

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01808499.0

[45] 授权公告日 2006 年 10 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1281748C

[22] 申请日 2001.3.15 [21] 申请号 01808499.0

[30] 优先权

[32] 2000. 3. 15 [33] KR [31] 2000/13133

[32] 2001. 3. 13 [33] KR [31] 2001/12987

[86] 国际申请 PCT/KR2001/000408 2001.3.15

[87] 国际公布 WO2001/068802 英 2001.9.20

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.23

[71] 专利权人 格纳西尼有限公司

地址 韩国庆尚北道

[72] 发明人 成永喆 李圣熙 河相准 宋万基

张俊

审查员 李 岚

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

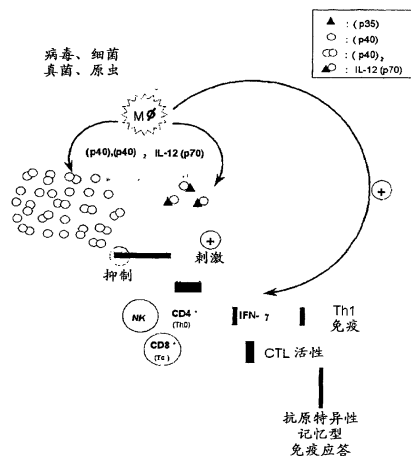
权利要求书 1 页 说明书 51 页 附图 11 页

[54] 发明名称

为改善 IL-12 活性而突变的 IL-12p40 亚基基因及其作为 DNA 疫苗佐剂的用途

[57] 摘要

本发明涉及可产生高活性人和小鼠源性 IL-12 (白细胞介素 12) 的 IL-12p40 亚基突变基因、包含上述突变基因的表达载体及其作为 DNA 疫苗佐剂的用途。本发明尤其涉及 IL-12p40 突变基因,其可通过作为 IL-12 活性形式 IL-12p70 的竞争性抑制物 IL-12p40 中 Asn-222 (人) 或 Asn-220 (小鼠) 氨基酸处发生突变,抑制 IL-12p40 的分泌,但仍正常分泌活性 IL-12p70。因此,本发明的 IL-12p40 突变基因可以用于多种疾病的 DNA 疫苗和基因治疗,例如爱滋病、丙型肝炎或乙型肝炎、癌症、流感、结核和疟疾,其治疗基本上需要细胞免疫应答。



1. 分离的核酸序列，其编码人源IL-12p40亚基，如SEQ. NO. 1所示，其中编码Asn 222的密码子被替换为编码另一氨基酸的密码子，因此抑制IL-12p40亚基的分泌。
2. 权利要求1的分离的核酸序列，其中Asn 222的密码子被替换为选自Leu 222、Gln 222或Ile 222的密码子。
3. 基因构建体，其含有i) 权利要求1的分离的核酸序列；ii) 编码人IL-12p35亚基的基因；和iii) 内部核糖体进入位点IRES，在其每一末端连接i) 的核酸序列和ii) 的基因。
4. 包含权利要求3的基因构建体的表达载体，其中该基因构建体操作性连接启动子。
5. 权利要求4的表达载体，它是pGX0-hp35/IRES/hp40-n222L。
6. 权利要求4的表达载体，它是pGX0-hp40-N222L/IRES/hp35。
7. 用于DNA免疫或基因治疗的佐剂在制备用于治疗丙型肝炎或乙型肝炎的药物的用途，所述佐剂包含权利要求4的表达载体。
8. 权利要求7的用途，其中的佐剂包含权利要求5的表达载体。
9. 权利要求7的用途，其中的佐剂包含权利要求6的表达载体。

为改善 IL-12 活性而突变的 IL-12p40
亚基基因及其作为 DNA 疫苗佐剂的用途

发明领域

本发明涉及可以产生高活性人和小鼠白细胞介素 12 (IL-12) 的突变的 IL-12p40 亚基基因、包含上述突变基因的表达载体及其在 DNA 疫苗佐剂上应用的方法。本发明尤其涉及，通过在作为活性 IL-12 竞争性抑制剂的 IL-12p40 上诱导 Asn-222(鼠)或 Asn-220(人)氨基酸突变，能正常分泌免疫活性的 IL-12p70 但降低 IL-12p40 分泌的突变的 IL-12p40 亚基基因。

背景技术

IL-12 由巨噬细胞、单核细胞和 B 细胞等抗原递呈细胞 (APC) 在受到合适刺激后分泌的，并作为体内多种免疫应答的调节剂。尤其是 IL-12 具有广谱活性，包括活化的 1 型辅助 T (Th1) 细胞和自然杀伤细胞 (NK) 的增殖、许多细胞因子产生的调节、1 型辅助 T 细胞免疫应答的诱导、CD8+ T 细胞的分化、造血干细胞的刺激 (Hsieh, C. S. 等, *Science*, 260:547-549, 1993), 特别是通过促进细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和 NK 细胞的裂解活性而对免疫应答进行调节 (Robertson, M. J. 和 J. Ritz., *Oncologist*, 1:88-97, 1999; Trinchieri, G., *Annu. Rev. Immunol.*, 13:251-276, 1995)。根据最近报道，来自受人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的病人的外周血单核细胞 (PBMC) 中产生低 5 倍的生物活性 IL-12 (Chehimmi, J. 等, *Exp. Med.*, 179:1361-1366, 1994), 并且发现在分枝杆菌和沙门氏菌感染中缺乏 IL-12 受体的表达 (de Jong, R. 等, *Science*, 280:1435-1438)。由于 IL-12 的这些作用，它可以在体内诱导针对病毒、细菌和多种癌症的强免疫应答。因此，本发明人可以预见利用本发明开发许多治疗制剂。

基于 IL-12 与记忆 Th1 和记忆 CTL 细胞的生长有关的理论 (Stobie, L. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:8427-8432, 2000; Mortarini,

R. 等, *Cancer Res.*, 60:3559-3568, 2000; Mbawuiké, I. 等, *J. Infect. Dis.*, 180:1477-1486, 1999), 认为 IL-12 可以用作有效的疫苗佐剂或针对多种需要细胞免疫应答的疾病的的治疗制剂. 对于癌症治疗中最困难的部分, 即转移和复发, 记忆免疫应答的诱导是特别必需的. 但是, 有关 IL-12 与以上作用相关联的具体机制至今还不清楚. 但是, 根据目前已知的数据, 已经有一些关于 IL-12 维持 CD4+Th1 细胞的机制的线索. 在 Th1 细胞的分化过程中, IFN- γ 的产生加强, IL-12 的产生减少. 因为 IL-12 是有效的生长因子, 而 IFN- γ 是抗增殖的, 因此 IL-12 可以维持细胞的生长和存活或防止 CD4+ IFN- γ T 细胞的凋亡 (Fuss, I. J. 等, *Gastroenterology*, 117:1078-1088, 1999; Marth, T. 等, *J. Immunol.*, 162:7233-7240). 另外由 IL-12 增加的 IFN- γ 可增加 IL-15 的表达 (Zhang, X. 等, *Immunity*, 8:591-599, 1998), 其与记忆 CD8+T 细胞有关. 基于以上报道, 由于 IL-12 不仅与早期免疫应答有关, 还与记忆免疫应答有关, 因此, IL-12 在疫苗免疫中非常有用.

IL-12 的生物学功能形式是 70 kDa 的异二聚体 IL-12p70, 由二硫键相连的 p40 和 p35 亚基组成. p40 亚基与 IL-6 受体具有氨基酸序列同源性, 因此它属于细胞因子受体超家族, 而 p35 亚基具有与 IL-6/粒细胞集落刺激因子细胞因子家族较远但很重要的关系 (Gearing, D.P., 和 Cosman, D., *Cell*, 66:9-10, 1991).

在体外 (D'Andrea 等, *J. Exp. Med.*, 176:1387-1398, 1992; Podlasky, F.J. 等, *Arch. Biochem. Biophys.* 294:230-237, 1992) 和体内 (Mattner, F. 等, *Eur. J. Immunol.*, 23:2202-2208, 1993; Heinzl, F.P. 等, *Infect. Immun.*, 62:4244-4249, 1994) IL-12p40 作为单体和同二聚体的分泌都远远超过 IL-12p70. 已经证实, 在体外 IL-12 p40 通过与 IL-12 受体竞争性结合而强烈拮抗 IL-12p70 介导的应答 (Gillesen, S. 等, *Eur. J. Immunol.*, 25:200-206, 1995; Ling, P. 等, *J. Immunol.*, 154:116-127, 1995), 这表明了 IL-12p40 作为 IL-12p70 的天然拮抗剂的关键作用. 包括在 IL-12p40 转基因小鼠中 Th1 应答降低 (Yoshimoto, T. 等, *J. Immunol.*, 160:588-594, 1998)、在加

工成生产 IL-12p40 的移植成肌细胞中防止异源排斥 (Kato, K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:9085-9089, 1996) 以及表达 IL-12p40 的腺病毒对 IL-12p70 之肿瘤抑制活性的抑制 (Chen, L. 等, J. Immunol., 159:351-359, 1997) 在内的几项观察资料证实了这一点。但是, 也有报道描述了 IL-12p40 对 IL-12p70 介导的应答有积极的作用, 在某些条件下导致同种抗原特异性的 Th1 发生 (Piccotti, J.R. 等, J. Immunol., 157:1951-1957, 1996)。另外, 本发明人发现了 IL-12p40 作为巨噬细胞趋化分子的新功能 (Ha, S. J. 等, J. Immunol., 163:2902-2908, 1999)。

为证实 IL-12p70 的抗癌作用已经建立了多种体内体系。但是, 如果将重组人 IL-12p70 蛋白质直接注射癌症病人, 存在明显的可导致死亡的副作用 (Robertson, M. J. 和 J. Ritz., Oncologist, 1:88-97, 1996; Cohen, J., Science, 270:908, 1995)。为防止该副作用和经济有效, 进行了许多关于利用 IL-12 基因的基因治疗的研究, 现已证明 IL-12 的基因治疗非常有效, 并且无害 (Rakhmievich, A. L. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:6291-6296, 1996; Tahara, H. 等, J. Immunol., 154:6466-6474, 1995; Lotze, M. T. 等, Ann. N.Y. Acad. Sci., 795:440-454, 1996)。

IL-12 的生物学活性形式 IL-12p70 在利用 IL-12 的基因治疗中是必需的 (Gulber, U. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4143-4147), 并且 p35 和 p40 的 cDNA 必须在细胞中同时得到表达。许多方法已被用于在一个细胞中同时表达 p35 和 p40 亚基。其中之一是利用 p35 和 p40 连续排列并依次表达的表达盒 (Rakhmievich, A. L. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:6291-6296, 1996)。另一种方法是利用脑心肌炎病毒 (EMCV) 的内部核糖体进入位点 (IRES) 来同时表达两个基因。这些方法都成功地在一个细胞中表达了 IL-12p70, 但是如上所述, 没有成功消除持续表达的过量的 IL-12p40 对 IL-12p70 的生物学作用抑制的可能性。

为克服这种本质上的缺陷, 最近提出, 通过一段编码在抗体基因工程中常用的蛋白质接头的 DNA 序列, 将 p35 与 p40 进行遗传连接 (Lieschke, G. J. 等, Nat. Biotechnol., 15:35-40, 1997; Lode,

H. N. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95: 2475-2480, 1998; Lee, Y. L. 等, Human Gene Ther., 9:457-465, 1998). 在上述方法中可以克服过量的 IL-12p40 对 IL-12p70 的生物学活性的拮抗作用. 但是, 由于当 p35 与 p40 连接在一起时 IL-12p70 的结构可能发生了改变, 使其活性降低 5-100 倍多, 因这一问题的存在使该方法还不够好. 为了利用 IL-12 基因有效地治疗癌症或其他疾病, 需要诱导活性不变的 IL-12p70 并防止 IL-12p40 的分泌.

已知糖基化影响蛋白质的折叠、分泌、构象、稳定性和生物学活性. 人 IL-12 的 p35 和 p40 亚基分别表达含有 56 个和 22 个氨基酸的疏水信号序列的 219 个和 328 个氨基酸. 对人 IL-12 的氨基酸序列分析表明在 p35 和 p40 亚基内分别有 3 个和 4 个推定的 N-糖基化位点 (Podlasky, F. J. 等 Arch. Biochem. Biophys., 294:230-237, 1992). Stern 等人报道, 将人 IL-12 用三氟甲烷磺酸或糖苷酶 F 处理后, IL-12 p35 和 IL-12p40 的分子量降低 (Podlasky, F. J. 等 Arch. Biochem. Biophys., 294:230-237, 1992). 这表明人 IL-12 的 p35 和 p40 亚基含有碳水化合物. 在同一报道中还证实用神经胺酶 (neuramidase) 消化之后用内切- α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶消化, IL-12p35 的分子量降低, 而这种处理不影响 IL-12 p40. 该实验表明 IL-12p35 的糖基化是 O-连接的寡糖, 而 IL-12 p40 没有 O-连接的碳水化合物. 而且, 在对 Asn-135 和 Asn-222 氨基酸残基的 N-糖基化的分析中表明, Asn-222 是 N-糖基化位点. 但是, 人和小鼠 IL-12 的确切的 N-糖基化位点及其对 IL-12 的合成、分泌和生物学活性的作用还不明确.

另一方面, 因为在许多病毒性或细菌性疾病预防和治疗以及抑制癌症形成中更需要的是细胞介导的免疫应答而不是体液免疫应答, 所以促进了 IL-12 基因的应用研究. 丙型肝炎是典型的病毒介导的疾病, 一旦感染 HCV, 超过 50% 的病人会转为慢性, 并最终引起肝硬变或肝癌 (Alter, H. J. 等, N. Engl. J. Med., 321:1494-1500, 1989). 至今, 作为丙型肝炎的治疗制剂已知的只有 α -干扰素, 但效果不够好 (10-30%) (Weiland, E. 等, J. Virol., 66:3677-3682, 1992). 因此, 急需对丙

型肝炎比较有效的疫苗或治疗制剂。根据包括人和黑猩猩的医学检验报告, HCV 既与特异的体液免疫应答有关, 也与细胞介导的免疫应答有关 (Prince, A.M. 等, *J. Infect. Dis.*, 165:438-443, 1992), HCV 的结构蛋白质 E1 和 E2 是诱导保护性免疫力的主要抗原 (Choo, Q. L. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91: 1294-1298, 1994). 同样地, 在祛除 HCV 中, 与体液免疫应答相比, 优选地需要包括 CTL 的细胞介导的免疫应答 (Cooper, s. 等, *Immunity*, 10:439-449, 1999; Rinado, C. 等, *J. Virol.*, 69:5838-5842, 1995).

DNA 免疫是最新的诱导细胞介导的免疫应答的方法. 与已有的利用死的或去毒的病原体或病原体的某些部分免疫不同的是, DNA 免疫是将编码病原体特异组分的 DNA 直接注入人体. 已知 DNA 免疫还能诱导针对多种感染的病毒如流感、乙型肝炎和人免疫缺陷病毒的强的免疫应答 (Ulmer, J. B. 等, *Science*, 259:1745-1749, 1993; Michel, M. L. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92:5307-5311, 1995; Irwin, M. J. 等, *J. Virol.*, 68:5306-5044, 1994). 另外, 也有报道 DNA 免疫还可以诱导针对 HCV 的衣壳和 E2 蛋白质的特异的免疫应答 (Major, M. E. 等, *J. Virol.*, 69:5798-5805, 1995; Tedeschi, V. 等, *Hepatology*, 25:459-462, 1997).

