(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 111971297 A
(43)申请公布日 2020.11.20

(21)申请号 201980024102.8

(22)申请日 2019.05.15

(30)优先权数据
10-2018-0055909 2018.05.16 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/005853 2019.05.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/221516 KO 2019.11.21

(71)申请人 韩国亿诺生物有限公司
地址 韩国京畿道

(72)发明人 尹京婉 许允景 全富男 孙珍英 金允渊 李洙鲁 郑朱然 郑阿姆

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 刘振佳

(51)Int.Cl.
C07K 14/705(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)

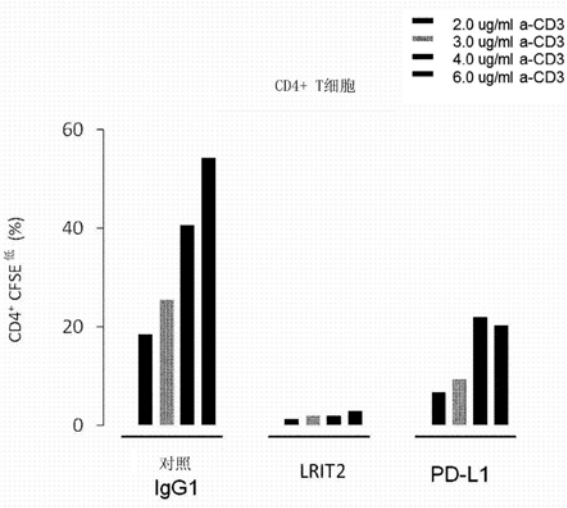
权利要求书1页 说明书7页
序列表6页 附图16页

(54)发明名称

包含LRIT2抑制剂作为活性成分用于预防或治疗癌症的药物组合物

(57)摘要

本发明涉及用于预防或治疗癌症的药物组合物，其包含LRIT2抑制剂作为活性成分。根据本发明的LRIT2抑制剂可提高免疫细胞的活性，并因此可用作免疫增强剂。另外，根据本发明的LRIT2抑制剂可通过增强个体的免疫力来有效地预防或治疗癌症。



CN 111971297 A

1.免疫增强剂,其包含以下作为活性成分:

与含富含亮氨酸重复序列、免疫球蛋白样结构域和跨膜结构域的蛋白2(LRIT2)蛋白结合的物质;或

抑制LRIT2基因表达的物质。

2.权利要求1所述的免疫增强剂,其中所述与LRIT2蛋白结合的物质是与所述LRIT2蛋白特异性结合的化合物、适配体、肽,或者抗体或其片段。

3.权利要求2所述的免疫增强剂,其中所述LRIT2蛋白具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

4.权利要求2所述的免疫增强剂,其中所述抗体或其片段是选自单克隆抗体、scFv、Fab、Fab'和F(ab)'中的任一种。

5.权利要求1所述的免疫增强剂,其中所述抑制LRIT2基因表达的物质是与所述LRIT2基因的DNA或mRNA互补结合的反义核酸、siRNA、shRNA、miRNA或核酶。

6.权利要求5所述的免疫增强剂,其中所述LRIT2基因的DNA具有SEQ ID NO:2的核苷酸序列。

7.权利要求5所述的免疫增强剂,其中所述siRNA是SEQ ID NO:3至14的核苷酸序列中的任一个。

8.用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含以下作为活性成分:

与LRIT2蛋白结合的物质;或

抑制LRIT2基因表达的物质。

9.权利要求8所述的药物组合物,其中所述与LRIT2蛋白结合的物质是与所述LRIT2蛋白特异性结合的化合物、适配体、肽,或者抗体或其片段。

10.权利要求9所述的药物组合物,其中所述LRIT2蛋白具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

11.权利要求9所述的药物组合物,其中所述抗体或其片段是选自单克隆抗体、scFv、Fab、Fab'和F(ab)'中的任一种。

12.权利要求8所述的药物组合物,其中所述抑制LRIT2基因表达的物质是与所述LRIT2基因的DNA或mRNA互补结合的反义核酸、siRNA、shRNA、miRNA或核酶。

13.权利要求12所述的药物组合物,其中所述LRIT2基因的DNA具有SEQ ID NO:2的核苷酸序列。

14.权利要求12所述的药物组合物,其中所述siRNA是SEQ ID NO:3至14的核苷酸序列中的任一个。

15.权利要求8所述的药物组合物,其中所述癌症是选自以下的任一种:膀胱癌、骨癌、血癌、乳腺癌、黑素瘤、甲状腺癌、甲状旁腺癌、骨髓癌、直肠癌、咽喉癌、喉癌、肺癌、食管癌、胰腺癌、结直肠癌、胃癌、舌癌、皮肤癌、脑肿瘤、子宫癌、头颈癌、胆囊癌、口腔癌、结肠癌、肛周癌、中枢神经系统肿瘤和肝癌。

16.用于治疗癌症的方法,其包括:

向个体施用权利要求8至15中任一项所述的药物组合物的步骤。

包含LRIT2抑制剂作为活性成分用于预防或治疗癌症的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含LRIT2抑制剂作为活性成分。

背景技术

[0002] T细胞是在人体免疫中发挥重要作用的细胞。T细胞分为杀伤T细胞、辅助性T细胞、调节性T细胞和记忆T细胞。特别地,杀伤T细胞在细胞表面上表达CD8;辅助性T细胞在细胞表面上表达CD4;并且调节性T细胞在细胞表面上表达CD4和CD25。

[0003] 当抗原(例如细菌)从外部进入时,辅助性T细胞分泌物质(例如细胞因子)以使杀伤T细胞和B细胞活化。活化的杀伤T细胞杀伤病原体感染的细胞,并且活化的B细胞分泌抗体以抑制抗原的活性。近来,已尝试通过激活T细胞的这样的免疫调节能力来治疗疾病例如癌症。

[0004] 另外,T细胞介导的疾病被认为是代表多种免疫系统疾病的疾病。特别地,T细胞被认为引起自身免疫病并使其持续。针对自身抗原的免疫应答是由自身反应性T细胞的连续性或周期性活化引起的。另外,作为在自身免疫病中被直接或间接地鉴定的特征性组织损伤和组织破坏的原因,自身反应性T细胞引起了人们的注意。

[0005] 同时,程序性细胞死亡配体1(programmed cell death ligand 1,PD-L1)是1型跨膜蛋白,其是程序性细胞死亡1(programmed cell death-1,PD-1)的配体。PD-L1在造血细胞例如T淋巴细胞、B淋巴细胞、树突细胞或巨噬细胞中表达。PD-1被称为免疫检查点(immune check point)因子或免疫调节剂,其调节T细胞的次级信号传导活性。另外,已报道PD-1能够通过与在细胞(例如活化的T细胞或树突细胞)的表面上表达的PD-L1等结合来发挥作用,以抑制T细胞的功能,例如抑制T细胞的增殖和降低细胞因子的表达(Krzysztof M.Zak,et al.,2015)。

[0006] 近来,已尝试使用调节T细胞免疫功能的物质(例如PD-1和PD-L1)来开发抗癌剂和免疫调节剂。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 因此,在研究能够抑制或提高免疫细胞活性的物质的过程中,本发明人已确定LRIT2细胞信号传导系统可调节T细胞的活性,并由此完成了本发明。

[0009] 问题的解决方案

[0010] 在一个实施方案中,提供了免疫增强剂,其包含与LRIT2蛋白结合的物质或抑制LRIT2基因表达的物质作为活性成分。

[0011] 另外,在一个实施方案中,提供了用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含与LRIT2蛋白结合的物质或抑制LRIT2基因表达的物质作为活性成分。

[0012] 另外,在一个实施方案中,提供了用于治疗癌症的方法,其包括向个体施用药物组合物的步骤。

[0013] 本发明的有益效果

[0014] 根据本发明的LRIT2抑制剂可提高免疫细胞的活性,并因此可用作免疫增强剂。另外,根据本发明的LRIT2抑制剂可增强个体的免疫力,并因此可用于有效地预防或治疗癌症。

附图说明

[0015] 图1示出了LRIT2抑制T细胞成熟为CD4+ T细胞。

[0016] 图2示出了LRIT2抑制T细胞成熟为CD8+ T细胞。

[0017] 图3a至3d示出了在其中用LRIT2抑制剂(抗体或siRNA)处理肺癌细胞系A549和外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)的情况下获得的每组PBMC的细胞毒性(%)。

[0018] 图4a至4d示出了在其中用LRIT2抑制剂(抗体或siRNA)处理结肠癌细胞系HCT-116和PBMC的情况下获得的每组PBMC的细胞毒性(%)。

[0019] 图5a至5d示出了在其中用LRIT2抑制剂(抗体或siRNA)处理乳腺癌细胞系MDA-MB-231和PBMC的情况下获得的每组PBMC的细胞毒性(%)。

[0020] 图6a至6d示出了在其中用LRIT2抑制剂(抗体或siRNA)处理胃癌细胞系MKN-74和PBMC的情况下获得的每组PBMC的细胞毒性(%)。

[0021] 图7a至7d示出了在其中用LRIT2抑制剂(抗体或siRNA)处理血癌细胞系U937和PBMC的情况下获得的每组PBMC的细胞毒性(%)。

[0022] 图8a至8d示出了每组用LRIT2抑制剂(3种类型的siRNA中的每一种)处理的小鼠中肿瘤尺寸的变化。

[0023] 本发明的最佳实施方式

[0024] 在一个实施方案中,提供了免疫增强剂,其包含与含富含亮氨酸重复序列、免疫球蛋白样结构域和跨膜结构域的蛋白2(leucine-rich repeat,immunoglobulin-like domain and transmembrane domain-containing protein 2,LRIT2)蛋白结合的物质或抑制LRIT2基因表达的物质作为活性成分。

[0025] 本文中使用的术语“LRIT2”是“含富含亮氨酸重复序列、免疫球蛋白样结构域和跨膜结构域的蛋白2”的缩写,并且可以是具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质。具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质可由具有SEQ ID NO:2的核苷酸序列的多核苷酸编码。

[0026] 在本发明中,与LRIT2蛋白结合的物质可以是与LRIT2蛋白特异性结合的化合物、适配体(aptamer)、肽,或者抗体或其片段。抗体或其片段可以是选自单克隆抗体、scFv、Fab、Fab’和F(ab)’中的任一种。

[0027] 在本发明中,抑制LRIT2基因表达的物质可以是与LRIT2基因的DNA或mRNA互补结合的反义核酸、siRNA、shRNA、miRNA或核酶。LRIT2 siRNA可以是SEQ ID NO:3至14的核苷酸序列中的任一个。

[0028] 在本发明的一个实施方案中,旨在确定靶向LRIT2并抑制其活性的抗LRIT2抗体或LRIT2 siRNA是否可提高外周血单个核细胞(PBMC)针对癌细胞的细胞毒性。作为结果,在用

LRIT2抑制剂进行处理的PBMC与癌细胞系的混合物中，与对照组相比，PBMC针对癌细胞系的细胞毒性表现出更高的水平。另外，在本发明的另一个实施方案中，旨在确定抑制LRIT2活性的LRIT2 siRNA是否在小鼠中抑制肿瘤的生长。作为结果，在其中通过用LRIT2 siRNA进行处理将LRIT2敲低的小鼠中，与对照组相比，表现出显著抑制的肿瘤生长速率。从以上结果可以看出，靶向LRIT2并抑制其活性的抗LRIT2抗体或LRIT2 siRNA阻断或敲低LRIT2并抑制其活性或表达，以使得延迟癌症的进展或使其停止。

[0029] 另外，在一个实施方案中，提供了用于预防或治疗癌症的药物组合物，其包含与LRIT2蛋白结合的物质或抑制LRIT2基因表达的物质作为活性成分。

[0030] 与LRIT2蛋白结合的物质或抑制LRIT2基因表达的物质如上所述。药物组合物可还包含可药用添加剂。

[0031] 在本发明中，癌症可以是但不限于选自以下的任一种：膀胱癌、骨癌、血癌、乳腺癌、黑素瘤、甲状腺癌、甲状旁腺癌、骨髓癌、直肠癌、咽喉癌、喉癌、肺癌、食管癌、胰腺癌、结直肠癌、胃癌、舌癌、皮肤癌、脑肿瘤、子宫癌、头颈癌、胆囊癌、口腔癌、结肠癌、肛周癌、中枢神经系统肿瘤和肝癌。

