



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103961694 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201410155986. X

(22) 申请日 2014. 04. 18

(71) 申请人 陶惠人

地址 710000 陕西省西安市新城区长乐西路
127 号 53 栋 50 号

申请人 李锋

(72) 发明人 陶惠人 李锋

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

A61P 19/10(2006. 01)

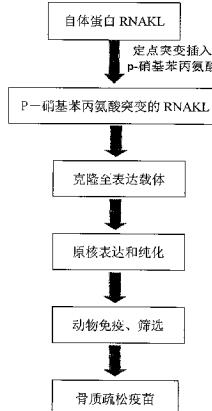
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

基于 P- 硝基苯丙氨酸插入法构建的骨质疏松疫苗

(57) 摘要

本发明公开了一种基于 P- 硝基苯丙氨酸插入法构建的骨质疏松疫苗，其特征在于通过如下步骤制备：1) RANKL 重组表达载体的构建；2) 非天然氨基酸 p- 硝基化苯丙氨酸编码序列的定点插入 / 置换；3) p- 硝基化苯丙氨酸 -RANKL 蛋白的重组表达与纯化；4) 动物免疫与筛选；5) 基于血清中和检测及破骨细胞形成分析后的筛选；6) 动物实验，确定所需疫苗。该方法有效突破机体对自体蛋白的免疫耐受，通过主动免疫手段，诱导机体产生针对 RANKL 的特异性中和抗体，实现对骨质疏松良好的防治；同时克服或绕过工业化生产抗体的高额成本问题。



1. 一种基于 P- 硝基苯丙氨酸插入法构建的骨质疏松疫苗, 其特征在于通过如下步骤制备 :1) RANKL 重组表达载体的构建 ;2) 非天然氨基酸 p- 硝基化苯丙氨酸编码序列的定点插入 / 置换 ;3) p- 硝基化苯丙氨酸 -RANKL 蛋白的重组表达与纯化 ;4) 动物免疫与筛选 ;5) 基于血清中和检测及破骨细胞形成分析后的筛选 ;6) 动物实验, 确定所需疫苗。

2. 如权利要求 1 所述的基于 P- 硝基苯丙氨酸插入法构建的骨质疏松疫苗, 其特征在于 : 从骨髓基质细胞中提取 RNA, 通过 RT-PCR 扩增 RANKL 基因编码区, 将胞外段克隆入表达载体, 构建重组表达载体。

3. 如权利要求 1 所述的基于 P- 硝基苯丙氨酸插入法构建的骨质疏松疫苗, 其特征在于 : 所述定点插入 / 置换是通过基于 PCR 的体外突变技术定点将 RANKL 基因编码酪氨酸或苯丙氨酸的密码子置换成能被非天然氨基酸 p- 硝基化苯丙氨酸反密码子特异识别的琥珀突变密码子 TAG。

4. 如权利要求 1 所述的基于 P- 硝基苯丙氨酸插入法构建的骨质疏松疫苗, 其特征在于 : 在共转化表达琥珀突变抑制子 tRNA (muttRNACUA) 和 p- 硝基苯丙氨酸 -tRNA 合成酶的大肠杆菌内表达插入 p- 硝基化苯丙氨酸 RANKL 突变体, 纯化重组蛋白。

基于 P- 硝基苯丙氨酸插入法构建的骨质疏松疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及一种治疗骨质疏松症的药物,具体地说是基于 P- 硝基苯丙氨酸插入法构建的针对破骨细胞分化因子受体配体 (RANKL) 产生抗体的疫苗,本发明还涉及该药物的制备方法。

背景技术

[0002] 骨质疏松症主要是一种表现为骨量的减少、骨骼微细结构的破坏,使得骨骼的承受力和强度降低,易于发生脆性骨折一类全身性骨代谢障碍疾病,也是多种骨破坏性疾病共有的病理损害。骨质疏松发病率高,且有逐年增高趋势。骨质疏松性骨折严重影响患者的生活质量,威胁患者的生命安全,同时也带来沉重的经济负担。目前治疗骨质疏松性疾病的药物包括钙剂、维生素 D3、双膦酸盐等药物,每种治疗手段都有其局限性。比如,随着双膦酸盐类药物的广泛应用,其长期使用所引起的一些副作用(下颌骨坏死、食道炎以及最近报道的食道癌病例)也不容忽视。因此,仍迫切地需要探索更加有效、安全、简便和经济的治疗手段。

