

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2006 年 7 月 13 日 (13.07.2006)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2006/072202 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/62 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/34 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C07K 14/52 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2005/002090

(22) 国际申请日: 2005 年 12 月 5 日 (05.12.2005)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200410081390.6
2004 年 12 月 3 日 (03.12.2004) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 四川大学
(SICHUAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国四川省成
都市磨子桥, Sichuan 610065 (CN)。

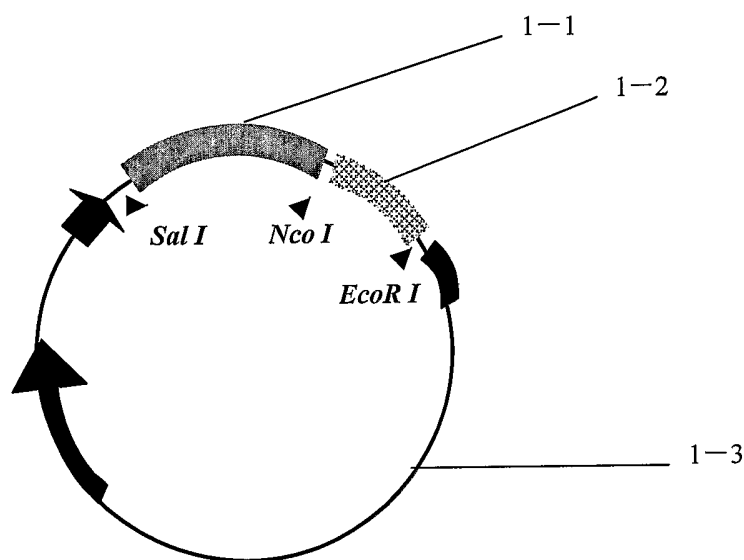
(71) 申请人及

(72) 发明人: 张林(ZHANG, Lin) [CN/CN]; 中国四川省成
都市磨子桥四川大学科技处, Sichuan 610065 (CN)。
贾怡(JIA, Yi) [CN/CN]; 中国四川省成都市四川大学
华西基础与法医学院, Sichuan 610041 (CN)。李虹
(LI, Hong) [CN/CN]; 中国四川省成都市四川大学
华西基础与法医学院, Sichuan 610041 (CN)。陈文捷
(CHEN, Wenjie) [CN/CN]; 中国四川省成都市四川
大学华西基础与法医学院, Sichuan 610041 (CN)。李
明远(LI, Mingyuan) [CN/CN]; 中国四川省成都市四
川大学华西基础与法医学院, Sichuan 610041 (CN)。

[见续页]

(54) Title: A RANTES-DT390 RECOMBINANT IMMUNOTOXIN PLASMID TARGETING ACTIVATED TH1 CELLS AND PRODUCTION METHOD AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 针对活化Th1细胞的重组免疫毒素Rantes-DT390的质粒及制备方法与应用



(57) Abstract: A recombinant immunotoxin plasmid targeting activated Th1 cells is constructed by gene recombination. A chemokine Rantes acts as a targeting molecule and an active fragment DT390 of diphtherotoxin functions as a toxin molecule in this plasmid. The method of producing the immunotoxin plasmid comprises the following steps: construction of a recombinant plasmid and preparation of an engineering bacterium transfected by the recombinant plasmid. The immunotoxin plasmid has specific targeting. It can induce specific immunity tolerance and thereby avoid non-selectively damage of all the T cells through targeting function of Rantes and specific attack on activated Th1 cells by DT390. It is especially suitable for

the prevention and treatment of autoimmune disease and rejection reaction to organ transplantation. It can be also applied in the treatment of tumors.

(57) 摘要: 一种针对活化Th1细胞的新型重组免疫毒素质粒, 以趋化因子Rantes为导向分子、白喉毒素活性片段DT390为毒素分子, 通过基因重组构建而成。该免疫毒素质粒的制备方法包括重组质粒的构建、重组质粒转染的工程菌的制备等步骤。该免疫毒素质粒具有严格的靶向性, 可以通过Rantes的导向作用, 以DT390特异性攻击活化的Th1细胞, 诱导特异性免疫耐受, 从而避免了无选择性地杀伤所有T细胞。特别适用于自身免疫性疾病和器官移植排斥反应的防治, 亦可应用于某些肿瘤的治疗。

WO 2006/072202 A1



(74) 代理人: 永新专利商标代理有限公司北京办事处 (NTD PATENT & TRADEMARK AGENCY LIMITED BEIJING OFFICE); 中国北京市金融大街27号 投资广场A座10层, Beijing 100032 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素 Rantes-DT390 的质粒及制备方法与应用

技术领域

本发明涉及免疫毒素领域,具体而言,本发明提供了一种特异攻击并杀伤活化的 Th1 细胞的新型重组免疫毒素质粒及其制备方法。

背景技术

免疫毒素 (Immunotoxin, IT) 是将生物毒素与导向载体 (抗体或细胞因子) 连接起来构成的杂合分子, 又称生物导弹或导向毒素。最早的免疫毒素 (即第一代免疫毒素) 是载体与毒素分子的化学偶联物, 这类免疫毒素免疫原性强、分子量大、渗透性差、在靶部位很难形成有效的浓度、稳定性及均一性较差, 毒副作用较强, 难以大规模生产, 从而限制了其应用。随着现代生命科学的不断发展, 近年来人们通过基因重组技术对免疫毒素进行了改进, 导向载体已由以前的单克隆抗体变成了基因工程抗体和一些配体等, 生物毒素的品种更加多样, 在不影响其毒性作用的同时减小了其分子量大小。这种新工艺产生的新型免疫毒素稳定性强、渗透性好、具有更好的导向特异性、且制备时简单易行、可短期内大量制备, 在很大程度上弥补了第一代免疫毒素稳定性差、半衰期短、免疫原性强等不足, 极大地推动了免疫毒素在相关领域的研究和应用。

