



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 114728041 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 08

(21) 申请号 202080076692.1

(22) 申请日 2020.09.18

(30) 优先权数据

19198358.4 2019.09.19 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/076089 2020.09.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/053134 EN 2021.03.25

(71) 申请人 洛桑联邦理工学院

地址 瑞士洛桑市

(72) 发明人 郭雨刚 唐力 谢虞清

(74) 专利代理机构 北京汇知杰知识产权代理有限公司 11587

专利代理师 杨巍 柴春玲

(51) Int.Cl.

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 47/55 (2017.01)

A61K 47/65 (2017.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

权利要求书2页 说明书17页 附图19页

(54) 发明名称

可用作免疫疗法的增强剂的IL-10/FC融合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及新的可用于抗癌疗法如抗癌过继性T细胞转移 (ACT) 免疫疗法或免疫检查点阻断疗法的剂及其相关组合物、用途和方法。

1. 一种用于预防和/或治疗癌症之用途的Fc融合蛋白,其中所述Fc融合蛋白是两个多肽的同源二聚体,每个多肽包含(i)免疫球蛋白IgG Fc结构域和(ii)包含人IL-10或其变体的序列的异源多肽,其中所述异源多肽通过多肽接头(例如柔性铰链)共价连接到所述Fc结构域的N端或C端,并且两个异源多肽非共价组装在同源二聚体中。

2. 根据权利要求1所述之用途的融合蛋白,其中所述Fc融合蛋白的序列包含人IL-10的序列。

3. 根据权利要求2所述之用途的融合蛋白,其中所述人IL-10的序列是SEQ ID NO:1或其变体的序列。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述融合蛋白的序列包含IgG1 Fc片段或其变体的序列。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述免疫球蛋白IgG Fc结构域由非溶胞性IgG1 Fc组成或包含非溶胞性IgG1 Fc。

6. 根据权利要求4或5所述之用途的融合蛋白,其中所述IgG1 Fc片段或其变体的序列包含SEQ ID NO:2或其变体的序列。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述融合蛋白的序列包含选自SEQ ID NO:3的柔性铰链的序列、和GS接头或其变体的序列。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:4或其变体的序列。

9. 根据权利要求1至3中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述免疫球蛋白IgG Fc结构域由非溶胞性IgG2 Fc组成或包含非溶胞性IgG2 Fc。

10. 根据权利要求9所述之用途的融合蛋白,其中所述IgG1 Fc片段或其变体的序列包含SEQ ID NO:5或其变体的序列。

11. 根据权利要求1至6或9至10中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述融合蛋白的序列包括选自SEQ ID NO:6的柔性铰链的序列、和GS接头或其变体的序列。

12. 根据权利要求9至11中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:7或其变体的序列。

13. 根据权利要求1至3中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述免疫球蛋白IgG Fc结构域由IgG3 Fc组成或包含IgG3 Fc。

14. 根据权利要求13所述之用途的融合蛋白,其中所述IgG3 Fc片段或其变体的序列包含SEQ ID NO:8或其变体的序列。

15. 根据权利要求13至14中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:10或其变体的序列。

16. 根据权利要求1至3中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述免疫球蛋白IgG Fc结构域由非溶胞性IgG4 Fc组成或包含非溶胞性IgG4 Fc。

17. 根据权利要求13所述之用途的融合蛋白,其中所述IgG4 Fc片段或其变体的序列包含SEQ ID NO:11或其变体的序列。

18. 根据权利要求16至17中任一项所述之用途的融合蛋白,其中所述融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:13或其变体的序列。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的用于预防和/或治疗癌症之用途的融合蛋白,

其中所述预防和/或治疗癌症治之用途是抗癌免疫疗法。

20. 根据权利要求19所述之用途的融合蛋白, 其中所述抗癌免疫疗法选自ACT疗法或免疫检查点阻断疗法。

21. 根据权利要求18或19所述之用途的融合蛋白, 其中ACT疗法选自TCR-T、CAR-T或TIL疗法。

22. 根据权利要求1至18中任一项所述之用途的融合蛋白, 其中所述癌症是实体瘤癌, 例如肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、支气管癌、胰腺癌、膀胱癌、肝癌和脑癌或皮肤癌, 特别是黑色素瘤。

23. 一种药物组合物, 其包含至少一种Fc融合蛋白和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂以及至少一种可用于抗癌免疫疗法的剂, 所述Fc融合蛋白包含免疫球蛋白IgG Fc结构域和包含人IL-10或其变体的序列的异源多肽, 其中所述异源多肽通过多肽接头(例如柔性铰链)共价连接到所述Fc结构域的C端或N端。

24. 根据权利要求23所述的药物组合物, 其中所述Fc融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:4或其变体的序列。

25. 一种用于治疗癌症特别是ACT疗法之用途的根据权利要求23或24所述的药物组合物。

26. 根据权利要求25所述之用途的药物组合物, 其中所述ACT疗法选自TCR-T疗法、CAR-T疗法或TIL疗法。

27. 一种预防或治疗癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的至少一种Fc融合蛋白, 所述至少一种Fc融合蛋白是两个多肽的同源二聚体, 每个多肽包含(i)免疫球蛋白IgG Fc结构域和(ii)包含人IL-10或其变体的序列的异源多肽, 其中所述异源多肽通过多肽接头(例如柔性铰链)共价连接到所述Fc结构域的N端或C端, 并且两个异源多肽非共价组装在同源二聚体中。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述预防或治疗癌症的方法是抗癌免疫疗法。

29. 根据权利要求27或28所述的方法, 其中所述融合蛋白将与抗癌免疫疗法联合施用, 特别是与选自ACT疗法或免疫检查点阻断疗法联合施用。

30. 一种在受试者中诱导免疫力或恢复对免疫疗法的反应性的方法, 所述方法包括在有需要的受试者中联合免疫检查点阻断疗法施用至少一种Fc融合蛋白, 所述至少一种Fc融合蛋白是两个多肽的同源二聚体, 每个多肽包含(i)免疫球蛋白IgG Fc结构域和(ii)包含人IL-10或其变体的序列的异源多肽, 其中所述异源多肽通过多肽接头(例如柔性铰链)共价连接到所述Fc结构域的N端或C端, 并且两个所述异源多肽非共价组装在同源二聚体中。

31. 根据权利要求27至30所述的方法, 其中所述至少一种Fc融合蛋白是如权利要求1至18中任一项所描述的融合蛋白。

可用作免疫疗法的增强剂的IL-10/Fc融合蛋白

发明领域

[0001] 本发明总体涉及抗癌疗法领域,特别是在抗癌免疫疗法(如过继性T细胞转移(ACT)免疫疗法和免疫检查点阻断)中有用的助剂。

背景技术

[0002] 过继性T细胞转移(ACT)免疫疗法最近产生了极好的临床结果。与传统的化学疗法和放射疗法不同,免疫疗法激活宿主免疫系统来攻击恶性肿瘤,并且与传统的化学疗法和放射疗法相比,免疫疗法可能提供长期的保护以防止复发,并且毒性更小。在过继性CD8⁺ T细胞疗法中,大量肿瘤特异性T细胞来源于患者并在体外扩增后回输给患者(Jiang et al.,2019,Cancer Lett.,10;462:23-32;Levine et al.,2017 Cell Therapy.Mol.Ther.-Methods Clin.Dev.4,92-101)。T细胞可以从分离自肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的天然诱导的肿瘤特异性CD8⁺ T细胞或基因修饰的自体循环CD8⁺ T细胞扩增。工程化T细胞表达肿瘤特异性抗原受体,包括分别由培养的T细胞克隆所制备的嵌合抗原受体(CAR)和T细胞受体(TCR)。最成功的ACT,即靶向B细胞淋巴瘤的抗CD19嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞疗法,已根据疗效证据被批准使用(June et al.,2018,Science 359,1361-1365)。尽管在治疗血液系统恶性肿瘤方面取得了巨大成功,但实体瘤仍然是ACT面临的主要挑战,且其治愈率仍然很低(Lim et al.,2017,Cell 168,724-740;Jiang et al.,2019,supra)。据报道,肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)在肿瘤微环境(TME)中表现出逐渐丧失的效应子功能和增殖能力,这被定义为T细胞“耗竭”(Thommen et al.,2018,Cancer Cell,33,547-562)。从代谢的角度来看,TME中持续的抗原刺激和其他代谢应激会极大地改变T细胞信号传导并削弱其抗肿瘤免疫反应(Schietinger et al.,2016,Immunity 45,389-401;Vodnala et al.,2019,Science 363)。通过体外预处理的过继性T细胞的代谢重编程已被证明可增强ACT免疫疗法(Li et al.,2019,Nat.Rev.Clin.Oncol.,doi:10.1038/s41571-019-020)。针对肿瘤浸润性CD8⁺ T细胞的体内代谢干预所进行的临床前研究很少(Chamoto et al.,2017,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,114,E761-E770;Chowdhury et al.,2018,Cancer Immunol.Res.6,1375-1387),但这些方法对靶细胞缺乏特异性。一些临床前研究是针对肿瘤抗原特异性CD8⁺ T细胞或CAR T细胞的体外代谢干预进行的(Klebanoff et al.,2004,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101,1969-1974;Vodnala et al.,2019,supra;Klebanoff et al.,2017,JCI Insight2)。然而,仍然缺乏一种简便且安全的可以与ACT结合以根除实体瘤并诱导持久治疗的体内代谢干预。

[0003] 白细胞介素10(IL-10)是IL-10家族细胞因子的成员,其通常被认为具有免疫抑制作用,因为它可以减少由不受控制的炎症反应所引起的组织损伤(Moore et al.,2001,Annu.Rev.Immunol.19,683-765)。它的抗炎特性在临床上的应用受到其在血清中的短循环半衰期的限制,因此设计了一种包含人IL-10和IgG Fc片段(hIL-10/Fc)的融合蛋白并在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中表达(Guo et al.,2012,Protein Expr Purif.,83(2):152-6)以提高人IL-10在体内的循环半衰期,并且已经提出将免疫抑制作用用于自身免疫性疾病

病的治疗。

[0004] 已经开发了包含通过多肽接头共价连接的西妥昔单抗(cetuximab)和两个IL-10分子的异源多聚体蛋白(CmAb-(IL-10)₂),以延长IL-10的半衰期并允许IL-10的肿瘤靶向递送(Qiao et al.,2019,Cancer Cell,35(6),901-915)。

[0005] 因此,迫切需要安全的用于对过继转移的T细胞进行代谢重编程且可与ACT联合以诱导用于实体瘤的持久治疗的工具。

发明内容

[0006] 本发明基于出乎意料的发现,即采用融合蛋白IL-10/Fc对肿瘤浸润性淋巴细胞的代谢重编程显著增强了ACT对同系(syngeneic)荷瘤小鼠模型中已建立的实体瘤的疗效。令人惊讶的是,观察到了本发明的融合蛋白IL-10/Fc在肿瘤微环境中选择性扩增肿瘤特异性PD-1+TIM-3+CD8+ T细胞,这表明,与基于IL-12或IL-15的疗法相比,该融合蛋白对其他细胞亚群几乎没有全身性影响且具有良好的安全性(Wang et al.,2017,Nat.Commun.,8,1-15;Momin et al.,2019,Sci.Transl.Med.11,eaaw2614;Berger et al.,2009,Blood,114,2417-2426;Huntington et al.,2011,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,108,6217-6222;Guo et al.2015,J.Immunol.195,2353-2364)。这种对终末耗竭的CD8+T细胞的直接作用使得能够通过代谢重编程来重振肿瘤浸润性CD8+ T细胞的功能和增殖,且其预期副作用比其他治疗策略要少得多,所述其他治疗策略是通过调节树突细胞(DC)上的IL-10受体(例如上述由Qiao et al.,2019提出的异源多聚体蛋白CmAb-(IL-10)₂)来调节树突细胞对IFN γ 的产生以增强CD8+ T细胞依赖性肿瘤反应。值得注意的是,所观察到的本发明的融合蛋白IL-10/Fc和ACT的联合的显著功效(90%的具有极强侵袭性肿瘤的小鼠经治疗后被完全治愈)是完全出乎意料的,因为IL-10/Fc通常被认为是一种免疫抑制细胞因子,对癌症治疗有负面影响。

[0007] 由于目前尚无可用于高效ACT癌症免疫疗法的针对肿瘤浸润性CD8+ T细胞的体内代谢干预策略,因此使用本发明的融合蛋白IL-10/Fc或其变体作为免疫疗法如ACT疗法或免疫检查点阻断的增强剂具有很大的潜力。

[0008] 根据第一方面,本发明提供了一种用于预防和/或治疗癌症之用途的Fc融合蛋白,其中所述Fc融合蛋白是两个多肽的同源二聚体,每个多肽包含(i)免疫球蛋白IgG Fc结构域和(ii)包含人IL-10或其变体的序列的异源多肽,其中所述异源多肽通过多肽接头(例如柔性铰链)共价连接到所述Fc结构域的N端或C端,并且两个异源多肽非共价组装在同源二聚体中。

[0009] 根据本发明的另一方面,提供了一种药物组合物,其包含至少一种根据本发明的Fc融合蛋白以及药学上可接受的载体(carrier)、稀释剂或赋形剂以及至少一种可用于抗癌免疫疗法的剂。

[0010] 根据另一方面,本发明提供了根据本发明的Fc融合蛋白在制备用于预防和/或治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0011] 根据另一方面,本发明提供了一种预防或治疗癌症的方法,所述方法包括在有需要的受试者中施用治疗有效量的至少一种本发明的Fc融合蛋白。

[0012] 根据另一方面,本发明提供了在受试者中诱导免疫力或恢复对免疫疗法的反应性

的方法,所述方法包括在有需要的受试者中联合免疫检查点阻断疗法施用本发明的Fc融合蛋白。

附图说明

[0013] 图1表示IL-10/Fc在启动期促进CD8⁺ T细胞的OXPHOS并增强T细胞的增殖。(a)左:本发明的融合蛋白作为其中描述的同源二聚体(IL-10/Fc)的示意图,所述同源二聚体包含两个多肽,每个多肽包含(i)免疫球蛋白IgG Fc结构域和(ii)包含人IL-10或其变体的序列的异源多肽,其中每个异源多肽通过多肽接头L共价连接到Fc结构域的N-末端或C-末端,并且两个IL-10多肽非共价组装在同源二聚体中(异源IL-10多肽之间的虚线);右:重组人IL-10和IgG1 Fc融合蛋白的SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)。在还原剂DTT(二硫苏糖醇)的存在下,每个单体之间的二硫键被裂解。(b和c)新鲜分离的Pmel-1小鼠脾细胞用增殖追踪染料CFSE(羧基荧光素琥珀酰亚胺酯)标记,并在有IL-10/Fc或没有IL-10/Fc存在的情况下用不同浓度的同源肽hgp100刺激3天。通过流式细胞术分析CD8⁺ T细胞计数(b)和非分裂细胞百分比(c)。(d)如(b和c)所示受刺激的CD8⁺ T细胞的代表性耗氧率(OCR)示踪。(e)来自(d)的最大OCR的统计分析。(f)如(b和c)所示受刺激的CD8⁺ T细胞的代表性细胞外酸化率(ECAR)示踪。(g)来自(f)的最大ECAR的统计分析。(h)来自(e)和(g)的OCR/ECAR比率。数据代表至少三个独立的实验。误差线表示SEM。

[0014] 图2表示在TCR刺激下,IL-10/Fc通过丙酮酸依赖性方式重编程T细胞代谢。(a)Pmel-1小鼠CD8⁺ T细胞的激活通过用hgp100肽刺激3天,再静息4天,然后与B16F10小鼠黑色素瘤细胞共培养2天,在有IL-10/Fc或没有IL-10/Fc存在的情况下。对照Pmel-1 CD8⁺ T细胞在没有B16F10细胞的情况下保持在静息期。从共培养物中分离出来的CD8⁺ T细胞的代表性OCR示踪和代表性ECAR示踪。(b)来自(a)的最大OCR的统计分析。(c)来自(a)的最大ECAR的统计分析。(d)来自(c)和(d)的OCR/ECAR比率。(e)来自(a)的B16F10肿瘤细胞计数。(f)来自(a)的CD8⁺ T细胞计数。(g)每个部分的代谢途径和抑制剂的示意图。(h)Pmel-1小鼠CD8⁺ T细胞的激活通过用hgp100肽刺激3天,再静息4天,然后用抗CD3四聚体再刺激2天,在有IL-10/Fc或没有IL-10/Fc存在的情况下,并且在存在(g)中的不同的抑制剂的情况下。CD8⁺ T细胞倍数变化代表经IL-10/Fc处理相对于未经IL-10/Fc处理的细胞计数。(i)来自(h)的CD8⁺ T细胞的基础OCR。数据代表至少三个独立的实验。误差线表示SEM。

