



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103214580 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201310073144. 5

(22) 申请日 2013. 03. 07

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
基础医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

(72) 发明人 施明 郭宁

(74) 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理
有限公司 11246

代理人 陈波

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006. 01)

C12N 15/62 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

A61K 38/20 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 15/14 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102199218 A, 2011. 09. 28,

WO 02102855 A2, 2002. 12. 27,

CN 102199218 A, 2011. 09. 28,

Welsh, W. 等. GenBank: AAB08080.

《GenBank》. 2002,

Wei-Yun Zhang 等. Rapid Purification of a New Humanized Single-chain Fv Antibody/ Human Interleukin-2 Fusion Protein Reactive against HER2 Receptor. 《Acta Biochimica et Biophysica Sinica》. 2004, 第 36 卷 (第 10 期), 707-712.

刘乐等. 人源化抗 P185 HER-2 单区抗体与 IL-2 融合基因的构建表达和生物学活性. 《中国肿瘤生物治疗杂志》. 1997, 第 4 卷 (第 3 期),

Jiannan Feng 等. Design and assembly of anti-CD16 ScFv antibody with two different linker peptides. 《Journal of Immunological Methods》. 2003, 第 282 卷 33-43.

Hirsch, B 等. GenBank: CAP05188. 1. 《GenBank》. 2008,

审查员 刘新蕾

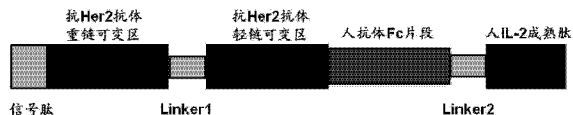
权利要求书1页 说明书6页
序列表8页 附图4页

(54) 发明名称

一种抗 Her2 免疫细胞因子及其应用

(57) 摘要

本发明公开了属于基因工程技术领域的一种抗 Her2 免疫细胞因子及其应用。该免疫细胞因子的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 1 所示。本发明的抗 Her2 免疫细胞因子生物学活性及产量明显提高,可在体内有效抑制 Her2 高表达的肿瘤细胞增殖、有效抑制 Herceptin 耐药的乳腺癌细胞增殖。



CN 103214580 B

1. 一种抗 Her2 免疫细胞因子,其特征在于,所述免疫细胞因子包括人 CD16 单克隆抗体重链信号肽、Her2 抗体重链可变区、Linker 1、Her2 抗体轻链可变区、人 IgG1 的 Fc 段、Linker 2 及 IL-2 成熟肽;所述免疫细胞因子的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 1 所示,所述 Linker 1 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 2 所示,所述 Linker 2 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 3 所示。

2. 编码权利要求 1 所述抗 Her2 免疫细胞因子的基因。

3. 含有权利要求 2 所述抗 Her2 免疫细胞因子编码基因的载体。

4. 含有权利要求 2 所述抗 Her2 免疫细胞因子编码基因的细胞系。

5. 含有权利要求 2 所述抗 Her2 免疫细胞因子编码基因的宿主菌。

6. 权利要求 1 所述抗 Her2 免疫细胞因子在制备治疗 Her2 阳性乳腺癌的抗体类药物中的应用。

7. 权利要求 1 所述抗 Her2 免疫细胞因子在制备治疗 Her2 阳性、赫赛汀耐药的乳腺癌的抗体类药物中的应用。

一种抗 Her2 免疫细胞因子及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种抗 Her2 免疫细胞因子及其应用。

背景技术

[0002] 癌症是死亡率最高的疾病之一。我国每年新增癌症病人约 200 万人,其中乳腺癌发病率在我国城区以平均每年递增 4% 的幅度上升。美国每年有 >18 万妇女患乳腺癌,我国的年发病率尚无确切的统计资料,但根据我国巨大的人口数量,年患病人数应远超过美国。

[0003] Her2 是具有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白,属于 I 型生长因子受体家族成员。Her2 在乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胃癌、肺癌等多种上皮细胞来源的恶性肿瘤中过表达,而在正常组织中表达水平很低。因此,Her2 是肿瘤免疫治疗的理想靶分子。自 1998 年美国 FDA 批准抗 Her2 抗体(Herceptin)用于 Her2 过表达乳腺癌患者的临床治疗以来,乳腺癌的分子靶向治疗已取得了较大的成绩,2007 年 Herceptin 的销售额达到约 40 亿美元。从抗体治疗的结果看,单用 Herceptin 作为临床一线用药的有效率为 15-30%,与化疗药物联合应用有效率可增至 50%。但是,并非所有 Her2 高表达的患者可从抗体治疗中受益,其中一半以上的患者对 Herceptin 治疗不敏感,且在用药一年后,较大比例的 Herceptin 治疗有效的患者出现耐药,导致治疗失败。Herceptin 治疗无效及耐药的机制尚不清楚,但研究表明,发展具有不同作用机制的新型靶向 Her2 的药物,将填补现有产品治疗谱的空白,为更多的患者提供新的用药选择。