但是, 因为抗原在体内的表达频率低, 使 DNA 免疫的应用受到限制. 为增加 DNA 免疫的效果, 可使用活化免疫细胞时必需的一些共同刺激分子的基因 (Geissler, M. 等, *J. Immunol.*, 159:5107-5113, 1997; Iwasaki, A. 等, *J. Immunol.*, 158:4591-4601, 1997; Lee, S. W. 等, *J. Virol.*, 72:8430-8446, 1997). 也用 IL-12 基因有效诱导了针对 HCV 的免疫应答 (Lasartte, J. J. 等, *J. Immunol.*, 162:270-277, 1999). 但是, 上述方法至今没有取得满意的结果, 特别是人类和灵长类的 DNA 免疫 (Boyer, J. 等, *Keystone, Symposium on DNA Vaccines April, 12-17, 1998*).

本发明人努力制备能通过控制糖基化而表达活性 IL-12p70 并能减少可降低 IL-12 发挥的免疫活性的 IL-12p40 分泌的基因. 结果, 获得了

人 IL-12p40 亚基的糖基化位点 Asn-222 发生突变和小鼠 IL-12p40 亚基的糖基化位点 Asn-220 发生突变的突变基因。获得的可以增加活性 IL-12p70 表达和能减少 IL-12p40 分泌的突变基因与 HCV E2 基因一起用于小动物模型、小鼠的 DNA 免疫。通过该方法诱导了最好的细胞介导的免疫应答，并且该免疫应答持续较长时期。因此，可以确定本发明的突变基因作为 DNA 疫苗的佐剂是非常有用的。

发明概述

本发明的一个目的是提供突变的 IL-12p40 基因，其通过对人或小鼠的 IL-12p40 分泌中必需的糖基化位点进行突变以降低 IL-12p40 的分泌，从而活化 IL-12 的基本功能(如活化 CTL 细胞或加强通过 Th1 细胞的免疫应答)，所述 IL-12p40 通过与 IL-12p70 的受体竞争性结合而抑制 IL-12p70 活化。

本发明的另一个目的是提供佐剂，其能通过使用含有突变的 IL-12p40 基因的表达载体和 DNA 疫苗的 DNA 免疫而维持和增加抗原特异性免疫应答。

附图说明

图 1 显示了人和小鼠的 IL-12p40 之间的序列同源性。

图 2 显示了野生型人 IL-12 的 p40 和 p35 亚基，以及本发明中 p40 和 p35 亚基在推定的 N-糖基化位点的氨基酸改变。

图 3a 显示了本发明的细胞裂解物中人 IL-12p35 及其推定的 N-糖基化位点突变的衍生物的 western 印迹分析结果。

图 3b 显示了本发明的细胞裂解物中人 IL-12p40 及其推定的 N-糖基化位点突变的衍生物的 western 印迹分析结果。

图 3c 显示了本发明的细胞上清液中人 IL-12p40 及其推定的 N-糖基化位点突变的衍生物的 western 印迹分析结果。

图 4 显示了本发明的插入有丙型肝炎 (HCV) 包膜糖蛋白 2 (E2) 及野生型或突变的小鼠 IL-12 基因的表达载体。

图 5a 显示了用本发明的 DNA 载体免疫的小鼠血清中 HCV E2 的总 IgG 抗体的滴度测量结果。

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠。

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠。

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫的小鼠。

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠。

图 5b 显示了用本发明的 DNA 载体免疫的小鼠血清中抗 HCV E2 的 IgG1 抗体的滴度测量结果。

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠。

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠。

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫的小鼠。

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠。

图 5c 显示了用本发明的 DNA 载体免疫的小鼠血清中 HCV E2 的 IgG2a 抗体的滴度测量结果。

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠。

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠。

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫

的小鼠.

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠.

图 5d 显示了用本发明的 DNA 载体免疫的小鼠血清中抗 HCV E2 的 IgG2a 和 IgG1 抗体 (IgG2a/ IgG1) 的滴度比测量结果.

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫的小鼠.

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠.

图 6a 显示了用本发明的 DNA 载体免疫后 3 周获得的小鼠脾细胞中 IFN- γ 产生水平的测量结果.

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫的小鼠.

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠.

图 6b 显示了用本发明的 DNA 载体免疫后 6 周获得的小鼠脾细胞中 IFN- γ 产生水平的测量结果.

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫的小鼠.

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫

的小鼠.

图 6c 显示了用本发明的 DNA 载体免疫后 10 周获得的小鼠脾细胞中 IFN- γ 产生水平的测量结果.

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫的小鼠.

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠.

图 7 显示了用本发明的 DNA 载体免疫后, 利用表达 hghE2t 的基因工程 CT26 肿瘤细胞测量针对 HCV E2 的特异 CTL 活性的结果.

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫的小鼠.

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠.

a: 刚刚免疫后, b: 免疫后 3 周,

c: 免疫后 6 周, d: 免疫后 10 周,

e: 免疫后 14 周, f: 免疫后 14 周, 对照(CT26-neo 细胞).

图 8a 显示了用本发明的 DNA 载体免疫的小鼠, 利用表达 hghE2t 的基因工程 CT26 肿瘤细胞激发 2 周后小鼠血清中抗 HCV E2 的总的 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体水平测量结果.

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫

的小鼠.

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠.

图 8b 显示了用本发明的 DNA 载体免疫的小鼠, 利用表达 hghE2t 的基因工程 CT26 肿瘤细胞激发 2 周后小鼠血清中抗 HCV E2 的 IgG2a 和 IgG1 抗体 (IgG2a/ IgG1) 的滴度比测量结果.

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫的小鼠.

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠.

图 8c 显示了用本发明的 DNA 载体免疫后的小鼠用表达 hghE2t 的基因工程 CT26 肿瘤细胞攻击后 IFN- γ 产生水平变化的测量结果.

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫的小鼠.

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠.

图 8d 显示了用本发明的 DNA 载体免疫后, 利用表达 hghE2t 的基因工程 CT26 肿瘤细胞攻击的小鼠存活率的测量结果.

GI: 用 200 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2 免疫的小鼠.

GIII: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12wt 免疫的小鼠.

GIV: 用 100 μ g pTV2-HCV-gDsE2t 和 100 μ g pTV2-mIL-12mut 免疫的小鼠.

图 9 是 IL-12 在体内的生物学功能示意图.

▲ : p35, ○ : p40,
○○ : (p40)₂, ▲○ : IL-12(p70)

发明详述

为实现所述的目的, 本发明提供了 IL-12p40 分泌所必需的 Asn-222(人)或 Asn-220(小鼠)被其他氨基酸取代的人或小鼠突变的 IL-12p40 亚基基因.

本发明提供了含有 IRES 序列的用于共表达人或小鼠突变的 IL-12p40 亚基和亚基本身之基因的基因构建体和表达载体.

另外, 本发明提供了含有和表达 HCV E2 基因的 DNA 疫苗载体、含有 Asn-222(人)或 Asn-220(小鼠)位点突变的 p40 亚基基因的基因构建体以及表达载体.

最后, 本发明提供了利用该基因构建体作为增强免疫应答的佐剂进行基因治疗或 DNA 免疫的方法.

本发明进一步的特征会在下文中描述.

再次重申, 本发明是要提供人或小鼠的突变的 IL-12p40 基因, 其中在具有序列 SEQ. NO. 1 的人 IL-12p40 或具有序列 SEQ. NO. 2 的小鼠 IL-12p40 的分泌中起重要作用的 Asn-222(人)或 Asn-220(小鼠)被其他氨基酸取代.

比较人和小鼠 IL-12p40 的氨基酸序列发现, 小鼠 IL-12p40 的 Asn-220 位于与人 IL-12p40 的 Asn-222 非常相似的前后序列中(图 1).

更特别的是, 编码人 IL-12p40 亚基中 Asn-222 的密码子 AAC 可以变成 CUC、CAG 或 AUA 等, 分别编码氨基酸 Leu、Gln 和 Ile. 本发明给出了证明 cDNA 上 AAC 变成 CTC 或 CAG, 因此密码子 AAC 变成了 CUC 或 CAG 的实施例. 最后, 本发明提供了 Asn-222 氨基酸被 Leu-222 (hp40-N222L)

或 Gln-222 (hp40-N222Q) 取代了的突变基因。

与人 IL-12p40 亚基中 Asn-222 相比, 编码小鼠 IL-12p40 亚基中 Asn-220 的密码子 ACC 可以变成 CUC、CAG 或 AUA, 分别编码氨基酸 Leu、Gln 和 Ile。本发明提供了通过将 cDNA 上的 AAC 改成 CTC, 使 Asn-220 氨基酸被 Leu-220 (mp40-N220L) 取代的突变基因。

本发明的突变基因 hp40-N222L、hp40-N222Q 和 mp40-N220L 分别编码 SEQ. NO. 3、SEQ. NO. 3 和 SEQ. NO. 5 所示的氨基酸序列。

本发明提供了含有用于同时表达亚基本身和人或小鼠突变 IL-12p40 亚基基因的 IRES 的基因构建体, 以及包括该基因构建体的表达载体。

首先, 本发明提供了含有上述基因的 hp40-N222L/IRES/hp35、hp35/IRES/hp40-N222L 和 mp35/IRES/mp40-N220L 基因。hp40-N222L/IRES/hp35 基因和 hp35/IRES/hp40-N222L 基因包括编码 p35 亚基和由 Leu-222 取代 Asn-222 的人 p40 亚基的基因, 而 mp35/IRES/mp40-N220L 基因包括编码 p35 亚基和由 Leu-220 取代 Asn-220 的小鼠 p40 亚基的基因。两个基因都具有能使亚基同时表达的 IRES 序列。对于如 hp40-N222L/IRES/hp35、hp35/IRES/hp40-N222L 和 mp35/IRES/mp40-N220L 基因但不仅限于这些基因, 优选来自 EMCV (脑心肌炎病毒) 的 IRES。IRES 序列在编码 p40 亚基和 p35 亚基的基因的共表达中非常重要。

本发明提供了表达载体, 例如, 含有 hp40-N222L/IRES/hp35 的 pGX0-hp40-N222L/IRES/hp35、含有 hp35/IRES/hp40-N222L 的 pGX0-hp35/IRES/hp40-N222L 以及含有 mp35/IRES/mp40-N220L 的 pTV2-mp35/IRES/mp40-N220L。

本发明给出了实施例, 其中 DNA 疫苗载体 pGX0 质粒由于插入卡那霉素抗性基因取代了 pTV2 DNA 疫苗载体中的氨苄青霉素抗性基因, 有可能用于医学实验 (Song, M. K. 等, J. Virol., 74:2920-2925, 2000), 以及将 hp40-N222L/IRES/hp35 基因和 hp35/IRES/hp40-N222L 基因插入了 pGX0 质粒的准备接受外源基因的部位。将 mp35/IRES/mp40-N220L 基因插入了 pTV2 DNA 疫苗载体的外源基因接受部位。除了以上用于制造表达

载体的质粒外，还有包括原核生物或真核生物的多种载体，使有可能为不同的目的应用不同的载体。还可能改变欲插入表达载体的外源基因接受部位的基因的大小和核苷酸序列。

本发明的表达载体 pGX0- hp35/IRES/hp40-N222L 和 pGX0-hp40-N222L/IRES/hp35 于 2001 年 2 月 26 日保存在 Gene Bank of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(入藏号: KCTC0969BP 和 KCTC 0970BP)。pTV2-mp35/IRES/mp40-N220L 于 2000 年 2 月 29 日保存(入藏号: KCTC0745BP)。

因为欲获得生物活性的 IL-12p70，必须共表达 p35 和 p40，因此除分别表达 hp35 或 hp40 的 pCIN- hp35 或 pCIN- hp40 外，还利用 EMCV 的 IRES 构建了双顺反子表达载体 pGX0-hp40 /IRES/hp35 和 pGX0-hp35/IRES/hp40。为理解 N-糖基化对人 IL-12 的合成、分泌和特异活性的影响，利用定点突变的方法用其他氨基酸残基取代了 p35 和 p40 亚基上存在的推定的 N-糖基化位点的 Asn 氨基酸残基(图 2)。通过野生型蛋白质与突变蛋白质的免疫印迹(图 3a、3b 和 3c)，确定了 hp35 亚基的 Asn-127、-141 和 hp40 的 Asn-222、-303 用于 N-糖基化。

为检测 hp35 或 hp40 的 N-糖基化对 IL-12p70 的异二聚体化的合成以及分泌的影响，用包含每个野生型基因或突变基因的 hIL-12 表达载体转染细胞，然后通过 ELISA 分析获得的培养上清液和细胞裂解物。

结果已经阐明，hp35 的 Asn-127 使 IL-12p70 的异二聚体化和分泌减少。然而，与野生型 hp35 相比，hp35 的 Asn-141 对 IL-12p70 和 IL-12p40 的异二聚体化以及分泌的影响似乎相对不大(表 1)。

此外，hp40 亚基的 Asn-135 或 Asn-222 突变显著降低 IL-12p40 的分泌，而不影响 IL-12p70 的分泌。Asn-222 尤其使 hp40 的分泌跌至相对野生型 hp40 8% 的程度。虽然 hp40 的 Asn-135 不是 N 糖基化位点，但仍引起 hp40 分泌降低，意味着 Asn-135 的 Asn 本身在 hp40 分泌中起重要作用。即使将 Asn-222 的氨基酸替换为 Gln 或 Leu，hp40 的分泌仍然降低，提示这是由于丧失了 Asn-222 处的 N 糖基化(表 1)。因此，分泌 hIL-12 异二聚体 hIL-12p70

不需要Asn-222处的N糖基化, 而只是分泌hIL-12p40需要。

鉴于所有这些结果, 本发明人证实Asn-222的N糖基化是hIL-12p40分泌所必需的, 而hIL-12p70的分泌和异二聚体化并不需要, 同时hp35 Asn-127的N糖基化在hIL-12p70的分泌和异二聚体化中起重要作用。

为研究hIL - 12的N糖基化对生物学活性的影响, 对野生型hIL-12及其包含假定的N糖基化位点突变的衍生物, 通过ELISA分析IFN- γ 诱导能力。

结果, 就IFN- γ 诱导能力而论, 与野生型或其它hp40突变体相比, 通过共转染野生型hp35和hp40突变体(其中Asn-135和/或Asn-222发生突变)获得的培养上清液, 其IFN- γ 诱导能力提高(表1)。并且当培养上清液中补充hp40时, 提高的IFN- γ 诱导能力下降到与野生型类似的水平(表1)。因而表明此结果是由于在包含hp40-N135Q和/或hp40-N222Q突变体的培养上清液中, hIL-12p70的拮抗剂hIL-12p40的水平相对较低, 并且Asn-135和/或Asn-222突变并不提高该突变产生的hp70的活性。

同时, 为了检查hp40 Asn-222的糖基化对hIL-12p40分泌下降的影响, 用包含一定数量突变基因以及不同数量野生型hp35 DNA的表达载体共转染细胞, 然后培养。最后利用ELISA测定诱导的IFN- γ 的量。

一般地, p35亚基不单独分泌, 而是结合p40以IL-12p70的形式分泌, 而p40亚基以单体或同二聚体的形式分泌, 这提示诱导IL-12p70分泌的主要因素是p40, 而不是p35亚基。与此对应, 在野生型hp40和hp40-N222Q突变体中, hIL-12p70的分泌量都与转染的hp35 DNA的量成比例增加(表1)。这意味着, 分泌缺陷的hp40一旦结合hp35亚基, 则能以IL-12p70形式分泌, 因此hp35亚基似乎在hIL-12p70分泌中行使其另一功能。根据最近的报导, hp40由于结合hp35而发生构象变化(Yoon, C. 等人, EMBO J., 19:3530-3534, 2000), 这也提示hp35亚基有助于IL-12p70的分泌。结论是, 包含Asn-222糖基化的hp40本身具有分泌缺陷, 然而其一旦与hp35结合, 形式可发生构象变化, 该构象变化可暴露或产生被掩蔽的或新的分