[0015] 图3表示IL-10/Fc增强了过继性T细胞疗法以根除已建立的高度侵袭性的小鼠黑色素瘤肿瘤。(a)用于小鼠B16F10黑色素瘤模型的Pmel CD8⁺ T细胞ACT和IL-10/Fc联合疗法的实验方案。(b-e)经过如(a)所示处理的PBS对照组(b)、IL-10/Fc单一疗法(c)、ACT单一疗法(d)和联合疗法(e)小鼠的个体肿瘤生长曲线。(f)用于小鼠B16F10黑色素瘤模型的减少了剂量的Pmel CD8⁺ T细胞ACT和IL-10/Fc联合疗法的实验方案。(g)对经过如(f)所示处理的小鼠的肿瘤生长进行监测。(h)经过如(f)所示处理的小鼠的存活曲线。(i和j)经过如(f)所示处理的ACT单一疗法组(i)和联合疗法(j)的小鼠的个体肿瘤生长曲线。数据代表至少三个独立的实验。误差线表示SEM。

[0016] 图4表示IL-10/Fc与过继性T细胞疗法联合以在多个同系肿瘤小鼠模型中根除已建立的肿瘤。(a)对经过如图3(a)所示处理的小鼠的肿瘤生长进行监测。(b)经过如图3(a)所示处理的小鼠的存活曲线。(c)在初次接种后第90天,用 1×10^5 个B16F10细胞经皮下再次

攻击来自图3(a)中的联合组的存活小鼠。用相同数量的肿瘤细胞接种 **naïve** 野生型小鼠作为对照。监测小鼠的存活曲线。(d) 将 1×10^6 个 YUMM1.7-OVA 小鼠黑色素瘤细胞皮下接种于 C57BL/6J 小鼠。在该模型中,将 OVA 特异性的 OT-I CD8⁺ T 细胞用作 ACT。实验方案与图3(a)所示相同。对肿瘤生长进行监测。(e) 经过如(d)所示处理的小鼠的存活曲线。(f) 将 1×10^6 个 MC38-HER2 小鼠结肠癌细胞皮下接种于 C57BL/6J 小鼠。在该模型中,将 HER2-CAR-T 细胞用作 ACT。实验方案与图3(a)所示相同。对肿瘤生长进行监测。(g) 经过如(f)所示处理的小鼠的存活曲线。数据代表(a)和(b)的至少三个独立实验。(c)中的数据是两个独立实验的集合。误差线表示 SEM。

[0017] 图5显示 IL-10/Fc 增强了抗肿瘤免疫力。(a) 在小鼠 B16F10 黑色素瘤模型中的流式细胞术机制研究的实验方案。在第14天处死小鼠并通过流式细胞术分析 TIL。(b) 肿瘤中的总 CD45.2⁺ 白细胞和 NK 细胞和 CD11c⁺ 树突细胞 (DC) 密度。(c) Foxp3⁺ 调节性 T 细胞 (Tregs) 在总 CD4⁺ T 细胞中的百分比以及总 CD8⁺ T 细胞数与 Treg 细胞数的比值。数据代表至少三个独立的实验。误差线表示 SEM。

[0018] 图6显示 IL-10/Fc 特异性扩增了 PD-1⁺ TIM-3⁺ 细胞毒性 T 细胞。通过流式细胞仪对 B16F10 TIL 进行分析,如图5(a)所示。(a) 肿瘤中的总 CD3⁺ T 细胞、总 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞密度。(b) 来自图5(a)的肿瘤切片的 CD3 免疫荧光染色。比例尺:50μm。(c) 内源性 CD8⁺ T 细胞和转移的 Pmel CD8⁺ T 细胞的代表性流式细胞图。内源性 CD8⁺ T 细胞和转移的 Pmel CD8⁺ T 细胞中的 PD-1⁺ TIM-3⁺ 百分比的统计分析。(d和e) 肿瘤中的 PD-1⁺ TIM-3⁺ 内源性 CD8⁺ T 细胞 (d) 和 PD-1⁺ TIM-3⁺ 转移的 Pmel CD8⁺ T 细胞 (e) 的密度。(f) 来自 B16F10 TIL 的 PBS 组的内源性 CD8⁺ T 细胞的不同亚群上的 IL-10R 表达。(g) 在 PD-1⁺ TIM-3⁺ 内源性 CD8⁺ T 细胞和 PD-1⁺ TIM-3⁺ 转移的 Pmel CD8⁺ T 细胞上的 PD-1 表达。(h) 多功能 (IFN γ ⁺ TNF α ⁺ Granzyme B⁺) CD8T 细胞在内源性 CD8⁺ T 细胞和转移的 Pmel CD8⁺ T 细胞中的百分比。(i) 多功能 (IFN γ ⁺ TNF α ⁺ Granzyme B⁺) CD8 T 细胞在内源性 PD-1⁺ TIM-3⁺ CD8⁺ T 细胞和转移的 Pmel PD-1⁺ TIM-3⁺ CD8⁺ T 细胞中的百分比。(j和k) 将根据图2(h)的 PD-1 和 TIM-3 的表达分选的不同 CD8⁺ T 细胞亚群与 B16F10 肿瘤细胞共培养2天。通过流式细胞术评估 CD8⁺ T 细胞计数 (j) 和 B16F10 细胞杀伤效率 (k)。(l) 来自 TIL 和脾细胞的 PD-1⁺ TIM-3⁺ 内源性 CD8⁺ T 细胞的记忆表型分析 (CD62L 表达和 CD44 表达)。(m) 如图2(h)所示的 PD-1⁺ TIM-3⁺ CD8⁺ T 细胞的代表性 OCR 示踪和最大 OCR。数据代表至少三个独立的实验。误差线表示 SEM。

[0019] 图7显示 IL-10/Fc 增强了检查点阻断疗法,以根除已建立的小鼠结肠肿瘤。(a) 用于小鼠 CT26 结肠癌模型的 α -PD-1 和 IL-10/Fc 联合疗法的实验方案。将 3×10^5 个 CT26 小鼠结肠癌细胞皮下接种于 BALB/c 小鼠。每三天给予 α -PD-1 抗体 (RMP-14) 作为对照。(b) 每组的个体肿瘤生长曲线。(c) 对经过如(a)所示处理的小鼠的肿瘤生长进行监测。(d) 经过如(a)所示处理的小鼠的存活曲线。数据代表至少两个独立的实验。误差线表示 SEM。

具体实施方式

[0020] 如本文所用,“Fc 融合蛋白”涉及包含通过柔性铰链共价连接在一起的人 IL-10 或其变体的序列和 IgG Fc 片段的 Fc 融合蛋白 (同源二聚体)。根据一方面,IgG Fc 片段可以是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型的 Fc 片段。IgG Fc 片段可以被突变以降低抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) (例如在 Czajkowski et al., 2012, EMBOMol.Med, 1015-1028 中所

描述的)或增加IgG的半衰期或体内水平,如在Zalevsky et al.,2010,Nat.Biotechnol.28,157-159;Vaccaro et al.,2005,Nat.Biotechnol.23,1283-1288中所描述的,例如IL-10/Fc。

[0021] 根据一个具体实施方案,可以将点突变引入到IgG1 Fc结构域中(如在Armour et al.,1999,Eur.J.Immunol.29,2613-2624或 Steele et al.,1995,J.Immunol.154,5590-5600中所描述的)以产生非溶胞性IgG1 Fc结构域。

[0022] 根据另一个具体实施方案,在SEQ ID NO:2的IgG1 Fc结构域中产生至少三个选自L234V、L235A和P331S的突变。

[0023] 根据另一个更具体实施方案,在SEQ ID NO:5的IgG2 Fc结构域中产生至少两个选自A330S和P331S的突变。

[0024] 根据另一个更具体实施方案,在SEQ ID NO:11的IgG4 Fc结构域中产生至少一个P329G突变。

[0025] 如本文所用,“人IL-10或其变体”包括包含天然人IL-10及其变体的序列的序列,如在Mumm et al.,2011,Cancer Cell,20,781-796;Guo,et al.,2012,Protein Expr.Purif.,83,152-156(2012);Zheng et al.,1997,J.Immunol.,158,4507-13;Qiao et al.,2019,Cancer Cell 35,901-915.e4中所描述的。

[0026] 根据一个具体方面,可以通过标准策略对本发明的Fc融合蛋白进行修饰以延长其体内半衰期,所述标准策略包括聚乙二醇化(例如人IL-10序列或其变体的聚乙二醇化:如上述Mumm et al.,2011所描述的,或本发明的Fc融合蛋白IL-10/Fc的Fc结构域也可以用抗体或人血清白蛋白或其变体来代替,如在Qiao,et al.,2019,Cancer Cell 35,901-915.e4;Kontermann,2011,Curr.Opin.Biotechnol.,22,868-876中所描述或评述的)。

[0027] 如本文所用,可在本发明的上下文中使用的“柔性铰链”可以是肽的或是非肽的。当上述柔性铰链具有肽性质时,它通常包含约3个至20个氨基酸。例如,本发明的合适铰链可以选自在Klein et al.,2014,Protein Eng.Des.Sel.27,325-330中描述的那些。非肽柔性铰链可以选自在Capon et al.,2011,Proc.Japan Acad.Ser.B Phys.Biol.Sci.,87,603-616中描述的那些接头。

[0028] “GS”接头是指与CPPCP结构域(SEQ ID NO:15)结合的包含选自G和S或其组合的氨基酸的任何肽接头,例如GGSCPPCP(SEQ ID NO:16)、GGGGSCPPCP(SEQ ID NO:17)、GGGGSGGGSCPPCP(SEQ ID NO 14)或更长的接头。通常,GS接头具有约3个至约50个氨基酸的长度,例如约3个至20个,例如5个至约15个。

[0029] 应用于肽或多肽的术语“变体”,如本文所指,表示与所提及的肽序列基本上同源的肽或多肽,但其由于一个或多个氨基酸缺失、插入和/或置换而具有至少一个与所提及的序列的氨基酸不同的氨基酸。基本上同源表示,除了1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸残基的缺失、插入和/或置换之外,与所提及的肽序列相同的变体氨基酸序列。在一个更具体的实施方案中,除了1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸残基的缺失和/或保守性置换之外,变体氨基酸序列与所提及的肽序列是相同的。两个氨基酸序列的一致性可以通过目测和/或数学计算来确定,或通过使用用于序列比较的已知计算机程序(例如Clustal package 1.83版)来比较序列信息从而更容易地确定。变体可以包含具有至少一个保守性置换的氨基酸的序列,这意味着一个给定的氨基酸残基被一个具有相似物理化学特征的残基所置

换。保守性置换的实例包括用一个脂肪族残基置换另一个脂肪族残基,例如用Ile、Val、Leu或Ala替换另一个脂肪族残基,或用一个极性残基置换另一个极性残基,例如在Lys和Arg之间;在Glu和Asp之间;或在Gln和Asn之间。氨基酸疏水性可以在已知尺度的基础上发现,例如Kyte,et al,1982,J.Mol.Biol.,157:105-131;Eisenberg,1984,Ann.Rev.Biochem.,53:595-623。其他这样的保守性置换,例如具有相似疏水性特征或二级结构倾向性的整个区域的置换,是众所周知的(Kyte,et al,1982,同上)。例如,“保守性氨基酸置换”可以涉及用非天然残基置换天然氨基酸残基,从而对该位置的氨基酸残基的极性或电荷有一点影响或没有影响。所需的氨基酸置换(无论是保守性的还是非保守性的)可由本领域技术人员在需要此类置换时来确定。示例性氨基酸置换如下表1所示。术语“变体”还包括与所提及的肽序列基本上同源的肽或多肽,但肽或多肽由于一个或多个氨基酸已经化学修饰或被氨基酸类似物置换而具有不同于所提及的序列的氨基酸序列。例如,可以引入非天然残基以增强基于肽的治疗剂的药理学特性(Geurink et al.,2013,J.Med.Chem.,56,1262;Rand et al.,2012,Med.Chem.Commun,3,1282)。

[0030] 表1

[0031]

氨基酸	《保守性》置换的示例
Ala (A)	Val、Leu、Ile
Arg (R)	Lys、Gln、Asn
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser、Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro、Ala
His (H)	Asn、Gln、Lys、Arg
Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸
Leu (L)	Ile、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸
Lys (K)	Arg、Gln、Asn
Met (M)	Leu、Ile、Phe
Phe (F)	Leu、Val、Ile、Ala、Tyr
Pro (P)	Ala、Gly
Ser (S)	Thr、Ala、Cys
Trp (W)	Phe、Tyr
Thr (T)	Ser
Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser
Val (V)	Ile、Met、Leu、Phe、Ala、正亮氨酸

[0032] 根据另一个具体实施方案,本发明的序列可以任选地在N-末端被乙酰化和/或在C-末端被酰胺化。

[0033] 根据另一个具体实施方案,本发明的序列可以任选地被聚乙二醇化。

[0034] 如本文所用,“抗癌免疫疗法”是指效应子激活免疫细胞的抗癌治疗策略(包括过

继性细胞疗法 (ACT)) 以及中和免疫抑制机制的策略,例如针对免疫检查点分子如细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA-4) 和程序性细胞死亡蛋白 1 (PD1) 的剂特别是抗体,如在 Weiden et al., 2018, Nat. Rev. Immunol., 18, 212-219 中所描述的。

[0035] 如本文所用,“ACT 免疫疗法”是指从患者的血液或肿瘤中收集 T 细胞并在实验室中培养的治疗技术。一旦有了足够的 T 细胞,它们就会被返还给患者,以帮助他们的免疫系统对抗癌细胞。Fan et al., 2018, Theranostics, 8 (20): 5784-5800; Rosenberg et al., 2008, Nat. Rev. Cancer 8, 299-308; Wang et al., 2014, Immunotherapy 6, 1265-1278 中列出了 ACT 免疫疗法的示例。

[0036] 如本文所用,“免疫检查点抑制剂”是指拮抗或抑制免疫检查点分子的剂,并且那些可以选自 PD-1 抑制剂、PD-L1 抑制剂或 CTLA-4 抑制剂或 LAG-3 抑制剂的实例,如在 Pardoll et al., 2012, Nat. Rev. Cancer 12, 252-264; Lee et al., 2019, Molecules 4, 1-16 中所描述的。

[0037] 如本文所用,“PD-1 抑制剂”包括抗 PD-1 单克隆抗体,例如 Keytruda 和 Opdivo,如上述 Lee et al., 2019 所描述的。

[0038] 如本文所用,“PD-L1 抑制剂”包括 PD-L1 抗体和 PD-1-Ig 融合蛋白,如上述 Pardoll et al., 2012 所描述的。

[0039] 如本文所用,“CTLA-4 抑制剂”包括抗 CTLA-4 单克隆抗体,例如 Ipilimumab 和 Tremelimumab,如上述 Pardoll et al., 2012 所描述的。

[0040] 如本文所用,“治疗/处理 (treatment)”和“治疗/处理 (treating)”等通常是指获得所需的药理学和生理学效果。该效果在预防或部分预防疾病、症状或病症方面可以是预防性的,和/或在部分或完全治愈疾病、病症、症状或归因于该疾病的不良影响的方面可以是治疗性的。如本文所用,术语“治疗/处理”涵盖对哺乳动物、特别是人类的疾病的任何治疗/处理,并且包括: (a) 预防该疾病发生在可能易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的受试者中,如预防性早期无症状干预; (b) 抑制疾病,即阻止其发展;或缓解疾病,即导致疾病和/或其症状或病症的消退,例如损害的改善或补救。特别的是,根据本发明的方法、用途、制剂和组合物可用于预防和/或治疗癌症。

[0041] “实体瘤”的表述包括肺癌 (小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、支气管癌、胰腺癌、膀胱癌、肝癌和脑癌或皮肤癌,特别是黑色素瘤。

[0042] 如本文所用,术语“受试者”是指哺乳动物。例如,本发明考虑的哺乳动物包括人、灵长类动物、诸如牛、绵羊、猪、马的家养动物、实验室啮齿动物、其他宠物等。

[0043] 如本文所用,术语“有效量”是指本发明的至少一种化合物或根据本发明的药物制剂在组织、系统、动物或人中引发所寻求的生物学或医学反应的量。在一个实施方案中,所述有效量是用于减轻所治疗的疾病或病症的症状的“治疗有效量”。在另一个实施方案中,所述有效量是用于预防所防止的疾病或病症的症状的“预防有效量”。该术语在本文中还包括足以减少疾病进展、尤其是减少或抑制癌症病症的进展并由此引发所寻求的发明的化合物量 (即“有效量”)。通常,有效量可用于抑制癌细胞的生长,即任何的癌细胞增殖和/或迁移的速率的减缓、癌细胞增殖和/或迁移的抑制、或杀死癌细胞,使得与在未处理的对照癌细胞中的实测或预测生长速率相比,癌细胞生长速率降低。术语“抑制生长”还可以

