次注射。除了 Tregs 的优先扩增外，高剂量的 IL-2 会导致血管渗漏综合征，这种情况会导致血管通透性增加、低血压、肺水肿、肝细胞损伤和肾功能衰竭(16-18)。

两个根本上重要的策略可用于改善 IL-2 在免疫治疗中的使用：1) 如何在肿瘤组织内活跃的同时限制全身副作用；2) 如何在限制 Tregs 刺激的同时优先激活效应 T 细胞。对于第一个问题，许多团体希望通过使用基于抗体的 IL-2 递送来降低 IL-2 的毒性(19-24)。对于第二个问题，一些研究人员构建了 IL-2 突变体，这些突变体优先降低其与 CD25 的结合，从而更好地扩增非 Tregs 群体(25-27)。。Christopher Garcia 的小组构建了 IL-2 超级因子(也称为 super-2)，以消除 IL-2 对 CD25 表达的功能要求，并增加了对 IL-2R β 的结合亲和力。与 IL-2 相比，IL-2 超因子诱导细胞毒性 T 细胞的超强扩增，导致体内抗肿瘤反应改善，并引起 Treg 扩增成比例地降低全身副作用(26)。

靶向 IL-2 方法是否能提高疗效一直存在争议。最近的一项研究表明，与靶向 IL-2 相比，由与人 IL-2 融合的 F8 抗体组成的免疫细胞因子 F8-IL2 可对淋巴瘤进展产生强烈且改善的抑制作用(21)。最近的另一项研究表明，抗原特异性可能对免疫细胞因子的功效和生物分布并不重要(28, 29)。他们发现，治疗效果或生物分布模式不需要免疫细胞因子抗原特异性和 Fc γ 受体相互作用，因为具有不相关特异性和/或无活性突变 Fc 结构域的免疫细胞因子的行为与肿瘤特异性 IL-2 相似。他们推测 IL-2 的生物分布主要与表达 IL-2R 的先天免疫细胞有关。我们认为这种差异的原因与肿瘤模型、抗体的靶向能力以及 IL-2 和 IL-2 受体之间的亲和力有关。因此有必要评估靶向效果是否更好。

在这里，我们设计了一种双功能分子（IL2 与抗 T 细胞表面抗原 PD1 抗体相连）来靶向 TIL，因为 TIL 比其他细胞表达更多的 T 细胞表面抗原 PD1。为了减少 IL2 与 Tregs 的结合，我们选择了一种 IL2 突变体(abIL2)，它大大降低了与 IL2R α 和 IL2R β 的结合。我们将 abIL2 与抗 T 细胞表面抗原 PD1 抗体连接起来（anti-PD1-abIL2），以增加其对肿瘤内 CD8+ T 细胞的亲和力。Anti-PD1-abIL2 显示出更好的瘤内 T 细胞结合和有效的抗肿瘤作用。使用此类双功能分子还可以克服 PDL1 治疗耐药性。

因此，anti-PD1-abIL2 双功能分子在临床上是非常具有开发潜力的肿瘤治疗新方案。

发明内容

本发明首先涉及一种双功能分子，所述的双功能分子为异源二聚体，其特征在于，

所述的异源二聚体包括：

(1) 白介素 2 (IL2) 与免疫球蛋白 Fc 单链连接而成的异源二聚体第一单体；

(2) 抗 T 细胞表面分子的抗体的 Fab 或 ScFv 与免疫球蛋白 Fc 单链连接而成的异源二聚体第二单体；

所述的第一单体与第二单体通过 Fc 单链的二聚化连接，构成所述的异源二聚体；

所述的 T 细胞表面分子包括但不限于：PD1、TIM-3、LAG-3、OX40、4-1BB、ICOS、GITR；

所述的免疫球蛋白 Fc 单链为天然免疫球蛋白 Fc 单链或通过基因突变敲除 ADCC 效应的免疫球蛋白 Fc 单链；

优选的，所述的免疫球蛋白 Fc 单链为天然免疫球蛋白 Fc 单链或通过基因突变敲除 ADCC 效应的免疫球蛋白 Fc 单链；更优选的，所述的免疫球蛋白 Fc 单链为人 IgG 的 Fc 单链。

所述的 T 细胞表面分子为 PD1，所述的抗 T 细胞表面分子的抗体为抗 PD1 的抗体（aPD1）；

所述的第二单体中，

所述的抗体的 Fab 为人源化抗体的 Fab 或全人化抗体的 Fab；

所述的抗体的 ScFv 为人源化抗体的 ScFv 或全人化抗体的 ScFv；

更优选的，所述的第二单体为：

抗 T 细胞表面分子的抗体的单体，所述抗体的单体包含一条轻链和一条重链；优选的，所述抗体为人源化抗体或全人抗体。

更优选的，所述的异源二聚体包括：

(1) 第一单体，所述的第一单体自 N 端开始依次包含：

1) 序列如 SEQ ID NO.1 所示的野生型 IL-2 蛋白、或所述的野生型 IL-2 蛋白的突变体，所述的突变体中包含如下任一或任意组合的突变位点；R38L、F42A、D20K、R38A、F42K 和 K43E；

2) 必要的连接结构（G4S 连接序列），优选的，所述的连接序列如 SEQ ID NO.6 所示；

3) 序列如 SEQ ID NO.2 所示的 IgG 的 Fc 单链、或如 SEQ ID NO.3 所示的 No-ADCC 突变型的 IgG 的 Fc、或如 SEQ ID NO.4 所示的 knob 突变型 Fc、或如 SEQ ID NO.5 所示的 hole 突变型 Fc；

(2) 第二单体，所述的第二单体包含：

1) 序列如 SEQ ID NO.7 所示的抗 PD1 抗体轻链 VL-KCL 和序列如 SEQ ID NO.8 所示的抗 PD1 抗体重链 VH&CH1 组成的抗 PD1 抗体 Fab 区；

或：2) 序列如 SEQ ID NO.9 所示的抗 PD1 单链抗体（ScFv）；

和：3) 序列如 SEQ ID NO.2 所示的 IgG 的 Fc 单链、或如 SEQ ID NO.3 所示的 No-ADCC 突变型的 IgG 的 Fc、或如 SEQ ID NO.4 所示的 knob 突变型 Fc、或如 SEQ ID NO.5 所示的 hole 突变型 Fc；

更优选的，所述的异源二聚体包括：

第一单体：其为序列如 SEQ ID NO.10 所示的多肽（abIL2-Fc）；

第二单体：其为：

(1) 序列如 SEQ ID NO.11 所示的抗 PD1 抗体 VH-CH1-Fc（knob）和序列如 SEQ ID NO.7 所示的抗 PD1 抗体轻链 VL-KCL 组成的第二单体；

或 (2) 序列如 SEQ ID NO.12 所示的多肽（aPD1ScFv-Fc（knob））。

本发明还涉及一种双功能分子，所述的双功能分子为同源二聚体，其特征在于，

所述的同源二聚体的单体为：

一分子白介素 2（IL2）与一分子抗 PD1 抗体 Fab 通过任意方式连接构成的单体，或，

一分子白介素 2（IL2）与一分子抗 PD1 单链抗体（ScFv）通过任意方式连接构成的单体。

优选的，所述的同源二聚体的单体自 N 端开始依次包含：

(1) 序列如 SEQ ID NO.1 所示的野生型 IL-2 蛋白、或所述的野生型 IL-2 蛋白的突变体，所述的突变体中包含如下任一或任意组合的突变位点；R38L、F42A、D20K、R38A、F42K 和 K43E；

(2) 必要的连接结构（G4S 连接序列），优选的，所述的连接序列如 SEQ ID NO.6 所示；

(3) 抗 PD1 抗体的 Fab 或 ScFv; 所述的 Fab 为人源化抗体的 Fab 或全人化抗体的 Fab, 所述的 ScFv 为人源化抗体的 ScFv 或全人化抗体的 ScFv;

(4) 抗体的 Fc; 所述的抗体 Fc 为全人野生型 Fc 或 No-ADCC 突变型 Fc。

更优选的, 所述的同源二聚体的单体为:

(1) SEQ ID NO.18 (aPD1-abIL2: VL-VH(ScFv)-Fc-abIL2);

(2) SEQ ID NO.19 (abIL2-aPD1: abIL2-VL-VH(ScFv)-Fc) 所示序列。

本发明还涉及另一种双功能分子, 所述的双功能分子为抗 PD1 抗体(K)与 abIL2 的组合成的双功能分子, 所述的双功能分子为异源二聚体;

