



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101985468 B

(45) 授权公告日 2013.04.24

(21) 申请号 201010501785.2

(22) 申请日 2010.09.30

(73) 专利权人 中山大学

地址 510080 广东省广州市中山二路 74 号
中山大学北校区中山医学院

(72) 发明人 孙希 卞国武 阮志燕 胡少敏
杨琳琳 刘灵辉 吕志跃 吴忠道

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 陈卫

(51) Int. Cl.

C07K 14/435(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61P 33/12(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1683403 A, 2005.10.19, 说明书第 1-5 页、第 7 页第 23 行至第 9 页第 25 行、第 11 页第 29 行至第 12 页第 7 行、序列表及权利要求 1、4、8、9.

卞国武等. 日本血吸虫(中国大陆株) Sjl6 基因的原核表达. 《中国血吸虫病防治杂志》. 2001, 第 13 卷(第 6 期), 全文.

孙希等. 重组日本血吸虫 Sjl6 蛋白调节宿主炎症反应的实验研究. 《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》. 2008, 第 26 卷(第 2 期), 全文.

卞国武等. 日本血吸虫(中国大陆株) Sjl6 基因真核表达载体的构建及序列分析(英文). 《中国寄生虫病防治杂志》. 2001, 第 14 卷(第 4 期), 全文.

审查员 王金凤

权利要求书1页 说明书5页
序列表2页

(54) 发明名称

SJ16 重组蛋白及其在制备血吸虫病疫苗、诊断试剂、治疗药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一系列 SJ16 重组蛋白及其在制备血吸虫病疫苗、诊断试剂、治疗药物中的应用技术。包括由 SJ16 蛋白分离得到活性片段 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :3, 通过蛋白重组得到系列同一性 70% 以上的功能性变体。进一步将上述蛋白应用于制备血吸虫病疫苗、诊断试剂、治疗药物。本发明是首次提出将 SJ16 蛋白应用于血吸虫病诊断制备诊断试剂, 该方法不但可以区分血吸虫的既往或现行感染, 且检测灵敏度高, 具有确切的早期诊断价值。也是首次提出将 SJ16 应用于血吸虫病的疫苗和治疗药物的制备。而且, 本发明提供的新型免疫抑制剂来源于病原体生物资源, 具有极其广阔的市场空间和较好的社会、经济效益。

1. 一种 SJ16 重组蛋白,其特征在于:该蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。
2. 一种多核苷酸,其特征在于:该核苷酸编码权利要求 1 所述的重组蛋白。
3. 权利要求 1 所述的重组蛋白在制备血吸虫病诊断试剂中的应用。
4. 权利要求 1 所述的重组蛋白在制备血吸虫病疫苗中的应用,该疫苗由权利要求 1 所述的重组蛋白制备。
5. 权利要求 1 所述的重组蛋白在制备治疗血吸虫病药物中的应用。

SJ16 重组蛋白及其在制备血吸虫病疫苗、诊断试剂、治疗药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制剂,尤其是涉及 SJ16 蛋白在制备血吸虫病疫苗、诊断试剂、治疗药物中的应用。

背景技术

[0002] 血吸虫病是危害人民身体健康最重要的寄生虫病。医药业界普遍认为研制血吸虫疫苗可能是控制血吸虫流行最终措施。血吸虫疫苗的研究已有 60 多年的历史,至今尚未找到一种真正有价值的疫苗。其原因是多方面的,但人们对血吸虫感染的保护性免疫机制及血吸虫逃避机体免疫攻击的机制的认识不足可能是一个重要原因。现已有十余个被公认有前途的日本血吸虫(中国大陆株)亚单位候选抗原在国内获得了克隆和表达。如,如谷胱甘肽转移酶、副肌球蛋白、脂肪酸结合蛋白和 23ku 膜蛋白等,但其中大多数候选疫苗分子尚未达到所要求的等于或大于 40% 减虫率的免疫保护力。

