

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102775501 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 14

---

(21) 申请号 201210276119. 2

(22) 申请日 2012. 08. 03

(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 王盛典 傅阳心 徐萌

(74) 专利代理机构 北京市汉信律师事务所  
11373

代理人 王文生

(51) Int. Cl.

*C07K 19/00* (2006. 01)

*C12N 15/62* (2006. 01)

*A61K 39/395* (2006. 01)

*A61K 47/48* (2006. 01)

*A61P 35/00* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页  
序列表 7 页 附图 4 页

---

(54) 发明名称

用于肿瘤治疗的白细胞介素 21 (IL-21) 药物

(57) 摘要

本发明涉及肿瘤治疗领域。本发明涉及使用白细胞介素 21 与抗 Her2/neu 的单链抗体的融合蛋白治疗乳腺癌。

1. 一种融合蛋白,其包含白细胞介素 21 与抗肿瘤组织细胞的单链抗体的氨基酸序列。
2. 权利要求 1 所述的融合蛋白,其中所述抗肿瘤组织细胞的单链抗体是抗 Her2/neu 的单链抗体。
3. 权利要求 2 所述的融合蛋白,其中所述白细胞介素 21 的氨基酸序列如 SEQ ID NO : 1 所示,所述抗 Her2/neu 的单链抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。
4. 权利要求 3 所述的融合蛋白,其中所述白细胞介素 21 与所述抗 Her2/neu 的单链抗体之间通过连接体相连。
5. 权利要求 4 所述的融合蛋白,其中所述连接体的氨基酸序列如 SEQ ID NO :3 所示。
6. 权利要求 5 所述的融合蛋白,所述融合蛋白在所述抗 Her2/neu 的单链抗体的 C 端还含有氨基酸序列如 SEQ ID NO :4 所示的 Ig Fc。
7. 权利要求 6 所述的融合蛋白,所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO :7 所示。
8. 编码权利要求 1-7 中任一项所述的融合蛋白的核苷酸序列。
9. 权利要求 1-7 中任一项所述的融合蛋白在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。
10. 权利要求 9 所述的用途,其中所述肿瘤为乳腺癌。
11. 权利要求 10 所述的用途,其中所述药物与抗 Her2/neu 抗体一起施用。
12. 一种用于治疗乳腺癌的试剂盒,所述试剂盒包含权利要求 1-7 中任一项所述的融合蛋白和抗 Her2/neu 抗体。

## 用于肿瘤治疗的白细胞介素 21 (IL-21) 药物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤治疗领域。具体地,本发明涉及将白细胞介素-21 用于治疗肿瘤。更具体地,本发明涉及使用白细胞介素 21 与抗 Her2/neu 的单链抗体的融合蛋白治疗乳腺癌。

### 背景技术

[0002] 机体免疫在肿瘤发生和发展过程中起着重要作用,近几年研究发现机体的抗肿瘤免疫反应对常规的肿瘤放疗、化疗的治疗效应也起着重要作用。肿瘤放疗和化疗导致肿瘤细胞大量死亡,释放肿瘤抗原和系列“危险信号”,激活机体先天免疫信号通路,促进抗原递呈细胞对抗原的摄取、加工和递呈,诱发和增强机体抗肿瘤免疫反应。诱发的机体内在抗肿瘤免疫反应对清除残存的肿瘤细胞和肿瘤灶、抑制残存的肿瘤细胞和肿瘤灶的生长、防止肿瘤复发起着决定性作用 [1, 2, 3]。

[0003] 肿瘤抗体靶向治疗,以其高特异性、低毒性作用以及和化疗之间很好的协同作用而成为快速发展的肿瘤治疗方法。抗 HER2/neu 抗体是其中的一个典型代表,传统认为其肿瘤治疗机制 [4, 5] 是通过阻断或抑制 HER2/neu 受体的胞内信号,以及抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 来杀伤肿瘤细胞,或抑制肿瘤细胞生长。本发明的申请人最新研究发现抗 HER2/neu 抗体的肿瘤治疗效应还依赖于机体的先天和获得性免疫反应 [6]。抗 HER2/neu 抗体在临床上主要与化疗药联合应用,对 HER2/neu<sup>+</sup> 肿瘤患者具有良好治疗效果,存在的主要问题是抗性肿瘤细胞的产生和高复发率。本发明的申请人在小鼠移植乳腺癌模型中对抗 HER2/neu 抗体和化疗的不同联合应用方案进行研究,发现虽然两者联合应用能够显著促进原位肿瘤的消退,但与单独抗体治疗或先用化疗后用抗体的联合治疗方案相比,先用抗体后用化疗的联合治疗方案明显降低机体产生的记忆性抗肿瘤免疫反应,能够抑制治愈小鼠对肿瘤再攻击的免疫保护作用,可能促进肿瘤复发。

[0004] 由于机体免疫系统在肿瘤发生和发展中的重要作用,肿瘤免疫治疗一直是肿瘤研究的一个热点,产生了各种旨在增强抗肿瘤免疫反应(主要是 T 细胞免疫反应)的肿瘤免疫治疗策略和方法。绝大多数免疫治疗对小的动物移植肿瘤具有良好的治疗效果,但对移植肿瘤晚期或者原发肿瘤治疗效果却不理想,临床试验的肿瘤治疗效果更不如人意 [7]。虽然肿瘤常规治疗诱发的机体内源性抗肿瘤免疫反应对清除残存的肿瘤细胞和肿瘤灶、抑制残存的肿瘤细胞和肿瘤灶的生长具有重要作用,但对大多数肿瘤病人来讲,并不能完全彻底清除肿瘤细胞,不能防止肿瘤最终的复发。大量研究显示,肿瘤细胞在发生和发展过程中,逐步建立起肿瘤微环境,以利于、或者促进肿瘤生长,同时抑制机体的抗肿瘤反应。造成这一局面的主要的原因是肿瘤免疫抑制微环境对抗肿瘤免疫反应的抑制作用 [8]。肿瘤免疫抑制微环境是肿瘤细胞为了生存和发展,在逃逸肿瘤免疫监视的基础上,为了对抗机体抗肿瘤免疫反应,充分利用机体免疫系统自身的负调控机制,在肿瘤微环境中建立的全方位免疫抑制网络。它是一个在抗肿瘤免疫选择压力作用下的动态免疫抑制网络,是随抗肿瘤免疫反应的变化而变化。无论是肿瘤疫苗免疫、抗体治疗、还是肿瘤反应性淋巴细胞过继

治疗等,仅单方面的诱发和增强抗肿瘤免疫反应,肿瘤细胞会在抗肿瘤免疫压力作用下发生变化和调整,发生免疫逃逸,并增强相应的免疫抑制信号,最终在另一层面建立起足以抑制抗肿瘤免疫、使肿瘤细胞不被杀伤的免疫抑制微环境。因此,只增强抗肿瘤免疫,而不改善或解除肿瘤免疫抑制,就难以取得良好的治疗效果。大量研究证据显示,无论是肿瘤快速生长期,还是肿瘤发展晚期,荷瘤机体内均有抗肿瘤免疫反应的存在,但是被肿瘤免疫抑制微环境不同程度地控制。越来越多靶向肿瘤免疫抑制机制的研究结果,说明了肿瘤免疫抑制微环境对促进肿瘤发展和抵抗肿瘤治疗效应的关键作用。

[0005] 巨噬细胞是肿瘤免疫抑制微环境的重要组成部分,已有大量研究显示,肿瘤组织巨噬细胞的浸润与肿瘤病人不良预后相关,不仅肿瘤组织中浸润巨噬细胞(又称为肿瘤相关巨噬细胞(TAM))的数量,而且TAM的表型和功能对肿瘤的发生、发展、以及化疗的敏感性具有重要调节作用[9,10,11]。根据表型和功能,巨噬细胞传统上被分为M1和M2型。在静止不发展的肿瘤、或者回缩肿瘤组织中,TAM表现为M1型,具有促炎、抗原递呈和肿瘤杀伤活性,起着抗肿瘤作用;而在进展的恶性肿瘤组织中,TAM主要表现为M2型,具有促进肿瘤血管生成、肿瘤细胞的侵袭和生长,以及抑制抗肿瘤免疫反应,起着促进肿瘤生长、转移的作用[11]。TAM在表型和功能上表现为不同的亚群,可以随着肿瘤组织环境的改变而发生变化,也可以通过免疫调控将TAM向不同亚群分化。本发明的申请人在小鼠乳腺癌移植模型中研究发现,随着肿瘤生长,肿瘤组织中浸润的巨噬细胞数量和比例急剧增加,功能和表型表现为典型的M2型,而其它免疫和炎症细胞的数量和比例变化不大。由于TAM在肿瘤发生发展中起着非常重要的作用,TAM一直是肿瘤治疗研究的靶点,诱导TAM由M2向M1型分化(即TAM的极化)一直是肿瘤治疗研究的一个重要方向[12,13,14]。

