

(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 108434450 A

(43)申请公布日 2018.08.24

(21)申请号 201810117693.0

A61P 31/20(2006.01)

(22)申请日 2018.02.06

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 朱明昭 王文君

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 单骁越

(51)Int.Cl.

A61K 39/385(2006.01)

A61K 39/29(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

A61K 39/145(2006.01)

A61K 47/65(2017.01)

A61K 47/69(2017.01)

权利要求书1页 说明书15页

序列表18页 附图24页

(54)发明名称

基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗及其制备方法

(57)摘要

本发明提供用于制备疫苗的铁蛋白纳米颗粒载体,并且还提供基于所述铁蛋白纳米颗粒载体的疫苗,及其制备方法。所述铁蛋白纳米颗粒载体由与SpyCatcher融合表达的铁蛋白自组装而成,或由与SpyTag融合表达的铁蛋白自组装而成,当所述纳米颗粒载体由与SpyCatcher融合表达的铁蛋白自组装而成时,所述疫苗还包含与SpyTag融合表达的抗原,当所述纳米颗粒载体由与SpyTag融合表达的铁蛋白自组装而成时,所述疫苗还包含与SpyCatcher融合表达的抗原,其中铁蛋白与所述抗原之间通过SpyCatcher-SpyTag相互作用共价连接。

1. 铁蛋白纳米颗粒载体,所述纳米颗粒载体由与SpyCatcher融合表达的铁蛋白自组装而成,或由与SpyTag融合表达的铁蛋白自组装而成。
2. 根据权利要求1所述的铁蛋白纳米颗粒载体,其中所述SpyCatcher或SpyTag融合表达在铁蛋白的N端。
3. 根据权利要求1所述的铁蛋白纳米颗粒载体,其中所述铁蛋白来源于强烈炽热球菌。
4. 根据权利要求1所述的铁蛋白纳米颗粒载体,其中SpyCatcher与铁蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,SpyTag与铁蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的铁蛋白纳米颗粒载体在制备疫苗中的用途。
6. 基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗,所述疫苗包含权利要求1-4中任一项所述的铁蛋白纳米颗粒载体,当所述纳米颗粒载体由与SpyCatcher融合表达的铁蛋白自组装而成时,所述疫苗还包含与SpyTag融合表达的抗原,当所述纳米颗粒载体由与SpyTag融合表达的铁蛋白自组装而成时,所述疫苗还包含与SpyCatcher融合表达的抗原,其中铁蛋白与所述抗原之间通过SpyCatcher-SpyTag相互作用共价连接。
7. 根据权利要求6所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗,其中所述抗原选自乙肝病毒preS1蛋白、流感病毒M2e蛋白、丙肝病毒E2蛋白、人乳头瘤病毒E7蛋白。
8. 根据权利要求6所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗,其中所述抗原是乙肝病毒preS1蛋白,优选地,所述疫苗包含由与SpyTag融合表达的铁蛋白自组装而成的纳米颗粒载体和与SpyCatcher融合表达的乙肝病毒preS1蛋白,优选地,SpyTag与铁蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,并且SpyCatcher与乙肝病毒preS1蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。
9. 根据权利要求8所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗用于制备乙型肝炎病毒预防性或治疗性疫苗的用途。
10. 根据权利要求6所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗,其中所述抗原是人乳头瘤病毒E7蛋白,优选地,所述疫苗包含由与SpyCatcher融合表达的铁蛋白自组装而成的纳米颗粒载体和与SpyTag融合表达的人乳头瘤病毒E7蛋白,优选地,SpyCatcher与铁蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,并且SpyTag与人乳头瘤病毒E7蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示。
11. 根据权利要求10所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗用于制备用于治疗宫颈癌的药物的用途。
12. 根据权利要求6所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗,其还包含佐剂,优选地,所述佐剂选自Toll样受体9的配体CpG-ODN、Toll样受体4的配体MPLA、铝佐剂。

## 基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于纳米颗粒载体技术领域,具体而言是以铁蛋白纳米颗粒为基础,利用 SpyCatcher-SpyTag 蛋白连接技术,建立一种能够快速连接蛋白质分子的纳米颗粒载体系统。利用该系统可以简单方便有效地将病毒抗原和肿瘤抗原等多种蛋白抗原以共价键的形式连接到铁蛋白纳米疫苗载体上,形成相应的铁蛋白纳米疫苗。

### 背景技术

[0002] 纳米颗粒材料的理化特征赋予其许多独特的生物学性状,广泛用于疫苗、药物等的研发中。铁蛋白是广泛存在于生物体的铁贮藏蛋白,可自组装形成纳米颗粒,是生物纳米材料研究领域的热点。在疫苗研发中,铁蛋白是理想的抗原载体。Masaru Kanekiyo 等将流感病毒 H1N1 的 HA 蛋白融合表达在幽门螺旋杆菌铁蛋白的 N 端,形成表面带有 8 个 HA 三聚体的纳米疫苗,与灭活三价流感病毒疫苗相比,能引起 10 倍以上的抗体应答的增强,同时还能产生广谱性的保护作用 (Kanekiyo, Wei et al. 2013)。Sebyung Kang 实验室对强烈热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 铁蛋白进行了改造,将 OTI、OTII 肽段融合表达在铁蛋白的表面 (第 142 位氨基酸处) 或 C 端形成纳米疫苗,能够引起较强的 CD4、CD8T 细胞应答 (Han, Kang et al. 2014)。此外,将 HIV 的外壳蛋白融合表达在铁蛋白纳米颗粒的表面也能在小鼠中引起 8 倍左右抗体应答的增强 (Sliepen, Ozorowski et al. 2015)。可见,用铁蛋白纳米颗粒展示抗原,能够显著地增强抗原的免疫原性,引起更强的体液、细胞免疫反应,因此铁蛋白是理想的纳米疫苗平台。在药物研发中,铁蛋白还被用于化疗药物或探针的载体,用于肿瘤的诊断和治疗。

[0003] HBV (hepatitis B virus, HBV) 病毒是噬肝 DNA 病毒属的双链 DNA 病毒,能够通过血液或体液传播。HBV 感染会引起不同程度的肝脏损伤,包括急性、慢性肝炎,肝纤维化,肝硬化和肝癌。全球范围内大约有 2.57 亿的慢性乙型肝炎患者,每年约有 100 万患者死于 HBV 感染所引起的晚期并发症。在我国慢性乙型肝炎是严重危害人民健康的重大传染病。目前临床上的乙肝疫苗均为预防 HBV 感染的预防性疫苗,慢性乙型肝炎的治疗方式则主要是抗病毒药物 (核苷 (酸) 类似物、病毒唑) 和干扰素等,它们通过抑制病毒的复制来发挥作用但不能彻底地清除病毒,大多数患者需要长期治疗而且易产生耐药性等副作用。因此,免疫治疗将成为乙型肝炎治疗的重要手段,治疗性疫苗的研制具有十分重要的意义。

[0004] preS1 是 large HBsAg N 端的一段氨基酸序列 (ay 型为 108 个氨基酸, ad 型为 119 个氨基酸), preS1 能够与肝脏细胞表面的 NTCP 结合从而介导 HBV 的感染。一段与 preS1 第 2-48 位氨基酸序列相同的 N 端十八烷基化修饰的多肽可以在体外阻止 HBV 感染肝脏细胞,也可在小鼠模型中预防 HBV 的感染。因此产生针对 preS1 的特异性抗体能够中和 HBV 病毒并且保护宿主免受感染。由于 preS1 蛋白本身的免疫原性较弱,只有联合了较强佐剂情况下才能诱导免疫反应,所以一种可以有效引起 preS1 特异性抗体应答的疫苗形式有待出现。

[0005] SpyCatcher-SpyTag 蛋白连接系统是由英国科学家 Mark Howarth 在 2012 年建立的,它来源于酿脓链球菌纤连蛋白结合蛋白 FbaB 的 CnaB2 结构域 (Zakeri, Fierer et

al. 2012)。CnaB2为一个分割蛋白,通过结构生物学和工程学的方法可以将CnaB2分割成一个含有138氨基酸的蛋白 SpyCatcher和一个含有13个氨基酸的多肽SpyTag。当它们相遇的时候,几分钟内就可以通过SpyTag的天冬氨酸和SpyCatcher的赖氨酸之间形成酰胺键共价结合形成一个完整的蛋白。SpyCatcher-SpyTag蛋白连接系统与化学偶联、酶联等传统方法相比具有反应条件简便、特异性高、效率高、产量大、反应产物稳定等优点。为了进一步优化SpyCatcher-SpyTag这个系统以使其更适用于疫苗的构建,我们曾尝试在不影响SpyCatcher与 SpyTag结合能力的情况下将SpyCatcher进行截短,形成的 $\Delta N$  SpyCatcher(N端氨基酸24-47截短,简称SC)免疫原性降低,更适合应用于疫苗的生产。

### 发明内容

[0006] 本发明利用SpyCatcher-SpyTag蛋白连接系统生产了一种能快速连接抗原的铁蛋白纳米疫苗系统,将乙肝病毒表面抗原preS1连接到铁蛋白表面制成的纳米疫苗可以显著地增强preS1特异性的抗体水平,能够有效地预防HBV的感染,同时具有治疗性效果。将人乳头瘤状病毒E7抗原连接到铁蛋白表面制成的纳米疫苗可有效地控制小鼠宫颈癌的生长,是一种有效的肿瘤治疗性疫苗。此外,其他病毒、肿瘤相关抗原也可利用 SpyCatcher-SpyTag蛋白连接系统快速连接到铁蛋白纳米疫苗载体上,实现了纳米疫苗的快捷、高效地生产。可用于本发明的SpyCatcher-SpyTag蛋白连接可以是原型SpyCatcher或其衍生物与原型SpyTag或其衍生物介导的蛋白质连接,特别地,本发明中使用的SpyCatcher可以是N端截短的 SpyCatcher( $\Delta N$  SpyCatcher)。

[0007] 本发明的目的是提供有效的预防性和治疗性疫苗,所述疫苗是一种以铁蛋白为载体的纳米疫苗,其具有制备迅速、效果显著的特点,解决了疫苗制备周期长、弱免疫原应答低等问题。

[0008] 在本发明的一些方面中,测试了乙肝病毒preS1蛋白、流感病毒M2e 蛋白、丙肝病毒E2蛋白以及人乳头瘤病毒E7蛋白等多种抗原,与未连接形式的相应抗原疫苗相比,铁蛋白纳米疫苗诱导产生了几倍-几十倍的抗体应答或T细胞应答。例如,在小鼠乙肝感染模型中,该疫苗显示了出色的预防和治疗作用。在小鼠宫颈癌模型中,该疫苗具有显著的治疗效果。

[0009] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0010] 1. 铁蛋白纳米颗粒载体,所述纳米颗粒载体由与SpyCatcher融合表达的铁蛋白自组装而成,或由与SpyTag融合表达的铁蛋白自组装而成。

[0011] 2. 根据1所述的铁蛋白纳米颗粒载体,其中所述SpyCatcher或SpyTag 融合表达在铁蛋白的N端。

[0012] 3. 根据1所述的铁蛋白纳米颗粒载体,其中所述铁蛋白来源于强烈炽热球菌。

[0013] 4. 根据1所述的铁蛋白纳米颗粒载体,其中SpyCatcher与铁蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,SpyTag与铁蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。

[0014] 5. 根据1-4中任一项所述的铁蛋白纳米颗粒载体在制备疫苗中的用途。

[0015] 6. 基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗,所述疫苗包含1-4中任一项所述的铁蛋白纳米颗粒载体,当所述纳米颗粒载体由与SpyCatcher融合表达的铁蛋白自组装而成时,所述疫苗

还包含与SpyTag融合表达的抗原,当所述纳米颗粒载体由与SpyTag融合表达的铁蛋白自组装而成时,所述疫苗还包含与SpyCatcher融合表达的抗原,其中铁蛋白与所述抗原之间通过 SpyCatcher-SpyTag相互作用共价连接。

[0016] 7.根据6所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗,其中所述抗原选自乙肝病毒preS1蛋白、流感病毒M2e蛋白、丙肝病毒E2蛋白、人乳头瘤病毒 E7蛋白。

[0017] 8.根据6所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗,其中所述抗原是乙肝病毒preS1蛋白,优选地,所述疫苗包含由与SpyTag融合表达的铁蛋白自组装而成的纳米颗粒载体和与SpyCatcher融合表达的乙肝病毒preS1蛋白,优选地,SpyTag与铁蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,并且SpyCatcher与乙肝病毒preS1蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11所示。

[0018] 9.根据8所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗用于制备乙型肝炎病毒预防性或治疗性疫苗的用途。

[0019] 10.根据6所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗,其中所述抗原是人乳头瘤病毒E7蛋白,优选地,所述疫苗包含由与SpyCatcher融合表达的铁蛋白自组装而成的纳米颗粒载体和与SpyTag融合表达的人乳头瘤病毒E7蛋白,优选地,SpyCatcher与铁蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,并且SpyTag与人乳头瘤病毒E7蛋白的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13所示。

[0020] 11.根据10所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗用于制备用于治疗宫颈癌的药物的用途。

[0021] 12.根据6所述的基于铁蛋白纳米颗粒的疫苗,其还包含佐剂,优选地,所述佐剂选自To11样受体9的配体CpG-ODN、To11样受体4的配体MPLA、铝佐剂。

## 附图说明

[0022] 图1.铁蛋白纳米疫苗平台结构示意图。A.  $\Delta$ N SpyCatcher (SC)融合表达在铁蛋白亚基N端第五个氨基酸处,24个SC-铁蛋白亚基自组装形成表面呈递SC的纳米颗粒结构; B. SC-铁蛋白纳米疫苗平台可与带有SpyTag的抗原结合形成单价或多价纳米疫苗; C. SpyTag融合表达在铁蛋白亚基N端第五个氨基酸处,24个SpyTag-铁蛋白亚基自组装形成表面呈递SpyTag纳米颗粒结构;D. SpyTag-铁蛋白纳米疫苗平台可与带有SC的抗原结合形成单价或多价纳米疫苗。

[0023] 图2.铁蛋白纳米疫苗平台的纯化和生化特征。A. SC-铁蛋白经预装柱 Superose 6层析的纯化图谱。蓝色线为280nm吸收峰,红色线为260nm吸收峰,SC-铁蛋白的洗脱峰在13.5ml左右;B.纯化后的SC-铁蛋白还原性 SDS-PAGE电泳结果图,SC-铁蛋白一个亚基的分子量约34.1kDa;C. SpyCatcher-铁蛋白纳米疫苗平台在透射电子显微镜下拍摄结果图;D. SpyTag-铁蛋白经预装柱Superose 6层析的纯化图谱。蓝色线为280nm吸收峰,红色线为260nm吸收峰,SpyTag-铁蛋白的洗脱峰在15ml左右;E. 纯化后的SpyTag-铁蛋白还原性 SDS-PAGE电泳结果图,SpyTag-铁蛋白一个亚基的分子量约22.4kDa;F. SpyTag-铁蛋白纳米疫苗平台在透射电子显微镜下拍摄结果图。

