



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118702827 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 07

(21) 申请号 202411180999.2

A61K 39/09 (2006.01)

(22) 申请日 2024.08.27

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 118702827 A

(43) 申请公布日 2024.09.27

(73) 专利权人 南京澄实生物医药科技有限公司

地址 210000 江苏省南京市江北新区探
路73号树屋十六栋A-4栋2层201室

(72) 发明人 韩梯云 徐实 李静 许梦微

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限

公司 11245

专利代理师 陆惠中

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(56) 对比文件

董运亮.肺炎链球菌PhtD和PcpA蛋白疫苗研究.中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑.2019,(第1期),第52页第2段.

C Gray,et al.Activation of memory Th17 cells by domain 4 pneumolysin in human nasopharynx-associated lymphoid tissue and its association with pneumococcal carriage.Mucosal Immunology.2014,第7卷(第3期),摘要.

注意:

申请人在申请日后补交了实验数据,但该数据并未包含在本授权公告文档中。

审查员 李雪莹

权利要求书2页 说明书11页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

一种预防肺炎链球菌感染的融合蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种预防肺炎链球菌感染的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗,以及分子架构设计和应用等。本发明从ply、PhtD的蛋白分子三级结构出发,经创造性地筛选,最终选取ply蛋白的C端结构域和phtD蛋白的N端结构域构建得到融合蛋白,再进一步添加Fc结构域、STABILON等元件。本发明的融合蛋白分子可减弱肺炎链球菌感染引起的组织病变,具有良好的免疫原性,起到有效预防和免疫保护作用,高效预防肺炎链球菌感染。本发明的预防肺炎链球菌感染的免疫原性组合物、融合蛋白、重组疫苗具有广阔的应用前景。



1. 一种融合蛋白,其特征在于,从N端到C端,包含如下元件:

元件a、组氨酸三联体蛋白PhtD的N端结构域多肽片段;和

元件b、溶血素的C端结构域多肽片段,

所述元件a和元件b的多肽片段来源于肺炎链球菌;所述PhtD的N端结构域多肽片段的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述溶血素的C端结构域多肽片段的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白的N端还包含信号肽和/或人的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白 (IGHG1) 的Fc结构域;或者,所述融合蛋白的C端还包含人S5a/PSMD4蛋白酶体亚基的C端多肽片段STABILON。

3. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其特征在于,所述信号肽来源于人的蓝啶蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示;所述IGHG1的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示;所述STABILON的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示。

4. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白从N端到C端依次包含所述来源于人的蓝啶蛋白的信号肽、所述免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域、所述PhtD的N端结构域多肽片段、所述溶血素的C端结构域多肽片段、所述STABILON;其中,所述来源于人的蓝啶蛋白的信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,所述免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示,PhtD的N端结构域多肽片段的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述溶血素的C端结构域多肽片段的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述STABILON的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示。

5. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其特征在于,所述免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域与PhtD的N端结构域多肽片段之间通过GGs linker序列连接,所述PhtD的N端结构域多肽片段和所述溶血素的C端结构域多肽片段之间通过间隔序列连接,所述溶血素的C端结构域多肽片段与所述STABILON之间通过GS linker序列连接;所述间隔序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示,所述GGs linker序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示,所述GS linker序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示。

6. 一种重组核酸分子,其特征在于,编码权利要求1-5任一项所述融合蛋白。

7. 一种重组基因表达盒,其特征在于,包含权利要求6所述重组核酸分子。

8. 一种重组载体,其特征在于,包含权利要求6所述重组核酸分子、或权利要求7所述重组基因表达盒。

9. 一种重组宿主细胞,其特征在于,包含权利要求6所述重组核酸分子、或权利要求7所述重组基因表达盒、或权利要求8所述重组载体。

10. 一种免疫原性组合物或药物组合物,其特征在于,包含一种权利要求1-5任一项融合蛋白,和/或一种权利要求6所述重组核酸分子,和/或一种权利要求7所述重组基因表达盒,和/或一种权利要求8所述重组载体,和/或一种权利要求9所述重组宿主细胞。

11. 一种重组疫苗,其特征在于,包含一种权利要求1-5任一项融合蛋白,和/或一种权利要求所述重组核酸分子,和/或一种权利要求所述重组基因表达盒,和/或一种权利要求8所述重组载体,和/或一种权利要求9所述重组宿主细胞,和/或一种权利要求10所述免疫原性组合物或药物组合物。

12. 一种权利要求1-5任一项融合蛋白,和/或权利要求6所述重组核酸分子,和/或权利

要求7所述重组基因表达盒,和/或权利要求8所述重组载体,和/或权利要求9所述重组宿主细胞,和/或权利要求10所述免疫原性组合物或药物组合物,和/或权利要求11所述重组疫苗在制备预防肺炎链球菌引起的疾病的药物中的用途。

13.根据权利要求12所述的用途,其特征在于,所述肺炎链球菌引起的疾病包括肺部组织感染、肺炎、脑膜炎、中耳炎、菌血症、鼻窦炎、心内膜炎、关节炎、腹膜炎、眼内炎。

一种预防肺炎链球菌感染的融合蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,特别是免疫药物技术领域,具体涉及一种肺炎链球菌体液免疫疫苗及应用等。

背景技术

[0002] 安全有效的疫苗被认为是预防和控制肺炎链球菌感染的最佳措施。肺炎链球菌的荚膜多糖(Capsular Polysaccharide, CPS)是当前疫苗开发中的核心抗原。CPS是包裹在细菌表面的糖类物质,是肺炎链球菌的主要毒力因子,也是诱导产生保护性抗体的关键成分。目前已知有90多种血清型的肺炎链球菌,每种血清型都有特异的CPS结构。在肺炎链球菌的生命周期中,CPS扮演着关键角色,不仅保护细菌免受宿主免疫系统的攻击,还参与细菌与宿主细胞的相互作用,是感染过程中的重要组成部分。

[0003] 目前市场上主要的肺炎链球菌疫苗类型包括多糖疫苗(Pneumococcal Polysaccharide Vaccine, PPV)和结合疫苗(Pneumococcal Conjugate Vaccine, PCV)。PPSV直接使用纯化的CPS作为抗原,而PCV则将CPS与蛋白载体(如破伤风类毒素)结合,以增强免疫原性,特别是在婴幼儿中的免疫效果。国内外已有多种商品化的肺炎链球菌疫苗,如13价肺炎链球菌结合疫苗(PCV13)和23价肺炎链球菌多糖疫苗(PPV23)。这些疫苗能够有效减少肺炎链球菌感染引起的临床症状,但仍存在一些局限性。首先,它们只能覆盖有限的血清型,无法完全防止所有肺炎链球菌的感染。此外,随着疫苗的广泛使用,非疫苗血清型的肺炎链球菌逐渐增多,引起了血清型替代的问题。

[0004] 为了克服现有疫苗的局限性,研究人员正在积极开发新型肺炎链球菌疫苗。例如,现有技术专利CN104208671A公开了一种多价肺炎链球菌结合疫苗及其制备方法,专利CN110179974B介绍了一种多价肺炎链球菌多糖-蛋白结合疫苗及其制备方法,专利CN1635904A提出了一种基于缀合蛋白的多价肺炎链球菌疫苗及其应用。这些新型疫苗旨在扩大血清型覆盖范围,提高免疫原性,或降低生产成本。