[0006] 白细胞介素21(IL-21)是一种主要由CD4<sup>+</sup>T细胞产生的I类细胞因子,它的受体是由IL-21受体(IL-21R)和共同的 $\gamma$ 链组成的异源二聚体。IL-21通过与靶细胞上受体的结合,激活胞内信号,在先天和获得性免疫反应中发挥多种生物学效应。已知IL-21可以促进B细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞和NK细胞的分化,增强抗体反应、以及CD8<sup>+</sup>T细胞和NK细胞的反应和效应功能。已有研究发现全身系统性给予IL-21可以增强CD8<sup>+</sup>T细胞和NK细胞的反应和效应功能发挥抗肿瘤作用[15,16,17],但肿瘤治疗效应不很理想。本发明发现通过肿瘤特异性单链抗体将IL-21靶向肿瘤组织,可以将促进肿瘤生长的M2型肿瘤相关巨噬细胞分化成具有抗肿瘤作用的M1型巨噬细胞,改善肿瘤组织微环境,从而显著增强机体抗肿瘤免疫反应,极大提高目前肿瘤常规治疗的疗效,防止肿瘤复发。

## 发明内容

[0007] 本发明公开了IL-21新的生物学功能,IL-21可以诱导肿瘤组织中肿瘤相关巨噬细胞(TAM)由M2向M1型分化。靶向肿瘤组织的IL-21能减少肿瘤组织巨噬细胞的数量,同时能将TAM由M2极化为M1,消除TAM对T细胞反应的抑制作用,减少巨噬细胞促血管生成因子(VEGF)、免疫抑制因子(TGF- $\beta$ 、IL-10等)的产生,显著改善肿瘤免疫抑制微环境,发挥极强的抗肿瘤作用。

[0008] 基于IL-21新的生物学功能,通过本说明书中公开的方法把IL-21靶向到肿瘤组织,改善肿瘤组织免疫抑制微环境,显著增强目前肿瘤常规治疗的疗效。

[0009] 本发明通过基因工程方法将IL-21与抗HER2/neu的单链抗体构建成融合蛋白

IL-21/scFv(neu),与抗 HER2/neu 抗体联合应用,显著增强抗 HER2/neu 抗体的肿瘤治疗效果,防止肿瘤复发。

[0010] 本发明除了通过基因工程方法把 IL-21 与抗肿瘤组织细胞的单链抗体或抗体构建成融合蛋白,还包括其它将 IL-21 靶向肿瘤组织,作用于肿瘤浸润巨噬细胞的方法,包括:把 IL-21 重组到融瘤病毒载体;通过转染建立表达 IL-21 的肿瘤特异性 T 细胞;通过纳米技术制备 IL-21 纳米颗粒。

[0011] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0012] 1. 一种融合蛋白,其包含白细胞介素 21 与抗肿瘤组织细胞的单链抗体的氨基酸序列。

[0013] 2. 第 1 项所述的融合蛋白,其中所述抗肿瘤组织细胞的单链抗体是抗 Her2/neu 的单链抗体。

[0014] 3. 第 2 项所述的融合蛋白,其中所述白细胞介素 21 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,所述抗 Her2/neu 的单链抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[0015] 4. 第 3 项所述的融合蛋白,其中所述白细胞介素 21 与所述抗 Her2/neu 的单链抗体之间通过连接体相连。

[0016] 5. 第 4 项所述的融合蛋白,其中所述连接体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

[0017] 6. 第 5 项所述的融合蛋白,所述融合蛋白在所述抗 Her2/neu 的单链抗体的 C 端还含有氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示的 Ig Fc。

[0018] 7. 第 6 项所述的融合蛋白,所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示。

[0019] 8. 编码第 1-7 项中任一项所述的融合蛋白的核苷酸序列。

[0020] 9. 第 1-7 项中任一项所述的融合蛋白在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0021] 10. 第 9 项所述的用途,其中所述肿瘤为乳腺癌。

[0022] 11. 第 10 项所述的用途,其中所述药物与抗 Her2/neu 抗体一起施用。

[0023] 12. 一种用于治疗乳腺癌的试剂盒,所述试剂盒包含第 1-7 项中任一项所述的融合蛋白和抗 Her2/neu 抗体。

[0024] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

## 附图说明

[0025] 图 1. 局部 IL-21 治疗增强抗 HER2/neu 抗体的治疗效果:(A) Balb/c 小鼠皮下接种  $8 \times 10^5$  Tubo 肿瘤细胞,分为 4 组,每组 5 只小鼠,抗 HER2/neu 抗体+IL-21 组:在第 16 天腹腔注射  $100 \mu\text{g}$  抗 HER2/neu 抗体,在第 16 天和第 19 天,瘤内注射  $5 \mu\text{g}$  IL-21 蛋白;抗 HER2/neu 抗体组:在第 16 天腹腔注射  $100 \mu\text{g}$  抗 HER2/neu 抗体,在第 16 天和第 19 天,瘤内注射等体积 PBS;IL-21 组:在第 16 天和第 19 天,瘤内注射  $5 \mu\text{g}$  IL-21 蛋白;PBS 组:在第 16 天腹腔注射等体积 PBS 做为对照,定期用游标卡尺测量肿瘤的两个垂直直径,按  $0.5 \times [\text{长}(\text{cm}) \times \text{宽}(\text{cm}) \times \text{宽}(\text{cm})]$  计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。(B) 给 (HER2/neu x Balb/c)F1 小鼠皮下接种  $1 \times 10^6$  Tubo 肿瘤细胞,小鼠分为两组,每组 5 只小鼠,在肿瘤接种后的第 18 天,两组小鼠腹腔注射  $100 \mu\text{g}$  抗 HER2/neu 抗体,在第 18 天和第 20 天,一组小鼠瘤内注射  $5 \mu\text{g}$  IL-21 蛋白,另一组小鼠瘤内注射等体积 PBS,定期用游标卡尺测量肿瘤的两个垂直直径,按  $0.5 \times [\text{长}(\text{cm}) \times \text{宽}(\text{cm}) \times \text{宽}(\text{cm})]$  计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线;

[0026] 图 2. 局部 IL-21 治疗诱导 M2 型肿瘤相关巨噬细胞向 M1 型转化 : (A-B) 给 Balb/c 小鼠皮下接种  $8 \times 10^5$  Tubo 肿瘤细胞, 在接种后的第 15 天, 瘤内注射  $10 \mu\text{g}$  IL-21 蛋白, 5 天后, 取肿瘤组织, 进行流式染色, 分析各种淋巴细胞亚群占 CD45+ 细胞的比例。 (C) 用流式细胞仪分选出肿瘤浸润的巨噬细胞 (Ly6c-GR-1-F4/80+CD11c+), 实时定量 PCR 检测各种 M1 型 (下排) 和 M2 (上排) 型细胞因子的表达, 内参为  $\beta$  肌动蛋白 ( $\beta$ -actin)。 (D) 流式细胞仪分选出肿瘤浸润的巨噬细胞, 在体外与 CFSE 标记的淋巴细胞以 1 : 3 的比例共孵育 72 小时, 同时用 CD3 和 CD28 激活抗体刺激。三天后, 用流式检测淋巴细胞的增殖情况, 图上分别标出增殖细胞群与未增殖细胞群。左图为代表性的流式结果, 右图为增殖细胞的统计结果 ;

[0027] 图 3. IL-21 直接作用于巨噬细胞向 M1 型极化 (A) 给 Balb/c 小鼠腹腔注射  $5 \mu\text{g}$  无 LPS 的 IL21 蛋白或生理盐水, 18 小时后, 取腹腔巨噬细胞, 实时定量 PCR 检测巨噬细胞分泌 M2 型细胞因子的水平。 (B-C) 取 Balb/c 小鼠腹腔巨噬细胞, 加入培养皿中贴壁过夜后, 去掉悬浮的细胞, 加  $100\text{ng/ml}$  的 IL-21 培养过夜 (B), 或加  $100\text{ng/ml}$  的 IL-21 培养 4 小时后, 移走上清, 加入低剂量  $50\text{ng/ml}$  LPS 短时间刺激 4 小时 (C), 实时定量 PCR 检测巨噬细胞分泌 M2 型细胞因子的水平。 (D) 给 Balb/c 小鼠皮下接种 Tubo 肿瘤细胞, 接种后第 20 天取肿瘤组织, 流式分选肿瘤浸润巨噬细胞 (CD11b+F4/80+CD11c+), 在  $100\text{ng/ml}$  IL-21 的条件下培养过夜, 实时定量 PCR 检测细胞因子的表达。以上内参为  $\beta$ -actin ;

