



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109328077 A

(43)申请公布日 2019.02.12

(21)申请号 201780035618.3

(22)申请日 2017.06.08

(30)优先权数据

16173925.5 2016.06.10 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/063985 2017.06.08

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/211964 EN 2017.12.14

(71)申请人 德国癌症研究公共权益基金会

地址 德国海德堡

(72)发明人 法米特·布珠皮 彼得·克拉姆

海科·韦德

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 51/08(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 47/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书17页

序列表13页 附图16页

(54)发明名称

膜联蛋白的核心结构域及其在抗原递送和
接种中的用途

(57)摘要

本公开提供了例如疫苗(包括DNA疫苗)的免
疫原性组合物及其用途,例如,其包括膜联蛋白
核心结构域以用于介导有效的抗原递送和抗原
呈递从而诱导抗原特异性免疫应答,和/或治疗
或预防传染病和/或癌症。

1. 分离的膜联蛋白核心结构域,其包含选自SEQ ID No.1至3和6至8的序列中所包含的核心结构域的氨基酸序列,或者与选自SEQ ID No.1至3和6至8的序列中所包含的膜联蛋白核心结构域的氨基酸序列具有至少50%同一性的氨基酸序列。

2. 蛋白质缀合物或融合蛋白,其包含 (i) 至少一个根据权利要求1所述的膜联蛋白核心结构域,和 (ii) 至少一个由MHC呈递的抗原肽,优选HLA呈递的抗原肽。

3. 根据权利要求2所述的蛋白质缀合物或融合蛋白,其中所述抗原来源于选自以下的蛋白质: β hCG, gp100或Pmel17, HER2/neu, WT1, 间皮素, CEA, gp100, MART1, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), 独特型, 酪氨酸酶, 端粒酶, SSX2, MUC-1, MART1, melan-A, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3和分子量黑素瘤相关抗原 (HMW-MAA)。

4. 根据权利要求2或3所述的蛋白质缀合物或融合蛋白,其中所述缀合物或所述融合蛋白进一步缀合/融合至共刺激分子或其免疫原性片段或者共刺激第二肽序列。

5. 编码权利要求1至4中任一项所述的融合蛋白的核酸。

6. 根据权利要求5所述的核酸,其中所述抗原的编码序列编码来源于选自以下蛋白质的抗原: β hCG, gp100或Pmel17, HER2/neu, WT1, 间皮素, CEA, gp100, MART1, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), 独特型, 酪氨酸酶, 端粒酶, SSX2, MUC-1, MART1, melan-A, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3和分子量黑素瘤相关抗原 (HMW-MAA)。

7. 根据权利要求5或6所述的核酸,其中所述编码序列与至少一种DC刺激核酸序列融合。

8. 重组表达载体,其表达根据权利要求5至7中任一项所述的核酸。

9. 药物组合物,其包含权利要求2至4中任一项所述的蛋白质缀合物或融合蛋白,或者权利要求5至7中任一项所述的核酸,或者权利要求8所述的表达载体,以及载体。

10. 根据权利要求9所述的药物组合物,其为疫苗。

11. 根据权利要求9或10所述的药物组合物,其用于治疗或预防受试者中的传染病或癌症。

12. 治疗或预防受试者中的传染病或癌症的方法,其包括向所述受试者施用权利要求9或10所述的药物组合物。

膜联蛋白的核心结构域及其在抗原递送和接种中的用途

[0001] 本公开提供了免疫原性组合物(例如疫苗,包括DNA疫苗)及其用途,例如,其包括膜联蛋白核心结构域用于介导有效的抗原递送和抗原呈递,以诱导抗原特异性免疫应答,和/或治疗或预防传染病和/或癌症。

[0002] 发明背景

[0003] 启动适应性免疫应答的核心是专职抗原呈递细胞(APC),其展示与其细胞表面上的I类和II类MHC复合物结合的抗原衍生肽(Verboogen,Dingjan等人,2016)。虽然胞质蛋白被蛋白酶体降解并加载到CD8+T细胞识别的I类MHC复合物上,但外源蛋白(例如来自吞噬细菌或凋亡细胞)的吞噬导致核内体/溶酶体降解并呈递在能呈递至CD4+T细胞的II类MHC复合物上。此外,诸如树突细胞(DC)的APC能够使来自吞噬蛋白的肽也穿梭到I类MHC途径中以便呈递给CD8+T细胞,该过程被称为交叉呈递(Segura和Amigorena 2015)。在所描述的用于实现APC-样功能的不同细胞类型中,DC被认为是最有效的(Kambayashi和Laufer 2014)。在APC:T细胞相互作用之后,T细胞受体(TCR)衔接导致初始T细胞活化(引发),以例如细胞因子如白细胞介素(IL)-2和干扰素- γ 的分泌为特征(Grakoui,Bromley等人,1999)。活化的T细胞将继续分裂并分化成不同类型的效应T细胞,其可被分为两个主要谱系:CD4+T辅助细胞(Th)和CD8+细胞毒性T细胞。细胞毒性T细胞直接诱导靶细胞凋亡,而Th细胞通过产生细胞因子引导免疫应答,并且已被分类为Th1,Th2和Th17主要亚群(Lutz 2016)。总结它们的效应功能,Th1细胞是激活细胞免疫所必需的,而Th2细胞诱导体液免疫反应。Th17细胞被认为参与针对细胞外病原体如真菌的免疫。关于抗肿瘤免疫应答,有效CD8+T细胞应答的诱导被认为是肿瘤排斥的关键,并且许多肿瘤接种方案不能诱导CD8+T细胞抗肿瘤应答(Buhrman和Slansky 2013)。因此,APC的有效抗原呈递在诱导适应性免疫中起关键作用。

[0004] 膜联蛋白包含钙和磷脂结合蛋白家族。除了真菌外,在所有真核生物王国以及植物和动物中已发现了20多个成员。膜联蛋白的分子量在30到40kDa之间(仅膜联蛋白VI是66kDa),并且具有明显的结构特征。每个膜联蛋白成员上的膜联蛋白氨基末端结构域在序列和长度上是不同的(范围从11到196)。相比之下,由四个(仅膜联蛋白VI为八个)包含约70个氨基酸残基的 α -螺旋结构域组成的羧基末端区在膜联蛋白中是非常保守的。钙和磷脂结合位点位于羧基末端结构域中。所有膜联蛋白的Ca²⁺结合相似性是由于它们共同的一级结构,独特的N-末端结构域(“尾部”)和保守的C-末端结构域(“核心”)。除膜联蛋白VI外,保守的C-末端结构域通常包含-70个氨基酸的4个重复序列(膜联蛋白VI含有8个),其含有被称为“内联蛋白折叠”的增加了的同源区。除了C末端核心外,膜联蛋白还包含明显更多变的N端头。正是这个结构域赋予每种膜联蛋白在多种细胞过程中的独特功能,包括:胞吞作用和胞吐作用,细胞骨架调节和膜电导以及组织作用。鉴于它们参与了各种各样的过程,因此膜联蛋白还涉及一系列疾病病理就不足为奇了。虽然没有直接归因于膜联蛋白功能失调的单一疾病状态,但是有几种病理状况显示被联蛋白改变。Fatimathas和Moss(Fatimathas和Moss,2010)讨论了关于越来越多的膜联蛋白在癌症、糖尿病和自身免疫性病征抗磷脂综合征进展中的作用的证据。

[0005] 在所有膜联蛋白中,脂质结合由所有膜联蛋白家族成员中高度保守的C末端核心

结构域介导 (Gerke和Moss 2002, Moss和Morgan 2004)。相比之下,膜联蛋白N末端序列不同。对应于AnxA1N末端的肽显示与N-甲酰肽受体 (FPR) 家族的成员结合,导致几种急性和慢性炎症模型中的中性粒细胞迁移减少 (Walther, Riehemann等人,2000, Strausbaugh和Rosen 2001, Ernst, Lange等人,2004, Perretti和Dalli,2009)。通过AnxA1N-末端肽与FPR家族成员结合诱导的下游信号传导引起ERK的激活,但不激活p38或JNK (Hayhoe, Kamal等人2006, Pupjalis, Goetsch等人2011)。所有高等真核生物中存在多个膜联蛋白家族成员,表明膜联蛋白在细胞生物学中具有基础性作用。然而,个体膜联蛋白家族成员缺陷的小鼠没有严重的表型,这表明几种膜联蛋白具有(部分)重叠的功能 (Gerke和Moss 2002, Farber, De Rose等人,2003)。实际上,在膜运输、抑制PLA₂活性和血液凝固的背景下证明了膜联蛋白的功能冗余 (Gerke和Moss 2002)。

[0006] US 2002-052358描述了治疗患有关节炎或关节炎疾病的受试者或预防受试者的关节炎或关节炎疾病的方法,包括向受试者施用治疗有效量的减弱膜联蛋白功能的药剂。还提供了筛选药剂的各种方法。

[0007] WO 01/10199描述了含有肿瘤抑制基因膜联蛋白VII的非功能性等位基因的敲除转基因小鼠。该小鼠用作潜在治疗剂的筛选模型,所述治疗剂可用于治疗由膜联蛋白肿瘤抑制疾病引起的肿瘤。

[0008] JP2014-095643描述了基于膜联蛋白A2和ADAM17之间结合的抑制来筛选有效治疗炎性疾病的化合物。

[0009] WO2014/126127描述了筛选活性成分的方法,所述活性成分用于治疗作为甲酰肽受体1诱导的坏死性凋亡相关疾病的严重庚疮,皮肤红斑,体表糜烂,水疱和脱落。所筛选的活性成分被认为是能够抑制由甲酰肽受体1与膜联蛋白A1结合诱导的坏死性凋亡的物质。

[0010] WO 02/17857公开了通过提供结合膜联蛋白II的化合物抑制内皮细胞中的血管生成和选择性诱导内皮细胞凋亡的方法。这些化合物和使用这些化合物的方法被认为可用于治疗以不需要的血管生成为特征的疾病或病症。还提供了包含结合膜联蛋白II的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物和鉴定这些化合物的方法。

[0011] WO 2005/027965公开了抗膜联蛋白抗体及其用途以及它们的配体即膜联蛋白的用途。此类膜联蛋白和抗膜联蛋白抗体用于检测细胞凋亡和用于诊断和/或治疗癌症,自身免疫疾病,心血管疾病和/或血管疾病的药物组合物的制备。

[0012] US2014/0322214公开了包括用能够激活免疫细胞的抗Dectin-1特异性抗体或其片段结合免疫细胞上的Dectin-1的组合物和方法,以及用于治疗或预防有需要的受试者中的流感感染的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的包含与流感抗原融合的抗-dectin-1抗体的组合物。Connie Hesse的论文 (CLEC7A/Dectin-1 attenuates the immune response against dying and dead cells, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, 2011), 讨论了C型凝集素CLEC4L/DC-SIGN, CLEC9A/DNGR1和CLEC7A/dectin-1在凋亡和坏死细胞的识别以及摄取中的作用和/或它们对垂死细胞和死亡细胞的免疫原性的影响。

[0013] 低密度脂蛋白受体相关蛋白-1 (LRP-1) 是一种显示清除和信号传导功能的膜受体。与LRP-1相互作用的各种细胞外配体以及各种细胞质支架和信号蛋白使LRP-1不仅在生理过程如胚胎发生和发育中,而且在重要的病理情况(包括癌症和神经病症)中发挥重要作

用(Emonard, Theret等人, 2014)。细胞表面膜联蛋白VI可以作为酸性pH结合位点或受体, 并且在 α 2-巨球蛋白识别的情况下也可以作为在中性pH下的LRP-1的共同受体(Ling, Chen等人2004)。

[0014] Arur及其同事(Arur, Uche等人, 2003年)以及Tzelepis等人(Tzelepis, Verway等人, 2015)描述了膜联蛋白A1在凋亡细胞的吞噬过程中的作用, 其被认为是免疫沉默的并且不导致T细胞应答。在同一出版物中, Tzelepis及其同事进一步描述了内源性膜联蛋白A1在交叉呈递过程中的作用。该出版物描述了膜联蛋白A1作为在树突细胞胞质溶胶中发挥作用的介质。因此, 该出版物不能使用膜联蛋白核心结构域作为外源介质来进行抗原呈递和交叉呈递。

[0015] Andersen及其同事(Andersen, Xia等人, 2016)描述了膜联蛋白A2与Toll-样受体(TLR) 2的结合。通过触发TLR2, 膜联蛋白A2可以作为疫苗佐剂, 增强TLR介导的DC激活和如上调共刺激表面分子和抗原交叉呈递的过程。该出版物没有提及将抗原递送到DC中。

[0016] Tzelepis等人(Tzelepis等人. Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during Mycobacterium tuberculosis infection. J Clin Invest. 2015Feb; 125(2): 752-68. Epub, 2014年12月22日中)公开了结核分枝杆菌(Mtb)感染期间, 吞噬配体膜联蛋白1是DC交叉呈递中的重要介质, 其增加DC中的胞葬作用, 并且固有力地增强DC抗原呈递机制的能力。膜联蛋白1缺陷型小鼠对Mtb感染高度敏感, 并显示受损的Mtb抗原特异性CD8⁺T细胞应答。

[0017] 最后, Weyd及其同事(Weyd, Abeler-Dorner等人, 2013, Linke, Abeler-Dorner等人, 2015)公开了在小鼠中, 膜联蛋白A1、膜联蛋白A5、膜联蛋白A13和膜联蛋白核心结构域阻止了炎症性DC的发展, 并且抑制了针对在凋亡细胞中表达的模型抗原卵清蛋白(OVA)的细胞免疫应答。

[0018] 特异或优先与DC反应并介导抗原呈递的试剂具有作为诱导对肿瘤或传染病抗原的有效免疫应答的靶向剂的很大潜力。还可以改造这些细胞特异性靶向剂以递送毒素, 从而消除骨髓和器官移植或其他自身免疫病症中的有效抗原呈递细胞(例如DC)。因此, 这类DC特异性结合剂具有很大的治疗和诊断价值。

[0019] 因此, 本发明的一个目的是提供这样的新试剂并将这些试剂用于开发新的有效疗法。通过阅读本发明的以下描述, 本发明的其他目的和方面对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0020] 本发明涉及分离的膜联蛋白核心结构域, 所述膜联蛋白核心结构域被定义为包含选自SEQ ID No. 1至3和6至8的序列中所示的膜联蛋白核心结构域的氨基酸序列, 或者包含与选自SEQ ID No. 1至3和6至8的序列内所包含的膜联蛋白核心结构域氨基酸序列具有至少50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 最优选99%同一性的氨基酸序列。核心结构域的定义在下文的实施例部分中提供。特别优选的是, 膜联蛋白核心结构域由选自SEQ ID No. 1至3和6至8的氨基酸序列所示的核心结构域的氨基酸序列组成; 或由与选自SEQ ID No. 1至3和6至8的氨基酸序列所示的核心结构域的氨基酸序列具有至少50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 最优选99%同一性的氨基酸序列组成。

[0021] 本发明还提供蛋白质缀合物或融合蛋白, 其包含(i)如本文所述的至少一个膜联蛋白核心结构域, 和(ii)至少一个可由MHC(优选HLA)呈递的抗原肽。抗原肽可以源自肿瘤

或感染因子,病原体或内源蛋白。本发明还提供了各自的疫苗,其包含融合物和/或缀合物和其他治疗组合物。

[0022] 在某些实施方案中,本发明的蛋白质缀合物或融合蛋白包含膜联蛋白核心结构域和至少一个可由MHC呈递的抗原肽之间的共价连接。还包括本发明的缀合物或融合蛋白,其中共价连接包括接头分子或肽。在相关领域中已良好确立了合适的接头分子的选择。在本发明的一些实施方案中,接头包含如图10 (SEQ ID NO:15) 所示的接头的氨基酸序列,或与图10B (SEQ ID NO:15) 中所示的接头序列具有至少80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的序列。

[0023] 在本发明的一些方面和实施方案中,融合蛋白由SEQ ID NO:13中所示的核酸编码,或由与SEQ ID NO:13具有至少80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的其核酸变体编码。优选地,本发明的融合蛋白包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14具有至少80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的其变体。

[0024] 如本文所用的术语“融合蛋白”涉及人工蛋白质构建体,并且是指包含由其来源和/或特殊功能定义的至少两种不同氨基酸序列的蛋白质。在这方面,本发明的融合蛋白包含与另一种蛋白质的第二氨基酸序列融合的膜联蛋白核心结构域氨基酸序列,所述另一种蛋白质不是膜联蛋白并且在所述第二蛋白质或其片段通过MHC复合物呈递在细胞上的意义上而言是抗原性的。此外,根据本发明的术语融合蛋白还包括这样的融合蛋白,其还含有非蛋白质分子,例如核酸,糖或用于放射性或荧光标记的标志物。

[0025] 令人惊讶地发现,根据本发明的构建体具有免疫刺激(增强)作用。因此,本发明的含有膜联蛋白核心结构域复合物和/或融合物的组合物可用于多种DC靶向治疗中,例如,以增强抗原呈递和/或诱导针对多种靶细胞或病原体的T细胞应答,例如细胞毒性T细胞(CTL)应答,或者以治疗抗原呈递细胞(APC)介导的疾病。本发明令人惊讶地发现,将抗原性分子(如抗原肽)与本文所述的膜联蛋白核心结构域组合可显著增强所述抗原性序列的免疫调节作用。不受特定理论的束缚,将膜联蛋白核心结构域与抗原性分子偶联可增强抗原呈递细胞(例如树突细胞)的抗原加工和MHC呈递。因此,本发明广泛地实现了通过MHC,优选人MHC(HLA)增强抗原性分子的抗原呈递的产品和方法。