指癌细胞或肿瘤的尺寸减小或消失,以及其转移潜能的减小。优选地,这种细胞水平的抑制可以减小患者中癌症的尺寸、延缓其生长、降低其侵袭性或预防或抑制其转移。通过多种合适标记中的任一种,本领域技术人员可以容易地确定癌细胞生长是否受到抑制。

[0044] 根据本发明的治疗的“功效”这一术语可以基于响应于根据本发明的用途或方法的疾病过程中的变化来测量。根据一个具体实施方案,所述功效可以通过测量针对癌细胞所引发的免疫反应来测量,例如通过分析肿瘤特异性T细胞或通过评估癌细胞死亡、和/或肿瘤生长、进展和散播的抑制、肿瘤体积的减少,和/或无进展存活时间的增加和/或增加的受试者的健康和康健(例如抑制癌症)。根据本发明的癌症治疗的功效可以通过癌细胞生长的抑制来测量,例如通过癌细胞在细胞周期的特定阶段的停滞例如在细胞周期的G2/M期的停滞来证明。还可以使用众所周知的成像方法来证明对癌细胞生长的抑制,所述成像方法例如磁共振成像、计算机轴向断层扫描、PET、SPECT、光声成像、X射线和荧光成像/检测。也可以间接地确定癌细胞生长,例如通过确定与癌细胞生长相关的循环癌胚抗原、前列腺特异性抗原或其他癌症特异性抗原的水平。

[0045] 特别地,根据本发明的联合治疗的功效可以通过肿瘤浸润性CD8⁺T细胞的扩增、肿瘤尺寸的减小、肿瘤消失、荷瘤小鼠的存活或与癌症类型相关的任何生物标志物的存在来评估。

[0046] “药学活性衍生物”是指在施用于接受者时能够直接或间接地提供本文所公开的活性的任何化合物。术语“间接地”还包括可以通过内源性酶或代谢转化为药物活性形式的前药。所述前药是根据本发明的并且呈现出抗肿瘤活性的化合物的具有可化学分解或可代谢分解基团的衍生物,以及在生理条件下可在体内转化为药物活性化合物的化合物。

[0047] 术语“药物制剂”是指其形式允许活性成分的生物活性明确有效并且不包含额外的会对被施用所述制剂的受试者有毒的组分的制剂。

[0048] 根据本发明的融合蛋白IL-10/Fc及其制备方法

[0049] 本文描述了适用于本发明背景下的Fc融合蛋白(同源二聚体)。

[0050] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白(IL-10/Fc)是两个多肽的同源二聚体,每个多肽包含(i)免疫球蛋白IgG Fc结构域和(ii)包含人IL-10或其变体的序列的异源多肽,其中所述异源多肽通过多肽接头(例如柔性铰链)共价连接到所述Fc结构域的N-末端或C-末端并且这两个多肽非共价组装在同源二聚体中。

[0051] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含人IL-10的序列,例如其中所述序列是SEQ ID NO:1或其变体的序列。

[0052] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含IgG Fc片段的序列,其中所述IgG Fc片段是IgG1 Fc片段或其变体,特别是非溶胞性IgG1 Fc。例如,融合蛋白IL-10/Fc包含SEQ ID NO:2或其变体的IgG Fc片段(Zheng et al., 1997, supra; Sazinsky et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 20167-20172)。

[0053] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含选自SEQ ID NO:3的柔性铰链、和GS接头或其变体的序列(Klein et al., 2014, 同上)。

[0054] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含选自SEQ ID NO:3的柔性铰链、和GGS接头或其变体的序列(Klein et al., 2014, 同上)。

[0055] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含选自SEQ ID NO:6的柔

性铰链、或GS接头或其变体的序列。

[0056] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含选自SEQ ID NO:9的柔性铰链、或GS接头或其变体的序列。

[0057] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含选自SEQ ID NO:12的柔性铰链、或GS接头或其变体的序列。

[0058] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:4或其变体的序列。

[0059] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含IgG Fc片段的序列,其中所述IgG Fc片段是IgG2 Fc片段或其变体,特别是非溶胞性IgG2 Fc。例如,融合蛋白IL-10/Fc包含SEQ ID NO:5或其变体的IgG Fc片段。

[0060] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:7或其变体的序列。

[0061] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含IgG Fc片段的序列,其中所述IgG Fc片段是IgG3 Fc片段或其变体。例如,融合蛋白IL-10/Fc包含SEQ ID NO:8或其变体的IgG Fc片段。

[0062] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:10或其变体的序列。

[0063] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含IgG Fc片段的序列,其中所述IgG Fc片段是IgG4 Fc片段或其变体。例如,融合蛋白IL-10/Fc包含SEQ ID NO:11或其变体的IgG Fc片段。

[0064] 根据一个具体方面,根据本发明的Fc融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:13或其变体的序列。

[0065] 根据一个具体方面,Fc融合蛋白IL-10/Fc包含在Guo et al.,2012,supra or in Zheng et al.,1997,J.Immunol.,158,4507-4513or in Steele et al.,1995,J.Immunol.,154,5590-5600中描述的融合蛋白IL-10/Fc或其变体或片段的序列。

[0066] Fc融合蛋白IL-10/Fc可以按本文所述来制备,或如在上述Guo et al.,2012、上述Zheng et al.,1997、上述Steele et al.,1995中所描述的来制备。

[0067] 根据本发明的组合物

[0068] 本发明提供药剂或治疗剂作为组合物和方法,用于治疗受试者,优选哺乳动物受试者,最优选患有医学疾病特别是癌症特别是实体瘤癌症的人类患者。

[0069] 在一个实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,其含有至少一种本发明的化合物及其药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0070] 本发明的剂或其制剂可以作为药物制剂施用,所述药物制剂可以包含一种或多种本文所述的任何形式的根据本发明的剂。根据本发明的组合物,连同常规使用的佐剂、载体、稀释剂或赋形剂,可以以药物组合物及其单位剂量的形式放置,并且这种形式可以以固体(例如片剂或填充胶囊)或液体(例如溶液、悬浮液、乳液、酞剂)或填充有这些物质的胶囊的形式使用,均用于口服,或为无菌注射溶液的形式,用于通过注射或连续输注的肠胃外(包括皮下)使用。可注射组合物通常是基于可注射无菌盐水或磷酸盐缓冲盐水或本领域已知的其他可注射载体。此类药物组合物及其单位剂型可以包含常规比例的成分,具有或不

具有额外的活性化合物或成分 (principles), 并且此类单位剂型可以包含与拟采用的预期日剂量范围相称的任何合适有效量的活性成分。

[0071] 本发明的组合物可以是液体制剂, 包括但不限于水性或油性的悬浮液、溶液、乳液、糖浆和酏剂。所述组合物也可配制成干燥产品, 用于在使用前用水或其他合适的载体进行重构。这种液体制剂可以包含添加剂, 所述添加剂包括但不限于助悬剂、乳化剂、非水载剂 (vehicle) 和防腐剂。助悬剂包括但不限于山梨糖醇糖浆、甲基纤维素、葡萄糖/糖浆、明胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶和氢化食用脂肪。乳化剂包括但不限于卵磷脂、脱水山梨糖醇单油酸酯和阿拉伯胶。防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯和山梨酸。分散剂或润湿剂包括但不限于聚(乙二醇)、甘油、牛血清白蛋白、**Tween®**、**Span®**。

[0072] 本发明的组合物也可配制成长效制剂, 其可通过植入或肌肉内注射施用。

[0073] 本发明的固体组合物可以是以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。例如, 用于口服施用的片剂和胶囊剂可包含常规赋形剂, 所述赋形剂包括但不限于粘合剂、填充剂、润滑剂、崩解剂和润湿剂。粘合剂包括但不限于糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨糖醇、黄蓍胶、淀粉粘液和聚乙烯吡咯烷酮。填充剂包括但不限于乳糖、糖、微晶纤维素、玉米淀粉、磷酸钙和山梨糖醇。润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸、滑石、聚乙二醇和二氧化硅。崩解剂包括但不限于马铃薯淀粉和羧甲基淀粉钠。润湿剂包括但不限于十二烷基硫酸钠。可以根据本领域周知的方法对片剂进行包衣。

[0074] 根据一个更具体的方面, 提供了一种组合物, 其中所述融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:4或其变体的序列。

[0075] 根据一个更具体的方面, 提供了一种组合物, 其中所述融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:7或其变体的序列。

[0076] 根据一个更具体的方面, 提供了一种组合物, 其中所述融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:10或其变体的序列。

[0077] 根据一个更具体的方面, 提供了一种组合物, 其中所述融合蛋白的序列包含SEQ ID NO:13或其变体的序列。

[0078] 本发明的化合物也可以以缓释形式施用或从缓释药物递送系统施用。

[0079] 根据一个具体实施方案, 根据本发明的组合物用于静脉内使用。

[0080] 根据一个具体实施方案, 根据本发明的组合物用于腹膜内使用。

[0081] 根据一个具体实施方案, 根据本发明的组合物用于肿瘤内使用。

[0082] 在另一个具体方面, 根据本发明的组合物适于通过重复施用来递送。

[0083] 根据一个具体实施方案, 本发明的组合物是兽用组合物。

[0084] 其他材料以及制剂加工技术等在本Part 5 of Remington's "The Science and Practice of Pharmacy", 22nd Edition, 2012, University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins中列出, 其通过引用并入本文。

[0085] 施用方式

[0086] 根据本发明的化合物及其制剂可以以任何方式施用, 包括肠胃外、静脉内、肿瘤内、鞘内、经粘膜、鼻内、直肠、或它们的组合。肠胃外施用包括但不限于静脉内、动脉内、腹膜内、皮下和肌肉内施用。本发明的组合物也可以以植入物的形式施用, 该植入物允许组合

物的缓慢释放以及缓慢受控的静脉内输液。

[0087] 作为单剂或多剂施用于个体的剂量将取决于多种因素,包括药代动力学特性、患者状况和特征(性别、年龄、体重、健康、体型)、症状程度、同步治疗、治疗频率和所需效果。

[0088] 联合

[0089] 根据一个方面,本发明的化合物将进一步与至少一种可用于预防和/或治疗癌症的治疗策略联合施用,特别是与抗癌免疫疗法(如ACT疗法或免疫检查点阻断疗法)联合施用。

[0090] 根据另一个具体方面,本发明的化合物将与ACT疗法联合施用。

[0091] 根据另一个具体方面,本发明的化合物将与至少一种免疫检查点抑制剂联合施用。

[0092] 根据一个方面,提供了一种药物组合物,其包含至少一种Fc融合蛋白IL-10/Fc及其药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂以及至少一种可用于ACT疗法的剂。

[0093] 根据一个方面,提供了一种药物组合物,其包含至少一种Fc融合蛋白IL-10/Fc及其药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂以及至少一种免疫检查点抑制剂。

[0094] 本发明包括施用本发明的化合物或其制剂,其中所述化合物或其制剂是在可用于预防、治疗和/或稳定癌症的其他治疗方案或助剂(co-agent)(如抗癌治疗)之前施用于受试者、同时施用于受试者或顺序施用于受试者。

[0095] 与所述助剂同时施用的根据本发明的本发明化合物或其制剂可以在同一组合物或不同组合物中通过相同或不同的施用途施用。

[0096] 根据一个实施方案,提供了一种药物制剂,其包含与至少一种可用于治疗和/或稳定神经退行性疾病的助剂联合的本发明化合物和至少一种药学上可接受的载体。

[0097] 根据本发明的Fc融合蛋白IL-10/Fc的用途

[0098] 本发明提供了用于预防和/或治疗癌症之用途的Fc融合蛋白(IL-10/Fc)。

[0099] 根据一个具体方面,提供了用于抗癌免疫疗法之用途的Fc融合蛋白(IL-10/Fc)。

[0100] 根据一个更具体的方面,提供了用于与ACT免疫疗法特别是基于TCR-T细胞或CAR-T细胞或TIL疗法联合使用之用途的Fc融合蛋白(IL-10/Fc)。

[0101] 根据本发明的方法

[0102] 根据另一方面,本发明提供了一种预防或治疗癌症(特别是实体瘤)的方法。

[0103] 根据另一方面,本发明提供了一种预防和/或治疗以下癌症的方法:肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、乳腺癌、前列腺癌、癌症、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、肾癌、胃癌、支气管癌、胰腺癌、膀胱癌、肝癌和脑癌、皮肤癌。

[0104] 根据另一方面,本发明提供一种在受试者中诱导免疫的方法,所述方法包括在有需要的受试者中联合施用免疫检查点阻断剂(特别是抗癌免疫检查点阻断剂)与本发明的Fc融合蛋白IL-10/Fc。

[0105] 本文引用的参考文献通过引用整体并入本文。本发明的范围不受本文所描述的具体实施方案的限制,这些具体实施方案旨在作为本发明各个方面的单一说明,并且功能上等同的方法和组分也在本发明的范围内。实际上,除了本文所示和所描述的那些修改之外的本发明的各种修改对于本领域技术人员来说从前文的描述中将变得显而易见。此类修

改均旨在落入所附权利要求的范围内。

[0106] 已经对本发明进行了描述,以下实施例是以说明而非限制的方式呈现。

[0107] 本发明化合物的合成

[0108] 本发明的化合物可以使用以下常规方法和程序从容易获得的起始材料来制备。应当理解,在给出典型或优选的实验条件(即培养或反应温度、时间、试剂摩尔数、溶剂等)的情况下,也可以使用其他实验条件,除非另有说明。最佳反应条件可随所用的具体反应物或溶剂而变化,但此类条件可由本领域技术人员使用常规优化程序来确定。

[0109] 患者

[0110] 在一个实施方案中,根据本发明的患者患有任何类型的癌症。

[0111] 在一个实施方案中,根据本发明的患者患有在任何阶段的任何类型的癌症,包括非转移性癌症和转移性癌症。

[0112] 在一个具体实施方案中,根据本发明的患者患有肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、乳腺癌、前列腺癌、癌症、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、头颈癌、成胶质细胞瘤、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、肾癌、胃癌、支气管癌、胰腺癌、膀胱癌、肝癌和脑癌或皮肤癌。

[0113] 在一个更具体实施方案中,根据本发明的患者患有皮肤癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、食道癌、肝细胞癌、卵巢癌、结直肠癌和头颈癌和其他实体瘤或任何恶化前或恶性肿瘤。

[0114] 在一个更具体实施方案中,根据本发明的患者患有黑色素瘤。

[0115] 在一个进一步的实施方案中,根据本发明的受试者患有癌症或有罹患癌症的风险。

[0116] 根据本发明的化合物、组合物和方法特别适用于增强CD8⁺T细胞中的丙酮酸依赖性OXPHOS,因此与诸如在其中所描述的那些免疫疗法联合使用。

[0117] 本文引用的参考文献通过引用整体并入本文。本发明的范围不受本文所描述的具体实施方案和附图的限制,这些具体实施方案和附图旨在作为本发明各个方面的单一说明,并且功能上等效的方法和组分也在本发明的范围内。说明本发明的实施例不旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0118] 实施例

[0119] 为了支持根据本发明的本发明化合物的有效性,进行了以下研究。

[0120] 实施例1:本发明的Fc融合蛋白IL-10/Fc的制备

[0121] 对重组人IL-10和IgG1 Fc融合蛋白(SEQ ID NO:4的IL-10/Fc)(图1a)进行了加工,所述融合蛋白可通过IL-10/Fc融合蛋白的IL-10结构域与小鼠IL-10受体或人IL-10受体(IL-10R)发生交叉反应(Qiao et al.,2019,Cancer Cell 35,901-915.e4)。因此,IL-10/Fc融合蛋白可以同时小鼠和人类的CD8⁺T细胞发挥作用。

[0122] IL-10/Fc融合蛋白通过使用携带有IL-10/Fc融合基因(如之前在上述Guo et al.,2012,或在Zheng et al.,1997,J.Immunol.,158,4507-4513 or in Steele et al.,1995,J.Immunol.,154,5590-5600中所描述的)的商业哺乳动物表达载体如pcDNA3.1或pSectag2A由HEK293 free style细胞表达,然后在培养7天后通过离心收获含有IL-10/Fc的培养上清液。

[0123] IL-10/Fc融合蛋白首先被蛋白A柱捕获,然后通过Superdex 200增加柱进一步纯

化。将纯化的IL-10/Fc融合蛋白等分并储存在-80℃备用。SDS-PAGE和HPLC分析证明IL-10/Fc的纯度达到了95%。使用HiTrap蛋白A亲和层析柱从通过0.22-μm膜过滤的澄清的表达上清液中捕获重组IL-10/Fc,用5个柱体积的结合缓冲液洗涤层析柱,并用洗脱缓冲液(0.05M 柠檬酸钠,0.3M NaCl,pH 3.0)进行洗脱。洗脱的蛋白质立即收集到中和缓冲液(1.0M Tris-HCl,pH 10.0)中。洗脱的蛋白质通过10kDa膜超滤(Vivaspin)浓缩,并用PBS以1.0mL/分钟的流速使用Superdex 200增加尺寸排阻色谱法进一步纯化,将纯化的蛋白质等分并储存在-80℃。

