(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120092015 A
(43)申请公布日 2025.06.03

(21)申请号 202380073809.4
(22)申请日 2023.07.26
(30)优先权数据
10-2022-0134839 2022.10.19 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.04.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2023/010821 2023.07.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/085375 KO 2024.04.25
(71)申请人 全南大学校产学协力团
地址 韩国
(72)发明人 李浚行 李施恩 金昆楚
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 郑天松
(51)Int.Cl.
C07K 14/28(2006.01)
A61K 39/39(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

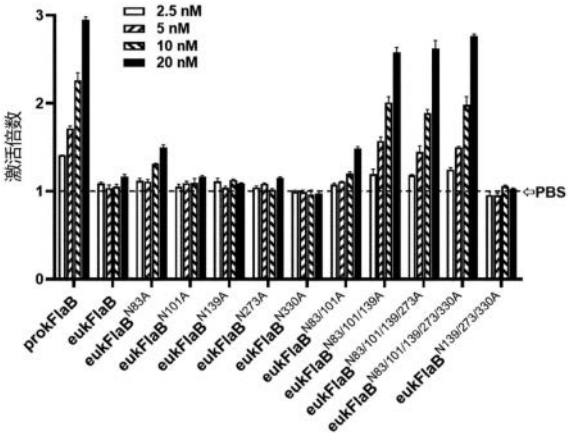
权利要求书3页 说明书15页
序列表（电子公布） 附图8页

(54)发明名称

利用真核细胞表达系统的具有TLR5活性的鞭毛蛋白免疫增强剂衍生物的制备及应用

(57)摘要

本发明涉及一种利用真核细胞表达系统的具有TLR5活性的鞭毛蛋白免疫增强剂衍生物的制备及应用,本发明的鞭毛蛋白变体具有高免疫增强效果,可用于多种疫苗及免疫治疗剂组合物中。



CN 120092015 A

1.能够在真核细胞中表达的多肽,其中,SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺被丙氨酸取代。

2.根据权利要求1所述的能够在真核细胞中表达的多肽,其中,所述多肽是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中选自由第83位、第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

3.根据权利要求1所述的能够在真核细胞中表达的多肽,其中,所述多肽包含选自由SEQ ID NO:14至SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的组中的一个氨基酸序列。

4.根据权利要求2所述的能够在真核细胞中表达的多肽,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

5.根据权利要求2所述的能够在真核细胞中表达的多肽,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位及第101位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

6.根据权利要求2所述的能够在真核细胞中表达的多肽,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位、第101位及第139位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

7.用于疫苗的免疫佐剂组合物,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

8.根据权利要求7所述的用于疫苗的免疫佐剂组合物,其中,

所述多肽是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中选自由第83位、第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

9.根据权利要求7所述的用于疫苗的免疫佐剂组合物,其中,所述多肽包含选自由SEQ ID NO:14至SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的组中的一个氨基酸序列。

10.根据权利要求8所述的用于疫苗的免疫佐剂组合物,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

11.根据权利要求8所述的用于疫苗的免疫佐剂组合物,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位及第101位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

12.根据权利要求8所述的用于疫苗的免疫佐剂组合物,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位、第101位及第139位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

13.用于增强免疫功能的组合物,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

14.根据权利要求13所述的用于增强免疫功能的组合物,其中,

所述多肽是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中选自由第83位、第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

15.根据权利要求13所述的用于增强免疫功能的组合物,其中,所述多肽包含选自由SEQ ID NO:14至SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的组中的一个氨基酸序列。

16.根据权利要求14所述的用于增强免疫功能的组合物,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

17.根据权利要求14所述的用于增强免疫功能的组合物,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位及第101位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

18.根据权利要求14所述的用于增强免疫功能的组合物,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位、第101位及第139位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

19.用于预防或治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、微生物感染或癌症的药物组合物,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

20.根据权利要求19所述的用于预防或治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、微生物感染或癌症的药物组合物,其中,所述多肽是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中选自由第83位、第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

21.根据权利要求19所述的用于预防或治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、微生物感染或癌症的药物组合物,其中,所述多肽包含选自由SEQ ID NO:14至SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的组中的一个氨基酸序列。

