



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110894241 A

(43)申请公布日 2020.03.20

(21)申请号 201811069211.5

(22)申请日 2018.09.13

(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
申请人 北京品泽生物科技有限公司

(72)发明人 王盛典 李颖 丛艳妮

(74)专利代理机构 北京市振邦律师事务所
11389

代理人 李朝辉

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页
序列表9页 附图17页

(54)发明名称

一种靶向抗原特异性T细胞诱导其向记忆干性细胞分化的融合蛋白

(57)摘要

本发明涉及一种抗PD-1抗体与IL-21融合蛋白,所述融合蛋白既能阻断PD-L1与T细胞表面PD-1的结合,发挥抗PD-1抗体的肿瘤治疗作用,又能将IL-21靶向肿瘤特异性T细胞,诱导T细胞的分化,调控T细胞功能,本发明所述融合蛋白具有显著增加抗PD-1抗体的肿瘤治疗效应的功能,具有广阔的医用治疗前景。

B.



C.



1. 一种融合蛋白,包含通过连接子相连接的细胞因子和T细胞表面受体分子结合拮抗剂或激动剂,其中,

所述细胞因子是选自IL-21、IL-2、IL-15、IL-7或IL-12中的一种;

所述T细胞表面受体分子结合拮抗剂或激动剂选自PD-1结合拮抗剂,LAG-3结合拮抗剂, Tim-3结合拮抗剂或CD137 (4-1BB) 结合激动剂中的一种;

优选的,所述融合蛋白能够诱导激活T细胞,同时将细胞因子靶向T细胞,诱导T细胞分化,增强T细胞功能。

2. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,

所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1对PD-L1的结合;和/或

所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1对PD-L1和PD-L2二者的结合;

优选的,所述PD-1结合拮抗剂是抗体;

更优选的,所述PD-1结合拮抗剂是单链抗体;

进一步优选的,所述PD-1结合拮抗剂为二聚体单链抗体。

3. 如权利要求1或2所述的融合蛋白,其特征在于,所述结构域从氨基末端到羧基末端包含如下结构:

-X-Linker1-Y-

其中:

X是PD-1结合拮抗剂,Y是细胞因子,Linker1是连接子;

优选的,所述PD-1结合拮抗剂是抗体,细胞因子是IL-21;

更优选的,所述PD-1结合拮抗剂从氨基末端到羧基末端包含如下结构:

V_H-Linker2-V_L

其中,V_H为PD-1单链抗体重链的可变区,V_L为抗体轻链的可变区,Linker2为连接子;

进一步优选的,所述融合蛋白在3' 端还可以包括标签序列。

4. 如上述权利要求任一项所述的融合蛋白,其特征在于,

所述PD-1结合拮抗剂,核苷酸序列如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:17所示;和/或

所述细胞因子为IL-21,核苷酸序列如SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19所示;

优选的,所述融合蛋白阻断PD-L1与T细胞表面PD-1的结合,并将IL-21靶向肿瘤特异性T细胞,诱导T细胞的分化。

5. 如上述权利要求任一项所述的融合蛋白,其特征在于编码所述融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:20所示;

进一步优选的,所述融合蛋白在3' 端还可以包括标签序列,所述含有标签序列的编码融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:21所示;

优选的,所述融合蛋白主要是同源二聚体形式。

6. 一种多核苷酸,其编码如权利要求1-5中任一项所述的融合蛋白。

7. 一种表达载体,其包含与表达控制序列操作性连接的如权利要求6所述的多核苷酸。

8. 一种宿主细胞,其包含权利要求7所述的表达载体。

9. 如权利要求1-5任一项所述的融合蛋白的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

a) 通过基因工程手段方法,将细胞因子编码基因链接到PD-1结合拮抗剂编码基因的C末端,成为融合蛋白的编码基因;

- b) 构建表达载体；
- c) 转染细胞,进行蛋白表达和纯化；
- d) 获得所述融合蛋白。

10. 一种药物组合物,其包含权利要求1-5中任一项所述的一种或多种融合蛋白,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂；

和/或,所述药物组合物还包括其他抗癌药物或肿瘤疫苗,所述融合蛋白可以和其他抗癌药物或肿瘤疫苗联合使用；

优选的,所述其他抗癌药物为Her2抗体；

更优选的,所述其他抗癌药物为赫赛汀。

11. 一种用于制备预防或治疗癌症药物或试剂盒的应用,其包括施用对该个体有效量的权利要求1-5任一项所述的融合蛋白；

优选的,所述癌选自肾细胞癌,膀胱癌,非小细胞肺癌,头颈鳞状细胞癌,鳞状非小细胞肺癌,非鳞状非小细胞肺癌,肠癌,霍奇金淋巴瘤,结直肠癌,黑色素瘤,卵巢癌,乳腺癌,激素受体阳性乳腺癌,Her2阳性乳腺癌,和三重阴性乳腺癌组成的组；

更优选的,连续或间歇施用权利要求1-5任一项所述的融合蛋白；

进一步优选的,通过静脉内,肌肉内,皮下,表面,口服,经皮,腹膜内,眶内,通过植入,通过吸入,鞘内,室内,或鼻内施用该融合蛋白。

12. 一种用于在个体中预防或治疗癌症的方法,其包括施用对该个体有效量的权利要求1-5任一项所述的融合蛋白；

优选的,所述癌选自肾细胞癌,膀胱癌,非小细胞肺癌,头颈鳞状细胞癌,鳞状非小细胞肺癌,非鳞状非小细胞肺癌,肠癌,霍奇金淋巴瘤、结直肠癌,黑色素瘤,卵巢癌,乳腺癌,激素受体阳性乳腺癌,Her2阳性乳腺癌,和三重阴性乳腺癌组成的组；

更优选的,连续或间歇施用权利要求1-5任一项所述的融合蛋白；

进一步优选的,通过静脉内,肌肉内,皮下,表面,口服,经皮,腹膜内,眶内,通过植入,通过吸入,鞘内,室内,或鼻内施用该融合蛋白。

一种靶向抗原特异性T细胞诱导其向记忆干性细胞分化的融合蛋白

技术领域

[0001] 本发明一般涉及生物工程领域,尤其涉及一种靶向抗原特异性T细胞诱导其分化,增强其效应功能的融合蛋白。

背景技术

[0002] 免疫系统的作用在于实现机体对于致病体的有效应答。T细胞在其中起到了关键的作用,正常细胞发生恶变成为癌细胞,能被机体免疫系统识别将其杀伤清除。机体内能杀伤和消除生长肿瘤的免疫细胞主要是T淋巴细胞。T淋巴细胞识别肿瘤抗原后,被激活,进行大量扩增,并分化为效应性T细胞,到达肿瘤部位攻击肿瘤细胞。但是,肿瘤细胞在长期发生进化过程中,产生多种机制来防止免疫细胞的攻击,例如肿瘤细胞高表达免疫抑制分子PD-L1,通过与T淋巴细胞表面的免疫抑制受体PD-1结合,就可以抑制T淋巴细胞对它的杀伤。

[0003] PD-1(也称为程序化细胞死亡-1)是CD28家族的一个成员,表达于活化的T细胞表面,其功能在于通过与配体PD-L1结合,抑制T细胞反应,防止T细胞过度反应造成组织损伤,是正常T细胞反应的一种负调控机制。肿瘤细胞通过高表达PD-L1,与T细胞表面的PD-1结合,抑制抗肿瘤T细胞对其杀伤,是肿瘤免疫逃逸的一种重要机制。科学家发明了一种抗PD-1抗体,可以阻断肿瘤细胞表面的PD-L1与T淋巴细胞表面的PD-1受体结合,解除肿瘤细胞对T淋巴细胞的抑制,功能恢复的T淋巴细胞就可以把肿瘤细胞杀死,清除体内肿瘤,这就是目前国际上广受关注的肿瘤治疗药——抗PD-1抗体。目前世界各国多家机构都在投入PD-1的研发当中,仅在美国每年就有数百个临床试验的项目在进行当中。而在全球范围内已有1600多个临床试验正在进行。截至目前由国际知名制药厂商所研发的PD-1/PD-L1药物已有5款已被美国FDA批准上市,包括:PD-1抑制剂Nivolumab (Opdivo)、Pembrolizumab (Keytruda);PD-L1抑制剂Atezolizumab (Tecentriq)、Durvalumab (Imfinzi)和Avelumab (Bavencio);用于黑色素瘤、头颈鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、霍奇金淋巴瘤、肾癌、膀胱癌等癌症的治疗。国内有包括信达、恒瑞、百济神州、君实等至少100多家生物公司,也在进行PD-1阻断药物的研发和肿瘤治疗临床实验。尽管抗PD-1抗体药的肿瘤治疗取得巨大成功,但是对大多数晚期肿瘤的治疗有效率也只有20%左右,因此,如何提高抗PD-1抗体肿瘤治疗效果是肿瘤药物研发的一个重要方向。

[0004] 一个淋巴细胞只能识别一种抗原表位,机体内有成千上万种T淋巴细胞,只有肿瘤特异性T淋巴细胞才能识别和杀伤特定的肿瘤细胞。T淋巴细胞分为CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞。体内识别和杀伤肿瘤细胞的主要是CD8⁺T细胞,CD4⁺T细胞的功能主要是辅助CD8⁺T细胞反应。静息的T淋巴细胞是没有活性的,只有在抗原刺激下发生活化、增殖、分化成不同功能状态的T细胞,才能发挥不同的生物学功能。CD8⁺T细胞根据分化状态可以分为原始T细胞(naive T cells)、记忆干性T细胞(memory stem T cells)、记忆性T细胞(memory T cells)和效应T细胞(effector T cells)。效应CD8⁺T细胞是终末分化细胞,具有最强杀伤活性,但是体内存活时间短,因此,体内抗肿瘤作用最弱。记忆性CD8⁺T细胞体内存活时间长,受到抗原

刺激可以分化为效应性T细胞发挥作用,因而体内抗肿瘤作用显著增强。记忆干性CD8⁺T细胞具有自我复制更新能力,可以在体内长期存活,受到抗原刺激可以分化为记忆性和效应性T细胞,体内抗肿瘤作用最强。T细胞的活化、增殖和分化这是一个复杂而精准调控的反应过程,其中,各种细胞因子在这一过程中发挥重要作用。

[0005] 细胞因子(cytokine)是免疫原、丝裂原或其他刺激剂诱导多种细胞产生的低分子量可溶性蛋白质,具有调节免疫、血细胞生成、细胞生长以及损伤组织修复等多种功能。其中,白细胞介素在激活与调节免疫细胞,介导T、B细胞活化、增殖与分化及在炎症反应中起重要作用。由于最初是由白细胞产生又在白细胞间发挥作用,所以由此得名。白细胞介素体内的作用方式,主要是以细胞的自分泌和旁分泌在局部发挥重要调控作用和生物学效应,全身应用会导致严重的炎症反应等副作用。白细胞介素21(interleukin 21,简称IL-21)是一种主要有CD4⁺T细胞产生,作用于CD8⁺T细胞、B淋巴细胞、NK细胞、单核巨噬细胞等多种细胞的细胞因子。IL-21可以诱导活化的CD8⁺T淋巴细胞分化成年轻、富有活力的细胞群体,即类似于记忆干性CD8⁺T淋巴细胞。由于IL-21还可以作用其它多种免疫细胞和组织细胞,全身应用临床试验抗肿瘤效果不明显,而且长期应用会导致炎症等副作用。因此,IL-21用于肿瘤治疗的关键是如何将其靶向作用于肿瘤特异性T细胞。

[0006] PD-1表达于活化T细胞表面,被认为是抗原活化T细胞的标志。最新研究显示:肿瘤患者体内肿瘤特异性CD8⁺T细胞均表达PD-1,体外通过PD-1⁺细胞分选,可以富集肿瘤患者肿瘤组织或外周血中肿瘤特异性T细胞,用于T细胞过继治疗。基于以上研究发现,本发明提供了一种融合蛋白和利用该融合蛋白治疗癌症的方法。利用抗PD-1抗体可以靶向结合肿瘤特异性T淋巴细胞,在发挥其自身抗肿瘤作用的同时,将IL-21靶向肿瘤特异性T淋巴细胞,体内诱导肿瘤特异性T细胞向记忆(干性)T细胞分化,增加抗PD-1抗体的肿瘤治疗效果。本发明提供的融合蛋白超过单独使用单克隆抗体或细胞因子的效果,同时可以诱导CD8⁺T细胞向记忆干性T细胞分化,此外,发明人惊奇的发现,在癌症的治疗效果上,使用本发明所制备的融合蛋白明显优于PD-1抑制剂与IL-21的联合用药。

发明内容

[0007] 发明概述

[0008] 本发明的目的是克服现有技术的这些缺点。具体地,本发明的目的是提供一种将IL-21靶向肿瘤特异性T淋巴细胞,并具有抗PD-1抗体的肿瘤治疗效果的融合蛋白及其相关的应用。

[0009] 抗PD-1抗体是目前国际上最受瞩目的抗肿瘤药,众多药物公司在竞相研发。抗PD-1抗体的肿瘤治疗机制是通过阻断肿瘤细胞表面的免疫抑制分子PD-L1与T淋巴细胞表面的免疫抑制受体PD-1结合,解除肿瘤细胞对T淋巴细胞的抑制,恢复肿瘤特异性T淋巴细胞的功能,杀死肿瘤细胞,清除体内肿瘤。患者体内活化的肿瘤特异性T淋巴细胞处于不同的分化阶段,如:终末分化效应性T细胞效应记忆性T细胞(effect memory T cells)、中枢记忆性T细胞(central memory T cells)和记忆干性T细胞。其中,记忆干性T细胞具有自我更新和繁殖的功能,同时又能分化成不同的下游各种效应性T细胞,因而在体内具有最强抗肿瘤作用。本发明发现,IL-21可以诱导活化的CD8⁺T淋巴细胞分化为记忆干性T淋巴细胞。

[0010] 本发明的研发动机,是将抗PD-1抗体与IL-21链接融合在一起,成为一个新的融合

蛋白,在发挥其阻断肿瘤细胞表面的PD-L1与T淋巴细胞表面PD-1结合,恢复T淋巴细胞功能的同时,将IL-21靶向T淋巴细胞,增强T淋巴细胞抗肿瘤的功能。

[0011] 以上只是概括了本发明的一些方面,不是也不应该认为是在任何方面限制本发明。

[0012] 本说明书提到的所有专利和出版物都是通过参考文献作为整体而引入本发明的。

[0013] 发明的详细说明

[0014] 除非另外指明或定义,所用的所有术语具有本领域常用的意思,这是技术人员所清楚的。例如,参考标准手册,如Sambrook等,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual (分子克隆:实验室手册)”(第2版),卷1-3,Green Publishing and Wiley Interscience,纽约(1987);Lewin,“Genes II(基因II)”,John Wiley&Sons,纽约,N.Y.,(1985);Old等.,“Principles of Gene Manipulation:An Introduction to Genetic Engineering(基因操作原理:基因工程入门)”,第2版,University of California Press(加利福尼亚大学出版社),Berkeley,CA(1981);Roitt等.,“Immunology(免疫学)”(第6版),Mosby/Elsevier,Edinburgh(2001);Roitt等.,Roitt's Essential Immunology(Roitt's基础免疫学),第10版.Blackwell Publishing,英国(2001);和Janeway等.,“Immunobiology(免疫学)”(第6版),Garland Science Publishing/Churchill Livingstone,纽约(2005),以及其中所引用的公知背景技术;

[0015] 此处所用的术语“氨基末端”和“羧基末端”是指多肽内的位置。在上下文允许的情况下,针对多肽的特定序列或部分,这些术语用于表示临近或相对位置。例如,位于多肽内参照序列的羧基末端的某一序列位于靠近该参照序列的羧基端,但不一定位于完整多肽的羧基端。

