

抗 PD1-IL10 融合蛋白及其应用

相关申请的交叉引用

本申请要求申请号为 202311297567.5，申请日为 2023 年 10 月 8 日，发明名称为“抗 PD1-IL10 融合蛋白及其应用”的中国发明专利申请的优先权，其全部内容通过引用并入本文中。

技术领域

本公开涉及生物技术领域，具体地，涉及一种抗 PD1-IL10 融合蛋白及其应用。

背景技术

程序死亡因子-1 (programmed cell death protein 1, 也称 PD1 或 PD-1) 是 CD28 家族成员，在活化的 B 细胞，T 细胞及髓样细胞上表达。人 PD1 由基因 Pdcd1 编码，位于 2q37.3，全长 9.6kb，由 5 个外显子和 4 个内含子组成，其上游包含 663bp 的启动子。PD1 为 55KDa 的 I 型跨膜蛋白，分子结构由胞外区，跨膜区及胞内区组成，胞外区含有一个免疫球蛋白可变区 IgV 结构域，胞内区含有免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM) 和免疫受体酪氨酸转接作用模块 (ITSM)。PD-1 胞外区氨基酸序列和 CTLA-4 有 24% 的同源性，与 CD28 有 28% 的同源性。在 T 细胞被激活后，PD-1 主要通过 ITIM 将酪氨酸磷脂酶 SHP2 集合，导致下游效应分子去磷酸化。PD-1 有两个配体：PD-L1 和 PD-L2。PD-L1 和 PD-L2 都是 B7 同源物，PDL 基因位于人染色体 9P24.2 位点，大小为 42kb，其分子结构均包含一个免疫球蛋白样可变区结构域，一个恒定区样结构域，一个跨膜区和一个短的胞质尾巴。PD-1 与 PD-L1 和 PD-L2 结合后可下调 T 细胞的活化。PD-L1 表达于多种肿瘤细胞表面，这些肿瘤细胞包括：肺癌，胃癌，肝癌，食道癌，肾癌，卵巢癌，宫颈癌，乳腺癌，皮肤癌，结肠癌，膀胱癌，神经胶质瘤，头颈癌，口腔鳞状细胞癌。而且这些癌症周边发现大量表达 PD1 的 CD8+T 细胞，临床结果显示，PD-L1 在肿瘤细胞上的高表达水平与癌症患者不良预后有关。

耗竭的 CD8+T 细胞在免疫检查点治疗耐药过程中发挥重要作用。T 细胞在持续的抗原刺激及各种抑制性分子的作用下，会使 T 细胞从活化状态转化为耗竭状态。耗竭的 CD8+T 细胞其增殖能力、细胞因子分泌能力、肿瘤杀伤能力等均显著降低，无法提供有效的抗肿瘤免疫。处于耗竭状态下的 CD8+T 细胞，即使给与抗 PD-1 抗体阻断 PD-1/PD-L1 通路，也不能使耗竭的 CD8+T 细胞重新回到活化的状态。

发明内容

本公开提供一种融合蛋白，其包括 PD1 结合单元部分和 IL10 单元部分。

在一些实施方案中，本公开公开一种融合蛋白，其包括 PD1 结合单元部分和 IL10 单元部分，其中，所述 PD1 结合单元部分为抗 PD1 抗体，所述 IL10 单元部分为 IL10 多肽；其中，所述抗 PD1 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包括与 SEQ ID NO.1、3、5 或 7 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%) 序列同一性的可变区中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和/或所述抗体的轻链可变区包括与 SEQ ID NO.2、4、6 或 8 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%) 序列同一性的可变区中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体选自：

A.所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括 SEQ ID NO.1 中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且所述抗 PD1 抗体的轻链可变区包括 SEQ ID NO.2 中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

B.所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括 SEQ ID NO.3 中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且所述抗 PD1 抗体的轻链可变区包括 SEQ ID NO.4 中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

C.所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括 SEQ ID NO.5 中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且所述抗 PD1 抗体的轻链可变区包括 SEQ ID NO.6 中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

D.所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括 SEQ ID NO.7 中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且所述抗 PD1 抗体的轻链可变区包括 SEQ ID NO.8 中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 由 IMGT 编号系统定义，或由 Kabat 编号系统定义，或由 Chothia 编号系统定义，或由 Contact 编号系统定义，或由 AbM 编号系统定义。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 根据 Kabat 编号系统定义。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 根据 IMGT 编号系统定义。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，其重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO.9 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO.10、15 或 16 的氨基酸序列，和 HCDR3 包含 SEQ ID NO.11 的氨基酸序列；并且轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO.12 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO.13 的氨基酸序列，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO.14 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，其中，所述抗 PD1 抗体包含分别如 SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10 和 SEQ ID NO.11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及分别如 SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13 和 SEQ ID NO.14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，其中，所述抗 PD1 抗体包含分别如 SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.15 和 SEQ ID NO.11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及分别如 SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13 和 SEQ ID NO.14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，其中，所述抗 PD1 抗体包含分别如 SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.16 和 SEQ ID NO.11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及分别如 SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13 和 SEQ ID NO.14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，所述抗体为人源化抗体，鼠源抗体或嵌合抗体。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，其中，所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括与 SEQ ID NO.1、3、5 或 7 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%) 序列同一性的氨基酸序列，和/或轻链可变区包括与 SEQ ID NO.2、4、6 或 8 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%) 序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，其中，所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括与 SEQ ID NO.1、3、5 或 7 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%) 序列同一性的氨基酸序列，和轻链可变区包括与 SEQ ID NO.2、4、6 或 8 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%) 序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，其中，

(a) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO.2 的氨基酸序列；

(b) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO.3 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO.4 的氨基酸序列；

(c) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO.5 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO.6 的氨基酸序列；或

(d) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO.7 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列；

在一些实施方案中，如上任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体，所述抗 PD1 抗体包括如 SEQ ID NO.1 所示的重链可变区，和如 SEQ ID NO.2 所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，公开一种融合蛋白，其包括 PD1 结合单元部分和 IL10 单元部分，其中，所述 PD1 结合单元为抗 PD1 抗体，所述 IL10 单元为 IL10 多肽；其中，

(a) 所述抗 PD1 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区与 SEQ ID NO.1 具有至少 95%序列同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO.2 具有至少 95%序列同一性；

(b) 所述抗 PD1 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区与 SEQ ID NO.3 具有至少 95%序列同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO.4 具有至少 95%序列同一性；

(c) 所述抗 PD1 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区与 SEQ ID NO.5 具有至少 95%序列同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO.6 具有至少 95%序列同一性；

(d) 所述抗 PD1 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区与 SEQ ID NO.7 具有至少 95% 序列同一性, 和所述轻链可变区与 SEQ ID NO.8 具有至少 95% 序列同一性; 或

(e) 所述抗 PD1 抗体, 其与 (a)、(b)、(c) 或 (d) 所述的抗 PD1 抗体竞争性结合 PD1 抗原或结合相同的表位。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗 PD1 抗体, 所述抗 PD1 抗体包括如 SEQ ID NO.1 所示的重链可变区, 和如 SEQ ID NO.2 所示的轻链可变区。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗 PD1 抗体包含恒定区。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗 PD1 抗体, 所述抗体的重链恒定区选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定区, 和/或所述轻链恒定区选自 κ 或 λ 链恒定区;

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗 PD1 抗体, 所述恒定区的种属来源为鼠或人;

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗 PD1 抗体, 所述重链恒定区为鼠 IgG2a 恒定区、鼠 IgG1 恒定区、人 IgG1 恒定区或人 IgG4 恒定区, 和/或所述轻链恒定区为鼠 κ 恒定区或人 κ 恒定区。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗 PD1 抗体, 所述重链恒定区包括与 SEQ ID NO.19 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 序列同一性的氨基酸序列, 和/或所述重链恒定区包括与 SEQ ID NO.20 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗 PD1 抗体, 所述重链恒定区包括 SEQ ID NO.19 的氨基酸序列, 和所述轻链恒定区包括 SEQ ID NO.20 的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗 PD1 抗体, 所述抗 PD1 抗体的重链包括与 SEQ ID NO.17 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 序列同一性的氨基酸序列, 所述抗 PD1 抗体的轻链包括与 SEQ ID NO.18 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 序列同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗 PD1 抗体, 所述抗 PD1 抗体包括如 SEQ ID NO.17 所示的重链和如 SEQ ID NO.18 所示的轻链。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述抗 PD1 抗体, 所述抗体为全长抗体或为选自 F(ab')₂、Fab'-SH、Fab'、Fab、scFab、dsFv、(dsFv)₂、Fv 和 scFv 中的任意一种抗原结合片段。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述 IL10 多肽, 其为天然 IL10 多肽或修饰的 IL10 多肽;

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述 IL10 多肽为修饰的 IL10 多肽, 所述修饰的 IL10 多肽为单体形式, 且所述修饰的 IL10 多肽相对于天然 IL10 多肽在任意两个相邻氨基酸之间插入有间隔肽, 所述间隔肽为柔性肽;

在一些实施方案中, 所述两个相邻氨基酸中的一个氨基酸位置为第 115 位、第 116 位、第 117 位、第 118 位、第 119 位;

在一些实施方案中, 所述间隔肽位于第 116 位和第 117 位之间;

在一些实施方案中, 所述间隔肽位于第 115 位和第 116 位之间;

在一些实施方案中, 所述间隔肽位于第 117 位和第 118 位之间;

在一些实施方案中, 所述间隔肽选自 GGGSGG、GGSGG、(GS)_n、(GGGS)_n、(GGSG)_n、(GGGG)_n 中的至少之一, n 为 1~10 之间的任意整数;

在一些实施方案中, 所述间隔肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.21 所示;

在一些实施方案中, 所述修饰的 IL10 多肽相对于天然 IL10 多肽, 在 N 端缺失 n 个氨基酸, n 为 1 至 12 之间的任意整数;

在一些实施方案中, 所述修饰的 IL10 多肽相对于天然 IL10 多肽, 在 N 端缺失 2 个氨基酸;

在一些实施方案中, 所述修饰的 IL10 多肽相对于天然 IL10 多肽, 在第 116 位与 117 位氨基酸之间插入有间隔肽, 且在 N 端缺失 2 个氨基酸;

在一些实施方案中, 所述天然 IL10 多肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO.23。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述 IL10 多肽, 所述 IL10 多肽包括与 SEQ ID NO.22 或 23 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 序列同一性的氨基酸序列;

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述 IL10 多肽, 所述 IL10 多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.22 所示。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中, 所述 IL10 多肽直接或通过连接肽与所述抗 PD1 抗体的重链或轻链连接; 在一些实施方案中, 所述 IL10 多肽的 N 末端通过连接肽与所述抗 PD1 抗体的轻链的 C 末端连接;

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中, 所述融合蛋白包括 2 条相同的式 P1 所示的第一链和 2 条相同的式 P2 所示的第二链:

P1: [抗 PD1 抗体的轻链]-[连接肽]-[IL10 多肽],

P2: 抗 PD1 抗体的重链;

在一些实施方案中, 所述式 P1 中, 所述连接肽为柔性连接肽;

在一些实施方案中, 所述连接肽选自 (GGGGGS)_nG、(GGGGGS)_n、(GS)_n、(GGGS)_n、(GGSG)_n、(GGGGSG)_n 中的至少之一, n 为 1~10 之间的任意整数;

在一些实施方案中, 所述连接肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.24 所示;

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 所述融合蛋白包括与 SEQ ID NO.25 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 序列同一性的氨基酸序列的第一链, 和与 SEQ ID NO.17 具有至少 90% (例如 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 序列同一性的氨基酸序列的第二链;

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 所述融合蛋白包括 2 条氨基酸序列如 SEQ ID NO.25 所示的第一链, 和 2 条氨基酸序列如 SEQ ID NO.17 所示的第二链。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的融合蛋白, 其中所述融合蛋白具有以下特性中的至少一种:

A. 所述的融合蛋白能与人 PD1 特异性结合; 可选地, 所述融合蛋白能以 ≤ 10 nM (例如, ≤ 10 nM、 ≤ 5 nM、 ≤ 4.50 nM、 ≤ 3.00 nM、 ≤ 2.00 nM、 ≤ 1.00 nM、 ≤ 0.90 nM、 ≤ 0.80 nM、 ≤ 0.70 nM、 ≤ 0.60 nM、 ≤ 0.50 nM、 ≤ 0.40 nM、 ≤ 0.30 nM、 ≤ 0.20 nM、 ≤ 0.10 nM、 ≤ 0.05 nM、 ≤ 0.01 nM、 ≤ 0.005 nM、 ≤ 0.001 nM 或更小) 的 EC50 值与人 PD1 蛋白结合, 其中, 所述 EC50 值通过 FACS 方法测定; 在一些实施方案中, 所述 EC50 值通过本申请实施例 3 的方法测定;

B. 所述的融合蛋白具有低血液毒性或无血液毒性; 在一些实施方案中, 所述血液毒性通过本申请实施例 3 的方法测定;

C. 所述的融合蛋白能增强 CD8+T 细胞杀伤活性; 在一些实施方案中, 所述血液毒性通过本申请实施例 5 的方法测定;

D. 所述的融合蛋白能抑制肿瘤的生长; 在一些实施方案中, 所述抑制肿瘤的生长通过本申请实施例 6 的方法测定。

本公开还提供一种核酸, 其编码前面任一项所述的融合蛋白。在一些实施方案中, 所述核酸为分离的核酸。

本公开还提供一种载体, 其含有前面任一项所述的核酸。

本公开还提供一种细胞, 其含有前面任一项所述的核酸或载体。

本公开还提供一种药物组合物, 其包含: 前面任一项所述的融合蛋白、核酸、载体或细胞, 在一些实施方案中, 所述药物组合物还包含一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

本公开还提供前面任一项所述的融合蛋白、核酸、载体、细胞或药物组合物在制备治疗或预防肿瘤或炎症疾病的药物中的应用。在一些实施方案中, 所述肿瘤或炎症疾病为人 PD1 和/或 PDL1 高表达的疾病。在一些实施方案中, 所述肿瘤为 PDL1 高表达肿瘤。在一些实施方案中, 所述肿瘤选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌和血液系统癌。在一些实施方案中, 所述肿瘤选自非小细胞肺癌、肾细胞癌、胃癌。

在一些实施方案中, 本公开提供一种治疗疾病的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的前面任一项所述的融合蛋白、核酸、载体、细胞或药物组合物的步骤。在一些实施方案中, 所述疾病为肿瘤或炎症疾病; 在一些实施方式中, 所述肿瘤或炎症疾病为人 PD1 和/或 PDL1 高表达的疾病。在一些实施方案中, 所述肿瘤为 PDL1 高表达肿瘤。在一些实施方案中, 所述肿瘤选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫

颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌和血液系统癌。在一些实施方案中，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、肾细胞癌、胃癌。

在另一个方面，本公开还提供用作药物的前述任一项所述的融合蛋白、核酸、载体、细胞或药物组合物。在一些实施方案中，药物用于治疗疾病。在一些实施方案中，所述疾病为肿瘤或炎症疾病；在一些实施方式中，所述肿瘤或炎症疾病为人 PD1 和/或 PDL1 高表达的疾病。在一些实施方案中，所述肿瘤为 PDL1 高表达肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌和血液系统癌。在一些实施方案中，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、肾细胞癌、胃癌。

在一些实施方案中，前面任一项所述的治疗，进一步包括向受试者施用另外的治疗药物。在一些实施方案中，所述另外的治疗药物为化疗剂。

本公开还提供一种试剂盒，其包含如前任一项所述的融合蛋白、核酸、载体、细胞或药物组合物；在一些实施方案中，所述试剂盒用于检测或测定人 PD1。本公开还提供了制备如前任一项所述的融合蛋白的方法，其包括培养如前任一项所述的细胞，然后分离和纯化获得融合蛋白的步骤。

本公开提供一种新的抗 PD1-IL10 融合蛋白。在一些实施方案中，本公开的抗 PD1-IL10 融合蛋白其通过抗 PD1 抗体，一方面可解除 PD-1/PD-L1 的免疫抑制，另一方面可直接结合在高表达 PD1 的耗竭 CD8+T 细胞表面，凭借 IL10 多肽阻碍 CD8+T 细胞进一步耗竭，增强 CD8+T 细胞杀伤活性，抑制活化诱导的细胞凋亡，从而增强抗肿瘤免疫应答。在一些实施方式中，相比天然 IL10 在食蟹猴体内具有显著的血液毒性，本公开的抗 PD1-IL10 融合蛋白在给药期间均无血液学毒性和肝损伤，解决临床上 IL10 存在的血液毒性，导致剂量过低而药效有限的问题，进而解决对 PD1/PDL1 耐药患者的治疗问题，增强机体抗肿瘤免疫反应，提高肿瘤患者生存率。

在一些实施方案中，本公开的抗 PD1-IL10 融合蛋白（例如 R1153）还具有良好的稳定性，例如在高温 40°条件下分别放置 7 天、14 天，在低 PH（3.5）条件下放置 1h、2h、4h，在室温放置 7 天，在 4°条件下放置 7 天等不同条件下均具有良好稳定性，抗 PD1-IL10 融合蛋白结合活性基本不受影响。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案，下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍，应当理解，以下附图仅示出了本发明的某些实施例，因此不应被看作是对本发明的限定，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