[0005] 然而,上述疫苗仍主要基于传统的多糖和结合疫苗技术。传统多糖疫苗在婴幼儿中效果有限,结合疫苗生产成本低,且两者都面临血清型替代的问题。因此,开发一种能够提供广谱保护、生产成本低、适用于各年龄段的新型肺炎链球菌疫苗势在必行。

[0006] 随着基因组学、蛋白组学和免疫学的发展,研发新一代肺炎链球菌疫苗已成为疫苗研制的重要方向。其中,基于保守抗原蛋白设计的新疫苗极具前景。新型疫苗以肺炎链球菌的保守蛋白抗原为基础,如肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌表面抗原A(PsaA)等,这些蛋白在不同血清型中高度保守,有望提供广谱保护。

[0007] 与传统的多糖和结合疫苗相比,基于保守抗原蛋白设计的疫苗具有多项优势:(1)不受血清型限制,有望提供广谱保护;(2)生产工艺相对简单,成本较低;(3)可以与其他病原菌的抗原组合,开发多价疫苗。

[0008] 综上所述,新一代肺炎链球菌疫苗的研发迫在眉睫,其将成为解决当前传统肺炎链球菌疫苗各项问题的关键。新型疫苗不仅有望提供更广泛的保护,还可能降低生产成本,

使疫苗更容易在全球范围内推广使用。这些研究不仅对控制肺炎链球菌感染至关重要,还为其他细菌性疫苗的开发提供了新的思路和方法。因此,虽然现有技术公开了多种新型肺炎链球菌疫苗,本领域仍亟需一种减弱肺炎链球菌感染引起的组织病变,具有良好的免疫原性,起到有效预防和免疫保护作用,高效预防肺炎链球菌感染的融合蛋白、免疫组合物、疫苗。

发明内容

[0009] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种新的预防肺炎链球菌感染的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗,以及分子架构设计和应用。本发明从ply、PhtD的蛋白分子三级结构出发,结合免疫表位,设计多种不同的ply截选型、PhtD截选型并进行组合。经创造性地筛选,最终选取ply蛋白的C端结构域和phtD蛋白的N端结构域构建得到融合蛋白,再进一步添加Fc结构域、STABILON等元件。本发明发现新的融合蛋白分子可减弱肺炎链球菌感染引起的组织病变,具有良好的免疫原性,起到有效预防和免疫保护作用,高效预防肺炎链球菌感染。本发明还提供相应的重组核酸、基因表达盒、载体、宿主细胞、药物组合物、疫苗、用途等。

[0010] 本发明的一方面提供一种融合蛋白,其特征在于,从N端到C端,包含如下元件:

[0011] (a) 组氨酸三联体蛋白PhtD(Pneumococcal histidine triad protein)的N端结构域多肽片段;和

[0012] (b) 溶血素(Pneumolysin, ply)的C端结构域多肽片段。

[0013] 进一步地,所述元件(a)和元件(b)的多肽片段来源于肺炎链球菌。

[0014] 进一步地,所述PhtD的N端结构域多肽片段的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述ply的C端结构域多肽片段的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0015] 进一步地,所述融合蛋白从N端到C端依次包含PhtD的N端结构域多肽片段、间隔序列、ply的C端结构域多肽片段;所述间隔序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7;所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0016] 进一步地,所述融合蛋白的N端还包含信号肽和/或人的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白(Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 1,IGHG1)的Fc结构域。

[0017] 进一步地,信号肽来源于人的蓝啉(Azurocidin)蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示;所述人的免疫球蛋白重链恒定区 γ 1蛋白的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示。

[0018] 进一步地,所述融合蛋白的C端还包含人S5a/PSMD4蛋白酶体亚基的C端多肽片段STABILON,其氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0019] 进一步地,所述融合蛋白的各个元件之间可任选地通过连接肽连接。

[0020] 进一步地,所述连接肽为间隔序列、GGs linker序列或GS linker序列。

[0021] 进一步地,所述间隔序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示,所述GGs linker序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示,所述GS linker序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示。

[0022] 进一步地,所述融合蛋白从N端到C端依次包含所述IGHG1的Fc结构域、所述PhtD的N端结构域多肽片段、所述ply的C端结构域多肽片段、所述STABILON。

[0023] 进一步地,所述融合蛋白从N端到C端依次包含所述来源于人的蓝啉(Azurocidin)蛋白的信号肽、所述IGHG1的Fc结构域、所述PhtD的N端结构域多肽片段、所述ply的C端结构域多肽片段、所述STABILON。

[0024] 进一步地,所述来源于人的蓝啉(Azurocidin)蛋白的信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示、所述IGHG1的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示、PhtD的N端结构域多肽片段的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示、所述ply的C端结构域多肽片段的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示、所述STABILON的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0025] 进一步地,所述IGHG1的Fc结构域与PhtD的N端结构域多肽片段之间通过GGs linker序列连接,所述PhtD的N端结构域多肽片段和所述ply的C端结构域多肽片段之间通过间隔序列连接,所述ply的C端结构域多肽片段与所述STABILON之间通过GS linker序列连接;其中,所述间隔序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示,所述GGs linker序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示,所述GS linker序列的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示。

[0026] 进一步地,所述融合蛋白还包含其他肺炎链球菌抗原蛋白。

[0027] 进一步地,所述其他肺炎链球菌抗原蛋白选自以下的一种或多种:肺炎球菌表面蛋白A(Pneumococcal surface protein A,PspA)、肺炎球菌表面抗原A(Pneumococcal surface adhesion A,PsaA)、肺炎链球菌胆固醇结合蛋白A(Pneumococcal choline-binding protein A,PcpA)。

[0028] 本发明的另一方面提供一种重组核酸分子,其特征在于,编码本发明所述融合蛋白。

[0029] 本发明的另一方面提供一种重组基因表达盒,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子。

[0030] 本发明的另一方面提供一种重组载体,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子、或本发明所述重组基因表达盒。

[0031] 本发明的另一方面提供一种重组宿主细胞,其特征在于,包含本发明所述重组核酸分子、或本发明所述重组基因表达盒、或本发明所述重组载体。

[0032] 本发明的另一方面提供一种免疫原性组合物或药物组合物,其特征在于,包含一种或多种本发明任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞。

[0033] 进一步地,所述免疫原性组合物或药物组合物还包含药学上可接受的载体。

[0034] 本发明的另一方面提供一种重组疫苗,其特征在于,包含一种或多种本发明任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述免疫原性组合物或药物组合物。

[0035] 进一步地,本发明所述免疫原性组合物或所述药物组合物或所述重组疫苗进一步还包含抗病毒剂。

[0036] 进一步地,所述抗病毒剂为抗肺炎链球菌感染性疾病抗病毒剂。

[0037] 本发明的另一方面提供一种或多种本发明任一项所述融合蛋白,和/或一种或多种所述重组核酸分子,和/或一种或多种本发明所述重组基因表达盒,和/或一种或多种本

发明所述重组载体,和/或一种或多种本发明所述重组宿主细胞,和/或一种或多种本发明所述免疫原性组合物或药物组合物,和/或一种或多种本发明所述重组疫苗在制备用于预防和/或接种的疫苗或生物免疫的药物或制备预防肺炎链球菌引起的疾病的药物中的用途。