[0003] 血吸虫病的早期诊断也是一个尚未解决的难题。感染血吸虫 1 个月后,感染者的粪便中才能检测到虫卵,而特异性抗体的出现时间一般在感染后 1 周左右,且针对抗原的血清抗体在宿主体内长期存在,不能区分早期和既往感染,没有疗效考核价值。此外,目前用于检测特异性抗体的诊断抗原主要是成虫抗原和虫卵抗原,但这类抗原成分复杂,也不易大量获得。一般认为宿主体内(体液中)存在血吸虫抗原,表明有活动性感染的可能,故检测宿主体内是否存在血吸虫循环抗原,可用于血吸虫病的诊断和疗效。但循环抗原进入血液系统后,以抗原抗体复合物的形式存在,降低了检测的灵敏度,给诊断带来了困难。特别是慢性血吸虫病患者感染度普遍偏低,血清和尿液中检测循环抗原的阳性率较低。在慢性血吸虫病患者血清中,由于 CAg 不断与血清抗体结合形成血吸虫循环免疫复合物(CIC),故 CAg 含量较少。目前尚缺乏能实际应用的抗原检测试剂。

[0004] 学者们也为解决血吸虫病疗效考核的方法问题作了大量研究。目前国内外在研究短程抗体的检测方面取得了较大进展,如:用抗独特型抗体,重组抗原,或用某些血吸虫抗原组分对抗体亚类进行检测。但敏感性不及检测总抗体者为高,故对其应用价值还有待于进一步探索。

[0005] 综上,寻求新的血吸虫病疫苗候选分子和具有早期诊断价值的血吸虫生物标志物是当前血吸虫病诊断技术实现突破的关键。我们注意到,日本血吸虫(*S. japonicum*)Sj16 是虫体分泌蛋白,其基因序列已被克隆,并建立了重组表达体系。但尚未有人对 SJ16 进行在诊断和免疫预防中的价值的研究。

发明内容

[0006] 本发明对 SJ16 蛋白在血吸虫病诊断和免疫预防中的价值进行了研究,目的在于提供一种含有活性成分的 SJ16 重组蛋白,并提供含有活性成分基因编码所述的融合蛋白的多核苷酸及该多核苷酸序列相应的核酸构建体系、表达载体和宿主细胞。

[0007] 进一步的目的在于提供一种日本血吸虫疫苗。

[0008] 再进一步的目的在于,将 SJ16 蛋白作为诊断抗原,制备克隆抗体,并由此提供一种日本血吸虫病诊断试剂及其使用方法。

[0009] 更进一步的目的在于,在此研究的基础上提供治疗日本血吸虫病的药物。

[0010] 具体的技术方案为:

[0011] 一、关于 SJ16 重组蛋白及带活性基因编码的多核苷酸

[0012] 首先,我们对 SJ16 蛋白全长序列 (SEQ ID NO :4) 进行了分析,发现有 2 个核定位序列肽段。分别将这两个核定位序列肽段去除,或同时去除,得到了三个不同的活性成分片段。SJ16 在本发明中的作用,包括 SJ16 在日本血吸虫在诊断方面的应用;SJ16 蛋白的疫苗活性成分;并发现 SJ16 蛋白,以及 SJ16 蛋白的前、中、后三个活性片段并优选其活性片段应用于诊断和制备血吸虫疫苗。在本发明中,对这三个活性片段分别命名为 SJ16-1、SJ16-2、SJ16-3(对应于 SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3,基因编码见序列表)。

[0013] 在对全长的 SJ16 及三个活性片段进行了克隆表达和对小鼠的保护性实验中,证实了 SJ16 蛋白及这些活性片段或它们的任意组合都能引起特异性免疫反应,对实验动物具有免疫保护作用。并根据需要针对活性片段进行重组表达,希望得到更优质的活性蛋白。通过实验证明,在重组蛋白中,与 SJ16 蛋白或其活性片段具有 70% 以上的同一性的功能性变体或这些功能性变体的组合物都具有较好的免疫保护作用,其中更优选的范围是具有 80% 以上的同一性的功能性变体或这些功能性变体的组合物。