[0032] 根据本发明的包含与LRIT2蛋白结合的物质或抑制LRIT2基因表达的物质作为活性成分用于预防或治疗癌症的药物组合物的优选的日剂量可以为0.01μg/kg至10g/kg，并且优选0.01mg/kg至1g/kg，这取决于患者的状况、体重、性别、年龄、疾病的严重程度和施用途径。施用可一天一次或数次进行。

[0033] 另外，在一个实施方案中，提供了用于治疗癌症的方法，其包括向个体施用用于预防或治疗癌症的药物组合物的步骤，所述药物组合物包含与LRIT2蛋白结合的物质或抑制LRIT2基因表达的物质作为活性成分。

[0034] 施用途径可以是但不限于选自以下的任一种：静脉内、肌内、皮内、皮下、腹膜内、小动脉内、心室内、病灶内、鞘内、表面，及其组合。

具体实施方式

[0035] 在下文中，将通过以下实施例更详细地描述本发明。然而，以下实施例仅旨在举例说明本发明，并且本发明的范围不限于此。

[0036] 制备实施例1.缓冲液的制备

[0037] 实施例中使用的缓冲液如下制备：

[0038] 通过将155mM氯化钠、2.96mM磷酸钠溶液与1.05mM磷酸钾溶液(pH 7.4)混合来制备1X PBS(Thermo Fisher gibco#10010)。

[0039] 通过将1X PBS(Thermo Fisher gibco#10010)、10ml的2％FBS(Thermo fisher gibco#16000-044)与1ml的1mM EDTA(Fisher 15575020)混合来制备FACS缓冲液。

[0040] 通过将10X RBC溶液(Biolegend#420301)在三次蒸馏水中以1:10进行稀释来制备1X RBC裂解缓冲液。

[0041] 通过将RPMI培养基(Cellgrow#10-040-CVR)、50ml的10％FBS(Thermo fisher gibco#16000-044)、5ml的1％抗生素(Thermo fisher gibco#15140-122)与0.5ml的2-巯基乙醇(Thermo fisher gibco#21985-023)混合来制备10％FBS RPMI1640。

[0042] 通过将1X PBS(Thermo Fisher gibco#10010)、0.5％牛血清白蛋白(bovine

serum albumin,BSA)(Millipore#82-100-6)与2ml的2mM EDTA(Fisher 15575020)混合来制备MACS缓冲液。

[0043] 实施例1.LRIT2蛋白对T细胞的增殖和活性的抑制作用的确定

[0044] 在本实施例中,旨在确定LRIT2蛋白是否抑制T细胞的增殖和活性并从而导致癌细胞避开T细胞介导的免疫系统。

[0045] 实施例1.1.CD4+ T细胞和CD8+ T细胞的制备

[0046] 收集人血液并将其置于涂覆有EDTA(或肝素)的10mL管中。将人血液与PBS以1:1的比例混合。然后,将Ficoll-Paque PLUS置于50mL管中,并向其添加上述血液样品。在离心之后,收集人PBMC。将所收集的产物进行离心以去除上清液。随后,向其添加RBC裂解(1×)缓冲液,进行移液,并随后将所得物在冰上保持3分钟。随后,向其添加50ml的10%FBS RPMI1640,并将混合物进行离心以去除上清液。然后,向其添加FACS缓冲液并进行离心以去除上清液。此后,向其添加50ml的MACS缓冲液(包含0.5%BSA和2mM EDTA的PBS),对细胞的数目进行计数,并进行离心以去除上清液。

[0047] 使用40μl的MACS缓冲液/1×10^7个细胞将CD4+ T细胞和CD8+ T细胞重悬。将抗CD4和抗CD8生物素抗体中的每一种的10μl置于管中,并随后将管在冷冻器中保持5分钟。此后,向所得产物添加30μl的MACS缓冲液/1×10^7个细胞。向其添加20μl的抗生物素微珠添加并进行混合。随后,使用LS柱对CD4+ T细胞和CD8+ T细胞进行分离,并对各细胞的数目进行计数。

[0048] 将所制备的CD4+ T细胞和CD8+ T细胞中的每一种与1μl的羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein succinimidyl ester,CFSE)/2×10^6个细胞进行混合,并将每种混合物在37℃下保持3分钟。然后,向包含CD4+ T细胞和CD8+ T细胞中的每一种的每个管添加FBS,并将每个管在冰上保持10分钟。此后,进行离心以去除上清液。向所得产物添加30ml的FACS缓冲液,并随后进行移液。进行离心以去除上清液。然后,向其添加10%FBS RPMI1640,并随后进行移液。进行离心以去除上清液。此后,将所得产物与10ml的10%FBS RPMI1640混合,并随后对细胞的数目进行计数。

[0049] 实施例1.2.由LRIT2蛋白引起的T细胞活性受到抑制的确定

[0050] 重组人IgG1蛋白(目录号110-HG)和重组人PD-L1/B7-H1蛋白(目录号156-B7)购自R&D Systems。另外,重组人LRIT2蛋白(目录号8388-LR-050)购自Sino Biological Inc。

[0051] 将10μg/ml的每种蛋白质分别与2μg/ml、3μg/ml、4μg/ml和6μg/ml的抗CD3抗体(BioLegend,目录号317325)混合。使用每种混合物在4℃下包被96孔板,并用PBS进行洗涤3次。将在实施例1.1中制备的CD4+ T细胞和CD8+ T细胞中的每一种以200μl以2×10^6个细胞/96孔板的每个孔的量添加,并进行孵育。使用抗CD3抗体活化CD4+ T细胞和CD8+ T细胞72小时。在此,可通过CFSE染色的水平来确定CD4+ T细胞和CD8+ T细胞的增殖,并使用FACSDiVa软件(BD Biosciences)通过流式细胞术对其进行分析。结果示于图1和2中。

[0052] 图1和图2是分别表示通过流式细胞术测量的CD4+ T细胞和CD8+ T细胞的增殖率(%)的条形图。如图1和2中所示,在用PD-L1处理的对照组中,与用IgG1处理的对照组相比,CD4+ T细胞和CD8+ T细胞二者的增殖均受到抑制。

[0053] 另外,在用LRIT2处理的组中,与用IgG1处理的对照组相比,CD4+ T细胞和CD8+ T细胞的增殖受到显著抑制,并且以与用PD-L1处理的对照组相似的水平抑制CD4+ T细胞和

CD8+ T细胞的增殖。从这些结果中，可以看出由于LRIT2的阻断或敲低而引起的LRIT2的中和降低了LRIT2对T细胞增殖的抑制能力，并因此使得能够有效治疗癌症。

[0054] 实施例2.PBMC细胞毒性测定

[0055] 在本实施例中，旨在确定在其中使用LRIT2抑制剂对LRIT2进行中和的情况下PBMC是否能够提高针对癌细胞的细胞毒性(杀伤能力)。

[0056] 实施例2.1.PBMC的制备

[0057] 收集人血液并将其置于涂覆有EDTA(或肝素)的10mL管中。将人血液与PBS以1:1的比例混合。然后，将Ficoll-Paque PLUS置于50mL管中，并向其添加上述血液样品。在离心之后，收集人PBMC。

[0058] 使用1.0μg/ml的抗CD3抗体(BioLegend，目录号317325)在4℃下包被96孔板。将96孔板的每个孔用PBS洗涤3次，然后添加PBMC。将先前获得的PBMC与10％FBS RPMI1640混合，并以100μl以6×10^5个细胞/96孔板的每个孔的量添加。通过抗CD3抗体活化PBMC 72小时。

[0059] 实施例2.2.癌细胞的制备

[0060] 将肺癌细胞系A549(ATCC®CCL-185)、结肠癌细胞系HCT-116(ATCC®CCL-247)、乳腺癌细胞系MDA-MB-231(ATCC®HTB-26)、胃癌细胞系MKN-74(KCLB No.80104)和白血病细胞系U937(ATCC®CRL-1593.2)各自与5μM的CFSE混合并在37℃下保持5分钟。此后，向包含每种细胞系的每个管添加FBS，并将每个管在冰上保持10分钟。随后，进行离心以去除上清液。向如此获得的产物添加30ml的FACS缓冲液。然后，进行移液并进行离心以去除上清液。然后，向其添加10％FBS RPMI1640。然后，进行移液并进行离心以去除上清液。将如此获得的产物与10ml的10％FBS RPMI1640混合，并随后对细胞的数目进行计数。

[0061] 将每种类型的癌细胞以3×10^4个细胞/100μl/实施例2.1中制备的96孔板的每个含PBMC孔添加，并进行孵育。

[0062] 实施例2.3.PBMC针对癌细胞系的细胞毒性的测量

[0063] 向96孔板的每个孔添加10μg/mL的抗人LRIT2抗体或50nM LRIT2 siRNA，并且进行孵育24小时。下表1示出了其中使用四种类型的中和抗体以阻断LRIT2的实验组，以及未经处理的对照组；并且下表2示出了其中使用三种类型的siRNA以敲低LRIT2的实验组，以及未经处理的对照细。

[0064] [表1]

[0065]

	人LRIT2中和抗体
对照组	未经处理
组1	抗人LRIT2抗体(Biobyt Ltd.,orb185006)
组2	抗人LRIT2抗体(Thermo Fisher Scientific,PA5-58105)
组3	抗人LRIT2抗体(Atlas Antibodies,HPA037788)
组4	抗人LRIT2抗体(Novus Biologicals,NBP1-90876)

[0066] [表2]

[0067]

	人 LRIT2 siRNA
对照组	未经处理
组 5	有义（5'-GA GCU UAG UGC UUG CAU GA-3'）（SEQ ID NO: 3） 反义（5'-UC AUG CAA GCA CUA AGC UC-3'）（SEQ ID NO: 4）
组 6	有义（5'-CU ACA UUG CAU CGG AUG AA-3'）（SEQ ID NO: 5） 反义（5'-UU CAU CCG AUG CAA UGU AG-3'）（SEQ ID NO: 6）
组 7	有义（5'-UG UGU UGA CAU CUU CUA CU-3'）（SEQ ID NO: 7） 反义（5'-AG UAG AAG AUG UCA ACA CA-3'）（SEQ ID NO: 8）

[0068] 将PBMC和每种癌细胞系的每种混合物与抗体或siRNA一起孵育。在24小时之后，为了鉴定裂解的细胞，用7-氨基放线菌素D(7-AAD;BD Pharmingen,San Diego,CA,USA)对细胞进行染色。使用FACSDiVa软件(BD Biosciences)对CFSE和7-AAD的染色进行测量以确定PBMC的针对每种癌细胞系的溶细胞能力。结果示于图3a至7d中。具体地，在其中用LRIT2中和抗体或siRNA处理肺癌细胞系A549的情况下获得的实验结果示于图3a至3d中。在其中用LRIT2中和抗体或siRNA处理结肠癌细胞系HCT-116的情况下获得的实验结果示于图4a至4d中。在其中用LRIT2中和抗体或siRNA处理乳腺癌细胞系MDA-MB-231的情况下获得的实验结果示于图5a至5d中。在其中用LRIT2中和抗体或siRNA处理胃癌细胞系MKN-74的情况下获得的实验结果示于图6a至6d中。在其中用LRIT2中和抗体或siRNA处理白血病细胞系U937的情况下获得的实验结果示于图7a至7d中。

[0069] 如图3a至3d中所示，在其中用LRIT2中和抗体处理肺癌细胞系A549和PBMC的情况下，虽然取决于抗体类型而在杀伤能力方面存在程度上的差异，但与未经处理的对照组相比，表现出显著提高的肺癌细胞杀伤能力;并且甚至在其中用LRIT2 siRNA处理肺癌细胞系的情况下，也表现出显著提高的肺癌细胞杀伤能力。

[0070] 与上述结果类似，PBMC表现出针对肺癌细胞系的杀伤能力提高，确定了在其中使用LRIT2中和抗体或siRNA对LRIT2进行中和的情况下，PBMC也表现出针对结肠癌细胞系、乳腺癌细胞系、胃癌细胞系和白血病细胞系的杀伤能力提高(图4a至7d)。

