



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105705641 B

(45) 授权公告日 2021.07.13

(21) 申请号 201480040538.3

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

(22) 申请日 2014.07.03

11313

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 孟锐

申请公布号 CN 105705641 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2016.06.22

C12N 15/62 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/19 (2006.01)

13306034.3 2013.07.18 EP

A61K 38/21 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/20 (2006.01)

2016.01.15

C07K 14/56 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 14/52 (2006.01)

PCT/EP2014/064227 2014.07.03

C07K 14/545 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07K 14/525 (2006.01)

W02015/007536 EN 2015.01.22

C07K 14/575 (2006.01)

(73) 专利权人 弗拉芒区生物技术研究所

(56) 对比文件

地址 比利时根特市

WO 2008124086 A2, 2008.10.16

专利权人 根特大学

Hilkens CM et al. Differential responses to IFN- α subtypes in human T cells and dendritic cells.《The Journal of Immunology》.2003, 第171卷(第10期),

法国国家科学研究中心

Yu Lei et al. XCL1 and XCR1 in the immune system.《Microbes and Infection》.2011, 第14卷(第3期),

蒙彼利埃大学

审查员 蔡玉品

蒙彼利埃大学医疗中心

权利要求书1页 说明书12页

(72) 发明人 J·塔威尼尔 J·堡丁克

序列表5页 附图13页

S·格尔罗 G·尤则 F·保罗

Y·博达特

(54) 发明名称

涉及具有强烈降低的受体结合亲和力的细胞因子的融合因子

(57) 摘要

本发明涉及一种包含至少两个细胞因子的融合蛋白,其中至少一个是对它的受体或对它的一种受体具有强烈降低的结合亲和力的修饰的细胞因子。优选地,两个细胞因子由接头,优选是GGS接头连接。本发明还涉及用于治疗疾病的所述融合蛋白。

1. 一种组合物，所述组合物包括包含至少两种细胞因子的融合蛋白，其中：

所述细胞因子是XCL1和IFN α 2，并且所述IFN α 2包括突变，所述突变强烈降低与它的受体的结合活性；以及

所述XCL1是野生型细胞因子，其提供恢复突变的IFN α 2对靶向细胞的活性的细胞特异性靶向。

2. 根据权利要求1所述的组合物，其还包含GGS接头。

3. 包括包含至少两种细胞因子的融合蛋白的组合物在制备用于刺激细胞中的免疫应答的药物中的用途，其中：

所述细胞因子是XCL1和IFN α 2，并且所述IFN α 2具有突变，与野生型IFN α 2相比，所述突变提供对其受体强烈降低的亲和力；以及

所述XCL1是野生型细胞因子，其提供恢复突变的IFN α 2对靶向细胞的活性的细胞特异性靶向。

4. 根据权利要求3所述的用途，其中所述组合物还包含GGS接头。

涉及具有强烈降低的受体结合亲和力的细胞因子的融合因子

[0001] 本发明涉及一种包含至少两个细胞因子的融合蛋白，其中至少一个是对它的受体或对它的一种受体具有强烈降低的结合亲和力的修饰的细胞因子。优选地，两个细胞因子由接头，优选是GGS接头连接。本发明还涉及用于治疗疾病的所述融合蛋白。

[0002] 细胞因子是分泌或膜结合的小蛋白质，其在细胞间通讯中起至关重要作用。细胞因子结合于它的同源受体复合物会触发细胞内信号传导事件的级联，所述级联使得细胞能够根据细胞、细胞作为其一部分的组织和器官的需要感应它的周围环境并对它的周围环境起应答。它们在特征上是多效性的，这意味着视靶细胞的性质和发育状态而定，它们激起广泛范围的应答。此外，它们中的一些是高度冗余的，因为若干细胞因子具有重叠活性，此使得它们能够在功能上弥补相互损失。细胞因子活性可为自分泌性、旁分泌性或内分泌性的，从而导致在指定术语细胞因子、肽激素和生长因子之间的模糊界限。

[0003] 已知六种不同结构类别的细胞因子： α 螺旋束细胞因子，其包括大多数白介素、集落刺激因子和激素样生长激素和瘦素(Nicola和Hilton, 1998)；三聚肿瘤坏死因子(TNF)家族(Idriss和Naismith, 2000)；半胱氨酸结生长因子(Sun和Davies, 1995)；包括白介素-1家族的 β 三叶形折叠(β -trefoil fold)组(Murzin等, 1992)；白介素17(IL-17)家族(Gaffen, 2011)和趋化因子(Nomiyama等, 2013)。

[0004] 若干细胞因子已得到重要临床应用。实例包括红血球生成素(Epo)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、干扰素 α 2和 β 以及生长激素。相反，常常由于它们的促炎症性质，使所选细胞因子拮抗也得到特定医学应用。此处的主要实例是用以阻断TNF α 活性以抗击如类风湿性关节炎的自体免疫疾病的策略。由于这些成功，正在探究用以优化细胞因子在临床中的活性的策略。这些策略包括优化半衰期，降低免疫原性，向特定细胞类型进行靶向递送以及遗传融合两个细胞因子，即所谓融合因子(fusokine)。

[0005] 融合因子是使用接头序列遗传连接的两个不同细胞因子的人工组合。融合因子的首个实例是作为粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和IL-3的融合蛋白的pIXY321或pixykin(Donahue等, 1988)，其相较于任一单独细胞因子显示优越的造血和免疫作用。这个作用可通过与它们的相应受体复合物的结合增强来解释。值得注意的是，两种受体共有信号传导性 β c亚单位，从而排除在信号转导水平上的协同作用。在III期临床试验中，pIXY321在相较于单独GM-CSF时未显示优越性质(O'Shaughnessy等, 1996)。也探究了与IL-2家族的细胞因子的基于GM-CSF的融合因子。这些细胞因子都通过包含 γ c亚单位的受体复合物进行信号传导。与GM-CSF的此类融合因子的实例包括IL-2(Stagg等, 2004)、IL-15(Rafei等, 2007)和IL-21(Williams等, 2010a)，也称为GIFT2、GIFT15和GIFT21。在信号转导水平(即靶细胞内的协同作用)与细胞水平(即不同靶细胞类型之间的协同作用)两者上均可预期协同作用。举例来说，GIFT2相较于未融合细胞因子的组合诱导更强力NK细胞活化(Penafuerte等, 2009)，而GIFT15诱导未曾预期的强力免疫抑制性B细胞群体(Rafei等, 2009a)。同样地，GIFT21对单核细胞发挥出乎意料的促炎性作用(Williams等, 2010b)。组合 α 螺旋细胞因子的融合因子的另一实例是IL-2/IL-12(Gillies等, 2002; Jahn等, 2012)。

[0006] 另一类别的融合因子组合来自不同结构家族的细胞因子。实例包括IL-18(IL-1细

胞因子家族的成员)和IL-2的融合物(Acres等,2005)以及IL-18与EGF(表皮生长因子)之间的融合物。因为常观察到EGFR在某些肿瘤细胞类型上过度表达,所以后述融合因子提供使IL-18活性靶向EGFR+肿瘤细胞的可能性(Lu等,2008)。也更详细地探究了 α 螺旋束细胞因子与趋化因子之间的融合物。趋化因子常使用浓度梯度起操纵免疫细胞向感染和炎症部位迁移的作用。许多趋化因子受体显示限制性表达模式,从而允许靶向所选(免疫)细胞。此外,通过蛇根碱(serpentine)进行信号传导,G蛋白偶联趋化因子受体从根本上不同于由 α 螺旋束细胞因子受体复合物活化的路径,并且可预期正协同和负协同交互作用机理。值得注意的是,趋化因子的设计N末端截短形式可保留它们的受体结合性质,但显示拮抗性行为。一实例是GM-CSF与缺乏前5个N末端氨基酸的N末端截短的CCL2之间的融合因子,也称为GMME1(Rafei等,2009b)。这个融合因子诱导炎症性CCR2+细胞的凋亡,并且用GMME1处理的小鼠显示实验诱发的自体免疫疾病评分(包括分别针对多发性硬化症(Rafei等,2009b)和类风湿性关节炎(Rafei等,2009c)的EAE和CIA)降低。同样地,这个融合因子诱导CCR2+肿瘤细胞的凋亡(Rafei等,2011)。

[0007] 然而,以前未探究野生型细胞因子与对它的同源受体复合物具有强烈降低的亲和力的突变细胞因子之间的融合物。这个方法的优势是野生型细胞因子的可能全身性毒性被消除。惊人地,我们发现此类融合因子允许细胞因子活性达成细胞特异性靶向,借此此类突变细胞因子可重新获得它对靶向细胞的活性,而不具有野生型细胞因子的负面作用。如以下所例示,已使用三种各自由来自在结构上不同的细胞因子类别的两个细胞因子组成的融合因子证明该原理的一般适用性。

[0008] XCL1/IFNa2突变体

[0009] XCL1是一种由CD8 $^{+}$ T细胞、Th1细胞极化CD4 $^{+}$ T细胞和NK细胞分泌的93个氨基酸的趋化因子。它与仅由树突细胞表达的趋化因子受体XCR1相互作用。在小鼠中,XCR1在大多数脾CD11c $^{+}$ CD8 α^{+} 树突细胞中表达,而仅有极少的子组CD8 α^{-} 树突细胞表达这个受体(Dorner等2009)。XCR1是与小鼠CD8 α^{+} 树突细胞同源的哺乳动物细胞(包括人细胞)的保守选择性标志物(Crozat等2010)。引起关注的是,已显示I型干扰素(IFNa/ β)对这个树突细胞子组的作用对小鼠中先天性免疫识别生长的肿瘤至关重要(Fuertes等2011)。

[0010] 全身性IFNa疗法具有相当大的毒性,包括如重度疲劳、发热、寒冷、抑郁、甲状腺功能障碍、视网膜疾病、脱发、皮肤干燥、皮疹、发痒和骨髓抑制的副作用。因此,将高度值得的是使IFN活性仅靶向应该用IFN处理的细胞群体。对于在抗肿瘤疗法中应用,靶向表达XCR1的树突细胞的群体是高度合乎需要的,因为这些细胞专门致力于抗原交叉递呈(Bachem等2012)。许多实验数据表明表达XCR1的树突细胞群体代表在肿瘤微环境中必须与I型IFN反应以引发最终将允许达成肿瘤破坏和免疫的免疫应答的关键细胞群体(Gajewski等2012)。

[0011] 人IFNa2-Q124R突变体对鼠类IFNAR1链具有高亲和力,而对鼠类IFNAR2链具有低亲和力(Weber等,1987)。它显示对鼠类细胞的活性极低,并且因此代表适于使IFN活性靶向所选小鼠细胞的工程改造的I型IFN亚型的原型(PCT/EP2013/050787)。

[0012] CCL20/IL1 β

[0013] CC趋化因子CCL20,也称为肝和活化调控的趋化因子(LARC)、巨噬细胞炎症性蛋白-3 α (MIP-3 α)或Exodus-1,是一种主要在肝和淋巴组织中表达的96个氨基酸的蛋白质(Hieshima等,1997)。在分泌后,CCL20通过结合属于G蛋白偶联受体(GPCR)1家族的CC趋化

因子受体6 (CCR6) 来发挥它的活性 (Baba等, 1997)。报道了关于不同白细胞子组的CCR6表达, 但Th17细胞群体的CCR6表达被文献最充分证明 (Singh等, 2008)。正常Th17功能为针对一定范围的病原体的保护性免疫所必不可少, 所述病原体包括结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) (Khader等, 2007)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) (Ye等, 2001) 和百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) (Higgins等, 2006)。