[0028] 图 4. 融合蛋白 IL-21/scFv (neu) 可以增强 HER2/neu 抗体的治疗效果, 防止肿瘤复发 (A) IL-21/scFv (neu) 融合蛋白的构建图谱 : 由 IL-21、G10S3 连接体 (linker)、抗 HER2/neu 单链抗体 (scFv) 和 IgG 的 Fc 段组成 ; (B) 融合蛋白 IL-21/scFv (neu) 可以结合到 HER2/neu 阳性的 Tubo 细胞表面, 红色为不加融合蛋白只加二抗的对照。 (C) 低剂量融合蛋白可以增强 HER2/neu 抗体的治疗效果 ; (D) 融合蛋白 IL-21/scFv (neu) 与抗 HER2/neu 抗体对免疫耐受肿瘤的联合治疗, ( $*p < 0.05$ )。

## 具体实施方式

[0029] 实施例中所用的实验材料

[0030] (1) 实验动物

[0031] Balb/c 小鼠 : SPF 级 Balb/c 雌性小鼠, 6 到 8 周, 购于维通利华实验动物技术有限公司。

[0032] HER2/Neu 转基因小鼠 : 为 FVB 遗传背景, 购自美国 Jackson Lab。因为所用的乳腺癌细胞 Tubo 来自 Balb/c 遗传背景小鼠, 我们将 HER2/Neu 转基因小鼠与 Balb/c 小鼠交配, 得到的 (HER2/Neu x Balb/c)F1 代小鼠用于 Tubo 肿瘤细胞的移植试验。正常小鼠接种外来肿瘤细胞建立的小鼠肿瘤模型, 并不能很好反映临床病人自发的肿瘤, 因为这种小鼠对肿瘤抗原没有免疫耐受, 容易产生良好的抗肿瘤免疫反应 ; 而肿瘤病人的肿瘤来自自身, 对其肿瘤抗原往往产生一定程度的免疫耐受, 不容易产生抗肿瘤免疫反应。HER2/Neu 转基因小鼠自身表达高水平 HER2/neu 抗原, 对 HER2/Neu 抗原免疫耐受, 接种 HER2/Neu+ 的乳腺癌细胞, 更能模拟乳腺癌病人的免疫状况。

[0033] (2) 细胞

[0034] Tubo 细胞来自于 Balb/c 背景的 HER2/neu 转基因小鼠, 将该小鼠自发的乳腺癌细

胞建成稳定的细胞系 [18]。该细胞系高表达大鼠原癌基因 HER2/neu, 且突变的 HER2/neu 分子可持续性的激活下游信号, 促进细胞的增殖和癌变。

[0035] 3T3KB 细胞株稳定表达 MHC I 和共刺激分子 B7. 1, 通过用表达 MHC I 和 B7. 1 的质粒共转染 3T3 细胞 (购自 ATCC, CCL-92™) 建立而成 [6]。3T3NKB 则稳定表达 HER2/neu, 同时也表达 MHC I 和共刺激分子 B7. 1, 其通过用表达 MHC I、B7. 1 和 HER2/neu 的质粒共转染 3T3 细胞建立而成 [6]。

[0036] (3) 抗体

[0037] 抗 HER2/neu 抗体 (克隆号 : 7. 16. 4) : 与 Tubo 细胞上的 HER2/neu 分子结合, 抑制肿瘤的生长 [19], 该抗体利用杂交瘤细胞制备 (所用杂交瘤及所用方法参见 [20])。

[0038] 流式染色抗体 : Anti-CD45-PacificBlue、Anti-CD11b-FITC、Anti-CD11c-PE、Anti-F4/80-PEcy7、Anti-Gr1-Percp cy5. 5、Anti-Ly6c-APCcy7、anti-FcR 均购于 Biologend 公司 (美国)。CD4、CD8、CD49b (DX5) 抗体购于 BD Pharmingen 公司 (美国)。

[0039] 活化细胞的功能性抗体 : Anti-CD3、Anti-CD28 抗体购于 BD Pharmingen 公司 (美国)。

[0040] (4) PCR 所用引物 :

[0041]

基因名称	上游引物序列	下游引物序列
IL-6	5'ATGGATGCTACCAAAC TGGAT3'	5'TGAAGGACTCTGGCTTT GTCT3'
VEGF	5'ACGACAGAAGGAGAG CAGAA3'	5'CACAGGACGGCTTGAA GATG3'
IL-10	5'GCCAAGCCTTATCGGA AATGA3'	5'GCCAAGCCTTATCGGAA ATGA3'
CCL2	5'GTGAAGTTGACCCGTA AA3'	5'TCCTACAGAAGTGCTTG A3'
iNos2	5'ACTACTGCTGGTGGTG ACAA3'	5'GAAGGTGTGGTTGAGT TCTCTAAG3'
IL-12p35	5'ACGCAGCACTTCAGAA TCAC3'	5'CGCAGAGTCTCGCCATT ATG3'
TNF $\alpha$	5'ACGCTCTTCTGTCTACT GAACT3'	5'ATCTGAGTGTGAGGGTC TGG3'
CCL17	5'GTGCTGCCTGGATTACT TCAA3'	5'GGACAGTCAGAAACAC GATGG3'
Mrc-1	5'CCTGAACAGCAACTTG ACCAATA3'	5'TCCAGTAGCCATCAACA TCCA3'
CXCL9	5'TGCTACACTGAAGAAC GGAGAT3'	5'TCCTTGAACGACGACG ACTT3'
$\beta$ -actin	5'GCACCACACCTTCTAC AA3'	5'TACGACCAGAGGCATA CA3'

[0042] 实验方法：

[0043] ①肿瘤组织单细胞悬液制备：将肿瘤组织置于含 2% 胎牛血清 (FBS) (Hyclone) 的 DMEM 培养基 (GIBCO) 中剪碎，加入 0.1% 胶原酶 IV (Sigma) 37℃ 消化 20 分钟，用磨砂玻璃片轻轻研磨，用不含 FBS 的 DMEM 培养基洗两遍，重悬于含 2% FBS 的 DMEM 培养基，过 40  $\mu$ m 筛网，制成单细胞悬液，计数。

[0044] ②流式细胞分析：每个样本取  $1 \times 10^6$  细胞，重悬于 100  $\mu$ l FACS 缓冲液 (PBS 溶液中加入 0.1% NaN<sub>3</sub>、2% FBS) 中，加入 5  $\mu$ l anti-FcR 抗体与细胞共孵育 10min 封闭 FcR，然后加入相应抗体，于 4℃ 染色 30min，用 FACS 缓冲液洗两遍，300  $\mu$ l 1% 多聚甲醛溶液重悬标记后的细胞，48 小时内 FACS Calibu 流式仪 (BD Bioscience) 检测，流式数据用 Cellquest



或 Flowjo 5.7 软件分析。

[0045] ③定量 RT-PCR 检测巨噬细胞中细胞因子表达：将流式分选细胞以 1500rpm 离心 5 分钟，充分移除上清，使用 RNeasy Micro Kit (cat74004, QIAGEN) 抽提细胞总 RNA，使用 ProtoScript® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (E6300, NEB) 逆转录合成 cDNA，并调整至合适的浓度；使用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪，检测细胞因子的表达；选用  $\beta$ -actin 和 18s 做为内参，用  $\Delta$ - $\Delta$ Ct 方法处理数据。

[0046] qPCR 扩增体系 (20  $\mu$  l)：

[0047] 上下游引物 (10  $\mu$  M) 各 0.5  $\mu$  l；

[0048] 2 $\times$ TransStart™ Eco Green qPCR SuperMix (TransGen Biotech) 10  $\mu$  l；

[0049] cDNA 2  $\mu$  l；ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$  l