泌信号，从而诱导异二聚体分泌。

为了通过诱导p35和p40在细胞中共表达以减少p40分泌，并通过诱导p40形成以减少p40的分泌量（其中p40基因位于IRES之后，因为利用IRES的基因表达程度比利用巨细胞病毒(CMV)启动子低很多），构建了hp40/IRES/hp35和hp35/IRES/hp40载体。并且在每一质粒中用hp40-N222L基因替换hp40基因，还生成了hp40-N222L/IRES/hp35和hp40/IRES/hp40-N222L（表1）。比较hp40/IRES/hp35和hp40-N222L/IRES/hp35，后者中hp40分泌减少到5%。另一方面，电穿孔hp35和hp40-N222L时，分泌8%的hp40。hp35和hp40-N222L电穿孔时，有可能这两个质粒没有都转染到细胞中。此外，当细胞中只表达hp40-N222L基因时，分泌少量hp40，而不分泌hp70。因此，与同时表达hp35和hp40-N222L基因的hp40-N222L/IRES/hp35相比，hp40-N222L和hp35的转染细胞应该分泌更多的hp40。比较hp40/IRES/hp35和hp35/IRES/hp40，hp70的分泌和表达没有多大差别，但在hp35/IRES/hp40中，由于hp40位于IRES之后，表达受到抑制，因此hp40的分泌和表达显著下降。在通过插入hp40-N222L基因代替hp40基因产生的hp35/IRES/hp40-N222L中，hp40的分泌水平跌至0.3%。从而通过本实验证实，hp35/IRES/hp40-N222L可以保持hp70的分泌水平并同时使hp40的分泌最少。

本发明另外提供包含并表达HCV-1b E2基因的DNA疫苗载体，以及含有在Asn-222(人)或Asn-220(小鼠)处发生突变的p40亚基基因的基因构建体。

为了检验本发明hIL-12突变基因作为DNA疫苗，用于基因治疗的可能性，检索了与hp40基因Asn-222同源的小鼠IL-12p40(mp40)基因序列。mp40的Asn-220位于与hp40的Asn-222类似的序列环境中，但至今仍不知道这个氨基酸是N糖基化的(图1)。因此，本发明人制备了包含突变型mp40基因mp40-N220L的载体pCIN-mp40-N220L，其中通过定点突变将Asn-220的氨基酸替换为Leu。

为了制备编码小鼠p35和p40亚基并用于DNA免疫的载体，将mp35/IRES/mp40片段插入用作小动物DNA疫苗载体的真核表达载体pTV2中(Lee等, *J. Virol.*, 72:8430-8436, 1998; Cho等, *Vaccine*, 17:1136-1144, 1999)，构建pTV2-mp35/IRES/mp40载体。由于hp35/IRES/hp40-N222L基因可以维持hp70的分泌，而使hp40的分泌最少，据此构建了pTV2-mp35/IRES/mp40-N220L载体，其包含小鼠IL-12p40的Asn-220突变基因并表达p35。

本发明的pTV2-mp35/IRES/mp40-N220L载体于2000年2月29日保藏在Gene Bank of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(入藏号: KCTC 0745BP)。

构建了能在真核细胞中表达HCV-E2蛋白质的DNA疫苗载体pTV2-HCV-E2(Song M. K., et al., *J. Virol.*, 74:2920-2925, 2000)。如图4所示，pTV2-HCV-E2 DNA疫苗载体包含猿猴病毒40复制起点(SV40 ori)、巨细胞病毒(CMV)启动子、腺病毒的三联前导序列(TPL)、多克隆序列(MCS)、SV40多聚腺苷酸化序列(poly A)和氨苄青霉素抗性基因(AmpR)。HCV-E2基因也克隆在载体的MCS中。为促进蛋白质分泌，去除本发明中应用的包含E2基因疏水性氨基酸残基的羧基末端(C端)。为帮助蛋白质表达和细胞分泌，连接疱疹病毒(HSV)糖蛋白D(gD)的氨基末端(N端)和信号序列。

为了分析小鼠IL-12p40 Asn-220突变对IL-12p40或IL-12p70分泌的影响，通过ELISA分析上述载体转染的细胞培养上清液和裂解物中，小鼠IL-12的分泌水平。结果，在关于IL-12p40或IL-12p70分泌及其生物学活性方面，mp40-N220L突变体与hp40 Asn-222突变体显示的特征相似(表1)。

最后，本发明提供了利用包含突变的p40亚基基因(其Asn-222(人)或Asn-220(小鼠)发生突变)的基因构建体作为免疫增强子，进行基因治疗或DNA疫苗免疫的方法。

该方法可用于预防和治疗多种疾病，例如治疗基本上需要细胞免疫

应答的爱滋病、丙型肝炎或乙型肝炎、癌症、流感、结核和疟疾。

在先前报导中，编码HCV E2抗原的质粒(pTV2-gDsE2t)的DNA疫苗接种，在免疫3周之后足以诱导抗原特异性和细胞介导的免疫应答。为了确定和野生型mIL-12基因相比，突变型mIL-12基因是否影响体内有效的抗原特异性免疫应答，并检验这种影响是否可以维持较长时间，用本发明的DNA疫苗载体免疫小鼠并加强，通过ELISA分析所产生的HCV E2特异性抗原。

结果，HCV E2 DNA疫苗诱导的系统性的HCV E2特异性总IgG、IgG1和IgG2a水平显著高于阴性对照值，用mIL-12mut基因或mIL-12wt基因共注射，与HCV E2 DNA疫苗单独注射相比，总IgG水平相似。然而，在注射HCV E2 DNA的各组间，IgG1水平相似。相反，较之HCV E2 DNA单独免疫组，抗HCV E2的IgG2a水平在mIL-12wt组中略微升高，在mIL-12mut组中显著升高。此外，公认为Th1免疫力的间接标志的IgG2a/IgG1之比，在mIL-12mut组最高，显示了IgG2水平的相似特性(图5a、5b、5c和5d)。这些数据表明，与mIL-12wt或单独HCV E2组相比，mIL-12mut基因显著影响体液免疫应答中IgG亚类从IgG1向IgG2a的转换。在加强免疫后这种影响维持了0、3、6和10周。

分析脾细胞中IFN- γ 的表达，以研究mIL-12mut基因对Th1免疫应答的影响，这是用于评价细胞介导的免疫应答效力的参数之一。

结果，无细胞因子基因的HCV E2 DNA免疫组，其IFN- γ 水平与hghE2t蛋白质浓度成比例增加，而模拟质粒免疫组不然。如所预期地，mIL-12wt组的IFN- γ 诱导水平比单独HCV E2组更强，mIL-12mut组产生的IFN- γ 高出mIL-12wt组2-3倍(图6a、6b和6c)，表明mIL-12p70可提高抗原特异性Th1免疫应答，而mIL-12p40在体内抑制通过IL-12p70诱导的Th1免疫应答。

如上所述，mIL-12mut基因有助于HCV E2 DNA免疫中的长期Th1免疫应答。为了确定由mIL-12mut基因表达而诱导的长期Th1免疫应答是否与主要的细胞介导免疫应答即CTL免疫力有关，并且倘若如此，还进一步查明mIL-12mut基因是否能影响DNA免疫模型中CTL活性的保持，本发明人于

加强免疫后不同周用DNA免疫小鼠的脾细胞进行CTL测定。

结果，在加强两周之后，除模拟的质粒免疫组以外，全部组都显示很强的抗原特异性CTL活性。但在单独HCV E2组、mIL-12wt组和mIL-12mut组之间几乎没有显著性差异。mIL-12wt共免疫组的CTL反应全程都比单独HCV E2组提高更多，表明mIL-12基因具有增强CTL产生的作用。有趣的是，mIL-12mut组与其它两个组（即单独HCV E2组和mIL-12wt组）之间的CTL活性差异，随着加强免疫后时间的延长，越来越大。尤其在第10周，单独HCV E2组和mIL-12wt组的CTL反应极低，表明长时间后抗原特异性CTL的频率显著降低，而mIL-12mut组的CTL活性比另两组高5-10倍，维持抗原特异性的CTL反应(图7)。作为对照，CT26-neo细胞用作靶细胞时，各组都没有观察到裂解，表明这些实验中观察到的CTL活性是HCV E2特异性的。

本发明人又测定了体内HCV E2特异性CD8⁺细胞的频率，以证实对mIL-12刺激的抗原特异性CD8⁺ T细胞的诱导和保持的影响。使用了两种免疫测定方法。第一种方法是计数产生抗原特异性IFN- γ 的细胞。为了研究CTL活性的增强是否来源于抗原特异性CD8⁺ T细胞的分泌，分离CD8⁺细胞，用缀合PE的抗小鼠IFN- γ 抗体或对照的缀合PE的同型匹配抗体染色。通过FACSCalibur流式细胞术(Becton Dickinson)分析染色的细胞，然后观察IFN- γ 的诱导。结果，在加强免疫后0、3、6、10或14周，mIL-12mut基因共免疫的小鼠与单独HCV E2组和mIL-12wt组相比，产生IFN- γ 的CD8⁺细胞频率增加3-7倍，显示与CTL反应的结果有相关性。相反，同型配合的对照实验中，各组间没有差异。与CTL测定结果类似，在加强免疫之后2-3周，各免疫组之间产生IFN- γ 的CD8⁺ T细胞的频率差异没有扩大。这些数据证明，mIL-12mut基因表达可在DNA免疫后长时间维持产生IFN- γ 的CD8⁺T细胞的频率。

为了研究抗原特异性CD8⁺ T细胞的频率，利用另一测定方法，即有限稀释法(LDA)测定HCV E2特异性CD8⁺ T细胞的频率。将加强免疫小鼠的脾细胞稀释为不同浓度，与表达E2的CT-26细胞培养。然后测定抗原特异

性刺激的CD8+ T细胞的CTL活性。有限稀释测定的结果与胞内染色测定结果相似。也就是说，mIL-12mut组甚至在免疫初期就观察到最高的抗原特异性CD8+ T细胞的频率，并且该频率在加强免疫后能维持14周以上(表2)。

也随时间观察了未经加强免疫的HCV E2特异性CD8+ T细胞的频率。总的抗原特异性CD8+ T细胞的频率略微降低，但在mIL-12mut组观察到抗原特异性CD8+ T细胞的最高频率(表2)。

这一点可能表明，IL-12p70本身在体内细胞介导免疫应答中的作用是从最开始诱导Th1和CTL活化并维持很长时间，而IL-12p40则作为体内拮抗剂抑制IL-12p70。

为了证实mIL-12mut基因体内诱导Th1和CTL免疫力，并检测保护性免疫力与Th1和CTL免疫应答的相关性，在加强免疫后12周，将表达hghE2t的CT26-hghE2t肿瘤细胞注射给各组免疫小鼠。注射后2周，测定抗原特异性IgG、IgG1、IgG2的相对水平以及IgG2a/IgG1的比值(图8a和图8b)。结果，在mIL-12mut组观察到最高水平的IgG2a/IgG1比值，表明可以通过甚至在肿瘤注射中的mIL-12mut诱导Th1免疫应答。

测定肿瘤大小30天。具体地，每三天用测径器测定肿瘤的面积和直径，以确定平均的局部肿瘤的生长。还观察了大约70天，确定小鼠的存活率。mIL-12mut免疫组小鼠诱导强的Th1免疫应答。与单独pTV2-gDsE2t免疫相反，mIL-12wt免疫组的肿瘤生长延迟(图8c)，而mIL-12mut免疫组的肿瘤生长显著延迟。对照组中大部分小鼠长有肿瘤，并于50天内死亡，而70天后mIL-12mut组中的90%的小鼠仍能存活(图8d)。因此这些数据表明，本发明的mIL-12mut基因诱导的HCV E2特异性Th1和CTL反应，可提供体内保护作用，以抵抗修饰的表达特异性抗原的肿瘤细胞的侵害。

本发明人证实，包含IL-12p40分泌所必需的、突变的Asn-222(人)或Asn-220(小鼠)的人或小鼠突变的IL-12p40亚基，可作为佐剂用于DNA疫苗免疫和基因治疗。因此，本发明提供包含人或小鼠突变的IL-12p40基因的佐剂，作为DNA免疫和基因治疗的有效组分，其可诱导预防并治疗

各种疾病的抗原特异性免疫应答。

如果该佐剂与DNA疫苗一起使用，则可以通过提高CD8⁺或T辅助细胞分泌IFN- γ 以及细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的水解活性，从而诱导免疫应答。

实施例

本发明实用的以及当前优选的实施方案如以下实施例所示进行说明。

然而，应当理解为本领域技术人员根据此公开内容，可以在本发明的启示和范围内修改及改进。

实施例1: 人IL-12表达载体的构建

<1-1> 人IL-12表达载体的构建

利用逆转录酶-聚合酶链式反应(RT-PCR, PCR System 2400, Perkin Elmer)克隆和扩增人p35(820bp)和p40(1050bp)亚基cDNA。每个扩增的cDNA亚克隆到通用载体pSK(Stratagene, La Jolla, California)的Sma I区,构建成pSK-hp35和pSK-hp40。

为了制备编码hp35和hp40基因的双顺反子载体,构建了pSK-内部核糖体进入位点(IRES)载体。将RT-PCR获得的脑心肌炎病毒(EMCV)IRES基因,亚克隆到pSK质粒的Sma I和Pst I位点之间。用EcoRV酶切pSK-IRES载体,并使用T4 DNA聚合酶将用Xba I和BamH I处理pSK-hp40而获得p40 DNA片段,添加至其上,因此制备了pSK-hp40/IRES。然后用Nco I和Sac I处理pSK-hp35,得到p35 DNA片段,插入pSK-hp40/IRES,构建p40、IRES、p35基因依次排列的质粒pSK-hp40/IRES/hp35。

还构建了pSK-hp35/IRES/hp40。用EcoRV酶切pSK-IRES载体,并在其上加入pSK-hp40/IRES/hp35经Nco I和Not I处理获得的hp35 DNA片段。加入pSK-hp40经Nco I和BamH I酶切获得的hp40片段,构建pSK-hp35/IRES/hp40质粒。将hp40/IRES/hp35和hp35/IRES/hp40基因克隆到pGX0载体的Spe I/Not I和Xho I/Not I位点,以构建

pGX0-hp40/IRES/hp35和pGX0-hp35/IRES/hp40表达载体, 其可在哺乳动物细胞中表达活性IL-12p70。通过在pTV2载体中插入抗卡那霉素基因, 构建了pGX0载体(Song, M. K. 等, *J. Virol.*, 74:2920-2925, 2000)。

<1-2> p40亚基表达载体的构建

用Sac II和Not I酶切pCIN-hp40/IRES/hp35载体(以除去p35亚基编码基因), 用T4 DNA聚合酶自我连接, 构建p40亚基表达载体, 命名为pCIN-hp40。

<1-3> p35亚基表达载体的构建

为了构建p35亚基表达载体, 用Nco I和T4 DNA聚合酶酶切并连接pCIN-hp40/IRES/hp35载体, 得到p35 DNA片段。将该p35 DNA片段插入pCI-neo载体的Xho I和Not I限制性内切酶位点, 命名为pCIN-hp35。