[0024] 图3.铁蛋白-preS1、铁蛋白-E7纳米疫苗的纯化和生化特征。A. SpyTag-铁蛋白和SC-preS1按不同的摩尔比例混合,4℃过夜后还原性 SDS-PAGE电泳结果图,摩尔比分别为

1:1、1:2、1:3, SC-preS1的分子量约为25.5kDa, 结合后的铁蛋白-preS1一个亚基的分子量约为47.8kDa; B. 结合后的铁蛋白-preS1纳米疫苗经预装柱Superose 6层析的纯化图谱。蓝色线为280nm吸收峰, 红色线为260nm吸收峰, 铁蛋白-preS1的洗脱峰在11.5ml左右; C. 铁蛋白-preS1纳米疫苗在透射电子显微镜下拍摄结果图。D. SC-铁蛋白和E7-SpyTag按不同的摩尔比例混合, 4℃过夜后还原性 SDS-PAGE电泳结果图, 摩尔比分别为1:1、1:2、1:3, E7-SpyTag的分子量约为13.7kDa, 结合后的铁蛋白-E7一个亚基的分子量约为47.8kDa; E. 铁蛋白-E7纳米疫苗在透射电子显微镜下拍摄结果图。

[0025] 图4. 铁蛋白-preS1纳米疫苗以及基于铁蛋白纳米疫苗平台设计的病毒相关疫苗免疫后引起的抗原特异性抗体应答水平检测。A. 铁蛋白-preS1 纳米疫苗单独免疫及以CpG为佐剂联合免疫后引起的anti-preS1抗体应答水平检测; B. 铁蛋白-preS1纳米疫苗与CpG佐剂联合免疫后引起的 anti-preS1抗体随时间变化图。在初次免疫后第270天给予第三次免疫; C. 抗体亲和力检测结果图; D. 铁蛋白纳米颗粒与游离preS1抗原物理混合后引起的抗体应答水平检测; E. 不同佐剂与铁蛋白-preS1纳米疫苗联合免疫后引起的anti-preS1抗体应答水平检测; F. 鼠源的铁蛋白纳米颗粒制成的铁蛋白-preS1纳米疫苗与CpG佐剂联合免疫后引起的anti-preS1抗体应答水平检测; G. 铁蛋白-M2e纳米疫苗联合CpG佐剂免疫后引起的 anti-M2e抗体应答水平检测; H. 铁蛋白-HCVpep<sub>(412-423)</sub> 纳米疫苗联合-Alum 佐剂免疫后引起的anti-HCVpep<sub>(412-423)</sub> 抗体应答水平检测; I. 铁蛋白-E7纳米疫苗联合CpG佐剂免疫后引起的anti-E7抗体应答水平检测。

[0026] 图5. 铁蛋白-preS1纳米疫苗预防HBV感染的效果检测。A. 铁蛋白-preS1纳米疫苗预防AAV-HBV1.3感染的体内实验流程图; B. 血清中 preS1抗原水平检测结果; C. 血清中HBV DNA水平检测结果; D. 血清中和的HBV感染HepG2-hNTCP细胞系后细胞上清中HBV相关抗原HBsAg 的水平检测; E. 细胞上清中HBV相关抗原HBeAg的水平检测; F. 感染细胞中HBV相关RNA水平的检测。

[0027] 图6. 铁蛋白-preS1纳米疫苗治疗HBV慢性感染的效果检测。A. 铁蛋白-preS1纳米疫苗治疗AAV-HBV1.3慢性感染小鼠实验流程图; B. 铁蛋白-preS1纳米疫苗在HBV耐受小鼠中引起anti-preS1抗体水平检测; C. 小鼠血清中HBV相关抗原preS1的水平检测; D. 小鼠血清中HBV相关抗原HBsAg的水平检测; E. 小鼠血清中HBV DNA水平检测。

[0028] 图7. 铁蛋白-E7<sub>(43-62)</sub> 纳米疫苗引起CTL应答及肿瘤治疗效果检测。

[0029] A. E7抗原特异性CD8T细胞分泌IFN $\gamma$ 水平检测流式图及分泌IFN $\gamma$ 的 E7抗原特异性CD8T细胞比例统计图; B. 疫苗治疗后TC-1小鼠宫颈癌肿瘤的生长曲线。箭头所示疫苗接种的时间, 即第9、14、19天; C. 荷瘤小鼠的生存曲线。

## 具体实施方式

[0030] 下文将参考实施例和附图详细描述本发明, 所述实施例仅是意图举例说明本发明, 而不是意图限制本发明的范围。本发明的范围由后附的权利要求具体限定。

[0031] 实施例一、铁蛋白纳米疫苗平台的构建和生产

[0032] 材料: 1. 菌种: DH5 $\alpha$  E. coli、BL21 (DE3) PLYSs E. coli感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司。2. 质粒: pDEST14-SpyCatcher质粒 (包含有SpyCatcher全长基因序列) 由Dr. Mark Howarth (University of Oxford, UK) 惠赠, 本实验室保存 (Zakeri, Fierer

et al.2012)。pDEST14- $\Delta$ N SpyCatcher质粒由本实验室保存(Liu,Zhou et al.2014)。3. 试剂:分子生物学实验中用到的DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提及质粒大提试剂盒、DNAMarker、Taq PCR Mastermix和Pfu PCR Mastermix均购自天根生化科技(北京)有限公司;限制性核酸内切酶和T4连接酶购自New England Biolabs;细菌培养所用的LB培养基、抗生素(Ampicillin)和蛋白表达诱导剂IPTG均购自Sigma和Amresco公司;其他试剂均为国产分析纯。4. 缓冲液:纯化铁蛋白纳米疫苗平台所用的缓冲液为20mM Tris-HCl、50mM NaCl,PH调至7.5。5. 基因片段:铁蛋白基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

[0033] 方法:

[0034] 1. pDEST14- $\Delta$ N SpyCatcher/SpyTag-铁蛋白表达载体的构建根据强烈热球菌铁蛋白的蛋白序列(WP\_011011871.1)对其核酸序列进行大肠杆菌宿主密码子优化,优化后铁蛋白基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成。设计带有酶切位点的引物(引物序列见下)对铁蛋白片段(aa5-aa174)进行PCR扩增,上游引物带有SpyTag和3个G<sub>4</sub>S序列,在SpyTag片段和铁蛋白片段之间加入3个G<sub>4</sub>S连接,扩增后片段与pDEST14表达质粒分别进行双酶切、琼脂糖凝胶回收,按pDEST14载体:铁蛋白片段的摩尔比值为1:5的比例在T4连接酶作用下16℃连接过夜。将连接产物转化DH5 $\alpha$ E.coli感受态细胞筛选连接正确的克隆。类似地,设计带有酶切位点的引物(引物序列见下)分别对SC和铁蛋白片段(aa5-aa174)进行PCR扩增,SC的下游引物带有3个G<sub>4</sub>S序列,在SC片段和铁蛋白片段之间加入3个G<sub>4</sub>S连接,扩增后片段与pDEST14表达质粒分别进行双酶切、琼脂糖凝胶回收,按pDEST14载体:SC片段:铁蛋白片段的摩尔比值为1:5:5的比例在T4连接酶作用下16℃连接过夜。将连接产物转化DH5 $\alpha$ E.coli感受态细胞筛选连接正确的克隆。 $\Delta$ N SpyCatcher-铁蛋白的核酸序列见SEQ ID NO:6,SpyTag-铁蛋白的核酸序列见SEQ ID NO:8。

[0035] SpyTag-铁蛋白片段的扩增引物为:

[0036] NdeI-ST-ferritin-F:

[0037] GGAATTC CATATGGCCACATCGTGATGGTGGACGCCTATAAACCGA  
CCAAAGGCGGTGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGCAGCGGCGGTGGTGCAGCCGTATGCTGAAAGCCCTGAATGACC  
(SEQ ID NO:18)

[0038] SacI-ferritin-R:

[0039] CGAGCTCTTATTCACCACCCTGCATCAGCAGACCCGGCAGTTTC (SEQ ID NO:19)

[0040]  $\Delta$ N SpyCatcher片段的扩增引物为:

[0041] NdeI-SC-F:

[0042] GGAATTC CATATGTGCTACTACCATCACCATCACCATCAGATTAC (SEQ ID NO:20)

[0043] EcoRI-SC-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-R:

[0044] CG G A A T T C G C T G C C A C C A C C G C C G C T G C C A C C A C C G C C G C T G C C A C  
CACCGCCAATATGAGCGTCACCTTTAG (SEQ ID NO:21)

[0045] 铁蛋白片段的扩增引物为:

[0046] EcoRI-ferritin-F:CGGAATTCCGTATGCTGAAAGCCCTGAATGACC (SEQ ID NO:22)

[0047] SacI-ferritin-R:

[0048] CGAGCTCTTATTCACCACCCTGCATCAGCAGACCCGGCAGTTTC (SEQ ID NO:19)

[0049] 2.  $\Delta$ N SpyCatcher/SpyTag-铁蛋白纳米疫苗的表达将构建成功的 pDEST14- $\Delta$ N

SpyCatcher/SpyTag-铁蛋白质粒转化BL21 (DE3) PLYSs E.coli 感受态细胞,42℃热击90s,涂Ampicillin抗性LB固体培养平板。挑取阳性克隆于5ml LB (Amp<sup>+</sup>) 液体培养基37℃220rpm培养过夜,此时OD<sub>600</sub>约为2。将菌液1:50稀释到大体积LB (Amp<sup>+</sup>) 液体培养基中,相同条件继续培养1.5-2h,此时OD<sub>600</sub>约为0.4。加入IPTG至终浓度为0.3Mm,37℃诱导5-6h后离心收集菌体。用缓冲液20mM Tris-HCl、50mM NaCl,PH7.5 将菌体重悬,以超声仪30%的功率进行超声破碎,超5s后冷却5s,共超 15min,约90个循环。离心收集上清即得 Δ N SpyCatcher/SpyTag-铁蛋白粗提液。

[0050] 结果:将 Δ N SpyCatcher或SpyTag通过G4S连接在铁蛋白N端第五个氨基酸处,铁蛋白自组装后会形成表面呈递 Δ N SpyCatcher或SpyTag 的铁蛋白纳米疫苗平台,该平台可以与带有SpyTag或 Δ N SpyCatcher 的抗原发生SpyCatcher-SpyTag之间的共价键结合反应,从而实现方便、高效生产纳米疫苗的目的。(图1)

[0051] 经过克隆构建和筛选获得序列正确的pDEST14- Δ N SpyCatcher/SpyTag-铁蛋白表达载体,经过试表达,筛选出最优的诱导条件和表达菌株。Δ N SpyCatcher-铁蛋白纳米颗粒的表达量约每升菌液23mg, SpyTag-铁蛋白纳米颗粒的表达量约每升菌液40mg。

[0052] 实施例二、铁蛋白纳米疫苗平台的纯化和表征

[0053] 材料:Superose6Increase 10/300凝胶过滤预装柱购自GE HealthCare 公司。50kDa超滤管购自Merck Millipore公司。0.22μm、0.45μm滤器购自pall corporation。透射电子显微镜Tecnai Spirit (120kV) 制造商美国FEI。常用化学试剂(SDS-PAGE凝胶配置及电泳缓冲液、甘氨酸、Tris、考马斯亮蓝等)均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司和Amresco公司。

[0054] 方法:

[0055] 1.粗纯将 Δ N SpyCatcher/SpyTag-铁蛋白粗提液置于70℃水浴加热 15min,使绝大部分不耐高温的杂蛋白变性沉淀,12000rpm离心15min将变性的蛋白沉淀除去,再过0.45 μm滤膜除去微小沉淀得到 Δ N SpyCatcher/SpyTag-铁蛋白粗纯液。将粗纯液于50kDa截流量的浓缩管中浓缩,过0.22μm滤膜除去微小沉淀。

[0056] 2.凝胶过滤柱纯化用20mM Tris-HCl、50mM NaCl,pH 7.5缓冲液平衡Superose6Increase凝胶过滤柱,上0.5ml过0.22μm滤膜后的蛋白粗纯液,继续用20mM Tris-HCl、50mM NaCl,PH 7.5缓冲液平衡洗脱凝胶过滤柱,收集各洗脱峰,全程用0.5ml/min的流速。蛋白的生化特征用SDS-PAGE 电泳分析。

[0057] 3.透射电子显微镜观察纳米颗粒形态将纯化后的 Δ N SpyCatcher/SpyTag-铁蛋白滴于带有支持膜的铜网上,放置数分钟后用滤纸从铜网边缘吸去多余液体,滴上染色液染色1-2分钟,滤纸吸去染液,待干燥后即可电镜观察。

[0058] 结果:蛋白粗提液经过简单的加热粗纯后,百分之八十以上的杂蛋白都被加热变性除去。经过Superose6Increase凝胶过滤柱洗脱, Δ N SpyCatcher-铁蛋白的主峰在13.5ml位置(图2A),SDS-PAGE电泳结果(图 2B)显示纯化后蛋白条带位置与预测蛋白大小基本相符(34.1kDa)。SpyTag-铁蛋白的主峰在15ml位置(图2D),SDS-PAGE电泳结果(图2E)显示纯化后蛋白条带位置与预测蛋白大小基本相符(22.4kDa),两者蛋白纯度均在95%以上。透射电镜结果表示纯化后 Δ N SpyCatcher/SpyTag-铁蛋白均为大小均一,结构、形态稳定的纳米颗粒结构,直径在20nm左右(图 2C、2F)。



[0059] 实施例三、基于铁蛋白纳米疫苗平台设计的铁蛋白-preS1、铁蛋白-M2e、铁蛋白-HCV pep<sub>(412-423)</sub>、铁蛋白-E7纳米疫苗的生产、纯化和生化特征

[0060] 材料：含有HBV包膜蛋白preS1核酸序列的质粒由中国科学院生物物理研究所傅阳心组惠赠，含有流感病毒膜蛋白M2e核酸序列、人乳头瘤状病毒16型E7蛋白核酸序列及荧光指示蛋白eGFP核酸序列的质粒由本实验保存；带有SpyTag的丙型肝炎病毒E2蛋白保守区段第412-423位氨基酸 (SEQ ID NO:17) 由吉尔生化(上海)有限公司合成；蛋白纯化用到的Ni-Agarose His标签蛋白纯化试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司；其他菌种试剂同以上实施案例一、二。

[0061] 方法：

[0062] 1. ΔN SpyCatcher-preS1等抗原蛋白的表达和纯化

[0063] 设计带有酶切位点的引物(引物序列见下)对ΔN SpyCatcher片段和preS1片段分别进行PCR扩增，使SC片段两段带有NdeI和EcoRI酶切位点，preS1片段两段带有EcoRI和SacI酶切位点，双酶切后按pDEST14载体:SC片段:preS1片段的摩尔比值为1:5:5的比例在T4连接酶作用下16℃连接过夜。将连接产物转化DH5αE.coli感受态细胞筛选连接正确的克隆。提取pDEST14-SC-preS1质粒，转化BL21(DE3)PLYSS E.coli感受态细胞，1mM IPTG诱导剂浓度，37℃诱导5-6h。在缓冲液5mM Tris-HCl、100mM NaCl, pH 7.5中超声破碎菌体，离心获取上清过Ni-Agarose自装柱，用100mM咪唑洗脱目的蛋白。通过SDS-PAGE电泳和NanoDrop2000确定蛋白浓度，SC-preS1蛋白(SEQ ID NO:11)分子量约25.4kDa(图3A)。SC-M2e(SEQ ID NO:15)的载体构建方法、诱导表达条件、纯化方式与SC-preS1基本相同。E7-SpyTag蛋白(SEQ ID NO:13)是将SpyTag和Histag融合表达在E7的N端，载体构建方法、诱导表达条件、纯化方式与以上基本相同(PCR引物序列见下)。HCV pep<sub>(412-423)</sub>-SpyTag多肽(SEQ ID NO:19)是C端连接了SpyTag的HCV E2蛋白412-423aa。为了增加多肽的稳定性进行了N端乙酰化修饰。