[0038] 进一步地,所述药物用于预防肺炎链球菌引起的组织感染。

[0039] 进一步地,所述组织感染为肺部组织感染。

[0040] 进一步地,所述肺炎链球菌引起的疾病包括肺部组织感染、肺炎、脑膜炎、中耳炎、菌血症、鼻窦炎、心内膜炎、关节炎、腹膜炎、眼内炎。

[0041] 本发明的融合蛋白、免疫原性组合物、重组疫苗等具有如下有益技术效果:

[0042] 1. 本发明发现新的融合分子具有良好的免疫原性,并且能够提供免疫保护效果,可用于核酸疫苗或亚单位疫苗的研发。本发明的免疫原性组合物,可针对肺炎链球菌的感染提供有效的免疫保护;

[0043] 2. 本发明可作为核酸疫苗或亚单位疫苗的通用抗原架构,具有强免疫原性,相较于传统多糖疫苗,能够不受血清型限制,诱导广谱的免疫保护;

[0044] 3. 本发明从ply、PhtD的蛋白分子三级结构出发,结合免疫表位,设计多种不同的ply截选型、PhtD截选型并进行组合。经创造性地筛选,最终选取ply蛋白的C端结构域和phtD蛋白的N端结构域构建得到融合蛋白,筛选后的多肽片段具有完整、稳定的3D结构;

[0045] 4. 本发明实施例5表明,基于本发明的融合分子能够有效促进细菌蛋白在真核细胞中高丰度表达、分泌,且表达的蛋白结构正确、稳定,有利于免疫表位呈递,从而进一步提高免疫保护效果,为肺炎链球菌多价疫苗的免疫药物设计领域提供新技术。特别是疫苗C(包含PhtD蛋白N端结构域-Ply蛋白C端结构域融合蛋白),其在上清中的表达量最高,证明相较于单独表达的截短蛋白Ply蛋白C端结构域、PhtD蛋白N端结构域(疫苗A、疫苗B),融合蛋白的分泌效率最高,更有利于抗原呈递和体液免疫的激活;

[0046] 5. 本发明实施例6表明,在小鼠滴鼻感染模型中,小鼠免疫攻毒后的肺部组织载菌量(平板菌落数量)对比结果显示,相较于空白对照组小鼠(PBS免疫),实验组小鼠(疫苗C免疫)的肺炎链球菌载量显著下降,空白对照组小鼠的细菌载量约为实验组小鼠的450倍。基于本发明的疫苗能够提供良好的免疫预防效果,在4/5的个体中,几乎能够完全抵御肺炎链球菌感染(肺组织细菌载量 ≤ 5)。这一结果证明,基于本发明的重组核酸疫苗C能够在小鼠模型中提供有效的免疫保护,接种疫苗的小鼠能够产生保护性免疫,预防肺炎链球菌感染;

[0047] 6. 本发明实施例6还表明,通过组织切片和HE染色的方法检测,攻毒后,疫苗C免疫组的小鼠肺泡结构相对完整,仅有少量炎性细胞浸润,肺泡壁增厚不明显。这一结果证明,基于本发明的重组核酸疫苗C在小鼠模型中诱导的免疫保护可以减弱肺炎链球菌感染引起的组织病变,起到良好的预防作用。

附图说明

[0048] 图1为本发明PhtD蛋白全长、PhtD蛋白N端结构域多肽、ply蛋白全长、ply蛋白C端结构域多肽的3D结构示意图。

[0049] 图2为实施例中对比实验所用疫苗的分子结构示意图。

- [0050] 图3为本发明疫苗所表达融合蛋白的非限制性分子结构示意图。
- [0051] 图4为包含本发明的疫苗模板质粒示意图。
- [0052] 图5A-图5C为本发明疫苗的质量控制峰图以及纯度检测结果;其中图5A为疫苗A质量控制峰图以及纯度检测结果,图5B为疫苗B质量控制峰图以及纯度检测结果,图5C为疫苗C质量控制峰图以及纯度检测结果。
- [0053] 图6为本发明疫苗在体外转染HEK293T细胞后的表达效果。
- [0054] 图7为本发明疫苗在小鼠滴鼻感染模型中的免疫及取样流程。
- [0055] 图8A-图8B为本发明疫苗免疫后,在小鼠滴鼻感染模型中的预防保护效果;其中图8A为小鼠免疫攻毒后的肺部组织载菌量(平板菌落数量)对比,图8B为载菌量统计结果。
- [0056] 图9为小鼠免疫攻毒后的肺部组织切片HE染色结果对比。

具体实施方式

- [0057] 术语“肺炎链球菌”指*Streptococcus pneumoniae*,又名肺炎双球菌(*Diplococcus pneumonia*)或肺炎球菌,是一种球状的革兰氏阳性菌,具备 α 溶血性,属于链球菌属。
- [0058] 术语“肺炎链球菌感染”指由肺炎链球菌引起的各种疾病,包括肺炎、急性鼻窦炎、中耳炎、脑膜炎、骨髓炎、脓毒性关节炎、心内膜炎、腹膜炎、心囊炎、蜂窝组织炎、脑脓肿等。
- [0059] 术语“PhtD”指肺炎链球菌的组氨酸三聚体(pneumococcal histidine triad, Pht)蛋白家族成员之一。该家族包含4个成员蛋白:PhtA、PhtB、PhtD和PhtE。
- [0060] 术语“ply”指肺炎球菌溶血素(Pneumolysin),是肺炎链球菌的主要毒力因子之一,是由471个氨基酸组成的成孔毒素,具有破坏宿主细胞、干扰宿主免疫应答的能力。
- [0061] 术语“N端结构域”指蛋白质分子中靠近氨基末端(N端)的一个功能或结构单元,通常具有独立的三维结构,或包含特定的氨基酸序列或保守区域,从而具备特定的生物学功能。进一步地,本发明的“N端结构域”采用PhtD的N端结构域,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示。
- [0062] 术语“C端结构域”指蛋白质分子中靠近羧基末端(C端)的一个功能或结构单元,与N端结构域相对,处于蛋白质的另一端,通常具有独立的三维结构,或包含特定的氨基酸序列或保守区域,从而具备特定的生物学功能。进一步地,本发明的“C端结构域”采用ply的C端结构域,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。
- [0063] 术语“免疫应答”指有机体中的体液应答、细胞应答或体液和细胞应答两者。免疫应答可以进行测定,所述测定包括但不限于测量特异性识别蛋白质或细胞表面蛋白的抗体的存在、测量T细胞活化或增殖,和/或测量一种或更多种细胞因子活性调节或表达调节。
- [0064] 术语“给药”或“接种”指基于本发明核酸疫苗或疫苗组合物优选地经肌内的或皮下的途径给予,尽管其他的给药途径也能被使用,例如,口服、鼻内(例如气雾剂或其他非针剂给药)、淋巴结内、真皮内、腹膜内、直肠或阴道给药,或通过联用的途径。在动物的颈部肌内的给药是优选的。可采用加速方案(boosting regimens)将给药方案调节为提供最佳免疫。
- [0065] 术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于:转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。
- [0066] 术语“重组核酸分子”指具有在自然界中不连接在一起的序列的多核苷酸。重组多