[0004] 例如,2007 年美国 FDA 批准上市的 Lapatinib 是一种新型靶向 Her2 酪氨酸激酶结构域的小分子药物,其作用机制与 Herceptin 不同。Lapatinib 单独应用的有效率为 28%,但是作为二线药物用于 Herceptin 治疗失败后的患者,有效率仍有 8%,这一结果具有重要的实际意义,为 Herceptin 耐药或治疗失败的患者带来了新的生存希望。专家预测,2010 年 Lapatinib 的年销售额达到 10 亿美元。又如正在进行 III 期临床试验的治疗性抗体 Pertuzumab 是新开发的 Her2 特异性抗体,其作用位点与 Herceptin 不同,可结合于 Her2 二聚化功能域,阻止 Her2 同源二聚体形成及与其他 Her 家族成员形成异源二聚体,从而阻断配体激活的 Her2 信号传导。临床前研究表明,Pertuzumab 对 Her2 低表达的肿瘤亦有抑制作用。Pertuzumab 的上市将为一大批 Her2 低表达、无药可用的患者提供治疗选择的机会。不同作用机制的靶向药物抗肿瘤谱具有互补性。在当前大力倡导循证医学及个体化治疗的实践中,发展新型靶向 Her2 抗肿瘤药物十分必要,将为临床医师和广大患者提供更为合理的用药选择。

[0005] 白介素 2 (IL-2)是免疫反应中的重要介导分子,也是已知最强有力的抗肿瘤细胞因子之一,具有广泛的生物学活性。然而,IL-2 的全身用药常在远离肿瘤部位的循环中产生高浓度,而在肿瘤局部的微环境中却达不到治疗的最佳浓度。由于 IL-2 的全身用药可致致命的副作用,这使 IL-2 的治疗剂量大受限制。如何提高细胞因子在肿瘤局部的有效浓度,增强其抗肿瘤活性,同时避免全身性毒性反应一直是研究者们努力的方向。

[0006] 免疫细胞因子是利用基因工程方法构建的肿瘤特异性抗体与细胞因子的融合蛋

白。其作用机制与其它抗肿瘤靶向性生物技术药物不同。它可利用抗体特异性的靶向功能,将具有抗肿瘤活性的细胞因子携至肿瘤组织局部,以提高肿瘤局部的细胞因子浓度,在靶部位招募、刺激免疫细胞,产生对肿瘤细胞的特异性杀伤,特别对于转移性病灶及微小残留病灶的治疗具有很大的优越性。目前国外已有 2 种免疫细胞因子正在进行 I、II 期临床试验。I 期临床试验的结果表明,免疫细胞因子可诱发机体的免疫激活,治疗剂量仅为 7.5 mg/平方米/天,比普通抗体治疗的用量减少了几十倍!

[0007] 采用基因工程方法,已成功设计、构建含抗 Her2 scFv、人 IgG1 的 Fc 段、IL-2 的融合蛋白(HF)。HF 保留了识别 ErbB-2 抗原的能力及 IL-2 的生物学活性。然而 HF 存在如下缺陷:1、生物学活性低;2、表达水平低,不能用于规模化生产。这些缺陷使 HF 的临床应用受到了很大的限制,急需对 HF 进行分子改造以克服规模化生产的瓶颈,使 HF 能应用于 Her2 阳性的乳腺癌的临床治疗。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种抗 Her2 免疫细胞因子。

[0009] 本发明的目的还在于提供编码上述抗 Her2 免疫细胞因子的基因。

[0010] 本发明的目的还在于提供一种含抗 Her2 免疫细胞因子基因的重组载体。

[0011] 本发明的目的还在于提供了一种表达抗 Her2 免疫细胞因子的细胞系和宿主菌。

[0012] 本发明的目的还在于提供上述抗 Her2 免疫细胞因子在制备治疗 Her2 阳性乳腺癌的抗体类药物中的应用。

[0013] 本发明的目的还在于提供上述抗 Her2 免疫细胞因子在制备治疗 Her2 阳性、Herceptin (赫赛汀)耐药的乳腺癌的抗体类药物中的应用。

[0014] 一种抗 Her2 免疫细胞因子,所述免疫细胞因子包括人 CD16 单克隆抗体重链信号肽、Her2 抗体重链可变区、Linker 1、Her2 抗体轻链可变区、人 IgG1 的 Fc 段、Linker 2 及 IL-2 成熟肽。

[0015] 上述免疫细胞因子的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 1 所示,所述 Linker 1 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 2 所示,所述 Linker 2 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 3 所示。

[0016] 编码上述抗 Her2 免疫细胞因子的基因。

[0017] 含有权利要求 2 所述抗 Her2 免疫细胞因子编码基因的载体,如真核表达载体 pCID。

[0018] 含有权利要求 2 所述抗 Her2 免疫细胞因子编码基因的细胞系,如 CHO/dhfr- 细胞。

[0019] 含有权利要求 2 所述抗 Her2 免疫细胞因子编码基因的宿主菌,如 E. coli JM109。

[0020] 上述抗 Her2 免疫细胞因子在制备治疗 Her2 阳性乳腺癌的抗体类药物中的应用。

[0021] 上述抗 Her2 免疫细胞因子在制备治疗 Her2 阳性、赫赛汀(Herceptin)耐药的乳腺癌的抗体类药物中的应用。

[0022] 本发明的有益效果:1. 本发明的抗 Her2 免疫细胞因子生物学活性及产量明显提高。2. 本发明的抗 Her2 免疫细胞因子可在体内有效抑制 Her2 高表达的肿瘤细胞增殖。3. 本发明的抗 Her2 免疫细胞因子可在体内有效抑制 Herceptin 耐药的乳腺癌细胞增

