

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710101482. X

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 12 月 19 日

[11] 公开号 CN 101089180A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

[22] 申请日 2007.4.23

[21] 申请号 200710101482. X

[30] 优先权

[32] 2006.4.26 [33] CN [31] 200610026070. X

[71] 申请人 上海中信国健药业有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区李冰路 399 号

[72] 发明人 郭亚军 候盛 谈珉 钱卫珠

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种重组 LFA3 基因,及其融合基因与产物

[57] 摘要

本发明公开了一种重组 LFA3 基因,具有 SEQ ID NO: 1 所示的序列,还公开了一种含有重组 LFA3 基因和与之融合的人 Ig 抗体 Fc 片段基因的融合基因,以及该融合基因的蛋白质产物。本发明还提供了含有该融合基因的重组表达载体,宿主细胞,以及该重组 LFA3 - Ig 融合基因在制备治疗自身免疫疾病的药物中的用途。本发明的重组 LFA3 融合基因表达水平较高,对该蛋白质的规模生产具有重要的经济价值。

1. 一种重组 LFA3 基因,其特征在于,所述的重组 LFA3 基因具有天然 LFA3 基因-接头-天然 LFA3 基因的结构。
2. 权利要求 1 所述的重组 LFA3 基因,其特征在于,所述的重组 LFA3 基因具有 SEQ ID NO:1 所示的序列。
3. 权利要求 1 所述的重组 LFA3 基因,其特征在于,所述接头的序列编码的氨基酸序列为 $(Ala_3 Ser_2)_3$,亦即 SEQ ID NO:2。
4. 权利要求 3 所述的重组 LFA3 基因,其特征在于,所述的接头的 DNA 序列为 SEQ ID NO:3。
5. 一种融合基因,其特征在于,所述的融合基因含有权利要求 1 所述的重组 LFA3 基因和与之融合的人 Ig 抗体 Fc 片段基因,其序列如 SEQ ID NO:4 所示。
6. 权利要求 5 所述融合基因的蛋白质产物,包含重组 LFA3 和人 Ig 抗体 Fc 片段,其序列如 SEQ ID NO:5 所示。
7. 一种重组表达载体,其特征在于,所述的重组表达载体含有权利要求 5 所述的基因序列。
8. 一种宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞含有权利要求 7 所述的重组载体。
9. 权利要求 8 所述的宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞选自 CHO 细胞, Hela 细胞, 小鼠 Ltk-(4)细胞和猴肾 VERO 细胞之一。
10. 权利要求 6 所述的融合基因的蛋白质产物在制备治疗自身免疫性疾病的药物中的用途。

一种重组 LFA3 基因，及其融合基因与产物

技术领域

本发明属于免疫学领域，具体的说，涉及一种重组 LFA3 基因，及其融合基因与产物。

背景技术

近年来人们认识到，T 淋巴细胞的激活需要至少 2 个信号，第一信号为 T 细胞抗原受体 (TCR) 和抗原提呈细胞表面 MHC/抗原肽复合物结合产生所产生，这两种配体的结合需要特异性识别，与免疫反应的特异性有密切关系。第二信号为 T 细胞表面的其它辅助分子与抗原提呈细胞表面的相应配体结合产生，该信号又称为共刺激信号，目前已经发现了多种配体对。如果 T 细胞仅受到第一信号的刺激而无辅助信号的刺激，T 细胞不但不被激活，而且还有可能造成该 T 细胞凋亡，在体内造成克隆无反应性 (anergy)。

T 细胞、抗原提呈细胞表面参与产生共刺激作用的分子统称为共刺激分子。目前公认的共刺激通路包括 CD2: LFA3 途径、B7: CD28 途径和 CD11a:ICAM-1 途径等。这些信号传导途径在 T 细胞的免疫功能调节方面具有十分重要的作用，任何一种信号传导途径的阻断都有可能导致免疫功能下调。

借此原理，可以开发出自身免疫疾病如银屑病的治疗药物。从基因工程角度来看，开发这类药物的策略主要有三种。一种是研制信号通道相关蛋白的单克隆抗体，一种是研制信号通道相关蛋白的受体蛋白，一种是利用信号通道相关蛋白的拮抗剂。这三种策略都是利用一种（或多种）可以与信号通道蛋白特异性结合的蛋白来阻断信号传导过程。

CD2 又称淋巴细胞功能相关抗原 2(lymphocyte function associated antigen 2, LFA-2)或绵羊红细胞(SRBC)受体，为跨膜单链分子，表达于 T 细胞、胸腺细胞和 NK 细胞。分子量约 50kDa，其成熟蛋白由 332 个氨基酸组成，其前体有一个 19 个氨基酸组成的信号肽。人 CD2 分子的配体是 CD58(LFA-3)，其结构与 CD2

相似，亦为跨膜单链，其前体蛋白有一个 28 个氨基酸的信号肽，成熟蛋白由 233 个氨基酸组成。上述两者均属 Ig 超家族成员。CD58 分布较广，表达于 T、B 细胞、单核细胞、树突状细胞、中性粒细胞、血小板、红细胞以及某些非造血细胞表面。CD2 与 CD58 结合，能增强 T 细胞与 APC 或靶细胞间粘附，促进 T 细胞对抗原识别和 CD2 所介导的信号转导。

