



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110256583 A  
(43)申请公布日 2019.09.20

(21)申请号 201910625158.0

(22)申请日 2019.07.11

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 彭华 孙志辰  
其他发明人请求不公开姓名

(74)专利代理机构 北京市诚辉律师事务所  
11430

代理人 范盈

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

A61K 38/20(2006.01)

A61K 47/68(2017.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页  
序列表8页 附图7页

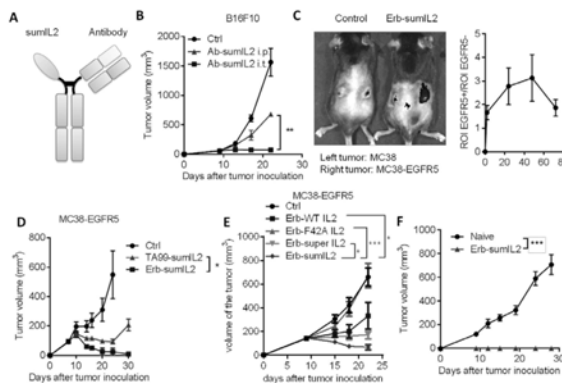
(54)发明名称

一种IL-2突变体与抗体的融合蛋白及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种IL-2突变体与抗体的融合蛋白及其应用,所述融合蛋白是由IL-2突变体(sumIL-2)与肿瘤治疗抗体构成的异源三聚体蛋白,其结构与抗体类似,结构示意图如图2A所示,所述的异源三聚体的三个单体分别为:(1)单体一:IL-2突变体(sumIL-2)与免疫球蛋白Fc片段融合而成的融合蛋白,自N端至C端顺序包含sumIL-2和免疫球蛋白Fc区;(2)单体二:单条所述肿瘤治疗抗体的重链,自N端至C端顺序包含所述抗体的重链可变区VH、重链CH区和免疫球蛋白Fc区,单体二包含的免疫球蛋白Fc区可以与单体一的免疫球蛋白Fc片段配对形成异二聚体;(3)单体三:单条所述肿瘤治疗抗体的轻链(包括VL和CL区),单体三包含的CL区能够与单体二的CH配对形成半抗体结构的异二聚体;所述肿瘤治疗抗体为靶向肿瘤细胞表面高表达膜蛋白的抗体。

CN 110256583 A



1. 一种肿瘤靶向融合蛋白Ab-sumIL2,所述融合蛋白是由IL-2突变体(sumIL-2)与肿瘤治疗抗体构成的异源三聚体蛋白,其结构与抗体类似,结构示意图如图2A所示,所述的异源三聚体的三个单体分别为:

(1) 单体一:IL-2突变体(sumIL-2)与免疫球蛋白Fc片段融合而成的融合蛋白,自N端至C端顺序包含sumIL-2和免疫球蛋白Fc区;

(2) 单体二:单条所述肿瘤治疗抗体的重链,自N端至C端顺序包含所述抗体的重链可变区VH、重链CH区和免疫球蛋白Fc区,单体二包含的免疫球蛋白Fc区可以与单体一的免疫球蛋白Fc片段配对形成异二聚体;

(3) 单体三:单条所述肿瘤治疗抗体的轻链(包括VL和CL区),单体三包含的CL区能够与单体二的CH配对形成半抗体结构的异二聚体;

所述肿瘤治疗抗体为靶向肿瘤细胞表面高表达膜蛋白的抗体。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述肿瘤细胞表面高表达的膜蛋白为EGFR、Her2、CD47或PD-L1;

所述靶向肿瘤细胞表面高表达膜蛋白的抗体分别为EGFR抗体、Her2抗体、CD47抗体或PD-L1抗体,其与所述IL-2突变体(sumIL-2)组成的Ab-sumIL2分别为Erb-sumIL2、anti-Her2-sumIL2、anti-CD47-sumIL2或anti-PD-L1-sumIL2。

3. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其特征在于,

所述的IL-2突变体(sumIL-2)的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,

所述抗EGFR、Her2、CD47、PD-L1抗体的单条重链的氨基酸序列分别为:

抗EGFR抗体的单条重链的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;

抗Her2抗体的单条重链的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示;

抗CD47抗体的单条重链的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示;

抗PD-L1抗体的单条重链的氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示;

所述抗EGFR、Her2、CD47、PD-L1抗体的轻链的氨基酸序列分别为:

抗EGFR抗体的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示;

抗Her2抗体的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示;

抗CD47抗体的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示;

抗PD-L1抗体的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示。

4. 根据权利要求1-3任一所述的融合蛋白,其特征在于,

所述免疫球蛋白Fc区可选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区氨基酸序列;

优选的,所述免疫球蛋白Fc区的氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示,

更优选的,所述免疫球蛋白Fc区选用Knob and hole体系的Fc结构,其具体的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.11或SEQ ID NO.12所示。

5. 根据权利要求1-3任一所述的融合蛋白,其特征在于,所述的IL-2突变体(sumIL-2)与免疫球蛋白Fc片段通过Linker连接,所述的Linker的氨基酸序列如SEQ ID NO.13所示。

6. 权利要求1-5任一所述的融合蛋白Ab-sumIL2在制备药物中的应用,所述的药物为抗肿瘤药物,其功能包括:

(1) 单体一的生物学功能:诱导CD8+T细胞,所述的诱导CD8+T细胞为增加CD8+T细胞的总数的同时增加CD8+T细胞在T细胞总量中的比例和与Treg细胞的比值;

和(2)单体二和单体三构成的半抗体结构的异二聚体的生物学功能:通过靶向肿瘤细胞表面特定膜蛋白来抑制肿瘤的生长或转移。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,

所述的肿瘤表面特定膜蛋白包括但不限于:EGFR、HER2、CD47、PD-L1;

所述的肿瘤为EGFR、Her2、CD47、PD-L1阳性的肿瘤组织;

优选的,所述肿瘤为EGFR、Her2、CD47、PD-L1阳性的结直肠癌、黑色素瘤、乳腺癌;

更优选的,所述肿瘤为EGFR、Her2、CD47、PD-L1阳性的结直肠癌、黑色素瘤、乳腺癌,且所述肿瘤有如下特征:

(1) PD-L1阻断剂单独治疗无效的肿瘤;

(2) EGFR酪氨酸激酶抑制剂(TKI)单独治疗后会复发的肿瘤;

(3) 手术切除后会复发的肿瘤。

8. 一种药物制剂或药物组合物,所述药物制剂或药物组合物包括治疗有效量的权利要求1-5任一所述的融合蛋白Ab-sumIL2,优选的,所述的Ab-sumIL2为Erb-sumIL2、anti-Her2-sumIL2、anti-CD47-sumIL2或anti-PD-L1-sumIL2。

9. 权利要求1-5任一所述融合蛋白Ab-sumIL2在制备联用药物制剂中的应用,所述的联用制剂包括:

(1) 治疗有效量的所述融合蛋白Ab-sumIL2,

优选的,所述的Ab-sumIL2为Erb-sumIL2、anti-Her2-sumIL2、anti-CD47-sumIL2或anti-PD-L1-sumIL2;

(2) PD-1/PD-L1阻断剂或EGFR酪氨酸激酶抑制剂;

优选的,所述的PD-1/PD-L1阻断剂为抗PD-1的抗体或抗PD-L1的抗体。

10. 一种药物制剂或药物组合物,所述药物制剂或药物组合物包括:

(1) 治疗有效量的所述融合蛋白Ab-sumIL2,

优选的,所述的Ab-sumIL2为Erb-sumIL2、anti-Her2-sumIL2、anti-CD47-sumIL2或anti-PD-L1-sumIL2;

(2) PD-1/PD-L1阻断剂或EGFR酪氨酸激酶抑制剂;

优选的,所述的PD-1/PD-L1阻断剂为抗PD-1的抗体或抗PD-L1的抗体。

## 一种IL-2突变体与抗体的融合蛋白及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和抗体工程技术领域,具体而言,涉及一种IL-2突变体与抗体的融合蛋白及其应用。

### 背景技术

[0002] 白细胞介素-2 (IL-2) 是一种由抗原刺激诱导的T细胞生长因子,是一种多效细胞因子,在免疫应答中起着关键作用<sup>1,2</sup>。作为细胞毒性T细胞和NK细胞的有效诱导剂,IL-2是FDA批准的首批用于转移性黑色素瘤和肾细胞癌的免疫治疗药物之一<sup>3,4</sup>。遗憾的是,由于体内半衰期短,治疗剂量和严重毒性<sup>5</sup>等问题,IL-2免疫治疗尚未得到广泛应用。

[0003] IL2通过与IL-2受体 $\alpha$  (IL-2Ra) 结合诱导调节性T细胞 (Tregs) 的增殖,IL-2受体 $\alpha$ 优先在Tregs上表达<sup>6,7,8,9,10</sup>。已经显示Treg细胞对IL-2的消耗降低IL-2诱导的抗肿瘤免疫力,提示Treg可能是IL-2介导的CTL扩增的主要障碍<sup>11</sup>。

[0004] IL-2通过与各种IL-2受体 (IL-2R) 结合发挥刺激和调节功能,包括单体,二聚体和三聚体IL-2R。一些T细胞,例如Tregs,表达由CD25 (IL2Ra), CD122 (IL2Rb) 和CD132 (常见细胞因子受体 $\gamma$ 链) 亚基组成的高亲和力异源三聚体受体。相反,初始CD8T细胞,CD4/CD8记忆T细胞和NK细胞表达亲和力较低的二聚体受体,其缺乏CD25亚基<sup>2,12</sup>。IL-2特异性突变 (IL-2突变蛋白) 可诱导选择性优先结合CD25或CD122,从而激活特定的免疫细胞亚群。降低对CD25 (主要在肺内皮细胞和Treg细胞上表达) 亲和力的IL-2突变蛋白,可以在一定程度上提高野生型IL-2控制肿瘤效果<sup>13,14</sup>。而具有增加对CD122亲和力的IL-2超级突变蛋白因子,可以优先扩大CTL,但同时增加Treg<sup>15</sup>。

[0005] 为了限制全身性毒性,已有研究利用抗体实现对WT IL-2的靶向递送 (Ab-IL2)<sup>16,17,18,19,20</sup>。然而,由于IL-2与受体结合的高亲和力在实际上可能会限制Ab-IL2的肿瘤靶向。最近的几项研究表明,免疫细胞因子的功效和IL-2突变体的生物分布可能不足以归因于肿瘤抗原靶向<sup>21,22</sup>。系统性递送Ab-IL2可能激活淋巴和非淋巴组织中导致严重的T细胞毒性和有限的抗肿瘤功效。