- 图 1：抗 PD1-IL10 融合蛋白的结构示意图；
- 图 2：抗 PD1-IL10 融合蛋白电泳图；
- 图 3：抗 PD1-IL10 融合蛋白与人 PD1 抗原的结合活性检测结果图；
- 图 4：抗 PD1-IL10 融合蛋白与人 IL10R 结合活性检测结果图；
- 图 5：报告基因法检测蛋白(R1153、R1152)的 IL10 的活性实验结果图；
- 图 6：报告基因法检测蛋白(R1153、R1152+CHO-hPD1)的 IL10 的活性实验结果图；
- 图 7：报告基因法检测蛋白(R1153、R1152)的 PD1 的活性实验结果图；
- 图 8：抗 PD1-IL10 融合蛋白 CD8+T 细胞凋亡检测实验结果图；
- 图 9：抗 PD1-IL10 融合蛋白 CD8+T 细胞凋亡实验中 IFN-γ 因子分泌检测结果图；
- 图 10：抗 PD1-IL10 融合蛋白的体内药效检测实验结果图；
- 图 11：抗 PD1-IL10 融合蛋白 PD-1 端 FACS 结合实验结果图；
- 图 12：抗 PD1-IL10 融合蛋白 IL10 端 FACS 结合实验结果图；
- 图 13：抗 PD1-IL10 融合蛋白 PD-1 端荧光报告检测活性实验结果图；
- 图 14：抗 PD1-IL10 融合蛋白 IL10 端荧光报告检测活性实验结果图；
- 图 15：抗 PD1-IL10 融合蛋白 PD-1 端结合与阻断活性实验结果图；
- 图 16：抗 PD1-IL10 融合蛋白与诱导的耗竭 CD8+T 细胞结合活性实验结果图；
- 图 17：抗 PD1-IL10 融合蛋白抑制耗竭 CD8+T 细胞凋亡检测结果图；
- 图 18：抗 PD1-IL10 融合蛋白对耗竭 CD8+T 细胞功能检测结果图；
- 图 19：抗 PD1-IL10 融合蛋白对 SEB 实验中 IFN-γ 分泌水平的影响结果图；
- 图 20：抗 PD1-IL10 融合蛋白对 MLR 实验中 IL-2 分泌水平的影响结果图；
- 图 21：抗 PD1-IL10 融合蛋白对 MLR 实验中 IFN-γ 分泌水平的影响结果图；
- 图 22：抗 PD1-IL10 融合蛋白与 C1q 蛋白的结合活性实验结果图；
- 图 23：抗 PD1-IL10 融合蛋白荧光报告检测 ADCC 活性实验结果图；
- 图 24：抗 PD1-IL10 融合蛋白在 CT26 模型中的体内药效检测实验结果图；
- 图 25：抗 PD1-IL10 融合蛋白在 MC38 模型中的体内药效检测实验结果图；

具体实施方式

为使本公开实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面对本公开实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，但是描述和实施例不应被解释为限制本公开的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。除非本公开明确定义，否则本公开所用的技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。

本公开中的“一种”(a/an)、“一个”(a/an)、“所述”、“上述”、“前述”包括复数指代，除非上下文清楚表明其并非如此。例如，“一种抗体”意指一种抗体或多种抗体。另外，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。术语“多个”的含义是至少两个，例如 2 个、3 个等，除非另有明确具体指出其并非如此。

除非上下文另外清楚表明并非如此，否则本公开的说明书和权利要求书中，应将词语“包含”或“具有”等理解为“包括”的意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不限于”的意义。例如“包含 A”其意指“包括 A，但不限于 A”。

“约”是指处于如本领域的普通技术人员所确定的特定值的可接受误差范围之内，其将部分取决于所述值是如何测量或测定的，即所述测量系统的限制。在特定测定、结果或实施方案的上下文中，除非实施例或说明书其它地方另有明确说明，否则“约”意指在根据本领域惯例的一个标准偏差之内、或多至 5% 的范围。

术语“和/或”是指两个特定特征中的每一个或其组合，其包含或不包含另一个特定特征。例如“A 和/或 B”意指包括以下任何一种情形：A 和 B、A 或 B、A(单独)和 B(单独)；“A、B 和/或 C”意指涵盖以下任何一种情形：A 和 C、A 和 B 和 C、A 或 C、A 或 B、B 或 C、A 和 C、A 和 B、B 和 C、A(单独)、B(单独)，和 C(单独)。

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。

术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸和合成的氨基酸，以及与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸包括由遗传密码编码的氨基酸及其经修饰的氨基酸，例如环脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。常见的天然氨基酸例如：丙氨酸(Ala; A)、精氨酸(Arg; R)、天冬酰胺(Asn; N)、天冬氨酸(Asp; D)、半胱氨酸(Cys; C)、谷氨酸(Glu; E)、谷氨酰胺(Gln; Q)、甘氨酸(Gly; G)、组氨酸(His; H)、异亮氨酸(Ile; I)、亮氨酸(Leu; L)、赖氨酸(Lys; K)、甲硫氨酸(Met; M)、苯丙氨酸(Phe; F)、脯氨酸(Pro; P)、丝氨酸(Ser; S)、苏氨酸(Thr; T)、色氨酸(Trp; W)、酪氨酸(Tyr; Y)和缬氨酸(Val; V)。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构（即与氮、羧基、氨基和 R 基团结合的 α 碳）的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫。氨基酸类似物通常具有修饰的 R 基团（例如，正亮氨酸）或修饰的肽骨架，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构，但具有与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。

本公开中的术语“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，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、三特异性抗体、四特异性抗体），鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体，全长抗体、抗原结合片段（也称抗原结合部分、或抗体片段）等，只要它们展现出期望的抗原结合活性。。

“天然抗体”是天然存在的免疫球蛋白分子，例如，天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白，由二硫键结合的两条轻链和两条重链构成。IgG 抗体从 N 至 C 端，每条重链具有一个轻链可变区（VH，也称可变域或重链可变域），接着是一个轻链恒定区（CH，也称恒定域），轻链恒定区包括三个恒定域

(CH1、CH2 和 CH3)；类似地，从 N 至 C 端，每条轻链具有一个轻链可变区 (VL，又称作可变轻域，或轻链可变域)，接着是一个轻链恒定区 (CL，也称恒定轻域)。根据抗体是否含有 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链，抗体可分为 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 五个同种型，同种型抗体还可进一步分为不同亚类，例如，IgG 同种型包括 IgG1(γ 1 重链)、IgG2(γ 2 重链)、IgG3(γ 3 重链)和 IgG4(γ 4 重链)四种亚型，IgA 同种型分为 IgA1(α 1 重链)和 IgA2(α 2 重链)两种亚型等。

本公开中的术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本公开可互换使用，指具有与天然抗体结构基本类似的结构的重链，或包含 Fc 区的重链的抗体。

“分离的”抗体是已经与其天然环境的组分分开的抗体。在一些实施方案中，抗体可纯化至大于 90% 或 99% 的纯度，可通过例如电泳（例如，SDS-PAGE、等电聚焦 (IEF)、毛细管电泳）或层析（例如，离子交换或反相 HPLC）方法进行纯化和测定。关于评估抗体纯度的方法的综述，可参见例如 Flatman 等, J.Chromatogr.B 848: 79-87 (2007)。

术语“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链中涉及抗体结合抗原的域。天然抗体的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)，每个可变区包含 4 个保守的框架区 (FR) 和 3 个高变区 (也称互补决定区，HVR 或 CDR)。

术语“互补决定区”、“高变区”或“CDR”指可变结构域内促成与抗原结合的主要区域；“框架”或“FR”是指可变区中除 CDR 残基之外的可变结构域残基。VH 包含 3 个 CDR 区：HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；VL 包含 3 个 CDR 区：LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。每个 VH 和 VL 通常由按以下顺序排列的三个 CDR 和四个 FR 构成（从氨基末端到羧基末端）：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。可通过本领域技术人员熟知的方法来确定 CDR 的氨基酸序列边界，例如：“Kabat”编号规则（参见 Kabat 等（1991），“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）、“Chothia”编号规则、“ABM”编号规则、“contact”编号规则（参见 Martin, ACR, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J], 2001）和 ImMunoGenTics (IMGT) 编号规则 (Lefranc, M.P 等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)；Front Immunol. 2018 Oct 16;9:2278) 等；各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的。

术语“轻链”包括轻链可变区 (VL) 及轻链恒定区 (CL)。VL 处于轻链的氨基末端，CL 处于轻链的羧基末端。轻链可以是 κ 链或 λ 链等。

术语“重链”包括重链可变区 (VH) 及重链恒定区 (CH)。重链可变区处于重链的氨基末端，重链恒定区处于重链的羧基末端。IgG 抗体重链恒定区包括三个恒定区结构域：CH1、CH2 及 CH3。重链可属于任何同种型，包括 IgG（包括 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 亚型）、IgA（包括 IgA1 及 IgA2 亚型）、IgD、IgM 及 IgE 等。

术语“恒定区”或“恒定结构域”是指轻链和重链的羧基末端部分，该部分不直接参与抗体与抗原的结合，与 VH 和 VL 相比，恒定区具有相对保守的氨基酸序列。

术语“抗原结合片段”指包含完整抗体的部分，但不同于完整抗体，该部分能特异性结合完整抗体所结合的抗原。抗原结合片段的一些实例包括但不限于：Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)2、dsFv、(dsFv)2、单链 Fab (scFab)、单链抗体（例如 scFv）、双抗体、线性抗体，以及由抗原结合片段形成的多特异性抗体。其中，“Fab”，是由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；“Fv”由 VH 和 VL 组成；“Fab”包含部分铰链区的 Fab 片段；“F(ab’)2”包含在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段；“scFab”是由 VH、CH1、VL、CL 和接头组成的多肽，其中所述抗体域和所述接头在 N 端至 C 端方向具有以下顺序之：a) VH-CH1-接头-VL-CL，b) VL-CL-接头-VH-CH1，c) VH-CL-接头-VL-CH1 或 d) VL-CH1-接头-VH-CL；“scFv”是包含轻链可变区和重链可变区的融合蛋白，其中轻链可变区和重链可变区通过肽接头连接，能够表达为单链多肽，并且 scFv 保持其所源自的完整抗体的特异性，除非特别指出，否则在本文中 scFv 可以以任何一种顺序具有 VL 和 VH 可变区，例如 scFv 多肽的 N 端至 C 端，可以包含：a) VL-接头-VH 或 b) VH-接头-VL；“dsFv”是二硫键稳定化的 Fv 片段；(dsFv)2 是二聚化 dsFv；“Fab-SH”是 Fab 片段的铰链区的半胱氨酸残基携带游离巯基团。

术语“Fc 区”是抗体重链的 C 末端区域，包括天然抗体 Fc 区和 Fc 区变体。在一些实施方式中，人 IgG 重链的 Fc 区为从 Cys226 位置处的氨基酸残基延伸至其羧基末端。在一些实施方式中，人 IgG 重链的 Fc 区为从 Pro230 延伸至其羧基末端。Fc 区的 C 末端，还可以是例如缺失 Fc 区的 C 末端赖氨酸（根据 EU 编号系统的残基 447）或缺失 Fc 区的 C 末端甘氨酸和赖氨酸（根据 EU 编号系统的残基 446 和 447）。在一些实施方式中，完整抗体的组合物可以包括缺失了 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中，完整抗体的组合物可以包括没有缺失 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体群体。在一些实施方式中，完整抗体的组合物具有带有和不带有 K447 残基和/或 G446+K447 残基的抗体混合物的抗体群体。用于本公开所述抗体的 Fc 区包括人 IgG1、IgG2 (IgG2a、IgG2b)、IgG3 和 IgG4 的 Fc 区。除非本公开中另有规定，Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号方式依照 EU 编号系统，又称作 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。

术语“嵌合”的抗体指抗体中的重链和/或轻链的一部分由某一特定物种衍生，重链和/或轻链的剩余部分由其它物种衍生。

术语“人源化”抗体是保留非人抗体的反应性同时在人体中具有较低免疫原性的抗体。例如，可以通过保留非人抗体的 CDR 区并用其对应物（即，抗体的重链可变区的框架区、轻链可变区的框架区和人抗体恒定区）替换抗体的其余部分来实现。

术语“人抗体”、“人源抗体”、“全人抗体”、“完全人抗体”可以互换使用，指其中可变区及恒定区序列是人序列的抗体。人抗体包括具有源自人基因，但为半胱氨酸或糖基化位点等已发生改变的抗体。人抗体可以是在非人细胞中重组产生的抗体。人抗体包括人免疫球蛋白重链及轻链基因座的转基因小鼠中获得的抗体。

术语“亲和力”是指分子（例如，抗体）的单个结合部位与其结合配体（例如，抗原）之间非共价相互作用的总体的强度。除非另外指明，如本公开“亲和力”是指内部结合亲和力，其反映出结合对（例如，抗体与抗原）的成对之间 1:1 相互作用。分子 X 对其配体 Y 的亲和力通常以解离常数 (KD) 表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量。术语“kassoc”或“ka”指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率，术语“kdis”或“kd”指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。术语“KD”指解离常数，其获得自 kd 与 ka 的比率（即 kd/ka），通常表示为摩尔浓度 (M)。可以使用本领域公知的方法测定抗体的 KD 值。用于测定抗体 KD 的方法包括使用生物传感系统例如系统测量表面等离子体共振，或通过溶液平衡滴定法 (SET) 测量溶液中的亲和力。

术语“亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个 CDR 中具有一处或多处氨基酸残基改变，导致该抗体对抗原的亲和力与亲本抗体相比有所改进的抗体。在一些实施方式中，亲和力成熟的抗体将具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知方法生成。Marks 等, Bio/Technology 10:779-783 (1992) 记载了通过 VH 和 VL 结构域改组进行的亲和力成熟。以下文献记载了 CDR 和/或框架残基的随机诱变：Barbas 等, PNAS, 91:3809-3813 (1994)；Schier 等, Gene 169:147-155 (1995)；Yelton 等, J.Immunol. 155:1994-2004 (1995)；Jackson 等, J.Immunol. 154 (7):3310-9 (1995) 及 Hawkins 等, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)。

术语“效应子功能”指那些可归于抗体 Fc 区（天然序列 Fc 区或氨基酸序列突变的 Fc 区）的生物学活性。抗体效应子功能的例子包括但不限于：C1q 结合和补体依赖性细胞毒性、Fc 受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体（例如 B 细胞受体）下调；和 B 细胞活化。

术语“单克隆抗体”指基本上均质的抗体群，即在该群中包含的抗体分子的氨基酸序列是相同的（除了可能少量存在的天然突变以外）。相比之下，多克隆抗体通常包含可变结构域具有不同氨基酸序列的不同抗体，其通常特异性针对不同表位和/或不同抗原。“单克隆”表示从基本上均质的抗体群体获得的抗体。可以通过本领域公知的方法来生产单克隆抗体，例如，可以由杂交瘤方法制备（Kohler 等, (1975) Nature 256:495），可以由重组 DNA 方法制备（参见例如美国专利号 4,816,567），可以由噬菌体抗体文库中分离方法制备（Clackson 等, (1991) Nature 352:624-628 和 Marks 等, (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597），还利用含有所有或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物制备获得单克隆抗体（参见 Presta (2005) J.Allergy Clin.Immunol. 116:731）。

术语“抗原”是指能够与抗原结合蛋白（例如抗体）选择性结合的蛋白。抗原可具有一个或多个与不同的抗原结合蛋白（例如抗体）相互作用的表位。

术语“表位”指抗原上能够与抗体特异性结合的区域 (area 或 region)。表位通常是由具有一定结构的特殊化学基团的抗原决定簇组成。表位可以由连续氨基酸残基（线性表位）形成，也可以由非连续氨基酸残基（构象表位）形成，例如因抗原的折叠而形成空间接近的非连续氨基酸残基。在一些实施方案中，表位包含处于独特空间构象的至少 3，至少 4，至少 5，至少 6，至少 7，或 8-10 个氨基酸残基。表位可以通过本领域熟知的任何方法确定，例如常规免疫测定法、抗体竞争性结合测定法或 X 射线晶体学或相关结构测定方法(例如核磁共振光谱)。而筛选结合特定表位的抗体（即那些结合相同表位的）可以使用本领域公知方法获得，包括但不限于，例如丙氨酸扫描、肽印迹（见 Meth. Mol. Biol. 248 (2004) 443-463）、肽切割分析、表位切除、表位提取、抗原的化学修饰（见 Prot. Sci. 9 (2000) 487-496）和交叉阻断（见“Antibodies”, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)）。

与参照抗体“结合相同表位的抗体”或与参照抗体“竞争结合的抗体”是指在竞争测定法中，将参照抗体对抗原的结合阻断 50% 或更多的抗体，或其对抗原的结合被参照抗体阻断 50% 或更多的抗体。为了测定待测抗体是否与参照抗体结合相同表位，可在饱和条件下检测是否竞争参照抗体结合该抗原，例如，在去除过量的参照抗体后，评估待测抗体结合抗原的能力；如果该待测抗体能够在参照抗体的饱和结合之后结合抗原，那么该待测抗体与参照抗体结合不同表位；但是，如

果该待测抗体在参照抗体的饱和结合之后不能够结合抗原,那么该待测抗体可结合与参照抗体结合相同的表位。为了确认待测抗体是否结合相同表位或仅仅受到空间原因阻碍结合,可以使用常规实验(例如,肽突变和使用 ELISA、RIA、表面等离子共振、流式细胞术或本领域已知的任何其它定量或定性方法检测)测定,如果在两种设置(即两种抗体分别作为饱和和抗体)中,均只有饱和抗体能够结合抗原,那么可以得出结论,该待测抗体和参照抗体竞争结合该抗原。在一些实施方案中,在竞争性结合测定中(参见例如, Jungmans 等, Cancer Res.50 (1990) 1495-1502),如果一个过量(例如 1 倍、5 倍、10 倍、20 倍或 100 倍的量)的抗体将另一个抗体与抗原的结合抑制至少 50%、至少 75%、至少 90%或甚至 99%或更多,则认为两个抗体结合相同或重叠的表位。

术语“特异性结合”或“特异性地结合”是指两分子间的非随机结合,例如,抗体以比针对其他抗原或表位更高的亲和力结合至该抗体对应的抗原或表位。通常,抗体以约 1×10^6 M 或更小(例如约 1×10^8 M 或更小、约 1×10^9 M 或更小、约 1×10^{10} M 或更小、约 1×10^{11} M 或更小、或者约 1×10^{12} M 或更小)的平衡解离常数(KD)结合抗原或抗原内的表位。在一些实施方式中,抗体与抗原结合的 KD 为该抗体结合至非特异性抗原(例如 BSA、酪蛋白)的 KD 的 10%、1%或更小。可使用本领域公知的方法测量 KD 值,例如通过 BIACORE®表面等离子体共振测定法测量。特异性结合至抗原或抗原内的表位的抗体可能对其它相关的抗原具有交叉反应性,例如,对来自其它物种(诸如人或猴,例如食蟹猕猴(Macaca fascicularis)(cynomolgus, cyno)、黑猩猩(Pan troglodytes)(chimpanzee, chimp))或猿猴(Callithrix jacchus)(commonmarmoset, marmoset)的相应抗原具有交叉反应性。

术语“抗 PD1 抗体”和“结合 PD1 的抗体”是指能够以足够的亲和力结合 PD1 抗原的抗体。在一个实施例中,抗 PD1 抗体与非 PD1 蛋白的结合程度小于与 PD1 结合的约 10%、1%或更小,所述结合可通过 BIACORE®表面等离子体共振测定法所测量的。在某些实施方式中,与 PD1 结合的抗体具有以下解离常数(KD):<约 $1 \mu\text{M}$ 、<约 100 nM、<约 10 nM、<约 1 nM、<约 0.1 nM、<约 0.01 nM 或<约 0.001 nM 或更小。在某些实施例中,抗 PD1 抗体结合来自不同物种的 PD1 中保守的 PD1 表位。

