



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202237631 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：110146439

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl.：

*C07K14/54 (2006.01)**C07K16/46 (2006.01)**C12N15/24 (2006.01)**C12N15/85 (2006.01)**A61K38/20 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/12/10

俄羅斯聯邦

RU2020140807

(71)申請人：俄羅斯聯邦商拜奧卡德聯合股份公司 (俄羅斯聯邦) JOINT STOCK COMPANY

"BIOCAD" (RU)

俄羅斯聯邦

(72)發明人：柯諾夫 瓦帝米洛 KONONOV, ALEKSEY VLADIMIROVICH (RU)；伊多奇莫凱亞 埃里納 EVDOKIMOVSKAIA, IULIIA VIKTOROVNA (RU)；司米爾諾瓦 艾納 SMIRNOVA, IANA ANDREEVNA (RU)；伊多奇莫 斯坦拉夫 EVDOKIMOV, STANISLAV RUDOLFOVICH (RU)；科洛首瓦 伊雷納 KOLOSOVA, ELENA SERGEEVNA (RU)；阿傑耶夫 謝爾蓋 AGEEV, SERGEI ANDREEVICH (RU)；西米洛夫 弗拉迪米 TSYMPILOV, VLADIMIR SERGEEVICH (RU)；索洛維耶瓦萊麗 SOLOVYEV, VALERY VLADIMIROVICH (RU)；埃科里 帕維爾 IAKOVLEV, PAVEL ANDREEVICH (RU)；摩羅佐 狄密崔 MOROZOV, DMITRY VALENTINOVICH (RU)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：35 項 圖式數：15 共 93 頁

(54)名稱

用於啟動人類 IL-10R α 受體的免疫細胞因數及其用途

(57)摘要

本發明涉及生物技術和醫藥領域，具體地講涉及一種用於啟動人類 IL-10R α 受體的免疫細胞因數。本發明進一步涉及編碼所述免疫細胞因數的核酸、表達載體、宿主細胞及其產生方法、用於產生所述免疫細胞因數的方法、包含以上免疫細胞因數的藥物組合物、包含以上述免疫細胞因數和其他治療活性化合物的藥物組合物、用於治療腫瘤疾病的方法和所述免疫細胞因數或其藥物組合物用於治療腫瘤疾病的用途。

The present invention relates to the field of biotechnology and medicine, in particular to an immunocytokine for activating the human IL-10R α receptor. The invention further relates to nucleic acids encoding said immunocytokine, expression vectors, host cells and methods for producing same, methods for producing the immunocytokine, pharmaceutical compositions comprising the above immunocytokine, pharmaceutical compositions comprising the above immunocytokine and other therapeutically active compounds, methods for treating an oncological disease and the uses of the immunocytokine or pharmaceutical compositions thereof for treating an oncological disease.



【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於啟動人類 IL - 10 R α 受體的免疫細胞因數及其用途

【英文發明名稱】

IMMUNOCYTOKINE FOR ACTIVATING HUMAN IL-10RA
RECEPTOR AND USE THEREOF

【中文】

本發明涉及生物技術和醫藥領域，具體地講涉及一種用於啟動人類 IL-10R α 受體的免疫細胞因數。本發明進一步涉及編碼所述免疫細胞因數的核酸、表達載體、宿主細胞及其產生方法、用於產生所述免疫細胞因數的方法、包含以上免疫細胞因數的藥物組合物、包含以上述免疫細胞因數和其他治療活性化合物的藥物組合物、用於治療腫瘤疾病的方法和所述免疫細胞因數或其藥物組合物用於治療腫瘤疾病的用途。

【英文】

The present invention relates to the field of biotechnology and medicine, in particular to an immunocytokine for activating the human IL-10R α receptor. The invention further relates to nucleic acids encoding said immunocytokine, expression vectors, host cells and methods for producing same, methods for producing the immunocytokine, pharmaceutical compositions comprising the above immunocytokine, pharmaceutical compositions comprising the above immunocytokine and other therapeutically active compounds, methods for treating an oncological disease and the uses of the immunocytokine or pharmaceutical compositions thereof for treating an oncological disease.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於啟動人類 IL - 10 R α 受體的免疫細胞因數及其用途

【英文發明名稱】

IMMUNOCYTOKINE FOR ACTIVATING HUMAN IL-10RA
RECEPTOR AND USE THEREOF

【技術領域】

本發明涉及生物技術和醫藥領域，具體地講涉及一種用於啟動人類 IL-10R α 受體的免疫細胞因數。本發明進一步涉及編碼所述免疫細胞因數的核酸、表達載體、宿主細胞及其產生方法、用於產生免疫細胞因數的方法、包含以上免疫細胞因數的藥物組合物、包含以上述免疫細胞因數和其他治療活性化合物的藥物組合物、用於治療腫瘤疾病的方法和免疫細胞因數或其藥物組合物用於治療腫瘤疾病的用途。

【先前技術】

白細胞介素 10（或 IL-10）為一種細胞因數，並且直至最近才被視為一種抗炎細胞因數。其為一種分子量為約 37-39 kDa 的同二聚體。人類白細胞介素 10 與鼠白細胞介素 10 具有為約 80% 的高度同源性。

IL-10能夠消除血管生成、轉移並具有直接抗腫瘤作用 (Martin Oft, IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity, Cancer Immunology at the Crossroads: Experimental Immunotherapies, March 2014, Volume 2, Issue 3, 10.1158/2326-6066.CIR-13-0214)。

已經表明，IL-10可能的抗腫瘤作用之一為其對表達PD-1的CD8淋巴細胞的啟動作用。IL-10導致有效的抗凋亡細胞內級聯反應，這一事實有助於細胞毒性淋巴細胞在腫瘤微環境中的存活 (Martin Oft, Immune regulation and cytotoxic T cell activation of IL-10 agonists-Preclinical and clinical experience, Seminars in Immunology, Volume 44, August 2019, DOI: 10.1016/j.smim.2019.101325)。

IL-10的特徵為由於其尺寸小(為約37-39 kDa)所致血漿半衰期短，導致腎臟快速清除；事實上，其在全身隔室中的半衰期為2.5小時 (Braat H. et al., Interleukin-10-based therapy for inflammatory bowel disease, Expert Opin. Biol. Ther. 3(5), 2003, pp. 725-731)。一些作者已經採用這種細胞因數的聚乙二醇化來增加在血流中的保留時間、暴露、功效和減少腎臟吸收 (Mattos A. et al., PEGylation of interleukin-10 improves the pharmacokinetic profile and enhances the antifibrotic effectivity in CCl₄-induced fibrogenesis in mice, J. Control Release 162, 2012, pp. 84-91和Mumm J.B. et al., IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance, Cancer Cell 20(6), 2011, pp. 781-

796)。然而，聚乙二醇化的缺點可包括潛在風險，比如免疫原性、聚乙二醇化分子的生物活性降低和聚乙二醇化的異質性，這一事實可導致產生具有不同特性(大小、電荷等)的治療性分子以及在治療性分子周圍形成親水性覆層。此外，這種方法可將製劑在血流中的半衰期延長至不超過24小時。

用於延長血漿中IL-10半衰期的另一種方法為使用包含抗體或其片段和IL-10的融合蛋白，用於將細胞因數定向轉運至發炎組織並在其中積聚細胞因數。

現有技術提供的文章(Zheng, X.X. ET AL., A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice. J. Immunol. 1997, 158, 4507-4513 及 Zheng, X.X. ET AL., Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. J. Immunol. 1995, 154, 5590-5600)描述了一種基於IL-10和Fc片段的免疫細胞因數。

國際申請WO2012045334和WO2014023673進一步提供了一種包含基於IL-10和Fc片段的異二聚體複合物的融合蛋白。

國際申請WO2015117930提供了一種包含IgG類抗體和突變型IL-10分子的融合蛋白，其中融合蛋白包含兩條相同的重鏈多肽和兩條相同的輕鏈多肽，並且其中與野生型

IL-10分子相比較，突變型IL-10分子包含降低突變型IL-10分子與IL-10受體的結合親和力的胺基酸取代。

以上基於IL-10和Fc片段的融合蛋白(免疫細胞因數)具有一個共同缺點，特別是在血液中穩定性不足，因為它們易於被血清蛋白酶降解。

鑒於上述，需要開發基於IL-10和Fc片段的融合蛋白(免疫細胞因數)，與IL-10相比較，其顯示延長的血漿半衰期，並且由於對血清蛋白酶降解的抗性而保持穩定。

【發明內容】

正如作者發現的，本發明提供的包含基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的同二聚體複合物的免疫細胞因數與IL-10相比較具有延長的血漿半衰期，並且由於其獨特結構而對血清蛋白酶降解的抗性所致而穩定。

一方面，本發明涉及一種用於啟動人類IL-10R α 受體的免疫細胞因數，其包含基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的同二聚體複合物，其中基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的單體包含SEQ ID NO:1的胺基酸序列。

一方面，本發明涉及一種編碼以上免疫細胞因數的分離的核酸。

在一些實施方案中，分離的核酸為DNA。

在一些實施方案中，分離的核酸包括具有SEQ ID NO:3的核苷酸序列。

在一些實施方案中，分離的核酸包括具有SEQ ID

NO:4的核苷酸序列。

一方面，本發明涉及一種包含任何以上核酸的表達載體。

一方面，本發明涉及一種用於產生宿主細胞(用於產生以上本發明免疫細胞因數)的方法，其包括用以上載體轉化細胞。

一方面，本發明涉及一種用於產生以上本發明免疫細胞因數的宿主細胞，所述宿主細胞包含任何以上核酸。

一方面，本發明涉及一種用於製備包含以上本發明免疫細胞因數的製劑的方法，其包括在足以產生所述免疫細胞因數的條件下於培養基中培養以上宿主細胞，如果需要，然後分離和純化所得的本發明免疫細胞因數。

一方面，本發明涉及一種用於啟動人類IL-10R α 受體的藥物組合物，其包含以上本發明免疫細胞因數和一種或多種藥學上可接受的賦形劑。

一方面，本發明涉及一種用於啟動人類IL-10R α 受體的藥物組合物，其包含以上本發明免疫細胞因數和至少一種其他治療活性化合物。

在一些實施方案中，藥物組合物用於治療腫瘤疾病。

在一些實施方案中，腫瘤疾病選自：HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC (三陰性乳腺癌)、CRC (結直腸癌)、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC (非小細胞肺癌)、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病

(急性白血病或粒細胞性白血病)、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞急性成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用作為抗體、化學治療劑或激素治療劑的其他治療活性化合物。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用作為免疫檢查點抑制劑的其他治療活性化合物。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用選自PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑或CTLA-4抑制劑的免疫檢查點抑制劑。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用作為與PD-L1特異性地結合的抗體的PD-L1抑制劑。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用與PD-L1特異性地結合並且選自德瓦魯單抗、阿維魯單抗、阿特珠單抗、瑪奈利單抗的抗體。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用作為與PD-1特異性地結合的抗體的PD-1抑制劑。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用與PD-1特異性地結合並且選自prolgolimab、派姆單抗、納武單抗的抗體。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用作為與CTLA-

4特異性地結合的抗體的CTLA-4抑制劑。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用與CTLA-4特異性地結合並且為伊匹單抗的抗體。

一方面，本發明涉及一種用於啟動人類IL-10R α 受體的藥物組合物，其包含以上本發明免疫細胞因數和至少一種其他治療活性化合物。

在一些實施方案中，藥物組合用於治療腫瘤疾病。

在一些實施方案中，腫瘤疾病選自：HNSCC（頭頸部鱗狀細胞癌）、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC（三陰性乳腺癌）、CRC（結直腸癌）、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC（非小細胞肺癌）、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病（急性白血病或粒細胞性白血病）、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞急性成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

在藥物組合的一些實施方案中，使用作為抗體、化學治療劑或激素治療劑的其他治療活性化合物。

在藥物組合的一些實施方案中，使用作為免疫檢查點抑制劑的其他治療活性化合物。

在藥物組合的一些實施方案中，使用選自PD-1抑制

劑、PD-L1抑制劑或CTLA-4抑制劑的免疫檢查點抑制劑。

在藥物組合的一些實施方案中，使用作為與PD-L1特異性地結合的抗體的PD-L1抑制劑。

在藥物組合的一些實施方案中，使用與PD-L1特異性地結合並且選自德瓦魯單抗、阿維魯單抗、阿特珠單抗、瑪奈利單抗的抗體。

在藥物組合的一些實施方案中，使用作為與PD-1特異性地結合的抗體的PD-1抑制劑。

在藥物組合的一些實施方案中，使用與PD-1特異性地結合並且選自prolgolimab、派姆單抗、納武單抗的抗體。

在藥物組合的一些實施方案中，使用作為與CTLA-4特異性地結合的抗體的CTLA-4抑制劑。

在藥物組合的一些實施方案中，使用與CTLA-4特異性地結合並且為伊匹單抗的抗體。

一方面，本發明涉及一種用於治療腫瘤疾病的方法，其包括以治療有效量給予需要這種治療的受試者以上本發明免疫細胞因數或任何以上藥物組合物。

在治療方法的一些實施方案中，腫瘤疾病選自：HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC (三陰性乳腺癌)、CRC (結直腸癌)、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC (非小細胞肺癌)、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病(急性白血病或粒細胞性白血病)、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞

癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞急性成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

一方面，本發明涉及一種用於在需要這種啟動的受試者啟動人類IL-10R α 受體的方法，其包括以治療有效量給予需要這種治療的受試者有效量的以上本發明免疫細胞因數或任何以上藥物組合物。

一方面，本發明涉及以上本發明免疫細胞因數或任何以上藥物組合物用於在需要這種治療的受試者中治療腫瘤疾病的用途。

一方面，本發明涉及以上本發明免疫細胞因數或至少一種其他治療活性化合物用於在需要這種治療的受試者中治療腫瘤疾病的用途。

在用途的一些實施方案中，腫瘤疾病選自：HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC (三陰性乳腺癌)、CRC (結直腸癌)、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC (非小細胞肺癌)、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病 (急性白血病或粒細胞性白血病)、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞急性成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴

瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

在用途的一些實施方案中，使用作為抗體、化學治療劑或激素治療劑的其他治療活性化合物。

在用途的一些實施方案中，使用作為免疫檢查點抑制劑的其他治療活性化合物。

在用途的一些實施方案中，使用選自PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑或CTLA-4抑制劑的免疫檢查點抑制劑。

在用途的一些實施方案中，使用作為與PD-L1特異性地結合的抗體的PD-L1抑制劑。

在用途的一些實施方案中，使用與PD-L1特異性地結合並且選自德瓦魯單抗、阿維魯單抗、阿特珠單抗、瑪奈利單抗的抗體。

在用途的一些實施方案中，使用作為與PD-1特異性地結合的抗體的PD-1抑制劑。

在用途的一些實施方案中，使用與PD-1特異性地結合並且選自pdlgolimab、派姆單抗、納武單抗的抗體。

在用途的一些實施方案中，使用作為與CTLA-4特異性地結合的抗體的CTLA-4抑制劑。

在用途的一些實施方案中，使用與CTLA-4特異性地結合並且為伊匹單抗的抗體。

【圖式簡單說明】

[圖 1]為質粒 pIntA-IL-10Ra-exc-hum-EPEA的圖譜，其包含人類 IL-10R 受體亞基 α 的細胞外部分的序列，EPEA 標籤連接於 C 末端。

AmpR 為一種提供對氨苄青黴素的抗性的基因

pUC 為一種細菌複製起點

cmv-增強子為一種巨細胞病毒增強子

hCMV 啟動子為一種人類巨細胞病毒真核生物啟動子

內含子 A 為一種內含子 A 的序列

Kozak 為一種用於翻譯起始的 Kozak 共有序列

mIgK 前導為一種前導肽

SalI 為一種 SalI 限制性位點

IL-10Ra-exc-hum 為人類 IL-10 受體亞基 α 的細胞外部分

EPEA-標籤為一種用於蛋白純化的 EPEA 標籤序列

KpnI 為一種 KpnI 限制性位點

終止為一種終止密碼子

SV40_PA 終止子為一種 poly(A) SV40 轉錄終止子

EBV ori 為一種真核生物複製起點

[圖 2]為質粒 pIntA-N-Fc-LALA-link-hIL-10 的圖譜，其包含具有突變 LALA、del GK 並經接頭交聯於人類 IL-10 的 N-末端人類 IgG1 Fc 片段的序列。

AmpR 為一種提供對氨苄青黴素的抗性的基因

pUC 為一種細菌複製起點

cmv-增強子為一種巨細胞病毒增強子

hCMV 啟動子為一種人類巨細胞病毒真核生物啟動子

內含子A為一種內含子A的序列

Kozak為一種用於翻譯起始的Kozak共有序列

mIgK前導為一種前導肽

SalI為一種SalI限制性地點

Fc-LALA-DELGK為一種具有LALA突變(根據順序編號為L19A、L20A)和在C-末端處缺失的GK(根據順序編號為G231、K232)的人類IgG1 Fc片段的序列

接頭為一種接頭序列

hIL-10為一種人類IL-10序列

XbaI為一種XbaI限制性地點

終止為一種終止密碼子

SV40_PA終止子為一種poly(A) SV40轉錄終止子

EBV ori為一種真核生物複製起點

[圖3]是從CHO細胞衍生和分離的人類、食蟹猴和兔IL-10受體細胞外部分的PAAG電泳。

- 1) 蛋白分子量標誌物
- 2) 人類excIL-10Ra
- 3) 食蟹猴excIL-10Ra
- 4) 蛋白分子量標誌物
- 5) 兔excIL-10Ra

[圖4]為從CHO細胞衍生和分離的本發明基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的重組免疫細胞因數(融合蛋白)(IL-10-Fc)的PAAG電泳。

- 1) 蛋白分子量標誌物

- 2) 在還原條件下的 IL10-Fc 4.5 μg
- 3) 在非還原條件下的 IL10-Fc 4.5 μg 。

[圖 5]為顯示本發明基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的免疫細胞因數(融合蛋白) (IL-10+Fc) 在 +37°C 下長時間儲存於人體血清中時的穩定性的圖表。X 軸為儲存時間，Y 軸為血清中穩定分子的相對含量(初始樣品的百分比)。