22.根据权利要求20所述的用于预防或治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、微生物感染或癌症的药物组合物,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

23.根据权利要求20所述的用于预防或治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、微生物感染或癌症的药物组合物,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位及第101位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

24.根据权利要求20所述的用于预防或治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、微生物感染或癌症的药物组合物,其中,

所述多肽是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:

SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位、第101位及第139位;以及

选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

利用真核细胞表达系统的具有TLR5活性的鞭毛蛋白免疫增强剂衍生物的制备及应用

【技术领域】

[0001] 本发明是在韩国科学技术信息通信部的支持下(课题编号2020R1A5A2031185)完成的(贡献率为60%),该课题的研究管理专门机构为韩国研究财团,研究项目名称为“团体研究支持”,研究课题名称为“复合癌症免疫治疗研究中心”,其主承办机构为韩国全南大学,研究期限为2018年06月01日～2025年02月28日。

[0002] 本发明是在韩国科学技术信息通信部的支持下(课题编号2020M3A9G3080282)完成的(贡献率为20%),该课题的研究管理专门机构为韩国研究财团,研究项目名称为“生物医疗技术开发”,研究课题名称为“免疫治疗创新研究组”,其主承办机构为韩国全南大学,研究期限为2020年06月01日～2024年12月31日。

[0003] 本发明是在韩国保健福祉部的支持下(课题编号HV22C0079)来完成的(贡献率为20%),该课题的研究管理专门机构为韩国保健产业振兴院,研究项目名称为“疫苗基础技术开发”,研究课题名称为“细胞免疫诱导粘膜免疫增强剂通用平台的开发”,其主承办机构为韩国全南大学,研究期限为2022年04月01日～2024年12月31日。

[0004] 本发明涉及一种利用真核细胞表达系统的具有TLR5活性的鞭毛蛋白免疫增强剂衍生物的制备及应用,更详细地,涉及一种可在真核细胞中表达并具有与现有源自原核生物的鞭毛蛋白同等或更高的免疫增强效果的鞭毛蛋白。

【背景技术】

[0005] 将形成细菌鞭毛的细丝的结构单位蛋白质称为鞭毛蛋白(flagellin),鞭毛蛋白有规律地组合在一起就形成细丝,以使细菌能够运动。

[0006] TLR5是一种模式识别受体,其在包括巨噬细胞及树突状细胞在内的多种免疫细胞的表面上表达,当TLR5识别鞭毛蛋白时,其诱导NF-kB的激活及炎性细胞因子的生成。NF-kB是一种转录因子,其调节参与免疫和炎症反应的基因表达,并包括一种被称为IkB(NF-kB抑制剂)的抑制蛋白,以蛋白质复合物的形式存在于细胞质中。当TLR5受到刺激被激活时,降解IkB并诱导NF-kB的激活,并且NF-kB的激活诱导促炎性细胞因子(如TNF-α(肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor)-α)及IL-1β(白细胞介素(Interleukin)-1β))的生成。

[0007] 另外,鞭毛蛋白是一种病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern)因子,其可刺激细胞质中存在的NLRC4-炎性小体(NLRC4-inflammasome)信号通路。因此,鞭毛蛋白是一种免疫调节物质,既可激活存在于细胞表面的TLR5,又可激活存在于细胞质中的NLRC4-炎性小体。

[0008] 利用这些特征,将其作为可应用于各种疫苗及免疫治疗剂的免疫增强剂开发对象来进行研究。当将多种抗原与鞭毛蛋白一起给药或以与鞭毛蛋白重组融合蛋白的形式给药时,具有增强抗原特异性免疫反应的功能,并且其免疫增强剂功效已在流感疫苗、肺炎疫苗、细菌性牙周病、抗癌治疗疫苗、诺如病毒疫苗、神经退行性疾病及各种免疫性疾病中得到证实。另外,据报道,基于鞭毛蛋白的TLR5激活可保护造血细胞以及使胃组织免受放射线