[0071] 实施例3.使用肿瘤小鼠模型进行的实验

[0072] 在本实施例中，旨在在体内确定在其中使用LRIT2抑制剂对LRIT2进行中和的情况下小鼠中肿瘤的生长是否受到抑制。

[0073] 将来源于C57BL/6结肠腺癌细胞的MC38细胞系以2.0×10^5个细胞的浓度重悬于50μl的PBS中，并且将其皮下注射到6周龄雌性C57BL/6小鼠的胁腹中。下表3示出了其中使用siRNA以敲低LRIT2的实验组，以及未经处理的对照组。

[0074] [表3]

[0075]

	小鼠 LRIT2 siRNA
对照组	未经处理
组 8	有义（5'-CU CUU CAG UUC CUA ACC AA-3'）（SEQ ID NO: 9） 反义（5'-UU GGU UAG GAA CUG AAG AG-3'）（SEQ ID NO: 10）
组 9	有义（5'-GU CAC UAU CCA GGU AGG AA-3'）（SEQ ID NO: 11） 反义（5'-UU CCU ACC UGG AUA GUG AC-3'）（SEQ ID NO: 12）
组 10	有义（5'-CA GAC AAC UUU CCC GAA GA-3'）（SEQ ID NO: 13） 反义（5'-UC UUC GGG AAA GUU GUC UG-3'）（SEQ ID NO: 14）

[0076] 对于所有实验组，自注射MC38细胞系之后的第11天开始，将靶向小鼠LRIT2的每种siRNA以5天的间隔总共3次注射到小鼠肿瘤中。具体地，根据制造商的说明，将10μg的siRNA与7.5μl的Oligofectamine(Invitrogen)在PBS中混合，并随后将混合物以0.5mg/kg的剂量直接注射到小鼠中诱导的肿瘤组织中。通过测量未经处理对照组和其中敲低LRIT2的实验组中的小鼠中的肿瘤尺寸所获得的结果示于图8a至8d中。如图8a至8d中所示，发现在未经处理的对照组中，肿瘤自其在小鼠中产生以来就持续生长。在另一方面，发现在其中敲低LRIT2的小鼠中，与未经处理的对照组相比，肿瘤表现出显著抑制的生长速率。这表明在其中阻断或敲低LRIT2并抑制其活性或表达的情况下，癌症的进展被延迟或停止，并且癌症的发生受到抑制。因此，LRIT2抑制剂可有效地用于预防和治疗癌症。

<110> 韩国亿诺生物有限公司
<120> 包含LRIT2抑制剂作为活性成分用于预防或治疗癌症的药物组合物
<130> PCB903025GNC
<150> KR 10-2018-0055909
<151> 2018-05-16
<160> 14
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 550
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LRIT2
<400> 1

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

Leu Val Val Ala Leu His Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Leu
195 200 205
Arg Gly Leu Val Gln Phe Val Lys Ser Ile Thr Leu Pro Val Ile Leu
210 215 220
Val Asn Ser Tyr Leu Ile Cys Gln Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Gln
225 230 235 240
Leu Phe His Glu Thr Glu Leu Ser Ala Cys Met Lys Pro Gln Ile Ser
245 250 255
Thr Pro Ser Ala Asn Ile Thr Ile Arg Ala Gly Gln Asn Val Thr Leu
260 265 270
Arg Cys Leu Ala Gln Ala Ser Pro Ser Pro Ser Ile Ala Trp Thr Tyr
275 280 285
Pro Leu Ser Met Trp Arg Glu Phe Asp Val Leu Thr Ser Ser Thr Gly
290 295 300
Glu Asp Thr Ala Leu Ser Glu Leu Ala Ile Pro Ala Ala His Leu Val
305 310 315 320
Asp Ser Gly Asn Tyr Thr Cys Met Ala Ser Asn Ser Ile Gly Lys Ser
325 330 335
Asn Leu Val Ile Ser Leu His Val Gln Pro Ala Gln Ala Leu His Ala
340 345 350
Pro Asp Ser Leu Ser Ile Pro Ser Glu Gly Asn Ala Tyr Ile Asp Leu
355 360 365
Arg Val Val Lys Gln Thr Val His Gly Ile Leu Leu Glu Trp Leu Ala
370 375 380
Val Ala Asp Thr Ser Lys Glu Glu Trp Phe Thr Leu Tyr Ile Ala Ser
385 390 395 400
Asp Glu Ala Phe Arg Lys Glu Val Val His Ile Gly Pro Gly Ile Asn
405 410 415
Thr Tyr Ala Val Asp Asp Leu Leu Pro Gly Thr Lys Tyr Glu Ala Cys
420 425 430
Leu Ser Leu Glu Gly Gln Pro Pro His Gln Gly Gln Cys Val Ala Phe
435 440 445
Val Thr Gly Arg Asp Ala Gly Gly Leu Glu Ala Arg Glu His Leu Leu
450 455 460
His Val Thr Val Val Leu Cys Val Val Leu Leu Ala Val Pro Val Gly
465 470 475 480
Ala Tyr Ala Trp Ala Ala Gln Gly Pro Cys Ser Cys Ser Lys Trp Val
485 490 495
Leu Arg Gly Cys Leu His Arg Arg Lys Ala Pro Ser Cys Thr Pro Ala

500 505 510

Ala Pro Gln Ser Lys Asp Gly Ser Phe Arg Glu His Pro Ala Val Cys

515 520 525

Asp Asp Gly Glu Gly His Ile Asp Thr Glu Gly Asp Lys Glu Lys Gly

530 535 540

Gly Thr Glu Asp Asn Ser

545 550

<210> 2

<211> 1653

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LRIT2

<400> 2

atggcttcag tttttcatta cttcctgtta gttctggtct ttctggatac acacgcagct 60

cagcctttct gtctgccagg atgcacttgc tcagaggaga gttttggcag gactctgcag 120

tgcacatctg tctccttggg aaagatccct gggaaccttt ctgaagagtt caagcaagtg 180

agaattgaaa attcaccctt atttgagatg ccccaagggt ctttcatcaa catgagcacc 240

ttggaatacc tctggctcaa ttttaacaat atcagtgtga tccacctagg agccctggaa 300

cacctgccag aactgaggga gctgagactg gaggggaaca agctctgctc agtaccatgg 360

acagcgttcc gtgccacccc tctcctgagg gtcttggatc tcaaacgcaa caagattgat 420

gcactccctg agctggctct tcaattcttg gtcagcctga cctaccttga cctatcctcc 480

aataggctta cagttgtatc caagagtgtc ttcctgaact ggccagccta ccagaaatgc 540

cggcagcctg actgtggggc tgagattctc tccagcctgg tggtggccct gcatgacaac 600

ccctgggtat gtgactgtcg cctaaggggg cttgtccagt ttgtcaagtc cattaccctc 660

ccagtcatcc tggtgaattc ctacctgata tgtcagggcc ctctgtccaa ggcagggcag 720

ctttttcatg aaactgagct tagtgcttgc atgaagccac agatctcaac ccccagtgcc 780

aatatcacca tccgggcagg acagaatgtg accctgcgat gcttggcaca ggccagcccc 840

tcaccatcca ttgcatggac ttatcccctg agtatgtgga gagaatttga tgtgttgaca 900

tcttctactg gagaagacac tgctctgtca gagctggcca tacctgctgc ccacctggta 960

gacagtggta attacacctg catggcctcc aactccattg gcaagagcaa ccttgtaatc 1020

tctctccatg tccagcctgc ccaggcccta catgcacctg attctctttc catcccctcg 1080

gagggcaatg cctacattga cctgcgggtt gtcaagcaga cagtgcatgg gattttgctg 1140

gagtggcttg cagtggctga cacctctaag gaggagtggt tcaccctcta cattgcatcg 1200

gatgaagcct tcaggaagga ggtggttcac attggccccg gaatcaatac ttatgctgtg 1260

gatgacctcc ttcctggcac aaaatatgag gcctgcctca gcctagaggg ccagcctcca 1320

caccagggcc agtgtgtagc ttttgtaaca ggcagagatg ctggtgggct agaggcacgt 1380

gagcacctcc tgcatgtcac agtggtcctg tgtgtggtgc tgcttgcagt gcctgtgggc 1440

gcctatgcct gggcagccca gggcccctgc agctgcagca agtgggtcct gcgcggctgt 1500

cttcatcgca ggaaagcccc cagctgcacc cctgcagccc cgcagtccaa ggatggctcc 1560
tttagagaac atccagctgt ctgtgatgac ggtgaagggc acatagacac tgagggggac 1620
aaggagaaag gaggaacgga agacaacagc tga 1653

<210> 3
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人LRIT2 siRNA-有义(组5)
<400> 3
gagcuuagug cuugcauga 19

<210> 4
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人LRIT2 siRNA-反义(组5)
<400> 4
ucaugcaagc acuaagcuc 19

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人LRIT2 siRNA-有义(组6)
<400> 5
cuacauugca ucggaugaa 19

<210> 6
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人LRIT2 siRNA-反义(组6)
<400> 6
uucauccgau gcaauguag 19

<210> 7
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人LRIT2 siRNA-有义(组7)
<400> 7
uguguugaca ucuucuacu 19
<210> 8
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人LRIT2 siRNA-反义(组7)
<400> 8
aguagaagau gucaacaca 19
<210> 9
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 小鼠LRIT2 siRNA-有义(组8)
<400> 9
cucuucaguu ccuaaccaa 19
<210> 10
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 小鼠LRIT2 siRNA-反义(组8)
<400> 10
uugguuagga acugaagag 19
<210> 11
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 小鼠LRIT2 siRNA-有义(组9)
<400> 11
gucacuaucc agguaggaa 19
<210> 12
<211> 19
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 小鼠LRIT2 siRNA-反义(组9)
<400> 12
uuccuaccug gauagugac 19
<210> 13
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 小鼠LRIT2 siRNA-有义(组10)
<400> 13
cagacaacuu ucccgaaga 19
<210> 14
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 小鼠LRIT2 siRNA-反义(组10)
<400> 14
ucuucgggaa aguugucug 19

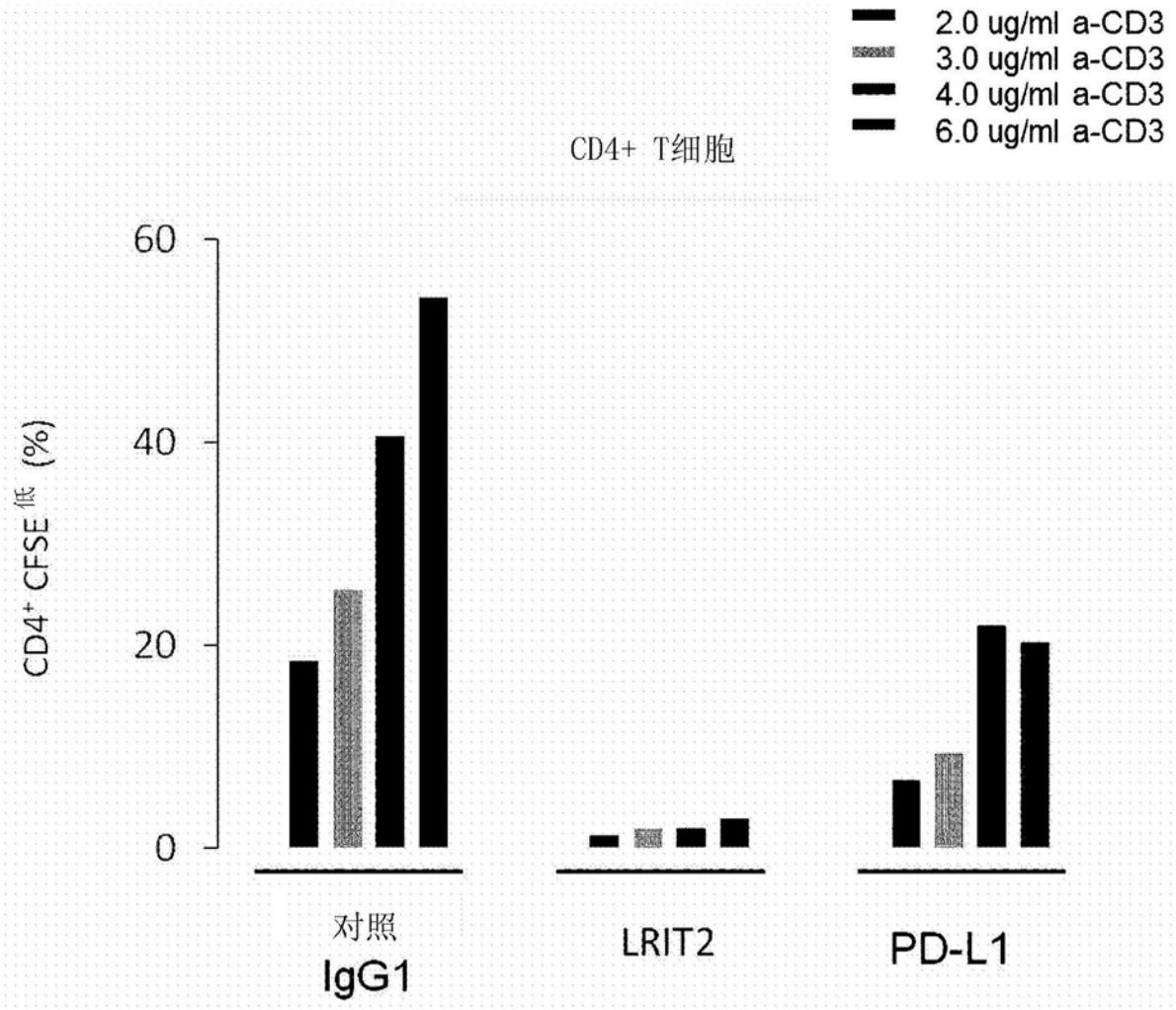

2.0 ug/ml a-CD3
3.0 ug/ml a-CD3
4.0 ug/ml a-CD3
6.0 ug/ml a-CD3
CD4+ T细胞
CD4+ CFSE低 (%)
60
40
20
0
对照
IgG1
LRIT2
PD-L1