[0064] ΔN SpyCatcher片段的扩增引物见实施例一；

[0065] preS1片段的扩增引物为：

[0066] EcoRI-preS1：

[0067] CGGAATTCATGGGGCAGAATCTTTCCACCAGC(SEQ ID NO:23) SacI-preS1：

[0068] CGAGCTCTTAGGCCTGAGGATGAGTGTTC(SEQ ID NO:24) E7-SpyTag片段的扩增引物为：

[0069] NdeI-E7-SpyTag-F：

[0070] GGAATTCATATGATGCATGGAGATACCTACATTGC(SEQ ID NO:25)

[0071] SacI-E7-SpyTag-R：

[0072] GGAGCTCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTAGTACGATTTGGTTCGGT  
TTATAGGCGTCCACCATCACGATGTGGCTGGTTTCTGAGAACAGATGGGGC(SEQ ID NO:26)

[0073] 2. 铁蛋白-preS1等疫苗的生产

[0074] 由于SpyTag和SpyCatcher蛋白之间可以发生快速的共价键结合，使疫苗抗原的连接变得方便。将SpyTag-铁蛋白和SC-preS1按摩尔比例1:1、1:2、1:3混合，4℃上下颠倒混匀过夜，SDS-PAGE蛋白电泳检测结合效率。结合前SpyTag-铁蛋白和SC-preS1的分子量分别约为22.4kDa、25.4kDa，结合后的铁蛋白-preS1的分子量约为47.8kDa(图3A)。同理SC-铁蛋

白与 E7-SpyTag之间也可发生快速的共价键结合,将SC-铁蛋白和E7-SpyTag按摩尔比例1:1、1:2、1:3的摩尔比混合,4℃上下颠倒混匀过夜,SDS-PAGE 蛋白电泳检测结合效率。结合前SC-铁蛋白和E7-SpyTag的分子量分别约为 34.1kDa、13.7kDa,结合后的铁蛋白-E7的分子量约为47.8kDa(图3D)

[0075] 3.铁蛋白-preS1疫苗的纯化和表征观察我们以SpyTag-铁蛋白和 SC-preS1按摩尔比例1:1.5大体积混合,4℃上下颠倒混匀过夜,于50kDa 截流量的浓缩管中浓缩,过0.22 μm滤膜除去微小沉淀。通过Superose6 Increase凝胶过滤柱纯化除去过量的SC-preS1,用20mM Tris-HCl、50mM NaCl,PH 7.5缓冲液平衡和洗脱,全程用0.5ml/min的流速洗脱。纯化后的铁蛋白-preS1疫苗用透射电镜观察其形态结构。铁蛋白-M2e、铁蛋白-HCVpep<sub>(412-423)</sub>、铁蛋白-E7纳米疫苗的生产及纯化方式与铁蛋白-preS1相同。

[0076] 结果:经过SpyTag-铁蛋白和SC-preS1的混合,Superose6 Increase凝胶过滤柱的纯化,得到高纯度的铁蛋白-preS1纳米疫苗。铁蛋白-preS1的主峰在11.5ml位置(图3B)。透射电镜结果可见与未连接抗原的铁蛋白纳米颗粒相比,铁蛋白-preS1纳米颗粒的表面呈现突起的结构,即结合上的抗原,此时铁蛋白-preS1纳米颗粒的直径约为30nm(图3C)。通过SpyTag和 SpyCatcher蛋白之间的共价键结合,得到了铁蛋白-M2e、铁蛋白-HCVpep<sub>(412-423)</sub>、铁蛋白-E7(图3E)纳米疫苗。

[0077] 实施例四、铁蛋白-preS1等纳米疫苗引起抗体应答检测

[0078] 材料:辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG购自中杉金桥公司;ELISA显色底物TMB购自eBioscience公司;96孔酶联免疫吸附测定板购自Corning Costar公司;酶标仪SPECTRA max PLUS384购自美国 Molecular公司。TLR9配体鼠CpG-B佐剂(ODN1826,5'-tccatgacgttctctgacgtt-3',全部核苷酸均为硫代修饰)由上海捷瑞生物工程有限公司合成。TLR4配体单磷酸脂质A佐剂(Monophosphoryl Lipid A, MPLA)购自美国Avanti Polar lipids公司。铝佐剂、弗氏不完全佐剂IFA 均购自SIGMA公司。C57BL/6雌性小鼠(6-8周)购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

[0079] 方法:

[0080] 1.铁蛋白-preS1纳米疫苗免疫小鼠将500pmol(按单体计算)的铁蛋白-preS1疫苗或500pmol SC-preS1对照疫苗皮下免疫8周龄C57BL/6 小鼠,单独免疫或以30μg TLR9配体CpG为佐剂,用PBS稀释至每只小鼠100μl免疫体系。在初次免疫第14天后再次给予相同剂量的免疫,从第21天起每隔两周取免疫小鼠的血清进行检测。为了检测铁蛋白-preS1 纳米疫苗形成的免疫记忆能力,在第270天给予第三次免疫,取血清检测 anti-preS1抗体水平。

[0081] 2.ELISA检测血清中针对preS1的特异性抗体水平包被液(PBS溶液)稀释preS1蛋白至5μg/ml,每孔加入100μl,4℃过夜。用PBS洗板3次,加入封闭液(含5%血清的PBS溶液),每孔250μl,室温放置2h以上。用含5%FBS的PBS溶液稀释血清样品(1:10,1:100,1:1000,1:10000),每孔加100μl,每个稀释度两个复孔,37℃孵育1.5h。用PBST洗5次,每次250μl。用含2%FBS的PBS溶液稀释二抗HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:5000),每孔加100μl,37℃孵育1h。用PBST洗5次,每次250μl。加底物TMB 100μl/孔,室温避光孵育,等待底物显色。每孔加50μl终止液(2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)终止显色,酶标仪读板检测450nm和630nm下的光吸收值。

[0082] 3.anti-preS1抗体亲和力检测将铁蛋白-preS1纳米疫苗及对照疫苗免疫小鼠所得的血清从1:5开始五倍倍比稀释作为检测样品,以donkey anti-mouse IgG包被ELISA平

板,加入倍比稀释的血清样品,用HRP标记的山羊抗小鼠IgG进行显色,酶标仪读板得到450nm-630nm光吸收值记为OD1,此数值代表血清中mouse IgG的浓度。同时,将血清样品加入5ug/ml preS1蛋白包被的ELISA平板中孵育,用HRP标记的山羊抗小鼠IgG进行显色,读取450nm-630nm光吸收值记为OD2,此数值代表血清中anti-preS1 IgG的浓度。以OD1为横坐标,OD2为纵坐标做曲线图。比较在相同mouse IgG含量的情况下anti-preS1的含量,anti-preS1含量越高即亲和力越高。

[0083] 4. 铁蛋白纳米疫苗平台作用方式验证为了验证铁蛋白纳米疫苗平台与preS1抗原仅发生简单物理混合而非共价连接的情况下可否诱导相当的免疫应答效果,采用铁蛋白纳米疫苗平台与preS1抗原游离的方式进行免疫。将SC-铁蛋白和SC-preS1混合时,两者不能发生共价键结合而实现了铁蛋白纳米疫苗平台与preS1抗原的分别游离。此外,SpyTag-铁蛋白和SC-preS1在高pH情况下不能发生SpyTag和SC之间的共价键结合反应,同样实现了铁蛋白纳米疫苗平台与preS1抗原分别游离的状态。在第0天和第14天分别免疫小鼠,第21天取血清ELISA检测anti-preS1的抗体水平。

[0084] 5. 免疫佐剂的多样化检测将500pmol的铁蛋白-preS1疫苗或500pmol SC-preS1对照疫苗联合30μg CpG佐剂或10μg MPLA佐剂或者与铝佐剂5:1混合过夜后皮下免疫8周龄C57BL/6小鼠,在第0天和第14天分别免疫小鼠,第21天取血清ELISA检测anti-preS1的抗体水平。

[0085] 6. 铁蛋白种属的多样化检测参照实施例一、二生产纯化由鼠源铁蛋白重链(NP\_034369.1)自组装形成的SpyTag-鼠源铁蛋白纳米颗粒,蛋白序列见SEQ ID NO:9,核酸序列见SEQ ID NO:10。参照实施例三生产鼠源铁蛋白-preS1纳米疫苗。将500pmol的强烈热球菌铁蛋白-preS1疫苗或500pmol鼠源铁蛋白-preS1疫苗以及500pmol SC-preS1对照疫苗联合30μg CpG佐剂皮下免疫8周龄C57BL/6小鼠,在第0天和第14天分别免疫小鼠,第21天取血清ELISA检测anti-preS1的抗体水平。

[0086] 7. 抗原的多样化检测参照实施例三生产纯化铁蛋白-M2e、铁蛋白-HCVpep<sub>(412-423)</sub>、铁蛋白-E7纳米疫苗。将500pmol的铁蛋白-M2e疫苗或等摩尔量的SC-M2e对照疫苗联合30μg CpG皮下免疫8周龄C57BL/6小鼠,间隔两周免疫三次,第49天取血清ELISA检测anti-M2e的抗体水平。将5nmol的铁蛋白-HCVpep<sub>(412-423)</sub>疫苗或等摩尔量的HCVpep<sub>(412-423)</sub>对照多肽分别与铝佐剂5:1混合过夜后皮下免疫8周龄C57BL/6小鼠,间隔两周免疫三次,第35天取血清ELISA检测anti-M2e的抗体水平。将50pmol铁蛋白-E7疫苗或等摩尔量E7-SpyTag对照疫苗皮下免疫8周龄C57BL/6小鼠,以30μg CpG为佐剂,间隔两周免疫两次,第21天取血清ELISA检测anti-E7的抗体水平。

[0087] 结果:游离preS1蛋白的免疫原性较弱,单独免疫或联合CpG免疫都很难引起较强的anti-preS1抗体应答。铁蛋白-preS1纳米疫苗与游离preS1疫苗相比,在无免疫佐剂存在时有一定程度抗体应答的增强,在联合CpG佐剂时抗体应答有显著性的大幅度增强(图4A)。对anti-preS1抗体水平进行长时间地检测,在初次免疫后第60天左右,anti-PreS1抗体达到峰值,此时铁蛋白-preS1纳米疫苗引起的抗体水平是游离preS1疫苗的150倍左右。在初次免疫后第270天给予第三次免疫,游离preS1仍未产生强劲的抗体应答,而铁蛋白-preS1纳米疫苗组抗体水平迅速升高,两组达到了600倍左右的差别(图4B)。铁蛋白-preS1纳米疫苗产生抗体的亲和力也较游离preS1疫苗高(图4C)。如果preS1抗原未连接到铁蛋白纳米疫

苗载体上而是与铁蛋白载体物理混合,则不能诱导强劲的抗体应答(图4D)。除了以CpG为佐剂外,铁蛋白-preS1纳米疫苗联合MPLA佐剂、铝佐剂均能引起强劲的抗体水平(图4E),说明此疫苗载体没有佐剂限制性。鼠源铁蛋白重链形成的纳米疫苗载体与强烈炽热球菌来源的铁蛋白纳米疫苗载体有基本相同的作用效果(图4F),也进一步说明在小鼠免疫模型中铁蛋白疫苗载体作用的产生不是由于铁蛋白的异源性引起的。除了preS1抗原外,M2e、HCVpep<sub>(412-423)</sub>、E7抗原共价连接到铁蛋白纳米疫苗载体上均能增强相应抗原的抗体反应水平(图4G、H、I),说明铁蛋白纳米疫苗载体是一种广泛适用于多种抗原的疫苗载体形式。

[0088] 实施例五、铁蛋白-preS1纳米疫苗预防HBV感染的效果检测

[0089] 材料:AAV-HBV1.3购自北京五加和分子医学研究所有限公司。preS1 抗体XY007由中国科学院生物物理研究所傅阳心组惠赠。HBV DNA检测试剂盒购自Qiagen公司。HBV病毒和HepG2-hNTCP细胞系由北京生命科学研究李文辉教授惠赠。乙肝病毒表面抗原/e抗原检测试剂盒购自北京科华康达医疗器械有限公司。

[0090] 方法:

[0091] 1. 铁蛋白-preS1疫苗预防AAV-HBV1.3感染小鼠如图5A所示,将 200pmol的铁蛋白-preS1疫苗或200pmol SC-preS1对照疫苗联合30 $\mu$ g CpG佐剂皮下免疫8周龄C57BL/6小鼠,第14天重复免疫一次,第28 天尾静脉注射 $1 \times 10^{10}$ vg AAV-HBV1.3,之后每周采血收集血清待测。将血清加入用5 $\mu$ g/ml XY007包被的ELISA平板中孵育,用HRP标记的抗HBV 表面抗原的抗体作为二抗检测血清中preS1的含量。收集第35天血清提取血清中DNA,用实时荧光定量PCR的方法检测血清中HBV DNA的水平。

[0092] 2. 铁蛋白-preS1疫苗预防HBV病毒感染肝脏细胞将 $1 \times 10^5$ HepG2-hNTCP细胞接种于胶原包被的48孔板中,待细胞贴壁后换成维持培养基PMM。收集铁蛋白-preS1疫苗及游离preS1对照疫苗免疫小鼠后第21天的血清进行倍比稀释,HBV病毒与倍比稀释的血清共孵育后加入 HepG2-hNTCP细胞培养上清中进行感染。24h后吸走上清,用预热的PBS 洗三遍,除去多余未感染的病毒,换上新鲜的维持培养基PMM。之后每两天收集上清并换液,在感染后第10天,ELISA检测不同天数收集的上清中 HBsAg及HBeAg的含量。收集第10天的细胞,trizol法提取细胞的RNA,反转录成cDNA,用实时荧光定量PCR的方法检测细胞中HBV 3.5kb RNA及总RNA的含量。

[0093] 结果:与免疫了SC-preS1对照疫苗或PBS的小鼠相比,免疫铁蛋白 -preS1纳米疫苗的小鼠在尾静脉注射AAV-HBV1.3病毒后能显著地阻止病毒的感染,小鼠血清中的preS1抗原的水平 and HBV DNA的含量都有显著性地降低,说明铁蛋白-preS1纳米疫苗免疫后产生的anti-preS1抗体在体内可以显著地预防病毒的感染(图5B、C)。此外,铁蛋白-preS1纳米疫苗免疫后产生的抗体也可以在体外显著性地减少HBV感染HepG2-hNTCP细胞,使细胞培养上清中HBV相关抗原HBsAg、HBeAg的含量以及细胞中HBV RNA的水平较对照疫苗组有显著性的降低(图5D、E、F)。因此,铁蛋白 -preS1疫苗是有效的HBV预防性疫苗。