所述的异源二聚体包括:

(1) 第一单体, 所述的第一单体自 N 端开始依次包含:

1) 序列如 SEQ ID NO.1 所示的野生型 IL-2 蛋白、或所述的野生型 IL-2 蛋白的突变体, 所述的突变体中包含如下任一或任意组合的突变位点; R38L、F42A、D20K、R38A、F42K 和 K43E;

2) 必要的连接结构 (G4S 连接序列), 优选的, 所述的连接序列如 SEQ ID NO.6 所示;

3) 如 SEQ ID NO.2 所示的 IgG 的 Fc 单链、或如 SEQ ID NO.3 所示的 No-ADCC 突变型的 IgG 的 Fc、或如 SEQ ID NO.4 所示的 knob 突变型 Fc、或如 SEQ ID NO.5 所示的 hole 突变型 Fc;

(2) 第二单体, 所述的第二单体包含:

1) 序列如 SEQ ID NO.13 所示的抗 PD1 抗体(K)轻链 VL-KCL 与序列如 SEQ ID NO.14 所示的抗 PD1 抗体(K)重链 VH&CH1 组成的抗体 Fab 区;

或: 2) 序列如 SEQ ID NO.15 所示的抗 PD1 单链抗体(K) (ScFv);

和: 3) 序列如 SEQ ID NO.2 所示的 IgG 的 Fc 单链、或如 SEQ ID NO.3 所示的 No-ADCC 突变型的 IgG 的 Fc、或如 SEQ ID NO.4 所示的 knob 突变型 Fc、或如 SEQ ID NO.5 所示的 hole 突变型 Fc;

更优选的, 所述的异源二聚体包括:

第一单体: 其为序列如 SEQ ID NO.10 所示的多肽 (abIL2-Fc);

第二单体: 其为:

(1) 序列如 SEQ ID NO.16 所示的多肽 (aPD1(K)VH-CH1-Fc (knob)) 和序列如 SEQ ID NO.13 所示的抗 PD1 抗体(K)轻链组成的第二单体; 或

(2) 序列如 SEQ ID NO.17 或 SEQ ID NO.22 所示的多肽 (aPD1(K)ScFv-Fc (knob))。

本发明还涉及一种双功能分子, 所述的双功能分子为同源二聚体, 其特征在于,

所述的同源二聚体的单体为：

一分子白介素 2 (IL2) 与一分子抗 PD1 抗体(K)Fab 通过任意方式连接构成的单体，或，
一分子白介素 2 (IL2) 与一分子抗 PD1 单链抗体(K)(ScFv)通过任意方式连接构成的单体。

优选的，所述的同源二聚体的单体自 N 端开始依次包含：

(1) 序列如 SEQ ID NO.1 所示的野生型 IL-2 蛋白、或所述的野生型 IL-2 蛋白的突变体，所述的突变体中包含如下任一或任意组合的突变位点；R38L、F42A、D20K、R38A、F42K 和 K43E；

(2) 必要的连接结构 (G4S 连接序列)，优选的，所述的连接序列如 SEQ ID NO.6 所示；

(3) 抗 PD1 抗体(K)的 Fab 或 ScFv；所述的 Fab 为人源化抗体的 Fab 或全人化抗体的 Fab，所述的 ScFv 为人源化抗体的 ScFv 或全人化抗体的 ScFv；

(4) 抗体的 Fc；所述的抗体 Fc 为全人野生型 Fc 或 No-ADCC 突变型 Fc。

更优选的，所述的同源二聚体的单体为：

(1) SEQ ID NO.20 (aPD1(K)-abIL2: VL-VH(ScFv)-Fc-abIL2)、

(2) SEQ ID NO.21 (IL2-a PD1(K): IL2-VL-VH(ScFv)-Fc) 所示序列。

本发明还涉及所述的双功能分子的如下应用：

- (1) 制备抗肿瘤药物；
- (2) 制备与免疫检查点抑制剂联用的抗肿瘤药物；
- (3) 制备克服免疫检查点抑制剂耐受的抗肿瘤药物；
- (4) 制备与 T 细胞过继转移联用的抗肿瘤药物；
- (5) 制备克服 T 细胞过继转不响应的抗肿瘤药物。

优选的，所述的免疫检查点抑制剂为 PDL1 抗体；

优选的，所述的 T 细胞为抗肿瘤 T 细胞；更优选的，所述的 T 细胞为抗肿瘤 CAR T 细胞或其结构类似物。

本发明的有益效果在于：

(1) 提出了 IL2 临床应用的瓶颈和解决方案，abIL2/aPD1-hIgG1 抗体在保留 IL2 对效应细胞活化的同时降低了与瘤内 Treg 细胞的结合，克服了 IL2 使用过程中会导致 Treg 扩增的不利因素，这些结果为临床使用 IL2 提供了新思路；

(2) 对克服免疫检查点阻断疗法耐受和 T 细胞过继转不响应具有重要意义。

附图说明

- 图 1、Anti-PD1-abIL2 具有更低的体外活性。
- 图 2、Anti-PD1-abIL2 能有效控制 A20 肿瘤生长。
- 图 3、Anti-PDL1-abIL2 不能有效控制 A20 肿瘤生长。
- 图 4、Anti-PD1-abIL2 抗肿瘤效果明显优于 anti-PDL1-abIL2。
- 图 5、Anti-PD1-abIL2 能有效控制 MC38 肿瘤生长。
- 图 6、在 A20 肿瘤中，anti-PD1-abIL2 抗肿瘤效果明显优于 anti-PD1-IL2。
- 图 7、在 MC38 肿瘤中，anti-PD1-abIL2 抗肿瘤效果明显优于 anti-PD1-IL2。
- 图 8、Anti-PD1-abIL2 抗肿瘤效果不依赖于 CD4T 细胞。
- 图 9、Anti-PD1-abIL2 抗肿瘤效果不依赖于 NK 细胞。
- 图 10、Anti-PD1-abIL2 抗肿瘤效果依赖于 CD8 T 细胞。
- 图 11、Anti-hPD1-abIL2 可以更好地控制人的肿瘤。
- 图 12、Anti-PD1-abIL2 可以协同 T 细胞移植控制肿瘤。
- 图 13、Anti-PD1-abIL2 可以协同 anti-PDL1 控制肿瘤。

具体实施方式

实验材料

1、菌种和质粒

菌种：Top10 E. coli、DH5 α E. coli 感受态细胞（北京全式金生物技术有限公司）

质粒：

pEE6.4-IgG κ -hIgG1，包含有小鼠 IgG κ 的信号肽和人 IgG1 的 Fc 序列，用于表达抗体。

pEE6.4-IgG κ -hIgG1-Fc-hole 和 pEE6.4-IgG κ -hIgG1-Fc-knob 用于表达异二聚体蛋白。

pEE6.4-PD1 VH-CH1-Fc-knob、pEE6.4-PD1 VL-CL 用于表达异二聚体蛋白的抗体部分；pEE6.4-abIL2-Fc-hole、用于表达异二聚体蛋白的 abIL2 部分。

2、实验动物

野生型 C57BL/6、BALB/c 小鼠和 BALB/c-Rag 小鼠购于中国北京维通利华实验动物中心。除特殊说明外，所有实验使用的均为 8-10 周龄的雌性小鼠。小鼠均在无特定病原微生物（specific pathogen-free, SPF）的屏障环境中饲养。动物的饲养和实验操作遵从中国科学院生物物理研究所动物管理委员会的相关规定。

3、细胞系

MC38 为 C57 背景小鼠结直肠癌细胞系，在 DMEM 完全培养基（含 10%灭活胎牛血清，2 mmol/L L-谷氨酰胺，0.1mmol/L 非必需氨基酸，100U 青霉素和 100µg/ml 链霉素）中培养。

A20 为 BALB/c 背景小鼠结 B 细胞淋巴瘤细胞系，培养在 RPMI1640 完全培养基（含 10%灭活胎牛血清，2mmol/L L-谷氨酰胺，0.1mmol/L 非必需氨基酸，100U 青霉素和 100µg/ml 链霉素）中

FreeStyle™ 293F 细胞系（Invitrogen）为悬浮细胞，源自于 HEK293 细胞株，培养在 SMM293-TII 或者 CD OptiCHO™ 培养基中，主要用于瞬时转染表达双功能分子。