[0026] 如本文所用,术语“抗原”是指能够通过主要组织相容性抗原(MHC)细胞蛋白上呈递该抗原从而引发免疫应答如T细胞介导的免疫应答并引起抗原特异性T细胞应答的物质。在调节性T细胞(Treg)的情况下,对抗原的应答是其他效应细胞(例如辅助性T细胞(Th)和/或细胞毒性T细胞(Tc))引起的免疫应答的降低或改善。专业的免疫学家将认识到,当讨论被加工以呈递给T细胞的抗原时,术语“抗原”是指抗原的那些部分(例如,肽片段),其是由MHC呈递给T细胞受体的T细胞表位。当表述“抗原”被自体或自身修饰时,这是指通常存在于MHC分子中但也引发T细胞应答的自体或自身抗原。当在B细胞介导的免疫应答的背景下以对“抗原”(即抗原的与抗体(轻和重)可变结构域的互补决定区结合的抗原部分)具有特异性的抗体形式使用时,结合部分可以是线性或三维表位。在某些情况下,由本发明的疫苗或融合蛋白或蛋白质缀合物递送的抗原在呈递之前被抗原呈递细胞例如通过切割抗体或融合蛋白的一个或多个部分内化和加工。

[0027] 如本文所用,术语“抗原肽”是指被B细胞和/或T细胞特异性识别的多肽抗原部分。

B细胞通过抗体产生对外来抗原决定簇应答,而T淋巴细胞介导细胞免疫。因此,T细胞应答中的抗原肽是在MHC背景下被抗原特异性T细胞受体识别的那些抗原部分。

[0028] 如本文所用,术语“表位”是指能够特异性结合免疫球蛋白或由主要组织相容性复合物(MHC)蛋白(例如I类或II类)呈递给T细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常是适合MHC分子的凹槽的5-30个氨基酸长的短肽,所述MHC分子向T细胞受体呈递某些氨基酸侧基,并且例如由于凹槽、肽侧基和T细胞受体的特定电荷特征,在凹槽中具有某些其他残基。通常,当解离常数为1mM,100nM或甚至10nM时,抗体特异性结合抗原。

[0029] 如本文所用,术语“抗原呈递细胞”(APC)是能够活化T细胞的细胞,包括但不限于某些巨噬细胞,B细胞和树突细胞。“树突细胞”(DC)是指在淋巴或非淋巴组织中发现的形态上相似的细胞类型的不同群体的任何成员。这些细胞的特征在于它们独特的形态,高水平的表面II类MHC表达(Steinman等人,Ann.Rev.Immunol.9:271(1991);通过引用将其并入本文,用于描述这些细胞)。如本文所述,这些细胞可以从许多组织来源分离,并且方便地从外周血中分离或从鼠骨髓中分化。树突细胞结合蛋白是指其受体在树突细胞上表达的任何蛋白质。实例包括GM-CSF,IL-1,TNF,IL-4,CD40L,CTLA4,CD28和FLT-3配体。抗原肽包含能够由HLA分子(I类MHC和/或II类MHC)呈递并诱导T细胞应答例如细胞毒性T细胞(CTL)应答的肽序列。通常,这些肽的长度为8至30,优选8至24个氨基酸,I类MHC肽通常为8至10个长,II类MHC肽通常为21至25个氨基酸长。鉴定(“筛选”)这些抗原肽的方法也是已知的,并且可以涉及体内或体外和计算机方法。

[0030] 制备膜联蛋白核心结构域和抗原肽的各自的缀合物(即,包含不同组分(即膜联蛋白和肽)之间引入的非共价键或共价键)以及制备各自的融合蛋白(即在组分重组克隆之后同一蛋白质的表达)的方法是本领域熟知的。

[0031] 在本发明的上下文中,术语“膜联蛋白核心结构域”应理解为表示/代表膜联蛋白(或其同源物)多肽的最小片段,其对于介导抗原呈递是必需和足够的(参见下文)。一些优选的蛋白质膜联蛋白核心结构域如上文所定义。这种能力(生物学功能)可以用本文所述的许多本领域已知的方法进行测试,例如,下面的实施例。这种能力可以进一步用各种文献中描述的多种本领域已知的方法进行测试。关于膜联蛋白核心结构域的例子,另见下面的图7。此外,该术语应特别包括脊椎动物,特别是哺乳动物(特别是人)膜联蛋白基因和/或蛋白质和/或mRNA和/或如本文所述的核心片段(核心结构域)。该术语还涵盖不同制剂中的膜联蛋白核心结构域,例如在细胞背景下,重组表达所述核心结构域的细胞,从所述细胞中纯化的膜联蛋白核心结构域,以及其部分,特别是生物活性部分。

[0032] 已知蛋白质聚集体增强免疫应答。蛋白质聚集体介导这种有效抗体应答的机制尚未被完全理解。然而,据信效力至少部分是由于多价蛋白质广泛地交联细胞表面受体如B细胞的免疫球蛋白并激活B细胞的能力。因此,在本发明的背景下,一个实施方案是聚集本发明的蛋白质缀合物或融合蛋白以进一步增强免疫应答。这可以通过使用多聚体抗原肽来实现,其中抗原分子直接或通过接头序列多聚化以形成多抗原肽,其具有用于与根据本发明的膜联蛋白核心结构域融合的重复抗原序列。或者,本发明的融合蛋白可以进一步包含与融合蛋白共价连接的诱导蛋白质缀合物或融合蛋白聚集的部分,例如蛋白质多聚化结构域或二聚化结构域。这种蛋白质多聚化结构域的一个特别有利的实例是卷曲螺旋结构域,例如异亮氨酸拉链结构域,其促进具有这种结构域的多个多肽的三聚化。蛋白质多聚化修饰

的另一个有利实例是缀合的生物素或生物素化序列与蛋白质链霉亲和素一起使用。本发明上下文中的另一种选择提供了本发明的融合蛋白与蛋白质聚集剂组合的组合物。

[0033] 还可以通过顺序且在正确的编码框中放置蛋白质或肽(即膜联蛋白核心结构域和相应的抗原肽或抗原)的部分的两个或多个序列,在核酸编码水平上制备融合蛋白。融合蛋白通过本领域技术人员已知的方法包括例如固相蛋白质合成,以及允许在体外操纵DNA的分子技术包括聚合酶链式反应(PCR)和寡核苷酸定向诱变来合成。

[0034] 在本发明的上下文中,术语“C-型凝集素受体”,“Dectin-1”,“DC-SIGN”和“LRP-1”应理解为表示/代表受体的最小片段,如在实施例并且在例如上文针对凝集素-Fc融合蛋白提到的Hesse中所述和测试的,其对于结合膜联蛋白的核心结构域是必需和足够的。这种能力可以进一步用各种文献中描述的许多本领域已知的方法进行测试。此外,该术语应包括本文所述的人受体基因和/或蛋白质和/或mRNA和/或片段(结合部分,片段或结构域)的哺乳动物(特别是小鼠)同源物。该术语还涵盖不同制剂中的受体和/或受体的最小片段,例如在细胞背景下,(重组)表达所述受体和/或受体的最小片段的细胞,从所述细胞中纯化的受体和/或受体的最小片段,以及其部分。

[0035] 使用Dectin-1和DC-SIGN作为C-型凝集素受体和LRP-1家族的成员,可以鉴定新的DC-表面受体,其以高亲和力结合所研究的所有膜联蛋白的核心结构域。这表明Dectin-1, DC-SIGN和LRP-1负责膜联蛋白介导的对免疫应答和抗原呈递诱导的作用。

[0036] 膜联蛋白通过特异性受体对DC的作用是抗原呈递的新型分子机制,从而产生治疗癌症和肿瘤以及哺乳动物(例如小鼠和人)的传染病的多种新的可能性。

[0037] W02009/049892描述了第一多肽(A),其包含含有至少一个膜联蛋白核心结构域或其功能变体的募集多肽(a),诱饵多肽(b)和发光体。本发明的组合物可用于测量整个多蛋白复合物之内和/或之间的蛋白质-蛋白质相互作用。描述了根据本发明的方法用于鉴定测试化合物库中的测试化合物的用途,所述测试化合物调节医学相关的蛋白质-蛋白质相互作用,而没有公开任何具体的疾病背景。W02009/049892未提及膜联蛋白与Dectin-1, DC-SIGN和/或LRP-1的任何相互作用,并且还不能用于筛选治疗相关的化合物和/或组合物。

[0038] W0 2005/027965描述了膜联蛋白I和其他膜联蛋白与特定受体有关,该受体可以通过结合一种膜联蛋白或其片段或抗该受体的抗体被刺激或阻断。因此,讨论了膜联蛋白和/或其功能片段和/或包含膜联蛋白或其功能片段的融合蛋白用于调节免疫系统。W0 2005/027965未提及膜联蛋白核心结构域本身用于介导抗原呈递的用途,因此也不能用于筛选治疗相关的化合物和/或组合物。

[0039] 在体外将骨髓来源的DC(BMDC)暴露于包含膜联蛋白核心结构域和模型抗原卵清蛋白(OVA)的融合蛋白,导致在表面I类MHC分子中OVA来源的肽的显著的抗原呈递(图1),以及CD8⁺和CD4⁺T细胞的强烈增强的特异性T细胞刺激(图2和3)。这些结果表明,膜联蛋白核心结构域在抗原呈递和抗原交叉呈递中具有先前未被鉴别的作用。因此,在设计接种策略时,操纵膜联蛋白核心结构域介导的抗原呈递可能显示是有用的,因此对癌症(接种肿瘤抗原)或传染病的患者有益。值得注意的是,这种膜联蛋白核心结构域外源地地施用于DC并与抗原连接时介导抗原递送和抗原呈递的机制,固有地不同于已描述的膜联蛋白A1的内源性细胞溶质功能(Tzelepis, Verway等人,2015)。该机制也不同于已描述的能结合Toll-样受体2的膜联蛋白A2的疫苗佐剂功能(Andersen, Xia等人2016),因为如本文所述的膜联蛋白

核心结构域不通过TLR介导DC刺激但介导抗原递送和抗原(交叉)呈递。

[0040] 优选的是根据本发明的蛋白质缀合物或融合蛋白,其中所述抗原肽源于选自以下的蛋白质: β hCG, gp100或Pmel17, HER2/neu, WT1, 间皮素, CEA, gp100, MART1, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), 独特型, 酪氨酸酶, 端粒酶, SSX2, MUC-1, MART1, melan-A, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3和分子量黑素瘤相关抗原(HMW-MAA)。

[0041] 用于本发明的其他抗原肽包括选自肿瘤相关抗原的癌症肽,例如从患者获得的自体癌抗原。癌抗原的非限制性实例包括来自以下的抗原:白血病和淋巴瘤;神经性肿瘤,如星形细胞瘤或胶质母细胞瘤;黑素瘤;乳腺癌;肺癌;头颈癌;胃肠道肿瘤;胃癌;结肠癌;肝癌;胰腺癌;泌尿生殖系统肿瘤如宫颈;子宫;卵巢癌;阴道癌;睾丸癌;前列腺癌或阴茎癌;骨肿瘤;血管瘤;或唇部;鼻咽;咽和口腔;食管;直肠;胆囊;胆管树;喉;肺和支气管;膀胱;肾;大脑和神经系统的其他部分;甲状腺的癌症;霍奇金病;非霍奇金淋巴瘤;多发性骨髓瘤和白血病。在一个具体方面,组合物还包含选自肿瘤相关抗原的抗原肽,其选自:CEA;前列腺特异性抗原(PSA);HER-2/neu;BAGE;GAGE;MAGE 1-4, 6和12;MUC(粘蛋白)(例如MUC-1, MUC-2等);GM2和GD2神经节苷脂;ras;myc;酪氨酸酶;MART(黑素瘤抗原);MARCO-MART;细胞周期蛋白B1;细胞周期蛋白D;Pmel17(gp100);GnT-V内含子V序列(N-乙酰葡萄糖胺基转移酶V内含子V序列);前列腺Ca psm;前列腺血清抗原(PSA);PRAME(黑素瘤抗原); β -连环蛋白;MUM-1-B(黑素瘤普遍存在的突变基因产物);GAGE(黑素瘤抗原)1;BAGE(黑素瘤抗原)2-10;C-ERB2(Her2/neu);EBNA(爱泼斯坦-巴尔病毒核抗原)1-6;gp75;人乳头瘤病毒(HPV)E6和E7;P53;肺耐药蛋白(LRP);BCL-2和Ki-67。

[0042] 用于本发明上下文的其他抗原肽或抗原选自病毒抗原。术语“病毒抗原”包括引发针对病毒的免疫应答的任何物质。实例包括:逆转录病毒科,特别是HIV-1和HIV-LP;小核糖核酸病毒科,特别是脊髓灰质炎病毒和甲型肝炎病毒;肠道病毒,特别是人类柯萨奇病毒,鼻病毒,埃可病毒;杯状病毒科,特别是引起胃肠炎的毒株;披膜病毒科,特别是马脑炎病毒和风疹病毒;黄病毒科,特别是登革热病毒,脑炎病毒和黄热病病毒;冠状病毒科,特别是冠状病毒;弹状病毒科,特别是水泡性口炎病毒和狂犬病病毒;丝状病毒科,特别是埃博拉病毒和马尔堡病毒;副粘病毒科,特别是副流感病毒,腮腺炎病毒,麻疹病毒和呼吸道合胞病毒;正粘病毒科,特别是流感病毒;布尼亚病毒科,特别是汉坦病毒,bunga病毒,白蛉病毒和内罗病毒;沙粒病毒科,特别是出血热病毒;呼肠孤病毒科,特别是呼肠孤病毒,环状病毒和轮状病毒;双核糖核酸病毒科;嗜肝DNA病毒科,特别是乙型肝炎病毒;细小病毒科,特别是细小病毒;乳多空病毒科,特别是乳头状瘤病毒,猿猴病毒-40(SV40)和多瘤病毒;腺病毒科;疱疹病毒科,特别是单纯疱疹病毒(HSV)1和2,水痘带状疱疹病毒,巨细胞病毒(CMV),疱疹病毒;痘病毒科,特别是天花病毒,牛痘病毒和痘病毒;以及虹彩病毒科,特别是非洲猪瘟病毒;丙型肝炎病毒和HPV L6, HPV L7, 以上的片段和衍生物。

[0043] 用于本发明上下文的其他抗原肽或抗原选自细菌抗原。如本文所用,术语“细菌抗原”包括引发针对细菌的免疫应答的任何物质。实例包括:螺杆菌,特别是幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*);疏螺旋体,特别是伯氏疏螺旋体(*Borelia burgdorferi*);军团菌,特别是嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*);分枝杆菌,特别是结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*),鸟分枝杆菌(*M. avium*),胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*),堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*),戈登分枝杆菌(*M. goodii*);葡萄球菌,特别是金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*); 奈瑟氏球菌, 特别是淋病奈瑟氏球菌 (*N.gonorrhoeae*), 脑膜炎奈瑟氏球菌 (*N.meningitidis*); 李斯特氏菌, 特别是单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*); 链球菌, 特别是化脓性链球菌 (*S.pyogenes*), 无乳链球菌 (*S.agalactiae*); 粪链球菌 (*S.faecalis*); 牛链球菌 (*S.bovis*), 肺炎链球菌 (*S.pneumoniae*); 厌氧链球菌; 致病性弯曲杆菌; 肠球菌; 嗜血杆菌, 特别是流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*); 芽孢杆菌, 特别是炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*); 棒杆菌, 特别是白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*); 丹毒丝菌, 特别是猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*); 梭菌, 特别是产气荚膜梭菌 (*C.perfringens*), 破伤风梭菌 (*C.tetani*); 肠杆菌, 特别是产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 克雷伯氏菌, 特别是肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 巴斯德氏菌, 特别是多杀性巴氏菌 (*Pasturella multocida*), 拟杆菌; 梭杆菌, 特别是具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*); 链杆菌, 特别是念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*); 密螺旋体, 特别是纤细密螺旋体 (*Treponema pertenuis*); 钩端螺旋体; 致病性埃希氏菌; 和放线菌, 特别是衣氏放线菌 (*Actinomyces israelii*)。

[0044] 此外, 优选的是根据本发明的蛋白质缀合物或融合蛋白, 其中所述缀合物或所述融合蛋白进一步缀合/融合至共刺激分子或其免疫原性片段或共刺激第二肽序列。

[0045] 然后, 本发明的另一方面涉及编码根据本发明的融合蛋白或蛋白质缀合物的核酸。优选地, 编码序列编码来源于选自以下的蛋白质的抗原: β hCG, gp100或Pmel17, HER2/neu, WT1, 间皮素, CEA, gp100, MART1, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), 独特型, 酪氨酸酶, 端粒酶, SSX2, MUC-1, MART1, melan-A, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3和分子量-黑素瘤相关抗原 (HMW-MAA)。更优选地, 所述编码序列与至少一种 (另外的) DC刺激核酸序列融合。还可以使用多种抗原肽的融合物, 例如在一种肿瘤疾病中发现的多种序列, 或在个体肿瘤中发现的患者特异性抗原。

