

免疫缀合物及其用途

本公开要求如下专利申请的优先权：于 2022 年 02 月 11 日提交，申请号为 CN202210127604.7，发明名称为“免疫缀合物及其用途”的中国专利申请；上述
5 专利申请的全部内容通过引用结合在本公开中。

技术领域

本公开涉及生物医药领域，具体涉及包含 PD-1 抗体和 IL-2 的免疫缀合物及其用于治疗癌症的方法和相关制药用途。

10

背景技术

人白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2)，也称为 T 细胞生长因子(TCGF)，基因位于 4 号染色体(4q27)，包括共 7kb 的序列，由 133 个氨基酸组成，分子量约 15kD。最初的体外细胞实验表明 T 细胞在通过 TCR 和 CD28 活化之后，可以分泌 IL-2 并在细胞表面表达 IL-2 受体(IL-2R)。IL-2 和其受体的结合可以引起 T 细胞的增殖和使 T 细胞产生效应。这一模型使得 IL-2 成为 T 细胞免疫反应中起到中心作用的一个分子。不过随后的体内实验发现在敲除 IL-2 或其受体后，动物产生了自身免疫。随后的实验表明 IL-2 不仅可以激活如 T 细胞和 NK 细胞的效应细胞，还可以激活调节性 T 细胞(Treg)，从而抑制过量的针对自身的免疫。

20 IL-2 通过细胞表面的 IL-2R 发生作用。IL-2R 包括三个亚基，IL-2R α (即 CD25)、IL-2R β (即 CD122)和 IL-2R γ (即 CD132)。三个亚基可以形成三种受体形式：高结合力受体包含所有三个亚基 IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ ，中结合力受体包含 IL-2R β/γ ，低结合力受体为 IL-2R α 。其中，IL-2R β 和 IL-2R γ 是 IL-2 激活下游信号通路所必需的，当 IL-2 同时结合 IL-2R β 和 IL-2R γ 时，两个受体亚基形成异源二聚体，磷酸化细胞内的
25 STAT5，进入细胞核导致相应的基因转录和表达；IL-2R α 并非信号传导所必需，但可以增强 IL-2 与 IL-2R β 和 IL-2R γ 的结合。Treg 持续表达高结合力受体 IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ ，而未被激活的 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞等只表达中结合力受体 IL-2R β/γ 。因此，低剂量 IL-2 优先结合并激活 Treg，而高剂量 IL-2 则也可以激活 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞等免疫效应细胞。由于具有激活免疫效应细胞的作用，高剂量 IL-2
30 可用于肿瘤免疫治疗。但是，高剂量 IL-2 治疗同时伴有严重的毒副作用，包括发热、腹泻、毛细血管渗漏综合征(capillary leak syndrome)等。这些副作用与外周 T 细胞和 NK 细胞的过度激活相关。降低或消除 IL-2 对外周 T 细胞和 NK 细胞的活性，并且特异性靶向肿瘤微环境或肿瘤相关免疫细胞，可以在避免 IL-2 引起的系统毒性的同时发挥其抗肿瘤效果。

35 PD-1(Programmed Cell death-1)属于 CD28 受体家族，是免疫抑制性受体(Riley 等人 2009, Immunol.Rev. 29:114-25)。该家族还包括 CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1

和 BTLA。PD-1 主要表达在活化的 B 细胞、T 细胞和骨髓细胞(Chen 等人 2013, Nat. Rev. Immunol. 13: 227-42), 有两种细胞表面的糖蛋白配体, 分别是 PD-L1 和 PD-L2。PD-L1 广泛表达于淋巴细胞(例如 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞、巨噬细胞等)以及如外周组织、各种肿瘤细胞和病毒感染细胞等。PD-L2 主要表达于活化的树突状细胞和巨噬细胞(Dong 等人 1999, Nat. Med. 5:1365-9)。PD-1 与其配体 PD-L1 或 PD-L2 结合后, 会下调 T 细胞的功能, 包括降低 T 细胞的活化、分化增殖和细胞因子的分泌等。

PD-1 具有在外周 T 细胞表面低表达或不表达, 但在肿瘤相关的 T 细胞表面高表达的特征。目前已有帕博利珠单抗、纳武单抗、卡瑞利珠单抗等多个 PD-1 单克隆抗体被开发出来用于肿瘤免疫治疗。这些单克隆抗体通过阻断肿瘤微环境中 PD-1 与配体之间的相互作用发挥药效, 在多个瘤种中取得良好的疗效。但是, 仍有相当部分的患者对 PD-1 单抗响应较差。比如在晚期非鳞状非小细胞肺癌中纳武单抗的响应率为 19%(Borghaei 等人 2015, N Engl J Med. 373:1627-39)。响应率低的部分原因可能是肿瘤浸润淋巴细胞水平较低(Daud 等人 2016, J. Clin. Invest. 126:3447-52), 和 T 细胞活化肿瘤微环境的缺失(Ayers 等人 2017, J. Clin. Invest. 127:2930-2940)。有临床研究表明 PD-1 与 IL-2 的联用可能具有很好的效果。只是这种 IL-2 具有一定的系统毒性, 例如流感样症状(86.8%)、皮疹(78.9%)、乏力(73.7%)(Diab 等人 2020, Cancer Discov. 10:1158-1173), 限制了药效的发挥。

现有技术中, 缺少可同时利用 IL-2 增强 PD-1 抗肿瘤效果, 并且避免 IL-2 相关毒性的方案。本公开提供一种免疫缀合物, 其包含 PD-1 抗体和 IL-2 或其变体, 该 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与高亲合力受体(IL-2R α / β / γ)和中等亲合力受体(IL-2R β / γ)的亲合力, 具有较之野生型 IL-2 消除的与低亲合力受体(IL-2R α)的亲合力, 且对高亲合力受体的亲合力比对中等亲合力受体的亲合力降低得更多。由于具有相对野生型 IL-2 降低的与 IL-2R α / β / γ 和 IL-2R β / γ 的亲合力, 该免疫缀合物对低表达或不表达 PD-1 的免疫细胞无活性, 但能够从两方面发挥激活高表达 PD-1 的免疫细胞的功能。一方面, 通过 PD-1 抗体阻断 PD-1/PD-L1 和 PD-1/PD-L2 相互作用, 解除肿瘤对 T 细胞的免疫抑制; 另一方面, 该免疫缀合物结合 T 细胞表面 PD-1, 并且只有在结合 PD-1 时, 其 IL-2 变体才能通过顺式(in-cis)作用结合该细胞表面的 IL-2 受体, 从而发挥 IL-2 变体对 PD-1 阳性 T 细胞的激活作用。通过这种设计, 可利用 IL-2 变体增强 PD-1 抗体对于 T 细胞的活化与增殖以及抗肿瘤效果, 同时增加了 IL-2 对 PD-1 阳性免疫细胞的特异性, 避免了野生型 IL-2 中常见的系统毒性, 这为临床治疗肿瘤提供了更优效的解决方案。

发明内容

本公开提供 PD-1 抗体或其抗原结合片段。以及提供 IL-2 变体。以及, 提供免疫缀合物, 所述免疫缀合物含有抗原结合结构域(例如 PD-1 结合结构域)和细胞因

子(例如 IL-2 或其变体)。以及, 提供 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体、免疫缀合物的编码核酸、载体、宿主细胞、药物组合物、其用于治疗或预防疾病或病症(例如癌症)的方法和相关制药用途。

PD-1 抗体或其抗原结合片段

5 本公开提供 PD-1 抗体或其抗原结合片段, 其包含 PD-1 结合结构域, 所述 PD-1 结合结构域包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含:

SEQ ID NO: 3、13-15、17-35、88-92 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 或

10 SEQ ID NO: 2、16 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3,

所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。所述免疫球蛋白单一可变结构域是特异性结合 PD-1 抗原或其片段的。

本公开提供 PD-1 抗体或其抗原结合片段, 其包含 PD-1 结合结构域, 所述 PD-1
15 结合结构域包含上述 CDR1、CDR2 和 CDR3 中的任意一个或其任意组合。

一些实施方案中, 前述 PD-1 结合结构域, 根据 Kabat 编号系统, 所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别

如 SEQ ID NO: 97、100、101 所示,

如 SEQ ID NO: 7、36、37 所示,

20 如 SEQ ID NO: 97、98、99 所示, 或

如 SEQ ID NO: 4、5、6 所示。

一些实施方案中, 前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 或 93 所示, CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8、38-40、94-95 任一所示, CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9、41、42、
25 96 任一所示;

一些实施方案中, 前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、38、41 所示。

一些实施方案中, 前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、38、96 所示。

30 一些实施方案中, 前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、94、41 所示。

一些实施方案中, 前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 93、94、41 所示。

一些实施方案中, 前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的
35 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 93、94、96 所示。

一些实施方案中, 前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的

CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 93、95、96 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、8、9 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的
5 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、8、42 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、38、6 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、39、9 所示。

10 一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、40、6 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、8、41 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的
15 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、8、42 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、38、41 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、38、42 所示。

20 一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、39、41 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、39、42 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的
25 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、40、41 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、40、42 所示。

一些实施方案中，前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段中的免疫球蛋白单一可变结构域为人源化的、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的。一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域经过亲合力成熟获得的，其在一个或多个 CDR 中具有一个或多个变化，所述变化导致对 PD-1 的亲合力相比于亲本有所增加。

一些具体实施方案中，人源化改造过程使用人种系模板的重链框架区 IGHV3-23 *01 或 IGHV3-23*04。

35 一些实施方案中，前述 PD-1 结合结构域中所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO: 3、13-15、17-35、88-92 任一所示的氨基酸序列，或如 SEQ ID NO:

2、16 任一所示的氨基酸序列，或与前述任一序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90% 序列同一性的序列。

一些实施方案中，前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段中包含或为特异性结合 PD-1 或其片段的抗体或其抗原结合片段；所述抗体或其抗原结合片段例如为骆驼
5 抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其抗原结合片段；所述抗体或其抗原结合片段例如为重组抗体或其片段。一些具体实施方案中，抗原结合片段为线性抗体、单链抗体、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二- scFv、串联三-scFv)。

一些实施方案中，前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段中的至少一个免疫球蛋白
10 单一可变结构域是 VHH。

一些实施方案中，前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其包含一个或多个(例如 2、3、4、5、6 个)前述免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域可以是相同或不同的，可以形成二聚体或多聚体分子。

一些实施方案中，前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段，其中的 PD-1 结合结构
15 域包含：重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的 PD-1 结合结构域。例如，PD-1 结合结构域包含或者为 Fab，Fab'，(Fab')₂，ScFv，Fv 等。

一些具体的实施方案中，包含重链可变区和轻链可变区的 PD-1 结合结构域为 Fab。

一些具体的实施方案中，PD-1 抗体或其抗原结合片段，其包含 PD-1 结合结
20 构域 1 和 PD-1 结合结构域 2，或包含 PD-1 结合结构域 1，或包含 PD-1 结合结构域 2。其中，所述 PD-1 结合结构域 1 包含至少一个前述任一种的免疫球蛋白单一可变结构域。所述 PD-1 结合结构域 2 包含结合 PD-1 的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。

示例性的，所述 PD-1 结合结构域 2 选自如下 PD-1 抗体中的 PD-1 结合结构域：
25 派姆单抗(Pembrolizumab)，纳武单抗(Nivolumab)，信迪利单抗(Sintilimab)，替雷利珠单抗(Tislelizumab)，西米普利单抗(Cemiplimab)，特瑞普利单抗(Toripalimab)，卡瑞利珠单抗(Camrelizumab)，派安普利单抗，赛帕利单抗，萨善利单抗(Sasanlimab)，斯巴达珠单抗(Spartalizumab)，瑞弗利单抗(Retifanlimab)，巴替利单抗(Balstilimab)，西利单抗(Cetrelimab)，多塔利单抗(Dostarlimab；TSR-042)，
30 CS-1003，SCT-I10A，SSI-361，MEDI-0680(AMP-514)，BAT-1306，JTX-4014，JTX-4014，BI-754091，AK-103。

另一些实施方案中，所述免疫缀合物中的 PD-1 结合结构域 2 选自如下抗体的抗原结合结构域：PD-L1 抗体(例如，度伐鲁单抗(Durvalumab)、阿特殊单抗(Atezolizumab)、度伐利尤单抗(Durvalumab)、阿维单抗(Avelumab)、阿得贝利单抗
35 (Adebrelimab)、恩弗利单抗(Envafolimab)、STI-A1110、CS-1001、TQB-2450、KL-A167、IMC-001、CX-072)；CTLA-4 抗体(例如，曲美目单抗(Tremelimumab)、

伊匹单抗(Ipilimumab)); 4-1BB 抗体(例如, 乌瑞鲁单抗(Urelumab)、乌托鲁单抗(Utomilumab))。

所述抗原结合结构域(例如, PD-1 结合结构域 2)为所述抗体(例如, PD-1 抗体)结合抗原(例如, PD-1)的部分, 例如, 其 Fab'、F(ab')₂, 或其重链可变区和轻链可变区, 或含有其重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 的结构域。

一些实施方案中, 所述 PD-1 结合结构域 2 包含派姆单抗或其抗原结合片段(例如 Fab), 例如, 包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL), 其中, 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 54、55、56 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 57、58、59 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。一些具体实施方案中, 所述重链可变区为 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列的 Fab 重链中的重链可变区, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列的 Fab 轻链中的轻链可变区。

一些实施方案中, 前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段还包含人免疫球蛋白 Fc 区; 例如, 所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 区。所述 Fc 区可以具有突变, 示例性突变是 IgG1 上的 L234A/L235A, IgG2 上的 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, IgG4 上的 F234A/L235A, IgG4 上的 S228P/F234A/L235A, IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 上的 N297A, IgG2 上的 V234A/G237A, IgG1 上的 K214T/E233P/L234V/L235A/G236 缺失/A327G/P331A/D365E/L358M, IgG2 上的 H268Q/V309L/A330S/P331S, IgG1 上的 L234F/L235E/D265A, IgG1 上的 L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, IgG4 上的 S228P/F234A/L235A/G237A/P238S, 以及 IgG4 上的 S228P/F234A/L235A/G236 缺失/G237A/P238S。还可使用杂合 IgG2/4Fc 域, 例如具有来自 IgG2 的残基 117-260 和来自 IgG4 的残基 261-447 的 Fc。一些具体的实施方案中, 所述人 IgG4 的 Fc 区具有 S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 突变。一些具体的实施方案中, 所述人 IgG1 的 Fc 区具有 L234A/L235A 或 L234A/L235A/P329G 突变。一些具体的实施方案中, 所述人 IgG1 的 Fc 区具有或不具有 C220S 突变。

上述位于 Fc 区的突变根据 EU 编号规则编号。

一些实施方案中, 前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段中包含的 Fc 区可以使所述结合蛋白形成二聚体分子, 同时延长所述结合蛋白的体内半衰期。

一些实施方案中, 前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段中免疫球蛋白单一可变结构域与 Fc 区通过连接子连接。所述连接子可以是长 1-20 个或更多个氨基酸、无二级以上结构的非功能性氨基酸序列。例如, 所述连接子是柔性连接子, 例如 G₄S、GS、GAP、(G₄S)₂、(G₄S)₃、(G₄S)₄、(G₄S)₅、ASGS 等。

一些实施方案中, 前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段, 具有选自以下至少一项

的活性:

- (a) 以 $\leq 10^{-7}$ 的 K_D 值与人 PD-1 或其表位结合;
- (b) 抑制 PD-1 与 PD-L1 的结合;
- (c) 抑制 PD-1 与 PD-L2 的结合;
- 5 (d) 诱导 $CD4^+T$ 细胞分泌 IFN- γ ;
- (e) 增强 PBMC 的活化;
- (f) 增强 T 细胞的活化;
- (g) 抑制肿瘤生长。

一些实施方案中, 本公开的前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段结合 PD-1 的 K_D 值可以 $\leq 1 \times 10^{-7}M$, 例如 $\leq 1 \times 10^{-8}M$, 或 $\leq 1 \times 10^{-9}M$, 或 $\leq 1 \times 10^{-10}M$ 。

一些实施方案中, 本公开的 PD-1 抗体或其抗原结合片段能够特异性结合人 PD-1 并阻断 PD-1 和 PD-L1, 和/或 PD-1 和 PD-L2 的相互作用。

一些实施方案中, 本公开的前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段能够抑制肿瘤生长至少约 10%, 例如至少约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%。

一些实施方案中, 本公开的前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段涵盖变体, 例如与 SEQ ID NO:2-3、13-35 任一相比, 包含一或多个氨基酸取代, 优选保守氨基酸取代, 例如, 包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守氨基酸取代, 所述取代可以发生在 CDR 区和/或 FR 区。

一些实施方案中, 本公开的前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段对热处理具有抗性或具有较高的稳定性。例如, 在 40°C 下处理多达 30 天未见明显聚集或降解, 至少在 60°C 稳定。

一些实施方案中, 提供 PD-1 抗体或其抗原结合片段, 其与前述本公开的 PD-1 抗体或其抗原结合片段中的免疫球蛋白单一可变结构域结合或竞争结合相同的表位。

一些实施方案中, 提供 PD-1 抗体或其抗原结合片段, 其阻断前述本公开的 PD-1 抗体或其抗原结合片段中的免疫球蛋白单一可变结构域与 PD-1(例如人 PD-1) 的结合。

一些实施方案中, 提供 PD-1 抗体或其抗原结合片段, 其与 PD-1(例如人 PD-1) 的结合被前述本公开的 PD-1 抗体或其抗原结合片段中的免疫球蛋白单一可变结构域阻断。

一些实施方案中, 前述本公开的 PD-1 抗体或其抗原结合片段使 PD-1 与 PD-L1 和/或 PD-L2 的结合降低至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98%。

一些实施方案中, 本公开提供 PD-1 结合蛋白, 其包含至少一个前述结合 PD-1 的免疫球蛋白单一可变结构域(如 VHH)。

如前所述的，以及本公开中，“至少 90%同一性”包含至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%同一性。

IL-2 及其变体

5 本公开提供 IL-2 及其变体。所述 IL-2 优选为人 IL-2，野生型人 IL-2 的氨基酸序列示例如 SEQ ID NO:87。本公开的 IL-2 变体的位置是根据 SEQ ID NO:87 所示的野生型 IL-2 氨基酸序列编号。

一些实施方案中，本公开提供 IL-2 变体，其具有较之野生型 IL-2 降低的与高亲和力受体(IL-2R α / β / γ)和中等亲和力受体(IL-2R β / γ)的亲和力，和/或，具有较之野生型 IL-2 消除的与低亲和力受体(IL-2R α)的亲和力。一些具体实施方案中，所述
10 IL-2 变体对 IL-2R α / β / γ 的亲和力比对 IL-2R β / γ 的亲和力降低得更多。所述亲和力可以通过常规方法检测，例如 ELISA、ForteBio、SPR，例如本公开实施例 13 提供的 SPR 检测方法。

一些实施方案中，本公开提供 IL-2 变体，其包含如下突变(i)、突变(ii)、突变
15 (iii)、突变(iv)或其任意组合，或由突变(i)、突变(ii)、突变(iii)、突变(iv)或其任意组合组成。

关于突变(i)：

本公开提供使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 改变(例如升高或降低)的与 IL-2R β / γ 的亲合力的突变。

20 一些实施方案中，IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与 IL-2R β / γ 的亲合力的突变(i)。一些具体实施方案中，所述 IL-2 变体较之野生型 IL-2，与 IL-2R β / γ 的亲和力降低 1-1000 倍、2-800 倍、5-500 倍、5-200 倍、10-200 倍、10-100 倍、10-50 倍、20-200 倍、20-100 倍、5-20 倍、2-20 倍、50-100 倍、50-70 倍，例如约 5、约 10、约 13、约 15、约 20、约 30、约 40、约 50、约 60、约 63、约 70、约 80、约
25 90、约 100、约 110、约 120、约 130、约 140、约 150、约 180、约 200、约 250、约 300、约 400、约 500 倍。一些具体实施方案中，所述 IL-2 变体较之野生型 IL-2，与 IL-2R β / γ 的亲和力降低 10-100 倍。所述亲和力可以通过常规方法检测，例如本公开实施例 13 提供的 SPR 检测方法。

一些实施方案中，前述突变(i)位于 IL-2 的位置 12-20、位置 84-95、和位置
30 126-130。

一些实施方案中，前述突变(i)选自位置 12, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 43, 69, 84, 87, 88, 91, 92, 95, 123, 126, 127, 129, 130 或其任意组合；一些实施方案中，所述突变选自位置 L12, E15, H16, L18, L19, D20, M23, Q22, K43, V69, D84, S87, N88, V91, I92, E95, T123, Q126, S127, I129 和 S130
35 或其任意组合，例如 N88/D20；一些具体实施方案中，所述突变选自 12R, 12K, 12E, 12Q, 15Q, 15R, 15A, 15S, 16N, 16A, 16E, 16D, 16G, 16S, 16T, 16V,

16P, 20A, 20H, 20Y, 20N, 20Q, 20E, 20R, 20S, 23A, 23R, 23K, 23G, 23S, 23T, 23V, 23P, 87K, 87A, 84S, 84L, 84N, 84V, 84H, 84Y, 84R, 84K, 84G, 84A, 84T, 84P, 88D, 88A, 88S, 88E, 88T, 88R, 88I, 91A, 91T, 91E, 91I, 91L, 91D, 91N, 91Q, 91S, 91H, 92E, 92T, 92K, 92R, 92L, 95S, 95A, 95R, 95Q, 95G, 95T, 95V, 95P, 95H, 95N, 123A, 123E, 123K, 123Q, 126D, 126L, 126A, 126S, 126T, 126E, 127A, 127E, 127K, 127Q, 84N/95Q, 84E/95Q, 84T/95Q, 84Q/95Q, 84T/16T, 84N/91I, 84T/126E, 84N/126E, 16T/84Q, 16T/91I; 一些具体实施方案中, 所述突变选自 L12R, L12K, L12E, L12Q, E15Q, E15R, E15A, E15S, H16N, H16A, H16E, H16D, H16G, H16S, H16T, H16V, H16P, D20A, D20H, D20Y, D20N, D20Q, D20E, D20R, D20S, M23A, M23R, M23K, M23G, M23S, M23T, M23V, M23P, S87K, S87A, D84S, D84L, D84N, D84V, D84H, D84Y, D84R, D84K, D84G, D84A, D84T, D84P, N88D, N88A, N88S, N88E, N88T, N88R, N88I, V91A, V91T, V91E, V91I, V91L, V91D, V91N, V91Q, V91S, V91H, I92E, I92T, I92K, I92R, I92L, E95S, E95A, E95R, E95Q, E95G, E95T, E95V, E95P, E95H, E95N, T123A, T123E, T123K, T123Q, Q126D, Q126L, Q126A, Q126S, Q126T, Q126E, S127A, S127E, S127K, S127Q, D84N/E95Q, D84E/E95Q, D84T/E95Q, D84Q/E95Q, D84T/H16T, D84N/V91I, D84T/Q126E, D84N/Q126E, H16T/D84Q, H16T/V91I; 一些实施方案中, 所述突变(i)选自 N88D, N88R, D20A, D20N, V91T, Q126D 或 H16A/D84S; 一些实施方案中, 所述突变(i)为 N88D 或 D20A。

关于突变(ii):

本公开提供使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 改变(例如降低)的与 IL-2R α 的亲合力, 或不与 IL-2R α 结合的突变。

一些实施方案中, IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与 IL-2R α 的亲合力, 或不与 IL-2R α 结合的突变(ii)。所述亲合力可以通过常规方法检测, 例如本公开实施例 13 提供的 SPR 检测方法。

一些具体实施方案中, 前述突变(ii)选自位置 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 62, 65, 68, 72 或其任意组合; 一些实施方案中, 所述突变选自 38A, 38D, 38E, 62Q, 42A, 42G, 42S, 42T, 42Q, 42E, 42N, 42D, 42R, 42K, 45A, 45G, 45S, 45T, 45Q, 45E, 45N, 45D, 45R, 45K, 65R, 65E, 65K, 65H, 65Y, 65Q, 65D, 65N, 68A, 68Q, 68K, 68R, 72G, 72A, 72S, 72T, 72Q, 72E, 72N, 72D, 72R, 72K; 一些实施方案中, 所述突变(ii)选自位置 K35, T37, R38, E62, P65, E68, F42, Y45, L72 或其任意组合; 一些实施方案中, 所述突变选自 R38A, R38D, R38E, E62Q, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, P65R, P65E, P65K, P65H, P65Y, P65Q, P65D, P65N, E68A, E68Q,

E68K, E68R, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, L72K; 一些实施方案中, 所述突变(ii)选自 F42A, Y45A, L72G, R38E/F42A, F42A/L72G, F42A/Y45A, Y45A/L72G 或 F42A/Y45A/L72G。

关于突变(iii):

5 本公开提供使 IL-2 变体具有提高的稳定性、表达量、纯度、成药性的突变(iii)。本公开全文引入 WO2020125743A 中的 IL-2 变体。

一些实施方案中, IL-2 变体具有突变(iii), 所述突变(iii)选自位置 11, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 70, 71, 72, 78, 82, 88, 132 或其任意组合; 一些实施方案中, 所述突变(iii)选自 26Q, 10 29S, 30S, 71Q, 11C, 132C, 70C, 82C, 27C, 78C 或其任意组合; 一些实施方案中, 所述突变(iii)选自位置 N26, N29, N30, N71, Q11, L132, L70, P82, G27, F78 或其任意组合; 一些实施方案中, 所述突变(iii)选自 N26Q, N29S, N30S, N71Q, Q11C/L132C, L70C/P82C, G27C/F78C 或其任意组合; 一些实施方案中, 所述突变(iii)选自 N26Q, N29S, N30S, N26Q/N29S/N71Q, N26Q/N29S, N26Q/N30S, 15 N26Q/N30S/Q11C/L132C, N26Q/N29S/L70C/P82C, N26Q/N30S/G27C/F78C。

关于突变(iv):

一些实施方案中, IL-2 变体含有突变(iv), 所述突变(iv)选自位置 3 和/或 125; 一些实施方案中, 所述突变(iv)选自位置 T3 和/或 C125; 一些实施方案中, 所述突变(iv)选自 3A, 3G, 3Q, 3E, 3N, 3D, 3R, 3K, 3P 和/或 125A, 125S, 125T, 20 125V 突变。一些实施方案中, 所述突变(iv)选自 T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K, T3P 和/或 C125A, C125S, C125T, C125V 突变。

作为示例, “突变 1/突变 2” 表示同时包含突变 1 和突变 2。

示例性 IL-2 变体

本公开提供 IL-2, 其包含或仅包含如下突变:

- 25 (a) F42A 和 N88D, N88A, N88S, N88E, N88T, N88R 或 N88I;
(b) F42A 和 D20A, D20H, D20Y, D20N, D20Q, D20E, D20R 或 D20S;
(c) F42A 和 Q126D, Q126L, Q126A, Q126S, Q126T 或 Q126E;
(d) F42A 和 V91A, V91T, V91E, V91I, V91L, V91D, V91N, V91Q, V91S
或 V91H;
30 (e) F42A/L72G 和 N88D, N88A, N88S, N88E, N88T, N88R 或 N88I;
(f) F42A/L72G 和 D20A, D20H, D20Y, D20N, D20Q, D20E, D20R 或 D20S;
(g) F42A/L72G 和 Q126D, Q126L, Q126A, Q126S, Q126T 或 Q126E;
(h) F42A/L72G 和 V91A, V91T, V91E, V91I, V91L, V91D, V91N, V91Q,
V91S 或 V91H;
35 (s) F42A/R38E 和 V91A, V91T, V91E, V91I, V91L, V91D, V91N, V91Q,
V91S 或 V91H;

- (i) 为前述(a)-(h)、(s)任一和 N26Q;
- (j) 为前述(a)-(h)、(s)任一和 N29S;
- (k) 为前述(a)-(h)、(s)任一和 N71Q;
- (l) 为前述(a)-(h)、(s)任一和 N26Q/N29S;
- 5 (m) 为前述(a)-(h)、(s)任一和 N26Q/N29S/N71Q;
- (n) 为前述(a)-(h)、(s)任一和 Q11C/L132C;
- (o) 为前述(a)-(h)、(s)任一和 L70C/P82C;
- (p) 为前述(a)-(h)、(s)任一和 G27C/F78C;
- (q) 为前述(a)-(h)、(s)任一和 T3A;
- 10 (r) 为前述(a)-(h)、(s)任一和 T3A/C125A。

一些实施方案中, 本公开提供 IL-2 变体, 含有或具有如 SEQ ID NO: 60-68 任一项所示的氨基酸序列或与之具有至少 80%、至少 85%、至少 90%序列同一性。

一些实施方案中, 前述任意的含有突变(i)的 IL-2 变体相对野生型 IL-2, 具有 1)-5)中任一项或多项:

- 15 1) 具有降低的对高亲和力 IL-2R 受体(IL-2R $\alpha\beta\gamma$)的亲和力;
- 2) 具有降低的对中等亲和力 IL-2R 受体(IL-2R $\beta\gamma$)的亲和力;
- 3) 具有降低的对 T 细胞(例如 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞)的激活;
- 4) 具有降低的对 NK 细胞的激活;
- 5) 具有降低的由 IL-2 刺激的 T 细胞和/或 NK 细胞炎症因子释放。

20 一些实施方案中, 前述任意的含有突变(i)和突变(ii)的 IL-2 变体相对野生型 IL-2, 具有前述 1)-5)和下述 6)-8)中任一项或多项:

- 6) 具有降低的对 IL-2R α 的亲和力, 或不与 IL-2R α 结合;
- 7) 对 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 的亲和力比对 IL-2R $\beta\gamma$ 的亲和力降低得更多;
- 8) 具有降低的对 CD25⁺细胞(例如 CD25⁺CD8⁺T 细胞, Treg 细胞)的激活。

25 一些实施方案中, 前述任意的含有突变(i)和突变(ii)和突变(iii)和/或突变(iv) 的 IL-2 变体相对野生型 IL-2, 具有前述 1)-8)和下述 9)中任一项或多项:

- 9) 提高的稳定性、成药性、表达量、纯度和/或延长的体内半衰期。

免疫缀合物

本公开提供免疫缀合物, 含有抗原结合结构域, 和 IL-2 或其变体。

30 一些实施方案中, 所述免疫缀合物中的抗原结合结构域靶向免疫效应细胞或肿瘤细胞; 一些具体实施方案中, 所述免疫效应细胞能够响应免疫缀合物中的 IL-2 的刺激或激活; 一些具体实施方案中, 所述免疫效应细胞上具有 IL-2R $\beta\gamma$; 一些具体实施方案中, 所述免疫效应细胞例如为 NK 细胞、CD4⁺ CD25⁺T 细胞、CD8⁺CD25⁺T 细胞。

35 一些实施方案中, 所述免疫缀合物中的抗原结合结构域靶向 PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、4-1BB、OX40、GITR、CD8a、CD8b、CD4、NKG2A、

TIGIT、TGFβR1、TGFβR2、Fas、NKG2D、NKp46、PD-L1、CD107a、ICOS、TNFR2、FAP、TNC A1、TNC A2、CEA、EDB、MCSP 或 CD16a；一些具体实施方案中，所述抗原结合结构域靶向 PD-1(即，PD-1 结合结构域)。

5 一些实施方案中，所述 PD-1 结合结构域为前述本公开提供的任意 PD-1 结合结构域。

示例性的，一些具体实施方案中，所述 PD-1 结合结构域包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含：SEQ ID NO：3、13-15、17-35、88-92 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，或 SEQ ID NO：2、16 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。

示例性的，一些具体实施方案中，所述 PD-1 结合结构域，根据 Kabat 编号系统，所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO：7、36、37 所示，或如 SEQ ID NO：4、5、6 所示。

示例性的，一些具体实施方案中，所述 PD-1 结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：7 所示，CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：8、38-40 任一所示，CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：9、41、42 任一所示。

示例性的，一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO：7、36 和 37 所示，或如 SEQ ID NO：4、5 和 6 所示，或如 SEQ ID NO：7、38 和 41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

示例性的，一些具体实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO：3、13-15、17-35、88-92 任一所示的氨基酸序列；或 SEQ ID NO：2、16 任一所示的氨基酸序列；或与所述序列任一具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

25 一些实施方案中，所述 PD-1 结合结构域还可以包含除上述免疫球蛋白单一可变结构域以外的靶向 PD-1 的抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)，和轻链可变区(VL)。示例性的，所述靶向 PD-1 的抗原结合片段选自如下 PD-1 抗体中的 PD-1 结合结构域：派姆单抗(Pembrolizumab)，纳武单抗(Nivolumab)，信迪利单抗(Sintilimab)，替雷利珠单抗(Tislelizumab)，西米普利单抗(Cemiplimab)，特瑞普利单抗(Toripalimab)，卡瑞利珠单抗(Camrelizumab)，派安普利单抗，赛帕利单抗，萨善利单抗(Sasanlimab)，斯巴达珠单抗(Spartalizumab)，瑞弗利单抗(Retifanlimab)，巴替利单抗(Balstilimab)，西利单抗(Cetrelimab)，多塔利单抗(Dostarlimab；TSR-042)，CS-1003，SCT-110A，SSI-361，MEDI-0680(AMP-514)，BAT-1306，JTX-4014，JTX-4014，BI-754091，AK-103。

35 另一些实施方案中，所述免疫缀合物中的抗原结合结构域选自如下抗体的抗原结合结构域：PD-L1 抗体(例如，度伐鲁单抗(Durvalumab)、阿特殊单抗

(Atezolizumab)、度伐利尤单抗(Durvalumab)、阿维单抗(Avelumab)、阿得贝利单抗(Adebrelimab)、恩弗利单抗(Envafolimab)、STI-A1110、CS-1001、TQB-2450、KL-A167、IMC-001、CX-072); CTLA-4 抗体(例如, 曲美目单抗(Tremelimumab)、伊匹单抗(Ipilimumab)); 4-1BB 抗体(例如, 乌瑞鲁单抗(Urelumab)、乌托鲁单抗(Utomilumab))。

所述抗原结合结构域(例如, PD-1 结合结构域)为所述抗体(例如, PD-1 抗体)结合抗原(例如, PD-1)的部分, 例如, 其 Fab'、F(ab')₂, 或其重链可变区和轻链可变区, 或含有其重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 的结构域。

一些实施方案中, 所述 PD-1 结合结构域包含派姆单抗或其抗原结合片段(例如 Fab), 例如, 包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL), 其中, 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 54、55、56 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 57、58、59 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。一些具体实施方案中, 所述重链可变区为 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列的 Fab 重链中的重链可变区, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列的 Fab 轻链中的轻链可变区。

在一些实施方案中, 所述免疫缀合物包含如下任一项:

- 1)PD-1 结合结构域 1 和 IL-2 或其变体; 其中, 所述 PD-1 结合结构域 1 包含至少一个本公开提供的任意免疫球蛋白单一可变结构域;
- 2)PD-1 结合结构域 1、PD-1 结合结构域 2 和 IL-2 或其变体; 其中, 所述 PD-1 结合结构域 1 包含至少一个本公开提供的任意免疫球蛋白单一可变结构域; 所述 PD-1 结合结构域 2 为本公开提供的任意包含 VH 和 VL 的 PD-1 结合结构域。

一些实施方案中, 所述免疫缀合物中的 IL-2 或其变体为前述本公开提供的任意 IL-2 或其变体。

示例性的, 一些具体实施方案中, 所述 IL-2 为野生型人 IL-2。

示例性的, 一些具体实施方案中, 所述 IL-2 变体包含前述本公开提供的突变(i)、突变(ii)、突变(iii)、突变(iv)或其任意组合, 或由突变(i)、突变(ii)、突变(iii)、突变(iv)或其任意组合组成。

示例性的, 一些具体实施方案中, 所述 IL-2 变体包含或仅包含前述本公开提供的(a)-(r)、(s)任一项的突变。

示例性的, 一些具体实施方案中, 所述 IL-2 变体含有如 SEQ ID NO: 60-68 任一项所示的氨基酸序列或与之具有至少 80%、至少 85%、至少 90%同一性的序列, 或由上述序列组成。

一些实施方案中, 所述免疫缀合物中还包含人免疫球蛋白 Fc 区, 例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。

一些实施方案中, 所述免疫缀合物中的抗原结合结构域(例如 PD-1 结合结构

域)位于 Fc 区的 N 端, 所述 IL-2 或其变体位于 Fc 区的 N 端或 C 端。一些具体实施方案中, 所述抗原结合结构域位于 Fc 的 N 端, 所述 IL-2 或其变体位于 Fc 区的 C 端。

一些实施方案中, 所述免疫缀合物中的抗原结合结构域(例如 PD-1 结合结构域)与 IL-2 或其变体的价数比为 6: 1 至 1: 3(例如 4: 1 至 1: 2)之间, 具体例如 4: 1、2: 1、3: 1 或 1: 1。

如本文所用, PD-1 结合结构域与 IL-2 或其变体的价数比指的是在一个免疫缀合物分子中, 所包含的 PD-1 结合结构域与 IL-2 或其变体的数量比值。在一些实施方案中, 价数比为包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域的 PD-1 结合结构域 1 与 IL-2 或其变体的个数比。在一些实施方案中, 价数比为 PD-1 结合结构域 1 与 PD-1 结合结构域 2 的数量之和, 与 IL-2 或其变体的个数比。

一些实施方案中, 所述免疫缀合物中, 一个免疫缀合物中含有 1 或 2 个 IL-2 或其变体, 含有 1、2、3、4、5 或 6 个抗原结合结构域(例如 PD-1 结合结构域)。

一些实施方案中, 所述免疫缀合物还包含 Fc 区, 所述 Fc 区包含能够彼此缔合的第一亚基 Fc1 与第二亚基 Fc2 的 knob-into-hole 修饰。

一些实施方案中, Fc1 和 Fc2 中包含氨基酸突变, 使得与 Fc1 配对相比, Fc1 优先与 Fc2 配对或优先形成异源二聚体。一些实施方案中, 所述突变位于 Fc1 和 Fc2 的 CH3 中。一些实施方案中, Fc1 和 Fc2 中的氨基酸突变产生比不含该突变的野生型更大的静电互补性。一些实施方案中, Fc1 和 Fc2 中的氨基酸突变产生比不含该突变的野生型更大的空间互补性。

一些实施方案中, 在 Fc1 和 Fc2 中, 例如在 CH3/CH3 界面内, 用一个或多个具有更大侧链体积的氨基酸残基突变 Fc1 的 CH3 域中的一个或多个氨基酸残基, 从而在 Fc1 的 CH3 域表面产生凸起(或杵, Knob), Fc2 的 CH3 域中与 Fc1 的 CH3 域相互作用的一个或多个、优选两个或三个氨基酸残基, 用具有更小侧链体积的氨基酸残基突变, 从而在与 Fc1 的 CH3 域相互作用的 Fc2 的 CH3 域表面产生凹陷(或臼, Hole)。一些实施方案中, 具有更大侧链体积的输入残基是苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、精氨酸(R)或色氨酸(W)。一些实施方案中, 具有更小侧链体积的输入残基是丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)或苏氨酸(T)。

一些实施方案中, 所述 Fc1 中包含选自 T366、L368 和 Y407 中的至少一个或至少两个氨基酸突变(臼突变修饰, 又称 Hole 修饰), 所述 Fc2 中包含 T366(杵突变修饰, 又称 Knob 修饰); 或者所述 Fc1 中包含 T366(杵突变修饰), 所述 Fc2 中包含选自 T366、L368 和 Y407 中的至少一个或至少两个氨基酸突变(臼突变修饰)。

一些具体实施方案中, 所述 Fc1 中包含选自 T366S、L368A 和 Y407V 中的至少一个或至少两个氨基酸突变(臼突变修饰), 所述 Fc2 中包含 T366W(杵突变修饰); 或者所述 Fc1 中包含 T366W(杵突变修饰), 所述 Fc2 中包含选自 T366S、L368A 和 Y407V 中的至少一个或至少两个氨基酸突变(臼突变修饰)。

一些具体实施方案中，所述 IL-2 或其变体位于 Fc1 所在的多肽链。

一些具体实施方案中，Fc1 和 Fc2 中，例如 CH3 中可以包含天然非半胱氨酸至半胱氨酸的突变，例如在 Fc1 中包含 S354C，Fc2 中包含 Y349C；或 Fc1 中包含 Y349C，Fc2 中包含 S354C。

5 一些具体实施方案中，Fc1 和 Fc2 中，例如在 Fc1 CH3/Fc2 CH3 界面内，包含如下的氨基酸突变或其组合：

T366Y/Y407T；

T366W/Y407A；

T366Y/Y407T；

10 T394W/F405A；

T366Y/F405A；

T394W/Y407T；

T366W/F405W/T394S/Y407A；

F405W/T394S；

15 D399C/K392C；

T366W/T366S/L368A/Y407V；

T366W/D399C/T366S/L368A/K392C/Y407V；

T366W/K392C/T366S/D399C/L368A/Y407V；

S354C/T366W/Y349C/T366S/L368A/Y407V；

20 Y349C/T366W/S354C/T366S/L368A/Y407V；

E356C/T366W/Y349C/T366S/L368A/Y407V；

Y349C/T366W/E356C/T366S/L368A/Y407V；

E357C/T366W/Y349C/T366S/L368A/Y407V；和

Y349C/T366W/E357C/T366S/L368A/Y407V。

25 一些具体实施方案中，Fc1 和 Fc2 中还包含使得 Fc1 和 Fc2(例如 CH3 和 CH3)之间形成静电相互作用界面的氨基酸突变。形成静电相互作用界面的氨基酸突变例如选自以下：

K370E/D399K/K439D/D356K/E357K/K409D；

K409D/D399K；

30 K409E/D399K；

K409E/D399R；

K409D/D399R；

D339K/E356K；

D399K/E356K/K409D/K392D；

35 D399K/E356K/K409D/K439D；

D399K/E357K/K409D/K370D；

D399K/E356K/E357K/K409D/K392D/K370D;

D399K/E357K/K409D/K392D;

K392D/K409D/D399K; 和

K409D/K360D/D399K。

- 5 一些实施方案中，Fc1 和/或 Fc2 中包含来自不同抗体亚型的结构域，例如来自不同抗体亚型 CH3。

此外，本公开援引 WO96/27011、WO98/050431、EP1870459、WO2007/110205、WO2007/147901 、 WO2009/089004 、 WO2010/129304 、 WO2011/90754 、 WO2011/143545、WO2012058768、WO2013157954、WO2013096291 中修饰 Fc 区的 CH3 区以加强异二聚化的方案。

- 10 一些实施方案中，Fc1 和/或 Fc2，例如 CH3 中，包含用于改变效应子功能的氨基酸突变。所述抗体效应子功能的包括但不限于：C1q 结合和依赖补体的细胞毒性、Fc 受体(例如 FcγR)结合、依赖抗体的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如 B 细胞受体)的下调和 B 细胞激活。改变效应子功能的氨基酸突变例如
- 15 选自以下：

S298A/E333A/K334A;

S239D/I332E/A330L;

S239D/I332E/G236A;

G236A/S239D/A330L/I332E;

- 20 F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L;

K326A/E333A;

K326W/E333S;

K326M/E333S;

C221D/D222C;

- 25 S267E/H268F/S324T;

E345R;

S298A/E333A/K334A/N434A;

E294 缺失/T307P/N434Y;

T256N/A378V/S383N/N434Y;

- 30 T252L/T253S/T254F;

M252Y/S254T/T256E;

M428L/N434S;

L234A/L235A;

S228P/L235E;

- 35 L234A/L235A/P331S;

L234A/L235A/P329G;

D265A/E233P;
H268Q/V309L/A330S/P331S;
V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A300S/P331S;
L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/V309L/A300S/P331S;
5 S228P/F234A/L235A;
D270A/P329A;
L234F/L235E;
L234F/L235E/P331S;
F241A/V264A/D265A;
10 N297G/D265A; 和
L234Y/G236W/S298A。

一些具体实施方案中, 所述 Fc1 和/或所述 Fc2 包含降低效应子功能(例如 ADCC)的突变, 例如 L234A/L235A、L234A/L235A/P329G。

一些实施方案中, Fc1 和 Fc2, 例如其 CH3 中, 包含用于改变半衰期(例如延
15 长半衰期)的氨基酸突变。一些实施方案中, 所述半衰期取决于 FcRn 结合亲和力。
半衰期的延长可以允许减少给予患者的药物的量, 和/或降低给药频率。一些具体
实施方案中, Fc 区具有 M252Y、S254T 和/或 T256E 突变。一些实施方案中, 所
述免疫缀合物具有 PEG 化修饰或与(人血清)白蛋白、白蛋白结合蛋白缀合/融合。

一些实施方案中, Fc1 和/或 Fc2, 例如 CH3 中包含一个或多个异同种异型突
20 变。在一些实施方案中, 异同种异型突变是 D356E 和 L358M。

一些实施方案中, Fc1 和/或 Fc2, 包含 C220 突变, 例如为 C220S 突变。

一些实施方案中, 免疫缀合物包含如下所示氨基酸序列的多肽链组合: SEQ ID
NO: 73 和 74; SEQ ID NO: 75 和 76; SEQ ID NO: 77 和 78; SEQ ID NO: 79 和 80;
SEQ ID NO: 43 和 44; SEQ ID NO: 45 和 46; SEQ ID NO: 47、44 和 48; SEQ ID NO:
25 47、46 和 48; SEQ ID NO: 49、50 和 48; SEQ ID NO: 51 和 46; SEQ ID NO: 102
和 103 或与以上任一多肽链组合具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、
至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%同一性的氨基酸序列。

示例性免疫缀合物

关于免疫缀合物, 本公开提供如下的实施方案:

30 实施方案 1. 一种免疫缀合物, 含有:

1)PD-1 结合结构域, 和 IL-2 变体, 所述 IL-2 变体含有选自 N88D 或 D20A 的
突变; 或

2)PD-1 结合结构域, 和 IL-2 变体, 所述 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低
或消除的与高亲和力受体(IL-2R α / β / γ)的亲和力, 具有较之野生型 IL-2 降低的与中
35 等亲和力受体(IL-2R β / γ)的亲和力, 对高亲和力受体的亲和力比对中等亲和力受体的
亲和力降低得更多; 例如, 所述 IL-2 变体含有选自 N88D 或 D20A 的突变。

实施方案 2. 如实施方案 1 所述的免疫缀合物, 其中的 IL-2 变体含有选自 F42, Y45, L72 的突变或其任意组合;

例如, 其含有选自 F42A, Y45A, L72G 的突变或其任意组合;

更例如, 其含有 F42A/L72G, F42A/Y45A, Y45A/L72G, F42A/Y45A/L72G 的突变。

实施方案 3. 如实施方案 1 或 2 所述的免疫缀合物, 其中的 IL-2 变体含有选自 N26Q, N29S, N30S, N71Q, Q11C 和 L132C, L70C 和 P82C, G27C 和 F78C 的突变或其任意组合;

例如, 其含有选自如下的突变或组合:

N26Q, N29S, N30S, N26Q/N29S/N71Q, N26Q/N29S, N26Q/N30S, N26Q/N30S/Q11C/L132C, N26Q/N29S/L70C/P82C, N26Q/N30S/G27C/F78C。

实施方案 4. 一种免疫缀合物, 含有:

抗原结合结构域, 和 IL-2 或其变体, 所述 IL-2 变体含有第一类突变, 所述第一类突变使得 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与中等亲合力受体(IL-2R β / γ)的亲合力;

例如, 所述第一类突变选自: L12, E15, H16, L18, L19, D20, M23, Q22, K43, V69, D84, S87, N88, V91, I92, E95, T123, Q126, S127, I129 和 S130;

又例如, 所述第一类突变选自: L12R, L12K, L12E, L12Q, E15Q, E15R, E15A, E15S, H16A, H16E, H16D, H16G, H16S, H16T, H16V, H16P, D20A, D20H, D20Y, D20N, M23A, M23R, M23K, M23G, M23S, M23T, M23V, M23P, S87K, S87A, D84S, D84L, D84N, D84V, D84H, D84Y, D84R, D84K, D84G, D84A, D84T, D84P, N88D, N88A, N88S, N88T, N88R, N88I, V91A, V91T, V91E, I92A, E95S, E95A, E95R, E95Q, E95G, E95T, E95V, E95P, E95H, E95N, T123A, T123E, T123K, T123Q, Q126D, Q126L, Q126A, Q126S, Q126T, Q126E, S127A, S127E, S127K, S127Q;

又例如, 所述第一类突变选自: N88D, N88R, D20A, D20N, V91T, Q126D, H16A/D84S;

更例如, 所述第一类突变选自 N88D 或 D20A。

实施方案 5. 如实施方案 4 所述的免疫缀合物, 其中的 IL-2 变体含有第二类突变, 所述第二类突变使得 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低或消除的与高亲合力受体(IL-2R α / β / γ)的亲合力;

例如, 所述第二类突变选自 R38, E62, P65, E68, F42, Y45, L72 或其任意组合;

又例如, 所述第二类突变选自 R38A, R38D, R38E, E62Q, P65R, P65E, P65K, P65H, P65Y, P65Q, P65D, P65N, E68A, E68Q, E68K, E68R, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G,

Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, L72K;

更例如,所述第二类突变选自 F42A, Y45A, L72G, F42A/L72G, F42A/Y45A, Y45A/L72G 或 F42A/Y45A/L72G。

5 实施方案 6. 如实施方案 4 或 5 所述的免疫缀合物,其中的 IL-2 变体含有第三类突变,所述第三类突变使得 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 增加的稳定性;

例如,所述第三类突变选自 N26, N29, N30, N71, Q11, L132, L70, P82, G27, F78 或其任意组合;

又例如,所述第三类突变选自 N26Q, N29S, N30S, N71Q, Q11C/L132C,
10 L70C/P82C, G27C/F78C 或其任意组合;

更例如,所述第三类突变选自: N26Q, N29S, N30S, N26Q/N29S/N71Q, N26Q/N29S, N26Q/N30S, N26Q/N30S/Q11C/L132C, N26Q/N29S/L70C/P82C, N26Q/N30S/G27C/F78C。

实施方案 7. 一种免疫缀合物,含有: PD-1 结合结构域,和 IL-2 或其变体;

15 所述 PD-1 结合结构域 PD-1 结合结构域包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域,所述免疫球蛋白单一可变结构域包含:

SEQ ID NO: 3, 13-15, 17-35 任一所示氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3,
或

SEQ ID NO: 2, 16 任一所示氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3,

20 所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat, IMGT, Chothia, AbM 或 Contact 编号系统定义的;

例如,根据 Kabat 编号系统,所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1, CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别

如 SEQ ID NO: 7, 36, 37 所示, 或

25 如 SEQ ID NO: 4, 5, 6 所示;

又例如,所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示, CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8, 38-40 任一所示, CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9, 41, 42 任一所示;

更例如,所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1, CDR2, CDR3 的氨基酸
30 序列分别如 SEQ ID NO: 7, 38, 41 所示。

实施方案 8. 如实施方案 1 至 7 任一项所述的免疫缀合物,其中,所述 IL-2 变体含有选自第 1)组和第 2)组的突变组合:

第 1)组突变选自: F42A/L72G, F42A/Y45A, Y45A/L72G 和 F42A/Y45A/L72G;

第 2)组突变选自: N88R, N88G, N88I, N88D, D20H, D20Y, V91T, Q126L,
35 Q126D, H16A/D84S;

例如,所述 IL-2 变体含有如下突变组合: F42A/L72G/N88D, F42A/L72G/N88R,

F42A/L72G/D20A, F42A/L72G/D20N, F42A/L72G/V91T, F42A/L72G/Q126D, F42A/L72G/H16A/D84S。

实施方案 9. 如实施方案 8 所述的免疫缀合物, 其中, 所述 IL-2 变体还含有第 3) 组突变, 所述第 3) 组突变选自: N26Q, N29S, N30S, N26Q/N29S/N71Q, N26Q/N29S, N26Q/N30S, N26Q/N30S/Q11C/L132C, N26Q/N29S/L70C/P82C 和 N26Q/N30S/G27C/F78C;

例如, 所述 IL-2 变体含有如下突变组合:

F42A/L72G/N88D/N26Q/N29S/N71Q,
F42A/L72G/N88R/N26Q/N29S/N71Q,
10 F42A/L72G/D20A/N26Q/N29S/N71Q,
F42A/L72G/D20N/N26Q/N29S/N71Q,
F42A/L72G/V91T/N26Q/N29S/N71Q,
F42A/L72G/Q126D/N26Q/N29S/N71Q,
F42A/L72G/H16A/D84S/N26Q/N29S/N71Q。

15 实施方案 10. 如实施方案 1 至 9 任一项所述的免疫缀合物, 其中 IL-2 变体含有选自 T3 和/或 C125 的突变或其组合;

例如, T3A 和/或 C125A, C125S, C125T, C125V 突变。

实施方案 11. 如实施方案 1 至 10 任一项所述的免疫缀合物, 所述 IL-2 变体具有如 SEQ ID NO: 60-68 任一项所示的氨基酸序列。

20 实施方案 12. 如实施方案 4 至 6, 8 至 10 任一项所述的免疫缀合物中,

1) 所述抗原选自:

1-1) 肿瘤细胞上或肿瘤微环境中免疫细胞上的抗原;

1-2) PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、4-1BB、OX40、GITR、CD8a、CD8b、CD4、NKp30、NKG2A、TIGIT、TGFβR1、TGFβR2、Fas、NKG2D、NKp46、PD-L1、
25 CD107a、ICOS、TNFR2、FAP、TNC A1、TNC A2、CEA、EDB、MCSP 或 CD16a;

1-3) 免疫检查点抗原, 例如 PD-1, PD-L1, CTLA-4;

2) 所述抗原结合结构域包含选自以下的抗体的 VH 结构域和 VL 结构域, 或 VH 的 HCDR1, HCDR2, HCDR3 和 VL 的 LCDR1, LCDR2, LCDR3:

PD-1 抗体(例如, 派姆单抗(Pembrolizumab), 纳武单抗(Nivolumab), 信迪利单抗(Sintilimab), 替雷利珠单抗(Tislelizumab), 西米普利单抗(Cemiplimab), 特瑞普利单抗(Toripalimab), 卡瑞利珠单抗(Camrelizumab), 派安普利单抗, 赛帕利单抗, 萨善利单抗(Sasanlimab), 斯巴达珠单抗(Spartalizumab), 瑞弗利单抗(Retifanlimab), 巴替利单抗(Balstilimab), 西利单抗(Cetrelimab), 多塔利单抗(Dostarlimab; TSR-042), CS-1003, SCT-110A, SSI-361, MEDI-0680(AMP-514), BAT-1306, JTX-4014, JTX-4014, BI-754091, AK-103);

CTLA-4 抗体(例如, 曲美目单抗(Tremelimumab), 伊匹单抗(Ipilimumab));

4-1BB 抗体(例如, 乌瑞鲁单抗(Urelumab), 乌托鲁单抗(Utomilumab));

PD-L1 抗体(例如, 度伐鲁单抗(Durvalumab), 阿特珠单抗(Atezolizumab), 度伐利尤单抗(Durvalumab), 阿维单抗(Avelumab), 阿得贝利单抗(Adebrelimab), 恩弗利单抗(enfaveolimab), STI-A1110, CS-1001, TQB-2450, KL-A167, IMC-001, 5 CX-072)。

实施方案 13. 如实施方案 1 至 3, 12 任一项所述的免疫缀合物, 所述 PD-1 结合结构域包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含:

SEQ ID NO: 3, 13-15, 17-35、88-92 任一所示氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 10 和 CDR3, 或

SEQ ID NO: 2, 16 任一所示氨基酸序列中的 CDR1, CDR2 和 CDR3,

所述 CDR1, CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat, IMGT, Chothia, AbM 或 Contact 编号系统定义的;

例如, 根据 Kabat 编号系统, 所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1, CDR2 15 和 CDR3 的氨基酸序列分别

如 SEQ ID NO: 97、100、101 所示,

如 SEQ ID NO: 7, 36, 37 所示,

如 SEQ ID NO: 97、98、99 所示, 或

如 SEQ ID NO: 4, 5, 6 所示;

20 又例如, 所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 或 93 所示, CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8, 38-40、94-95 任一所示, CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9, 41, 42、96 任一所示;

又例如, 所述免疫球蛋白单一可变结构域选自如下任一种:

- 25 1) 包含如 SEQ ID NO: 7、38、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 2) 包含如 SEQ ID NO: 7、38、96 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 3) 包含如 SEQ ID NO: 7、94、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 4) 包含如 SEQ ID NO: 93、94、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 5) 包含如 SEQ ID NO: 93、94、96 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 6) 包含如 SEQ ID NO: 93、95、96 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 30 7) 包含如 SEQ ID NO: 7、8、9 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 8) 包含如 SEQ ID NO: 7、8、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 9) 包含如 SEQ ID NO: 7、38、6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 10) 包含如 SEQ ID NO: 7、39、9 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 11) 包含如 SEQ ID NO: 7、40、6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 35 12) 包含如 SEQ ID NO: 7、8、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
- 13) 包含如 SEQ ID NO: 7、8、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

14) 包含如 SEQ ID NO: 7、38、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

15) 包含如 SEQ ID NO: 7、38、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

16) 包含如 SEQ ID NO: 7、39、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

17) 包含如 SEQ ID NO: 7、39、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

5 18) 包含如 SEQ ID NO: 7、40、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

19) 包含如 SEQ ID NO: 7、40、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3

更例如, 所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1, CDR2, CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7, 38, 41 所示。

10 实施方案 14. 如实施方案 7 或 13 所述的免疫缀合物, 其中所述免疫球蛋白单一可变结构域为:

1) 人源化, 亲和力成熟, 去除 T 细胞表位, 降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的; 例如, 人源化改造过程使用的人种系模板的重链框架区为 IGHV3-23*01 或 IGHV3-23*04;

2) 骆驼抗体, 嵌合抗体, 人源化抗体, 全人抗体或其抗原结合片段。

15 实施方案 15. 如实施方案 13 或 14 所述的免疫缀合物, 其中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如

SEQ ID NO: 3, 13-15, 17-35、88-92 任一所示的氨基酸序列; 或

SEQ ID NO: 2, 16 任一所示的氨基酸序列; 或

与前述序列任一具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

20 实施方案 16. 如实施方案 1 至 3, 12 任一项所述的免疫缀合物, 所述 PD-1 结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL), 其中, 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 54, 55, 56 所示氨基酸序列的 HCDR1, HCDR2, HCDR3, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 57, 58, 59 所示氨基酸序列的 LCDR1, LCDR2, LCDR3;

25 例如, 所述重链可变区为 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列的 Fab 重链中的重链可变区, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列的 Fab 轻链中的轻链可变区。

实施方案 17. 如前述实施方案任一项所述的免疫缀合物, 其还包含人免疫球蛋白 Fc 区; 例如, 所述 Fc 区是人 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。

30 实施方案 18. 如实施方案 17 所述的免疫缀合物, 所述人 IgG1 的 Fc 区含有一个或多个降低对 Fc 受体(FcR, 例如 FcγR)结合, 和/或降低效应器功能的氨基酸突变;

例如, 所述人 IgG1 的 Fc 区含有一个或多个降低对 Fcγ 受体(FcγR)结合, 和/或降低 ADCC 效应的氨基酸突变;

35 又例如, 所述人 IgG1 的 Fc 区含有 L234, L235, P329 或其任意组合的突变; 更例如, 所述人 IgG1 的 Fc 区含有 L234A/L235A 或 L234A/L235A/P329G 突

变。

实施方案 19. 如实施方案 17 或 18 所述的免疫缀合物, 所述 Fc 区包含促进 Fc 区的第一和第二亚基联合(或异二聚化)的 knob-into-hole 修饰;

如本文所述, 所述 knob-into-hole 修饰是指, 例如, 所述 Fc 区的第一亚基的 CH3 区中氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换, 以在第一亚基的 CH3 区内生成隆起, 所述隆起可放置在第二亚基的 CH3 区内的空腔中, 且在所述 Fc 区的第二亚基的 CH3 区中氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换, 以在第二亚基的 CH3 区内生成空腔, 可放置第一亚基的 CH3 区内的隆起; 又例如, 所述具有更大侧链体积的氨基酸残基选 R、F、Y、W, 所述具有更小侧链体积的氨基酸残基选自 A、S、T、V。

实施方案 20. 如实施方案 19 所述的免疫缀合物, 其中

所述 Fc 区的第一亚基含有 T366 突变, 第二亚基含有选自 T366, L368, Y407 或其任意组合的突变;

所述 Fc 区的第一亚基含有 S354 或 E356 突变, 第二亚基含有选自 Y349 突变; 或

所述 Fc 区的第一亚基含有 S354 和 T366 突变, 第二亚基含有 Y349, T366, L368 和 Y407 突变;

例如,

所述 Fc 区的第一亚基含有 T366W 突变, 第二亚基含有选自 T366S, L368A, Y407V 或其任意组合的突变;

所述 Fc 区的第一亚基含有 S354C 或 E356C 突变, 第二亚基含有选自 Y349C 突变; 或

所述 Fc 区的第一亚基含有 S354C/T366W 突变, 第二亚基含有 Y349C/T366S/L368A/Y407V 突变。

实施方案 21. 如实施方案 19 或 20 所述的免疫缀合物, 其中, 所述 Fc 区的第二亚基还含有 H435 和/或 R436 突变, 优选为 H435R/Y436F, H435R, H435K 突变。

实施方案 22. 如实施方案 17 至 21 任一项所述的免疫缀合物, 其中, 所述人 IgG1 的 Fc 区含有增强的 FcRn 介导的再循环, 和/或延长半衰期的突变;

例如, 所述人 IgG1 的 Fc 区含有 M252 和/或 M428 突变;

例如, 所述人 IgG1 的 Fc 区含有 M252Y/M428V, M252Y/M428L 突变。

实施方案 23. 如实施方案 17 至 22 任一项所述的免疫缀合物, 其中, 所述人 IgG1 的 Fc 区的第一亚基和/第二亚基含有 C220 突变, 例如为 C220S 突变。

实施方案 24. 如前述实施方案任一项所述的免疫缀合物, 所述 PD-1 结合结构域或抗原结合结构域位于 Fc 区的 N 端, 所述 IL-2 变体位于 Fc 区的 N 端或 C 端;

例如, 所述 PD-1 结合结构域或抗原结合结构域位于 Fc 的 N 端, 所述 IL-2 变

体位于 Fc 区的 C 端。

实施方案 25. 如前述实施方案任一项所述的免疫缀合物, 所述 PD-1 结合结构域或抗原结合结构域与 IL-2 或其变体的价数比为 6: 1 至 1: 3(例如 4: 1 至 1: 2) 之间, 优选为 4: 1、2: 1、3:1 或 1: 1; 或, 一个免疫缀合物中含有 1 或 2 个 IL-2 或其变体, 含有 1、2、3、4、5 或 6 个 PD-1 结合结构域或抗原结合结构域。

实施方案 26. 如实施方案 1 至 3, 7, 11 至 25 任一项所述的免疫缀合物, 其包含如下 I)-VI)任一项所示的多肽链组合:

- I)第一多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第一亚基]-[连接子 1]-[IL-2 或其变体],
- 10 第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第二亚基];
- II)第一多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第一亚基]-[连接子 1]-[IL-2 或其变体],
- 第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第二亚基];
- 15 III)第一多肽链: [PD-1 结合结构域 2 的 Fab 重链]-[Fc 区第一亚基]-[连接子 1]-[IL-2 或其变体],
- 第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第二亚基],
- 第三多肽链: [PD-1 结合结构域 2 的 Fab 轻链];
- IV)第一多肽链: [PD-1 结合结构域 2 的 Fab 重链]-[Fc 区第一亚基]-[连接子 1]-[IL-2 或其变体],
- 20 第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第二亚基],
- 第三多肽链: [PD-1 结合结构域 2 的 Fab 轻链];
- V)第一多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 2 的 Fab 重链]-[Fc 区第一亚基]-[连接子 1]-[IL-2 或其变体],
- 25 第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 2 的 Fab 轻链]-[Fc 区第二亚基],
- 第三多肽链: [PD-1 结合结构域 2 的 Fab 轻链];
- VI)第一多肽链: [IL-2 或其变体]-[连接子 3]-[Fc 区第一亚基],
- 30 第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第二亚基];

其中, -表示肽键, 连接子为能够实现连接功能的多肽, 连接子 1, 连接子 2, 连接子 3 可以相同, 也可以不同; [PD-1 结合结构域 1]选自实施方案 11 至 13 中任意的 PD-1 结合结构域; [PD-1 结合结构域 2]选自实施方案 14 中任意的 PD-1 结合结构域;

例如, 所述连接子为 $(G_xS)_y$ 连接子, 其中, x 选自 1-5 的整数, y 选自 1-6 的

整数；又例如，连接子 1 为 $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 104)，连接子 2 为 $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 105)，连接子 3 为 G_4S (SEQ ID NO: 106)。

一些其他的连接子包括但不限于如 $(G_mS_n)_h$ 或 $(GGNGT)_h$ (SEQ ID NO: 107) 或 $(YGNGT)_h$ (SEQ ID NO: 108) 或 $(EPKSS)_h$ (SEQ ID NO: 109) 所示的氨基酸
5 序列，其中 m, n 各自独立地选自 1-8 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8)，
h 独立地选自 1-20 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、
14、15、16、17、18、19 或 20)。

以上多肽链的顺序为从 N 端到 C 端。

实施方案 27. 如前述实施方案任一项所述的免疫缀合物，其包含如下所示氨
10 基酸序列的多肽链组合：

- SEQ ID NO: 73 和 74;
- SEQ ID NO: 75 和 76;
- SEQ ID NO: 77 和 78;
- SEQ ID NO: 79 和 80;
- 15 SEQ ID NO: 43 和 44;
- SEQ ID NO: 45 和 46;
- SEQ ID NO: 47、44 和 48;
- SEQ ID NO: 47、46 和 48;
- SEQ ID NO: 49、50 和 48;
- 20 SEQ ID NO: 51 和 46;
- SEQ ID NO: 102 和 103。

或与以上任一多肽链组合具有至少 80%，至少 85%，至少 90%，至少 95%，
至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%同一性的氨基酸序列。

在未予特殊说明的情况下，以上位点编号规则均为 Kabat EU 索引。

25 本公开提供融合蛋白，包含前述任意的免疫缀合物，或为前述任意的免疫缀
合物。

多核苷酸和载体

本公开提供编码本公开的 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体、免疫缀合
物的多核苷酸。本公开的核酸可为 RNA、DNA 或 cDNA。根据本公开的一些实施
30 方案，本公开的核酸是基本上分离的核酸。

本公开的核酸也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该
载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可尤其为表达载体，即可提供
PD-1 抗体或其抗原结合片段体外和/或体内(即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或
表达系统中)表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的核酸，其可操作
35 地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、增强子、终止子等)。针对
在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对

本公开的 PD-1 抗体或其抗原结合片段的表达有用或必需的调控元件及其他元件例如为启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的核酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式(例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术)制备或获得, 和/或可从适合的天然来源加以分离。

宿主细胞

本公开提供表达或能够表达一种或多种本公开的 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体、免疫缀合物和/或含有本公开的核酸或载体的重组宿主细胞。一些实施方案中, 宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属(*Aspergillus*)的物种的细胞; 或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而, 本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

制备方法

本公开提供一种用于制备 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体、免疫缀合物的方法, 包括: 在如前所述的宿主细胞中表达所述目的蛋白, 并自该宿主细胞中分离目的蛋白。可选地, 还可以包含纯化步骤, 例如, 用含调整过的缓冲液的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化, 洗去非特异性结合的组分, 再用 PH 梯度法洗脱结合的抗体, 用 SDS-PAGE 检测, 收集。可选地, 用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体, 也可以用常规方法去除, 比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻, 如-70℃, 或者冻干。

生产和纯化抗体的方法在现有技术中熟知和能找到, 如冷泉港的抗体实验技术指南(5-8 章和 15 章)。

本公开工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如, 编码重链和轻链的 cDNA 序列, 可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化, 特别

是在 Fc 区的高度保守 N 端。通过表达与人源抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛，离子交换。

5 组合物

本公开提供组合物，包含前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体和/或免疫缀合物。例如，提供药物组合物，其含有对癌症治疗、缓解或预防有效量的如上所述的 PD-1 抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物和至少一种可药用的赋形剂、稀释或载体。

10 在一些具体实施方式中，所述药物组合物单位计量中可含有 0.01 至 99 重量 % 的 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体和/或免疫缀合物，或药物组合物单位剂量中含 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体和/或免疫缀合物的量为 0.1-2000mg，在一些具体实施方式中为 1-1000mg。

一些实施方案中，提供制品或产品，包含前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段、
15 IL-2 变体和/或免疫缀合物。可选地，制品包含容器和标签。容器例如瓶、注射器和试管。容器容纳有效于治疗病症的组合物。容器上或与容器相连的标签表明所述组合物用于治疗所选病症。组合物中含有前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物。

示例性的，提供组合物，其含有：

20 本公开提供的任意的 PD-1 抗体或其抗原结合片段；

本公开提供的任意的 IL-2 变体

本公开提供的任意的免疫缀合物；

可选地，当组合物为药物组合物时，还含有至少一种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

25 治疗方法和制药用途

本公开提供前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体、免疫缀合物、多核苷酸、组合物(包括药物组合物)在如下至少一种中的用途：

1)用于治疗癌症；

2)制备用于治疗癌症的药物；

30 3)用于活化细胞毒性 T 细胞(CTL)；

4)制备用于活化细胞毒性 T 细胞(CTL)的药物；

5)用于促进 CD4⁺和/或 CD8⁺T 细胞增殖；

6)制备用于促进 CD4⁺和/或 CD8⁺T 细胞增殖的药物；

7)用于使 PD-1 抗体高表达的细胞毒性 T 细胞(CTL)，具有高于 PD-1 抗体低表达
35 达或不表达的细胞毒性 T 细胞(CTL)的细胞活化效率；

8)用于使 PD-1 抗体高表达的 CD4⁺和/或 CD8⁺T，具有高于 PD-1 抗体低表达

或不表达的 CD4⁺和/或 CD8⁺T 细胞的细胞增殖效率。

本公开提供前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体、免疫缀合物、多核苷酸、组合物(包括药物组合物)用于治疗、缓解、预防、诊断疾病或病症的方法。

一些实施方案中，提供改善、缓解、治疗或预防疾病的方法，包括向受试者
5 施用改善、缓解、治疗或预防有效量的前述 PD-1 抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、多核苷酸、组合物(包括药物组合物)。

一些实施方案中，提供本公开的 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体、免疫缀合物用于制备改善、缓解、治疗或预防疾病的药物的用途。

一些实施方案中，前述疾病为增殖性病症或者任何特征在于不受控细胞生长的
10 的其它疾病或病症(例如癌症，本公开中，癌症和肿瘤可互相替代使用)，例如为 PD-L1 超量表达相关的相关疾病，或受益于 PD-1 抗体或其抗原结合片段治疗的相关疾病，例如癌症。

一些实施方案中，前述癌症为实体瘤或血液肿瘤。

一些实施方案中，前述癌症为晚期或转移性的。

15 一些实施方案中，前述癌症选自以下或其组合：肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症或者任何特征在于不受控细胞生长的其它疾病或病症。

例如，选自前列腺癌、肝癌(HCC)、结直肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、
20 三阴性乳腺癌、胰腺癌、胃(stomach/gastric)癌、宫颈癌、头颈癌、甲状腺癌、睾丸癌、尿路上皮癌、肺癌(小细胞肺癌、非小细胞肺癌)、黑色素瘤、非黑色素瘤皮肤癌(鳞状和基底细胞癌)、神经胶质瘤、肾癌(RCC)、淋巴瘤(NHL 或 HL)、急性骨髓性白血病(AML)、T 细胞急性淋巴母细胞性白血病(T-ALL)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、间皮瘤、食道癌、默克细胞癌(Merkel Cells cancer)、高 MSI
25 癌、KRAS 突变肿瘤、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤和骨髓增生异常综合征(MDS)。

例如，选自基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑和中枢神经系统癌症、乳腺癌、腹膜癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌症、子宫内膜癌、食道癌、眼癌、头颈癌、胃癌、胃肠癌、胶质母细胞瘤、肝癌、肝肿瘤、上皮内瘤、肾脏癌或肾癌、喉癌、肝脏癌症、肺癌、小细胞肺癌、非小
30 细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞癌、黑色素瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌、呼吸系统癌症、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫或子宫内膜癌、泌尿系统癌症、外阴癌、淋巴瘤、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞(SL)NHL、
35 中级/滤泡性 NHL、中级弥漫性 NHL、高级别免疫母细胞 NHL、高级别淋巴母细胞 NHL、高级别小非裂解细胞 NHL、大肿块 NHL、套细胞淋巴瘤、艾滋病相关淋

巴瘤、华氏巨球蛋白血症、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞白血病、和慢性成髓细胞性白血病。

一些实施方案中，前述受试者具有与 PD-L1 相关的病况。一些具体方案中，受试者病况包括异常表达或不异常表达 PD-L1 的癌症，并且进一步包括非转移性或非浸润性以及浸润性或转移性癌症。

一些实施方案中，提供激活受试者免疫系统的方法，提供体内或体外活化受试者的细胞毒性 T 细胞(CTL)的方法，提供体内或体外增加 CD4⁺和/或 CD8⁺T 细胞增殖的方法，提供体内或体外活化受试者的 NK 细胞的方法，提供体内或体外活化受试者的 $\gamma\delta$ T 细胞的方法，提供体内或体外活化受试者的 Th1 细胞的方法，提供活化、减少或消除受试者体内的调节性 T 细胞(Treg)中的至少一种的细胞数量和/或活性的方法，提供增加受试者体内的 IFN- γ 产生和/或促炎性细胞因子分泌的方法，提供阻断或抑制受试者体内 PD-1 与 PD-L1/PD-L2 的相互作用的方法，均包括向所述受试者施用有效量的前述本公开的 PD-1 抗体或其抗原结合片段、IL-2 变体、免疫缀合物、多核苷酸、组合物(包括药物组合物)。

15 检测

本公开提供 PD-1 抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、多核苷酸、组合物的检测用途。本公开还提供用于体内或体外检测 PD-1 的方法、系统或装置，其包括用本公开的前述结合蛋白、多核苷酸、组合物处理样品。

一些实施方案中，体外检测方法、系统或装置可能例如包括：

- 20 (1)使样品与 PD-1 抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物、多核苷酸、组合物接触；
- (2)检测在前述结合蛋白、多核苷酸和样品之间形成的复合物；和/或
- (3)使参比样品(例如，对照样品)与结合蛋白、核酸接触；和
- (4)通过与参比样品比较，确定复合物形成的程度。如与对照样品或受试者中
- 25 相比，样品或受试者中复合物形成的变化(例如，统计学上的显著变化)表示样品中存在 PD-1。

另一些实施方案中，体内检测方法、系统或装置可以包括：

- (1)向受试者施用前述结合蛋白、多核苷酸；和
- (2)检测在结合前述结合蛋白、多核苷酸和受试者之间复合物的形成。
- 30 检测可以包括确定形成复合物的位置或时间。用可检测物质对前述结合蛋白、多核苷酸标记，通过对所述标记检测以实现能对结合的蛋白、多核苷酸的物质(例如 PD-1)的检测。合适的可检测物质包括多种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。可以通过测量与 PD-1 结合或不结合的物质或使其可视化，检测结合蛋白、多核苷酸与 PD-1 的复合物形成。可以使用常规检测测定法，例如，酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或组织免疫组织化学。出于检测目的，本公
- 35 开的结合蛋白、多核苷酸可以用荧光团发色团标记。

一些实施方案中，还提供试剂盒，所述试剂盒包含前述结合蛋白、多核苷酸，还可以包含诊断使用说明。试剂盒还可以含有至少一种额外的试剂，如标记物或额外的诊断剂。对于体内使用，抗体可以配制为药物组合物。

5 附图说明

图 1A-1B 为 PD-1/PD-L1 NFAT 报告基因系统检测抗 PD-1 纳米抗体的活性结果，使用派姆单抗(Pembrolizumab)作为阳性对照，人 IgG4 作为阴性对照；其中，图 1A 为 A6_IgG4 和 A17_IgG4 结果，图 1B 为 A17h1_IgG4、A17m09_hIgG4、A17m0901_hIgG4、A17m0902_hIgG4、A17m0903_hIgG4、A17m0905_hIgG4 的结果。

图 2 为通过 DC 细胞：T 细胞混合淋巴反应中细胞因子的释放检测 A17m09_hIgG4 对 T 细胞激活程度，使用派姆单抗作为阳性对照，hIgG4 作为阴性对照。

图 3A 和图 3B 为 A17m09_hIgG4 抑制小鼠 M38 结肠癌肿瘤生长的体内药效试验结果，图 3A 为小鼠肿瘤体积结果图，图 3B 为小鼠体重图，使用派姆单抗作为阳性对照，hIgG4 作为阴性对照。

图 4 为抗 PD-1 抗体与 IL-2 突变体的融合蛋白的构建。图 4 的 A 所示的分子结构中，抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过 IgG1 重链铰链区分别与 Knob 和 Hole 链的 N 端偶联；图 4 的 B 所示的分子结构中，将两个抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过 $(G_4S)_2$ 的连接子首尾相接，再将其 C 端通过 IgG1 重链铰链区分别与 Knob 和 Hole 链的 N 端偶联；图 4 的 C 所示的分子结构中，抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过 IgG1 重链铰链区与 Hole 链的 N 端偶联，抗 PD-1 抗体派姆单抗对应的 Fab 片段的重链通过 IgG1 重链铰链区与 Knob 链的 N 端偶联；图 4 的 D 所示的分子结构中，两个抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过 $(G_4S)_2$ 的连接子首尾相接，再将其 C 端通过 IgG1 重链铰链区与 Hole 链的 N 端偶联；将抗 PD-1 抗体派姆单抗对应的 Fab 片段的重链通过 IgG1 重链铰链区与 Knob 链的 N 端偶联；图 4 的 E 所示的分子结构中，将抗 PD-1 抗体派姆单抗对应的 Fab 片段的重链通过 IgG1 重链铰链区分别与 Knob 和 Hole 链的 N 端偶联，再将抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过 $(G_4S)_2$ 的连接子与派姆单抗对应的 Fab 片段的重链的 N 端偶联；图 4 的 F 所示的分子结构中，两个抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过 $(G_4S)_2$ 的连接子首尾相接，再将其 C 端通过 IgG1 重链铰链区与 Hole 链的 N 端偶联。图 4 的 A-E 的分子中 IL-2 突变体通过 $(G_4S)_3$ 连接子与 Fc 的 Knob 链的 C 端相连，F 的分子中 IL-2v(V91T)通过 G_4S 连接子与 Knob 链的 N 端偶联。

图 5A 和图 5B 为不同形式的 PD-1-IL-2v(V91T)融合蛋白对 M07e 和 M07e-hPD-1 细胞的增殖活性检测结果。其中，图 5A 是不同形式的 PD-1-IL-2v(V91T)融合蛋白对 M07e-hPD-1 细胞的增殖活性结果，图 5B 是不同形式的

PD-1-IL-2v(V91T)融合蛋白对 M07e 细胞的增殖活性结果。

图 6A 和图 6B 为带有不同 IL-2 突变体的、同一形式的 PD-1-IL-2v 融合蛋白对 M07e 和 M07e-hPD-1 细胞株的增殖活性检测结果。其中，图 6A 是 PD-1-IL-2v 融合蛋白对 M07e-hPD-1 细胞的增殖活性结果，图 6B 是 PD-1-IL-2v 融合蛋白对 M07e 细胞的增殖活性结果。

图 7 为 PD-1-IL-2v 或 IgG-IL-2v 对 M07e-hPD-1 细胞的促增殖活性检测结果。

图 8A 和图 8B 为带有不同 IL-2 突变体的 PD-1-IL-2v 对未经刺激的 T 细胞的增殖活性检测结果。其中，图 8A 为 CD4⁺T 细胞增殖结果，图 8B 为 CD8⁺T 细胞增殖结果。

图 9A 和图 9B 为带有不同 IL-2 突变体的 PD-1-IL-2v 对经抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖活性检测结果。其中，图 9A 为 CD4⁺T 细胞增殖结果，图 9B 为 CD8⁺T 细胞增殖结果。

图 10 为带有不同抗 PD-1 纳米抗体突变体的 PD-1-IL-2v 对 M07e-hPD-1 细胞株的增殖活性检测结果。

图 11 示出 A-N88D 对小鼠 CT26 肿瘤模型的肿瘤生长抑制结果。其中，以 A17m0902_hIgG4 为对照。

图 12 示出了施用 A-N88D 后小鼠 CT26 肿瘤模型的体重变化结果。

具体实施方式

术语定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本公开中另有明确定义，本公开使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968) 中所述。