辐射损伤,并影响癌细胞的存活和生长。

[0009] 然而,迄今为止,鞭毛蛋白的免疫增强剂效果通过使用作为原核细胞的大肠杆菌中表达的重组蛋白来实现。然而,为了将鞭毛蛋白免疫增强剂的适用范围应用于基于核酸的疫苗(例如,DNA疫苗或mRNA疫苗等)或需要翻译后修饰(post-translational modification)的抗原,需要制备在真核细胞表达系统中表达的鞭毛蛋白。然而,与原核细胞表达的鞭毛蛋白相比,真核细胞系统中制备的鞭毛蛋白表现出显著降低的TLR5-信号传导能力。这种现象的原因被推测为:在真核细胞中表达鞭毛蛋白时,由于经过翻译后修饰过程的空间位阻,而无法有效诱导TLR5-信号传导。

[0010] 由此,需要研究一种具有强效免疫调节能力并具有有效的疫苗免疫增强剂功能且可在真核细胞中制备的鞭毛蛋白。

【发明内容】

[0011] 【发明要解决的问题】

[0012] 由此,本发明人在真核细胞中制备了鞭毛蛋白,并且确认了其具有显著优异的免疫增强能力及安全性。

[0013] 具体地,本发明人确认了与原核细胞中表达的鞭毛蛋白相比,在真核细胞系统中制备的鞭毛蛋白的TLR5刺激活性非常弱。这种现象的原因被推测为:在真核细胞中表达鞭毛蛋白时,经过翻译后修饰过程制备出糖基化的鞭毛蛋白(glycosylated-eFlaB),并且由于糖分子的空间位阻,糖基化的鞭毛蛋白无法有效诱导TLR5-信号传导。为了验证该假设,进行了生物信息学分析,并且确认了在真核细胞中表达的鞭毛蛋白具有5个N-糖基化位点。因此通过导入定点诱变(site-directed mutagenesis)法来制备被推测为N-糖基化(N-glycosylation)位点的天冬酰胺用丙氨酸取代的鞭毛蛋白变体,并在体外(in vitro)及体内(in vivo)条件下验证了该鞭毛蛋白变体的活性。由此导出了表现出与pFlaB相同的TLR5刺激活性及免疫增强剂功效的真核细胞-表达鞭毛蛋白免疫增强剂变体(eukFlaBvariants)。有趣的是,该变体(eukFlaBvariant)表现出免疫性消失特性。综合使用免疫信息学分析及蛋白修饰策略,建立了不诱导N-糖基化的真核细胞表达鞭毛蛋白(deglycosylated eukaryotic expressed flagellin),从而导出了更安全、能够进行多种临床应用的鞭毛蛋白免疫增强剂。

[0014] 由此,本发明的目的在于,提供一种能够在真核细胞中表达的鞭毛蛋白。

[0015] 本发明的另一目的在于,提供一种用于疫苗的免疫佐剂组合物,所述组合物包含能够在真核细胞中表达的鞭毛蛋白。

[0016] 本发明的再一目的在于,提供一种用于增强免疫功能的组合物,所述组合物包含能够在真核细胞中表达的鞭毛蛋白。

[0017] 本发明的又一目的在于,提供一种用于预防或治疗微生物感染或癌症的药物组合物,所述组合物包含能够在真核细胞中表达的鞭毛蛋白。

[0018] 本发明的又一目的在于,提供一种能够在真核细胞中表达的鞭毛蛋白的免疫辅助用途。

[0019] 本发明的又一目的在于,提供一种能够在真核细胞中表达的鞭毛蛋白的免疫功能增强用途。

[0020] 本发明的又一目的在于,提供一种能够在真核细胞中表达的鞭毛蛋白在预防或治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、微生物感染或癌症中的用途。

[0021] 【用于解决问题的手段】

[0022] 本发明涉及一种利用真核细胞表达系统的具有TLR5活性的鞭毛蛋白免疫增强剂衍生物的制备及应用,本发明的鞭毛蛋白表现出高免疫增强效果。

[0023] 以下,将更详细地说明本发明。

[0024] 本发明的一实施方式涉及一种能够在真核细胞中表达的多肽,所述多肽是SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺(Asparagine,N)被丙氨酸(Alanine)取代的多肽。

[0025] 在本发明的一实现例中,多肽可以是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中选自由第83位、第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