核苷酸可包括在合适的载体中,且该载体可用于转化至合适的宿主细胞。然后多核苷酸在重组宿主细胞中表达以产生例如“重组多肽”“重组蛋白”“融合蛋白”等。

[0067] 术语“重组表达载体”指用于表达例如编码所需多肽的多核苷酸的DNA结构。重组表达载体可包括,例如包含(1)对基因表达具有调控作用的遗传元素的集合,例如启动子和增强子;(2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列;以及(3)适当的转录和翻译起始和终止序列的转录亚单位。重组表达载体以任何合适的方式构建、可以使用任何载体,包括质粒、病毒、噬菌体和转座子。用于本公开的可能载体包括但不限于染色体、非染色体和合成的DNA序列,例如病毒质粒、细菌质粒、噬菌体DNA、酵母质粒以及从质粒和噬菌体DNA的组合中衍生的载体,来自如慢病毒、逆转录病毒、牛痘、腺病毒、鸡痘、杆状病毒、SV40和伪狂犬病等病毒的DNA。包括自复制型载体和非自复制型载体。

[0068] 术语“mRNA”,指信使RNA、Messenger RNA,中文译名“信使核糖核酸”,是由DNA的一条链作为模板转录而来的、携带遗传信息能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。

[0069] 术语“5' -UTR”,指“5' 非翻译区”或“5' UTR”,为转录成初级RNA转录本(前体mRNA)并位于编码序列上游的一部分基因。初级转录本是初始RNA产物,包含内含子和外显子,由DNA转录产生。许多初级转录本必须经过RNA加工以形成具有生理活性的RNA。形成成熟mRNA的加工过程包括修饰末端、切除内含子、加帽和/或从前体RNA上剪切出各rRNA分子。因此,mRNA的5' UTR是不会被翻译成蛋白质并位于编码序列上游的一部分mRNA。在基因组序列中,5' UTR通常被定义为位于转录起始点和起始密码子之间的区域。脊椎动物mRNA的5' 非翻译区(5' UTR)长度可以是几十个碱基到几百个碱基。

[0070] 术语“3' -UTR”,指“3' -非翻译区”或“3' UTR”,涉及位于基因的3' 端,在蛋白质编码区的终止密码子下游,并且被转录但不翻译成氨基酸序列的区域,或涉及RNA分子中的对应区域。3' -非翻译区通常从翻译产物的终止密码子延伸至通常在转录过程之后附着的多聚(A)序列。哺乳动物mRNA的3' -非翻译区通常具有已知为AAUAAA六核苷酸序列的同源区。该序列可能是多聚(A)附着信号并且经常位于多聚(A)附着位点上游的10至30个碱基处。3' -非翻译区可以包含一个或更多个反向重复,可以折叠产生茎环结构,所述结构充当核糖核酸外切酶的屏障或与已知提高RNA稳定性的蛋白质(例如, RNA结合蛋白)相互作用。

[0071] 术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生基于本发明的重组疫苗的任何类型的细胞系统,包括真核细胞,例如,哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞;和原核细胞,例如,大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞。

[0072] 术语“个体”、“患者”或者“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于,家养动物(例如,猪、牛、羊、猫、狗和马等),灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴),以及啮齿类动物(例如,兔、小鼠和大鼠等)。

[0073] 术语“转化、转染、转导”具有本领域技术人员普遍理解的意思,即将外源性的DNA、RNA导入宿主的过程。

[0074] 术语“药物组合”或“药物组合物”是指包含在药物生产领域中广泛采用的辅助物料。使用载体的主要目的在于提供一种使用安全、性质稳定和/或具有特定功能性的药物组合物,还在于提供一种方法,以便在为受试者体内得到有效吸收。药学上可接受的载体可以

是具有惰性的填充剂,也可以是为药用组合提供某种功能(例如稳定组合物的整体pH值或防止组合物中活性成分的降解)的功效成分。药学上可接受的载体的非限制性实例包括但不限于粘合剂、助悬剂、乳化剂、稀释剂(或填充剂)、成粒剂、粘胶剂、崩解剂、润滑剂、抗粘合剂、助流剂、胶凝剂、吸收延迟剂、溶解抑制剂、增强剂、吸附剂、缓冲剂、螯合剂、防腐剂、着色剂、矫味剂和甜味剂等。

[0075] 术语“预防”是指在罹患疾病之前,通过使受试者接触(例如给药)基于本发明的重组疫苗、组合物等,从而与不接触时相比减轻罹患疾病后的症状,并不意味着必需完全抑制患病。

[0076] 除非另外定义或由背景清楚指示,否则在本公开中的全部技术与科学术语具有如本公开所述领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0077] 本发明公开了一种新的肺炎链球菌疫苗的制备方法及应用。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,都被视为包括在本发明以内。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0078] 本发明提供的融合蛋白和编码核酸及其元件,制备方法及应用中,所用原料及试剂均可由市售获得。

[0079] 下面结合实施例,进一步阐明本发明。其中,作为一种优选,选用核酸疫苗架构用于制备重组疫苗。

[0080] 实施例1 ply蛋白、PhtD蛋白的结构域多肽筛选设计

[0081] 由于ply蛋白具有细胞毒性、PhtD蛋白分子量较大等原因,两种抗原蛋白均不适合全长表达或以全长的形式构建融合蛋白,用于疫苗制备。因此,需要对ply蛋白和PhtD蛋白做出截断或改造,在保留蛋白免疫原性的同时,保证截断或改造的新分子具有稳定的三级结构,从而达到更容易分泌表达、免疫原性强、无细胞毒性等有益效果。

[0082] 按照上述思路,本发明从ply、PhtD的蛋白分子三级结构出发,结合免疫表位,筛选出具有稳定结构的多肽片段。设计多种不同的ply截选型、PhtD截选型并进行组合,经筛选,最终选取ply蛋白的C端结构域和phtD蛋白的N端结构域。优选地,PhtD蛋白的N端结构域氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,ply蛋白的C端结构域氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。如图1所示,筛选后的多肽片段具有完整的3D结构。将筛选的多肽片段作为抗原序列,用于本发明后续实施例的疫苗设计及对比试验。

[0083] 实施例2 本发明重组核酸疫苗的构建

[0084] 为了制备包含本发明抗原的重组核酸疫苗,并对比基于本发明的疫苗是否具有良好的体外表达效果,实施例中涉及的疫苗分子架构如图2、图3所示。示例性的,图2为实施例中对比实验所用疫苗A、疫苗B的分子结构示意图。图3为本发明实施例所用疫苗C表达的蛋白分子示意图,从N端到C端依次包含如下元件:信号肽、Fc结构域、目标抗原区(PhtD蛋白N端结构域和PhtD蛋白C端结构域,二者之间可通过间隔序列相连)、STABILON,各元件可直接相连,也可通过不同的linker相连,比如GGS linker或GS linker。其中图2、图3示意的疫苗A、疫苗B、疫苗C三种疫苗区别在于目标抗原区不同,目标抗原分别为Ply蛋白C端结构域、PhtD蛋白N端结构域、PhtD蛋白N端结构域和PhtD蛋白C端结构域(二者之间可通过间隔序列

相连)。为了制备能够产生如图2、图3所示蛋白的重组核酸疫苗,首先构建一个基因表达盒,用于表达本发明所述的抗原序列。表达盒从5'端到3'端依次包含:5' UTR、CDS区、3' UTR、PolyA,其中,CDS区包含本发明所述的融合分子架构。随后,基于密码子简并性对完整的基因表达盒序列做优化,通过基因合成的方式直接获得DNA序列(委托金斯瑞公司合成)。最后,将合成的基因表达盒DNA序列插入至可用于体外RNA转录的表达载体中,如图4所示,得到用于制备重组核酸疫苗的载体质粒。

