



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112480237 B

(45) 授权公告日 2023.10.17

(21) 申请号 202010953136.X

US 2018344829 A1,2018.12.06

(22) 申请日 2020.09.11

WO 0053747 A1,2000.09.14

(65) 同一申请的已公布的文献号

Amira A Barkal等.CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy.Nature.2019,第572卷全文.

申请公布号 CN 112480237 A

(43) 申请公布日 2021.03.12

(66) 本国优先权数据

Pei Zhang等.Siglec-10 is associated with survival and natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma.Journal of Surgical Research.2014,全文.

201910867066.3 2019.09.12 CN

(73) 专利权人 上海津曼特生物科技有限公司

地址 201318 上海市浦东新区青黛路500号
1幢2层206室

(72) 发明人 刘倩 廖诗骅 王明晓 宋利平
范艺

Z. Escalona等.Molecular characterization of porcine Siglec-10 and analysis of its expression in blood and tissues.Developmental and Comparative Immunology.2014,第48卷全文.

(51) Int.Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

梁静;王凯;吴家媛.CD24在口腔医学中的研究进展.国际口腔医学杂志.2017,(第05期),全文.

(56) 对比文件

CN 102869369 A,2013.01.09

CN 108463229 A,2018.08.28

US 2011064746 A1,2011.03.17

US 2017095531 A1,2017.04.06

方宏亮;万涛.CD24和Siglec-10选择性抑制组织损伤诱导的炎性反应.中国肿瘤生物治疗杂志.2009,(第03期),全文.

审查员 王娟

权利要求书1页 说明书7页

序列表7页 附图2页

(54) 发明名称

一种融合蛋白及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及生物制药领域,具体涉及一种 Siglec-10的截短体、包含该截短体的融合蛋白、该截短体或包含其的融合蛋白的编码核酸、包含该编码核酸的表达载体、包含该表达载体的宿主细胞、及其该截短体或包含该截短体的融合蛋白的应用。

1. 一种Siglec-10截短体-Fc融合蛋白,其能够阻断CD24与Siglec-10相互作用,其氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。
2. 编码权利要求1所述的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白的核酸分子。
3. 包含权利要求2所述的核酸分子的表达载体。
4. 包含权利要求3所述的表达载体的宿主细胞。
5. 权利要求1所述的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白的制备方法,其特征在于,包括使用权利要求4所述的宿主细胞进行表达的步骤。
6. 权利要求1所述的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白用于制备治疗与CD24高表达相关疾病的药物中的应用。

一种融合蛋白及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药领域,具体涉及一种Siglec-10的截短体、包含该截短体的融合蛋白、该截短体或包含其的融合蛋白的编码核酸、包含该编码核酸的表达载体、包含该表达载体的宿主细胞、及其该截短体或包含该截短体的融合蛋白的应用。

背景技术

[0002] 肿瘤免疫治疗就是通过重新启动并维持肿瘤-免疫循环,恢复机体正常的抗肿瘤免疫反应,从而控制与清除肿瘤的一种治疗方法。然而,异变细胞在某些情况下能通过多种机制逃避机体的免疫监视,在体内迅速增殖,形成肿瘤。在多种癌症中,肿瘤细胞CD24呈高表达状态,并使肿瘤细胞得以逃避巨噬细胞的吞噬作用。因此,CD24在肿瘤细胞免疫逃逸中发挥了重要的作用。

[0003] CD24是一种高度糖基化的糖基磷脂酰肌醇锚定的细胞膜蛋白,可以与肿瘤相关巨噬细胞表面的唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素10(Siglec-10)结合,激活SHP-1/SHP-2介导的抑制性信号通路。2017年,张培等人提到肝细胞癌中通过Siglec-10与CD24相互作用抑制自然杀伤(NK)细胞功能,从而导致患者生存期减少,Siglec-10可能成为肝细胞癌治疗的一个新靶点(Siglec-10在肝细胞癌中介导肿瘤细胞存活并抑制自然杀伤细胞功能,中国科技论文在线,2016年6月7日)。另外,CD24可能是肝癌患者的治疗靶点(Siglec-10 is associated with survival and natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma,The Journal of surgical research,2015.194(1):107-113)。近期研究发现,通过对CD24或Siglec-10进行基因消融或使用抗体阻断CD24-Siglec-10相互作用,所有表达CD24的人类肿瘤中巨噬细胞的吞噬作用均显著增强。肿瘤表达的CD24通过与表达在肿瘤相关巨噬细胞上的抑制性受体Siglec-10相互作用,促进了免疫逃逸,CD24-Siglec-10信号轴可作为新的“别吃我”信号,是未来免疫治疗的潜在靶标(CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy, Nature,2019.572(7769):392-39)。