[0026] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0027] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位及第101位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0028] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位、第101位及第139位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0029] 在本发明的一实现例中,多肽可包含选自由SEQ ID NO:14至SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的组中的一个氨基酸序列。

[0030] 本发明的多肽具有优异的TLR-5活性,因此表现出高免疫增强效果,从而可用作用于疫苗的免疫佐剂组合物、用于增强免疫功能的组合物、或用于预防或治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、微生物感染或癌症的药物组合物,但不限于此。

[0031] 当本发明的多肽与流感疫苗一起给药时,由于诱导生成对流感抗原特异性的抗体的效果优异,因此可用作用于流感疫苗的免疫佐剂组合物或用于治疗流感的免疫佐剂组合物,但不限于此。

[0032] 本发明的另一实施方式涉及一种用于疫苗的免疫佐剂组合物,所述组合物包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺(Asparagine,N)被丙氨酸(Alanine)取代的多肽。

[0033] 在本发明的一实现例中,多肽可以是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中选自由第83位、第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

[0034] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0035] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多

肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位及第101位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0036] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位、第101位及第139位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0037] 在本发明的一实现例中,多肽可包含选自由SEQ ID NO:14至SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的组中的一个氨基酸序列。

[0038] 本发明的用于疫苗的免疫佐剂组合物还可包含一种以上的常用的药学上和/或兽医学上可接受的载体、稀释剂、抗生素及佐剂等。

[0039] 载体可包括在向目标动物(宿主动物)给药的过程中药学上可接受的任意溶剂(溶液)、分散介质、包衣剂、缓冲剂、等渗剂、悬浮液、胶体、稳定剂、防腐剂、抗生素(抗菌剂、抗真菌剂等)、吸收延迟剂、辅助剂(佐剂,Adjuvant)及插入物等。通常,对于制药领域的技术人员而言,使用化学化合物,尤其是对免疫原使用一种以上的递送载体(Vehicle)是众所周知的。只要是任意常规介质或激动剂与活性成分不相容,就可以考虑将其用于诊断、预防和治疗的组合物中。一种以上的补充活性成分也可混入一种以上的所公开的免疫原性组合物及疫苗制剂中或者与其一起给药。

[0040] 稀释剂可包括水、盐水、葡萄糖、乙醇及甘油等,所述等渗剂可包括氯化钠、葡萄糖、甘露醇、山梨醇及乳糖等,所述稳定剂可包括白蛋白,但不限于此。

[0041] 作为辅助剂(佐剂)包括:矿物凝胶,例如氢氧化铝凝胶;表面活性物质,例如溶血卵磷脂;糖苷,例如皂苷衍生物,例如Quil A或GPI-0100(Galenica Pharmaceuticals,Inc.,阿拉巴马州,伯明翰);普卢兰尼克多元醇(Pluronic polyol);聚阴离子(多阴离子);非离子嵌段聚合物,例如Pluronic F-127(B.A.S.F.,美国);肽;矿物油,例如Montanide ISA-206(赛比克(Seppic)公司,法国)、MontanideISA-50(赛比克公司,法国)、Cabopol、白榴石(amphigene)、Amphigen MarkII(Hydronic公司,美国)、铝水凝胶、油乳胶(例如,如Bayol F/ArlacelA)的矿物油和水的乳化液)、或植物油、如水和卵磷脂的乳化剂的乳化液;明矾(alum);胆固醇;弗氏(Freund)完全及不完全佐剂;嵌段共聚物(CytRx,佐治亚州亚特兰大);SAF-M(Chiron公司,加利福尼亚州埃默里维尔);AMPHIGEN(注册商标)辅助剂;单磷酰脂质A、阿夫立定(Avridine)脂质胺辅助剂;大肠杆菌(E.coli)来源的不耐热肠毒素(重组等);霍乱毒素;胞壁酰二肽;IMS1313(赛比克(Seppic)公司,法国);ISA206;Montanide 01凝胶(赛比克公司,法国);以及它们的辅助剂的混合物,但不限于此,优选地,选自由IMS1313、Cabopol及Montanide 01凝胶组成的组中的一种以上的佐剂。所述佐剂是指提高免疫反应和/或促进接种后的吸收速度的化合物或混合物,其包括任意吸收促进剂。