殖。

附图说明

- [0023] 图 1 为抗 Her2 免疫细胞因子的结构示意图。
- [0024] 图 2 为含抗 Her2 免疫细胞因子的基因载体质粒图。
- [0025] 图 3 为 HFI 与 HF 在工程细胞中的表达量。
- [0026] 图 4 为 HFI 和 HF 蛋白与抗原的结合活性。
- [0027] 图 5 为 HFI 和 HF 蛋白的生物学活性。
- [0028] 图 6 HFI 在体外对高表达 Her2 的乳腺癌细胞增殖的影响。
- [0029] 图 7 HFI 在体内对高表达 Her2 的乳腺癌移植瘤增殖的影响。
- [0030] 图 8 HFI 在体外对 Herceptin 耐药乳腺癌细胞 BT474、MDA-453 和 SKBR3 增殖的影响。
- [0031] 图 9 HFI 在体内对 Herceptin 耐药乳腺癌细胞移植瘤增殖的影响。

具体实施方式

- [0032] 下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步说明。
- [0033] 以下实施例并不限定本发明,实施例中未详细说明的操作步骤为常规实验方法,请参照《分子克隆实验指南》第三版相应部分(J. 萨姆布鲁克 E. F. 弗里奇等,科学出版社)或参阅所用试剂盒的说明书。
- [0034] 以下实施例采用的实验材料来源: E. coli JM109 工程菌株购自天根生物科技有限公司; CHO、BT474、MDA-453、SKBR3、MCF-7 细胞购自 ATCC; T4 DNA 连接酶为 Gibco BRL 公司产品; 限制性内切酶为 Biolab 公司产品; Taq DNA 聚合酶、克隆载体 pGEM-T Easy 为 Promega 公司产品; Ex Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品; 质粒提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒购自 QIAGEN 公司; Protein A 亲和层析介质购自本元正阳公司; 胎牛血清(FCS)、DMEM 培养基、1640 培养基为 HyClone 公司产品; MTX(氨甲喋呤)及 MTT(四噻唑蓝)为 Sigma 公司产品。
- [0035] 实施例 1 抗 Her2 免疫细胞因子基因表达载体的构建
- [0036] 抗 Her2 免疫细胞因子包括人 CD16 单克隆抗体重链信号肽、Her2 抗体重链可变区、Linker 1、Her2 抗体轻链可变区、人 IgG1 的 Fc 段、Linker 2 及 IL-2 成熟肽,其结构如图 1 所示,其是在 HF 融合蛋白的基础上对 Linker 2 进行改进而成,命名为 HFI,其中 Linker 1 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 2 所示, Linker 2 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 3 所示。
- [0037] 以含抗人 CD16 单克隆抗体重链信号肽、抗 Her2 scFv、人 IgG1 的 Fc 段、IL-2 的融合蛋白基因载体 pCID/HF 为模板(载体中融合蛋白的核苷酸序列如序列表中 SEQ ID No. 5 所示),用引物 P1(其核苷酸序列如序列表中 SEQ ID No. 6 所示)和 P2(其核苷酸序列如序列表中 SEQ ID No. 7 所示) PCR 扩增含有编码抗人 CD16 单克隆抗体重链信号肽的基因、Her2 抗体重链可变区的基因、Linker1、Her2 抗体轻链可变区的基因及人抗体 IgG1 的 Fc 基因的片段,条件为: 95℃变性 2 min; 然后 94℃变性 1 min、58℃退火 1 min、72℃延伸 2 min, 进行 30 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。以 NheI 和 XhoI 位点插入表达载体 pCID 中,获得

载体 pCID/ScFv-Fc。

[0038] 用引物 P3(其核苷酸序列如序列表中 SEQ ID No. 8 所示)和 P4 (其核苷酸序列如序列表中 SEQ ID No. 9 所示)PCR 扩增含有编码 N 末端含有优化后的具有优良特性的十肽 Linker2 及 IL-2 成熟肽的基因片段。扩增条件为 :95℃变性 2 min ;然后 94℃变性 1 min、56℃退火 1 min、72℃延伸 1 min,进行 30 个循环 ;最后 72℃延伸 10 min。以 XhoI 和 MluI 位点插入表达载体 pCID/ScFv-Fc 中,获得真核表达载体 pCID/HFI,如图 2 所示。

[0039] 将 pCID/HFI 转化 JM109 感受态菌,筛选阳性克隆、扩增并纯化质粒 DNA,具体步骤为 :

[0040] 1) 100 μl 感受态菌置于冰水,加入 DNA 0.5 μl,静置 30 分钟 ;

[0041] 2) 42℃水浴 2 分钟 ;

[0042] 3) 冰浴 5 分钟 ;

[0043] 4) 加入不含抗生素的 LB 培养基,37℃下,150 rpm 振荡培养 50 分钟。

[0044] 5) 将转化菌接种于含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板,置 37℃孵箱培养过夜。

[0045] 6) 挑选阳性克隆 4 个,分别接种于 LB 液体培养基,置 37℃摇床震荡培养。

[0046] 7) 用试剂盒提取阳性克隆质粒 DNA。

[0047] 用 Nhe I 和 MluI 双酶切鉴定质粒 DNA,得到编码抗 Her2 免疫细胞因子的基因,其核苷酸序列如序列表中 SEQ ID No. 4 所示,经 Invitrogen 公司测序验证。

