



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102755633 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201110204191. X

(22) 申请日 2011. 07. 20

(66) 本国优先权数据

201110109529. 3 2011. 04. 28 CN

(73) 专利权人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路 5 号

(72) 发明人 陈英玉 马大龙 肖娟 宋泉声

张颖妹 许兰俊 许冬

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 9/00(2006. 01)

A61P 19/02(2006. 01)

A61P 21/04(2006. 01)

A61P 25/00(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

A61P 43/00(2006. 01)

(56) 对比文件

赖泽中等. TFAR19 抗体水平在类风湿性关节炎检测中的应用.《右江民族医学院学报》. 2005, (第 3 期), 第 292-294 页.

王建华等. 细胞凋亡相关基因 TFAR19 研究进展.《医学综述》. 2003, 第 9 卷 (第 12 期), 第 710 页最后一段.

赵杰等. 程序性死亡因子 5 在 Graves 病和桥本甲状腺炎中表达的初步研究.《中国煤炭工业医学杂志》. 2009, 第 12 卷 (第 1 期), 第 4-6 页.

张会爱. 自身免疫性肝病 TGF- β 1 和 IL-17 的表达及意义.《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2009, 第 1-2 页及第 22-25 页.

Huang X 等. Protection against autoimmunity in nonlymphopenic hosts by CD4+CD25+ regulatory T cells is antigen-specific and requires IL-10 and TGF- β .《Journal of Immunology》. 2005, 第 175 卷 (第 7 期), 全文.

王建华等. 细胞凋亡相关基因 TFAR19 研究进展.《医学综述》. 2003, 第 9 卷 (第 12 期), 第 710 页最后一段.

侯娟. Th17/Treg 失衡在 EAE 小鼠模型免疫学发病机制中的作用.《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2010, 第 8-10 页, 第 31-37 页, 第 43-49 页.

焦国慧等. Th17 细胞的分化调节.《中国免疫学杂志》. 2009, (第 1 期), 第 89-93 页.

审查员 童欣

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 8 页

(54) 发明名称

人重组蛋白 PDCD5 在治疗自身免疫病中的应用

炎、桥本氏病、Grave's 病、重症肌无力等具有广阔的前景。

(57) 摘要

本发明提供一种人重组蛋白 PDCD5 在治疗自身免疫病中的应用。人重组蛋白 PDCD5 能够诱导 CD4+CD25+Foxp3+ 调节性 T 细胞分化、抑制 Th17 细胞的分化、抑制炎症细胞因子 IL-17A 和 TNF- α 的产生, 具有免疫抑制作用。因此人重组蛋白 PDCD5 在诱导自身免疫抑制, 应用于治疗自身免疫性疾病如多发性硬化症和 / 或其他脱髓鞘疾病、迟发型超敏反应、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、胰岛素依赖性的糖尿病、自身免疫性心肌

1. 人重组 PDCD5 蛋白在制备预防和治疗多发性硬化症的药物中的应用。
2. 人重组 PDCD5 蛋白在制备预防和治疗类风湿关节炎的药物中的应用。

人重组蛋白 PDCD5 在治疗自身免疫病中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制品以及免疫学领域,尤其涉及人重组蛋白 PDCD5 在诱导 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 细胞分化、抑制 Th17 细胞的分化,抑制炎症细胞因子 IL-17A 和 TNF- α 的产生,预防和 / 或治疗自身免疫病中的应用。

背景技术

[0002] PDCD5(程序性细胞死亡分子 5, programmed cell death 5), 以前被称为 TFAR19(TF-1 细胞凋亡相关基因 19, TF-1 cell apoptosis-related gene 19), 是一种新的程序性细胞死亡调控基因(中国专利 98101869.6; Biochem Biophys Res Comm, 1999, 254: 203-210)。该基因进化保守, 表达广泛, 其编码的 PDCD5 蛋白由 125 个氨基酸组成。前期的功能研究证明 PDCD5 在多种肿瘤组织中表达下调, 人重组蛋白 PDCD5 可以利用窖蛋白(caveolae)/ 脂筏介导的胞吞作用进入细胞(J. Biol. Chem. 2006, 281: 24803-24817), 加入外源性人重组 PDCD5 蛋白, 细胞内吞后还可到达细胞核。进入细胞的重组人 PDCD5 能够增强多种肿瘤细胞对多种化疗药的敏感性, 促进化疗药引起的肿瘤细胞的死亡(Chinese Science Bulletin, 2009, 54(21): 3981-3989; Biochem Biophys Res Commun, 2010, 96(2): 224-230; 中国实验血液学杂志, 2010; 18(2): 277-281; Apoptosis, 2010, 15: 805-813), 是一种潜在的新的抑癌基因, 其效应机制是通过结合组蛋白乙酰转移酶 Tip60(Tat Interactive Protein 60kD, Tip60) 发挥促进肿瘤细胞凋亡的作用(Neoplasia, 2009, 10(4): 345-354)。

[0003] Tip60 是进化上保守的组蛋白乙酰化转移酶, 其在转录调控、DNA 损伤修复、细胞周期阻滞和凋亡等过程中发挥重要作用。最近的研究发现 Tip60 能够与 FOXP3 相互作用, 促进 FOXP3 的乙酰化, 从而介导 FOXP3 的转录抑制活性(Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(11): 4571-4576)。Foxp3 分子是赋予调节 T 细胞细胞免疫抑制功能的主要分子, 也是其最具特异性的标志分子。

[0004] FOXP3⁺ 调节性 T 细胞(FOXP3⁺Tregs) 属于 T 淋巴细胞中表达 CD4、CD25 及转录因子 FOXP3 的一类 T 细胞亚型, 其正常功能对于人体免疫稳态的动态调节必不可少。调节性 T 细胞的发育及功能失调, 与多种重大免疫相关性疾病, 包括自身免疫性疾病、炎症反应、急性及慢性传染性疾病、肿瘤免疫耐受、移植排斥以及过敏性疾病的生理病变进程密切相关(Cell, 2008, 133(5): 775-87, Cell, 2010, 140(6): 845-858)。FOXP3⁺Tregs 主要可分为两类: 自然性 FOXP3⁺Treg(natural Treg, nTreg) 和诱导性 FOXP3⁺Treg(induced Treg, iTreg)。nTreg 免疫调节功能的发挥与 Foxp3 分子的持续表达密切相关。这些胸腺产生的 nTreg 细胞释放到外周后能够保持 Foxp3 分子的稳定表达, 在特异性抗原的刺激下, 此群细胞被激活, 从而发挥免疫抑制作用。iTreg 稳定发挥免疫抑制作用也需要维持 Foxp3 分子的稳定表达。Treg 细胞抑制免疫反应的调节作用的机制包括分泌细胞因子(如 IL-10, TGF- β , IL-35 等) 和细胞接触抑制。

[0005] 多发性硬化(Multiple Sclerosis, MS) 是一种以血脑屏障遭破坏, 伴有炎症、髓鞘

损害为特征的中枢神经系统慢性自身免疫性疾病。好发于青壮年,发病年龄多在 20 ~ 40 岁,女性多见,具有高致残率、高复发性的特点,部分患者病情呈进行性加重,甚至死亡,对社会和家庭造成严重的影响。数据显示,在西方一些国家,该病患病率高达十万分之一到三百;而在我国,据不完全统计,该病患病率也已达约十万分之五,并呈逐年上升趋势。MS 的病理学改变由于自身反应性效应 CD4⁺T 细胞透过血-脑屏障,在中枢神经系统中浸润,诱发组织损伤。自身反应性效应 T 细胞 (Th1 和 Th17) 既存在于 MS 患者血液中,也存在于健康人群的血液中。调节 T 细胞 (Regulatory T cell, Treg) 在控制自身抗原反应性 T 细胞以及介导外周耐受过程中起着非常关键的作用。Treg 与 MS 的免疫病理学改变相关,成为治疗 MS 潜在的靶标。

[0006] 实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 是发生在动物中枢神经系统内,由 CD4⁺T 淋巴细胞所介导的自身免疫性疾病,是目前被公认为人类多发性硬化症 (MS) 的理想动物模型, EAE 与 MS 在临床、生化、免疫及病理等方面具有相同的特征,在研究 MS 的发病机制、治疗和预防复发中具有重要意义。