美国 BIOGEN 公司开发了一种 FLA3-Ig 融合蛋白（商品名 Amevive），由于该融合蛋白保留了与配体 CD2 结合的 FLA3 膜外区，在与表达有 CD2 分子的 T 细胞接触后，可以与 CD2 结合，阻断抗原呈递细胞（APC）表面的 LFA3 分子与 CD2 结合，从而阻断 T 细胞的激活、增殖和分化，抑制 IL-2、IFN- γ 、IL-8 等细胞因子的产生。另一方面，融合蛋白的 Fc 段可以与细胞表面的 Fc 受体结合，使单核细胞、NK 细胞向 T 细胞聚集，通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用（ADCC），造成 T 细胞的凋亡。Amevive 上市后用于治疗银屑病，并取得了良好的治疗效果。但是还有许多银屑病患者对 Amevive 的治疗表现为无反应性，因此，临床上需要一种特异性更强、亲和力更高的替代产品。

发明内容

本发明需要解决的第一个技术问题是提供一种新的重组 LFA3 基因，具有天然 LFA3 基因-接头-天然 LFA3 基因的结构。

本发明需要解决的第二个技术问题是提供一种新的融合基因，含有上述的重组 LFA3 基因和与之融合的人 Ig 抗体 Fc 片段基因。

本发明需要解决的第三个技术问题是提供一种含有该融合基因的重组表达载体。

本发明需要解决的第四个技术问题是提供一种含有该重组表达载体的宿主细胞。

本发明需要解决的第五个技术问题是提供一种重组 LFA3-Ig 融合基因的蛋白表达产物在制备治疗自身免疫疾病药物中的用途。

本发明的发明构思是这样的：

利用基因工程的方法，可以将本来位于细胞膜表面的特异性受体蛋白分子和免疫球蛋白（抗体）人工地组合起来，形成融合蛋白。一般是取编码膜蛋白的细胞外区和抗体恒定区的 DNA 序列，连接成融合基因，在适当的载体和细胞中表达，得到一个天然状态下不存在的融合蛋白分子，它既有细胞表面受体与其原有配体结合的特性，又象抗体一样为可溶性分子，且半衰期长，作用时间较为持久。和人源化抗体相比，受体（配体）的亲合力更强，而且全部蛋白成分都为人体固有，因此人源化的程度要比从鼠源抗体改造过来的抗体高，在体内不会引起免疫反应。目前已有多种可溶性受体被制备出来，根据它们所含有的不同细胞膜受体细胞外区，可产生各种特定的功能。人 CD2 分子的配体 LFA-3 则可以竞争性地与 CD2 分子结合，从而阻断 CD2/LFA3 这一共刺激通路。

同时，为避免在融合蛋白中出现非天然的氨基酸序列，我们在 LFA3 与 Fc 段的连接处没有设计酶切位点连接，而是采用 Overlapping PCR 法进行连接。

在本发明中，“LFA3-Ig 融合蛋白”是指由人 LFA3 可溶部分与人抗体 Fc 片段融合所形成的融合蛋白。

本发明的技术内容如下：

本发明公开了一种重组 LFA3 基因，其特征在于，所述的重组 LFA3 基因具有天然 LFA3 基因-接头-天然 LFA3 基因的结构，所述的重组 LFA3 基因具有 SEQ ID NO:1 所示的序列，所述接头的序列编码的氨基酸序列为(Ala₃ Ser₂)₃，亦即 SEQ ID NO:2。该氨基酸序列的 DNA 序列之一为：5'-GCTGC TGCTT CTTCT GCCGC TGCTT CTTCT GCTGC CGCTT CTTCT-3' (SEQ ID NO:3)。

本发明还公开了一种融合基因，其特征在于，所述的融合基因含有上述重组 LFA3 基因和与之融合的人 Ig 抗体 Fc 片段基因，其序列如 SEQ ID NO:4 所示。

该融合基因的蛋白质产物，包含重组 LFA3 和人 Ig 抗体 Fc 片段，其序列如 SEQ ID NO:5 所示。

本发明还提供了一种重组表达载体，该重组表达载体含有 LFA3-Fc 融合基因，可转染哺乳动物细胞而实现高表达。所述的载体可以是本领域熟知的各种适

合转染哺乳动物细胞的表达载体。

本发明还公开了一种宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞含有上述的重组载体。所述的宿主细胞选自 CHO 细胞，Hela 细胞，小鼠 Ltk-(4)细胞和猴肾 VERO 细胞等各种常用哺乳动物工程细胞株。

本发明所提供的重组 LFA3 基因，由于该基因由两个天然 LFA3 基因通过人工设计的接头序列连接而成，具有了两个 CD2 结合部位，增加了亲和力，能更有效的阻断抗原呈递细胞（APC）表面的 LFA3 分子与 CD2 结合，从而阻断 T 细胞的激活、增殖和分化，抑制 IL-2、IFN- γ 、IL-8 等细胞因子的产生。同时通过构建的重组载体，使该 LFA3-Ig 融合基因的蛋白产物表达量保持较高的水平。

本发明还提供了该重组 LFA3-Ig 融合基因的蛋白产物在制备治疗自身免疫疾病药物中的用途，自身免疫疾病包括类风湿关节炎、强直性脊柱炎、移植排斥反应、银屑病、系统性红斑狼疮、口眼干燥综合征、硬皮病、结节性多动脉炎、Wegener 肉芽肿病等，这里优选银屑病。

附图说明

图 1: APC 细胞与 T 细胞相互作用的几种信号通道。

图 2: LFA3-Ig 融合蛋白结构示意图，两个 LFA3 之间用接头连接，LFA3-Ig 利用重组 DNA 技术构建的 LFA3 的胞外区与人抗体 IgG Fc 段的融合蛋白，其 N-末端含有人 LFA3 的胞外段，随后是人 IgG1 的重链铰链区、CH2 和 CH3 区。