[0006] 肿瘤浸润淋巴细胞 (TILs) 是预测PD-L1阻断治疗有效性的重要生物标志物<sup>23</sup>,已知IL-2能够激活淋巴组织和非淋巴组织中的CTL<sup>[17,24]</sup>,但肿瘤内预先存在的T细胞再经IL-2活化后是否足以控制肿瘤生长是尚不清楚的。尽管最近的许多研究是集中于检查点阻断方面<sup>14,25</sup>,然而我们认为能够控制肿瘤微环境 (TME) 内Treg的增加;同时促进IL-2对CTL的活化是治疗肿瘤另一个有效途径。

[0007] 在本研究中,我们通过向肿瘤组织靶向传递新型IL-2突变体的方式,使得肿瘤组织中的CTL得到足够的活化,进一步提高肿瘤内CTL与Treg的比例 (CD8T/Treg),最终达到治疗肿瘤的效果。

[0008] 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKI) 的靶向治疗已被批准作为EGFR突变阳性癌症的一线治疗。尽管客观反应率很高,但大多数患者在治疗后数月出现肿瘤复发<sup>26</sup>。类似地,抗Her2/neu已经被FDA批准用于治疗肿瘤组织中具有高Her2/neu表达的患

者<sup>27</sup>,尚未测试IL-2疗法是否能限制这种复发。

[0009] 对肿瘤组织进行手术切除是目前临床上优先采取的治疗措施,其他治疗手段包括免疫治疗常被用于术后的辅助治疗。然而在临床上,许多肿瘤患者在原位肿瘤切除后仍会检测到转移肿瘤的复发。基于上述背景,我们也想要探索是否术前的IL-2治疗能够激活更强的抗肿瘤反应,从而在原位肿瘤被切除之后依然能够更好的防止转移肿瘤的复发。在此研究中,我们也就相关问题做了探索。

[0010] 免疫检查点阻断已经取得了令人兴奋治疗效果,例如anti-PD-L1。但是单一的用药患者的反应率较低。因此,我们也需要评价IL-2治疗是否能够提高患者对免疫检查点阻断的反应性,延长生存期。

[0011] 综上所述,IL-2运用于肿瘤治疗亟待解决的问题包括:建立肿瘤靶向,减少外周毒性;降低与Treg细胞的结合及其诱导的Treg免疫抑制功能;提高与CD8<sup>+</sup>T细胞的结合;改变肿瘤组织中CD8/Treg比例;探索更广泛的联合应用。

[0012] 1.Morgan DA,Ruscetti FW,Gallo R.Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows.Science(New York,NY) 193,1007-1008 (1976) .

[0013] 2.Liao W,Lin JX,Leonard WJ.Interleukin-2 at the crossroads of effector responses,tolerance,and immunotherapy.Immunity 38,13-25 (2013) .

[0014] 3.Rosenberg SA,Yang JC,White DE,Steinberg SM.Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2:identification of the antigens mediating response.Annals of surgery 228,307-319 (1998) .

[0015] 4.Rosenberg SA.IL-2:the first effective immunotherapy for human cancer.Journal of immunology (Baltimore,Md:1950) 192,5451-5458 (2014) .

[0016] 5.Skrombolas D,Frelinger JG.Challenges and developing solutions for increasing the benefits of IL-2treatment in tumor therapy.Expert review of clinical immunology 10,207-217 (2014) .

[0017] 6.Panelli MC,et al.Forecasting the cytokine storm following systemic interleukin(IL)-2 administration.Journal of translational medicine 2,17 (2004) .

[0018] 7.Chavez AR,et al.Pharmacologic administration of interleukin-2.Annals of the New York Academy of Sciences 1182,14-27 (2009) .

[0019] 8.Ahmadzadeh M,Rosenberg SA.IL-2 administration increases CD4+CD25 (hi)Foxp3+regulatory T cells in cancer patients.Blood 107,2409-2414 (2006) .

[0020] 9.Jensen HK,Donskov F,Nordmark M,Marcussen N,von der Maase H.Increased intratumoral FOXP3-positive regulatory immune cells during interleukin-2 treatment in metastatic renal cell carcinoma.Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 15,1052-1058 (2009) .

[0021] 10.Sim GC,et al.IL-2therapy promotes suppressive ICOS<sup>+</sup>Treg expansion

- in melanoma patients. *The Journal of clinical investigation* 124,99-110 (2014).
- [0022] 11. Imai H, et al. Depletion of CD4+CD25+regulatory T cells enhances interleukin-2-induced antitumor immunity in a mouse model of colon adenocarcinoma. *Cancer science* 98,416-423 (2007).
- [0023] 12. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature reviews Immunology* 12,180-190 (2012).
- [0024] 13. Heaton KM, Ju G, Grimm EA. Human interleukin 2 analogues that preferentially bind the intermediate-affinity interleukin 2 receptor lead to reduced secondary cytokine secretion: implications for the use of these interleukin 2 analogues in cancer immunotherapy. *Cancer research* 53,2597-2602 (1993).
- [0025] 14. Mott HR, et al. The solution structure of the F42A mutant of human interleukin 2. *Journal of molecular biology* 247,979-994 (1995).
- [0026] 15. Levin AM, et al. Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 'superkine'. *Nature* 484,529-533 (2012).
- [0027] 16. Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA. An antibody-interleukin 2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93,7826-7831 (1996).
- [0028] 17. Gutbrodt KL, Casi G, Neri D. Antibody-based delivery of IL2 and cytotoxics eradicates tumors in immunocompetent mice. *Molecular cancer therapeutics* 13,1772-1776 (2014).
- [0029] 18. Gutbrodt KL, et al. Antibody-based delivery of interleukin-2 to neovasculature has potent activity against acute myeloid leukemia. *Science translational medicine* 5,201ra118 (2013).
- [0030] 19. Du YJ, et al. Stability of the recombinant anti-erbB2 scFvFc interleukin 2 fusion protein and its inhibition of HER2 overexpressing tumor cells. *International journal of oncology* 42,507-516 (2013).
- [0031] 20. Yang RK, et al. Intratumoral treatment of smaller mouse neuroblastoma tumors with a recombinant protein consisting of IL-2 linked to the hu14.18 antibody increases intratumoral CD8+T and NK cells and improves survival. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* 62,1303-1313 (2013).
- [0032] 21. Tzeng A, Kwan BH, Opel CF, Navaratna T, Wittrup KD. Antigen specificity can be irrelevant to immunocytokine efficacy and biodistribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112,3320-3325 (2015).
- [0033] 22. Zhu EF, et al. Synergistic innate and adaptive immune response to combination immunotherapy with anti-tumor antigen antibodies and extended serum half-life IL-2. *Cancer cell* 27,489-501 (2015).

- [0034] 23. Tumei PC, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515, 568-571 (2014).
- [0035] 24. Jackaman C, et al. IL-2 Intratumoral Immunotherapy Enhances CD8+ T Cells That Mediate Destruction of Tumor Cells and Tumor-Associated Vasculature: A Novel Mechanism for IL-2. *The Journal of Immunology* 171, 5051-5063 (2003).
- [0036] 25. Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 184, 569-577 (1996).
- [0037] 26. Soria JC, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*, (2017).
- [0038] 27. Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG. Trastuzumab—mechanism of action and use. *The New England journal of medicine* 357, 1664; author reply 1665-1666 (2007).

### 发明内容

[0039] 本发明中, 我们希望通过抗体将IL-2突变体(sumIL-2)靶向到肿瘤组织以减轻其毒副作用同时发挥更好的肿瘤治疗效果。我们制备肿瘤靶向Ab-sumIL-2; 其中Ab代表肿瘤细胞靶向抗体; sumIL-2是野生型(WT) IL-2的突变体, 具备降低与CD25结合, 同时增加与CD122结合的特点, 从而实现在肿瘤微环境(TME)内有效地激活CD8+CTL。我们进一步发现Ab-sumIL2是一种有效的重组免疫细胞因子, 可与TKI治疗, 手术治疗和检查点阻滞协同作用, 以更有效地进行CTL扩增, 从而提高完全反应率并限制肿瘤复发。

[0040] 本发明首先涉及肿瘤靶向融合蛋白Ab-sumIL2, 所述融合蛋白是由IL-2突变体(sumIL-2)与肿瘤治疗抗体构成的异源三聚体蛋白, 其结构与抗体类似, 结构示意图如图2A所示, 所述的异源三聚体的三个单体分别为:

[0041] (1) 单体一: IL-2突变体(sumIL-2)与免疫球蛋白Fc片段融合而成的融合蛋白, 自N端至C端顺序包含sumIL-2和免疫球蛋白Fc区;

[0042] (2) 单体二: 单条所述肿瘤治疗抗体的重链, 自N端至C端顺序包含所述抗体的重链可变区VH、重链CH区和免疫球蛋白Fc区, 单体二包含的免疫球蛋白Fc区可以与单体一的免疫球蛋白Fc片段配对形成异二聚体;

[0043] (3) 单体三: 单条所述肿瘤治疗抗体的轻链(包括VL和CL区), 单体三包含的CL区能够与单体二的CH配对形成半抗体结构的异二聚体;

[0044] 所述肿瘤治疗抗体为靶向肿瘤细胞表面高表达膜蛋白的抗体,

[0045] 优选的, 所述肿瘤细胞表面高表达的膜蛋白为EGFR、Her2、CD47或PD-L1;

[0046] 所述靶向肿瘤细胞表面高表达膜蛋白的抗体分别为EGFR抗体、Her2抗体、CD47抗体或PD-L1抗体, 其与所述IL-2突变体(sumIL-2)组成的Ab-sumIL2分别为Erb-sumIL2、anti-Her2-sumIL2、anti-CD47-sumIL2或anti-PD-L1-sumIL2;

[0047] 所述的IL-2突变体(sumIL-2)的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0048] 优选的, 所述抗EGFR、Her2、CD47、PD-L1抗体的单条重链的氨基酸序列分别为:

- [0049] 抗EGFR抗体的单条重链的VH和CH区的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示；
- [0050] 抗Her2抗体的单条重链的VH和CH区的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示；
- [0051] 抗CD47抗体的单条重链的VH和CH区的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示；
- [0052] 抗PD-L1抗体的单条重链的VH和CH区的氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示；
- [0053] 优选的,所述抗EGFR、Her2、CD47、PD-L1抗体的轻链的氨基酸序列分别为：
- [0054] 抗EGFR抗体的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示；
- [0055] 抗Her2抗体的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示；
- [0056] 抗CD47抗体的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示；
- [0057] 抗PD-L1抗体的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示；
- [0058] 所述免疫球蛋白Fc区可选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区氨基酸序列,其中IgG1具有较强的诱导ADCC和CDC效应的能力和较长的血清半衰期,是抗体药物最常见的抗体亚型；IgG2、IgG4具有较弱的诱导ADCC和CDC效应的能力,但血清半衰期较长；
- [0059] 所述的IgG1的Fc区的氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示,或选用Knob and hole体系的Fc结构,其具体的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.11或SEQ ID NO.12所示,
- [0060] 进一步的,所述单体一的IL-2突变体(sumIL-2)与免疫球蛋白Fc片段通过Linker连接,所述的Linker的氨基酸序列如SEQ ID NO.13所示。
- [0061] 本发明还涉及所述融合蛋白Ab-sumIL2在制备药物中的应用,所述的药物为抗肿瘤药物,其功能包括：
- [0062] (1) 单体一的生物学功能:诱导CD8+T细胞,所述的诱导CD8+T细胞为增加CD8+T细胞的总数的同时增加CD8+T细胞在T细胞总量中的比例和与Treg细胞的比值；
- [0063] 和(2) 单体二和单体三构成的半抗体结构的异二聚体的生物学功能:通过靶向肿瘤细胞表面特定膜蛋白来抑制肿瘤的生长或转移；
- [0064] 所述的肿瘤表面特定膜蛋白包括但不限于:EGFR、HER2、CD47、PD-L1；
- [0065] 优选的,所述的肿瘤为EGFR、Her2、CD47、PD-L1阳性的肿瘤组织；
- [0066] 更优选的,所述肿瘤为：
- [0067] (1) PD-L1阻断剂单独治疗无效的肿瘤；
- [0068] (2) EGFR酪氨酸激酶抑制剂(TKI)单独治疗后会复发的肿瘤；
- [0069] (3) 手术切除后会复发的肿瘤。
- [0070] 本发明还涉及所述肿瘤细胞靶向融合蛋白Ab-sumIL2在制备药物中的应用,所述的药物为针对EGFR、Her2、CD47、PD-L1阳性的结直肠癌、黑色素瘤、乳腺癌的药物；
- [0071] 优选的,所述EGFR、Her2、CD47、PD-L1阳性的结直肠癌、黑色素瘤和乳腺癌为：
- [0072] (1) PD-L1阻断剂单独治疗无效的结直肠癌和黑色素瘤；
- [0073] (2) EGFR酪氨酸激酶抑制剂(TKI)单独治疗后会复发的结直肠癌和黑色素瘤；
- [0074] (3) 手术切除后会复发的结直肠癌和黑色素瘤。
- [0075] 本发明还涉及一种药物制剂或药物组合物,所述药物制剂或药物组合物包括治疗有效量的所述融合蛋白Ab-sumIL2,优选的,所述的融合蛋白为Erb-sumIL2、anti-Her2-sumIL2、anti-CD47-sumIL2或anti-PD-L1-sumIL2。
- [0076] 本发明还涉及所述融合蛋白Ab-sumIL2在制备联用药物制剂中的应用,所述的联用制剂包括：



[0077] (1) 治疗有效量的所述融合蛋白Ab-sumIL2, 优选的, 所述的Ab-sumIL2为Erb-sumIL2、anti-Her2-sumIL2、anti-CD47-sumIL2或anti-PD-L1-sumIL2;

[0078] (2) PD-1/PD-L1阻断剂;

[0079] 优选的, 所述的PD-1/PD-L1阻断剂为抗PD-1的抗体或抗PD-L1的抗体。

[0080] 本发明提供一种治疗肿瘤的方法, 其包括向癌症患者施用有效量的所述融合蛋白Ab-sumIL2, 优选的, 所述的Ab-sumIL2为Erb-sumIL2、anti-Her2-sumIL2、anti-CD47-sumIL2、anti-PD-L1-sumIL2。所述肿瘤优选为PD-L1阻断剂单独治疗无效的肿瘤、EGFR酪氨酸激酶抑制剂(TKI)单独治疗后复发的肿瘤以及手术切除后会复发的肿瘤。

[0081] 在此基础上, 本发明还提供了一种抗PD-L1抗体和Ab-sumIL2的联合疗法, 以及包含抗PD-L1抗体和Ab-sumIL2融合蛋白的药物组合物或试剂盒。所述疗法包括向患者施用有效量的抗PD-L1抗体以及Erb-sumIL2, 所述施用为顺序施用或同时施用。所述肿瘤为对PD-L1阻断单独治疗产生抗性或无效的肿瘤, 或晚期肿瘤; 优选为对抗PD-1/PD-L1抗体单独治疗产生抗性或无效的肿瘤。

[0082] 本发明还提供了一种TKI和Ab-sumIL2的联合疗法, 以及包含TKI和Ab-sumIL2融合蛋白的药物组合物或试剂盒。所述疗法包括向患者施用有效量的TKI以及Ab-sumIL2, 所述施用为顺序施用或同时施用。所述肿瘤为对TKI单独治疗产生抗性的肿瘤, 或晚期肿瘤; 优选对抗TKI单独治疗产生抗性或无效的肿瘤。

[0083] 本发明还提供了一种手术切除和Ab-sumIL-2的联合疗法。所述疗法包括在手术前向患者施用有效量的Ab-sumIL-2, 所述施用为顺序施用。所述肿瘤为对手术切除单独治疗易复发的肿瘤; 优选对抗TKI单独治疗产生抗性或无效的肿瘤。

## 附图说明

[0084] 图1, SumIL-2具有比野生型IL-2更强的抗肿瘤活性

[0085] (1A) WT C57BL/6小鼠皮下接种B16F10细胞。荷瘤小鼠在肿瘤生长第13天开始分组治疗: 肿瘤内分别注射5 $\mu$ g的IL-2-Fc融合蛋白或者相同摩尔剂量的游离的IL-2单体分子(Free IL2)。

[0086] (1B) WT C57BL/6小鼠皮下接种B16F10细胞。在肿瘤生长第14天后收集肿瘤组织和相应的引流淋巴结, 利用流式细胞技术分析的肿瘤组织中的Treg细胞占CD4<sup>+</sup>T细胞的比例。

[0087] (1C) 利用流式细胞术检测Mutant IL-Fc与WT IL-2-Fc结合不同T细胞亚群的能力, 数量为1\*10<sup>6</sup>的Foxp3-GFP小鼠脾脏细胞分别与WT IL2-Fc, F42A IL2-Fc, super IL2-Fc, 或者sumIL2-Fc进行冰上孵育, 之后用anti-Human IgG-PE以及其他荧光标记抗体检测活化的CD8<sup>+</sup>T (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>) 细胞以及Treg (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) 细胞结合不同IL-2的能力。

[0088] (1D, 1E) 对野生型C57BL/6小鼠腹腔注射2 $\mu$ g WT IL2-Fc, F42A IL2-Fc, super IL2-Fc, 或者sumIL2-Fc, 共计注射5天, 在第六天检测小鼠脾脏中CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>活化的CD8<sup>+</sup>T细胞CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg cells的数目和比例。

[0089] (1F, 1G) 野生型C57BL6小鼠背部接种B16F10细胞, 在肿瘤接种后第9天进行分组治疗, 肿瘤内注射5 $\mu$ g的SumIL-2-Fc或者WT IL-2-Fc融合蛋白, 对照组注射PBS溶液。治疗3天后, 取肿瘤组织, 分离单细胞, 并用流式分析T细胞亚群的变化。

[0090] (1H) 野生型C57BL6小鼠背部接种个B16F10细胞, 在肿瘤接种后第9天、12天和15天

分别进行肿瘤内注射5 $\mu$ g的SumIL-2-Fc或者WT IL-2-Fc融合蛋白,对照组为PBS。测量肿瘤生长曲线。

[0091] 图2,靶向到肿瘤局部的sumIL-2能够明显增强其抗肿瘤效果

[0092] (2A) antibody-sumIL2的分子模式示意图。

[0093] (2B) WT C57小鼠背部皮下接种B16F10细胞,在第9、12、15天时,肿瘤内或者腹腔注射10 $\mu$ g Ab-sumIL2融合蛋白;对照组为PBS。

[0094] (2C) WT C57小鼠背部左右两侧皮下分别接种MC38细胞和MC38-EGFR5细胞,接种后第10天,尾静脉注射25 $\mu$ g Cy5.5-Erb-sumIL2融合蛋白,并用小动物成像系统进行检测。

[0095] (2D) WT C57小鼠背部皮下接种MC38-EGFR5细胞,在第7、10天时,腹腔注射25 $\mu$ g Erb-sumIL2融合蛋白或者25 $\mu$ g TA99-sumIL2;对照组为PBS。

[0096] (2E) WT C57小鼠(n=5/组)背部皮下接MC38-EGFR5细胞,在第9天时,腹腔注射25 $\mu$ g Erb-

[0097] WT IL2、Erb-F42A IL2、Erb-super IL-2以及Erb-sumIL2融合蛋白;对照组为PBS。

[0098] (2F) WT C57小鼠或者经由Erb-sumIL2融合蛋白治疗后肿瘤消退的MC38-EGFR5荷瘤小鼠背部注射MC38-EGFR5肿瘤细胞,并测量小鼠肿瘤生长情况。

[0099] 图3,CD8T细胞对于Erb-sumIL2的治疗起到关键作用

[0100] (3A) WT C57小鼠背部皮下接种B16F10细胞,在第9、12、15天时,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2融合蛋白,对照组为PBS。NK删除性抗体在治疗前一天进行腹腔注射400 $\mu$ g,之后每4天一次,共计3次。

[0101] (3B) WT C57小鼠背部皮下接种B16F10细胞,在第9、12、15天时,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2融合蛋白,对照组为PBS。中性粒细胞删除型抗体(1A8)在治疗前一天进行腹腔注射400 $\mu$ g,之后每4天一次,共计3次。

[0102] (3C) WT C57小鼠皮下接种B16F10细胞,在接种后的第10、14、17天时,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2融合蛋白,对照组为PBS。在治疗的相同的时间腹腔注射200 $\mu$ g CD4<sup>+</sup>T细胞删除抗体(克隆号:GK1.5)。

[0103] (3D) WT C57小鼠皮下接种细胞,在接种后的第9、12、15天时,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2融合蛋白,对照组为PBS。在治疗的相同的时间腹腔注射200 $\mu$ g CD8<sup>+</sup>T细胞删除抗体(克隆号:TIB210)或者同时腹腔注射200 $\mu$ g CD4<sup>+</sup>T细胞删除抗体(克隆号:GK1.5)。

[0104] (3E,3F) WT C57小鼠皮下接种B16-SIY细胞,在接种后的第9天时,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2融合蛋白,对照组为PBS。在第15天分别取肿瘤组织,通过四聚体染色并利用流式分析肿瘤内特异性T细胞的比例和数量。

[0105] 图4,肿瘤内预先存在的CD8<sup>+</sup>T细胞对于Erb-sumIL2的治疗起关键作用

[0106] (4A) WT C57小鼠皮下接种B16F10细胞。在FTY720处理组中,在接种后的第1天时,腹腔注射25 $\mu$ g FTY720,在第3天和第五天分别注射10 $\mu$ g。在肿瘤接种后第9,12和15天,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2。

[0107] (4B) WT C57小鼠皮下接种B16F10细胞。在肿瘤接种后第9,12和15天,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2。对于在FTY720处理组,在肿瘤接种第8天时,腹腔注射25 $\mu$ g FTY720,继续第10,12和14天分别注射10 $\mu$ g。对于肿瘤内删除CD8<sup>+</sup>T细胞,小鼠在FTY720阻断的同一天,肿瘤内注射20 $\mu$ g CD8<sup>+</sup>T细胞删除性抗体。