有关免疫毒素在生物学中的应用, 主要集中于对某些恶性肿瘤及与免疫相关的人类疾病的导向治疗。在恶性肿瘤的研究中, 如血液系统肿瘤 (白血病、复发性淋巴瘤等)、黑色素瘤、小细胞肺癌、脑瘤等疾病, 利用免疫毒素治疗已取得了很大的进展, 有些已经进入临床 I、II、III 期试验。而在与免疫相关的人类疾病的导向治疗中, 免疫毒素的作用靶点主要是选择针对 T 细胞表面抗原或细胞因子受体, 如 CD3、CD4、IL-2 等。在接受这些免疫毒素的治疗后, 相应的自身免疫性疾病或 GvHD 病情虽有减退, 但毒副作用也较显著, 甚至使临床治疗被迫终止。产生毒副作用的主要原因之一是由于这类免疫毒素所选择的导向分子特异性欠佳, 往往导致杀伤许多其他无关细胞。

自身免疫性疾病 (Autoimmune Disease) 是一类免疫相关的疾病, 产生这类疾病的

主要原因是由于各种刺激因素导致免疫系统对自身抗原发起攻击，造成自身组织损伤和功能障碍。目前的治疗措施主要是采用各种非特异的免疫抑制剂，但往往使患者免疫系统受到普遍性抑制而导致感染、肿瘤的发生及骨髓抑制等，且不能有效地防止疾病的复发。这促使相关领域的研究者从免疫治疗的角度，寻求一种特异、安全、有效的治疗方法：如 MHC 阻断法、CD₄ 分子阻断法、TCR 阻断法、细胞因子治疗、T 细胞接种以及口服抗原诱导耐受等等，但这些方法或因特异性不高、疗效不稳定，或因技术难度大、难以克服的毒副作用等而不能顺利地过渡到临床（见：Waldor MK, et al. Science. 1985, 227: 415; Chen Y, et al. Nature. 1995, 376: 177; Weiner HL, Immunology Today. 1997, 18: 355; Hollday SD, et al. Environmental Health Perspectives. 108 Suppl 3:463-73, 2000 Jun; Palmisano GL, et al. Clinical & Experimental Immunology. 135 (2):259-66, 2004 Feb），因而自身免疫性疾病的治疗至今仍然是困扰临床的一大难题。

发明内容

通过提供一种新型的特异性攻击 Th1 细胞的重组免疫毒素、编码所述免疫毒素的多核苷酸以及携带所述多核苷酸的质粒，本发明克服了现有技术中存在的不足，为临床治疗自身免疫性疾病提供一种新方案，为重组免疫毒素的应用开辟一条新途径。

因此，本发明提供了一种分离的多核苷酸，其编码针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素，其中所述重组免疫毒素包含 Rantes 多肽和白喉毒素活性片段。

优选地，本发明的多核苷酸中的所述白喉毒素活性片段是 DT390 片段。在一个具体的实施方式中，本发明的多核苷酸包含 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。

本发明还提供了一种针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素质粒，其包含本发明的多核苷酸。

优选地，本发明的重组免疫毒素质粒是一种真核质粒，所述真核质粒例如是 SR α 或 pSecTag2。

本发明也提供了用于制备针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素质粒的方法，其特征在于依次包括以下步骤：

- (1) 通过 RT-PCR 反应扩增编码 Rantes 多肽的核苷酸序列；
- (2) 将上述扩增的编码 Rantes 多肽的核苷酸序列插入到含有编码白喉毒素活性片

段（例如 DT390 片段）的核苷酸序列的质粒载体中构建重组质粒，再将重组质粒转染至合适的宿主细胞（例如感受态细菌）中进行扩增，然后筛选出含有正确插入体的克隆；和

（3）任选地对所得重组质粒进行鉴定，例如利用限制性内切酶酶切图谱分析重组质粒，或进行 DNA 序列。

优选地，在本发明的用于制备针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素质粒的方法中，所述质粒载体为真核质粒载体，例如 SR α 或 pSecTag2。

此外，本发明还提供了一种针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素，其包含 Rantes 多肽和白喉毒素活性片段。

优选地，本发明的重组免疫毒素中的所述白喉毒素活性片段是 DT390 片段。

本发明还进一步涉及上述多核苷酸或重组免疫毒素质粒或重组免疫毒素在制备用于治疗或预防自身免疫性疾病、器官移植排斥反应和/或肿瘤的药物中的应用。

因此，本发明还提供了一种药物组合物，其包含本发明的上述多核苷酸或重组免疫毒素质粒或重组免疫毒素，以及药用可接受的载体或赋形剂。

以下结合附图和实施例进一步阐述本发明。

附图说明

图 1 是本发明所述针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素质粒（Rantes-DT390 质粒）的示意图，真核质粒载体为 SR α 。图中：1-1—DT390、1-2—Rantes、1-3—SR α 真核质粒。

图 2 是本发明所述重组免疫毒素质粒（Rantes-DT390 质粒）对活化 T 细胞的蛋白合成抑制试验结果。

图 3 是本发明所述重组免疫毒素质粒（Rantes-DT390 质粒）治疗组与对照组的临床评分图。图中：3-1—未治疗组、3-2—治疗组。

图 4 是流式细胞仪测定本发明所述重组免疫毒素质粒（Rantes-DT390 质粒）对活化 T、Th1、Th2 和 B 细胞的细胞毒实验结果图。

具体实施方式

除非另有说明，本申请中所使用的分子生物学技术和方法均参照《分子克隆操作指

南》。

随着基础免疫学的研究进展,人们认识到识别自身抗原的自身反应性 T 细胞,实际上是由 CD_4^+ Th1 细胞所承担的,而 CD_4^+ Th2 仅具有一定的调节作用(见: Lib lau RS, et al. Immunol. Today; 1995, 16:34; Costa GL, et al. J. Immunol. 2000, 164:3581)。本发明人由此想到,如果能利用高特异性的免疫毒素只将这些活化的自身反应性 Th1 细胞杀死,而不影响 Th2 细胞,则有可能弥补现有技术中的缺陷,从而治疗自身免疫性疾病。