[0014] 已坚定地确定IL-1 β 对不同T细胞子组 (特别是Th17细胞) 的扩增和分化的增强作用 (Sutton等, 2006; Acosta-Rodriguez等, 2007; Dunne等, 2010; Shaw等, 2012)。在T细胞子组之中, Th17细胞表达最高水平的IL-1R, 并且IL-1在Th17致敏中起重要作用。因此, 控制激动性IL-1活性可应用于其中免疫刺激性作用将为合乎需要的不同生理/病理过程中。然而, 关于在免疫刺激性疗法中使用IL-1的一个主要顾虑是它在全身性施用时的重度毒性。因此, 当可使IL-1作用限于所选细胞群体时, 毒性问题可能被解决, 这打开例如作为T细胞佐剂用于增强对微弱疫苗的应答的治疗远景 (Ben-Sasson等, 2011)。为使IL-1突变体特异性靶向Th17细胞群体, 使用由融合于CCL20靶向部分的突变IL-1组成的IL-1变体。因为活化将仅被限于表达CCR6的细胞 (即Th17细胞), 所以预期无重大全身性毒性。

[0015] TNF α /瘦素突变体

[0016] TNF α 是一种具有广泛范围的生物活性的细胞因子, 所述活性包括细胞毒性、调控免疫细胞以及介导炎症性应答。它是一种具有233个氨基酸的自我装配性、非共价结合的同源三聚II型跨膜蛋白。TNF α 作为膜结合以及可溶性蛋白质具有活性, 在由TNF α 转化酶 (TACE, 也称为ADAM17) 蛋白水解裂解76个氨基末端氨基酸 (前导序列) 之后从细胞膜释放。它通过均为在配体结合的细胞外结构域中具有富含半胱氨酸的基序的跨膜糖蛋白的2种不同受体, 即TNF-R1 (p55) 和TNF-R2 (p75) 进行信号传导。尽管具有细胞外同源性, 但它们具有不同的细胞内结构域, 并且因此信号传导不同的TNF活性 (Hehlgans和Pfeffer, 2005)。如以前由Boschert等, 2010所述, 我们产生由通过GGGGS接头偶联的三个TNF单体组成的单链变体 (scTNF)。

[0017] 瘦素是一种涉及许多生物过程, 包括免疫、繁殖、线性生长、葡萄糖稳态、骨代谢和脂肪氧化的16kDa的脂肪细胞细胞因子, 但因它作为饱腹感信号的显著作用而最众所周知 (Halaas等, 1995)。由于它对免疫细胞的作用, 瘦素也牵涉于若干自体免疫疾病中 (Iikuni等, 2008)。瘦素活性的选择性靶向可有益于代谢病症与免疫或炎症相关病症两者。

[0018] 本发明的第一方面是一种包含至少两个细胞因子的融合蛋白, 其中至少一个细胞因子是对它的受体, 或如果有可能在不同受体上结合, 那么对它的至少一种受体显示强烈降低的结合活性的修饰的细胞因子。如此处所用的降低的结合亲和力意指亲和力是野生型细胞因子的小于50%、优选小于40%、更优选小于30%、更优选大于25%、更优选小于20%、更优选小于15%、更优选小于10%、更优选小于5%、最优选小于1%。如此处所用的“野生型细胞因子”意指如它在自然界中在宿主生物体中所存在的细胞因子。对细胞因子的导致结合亲和力降低的修饰可为使正常野生型细胞因子的活性降低的修饰, 或它可为使同源性、非内源性细胞因子 (如但不限于结合人细胞因子受体的小鼠细胞因子) 的亲和力增加的修饰。修饰可为本领域技术人员所知的降低或增加活性的任何修饰, 包括但不限于化学和/或酶修饰, 如聚乙二醇化和糖基化、融合于其它蛋白质以及突变。优选地, 具有对受体的结合

亲和力降低的细胞因子是突变细胞因子。突变可为本领域技术人员所知的任何突变，包括缺失、插入、截短或点突变。优选地，所述突变是点突变或点突变的组合。可用为本领域技术人员所知的任何方法测量亲和力。作为一非限制性实例，配体对受体的亲和力可通过Scatchard图分析和计算机拟合结合数据(例如Scatchard, 1949)，或通过如由Brecht等(1993)所述在流通条件下进行反射干涉光谱法来测量。

[0019] 或者，降低的结合活性可测量为突变配体相较于野生型配体的生物活性降低。在一优选实施方案中，使用报告子测定在体外测量所述生物活性。此类报告子测定取决于所用细胞因子受体系统，并且为本领域技术人员所知。作为一非限制性实例，由Bono等(1989)连同Scatchard分析一起描述IFN- γ 报告子测定。优选地，突变体的生物活性是野生型细胞因子的小于50%、优选小于40%、更优选小于30%、更优选大于25%、更优选小于20%、更优选小于15%、更优选小于10%、更优选小于5%、最优选小于1%。

[0020] 修饰的细胞因子被融合于另一修饰或未修饰的细胞因子。优选地，使用接头序列，优选是包含一个或多个GGS重复序列的GGS接头使两个细胞因子融合。可将修饰的细胞因子放置在分子的氨基末端部分中，或羧基末端部分中；融合蛋白可还包含其它结构域，如但不限于标签序列、信号序列、另一细胞因子或抗体。

[0021] 如此处所用的细胞因子可为本领域技术人员所知的任何细胞因子，包括但不限于 α 螺旋束细胞因子家族、三聚肿瘤坏死因子(TNF)家族(Idriss和Naismith, 2000)、半胱氨酸结生长因子(Sun和Davies, 1995)、包括白介素-1家族的 β 三叶形折叠组(Murzin等, 1992)、白介素17(IL-17)家族(Gaffen, 2011)和趋化因子(Nomiyama等, 2013)的细胞因子。在三聚TNF家族的成员的情况下，优选使用单链形式。此类单链细胞因子为本领域技术人员所知，并且尤其由Krippner-Heidenrich等(2008)所述。

[0022] 在一个优选实施方案中，此类融合蛋白是XCL1与IFN α 2突变体，优选是Q124R突变体之间的融合物。在另一优选实施方案中，此类融合物是CCL20与IL1 β 突变体之间的融合物。优选地，此类IL1 β 突变体是Q148G突变体。在另一优选实施方案中，此类融合物是TNF α 与瘦素突变体之间的融合物。优选地，此类瘦素突变体选自由L86S和L86N组成的组。

[0023] 本发明的另一方面是一种用作药剂的根据本发明的融合蛋白。在一个优选实施方案中，它是用于治疗癌症的根据本发明的融合蛋白。在另一优选实施方案中，它是用于调节免疫应答的根据本发明的融合蛋白。

[0024] 附图简述

[0025] 图1:XCL1/IFN α 2-Q124R融合蛋白中的结构元件的图示。

[0026] 图2:XCL1/IFN α 2-Q124R融合蛋白对表达XCR1的细胞的选择性活性。

[0027] 测量特征在于表达CD11c和CD8 α 的不同小鼠脾细胞子组中应答于IFN α / β 或XCL1/IFN α 2-Q124R融合蛋白的STAT1Y701磷酸化。第一列：CD11c $^-$ CD8 α^+ 子组；第二列：CD11c $^-$ CD8 α^- 子组；第三列：CD11c $^+$ CD8 α^- 子组；第四列：CD11c $^+$ CD8 α^+ 子组；第五列：CD11c $^+$ CD8 α^- 子组。

[0028] 图3：IL-1 β 突变体/CCL20融合蛋白中的结构元件的图示。

[0029] 图4：IL-1 β 突变体/CCL20融合蛋白对表达CCR6的细胞的选择性活性。

[0030] (A)由野生型和5种融合于CCL20的不同IL-1 β 突变体对NF κ B活性的诱导。

[0031] (B)在模拟转染细胞或用CCR6转染的细胞中，由野生型和IL-1 β Q148G突变体/CCL20融合蛋白对NF κ B活性的诱导的浓度依赖性。

- [0032] (C)相较于由媒介物达成的诱导,在模拟转染细胞或用CCR6转染的细胞中,由野生型和IL-1 β Q148G突变体/CCL20融合蛋白(12.5ng/ml)对NF κ B活性的诱导。
- [0033] 图5:scTNF α /瘦素突变体融合蛋白中的结构元件的图示。
- [0034] 图6:scTNF α /瘦素突变体融合蛋白对瘦素受体表达性细胞的选择性活性。
- [0035] 通过XTT测定来测量Ba/F3-mLR细胞(图A)或Ba/F3-mLR-TNFR1 Δ Cyt细胞(图B)中由指示浓度的scTNF靶向WT或突变瘦素诱导的瘦素依赖性生长。
- [0036] 图7:IFN活性对表达XCR1的小鼠脾细胞的体内靶向。
- [0037] 用指示量的XCL1-IFN α 2-Q124R,或用1000000个单位的天然鼠类IFN α / β 或PBS静脉内注射C57B1/6小鼠。在45分钟之后,通过FACS,针对以下细胞群体中的CD11c和CD8 α 表达(第一张图)以及P-STAT1(其它图)来分析脾细胞:CD11c-CD8 α - (株系1)、CD11c-CD8 α + (株系2)、CD11c+CD8 α + (株系3)、CD11c+CD8 α - (株系4)。

实施例

- [0038] 实施例的材料和方法
- [0039] 克隆和产生融合因子
- [0040] 克隆XCL1/IFN α 2-Q124R融合蛋白。
- [0041] 使用扩增高保真PCR系统(Roche Diagnostics)和以下引物,通过PCR从编码XCL1的质粒MR200473(Origen Inc.)合成XCL1开放阅读框:
- [0042] 正向:5'GGGGGGGAATTCATGAGACTTCTCCTCCTGAC3'
- [0043] 反向:5'GGGGGGTCCGGAGGCCAGTCAGGGTTATCGCTG3'
- [0044] PCR产物用EcoRI和BspEI消化,并且替换为编码pMET7S1g K-HA-1R59B-His-PAS-ybbr-IFN α 2-Q124R载体(PCT/EP2013/050787)中的纳米抗体的EcoRI-BspEI片段。
- [0045] 产生XCL1/IFN α 2-Q124R融合蛋白。
- [0046] 使用标准lipofectamin方法(Invitrogen),用蛋白质融合构建体转染Hek 293T细胞。在转染之后48小时,收获培养基并储存在-20℃下。使用纯化的纳米抗体GFP-IFN α 2-Q124R制剂(描述于PCT/EP2013/050787中)作为标准物,如所述(UZé等J.Mol.BioI.1994)测定IFN对人HL116和鼠类LL171细胞系的活性。
- [0047] 克隆IL-1 β /CCL20融合蛋白。
- [0048] 通过基因合成(Invitrogen Gene Art)来产生编码成熟人IL-1 β /CCL20融合蛋白的密码子优化序列。简言之,合成以下序列:其中使前置有SigK前导肽,并且配备有N末端HA的成熟人IL-1 β 蛋白在它的C末端融合于13×GGS接头序列,在接头序列之后是具有C末端HIS标签的成熟人CCL20的序列(图3)。
- [0049] 基于文献以及对与它的受体复合的人IL-1 β 的公开晶体结构的分析来选择预期对IL-1R具有降低的结合亲和力的IL-1 β 突变体。使用如下表中指示的诱变引物,通过定点诱变(QuickChange,Stratagene)来在hIL-1 β 部分中产生突变:

	正向引物	反向引物
[0050]	R120G GCGGCAGCGCCCCCTGTCGGAAGCTTGAACGTGCACCCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAGGGGC GCTGCCGC
	Q131G CTGCGGGACAGCCAGGGGAAGAGGCCTGGTCATGAGCG	CGCTCATGACCAGGCTTCCCCCTGGCTGTCCC GCAG
	H146A CGAGCTGAAGGCACTGGCTTCAAGGCCAGGACATGG	CCATGTCTGGCCCTGAAGAGCCAGTGCCTTCA GCTCG
	Q148G GAAGGCACTGCATCTGGTGCCAGGACATGGAACAGC	GCTGTTCCATGTCTGGCCACCCAGATGCAGTG CCTTC
	K209A CCCCAAGAACTACCCAAGGCAAAGATGGAAAAGCGCT	GTTGAACACGAAGCGTTTCCATTTGCCTT

[0051]	正向引物	反向引物
	TCGTGTTCAAC	GGGGTAGTTCTGGGG

[0052] 产生IL-1 β 突变体:CCL20融合蛋白。

[0053] 在HEK293T细胞中产生IL-1 β -CCL20融合蛋白。对于小规模产生,将HEK293T细胞于补充有10%FCS的DMEM中在400000个细胞/孔下接种于6孔板中。在24小时之后,用血清减少的培养基(DMEM/5%FCS)替换培养基,并且使用线性PEI转染细胞。简言之,通过将1 μ g表达载体与5 μ g PEI组合于160 μ l DMEM中来制备PEI转染混合物,在室温下孵育10分钟,并且逐滴添加至各孔中。在24小时之后,转染的细胞用DMEM洗涤,并且用1.5ml OptiMem/孔分层以产生蛋白质。在48小时之后回收条件培养基,经0.45 μ 过滤器过滤并储存在-20℃下。根据制造商说明书(R&D Systems),通过ELISA来测定条件培养基中的IL-1 β 含量。

[0054] 克隆scTNF/瘦素融合蛋白。

[0055] 使用以下引物,通过PCR分别从表达WT瘦素、瘦素L86S或瘦素L86N的pMet7质粒合成野生型(WT)、L86S和L86N瘦素的编码序列:

[0056] 正向 5'-GCAGCTCTGTCGACATCCAGAAAGTCCAGGATGACACC-3',

[0057] 反向 5'-CGATGCGGCCGCACATTCAAGGCTAACATCCAATGT-3'。

[0058] 这在瘦素编码序列的氨基和羧基末端处分别引入BgIII和NotI位点。PCR产物用BgIII和NotI消化,并且克隆至用BgIII和NotI打开的pMET7-S1gK-HA-scTNF WT-6×GGS-FLAG(WT scTNF通过基因合成(GeneArt)产生)中,其存在于6×GGS与FLAG之间。这产生pMET7-S1gK-HA-scTNF WT-6×GGS-mLeptin-FLAG、pMET7-S1gK-HA-scTNF WT-6×GGS-mLeptinL86S-FLAG和pMET7-S1gK-HA-scTNF WT-6×GGS-mLeptin L86N-FLAG。

[0059] 产生scTNF/瘦素融合蛋白。

[0060] 使用标准磷酸钙沉淀方法,用不同融合蛋白构建体转染HekT细胞。在转染之后48小时,收获培养基并储存在-20℃下。用商业hTNF α ELISA(DY210,R&D systems)测定浓度。

[0061] 细胞系

[0062] 使Hek 293T、HL116和LL171细胞系在补充有10%FCS的DMEM中生长。在补充有10%热失活FCS和100ng/ml瘦素的RPMI中维持Ba/F3-mLR和Ba/F3-mLR-TNFR1 Δ Cyt细胞。

[0063] 测定

[0064] 磷酸STAT1测定。

[0065] 从分离自C57B1/6小鼠的脾制备单细胞混悬液。使用红血细胞裂解缓冲液(Lonza)

消减红细胞。在37°C下用含小鼠IFN α /β或XCL1-IFN α 2-Q124R融合蛋白的5%胎牛血清RPMI处理脾细胞30分钟,接着根据BD Biosciences说明书,用BD Phosflow PE小鼠抗STAT1(pY701)以及Alexa Fluor 488标记的抗小鼠CD11c(eBioscience#53-0114-80)和APC标记的抗小鼠CD8α(BD Bioscience#553035)或抗小鼠CD11c和Alexa 488-标记的抗小鼠CD8α标记。使用BD FACS Canto获得FACS数据,并且使用任一Diva(BD Biosciences)软件加以分析。

[0066] NF-κB报告基因测定。

[0067] 为评估IL-1R活化,我们使用稳定表达IL-1R的HEK-BlueTM IL-1 β 细胞(Invivogen),并且用NF-κB荧光素酶报告基因瞬时转染它们。简言之,将HEK-BlueTM IL-1 β 细胞于培养基(DMEM/10%FCS)中接种于96孔板中(10000个细胞/孔),并且次日使用磷酸钙沉淀方法,以指示量的表达质粒和5ng/孔的3κB-Luc报告基因质粒(Vanden Berghe等,1998)进行转染。转染后24小时,用饥饿培养基(DMEM)替换培养基,并且转染后48小时,用IL1-CCL20融合蛋白诱导细胞6小时。在诱导之后,使细胞裂解,并且使用Promega萤火虫荧光素酶测定系统(Promega Firefly Luciferase Assay System)在Berthold centro LB960光度计上测定裂解产物中的荧光素酶活性。

[0068] 细胞增殖测定。

[0069] 通过用pMet7-mLR载体电穿孔Ba/F3细胞来产生Ba/F3-mLR细胞系。通过使它们在瘦素而非IL-3的情况下生长来选择稳定表达性细胞。实际上,Ba/F3细胞的生长依赖于IL-3,但当它们表达mLR时,它们也在瘦素的情况下增殖。为获得Ba/F3-mLR-TNFR1 Δ Cyt细胞系,用pMet7-HA-hTNFR1 Δ Cyt和p1RESpuro2(Clontech)共同转染Ba/F3-mLR细胞,随后进行嘌呤霉素选择以及FACS分选表达hTNFR1 Δ Cyt的细胞。

[0070] 为评估细胞增殖,将Ba/F3-mLR和Ba/F3-mLR-TNFR1 Δ Cyt细胞洗涤,于RPMI/10% iFCS中接种于96孔板中(10.000个细胞/孔),并且用指示量的瘦素或融合蛋白刺激。4天后,添加50μl XTT(XTT细胞增殖试剂盒II, Roche, 11465015001),并且孵育4小时,随后在450nm下测量吸光度。

[0071] 实施例1:XCL1/IFN α 2-Q124R融合蛋白对表达XCR1的细胞的IFN活性被恢复。

[0072] 用1nM XCL1-IFN α 2-Q124R或用10000个单位/ml的小鼠IFN α /β处理小鼠脾细胞30分钟。细胞接着被固定,经渗透化处理,并且用抗磷酸STAT1(PE)、抗CD11c(Alexa Fluor 488)和抗CD8α(APC)染色并通过FACS加以分析。图2显示小鼠IFN α /β在所有分析的脾细胞子组中都诱导STAT1磷酸化。相反,XCL1-IFN α 2-Q124R融合蛋白仅在大多数属于CD11c $^+$ CD8α $^+$ 子组的细胞中以及在少数属于CD11c $^+$ CD8α $^-$ 子组的细胞中诱导IFN应答。对XCL1-IFN α 2-Q124R融合蛋白起应答的脾细胞子组的分布完全匹配于XCL1受体XCR1的预期分布(Dorner等2009)。

[0073] 实施例2:IL1 β 对表达CCR6的细胞的活性被恢复

[0074] 用NF-κB报告基因质粒(5ng/孔)和空载体或hCCR6表达质粒(10ng/孔)瞬时转染稳定表达IL-1R的HEK-BlueTM IL-1 β 细胞。接着用野生型或突变IL1 β -CCL20融合蛋白(25ng/ml)处理模拟和CCR6转染细胞6小时,此后使细胞裂解,并且测定NF-κB报告基因活性。如从图4A显而易见,表达CCR6的细胞相较于模拟转染细胞以增加的NF-κB报告基因活性对所有探究的突变IL1 β -CCL20融合蛋白起应答。为评估靶向作用最明显的IL-1 β -Q148G突变体的

作用,更详细来说,用递增剂量的WT IL-1 β 或IL-1 β Q148G-CCL20融合蛋白处理模拟转染或表达CCR6的HEK-BlueTM IL-1 β 细胞6小时。图4B证明过度表达CCR6使WT IL-1 β -CCL20融合物的活性增加,但对IL-1 β Q148G-CCL20融合物具有更强烈的增强作用。当IL1- β -CCL20在12.5ng/ml下应用于细胞时,靶向作用最突出(图4C)。

[0075] 实施例3:瘦素对表达TNFR的细胞的活性被恢复

[0076] 评估在用指示量的瘦素或瘦素-scTNF融合蛋白刺激4天之后,Ba/F3-mLR和Ba/F3-mLR-TNFR1 Δ Cyt细胞的增殖。如图6A中所示,两种细胞系均不在仅补充有热失活血清的生长培养基中增殖。此外,当瘦素偶联于scTNF时,它诱导Ba/F3增殖的能力降低。使WT瘦素内的L86突变成丝氨酸(L86S)或天冬酰胺(L86N)分别导致对小鼠瘦素受体的亲和力中度或强烈降低。对于瘦素L86S相对于L86N,这种亲和力降低分别转变为诱导Ba/F3-mLR细胞的增殖的强力性减小3倍相对于10倍。用缺乏它的细胞内结构域的人TNF-R1(hTNFR1 Δ Cyt)额外转染Ba/F3-mLR细胞会引入非功能性受体,其可充当膜结合的细胞外标志物。明显的是,在用偶联于scTNF的L86S和L86N瘦素突变体刺激后,在表达hTNFR1 Δ Cyt的Ba/F3-mLR细胞中,增殖应答被完全恢复(图6B)。

[0077] 实施例4:体内靶向表达XCR1的细胞群体

[0078] 根据Bachem等(Frontiers in Immunology 3,1-12.2012),表达XCR1的细胞代表大部分CD11c+CD8 α +脾细胞群体和小部分CD11c+CD8 α -脾细胞群体。用指示量的XCL1-IFNa2-Q124R,或用1000000个单位的天然鼠类IFNa/ β 或PBS静脉内注射C57B1/6小鼠。在45分钟之后,通过FACS,针对以下细胞群体中的P-STAT1来分析脾细胞:CD11c-CD8 α -、CD11c-CD8 α +,CD11c+CD8 α +,CD11c+CD8 α -。结果显示于图7中。根据这些结果,明显的是融合构建体可在群体的小部分(总细胞的约0.1%)中进行靶向并诱导应答,而不表达标志物的IFN敏感性细胞不受影响。实际上,野生型IFN也影响CD11c+CD8 α -细胞,而那些细胞不受融合构建体影响,从而明确证明融合物的特异性作用。

[0079] 参考文献

[0080] -Acosta-Rodriguez EV,Napolitani G,Lanzavecchia A and Sallusto F.(2007) Interleukins 1beta and 6but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells.Nat Immunol.8,942-9.

[0081] -Acres B,Gantzer M,Remy C,Futin N,Accart N,Chaloin O,Hoebeke J,Balloul JM and Paul S.(2005) .Fusokine interleukin-2/interleukin-18,a novel potent innate and adaptive immune stimulator with decreased toxicity.Cancer Res.65,9536-46.

[0082] -Babe M,Imai T,Nishimura M,Kakizaki M,Takagi S,Hieshima K,Nomiyama H and Yoshie O.(1997) .Identification of CCR6,the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC.J Biol Chem.272,14893-8.

[0083] -Bachem A,Hartung E,Güttler S,Mora A,Zhou X,Hegemann A,Plantinga M,Mazzini E,Stoitzner P,Gurka S,Henn V,Mages HW and Kroczek RA.(2012) .Expression of XCR1Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation.Front Immunol.3,214.doi:10.3389.

