

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610043442.X

[51] Int. Cl.

- C07K 17/02 (2006.01)
- C07K 19/00 (2006.01)
- C07K 14/595 (2006.01)
- C07K 1/10 (2006.01)
- A61K 38/16 (2006.01)
- A61K 38/22 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100558747C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2006.4.6

[21] 申请号 200610043442.X

[73] 专利权人 海南天源康泽医药科技有限公司

地址 570314 海南省海口市国家高新区南海大道 273 号 - A

[72] 发明人 王晶翼 王栋海 李模孝 张 薛

王庆民 刘禄娟 卫立辛

[56] 参考文献

US5468494A 1995.11.21

CN1665487A 2005.9.7

CN1389472A 2003.1.8

WO2005105140A2 2005.11.10

审查员 黄 磊

[74] 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司

代理人 宁钦亮

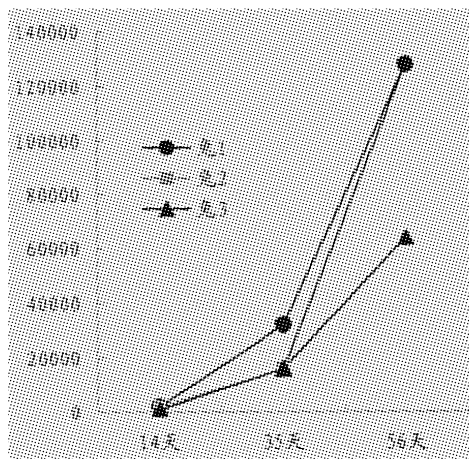
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 2 页

[54] 发明名称

以白喉毒素突变体 CRM197 为载体的免疫原及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明涉及一种免疫原及其制备方法，是以白喉毒素突变体 CRM197 为载体蛋白，通过异型双功能交联剂 ϵ -马来酰亚胺基己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (EMCS) 与胃泌素 G17 分子相交联而得的 G17CRM197。本发明所使用的载体蛋白具有回收率高，易于纯化，适合于大规模工业化生产的优点，同时交联产物交联率高，制备时间短，降低了生产成本。本发明也涉及用此方法制备的免疫原作为治疗性疫苗的有效成分，以适宜的免疫佐剂作为辅料制成的药物在肿瘤治疗中的应用。



1、一种免疫原 G17CRM197，其特征是以白喉毒素突变体 CRM197 为载体蛋白，通过异型双功能交联剂 ϵ -马来酰亚胺基己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯与胃泌素 G17 分子相交联而得的 G17CRM197，每个 CRM197 分子上交联 15-20 个 G17 分子；其中，所述的 G17 分子的氨基酸序列如下：

pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ser-Ser-Pro-Pro-Pro-Cys

所述的白喉毒素突变体 CRM197 的氨基酸序列如下：

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser				
1	5	10	15	20
Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys				
21	25	30	35	40
Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys				
41	45	50	55	60
Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly				
61	65	70	75	80
Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala				
81	85	90	95	100
Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly				
101	105	110	115	120
Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro				
121	125	130	135	140
Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu				
141	145	150	155	160
Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr				
161	165	170	175	180
Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu				
181	185	190	195	200
Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser				
201	205	210	215	220
Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser				
221	225	230	235	240
Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu				
241	245	250	255	260
Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala				
261	265	270	275	280
Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys				
281	285	290	295	300
Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly				
301	305	310	315	320

Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met
 321 325 330 335 340
 Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn
 341 345 350 355 360
 Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala
 361 365 370 375 380
 Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn
 381 385 390 395 400
 Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys
 401 405 410 415 420
 Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly
 421 425 430 435 440
 Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met
 441 445 450 455 460
 Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val
 461 465 470 475 480
 Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile
 481 485 490 495 500
 His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp
 501 505 510 515 520
 His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 521 525 530 535

2、权利要求1的免疫原G17CRM197的制备方法，以白喉毒素突变体CRM197为载体蛋白，选用异型双功能交联剂 ϵ -马来酰亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯，通过交联反应，将胃泌素G17分子与CRM197相交联，每个CRM197分子上交联15-20个G17分子，具体步骤为：

- (1) 首先使G17与交联剂 ϵ -马来酰亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯反应，反应时间为2小时，得到活化的G17；所述G17中自由巯基的含量不少于60%，所述的CRM197中游离氨基数量为10-30摩尔氨基/摩尔CRM197；
- (2) 通过G10脱盐柱对活化的G17进行纯化；
- (3) 活化纯化后的G17再与CRM197进行交联反应，反应时间为2小时；
- (4) 对交联产物进行纯化。