[圖 6]為顯示與 IL-10 相比較，本發明基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的免疫細胞因數(融合蛋白) (IL-10+Fc) 表現出增殖活性的能力的圖表。X 軸為 IL-10 (來自 Peprotech 的陽性對照人類重組 IL-10) 的濃度，Y 軸為反映活細胞數量的相對螢光。對照樣品的半數最大有效濃度為 91.7 pM，而本發明的 IL-10+Fc 為 53.3 pM。

[圖 8]為顯示與來自 Peprotech 和對照的重組人類 IL-10 相比較，本發明基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的免疫細胞因數(融合蛋白) (IL-10+Fc) 對 CD8+T 細胞對於 Raji 靶細胞的細胞毒性的影響的圖表。

[圖 9]為顯示本發明基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的測試免疫細胞因數(融合蛋白) (IL-10+Fc) 在採用 Jurkat 細胞系的測定中不存在 CDC 活性的圖表。對照抗體利妥昔單抗誘導補體介導的靶細胞裂解。

[圖 10]為顯示本發明基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的測試免疫細胞因數(融合蛋白) (IL-10+Fc) 在採用 Jurkat 靶細胞的測定中不存在抗體依賴性細胞毒性(ADCC 活性)的圖表。抗 PD1 抗體用作陽性對照。

[圖 11]為顯示在本發明基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的免疫細胞因數(融合蛋白)(IL-10-Fc)中相對於濃度為0.01 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 的人類外周血細胞亞群不存在自體細胞毒性的長條圖：

圖 11A) CD4+T細胞，

圖 11B) CD8+T細胞，

圖 11C) T細胞，

圖 11D) NK細胞，

圖 11E) B細胞。

誘導針對B細胞的自體細胞毒性的抗CD20抗體和誘導針對NK細胞的自體細胞毒性的抗CD47抗體用作陽性對照。

[圖 12]為反映本發明基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的免疫細胞因數(融合蛋白)(IL-10-Fc)以及本發明IL-10-Fc與抗mPD1抗體的組合在接種有CT26癌的Balb/c小鼠中發揮抗腫瘤活性的能力的長條圖。抗MPD1抗體用作對照。

[圖 13]為反映本發明基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的免疫細胞因數(融合蛋白)(IL-10-Fc)以及本發明IL-10-Fc與抗mPD1抗體的組合在接種有CT26癌的Balb/c小鼠中發揮抗腫瘤活性的能力的長條圖。抗MPD1抗體用作對照。Y軸為腫瘤生長指數(ITG)。

[圖 14]為反映本發明基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的免疫細胞因數(融合蛋白)(IL-10-Fc)以及本發明IL-10-Fc與抗mPD1抗體的組合在接種有CT26癌的Balb/c小鼠中發揮

抗腫瘤活性的能力的長條圖；長條圖顯示腫瘤生長抑制(TGI)的指標。抗MPD1抗體用作對照。

[圖 15]為本發明基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的免疫細胞因數(融合蛋白)的形式的示意圖。

【實施方式】

定義和一般方法

除非在本文中另外定義，否則與本發明相關使用的所有技術和科學術語將具有與本領域技術人員通常理解的相同含義。

進一步地，除非上下文另外要求，否則單數術語應包括複數術語，和複數術語應包括單數術語。一般地，細胞培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學、分析化學、有機合成化學、醫藥和藥物化學以及本文所述的蛋白和核酸的雜交和化學的目前分類和方法為技術人員眾所周知的並且在本領域廣泛使用。酶反應和純化方法根據製造商的指南進行，如本領域常見的，或如本文所述。

“結合親和力”通常是指分子(例如抗體)的單個結合位點與其結合配偶體(例如抗原)之間非共價相互作用總和的強度。除非另外指明，否則“結合親和力”是指反映結合對成員(例如抗體和抗原)之間1:1相互作用的固有的(特徵性，真實的)結合親和力。分子X對其結合配偶體Y的親和力通常可用解離常數(Kd)表示。優選的Kd值為約200 nM、150 nM、100 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20

nM、10 nM、8 nM、6 nM、4 nM、2 nM、1 nM或更少。親和力可通過本領域已知的常用方法測量，包括在本說明書中描述的那些。低親和力抗體通常緩慢結合抗原並傾向於易於解離，而高親和力抗體通常更快速地結合抗原並傾向於保持結合更長時間。本領域已知多種測量結合親和力的方法，其中任何一種均可用於本發明的目的。

術語“體外”是指在人工條件下體外的生物實體、生物過程或生物反應。例如，體外生長的細胞應理解為在體外環境中，例如在試管、培養小瓶或微量滴定板中生長的細胞。

如本文使用的術語“IC50”(50%抑制濃度)是指可測量的活性或反應，例如細胞比如腫瘤細胞的生長/增殖被抑制50%的製劑濃度。IC50值可使用適當的劑量反應曲線，使用特殊的統計軟體進行曲線擬合來計算。

術語“ED50”(EC50) (50%有效劑量/濃度)是指產生50%生物效應(可包括細胞毒性)的製劑濃度。

如在本說明書和隨後的請求項中使用的，除非上下文另外規定，否則詞語“具有(have)”、“包括(include)”和“包含(comprise)”或其變體比如“具有(has)”、“具有(having)”、“包括(includes)”、“包括(including)”、“包含(comprises)”或“包含(comprising)”將理解為意指包括規定的整數或整數組，但不排除任何其他整數或整數組。

免疫細胞因數

正如作者驚訝地發現的，本發明提供的包含基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的同二聚體複合物的免疫細胞因數與 IL-10 相比較具有延長的血漿半衰期，並且由於其獨特結構而對血清蛋白酶降解的抗性所致而穩定。

以上免疫細胞因數的形式如圖 15 所示。

術語“免疫細胞因數”意指包含通過共價鍵直接或間接連接於細胞因數或其衍生物的抗體或其片段的分子。所述抗體和所述細胞因數可通過接頭肽連接。

本發明的免疫細胞因數考慮指代分離的免疫細胞因數。

本發明的免疫細胞因數是指基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的融合蛋白。

用於描述本說明書中各種免疫細胞因數的術語“分離的”意指已經從其中表達免疫細胞因數的細胞或細胞培養物中鑒定和分離和/或再生的免疫細胞因數。來自自然環境的雜質(污染物成分)為通常干擾多肽的診斷或治療用途的材料，並且可包括酶、激素和其他蛋白或非蛋白溶質。分離的多肽一般地通過至少一個純化步驟製備。

本發明的免疫細胞因數為重組免疫細胞因數。

術語“重組免疫細胞因數”旨在指代在包含編碼免疫細胞因數的核苷酸序列的細胞或細胞系中表達的免疫細胞因數，其中所述核苷酸序列並非與細胞天然相關。

免疫球蛋白的片段可結晶區(“Fc 區，Fc 片段”)為與細胞表面 Fc 受體以及補體系統的一些蛋白相互作用的免疫球

蛋白分子的“尾部”區域。這種特性使得抗體能夠啟動免疫系統。在IgG、IgA和IgD同種型中，Fc區由分別來自兩條重鏈的第二和第三恒定結構域的兩個相同的蛋白片段組成；在IgM和IgE同種型中，Fc在每條多肽鏈中含有3個重鏈恒定結構域(CH2、CH3和CH4結構域)。

IL-10受體為一種包含由IL-10ra基因編碼的兩個IL-10R α (也稱為IL-10R1)分子和由IL-10rb基因編碼的兩個IL10R β (也稱為IL-10R2)分子的異四聚體複合物。

人類IL-10R α 受體(或CD210a，或IL-10R1)是指白細胞介素10受體， α 亞基。IL-10R α 的分子量為90-120 kDa，並且用作受體複合物的配體結合亞基。

一方面，本發明涉及一種用於啟動人類IL-10R α 受體的免疫細胞因數，其包含基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的同二聚體複合物，即包含基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的兩個相同單體的二聚體，其中單體包含胺基酸序列

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGGPG
SGGSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFF
QMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVS

MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCEN
KSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM
KIRN (SEQ ID NO:1)。

在一個實施方案中，本發明涉及一種用於啟動人類 IL-10R α 受體的免疫細胞因數，其包含基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的同二聚體複合物，即包含基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的兩個相同單體的二聚體，其中單體具有 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列。

本發明的免疫細胞因數包含人類 IgG1 抗體 Fc 片段中的 L234A 和 L235A (LALA) 突變，以提供免疫細胞因數的無效應子特性。這些突變存在於以上免疫細胞因數中，所述免疫細胞因數包括具有 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列。

在一個實施方案中，本發明的免疫細胞因數包含前導肽。

在本發明的一個實施方案中，具有前導肽的本發明免疫細胞因數包含基於前導肽、IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的同二聚體複合物，即包含基於前導肽、IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的兩個相同單體的二聚體，其中單體具有胺基酸序列
MMSFVSLLLVGILFHATQAEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN

HYTQKSLSLSPGGGSGGGPGSGGSPGQGTQSENSCTHFPG
 NLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFK
 GYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGEN
 LKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNLQEKGIY
 KAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN (SEQ ID NO:2)。

術語“本發明的免疫細胞因數”、“基於IL-10和Fc的免疫細胞因數”、“本發明的融合蛋白”、“IL-10-Fc”和“IL-10+Fc”在本文中可互換使用，並且是指以上本發明免疫細胞因數。

核酸

一方面，本發明涉及一種編碼以上本發明免疫細胞因數的分離的核酸。

在本說明書中可互換使用的術語“核酸”、“核酸序列(nucleic sequence)”、“核酸序列(nucleic acid sequence)”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”意指核苷酸的精確序列，無論修飾與否，決定核酸的片段或區域，無論含有非天然核苷酸與否，並且為雙鏈DNA或RNA、單鏈DNA或RNA，或所述DNA的轉錄產物。

此處還應當包括本發明不涉及處於其天然染色體環境中，即處於天然狀態的核苷酸序列。本發明的序列已被分離和/或純化，即其例如通過複製直接或間接採樣，其環境已至少部分地被改變。因此，在此還應提及例如借助宿主細胞通過重組遺傳學獲得或通過化學合成獲得的分離的

核酸。

“分離的”核酸分子為被鑒定並與至少一種核酸分子雜質分離的核酸分子，前者在天然來源中與之結合。分離的核酸分子不同於其中在自然條件下發現的形式或集合。因此，分離的核酸分子不同於在自然條件下存在於細胞中的核酸分子。然而，分離的核酸分子包括位於其中正常表達免疫細胞因數的細胞中的核酸分子，例如，如果核酸分子的染色體定位不同於其在自然條件下細胞中的定位。

在一些實施方案中，分離的核酸為DNA。

在一個實施方案中，本發明涉及一種核酸分子，其包含編碼基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的融合蛋白的單體的核苷酸序列，其中單體包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列。

在一個實施方案中，本發明涉及一種核酸分子，其包含編碼基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的融合蛋白的單體的核苷酸序列，其中單體具有SEQ ID NO: 1的胺基酸序列。

正如本領域技術人員將意識到的，由於遺傳密碼的冗餘，多種不同的DNA序列可編碼具有SEQ ID NO: 1的胺基酸序列的融合蛋白。創建編碼相同胺基酸序列的這些備選DNA序列完全處於本領域受過訓練的人員的技能範圍內。這種變異DNA序列處於本發明的範圍內。

除非另外說明，否則提及核苷酸序列包括其互補序列。因此，提及具有特定序列的核酸應理解為包括其互補鏈與其互補序列的核酸。

在一些實施方案中，編碼基於IL-10和人類IgG1 Fc片

段的融合蛋白的單體(其中單體包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列)的分離的核酸包含具有SEQ ID NO: 3的核苷酸序列。

在一些實施方案中，編碼基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的融合蛋白的單體(其中單體具有SEQ ID NO: 1的胺基酸序列)的分離的核酸具有具有SEQ ID NO: 3的核苷酸序列。

在一些實施方案中，編碼基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的融合蛋白的單體(其中單體包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列)的分離的核酸包含具有SEQ ID NO: 4的核苷酸序列。

在一些實施方案中，編碼基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的融合蛋白的單體(其中單體具有SEQ ID NO: 1的胺基酸序列)的分離的核酸具有具有SEQ ID NO: 4的核苷酸序列。

在一些實施方案中，本發明的核酸編碼基於前導肽、IL-10和人類IgG1 Fc片段的融合蛋白的單體。

在一些實施方案中，編碼基於前導肽、IL-10和人類IgG1 Fc片段的融合蛋白的單體(其中單體具有SEQ ID NO: 2的胺基酸序列)的核酸具有具有SEQ ID NO: 5的核苷酸序列。

在一些實施方案中，編碼基於前導肽、IL-10和人類IgG1 Fc片段的融合蛋白的單體(其中單體具有SEQ ID NO: 2的胺基酸序列)的核酸具有具有SEQ ID NO: 6的核苷酸序列。

以上核酸分子可用於表達本發明的免疫細胞因數。

表達載體

一方面，本發明涉及一種包含任何以上核苷酸序列的表達載體。

本發明涉及一種適合於表達任何本文所述的核苷酸序列的載體。

如本文使用的術語“載體”意指能夠轉運與其連接的另一種核酸的核酸分子。在一些實施方案中，載體為質粒，即其中連接另外的DNA區段的環狀雙鏈DNA片段。在一些實施方案中，載體為病毒載體，其中另外的DNA區段可連接到病毒基因組中。

在一些實施方案中，載體能夠在其被引入的宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起始位點的細菌載體和附加型哺乳動物載體)。在進一步的實施方案中，載體(例如非附加型哺乳動物載體)可在引入到宿主細胞中後整合到宿主細胞的基因組中，從而與宿主基因一起複製。此外，某些載體能夠指導其可操作地連接的基因的表達。這種載體在本文中稱為“重組表達載體”(或簡稱為“表達載體”)。

本發明涉及包含編碼本發明免疫細胞因數(融合蛋白)的胺基酸序列、其部分(例如IL-10序列或Fc片段的第二和第三恒定結構域的序列)的核酸分子的載體，如本文所述。本發明進一步涉及包含編碼基於IL-10和本發明人類IgG1 Fc片段的免疫細胞因數(融合蛋白)或其片段的核酸分子的載體。

表達載體包括質粒、逆轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒(AAV)、植物病毒(比如花椰菜花葉病毒、煙草花葉病

毒)、粘粒、YAC、EBV衍生的附加體等。DNA分子可連接到載體中，使得載體內的轉錄和翻譯控制序列發揮其調控DNA的轉錄和翻譯的預期功能。可選擇與所使用的表達宿主細胞相容的表達載體和表達控制序列。可通過標準方法將DNA分子引入到表達載體中(例如連接免疫細胞因數基因片段和載體上的互補限制性位點，或者如果不存在限制性位點則平末端連接)。

術語“控制序列”是指在特定宿主生物體中表達可操作地連接的編碼序列所需的DNA序列。適合於原核生物的控制序列為例如啟動子、任選地操縱基因序列和核糖體結合位點。已知真核細胞包括啟動子、多聚腺苷酸化信號和增強子。

當核酸被置於與另一核酸序列的功能關係中時，其為“可操作地連接的”。例如，如果前序列或分泌前導序列DNA表達為參與多肽分泌的前蛋白，則其與多肽的DNA可操作地連接；如果啟動子或增強子影響序列的轉錄，則其與編碼序列可操作地連接；如果核糖體結合位點的定位有利於促進翻譯，則其與編碼序列可操作地連接。一般地，“可操作地連接”意指被連接的DNA序列為連續的，並且在分泌前導序列的情況下為連續的並且處於閱讀相。然而，增強子不必為連續的。

重組表達載體也可編碼促進免疫細胞因數從宿主細胞中分泌的信號(前導)肽。免疫細胞因數基因可克隆到載體中，使得信號(前導)肽與免疫細胞因數鏈的氨基末端框內

連接。信號(前導)肽可為免疫球蛋白信號(前導)肽或異源信號肽(即來自非免疫球蛋白蛋白質的信號(前導)肽)。

本發明的重組載體表達可攜帶控制宿主細胞中免疫細胞因數基因表達的調控序列。本領域的技術人員將理解，表達載體的設計，包括調控序列的選擇，可取決於因素比如待轉化的宿主細胞的選擇、期望蛋白的表達水準等。哺乳動物中表達宿主細胞的優選控制序列包括確保哺乳動物細胞中蛋白高水準表達的病毒元件，比如源自逆轉錄病毒LTR、巨細胞病毒(CMV) (比如CMV啟動子/增強子)、猿猴病毒40 (SV40) (比如SV40啟動子/增強子)、腺病毒(例如主要晚期啟動子腺病毒(AdMLP))、多瘤病毒和強哺乳動物啟動子比如天然免疫球蛋白啟動子或肌動蛋白啟動子的啟動子和/或增強子。

用於在細菌細胞或真菌細胞(例如酵母細胞)中表達多肽的方法也是本領域眾所周知的。

除免疫細胞因數基因和調控序列之外，本發明的重組表達載體可攜帶另外的序列，比如調控宿主細胞中載體複製的序列(例如複製起點)和選擇標記基因。選擇標記基因促進選擇已引入到載體的宿主細胞。

如本說明書中使用的術語“表達控制序列”是指實現其連接的編碼序列的表達和加工所需的多核苷酸序列。表達控制序列包括適當的轉錄起始、終止、啟動子和增強子序列；有效的RNA處理信號，比如剪接和多聚腺苷酸化信號；穩定細胞質mRNA的序列；提高翻譯效率的序列(即

Kozak共有序列)；提高蛋白穩定性的序列；以及在期望時，增強蛋白分泌的序列。這種控制序列的性質因宿主生物體而異；在原核生物中，這種控制序列通常包括核糖體結合位點的啟動子和轉錄終止序列；在真核生物中，一般地，這種控制序列包括啟動子和轉錄終止序列。術語“控制序列”至少包括其存在對於表達和加工必不可少的所有組件，並且還可包括其存在為有利的另外的元件，例如前導序列和融合配偶體序列。