- [0084] -Ben-Sasson SZ,Caucheteux S,Crank M,Hu-Li J and Paul WE.(2011).IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses.Cytokine,56,122-5.
- [0085] -Bono MR,Benech P,Couillin P,Alcaide-Loridan C,Grisard MC,Join H,Fischer DG and Fellous M.(1989).Characterization of human IFN-gamma response using somatic cell hybrids of hematopoietic and nonhematopoietic origin.Somat.Cell Mol.Genet.15,513-23.
- [0086] -Brecht A.,Gauglitz G.,Polster J.(1993).Interferometric immunoassay in a FIA-system-A sensitive and rapid approach in label-free immunosensing., Biosens Bioelectron 8:387-392.
- [0087] -Crozat K,Guiton R,Contreras V,Feuillet V,Dutertre CA,Ventre E,Vu Manh TP,Baranek T,Storset AK,Marvel J,Boudinot P,Hosmalin A,Schwartz-Cornil I and Dalod M.(2010).The XC chemokine receptor 1is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+dendritic cells.J.Exp.Med.207,1283-1292.
- [0088] -Donahue RE,Seehra J,Metzger M,Lefebvre D,Rock B,Carbone S,Nathan DG,Garnick M,Sehgal PK,Laston D,et al.(1988).Human IL-3and GM-CSF act synergistically in stimulating hematopoiesis in primates.Science 241,1820-1823
- [0089] -Dorner BG,Dorner MB,Zhou X,Opitz C,Mora A,Güttler S,Hutloff A,Mages HW,Ranke K,Schaefer M,Jack RS,Henn V and Krocze RA.(2009).Selective expression of the chemokine receptor XCR1on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+T cells.Immunity 31,823-833.
- [0090] -Dunne A,Ross PJ,Pospisilova E,Masin J,Meaney A,Sutton CE,Iwakura Y,Tschopp J,Sebo P and Mills KH.(2010) Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against Bordetella pertussis.J Immunol.185,1711-9.
- [0091] -Fuertes MB,Kacha AK,Kline J,Woo SR,Kranz DM,Murphy KM and Gajewski TF(2011).Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+T cell responses through CD8{alpha}+dendritic cells.J.Exp.Med.208,2005-2016.
- [0092] -Gaffen SL.(2011).Recent advances in the IL-17 cytokine family.Curr Opin Immunol.23,613-9.
- [0093] -Gajewski TF,Fuertes MB and Woo SR(2012).Innate immune sensing of cancer:clues from an identified role for type I IFNs.Cancer Immunol Immunother.61,1343-7.
- [0094] -Gillies SD,Lan Y,Brunckhorst B,Wong WK,Li Y,Lo KM.(2002).Bi-functional cytokine fusion proteins for gene therapy and antibody-targeted treatment of cancer.Cancer Immunol Immunother 51,449-460
- [0095] -Halaas JL,Gajiwala KS,Maffei M,Cohen SL,Chait BT,Rabinowitz D,

- Lallone RL,Burley SK and Friedman JM.(1995).Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene.Science,269,543-6.
- [0096] -Hehlgans,T and Pfeffer,K(2005).The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily:players,rules and the games.Immunology.115,1-20.
- [0097] -Hieshima K,Imai T,Opdenakker G,Van Damme J,Kusuda J,Tei H,Sakaki Y,Takatsuki K,Miura R,Yoshie O and Nomiyama H.(1997).Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver.Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2.J Biol Chem.272,5846-53.
- [0098] -Higgins SC,Jarnicki AG,Lavelle EC and Mills KH.(2006).TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*:role of IL-17-producing T cells.J Immunol.177,7980-9.
- [0099] -Idriss HT&Naismith JH(2000).TNF alpha and the TNF receptor superfamily:structure-function relationship(s).Microscopy research and technique 50,184-95.
- [0100] -likuni N,Lam QL,Lu L,Matarese G,La Cava A.(2008).Leptin and Inflammation.Curr Immunol Rev.4,70-79.
- [0101] -Jahn T,Zuther M,Friedrichs B,Heuser C,Guhlke S,Abken H,Hombach AA(2012).An IL12-IL2-antibody fusion protein targeting Hodgkin's lymphoma cells potentiates activation of NK and T cells for an anti-tumor attack.PLoS One 7:e44482.
- [0102] -Khader SA,Bell GK,Pearl JE,Fountain JJ,Range I-Moreno J,Cilley GE,Shen F,Eaton SM,Gaffen SL,Swain SL,Locksley RM,Haynes L,Randall TD and Cooper AM.(2007).
- [0103] IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge.Nat Immunol.8,369-77.
- [0104] -Krippner-Heidenreich A,Grunwald I,Zimmermann G,Kühnle M,Gerspach J,Stems T,Shnyder SD,Gill JH,**Männel** DN,Pfizenmaier K and Scheurich P.(2008).Single-chain TNF,a TNF derivative with enhanced stability and antitumoral activity.J Immunol.180,8176-83.
- [0105] -Lu J,Peng Y,Zheng ZJ,Pan JH,Zhang Y,Bai Y(2008).EGF-IL-18 fusion protein as a potential anti-tumor reagent by induction of immune response and apoptosis in cancer cells.Cancer Lett 260,187-197.
- [0106] -Murzin AG,Lesk AM&Chothia C(1992). β -Trefoil fold:Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors.Journal of Molecular Biology 223,531-543.
- [0107] -Nicola NA&Hilton DJ(1998).General classes and functions of four-

helix bundle cytokines. *Advances in protein chemistry* 52,1-65.

[0108] -Nomiyama H,Osada N and Yoshie O. (2013) .Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes Cells*.18,1-16.

[0109] -O'Shaughnessy JA,Tolcher A,Riseberg D,Venzon D,Zujewski J,Noone M, Gossard M,Danforth D,Jacobsen J,Chang V,Goldspiel B,Keegan P,Giusti R and Cowan KH. (1996) .Prospective,randomized trial of 5-fluorouracil,leucovorin, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in combination with the interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) fusion protein(PIXY321) versus GM-CSF in patients with advanced breast cancer. *Blood* 87,2205-2211

[0110] -Penafuerte C,Bautista-Lopez N,Boulassel MR,Routy JP and Galipeau J (2009) .The human ortholog of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion protein induces potent ex vivo natural killer cell activation and maturation. *Cancer Res* 69,9020-9028

[0111] -Rafei M,Wu JH,Annabi B,Lejeune L,**François** M and Galipeau J (2007) .A GMCSF and IL-15 fusokine leads to paradoxical immunosuppression in vivo via asymmetrical JAK/STAT signaling through the IL-15 receptor complex. *Blood* 109, 2234-2242

[0112] -Rafei M,Hsieh J,Zehntner S,Li M,Forner K,Birman E,Boivin MN,Young YK,Perreault C and Galipeau J. (2009a) .A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat Med* 15,1038-1045

[0113] -Rafei M,Campeau PM,Wu JH,Birman E,Forner K,Boivin MN and Galipeau J. (2009b) Selective inhibition of CCR2 expressing lymphomyeloid cells in experimental autoimmune encephalomyelitis by a GM-CSF-MCP1 fusokine. *J Immunol*.182,2620-7.

[0114] -Rafei M,Berchiche YA,Birman E,Boivin MN,Young YK,Wu JH,Heveker N, and Galipeau J. (2009c) An engineered GM-CSF-CCL2 fusokine is a potent inhibitor of CCR2-driven inflammation as demonstrated in a murine model of inflammatory arthritis. *J Immunol*.183,1759-66.

[0115] -Rafei M,Deng J,Boivin MN,Williams P,Matulis SM,Yuan S,Birman E, Forner K,Yuan L,Castellino C,Boise LH,MacDonald TJ and Galipeau J. (2011) A MCP1 fusokine with CCR2-specific tumoricidal activity. *Mol Cancer*.10:121.doi: 10.1186/1476-4598-10-121.

[0116] -Shaw MH,Kamada N,Kim YG and **Núñez** G. (2012) Microbiota-induced IL-1 β ,but not IL-6,is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med*.209,251-8.

[0117] -Singh SP,Zhang HH,Foley JF,Hedrick MN and Farber JM. (2008) Human T

cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6.J Immunol.180,214-21.

[0118] -Scatchard G. (1949) .Ann New York Acad Sci 51,660-72.

[0119] -Stagg J,Wu JH,Bouganim N and Galipeau J. (2004) .Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion cDNA for cancer gene immunotherapy.Cancer Res 64,8795-8799

[0120] -Sun PD&Davies DR. (1995) .The cystine-knot growth-factor superfamily.Annual review of biophysics and biomolecular structure 24,269-91.

[0121] -Sutton C,Brereton C,Keogh B,Mills KH and Lavelle EC. (2006) .A crucial role for interleukin(IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis.J Exp Med.203,1685-91.

[0122] -Weber H,Valenzuela D,Lujber G,Gubler M and Weissmann C. (1987) .Single amino acid changes that render human IFN-alpha 2 biologically active on mouse cells.EMBO J.6,591-8.

[0123] -Williams P,Bouchentouf M,Rafei M,Romieu-Mourez R,Hsieh J,Boivin MN,Yuan S,Forner KA,Birman E and Galipeau J. (2010a) .A dendritic cell population generated by a fusion of GM-CSF and IL-21 induces tumor-antigen-specific immunity.J Immunol.185,7358-66.

[0124] -Williams P,Rafei M,Bouchentouf M,Raven J,Yuan S,Cuerquis J,Forner KA,Birman E and Galipeau J. (2010b) .A fusion of GMCSF and IL-21 initiates hypersignaling through the IL-21Ralpha chain with immune activating and tumoricidal effects in vivo.Mol Ther 18,1293-1301.

[0125] -Ye P,Rodriguez FH,Kanaly S,Stocking KL,Schurr J,Schwarzenberger P,Oliver P,Huang W,Zhang P,Zhang J,Shellito JE,Bagby GJ,Nelson S,Charrier K,Peschon JJ and Kolls JK. (2001) .Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression,neutrophil recruitment, and host defense.J Exp Med.194,519-27.