图1

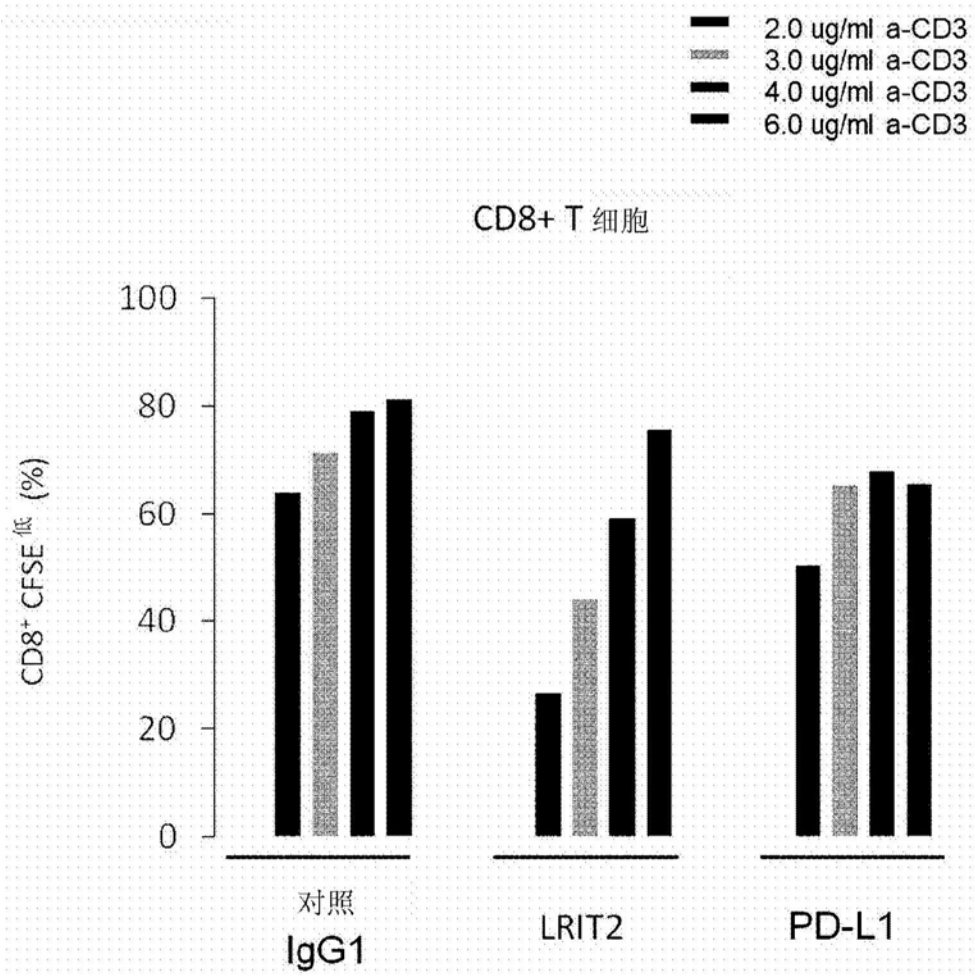

2.0 ug/ml a-CD3
3.0 ug/ml a-CD3
4.0 ug/ml a-CD3
6.0 ug/ml a-CD3
CD8+ T 细胞
CD8+ CFSE低 (%)
100
80
60
40
20
0
对照
IgG1
LRIT2
PD-L1