宿主細胞及其產生方法

一方面，本發明涉及一種用於產生宿主細胞的方法，所述宿主細胞用於產生本發明的免疫細胞因數，所述方法包括用以上載體轉化細胞。

一方面，本發明涉及一種用於產生本發明免疫細胞因數的宿主細胞，該宿主細胞包含任何以上核酸。

如本文使用的術語“重組宿主細胞”(或簡稱為“宿主細胞”)是指其中已引入重組表達載體的細胞。本發明涉及宿主細胞，其可包括例如上述本發明的載體。本發明進一步涉及包含編碼本發明免疫細胞因數的任何核酸的宿主細胞。應當理解，“重組宿主細胞”和“宿主細胞”不僅是指特定的受試細胞，還指這種細胞的後代。由於突變或環境影響所致可能會在後代中發生修飾，這種後代事實上可能與親本細胞不同；然而，這種細胞仍包括在如本文使用的術語“宿主細胞”的範圍內。

編碼本發明免疫細胞因數的核酸分子和包含這些核酸分子的載體可用於轉染合適的哺乳動物或其細胞、植物或其細胞、細菌或酵母宿主細胞。轉化可通過任何已知的將多核苷酸引入到宿主細胞中的技術進行。用於將異源多核苷酸引入到哺乳動物細胞中的方法為本領域眾所周知的，並且包括葡聚糖介導的轉染、陽離子聚合物-核酸複合物轉染、磷酸鈣沉澱、聚凝胺介導的轉染、原生質體融合、多核苷酸包封於脂質體中以及將DNA直接顯微注射到細胞核中。另外，可通過病毒載體將核酸分子引入到哺乳動物細胞中。

用作用於轉化的宿主的哺乳動物細胞系為本領域眾所周知的，並且包括多種可用的永生化細胞系。這些包括例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、NS0細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、FreeStyle 293細胞(Invitrogen)、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、非洲綠猴腎細胞(COS)、人類肝細胞癌細胞(例如Hep G2)、A549細胞和許多其他細胞系。通過確定哪些細胞系具有高表達水準並提供所產生蛋白的必要特徵來選擇細胞系。可使用的其他細胞系為昆蟲細胞系，比如Sf9或Sf21細胞。當將編碼本發明免疫細胞因數的重組表達載體引入到哺乳動物宿主細胞中時，通過將宿主細胞培養足以在宿主細胞中表達本發明免疫細胞因數的一段時間來產生免疫細胞因數，或者更優選地，將免疫細胞因數分泌到其中培養宿主細胞的培養基中。可使用標準蛋白純化技術從培養基中分離本發明的免

疫細胞因數。植物宿主細胞包括例如煙草(*Nicotiana*)、擬南芥(*Arabidopsis*)、浮萍、玉米、小麥、馬鈴薯等。細菌宿主細胞包括埃希氏菌屬(*Escherichia*)和鏈黴菌屬(*Streptomyces*)物種。酵母宿主細胞包括粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)。

此外，可使用許多已知技術來提高從生產細胞系產生本發明免疫細胞因數的水準。例如，谷氨醯胺合成酶基因表達系統(GS系統)為用於在某些條件下增強表達的常用方法。

很可能本發明的免疫細胞因數在不同細胞系或轉基因動物中將具有彼此不同的糖基化模式。然而，由本文所述的核酸分子編碼或包含本文提供的胺基酸序列的本發明免疫細胞因數為本發明的一部分，無論結合分子的糖基化如何，並且一般而言無論是否存在翻譯後修飾。

以上宿主細胞並非指代使用人類胚胎產生的宿主細胞。

以上宿主細胞並非指代通過改變人類生殖細胞的遺傳完整性而產生的宿主細胞。

一方面，本發明涉及一種用於製備包含本發明免疫細胞因數的產物的方法，其包括在培養基中於足以產生所述免疫細胞因數的條件下培養以上宿主細胞，如果需要，然後分離和純化所得的免疫細胞因數。

本發明涉及用於產生本發明免疫細胞因數的方法。本

發明的一個實施方案涉及一種用於產生如本文定義的免疫細胞因數的方法，包括製備能夠表達本發明免疫細胞因數的重組宿主細胞，在適合於表達/產生本發明免疫細胞因數的條件下培養所述宿主細胞，和分離所得的免疫細胞因數。通過在這種重組宿主細胞中的這種表達產生的免疫細胞因數在本文中稱為“重組免疫細胞因數”。本發明還涉及來自這種宿主細胞的細胞後代和類似產生的免疫細胞因數。

藥物組合物和藥物組合

一方面，本發明涉及一種用於啟動人類IL-10R α 受體的藥物組合物，其包含本發明的免疫細胞因數和一種或多種藥學上可接受的賦形劑。

“藥物組合物”是指包含本發明的免疫細胞因數和至少一種選自以下的組分的組合物：藥學上可接受的和藥理學上相容的填充劑、溶劑、稀釋劑、載體、助劑、分佈劑和感測劑、遞送劑，比如防腐劑、穩定劑、填充劑、崩解劑、潤濕劑、乳化劑、助懸劑、增稠劑、甜味劑、矯味劑、芳香劑、抗細菌劑、殺真菌劑、潤滑劑和延長遞送控制劑，其選擇和合適的比例取決於給予的類型和方式以及劑量。合適的助懸劑的實例為乙氧基化異硬脂醇、聚氧乙烯、山梨醇和山梨醇醚、微晶纖維素、偏氫氧化鋁、膨潤土、瓊脂和黃耆膠以及其混合物。可通過各種抗細菌和抗真菌劑，比如對羥基苯甲酸酯類、氯丁醇、山梨酸和類似

化合物來提供針對微生物作用的防護。組合物還可含有等滲劑，比如糖類、多元醇類、氯化鈉等。組合物的延長作用可通過減緩活性成分吸收的試劑(例如單硬脂酸鋁和明膠)來實現。合適的載體、溶劑、稀釋劑和遞送劑的實例包括水、乙醇、多元醇及其混合物、天然油類(比如橄欖油)和用於注射的有機酯類(比如油酸乙酯)。填充劑的實例為乳糖、奶糖、枸橼酸鈉、碳酸鈣、磷酸鈣等。崩解劑和分散劑的實例為澱粉、海藻酸及其鹽、矽酸鹽等。合適的潤滑劑的實例為硬脂酸鎂、月桂基硫酸鈉、滑石和高分子量的聚乙二醇。用於口服、舌下、經皮、眼內、肌內、靜脈內、皮下、局部或直腸給予活性成分的藥物組合物，單獨或與另一種活性化合物組合，可與傳統藥用載體混合以標準給藥形式給予人類和動物。合適的標準給藥形式包括口服形式，比如片劑、明膠膠囊劑、丸劑、粉劑、顆粒劑、口香糖和口服溶液劑或混懸劑；舌下和經口含化給藥形式；氣溶膠；植入物；局部、經皮、皮下、肌內、靜脈內、鼻內或眼內形式和直腸給藥形式。

術語“賦形劑”在本文中用於描述除本發明免疫細胞因數以外的任何成分。這些為用於藥物製造以賦予藥物產品必要的理化特性的無機或有機性質的物質。

術語“藥學上可接受的”是指一種或多種適合於給予哺乳動物，優先地為人類的相容性液體或固體成分。

術語“緩衝液”、“緩衝液組合物”、“緩衝劑”是指一種溶液，其能夠通過其共軛酸成分的作用抵抗pH的變化，

並且使得免疫細胞因數產物能夠抵抗pH的變化。通常，藥物組合物優選地具有4.0-8.0範圍內的pH。所用緩衝液的實例包括(但不限於)醋酸鹽、磷酸鹽、枸橼酸鹽、組氨酸、琥珀酸鹽等緩衝溶液。

如本文使用的術語“張力劑”、“滲透劑(osmolyte)”或“滲透劑(osmotic agent)”是指可調整本發明免疫細胞因數液體製劑的滲透壓的賦形劑。“等滲”藥物為具有等同於人體血液的滲透壓的藥物。等滲藥物一般地具有約250-350 mOsm/kg的滲透壓。使用的等滲劑包括(但不限於)多元醇、糖類和蔗糖、胺基酸、金屬鹽(例如氯化鈉)等。

“穩定劑”是指提供活性劑的物理和/或化學穩定性的賦形劑或者兩種或更多種賦形劑的混合物。穩定劑包括胺基酸，例如(但不限於)精氨酸、組氨酸、甘氨酸、賴氨酸、穀氨醯胺、脯氨酸；表面活性劑，例如(但不限於)聚山梨酯20(商品名：Tween 20)、聚山梨酯80(商品名：Tween 80)、聚乙二醇-聚丙二醇及其共聚物(商品名：泊洛沙姆、普朗尼克、十二烷基硫酸鈉(SDS)；抗氧化劑，例如(但不限於)甲硫氨酸、乙醯半胱氨酸、抗壞血酸、單硫代甘油、亞硫酸鹽等；螯合劑，例如(但不限於)乙二胺四醋酸(EDTA)、二亞乙基三胺五醋酸(DTPA)、枸橼酸鈉等。

一方面，本發明涉及一種用於啟動人類IL-10R α 受體的藥物組合物，其包含本發明的免疫細胞因數和至少一種其他治療活性化合物。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用作為抗體、化學治療劑或激素治療劑的其他治療活性化合物。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用作為免疫檢查點抑制劑的其他治療活性化合物。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用選自PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑或CTLA-4抑制劑的免疫檢查點抑制劑。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用作為與PD-L1特異性地結合的抗體的PD-L1抑制劑。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用與PD-L1特異性地結合並且選自德瓦魯單抗、阿維魯單抗、阿特珠單抗、瑪奈利單抗的抗體。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用作為與PD-1特異性地結合的抗體的PD-1抑制劑。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用與PD-1特異性地結合並且選自prolgolimab、派姆單抗、納武單抗的抗體。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用作為與CTLA-4特異性地結合的抗體的CTLA-4抑制劑。

在藥物組合物的一些實施方案中，使用與CTLA-4特異性地結合並且為伊匹單抗的抗體。

一方面，本發明涉及一種用於啟動人類IL-10R α 受體的藥物組合，其包含以上本發明免疫細胞因數和至少一種其他治療活性化合物。

在藥物組合的一些實施方案中，使用作為抗體、化學

治療劑或激素治療劑的其他治療活性化合物。

在藥物組合的一些實施方案中，使用作為免疫檢查點抑制劑的其他治療活性化合物。

在藥物組合的一些實施方案中，使用選自PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑或CTLA-4抑制劑的免疫檢查點抑制劑。

在藥物組合的一些實施方案中，使用作為與PD-L1特異性地結合的抗體的PD-L1抑制劑。

在藥物組合的一些實施方案中，使用與PD-L1特異性地結合並且選自德瓦魯單抗、阿維魯單抗、阿特珠單抗、瑪奈利單抗的抗體。

在藥物組合的一些實施方案中，使用作為與PD-1特異性地結合的抗體的PD-1抑制劑。

在藥物組合的一些實施方案中，使用與PD-1特異性地結合並且選自prolgolimab、派姆單抗、納武單抗的抗體。

在藥物組合的一些實施方案中，使用作為與CTLA-4特異性地結合的抗體的CTLA-4抑制劑。

在藥物組合的一些實施方案中，使用與CTLA-4特異性地結合並且為伊匹單抗的抗體。

在一些實施方案中，藥物組合物或藥物組合用於治療腫瘤疾病。

“治療(Treat)”、“治療(treating)”和“治療(treatment)”是指一種減輕或消除生物障礙和/或至少一種其伴隨症狀的方法。如本文使用的“減輕”疾病、障礙或病症意指降低疾病、障礙或病症的症狀的嚴重性和/或發生頻率。進一

步地，本文中提及“治療”包括提及治癒性、姑息性和預防性治療。

術語“腫瘤疾病”、“癌症”和“癌性”是指哺乳動物的生理狀況或者描述哺乳動物的生理狀況，其一般地特徵為細胞不受調控的生長/增殖。腫瘤疾病的實例包括(但不限於)癌、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤和白血病。這種癌性疾病的更具體實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺部腺癌、肺部鱗癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌(包括胃癌)、胰腺癌、膠質母細胞瘤、神經膠質瘤、宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、結腸癌、結直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(腎細胞癌)、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、肛門癌、陰莖癌、黑色素瘤和各種頭頸部癌。

一方面，治療的受試者或患者為哺乳動物，優選地為人類受試者。所述受試者可為任何年齡的男性或女性。

藥物組合物或組合內的本發明免疫細胞因數以治療有效量存在。

“治療有效量”是指治療期間給予的治療劑的量，其將在一定程度上緩解所治療疾病的一種或多種症狀。

在一些實施方案中，腫瘤疾病選自：HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC (三陰性乳腺癌)、CRC (結直腸癌)、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC (非小細胞肺癌)、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病

(急性白血病或粒細胞性白血病)、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞急性成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

本發明的藥物組合物或藥物組合及其製備方法對本領域技術人員來說無疑是顯而易見的。藥物組合物或藥物組合應優選地按照GMP(良好生產規範)要求來製造。組合物或組合可包含緩衝組合物、張力劑、穩定劑和增溶劑。組合物或組合的延長作用可通過減緩活性藥用成分吸收的試劑(例如單硬脂酸鋁和明膠)來實現。合適的載體、溶劑、稀釋劑和遞送劑的實例包括注射用水、乙醇、多元醇及其混合物、油類和有機酯類。

本領域接受的任何用於給予免疫細胞因數的方法均可適當地用於本發明的免疫細胞因數。

如果活性劑在規定的貨架期期間於例如2-8℃的儲存溫度下保持其物理穩定性和/或化學穩定性和/或生物活性，則藥物組合物或藥物組合為“穩定的”。優選地，活性劑保持物理和化學穩定性以及生物活性兩者。儲存期基於在加速或自然老化條件下的穩定性測試結果進行調整。

本發明的藥物組合物或藥物組合可以呈現成製劑形式的單一單位劑量或多個單一單位劑量的形式製造、包裝或

廣泛銷售。如本文使用的術語“單一單位劑量”是指含有預定量的活性成分的藥物組合物的離散量。活性成分的量一般地等於待在受試者中給予的活性成分的劑量或這種劑量的便利部分，例如這種劑量的一半或三分之一。

本發明的藥物組合物或藥物組合一般地適合於作為無菌製劑非腸道給予，旨在通過皮膚或粘膜屏障中的裂口、通過注射、輸注和植入繞過胃腸道而在人體中給予。特別地，非腸道給予尤其包括皮下、腹膜內、肌內、靜脈內、動脈內、鞘內、心室內、尿道內、顱內、滑膜內、經皮注射或輸注和腎臟透析輸注技術。也可採用腫瘤內遞送，例如腫瘤內注射。還考慮了區域灌注。

優選的實施方案包括靜脈內和皮下途徑。本領域接受的任何用於給予肽或蛋白的方法均可適當地用於本發明的免疫細胞因數。

可注射製劑可非限制性地以單位劑型，比如以安瓿、小瓶、以塑膠容器、預填充注射器、自動注射裝置製備、包裝或出售。用於非腸道給予的製劑尤其包括混懸劑、溶液劑、油性或水性基質中的乳劑、糊劑等。

在另一個實施方案中，本發明提供一種用於非腸道給予的藥用製劑，其中藥物組合物或藥物組合以乾燥(即粉末或顆粒)形式提供，用於在給予之前用合適的基質(例如無菌無熱原水)重構。這種藥用製劑可通過例如凍幹來製備，即本領域中已知為冷凍乾燥的方法，並且該方法包括冷凍產物，然後從冷凍材料中去除溶劑。

本發明的免疫細胞因數還可鼻內或通過吸入給予，無論是單獨還是作為與來自吸入器(比如加壓氣溶膠容器、泵、噴霧器、霧化器或噴灑器，其中使用或不使用合適的推進劑)的合適的藥學上可接受的賦形劑的混合物，或者作為滴鼻劑或噴霧劑。

用於非腸道給予的劑型可配製成速釋或調釋。調釋藥用製劑包括延遲釋放、持續釋放、脈衝釋放、控制釋放、靶向釋放和程式釋放。

治療方法/治療用途

一方面，本發明涉及一種用於治療腫瘤疾病的方法，其包括以治療有效量給予需要這種治療的受試者本發明的免疫細胞因數或任何以上本發明藥物組合物。

一方面，本發明涉及本發明的免疫細胞因數或任何以上本發明藥物組合物用於治療需要這種腫瘤疾病治療的受試者的用途。

在治療方法的一些實施方案中，腫瘤疾病選自：HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC (三陰性乳腺癌)、CRC (結直腸癌)、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC (非小細胞肺癌)、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病(急性白血病或粒細胞性白血病)、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞急性

成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

在腫瘤(例如癌症)的情況下，本發明免疫細胞因數的治療有效量可減少癌細胞的數量；減小初始腫瘤大小；抑制(即在一定程度上減緩並優選地停止)癌細胞浸潤到周圍器官中；抑制(即在一定程度上減緩並優選地停止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；和/或在一定程度上緩解與疾病相關的一種或多種症狀。本發明的免疫細胞因數可在一定程度上阻止生長和/或殺死現有的癌細胞，其可為細胞抑制和/或細胞毒性的。對於癌症治療，體內功效可例如通過評價存活率、腫瘤進展時間(無進展生存期)、腫瘤對治療的回應率(TRR)、回應持續時間和/或生命品質來測量。

本發明的免疫細胞因數可在沒有進一步治療性治療的情況下給予，即作為獨立治療。此外，本發明免疫細胞因數的治療可包含至少一種另外的治療性治療(聯合治療)。在一些實施方案中，本發明的免疫細胞因數可與另一種藥物/製劑聯合給予或一起配製以治療癌症。

如本文使用的提及本發明的免疫細胞因數和一種或多種其他治療劑的術語“共同給藥”、“共同給予”和“與...組合”考慮意指、指代或包括以下：

- 1) 同時給予需要治療的患者本發明的免疫細胞因數

和治療劑的這種組合，當將這些組分一起配製成單一劑型時，其基本上同時向所述患者釋放所述組分，

2) 同時給予需要治療的患者本發明的免疫細胞因數和治療劑的這種組合，當將這些組分彼此分開配製成由所述患者基本上同時服用的單獨劑型時，於是基本上同時向所述患者釋放所述組分，