[0108] (4C) WT C57小鼠皮下接种MC38细胞。在肿瘤接种后第8,11和13天,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2。对于在FTY720处理组,在肿瘤接种第7天时,腹腔注射25 $\mu$ g FTY720,继续在第9,11和13天分别注射10 $\mu$ g。对于肿瘤内删除CD8<sup>+</sup>T细胞,小鼠在FTY720阻断的同一天,肿瘤内注射20 $\mu$ g CD8<sup>+</sup>T细胞删除性抗体。

[0109] (4D) WT C57小鼠皮下接种B16F10细胞,在接种后的第9天时,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2融合蛋白,对照组为PBS。在第12天分别取肿瘤组织,检测肿瘤组织中PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞的比例。

[0110] (4E) WT C57小鼠背部左右两侧皮下分别接种MC38细胞和MC38-EGFR5细胞,在肿瘤接种后第9,12和15天,MC38-EGFR5肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2。测量双侧肿瘤各自生长情况。

[0111] 图5,SumIL-2治疗能够克服肿瘤对酪氨酸激酶抑制剂的抗性

[0112] (5A) WT BALB/c小鼠皮下接种TUB0细胞。在第10、13和17天时,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2,对照组为PBS。

[0113] (5B,5C) TUB0、B16F10和MC38肿瘤接种第9天,流式分析肿瘤组织内CD3<sup>+</sup>T细胞占CD45<sup>+</sup>细胞的比例以及CD8<sup>+</sup>T细胞占CD3<sup>+</sup>T细胞的比例。

[0114] (5D,5E) WT BALB/c小鼠皮下接种TUB0细胞。在第12和17天,通过灌胃方式进行Afatinib治疗,治疗剂量为1mg每次;在第12、15和18天时或者第25、28和31天时,腹腔注射20 $\mu$ g anti-Her2-sumIL2;联合治疗的处理方式与单个治疗方案相同;对照组为PBS。

[0115] (5F) 在图E中联合治疗之后肿瘤完全消退的小鼠,在皮下接种TUB0细胞。对照组为WT BALB/c小鼠皮下接种TUB0细胞。

[0116] 图6,手术前给予Sum-IL2治疗能够更有效地治疗转移性肿瘤

[0117] (6A) 雌性WT BALB/c小鼠乳腺脂肪垫处接种4T1细胞。在肿瘤接种第14天进行肿瘤切除。SumIL-2治疗的分别开始于肿瘤接种后第9天或者第16天。对照组不做任何处理。观察小鼠生存情况以研究术前或者术后的sumIL-2治疗对于小鼠生存的影响。

[0118] (6B) 对4T1荷瘤小鼠进行术前sumIL-2治疗和手术切除的联合治疗方案下,期间利用删除型抗体删除小鼠的CD4或者CD8T细胞,观察小鼠生存情况。

[0119] 图7,Anti-PD-L1能够协同sumIL-2增强抗肿瘤疗效

[0120] (7A) WT C57小鼠皮下接种B16F10细胞,在接种后的第9天时,肿瘤内注射10 $\mu$ g Erb-sumIL2融合蛋白,对照组为PBS。在第12天分别取肿瘤组织,检测肿瘤组织中肿瘤细胞、巨噬细胞以及树突状细胞表面PD-L1的表达情况。

[0121] (7B) WT C57小鼠皮下接种B16F10-EGFR5细胞。在第8、11和14天时,腹腔内注射25 $\mu$ g Erb-sumIL2或者肿瘤内注射50 $\mu$ g anti-PD-L1(克隆号:10F9G2)或者同时注射两种药物。

[0122] 图8,其他肿瘤靶向抗体与sumIL-2的融合蛋白同样能够增强抗肿瘤疗效

[0123] (8A) WT BALB/c小鼠皮下接种MC38细胞,接种后8天肿瘤大小为80-100mm<sup>3</sup>。分别第8、13天时,肿瘤内注射10 $\mu$ g Ab-sumIL2,对照组为hIgG。

[0124] (8B) Anti-Her2-sumIL2和anti-PD-L1-sumIL2与对照抗体比较能够显著控制肿瘤生长。

[0125] (8C) Anti-CD47-L1-sumIL2与对照抗体比较能够显著控制肿瘤生长。

## 具体实施方式

[0126] 材料和方法:

[0127] 实验动物

[0128] 野生型C57BL/6、BALB/c小鼠和BALB/c-nude小鼠购于中国北京维通利华实验动物中心。Rag-I敲除小鼠购于南京模式动物研究所。CD11c-DTR小鼠来自本实验室。除特殊说明外,所有实验使用的均为8-10周龄的雌性小鼠。小鼠均无特定病原微生物(specific pathogen-free, SPF)的屏障环境中饲养。

[0129] 细胞系

[0130] B16F10为C57背景小鼠黑色素瘤细胞系,MC38为C57背景小鼠结直肠癌细胞系,B16-EGFR5细胞和MC38-EGFR5是分别利用B16F10和MC38感染表达人鼠嵌合的表皮生长因子(EGFR)的慢病毒并筛选得出的单克隆细胞系。TIB-210<sup>TM</sup>杂交瘤细胞系(ATCC),用于表达CD8<sup>+</sup>T细胞的删除抗体(clone:2.43)。TIB-207<sup>TM</sup>杂交瘤细胞系(ATCC),用于表达CD4<sup>+</sup>T细胞的删除抗体(clone:GK1.5)。PK136杂交瘤细胞系用于生产NK细胞的删除抗体。HB-197<sup>TM</sup>杂交瘤细胞系(ATCC),用于表达阻断小鼠的Fc $\gamma$  RII/III的抗体(clone:2.4G2)。

[0131] 融合蛋白的构建

[0132] 将Erbitux抗体的轻链插入到IgG kappa链的N端,将重链插入到CH1-Fc的N端,用于表达异源二聚体的抗体部分。将人IL-2或者突变的人IL-2的cDNA序列克隆并通过G4S连接子插入到人IgG1Fc的N端,表达获得异源二聚体的第二多肽IL-2-Fc。

[0133] anti-EGFR和sumIL-2的异源二聚化使用之前报道的knob-to-holes技术产生。质粒以3:2的比例瞬时转染到293F细胞中。转染后第7天收集上清液。根据操作手册(Repligen公司)使用蛋白A-琼脂糖凝胶柱纯化融合蛋白。

[0134] 小鼠肿瘤接种及治疗

[0135] (1) 肿瘤接种及测量:对于肿瘤模型的建立,5-7.5 $\times 10^5$ 个B16F10、B16-EGFR5、B16-SIY、MC38、MC38-EGFR5单细胞悬于100 $\mu$ l PBS中,皮下接种于C57BL/6小鼠背部;3 $\times 10^6$ 个A20单细胞悬于100 $\mu$ l PBS中皮下接种于BALB/c小鼠背部;5-7.5 $\times 10^5$ 个TUBO单细胞悬于100 $\mu$ l PBS中,接种于BALB/c小鼠背部皮下。2 $\times 10^5$ 个4T1单细胞悬于100 $\mu$ l PBS中,接种于BALB/c乳房脂肪垫处。

[0136] 对肿瘤消退的小鼠进行同一种肿瘤细胞的re-challenge实验时,肿瘤细胞的接种数量为初始肿瘤造模时候的5倍,接种部位为小鼠背部另一侧皮下。每周监测两次肿瘤大小,使用游标卡尺测量肿瘤长径(a)、短径(b)和高(c),小鼠肿瘤体积=a $\times$ b $\times$ c/2。

[0137] (2) 治疗:抗体或者抗体融合蛋白采用腹腔注射方式,部分实验也采用肿瘤内给药的方式,具体给药剂量将在具体实验中叙述。

[0138] T细胞迁出阻断

[0139] FTY720是一种免疫抑制剂,可以减少T细胞从淋巴器官迁出外周血液循环。在本研究中,小鼠肿瘤接种的不同时期进行FTY720阻断以改变肿瘤微环境。在小鼠肿瘤接种的初期进行阻断:肿瘤接种后第1天腹腔注射20 $\mu$ g FTY720,之后在第三天和第五天分别腹腔注射10 $\mu$ g,造成小鼠缺少T细胞浸润的模型。在对小鼠肿瘤治疗过程中进行阻断:肿瘤治疗前1天腹腔注射20 $\mu$ g FTY720,之后每隔一天进行腹腔注射10 $\mu$ g,阻断时间依据治疗周期而定,这样会造成在肿瘤治疗的过程中,没有新迁入肿瘤组织的T细胞。借助不同FTY720阻断方

案,可以研究肿瘤组织中浸润的淋巴细胞的重要性。

[0140] 生物统计分析

[0141] 所有数据均由统计学分析软件GraphPad Prism statistical software分析完成。其中小鼠生存率曲线采用One-way ANOVA方法分析,其它数据均用双尾t检验方法分析。P值小于0.05视为有统计学差异(\*)、小于0.01视为有显著性差异(\*\*)、小于0.001(\*\*\*)或者0.0001(\*\*\*\*)视为有极显著性差异。

[0142] 实施例1:Treg细胞抑制了WT IL-2发挥其生物学功能

[0143] 考虑到临床使用大剂量IL-2的毒副作用,因此我们将IL-2与人的抗体IgG1的Fc进行融合,并利用哺乳动物悬浮细胞表达体系进行表达和纯化。用低剂量Free IL-2不能控制肿瘤的生长,相同剂量的IL2-Fc治疗B16F10荷瘤小鼠时,小鼠的肿瘤生长相对受到控制但依然呈上升趋势(图1A)。该结果说明野生型IL-2发挥作用过程中同时也发挥了抑制免疫反应的功能。通过检测发现肿瘤组织中与淋巴器官相比有更多比例的Treg(图1B)。提示了降低IL-2结合和诱导活化增殖Treg的必要性。

[0144] 实施例2:sumIL-2增强结合扩增活化CD8T细胞减少结合扩增Treg细胞

[0145] 我们在IL-2上引入了上述6个突变变位点。我们表达并纯化了融合Fc形式的WT IL-2-Fc和sumIL-2-Fc,并在体外检测了两种融合蛋白与受体的结合能力以及与效应细胞结合的能力。

[0146] 为了描述WT IL-2和sumIL-2结合不同T细胞亚群的能力,我们通过体外细胞结合实验来比较了IL-2融合蛋白结合T细胞的差异。在相同的脾脏细胞中,

[0147] (1) WT IL-2结合Treg细胞的能力比结合记忆性CD8<sup>+</sup>T细胞的能力高(图1C);