如本文所用，术语“免疫缀合物”指包含一个效应物部分和至少一个抗原结合部分的融合多肽分子，任选地，所述免疫缀合物还可以包含 Fc 区。在某些实施方案中，免疫缀合物包含一个效应物部分、一个抗原结合部分和一个 Fc 区。在某些实施方案中，免疫缀合物包含一个效应物部分、两个抗原结合部分和两个 Fc 区。在某些实施方案中，免疫缀合物包含一个效应物部分、四个抗原结合部分和两个 Fc 区。在某些实施方案中，免疫缀合物包含一个效应物部分、一个抗原结合部分和两个 Fc 区。在某些实施方案中，免疫缀合物包含一个效应物部分、三个抗原结合部分和两个 Fc 区。

在具体的实施方案中，如本文所述的免疫缀合物是融合蛋白，即免疫缀合物的组分通过肽键直接或通过连接子相互连接。

在本文的具体实施方案中,所述“免疫缀合物”中的抗原结合部分是 PD-1 结合结构域,并且所述效应物部分是 IL-2 或其变体。

“程序性死亡 1”、“细胞程序性死亡 1”、“蛋白 PD-1”、“PD-1”、“PDCD1”和“hPD-1”可互换使用,且包括人 PD-1 的变体、同种型、物种同源物、以及
5 PD-1 具有至少一个共同表位的类似物。完整的 PD-1 序列可以从 GenBank 登录号 U64863 找到。“程序性死亡配体-1(PD-L1)”是 PD-1 的两种细胞表面糖蛋白配体之一(另一种为 PD-L2),它在与 PD-1 结合时下调 T 细胞活化和细胞因子分泌。如本文中使用的“PD-L1”包括人 PD-L1(hPD-L1),hPD-L1 的变体、同种型、和种间同源物,以及与 hPD-L1 具有至少一个共同表位的类似物。完整的 hPD-L1 序列
10 可以用 GenBank 登录号 Q9NZQ7 查到。

如本文所用术语“PD-1 结合结构域”或“PD-1 结合蛋白”可互换使用,意指任何能够特异性结合 PD-1 的蛋白或包含所述蛋白的任何分子。PD-1 结合蛋白可以包括针对 PD-1 的如本公开定义的抗体、其抗原结合片段或其缀合物。PD-1 结合蛋白还涵盖免疫球蛋白超家族抗体(IgSF)或 CDR 移植分子。本公开的“PD-1 结合蛋白”
15 可以包含至少一个结合 PD-1 的免疫球蛋白单一可变结构域(如 VHH)。在一些实施方案中,“PD-1 结合蛋白”可以包含 2、3、4 或更多个结合 PD-1 的免疫球蛋白单一可变结构域(如 VHH)。本公开的 PD-1 结合蛋白除包含 PD-1 的免疫球蛋白单一可变结构域外,也可包含连接子和/或具有效应器功能的部分,例如半衰期延长部分(如结合血清白蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域)、和/或融合配偶体(如血清白蛋白)和/或缀合的聚合物(如 PEG)和/或 Fc 区。在一些实施方案中,本公开的“PD-1 结合蛋白”还涵盖双/多特异性抗体,其含有结合不同抗原的免疫球蛋白(如结合第一抗原(如 PD-1)的第一抗体和结合第二抗原(如 4-1BB)的第二抗体,可选的,包括结合第三抗原的第三抗体,进一步可选的,包括结合第四抗原的第四抗体。
20

本公开的“PD-1 结合蛋白”或“PD-1 抗体或其抗原结合片段”可以例如缀和的方式包含一个或多个效应分子。所述“效应分子”包括例如抗肿瘤剂、药物、毒素、生物活性蛋白(例如酶)、其它抗体或抗体片段、合成或天然存在的聚合物、核酸及其片段(例如 DNA、RNA 及其片段)、放射性核素,特别地放射性碘化物、放射性同位素、螯合金属、纳米颗粒和报道基团例如荧光化合物或可通过 NMR 或
30 ESR 光谱分析检测的化合物。一些实施方案中,效应分子为细胞因子(例如 IL-2、IL-15 或其变体)。另一些实施方案中,效应分子是聚合物,其通常可以是合成或天然存在的聚合物,合成聚合物的具体实例包括任选地取代的直链或支链聚(乙二醇)、聚(丙二醇)、聚(乙烯醇)或其衍生物,具体的天然存在的聚合物包括乳糖、直链淀粉、葡聚糖、糖原或其衍生物。另一些实施方案中,聚合物是白蛋白或其片段,例如人血清白蛋白或其片段。聚合物与 PD-1 结合蛋白或 PD-1 抗体的缀和方式可以通过常规方法实现。
35

“细胞因子”是由一个细胞群体释放的、作为细胞间介质作用于其它细胞的蛋白质的一般。这样的细胞因子的例子包括淋巴因子、单核因子、趋化因子和传统的多肽激素。示例性的细胞因子包括：人 IL-2、IL-15、IFN- γ 、IL-6、TNF α 、IL-17 和 IL-5 及其变体。

5 “白介素-2”或“IL-2”指来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物如灵长类(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)的任何天然的 IL-2。该术语涵盖未加工的 IL-2 以及源自细胞中的加工的任何形式的 IL-2。该术语还涵盖天然存在的 IL-2 变体，例如剪接变体或等位变体。例示性野生型人 IL-2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 87 所示。未加工的人 IL-2 额外包含 N 端 20 个氨基酸的信号肽(如 WO2012107417 中的
10 的 SEQ ID NO.272 所示)，所述信号肽在成熟的 IL-2 分子中是缺乏的。

“突变的 IL-2”或“IL-2 变体”是指由于在至少一个氨基酸位置处的突变(例如取代、缺失、添加)而与野生型 IL-2 氨基酸序列不同的多肽。

本公开中，在提及 IL-2 变体时，以如下方式来描述单氨基酸取代：[原始氨基酸残基/位置/取代的氨基酸残基]。例如，位置 42 的苯丙氨酸取代为丙氨酸，可以
15 表示为 F42A。可以通过“/”将各单氨基酸取代连接起来，以表示在多个给定位置的组合突变。例如 F42A、L72G 和 N88R 位置的组合突变，可以表示为：F42A/L72G/N88R，意味着所述变体包含 F42A、L72G 和 N88R 突变。

本公开中，当提及 IL-2 蛋白或 IL-2 序列区段中的氨基酸位置时，通过参考野生型人 IL-2 蛋白(也称作 wt IL-2)的氨基酸序列 SEQ ID NO:87 进行确定。可以通过
20 与 SEQ ID NO:87 进行氨基酸序列比对，鉴定在其它 IL-2 蛋白或多肽(包括全长序列或截短片段)上的对应氨基酸位置。因此，在本公开中，除非另有说明，否则 IL-2 蛋白或多肽的氨基酸位置为根据 SEQ ID NO:87 编号的氨基酸位置。例如，当提及“F42”时，是指 SEQ ID NO:40 的第 42 位苯丙氨酸残基 F，或经比对在其它 IL-2 多肽序列上的对应位置的氨基酸残基。为进行氨基酸位置确定而实施的序列比对，
25 可以使用可从 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 获得的 Basic Local Alignment Search Tool，采用默认参数进行。

“CD25”或“IL-2 受体的 α 亚基”指来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物如灵长类(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)的任何天然 CD25，包括“全长”的未加工的 CD25 以及源自细胞中的加工的任何形式的 CD25，还包括天然存在的
30 CD25 变体，例如剪接变体或等位变体。在某些实施方案中，CD25 是人 CD25。

“高亲合力 IL-2 受体”指 IL-2 受体的异型三聚体形式，其由受体 γ 亚基(也称为通用细胞因子受体 γ 亚基、 γ_c 或 CD132)、受体 β 亚基(也称为 CD122 或 p70)和受体 α 亚基(也称为 CD25 或 p55)组成。比较而言，“中等亲合力 IL-2 受体”指仅包含 γ 亚基和 β 亚基而无 α 亚基的 IL-2 受体(参见例如 Olejniczak 和 Kasprzak,
35 MedSci Monit14, RA179-189(2008))。

“抗体”以最广义使用，涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多

克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体(例如双特异性抗体)，全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段，或抗原结合部分)，只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中第每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区(V 区)；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区(C 区)。可变区包括 3 个高变区(CDR)和 4 个序列相对保守的骨架区(FR)。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1，LCDR2，和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。

“抗原结合片段”涵盖单链抗体(即全长重链和轻链)；Fab、修饰的 Fab、Fab'、修饰的 Fab'、F(ab')₂、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体(例如 VH 或 VL 或 VHH)、scFv、二价或三价或四价抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetraabody 和上述任意一种的表位结合片段(参见例如 Holliger and Hudson,2005,Nature Biotech.23(9): 1126-1136; Adair and Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3),209-217)。一些实施方案中，抗原结合片段为 VHH。产生和制备这些抗原结合片段的方法在本领域是公知的(参见例如 Verma 等人,1998,Journal of Immunological Methods,216,165-181)。Fab-Fv 形式首先公开于 WO2009/040562，其二硫键稳定化形式 Fab-dsFv 首先公开于 WO2010/035012。本公开的抗原结合片段还包括描述于 WO2005/003169、WO2005/003170 和 WO2005/003171 中的 Fab 和 Fab' 片段。多价抗体可包含多特异性例如双特异性或可以是单特异性的(参见例如 WO92/22583 和 WO05/113605)，后的一个示例是描述于 WO 92/22583 中的 Tri-Fab(或 TFM)。

“Fc 域”或“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链中至少含有恒定区的一部分的 C 端区域。其包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。虽然 IgG 重链的 Fc 区的边界可以略微变化，但是人 IgG 重链 Fc 区通常定义为自 Cys226 或 Pro230 延伸至重链的羧基端。然而，由宿主细胞生成的抗体可能经历翻译后切割，自重链的 C 端切除一个或多个，特别是一个或两个氨基酸。因此，通过表达编码全长重链的特定核酸分子由宿主细胞生成的抗体可包括全长重链，或者它可包括全长重链的切割变体(在本公开中也称作“切割变体重链”)。当重链的最终两个 C 端氨基酸是甘氨酸

(G446)和赖氨酸(K447, 编号方式依照 Kabat EU 索引)时可能就是这种情况。因此, Fc 区的 C 端赖氨酸(K447), 或 C 端甘氨酸(G446)和赖氨酸(K447)可以存在或不存在。如果没有另外指明的话, 包括 Fc 区(或本公开中定义的 Fc 区的亚基)的重链的氨基酸序列在本公开中表示无 C 端甘氨酸-赖氨酸二肽的。在一个实施方案中, 免疫缀合物中包含的 Fc 区的一个亚基的重链包含另外的 C 端甘氨酸-赖氨酸二肽 (G446 和 K447, 编号方式依照 Kabat 的 EU 索引)。在一个实施方案中, 免疫缀合物中包含的 Fc 区的一个亚基的重链包含另外的 C 端甘氨酸残基(G446, 编号方式依照 Kabat 的 EU 索引)。本公开的组合物(例如药物组合物), 包含本公开的免疫缀合物的群体。免疫缀合物的群体可包含具有全长重链的分子和具有切割变体重链的分子。免疫缀合物的群体可以由具有全长重链的分子和具有切割变体重链的分子的混合物组成, 其中至少 50%, 至少 60%, 至少 70%, 至少 80%或至少 90%的免疫缀合物具有切割变体重链, 所述切割变体重链可以是 Fc 区的 C 端赖氨酸 (K447), 或 C 端甘氨酸(G446)和赖氨酸(K447)不存在。除非本公开中另外指定, Fc 区或恒定区中氨基酸残基的编号方式依照 EU 编号系统, 也称作 EU 索引, 如记载于 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991。

Fc 区的“亚基”指形成二聚体 Fc 区的两个多肽之一, 即包含免疫球蛋白重链中能够稳定自身联合的 C 端恒定区的多肽。例如, IgG Fc 区的亚基包含 IgG CH2 和 IgG CH3 恒定域。本公开中, “第一亚基”或 Fc1、“第二亚基”或 Fc2 的使用不意图赋予特定次序或取向, 是为了便于区分而使用。

“促进 Fc 域的第一亚基和第二亚基联合的修饰(或突变)”是降低或防止包含 Fc 域亚基的多肽与相同多肽联合以形成同二聚体的肽主链操作或 Fc 域亚基的翻译后修饰。如本文中使用的, 具体地, 促进联合的修饰包括对期望联合的两个 Fc 域亚基(即 Fc 域的第一亚基和第二亚基)中的每一个进行的分开的修饰, 其中所述修饰彼此互补, 从而促进两个 Fc 域亚基的联合。例如, 促进联合的修饰可以改变一种或两种 Fc 域亚基的结构或电荷, 从而在立体或静电上分别促进它们的联合。如此, (异)二聚化在包含第一 Fc 域亚基的多肽和包含第二 Fc 域亚基的多肽之间发生, 其在融合至每个亚基的别的组分(例如抗原结合模块)不同这一意义上讲可能是不相同的。在一些实施方案中, 促进联合的修饰包含在 Fc 域中的氨基酸突变, 具体为氨基酸替代。

“互补性”指例如本文所述抗原结合蛋白的 CH1 和 CL(或 CH3 和 CH3)的界面处影响重链/轻链配对的相互作用的组合。“空间互补性”或“构象互补性”指例如 CH1 和 CL(或 CH3 和 CH3)的相互作用表面处的三维结构的相容性。“静电互补性”指在例如 CH1 和 CL(或 CH3 和 CH3)的相互作用表面处放置带负电荷和/或正电荷原子的相容性。测量蛋白质/蛋白质界面处的静电互补性的方法为本领域已知, 并描述于例如 McCoy 等(1997)J Mol Biol 268,570-584; Lee 等,(2001)Protein

Sci.10,362-377; 和 Chau 等(1994)J Comp Mol Des8,51325 中。测量蛋白质/蛋白质界面处的空间互补性的方法为本领域已知, 并描述于例如 Lawrence 等(1993)J Mol Biol 234,946-950; Walls 等(1992)J Mol Biol228,277-297; 和 Schueler-Furman 等(2005)Proteins 60,187-194 中。

5 “效应器功能”在提到抗体使用时指那些可归于抗体 Fc 区且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括:C1q 结合和补体依赖性细胞毒性(CDC), Fc 受体(FcR)结合, 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC), 抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP), 细胞因子分泌, 免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取, 细胞表面受体(例如 B 细胞受体)下调和 B 细胞激活。ADCC 是一种导致通过
10 免疫效应器细胞对抗体包被的靶细胞裂解的免疫机制。靶细胞是包含 Fc 区的抗体或其衍生物一般经由 Fc 区的 N 端的蛋白质部分特异性结合的细胞。“降低的 ADCC”定义为通过上文定义的 ADCC 机制, 以靶细胞周围介质中给定浓度的抗体, 在给定的时间内裂解的靶细胞数目的降低, 和/或通过 ADCC 机制, 实现给定时间内给定数目的靶细胞裂解需要的靶细胞周围介质中抗体浓度的增加。ADCC
15 的降低是相对于使用本领域技术人员已知的相同的标准生产、纯化、配制和贮存方法, 由同一类型的宿主细胞生成但尚未工程化改造的相同抗体介导的 ADCC。例如, 由在其 Fc 域包含降低 ADCC 的氨基酸替代的抗体所介导的 ADCC 中的降低, 是相对于由在 Fc 域中无此氨基酸替代的相同抗体介导的 ADCC 而言。测量 ADCC 的合适测定法是本领域中公知的(参见例如 WO2006/082515 或
20 WO2012/130831)。

“激活 Fc 受体”是一种在抗体的 Fc 域衔接后, 引发刺激携带该受体的细胞实施效应器功能的信号传导事件的 Fc 受体。人激活 Fc 受体包括 FcγRIIIa(CD16a), FcγRI(CD64), FcγRIIa(CD32)和 FcαRI(CD89)。

25 “免疫缀合物”指包括至少一个 IL-2 分子和至少一个抗体的多肽分子。如本文中描述的, IL-2 分子可以通过多种相互作用及以多种构造连接至抗体。在特定实施方案中, IL-2 分子经由肽连接器融合至抗体。依照本发明的特定免疫缀合物本质上由通过一个或多个连接器序列连接的一个 IL-2 分子和抗体组成。

“降低的亲合力”或“降低的结合”, 例如降低的对 IL-2Rα 的结合, 指相应相互作用的亲合力降低, 例如通过 SPR 测量的。该术语还包括亲合力降低至 0 或
30 低于分析方法的检测限, 即完全消除相互作用。相反, “降低的亲合力”或“升高的结合”指相应相互作用的结合亲合力升高。

对于 CDR 的确定或定义, 能够通过分辨抗体的结构和/或分辨抗体-配体复合物的结构来完成 CDR 的确定性描绘和包含抗体的结合位点的残基的鉴定。这可通过本领域技术人员已知的各种技术中的任一种, 例如 X 射线晶体学来实现。多种
35 分析方法可用于鉴定 CDR, 包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统、AbM 编号系统、IMGT 编号系统、接触定义、构象定义。

Kabat 编号系统是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定 CDR 区域(参见例如 Johnson&Wu, 2000, Nucleic Acids Res., 28: 214-8)。Chothia 编号系统与 Kabat 编号系统类似, 但 Chothia 编号系统考虑了某些结构环区域的位置。(参见例如 Chothia 等, 1986, J.Mol.Biol., 196: 901-17; Chothia 等人, 1989, Nature, 342: 877-83)。AbM 编号系统使用建模抗体结构的由 Oxford Molecular Group 生产的计算机程序集成套件(参见例如 Martin 等, 1989, ProcNatl Acad Sci(USA), 86: 9268-9272; “AbMTM, A Computer Program for ModelingVariable Regions of Antibodies,”Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd)。AbM 编号系统使用知识数据库和从头开始方法的组合, 从基本序列建模抗体的三级结构(参见 Samudrala 等, 1999, 在 PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl., 3: 194-198 中的“Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined HierarchicalApproach”描述的那些)。接触定义基于可用复杂晶体结构的分析(参见例如 MacCallum 等, 1996, J.Mol.Biol., 5: 732-45)。构象定义中, CDR 的位置可鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基(参见例如 Makabe 等, 2008, Journal ofBiological Chemistry, 283: 1156-1166)。另外其它的 CDR 边界定义可能不严格遵循上述方法之一, 但仍然与 Kabat CDR 的至少一部分重叠, 尽管根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验结果, 它们可缩短或延长。如本公开使用的, CDR 可指通过本领域已知的任何方法(包括方法的组合)定义的 CDR。各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的, 示例性的, 如下表 1 中所示。

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

本公开的抗体的 VL 区和 VH 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号系统。

本公开的抗体可以是多克隆的、单克隆的、异种的、同种异体的、同基因的或其经过修饰的形式, 其中单克隆抗体尤其适用于多个实施例。一般来说, 本公开的抗体是重组抗体。如本文所用的“重组”泛指例如细胞或核酸、蛋白质或载体等产品, 表示所述细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质而加以修饰, 或所述细胞来源于如此修饰的细胞。例如, 重组细胞表达天然(非重组)细胞形式内不存在的基因或表达原本异常表达、低表达或完全不表达的天然基因。

多肽或蛋白的“结构域”是指折叠蛋白结构，其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言，结构域负责蛋白的单个功能性质，并在许多情况下可添加、移除或转移至其它蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

“免疫球蛋白结构域”是指抗体链(例如常规四肽链结构抗体的链或重链抗体的链)的球形区域，或是指基本上由这类球形区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于其维持抗体分子的免疫球蛋白折叠特征，其由排列在两个 β 折叠中任选由保守二硫键稳定的约 7 个反平行 β 折叠股的 2 层夹层组成。

“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由本领域及下文中分别称为“框架区 1”或“FR1”、“框架区 2”或“FR2”、“框架区 3”或“FR3”、及“框架区 4”或“FR4”的四个“框架区”组成的免疫球蛋白结构域，其中所述框架区由本领域及下文中分别称为“互补决定区 1”或“CDR1”、“互补决定区 2”或“CDR2”、及“互补决定区 3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”间隔开。因此，免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予其对抗原的特异性。

“免疫球蛋白单一可变结构域”通常用于指可以在不与其它可变结构域相互作用的情况下(例如在没有有如常规四链单克隆抗体的 VH 和 VL 结构域之间所需要的 VH/VL 相互作用的情况下)，形成功能性抗原结合位点的免疫球蛋白可变结构域(其可以是重链或轻链结构域，包括 VH、VHH 或 VL 结构域)。“免疫球蛋白单一可变结构域”的实例包括纳米抗体(包括 VHH、人源化 VHH 和/或骆驼化 VH，例如骆驼化人 VH)、IgNAR、结构域、作为 VH 结构域或衍生自 VH 结构域的(单结构域)抗体(例如 dAbsTM)和作为 VL 结构域或衍生自 VL 结构域的(单结构域)抗体(例如 dAbsTM)。基于和/或衍生自重链可变结构域(例如 VH 或 VHH 结构域)的免疫球蛋白单一可变结构域通常是优选地。免疫球蛋白单一可变结构域的一个具体实例为如下文定义的“VHH 结构域”(或简称为“VHH”)。

“VHH 结构域”，亦称为重链单域抗体、VHH、VHH 抗体片段、VHH 抗体、纳米抗体，是称为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: “Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature363, 446-448(1993))。使用“VHH 结构域”以将所述可变结构域与存在于常规四肽链结构抗体中的重链可变结构域(其在本公开中称为“VH 结构域”)以及轻链可变结构域(其在本公开中称为“VL 结构域”)进行区分。VHH 结构域特异性结合表位而无需其它抗原结合结构域(此与常规四肽链结构抗体中的 VH 或 VL 结构域相反，在该情况下表位由 VL 结构域与 VH 结构域一起识别)。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。“重链单域抗体”、“VHH 结构域”、“VHH”、“VHH 抗体片段”、“VHH 抗体”以及“结

构域”(“Nanobody”为 Ablynx N.V.公司, Ghent, Belgium 的商标)可互换使用。

“VHH 结构域”包括但不限于经骆驼科动物产生的天然抗体,也可以是骆驼科动物产生的抗体再经人源化的,也可以是经噬菌体展示技术筛选获得的。一些实施方案中,VHH 结构域包含三个 CDR 和四个框架区,指定为 FR1、CDR1、FR2、
5 CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。一些实施方案中,VHH 结构域可以在 N 端或 C 端被截短以使其仅包含部分 FR1 和/或 FR4,或缺少那些框架区中的一个或两个,只要 VHH 基本上保持抗原结合和特异性即可。VHH 结构域中的氨基酸残基的总数将通常在 110 至 120 范围内,常常介于 112 与 115 之间。然而应注意较小及较长序列也可适于本公开所述的目的。

10 如本领域中对于 VH 结构域及 VHH 结构域所公知的,各 CDR 中的氨基酸残基的总数可能不同,且可能不对应于由 Kabat 编号指示的氨基酸残基的总数(即根据 Kabat 编号的一个或多个位置可能在实际序列中未被占据,或实际序列可能含有多于 Kabat 编号所允许数目的氨基酸残基)。这意味着一般而言,根据 Kabat 的编号可能对应或可能不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。其它的编号系统
15 或编码规则包括 Chothia、IMGT、AbM。

“人源化抗体(humanized antibody)”,也称为 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将非人 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量非人蛋白成分,从而诱导的强烈的免疫应答反应。为避免在免疫原性下降的同时引起活性的下降,可对所述的全人抗体可变区可进行
20 最少反向突变,以保持活性。“人源化”的例子包括可将源自骆驼科的 VHH 结构域通过以人常规四肽链结构抗体 VH 结构域中相应位置处存在的一个或多个氨基酸残基置换原始 VHH 序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基而“人源化”(本公开中亦称为“序列优化”,除人源化外,“序列优化”也可涵盖通过提供 VHH 改良性质的一个或多个突变对序列进行的其它修饰,例如移除潜在的翻译后修饰位点)。人源化 VHH 结构域可含有一个或多个完全人框架区序列,且在一些具体实施方案中,可含 IGHV3 的人框架区序列。人源化方法例如蛋白表面氨基酸人源化(resurfacing)及抗体人源化通用框架移植法(CDR grafting to a universal
25 framework),即将 CDR “移植”于其它“支架”(包括但不限于人支架或非免疫球蛋白支架)上。适于所述 CDR 移植的支架及技术在本领域中是已知的。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库,以及在 Kabat, E.A.等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。此外,为避免免疫原性下降的同时,引起的活性下降,可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变,以保持活性。

35 “亲和力成熟的”抗体指与不拥有此类改变的亲本抗体相比,在一个或多个高变区(HVR)中具有一处或多处改变的抗体,此类改变导致该抗体对抗原的亲和力

改善。例如，“亲合力成熟”的 PD-1 抗体，在一个或多个 CDR 中具有一个或多个变化，所述变化导致对抗原的亲合力相比于其亲本抗体有所增加。亲合力成熟的抗体可通过例如由以下所述的本领域中已知的方法来制备：Marks 等人，1992，*Biotechnology* 10: 779-783 或 Barbas 等人，1994，*Proc.Nat.Acad.Sci, USA* 91: 3809-3813.; Shier 等人，1995，*Gene* 169: 147-155; Yelton 等人，1995，*Immunol.* 155: 1994-2004; Jackson 等人，1995，*J.Immunol.* 154(7): 3310-9; 及 Hawkins 等人，1992，*J.Mol.Biol.* 226(3): 889896; KS Johnson 及 RE Hawkins, “Affinity maturation of antibodies using phage display”, Oxford University Press 1996。

通常，本公开的 PD-1 抗体、免疫缀合物将以如于 Biacore 或 KinExA 或 Fortibio 测定中测量的优选 10^{-7} 至 10^{-10} 摩尔/升(M)、更优选 10^{-8} 至 10^{-10} 摩尔/升、甚至更优选 10^{-9} 至 10^{-10} 或更低的解离常数(KD)，和/或以至少 10^{-7} M、优选至少 10^{-8} M、更优选至少 10^{-9} M，更优选至少 10^{-10} M 的缔合常数(KA)结合所要结合的抗原(即 PD-1)。任何大于 10^{-4} M 的 KD 值一般都视为指示非特异性结合。抗原结合蛋白对抗原或表位的特异性结合可以以已知的任何适合方式来测定，包括例如本公开所述的表面等离子体共振术(SPR)测定、Scatchard 测定和/或竞争性结合测定(例如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)及夹心式竞争性测定)。

“抗原”指用于免疫接种免疫活性的脊椎动物的分子，以产生识别抗原的抗体，或筛选表达文库(例如尤其是噬菌体、酵母或核糖体展示文库)。在本公开中，抗原被更广义地定义，包括由抗体特异性识别的靶分子，以及包括用于产生抗体的免疫接种过程或用于选择抗体的文库筛选中使用的分子的一部分或模拟物。例如，对于本公开的与人 PD-1 结合的抗体，人 PD-1 的单体和多聚体(例如二聚体、三聚体等)，以及人 PD-1 的截短变体和其它变体均被称为 PD-1 抗原。