3) 依序給予需要治療的患者本發明的免疫細胞因數和治療劑的這種組合，當將這些組分彼此分開配製成由所述患者連續幾次服用，每次給予之間具有顯著時間間隔的單獨劑型時，於是在基本上不同的時間向所述患者釋放所述組分；和

4) 依序給予需要治療的患者本發明的免疫細胞因數和治療劑的這種組合，當將這些組分一起配製成以受控方式釋放所述組分的單一劑型時，於是其在相同和/或不同時間同時、連續和/或重疊地向所述患者釋放，其中每個部分可通過相同或不同途徑給予。

一方面，本發明涉及本發明的免疫細胞因數或至少一種其他治療活性化合物用於在需要這種治療的受試者治療腫瘤疾病的用途。

本發明的免疫細胞因數可與選自以下的治療劑組合：細胞毒劑、化學治療劑、激素治療劑或另一種治療性抗體。

如本文使用的術語“細胞毒劑”是指抑制或阻止細胞功能和/或引起細胞破壞的物質。該術語旨在包括放射性同

位素(例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 和 Lu 的放射性同位素)、化學治療劑和毒素，比如細菌、真菌、植物或動物來源的小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段和/或變體。

“化學治療劑”為可用於治療惡性腫瘤的化合物。化學治療劑的實例包括烷化劑類，比如噻替呱(thiotepa)和環磷醯胺(cyclophosphamide) (CYTOXAN®)；烷基磺酸酯類(alkyl sulfonates)，比如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和呱泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶類(aziridines)，比如苯並多巴(benzodopa)、卡巴醌(carboquone)、美托多巴(meturedopa)和烏多巴(uredopa)；乙烯亞胺類(ethylenimines)和甲基三聚氰胺類(methylamelamines)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙烯三聚氰胺(triethylenemelamine)、三乙烯磷醯胺(triethylenephosphoramidate)、三乙烯硫代磷醯胺(triethylenethiophosphoramidate)和三甲基三聚氰胺(trimethylmelamine)；乙醯精寧類(acetogenins) (例如布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone))； δ -9-四氫大麻酚(delta-9-tetrahydrocannabinol) (屈大麻酚(dronabinol) MARINOL®)； β -拉帕酮(beta-lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙堿類(colchicines)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹堿(camptothecin) (包括合成類似物拓撲替康(topotecan) (HYCAMTIN®)、CPT-11 (伊立替康(irinotecan)、CAMPTOSAR®)、乙醯基喜樹堿

(acetylcamptothecin)、東莨菪亭(scopolectin)和9-氨基喜樹城(9-aminocamptothecin))；苔蘚抑素類(bryostatin)；卡利斯他汀(callystatin)；CC-1065（包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)和比折來新(bizelesin)合成類似物)；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；替尼泊苷(teniposide)；隱藻素類(cryptophycins)（例如隱藻素(cryptophycin) 1和隱藻素(cryptophycin) 8)；朵拉司他汀(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin)（包括合成類似物KW-2189和CB1-TM1)；艾榴塞洛素(eleutherobin)；水鬼蕉城(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑制素(spongistatin)；氮芥類(nitrogen mustards)，比如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、雙氯乙基甲胺(mechlorethamine)、鹽酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、苯芥膽甾醇(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；硝基脲類(nitrosureas)，比如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福替莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷尼司汀(ranimustine)；抗生素類(antibiotics)，比如烯二炔類抗生素(enediynes antibiotics)（例如加利車黴素(calicheamicin)，例如加利車黴素 γ II

(calicheamicin gamma II)和加利車黴素 ω II (calicheamicin omega II) (參見例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))；達內黴素 (dynemicin)，包括達內黴素 A (Dynemicin A)；埃斯波黴素 (esperamicin)；以及新抑癌素生色團 (neocarzinostatin chromophore) 和相關色蛋白烯二炔抗生素生色團 (chromoprotein enediyne antibiotic chromophores)、阿克拉黴素類 (aclacinomysins)、放線菌素 (actinomycin)、安麴黴素 (authramycin)、氮雜絲氨酸 (azaserine)、博來黴素 (bleomycins)、放線菌素 C (cactinomycin)、卡拉比星 (carabycin)、洋紅黴素 (carminomycin)、嗜癌菌素 (carzinophilin)、色黴素類 (chromomycins)、放線菌素 D (dactinomycin)、柔紅黴素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸 (6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、多柔比星 (doxorubicin) (包括 ADRIAMYCIN[®]、嗎啉代多柔比星 (morpholino-doxorubicin)、氰基嗎啉代多柔比星 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯啉多柔比星 (2-pyrrolino-doxorubicin)、鹽酸多柔比星脂質體注射液 (doxorubicin HCl liposome injection) (DOXOL[®])、多柔比星脂質體 (liposomal doxorubicin) TLC D-99 (MYOCET[®])、聚乙二醇化多柔比星脂質體 (peglylated liposomal doxorubicin) (CAELYX[®]) 和去氧多柔比星 (deoxydoxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊達比星 (idarubicin)、馬塞羅黴素 (marcellomycin)、絲裂黴素類

(mitomycins) 比如絲裂黴素 C (mitomycin C)、黴酚酸 (mycophenolic acid)、諾加黴素 (nogalamycin)、橄欖黴素類 (olivomycins)、培洛黴素 (peplomycin)、泊非黴素 (potfiromycin)、嘌呤黴素 (puromycin)、奎拉黴素 (quelamycin)、羅多比星 (rodorubicin)、鏈黑黴素 (streptonigrin)、鏈脲佐菌素 (streptozocin)、殺結核菌素 (tubercidin)、烏苯美司 (ubenimex)、淨司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin)；抗代謝物，比如甲氨蝶呤 (methotrexate)、吉西他濱 (gemcitabine) (GEMZAR®)、替加氟 (tegafur) (UFTORAL®)、卡培他濱 (capecitabine) (XELODA®)、埃坡黴素 (epothilone) 和 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil) (5-FU)；葉酸類似物，比如二甲葉酸 (denopterin)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、蝶羅呤 (pteropterin)、曲美沙特 (trimetrexate)；嘌呤類似物，比如氟達拉濱 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine)、硫唑嘌呤 (thiamiprine)、硫鳥嘌呤 (thioguanine)；嘧啶類似物，比如安西他濱 (ancitabine)、阿紮胞苷 (azacitidine)、6-氮雜尿苷 (6-azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、雙去氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依諾他濱 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine)；抗腎上腺素類 (anti-adrenals)，比如氨魯米特 (aminogluthimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane)；葉酸補充劑 (folic acid replenisher)，比如亞葉酸 (folinic acid)；醋葡醛內酯

(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamideglycoside)；
 氨基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯布西(bestrabucil)；
 比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；地美可辛(demecolcine)；地吡醯(diaziquone)；依氟鳥氨酸(elfornithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；依託格魯(ethoglucid)；硝酸鎳(gallium nitrate)；羥基脲(hydroxyurea)；香菇多糖(lentinan)；氯尼達明(lonidainine)；美登素類化合物(maytansinoids)比如美登素(maytansine)和安絲菌素類(ansamitocins)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醯(mitoxantrone)；莫匹丹莫(mopidanmol)；二胺硝吡啶(nitraerine)；噴司他丁(pentostatin)；蛋氨酸芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；2-乙基醯肼(2-ethylhydrazide)；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK[®]多糖複合物(polysaccharide complex)(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；
 根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；鍺螺旋胺(spirogermanium)；細偶氮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙基胺(2,2',2''-trichlorotriethylamine)；單端孢黴烯類(trichothecenes)(例如T-2毒素(toxin)、維拉庫林A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)和胍丁胺(anguidine))；烏拉坦(urethan)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘

露醇 (mitobronitol)；二溴衛矛醇 (mitolactol)；呱泊溴烷 (pipobroman)；加胞嘧啶 (gacytosine)；阿拉伯糖苷 (arabinoside) (“Ara-C”)；噻替呱 (thiotepa)；紫杉化合物 (taxoid)，例如紫杉醇 (paclitaxel) (TAXOL®)、紫杉醇 (paclitaxel) (ABRAXANE) 和多西紫杉醇 (docetaxel) (TAXOTERE®) 的白蛋白工程化納米顆粒製劑 (albumin-engineered nanoparticle formulation)；苯丁酸氮芥 (chlorambucil)；6-硫鳥嘌呤 (6-thioguanine)；巰基嘌呤 (mercaptopurine)；甲氨蝶呤 (methotrexate)；鉑劑 (platinum agents)，比如順鉑 (cisplatin)、奧沙利鉑 (oxaliplatin) 和卡鉑 (carboplatin)；長春花生物鹼類 (vinca alkaloids)，其防止微管蛋白聚合形成微管，包括長春城 (vinblastine) (VELBAN®)、長春新城 (vincristine) (ONCOVIN®)、長春地辛 (vindesine) (ELDISINE®)、FILDESIN® 和長春瑞濱 (vinorelbine) (NAVELBINE®)；依託泊苷 (etoposide) (VP-16)；異環磷醯胺 (ifosfamide)；米托蒽醌 (mitoxantrone)；立可林 (leucovorin)；諾肖林 (novantrone)；依達曲沙 (edatrexate)；道諾黴素 (daunomycin)；氨基蝶呤 (aminopterin)；伊班膦酸鹽 (ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000；二氟甲基鳥氨酸 (difluoromethylhylnornithine) (DMFO)；類視黃醇類物質 (retinoids)，比如視黃酸 (retinoic acid)，包括貝沙羅汀 (bexarotene) (TARGRETIN®)；雙膦酸鹽類 (bisphosphonates)，比如氯膦酸鹽 (clodronate) (例如

BONEFOS[®] 或 OSTAC[®])、依替膦酸鹽(etidronate)(DIDROCAL[®])、NE-58095、唑來膦酸(zoledronic acid)/唑來膦酸鹽(zoledronate)(ZOMETA[®])、阿侖膦酸鹽(alendronate)(FOSAMAJX[®])、帕米膦酸鹽(pamidronate)(AREDIA[®])、替魯膦酸鹽(tiludronate)(SKELID[®])或利塞膦酸鹽(risedronate)(ACTONEL[®])；曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸類，例如抑制與異常細胞增殖有關的信號傳導通路中基因表達的那些，比如 PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生長因數受體(EGF-R)；疫苗，比如 THERATOPE[®] 疫苗和基因治療疫苗，例如 ALLOVECTIN[®] 疫苗、LEUVECTIN[®] 疫苗和 VAXID[®] 疫苗；拓撲異構酶 1 抑制劑(例如 LURTOTECAN[®])；rmRH (例如 ABARELIX[®])；BAY439006 (索拉非尼(sorafenib)；Bayer)；SU-11248 (Pfizer)；呱立福新(perifosine)、COX-2抑制劑(例如塞來昔布(celecoxib)或依託昔布(etoricoxib))、蛋白酶體抑制劑(例如 PS341)；硼替佐米(bortezomib)(VELCADE[®])；CCI-779；替吡法尼(tipifarnib)(811577)；奧拉非尼(orafenib)，ABT510；Bcl-2 抑制劑，比如奧利默森鈉(oblimersen sodium)(GENAENSE[®])；匹杉瓊(pixantrone)；EGFR抑制劑(參見以下定義)；酪氨酸激酶抑制劑(參見以下定義)；及任何以上物質的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物；以及兩種或更多種以上物質的組合，比如 CHOP (一種環磷醯胺(cyclophosphamide)、多柔比星(doxorubicin)、長春新城

(vincristine)和潑尼松龍(prednisolone)聯合治療的縮寫)和 FOLFOX (一種奧沙利鉑(oxaliplatin) (ELOXATINTM)聯合 5-FU和立可林(leucovorin)治療方案的縮寫)。

該定義中還包括用於調控或抑制激素對腫瘤的作用的 激素治療劑，比如具有混合型激動劑/拮抗劑特徵的抗雌 激素，包括他莫昔芬(tamoxifen) (NOLVADEX®)、4-羥基 他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬(trioxifene)、托 瑞米芬(toremifene) (FARESTON®)、艾多昔芬 (idoxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、雷洛昔芬 (raloxifene) (EVTSTA®)、曲奧昔芬(trioxifene)、凱奧昔芬 (keoxifene)和選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，比如 SERM3；沒有激動劑特性的純抗雌激素，比如氟維司群 (fulvestrant) (FASLODEX®)和EM800 (這種藥物可阻斷雌激 素受體(ER)二聚化、抑制DNA結合、增加ER轉換和/或抑 制ER水準)；芳香化酶抑制劑，包括甾體類芳香化酶抑制 劑(比如福美司坦(formestane)和依西美坦(exemestane) (AROMASIN®))和非甾體類芳香化酶抑制劑(比如阿那曲唑 (anastrozole) (AREVIIDEX®)、來曲唑(letrozole) (FEMARA®)和氨魯米特(aminoglutethimide))以及其他芳香 化酶抑制劑(包括伏氯唑(vorozole) (RIVISOR®)，醋酸甲地 孕酮(megestrol acetate) (MEGASE®)、法屈唑(fadrozole)、 咪唑；黃體生成素釋放激素激動劑(luteinizing hormone- releasing hormone agonist)，包括亮丙瑞林(leuprolide) (LUPRON®和ELIGARD®)、戈舍瑞林(goserelin)、布舍瑞

林(buserelin)和曲普瑞林(tripterelin)；性類固醇類，包括孕激素類(比如醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)和醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate))、雌激素類(比如己烯雌酚(diethylstilbestrol)和普力馬林(premarin))和雄激類/類視黃醇類物質(比如氟甲睾酮(flouxymesterone)、全反式維甲酸和芬維A胺(fenretinide))；奧那司酮(onapristone)；抗黃體酮類；雌激素受體下調劑類(ERDs)；抗雄激素類，比如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)和比卡魯胺(bicalutamide)；睾酮內酯(testolactone)；和任何上述物質的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物；以及兩種或更多種以上物質的組合。

可與本發明免疫細胞因數組合使用的其他治療劑可為選自以下的治療性抗體：針對PD-1的抗體(例如prolgolimab、派姆單抗或納武單抗、針對PD-L1的抗體、針對CTLA4的抗體、針對4-1BB的抗體、針對OX40的抗體、針對GITR的抗體、針對CD20的抗體(例如利妥昔單抗(rituximab))、針對HER2的抗體(例如曲妥珠單抗(trastuzumab)或帕妥珠單抗(pertuzumab))、針對VEGF的抗體(例如貝伐珠單抗(bevacizumab))或其組合。

在用途的一些實施方案中，使用作為免疫檢查點抑制劑的其他治療活性化合物。

術語“免疫檢查點抑制劑”(或“檢查點抑制劑”)是指抑制免疫檢查點活性的化合物。抑制包括功能降低和完全阻斷。抑制性檢查點分子的實例包括B7-H3、B7-H4、

BTLA、CTLA-4、KIR、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、TIGIT和VISTA。在一些實施方案中，免疫檢查點抑制劑為特異性地識別免疫檢查點蛋白的抗體。許多免疫檢查點抑制劑為已知的，並且類似於這些已知的免疫檢查點蛋白抑制劑，在不久的將來可能會開發備選的免疫檢查點抑制劑。免疫檢查點抑制劑包括(但不限於)肽、抗體、核酸分子和低分子量化合物。

在用途的一些實施方案中，使用選自PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑或CTLA-4抑制劑的免疫檢查點抑制劑。

在用途的一些實施方案中，使用作為與PD-L1特異性地結合的抗體的PD-L1抑制劑。

在用途的一些實施方案中，使用與PD-L1特異性地結合並且選自德瓦魯單抗、阿維魯單抗、阿特珠單抗、瑪奈利單抗的抗體。

在用途的一些實施方案中，使用作為與PD-1特異性地結合的抗體的PD-1抑制劑。

在用途的一些實施方案中，使用與PD-1特異性地結合並且選自prolgolimab、派姆單抗、納武單抗的抗體。

在用途的一些實施方案中，使用作為與CTLA-4特異性地結合的抗體的CTLA-4抑制劑。

在用途的一些實施方案中，使用與CTLA-4特異性地結合並且為伊匹單抗的抗體。

一方面，本發明涉及一種用於在需要這種啟動的受試者啟動人類IL-10R α 受體的方法，其包括以治療有效量給

予需要這種治療的受試者有效量的本發明免疫細胞因數或任何以上本發明藥物組合物。

應當理解，本發明的免疫細胞因數可用於如上所述的治療方法、用於如上所述的治療和/或用於製造用於上述治療應用的藥物。

劑量和給予途徑

本發明的免疫細胞因數將以有效治療所討論的病症的量，即以達到期望的結果所需的劑量並在達到期望的結果所需的時間段期間給予。治療有效量可根據因素而變化，比如待治療的具體病症、患者的年齡、性別和體重，以及免疫細胞因數單獨還是與一種或多種另外的藥物或治療技術組合給予。

可調整劑量方案以提供最佳期望的反應。例如，可給予單次推注，可隨著時間的推移給予幾個分開的劑量，或者可根據治療情況的緊急情況按比例減少或增加劑量。以單位劑型配製非腸道組合物以易於給予和劑量均勻為尤其有利的。如本文使用的單位劑型旨在指代適合作為用於待治療的患者/受試者的單位劑量的物理離散單位；每個單位含有經計算與期望的藥用載體結合產生期望的治療效果的預定量的活性化合物。本發明單位劑型的規格一般地由以下決定並直接取決於(a) 化學治療劑的獨特特徵和待達到的特定治療或預防效果，和(b) 配混這種活性化合物用於治療受試者的敏感性的領域中固有的局限性。

因此，技術人員將意識到，基於本文提供的公開，根據治療領域眾所周知的方法調整劑量和劑量方案。也就是說，可易於建立最大耐受劑量，並且還可確定提供給患者可檢測的治療效果的有效量，也可確定用於給予每種藥物以提供給患者可檢測的治療效果的時間要求。因此，儘管本文中舉例說明某些劑量和給予方案，但這些實例決不限制在實踐本發明的實施方案時可提供給患者的劑量和給予方案。