图 3: LFA3-Ig 融合基因的扩增示意图，其中，1、2、3、4、5、6 分别代表引物 1、2、3、4、5、6。

图 4: 本发明融合蛋白与 Amevive 对混合淋巴细胞反应的抑制结果。

具体实施方式

下面将结合实施例进一步详细的描述本发明，然而应当理解，列举这些实施例只是为了起说明作用，而并不是用来限制本发明。

实施例 1 重组 LFA3 融合基因的设计和制备

1、引物设计

引物 1: 5' -GCTAGCGCCGCCACCATGGTTGCTGGGAGCGACGCGGGG-3' (SEQ ID NO: 6)

引物 2: 5' -AGCAGAAGAAGCAGCGGCAGAAGAAGCAGCAGCATTAGTCAATGCACA-3' (SEQ ID NO :7)

引物 3: 5' -TCTGCCGCTGCTTCTTCTGCTGCCGCTTCTTCTTTTCCCAACAAATA (SEQ ID NO :8)

引物 4: 5' -TGTGTGAGTTTGTCAGTTAGTGTGGGAGA-3' (SEQ ID NO :9)

引物 5: 5' -TCTCCCACTAACTGACAAAACTCACACA-3' (SEQ ID NO :10)

引物 6: 5' -TACTCGAGTCATTTACCCGG-3' (SEQ ID NO :11)

引物 1 为 5' -有义引物, 包含 *NheI* 酶切位点、*Koak* 序列, 以及编码人 LFA3 信号肽的起始部分 cDNA 序列;

引物 2 为 3' -反义引物, 序列与编码人 LFA-3 膜外区末端氨基酸的 cDNA 序列互补, 并包含了部分 (Ala3Ser2) 3 的接头序列;

引物 3 为 5' -有义引物, 包含部分 (Ala3Ser2) 3 的接头序列及 LFA3 膜外段成熟序列的起始 5 个氨基酸的 cDNA;

引物 4, 5 完全互补, 5 为 5' -有义引物, 4 为 3' -反义引物, 非下划线部分的密码子与目的基因编码 LFA3 结尾部分氨基酸的 cDNA 序列; 其中下划线部分的密码子与目的基因编码 IgG₁Fc 段的起始部分氨基酸 cDNA 的互补序列;

引物 6 为 3' -反义引物, 其中含有终止密码子 TGA (3' →5'), 随后是 *Xho* 的酶切位点。

2、重组 LFA3 基因的设计和制备

取正常人外周血 10ml, 用 Ficoll 密度梯度法分离单个核细胞, 取 1×10^7 细胞, 用 PBS 洗涤后离心沉淀, 弃上清, 用 TRIZAL 试剂抽提总 RNA。

根据试剂盒要求的操作步骤, 以 PBMC 的总 RNA 为模板, 引物 1、2 及引

物 3、4 按照常规方法分别进行 RT-PCR。

以上述 RT-PCR 获得的产物为模板，引物为 1、4 进行 Overlap-PCR，反应条件按常规方法进行。在琼脂糖凝胶电泳上获得分子大小约为 801bp 的单一一条带进行凝胶回收。用 Promega 公司的 PCR 产物克隆试剂盒将所获得的 cDNA 插入 pGEM-T 载体中，常规方法转化大肠杆菌 TG1 菌株，经蓝白斑筛选初选出候选克隆，PCR 鉴定确认阳性克隆，然后进行 cDNA 测序。测序结果显示，获取的基因序列与设计序列完全一致。

所获得的重组 LFA3 基因为两个 LFA3 基因之间由接头序列连接，该接头序列的 DNA 序列为 SEQ ID NO:3。其编码的氨基酸序列为(Ala₃Ser₂)₃(SEQ ID NO:2)。该氨基酸序列的 DNA 序列之一为：5'-GCTGC TGCTT CTTCT GCCGC TGCTT CTTCT GCTGC CGCTT CTTCT-3' (SEQ ID NO:3)。

3、人 IgG1 Fc 片段的获得：

以含有人 IgG1 恒定区基因的载体 pMG18 为模板，引物 5、6 按下列方法进行 PCR：

反应体系的组成：

成分	数量(μl)
10X PCR 反应缓冲液	10
25 mM Mg ₂ SO ₄	10
Pfu DNA 聚合酶(5U/μl)	2
引物(2μg/μl)	各 3μl，共计 6μl
模板 DNA (1.8μg/μl)	1
灭菌三蒸水	至 100μl

反应条件：

预变性：94℃，2 分钟；

主循环：94℃，1 分钟；55℃，1 分钟；72℃，3 分钟；

循环数：20

后延伸：72℃，5 分钟。

PCR 过程在 PROGENE GENIUS 热循环仪上进行。

获得 IgG1 的 Fc 段。PCR 产物进行凝胶回收，用 Promega 公司的 PCR 产物克隆试剂盒将所获得的 cDNA 插入 pGEM-T 载体中，常规方法转化大肠杆菌 TG1 菌株，经蓝白斑筛选初选出候选克隆，PCR 鉴定确认了阳性克隆，然后进行 cDNA 测序。测序结果显示，获取的基因序列与理论序列完全一致。

4、LFA3-Ig 融合基因的获得

以上述步骤 2 和 3 获得的片段为模板，引物为 1、6，按上述步骤 3 的方法进行 PCR，扩增出 1-6 片段 (LFA3)₂-Ig。完毕后将产物在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳上进行鉴定，发现产物中有一条分子量在 1455bp 左右的单一带，与预期的 1455 大小一致。用 Promega 公司的 PCR 产物克隆试剂盒将所获得的 cDNA 插入 pGEM-T 载体中，常规方法转化大肠杆菌 TG1 菌株，经蓝白斑筛选初选出候选克隆，PCR 鉴定确认阳性克隆，然后进行 cDNA 测序，确认序列完全正确的克隆，即为 LFA3-Ig。