[0016] 此处所用的术语“癌症”或“癌细胞”是指在生物中发现的、具有使其和正常组织或组织细胞区分开的特征的组织或细胞。在这些特征中包括但不限于:退行性变化的程度、形状上的不规则、细胞轮廓的不可分辨性、细胞核大小、细胞核或细胞质的结构上的改变、其他表型改变、预示癌症或前癌状态的细胞蛋白的存在、增加的有丝分裂次数和转移的能力。和“癌症”有关的术语包括癌、肉瘤、肿瘤、上皮癌、白血病、淋巴瘤、息肉,以及硬癌、转化等。

[0017] 此处所用的术语“组合治疗”是指给受治疗者施用至少一种治疗有效剂量的融合蛋白组分(包括但不限于“抗PD-1抗体与IL-21融合蛋白(PD-1Ab21)”)。所述融合蛋白可以是具有“将IL-21靶向肿瘤特异性T淋巴细胞,增加抗PD-1抗体的肿瘤治疗效果”的生物学活性的成熟的多肽、其片段、融合物或缀合物。

[0018] “记忆干性CD8⁺T细胞”是指活化的CD8⁺T细胞处于分化的早期阶段,具有自我复制更新能力,可以在体内长期存活,受到抗原刺激可以分化为记忆性和效应性T细胞。其细胞表型类似于原始(naïve)CD8⁺T细胞,在小鼠表现为CD44^{low}CD62L^{high},在人表现为CD45RA⁺CCR7⁺CD45RO⁻,同时,又表达IL-2R、Bcl-2、Scal-1或CD95。

[0019] “序列”在用于本文时(例如,在术语如“免疫球蛋白序列”,“抗体序列”,“结构域序列”或“蛋白序列”中)通常应该理解为包括相关的免疫球蛋白序列以及编码其的核酸序列或核苷酸序列二者,除非上下文需要更局限性的解释。

[0020] “核酸分子”的引用可以涉及用于基因疫苗接种的核酸,或编码本发明的免疫球蛋白序列的核酸,或二者,这将通过具体的上下文变得清楚。

[0021] 本发明涉及可以结合本文定义的抗原和/或具有针对本文定义的抗原的亲亲和性的免疫球蛋白序列。在本发明的情形中，“结合某种抗原和/或具有针对某种抗原的亲亲和性”具有本领域中常用的意思，例如，如在抗体及其各自的抗原的情形中所理解的意思。

[0022] 在本发明的具体实施方案中，术语“结合”意指所述免疫球蛋白序列特异性与抗原相互作用。

[0023] 本发明的核酸可以以本身已知的方法制备或获得，其基于关于本发明的细胞相关抗原或免疫球蛋白序列的信息，和/或可以从适当的天然来源分离。

[0024] 本发明的核酸还可以是这样的形式，存在于和/或是遗传构建体的一部分，这对于本领域的技术人员应该是清楚的。这样的遗传构建体通常包括至少一种本发明的核酸，其任选地与本身已知的一个或多个遗传构建体元件连接，诸如例如一个或多个适宜的调节元件（诸如适当的启动子、增强子、终止子、等等）和本文提到的其它构建体元件。

[0025] 关于可以存在于/用于本发明的遗传构建体的启动子、选择标记、前导序列、表达标记和其它元件的一些（其它）非限制性的实例——诸如终止子、转录和/或翻译增强子和/或整合因子——参考通用手册，诸如Sambrook等和Ausubel等。

[0026] 通常，本发明的遗传构建体通过将本发明的核苷酸序列插入到本身已知的适当的（表达）载体中而获得。适当的表达载体的一些优选的但非限制性的实例是下述实施例中所用的那些，以及本文提及的那些。

[0027] 本发明的核酸和/或本发明的遗传构建体可以用于转化宿主细胞或宿主生物体，即，用于表达和/或生产本发明的融合蛋白。适当的宿主或宿主细胞是专业技术人员所清楚的，并且例如可以是任何适当的真菌的、原核的或真核的细胞或细胞系，或者任何适当的真菌的、原核的或真核的生物体。

[0028] 特别地，本发明在一些具体的方面中提供下述：

[0029] 本发明涉及一种融合蛋白，包含通过连接子相连接的细胞因子和T细胞表面受体分子结合拮抗剂或激动剂，其中，所述细胞因子是选自IL-21、IL-2、IL-15、IL-7或IL-12中的一种；所述T细胞表面受体分子结合拮抗剂或激动剂选自PD-1结合拮抗剂，LAG-3结合拮抗剂，Tim-3结合拮抗剂或CD137（4-1BB）结合激动剂中的一种，优选的，所述融合蛋白能够诱导激活T细胞，同时将细胞因子靶向T细胞，诱导T细胞分化，增强T细胞功能。

[0030] 在一个具体的实施例中，PD-1结合拮抗剂抑制PD-1对PD-L1的结合；和/或所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1对PD-L1和PD-L2二者的结合；优选的，所述PD-1结合拮抗剂是抗体；更优选的，所述PD-1结合拮抗剂是单链抗体；进一步优选的，所述PD-1结合拮抗剂为二聚体单链抗体。

[0031] 在本发明的另一个技术方案中，公开了一种融合蛋白，其结构域从氨基末端到羧基末端包含如下结构：-X-Linker1-Y-其中，X是PD-1结合拮抗剂，Y是细胞因子，Linker1是连接子；优选的，所述PD-1结合拮抗剂是抗体，细胞因子是IL-21；更优选的，所述PD-1结合拮抗剂从氨基末端到羧基末端包含如下结构：V_H-Linker2-V_L其中，V_H为PD-1单链抗体重链的可变区，V_L为抗体轻链的可变区，Linker2为连接子；进一步优选的，所述融合蛋白在3'端还可以包括标签序列。

[0032] 本发明还公开了一种融合蛋白，其中，PD-1结合拮抗剂，其核苷酸序列如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:17所示；和/或所述细胞因子为IL-21，其核苷酸序列如SEQ ID NO:7或

SEQ ID NO:19所示;优选的,所述融合蛋白阻断PD-L1与T细胞表面PD-1的结合,并将IL-21靶向肿瘤特异性T细胞,诱导T细胞的分化。

[0033] 在本发明的一个具体实施例中,涉及一种融合蛋白,所述编码融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:20所示;进一步优选的,所述融合蛋白在3'端还可以包括标签序列,所述含有标签序列的融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:21所示;优选的,所述融合蛋白主要是同源二聚体形式。

[0034] 此外,本发明还涉及一种多核苷酸,其编码本发明所述的融合蛋白。以及一种表达载体,其包含与表达控制序列操作性连接的上多核苷酸。同时,本发明还公开了一种宿主细胞,其包含本发明涉及的表达载体。

[0035] 在本发明的一个具体实施例中,公开了一种融合蛋白的制备方法,包括如下步骤:a)通过基因工程手段方法,将细胞因子编码基因链接到PD-1结合拮抗剂编码基因的C末端,成为融合蛋白的编码基因;b)构建表达载体;c)转染细胞,进行蛋白表达和纯化;d)获得所述融合蛋白。

[0036] 此外,本发明还公开了一种药物组合物,其包含一种或多种融合蛋白,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂;和/或,所述药物组合物还包括其他抗癌药物或肿瘤疫苗,所述融合蛋白可以和其他抗癌药物或肿瘤疫苗联合使用;优选的,所述其他抗癌药物为Her2抗体;更优选的,所述其他抗癌药物为赫赛汀;

[0037] 另外,本发明还涉及一种用于制备预防或治疗癌症药物或试剂盒的应用,其包括施用对该个体有效量的融合蛋白;优选的,所述癌选自肾细胞癌,膀胱癌,非小细胞肺癌,头颈鳞状细胞癌,鳞状非小细胞肺癌,非鳞状非小细胞肺癌,肠癌,霍奇金淋巴瘤,结直肠癌,黑色素瘤,卵巢癌,乳腺癌,激素受体阳性乳腺癌,Her2阳性乳腺癌,和三重阴性乳腺癌组成的组;更优选的,连续或间歇施用本发明涉及的融合蛋白;进一步优选的,通过静脉内,肌肉内,皮下,表面,口服,经皮,腹膜内,眶内,通过植入,通过吸入,鞘内,室内,或鼻内施用该融合蛋白。

[0038] 在本发明的具体实施例中,还涉及一种用于在个体中预防或治疗癌症的方法,其包括施用对该个体有效量的融合蛋白;优选的,所述癌选自肾细胞癌,膀胱癌,非小细胞肺癌,头颈鳞状细胞癌,鳞状非小细胞肺癌,非鳞状非小细胞肺癌,肠癌,霍奇金淋巴瘤、结直肠癌,黑色素瘤,卵巢癌,乳腺癌,激素受体阳性乳腺癌,Her2阳性乳腺癌,和三重阴性乳腺癌组成的组;更优选的,连续或间歇施用融合蛋白;进一步优选的,通过静脉内,肌肉内,皮下,表面,口服,经皮,腹膜内,眶内,通过植入,通过吸入,鞘内,室内,或鼻内施用该融合蛋白。

附图说明

[0039] 图1.抗鼠PD-1单链抗体与小鼠IL-21融合蛋白(mPD-1Ab21)的构建示意图A.抗鼠PD-1单链抗体与小鼠IL-21融合蛋白(mPD-1Ab21)的DNA序列;B.抗鼠PD-1单链抗体与小鼠IL-21融合蛋白(mPD-1Ab21)的示意图,其中, V_H 和 V_L 分别为抗鼠PD-1单链抗体的重链和轻链的可变区, V_H 和 V_L 以及IL-21之间分别由两个不同长度的linker连接,3xFlag位于3'端;C.抗鼠PD-1单链抗体与小鼠IL-21形成的融合蛋白(mPD-1Ab21)的构象示意图。

[0040] 图2.小鼠mPD-1Ab21融合蛋白的表达纯化和鉴定A.SDS-PAGE蛋白胶对纯化的小鼠

PD-1单链抗体(mPD-1Ab)和小鼠抗PD-1单链抗体与IL-21融合蛋白(mPD-1Ab21)的纯度进行鉴定;B.将纯化的mPD-1Ab21融合蛋白过分子筛层析柱,结果显示:mPD-1Ab21融合蛋白主要以二聚体形式存在。

[0041] 图3. 抗人PD-1单克隆抗体鉴定A.通过杂交瘤技术筛选单克隆抗人PD-1抗体,得到高表达PD-1抗体的1G1单克隆;将培养1G1细胞的上清与表达PD-1的CHO细胞共孵育30min,流式检测1G1上清与CHO细胞上的PD-1结合的能力;B.将CHO细胞与PD-L1-IgFc共孵育30min,或者先加入1G1上清与CHO细胞孵育30min,然后再加入PD-L1-IgFc,流式检测1G1上清阻断PD-1与PD-L1-IgFc结合的能力。

[0042] 图4. 抗人PD-1抗体和人IL-21融合蛋白(PD-1Ab21)的构建示意图和功能鉴定A.抗人PD-1抗体和人IL-21融合蛋白(PD-1Ab21)的构建示意图。 V_H 为鼠源PD-1抗体重链的可变区, V_L 为鼠源PD-1抗体轻链的可变区,以及人源抗体的恒定区和Fc段。3'端为人IL-21;B.抗人PD-1抗体的 V_H 和 V_L 的序列;C.稳定表达PD-1的CHO细胞与PD-1Ab21蛋白于4℃共孵育30min,然后流式检测PD-1Ab21与PD-1结合的能力;D.将CHO细胞与PD-L1-IgFc共孵育30min(黑色实线),或者先将PD-1Ab21与CHO细胞孵育30min,然后再加入PD-L1-IgFc(虚线),流式检测1G1上清阻断PD-1与PD-L1-IgFc结合的能力。

[0043] 图5.mPD-1Ab21融合蛋白的体外结合和阻断实验A.流式技术检测mPD-1Ab21与PD-1结合以及mPD-1Ab21阻断PD-1与其配体PD-L1IgFc结合的能力,A左图:EG7细胞(PD-1⁺)与mPD-1Ab21蛋白于4℃条件下共孵育30min(黑色实线),或EG7细胞先与抗PD-1抗体于4℃孵育30min,再与mPD-1Ab21蛋白孵育30min(黑色虚线),不加mPD-1Ab21的为阴性对照(灰色阴影),APC-抗Flag流式抗体检测mPD-1Ab21与PD-1结合的能力,A右图:EG7细胞与mPD-L1-IgFc蛋白于4℃条件下共孵育30min(黑色实线),或者EG7细胞先与mPD-1Ab21蛋白孵育30min,再和mPD-L1-IgFc共孵育30min(黑色虚线)。不加mPD-1Ab21为阴性对照(灰色阴影),PE-抗hIg流式抗体检测mPD-1Ab21阻断PD-1与其配体mPD-L1IgFc结合的能力;B.取OT-1转基因小鼠(OVA抗原肽特异性T细胞受体转基因小鼠)淋巴结T细胞,体外用OVA肽(0.1ng/ml)刺激活化48小时,T细胞高表达PD-1分子。重复上述结合和阻断实验。

[0044] 图6.mPD-1Ab21融合蛋白的IL-21生物学功能鉴定Baf3细胞为pre-B细胞系。Baf3细胞铺于96孔板中,每孔10000个细胞。mIL-21和mPD-1Ab21蛋白按照不同的浓度梯度加入到相应的细胞中。细胞培养第三天,对Baf3细胞进行计数。细胞增殖率=(实验组细胞数/对照组细胞数-1) x 100%

[0045] 图7.mPD-1Ab21体外诱导CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化A.OT-1转基因小鼠T细胞,体外用OVA肽(0.02ng/ml)进行活化,活化34h后,加入等摩尔量的细胞因子或蛋白进行细胞分化,分化第三天,流式检测T细胞的分化表型;B.对图A中CD44和CD62L标记的四个象限的细胞亚群比例进行统计,CD44^{low}CD62L^{hi}为记忆干性T细胞表型。

[0046] 图8.mPDIL21诱导的CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞的增殖情况使用OT-1转基因小鼠的T细胞,体外用CFSE染料进行标记。加入0.02ng/ml的OVA多肽活化47h后,再加IL-2(10ng/ml)和mPD-1Ab21(25ng/ml)进行分化,分化第二天,流式检测:A.T细胞增殖;B.CD44、CD62L的表达以及分析CD44^{low}CD62L^{high},CD44^{high}CD62L^{high}和CD44^{high}CD62L^{low}三个细胞亚群的CFSE标记的细胞增殖水平。

[0047] 图9.mPD-1Ab21诱导的CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞是由活化的

CD44^{high}CD62L^{high}细胞分化而来A. OT-1小鼠的淋巴结T细胞,体外用CFSE标记后,再用OVA多肽进行活化。活化42h后,流式分选活化的T细胞,得到CD44^{high}CD62L^{high}的亚群细胞;B. 分选后得到的T细胞,分别加入IL-2和mPD-1Ab21进行体外分化,分化的第三天,流式检测CD44、CD62L的表达以及分析CD44^{low}CD62L^{high}, CD44^{high}CD62L^{high}和CD44^{high}CD62L^{low}三个细胞亚群细胞增殖。

[0048] 图10. mPD-1Ab21诱导的记忆干性T细胞受到抗原再刺激后细胞因子分泌水平小鼠原始OT-1T细胞和用mPD-1Ab21及IL-2分别分化三天的OT-1转基因小鼠T细胞,先用IL-7细胞因子静息两天后,加入事先扣板(抗CD3抗体0.5 μ g/ml)的细胞培养板中。抗CD3抗体刺激12小时后,加入BFA阻断4小时,然后流式检测细胞中IFN- γ 和IL-2的表达水平。

[0049] 图11. mPD-1Ab21诱导的干性记忆性细胞在体内的存活情况A. 取CD90.1+OT-1小鼠淋巴结T细胞,体外用0.02ng/ml浓度的OVA肽进行活化。活化40h后,加入IL-2(10ng/ml)和mPD-1Ab21(25ng/ml)进行分化。将分化三天的细胞,通过尾静脉注射到经过Co60照射(4Gy)过的C57小鼠体内。注射当天用完全佐剂混合OVA肽(50 μ g)进行皮下免疫,同时连续七天腹腔注射IL-2(5 μ g/次)。在不同的时间点,眼眶取血,流式检测外周血中CD90.1+T细胞占CD45+细胞的比例。B. 上述小鼠,T细胞尾静脉注射35天后,杀老鼠,取其脾脏,对其进行细胞计数,然后流式检测脾脏中CD90.1+T细胞的比例,计算脾脏中CD90.1+T细胞的绝对数。