[0094] 实施例六、铁蛋白-preS1纳米疫苗在HBV耐受小鼠模型中治疗性效果检测

[0095] 材料:同实施案例五。

[0096] 方法:

[0097] 1. HBV耐受小鼠模型的构建购买4-5周龄的雄性C57BL/6小鼠,尾静脉注射 $1 \times 10^{10}$ vg AAV-HBV1.3病毒,感染后每周采血检测血清中 preS1、HBsAg、HBeAg的含量,连续检

测5-6周,选取能够持续检测到抗原的稳定感染的小鼠。

[0098] 2. 铁蛋白纳米疫苗的治疗及效果检测AAV-HBV1.3病毒感染第35天,选取稳定感染的小鼠进行分组。尾基部皮下免疫500pmol铁蛋白-preS1疫苗或等摩尔量的SC-preS1对照疫苗或PBS,疫苗免疫时联合30 $\mu$ g CpG佐剂。每两周免疫一次,连续免疫四次(图6A)。每两周采集小鼠的血清,检测血清中anti-preS1抗体水平以及preS1、HBsAg抗原的含量。提取血清中DNA,用实时荧光定量PCR的方法检测血清中HBV DNA的水平。

[0099] 结果:铁蛋白-preS1纳米疫苗在HBV耐受的小鼠模型中能够引起较强的anti-preS1抗体应答(图6B)。与PBS及对照疫苗组相比,铁蛋白-preS1纳米疫苗免疫后,血清中preS1、HBsAg抗原都有显著性地降低(图6C、D),同时血清中HBV DNA也基本被清除(图6E)。因此,铁蛋白-preS1疫苗对于慢性乙型肝炎具有治疗性的效果。

[0100] 实施例七、铁蛋白-E7纳米疫苗可诱导CTL反应并有效控制肿瘤生长

[0101] 材料:荧光标记的流式抗体、胞内染色实验所用到的Brefeldin A和Transcription Factor Staining Buffer Set均购自eBioscience;Anti-Fc $\gamma$ R抗体(clone 2.4G2)由本实验室自己生产保存;体外T细胞活化所用的多肽E7<sub>49-57</sub>(RAHYNIVTF)由上海吉尔生化有限公司合成。TC-1肿瘤细胞系由中国医学科学院基础医学研究所许雪梅教授惠赠。C57BL/6雌性小鼠(6-8周)购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

[0102] 方法:

[0103] 1. 铁蛋白-E7纳米疫苗免疫小鼠将1nmol(按单体计算)的铁蛋白-E7<sub>(43-62)</sub>疫苗或1nmol E7<sub>(43-62)</sub>-SpyTag对照疫苗皮下免疫6周龄C57BL/6小鼠,以30 $\mu$ g CpG为佐剂,用PBS稀释至每只老鼠100 $\mu$ l免疫体系。免疫后第7天检测小鼠引流淋巴结(腹股沟淋巴结)中抗原特异性的IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>T细胞占总CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>T细胞的比例。

[0104] 2. CTL反应检测疫苗免疫7天后将小鼠处死,取腹股沟淋巴结放入含2%FBS的RPMI1640培养基中,用1ml注射器芯杆的背面在70目筛网上对淋巴结进行充分研磨,去除沉淀,500 $\times$ g离心5分钟后重悬细胞计数。将细胞稀释到1 $\times$ 10<sup>7</sup>/ml,以每孔1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞铺于圆底96孔板中,每个样品3个复孔。加入含有终浓度为5 $\mu$ g/ml的E7<sub>49-57</sub>多肽和BFA的完全RPMI1640培养基,总体系为200 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C孵育6小时。E7<sub>49-57</sub>多肽刺激淋巴结细胞6小时后收集细胞加入anti-Fc $\gamma$ R抗体阻断Fc受体,4 $^{\circ}$ C孵育10min,加入anti-CD8 $\alpha$ 抗体4 $^{\circ}$ C孵育30min,以FACS溶液(含2%FBS的PBS)洗涤一次,震荡重悬细胞沉淀,边震荡边加入300 $\mu$ l固定液,4 $^{\circ}$ C固定30min或过夜。用1ml透膜液透膜两次,加入anti-IFN $\gamma$ 抗体染液,4 $^{\circ}$ C孵育30min,透膜液洗涤两次,重悬细胞,上机检测,分析IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>T细胞占淋巴结总CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>T细胞的比例。

[0105] 4. TC-1肿瘤细胞的培养、接种及治疗TC-1肿瘤细胞源自于HPV16 E6和E7基因及活化形式的人c-Ha-ras癌基因共同恶性转化的C57BL/6小鼠原代肺上皮细胞。将液氮中冻存的TC-1宫颈癌肿瘤细胞系于37 $^{\circ}$ C水浴中快速融化复苏,用含10%FBS的RPMI1640完全培养基中培养,每两天传代一次。将TC-1细胞悬液用PBS洗涤3次,以3 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml的细胞悬液皮下接种100 $\mu$ l,即每只C57BL/6小鼠右侧皮下接种3 $\times$ 10<sup>4</sup>的TC-1细胞。皮下接种9-11天后,待肿瘤体积长至40-50mm<sup>3</sup>时开始给予疫苗免疫治疗,疫苗组和对照组分别免疫1nmol铁蛋白-E7<sub>(43-62)</sub>纳米疫苗和1nmol E7<sub>(43-62)</sub>-SpyTag蛋白,同时每只老鼠使用30 $\mu$ g CpG佐剂,间隔4天免疫三次。检测肿瘤生长,每周检测两次,当肿瘤体积达到或超过1000mm<sup>3</sup>时将小鼠处死。肿

瘤体积用游标卡尺测量肿瘤长a、宽b、高c,体积按照 $V(\text{mm}^3) = abc/2$ 公式计算。

[0106] 结果:如图(图7A)显示,铁蛋白-E7<sub>(43-62)</sub>纳米疫苗与E7<sub>(43-62)</sub>-SpyTag 疫苗相比可引起两倍以上抗原特异性CD8T细胞反应的增强。如肿瘤生长曲线(图7B、C)所示,铁蛋白-E7纳米疫苗与E7-SpyTag蛋白或PBS组相比能显著性地抑制肿瘤的生长,并且延长小鼠的生存期。可见在使用相同抗原量的情况下,将抗原连接在铁蛋白纳米疫苗平台上可提高疫苗的抗肿瘤效果。

[0107] 本发明涉及的部分序列信息:

[0108] 强烈炽热球菌来源铁蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)

[0109] MLSERMLKALNDQLNRELYSAYLYFAMAAYFEDLGLEGFANWMKAQA  
AEE EIGHALRFYNYIYDRNGRVELDEIPKPPKEWESPLKAFEAAAYEHEK  
FISKSIYELAALAE E EKDYSTRAFLEWFINEQVEEEASVKKILDKLKF  
AKDSPQILFMLDKELSARAPKLPGLLMQGG E

[0110] 完整SpyCatcher的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)

[0111] MSYYHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMVDTL SGLSSEQGQSGDMTIEE  
DSATHIKFSKRDEEDGKELAGATMELRDSSGKTI STWISDGQVKDFYLYP  
GKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGAHI

[0112] ΔN SpyCatcher (SC)的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)

[0113] MSYYHHHHHDYDIPTTENLYFQGDSATHIKFSKRDEEDGKELAGATME  
LRDSSGKTI STWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTV NEQGQVTVNGKATKGAHI

[0114] SpyTag的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)

[0115] AHIVMVDAYKPTK

[0116] SC-强烈炽热球菌来源铁蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)

[0117] MSYYHHHHHDYDIPTTENLYFQGDSATHIKFSKRDEEDGKELAGATME  
LRDSSGKTI STWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTV  
NEQGQVTVNGKATKGAHIGGGSGGGSGGGGSEFRMLKALNDQL  
NRELYSAYLYFAMAAYFEDLGLEGFANWMKAQAEE E EIGHALRFYNYIY  
DRNGRVELDEIPKPPKEWESPLKAFEAAAYEHEK FISKSIYELAALAE E EK  
DYSTRAFLEWFINEQVEEEASVKKILDKLKF AKDSPQILFMLDKELSAR APKLPGLLMQGG E

[0118] SC-强烈炽热球菌来源铁蛋白的核酸序列 (SEQ ID NO:6)

[0119] ATGTCGTA CTACCATCACCATCACCATCACGATTACGACATCCCAACG  
ACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGATAGTGCTACCCATATTAAATTC  
TCAAAAACGTGATGAGGACGGCAAAGAGTTAGCTGGTGCAACTATGG  
AGTTGCGTGATTCATCTGGTAAA ACTATTAGTACATGGATTTTCAGATG  
GACAAGTGAAAGATTTCTACCTGTATCCAGGAAAATATACATTTGTCG  
AAACCGCAGCACCCAGACGGTTATGAGGTAGCAACTGCTATTACCTTT  
ACAGTTAATGAGCAAGGTCAGGTTACTGTAAATGGCAAAGCAACTA  
AAGGTGACGCTCATATTGGCGGTGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGCAG  
CGGCGGTGGTGGCAGCGAATTCCGTATGCTGAAAGCCCTGAATGAC  
CAGCTGAACCGCGAACTGTATAGCGCCTACCTGTACTTCGCCATGGC

AGCCTATTTTCGAGGATCTGGGCCTGGAAGGCTTTGCCAATTGGATGA  
AAGCCCAAGCCGAAGAAGAAATTTGGCCACGCCCTGCGCTTTTACAA  
CTACATCTATGATCGCAATGGCCGCGTGGAACTGGACGAAATCCCGA  
AACCGCCGAAAGAAATGGGAAAGCCCGCTGAAAGCCTTCGAGGCCG  
CCTATGAACATGAAAAATTTATTAGCAAAAGCATTATGAACTGGCCG  
CCCTGGCCGAGGAAGAAAAGGACTATAGCACCCGCGCATTCCTGGA  
GTGGTTTCATCAATGAGCAGGTGGAAGAAGAAGCTAGCGTGAAAAAG  
ATCCTGGACAAACTGAAATTCGCCAAGGACAGCCCGCAGATCCTGTT  
CATGCTGGATAAGGAGCTGAGCGCACGTGCCCGAAACTGCCGGT CTGCTGATGCAGGGTGGTGAATAA

[0120] SpyTag-强烈炽热球菌来源铁蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)

[0121] MAHIVMVDAYKPTKGGGSGGGGSGGGSRMLKALNDQLNRELYSA  
YLYFAMAAYFEDLGLGFANWMKAQAEEEIGHALRFYNYIYDRNGRV  
ELDEIPKPPKEWESPLKAFEAAYEHEKFISKSIYELAALAEEEKDYSTRA  
FLEWFINEQVEEEASVKKILDKLFKADSPQILFMLDKELSARAPKLPGLLMQGGG

[0122] SpyTag-强烈炽热球菌来源铁蛋白的核酸序列 (SEQ ID NO:8)

[0123] ATGGCCACATCGTGATGGTGGACGCCTATAAACCGACCAAAGGCCG  
TGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGCAGCCGTATG  
CTGAAAGCCCTGAATGACCAGCTGAACCGCGAACTGTATAGCGCCTA  
CCTGTACTTCGCCATGGCAGCCTATTTTCGAGGATCTGGGCCTGGAAG  
GCTTTGCCAATTGGATGAAAGCCCAAGCCGAAGAAGAATAATGGCCA  
CGCCCTGCGCTTTTACAACCTACATCTATGATCGCAATGGCCGCGTGG  
ACTGGACGAAATCCCGAAACCGCCGAAAGAATGGGAAAGCCCGCTG  
AAAGCCTTCGAGGCCGCTATGAACATGAAAAATTTATTAGCAAAAG  
CATTTATGAACTGGCCGCCCTGGCCGAGGAAGAAAAGGACTATAGC  
ACCCGCGCATTCCTGGAGTGGTTCATCAATGAGCAGGTGGAAGAAG  
AAGCTAGCGTGAAAAAGATCCTGGACAAACTGAAATTCGCCAAGGA  
CAGCCCGCAGATCCTGTTTCATGCTGGATAAGGAGCTGAGCGCACGTG  
CCCCGAAACTGCCGGTCTGCTGATGCAGGGTGGTGAATAA SpyTag-鼠源铁蛋白的氨基酸序列 (SEQ  
ID NO:9)

[0124] MAHIVMVDAYKPTKGGGSGGGGSGGGSMTTASPSQVRQNYHQDS  
EAAINRQINLELYASYVYLSMSCYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHERE  
HAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPDRDDWESGLNAMECALHLEKSVN  
QSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLNQVKSikelGDHVTNLRKMG APESGMAEYLFDKHTLGHGDES

[0125] SpyTag-鼠源铁蛋白的核酸序列 (SEQ ID NO:10)

[0126] ATGGCCACATCGTGATGGTGGACGCCTATAAACCGACCAAAGGCCG  
TGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGCAGCACCA  
CGCGTCTCCCTCGCAAGTGCGCCAGAACTACCACCAGGACTCGGAG  
GCTGCCATCAACCGCCAGATCAACCTGGAGTTGTATGCCTCCTACGT  
CTATCTGTCCATGTCTTGTATTTTGACCGGGATGATGTGGCCCTGAA

G A A C T T T G C C A A A T A C T T T C T C C A T C A A T C T C A T G A A G A G A G G G A G C  
A T G C T G A G A A A C T G A T G A A G C T G C A G A A C C A G C G A G G T G G A C G A A T  
C T T C C T G C A G G A T A T A A A G A A A C C T G A C C G T G A T G A C T G G G A G A G C  
G G G C T G A A T G C A A T G G A G T G T G C A C T G C A C T T G G A A A A G A G T G T G A  
A T C A A T C A C T A C T G G A A C T T C A C A A A C T G G C T A C T G A C A A G A A T G A T  
C C C C A C T T A T G T G A C T T C A T T G A G A C G C A T T A C C T G A A T G A G C A G G T  
G A A A T C C A T T A A A G A A C T G G G T G A C C A C G T G A C C A A C T T A C G C A A G  
A T G G G A G C C C T G A A T C T G G C A T G G C A G A A T A T C T C T T T G A C A A G C A C A C C C T G G G A C A C G G T G A T G A G A G C T A A

[0127] SC-preS1的氨基酸序列 (SEQ ID NO:11)

[0128] M S Y Y H H H H H D Y D I P T T E N L Y F Q G D S A T H I K F S K R D E D G K E L A G A T M E  
L R D S S G K T I S T W I S D G Q V K D F Y L Y P G K Y T F V E T A A P D G Y E V A T A I T F T V  
N E Q G Q V T V N G K A T K G D A H I G G G G S G G G G S G G G G S M G Q N L S T S N P L G F  
F P D H Q L D P A F R A N T A N P D W D F N P N K D T W P D A N K V G A G A F G L G F T P P H  
G G L L G W S P Q A Q I L Q T L P A N P P P A S T N R Q T G R Q P T P L S P P L R N T H P Q A SC-preS1的核酸序列 (SEQ ID  
NO:12)