实施例 2 LFA3-Ig 融合蛋白的表达

1、融合基因表达载体的构建

将实施例 1 的产物 LFA3-Ig 基因分别用 Nhe I 和 Xho I(Pharmacia)(10U/ul) 消化 pUC 18 和表达质粒 pMSG(Pharmacia)。酶切反应 37 °C 反应过夜。酶切产物在 0.8% 琼脂糖电泳上进行分离鉴定，用 Promega 公司的凝胶回收试剂盒回收大小约为大小正确的片段。

分别用 T4 DNA 连接酶(10U/uI)将 LFA3/接头/Fc 连接到 pMSG 载体的 Nhe I 和 Xho I 位点。

按照常规方法(见 Sambrook 等, 1989)用连接所得重组 pMSG 转化大肠杆菌 DH5a 菌株，并在 IPTG/X-Gal 平板培养基上进行蓝白斑筛选。各取白斑 10 个接种于 LB 液体培养基 37°C 培养后抽取质粒如前所述进行酶切鉴定，每种融合基因至少获得 4 个具有正确大小的插入片段的克隆，作为候选克隆。

将上述候选克隆中的两个进行 DNA 测序。根据测序结果，分别确认插入片段的序列与设计的完全一致。

2、CHO 细胞的转化与表达

取带有上述重组 pMSG 的大肠杆菌菌株，分别接种于 500ml 加入了氨苄青霉素的 2xYT 液体培养基，37°C，260rpm 震荡培养 16 小时。用 Qiagen 公司的 "Ultrapure Plasmid Purification Kit" 抽提质粒 DNA，抽提过程按照厂家提供的说明书进行。

用脂质体法转染 CHO 细胞，转染试剂盒购自 Invitrogene 公司(lipofectamine 2000 transfection reagent, 11668-027)。转染时取上述纯化的 pMSG 质粒 100 微克作为 DNA 样品对 CHO 细胞进行转染，转染操作程序按照厂家的说明书进行。

转染后的 CHO 细胞经连续 3 个月的氨甲喋呤(MTX)筛选，其浓度从 0.05 μ M 到 1 0 μ M，每两周增加一次浓度，每次 MTX 的用量约为前一次的 2 倍，具体视细胞生长情况而定。细胞培养按照常规进行，培养基为：15%胎牛血清(Gibco)+RPMI 1640/DEME，于 37°C，5%CO₂ 培养箱中培养。然后按照常规极度稀释法进行单克隆化。应用 ELISA 方法分别检测其融合蛋白的表达量，总共得到克隆 89 个。

在 DEME 培养基中常规培养，经 ELISA 上述部分克隆 LFA3-Ig 的表达强度进行了研究，具体数据如下：

被测克隆数量	44
平均表达水平 (mg/L 上清)	25.2 \pm 0.33

以上数据说明，本发明的重组 LFA3-Ig 融合基因表达水平较高，对该蛋白质的规模生产具有重要的经济价值。

实施例 3 FLA3-Ig 融合蛋白结合 Jurkat 细胞表面 CD2 及亲和常数的测定

人 T 淋巴瘤细胞 Jurkat 表面表达 CD2，我们利用流式细胞术检测了重组人 LFA3-Ig 融合蛋白及 Amevive[®]与抗 CD2 单克隆抗体 TS2/18 (ATCC HB195) 竞争结合 Jurkat 表面 CD2 的能力。

1、试验原理

人 T 淋巴瘤细胞系 Jurkat (ATCC TIB152) 细胞膜表面表达 CD2, LFA3 及抗 CD2 单克隆抗体均可与 CD2 特异结合。荧光标记的抗 CD2 单克隆抗体与细胞结合的量效曲线应为“S”形, 即随着标记物浓度的增加, 荧光强度也逐渐增加, 直至达到饱和(结合曲线); 若存在 LFA3-Ig 融合蛋白对 FITC-CD2 mAb 的竞争, 在 FITC-CD2 mAb 浓度固定(结合曲线的亚饱和点)的条件下, 随着加入的 LFA3-Ig 融合蛋白浓度的增加, 细胞结合的 FITC-CD2 mAb 量逐渐减少, 荧光强度减弱, 因此量效曲线呈反“S”形或“乙”字形; 在靶细胞和 FITC-融合蛋白相同的条件下, EC50 值越小, 则说明加入的 LFA3-Ig 融合蛋白与标记抗体竞争的能力越强, 即 LFA3-Ig 融合蛋白的亲合力越高。

2、材料和试剂

- 1) 测活细胞株: 人 T 细胞淋巴瘤 Jurkat 细胞(ATCC TIB152), 传代培养于含 10%新生牛血清的 RPMI1640/DMEM (1:1) 培养液;
- 2) 培养条件: 37°C, 5% CO₂, 饱和湿度;
- 3) 含 1%NBS 的 PBS (PBSS);
- 4) 本发明重组人 LFA3-Ig 融合蛋白;
- 5) Amevive, Biogen 公司, 批号 P21020;
- 6) 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗 CD2 单克隆抗体 (透析法标记);
- 7) 流式细胞仪: 美国 Becton Dickinson 公司 FACScan。