Rantes 是近年发现的一种新型细胞因子,在免疫应答的过程中,活化的 T 细胞将表达多种受体,如细胞因子 IL-2、IL-12、IL-18 的受体以及多种化学趋化因子 CCR-5、CXCR-3 等的受体。这些 T 细胞的膜受体中,现已证实 Rantes 受体的表达仅限于活化的 Th1 细胞,而 Th2 细胞没有表达,并且这种膜受体的表达是稳定和持续的(见: Karlsson I, et al. Journal of Virology, 2004 Nov, 78(21): 11807-15; Emingil G, et al. Journal of Clinical Periodontology. 2004 Oct, 31 (10) :829-34)。因此, Rantes 受体不仅可以作为识别 Th1 细胞和 Th2 细胞的标志,也为相关的免疫治疗提供了一个理想的靶位。

本发明选用 Rantes 为导向分子,以白喉毒素活性片段为毒素分子,来构建本发明的特异性攻击 Th1 细胞的重组免疫毒素和编码所述重组免疫毒素的质粒。在本发明的一个实施方案中,所述白喉毒素活性片段为 DT390,且所构建的重组免疫毒素质粒为 Rantes-DT390 重组免疫毒素质粒。DT390 是细菌毒素的跨膜结构域和酶性结构域,去除了 DT 分子的细胞结合区,因此可进一步减少非特异性结合和降低不良反应。将所述重组免疫毒素质粒转染入体内,表达重组免疫毒素,可特异攻击并杀伤活化的 Th1 细胞,诱导自身免疫耐受,并克服了现有免疫毒素的特异性欠佳、需要提纯等不足之处,能够实现有效治疗自身免疫性疾病的目的。

在本发明的一个具体实施方案中,本发明的针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素质粒包含 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。此种质粒可通过将 Rantes cDNA 序列(来自 gene bank)和白喉毒素活性片段 DT390 cDNA 序列(来自 gene bank)连接并随后插入到合适的载体中而构建。构建载体的方法和转染宿主细胞的技术是本领域技术人员已知的,例如可参见《分子克隆操作指南》。此外,可通过本领域任何已知的方法测试本发明的免疫毒素和重组免疫毒素质粒的活性和效果。

典型地,本发明所述针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素质粒的制备方法包括以下步

骤:

1、通过 RT-PCR 反应, 获得编码 Rantes 多肽的多核苷酸;

2、将上述扩增的编码 Rantes 多肽的多核苷酸插入到含有编码 DT390 片段的多核苷酸的真核质粒中, 即构建成重组质粒, 再转染至感受态细菌中进行扩增, 然后筛选出含有正确插入体的克隆; 以及

3、限制性内切酶酶切图谱分析重组质粒, 并进行 DNA 序列分析, 以保证重组质粒中编码 Rantes 多肽的核苷酸序列的正确性; 以及

4、任选地, 通过蛋白合成抑制实验测定重组免疫毒素质粒的表达活性。

上述方法中, 构建重组质粒可选用的真核质粒载体为 SR α 或 pSecTag2, 但本领域人员已知其他合适的载体也可用于本发明。

本发明的免疫毒素和重组免疫毒素质粒适合用于治疗或预防自身免疫性疾病、器官移植排斥反应和/或肿瘤。由于选择细胞因子 Rantes 为导向分子, 而 Rantes 受体只表达在活化的 Th1 细胞表面, 在 Th2 细胞表面没有表达, 因而由 Rantes 导向的重组免疫毒素只针对 Th1 细胞, 从而使导向攻击更特异、更有效, 减少临床应用的毒副作用。在一个具体实施方式中, 本发明选用毒素分子的是白喉毒素活性片段 DT390, 其是细菌毒素的跨膜结构域和酶性结构域, 去除了 DT 分子的细胞结合区, 因此可进一步减少非特异性结合和降低不良反应。

因此, 本发明还提供了一种药物组合物, 其包含本发明的多核苷酸或重组免疫毒素质粒或重组免疫毒素, 以及药用可接受的载体或赋形剂。可采用任何适当的方式施用本发明的药物组合物。例如, 可通过质粒转染活体肌肉细胞的方法, 将免疫毒素 (Rantes-DT390) 质粒直接导入动物肌肉, 使免疫毒素 (Rantes-DT390) 在骨骼肌内高效表达而起到治疗作用。

本发明的免疫毒素可通过基因重组技术来制备, 这样可避免原来化学偶联免疫毒素复杂的制备工艺和难以标化的缺点, 使其更易产业化。本发明的免疫毒素质粒也可直接转染细胞而表达重组免疫毒素, 这样可无需进一步提纯免疫毒素蛋白质。

本发明的免疫毒素 Rantes-DT390 可用来制备用于治疗/和或预防自身免疫性疾病的药物, 其还可用于移植排斥反应及某些肿瘤的治疗和/或预防。

以下实施例目的在举例说明本发明, 而无意于对本发明做出任何限制。

实施例 1：重组免疫毒素真核质粒的制备

载体选用含有 DT390 的 SR α 真核质粒（由美国 Wisconsin 大学 PhD. Hu Huaizhong 提供，promega 公司）（Takebe Y, et al. Mol Cell Biol; 1988,8(1): 466），具体步骤如下：