[0007] 类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 是一种慢性反复发作的系统性的自身免疫性疾病。该病在世界范围内普遍存在,其病理机制目前还不清楚,许多研究已经表明淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、滑膜细胞等多种炎症细胞介导的异常细胞免疫、体液免疫,导致关节局部和全身的免疫功能紊乱,在 RA 的病理中起着重要作用。为了进一步探讨 RA 的病因、病理、免疫学、临床等方面的机制,以便寻找更有效的治疗 RA 的方案,国内外学者进行了大量的动物实验,并建立了一些比较成熟的整体动物病理模型,目前应用较广泛的且较成熟的整体动物实验模型主要有 II 型胶原诱导的关节炎 (Type II collagen induced arthritis, CIA) 模型。这些动物模型在临床表现、病理学、免疫学改变和病理机制等方面与人 RA 有许多相似特征,目前国际上广泛用于 RA 发病机制的研究以及创新药物的研发。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种人重组 PDCD5 蛋白在促进 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞分化,免疫抑制中的应用。

[0009] 上述所说的人重组 PDCD5 蛋白具有增强 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞抑制效应的作用,可在制备增强 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞抑制效应的药物中应用。

[0010] 上述所说的人重组 PDCD5 蛋白具有促进抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- β 产生的作用,可在制备促进抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- β 产生的药物中应用。

[0011] 上述所说的人重组 PDCD5 蛋白具有抑制炎症性 Th17 细胞分化的作用,可在制备抑制炎症性 Th17 细胞分化的药物中应用。

[0012] 上述所说的人重组 PDCD5 蛋白具有抑制炎症性细胞因子 IL-17、IFN- γ 和 TNF- α 产生的作用,可在制备抑制炎症性细胞因子 IL-17、IFN- γ 和 TNF- α 产生的药物中应用。

[0013] 上述所说的人重组 PDCD5 蛋白具有预防和治疗多发性硬化症和/或其他脱髓鞘疾病的药物中的应用。

[0014] 上述所说的人重组 PDCD5 蛋白具有预防和治疗类风湿性关节炎的药物中的应用。

[0015] 上述所说的人重组 PDCD5 蛋白在制备预防和治疗自身免疫病的药物中的应用。

[0016] 人重组 PDCD5 蛋白可用于治疗 Foxp3⁺ 调节性 T 细胞失调介导的自身免疫疾病 EAE, 人重组 PDCD5 蛋白在预防和治疗上都是有效的。因此人重组 PDCD5 蛋白可用于治疗的 Foxp3⁺ 调节性 T 细胞介导的自身免疫病的实例包括多发性硬化症和 / 或其他脱髓鞘疾病、迟发型超敏反应、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、胰岛素依赖性的糖尿病、自身免疫性心肌炎、桥本氏病、Grave's 病、重症肌无力等。

[0017] 发明人经过研究表明, 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG₃₅₋₅₅) 成功诱导了小鼠 EAE 模型, 腹腔注射人重组蛋白 PDCD5 能够延缓 EAE 模型小鼠的发病, 减轻病情; 组织病理学分析发现, 人重组蛋白 PDCD5 处理能够减少炎性细胞在中枢神经系统的浸润, 减少脊髓的脱髓鞘病变; 进一步研究显示人重组蛋白 PDCD5 在小鼠体内能够上调抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- β 的产生, 增加 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的数量, 减少 Th17 的数量, 降低炎症细胞因子 IL-17、IFN- γ 和 TNF- α 的产生。体外实验的结果证明, 人重组蛋白 PDCD5 处理的小鼠淋巴细胞和脾细胞对自身抗原 MOG₃₅₋₅₅ 的增殖能力显著低于对照小鼠; 人重组蛋白 PDCD5 体外处理 naive 小鼠的淋巴结细胞, 能够促进 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的分化。研究还发现, 在 II 型胶原诱导的关节炎 (CIA) 大鼠模型中, 腹腔注射人重组蛋白 PDCD5 能够减轻 CIA 模型大鼠的病情; 进一步研究显示人重组蛋白 PDCD5 在大鼠体内能够增加 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的数量, 抑制炎症细胞因子 IL-17A 和 TNF- α 的产生。体外实验的结果证明, 人重组蛋白 PDCD5 处理的大鼠淋巴细胞和脾细胞对 II 型胶原的增殖能力显著低于对照小鼠。

附图说明

[0018] 以下, 结合附图来详细说明本发明的实施方案, 其中:

[0019] 图 1 显示人重组蛋白 PDCD5 和阴性对照 PBS 处理的 EAE 小鼠临床评分。

[0020] 图 2 显示人重组蛋白 PDCD5 和阴性对照 PBS 处理的 EAE 小鼠的发病率。

[0021] 图 3 显示人重组蛋白 PDCD5 和阴性对照 PBS 处理的 EAE 小鼠脊髓的 H&E 染色。

[0022] 图 4 显示人重组蛋白 PDCD5 和阴性对照 PBS 处理的 EAE 小鼠脊髓的 luxol fast blue 染色。

[0023] 图 5 显示 ELISA 方法检测人重组蛋白 PDCD5 和阴性对照 PBS 处理的 EAE 小鼠血清的细胞因子水平。

[0024] 图 6 显示流式细胞术分析人重组蛋白 PDCD5 和阴性对照 PBS 处理的 EAE 小鼠淋巴结和脾细胞中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞的数目。

[0025] 图 7 显示流式细胞术分析人重组蛋白 PDCD5 和阴性对照 PBS 处理的 EAE 小鼠淋巴结细胞中 CD4⁺IL-17A⁺ 细胞的数目。

[0026] 图 8 显示 [³H] 掺入法检测人重组蛋白 PDCD5 和阴性对照 PBS 处理的 EAE 小鼠脾细胞和淋巴结细胞对 MOG₃₅₋₅₅ 的反应性。

[0027] 图 9 显示 ELISA 方法检测人重组蛋白 PDCD5 和阴性对照 PBS 处理的 EAE 小鼠淋巴结细胞与 MOG₃₅₋₅₅ 反应的培养上清中细胞因子的水平。

[0028] 图 10 显示 ELISA 方法检测人重组蛋白 PDCD5 和阴性对照 PBS 处理的 EAE 小鼠脾细胞与 MOG₃₅₋₅₅ 反应的培养上清中细胞因子的水平。

[0029] 图 11 显示流式细胞术分析人重组蛋白 PDCD5 对小鼠淋巴结细胞中

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞的诱导分化作用。

[0030] 图 12 显示人重组蛋白 PDCD5、卵白蛋白 (OVA) 处理的 CIA 大鼠以及生理盐水对照大鼠的发病情况。A : 人重组蛋白 PDCD5 组、OVA 对照组和生理盐水组大鼠的足跖肿胀程度 ; B : 人重组蛋白 PDCD5 组、OVA 对照组和生理盐水组大鼠的临床评分 ; C : 人重组蛋白 PDCD5 组、OVA 对照组和生理盐水组大鼠的足部图片。

[0031] 图 13 显示 [³H] 掺入法检测人重组蛋白 PDCD5 和 OVA 处理的 CIA 大鼠脾细胞和淋巴结细胞对胶原的反应性。

[0032] 图 14 显示 ELISA 方法检测人重组蛋白 PDCD5、OVA 处理的 CIA 大鼠以及生理盐水对照大鼠的炎性细胞因子的水平。A : 人重组蛋白 PDCD5 组、OVA 对照组和生理盐水组大鼠血清和关节液中 TNF- α 的水平 ; B : 人重组蛋白 PDCD5 组、OVA 对照组和生理盐水组大鼠血清和关节液中 IL-17A 的水平。

[0033] 图 15 显示流式细胞术分析人重组蛋白 PDCD5 和 OVA 处理的 CIA 大鼠大鼠的淋巴结、外周血以及脾细胞中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞的数目。

具体实施方式

[0034] 在本发明中所使用的术语, 除非有另外说明, 一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0035] 下面结合具体的制备实施例和应用实施例, 并参照数据进一步详细地描述本发明。这些实施例只是为了举例说明本发明, 而非以任何方式限制本发明的范围。

[0036] 实施例 1、人重组蛋白 PDCD5 (rhPDCD5) 作为蛋白重组药物, 可延缓 EAE 模型小鼠的发病, 减轻病情, 减少发病率

[0037] 方法 : EAE 模型的建立与临床评分

[0038] 6-8 周的雌性 C57BL/6 小鼠, 饲养于北京大学医学部实验动物部, SPF 级饲养, 所用垫木、饮水、饲料及其与动物接触的物品均经高压灭菌处理。所有的动物实验操作和流程都符合北京大学实验动物管理制度。实验时, 每只小鼠给予用完全弗氏佐剂乳化的 MOG₃₅₋₅₅ 抗原 200 μ l (1.5mg/ml) 背部皮下三点免疫, 同时尾静脉注射 200 μ l (1 μ g/ml) 百日咳毒素 (PT), 第 2 天, 再次尾静脉注射 200 μ l PT。同时将小鼠随机分成 2 组, 每组 8-10 只小鼠。