3、权利要求1所述免疫原G17CRM197的制药用途，用于制备治疗消化道肿瘤的药物。

以白喉毒素突变体 CRM197 为载体的免疫原及其制备方法与应用

(一) 技术领域

本发明涉及一种以白喉毒素突变体 CRM197 为载体的免疫原 G17CRM197 及其制备方法, 以及此免疫原在消化道肿瘤治疗中的应用, 属于医药技术领域。

(二) 背景技术

CRM197 (cross-reacting materials 197) 是白喉毒素丧失了毒性的一种突变体, 参见乌其达等人, 白喉毒素和相关蛋白 I. 分离并描述白喉毒素血清型相关突变体菌株, 生物化学, 1973. 248:3838-3844. (Uchida, T., A. M. Pappenheimer, Jr. and R. Gregory. al., Diphtheria toxin and related proteins I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin. J. Biol. Chem. 1973. 248:3838-3844.), 它是由野生型白喉毒素的碱基序列中由一个碱基 G 突变为 A, 从而导致了第 52 位氨基酸 GLY 突变为 GLU, 参见简尼尼等人, 两种白喉毒素无毒性突变体 CRM45 和 CRM197 的氨基酸序列, 核酸研究, 1984. Vol. 12 No. 10, P4063-4070 (G. Giannini, R. Rappuoli and G. Ratti al., The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197.. Nucleic Acids Research. 1984. Vol. 12 No. 10, P4063-4070)。从结构上看, CRM197 具有完整的白喉毒素功能结构, 但实验表明, 白喉毒素的 A 片断能与 NAD 结合而 CRM197 不能, 这表明 NAD 结合位点的变化影响了白喉毒素的酶活性及毒性。后来研究证明 CRM197 与白喉毒素的差异在于 52 位的 GLY 突变为 GLU, 这就证明了 52 位的 GLY 在白喉毒素 NAD 结合位点起着重要作用, 这就导致白喉毒素酶活性位点——同 NAD:EF2 ADP 核糖转移酶结合区发生改变, 导致 CRM197 片断 A 不能 EF2 结合, 不能对细胞起到毒性作用, 参见: 摩依那, 克丽思天森. 采用凝胶过滤和饱和硫酸氨沉淀法纯化白喉毒素和白喉类毒素方法的比较. 病原微生物及免疫治疗年会. 1984, 92:17-23 (K. Moyner, G. Christiansen, Comparison of gel filtration and ammonium sulphate precipitation in the purification of diphtheria toxin and toxoid, Acta path microbiol immunol scand sect C, 1984, 92:17-23)。CRM197 不具有酶活性以及毒性, 但具有白喉毒素的免疫原性, 因此 CRM197 也常被用作一种免疫蛋白载体交联其它半抗原一起作为疫苗。早在 1985 年美国科学家就利用 CRM197 的免疫原性, 将嗜血流感菌表面的多糖交联到白喉类毒素及 CRM197 的蛋白载体上制作疫苗防治呼吸道感染, 从防治效果上看, 两种交联疫苗在效果上没有显著差异, 但都能使小孩产生较强的免疫记忆, 参见: 彼得. 安德森, 米切而, 皮其切罗, 瑞卡德. 采用白喉类毒素或白喉毒素蛋白 CRM197 交联嗜血流感菌 b 亚型表面的多糖制备流感免疫原. 临床调研杂志. 1985:52-59 (Porter Anderson, Micheal E. Pichichero, and Richard A. Insel. Immunogens Consisting of Oligosaccharides from the Capsule of Haemophilus influenzae Type b Coupled to Diphtheria Toxoid or the Toxin protein CRM197. J. Clin. Invest. 1985:52-59)。美国科学家针对小儿在 2 岁前对于肺炎球菌疫苗 (球菌表面多糖, PnPs) 不能产生免疫记忆, 因此将球菌表面七价多糖交联于多种蛋白载体以便在小儿 2 岁前能对肺炎球菌产生抗体, 经过多种蛋白载体交联后的动物及临床效果比较, 发现 PnPs-CRM197 能产生较好的

免疫效果,而且安全无毒副作用,参见:布莱克,谢里蜚德,伐而曼,路易斯,瑞,汉森,艾而纹,恩塞而,哈克而,斯博而,曼李罗斯克,马夺,常仪,科白格,沃克,奥斯廷,爱德沃德.2000,交联七价肺炎球菌表面多糖疫苗在儿童体内的有效性、安全性和免疫原性.传染病学报.9:187-195(Black, S., H. Shinefield, B. Fireman, E. Lewis, P. Ray, J. R. Hansen, L. Elvin, K. M. Ensor, J. Hackell, G. Siber, F. Malinoski, D. Madore, I. Chang, R. Kohberger, W. Watson, R. Austrian, K. Edwards, et al. 2000. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9:187-195)。目前该产品也通过美国FDA批准上市,商品名为Prevnar[BIOPHARMA: Biopharmaceutical Products in the U.S. Market]。意大利科学家 Francesco 针对流行性脑膜炎也采用了利用其病菌表面多糖交联 CRM197 制作疫苗,他们从 CRM197 的结构上分析了交联的可行性,其中 CRM197 带有 39 个 Lysin 氨基酸残基和 16 个 Arg 残基,能提供较多的交联用的游离氨基。从实验结果来看,虽然化学交联率较高,但都没有达到理论交联率,而且,不同的糖其交联率也存在差异,这说明交联率也与交联物相关,参见:弗朗西斯科.贝体,保罗.克斯坛替,麦克.弗莱该,克罗的奥.鲁奇拉滋.多糖-蛋白交联疫苗的水溶性、沉积性和动力学特点。(Francesco Berti, Paolo Costantino, Marco Fragai, y and Claudio Luchinatz. Water Accessibility, Aggregation, and Motional Features of Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccines. *Biophysical Journal* Volume 86 January 2004 3-9)。