[0042] 本发明的再一实施方式涉及一种用于增强免疫功能的组合物,所述组合物包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺(Asparagine,N)被丙氨酸(Alanine)取代的多肽。

[0043] 在本发明的一实现例中,多肽可以是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中选自由第83位、第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

[0044] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多

肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0045] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位及第101位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0046] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位、第101位及第139位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0047] 在本发明的一实现例中,多肽可包含选自由SEQ ID NO:14至SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的组中的一个氨基酸序列。

[0048] 本发明的又一实施方式涉及一种用于预防或治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、微生物感染或癌症的药物组合物,所述组合物包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺(Asparagine,N)被丙氨酸(Alanine)取代的多肽。

[0049] 在本发明的一实现例中,自身免疫性疾病可选自由噬血细胞性淋巴组织细胞增生症(Hemophagocytic lymphohistiocytosis)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus)、坏死性淋巴结炎(Kikuchi)病、血管炎(vasculitis)、成人斯蒂尔病(Adult onset Still's disease)、类风湿关节炎(rheumatoid arthritis)、炎症性肌病(Inflammatory Myositis)、白塞氏病(Behcet disease)、IgG4-相关疾病、干燥综合征(Sjogren syndrome)、巨细胞动脉炎(Giant cell arteritis)、颞动脉炎(Temporal arteritis)、1型糖尿病、特应性皮炎、克罗恩病(Crohn'sdisease)、系统性硬化症(systemic sclerosis)、牛皮癣、多发性硬化症(multiple sclerosis)及格雷夫斯甲状腺功能亢进症(Graves hyperthyroidism)组成的组中的一种以上,但不限于此。

[0050] 在本发明的一实现例中,炎症性疾病可选自由败血症、胃炎、肠炎、肾炎、肝炎、慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease,COPD)、肺纤维化、肠易激综合征、炎症性疼痛、偏头痛、头痛、背痛、纤维肌痛、筋膜疾病、病毒感染、细菌感染、真菌感染、烧伤、外科手术或牙科手术造成的伤口、前列腺素增多症、动脉粥样硬化、痛风、霍奇金病、胰腺炎、结膜炎、虹膜炎、巩膜炎、葡萄膜炎及湿疹组成的组中的一种以上,但不限于此。

[0051] 在本发明的一实现例中,微生物可选自由流感病毒(Influenza virus)、冠状病毒(Corona virus)、肝炎病毒(Hepatitis virus)、寨卡病毒(Zika virus)、登革热病毒(Dengue virus,DENV)、汉坦病毒(Hantavirus)、巨细胞病毒(Cytomegalovirus,CMV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein Barr virus,EBV)、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)、单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus,HSV)、奇昆古尼亚病毒(Chikungunya virus)、肠道病毒(Enterovirus)、马尔堡出血热病毒(Marburg hemorrhagic fever virus)、细小病毒(parvovirus)、发热伴血小板减少综合征病毒(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus,SFTSV)、轮状病毒(Rotavirus)、诺如病毒(Norovirus)、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、A组溶血性链球菌(Group A Streptococcus,GAS)、B组链球菌(Group B Streptococcus,GBS)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、志贺氏菌(Shigella)、致病性大肠杆菌(pathogenic E.coli)、沙门氏菌(Salmonella)、衣原体(Chlamydia)、绿脓杆菌(Pseudomonas aeruginosa)、不可

分型流感嗜血杆菌(Non-typeable Haemophilus influenzae)、肺炎克雷伯菌(Klebsiella pneumoniae)、艰难梭状芽孢杆菌(Clostridium difficile)、疟原虫(Plasmodium)、利什曼原虫(Leishmania)、血吸虫(Schistosoma)、锥虫(Trypanosoma)、布鲁氏菌(Brucella)、隐孢子虫(Cryptosporidium)及内阿米巴(Entamoeba)组成的组中的一种以上,但不限于此。

[0052] 在本发明的一实现例中,癌症可选自由乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、泌尿生殖道癌、淋巴癌、直肠癌、胰腺癌、食道癌、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌及皮肤癌组成的组中的一种以上,但不限于此。

[0053] 在本发明的一实现例中,多肽可以是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中选自由第83位、第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽。