1、小鼠 Rantes 编码核酸的预处理（以下试剂均购于 promega 公司）

（1）用 Trizol 试剂提取小鼠肝总 RNA，具体方法如下：取小鼠肝组织 100mg，加 1ml Trizol，匀浆（要彻底，后转至 EP 管），如果组织匀浆量>100mg 时分装 1ml/每 EP 管。颠倒混匀 10 下，室温放置 5 分钟。加氯仿 1/5 体积（0.2ml）（必须按总体积的 1/5）。颠倒混匀 10 下，室温放置 5 分钟。4℃，离心 12000g，15 分钟。将上层水相（约 400 μ l）转移至另一 1.5mlEP 管中，加等体积异丙醇（约 400 μ l），混匀室温放置 10 分钟。4℃，离心 12000g，10 分钟，弃上清。加冰预冷的 75%乙醇（用 DEPC 水配）1ml。4℃离心 7500g，5 分钟，弃上清，空气干燥 5-10 分钟（不能完全干燥）。干燥后的产物溶于 DEPC 水中至 20 μ l（10 μ l-20 μ l）（可在 55-60℃水中，<10 分钟助溶）。

（2）逆转录反应

反应体系如下：采用 10 μ l 扩增体系，其中包括 MgCl₂ (25mM) 3 μ l，5 $\times$ 逆转录缓冲液 2 μ l，dNTP 混和液(10mM) 1 μ l，RNA 酶抑制剂 0.25 μ l，oligo(dT)15 (0.5 μ g/ μ l) 1 μ l，M-MLV 逆转录酶 1 μ l，总 RNA 1 μ l，去 RNA 酶的 ddH₂O 2.55 μ l。反应条件如下：30℃ 10min，42℃ 30min，99℃ 5min，5℃ 5min。反应后的产物置于 4℃保存备用。

（3）cDNA 的 PCR 反应（见表 1）

表 1：反应体系：

试剂	浓度	体积（ μ l）
Taq 缓冲液	10 $\times$	2
MgCl ₂	25mM	1.2
dNTP	10mM	0.2
上游引物	12.5pmol/ μ l	0.5
下游引物	12.5pmol/ μ l	0.5
cDNA 模板		2
ddH ₂ O		13.3
Taq 酶	2.5U/ μ l	0.3

PCR 扩增的引物:

上游: 5' -CAT GCC ATG GGC CTC ACC ATA TGG CTC GGA C-3' (引物 1, SEQ ID NO:2)

下游: 5' -CCG GAA TTC CTA GCT CAT CTC CAA ATA GTT-3' (引物 2, SEQ ID NO:3)

PCR 反应条件:

94°C 预变性 3min, 94°C 变性 35sec、58°C 复性 30sec、72°C 延伸 55sec, 34 个循环后 72°C 延伸 10min。

(4) 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2、重组免疫毒素 SR α 真核表达质粒的预处理

(1) 用限制性内切 NcoI 及 EcoRI 双酶切 SR α 真核质粒, 反应体积 20 μ l (其中含有 NcoI 酶 1 μ l、EcoRI 酶 1 μ l、10 $\times$ NEbuffer₂ 2 μ l、SR α 真核质粒 10 μ l、ddH₂O 6 μ l), 37°C 过夜 (内切酶均购自 New England 公司);

(2) 反应后用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统的紫外灯照射下, 按胶回收试剂盒 (购自 Omiga 公司) 的方法回收大片段。

3、Rantes 核苷酸序列与 SR α 真核表达质粒的连接及转化

(1) 将上述步骤中所获得的载体片段及插入体粗略定量后, 按插入体: 载体分子摩尔数比=3~10:1 的连接反应原则进行连接实验;

(2) 反应体系如表 2 所示, 整个反应过程在 PCR 仪中 16°C 过夜。连接反应时应分别设立无插入体和无载体的对照管。使上述扩增的编码 Rantes 多肽的多核苷酸插入到含有编码 DT390 片段的多核苷酸的 SR α 真核质粒中, 编码 Rantes 多肽的多核苷酸与编码 DT390 片段的多核苷酸通过 NcoI 酶切位点连接, 与 SR α 真核质粒通过 EcoR I 酶切位点连接, 构建成重组质粒 (结果见图 1)。

表 2: 反应体系

试剂	体积 (μl)
ddH ₂ O	11
10×缓冲液	2
Rantes	2
SR α	4
T4DNA 连接酶	1
总体积	20

(3) 将连接产物分别转化大肠杆菌 JM109 的感受态细胞。连接产物的转化方法按《分子克隆操作指南》进行, 主要步骤如下:

A、取连接产物 4 μl 加入感受态细胞 30 μl 置于 1.5ml Ep 管中, 阴性对照为感受态细胞 30 μl 置于 1.5ml Ep 管中;

B、置于冰上 30min, 每隔几分钟轻弹;

C、42°C 水浴 30 Sec;

D、冰上放置 3 min;

E、加 0.3ml SOC 培养基 (10ml SOC+50 μl 2mol/L MgCl₂), 置于冰上;

F、37°C, 250rpm 振摇 1 小时;

G、取 50 μl 转化细胞+5 μl 0.1g/ml Amp, 均匀涂布于含 Amp 的平板, 置 37°C 孵箱培养过夜。

4、限制性内切酶酶切图谱分析重组质粒, 并进行 DNA 序列分析, 以保证重组质粒中编码 Rantes 多肽的核苷酸序列的正确性。测序结果表明, 重组质粒中含有序列表中 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。

5、重组免疫毒素 (Rantes-DT390) 真核质粒在 NIH3T3 细胞 (invitrogen) 中的表达

(1) 在转染前 24h, 将 NIH3T3 细胞 (购自 invitrogen 公司) 接种于六孔培养板中, 每孔细胞约 1×10^6 , 置于 37°C 5% CO₂ 孵箱培养;