针对现有 CRM197 的不足,海南天源康泽医药科技有限公司对原有 CRM197 的基因序列进行了改进,构建了表达 CRM197 的重组表达质粒并转化至大肠杆菌表达宿主中以包涵体形式表达。结果目的产物 CRM197 表达量高,在全菌蛋白中占 24% 以上,且目的产物的回收率高易于纯化,适合于大规模工业化生产。参见中国专利 CN200610042194.7。

胃泌素 (gastrin) 是一种肽类激素,按照分子结构可分为大胃泌素 (big gastrin G34), 小胃泌素 (little gastrin G17), 小小胃泌素 (minigastrin G14), 大大胃泌素 (big big gastrin) 和成分 I (component I), 是由位于胃肠道的 G 细胞分泌的。其传统作用是刺激胃酸和蛋白酶原的分泌以及对消化道细胞的营养作用,参见:邹继红,李金瑞,张忠平 胃泌素研究的新进展.放射免疫学杂志 1995 年第 8 卷第 4 期。近年来胃泌素和胆囊收缩素 (CCK) 作为单纯消化道激素的概念发生了较大的变化,其对胃肠道肿瘤的调控作用逐渐成为人们关注的焦点,参见:柔潜哥特 E,沃尔石 J.H. 胃泌素、胆囊收缩素,信号传导和肿瘤。(Rozenfurt E, Walsh JH. Gastrin, CCK, signaling, and cancer. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 49-76)。大多数消化道肿瘤细胞能合成和分泌胃泌素,并表达相应的受体,其分泌的胃泌素通过自身的受体后途径发挥对肿瘤的调节作用,此即消化道肿瘤的 Gastrin/CCK 自分泌调节环路 (autocrine loop), 这可能是消化道肿瘤细胞最重要的生物学特性和自主性调节机制之一,参见:巴尔德文 GS, 胃泌素和胆囊收缩素在正常癌变胃肠道生长中的作用。(Baldwin GS. The role of gastrin and cholecystokinin in normal and neoplastic gastrointestinal growth. *J Gastroenterol Hepatol*, 1995, 10 (2): 581-584)。近年来的研究表明,除了成熟的酰胺化分子形式外,消化道肿瘤细胞尚能分泌有调节作用的胃泌素前体和甘氨酸延伸型中间产物。已经证实在胃癌、大肠癌、胰腺癌及胆管癌中均存在完整的胃泌素自分泌调节环路,这一环路对消化道肿瘤的发生、生长及浸

润转移过程均有调控作用,参见:张丰深,何振平,马宽生 消化道肿瘤细胞 Gastrin/CCK 自分泌调节环路的研究进展.胃肠病学和肝病学杂志,2002,19:92-94)。

(三) 发明内容

本发明针对现有技术的不足,提供一种以白喉毒素突变体 CRM197 为载体的免疫原及其制备方法。

本发明的另一任务是通过体外及体内实验评价了免疫原对消化道肿瘤的抗肿瘤活性。

本发明的免疫原,是以白喉毒素突变体 CRM197 为载体蛋白,通过异型双功能交联剂 ϵ -马来酰亚胺基己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)与胃泌素 G17 分子相交联而得的 G17CRM197,其中,所述的 G17 分子的氨基酸序列如下:

(a) 序列特征

长度: 16 个氨基酸

类型: 氨基酸

(b) 分子类型: 多肽

(c) 序列描述

pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ser-Ser-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys

所述的白喉毒素突变体 CRM197, 具有如下序列:

(a) 序列特征

* 长度: 536 氨基酸

* 类型: 氨基酸

(b) 分子类型: 蛋白质

(c) 序列描述

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser				
1	5	10	15	20
Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys				
21	25	30	35	40
Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys				
41	45	50	55	60
Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly				
61	65	70	75	80
Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala				
81	85	90	95	100
Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly				
101	105	110	115	120
Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro				
121	125	130	135	140
Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu				
141	145	150	155	160
Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr				
161	165	170	175	180

Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu
 181 185 190 195 200
 Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser
 201 205 210 215 220
 Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
 221 225 230 235 240
 Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu
 241 245 250 255 260
 Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala
 261 265 270 275 280
 Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys
 281 285 290 295 300
 Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
 301 305 310 315 320
 Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met
 321 325 330 335 340
 Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn
 341 345 350 355 360
 Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala
 361 365 370 375 380
 Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn
 381 385 390 395 400
 Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys
 401 405 410 415 420
 Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly
 421 425 430 435 440
 Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met
 441 445 450 455 460
 Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val
 461 465 470 475 480
 Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile
 481 485 490 495 500
 His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp
 501 505 510 515 520
 His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 521 525 530 535