[0050] qPCR 反应条件：

[0051] 95°C 30 秒

[0052] 95°C 5 秒

[0053] 55°C 退火 5 秒

[0054] 72°C 延伸 5 秒，

[0055] 共 35 个循环

[0056] ④肿瘤巨噬细胞对 T 细胞增殖的抑制：取 6-8 周龄 Balb/c 小鼠颈椎脱臼致死，取小鼠腹股沟，腋下，肠系膜等处淋巴结，用玻片轻轻研磨分散细胞，过筛网，离心后收集细胞。以终浓度 5  $\mu$  M CFSE (C1157, Invitrogen) 标记细胞，37°C 水浴 5-10 分钟，以预冷 PBS 洗一遍，用 10% FBS 1640 完全培养基 (GIBCO) 重悬细胞，计数。将细胞以  $1 \times 10^5$ /孔铺圆底 96 孔板，加入终浓度为 1-2  $\mu$  g/ml Anti-CD3 抗体和 0.5  $\mu$  g/ml Anti-CD28 抗体刺激。将上述实验方法①制备的肿瘤组织单细胞悬液用抗 CD45、CD11b、F4/80、CD11c、Gr1、Ly6C 的荧光抗体标记，流式分选 CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> 肿瘤巨噬细胞。将分选所得的肿瘤巨噬细胞以 1 : 3 或 1 : 5 (巨噬细胞 / T 细胞) 比例加入到上述 96 孔细胞培养板中，在 37°C CO<sub>2</sub> 培养箱共孵育 3 天，收集细胞，用抗 CD8mAb 染色，流式细胞术检测 CD8 细胞 CFSE，以确定细胞增殖情况。

[0057] 实施例 1. 肿瘤内注射 IL-21 显著增强抗 HER2/neu 抗体的肿瘤治疗效果：

[0058] 给正常野生型 Balb/c 小鼠 (图 1A) 或 HER2/neu 抗原免疫耐受的 (HER2/neu x Balb/c)F1 小鼠 (图 1B) 接种肿瘤，待肿瘤长到一定大小给予抗 HER2/neu 抗体治疗，同时给予肿瘤注射重组 IL-21 蛋白 (Pepro Tech) 进行联合治疗，可以显著增强抗 HER2/neu 抗体的肿瘤治疗效果。

[0059] 具体实验方法：

[0060] (1) 给正常 Balb/c 小鼠皮下接种  $8 \times 10^5$  Tubo 肿瘤细胞，分为 4 组，每组 5 只小鼠，抗 HER2/neu 抗体 + IL-21 组：在第 16 天腹腔注射 100  $\mu$  g 抗 HER2/neu 抗体，在第 16 天和第 19 天，瘤内注射 5  $\mu$  g IL-21 蛋白 (Pepro Tech)；抗 HER2/neu 抗体组：在第 16 天腹腔注射 100  $\mu$  g 抗 HER2/neu 抗体，在第 16 天和第 19 天，瘤内注射等体积 PBS；IL-21 组：在第 16 天和第 19 天，瘤内注射 5  $\mu$  g IL-21 蛋白；PBS 组：在第 16 天腹腔注射等体积 PBS 作为对照，定期用游标卡尺测量肿瘤的两个垂直直径，按  $0.5 \times [长 (cm) \times 宽 (cm) \times 宽 (cm)]$  计算肿瘤体积，绘制肿瘤生长曲线，结果见图 1A。

[0061] (2) 给 (HER2/neu x Balb/c)F1 小鼠皮下接种  $1 \times 10^6$  Tubo 肿瘤细胞, 小鼠分为两组, 每组 5 只小鼠, 在肿瘤接种后的第 18 天, 两组小鼠腹腔注射  $100 \mu\text{g}$  抗 HER2/neu 抗体, 在第 18 天和第 20 天, 一组小鼠瘤内注射  $5 \mu\text{g}$  IL-21 蛋白, 另一组小鼠瘤内注射等体积 PBS, 定期用游标卡尺测量肿瘤的两个垂直直径, 按  $0.52 \times [\text{长 (cm)} \times \text{宽 (cm)}]$  计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线, 结果见图 1B。

[0062] 实施例 2. 瘤内注射 IL-21 诱导肿瘤相关巨噬细胞向 M1 型极化, 显著改善肿瘤免疫抑制微环境:

[0063] 给荷瘤小鼠瘤内注射 IL-21, 显著减少肿瘤组织中巨噬细胞比例 (图 2A), 增加抗肿瘤效应细胞 (NK、CD8<sup>+</sup>T 细胞) 的比例 (图 2B); 诱导肿瘤浸润巨噬细胞低表达 M2 型巨噬细胞因子 CCL17、IL-10、TGF- $\beta$ 、VEGF 等, 高表达 M1 型巨噬细胞因子 CXCL9、Nos2 等 (图 2C); 消除 TAM 对 T 细胞增殖的抑制作用 (图 2D)。

[0064] 具体实验方法:

[0065] (1) 肿瘤组织中细胞亚群的分析: 给 Balb/c 小鼠皮下接种  $8 \times 10^5$  Tubo 肿瘤细胞, 在接种后的第 15 天, 瘤内注射  $10 \mu\text{g}$  IL-21 蛋白 (Pepro Tech), 5 天后, 取肿瘤组织, 按照实验方法①制备肿瘤组织单细胞悬液, 按照实验方法②, 分别利用以下荧光标记抗体进行染色和流式细胞分析: Anti-CD45-PacificBlue (抗 CD45)、Anti-CD11b-FITC (抗 CD11b)、Anti-CD11c-PE (抗 CD11c)、Anti-F4/80-PEcy7 (抗 F4/80)、Anti-Gr1-Percp cy5.5 (抗 Gr1)、Anti-Ly6c-APCcy7 (抗 Ly6c)、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD49b (DX5) 抗体。肿瘤浸润的细胞亚群按下列表面标记分析:

[0066] 巨噬细胞:  $\text{CD45}^+\text{CD11b}^+\text{Gr1}^-\text{Ly6C}^+\text{F4/80}^+\text{CD11c}^+$

[0067] 粒细胞性 MDSC:  $\text{CD45}^+\text{CD11b}^+\text{Gr1}^{\text{hi}}\text{Ly6C}^{\text{low}}\text{F4/80}^-\text{CD11c}^-$

[0068] 单核细胞性 MDSC:  $\text{CD45}^+\text{CD11b}^+\text{Gr1}^{\text{low}}\text{Ly6C}^{\text{hi}}\text{F4/80}^-\text{CD11c}^{-/+}$

[0069] CD8<sup>+</sup>T 细胞:  $\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD8}^+$

[0070] CD4<sup>+</sup>T 细胞:  $\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD4}^+$

[0071] NK 细胞:  $\text{CD45}^+\text{CD3}^-\text{DX5}^+$

[0072] (2) 定量 RT-PCR 检测巨噬细胞中细胞因子表达: 将上述制备的肿瘤组织单细胞悬液荧光抗体标记后, 流式分选表型为  $\text{CD11b}^+\text{F4/80}^+\text{CD11c}^+$  的肿瘤浸润巨噬细胞, 按照实验方法③进行定量 PCR, 检测细胞中 VEGF、IL-10、TGF- $\beta$ 、CCL2、CCL-17、CXCL-9、Nos2 因子的表达。

[0073] (3) 肿瘤巨噬细胞对 T 细胞增殖的抑制: 取 6-8 周龄 Balb/c 小鼠颈椎脱臼致死, 取小鼠腹股沟, 腋下, 肠系膜等处淋巴结, 用玻片轻轻研磨分散细胞, 过筛网, 离心后收集细胞。以终浓度  $5 \mu\text{M}$  MCFSE (C1157, Invitrogen) 标记细胞,  $37^\circ\text{C}$  水浴 5-10 分钟, 以预冷 PBS 洗一遍, 用 10% FBS 1640 完全培养基 (GIBCO) 重悬细胞, 计数。将细胞以  $1 \times 10^5$  / 孔加到圆底 96 孔板, 加入终浓度为  $1-2 \mu\text{g/ml}$  抗 CD3 抗体和  $0.5 \mu\text{g/ml}$  抗体 CD28 抗体刺激。将上述 (2) 流式分选的  $\text{CD11b}^+\text{F4/80}^+\text{CD11c}^+$  肿瘤巨噬细胞以 1 : 3 或 1 : 5 (巨噬细胞 / T 细胞) 比例加入到上述 96 孔细胞培养板中, 在  $37^\circ\text{C}$  CO2 培养箱共孵育 3 天, 收集细胞, 用抗 CD8 抗体染色, 流式细胞术检测 CD8 细胞 CFSE, 以确定细胞增殖情况。