本公开提供的抗 PD1 抗体与人 PD1 的结合也可以用“半最大有效浓度”(EC50)值表示,一般 EC50 越小亲和力越好,表示更低的浓度下抗体即可以与抗原结合。可以通过本领域已知的结合检测法,例如直接或间接结合检测法(例如酶联免疫吸附检测法(ELISA)、流式细胞荧光分选技术和其他结合检测法)来测定 EC50 值。

在一些实施方式中,本公开的抗 PD1 抗体为 R1149、R1150、R1151 或 R1152。

术语“融合蛋白”指天然存在的、合成的、半合成的或重组的蛋白质分子,其包含通过肽键连接的两个或更多个异源多肽的全部或部分。

在一些实施方式中,本公开的融合蛋白,其为抗 PD1-IL10 融合蛋白(包括 PD1 结合单元部分和 IL10 单元部分),其中,所述 PD1 结合单元部分为抗 PD1 抗体,所述 IL10 单元部分为 IL10 多肽。在一些实施方式中,IL10 单元连接在所述抗 PD1 抗体的重链和/或轻链的 C 端和/或 N 端,从而构建所述抗 PD1-IL10 融合蛋白。抗 PD1-IL10 融合蛋白通过所述抗 PD1 抗体自身结构的空间位阻使 IL10 单元被隔离开,当 IL10 单元融合蛋白处于游离状态时,即使 IL10 单元与 IL10R α 结合也无法引起功能反应。当抗 PD1-IL10 融合蛋白的抗体端结合到靶细胞后,通过聚集效应,将邻近 IL10 单元-IL10R α 复合物聚拢,进一步与 IL10R β 结合形成复合物产生下游信号并引发生物功能,避免药物分子在没有到达靶部位前 IL10 分子对所述抗体的靶向性产生干扰,避免产生临床副作用;且由于 IL10 单元很难引发生物功能,抗 PD1-IL10 融合蛋白不会产生天然二聚体 IL10 分子那样的给药剂量限制,使得融合蛋白的给药剂量得到显著提高。

在一些实施方案中,本公开提供了一种抗 PD1-IL10 融合蛋白,其包括 PD1 结合单元部分和 IL10 单元部分,其中,所述 PD1 结合单元部分为抗 PD1 抗体,其包括两条相同的轻链和两条相同的重链,IL10 单元与抗 PD1 抗体重链和/或轻链连接。天然 IL10 分子为二聚体形式,根据本公开的一些具体实施例的融合蛋白在抗体结合靶细胞前 IL10 分子呈单体形式,无法与 IL10 受体结合,不会干扰抗体分子与靶细胞的结合,抗体结合靶细胞后,大量 IL10 单元分子聚集,使得相互靠近的 2 个 IL10 单元作为二聚体发挥作用,与 IL10 受体进行结合,从而引起正常的生物学反应,使得融合蛋白的靶向性和安全性得到显著提高,药效得到充分发挥。根据本公开的一些具体实施方案,抗 PD1 抗体每条抗体轻链包括 VL 区、CL 区,每条抗体重链包括 VH 区、CH1 区、CH2 区、CH3 区;所述 IL10 单元的 N 末端与抗体轻链 C 末端相连,或所述 IL10 单元的 C 末端与抗体轻链 N 末端相连,或所述 IL10 单元的 N 末端与轻链 VL 区的 C 末端相连,所述 IL10 单元的 C 末端与轻链 CL 区的 N 末端相连,或所述 IL10 单元的 C 末端与抗体重链的 N 末端相连,或所述 IL10 单元的 N 末端与重链 VH 区的 C 末端相连,所述 IL10 单元的 C 末端与重链 CH1 区的 N 末端相连,或所述 IL10 单元的 N 末端与重链 CH2 区的 C 末端相连,所述 IL10 单元的 C 末端与重链 CH3 区的 N 末端相连。

本公开的一些具体实施方案,所述 IL10 单元包括天然 IL10 单元,所述天然 IL10 单元具有 SEQ ID NO.23 所示的氨基酸序列。

天然 IL10 (Interleukin-10, 也称 IL-10 或 IL10)是一种具有多向调节功能的细胞因子,其活性形式通常是以二硫键连接两个亚基形成的同源二聚体。天然 IL10 主要由免疫细胞如单核、巨噬、DC 表达并分泌,在抑制炎症因子如 TNF- α 、IL-6 等分泌方面发挥重要作用。IL10 受体 IL10R 由两个结合亚单位(R1、R2)组成,形成的 IL10/IL10R α /IL10R β 六聚复合物介导下游信号转导。IL10 受体主要表达于单核/巨噬细胞,DC 细胞,T 细胞,及 B 细胞等细胞中,其在不同细胞中发挥的作用不同。初始 CD8+T 细胞不表达 IL10 受体,在肿瘤组织中,CD8+T 细胞活化程度越高的,IL10 受体表达量越高,耗竭的 CD8+T 细胞相较于活化的 CD8+T 细胞有更高的表达量。因此,IL10 在肿瘤微环境中发挥双向调节作用,一方面通过抑制 Th1 细胞、巨噬细胞、Th17 的炎症反应以及下调巨噬、DC 细胞的 MHC 表达来降低抗原呈递,从而发挥促肿瘤作用;另一方面通过直接刺激肿瘤内浸润的 CD8+T 细胞活化可发挥抗肿瘤作用。本公开的一些具体实施方案,本公开的抗 PD1-IL10 融合蛋白其一方面可解除 PD-1/PD-L1 的免疫抑制,另一方面可直接富集在表达 PD1 的耗竭 CD8+T 细胞表面,凭借 IL10 多肽阻碍 CD8+T 细胞进一步耗竭,增强 CD8+T 细胞杀伤活性,抑制活化诱导的细胞凋亡,从而增强抗肿瘤免疫应答。

本公开的一些具体实施方案,所述 IL10 单元为天然 IL10 经修饰后的 IL10 多肽,所述修饰的 IL10 多肽为单体形式,且所述修饰的 IL10 多肽相对于天然 IL10 多肽在任意两个相邻氨基酸之间插入间隔肽,所述间隔肽为柔性肽;在一些实施方案中,所述两个相邻氨基酸中的一个氨基酸位置为第 115 位、第 116 位、第 117 位、第 118 位、第 119 位;在一些实施方案中,所述间隔肽位于第 116 位和第 117 位之间;在一些实施方案中,所述间隔肽位于第 115 位和第 116 位之间;在一些实施方案中,所述间隔肽位于第 117 位和第 118 位之间;在一些实施方案中,所述间隔肽选自 GGGSGG、GGGSG、(GS) $_n$ 、(GGGS) $_n$ 、(GSGGS) $_n$ 、(GGGGS) $_n$ 中的至少之一,n 为 1-10 之间的任意整数;在一些实施方案中,所述间隔肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.21 所示。

在一些实施方案中,所述修饰的 IL10 多肽相对于天然 IL10 多肽,在 N 端缺失 n 个氨基酸,n 为 1 至 12 之间的任意整数;在一些实施方案中,所述修饰的 IL10 多肽相对于天然 IL10 多肽,在 N 端缺失 2 个氨基酸。

例如,所述修饰包括下列(i)和(ii)的至少之一:(i)去除天然 IL10 单元的 N 末端的前 2 个氨基酸;(ii)在第 116 位和 117 位氨基酸之间插入间隔肽,所述间隔肽为柔性连接肽,例如所述间隔肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.21 所示。将天然 IL10 单元的 N 末端的前 2 个氨基酸去除后,IL10 单元的稳定性得到提升,同时在 IL10 单元的第 116 位和 117 位氨基酸之间插入间隔肽后,所述融合蛋白中的 IL10 单元分子成为闭环单体分子(天然 IL10 二聚体的两条 IL10 链是交错在一起形成的,经过插入间隔肽改造后,IL10 单体可以独立形成结构域,即闭环单体分子),同一融合蛋白中的两个 IL10 单元不会出现相互连接等干扰。

本公开的一些实施例,所述 IL10 单元与抗体重链或轻链通过连接肽连接,连接肽将所述 IL10 单体与所述抗体重链或轻链相连,使得所述融合蛋白中的抗体部分与相应靶细胞结合后,相互靠近的 2 个融合蛋白的 IL10 单元更易形成二聚体,与 IL10 受体进行结合,进而发挥作用。根据本公开的实施例,所述连接肽的 N 末端与所述抗体轻链的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述 IL10 单元的 N 末端相连;或所述连接肽的 N 末端与所述 IL10 单元的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述抗体轻链的 N 末端相连;或所述连接肽的 N 末端与所述 IL10 单元的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述抗体重链的 N 末端相连。本公开的一些实施例,所述 IL10 单元与所述抗体的重链末端或轻链末端通过所述连接肽连接;本公开的一些实施例,所述连接肽的 N 末端与所述抗体轻链的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述 IL10 单元的 N 末端相连;或所述连接肽的 N 末端与所述 IL10 单元的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述抗体轻链的 N 末端相连;或所述连接肽的 N 末端与所述 IL10 单元的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述抗体重链的 N 末端相连。

本公开的一些实施例,所述连接肽的 N 末端与所述轻链 VL 区的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述 IL10 单元的 N 末端相连;或所述连接肽的 N 末端与所述 IL10 单元的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述轻链 CL 区的 N 末端相连;或所述连接肽的 N 末端与所述重链 VH 区的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述 IL10 单元的 N 末端相连;或所述连接肽的 N 末端与所述重链 CH1 区的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述 IL10 单元的 N 末端相连;或所述连接肽的 N 末端与所述重链 CH2 区的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述 IL10 单元的 N 末端相连;或所述连接肽的 N 末端与所述 IL10 单元的 C 末端相连,所述连接肽的 C 末端与所述重链 CH3 区的 N 末端相连。

本公开的一些实施例,所述 IL10 单元的 N 末端通过所述连接肽与所述抗体的轻链的 VL 区的 C 末端相连,所述 IL10 单元的 C 末端通过所述连接肽与所述抗体的轻链 CL 区的 N 末端相连;或所述 IL10 单元的 N 末端通过所述连接肽与所述抗体的重链 VH 区的 C 末端相连,所述 IL10 单元的 C 末端通过所述连接肽与所述抗体的重链 CH1 区的 N 末端相连;或所述 IL10 单元的 N 末端通过所述连接肽与所述抗体的重链 CH2 区的 C 末端相连,所述 IL10 单元的 C 末端通过所述连接肽与所述抗体的重链 CH3 区的 N 末端相连。

在一些实施方案中,本公开的所述融合蛋白,其包括 2 条相同的式 P1 所示的第一链和 2 条相同的式 P2 所示的第二链,其中,P1:[抗 PD1 抗体的轻链]-[连

接头)[IL10 多肽], P2; 抗 PD1 抗体的重链; 在一些实施方式中, 式 P1 中, 所述连接肽为柔性连接肽; 例如, 所述连接肽如 SEQ ID NO.24 所示。

术语“连接肽”、“连接多肽”、“连接器”、“Linker”或“接头”指连接两个多肽片段的连接单元, 通常具有一定的柔性, 接头的使用不会使蛋白质结构域原有的功能丧失。连接器可以是肽连接器, 其包含一个或多个氨基酸, 典型的约 1-30 个、2-24 个或 3-15 个氨基酸。在一些实施方案中, 所述连接器为选自 (GxSy)zGmSn 连接器, 其中, x、y、z、m、n 独立地选自 0-6 的整数; 可选地, x 选自 1-5 的整数, y、z、m、n 独立地选自 0-6 的整数 (例如, 当 x=4、y=1、z=4、m=1、n=0 时, 也即 (G₄S₁)₄G₁S₀ 其表示氨基酸序列: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG), 在一些实施方案中, 所述连接器为选自 (GxS) zG 连接器, 其中, x 选自 1-5 的整数, z 选自 1-6 的整数。在一些实施方案中, 所述连接器为 SEQ ID NO.21 或 SEQ ID NO.24 所示的多肽。

术语“核酸”在本公开中与术语“多核苷酸”互换使用, 指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。核酸包括含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接肽的核酸, 核酸可以是合成的、天然存在的和非天然存在的, 例如具有与参考核酸相似的结合特性, 并且以类似于参考核苷酸的方式代谢的非天然核酸。包括但不限于, 硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性-甲基磷酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸 (PNA) 修饰后核酸。“分离的”核酸指已经与其天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括在下述细胞中含有的核酸分子, 所述细胞通常含有该核酸分子, 但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。“编码抗 PD1 抗体的核酸”指编码抗体重链和轻链 (或其片段) 的一个或多个核酸分子, 包括在单一载体或分开的载体中的一个或多个核酸分子, 和存在于宿主细胞中的一个或多个位置的一个或多个核酸分子。在一些实施例中, 核酸序列还包括保守修饰的变体 (例如, 简并密码子取代) 和互补序列以及明确指明的序列。例如, 简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得, 一个或多个所选的 (或全部) 密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代 (Batzler 等, *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka 等, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; 和 Rossolini 等, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994)。

术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用, 指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物, 其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物, 以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

术语“同一性 (identity)”、“序列同一性”是指当两个序列最佳比对时, 两个序列的氨基酸 (氨基酸序列同一性) 或核酸 (核酸序列同一性) 在等效位置相同的程度 (百分比)。为获得两个序列最佳比对, 必要时可引入间隙, 以获取最大序列同一性百分比。氨基酸序列同一性百分比可以采用本技术领域公知的各种方式进行, 例如本领域熟知的 BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN(DNASTAR)、CLUSTALW 或 CLUSTAL OMEGA 等软件。本领域技术人员可确定比对序列的适当参数, 包括要实现比较序列全长的最大比对所需的任何算法。

术语氨基酸的“保守修饰的变体”或“保守性取代”指使用具有相似特征 (例如, 电荷、侧链尺寸、亲水性/疏水性、骨架构型和刚性等) 的其他氨基酸替换序列中的氨基酸, 但不改变蛋白的生物活性。在通常情况下, 在多肽的非必需区域中的单氨基酸置换通常不改变生物活性 (参见例如, Watson 等, (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub.Co., p.224 (4th Ed.))。术语核酸“保守修饰的变体”或“保守性取代”是指那些编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸, 也包括在核酸不编码氨基酸序列的情况下基本相同的序列的核酸。由于遗传密码的简并性, 任何给定的蛋白质/肽可以由多个功能相同的核酸编码。例如, 密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此, 在密码子指定丙氨酸的每个位置, 该密码子可以改变为任何所述相应密码子而不改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”, 它们是保守修饰变异中的一种。本公开中编码多肽的每个核酸序列包含核酸的每种可能的沉默变异, 核酸中的每个密码子 (除了 AUG--通常是甲硫氨酸的唯一密码子; 和 TGG--通常是色氨酸的唯一密码子) 均可以被修饰以产生功能相同的分子。

术语“载体”是能够转运与其连接的遗传元件 (例如核酸) 的运载工具。载体可用于转化、转导或转染宿主细胞, 使其携带的遗传元件在宿主细胞内得以表达。示例性地, 载体包括: 质粒、噬菌粒、柯斯质粒 (cosmid)、人工染色体如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 衍生的 P1 染色体 (PAC)、噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体, 以及动物病毒等。在一些实施方式中, 载体是“质粒”, 其是环状双链 DNA 环, 其中可以连接附加的 DNA 区段。在一些实施方式中, 载体是病毒载体, 例如腺相关病毒载体 (AAV 或 AAV2), DNA 区段可以连接到病毒基因组中。载体可含有多种控制表达的元件, 包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因, 载体还可含有复制起始位点, 载体还可包括协助其进入细胞的成分, 包括但不限于, 病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳。载体可以是表达载体。在一些实施方案中, 载体 (例如表达载体) 含有本公开编码抗体的核酸序列、启动子 (例如, SV40、CMV、EF1α), 还可以包含至少一个选择标记。

术语“表达载体”或“表达构建体”是可适用于对宿主细胞进行转化, 只含有指导及/或控制 (连同宿主细胞一起) 与其可操作地连接的一个或多个编码区的表达的核酸序列的载体。表达载体可以包括但不限于: 影响或控制转录、翻译且在存在内含子时影响与其可操作地连接的编码区的 RNA 剪接的序列。

术语“可操作地连接”指该术语所指的组分允许其在适合条件下执行其固有功能的连接关系。例如, 与蛋白质编码序列“可操作地连接”的控制序列是指与其连接并存在与该控制序列的转录活性兼容的条件下实现蛋白质编码序列的表达的序列。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用, 并且指已经导入外源核酸的细胞, 包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”, 其包括原代的经转化的细胞及其衍生的后代, 而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同, 而是可以含有突变。本文中包括具有与在初始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞包括原核和真核宿主细胞, 其中真核宿主细胞包括但不限于哺乳动物细胞、昆虫细胞系植物细胞和真菌细胞。哺乳动物宿主细胞包括人、小鼠、大鼠、犬、猴、猪、山羊、牛、马和仓鼠细胞, 包括但不限于中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、NSO、SP2 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、猴肾细胞 (COS)、人肝细胞癌细胞 (例如, Hep G2)、A549 细胞、3T3 细胞和 HEK-293 细胞。真菌细胞包括酵母和丝状真菌细胞, 包括例如巴氏毕赤酵母 (Pichia pastoris)、芬兰毕赤酵母 (Pichia finlandica)、海藻毕赤酵母 (Pichia trehalophila)、科克拉克毕赤酵母 (Pichia kocklaeae)、膜状毕赤酵母 (Pichia membranaefaciens)、小毕赤酵母 (Pichia minuta)、Ogataea minuta、Pichia lindneri)、仙人掌毕赤酵母 (Pichia opuntiae)、耐热毕赤酵母 (Pichia thermotolerans)、柳毕赤酵母 (Pichia salictaria)、Pichia guercuum、皮杰毕赤酵母 (Pichia pijperi)、贝栖毕赤酵母 (Pichia stipitis)、甲醇毕赤酵母 (Pichia methanolica)、毕赤酵母属、酿酒酵母 (Saccharomyces cerevisiae)、酿酒酵母属、多形汉逊酵母 (Hansenula polymorpha)、克鲁维酵母属、乳酸克鲁维酵母 (Kluyveromyces lactis)、白色念珠菌 (Candida albicans)、构巢曲霉 (Aspergillus nidulans)、黑曲霉 (Aspergillus niger)、米曲霉 (Aspergillus oryzae)、里氏木霉 (Trichoderma reesei)、勒克氏菌 (Chrysosporium lucknowense)、镰刀菌属 (Fusarium sp.)、禾谷镰刀菌 (Fusarium gramineum)、菜镰刀菌 (Fusarium venenatum)、小立碗藓 (Physcomitrella patens) 和粗糙脉孢菌 (Neurospora crassa)。毕赤酵母属、任何酿酒酵母属、多形汉逊酵母 (Hansenula polymorpha)、任何克鲁维酵母属、白色念珠菌 (Candida albicans)、任何曲霉属、里氏木霉 (Trichoderma reesei)、勒克氏菌 (Chrysosporium lucknowense)、任何镰刀菌属、解脂耶氏酵母 (Yarrowia lipolytica) 和粗糙脉孢菌 (Neurospora crassa)。