[0050] 图12. mPD-1Ab21靶向PD-1⁺T细胞,促进记忆干性T细胞的分化A. 取OT-1小鼠淋巴结T细胞,体外用OVA肽(0.02ng/ml)进行活化。活化40h后,再加入不同浓度的mIL-21和mPD-1Ab21进行分化。分化第三天,流式检测CD8⁺T细胞的CD44和CD62L的表达。对CD44^{low}CD62L^{high}细胞亚群所占的比例进行统计。B. 分别制备野生型C57小鼠和PD-1敲除小鼠的T细胞,体外用抗CD3和CD28抗体进行活化。活化39小时后,再加入不同浓度的mIL-21和mPD-1Ab21对T细胞进行分化。分化第四天,流式检测T细胞的CD44和CD62L的表达,对CD44^{low}CD62L^{high}细胞亚群所占的比例进行统计。

[0051] 图13. mPD-1Ab21快速靶向外周血及肿瘤组织中活化的肿瘤特异性T细胞C57小鼠皮下接种1 $\times 10^6$ 黑色素瘤细胞B16-OVA,接种前一天尾静脉注射1 $\times 10^6$ 原始OT-1T细胞。接种后第六天,polyI:C(50 μ g)+OVA肽(50 μ g)皮下免疫小鼠;第九天给小鼠腹腔注射蛋白(抗体200 μ g,蛋白100 μ g);不同时间点取血和肿瘤,流式技术分析其中OT-1T细胞表面PD-1分子的表达。

[0052] 图14. mPD-1Ab21抑制结直肠癌肿瘤细胞CT26的生长Balb/c小鼠皮下接种2 $\times 10^6$ 肠癌细胞CT26,接种后第三天,腹腔注射抗体进行治疗。抗PD-1抗体组每周注射三次,每次200 μ g。mPD-1Ab+mIL-21组和mPD-1Ab21组每隔一天注射一次,共四次,每次各150 μ g。在不同的时间点对CT26肿瘤大小进行测量,肿瘤体积=(长 \times 宽 \times 宽)/2。

[0053] 图15. mPD-1Ab21和抗Her2/neu抗体的联合治疗显著抑制Her2⁺Tubo肿瘤的生长Balb/c小鼠皮下接种1 $\times 10^6$ 乳腺癌细胞Tubo。mPD-1Ab+mIL-21组和mPD-1Ab21组从第十五天开始腹腔注射,每隔一天注射一次,共四次,每次各150 μ g。抗Her2/neu抗体在第16天和第19天注射,每次200 μ g。在不同的时间点对Tubo肿瘤大小进行测量,肿瘤体积=(长 \times 宽 \times 宽)/2。

[0054] 图16. mPD-1Ab21和肿瘤疫苗联合治疗显著抑制黑色素瘤B16-OVA的生长C57小鼠皮下接种1 $\times 10^6$ 黑色素瘤细胞B16-OVA,接种前一天尾静脉注射2 $\times 10^6$ 原始OT-1T细胞。接种后

第六天, polyI:C (50 μ g) + OVA肽 (50 μ g) 皮下免疫小鼠。第九天开始腹腔注射蛋白治疗, anti-PD-1 每隔两天注射一次, 共三次, 每次 200 μ g。mPD-1Ab+mIL-21 和 mPD-1Ab 每隔一天注射一次, 共五次, 每次各 150 μ g。在不同的时间点测量 B16-OVA 肿瘤大小, 肿瘤体积 = (长 \times 宽 \times 宽) / 2。

[0055] 图 17. mPD-1Ab21 治疗显著增加记忆干性 CD8⁺T 细胞比例和肿瘤特异性 T 细胞反应 A. Balb/c 小鼠皮下接种 2 $\times 10^6$ 结直肠癌细胞 CT26, anti-PD-1 组第四天和第七天腹腔注射抗体, 每次 200 μ g。mPD-1Ab21+mIL-21 组及 mPD-1Ab21 组从第四天开始腹腔注射蛋白, 每天一次共七次, 每次各 100 μ g。第 11 天杀老鼠, 分别取小鼠的引流淋巴结和脾脏, 制备单细胞悬液。流式检测不同组织中 CD62L^{high}CD44^{low}CD122⁺ScaI⁺T 细胞占总 CD8⁺T 细胞的比例。B&C. C57 小鼠皮下接种 1 $\times 10^6$ 黑色素瘤细胞 B16-OVA。接种前一天, 尾静脉注射 2 $\times 10^6$ 原始 OT-1T 细胞。接种后第六天, polyI:C (50 μ g) + OVA肽 (50 μ g) 皮下免疫小鼠。第九天开始腹腔注射蛋白治疗, mPD-1Ab21 每天一次共七次, 每次 100 μ g。anti-PD-1 第 10 天和第 14 天注射, 每次 200 μ g。第 17 天杀老鼠, 分别取引流淋巴结、脾脏和肿瘤, 制备单细胞悬液。流式检测不同组织中 OT-1T 细胞占 CD45⁺ 细胞的比例 (图 B), 计算肿瘤中 CD127^{low}KLRG1^{high}CD8⁺T 细胞与 CD127^{high}KLRG1^{low}CD8⁺T 的比值 (图 C)。

具体实施方式

[0056] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明, 本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的, 并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是, 在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换, 但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0057] 主要实验材料

[0058] IL-2 细胞因子: recombinant human IL-2 公司: peprotech 货号: 200-02

[0059] IL-7 细胞因子: recombinant human IL-7 公司: peprotech 货号: 200-07

[0060] 注射用重组人白介素-2: 沈阳三生制药有限责任公司

[0061] 完全弗氏佐剂: 公司 sigma; 货号 F5881-10ml

[0062] PolyI:C: 公司 sigma; 货号 I3036-20mg

[0063] pTT3 表达载体: 受赠于刘迎芳教授

[0064] 293T 细胞: 受赠于张叔人教授

[0065] CHO 细胞: 受赠于陈列平教授

[0066] EG7 细胞: 受赠于陈列平教授

[0067] Baf3 细胞: 购自北纳创联生物技术有限公司

[0068] PD-1KO 小鼠: 受赠于陈列平教授

[0069] Her2/neu+ 乳腺癌 Tubo 细胞: 受赠于付阳新教授

[0070] OT-1 转基因小鼠: 卵清白蛋白 (OVA) 抗原肽 (SIINFEKL) 特异性 T 细胞受体 (TCR) 转基因小鼠, 受赠于王红阳教授。

[0071] C57 小鼠: C57BL/6 购自维通利华

[0072] Balb/c 小鼠: Balb/c 购自维通利华

[0073] OVA 抗原肽: SIINFEKL (由生工生物公司合成)

- [0074] 抗Flag beads:ANTI-FLAG®M2 Affinity Gel Sigma A2220
- [0075] CSFE染料:公司:Sigma 货号:21888
- [0076] 抗鼠PD-1抗体(G4):由抗鼠PD-1抗体杂交瘤细胞(G4)培养上清,用Protein G柱纯化获得。
- [0077] Protein G蛋白纯化柱:公司:GE货号:17-0404-01
- [0078] 抗CD3抗体:Leaf purified anti-mouse CD3 ϵ 公司:biolegend货号:100331
- [0079] 抗CD28抗体:Leaf purified anti-mouse CD28公司:biolegend货号:102111
- [0080] 抗Her2/neu抗体:由抗鼠her2抗体杂交瘤细胞(7.16.4)培养上清,用Protein G柱纯化获得
- [0081] APC-抗Flag 公司:Biolegend 货号:637307
- [0082] PE-抗hIg 公司:ebioscience 货号:14-4998-82BFA:公司:ebioscience 货号:00-4506-51
- [0083] 实施例1抗鼠PD-1单链抗体与小鼠IL-21融合蛋白(mPD-1Ab21)的构建
- [0084] 将抗鼠PD-1抗体(G4)杂交瘤细胞进行外显子测序,根据抗体重链和轻链基因序列设计以下引物,通过RT-PCR克隆抗体重链和轻链可变区编码基因。引物序列如下:
- [0085] 抗鼠PD-1抗体重链(H)上游引物(SEQ ID NO.1):
- [0086] GGC CAC TTG CCA TGA ACT
- [0087] 抗鼠PD-1抗体重链(H)下游引物(SEQ ID NO.2):
- [0088] TGT TGT TGT GGT TGA GGA GAC
- [0089] 抗鼠PD-1抗体轻链(L)上游引物(SEQ ID NO.3):
- [0090] CAG TTT GTG CTA ACT CAG CC
- [0091] 抗鼠PD-1抗体轻链(L)下游引物(SEQ ID NO.4):
- [0092] TGTGACTTTGGGAGAAGACTT
- [0093] 克隆获得抗体重链(H)和轻链(L)可变区编码基因后,通过一段链接序列(linker):GGGTCCAGTGGCGGT,将抗体重链(H)和轻链(L)可变区编码基因相连接,成为一个抗PD-1单链抗体mPD-1Ab的编码基因序列,序列如SEQ ID NO.5所示。
- [0094] 进一步,通过另一个由36个氨基酸组成的,其编码核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示的链接序列linker。将获得的序列如SEQ ID NO.5所示PD-1单链抗体(mPD-1Ab)与序列如SEQ ID NO.7所示的小鼠IL-21编码基因序列链接。获得抗PD-1单链抗体与IL-21融合蛋白(mPD-1Ab21),序列如SEQ ID NO.8所示。
- [0095] 为了后续蛋白纯化和检测,可选择的,在获得的融合蛋白C端加上一个由22个氨基酸组成标签蛋白3xFlag的编码基因序列,3xFlag的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示。
- [0096] 最终,构建获得编码小鼠融合蛋白(mPD-1Ab21)的编码基因,核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示,参见图1。
- [0097] 实施例2小鼠PDSIL21融合蛋白的表达和纯化
- [0098] 将实施例1中构建的编码小鼠mPD-1Ab单链抗体和mPD-1Ab21融合蛋白的编码基因装入pTT3表达载体,转染293T细胞,收集细胞培养上清,用抗Flag beads纯化,获得小鼠mPD-1Ab和mPD-1Ab21蛋白。
- [0099] SDS-PAGE电泳证明,小鼠mPD-1Ab和mPD-1Ab21蛋白均为单一蛋白条带,如图2所

示。分子体积排除色谱分析显示,mPD-1Ab21融合蛋白主要是二聚体形式。

[0100] 实施例3抗人PD-1抗体制备

[0101] 用人PD-1-IgFc融合蛋白(PD-1:NCBI Reference Sequence:NM_005018.2,IgFc:Gene ID:3500)免疫小鼠,通过杂交瘤技术筛选获得一株产生高亲和力抗人PD-1抗体的杂交瘤细胞1G1。参见图3,结果显示该抗PD-1抗体特异性结合过表达PD-1的CHO细胞株,而且能完全阻断PD-L1-IgFc与细胞表面PD-1的结合。

[0102] 实施例4抗人PD-1抗体与人IL-21融合蛋白(PD-1Ab21)的构建、表达和鉴定

[0103] 通过RT-PCR技术,分别使用:

[0104] 抗人PD-1抗体重链(H)上游引物,M为简并引物(SEQ ID NO.11):

[0105] GAA GTG MAG CTG GTG GAG TCT GG

[0106] 抗人PD-1抗体重链(H)下游引物(SEQ ID NO.12):

[0107] ATA GAC AGA TGG GGG TGT CGT TTT GGC

[0108] 抗人PD-1抗体轻链(L)上游引物,M/R为简并引物(SEQ ID NO.13):

[0109] GAC ATT GTG CTG ACM CAR TCT CCA

[0110] 抗人PD-1抗体轻链(L)下游引物(SEQ ID NO.14):

[0111] GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC

[0112] 从抗PD-1抗体杂交瘤细胞(1G1)中克隆编码抗体重链和轻链可变区的基因(参见图4B),序列如SEQ ID NO.15和SEQ ID NO.16所示。用克隆的抗PD-1抗体重链和轻链可变区替代人免疫球蛋白重链和轻链的相应片段,合成完整的编码人免疫球蛋白重链和轻链基因,构建嵌合重链序列如SEQ ID NO.17,轻链序列如SEQ ID NO.18所示。同时在重链C末端与SEQ ID NO.19所示的人IL-21链接,构建成人源化抗PD-1抗体重链与IL-21融合蛋白,融合蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.20。

[0113] 将合成的抗PD-1抗体重链与IL-21融合蛋白和轻链基因,分别构建到pTT3表达载体中,共传染CHO细胞,用proteinG柱纯化抗PD-1抗体与IL-21融合蛋白(也称为PD-1Ab21)。参见图4A。

[0114] 检测PD-1Ab21与PD-1结合的能力,将稳定表达PD-1的CHO细胞与PD-1Ab21孵育30min,然后用抗Flag抗体检测细胞上结合的PD-1Ab21,结果显示PD-1Ab21能够很好结合细胞表面表达的PD-1,参见图4C。检测PD-1Ab21阻断PD-1与PD-L1的结合的能力,将CHO细胞与PD-L1-IgFc共孵育30min(黑色实线),或者先将PD-1Ab21与CHO细胞孵育30min,然后再加入PD-L1-IgFc,用抗IgFc抗体检测细胞上结合的PD-L1-IgFc(虚线)。结果显示PD-1Ab21能完全阻断PD-1与PD-L1的结合,参见图4D。

[0115] 实施例5 mPD-1Ab21融合蛋白功能鉴定

[0116] 流式细胞分析证明,mPD-1Ab21可以结合细胞表面表达的PD-1分子,这种结合能被抗PD-1抗体完全阻断,参见图5A,说明mPD-1Ab21和抗PD-1抗体一样能结合细胞表面表达的PD-1,而且能阻断PD-L1与细胞表面PD-1结合。同样,参见图5B,结果显示,mPD-1Ab21能够结合活化的T淋巴细胞,能阻断PD-L1与活化T淋巴细胞表面PD-1的结合。

[0117] 实施例6 mPD-1Ab21融合蛋白的IL-21生物学功能鉴定

[0118] 将Baf3细胞(Baf3细胞为pre-B细胞系)铺于96孔板中,每孔 1×10^4 个细胞。小鼠IL-21和mPD-1Ab21蛋白按照不同的浓度梯度:0.1ng/ml,1ng/ml,10ng/ml,加入到相应的细

胞孔中,每个浓度设三个复孔,不加蛋白的孔作为对照孔。细胞培养第三天,对Baf3细胞进行计数。计算每个蛋白浓度三个复孔细胞数的平均值,计算细胞增殖率,计算公式为:细胞增殖率=(实验组细胞数/对照组细胞数-1) x 100%。从图6结果可以看出,mPD-1Ab21具有和重组mIL-21同样促进B细胞增殖的生物学活性。

[0119] 从实施例5和实施例6可以看出,本发明制备的mPD-1Ab21融合蛋白既具有抗PD-1抗体阻断PD-L1与PD-1结合的作用,又具有IL-21的生物学活性。

[0120] 实施例7 mPD-1Ab21诱导记忆干性CD8⁺T细胞分化

[0121] 本发明进一步研究了mPD-1Ab21对活化CD8⁺T细胞分化的作用,利用OT-1转基因小鼠T细胞,体外用OVA抗原肽刺激活化48小时,然后分别在有IL-2、mIL-21、mPD-1Ab或mPD-1Ab21的培养基中培养分化,2天后用流式细胞技术分析T细胞的分化。

[0122] 结果如图7所示,结果显示:IL-2促进活化的CD8⁺T细胞向CD44^{high}CD62L^{low}效应性T细胞或记忆效应性T细胞分化,mIL-21诱导活化的CD8⁺T细胞向CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化,单独mPD-1Ab对活化的CD8⁺T细胞的分化没有影响,mPD-1Ab联合mIL-21具有和单独mIL-21同样诱导CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化的活性,而mPD-1Ab21具有更强诱导CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化的生物学作用。