需要注意的是，劑量值可隨著待減輕病症的類型和嚴重性而變化，並且可包括單次或多次劑量。此外，應當理解，對於任何特定受試者，應根據個體需要和給予或監督給予組合物的醫學專業人士的判斷隨著時間的推移調整具體劑量方案，並且本說明書中闡述的劑量範圍僅為示例性的，並且不旨在限制要求保護的組合物的範圍或實踐。進一步地，本發明組合物的給予方案可基於多種因素，包括疾病類型、患者的年齡、體重、性別、醫學狀況、病症的嚴重性、給予途徑以及本發明的特定免疫細胞因數。因此，劑量方案可廣泛變化，但可使用標準方法常規確定。例如，劑量可基於藥代動力學和藥效學參數進行調整，所述參數可包括臨床效果比如毒性作用或實驗室值。因此，本發明包括由本領域技術人員確定的患者內劑量遞增。用於確定適當劑量和方案的方法為本領域眾所周知的，並且一旦提供了本文公開的想法，技術人員就會理解。

以上提供了合適的給藥方法的實例。

考慮本發明免疫細胞因數的合適劑量在 0.007-200 mg/kg，優選地 0.007-100 mg/kg，包括約 0.5-50 mg/kg，例如約 1-20 mg/kg 的範圍內。本發明的免疫細胞因數可例如以至少 0.25 mg/kg，比如至少 0.5 mg/kg，包括至少 1 mg/kg，例如至少 1.5 mg/kg，比如至少 2 mg/kg，例如至少 3 mg/kg，包括至少 4 mg/kg，例如至少 5 mg/kg；並且例如最高 50 mg/kg，包括最高 30 mg/kg，例如最高 20 mg/kg，包括最高 15 mg/kg 的劑量給予。一般地以適當的時間間隔，比如每週一次、每兩週一次、每三週一次或每四周一次重複給予，並且長達主診醫生認為適當的時間，如果需要，其可在某些情況下增加或減少劑量。

本發明的實施

提供以下實施例以更好地理解本發明。這些實施例僅用於說明的目的，並且不應解釋為以任何方式限制本發明的範圍。

本說明書中引用的所有出版物、專利和專利申請均通過參考結合至本文中。儘管出於清楚理解的目的，已通過說明和實例對上述發明進行了一些詳細描述，但根據本發明的教導，對本領域的普通技術人員將易於顯而易見的是，可對其進行某些變化和修改而不背離所附實施方案的精神或範圍。

材料和一般方法

關於人類免疫球蛋白輕鏈和重鏈核苷酸序列的一般資訊參見：Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。抗體鏈的胺基酸根據EU編號進行編號(Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)。

重組DNA技術

使用標準方法來操作DNA，如Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述。根據製造商的方案使用分子生物學試劑。

基因合成

期望的基因區段由通過化學合成製備的寡核苷酸製備。300-4000 kb長的基因區段，其側接單一限制性位點，通過寡核苷酸的退火和連接進行組裝，包括PCR擴增和隨後經指定的限制性位點進行克隆。亞克隆的基因片段的DNA序列通過DNA測序確認。

DNA序列測定

DNA序列通過Sanger測序進行測定。

DNA和蛋白序列分析和序列資料管理

Infomax的Vector NT1 Advance套件版本8.0用於序列創建、作圖、分析、注釋和說明。

表達載體

為了表達所描述的抗體和抗原，應用了旨在於原核細胞(大腸桿菌)中表達、於真核細胞中(例如在CHO細胞中)暫態表達的表達質粒的變體。除抗體表達盒之外，載體還包含：使得所述質粒能夠在大腸桿菌中複製的複製起點，在大腸桿菌中賦予對各種抗生素(例如氨苄青黴素和卡那黴素)的抗性的基因。

如下所述的，包含所述抗體鏈的融合基因通過PCR和/或基因合成產生，並通過連接相應的核酸區段，例如在相應的載體中使用獨特的限制性位點，用已知的重組方法 and 技術進行組裝。通過DNA測序驗證亞克隆的核酸序列。對於暫態轉染，通過從轉化的大腸桿菌培養物製備質粒來製備更大量的質粒。

實施例1

人類IL-10Ra基因序列、食蟹獼猴(*Macaca cynomolgus*) (食蟹猴(*fascicularis*))直系同源IL-10Ra基因和穴兔(*Oryctolagus cuniculus*)(兔) IL-10Ra基因序列的產生。

為了克隆人類IL-10Ra受體(<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13651>)

和 IL-10Ra 食蟹獼猴 (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2K5WJ66>) 細胞外部分的序列，我們合成了各自 60 個核苷酸的寡核苷酸，形成一個完全重疊的基因序列。使用兩輪 PCR 組裝每個基因，產生 642 bp 的片段。接下來，將受體的細胞外部分克隆到載體中，用於暫態表達帶有 EPEA 標籤的 pIntA，以進行蛋白的親和純化。

為了克隆穴兔 IL-10Ra 受體細胞外部分的序列，從兔外周血細胞中分離總 RNA 並產生 cDNA。逆轉錄產物用作聚合酶鏈反應中的範本，以產生側接限制性位點的受體基因。接下來，將受體基因克隆到載體中，用於暫態表達帶有 EPEA 標籤的 pIntA (圖 1)，以進行蛋白的親和純化。通過 DNA 測序驗證克隆的核酸序列。

實施例 2

人類 IL-10/Fc 片段融合蛋白以及兔 IL-10/Fc 片段融合蛋白序列的產生。

為了克隆包含人類/兔 IL-10 序列和人類 IgG1 Fc 片段的基因，使用已知的重組方法和方案，通過連接適當的核酸區段，例如使用 SOE-PCR (通過重疊延伸剪接)，通過 PCR 和/或基因合成和組裝來融合基因。接下來，將融合蛋白基因克隆到用於 pIntA 暫態表達的載體中(圖 2)。通過 DNA 測序驗證克隆的核酸序列。

實施例 3

從哺乳動物細胞懸浮培養物中分離和純化人類、猴和兔 IL-10R 受體。

在 CHO-C 細胞培養基中產生重組蛋白 (兔、人類和猴 IL-10R α 受體、兔 IL-10 受體)。在用表達載體轉染細胞後，在無血清培養基中進行軌道分批補料式培養 5-10 天。培養之後，細胞培養物在 2000 g 下離心 20 分鐘，並通過 0.22 μ m 篩檢程式過濾。使用 Akta Pure 25 層析系統上的親和層析，使用含有 5 ml CaptureSelect C-標籤親和基質 (Thermo Scientific) 和 Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) 的 XK 16 柱 (GE Healthcare) 從培養液中分離目標蛋白。將培養液上樣到含有 CaptureSelect C-標籤親和基質的柱上，之後用補充有 150 mM NaCl 的 20 mM TrisHCl pH7 洗滌柱，並用補充有 150 mM NaCl 的 20 mM TrisHCl pH7 中的 2 M MgCl₂ 溶液洗脫蛋白。接下來，將蛋白透析到含有 150 mM NaCl 的 20 mM TrisHCl pH7 中，之後將產物濃縮至 1 ml 並上樣到用補充有 150 mM NaCl 的 20 mM TrisHCl pH7 溶液平衡的 GE Superdex 200 Increase 10/300 GL 柱上。收集目標峰並過濾所得溶液 (0.22 μ m)。產物儲存於 -70 °C 下。所得蛋白溶液的純度通過 SDS 凝膠電泳進行評估 (圖 3)。

實施例 4

從哺乳動物細胞懸浮培養物中分離和純化基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的免疫細胞因數 (融合蛋白) (IL-10-Fc)。

在CHO-C細胞培養基中產生本發明的重組IL-10-Fc蛋白。在用表達載體轉染細胞後，在無血清培養基中進行軌道分批補料式培養5-10天。使用Pall ForteBio's Octet RED96系統在蛋白A生物感測器上監測所討論的免疫細胞因數的分泌以進行分子相互作用分析。

培養之後，細胞培養物在2000 g下離心20分鐘，並通過0.22 μ m篩檢程式過濾。通過Akta Pure 25層析系統上的親和層析，使用HiTrap rProtein A FF, 5ml和HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR柱(GE Healthcare)從培養液中分離目標蛋白。將培養液上樣到HiTrap rProtein A FF柱上，之後用PBS洗滌柱，並用100 mM枸橼酸鹽緩衝液pH 3的溶液洗脫蛋白，之後通過以比率為1/10 v/V添加2M醋酸鹽緩衝液pH6中和蛋白溶液。接下來，將蛋白透析到20 mM醋酸鹽緩衝液pH6中，之後將產物濃縮並上樣到用200 mM醋酸鹽緩衝液pH6的溶液平衡的HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR柱上。收集目標峰並過濾所得溶液(0.22 μ m)。產物儲存於-70°C下。所得蛋白溶液的純度通過SDS凝膠電泳進行評估(圖4)。

實施例5

使用Forte Bio OctetRed96對基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的免疫細胞因數(融合蛋白)(IL-10-Fc)與人類、食蟹猴、鼠和兔IL-10R α 受體之間相互作用的親和力和特異性進行動力學研究。

本發明的人類 IL-10-Fc 與人類 IL-10 受體以及與食蟹猴、鼠和兔 IL-10R α 受體的結合使用 OctetRed96 裝置 (Pall) 通過生物膜層干涉進行評價。根據製造商關於製備和固定 AR2G 感測器的說明，使 IL-10-Fc 與 AR2G 感測器結合。然後將具有固定化 IL-10 的感測器浸入到含有人類、獼猴、鼠或兔 IL-10R α 受體的孔中。在白細胞介素和受體結合後，將感測器浸入工作溶液中，用於隨後的解離階段。根據標準程式並使用 1:1 相互作用模型，使用 Octet Data Analysis 軟體 (版本 8.0) 分析減去參考信號之後的所得傳感圖。根據獲得的資料 (表 1)，本發明的 IL-10-Fc 與人類、食蟹猴、鼠 IL-10 受體結合。

表 1. 本發明的 IL-10-Fc 與人類、食蟹猴、鼠和兔 IL-10 受體相互作用的親和常數。

	親和常數 (KD), M			
	人類 IL-10 受體, M	食蟹猴 IL-10 受體, M	鼠 IL-10 受體, M	兔 IL-10 受體, M
IL-10-Fc	5.1 $\pm$ 0.3 E-09	3.7 $\pm$ 0.4 E-09	2.1 $\pm$ 0.2 E-09	2.03E-08

實施例 6

基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的免疫細胞因數 (融合蛋白) (IL-10-Fc) 的熱穩定性分析。

將在 20 mM 醋酸鹽緩衝液 (pH6) 中的本發明重組 IL10-Fc 蛋白使用擴增儀在塑膠試管中於 50 $^{\circ}$ C 下加熱 48 小時，然後轉變到 +4 $^{\circ}$ C。程式結束之後，在 TSK Gel G3000 SWx1 柱上使用分析型凝膠層析分析加熱前後的樣品。比較加熱前後樣品的目標峰面積。加熱 48 小時之後二聚體峰面積的

7%變化表明產物的穩定性和長期儲存的可能性(表2)。

表2.本發明 IL-10-Fc產物在加熱前後色譜峰面積比率的比較

樣 品	峰 的 比 率 %		
	Σ聚 集 體 , %	二 聚 體 , %	Σ片 段 , %
加 熱 之 前	1.80	97.25	0.96
加 熱 後	7.99	89.97	2.05

實施例 7

基於 IL-10和人類 IgG1 Fc片段的免疫細胞因數(融合蛋白)(IL-10-Fc)在 37℃ 下的人體血清中長期儲存期間的穩定性分析.

IL-10在生物體中的半衰期相對較短。例如，如通過體外生物測定或通過感染性休克類比系統中的功效測量的小鼠半衰期[參見 Smith et al., Cellular Immunology 173: 207-214 (1996)]為約 2-6 小時。在本研究中，穩定性理解為在 +37℃ 的人體血清中體外儲存後全長 IL-10 候選分子的濃度降低。為了確定穩定性，將 IL-10-Fc 免疫細胞因數在人體血清中稀釋至濃度為 5 μg/ml，並在 +37℃ 的溫度調控室中儲存 24 小時 -14 天。在類似條件下儲存用於隨後確定所討論樣品的背景濃度值的未補充人體血清的樣品。儲存之後，通過酶免疫測定來測定樣品的濃度。使用 MS Excel 套裝軟體進行資料計算和繪圖(圖 5)。

因此，由於對血清蛋白酶降解的抗性所致，本發明的 IL-10+Fc 在血清中具有高穩定性。抗性由給定融合蛋白的結構特徵提供，其結構如 SEQ ID NO: 1 所示。

實施例 8

在對 MC/9 小鼠肥大細胞的細胞測定中測定基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的免疫細胞因數(融合蛋白) (IL-10-Fc) 的增殖活性。

細胞因數功能的關鍵步驟為細胞因數與其受體的相互作用。在存在共刺激細胞因數 IL4 的情況下，在標準增殖測定中對 MC/9 細胞系分析了測試候選物對 IL-10R α 受體的啟動。文獻中已經表明，IL-10 在存在 IL4 的情況下刺激 MC/9 小鼠肥大細胞的增殖(Thompson-Snipes L et al J Exp Med. 1991 doi: 10.1084/jem.173.2.507 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2118779/>)。該測定用作用於評價市售重組人類 IL-10 製劑的生物活性的標準測定。如製造商(Peprotech)規定的，對照產物(重組人類 IL-10)的活性在對 MC/9 系的增殖測定中為 ≤ 2.0 ng/ml。

測定在用於懸浮細胞培養物的 96 孔培養板中進行。懸浮液每孔含有 10,000 個 MC/9 細胞以及如圖所示濃度的測試候選物(重組人類 IL-10，Peprotech 目錄號：200-10，和本發明的 IL-10+Fc)。最終懸浮液體積為每孔 150 μ l。所有懸浮液組分均在補充有 2 mM 穀氨醯胺、10 μ g/ml 慶大黴素、10% 滅活胎牛血清(FBS)和 10 pg/ml IL4 的 RPMI-1640 培養基中製備。添加所有組分之後，將板在 37°C 下於存在 5% CO₂ 的潮濕氣氛中溫育 72 小時。在溫育期結束時，將 17 μ L 阿拉瑪藍染料添加至孔中，並將板在 37°C 下於存在 5% CO₂

的潮濕氣氛中溫育3-6小時，直至看到粉紅色染色。使用酶標儀在495/590 nm波長下測量螢光。

因此，本發明的 IL-10-Fc 啟動 IL-10R α 受體，如對 MC/9 細胞的增殖細胞測定中所證實的(圖 6)。在細胞測定中，本發明測試 IL-10+Fc 免疫細胞因數的半數最大有效濃度(EC50)為 53.3 pM，而來自 Peprtech 的對照重組人類 IL-10 為 91.7 pM。所得資料表明本發明 IL-10+Fc 的活性高於市售 IL-10。

實施例 9

通過經人類 CD8+T 細胞分泌 IFN- γ ，確定基於 IL-10 和人類 IgG1 Fc 片段的免疫細胞因數(融合蛋白) (IL-10-Fc) 的功能活性。

體外 CD8+T 細胞上 TCR 和 CD28 的抗原非依賴性啟動(經抗 CD3 和抗 CD28 抗體)導致細胞表面的 PD1 表達，這導致細胞毒性淋巴細胞活性的抑制，然後是其耗盡。同時，IL-10R α 受體在細胞表面表達，當與 IL-10 相互作用時，其啟動具有抗凋亡作用，這有助於產生各種細胞因數(包括 IFN- γ)的細胞毒性 T 細胞在腫瘤微環境中的存活。

通過 Ficoll 密度梯度離心從健康供體的全血中分離人類外周血單核細胞(PBMC)。然後使用商業試劑盒從磁柱上的 PBMC 懸浮液中分離 CD8+T 細胞。

測試在 96 孔板中進行，孔中預先固定有抗 CD3 抗體(1 μ g/ml)。懸浮液每孔含有 30,000 個 CD8+T 細胞以及濃度為 1

$\mu\text{g/ml}$ 的抗CD28抗體。孔中細胞懸液和抗體的最終體積為200 μl ，懸浮液的所有組分均在包含10% FBS的RPMI-1640培養基中製備。將板在37°C和5% CO_2 下溫育3天。在溫育的第4天，收集細胞並通過離心從抗CD28抗體中洗滌。將所得細胞沉澱物以 0.3×10^6 個細胞/ ml 的濃度懸浮於補充有10% FBS的RPMI 1640培養基中。將100 μl 洗滌過的細胞和100 μl 候選抗體以如圖表中所示的濃度引入到新的預先製備的ELISA 96孔板的孔中，其中抗CD3抗體固定到塑膠上(1 $\mu\text{g/ml}$)。將板在37°C和5% CO_2 下溫育3天。在培養的第4天，從孔中收集培養液的等分試樣並測量IFN- γ 的濃度。

因此，本發明的IL-10-Fc顯示出誘導人類啟動的細胞毒性CD8+T細胞產生細胞因數IFN- γ 的能力。

實施例 10

測定基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的免疫細胞因數(融合蛋白)(IL-10-Fc)對人類CD8+T細胞對於Raji靶細胞的細胞毒性的影響。

通過Ficoll密度梯度離心從健康供體的全血中分離人類外周血單核細胞(PBMC)。然後從磁柱上的PBMC懸浮液中分離CD8+T細胞。

將含有30,000個CD8+T細胞和1 $\mu\text{g/ml}$ 抗CD28抗體的200 μl 懸浮液引入到孔中預先固定有抗CD3抗體(1 $\mu\text{g/ml}$)的96孔板中，並在37°C和5% CO_2 下溫育3天。然後收集細胞，通過離心洗滌，懸浮於補充有10% FBS的RPMI-1640

培養基中，並以 30,000 個細胞/孔注射到新的預先製備的 ELISA 96 孔板的孔中，其中抗 CD3 抗體固定到塑膠上 (1 $\mu\text{g/ml}$) 和候選抗體溶液的濃度如圖表中所示的。將板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 下溫育 3 天。然後從板孔中收集細胞，通過離心洗滌，並將沉澱物以 0.3×10^6 個細胞/ml 的濃度懸浮於 RPMI-1640 10% 培養基中。

將 6.5 ml 鈣黃綠素 AM 溶液添加至 2×10^6 個 Raji 細胞中。將含有鈣黃綠素的細胞在 CO_2 溫育器中於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下溫育 30 分鐘。在溫育結束時，通過離心將細胞從鈣黃綠素中洗滌兩次。製備濃度為 0.3×10^6 個細胞/ml 的懸浮液。

測定在 96 孔培養板中進行。懸浮液每孔含有 30,000 個 CD8+T 細胞、30,000 個用鈣黃綠素 AM 標記的 Raji 細胞和最終濃度為 50 ng/ml 的抗 CD3/CD20 抗體。將板在溫育器中於 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 下溫育 2.5 小時。

在溫育結束之前 30 分鐘，在最大解裂控制下將裂解緩衝溶液添加至孔中。在酶標儀上於 485/538 nm 處測量螢光。

結果表明，與對照相比較，在存在本發明 IL-10+Fc 的情況下培養 CD8+T 細胞將其對 Raji 靶細胞的細胞毒活性提高 7 倍 (圖 8)。

實施例 11

CDC 活性的測量。

CDC 測定使用 Jurkat 細胞系。測定在 96 孔培養板中進

行。懸浮液每孔含有 50,000 個 Jurkat 細胞以及指定濃度的本發明 IL-10+Fc 和稀釋至 1:4 的人體血清補體。孔中細胞懸液的最終體積為 150 μ l，懸液的所有組分均在包含 0.1% BSA 的 RPMI-1640 培養基中製備。然後將板在 37°C 和 5% CO₂ 下溫育 4 小時。將 15 μ l 阿拉瑪藍試劑添加至每孔中，並在 37°C 和 5% CO₂ 下溫育 16 小時。由 JSC“Biocad”生產的具有 CDC 活性的抗體利妥昔單抗 (CO83031118R) 和 Raji 靶細胞 (以與 Jurkat 細胞相同的濃度) 用作陽性對照。使用酶標儀在 544 nm 的激發波長和 590 nm 的發射波長下測量螢光。

結果表明，本發明的 IL-10+Fc 不誘導 Jurkat 細胞系的補體介導的裂解 (CDC) (圖 9)。

實施例 12

ADCC 活性的測量.