[0148] (2)相反的是,sumIL-2则更倾向于结合记忆性CD8<sup>+</sup>T细胞而不是Treg细胞(图1C)。

[0149] 这些体外实验说明了sumIL-2的设计方案是可以实现激活记忆性CD8<sup>+</sup>T细胞而不是Treg细胞。

[0150] 为了更进一步地比较WT-IL2与sumIL-2的生物学活性的差异。注射相同剂量的不同形式的IL-2-Fc,只有sumIL-2能够扩增最多的活化的CD8T细胞(图1D-E)。这些结果说明sumIL-2与其他IL-2相比具有更好的生物学活性。

[0151] 实施例3:SumIL-2比WT IL-2具备更强的抗肿瘤活性

[0152] 为了比较所构建的IL-2突变体和野生型IL-2在体内的抗肿瘤功能是否存在差异,我们利用小鼠黑色素瘤模型进行评价。sumIL-2在体外细胞结合实验中表现出了倾向结合活化的CD8<sup>+</sup>T细胞的特点,因此首先检测了sumIL-2或者WT IL-2治疗后肿瘤内T细胞的变化。

[0153] 通过肿瘤内注射相同剂量(5 $\mu$ g)的sumIL-2-Fc和WT IL-2-Fc融合蛋白,3天后利用流式检测小鼠肿瘤内的细胞比例的变化。CTL是与肿瘤消退相关的非常重要的因素,我们发现sumIL-2可以提高CD8/CD4的比例(图1F),并且能够提高CD8/Treg的比例(图1G),这预示着mutant IL-2在肿瘤内确实能够扩增更多的CD8<sup>+</sup>T细胞。有着这样一个有力证据,我们进一步对sumIL-2和WT-IL-2的肿瘤治疗效果进行了评价(图1H)。在小鼠黑色素瘤模型中,我们依然通过肿瘤内注射的方式注射相同的低剂量的融合蛋白,结果显示sumIL-2有着比WT IL-2更有效的抗肿瘤效果。以上这些结果从改变肿瘤微环境以及肿瘤治疗的角度说明了sumIL-2与WT IL-2相比具有更强在作用。

[0154] 实施例4: Erb-sumIL2融合蛋白能够靶向到EGFR阳性的肿瘤组织

[0155] 为了靶向传递sumIL-2到肿瘤微环境,我们构建并在哺乳动物细胞表达体系中表达了antibody-IL2融合蛋白(EGFR抗体Erbbitux与sumIL-2的融合蛋白)(图2A)。考虑到二聚体形式的IL-2会和IL-2R有更高的结合力而影响抗体的靶向效果,因此为了达到较为理想的靶向效果,我们将抗体和sumIL-2构建形成异二聚体形式。

[0156] 我们首先通过比较全身系统性给药(腹腔注射)与肿瘤局部给药(肿瘤内注射)的差异(图2B)。结果显示,采用肿瘤内注射Erb-sumIL2融合蛋白的方式,低剂量的Erb-sumIL2融合蛋白就能在B16F10小鼠肿瘤模型中起到有效控制肿瘤生长的作用。这也进一步暗示我们,sumIL-2发挥作用的主要场所应该在肿瘤微环境中。

[0157] 为了验证Erb-sumIL2能否靶向到肿瘤局部,我们利用了表达人的EGFR的小鼠肿瘤模型来评价Erb-sumIL2的靶向效果。B16-EGFR5和MC38-EGFR5是分别利用小鼠肿瘤细胞系B16和MC38感染了表达人鼠嵌合的EGFR的慢病毒并筛选获得的。因为人和小鼠的EGFR的氨基酸同源性不高,直接构建表达人的EGFR的小鼠肿瘤细胞系则会造成筛选出的细胞系会被小鼠的免疫系统排斥掉,从而不能够建立肿瘤模型。为了能够在免疫健全小鼠中研究抗人EGFR抗体Erbbitux(简称Erb)的功能,我们将小鼠的EGFR基因进行改造,将其中的6个氨基酸替换成人的氨基酸,使得改造后的EGFR能够在细胞表面表达且能够被Erb所识别。进一步,我们利用荧光成像方法检测Erb-muIL2能够靶向到EGFR阳性肿瘤组织。我们将Erb-sumIL2融合蛋白在体外标记了荧光染料Cy5.5。为了验证标记后的抗体的结合功能,我们利用流式的方法确认了标记后的荧光抗体能够结合到MC38-EGFR5细胞表面。在利用小鼠模型进行荧光成像实验中,C57小鼠背部左右两侧分别接种了MC38和MC38-EGFR5肿瘤细胞,使得同一只小鼠荷有EGFR阴性和阳性两种肿瘤。注射Cy5.5标记的Erb-sumIL2后,可以观察到MC38-EGFR5肿瘤明显比MC38肿瘤显现出更强的荧光,通过计算两种肿瘤荧光强度的比值,可以反映出Erb-muIL2确实在EGFR+肿瘤聚集较多(图2C)。以上实验证明了我们所构建的Erb-muIL2确实具有肿瘤靶向作用。

[0158] 实施例5: Erb-sumIL2静脉给药仍然能够有效控制小鼠肿瘤生长

[0159] 为了检测在系统性给药的情况下,Erb-sumIL2能够控制肿瘤生长并体现靶向效应。我们对M38-EGFR5型进行了Erb-muIL2全身给药治疗,同时设置了非靶向抗体-sumIL-2融合蛋白组作为对照(图2D)。

[0160] 而在MC38-EGFR5模型中,Erb-sumIL-2则表现出明显的控制肿瘤的效果,所有肿瘤发生消退,延长了小鼠的生存期。而对照组,TA99-sumIL-2可以控制肿瘤生长,但最终肿瘤会继续生长。同时,我们也在MC38-EGFR5模型中检测了Erb-IL2突变体的抗肿瘤效果,其中我们所构建的Erb-sumIL2控制肿瘤的效果最为明显(图2E)。

[0161] 这项结果表明,通过抗体靶向sumIL-2到肿瘤局部的方式能够提高其治疗效果。在Erb-sumIL2治疗后肿瘤消退的小鼠再次接种高剂量的相同肿瘤细胞后不能形成肿瘤团块,说明Erb-sumIL2治疗能够引起免疫保护(图2F)。

[0162] 实施例6: CD8<sup>+</sup>T细胞在Erb-sumIL2治疗中起到关键作用

[0163] 除了T细胞和NK细胞是IL-2的主要的效应细胞。为了区分哪些细胞对于Erb-sumIL2治疗中起到关键作用,我们利用删除抗体删除不同的细胞亚群以研究相关问题。我们在Erb-sumIL2治疗肿瘤的同时删除小鼠体内的NK细胞以评价NK细胞是否在Erb-

sumIL2治疗过程中起到关键作用。结果显示删除NK细胞后,并不影响Erb-sumIL2的治疗肿瘤的效果(图3A)。

[0164] 有研究表明中性粒细胞(neutrophil)在IL-2抗肿瘤的作用机制中也发挥一定的作用。因此我们也在sumIL-2突变体治疗中检测了中性粒细胞是否也起到重要作用。同样是利用中性粒细胞删除型抗体(克隆号:1A8)删除小鼠体内的中性粒细胞。结果显示,删除中性粒细胞并不影响Erb-sumIL2治疗肿瘤的效果(图3B)。

[0165] T细胞免疫反应在抗肿瘤反应中起到关键的作用。因此我们想要明确Erb-sumIL2介导的抗肿瘤效果是否依赖于T细胞,以及具体是哪一T细胞亚群起到关键作用。我们在Erb-sumIL2治疗小鼠黑色素瘤过程中利用特异性删除抗体分别删除CD4<sup>+</sup>或者CD8<sup>+</sup>T细胞。结果显示CD4<sup>+</sup>T细胞对于Erb-sumIL2控制肿瘤的作用是非必需的(图3C)。然而,当在Erb-sumIL2治疗过程中删除CD8<sup>+</sup>T细胞,Erb-sumIL2的治疗效果就完全消失(图3D)。综上,CD8<sup>+</sup>T细胞在Erb-sumIL2介导的抗肿瘤过程中起到至关重要的作用。

[0166] 实施例7:Erb-sumIL2治疗诱导产生肿瘤特异性T细胞免疫反应

[0167] sumIL-2可以增加肿瘤内T细胞的数量。但是针对肿瘤细胞特异性的T细胞反应则是真正与肿瘤消退最直接相关的指标。因此在B16-SIY小鼠肿瘤模型中,我们通过特异性四聚体检测了肿瘤在经过Erb-muIL2治疗之后特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的变化。

[0168] 经过Erb-muIL2治疗之后第6天,肿瘤内特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的比例和数目都明显增加(图3E、F)。这些结果提示我们,sumIL-2的治疗能够明显增强肿瘤内抗原特异性T细胞反应。综上,Erb-sumIL2治疗是通过诱导了大量的肿瘤抗原特异性T细胞反应,从而引起肿瘤消退。

[0169] 实施例8:肿瘤内预先存在的CD8<sup>+</sup>T细胞对于Erb-sumIL2的治疗起关键作用

[0170] 我们的研究中着重强调了肿瘤微环境是sumIL-2发挥作用的主要场所。然而肿瘤微环境已经存在的T细胞浸润是否对Erb-muIL2的治疗有重要影响还不是十分清楚。因此接下来,我们利用FTY720阻断的实验来回答我们的疑问。FTY720是临床上器官移植中常用的一种药物,它可以选择性的抑制T细胞从淋巴器官中迁入到外周血液循环。正常小鼠肿瘤模型建立过程中,肿瘤组织中会有T细胞浸润。而当小鼠在肿瘤模型建立的初期被注射了FTY720,则会造成T细胞迁出受到抑制,肿瘤形成过程中缺少T细胞的浸润。

[0171] Erb-sumIL2能够有效控制不处理组的小鼠肿瘤的生长;然而,当利用FTY720阻断后所建立的肿瘤模型中,Erb-sumIL2完全不能控制肿瘤生长(图4A)。进一步实验中,我们在Erb-sumIL2治疗的同期进行FTY720的阻断。这样又会建立一种新的肿瘤模型,即在肿瘤治疗前,肿瘤内具有正常的T细胞浸润,但是当治疗后用FTY720阻断则能够阻止新的T细胞迁入到肿瘤。利用这样的模型我们能够回答肿瘤内已经存在的T细胞是否足以发挥较强的抗肿瘤反应。结果显示,无论是在FTY720未处理和处理组,Erb-sumIL2均能很好地控制肿瘤生长,说明肿瘤内的T细胞足够被Erb-sumIL2激活并发挥功能。

[0172] 如果在FTY720阻断的同时,再向肿瘤内注射CD8<sup>+</sup>T细胞的删除性抗体去删除肿瘤内的CD8<sup>+</sup>T细胞,则Erb-sumIL2的治疗效果则受到极大的影响(图4B、C)。综合这些结果,能够可以确定肿瘤内浸润的CD8<sup>+</sup>T细胞对于Erb-sumIL2至关重要。