[0004] CD24高表达于各类肿瘤细胞(Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium,Exp Lung Res,2001.27:401-415;CD24 is an effector of HIF-1-driven primary tumor growth and metastasis.Cancer Res,2012.72(21):5600-5612;CD24(+) cells fuel rapid tumor growth and display high metastatic capacity.Breast Cancer Res,2015.17:78),因此,阻断CD24-Siglec-10信号轴的药物成为肿瘤免疫治疗领域中的研发热点。考虑到传统高亲和力单抗药物会存在例如B细胞耗竭及红细胞损伤等潜在的副作用等问题,基于人源Siglec-10的阻断CD24和Siglec-10相互作用的融合蛋白具有了一定的优势。

[0005] 已有文献报道,包含完整胞外序列的Siglec-10截短体与Fc形成Siglec10-Fc融合蛋白可以有效阻断CD24和Siglec-10的相互作用(CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy,Nature,2019.572(7769):392-39),

因此可推测融合蛋白与CD24的结合可起到阻断CD24-Siglec-10信号轴的作用,解除“别吃我”信号。

[0006] Siglec-10是Siglec家族成员中的抑制性受体,人源的Siglec-10蛋白全长为697个氨基酸残基(UniProt登录号Q96LC7),包括信号肽(1-16)、胞外结构域(5个免疫球蛋白样区域,17-539)、1个跨膜区(540-594)和2个细胞内抑制信号域(595-697)。其中,胞外结构域包括胞外结构域1(D1区,Ig-like V-type,17-141,含Linker)、胞外结构域2(D2区,Ig-like C2-type1,142-235,含Linker)及胞外结构域3-5(D3-D5区,236-539,含Linker),其中D1区是Siglec-10与唾液酸结合的主要功能片段,且D1区的第119位精氨酸为Siglec家族共有的与唾液酸结合的关键位点,同时,根据文献报道该位点突变后Siglec-10不再与CD24结合(CD24 and Siglec-10 Selectively Repress Tissue Damage-Induced Immune Responses,Science,2009(323):1722-1725)。因此推测D1区是Siglec-10与CD24结合的关键区域。

[0007] 由于人Siglec-10蛋白的完整胞外结构域的氨基酸序列较长(539个氨基酸残基(含信号肽)),且其中糖基化氨基酸位点较多,无论是从成药性上还是经济角度考虑,包含完整胞外结构域的Siglec-10蛋白临床应用价值非常有限,且其生产成本也极高,因此有针对性地开发既保留了Siglec-10与CD24结合特性又满足成药性要求的Siglec-10截短体或包含该Siglec-10截短体的融合蛋白,并进一步对其潜在临床应用价值进行挖掘,具有重要意义。

发明内容

[0008] 为了解决上述问题,本发明人基于人源Siglec-10开发能阻断在肿瘤免疫逃逸中起重要作用的CD24-Siglec-10信号轴的Siglec-10截短体或其突变体以及包含其的融合蛋白。发明人设计了各种Siglec-10截短体,并与Fc融合形成融合蛋白,却发现大部分Siglec-10截短体-Fc融合蛋白在重组后表达量极低甚至检测不到表达,因此发明人尝试对Siglec-10截短体-Fc融合蛋白中的Siglec-10截短体进行突变改造,筛选既保留了与CD24结合活性的,同时又具有较高表达量的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白。

[0009] 本发明通过以下技术方案解决以上技术问题。

[0010] 本发明提供一种Siglec-10截短体-Fc融合蛋白,其能够阻断CD24与Siglec-10相互作用,所述的Siglec-10截短体可为天然的Siglec-10截短体或其突变体。

[0011] 如本文所用,Siglec-10截短体是指野生型人源Siglec-10蛋白选择性地截短后所获得的功能性变体或其突变体,例如:所述的功能性变体为截掉Siglec-10胞外结构域中的一个氨基酸或者几个氨基酸残基,甚至是多个氨基酸残基后所得到的功能性变体;或截取Siglec-10胞外结构域中几个或者多个氨基酸残基后所得到的功能性变体;或是截取二个或二个以上Siglec-10胞外结构域中几个或者多个氨基酸残基所得到的功能性变体;或者上述功能性变体的组合,即通过连接子将这些功能性变体连接形成的功能性变体。只要所述的Siglec-10截短体具有阻断CD24与Siglec-10相互作用的功能即可。

[0012] 在本发明一较佳的实施例中,所述的Siglec-10截短体包括Siglec-10胞外结构域,优选地,所述的Siglec-10截短体包括Siglec-10胞外结构域的D1区;或者Siglec-10胞外结构域的D1区和D2区。

[0013] 如上所述的Siglec-10截短体中所包含的Siglec-10胞外结构域的不同结构片段之间(例如D1区和D2区之间)优选通过Siglec-10蛋白D1区和D2区之间原始的连接子(Linker)连接,也可以通过连接子(Linker)或者该连接子的突变体连接,所述的连接子可为本领域常规的连接子,例如(G4S)₃。所述的Siglec-10截短体的N端或者C端优选带有信号肽或者该信号肽的突变体;所述的信号肽可为本领域常规的信号肽,例如HSA。此处提及的连接子或者信号肽的突变体是指保留有突变之前连接子或者信号肽的功能的突变体。