术语“药物组合物”表示含有一种或多种药物 (例如本公开所述的抗体) 与其他组分的混合物, 所述其他组分例如是生理学/可药用的载体和赋形剂。

术语“药理学上可接受的载体”指药配制剂中与活性成分不同的、且对受试者无毒的成分。药理学上可接受载体剂包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂等。

术语“受试者”或“个体”包括人类和非人类动物。非人类动物包括所有脊椎动物 (例如哺乳动物和非哺乳动物) 例如非人灵长类 (例如, 食蟹猴)、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非特别指出时, 否则所述术语“患者”或“受试者”在本公开中可互换地使用。除非本公开明确定义, 术语“食蟹猴 (cyno)”或“食蟹猴 (cynomolgus)”是指食蟹猴 (Macaca fascicularis)。在某些实施方案中, 受试者是人。

“施用”或“给予”, 当其应用于动物、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。

术语“样本”是指从受试者分离的类似流体、细胞、或组织的采集物, 以及存在于受试者体内的流体、细胞或组织。示例性样本为生物流体, 诸如血液、血清和浆膜液、血浆、淋巴液、尿液、唾液、囊液、胆汁、排泄物、痰、分泌组织和器官的粘膜分泌物、阴道分泌物、腹水、胸膜、心包、腹膜、腹腔和其它体腔的流体、由支气管灌洗液收集的流体、滑液、与受试者或生物来源接触的液体溶液, 例如细胞和器官培养基 (包括细胞或器官条件培养基)、灌洗液等, 组织活检样本、细针穿刺、手术切除的组织、器官培养物或细胞培养物。

术语“治疗 (treatment 或 treat)”指试图改变所治疗个体的天然过程的临床干预, 并且可以为了预防或者在临床病理学的过程期间实施。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或再发生, 减轻症状, 减轻/减少疾病的任何直接或间接病理后果, 预防转移, 降低疾病进展速率, 改善或减轻疾病状态, 和消退或改善的预后。在一些实施方案中, 使用本公开的抗体来延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

术语“施用”或“给予”, 当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时, 是指外源性药物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。

术语“有效量”一般是指足以降低症状的严重程度或发生频率、消除症状和/或潜在病因、预防症状和/或其潜在病因出现、改善由疾病状态引起与其相关的损

伤（例如肺病）的量。在一些实施例 5 中，有效量可以是治疗有效量或预防有效量。“治疗有效量”是足以治疗疾病状态或症状、尤其与该疾病状态相关的状态或症状，或者以其他方式预防、阻碍、延迟或逆转该疾病状态或以任何方式与该疾病相关的任何其他不理想症状的进展的量。“预防有效量”是当给予受试者时将具有预定预防效应，例如预防或延迟该疾病状态的发作（或复发），或者降低该疾病状态或相关症状的发作（或复发）可能性的量。完全治疗或预防未必在给予一个剂量之后便发生，可能在给予一系列剂量之后发生。因而，治疗或预防有效量可以一次或多次给予的方式给予。“治疗有效量”和“预防有效量”可取决于多种因素的变化：例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重，以及治疗剂在个体中引发期望的应答的能力。

术语“癌（症）”、“肿瘤”指哺乳动物中以不受调节的细胞生长为特征的疾病。肿瘤包括良性和恶性肿瘤，早期肿瘤指非侵入性的或转移性的，或者归为 0 期、I 期、或 II 期癌症的癌症。在一些实施方案中，所述肿瘤为表达 PD-L1 的肿瘤，癌症的例子包括但不限于肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌和血液系统癌。

在一些实施方式中，本公开采用本领域公知的细胞生物学、分子生物学（包含重组技术）、微生物学、生物化学和免疫学的常规技术制备或检测本公开的抗体。文献中已公开了相关技术，如《分子克隆：实验室手册（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）》第二版（Sambrook 等人，1989）；《寡核苷酸合成（Oligonucleotide Synthesis）》（M.J.Gait 编，1984）；《动物细胞培养（Animal Cell Culture）》（R.I.Freshney 编，1987）；《酶学方法（Methods in Enzymology）》（学术出版社有限公司（Academic Press, Inc.））；《实验免疫学手册（Handbook of Experimental Immunology）》（D.M.Weir 和 C.C.Blackwell 编）；《哺乳动物细胞用基因转移载体（Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells）》（J.M.Miller 和 M.P.Calos 编，1987）；《当代分子生物学方法（Current Protocols in Molecular Biology）》（F.M.Ausubel 等人编，1987）；《PCR：聚合酶链反应（PCR: The Polymerase Chain Reaction）》（Mullis 等人编，1994）；以及《当代免疫学方法（Current Protocols in Immunology）》（J.E.Coligan 等人编，1991），所述文献通过引用并入本文中。

以下结合实施例对本公开的特征和性能作进一步的详细描述。

实施例 1、抗 PD1-IL10 融合蛋白的构建

示例性地，将 IL10 单体 N 末端连接到抗 PD1 抗体的轻链的 C 末端构建抗 PD1-IL10 融合蛋白（结构示意图见附图 1）。

其中，抗 PD1 抗体的可变区氨基酸序列见下表 1：

表 1. 抗 PD1 抗体的可变区序列表

抗 体	VH	VL
R1 15 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TFTYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINP SNGGTNYAQKFQGRATMTVDITSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCTRRDSNYDGGFDY YWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO.1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSV STSGYSYMHWYQQKPGKAP KLLIYLAYHLESGVPSRFRSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQHSWEL PITFGQGTGLEIK (SEQ ID NO.2)
R1 15 0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TFTYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINP SNGGTNENEKFKSRVTMTVDKSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCTRRDSNYDGGFDY YWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO.3)	DIQLTQSPSSLSASVGDRATITCRASKSV STSGYSYMHWYQQKPGKAPK LLIYLAYHLESGVPSRFRSGSGSGTDFTL TISSVQPEDFATYYCQHSWELPI TFGQGTGLEIK (SEQ ID NO.4)
R1 15 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TFTYYMYWVRQAPGQGLEWIGGINP NGGTNYAEKFKGRVLTVDITSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCTRRDSNYDGGFDY YWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO.5)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSV STSGYSYMHWYQQKPGKAP KLLIYLAYHLESGVPSRFRSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQHSWEL PITFGQGTGLEIK (SEQ ID NO.6)
R1 14 9	QVQLQQSGAEVLKPGASVKLSCKASGYTF TFTYYMYWVKRPGQGLEWIGGINP NGGTNENEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCTRRDSNYDGGFDY YWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO.7)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSV STSGYSYMHWYQQKPGQPPK LLIYLAYHLESGVPSRFRSGSGSGTDFLT NIHPVEEEDAATYYCQHSWEL PITFGSGTGLEIK (SEQ ID NO.8)

抗 PD1 抗体 R1149、R1150、R1151、R1152 的 CDRs(由 Kabat 编号系统定义)的氨基酸序列：

HCDR1 的氨基酸序列：TYYMY (SEQ ID NO.9)；

HCDR2 的氨基酸序列：GINPSNGGTNYAQKFQ (SEQ ID NO.10)；GINPSNGGTNENEKFKS (SEQ ID NO.15)；或 GINPSNGGTNYAEKFKG (SEQ ID NO.16)

HCDR3 的氨基酸序列：RDSNYDGGFDY (SEQ ID NO.11)；

LCDR1 的氨基酸序列：RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO.12)；

LCDR2 的氨基酸序列：LAYHLES (SEQ ID NO.13)；

LCDR3 的氨基酸序列：QHSWELPIT (SEQ ID NO.14)。

上述表 1 中的抗体 VH 与人重链恒定区 (SEQ ID NO.19) 连接，抗体 VL 与人轻链恒定区 (SEQ ID NO.20) 连接，获得抗 PD1 抗体：R1149、R1150、R1151、R1152。

示例性地，抗 PD1 抗体为 R1152，R1152 氨基酸序列如下：

R1152 抗体重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO.17)：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF
TFTYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGT
NYAQKFQGRATMTVDITSTAYMELSSLRSE
DTAVYYCTRRDSNYDGGFDYWGQGTITVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEAGGPSV
FLFPPKPKDITLMISRTEPVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRV
VSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK；

R1152 抗体轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO.18)：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSV
STSGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLAYHLES
GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY
CQHSWELPITFGQGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC；

抗体重链恒定区的氨基酸序列 (SEQ ID NO.19)：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEAGGPSV
FLFPPKPKDITLMISRTEPVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRV
VSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK；

抗体轻链恒定区的氨基酸序列 (SEQ ID NO.20)：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

IL10 单体可以是天然的 IL10 或经修饰的 IL10 多肽，示例性地，IL10 单体为经修饰的 IL10 多肽（在天然 IL10 多肽的第 116 位与 117 位氨基酸残基之间插入间隔肽：GGSGG (SEQ ID NO.21)，同时删除天然 IL10 多肽的 N 末端第 1 和第 2 位氨基酸残基），IL10 单体氨基酸序列如下：

天然 IL10 多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO.23):

抗 PD1-IL10 融合蛋白 R1153 的第一链的氨基酸序列 (SEQ ID NO.25):

备注：其中粗体字部分为抗 PD1 抗体轻链部分，双下划线部分为连接肽部分，单下划线部分为 IL10 多肽部分；

R0862: 即含 L234A/L235A 突变的 hIgG1 抗体, 在本发明中也称为 Isotype control_hIgG1.8 或 ISO-hIgG1.8 或 Isotype control

R0862 的轻链序列 (SEQ ID NO.27) :

R0676 含两条相同的肽链, 其中一条链的氨基酸序列 (SEQ ID NO.28):

R0579 的重链序列 (SEQ ID NO.29) :

R0579 的轻链序列 (SEQ ID NO.30):

R0674: 由 Fc 区以及在其 C 端融合的 IL10 WT 组成, 其包括两条相同的肽链, 其中一条肽链如下:

实施例 2、抗 PD1-IL10 融合蛋白的制备

抗 PD1-IL10 融合蛋白表达实验结果见表 2, 实验结果显示, R1153 的瞬转表达量达到 204.81mg/L; 一步亲和纯化后样品经 SEC-HPLC 检测的实验结果见表 3, 实验结果显示, 目标蛋白纯度达 94.60%; 另外, 样品经 SDS-PAGE 检测, 其电泳图见附图 2, 实验结果显示, PD1-IL10 融合蛋白正确的轻重链配对。

样品	蛋白量 mg	浓度(mg/mL)	Titer(mg/L)
R1153	1659	7.9	204.81

备注: Titer (滴度) 指: 蛋白的瞬转表达浓度。

样 ¹¹ _品	H.M.W%	Main%	L.M.W%
------------------------------	--------	-------	--------

	R1153	5.06	94.6	0.34
--	-------	------	------	------

备注：表中，H.M.W%指高分子量聚集体百分比（High Molecular Weight %）；L.M.W%指低分子量片段百分比（LOW Molecular Weight %）；Main%指主峰百分比。

实施例 3.抗 PD1-IL10 融合蛋白结合活性检测

采用流式法检测抗 PD1-IL10 融合蛋白的抗体端、IL10 单体端的结合活性：

称取 6 g BSA 到 200mL 1XPBS 中，混匀后放置冰上备用；将待测分子用 3% BSA 稀释成初始浓度为 125nM（配置浓度为 250nM），体积 300μL,倍梯度稀释（100+200）共 11 个点；将细胞计数后，按 50μL、2E+05/孔分到 96 孔 V 型板中，将不同浓度待测分子 50μL 加入到细胞中，2-8 度孵育 30min；350xg 离心 5min 后，去掉上清，按 200μl/孔 3% BSA；350xg 离心 5min 后，去掉上清，3%BSA 配制荧光抗体 PE Mouse anti-human IgG Fc（1:500x 稀释），按 100μL/孔加入对应的 96 孔板中，2-8 度孵育 30min；350g 离心 5min，去上清，按 200μl/孔 3% BSA 洗一遍细胞；350xg 离心 5min 后，去掉上清，按 100μl/孔加入 1XPBS 重悬细胞；按照《CytoFLEX 流式细胞仪标准操作教程》上机进行 FACS 检测。其中，抗体端与抗原结合检测时采用 CHO-hPD1 细胞（过表达人 PD1 的 CHO 细胞）；IL10 端检测与 IL10 受体结合检测时采用 H_IL10 Reporter 293 Cell Line（购自吉满生物科技）。

实验结果见附图 3 和 4，实验结果表明，相比 PD1 单抗 R1152，抗 PD1-IL10 融合蛋白的抗体端与人 PD1 抗原的结合活性没有发生显著改变，说明抗体与 IL10 单体构成融合蛋白后并不会影响抗体端与其抗原的结合活性；相比 IL10-Fc 融合蛋白 R0676(SEQ ID NO.22 所述 IL10 与人 Fc 恒定区 N 端直接连接构建的二聚体融合蛋白)，本公开的抗 PD1-IL10 融合蛋白与 IL10R 的结合明显更弱。

实施例 4.报告基因法检测抗 PD1-IL10 融合蛋白的活性

4.1.报告基因法检测抗 PD1-IL10 融合蛋白的 IL10 端的活性

细胞准备：取出正在培养的 HEK293-hIL10-Report gene cell（吉满生物科技，货号为 GM-C07927）在显微镜下观察，细胞贴壁正常，颗粒透亮，且密度适中的细胞可以作为实验所用的效应细胞；将上述细胞用胰酶消化，终止消化后在 350g/4min 离心去上清，用 1%FBS- PBS 重悬后再清洗一遍；弃上清，最终使用 DMEM 培养基重悬细胞，细胞计数后调整细胞密度 5E5/mL，按照每孔 50μL 铺板 96 平底板，相当于 2.5E4/孔的细胞数，之后置于 37℃培养箱贴壁处理 6h。取 R0056FC2-6 细胞（CHO-hPD1，过表达人 PD1 的 CHO 细胞），离心去上清，计数，调整细胞密度为 1E6/mL，按照每孔 25μL 铺板，相当于 2.5E4/孔的细胞数；稀释：用 Assay Buffer(DMEM 基础培养基)将待测分子（R1152、R1153）稀释成初始终浓度 50nM（稀释浓度 200 nM ），体积 150μL,3 倍梯度稀释（50+100），7 个浓度；分别在无富集条件和富集条件下进行实验：

无富集条件下，直接往贴壁处理好的细胞中加入稀释好的待测分子，25μL/孔；富集条件下，将稀释好的待测分子以 25μL/孔的体积与靶细胞 R0056FC2-6 等体积混合后，共孵育约 30min，之后将其一起小心转入到贴壁处理 6h 的 HEK293 中； Cell only 的孔中补加 25μL 的培养基，最终所有孔的终体积为 100μL，边缘孔用 200μL 的无菌水封上；将 96 孔板继续在培养箱中培养 16h；

第二天提前解冻 Bright-LumiTM 萤火虫荧光素酶检测试剂，平衡至室温；细胞培养到时间点后取出细胞培养板平衡至室温 10min（不宜超过 30min），每孔加入 100μL Bright-LumiTM 萤火虫荧光素酶检测试剂，室温震荡孵育 5-10min；随后将反应结束的体系，每孔取 100μL 至 96 孔空白板中，多功能酶标仪，使用化学发光模式检测信号。

检测结果见附图 5 和图 6，实验结果表明本公开构建的抗 PD1-IL10 融合蛋白 R1153，在 CHO-hPD1 富集条件下其荧光活性高。

4.2、报告基因法检测抗 PD1-IL10 融合蛋白的 PD1 结合端的活性

细胞准备：细胞计数，取适应的 CHO-OKT3-hPDL1 细胞（过表达 OKT3 和人 PDL1 的 CHO 细胞）、Jurkat-luc-hPD1 细胞（过表达 NFAT-luc 和人 PD1 的 Jurkat 细胞），300g 离心 5 min，弃上清，用 1640+10%FBS 培养基洗涤 1 次，用 1640+10%FBS 培养基重悬后调整 CHO-OKT3-hPDL1 细胞密度至 1E+06 个/mL，Jurkat-luc-hPD1 细胞密度至 5E+06 个/mL；

稀释：用 1640+10%FBS 培养基将待测分子稀释成初始终浓度 250nM（稀释浓度 500 nM ），体积 100μL,2 倍梯度稀释（50+50），10 个浓度；

按照实验设计在 96 孔全白细胞培养平底板每孔加入 20 μL 待测分子稀释液，CHO-OKT3-hPDL1 细胞按照 4E+04 个/孔，即 40 μL/孔加入，Jurkat-luc-hPD1 细胞按照 2E+05 个/孔，即 40 μL/孔加入，并添加一定体积的培养基至相应孔中,使得所有孔的总体积为 100 μL，最外周一圈加入 100 μL 的 PBS；将细胞培养板置于 CO²培养箱中孵育 6 h；提前解冻 Bright-LumiTM 萤火虫荧光素酶检测试剂，平衡至室温；细胞培养到时间点后取出细胞培养板平衡至室温 10min（不宜超过 30min），每孔加入 100μL Bright-LumiTM 萤火虫荧光素酶检测试剂，室温震荡孵育 5-10min；上机进行化学发光检测。

实验检测结果见附图 7，本公开的抗 PD1-IL10 融合蛋白的 PD1 结合端的荧光活性与抗 PD1 抗体 R1152 的荧光活性基本一致，说明抗 PD1 抗体与 IL10 单体构建融合蛋白后并不影响抗体端的荧光激活活性。