3、试验方法

- 1) Amevive, 用 PBSS 稀释至 2000 μ g/mL, 加入等体积 4 μ g/mL 的 FITC-CD2 mAb。
- 2) rhLFA3-Ig 融合蛋白, 用 PBSS 稀释至 200 μ g/mL, 加入等体积 4 μ g/mL 的 FITC-CD2 mAb。
- 3) 然后分别用 2 μ g/mL 的 FITC-CD2 mAb 连续 2 倍比稀释 Amevive 及本发明 rhLFA3-Ig 融合蛋白。

- 4) 对数生长期的 Jurkat 细胞, PBSS 调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 然后将细胞悬液分至流式专用管中, 0.1mL/管。
- 5) 200g 离心 5 分钟, 弃上清。
- 6) 将 Amevive 和本发明 rhLFA3-Ig 融合蛋白的序列稀释液加入步骤 5 的流式管中, 0.1ml/管, 每一浓度设 2 复管, 另外设 3 组对照, ① 只加 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FITC-CD2 mAb 为空白对照, ②加入 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ FITC-CD2 mAb 及 $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 同型抗体的细胞悬液为阴性对照, ③只加入 PBSS 的细胞悬液类似于阳性对照, 每组对照设 2 复管。冰浴避光 45 分钟。
- 7) PBSS 洗涤细胞两次, 200g 离心 5 分钟, 重悬于 $300\mu\text{L}$ PBSS 中。
- 8) 上机检测。

4、结果分析

采用 Origin6.0 拟合标准曲线: 横坐标为 Amevive 或本发明 rhLFA3-Ig 融合蛋白浓度, 纵坐标为荧光强度几何均数的平均数, 曲线为反“S”形, 选用 Logistic 4 参数方程回归模型。

该软件给出的回归方程为:

$$Y = (A-B)/[1+(X/C)^D] + B$$

根据该方程, $X \rightarrow +\infty$ 时, $Y=B$, 即最高限; 当 $X=0$ 时, $Y=A$, 即最低限; 而当 $X=C$ 时, $Y=(A+B)/2$, 即半数有效。因此 C 的数值即为半数有效浓度 (EC50)。

5、结果

表 1: Amevive 及本发明 rhLFA3-Ig 融合蛋白竞争结合试验结果总结

实验编号	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)		相对亲和力
	rhLFA3-Ig 融合蛋白	Amevive	
1	1.10	10.34	9.4
2	1.17	11.62	9.9
3	1.12	10.05	9.0
4	1.08	11.14	10.3
5	1.02	10.30	10.1

相对亲和力为 rhLFA3-Ig 融合蛋白亲和力与 Amevive 的比值, 从表 1 中的数据可以看到, 本发明所提供的 LFA3-Ig 的亲和力约为对照品 Amevive 的 10 倍。

实施例 4 rhLFA3-Ig 融合蛋白对混合淋巴细胞反应的抑制

1、试验原理

混合淋巴细胞培养 (mixed lymphocyte culture, MLC) 或称混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction, MLR) 是来源于两个个体的淋巴细胞在体外混合培养时, 由于细胞表面 HLA-II 类抗原中的 DR 和 DP 抗原不同, 可相互刺激对方淋巴细胞转化 (称为双向 MLC), 并产生多种淋巴因子, 促进 NK、CTL、LAK 等杀伤细胞活性。若将刺激的一方淋巴细胞先用丝裂霉素 C (mitomycin C) 或放射线照射处理, 使该细胞失去增殖能力, 但仍保持刺激对方淋巴细胞增殖能力的试验称为单向 MLC; 如不加上述处理, 则双方互相刺激, 称为双向 MLC。MLC 反应可通过 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率或形态学检测法以及 MTT 法检测反应细胞的增殖能力。在淋巴细胞相互刺激转化的过程中, 共刺激分子间的相互结合发挥着重要的作用, CD2/LFA-3 是重要的共刺激分子对, 若加入外源性 LFA3, 则可竞争结合淋巴细胞表面 CD2, 从而抑制 MLR。

2、材料和试剂

1) 玻璃纤维滤膜及负压抽滤装置, 闪烁液及液闪计数器;

- 2) 台式离心机: Eppendorf 公司产品;
- 3) 生物安全柜: 台湾造鑫公司产品;
- 4) 细胞培养箱: 美国 Revco 产品;
- 5) 流式细胞仪: 美国 Becton Dickinson 公司 FACScan;
- 6) 培养瓶、离心管、移液管、移液器、无菌吸嘴;
- 7) ³H-TdR: 中科院上海原子核研究所产品, 比放射活性 30Ci/mmol, 放射性浓度 1mCi/mL。
- 8) 淋巴细胞分离液
- 9) 肝素
- 10) 细胞培养试剂, 小牛血清, 杭州四季青生物工程研究所产品; RPMI1640 培养基, GIBCO 公司产品。
- 11) 磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 及含 1%小牛血清的 PBS (PBSS)。
- 12) 健康志愿者新鲜外周静脉血。

3、试验方法

分别取两位健康志愿者 (A、B) 肝素抗凝静脉血 10mL, 淋巴细胞分层液密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (PBMC), 无血清 RPMI1640 洗涤 3 次, 每次 1000rpm 离心 10min。

计数, 并用含 20%FCS 的 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度至 2.0×10^5 /mL。

rhLFA3-Ig 融合蛋白用含 20%FCS 的 RPMI1640 完全培养液稀释至 4000ng/mL;

用含 20%FCS 的 RPMI1640 完全培养液稀释 rhLFA3-Ig 融合蛋白, 至浓度为 4000、2000、1000、500、250 及 125ng/mL (注意: 样品在后续步骤中加入等体积的细胞悬液中时还要稀释 1 倍, 故终浓度分别为 2000、1000、500、250、125 及 62.5ng/mL)。