[0085] 根据上述方法,制备用于后续实施例的载体:

[0086] (1) 基于本发明的重组核酸疫苗A制备载体

[0087] 步骤a:合成“信号肽-人IGHG的Fc结构域-ply的C端结构域-STABILON”融合基因片段,人IGHG的Fc结构域、ply的C端结构域之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示的GGs linker序列连接,ply的C端结构域、STABILON之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示的GS linker序列连接,信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,人IGHG的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示,ply的C端结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,STABILON的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示。

[0088] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0089] 所述核酸疫苗架构载体包含5'-UTR和3'-UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0090] 步骤c:制备重组质粒。

[0091] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗A制备载体。

[0092] (2) 基于本发明的重组核酸疫苗B制备载体

[0093] 步骤a:合成“信号肽-人IGHG的Fc结构域-PhtD的N端结构域-STABILON”融合基因片段,人IGHG的Fc结构域、PhtD的N端结构域之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示的GGs linker序列连接,PhtD的N端结构域、STABILON之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示的GS linker序列连接,信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,人IGHG的Fc结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示,PhtD的N端结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,STABILON的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示。

[0094] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0095] 所述核酸疫苗架构载体包含5'-UTR和3'-UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0096] 步骤c:制备重组质粒。

[0097] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗B制备载体。

[0098] (3) 基于本发明的重组核酸疫苗C制备载体

[0099] 步骤a:合成“信号肽-人IGHG的Fc结构域-PhtD的N端结构域-ply的C端结构域-STABILON”融合基因片段,人IGHG的Fc结构域、PhtD的N端结构域之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示的GGs linker序列连接,PhtD的N端结构域、ply的C端结构域之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示的间隔序列连接,ply的C端结构域、STABILON之间通过氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示的GS linker序列连接,信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所

示,人IGHG的Fc结构域的氨基酸如SEQ ID NO: 5所示,PhTD的N端结构域的氨基酸如SEQ ID NO.1所示,pIy 的C端结构域的氨基酸如SEQ ID NO.2所示,STABILON的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示。

[0100] 步骤b:构建核酸疫苗架构载体。

[0101] 所述核酸疫苗架构载体包含5' -UTR和3' -UTR,可以是用于生产任一形式RNA疫苗的载体或生产DNA疫苗的载体。

[0102] 步骤c:制备重组质粒。

[0103] 将步骤a合成的基因插入步骤b的载体架构中,得到基于本发明的重组核酸疫苗C制备载体。

[0104] 表1本发明所涉及的蛋白氨基酸序列

[0105]

	氨基酸序列以及序列编号
PhTD的N端结构域多肽片段	CSYELGRHQAGQVKKESNRVSYIDGDQAGQKAENLTPDEVSKREGINAEQIVIKITDQGYVTSHGDH YHYNGKVPYDAI ISEELLMKDPNYQLKSDIVNEIKGGYVIVKVDGKYVYVYLKDAAHADNIRTKEEI KRQKQERSHNHNSRADNAVAARAQGRYTTDDGYIFNASDI IEDTGDAYIVPHGDHYHYIPKSDL SELAAAQAYWNGKQGS (SEQ ID NO: 1)
pIy的C端结构域多肽片段	EVKAVILGGDPSSGARVVTGKVMVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTSFRLDNNVATFQNSTDYVE TKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWDELSYDHQGEVLT PKAWDRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVR NLSVKIRECTGLAWEWRTVYEKTDLPLVRKRTISIWGTTLYPQVEDKVEN (SEQ ID NO: 2)
PhTD的N端结构域-P1y 的C端结构域	CSYELGRHQAGQVKKESNRVSYIDGDQAGQKAENLTPDEVSKREGINAEQIVIKITDQGYVTSHGDH YHYNGKVPYDAI ISEELLMKDPNYQLKSDIVNEIKGGYVIVKVDGKYVYVYLKDAAHADNIRTKEEI KRQKQERSHNHNSRADNAVAARAQGRYTTDDGYIFNASDI IEDTGDAYIVPHGDHYHYIPKSDL SELAAAQAYWNGKQGS GSGSGGGSGGEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVMVEDLIQEGSRFTADHPG LPISYTTSFRLDNNVATFQNSTDYVETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWDELSYDHQGEVLT PKAWDRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWRTVYEKTDLPLVRKRTISIWGTT LYPQVEDKVEN (SEQ ID NO: 3)
信号肽	MTRLTVLALLAGLASSRA (SEQ ID NO: 4)
人IGHG的Fc结构域	EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5)
STABILON	KDGKKDKKEEDKK (SEQ ID NO: 6)
间隔序列	GGSGGGSGG (SEQ ID NO: 7)
GG linker	GGSGSGSG (SEQ ID NO: 8)
GS linker	GSGSGS (SEQ ID NO: 9)

[0106] 实施例3 本发明重组核酸疫苗制备

[0107] (1) 加帽mRNA疫苗制备

[0108] 步骤a:将实施例2中用于生产加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0109] 步骤b:将线性化的质粒进行体外共转录加帽反应,将7-甲基化鸟苷酸帽结构加至转录的mRNA的5'端,并对模板DNA进行降解。

[0110] (2) 非加帽mRNA疫苗制备

[0111] 步骤a:将实施例2中用于生产非加帽mRNA疫苗的载体质粒进行酶切线性化,获得用于体外转录的线性化质粒。

[0112] 步骤b:将线性化的质粒进行体外非加帽的转录反应,并对模板DNA进行降解。

[0113] (3) DNA疫苗制备

[0114] 步骤a:将实施例2中用于生产DNA疫苗的载体质粒进行扩增,获得大量用于纯化的目的质粒。

[0115] 步骤b:用去内毒素质粒提取及纯化试剂盒对目的质粒进行提取纯化。

[0116] 实施例4 本发明重组核酸体外转录质量控制及疫苗制备

[0117] 以实施例3中的加帽mRNA疫苗制备的方法制备获得疫苗A(基于本发明的重组核酸疫苗A)、疫苗B(基于本发明的重组核酸疫苗B)、疫苗C(基于本发明的重组核酸疫苗C)。对生产的重组核酸进行纯度检测,用于实验的重组核酸纯度均大于90%,基于本发明的重组核酸质量控制峰图如图5A、图5B、图5C所示。具体描述为:(1)基于本发明的重组核酸疫苗A,纯度为93%,质量控制峰图以及纯度检测结果如图5A;(2)基于本发明的重组核酸疫苗B,纯度为94.6%,质量控制峰图以及纯度检测结果如图5B;(3)基于本发明的重组核酸疫苗C,纯度为90.1%,质量控制峰图以及纯度检测结果如图5C。上述纯度均符合细胞转染实验和生产疫苗的质量要求。

[0118] 实施例5 本发明重组核酸的体外表达效果

[0119] 通过细胞转染试剂,将实施例4中的疫苗转染至HEK293T细胞中,体外培养48小时后收集蛋白,进行Western blot检测,并计算疫苗A、疫苗B、疫苗C的蛋白分子量,如表2所示。

[0120] 表2 疫苗A、疫苗B、疫苗C的蛋白分子量

疫苗	蛋白分子量(kDa)
A	52.6
B	55.9
C	77.6

[0122] 图6展示了疫苗A、B、C转染HEK293细胞的体外表达WB(Western blot)检测结果,三者所表达的抗原均为体液免疫抗原,理论上能够在上清中检测到显著表达。