[0048] 双酶切体系为 : H₂O 18 μl

[0049] Buffer (10×)4 μl

[0050] DNA 16 μl

[0051] Nhe I 1 μl

[0052] Mlu I 0.9 μl。

[0053] 37℃水浴 4 小时。

[0054] 实施例 2 工程细胞株的筛选及 HFI 的表达

[0055] 将 CHO/dhfr- 细胞培养于含 10% FCS、0.1 mol/L 次黄嘌呤、0.016 mol/L 胸腺嘧啶脱氧核苷的 IMDM 培养基。按照 Lipofectamine 试剂说明书将重组载体 PCI/HFI 转染 CHO/dhfr- 细胞。转染细胞培养 48 h 后,采用夹心 ELISA 法检测免疫细胞因子的瞬时表达,方法同前。

[0056] 采用有限稀释法对转染的细胞进行克隆化培养,培养基为含 10% 透析 FCS、10⁻⁶ M MTX 的 DMEM 培养基。筛选过程中,在不同时间点,采用夹心 ELISA 法检测各细胞克隆的抗体表达水平。具体过程如下 :用羊抗人 IgG (2 μg/ml)包被 96 孔板,4℃过夜。用 2% 牛血清白蛋白封闭 1h 后,加入转染的 CHO 细胞培养上清,37℃温育 1h。洗涤 5 次后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (1 :5000 稀释),37℃温育 1h。洗涤 5 次后用 OPD 显色,测定 OD₄₉₀。高表达克隆在含 MTX 选择性培养基中继续传代,并采用夹心 ELISA 法检测,筛选出最高表达克隆,作为工程细胞株。

[0057] 将 HFI 工程细胞与 HF 工程细胞均以 5×10⁶ 接种于底面积为 150 cm² 的培养瓶中,在相同培养条件下(30℃、5% CO₂),培养 6 天。

[0058] 收获培养上清,通过夹心 ELISA 法检测上清中目的蛋白的含量,结果表明(如图 3A 所示)HFI 培养上清中目的蛋白的含量为 0.30 mg/ml, HF 培养上清中目的蛋白含量为

0.19mg/ml.

[0059] 收获培养上清,取 5 μ l HF1 与 HF 培养上清通过免疫印记法检测其目的蛋白含量,结果表明(如图 3B 所示)HF1 培养上清中目的蛋白含量为 0.28 mg/ml, HF 培养上清中蛋白含量为 0.18 mg/ml。

[0060] 结果表明,经优化后的抗 Her2 免疫细胞因子(HFI)较 HF 在 CHO 细胞中具有更高的产量(**, $p < 0.01$)。取培养上清通过 protein A 亲和层析纯化,将纯化后的样品和培养上清通过 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色后分析。结果表明 HF1 的纯度大于 90%。

[0061] 实施例 3 HF1 与 HF 抗原结合活性和生物活性检测实验

[0062] 收集 1×10^6 个 SKBR3 细胞,经 PBS 缓冲液洗涤后,加入不同浓度的纯化后的 HF1 及 HF,冰浴震荡孵育 30 min,用 PBS 洗 3 次,加入 FITC 标记的羊抗人 IgG,冰浴下震荡孵育 30 min,用 PBS 洗 3 次,上流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)分析,以未与转染细胞培养上清孵育的细胞作为阴性对照。

[0063] 将培养的 CTLL-2 细胞用 1640 培养基洗 3 次,计数后,以 3×10^4 /孔接种于 96 孔板,同时加入纯化后的 HF1 及 HF,以倍比稀释的 IL-2 标准品作为阳性对照。培养 18 h 后,加入 10 μ l MTT (5 mg/ml),继续培养 4 h。以 10% SDS-0.01 mol/L HCl 裂解细胞,测 A490 值。

[0064] 结果表明(如图 4 所示),HF1 的抗原结合活性略高于 HF (*, $p < 0.05$),HF1 的生物学活性显著高于 HF (如图 5 所示; **, $p < 0.01$)。

[0065] 实施例 4 HF1 在制备杀伤 Her2 高表达乳腺癌细胞的药物方面的应用

[0066] 1、体外抑制高表达 Her2 的乳腺癌细胞增殖

[0067] MCF-7 细胞及 MCF-7/Her2 (高表达 Her2 的 MCF-7 细胞)以 3×10^3 /孔接种 96 孔板,同时加入纯化后的 HF1 (10 μ g/ml,图 6B),以商品化 Herceptin (20 μ g/ml,图 6A)作为对照药物。培养 96 h 后加入 10 μ l MTT (5 mg/ml),继续培养 4 h。以 10%SDS-0.01 mol/L HCl 裂解细胞,测 A490 值。

[0068] 结果如图 6 所示,HF1 能在体外特异性抑制高表达 Her2 的乳腺癌细胞 MCF-7/Her2 细胞的增殖(**, $p < 0.01$),而 HF1 对低表达 Her2 的 MCF-7 细胞的增殖无显著影响。