[0124] 实施例2:本发明的融合蛋白IL-10/Fc在IL-10介导的代谢重编程中的作用

[0125] 在B16F10小鼠黑色素瘤细胞和识别gp100同源抗原的活化Pmel CD8⁺ T细胞的共培养系统中,CD8⁺ T细胞的基础和最大耗氧率(OCR)在用本发明的融合蛋白IL-10/Fc处理后均升高,而细胞外酸化率(ECAR)保持不变(图2a-c)。用IL-10/Fc处理的CD8⁺ T细胞的OCR与EACR的比值显著增加(图2d),这表明IL-10信号传导积极促进了T细胞氧化磷酸化(OXPHOS)。因此,T细胞计数和细胞毒性大大增强(图2e和图2f)。重要的是,未在没有抗原刺激的CD8⁺ T细胞中观察到这种代谢重编程效应(图2d),这表明IL-10介导的代谢重编程是TCR信号传导依赖性的。类似地,融合蛋白IL-10/Fc被发现在启动期期间也促进了CD8⁺ T细胞的OXPHOS并增强了T细胞增殖(图1)。

[0126] 接下来,几种途径特异性抑制剂例如2-脱氧-D-葡萄糖、etomoxir或UK5099被用于研究(Hildyard et al.,2005,Biochim.Biophys.Acta-Bioenerg.,1707,221-230)。在使用或不使用指定抑制剂的情况下,将每毫升100万个的静息的Pmel T细胞用可溶性αCD3四聚体(0.1μg/ml)重新刺激2天,然后通过FACS分析对T细胞计数进行分析,这是IL-10/Fc控制CD8⁺ T细胞代谢的分子基础(图2g)。然后,通过2-脱氧-D-葡萄糖(2DG)抑制葡萄糖摄取被发现显著损害了IL-10/Fc对CD8⁺ T细胞增殖的作用(图2h)。限制葡萄糖会损害IL-10/Fc对CD8⁺ T细胞增殖的影响(图1e)。有趣的是,ETO对脂肪酸依赖性氧化的抑制作用甚至进一步增强了通过IL-10/Fc的OXPHOS(图2i)。这些结果可能表明本发明的Fc融合蛋白增加了依赖于丙酮酸氧化的OXPHOS而不是依赖于脂肪酸β-氧化的OXPHOS,这进一步通过应用线粒体丙酮酸载体(MPC)抑制剂UK5099几乎消除了IL-10/Fc对T细胞增殖和代谢重编程的影响得到了证实(图2h和图2i)。

[0127] 这些数据支持了本发明的融合蛋白能够重编程T细胞代谢以通过丙酮酸依赖性方式在TCR刺激时增加OXPHOS来促进T细胞增殖,这可能表明本发明的融合蛋白也可以通过重编程T细胞代谢促进肿瘤反应性CD8⁺ T在TME中进行细胞扩增。

[0128] 实施例3:本发明融合蛋白的体内抗肿瘤作用

[0129] 通过各种试剂在CD8⁺ T细胞中增强OXPHOS或抑制糖酵解代谢促进了TME中的CD8⁺ T细胞增殖、记忆发育和抗肿瘤功能(Zhang et al.,2017,Cancer Cell 32,377-391.e9; Chowdhury et al.,2018,Cancer Immunol.Res.6,1375-1387;Sukumar et al.,2013,123,4479-4488)。基于观察到的本发明的Fc融合蛋白对CD8⁺ T细胞的代谢调节作用,针对提高T细胞过继免疫治疗对实体瘤的功效,对IL-10/Fc能否实现CD8⁺ T细胞的体内代谢干预进行了研究。

[0130] 为克服在TME中的T细胞耗竭,IL-10/Fc与TCR转基因CD8⁺ T细胞(Pmel CD8⁺ T细胞或OTI CD8⁺ T细胞)或HER2 CAR-T细胞的ACT一起的体内抗肿瘤作用分别在几种肿瘤模型

(例如B16F10(低免疫原性、高侵袭性小鼠黑色素瘤模型)、YUMM1.7-OVA(小鼠黑色素瘤模型)或MC-38-HER2(小鼠结肠癌))中。

[0131] 进行了如图3a所示的B16F10小鼠黑色素瘤模型中的治疗方案,观察到与PBS组相比,仅用IL-10/Fc或ACT细胞的治疗略微控制了肿瘤生长,但大多数小鼠最终死于肿瘤负荷的增加(图4a,图3b-图3d)。引人注目的是,IL-10/Fc和ACT疗法的联合治疗(ACT通过静脉内注射进行,然后通过瘤内注射施用IL-10/Fc)诱导了肿瘤的显著消退,从而导致90%的携带B16F10小鼠黑色素瘤的小鼠获得了持久治愈(图4b,图3e)。即使IL-10/Fc的剂量频率降低(图3f),IL-10/Fc和ACT的联合治疗也显示出与之前相当的功效(图3j-g)。值得注意的是,约80%(11/14)的经过治疗的长期幸存者拒绝了在最后一次注射后3个月的二次B16F10肿瘤细胞攻击(每只小鼠10万个肿瘤细胞)(图4c)。

[0132] 为了测试联合疗法的稳健性,在对表达OVA的小鼠黑色素瘤模型(YUMM1.7-OVA)中将IL-10/Fc治疗与OT-I CD8⁺ T细胞进行联合(Meeth et al.,2016,Pigment Cell Melanoma Res.29,590-597;Lane et al.,2018,J.Exp.Med.215,3057-3074)。皮下注射肿瘤细胞(每只小鼠100万个肿瘤细胞)并在开始治疗前使肿瘤细胞生长至高肿瘤负荷(尺寸>60mm²或150mm³)(Pai et al.,2019,Immunity,50,477-492.e8)。施用IL-10/Fc和OT-I CD8⁺ T细胞的ACT诱导了肿瘤的显著消退,而OT-I CD8⁺ T细胞ACT本身仅显示了短暂的肿瘤消退(图4d)。此外,IL-10/Fc和OT-I CD8⁺ T细胞ACT治疗组中60%(5/8)的小鼠被治愈,而单独的ACT组没有小鼠被治愈(图4e)。

[0133] 还测试了用嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞的联合疗法,并使用MC-38进行了体内抗肿瘤实验,MC-38是一种表达人表皮生长因子受体2(HER2)的鼠结肠腺癌。MC-38通过使用包含人HER2编码序列的逆转录病毒构建体进行转导。

[0134] 观察到IL-10/Fc和HER2 CAR-T细胞强烈抑制了MC-38-HER2肿瘤生长(图4f),最终治愈了联合疗法组中80%(4/5)的荷瘤小鼠,而HER2 CAR-T细胞本身具有非常微弱的治疗益处,并且在实验结束时没有一只小鼠存活下来(图4g)。

[0135] 那些数据支持了在具有预先建立的实体瘤的同系小鼠模型和异种移植小鼠模型中,本发明的融合蛋白能够通过促进T细胞介导的肿瘤消退来增强过继性T细胞疗法以根除已建立的肿瘤。

[0136] 实施例4:本发明的融合蛋白对肿瘤的免疫浸润的体内作用

[0137] 为了了解IL-10/Fc显著提高ACT功效的能力,在B16F10肿瘤模型中分析了对肿瘤的免疫浸润(图5a)。

[0138] 将B16F10肿瘤细胞(1×10^6)皮下接种于C57B1/6小鼠,并使其建立肿瘤6天。然后小鼠在第6天接受了PBS、IL-10/Fc、 5×10^6 个活化pme1-1CD8⁺ T细胞的单次过继转移(ACT)或IL-10/Fc和ACT联合治疗(联合)。小鼠接受了4次如实验方案所示的IL-10/Fc或PBS注射。然后在第14天处死小鼠并通过流式细胞术对TIL进行分析。

[0139] 结果表明,与单独使用ACT的组相比,在接受联合治疗的组中,IL-10/Fc显著增加了TME中的肿瘤浸润性T细胞,特别是CD8⁺ T细胞(图6a),但未增加自然杀伤(NK)细胞或树突细胞(DC)(图5b)。通过肿瘤切片的免疫荧光染色证实了该结果(图6b)。此外,IL-10/Fc在TME中显著降低了Treg的百分比并增加了CD8⁺/Treg细胞的比例(图5c)。

[0140] 这些数据表明,IL-10/Fc和ACT协同重塑了TME的免疫细胞组成,尤其是CD8⁺ T细

胞,以增强抗肿瘤免疫。此外,IL-10/Fc治疗还显著增强了肿瘤中内源性和过继转移的Pmel CD8⁺ T细胞的多功能性(图6h)。

[0141] 为了确定哪个CD8⁺ T细胞亚群响应于IL-10/Fc治疗并有助于显著提高的疗效,在肿瘤浸润性CD8⁺ T细胞上对激活/耗竭标志物进行染色。用抗小鼠CD45.2、CD4、CD8、PD-1和TIM-3荧光抗体对从肿瘤组织中分离的TIL进行染色,然后通过FACS分析对其进行分析。最近有报道称,之前定义为耗竭的PD-1+TIM-3+CD8⁺ T细胞实际上是人类肿瘤微环境内具有高细胞毒性的高度增殖、克隆、动态分化的细胞群(Miller et al.,2019,Nat.Immunol.20,326-336;Li et al.,2019,Cell,176,775-789.e18)。这些结果促使我们研究IL-10/Fc治疗对这一特定亚群PD-1+TIM-3+CD8⁺ T细胞的代谢重编程的影响的能力。

[0142] 在体内观察到的这种特定群体是通过在体外(in vitro)使用抗CD3 TCR触发(模拟体内持续的抗原刺激)而获得的。将每毫升100万个的静息的Pmel T细胞用可溶性 α CD3四聚体(0.1 μ g/ml)重新刺激2天。

[0143] 观察到IL-10/Fc治疗显著增加了具有类似“耗竭T细胞”表型的CD8⁺ T细胞中的PD-1+Tim-3+亚群的比例(图6c)。

[0144] 进一步的分析表明,IL-10/Fc选择性扩增了肿瘤中内源性(5.9倍)和过继转移的Pmel CD8⁺ T细胞(12.9倍)中的PD-1+Tim-3+亚群而不是其他亚群(图6d和图6e)。与这一观察结果一致的是,IL-10受体的表达在TME中的PD-1+Tim-3+CD8⁺ T亚群上高度上调(图6f)。

[0145] 尽管PD-1+Tim-3+亚群通常被认为是“耗竭T细胞”,但我们注意到,在联合治疗组中的该亚群在内源性CD8⁺ T细胞和Pmel CD8⁺ T细胞中均显示出了降低的PD-1表达水平(图6g),这可能表明效应子功能的重振。与推测一致的是,通过IL-10/Fc处理,PD-1+TIM-3+CD8⁺ T细胞亚群中的多功能效应子细胞大大增加(图6i)。高百分比的肿瘤内PD-1+Tim-3+CD8⁺ T细胞表现出高细胞毒性和增殖能力(图6j和图6k)。进一步的分析表明,PD-1+Tim-3+CD8⁺ T细胞在中枢淋巴器官中获得记忆表型,这可能有助于记忆CD8⁺ T细胞的发育(图6l)。

[0146] 一致地,在T细胞和B16F10共培养系统中,IL-10/Fc处理的PD-1+Tim-3+CD8⁺ T细胞的细胞数量和杀伤效率也相应增加(图6j和图6k)。

[0147] 如预料的,通过IL-10/Fc的处理,PD-1+Tim-3+CD8⁺ T亚群的OCR显著增加(图6m),这表明PD-1+Tim-3+CD8⁺ T亚群在通过IL-10/Fc进行代谢重编程后,优先使用OXPHOS而不是糖酵解。

[0148] 总之,这些结果表明,通过使用本发明的Fc融合蛋白的代谢干预通过增加OXPHOS有效地重振了CD8⁺ TIL,特别是肿瘤浸润性PD-1+Tim-3+CD8⁺ T细胞(细胞毒性T细胞),以重新获得/维持细胞因子分泌能力、增殖潜力以及长期记忆的形成,其中与没有经过IL-10/Fc处理的小鼠相比,经过IL-10/Fc处理的小鼠的PD-1+TIM-3+CD8⁺ T细胞亚群在过继转移CD8⁺ T细胞和内源性CD8⁺ T细胞中分别增加到12.9倍和5.9倍。

[0149] 类似地,IL-10/Fc也增强了检查点阻断疗法对小鼠中已建立的实体瘤的性能(图7)。IL-10/Fc和 α -PD-1抗体的联合治疗显著抑制了肿瘤的生长并促进了CT-26荷瘤小鼠的存活(图7b-图7d)。

[0150] 因此,本发明的Fc融合蛋白为针对实体瘤的高效ACT癌症免疫疗法如用于个体化癌症免疫疗法的从肿瘤组织中分离的TCR-T、CAR-T以及TIL提供了新的代谢干预策略。

[0151] 此外,基于这些数据,本发明的Fc融合蛋白的使用被认为是可用于免疫检查点阻断疗法的安全且有效的潜在增强剂。

[0152] 序列表

[0153] SEQ ID NO:1-人IL-10

[0154] SPGQGTQSENSCTHFGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFK
GYLGCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPC
ENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

[0155] SEQ ID NO:2-IgG1 Fc

[0156] APEVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0157] SEQ ID NO:3-柔性铰链1

[0158] EPKSCDKTHTCPPCP

[0159] SEQ ID NO:4-IL-10/Fc融合蛋白1

[0160] SPGQGTQSENSCTHFGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFK
GYLGCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPC
ENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNEPKSCDKTHTC
PPCPAPEVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0161] SEQ ID NO:5-IgG2 Fc

[0162] APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0163] SEQ ID NO:6-柔性铰链2

[0164] ERKCCVECP

[0165] SEQ ID NO:7-IL-10/Fc融合蛋白2

[0166] SPGQGTQSENSCTHFGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFK
GYLGCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPC
ENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNERKCCVECP
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0167] SEQ ID NO:8-IgG3 Fc

[0168] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

[0169] SEQ ID NO:9-柔性铰链3

- [0170] ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
- [0171] SEQ ID NO:10-IL-10/Fc融合蛋白3
SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFK
GYLGCAALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPC
ENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNELKTPLGDTTH
- [0172] TPCRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPS
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGDSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNIFSCSVMEALHNRFQKSLSLSPGK
- [0173] SEQ ID NO:11-IgG4 Fc
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLXGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPS
- [0174] SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGDSFFLYSRLTVDKSXWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
- [0175] SEQ ID NO:12-柔性铰链4
- [0176] ESKYGPPCPPCP
- [0177] SEQ ID NO:13-IL-10/Fc融合蛋白4
SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFK
GYLGCAALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPC
ENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNESKYGPPCPPCP
- [0178] APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLXGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPS
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGDSFFLYSRLTVDKSXWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
- [0179] SEQ ID NO:14-柔性铰链5
- [0180] GGGSGGGGSCPPCP
- [0181] SEQ ID NO:15-CPPCP结构域
- [0182] CPPCP
- [0183] SEQ ID NO:16-柔性铰链6
- [0184] GGSCPPCP
- [0185] SEQ ID NO:17-柔性铰链7
- [0186] GGGSCPPCP。