[0014] 在对上述 SJ16 蛋白及其活性片段进行重组多肽的研究结果也表明,含 SJ16 蛋白活性氨基酸片段的数量为 10 以上的多肽的免疫保护作用较好。

[0015] 在此研究的过程中,我们还提供了含有 SJ16 蛋白活性成分基因编码所述的融合蛋白的多核苷酸及该多核苷酸序列相应的核酸构建体系、表达载体和宿主细胞。

[0016] 二、应用于制备日本血吸虫病疫苗

[0017] 居于上述第一点研究的基础上,我们将上述活性物质应用于制备预防日本血吸虫的疫苗。该疫苗包含上述所提及的重组蛋白作为活性成分。即该疫苗的蛋白组成多肽序列包含 SJ16 蛋白或 SJ16 蛋白的活性片段 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :3 序列其中的一种或几种。或包含与 SJ16 蛋白或 SJ16 蛋白的活性片段具有 70% 以上的同一性的功能性变体中的一种或几种。

[0018] 三、应用于制备日本血吸虫病诊断试剂

[0019] 在血吸虫感染过程中,由于 SJ16 蛋白参与了免疫逃避,在患者体内不引起强烈的免疫应答。SJ16 蛋白主要以游离形式存在,因此,我们认为可以通过对 SJ16 的检测来区分既往感染或现行感染;并可以达到很高的灵敏度。通过动物感染实验也证实了这一点,感染 1 天后,即可检测到血清中 SJ16,比检测特异性抗体的时间明显提前,因此认为以 SJ16 蛋白作为诊断抗原,其检测特异性抗体的灵敏度明显高于现有的诊断抗原,并具有早期诊断价值。

[0020] 具体方案为,以 SJ16 蛋白活性成份作为诊断抗原,通过抗体克隆技术得到对应的克隆抗体作为诊断试剂,检测到血清中 SJ16 蛋白。使用方法为:将生物样品与克隆抗体接触,并检测是否产生免疫反应,从而判断是否感染。

[0021] 四、应用于制备日本血吸虫病的治疗药物

[0022] 在本发明的研究过程中,我们观察到,所涉及的这些活性蛋白及多肽片段有减虫和减卵的作用;可以用于制备治疗日本血吸虫病的药物。即该药物由 SJ16 蛋白、其活性片段或其同一性为 70% 以上的功能性变体制备。

[0023] 本发明与现有技术相比,有以下优点和创新:

[0024] 第一,本发明首次提出将 SJ16 蛋白应用于血吸虫病诊断,制备诊断试剂。该方法不但可以区分血吸虫的既往或现行感染,且检测灵敏度高,具有确切的早期诊断价值。

[0025] 第二,本发明首次提出将 SJ16 应用于血吸虫病的疫苗制备及治疗药物制备。

[0026] 第三,本发明提供的新型免疫抑制剂来源于病原体生物资源,具有极其广阔的市场空间和较好的社会、经济效益。

具体实施方式:

[0027] 实施例 1

[0028] 根据日本血吸虫 SJ16 基因序列设计引物,经 PCRDESIGN 软件分析,由上海生工生物工程公司合成,引物 P1 为 5'GCCATATGAACATGACTTTAATTAAC,引入 NdeI 酶切位点;引物 P2 为 5'ACTTAATACTTTGTAGAATTCGAACC,引入 HindIII 酶切位点。扩增出全长 SJ16 基因。