[0123] 实施例8 mPD-1Ab21是通过促进细胞增殖诱导CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化

[0124] 为了区分mPD-1Ab21诱导分化的CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞是来源于没有活化增殖的原始(naïve)CD44^{low}CD62L^{high}T细胞,还是活化的T细胞被融合蛋白mPD-1Ab21诱导分化为CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞,我们对OT-1转基因小鼠T细胞进行CFSE标记,然后进行活化和在不同条件下分化,结果参见图8所示,单纯培养基中分化的CD44^{low}CD62L^{high}细胞群增殖显著低于CD44^{high}CD62L^{high}T细胞群。mPD-1Ab21诱导分化的CD44^{low}CD62L^{high}细胞群也具有明显增殖,与CD44^{high}CD62L^{high}T细胞群的增殖没有区别。说明mPD-1Ab21诱导分化的CD44^{low}CD62L^{high}细胞是由活化的细胞通过增殖分化来的。

[0125] 实施例9 mPD-1Ab21诱导活化的CD44^{high}CD62L^{high}细胞分化返回到CD44^{low}CD62L^{high}原始细胞表型

[0126] 为了进一步证明mPD-1Ab21诱导分化的CD44^{low}CD62L^{high}细胞是由活化的CD44^{high}CD62L^{high}T细胞分化返回到CD44^{low}CD62L^{high}细胞群,我们将CFSE标记的OT-1转基因小鼠T细胞用OVA抗原肽活化后,用流式分选纯化活化的CD44^{high}CD62L^{high}T细胞群,然后在加入细胞因子或融合蛋白进行分化。参见图9,结果显示:IL-2诱导活化的CD44^{high}CD62L^{high}T细胞向CD44^{high}CD62L^{low}效应性T细胞分化,而mPD-1Ab21诱导活化的CD44^{high}CD62L^{high}T细胞向CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化。而且,与CD44^{high}CD62L^{high}T细胞群的增殖相比较,mPD-1Ab21诱导分化的CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞增殖分裂的代数比CD44^{high}CD62L^{high}T细胞群的分裂代数更多。进一步说明,mPD-1Ab21诱导分化的CD44^{low}CD62L^{high}细胞是由活化的细胞通过增殖、分化返回到CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞。

[0127] 实施例10 mPD-1Ab21诱导的记忆干性CD8⁺T细胞功能鉴定

[0128] 为了验证mPD-1Ab21诱导分化的CD44^{low}CD62L^{high}细胞的生物学功能特性,我们将mPD-1Ab21或IL-2诱导分化2-3天的OT-1转基因小鼠T细胞在含有IL-7培养基中培养2天,然后用抗CD3刺激,检测细胞因子产生,参见图10,结果显示:IL-2诱导分化的细胞产生大量

IFN- γ ，几乎不表达IL-2；mPD-1Ab21诱导分化的细胞产生大量IL-2，IFN- γ 表达显著低于IL-2诱导分化的细胞。说明IL-2诱导分化的细胞具有很强的效应功能，而mPD-1Ab21诱导分化的细胞具有更强的增殖分化能力。

[0129] 实施例11 mPD-1Ab21诱导的记忆干性T细胞在小鼠体内具有更强的记忆应答反应(recall response)及形成记忆细胞的能力

[0130] 为了进一步验证mPD-1Ab21诱导分化的细胞在体内的生物学功能特性，我们将mPD-1Ab21或IL-2诱导分化的OT-1转基因小鼠T细胞静脉输入到C57小鼠体内，第二天给小鼠皮下注射OVA抗原肽和弗氏完全佐剂进行抗原刺激，然后监控小鼠体内OT-1转基因小鼠T细胞的反应，结果显示：受到抗原刺激后，mPD-1Ab21诱导分化的T细胞反应是IL-2诱导分化的T细胞反应的4倍。一个月后检测发现，输入mPD-1Ab21分化细胞的小鼠体内OT-1转基因小鼠T细胞数量是输入IL-2分化细胞小鼠的2倍，参见图11，说明mPD-1Ab21诱导分化的细胞在体内具有更强的记忆反应能力和形成记忆性T细胞的能力。

[0131] 实施例12

[0132] mPD-1Ab21靶向PD-1⁺T细胞促进CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化

[0133] 实施例7显示：mPD-1Ab21诱导CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化的能力显著高于重组mIL-21、或者mPD-1Ab与mIL-21联合。为了验证mPD-1Ab21是否能够通过将IL-21靶向活化的PD-1⁺T细胞，从而促进T细胞分化，本发明分析比较了mPD-1Ab21和mIL-21诱导CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化的剂量效应关系。将OT-1转基因小鼠T细胞体外活化，然后用不同浓度的重组mIL-21、或mPD-1Ab21融合蛋白诱导分化，流式细胞技术分析CD44^{low}CD62L^{high}细胞的比例。参见图12A，结果显示：mPD-1Ab21融合蛋白诱导CD44^{low}CD62L^{high}细胞分化的活性比mIL-21高3倍以上。为进一步分析T细胞表达的PD-1在mPD-1Ab21诱导CD44^{low}CD62L^{high}细胞分化中的作用，将正常小鼠T细胞、或PD-1基因敲除小鼠T细胞在体外用抗-CD3和CD8抗体刺激活化，然后用不同浓度的重组IL-21、或mPD-1Ab21融合蛋白诱导分化，流式细胞技术分析CD44^{low}CD62L^{high}细胞的比例。参见图12B，结果显示：对于正常小鼠T细胞，mPD-1Ab21诱导CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化的能力显著高于重组IL-21；而对于PD-1基因敲除小鼠T细胞，mPD-1Ab21诱导CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化的能力略好于重组IL-21。这一结果说明：mPD-1Ab21通过结合活化T细胞表面的PD-1将IL-21靶向活化的T细胞，从而促进CD44^{low}CD62L^{high}记忆干性T细胞分化。

[0134] 实施例13 mPD-1Ab21快速靶向外周血及肿瘤组织中活化的肿瘤特异性T细胞

[0135] 给小鼠接种表达OVA抗原的肿瘤细胞B16-OVA，在接种前一天给小鼠输入OVA特异的OT-1原始T细胞，接种后第六天给小鼠进行佐剂polyI:C和OVA抗原肽的皮下免疫，第九天给予小鼠腹腔注射mPD-1Ab21或者抗-PD-1抗体。在给蛋白后的不同时间点(30min, 6h, 12h, 24h和48h)分别流式分析外周血中和肿瘤内浸润的肿瘤特异性的T细胞与抗PD-1抗体的结合能力，来反映体内mPD-1Ab21蛋白或抗-PD-1抗体与肿瘤特异性OT-1T细胞的结合情况。参见图13，结果显示，免疫后的小鼠外周血和肿瘤中活化的OT-1T细胞表面均高表达PD-1分子。腹腔注射抗PD-1抗体或者mPD-1Ab21蛋白30分钟后，外周血中OT-1T细胞表面PD-1流式抗体染色被阻断，说明注射到体内的mPD-1Ab21和抗PD-1抗体都能快速结合到肿瘤特异性T细胞表面。肿瘤组织中融合蛋白或抗体与肿瘤特异性T细胞的结合比外周血慢，6小时开始部分阻断，12小时则完全阻断了PD-1流式抗体染色，说明融合蛋白或抗体结合到肿瘤特异

性T细胞表面。在外周血和肿瘤组织中,融合蛋白和OT-1T细胞的结合作用能持续至少24小时,48小时后仅在肿瘤组织能观察到抗PD-1抗体的部分结合。结果说明,mPD-1Ab21融合蛋白注射到体内后能够快速结合外周血及肿瘤组织中活化的肿瘤特异性T细胞。

[0136] 实施例14mPD-1Ab21融合蛋白的抗肿瘤作用

[0137] 给小鼠皮下接种小鼠肠癌肿瘤细胞CT26,3天后给小鼠腹腔注射mPD-1Ab21融合蛋白、mPD-1Ab联合mIL-21重组蛋白、或者抗-PD-1抗体进行治疗,定时检测肿瘤大小,绘制肿瘤生长曲线。参见图14,结果显示:与不治疗的对照小鼠相比,mPD-1Ab和mIL-21联合治疗仅仅使小鼠的肿瘤生长稍有减慢,而抗PD-1抗体和mPD-1Ab21融合蛋白治疗可分别是20%和40%小鼠肿瘤完全消退。结果说明,与mPD-1Ab和mIL-21联合治疗相比,mPD-1Ab21具有更显著的肿瘤治疗效果,而且优于抗PD-1抗体的治疗作用。

[0138] 实施例15mPD-1Ab21的联合治疗显著增加抗Her2/neu(赫赛汀)对Her2⁺乳腺癌的治疗作用

[0139] 给小鼠皮下接种Her2/neu⁺乳腺癌Tubo,16天后给小鼠腹腔注射抗Her2/neu抗体、或者抗Her2/neu抗体联合mPD-1Ab21融合蛋白、抗Her2/neu抗体联合mPD-1Ab和mIL-21进行治疗,定时检测肿瘤大小,绘制肿瘤生长曲线。参见图15,结果显示:单独抗Her2/neu抗体治疗可使40%小鼠肿瘤消退,抗Her2/neu抗体联合mPD-1Ab和mIL-21治疗可使60%小鼠肿瘤完全消退,抗Her2/neu抗体联合mPD-1Ab21治疗可使所有小鼠肿瘤完全消退。结果说明,mPD-1Ab21联合治疗能够显著增加抗Her2/neu(赫赛汀)的肿瘤治疗效应,显著优于与mPD-1Ab和mIL-21的联合治疗。

[0140] 实施例16mPD-1Ab21的联合治疗显著增加肿瘤疫苗对B16-OVA肿瘤的治疗作用

[0141] 肿瘤疫苗是肿瘤治疗未来的一个重要方向,尤其是与PD-1抑制剂联合应用。mPD-1Ab21融合蛋白通过PD-1将IL-21靶向肿瘤疫苗激活的肿瘤特异性T细胞,促进记忆性T细胞形成,将会比PD-1抑制剂更显著地促进肿瘤疫苗的肿瘤治疗效果。为此,给小鼠接种表达OVA抗原的肿瘤细胞B16-OVA,在接种前一天给小鼠输入OVA特异的OT-1原始T细胞,接种后第六天给小鼠进行佐剂polyI:C和OVA抗原肽的皮下免疫,第九天开始给予小鼠腹腔注射mPD-1Ab21融合蛋白、mPD-1Ab联合mIL-21重组蛋白、或者抗-PD-1抗体进行治疗,定时检测肿瘤大小,绘制肿瘤生长曲线。参见图16,结果显示:给荷瘤小鼠进行肿瘤抗原免疫,可以明显抑制肿瘤生长,联合mPD-1Ab和mIL-21、或者抗-PD-1抗体没有显著增加肿瘤疫苗的治疗效果,但是,与mPD-1Ab21联合应用可以极大提高肿瘤疫苗的抗肿瘤作用。

[0142] 实施例17mPD-1Ab21治疗显著增加记忆干性CD8⁺T细胞比例和肿瘤特异性T细胞反应

[0143] 分析上述治疗的CT26荷瘤小鼠体内各T细胞亚群比例,参见图17A,发现mPD-1Ab21治疗小鼠脾脏和肿瘤引流淋巴结中记忆干性(CD62L^{high}CD44^{low}CD122⁺Sca1-1⁺)CD8⁺T细胞比例显著高于抗-PD-1抗体或mPD-1Ab联合mIL-21治疗的小鼠。

[0144] 分析上述疫苗治疗的B16-OVA荷瘤小鼠,肿瘤疫苗治疗刺激体内肿瘤特异性T细胞活化和增殖,导致荷瘤小鼠脾脏、尤其是肿瘤内肿瘤特异性CD8⁺T细胞比例显著增加。抗PD-1抗体联合治疗没有进一步增加肿瘤特异性CD8⁺T细胞比例,但是,mPD-1Ab21极大提高了疫苗治疗小鼠体内肿瘤特异性T细胞反应,使肿瘤特异性CD8⁺T细胞的比例到达肿瘤内CD8⁺T细胞的80%。更重要的是,与单独疫苗治疗的肿瘤相比,抗PD-1抗体联合治疗促使肿瘤特异性

CD8⁺T细胞向效应性 (CD127^{low}KLRG1^{high}) 分化, 而mPD-1Ab21的联合治疗显著促进肿瘤特异性CD8⁺T细胞向记忆性效应 (CD127^{high}KLRG1^{low}) 分化。参见图17B和17C。

[0145] 这些研究结果说明, mPD-1Ab21治疗除了阻断PD-1免疫抑制信号, 还能促进记忆性抗肿瘤T细胞反应, 从而极大提高肿瘤治疗效果。

[0146] 以上详细描述了本发明的优选实施方式, 但是, 本发明并不限于上述实施方式中的具体细节, 在本发明的技术构思范围内, 可以对本发明的技术方案进行多种简单变型, 这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0147] 另外需要说明的是, 在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征, 在不矛盾的情况下, 可以通过任何合适的方式进行组合, 为了避免不必要的重复, 本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0148] 此外, 本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合, 只要其不违背本发明的思想, 其同样应当视为本发明所公开的内容。

序列表

<110> 王盛典

李颖

丛艳妮

<120> 一种靶向抗原特异性T细胞诱导其向记忆干性细胞分化的融合蛋白

<130> 1

<141> 2018-09-13

<160> 21

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 1

ggccacttgc catgaact 18

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 2

tgttggttg gttgaggaga c 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 3

cagtttgtgc taactcagcc 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 4

tgtgactttg ggagaagact t 21

<210> 5

<211> 801

<212> DNA

<213> mus

<400> 5

atgaactcag gactcaaatt ggTTTTcttt gtccttattc taaaaggtgt ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gcacaacctg gaaagtcctt gaaactctcc 120
 tgtgaggcct ctggattcac cttcagtac tatggcatga actggttccg tcaggctcca 180
 gggaaagggc tggagtgggt cgcatatatt agtagtggtgta gtaataagat cacatatgcc 240
 gacactgtga agggccggtt caccgtctcc agagacaacg gcaagaacca actgttcctg 300
 caaatgaaca atctcaagtc tgaggacaca gccatttatt actgtgtgga tagcggattt 360
 aattcttact ctgatgtctg gggccaggga atccaggta cegtctctc aaccacaaca 420
 acagggtcca gtggcggta gtttgtgcta actcagccaa agactgtgtc agagtctctg 480
 gggagaacag tcaccatctc ctgcaaacgc agcagtggca gcgttgggga ctactatgtc 540
 agctggcacc agcagcgtt tggaagctct cccaaaactg tgatctatct tgatgatgag 600
 agaccatctg gggttcctaa aaggttctct ggctccattg acagctcacc caactcagcc 660
 tcaactgacca tcaactgatct gcagaactgac gatgaggtg actacttttg tctctcttat 720
 gatagtaaca atcactttgt ttttggcagc ggaaccacc tcaccgtctt aggtggacc 780
 aagtcttctc ccaaagtcac a 801

<210> 6

<211> 108

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 6

ggtggttctg gcggcggttc tgaaggtggc ggctccgaag gcggcggcag cgaggcgggt 60
 ggtagcgaag gtggtggctc cgagggtggc ggttccggcg gcggtagc 108

<210> 7

<211> 372

<212> DNA

<213> mus

<400> 7

caagggccag atgcctcctt gattagactt cgtcacctta ttgacattgt tgaacagctg 60
 aaaatctatg aaaatgactt ggatcctgaa cttctatcag ctccacaaga tgtaaagggg 120
 cactgtgagc atgcagcttt tgctgtttt cagaaggcca aactcaagcc atcaaaccct 180
 ggaacaata agacattcat cattgacctc gtggcccagc tcaggaggag gctgcctgcc 240
 aggaggggag gaaagaaaca gaagcacata gctaaatgcc cttctgtgta ttcgtatgag 300
 aaaaggacac ccaaagaatt cctagaaaga ctaaatggc tccttcaaaa gatgattcat 360
 cagcatctct cc 372