Amevive 用含 20%FCS 的 RPMI1640 完全培养液稀释至 40000ng/mL;

用含 20%FCS 的 RPMI1640 完全培养液稀释 Amevive, 至浓度为 40000、20000、10000、5000、2500 及 1250ng/mL (注意: 样品在后续步骤中加入等体积的细胞悬液中时还要稀释 1 倍, 故终浓度分别为 20000、10000、5000、2500、1250 及 625ng/mL)。

A、B 两个不同个体的淋巴细胞悬液, 检测双向 MLR, 于 96 孔细胞培养板中各孔加入两种细胞悬液各 50 μ L, 最弱反应对照 (min) 加入同一个体的单个核细胞 100 μ L。

将 rhLFA3-Ig 融合蛋白及 Amevive 稀释液加入上述 96 孔细胞培养板, 100 μ L/孔, 最强反应对照 (max) 孔 (分别为含每组两种不同的淋巴细胞的孔) 加入含 20%FCS 的 RPMI1640 完全培养液, 100 μ L/孔, 最弱反应对照也加入含 20%FCS 的 RPMI1640 完全培养液, 100 μ L/孔, 设置 3 个复孔, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 温箱培养 6d。

终止培养前 20h 每孔加入 0.5Ci 3H-TdR。

用细胞收集器将细胞吸附在玻璃纤维滤纸片上, 用生理盐水充分洗涤, 洗去游离的 3H-TdR; 将滤纸片烘干后, 用镊子按其顺序分别依次放入盛有闪烁液的塑料管内; β 闪烁仪自动测定样品 1min。

4、结果分析

计算刺激指数 (Stimulator Index, SI):

$SI = (\text{加入样品混合淋巴细胞反应 cpm 均值} - \text{最弱反应对照管 cpm 均值}) / (\text{最强反应对照管 cpm 均值} - \text{最弱反应对照管 cpm 均值})$ 。

表 2: rhLFA3-Ig 融合蛋白对 MLR 的抑制作用

浓度 (ng/ml)	rhLFA3-Ig 融合蛋白	
	³ H-TdR 掺入量 (cpm)	SI (%)
/ (A)	1383 \pm 212	/
/ (B)	1405 \pm 112	/

2000	4363±182	14.9±0.91
1000	4577±259	15.9±1.29
500	8442±224	35.2±1.12
250	11651±725	51.2±3.62
125	17185±714	78.9±3.56
63	20784±451	96.8±2.25
最强对照	21423±919	100

表 3: Amevive 对 MLR 的抑制作用

浓度 (ng/ml)	Amevive	
	³ H-TdR 掺入量 (cpm)	SI (%)
/ (A)	1383±212	/
/ (B)	1405±112	/
20000	4012±273	13.1±1.36
10000	4115±207	13.6±1.03
5000	7572±324	30.9±1.62
2500	10436±220	45.2±1.10
1250	15420±263	70.0±1.31
625	18433±243	85.1±1.21
最强对照	21423±919	100

绘制 rhLFA3-Ig 融合蛋白及 Amevive 的抑制比例图 4, rhLFA3-Ig 融合蛋白可明显抑制 MLR, 抑制能力为 Amevive 的 10 倍。

以上结果表明, 本发明的 rhLFA3-Ig 融合蛋白在亲和力、特异性方面均显著优于 Amevive。

序列表

<110> 上海中信国健药业有限公司

<120> 一种重组 LFA3 基因, 及其融合基因与产物

<150> CN200610026070.X

<151> 2006-04-26

<160> 11

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 771

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (771)

<223> 重组 LFA3 核苷酸序列

<400> 1

```

ATGGT TGCTG GGAGC GACGC GGGGC GGGCC CTGGG GGTCC TCAGC GTGGT CTGCC TGCTG   60
CACTG CTTTG GTTTC ATCAG CTGTT TTTCC CAACA AATAT ATGGT GTTGT GTATG GGAAT   120
GTAAC TTTCC ATGTA CCAAG CAATG TGCCT TTAAG AGAGG TCCTA TGGAA AAAAC AAAAG   180
GATAA AGTTG CAGAA CTGGA AAATT CTGAA TTCAG AGCTT TCTCA TCTTT TAAAA ATAGG   240
GTTTA TTTAG ACACT GTGTC AGGTA GCCTC ACTAT CTACA ACTTA ACATC ATCAG ATGAA   300
GATGA GTATG AAATG GAATC GCCAA ATATT ACTGA TACCA TGAAG TTCTT TCTTT ATGTG   360
CTTGA GTCTC TTCCA TCTCC CACAC TAACT TGTGC ATTGA CTAAT GCTGC TGCTT CTTCT   420
GCCGC TGCTT CTTCT GCTGC CGCTT CTTCT TTTTC CCAAC AAATA TATGG TGTTG TGTAT   480
GGGAA TGTA AATT CATT CATGT ACCAA GCAAT GTGCC TTAA AAGAG GTCCT ATGGA AAAAA   540
CAAAA GGATA AAGTT GCAGA ACTGG AAAAT TCTGA ATTCA GAGCT TTCTC ATCTT TTAAG   600
AATAG GGTTC ATTTA GACAC TGTGT CAGGT AGCCT CACTA TCTAC AACTT AACAT CATCA   660
GATGA AGATG AGTAT GAAAT GGAAT CGCCA AATAT TACTG ATACC ATGAA GTTCT TTCTT   720
TATGT GCTTG AGTCT CTTCC ATCTC CCACA CTAAC TTGTG CATTG ACTAA T           771