图2

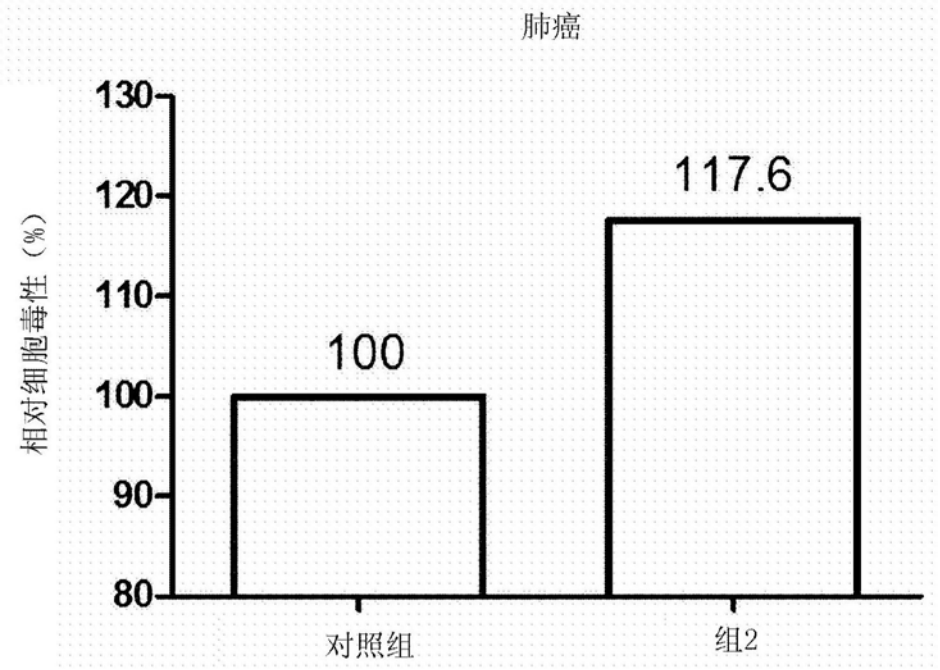

肺癌
相对细胞毒性（%）
130
120
110
100
90
80
100
117.6
对照组
组2

图3a

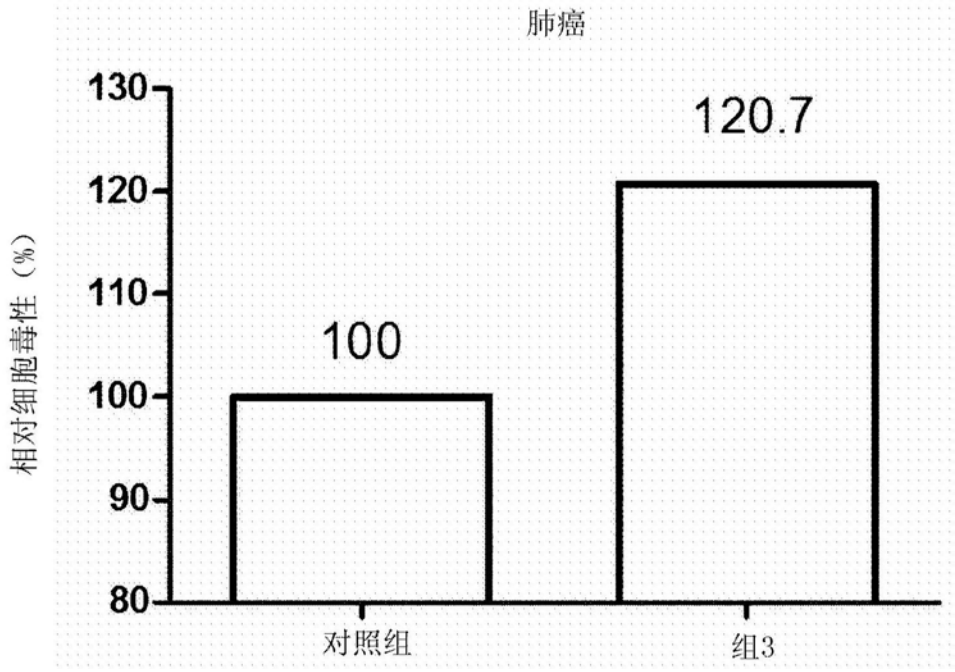

肺癌
相对细胞毒性（%）
130
120
110
100
90
80
100
120.7
对照组
组3

图3b

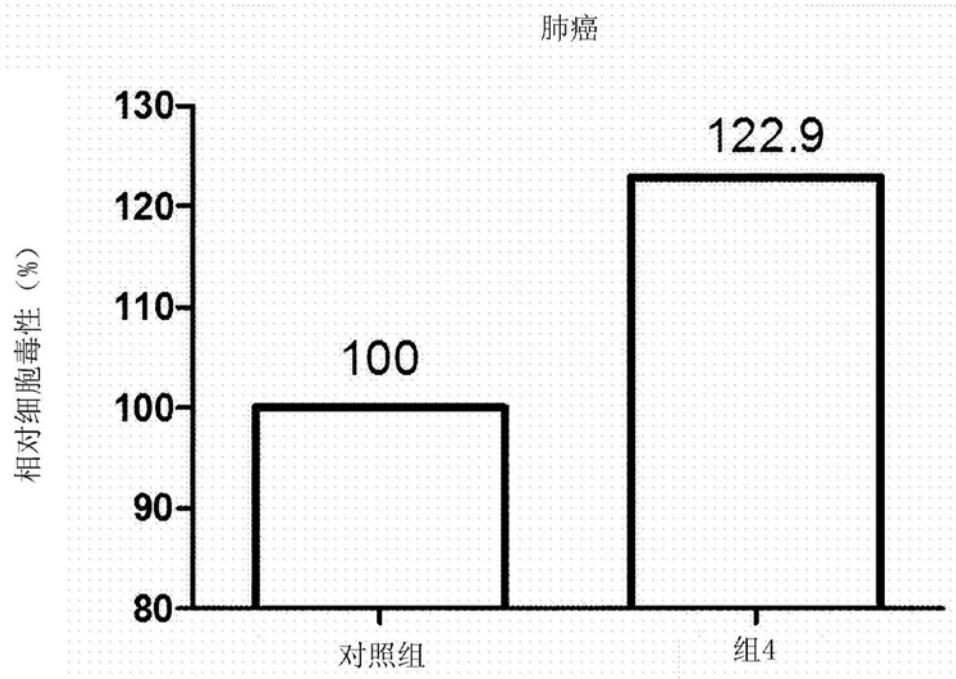

肺癌
相对细胞毒性（%）
130
120
110
100
90
80
100
122.9
对照组
组4

图3c

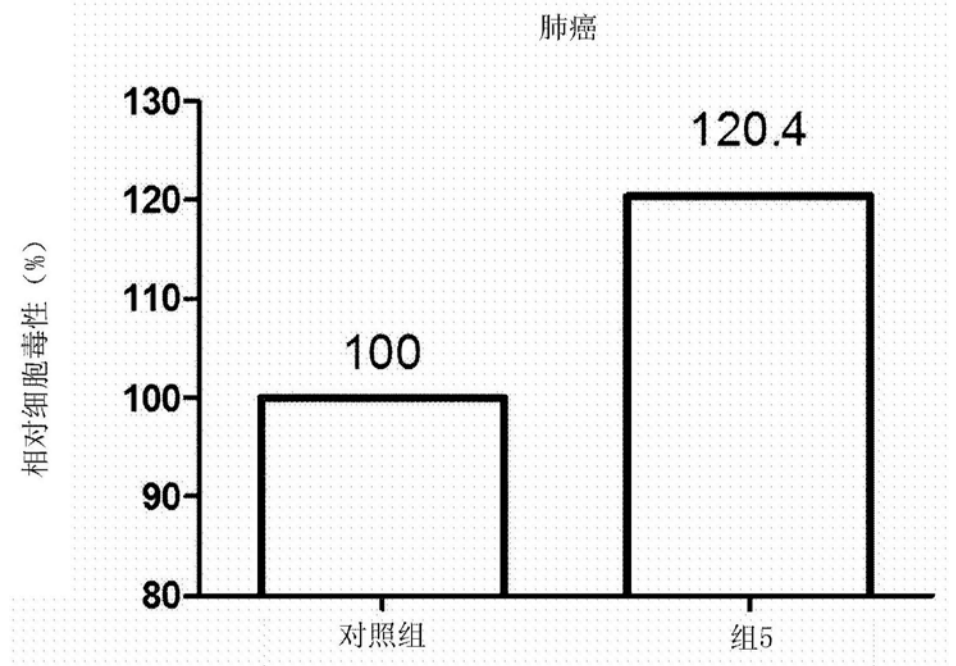

肺癌
相对细胞毒性（%）
130
120
110
100
90
80
100
120.4
对照组
组5

图3d

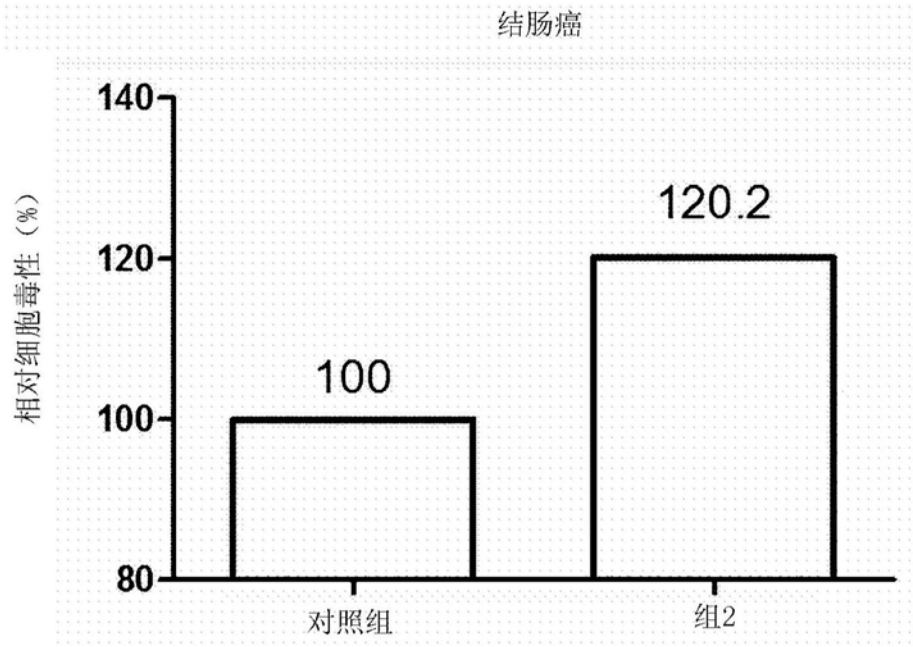

结肠癌
相对细胞毒性（%）
140
120
100
80
120.2
100
对照组
组2

图4a

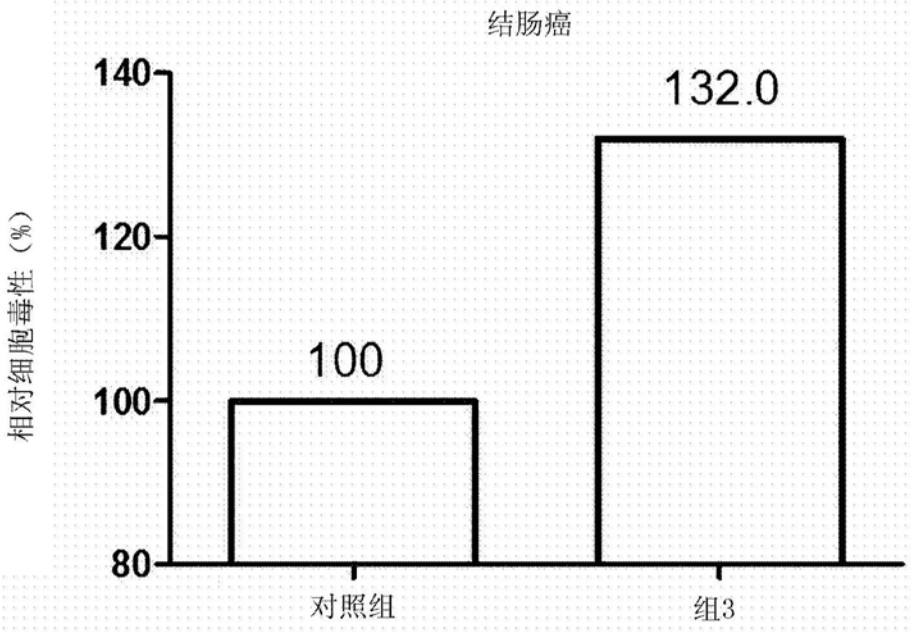

结肠癌
相对细胞毒性（%）
140
120
100
80
132.0
100
对照组
组3

图4b