[0129] A T G T C G T A C T A C C A T C A C C A T C A C C A T C A C G A T T A C G A C A T C C C A A C G  
A C C G A A A A C C T G T A T T T T C A G G G C G A T A G T G C T A C C C A T A T T A A A T T C  
T C A A A A C G T G A T G A G G A C G G C A A A G A G T T A G C T G G T G C A A C T A T G G  
A G T T G C G T G A T T C A T C T G G T A A A A C T A T T A G T A C A T G G A T T T C A G A T G  
G A C A A G T G A A A G A T T T C T A C C T G T A T C C A G G A A A A T A T A C A T T T G T C G  
A A A C C G C A G C A C C A G A C G G T T A T G A G G T A G C A A C T G C T A T T A C C T T T  
A C A G T T A A T G A G C A A G G T C A G G T T A C T G T A A A T G G C A A A G C A A C T A  
A A G G T G A C G C T C A T A T T G G C G G T G G T G G C A G C G G C G G T G G T G G C A G  
C G G C G G T G G T G G C A G C A T G G G G C A G A A T C T T T C C A C C A G C A A T C C T C  
T G G G A T T C T T T C C C G A C C A C C A G T T G G A T C C A G C C T T C A G A G C A A A C  
A C A G C A A A T C C A G A T T G G G A C T T C A A T C C C A A C A A G G A C A C C T G G C  
C A G A C G C C A A C A A G G T A G G A G C T G G A G C A T T C G G G C T G G G T T T C A C  
C C C A C C G C A C G G A G G C C T T T T G G G G T G G A G C C C T C A G G C T C A G G G C  
A T A C T A C A A A C T T T G C C A G C A A A T C C G C C T C C T G C C T C C A C C A A T C G  
C C A G A C A G G A A G G C A G C C T A C C C G C T G T C T C C A C C T T T G A G A A A C A C T C A T C C T C A G G C C

[0130] E7-SpyTag的氨基酸序列 (SEQ ID NO:13)

[0131] M H G D T P T L H E Y M L D L Q P E T T D L Y C Y E Q L N D S S E E E D E I D G P A G Q A E P D  
R A H Y N I V T F C C K D S T L R L C V Q S T H V D I R T L E D L L M G T L G I V C P I C S Q K P A H I V M V D A Y K P T K S Y H H H H H H H

[0132] E7-SpyTag的核酸序列 (SEQ ID NO:14)

[0133] A T G C A T G G A G A T A C A C C T A C A T T G C A T G A A T A T A T G T T A G A T T T G C A A  
C C A G A G A C A A C T G A T C T C T A C T G T T A T G A G C A A T T A A A T G A C A G C T C  
A G A G G A G G A G G A T G A A A T A G A T G G T C C A G C T G G A C A A G C A G A A C C  
G G A C A G A G C C C A T T A C A A T A T T G T A A C C T T T T G T T G C A A G T G T G A C T  
C T A C G C T T C G G T T G T G C G T A C A A A G C A C A C A C G T A G A C A T T C G T A C T



TTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGT  
TTCTCAGAAACCAGCCACATCGTGATGGTGGACGCCTATAAACCGA  
CCAAATCGTACTACCATCACCATCACCATCACTAA

[0134] SC-M2e的氨基酸序列(SEQ ID NO:15)

[0135] MSYYHHHHHDYDIPTTENLYFQGDSATHIKFSKRDEDGKELAGATME  
LRDSSGKTI STWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTV  
NEQGQVTVNGKATKGDHIGGGSGGGSGGGSEFSLLTEVETPIRN EWGCRCNGSSD

[0136] SC-M2e的核酸序列(SEQ ID NO:16)

[0137] ATGTCGTACTACCATCACCATCACCATCACGATTACGACATCCCAACG  
ACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGATAGTGCTACCCATATTAAATTC  
TCAAAAACGTGATGAGGACGGCAAAGAGTTAGCTGGTGCAACTATGG  
AGTTGCGTGATTTCATCTGGTAAA ACTATTAGTACATGGATTTTCAGATG  
GACAAGTGAAAGATTTCTACCTGTATCCAGGAAAATATACATTTGTCG  
AAACCGCAGCACCCAGACGGTTATGAGGTAGCAACTGCTATTACCTTT  
ACAGTTAATGAGCAAGGTCAGGTTACTGTAAATGGCAAAGCAACTA  
AAGGTGACGCTCATATTGGCGGTGGTGGCAGCGGCGGTGGTGGCAG  
CGGCGGTGGTGGCAGCGAATTCAGCCTGCTGACCGAAGTTGAAACC  
CCGATTCGTAATGAATGGGGTTGTCGTTGTAATGGTAGCAGTGATTAA HCV<sub>pep (412-423)</sub>-SpyTag (SEQ ID  
NO:17)

[0138] Ac-QLINTNGSWHINAHIVMVDAYKPTK

[0139] 参考文献:

[0140] Han, J.A., et al. (2014). "Ferritin protein cage nanoparticles as versatile antigen delivery nanoplatfoms for dendritic cell (DC)-based vaccine development." Nanomedicine 10 (3):561-569.

[0141] Kanekiyo, M., et al. (2013). "Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies." Nature 499 (7456):102-106.

[0142] Liu, Z., et al. (2014). "A novel method for synthetic vaccine construction based on protein assembly." Sci Rep 4:7266.

[0143] Sliepen, K., et al. (2015). "Presenting native-like HIV-1 envelope trimers on ferritin nanoparticles improves their immunogenicity." Retrovirology 12:82.

[0144] Zakeri, B., et al. (2012). "Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin." Proc Natl Acad Sci US A 109 (12):E690-697.



	100	105	110
	Asp Tyr Ser Thr Arg Ala Phe Leu Glu Trp Phe Ile Asn Glu Gln Val		
	115	120	125
	Glu Glu Glu Ala Ser Val Lys Lys Ile Leu Asp Lys Leu Lys Phe Ala		
	130	135	140
	Lys Asp Ser Pro Gln Ile Leu Phe Met Leu Asp Lys Glu Leu Ser Ala		
	145	150	155 160
	Arg Ala Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Met Gln Gly Gly Glu		
	165	170	
[0002]	<210> 2		
	<211> 139		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<400> 2		
	Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr		
	1 5 10 15		
	Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Met Val Asp Thr Leu Ser Gly		
	20 25 30		
	Leu Ser Ser Glu Gln Gly Gln Ser Gly Asp Met Thr Ile Glu Glu Asp		
	35 40 45		
	Ser Ala Thr His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu		
	50 55 60		
	Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile		
	65 70 75 80		

Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro  
85 90 95

Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val  
100 105 110

Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val  
115 120 125

Asn Gly Lys Ala Thr Lys Gly Asp Ala His Ile  
130 135

<210> 3  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> 人工序列

[0003] <400> 3

Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr  
1 5 10 15

Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Asp Ser Ala Thr His Ile Lys Phe  
20 25 30

Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu  
35 40 45

Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly  
50 55 60

Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu  
65 70 75 80

Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr

85

90

95

Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Ala Thr Lys Gly  
 100 105 110

Asp Ala His Ile  
 115

<210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 4

Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys  
 1 5 10

[0004]

<210> 5  
 <211> 303  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 5

Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Asp Ser Ala Thr His Ile Lys Phe  
 20 25 30

Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu  
 35 40 45

Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly  
 50 55 60

Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu  
65 70 75 80

Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr  
85 90 95

Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Ala Thr Lys Gly  
100 105 110

Asp Ala His Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Phe Arg Met Leu Lys Ala Leu Asn Asp Gln Leu Asn  
130 135 140

Arg Glu Leu Tyr Ser Ala Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Ala Ala Tyr Phe  
145 150 155 160

[0005]

Glu Asp Leu Gly Leu Glu Gly Phe Ala Asn Trp Met Lys Ala Gln Ala  
165 170 175

Glu Glu Glu Ile Gly His Ala Leu Arg Phe Tyr Asn Tyr Ile Tyr Asp  
180 185 190

Arg Asn Gly Arg Val Glu Leu Asp Glu Ile Pro Lys Pro Pro Lys Glu  
195 200 205

Trp Glu Ser Pro Leu Lys Ala Phe Glu Ala Ala Tyr Glu His Glu Lys  
210 215 220

Phe Ile Ser Lys Ser Ile Tyr Glu Leu Ala Ala Leu Ala Glu Glu Glu  
225 230 235 240

Lys Asp Tyr Ser Thr Arg Ala Phe Leu Glu Trp Phe Ile Asn Glu Gln

	245	250	255
Val Glu Glu Glu Ala Ser Val Lys Lys Ile Leu Asp Lys Leu Lys Phe	260	265	270
Ala Lys Asp Ser Pro Gln Ile Leu Phe Met Leu Asp Lys Glu Leu Ser	275	280	285
Ala Arg Ala Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Met Gln Gly Gly Glu	290	295	300

<210> 6  
 <211> 912  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0006]

<400> 6	atgtcgtact accatcacca tcaccatcac gattaagaca teccaacgac cgaaaacctg	60
	tattttcagg gcgatagtgc tacccatatt aaattctcaa aacgtgatga ggacggcaaa	120
	gagttagctg gtgcaactat ggagttgegt gattcatctg gtaaaactat tagtacetgg	180
	atctcagatg gacaagtgaa agattttctac ctgtatccag gaaaatatac atttgtcgaa	240
	accgcagcac cagacggta tgaggtagca actgctatta cettacagt taatgagcaa	300
	ggtcaggtta ctgtaaattgg caaagcaact aaaggtgacg ctcatattgg cgggtgtggc	360
	agcggcggtg gtggcagcgg cgggtgtggc agcgaattcc gtatgctgaa agccctgaat	420
	gaccagctga accgcgaact gtatagcgc tacctgtact teccatggc agcctatttc	480
	gaggatctgg gcttgaagg ctttgccaat tggatgaaag cccaagccga agaagaaatt	540
	ggccacgccc tgegetttta caactacatc tatgategca atggcgcgt ggaactggac	600
	gaaateccga aaccgcegaa agaatgggaa agcccgctga aagccttcga ggccgcctat	660
	gaacatgaaa aatttattag caaaagcatt tatgaactgg cgcacctggc cgaggaagaa	720

aaggactata gcacccgcgc attcctggag tggttcatca atgagcaggt ggaagaagaa 780  
gctagegtga aaaagatcct ggacaaactg aaattcgcca aggacagccc gcagatectg 840  
ttcatgctgg ataaggagct gagegecaegt gccccgaaac tgcgggtct getgatgcag 900  
ggtggtgaat aa 912

<210> 7  
<211> 199  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<400> 7

Met Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Met Leu  
20 25 30

[0007]

Lys Ala Leu Asn Asp Gln Leu Asn Arg Glu Leu Tyr Ser Ala Tyr Leu  
35 40 45

Tyr Phe Ala Met Ala Ala Tyr Phe Glu Asp Leu Gly Leu Glu Gly Phe  
50 55 60

Ala Asn Trp Met Lys Ala Gln Ala Glu Glu Glu Ile Gly His Ala Leu  
65 70 75 80

Arg Phe Tyr Asn Tyr Ile Tyr Asp Arg Asn Gly Arg Val Glu Leu Asp  
85 90 95

Glu Ile Pro Lys Pro Pro Lys Glu Trp Glu Ser Pro Leu Lys Ala Phe  
100 105 110

Glu Ala Ala Tyr Glu His Glu Lys Phe Ile Ser Lys Ser Ile Tyr Glu



115	120	125
Leu Ala Ala Leu Ala Glu Glu Glu Lys Asp Tyr Ser Thr Arg Ala Phe		
130	135	140
Leu Glu Trp Phe Ile Asn Glu Gln Val Glu Glu Glu Ala Ser Val Lys		
145	150	155
Lys Ile Leu Asp Lys Leu Lys Phe Ala Lys Asp Ser Pro Gln Ile Leu		
165	170	175
Phe Met Leu Asp Lys Glu Leu Ser Ala Arg Ala Pro Lys Leu Pro Gly		
180	185	190
Leu Leu Met Gln Gly Gly Glu		
195		

[0008]

<210> 8  
 <211> 600  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<400> 8  
 atggeccaca tegtgatggt ggacgcetat aaaccgacca aaggcggtagg tggcagcggc 60  
 ggtggtggca gcggcggtagg tggcagccgt atgctgaaag cctgaaatga ccagctgaac 120  
 cgccaactgt atagegccta cctgtacttc gccatggcag cctatttcga ggatctgggc 180  
 ctggaaggct ttgccaattg gatgaaagcc caagccgaag aagaaattgg ccacgccctg 240  
 cgcttttaca actacatcta tgatcgcaat ggccgcgtgg aactggacga aatccgaaa 300  
 ccgccgaaag aatgggaaag cccgctgaaa gccttcgagg ccgcctatga acatgaaaaa 360  
 tttattagca aaageattta tgaactggcc gccctggcgg aggaagaaaa ggactatagc 420  
 acccgcgcac tectggagtg gttcateaat gaggcaggtg aagaagaagc tagcgtgaaa 480

aagatcctgg acaaaactgaa attcgccaag gacageccegc agatcctgtt catgctggat 540

aaggagctga ggcacagtgc cccgaaactg ccgggtctgc tgatgcaggg tggatgaataa 600

<210> 9

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Met Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Thr Thr  
20 25 30

Ala Ser Pro Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp Ser Glu Ala  
35 40 45

[0009]

Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser Tyr Val Tyr  
50 55 60

Leu Ser Met Ser Cys Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala Leu Lys Asn  
65 70 75 80

Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg Glu His Ala  
85 90 95

Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg Ile Phe Leu  
100 105 110

Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp Arg Asp Asp Trp Glu Ser Gly Leu Asn  
115 120 125

Ala Met Glu Cys Ala Leu His Leu Glu Lys Ser Val Asn Gln Ser Leu

130	135	140
Leu Glu Leu His Lys	Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp	Pro His Leu Cys
145	150	155 160
Asp Phe Ile Glu Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys Ser Ile Lys	165	170 175
Glu Leu Gly Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly Ala Pro Glu	180	185 190
Ser Gly Met Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu Gly His Gly	195	200 205
Asp Glu Ser	210	

[0010]

<210> 10  
 <211> 633  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<400> 10  
 atggcccaca tcgtgatggt ggacgcctat aaaccgacca aaggcgggtgg tggcagcggc 60  
 ggtggtggca geggeggtgg tggcagcacc accgcgtctc cctcgcaagt gcgccagaac 120  
 taccaccagg actcggagge tgccatcaac cgccagatca acctggagtt gtatgcctcc 180  
 tacgtctatc tgtccatgtc ttgttatitt gaccgggatg atgtggccct gaagaacttt 240  
 gccaaatact ttctccatea atctcatgaa gagagggagc atgctgagaa actgatgaag 300  
 ctgcagaacc agegaggtgg acgaatcttc ctgcaggata taaagaaacc tgaccgtgat 360  
 gactgggaga gggggtgaa tgcaatggag tgtgcactgc acttgaaaaa gagtgtgaat 420  
 caatcactac tggaacttea caaactgget actgacaaga atgateccca cttatgtgac 480

[0011]

ttcattgaga cgcattacct gaatgagcag gtgaaatcca ttaaagaact gggtgaccac 540  
 gtgaccaact tacgcaagat gggagcccct gaatctggca tggcagaata tctctttgac 600  
 aagcacaccc tgggacacgg tgatgagagc taa 633