实施例2: 小鼠IL-12表达载体的构建

<2-1> 人IL-12表达载体的构建

为了制备编码小鼠p35和p40基因的双顺反子载体, 将从小鼠IL-12p40 PCR产物(Schoenhaunt, D. S. 等人, *J. Immunol.*, 148:3433-3440, 1999)用Nco I和BamH I处理得到p40 DNA片段, 插入切开的包含EMCV IRES的pSK-IRES载体, 构建了pSK-IRES/mp40载体。使用BamH I和T4 DNA聚合酶, 将小鼠p35 DNA片段插入pSK-IRES/mp40, 构建了pSK-mp35/IRES/mp40质粒。最后, 将mp35/IRES/mp40基因插入pCI-neo载体(Promega)的XhoI和NotI位点, 构建了pCIN-mp35/IRES/mp40表达载体, 其可在哺乳动物细胞中表达活性的IL-12p70。

<2-2> p40亚基表达载体的构建

为了构建小鼠野生型p40亚基表达载体, 用NcoI和SacI处理pSK-mp35/IRES/mp40载体, 得到p40 DNA片段。将该p40片段插入经相同限制性酶处理的pGEX-KG载体(Clontech), 构建了pGEX-KG-mp40。用EcoRI

和NotI处理pGEX-KG-mp40, 插入pCI-neo载体的EcoRI和NotI位点。这样得到pCIN-mp40表达载体。

<2-3> p35亚基表达载体的构建

为了构建小鼠野生型p35亚基表达载体, 用XhoI和EcoRI处理pSK-mp35/IRES/mp40载体, 得到p35 DNA片段。将该DNA片段插入利用相同限制性酶处理的pCI-neo载体的XhoI和EcoRI位点, 构建pCIN-mp35表达载体。

实施例3: 具有部分糖基化突变的IL-12p40和IL-12p70的构建

利用定点诱变, 将预计用作hp35和hp40亚基的N糖基化位点的7个Asn密码子, 替换为无关密码子。

为了构建hp40和hp35假定的N糖基化位点的谷氨酰胺突变基因, 根据Haraguchi等人的方法(Haraguchi等人J. Immunol., 163:2092-2098, 1999), 利用PCR进行氨基酸的置换。通过核苷酸的合成使用突变引物, 例如SEQ. ID NO. 6所示的T7、SEQ. ID NO. 7所示的T3、SEQ. ID NO. 8所示的hp40-N125Q(S)、SEQ. ID NO. 9所示的hp40-N125Q(AS)、SEQ. ID NO. 10所示的hp40-N135Q(S)、SEQ. ID NO. 11所示的hp40-N135Q(AS)、SEQ. ID NO. 12所示的hp40-N222Q(S)、SEQ. ID NO. 13所示的hp40-N222Q(AS)、SEQ. ID NO. 14所示的hp40-N303Q(S)、SEQ. ID NO. 15所示的hp40-N303Q(AS)、SEQ. ID NO. 16所示的hp40-N127Q(S)、SEQ. ID NO. 17所示的hp40-N127Q(AS)、SEQ. ID NO. 18所示的hp40-N141Q(S)、SEQ. ID NO. 19所示的hp40-N141Q(AS)、SEQ. ID NO. 20所示的hp40-N251Q(S)以及SEQ. ID NO. 21所示的hp40-N251Q(AS)。(S)和(AS)分别表示正义和反义引物。

为了构建hp40和hp35的单个谷氨酰胺突变基因, 以实施例<2-2>产生的pCIN-mp40或实施例<2-3>产生的pCINmp35为模板, 用T7引物和每个正义引物进行PCR。类似地, 将T3引物和每个反义引物用于PCR。得到两个均有包含突变点的公共位点的PCR片段。以这些产物的混合物为模板,

利用侧翼引物进行第二次PCR，产生融合产物。将该产物插入pCI-neo质粒。类似地，以单个或两个谷氨酰胺突变基因作为PCR模板，构建双重或三重谷氨酰胺突变基因。通过DNA序列分析证实突变基因。

为了构建包含mp40上Asn-220处 N糖基化缺陷的小鼠IL-12p70基因，将实施例<2-1>产生的pCIN-mp35/IRES/mp40质粒中的mp40基因区替换为mp40-N222L。在构建pCIN-mp40-N222L的突变实验中，所用PCR引物为SEQ. ID NO. 22代表的mp40-N220L(S)以及SEQ. ID NO. 23代表的包含SacI位点的mp40-N220L(AS)。利用诱变产生的特异性识别位点的限制性内切酶处理以及DNA序列分析，确证扩增的突变基因。

图2显示本发明的人IL-12p40或IL-12p35亚基的正常和突变基因的氨基酸组成。带有氨基酸编号的Y符号用来表明假定的N糖基化位点，方框表示每个突变基因中置换的氨基酸。

实施例4: 人IL-12p40的Asn222处的N糖基化的影响

将COS-7(ATCC)细胞培养于包含10%加热灭活的胎牛血清的Dulbecco's modified Eagle's培养基中(DMEM, GIBCO-BRL)。通过电穿孔进行COS-7细胞转染。向培养基中包含大约 5×10^6 个细胞的悬浮液中加入20 ug样品DNA及2 ug pNEB-SEAP(pNEB-分泌的碱性磷酸酶, New England Biolabs)(其表达分泌的碱性磷酸酶并作为内对照), 在250 V、960 pF进行脉冲(电穿孔仪和0.4电穿孔杯来自Bio-Lad)。

转染后24小时, 用1.5ml无血清的CHO-SFM II培养基(GIBCO-BRL)取代该培养基。某些实验中加入1.5 ug/ml的衣霉素。再次温育24小时后, 离心收集上清液和细胞沉淀。上清液用于SEAP测定, 细胞沉淀重悬于200ul裂解液中(Promega)。利用ELISA(R & D system)测定上清液和细胞裂解物中的IL-12p70和IL-12p40水平。为了免疫印迹, 将上清液和细胞裂解物进行10%或12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)。将以上实验分离的蛋白质电转移到尼龙膜(Amersham)。利用生物素标记的人IL-12抗体(Amersham)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的链亲和素(PharMingen)以及ECL试剂盒(Amersham)获取膜上吸附的蛋白质。结果如

表1所示。利用ELISA测定IL-12p70或IL-12p40的表达水平，按相对野生型水平（任意地定为100%）来表示。

〈表1〉 IL-12p40和IL-12p70的表达水平、分泌以及IFN- γ 诱导能力的变化

构建体 ^a	细胞裂解物 (%) ^b		上清液 (%) ^b		IFN- γ 诱导 (%) ^c
	IL-12p40	IL-12p70	IL-12p40	IL-12p70	
mock ^f	< 1 ^g	< 1	< 1	< 1	5.2 \pm 2.3
hp35 + hp40	100 \pm 8.3	100 \pm 12	100 \pm 13	100 \pm 7.4	100 \pm 11
hp40	102 \pm 11	< 1	91 \pm 16	< 1	8.3 \pm 2.1
hp35-N127Q + hp40	99 \pm 4.3	72 \pm 7.7	98 \pm 16	55 \pm 14	98 \pm 19
hp35-N141Q + hp40	102 \pm 18	90 \pm 12	87 \pm 11	95 \pm 8.1	91 \pm 21
hp35-N251Q + hp40	97 \pm 10	88 \pm 8.4	88 \pm 12	89 \pm 8.9	102 \pm 18
hp35-N127,141Q + hp40	88 \pm 6.7	71 \pm 4.6	103 \pm 13	52 \pm 11	90 \pm 7.9
hp35	< 1	< 1	< 1	< 1	3.4 \pm 1.4
hp40-N125Q + hp35	89 \pm 11	97 \pm 17	108 \pm 17	101 \pm 11	108 \pm 21
hp40-N135Q + hp35	92 \pm 13	99 \pm 4.4	29 \pm 4.7	102 \pm 14	121 \pm 9.1
hp40-N135Q + hp35 + rhp40 ^h					97 \pm 14
hp40-N222L + hp35	90 \pm 16	89 \pm 21	8 \pm 6.2	93 \pm 12	142 \pm 24
hp40-N222Q + hp35 (10 : 10) ⁱ	88 \pm 17	90 \pm 14	9 \pm 4.3	94 \pm 7.5	146 \pm 12
hp40-N222Q + hp35 (10 : 0)	92 \pm 6.7	< 1	10 \pm 5.3	< 1	5.3 \pm 3.1
hp40-N222Q + hp35 (10 : 2)	87 \pm 11	39 \pm 7.0	11 \pm 2.7	48 \pm 16	125 \pm 14
hp40-N222Q + hp35 (10 : 4)	84 \pm 14	62 \pm 11	9 \pm 1.1	72 \pm 9.2	139 \pm 24
hp40-N222Q + hp35 (2 : 10)	41 \pm 4.2	92 \pm 11	2.4 \pm 1.0	91 \pm 7.4	166 \pm 19
hp40-N222Q + hp35 (4 : 10)	65 \pm 7.8	99 \pm 17	7.2 \pm 0.8	97 \pm 11	151 \pm 23
hp40-N222Q + hp35 + rhp40 ^h					103 \pm 18
hp40-N303Q + hp35	108 \pm 12	102 \pm 22	104 \pm 11	121 \pm 19	97 \pm 7.8
hp40-N135,222Q + hp35	86 \pm 11	88 \pm 6.9	4.0 \pm 2.1	81 \pm 8.4	147 \pm 15
hp40-N135,303Q + hp35	89 \pm 7.1	97 \pm 11	23 \pm 4.5	82 \pm 11	103 \pm 8.3
hp40-N222,303Q + hp35	91 \pm 7.9	102 \pm 24	19 \pm 6.7	85 \pm 4.8	125 \pm 12
hp40-N135,222,303Q + hp35	85 \pm 7.4	65 \pm 4.3	2.2 \pm 1.1	65 \pm 7.4	148 \pm 28
hp35-N127,141Q + hp40-N222,303Q	89 \pm 11	65 \pm 12	17 \pm 8.8	51 \pm 6.5	120 \pm 13
mock ^j	< 1	< 1	< 1	< 1	5.4 \pm 3.2
hp40/RES/hp35	100 \pm 11	100 \pm 21	100 \pm 14	100 \pm 17	100 \pm 16
hp40-N222L/RES/hp35	88 \pm 13	87 \pm 12	5.3 \pm 3.2	95 \pm 15	134 \pm 17
hp35/RES/hp40	6.2 \pm 2.3	99 \pm 14	4.3 \pm 1.9	101 \pm 13	138 \pm 21
mp35/RES/hp40-N222L	5.8 \pm 3.1	97 \pm 17	0.3 \pm 0.2	97 \pm 16	169 \pm 33
mock ^k	< 1	< 1	< 1	< 1	5.2 \pm 2.4
mp35/RES/mp40 (mIL-12wt)	100 \pm 17	100 \pm 11	100 \pm 22	100 \pm 12	100 \pm 22
mp35/RES/mp40-N220L (mIL-12mut)	94 \pm 22	96 \pm 7.9	2.2 \pm 0.5	98 \pm 18	148 \pm 19

a; 每个DNA构建体总计20ug用于电穿孔转染COS-7细胞。同时转染两个DNA构建体时，每个DNA构建体使用10 ug。

b; 利用ELISA测定人和小鼠IL-12p70或IL-12p40的表达水平，按相对野生型水平（100%）来表示。

c; 每种突变上清液中的等量p70用于测定IFN- γ 诱导测定。利用ELISA测定IFN- γ 的诱导水平，按相对野生型水平（定为100%）来表示。

d; IL-12p40表示IL-12p40的单体和同二聚体形式的p40，而非

IL-12p70的p40部分。

e; IL-12p70表示包含IL-12p35和IL-12p40的异二聚体。

f; 用于独立表达hIL-12p40、hIL-12p35及其衍生物的质粒主链是pCIN-neo, 被称作模拟物(mock)。

g; <1 表示低于ELISA测定可检测范围的值。

h; 每种所示突变型(hp40-N135Q或hp40-N222Q)和野生型上清液中的等量p70用于IFN- γ 诱导测定时, 各突变型上清液中与野生型上清液相比不足的hp40, 用给hp40单独转染后获取的hp40上清液重溶。

i; ()中的数值表示每种共转染的质粒pCIN-hp40-N222Q和pCIN-hp35中的量(ug)。总计共转染20ug DNA, 用pCI-neo质粒补充不足的DNA量。

j; 用于共表达hIL-12p40、hIL-12p35或其衍生物的质粒主链是pGX0, 被称作模拟物。

k; 用于共表达mIL-12p40和mIL-12p35或其衍生物的质粒主链是pTV2, 被称作模拟物。

如表1所示, p35的Asn-141突变和p40的Asn-303突变对IL-12p70或IL-12p40的分泌没有影响。但是在Asn-135和Asn-222突变的IL-12p40分泌下降。特别是, 用亮氨酸(Leu)或谷氨酰胺(Gln)替换Asn-222的突变体显示相同的结果, 表明Asn-222处N糖基化的缺失非常重要。

图3a显示将野生型和突变型人IL-12p35基因转染COS-7细胞后, 其细胞裂解物的免疫印迹结果。第1和2列分别为用pCI-neo和pCIN-hp35转染的细胞裂解物的结果。第3、4、5和6列分别为用包含突变基因的表达载体例如pCIN-hp35-N127Q、pCIN-hp35-N141Q、pCIN-hp35-N251Q和pCIN-hp35-N127, 251Q转染的细胞裂解物的结果。第2和5列中的约33.2 kDa条带是p35亚基N糖基化的蛋白质。如第3和4列所示, 用衣霉素抑制N糖基化时, 形成28 kDa条带。因此, Asn-127和Asn-141氨基酸是N糖基化位点。

图3b显示将野生型和突变型人IL-12p40基因转染COS-7细胞后, 其

细胞裂解物的免疫印迹结果。第1和2列分别为用pCI-neo和pCIN-hp40转染的细胞裂解物的结果。第3、4、5和6列分别为用包含突变基因的表达载体例如pCIN-hp40-N125Q、pCIN-hp40-N135Q、pCIN-hp40-N222Q和pCIN-hp40-N303Q转染的细胞裂解物的结果。此外，第7、8、9和10列为用双重或三重突变基因转染的细胞裂解物的结果。第11列为用pCIN-hp40和抗N糖基化的拮抗剂衣霉素转染的细胞裂解物的结果。

在许多报导中，在IL-12p40的免疫印迹测定中已知有3-4条36-45 kDa的带。类似地，用野生型IL-12p40和IL-12p35转染的细胞裂解物中，其免疫印迹测定也出现36、37.5、40和43.1 kDa条带。衣霉素处理的细胞裂解物中，只剩下36 kDa条带，其它三条带消失了(第11列)。所以该条带是没有N糖基化的p40亚基。Asn-125或Asn-135突变得到的条带几乎与野生型中的相同(第3、4列)。Asn-222和Asn-303中条带移位(第5、6列)，表明135、222和303位氨基酸Asn是N糖基化位点。

图3c显示用野生型和突变型人IL-12p40基因转染的COS-7细胞的培养上清液的免疫印迹结果。每列的说明与图3b相同。与细胞裂解物的结果类似，产生3-4条36-45 kDa的带。Asn-125或Asn-135突变得到的条带几乎与野生型的相同(第3、4列)。Asn-222和Asn-303的条带移位(第5、6列)。特别是Asn-135和Asn-222突变体，与细胞裂解物的结果相反，不分泌到细胞培养基中。此结果与ELISA获得的定量测定结果一致。

包含本发明突变基因的表达载体pGX0-hp35/IRES/hp40-N222L和pGX0-hp40-N222L/IRES/hp35(其中Asn-222替换为Leu-222)，于2001年2月29日保藏于Gene Bank of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(登入号: KCTC 0969BP和KCTC 0970BP)。