本发明的免疫原 G17CRM197 的制备方法如下：

以白喉毒素突变体 CRM197 为载体蛋白，选用异型双功能交联剂 ϵ -马来酰亚胺基己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (EMCS)，通过交联反应，将胃泌素 G17 分子与 CRM197 相交联，

测定交联率，每个 CRM197 分子上交联 15-20 个 G17 分子。

上述 G17 的自由巯基的数量应不低于 60%。因此需要预先测定 G17 中自由巯基的数量，如巯基含量少于 60%，则需要对其进行还原。具体还原方法可使用 Ellman 试剂 (Ellman's Reagent) 按照使用说明书中的操作指南进行。

上述的 CRM197 中游离氨基的数量应不低于 5 摩尔/每摩尔 CRM197。优选的游离氨基数量范围为每摩尔 CRM197 中含有 10-30 摩尔游离氨基。因此需要预先采用荧光胺法测定 CRM197 中游离氨基的数量。若每摩尔 CRM197 中的游离氨基低于 5 摩尔则不能制备出具有较高活性的免疫原。

至于具体地交联反应可采用本领域技术人员熟悉的方法进行，如 G.L.琼斯、H.M.爱德蒙德森、L.斯本德、J.盖尔、A.绍尔等在利用马来酰亚胺基己酸琥珀酸亚胺基酯来制备马来酰多肽载体免疫原中所报道的方法 (G.L.Jones, H.M.Edmundson, L.Spender.J.Gale,A.Saul. The use of maleimidocaproyloxysuccinimide to prepare malarial peptide carrier immunogens. Journal of immunological methods,123(1989)211-216)。交联率的测定方法可选用本领域人员所熟悉的方法,如: SDS-PAGE 法、化学定量法或氨基酸分析法等。

本发明提供以下具体操作步骤，但不限于此：

- (1) 首先使 G17 与交联剂 EMCS 反应，反应时间为 2 小时，得到活化的 G17；
- (2) 通过 G10 脱盐柱对活化的 G17 进行纯化；
- (3) 活化纯化后的 G17 再与 CRM197 进行交联反应，反应时间为 2 小时；
- (4) 对交联产物进行纯化。

步骤 (4) 所述的纯化，可采用透析法 (透析袋截留量为 8000-10000 道尔顿)、超滤法以及凝胶柱脱盐的方法进行纯化。具体优选 G25 脱盐柱进行纯化。

测定所制备的交联产物的免疫原性。采用免疫动物的方法来测定所制备的交联产物刺激动物产生抗体的情况，按照常规的方法进行免疫，采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测产生的抗体效价。

用所制备的 G17CRM197 免疫原免疫动物，第三次免疫后两周将动物处死并采集血清。对所采集的血清进行纯化得到抗 G17CRM197 抗体，并将所得到的抗体进行体外、体内药效评价。体外实验所采用的肿瘤细胞为胃癌细胞 MKN45、BGC823 和大肠癌细胞 LOVO、SW480；体内实验用裸鼠进行。通过体外肿瘤细胞培养及裸鼠体内抑瘤实验证明本发明的免疫原性抗体对胃癌及大肠癌有明显的治疗作用。具体内容将在实施例中进行进一步详细说明。

以白喉毒素突变体 CRM197 为载体的免疫原的制药用途，用于制备治疗肿瘤的药物。以本发明的免疫原作为治疗性疫苗的有效成分，以适宜的免疫佐剂作为辅料制成的药物制剂可直接用于人体注射。此免疫原在人体内能够刺激免疫系统产生相应的抗胃泌素抗体，此抗体可中和消化道肿瘤患者体内过多的胃泌素，从而达到治疗肿瘤的目的。

与现有的技术相比较，本发明的优良效果主要表现在以下几个方面：

1. 本发明所使用的蛋白载体为白喉毒素突变体 CRM197，具有回收率高，易于纯化，适合于大规模工业化生产的优点；
2. 使用的白喉毒素突变体 CRM197 物质单一、制备工艺简单、质量易于控制；
3. 本发明的制备方法整个制备过程仅需 6 小时，比现有技术大为缩短，极大的降低了生产成本；

4. 所制备的交联产物交联率大大高于现有技术, 也就是说每个 CRM197 分子所交联上的 G17 分子明显多于现有技术; 本发明的交联率介于 15-20 个 G17 分子/CRM197 分子之间, 而现有技术只能达到 7-15 个 G17 分子/CRM197 分子。
5. 动物实验结果表明, 与现有技术相比较, G17CRM197 的免疫原性更强, 所产生的抗体滴度最高可达到 1: 500000, 根据文献报道现有技术所能达到的抗体滴度为 1: 64000。
6. 体外及裸鼠体内抑瘤实验表明此交联产物具有较好的抗肿瘤效果。