“表位”是指抗原上与免疫球蛋白或抗体结合的位点。表位可以由相邻的氨基酸、或通过蛋白质的三级折叠而并列的不相邻的氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保持，而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理后丧失。表位通常以独特的空间构象包括至少 3-15 个氨基酸。确定什么表位由给定的抗体结合的方法在本领域中是熟知的，包括免疫印迹和免疫沉淀检测分析等。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本公开所述的技术，例如 X 射线晶体分析法和二维核磁共振等。

“特异性结合”、“选择性结合”是指抗体与预定的抗原上的表位结合。例如，当使用人 PD-1 或其表位作为分析物并使用抗体作为配体，在仪器中通过表面等离子体共振(SPR)技术测定时，抗体以大约低于 10^{-7} M 或甚至更小的平衡解离常数(K_D)与预定的抗原或其表位结合，并且其与预定抗原或其表位结合的亲合力是其与预定抗原(或其表位)或紧密相关的抗原之外的非特异性抗原(如 BSA 等)结合的亲合力的至少两倍。“识别抗原的抗体”在本公开中可以与“特异性结合的抗体”互换使用。

“结合亲和力”或“亲和力”在本公开中用作两个分子(例如抗体或其部分与抗原)之间的非共价相互作用的强度量度。两个分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数(KD)来量化。可通过使用例如表面等离子共振(SPR)方法(Biacore)测量复合物形成和解离的动力学来确定 KD。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数
5 分别被称为结合速率常数 ka(或 kon)和解离速率常数 kd(或 koff)。KD 通过方程 $K_D = k_d/k_a$ 与 ka 和 kd 有关。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定,并且可通过方法例如 Caceci 等人(1984, Byte 9: 340-362)中所述的那些甚至对于复杂混合物进行计算。例如,可使用双重过滤硝化纤维素滤器结合测定如 Wong&Lohman(1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 5428-5432)中公开的那种来确定
10 KD。评估抗体针对靶抗原的结合能力的其它标准测定是本领域已知的,包括例如 ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析、以及本公开其它地方例举的其它测定。抗体的结合动力学和结合亲和力也可通过本领域已知的标准测定,例如表面等离子共振(SPR),例如通过使用 Biacore™ 系统或 KinExA 来评价。可通过比较各个抗体/抗原复合物的 KD 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲和力,例如,
15 不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较。类似地,相互作用的特异性可通过确定和比较目的相互作用(例如抗体和抗原之间的特异性相互作用)的 KD 值与非目的相互作用(例如已知不结合 CD40 的对照抗体)的 KD 值进行评价。

“保守性置换”指置换为具有与原始氨基酸残基相似的特性的另一个氨基酸残基。例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性,在于它们具有碱性侧链,
20 并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性,在于它们具有酸性侧链。此外,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性,在于它们具有不带电荷极性侧链,并且丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性,在于它们具有非极性侧链。另外,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性,在于它们具有芳族侧链。因此,本领域技术人员将显而易见,甚至当置换如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时,它将不显示特性的特定变化。
25

“同源性”、“同一性”或“序列同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同核苷酸或氨基酸单体占据时,例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被相同核苷酸占据时,那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100\%$ 的函数。例如,在序列最佳比对时,如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源,那么两个序列为 60%同源。一般而言,当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。
30

“核酸分子”、“核酸”或“多核苷酸”可互换使用,指 DNA 和 RNA。核酸分子可以是单链或双链的,优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序
35

列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

“载体”意指能够在宿主细胞中递送并且在一些实施例中表达一种或多种目的基因或序列的构建体。载体的例子包括但不限于病毒载体、裸露 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂结合的 DNA 或 RNA 表达载体、包封在脂质体中的 DNA 或 RNA 表达载体、以及某些真核细胞如生产细胞。

“宿主细胞”包括各个细胞或细胞培养物，其可为或已是用于掺入多核苷酸插入片段的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，并且由于天然、偶然或有意的突变，子代可不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态学或基因组 DNA 互补体中)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染和/或转化的细胞。“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括其后代。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述抗体或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其它化学组分的混合物，以及其它组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

“药学可接受的载体”或“药学可接受的赋形剂”包括当与活性成分组合时，允许该成分保留生物学活性并且不与受试者的免疫系统反应的任何材料。例子包括但不限于任何标准药物载体，例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂如油/水乳剂、和各种类型的润湿剂。在一些实施例中，用于气雾剂或肠胃外施用的稀释剂是磷酸盐缓冲盐水(PBS)或生理(0.9%)盐水。包含此类载体的组合物通过众所周知的常规方法配制(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, A.Gennaro, 编辑, Mack PublishingCo., Easton, PA, 1990; 以及 R Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 20 版 Mack Publishing, 2000)。

“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。“抑制生长”(例如涉及细胞)旨在包括细胞生长任何可测量的降低。

“增殖性疾病”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中，增殖性病症指癌症。

“癌症”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括但不限于鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)，肺癌(包括小细胞肺癌，非小细胞肺癌，肺的腺癌，和肺的鳞癌)，腹膜癌，肝细胞癌，胃癌(包括胃肠癌和胃肠基质癌)，胰腺癌，成胶质细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，尿道癌，肝癌，乳腺癌，结肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝癌，肛门癌，阴茎

癌, 黑素瘤, 浅表扩散性黑素瘤, 恶性雀斑样痣黑素瘤, 肢端黑素瘤, 结节性黑素瘤, 多发性骨髓瘤和 B 细胞淋巴瘤, 慢性淋巴细胞性白血病(CLL), 急性成淋巴细胞性白血病(ALL), 毛细胞性白血病, 慢性成髓细胞性白血病, 和移植后淋巴增殖性病症(PTLD), 以及与癍痣病(phakomatoses), 水肿(例如与脑瘤有关的)和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖, 脑瘤和脑癌, 以及头颈癌, 及相关转移。

在某些实施方案中, 适合于通过本公开的 PD-1 结合蛋白来治疗的癌症包括乳腺癌, 结肠直肠癌, 直肠癌, 非小细胞肺癌, 成胶质细胞瘤, 非何杰金氏淋巴瘤(NHL), 肾细胞癌, 前列腺癌, 肝癌, 胰腺癌, 软组织肉瘤, 卡波西(Kaposi)氏肉瘤, 类癌癌(carcinoid carcinoma), 头颈癌, 卵巢癌, 间皮瘤, 和多发性骨髓瘤。一些实施方案中, 癌症选自: 非小细胞肺癌, 成胶质细胞瘤, 成神经细胞瘤, 黑素瘤, 乳腺癌(例如三重阴性乳腺癌), 胃癌, 结肠直肠癌(CRC), 和肝细胞癌。还有, 一些实施方案中, 癌症选自: 非小细胞肺癌, 结肠直肠癌, 成胶质细胞瘤和乳腺癌(例如三重阴性乳腺癌), 包括那些癌症的转移性形式。

“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖, 无论是恶性的还是良性的, 及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。

“癌症”、“癌性”、“增殖性病症”和“肿瘤”在本公开中提到时并不互相排斥。

“预防癌症”是指在受试者中延迟、抑制或防止癌症发作, 所述受试者中癌症发生或肿瘤发生的起始尚未得到证实, 但是通过例如遗传筛查或其它方法确定, 已鉴定了癌症易感性。该还包括治疗具有癌变前病症的受试者以终止所述癌变前病症向恶性肿瘤的进展或导致其消退。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时, 是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触, 例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触, 以及试剂与流体的接触, 其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。当应用于人、兽医学或研究受试者时, 是指治疗处理、预防或预防性措施, 研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂, 例如包含本公开的任一种抗体或其药物组合物作为治疗剂, 所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种增殖性疾病或其症状, 而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常, 在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂, 无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床能测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化, 例如受试者的疾病状态、年龄和体重, 以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任

何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验
5 确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。本公开的受试者
10 可以是动物或人类受试者。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。“和/或”应视为特定揭示两种指定特征或组分中的每一者具有或不具有另一者。因此，诸如本公开中“A 和/或 B”的
15 词组中所用的术语“和/或”包括“A 及 B”、“A 或 B”、“A”(单独)及“B”(单独)。除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不限于”的意义。

本公开中，除非另行定义，例如“第一”、“第二”、“第三”的使用不意图赋予特定次序或取向，是为了例如超过一个同类模块时便于区分而使用。

20 本公开中，“/”用于突变时，表示在同一个 IL-2 变体或同一个 Fc 或同一个免疫缀合物中，所述突变是同时存在的，例如“F42A/L72G”表示在同一个 IL-2 变体中同时存在 F42A 和 L72A 突变。

本公开中，“受试者”、“患者”意指哺乳动物，尤其灵长类动物，尤其是人。未予特殊说明的情况下，本公开中的 IL-2 或其变体的氨基酸位点编号均是相
25 对于野生型 IL-2(例如 SEQ ID NO: 87 所示)。

实施例

以下结合实施例用于进一步描述本公开，但这些实施例并非限制本公开的范围。

30 本公开实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience, NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

35 实施例 1. 抗 PD-1 纳米抗体的筛选和制备

本公开使用带有 His 标签的人 PD-1 作为免疫抗原，使用带有生物素标记的人

PD-1 和食蟹猴 PD-1 作为筛选抗原，以上均购自 AcroBiosystems 公司。

1. 免疫抗原、筛选抗原序列和制备

表 2. 免疫羊驼和筛选用 PD-1 抗原信息

抗原	货号	氨基酸起止	登录号
人 PD-1 蛋白(His Tag)	PD1-H5221	Leu25-Gln167	# NP_005009.2
生物素标记人 PD-1 蛋白(Avitag -His Tag)	PD1-H82E4		# Q15116-1
生物素标记猴 PD-1 蛋白(Avitag -His Tag)	PD1-C82E6		# B0LAJ3

5 人 PD-1 蛋白(NP_005009.2)序列如下，其中下划线为胞外区域序列，氨基酸起
止 Leu25-Gln 167。

 >人 PD-1 氨基酸序列

 MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVVTEGDNATFTC
 SFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVR
10 ARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTLVV
 GVVGGLLGLSVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQ
 WREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
 (SEQ ID NO: 1)

 2. 羊驼免疫、纳米抗体酵母展示文库构建和抗体筛选

15 1)羊驼免疫

 对 2 只健康羊驼(alpaca)进行免疫。第 0 天初次免疫，将 0.25 mg 人 PD-1 抗原
 与弗氏完全佐剂 (CFA) 1 ml 混匀后皮下注射。第 21、42、63 天，将 0.125 mg 人
 PD-1 抗原与弗氏不完全佐剂(IFA) 1 ml 混匀后皮下注射。分别在第 28 天、49 天、
 70 天采血 10 ml、50 ml、50 ml。检测血清滴度，符合建库标准的羊驼外周淋巴细
20 胞用于构建纳米抗体酵母展示文库。

 2)酵母库构建

 分别采集 2 只羊驼第三次和第四次免疫后 50mL 外周血，分离出外周血中的
 PBMC，提取 PBMC 中的 RNA，反转录，获取总 cDNA。将 cDNA 作为巢氏 PCR
 第一轮反应模板。经过两轮巢式 PCR 扩增，第二轮巢氏 PCR 产物片段与酵母文库
25 载体 (酵母文库载体 pYDN3)连接，将连接产物电击转化进入酵母感受态细胞。采
 用菌落 PCR 方法验证插入率和文库多样性。依据库转化子数、库插入率和文库多
 样性分析测序结果表明，一只羊驼文库库容为 9.28×10^7 ，另一只羊驼文库库容为
 1.54×10^8 。

 3)纳米抗体(VHH)筛选

30 对此酵母展示系统采用流式细胞荧光(FACS)分选，以及文库筛选与鉴定进行
 抗体的筛选。分选采用两轮分选步骤：第一轮分选采用生物素标记人 PD-1 蛋白
 (Avitag -His Tag)磁珠富集，第二轮采用生物素标记猴 PD-1 蛋白(His, Avitag)流式
 分选仪进行分选(流式抗体为：小鼠抗 HA 标签 Dylight 488(Mouse anti-HA tag
 Dylight 488)；链霉亲和素 Dylight 650(streptavidin Dylight 650))。两轮分选结束后

经过单克隆鉴定、测序、序列分析获得人、猴 PD-1 抗原交叉结合的 18 条 VHH 独特序列。以下示出其中的 A6 和 A17 序列。

>A6 可变区

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSSAAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSF
5 GSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAADPSIETMGGGWDY
WGQGTQVTVSS(SEQ ID NO: 2)

>A17 可变区

EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGLTFSDYSMSWYRQAPGKERELVAIISGSGV
IAHYVDSVKGRFTISRDNASTVYLMVSLKPEDRGVYYCRAVSDWDDYWGQGTQV
10 TVSS(SEQ ID NO: 3)

表 3. 抗 PD-1 纳米抗体的 CDR(Kabat 编号规则)

编号	CDR 序列	
A6	CDR1	SAAMG (SEQ ID NO : 4)
	CDR2	ISWSFGSTYYADSVKG (SEQ ID NO : 5)
	CDR3	DPSIETMGGGWDY (SEQ ID NO : 6)
A17	CDR1	DYSMS (SEQ ID NO : 7)
	CDR2	IISGSGVIAHYVDSVKG (SEQ ID NO : 8)
	CDR3	VSDWDDY (SEQ ID NO : 9)

将上述序列分别连接到人 IgG4 Fc (包含铰链区, 且带有 S228P, 根据 EU 编号系统)片段上, 构建成 VHH-Fc 抗体。构建质粒, 瞬转 293 细胞, 表达, 使用蛋白 A
15 柱纯化, PBS 洗柱, 0.1 M 甘氨酸缓冲液洗脱, pH 2.5。透析至 PBS pH7.4 缓冲液中。其中人 IgG4 Fc(包含铰链区)序列如下:

>hIgG4

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
20 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
(SEQ ID NO: 10)

>A6_hIgG4

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSSAAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSF
25 GSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAADPSIETMGGGWDYW
GQGTQVTVSSISKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
30 LSLGK (SEQ ID NO: 11)

>A17_hIgG4

EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGLTFSDYSMSWYRQAPGKERELVAIISGSGVI
AHYVDSVKGRFTISRDNASTVYLMVSLKPEDRGVYYCRAVSDWDDYWGQGTQVT

VSSSESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

5 (SEQ ID NO: 12)

实施例 2. 抗 PD-1 纳米抗体与抗原 PD-1 的亲合力鉴定

1. ELISA

使用 PBS 溶解人 PD-1 蛋白(his tag)至 1μg/mL, 100uL/孔加入到 96 孔板中, 4℃
10 过夜, 包被抗原。使用 PBST(PBS+0.05% tween20)溶液洗三次。加入 PBST/1%BSA
溶液, 37℃孵育 1h, 进行封闭。PBST 溶液洗三次后加入不同浓度的 PD-1 候选
VHH-Fc 抗体(PBST/1% BSA 溶液稀释), 37℃孵育 1.5 小时。PBST 溶液洗三次。
加入 100 μL HRP 偶联的抗人 IgG4 Fc 的二抗(Thermo)溶液, 37℃孵育 1 小时。PBST
溶液洗三次后, 加入 100μL/孔 TMB 溶液, 室温反应 5 min 后, 加入 50 μL 终止液,
15 而后使用酶标仪读取 450 nM 值, 计算 EC₅₀,

结果如表 4, 显示 A6_hIgG4 和 A17_hIgG4 均与 PD-1 抗原有较强的结合力。

表 4. ELISA 检测抗 PD-1 纳米抗体的 EC₅₀ 值

20	抗体编号	EC ₅₀ (nM)
	A6_hIgG4	0.08605
	A17_hIgG4	0.06099

2. FACS

为检测抗 PD-1 纳米抗体与细胞膜上表达的 PD-1 的结合能力, 将不同浓度的
候选抗 PD-1 VHH-Fc 抗体加入到 10⁵/孔过表达人 PD-1 的 Jurkat 细胞(Cat: J1250,
25 Promega)中, 室温孵育 20 min 后, PBS 洗两次后, 加入 100 μL 抗人 IgG Fc 的荧光
二抗(Biolegend), 室温孵育 20 min 后, PBS 洗两次, 250 μL PBS 重悬, 使用 FACS
检测荧光信号, 计算 EC₅₀。

使用派姆单抗(购自百英生物)作为对照, 结果如表 5 所示。并且, A17_hIgG4
的 EC₅₀ 值为 0.3568 nM, 显著优于同步筛选获得的其它抗体(结果未出示)。

30 表 5. FACS 检测抗 PD-1 纳米抗体结合细胞表面 PD-1 的 EC₅₀ 值

抗体	EC ₅₀ (nM)
A6_hIgG4	1.09
A17_hIgG4	0.3568
派姆单抗	0.2169

实施例 3. 抗 PD-1 纳米抗体的序列改造

1. 抗 PD-1 纳米抗体的人源化和回复突变

抗体人源化通过 CDR 移植(CDR-grafting)方法进行。通过 IMGT 或 NCBI 网
35 站, 将母本 PD-1 抗体与 IMGT 或 NCBI/igblast 数据库中的全人源胚系基因进行比

对, 选择与 PD-1 纳米抗体高度同源的人胚系基因 IGHV 3-23(IGHV3-23*01; IGHV3-23*04)作为人源化模板, 移植 CDR, 保留纳米抗体的 FR2 中的 4 个关键残基(Y37、E44、R45、L47)。并对接近 CDR 区的关键核心残基, 以及 CDR 相互作用的 Vernier 位置残基进行回复突变。获得人源化抗体 A17h1、A17h2、A17h3、

5 A6h1。

> A17h1 可变区

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
AHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMRLTPEDRAVYYCRAVSDWDDYWGQGTQVT
VSS

10 (SEQ ID NO: 13)

> A17h2 可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGLTFSDYSMSWVRQAPGKGLEWVAIISGSGV
IAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCRAVSDWDDYWGQGTQVT
VSS(SEQ ID NO: 14)

15 > A17h3 可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGLTFSDYSMSWVRQAPGKGLEWVAIISGSGV
IAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCRAVSDWDEYWGQGTQVT
VSS(SEQ ID NO: 15)

> A6h1 可变区

20 EVQLLES GGGLVQAGGSLRLSCATSGRTFSSAAMGWFRQAPGKGLEWVA AISWSE
GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTAVYYCAADPSIETMGGGWDYW
GQGTQVT VSS(SEQ ID NO: 16)

2. 去除 TCE(T 细胞表位)、降低抗体脱酰胺、降低抗体异构化改造

为降低抗体潜在的免疫原性风险, 进行去除 TCE 改造。为提高抗体的成药性,
25 进行抗体脱酰胺、抗体异构化位点的改造。获得如下序列:

> A17m01 可变区

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
AHYVDSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMRLTPEDRAVYYCRAVSDWDDYWGQGTQVT
VSS(SEQ ID NO: 17)

30 > A17m02 可变区

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
THYVDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMRLTPEDRAVYYCRAVSDWDDYWGQGTQVT
VSS(SEQ ID NO: 18)

> A17m03 可变区

35 EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGGI
AHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMRLTPEDRAVYYCRAVSDWDDYWGQGTQVT
VSS(SEQ ID NO: 19)

> A17m04 可变区

40 EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGV
SAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMRLTPEDRAVYYCRAVSDWDDYWGQGTQVT

- VSS(SEQ ID NO: 20)
> A17m05 可变区
EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
AHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWEDYWGQGTQVT
- 5 VSS(SEQ ID NO: 21)
> A17m06 可变区
EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
AHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDEYWGQGTQVT
- VSS(SEQ ID NO: 22)
10 > A17m07 可变区
EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
AHYVDSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWEDYWGQGTQVT
- VSS(SEQ ID NO: 23)
> A17m08 可变区
15 EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
AHYVDSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDEYWGQGTQVT
- VSS(SEQ ID NO: 24)
> A17m09 可变区
EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVITHY
20 VDSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWEDYWGQGTQVT VSS(
SEQ ID NO: 25)
- > A17m10 可变区
EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
25 THYVDSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDEYWGQGTQVT
- VSS(SEQ ID NO: 26)
> A17m11 可变区
EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGGI
AHYVDSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWEDYWGQGTQVT
- 30 VSS(SEQ ID NO: 27)
> A17m12 可变区
EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGGI
AHYVDSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDEYWGQGTQVT
- VSS(SEQ ID NO: 28)
35 > A17m13 可变区
EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGV
SAHYVDSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWEDYWGQGTQV
- TVSS(SEQ ID NO: 29)
> A17m14 可变区
40 EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGV
SAHYVDSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDEYWGQGTQV

TVSS(SEQ ID NO: 30)

> A17m15 可变区

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGGI
THYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWEDYWGQGTQVT

5 VSS(SEQ ID NO: 31)

并且, 进一步选择 A17m09 对抗体序列胚系化改造, 以提高人源化程度, 获得如下序列:

> A17m0901 可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
 10 THYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWEDYWGQGTQVT

VSS(SEQ ID NO: 32)

> A17m0902 可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
THYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWEDYWGQGTQVT

15 VSS(SEQ ID NO: 33)

> A17m0903 可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
THYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWEDYWGQGTQVT

VSS(SEQ ID NO: 34)

20 > A17m0905 可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVI
THYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMRSLRAEDRAVYYCRAVSDWEDYWGQGTQVT

VSS(SEQ ID NO: 35)

即, 本公开的 A17 的 CDR 区具有如下的通式序列:

25 CDR1: DYSMS (SEQ ID NO: 7)

CDR2: IISGSGX₁X₂X₃HYVDSVKG, 其中, X₁ 选自 V 或 G, X₂ 选自 I 或 S, X₃ 选自 T 或 A (SEQ ID NO: 36)

CDR3: VSDWX₄X₅Y, 其中, X₄ 选自 D 或 E, X₅ 选自 D 或 E (SEQ ID NO: 37)

30 具体地, CDR2 可以为:

IISGSGVIAHYVDSVKG (SEQ ID NO: 8)

IISGSGVITHYVDSVKG (SEQ ID NO: 38)

IISGSGGIAHYVDSVKG (SEQ ID NO: 39)

IISGSGVSAHYVDSVKG (SEQ ID NO: 40)

35 IISGSGGITHYVDSVKG (SEQ ID NO: 94)

CDR3 可以为:

VSDWDDY (SEQ ID NO: 9)

VSDWEDY (SEQ ID NO: 41)

VSDWDEY (SEQ ID NO: 42)

实施例 4. PD-1/PD-L1 报告基因系统检测抗 PD-1 纳米抗体对 PD-1 的阻断

使用 PD-1/PD-L1 NFAT 基因报告系统(Cat: J1250, Promega), 可以检测 PD-1 抗体在细胞层面的生物学活性功能。该系统由两个基因工程细胞系组成: 过表达 PD-1 的效应细胞 Jurkat(内含 NFAT 报告基因荧光素酶)和过表达 PD-L1 的抗原递呈细胞 CHO-K1 细胞。当这两种细胞共培养时, PD-1/PD-L1 相互作用会抑制 TCR 介导的 NFAT 活化, 进而抑制 NFAT 报告基因荧光素酶的表达。当 PD-1/PD-L1 相互作用被破坏时, TCR 激活会通过 NFAT 通路诱导荧光素酶的表达, 可以通过添加 Bio-Glo 试剂和使用光度计进行荧光定量检测, 从而测定效应细胞活化程度以及抗体的生物学活性。

将过表达 PD-L1 的 CHO-K1 细胞稀释到 $4\times10^5/\text{mL}$, 在 96 孔板中, 每孔加入 $100\mu\text{L}$, 培养过夜。吸出培养基后, 迅速加入 $40\mu\text{L}$ $1.25\times10^6/\text{mL}$ 的 PD-1 Jurkat 细胞以及不同浓度的 $40\mu\text{L}$ 抗 PD-1 纳米抗体溶液($1640+2\%\text{FBS}$ 溶液稀释)。 37°C 培养 6 小时, 恢复至室温, 每孔加入 $40\mu\text{L}$ Bright-glo 试剂(Cat: E2620, promega), 350 rpm 避光震荡 5 min, 避光, 室温静置 5min 后, 使用酶标仪读取荧光值, 计算 IC_{50} 。

使用派姆单抗和 hIgG4 isotype 作为对照。如图 1A 和表 6 所示, A17_hIgG4 的生物学功能活性 IC_{50} 值为 1.199nM, 显著优于本公开同步筛选的其它抗体(例如 A3_hIgG4 为 7.62, A13_hIgG4 为 3.208; A3_hIgG4 和 A13_hIgG4 未示出序列)。

表 6. PD-1/PD-L1 NFAT 报告基因系统检测抗 PD-1 纳米抗体的活性 IC_{50} 值

抗体	$\text{IC}_{50}(\text{nM})$
A6_hIgG4	1.354
A17_hIgG4	1.199
派姆单抗	0.5126
hIgG4	-

采用如上方法, 对抗 PD-1 纳米抗体进行功能验证, 参见图 1B 和表 7, A17h1_hIgG4 的 IC_{50} 活性与阳性抗体派姆单抗相似。经改造的候选分子中, A17m0901_hIgG4、A17m0902_hIgG4 抗体的生物学活性 IC_{50} 值分别为 0.5307 nM、0.4352 nM, 优于派姆单抗。

表 7. PD-1/PD-L1 NFAT 报告基因系统检测经改造的抗 PD-1 纳米抗体的活性 IC_{50}

抗体	$\text{IC}_{50}(\text{nM})$
A17h1_hIgG4	1.039
A17m09_hIgG4	1.083
A17m0901_hIgG4	0.5307
A17m0902_hIgG4	0.4352
A17m0903_hIgG4	1.284
A17m0905_hIgG4	0.5588

派姆单抗	0.9756
------	--------

实施例 5. 经改造的抗 PD-1 纳米抗体与抗原 PD-1 的结合亲和力鉴定

采用表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR)检测抗 PD-1 纳米抗体与 PD-1 抗原的亲和力，使用 Biacore 8k(GE Healthcare)。实验选用 CM5 传感器芯片，流动相采用 HBS-EP+缓冲溶液(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% surfactant P20)。将抗人 IgG (Fc) 抗体用 10 mM 醋酸钠缓冲液(pH 5.0)，配制成 30 μg/mL 溶液，选择 Immobilization 程序自动进行抗人 IgG (Fc) 抗体通道氨基偶联固定。用 HBS-EP+缓冲溶液分别配制各待测抗体作为配体，用芯片通道上的抗人 IgG (Fc) 抗体进行捕获。将人或食蟹猴 PD-1 抗原蛋白(Sino Biological, 10377-H08H; 90311-C08H)作为分析物，用 HBS-EP+缓冲溶液进行配制，分析物进行 2 倍梯度稀释将稀释，在 30 μL/min 的流速下流过实验通道和参比通道，结合 1min，解离 15min。再生缓冲液 10 mM Glycine pH 1.5(GE Healthcare, BR-1003-54) 在 10 μl/min 的流速下运行 30s, 计算结合速率 K_a 和解离速率 K_d , 以及解离常数(即亲和力 K_D)。结果参见表 8 和表 9。