<210> 8

<211> 1281

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 8

atgaactcag gactcaaatt ggTTTTcttt gtccttattc taaaaggtgt ccagtgtgag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gcacaacctg gaaagtcct gaaactctcc 120
 tgtgaggcct ctggattcac cttcagtgac tatggcatga actggttccg tcaggctcca 180
 gggaaaggggc tggagtgggt cgcatatatt agtagtgga gtaataagat cacatatgcc 240
 gacactgtga agggccggtt caccgtctcc agagacaacg gcaagaacca actgttcctg 300
 caaatgaaca atctcaagtc tgaggacaca gccatttatt actgtgtgga tagcggattt 360
 aattcttact ctgatgtctg gggccaggga atccaggta cegtctctc aaccacaaca 420
 acagggtcca gtggcggta gtttgtgta actcagccaa agactgtgtc agagtctctg 480
 gggagaacag tcaccatctc ctgcaaacgc agcagtggca gcgttgggga ctactatgtc 540
 agctggcacc agcagcgtt tggaagctct cccaaaactg tgatctatct tgatgatgag 600
 agaccatctg gggttcctaa aaggttctct ggctccattg acagctcctc caactcagcc 660
 tcaactgacca tcaactgatc gcagaactgac gatgaggctg actacttttg tctctcttat 720
 gatagtaaca atcactttgt ttttggcagc ggaaccacc tcaccgtctc aggtggacc 780
 aagtcttctc ccaaagtcac aggtggttct ggcgccggtt ctgaagggtg cggctccgaa 840
 ggcggcggca gcgagggcgg tggtagcga ggtggtggct ccgagggtg cggttccggc 900
 ggcggtagcc aaggccaga tcgctctctg attagactc gtcacctat tgacattgtt 960
 gaacagctga aaatctatga aaatgactg gatcctgaac ttctatcagc tccacaagat 1020
 gtaaaggggc actgtgagca tgcagctttt gcctgttttc agaaggccaa actcaagcca 1080
 tcaaaccctg gaaacaataa gacattcctc attgacctg tggcccagct caggaggagg 1140
 ctgcctgcca ggaggggagg aaagaaacag aagcacatag ctaaagccc ttctgtgat 1200
 tcgtatgaga aaaggacacc caaagaattc ctagaaagac taaaatggct ctttcaaag 1260
 atgattcctc agcatctctc c 1281

<210> 9

<211> 66

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 9

gactacaaag accatgacgg tgattataaa gatcatgaca tcgattaca ggatgacgat 60
 gacaag 66

<210> 10

<211> 1350

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 10

atgaactcag gactcaaatt ggTTTTttt gtctttattc taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gcacaacctg gaaagtcct gaaactctcc 120
 tgtgaggcct ctggattcac cttcagtgac tatggcatga actggttccg tcaggctcca 180
 gggaaaggggc tggagtgggt cgcatatatt agtagtgga gtaataagat cacatatgcc 240
 gacactgtga agggccggtt caccgtctcc agagacaacg gcaagaacca actgttcctg 300
 caaatgaaca atctcaagtc tgaggacaca gccatttatt actgtgtgga tagcggattt 360

aattcttact ctgatgtctg gggccagga atccaggtca cegtctctc aaccacaaca 420
acagggtcca gtggcgtca gtttgtgcta actcagccaa agactgtgtc agagtctctg 480
gggagaacag tcaccatctc ctgcaaacgc agcagtggca gcgttgggga ctactatgtc 540
agctggcacc agcagcgtt tggaagctct cccaaaactg tgatctatct tgatgatgag 600
agaccatctg gggttcctaa aaggttctct ggctccattg acagctcatc caactcagcc 660
tcaactgacca tcaactgatct gcagactgac gatgaggctg actacttttg tctctcttat 720
gatagtaaca atcactttgt ttttggcagc ggaaccacc tcaccgtcct aggtggacc 780
aagtcttctc ccaaagtcac aggtggttct ggcggcggtt ctgaaggtgg cggctccgaa 840
ggcggcggca gcgagggcgg tggtagcgaa ggtgggtgct ccgaggggtg cggttccggc 900
ggcggtagcc aaggccaga tcgctcctg attagacttc gtcaccttat tgacattgtt 960
gaacagctga aaatctatga aaatgacttg gatcctgaac ttctatcagc tccacaagat 1020
gtaaaggggc actgtgagca tgcagctttt gctgttttc agaaggccaa actcaagcca 1080
tcaaaccctg gaaacaataa gacattcatc attgacctg tggcccagct caggaggagg 1140
ctgcctgccca ggaggggagg aaagaaacag aagcacatag ctaaatgcc ttctgtgat 1200
tcgtatgaga aaaggacacc caaagaattc ctagaaagac taaaatggct cttcaaaag 1260
atgattcatc agcatctctc cgactacaaa gaccatgacg gtgattataa agatcatgac 1320
atcgattaca aggatgacga tgacaagtag 1350

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 11

gaagtgmagc tgggtgagtc tgg 23

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 12

atagacagat ggggtgtcg ttttggc 27

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 13

gacattgtgc tgacmcartc tcca 24

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 14
 ggatacagtt ggtgcagcat c 21
 <210> 15
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> HUM
 <400> 15
 gaagtgcagc tggaggagtc tgggggaggt ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcact agctatacca tgtcttgggt tcgccagact 120
 cccgagaaga ggctggaatg ggtcgcattc attagtgggt gtgggtggga cacctactat 180
 ccagacactg taaagggcgg attcaccate tccagagaca atgccaagaa caccctgtat 240
 ttgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaggcatggt 300
 tacgacggga cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggctactgt ctctgcagcc 360
 aaaacgacac ccccatctgt ctat 384
 <210> 16
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> HUM
 <400> 16
 gtgctgacc agtctccagc ctccctatct gcactctgtg gagaaactgt caccatcaca 60
 tgtcgagcaa gtgagaatat ttacagttat ttagcatggt atcagcagaa acagggaaaa 120
 tctcctcaac tcttggcttc taatgcaaaa accttagcag aggggtgtgcc atcaaggttc 180
 agtggcagtg gatcaggcac acagttttct ctgaagatca acagcctgca gcctgaagat 240
 tttgggagtt attactgtca acatcattat gctactccgt acacgttcgg gggggggacc 300
 aagctggaaa taaaacgggc tgatgctgca ccaactgtat cc 342
 <210> 17
 <211> 1400
 <212> DNA
 <213> HUM
 <400> 17
 atggcatgcc ctggcttctt gtgggcactt gtgatctcca cctgtcttga attttccatg 60
 gccgaagtgc agctgggtgga gtctggggga ggttttagtgc agcctggagg gtccctgaaa 120
 ctctcctgtg cagcctctgg attcactttc actagctata ccatgtcttg ggttcgccag 180
 actcccgaga agaggctgga atgggtcgca ttatttagtg gtgggtgggg tgacacctac 240
 tatccagaca ctgtaaaggg cggattcacc atctccagag acaatgcca gaacacctg 300
 tatttgcaaa tgagcagtct gaagtctgag gacacggcca tgtattactg tgcaaggcat 360
 ggttacgacg ggacctggtt tgettactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 420
 gcaagcttca agggcccatc ggtcttcccc ctggtgcctt gctccaggag cacctccgag 480
 agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540

tggaaactcat gcgccctgac cagcggcgtg cacacettcc cggctgtcct acagtcctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 660
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 720
 aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 780
 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 960
 cgtgtgggtca gggctctcac cgtctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggtct ccaacaaaag cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 1140
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggaggacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctctc cagcaggeta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1320
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa 1400

<210> 18

<211> 811

<212> DNA

<213> HUM

<400> 18

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
 atggccgaaa ttgtgtgac gcagcttcca gccaccctgt ctttgtctgt gggagaaact 120
 gtcaccatca catgtcgagc aagtgagaat atttacagtt atttagcatg gtatcagcag 180
 aaacagggaa aatctcctca actcctggtc tctaatagcaa aaaccttagc agagggtgtg 240
 ccatcaaggt tcagtggcag tggatcaggc acacagtttt ctctgaagat caacagcctg 300
 cagcctgaag attttgggag ttattactgt caacatcatt atgctactcc gtacacgttc 360
 ggcggagggg ccaaggtgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
 ttctatccca gagaggcaa agtacagtg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
 cagggcctga gctcgcctgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgttc ggcgcgccag 720
 tcgactccat tcgtttgtga atatcaaggc caatcgtctg acctgctca acctcctgtc 780
 aatgctggcg gcggctctgg tgggtggttct g 811

<210> 19

<211> 399

<212> DNA

<213> HUM

<400> 19

caaggtcaag atcgccacat gattagaatg cgtcaactta tagatattgt tgatcagctg 60
 aaaaattatg tgaatgactt ggtccctgaa tttctgccag ctccagaaga tgtagagaca 120
 aactgtgagt ggtcagcttt ttctgcttt cagaaggccc aactaaagtc agcaaataca 180
 ggaaacaatg aaaggataat caatgtatca attaaaaagc tgaagaggaa accaccttcc 240
 acaaatgcag ggagaagaca gaaacacaga ctaacatgcc cttcatgtga ttcttatgag 300
 aaaaaaccac ccaaagaatt cctagaaaga ttcaaatcac ttctccaaa gatgattcat 360
 cagcatctgt cctctagaac acacggaagt gaagattcc 399

<210> 20

<211> 1845

<212> DNA

<213> artificially?synthesized

<400> 20

atggcatgcc ctggcttctt gtgggcactt gtgatctcca cctgtcttga attttccatg 60
 gccgaagtgc agctggtgga gtctggggga ggtttagtgc agcctggagg gtccctgaaa 120
 ctctcctgtg cagcctctgg attcactttc actagctata ccatgtcttg ggttcgccag 180
 actcccgaga agaggctgga atgggtcgca ttcattagtg gtggtggtgg tgacacctac 240
 tatccagaca ctgtaaaggg ccgattcacc atctccagag acaatgcaa gaacacctg 300
 tatttgcaaa tgagcagtct gaagtctgag gacacggcca tgtattactg tgcaaggcat 360
 ggttacgacg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 420
 gcaagcttca agggcccatc ggtcttccc ctggtgcctt gctccaggag cacctccgag 480
 agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540
 tggaactcat gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 660
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 720
 aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcttgggggg accatcagtc 780
 ttctgttcc cccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccgacccc tgaggtcacg 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 960
 cgtgtggtca gggctctcac cgtctctcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggtct ccaacaaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 1140
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggaggacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctctca cagcaggeta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1320
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1380
 ctctcccctgt ctccgggtaa aggtggtggt ggttctggtg gtggtggttc tggcggcggc 1440
 ggctcccaag gtcaagatcg ccacatgatt agaatgcgtc aacttataga tattgttgat 1500
 cagctgaaaa attatgtgaa tgacttggtc cctgaatttc tgccagctcc agaagatgta 1560
 gagacaaact gtgagtggtc agcttttcc tgctttcaga aggcccact aaagtcagca 1620

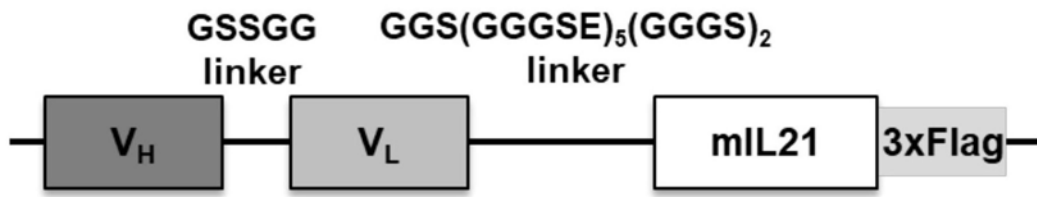
aatacaggaa acaatgaaag gataatcaat gtatcaatta aaaagctgaa gaggaaacca 1680
ccttccacaa atgcaggag aagacagaaa cacagactaa catgcccttc atgtgattct 1740
tatgagaaaa aaccacccaa agaattccta gaaagattca aatcacttct ccaaaagatg 1800
attcatcagc atctgtcctc tagaacacac ggaagtgaag attcc 1845
<210> 21
<211> 1914
<212> DNA
<213> artificially?synthesized
<400> 21
atggcatgcc ctggcttct gtgggcactt gtgatctcca cctgtcttga attttccatg 60
gccgaagtgc agctggtgga gtctggggga ggtttagtgc agcctggagg gtccctgaaa 120
ctctcctgtg cagcctctgg attcactttc actagctata ccatgtcttg ggttcgccag 180
actcccgaga agaggctgga atgggtcgca ttcattagt gtggtggtgg tgacacctac 240
tatccagaca ctgtaaaggg ccgattcacc atctccagag acaatgcaa gaacacctg 300
tatttgcaaa tgagcagtct gaagtctgag gacacggcca tgtattactg tgcaaggcat 360
ggttacgacg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 420
gcaagcttca agggcccacg ggtcttcccc ctggtgcctt gctccaggag cacctccgag 480
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540
tggaactcat gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtctctca 600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 660
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 720
aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 780
ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 840
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 960
cgtgtggtca gggctctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020
tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1080
ggcgagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 1140
aaccaggcca gcctgacctg cctggtcaaa ggttcttacc ccagcgacat cgccgtggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggaggacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1260
gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1320
aatgtcttct catgtctcgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1380
ctctccctgt ctccgggtaa aggtggtggt ggttctggtg gtggtggttc tggcggcggc 1440
ggctcccaag gtcaagatcg ccacatgatt agaatgcgtc aacttataga tattgttgat 1500
cagctgaaaa attatgtgaa tgacttggtc cctgaatttc tgccagctcc agaagatgta 1560
gagacaaact gtgagtggtc agctttttcc tgctttcaga aggcccact aaagtcagca 1620
aatacaggaa acaatgaaag gataatcaat gtatcaatta aaaagctgaa gaggaaacca 1680
ccttccacaa atgcaggag aagacagaaa cacagactaa catgcccttc atgtgattct 1740
tatgagaaaa aaccacccaa agaattccta gaaagattca aatcacttct ccaaaagatg 1800

attcatcagc atctgtcctc tagaacacac ggaagtgaag attccgacta caaagacat 1860
gacggtgatt ataaagatca tgacatcgat tacaaggatg acgatgacaa gtag 1914

A.

ATGAACTCAGGACTCAAATTGGTTTTCTTTGTCCTTATTCTAAAAGGTGTCCAGTGTGA
GGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGCACAACTGGAAAGTCCCTGAAACT
CTCCTGTGAGGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACTATGGCATGAACTGGTTCCGTCAGG
CTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCGCATATATTAGTAGTGGTAGTAATAAGATCACA
TATGCCGACACTGTGAAGGGCCGGTTCACCGTCTCCAGAGACAACGGCAAGAACCAA
CTGTTCTTGCAAATGAACAATCTCAAGTCTGAGGACACAGCCATTTATTACTGTGTGGA
TAGCGGATTTAATTCTTACTCTGATGTCTGGGGCCAGGGAATCCAGGTCACCGTCTCCT
CAACCACAACAACAGGGTCCAGTGGCGGTTCAGTTTGTGCTAACTCAGCCAAAGACTG
TGTCAGAGTCTCTGGGGAGAACAGTCACCATCTCCTGCAAACGCAGCAGTGGCAGCG
TTGGGGACTACTATGTCAGCTGGCACCAGCAGCGCTTTGGAAGCTCTCCAAAAGTGT
GATCTATCTTGATGATGAGAGACCATCTGGGGTTCCTAAAAGGTTCTCTGGCTCCATTG
ACAGCTCATCCAACCTCAGCCTCACTGACCATCACTGATCTGCAGACTGACGATGAGGC
TGACTACTTTTGTCTCTCTTATGATAGTAACAATCACTTTGTTTTTGGCAGCGGAACCCA
CCTCACCGTCTAGGTGGACCCAAGTCTTCTCCCAAAGTCACAGGTGGTTCTGGCGGC
GGTTCTGAAGGTGGCGGCTCCGAAGGCGGCGGCAGCGAGGGCGGTGGTAGCGAAGG
TGGTGGCTCCGAGGGTGGCGGTTCCGGCGGCGGTAGCCAAGGGCCAGATCGCCTCCT
GATTAGACTTCGTCACCTTATTGACATTGTTGAACAGCTGAAAATCTATGAAAATGACT
TGGATCCTGAACTTCTATCAGCTCCACAAGATGTAAAGGGGCACTGTGAGCATGCAGC
TTTTGCCTGTTTTTCAGAAGGCCAAACTCAAGCCATCAAACCCTGGAAACAATAAGACA
TTCATCATTGACCTCGTGGCCCAGCTCAGGAGGAGGCTGCCTGCCAGGAGGGGAGGA
AAGAAACAGAAGCACATAGCTAAATGCCCTTCTGTGATTTCGTATGAGAAAAGGACAC
CCAAAGAATTCCTAGAAAGACTAAAATGGCTCCTTCAAAGATGATTCATCAGCATCTC
TCCGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGA
CGATGACAAGTAG

B.