[0029] 实施例 2

[0030] SJ16 全长的表达和鉴定及纯化

[0031] 利用所设计的一对引物 (P1、P2) 成功扩增。将其克隆到 pGEX-4T-1 载体上,挑取筛选到的 pGEX-4T-1-Sj16-1 重组质粒的 DNA,以其为模板,用 P1、P2 引物进行 PCR 扩增获取的特异性条带;双酶切验证其大小与预期序列一致;将所筛选的重组质粒送 TaKaRa 公司测序,测序结果无误。获得的重组质粒确实为 pGEX-4T-1-Sj16-1 重组质粒。将 pGEX-4T-1-Sj16-1 重组质粒转化的工程菌经 IPTG 诱导表达后,15% SDS-PAGE 电泳显示在分子量约 46kDa 处出现一明显蛋白条带,而空质粒转化菌在诱导前后以及重组质粒工程菌在诱导前后均无此条带的出现,表明此蛋白条带可能为目的蛋白条带。菌体裂解上清上亦有此蛋白条带的出现,显示该蛋白为可溶性表达。将裂解上清经过 GST 亲和层析柱,经过 thrombin 酶酶切以后,可以得到分子量为 19kDa 左右的单一蛋白。

[0032] pGEX-4T BL21 转化菌经诱导后出现一分子量约为 26kDa 明显表达带,此为 GST 蛋白。pGEX-4T-1 转化的 BL 21-DE3 菌经 IPTG 诱导后,较诱导前于约 40Da 出现一条明显的融合蛋白表达条带。免疫印迹分析,该蛋白能特异地被抗 GST 抗体 (1 : 500 稀释) 识别,于约 40Da 位置有一一条条带,pGEX24T-1 转化菌经诱导于约 26kDa 处有一一条条带为 pGEX-4T-1 转化菌经诱导表达 GST 蛋白能特异地被抗 GST 抗体识别。ST 柱亲和层析纯化。

[0033] 实施例 3

[0034] SJ16-1、SJ16-2、Sj16-3 的表达和鉴定。

[0035] 根据 SJ16-1 的蛋白序列直接合成相应的 DNA 序列,命名为 SJ16-1 序列。根据 SJ16-2、SJ16-3 之间引入柔性臂 (-GGAGGA-),使 SJ16-2、SJ16-3 融合;再根据其蛋白序列设计相应的核酸序列。分别将其克隆到 pGEX-4T-1 载体上,挑取筛选到的 pGEX-4T-1-Sj16-1、pGEX-4T-1-Sj16-2、pGEX-4T-1-Sj16-3 重组质粒的 DNA,以其为模板,用相应引物进行 PCR 扩增获取的特异性条带;双酶切验证其大小与预期序列一致;将所筛选的重组质粒送 TaKaRa 公司测序,测序结果无误。获得的重组质粒确实为 pGEX-4T-1-Sj16-1、

pGEX-4T-1-Sj16-2-3 重组质粒。将 pGEX-4T-1-Sj16-1、pGEX-4T-1-Sj16-2-3 重组质粒转化的工程菌经 IPTG 诱导表达后,15% SDS-PAGE 电泳显示其分别在分子量约 40kDa、84kDa 处出现一明显蛋白条带,而空质粒转化菌在诱导前后以及重组质粒工程菌在诱导前后均无此条带的出现,表明此蛋白条带可能为目的蛋白条带。菌体裂解上清上亦有此蛋白条带的出现,显示该蛋白为可溶性表达。将裂解上清经过 GST 亲和层析柱,经过 thrombin 酶酶切以后,可以得到分子量为 14kDa、36kDa 左右的单一蛋白

[0036] pGEX-4T-1 转化的 BL21-D E3 菌经 IPTG 诱导后,较诱导前于约 40kDa、84kDa 出现一条明显的融合蛋白表达条带。免疫印迹分析,该蛋白能特异地被抗 GST 抗体(1 : 500 稀释)识别,于约 40kDa、84kDa 位置有一条条带,pGEX24T 21 转化菌经诱导于约 26kDa 处有一条条带为 pGEX-4T-1 转化菌经诱导表达 GST 蛋白能特异地被抗 GST 抗体识别。GST 柱亲和层析纯化。