表 8. 抗 PD-1 纳米抗体结合人 PD-1 抗原的 SPR 亲和力数据

抗体	$k_a(1/MS)$	$K_d(1/s)$	$K_D(M)$
A17h1_hIgG4	4.30E+05	8.68E-04	2.02E-09
A17m09_hIgG4	4.58E+05	1.63E-03	3.56E-09
A17m0901_hIgG4	2.97E+05	1.92E-03	6.44E-09
A17m0902_hIgG4	2.91E+05	1.77E-03	6.09E-09
派姆单抗	1.25E+06	3.89E-03	3.11E-09

表 9. 抗 PD-1 纳米抗体结合食蟹猴 PD-1 抗原的 SPR 亲和力数据

抗体	$k_a(1/MS)$	$K_d(1/s)$	$K_D(M)$
A17h1_hIgG4	4.44E+05	8.07E-04	1.82E-09
A17m09_hIgG4	4.81E+05	8.43E-04	1.75E-09
A17m0901_hIgG4	3.40E+05	1.13E-03	3.32E-09
A17m0902_hIgG4	3.28E+05	1.08E-03	3.28E-09
派姆单抗	1.31E+06	1.15E-03	8.82E-10

结合人 PD-1 抗原结果显示，人源化抗体 A17h1_hIgG4 及后续改造优化的抗体 A17m09_hIgG4、A17m0901_hIgG4、A17m0902_hIgG4 与派姆单抗具有相似的 K_D 值。A17h1_hIgG4、A17m09_hIgG4、A17m0901_hIgG4、A17m0902_hIgG4 均比派姆单抗的解离时间慢。A17h1_hIgG4、A17m09_hIgG4、A17m0901_hIgG4、A17m0902_hIgG4 抗体交叉结合猴 PD-1，抗体结合人和猴 PD-1 的具有相似亲和力。

实施例 6. DC: T 混合淋巴反应检验经改造的抗 PD-1 纳米抗体的体外药效

(MLR)

成熟的树突细胞(Dendritic cells, DC)与异体 T 细胞共培养，可以激活 T 细胞，促进 T 细胞分泌细胞因子。该过程受 PD-1/PD-L1 信号抑制，使用 PD-1 抗体可以解除抑制，促进 T 细胞活化。因此，使用 DC: T 混合淋巴反应实验，可以检验 PD-1 抗体的体外药效。

使用分选试剂盒(cat: 19359, stemcell)从一个健康人的新鲜外周血(PBMC)中分选出单核细胞。使用 DC 细胞诱导试剂盒(cat: 10985, stemcell)，培养七天后，诱导单核细胞分化为成熟 DC 细胞。而后使用分选试剂盒(cat: 17951, stemcell)从另一个健康人的新鲜 PBMC 中分选出异体 T 细胞。将 5000 个成熟 DC 细胞与 50000 个异体 T 细胞共培养，并加入相应浓度的候选抗体，共培养六天后，吸取细胞上清，使用 Cisbio-HTRF IFN- γ 检测试剂盒(Cat: 62HIFNGPEH, Perkinelmer)检测 IFN- γ 浓度，计算 EC₅₀。

如图 2 所示，A17m09_hIgG4 在 MLR 实验中，显示出与派姆单抗基本一致的体外药效。其中，A17m09_hIgG4 的 EC₅₀ 为 0.2931nM，派姆单抗的 EC₅₀ 为 0.3271nM。

实施例 7. 抗 PD-1 纳米抗体抑制小鼠结肠癌模型中肿瘤生长

本实施例在人源化 PD-1 C57BL/6 小鼠的 MC38 肿瘤模型上，验证 PD-1 抗体的体内抗肿瘤药效。

使用 DMEM 培养基(10% FBS)培养 MC38 小鼠结肠癌细胞系，将 5×10^5 个 MC38 细胞接种于人源化 PD-1 C57BL/6 雌鼠 (集萃药康) 皮下，待小鼠平均肿瘤体积达到 80 mm³ 左右时，随机分组，每组 8 只，给予腹腔注射抗体或对照，每周两次测量肿瘤体积，称体重，记录数据。实验分组与给药方案参见表 10。考虑到 A17m09_hIgG4 的分子量约 75 kDa，只有正常 IgG 分子量的一半，故给药剂量调整为派姆单抗的一半，以实现等摩尔数剂量。

如图 3A 和图 3B 所示，A17m09_hIgG4 与派姆单抗，在同等摩尔剂量下，A17m09_hIgG4 的体内抗肿瘤药效与派姆单抗一致。肿瘤体积与肿瘤抑制率参见表 11，在等摩尔剂量下 A17m09_hIgG4 的肿瘤抑制率略优于派姆单抗。

表 10. 小鼠实验分组与给药方案

组别	药物或对照	给药剂量(mg/kg)	给药方式	给药频率
组 1	PBS	--	i.p.	BIW*7
组 2	A17m09_hIgG4	0.25		
组 3	A17m09_hIgG4	0.75		
组 4	派姆单抗	0.5		

表 11. 小鼠肿瘤体积与肿瘤抑制率

组别	药物或对照	肿瘤体积/mm ³	肿瘤抑制(%)	
----	-------	----------------------	---------	--

		(平均值±SEM)		第 31 天	P 值
		第 0 天	第 31 天		
组 1	PBS	79±4	2074±198	/	/
组 2	A17m09 hIgG4 (0.25 mg/kg)	79±4	1261±260	41%	0.0263
组 3	A17m09 hIgG4 (0.75 mg/kg)	78±3	1078±186	50%	0.0026
组 4	派姆单抗(0.5 mg/kg)	78±3	1300±174	39%	0.0109

(注：与对照组(hIgG1)组比较，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001 即认为具有显著性差异。)

实施例 8. 抗 PD-1 抗体与 IL-2 突变体的融合蛋白(PD-1-IL-2v)的构建

相比对 NK 和 CD8⁺ T 细胞的活性，野生型 IL-2 会更优先激活调节性 T 细胞 (Treg)，这是因为 Treg 上高表达 IL-2 的高亲和力受体 IL-2Rαβγ。为了降低 IL-2 对 Treg 的优先激活，常用的做法是通过在 IL-2 上引入突变，比如 F42A 和 F72G，以去除 IL-2 与 IL-2Rα 的结合。然而这样的 IL-2 突变体 IL-2v(F42A,L72G)依然可以系统性的激活 NK 和 CD8⁺ T 细胞，造成毒性。为了增加 IL-2 的特异性，我们引入突变 V91T，降低 IL-2 与 IL-2Rβγ 的亲和力，从而降低 IL-2 对 NK 和 CD8⁺ T 细胞的活性。进一步地，我们通过将上述 IL-2 突变体与抗 PD-1 抗体偶联，将 IL-2 突变体带到 PD-1 阳性的 NK 和 T 细胞上，特异性的激活这些细胞。

以下按照图 4 所示分子形式示意图构建抗 PD-1 抗体与 IL-2 突变体的融合蛋白。图 4 中分子的 Fc 均采用 Knob-in-Hole(KIH)技术，即，在两条 Fc 中分别引入 S354C, T366W(Eu 编号系统) (构成 Knob 链)和 Y349C, T366S, L368A, Y407V(Eu 编号系统)(构成 Hole 链)的突变，以促进形成异源二聚体；为了方便纯化，均在 Hole 链中额外引入 H435R, Y436F(Eu 编号系统)；此外，Knob 和 Hole 链均引入 L234A, L235A 和 P329G 突变，以消除 ADCC 效应；对无轻链配对的重链，铰链区引入 C220S 的突变，以去除游离的、无配对的半胱氨酸。IL-2 采用突变体 IL-2v(V91T)，其包括 1)T3A，以去除蛋白质在哺乳动物细胞中表达时可能存在的糖基化修饰；2)R38E,和 F42A，以消除 IL-2 与 CD25(即，IL-2Rα)的结合；3)V91T，降低 IL-2 与中等亲和力 IL-2 受体 IL-2Rβγ 的结合，和 4)C125A，以去除 IL-2 中游离的半胱氨酸，避免 IL-2 形成分子间的二硫键。

图 4 的 A 所示的分子 A-V91T 中，抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过 IgG1 重链铰链区分别与 Knob 和 Hole 链的 N 端偶联；图 4 的 B 所示的分子 B-V91T 中，将两个抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过(G₄S)₂ 的连接子首尾相接，再将其 C 端通过 IgG1 重链铰链区分别与 Knob 和 Hole 链的 N 端偶联；图 4 的 C 所示的分子 C-V91T 中，抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过 IgG1 重链铰链区与 Hole 链的 N 端偶联，抗 PD-1 抗体派姆单抗对应的 Fab 片段的重链通过 IgG1 重链铰链区与 Knob 链的 N 端偶联；图 4 的 D 所示的分子 D-V91T 中，两个抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过(G₄S)₂ 的连接子首尾相接，再将其 C 端通过 IgG1 重链铰链区与 Hole 链的 N

端偶联；将抗 PD-1 抗体派姆单抗对应的 Fab 片段的重链通过 IgG1 重链铰链区与 Knob 链的 N 端偶联；图 4 的 E 所示的分子 E-V91T 中，将抗 PD-1 抗体派姆单抗对应的 Fab 片段的重链通过 IgG1 重链铰链区分别与 Knob 和 Hole 链的 N 端偶联，再将抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过 $(G_4S)_2$ 的连接子与派姆单抗对应的 Fab 片段的 5 的重链的 N 端偶联；图 4 的 F 所示的分子 F-V91T 中，将两个抗 PD-1 纳米抗体 A17m0902 通过 $(G_4S)_2$ 的连接子首尾相接，再将其 C 端通过 IgG1 重链铰链区与 Hole 链的 N 端偶联。图 4 中 A-E 的分子中 IL-2v(V91T)通过 $(G_4S)_3$ 连接子与 Fc 的 Knob 链的 C 端相连，F 的分子中 IL-2v(V91T)通过 G_4S 连接子与 Knob 链的 N 端偶联。

各分子的序列如下，下划线为 Fc，斜体为连接子。

10 >A-V91T 的 Knob 链

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAIIS
GSGVIAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDDY
WGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
15 DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL
WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGSGGGGSAPASSSTKKTQ
LQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEM LTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINTIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW
20 ITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:43)

>A-V91T 的 Hole 链

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAIIS
GSGVIAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDDY
WGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
25 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL
SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSP (SEQ ID NO:44)

>B-V91T 的 Knob 链

30 EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAIIS
GSGVIAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDDY
WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDY
SMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVIAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMRSL
TPEDRAVYYCRAVSDWDDYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGP
35 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSAPASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEM LTAKF

YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINTIVLELKGS
ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:45)

>B-V91T 的 Hole 链

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAIIS
5 GSGVIAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDDY
WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDY
SMSWYRQAPGKGRELVAIISGSGVIAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMRSL
TPEDRAVYYCRAVSDWDDYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
10 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR
EPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSP (SEQ ID
NO:46)

>C-V91T 的 Knob 链

15 QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWM
GGINPSNGGTNFKNEFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYR
FDMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
20 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL
VKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTKKTQLQ
LEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEM LTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE
25 EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINTIVLELKGSSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT
FAQSIISTLT (SEQ ID NO:47)

C-V91T 的 Hole 链为 SEQ ID NO:44。

>C-V91T 的轻链

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLI
30 YLASYLESQVPAFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

(SEQ ID NO:48)

35 D-V91T 的 Knob 链为 SEQ ID NO:47, Hole 链为 SEQ ID NO:46, 轻链为 SEQ
ID NO:48。

>E-V91T 的 Knob 链

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAIIS
GSGVIAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDDY
40 WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTN

YYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMEL
 KSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF
 5 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGS
GGGGSAPASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKK
 10 ATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINTIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:49)

>E-V91T 的 Hole 链

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGLTFS DYSMSWYRQAPGKGRELVAIIS
 GSGVIAHYVDSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMRSLTPEDRAVYYCRAVSDWDDY
 15 WGQGTQVT VSSGGGGSGGGGSQVQLVQSGVEVKKPGASVKV SCKASGYTFTN
 YYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMEL
 KSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF
 20 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVC
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF
FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSP
 (SEQ ID NO:50)

25 E-V91T 的轻链为 SEQ ID NO:48。

>F-V91T 的 Knob 链

APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKAT
 ELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINTIVLELKGSETTFMCEY
 ADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
 30 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID
 NO:51)

35 F-V91T 的 Hole 链为 SEQ ID NO:46。

上文中提到的派姆单抗的序列为:

> 派姆单抗的 Fab 重链

QVQLVQSGVEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWM
 GGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYR
 40 FDMGFDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP

VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKV (SEQ ID NO:52)

> 派姆单抗的 Fab 轻链

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLI
5 YLASYLESQVGPARGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC (SEQ ID NO:53)

> 派姆单抗的 HCDR1

10 NYMY (SEQ ID NO:54)

> 派姆单抗的 HCDR2

GINPSNGGTNFNEKFKN (SEQ ID NO:55)

> 派姆单抗的 HCDR3

RDYRFDMGFDY (SEQ ID NO:56)

15 > 派姆单抗的 LCDR1

RASKGVSTSGYSYLH (SEQ ID NO:57)

> 派姆单抗的 LCDR2

LASYLES (SEQ ID NO:58)

> 派姆单抗的 LCDR3

20 QHSRDLPLT (SEQ ID NO:59)

以上 PD-1-IL-2v 中的 IL-2v(V91T)序列为:

APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKAT
ELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINTIVLELKGSETTFMCEY
ADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:60)

25 即, IL-2v(V91T)含有 T3A/R38E/F42A/V91T/C125A。

将上述融合蛋白在 HEK293 细胞中进行表达, 通过 Protein A 进行纯化, 纯化产物经 SDS-PAGE 确认分子量符合预期, 证明制备获得了目标蛋白。

实施例 9. PD-1-IL-2v 促 M07e 细胞增殖活性检测

30 M07e 为人源细胞系, 只表达 IL-2R β 、IL-2R γ , 不表达 IL-2R α 。为了检测上述不同形式的 PD-1-IL-2v(V91T)融合蛋白的活性以及对 PD-1 表达的依赖性, 我们在 M07e 细胞株过表达人 PD-1(SEQ ID NO: 1), 得到 M07e-hPD-1 细胞株, 并分别在 M07e 和 M07e-hPD-1 细胞株中检测上述融合蛋白对细胞增殖的影响。

完全培养液: RPMI 1640 + 2 mM L-谷氨酰胺 + 1 mM 丙酮酸钠 + 10% 胎牛血清 + 15 ng/mL GM-CSF; 基础培养基: RPMI 1640 + 2 mM L-谷氨酰胺 + 1 mM 丙酮酸钠 + 10% 胎牛血清。

M07e细胞增殖实验: M07e细胞或M07e-hPD1用完全培养液于37℃、5% CO₂条件下培养, 对细胞进行传代, 1-2天后离心收集细胞, 用PBS洗涤3次, 重悬于基

基础培养液中配制成每mL含 6.0×10^5 个细胞的细胞悬液，置于96孔板中，每孔50 μ L 体积。加入50 μ L 2 $\times$ 相应浓度的用基础培养液调配的受试药物，细胞培养72小时后，每孔加入裂解液100 μ L CELLTITER-Glo试剂(Promega)，混匀，以630 nm为参比波长，在波长570 nm处用酶标仪测定吸光度。

5 不同形式的PD-1-IL-2v(V91T)融合蛋白对M07e和M07e-hPD-1细胞的增殖活性数据见表12和图5A、图5B。采用PEG化的IL-2突变体(PEG-IL-2v)作为阳性对照，其中IL-2突变体带有T3A, F42A, L72G, N26Q, N29S, N71Q和C125A突变，其不结合IL-2R α ，但与IL-2中亲合力受体IL-2R $\beta\gamma$ 可以结合。

结果表明，PEG-IL-2v对M07e和M07e-hPD-1细胞增殖的活性相当，各种不同
10 形式的PD-1-IL-2(V91T)对M07e-hPD-1的活性明显强于其对M07e细胞增殖的活性，说明抗PD-1抗体可以增加IL-2突变体对PD-1阳性细胞的选择性。此外，各种不同形式的PD-1-IL-2(V91T)之间相比，其对M07e增殖的活性相当，但是对M07e-hPD-1增殖的活性，C-V91T略强于A-V91T，A-V91T又强于B-V91T和E-V91T。

表 12. PD-1-IL-2v(V91T)对 M07e 和 M07e-hPD-1 细胞的增殖活性

名称	M07e		M07e-hPD1	
	最大荧光值 (Max Lum)	EC ₅₀ (nM)	最大荧光值 (Max Lum)	EC ₅₀ (nM)
PEG-IL-2v	4.45E+06	20.88	7.94E+06	13.34
A-V91T	4.24E+06	84.58	7.02E+06	0.032
B-V91T	3.85E+06	50.08	7.064E+06	0.693
C-V91T	3.90E+06	54.26	6.72E+06	0.010
E-V91T	4.11E+06	84.58	7.60E+06	0.761

15

实施例 10. 更多 PD-1-IL-2v 的构建

PD-1-IL-2v(V91T)在没有 PD-1 表达的 M07e 中，虽然比 PEG-IL-2v 的活性更弱，但是仍然可以刺激细胞增殖，说明 IL-2v(V91T)仍然可以较强地结合 IL-2 中等亲合力受体 IL-2R $\beta\gamma$ ，PD-1-IL-2(V91T)仍然可能系统性地激活 NK 和 CD8⁺ T 细胞
20 并造成毒性。为了进一步降低 PD-1-IL-2v 的毒性，使得 IL-2 的活性更加依赖于 PD-1 的表达，我们在 A-V91T 分子形式的基础上，构建了带有不同 IL-2 突变体的 PD-1-IL-2v。所有 IL-2 突变体均带有 F42A 和 L72G 的突变，以消除 IL-2 与 IL-2R α 的结合；此外，出于稳定性考虑，IL-2 突变体中加 N26Q、N29S 和 N71Q，以去除 IL-2 中可能存在的脱酰胺修饰，增加 IL-2 的稳定性。以及，它们还分别带有如
25 表 13 中所示的各自不同的独有的突变，均在不同程度上降低了 IL-2 与中等亲合力受体 IL-2R $\beta\gamma$ 的亲合力。

表 13. PD-1-IL-2v 中的 IL-2 突变

名称	IL-2 中的共有突变	IL-2 中的独有突变	对应序列号
A-PC	T3A/F42A/L72G/N26Q/N29S/ N71Q/C125A	/	SEQ ID NO:61
A-V91T-02		V91T	SEQ ID NO:62
A-D20A		D20A	SEQ ID NO:63
A-D20N		D20N	SEQ ID NO:64
A-N88D		N88D	SEQ ID NO:65

A-N88R		N88R	SEQ ID NO:66
A-Q126D		Q126D	SEQ ID NO:67
A-H16A/D84S		H16A/D84S	SEQ ID NO:68

> A-PC 中的 IL-2 序列

APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKAT
ELKHLQCLEEELKPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE
5 YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:61)

> A-V91T-02 中的 IL-2 序列

APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKAT
ELKHLQCLEEELKPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISNINTIVLELKGSETTFMCE
YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:62)

10 > A-D20A 中的 IL-2 序列

APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKAT
ELKHLQCLEEELKPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE
YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:63)

> A-D20N 中的 IL-2 序列

15 APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKAT
ELKHLQCLEEELKPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE
YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:64)

> A-N88D 中的 IL-2 序列

APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKAT
20 ELKHLQCLEEELKPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCE
YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:65)

> A-N88R 中的 IL-2 序列

APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKAT
ELKHLQCLEEELKPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCE
25 YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:66)

> A-Q126D 中的 IL-2 序列

APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKAT
ELKHLQCLEEELKPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE
YADETATIVEFLNRWITFADSIISTLT (SEQ ID NO:67)

30 > A-H16A/D84S 中的 IL-2 序列

APASSSTKKTQLQLEALLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKAT
ELKHLQCLEEELKPLEEVLQGAQSKNFHLRPRSLISNINVIVLELKGSETTFMCE
YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:68)

在 Fc 上引入 L234A 和 L235A 突变,以消除 ADCC 效应;引入 S354C, T366W(构成 Knob 链)和 Y349C, T366S, L368A, Y407V(Eu 编号系统)(构成 Hole 链)的突变,以促进形成异源二聚体;以及,较链区引入 C220S 的突变。为了方便纯化,抗体在 Hole 链中可以包含 H435R, Y436F (Eu 编号系统)突变。另外,这些抗体的 Fc 区

的 Hole 链在第 356 和第 358 位氨基酸上可能分别为 D356, L358 或 E356, M358(Eu 编号系统), 他们分别在不同的等位基因中出现, 并不影响抗体的功能。

>Fc 的 Knob 链(D356, L358)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
5 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:69)

>Fc 的 Hole 链(D356, L358)

10 EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:70)

15 >Fc 的 Knob 链(E356, M358)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
20 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:71)

>Fc 的 Hole 链(E356, M358)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGF
25 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:72)

示例性的, 给出 A-D20A 和 A-N88D 的全长序列, 下划线为 Fc, 斜体为连接子。

>A-D20A 的 Knob 链(D356, L358)

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMRLRAEDTAVYYCRAVSDWED
YWGGGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS
35 LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGSGGGGSAPASSSTKKT
QLQLEHLLALQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELK
PLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:73)

40 >A-D20A 的 Hole 链(D356, L358)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWED
YWGGGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
5 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVS
LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSP (SEQ ID NO:74)

>A-D20A 的 Knob 链(E356, M358)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
10 SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWED
YWGGGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV
SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW
15 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGGSAPASSSTKK
TQLQLEHLLALQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEEL
KPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN
RWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:75)

>A-D20A 的 Hole 链(E356, M358)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
20 SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWED
YWGGGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVS
25 LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:76)

>A-N88D 的 Knob 链(D356, L358)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWED
30 YWGGGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGGSAPASSSTKKT
35 QLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELK
PLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:77)

>A-N88D 的 Hole 链(D356, L358)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
40 SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWED

YWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVS
 LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
 5 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:78)
 >A-N88D 的 Knob 链(E356, M358)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
 SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWED
 YWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 10 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV
 SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRW
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGGSAPASSSTKK
 TQLQLEHLLLDLQMLQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEEL
 15 KPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN
 RWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:79)
 >A-N88D 的 Hole 链(E356, M358)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
 SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWED
 20 YWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVS
 LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:80)
 25

此外,为了更好的证明 PD-1-IL-2v 对 PD-1 的依赖性,我们将部分 PD-1-IL-2v
 中的抗 PD-1 抗体部分替换为针对不相关抗原的抗体,而保留 IL-2 部分的突变,得
 到 IgG-PC, 及 IL-2 上含有 V91T 的对应的 IgG-V91T, 及 IL-2 上含有 D20A 的对
 应的 IgG-D20A, 及 IL-2 上含有 N88D 的对应的 IgG-N88D。IgG-PC 和 IgG-V91T、
 30 IgG-D20A、IgG-N88D 的区别仅在于 IL-2 的部分不同。序列如下:

>IgG-PC 的 Knob 链
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSWIGWFRQAPGQGLEWIG
 DIYPGGGYTNYNEIFKGKATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDYAVYYCSRIGIPGY
 AMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
 35 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGN
 40 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGGSAPASSSTKKTQLQ

LEHLLLDLQMLQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE
EVLQGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT
FAQSIISTLT (SEQ ID NO:81)

>IgG-V91T 的 Knob 链

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSWIGWFRQAPGQGLEWIG
DIYPGGGYTNYNEIFKGKATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCSRIGIPGYA
MDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
10 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTKKTQLQLEHLL
LDLQMLNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNL
15 AQSKNFHLRPRDLISNINTIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSII
STLT

(SEQ ID NO:82)

> IgG-N88D 的 Knob 链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSWIGWFRQAPGQGLEWIG
20 DIYPGGGYTNYNEIFKGKATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCSRIGIPGYA
MDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
25 YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTKKTQLQLEHLL
LDLQMLQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLQG
AQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSII
30 STLT(SEQ ID NO:83)

> IgG-D20A 的 Knob 链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSWIGWFRQAPGQGLEWIG
DIYPGGGYTNYNEIFKGKATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCSRIGIPGYA
MDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
35 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
40 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTKKTQLQLEHLL

LALQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLQG
AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSH
STLT

(SEQ ID NO:84)

5 > IgG-PC、IgG-V91T、IgG-D20A 或 IgG-N88D 的 Hole 链
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSWIGWFRQAPGQGLEWIGDIYP
GGGYTNYNEIFKGKATMTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSRIGPGYAMDY
WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
10 EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALGAPIEKTKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNRFTQKSLSLSP (SEQ ID NO:85)

15 >IgG-PC、IgG-V91T、IgG-D20A 或 IgG-N88D 的轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQSLNLSGDQKNYLTWYQQKPGKAP
KLLIYWASTGESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQNDYSYPWTFG
QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
20 SFNRGEC (SEQ ID NO:86)

将上述融合蛋白在 HEK293 细胞中进行表达，通过 Protein A 进行纯化，纯化产物经 SDS-PAGE 确认分子量符合预期，证明获得目的蛋白。

此外，本公开的野生型 IL-2 序列为：

>wt IL-2

25 APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKAT
ELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE
YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:87)

实施例 11. 更多 PD-1-IL-2v 促 M07e 细胞增殖活性检测

30 为了检测上述带有不同 IL-2 突变体的 PD-1-IL-2v 融合蛋白的活性以及对 PD-1 表达的依赖性，我们在 M07e 和 M07e-hPD-1 细胞株中检测实施例 10 中融合蛋白对细胞增殖的影响。实验方法参见实施例 9。PD-1-IL-2v 的相对细胞增殖活性按如下方法计算：

$$Activity_{PD-1-IL-2v}^{conc} = 100\% \times \frac{Lum_{PD-1-IL-2v}^{conc} - Lum_{Medium}}{Lum_{A-PC}^{1000nM} - Lum_{Medium}},$$

35 其中， $Activity_{PD-1-IL-2v}^{conc}$ 表示在 conc 的浓度下的 PD-1-IL-2v 的活性， $Lum_{PD-1-IL-2v}^{conc}$ 表示在 conc 的浓度下的 PD-1-IL-2v 刺激时细胞裂解液的发光强度， Lum_{A-PC}^{1000nM} 表示在 M07e 或 M07e-hPD-1 细胞株中在 1000 nM 浓度下的阳性对照分子 A-PC 刺激细胞后细胞裂解液的发光强度， Lum_{Medium} 表示在 M07e 或 M07e-hPD-1