[0046] 然后, 本发明的另一方面涉及表达根据本发明的核酸的重组表达载体。

[0047] 本发明还涉及分离的膜联蛋白核心结构域, 其包含选自SEQ ID No.1至3和6至8的序列中所示的核心结构域的氨基酸序列。结构域范围在本文的实施例部分中提供。优选的是由所述序列组成, 或基本上由所述序列组成 (例如具有不干扰结构域的功能的5-10个氨基酸延伸) 的结构域。可以进一步用于根据本发明的方法中的根据本发明的膜联蛋白核心结构域可以来源于任何已知的膜联蛋白或功能片段 (即能够结合如本文所述的受体), 并且优选地选自人或鼠膜联蛋白1、5和13核心结构域, 优选包含于SEQ ID NO:1至3和6至8的序列中的序列, 或者包含于SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 7或8的序列中的核心序列, 或其功能片段, 更优选如图8中所示的加框序列。

[0048] 本发明中的术语“接触”是指潜在结合物质/抗原与膜联蛋白核心结构域之间的任何相互作用, 由此两种组分中的任何一种可以彼此独立地在液相中 (例如在溶液中) 或者在悬浮液中, 或者可以与固相结合, 例如, 以基本上平坦的表面的形式或以颗粒, 珍珠等的形式。

[0049] 本发明的另一方面涉及制备用于治疗或预防传染病或癌症的药物组合物的方法, 其包括将根据本发明的蛋白质缀合物或融合蛋白, 或根据本发明的核酸, 或根据本发明的表达载体与合适的试剂或载体混合的步骤。

[0050] 因此,本发明化合物可与合适的辅助物质和/或添加剂混合。这些物质包括能增加相互作用化合物的稳定性,溶解性,生物相容性或生物半衰期的药理学上可接受的物质,或包括某些应用途径(例如静脉内溶液,喷雾剂,创可贴或药丸)中必须包含的物质或材料。

[0051] 用于配制药物组合物,例如以通过任何常规途径全身或局部施用的载体,赋形剂和策略,是本领域技术人员所熟知的并且在相应的文献中有所描述,所述任何常规途径特别是肠内,例如经口,例如片剂或胶囊形式,肠胃外,例如以可注射溶液或悬浮液的形式,局部地,例如以乳液,凝胶,软膏或乳膏的形式,或以鼻或栓剂的形式。

[0052] 因此,本发明的另一方面是药物组合物,其包含根据本发明的蛋白质缀合物或融合蛋白,或根据本发明的核酸,或根据本发明的表达载体。优选地,药物组合物是疫苗。

[0053] 可以通过允许药剂到达靶细胞的任何方法来完成药剂(例如复合物或融合物)的施用。这些方法包括例如注射,沉积,植入,塞药,口服摄入,吸入,局部施用或获得药剂接近靶细胞的任何其他施用方法。注射可以是例如静脉内,皮内,皮下,肌肉内或腹膜内。植入包括插入可植入药物递送系统,例如微球,涂覆的微粒,水凝胶,聚合物储库,胆固醇基质,聚合物系统例如基质侵蚀和/或扩散系统,以及非聚合物系统,例如压缩,熔融或部分熔融的粒料。塞药包括甘油塞药。口服摄入剂量可以是带肠溶包衣的。吸入包括用吸入器中的气溶胶施用药剂,单独使用或附着在可被吸收的载体上。药剂可以例如以溶解或胶体形式悬浮在液体中。液体可以是溶剂,部分溶剂或非溶剂。在许多情况下,可以使用水或有机液体。

[0054] 在某些实施方案中,通过施用重组核酸(例如膜联蛋白核心结构域或抗原RNA)将化合物(活化剂或抑制剂)施用于受试者。优选地,重组核酸是基因治疗载体。

[0055] 本发明的另一方面涉及如本文所述的方法或用途,其中所述药物组合物还包含用于治疗或预防自身免疫疾病,慢性炎症疾病,过敏症或癌症的其他药物活性成分,即化学治疗剂。

[0056] 本发明的另一方面涉及用于预防和/或治疗本文所述的疾病(参见例如下文)的根据本发明的分离的膜联蛋白核心结构域;膜联蛋白核心结构域与至少一种抗原的复合物或融合物;活化抗体,其任选地与至少一种抗原或过敏化合物偶联;或药物组合物。优选的是用于本发明的用途的复合物或融合物,其中所述复合物或融合物是可溶的或结合至载体,例如脂质体或乳胶珠。

[0057] 本发明的另一方面涉及治疗或预防患者的传染病或癌症的方法,其包括向所述患者施用根据本发明的有效量的分离的膜联蛋白核心结构域;膜联蛋白核心结构域与至少一种抗原或过敏化合物的复合物或融合物;活化抗体,其任选与至少一种抗原或过敏化合物结合;或通过本发明的方法获得的药物组合物。

[0058] 一般而言,主治医生将基于所鉴定的化合物,并且任选地还基于其他个体患者数据(临床数据,家族史,DNA等)进行治疗,并且还可以基于这些因素的组合进行治疗。例如,本发明的这种方法涉及将个体诊断免疫学数据与患者临床信息和一般医疗保健统计相结合,以例如能够向患者应用个性化医疗。还可以使用关于药物有效性,药物相互作用和其他患者状态条件的重要信息。

[0059] 优选的是根据本发明的治疗方法,其中所述待治疗的哺乳动物是小鼠,大鼠或人。

[0060] 优选地,本发明的活性剂(优选本发明的膜联蛋白核心结构域或蛋白质缀合物或融合蛋白)以包含如上所述的活化剂(例如抗体,核苷酸或用于膜联蛋白核心结构域/受体

结合的活化结合化合物)的药物组合物的形式施用。优选地,所述患者是人。治疗意指包括例如疾病或病况(即免疫疾病例如免疫缺陷,传染病或癌症)的预防,治疗,减轻症状,或治愈。

[0061] 一般而言,主治医生将基于所鉴定的化合物,并且任选地还基于其他个体患者数据(临床数据,家族史,DNA等)进行治疗,并且还可以基于这些因素的组合进行治疗。例如,本发明的这种方法涉及将个体诊断免疫学数据与患者临床信息和一般医疗保健统计相结合,以例如能够向患者应用个性化医疗。还可以使用关于药物有效性,药物相互作用和其他患者状态条件的重要信息。

[0062] 优选的是根据本发明的治疗方法,其中所述待治疗的哺乳动物是小鼠,大鼠或人。

[0063] 更优选地,待治疗的癌症是实体瘤,例如选自乳腺癌,骨癌,卵巢癌,肝癌,肾癌和肺癌的实体瘤。

[0064] 优选地,活性剂以药物组合物,例如本发明的蛋白质缀合物或融合蛋白的形式施用,所述患者是人。治疗意指包括例如疾病或病况(即癌症)的预防,治疗,减轻症状或治愈。治疗通常涉及向需要治疗的受试者施用治疗有效量的本发明的蛋白质缀合物或融合蛋白。

[0065] 另一方面,本发明提供了接种受试者的方法,其包括将本发明的蛋白质缀合物或融合蛋白施用于需要接种的受试者。本发明的蛋白质缀合物或融合蛋白优选为疫苗组合物的形式,并额外包含至少一种载体和/或赋形剂和/或疫苗佐剂。

[0066] 本文公开的药物,特别是疫苗组合物优选还包含一种或多种免疫刺激化合物,例如佐剂。“佐剂”是以非特异性方式增强免疫应答产生的药剂。常用佐剂包括本发明的融合蛋白吸附于其上的矿物质(明矾,氢氧化铝,磷酸铝)的悬浮液;乳液,包括油包水,和水包油(及其变体,包括双重乳液和可逆乳液),脂糖,脂多糖,免疫刺激核酸(如CpG寡核苷酸),脂质体,To11-样受体激动剂(特别是TLR2,TLR4,TLR7/8和TLR9激动剂),以及这些组分各种组合。

[0067] “有效量”是增加抗原呈递的本文所述的化合物或药物组合物的量。该量减轻了疾病和/或病况中存在的症状。

[0068] 本发明还包括治疗具有传染病或癌症风险的受试者的方法,其中提供治疗有效量的膜联蛋白核心结构域缀合物。处于疾病风险中可能是由于例如疾病的家族史,易患该疾病的基因型,或易患该疾病的表型症状。

[0069] 哺乳动物患者可以是大鼠,小鼠,山羊,兔,绵羊,马,猴或人,优选小鼠,大鼠或人。

[0070] 然后,本发明的另一优选方面涉及试剂盒,其包含在一个或多个容器中的如本文所述的根据本发明的接种材料,优选包含根据本发明的筛选工具。任选地,试剂盒包含用于实施如本文所述的根据本发明的方法的说明书。

[0071] 试剂盒可进一步包含(iii)缓冲液,(iv)稀释液,(v)过滤器,(vi)针或(v)注射器中的一种或多种。容器优选为瓶子,小瓶,注射器或试管,并且它可以是一个多用途的容器。容器可以由多种材料制成,例如玻璃或塑料。优选地,试剂盒和/或容器包含在容器上或与容器相关的说明书,其显示复溶和/或使用的说明。

[0072] 优选的是根据本发明的试剂盒,其中所述试剂盒包含用于选自蛋白质印迹和/或酶联免疫吸附测定(ELISA)的方法的材料。例如,标签可以指示冻干制剂将复溶成适合于上述方法例如ELISA的某些抗体浓度。

[0073] 进一步优选的是根据本发明的用途,其中所述试剂盒包含对本文所述的膜联蛋白核心结构域和/或其功能部分和变体具有特异性的单克隆抗体或其片段。

[0074] 以下附图,序列和实施例仅用于说明本发明,不应解释为将本发明的范围限制于实施例中描述的本发明的具体实施方案。本文引用的所有参考文献均通过引用整体并入本文。

[0075] 图1显示与单独的抗原OVA相比,含有膜联蛋白核心结构域和模型抗原卵清蛋白的融合蛋白(Anx-OVA)导致树突细胞(DC)上的I类MHC分子中强烈增强的抗原交叉呈递。A)实验的示意图。将鼠骨髓来源的DC与OVA或Anx-OVA一起孵育。通过特异性抗体(抗MHC-SIINFEKL,抗体25-D1.16,eBioscience)检测在DC上的MHC I分子内交叉呈递的OVA来源肽SIINFEKL(SEQ ID NO:4)。B)对交叉呈递的OVA来源肽SIINFEKL为阳性的DC的描绘,如在与等量(500nM)的OVA或Anx-OVA孵育12小时后在流式细胞术中检测到的。 $N=3$ 。

[0076] 图2显示相比与单独的抗原OVA孵育,DC与含有膜联蛋白核心结构域和模型抗原卵清蛋白的融合蛋白(Anx-OVA)的孵育导致强烈增强的CD8+T细胞活化。A)实验的示意图。将鼠骨髓来源的DC与OVA或Anx-OVA一起孵育。使用携带对OVA来源的SIINFEKL(SEQ ID NO:4)肽具有特异性的转基因T细胞受体的CD8+OT-IT细胞检测CD8+T细胞活化。通过干扰素- γ (IFN- γ)的分泌检测T细胞活化。B)将鼠骨髓来源的DC与等量的OVA或Anx-OVA或作为阳性对照的纯化的SIINFEKL-肽一起孵育。孵育12小时后,将DC与OT-IT细胞共培养3-5天。通过在ELISA中测量IFN- γ 分泌来检测OT-IT细胞活化。 $N=3$ 。

[0077] 图3显示相比与单独的抗原OVA孵育,DC与含有膜联蛋白核心结构域和模型抗原卵清蛋白的融合蛋白(Anx-OVA)的孵育导致强烈增强的CD4+T细胞活化。A)实验的示意图。将鼠骨髓来源的DC与OVA或Anx-OVA一起孵育。使用携带对OVA来源的ISQAVHAAHAEINEAGR(SEQ ID NO:5)肽具有特异性的转基因T细胞受体的CD4+OT-IIT细胞检测CD4+T细胞活化,通过白细胞介素-2(IL-2)的分泌检测T细胞活化。B)将鼠骨髓来源的DC与等量的OVA或Anx-OVA一起孵育。孵育12小时后,将DC与OT-IIT细胞共培养1天。通过在ELISA中测量IL-2分泌来检测OT-IIT细胞活化。

[0078] 图4显示相比与单独的抗原OVA孵育,DC与含有膜联蛋白核心结构域和模型抗原卵清蛋白的融合蛋白(Anx-OVA)的孵育导致强烈增强的CD4+T细胞活化。A)实验的示意图。将鼠骨髓来源的DC与OVA或Anx-OVA一起孵育。使用携带对OVA来源的ISQAVHAAHAEINEAGR(SEQ ID NO:5)肽具有特异性的转基因T细胞受体的CD4+OT-IIT细胞检测CD4+T细胞活化,通过干扰素- γ (IFN- γ)的分泌检测T细胞活化。B)将鼠骨髓来源的DC与等量的OVA或Anx-OVA一起孵育。孵育12小时后,将DC与OT-IIT细胞共培养3-5天。通过在ELISA中测量IFN- γ 分泌来检测OT-IIT细胞活化。

[0079] 图5显示各种膜联蛋白以高亲和力结合受体LRP-1。通过石英晶体微量天平检测所示重组膜联蛋白和膜联蛋白A1核心结构域与固定的LRP-1的结合。以3种不同浓度分析重组膜联蛋白。描绘了所示膜联蛋白和膜联蛋白A1核心结构域与LRP-1的拟合结合曲线。计算出的针对所有膜联蛋白和膜联蛋白A1核心结构域的亲和力范围为50-300nM。鼠膜联蛋白A1(mAnxA1):实心圆;鼠膜联蛋白A1核心结构域(mAnxA1核心):空心圆;鼠膜联蛋白A5(mAnxA5):实心方块;鼠膜联蛋白A13(mAnxA13):空心方块。

[0080] 图6显示几种膜联蛋白以高亲和力结合受体Dectin-1。A)在ELISA中分析重组膜联

蛋白A1 (膜联蛋白I) 和膜联蛋白A5 (膜联蛋白V) 与所示固定化C型凝集素分子的结合。B) 鼠膜联蛋白A1, 膜联蛋白A5, 膜联蛋白A13和膜联蛋白A1核心结构域与表面分子Dectin-1结合的表面等离子体共振光谱传感图。使所示浓度的所示重组膜联蛋白与固定的Dectin-1结合, 并通过表面等离子体共振测量结合分子。膜联蛋白对Dectin-1的亲合力计算为纳摩尔范围 (~100nM)。

[0081] 图7显示了代表性膜联蛋白的结构域结构。其他脊椎动物中显示的12种人膜联蛋白的直系同源物具有相同的结构, 其中核心区中的四个重复序列 (黑色) 严格保守, 而氨基末端区的长度和序列变化 (阴影)。人ANXA1和ANXA2与和它们相互作用的S100蛋白家族的成员显示为二聚体。其他模式生物的结构域结构来自相关基因组测序项目获得的公共数据。特征: S100Ax, 用于连接钙结合蛋白的所示S100家族成员的位点; P, 已知的磷酸化位点; K, KGD共源性状 (蛋白质的保守的, 遗传特征); I, 密码子插入 (+x表示插入的密码子数); S-A/b, 非同义编码多态性 (SNP), 其中氨基酸在主要变体 (A) 中和氨基酸在次要变体 (b) 中; N, 推定的核苷酸结合位点; D, 密码子缺失 (-x表示缺失的密码子数); A, 可选择拼接的外显子; Myr, 豆蔻酰化。每种蛋白质的总长度显示在右侧。取自Moss和Morgan. The annexins. *Genome Biol.* 2004; 5 (4): 219。

[0082] 图8显示了FASTA形式的登录号以及人和鼠膜联蛋白A1, A5和A13的蛋白质序列的比对。膜联蛋白的核心结构域的保守序列是加框的。* (星号) 表示具有单个完全保守残基的位置。: (冒号) 表示具有强烈相似特性的组之间的保守性。· (句号) 表示具有微弱相似特性的组之间的保守性。

[0083] 图9表明与单独的抗原OVA相比, 用含有膜联蛋白核心结构域和模型抗原卵清蛋白的融合蛋白 (Anx-OVA) 进行接种强烈地提高了接种效力。A) 实验的示意图。C57BL/6wt小鼠用每只动物400pMol OVA或Anx-OVA进行免疫。使用荧光标记的SIINFEKL-I类MHC四聚体在接种后7天检测抗原 (OVA) 特异性CD8+T细胞的诱导。B) 和C) 结果表明在所示接种后每组平均3只小鼠 (B) 和单独的每只动物 (C) 中所有CD8+T细胞内OVA特异性CD8+T细胞的频率。OVA: 卵清蛋白, Anx-OVA: 含有膜联蛋白核心结构域, 连接序列和卵清蛋白的融合蛋白, -: 未接种。

[0084] 图10显示了用于接种的Anx-OVA融合蛋白的DNA序列 [SEQ ID NO: 13] (A) 和氨基酸序列 [SEQ ID NO: 14] (B)。浅灰色阴影: 人膜联蛋白A1核心结构域; 无阴影: 接头序列; 深灰色阴影: 卵清蛋白 (OVA)。