[0054] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第101位、第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0055] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位及第101位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第139位、第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0056] 在本发明的一实现例中,多肽可以是以下位置上的天冬酰胺被丙氨酸取代的多肽:SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第83位、第101位及第139位;以及选自由SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的第273位及第330位组成的组中的一个以上位置。

[0057] 在本发明的一实现例中,多肽可包含选自由SEQ ID NO:14至SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的组中的一个氨基酸序列。

[0058] 本发明的药物组合物可以以药学有效量给药。

[0059] 在本说明书中,术语“药学有效量”是指足以实现上述提取物的功效或活性的量。

[0060] 本发明的药物组合物可包括药学上可接受的载体。

[0061] 本发明的药物组合物中包含的药学上可接受的载体是制剂中常用的,还可包括但不限于乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁及矿物油等。除了上述成分之外,本发明的药物组合物还可包括润滑剂、保湿剂、甜味剂、香味剂、乳化剂、悬浮剂及防腐剂等。

[0062] 本发明的药物组合物可通过多种途径施用于哺乳动物(包括人类)。给药方式可以是所有常规方式,例如,可以以口服、皮肤、静脉内、肌肉内及皮下等途径给药,优选地,可以以口服的方式给药。

[0063] 本发明的药物组合物的适当给药量可取决于制剂化方法、给药方式、患者的年龄、体重、性别、病理状况、食物、给药时间、给药途径、排泄速度及反应敏感性等因素,并且通常熟练的医生可容易地确定并开出对于所需治疗或预防有效的剂量。

[0064] 本发明的药物组合物可根据本发明所属技术领域的普通技术人员容易实施的方法,使用药学上可接受的载体和/或赋形剂进行制剂化,由此可以以单位剂量形式制备或将其置于多剂量容器中制备。此时,剂型可以是油性或水性介质中的溶液、混悬液或乳化液形式、或者也可以是提取物、粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂或凝胶(例如,水凝胶)形式,并且还可

包括分散剂或稳定剂。

[0065] 本发明的又一实施方式涉及一种多肽作为疫苗免疫辅助的用途,所述多肽是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺(Asparagine,N)被丙氨酸(Alanine)取代的多肽。

[0066] 本发明的又一实施方式涉及一种多肽的免疫功能增强用途,所述多肽是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺(Asparagine,N)被丙氨酸(Alanine)取代的多肽。

[0067] 本发明的又一实施方式涉及一种多肽在预防或治疗自身免疫性疾病、炎症性疾病、微生物感染或癌症中的用途,所述多肽是在SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺(Asparagine,N)被丙氨酸(Alanine)取代的多肽。

[0068] 【发明效果】

[0069] 本发明涉及一种利用真核细胞表达系统的具有TLR5活性的鞭毛蛋白免疫增强剂衍生物的制备及应用,本发明的鞭毛蛋白变体具有高免疫增强效果,可用于多种疫苗及免疫治疗剂组合物中。

【附图说明】

[0070] 图1是示出根据本发明的一实施例通过蛋白免疫印迹确认作为原核细胞的大肠杆菌中表达的败血症创伤弧菌来源的野生型鞭毛蛋白(prokFlaB)及作为真核细胞的Expi293™细胞中表达的野生型鞭毛蛋白(eukFlaB)的结果的图。

[0071] 图2是示出根据本发明的一实施例比较作为原核细胞的大肠杆菌中表达的败血症创伤弧菌来源的野生型鞭毛蛋白(prokFlaB)及作为真核细胞的Expi293™细胞中表达的野生型鞭毛蛋白(eukFlaB)的TLR5-刺激活性的结果的曲线图。

[0072] 图3a是示出根据本发明的一实施例通过蛋白免疫印迹确认将在真核细胞Expi293™细胞中表达的野生型鞭毛蛋白(eukFlaB)用作为去糖基化酶的肽N-糖苷酶F(Peptide N-glycosidase F,PNGase)进行处理前后的蛋白状态的结果的图。

[0073] 图3b是示出根据本发明的一实施例比较作为真核细胞的Expi293™细胞中表达的野生型鞭毛蛋白(eukFlaB)用作为去糖基化酶的肽N-糖苷酶F(Peptide N-glycosidase F,PNGase)进行处理前后的TLR5-刺激活性的结果的曲线图。