[0123] 如图6所示,疫苗A、B、C均在上清中检测到目的蛋白信号,且分子量大小均符合预期。这证明基于本发明的截短蛋白、融合蛋白不仅能够在真核细胞中顺利翻译、正确折叠,而且结构稳定、能够高效分泌到胞外。

[0124] 其中,疫苗C在上清中的表达量最高,证明相较于单独表达的截短蛋白,融合蛋白的分泌效率最高,更有利于抗原呈递和体液免疫的激活。因此,后续采用疫苗C进行动物试验,验证免疫保护效果。

[0125] 实施例6 基于本发明的重组核酸疫苗在小鼠滴鼻感染模型中的预防效果

[0126] 为了验证基于本发明的核酸疫苗是否具备免疫保护效果,本实施例将疫苗免疫小鼠(实验组,即疫苗C)与未进行免疫的小鼠(空白对照组)进行免疫、攻毒对比实验。

[0127] 实验选用6-8周龄的Balb/c品系小鼠共12只,体重18-25 g,均饲养于恒温恒湿的独立饲养笼内,并且提前适应环境3-7天,饲养室温度20-26℃,湿度40-70%,昼夜明暗交替,早上8点到晚上8点光照,晚上8点到次日早上8点黑暗;持续供给足量饲料,不限量自由摄

取, 饮用无菌水, 饮水瓶不间断供水, 自由摄取。小鼠适应性饲养后将小鼠随机分为4组, 每组6只, 每只小鼠使用耳标记。具体如表3所示, 本表以及下文中剂量指活性成分量。

[0128] 表3 实施例5小鼠免疫实验分组及免疫流程

组别	疫苗	动物数量	免疫剂量	免疫程序
1	基于本发明的重组核酸疫苗C	6	5 μ g (100 μ L) / 只/次	Day0, Day21左腹股沟皮下接种
2	PBS (空白对照)	6	100 μ L / 只/次	Day0, Day21左腹股沟皮下接种

[0130] 将各组小鼠按照表3的免疫流程进行两次免疫, 第35天 (Day35) 时攻毒: 将小鼠用异氟烷气体麻醉, 待小鼠完全麻醉后, 使用40 μ L 肺炎链球菌溶液 (5×10^6 CFU/mL) 滴鼻, 滴鼻后小鼠正常饲养, 每天观察监测记录小鼠的临床表现。第38天 (Day38) 时处死小鼠, 采集样品, 检测肺组织细菌载量、肺组织病理切片, 评估疫苗的免疫保护效果。免疫、攻毒及取样流程如图7所示。

[0131] 取每只小鼠的肺组织, 切取10 mg, 分别研磨后稀释1000 倍, 在LB固体培养皿中涂布培养, 检测肺组织细菌载量。结果如图8A和图8B所示。图8A为小鼠免疫攻毒后的肺部组织载菌量 (平板菌落数量) 对比, 结果显示相较于空白对照组小鼠 (PBS免疫), 实验组小鼠 (疫苗C免疫) 的肺炎链球菌载量显著下降。图8B为载菌量统计结果, 结果显示空白对照组小鼠的细菌载量约为实验组小鼠的450倍。基于本发明的疫苗能够提供良好的免疫预防效果, 在4/5的个体中, 几乎能够完全抵御肺炎链球菌感染 (肺组织细菌载量 ≤ 5)。这一结果证明, 基于本发明的重组核酸疫苗C能够在小鼠模型中提供有效的免疫保护, 接种疫苗的小鼠能够产生保护性免疫, 预防肺炎链球菌感染。

[0132] 切取每只小鼠的部分肺组织, 使用多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片, 使用苏木精-伊红染料分别染色, 显微镜下观察肺组织病理变化。结果如图9所示, 空白对照组小鼠 (PBS免疫) 肺泡有大量炎性细胞浸润, 局部可见出血灶, 肺泡壁明显增厚, 肺泡明显缩小; 实验组小鼠 (疫苗C免疫) 肺泡结构相对完整, 有少量炎性细胞浸润, 肺泡壁增厚不明显。这一结果证明, 基于本发明的重组核酸疫苗C在小鼠模型中诱导的免疫保护可以减弱肺炎链球菌感染引起的组织病变, 起到良好的预防作用。

[0133] 综上所述, 本发明提供的免疫原性组合物, 能够诱导模式动物小鼠产生有效的保护性免疫, 针对肺炎链球菌感染有良好的预防效果。因此, 本发明能够应用于免疫药物的生产和研发, 填补当前肺炎链球菌广谱疫苗研发领域的空白, 具有极高的商业价值及广阔的应用前景。

[0134] 本公开的上述实施例仅是为清楚地说明本公开所作的举例, 而并非是对本公开的实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说, 在上述说明的基础上还可以做出其他不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本公开的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等, 均应包含在本公开权利要求的保护范围之内。