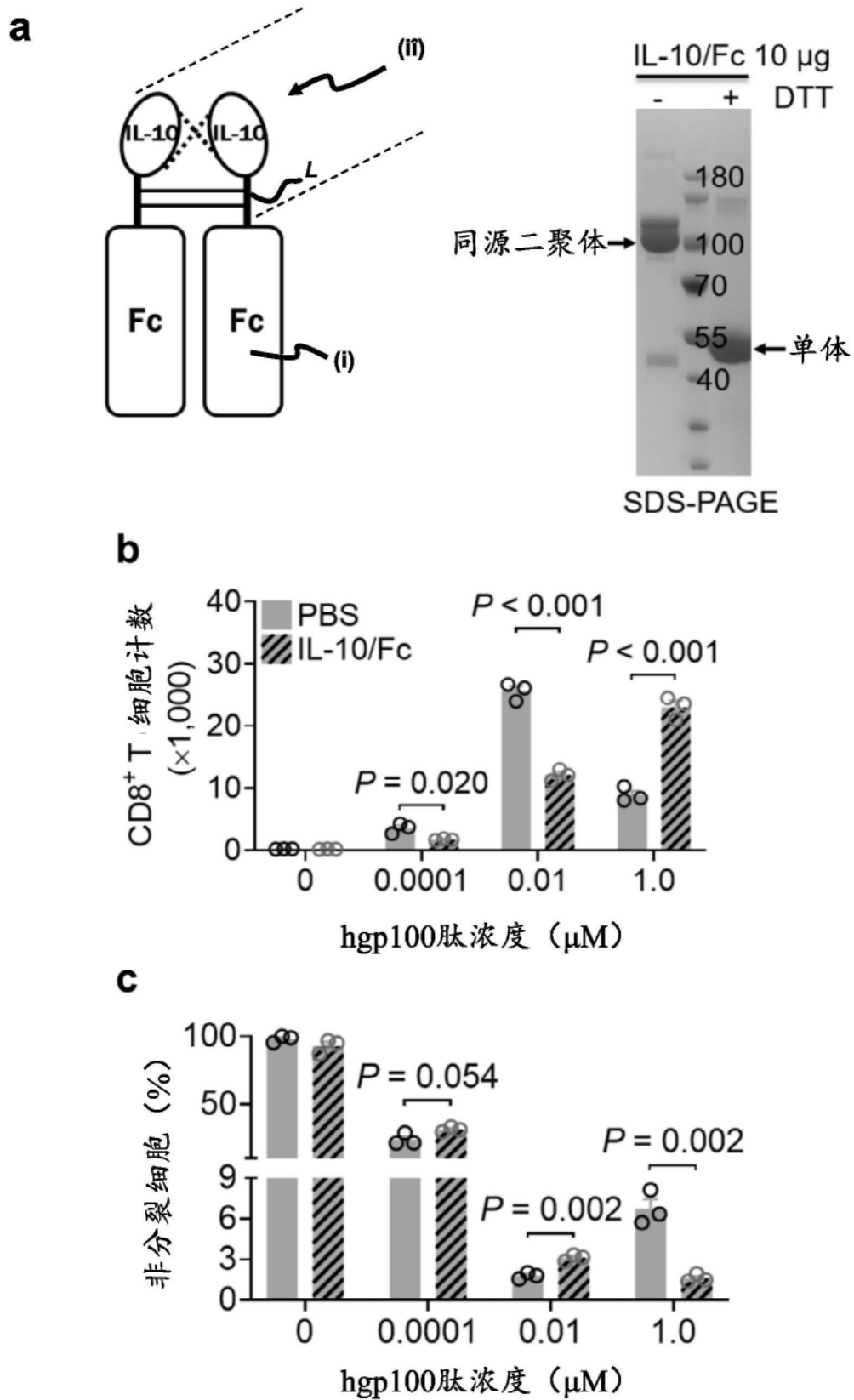


图1

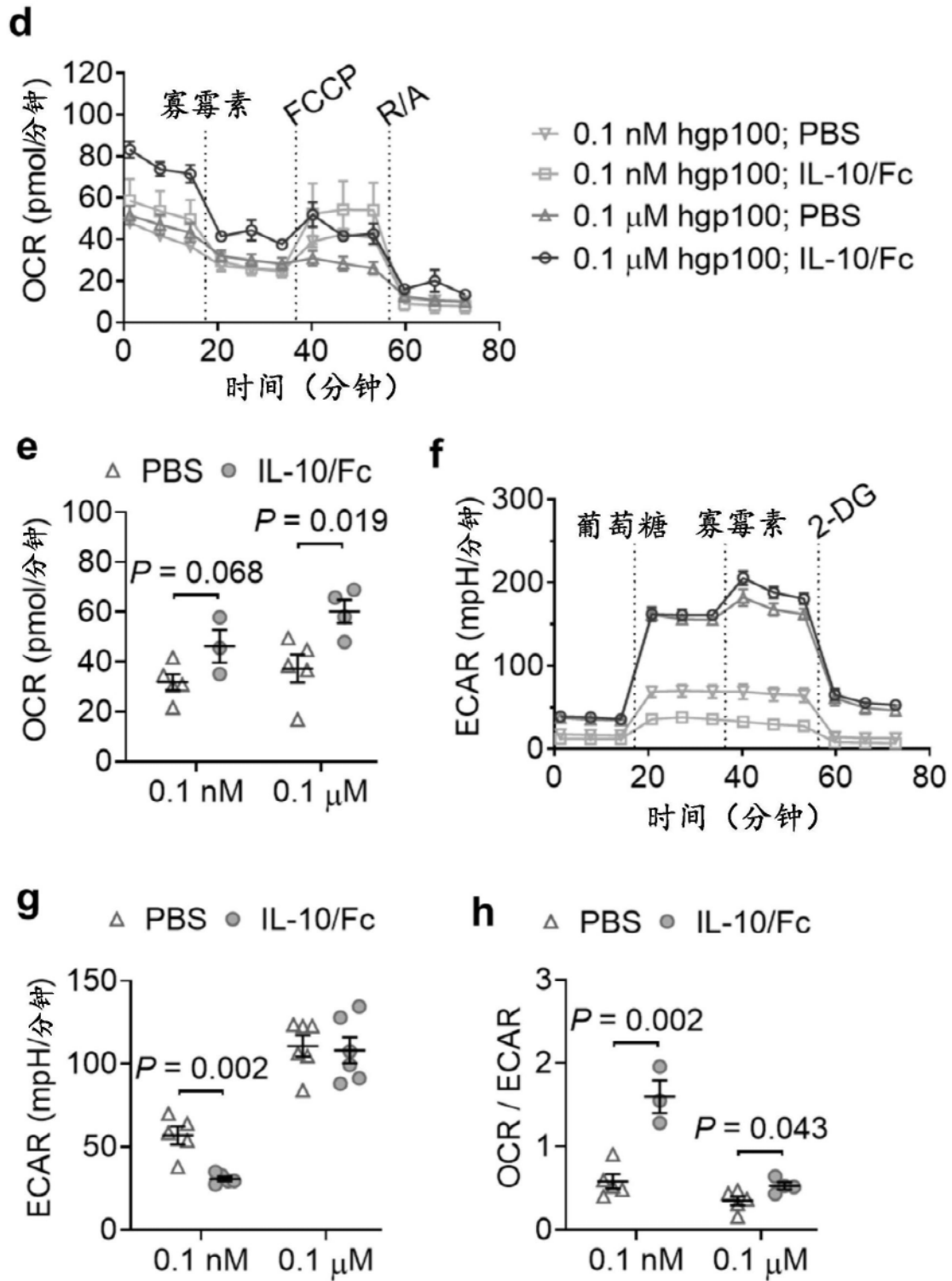


图1 (接上页)

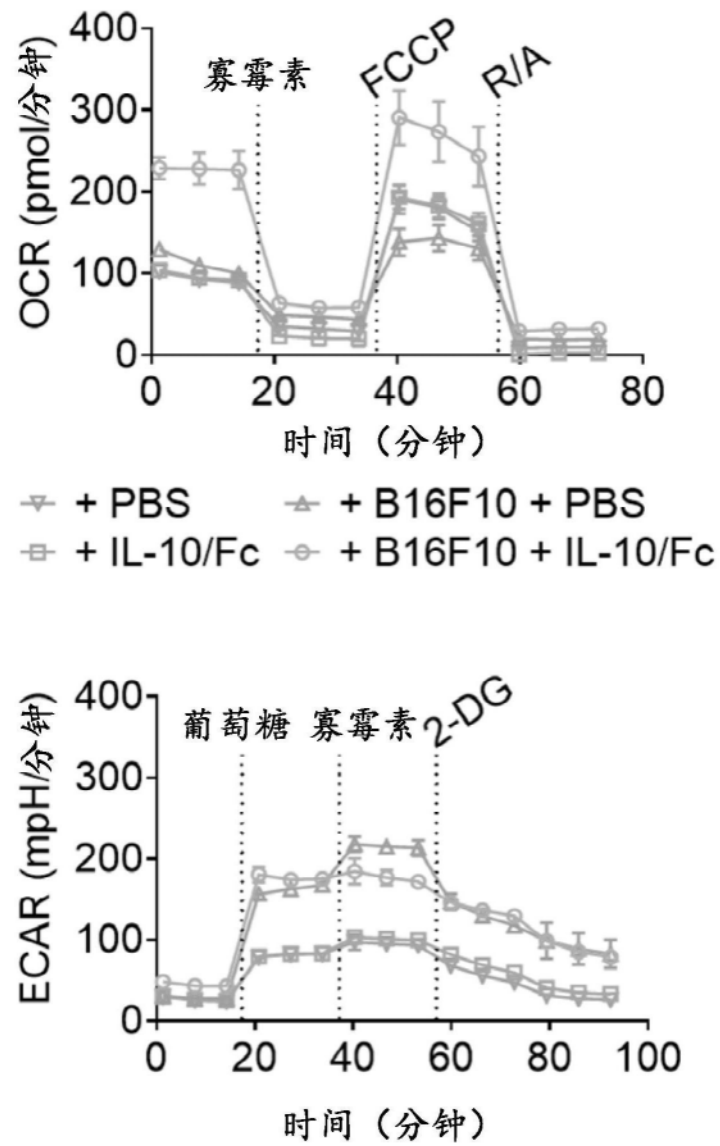
a

图2

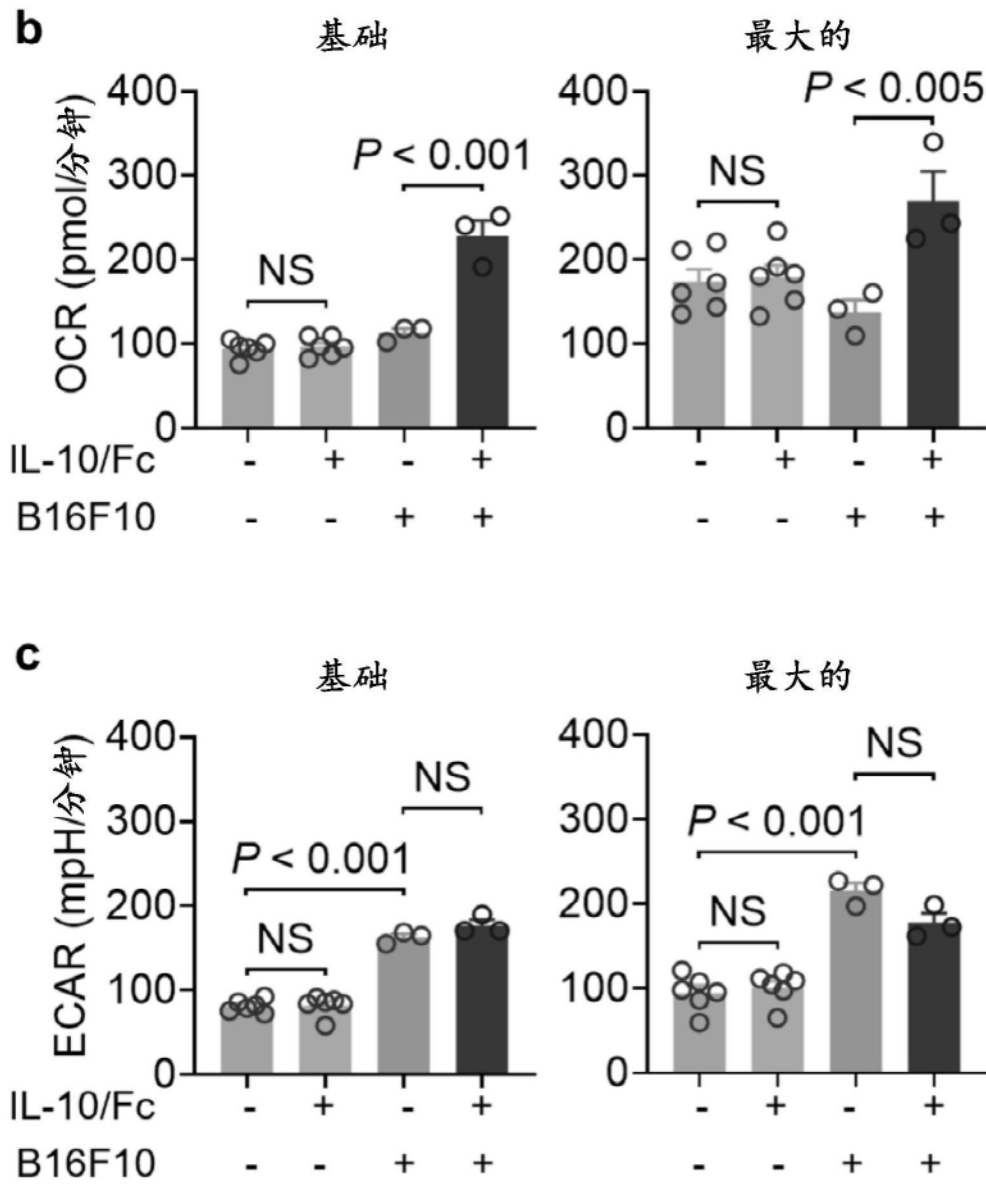


图2 (接上页)

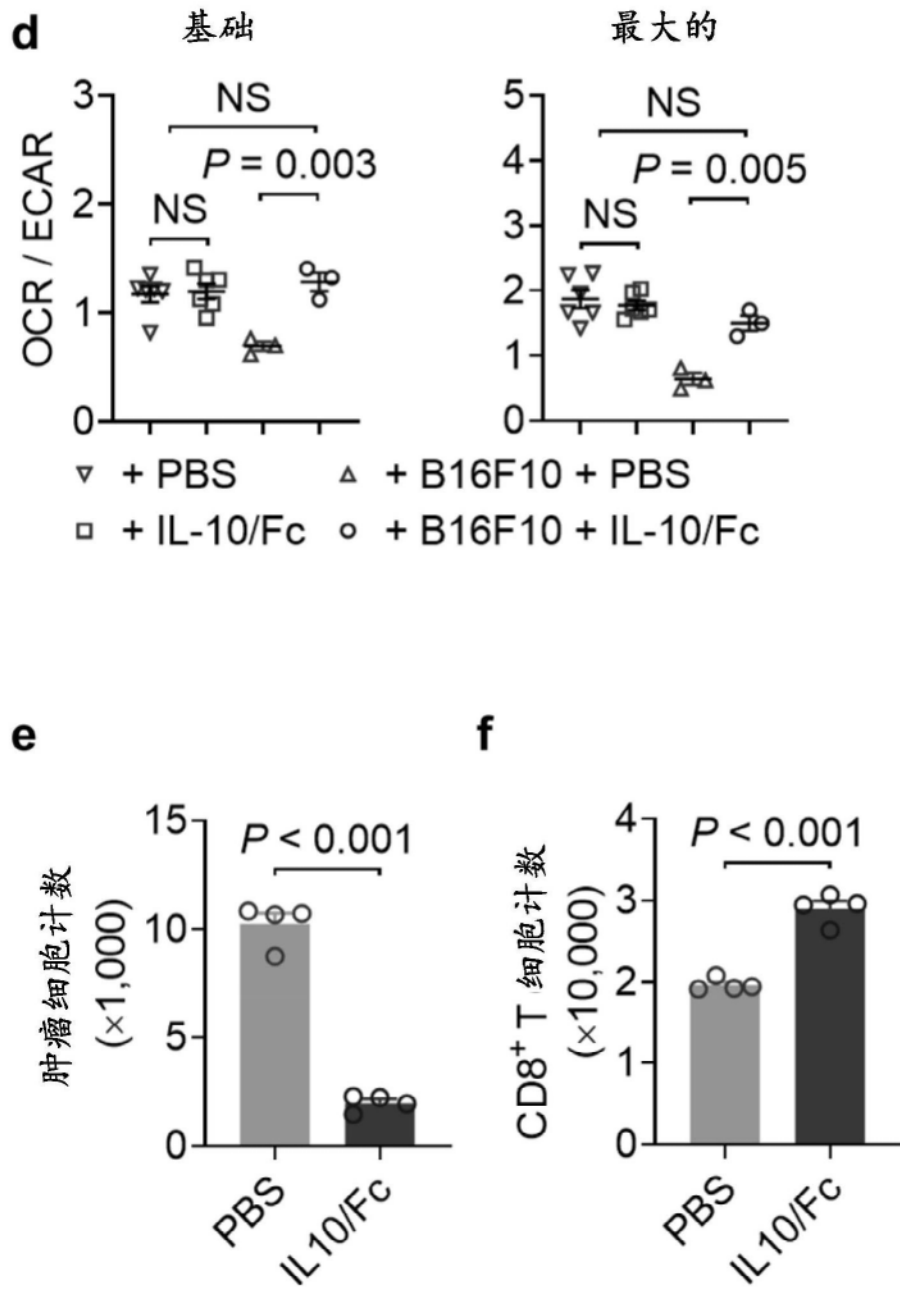


图2(接上页)