<4-1> hp35的N糖基化对hIL-12p70的合成、异二聚体化及分泌的影响。

利用包含野生型hp35基因或其N糖基化突变基因的hIL-12表达载体转染细胞，通过ELISA分析其培养上清液和裂解物，研究hp35的N-糖基化对IL-12p70的合成、异二聚体化及分泌的影响。

如表1所示, 去除hp35上除Asn-127以外的潜在N糖基化残基, 并不显著影响hIL-12p70的合成、异二聚体化及分泌。然而, 当转染效率归一化时, western印迹中hp35-N127Q和hp35-N127, 141Q的表达水平, 与其它突变体相似, 故Asn-127的去糖基化在某种程度上降低了hIL-12p70的异二聚体化和分泌。因此, 这些结果表明, 对于hIL-12p70的异二聚体化和分泌至关重要是hp35的Asn-127N处的N糖基化, 而非Asn-141。

<4-2> hp40的N糖基化对hIL-12p70的合成、异二聚体化及分泌的影响。

为了确定hp40的N糖基化对IL-12p70的合成、异二聚体化及分泌的影响, 利用包含野生型hp40基因或其N糖基化突变基因的hIL-12表达载体转染细胞, 通过ELISA分析其培养上清液和裂解物中的hIL-12p70和hIL-12p40的水平。

如表1所示, 这些突变体的细胞外hIL-12p70水平与野生型hp40的似, 故Asn-135或Asn-222的突变对hIL-12p70的分泌几乎没有影响。有趣的是, Asn-135和Asn-222突变体的hIL-12p40分泌显著降低, 尤其是Asn-222突变体, 其分泌水平低于野生型hp40的约9%, 表明只有hIL-12p40的分泌需要Asn-222处的N糖基化, 而hIL-12的异二聚体形式hIL-12p70并不需要。此外, 包含Asn-135和/或Asn-222的双重和三重突变体, 显示低水平的hIL-12p40, 而非低水平的hIL-12p70。相反, 其它突变体和野生型hp40相比, 其细胞裂解物中似乎产生等量的hIL-12p40和hIL-12p70。Asn-125和Asn-303的突变并不引起hIL-12p40和hIL-12p70在表达、异二聚体化和分泌上的显著差异。

总而言之, 这些数据表明hp40 Asn-222的N糖基化对IL-12p40分泌是重要的, 但对IL-12p70的异二聚体化和分泌中并不需要, 而hp35 Asn-127的N糖基化对于IL-12p70的异二聚体化和分泌都是重要的。这也与hp35的N糖基化似乎是IL-12p70分泌的关键条件的报导相一致(Carra, G. 等, *J. Immunol.*, 164:47524761, 2000)。

<4-3> hIL-12的N糖基化对其生物学活性的影响

为研究hIL-12的N糖基化对其生物学活性的作用，分析野生型hIL-12及其在假定的N糖基化位点处具有突变衍生物的IFN- γ 诱导能力。包含等量野生型hIL-12p70及其突变体（每种100ng/ml）的培养上清液，与人PBLs温育。利用ELISA确定各培养上清液中的IFN- γ 诱导水平。如表1所示，IFN- γ 的诱导在野生型及其所有衍生物之间几乎没有差异。然而，和野生型或其它hp40突变体相比，Asn-135和/或Asn-222突变的hp40衍生物显示一定程度上提高的IFN- γ 诱导。这大概由于作为hIL-12p70拮抗剂的hIL-12p40，在包含hp40-N135Q和/或hp40-N222Q的突变体的培养上清液中，与其它突变体相比其水平相对很低。

实施例5: IL-12p35在包含糖基化突变的IL-12p70分泌中的作用

为了研究hp40 Asn-222处的去糖基化如何降低hIL-12p40而非hIL-12p70的分泌，本发明人将有限量的hp40-N222Q表达质粒与不同量的野生型hp35 DNA共转染。

从新鲜血液中通过Ficoll-Hypaque(Sigma)密度梯度离心分离人外周血单核细胞(PBMC)，重悬于补充有10%加热灭活FBS和青霉素/链霉素(GIBCO-BRL)的RPMI-1640培养基(GIBCO-BRL)中。为了进行人IFN- γ 诱导测定，人PBM细胞(4×10^5)与包含100 ng/ml人IL-12p70或其突变体衍生物的培养上清液温育16小时。

为了小鼠IFN- γ 检测，取6-8周龄雌性BALB/c小鼠的脾，将 1×10^5 脾细胞与包含100 ng/ml小鼠IL-12p70或其突变体衍生物的培养上清液温育24小时。分别利用人和小鼠IFN- γ ELISA试剂盒(R & D systems)测定人和小鼠IFN- γ 的诱导量。结果如表1所示。表1的数值是由ELISA测定的IFN- γ 量，按相对野生型水平（定为100%）来表示。

众所周知，p35亚基一般并不单独分泌，而是结合p40亚基以IL-12p70的形式分泌，而p40亚基以单体或同二聚体的形式分泌，表明p40亚基是IL-12p70分泌的主要因素。如表1所示，在野生型hp40和hp40-N222Q突变体中，hIL-12p70的分泌水平与转染的hp35 DNA的量成比

例增加。此结果表明分泌缺陷的hp40亚基如果联合hp35亚基，则以IL-12p70的形式分泌，提示hp35亚基也有助于hIL-12p70的分泌。最近有报导，hp40亚基与hp35结合，发生构象变化，提示hp35亚基可能有助于IL-12p70分泌(Yoon, C.等, *EMBO J.*, 19:3530-3534, 2000)。根据此报告和本发明的数据可以证实，包含Asn-222处的去糖基化的hp40自身分泌缺陷，但与hp35结合则可分泌，这是由于hp40区域发生构象变化，随后分别暴露或产生被掩蔽的或新的分泌信号。

实施例6: 包含小鼠IL-12p40 Asn-220突变基因的HCV-E2 DNA疫苗和表达载体的构建

<6-1> pCIN-mp40-N220L的构建

为了检验本发明hIL-12突变基因作为DNA疫苗，用于基因治疗的可能性，检索了与hp40基因Asn-222同源的小鼠IL-12p40(mp40)基因序列。mp40的Asn-220位于与hp40 Asn-222类似的序列环境内，但至今仍不知道这个氨基酸是N糖基化的。因此，本发明人制备了突变型mp40基因mp40-N220L，其中通过定点诱变将氨基酸序列中的Asn-220替换为Leu。诱变作用SEQ. NO. 22和SEQ. NO. 23使为引物。产生SacI限制性位点，以易于鉴定突变基因。利用对诱变所产生的特异性识别位点的限制性内切酶处理以及DNA序列分析，确证扩增的突变基因。最后构建了包含可于动物细胞中表达的小鼠IL-12p40突变基因的pCIN-mp40-N220L载体。

<6-2> pTV2-mp35/IRES/mp40-N220L载体的构建

为了制备编码小鼠p35和p40亚基并用于DNA免疫的载体，将用作小动物DNA疫苗载体的真核表达载体pTV2(Lee, 等, *J. Virol.*, 72:8430-8436, 1998; Cho, 等, *Vaccine*, 17:1136-1144, 1999)用Asp718和Not I处理。通过在其中插入从pSK-mp35/IRES/mp40经限制性内切酶处理得到的mp35/IRES/mp40片段，构建了pTV2-mp35/IRES/mp40载体。将mp40-N220L片段插入经NcoI和NotI处理的pSK-mp35/IRES/mp40，构建了包含Asn-220突变基因、可表达p35的pSK-mp35/IRES/mp40-N220L载体。

用EcoRV和NotI处理pTV2-mp35/IRES/mp40载体，以删除mp40片段，然后添加mp40-N220L。结果构建了pTV2-mp35/IRES/mp40-N220L。

本发明的pTV2-mp35/IRES/mp40-N220L载体于2000年2月29日保藏在Gene Bank of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(登入号: KCTC 0745BP)。

<6-3> pTV2-HCV-E2载体的构建

构建了能在真核细胞中表达HCV-E2蛋白质的DNA疫苗载体pTV2-HCV-E2(Song M. K.等, *J. Virol.*, 74:2920-2925, 2000)。如图4所示, pTV2-HCV-E2 DNA疫苗载体包含猿猴病毒40复制起点(SV40 ori)、巨细胞病毒(CMV)启动子、腺病毒的三联前导序列(TPL)、多克隆序列(MCS)、SV40多聚腺苷酸化序列(poly A)和氨苄青霉素抗性基因(AmpR)。并且, HCV-E2基因也克隆在载体的MCS中。为促进蛋白质分泌, 去除包含本发明所用的E2基因的疏水性氨基酸残基的羧基末端(C端)。为有助于蛋白质表达和细胞分泌, 连接了疱疹病毒(HSV)糖蛋白D(gD)的氨基端(N端)和信号序列。

<6-4> 小鼠IL-12p40 Asn-220突变的IL-12p40和IL-12p70的分泌

利用<实施例4>中相同方法将表1所列载体转染进COS-7细胞。通过ELISA(PharMingen)分析该培养上清液和细胞裂解物。野生型IL-12p70和40的表达水平如表1所示。pCI-neo中的<1是指蛋白质由ELISA检测不到。

如表1所示, 在IL-12p40或IL-12p70分泌及其生物学活性方面, mp40-N220L突变体与hp40 Asn-222突变体显示相似的特征。

为了将mp40-N222L突变基因应用于DNA疫苗模型, 并与野生型mp40基因比较其诱导的Th1和CTL免疫应答, 本发明人将mp35/IRES/mp40(mIL-12wt)或mp35/IRES/mp40-N220L(mIL-12mut)基因插入pTV2 DNA疫苗载体, 并观察其体外特征。结果如表1所示, 在关于IL-12p40或IL-12p70分泌及其生物学活性方面, pTV2载体中的mIL-12mut(mp40-N220L突变体)

基因与hp40 Asn-222突变体显示相似的特征。

实施例7: IL-12突变体对抗原特异性体液免疫应答的影响

在先前报导中,用编码HCV E2抗原的质粒(pTV2-gDsE2t)进行DNA疫苗接种,在免疫3周后足以诱导抗原特异性的体液和细胞介导的免疫应答。(Song, M. K. 等., *J. Virol.*, 74:2920-2925, 2000)。为了确定该mIL-12mut基因和mIL-12wt基因相比,是否也影响体内有效的抗原特异性免疫应答,用pTV2-mIL-12mut或pTV2-mIL-12wt对免疫小鼠进行初次免疫,4周以后与pTV2-gDsE2质粒联用进行加强免疫。

为了检验用包含本发明突变基因的表达载体DNA疫苗诱导的免疫应答,用带有mIL-12突变体或野生型mIL-12 DNA的各种pTV2或pTV2-gDsE2t DNA免疫6-8周龄的BALB/c小鼠。具体而言,在终体积100 μ l的磷酸盐缓冲盐溶液中配制总计200 μ g的DNA,注射给各只小鼠的胫骨前肌,间隔4周准时用相同剂量的DNA加强。加强免疫3周后,利用ELISA监测体液免疫应答。具体地,将人生长激素(hgh)与截掉C端的HCV E2(HCV E2t)融合的蛋白质hghE2t蛋白质100 ng,包被96孔板(Dynex Technologies)的每个孔。将免疫小鼠的血清稀释到1:100,与hghE2t蛋白质反应,用于确定HCV E2t特异性IgG及其亚类例如IgG1和IgG2a的相对水平。

如图5a、5b、5c和5d所示,HCV E2 DNA疫苗诱导的系统性HCV E2特异性总IgG、IgG1和IgG2a水平显著高于阴性对照值,与mIL-12mut基因或mIL-12wt基因共注射时,与HCV E2 DNA疫苗单独注射相比,其总IgG水平相似。并且,在注射HCV E2 DNA的各组间,IgG1水平相似。与此相反,较HCV E2 DNA单独免疫组,抗HCV E2的IgG2a水平在mIL-12wt组中略微升高,在mIL-12mut组中显著升高。此外,公认为Th1免疫力的间接标志的IgG2a/IgG1的比值,在mIL-12mut组最高,其显示了IgG2水平的相似性。这些数据表明,与mIL-12wt或单独HCV E2组相比,mIL-12mut基因显著影响体液免疫应答中IgG亚类从IgG1向IgG2a的转换。

实施例8: 免疫小鼠中细胞介导的免疫应答

<8-1> IL-12突变体诱导的抗原特异性Th1免疫应答

测定脾细胞IFN- γ 的表达，以研究mIL-12mut基因对Th1免疫应答的影响，这是用于评价细胞介导的免疫效力的参数之一。在U型底96孔板的各孔中加入加强免疫8周后获取的 1×10^5 脾细胞。然后向每孔中加入1-5 ug从CHO细胞纯化的hgh-E2t蛋白质，细胞在37°C、5% CO₂恒温箱中温育3天。然后取细胞上清液，利用ELISA试剂盒(R & D systems)检测IFN- γ 的水平。众所周知，特异性抗原刺激后诱导的IFN- γ 是由抗原特异性CD4+ T细胞产生的，它是Th1免疫应答的标志。

如图6所示，无细胞因子基因的HCV E2 DNA免疫组，其IFN- γ 水平与hghE2t蛋白质浓度成比例增加，而模拟质粒免疫组不变。预期地，mIL-12wt组的IFN- γ 诱导水平比单独HCV E2组提高的更多，mIL-12mut组的IFN- γ 产量高出mIL-12wt组2-3倍，表明mIL-12p70可提高抗原特异性Th1免疫应答，而mIL-12p40在体内抑制由IL-12p70诱导的Th1免疫应答。

<8-2> IL-12突变体长期增强抗原特异性CD8+ T细胞的功能

如上所述，mIL-12mut基因有助于HCV E2 DNA免疫接种中的长期Th1免疫应答。为了确定由mIL-12mut基因表达而诱导的长期Th1免疫应答是否与CTL免疫力和主要的细胞介导免疫应答有关，以及mIL-12mut基因因而可影响DNA免疫模型中CTL活性的保持，本发明人对加强免疫后几周的DNA免疫小鼠的脾细胞进行CTL测定。将脾细胞(2×10^7)用经丝裂霉素C处理(25 ug/ml)的CT26-hghE2t细胞(1×10^6) (其表达截短形式的HCV包膜蛋白质2(E2t))在37°C进行体外再刺激。体外培养5天后，在对不同靶细胞(例如CT26-hghE2t或CT26-neo)的常规细胞毒性测定中测试效应细胞。一式三份接种不同数目的效应细胞，以获得所要求的E/T比值。在U型底96孔板每孔中加入⁵¹Cr标记的靶细胞(5×10^3)，37°C温育6小时后，收集上清液，用 γ -计数器(Wallac, Turku, Finland)计数。利用以下数学公式1计算特异性裂解的百分率。最小裂解是由靶细胞只与培养基温育得到。最大裂解由靶细胞与1% Nonidet-P40温育得到。

<数学公式1>

特异性裂解百分率= (实验的裂解-最小裂解) x100 / (最大裂解-最小裂解)

结果如图7所示, 加强两周后, 除模拟质粒免疫组以外, 全部组都显示很强的抗原特异性CTL活性。但在单独HCV E2组、mIL-12wt组和mIL-12mut组之间几乎没有差异。mIL-12wt共免疫组全程都比单独HCV E2组诱导更多的CTL反应, 表明mIL-12基因具有增强CTL产生的作用。有趣的是, mIL-12mut组与其它两个组, 即单独HCV E2组和mIL-12wt组之间的CTL活性差异, 随着加强免疫后时间的延长, 越来越大。尤其在第10周, 单独HCV E2组和mIL-12wt组的CTL反应极低, 提示长时间后抗原特异性CTL的频率显著降低, 而mIL-12mut组的CTL活性比另两组高5-10倍, 仍维持抗原特异性CTL反应。作为对照, CT26-neo细胞用作靶细胞时, 各组都没有观察到裂解, 提示这些实验中观察到的CTL活性是HCV E2特异性的。