序列表

<110> VIB VZW
UNIVERSITEIT GENT
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSIT MONTPELLIER 2
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER

<120> 涉及具有强烈降低的受体结合亲和力的细胞因子的融合因子

<130> JT/DU0/459

<150> EP 13306034.3

<151> 2013-07-18

<160> 15

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 5

[0001] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 2

gggggggaat tcatgagact ttcctcctg ac

32

<210>	3	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	3	
	gggggtccg gaggcccagt cagggttatc gctg	34
<210>	4	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	4	
[0002]	gcggcagcgc ccctgtcgga agcttgaact gcaccctgc	39
<210>	5	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	5	
	ctgcgggaca gccagggaa gagcctggtc atgagcg	37
<210>	6	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	

<400>	6	
cgagctgaag gcactggctc ttcagggcca ggacatgg		38
<210>	7	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	7	
gaaggcactg catctgggtg gccaggacat ggaacagc		38
<210>	8	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
[0003]	<220>	
<223>	引物	
<400>	8	
ccccagaac taccccaagg caaagatgga aaagcgcttc gtgttcaac		49
<210>	9	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	9	
gcagggtgca gttcaagctt ccgacaggggg cgctgccgc		39
<210>	10	
<211>	37	
<212>	DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 10

cgctcatgac caggctttc ccctggctgt cccgcag

37

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 11

ccatgtcctg gccctgaaga gccagtgcct tcagctcg

38

[0004] <210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 12

gctgttccat gtccctggcca cccagatgca gtgccttc

38

<210> 13

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13

gttgaacacg aagcgcttt ccatcttgc ctggggtag ttcttgccc

49

<210> 14
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 14
gcagatctgt cgacatccag aaagtccagg atgacacc 38

[0005]

<210> 15
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 15
cgatgcggcc gcacattcag ggctaacatc caactgt 37