[0014] 本发明中所述的Siglec-10截短体突变体中的“突变”较佳地发生于唾液酸结合位点、N连接糖基化位点和/或半胱氨酸位点。所述的突变体可通过本领域中的常规突变手段获得,例如对其中的一个或者多个氨基酸进行替换、增添或者缺失;本发明中的突变体优选对截短体中的个别或者多个氨基酸进行替换后获得。所述的替换优选发生于登录号为Q96LC7所示序列的第21F、36C、41C、100N、101C、119R、128Y、164C以及173C中的一个或多个氨基酸残基位点。

[0015] 如上所述的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白中的Fc区优选包含Fc区天然序列或Fc非天然序列;更优选地,所述Fc区为人Fc区。

[0016] 在另一个实施方案中,本发明的Fc区是概念上的,即虽然它实际上可能并不存在,但可根据所需Fc区变体的氨基酸序列实施抗体工程改造,产生含此序列的多肽或融合蛋白或编码所需Fc区变体氨基酸序列的DNA。

[0017] 在另一实施方案中,所述Fc区可为Fc区变体。本文所使用的“Fc区变体”是指对Fc天然氨基酸序列进行一个或多个氨基酸残基的修饰所获得Fc区。修饰的方法是本领域技术人员熟知的,包括但不限于对编码Fc区的DNA序列进行定点诱变,例如使用PCR诱变和盒式诱变来制备Fc区变体。例如,为了提高与FcR的结合,可以缺失Fc区的一个或多个氨基酸残基。例如,在一个实施方案中,为了改变Fc区的效应功能,可以制备氨基酸插入型Fc区变体。

[0018] 在一个实施方案中,例如可以在一个或多个鉴定为影响FcR结合的Fc区位点附近引入至少一个氨基酸残基(例如1-2个氨基酸残基,通常不超过10个氨基酸残基)。“附近”是指距所鉴定的影响FcR结合的Fc区位点的1-2个氨基酸残基之内。这类Fc区变体可以呈现增强或降低的FcR结合和/或ADCC活性。

[0019] 为了制备这类插入型变体,可评估含FcR结合区(例如靶FcR的细胞外结构域)的多肽与待插入氨基酸残基的Fc区的共结晶结构,以便涉及具有,例如增强的FcR结合能力的Fc区变体。这类插入通常被置于Fc区的环中。

[0020] 在一个实施方案中,通过在天然Fc区中引入适当的氨基酸序列修饰,能够制备在人效应细胞存在的条件下比含有天然Fc区的重组蛋白更有效地介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或以更强地亲和力结合Fc γ 受体(Fc γ R)的Fc区变体。本发明的Fc区变体通常在Fc区中包括至少一个氨基酸修饰。优选组合多个氨基酸修饰。例如,Fc区变体可包括2、3、4、5个或更多个氨基酸残基的取代,如在所鉴定的特异性FcR结合位点中。

[0021] 所述天然Fc区优选人Fc区,例如人IgG1(A或非A同种型)、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区天然序列。

[0022] 本发明还提供一种编码如上所述的Siglec-10截短体、如上所述的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白的核酸分子。

[0023] 本发明还提供一种包含如上所述的核酸分子的表达载体,所述的载体优选

pcDNA3.4(购自Thermo Fisher)。

[0024] 本发明还提供一种包含如上所述的表达载体的宿主细胞,所述的宿主细胞优选 Expi293F(购自Thermo Fisher)。

[0025] 本发明还提供一种如上所述的Siglec-10截短体、如上所述的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白制备方法,所述的制备方法包括使用如上所述的宿主细胞进行表达。

[0026] 本发明还提供一种如上所述的Siglec-10截短体、如上所述的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白用于制备治疗与CD24高表达相关疾病的药物中的应用。

[0027] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0028] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0029] 本发明的积极进步效果在于:既保留了与CD24结合活性的,同时又具有较高表达量的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白,该融合蛋白易于成药、制备成本低,具备潜在的临床应用价值。

附图说明

[0030] 图1为本发明Siglec-10截短体-Fc融合蛋白的结构示意图。

[0031] 图2为本发明所制备的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白的SDS-PAGE结果图。

[0032] 图3为本发明Siglec-10截短体-Fc融合蛋白与高表达人源CD24细胞的结合测定图。

实施例

[0033] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0034] 实施例1 Siglec-10截短体-Fc融合蛋白及其制备

[0035] 针对人Siglec-10蛋白的结构特征以及其与CD24的结合方式,设计了Siglec-10截短体-Fc融合蛋白,其由人源的Siglec-10的胞外结构域中的结构片段(如D1区、D2区等)和Fc组成,如由Siglec-10中D1区与Fc构成的融合蛋白(下称Siglec-10(D1)-Fc),其序列如SEQ ID NO:1所示,由Siglec-10中D1区和D2区与Fc构成的融合蛋白(下称Siglec-10(D1+D2)-Fc),其序列如SEQ ID NO:2所示,以及由Siglec-10中D1区与Fc构成的融合蛋白,其中Siglec-10中D1区中的36位半胱氨酸突变为丝氨酸(下称Siglec-10(D1m)-Fc),其序列如SEQ ID NO:3所示。