[0085] SEQ ID No. 1至3和6至8分别显示了在本发明的上下文中使用的人和小鼠膜联蛋白1, 5和13的序列。

[0086] SEQ ID No. 4和5显示了在本发明的上下文中使用的肽序列。

[0087] SEQ ID No: 9至12显示了用于本发明中的引物序列。

实施例

[0088] 序列

[0089] 序列如下:

[0090]

SeqID	UniProt 蛋白质 ID	范围	在文本中称为
1	P04083	41-344	人膜联蛋白 A1 核心结构域
2	P08758	14-317	人膜联蛋白 A5 核心结构域
3	P27216	13-316	人膜联蛋白 A13 核心结构域
4	P01012	257-267	ova 肽 SIINFEKL
5	P01012	323-339	ova 肽

[0091] ISQAVHAAHAEINEAGR

[0092]

6	P10107	41-344	鼠膜联蛋白 A1 核心结构域
7	P48036	12-315	鼠膜联蛋白 A5 核心结构域
8	Q99JG3	14-317	鼠膜联蛋白 A13 核心结构域

[0093] 小鼠

[0094] C57BL/6小鼠购自Jackson实验室。将所有小鼠供养在无特定病原体的设施中。

[0095] 细胞

[0096] 为了使用重组的鼠GM-CSF将BM前体分化为BMDC,在24孔板的RPMI 1640完全培养基(10%FCS,10U/ml青霉素/链霉素,300mg/1L-谷氨酰胺,20ng/ml GM-CSF(Immunotools))中以 1×10^6 个细胞/ml的密度接种 1×10^6 个细胞。2天后,将培养基更换为新鲜培养基。4天后,除去一半培养基并用新鲜培养基更换。分化后7-8天进行实验。

[0097] 重组的核心结构域-抗原融合蛋白的产生

[0098] 小鼠(m) AnxA1-OVA-pET41a质粒通过将鸡卵清蛋白(OVA;分别未NM_205152或NP_990483,来自氨基酸140)克隆到修饰形式的pET41a中来产生,所述修饰形式的pET41a具有C-末端FLAG标签,PreScission蛋白酶切割位点和蛋白A标签。此外,在mAnxA1和OVA之间引入两个柔性接头和烟草蚀刻病毒(TEV)切割位点。使用以下引物进行连续PCR:

[0099] Fw_1:5' GGCGGAGGTTTCAGGCGGAGGTTTCAGATCAAGCCAGAGAGCTCATC 3'; (SEQ ID NO:9),

[0100] Fw_2:5' GAAAACCTTGATTTCCAGGGCGGCGGAGGTTTCAGGCG 3'; (SEQ ID NO:10),

[0101] Fw_3:5' GGATCCGCGGAGGTTTCAGGCGGAGGTTTCAGAAAACCTTGATTTCCAGGGCGG 3' (SEQ ID NO:11) 和

[0102] Rev:5' GGATCCAGGGGAAACACATCTGCCAAAG 3' (SEQ ID NO:12)。

[0103] 使用来自Promega的pGEM®-T easy载体系统亚克隆最终的PCR产物。大肠杆菌BL21(DE3)pLysS菌株(Promega)用于表达融合蛋白。将用上述载体转化的大肠杆菌的过夜培养物用于接种4L含有50 μ g/ml卡那霉素和34 μ g/ml氯霉素的LB。将培养物以180rpm搅拌直至A600nm达到0.6。使用1mM异丙基-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)在37 $^{\circ}$ C诱导表达4小时。通过离心收获细胞并在-20 $^{\circ}$ C下冷冻保存。将含有蛋白A标记的重组融合蛋白的细胞团重悬于天然细菌裂解缓冲液中,并通过六个冷冻和解冻循环破碎。将细胞提取物上样到IgG

Sepharose 6 Fast Flow珠(GE Healthcare)。如先前所述(Reichelt,Schwarz等人,2006,Zimmerman,Petit Frere等人,2006),通过用含有0.1%Triton X-114(Sigma-Aldrich)的TBS洗涤来实现LPS的去除。通过用含有0.05%Tween-20的TBS洗涤除去Triton X-114。在用PreScission蛋白酶(GE Healthcare)切割融合蛋白并用谷胱甘肽琼脂糖珠4B(Amersham Biosciences)除去PreScission蛋白酶后,将重组蛋白用PBS透析。无菌过滤后,使用BCA-Assay(Pierce)测量蛋白质浓度,并使用Limulus Amoebocyte Lysate Assay(Lonza)测定LPS含量。

[0104] 重组蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)pLysS菌株(Promega)中由pET41a载体(Novagen)表达。将编码膜联蛋白A1核心结构域和全长鸡卵清蛋白的融合蛋白的PCR产物克隆到含有C-末端FLAG_标签,PreScission蛋白酶切割位点和蛋白A_标签的pET41a中。将细菌裂解物($10,000 \times g$, 4°C , 40分钟)上样到预平衡的IgG Sepharose 6 Fast Flow珠(GE Healthcare)上。通过用含有0.1%Triton X-114(Sigma)的TBS洗涤来实现LPS的去除。通过用含有0.05%Tween-20(Gerbu)的TBS洗涤除去Triton X_114。在用PreScission蛋白酶(GE Healthcare)切割融合蛋白并除去PreScission蛋白酶后,将重组蛋白针对PBS透析。根据制造商的说明,使用Limulus Amoebocyte Lysate Assay(Lonza)测定所有膜联蛋白A1制备物中的LPS含量低于5EU/mg。

[0105] 体外抗原呈递的检测

[0106] 将来自C57BL/6野生型小鼠的 2×10^5 个BMDC与500nM或所示量的重组卵清蛋白(OVA,Sigma)或膜联蛋白核心结构域-OVA融合蛋白一起孵育。8-12小时后,用PBS洗涤DC,并与针对I类MHC中的OVA来源肽SIINFEKL的荧光标记的抗体(抗体25-D1.16,eBioscience)一起孵育。在FACS(FACS-Canto,Becton-Dickinson)中检测SIINFEKL阳性细胞。

[0107] DC和T细胞的共培养和T细胞活化

[0108] 将来自C57BL/6野生型小鼠的 2×10^5 个BMDC与500nM或所示量的重组卵清蛋白(OVA,Sigma)或膜联蛋白核心结构域-OVA融合蛋白一起孵育。12小时后,分别将来自OT-I或OT-II小鼠脾脏的 1×10^6 个磁性纯化(Easysep,Stemcell Technologies)的CD8+或CD4+T细胞加入DC培养物中。1-2天(白细胞介素-2)或3-5天(干扰素- γ)后,通过ELISA(Becton-Dickinson)在培养物上清液中测定所示的细胞因子。

[0109] 测量膜联蛋白和LRP-1之间的结合亲和力

[0110] 为了测量LRP-1与不同膜联蛋白(膜联蛋白A1,A5和A13)结合的亲和力,使用装置A100(ATTANA)。根据制造商的说明书,将LRP-1固定在LNB羧基芯片上。为了实现这一目标,首先,根据制造商的说明书,用EDC/SulfoNHS激活芯片,然后将在乙酸钠缓冲液(pH4.0)中的纯化的LRP1($5-15 \mu\text{g/ml}$)注射到芯片上,直到频率增加达到70-100Hz。然后,使用两次乙醇胺注射使芯片上剩余的结合点饱和,并将芯片在PBS中缓冲。对于与不同膜联蛋白的孵育,在含有2mM钙的PBS中以六种不同的浓度来制备它们,并一式三份进行测量。在每次Anx注射后,在下次Anx注射之前,用5mM EDTA/PBS和3M NaCl使芯片再生。

[0111] 通过ELISA进行的针对不同受体的膜联蛋白结合测量

[0112] 为了测试与膜联蛋白的结合,将推定的受体分子,其片段或融合蛋白(例如LRP-11,单个LRP-1结构域或Dectin-1Fc蛋白)以 $10 \mu\text{g/ml}$ 固定在ELISA板上的包被缓冲液(碳酸盐-碳酸氢盐- $1.5 \text{g Na}_2\text{CO}_3$; 2.93g NaHCO_3 ; 蒸馏水,1升,pH至9.6)中。洗涤(3x PBS Tween

0.01%) 和封闭 (PBS中1%酪蛋白) 后,将不同浓度的重组膜联蛋白在孔中孵育2小时,然后进行5次洗涤步骤 (PBS-Tween 0.05%)。然后通过针对重组的膜联蛋白-蛋白质的合适的第二试剂 (例如辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗或生物素标记的二抗加链霉亲和素标记的 HRP) 检测结合的膜联蛋白,并通过与合适的底物 (例如OPD) 反应在ELISA板读数器中进行测量。还可以通过将不同的膜联蛋白固定在平板上并用重组受体分子,其片段或融合蛋白 (例如LRP-11,单个LRP-1结构域或Dectin-1Fc蛋白) 探测来进行测定。

[0113] 通过表面等离子体共振对膜联蛋白-Dectin1的结合亲和力测量

[0114] 表面等离子体共振 (SPR) 是用于实时分析受体配体相互作用并提供关于结合的亲和力和动力学的见解的有价值的工具。SPR是用于测量配体 (称为分析物) 与受体的结合和解离动力学的技术。分析物或受体可以固定在带有金膜的传感器芯片上。分析物和受体非此即彼的结合 (取决于哪一种被固定) 引起与金膜接触的层的折射率的变化。这被测量为表面层处的折射率的变化,并且记录为以共振单位 (RU) 计的SPR信号。为了制备Dectin-1包被的表面,以10 μ l/min的流速固定Dectin-1。通过注射N-乙基-N'-(二乙基氨基丙基)-碳二亚胺 (EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的混合物10分钟激活CM5芯片,并通过注射100 μ g/mL和10 μ g/mL在醋酸盐缓冲液pH5.5中的Dectin 7分钟进行功能化。然后通过注射1M乙醇胺将剩余的活化的羧基封端10分钟。如上所述,用EDC/NHS处理对照流动细胞,然后用乙醇胺处理。将不同膜联蛋白的浓度梯度以10 μ L/min注射到Dectin-1功能化表面上,允许接触60秒,并且解离时间为300秒,然后使用100mM甲基- α -D-吡喃甘露糖苷以30 μ L/min持续30秒进行再生。使用Biacore S20 T100评估软件分析实验数据。使用Scrubber2 (BioLogic Software, Campbell, Australia) 进行基于膜联蛋白-dectin-1复合物相互作用的1:1相互作用模型的动力学分析。

[0115] 在图9中,体内实验证明与单独的抗原OVA相比,用含有膜联蛋白核心结构域和模型抗原卵清蛋白 (Anx-OVA) 的融合蛋白接种强烈地提高了接种效力。

[0116] 所引用的参考文献

[0117] Andersen, B.M., J.Xia, A.L.Epstein, J.R.Ohlfest, W.Chen, B.R.Blazar, C.A.Pennell and M.R.Olin (2016). "Monomeric annexin A2 is an oxygen-regulated toll-like receptor 2ligand and adjuvant." *J Immunother Cancer* 4:11.

[0118] Arur, S., U.E.Uche, K.Rezaul, M.Fong, V.Scranton, A.E.Cowan, W.Mohler and D.K.Han (2003). "Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment." *Dev Cell* 4 (4):587-598.

[0119] Buhrman, J.D. and J.E.Slansky (2013). "Improving T cell responses to modified peptides in tumor vaccines." *Immunol Res* 55 (1-3):34-47.

[0120] Emonard, H., L.Theret, A.H.Bennasroune and S.Dedieu (2014). "Regulation of LRP-1expression:make the point." *Pathol Biol (Paris)* 62 (2):84-90.

[0121] Ernst, S., C.Lange, A.Wilbers, V.Goebeler, V.Gerke and U.Rescher (2004). "An annexin 1N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family." *J Immunol* 172 (12):7669-7676.

[0122] Farber, S.A., R.A.De Rose, E.S.Olson and M.E.Halpern (2003). "The zebrafish annexin gene family." *Genome Res* 13 (6A):1082-1096.

- [0123] Fatimathas,L.and S.E.Moss (2010) .“Annexins as disease modifiers.” Histol Histopathol 25 (4) :527-532.
- [0124] Gerke,V.and S.E.Moss (2002) .“Annexins:from structure to function.” Physiol Rev 82 (2) :331-371.
- [0125] Grakoui,A.,S.K.Bromley,C.Sumen,M.M.Davis,A.S.Shaw,P.M.Allen and M.L.Dustin(1999) .“The immunological synapse:a molecular machine controlling T cell activation.” Science 285 (5425) :221-227.
- [0126] Hayhoe,R.P.,A.M.Kamal,E.Solito,R.J.Flower,D.Cooper and M.Perretti (2006) .“Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow:indication of distinct receptor involvement.” Blood 107 (5) :2123-2130.
- [0127] Kambayashi,T.and T.M.Laufer(2014) .“Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells:can anything replace a dendritic cell?” Nat Rev Immunol 14 (11) :719-730.
- [0128] Ling,T.Y.,C.L.Chen,Y.H.Huang,I.H.Liu,S.S.Huang and J.S.Huang (2004) .“Identification and characterization of the acidic pH binding sites for growth regulatory ligands of low density lipoprotein receptor-related protein-1.” J Biol Chem 279 (37) :38736-38748.
- [0129] Linke,B.,L.Abeler-Dorner,V.Jahndel,A.Kurz,A.Mahr,S.Pfrang,L.Linke, P.H.Krammer and H.Weyd(2015) .“The tolerogenic function of annexins on apoptotic cells is mediated by the annexin core domain.” J Immunol 194(11) : 5233-5242.
- [0130] Lutz,M.B. (2016) .“Induction of CD4(+)Regulatory and Polarized Effector/helper T Cells by Dendritic Cells.” Immune Netw 16(1) :13-25.
- [0131] Moss,S.E.and R.O.Morgan(2004) .“The annexins.” Genome Biol 5(4) :219.
- [0132] Perretti,M.and J.Dalli(2009) .“Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics.” Br J Pharmacol 158 (4) :936-946.
- [0133] Pupjalis,D.,J.Goetsch,D.J.Kottas,V.Gerke and U.Rescher(2011) .“Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling.” EMBO Mol Med 3(2) :102-114.
- [0134] Reichelt,P.,C.Schwarz and M.Donzeau(2006) .“Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents.” Protein Expr Purif 46 (2) :483-488.
- [0135] Segura,E.and S.Amigorena(2015) .“Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells.” Adv Immunol 127:1-31.
- [0136] Strausbaugh,H.J.and S.D.Rosen(2001) .“A potential role for annexin 1 as a physiologic mediator of glucocorticoid-induced L-selectin shedding from

myeloid cells." J Immunol 166(10):6294-6300.

[0137] Tzelepis, F., M. Verway, J. Daoud, J. Gillard, K. Hassani-Ardakani, J. Dunn, J. Downey, M. E. Gentile, J. Jaworska, A. M. Sanchez, Y. Nedelec, H. Vali, M. Tabrizian, A. S. Kristof, I. L. King, L. B. Barreiro and M. Divangahi (2015). "Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during Mycobacterium tuberculosis infection." J Clin Invest 125(2):752-768.

[0138] Verboogen, D. R., I. Dingjan, N. H. Revelo, L. J. Visser, M. ter Beest and G. van den Bogaart (2016). "The dendritic cell side of the immunological synapse." Biomol Concepts 7(1):17-28.

[0139] Walther, A., K. Riehemann and V. Gerke (2000). "A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR." Mol Cell 5(5):831-840.

[0140] Weyd, H., L. Abeler-Dorner, B. Linke, A. Mahr, V. Jahndel, S. Pfrang, M. Schnolzer, C. S. Falk and P. H. Krammer (2013). "Annexin A1 on the surface of early apoptotic cells suppresses CD8+T cell immunity." PLoS One 8(4):e62449.

[0141] Zimmerman, T., C. Petit Frere, M. Satzger, M. Raba, M. Weisbach, K. Dohn, A. Popp and M. Donzeau (2006). "Simultaneous metal chelate affinity purification and endotoxin clearance of recombinant antibody fragments." J Immunol Methods 314(1-2):67-73.