[0069] 2、体内抑制高表达 Her2 的乳腺癌细胞增殖

[0070] 4 周龄裸鼠,背部皮下植入雌激素缓释药片。次日,将对数生长期 BT474 细胞按 1×10^7 /只接种于裸鼠右腋皮下。将实验动物随机为 3 组,6 只/组。移植瘤接种后第 5 天开始给药。对照组(control):生理盐水,0.1 ml/次/只,每周两次;Herceptin 组:商品化 Herceptin,按照 3 mg/kg/次/只,注射体积为 0.1 ml,每周两次;HF1 组:HF1 纯化样品,按照 0.5 mg/kg/次/只,注射体积为 0.1 ml,每周两次。从移植瘤接种开始,每两天测量移植瘤体积,计算公式为:移植瘤体积 = 长径 \times 短径²/2。

[0071] 结果表明,HF1 能在裸鼠体内有效抑制移植瘤的生长,其疗效与 Herceptin 治疗组相似(如图 7 所示)。

[0072] 实施例 5 HF1 在制备抗 Herceptin 耐药乳腺癌细胞增殖的药物方面的应用

[0073] 1、HF1 体外抑制 Herceptin 耐药乳腺癌细胞的增殖

[0074] 采用在培养体系中逐步提高 Herceptin 浓度的筛选方法,对高表达 Her2 的乳腺癌细胞 BT474、MDA-453 和 SKBR3 细胞进行驯化。经过 6 个月的筛选获得了三株 Herceptin 耐

药的细胞株(BT474-Herceptin、MDA-453- Herceptin 和 SKBR3- Herceptin)。

[0075] 将上述三种 Herceptin 耐药细胞以 3×10^3 /孔接种 96 孔板,同时加入纯化后的 HFI (5 μ g/ml),以商品化 Herceptin (5 μ g/ml)作为对照。培养 96 h 后加入 10 μ l MTT (5 mg/ml),继续培养 4 h。以 10%SDS-0.01 mol/L HCl 裂解细胞,测 A490 值。

[0076] 结果如图 8 所示,Herceptin 对 3 种耐药细胞的增殖无显著影响,而 HFI 在体外对耐药乳腺癌细胞 BT474、MDA-453 和 SKBR3 的增殖具有显著的抑制作用(**, $p < 0.01$)。

[0077] 2、HFI 体内抑制 Herceptin 耐药乳腺癌细胞的增殖

[0078] 4 周龄裸鼠,背部皮下植入雌激素缓释药片。次日,将对数生长期 BT474-Herceptin 耐药细胞按 1×10^7 /只接种于裸鼠右腋皮下。将实验动物随机为 3 组,6 只/组。移植瘤接种后第 5 天开始给药。对照组:生理盐水,0.1 ml/次/只,每周两次;Herceptin 组:商品化 Herceptin,按照 3 mg/kg/次/只,注射体积为 0.1 ml,每周两次;HFI 组:HFI 纯化样品,按照 0.5 mg/kg/次/只,注射体积为 0.1 ml,每周两次。从移植瘤接种开始,每两天测量移植瘤体积,计算公式为:移植瘤体积 = 长径 \times 短径²/2。

[0079] 结果表明,HFI 在体内对乳腺癌耐药细胞株 BT474 移植瘤的增殖具有较强的抑制作用(如图 9 所示)。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所

<120> 一种抗 Her2 免疫细胞因子及其应用

<130> 1111

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 608

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr

 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe

 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys

 85 90 95

Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe

 130 135 140

[0002]

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

[0003]

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp				
385	390	395		400
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val				
	405	410		415
Leu Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp				
	420	425		430
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His				
	435	440		445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro				
	450	455		460
Gly Lys Leu Glu Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ala Met Ala Pro				
465	470	475		480
Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu				
	485	490		495
Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro				
	500	505		510
Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala				
	515	520		525
Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu				
	530	535		540
Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro				
545	550	555		560
Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly				
	565	570		575
Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile				
	580	585		590
Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser				
	595	600		605
<210>	2			

[0004]

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ala Met
 1 5 10

<210> 4
 <211> 1769
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

gggtatcctt tcacaaacta tggaatgaac tgggtgaage aggctccagg acagggttta 60
 aagtggatgg gctggattaa cacctccact ggagagfcaa catttgctga tgacttcaag 120
 ggacggtttg acttctcttt ggaaacctct gccaacactg cctatttga gatcaacaac 180
 ctcaaaagtg aagacatggc tacatatttc tgtgcaagat gggaggttta ccacggctac 240
 gtctcttact ggggccaaagg gaccacggtc accgtttcct ctggcggtgg cggttctggt 300
 ggcgggtggt ccggcggtgg cggttctgac atccagctga cccagtctca caaattctg 360
 tccactttag taggagacag ggtcagcacc acctgcaagg ccagtcagga tgtgtataat 420
 gctgttgctt ggtatcaaca gaaaccagga caatctccta aacttctgat ttactcggca 480
 tcttccgggt aactggagt ccttctcgc ttaactggca gtggctctgg gccggatttc 540
 acttccacca tcagcagtgt gcaggctgaa gacctggcag ttatttctg tcagcaacat 600