(一) 附图说明

图 1 是本发明的免疫原性组合物的 SDS-PAGE 图, 其中 1 为蛋白分子量标准, 2 为 CRM197, 3 为活化后的 CRM197, 4 为交联产物。

图 2 是用本发明所制备的免疫原性组合物免疫动物后分别在 14、35 和 56 天所测得的抗体滴度。其中横坐标表示实验天数, 纵坐标表示抗体滴度。

图 3 是采用 ELISA 法检测抗血清抗体滴度照片。其中 1 为用现有技术 G17DT 免疫动物所得到的抗血清的检测结果, 2 为用本发明所制备的免疫原免疫动物所得到的抗血清的检测结果, 3 为阳性对照, 4 为阴性对照, 横向数字为抗血清的稀释倍数。

(二) 具体实施方式

下面结合实施例详细说明本发明免疫原性组合物 G17CRM197 的制备方法。

实施例 1:

1. 所用材料

1.1 主要试剂

单水合半胱氨酸盐酸盐 (Cysteine Hydrochloride Monohydrate), 巯基测定试剂 Ellman 试剂, 交联剂 EMCS: 皮尔斯 (Pierce) 公司产品; 荧光胺: 西咖玛 (Sigma) 公司产品; 其它为国产试剂。

1.2 主要仪器设备

TGL-16 型高速台式离心机: 上海医疗器械六厂产品。

微量移液器: 德国爱本道夫 Eppendorf 公司产品。

HD95-1 蛋白检测仪及 3057 型记录仪: (上海康华生化仪器制造厂)。蠕动泵: 兰格泵, YZ1515, 保定兰格恒流泵有限公司。BHW-IV 电热恒温水温箱: 北京市医疗设备厂。J2-MC 高速低温离心机: Beckman 公司产品。制冰机 (GRANT)、1-15 离心机 (Sigma), Spectrumlad54 紫外可见分光光度计 (上海棱光技术有限公司)、FR-200 凝胶成像系统 (上海复日科技有限公司)、DK-8D 型电热恒温水槽 (上海森信实验仪器有限公司)、DYY-12 型电脑三恒多用电泳仪 (北京市六一仪器厂)、MS2 迷你振荡器 (IKA, 广州公司)、PHS-3C 型精密 PH 计 (上海精密科学仪器有限公司)、MILLEXTMGP 0.22um 微孔滤器 (Millipore)、超净工作台、电子天平。

1.3 抗体及二抗、佐剂

辣根过氧化物酶标羊抗兔二抗 (北京华美生物工程公司), 白喉类毒素抗体 (Sigma 公司), 弗氏佐剂 (BBI 公司)。

2. 免疫原性组合物的制备方法

2.1 巯基及氨基的测定

以单水合半胱氨酸盐酸盐 (Cysteine Hydrochloride Monohydrate) 为对照, 采用 Ellman

试剂测定的方法作出标注曲线。精确配制 0.1mM 的 G17 溶液，同样采用 Ellman 试剂进行测定，通过标准曲线计算出自由巯基的数量。本发明中所使用的 G17 经测定，其中巯基含量为 97%，无需进行处理。若巯基含量较低，则需要对 G17 进行还原，可以采用二硫苏糖醇进行处理。

采用荧光胺试剂测定 CRM197 中游离氨基的数量。以甘氨酸为对照作出标准曲线。精确配置 0.1M 的 CRM197 溶液，同样用荧光胺进行测定，通过与标准曲线对比计算出游离氨基的数量。本发明中所使用的 CRM197 中游离氨基的数量为 30mol 氨基/molCRM197。

2.2 交联物的制备

方法一：

称取 20mgG17，溶于 1ml 氮气饱和的磷酸钠缓冲液（pH6.5-7.0）中；称取 6mgEMCS 溶于 100ul 二甲基甲酰胺中，待其充分溶解后在 15 分钟内缓慢、分次加入至 G17 溶液中，振荡反应 2 小时。此步反应要求 EMCS 在分子数量绝对高于 G17 的分子数量。

将上述反应产物进行纯化以除去未反应的 EMCS。纯化方法有多种，可以采用 G10 脱盐柱法，也可以采用透析的方法。

称取 10mgCRM197，缓慢加入至上述纯化过的 G17 中，振荡反应过夜。除去未反应的 G17 后即得到交联产物。同样可以采用透析或 G25 脱盐柱来除去未反应的 G17。

方法二：

称取 20mgCRM197 溶于磷酸钠缓冲液中；称取 6mgEMCS 溶于 100ul 二甲基甲酰胺中，待其充分溶解后在 15 分钟内缓慢、分次加入至 CRM197 溶液中，振荡反应 2 小时。

将上述反应产物进行纯化以除去未反应的 EMCS。纯化方法有多种，可以采用 G10 脱盐柱法，也可以采用透析的方法。

称取 10mgG17，缓慢加入至上述纯化过的 CRM197 中，振荡反应过夜，同时采用氮气保护。除去未反应的 G17 后即得到交联产物。同样可以采用透析或 G25 脱盐柱来除去未反应的 G17。