測定使用基於 Jurkat 細胞系創建的，在 NFAT 啟動子的控制下於表面穩定表達 CD16 並含有編碼螢火蟲螢光素酶的基因的報告細胞系 Jurkat-NFAT-Luc-CD16；Jurkat-PD1 克隆 43 用作靶細胞。進行測定以確認在本發明的測試免疫細胞因數 IL-10+Fc 中不存在效應子特性。

測定在設計用於發光測定的白色 96 孔培養板中進行。懸浮液每孔含有 25,000 個 Jurkat-NFAT-Luc-CD16 效應細胞、25,000 個 Jurkat-PD1 靶細胞和如圖表中所示濃度的本發明 IL-10-Fc。由 JSC“Biocad”產生的效應抗 PD1 抗體用作

陽性對照。孔中細胞懸液和免疫細胞因數(本發明 IL-10+Fc)的最終體積為 75 μ l，懸浮液的所有組分在包含 10% FBS 的 RPMI-1640 培養基中製備。添加所有組分之後，將板在 37°C 和 5% CO₂ 下溫育 5 小時，並然後使用 One-Glo 螢光素酶測定試劑盒 (Promega) 測量孔中的發光強度。使用酶標儀測量發光。

結果表明，本發明的 IL-10+Fc 在使用 Jurkat-NFAT-Luc-CD16-V176 報告細胞系的測定中不表現出抗體依賴性細胞毒性(圖 10)。

實施例 13

自體細胞毒性的測量。

測定使得能夠在體外評價抗體誘導的血液中主要白細胞亞群的耗盡，這反過來又可甚至在體內研究之前評價正在開發的治療性分子的安全性。

測定在用於懸浮培養的 96 孔培養板中進行。懸浮液每孔含有 300,000 個從健康供體新鮮分離的 PBMC 和指定濃度的本發明 IL-10+Fc，孔中細胞懸液的最終體積為 150 μ l。奧比妥珠單抗 (Obinutuzumab) (aCD20) 和抗 CD47 抗體用作陽性對照。所有懸浮液組分均在補充有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培養基中製備。在混合 PBMC 和抗體之後，將板在 37°C 和 5% CO₂ 下溫育 16 小時。CD45+、CD56+、CD19+、CD3+、CD4+ 和 CD8+ 亞群在懸浮液中 PBMC 中的比例然後通過用針對相應 CD 的螢光標記抗體將懸浮液直

接染色，然後使用流式細胞螢光計分析細胞來測量。對於CD56+、CD19+、CD3+細胞，圖表顯示其相對於測試懸浮液的CD45+細胞的比例，而對於CD4+、CD8+細胞，圖表顯示其相對於CD45+CD3+細胞的比例。

體外自體細胞毒性測定未顯示出本發明的IL-10+Fc誘導人類PBMC中NK、B和T細胞群的顯著耗盡(圖11A、11B、11C、11D、11E)。進一步地，對照抗體奧比妥珠單抗(aCD20)顯示出CD20+B細胞群的幾乎完全耗盡，而抗CD47抗體顯示出NK細胞的幾乎50%耗盡。

實施例 14

體內抗腫瘤活性的研究。

研究在Balb/c小鼠(4-6周齡的雄性，體重18-24克)上進行。將0.1 ml CT26腫瘤細胞懸液以 2×10^5 個細胞的量皮下注射到小鼠右側。當腫瘤達到約70 mm³的體積($V=LW^2/2$)時，將動物分組，使得組中的平均腫瘤體積差異不超過10%。所有藥物均通過腹膜內(i.p.)給予每週給予兩次，持續3周。在所有情況下，本發明的IL-10-Fc以0.1 mg/kg的劑量給予，amPD-1以10 mg/kg的劑量給予。在本發明IL-10-Fc組合的組中，在給予本發明IL-10-Fc之後第二天給予amPD-1。來自“腫瘤生長對照”組的動物被給予緩衝液。每週兩次評價腫瘤結節的線性大小。ITG (腫瘤生長指數)計算為測量當天(1-19)的腫瘤體積與治療開始當天的腫瘤體積的比率。

結果表明，本發明的 IL-10+Fc 在單一治療中具有抗腫瘤活性，並且進一步地，與用本發明的免疫細胞因數 IL-10+Fc 或抗 PD-1 抗體的單一療法相比較，本發明的 IL-10+Fc 與抗 PD1 抗體的組合在抗腫瘤活性方面具有顯著的協同作用(圖 12、13、14)。

序列表

<110> 俄羅斯聯邦商拜奧卡德聯合股份有限公司(Joint stock Company "BIOCAD")

<120> 用於啟動人類IL-10Ra受體的免疫細胞因數及其用途

<140> TW 110146439

<141> 2021-12-10

<150> RU2020140807

<151> 2020-12-10

<160> 6

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 402

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL-10-Fc單體

<400> 1

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Gly Ser
225 230 235 240
Gly Gly Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
 245 250 255
Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe

260 265 270
Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
275 280 285
Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
290 295 300
Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
305 310 315 320
Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu
325 330 335
Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
340 345 350
Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
355 360 365
Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
370 375 380
Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
385 390 395 400
Arg Asn

<210> 2
<211> 421
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IL-10-Fc
<400> 2

Met Met Ser Phe Val Ser Leu Leu Leu Val Gly Ile Leu Phe His Ala
1 5 10 15
Thr Gln Ala Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
20 25 30
Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
35 40 45
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
50 55 60
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
65 70 75 80
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
85 90 95
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
100 105 110
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
115 120 125
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
130 135 140
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
145 150 155 160
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
165 170 175
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
180 185 190

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
195 200 205
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
210 215 220
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
225 230 235 240
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
245 250 255
Pro Gly Ser Gly Gly Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser
260 265 270
Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg
275 280 285
Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu
290 295 300
Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr
305 310 315 320
Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu
325 330 335
Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val
340 345 350
Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg
355 360 365
Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln
370 375 380
Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala
385 390 395 400
Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr
405 410 415
Met Lys Ile Arg Asn
420

<210> 3

<211> 1206

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA IL-10-Fc

<400> 3

gagcccaaat ctagtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagccgca	60
gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acacctcat gatctcccg	120
acctctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc	180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag	240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	360
atctccaaag ccaaagggca gccccagaaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccg	420
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct	540
cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc	600
agggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	660
tacacgcaga aaagcctctc cctgtccccg ggtggagggt caggagggtg tccaggatcg	720
ggtggctctc ctggacaggg aaccagtcgc gagaactcct gcacccactt ccccggaac	780

ctgccaaca tgctgcggga cctgagagat gccttctcca gagtgaaaac attcttccag 840
atgaaggacc agctggacaa cctgctgctg aaagagtccc tgctggaaga tttcaagggc 900
tacctgggct gccaggccct gtccgagatg atccagttct acctggaaga agtgatgcct 960
caggccgaga accaggaccc cgacatcaag gcccacgtga actccctggg cgagAACctg 1020
aaaaccctgc ggctgcggct gagaagatgc caccggtttc tgccctgcga gaacaagtcc 1080
aagcccgctg aacaagtga gaacgccttc aacaagctgc aggaaaagg catctacaag 1140
gccatgagcg agttcgacat cttcatcaac tacatcgagg cctacatgac catgaagatc 1200
cggaac 1206

<210> 4

<211> 1206

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA IL-10-Fc

<400> 4

gagcccaaat ctagtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagccgca 60
gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acacctcat gatctcccg 120
acctctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc 180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctacccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 360
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacagggtg acaccttgc cccatcccgg 420
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacgcct 540
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 600
agggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
tacacgcaga aaagcctctc cctgtccccg ggtggagggt caggaggtgg tccaggatcg 720
ggtggctcgc ccgtcaagg aactcagctt gagaactcat gtacacactt tccagggaat 780
ctgccaaca tgcttaggga tctccgggac gctttctcta gggtaagac cttcttccag 840
atgaagacc aactggacaa tctgctgtta aaggaaagt tgctcgaaga ttttaagggc 900
tatctcgggt gccaggccct ttccgaaatg attcagtttt acctggagga agtaatgcct 960
caagctgaaa accaggaccc cgatatcaag gcgcatgtga attcattggg cgagAACctg 1020
aaaaccctcc gactcagact ccggcgttgc cacaggttcc tgccatgcga gaacaaatca 1080
aagcccgctc agcaggtgaa gaacgcattc aataagctgc aggagaaagg aatctacaaa 1140
gctatgtcgg agttcgacat cttcatcaac tatatcgagg cttacatgac tatgaaaatc 1200
cgtaat 1206

<210> 5

<211> 1263

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有前導肽的DNA IL-10-Fc

<400> 5

atgatgtect ttgtctctct gctcctgggt ggcatcctgt tccatgccac ccaggccgag 60
cccaaattcta gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agccgcaggg 120
ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc 180
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag acctgaggt caagttcaac 240
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 300
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 360
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 420

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 480
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac 540
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 600
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 660
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac 720
acgcagaaaa gcctctccct gtccccgggt ggagggtcag gaggtggtcc aggatcgggt 780
ggctctcctg gacagggaac ccagtccgag aactcctgca cccacttccc cggcaacctg 840
cccaacatgc tgcgggacct gagagatgcc ttctccagag tgaaaacatt cttccagatg 900
aaggaccagc tggacaacct gctgctgaaa gagtccctgc tggagattt caagggtac 960
ctgggctgcc aggccctgtc cgagatgac cagtcttacc tggagaagt gatgcctcag 1020
gccgagaacc aggaccccga catcaaggcc cagtggaact ccctgggcga gaacctgaaa 1080
accttgcggc tgcggctgag aagatgccac cggtttctgc cctgcgagaa caagtccaag 1140
gccgtggaac aagtgaagaa cgccttcaac aagctgcagg aaaaggcat ctacaaggcc 1200
atgagcgagt tcgacatctt catcaactac atcgaggcct acatgacat gaagatccgg 1260
aac 1263

<210> 6

<211> 1263

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有前導肽的DNA IL-10-Fc

<400> 6

atgatgtcct ttgtctctct gtccttgggt ggcatacctgt tccatgccac ccaggccgag 60
cccaaattcta gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agccgcaggg 120
ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc 180
cctgagggtca catgcgtgggt ggtggacgtg agccacgaag acctgaggt caagttcaac 240
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtag 300
aacagcacgt accgtgtgggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 360
aaggagtaca agtgaagggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 420
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 480

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac 540
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 600
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 660
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac 720
acgcagaaaa gcctctccct gtccccgggt ggagggtcag gaggtggtcc aggatcgggt 780
ggctcgcccg gtcaaggaac tcagtctgag aactcatgta cacactttcc agggaatctg 840
cccaacatgc ttagggatct ccgggacgct ttctctaggg tcaagacctt cttccagatg 900
aaagaccaac tggacaatct gctgttaaag gaaagtttgc tcgaagattt taagggtat 960
ctcgggtgcc aggccctttc cgaaatgatt cagttttacc tggaggaagt aatgcctcaa 1020
gctgaaaacc aggaccccga tatcaaggcg catgtgaatt cattgggcga gaacctgaaa 1080
acctccgac tcagactccg gcgttggcac aggttcctgc catgcgagaa caaatcaaag 1140
gccgtcgagc aggtgaagaa cgcattcaat aagctgcagg agaaaggaat ctacaagct 1200
atgtcggagt tcgacatctt catcaactat atcgaggctt acatgactat gaaaatccgt 1260
aat 1263

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種用於啟動人類IL-10R α 受體的分離的免疫細胞因數，其包含基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的同二聚體複合物，其中該基於IL-10和人類IgG1 Fc片段的單體包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列。

【請求項2】一種分離的核酸，其編碼如請求項1之免疫細胞因數。

【請求項3】如請求項2之分離的核酸，其中該核酸為DNA。

【請求項4】如請求項2之分離的核酸，其中該核酸包含具有SEQ ID NO: 3的核苷酸序列。

【請求項5】如請求項2之分離的核酸，其中該核酸包含具有SEQ ID NO: 4的核苷酸序列。

【請求項6】一種包含如請求項2至5中任一項之核酸之表達載體。

【請求項7】一種用於產生宿主細胞之方法，該宿主細胞用於產生如請求項1之免疫細胞因數，該方法包括用如請求項6的載體轉化該細胞。

【請求項8】一種用於產生如請求項1之免疫細胞因數的宿主細胞，其包含如請求項2至5中任一項之核酸。

【請求項9】一種用於產生如請求項1之免疫細胞因數之方法，其包括在足以產生該免疫細胞因數的條件下於培養基中培養如請求項8之宿主細胞，如果需要，然後分離和純化所得的免疫細胞因數。

【請求項10】一種藥物組合物，其包含如請求項1之免疫細胞因數和一種或多種藥學上可接受的賦形劑。

【請求項11】如請求項1之藥物組合物，其中該藥物組合物用於啟動人類IL-10R α 受體。

【請求項12】一種用於治療腫瘤疾病的如請求項10之藥物組合物。

【請求項13】如請求項12之藥物組合物，其中該腫瘤疾病選自：HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC (三陰性乳腺癌)、CRC (結直腸癌)、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC (非小細胞肺癌)、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病(急性白血病或粒細胞性白血病)、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞急性成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

【請求項14】一種用於啟動人類IL-10R α 受體之藥物組合物，其包含如請求項1的免疫細胞因數和至少一種其他治療活性化合物。

【請求項15】一種用於治療腫瘤疾病的如請求項14之藥物組合物。

【請求項16】如請求項15之藥物組合物，其中該腫瘤

疾病選自：HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC (三陰性乳腺癌)、CRC (結直腸癌)、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC (非小細胞肺癌)、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病(急性白血病或粒細胞性白血病)、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞急性成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

【請求項17】如請求項14至15中任一項之藥物組合物，其中該其他治療活性化合物為抗體、化學治療劑或激素治療劑。

【請求項18】如請求項14至15中任一項之藥物組合物，其中該其他治療活性化合物為免疫檢查點抑制劑。

【請求項19】如請求項18之藥物組合物，其中該免疫檢查點抑制劑選自與PD-1特異性地結合的抗體、與PD-L1特異性地結合的抗體或與CTLA-4特異性地結合的抗體。

【請求項20】如請求項19之藥物組合物，其中該與PD-1特異性地結合的抗體選自：prolgolimab、派姆單抗、納武單抗。

【請求項21】如請求項19之藥物組合物，其中該與CTLA-4特異性地結合的抗體為伊匹單抗。

【請求項22】如請求項19之用途，其中該與PD-L1特異性地結合的抗體選自德瓦魯單抗、阿維魯單抗、阿特珠單抗、瑪奈利單抗。

【請求項23】一種治療腫瘤疾病之方法，其包括以治療有效量給予需要這種治療的受試者如請求項1的免疫細胞因數或如請求項10、14中任一項之藥物組合物。

【請求項24】如請求項23之治療方法，其中該腫瘤疾病選自：HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC (三陰性乳腺癌)、CRC (結直腸癌)、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC (非小細胞肺癌)、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病(急性白血病或粒細胞性白血病)、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞急性成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

【請求項25】一種用於在需要這種啟動的受試者啟動人類IL-10R α 受體之方法，其包括給予受試者有效量的如請求項1之免疫細胞因數或如請求項10、14中任一項之藥物組合物。

【請求項26】一種如請求項1之免疫細胞因數或如請求項10、14中任一項之藥物組合物用於在需要這種治療的

受試者治療腫瘤疾病之用途。

【請求項27】如請求項26之用途，其中該腫瘤疾病選自：HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC (三陰性乳腺癌)、CRC (結直腸癌)、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC (非小細胞肺癌)、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病(急性白血病或粒細胞性白血病)、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞急性成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