CTLL-2 细胞系为小鼠 T 细胞系，用于检测 IL2 的生物活性，在 RPMI1640 完全培养基（含 10%灭活胎牛血清，2mmol/L L-谷氨酰胺，0.1mmol/L 非必需氨基酸，100U 青霉素和 100µg/ml 链霉素，100IU/ml 重组 IL2）中培养。

基因及引物的设计与合成

人的野生型及突变型的 IL2 基因序列如下 SEQ ID NO.1 所示。实验中所用引物均通过 DNAMAN 软件设计并由 Invitrogen 公司合成。

以下实施例使用的蛋白都为异源二聚体，具体的

1、aPD1-abIL2 是由如下第一单体和第二单体构成：

(1) 含有 R38L、F42A、D20K、R38A、F42K 和 K43E 突变的 IL2 和 Fc 片段融合的多肽，其序列如 SEQ ID NO.10 所示，

(2) SEQ ID NO.22 所示的 aPD1 的第二单体；

2、aPDL1-abIL2 是由如下第一单体和第二单体构成：

(1) 含有 R38L、F42A、D20K、R38A、F42K 和 K43E 突变的 IL2 和 Fc 片段融合的多肽，其序列如 SEQ ID NO.10 所示，

(2) SEQ ID NO.23 所示的 aPDL1 的第二单体；

3、ahPD1-abIL2 是由如下第一单体和第二单体构成：

(1) 含有 R38L、F42A、D20K、R38A、F42K 和 K43E 突变的 IL2 和 Fc 片段融合的多肽，其序列如 SEQ ID NO.10 所示，

(2) SEQ ID NO.17 所示的 aPD1 的第二单体；

4、aPDL1 抗体是商业化的 atezolizumab。

其第一单体为：含有 R38L、F42A、D20K、R38A、F42K 和 K43E 突变的 IL2 和 Fc 片段融合的多肽，涉及鼠源动物模型时，如 SEQ ID NO.10 所示的多肽（abIL2-Fc）；

第二单体为：PD1 抗体的 scFv-Fc 嵌段，涉及鼠源动物模型时，其为如 SEQ ID NO.10 所示的多肽。

小鼠肿瘤接种及治疗

(1) 肿瘤接种及测量:

肿瘤模型的建立,

$5-7.5 \times 10^5$ 个 MC38、MC38-EGFR5 单细胞悬于 100 μ l PBS 中, 皮下接种于 C57BL/6 小鼠背部;

2×10^6 个 A20 单细胞悬于 100 μ l PBS 中, 接种于 BALB/c 小鼠背部皮下。

对肿瘤消退的小鼠进行同一种肿瘤细胞的 re-challenge 实验时, 肿瘤细胞的接种数量为初始肿瘤造模时候的 5 倍, 接种部位为小鼠背部另一侧皮下。每周监测两次肿瘤大小, 使用游标卡尺测量肿瘤长径 (a)、短径 (b) 和高 (c), 小鼠肿瘤体积= $a \times b \times c / 2$ 。

(2) 治疗:

抗体或者双功能分子采用腹腔注射方式, 部分实验也采用肿瘤内给药的方式, 具体给药剂量将在具体实验中叙述。

小鼠体内细胞删除

(1) CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞的删除:

IL2 或 IL2 双功能分子治疗前一天分别腹腔注射 200 μ g GK1.5 或者 TIB210 抗体用来删除 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞, 之后每隔 3 天注射一次, 依据治疗周期调整注射次数。通过流式检测删除效率。

(2) NK 细胞的删除:

IL2 或 IL2 双功能分子治疗前一天分别腹腔注射 20 μ l NK 细胞删除抗体来删除 NK 细胞。流式检测删除效率。

实施例 1、aPD1-abIL2 具有更低的激活受体的能力, 从而避免外周的副作用

为了降低 IL2 的毒性, 我们降低了 IL2 与 IL2R α 以及 IL2R β 的结合能力。我们通过体外 CTLL2 增殖实验验证了我们的设计。在 CTLL2 细胞培养基中加入不同浓度的 IL2 或 aPD1-abIL2 蛋白, 72h 后通过 CCK8 试剂盒检测 CTLL2 细胞在不同蛋白浓度下的增值水平, 结果显示 aPD1-abIL2 具有更低的扩增 CTLL2 细胞能力 (图 1), 这就说明构建的抗体分子降低了 IL2 活性。

实施例 2、aPD1-abIL2 双特异性抗体具有更好地抗肿瘤活性

1. aPD1-abIL2 双特异性抗体比单独治疗效果显著改善

在 BALB/c 小鼠皮下接种 2×10^6 A20 肿瘤细胞, 在接种肿瘤后 D14 开始治疗; 分别通过腹腔注射 10 μ g aPD1 抗体或 20 μ g aPD1-abIL2 抗体蛋白。每周两次测量肿瘤大小; 结果显示, 与单独的 aPD1 抗体治疗相比, aPD1-abIL2 双特异抗体具有更好的治疗效果 (图 2)。

2. aPDL1-abIL2 双特异性抗体治疗未能显著改善治疗效果

在 BALB/c 小鼠皮下接种 2×10^6 A20 肿瘤细胞，在接种肿瘤后 D14 开始治疗；分别通过腹腔注射 10ug aPDL1 抗体或 20ug aPDL1-abIL2 抗体蛋白。每周两次测量肿瘤大小；结果显示，与单独的 aPD1 抗体治疗相比，aPD1-abIL2 双特异抗体没有更好的治疗效果（图 3）。

3. aPD1-abIL2 双特异性抗体比 aPDL1-abIL2 双特异性抗体治疗效果显著改善

在 BALB/c 小鼠皮下接种 2×10^6 A20 肿瘤细胞，在接种肿瘤后 D14 开始治疗；分别通过腹腔注射 20ug aPD1-abIL2 抗体或 20ug aPDL1-abIL2 抗体蛋白。每周两次测量肿瘤大小；结果显示，与单独的 aPDL1-abIL2 抗体治疗相比，aPD1-abIL2 双特异抗体具有更好的治疗效果（图 4）。

4. 在 MC38 结直肠癌肿瘤中，aPD1-abIL2 双特异性抗体比单独治疗效果显著改善

在 C57BL/6 小鼠皮下接种 5×10^5 MC38 肿瘤细胞，在接种肿瘤后 D18 开始治疗；分别通过腹腔注射 10ug aPD1 抗体或 20ug aPD1-abIL2 抗体蛋白。每周两次测量肿瘤大小；结果显示，与单独的 aPD1 抗体治疗相比，aPD1-abIL2 双特异抗体具有更好的治疗效果（图 5）。

5. aPD1-abIL2 双特异性抗体比 aPDL1-abIL2 双特异性抗体治疗效果显著改善

在 BALB/c 小鼠皮下接种 2×10^6 A20 肿瘤细胞，在接种肿瘤后 D14 开始治疗；分别通过腹腔注射 20ug aPD1-IL2 抗体或 20ug aPDL1-abIL2 抗体蛋白。每周两次测量肿瘤大小；结果显示，与单独的 aPDL1-IL2 抗体治疗相比，aPD1-abIL2 双特异抗体具有更好的治疗效果（图 6）。

在 C57BL/6 小鼠皮下接种 5×10^5 MC38 肿瘤细胞，在接种肿瘤后 D18 开始治疗；分别通过腹腔注射 20ug aPD1-IL2 抗体或 20ug aPD1-abIL2 抗体蛋白。每周两次测量肿瘤大小；结果显示，与单独的 aPD1-IL2 抗体治疗相比，aPD1-abIL2 双特异抗体具有更好的治疗效果（图 7）。

实施例 3、aPD1-abIL2 能够激活 CD8 T 细胞

1、aPD1-abIL2 双特异抗体治疗效果不依赖于 NK 细胞

由于 CD25 (IL2 受体 α) 和 PD1 主要表达在活化的效应 T 细胞和 NK 细胞上，为了确定 aPD1-abIL2 抗体的治疗主要依赖于哪一群免疫细胞，我们分别进行了不同细胞群的删除实验。

BALB/c 小鼠皮下接种 2×10^6 A20 肿瘤细胞，在 17 天腹腔注射 20ug aPD1-abIL2 双功能分子。在治疗开始前一天腹腔注射 20ul NK 细胞删除性抗体，每 4 天一次，共注射 3 次。