[0036] (一).融合蛋白序列及IgG亚型选择

[0037] Siglec-10(D1)-Fc氨基酸序列:(SEQ IDNO:1)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSMDGRFWIRVQESVMVPEGLCISVPCSFYSYPRQDWTGSTPAYGYWF

[0038]

KAVTETTKGAPVATNHQSREVEMSTRGRFQLTGDPKGNCSLVIRDAQMQDESQYFFRVERGSYVRYNF

- MNDGFFLKVTADIEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0039] Siglec-10 (D1+D2) -Fc氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)
- MYRMQLLSICIALSLALVTNSMDGRFWIRVQESVMVEGLCISVPCSFYPRQDWTGSTPAYGYWF
KAVTETTKGAPVATNHQSREVEVEMSTRGRFQLTGDPKGNCSLVIRDAQMDESQYFFRVERGSYVRYNF
MNDGFFLKVTALTQKPDVYIPETLEPGQPVTVICVFNWAFEECPSPFSWTGAALSSQGTKPTTSHFSV
- [0040] LSFTPRPQDHNTDLTCHVDFSRKGVSAQRTVRLRVADIEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0041] Siglec-10 (D1m) -Fc氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)
- MYRMQLLSICIALSLALVTNSMDGRFWIRVQESVMVEGL**S**ISVPCSFYPRQDWTGSTPAYGYWF
KAVTETTKGAPVATNHQSREVEVEMSTRGRFQLTGDPKGNCSLVIRDAQMDESQYFFRVERGSYVRYNF
MNDGFFLKVTADIEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
- [0042] HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0043] 人Siglec-10胞外结构域氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)
- MLLPLLLSSLLGGSQAMDGRFWIRVQESVMVEGLCISVPCSFYPRQDWTGSTPAYGYWFKAVT
ETTKGAPVATNHQSREVEVEMSTRGRFQLTGDPKGNCSLVIRDAQMDESQYFFRVERGSYVRYNFMNDG
FFLKVTALTQKPDVYIPETLEPGQPVTVICVFNWAFEECPSPFSWTGAALSSQGTKPTTSHFSVLSFT
PRPQDHNTDLTCHVDFSRKGVSAQRTVRLRVAYAPRDLVISISRDNTPALEPQPQGNVPYLEAQKGGQFL
- [0044] RLLCAADSQPPATLSWVLQNRVLSSSHWPGRPLGLELPGVKAGDSGRYTCRAENRLGSQQRALDLSVQ
YPPENLRVMVSQANRTVLENLNGTSLPVLEGQSLCLVCVTHSSPPARLSWTQRGQVLSPSQPSDPGVL
ELPRVQVEHEGEFTCHARHPLGSQHVSLSLSVHYSKLLGPSCSWEAEGHCSQASPAPSLRWWLG
EELLEGNSSQDSFEVTPSSAGPWANSSLSLHGGLSSGLRLRCEAWNVAHQSGSILQLPDKKGLIST
- [0045] 下划线标示的氨基酸为信号肽序列;波浪线标示的氨基酸为人Siglec-10 D1区序列;双下划线标示的氨基酸为人Siglec-10 D2区序列;加粗斜体显示的氨基酸为人Siglec-10胞外结构域中第36位突变后的氨基酸序列;虚线标示的氨基酸为Fc序列,阴影标示的氨

基酸为连接子(linker)。

[0046] 这些融合蛋白编码片段与表达载体连接后转入宿主细胞系(例如Expi293F)进行表达,本发明人意外发现大部分Siglec-10截短体-Fc融合蛋白表达量很低甚至检测不到表达,意外地发现,Siglec-10(D1m)-Fc在保留了与CD24结合活性的同时,表达量达到2-3mg/L,详见表1。

[0047] 表1三个融合蛋白在Expi293F体系中的表达量及纯化效率

融合蛋白	表达	产量(mg/L)	纯化(一步纯化)
Siglec-10(D1)-Fc	无表达	NA	NA
Siglec-10(D1+D2)-Fc	低表达	<1	80%
Siglec-10(D1m)-Fc	有表达	2-3	80%

[0049] Siglec-10截短体融合蛋白的制备方法:

[0050] 将表达Siglec-10截短体-Fc融合蛋白的核苷酸序列克隆到表达载体中,此表达载体包含一个Leader序列,通过PCR技术合成所述融合蛋白。其中,在哺乳动物表达结构的N端设计相关信号肽序列,以确保与分泌相关的信号转导与加工。所述表达载体包含:表达CMV启动子的哺乳动物表达载体。本发明提供一种宿主细胞,该宿主细胞含有如上所述的表达载体;该宿主细胞为哺乳动物来源的细胞。