<8-3> FACSCalibur流式细胞术分析免疫小鼠CD8+细胞产生的IFN- γ

为了研究长期增强的CTL活性是否来源于抗原特异性CD8+ T细胞的频率, 并确定CD8+抗原特异性T淋巴细胞的频率, 进行以下实验。在加强免疫后的指定周获取脾细胞(2×10^7), 在10 U/ml重组IL-12(PharMingen)存在下用CT26-hghE2t细胞(1×10^6)刺激40小时, 然后加入4ul GolgiStop™(PharMingen), 细胞于37℃再温育8小时。为了直接纯化CD8+ T细胞, 刺激的脾细胞与抗CD8微珠(Miltenyi Biotech, Inc)温育, 然后流过miniMACS system柱(Miltenyi Biotech, Inc), 分离保留的CD8+ T细胞。为封闭非特异性染色, 细胞预先与Fc Block™(PharMingen)温育, 并用缀合FITC的抗小鼠CD8染色。温育后, 细胞悬液用Cytotfix/Cytoperm™(PharMingen)固定并透化, 然后加入缀合PE的抗小鼠IFN- γ mAb或缀合PE的同型匹配对照mAb。通过FACSCalibur流式细胞术分析染色的细胞(Becyon Dickinson), 然后观察IFN- γ 的诱导。

〈表2〉 HCV-E2特异性前体CD8⁺ T细胞的频率动力学

免疫 No.	最终免疫后的周数	组 ^b	HCV-E2 特异性 CD8 ⁺ T 细胞的频率							
			细胞内 IFN- γ 染色测定 (%) ^c				有限稀释测定 (No.) ^d			
			I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	0		0.08	0.34	0.42	0.58	7.1	36.1	39.0	47.1
	3		0.05	0.34	0.48	0.72	8.4	39.0	48.8	66.7
	6		0.06	0.29	0.39	0.73	6.9	34.8	46.8	64.9
	10		0.07	0.21	0.20	0.68	7.2	18.2	19.8	64.3
	14		0.07	0.09	0.09	0.57	8.1	9.6	8.8	45.7
1	4		0.06	0.33	0.42	0.55	7.5	33.2	41.0	48.7
	8		0.08	0.26	0.27	0.51	8.4	11.3	12.5	48.2
	14		0.06	0.10	0.07	0.42	7.1	6.8	8.1	44.7

a: 用本发明的各种质粒每隔4周免疫6-8周龄雌性BALB/c小鼠。

b: 每组解释如下。组I: pTV2, 组II: pTV2-HCV-E2t+pTV2, Group III: pTV2-HCV-E2t+pTV2-mIL-12wt, 组IV: pTV2-HCV-E2t+pTV2-mIL-12mut.

c: 从DNA免疫小鼠获得 2×10^7 脾细胞, 在体外用 1×10^6 丝裂霉素C处理的CT26-hghE2t细胞再刺激。培养48小时后, 利用MACSing分离CD8⁺ T细胞。固定并透化后, 用抗CD8和抗IFN- γ 抗体染色细胞。通过用FSC和CD8的细胞划分建立活的CD8⁺ T细胞通道, 然后通过用CD8和IFN- γ 对活的CD8⁺ T细胞作图, 来计算活CD8⁺ T细胞中IFN- γ 产生细胞的百分率。数据代表两次独立实验中每组2只小鼠的平均值。

d: 稀释从DNA免疫小鼠得到的脾细胞, 与丝裂霉素C处理的CT26-hghE2t细胞混合, 温育5天。通过⁵¹Cr标记的CT26-hghE2t细胞的特异性裂解来确定所产生CTL的特异性。如果特异性裂解水平大于平均裂解值加上由未接触抗原的小鼠获得的3SD, 则记数为CTL识别阳性的孔。利用对每个效应细胞稀释度的阴性孔数的回归分析, 计算每 1×10^7 个脾细胞中前体CTL的频率。数据代表两次独立实验中每组2只小鼠的平均值。

如表2所示, 在加强免疫后0、3、6、10或14周, mIL-12mut基因共免疫的小鼠与单独HCV E2组和mIL-12wt组相比, 产生IFN- γ 的CD8⁺细胞频

率增加3-7倍，与CTL反应的结果相关。相反，在同型匹配的对照实验中，各组间没有差异。与CTL测定结果相似，在加强免疫后2-3周，各免疫组之间产生IFN- γ 的CD8+ T细胞频率没有很大差别。这些数据证明，mIL-12mut基因表达可在DNA免疫后长期维持产生IFN- γ 的CD8+T细胞的频率。在这方面可能提示，IL-12p70本身在细胞介导免疫应答中的体内作用是长期维持Th1和CTL，IL-12p40在体内则作为拮抗剂抑制IL-12p70。

<8-4> 免疫小鼠脾细胞中抗原特异性CD8+ T细胞的频率

进行有限稀释测定(LDA)，以研究其它抗原特异性CD8+ T细胞的频率。此实验中，利用HCV E2特异性CD8+ T细胞的裂解能力，来测定抗原特异性CD8+ T细胞的频率(Kuzushima, K.等, Blood, 94:3094-3100, 1999)。将加强免疫小鼠的脾细胞稀释为不同浓度，加入U型底96孔板的各孔中，每稀释度20孔。用丝裂霉素C(500ug/ml)处理表达E2的CT-26细胞，以阻断细胞分裂，并用稀释的脾细胞活化5天。上述96孔板每孔中加入⁵¹Cr标记的靶细胞(5×10^3)，37℃温育6小时后，收集上清液，用 γ -计数器(Wall ac, Turku, Finland)计数。计算CTL频率，当特异性裂解的水平高于平均裂解值+ 3 x 标准差时，认为CTL频率是阳性的(Kuzushima, K.等, Blood, 94:3094-3100, 1999)。

有限稀释测定的结果与胞内染色测定结果相似。即，在mIL-12组中甚至在免疫接种初期就观察到最高的抗原特异性CD8+ T细胞频率，并在加强免疫后14周内维持该频率(表2)。

<8-5> 由IL-12突变体增强保护性免疫应答

为了证实mIL-12mut基因体内诱导Th1和CTL免疫力，并检测保护性免疫力与Th1和CTL免疫力的相关性，在加强免疫后12周，将表达hghE2t的CT26-hghE2t肿瘤细胞注射给各组免疫小鼠。2周后，确定抗原特异性IgG、IgG1、IgG2的相对水平以及IgG2a/IgG1的比值，并测定肿瘤的大小，持续进行30天。具体地，每三天用测径器测定一次肿瘤的体积和直径，以确定局部肿瘤的平均生长。再观察大约70天，确定小鼠的存活率。

如图8a、8b和8c所示，mIL-12mut免疫组小鼠诱导强的Th1免疫应答。与单独pTV2-gDsE2t免疫相反，mIL-12wt免疫组的肿瘤生长延迟，而mIL-12mut免疫组的肿瘤生长显著延迟。对照组中大部分小鼠长有肿瘤，并于50天内死亡，而mIL-12mut组90%的小鼠在70天后仍能存活。因此这些数据表明，mIL-12mut基因诱导的HCV E2特异性Th1和CTL反应，可在体内预防修饰的表达特异性抗原的肿瘤细胞的侵害。虽然不容易评价Th1和CTL反应对体内肿瘤防护的相对影响，但很可能分别如体外Th1和CTL测定所示，E2特异性的CD8⁺ CTL和Th1细胞可以直接杀死CT26-hgE2t细胞并促进CTL。与巨噬细胞和天然杀伤细胞上FcγR牢固结合的IgG2a抗体，也可能介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。

工业应用性

如上所述，本发明涉及可产生高活性人和小鼠源性白细胞介素12(IL-12)的IL-12p40亚基突变基因、包含上述突变基因的表达载体及其作为DNA疫苗佐剂的用途。本发明尤其涉及IL-12p40突变基因，其通过在作为IL-12的活性形式IL-12p70的竞争性抑制剂的IL-12p40上使Asn-222(人)或Asn-220(小鼠)氨基酸发生突变，抑制IL-12p40的分泌，但仍正常分泌活性IL-12p70。本发明的IL-12p40突变基因如果与DNA疫苗一起免疫，可以在早期并长时间诱导最佳的细胞介导免疫应答。因此，本发明的IL-12p40突变基因可用于多种疾病的DNA疫苗和基因治疗，例如爱滋病、丙型肝炎或乙型肝炎、癌症、流感、结核和疟疾，其治疗基本上需要细胞免疫应答。本领域技术人员应当理解，上文说明书公开的概念和特定实施方案可以轻易用于修改或设计其它实施方案的基础，以实现与本发明相同的目的。本领域技术人员亦当理解，这种等价的实施方案并没有背离在所附权利要求书中阐明的本发明的精神和范围。

序列表

- <110> Pohang University of Science and Technology et al.
- <120> 为改善 IL-12 活性而突变的 IL-12p40 亚基基因及其作为 DNA 疫苗佐剂的用途
- <130> 1p-02-14
- <150> KR 2000-13133
- <151> 2000-03-15
- <160> 23
- <170> KopatentIn 1.55
- <210> 1
- <211> 1007
- <212> DNA
- <213> 人
- <400> 1
- | | |
|---|-----|
| agcaagatgt gtcaccagca gttggtcacc tcttggtttt ccttggtttt tctggcatct | 60 |
| ccctcgtgg ccatatggga actgaagaaa gatgtttatg tcgtagaatt ggattggtat | 120 |
| ccggatgcc ctggagaaat ggtggtcctc acctgtgaca ccctgaaga agatggtatc | 180 |
| acctggacct lggaccagag cagtgaggtc ttaggctctg gcaaacct gaccatcaa | 240 |
| gtcaaagagt ttggagatgc tggccagtac acctgtcaca aaggaggcga ggttctaagc | 300 |
| cattcgtcc tgctgctca caaaaaggaa gatggaattt ggtccactga tattttaaag | 360 |
| gaccagaaag aacccaaaaa taagacctt claatgacg agccaagaa ttattctgga | 420 |

cgtttcacct gctgggtgct gacgacaatc agtactgatt tgacattcag tgtcaaaagc 480
 agcagaggct ctctgaccc ccaaggggtg acgtgcggag ctgctacact ctctgcagag 540
 agagtcaag gggacaacaa ggagtatgag tactcagtgg agtgccagga ggacagtgcc 600
 tgcccagctg ctgaggagag tctgccatt gaggtcatgg tggatgccgt tcacaagctc 660
 aagtatgaaa actacaccag cagcttcttc atcagggaca tcatcaaacc tgaccaccc 720
 aagaacttgc agctgaagcc attaaagaat tctcggcagg tggaggtcag ctgggagtac 780
 cctgacacct ggagtactcc acattctac tctcctga cattctcgt tcaggtccag 840
 ggcaagagca agagagaaaa gaaagataga gtcttcacgg acaagacctc agccacggtc 900
 atctgccgca aaaatgccag cattagcgtg cgggccag accgctacta tagctcatct 960
 tggagcgaat gggcatctgt gcctgcagt taggttctga tccagga 1007

<210> 2
 <211> 900
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 2
 cccaaaagag tgaccttga atcatctgta cgcttgcta tgtctagctc agttcatgct 60
 gctatcaatc catgagtaag gacctataag cataagagac gcctcaaaa cactatgact 120
 tttattagtt attcacctcc ccagagctgt ccctggatac agacaacata ggtatgaggt 180
 agggggtacg tggagccaaa caggaggtaa taccttctga atttagatgc taacaagaaa 240

acatggggaa aggtggccca gatacactag gccctttatt ctttggcct gtaacaccta 300
 cttattgat tgtggcatga accatgaact cggtttgggg caagtccttc cttttctgc 360
 agtctgtgga atcgggagag gtagccatt gccgccteta ttcaccttag gcatgatga 420
 aacagaaatt agtalctctg cctccttctt tttccacac cccgaagtea tttccttta 480
 acctgggatt tcgacgteta tattecctct gtagataga tgcactcagg gaggcaaggg 540
 ggggaggag gaacttctta aaattcccc agaatgttt gacactagti ttcagtgtg 600
 caattgagac tagtcagttt ctacttggg ttccatcag aaagttctgt aggagtagag 660
 tatataagca ccaggagcag ccaaggcagc agaaggaaca gtgggtgtcc aggcacatca 720
 gaccaggcag ctgcagcaa agcaaggtaa gtctctctt cttccctgtc gctaactccc 780
 tgcactlaga ggctgtccag attcagactc caggggacag gctaccctg aaccaggcag 840
 cgtgggagtg gggtaagtgg attctgggag catctcggat ggctttccc gctggtggaa 900
 900

<210> 3

<211> 328

<212> PRT

<213> 人 IL-12p40-N222L

<400> 3

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu

1

5

10

15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val

	20	25	30	
Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu				
	35	40	45	
Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln				
	50	55	60	
Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys				
	65	70	75	80
Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val				
	85	90	95	
Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp				
	100	105	110	
Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe				
	115	120	125	
Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp				
	130	135	140	
Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg				
	145	150	155	160
Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser				
	165	170	175	
Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu				
	180	185	190	
Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile				
	195	200	205	

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Leu Tyr Thr
 210 215 220

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
 225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
 245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
 260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
 275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
 290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
 305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
 325

<210> 4

<211> 328

<212> PRT

<213> 人 IL-12p40-N222Q

<400> 4

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
50 55 60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
85 90 95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
180 185 190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Gln Tyr Thr

210 215 220
 Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
 225 230 235 240
 Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
 245 250 255
 Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
 260 265 270
 Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
 275 280 285
 Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
 290 295 300
 Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
 305 310 315 320
 Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
 325

<210> 5
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 小鼠 IL-12p40-N220L

<400> 5
 Met Cys Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30

Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu
 35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln
 50 55 60

Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys
 65 70 75 80

Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr
 85 90 95

Leu Ser His Ser His Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp
 100 105 110

Ser Thr Glu Ile Leu Lys Asn Phe Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys
 115 120 125

Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln
 130 135 140

Arg Asn Met Asp Leu Lys Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Pro
 145 150 155 160

Asp Ser Arg Ala Val Thr Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys
 165 170 175

Val Thr Leu Asp Gln Arg Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln
 180 185 190

Glu Asp Val Thr Cys Pro Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu
 195 200 205

Ala Leu Glu Ala Arg Gln Gln Asn Lys Tyr Glu Leu Tyr Ser Thr Ser

210	215	220	
Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln			
225	230	235	240
Met Lys Pro Leu Lys Asn Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro			
	245	250	255
Asp Ser Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val			
	260	265	270
Arg Ile Gln Arg Lys Lys Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys			
	275	280	285
Asn Gln Lys Gly Ala Phe Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu Val Gln			
	290	295	300
Cys Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn			
305	310	315	320
Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser			
	325	330	335

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> T7 引物

<400> 6
 gtacttaata cgactcacta tagg

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> T3 引物

<400> 7

gaagcattaa ccctcactaa aggg

24

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> hp40-N125Q 正义引物

<400> 8

cccaaacaga aaacgtttct a

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> hp40-N125Q 反义引物

<400> 9

cgttttctgt ttgggttctt t

21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> hp40-N135Q 正义引物

<400> 10
gcccaagcagt attctggacg t 21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ho40-N135Q 反义引物

<400> 11
agaatactgc ttggcctcgc a 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> hp40-N222Q 正义引物