实施例 5.抗 PD1-IL10 融合蛋白介导的耗竭 CD8⁺T 细胞功能检测

新鲜的人健康血液按照操作流程分离得到 PBMC；按照美天旎公司 CD8 microbeads 试剂盒提供的方法，分离 PBMC 中的 CD8⁺T 细胞，并使用 FITC anti human CD8 流式抗体鉴定纯度；D0-将 CD8⁺T 细胞用 1640+10%FBS+100U/mL IL-2 培养基调整密度为 1E6 cells/mL，同时按照 1：1 的比例加入 CD3/CD28 磁珠，混匀后按照 200μL/孔，相当于 2E5 cells/孔的细胞数接种在 96 平底板，置于 37℃、5%CO²培养箱诱导培养； D0-分离的 CD8⁺T 细胞用 PE anti human IL10R（Biolegend, 308804）、FITC anti human PD1（Biolegend, 329904）和 APC anti human TIM3（Biolegend, 364804）流式抗体鉴定初始表达水平。

D1（D1 表示实验开始的第一天，D2 表示第二天.....依此类推）用 DPBS 稀释 PD-1-his（R2294，带 his 标签的人 PD1 蛋白）蛋白至 5μg/mL，按照 200μL/孔体积加入 96 平底板，4℃过夜；D2-用 1640+10%FBS 培养基稀释待测分子（本公开的 R1153、对照分子 R0579、R1152，空白对照组 cell）至终浓度分别为 50nM，5 倍稀释（3 个梯度），备用。将 4℃过夜包板的液体弃掉，并用无菌 DPBS 洗涤 2 遍，随后加入稀释好的梯度待测分子，置于 37℃培养箱中孵育 0.5 h-1 h。D2-孵育期间，将 96 平底板中所有 CD8⁺T 细胞吹打下来并收集混合，用磁铁去除 beads 后进行细胞计数，取部分细胞进行表面 marker 检测（包括 IL10R、PD1、TIM3），其余细胞离心后用 1640+10%FBS 培养基调整密度为 1.5E6 cells/mL，按照实验需求取对应细胞量到新离心管中，按照 1：1 的比例加入 CD3/CD28 磁珠，混匀后按照 100μL（1.5E5 cells）/孔细胞数加入到抗体孵育的平板中，置于 37℃培养箱中孵育 4d（天）。D2-剩余的细胞离心后用 1640+10%FBS+100U/mL IL-2 培养基调整密度为 5E5 cells/mL，同时按照 1：1 的比例加入 CD3/CD28 磁珠，混匀后按照 200μL（1E5 cells）/孔体积重新接种在 96 平底板，置于 37℃继续培养刺激。

按照上述操作继续进行预包板及抗体孵育；检测 marker 以及将诱导的 CD8⁺T 细胞加入到抗体孵育的平板中，置于 37℃培养箱中孵育 4d；D6-检测 D2 孵育 4d 的细胞凋亡情况：将相应细胞吹起后转移到 V 底板，350g 离心并去上清液，用 Annexin-V binding buffer 洗涤 1 次（200μL/孔），用 Annexin-V binding buffer 配制染色液（按照每孔加入 1μL APC annexin-V 和 1μL Propidium Iodide Solution 配制混合液），按照 100μL/孔加入，室温避光孵育 15min 后，每孔补加 100μL Annexin-V binding buffer 混匀，最后上流式检测细胞凋亡。D10-检测 D6 孵育 4d 的细胞凋亡情况。

细胞因子检测：分别收集孵育 4d 后的细胞上清液，使用 Human IFN-γ uncoated ELISA kit 试剂盒(Invitrogen，88-7316-77)检测 IFN-γ。

检测结果见附图 8 和图 9，对比 Cell 组，在 PD-1-his 蛋白存在的富集条件下，本公开的抗 PD1-IL10 融合蛋白耗竭 CD8⁺T 细胞凋亡明显降低；IFN-γ 因子分泌水平阳性对照 R0579。

实施例 6.抗 PD1-IL10 融合蛋白的体内药效研究

目的：观察抗 PD1-IL10 融合蛋白对 CT-26 小鼠结肠癌的抗肿瘤活性，同时设置同型对照组，单药对照组及联合用药组。

实验材料：hPDL1 Knock in 小鼠，雌性，6-8 周（Balb/c 背景，来源：江苏集萃药康生物科技股份有限公司，动物质量合格证号.320327230100208956）；CT-26 细胞（上海细胞库，目录号：TCM37）；RPMI 1640 培养基(Gibco, 11875085)，FBS (Gibco, 10091-148)，0.25% 胰蛋白酶-EDTA (Gibco, 25200056)，青霉素-链霉素(Gibco, 15140122)，DPBS(Hyclone, SH30028.02)

仪器设备：电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司，JA12002)，游标卡尺(上海美耐特实业有限公司，MNT-150T)，显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司，BDS200)，医用离心机（湖南湘仪实验室开发有限公司，LS30R），数显恒温水浴锅（普瑞斯机械有限公司，HH-S），二氧化碳培养箱（日本松下健康医疗器械株式会社，MCO-18AC），生物安全柜（广州千江实验科技有限公司，ACZ-451），细胞计数器（上海睿钰生物，IC1000）

实验方法

细胞培养：将小鼠结肠癌细胞（CT-26，）培养在含有 10%胎牛血清（FBS）、与 1%青霉素-链霉素（1:1）的 RPMI 1640 培养基中，置于 37℃，5% CO²培

养箱中培养。

接种：收集对数生长期的 CT-26 细胞，用 DPBS 洗两次，用 DPBS 调节细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取雌性 hPDL1 小鼠，皮下接种 CT-26 细胞，接种体积为 $0.1\text{mL}/$ 小鼠，即 $1 \times 10^5/\text{小鼠}$ 。

给药：接种当天记为第 0 天(D0)，当平均瘤体积达到 $80\text{--}100\text{mm}^3$ ，即可对小鼠按瘤体积随机分组，保证每组小鼠的平均瘤体积相同或相近，本实验第 9 天(D9)，将小鼠按瘤体积随机分为 5 组，每组 7 只，开始给药（给药方案见下表 4），R1153 组给药剂量为 10mg/kg ，其他组按 R1153（ 10mg/kg ）的等摩尔剂量进行给药。

表 4. CT-26 肿瘤模型给药剂量，方式以及频率

组别	剂量(mg/kg)	给药体积 (μL/g)	给药途径	给药频率
Isotype control_hIgG1.8	8	10	i.p.	Q3D*4
R0676	5	10	i.p.	Q3D*4
R1152	7.9	10	i.p.	Q3D*4
R1153	10	10	i.p.	Q3D*4
R0676+R1152	5+7.9	10	i.p.	Q3D*4

注：i.p., 腹腔注射; Q3D, 每 3 天给药 1 次; 如给药期间体重下降超过 15%，给药方案将做调整。

记录：D9 开始测量肿瘤体积并记录，之后每周 2 次用游标卡尺测量肿瘤长径和短径。以公式： $(1/2) \times \text{长径} \times (\text{短径})^2$ 计算肿瘤体积（见表 5）。每只小鼠达到实验终点时（体重下降超 20%或肿瘤体积超过 2000mm^3 达到仁慈终点）， CO_2 窒息处死小鼠。

表 5. PD1-IL10 融合蛋白在 CT-26 小鼠结肠癌模型的抗肿瘤活性

PD1-IL10 融合蛋白减小 hPDL1 小鼠 CT-26 结肠癌的肿瘤体积(mm^3)的研究					
植入后天数	Isotype control	R0676	R1152	R1153	R1152+R0676
9	86.97	84.87	85.25	84.10	85.95
13	140.22	161.88	142.71	88.35	150.96
16	245.15	154.80	169.60	76.29	125.59
20	433.94	127.15	157.22	38.02	79.61
23	700.08	180.18	207.69	29.79	69.3
27	1352.84	308.83	331.26	24.14	102.53
TGI%, D27	-	82.31%	80.57%	104.74%	98.69%
CR, D27	0/7	1/7	1/7	4/7	2/7

数据计算、统计与分析：

两组之间比较可用独立样本 T 检验。3 组以上比较应用 *One-Way ANOVA*。如果 F 值显示有显著性差异，可进行多组间的事后分析。数据使用 Prism GraphPad 处理，当 $p < 0.05$ 表示统计学显著性差异。肿瘤体积 $(\text{TV}) = 0.5 \times a \times b^2$ ，a 和 b 分别为肿瘤的长径短径。肿瘤生长抑制 $\text{TGI}(\%) = [1 - (\text{Ti} - \text{T}_0) / (\text{Vi} - \text{V}_0)] \times 100$ ，Ti 为第 i 天治疗组的平均瘤体积， T_0 为治疗开始时治疗组的平均瘤体积，Vi 为第 i 天溶剂对照组的平均瘤体积， V_0 为治疗开始时溶剂对照组的平均瘤体积。实验结果见表 5 及附图 10，实验结果表明，抗 PD1-IL10 融合蛋白 R1153（ $\text{TGI}=104.74\%$ ， $\text{CR}: 4/7$ ）在 hPDL1 小鼠 CT-26 结肠癌模型抗肿瘤药效显著，显著优于 PD1 单抗 R1152（ $\text{TGI}=80.57\%$ ， $\text{CR}: 1/7$ ）和 IL10 融合蛋白 R0676（ $\text{TGI}=82.31\%$ ， $\text{CR}: 1/7$ ）单用。

实施例 7、抗 PD1-IL10 融合蛋白的早期安全性评估

试验一：本试验旨在食蟹猴静脉注射给予 R0674，首次给药 1 周后进行多次给药，每周 2 次，共 6 次（含首次给药），观察 674 引起的毒性反应并研究其毒代（药代）动力学特点，为后续试验设计提供参考。本试验 R0674 设 2 组，剂量分别为 1mg/kg 和 3mg/kg ；另设置溶媒对照组，试验期间对动物进行以下观察：死亡和濒死、临床观察、体重、摄食量、体温、凝血和凝血指标检测，血清生化指标以及免疫功能检测。在 D27 安乐死动物并进行大体解剖，对主要脏器（肾上腺、脑、附睾、心脏、肾脏、肝脏、脾脏、睾丸、胸腺、甲状腺及甲状旁腺）进行称重，对肝脏、脾脏和肾脏进行组织病理学检查。

实验期间，动物死亡和濒死、临床观察、体重、摄食量、体温、凝血、免疫功能检测，脏器重量未发现明显异常。

血液学：与溶媒对照组相比，R0674 低剂量组（ 1mg/kg ），D15， $\text{RBC} \downarrow$ （-37.4%）、 $\text{HGB} \downarrow$ （-37.0%）、 $\text{HCT} \downarrow$ （-25.6%）；同期高剂量组（ 3mg/kg ）也出现 $\text{RBC} \downarrow$ （-13.6%）、 $\text{HGB} \downarrow$ （-15.7%）、 $\text{HCT} \downarrow$ （-12.8%）。以上异常指标考虑与供试品相关。D28，以上异常指标基本恢复正常。（备注：“ $\uparrow$ ”表示相比溶媒对照组的相应值升高，“ $\downarrow$ ”表示相比溶媒对照组的相应值下降，例如“ $\text{RBC} \downarrow$ （-37.4%）”表示 RBC 值相比溶媒组下降 37.4%，其它依此类推）。

血清生化：与溶媒对照组相比，R0674 高剂量组（ 3mg/kg ），D23 血清生化指标， $\text{ALT} \uparrow$ 、 $\text{AST} \uparrow$ 、 $\text{CK} \downarrow$ 、 $\text{BUN} \uparrow$ 、 $\text{CREA} \uparrow$ 。

毒代（药代）动力学：【暴露蓄积关系】R0674 的暴露（ $\text{AUC}(0\text{--}t)$ 和 C_{max} ）随着剂量的升高而升高，D1 给药后动物体内暴露量升高的比例与剂量比例相当，D22 给药（第 3 次）后动物暴露量比例高于剂量比例。【蓄积情况】22 天后，R0674 各剂量组均无明显蓄积。

细胞因子：实验期间，与溶媒对照组相比，R0674 低、高剂量组首次给药前、首次给药后 6 小时、D22 给药后 6 小时细胞因子 $\text{IFN-}\gamma$ 、 IL-17A 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-4 、 IL-5 、 $\text{TNF-}\alpha$ 未见异常；首次给药后 6 小时、D22 给药后 6 小时，细胞因子 IL-6 于 R0674 各剂量组均有检出。但溶媒对照组中亦有检出，检出值略高于定量下限，考虑为检测基线波动。R0674 低、高剂量组细胞因子 IL10 首次给药后 6 小时检出值均高于定量上限。

综上所述，食蟹猴静脉注射给予 R0674 第 1 周给药 1 次（D1，也即实验的第一天给药），此后每周 2 次（D8、D11、D15、D18 和 D22），共 6 次，剂量为 1mg/kg 、 3mg/kg 。试验期间，动物临床、体重、摄食、体温、凝血与免疫功能检测未见供试品相关的明显异常。R0674（ $\geq 1\text{mg/kg}$ ）于 D15，红系指标下降（ $\text{RBC} \downarrow$ 、 $\text{HGB} \downarrow$ 、 $\text{HCT} \downarrow$ ），考虑与供试品相关，似于 D28 基本恢复。R0674 高剂量组（ 3mg/kg ），出现 $\text{ALT} \uparrow$ 、 $\text{AST} \uparrow$ 、 $\text{CK} \downarrow$ 、 $\text{BUN} \uparrow$ 、 $\text{CREA} \uparrow$ ；同时大体解剖观察发现肾脏双侧灰白色，组织病理学检查发现肾脏中度肾小管管型、中度肾小管扩张、轻度肾小管单细胞坏死、轻度肾小管肾炎、轻度肾小管矿化、轻度间质单核细胞浸润。给药期末可能与供试品相关的组织病理学改变见 R0674 剂量组脾脏白髓生发中心嗜酸性物质沉积。

试验二：本试验旨在食蟹猴静脉注射给予抗 PD1-IL10 融合蛋白 R1153，每周给药 1 次，连续给药 3 周，共给药 4 次（D1、D8、D15、D22）。首次给药当天定义为 D1，观察引起的毒性反应并研究其毒代（药代）动力学特点，为后续试验设计提供参考。本试验设 2 组，组 1 溶媒对照组 D1、D8、D15 不给药，D22 给药剂量为 10mg/kg ，组 2 供试品组 D1、D8、D15、D22 给药剂量分别为 1mg/kg 、 3mg/kg 、 10mg/kg 、 10mg/kg ；试验期间对动物进行以下观察：死亡和濒死、临床观察、体重、体温、血液学和凝血指标检测，血清生化指标以及免疫功能检测。

实验期间，动物死亡和濒死、临床观察、体重、体温、凝血、免疫功能检测未发现明显异常。

血液学：未见明显异常

血清生化：未见明显异常

淋巴细胞亚型：未见明显异常

细胞因子：未见明显异常

综上所述，食蟹猴静脉注射给予抗 PD1-IL10 融合蛋白 R1153 每周给药 1 次，D1、D8、D15 和 D22 给药剂量分别为 1mg/kg 、 3mg/kg 、 10mg/kg 、 10mg/kg 。试验期间，动物临床观察、体重、体温、凝血与免疫功能检测（免疫淋巴细胞亚型，血清细胞因子）均未见供试品相关的异常。在试验一中 Fc-IL10 融合蛋白 R0674 出现的明显红系指标下降，肝功能指标上升，细胞因子升高异常，在 R1153 给药后均未出现，抗 PD1-IL10 融合蛋白 R1153 的安全性显著提高。

附录 I：检查参数指标见表 6~9：

表 6. 血细胞计数（ADVIA®2120 系列血液分析仪）

英文缩写	检测项目	单位	检测方法
WBC	白细胞计数	$\times 10^9/L$	嗜碱性粒细胞/分叶核方法+流式细胞术+过氧化物酶染色方法
Neut	中性粒细胞	$\times 10^9/L\&\%$	过氧化物酶染色方法+嗜碱性粒细胞/分叶核方法
Lymph	淋巴细胞	$\times 10^9/L\&\%$	过氧化物酶染色方法+嗜碱性粒细胞/分叶核方法
Mono	单核细胞	$\times 10^9/L\&\%$	过氧化物酶染色方法+嗜碱性粒细胞/分叶核方法
Eos	嗜酸性粒细胞	$\times 10^9/L\&\%$	过氧化物酶染色方法+嗜碱性粒细胞/分叶核方法
Baso	嗜碱性粒细胞	$\times 10^9/L\&\%$	过氧化物酶染色方法+嗜碱性粒细胞/分叶核方法
RBC	红细胞计数	$\times 10^{12}/L$	二维激光流式技术
HGB	血红蛋白	g/L	氰化高铁血红蛋白比色法
HCT	红细胞比容	%	根据RBC和MCV计算
Retic	网织红细胞计数	$\times 10^{12}/L\&\%$	激光流式细胞技术+核酸荧光染色法
MCV	平均红细胞体积	fL	计算
MCHC	平均红细胞血红蛋白浓度	g/L	计算
MCH	平均红细胞血红蛋白	pg	计算
PLT	血小板计数	$\times 10^9/L$	二维激光流式技术

注：本研究仅分析测定的上述指标，该仪器测定的其它测定指标不予分析。

表7.血细胞计数（Sysmex®XN系列全自动模块式血液体液分析仪）

英文缩写	检测项目	单位	检测方法
WBC	白细胞计数	$\times 10^9/L$	半导体激光+流式细胞计数法
Neut	中性粒细胞	$\times 10^9/L\&\%$	半导体激光+流式细胞计数法
Lymph	淋巴细胞	$\times 10^9/L\&\%$	半导体激光+流式细胞计数法
Mono	单核细胞	$\times 10^9/L\&\%$	半导体激光+流式细胞计数法
Eos	嗜酸性粒细胞	$\times 10^9/L\&\%$	半导体激光+流式细胞计数法
Baso	嗜碱性粒细胞	$\times 10^9/L\&\%$	半导体激光+流式细胞计数法
RBC	红细胞计数	$\times 10^{12}/L$	阻抗法
HGB	血红蛋白	g/L	SLS-血红蛋白法
HCT	红细胞比容	%	计算
Retic	网织红细胞计数	$\times 10^{12}/L\&\%$	半导体激光+流式细胞计数法
MCV	平均红细胞体积	fL	计算
MCHC	平均红细胞血红蛋白浓度	g/L	计算
MCH	平均红细胞血红蛋白	pg	计算
PLT	血小板计数	$\times 10^9/L$	阻抗法