[0039] rhPDCD5 处理组 : 第 0、2、4、6、8、10 天腹腔注射 200 μ g 的 rhPDCD5 ;

[0040] 阴性对照 PBS 组 : 第 0、2、4、6、8、10 天腹腔注射 200 μ L 的 PBS。

[0041] 第 6 天开始观察 EAE 临床体征的严重性, 给出临床评分, 观察发病率。

[0042] 临床评分标准 : 0 分 : 无症状 ; 1 分 : 尾部无力 ; 2 分 : 前肢或后肢中度瘫痪和运动失调 ; 4 分 : 前肢或后肢严重瘫痪或运动失调, 人为翻转不能恢复 ; 5 分 : 濒死状态或者死亡。

[0043] 结果如图 1 所示, 阴性对照 PBS 组小鼠在第 9 天开始发病, 症状呈进行性加重 ; 而在 rhPDCD5 处理组, 小鼠在第 12 天发病, 发病时间明显延迟, 症状减轻 ; 同时如图 2 所示, rhPDCD5 处理小鼠的发病率明显低于 PBS 阴性对照组, 因此, 给小鼠施用 rhPDCD5 能够延缓小鼠诱发的 EAE。

[0044] 实施例 2、rhPDCD5 作为蛋白重组药物, 能够减少炎症细胞在中枢神经系统的浸润, 减少脊髓白质脱髓鞘病变

[0045] 方法 :

[0046] 1 :EAE 模型的建立与临床评分同见实施例 1。

[0047] 2 :组织化学染色

[0048] 实验小鼠麻醉后打开胸腔, PBS 心脏灌注, 用 4% 多聚甲醛灌注内固定, 再取出脊髓, 放入装有 4% 多聚甲醛的玻璃瓶中固定, 再将标本做脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、展片、捞片、烘片。然后进行 H&E 染色和勒克索尔固蓝 (Luxol Fast Blue) 染色, 封片进行观察。

[0049] H&E 染色结果如图 3 所示, rhPDCD5 处理的小鼠脊髓白质区炎性细胞浸润要比阴性对照 PBS 组轻; 说明施用 rhPDCD5 减少炎症细胞在 EAE 小鼠中枢神经系统的浸润。

[0050] Luxol Fast Blue 染色如图 4 所示, 在 rhPDCD5 处理组脊髓的白质区致密, 脱髓鞘现象很轻, 而在 PBS 阴性对照组脊髓的白质区脱髓鞘现象明显。说明施用 rhPDCD5 减少 EAE 小鼠的脊髓脱髓鞘反应。

[0051] 实施例 3、rhPDCD5 作为蛋白重组药物, 能够减少 EAE 小鼠 Th17 细胞数目, 减少血清中炎症细胞的水平; 同时促进调节性 T 细胞 (CD4⁺CD25⁺FoxP3) 的分化, 增加抑制性细胞因子的水平

[0052] 方法:

[0053] 1 :EAE 模型的建立与临床评分同见实施例 1。

[0054] 2 :ELISA 方法检测血清中的细胞因子: rhPDCD5 和 PBS 处理的 EAE 小鼠, 行麻醉处死, 收集血清, 按照 Biolegend 公司的说明书操作。

[0055] 3 :流式细胞术分析 T 细胞亚群: rhPDCD5 和 PBS 处理的 EAE 小鼠, 行麻醉处死, 分别摘取体内淋巴结和脾脏, 制成细胞悬液, 加入合适浓度抗鼠 CD16/32 抗体, 封闭免疫球蛋白 Fc 受体, 4℃ 10min。1200rpm, 离心洗一遍。细胞重悬 100 μl PBS, 分别加入合适浓度的抗 CD4 和抗 CD25 表面荧光抗体, 4℃, 避光孵育 20min。PBS 洗两遍, 加 1ml Fix/Perm buffer 重悬细胞, 混匀, 避光 20min, 离心, 弃上清。用 1ml perm buffer 洗一遍。重悬 1ml perm buffer, 避光 15min。离心, 加 100 μl perm buffer, 加入合适浓度抗 IL-17A 抗体或抗 FOXP3 抗体, 避光 30min。PBS 洗两遍。重悬于 400 μl PBS 中, 流式细胞计进行分析。

[0056] ELISA 分析的结果如图 5 所示, rhPDCD5 处理的 EAE 小鼠血清中炎症细胞因子如 IL-17A 和 IFN-γ 含量明显低于 PBS 阴性处理组; 同时, rhPDCD5 处理的 EAE 小鼠血清中抑制性细胞因子如 IL-10 和 TGF-β 含量明显高于 PBS 阴性处理组。说明施用 rhPDCD5 减少 EAE 小鼠炎症细胞因子水平。

[0057] 流式细胞计的分析结果如图 6 所示, rhPDCD5 处理的 EAE 小鼠淋巴结中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 的细胞为 26.9%, PBS 阴性处理组则为 7.4%, 在小鼠脾细胞中, rhPDCD5 处理组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 的细胞为 14.9%, PBS 阴性处理组则为 9.1%。因此, rhPDCD5 处理小鼠外周免疫器官 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞数目显著高于 PBS 阴性处理组; 说明施用 rhPDCD5 能够增加外周免疫器官 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞的数目。另外如图 7 所示, rhPDCD5 处理的 EAE 小鼠淋巴结中 CD4⁺IL-17A⁺ 的细胞为 8.5%, PBS 阴性处理组则为 14.62%, rhPDCD5 处理小鼠 Th17 细胞数目显著低于 PBS 阴性处理组。说明施用 rhPDCD5 能够减少外周免疫器官 CD4⁺IL-17A⁺ 细胞的数目。

[0058] 实施例 4、rhPDCD5 作为蛋白重组药物, 能够抑制 MOG₃₅₋₅₅ 特异性脾细胞和淋巴细胞增殖

[0059] 方法:

[0060] 1: EAE 模型的建立与临床评分同实施例 1。

[0061] 2: [^3H -TdR] 掺入法检测细胞的增殖

[0062] RhPDCD5 和 PBS 处理的 EAE 小鼠, 行麻醉处死, 分别摘取体内淋巴结和脾脏, 制成细胞悬液。将小鼠脾细胞或者淋巴结细胞重悬于 10% FBS-RPMI 1640 中, 加 200 μl 细胞悬液于 96 孔板中 (每孔 4×10^5 的细胞), 每个标本三个复孔, 细胞培养液中加入 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 MOG₃₅₋₅₅。在含有 5% CO_2 的 37°C 培养箱中培养 40 小时, 在培养时间到达 40 小时每孔加入 1 μCi ^3H -甲基胸腺嘧啶 ([^3H]-TdR)。培养时间到达 48h 时, 将细胞摄取的同位素转移到玻璃纤维素膜。膜烘干后加入闪烁液, 计数仪上读取 cpm 值, 检测 ^3H 的掺入量。

[0063] 结果如图 8 所示, rhPDCD5 处理的 EAE 小鼠淋巴结细胞对 MOG₃₅₋₅₅ 的反应性明显低于 PBS 阴性处理组, 显示 [^3H]-TdR 掺入量的明显降低, 两者有显著性差异; 同时, rhPDCD5 处理的 EAE 小鼠脾细胞对 MOG₃₅₋₅₅ 的反应性明显低于 PBS 阴性处理组, 两者有显著性差异。说明施用 rhPDCD5 能够抑制 MOG₃₅₋₅₅ 特异的淋巴细胞增殖反应。

[0064] 实施例 5、rhPDCD5 作为蛋白重组药物, 能够促进 MOG₃₅₋₅₅ 特异性脾细胞和淋巴结细胞产生抑制性细胞因子, 抑制 MOG₃₅₋₅₅ 特异性脾细胞和淋巴结细胞产生炎症性细胞因子

[0065] 方法

[0066] 1: EAE 模型的建立与临床评分同实施例 1。

[0067] 2: ELISA 方法检测细胞培养上清中的细胞因子: RhPDCD5 和 PBS 处理的 EAE 小鼠, 行麻醉处死, 分别摘取体内淋巴结和脾脏, 制成细胞悬液。将小鼠脾细胞或淋巴结细胞重悬于 10% FBS-RPMI 1640 中, 加 200 μl 细胞悬液于 96 孔板中 (每孔 4×10^5 的细胞), 每个标本三个复孔, 细胞培养液中加入 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 MOG₃₅₋₅₅。在含有 5% CO_2 的 37°C 培养箱中培养 48 小时, 收集细胞上清, Flow Cytomix (按照 e Bioscience 公司的说明书操作) 方法或 ELISA (按照 Biolegend 公司的说明书操作) 方法检测培养上清中的细胞因子。