C.

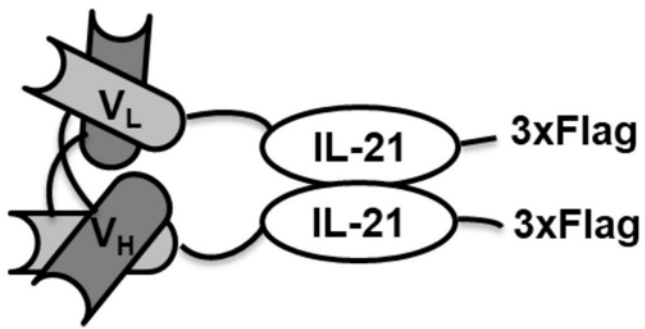
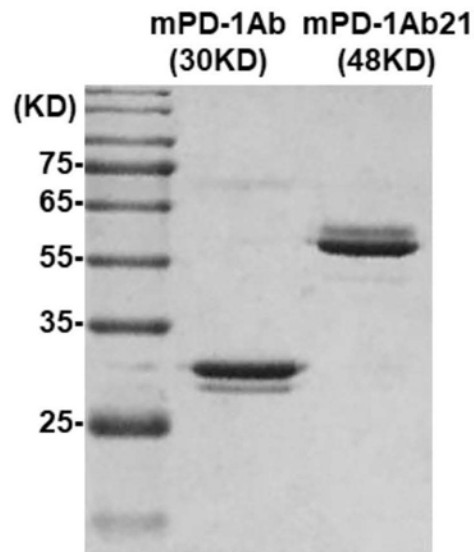


图1

A.



B.

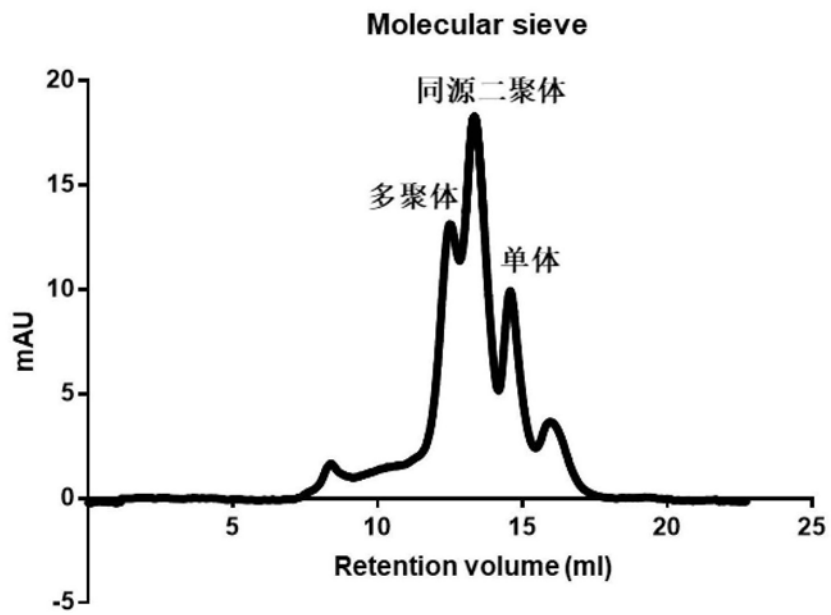
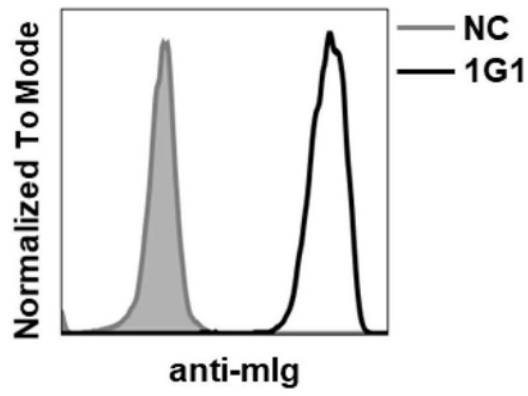


图2

A.



B.

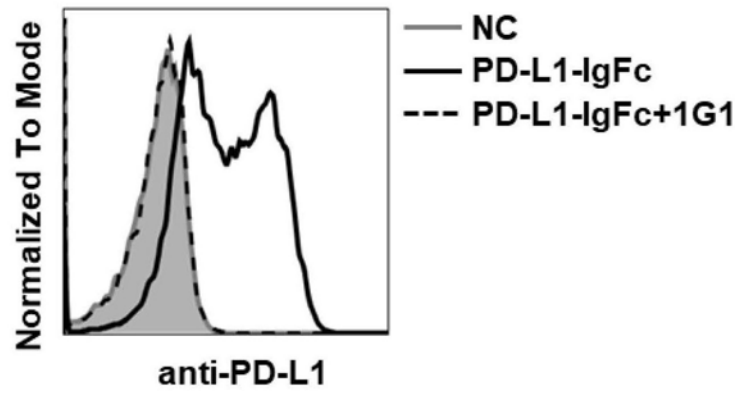
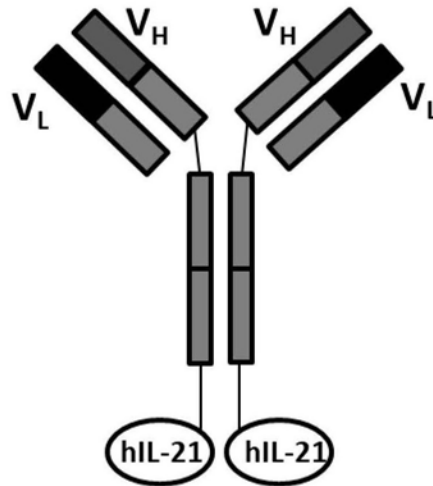


图3

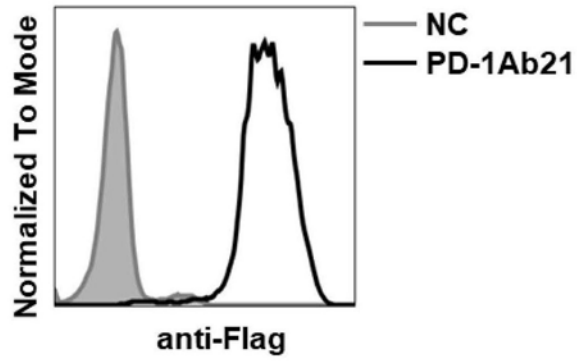
A.**B.****V_L:**

GTGCTGACCCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCAC
 ATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAA
 AATCTCCTCAACTCCTGGTCTCTAATGCAAAAACCTTAGCAGAGGGTGTGCCATCAAG
 GTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGCTACTCCGTACACGTTCCGGGGG
 GGGGACCAAGCTGGAAATAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC

V_H:

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCACTAGCTATAACCATGTCTTGGGTTCGCCAG
 ACTCCCGAGAAGAGGCTGGAATGGGTTCGATTATTAGTGGTGGTGGTGGTGACACCT
 ACTATCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAC
 CCTGTATTTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAA
 GGCATGGTTACGACGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGT
 CTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTAT

C.



D.

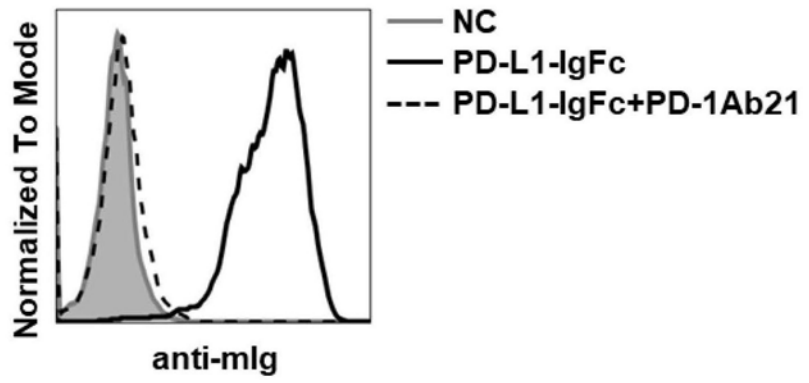
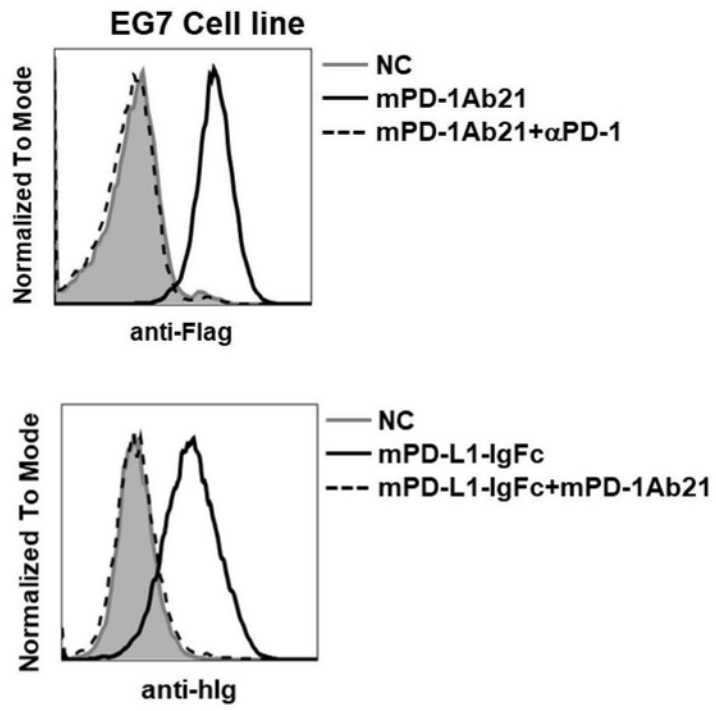


图4

A.



B.

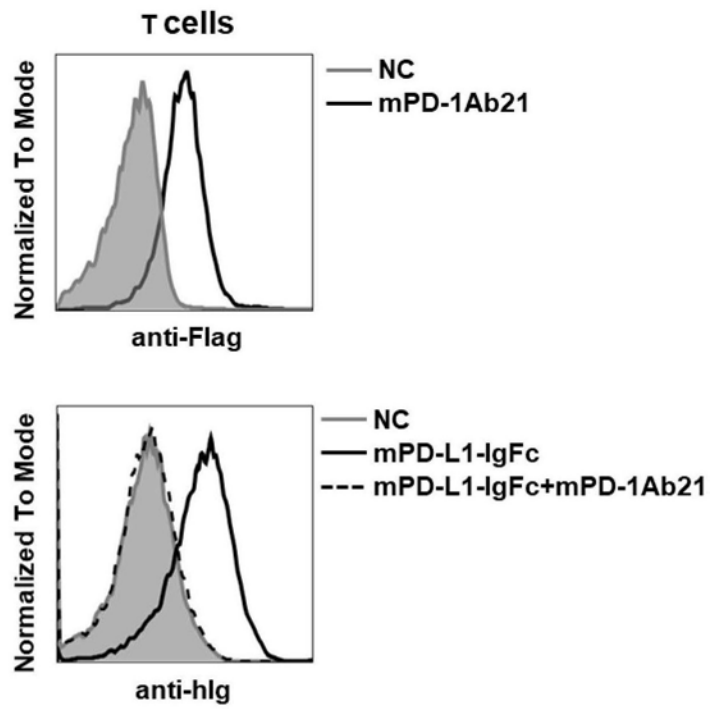


图5

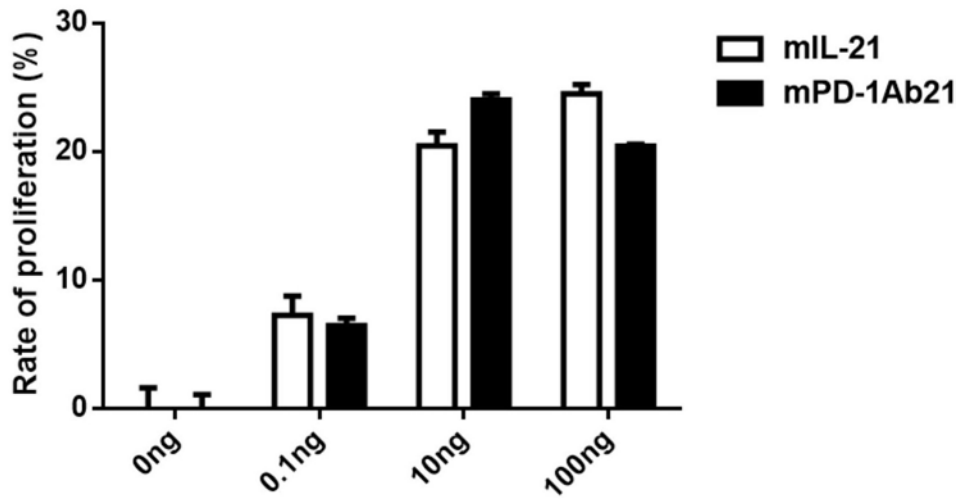
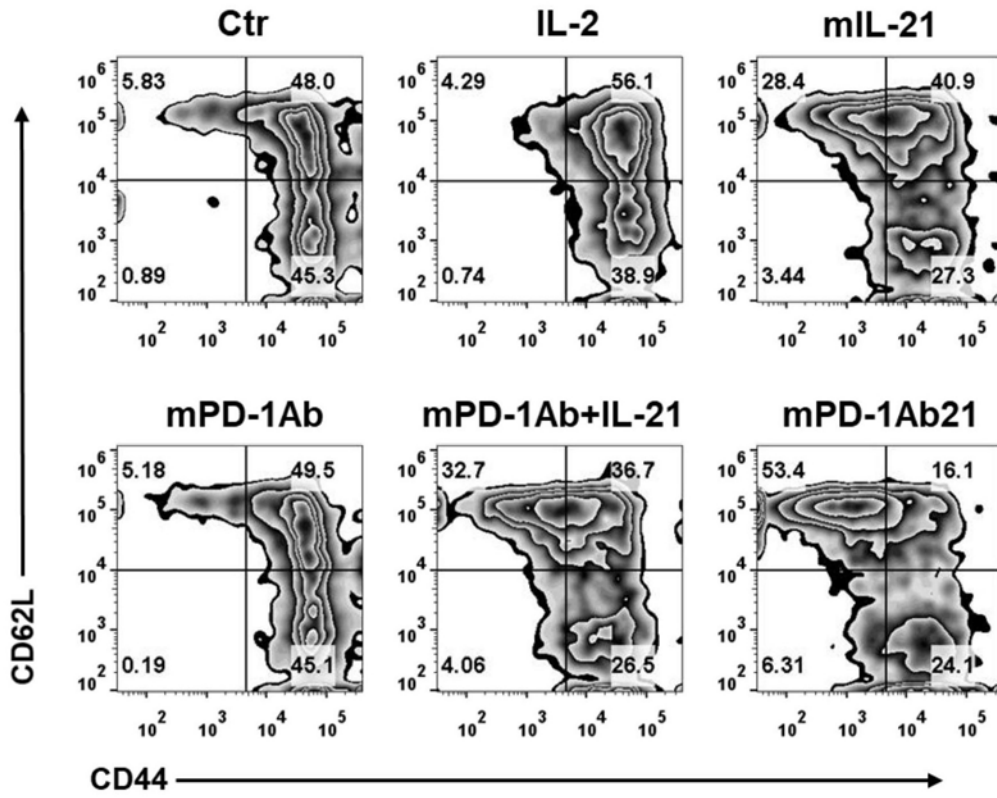


图6

A.