<400> 12
tatgaacagt acaccagcag c 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> hp40-N222Q 反义引物

<400> 13
ggtgtactgt tcatactga g 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> hp40-N303Q 正义引物

<400> 14
cgcaaacagg ccagcattag c 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> hp40-N303Q 反义引物

<400> 15

gctggcctgt ttgcggcaga t 21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> hp40-N127Q 正义引物

<400> 16

accaagcagg agagttgcct a 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> hp40-N127Q 反义引物

<400> 17

actctcctgc ttggtaatt c 21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> hp40-N141Q 正义引物

-
- <400> 18
ataactcagg ggagttgcct g 21
- <210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> hp40-N141Q 反义引物
- <400> 19
actcccctga gttatgaaag a 21
- <210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> hp40-N251Q 正义引物
- <400> 20
tatctgcagg cttcctaaaa a 21
- <210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> hp40-N251Q 反义引物

<400> 21
ggaagcctgc agatagctca t 21

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mp40-N220L 正义引物

<400> 22
tatgagctct acagcaccag c 21

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mp40-N220L 反义引物

<400> 23
gctgtagagc tcatatnttt actg 24

图1

小鼠	1	HCPOKLTISWFAIVLLVSPIMANKKELEKDVYVVEVQWTPCARGSTVNLTC	50
人	1	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELEKEDVYVVEVDWYPPDARGEMVVLTC	50
小鼠	51	DTPEEDDITWTDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLCHS	100
人	51	DTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIOVKEFGDAGQYTCHKGGSEVLCHS	100
小鼠	101	HLLEKKENGINSTEILEKFKNKTEFKCEAPNYSGRFTCSALVQRNY	150
人	101	LLLLHKKEDGINSTDIKLDQKEPKNKTELRCEAKNYSGRFTCQWLTTIST	150
小鼠	149	DLKFNKSSSSPDSRAVTCGMASLSAENVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTC	199
人	149	DLTESVKSSRGSSDPQGYTCGAATLSAERVVGDNKEYEYSVECDQDSHC	199
小鼠	199	PTAETIPIELALEARQNEYENY ²²⁰ STSEFFIRDIKPPKPKNLQMYPLKNS	247
人	199	PAAEELPIEVMVDAVHKLNYENY ²²² STSEFFIRDIKPPKPKNLQIKPLENS	249
小鼠	249	QVEVSMWYFDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCKCKGAFV	297
人	249	QVEVSMWYFDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGSKREYFORVE	297
小鼠	297	EKTSTEVQC KGGNVCVQAQDRYVNSSSCKKACVPCRVRS	335
人	297	DKTSATVICRKNASISVRAQDRYVSSSNSEWASVPC	335