(2) 待细胞长满至约 80-90% 融合后, 分别以 SR α 空质粒及 Rantes-DT390 SR α 质粒转染真核细胞 NIH-3T3, 具体操作按 Qiagen 公司脂质体转染试剂盒 (Qiagen) 中的说明书进行;

(3) 质粒转染后 72h, 收集细胞。将变性后的蛋白质 marker 和转染后细胞裂解上清液在 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶中进行 SDS-PAGE 电泳;

(4) 电泳完备后, 将凝胶上的蛋白质电转移到硝酸纤维素滤膜上, 电转移后的膜用封闭液(约 10% 的 PBS 脱脂奶粉)封闭处理 2h, 再加入 Rantes 多克隆抗体(Santa Cruz)应用液作用 1h, 充分洗涤后再加入酶标二抗兔抗羊 IgG, 作用 1h。最后加底物显色。

实施例 2: 体外重组免疫毒素 Rantes-DT390 的生物活性测定

1、蛋白合成抑制试验

(1) 在无菌操作台上取小鼠脾脏, 获得脾细胞悬液, 接种于细胞培养瓶(约 10×10^6 个细胞/ml), 加入 conA (Sigma) (10ug/ml) 混合培养;

(2) 培养 3 天后, 收获细胞, 计数并调整细胞浓度为 1×10^6 个细胞/ml;

(3) 转入 96 孔细胞培养板(培养液为不含亮氨酸的 DMEM 培养基), 分别将上述转染上清按原液 1/2、1/4、1/8、1/20、1/50 稀释的浓度加入, 50 μ l/孔, 各浓度设立三复孔;

(4) 继续培养 24h, 加入 3H 亮氨酸 10 μ l (5 μ ci/ml), 2h 后收集细胞, 液闪测定并计算蛋白合成抑制率(有关结果如图 2 所示)。由此表明, 重组免疫毒素 Rantes-DT390 对活化 T 细胞具有较强的细胞抑制效应。

2、流式细胞仪测定其细胞毒性

(1) 在无菌操作台上取小鼠脾脏, 用 RPMI1640 培养基制成脾细胞悬液, 与 conA (10ug/ml) 混合培养;

(2) 培养 3 天后, 加入上述转染上清按原液 1/2、1/4、1/8、1/20、1/50 稀释的浓度, 50 μ l/孔, 各浓度设立三复孔;

(3) 继续培养 24h, 收集细胞, 流式细胞仪(Epics Elite ESP, Beckman Coulter)测定免疫毒素 Rantes-DT390 分别对活化 T、Th1、Th2 细胞和 B 细胞的细胞毒性(CD4⁺: T 细胞膜表面标记; IFN- γ : Th1 细胞内标记; IL-4: Th2 细胞内标记; CD19⁺: B 细胞膜表面标记);

(4) 流式细胞仪测定结果显示, T 细胞及 Th1 细胞数目下降 40%-60%, 而对 Th2 及 B 细胞无此影响(如图 4 所示)。由此表明重组免疫毒素 Rantes-DT390 具有较好的靶

向特异性。

实施例 3：重组免疫毒素 Rantes-DT390 真核质粒对自身免疫性疾病动物模型 EAE (Experimental Allergic Encephalomyelitis) 的初步治疗效果

1. EAE 动物模型的建立：根据常规方法用 C57BL/6 小鼠（四川大学华西试验动物中心）建立 EAE 模型。

(1) 用 C57BL/6 小鼠建立 EAE 动物模型，将自提的 MBP 粗提液与福氏完全佐剂（FCA，内含结核分枝杆菌 5mg/ml）等体积混和，使用 3ml 注射器反复推拉成为油包水的乳剂，采用腹腔注射的方法。

(2) 免疫剂量：每只小鼠腹腔注射 MBP:FCA (1:1) 混和液 0.4ml，百日咳杆菌菌液（成都市生物制品研究所）：PBS (1:50) 混和液 0.2ml（内含百日咳杆菌 $0.6-1.8 \times 10^6$ 个）。

(3) 对照组每只小鼠腹腔注射百日咳杆菌菌液与 PBS 混和液 0.2ml（内含百日咳杆菌 $0.6-1.8 \times 10^6$ 个）。

(4) 免疫时间：第 1 天、第 7 天免疫两次。

2. 重组质粒对 EAE 模型的初步治疗

(1) 用 Rantes-DT390 重组质粒对 EAE 动物模型进行治疗试验

治疗时间：在 MBP 免疫小鼠后第 1 天、第 3 天分别治疗 2 次；

治疗方法：使用阳离子脂质体包被的 Rantes-DT390 重组质粒，采用试验小鼠大腿肌肉注射的方式；

治疗剂量：50 μ g/只。

(2) 观察治疗后治疗组及未治疗组的症状表现，根据临床评分标准进行打分（Kono 分级法），具体为：0 分：没有任何临床症状；1 分：动物尾部无力；2 分：动物尾部无力 + 前肢或后肢中等无力；3 分：前肢或后肢严重无力，人为翻身后不能恢复；4 分：肢体麻痹，人为翻身后不能恢复；5 分：濒死状态（有关结果如图 3 所示）。