[0074] 实施例 3. IL-21 直接诱导巨噬细胞向 M1 型分化:

[0075] 为了证明瘤内注射 IL-21 诱导肿瘤相关巨噬细胞向 M1 型极化是 IL-21 对巨噬细

胞直接作用的结果,我们首先证明小鼠腹腔注射 IL-21,也能显著抑制腹腔巨噬细胞表达 M2 型巨噬细胞因子 CCL17、IL-10、TGF- $\beta$ 、Mrc-1(图 3A);在此基础上,我分离小鼠腹腔巨噬细胞在体外和 IL-21 共培养,培养过夜即可显著抑制腹腔巨噬细胞 M2 型巨噬细胞因子 VEGF、TGF- $\beta$  的表达(图 3B);此外,IL-21 也能显著增加 LPS 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞体外分泌炎症细胞因子 TNF- $\beta$  和 IL-6 的分泌(图 3C);IL-21 直接作用于 M2 型肿瘤浸润巨噬细胞,可以快速诱导其向 M1 型分化(图 3D)。这些结果说明:IL-21 可以直接作用于巨噬细胞,诱导巨噬细胞由 M2 型向 M1 型分化。

[0076] 具体实验方法:

[0077] (1) IL-21 诱导小鼠腹腔巨噬细胞向 M1 型分化:给 Balb/c 小鼠腹腔注射重组 IL21 蛋白(Pepro Tech)或生理盐水,18 小时后,用含 20%蔗糖的 PBS 冲洗腹腔,收集腹腔细胞,按照实验方法③进行定量 PCR,检测腹腔细胞中 IL-10、TGF- $\beta$ 、CCL-17、Mrc-1 因子的表达。

[0078] (2) 用含 20%蔗糖的 PBS 冲洗腹腔,收集腹腔细胞,加入细胞培养皿中贴壁过夜后,去掉悬浮的细胞,加 100ng/ml 的 IL-21 培养过夜,然后收集细胞,按照实验方法③进行定量 PCR,检测腹腔细胞中 IL-10、TGF- $\beta$ 、VEGF、Mrc-1 因子的表达。

[0079] (3) 用含 20%蔗糖的 PBS 冲洗腹腔,收集腹腔细胞,在体外贴壁过夜后,去掉悬浮的细胞,加 100  $\mu$ g/ml 的 IL-21 培养 4 小时后,移走上清,加入低剂量 50ng/ml LPS(sigma)短时间刺激 4 小时,按照实验方法③进行定量 PCR,检测腹腔细胞中 IL-6、TNF- $\beta$  因子的表达。

[0080] (4) 给 Balb/c 小鼠皮下接种 Tubo 肿瘤细胞,接种后第 20 天取肿瘤组织,按照实施例 2 流式分选肿瘤浸润巨噬细胞(CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>),在 100ng/ml IL-21 的条件下培养过夜,按照实验方法③进行定量 PCR,检测肿瘤巨噬细胞中 IL-10、TGF- $\beta$ 、VEGF、Mrc-1、CCL2、CCL17 因子的表达。

[0081] 实施例 4. 融合蛋白 IL-21/scFv(neu) 肿瘤靶向治疗增强抗 HER2/neu 抗体的肿瘤治疗效果,防止肿瘤复发

[0082] 为了将 IL-21 靶向肿瘤局部,我们构建并表达了一种新型蛋白:IL-21/scFv(neu),由细胞因子 IL-21(氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示)与抗 HER2/neu 的单链抗体(抗 HER2/neu ScFv,氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示)融合而成,两者之间有连接体 G10S3(氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示),在抗 HER2/neu ScFv 的 C 端还连接有 IgG 的 Fc 段(氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示)用于蛋白纯化,同时可增强 IL-21/scFv(neu) 融合蛋白的生物学功能(图 4A)。IL-21/scFv(neu) 蛋白可以有效的结合在 HER2/neu<sup>+</sup> 的肿瘤细胞系 Tubo 上(图 4B)。首先,我们检测 IL-21/scFv(neu) 是否能提高抗 HER2/neu 抗体的治疗效果,抑制肿瘤的生长和复发。给 BALB/c 小鼠皮下接种 Tubo 肿瘤细胞,待肿瘤长到超过 150mm<sup>3</sup>,给小鼠腹腔注射低剂量(25  $\mu$ g)的融合蛋白 IL-21/scFv(neu) 或 PBS,两天后,腹腔注射抗 HER2/neu 抗体 100  $\mu$ g,监测肿瘤的生长。结果发现,低剂量融合蛋白确实可以显著的改善机体对抗 HER2/neu 抗体的反应,增强其治疗效果,抑制肿瘤的复发(图 4C)。

[0083] 为了进一步鉴定融合蛋白 IL-21/scFv(neu) 的临床肿瘤治疗价值,我们采用了 HER2/neu 转基因小鼠的肿瘤移植模型。给 (HER2/neu x Balb/c)F1 小鼠皮下接种 8x10<sup>5</sup> 肿瘤细胞 Tubo,等肿瘤长 200mm<sup>3</sup> 左右,分别在第 19 天和第 22 天腹腔注射 100  $\mu$ g 抗 HER2/neu 抗体。在第 32 天和第 42 天,分为腹腔注射 100  $\mu$ g 的抗 HER2/neu 抗体、IL-21/scFv(neu)

融合蛋白或 PBS 作为对照,监测肿瘤生长。结果发现,融合蛋白 IL-21/scFv(neu) 显著提高抗 HER2/neu 抗体对免疫耐受肿瘤的治疗效果,防止肿瘤的复发(图 4D)。综上所述,融合蛋白 IL-21/scFv(neu) 联合 HER2/neu 抗体显著地抑制了肿瘤的生长和复发,在临床上有很好的应用前景。

[0084] 具体实验方法:

[0085] (1) 克隆 IL-21 基因:取野生型 Ba1b/c 小鼠脾脏置于 DMEM 培养基中,用玻片磨砂端轻轻研磨,使细胞分散,过筛网,400xg 离心 5 分钟,弃上清,加入 1ml ACK 红细胞裂解液(0.16M NH<sub>4</sub>Cl,0.17M Tris,HCl 调 pH 至 7.21)裂解 2 分钟,加入含 10% FBS 培养基终止反应,离心后重悬细胞,计数。体外用 5 μg/ml 抗 CD3 抗体刺激三天,收集细胞,参照实验方法③进行 RNA 提取和 cDNA 合成,PCR 扩增 IL-21 基因片段。扩增 IL-21 基因的引物为:上游引物:5' GGAG ACTCAGTT3';下游引物:5' GGAATCTTCTCGGATCCTC3',所扩增的 IL-21 编码基因序列如 SEQ ID NO:5 所示。

[0086] (2) 利用通用简并引物,通过 RT-PCR 从抗 HER2/neu 抗体(克隆号:7.16.4)的杂交瘤细胞[20]克隆抗 HER2/neu 单链抗体(scFv)的基因片段,用 Hind III(NEB 公司)和 EcoR I 酶(NEB 公司)消化,连接到质粒 pSecTag2A(Invitrogen,货号 V900-20)的 Hind III 和 EcoR I 酶之间,构建成表达质粒 pSecTag2A ScFv。用上游引物为 5' TCAGGTGGATCCGGTTC TGGAGGTGGAGATATCACGCAGTCTC3' 下游引物为 5' AATTGCTAGCCTAGACAGATGGGGGTGTT3',从质粒 pSecTag2A ScFv 上,用 PCR 扩增抗 HER2/neu ScFv 基因片段,所扩增的抗 HER2/neu scFv 基因片段序列如 SEQ ID NO:6 所示。

[0087] (3) 融合蛋白 IL-21/scFv(neu) 载体构建和表达:通过重叠 PCR 将上述 IL-21 与抗 HER2/neu ScFv 基因片段通过 G10S3(Linker)融合成 IL-21/scFv(neu),重叠 PCR 所用的四条引物分别为:IL-21 上游 5' AGTAGAATTCATGGAGAGGACCCTTGTCTGTCT3' 下游 5' CCGGATCCACCTGATCCACCTCCAGGAGAGATGCTGATGA3';scFv 上游 5' TCAGGTGGATCCGGTTC TGGAGGTGGAGATATCACGCAGTCTC3' 和下游 5' AATTGCTAGCCTAGACAGATGGGGGTGTT3',最后将 IL-21/scFv(neu) 融合片段用 EcoRI(NEB 公司)和 NheI(NEB 公司)限制性内切酶处理,与经过同样内切酶处理的 pIgFc 载体连接,使 IL-21/scFv(neu) 片段与小鼠 IgG 的 Fc 段融合[21]。用转染试剂 Fugene6 转染试剂(Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany)参照试剂说明书,将构建的表达载体转染 293T 细胞,收集培养上清,用 protienG-Sepharose 柱(Pharmacia,Uppsala,瑞典)纯化 IL-21/scFv(neu) 融合蛋白。所构建的 IL-21/scFv(neu) 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示。