图1

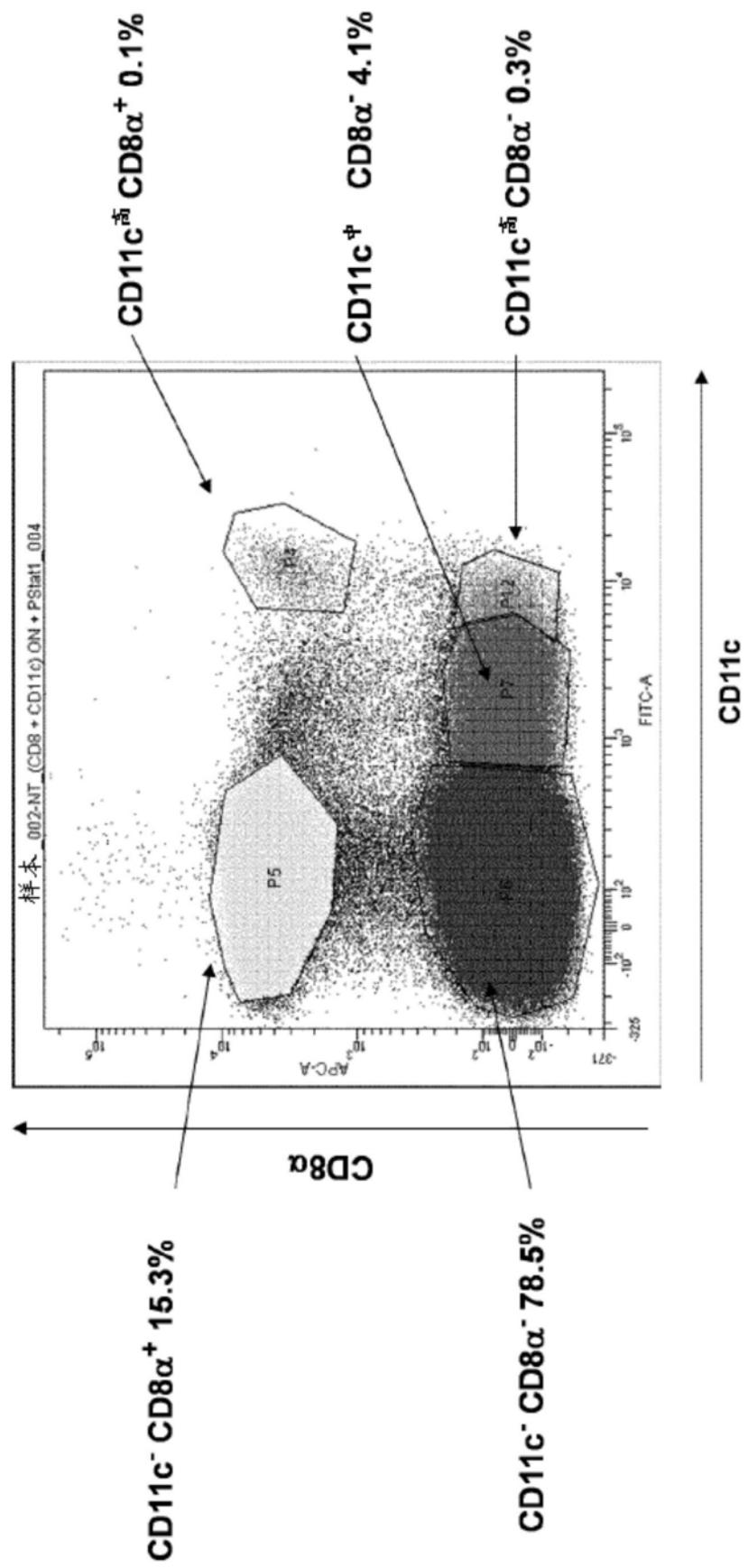


图2

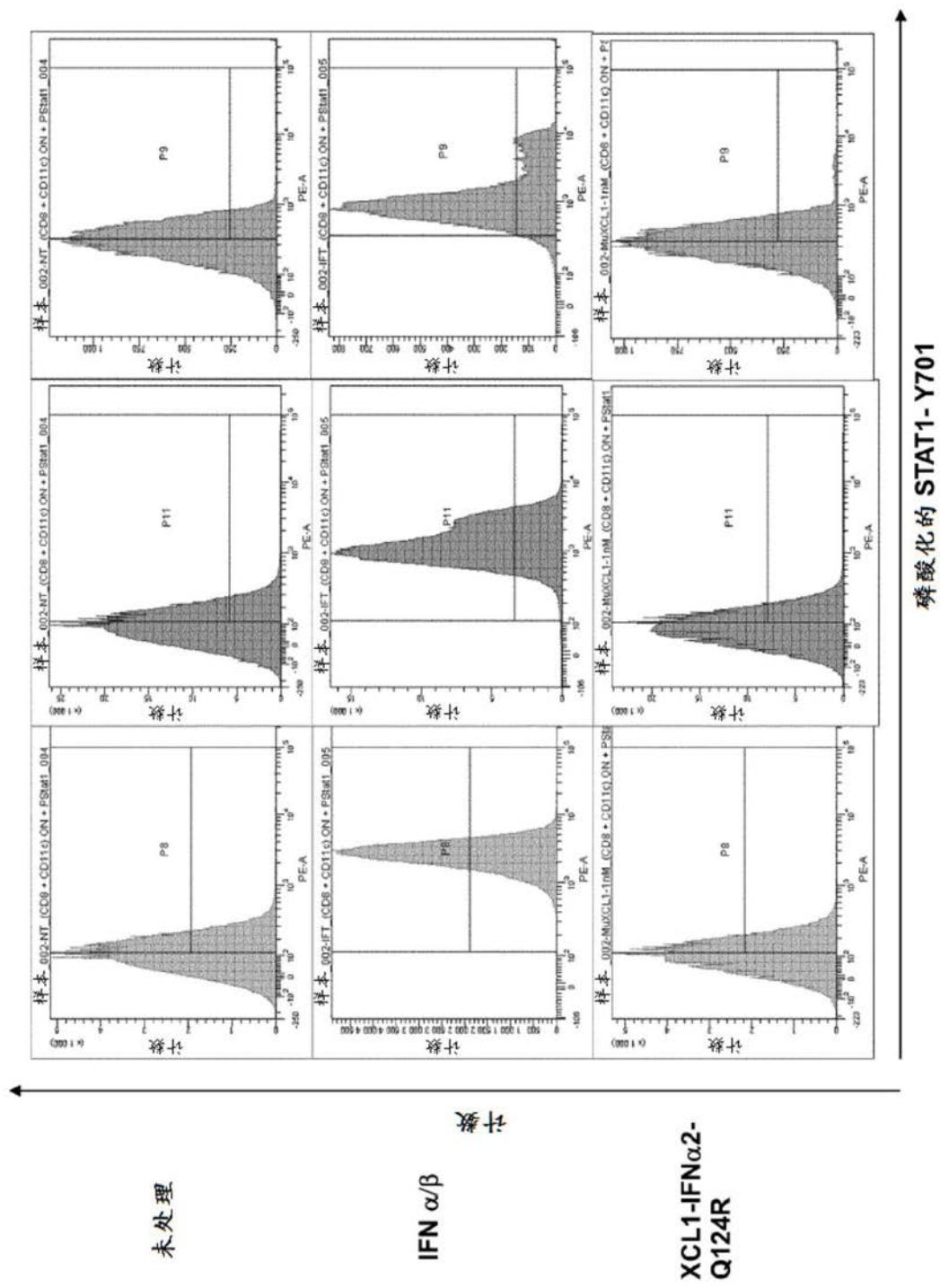


图2续

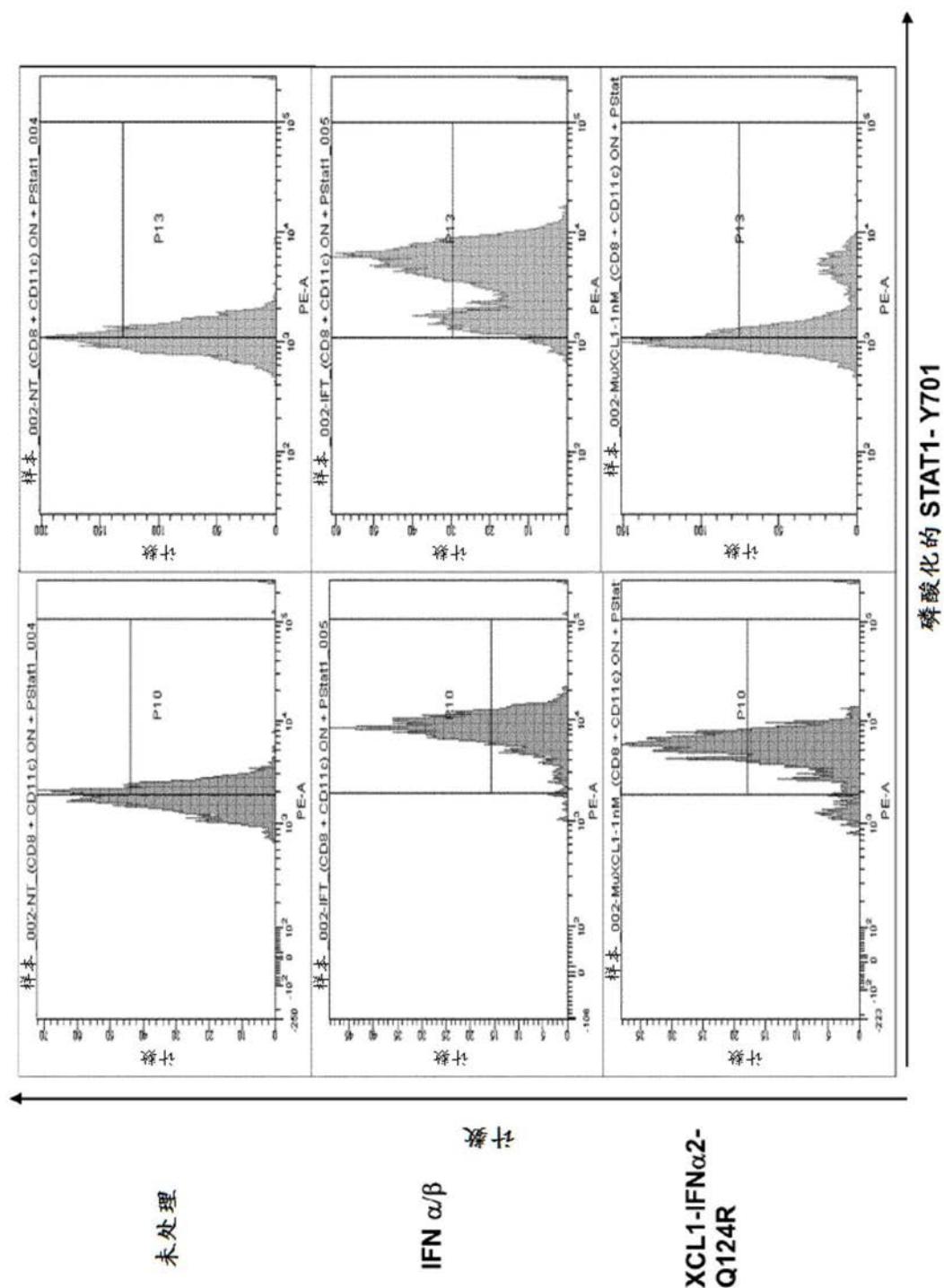


图2续



图3

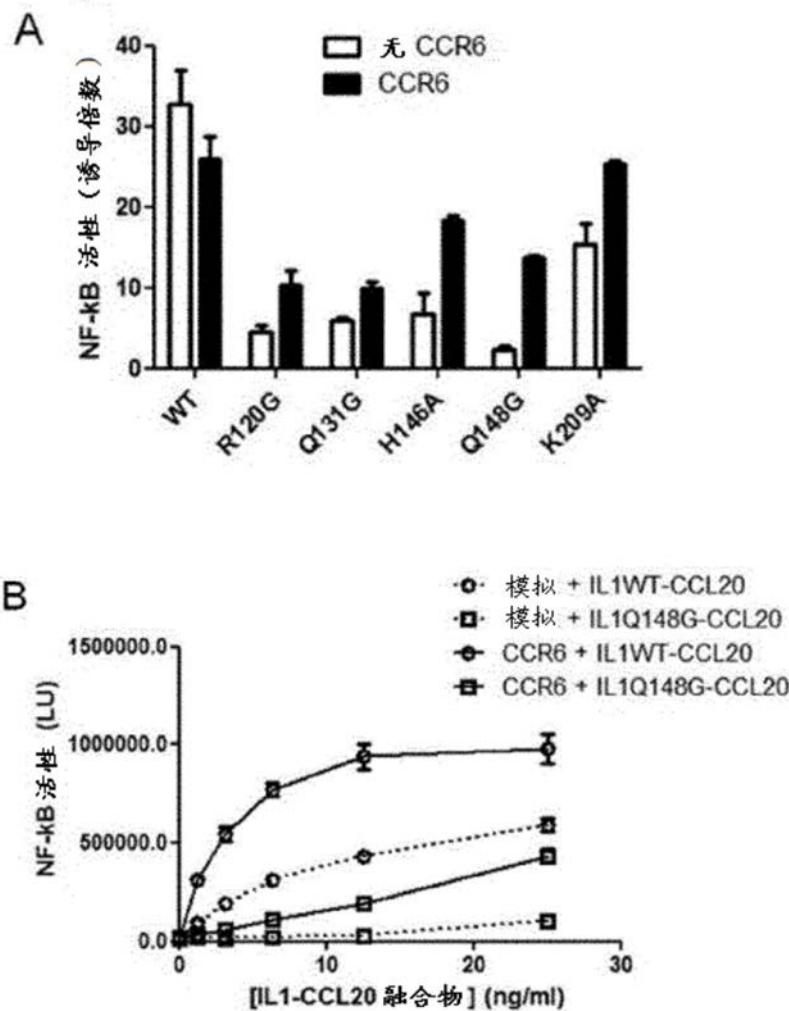


图4

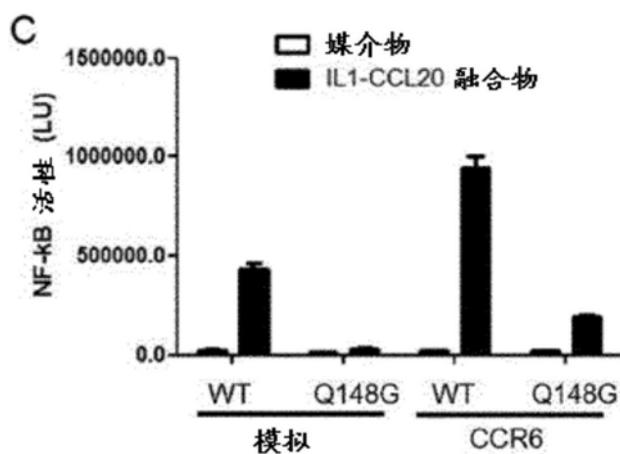


图4续



图5

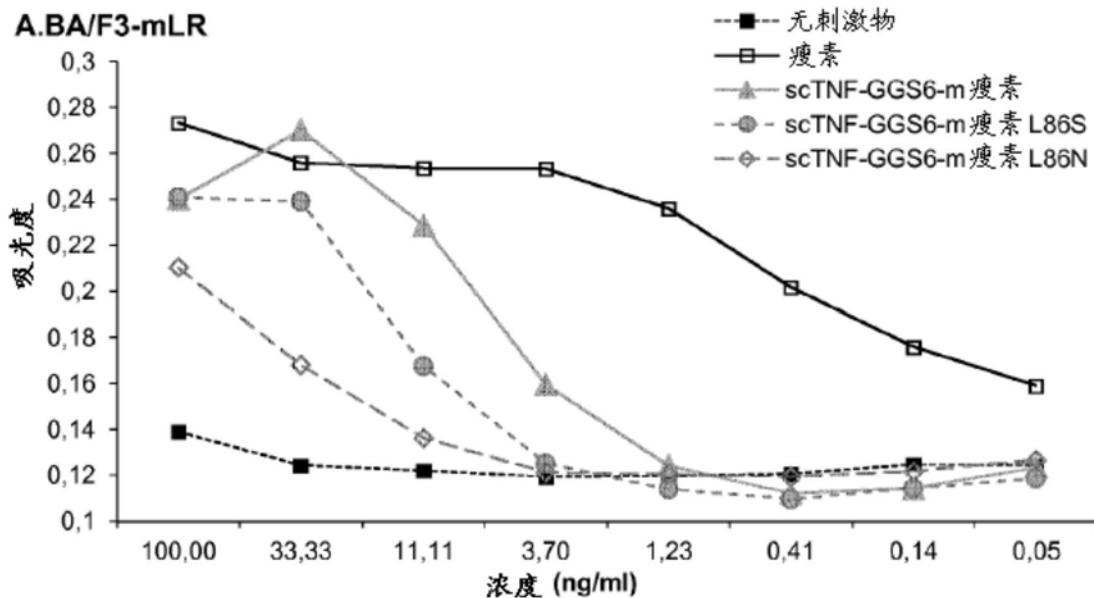