[0173] 实施例10:局部Erb-sumIL2治疗能够抑制远端肿瘤的生长

[0174] 在小鼠双肿瘤模型中,我们发现在一侧肿瘤局部进行Erb-sumIL2治疗,能够抑制

肿瘤生长,同时能够抑制另外一侧肿瘤的生长(图4E)。这说明Erb-sumIL2治疗在局部引起的反应足以促进原位肿瘤消退,其产生的肿瘤特异性T细胞同时能够迁移到远端肿瘤,从而抑制其生长。

[0175] 实施例11:肿瘤内浸润的T细胞与肿瘤对sumIL-2治疗的反应性相关

[0176] 在我们的课题研究中发现,Ab-sumIL2的治疗并不是在所有肿瘤均有较好的治疗效果。sumIL-2在B16F10和MC38肿瘤模型中有较好的治疗效果。然而在TUB0(小鼠乳腺癌模型)中。肿瘤内注射Ab-sumIL2则不能控制肿瘤生长(图5A)。肿瘤内浸润的T细胞被认为是肿瘤良好预后的重要指征。因此我们比较了不同种小鼠肿瘤中的T细胞浸润情况。结果显示在TUB0小鼠肿瘤中,CD3<sup>+</sup>T细胞占CD45<sup>+</sup>淋巴细胞的比例明显低于在B16F10或者MC38肿瘤中的结果(图5B)。进一步分析CD8<sup>+</sup>T细胞占CD3<sup>+</sup>T细胞的比例,发现其比例也是低于B16F10或者MC38肿瘤中的结果。因此,这些结果提示我们肿瘤内浸润的T细胞的数量会影响肿瘤对mutant IL-2治疗的应答。

[0177] 实施例12:sumIL-2可以克服肿瘤对TKI治疗的抗性

[0178] EGFR-TKI是临床上治疗EGFR突变肿瘤的一线药物,大多数病人在进行TKI治疗之后肿瘤出现明显消退。阿法替尼(afatinib)是第二代TKI药物,它可以通过共价不可逆的结合方式广泛的抑制ErBB家族成员的酪氨酸激酶活性。

[0179] 我们在小鼠TUB0模型中,检测了afatinib治疗肿瘤的效果。通过检测afatinib治疗后第6天肿瘤内T细胞浸润的变化,肿瘤内CD3<sup>+</sup>T细胞占CD45<sup>+</sup>淋巴细胞的比例明显升高(图5C)。但是在afatinib单独治疗的后期,小鼠肿瘤生长不再受到抑制。这一结果与临床上TKI治疗后期出现耐药的现象一致。因此克服TKI的耐药也是提高疗效的突破口。

[0180] 在我们的研究中(动物模型的给药方案见图5D),尽管anti-Her2-sumIL2单独治疗不能够控制肿瘤生长,但是通过与afatinib的联合治疗则能够强有力地控制肿瘤生长。甚至出现部分小鼠肿瘤完全消退的现象(图5E)。发生肿瘤消退的小鼠在时隔3个月后重新接种5倍初始剂量的肿瘤细胞,依然没有肿瘤形成(图5F)。说明联合治疗能够促进小鼠产生记忆性免疫反应。

[0181] 实施例13:sumIL-2治疗需要与TKI治疗同时进行才能有效控制肿瘤

[0182] 在图5F中可以看出,anti-Her2-sumIL2与Afatinib同时应用能够有效控制肿瘤生长。然而,当单独使用Afatinib后,小鼠肿瘤先变小后复发的情况下再次使用anti-Her2-sumIL2则不能够继续控制肿瘤生长。综合上述数据,sumIL-2应该在抗肿瘤免疫反应活跃时期进行使用。这对IL-2在临床上的用药指导有着非常重要的意义。

[0183] 实施例14:术前sumIL-2治疗能够有效控制转移性肿瘤的复发

[0184] 在临床上,许多肉眼可见的肿瘤组织需要进行手术切除,然而已经转移的肿瘤细胞可能在其他组织重新形成肿瘤。在我们的研究中,我们想知道是否sumIL-2治疗能否与手术进行连用从而抑制肿瘤的复发。我们考虑到临床上,患者进行肿瘤手术前需要几天的准备阶段,因此,患者术前进行sumIL-2治疗能否能够更好的激活抗肿瘤免疫反应从而到达肿瘤消退的目的。在我们的实验中,发现对小鼠进行术前的sumIL-2治疗后,小鼠有更长的生存期。然而术后sumIL-2辅助治疗则不能保护小鼠免受转移肿瘤(图6A)。进一步地,我们确定CD8<sup>+</sup>T细胞而不是CD4<sup>+</sup>T细胞在sumIL-2的术前辅助治疗中起关键作用(图6B)。这些数据为临床上IL-2与手术联合应用提供依据。



[0185] 实施例15:sumIL-2治疗能够协同anti-PD-L1增强抗肿瘤疗效

[0186] 免疫检查点阻断在肿瘤免疫治疗中取得了非常令人兴奋的治疗效果。我们发现Erb-sumIL2的刺激能够上调脾脏或者肿瘤内DC细胞上调表达PD-L1(图7A)。这提示我们在Erb-sumIL2之后,肿瘤内的PD-1/PD-L1信号通路会抑制T细胞的功能。因此我们想到是否可以联合anti-PD-L1治疗来增强Erb-sumIL2的抗肿瘤效果。在B16F10-EGFR5小鼠模型中,anti-PD-L1与Erb-sumIL2联合治疗确实能够得到更理想的治疗效果(图7B)。这些结果提示我们,anti-PD-L1与sumIL-2联合将会是一种理想的肿瘤治疗方案。

[0187] 实施例16:多种肿瘤细胞靶向抗体sumIL2融合蛋白Ab-sumIL2同样能够有效控制小鼠肿瘤生长

[0188] 为了检测肿瘤细胞靶向抗体运送sumIL2至肿瘤位点增强抗肿瘤疗效的“普适性”,我们构建表达anti-Her2-sumIL2、anti-CD47-sumIL2和anti-PD-L1融合蛋白。我们先前的研究已经证明anti-Her2、anti-CD47和anti-PD-L1抗体分别结合MC38肿瘤细胞表面的EGFR,CD47和PD-L1分子。

[0189] 在MC38-EGFR5模型中,Ab-sumIL-2与对照组相比显著提高控制肿瘤的效果,部分肿瘤完全消退。(图8)。这项研究结果再次验证,通过抗体靶向sumIL-2到肿瘤局部的治疗方案能够显著增强其治疗效果。

[0190] 最后需要说明的是,以上实施例仅帮助本领域技术人员理解本发明的实质,不用作对本发明保护范围的限定。

## SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 一种IL-2突变体与抗体的融合蛋白及其应用

<130> 一种IL-2突变体与抗体的融合蛋白及其应用

<160> 13

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

```

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1           5           10           15

```

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Leu Glu Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Ser  
 20 25 30  
 Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Asn Leu Asn Ser Met Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Glu Glu Asn Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Gln Val Lys Leu Leu Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
                   20                   25                   30  
 Trp Val Thr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile  
                   35                   40                   45  
 Gly Glu Ile Tyr Pro Ser Asn Thr Val Thr Asn Phe Asn Asp Asn Phe  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Thr Arg Leu Gly Asn Ser Gly Tyr Arg Val Gly Trp Phe Leu Tyr Trp  
                   100                   105                   110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
                   115                   120

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser  
                   20                   25                   30  
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45  
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                   100                   105                   110  
 Leu Val Thr Val Ser Ala  
                   115

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
1				5				10						15	
Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn
			20					25					30		
Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35					40					45		
Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50					55					60		
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser
65					70					75				80	
Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr
					85					90				95	
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys					
				100						105					

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5				10						15	
Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Lys	Asn
				20				25						30	
Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	His	Glu	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
				35				40					45		
Lys	Phe	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
				50				55					60		
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Thr
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Gly	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Asn	Trp	Pro	Leu
					85					90				95	
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys					
				100						105					

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Leu	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Ser	Ser	His
			20					25						30	
Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gln	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40						45		
Tyr	Lys	Ala	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55						60		
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Pro	Val	Glu	Ala
65					70					75					80
Asp	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Trp	Asn	Gly	Pro	Phe
				85						90					95
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Leu	Lys					
			100							105					

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
			20					25						30	
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40						45		
Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55						60		
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Pro	Ala
				85						90					95
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100							105					

<210> 10

<211> 229

<212> PRT



Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly Lys  
 225  
 <210> 12  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45



Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125  
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly Lys  
 225  
 <210> 13  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <400> 13  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