权 利 要 求 书

- 1、一种分离的多核苷酸，其编码针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素，其中所述重组免疫毒素包含 Rantes 多肽和白喉毒素活性片段。
- 2、权利要求 1 的多核苷酸，其中所述白喉毒素活性片段是 DT390 片段。
- 3、权利要求 1 的多核苷酸，其包含 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。
- 4、一种针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素质粒，其包含权利要求 1-3 中任一项的多核苷酸。
- 5、权利要求 4 的重组免疫毒素质粒，其是一种真核质粒。
- 6、权利要求 5 的重组免疫毒素质粒，其中所述真核质粒是 SR α 或 pSecTag2。
- 7、权利要求 4-6 中任一项所述的针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素质粒的制备方法，其特征在于依次包括以下步骤：
 - (1) 通过 RT-PCR 反应扩增编码 Rantes 多肽的核苷酸序列；
 - (2) 将上述扩增的编码 Rantes 多肽的核苷酸序列插入到含有编码 DT390 片段的核苷酸序列的质粒载体中构建重组质粒，再将重组质粒转染至感受态细菌中进行扩增，然后筛选出含有正确插入体的克隆；和
 - (3) 任选地利用限制性内切酶酶切图谱分析重组质粒，或进行 DNA 序列。
- 8、权利要求 7 的方法，其中所述质粒载体为真核质粒载体。
- 9、权利要求 8 的方法，其中所述真核质粒载体为 SR α 或 pSecTag2。
- 10、一种针对活化 Th1 细胞的重组免疫毒素，其包含 Rantes 多肽和白喉毒素活性片段。
- 11、权利要求 10 的重组免疫毒素，其中所述白喉毒素活性片段是 DT390 片段。
- 12、权利要求 1-3 中任一项的多核苷酸或者权利要求 4-6 中任一项的重组免疫毒素质粒或者权利要求 10 或 11 的重组免疫毒素在制备用于治疗或预防自身免疫性疾病、器官移植排斥反应和/或肿瘤的药物中的应用。