图6

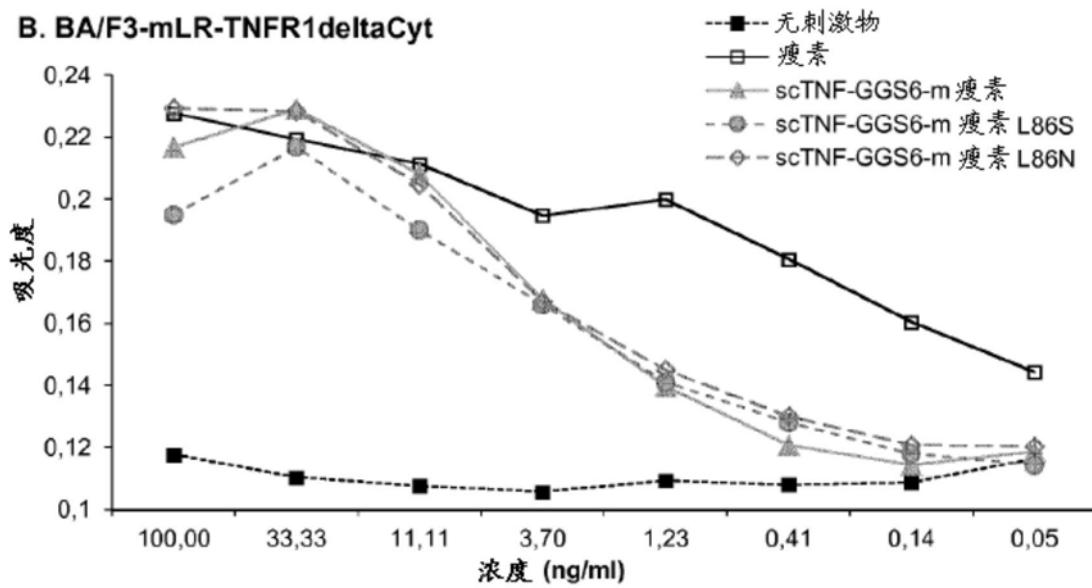


图6续

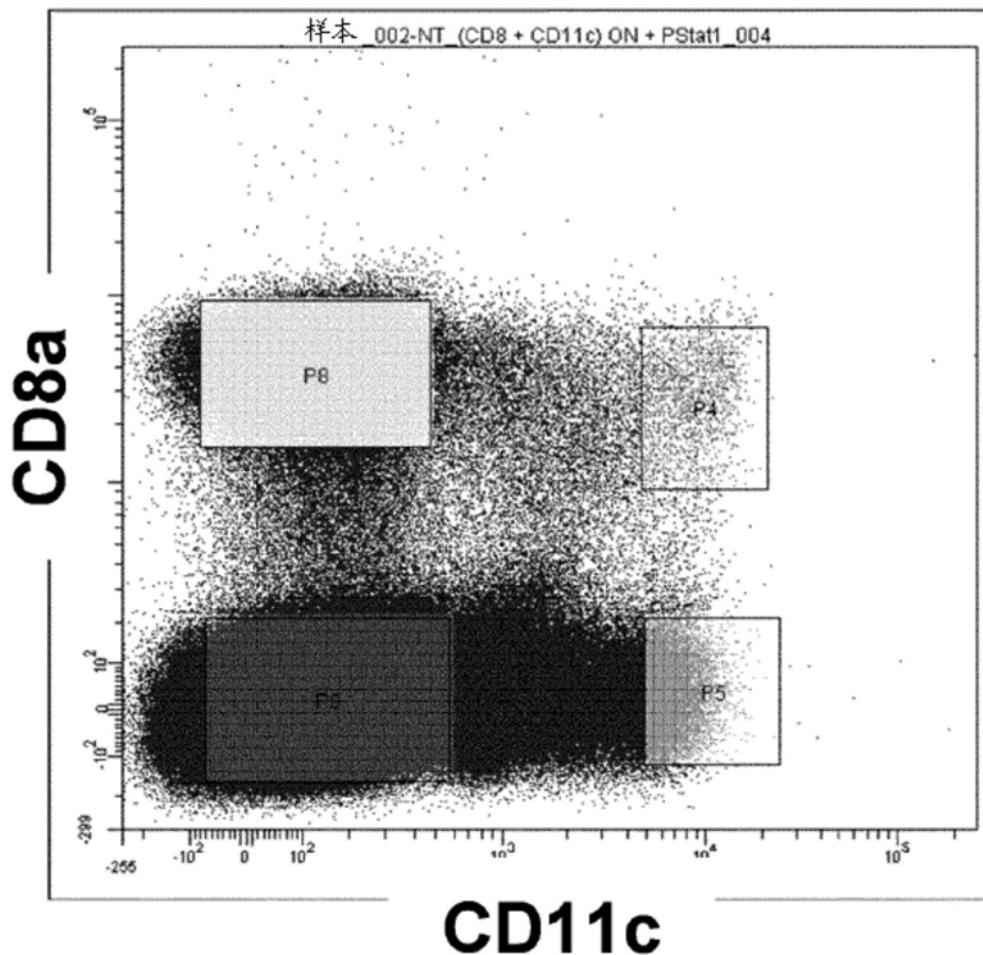


图7

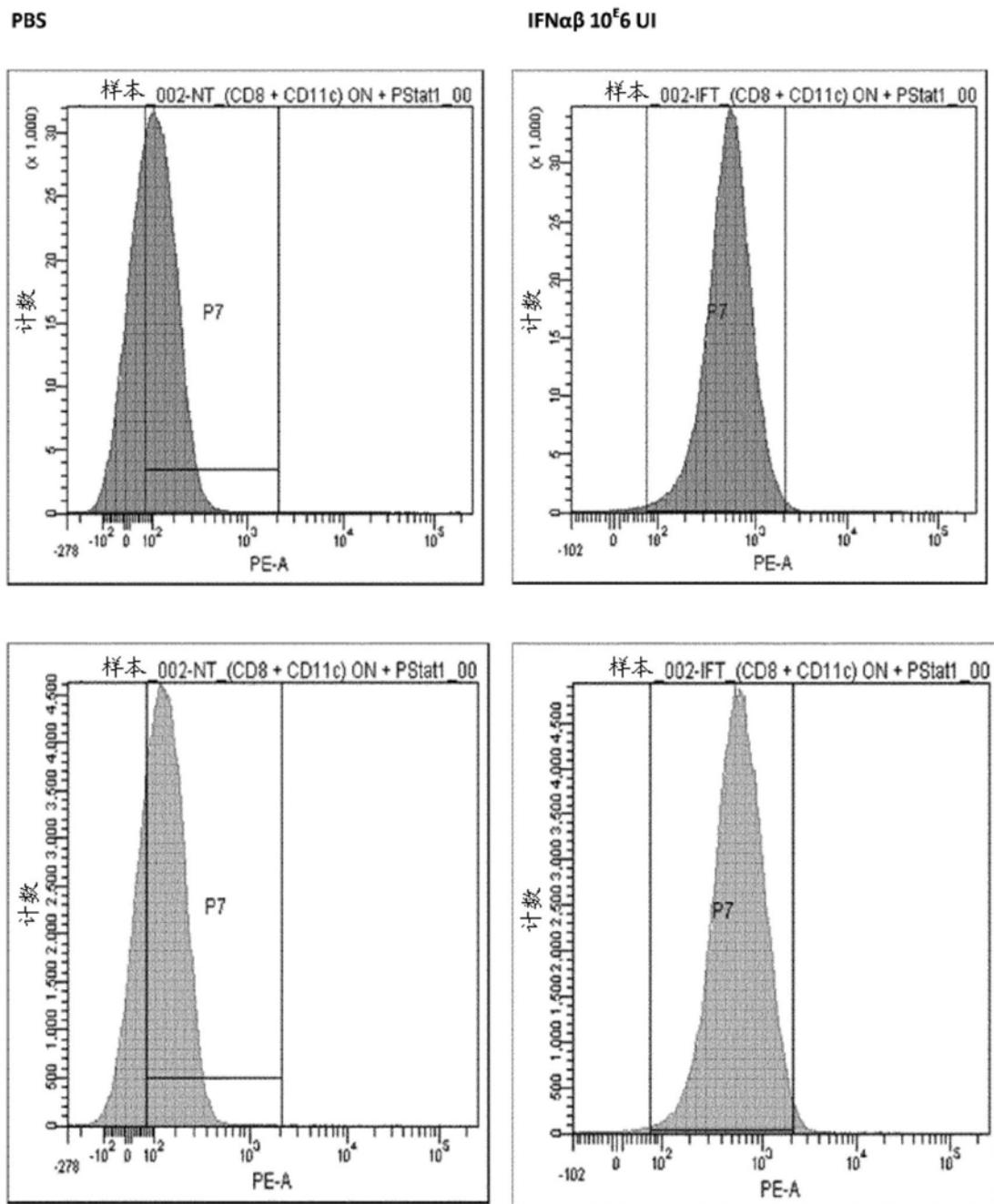


图7续

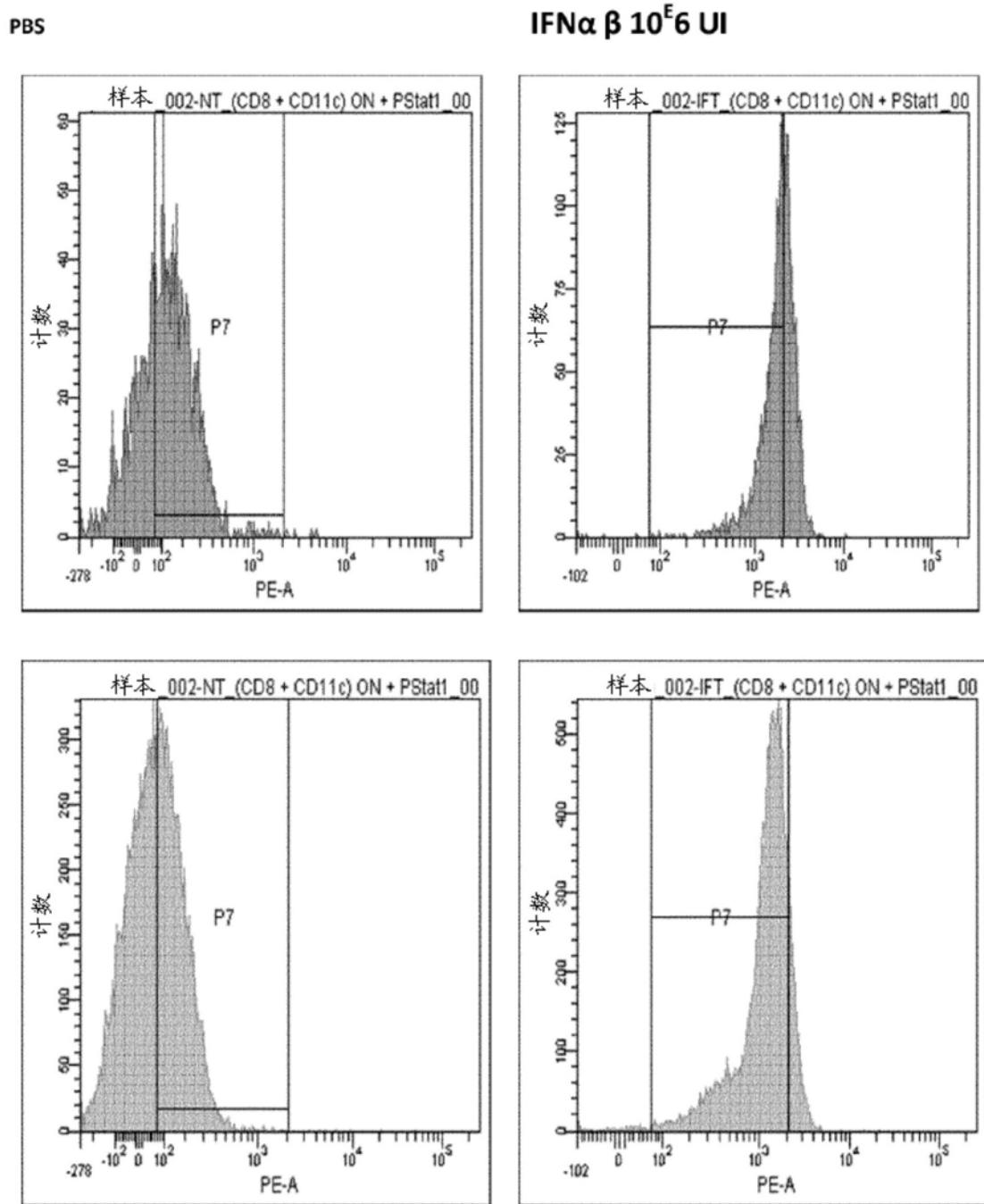


图7续

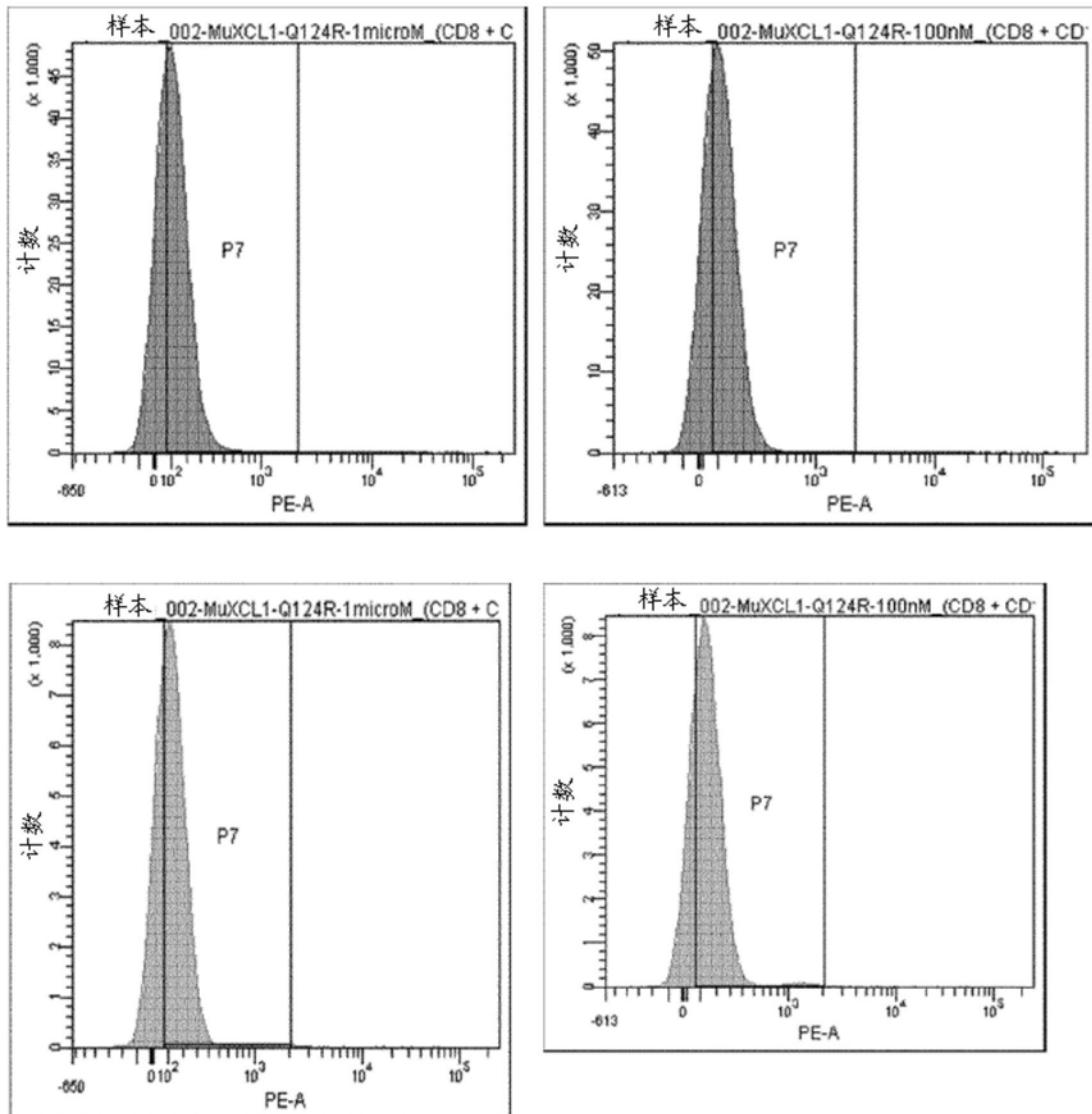
MuXCL1_IFNA2 Q124R 10 μ gMuXCL1_IFNA2 Q124R 1 μ g