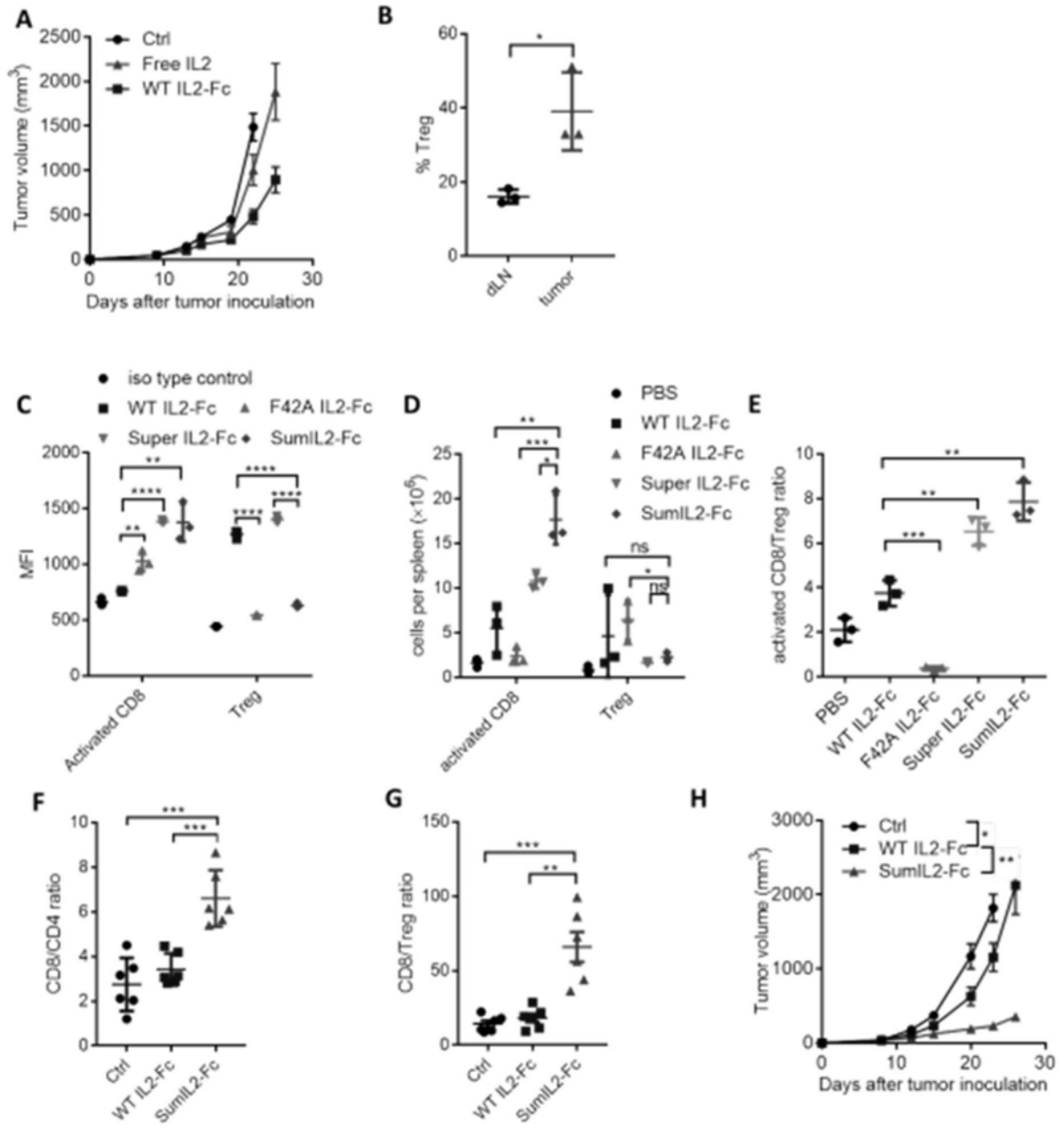


图1

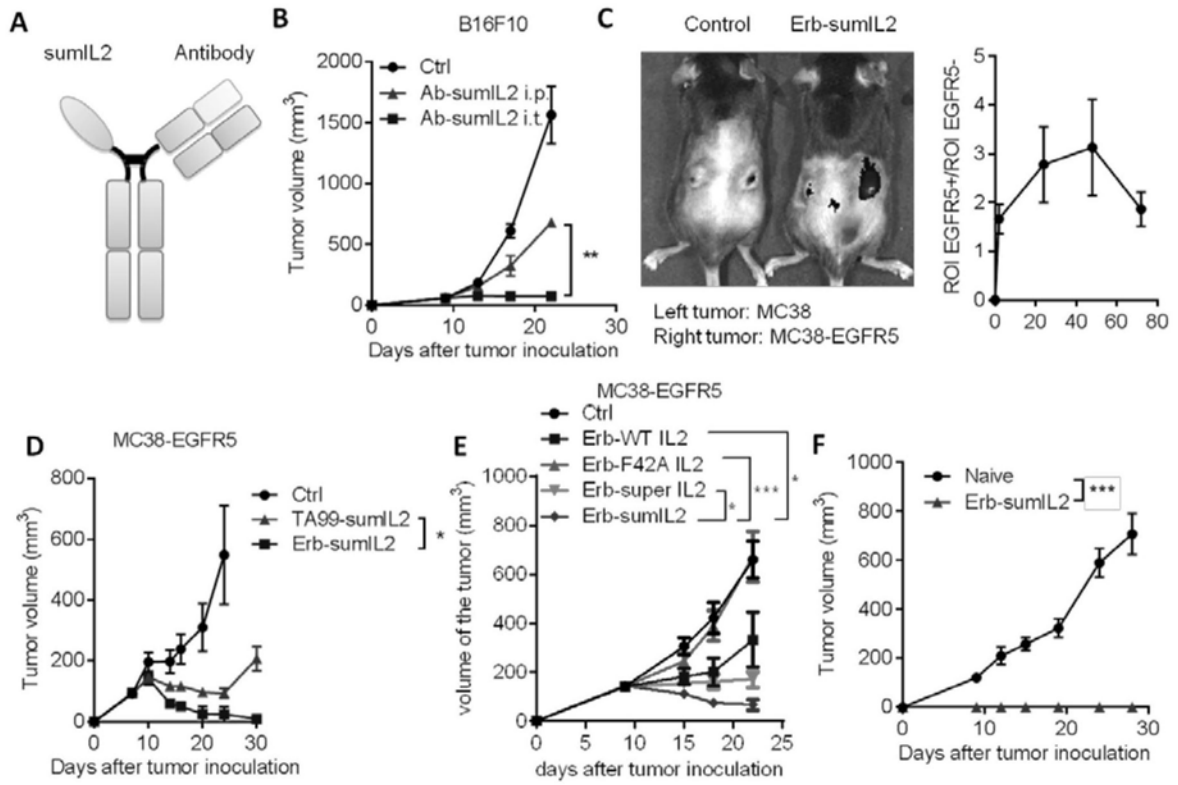


图2

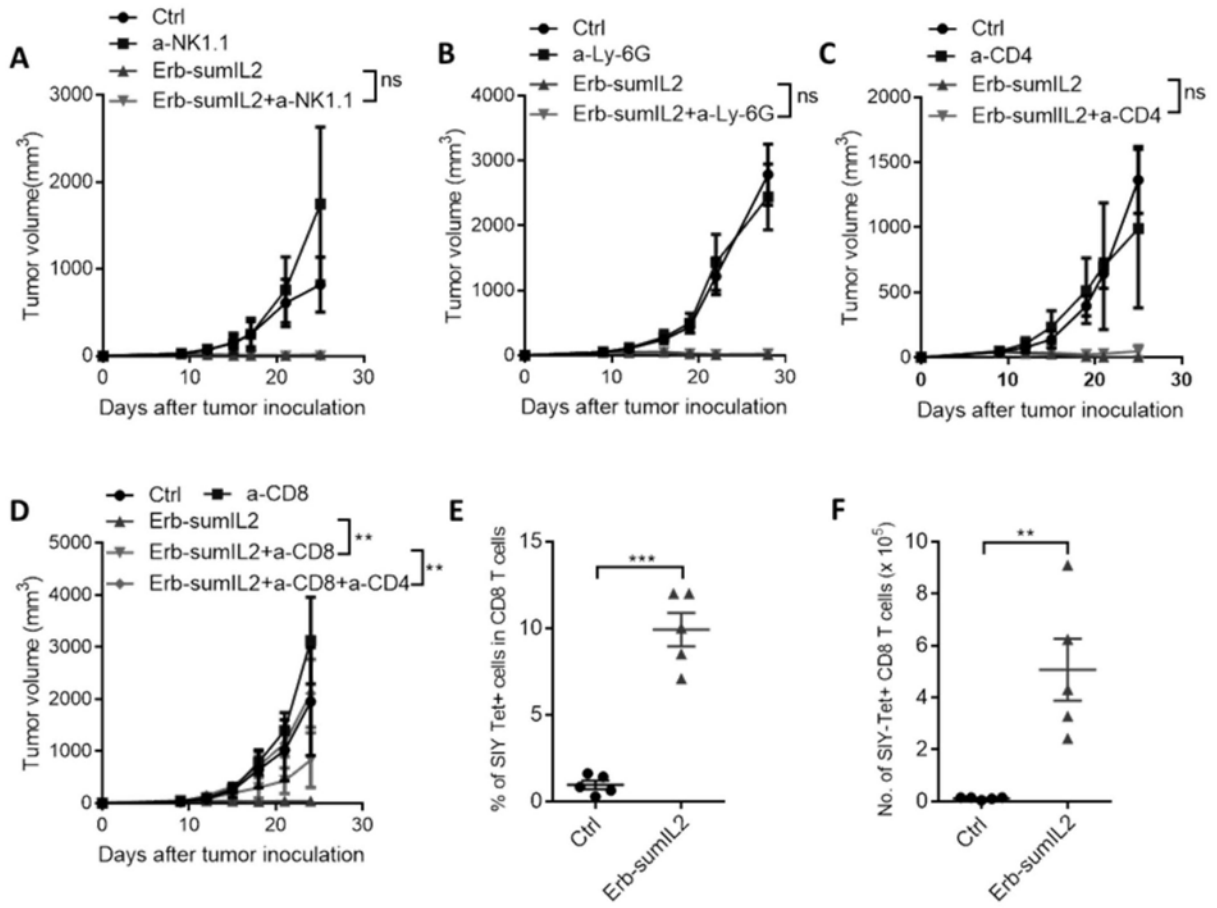


图3

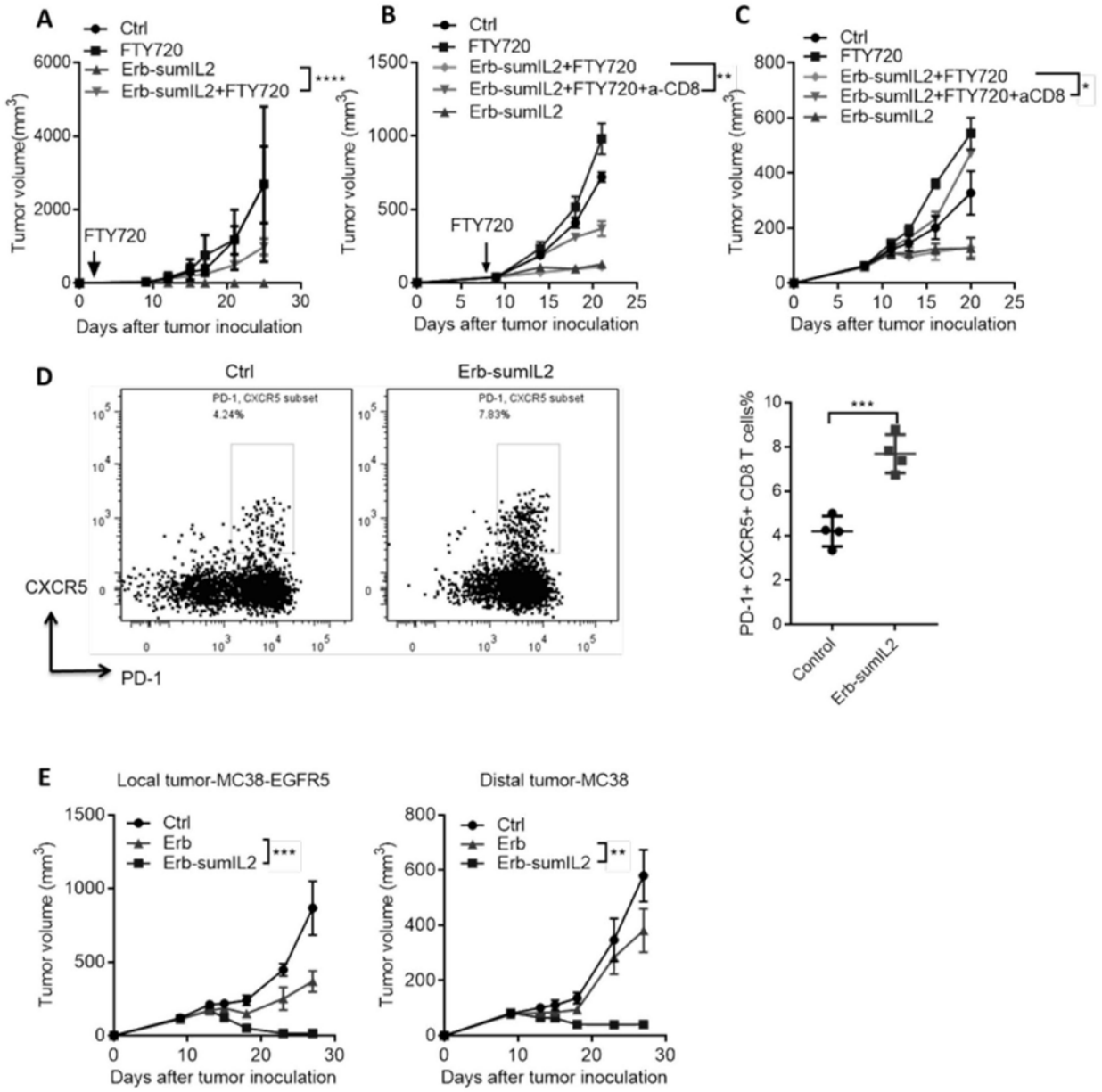


图4