在小鼠肿瘤实验中，删除 NK 细胞后 aPD1-abIL2 抗体仍然具有治疗效果，说明 NK 细胞不是抗体发挥治疗效果的主要效应细胞（图 8）。

2、aPD1-abIL2 抗体治疗效果依赖于 CD8 T 细胞

我们进一步验证 T 细胞在抗体治疗过程中发挥的作用。

BALB/c 小鼠皮下接种 2×10^6 A20 肿瘤细胞后第 17 天开始治疗，腹腔注射 20ug aPD1-abIL2 蛋白。在治疗的同时腹腔注射 200ug CD4 T 细胞删除性抗体（克隆号：GK1.5，本实验室制备）、200ug CD8 T 细胞删除性抗体（克隆号：TIB210，本实验室制备）或者同时注射两种删除性抗体，共注射三次。

CD4 T 和 CD8 T 细胞的删除实验表明，删除 CD4 T 细胞后抗体治疗效果无显著下降，但在删除 CD8 T 细胞后，治疗效果有明显的降低；同时删除 CD4 T 和 CD8 T 细胞后，抗体治疗效果也完全消失。说明 aPD1-abIL2 抗体的治疗效果依赖于 T 细胞，而且主要是 CD8 T 细胞（图 9 和图 10）。

实施例 4、aPD1-abIL2 双特异性抗体在人源化小鼠中具有更好地抗肿瘤活性

人源化小鼠皮下接种 2×10^6 A549 肿瘤细胞，在接种肿瘤后 D9 开始治疗；分别通过腹腔注射 10ug ahPD1 抗体加 10ugabIL2 或 20ug ahPD1-abIL2 抗体蛋白。每周两次测量肿瘤大小；结果显示，与联合抗体治疗相比，ahPD1-abIL2 双特异抗体具有更好的治疗效果（图 11）。

实施例 5、aPD1-abIL2 能够克服 T 细胞过继转移治疗不响应

Rag 敲除小鼠皮下接种 2×10^6 A20-HA 肿瘤细胞，12 天后过继转移 2×10^6 OTI 细胞，腹腔注射 20ug aPD1-abIL2 蛋白。每周两次测量肿瘤大小；结果显示，与单独的 T 细胞过继转移治疗相比，aPD1-abIL2 双特异抗体具有更好的治疗效果（图 12）。

实施例 6、aPD1-abIL2 能够克服 PDL1 抗体治疗不响应

在 A20 荷瘤小鼠肿瘤在 150mm^3 以下时，单独的 aPD1-abIL2 抗体治疗具有很好的清除作用。但是当肿瘤更大时，单独的抗体治疗只能控制肿瘤生长而不能完全清除；为了更好的提高治疗效果，我们将双特异性抗体和免疫检查点抑制性抗体联合使用观察能否提高治疗效果。

具体试验方案：在 BALB/c 小鼠皮下接种 2×10^6 A20 肿瘤细胞，在接种肿瘤后 D20 开始治疗；分别通过腹腔注射 50ug aPDL1 抗体或/和 20ug aPDL1-abIL2 抗体蛋白。每周两次测量肿瘤大小；结果显示，与单独的 aPDL1 抗体或 aPD1-abIL2 双特异抗体治疗相比，联合治疗具有更好的治疗效果（图 13）。

最后需要说明的是，以上实施例仅用作帮助本领域技术人员理解本发明的实质，不用于限制本发明的保护范围。

[参考文献]

1. Malek TR, and Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(9):665-74.
2. Rosenberg SA, Mule JJ, Spiess PJ, Reichert CM, and Schwarz SL. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *The Journal of experimental medicine*. 1985;161(5):1169-88.
3. Murphy K, Travers P, and Walport M. In: Murphy K, Travers P, and Walport M eds. *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science; 2008:323-79.
4. Cousens LP, Orange JS, and Biron CA. Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol*. 1995;155(12):5690-9.
5. Su HC, Cousens LP, Fast LD, Slifka MK, Bungiro RD, Ahmed R, et al. CD4+ and CD8+ T cell interactions in IFN-gamma and IL-4 responses to viral infections: requirements for IL-2. *J Immunol*. 1998;160(10):5007-17.
6. Blattman JN, Grayson JM, Wherry EJ, Kaech SM, Smith KA, and Ahmed R. Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nature medicine*. 2003;9(5):540-7.
7. D'Souza WN, Schluns KS, Masopust D, and Lefrancois L. Essential role for IL-2 in the regulation of antiviral extralymphoid CD8 T cell responses. *J Immunol*. 2002;168(11):5566-72.

8. Suzuki H, Duncan GS, Takimoto H, and Mak TW. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *The Journal of experimental medicine*. 1997;185(3):499-505.
9. Klapper JA, Downey SG, Smith FO, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, et al. High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma : a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006. *Cancer*. 2008;113(2):293-301.
10. McDermott DF, Regan MM, Clark JI, Flaherty LE, Weiss GR, Logan TF, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005;23(1):133-41.
11. Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Hwu P, et al. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(16):3127-32.
12. Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C, et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie. *N Engl J Med*. 1998;338(18):1272-8.
13. Boyman O, and Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(3):180-90.
14. Liao W, Lin JX, and Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*. 2013;38(1):13-25.
15. Moriggl R, Marine JC, Topham DJ, Teglund S, Sexl V, McKay C, et al. Differential roles of cytokine signaling during T-cell development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:389-95.
16. Skrombolas D, and Frelinger JG. Challenges and developing solutions for increasing the benefits of IL-2 treatment in tumor therapy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(2):207-17.
17. Panelli MC, White R, Foster M, Martin B, Wang E, Smith K, et al. Forecasting the cytokine storm following systemic interleukin (IL)-2 administration. *J Transl Med*. 2004;2(1):17.
18. Chavez AR, Buchser W, Basse PH, Liang X, Appleman LJ, Maranchie JK, et al. Pharmacologic administration of interleukin-2. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1182:14-27.
19. Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, and Reisfeld RA. An antibody-interleukin 2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(15):7826-31.
20. Gutbrodt KL, Casi G, and Neri D. Antibody-based delivery of IL2 and cytotoxics eradicates tumors in immunocompetent mice. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(7):1772-6.
21. Gutbrodt KL, Schliemann C, Giovannoni L, Frey K, Pabst T, Klapper W, et al. Antibody-based delivery of interleukin-2 to neovasculature has potent activity against acute myeloid leukemia. *Science translational medicine*. 2013;5(201):201ra118.
22. Du YJ, Lin ZM, Zhao YH, Feng XP, Wang CQ, Wang G, et al. Stability of the recombinant antiHerB2 scFvFcinterleukin2 fusion protein and its inhibition of HER2overexpressing tumor cells. *International journal of oncology*. 2013;42(2):507-16.
23. Gillies SD, Lan Y, Hettmann T, Brunkhorst B, Sun Y, Mueller SO, et al. A low-toxicity IL-2-based immunocytokine retains antitumor activity despite its high degree of IL-2 receptor selectivity. *Clin Cancer Res*. 2011;17(11):3673-85.
24. Yang RK, Kalogriopoulos NA, Rakhmilevich AL, Ranheim EA, Seo S, Kim K, et al. Intratumoral treatment of smaller mouse neuroblastoma tumors with a recombinant protein consisting of IL-2 linked to the hu14.18 antibody increases intratumoral CD8+ T and NK cells and improves survival. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2013;62(8):1303-13.
25. Carmenate T, Pacios A, Enamorado M, Moreno E, Garcia-Martinez K, Fuente D, et al. Human IL-2 mutein with higher antitumor efficacy than wild type IL-2. *J Immunol*. 2013;190(12):6230-8.
26. Levin AM, Bates DL, Ring AM, Krieg C, Lin JT, Su L, et al. Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 'superkine'. *Nature*. 2012;484(7395):529-33.
27. Rosalia RA, Arenas-Ramirez N, Bouchaud G, Raeber ME, and Boyman O. Use of enhanced interleukin-2 formulations for improved immunotherapy against cancer. *Current opinion in chemical biology*. 2014;23:39-46.
28. Tzeng A, Kwan BH, Opel CF, Navaratna T, and Wittrup KD. Antigen specificity can be irrelevant to immunocytokine efficacy and biodistribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(11):3320-5.