```

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (15)

<223> 接头氨基酸序列

<400> 2

Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser

1

5

10

15

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (45)

<223> 接头核苷酸序列

<400> 3

GCTGC TGCTT CTTCT GCCGC TGCTT CTTCT GCTGC CGCTT CTTCT

45

<210> 4

<211> 1455

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (1455)

<223> 融合基因核苷酸序列

<400> 4

ATGGT TGCTG GGAGC GACGC GGGGC GGGCC CTGGG GGTCC TCAGC GTGGT CTGCC TGCTG 60
 CACTG CTTTG GTTTC ATCAG CTGTT TTTCC CAACA AATAT ATGGT GTTGT GTATG GGAAT 120
 GTAAC TTTCC ATGTA CCAAG CAATG TGCCT TTAAG AGAGG TCCTA TGGAA AAAAC AAAAG 180
 GATAA AGTTG CAGAA CTGGA AAATT CTGAA TTCAG AGCTT TCTCA TCTTT TAAAA ATAGG 240
 GTTTA TTTAG ACACT GTGTC AGGTA GCCTC ACTAT CTACA ACTTA ACATC ATCAG ATGAA 300
 GATGA GTATG AAATG GAATC GCCAA ATATT ACTGA TACCA TGAAG TTCTT TCTTT ATGTG 360
 CTTGA GTCTC TTCCA TCTCC CACAC TAACT TGTGC ATTGA CTAAT GCTGC TGCTT CTTCT 420
 GCCGC TGCTT CTTCT GCTGC CGCTT CTTCT TTTTC CCAAC AAATA TATGG TGTTG TGTAT 480
 GGGAA TGTA CTTTC CATGT ACCAA GCAAT GTGCC TTTAA AAGAG GTCCT ATGGA AAAAA 540
 CAAAA GGATA AAGTT GCAGA ACTGG AAAAT TCTGA ATTCA GAGCT TTCTC ATCTT TAAAA 600
 AATAG GGTTC ATTTA GACAC TGTGT CAGGT AGCCT CACTA TCTAC AACTT AACAT CATCA 660

GATGA AGATG AGTAT GAAAT GGAAT CGCCA AATAT TACTG ATACC ATGAA GTTCT TTCTT 720
TATGT GCTTG AGTCT CTTCC ATCTC CCACA CTAAC TTGTG CATTG ACTAA TGACA AAAC 780
CACAC ATGCC CACCG TGCCC AGCAC CTGAA CTCCT GGGGG GACCG TCAGT CTTCC TCTTC 840
CCCCC AAAAC CCAAG GACAC CCTCA TGATC TCCCG GACCC CTGAG GTCAC ATGCC TGGTG 900
GTGGA CGTGA GCCAC GAAGA CCCTG AGGTC AAGTT CAACT GGTAC GTGGA CGGCG TGGAG 960
GTGCA TAATG CCAAG ACAA GCCGC GGGAG GAGCA GTACA ACAGC ACGTA CCGTG TGGTC 1020
AGCGT CCTCA CCGTC CTGGG GCAGG ACTGG CTGAA TGGCA AGGAG TACAA GTGCA AGGTC 1080
TCCAA CAAAG CCCTC CCAGC CCCCC TCGAG AAAAC CATCT CAAA GCCAA AGGGC AGCCC 1140
CGAGA ACCAC AGGTG TACAC CCTGC CCCCC TCCCG GGATG AGCTG ACCAA GAACC AGGTC 1200
AGCCT GACCT GCCTG GTCAA AGGCT TCTAT CCCAG CGACA TCGCC GTGGA GTGGG AGAGC 1260
AATGG GCAGC CGGAG ACAA CTACA AGACC ACGCC TCCCG TGCTG GACTC CGACG GCTCC 1320
TTCTT CCTCT ACAGC AAGCT CACCG TGGAC AAGAG CAGGT GGCAG CAGGG GAACG TCTTC 1380
TCATG CTCG TGATG CATGA GGCTC TGCAC AACCA CTACA CGCAG AAGAG CCTCT CCCTG 1440
TCTCC CGGTA AATGA 1455

<210> 5

<211> 456

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(456)

<223> 融合基因氨基酸序列

<400> 5

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15
Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30
Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45
Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60
Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80
Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu
85 90 95
Pro Ser Pro Thr Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Ala Ala Ala Ser Ser
100 105 110
Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Phe Ser Gln Gln Ile Tyr
115 120 125
Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro Ser Asn Val Pro
130 135 140

Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala Glu Leu
 145 150 155 160
 Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg Val Tyr
 165 170 175
 Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Leu Thr Ser Ser
 180 185 190
 Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp Thr Met
 195 200 205
 Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu Pro Ser Pro Thr Leu Thr
 210 215 220
 Cys Ala Leu Thr Asn Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (39)

<223> 引物核苷酸序列

<400> 6

GCTAG CGCCG CCACC ATGGT TGCTG GGAGC GACGC GGGG

39

<210> 7

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (48)

<223> 引物核苷酸序列

<400> 7

AGCAG AAGAA GCAGC GGCAG AAGAA GCAGC AGCAT TAGTC AATGC ACA

48

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (48)

<223> 引物核苷酸序列

<400> 8

TCTGC CGCTG CTTCT TCTGC TGCCG CTTCT TCTTT TTCCC AACAA ATA

48

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (30)

<223> 引物核苷酸序列

<400> 9

TCTCC CACAC TAACT GACAA AACTC ACACA

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (30)