【請求項28】如請求項1之免疫細胞因數或至少一種其他治療活性化合物用於在需要這種治療的受試者治療腫瘤疾病之用途。

【請求項29】如請求項28之用途，其中該腫瘤疾病選自：HNSCC (頭頸部鱗狀細胞癌)、宮頸癌、未知原發癌、膠質母細胞瘤、食道癌、膀胱癌、TNBC (三陰性乳腺癌)、CRC (結直腸癌)、肝細胞癌、黑色素瘤、NSCLC (非小細胞肺癌)、腎癌、卵巢癌、具有微衛星不穩定性的結直腸癌、白血病(急性白血病或粒細胞性白血病)、淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肉瘤、肝細胞癌、膠質母細胞瘤、霍奇金淋巴瘤、T細胞和B細胞

胞急性成淋巴細胞性白血病、小細胞肺癌、難治性非霍奇金B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、胰腺癌、卵巢癌、高風險骨髓增生異常綜合症。

【請求項30】如請求項28至29中任一項之用途，其中該其他治療活性化合物為抗體、化學治療劑或激素治療劑。

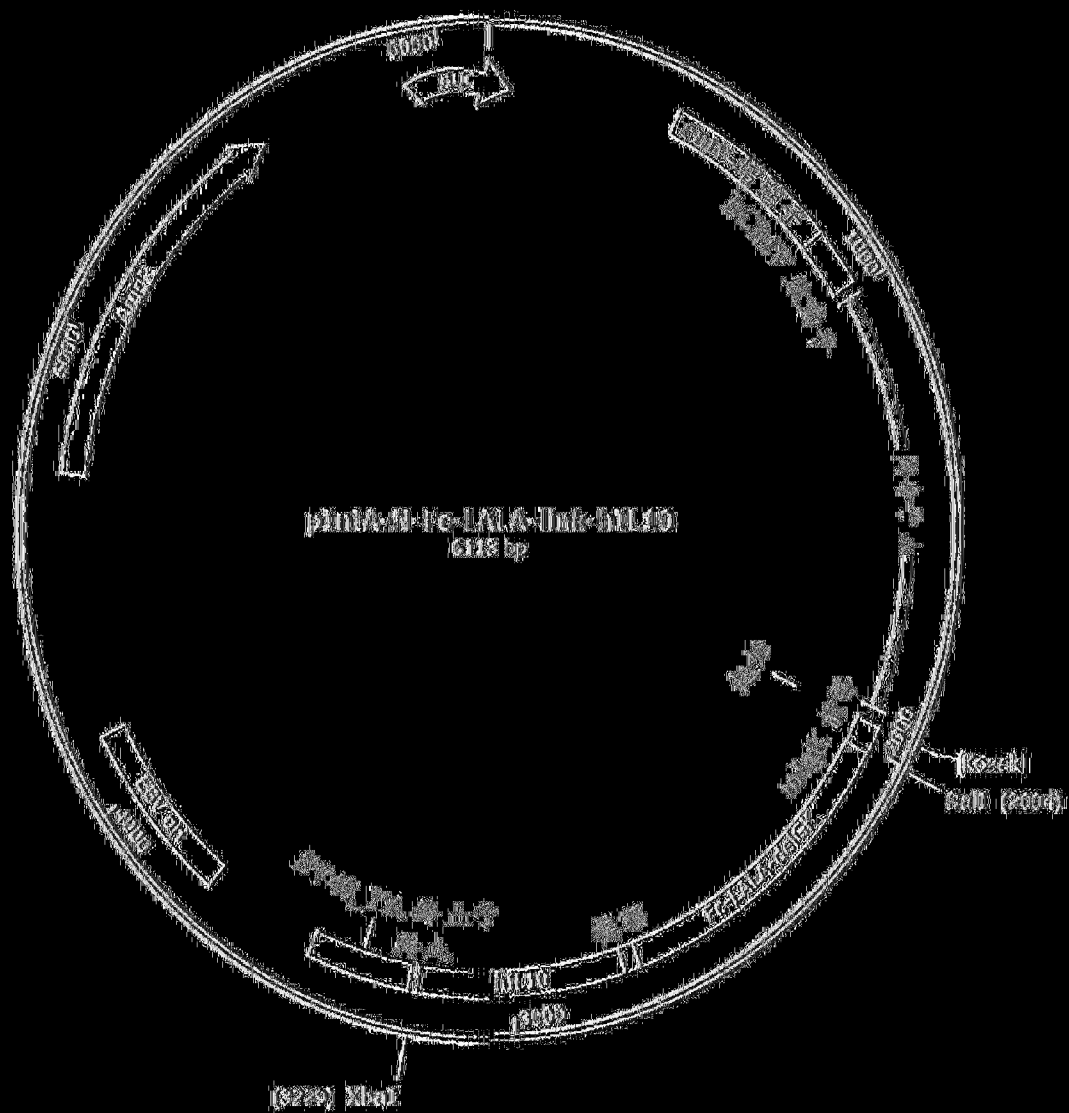
【請求項31】如請求項28至29中任一項之用途，其中該其他治療活性化合物為免疫檢查點抑制劑。

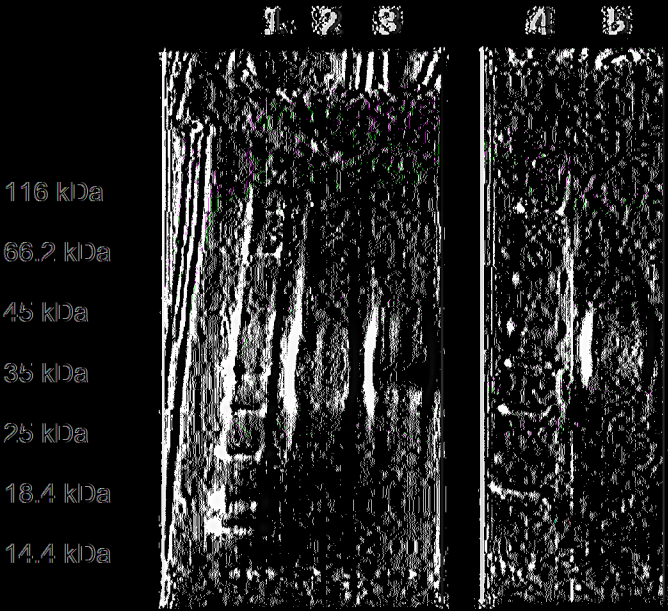
【請求項32】如請求項31之用途，其中該免疫檢查點抑制劑選自與PD-1特異性地結合的抗體、與PD-L1特異性地結合的抗體或與CTLA-4特異性地結合的抗體。

【請求項33】如請求項32之用途，其中該與PD-1特異性地結合的抗體選自：prolgolimab、派姆單抗、納武單抗。

【請求項34】如請求項32之用途，其中該與CTLA-4特異性地結合的抗體為伊匹單抗。

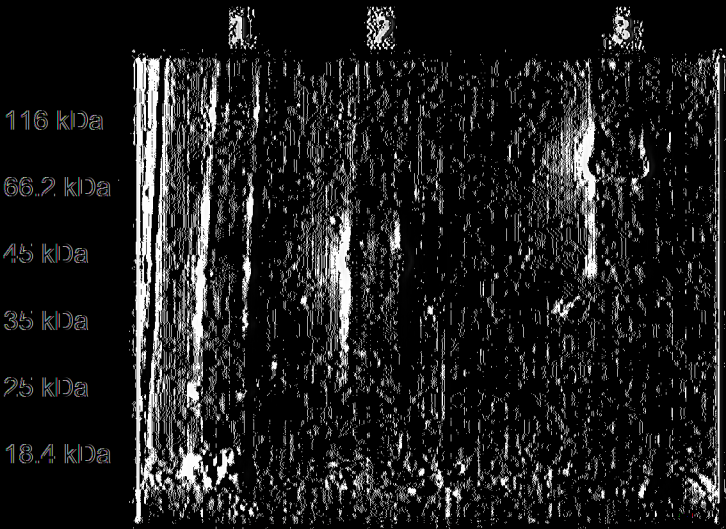
【請求項35】如請求項32之用途，其中該與PD-L1特異性地結合的抗體選自德瓦魯單抗、阿維魯單抗、阿特珠單抗、瑪奈利單抗。


$$\left| \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \right|$$



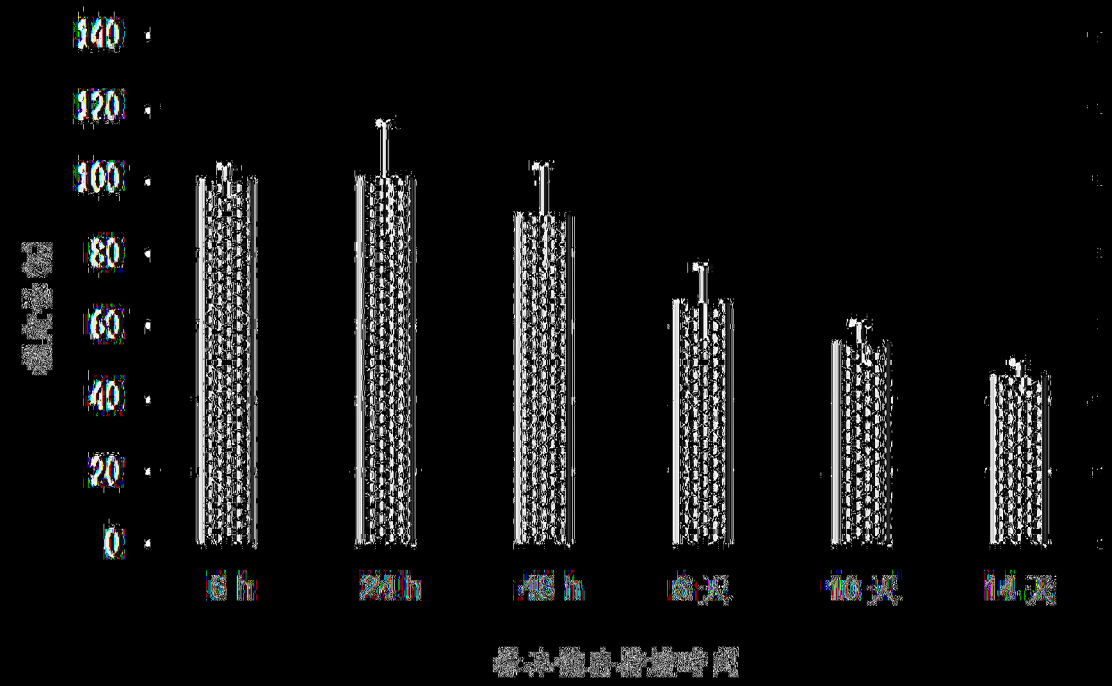
- 1) 蛋白分子量標誌物
- 2) 人類JOL 10Ra cxc JEPEA
- 3) 食蟹猴JOL 10Ra cxc JEPEA
- 4) 蛋白分子量標誌物
- 5) 兔JOL 10Ra cxc JEPEA

|(Fig 3)|

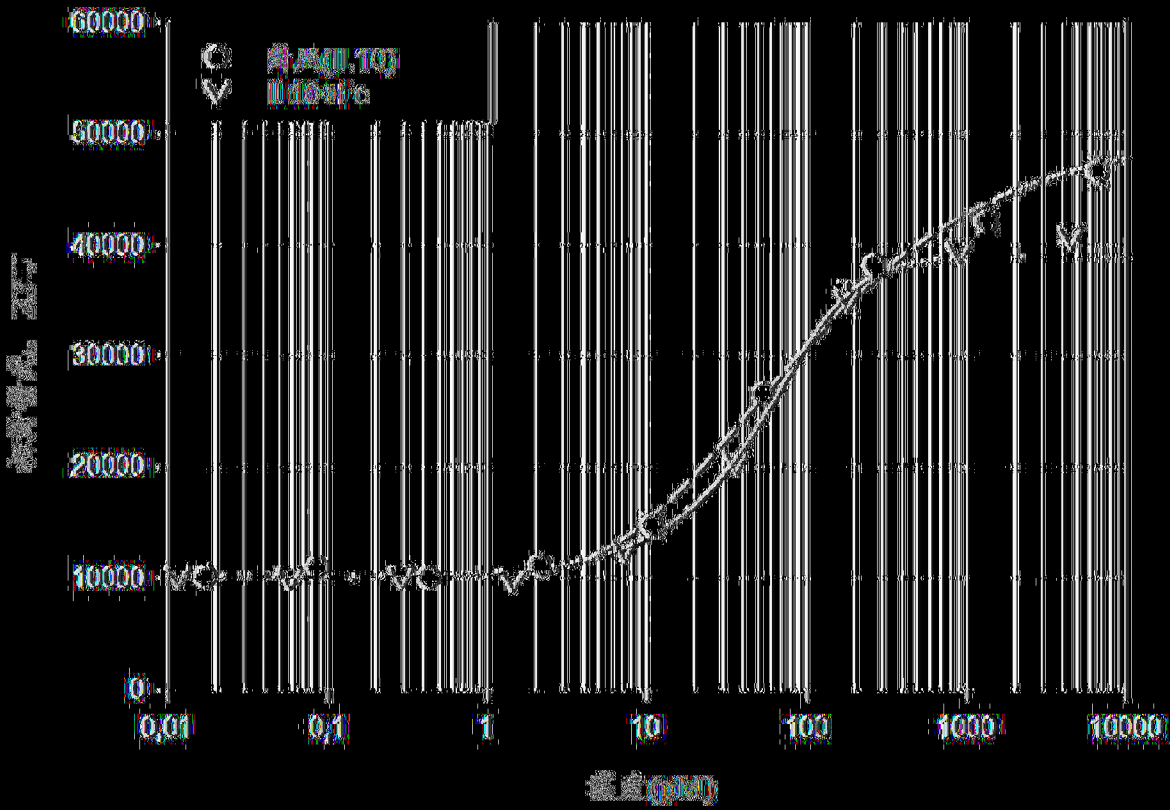


- 1) 蛋白分子量標誌物
- 2) 在還原條件下的JOL10-FC 4.5 μg
- 3) 在非還原條件下的JOL10-FC 4.5 μg

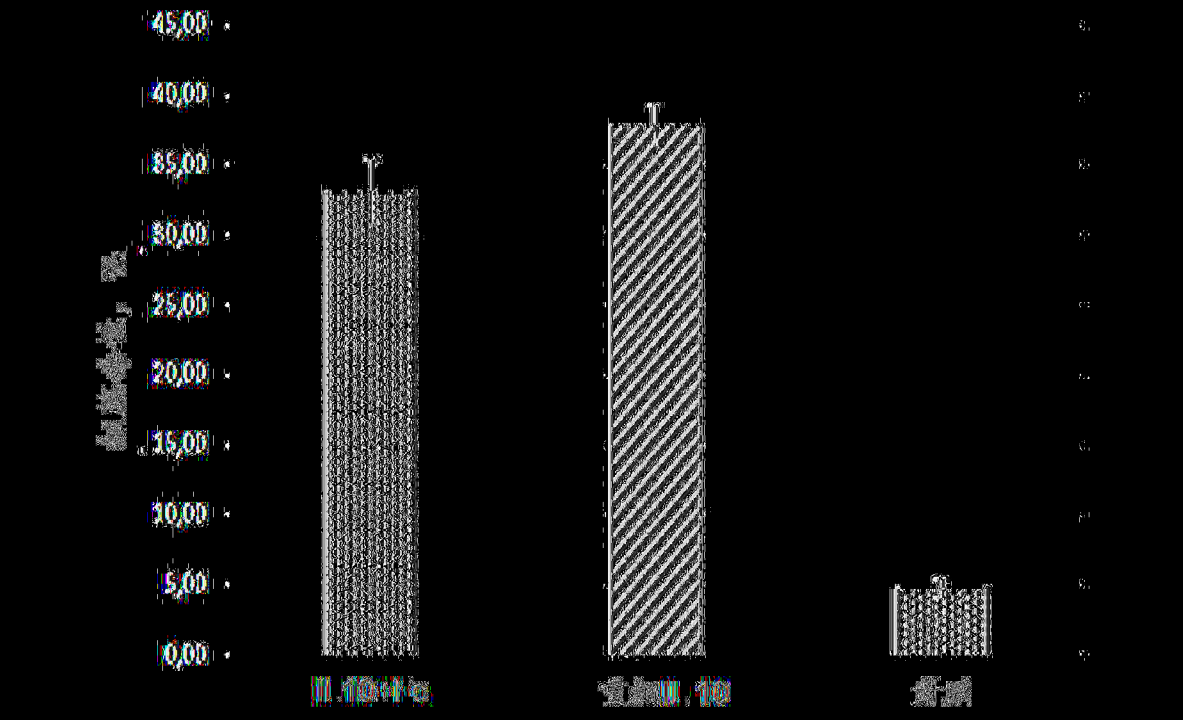
|(Fig 4)|



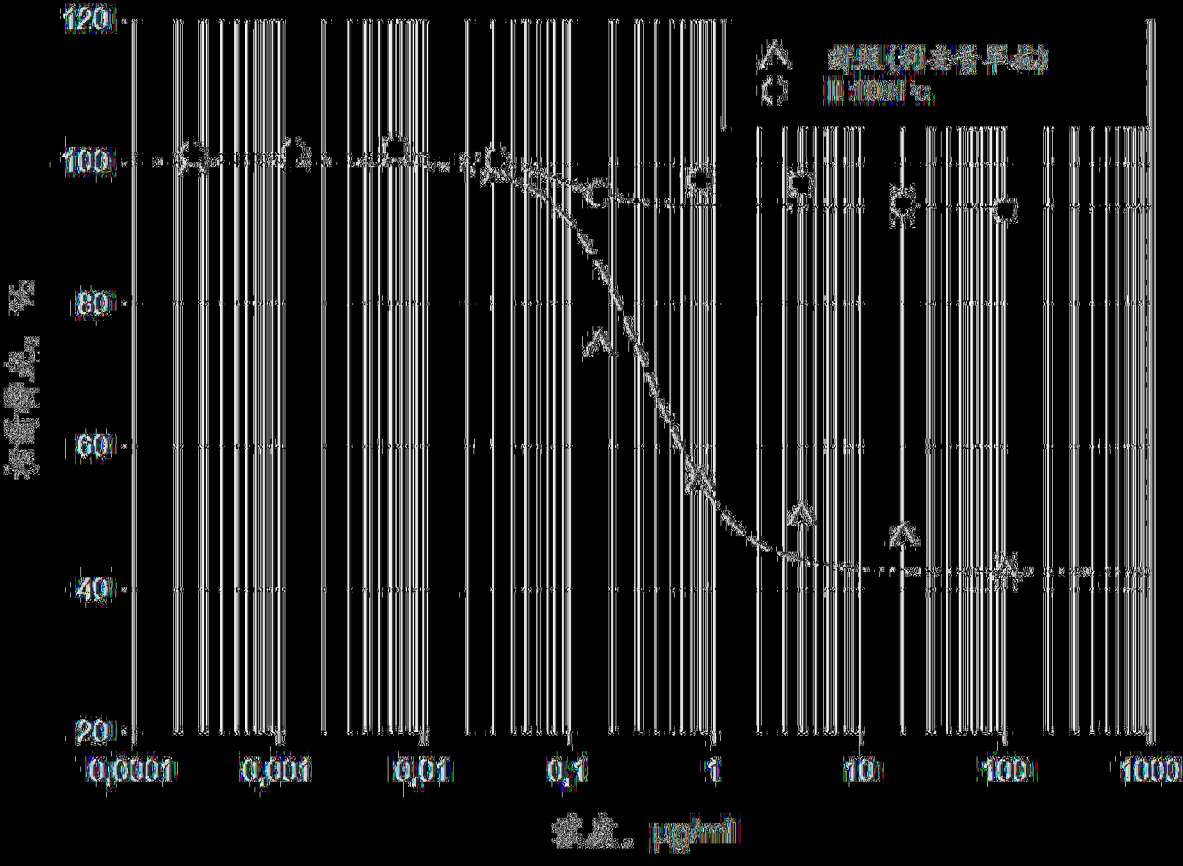
(图 5)