29. Zhu EF, Gai SA, Opel CF, Kwan BH, Surana R, Mihm MC, et al. Synergistic innate and adaptive immune response to combination immunotherapy with anti-tumor antigen antibodies and extended serum half-life IL-2. *Cancer cell*. 2015;27(4):489-501.

权利要求书

1、一种双功能分子，所述的双功能分子为异源二聚体，其特征在于，

所述的异源二聚体包括：

(1) 白介素 2 (IL2) 与免疫球蛋白 Fc 单链连接而成的第一单体；

(2) 抗 T 细胞表面分子的抗体的 Fab 或 ScFv 与免疫球蛋白 Fc 单链连接而成的第二单体；

所述的第一单体与第二单体通过 Fc 单链的二聚化连接，构成所述的异源二聚体；

所述的 T 细胞表面分子包括但不限于：PD1、TIM-3、LAG-3、OX40、4-1BB、ICOS、GITR。

2、根据权利要求 1 所述的双功能分子，其特征在于，所述的免疫球蛋白 Fc 单链为天然免疫球蛋白 Fc 单链或通过基因突变敲除 ADCC 效应的免疫球蛋白 Fc 单链；优选的，所述的免疫球蛋白 Fc 单链为人 IgG 的 Fc 单链。

3、根据权利要求 1 任一所述的双功能分子，其特征在于，

所述的第二单体中，

所述的抗体的 Fab 为人源化抗体的 Fab 或全人化抗体的 Fab；

所述的抗体的 ScFv 为人源化抗体的 ScFv 或全人化抗体的 ScFv；

优选的，所述的第二单体为：

抗 T 细胞表面分子的抗体的单体，所述抗体的单体包含一条轻链和一条重链；

更优选的，所述的第二单体为：

人源化抗 T 细胞表面分子的抗体的单体或全人化抗 T 细胞表面分子的抗体的单体，所述抗体的单体包含一条轻链和一条重链。

4、根据权利要求 1-3 任一所述的双功能分子，其特征在于，

所述的 T 细胞表面分子为 PD1，

所述的抗 T 细胞表面分子的抗体为抗 PD1 的抗体 (aPD1)。

5、根据权利要求 1-4 任一所述的双功能分子，其特征在于，

所述的异源二聚体包括：

(1) 第一单体，所述的第一单体自 N 端开始依次包含：

1) 序列如 SEQ ID NO.1 所示的野生型 IL-2 蛋白；或所述的野生型 IL-2 蛋白的突变体，所述的野生型 IL-2 蛋白的突变体中包含如下任一或任意组合的突变位点：R38L、F42A、D20K、R38A、F42K 和 K43E；

2) 必要的连接结构 (G4S 连接序列)，优选的，所述的连接序列如 SEQ ID NO.6 所示；

3) 序列如 SEQ ID NO.2 所示的 IgG 的 Fc 单链、或如 SEQ ID NO.3 所示的敲除 ADCC 效应的突变型的 IgG 的 Fc、或如 SEQ ID NO.4 所示的 knob 突变型 Fc、或如 SEQ ID NO.5 所示的 hole 突变型 Fc;

(2) 第二单体, 所述的第二单体包含:

1) 序列如 SEQ ID NO.7 所示的抗 PD1 抗体轻链 VL-KCL 和序列如 SEQ ID NO.8 所示的抗 PD1 抗体重链 VH&CH1 组成的抗 PD1 抗体 Fab 区; 或,

序列如 SEQ ID NO.9 所示的抗 PD1 单链抗体 (ScFv);

和,

2) 序列如 SEQ ID NO.2 所示的 IgG 的 Fc 单链、或如 SEQ ID NO.3 所示的敲除 ADCC 效应的突变型的 IgG 的 Fc、或如 SEQ ID NO.4 所示的 knob 突变型 Fc、或如 SEQ ID NO.5 所示的 hole 突变型 Fc。

6、根据权利要求 1-5 任一所述的双功能分子, 其特征在于,

所述的异源二聚体包括:

第一单体: 其为序列如 SEQ ID NO.10 所示的多肽 (abIL2-Fc);

第二单体: 其为:

(1) 由序列如 SEQ ID NO.7 所示的抗 PD1 抗体轻链 VL-KCL 和序列如 SEQ ID NO.11 所示的抗 PD1 抗体 VH-CH1-Fc (knob) 所组成的抗 PD1 抗体的 Fab 构建体;

或 (2) 序列如 SEQ ID NO.12、22 所示的多肽 (aPD1ScFv-Fc (knob))。

7、根据权利要求 5 任一所述的双功能分子, 其特征在于,

所述的第二单体包含:

1) 序列如 SEQ ID NO.13 所示的抗 PD1 抗体(K)轻链与序列如 SEQ ID NO.14 所示的抗 PD1 抗体(K)重链 VH&CH1 组成的抗体 Fab 区;

或: 2) 序列如 SEQ ID NO.15 所示的抗 PD1 单链抗体(K) (ScFv);

和: 3) 序列如 SEQ ID NO.2 所示的 IgG 的 Fc 单链、或如 SEQ ID NO.3 所示的 No-ADCC 突变型的 IgG 的 Fc、或如 SEQ ID NO.4 所示的 knob 突变型 Fc、或如 SEQ ID NO.5 所示的 hole 突变型 Fc。

8、根据权利要求 6 所述的双功能分子, 其特征在于,

所述的第二单体为:

(1) 序列如 SEQ ID NO.16 所示的多肽 (aPD1(K) VH-CH1-Fc (knob)) 和序列如 SEQ ID NO.13 所示的抗 PD1 抗体轻链可变区组成的抗 PD1 抗体的 Fab 构建体; 或

(2) 序列如 SEQ ID NO.17 或 SEQ ID NO.22 所示的多肽 (a PD1(K)ScFv-Fc (knob))。

9、一种双功能分子，所述的双功能分子为同源二聚体，其特征在于，

所述的同源二聚体的单体为：

一分子白介素 2 (abIL2) 与一分子抗 PD1 的抗体 (aPD1) 的 Fab 通过任意方式连接构成的单体，
或，

一分子白介素 2 (abIL2) 与一分子抗 PD1 的抗体 (aPD1) 的 (ScFv) 通过任意方式连接构成的单体。

10、根据权利要求 9 所述的双功能分子，其特征在于，

所述的同源二聚体的单体自 N 端开始依次包含：

(1) 如 SEQ ID NO.1 所示的野生型白介素 2、或所述的野生型白介素 2 的突变体，所述的突变体中包含如下任一或任意组合的突变位点；R38L、F42A、D20K、R38A、F42K 和 K43E；

(2) 必要的连接结构 (G4S 连接序列)，优选的，所述的连接序列如 SEQ ID NO.6 所示；

(3) 抗 PD1 的抗体 (aPD1) 的 Fab/ScFv；所述的 Fab 为人源化抗体的 Fab 或全人化抗体的 Fab，所述的 ScFv 为人源化抗体的 ScFv 或全人化抗体的 ScFv；