B.

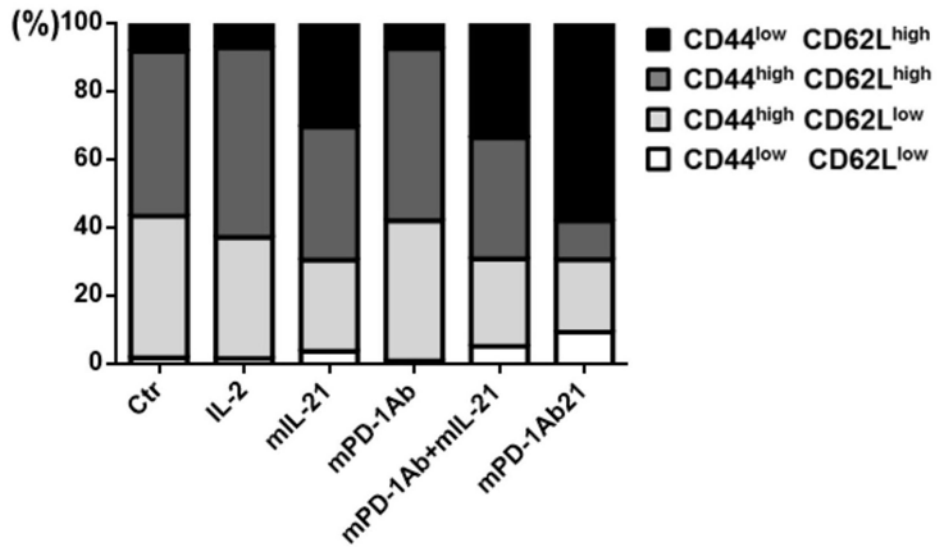


图7

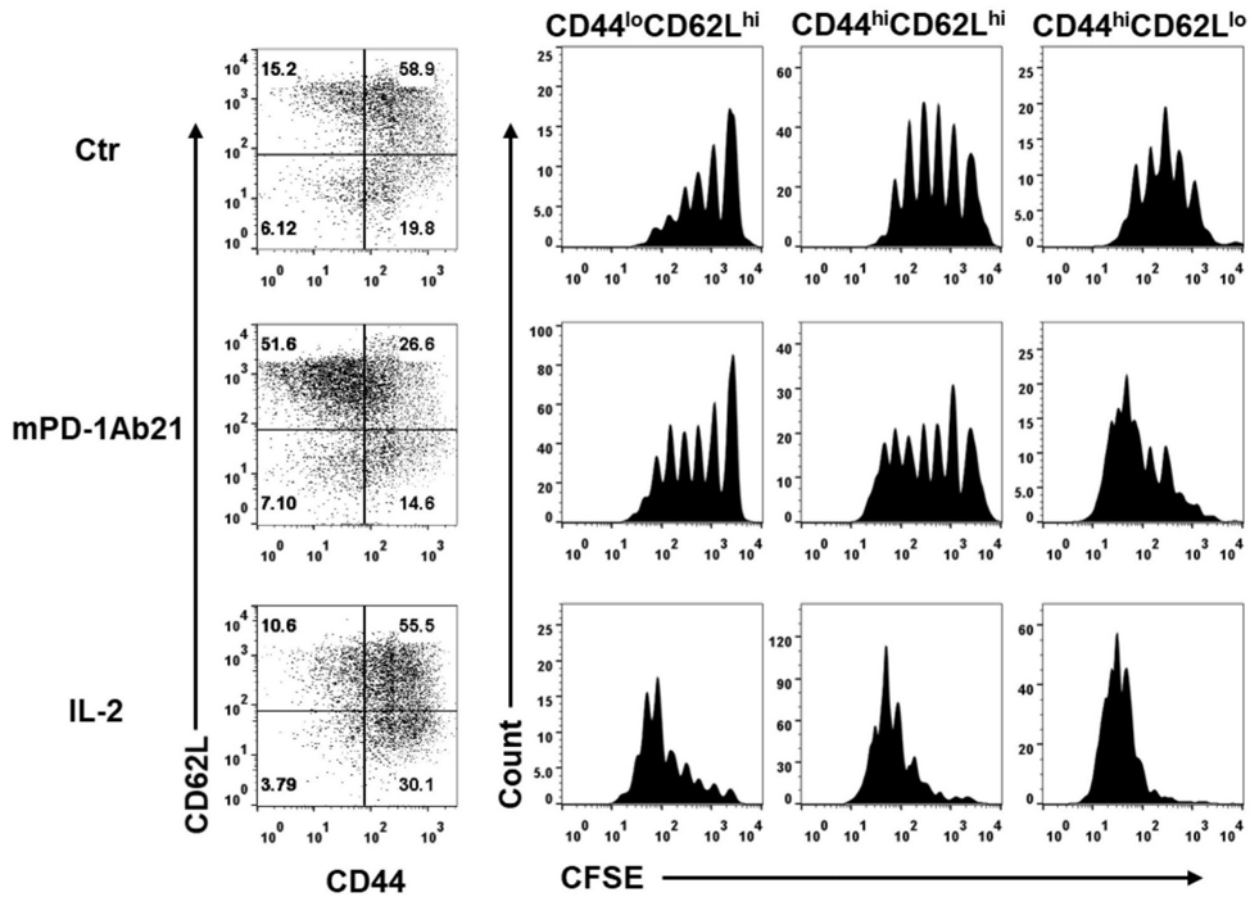
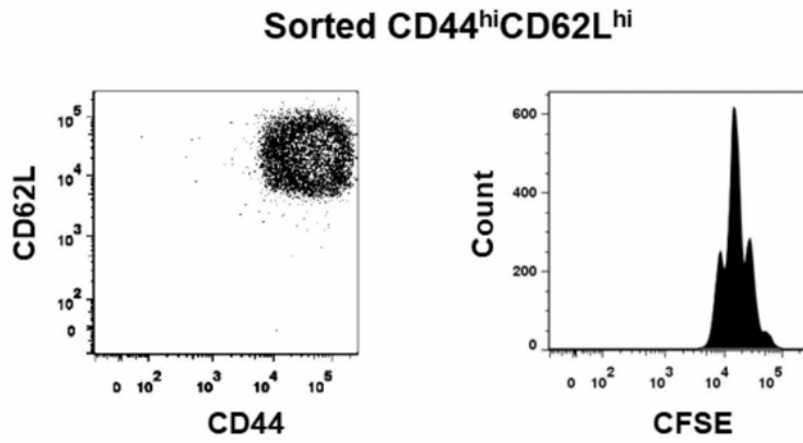


图8

A.



B.

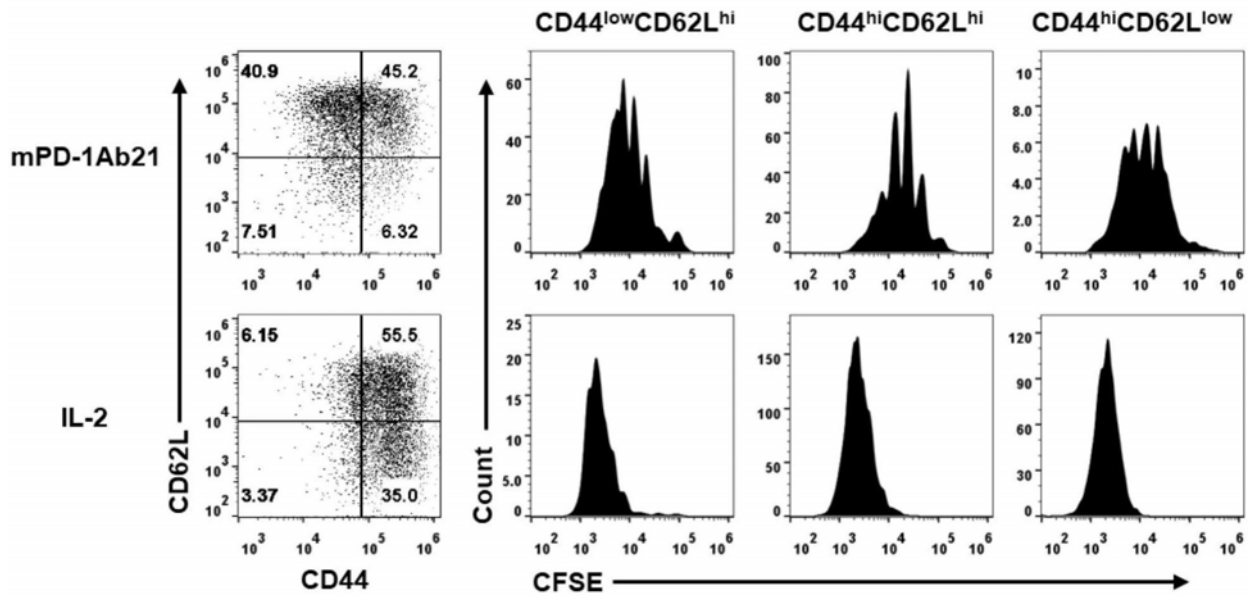


图9

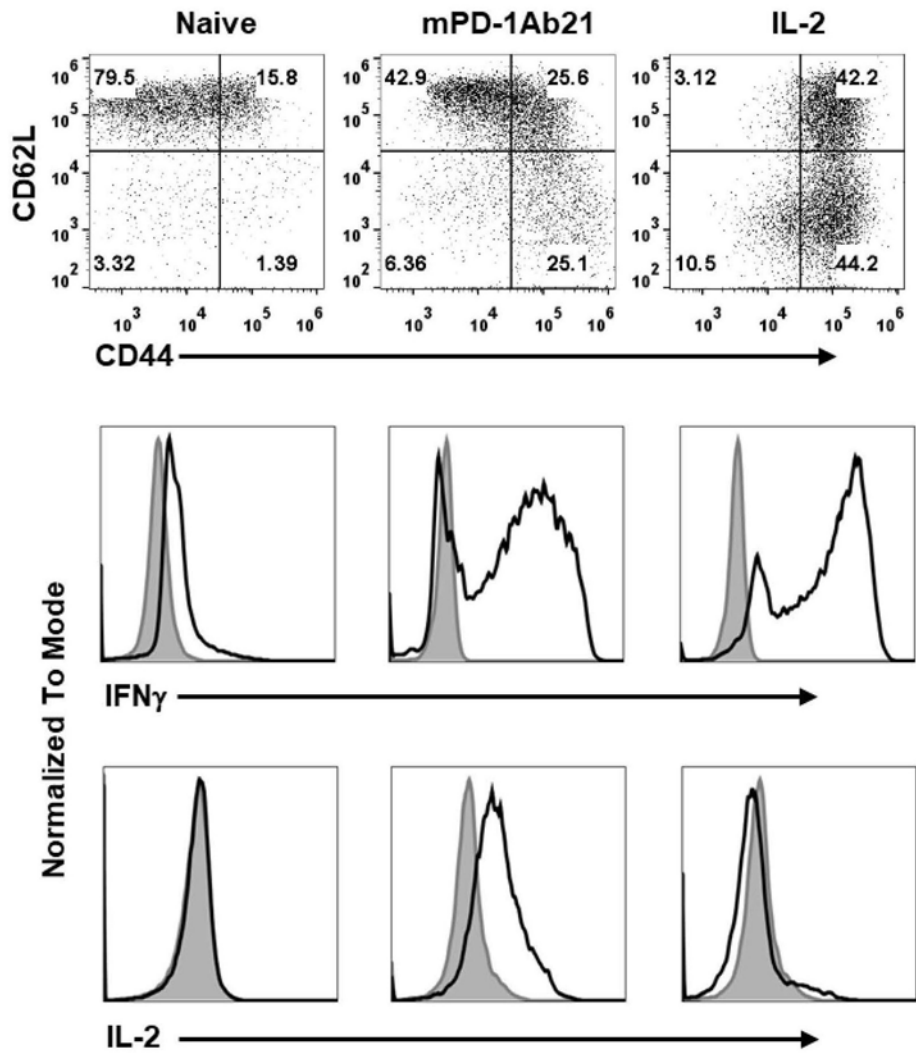
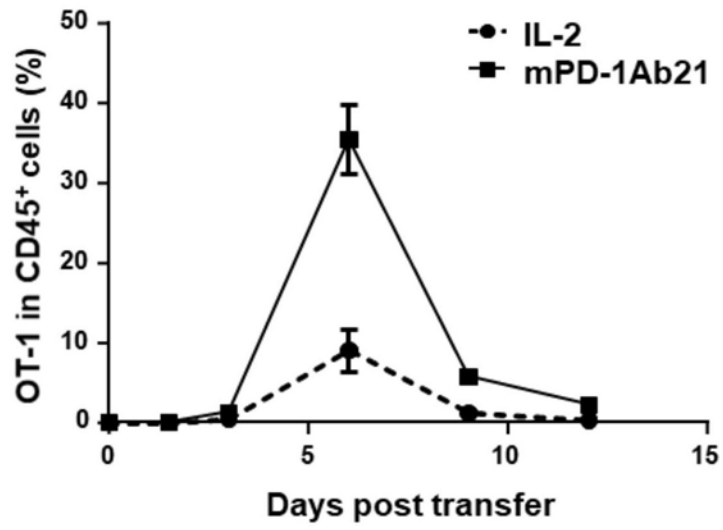


图10

A.



B.

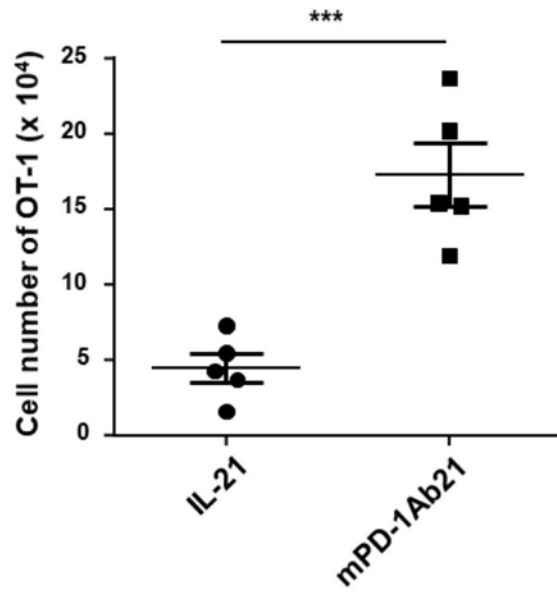
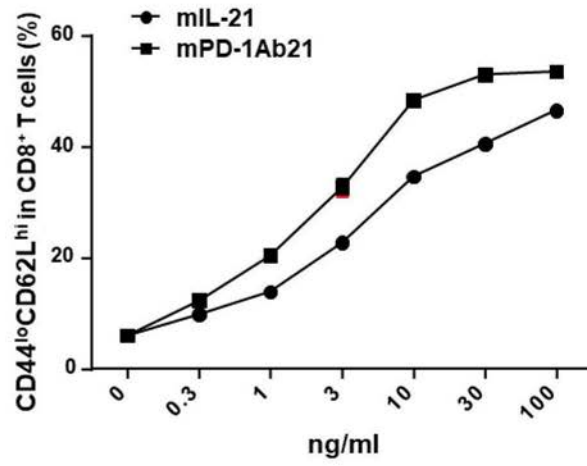


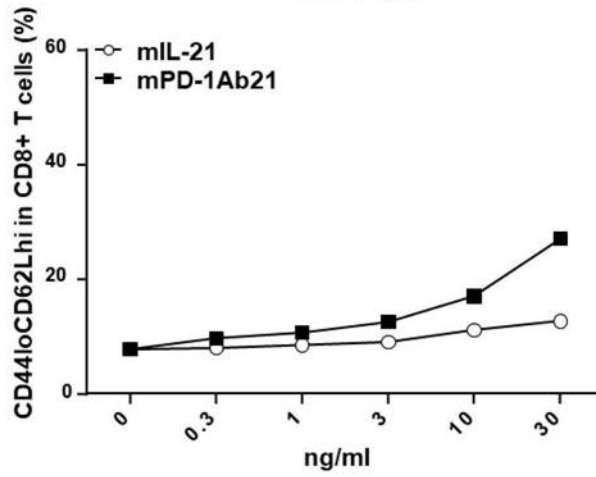
图11

A.