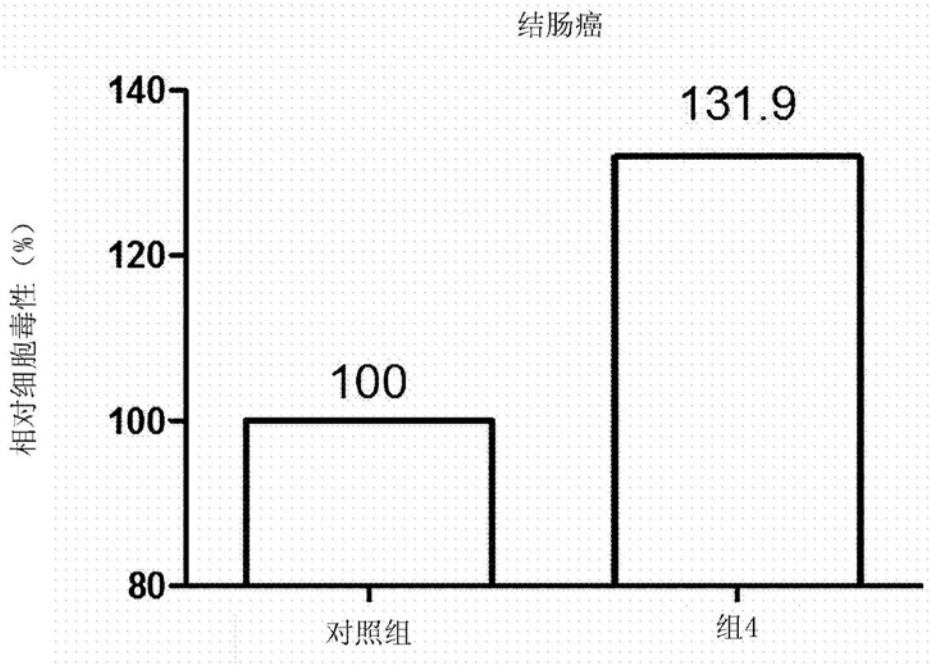

结肠癌
140
120
100
80
相对细胞毒性（%）
131.9
100
对照组
组4

图4c

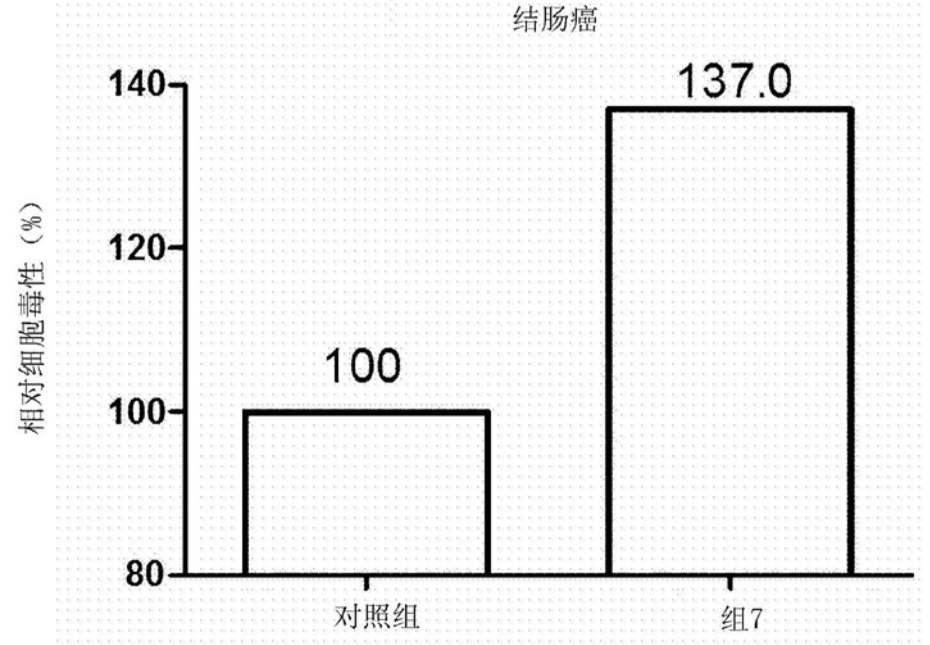

结肠癌
140
120
100
80
相对细胞毒性（%）
137.0
100
对照组
组7

图4d

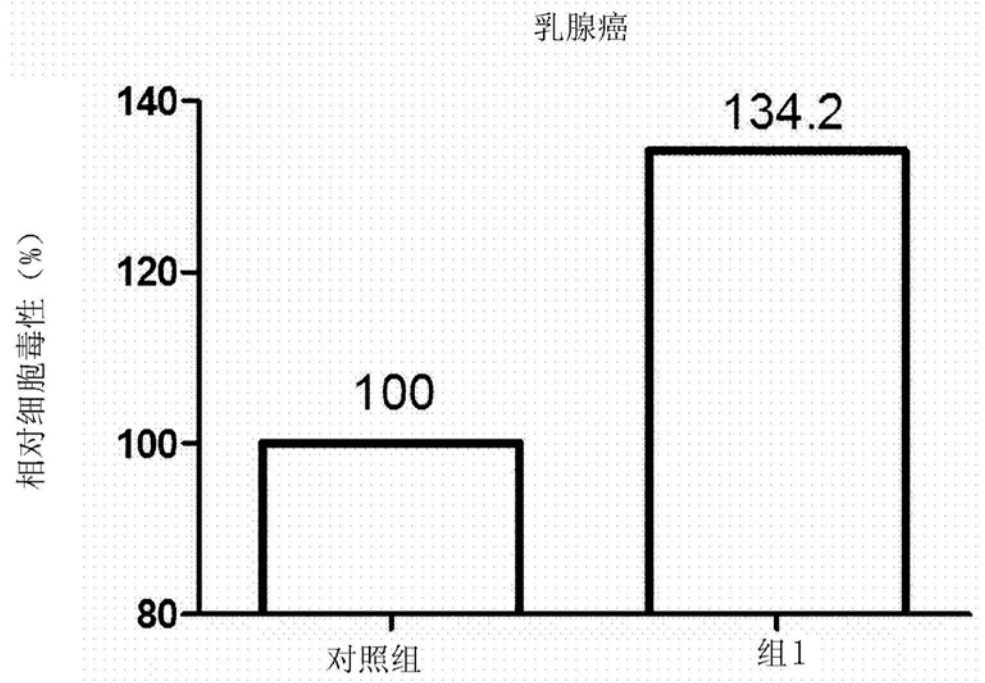

乳腺癌
相对细胞毒性（%）
140
120
100
80
134.2
100
对照组
组1

图5a

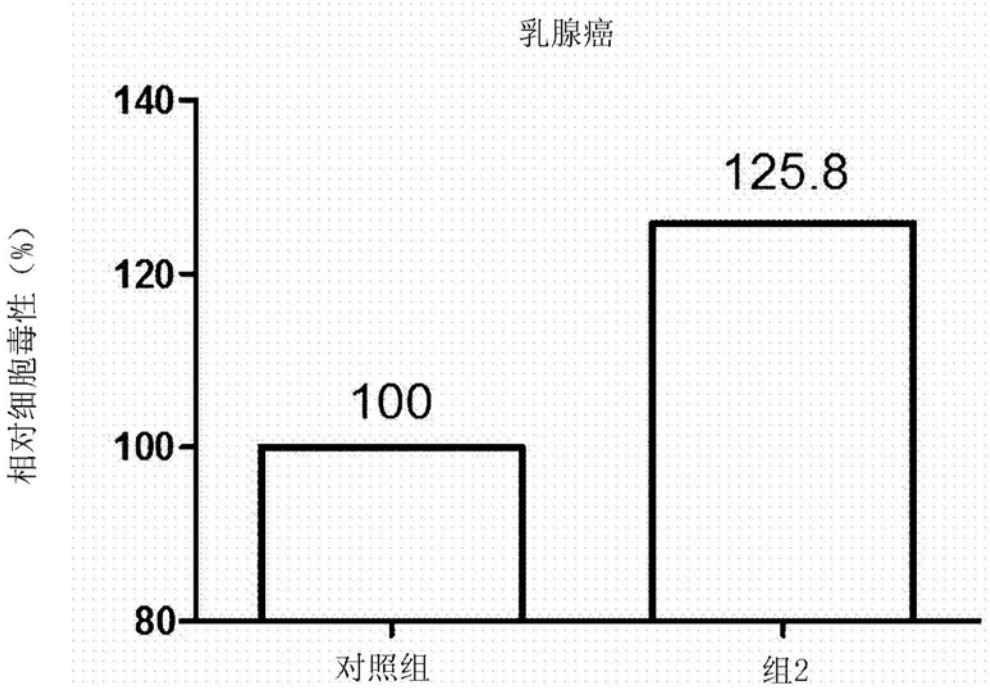

乳腺癌
相对细胞毒性（%）
140
120
100
80
125.8
100
对照组
组2

图5b

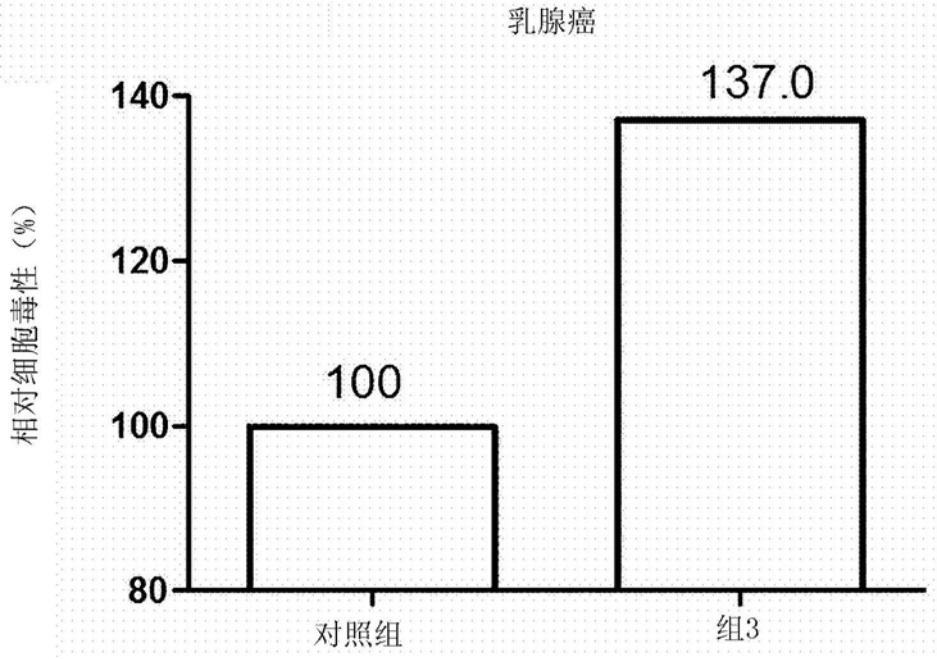

乳腺癌
相对细胞毒性（%）
140
120
100
80
137.0
100
对照组
组3

图5c

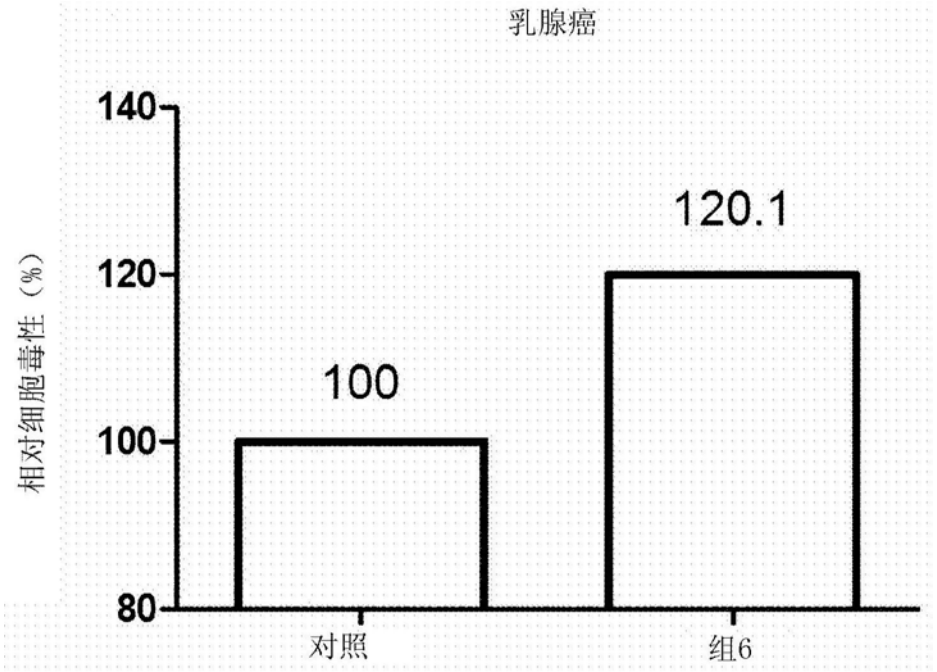

乳腺癌
相对细胞毒性（%）
140
120
100
80
120.1
100
对照
组6

图5d

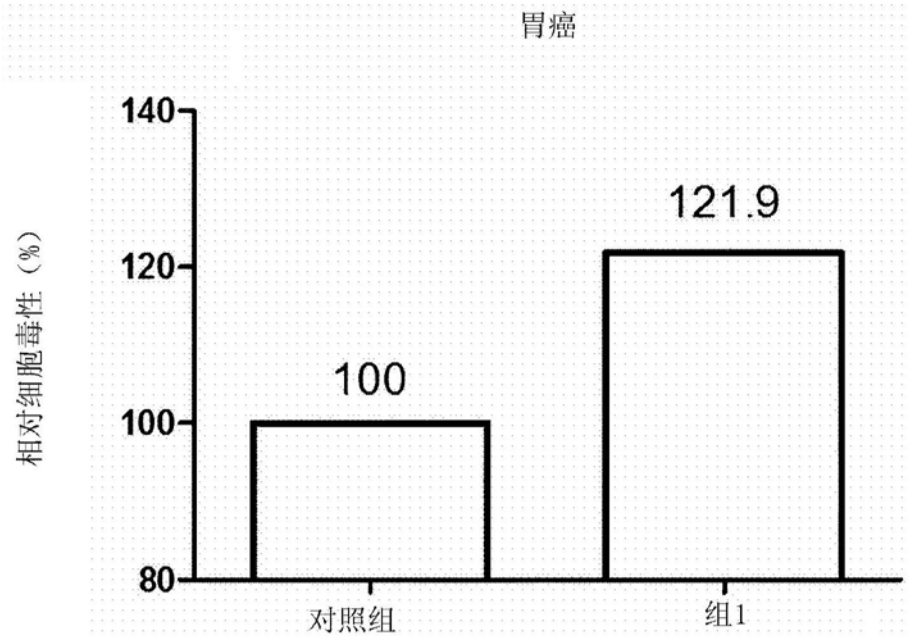

胃癌