注：本研究仅分析测定的上述指标，该仪器测定的其它测定指标不予分析。

表8.血液生化指标（TBA-120FR全自动生化分析仪）

英文缩写	检测项目	单位	检测方法
ALT	丙氨酸氨基转移酶	U/L	丙氨酸底物法
AST	天门冬氨酸氨基转移酶	U/L	天门冬氨酸底物法
TP	总蛋白	g/L	双缩脲法
Alb	白蛋白	g/L	溴甲酚绿法
Glb	球蛋白	g/L	计算法
A/G	白蛋白/球蛋白	-	计算法
TBil	总胆红素	$\mu\text{mol}/L$	化学氧化法
LDH	乳酸脱氢酶	U/L	乳酸底物法
ALP	碱性磷酸酶	U/L	NPP底物-AMP缓冲液法

英文缩写	检测项目	单位	检测方法
CK	肌酸激酶	U/L	磷酸肌酸底物法
GGT	γ-谷氨酰基转移酶	U/L	GCANA底物法
UREA	尿素	mmol/L	脲酶-谷氨酸脱氢酶法
Cre	肌酐	μmol/L	肌氨酸氧化酶法
CHO	总胆固醇	mmol/L	CHOD-PAP 法
TG	甘油三酯	mmol/L	GPO-PAP 法
Glu	葡萄糖	mmol/L	己糖激酶法
Ca	钙	mmol/L	偶氮肿III法
P	磷	mmol/L	钼钼酸盐法
Na ⁺	钠离子浓度	mmol/L	电极法
K ⁺	钾离子浓度	mmol/L	电极法
Cl ⁻	氯离子浓度	mmol/L	电极法

表9.血液生化指标（Beckman Coulter AU5800全自动生化分析仪）

英文缩写	检测项目	单位	检测方法
ALT	丙氨酸氨基转移酶	U/L	乳酸脱氢酶法
AST	天门冬氨酸氨基转移酶	U/L	MDH法
TP	总蛋白	g/L	双缩脲法
Alb	白蛋白	g/L	溴甲酚绿法
Glb	球蛋白	g/L	计算法
A/G	白蛋白/球蛋白	-	计算法
TBil	总胆红素	μmol/L	重氮盐法
LDH	乳酸脱氢酶	U/L	乳酸底物法
ALP	碱性磷酸酶	U/L	NPP底物-AMP缓冲液法
CK	肌酸激酶	U/L	酶偶联法
GGT	γ-谷氨酰基转移酶	U/L	速率法
UREA	尿素	mmol/L	尿素酶-谷氨酸脱氢酶法
Cre	肌酐	μmol/L	肌氨酸氧化酶法
CHO	总胆固醇	mmol/L	酶法
TG	甘油三酯	mmol/L	GPO-POD法
Glu	葡萄糖	mmol/L	己糖激酶法
Ca	钙	mmol/L	偶氮肿III法
P	磷	mmol/L	钼钼酸盐法
Na ⁺	钠离子浓度	mmol/L	电极法
K ⁺	钾离子浓度	mmol/L	电极法
Cl ⁻	氯离子浓度	mmol/L	电极法

5 免疫细胞分型：使用仪器 BD FACSCalibur 流式细胞仪和/或 BD LSRFortessa™流式细胞仪和/或 BD FACSCanto™II 流式细胞仪，检测外周血总 T 淋巴细胞（CD45⁺CD3⁺）、Th 细胞（CD45⁺CD3⁺CD4⁺）、Tc 细胞（CD45⁺CD3⁺CD8⁺）和 Treg 细胞（CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺）和单核细胞（CD14⁺）的百分率并结合血细胞计数结果计算绝对值，计算 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 的比值。

5 细胞因子：使用 BD FACSCalibur 流式细胞仪和/或 BD LSRFortessa™流式细胞仪和/或 BD FACSCanto™II 流式细胞仪，商品化试剂盒（BioLegend®）进行血清中白介素-2（IL-2）、白介素-4（IL-4）、白介素-6（IL-6）、白介素-10（IL10）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）和干扰素-γ（IFN-γ）的检测。

10 实施例 8、FACS 检测 R1153 与表达人、猴和小鼠 PD-1 的 CHO 细胞结合活性

从液氮中取出 CHO/human PD-1、CHO/cyno PD-1 和 CHO/mouse PD-1 细胞并迅速转移至 37℃ 水浴锅中解冻，不时摇动至剩余一小块冰晶时转移至生物安全柜。将 1mL 细胞液吸出并加入含 10mL 新鲜 CD-CHO 培养基的离心管中，轻轻吹打混匀，300g 离心 5min 后弃上清，用 10 mL 新鲜 CD-CHO 培养基重悬，置于 37℃ 的 5%、CO2 培养箱中培养 2 天。细胞计数，将待检测的 CHO/human PD-1、CHO/cyno PD-1、CHO/mouse PD-1 细胞进行细胞计数，300×g 离心 5min，FACS buffer 重悬，调整细胞密度至 4E+06 个/mL；每株细胞以 50μL/孔加入到 96 孔 V 型板中，使每孔细胞数量为 2E+05 个。以 50μL/孔加入稀释后的样品至 96 孔 V 型板，冰上避光孵育 30min；将 96 孔 V 型板 300×g 离心 5min，弃上清，加入 200μL FACS buffer 洗涤一次，300×g 离心 5 分钟，弃上清；按照 100 μL/孔将稀释二抗（1:500）加入 96 孔 V 型板，冰上避光孵育 30min；将 96 孔 V 型板 300×g 离心 5min，弃上清，加入 200 μL FACS buffer 洗涤一次，300×g 离心 5 分钟，弃上清；加入 100μL 1×PBS 重悬，将 96 孔 V 型板置于流式细胞仪中进行检测；使用 GraphPad Prism 8.3.0 作曲线图，并通过四参数法确定 EC50 值。

15 表 10. 融合蛋白 PD-1 端 FACS 结果汇总表

EC ₅₀ (nM)	CHO /human PD-1	CHO /cyno PD-1	CHO /mouse PD-1	CHO
R1153	6.045	3.587	不结合	不结合
R1152	5.469	3.469	不结合	不结合
R0862	不结合	不结合	不结合	不结合

在本实验条件下，结果如图 11 和表 10 所示，R1153 和相应 PD-1 亲本抗体 R1152 均特异性结合 CHO/human PD-1 细胞，与 CHO/cyno PD-1 细胞有交叉反应，且结合活性相当，但与 CHO/mouse PD-1 细胞不存在交叉反应，同型对照分子 R0862 与三种种属细胞均没有交叉反应。

20 实施例 9、FACS 检测 R1153 与表达人、猴和小鼠 IL10R1 的 CHO 细胞结合活性

细胞复苏：从液氮罐中取出 CHO/human IL10R1、CHO/cyno IL10R1 和 CHO/mouse IL10R1 细胞并迅速转移至 37℃ 水浴锅中解冻，不时摇动至剩余一小块冰晶时转移至生物安全柜。将 1mL 细胞液吸出并加入含 10mL 新鲜 CD-CHO 培养基的离心管中，轻轻吹打混匀，300g 离心 5min 后弃上清，用 10mL 新鲜 CD-CHO 培养基重悬，置于 37℃ 的 5%、CO2 培养箱中培养 2 天。细胞计数：将待检测的 CHO/human IL10R1、CHO/cyno IL10R1 和 CHO/mouse IL10R1 细胞进行细胞计数，300×g 离心 5min，FACS 缓冲液重悬，调整细胞密度至 4E+06 个/mL。每株细胞以 50μL/孔加入到 96 孔 V 型板中，使每孔细胞数量为 2E+05 个。以 50μL/孔加入稀释后的样品至 96 孔 V 型板，冰上避光孵育 30min；将 96 孔 V 型板 300×g 离心 5min，弃上清，加入 200μL FCM buffer 洗涤一次，300×g 离心 5 分钟，弃

表 13. 融合蛋白 IL10 端报告基因结果汇总表

EC ₅₀ (nM)	无富集	富集
R1153	9.237	1.811
R1187	4.542	4.918
R3361	2.805	2.917
R0862	NA	NA

在本实验条件下，如图 14 和表 13 所示，同型对照分子 R0862 在无富集和富集条件下均无激活活性，表明实验系统可靠。无富集和富集条件下 R1153 和 R1187 的荧光报告活性平台值均显著低于野生型 IL10 的对照 R3361。R1187 在无富集和富集条件下的 EC50 值相当，R3361 在无富集和富集条件下的 EC50 值也相当，而待测抗体 R1153 在富集条件下的 EC50 值显著低于无富集，表明富集后 R1153 的报告基因活性增加。

实施例 12、FACS 检测 R1153 的 PD-1 端结合与阻断活性

细胞复苏：从液氮罐中取出 CHO/human PD-1 细胞冻存管并迅速转移至 37℃ 水浴锅中解冻，不时摇动至剩余一小块冰晶时转移至生物安全柜。将 1mL 细胞液吸出并加入含 10 mL 新鲜 CD-CHO 培养基的离心管中，轻轻吹打混匀，300 g 离心 5 min 后弃上清，用 10 mL 新鲜 CD-CHO 培养基重悬，置于 37℃ 的 5% CO2 培养箱中培养 2 天。细胞计数：将待检测的 CHO/human PD-1 细胞进行细胞计数，300 ×g 离心 5 min，FACS 缓冲液重悬，调整细胞密度至 4E+06 个/mL。每株细胞以 50 μL/孔加入到 96 孔 V 型板中，使每孔细胞数量为 2E+05 个。以 50 μL/孔加入稀释后的样品至 96 孔 V 型板，冰上避光孵育 30 min。结合实验：将 96 孔 V 型板 300 ×g 离心 5 min，弃上清，加入 200 μL FACS 缓冲液洗涤一次，300 ×g 离心 5 分钟，弃上清；按照 100 μL/孔将稀释二抗 PE anti-human IgG Fc (1:500) 加入 96 孔 V 型板，冰上避光孵育 30 min。阻断实验：按照 50 μL/孔继续加入 1 μg/mL 配体 human PD-L1-mFc 蛋白，混匀后冰上避光孵育 30 min，将 96 孔 V 型板 300 ×g 离心 5 min，弃上清，加入 200 μL FACS 缓冲液洗涤一次，300 ×g 离心 5 分钟，弃上清；按照 100 μL/孔将稀释二抗 PE anti-mouse IgG Fc (1:500) 加入 96 孔 V 型板，冰上避光孵育 30 min；将 96 孔 V 型板 300 ×g 离心 5min，弃上清，加入 200 μL FCM buffer 洗涤一次，300 ×g 离心 5 分钟，弃上清；加入 100 μL 1×PBS 重悬，将 96 孔 V 型板置于流式细胞仪中进行检测；使用 GraphPad Prism 8.3.0 作曲线图，并通过四参数法确定 EC50 值。

表 14. 融合蛋白 PD-1 端结合与阻断活性结果汇总表

样品	EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
R1153	7.299	8.621
R1152	7.751	8.344
R0862	不结合	不阻断

可知，如图 15 和表 14 所示，同型对照 R0862 与 CHO/human PD-1 细胞不结合，且不阻断 human PD-L1-mFc 蛋白与 CHO/human PD-1 细胞的结合。R1153 与 CHO/human PD-1 (EC50=7.299 nM) 有很强的结合活性，且结合能力与参照抗体 R1152 相当 (EC50=7.751 nM)。R1153 对 human PD-L1-mFc 蛋白结合 CHO/human PD-1 细胞有很强的阻断活性 (IC50=8.621 nM)，且阻断能力与参照抗体 R1152 相当 (IC50=8.344 nM)。

实施例 13、FACS 检测 R1153 与体外人耗竭 CD8+T 细胞的结合活性

PBMC 细胞分离：将新鲜的 100 mL 人外周血置于生物安全柜，每个 50 mL 离心管中加入 15mL 人外周血，之后每管加入 15mL DPBS 稀释一倍，混匀；准备新的 50 mL 离心管并每管加入 15 mL Lymphoprep™ 淋巴分离液，缓慢加入稀释后的外周血在分离液的上层；4℃、400×g 离心 30 min，离心升降速分别设为 1/0，结束后小心地吸取单核细胞层至干净的 50 mL 离心管，加入 PBS 至 45 mL，4℃，300×g 离心 10 min；弃去上清后每管加 4 mL 人红细胞裂解液，重悬后室温静置 10 min，补加 PBS 至 45 mL，混匀后进行细胞计数，同时 300×g 离心 5 min。

CD8+T 细胞分离和激活：新鲜的人 PBMC 按照“Human CD8 Microbeads 试剂盒操作手册”操作分离 CD8+T 细胞。将分离的 CD8+T 细胞用 RPMI 1640+10 % FBS+100 U/mL IL-2 培养基调整密度为 1E6 cells/mL，以每孔 1 mL 接种在 24 孔板，同时按照 1:1 的比例加入 5 μL 密度为 2E+08 /mL 的 CD3/CD28 磁珠，混匀后置于 37℃，5% CO2 培养箱持续刺激 3 天。

将诱导好的 CD8+T 细胞进行细胞计数，300 ×g 离心 5 min，FACS 缓冲液重悬，调整细胞密度至 4E+06 个/mL，以 50μL/孔加入到 96 孔 V 型板中，使每孔细胞数量为 2E+05 个；以 50μL/孔加入稀释后的样品至 96 孔 V 型板，冰上避光孵育 30 min；将 96 孔 V 型板 300×g 离心 5 min，弃上清，加入 200 μL FACS 缓冲液洗涤一次，300×g 离心 5 分钟，弃上清；按照 100 μL/孔将稀释二抗 (1:500) 加入 96 孔 V 型板，冰上避光孵育 30 min；将 96 孔 V 型板 300×g 离心 5 min，弃上清，加入 200 μL FACS 缓冲液洗涤一次，300 ×g 离心 5 分钟，弃上清；加入 100 μL 1×PBS 重悬，将 96 孔 V 型板置于流式细胞仪中进行检测；使用 GraphPad Prism 8.3.0 作曲线图，并通过四参数法确定 EC50 值。

表 15. 融合蛋白与诱导的耗竭 CD8+T 细胞结合活性结果汇总表

样品	耗竭 CD8+T 细胞结合 EC ₅₀ (nM)
R1153	0.1680
R1152	0.1475
R1187	弱结合
R0862	不结合

在本实验条件下，结果如图 16 和表 15 所示，同型对照 ISO-hlgG1.8 与诱导耗竭的 CD8+T 细胞不结合。R1153 与 PD-1 亲本抗体与耗竭 CD8+T 细胞具有较好的结合活性 (EC50 分别为 0.1680 nM 和 0.1475 nM)。R1187 (即 ISO-hlgG1.8-IL10) 与耗竭 CD8+T 细胞有弱结合。

实施例 14、R1153 激活耗竭 CD8+T 细胞功能并抑制细胞凋亡

PBMC 细胞分离：将新鲜的 100 mL 人外周血置于生物安全柜，每个 50 mL 离心管中加入 15 mL 人外周血，之后每管加入 15 mL DPBS 稀释一倍，混匀；准备新的 50 mL 离心管并每管加入 15 mL Lymphoprep™ 淋巴分离液，缓慢加入稀释后的外周血在分离液的上层；4℃、400×g 离心 30 min，离心升降速分别设为 1/0，结束后小心地吸取单核细胞层至干净的 50 mL 离心管，加入 PBS 至 45 mL，4℃，300×g 离心 10 min；弃去上清后每管加 4 mL 人红细胞裂解液，重悬后室温静置 10 min，补加 PBS 至 45 mL，混匀后进行细胞计数，同时 300×g 离心 5 min。

CD8+T 细胞分离和激活：新鲜的人 PBMC 按照“Human CD8 Microbeads 试剂盒操作手册”操作分离 CD8+T 细胞。将分离的 CD8+T 细胞用 RPMI 1640+10% FBS+100 U/mL IL-2 培养基调整密度为 1E6 cells/mL，每孔 1 mL 接种在 24 孔板，同时按照 1:1 的比例加入 5μL 密度为 2E+08/mL 的 CD3/CD28 磁珠，混匀后置于 37℃，5% CO2 培养箱持续刺激 3 天。

预包板：将稀释的 5 μg/mL R2294 蛋白，按照 200 μL/孔体积加入 96 孔平底板，-2℃~-8℃冰箱放置 16 h；将预包被 R2294 蛋白的孔板用 1×PBS 清洗 3 遍。随后将稀释好的样品按 100 μL/孔体积加到预包被的平底板中，37℃孵育 60 min；将诱导好的耗竭 CD8+T 细胞进行细胞计数，300 ×g 离心 5 min，用 RPMI 1640+10 % FBS 培养基重悬，调整细胞密度至 2E+06 个/mL，共 3 mL；按照 1:1 的数量比例加入 30 μL 密度为 2E+08 /mL 的 CD3/CD28 磁珠混匀，随后按照 100 μL/孔体积加到样品孵育的 96 平底板，混匀后置于 37℃，5% CO2 培养箱持续孵育 4 天；细胞因子检测：收集 4 天后的细胞上清，3 倍稀释后使用 Human IFN-γ uncoated ELISA kit 试剂盒按说明书方法检测 IFN-γ 的分泌水平，用 GraphPad Prism 8.3.0 作图；细胞凋亡检测：将 96 平底板中的细胞转移到 96 V 底板，300×g 离心 5 min，弃去上清液后用 200 μL/孔的 Annexin-V binding buffer 洗涤 1 次，按照 100 μL/孔将 Annexin-V binding buffer 稀释的染色液 (1:100) 加到 96 V 底板，染色液包含 APC annexin-V 和 Propidium Iodide Solution 试剂，室温避光孵育 15 min；孵育结束后，每孔补加 100 μL Annexin-V binding buffer 混匀，将 96 孔 V 型板置于流式细胞

仪中进行检测；使用 GraphPad Prism 8.3.0 作曲线图。

在本实验条件下，结果如图 17 和图 18 所示，R1153 和 R3361 均可抑制耗竭 CD8⁺T 细胞的凋亡，激活耗竭 CD8⁺T 细胞功能，而同型对照分子 R0862 与 PD-1 亲本抗体 R1152 对耗竭 CD8⁺T 细胞功能无影响。

实施例 15、R1153 在 SEB 实验中的活性研究

金黄色葡萄球菌肠毒素 B 型（Staphylococcal enterotoxin B，SEB）是一种典型的 T 细胞性超抗原，可引起 T 细胞多克隆活化。为了探究 R1153 的 T 细胞活化功能，本研究使用 SEB 超抗原活化 T 细胞，评估 R1153 对 IFN- γ 分泌的影响。