(4) 抗体的 Fc；所述的抗体 Fc 为全人野生型 Fc 或 No-ADCC 突变型 Fc。

11、根据权利要求 9 所述的双功能分子，其特征在于，

所述的同源二聚体的单体为：

(1) SEQ ID NO.18 (aPD1-abIL2: aPD1(ScFv)-Fc-abIL2) 所示的多肽，或

(2) SEQ ID NO.19 (abIL2-aPD1: abIL2-aPD1(ScFv)-Fc) 所示的多肽，或

(3) SEQ ID NO.20 (aPD1(K)-abIL2: aPD1(K)(ScFv)-Fc-abIL2) 所示的多肽，或

(4) SEQ ID NO.21 (IL2-a PD1(K): IL2-aPD1(K)(ScFv)-Fc) 所示的多肽。

12、权利要求 1-11 任一所述的双功能分子的如下应用：

(1) 制备抗肿瘤药物；

(2) 制备与免疫检查点抑制剂联用的抗肿瘤药物；

(3) 制备克服免疫检查点抑制剂耐受的抗肿瘤药物；

(4) 制备与 T 细胞过继转移联用的抗肿瘤药物；

(5) 制备克服 T 细胞过继转不响应的抗肿瘤药物。

13、根据权利要求 12 所述的应用，其特征在于，所述的免疫检查点抑制剂为抗 PDL1 的拮抗剂，优选的，所述的抗 PDL1 的拮抗剂为抗 PDL1 的抗体。

14、根据权利要求 12 所述的应用，其特征在于，所述的 T 细胞为抗肿瘤 T 细胞；更优选的，所述的 T 细胞为抗肿瘤 CAR T 细胞或其结构类似物。

15、包含权利要求 1-12 任一所述的双功能分子的药物或药物组合物。

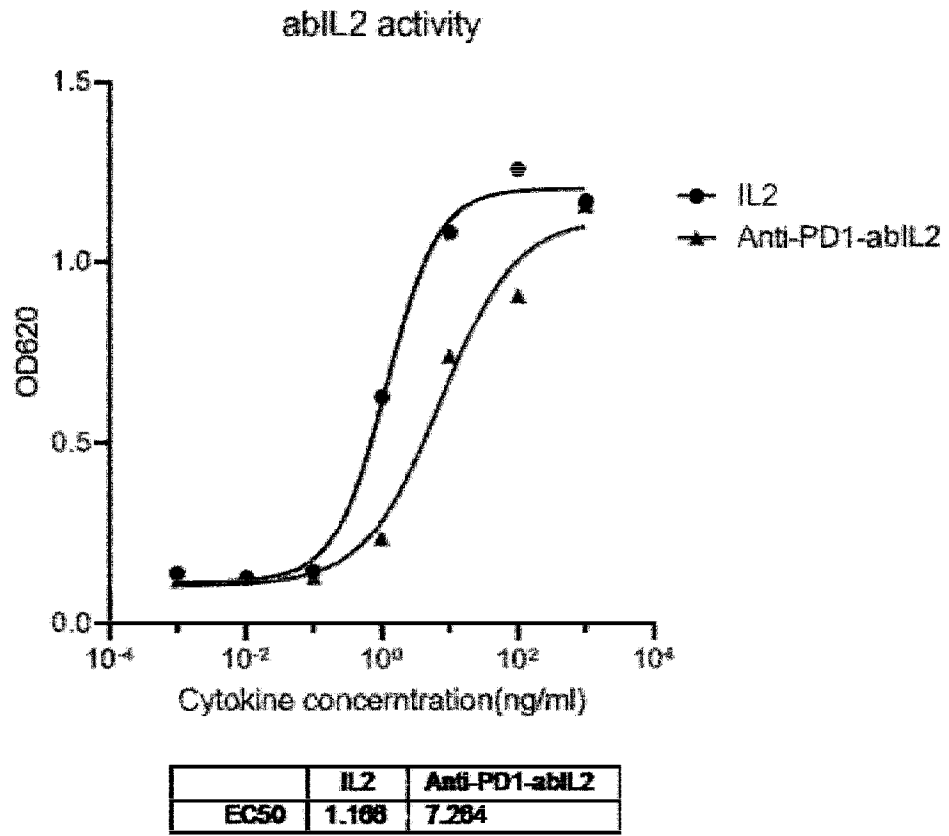


图 1

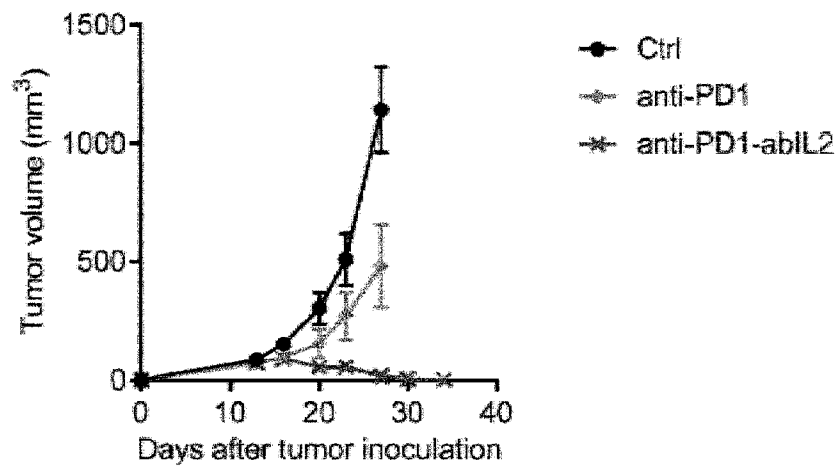


图 2

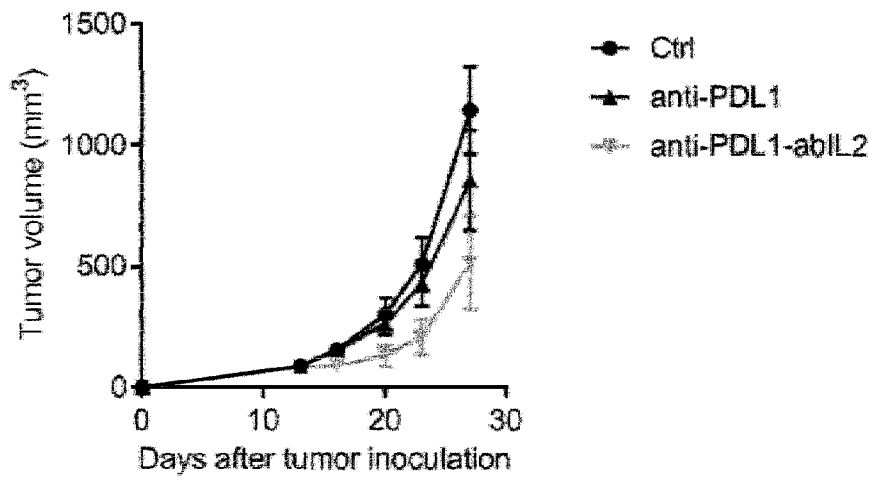


图 3

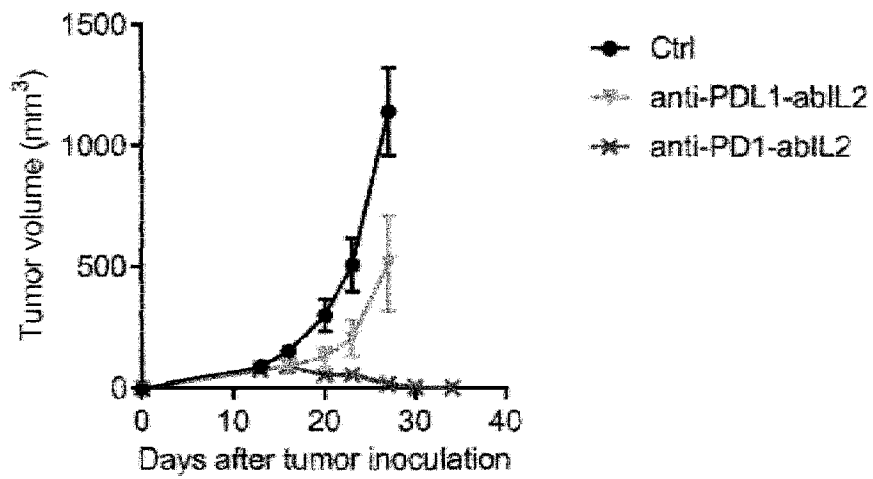


图 4

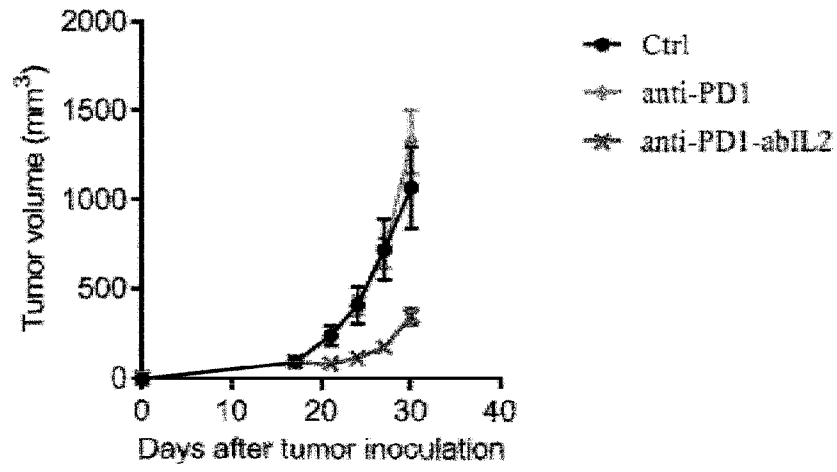


图 5

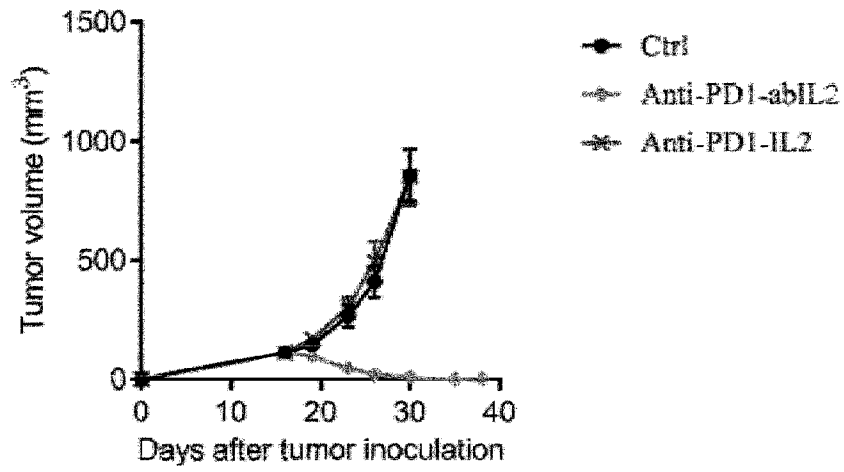


图 6

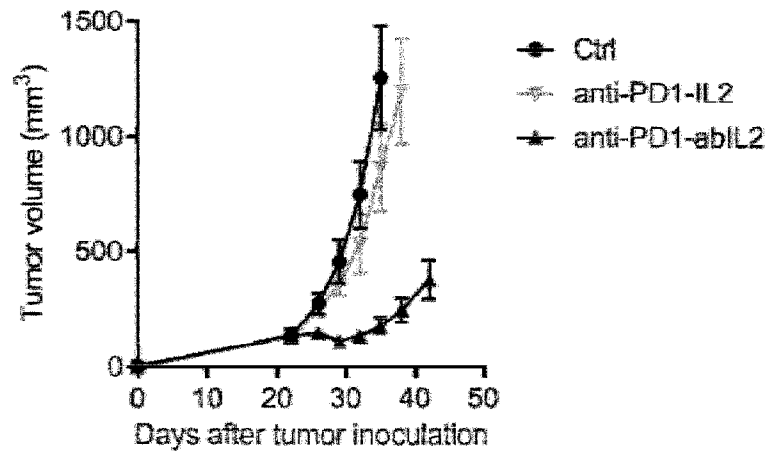


图 7

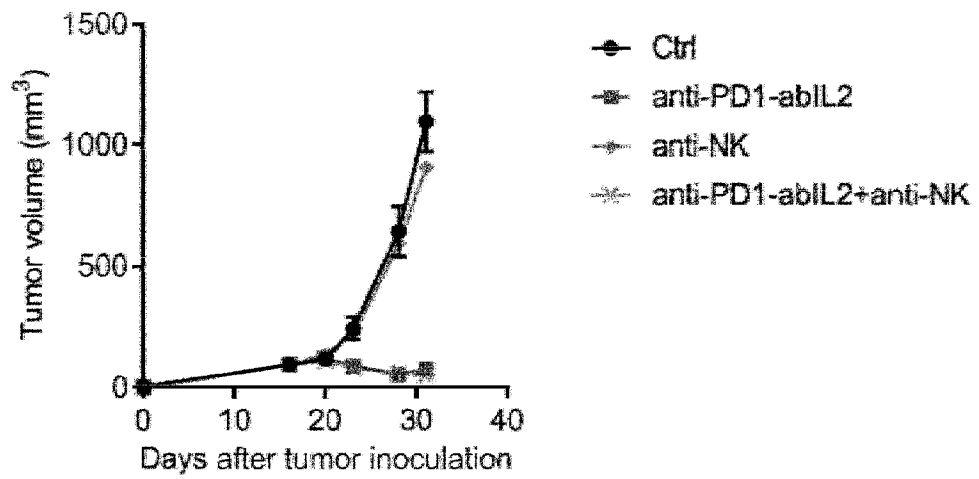


图 8

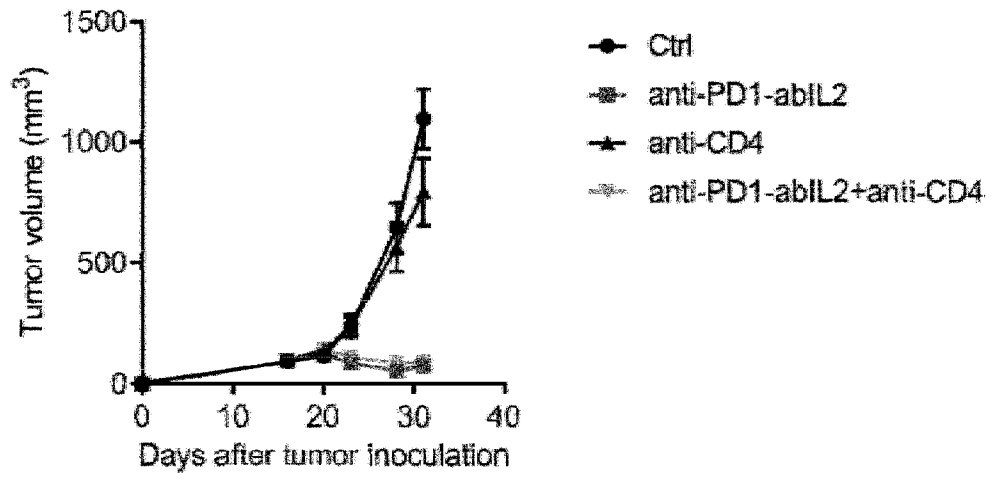


图 9

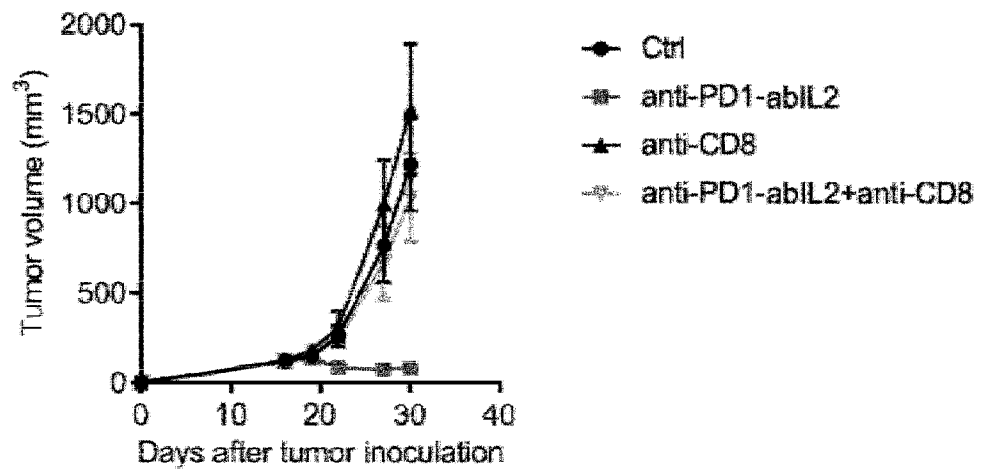


图 10

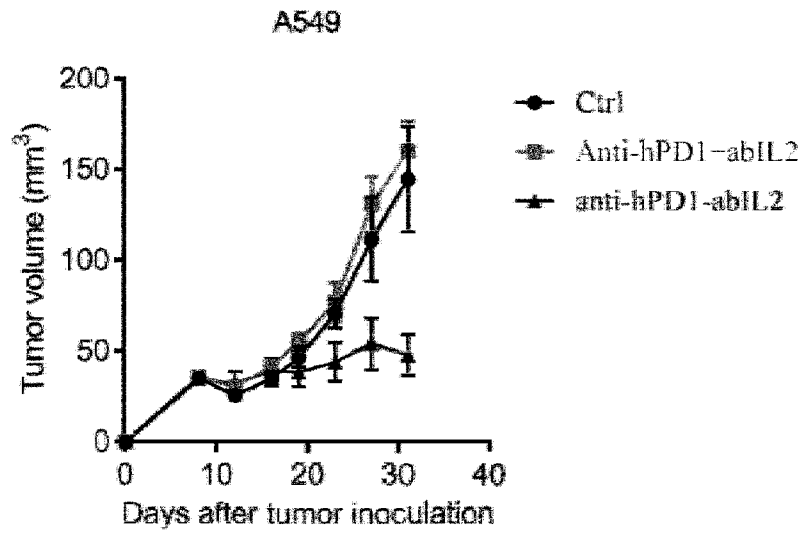


图 11

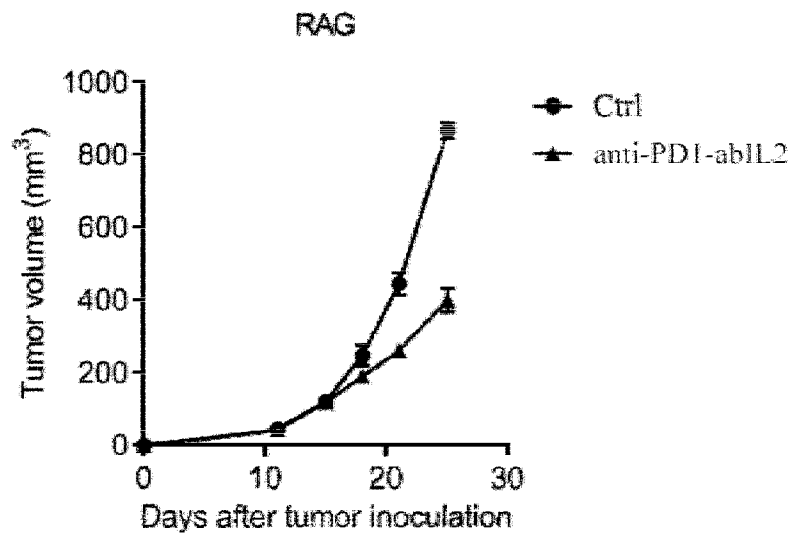


图 12

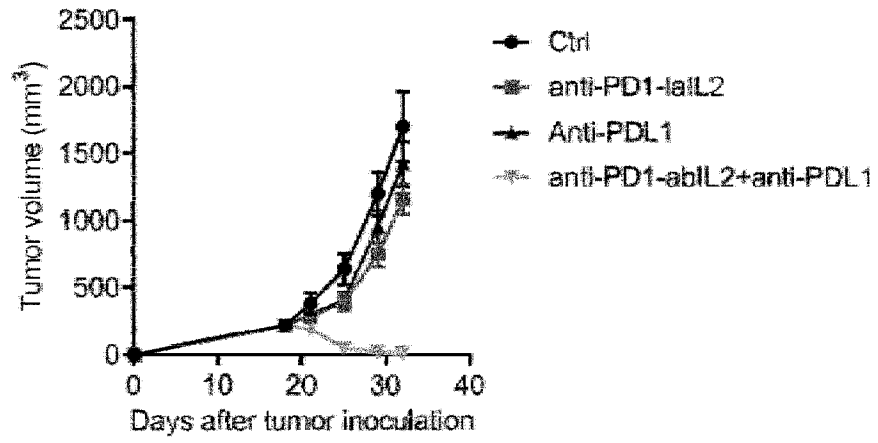


图 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/072903

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K19/00(2006.01)i;C12N15/62(2006.01)i;A61K39/395(2006.01)i;A61K47/68(2017.01)i;A61K45/06(2006.01)i;A61P35/00(2006.01)i;A61K38/20(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) IPC: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) VEN; CNABS; CNTXT; USTXT; WOTXT; EPTXT; PubMed; ISI Web of knowledge; Genbank; EMBL-EBI; CNKI; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 中国科学院生物物理研究所, 白介素2, 白细胞介素2, IL-2, IL2, 抗体, antibody, PD1, PD-1, 融合, fusion, Fc, TIM-3, LAG-3, OX40, 4-1BB, ICOS, GITR, 针对序列1-21的检索, Retrieval for sequences 1-21		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114437228 A (INSTITUTE OF BIOPHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 06 May 2022 (2022-05-06) claims 1-18	1-15