相对细胞毒性（%）
140
120
100
80
100
121.9
对照组
组1

图6a

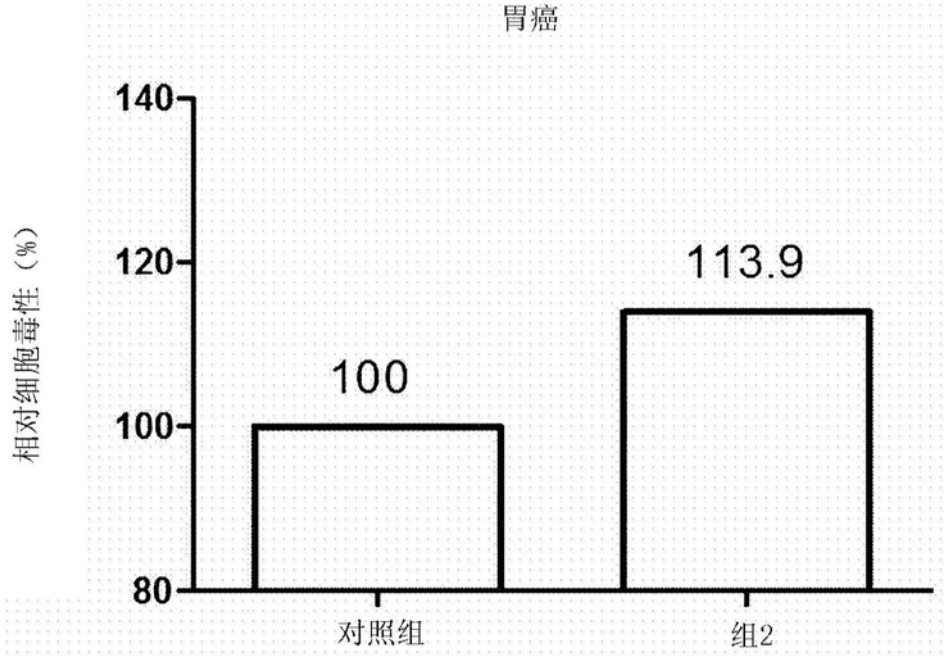

胃癌
相对细胞毒性（%）
140
120
100
80
100
113.9
对照组
组2

图6b

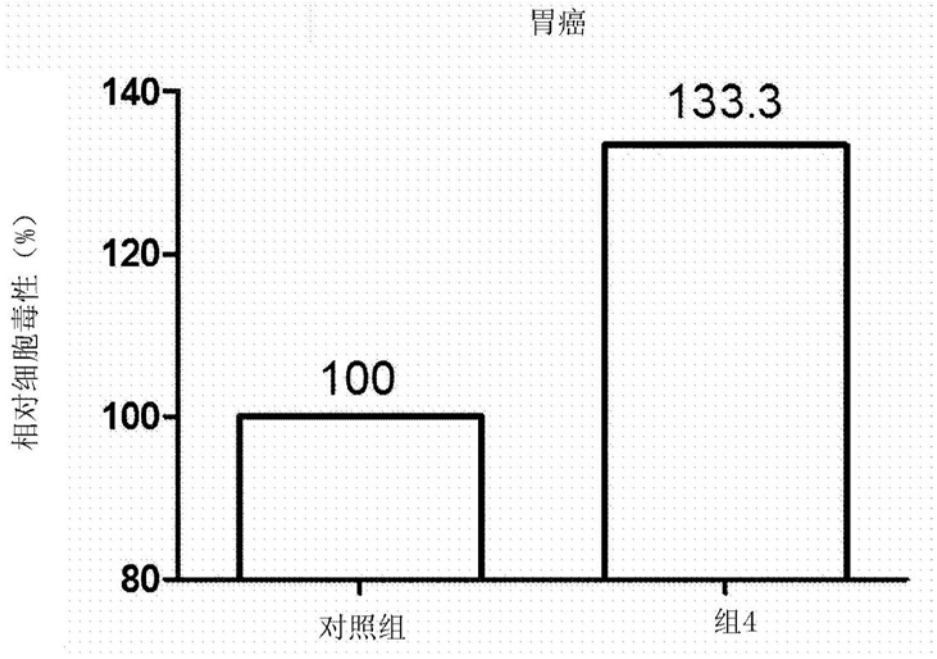

胃癌
相对细胞毒性（%）
140
120
100
80
100
133.3
对照组
组4

图6c

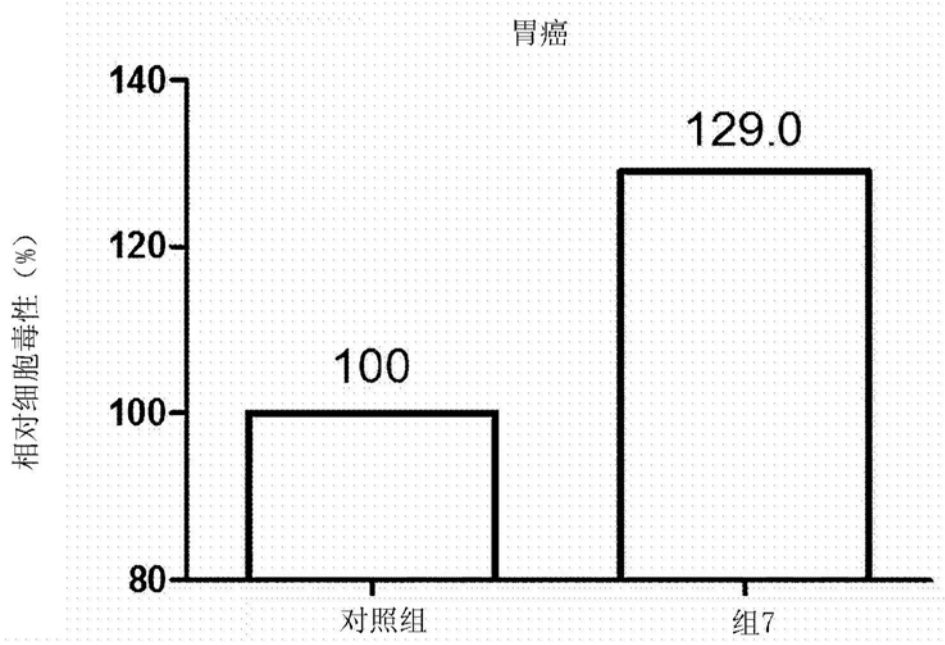

胃癌
相对细胞毒性（%）
140
120
100
80
100
129.0
对照组
组7

图6d

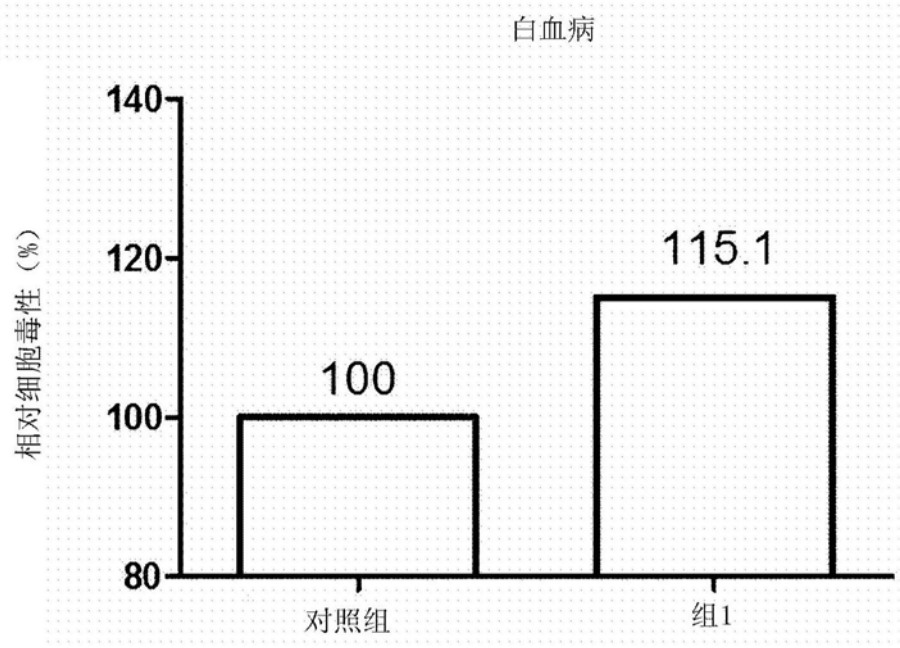

白血病
140
120
100
80
相对细胞毒性（%）
100
115.1
对照组
组1

图7a

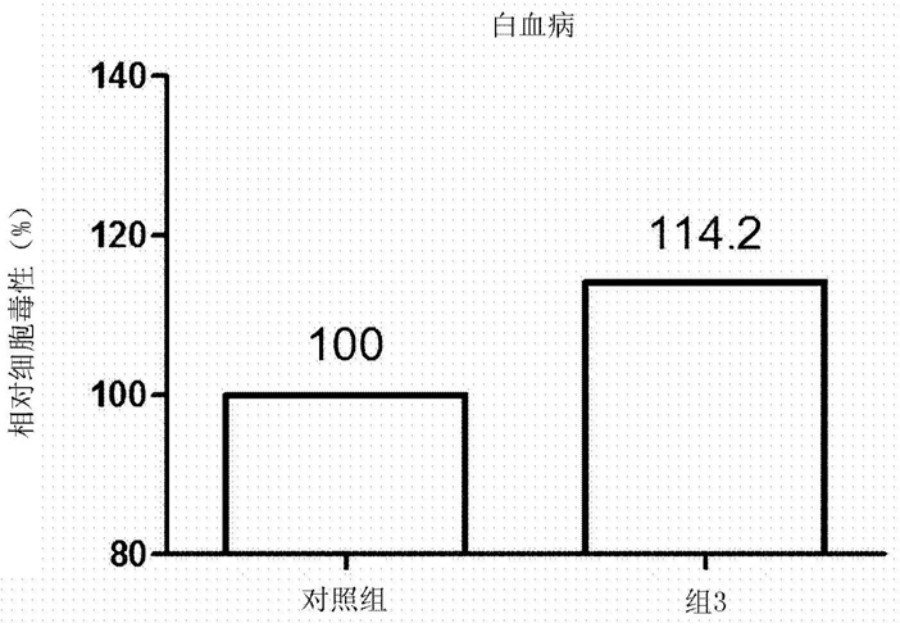

白血病
140
120
100
80
相对细胞毒性（%）
100
114.2
对照组
组3

图7b

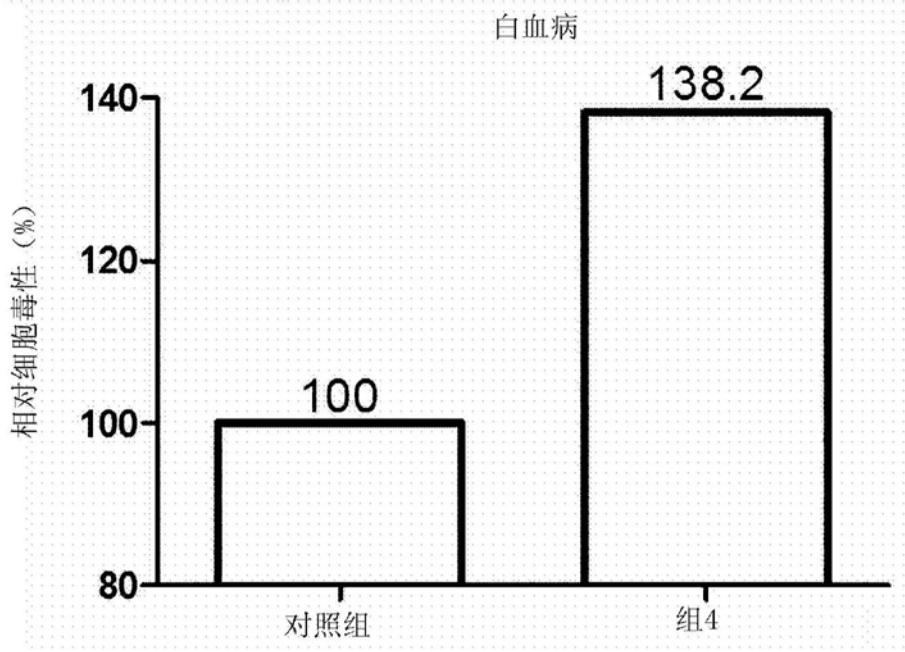

白血病
138.2
140
120
100
80
100
相对细胞毒性（%）
对照组
组4