细胞株中不使用任何 PD-1-IL-2v 或 PEG-IL-2v 刺激而只加入培养基时的本底发光强度。

实验结果见表 14 和图 6A 和图 6B。结果表明，1)在 M07e 细胞中，A-PC 与 PEG-IL-2v 活性相当，说明在没有 PD-1 过表达的情况下，与抗体结合的 IL-2 和偶联了 PEG 的 IL-2 的活性是一致的；A-V91T 以及 IgG-V91T 的活性相当，且弱于 A-PC，说明 V91T 的确会降低 IL-2 的活性，但仍可以刺激 M07e 的增殖；其他突变体，包括 D20A, D20N, N88R, N88D 和 Q126D，基本上均不激活 M07e 细胞，仅 A-N88D 在 1000 nM 的浓度下，有微弱活性。2)在 M07e-hPD-1 细胞中，由于细胞上过表达 PD-1，因此，各 PD-1-IL-2v 在较低浓度下的活性均远远超过 IgG-V91T 和 PEG-IL-2v，说明了抗 PD-1 抗体大幅提高了 PD-1-IL-2v 促细胞增殖活性对 PD-1 表达的依赖性；相比 A-PC 和 A-V91T-02，其他 PD-1-IL-2v 对 M07e-hPD-1 细胞增殖的最大活性略低。3)比较各 PD-1-IL-2v 分别在 M07e 和 M07e-hPD-1 细胞增殖实验中的活性，带有 D20A, D20N, N88R, N88D 或 Q126D 突变的 PD-1-IL-2v，基本上均不激活 M07e 细胞，但可以较强的刺激 M07e-hPD-1 细胞的增殖，体现了 PD-1-IL-2v 在保留对于 PD-1 阳性细胞的选择性激活的同时，降低了对于 PD-1 阴性细胞的激活；而 A-PC 以及 A-V91T-02，虽然具有对 PD-1 阳性细胞的选择性激活，但对于 PD-1 阴性细胞也能激活。

为了更好的证明 PD-1-IL-2v(N88D)和 PD-1-IL-2v(D20A)对 PD-1 的依赖性，我们在 M07e-hPD-1 细胞株中对比 A-N88D 与 IgG-N88D，A-D20A 与 IgG-D20 对细胞增殖的影响。

实验结果见表 15 和图 7。结果表明，在较高浓度(1000 nM)下，IgG-N88D 和 IgG-D20A 仍无法激活 M07e-hPD-1 细胞增殖，但 A-N88D 和 A-D20A 在较低浓度下即可激活 M07e-hPD-1 细胞增殖。

表 14.不同 IL-2 突变的 PD-1-IL-2v 对 M07e 和 M07e-hPD-1 细胞的促增殖活性

名称	M07e 细胞增殖活性(%)							
	1000 nM	333 nM	111 nM	37 nM	12 nM	4.1 nM	1.4 nM	0.46 nM
PEG-IL-2v	89.0	102.2	88.3	68.2	34.2	11.2	2.6	0.7
IgG-V91T	85.3	68.5	36.9	23.9	6.1	1.7	-0.1	2.0
A-PC	100.0	89.8	87.2	71.7	41.6	28.1	3.6	0.1
A-V91T-02	78.7	62.0	47.3	26.6	1.7	-3.3	-4.4	-4.6
A-D20A	0.6	-1.9	-2.4	-3.7	-3.0	-1.6	-2.6	-3.0
A-D20N	0.3	-0.9	0.1	-0.6	-0.7	0.2	-1.3	-0.8
A-N88R	-5.1	-5.2	-4.5	-3.0	-2.2	-1.9	-1.3	-0.9
A-N88D	14.6	0.2	-1.8	-2.8	-1.9	-1.5	-1.1	-1.7
A-Q126D	-12.8	-5.8	-2.9	-2.7	-0.5	-1.7	-0.6	-0.8
A17h1 IgG4	-5.8	-3.5	-3.0	-1.2	-1.3	-0.2	0.0	-1.4
名称	M07e-hPD-1 细胞增殖活性(%)							
	1000 nM	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM	0.001 nM	0.0001 nM
PEG-IL-2v	100.1	104.0	33.3	3.3	0.4	0.5	1.1	1.9
IgG-V91T	86.3	51.7	6.1	1.1	-0.4	0.2	0.5	1.6
A-PC	100	102	98	99	87	28	3	1
A-V91T-02	102.9	107.0	107.4	103.9	95.5	36.6	5.1	3.4
A-D20A	39.2	32.0	30.2	28.5	24.2	11.4	2.9	2.3
A-D20N	26.0	21.6	19.9	17.2	13.6	5.4	2.0	1.8

A-N88R	20.0	16.8	16.9	14.9	11.5	4.8	1.8	1.3
A-N88D	66.9	61.1	45.0	41.8	32.1	18.1	3.3	2.8
A-Q126D	1.1	5.4	6.3	5.1	3.3	1.6	1.4	-0.1
A17h1 IgG4	-0.1	1.6	0.7	0.3	0.0	0.3	0.2	1.8

表 15. PD-1-IL-2v 或 IgG-IL-2v 对 M07e-hPD-1 细胞的促增殖活性

名称	M07e-hPD-1 细胞增殖比例(%)							
	1000 nM	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM	0.001 nM	0.0001 nM
A-PC	100.0	112.0	112.6	95.9	79.0	33.7	4.9	2.4
IgG-PC	106.0	94.7	32.9	6.9	2.9	3.1	1.8	1.2
A-N88D	45.5	31.1	25.2	21.3	18.3	4.8	0.0	0.8
IgG-N88D	9.7	-1.3	-5.6	-1.3	-0.5	-1.5	-0.6	-1.2
A-D20A	15.4	13.5	10.8	10.8	8.4	2.6	-0.3	0.6
IgG-D20A	0.6	-0.3	0.3	-0.1	-0.2	0.1	0.0	1.1
PEG-IL-2v	89.1	76.7	24.4	-0.6	-2.2	-2.6	-2.1	-2.2
A17m0902 hIgG4	-4.4	-2.0	-2.4	-2.9	-3.3	-4.2	-3.5	-3.1

实施例 12. PD-1-IL-2v 促 T 细胞增殖活性检测

- 5 未经刺激的 T 细胞不表达或低表达 PD-1，经 CD3 抗体刺激的 T 细胞高表达 PD-1。为了检测上述带有不同 IL-2 突变体的 PD-1-IL-2v 融合蛋白是否能够激活低表达 PD-1 和高表达 PD-1 的人外周血细胞(PBMC)中的 T 细胞，我们分离了 PBMC 中的 T 细胞，并使用 CD3 抗体刺激分离出的 T 细胞，检测上述融合蛋白对未经刺激和经过刺激的 T 细胞增殖的影响。
- 10 经 CD3 抗体刺激的 T 细胞增殖实验：冻存的人 PBMC 复苏后，使用 Pan T Cell Isolation Kit(Miltenyi, 130-096-535)进行 T 细胞分离，得到 T 细胞。将 CD3 抗体用 PBS 稀释至 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ，加入 10 cm 培养皿中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 小时进行包被，用 PBS 清洗后待用。T 细胞按 2×10^6 细胞/mL 铺种于预包被 CD3 抗体的 10 cm 培养皿中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下刺激 24 h。收集刺激后的 T 细胞，清洗计数后调整
- 15 细胞密度至 5×10^5 细胞/mL，每孔 200 μL 铺种于 96 孔板中，待测样品用培养基梯度稀释，制成 5 $\times$ 工作液，将各浓度待测样品各取 50 μL 加入到刺激后的 T 细胞中并混匀，培养 4 天。加药处理后的细胞用 FACS buffer(PBS+2% FBS)清洗两次，用 Fixable Viability Dye(eBioscience, 65-0865-14)标记细胞死活，经 CD3(BD, 565491), CD4(BD, 558116), CD8 (BD, 565310), Ki-67(eBioscience, 12-5698-82))流式抗体染色
- 20 后，FACS 上机检测细胞增殖情况。
- 未经刺激的 T 细胞增殖实验：分离后的 T 细胞计数后按 5×10^5 细胞/mL 铺种于 96 孔板中，每孔 200 μL ，待测样品用培养基梯度稀释，制成 5 $\times$ 工作液，将各浓度待测样品各取 50 μL 加入到刺激后的 T 细胞中，混匀，培养 4 天。加药处理后的细胞用 FACS buffer 清洗两次，用 FVD780 标记细胞死活，经流式抗体染色后，
- 25 FACS 上机检测细胞增殖情况。

实验结果见表 16、表 17 和图 8A、图 8B、图 9A、图 9B。结果表明，1)在未经刺激的 T 细胞中，A-PC 在浓度高于 1 nM 时表现出激活 T 增殖的活性(CD8^+ T 细胞增殖 $\text{EC}_{50} = 21.46$ nM, CD4^+ T 细胞增殖 $\text{EC}_{50} = 8.61$ nM)；A-V91T-02 活性弱

于 A-PC, 说明 V91T 的确会降低 IL-2 的活性, 但仍可以促进未经刺激的 T 的增殖; 其他突变体, 包括 D20A, D20N, N88R, N88D, 和 Q126D, 在浓度达到 100 nM 时, 均未表现出对 T 细胞的激活。2) 在经 CD3 抗体刺激的 T 细胞中, 各 PD-1-IL-2v 在较低浓度(0.1 nM)下即表现出显著的促进 T 细胞增殖的活性。相比 A-PC 和 A-V91T-02, 携带其他突变的 PD-1-IL-2v 对经 CD3 抗体刺激的 pan T 细胞增殖的最大活性略低。3) 比较各融合蛋白分别在未经刺激和经 CD3 抗体刺激的 T 细胞增殖实验中的活性, 带有 D20A, D20N, N88R, N88D, 或 Q126D 突变的 PD-1-IL-2v, 均不激活未经刺激的 T 细胞增殖, 但可以较强的刺激经 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖; 而 A-PC 以及 A-V91T-02, 虽然可以更强的激活经 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖, 但也能较强的激活未经 CD3 抗体刺激的 T 细胞。

表 16. 不同 IL-2 突变的 PD-1-IL-2v 对未经刺激的 T 细胞的增殖活性

名称	CD4 ⁺ Ki67 ⁺ cells (%)					
	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM	0.001 nM
PEG-IL-2v	45	10.2	1.77	1.38	1.51	0.29
IgG-V91T	14.6	1.58	1.61	1.88	2.74	1.99
A-PC	46.1	14.6	2.83	1.31	3.6	1.42
A-V91T-02	38.1	3.31	2.84	4.99	2.28	2.57
A-D20A	1.37	2.7	2.66	0.94	1.47	1.91
A-D20N	3.24	1.53	3.01	2.03	2.2	1.85
A-N88R	1.01	2.83	2.52	2.22	3.2	1.35
A-N88D	1.84	1.71	3.13	3.48	4.72	1.42
A-Q126D	2.97	1.78	1.23	2.74	2.64	1.76
A17h1_IgG4	1.23	0.67	2.33	0.85	1.97	1.84
名称	CD8 ⁺ Ki67 ⁺ cells (%)					
	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM	0.001 nM
PEG-IL-2v	87.3	43	1.54	0.29	0.59	0.22
IgG-V91T	55.9	3.46	0.63	0.99	0.83	0.59
A-PC	87.6	50.3	3.91	1.4	1.2	0
A-V91T-02	79.3	9.11	1.89	2.25	0.65	1.29
A-D20A	1.34	1.23	0.75	0.33	0.24	0.71
A-D20N	1.9	0.58	0.6	0.87	0.48	0.42
A-N88R	0.6	1.71	1.34	0.93	1.27	0.38
A-N88D	2.21	1.12	1.76	1.5	1.44	0.83
A-Q126D	1.47	0.88	0.34	0.77	1	0.34
A17h1_IgG4	0.32	0.12	0.55	0.57	0.54	0.49

表 17. 不同 IL-2 突变的 PD-1-IL-2v 对经 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖活性

名称	CD4 ⁺ Ki67 ⁺ cells (%)					
	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM	0.001 nM
PEG-IL-2v	74.7	73	63	43.3	34.8	32.9
IgG-V91T	73.8	63	45.3	32.5	31.7	32.4
A-PC	76.4	74.4	67.2	57.2	40.4	34.3
A-V91T-02	75.6	70.5	60.2	56.9	41.3	33.6
A-D20A	61.9	56.1	54.9	52.7	40.5	31.5
A-D20N	63.2	58.2	54.3	53.6	42.5	35.2
A-N88R	63.4	61	59	56.2	46.2	32.4
A-N88D	63.9	56.8	54.9	54	40.7	33.9
A-Q126D	63.1	58.9	55.8	53.5	38.4	34.8
A17h1_IgG4	31.7	28.8	33.3	30.1	29.7	31.7

名称	CD8 ⁺ Ki67 ⁺ cells (%)					
	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM	0.001 nM
PEG-IL-2v	82.5	82	76.6	67.1	55.5	55.5
IgG-V91T	83.3	78.2	69	53.5	54.4	54.3
A-PC	82.6	82.5	79	70.2	57.9	55.9
A-V91T-02	82.4	79.9	73.9	67.9	58.1	55
A-D20A	75.9	68.2	67.7	65	57.1	54.3
A-D20N	75.6	68.5	64.7	66	61.2	56.3
A-N88R	75.6	69.4	68.2	66.6	60.9	49.9
A-N88D	76.8	69.3	66.3	64.8	57.4	55.5
A-Q126D	75.2	69.4	65.8	65.9	54.2	58.4
A17h1 IgG4	56	48.5	57.4	49.8	50	53.8

实施例 13. PD-1-IL-2v 与抗原 PD-1 和 IL-2Rα 或 IL-2Rβ/γ 的结合亲合力鉴定

采用表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR)检测上述带有不同 IL-2 突变体的 PD-1-IL-2v 融合蛋白的对 PD-1 和人 IL-2Rα 或 IL-2Rβ/γ 的结合亲合力。该实验使用 Biacore 8K(GE Healthcare)仪器检测。选用 CM5 传感器芯片，流动相采用 HBS-EP+缓冲溶液(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% surfactant P20)。将抗人 IgG (Fc) 抗体用 10 mM 醋酸钠缓冲液(pH 5.0)配制成 25 μg/mL 溶液，选择 Immobilization 程序自动进行抗人 IgG (Fc) 抗体通道氨基偶联固定。用 HBS-EP+缓冲溶液分别配制各待测 PD-1-IL-2v 作为配体，用芯片通道上的抗人 IgG (Fc) 抗体进行捕获。将人 PD-1 抗原蛋白(Sino Biological, 10377-H08H)，人 IL-2Rα 受体蛋白(Sino Biological, 10165-H08H)或人 IL-2Rβ/γ 受体异二聚体蛋白(Acrosystem, ILG-H5283)作为分析物，用 HBS-EP+缓冲溶液进行配制，分析物从 200 nM 进行 2 倍梯度稀释，共稀释 7 个浓度点，在 30 μL/min 的流速下流过实验通道和参比通道，结合时间 140s，解离时间 600s。再生缓冲液 10 mM Glycine pH 1.5(GE Healthcare, 29238268-AA) 在 10 μl/min 的流速下运行 30s。计算结合速率 Ka 和解离速率 Kd，以及解离常数(即亲合力 K_D 值)。结果参见表 18 和表 19。

表 18. 抗 PD-1 抗体与 IL-2 突变体的融合蛋白结合人 PD-1 抗原的 SPR 亲合力

抗体编号	ka(1/Ms)	Kd(1/s)	K _D (M)
A-PC	9.37E+04	1.82E-03	1.94E-08
A-N88D	9.98E+04	1.75E-03	1.76E-08
A-D20A	9.06E+04	1.68E-03	1.85E-08

表 19. 抗 PD-1 抗体与 IL-2 突变体的融合蛋白结合人 IL-2Rα 的 SPR 结合亲合力

抗体编号	ka(1/Ms)	Kd(1/s)	K _D (M)
A-PC	NB	NB	NB
A-N88D	NB	NB	NB
A-D20A	NB	NB	NB

(NB: not binding, 不结合)

表 20. 抗 PD-1 抗体与 IL-2 突变体的融合蛋白结合人 IL-2Rβ/γ 的 SPR 结合亲合力

抗体编号	ka(1/Ms)	Kd(1/s)	K _D (M)
A-PC	8.81E+04	2.23E-05	2.53E-10
A-N88D	6.37E+04	2.15E-04	3.38E-09
A-D20A	4.27E+04	6.81E-04	1.60E-08

结合人 PD-1 抗原结果显示，A-PC，A-N88D 与 A-D20A 对人 PD-1 具有相似的结合力，且与 A17m0902_hIgG4 对人 PD-1 的结合力相似(表 8)。结合人 IL-2R α 的结果显示，A-PC，A-N88D 与 A-D20A 均不结合人 IL-2R α 。结合人 IL-2R β/γ 的结果显示，A-PC 对人 IL-2R β/γ 具有最强的亲合力，A-N88D 与 A-D20A 对人 IL-2R β/γ 的亲合力分别降低约 13 倍和约 63 倍。

实施例 14. 具有不同 PD-1 结合亲和力的抗 PD-1 纳米抗体与 IL-2 突变体的融合蛋白(PD-1-IL-2v)的构建和亲和力鉴定

1. 抗 PD-1 纳米抗体突变体与 IL-2 突变体的融合蛋白(PD-1-IL-2v)的构建

在抗 PD-1 纳米抗体中引入突变，可以获得对 PD-1 具有不同亲和力的纳米抗体。我们在 A-N88D 的抗 PD-1 纳米抗体中引入突变，并保持 A-N88D 的 IL-2 突变体序列不变，构建了不同的 A-N88D 突变体。A-N88D 中引入的抗 PD-1 纳米抗体突变见表 21，引入突变后的抗 PD-1 纳米抗体序列如下(下划线为 CDR)：

>A17m0902M08

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWQD
YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO : 88)

>A17m0902M15

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
SGSGGITHYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWED
YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO : 89)

>A17m0902M26

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSSYSMSWYRQAPGKGRELVAIIS
GSGGITHYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWEDY
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO : 90)

>A17m0902M27

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSSYSMSWYRQAPGKGRELVAIIS
GSGGITHYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWQDY
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO : 91)

>A17m0902M28

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSSYSMSWYRQAPGKGRELVAIIS
GSGGITHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWQDY
WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO : 92)

表 21. 在 A-N88D 中引入的抗 PD-1 纳米抗体突变

名称	对应的 PD-1 抗体突变体名称	抗 PD-1 纳米抗体突变	对应的抗 PD-1 纳米抗体序列号
A-N88D	A17m0902	/	SEQ ID NO : 33
A-N88D-M08	A17m0902M08	E103Q	SEQ ID NO : 88
A-N88D-M15	A17m0902M15	V56G	SEQ ID NO : 89
A-N88D-M26	A17m0902M26	D31S, V56G	SEQ ID NO : 90
A-N88D-M27	A17m0902M27	D31S, V56G, E103Q	SEQ ID NO : 91
A-N88D-M28	A17m0902M28	D31S, V56G, E103Q, V61A	SEQ ID NO : 92

抗 PD-1 纳米抗体突变体的 CDR 序列如下表所示:

表 22. 抗 PD-1 纳米抗体的 CDR(Kabat 编号规则)

编号	CDR 序列		
A17m0902M08	CDR1	DYSMS	SEQ ID NO : 7
	CDR2	IISGSGVITHYVDSVKG	SEQ ID NO : 38
	CDR3	VSDWQDY	SEQ ID NO : 96
A17m0902M15	CDR1	DYSMS	SEQ ID NO : 7
	CDR2	IISGSGGITHYVDSVKG	SEQ ID NO: 94
	CDR3	VSDWEDY	SEQ ID NO : 41
A17m0902M26	CDR1	SYSMS	SEQ ID NO: 93
	CDR2	IISGSGGITHYVDSVKG	SEQ ID NO: 94
	CDR3	VSDWEDY	SEQ ID NO : 41
A17m0902M27	CDR1	SYSMS	SEQ ID NO: 93
	CDR2	IISGSGGITHYVDSVKG	SEQ ID NO: 94
	CDR3	VSDWQDY	SEQ ID NO: 96
A17m0902M28	CDR1	SYSMS	SEQ ID NO: 93
	CDR2	IISGSGGITHYADSVKG	SEQ ID NO: 95
	CDR3	VSDWQDY	SEQ ID NO: 96

- 5 即, A17m09 相关抗体具有如下通式序列:
- CDR1, X₆YSMS, 其中, X₆选自 D 或 S (SEQ ID NO: 97);
- CDR2, IISGSGX₁ITHYX₇DSVKG, 其中, X₁选自 V 或 G, X₇选自 V 或 A (SEQ ID NO:
- 98);
- CDR3, VSDWX₈DY, 其中, X₈选自 Q 或 E (SEQ ID NO: 99)。
- 10 具体地, CDR1 可以选自:
- DYSMS (SEQ ID NO: 7)
- SYSMS (SEQ ID NO: 93)。
- CDR2 可以选自:
- IISGSGVITHYVDSVKG (SEQ ID NO : 38)

IISGSGGITHYVDSVKG (SEQ ID NO : 94)

IISGSGGITHYADSVKG (SEQ ID NO : 95)。

CDR3 可以选白:

VSDWEDY (SEQ ID NO : 41)

5 VSDWQDY (SEQ ID NO : 96)。

进一步地, 本公开的 A17 具有如下通式序列:

CDR1: X₆YSMS (SEQ ID NO: 97)

CDR2: IISGSGX₁X₂X₃HYX₇DSVKG, 其中, X₁ 选自 V 或 G, X₂ 选自 I 或 S, X₃ 选自 T 或 A, X₇ 选自 V 或 A (SEQ ID NO: 100)

10 CDR3: VSDWX₉X₅Y, 其中, X₉ 选自 Q、D 或 E, X₅ 选自 D 或 E (SEQ ID NO: 101)

具体地, CDR1 可以选白:

DYSMS (SEQ ID NO: 7)

SYSMS (SEQ ID NO: 93)。

15 CDR2 可以选白:

IISGSGVIAHYVDSVKG (SEQ ID NO: 8)

IISGSGVITHYVDSVKG (SEQ ID NO: 38)

IISGSGGIAHYVDSVKG (SEQ ID NO: 39)

IISGSGVSAHYVDSVKG (SEQ ID NO: 40)

20 IISGSGGITHYVDSVKG (SEQ ID NO : 94)

IISGSGGITHYADSVKG (SEQ ID NO : 95)。

CDR3 可以为:

VSDWDDY (SEQ ID NO: 9)

VSDWEDY (SEQ ID NO: 41)

25 VSDWDEY (SEQ ID NO: 42)

VSDWQDY (SEQ ID NO : 96)。

抗 PD-1 纳米抗体突变体与 IL-2 突变体的融合蛋白(PD-1-IL-2v)分别为 A-N88D-M08、A-N88D-M15、A-N88D-M26、A-N88D-M27、A-N88D-M28。示例性的, 给出 A-N88D-M08 的全长序列, 下划线为 Fc, 斜体为连接子。

30 > A-N88D-M08 的 Knob 链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWQD
YWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
35 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV
SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGGSAPASSSTKK
TQLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEEL
KPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN
RWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO: 102)

5 > A-N88D-M08 的 Hole 链
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSDYSMSWYRQAPGKGRELVAII
SGSGVITHYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQMRSLRAEDTAVYYCRAVSDWQD
YWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
10 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVS
LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 103)

2. 含有抗 PD-1 纳米抗体突变体的抗 PD-1 抗体与 IL-2 突变体的融合蛋白
(PD-1-IL-2v)与人 PD-1 抗原的结合亲和力鉴定

15 采用 SPR 检测带有不同抗 PD-1 纳米抗体突变体的 A-N88D 的对 PD-1 抗原的
结合亲和力，实验方法实施例 13 相同。检测结果见表 23。

表 23. 含有不同抗 PD-1 纳米抗体突变体的 PD-1-IL-2v 的对 PD-1 抗原的 SPR 亲和
力数据

抗体编号	ka(1/Ms)	Kd(1/s)	K _D (M)
A-N88D-M08	2.15E+05	2.64E-03	1.23E-08
A-N88D-M15	2.41E+05	7.06E-03	2.93E-08
A-N88D-M26	1.79E+05	9.48E-03	5.31E-08
A-N88D-M27	1.37E+05	1.02E-02	7.43E-08
A-N88D-M28	1.48E+05	1.98E-02	1.34E-07

20 表 23 结果显示，所有突变体均能够实现与人 PD-1 的有效结合。

实施例 15. 具有不同 PD-1 结合亲和力的抗 PD-1 抗体与 IL-2 突变体的融合蛋白(PD-1-IL-2v)的促 M07e 细胞增殖活性检测

为了检测具有不同 PD-1 结合亲和力的 PD-1-IL-2v 融合蛋白的活性以及对
25 PD-1 结合亲和力的依赖性，我们在 M07e-hPD-1 细胞株中检测实施例 14 中提到的
PD-1 抗体突变体与 IL-2v 的融合蛋白对细胞增殖的影响。实验方法以及 PD-1-IL-2v
的相对细胞增殖活性计算方法参见实施例 11。

实验结果见表 24 和图 10。结果表明，A-N88D-M08，A-N88D-M15，
A-N88D-M26，A-N88D-M27和A-N88D-M28均具有促M07e-hPD-1细胞增殖活性。
30 PD-1-IL-2v融合蛋白促M07e-hPD-1细胞增殖活性与结合PD-1抗原的亲和力(表23)
呈现基本一致的趋势，说明PD-1-IL-2v融合蛋白促细胞增殖活性的强弱依赖于
PD-1-IL-2v对PD-1结合亲和力的强弱。

表24. 具有不同PD-1亲和力的PD-1-IL-2v融合蛋白对M07e-hPD-1细胞的促增殖活

性

名称	M07c-hPD-1 细胞增殖比例(%)							
	1000 nM	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM	0.001 nM	0.0001 nM
A-PC	100.0	104.6	107.2	112.3	99.5	29.3	8.1	4.0
A-N88D	55.4	41.1	35.5	36.0	30.8	13.4	4.4	5.2
A-N88D-M8	44.2	35.5	35.5	36.0	27.3	11.9	4.5	3.8
A-N88D-M15	47.7	54.9	41.6	32.9	17.0	7.0	4.1	8.9
A-N88D-M26	54.4	43.1	37.0	23.2	10.7	9.3	4.8	3.7
A-N88D-M27	60.0	39.5	31.9	21.1	9.3	4.9	4.9	7.5
A-N88D-M28	51.3	34.4	19.1	12.4	7.6	9.4	6.3	7.2
A17m0902_hIgG4	2.8	8.3	12.4	12.4	10.5	7.8	5.1	6.2

实施例 16. A-N88D 能够抑制小鼠 CT26 肿瘤生长

本实施例在人源化 PD-1 Balb/c 小鼠的 CT26 肿瘤模型上, 验证实施例 10 中构建的 A-N88D 的体内抗肿瘤药效。使用 DMEM 培养基(10% FBS)培养 CT26 小鼠结肠癌细胞系, 将 5×10^6 个 CT26 细胞接种于人源化 PD-1 Balb/c 雌鼠 (购自集萃药康) 皮下, 待小鼠平均肿瘤体积达到 90 mm^3 左右时, 随机分组, 每组 6 只, 给予腹腔注射抗体或对照, 每周两次测量肿瘤体积, 称体重, 记录数据。实验分组与给药方案参见表 25。考虑到 A-N88D 的分子量约 92 kDa, A17m0902_hIgG4 分子量约 76 kDa, 故 A-N88D 给药剂量调整为 A17m0902_hIgG4 的 120%, 以实现等摩尔数剂量。

如图 11 所示, 相较于对照组, A-N88D 表现出较强的抗肿瘤药效, 且在等摩尔剂量下, A-N88D 的体内抗肿瘤药效显著强于 A17m0902_hIgG4(图中 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。同时, 从小鼠毒性上来看, A-N88D 未产生小鼠体重上的变化(图 12), 显示出较好的安全性。