X	WO 2020259536 A1 (NANJING GENSCRIPT BIOTECH CO., LTD.) 30 December 2020 (2020-12-30) claims 1-26, description, page 15, lines 16-31, and page 16, lines 1-18, and figures 1-13	9, 12-15
A	WO 2020259536 A1 (NANJING GENSCRIPT BIOTECH CO., LTD.) 30 December 2020 (2020-12-30) claims 1-26, description, page 15, lines 16-31, and page 16, lines 1-18, and figures 1-13	1-8, 10, 11
A	CN 110256583 A (INSTITUTE OF BIOPHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 20 September 2019 (2019-09-20) claims 1-9	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 04 May 2023		Date of mailing of the international search report 18 May 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/072903

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.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/CN2023/072903

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114437228	A	06 May 2022	None			
WO	2020259536	A1	30 December 2020	EP	3988576	A1	27 April 2022
				US	2022235133	A1	28 July 2022
				CN	114008082	A	01 February 2022
CN	110256583	A	20 September 2019	CN	110256583	B	20 May 2022

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K19/00(2006.01)i;C12N15/62(2006.01)i;A61K39/395(2006.01)i;A61K47/68(2017.01)i;A61K45/06(2006.01)i;A61P35/00(2006.01)i;A61K38/20(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>IPC: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>VEN;CNABS;CNTXT;USTXT;WOTXT;EPTXT;PubMed;ISI Web of knowledge;Genbank;EMBL-EBI;CNKI;中国专利生物序列检索系统:中国科学院生物物理研究所,白介素2,白细胞介素2,IL-2,IL2,抗体,antibody,PD1,PD-1,融合,fusion,Fc,TIM-3,LAG-3,OX40,4-1BB,ICOS,GITR,针对序列1-21的检索</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>PX</td> <td>CN 114437228 A (中国科学院生物物理研究所) 2022年5月6日 (2022 - 05 - 06) 权利要求1-18</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2020259536 A1 (南京金斯瑞生物科技有限公司) 2020年12月30日 (2020 - 12 - 30) 