[0037] 实施例 4

[0038] SJ16 单克隆抗体的制备

[0039] 纯化 SJ16 抗原 50 μ g 加福氏完全佐剂皮下多点注射纯种 BALB/C 小鼠免疫 3-4 次,末次加强免疫 3 天后,取脾融合;取 108 脾淋巴细胞悬液备用。取对数生长骨髓瘤细胞离心;取得 $\times 10^7$ 细胞备用。选用小鼠腹腔巨噬细胞制备饲养细胞层,调整细胞数至 1×10^5 /mI 备用。

[0040] 进行细胞融合。将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1 : 10 比例混合,用无血清不完全培养液洗 1 次;90s 内加入 37 $^{\circ}$ C 预温的 1mI 45% PEG(分子量 4000)溶液,。37 $^{\circ}$ C 水浴作用 90s;加 37 度预温的不完全培养液以终止 PEG 作用,每隔 2min 分别加入 1mI、2mI、3mI、4mI、5mI 和 6mI;离心,去上清,用含 20%小牛血清 HAT 选择培养液重悬。将上述细胞,加到已有饲养细胞层的 96 孔板内,每孔加 100 μ I。培养板置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

[0041] 用 SJ16 蛋白进行 ELISA 检测,筛选出阳性杂交瘤细胞。筛选出的阳性细胞株进行单克隆抗体制备。

[0042] 实施例 5

[0043] 制备 SJ16 单克隆抗体,然后以 SJ16 单克隆抗体用 ELISA 方法检测感染血吸虫动物血清;平行实验对照为 M r 31 000/32 000 抗原单克隆抗体。以血吸虫尾蚴免疫小鼠,每组动物各 8 只,感染 45 天后杀鼠取的血清,SJ16 单克隆抗体 ELISA 检测,阳性检出率为 92.1%;M r 31 000/32 000 抗原单克隆抗体检出率 52.3%,无假阳,无交叉。

[0044] SJ16 单克隆抗体检出灵敏度和特异性比 M r 31 000/32 000 高。两者相比有统计学意义。

[0045] 实施例 6

[0046] SJ16-1 核酸疫苗保护实验

[0047] 构建了 DNA 疫苗 SJ16-1,并且加不同的佐剂用肌肉注射法分别免疫昆明鼠及 BALB/c 小鼠,与对照组相比,裸露 DNA 诱导小鼠产生了 Sj16-1 特异性抗体,并对日本血吸虫的攻击感染显示了一定的保护效果。成虫减少率为 45.7%,肝卵 EPG 减少率为 40.1%,肠卵减少率为 37.4%,肝脏表面结节也明显的减少,统计学分析有显著性意义。

[0048] 实施例 7

[0049] SJ16-1、SJ16-2、Sj16-3 蛋白疫苗保护实验

[0050] 重组蛋白 Sj16-1、Sj16-2、Sj16-3 分别与等量 FCA 混合,皮下注射免疫 BALB/c 小鼠(以 FCA 作对照),与 PBS 注射对照组相比,免疫组减虫率达 42.9%,肝卵减少率为 44.9%,肠卵减少率为 40.3%。统计学上差异有显著性。上述结果提示 Sj16-1、Sj16-2、Sj16-3 蛋白可诱导小鼠产生明显的抗日本血吸虫攻击感染的保护力。

[0051] 实施例 8:

[0052] SJ16 蛋白功能性变体疫苗保护实验

[0053] 通过序列分析,将 SJ16-1 定点突变,得到新的功能性变体,其序列 MK V T P I I F A V F C V V G G M T L I T G T T L E Q G P H P S E K D M E L V Y I D A E Y E K E A G L K S I C N E I K R S F R E D L G M K M L D V A K I L。通过定点技术,得到相应的核酸序列,并重组克隆到 pET-32a 载体,构建了重组蛋白 SJ16-1t。将重组蛋白 Sj16-1t 与等量 FCA 混合,皮下注射免疫 BALB/c 小鼠(以 FCA 作对照),与 PBS 注射对照组相比,免疫组减虫率达 44.9%,肝卵减少率为 50.2%,肠卵减少率为 43.3%。统计学上差异有显著性。上述结果提示 Sj16-1t 蛋白可诱导小鼠产生明显的抗日本血吸虫攻击感染的保护力。