[0068] 结果如图 9 所示, MOG₃₅₋₅₅ 与淋巴结细胞一起培养的上清中, 与 PBS 处理组相比较, RhPDCD5 处理组的细胞因子如 IL-2、IL-17A 以及 IFN- γ 的水平明显下调, 甚至检测不到, 而抑制性细胞因子 IL-10 明显上调。说明施用 rhPDCD5 能够抑制 MOG₃₅₋₅₅ 特异的淋巴结细胞分泌炎症因子。在 MOG₃₅₋₅₅ 与脾细胞一起培养的上清中, 与 PBS 处理组相比较, RhPDCD5 处理组的细胞因子如 TNF- α 、IL-17A 以及 IFN- γ 的水平明显下调 (图 10), 说明施用 rhPDCD5 能够抑制 MOG₃₅₋₅₅ 特异的脾细胞分泌炎症因子。

[0069] 实施例 6、rhPDCD5 作为蛋白重组药物, 能够促进小鼠 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ 细胞的分化

[0070] 方法:

[0071] 1: 细胞培养: 用 160 μl 的抗-CD3 抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) 包被 48 孔板, 4°C 过夜, 用 PBS 洗两遍; 麻醉处死的 6-8 周雌性 C57BL/6 小鼠, 摘取体内淋巴结, 制成细胞悬液 (含 10% FBS-RPMI 1640), 加 500 μl 培养液于预先包被抗-CD3 抗体的 48 孔板, 每孔为 1×10^6 的细胞, 同时加入抗 CD28 抗体 (5 $\mu\text{g/ml}$)、TGF- β (5ng/ml)、IL-2 (2ng/ml) 以及加入不同浓度的 rhPDCD5 蛋白, 在含有 5% CO_2 的 37°C 培养箱中培养 72 小时, 收集细胞。

[0072] 2: 流式细胞分析: 收集不同处理的培养细胞, 加入合适浓度的抗鼠 CD16/32 抗体, 封闭免疫球蛋白 Fc 受体, 4°C 10min。1200rpm, 离心洗一遍。细胞重悬 100 μl PBS, 分别加入合适浓度的抗 CD4 和抗 CD25 表面荧光抗体, 4°C, 避光孵育 20min。PBS 洗两遍, 加 1ml Fix/Perm buffer 重悬细胞, 混匀, 避光 20min, 弃上清。用 1ml perm buffer 洗一遍。重悬

1ml permabuffer, 避光 15min, 弃上清。加入合适浓度抗 FOXP3 抗体, 避光 30min。PBS 洗两遍。重悬于 400 μ l PBS 中, 流式细胞计进行分析。

[0073] 结果如图 11 所示, rhPDCD5 后以浓度依赖的方式增加 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞数目。说明施用 rhPDCD5 能够体外增加 Naïve 淋巴结细胞分化为 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞的数目。

[0074] 实施例 7、rhPDCD5 作为蛋白重组药物, 可延缓 CIA 模型大鼠的发病, 减轻病情。

[0075] 方法: CIA 大鼠模型的建立与临床评分

[0076] 6-8 周的雌性 SD 大鼠, 饲养于北京大学医学部实验动物部, SPF 级饲养, 所用垫木、饮水、饲料及其与动物接触的物品均经高压灭菌处理。所有的动物实验操作和流程都符合北京大学实验动物管理制度。实验时, 将胶原醋酸溶液与不完全佐剂 4℃ 过夜充分溶解后 1 : 1 均质混合, 于大鼠尾根部皮下注射 0.2ml/只, 7 天后避开上次注射部位强化免疫一次。同时将大鼠随机分成 3 组, 每组 8 只大鼠。

[0077] CIA 大鼠 rhPDCD5 处理组: 从模型制备当天起, 腹腔注射 rhPDCD5 (14mg/kg), 隔日一次, 第 30 天结束。

[0078] CIA 大鼠 OVA 无关蛋白对照组: 从模型制备当天起, 腹腔注射卵白蛋白 (OVA) (14mg/kg), 隔日一次, 第 30 天结束。

[0079] 阴性对照生理盐水组: 从模型制备当天起, 腹腔注射生理盐水, 隔日一次, 第 30 天结束。

[0080] 足跖肿胀度测量: 采用容积法测定大鼠膝关节容积。测量前于每只大鼠膝关节上 0.5cm 作一标记线, 每次测定以标记线为标准, 每只大鼠每次测量 3 次取其平均值为当前容积。在造模前 1 天测定双侧后足爪容积, 以后每周对大鼠双侧足爪容积进行测量, 记录容积值。肿胀程度用当前容积减去造模前容积的差值表示。

[0081] 临床评分: 按照关节炎指数评分办法进行评估病变程度多发性关节炎评分如下: 0 分, 无肿胀; 1 分, 1 个趾关节受累; 2 分, 多趾关节受累; 3 分, 踝关节以下受累; 4 分: 全爪受累。造模 1 天后, 隔日评分。

[0082] 结果如图 12A 所示, 阴性对照生理盐水组大鼠不出现足跖肿胀, OVA 无关蛋白对照组大鼠的足跖肿胀明显, 而在 rhPDCD5 处理组, 大鼠的足跖肿胀度明显减轻, 在第三和第四周, 比较 OVA 无关蛋白对照组和 rhPDCD5 处理组大鼠的足跖肿胀度, 两者有明显的差异, *P < 0.05。同时如图 12B 所示, 与 OVA 无关蛋白对照组相比, rhPDCD5 处理组大鼠的临床症状明显减轻, 有统计学意义。*P < 0.05, **P < 0.01。图 12C 是分别代表生理盐水组、OVA 无关蛋白对照组和 rhPDCD5 处理组大鼠的足部照片。

[0083] 实施例 8、rhPDCD5 作为蛋白重组药物, 能够抑制胶原 (collagen) 特异性脾细胞和淋巴细胞增殖

[0084] 方法:

[0085] 1: CIA 大鼠模型的建立与临床评分同实施例 7。

[0086] 2: [³H-TdR] 掺入法检测细胞的增殖同实施例 4。

[0087] 结果如图 13 所示, 在体外的培养体系中, rhPDCD5 处理的 CIA 大鼠淋巴结细胞对胶原的反应性明显低于 OVA 处理组, 显示 [³H]-TdR 掺入量的明显降低, 两者有显著性差异, *P < 0.05; 同时, rhPDCD5 处理的 CIA 大鼠脾细胞对胶原的反应性明显低于 OVA 处理组。说明施用 rhPDCD5 能够抑制胶原特异的淋巴细胞增殖反应。

[0088] 实施例 9、rhPDCD5 作为蛋白重组药物,能够减少血清和关节滑液中炎症细胞的水平;同时增加调节性 T 细胞 ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) 的数量

[0089] 方法:

[0090] 1: CIA 大鼠模型的建立与临床评分同实施例 7。

[0091] 2: ELISA 方法检测血清和关节液中的细胞因子: rhPDCD5 和 OVA 处理的 CIA 大鼠, 以及生理盐水 (空白) 对照组大鼠, 行麻醉处死, 收集血清和关节液, 按照 Biolegend 公司的说明书操作。

[0092] 3: 流式细胞术分析 T 细胞亚群: rhPDCD5 和 OVA 处理的 CIA 大鼠, 行麻醉处死, 分别摘取体内淋巴结和脾脏, 制成细胞悬液, 同时制备外周血淋巴细胞, 加入合适浓度抗鼠 CD16/32 抗体, 封闭免疫球蛋白 Fc 受体, 4°C 10min。1200rpm, 离心洗一遍。细胞重悬 $100\ \mu\text{l}$ PBS, 分别加入合适浓度的抗 CD4 和抗 CD25 表面荧光抗体, 4°C , 避光孵育 20min。PBS 洗两遍, 加 1ml Fix/Perm buffer 重悬细胞, 混匀, 避光 20min, 离心, 弃上清。用 1ml perm buffer 洗一遍。重悬 1ml perm buffer, 避光 15min。离心, 加 $100\ \mu\text{l}$ perm buffer, 加入合适浓度抗 FOXP3 抗体, 避光 30min。PBS 洗两遍。重悬于 $400\ \mu\text{l}$ PBS 中, 流式细胞计进行分析。