<223> 引物核苷酸序列

<400> 10

TGTGT GAGTT TTGTC AGTTA GTGTG GGAGA

30

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)... (20)

<223> 引物核苷酸序列

<400>

TACTC GAGTC ATTTA CCCGG

20

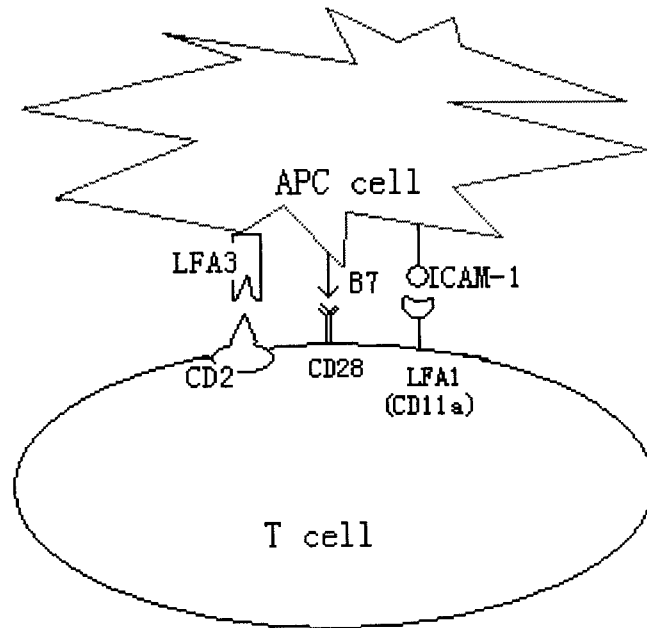


图 1

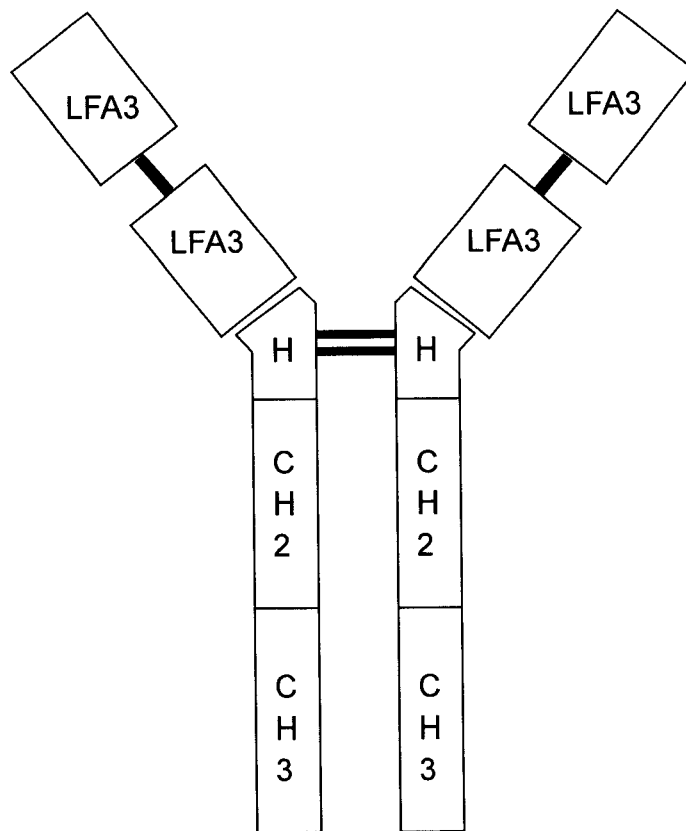


图 2

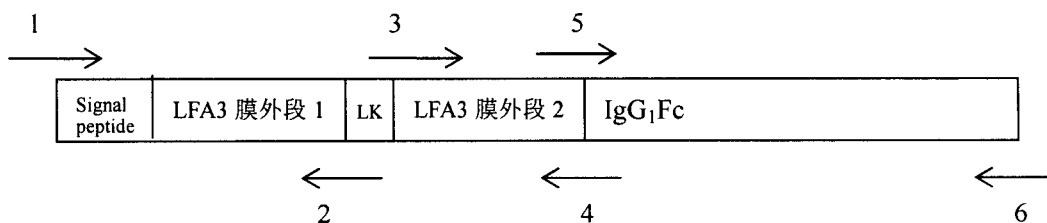


图 3

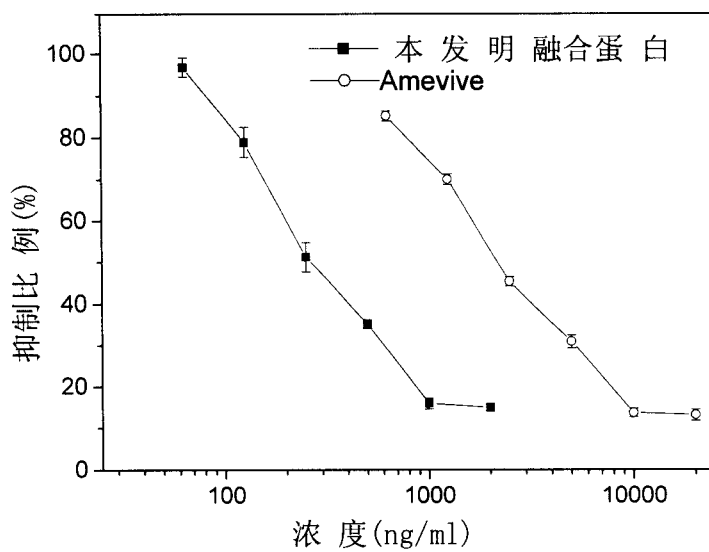


图 4