B.

PD-1-KO



WT

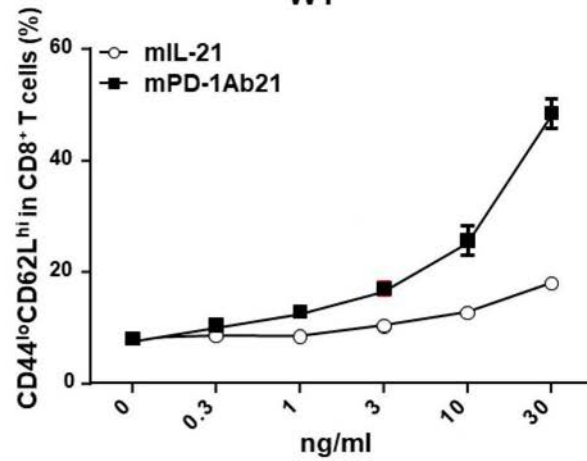


图12

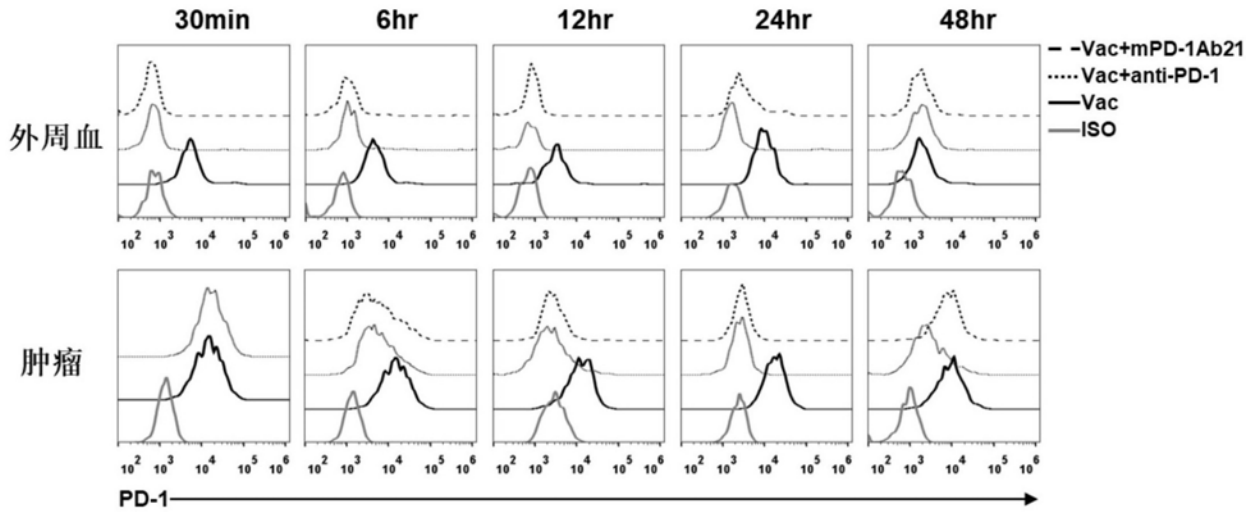


图13

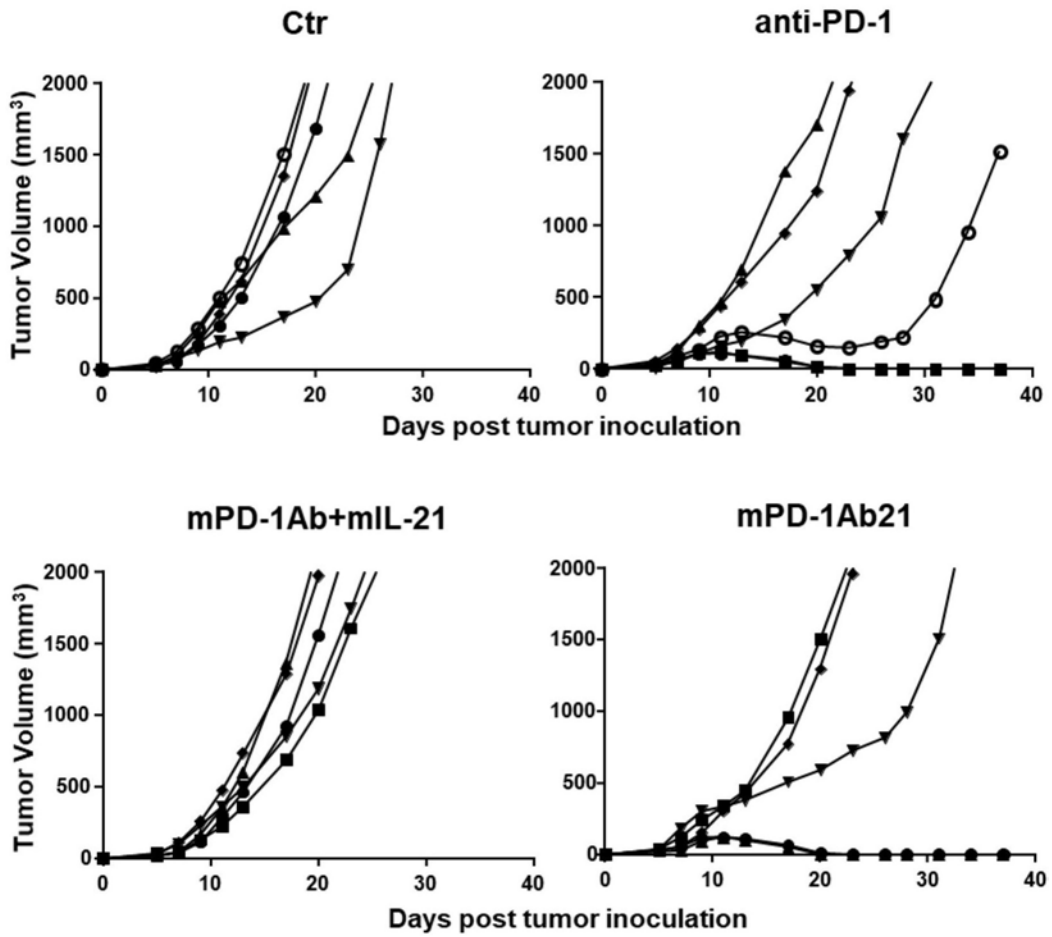


图14

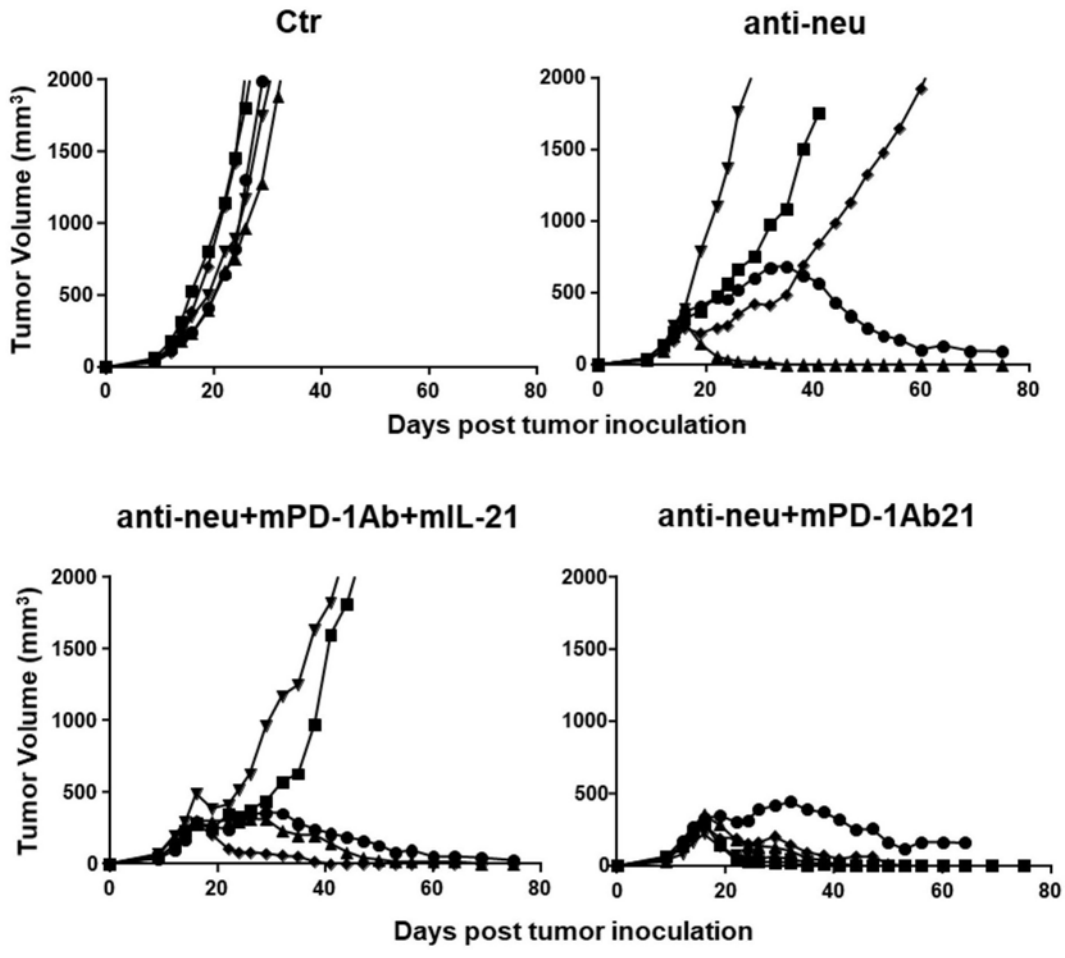


图15

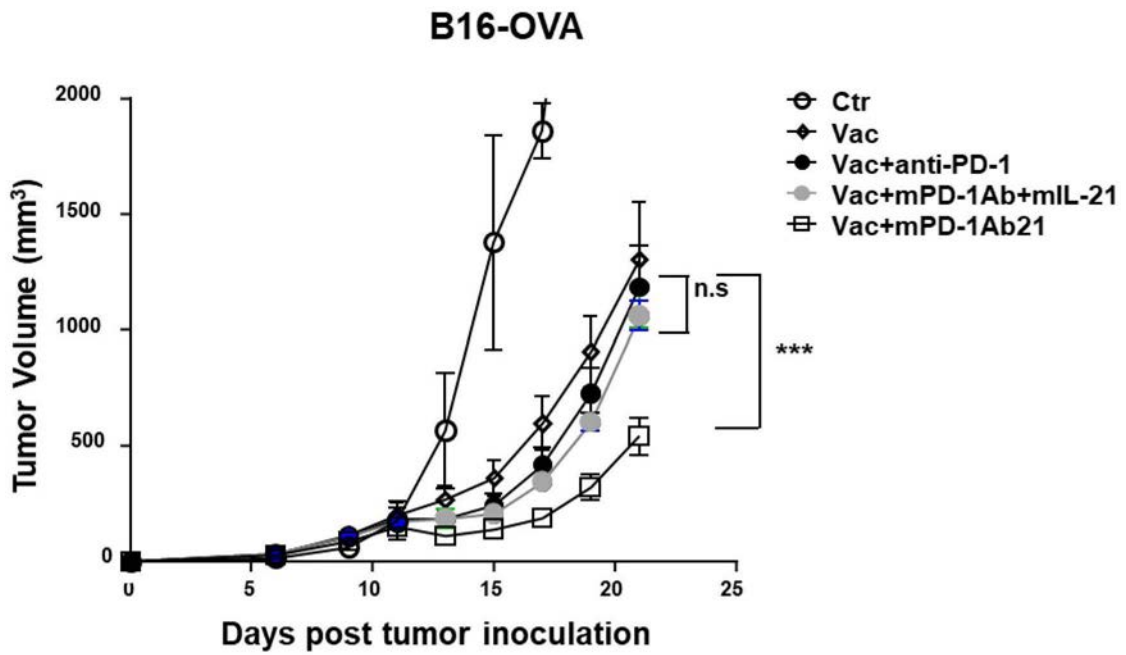
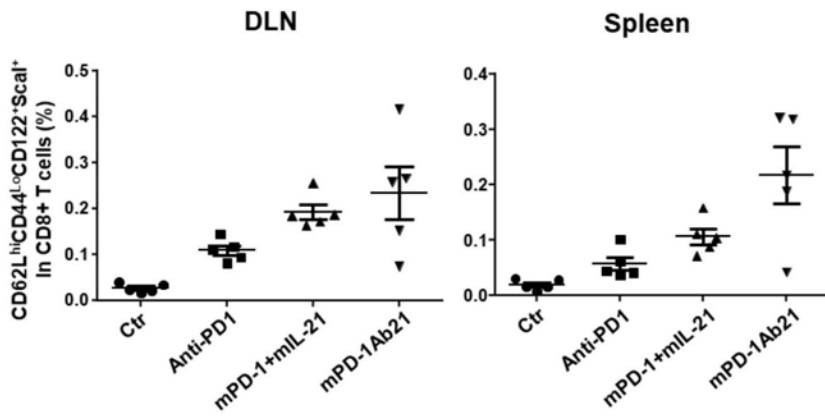
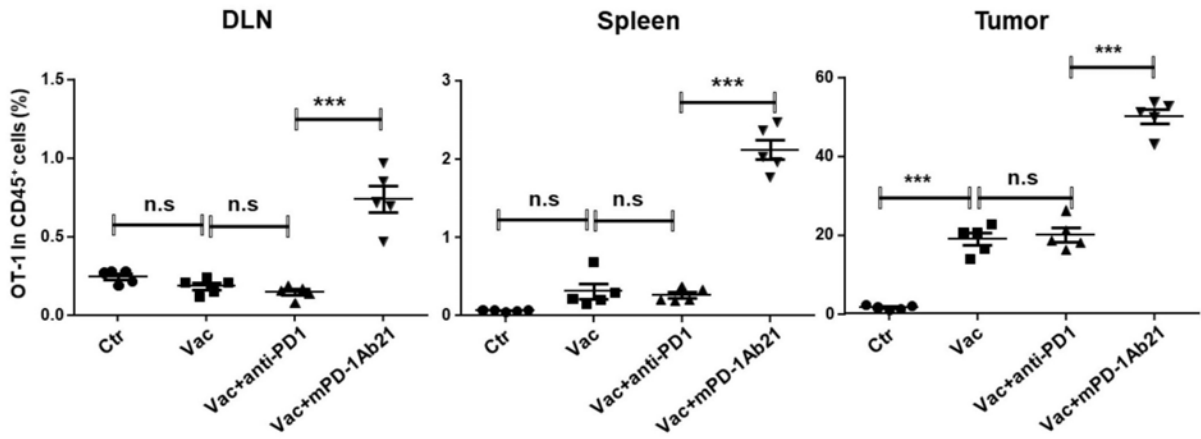


图16

A.



B.



C.

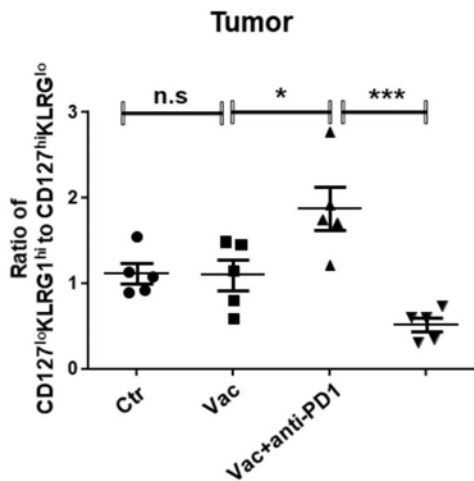


图17