权利要求1-26、说明书第15页第16-31行、说明书第16页第1-18行、图1-13</td> <td>9、12-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2020259536 A1 (南京金斯瑞生物科技有限公司) 2020年12月30日 (2020 - 12 - 30) 权利要求1-26、说明书第15页第16-31行、说明书第16页第1-18行、图1-13</td> <td>1-8、10、11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110256583 A (中国科学院生物物理研究所) 2019年9月20日 (2019 - 09 - 20) 权利要求1-9</td> <td>1-15</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	PX	CN 114437228 A (中国科学院生物物理研究所) 2022年5月6日 (2022 - 05 - 06) 权利要求1-18	1-15	X	WO 2020259536 A1 (南京金斯瑞生物科技有限公司) 2020年12月30日 (2020 - 12 - 30) 权利要求1-26、说明书第15页第16-31行、说明书第16页第1-18行、图1-13	9、12-15	A	WO 2020259536 A1 (南京金斯瑞生物科技有限公司) 2020年12月30日 (2020 - 12 - 30) 权利要求1-26、说明书第15页第16-31行、说明书第16页第1-18行、图1-13	1-8、10、11	A	CN 110256583 A (中国科学院生物物理研究所) 2019年9月20日 (2019 - 09 - 20) 权利要求1-9	1-15
类型*	引用文件,必要时,指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 114437228 A (中国科学院生物物理研究所) 2022年5月6日 (2022 - 05 - 06) 权利要求1-18	1-15															
X	WO 2020259536 A1 (南京金斯瑞生物科技有限公司) 2020年12月30日 (2020 - 12 - 30) 权利要求1-26、说明书第15页第16-31行、说明书第16页第1-18行、图1-13	9、12-15															
A	WO 2020259536 A1 (南京金斯瑞生物科技有限公司) 2020年12月30日 (2020 - 12 - 30) 权利要求1-26、说明书第15页第16-31行、说明书第16页第1-18行、图1-13	1-8、10、11															
A	CN 110256583 A (中国科学院生物物理研究所) 2019年9月20日 (2019 - 09 - 20) 权利要求1-9	1-15															
<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>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</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>2023年5月4日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年5月18日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>		<p>授权官员</p> <p>王岩</p> <p>电话号码 (+86) 0512-88996411</p>															

第1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;
- b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。

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/CN2023/072903

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	114437228	A	2022年5月6日	无			
WO	2020259536	A1	2020年12月30日	EP	3988576	A1	2022年4月27日
				US	2022235133	A1	2022年7月28日
				CN	114008082	A	2022年2月1日
CN	110256583	A	2019年9月20日	CN	110256583	B	2022年5月20日