表 25. 小鼠实验分组与给药方案

组别	药物或对照	给药剂量 (mg/kg)	给药方式	给药频率
组 1	PBS	--	i.p.	BIW*3
组 2	A17m0902_hIgG4	0.5		
组 3	A17m0902_hIgG4	2.5		
组 4	A-N88D	0.6		
组 5	A-N88D	3.0		

实施例 17. A-N88D 能够抑制小鼠 B16F10 肿瘤生长

本实施例在人源化 PD-1 C57BL/6 小鼠的 B16F10 肿瘤模型上, 验证 A-N88D 的体内抗肿瘤药效。使用 DMEM 培养基(10% FBS)培养 B16F10 小鼠皮肤黑色素瘤细胞系, 将 1×10^5 个 B16F10 细胞接种于人源化 PD-1 C57BL/6 雌鼠 (购自百奥赛图) 皮下, 待小鼠平均肿瘤体积达到 75 mm^3 左右时, 随机分组, 每组 8 只, 给予腹腔注射 PBS 与 A-N88D(24mg/kg), 每两天测量肿瘤体积, 称体重, 记录数据。结果显示, 第 10 天 A-N88D 的肿瘤抑制率为 39.9%, 显著高于 PBS 对照组(p,

0.0007), A-N88D 表现出较强的抗肿瘤药效。与此同时, A-N88D 未产生小鼠体重上的变化, 显示出较好的安全性。

权利要求书:

1. 一种免疫缀合物, 其含有 PD-1 抗体或其抗原结合片段, 和 IL-2 变体; 其中, 所述 IL-2 变体包含如下突变(i)所示的突变, 以及(ii)-(iii)中的任意一种或任意组合的突变:

- 5 (i) 使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与 IL-2R β / γ 的亲合力的突变;
- (ii) 使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与 IL-2R α 的亲合力、或不与 IL-2R α 结合的突变;
- (iii) 使 IL-2 变体具有提高的稳定性、表达量和/或纯度的突变;
- 优选地,
- 10 (i) 使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与 IL-2R β / γ 的亲合力的突变, 其选自位置 12, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 43, 69, 84, 87, 88, 91, 92, 95, 123, 126, 127, 129 和 130 中任意一个或任意组合;
- (ii) 使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与 IL-2R α 的亲合力、或不与 IL-2R α 结合的突变, 其选自位置 38, 42, 45, 62, 65, 68 和 72 中任意一个或任
- 15 意组合;
- (iii) 使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 提高的稳定性、表达量和/或纯度的突变, 其选自位置 11, 26, 27, 29, 30, 70, 71, 78, 82 和 132 中任意一个或任意组合;
- 以上位置是根据 SEQ ID NO:87 所示的野生型 IL-2 氨基酸序列编号。

- 20 2. 如权利要求 1 所述的免疫缀合物, 其中:

所述突变(i)包含如下的任意一个或任意组合的突变: L12R, L12K, L12E, L12Q, E15Q, E15R, E15A, E15S, H16N, H16A, H16E, H16D, H16G, H16S, H16T, H16V, H16P, D20A, D20H, D20Y, D20N, M23A, M23R, M23K, M23G, M23S, M23T, M23V, M23P, S87K, S87A, D84S, D84L, D84N, D84V, D84H, D84Y, D84R, D84K, D84G, D84A, D84T, D84P, N88D, N88A, N88S, N88T, N88R, N88I, V91A, V91T, V91E, I92A, E95S, E95A, E95R, E95Q, E95G, E95T, E95V, E95P, E95H, E95N, T123A, T123E, T123K, T123Q, Q126D, Q126L, Q126A, Q126S, Q126T, Q126E, S127A, S127E, S127K 和 S127Q; 和/或,

30 所述突变(ii)包含如下的任意一个或任意组合的突变: R38A, R38D, R38E, E62Q, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, P65R, P65E, P65K, P65H, P65Y, P65Q, P65D, P65N, E68A, E68Q, E68K, E68R, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R 和 L72K; 和/或,

35 或,

所述突变(iii)包含如下至少一组的突变: N26Q, N29S, N30S, N71Q,

Q11C/L132C, L70C/P82C 和 G27C/F78C;

优选地, 所述突变(i)包含如下至少一组的突变: N88D, N88R, D20A, D20N, V91T, Q126D, 和 H16A/D84S; 和/或,

所述突变(ii)包含如下至少一组的突变: F42A, Y45A, L72G, R38E/F42A,
5 F42A/L72G, F42A/Y45A, Y45A/L72G, 和 F42A/Y45A/L72G; 和/或,

所述突变(iii)包含如下至少一组的突变: N26Q, N29S, N30S,
N26Q/N29S/N71Q, N26Q/N29S, N26Q/N30S, N26Q/N30S/Q11C/L132C,
N26Q/N29S/L70C/P82C, 和 N26Q/N30S/G27C/F78C。

10 3. 如权利要求 1 或 2 所述的免疫缀合物, 其中所述 IL-2 变体进一步含有位置 3 和/或 125 的突变, 所述位置 3 的突变优选为 T3A; 所述位置 125 的突变优选为 C125A 或 C125S。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的免疫缀合物, 其中所述 IL-2 变体含有以下任一
15 组突变:

F42A/L72G/N88D,

F42A/L72G/N88R,

F42A/L72G/D20A,

F42A/L72G/D20N,

20 F42A/L72G/V91T,

F42A/R38E/V91T,

F42A/L72G/Q126D, 和

F42A/L72G/H16A/D84S;

优选地, 所述 IL-2 变体含有以下任一组突变:

25 F42A/L72G/N88D/N26Q/N29S/N71Q,

F42A/L72G/N88R/N26Q/N29S/N71Q,

F42A/L72G/D20A/N26Q/N29S/N71Q,

F42A/L72G/D20N/N26Q/N29S/N71Q,

F42A/L72G/V91T/N26Q/N29S/N71Q,

30 F42A/L72G/Q126D/N26Q/N29S/N71Q, 和

F42A/L72G/H16A/D84S/N26Q/N29S/N71Q;

更优选地, 所述 IL-2 变体含有以下任一组突变:

T3A/F42A/R38E/V91T/C125A,

T3A/F42A/L72G/N88D/N26Q/N29S/N71Q/C125A,

35 T3A/F42A/L72G/N88R/N26Q/N29S/N71Q/C125A,

T3A/F42A/L72G/D20A/N26Q/N29S/N71Q/C125A,

T3A/F42A/L72G/D20N/N26Q/N29S/N71Q/C125A,
T3A/F42A/L72G/V91T/N26Q/N29S/N71Q/C125A,
T3A/F42A/L72G/Q126D/N26Q/N29S/N71Q/C125A, 和
T3A/F42A/L72G/H16A/D84S/N26Q/N29S/N71Q/C125A。

5

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的免疫缀合物, 其中所述 IL-2 变体含有如 SEQ ID NO: 60-68 任一项所示的氨基酸序列或与之具有至少 90%同一性的序列。

6. 如权利要求 1-5 任一项所述的免疫缀合物, 其中, 所述 PD-1 抗体或其抗原
10 结合片段包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含

1) 如 SEQ ID NO: 97、100、101 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 或

2) 如 SEQ ID NO: 4、5、6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

优选地, 包含

15 1-1) 如 SEQ ID NO: 7、36、37 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3,

1-2) 如 SEQ ID NO: 97、98、99 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 或

1-3) 如 SEQ ID NO: 7 或 93 所示的 CDR1, 如 SEQ ID NO: 8、38-40、94-95
中任一所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 9、41、42、96 中任一所示的 CDR3;

优选地, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 1) 至 19) 中任一项所示的 CDR1、

20 CDR2 和 CDR3:

1) 如 SEQ ID NO: 7、38、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

2) 如 SEQ ID NO: 7、38、96 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

3) 如 SEQ ID NO: 7、94、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

4) 如 SEQ ID NO: 93、94、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

25 5) 如 SEQ ID NO: 93、94、96 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

6) 如 SEQ ID NO: 93、95、96 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

7) 如 SEQ ID NO: 7、8、9 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

8) 如 SEQ ID NO: 7、8、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

9) 如 SEQ ID NO: 7、38、6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

30 10) 如 SEQ ID NO: 7、39、9 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

11) 如 SEQ ID NO: 7、40、6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

12) 如 SEQ ID NO: 7、8、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

13) 如 SEQ ID NO: 7、8、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

14) 如 SEQ ID NO: 7、38、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

35 15) 如 SEQ ID NO: 7、38、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

16) 如 SEQ ID NO: 7、39、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

17)如 SEQ ID NO: 7、39、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

18)如 SEQ ID NO: 7、40、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3; 和

19)如 SEQ ID NO: 7、40、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

5 优选地, 所述免疫球蛋白单一可变结构域的包含以下序列, 或由以下序列组成: SEQ ID NO: 3、13-15、17-35、88-92 任一所示的氨基酸序列; SEQ ID NO: 2、16 任一所示的氨基酸序列; 或与前述任一序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的免疫缀合物, 其中, 所述 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含 PD-1 结合结构域 1 和/或 PD-1 结合结构域 2; 所述 PD-1 结合结构域 1 包含至少一个所述免疫球蛋白单一可变结构域, 所述 PD-1 结合结构域 2 包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL);

优选地, 所述 PD-1 结合结构域 2 选自 Fab, Fab', Fv 或 ScFv, 更优选为 Fab;

15 优选地, 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 54-56 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 57-59 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3; 更优选地, 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 52 所示氨基酸序列的 Fab 重链中的重链可变区, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 53 所示氨基酸序列的 Fab 轻链中的轻链可变区。

20 8. 一种免疫缀合物, 其含有 PD-1 抗体或其抗原结合片段, 和 IL-2 或其变体; 其中:

所述 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含

1) 如 SEQ ID NO: 97、100、101 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 或

25 2) 如 SEQ ID NO: 4、5、6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

优选地, 包含

1-1) 如 SEQ ID NO: 7、36、37 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3,

1-2) 如 SEQ ID NO: 97、98、99 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 或

30 1-3) 如 SEQ ID NO: 7 或 93 所示的 CDR1, 如 SEQ ID NO: 8、38-40、94-95 中任一所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 9、41、42、96 中任一所示的 CDR3。

9. 如权利要求 8 所述的免疫缀合物, 其中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 1) 至 19) 中任一项所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3:

1)如 SEQ ID NO: 7、38、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

35 2)如 SEQ ID NO: 7、38、96 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

3)如 SEQ ID NO: 7、94、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;

- 4)如 SEQ ID NO: 93、94、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
5)如 SEQ ID NO: 93、94、96 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
6)如 SEQ ID NO: 93、95、96 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
7)如 SEQ ID NO: 7、8、9 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
5 8)如 SEQ ID NO: 7、8、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
9)如 SEQ ID NO: 7、38、6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
10)如 SEQ ID NO: 7、39、9 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
11)如 SEQ ID NO: 7、40、6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
12)如 SEQ ID NO: 7、8、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
10 13)如 SEQ ID NO: 7、8、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
14)如 SEQ ID NO: 7、38、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
15)如 SEQ ID NO: 7、38、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
16)如 SEQ ID NO: 7、39、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
17)如 SEQ ID NO: 7、39、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3;
15 18)如 SEQ ID NO: 7、40、41 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3; 和
19)如 SEQ ID NO: 7、40、42 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的免疫缀合物, 其中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域为人源化、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的;

优选地, 所述人源化在改造过程使用的人种系模板的重链框架区为 IGHV3-23*01 或 IGHV3-23*04。

11. 如权利要求 8-10 中任一项所述的免疫缀合物, 其中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域的包含以下序列, 或由以下序列组成:

SEQ ID NO: 3、13-15、17-35、88-92 任一所示的氨基酸序列;

SEQ ID NO: 2、16 任一所示的氨基酸序列; 或

与前述任一序列具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

12. 如权利要求 8-11 中任一项所述的免疫缀合物, 其中, 所述 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含 PD-1 结合结构域 1 和/或 PD-1 结合结构域 2; 所述 PD-1 结合结构域 1 包含至少一个所述免疫球蛋白单一可变结构域, 所述 PD-1 结合结构域 2 包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL);

优选地, 所述 PD-1 结合结构域 2 选自 Fab, Fab', Fv 或 ScFv, 更优选为 Fab;

- 35 优选地, 所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 54-56 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 57-59 所示氨基酸序列的 LCDR1、

LCDR2、LCDR3；更优选地，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 52 所示氨基酸序列的 Fab 重链中的重链可变区，所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 53 所示氨基酸序列的 Fab 轻链中的轻链可变区。

5 13. 如权利要求 8-12 中任一项所述的免疫缀合物，其中，所述 IL-2 变体包含如下突变(i)-(iii)中的任意一种或任意组合：

(i) 使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与 IL-2R β / γ 的亲合力的突变；

(ii) 使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与 IL-2R α 的亲合力、或不与 IL-2R α 结合的突变；

10 (iii) 使 IL-2 变体具有提高的稳定性、表达量和/或纯度的突变；

优选地，

(i) 使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与 IL-2R β / γ 的亲合力的突变选自位置 12, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 43, 69, 84, 87, 88, 91, 92, 95, 123, 126, 127, 129 和 130 中任意一个或任意组合；

15 (ii) 使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 降低的与 IL-2R α 的亲合力、或不与 IL-2R α 结合的突变选自位置 38, 42, 45, 62, 65, 68 和 72 中任意一个或任意组合；

(iii) 使 IL-2 变体具有较之野生型 IL-2 提高的稳定性、表达量和/或纯度的突变选自位置 11, 26, 27, 29, 30, 70, 71, 78, 82 和 132 中任意一个或任意组合；

20 以上位置是根据 SEQ ID NO:87 所示的野生型 IL-2 氨基酸序列编号。

14. 如权利要求 13 所述的免疫缀合物，其中所述突变(i)包含如下的任意一个或任意组合的突变：L12R, L12K, L12E, L12Q, E15Q, E15R, E15A, E15S, H16N, H16A, H16E, H16D, H16G, H16S, H16T, H16V, H16P, D20A, D20H,
25 D20Y, D20N, M23A, M23R, M23K, M23G, M23S, M23T, M23V, M23P, S87K, S87A, D84S, D84L, D84N, D84V, D84H, D84Y, D84R, D84K, D84G, D84A, D84T, D84P, N88D, N88A, N88S, N88T, N88R, N88I, V91A, V91T, V91E, I92A, E95S, E95A, E95R, E95Q, E95G, E95T, E95V, E95P, E95H, E95N, T123A, T123E, T123K, T123Q, Q126D, Q126L, Q126A, Q126S, Q126T,
30 Q126E, S127A, S127E, S127K 和 S127Q；

优选地，所述突变(i)包含以下至少一组突变：

N88D, N88R, D20A, D20N, V91T, Q126D, 和 H16A/D84S。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的免疫缀合物，其中所述突变(ii)包含如下的任意一个或任意组合的突变：R38A, R38D, R38E, E62Q, F42A, F42G, F42S,
35 F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T,

Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, P65R, P65E, P65K, P65H, P65Y, P65Q, P65D, P65N, E68A, E68Q, E68K, E68R, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R 和 L72K;

优选地, 所述突变(ii)包含以下至少一组突变:

5 F42A, Y45A, L72G, R38E/F42A, F42A/L72G, F42A/Y45A, Y45A/L72G, 和 F42A/Y45A/L72G。

16. 如权利要求 13 至 15 中任一项所述的免疫缀合物, 其中所述突变(iii)包含如下的突变: N26Q, N29S, N30S, N71Q, Q11C/L132C, L70C/P82C 和 G27C/F78C;

10 优选地, 所述突变(iii)包含以下至少一组突变:

N26Q, N29S, N30S, N26Q/N29S/N71Q, N26Q/N29S, N26Q/N30S, N26Q/N30S/Q11C/L132C, N26Q/N29S/L70C/P82C, 和 N26Q/N30S/G27C/F78C。

17. 如权利要求 13 至 16 中任一项所述的免疫缀合物, 其中所述 IL-2 变体含有以下任一组突变:

15 F42A/L72G/N88D,
F42A/L72G/N88R,
F42A/L72G/D20A,
F42A/L72G/D20N,
20 F42A/L72G/V91T,
F42A/R38E/V91T,
F42A/L72G/Q126D, 和
F42A/L72G/H16A/D84S;

优选地, 所述 IL-2 变体含有以下任一组突变:

25 F42A/L72G/N88D/N26Q/N29S/N71Q,
F42A/L72G/N88R/N26Q/N29S/N71Q,
F42A/L72G/D20A/N26Q/N29S/N71Q,
F42A/L72G/D20N/N26Q/N29S/N71Q,
F42A/L72G/V91T/N26Q/N29S/N71Q,
30 F42A/L72G/Q126D/N26Q/N29S/N71Q, 和
F42A/L72G/H16A/D84S/N26Q/N29S/N71Q。

18. 如权利要求 13 至 17 中任一项所述的免疫缀合物, 其中所述 IL-2 变体进一步含有位置 3 和/或 125 的突变, 所述位置 3 的突变优选为 T3A; 所述位置 125 35 的突变优选为 C125A 或 C125S。

19. 如权利要求 13 至 18 中任一项所述的免疫缀合物, 其中所述 IL-2 变体含

有如 SEQ ID NO: 60-68 任一项所示的氨基酸序列或与之具有至少 90%同一性的序列。

20. 如前述权利要求中任一项所述的免疫缀合物，其还包含免疫球蛋白 Fc 区；
5 优选地，所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区。

21. 如权利要求 20 所述的免疫缀合物，其中所述人 IgG1 的 Fc 区含有一个或多个降低与 Fc 受体(FcR)结合，和/或降低效应器功能的氨基酸突变；

优选地，所述人 IgG1 的 Fc 区含有一个或多个降低对 Fc γ 受体(Fc γ R)结合，和
10 /或降低 ADCC 效应的氨基酸突变；

更优选地，所述人 IgG1 的 Fc 区含有 L234A、L235A、P329G 的任一突变或任意突变组合。

22. 如权利要求 20 或 21 所述的免疫缀合物，其中，所述 Fc 区包含第一亚基
15 和第二亚基，所述 Fc 区包含促进所述第一亚基和所述第二亚基联合的 knob-into-hole 修饰；

优选地，所述 Fc 区的第一亚基包含 knob 修饰，所述 Fc 区的第二亚基包含 hole 修饰。

23. 如权利要求 22 所述的免疫缀合物，其中，
20 所述 Fc 区的第一亚基含有 T366 突变，第二亚基含有选自 T366, L368 和 Y407 的突变或其任意组合；

所述 Fc 区的第一亚基含有 S354 或 E356 突变，第二亚基含有 Y349 突变；或
所述 Fc 区的第一亚基含有 S354 和 T366 突变，第二亚基含有 Y349, T366,
25 L368 和 Y407 突变；

优选地，

所述 Fc 区的第一亚基含有 T366W 突变，第二亚基含有选自 T366S、L368A
和 Y407V 的突变或其任意组合；

所述 Fc 区的第一亚基含有 S354C 或 E356C 突变，第二亚基含有 Y349C 突变；
30 或

所述 Fc 区的第一亚基含有 S354C/T366W 突变，第二亚基含有
Y349C/T366S/L368A/Y407V 突变。

24. 如权利要求 22 或 23 所述的免疫缀合物，其中，所述 Fc 区的第二亚基还
35 含有 H435 和/或 Y436 突变，优选含有 H435R/Y436F、H435R 或 H435K 突变。

25. 如权利要求 22-24 中任一项所述的免疫缀合物，其中，所述 Fc 区的第一

亚基和/或第二亚基还含有 C220 突变, 优选为 C220S 突变。

26. 如权利要求 20 至 25 任一项所述的免疫缀合物, 其中, 所述人 IgG1 的 Fc 区含有增强的 FcRn 介导的再循环, 和/或延长半衰期的突变;

5 优选地, 所述人 IgG1 的 Fc 区含有选自 M252, S254, T256, M428 或其任意组合的突变;

优选地, 所述人 IgG1 的 Fc 区含有 M252Y/M428V, M252Y/M428L, M252Y/S254T/T256E 突变。

10 27. 如前述权利要求任一项所述的免疫缀合物, 所述 PD-1 抗体或其抗原结合片段位于 Fc 区的 N 端, 所述 IL-2 或其变体位于 Fc 区的 N 端或 C 端;

优选地, 所述 PD-1 抗体或其抗原结合片段位于 Fc 的 N 端, 所述 IL-2 或其变体位于 Fc 区的 C 端。

15 28. 如权利要求 22 至 27 任一项所述的免疫缀合物, 所述 IL-2 或其变体位于 Fc 区的第一亚基所在的多肽链; 优选地, 所述 IL-2 或其变体与 Fc 区的第一亚基直接连接或通过连接子连接。

29. 如前述权利要求任一项所述的免疫缀合物, 所述 PD-1 抗体或其抗原结合片段中 PD-1 结合结构域与 IL-2 或其变体的价数比为 4: 1 至 1: 2 之间, 优选为 4: 1、3: 1、2: 1 或 1: 1。

30. 如前述权利要求任一项所述的免疫缀合物, 其还包含连接子,

25 优选地, 所述连接子为 $(G_xS)_y$ 连接子, 其中, x 选自 1-5 的整数, y 选自 1-6 的整数;

更优选地, x 为 4, y 为 1、2 或 3。

31. 如前述权利要求任一项所述的免疫缀合物, 其包含从 N-末端至 C-末端分别为如下 I)-VI)任一项所示的多肽链组合:

30 I)第一多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第一亚基]-[连接子 1]-[IL-2 或其变体],

第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第二亚基];

II)第一多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第一亚基]-[连接子 1]-[IL-2 或其变体],

35 第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第二亚基];

III)第一多肽链: [PD-1 结合结构域 2 的 Fab 重链]-[Fc 区第一亚基]-[连接子

- 1]-[IL-2 或其变体],
第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第二亚基],
第三多肽链: [PD-1 结合结构域 2 的 Fab 轻链];
IV)第一多肽链: [PD-1 结合结构域 2 的 Fab 重链]-[Fc 区第一亚基]-[连接子
5 1]-[IL-2 或其变体],
第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第二
亚基],
第三多肽链: [PD-1 结合结构域 2 的 Fab 轻链];
V)第一多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 2 的 Fab 重
10 链]-[Fc 区第一亚基]-[连接子 1]-[IL-2 或其变体],
第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 2 的 Fab 轻
链]-[Fc 区第二亚基],
第三多肽链: [PD-1 结合结构域 2 的 Fab 轻链];
VI)第一多肽链: [IL-2 或其变体]-[连接子 3]-[Fc 区第一亚基],
15 第二多肽链: [PD-1 结合结构域 1]-[连接子 2]-[PD-1 结合结构域 1]-[Fc 区第二
亚基];
其中, -表示肽键, 连接子为能够实现连接功能的多肽, 连接子 1、连接子 2、
连接子 3 中的任意两个可以相同, 也可以不同; 优选地, 所述连接子为 $(G_xS)_y$ 连接
子, 其中, x 选自 1-5 的整数, y 选自 1-6 的整数; 更优选地, 连接子 1 为 $(G_4S)_3$,
20 连接子 2 为 $(G_4S)_2$, 连接子 3 为 G_4S ;
任意两个[PD-1 结合结构域 1]可以相同或不同, 其选自权利要求 1 至 3 中任意
的 PD-1 结合结构域;
优选地, [PD-1 结合结构域 2]包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL), 其中,
所述 VH 包含如 SEQ ID NO: 54-56 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3,
25 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 57-59 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2、LCDR3;
优选地, 所述 VH 包含 SEQ ID NO: 52 所示氨基酸序列的 Fab 重链中的重链可变
区, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO: 53 所示氨基酸序列的 Fab 轻链中的轻链可变区。

32. 如前述权利要求任一项所述的免疫缀合物, 其包含如下氨基酸序列所示的
30 多肽链组合:
SEQ ID NO: 73 和 74;
SEQ ID NO: 75 和 76;
SEQ ID NO: 77 和 78;
SEQ ID NO: 79 和 80;
35 SEQ ID NO: 43 和 44;
SEQ ID NO: 45 和 46;

SEQ ID NO: 47、44 和 48;
SEQ ID NO: 47、46 和 48;
SEQ ID NO: 49、50 和 48; 或
SEQ ID NO: 51 和 46;
5 SEQ ID NO: 102 和 103。

33. 一种核酸分子, 其编码权利要求 1 至 32 中任一项所述的免疫缀合物。

34. 一种宿主细胞, 其含有权利要求 33 所述的核酸分子。

10

35. 一种制备权利要求 1 至 32 中任一项所述的免疫缀合物的方法, 包括培养权利要求 34 所述的宿主细胞, 表达所述免疫缀合物; 可选地, 包括分离或纯化所述免疫缀合物。

15

36. 一种药物组合物, 其含有权利要求 1-32 中任一项所述的免疫缀合物, 以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

37. 权利要求 1 至 32 中任一项所述的免疫缀合物, 权利要求 33 所述的核酸分子, 或权利要求 36 所述的药物组合物在如下(1)-(5)至少一项中的用途:

20

(1) 用于治疗癌症, 或制备用于治疗癌症的药物;

(2) 用于活化细胞毒性 T 细胞(CTL), 或制备用于活化细胞毒性 T 细胞(CTL)的药物;

(3) 用于促进 CD4⁺和/或 CD8⁺T 细胞增殖, 或制备用于促进 CD4⁺和/或 CD8⁺T 细胞增殖的药物;

25

(4) 用于使 PD-1 抗体高表达的细胞毒性 T 细胞(CTL), 具有高于 PD-1 抗体低表达或不表达的细胞毒性 T 细胞(CTL)的细胞活化效率;

(5) 用于使 PD-1 抗体高表达的 CD4⁺和/或 CD8⁺T, 具有高于 PD-1 抗体低表达或不表达的 CD4⁺和/或 CD8⁺T 细胞的细胞增殖效率;

30

优选地, 所述癌症选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症。

38. 一种治疗或改善疾病或病症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求 1 至 32 中任一项所述的免疫缀合物, 或权利要求 33 所述的核酸分子, 或权利要求 36 所述的药物组合物;

35

优选地, 所述疾病为癌症;

更优选地, 所述癌症选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃

癌、结肠癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症。

39. 一种活化细胞毒性 T 细胞(CTL)的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求 1 至 32 中任一项所述的免疫缀合物, 或权利要求 33 所述的核酸分子, 或权利要求 36 所述的药物组合物;

优选地, 所述受试者患有癌症;

更优选地, 所述癌症选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症;

优选地, 所述细胞毒性 T 细胞(CTL)特异性表达 PD-1。

40. 一种促进 CD4⁺和/或 CD8⁺T 细胞增殖的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求 1 至 32 中任一项所述的免疫缀合物, 或权利要求 33 所述的核酸分子, 或权利要求 36 所述的药物组合物;

优选地, 所述受试者患有癌症;

更优选地, 所述癌症选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症;

优选地, 所述 CD4⁺和/或 CD8⁺T 细胞特异性表达 PD-1。