[0005]

tttctactc cattcacgtt cggctcgggg acaaaattgg agatcaaaga attcacatgc	660
ccaccgtgcc cagcacctga actectgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa	720
cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggta catgcgtgtg ggtggacgtg	780
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagtgg acggcgtgga ggtgcataat	840
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtgtg cagcgtctc	900
accgtctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgaaggt ctccaacaaa	960
gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tcaaagcca aaggcagcc cegagaacca	1020
caggtgtaca cctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc	1080
tgcttgta aaggettta tccagcgac atcgccgtg agtgggagag caatggcgag	1140
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact cggacggccc ctctctctc	1200
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctc	1260
gtgatgatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt	1320
aaactcgagg ccgcaggcgg tggcggttct accgcgatgg cacctactc aagtctaca	1380
aagaaaacac agctacaact ggagcattta ctgctggatt tacagatgat ttgaaatgga	1440
attaataatt acaagaatcc caaactcacc aggatgctca catttaagt ttacatgcc	1500
aagaaggcca cagaactgaa acatctcag tgctagaag aagaactcaa acctctggag	1560
gaagtgctaa attagctca aagcaaaaac ttcacttaa gaccagga ctaatcagc	1620
aatatcaacg taatagtct ggaactaaag ggatctgaaa caacattcat gtgtgaatat	1680
gctgatgaga cagcaacct ttagaatt ctgaacagat ggattacct ttgtcaaagc	1740
atcatctcaa cactgactta gaaacgct	1769

<210> 5

<211> 1757

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gggtatcctt tcacaaacta tggaatgaac tgggtgaagc aggtccagg acagggttta	60
aagtggatgg gctggattaa cacctccact ggagagtaa catttctga tgactcaag	120
ggacggttg acttctctt gaaacctct gccaacctg cctatttga gatcaaac	180

[0006]

ctcaaaagtg aagacatggc tacatattc tgtgcaagat gggagggtta ccacggctac	240
gttccttact ggggccaagg gaccaeggic accgtttcct ctggcgggtgg cggttctggt	300
ggcgggtggct ccggcgggtgg cggttctgac atccagctga cccagctca caaattctcg	360
tccaattcag taggagacag ggtcagcadc acctgcaagg ccagtcagga tgtgtataat	420
gctgttgccct ggtatcaaca gaaaccagga caatctccta aacttctgat ttactcggca	480
tcctcccggg aactggagt cccctctcgc ttaactggca gtggctctgg gccggatttc	540
actticacca tcagcagtggt gcaggctgaa gacctggcag ttattttctg tcagcaacat	600
ttctgtactc cattcacgtt cggctcgggg acaaaattgg agatcaaaga attcacatgc	660
ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa	720
ccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggtea catgcgtggt ggtggacgtg	780
agccacgaag acctgaggt caagtcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	840
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctctc	900
accgtctctc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgaagggt ctccaacaaa	960
gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tcaaagcca aagggcagcc ccgagaacca	1020
caggtgtaca cctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc	1080
tgcttgtea aaggttcta tcccagcagc atgacctgg agtgggagag caatgggcag	1140
ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgtggact ccgacggccc ctctctctc	1200
tacagcaagc tcacctgga caagacagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1260
gtgatcatg aggcctctca caaccactac accgagaaga gcctctcct gtctccgggt	1320
aaactcgagg gagggctcgg caccatggca cctactcaa gttctacaaa gaaaacacag	1380
ctacaactgg agcatttact gctggattta cagatgattt tgaatggaat taataattac	1440
aagaatccca aactcaccag gatgctcaca tttaaagttt acatgcccaa gaaggccaca	1500
gaactgaaac atctcagtg tctagaagaa gaactcaaac ctctggagga agtgcataat	1560
ttagctcaa gcaaaaactt tacttaaga cccagggact taatcagcaa tatcaacgta	1620
atagttctgg aactaaagg atctgaaaca acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca	1680
gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg attaccttt gtcaaagcat catctcaaca	1740
ctgacttaga	aacgcgt

1757

<210> 6

[0007]

<211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> P1
 <400> 6
 ctagctagcg ccaccatgga gacagacaca ctcc 34

<210> 7
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> P2
 <400> 7
 ccgctcgagt ttaccggag acagggagag gc 32

<210> 8
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> P3
 <400> 8
 ccgctcgagg ccgcaggcgg tggcggttct accgcgatgg cacctacttc aagtct 57

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

[0008]