[0093] ELISA 分析的结果如图 14A 所示, rhPDCD5 处理的 CIA 大鼠血清以及关节滑液中 $\text{TNF-}\alpha$ 含量明显低于 OVA 处理组, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; 同时如图 14B 所示, rhPDCD5 处理的 CIA 大鼠血清以及关节滑液中 IL-17A 含量明显低于 OVA 处理组, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。说明施用 rhPDCD5 减少 CIA 大鼠炎症细胞因子水平。

[0094] 流式细胞计的分析结果如图 15 所示, rhPDCD5 处理的 CIA 大鼠淋巴结、外周血以及脾脏中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 的细胞均高于 OVA 处理组, 说明施用 rhPDCD5 能够增加外周免疫器官以及外周血中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞的数目。

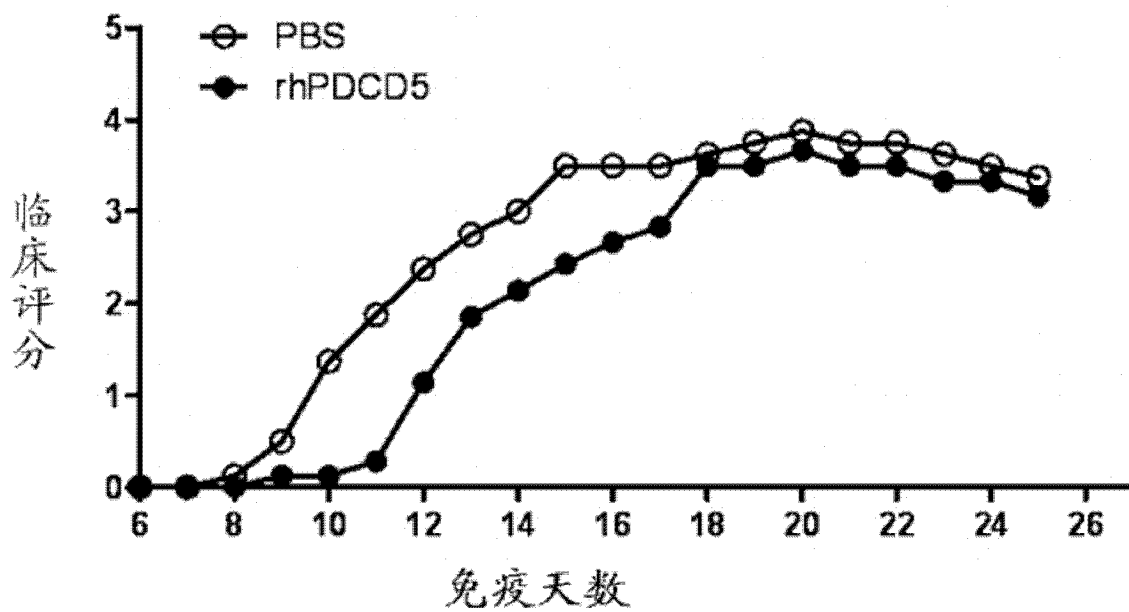


图 1

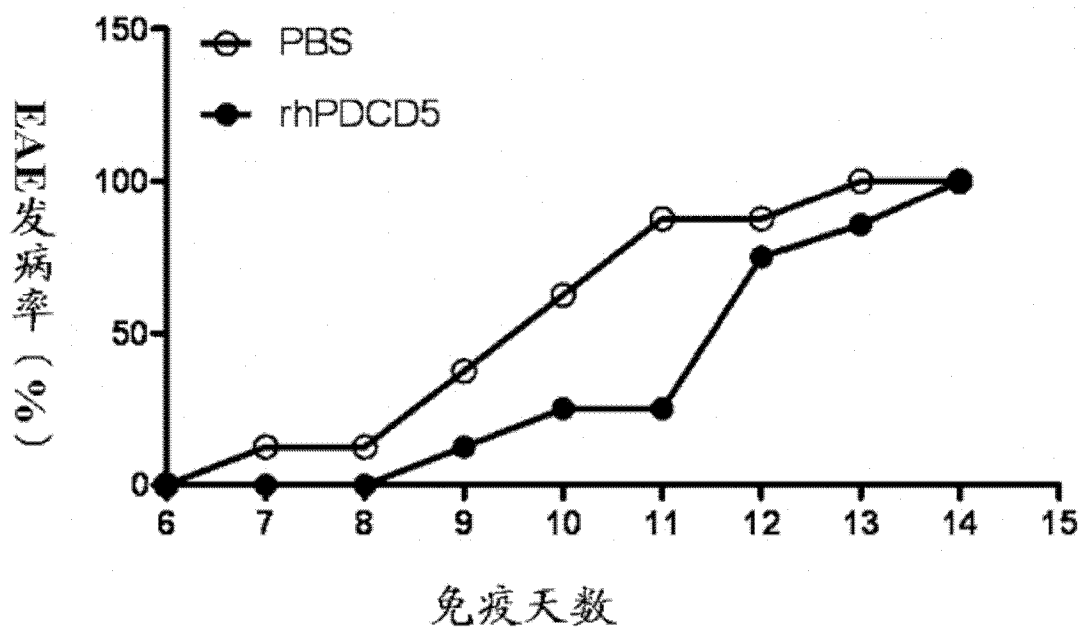


图 2