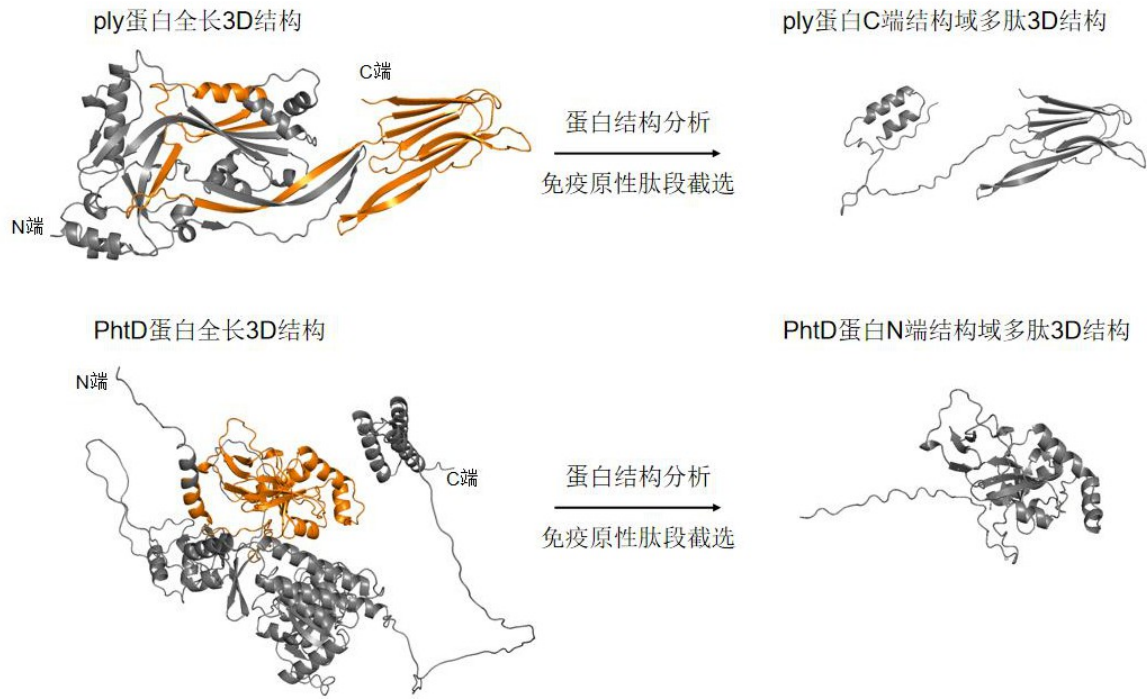


图 1

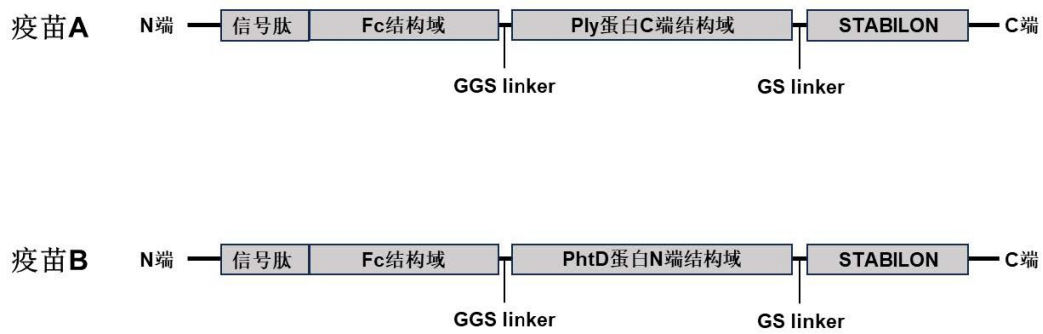


图 2

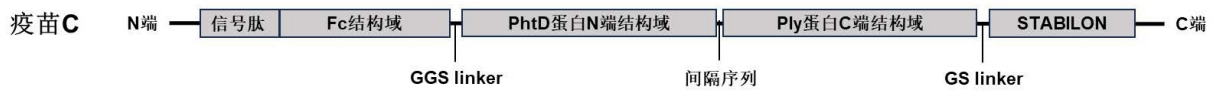


图 3

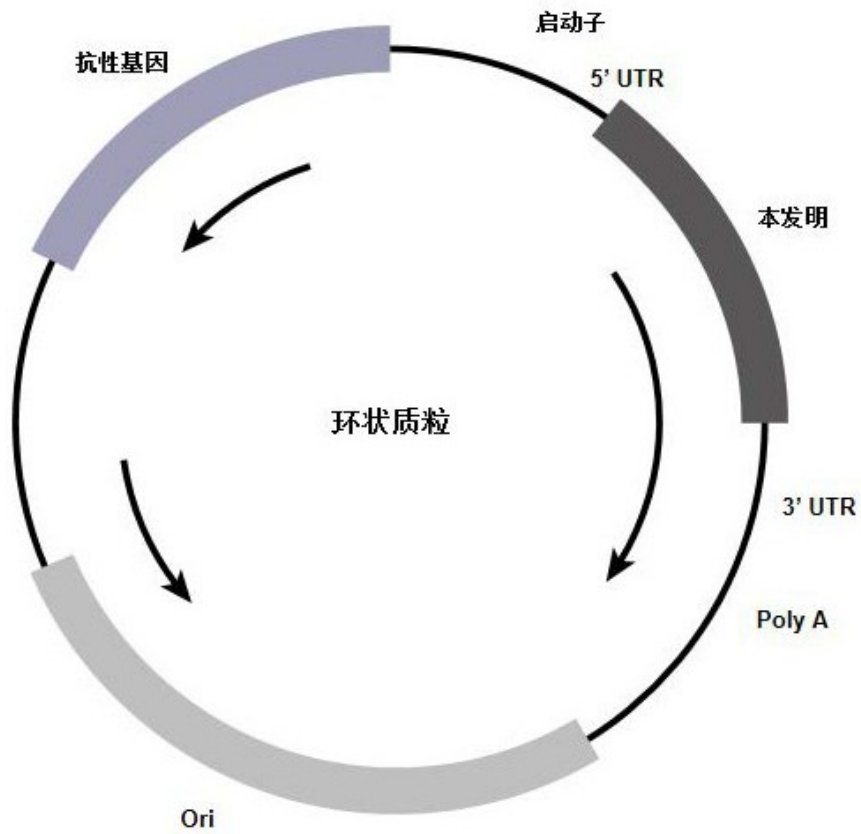


图 4

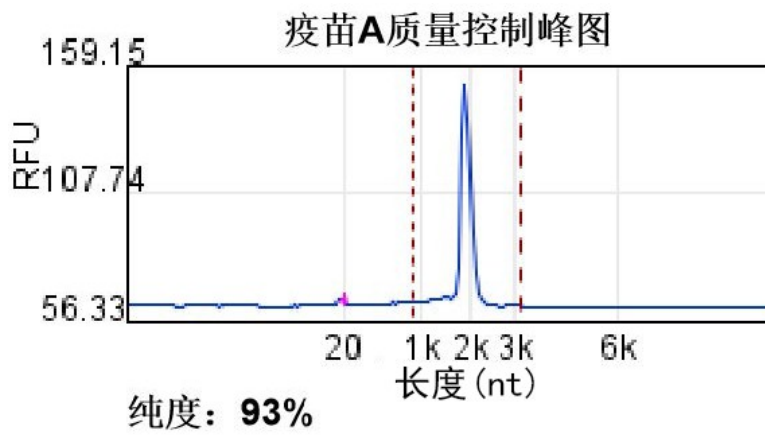


图 5A

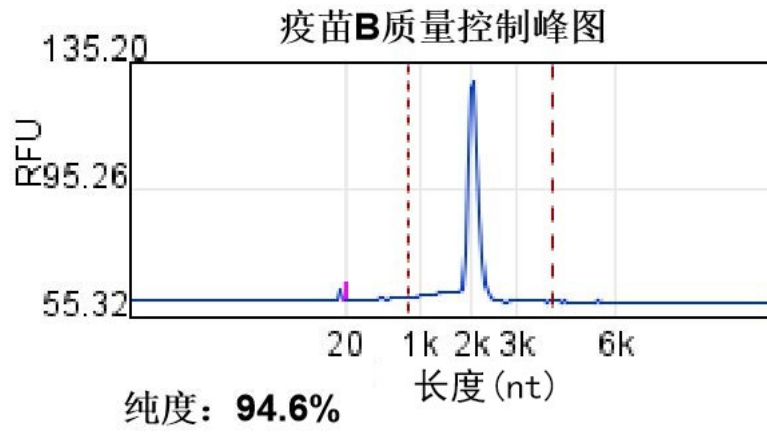


图 5B