[0088] (4) 融合蛋白 IL-21/scFv(neu) 的鉴定:将 5 μg 融合蛋白 IL-21/scFv(neu) 与 Tubo 细胞 4℃ 孵育 30 分钟,洗去不结合的蛋白后加入二抗抗大鼠 IgG-FITC(BD Pharmingen)孵育 30 分钟后,洗去未结合抗体,用流式细胞仪检测 IL-21/scFv(neu) 融合蛋白与 HER2/neu+ 肿瘤细胞 Tubo 的结合。

[0089] (5) 低剂量融合蛋白 IL-21/scFv(neu) 与 HER2/neu 抗体联合肿瘤治疗:给 Ba1b/c 小鼠接种 8x10<sup>5</sup> 肿瘤细胞 Tubo,分为 3 组,每组 5 只小鼠,IL-21/scFv+anti-neu 组:在第 12 天和第 20 天,腹腔注射低剂量的 IL-21/scFv(neu) 融合蛋白 25 μg,在第 15 天和第 22 天腹腔注射 100 μg 抗 HER2/neu 抗体;anti-neu 组:在第 12 天和第 20 天,腹腔注射等体积 PBS,在第 15 天和第 22 天腹腔注射 100 μg 抗 HER2/neu 抗体;PBS 组:在第 15 天和第 22 天

腹腔注射等体积 PBS, 定期用游标卡尺测量肿瘤的两个垂直直径, 按  $0.52 \times [\text{长 (cm)} \times \text{宽 (cm)}]$  计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线。

[0090] (6) 融合蛋白 IL-21/scFv(neu) 与抗 HER2/neu 抗体对免疫耐受肿瘤的联合治疗: 给 HER2/neu 抗原免疫耐受的 (HER2/neu x Balb/c)F1 小鼠接种  $8 \times 10^5$  肿瘤细胞 Turbo, 分别在第 19 天和第 22 天腹腔注射  $100 \mu\text{g}$  抗 HER2/neu 抗体, 在第 32 天和第 42 天, 3 组小鼠分别腹腔注射  $100 \mu\text{g}$  抗 HER2/neu 抗体、IL-21/scFv(neu) 融合蛋白或 PBS, 定期用游标卡尺测量肿瘤的两个垂直直径, 按  $0.5 \times [\text{长 (cm)} \times \text{宽 (cm)} \times \text{宽 (cm)}]$  计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线。

[0091] 除了本发明公开的通过基因工程方法把 IL-21 与抗肿瘤组织细胞的单链抗体或抗体构建成融合蛋白的方法, 本领域普通技术人员还可以容易地想到将 IL-21 靶向肿瘤组织从而作用于肿瘤浸润巨噬细胞的其他方法, 所述方法包括但不限于: 把 IL-21 重组到肿瘤病毒载体; 通过转染建立表达 IL-21 的肿瘤特异性 T 细胞; 通过纳米技术制备 IL-21 纳米颗粒。

[0092] 参考文献:

[0093] 1. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, et al. (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13:1050-1059.

[0094] 2. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, et al. (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13:54-61.

[0095] 3. Ma Y, Kepp O, Ghiringhelli F, Apetoh L, Aymeric L, et al. (2010) Chemotherapy and radiotherapy: cryptic anticancer vaccines. *Semin Immunol* 22:113-124.

[0096] 4. Hudis CA (2007) Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357:39-51.

[0097] 5. Spector NL, Blackwell KL (2009) Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 27:5838-5847.

[0098] 6. Park S, Jiang Z, Mortenson ED, Deng L, Radkevich-Brown O, et al. (2010) The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell* 18:160-170.

[0099] 7. Dougan M, Dranoff G (2009) Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 27:83-117

[0100] 8. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM (2007) Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25:267-296.

[0101] 9. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, et al. (2010) Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 362:875-885.

[0102] 10. Denardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, et al. (2011)

Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally Regulates Response to Chemotherapy. *Cancer Discov* 1:54-67.

[0103] 11. Qian BZ, Pollard JW(2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141:39-51.

[0104] 12. De Palma M, Mazzieri R, Politi LS, Pucci F, Zonari E, et al. (2008) Tumor-targeted interferon-alpha delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Cell* 14:299-311.

[0105] 13. Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, Saboury B, Teitelbaum UR, et al. (2011) CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* 331:1612-1616.

[0106] 14. Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, et al. (2011) HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell* 19:31-44.

[0107] 15. Spolski R, Leonard WJ(2008) Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 26:57-79.

[0108] 16. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, et al. (2000) Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408:57-63.

[0109] 17. Steele N, Anthony A, Saunders M, Esmarck B, Ehrnrooth E, et al. (2012) A phase 1 trial of recombinant human IL-21 in combination with cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 106:793-798.

[0110] 18. Rovero S, Amici A, Di Carlo E, Bei R, Nanni P, et al. (2000) DNA vaccination against rat her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. *J Immunol* 165:5133-5142.

[0111] 19. Zhang H, Wang Q, Montone KT, Peavey JE, Drebin JA, et al. (1999) Shared antigenic epitopes and pathobiological functions of anti-p185(her2/neu) monoclonal antibodies. *Exp Mol Pathol* 67:15-25.

[0112] 20. Drebin JA, Link VC, Greene MI(1988) Monoclonal antibodies specific for the neu oncogene product directly mediate anti-tumor effects in vivo. *Oncogene* 2:387-394.

[0113] 21. Wang S, Zhu G, Chapoval AI, Dong H, Tamada K, et al. (2000) Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* 96:2808-2813

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 中国科学院生物物理研究所

&lt;120&gt; 用于肿瘤治疗的白细胞介素 21 (IL-21) 药物

&lt;130&gt; IB121899

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 145

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

```

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

```

[0002]

<210> 2  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <400> 2  
 Asp Ile Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Lys Asn Leu His  
                   20                   25                   30  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Phe  
                   35                   40                   45  
 Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
                   50                   55                   60  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr Glu Asp  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Asn Trp Pro Leu Thr Phe  
                   85                   90                   95  
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
                   100                   105                   110  
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu Glu Val Gln Leu  
                   115                   120                   125  
 Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu  
                   130                   135                   140  
 Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Asp Tyr Tyr Trp Asn  
 145                   150                   155                   160  
 Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile  
                   165                   170                   175  
 Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile  
                   180                   185                   190  
 Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Asn Leu Asn  
                   195                   200                   205  
 Ser Met Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Glu  
                   210                   215                   220

[0003]





	115	120	125	
Pro	Lys	Gly	Ser	Val
	Arg	Ala	Pro	Gln
	Val	Tyr	Val	Leu
	Pro	Pro	Pro	
130		135		140
Glu	Glu	Glu	Met	Thr
	Lys	Lys	Gln	Ala
	Thr	Leu	Thr	Cys
	Met	Val	Thr	
145		150		155
Asp	Phe	Met	Pro	Glu
	Asp	Ile	Tyr	Val
	Glu	Trp	Thr	Asn
	Asn	Gly	Lys	
	165		170	
Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr
	Lys	Asn	Thr	Glu
	Pro	Val	Leu	Asp
	Ser	Asp	Gly	
	180		185	
Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr
	Ser	Lys	Leu	Arg
	Val	Glu	Lys	Lys
	Asn	Trp	Val	
	195		200	
Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr
	Ser	Cys	Ser	Val
	Val	His	Glu	Gly
	Leu	His	Asn	
	210		215	
His	His	Thr	Thr	Lys
	Ser	Phe	Ser	Arg
	Thr	Pro	Gly	Lys
	225		230	
			235	

<210> 5

<211> 441

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

atggagagga	cccttgtctg	tctggtagtc	atcttcttgg	ggacagtggc	ccataaatca	60
agcccccaag	ggccagatcg	cctcctgatt	agacttcgtc	accttattga	cattgttgaa	120
cagetgaaaa	tctatgaaaa	tgaactggat	cctgaacttc	tatcagetec	acaagatgta	180
aaggggeact	gtgagcatgc	agcttttggc	tgttttcaga	aggecaaaact	caagccatca	240
aaccttggaa	acaataagac	attcattcatt	gaactcgtgg	cccagctcag	gaggaggetg	300
cctgccagga	ggggaggaaa	gaaacagaag	cacatagcta	aatgcccttc	ctgtgatteg	360
tatgagaaaa	ggacacccaa	agaattccta	gaaagactaa	aatggctcct	tcaaaagatg	420
attcattcagc	atctctccta	g				441