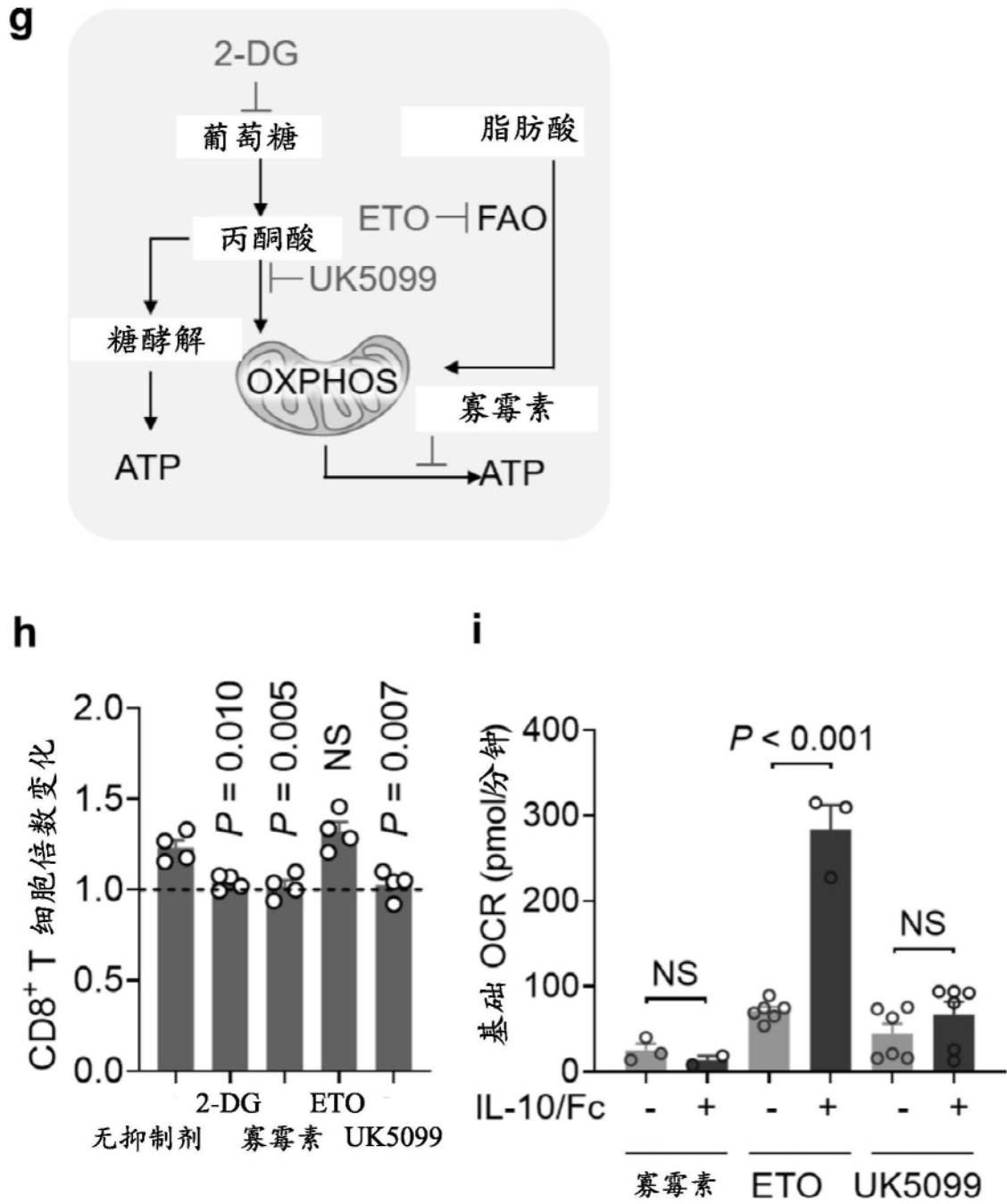


图2(接上页)

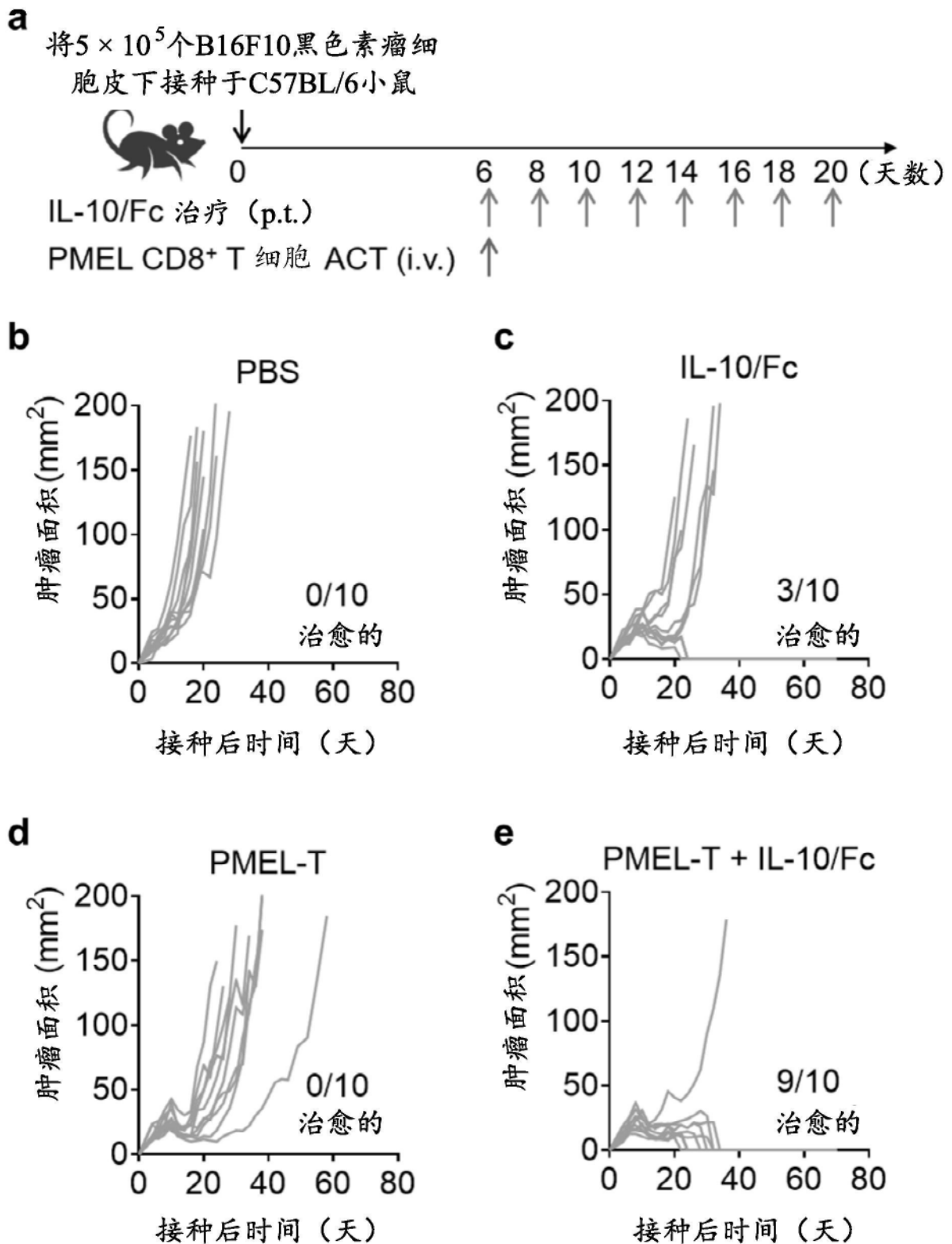
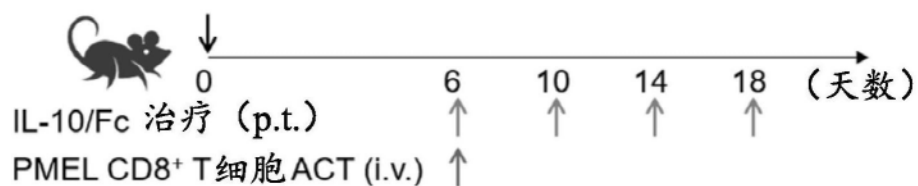
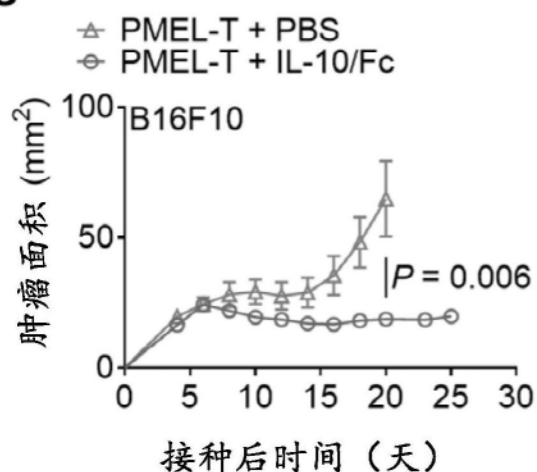


图3

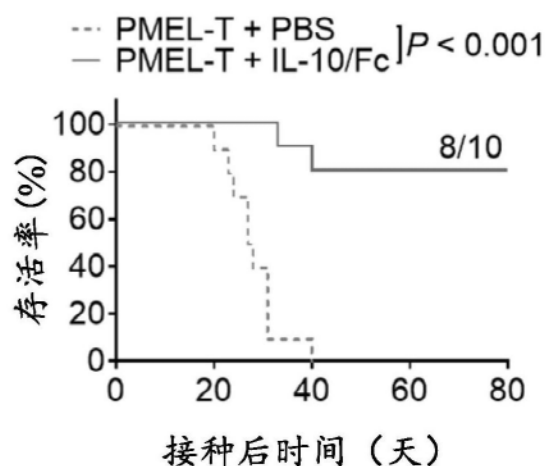
f 将 5×10^5 个 B16F10 黑色素瘤细胞皮下接种于 C57BL/6 小鼠



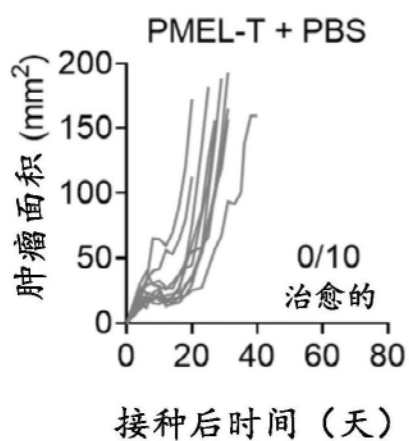
g



h



i



j

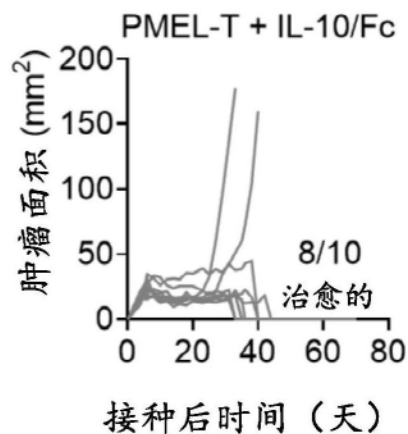


图3(接上页)

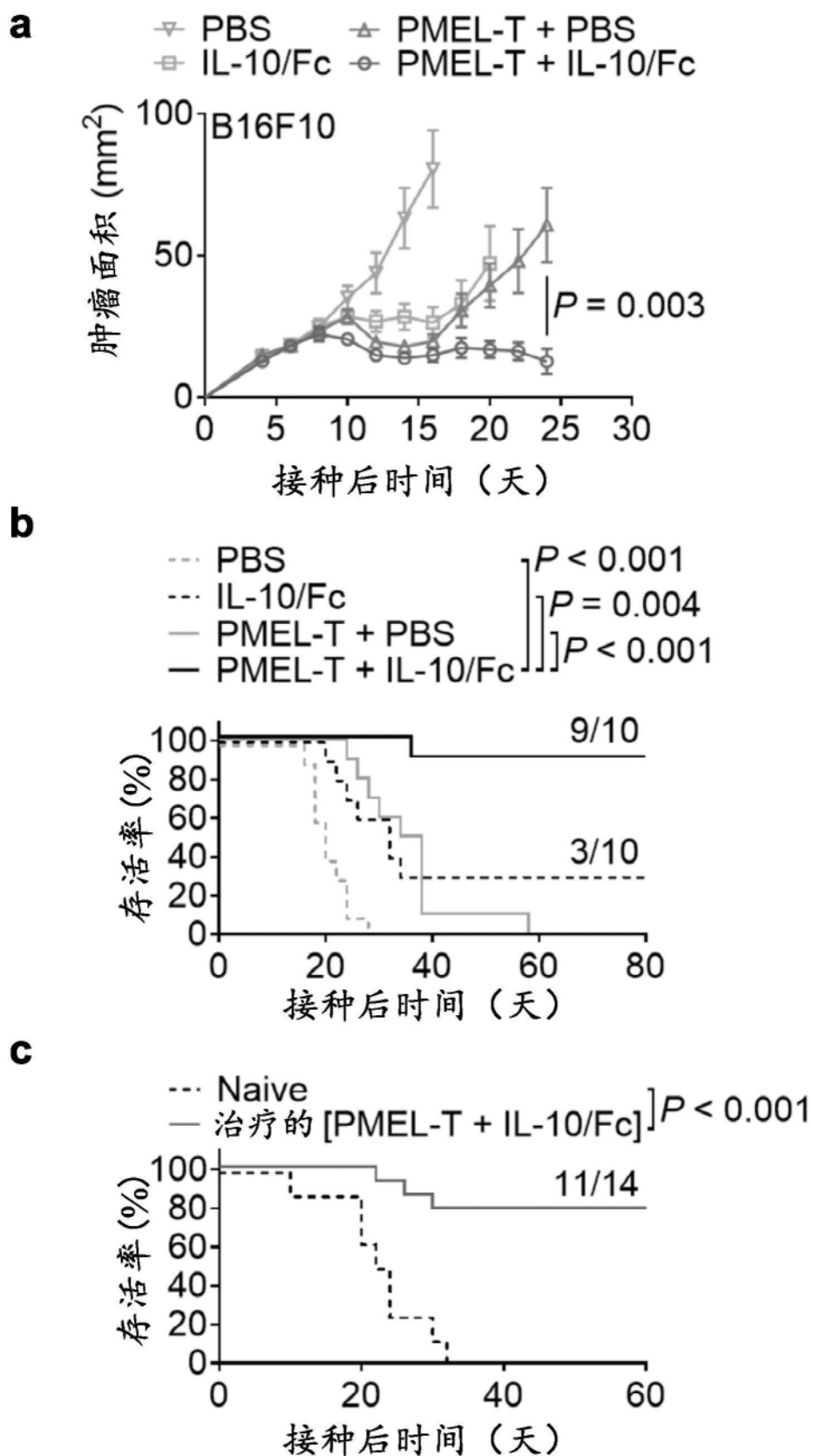


图4

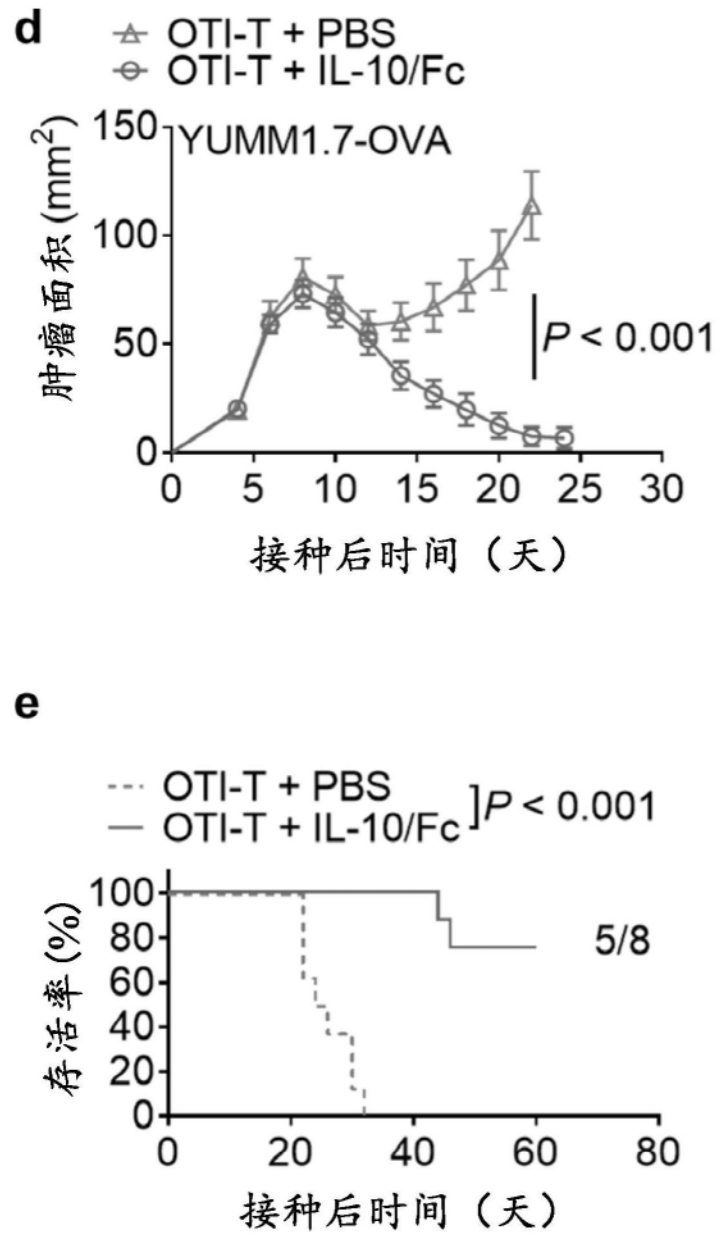


图4(接上页)