图7c

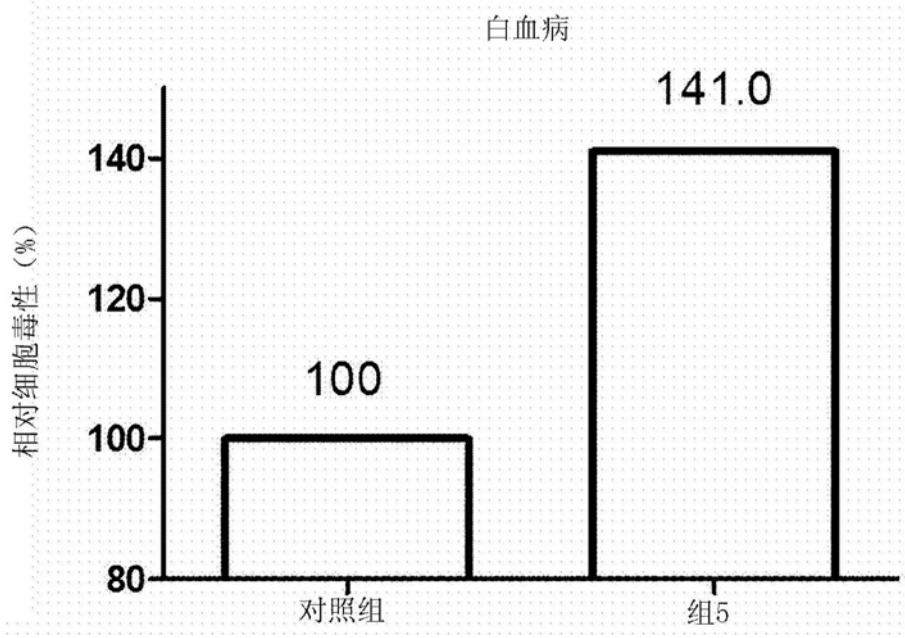

白血病
141.0
140
120
100
80
100
相对细胞毒性（%）
对照组
组5

图7d

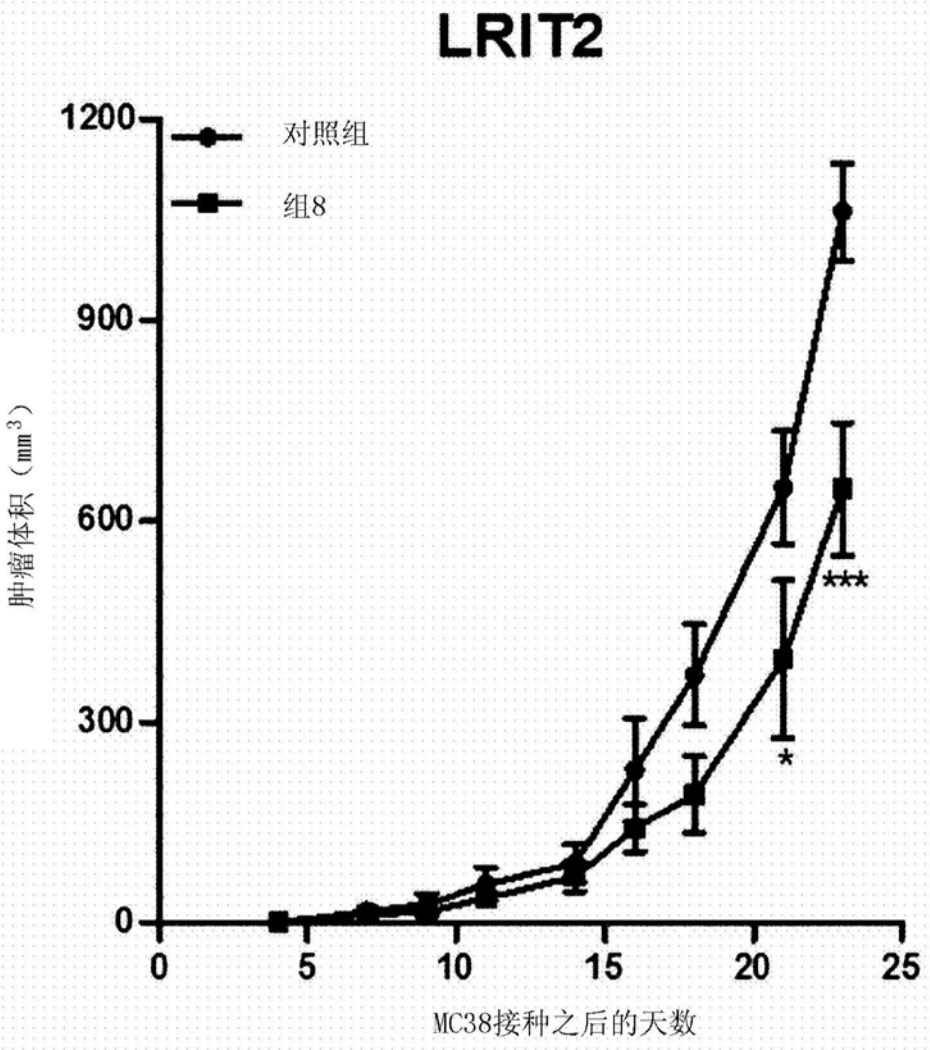

LRIT2
1200
900
600
300
0
对照组
组8
肿瘤体积（mm3）
0
5
10
15
20
25
MC38接种之后的天数
*
***

图8a

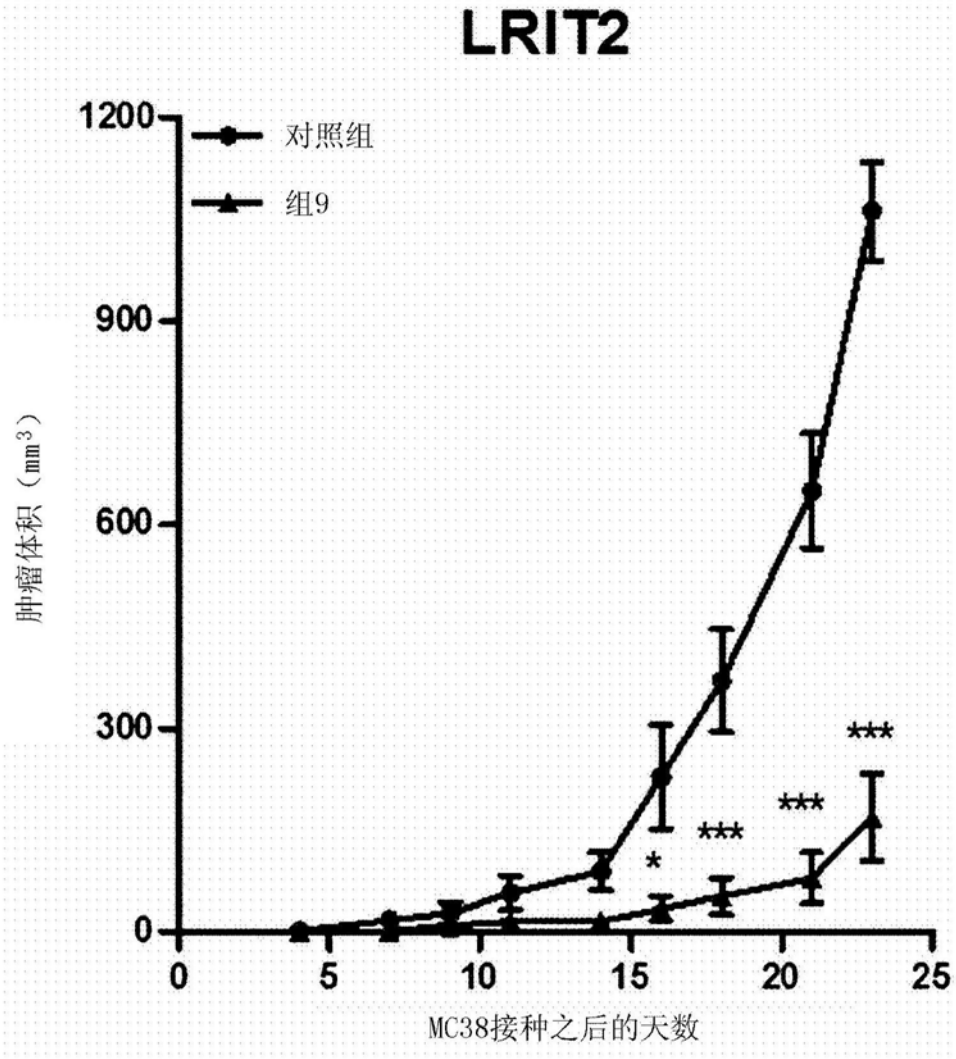

LRIT2
1200
900
600
300
0
对照组
组9
肿瘤体积（mm³）
0
5
10
15
20
25
MC38接种之后的天数
*
***
***
***

图8b

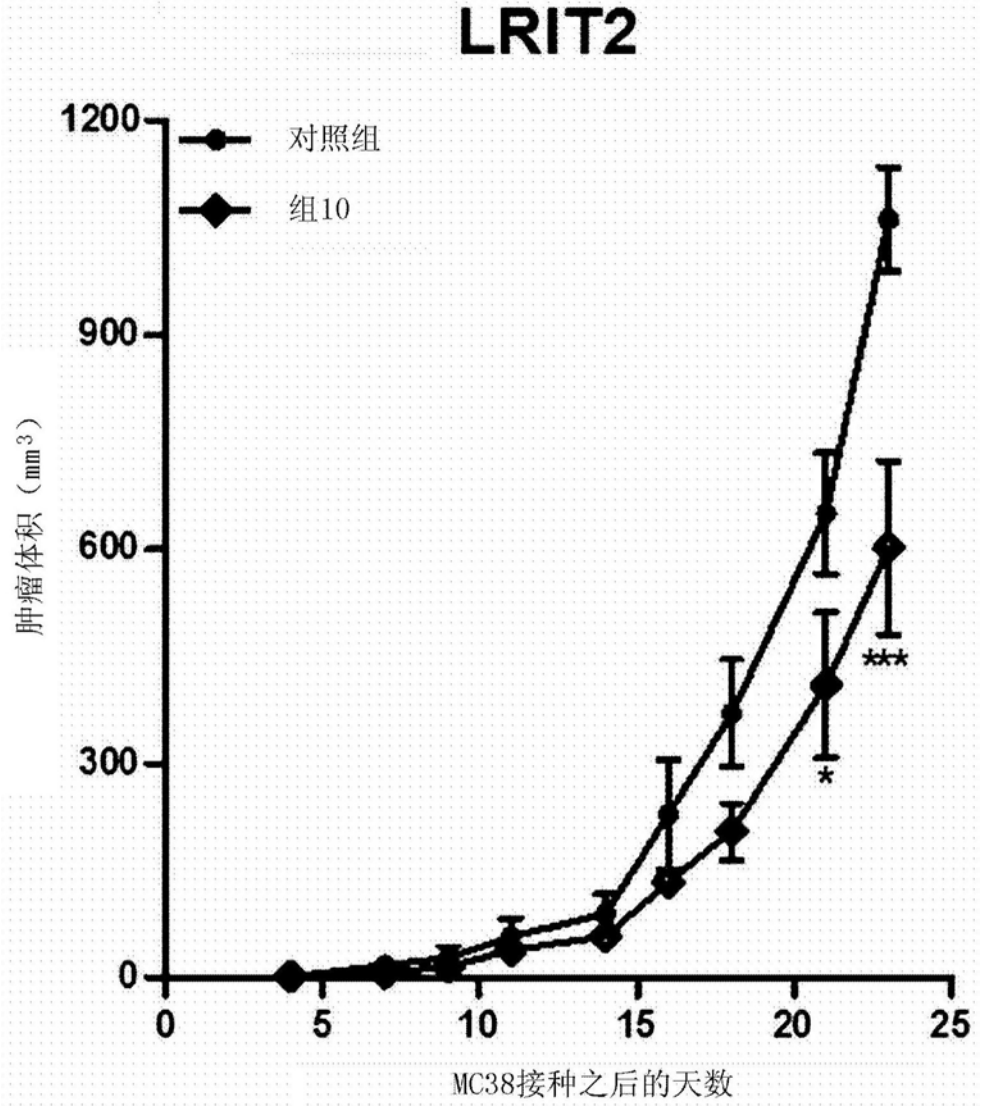

LRIT2
1200
900
600
300
0
对照组
组10
肿瘤体积（mm3）
0
5
10
15
20
25
MC38接种之后的天数
*
***

图8c

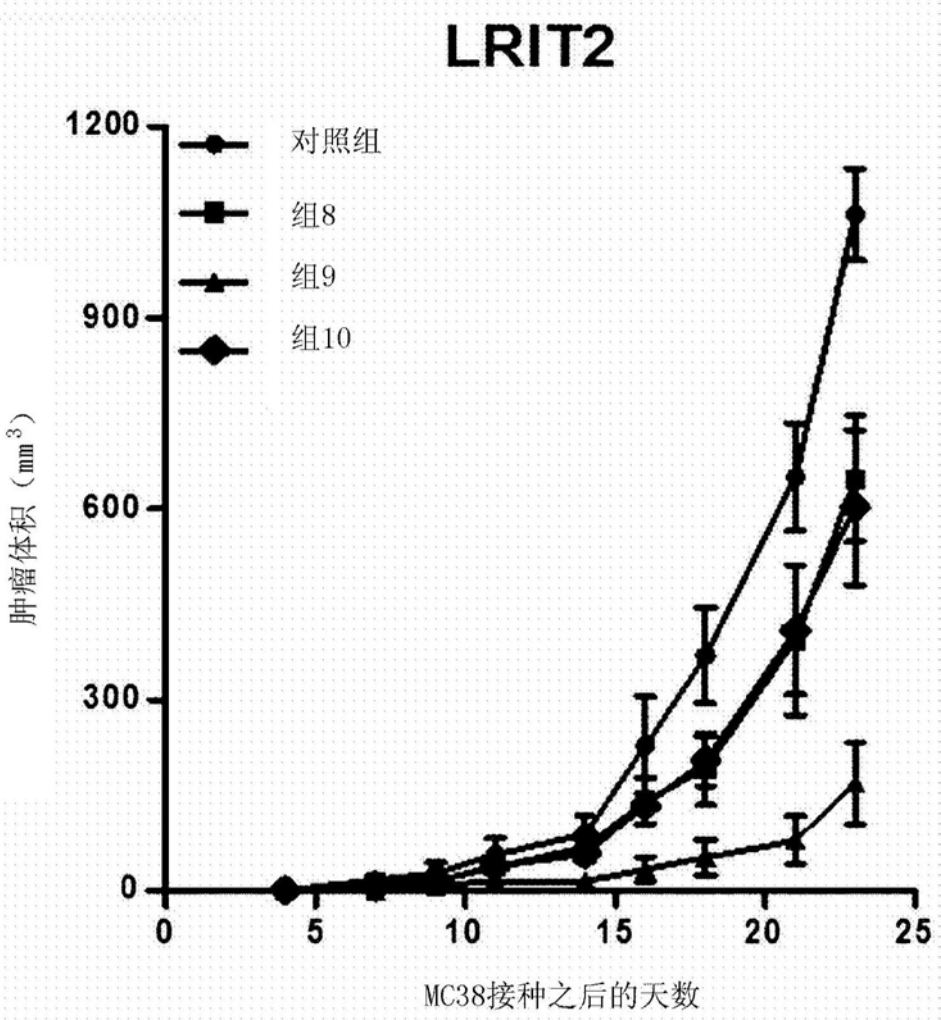

LRIT2
1200
900
600
300
0
对照组
组8
组9
组10
肿瘤体积（mm3）
0
5
10
15
20
25
MC38接种之后的天数

图8d