[0074] 图4示出根据本发明的一实施例预测鞭毛蛋白(FlaB)的糖基化氨基酸序列的结果。

[0075] 图5是诱导定点诱变(site-directed mutagenesis)的鞭毛蛋白变体的构建的示意图。

[0076] 图6至图7是根据本发明的一实施例验证作为真核细胞的Expi293™细胞中表达的鞭毛蛋白变体的特征及TLR5-刺激活性的结果。

[0077] 图8是通过免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation,Co-IP)方法来测定鞭毛蛋白变体与TLR5的结合的结果。

[0078] 图9示出根据本发明的一实施例在流感疫苗模型中比较作为原核细胞的大肠杆菌中表达的败血症创伤弧菌来源的野生型鞭毛蛋白(prokFlaB)、作为真核细胞的Expi293™细胞中表达的野生型鞭毛蛋白(eukFlaB)及多种鞭毛蛋白变体的免疫增强剂功效的结果。

[0079] 图10示出根据本发明的一实施例在流感疫苗模型中将作为原核细胞的大肠杆菌中表达的败血症创伤弧菌来源的野生型鞭毛蛋白(prokFlaB)及作为真核细胞的Expi293™细胞中表达的野生型鞭毛蛋白(eukFlaB)、eukFlaB$^{N83/101/139A}$、eukFlaB$^{N83/101/139/273A}$及eukFlaB$^{N83/101/139/273/330A}$用作免疫增强剂时,比较prokFlaB-或eukFlaB-选择性抗体是否生成的结果。

[0080] 图11示出根据本发明的一实施例比较作为原核细胞的大肠杆菌中表达的败血症创伤弧菌来源的野生型鞭毛蛋白(prokFlaB)、作为真核细胞的Expi293™细胞中表达的野生型鞭毛蛋白(eukFlaB)及多种鞭毛蛋白变体的稳定性的结果。

【具体实施方式】

[0081] 本发明涉及一种能够在真核细胞中表达的多肽,所述多肽是SEQ ID NO:13的氨基酸序列中的一个以上天冬酰胺(Asparagine,N)被丙氨酸(Alanine)取代。

[0082] 【实施方式】

[0083] 以下,通过以下实施例更详细地说明本发明。然而,这些实施例仅用于例示本发明,本发明的范围并不限于这些实施例。

[0084] 在整个说明书中,除非另有说明,用于表示特定物质的浓度的“%”表示时,固体/固体时为(重量/重量)%,固体/液体时为(重量/体积)%,以及液体/液体时为(体积/体积)%。

[0085] 【实施例1:用于制备真核细胞-表达野生型鞭毛蛋白的质粒的构建】

[0086] 原核细胞中表达的败血症创伤弧菌(Vibrio vunificus)-来源FlaB(prokFlaB)通过文献(Lee SE,et al.A bacterialflagellin,Vibrio vulnificus FlaB,has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity.Infect Immun.2006;74(1):694-702)中公开的方法来制备。

[0087] 为了在真核细胞中表达所述FlaB,使用包括HindIII(AAGCTT)切割位点的以下表1中的正向引物eukFlaB-F及包括NotI切割位点的反向引物eukFlaB-R并通过PCR反应进行扩增。此时,根据哺乳类细胞表达密码子的使用(频率),合成优化的FlaB后,将克隆到pBHA质粒中的pBHA::eukFlaB(BIONEER公司,韩国)用作PCR反应模板(template)。

[0088] 【表1】

[0089]

SEQ ID NO:	名称	序列(5′->3′)
1	eukFlaB-F	CCCAAGCTTG CCGTCAACGT GAACACCAA
2	eukFlaB-R	ATAGTTTAGC GGCCGCGCCC AGCAGGGAGA GGGCGC

[0090] 作为eukFlaB DNA扩增产物及真核细胞表达载体pSectag2B(英杰(Invitrogen)公司,V900-20),分别将一对限制性内切酶(RE)HindIII及NotI在37℃的温度条件下过夜处理。将用限制性内切酶处理的PCR产物及真核细胞表达载体pSectag2B在室温条件下通过T4 DNA连接酶(Enzynomics)结合2小时。作为新构建体的pSectag2B::eukFlaB质粒转化为大肠杆菌感受态细胞TOP10(英杰(Invitrogen)公司),并使用含有氨苄青霉素的LB板来进行培养。表达载体的DNA碱基序列通过Macrogen在线测序订单系统(Macrogen Online Sequencing Order System(http://dna.macrogen.com/kor/))并使用双脱氧链终止测序法(dideoxy-chain termination sequencing)来确认。