序列表

<110> 德国癌症研究公共权益基金会

<120> 膜联蛋白的核心结构域及其在抗原递送和接种中的用途

<130> D31523W0

<150> EP16173925.5

<151> 2016-06-10

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 346

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

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

```

195	200	205
Ala Gly Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val Asn Val Phe Asn Thr Ile		
210	215	220
Leu Thr Thr Arg Ser Tyr Pro Gln Leu Arg Arg Val Phe Gln Lys Tyr		
225	230	235
Thr Lys Tyr Ser Lys His Asp Met Asn Lys Val Leu Asp Leu Glu Leu		
245	250	255
Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Ala Ile Val Lys Cys Ala Thr		
260	265	270
Ser Lys Pro Ala Phe Phe Ala Glu Lys Leu His Gln Ala Met Lys Gly		
275	280	285
Val Gly Thr Arg His Lys Ala Leu Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser		
290	295	300
Glu Ile Asp Met Asn Asp Ile Lys Ala Phe Tyr Gln Lys Met Tyr Gly		
305	310	315
Ile Ser Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr Lys Gly Asp Tyr Glu		
325	330	335
Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn		
340	345	
<210> 2		
<211> 320		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 2		
Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe Asp		
1	5	10
Glu Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly		
20	25	30
Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala		
35	40	45
Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp		
50	55	60
Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu		
65	70	75
Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu		
85	90	95
Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu		
100	105	110
Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val		

115	120	125
Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp		
130	135	140
Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn		
145	150	155
Arg Asp Pro Asp Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala		
165	170	175
Gln Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu		
180	185	190
Lys Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys		
195	200	205
Val Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr		
210	215	220
Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val		
225	230	235
Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu Tyr		
245	250	255
Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val		
260	265	270
Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg Lys Glu Phe		
275	280	285
Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr		
290	295	300
Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Glu Asp Asp		
305	310	315
320		
<210> 3		
<211> 316		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 3		
Met Gly Asn Arg His Ala Lys Ala Ser Ser Pro Gln Gly Phe Asp Val		
1	5	10
Asp Arg Asp Ala Lys Lys Leu Asn Lys Ala Cys Lys Gly Met Gly Thr		
20	25	30
Asn Glu Ala Ala Ile Ile Glu Ile Leu Ser Gly Arg Thr Ser Asp Glu		
35	40	45
Arg Gln Gln Ile Lys Gln Lys Tyr Lys Ala Thr Tyr Gly Lys Glu Leu		
50	55	60
Glu Glu Val Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly Asn Phe Glu Lys Thr Ala		

65	70	75	80
Leu Ala Leu Leu Asp His Pro Ser Glu Tyr Ala Ala Arg Gln Leu Gln			
	85	90	95
Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr Asp Glu Ser Val Leu Ile Glu Val			
	100	105	110
Leu Cys Thr Arg Thr Asn Lys Glu Ile Ile Ala Ile Lys Glu Ala Tyr			
	115	120	125
Gln Arg Leu Phe Asp Arg Ser Leu Glu Ser Asp Val Lys Gly Asp Thr			
	130	135	140
Ser Gly Asn Leu Lys Lys Ile Leu Val Ser Leu Leu Gln Ala Asn Arg			
145	150	155	160
Asn Glu Gly Asp Asp Val Asp Lys Asp Leu Ala Gly Gln Asp Ala Lys			
	165	170	175
Asp Leu Tyr Asp Ala Gly Glu Gly Arg Trp Gly Thr Asp Glu Leu Ala			
	180	185	190
Phe Asn Glu Val Leu Ala Lys Arg Ser Tyr Lys Gln Leu Arg Ala Thr			
	195	200	205
Phe Gln Ala Tyr Gln Ile Leu Ile Gly Lys Asp Ile Glu Glu Ala Ile			
	210	215	220
Glu Glu Glu Thr Ser Gly Asp Leu Gln Lys Ala Tyr Leu Thr Leu Val			
225	230	235	240
Arg Cys Ala Gln Asp Cys Glu Asp Tyr Phe Ala Glu Arg Leu Tyr Lys			
	245	250	255
Ser Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Glu Glu Thr Leu Ile Arg Ile Ile			
	260	265	270
Val Thr Arg Ala Glu Val Asp Leu Gln Gly Ile Lys Ala Lys Phe Gln			
	275	280	285
Glu Lys Tyr Gln Lys Ser Leu Ser Asp Met Val Arg Ser Asp Thr Ser			
	290	295	300
Gly Asp Phe Arg Lys Leu Leu Val Ala Leu Leu His			
305	310	315	
<210> 4			
<211> 8			
<212> PRT			
<213> 原鸡(Gallus gallus)			
<400> 4			
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu			
1	5		
<210> 5			

<211> 17
 <212> PRT
 <213> 原鸡(Gallus gallus)
 <400> 5
 Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Arg
 <210> 6
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> 小家鼠(Mus musculus)
 <400> 6
 Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Arg Phe Leu Glu Asn
 1 5 10 15
 Gln Glu Gln Glu Tyr Val Gln Ala Val Lys Ser Tyr Lys Gly Gly Pro
 20 25 30
 Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Ser Phe Asn Val Ser Ser Asp Val
 35 40 45
 Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr
 50 55 60
 Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Thr Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile
 65 70 75 80
 Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Asn Gly Lys Pro Leu Asp Glu Val Leu
 85 90 95
 Arg Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Met Leu
 100 105 110
 Lys Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Gly Ala Met Lys
 115 120 125
 Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile Leu Thr Thr Arg
 130 135 140
 Ser Asn Glu Gln Ile Arg Glu Ile Asn Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu
 145 150 155 160
 Lys Arg Asp Leu Ala Lys Asp Ile Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe
 165 170 175
 Arg Lys Ala Leu Leu Ala Leu Ala Lys Gly Asp Arg Cys Gln Asp Leu
 180 185 190
 Ser Val Asn Gln Asp Leu Ala Asp Thr Asp Ala Arg Ala Leu Tyr Glu
 195 200 205
 Ala Gly Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val Asn Val Phe Thr Thr Ile

210	215	220
Leu Thr Ser Arg Ser Phe Pro His Leu Arg Arg Val Phe Gln Asn Tyr		
225	230	235
Gly Lys Tyr Ser Gln His Asp Met Asn Lys Ala Leu Asp Leu Glu Leu		
	245	250
Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Thr Ile Val Lys Cys Ala Thr		255
	260	265
Ser Thr Pro Ala Phe Phe Ala Glu Lys Leu Tyr Glu Ala Met Lys Gly		270
	275	280
Ala Gly Thr Arg His Lys Ala Leu Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser		285
290	295	300
Glu Ile Asp Met Asn Glu Ile Lys Val Phe Tyr Gln Lys Lys Tyr Gly		
305	310	315
Ile Ser Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr Lys Gly Asp Tyr Glu		
	325	330
Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn		335
	340	345

<210> 7

<211> 319

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 7

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

	85	90	95
Gln Lys Ala Met Lys Gly Val Gly Thr Asp Glu Ala Met Leu Ile Glu			
	100	105	110
Ile Leu Cys Thr Arg Ser Asn Lys Glu Ile Val Ala Ile Lys Glu Ala			
	115	120	125
Tyr Gln Arg Leu Phe Gly Arg Ser Leu Glu Ser Asp Val Lys Glu Asp			
	130	135	140
Thr Ser Gly Asn Leu Arg Lys Ile Leu Val Ser Leu Leu Gln Ala Ser			
145	150	155	160
Arg Asp Glu Glu Asp Thr Val Asp Lys Glu Leu Ala Gly Gln Asp Ala			
	165	170	175
Lys Asp Leu Tyr Asp Ala Gly Glu Gly Arg Trp Gly Thr Asp Glu Leu			
	180	185	190
Ala Phe Asn Glu Val Leu Ala Lys Arg Ser Tyr Lys Gln Leu Arg Ala			
	195	200	205
Thr Phe Gln Ala Tyr Gln Ile Leu Ile Gly Lys Asp Met Glu Glu Thr			
210	215	220	
Ile Glu Glu Glu Thr Ser Gly Asp Leu Lys Lys Ala Tyr Leu Thr Ile			
225	230	235	240
Val Arg Cys Ala Gln Asp Leu Glu Gly Tyr Phe Ala Asp Leu Leu Tyr			
	245	250	255
Lys Ala Met Lys Gly Met Gly Thr Asp Glu Glu Thr Leu Ile Arg Ile			
	260	265	270
Ile Val Thr Arg Ala Glu Val Asp Leu Gln Gly Ile Lys Ala Lys Phe			
	275	280	285
Gln Glu Lys Tyr Gln Lys Ser Leu Ser Asp Met Val His Ser Asp Thr			
	290	295	300
Ser Gly Asp Phe Arg Lys Leu Leu Val Ala Leu Leu His			
305	310	315	

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工的 (artificial)

<220>

<221> gene

<222> () .. ()

<223> 引物

<400> 9

ggcggagggtt caggcggagg ttcagatcaa gccagagagc tcatc 45

<210> 10
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的 (artificial)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 引物
<400> 10
gaaaacttgt atttccaggg cggcggaggt tcaggcg 37
<210> 11
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工的 (artificial)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 引物
<400> 11
ggatccggcg gaggttcagg cggaggttca gaaaacttgt atttccaggg cgg 53
<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工的 (artificial)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 引物
<400> 12
ggatccaggg gaaacacatc tgccaaag 28
<210> 13
<211> 1724
<212> DNA
<213> 人工的 (artificial)
<220>
<221> gene
<222> ()..()
<223> 融合蛋白
<400> 13

atgaatccat cctcggatgt cgctgccttg cataaggcca taatggttaa aggtgtggat 60
 gaggcaacca tcattgacat tctaactaag cgaacaatg cacagcgtca acagatcaaa 120
 gcagcattct ccaggaaaca ggaaagcccc tggatgaaac actgaagaaa gcccttacag 180
 gtcaccttga ggaggttgtt ttagctctgc taaaaactcc agcgcaattt gatgctgatg 240
 aacttcgtgc tgcctgaagg gccttggAAC tgatgaagat actctaattg agattttggc 300
 atcaagaact aacaaagaaa tcagagacat taacagggtc tacagagagg aactgaagag 360
 agatctggcc aaagacataa ctcagacaca tctggagatt ttcggaacgc tttgctttct 420
 cttgctaagg gtgaccgatc tgaggacttt ggtgtgaatg aagacttggc tgattcagat 480
 gccagggcct tgtatgaagc aggagaaaga gaaaggggac agacgtaaAC gtgttcaata 540
 ccatccttac caccagaagc tatccacaac ttcgcagagt gtttcagaaa tacaccaagt 600
 acagtaagca tgacatgaac aaagtctctg acctgagttg aaaggtgaca ttgagaaatg 660
 cctcacagct atcgtgaagt gcgccacaag caaaccagct ttctttgcag agaagcttca 720
 tcaagccatg aaaggtgttg gaactcgcca taaggcattg ataggattat ggtttcccgT 780
 tctgaaattg acatgaatga tatcaaagca ttctatcaga agatgtatgg tatctccctt 840
 tgccaagcca tcctggatga aaccaaagga gattatgaga aatcctggg gctctttgtg 900
 gaggaaacca tcggggatcc ggcgaggtt caggcggagg ttcagaaaac ttgtatttcc 960
 agggcggcgg aggttcaggc ggaggttcca tcaagccaga gagctcatca attcctgggt 1020