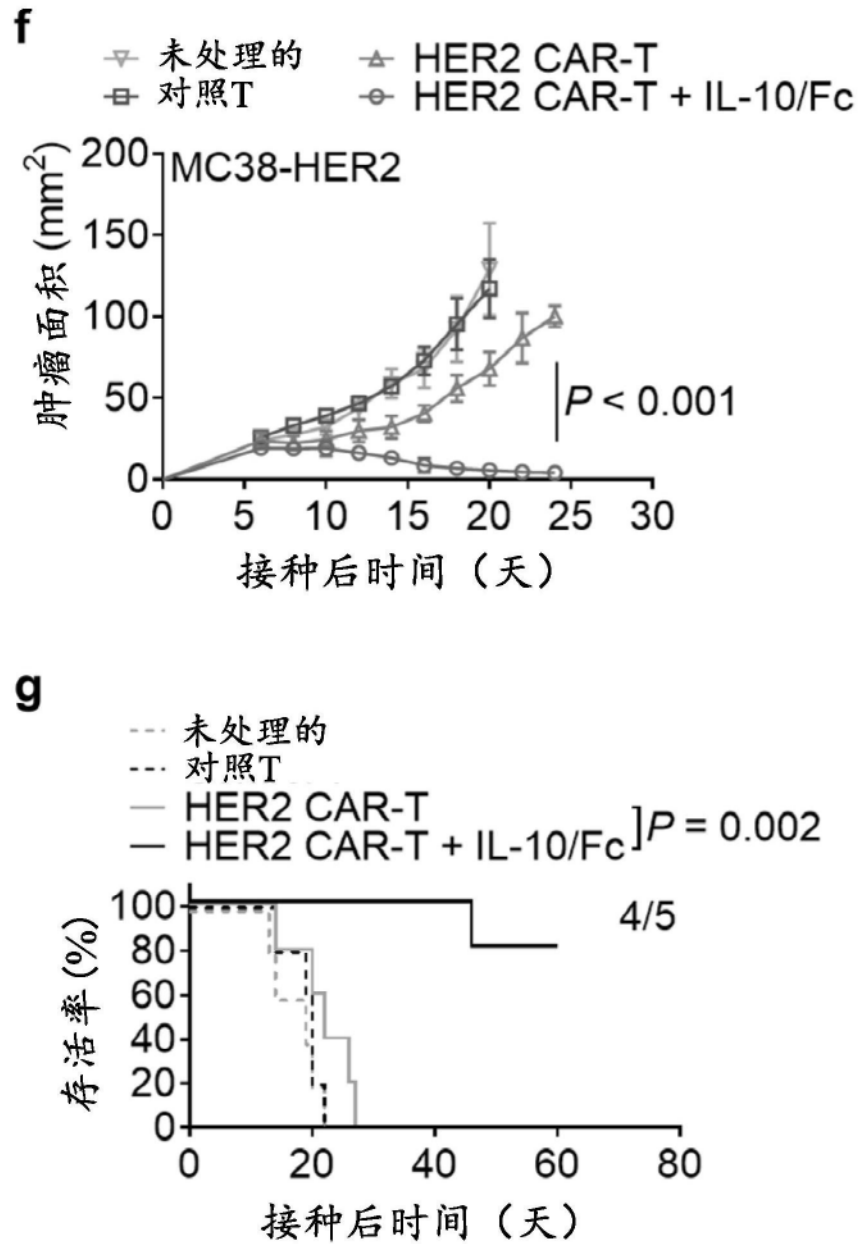


图4(接上页)

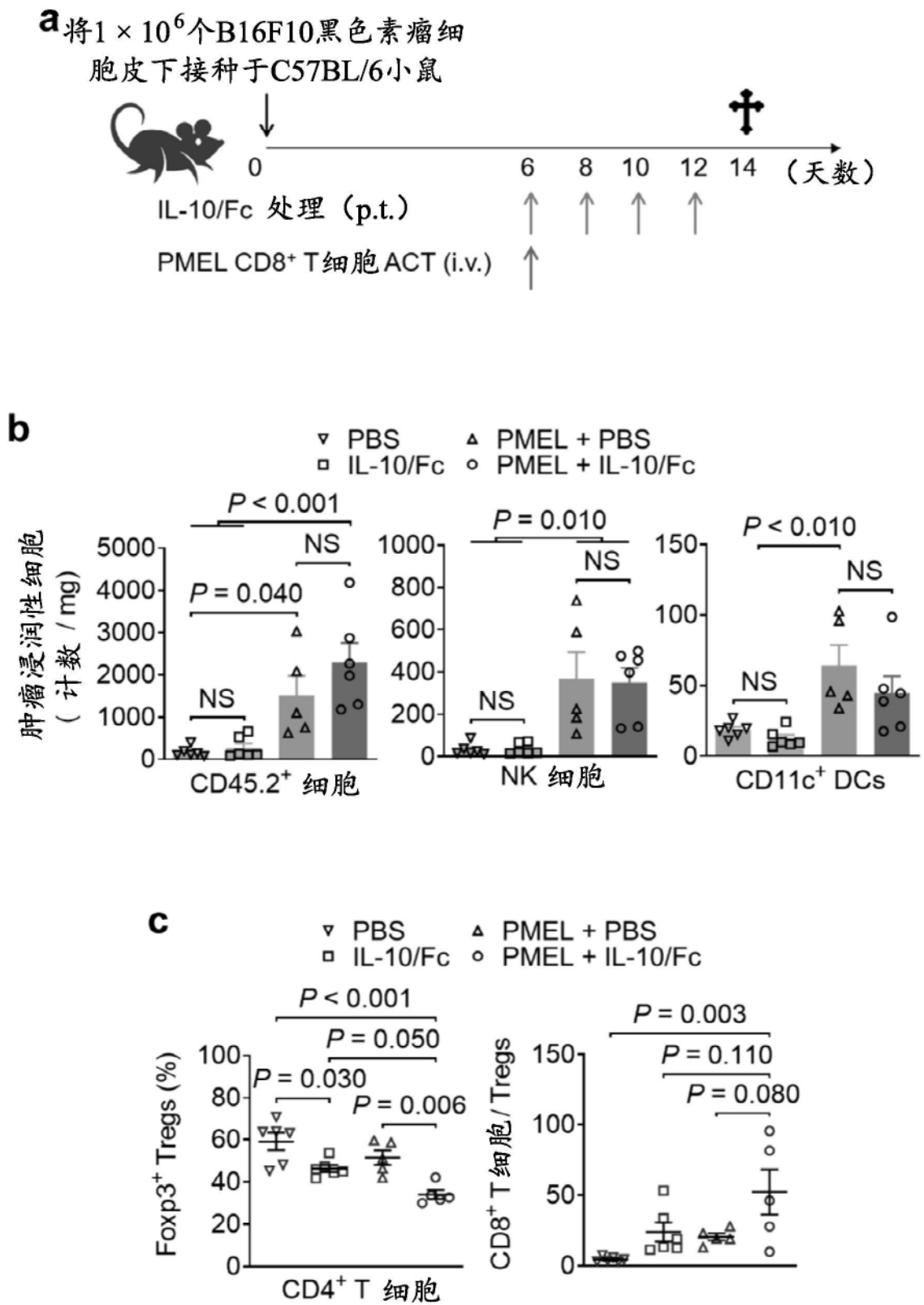


图5

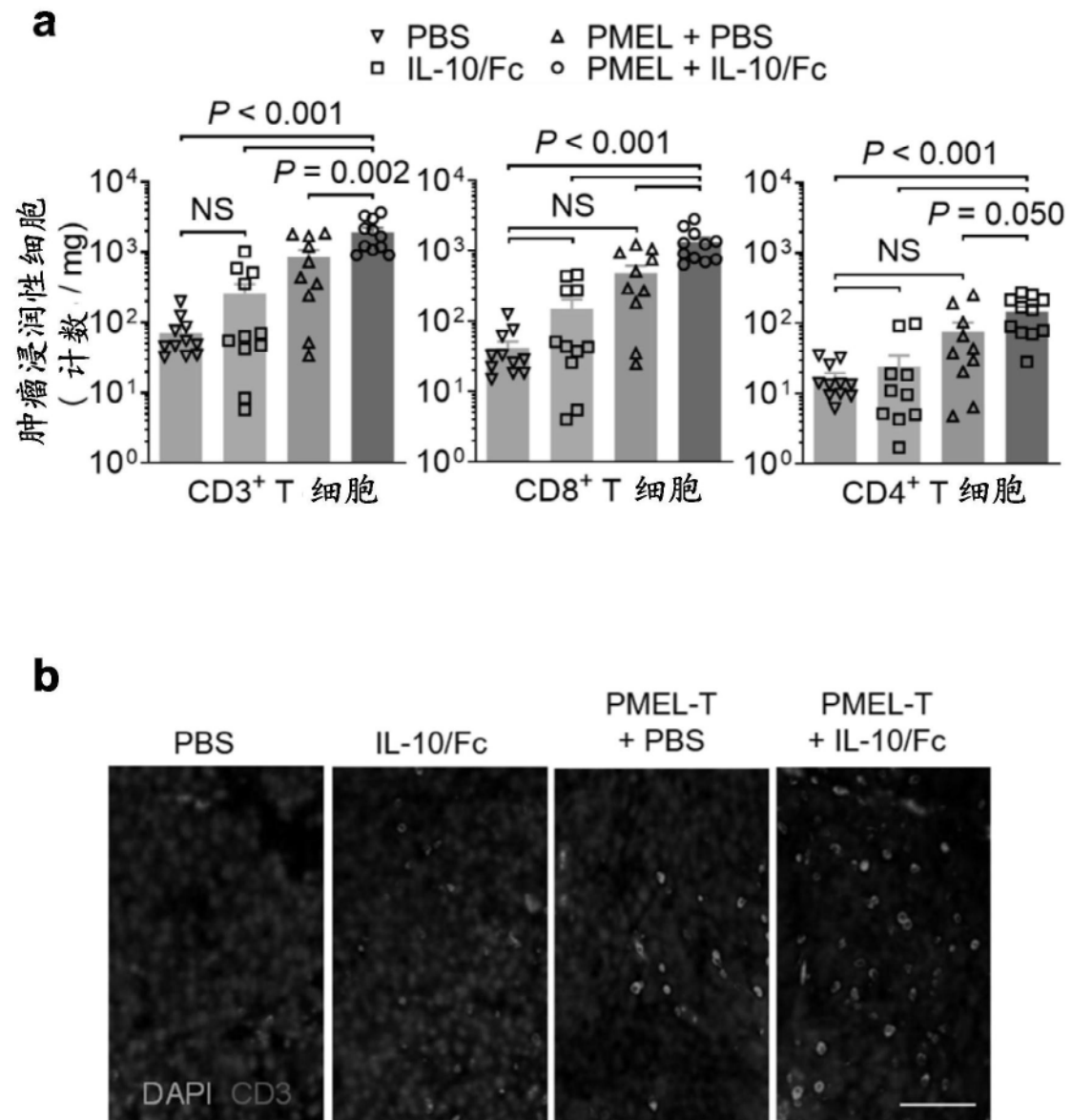


图6

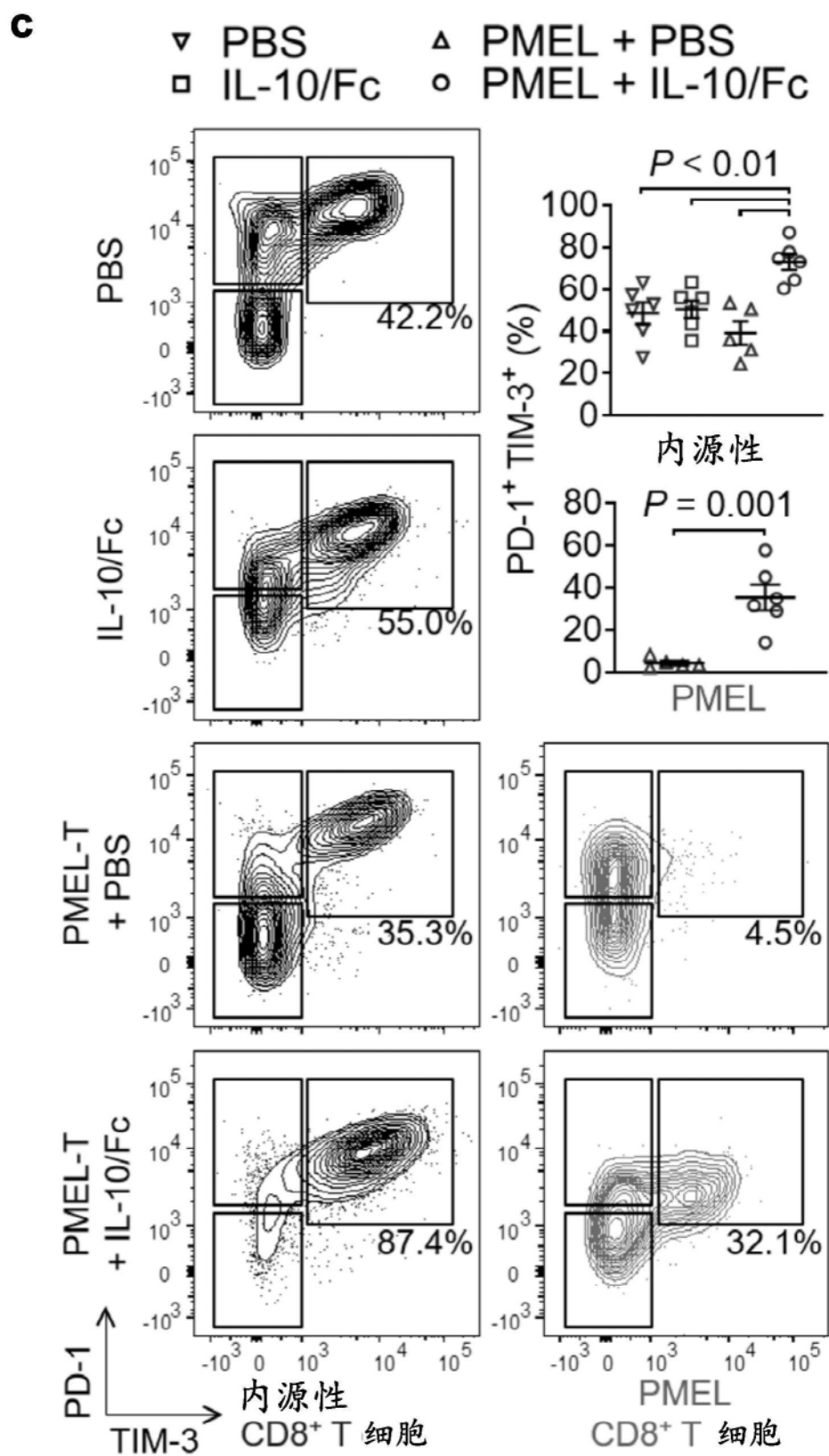


图6 (接上页)