[0051] 具体制备方法

[0052] 如图1所示,为本发明的Siglec-10截短体-Fc融合蛋白的结构示意图。上述融合蛋白均通过标准分子生物学技术的重叠PCR合成DNA片段,将DNA片段克隆到表达载体pcDNA3.4中。而后在Expi293F细胞中进行表达。最后,采用蛋白G亲和色谱以纯化融合蛋白,纯化后的融合蛋白在超滤管中浓缩并置换到pH7.4 DPBS缓冲液中。具体过程表述如下:

[0053] (1) 在哺乳动物细胞中表达Siglec-10截短体-Fc融合蛋白

[0054] 对Expi293F细胞株(购自ThermoFisher,货号A14527)进行目标蛋白的质粒瞬转。用GE蛋白纯化柱对融合蛋白进行纯化。具体地,Expi293F细胞培养于Expi293TM Expression Medium培养基(购自于ThermoFisher,货号A1435101),用ExpiFectamineTM 293转染试剂盒(购自Invitrogen,A14525)转入质粒DNA。经过1周后,收获上清并进行纯化。方法具体如下:

[0055] A. 转染前一天,将Expi293F细胞传代,添加新鲜培养基至密度 $2-3 \times 10^6$ 细胞/毫升,置于转速为120转/分钟,37度,8%二氧化碳的细胞摇床培养。

[0056] B. 转染当天,用新鲜培养基稀释细胞密度到 2.0×10^6 细胞/毫升,按照1毫升细胞1微克ExpiFectamine转染试剂的比例进行转染。转染后将细胞置于转速为120转/分钟,37度,8%二氧化碳的细胞摇床培养

[0057] C. 转染20小时后,按比例添加补料。

[0058] D. 转染5-7天,检测细胞活率,若活率小于60%,将细胞置于离心管中10000转/分钟离心,收获上清。

[0059] (2) 蛋白纯化的具体步骤如下:

[0060] 首先,使用蛋白G亲和色谱法。先用结合缓冲液(PBS,pH7.4)将稀释上清,并以1-5mL/分钟的流速加载到Protein G柱子(GE Healthcare)上。然后,用5-10倍柱体积的结合缓冲液(PBS,pH7.4)洗涤柱子,并以1-5ml/分钟流速用洗脱液(0.1M柠檬酸钠,pH3.0)对蛋白质进行洗脱并收集洗脱组分。

[0061] 最后,使用Millipore Amicon Ultra (10kD)超滤管将洗脱后的融合蛋白进行浓缩,并将缓冲液转换为pH 7.4的PBS。通过SDS-PAGE,对每种蛋白质的纯度进行鉴定,A280测定蛋白浓度。

[0062] 实施例2 Siglec-10(D1m)-Fc融合蛋白与CD24在细胞水平上的结合

[0063] 通过FACS技术测定了Siglec-10(D1m)-Fc融合蛋白和CD24的亲合力。

[0064] 具体方法:将一定浓度(40ug/mL)的融合蛋白S10-(D1m)-Fc与 2×10^5 个高表达人源CD24 CHOK1细胞(购于北京康源博创生物科技公司)孵育在100uL(2%BSA的PBS)中,置于4度1小时后,离心弃去上清并用缓冲液洗涤细胞两次。随后加入抗人源IgG荧光二抗(购于Sigma),置于4度1小时后,离心弃去上清并用缓冲液洗涤细胞两次。对抗体标记后的细胞进行流式细胞仪分析(CantoII,BD bioscience公司),得到数据分析如图3。如图3所示,Siglec-10(D1m)-Fc融合蛋白在细胞水平上保留了与CD24的结合活性。

[0001]	序列表															
[0002]	<110>	上海津曼特生物科技有限公司														
[0003]	<120>	一种融合蛋白及其制备方法和应用														
[0004]	<140>	202010953136X														
[0005]	<141>	2020-09-11														
[0006]	<160>	4														
[0007]	<170>	SIPOSequenceListing 1.0														
[0008]	<210>	1														
[0009]	<211>	383														
[0010]	<212>	PRT														
[0011]	<213>	未知(人工序列)														
[0012]	<400>	1														
[0013]	Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu															
[0014]	1	5	10	15												
[0015]	Val Thr Asn Ser Met Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser															
[0016]	20	25	30													
[0017]	Val Met Val Pro Glu Gly Leu Cys Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser															
[0018]	35	40	45													
[0019]	Tyr Pro Arg Gln Asp Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp															
[0020]	50	55	60													
[0021]	Phe Lys Ala Val Thr Glu Thr Thr Lys Gly Ala Pro Val Ala Thr Asn															
[0022]	65	70	75	80												
[0023]	His Gln Ser Arg Glu Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu															
[0024]	85	90	95													
[0025]	Thr Gly Asp Pro Ala Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala															
[0026]	100	105	110													
[0027]	Gln Met Gln Asp Glu Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser															
[0028]	115	120	125													
[0029]	Tyr Val Arg Tyr Asn Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr															
[0030]	130	135	140													
[0031]	Ala Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His															
[0032]	145	150	155	160												
[0033]	Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val															
[0034]	165	170	175													
[0035]	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr															
[0036]	180	185	190													
[0037]	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu															
[0038]	195	200	205													