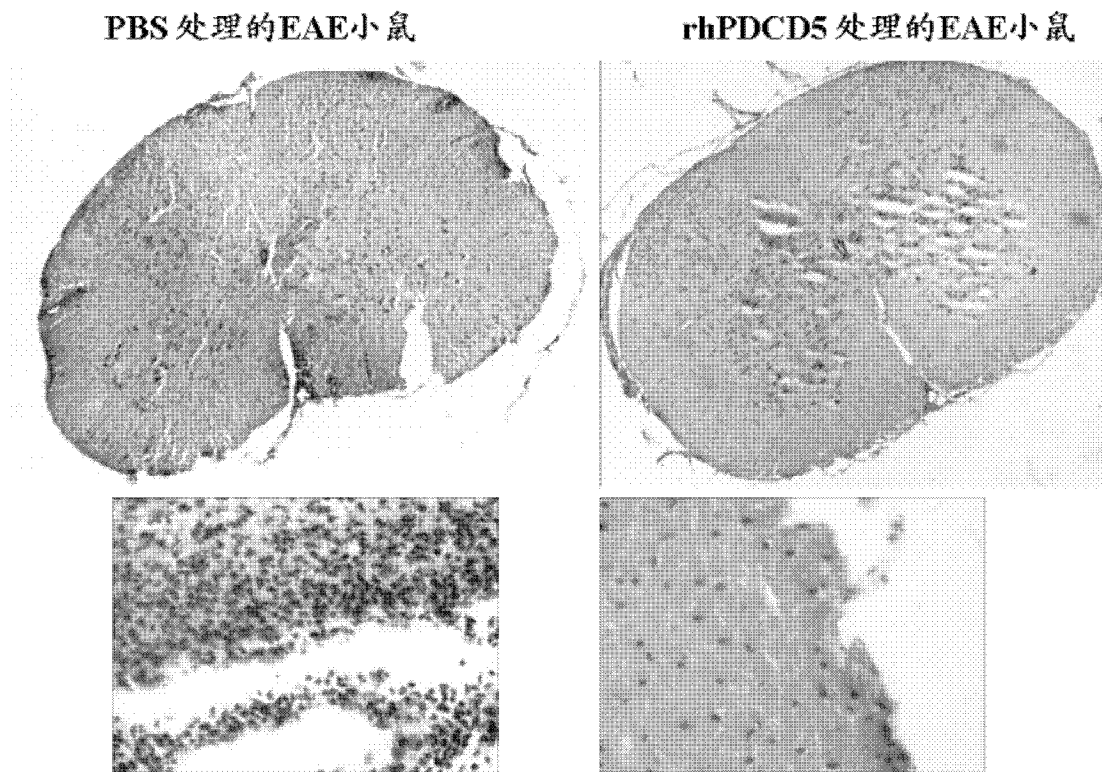


图 3

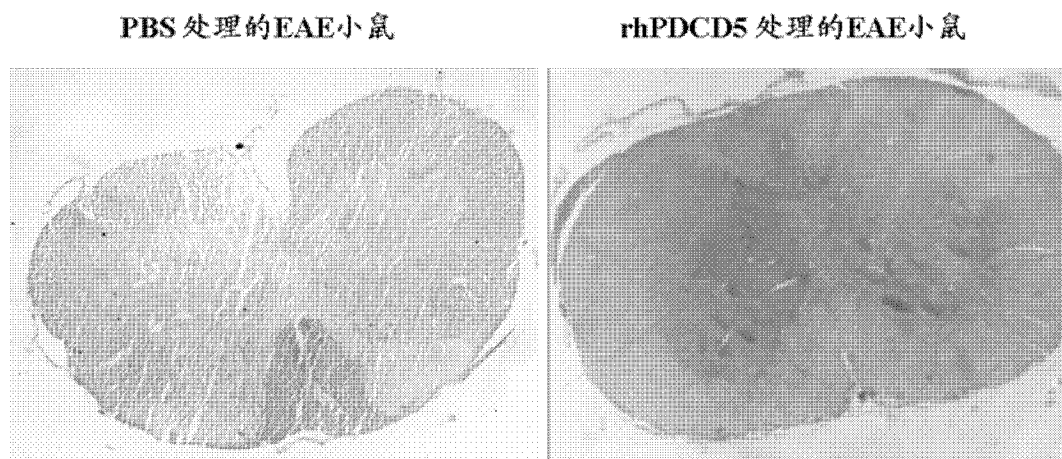


图 4

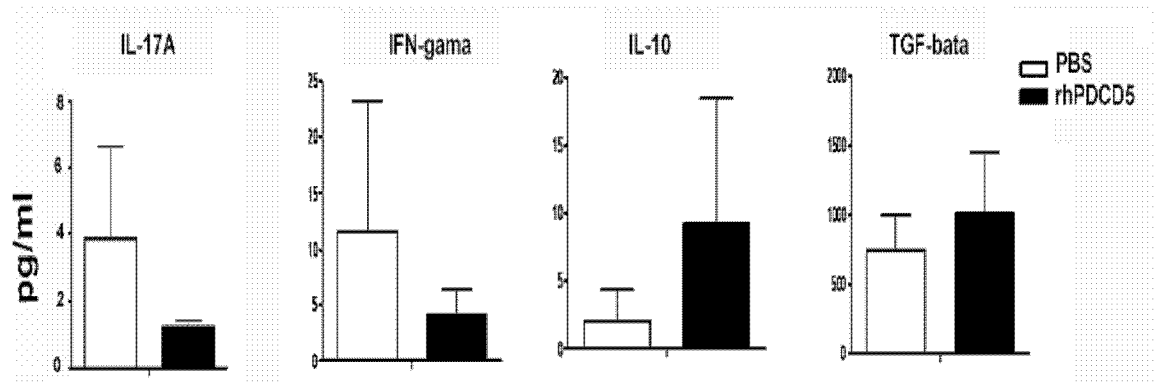


图 5

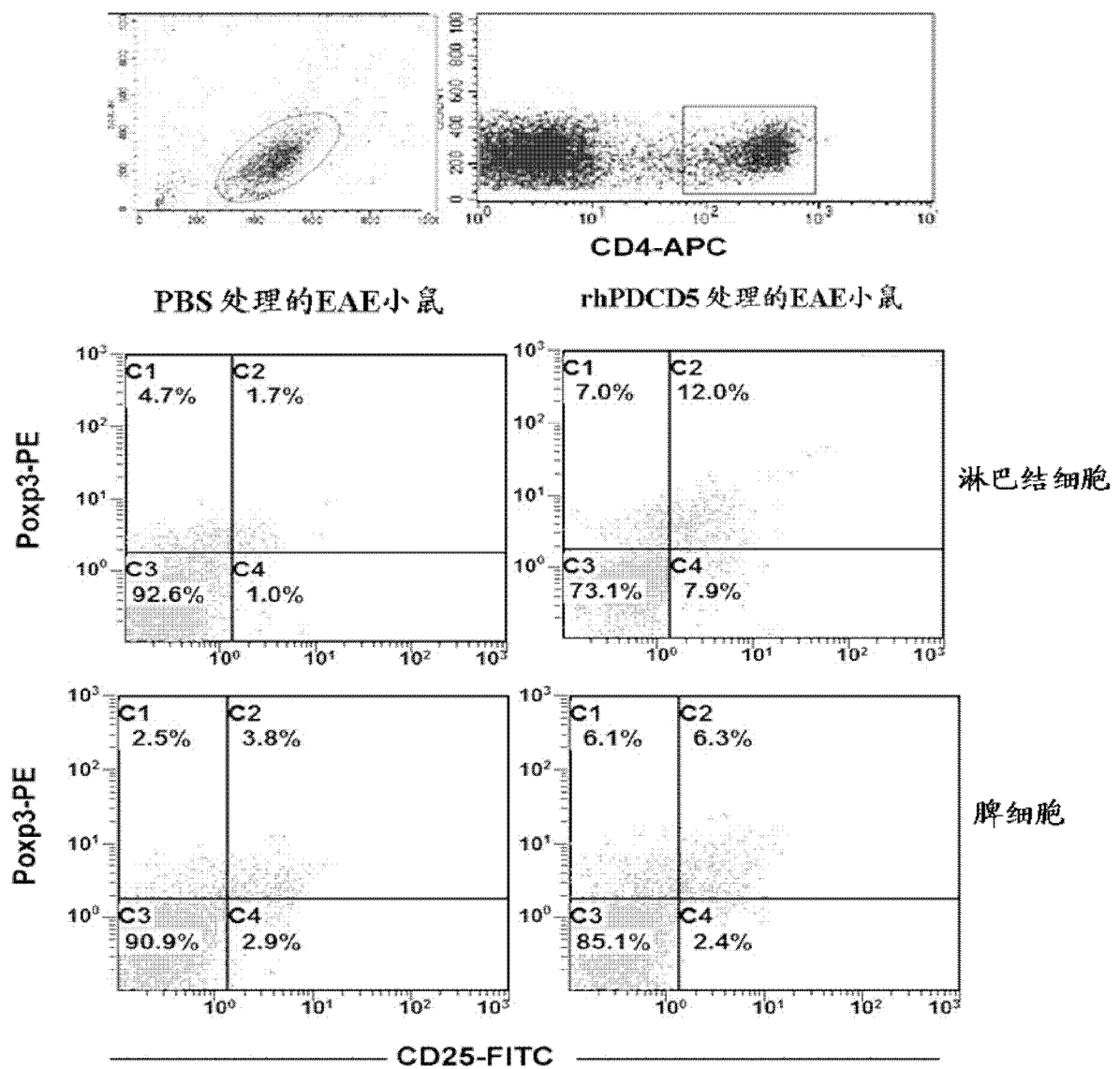


图 6

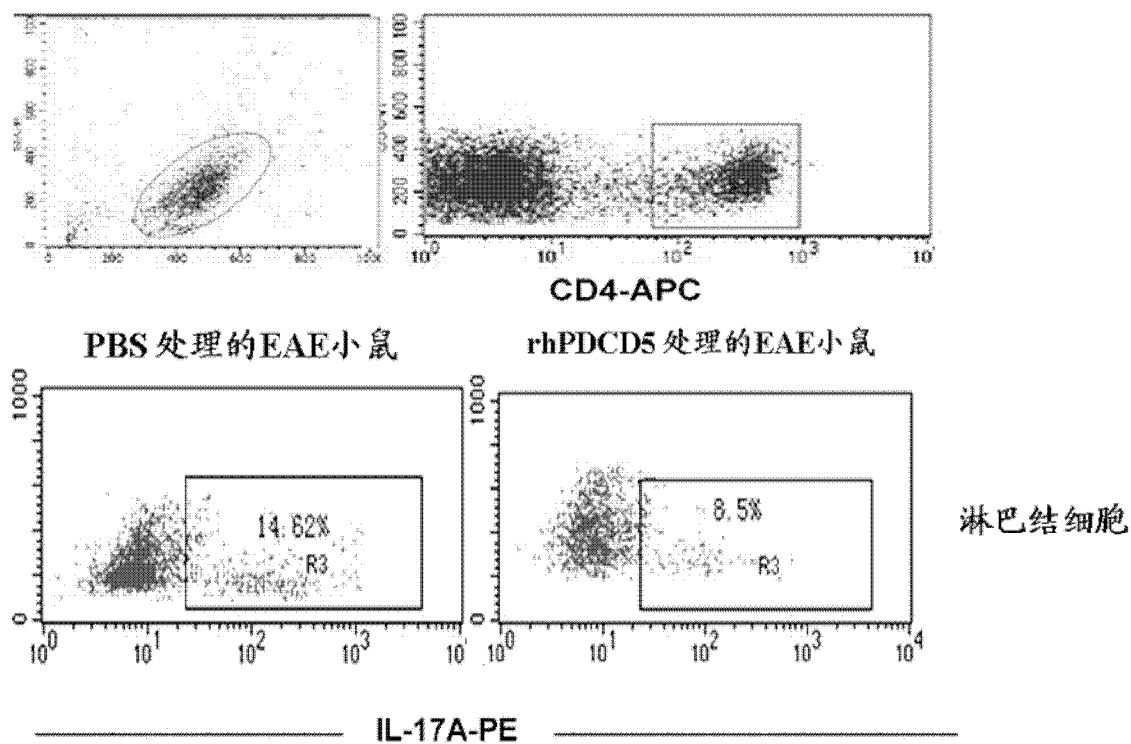


图 7

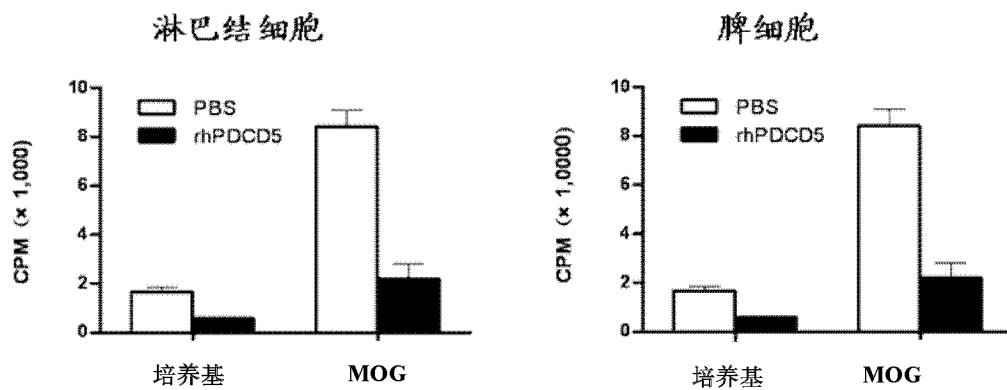


图 8

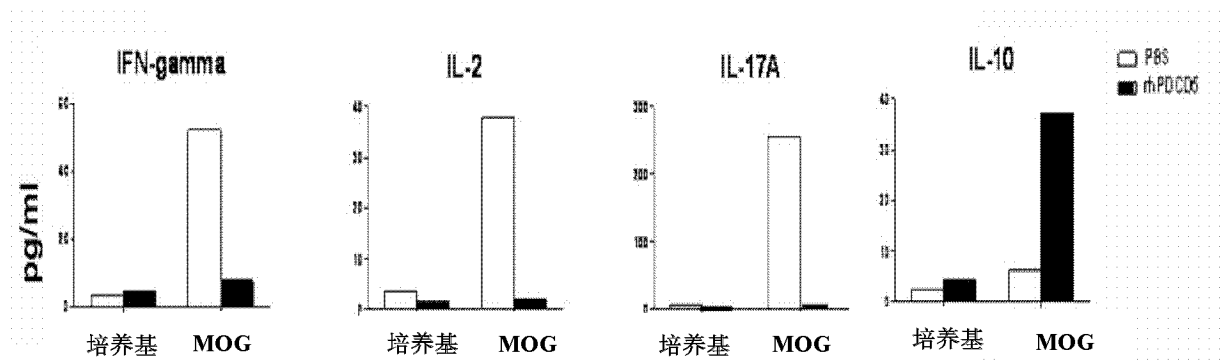