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 11

Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Asp Ser Ala Thr His Ile Lys Phe  
 20 25 30

Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu  
 35 40 45

Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly  
 50 55 60

Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu  
 65 70 75 80

Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr  
 85 90 95

Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Ala Thr Lys Gly  
 100 105 110

Asp Ala His Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

[0012]

Gly Gly Ser Met Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe  
 130 135 140

Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn  
 145 150 155 160

Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn  
 165 170 175

Lys Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro Pro His Gly  
 180 185 190

Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Gln Thr Leu  
 195 200 205

Pro Ala Asn Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Thr Gly Arg Gln  
 210 215 220

Pro Thr Pro Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asn Thr His Pro Gln Ala  
 225 230 235

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 717

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 12

atgtgtact accatcacca tcaccatcac gattacgaca tcccaacgac cgaaaacctg 60

tattttcagg gcgatagtgc taccatatt aaattctcaa aacgtgatga ggacggcaaa 120

gagttagctg gtgcaactat ggagttgegt gattcatctg gtaaaactat tagtacatgg 180

atttcagatg gacaagtgaag agatttctac ctgtatccag gaaaatatac atttgtcgaa 240

accgcagcac cagacgggta tgaggtagca actgctatta cctttacagt taatgagcaa 300

ggtcaggtta ctgtaaattg caaagcaact aaaggtgacg ctcatattgg cggtggtggc 360  
 ageggcgggtg gtggcagcgg cggtggtggc agcatggggc agaattttc caccageaat 420  
 cctctgggat tcttteccga ccaccagttg gatecagcct tcagagcaaa cacageaaat 480  
 ccagattggg acttcaatcc caacaaggac acctggccag acgccaacaa ggtaggagct 540  
 ggagcattcg ggctgggttt caccccaccg cacggaggcc ttttggggtg gagccctcag 600  
 gctcagggca tactacaaac tttgccagca aatccgcctc ctgcctccac caategccag 660  
 acaggaaggc agcctacccc getgtctcca cctttgagaa aactcatcc tcaggee 717

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 13

[0013]

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln  
 1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser  
 20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp  
 35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr  
 50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu  
 65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln  
 85 90 95

[0014]

Lys Pro Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys Ser  
 100 105 110

Tyr Tyr His His His His His His  
 115 120

<210> 14

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgntag atttgcaacc agagacaact 60  
 gatctctact gttatgagca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt 120  
 ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacett ttgttgaag 180  
 tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa 240  
 gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgcccctct gttctcagaa accageccac 300  
 atcgtgatgg tggacgccta taaaccgacc aaatcgtact accatcacca tcaccatcac 360  
 taa 363

<210> 15

<211> 156

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 15

Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr  
 1 5 10 15

Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Asp Ser Ala Thr His Ile Lys Phe  
 20 25 30

Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu  
 35 40 45

Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly  
 50 55 60

Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu  
 65 70 75 80

Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr  
 85 90 95

Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Ala Thr Lys Gly  
 100 105 110

Asp Ala His Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

[0015]

Gly Gly Ser Glu Phe Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg  
 130 135 140

Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp  
 145 150 155

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 471

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 16

atgtcgtact accatcacca tcaccatcac gattacgaca tcccaacgac cgaaaacctg 60

tattttcagg gcgatagtgc tacceatatt aaattctcaa aacgtgatga ggaeggcaaa 120

gagttagctg gtgcaactat ggagttgcgt gattcatctg gtaaaactat tagtacaatgg 180

atttcagatg gacaagtgaa agatttetac ctgtatccag gaaaatatac atttgcgaa 240



accgcagcac cagacggta tgaggtagca actgctatta cetttacagt taatgagcaa 300  
 ggtcaggta ctgtaaattg caaagcaact aaaggtgaag ctcattattg cggtggtggc 360  
 agcggcggtg gtggcagcgg cggtggtggc agcgaattca gcctgctgac cgaagttgaa 420  
 accccgattc gtaatgaatg gggttgtcgt tgtaattgta gcagtgatta a 471

<210> 17  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 17

Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ala His Ile Val  
 1 5 10 15

Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys  
 20 25

[0016]

<210> 18  
 <211> 122  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<400> 18

ggaattccat atgcccaca tcgtgatggt ggacgcctat aaaccgacca aaggcgggtg 60  
 tggcagcggc ggtggtggca gcggcggtgg tggeagccgt atgetgaaag cctgaaatga 120  
 cc 122

<210> 19  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<400> 19

cgagetetta tteaccacce tgcacagca gaccggcgag tttc 44

[0017]

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 20

ggaattccat atgtctgact accatcacca tcaccateac gattac

46

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 73

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 21

cggaattcgc tgccaccacc gccgctgcc a ccaccgccg tgcaccacc gccaatatga

60

gcgtcacctt tag

73

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 22

cggaattccg tatgctgaaa gccctgaatg acc

33

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 23

cggaattccat ggggcagaat ctttccacca gc

32

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

[0018]