2.3 交联率的测定

本发明所指的交联率是指每一分子的 CRM197 上所结合的 G17 分子的个数，其测定方法多样。可通过肽含量特征分析，肽含量可通过本领域技术人员抑制的许多方法比如重量增加和氨基酸分析等来测定。也可以通过 SDS-PAGE 电泳的方法进行，通过对比反应前后 CRM197 在分子量上的变化来计算交联率。另外也可以通过计算 CRM197 上结合的 EMCS 数量的变化来间接计算交联率。具体就是：使与 EMCS 反应后并经过纯化的 CRM197 与半胱氨酸盐酸盐一起培育，然后和 10mM 的 Ellman 试剂反应，用 Ellman 试剂于 412nm 处的摩尔消光系数 13600 计算游离的半胱氨酸中的巯基。在反应结束之后再通过同样的方法计算一下 EMCS 的数量，两次测定数值之差即为交联 G17 分子的数量。其中蛋白浓度采用 Lowry 法或 Bradford 法来测定。

3. 免疫原性的测定

3.1 动物的免疫

将所制备的交联物 G17CRM197 溶于生理盐水，并与等量弗氏佐剂混合，使得交联物的最终浓度为 1mg/ml。免疫时间为 0、21、42 天；免疫方法采用家兔后腿肌肉注射，第一次注射右腿，第二次注射左腿，第三次注射右腿，注射点略高于第一次注射点。第一次注

射采用弗氏完全佐剂处理样品,后两次采用弗氏不完全佐剂处理,并且第一次免疫剂量为1mg,后两次的免疫剂量为0.5mg。

分别在第14、35、56天采集兔血进行抗体效价检测。其中前两次为家兔耳缘静脉采血,第三次为颈动脉采血,采集的血清室温下放置1小时,凝固后置4℃过夜,析出血清,2000rpm离心,分离血清。血清保存于-4℃,2周内备用。

3.2 抗体滴度的检测

抗血清效价检测最为常用的方法是酶联免疫吸附法(ELISA)。本发明所使用的检测方法即为ELISA法。具体为:将免疫原G17BSA用包被液($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$, pH9.6)稀释至0.1 $\mu\text{g/ml}$,包被聚苯乙烯96孔板,50 $\mu\text{l/孔}$,4℃培育过夜。洗板三次后用封闭液(2%BSA-PBS)封闭,50 $\mu\text{l/孔}$,37℃,2小时。加抗血清,将采集的抗血清做如下倍数稀释:2000、8000、16000、32000、64000、128000、256000、512000,每孔50 μl ,37℃培育2小时。以注射生理盐水的兔血清为阴性对照,以商品抗白喉毒素抗体为阳性对照,同时与以注射G17DT的兔子产生的抗血清进行比较。洗涤三次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,1:4000稀释,37℃孵育1小时。洗板10次后加底物显色,37℃孵育40分钟后终止反应,测定 A_{491} 值。

结果如图3所示,从图中可以看出用本发明所制备的免疫原免疫动物三次后产生了高滴度的抗胃泌素抗体,最高效价达到1:512000,而用现有技术G17DT免疫动物三次后产生的抗体滴度为1:64000。实验结果充分证明本发明所制备的免疫原性组合物能够刺激机体产生高滴度抗胃泌素抗体,且其免疫原性要明显高于现有技术中的G17DT。

实施例2:

1. 体外抑瘤实验

1.1 肿瘤细胞培养过程中所产生的胃泌素的检测

本发明采用胃泌素检测试剂盒(ELISA法)测定肿瘤细胞培养过程中胃泌素的产生情况。

取培养好的肿瘤细胞株,倒置显微镜下观察细胞呈单层铺满整个生长面,表明生长良好。在无菌室内消化并制成单细胞悬液。取细胞悬液在血球计数板上计数,调整RPMI1640液的量,使最终细胞数为 1×10^9 个/L,用移液管取1ml细胞悬液接种在T25培养瓶中,另加RPMI1640液约4ml。每天换液1次,将更换的RPMI1640液5ml收集起来,留作ELISA测定。换液时随机取2瓶,按上述步骤制成单细胞悬液,取细胞悬液在血球计数板上计数,取其均数,代表此时每瓶中的细胞数。凡已计数过的该瓶细胞,不再包括在实验之内。连续3次,共培养72小时。

将结果进行统计,见下表。

表1a 胃癌细胞MKN45培养过程中胃泌素的产生情况

时间(小时)	细胞数($10^9/\text{L}$)	胃泌素(ng/L)
0	1.0	0
24	由1.0增至3.2	15.2
48	由3.2增至5.1	16.1
72	由5.1增至5.9	16.9

表 1b 胃癌细胞 BCG823 培养过程中胃泌素的产生情况

时间(小时)	细胞数 ($10^9/L$)	胃泌素 (ng/L)
0	1.0	0
24	由 1.0 增至 3.0	13.1
48	由 3.0 增至 4.8	14.2
72	由 4.8 增至 5.3	14.9