[0003] 骨骼的强度和完整性,依赖于骨骼内骨吸收和骨形成之间的动态平衡,主要体现在对成骨细胞和破骨细胞之间数量和功能状态的精细调节。破骨细胞活动的过度增强是导致骨质疏松的主要病理机制。OPG/RANKL-RANK 信号通路 (OPG :骨保护素 ;RANKL :破骨细胞分化因子受体配体 ;RANK :破骨细胞分化因子受体) 是机体控制破骨细胞分化成熟和功能的关键信号通路,通过阻断这一关键信号通路,可以抑制破骨细胞的分化和破骨活性,将实现对骨吸收作用的有效控制,以及对骨质疏松症等骨吸收性疾病的治疗。抗 RANKL 抗体可以特异性阻断 RANKL 与其受体的结合,从信号转导途径的上游有效地阻断破骨分化信号的发放,实现对骨质疏松的治疗。目前由美国 Amgen 公司研制的人源化抗 RANKL 抗体(商品名 denosumab) 治疗骨质疏松症的 II 期临床已经完成,安全性和疗效都得到充分的肯定,但是人源化抗体生产的高额成本使价格问题成为其市场化的一大障碍。

[0004] 骨质疏松疫苗就是通过主动免疫手段,诱导机体产生针对 RANKL 的特异性中和抗体,实现对骨质疏松良好的治疗,同时克服或绕过工业化生产抗体的高额成本问题。目前,研制自体蛋白疫苗面临的一个共同技术挑战是如何克服机体对自体蛋白的免疫耐受。目前尚无能够克服机体对自体蛋白 RANKL 的免疫耐受,从而达到对骨质疏松产生治疗效果的疫苗。

发明内容

[0005] 为了解决背景技术中所存在的问题,本发明提供了一种基于 P- 硝基苯丙氨酸插入法构建的骨质疏松疫苗,可以有效地克服自体蛋白 RANKL 的免疫耐受,从而实现对骨质疏松的治疗。

[0006] 本发明采用的技术方案是:

[0007] (1) RANKL 重组表达载体的构建。从骨髓基质细胞中提取 RNA,通过 RT-PCR 扩增

[0050] 4) 测定免疫小鼠的基础体温,以及脂多糖刺激后体温(炎症引起的发热反应),采用微型红外测温仪测定耳廓温度。

[0051] 5) 停止免疫后1,3,6个月,分别用ELISA检测抗体的滴度变化。

[0052] 6) 其它:骨和肾组织切片,通过免疫组织化学检测有无抗原抗体

[0053] 对骨质疏松具有良好防治效果、安全性好的p-硝基苯丙氨酸-RANKL重组蛋白即为所需的骨质疏松疫苗。

[0054] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

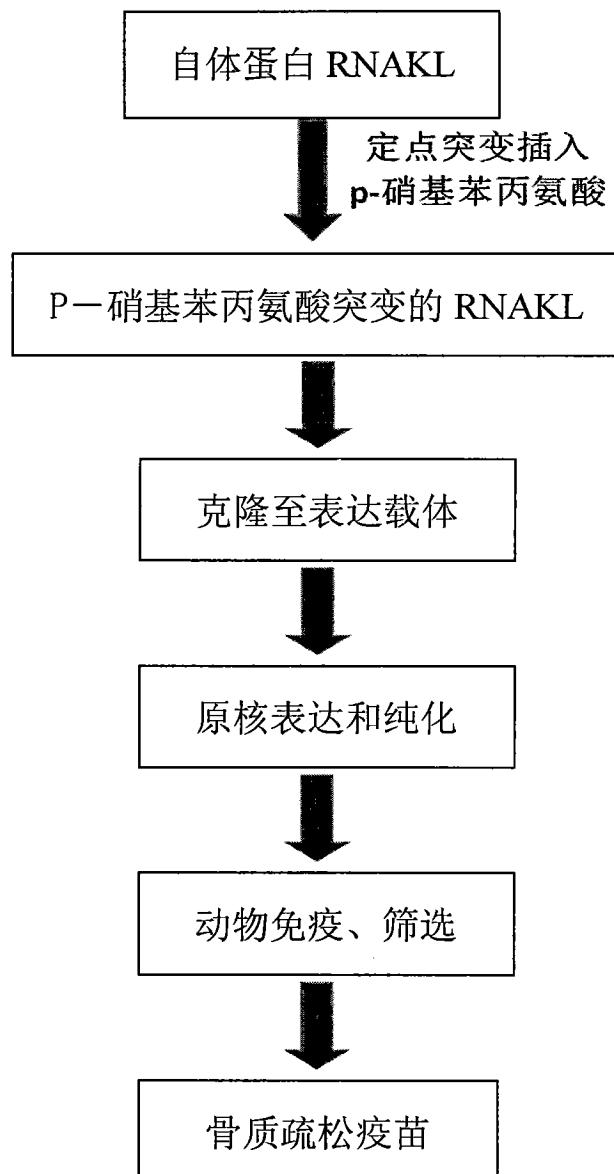


图 1