<400> 24

cgagctctta ggcctgagga tgagtgtttc tc 32

<210> 25

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 25

ggaattccat atgatgcatg gagatacacc tacattgc 38

<210> 26

<211> 99

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 26

ggagctctta gtgatggtga tggatggt agtacgattt gteggttta taggcgtcca 60

ccatcacgat gtgggetggt ttctgagaac agatggggc 99

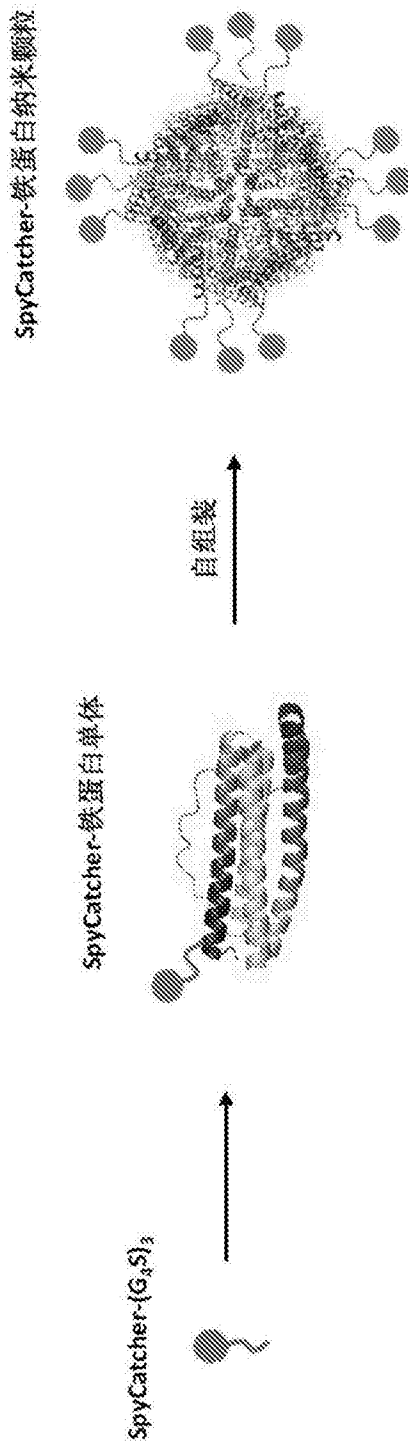


图1A

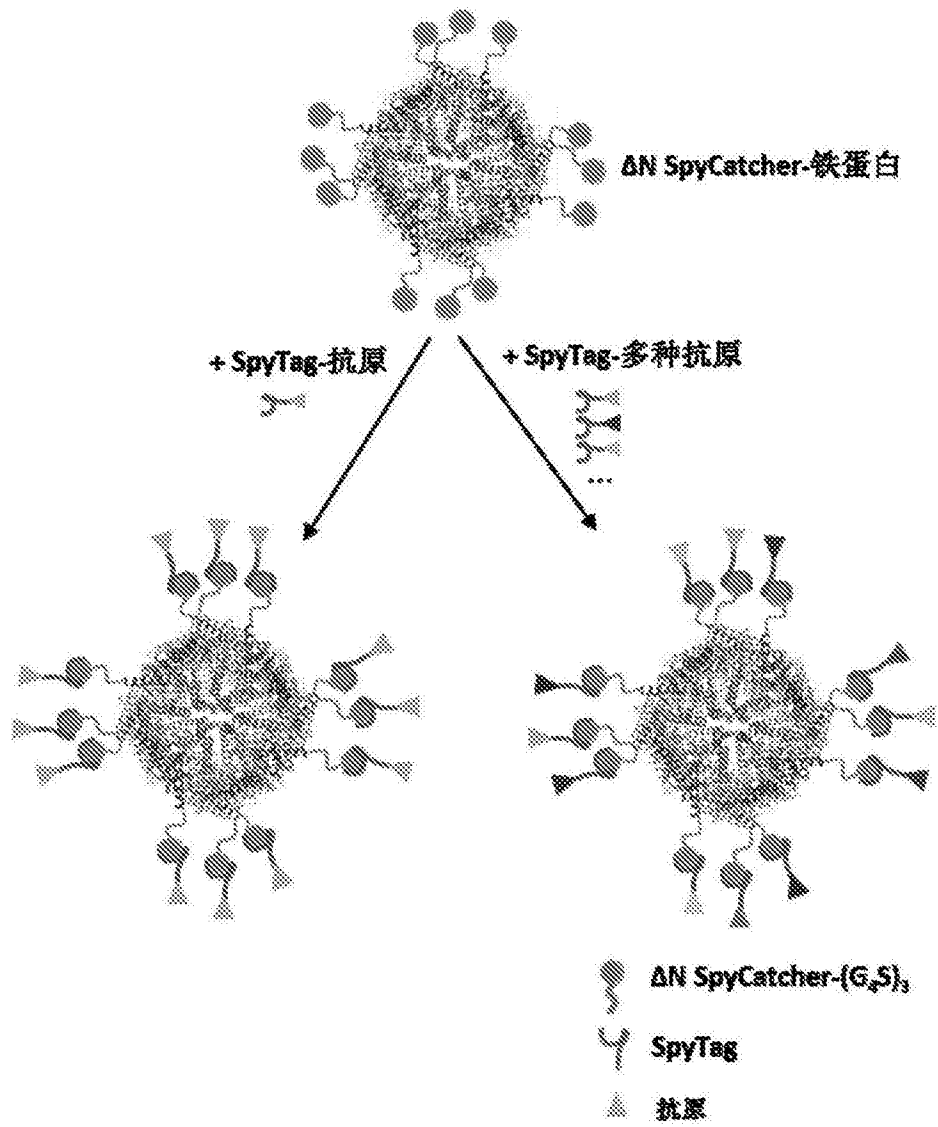


图1B

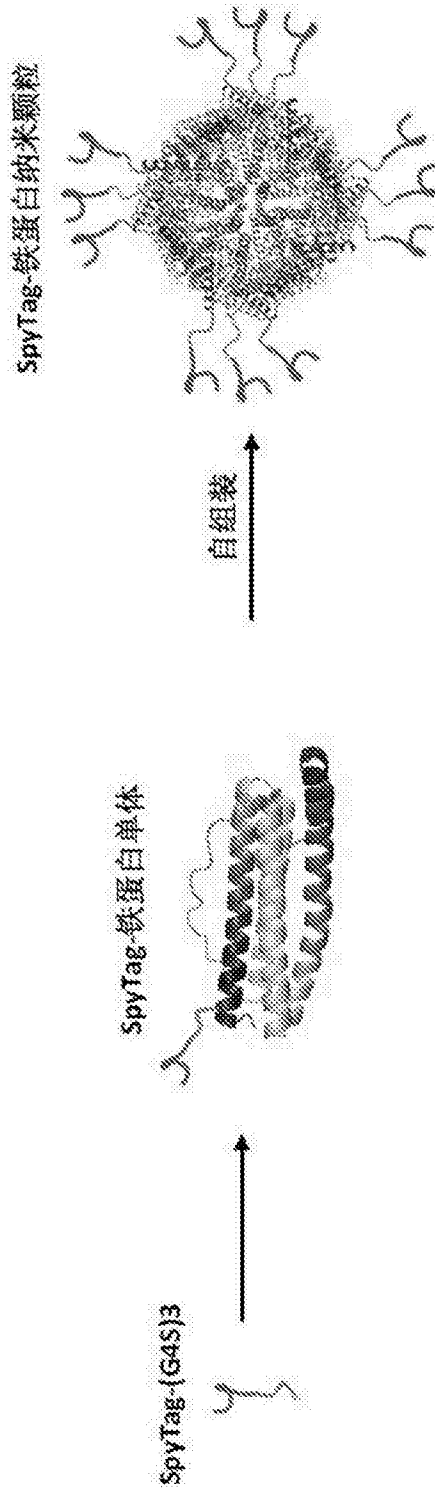


图1C

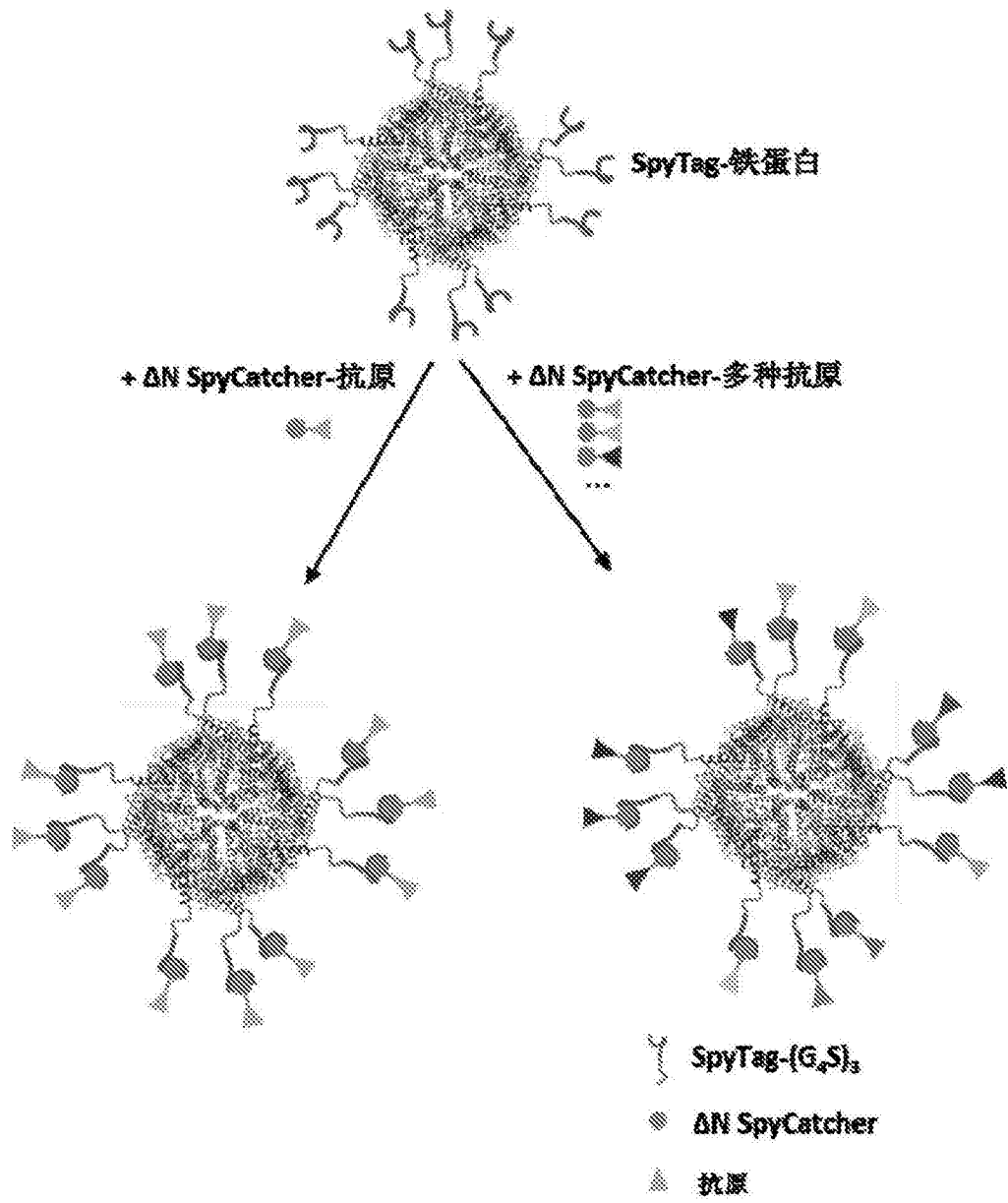


图1D

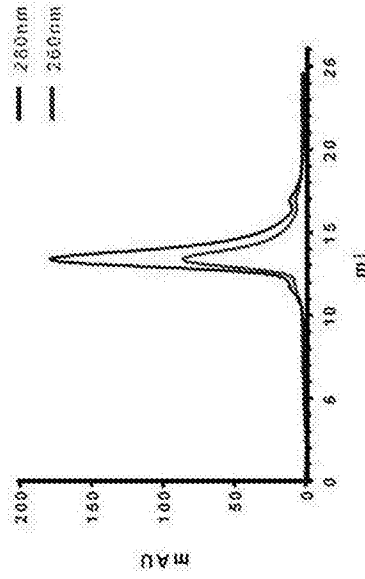


图2A

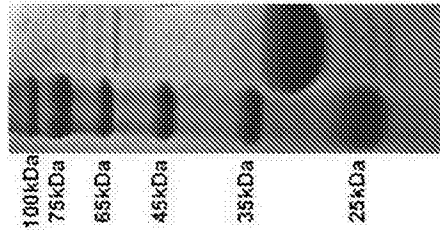


图2B



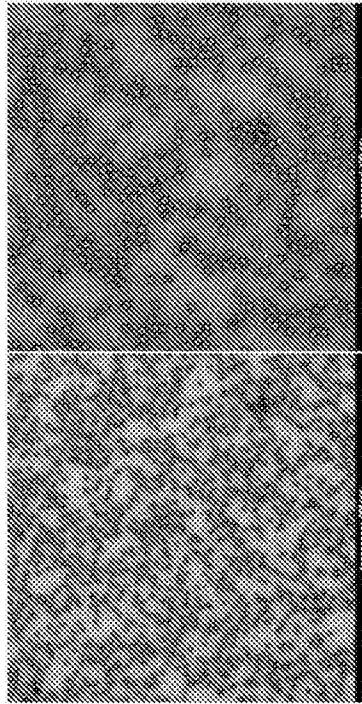


图2C

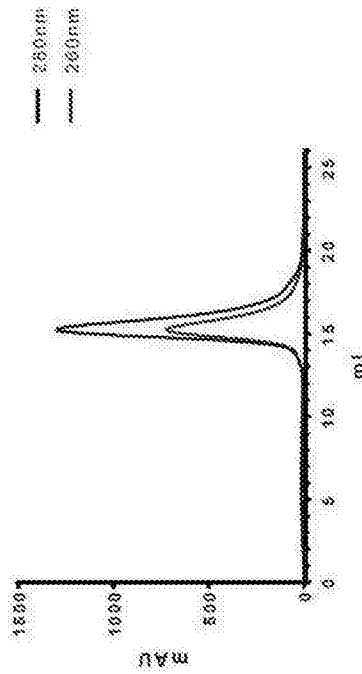


图2D

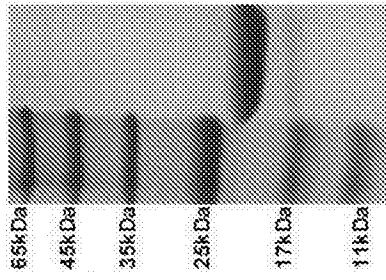


图2E

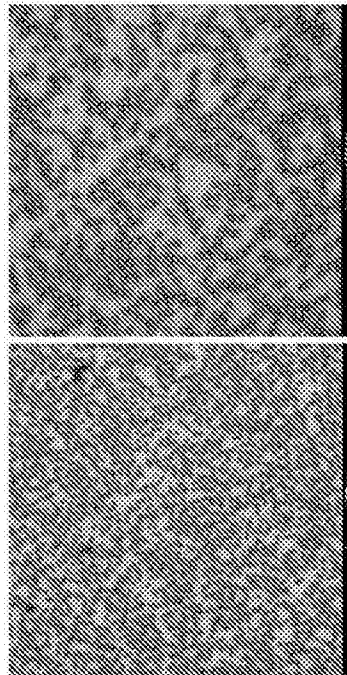


图2F

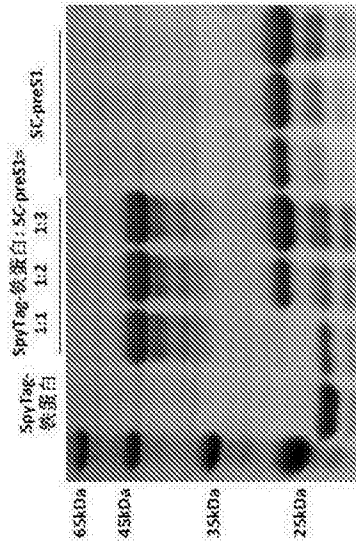


图3A

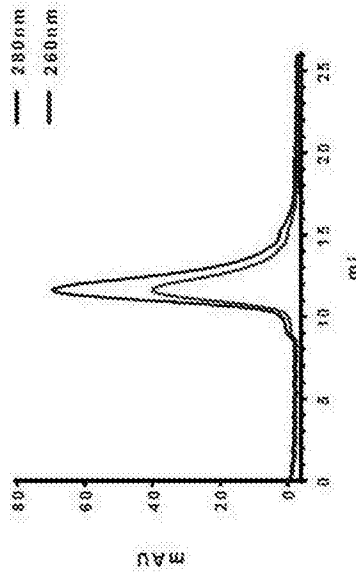


图3B

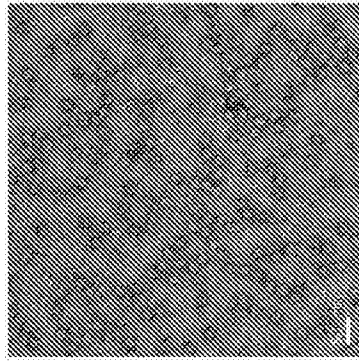


图3C

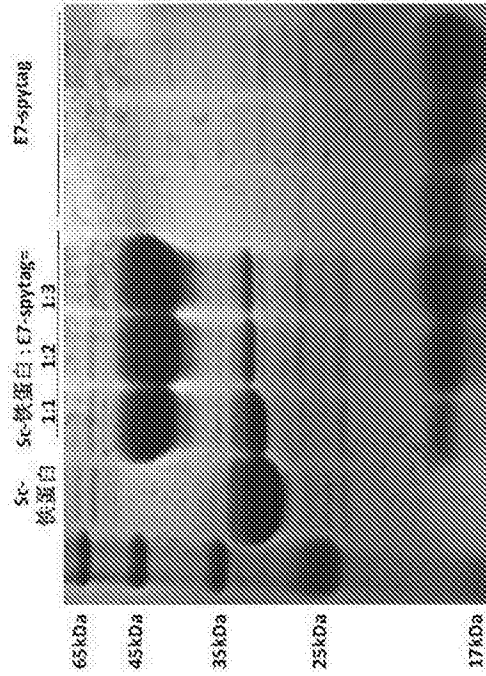


图3D

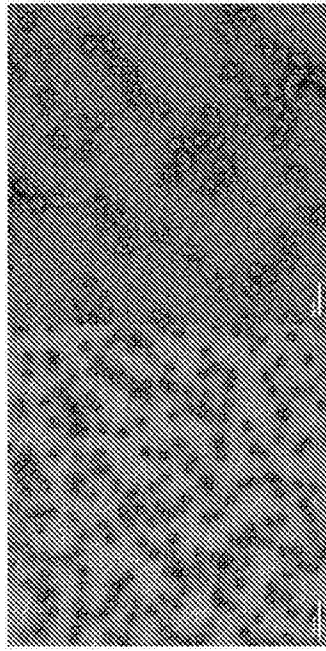


图3E