<210> 6

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

[0005]

<400> 6  
gataacacge agtctccage caccctgtct gtgactccag gagatagcgt cagtctttcc 60  
tgcagggccca gccaaagtat tagcaagaac ttacaactggt atcaacaaaa atcaaatgag 120  
tctccaagge ttctcatcaa gtttgcttcc cagtcacatct ctgggatecc ctcaggttc 180  
agtggcagtg gatecaggac agatttact ctcagtatca acagtgtgga gactgaagat 240  
tttgaatgt atttctgca acagagtaac aactggccgc tcacgttggg tgctgggacc 300  
aagctggage tgaatctctc tgggtggcgt ggctcggcg gtggtggggg tggttctct 360  
agatcttccc tcgaggtgca gctgaagcag tcaggacctg gcctcgtgaa acctctcag 420  
tctctgtctc tcacctgctc tgteactgge tactcttca ccagtgatta ctactggaac 480  
tggatccggc agtttccagg aaacagactg gaatggatgg gctacataag ctacgatggt 540  
aceaattact acaacceate tctcaaaaat cgaatctca tcaactcgtga cacatetaag 600  
aaccagtttt tectgaactt gaattctatg actactgagg acacagceac ttattactgt 660  
gcaagagaag agaattggga ctggtacttc gatgtctggg gcgcaggac cacggtcacc 720  
gtctctcag ccaaaacaac acccccatct gtctag 756

<210> 7

<211> 647

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

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

[0006]

	100		105		110										
Ala	Lys	Cys	Pro	Ser	Cys	Asp	Ser	Tyr	Glu	Lys	Arg	Thr	Pro	Lys	Glu
	115		120		125										
Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Met	Ile	His	Gln	His
	130		135		140										
Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp
145			150		155										160
Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	Asp	Ser	Val
			165		170										175
Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Lys	Asn	Leu	His	Trp
	180		185		190										
Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	His	Glu	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Phe	Ala
	195		200		205										
Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
	210		215		220										
Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Thr	Glu	Asp	Phe
225			230		235										240
Gly	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Asn	Trp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly
			245		250										255
Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	260		265		270										
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu	Val	Gln	Leu	Lys
	275		280		285										
Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr
	290		295		300										
Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp
305			310		315										320
Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Arg	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Tyr	Ile	Ser
			325		330										335
Tyr	Asp	Gly	Thr	Asn	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Asn	Arg	Ile	Ser
	340		345		350										
Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	Asn	Leu	Asn	Ser
	355		360		365										
Met	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Glu	Asn
	370		375		380										

[0007]

Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val  
 385 390 395 400  
 Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Met Ala Ser Met Glu Pro  
 405 410 415  
 Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Ser Pro Pro Ser Lys Ser Pro Ala Pro  
 420 425 430  
 Asn Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys  
 435 440 445  
 Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val  
 450 455 460  
 Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn  
 465 470 475 480  
 Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr  
 485 490 495  
 Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp  
 500 505 510  
 Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu  
 515 520 525  
 Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg  
 530 535 540  
 Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys  
 545 550 555 560  
 Lys Gln Ala Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp  
 565 570 575  
 Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys  
 580 585 590  
 Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser  
 595 600 605  
 Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser  
 610 615 620  
 Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser  
 625 630 635 640  
 Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 645