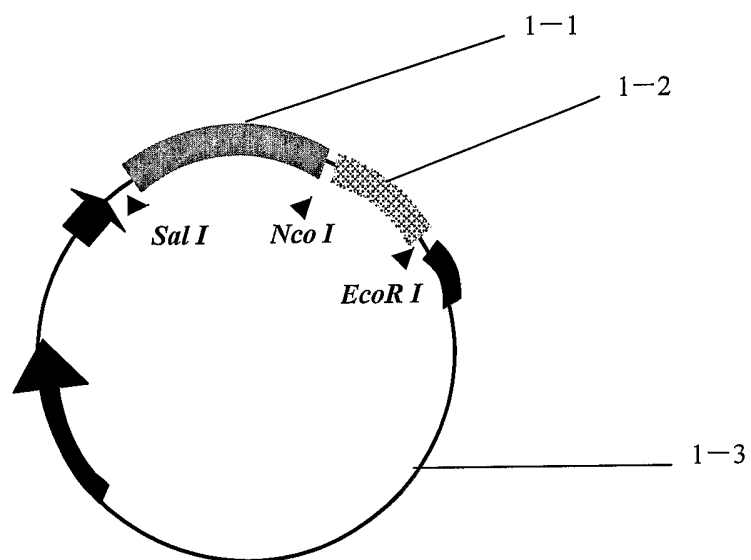


图 1

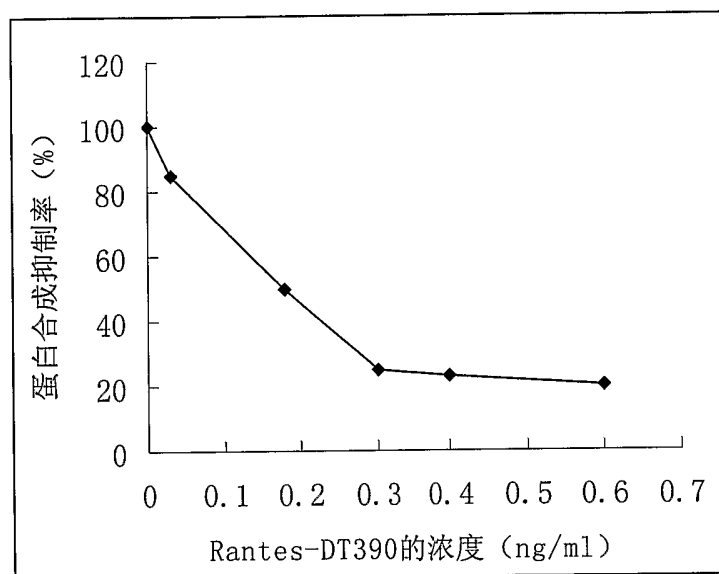


图 2

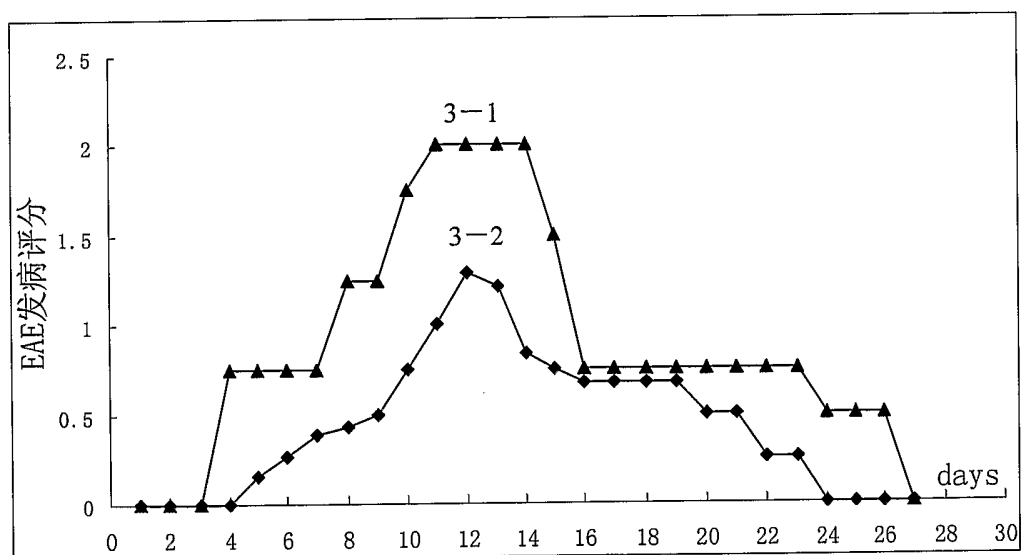


图 3

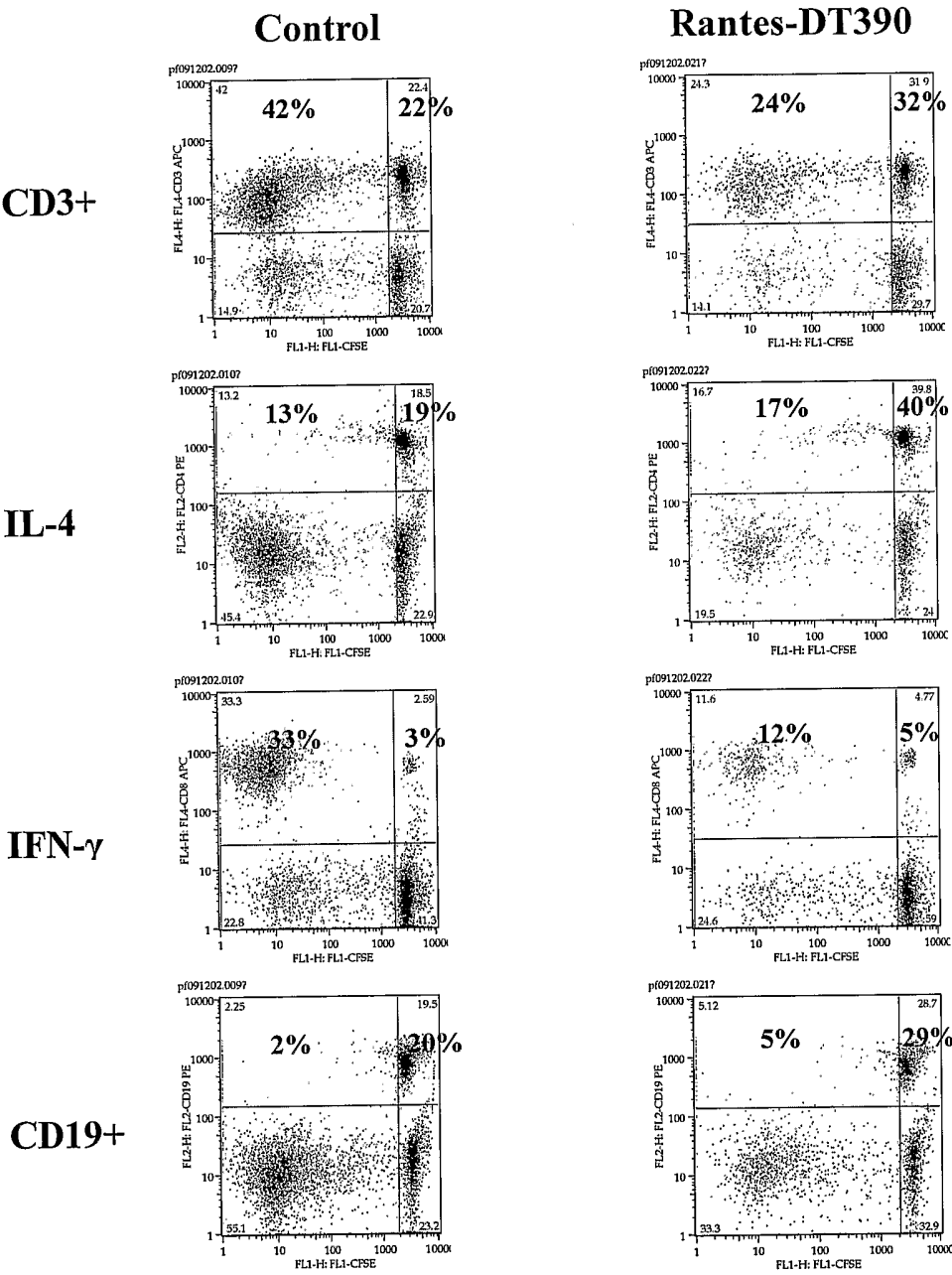


图 4

序列表

<110> 四川大学

<120> 针对活化Th1细胞的重组免疫毒素Rantes-DT390的质粒及制备方法与应用

<130> P2005377C

<150> CN 200410081390.6

<151> 2004-12-03

<160> 3

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1386

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Rantes-DT390

<400> 1

```
ggcgctgatg atgttggtga ttcttctaaa tcttttgtga tggaaaactt tgctagctac      60
cacgggacta aacctgggta tgtagattcc attcaaaaag gtatacaaaa gccaaaatct      120
ggtacacaag gaaattatga cgatgattgg aaagggtttt atagtaccga caataaatac      180
gacgctgcgg gatactctgt agataatgaa aaccgcctct ctggaaaagc tggaggcgtg      240
gtcaaagtga cgtatccagg actgacgaag gttctcgac taaaagtga taatgccgaa      300
actattaaga aagagttagg tttaagtctc actgaaccgt tgatggagca agtcggaacg      360
gaagagttta tcaaaagggt cggtgatggg gcttcgctg tagtgctcag ccttcccttc      420
gctgagggga gttctagcgt tgaatatatt aataactggg aacaggcgaa agcgttaagc      480
gtagaacttg agattaatth tgaaaccctg ggaaaacgtg gccaagatgc gatgtatgag      540
tatatggctc aagcctgtgc aggaaatcgt gtcaggcgat cagtaggtag ctcatgtgca      600
tgcataaatc ttgattggga tgtcataagg gataaaacta agacaaagat agagtctttg      660
aaagagcatg gccctatcaa aaataaaatg agcgaaagtc cggccaaaac agtatctgag      720
gaaaaagcta aacaatacct agaagaatth catcaaacgg cattagagca tcctgaattg      780
tcagaactta aaaccgttac tgggaccaat cctgtattcg ctggggctaa ctatgcggcg      840
tgggcagtaa acgttgcgca agttatcgat agcgaaacag ctgataatth ggaaaagaca      900
actgctgctc ttctgatact tcctgggtatc ggtagcgtaa tgggcattgc agacgggtgcc      960
gttcaccaca atacagaaga gatagtggca caatcaatag ctttatcgtc tttaatgggt      1020
gctcaagcta ttccattggg aggagagcta gttgatattg gtttcgctgc atataatth      1080
gtagagagta ttatcaatth atttcaagta gttcataatt cgtataatcg tcccgcgtat      1140
tctccggggc ataaaacgca accatttctt ccatggcgga gtggtatacc gagcctgacc      1200
```