[0001]

序列表

<110>中山大学医学院

<120>

<210>1

<212>

<400>蛋白序列 (SJ16 蛋白去 2 核定位序列后的三段中第一段)

MKVTPIIFAVFCVVGAMTLITATTLEQAPHPSEKDMEL
VYIDAEYEKEGGLKSICNEIKRSFREDLGMKMLDVAKI
LG

<110>中山大学医学院

<120>

<210>2

<212>

<400>蛋白序列 (SJ16 蛋白去 2 核定位序列后的三段中第二段)

EDLGMKMLDVAKILG

<110>中山大学医学院

<120>

<210>3

<212>

<400> 蛋白序列 (SJ16 蛋白去 2 核定位序列后的三段中第三段)

MMEYESS

[0002]

<110>中山大学医学院

<120>

<210>4

<212>

<400> 蛋白序列 (SJ16 蛋白全序列)

MKVTPIIFAVFCVVGAMTLITATTLEQAPHPSEKDMELVYIDAEYEKEGGLK

SICNEIKRSFRKGRHHIYKVMDKYIRKEDLGMKMLDVAKILGRRIEKRMEY

IAKKLDKMMEYESS

专利名称(译)	SJ16重组蛋白及其在制备血吸虫病疫苗、诊断试剂、治疗药物中的应用		
公开(公告)号	CN101985468B	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN201010501785.2	申请日	2010-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学		
申请(专利权)人(译)	中山大学		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学		
[标]发明人	孙希 卞国武 阮志燕 胡少敏 杨琳琳 刘灵辉 吕志跃 吴忠道		
发明人	孙希 卞国武 阮志燕 胡少敏 杨琳琳 刘灵辉 吕志跃 吴忠道		
IPC分类号	C07K14/435 C07K16/18 C12N15/12 C12N15/63 G01N33/53 A61K38/17 A61K39/00 A61P33/12		
CPC分类号	Y02A50/423		
代理人(译)	陈卫		
审查员(译)	王金凤		
其他公开文献	CN101985468A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一系列SJ16重组蛋白及其在制备血吸虫病疫苗、诊断试剂、治疗药物中的应用技术。包括由SJ16蛋白分离得到活性片段SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2和SEQ ID NO : 3，通过蛋白重组得到系列同一性70%以上的功能性变体。进一步将上述蛋白应用于制备血吸虫病疫苗、诊断试剂、治疗药物。本发明是首次提出将SJ16蛋白应用于血吸虫病诊断制备诊断试剂，该方法不但可以区分血吸虫的既往或现行感染，且检测灵敏度高，具有确切的早期诊断价值。也是首次提出将SJ16应用于血吸虫病的疫苗和治疗药物的制备。而且，本发明提供的新型免疫抑制剂来源于病原体生物资源，具有极其广阔的市场空间和较好的社会、经济效益。

序列表

```

<110>中山大学医学院
<120>
<210>1
<212>
<400>蛋白质序列 (SJ16 蛋白去 2 核定位序列后的三段中第一段)
MKVTPHIFAVFCVVGAMTLITATTLEQAPHSEKDMEL
VYIDAEEYEKEGGLKSICNEIKRSFREDLGMKMLDVAKI
LG
<110>中山大学医学院
<120>
<210>2
<212>
<400>蛋白质序列 (SJ16 蛋白去 2 核定位序列后的三段中第二段)
EDLGMKMLDVAKILG
<110>中山大学医学院
<120>
<210>3
<212>
<400>蛋白质序列 (SJ16 蛋白去 2 核定位序列后的三段中第三段)
MMEYESS

```