PBMC 细胞分离和计数：将新鲜的 100mL 人外周血置于生物安全柜，每个 50 mL 离心管中加入 15 mL 人外周血，之后每管加入 15 mL DPBS 稀释一倍，混匀；准备新的 50 mL 离心管并每管加入 15 mL Lymphoprep™ 淋巴分离液，缓慢加入稀释后的外周血在分离液的上层；4℃，400×g 离心 30 min，离心升降速分别设为 1/0，结束后小心地吸取单核细胞层至干净的 50 mL 离心管，加入 DPBS 至 45 mL，4℃，300×g 离心 10 min；弃去上清后每管加 4 mL 人红细胞裂解液 ACK Lysing Buffer，补加 DPBS 至 45 mL，混匀后进行细胞计数，同时 300×g 离心 5 min。

取适量的 PBMC 细胞，离心后用完全培养基（10 % FBS+X-VIVO）调整密度为 1E6 cells/mL，按每孔 100 μ L 加入到 96 孔 U 型板中；分别以 50 μ L/孔加入 10% FBS+X-VIVO 培养基稀释好的抗体样品和 100 ng/mL SEB 至 96 孔 U 型板；将 96 孔板放置在 5% CO₂ 培养箱，37℃ 培养 3 天；将每孔中的上清吸取 50 μ L 到新的 96 孔板中，离心，吸取上清进行稀释（8 倍稀释），按 Human IFN- γ uncoated ELISA kit 试剂盒说明书检测 IFN- γ 的分泌水平；使用 GraphPad Prism 8.3.0 作柱状图。

在本实验条件下，如图 19 所示，R1153 和 R1152 均能显著增加不同供体中 IFN- γ 的分泌，说明其可促进 T 细胞活化，且活化能力相当。对照抗体 R1187 对 IFN- γ 的分泌具有弱促进作用。同型对照分子 R0862 对 T 细胞活化没有影响。

实施例 16、R1153 在 MLR（混合淋巴实验）实验中的活性研究

混合淋巴反应（Mixed Lymphocyte Reaction, MLR），常用于器官移植前的组织配型，以测定受体和供体主要组织相容性抗原 HLA（Human Leukocyte Antigen）相容的程度。当来源不同供体的 DC 细胞 HLA 与 T 细胞 TCR 不匹配时，T 细胞可以被异源性 DC 细胞所激活，进行细胞分裂、产生种类众多的细胞因子。在药物开发领域，可以用来评价免疫调节药物对人原代 T 细胞功能的影响，从而评估药物的潜在免疫刺激或免疫抑制效应。

PBMC 细胞分离和计数：将新鲜的 100 mL 人外周血置于生物安全柜，每个 50 mL 离心管中加入 15 mL 人外周血，之后每管加入 15 mL DPBS 稀释一倍，混匀；准备新的 50 mL 离心管并每管加入 15 mL Lymphoprep™ 淋巴分离液，缓慢加入稀释后的外周血在分离液的上层；4℃，400×g 离心 30 min，离心升降速分别设为 1/0，结束后小心地吸取单核细胞层至干净的 50 mL 离心管，加入 DPBS 至 45 mL，4℃，300×g 离心 10 min；弃去上清后每管加 4 mL 人红细胞裂解液 ACK Lysing Buffer，补加 DPBS 至 45 mL，混匀后进行细胞计数，同时 300×g 离心 5 min。

按操作说明书，用 MACS CD14 microbeads 阳选 monocyte，阳选后剩余的细胞用 EasySep™ Human T Cell Enrichment kit 阴选 CD3 T 细胞，将 CD3 T 细胞冻存于液氮中备用。将分选好的 monocyte 分别按照 5E+05/mL 密度接种于 T75 培养瓶里，共 20 mL，向接种的 monocyte 培养基 X-VIVO +10% FBS 里补加终浓度为 50 ng/mL 的 GM-CSF 和 IL-4，37℃，5% CO₂ 培养箱培养 3 天；培养 3 天后进行半量换液，将 T75 培养瓶中的 20 mL 细胞液吸入到 50 mL 离心管，4℃，400×g 离心 5 min，吸出 10 mL 上清，随后加入 10 mL 新鲜的 X-VIVO+10 % FBS 培养基，混匀后一起加入到 T75 培养瓶中；

补加终浓度为 50 ng/mL 的 GM-CSF 和 IL-4 的 X-VIVO+10 % FBS 培养基，37℃，5% CO₂ 培养箱继续培养 3 天；补加终浓度为 1 μ g/mL 的 LPS，37℃，5% CO₂ 培养箱继续培养 24 小时；用移液管轻轻吹打使贴壁细胞悬浮，将诱导好的 DC 细胞吸入到 50 mL 离心管，400×g 离心 5 min，弃去上清后用 10 mL 新鲜的 X-VIVO+10 % FBS 培养基洗涤 2 次，最终用 X-VIVO+10% FBS 培养基调整 DC 密度为 2E+05/mL。复苏不同供体的 CD3 T 细胞，用 X-VIVO+10% FBS 培养基调整 CD3 T 细胞密度为 2E+6/mL。

MLR 实验：在 U 型 96 孔板体系，加入 2E+5/mL DC 细胞 100 μ L；加入 2E+06/mL CD3 T 细胞 50 μ L。CD3 T:DC 细胞比例为 5:1；DC 与 CD3 T 细胞组合为：FPZY-DC-195#（在 195 号供体血液分离液中的 DC 细胞）+FPZY-CD3T-270#（在 270 号供体血液分离液中的 T 细胞），FPZY-DC-270#（在 270 号供体血液分离液中的 DC 细胞）+FPZY-CD3T-195#（在 195 号供体血液分离液中的 T 细胞）；在 96 孔板的细胞中以每孔 50 μ L 加入抗体，混匀，37℃，5% CO₂ 培养箱培养 5 天；培养 3 天和 5 天时分别吸取 50 μ L 上清用于细胞因子检测。IL-2 检测：吸取 D3 上清进行 5 倍稀释，稀释好的上清按 Human IL-2 Uncoated ELISA kit 试剂盒说明书检测 IL-2 的分泌水平；IFN- γ 检测：吸取 D3 上清进行 8 倍稀释，稀释好的上清按 Human IFN- γ uncoated ELISA kit 试剂盒说明书检测 IFN- γ 的分泌水平；使用 GraphPad Prism 8.3.0 作柱状图。

在本实验条件下，结果如图 20 和图 21 所示，不同的 donor，结果趋势一致，R1153 和相应 PD-1 亲本抗体 R1152 均能显著增强 IL-2 和 IFN- γ 的分泌，说明可促进 T 细胞活化，且活化能力相当，而同型对照分子 R0862 和对照抗体 R1187 对 T 细胞活化没有影响。

实施例 17、ELISA 检测 R1153 与补体 C1q 蛋白的结合活性

将 50 mM CB 缓冲液梯度稀释的抗体分子按照 100 μ L/孔加入至 96 孔酶标板，用封板膜封住，2℃-8℃ 静置 18 h；使用 200 μ L 1×PBST 洗板 3 次，拍干。按 200 μ L/孔加入封闭液（1% BSA），室温封闭 1.5 小时；去除封闭液，使用 200 μ L 1×PBST 洗板 2 次，拍干；按照 100 μ L/孔加入 2 μ g/mL 的 Native human C1q 蛋白，室温孵育 1.5 小时，使用 200 μ L 1×PBST 洗板 7 次，拍干；按照 100 μ L/孔加入 50 ng/mL 的 Biotin Rabbit polyclonal to C1q 二抗，室温孵育 1 小时，使用 200 μ L 1×PBST 洗板 7 次，拍干；按照 100 μ L/孔加入经 1×BSA 稀释的 SA-HRP（1:20000），室温孵育 40 min；使用 200 μ L 1×PBST 洗板 7 次，拍干。先加入 50 μ L 的 A 液显色液，随后加入 50 μ L 的 B 液显色液，用封板膜封住，37℃ 孵育 10 min；加 100 μ L 孔终止液，使反应终止。立即使用多功能酶标仪在 450 nm 处测定吸光度；使用 GraphPad Prism 8.3.0 作曲线图。

在本实验条件下，结果如图 22 所示，R1153 和同型对照分子 R0862 与 C1q 蛋白均具有较弱的结合活性，且结合活性相当。而阳性对照分子 hPD-1-hIgG1-IL10M 与 C1q 蛋白具有较强的结合活性。

实施例 18、荧光素酶报告基因法检测 R1153 的 ADCC 活性

细胞复苏：从液氮罐中取出 CHO/human PD-1 细胞和 Jurkat-NFAT-luc-hCD16 细胞冻存管并迅速转移至 37℃ 水浴锅中解冻，不时摇动至剩余一小块冰晶时转移至生物安全柜。吸出 1 mL 的 CHO/human PD-1 细胞冻存液并加入含 5 mL CD-CHO 新鲜培养基的离心管中，吸出 1 mL 的 Jurkat-NFAT-luc-hCD16 细胞冻存液并加入含 5 mL RPMI 1640+10 % FBS 新鲜培养基的离心管中，混匀后 300×g 离心 5 min，弃去上清后用 10 mL 新鲜培养基重悬，最后置于 37℃ 的 5%、CO₂ 培养箱中培养 2 天。

细胞准备：细胞计数，取适量的 CHO/human PD-1、Jurkat-NFAT-luc-hCD16 细胞，300×g 离心 5 min，弃上清，用 RPMI1640+10% FBS 培养基洗涤 1 次，用 RPMI 1640+10 %FBS 培养基重悬后计数。调整 CHO/human PD-1 细胞密度至 2E+05 个/mL，Jurkat-NFAT-luc-hCD16 细胞密度至 1E+06 个/mL。

在白色 96 孔发光板中每孔分别加入 100 μ L 稀释好的待测抗体稀释液，CHO/human PD-1 细胞按照 1E+04 个/孔，即 50 μ L/孔加入；Jurkat-NFAT-luc-hCD16 细胞按照 5E+04 个/孔，即 50 μ L/孔加入，依次一起加入。添加一定体积的培养基至相应孔中，使得所有孔的总体积为 200 μ L，空白孔加入 200 μ L 的 PBS；将细胞培养板置于 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱中孵育 16 h；提前解冻 Bright-Lumi™ 萤火虫荧光素酶检测试剂，平衡至室温；细胞培养到时间点后取出细胞培养板平衡至室温 10 min，轻轻吹匀后每孔吸出 100 μ L 加到新的白色 96 孔发光板中；每孔加入 100 μ L Bright-Lumi™ 萤火虫荧光素酶检测试剂，室温震荡孵育 5 min；在多功能酶标仪中进行化学发光光度检测；使用 GraphPad Prism 8.3.0 作曲线图，并通过四参数法确定 EC50 值。

表 16. 融合蛋白荧光报告检测 ADCC 活性结果汇总表

供试品名称	EC ₅₀ (nM)
R1153	NA
R2464	0.2572
R0862	NA

R2464：即 anti-hPD1-hIgG1-IL10M，其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:42 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:43 所示
QVQLVQSGAEVKKPKASVKY^SCKASGYTFTTYYMYWVRQAPGQGLEWMGGGINSNGGTNYAQKFQGRATMTVDTS^TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRRD

菌-FD1TA (Gibco, 25200056), 青霉素-链霉素(Gibco, 15140122), 谷氨酰胺 (Gibco, 35050-061), 丙酮酸钠 (Gibco, 11360-070), DPBS(Hyclone, SH30028.02)

仪器设备: 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司, JA12002), 游标卡尺(上海美耐特实业有限公司, MNT-150T), 显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司, BDS200), 医用离心机 (湖南湘仪实验室开发有限公司, L530R), 数显恒温水浴锅 (普瑞斯机械有限公司, HH-S), 二氧化碳培养箱 (日本松下健康医疗器械株式会社, MCO-18AC), 生物安全柜 (广州千江实验科技有限公司, ACZ-451), 细胞技术器 (上海春钰生物, IC1000)

5

实验方法

细胞培养: 将小鼠结肠癌细胞 (MC38) 培养在含有 10%胎牛血清 (FBS)、与 1%青霉素-链霉素 (1:1), 1%谷氨酰胺及 1%丙酮酸钠的 DMEM 培养基中, 置于 37℃, 5% CO2 培养箱中培养。

接种: 收集对数生长期的 MC38 细胞, 用 DPBS 洗两次, 用 DPBS 调节细胞浓度为 3X10⁶/mL。取雌性 C57BL/6-hPDL1 小鼠, 皮下接种 MC38 细胞, 接种体

10

积为 0.1mL/小鼠, 即 3X10⁵/小鼠。

给药: 接种当天记为第 0 天(D0), 当平均瘤体积达到 80-100 mm³, 即可对小鼠按瘤体积随机分组, 保证每组小鼠的平均瘤体积相同或相近, 本实验第 7 天 (D7), 将小鼠按瘤体积随机分为 5 组, 每组 9 只, 开始给药 (给药方案见下表 19)。

表 19. MC38 肿瘤模型给药剂量, 方式以及频率

组别	剂量(mg/kg)	给药体积 (μL/g)	给药途径	给药频率
R0862	1.95	10	<i>i.p.</i>	Q3D*3
R1153 (anti-hPD1-IL10M)	0.1	10	<i>i.p.</i>	Q3D*3
R1153 (anti-hPD1-IL10M)	0.5	10	<i>i.p.</i>	Q3D*3
R1153 (anti-hPD1-IL10M))	2.5	10	<i>i.p.</i>	Q3D*3
Keytruda	0.39	10	<i>i.p.</i>	Q3D*3

注: Dosing Volume, 给药体积按动物体重调整 (10 μL/g); *i.p.*, 腹腔注射; Q3D, 每 3 天给药 1 次; 如给药期间体重下降超过 15%, 给药方案将做调整。

记录:

D7 开始测量肿瘤体积并记录, 之后每周 2 次用游标卡尺测量肿瘤长径和短径, 以公式: (1/2)×长径×(短径)² 计算肿瘤体积 (见表 20; 图 25)。每只

15

小鼠达到实验终点时 (体重下降超 20%或肿瘤体积超过 2000 mm³ 达到仁慈终点), CO₂ 窒息法处死小鼠。

表 20.R1153 融合蛋白在 MC38 小鼠结肠癌模型的抗肿瘤活性

植入后天数	R0862	R1153	R1153	R1153	Keytruda
7	91.27±9.79	92.04±7.25	91.86±7.65	92.83±7.45	93.63±8.00
9	135.46±14.67	120.24±19.72	119.88±16.54	127.37±17.02	158.77±19.09
12	238.93±22.48	183.72±30.46	136.90±14.47	117.13±28.38	225.39±43.61
15	415.80±64.93	343.53±59.51	187.14±28.98	87.62±43.05	303.92±78.07
18	720.06±98.64	713.99±127.01	323.16±33.88	95.44±45.30	466.29±143.08
21	1078.95±155.70	910.63±157.58	558.34±106.02	139.88±61.94	643.64±157.49

数据计算、统计与分析:

两组之间比较可用独立样本 T 检验。3 组以上比较应用 *One-Way ANOVA*。如果 F 值显示有显著性差异, 可进行多组间的事后分析。数据使用 Prism GraphPad 处理, 当 *p*<0.05 表示统计学显著性差异。肿瘤体积=0.5 a x b², a 和 b 分别为肿瘤的长短径。肿瘤生长抑制 TGI (%) = [1-(Ti-T0)/(Vi-V0)] ×100, Ti 为第 i 天治疗

20

组的平均瘤体积, T0 为治疗开始时治疗组的平均瘤体积, Vi 为第 i 天溶剂对照组的平均瘤体积, V0 为治疗开始时溶剂对照组的平均瘤体积。

实验结果: PD1-IL10M 融合蛋白 R1153 抗肿瘤作用显著, 低, 中, 高剂量组的 TGI%分别为 23.56%, 52.06%, 92.66%, 瘤重抑制率 (IRTW%) 分别为 17.85%, 59.12%, 86.5%; 9 只小鼠中肿瘤全消(CR)小鼠分别为 0 只, 0 只, 4 只; 与 R1153 中剂量等摩尔的 Keytruda 组 TGI 为 46.37%, IRTW%为 41.71%, 9 只小鼠肿瘤全消小鼠为 0 只。(见表 20; 图 25)。

25

实施例 21、抗 PD1-IL10 融合蛋白对肿瘤浸润淋巴细胞比例的影响

目的: 研究 PD1-IL10 融合蛋白的抗肿瘤的作用机制

实验材料: Balb/c 小鼠, 雌性, 6-8 周 (来源: 广东维通利华, 动物质量合格证号: 44829700019477; CT-26 细胞 (上海细胞库, 目录号: TCM37); RPMI 1640 培养基(Gibco, 11875085), FBS (Gibco, 10091-148), 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (Gibco, 25200056), 青霉素-链霉素 (Gibco, 15140122), DPBS(Hyclone, SH30028.02), 肿瘤组织消化酶 (美天施, 130-096-730), Zombie NIR™ Fixable Viability Kit (Biolegend, 423105), Brilliant Violet 510™ anti-mouse CD45 Antibody (Biolegend, 103138) Alexa Fluor® 700 anti-mouse CD3 (Biolegend, 100215), cBioScience®小鼠调节性 T 细胞染色试剂盒 (Invitrogen, 88-8111-40), PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD8a (Biolegend, 100712)

30

R0991 (anti-mPD1-IL10M); 其具有如 SEQ ID NO:38 (重链) 和 SEQ ID NO:39 (轻链) 所示的氨基酸序列。

QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYNVHWVRQPPGKGLFWMGGMRYNEDTSYNSALKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTDGTYGYCTRDVAVYG
GYGGWFAYWGQGLTVLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHHK
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLLPFPKPKDGLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPRFEQYNSTYRVVSVLTVTLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:38)

35

DTVLTQSPALAVSLGQRVTISCKASETVSSSMYSYIHWYQKPGQPKLLIYRASNLFSGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDDVATYFCQQSWNPWFVGGGT
KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGTQSENSTHFPGNLPNMLRLDLRDAFSRYKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCAQLSEMIQFYLEEVPQA
ENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRLFCEGGGGSGGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYEAYMTMKIRN (SEQ ID NO:39)

40

anti-mPD1: 其亚型为 hlgG1.8, 编号为 R1049, 鼠抗 PD-1 的单抗对照, 其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:40 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:41 所示,

R1049 的其中一条重链序列:

QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYNVHWVRQPPGKGLFWMGGMRYNEDTSYNSALKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTDGTYGYCTRDVAVYG
GYGGWFAYWGQGLTVLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHHK
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLLPFPKPKDGLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPRFEQYNSTYRVVSVLTVTLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:40)。

45

R1049 的其中一条轻链序列:

DTVLTQSPALAVSLGQRVTISCKASETVSSSMYSYIHWYQKPGQPKLLIYRASNLFSGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDDVATYFCQQSWNPWFVGGGT
KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF

50

NRGEC (SEQ ID NO:41)

仪器设备：电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司，JA12002)，游标卡尺(上海美耐特实业有限公司，MNT-150T)，显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司，BDS200)，医用离心机(湖南湘仪实验室开发有限公司，L530R)，大容量高速台式离心机(湖南湘仪实验室开发有限公司，H2050R)，数显恒温水浴锅(普瑞斯机械有限公司，HH-S)，二氧化碳培养箱(日本松下健康医疗器械株式会社，MCO-18AC)，生物安全柜(广州千江实验科技有限公司，ACZ-451)，细胞技术器(上海春钰生物，IC1000)，流式细胞仪(Beckman，A00-1-1102)

实验方法

细胞培养：将小鼠结肠癌细胞(CT-26，)培养在含有10%胎牛血清(FBS)、与1%青霉素-链霉素(1:1)的RPMI 1640培养基中，置于37℃，5% CO2培养箱中培养。

接种：收集对数生长期CT-26细胞，用DPBS洗两次，用DPBS调节细胞浓度为1×10⁶/mL。取雌性Balb/c-hPDL1小鼠，皮下接种CT-26细胞，接种体积为0.1mL/小鼠，即1×10⁵/小鼠。

给药：接种当天记为第0天(D0)，当平均瘤体达到200-300 mm³，即可对小鼠按瘤体体积随机分组，保证每组小鼠的平均瘤体体积相同或相近，本实验第16天(D16)，将小鼠按瘤体体积分为4组，每组6只，开始给药(给药方案见下表21)。

表 21. CT-26 肿瘤模型给药剂量，方式以及频率

组别	剂量(mg/kg)	给药体积 (μL/g)	给药途径	给药频率
R0862	7.8	10	<i>i.p.</i>	Q3D*3
R0991 (anti-mPD1-IL10M)	10	10	<i>i.p.</i>	Q3D*3
anti-mPD1	7.8	10	<i>i.p.</i>	Q3D*3
wt-IL10	5	10	<i>i.p.</i>	Q3D*3

注：Dosing Volume、给药体积按动物体重调整(10 μL/g)；*i.p.*、腹腔注射；Q3D、每3天给药1次；如给药期间体重下降超过15%，给药方案将做调整。

TILs 分析

- 取材：最后一次给药后第二天将小鼠安乐死后，取其肿瘤和脾脏，称重，泡入预冷RPMI 1640中，做好标记。
- 肿瘤处理：肿瘤用剪刀将瘤组织剪碎成小块，再用玻板研磨至糊状，视情况裂红。
- 脾脏处理：用玻板研磨后过细胞滤器。
- 消化液配制：在离心管中加入2.35 mL RPMI 1640培养基，分别再加入100 uL 酶 D，50uL 酶 R，12.5 uL 酶 A。(若进行TILs分析，建议减少酶R量可至20%，例如：加10 uL 酶R到2.5 ml 消化液中)
- 消化：将研磨后的组织1 g 加入到配好的消化液中，37℃消化40 min，加入适量的1640终止消化。
- 过滤：取消化好的组织上清，加入细胞筛网；在组织碎片中再加5-10 mL 1640培养基冲洗一下，加入细胞筛网，使其完全滤过。
- 离心：350 g 离心7 min，去上清，即可得消化后细胞。
- 裂红：肿瘤和脾脏样品加2-3 mL 红细胞裂解液，放置3-5 min，加足量的DPBS终止裂红。
- 计数：350 g 离心5 min，重悬细胞后用计数仪计数。
- 封闭：每个细胞悬液取适当细胞，350 g 离心5 min，去上清，重悬细胞，加2%血清进行封闭，封闭20-30 min。
- 染色：封闭完成后，350 g 离心5 min，去上清。染色前先染死活染料，混匀细胞，室温避光孵育20-30 min，350 g 离心5 min。样品管加入目标混合抗体，单染孔加入对应抗体，混匀细胞。
- 孵育：4℃数育30 min，350 g 离心5 min。
- 清洗：去上清，清洗一遍，350 g 离心5 min。
- 最后一次洗涤后，弃上清轻弹样品以完全溶解沉淀。
- 每孔加入200 μL Foxp3 固定/破膜工作溶液。最好使细胞完全重悬于添加的溶液中；2-8℃或室温避光孵育40 min。(小鼠样品可在2-8℃避光孵育长达18小时)。
- 在室温下300-400 g 离心样品5 min，弃上清。
- 每孔加入200 μL 1X 破膜液，在室温下300-400 g 离心样品5 min，弃上清。
- 用破膜液再次清洗，200 μL/孔，300-400 g 离心样品5 min，弃上清。
- 重悬沉淀，用1X 破膜液将体积调节至约100 μL。
- 不洗涤，加入推荐量的直接偶联抗体以检测细胞内抗原，并在室温下避光孵育30 min 以上。
- 每孔加入200 μL 1X 破膜液，在室温下300-400 g 离心样品5 min 弃上清。
- 用破膜液再次清洗，200 μL/孔，300-400 g 离心样品5 min，弃上清。
- 将染色细胞重悬于适当体积的流式细胞术染色液中，通过流式细胞术分析。

数据计算、统计与分析：

两组之间比较可用独立样本T检验。3组以上比较应用 *One-Way ANOVA*。如果F值显示有显著性差异，可进行多组间的事后分析。数据使用 Prism GraphPad 处理，当p<0.05 表示统计学显著性差异。

表 22. 肿瘤组织中各免疫细胞亚群比例

组别	mCD45+ (%)	mCD8+ (%)	mCD4+ (%)
R0862	9.6 ± 2.7	3.0 % ± 1.0	1.0 % ± 0.5
wtIL10	27.6 ± 10.2 *	6.1 % ± 1.7#	0.9 % ± 0.7
Anti-mPD1	15.4 ± 5.9	4.5 % ± 1.5	1.6 % ± 0.7
R0991	30.7 ± 16.8 **	6.9 % ± 2.4##	1.2 % ± 0.4

注：*/#、与 R0862 (Isotype control) 组比较，wtIL10 组有统计学差异，p<0.05；**/##、与 R0862 (Isotype control) 组比较，R0991 组有统计学差异，p<0.01。

实验结果：

RI153 可显著提高肿瘤浸润淋巴细胞中 CD45+细胞及 CD8+T 细胞比例，对 CD4+T 细胞无明显影响(见表 22)。

综上，目前临床上的 IL10 蛋白存在安全性问题，临床 IL10 药物分子缺乏靶向性，药物分子容易脱靶，并产生副作用。大部分在开发的 IL10 抗体融合蛋白利用抗体靶向作用将 IL10 引到局部环境中发挥作用，但这些融合蛋白分子往往具有正常的 IL10 二聚体结构，IL10 端的副作用仍然是一个棘手的问题。

而本公开实施例提供的抗 PD1-IL10 融合蛋白的安全性得到显著提高。其与 IL10 二聚体(Fc-IL10)相比，本公开的抗 PD1-IL10 融合蛋白在给药期间均无血液毒性和肝损伤，有助于解决临床上 IL10 治疗因存在的血液毒性高，导致给药剂量过低而药效有限的问题。

并且，而本公开实施例提供的抗 PD1-IL10 融合蛋白能够激活耗竭 CD8+T 细胞功能，抑制细胞凋亡，促进细胞增殖和细胞因子分泌，增强杀伤作用，在小鼠肿瘤模型中显示出强大的抗肿瘤活性。因此用本公开实施例提供的抗 PD1-IL10 融合蛋白逆转肿瘤微环境中耗尽的 CD8+T 细胞是一种很有前景的治疗策略。

以上所述仅为本公开的优选实施例而已，并不用于限制本公开，对于本领域的技术人员来说，本公开可以有各种更改和变化。凡在本公开的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本公开的保护范围之内。

工业实用性

本公开提供的抗 PD1-IL10 融合蛋白，其具有良好的靶向性、抗肿瘤效果及安全性，可治疗肿瘤或炎性疾病。因此，本公开提供的抗 PD1-IL10 融合蛋白具备优异的实用性能和广阔的市场应用前景。

5

权 利 要 求 书

1. 一种融合蛋白，其包括 PD1 结合单元部分和 IL10 单元部分，其中，所述 PD1 结合单元部分为抗 PD1 抗体，所述 IL10 单元部分为 IL10 多肽；其中，所述抗 PD1 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包括与 SEQ ID NO.1、3、5 或 7 具有至少 90% 序列同一性的可变区中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和/或所述轻链可变区包括与 SEQ ID NO.2、4、6 或 8 具有至少 90% 序列同一性的可变区中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。
2. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体选自：
- A. 所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括 SEQ ID NO.1 中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且所述抗 PD1 抗体的轻链可变区包括 SEQ ID NO.2 中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；
- B. 所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括 SEQ ID NO.3 中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且所述抗 PD1 抗体的轻链可变区包括 SEQ ID NO.4 中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；
- C. 所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括 SEQ ID NO.5 中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且所述抗 PD1 抗体的轻链可变区包括 SEQ ID NO.6 中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；
- 或
- D. 所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括 SEQ ID NO.7 中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且所述抗 PD1 抗体的轻链可变区包括 SEQ ID NO.8 中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；
- 可选地，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 由 Kabat 编号系统定义，或由 IMGT 编号系统定义，或由 Chothia 编号系统定义，或由 Contact 编号系统定义，或由 AbM 编号系统定义；
- 可选地，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 由 Kabat 编号系统定义；
- 可选地，其中所述抗 PD1 抗体，其重链可变区的 HCDR1 包含 SEQ ID NO.9 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO.10、15 或 16 的氨基酸序列，和 HCDR3 包含 SEQ ID NO.11 的氨基酸序列；并且轻链可变区的 LCDR1 包含 SEQ ID NO.12 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO.13 的氨基酸序列，和 LCDR3 包含 SEQ ID NO.14 的氨基酸序列；
- 可选地，所述抗 PD1 抗体包含分别如 SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10 和 SEQ ID NO.11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及分别如 SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13 和 SEQ ID NO.14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白，所述抗 PD1 抗体为人源化抗体、鼠源抗体或嵌合抗体；
- 可选地，所述抗体为全长抗体或选自 F(ab')₂、Fab'-SH、Fab'、Fab、scFab、dsFv、(dsFv)₂、Fv 和 scFv 中的任意一种抗原结合片段。
4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的融合蛋白，其中，所述抗 PD1 抗体的重链可变区包括与 SEQ ID NO.1、3、5 或 7 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，和/或轻链可变区包括与 SEQ ID NO.2、4、6 或 8 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；
- 可选地，
- (a) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO.2 的氨基酸序列；
- (b) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO.3 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO.4 的氨基酸序列；
- (c) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO.5 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO.6 的氨基酸序列；或
- (d) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO.7 的氨基酸序列，和所述轻链可变区包含 SEQ ID NO.8 的氨基酸序列；
- 可选地，所述抗 PD1 抗体包括如 SEQ ID NO.1 所示的重链可变区，和如 SEQ ID NO.2 所示的轻链可变区。
5. 一种融合蛋白，其包括 PD1 结合单元部分和 IL10 单元部分，其中，所述 PD1 结合单元为抗 PD1 抗体，所述 IL10 单元为 IL10 多肽；其中，
- (a) 所述抗 PD1 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区与 SEQ ID NO.1 具有至少 95% 序列同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO.2 具有至少 95% 序列同一性；
- (b) 所述抗 PD1 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区与 SEQ ID NO.3 具有至少 95% 序列同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO.4 具有至少 95% 序列同一性；
- (c) 所述抗 PD1 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区与 SEQ ID NO.5 具有至少 95% 序列同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO.6 具有至少 95% 序列同一性；
- (d) 所述抗 PD1 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区与 SEQ ID NO.7 具有至少 95% 序列同一性，和所述轻链可变区与 SEQ ID NO.8 具有至少 95% 序列同一性；或
- (e) 所述抗 PD1 抗体为与 (a)、(b)、(c) 或 (d) 所述的抗 PD1 抗体竞争性结合 PD1 抗原或结合相同表位的抗体；
- 可选地，所述抗体包括如 SEQ ID NO.1 所示的重链可变区，和如 SEQ ID NO.2 所示的轻链可变区。
6. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 PD1 抗体包含恒定区；
- 可选地，所述抗体的重链恒定区选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定区，和/或所述抗体的轻链恒定区选自 κ 或 λ 链恒定区；
- 可选地，所述恒定区的种属来源为鼠或人；
- 可选地，所述重链恒定区包括与 SEQ ID NO.19 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，和/或所述轻链恒定区包括与 SEQ ID NO.20 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；
- 可选地，所述抗 PD1 抗体的重链包括与 SEQ ID NO.17 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，所述抗 PD1 抗体的轻链包括与 SEQ ID NO.18 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；
- 可选地，所述抗 PD1 抗体包括如 SEQ ID NO.17 所示的重链和如 SEQ ID NO.18 所示的轻链。
7. 根据权利要求 1 至 6 任一项所述的融合蛋白，其中所述 IL10 多肽为天然 IL10 多肽或修饰的 IL10 多肽；
- 可选地，所述修饰的 IL10 多肽为单体形式，且所述修饰的 IL10 多肽相对于天然 IL10 多肽，在任意两个相邻氨基酸之间插入有间隔肽，所述间隔肽为柔性肽；
- 可选地，所述两个相邻氨基酸中的一个氨基酸位置为第 115 位、第 116 位、第 117 位、第 118 位、第 119 位；
- 可选地，所述间隔肽位于第 116 位和第 117 位之间；
- 可选地，所述间隔肽位于第 115 位和第 116 位之间；
- 可选地，所述间隔肽位于第 117 位和第 118 位之间；
- 可选地，所述间隔肽选自 GGGSGG、GGGSG、(GS)_n、(GGGS)_n、(GSGGS)_n、(GGGGS)_n 中的至少之一，n 为 1-10 之间的任意整数；
- 可选地，所述间隔肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.21 所示；
- 可选地，所述修饰的 IL10 多肽相对于天然 IL10 多肽，在 N 端缺失 n 个氨基酸，n 为 1 至 12 之间的任意整数；
- 可选地，所述修饰的 IL10 多肽相对于天然 IL10 多肽，在 N 端缺失 2 个氨基酸；
- 可选地，所述 IL10 多肽包括与 SEQ ID NO.22 或 23 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；
- 可选地，所述 IL10 多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.22 所示。
8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述的融合蛋白，其中，所述 IL10 多肽直接或间接通过间隔肽与所述抗 PD1 抗体的重链或轻链连接；

可选地，所述 IL10 多肽的 N 末端通过连接肽与所述抗 PD1 抗体的轻链的 C 末端连接；
可选地，所述融合蛋白，其包括 2 条相同的式 P1 所示的第一链和 2 条相同的式 P2 所示的第二链；
P1：[抗 PD1 抗体的轻链]-[连接肽]-[IL10 多肽]，
P2：抗 PD1 抗体的重链；

5 可选地，所述式 P1 中，所述连接肽为柔性连接肽；
可选地，所述连接肽选自(GGGGS)_nG、(GGGS)_n、(GS)_n、(GGGS)_n、(GSGGS)_n、(GGGGSG)_n 中的至少之一，n 为 1~10 之间的任意整数；
可选地，所述连接肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.24 所示；
可选地，所述融合蛋白包括与 SEQ ID NO.25 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列的第一链，和与 SEQ ID NO.17 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列的第二链；

10 可选地，所述融合蛋白包括 2 条氨基酸序列如 SEQ ID NO.25 所示的第一链，和 2 条氨基酸序列如 SEQ ID NO.17 所示的第二链。
9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的融合蛋白，其中所述融合蛋白具有以下特性中的至少一种：
A. 所述的融合蛋白能与 PD1 特异性结合；可选地，所述融合蛋白能以 ≤10nM 的 EC50 值与人 PD1 蛋白结合，其中，所述 EC50 值通过 FACS 方法测定；
B. 所述的融合蛋白具有低血液毒性或无血液毒性；
C. 所述的融合蛋白能增强 CD8⁺T 细胞杀伤活性；

15 D. 所述的融合蛋白能抑制肿瘤的生长；
E. 所述的融合蛋白具有良好的稳定性。
10. 一种核酸，其编码权利要求 1 至 9 任一项所述的融合蛋白。
11. 一种载体，其包含权利要求 10 所述的核酸。
12. 一种细胞，其含有权利要求 10 所述的核酸或权利要求 11 所述的载体。

20 13. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 9 任一项所述的融合蛋白、权利要求 10 所述的核酸、权利要求 11 所述的载体或权利要求 12 所述的细胞；可选地，其还包含一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。
14. 如权利要求 1 至 9 任一项所述的融合蛋白、权利要求 10 所述的核酸、权利要求 11 所述的载体或权利要求 12 所述的细胞或权利要求 13 所述的药物组合物在制备治疗或预防肿瘤或炎症疾病的药物中的应用；

25 可选地，所述肿瘤为 PDL1 高表达的肿瘤；
可选地，所述肿瘤选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌和血液系统癌；
可选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、肾细胞癌、胃癌。

15. 一种治疗疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如权利要求 1 至 9 任一项所述的融合蛋白、权利要求 10 所述的核酸、权利要求 11 所述的载体或权利要求 12 所述的细胞或权利要求 13 所述的药物组合物的步骤；

30 可选地，所述疾病为肿瘤或炎症疾病；
可选地，所述肿瘤或炎症疾病为人 PD1 和或 PDL1 高表达的疾病；
可选地，所述肿瘤为 PDL1 高表达肿瘤；
可选地，所述肿瘤选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌和血液系统癌；
可选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、肾细胞癌、胃癌。

35 16. 一种试剂盒，其包含如权利要求 1 至 9 任一项所述的融合蛋白、权利要求 10 所述的核酸、权利要求 11 所述的载体或权利要求 12 所述的细胞或权利要求 13 所述的药物组合物；
可选地，所述试剂盒用于检测或测定人 PD1。

17. 一种制备如权利要求 1 至 9 任一项所述的融合蛋白的方法，其包括培养如权利要求 12 所述的细胞，然后分离和纯化获得融合蛋白的步骤。