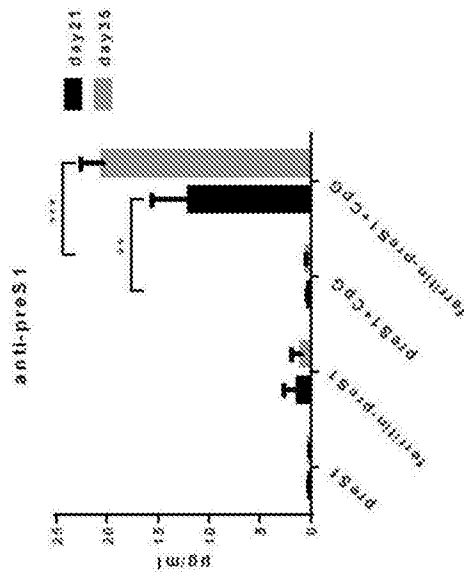


图4A

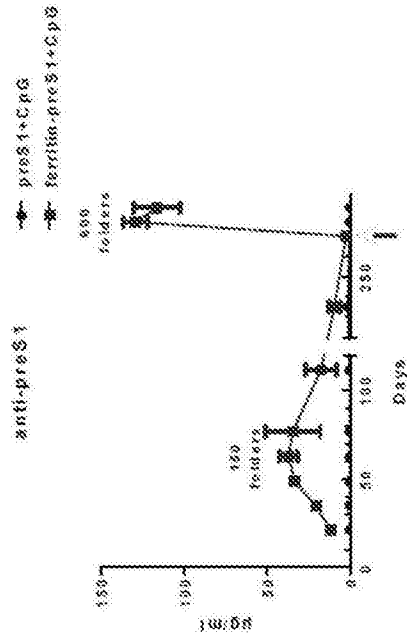


图4B

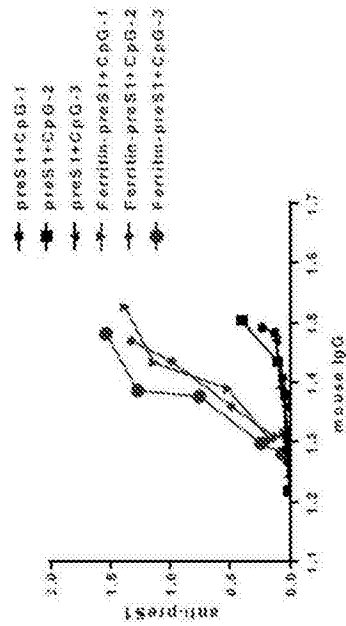


图4C

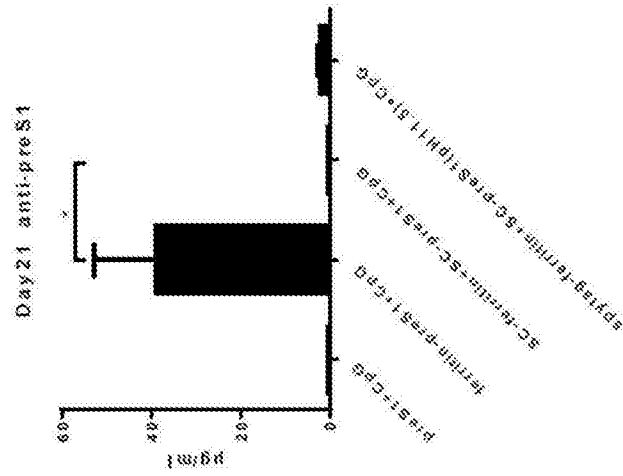


图4D

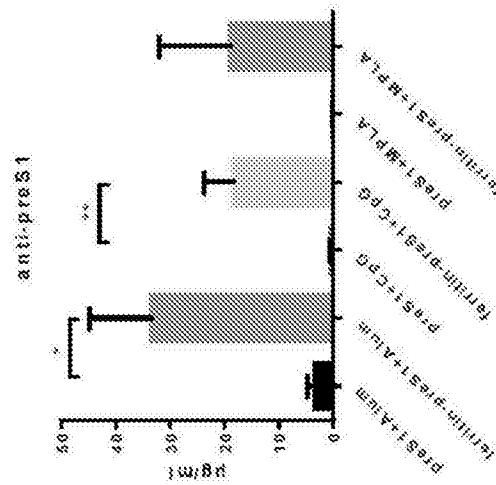


图4E

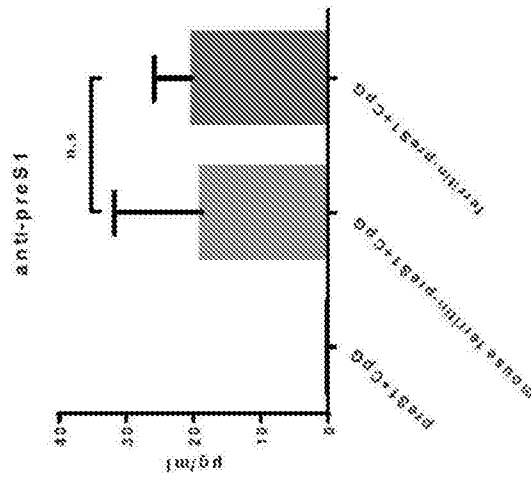


图4F

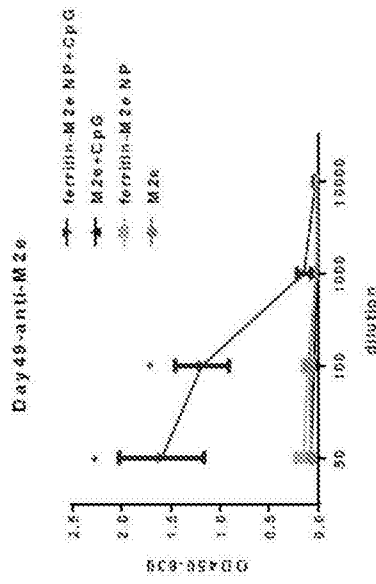


图4G

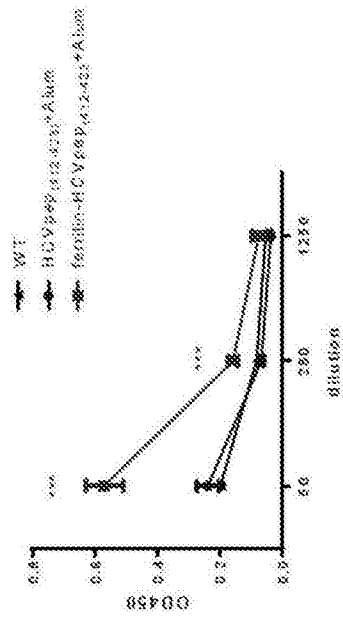


图4H



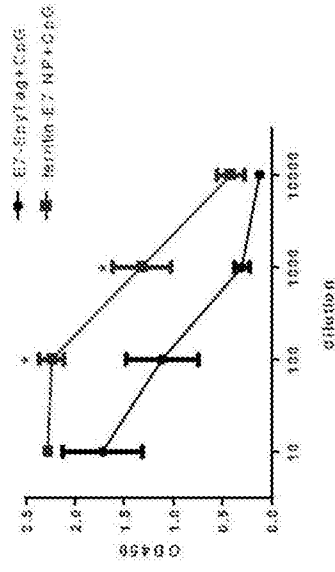


图4I

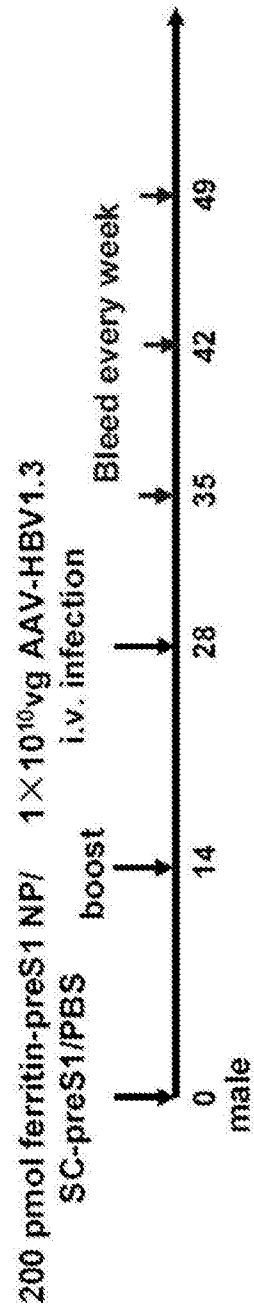


图5A

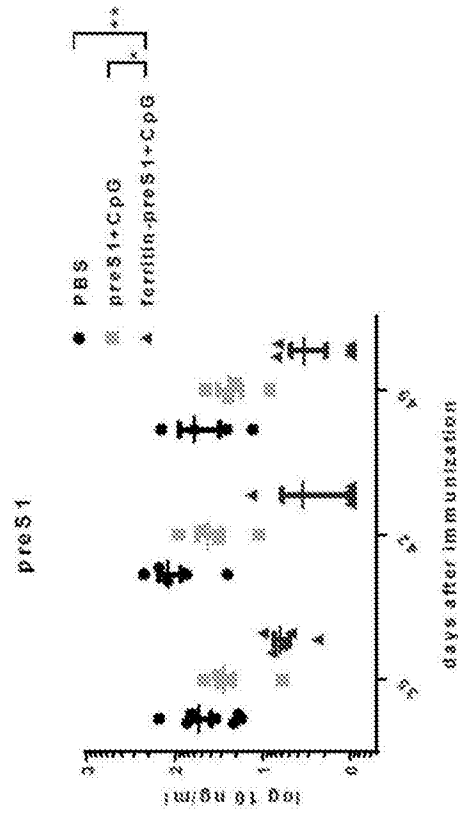


图5B

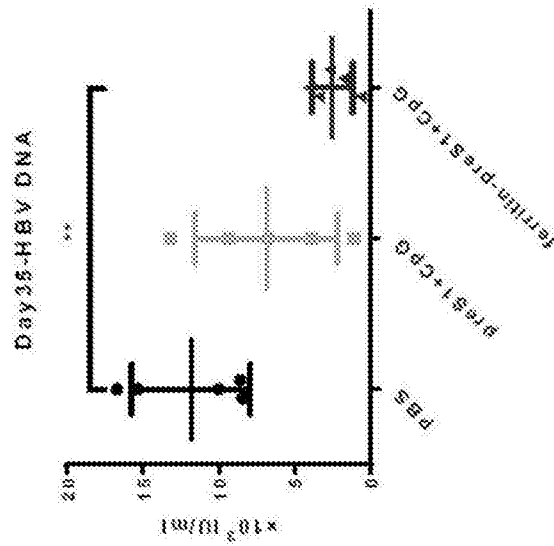


图5C

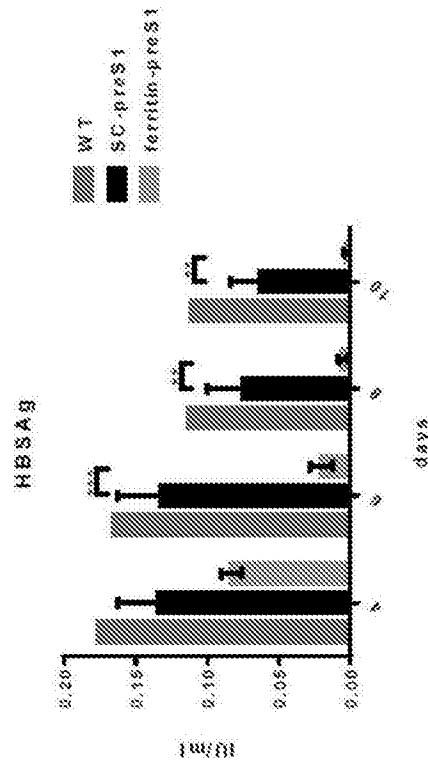


图5D

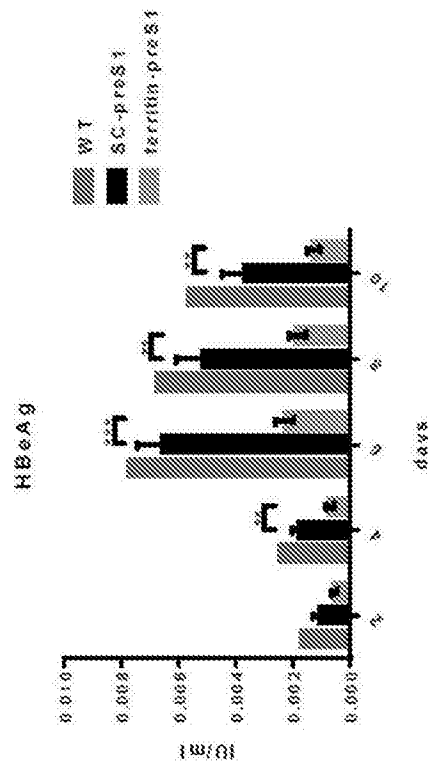


图5E

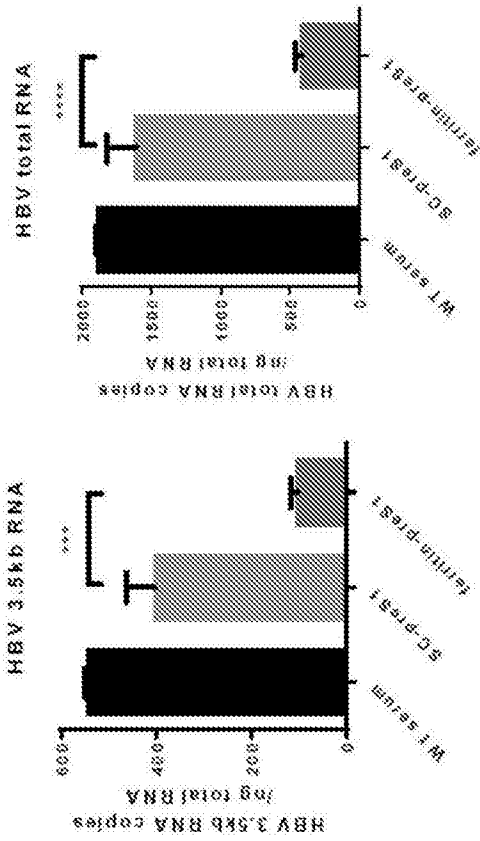


图5F

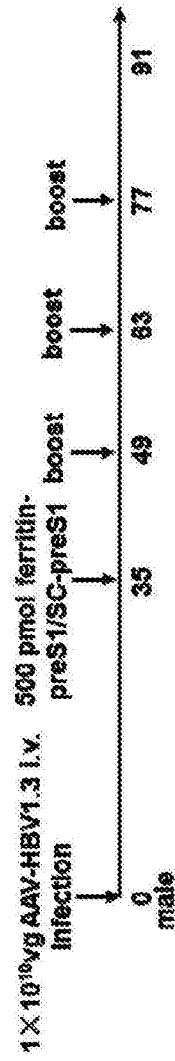


图6A

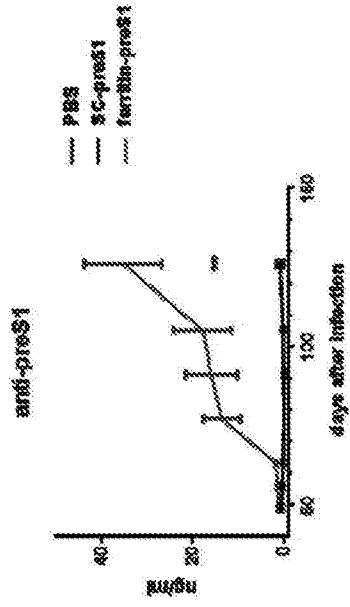


图6B

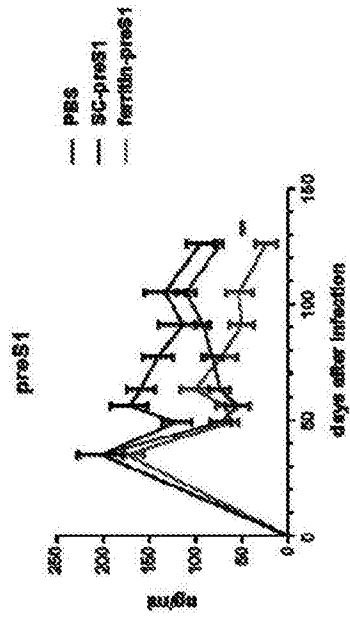


图6C

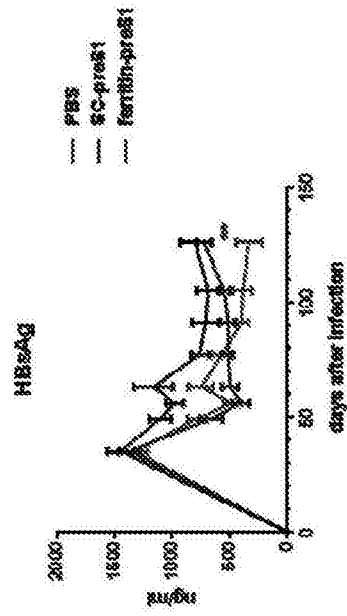


图6D

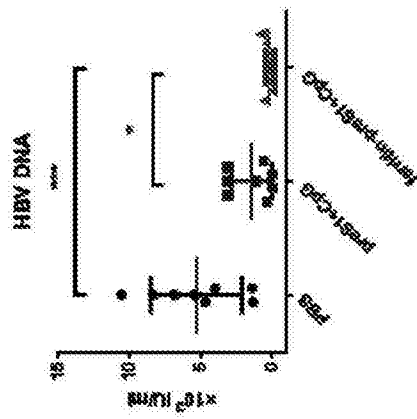


图6E



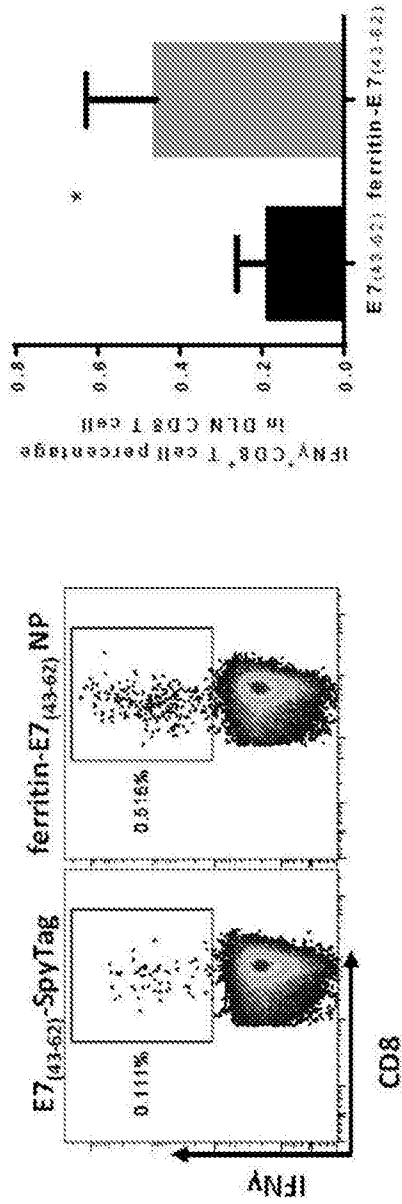


图7A

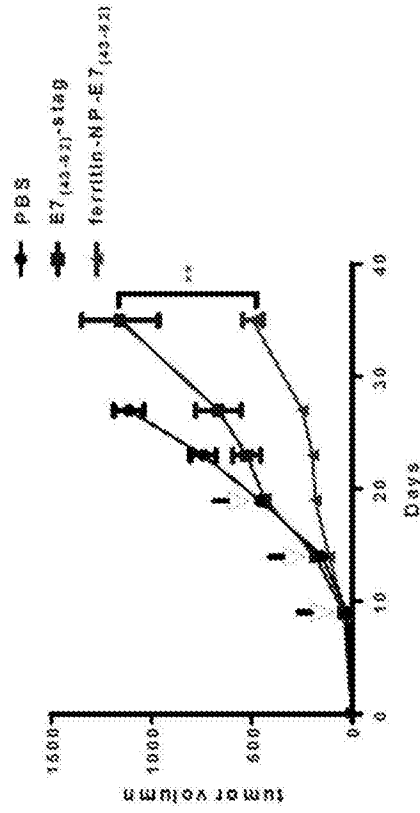


图7B

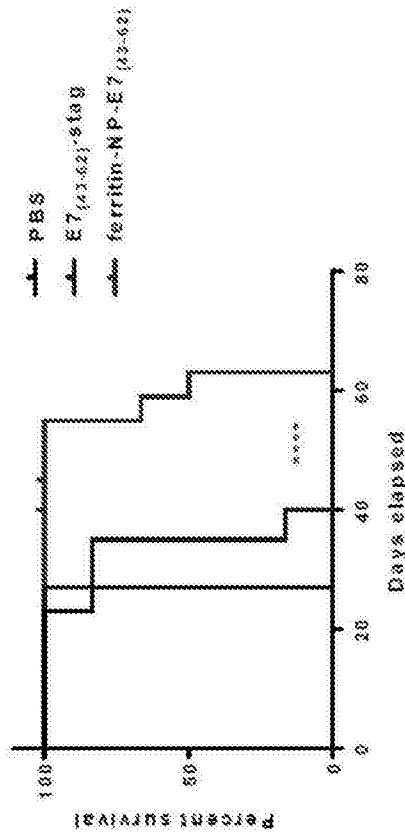


图7C