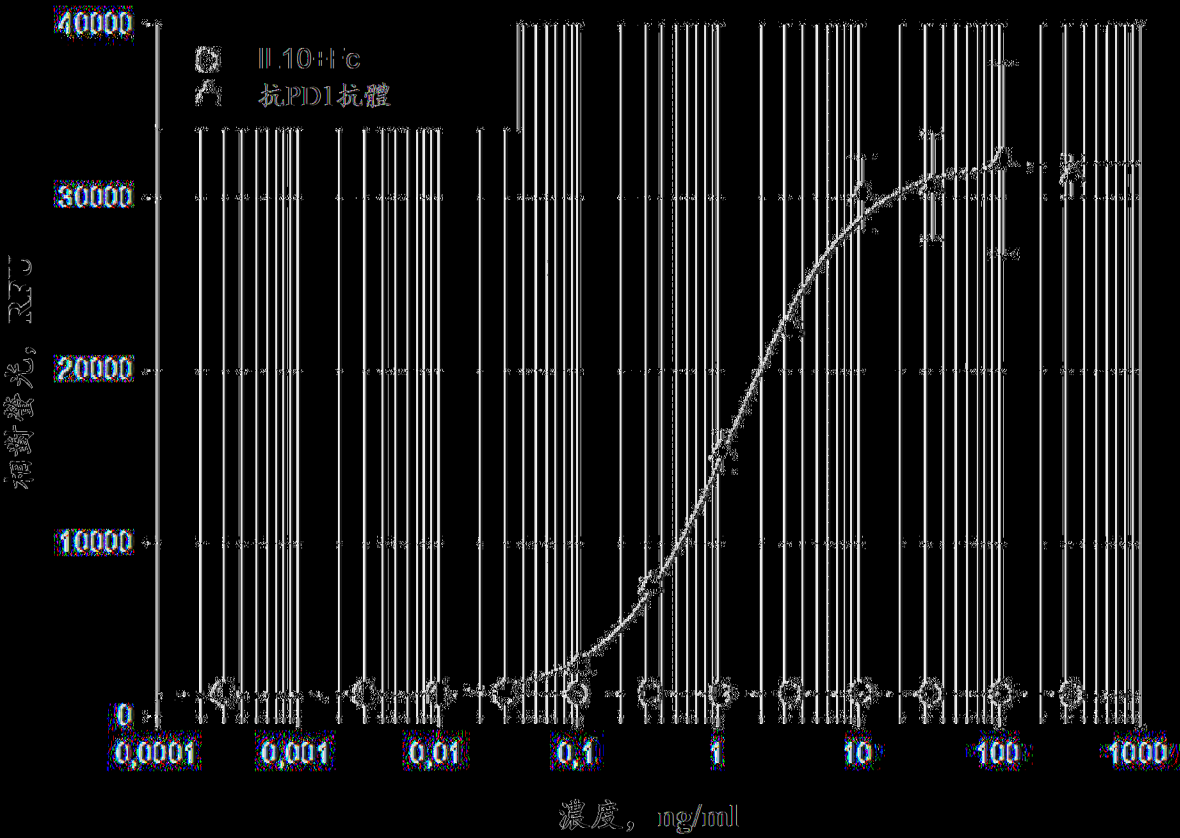
(图 6)



(Figure 8)



(Figure 9)



(Figure 10)

圖 10

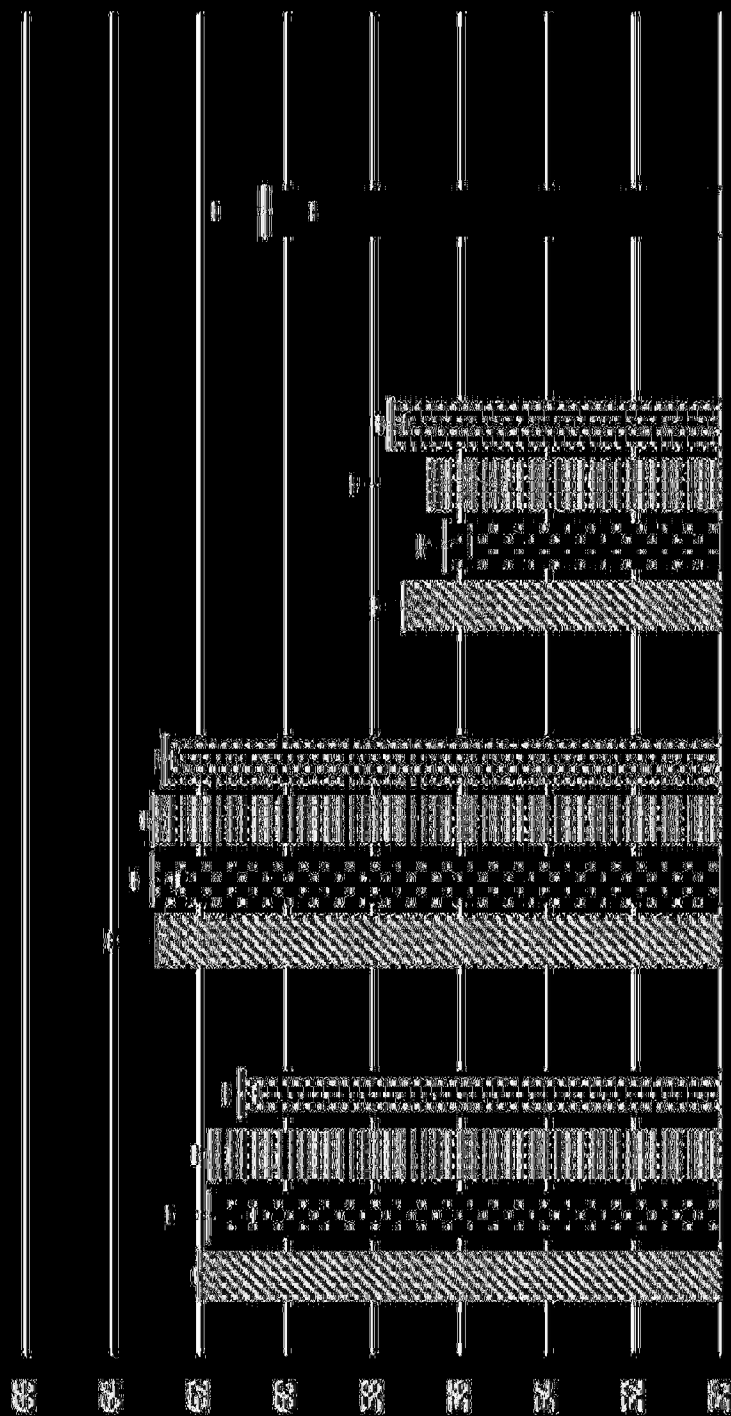


圖 10 顯示本發明的一實施例的半導體裝置的橫切面視圖。

圖 11

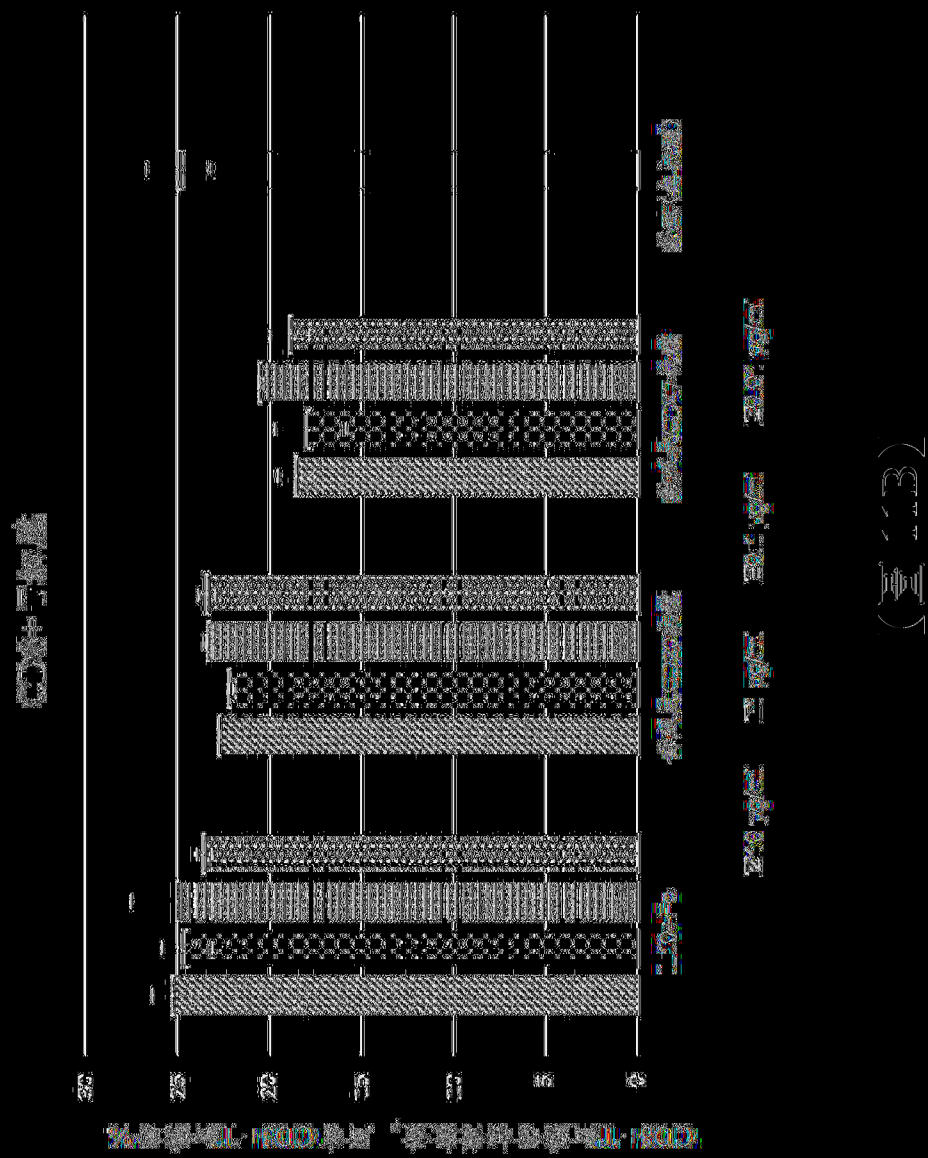
圖 12

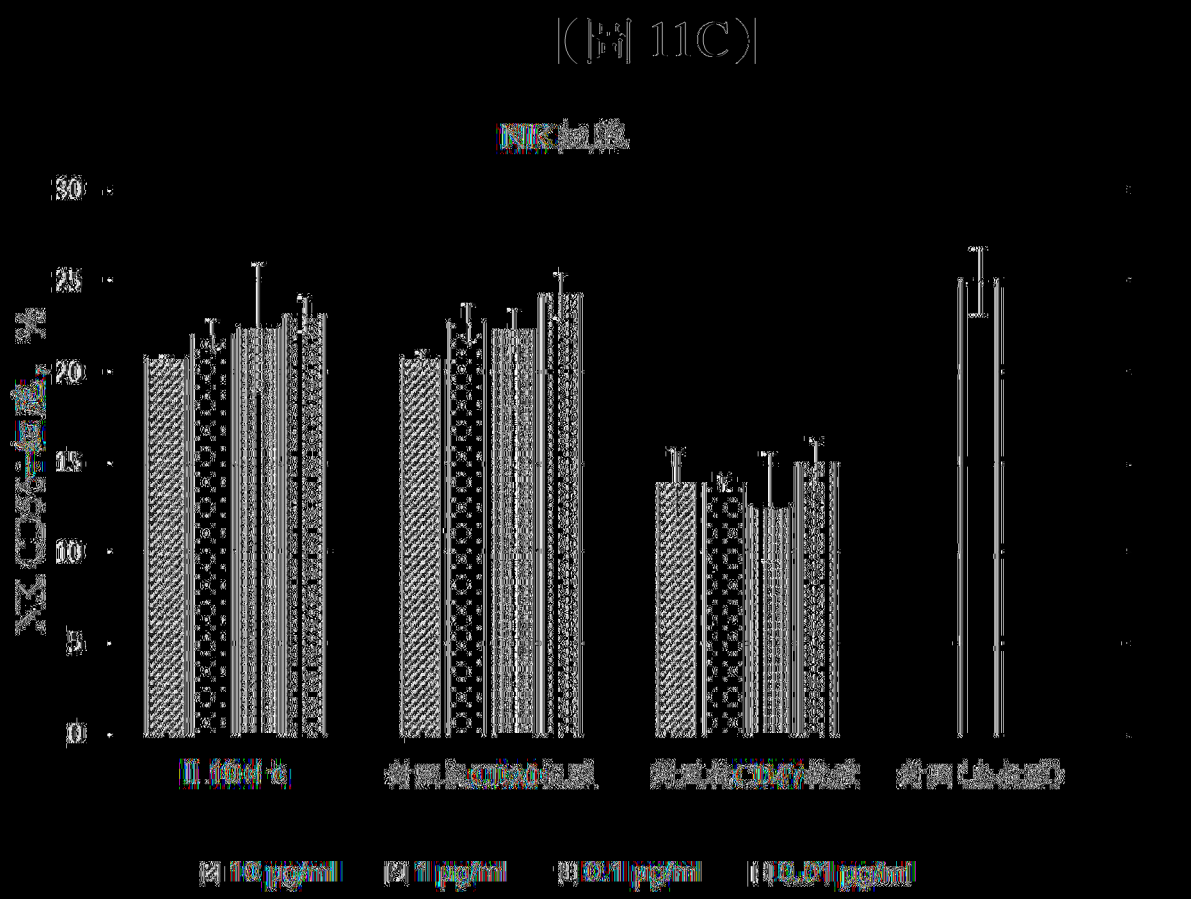
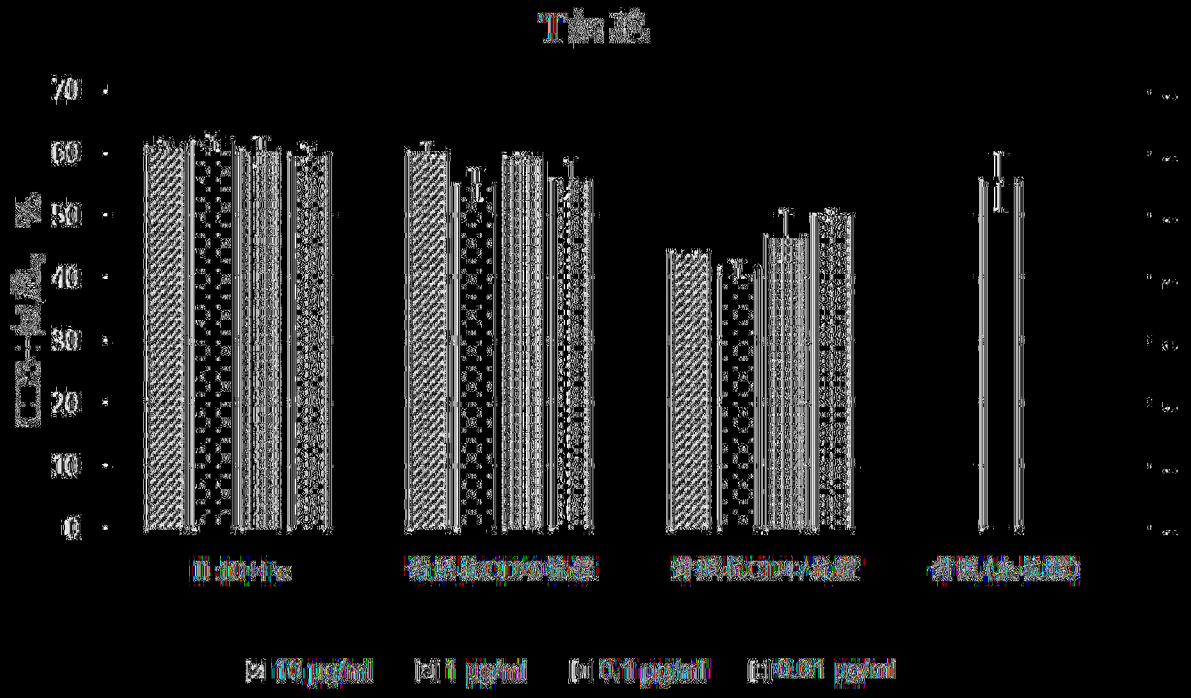
圖 13

圖 14

圖 15 顯示本發明的一實施例的半導體裝置的橫切面視圖。

(圖 1A)





$\left(\begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} \mid 11D \right)$