图7续

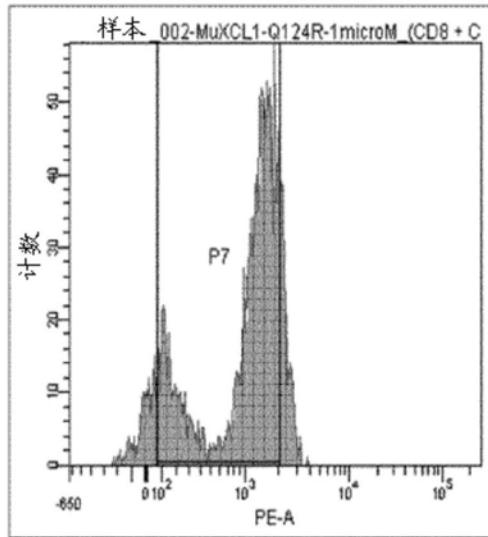
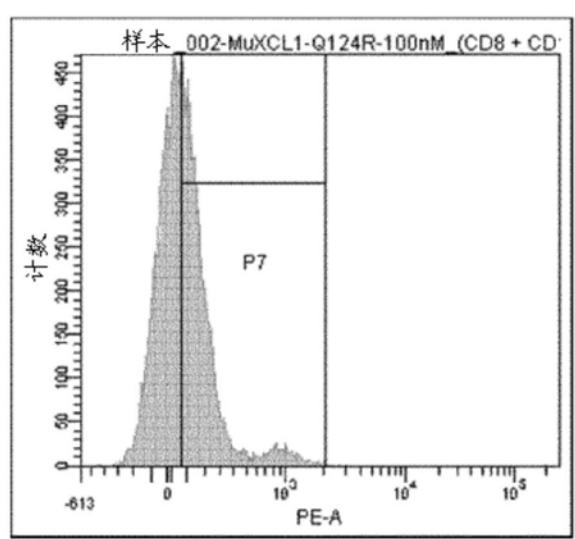
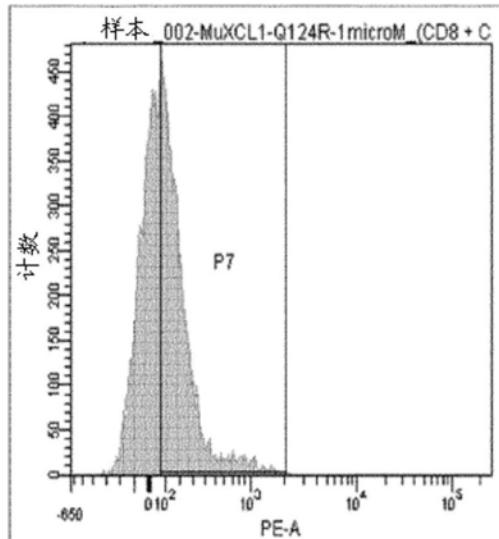
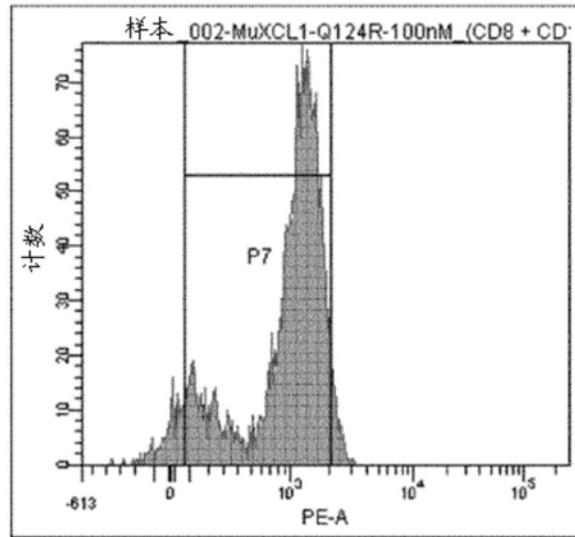
MuXCL1_IFNA2 Q124R 10 μ gMuXCL1_IFNA2 Q124R 1 μ g

图7续

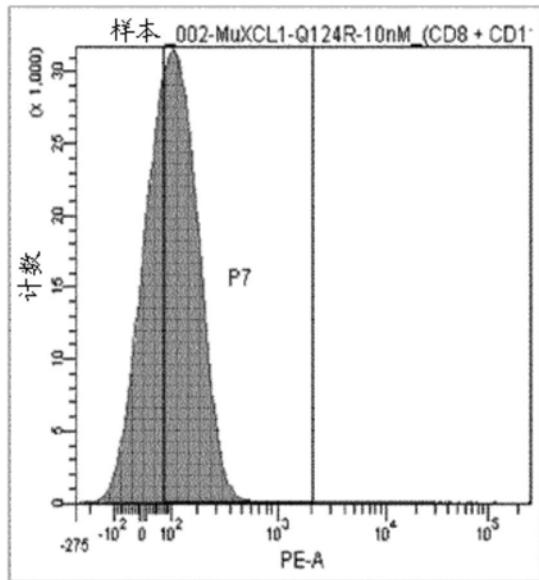
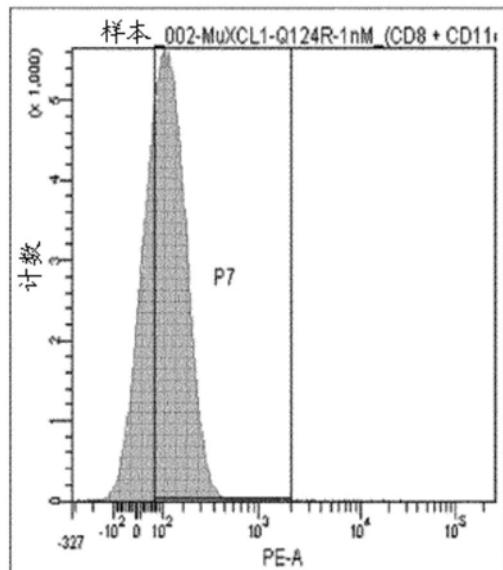
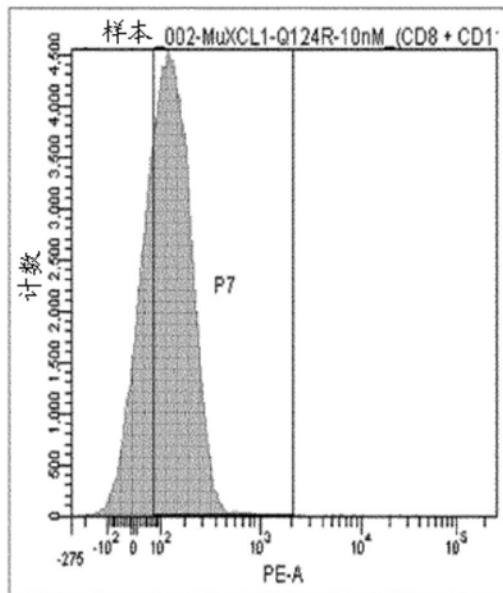
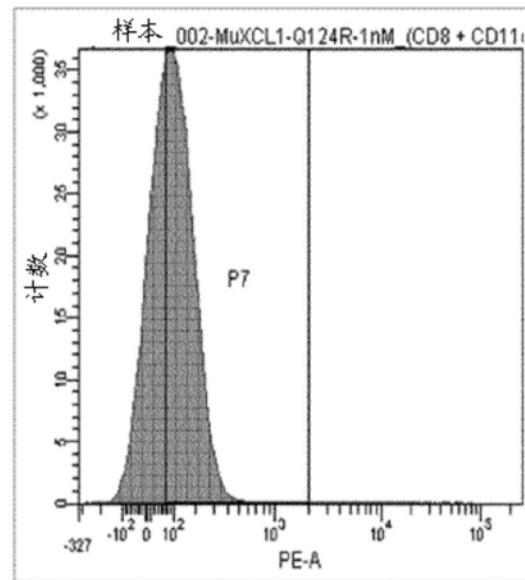
MuXCL1_IFNA2 Q124R 100ng**MuXCL1_IFNA2 Q124R 10ng**

图7续

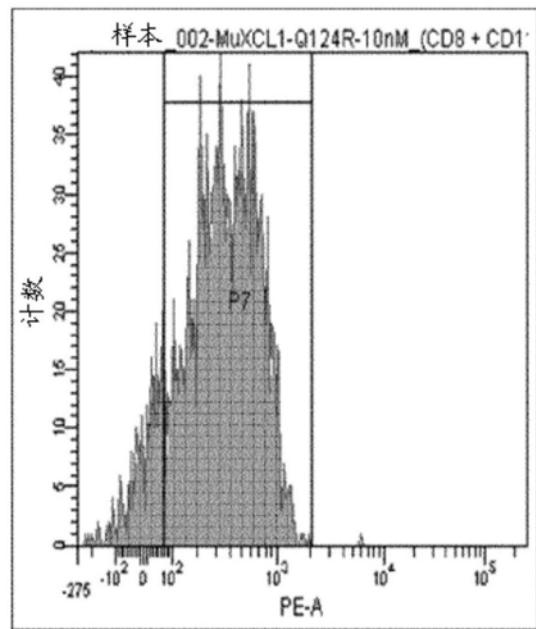
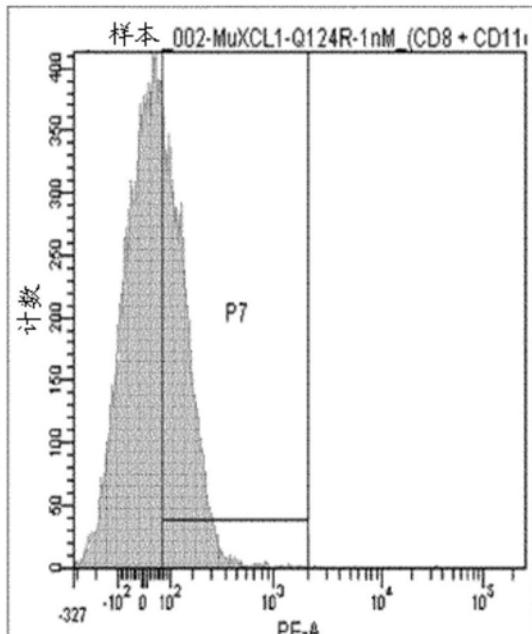
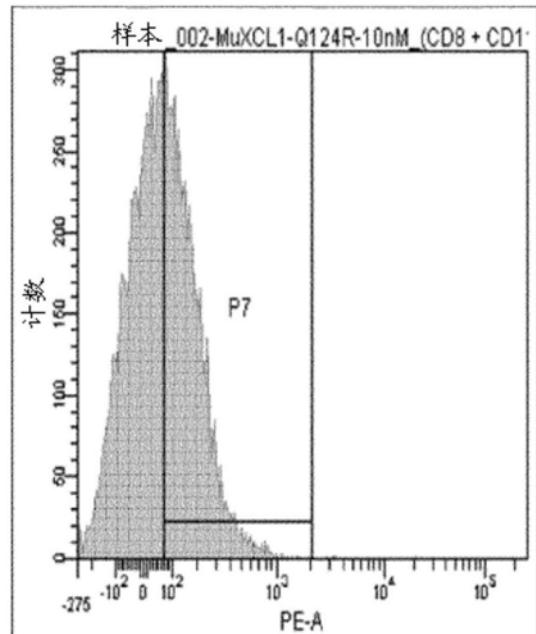
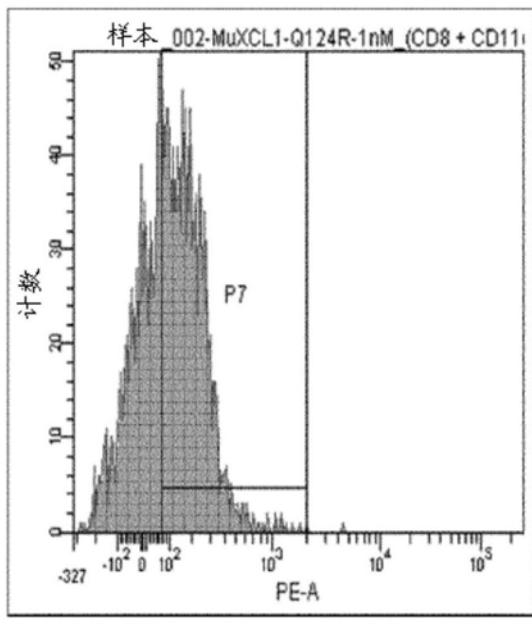
MuXCL1_IFNA2 Q124R 100ng**MuXCL1_IFNA2 Q124R 10ng**

图7续