 agaaagtcag acaaatggaa ttatcagaaa tgccttcag ccaagctccg tggatttctca 1080
 aactgcaatg gttctggtta atgccattgt cttcaaggac tgtgggagaa agcatttaag 1140
 gatgaagaca cacaagcaat gcctttcaga gtgactgagc aagaaagcaa acctgtgcag 1200
 atgatgtacc agattggttt atttagagtg gcatcaatgg ctctgagaaa atgaagatcc 1260
 tggagcttcc atttgccagt gggacaatga gcatgttggT gctgttgccT gatgaagtct 1320
 caggccttga gcagcttgag agtataatca actttgaaaa actgactgat ggaccagttc 1380
 taatgttatg gaagagagga agatcaaagt gtacttacct cgcatgaaga tggaggaaaa 1440
 atacaacctc acatctgtct taatggctat gggcattact gacgtgttta gctcttagcc 1500
 aatctgtctg gcatctcctc agcagagagc ctgaagatat ctcaagctgt ccatgcagca 1560
 catgcagaaa tcaatgaagc aggcagagag gtggtagggt cagcagaggc tggagtggat 1620
 gctcaagcgt ctctgaagaa tttagggtcT accatccatt cctcttctgt atcaagcaca 1680
 tcgcaaccaa cgccgttctc ttctttggca gatgtgttcc cct 1724

<210> 14

<211> 576

<212> PRT

<213> 人工的 (artificial)

<220>

<221> SITE

<222> () .. ()

<223> 融合蛋白

<400> 14

Met Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met Val

1	5	10	15
Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg Asn			
	20	25	30
Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Gln Glu Thr Gly			
	35	40	45
Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu Lys Lys Ala Leu Thr Gly His Leu Glu			
	50	55	60
Glu Val Val Leu Ala Leu Leu Lys Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Asp			
65	70	75	80
Glu Leu Arg Ala Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Leu			
	85	90	95
Ile Glu Ile Leu Ala Ser Arg Thr Asn Lys Glu Ile Arg Asp Ile Asn			
	100	105	110
Arg Val Tyr Arg Glu Glu Leu Lys Arg Asp Leu Ala Lys Asp Ile Ser			
	115	120	125
Asp Thr Ser Gly Asp Phe Arg Asn Ala Leu Leu Ser Leu Ala Lys Gly			
	130	135	140
Asp Arg Ser Glu Asp Phe Gly Val Asn Glu Asp Leu Ala Asp Ser Asp			
145	150	155	160
Ala Arg Ala Leu Tyr Glu Ala Gly Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val			
	165	170	175
Asn Val Phe Asn Thr Ile Leu Thr Thr Arg Ser Tyr Pro Gln Leu Arg			
	180	185	190
Arg Val Phe Gln Lys Tyr Thr Lys Tyr Ser Lys His Asp Met Asn Lys			
	195	200	205
Val Leu Asp Leu Glu Leu Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Ala			
	210	215	220
Ile Val Lys Cys Ala Thr Ser Lys Pro Ala Phe Phe Ala Glu Lys Leu			
225	230	235	240
His Gln Ala Met Lys Gly Val Gly Thr Arg His Lys Ala Leu Arg Ile			
	245	250	255
Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Met Asn Asp Ile Lys Ala Phe Tyr			
	260	265	270
Gln Lys Met Tyr Gly Ile Ser Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr			
	275	280	285
Lys Gly Asp Tyr Glu Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn His			
	290	295	300
Arg Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe			
305	310	315	320

Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Gln Ala Arg Glu Leu
325 330 335
Ile Asn Ser Trp Val Glu Ser Gln Thr Asn Gly Ile Ile Arg Asn Val
340 345 350
Leu Gln Pro Ser Ser Val Asp Ser Gln Thr Ala Met Val Leu Val Asn
355 360 365
Ala Ile Val Phe Lys Gly Leu Trp Glu Lys Ala Phe Lys Asp Glu Asp
370 375 380
Thr Gln Ala Met Pro Phe Arg Val Thr Glu Gln Glu Ser Lys Pro Val
385 390 395 400
Gln Met Met Tyr Gln Ile Gly Leu Phe Arg Val Ala Ser Met Ala Ser
405 410 415
Glu Lys Met Lys Ile Leu Glu Leu Pro Phe Ala Ser Gly Thr Met Ser
420 425 430
Met Leu Val Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu Glu
435 440 445
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Trp Thr Ser Ser Asn Val Met
450 455 460
Glu Glu Arg Lys Ile Lys Val Tyr Leu Pro Arg Met Lys Met Glu Glu
465 470 475 480
Lys Tyr Asn Leu Thr Ser Val Leu Met Ala Met Gly Ile Thr Asp Val
485 490 495
Phe Ser Ser Ser Ala Asn Leu Ser Gly Ile Ser Ser Ala Glu Ser Leu
500 505 510
Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala
515 520 525
Gly Arg Glu Val Val Gly Ser Ala Glu Ala Gly Val Asp Ala Ala Ser
530 535 540
Val Ser Glu Glu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Cys Ile Lys
545 550 555 560
His Ile Ala Thr Asn Ala Val Leu Phe Phe Gly Arg Cys Val Ser Pro
565 570 575

<210> 15

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工的 (artificial)

<220>

<221> SITE

<222> () .. ()

<223> 接头序列

<400> 15

His Arg Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr

1

5

10

15

Phe Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

20

25

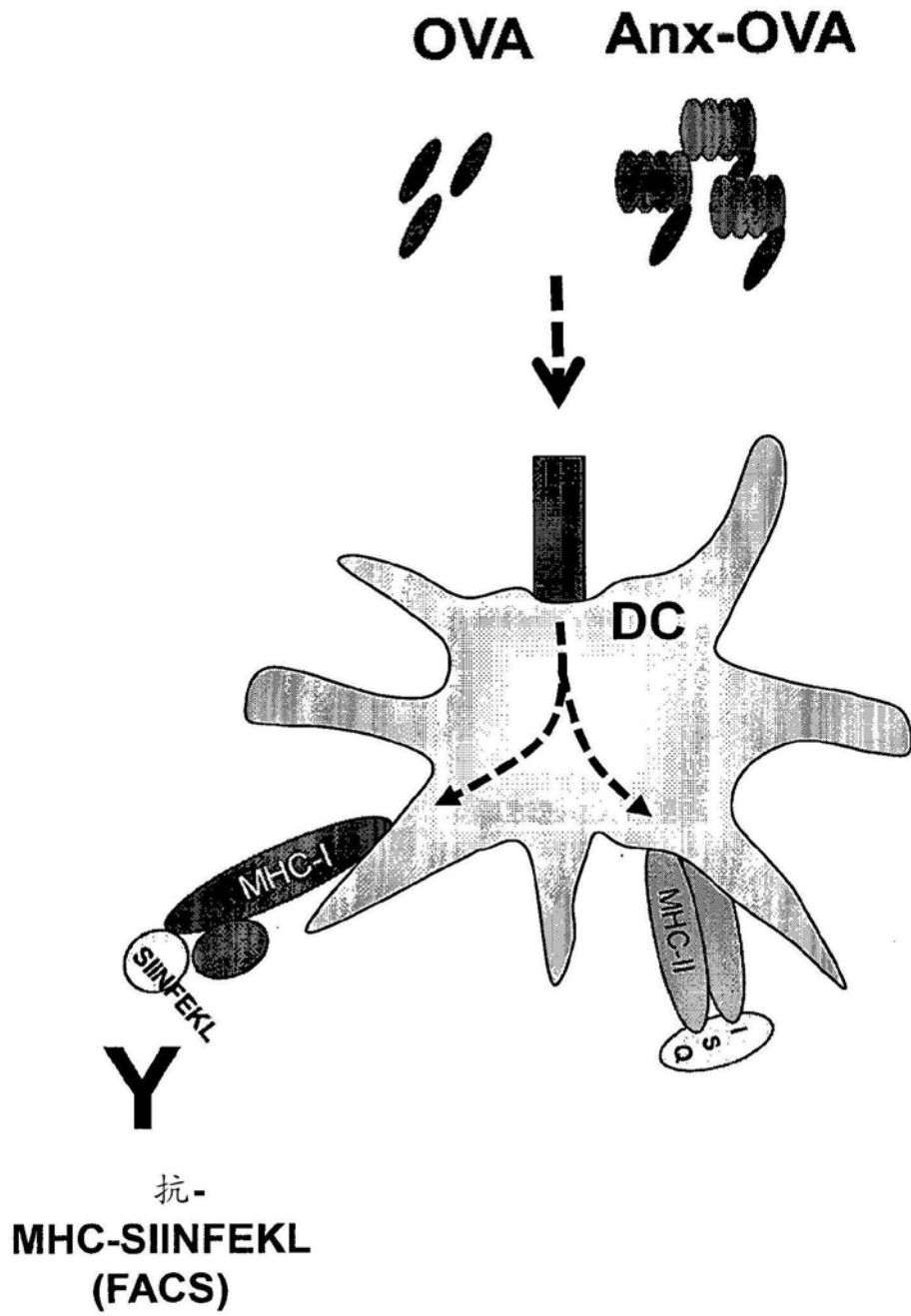


图1A

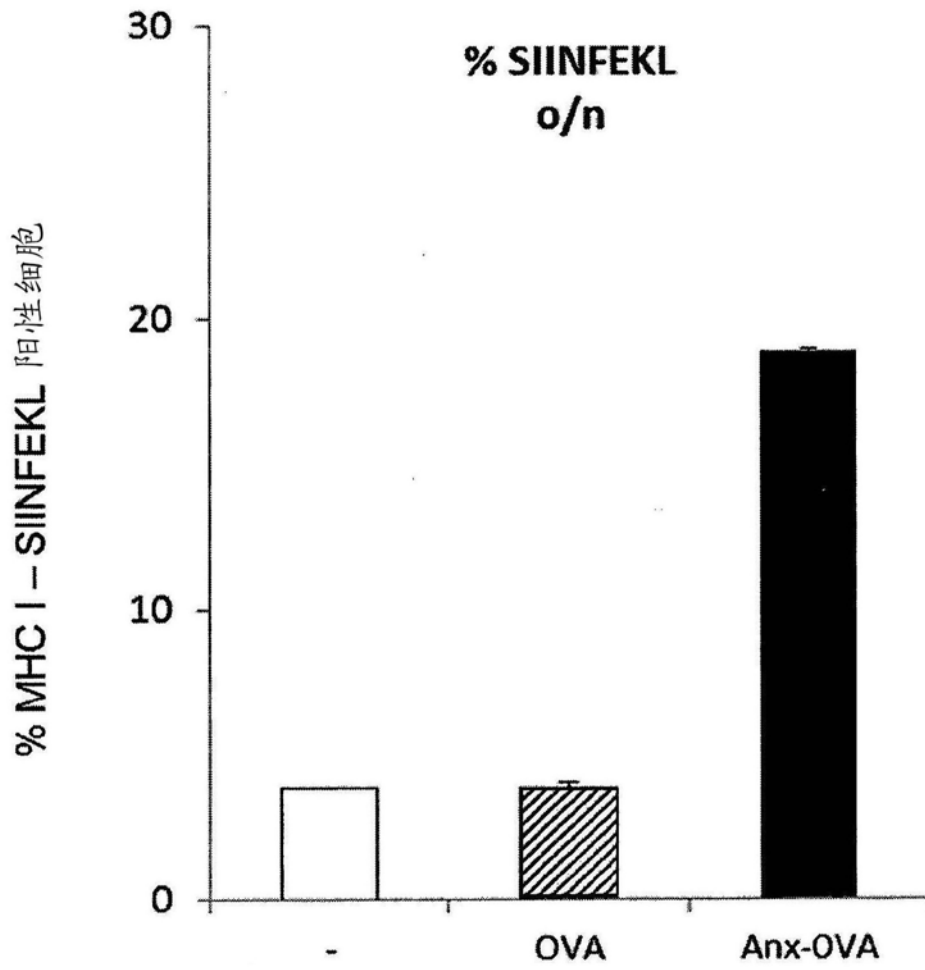


图1B

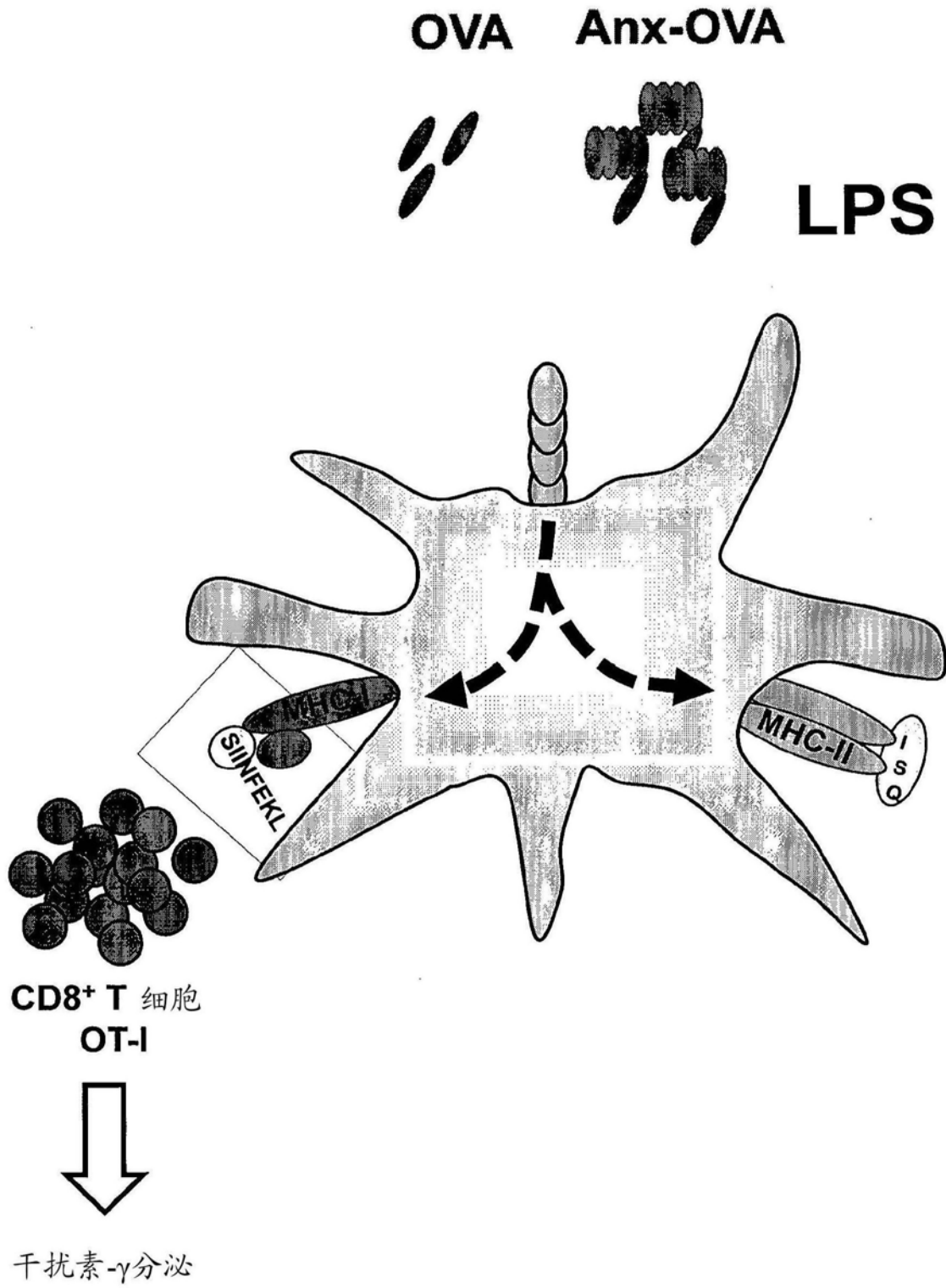


图2A

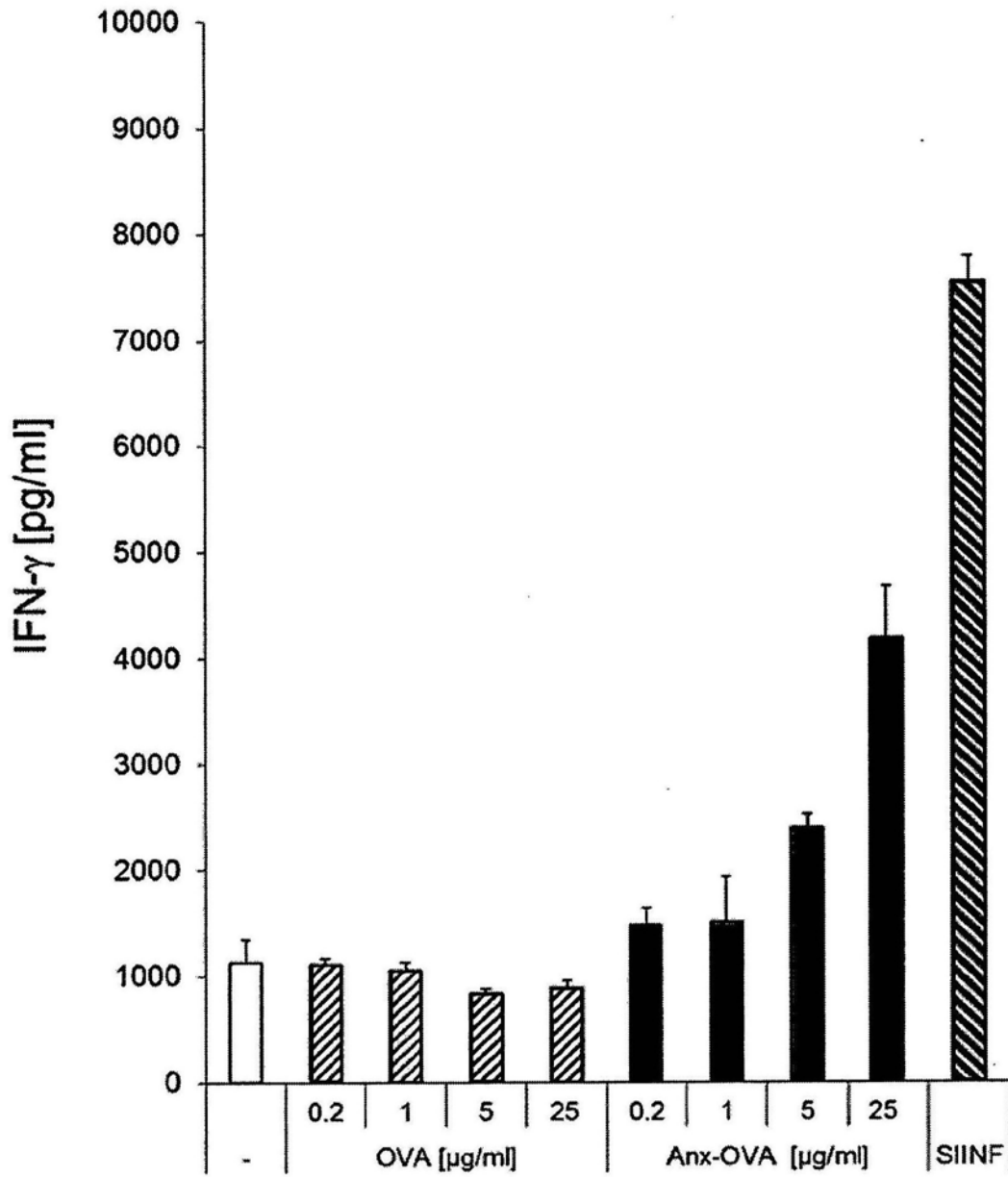


图2B

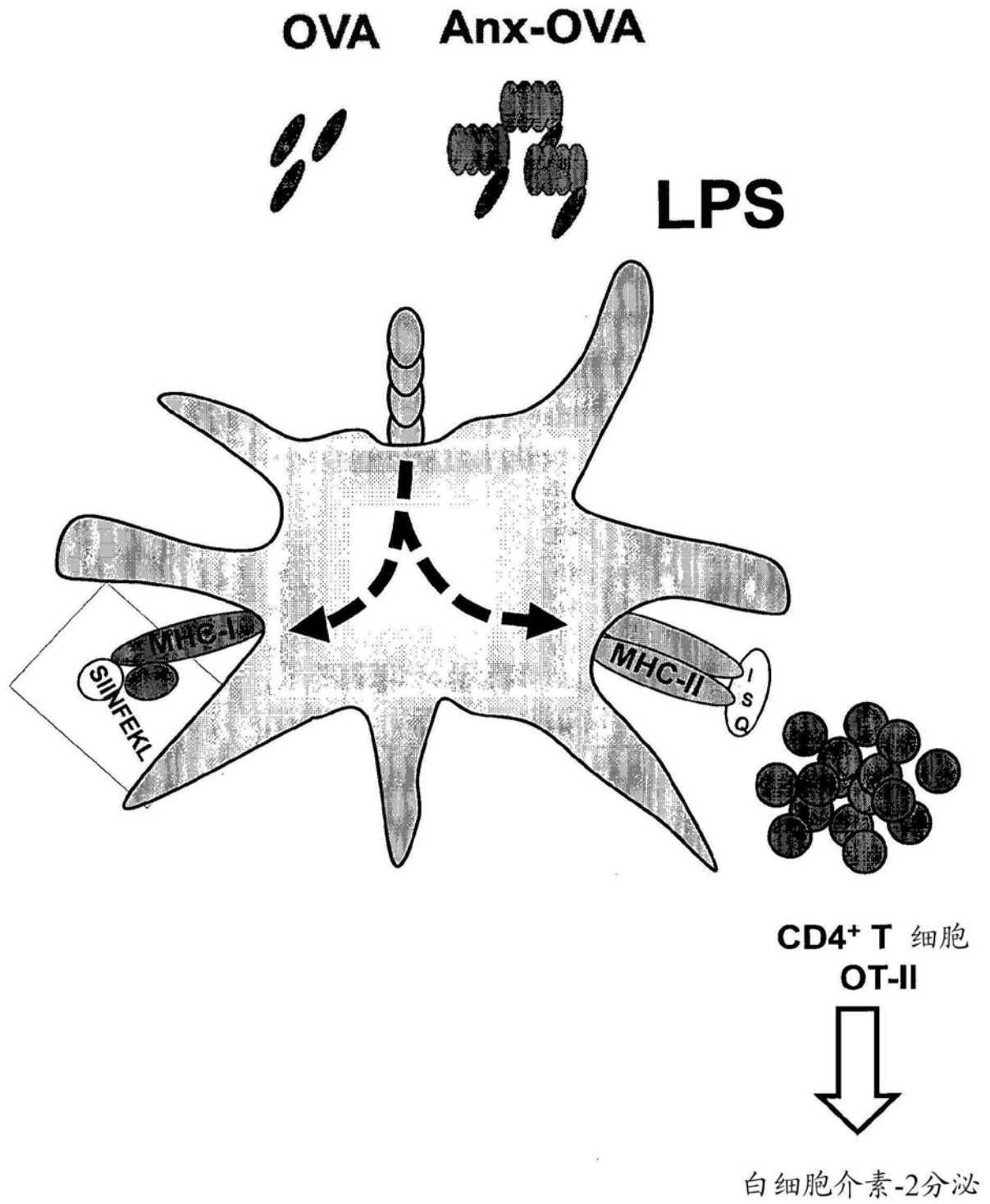


图3A

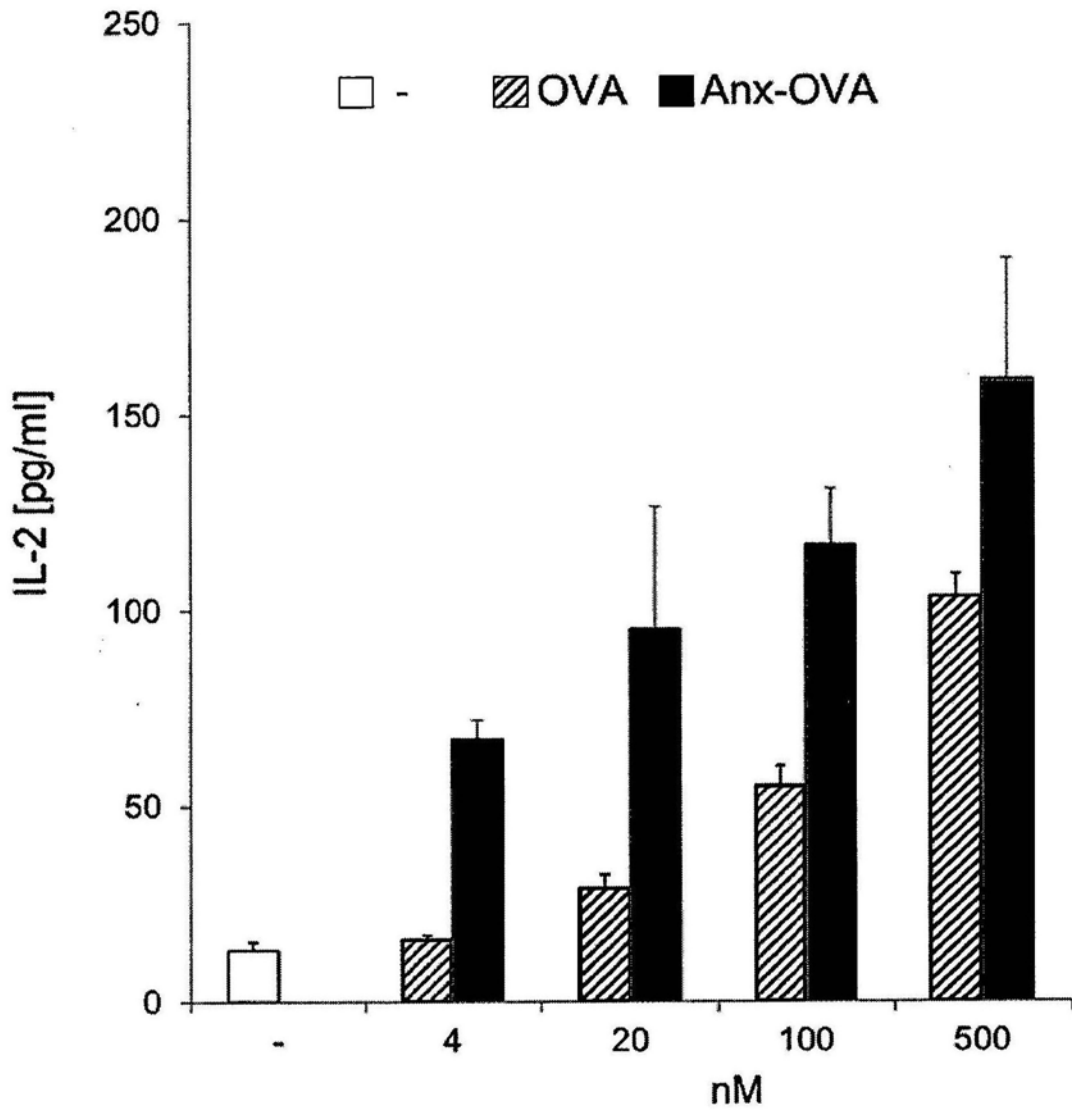


图3B

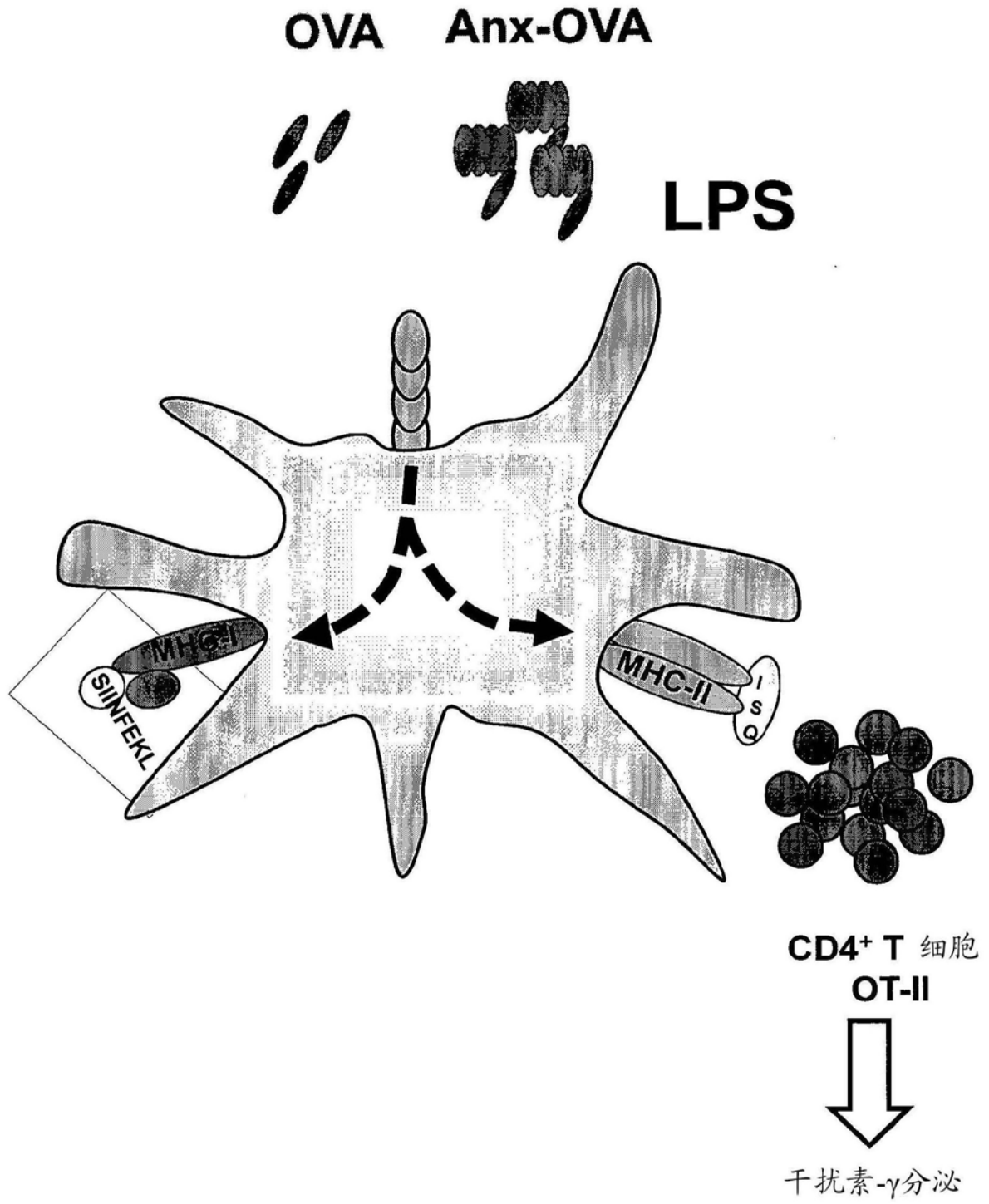


图4A

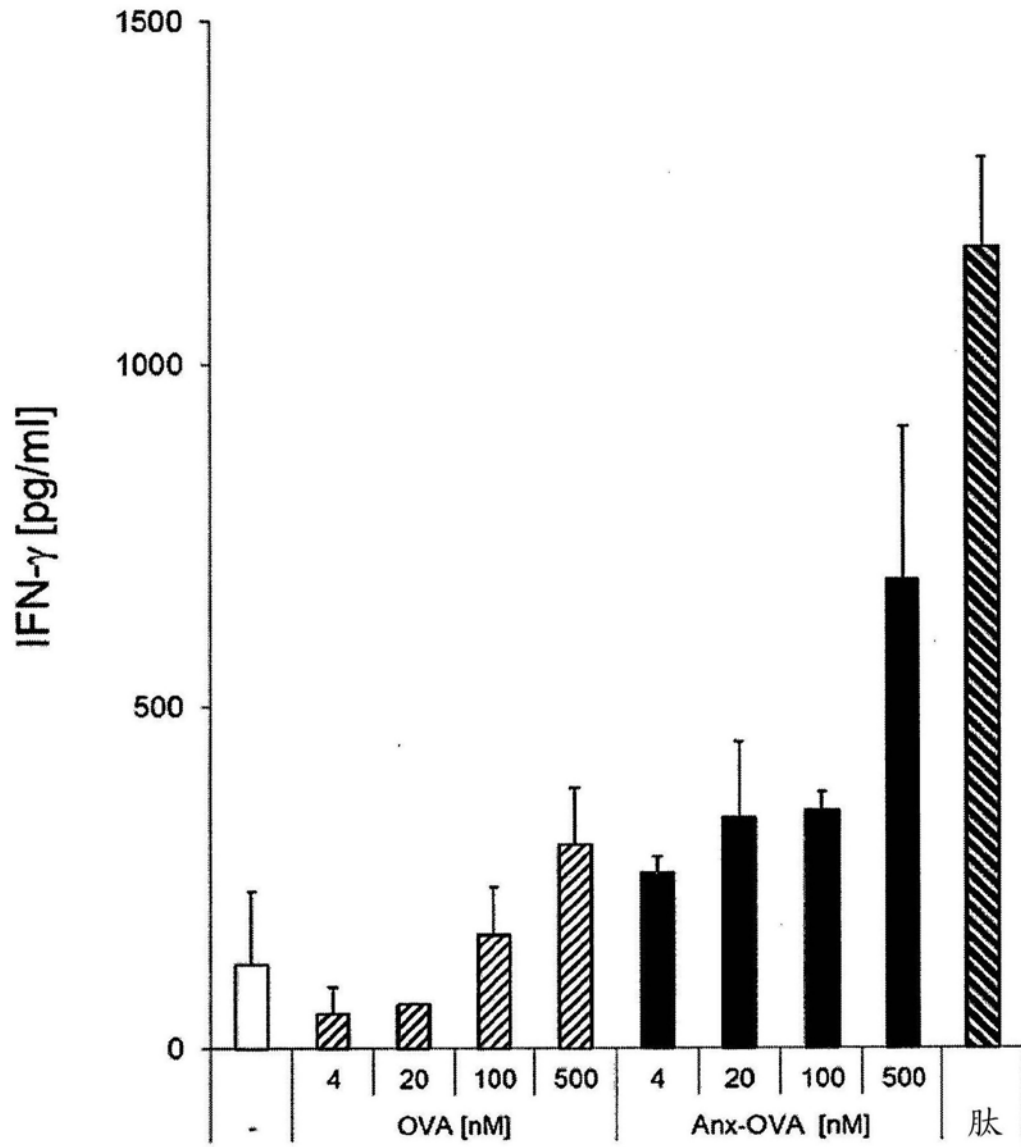


图4B

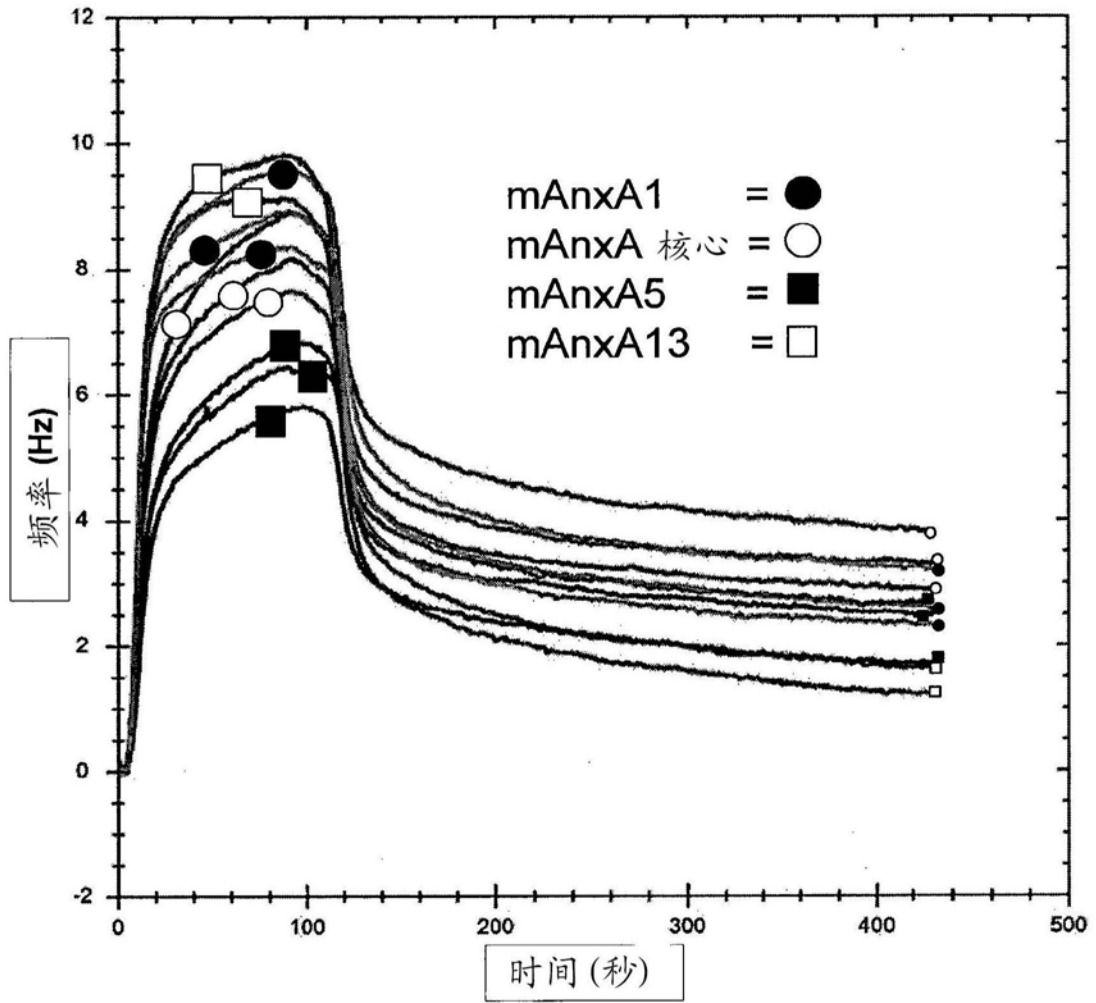


图5

B
(续)

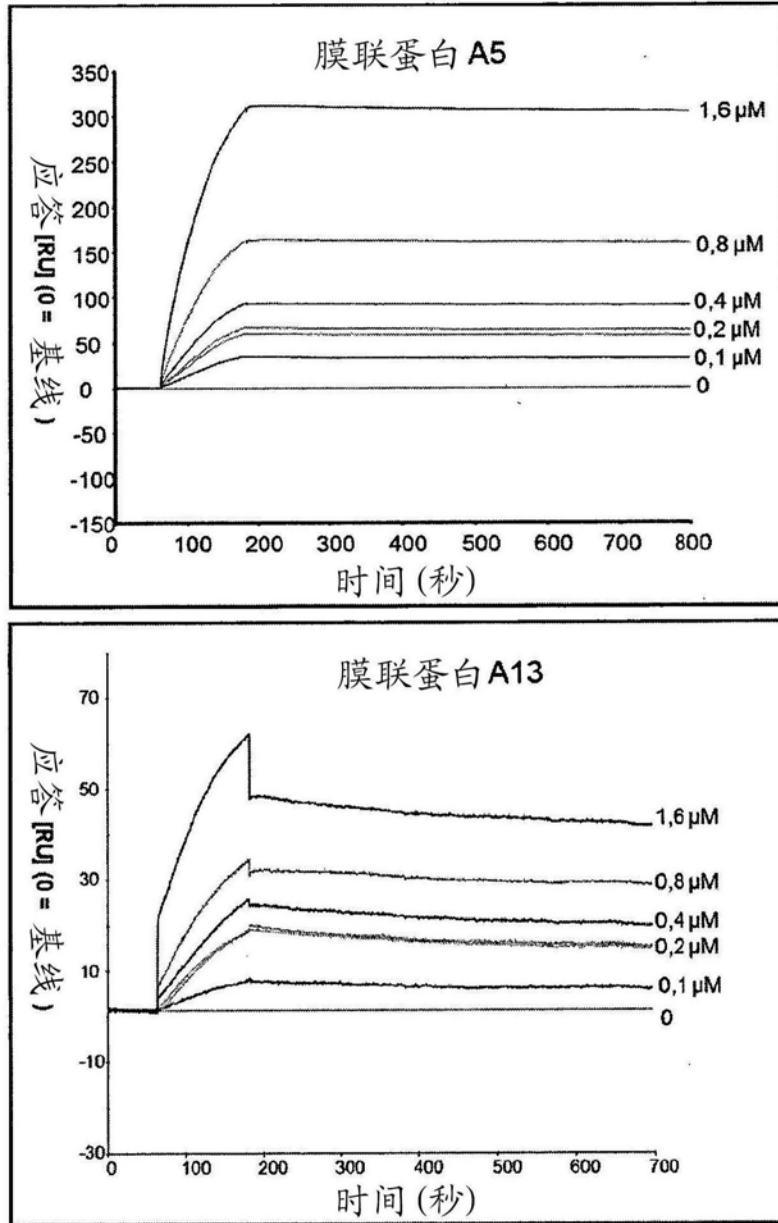


图6(续)

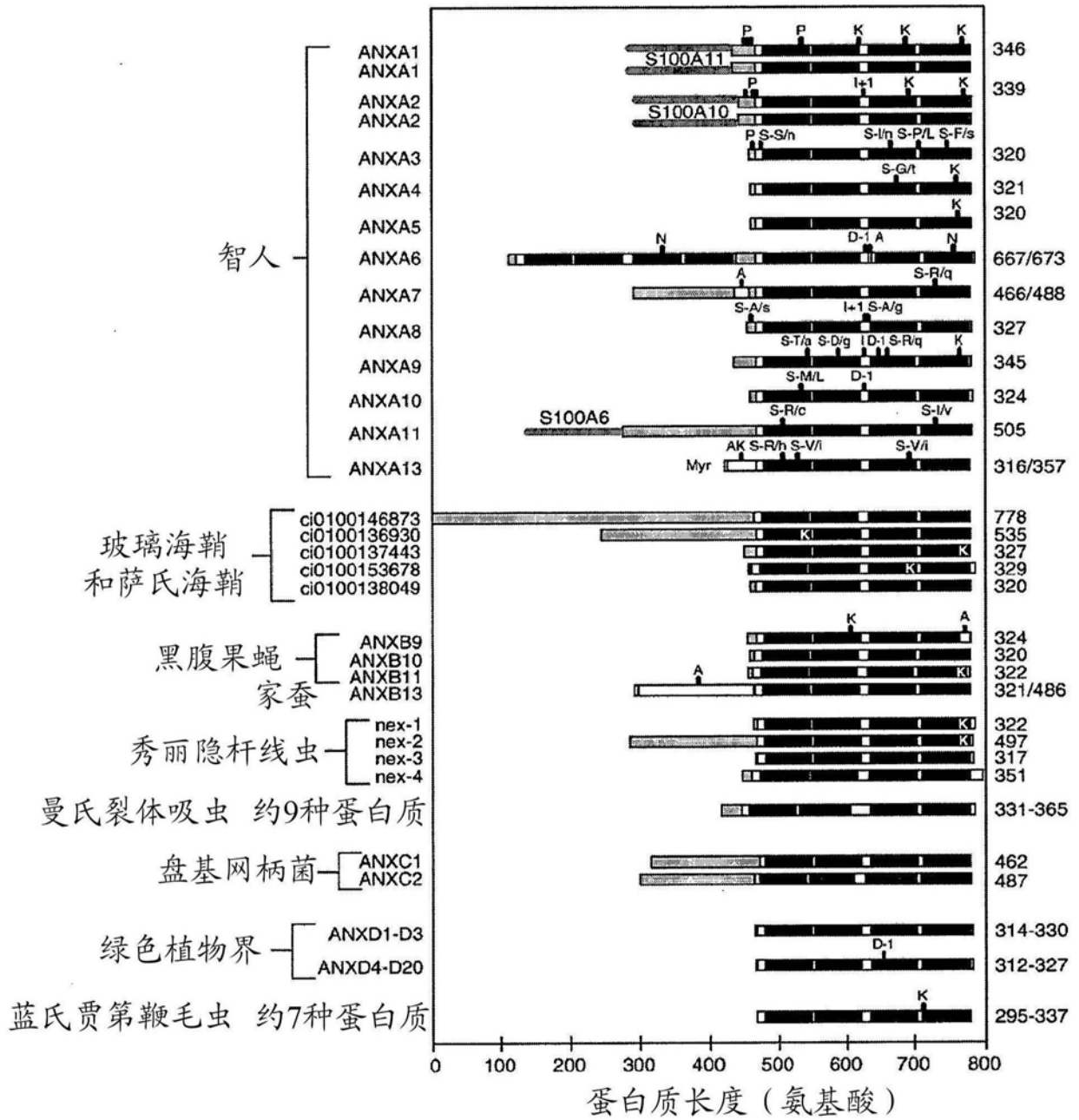


图7

hANXA1 → gi|47115305|emb|CAG28612.1|
hANXA5 → gi|49456639|emb|CAG46640.1|
hANXA13 → gi|49456633|emb|CAG46637.1|