[0039]	Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
[0040]	210 215 220
[0041]	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
[0042]	225 230 235 240
[0043]	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
[0044]	245 250 255
[0045]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
[0046]	260 265 270
[0047]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
[0048]	275 280 285
[0049]	Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
[0050]	290 295 300
[0051]	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
[0052]	305 310 315 320
[0053]	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
[0054]	325 330 335
[0055]	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
[0056]	340 345 350
[0057]	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
[0058]	355 360 365
[0059]	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0060]	370 375 380
[0061]	<210> 2
[0062]	<211> 477
[0063]	<212> PRT
[0064]	<213> 未知(人工序列)
[0065]	<400> 2
[0066]	Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
[0067]	1 5 10 15
[0068]	Val Thr Asn Ser Met Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser
[0069]	20 25 30
[0070]	Val Met Val Pro Glu Gly Leu Cys Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser
[0071]	35 40 45
[0072]	Tyr Pro Arg Gln Asp Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp
[0073]	50 55 60
[0074]	Phe Lys Ala Val Thr Glu Thr Thr Lys Gly Ala Pro Val Ala Thr Asn
[0075]	65 70 75 80
[0076]	His Gln Ser Arg Glu Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu
[0077]	85 90 95

[0078]	Thr Gly Asp Pro Ala Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala
[0079]	100 105 110
[0080]	Gln Met Gln Asp Glu Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser
[0081]	115 120 125
[0082]	Tyr Val Arg Tyr Asn Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr
[0083]	130 135 140
[0084]	Ala Leu Thr Gln Lys Pro Asp Val Tyr Ile Pro Glu Thr Leu Glu Pro
[0085]	145 150 155 160
[0086]	Gly Gln Pro Val Thr Val Ile Cys Val Phe Asn Trp Ala Phe Glu Glu
[0087]	165 170 175
[0088]	Cys Pro Pro Pro Ser Phe Ser Trp Thr Gly Ala Ala Leu Ser Ser Gln
[0089]	180 185 190
[0090]	Gly Thr Lys Pro Thr Thr Ser His Phe Ser Val Leu Ser Phe Thr Pro
[0091]	195 200 205
[0092]	Arg Pro Gln Asp His Asn Thr Asp Leu Thr Cys His Val Asp Phe Ser
[0093]	210 215 220
[0094]	Arg Lys Gly Val Ser Ala Gln Arg Thr Val Arg Leu Arg Val Ala Asp
[0095]	225 230 235 240
[0096]	Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
[0097]	245 250 255
[0098]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
[0099]	260 265 270
[0100]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
[0101]	275 280 285
[0102]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
[0103]	290 295 300
[0104]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
[0105]	305 310 315 320
[0106]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
[0107]	325 330 335
[0108]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
[0109]	340 345 350
[0110]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
[0111]	355 360 365
[0112]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
[0113]	370 375 380
[0114]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
[0115]	385 390 395 400
[0116]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

[0156]	195	200	205
[0157]	Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
[0158]	210	215	220
[0159]	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
[0160]	225	230	235
[0161]	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
[0162]	245	250	255
[0163]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
[0164]	260	265	270
[0165]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
[0166]	275	280	285
[0167]	Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
[0168]	290	295	300
[0169]	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
[0170]	305	310	315
[0171]	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
[0172]	325	330	335
[0173]	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
[0174]	340	345	350
[0175]	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
[0176]	355	360	365
[0177]	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0178]	370	375	380
[0179]	<210> 4		
[0180]	<211> 546		
[0181]	<212> PRT		
[0182]	<213> 未知(人工序列)		
[0183]	<400> 4		
[0184]	Met Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gly Ser Gln Ala		
[0185]	1	5	10
[0186]	Met Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro		
[0187]	20	25	30
[0188]	Glu Gly Leu Cys Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln		
[0189]	35	40	45
[0190]	Asp Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp Phe Lys Ala Val		
[0191]	50	55	60
[0192]	Thr Glu Thr Thr Lys Gly Ala Pro Val Ala Thr Asn His Gln Ser Arg		
[0193]	65	70	75
[0194]	Glu Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu Thr Gly Asp Pro		