图 2

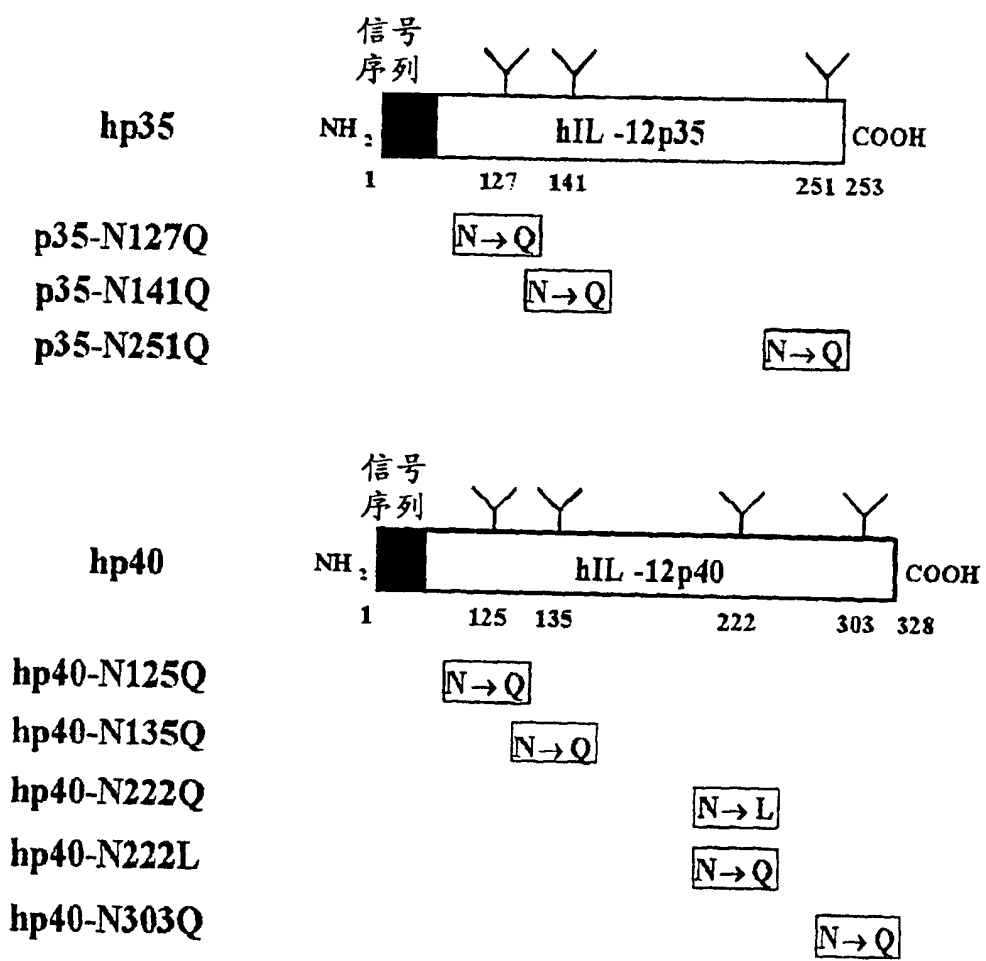


图 3a

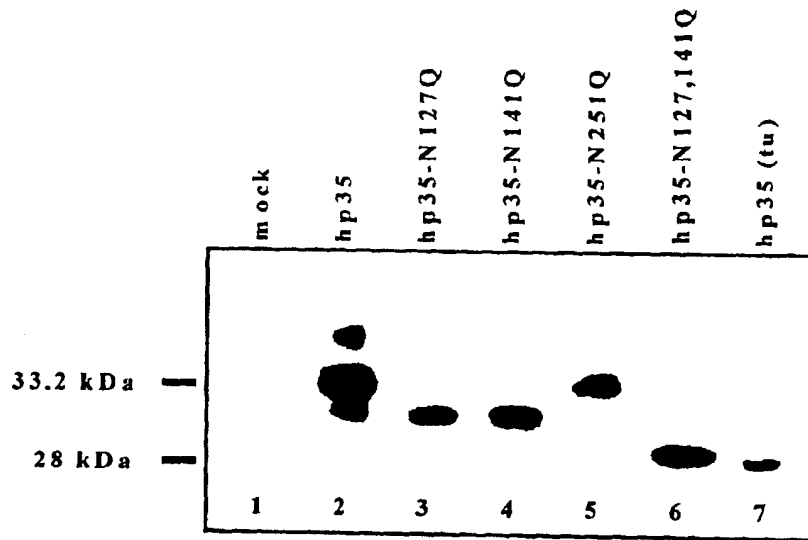


图 3b

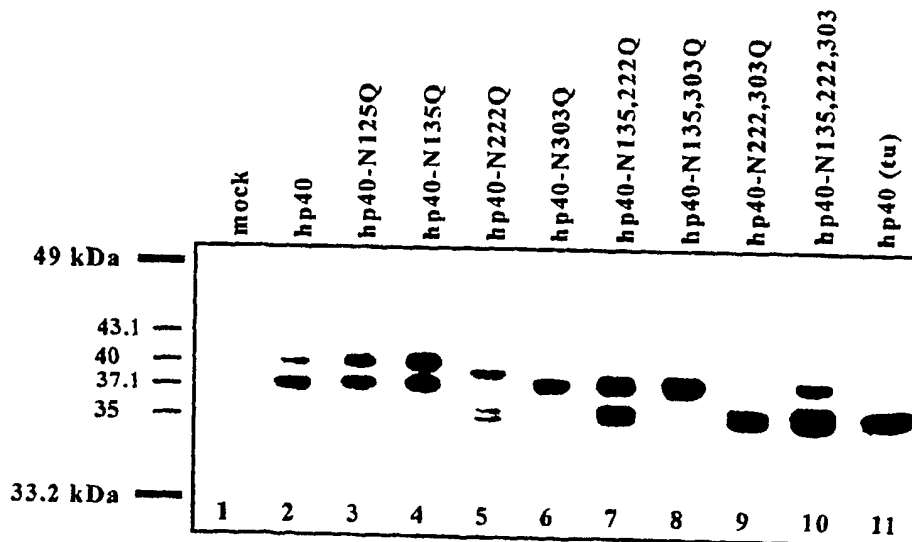


图 3c

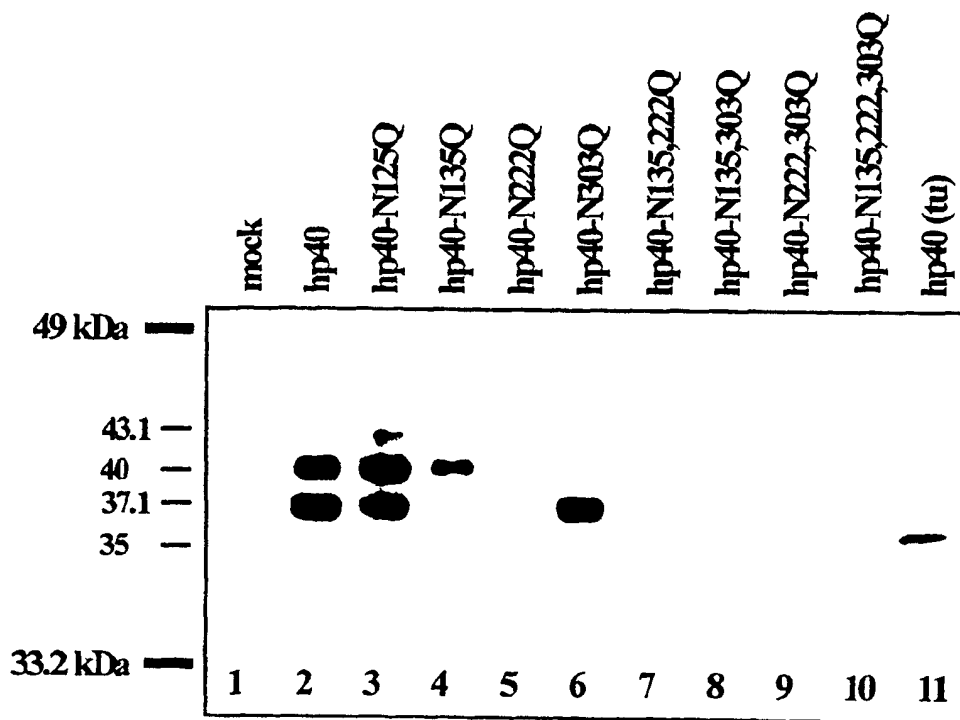


图 4

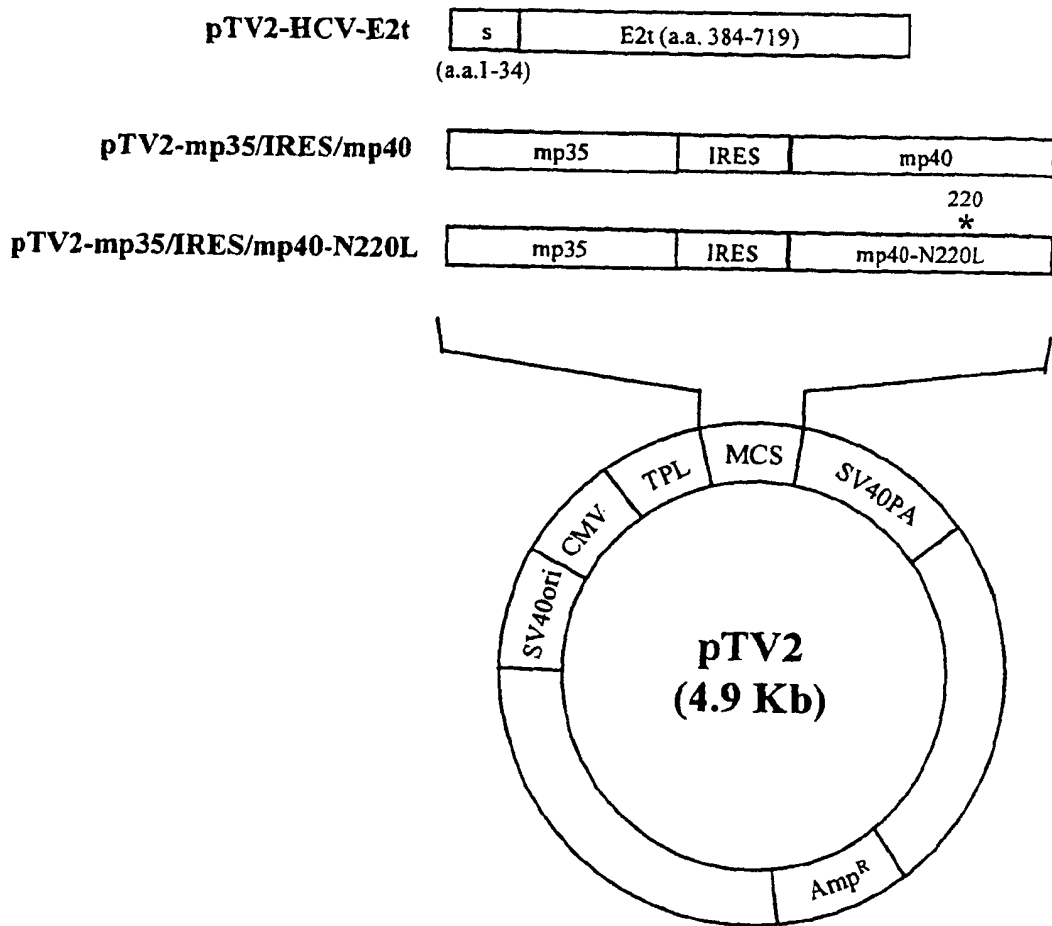


图 5a

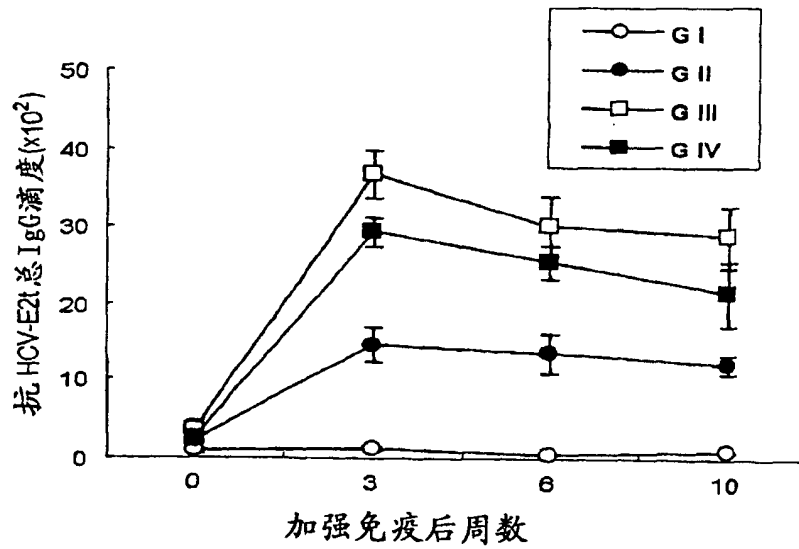


图 5b

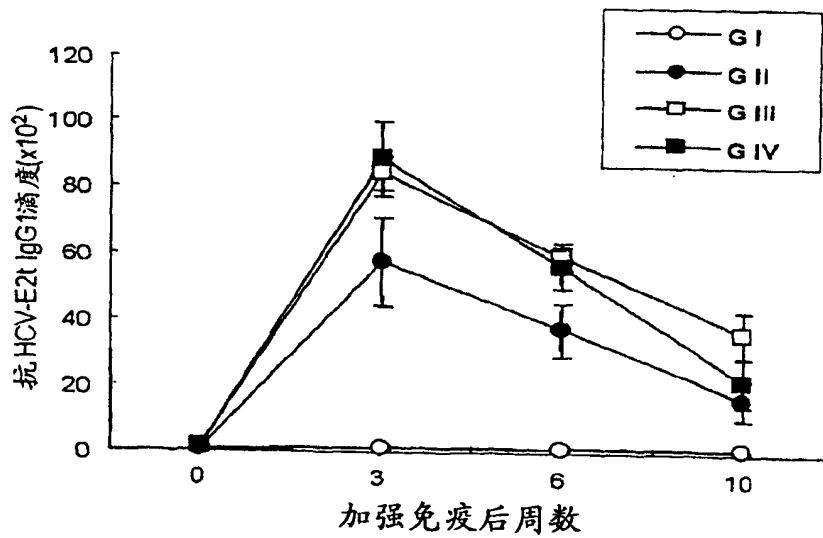


图 5c

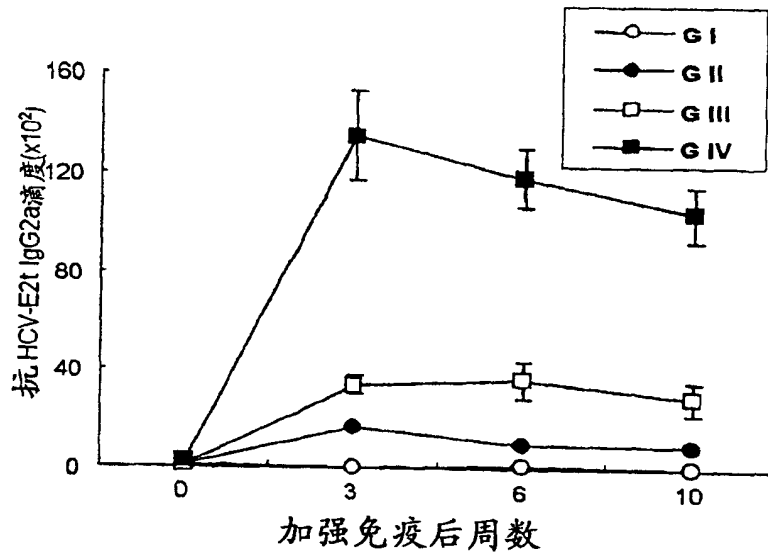


图 5d

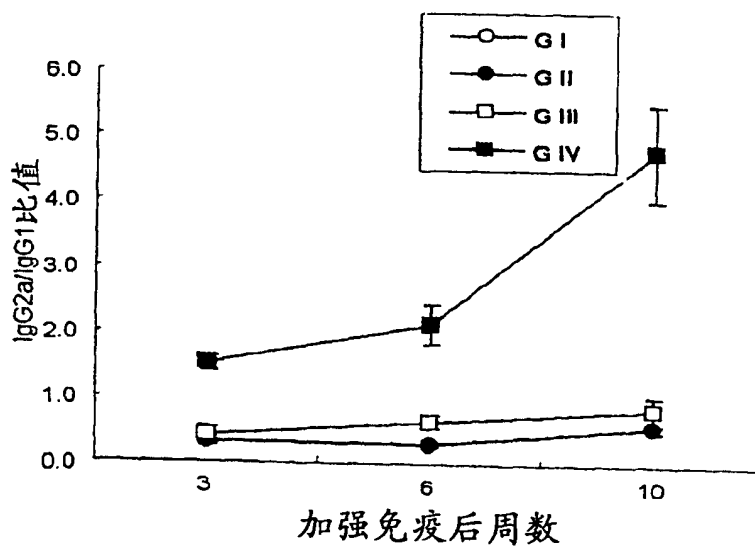


图6

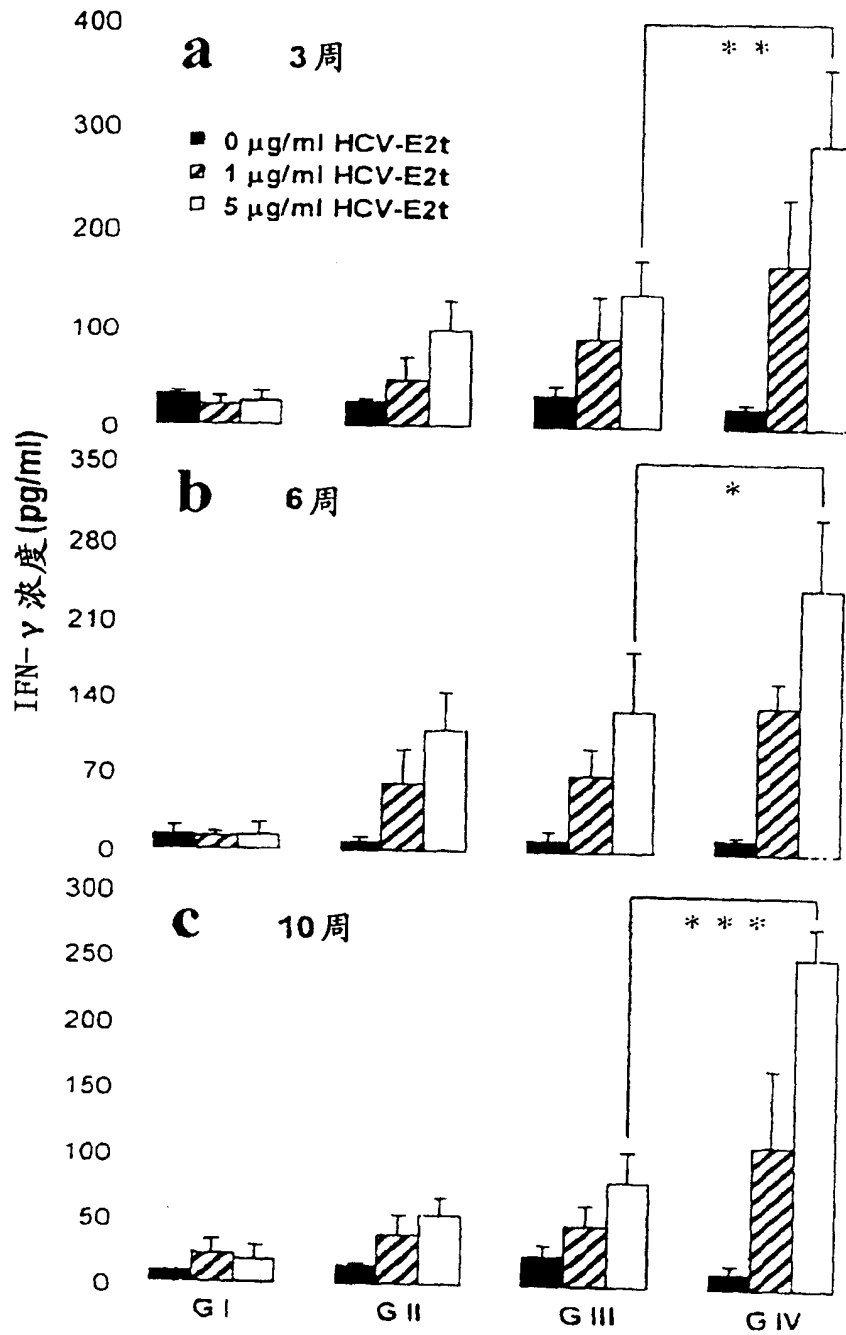


图7

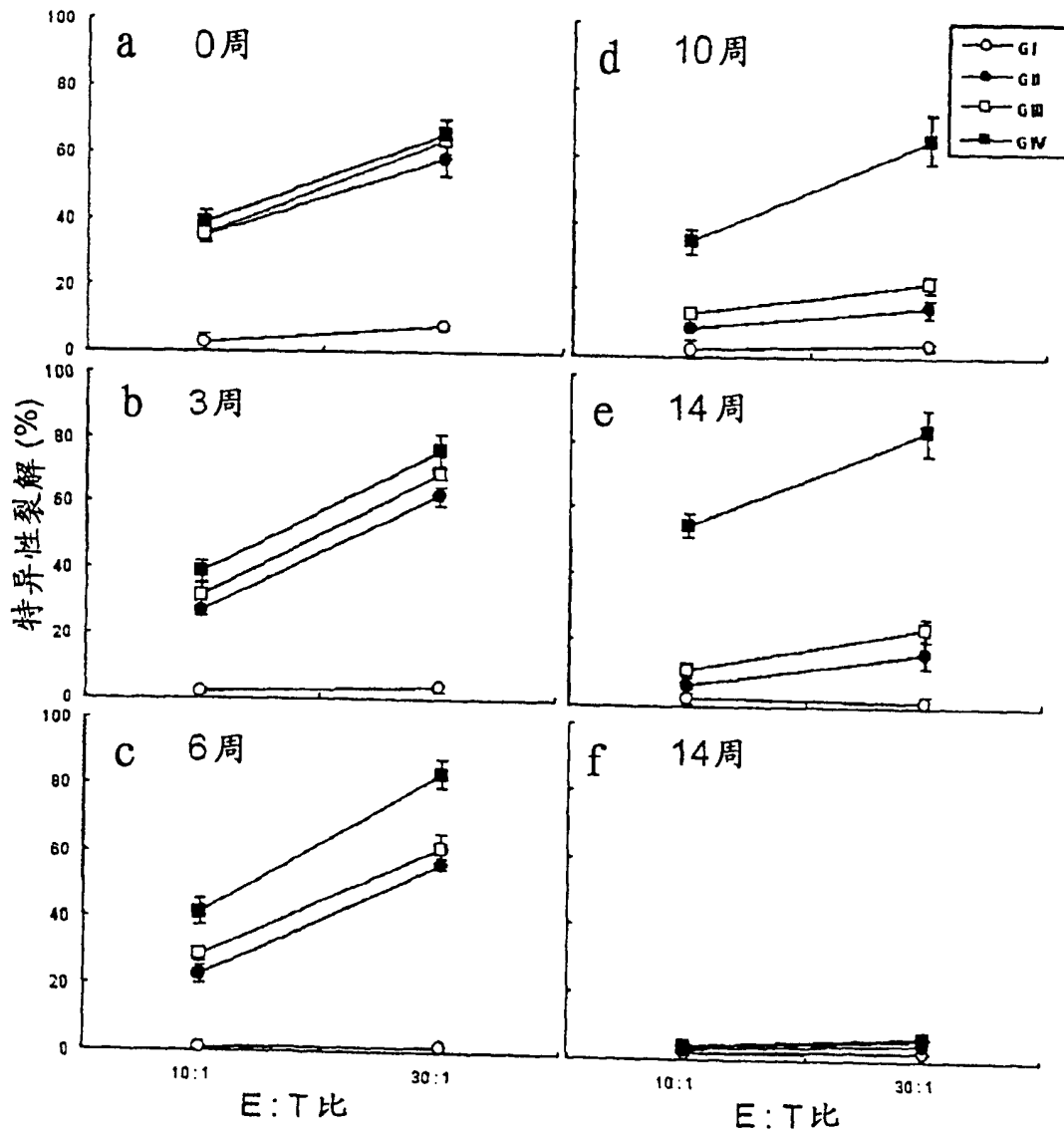


图 8a

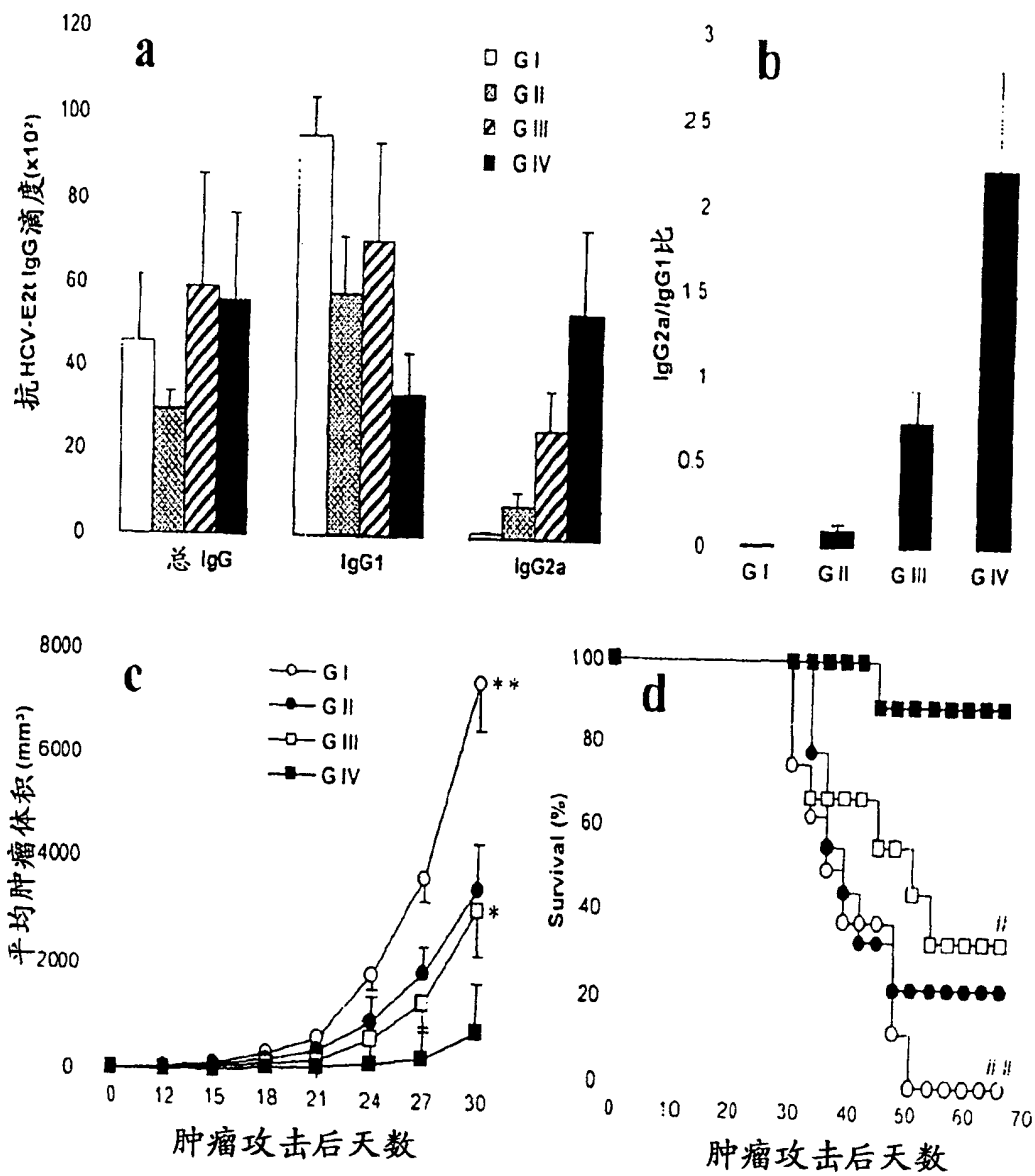


图9