```

MANVSEFLKQAWFLENEEQHYVTVKSKGGGSAVSFYPFENPSSDVAALHKAINVKGV
MAQVLRGTVIDFSGDERADAETLRKAMKGLGT
MGNPHKASSPQCFDVERDAKLNKACKGNGT
DEATIIDLTKRNAQSQIKAAAYLQETGKPLDETIKNAITGHLEEVIALLLKTPAQFDA
DEESILTLTSTRNAQSQISAAFKTLFGRDLLDLKSELTKFKELIIVALNKPSRLYDA
NEAAIIEILSGRTSDERQQIKQKYKATYKLEEVLEKSELSGNFERTALAILDHPSEYAA
DELPAAMKGLGTDEDTLIEILASRTNKEIRDINRVYREELKRDLAKDITSDTSGDFRNAL
YELKHALKGAGTNEKVLTEILASRTPEELRAIKQVYEEYGSSEDDVVGDTSGYYQRML
RQLQKAMKGLSTDESVLIEVLCIRTNKEI IAIKEAYQFLFRSLESDVKGDTSGNLKKEIL
LSLAKGDRSEDFGVNEDLADSDARALYEAGERKGTDWNVFNTILTRSYFQLRRVFQKY
WVLLQANRDPDASIDERAQVEQDAQALFQAGELKNGTDEEKFITIFGTRSVSHLEKVFQKY
VSLLQANFNEDDVKDLAQDAKDLYDAGEGRWGTDELAFNEVLAKRSYKQLBATFQAY
TRYSKHNMNKVLDLELKGDIKCLTAIVKCATSKPAFFAEKLRQAMKGVGTRHKALIRIM
MTISGFQIETIDRETSGNLEQLLLAVVKSIRSIFAYLAETLYAMKAGTDDHTLIRVM
QILIGKDIEEAIEEETSGDLQKAYTLVRECAQDCEDYFAERLYKSMKSGAGTDETLIRII
VSRSEIDMNDIKAFYQMYGILCQAILDETKGDEYKILVAICGSN-
VSRSEIDLPNRKEFRKFNATSLYSMKGDTSGDYKCALLLCCGEDD
VTRAEVLDQGHKAKFQEKYQKSLSDIMAVRSDTSGDFRKLVAILLH
  
```

图8

```

mANXA1 → gi|71059925|emb|CAJ18506.1|
mANXA5 → gi|13277612|gb|AAH03716.1|
mANXA13 → gi|13397933|emb|CAC34623.1|

MAMVSEFLQARFLENQEQEYVQAVKSYKCCPCSAVSPYH
SFNVSSDVAALHKAIMVKCY
-----MAIRGTVTDF
GFDGRADAEVLRKAMKGLGT
-----MGNRHAKERSHHE
GFDADRDAKRLYKACRGMGT
-----

DEATIIDIILTKRTNAQRQIIKAAYLQENKPEUDEVLRKALTGHLEEVVLAHMKTPAQFDA
DEDSILNLIITRSNAROROEIACEFKTLFGNDLVDELKSELTGKFEKLIIVAMKPSRLYDA
DEAAIEVLSRSTSEERQIIKOKYKRYGNDLEEVINSELSENGNEKKTALALLDRPNEYAA
-----

DELRGAMKGLGTFDETLIEILITRSNEQIREINRVYREELKRD LARDITFSGDFRRAL
YELKHALKCACTDEKVLTHIIASRTPEELSAIKQVYEEYGSNLEDDVVVCTSCTYYQFML
ROLOKAMKGVSTDEAMLIEILCTRSNKEIVAIKEAYORLFGRSLESDVKEDTSGNLRKIL
-----

LALAKGRCODLSVNQDLADTDARALYEAGERAKGTDVNVFTTILTSRSPHILRRVFNQY
VVLLOGNRDPDAIDDAQVELDAQALFQAGELKMGTDERKFTIFGTRSVSHLRRVFDKY
VSLLOASRDEEDTVDKELACQDARDLYDAGEGEMCTDELAENEVLAKRSYKQLRATFQAY
-----

GKYSOHMNRKALDLELKGDIKCLTTIVKCATSTPAFFAEKLYEANKGAGTRHKALIRIM
NTISGFQIIEEIDRETSGNLEQLLAVKSIERSIPAYLAETLYYANKGACSDHDTLIRVV
QILIGKDMEEIEEETSGLKKAYLIIVRGACDLEGYFADLLYKANKGNGTDEELLIRII
-----

VSRSEIDMNEIKRVYOKKYGISLCOAILDETRGDIYKILVALCEN--
VSRSEIDLINRKEFRKNEFATSLYSMIKGTSGDYKALLLCCGEDD
VTRAEVDLOGIKAKFOERYOKRSLSDNVHSDTSGDFRKLIVALLR
-----

```

图8(续)

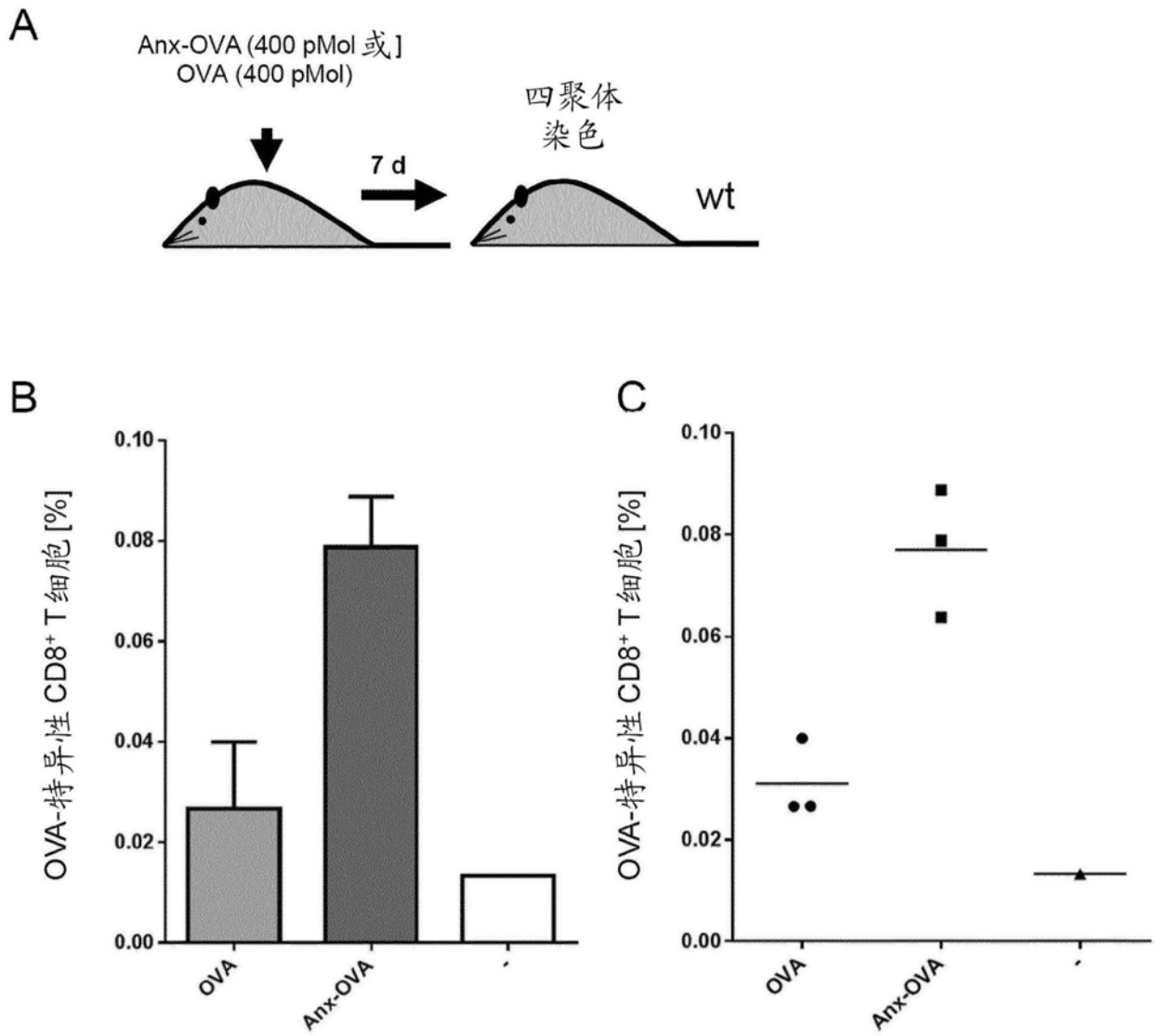


图9

A) Anx-OVA 融合蛋白, DNA-序列

ATGAATGCATCCTCGGATGTCGGTGCCTTGCCATAAGGGCCATAATGGTTAAAGGTGTGGATGAGGCAACCATCATT
GACATTCCTAACTAAGCGAAACAATGCACAGCGTCAACAGATCAAAGCAGCATATCTCCAGGAAAACAGGAAAGCCC
CTGGATGAAACACTGAAGAAAAGCCCTACAGGTCACTTGGAGGTTGTTTTAGCTGCTGCTAAAACTCCAGCG
CAATTTGATGCTGATGAACTTCGTGCTGCCATGAAGGGCCTTGGAACTGATGAAGATACTCTAATTGAGATTTTG
GCATCAAGAACTAACAAGAAATCAGAGACATTAACAGGCTACAGAGAGGAACTGAAGAGACATCTGGCCAA
AGACATAAGCTCAGACACATCTGGAGATTTTCGGAAGGCTTTGCTTTCTCTTGCTAAGGGTGACCGATCTGAGGA
CTTTGGTGTGAATGAAGACTTGGCTGATTCAGATGCCAGGGCCTTGTATGAAGCAGGAGAAAAGGAGAAAAGGGGA
CAGAGCTAAACGTGTTCAATACCATCCTTACCACCAGAAGCTATCCACAACCTTCGCAGAGTGTTCAGAAAATACAG
CAAGTACAGTAAGCATGACATGAACAAAGTTCTGGACCTGGAGTTGAAAGGTGACATTGAGAAAATGCCTCACAGC
TATCGTGAAGTGGCCACAAGCAAACAGCTTCTTTGCAGAGAAGCTTCATCAAGCCATGAAAAGGTGTTGGAAG
TGGCCATAAGGCATTGATCAGGATTATGGTTTCCCGTTCTGAAATTGACATGAATGATATCAAAGCATTCTATCA
GAAGATGTATGTTATCTCGCTTTGCCAAGCCATCCTGGATGAAACCAAAGGAGATTATGAGAAAATCCTGGTGGC
TCTTTGTGGAGGAAAC-

catcggggatccggcggaggttcaggcggaggttcagaaaactgtattccagggcggcggaggttcaggcggaggttc-

GATCAAGCCAGAGAGCTCATCAATTCCTGGGTAGAAAAGTCAAGCAAAATGGAATTATCAGAAAATGTCTTCAGCCA
AGCTCCGTGGATTCTCAAACCTGCAATGGTTCTGGTTAATGCCATTGTCTTCAAAGGACTGTGGGAGAAAAGCATTT
AAGGATGAAGACACACAAGCAATGCCCTTTCAGAGTGAAGTGAAGCAAAAGCAAAACCTGTGCAGATCATGTACCAG
ATTGGTTTATTAGAGTGGCATCAATGGCTTCTGAGAAAATGAAGATCCTGGAGCTTCCATTGCCCAGTGGGACA
ATGAGCATGTTGGTGTGTTGCCTGATGAAGTCTCAGGCCTTGAGCAGCTTGAGAGTATAATCAACTTTGAAAAA
CTGACTGAATGGACCAGTTCTAATGTTATGGAAGAGAGCAAGATCAAAGTGTACTTACCTCGCATGAAGATGGA
GGAAAAATACAACCTCACATCTGTCTTAATGGCTATGGGCATTAATGACGTGTTAGCTCTTCAGCCAACTGTGTG
TGGCATCTCCTCAGCAGAGAGCCTGAAGATATCTCAAGCTGTCCATGCAGCACATGCAGAAAATCAATGAAGCAGG
CAGAGAGGTGGTAGGGTCAAGAGAGGCTGGAGTGGATGCTGCAAGCGTCTCTGAAGAAATTAAGGGCTGACCATCC
ATTCTCTTCTGTATCAAGCACATCGCAACCAACGCCGTTCTCTTCTTTGGCAGATGTGTTTCCCCCT

B) Anx-OVA 融合蛋白, 氨基酸-序列

MNPSSDVAALHKAIMVKGVD EATHDILTKRNNAQRQQIKAAYLQETGKPLDET LKKALTGHLEEVVLAL LKTPAQ
FDAD ELRAAMKGLGTD EDTLIEILASRTNKEIRDINRVYREELKRD LAKDITSDTSGDFRNALLSLAKGDRSEDFGV
NEDLADSDARALYEAGERRKGT DVNVFNITLITRSYPLRRVVFQKYTKYSKHDMNKVLDLELKGDI EKGLTAIVKC
ATSKPAFFAEK LHQAMKGVGTRHKALIRIMVSRSEIDMNDIKAFYQKMYGISLCQAILDETKGDY EKILVALCGGN-

HRGSGGGSGGGS ENLYFQGGGGSGGGS-

DQARELINSWVESQTNGIIRNVLPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQ
IGLFRVASMASEKMKILEL PFASTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLT EWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEER
YNLTSVLMAMGITDV FSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGS AEGVDAASVSEFRADHPFLFCIK
HIATNAVLFGR CVSP

huAnxA1 核心

柔性接头

卵清蛋白 (OVA)

图10