actccctgct gctttgccta cctctccctc gcgctgcctc gtgcccacgt caaggagtat 1260
ttctacacca gcagcaagtg ctccaatctt gcagtcgtgt ttgtcactcg aaggaaccgc 1320
caagtgtgtg ccaacccaga gaagaagtgg gttcaagaat acatcaacta tttggagatg 1380
agctag 1386

<210> 2
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer 1

<400> 2 31
catgccatgg gcctcacat atggctcgga c

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer 2

<400> 3 30
ccggaattcc tagctcatct ccaaatagtt

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2005/002090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁸: C12N A61K C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI EPODOC PAJ CNPAT CA BA MEDLINE PUBMED CNKI(RANTES diphtheria toxin dt diphtherotoxin toxin immunotoxin chemokine cytokine autoimmune repulsion tumor cancer etc.)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US2004033209A1 19.FEB.2004(19.02.2004) see claims 1,5,23,35; page 1, left column, paragraph 4-page 3, right column, last paragraph, page 6, left column, last paragraph-page 11, left column, paragraph 3; abstract	1-12
X	US2004132657A1 08.JUL.2004(08.07.2004) see claims 1,5,18,33,36,45,48; page 1, left column, paragraph 5-page 4, right column, paragraph 1, page 7, left column, paragraph 1 -page 12, left column, paragraph 1; abstract	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
03.MAR.2006(03.03.2006)

Date of mailing of the international search report

16 MAR 2006 (16.03.2006)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

DING Huiping

Telephone No. (86-10)62085300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2005/002090

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1477129A 25.FEB.2004 (25.02.2004) see claims; page 4, paragraph 5-page 7 Last paragraph; abstract	1-12
A	VACCINE, No.21, 2003, Yu-Kyong Oh et al,"Enhanced mucosal systemic immune responses to a vaginal vaccine coadministered with RANTES-expressing plasmid DNA using in situ-gelling mucoadhesive delivery system", pages 1980-1988	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2005/002090

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US2004033209A1	2004.02.19	US2005136033 A9	2005.06.23
US2004132657A1	2004.07.08	NONE	
CN1477129A	2004.02.25	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2005/002090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G12N 15/62 (2006. 01) i
G12N 15/63 (2006. 01) i
G12N 15/64 (2006. 01) i
C07K 19/00 (2006. 01) i
A61K 39/00 (2006. 01) i
A61P 35/00 (2006. 01) i
A61P 37/00 (2006. 01) i
A61P 37/06 (2006. 01) i
C07K 14/34 (2006. 01) n
C07K 14/52 (2006. 01) n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2005/002090

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC⁸: C12N A61K C07K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI EPODOC PAJ CNPAT CA BA MEDLINE PUBMED CNKI(RANTES 白喉毒素 趋化因子 细胞因子 免疫毒素 毒素 自身免疫 排斥 肿瘤 癌 等 diphtheria toxin dt diphtherotoxin toxin immunotoxin chemokine cytokine autoimmune repulsion tumor cancer etc.)

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US2004033209A1 19.2 月 2004(19.02.2004) 见权利要求 1、5、23、35; 说明书第 1 页左栏第 4 段—第 3 页右栏最后一段、第 6 页左栏最后一段—第 11 页左栏第 3 段; 摘要	1-12
X	US2004132657A1 08.7 月 2004(08.07.2004) 见权利要求 1、5、18、33、36、45、48; 说明书第 1 页左栏第 5 段—第 4 页右栏第 1 段; 第 7 页左栏第 1 段—第 12 页左栏第 1 段; 摘要	1-12
A	CN1477129A 25.2 月 2004 (25.02.2004) 见权利要求、说明书第 4 页第 5 段-第 7 页最后一段; 摘要	1-12
A	VACCINE, 第 21 期, 2003 年出版, Yu-Kyong Oh 等, “对使用原位凝胶粘膜粘附递送系统, 用表达 RANTES 的质粒 DNA 共同给药的阴道疫苗的增强的粘膜和全身免疫反应”, 第 1980-1988 页	1-12

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

03.3 月 2006(03.03.2006)

国际检索报告邮寄日期

16. 3 月 2006 (16.03.2006)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

电话号码: (86-10)62085300



国际申请号
PCT/CN2005/002090

PCT/ISA/210 表(同族专利附件)(2005 年 4 月)

A. 主题的分类

C12N 15/62 (2006. 01) i
C12N 15/63 (2006. 01) i
C12N 15/64 (2006. 01) i
C07K 19/00 (2006. 01) i
A61K 39/00 (2006. 01) i
A61P 35/00 (2006. 01) i
A61P 37/00 (2006. 01) i
A61P 37/06 (2006. 01) i
C07K 14/34 (2006. 01) n
C07K 14/52 (2006. 01) n