表 1c 大肠癌细胞 LOVO 培养过程中胃泌素的产生情况

时间(小时)	细胞数 ($10^9/L$)	胃泌素 (ng/L)
0	1.0	0
24	由 1.0 增至 4.1	17.2
48	由 4.1 增至 5.5	18.1
72	由 5.5 增至 5.9	18.6

表 1d 大肠癌细胞 SW480 培养过程中胃泌素的产生情况

时间(小时)	细胞数 ($10^9/L$)	胃泌素 (ng/L)
0	1.0	0
24	由 1.0 增至 3.6	16.1
48	由 3.6 增至 4.8	16.9
72	由 4.8 增至 5.5	17.4

以上结果表明,胃癌细胞 MKN45、BCG823 和 大肠癌细胞 LOVO、SW480 在培养过程中能分泌胃泌素,且随着细胞不断增殖,其分泌的胃泌素数量也增加,两者呈正相关。

1.2 用本发明所制备的免疫原所制备的抗 G17CRM197 抗体对肿瘤细胞的生长抑制实验

向生长良好的肿瘤细胞中加入实施例 1 中所制备的抗体,通过 MTT 法测定不同处理组(加胃泌素 17 组、加抗体组、空白对照组)的细胞活力,以确定抗体对肿瘤细胞的抑制作用。所选用的肿瘤细胞为胃癌细胞 MKN45 和 大肠癌细胞 SW480。

肿瘤细胞株体外细胞培养,10%小牛血清 RPMI1640 培养液中分别加入无菌的胃泌素 17 和胃泌素抗体,分成三组空白对照组、胃泌素 17 组(25ug/ml) 抗体组(30ug/ml)。

细胞活力的测定:应用噻氮唑蓝(MTT)比色分析法测定细胞活力,取 100ul 含细胞的培养液(细胞浓度为 $10^5/ml$),接种于 96 孔培养板,细胞贴壁后吸去培养液;按上述分组分别加入培养液、胃泌素 17 和抗体,各组均设 8 个复孔,培养 66 小时后每孔加 MTT (5mg/ml) 20ul,继续培养 6 小时,离心弃上清,每孔加 20%SDS100ul,震荡 5 分钟,置室温半小时后在酶标仪上测定 570nm 波长处的吸光度。

各组 A_{570} 值间接反映活细胞数量,结果表明不论是胃癌细胞 MKN45 还是 大肠癌细胞 SW480,胃泌素组活细胞数明显高于对照组($P < 0.01$),抗体组细胞数明显下降($P < 0.01$)。

表 2 抗 G17CRM197 抗体对肿瘤细胞的生长抑制情况

分组	MKN45 细胞 A_{570}	SW480 细胞 A_{570}
空白对照组	0.561±0.056	0.472±0.046
胃泌素 17 组	0.767±0.065	0.656±0.057
抗体组	0.421±0.045	0.389±0.041

2. 裸鼠体内抑瘤实验

肿瘤动物模型的建立:取含有 MKN45 细胞和 SW480 细胞的培养液 70ul(细胞数 10^7),

接种于裸鼠右腋背交界处皮下层内成瘤，瘤块反复接种 2 次，形成肿瘤动物模型，取雄性裸鼠随机分成三组，每组六只；传代的肿瘤在放大镜下剪成大小一致的立方体状瘤块，约 8mm^3 大小，以套管针分别接种于裸鼠右前腋背交界处皮下。

各组均自瘤块接种后第 1 天开始用药。对照组：每只裸鼠腹腔内注射羧甲基纤维素助悬剂 200ul，每日 2 次，共治疗 28 天；抗体组：每只裸鼠静脉注射抗体 500mg/kg，每日 2 次，共治疗 28 天。

疗效观察：第 5 天时肿瘤开始形成，用游标卡尺测量每只裸鼠荷瘤的最长径及垂直径，隔天测量 1 次；第 28 天时裸鼠全部存活，取出肿瘤并称重。计算抑瘤率。各组差别用 t 检验进行统计学处理。

$$\text{抑瘤率}\% = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

结果：接种第 5 天时已有肿瘤生长，测量各组肿瘤面积，大小相近，无显著性差异 ($P>0.05$)，表明肿瘤生长的均一性好，从第 16 天开始抗体组肿瘤面积较对照组明显缩小，差异有显著性 ($P<0.05$)；第 28 天时抗体组肿瘤面积较对照组更小。

根据肿瘤的重量变化计算，用本发明所制备的抗体的抑瘤率对于两种肿瘤的抑瘤率分别达到 28% 和 26%。肿瘤重量变化情况如下表所示。

表 3 体内肿瘤重量变化表

分组	胃癌组裸鼠肿瘤重量	大肠癌组裸鼠肿瘤重量
对照组	1177.7 ± 183.5mg	1089.3 ± 156.2mg
抗体组	847.9 ± 69.6mg	802.1 ± 52.3mg