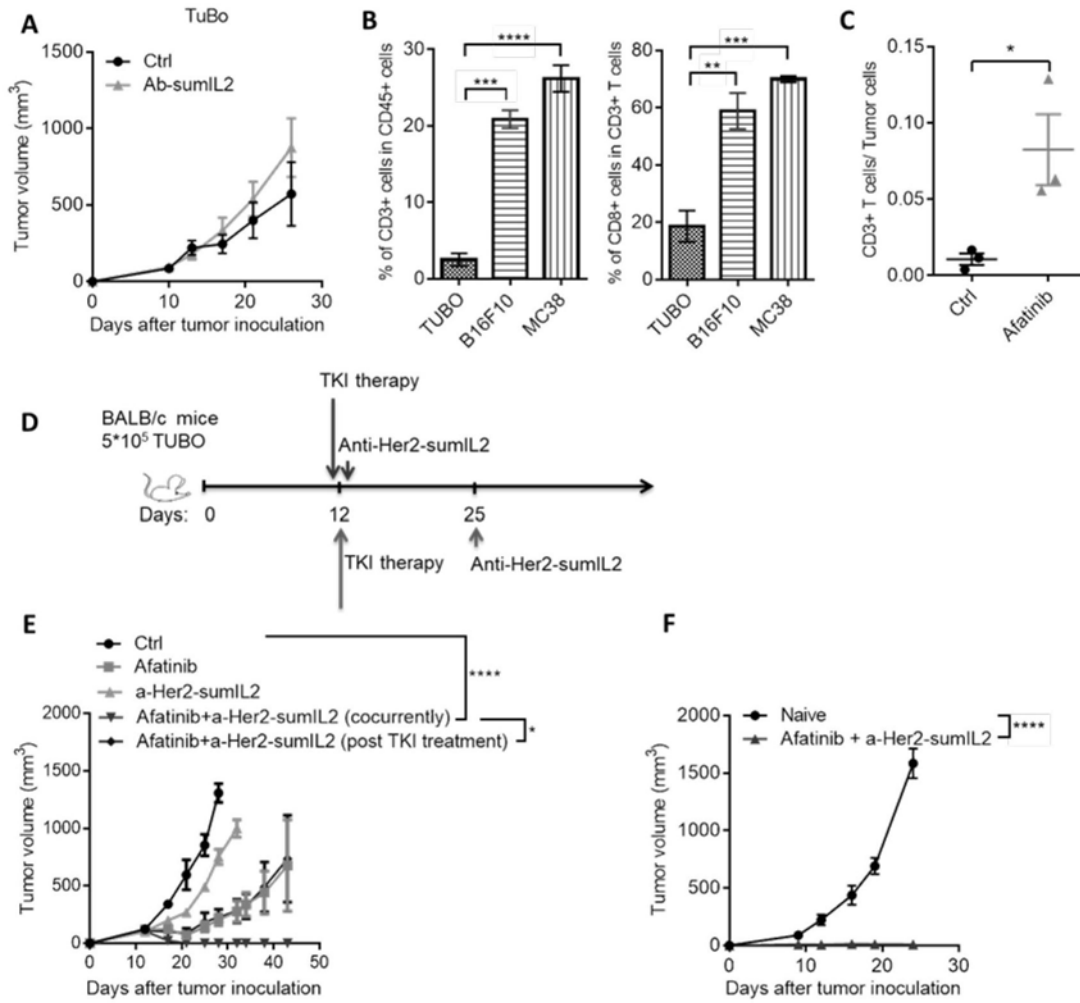


图5

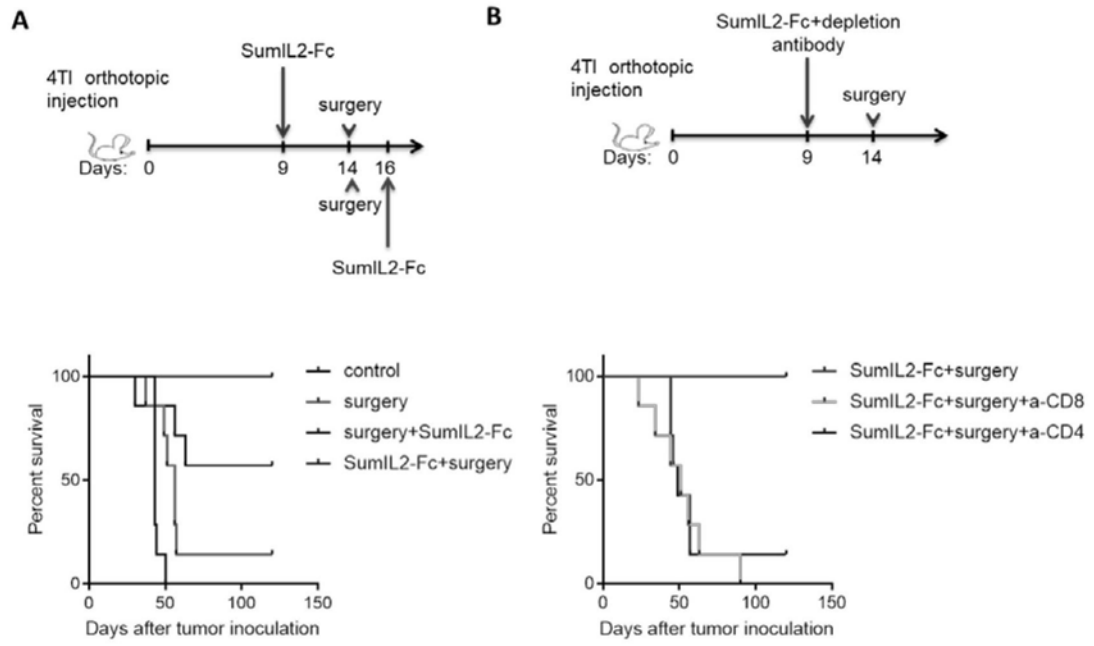


图6

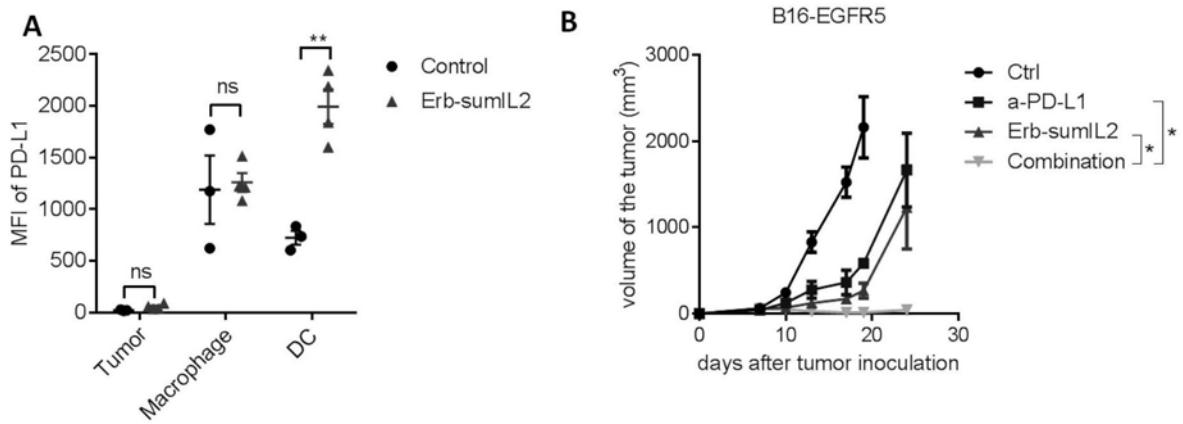


图7

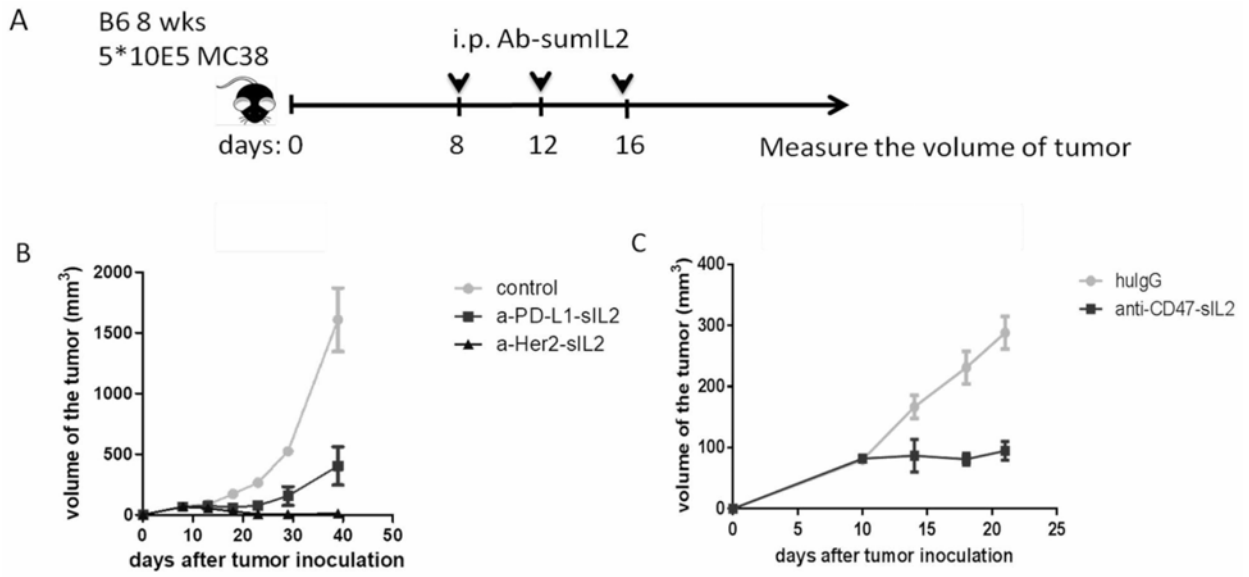


图8