图 9

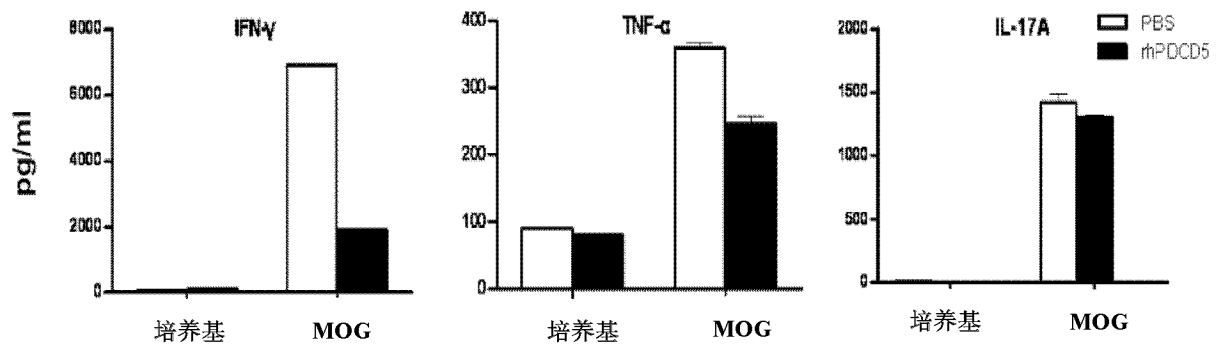


图 10

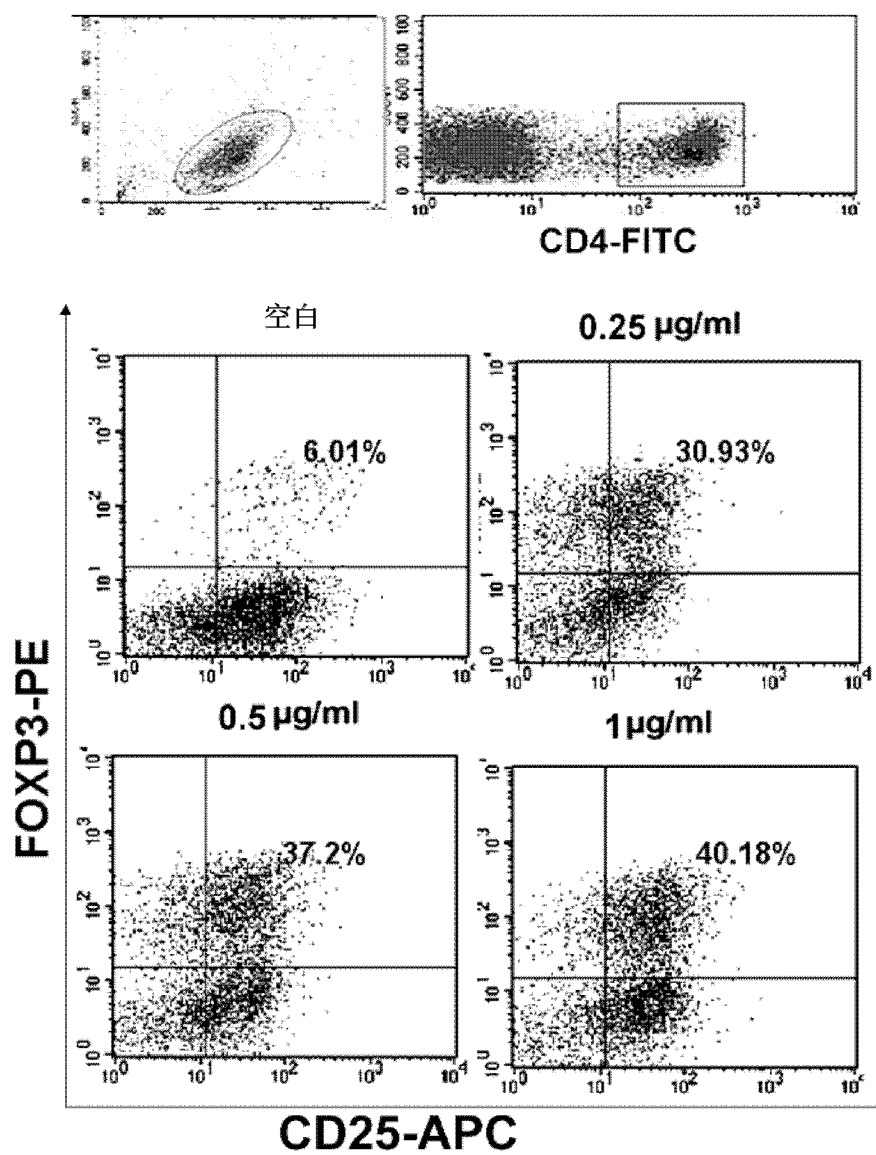


图 11

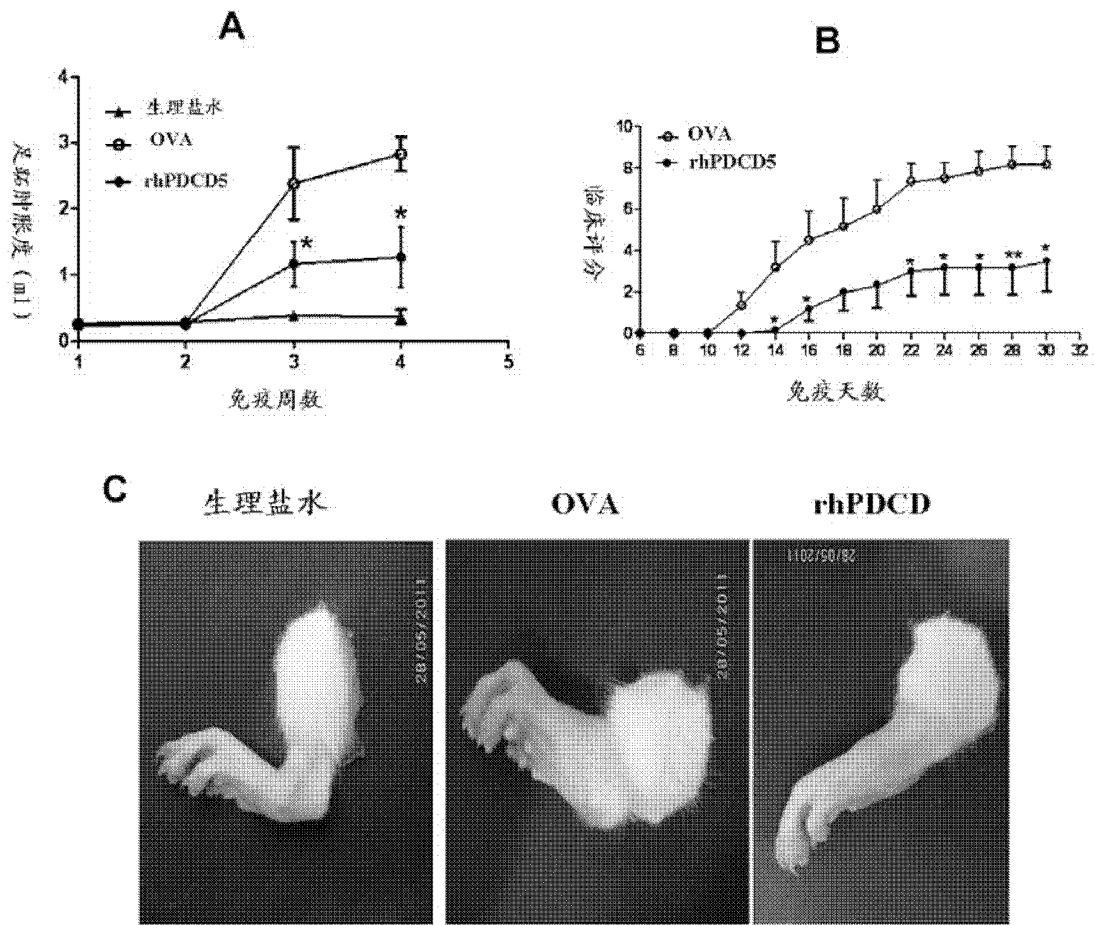


图 12

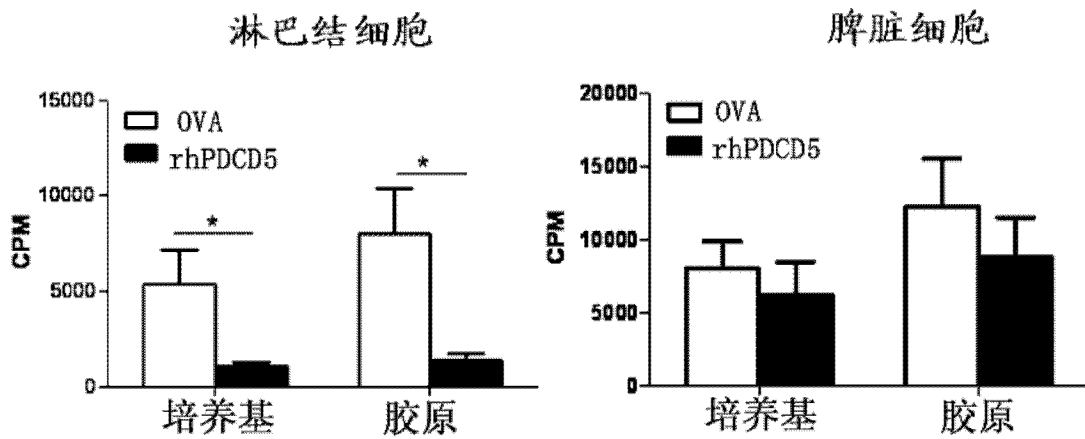


图 13

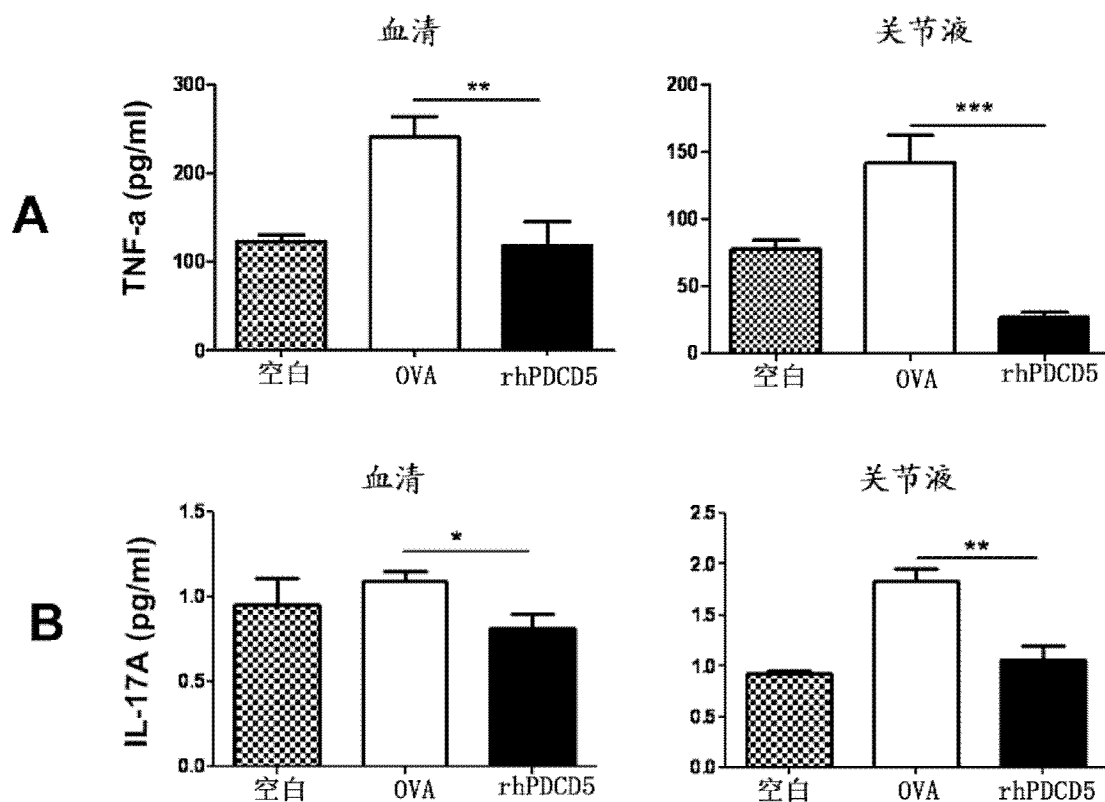


图 14

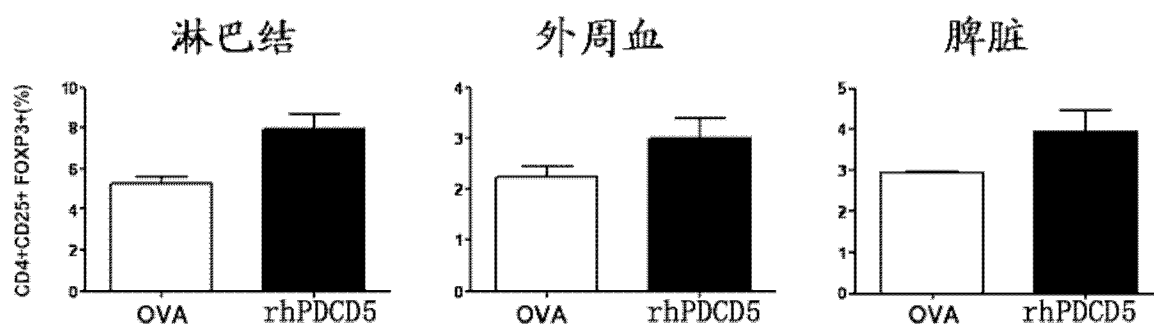


图 15