<220>

<223> P4

<400> 9

cgacgcgtac gcgtttctaa gtcagtgttg

30



图 1

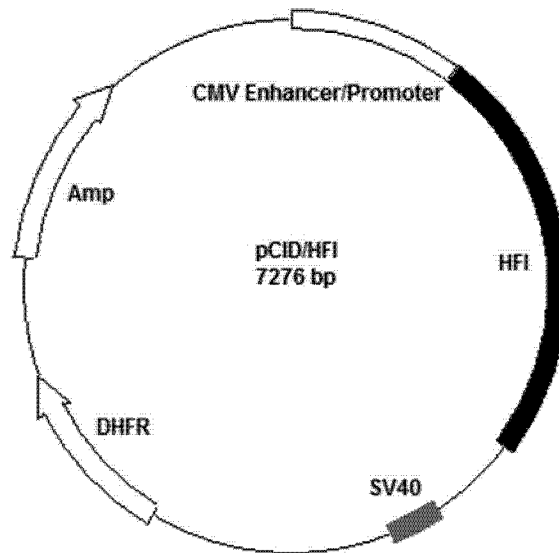


图 2

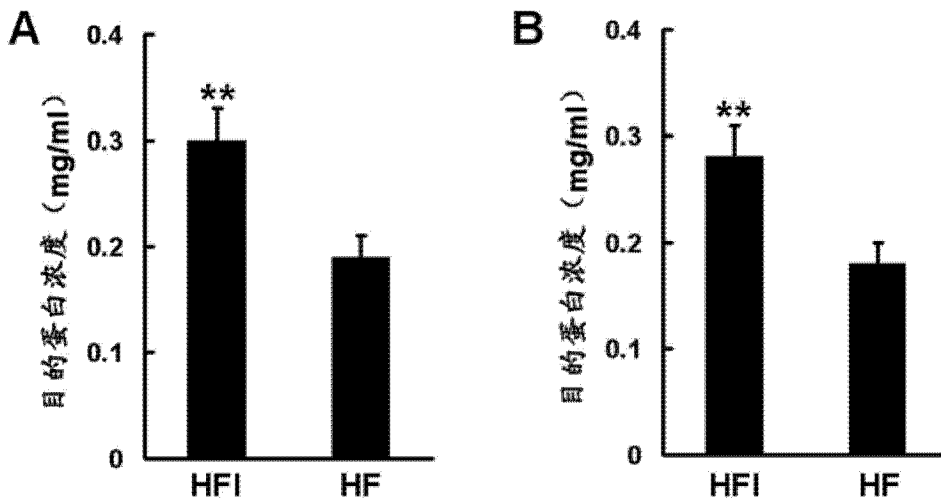


图 3

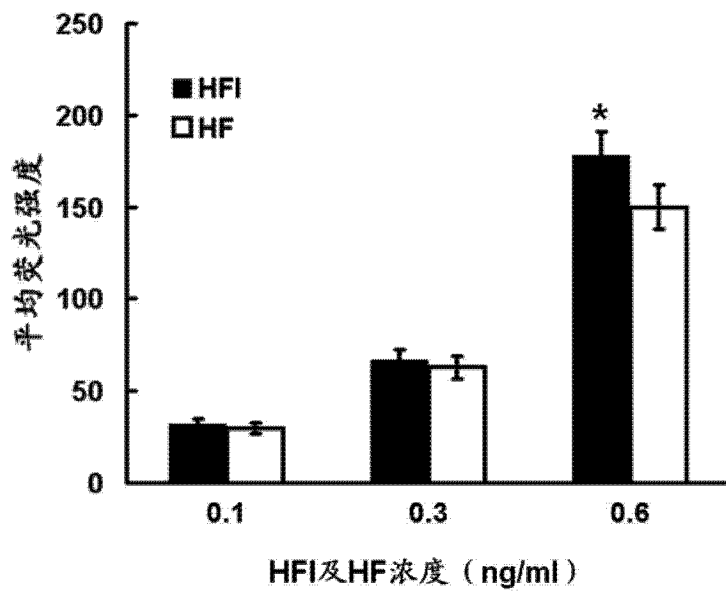


图 4