序列表

<110>海南天源康泽医药科技有限公司

<120>以白喉毒素突变体 CRM197 为载体的免疫原及其制备方法与应用

<140>

<141>

<160>2

<170> Patent In3.1

<210> 1

<211> 16

<212>多肽

<400> 1

pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ser-Ser-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys

5

10

15

<210> 2

<211> 536

<212>蛋白质

<213>白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)

<400> 2

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser			
1	5	10	15
Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys			
21	25	30	35
Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys			
41	45	50	55
Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly			
61	65	70	75
Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala			
81	85	90	95
Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly			
101	105	110	115
Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro			
121	125	130	135
Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu			
141	145	150	155
Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr			
161	165	170	175
Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu			
181	185	190	195
Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser			
201	205	210	215
			220

Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
 221 225 230 235 240
 Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu
 241 245 250 255 260
 Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala
 261 265 270 275 280
 Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys
 281 285 290 295 300
 Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
 301 305 310 315 320
 Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met
 321 325 330 335 340
 Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn
 341 345 350 355 360
 Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala
 361 365 370 375 380
 Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn
 381 385 390 395 400
 Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys
 401 405 410 415 420
 Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly
 421 425 430 435 440
 Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met
 441 445 450 455 460
 Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val
 461 465 470 475 480
 Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile
 481 485 490 495 500
 His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp
 501 505 510 515 520
 His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 521 525 530 535

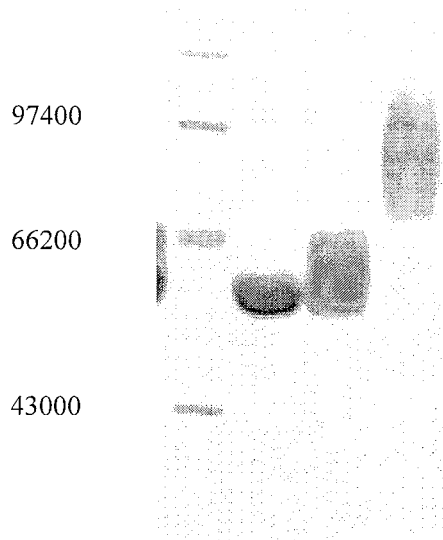


图1

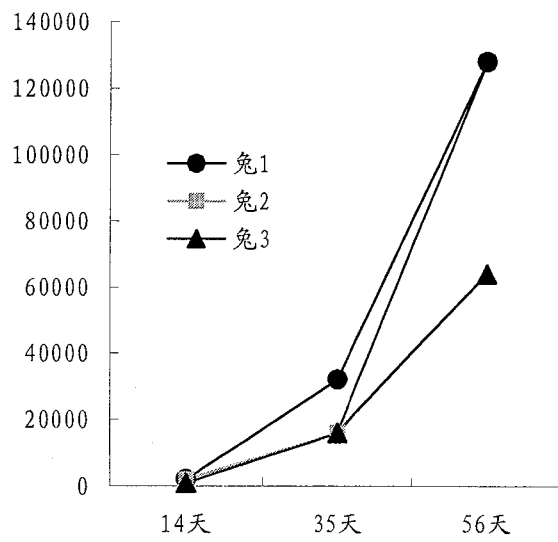


图2

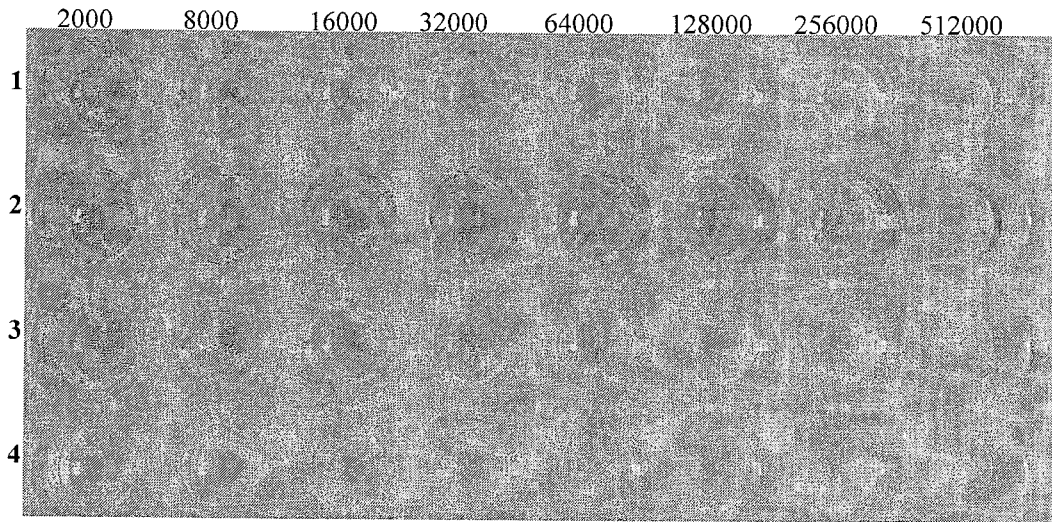


图 3