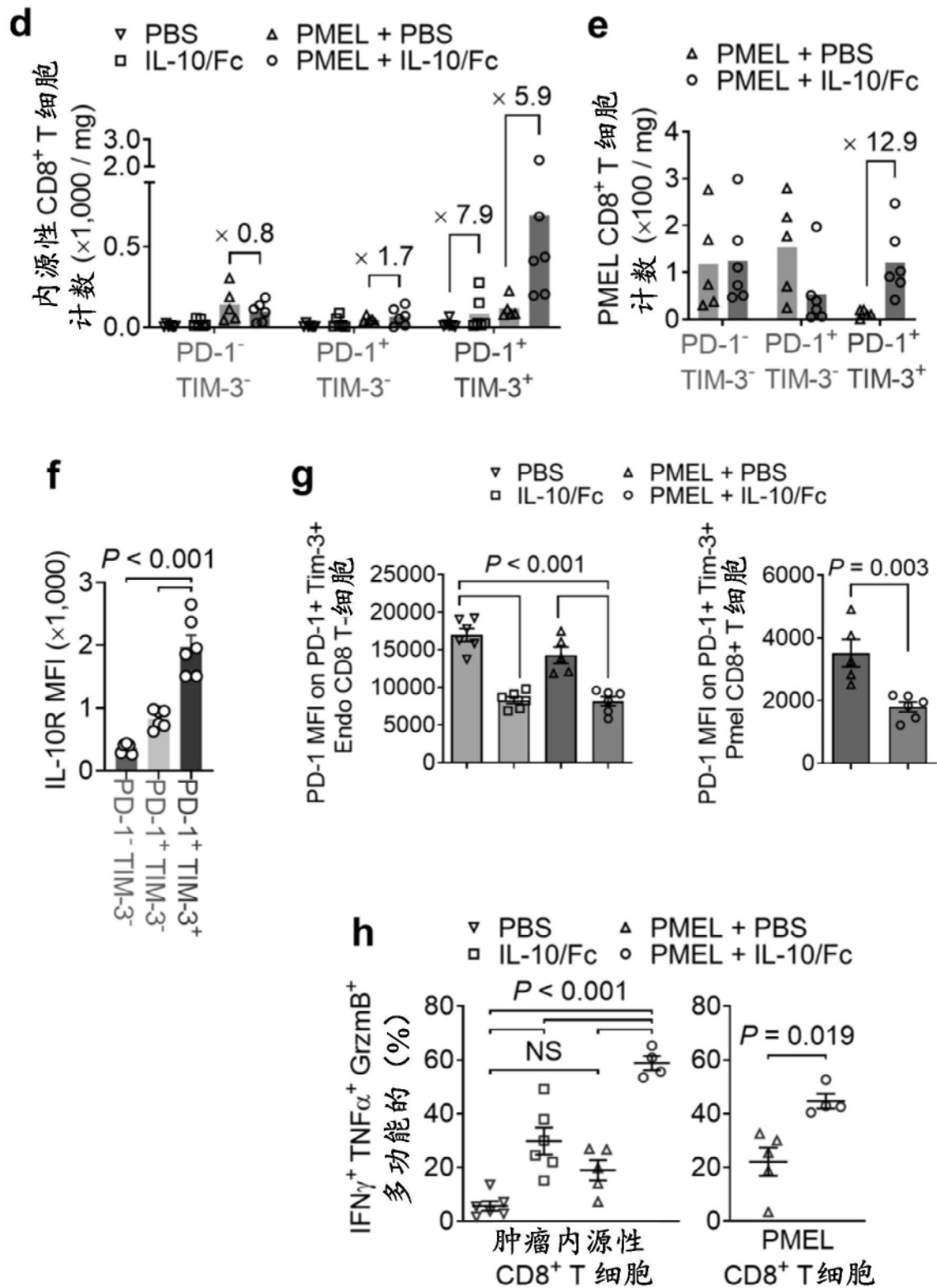


图6 (接上页)

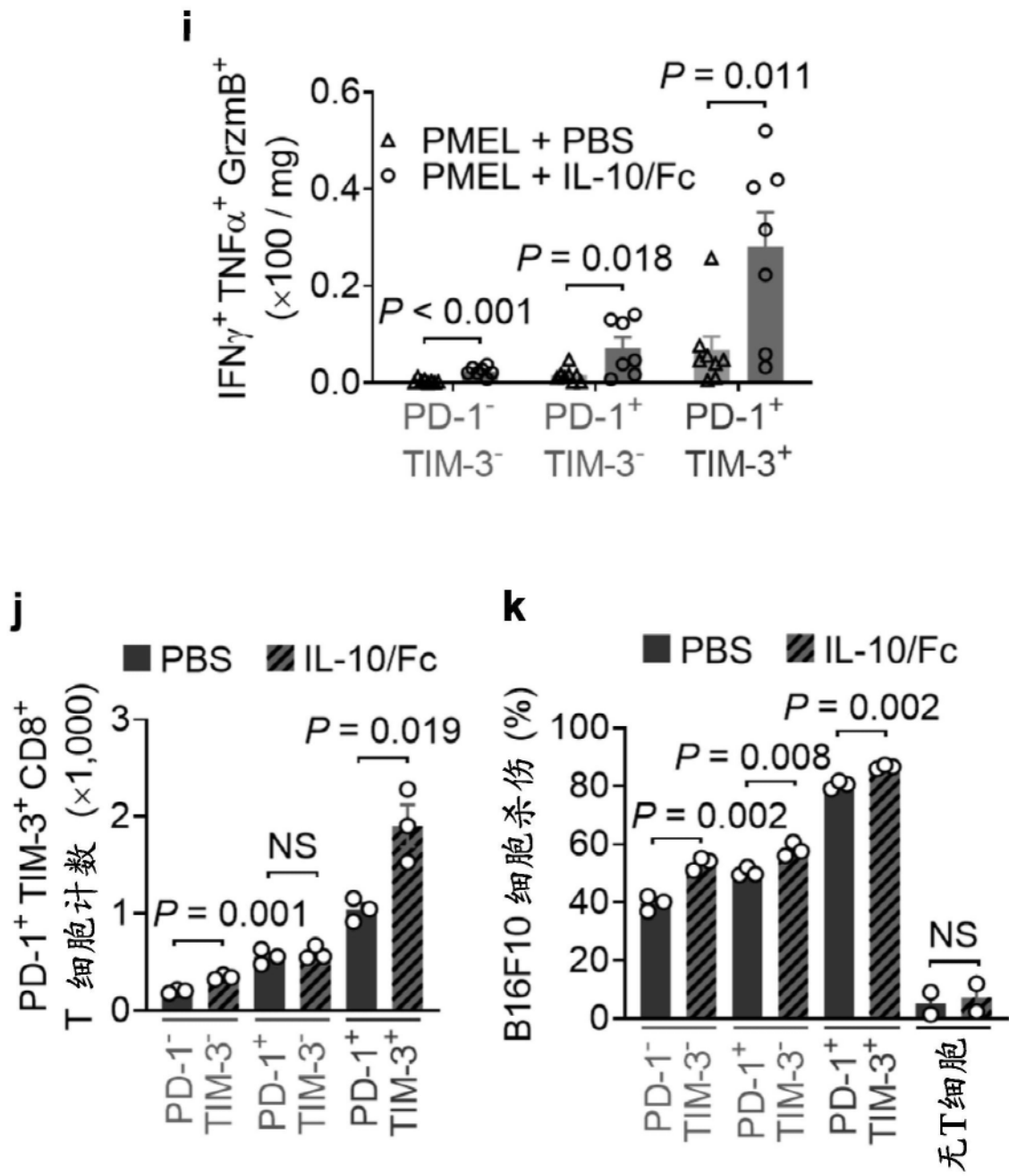
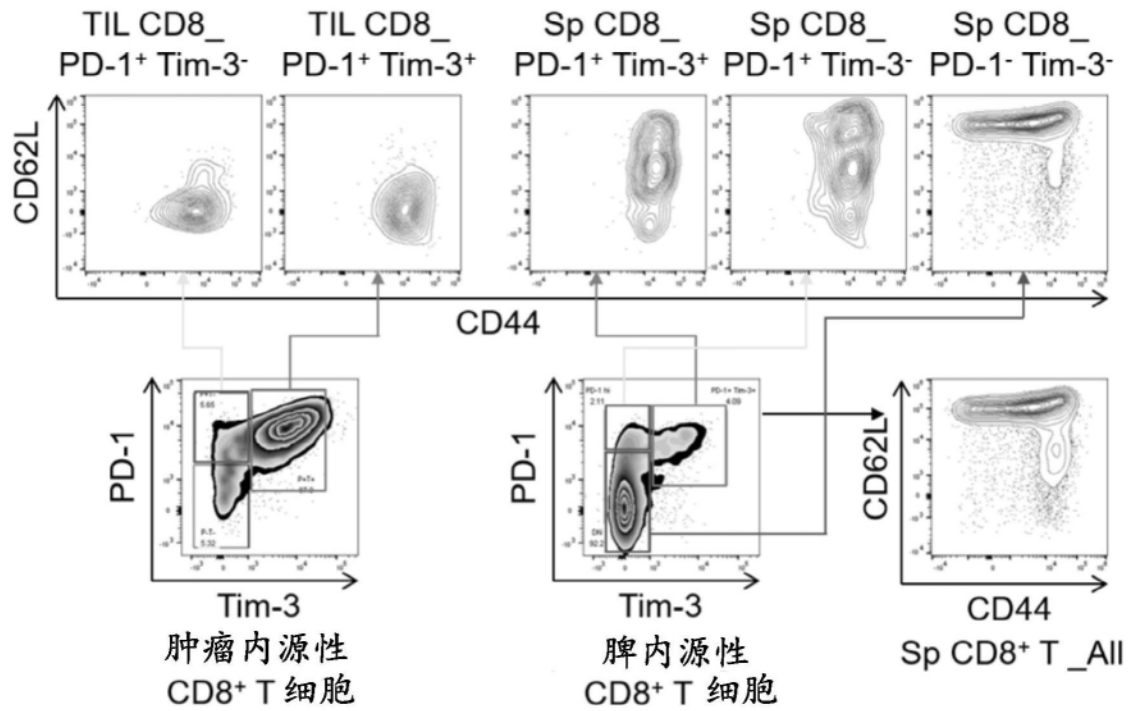


图6 (接上页)

I



m

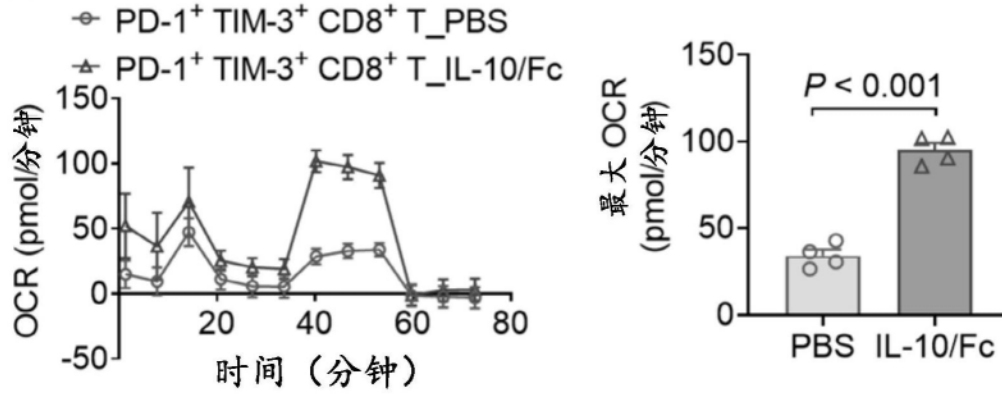


图6(接上页)

a

将 3×10^5 个CT26直肠癌细胞
皮下接种于BALB/c小鼠

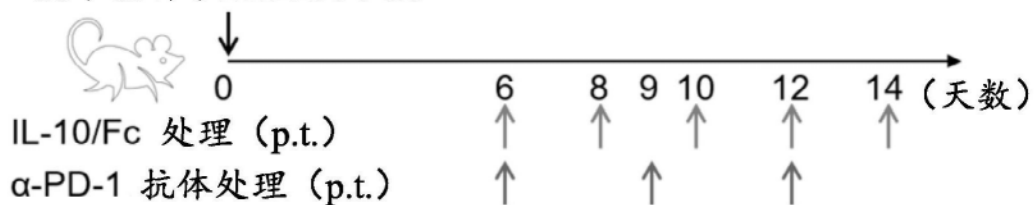
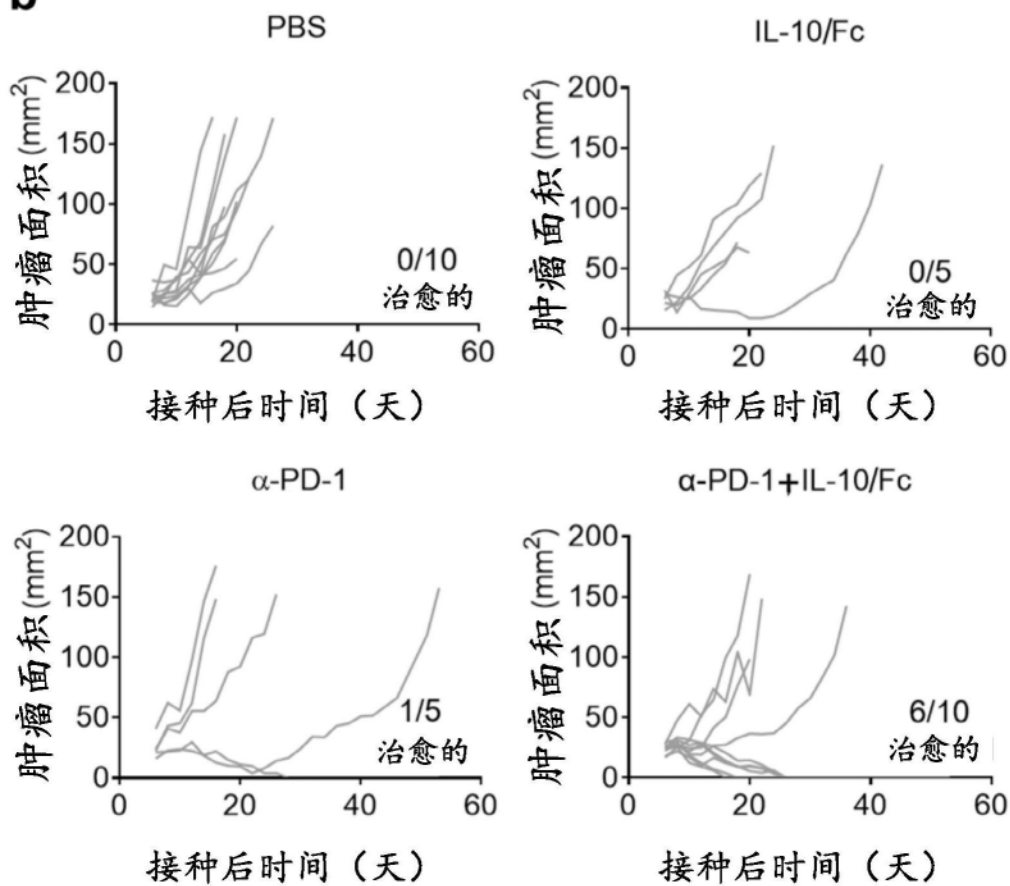
**b**

图7

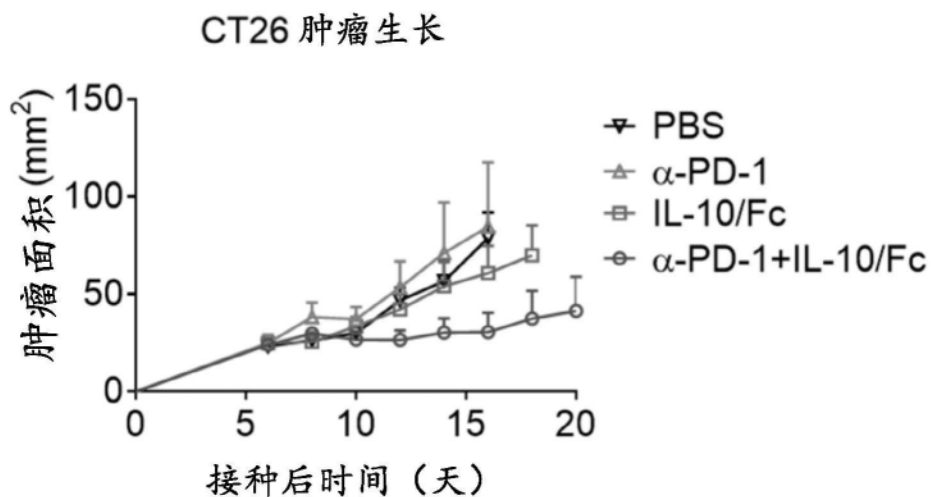
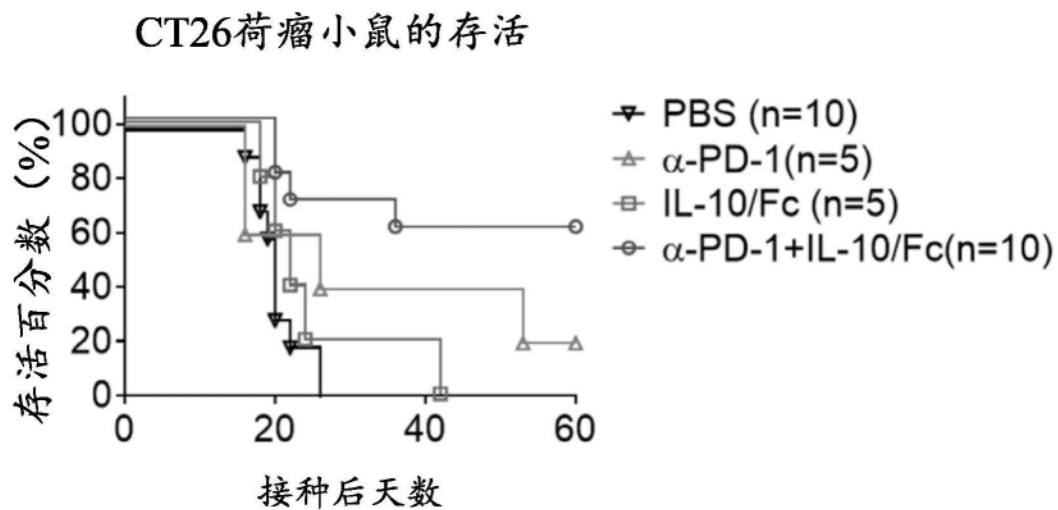
c**d**

图7 (接上页)