[0195]		85		90		95													
[0196]	Ala	Lys	Gly	Asn	Cys	Ser	Leu	Val	Ile	Arg	Asp	Ala	Gln	Met	Gln	Asp			
[0197]				100					105					110					
[0198]	Glu	Ser	Gln	Tyr	Phe	Phe	Arg	Val	Glu	Arg	Gly	Ser	Tyr	Val	Arg	Tyr			
[0199]				115					120					125					
[0200]	Asn	Phe	Met	Asn	Asp	Gly	Phe	Phe	Leu	Lys	Val	Thr	Ala	Leu	Thr	Gln			
[0201]				130					135					140					
[0202]	Lys	Pro	Asp	Val	Tyr	Ile	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Pro	Gly	Gln	Pro	Val			
[0203]				145					150					155					160
[0204]	Thr	Val	Ile	Cys	Val	Phe	Asn	Trp	Ala	Phe	Glu	Glu	Cys	Pro	Pro	Pro			
[0205]					165					170						175			
[0206]	Ser	Phe	Ser	Trp	Thr	Gly	Ala	Ala	Leu	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Lys	Pro			
[0207]					180					185						190			
[0208]	Thr	Thr	Ser	His	Phe	Ser	Val	Leu	Ser	Phe	Thr	Pro	Arg	Pro	Gln	Asp			
[0209]					195					200						205			
[0210]	His	Asn	Thr	Asp	Leu	Thr	Cys	His	Val	Asp	Phe	Ser	Arg	Lys	Gly	Val			
[0211]					210					215						220			
[0212]	Ser	Ala	Gln	Arg	Thr	Val	Arg	Leu	Arg	Val	Ala	Tyr	Ala	Pro	Arg	Asp			
[0213]					225									230					240
[0214]	Leu	Val	Ile	Ser	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Thr	Pro	Ala	Leu	Glu	Pro	Gln			
[0215]						245										250			255
[0216]	Pro	Gln	Gly	Asn	Val	Pro	Tyr	Leu	Glu	Ala	Gln	Lys	Gly	Gln	Phe	Leu			
[0217]																260			265
[0218]	Arg	Leu	Leu	Cys	Ala	Ala	Asp	Ser	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Trp			
[0219]																270			275
[0220]	Val	Leu	Gln	Asn	Arg	Val	Leu	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Trp	Gly	Pro	Arg			
[0221]																280			285
[0222]	Pro	Leu	Gly	Leu	Glu	Leu	Pro	Gly	Val	Lys	Ala	Gly	Asp	Ser	Gly	Arg			
[0223]																290			295
[0224]	Tyr	Thr	Cys	Arg	Ala	Glu	Asn	Arg	Leu	Gly	Ser	Gln	Gln	Arg	Ala	Leu			
[0225]																300			305
[0226]	Asp	Leu	Ser	Val	Gln	Tyr	Pro	Pro	Glu	Asn	Leu	Arg	Val	Met	Val	Ser			
[0227]																310			315
[0228]	Gln	Ala	Asn	Arg	Thr	Val	Leu	Glu	Asn	Leu	Gly	Asn	Gly	Thr	Ser	Leu			
[0229]																320			325
[0230]	Pro	Val	Leu	Glu	Gly	Gln	Ser	Leu	Cys	Leu	Val	Cys	Val	Thr	His	Ser			
[0231]																325			330
[0232]	Ser	Pro	Pro	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Gln	Arg	Gly	Gln	Val	Leu	Ser			
[0233]																330			335
																340			345
																350			355
																360			365
																370			375
																380			385
																385			390
																390			395
																395			400

[0234]	Pro Ser Gln Pro Ser Asp Pro Gly Val Leu Glu Leu Pro Arg Val Gln
[0235]	405 410 415
[0236]	Val Glu His Glu Gly Glu Phe Thr Cys His Ala Arg His Pro Leu Gly
[0237]	420 425 430
[0238]	Ser Gln His Val Ser Leu Ser Leu Ser Val His Tyr Ser Pro Lys Leu
[0239]	435 440 445
[0240]	Leu Gly Pro Ser Cys Ser Trp Glu Ala Glu Gly Leu His Cys Ser Cys
[0241]	450 455 460
[0242]	Ser Ser Gln Ala Ser Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp Trp Leu Gly Glu
[0243]	465 470 475 480
[0244]	Glu Leu Leu Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asp Ser Phe Glu Val Thr Pro
[0245]	485 490 495
[0246]	Ser Ser Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ser Ser Leu Ser Leu His Gly Gly
[0247]	500 505 510
[0248]	Leu Ser Ser Gly Leu Arg Leu Arg Cys Glu Ala Trp Asn Val His Gly
[0249]	515 520 525
[0250]	Ala Gln Ser Gly Ser Ile Leu Gln Leu Pro Asp Lys Lys Gly Leu Ile
[0251]	530 535 540
[0252]	Ser Thr
[0253]	545