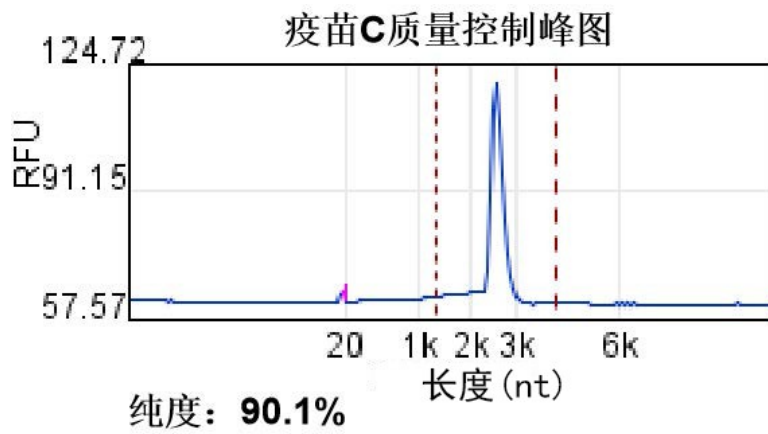


图 5C

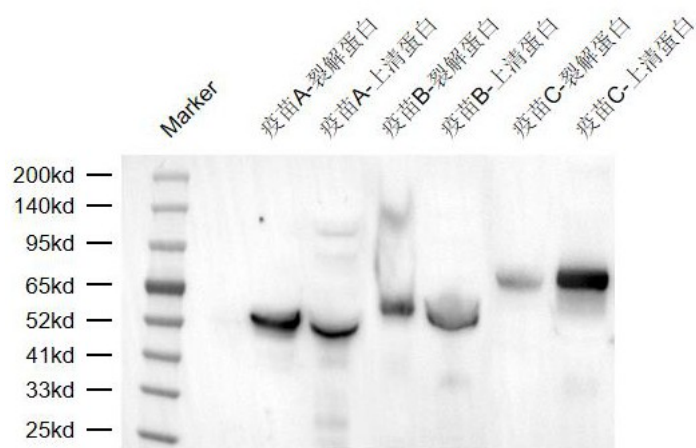


图 6

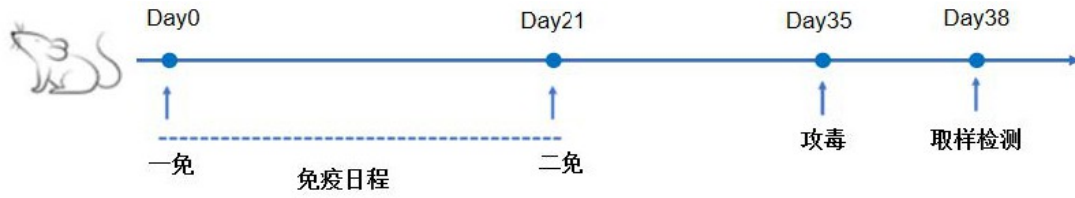


图 7

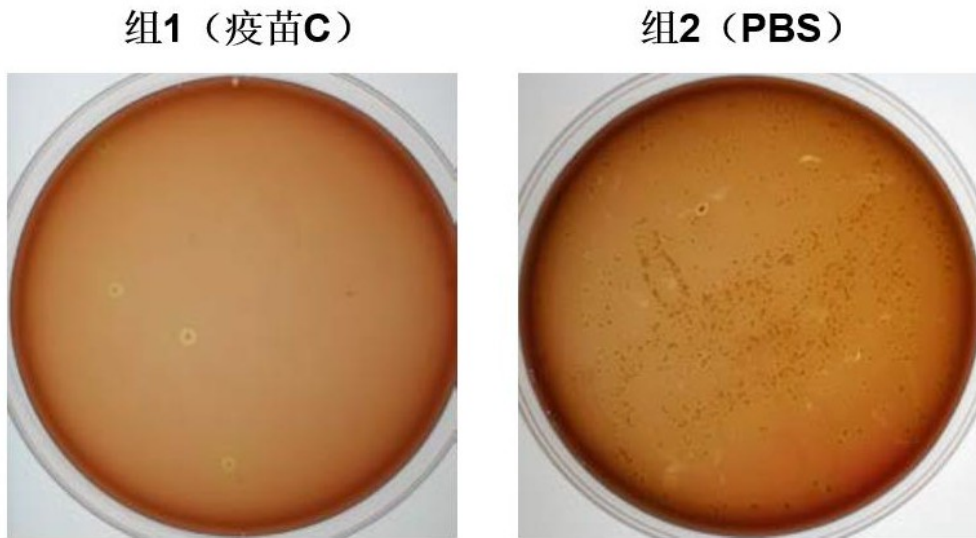


图 8A

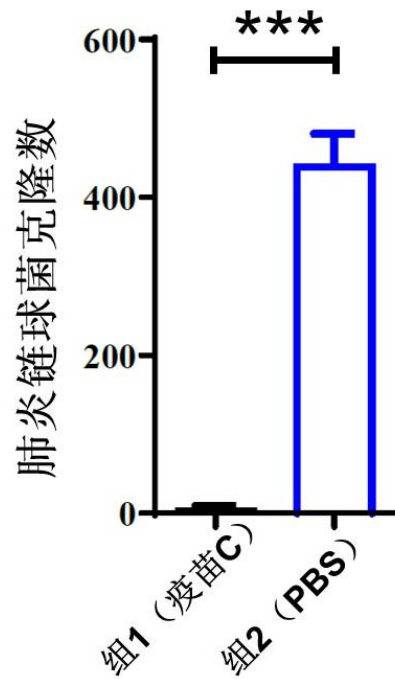


图 8B

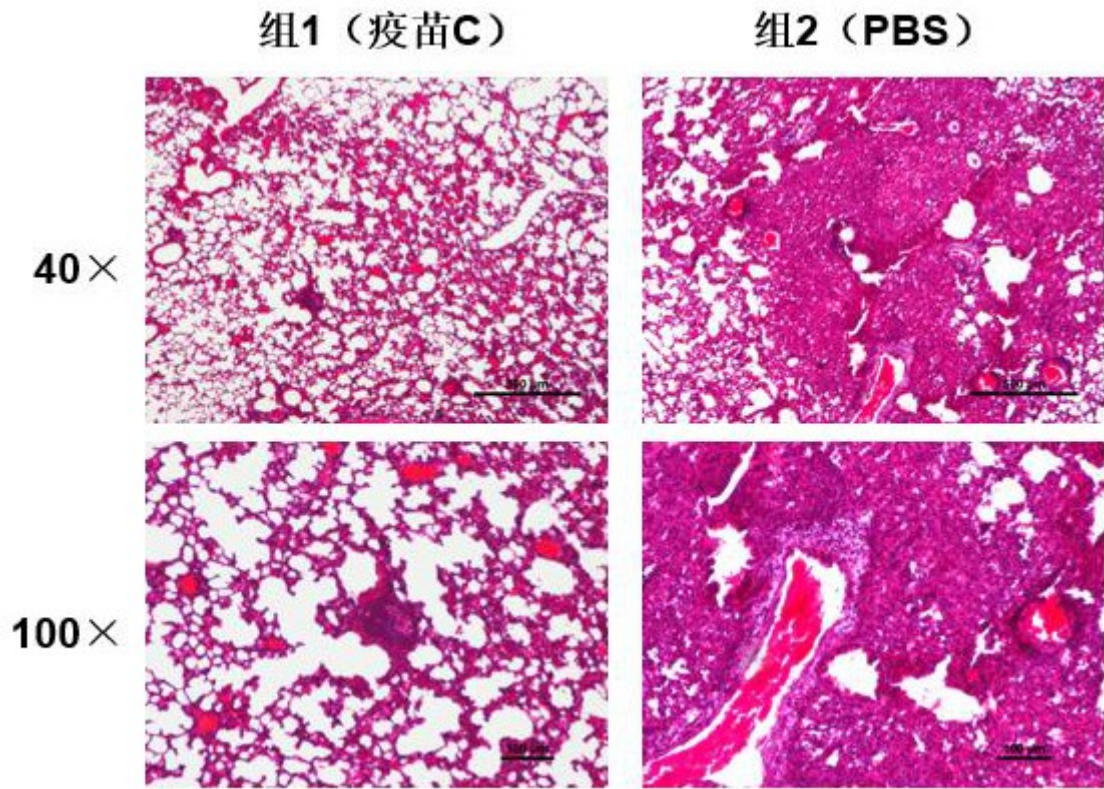


图 9