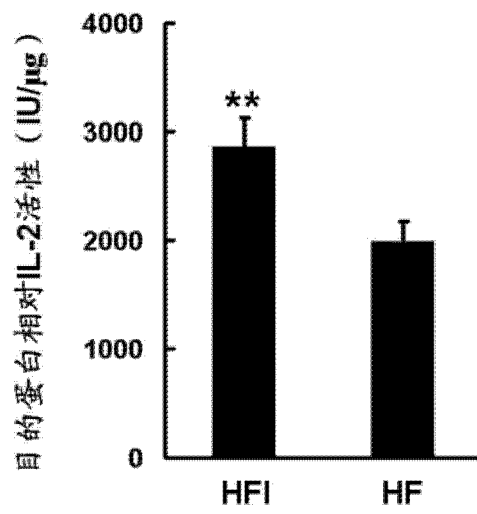


图 5

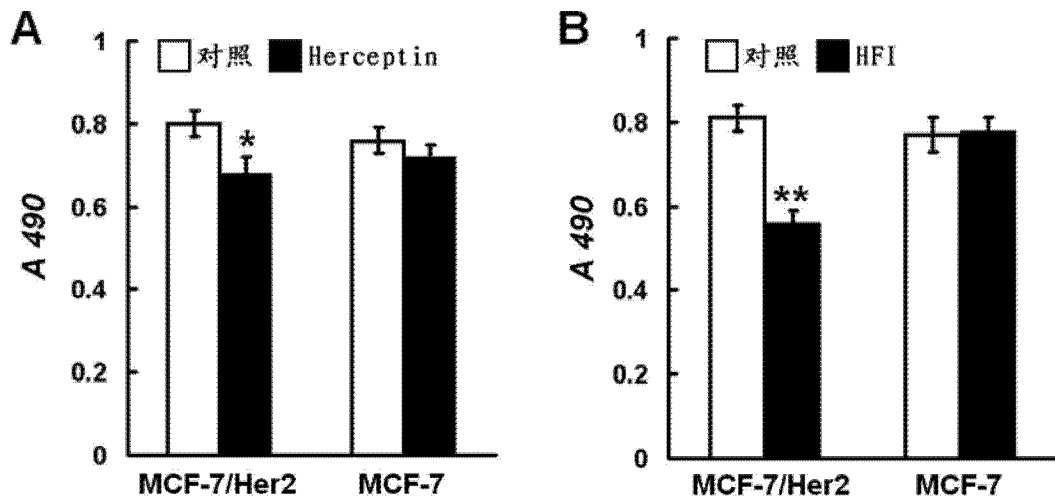


图 6

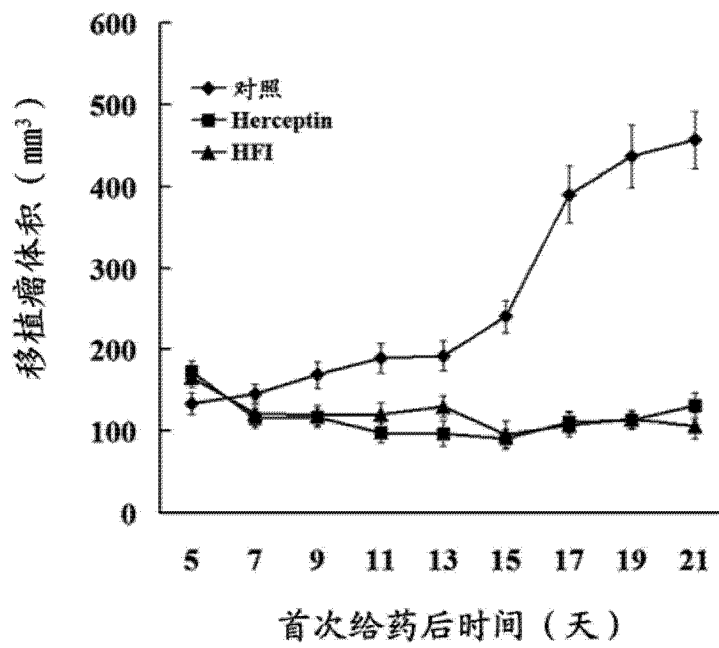


图 7

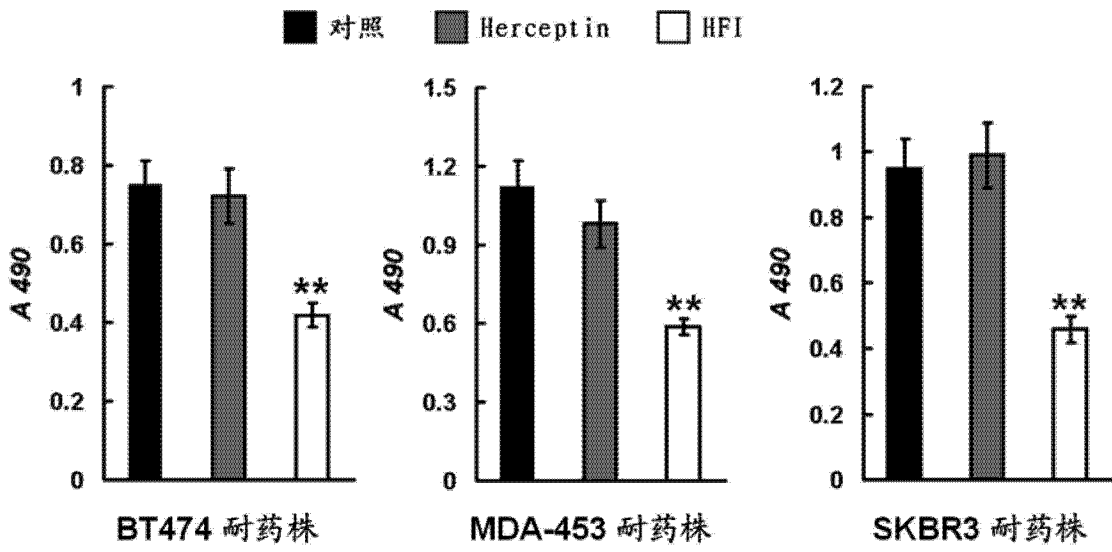


图 8

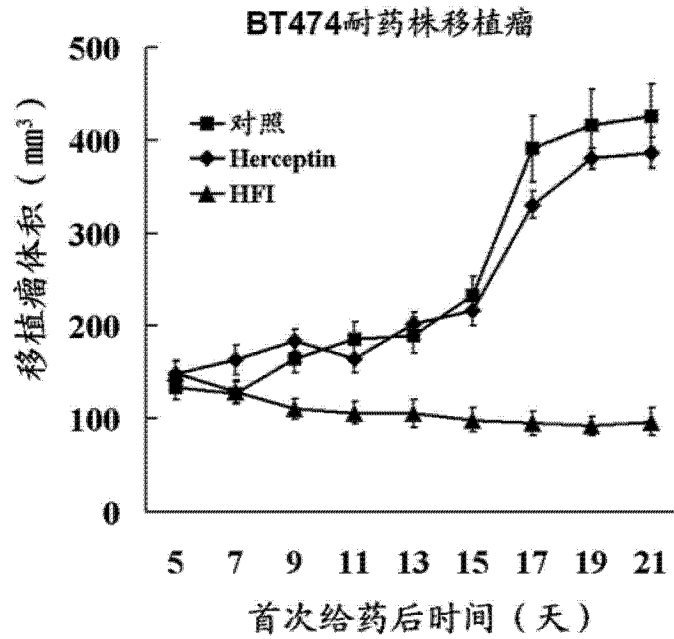


图 9