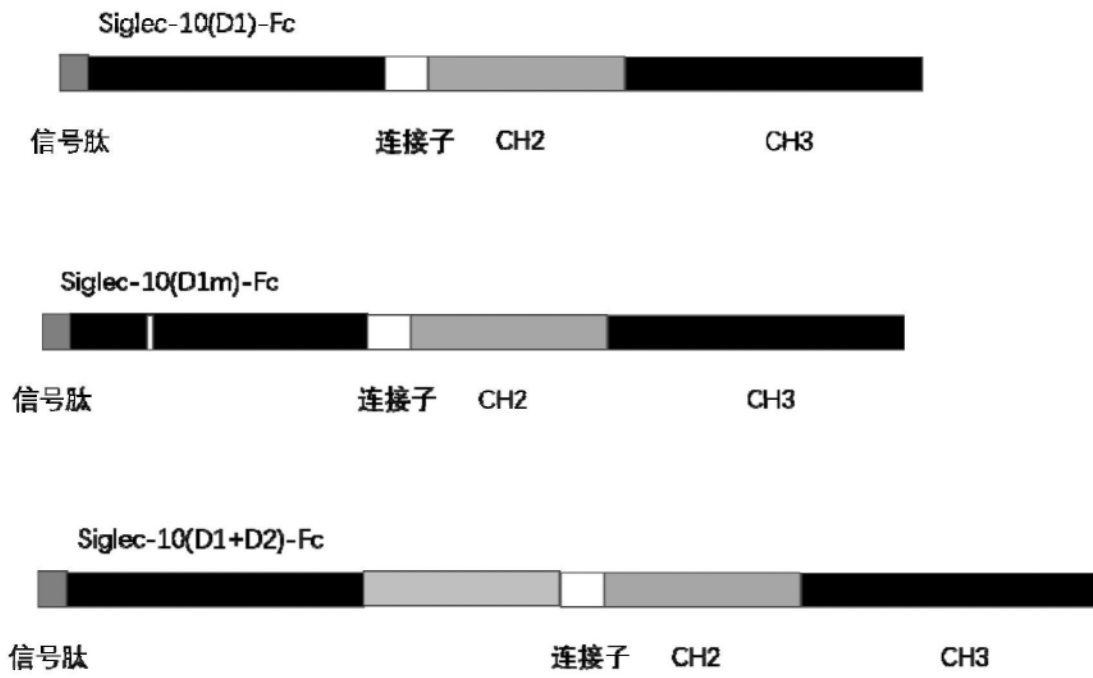


图1

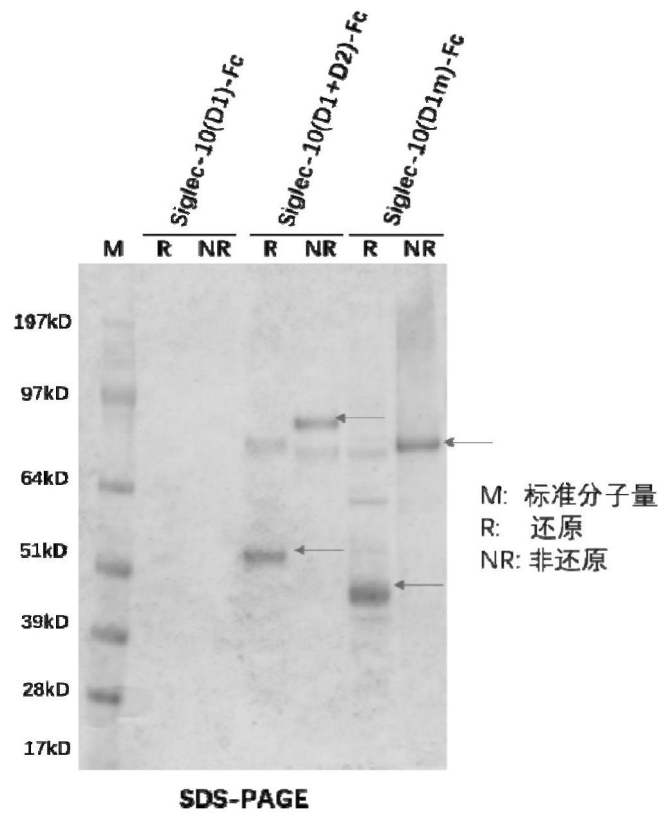


图2

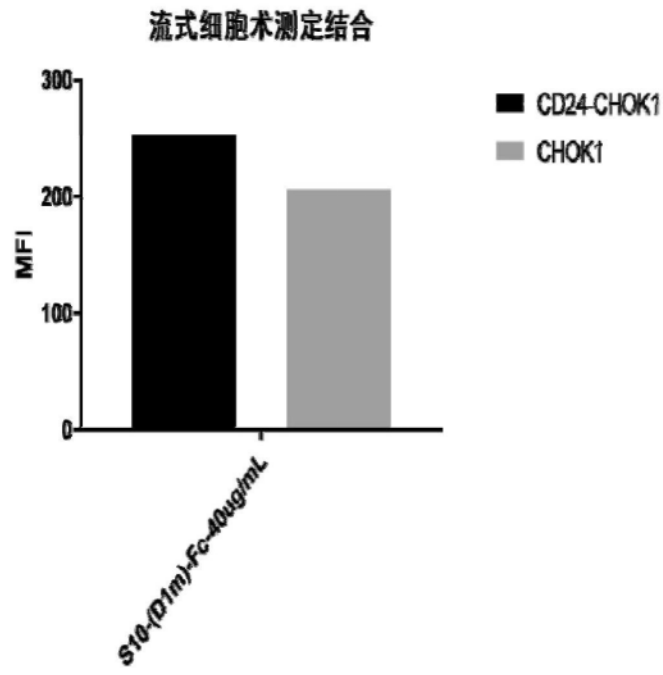


图3