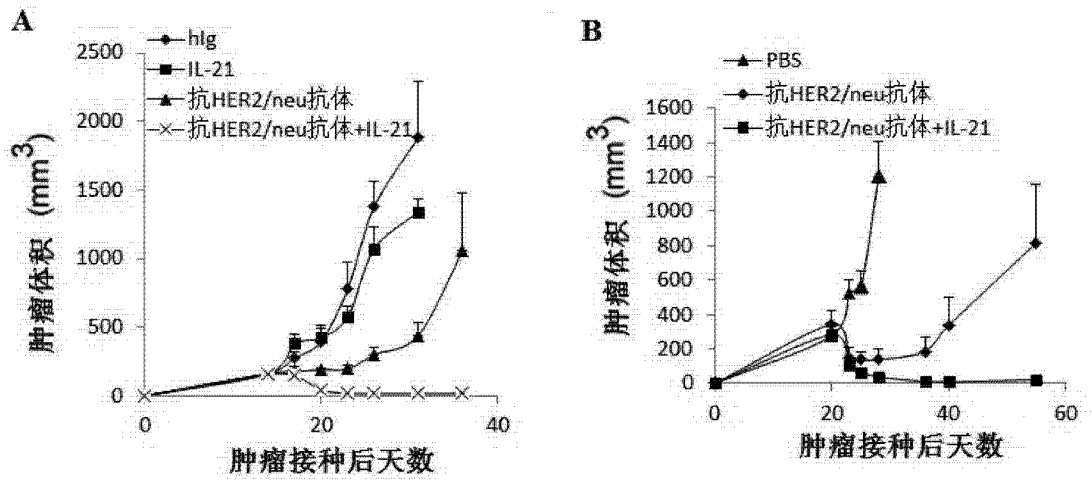


图 1

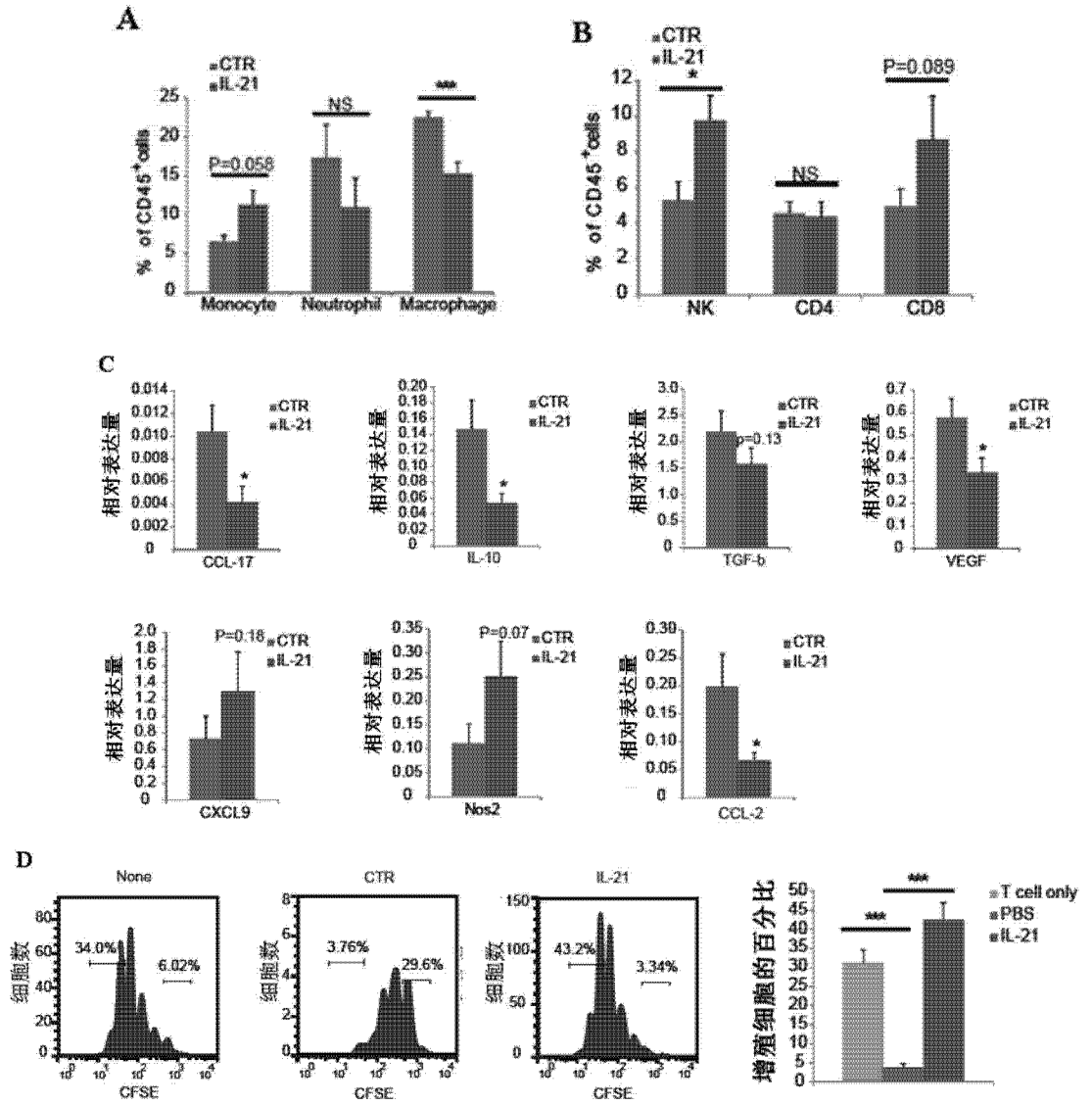


图 2

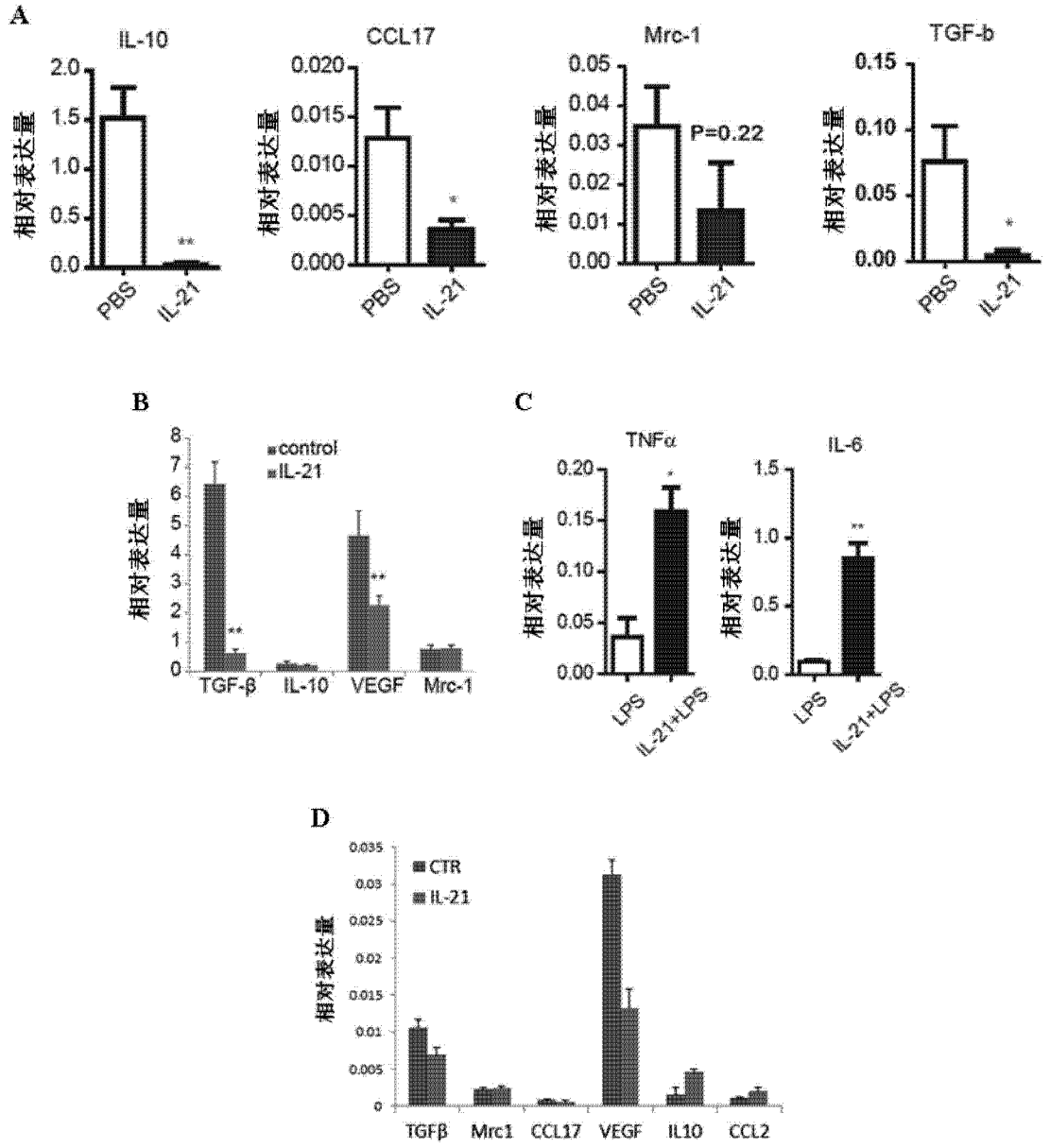


图 3



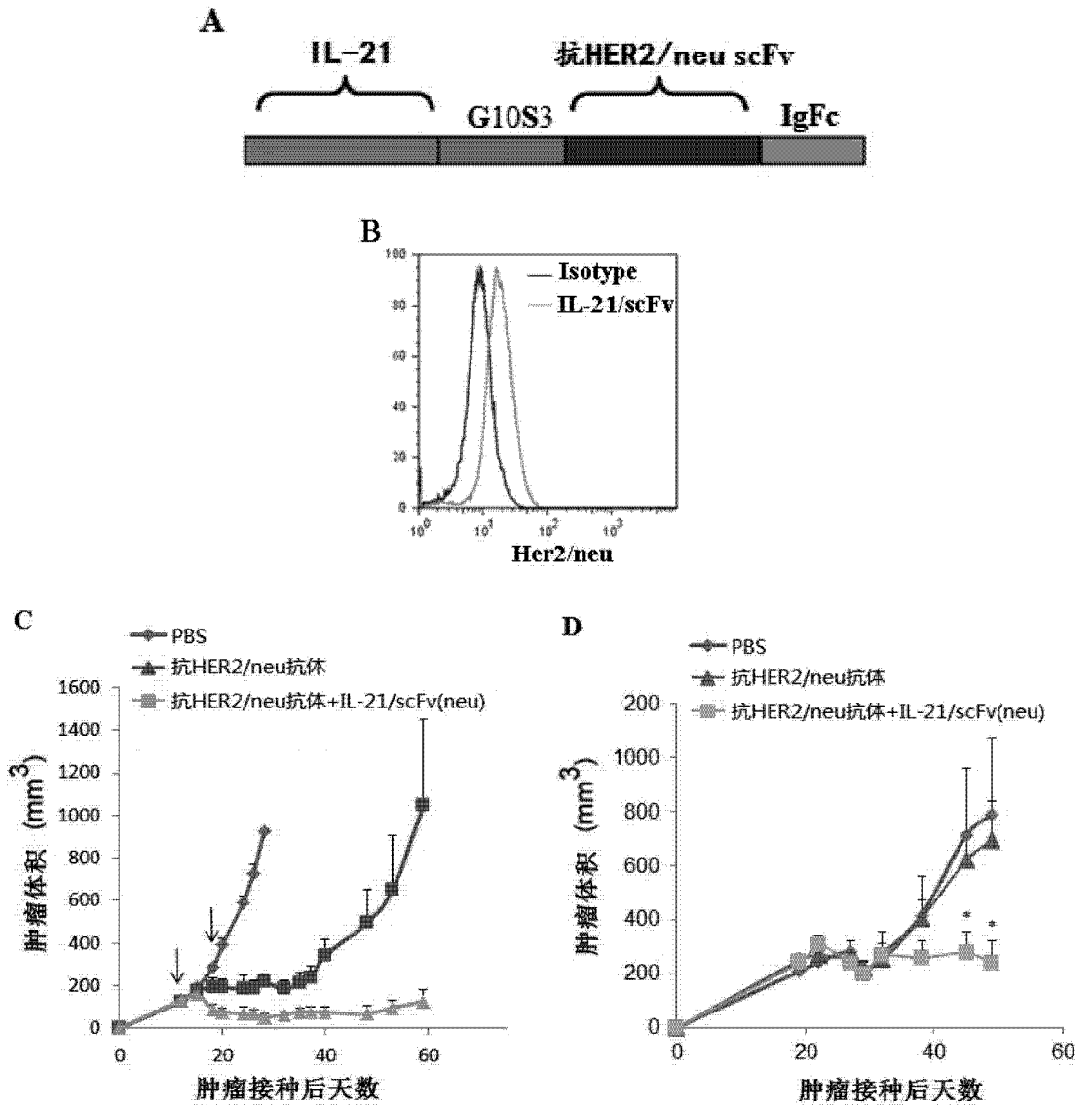


图 4