[0091] 【实施例2:采用真核细胞表达系统的重组蛋白的制备】

[0092] 真核细胞表达系细胞株Expi293™细胞购自赛默飞世尔科技公司(Thermofish Scientific,Cat#.A14635)并用于本发明中。转染步骤遵循制造商的协议。Expi293™细胞是在37℃、8%的CO_2的条件下以125rpm的速度搅拌的培养箱中培养。在第0天(转染前一天),Expi293™细胞以3x10^6/ml接种于培养瓶(美国康宁(corning))中。在第1天(转染当天),测定Expi293™细胞数量并以3x10^6/ml接种,将通过0.22μm的过滤器(Millexmil-GV,SLGVR13)过滤除菌的pSectag2B::eukFlaB质粒加入到细胞培养系统中。第二天,加入ExpiFectamine™ 293转染增强剂1(Transfection Enhancer 1)和增强剂2(enhancer 2)并继续培养至第四天。此时,重组蛋白通过包括IgK链序列的pSectag2B分泌到培养基中。

[0093] 第四天,将分泌蛋白的培养基在4℃的温度条件下以17000rpm离心分离20分钟后,并根据制造商的指南,将无细胞上清液上样到包含Ni-NTA琼脂糖珠(agarose beads)(凯杰(Qiagen)公司,希尔登(Hilden),德国(Germany))的柱中。为了去除所需蛋白之外的剩余蛋白,使用洗涤缓冲液I(50mM的NaH_2PO_4、300mM的NaCl、10mM的咪唑(Imidazole),pH=8)及洗涤缓冲液II(50mM的NaH_2PO_4、300mM的NaCl和20mM的咪唑(Imidazole),pH=8)进行洗涤。在常温条件下,使用洗脱缓冲液(50mM的NaH_2PO_4、300mM的NaCl和250mM的咪唑(Imidazole),pH=8)溶解并分离目标蛋白15分钟。经上述方式洗脱的蛋白通过透析法,将缓冲液替换为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0094] 重组肽通过使用SDS-PAGE及BALB/c小鼠中生成的抗-FlaB抗体的蛋白免疫印记来确认,其结果示于图1中。

[0095] 【实施例3:采用真核细胞表达系统制备的野生型鞭毛蛋白的TLR5-刺激活性的验证】

[0096] 为了验证采用真核细胞表达系统制备的野生型鞭毛蛋白的TLR5刺激活性,在多种蛋白浓度条件下测定NF-κB活性。具体地,根据制造商的协议,与HEK-Blue™检测(InvivoGen公司,hb-det2)分析系统一起使用了HEK-Blue™hTLR5细胞(InvivoGen公司,hκb-htlr-5)。针对各蛋白质的浓度,使用三次OD620nm值来计算EC50。为了确认去糖基化的eukFlaB的生物活性,使用购自美国赛默飞世尔科技公司(Thermo fisher Scientific)的HEK293T细胞,在体外进行了NF-κB荧光素酶报告分析。HEK293T细胞在包含10%的FBS及100单位/毫升(units/ml)的抗生素(Gibco™,cat.15140122)的DMEM培养基(Gibco™,cat.11995-065)中保持37℃的温度及5%的CO_2。为了NF-κB报告分析,使用了至少3次传代的细胞。HEK293T细胞以2x10^5/孔(well)接种于24孔板(SPL生命科学公司(SPL Life Sciences Co.,Ltd.),韩国(Korea))中并培养24小时。为了转染(transfection)细胞,加入报告质粒pNF-κB-luc(100ng/孔(well))、p3xFlag-hTLR5(100ng/孔(well))、pCMV-β-Gal(50ng/孔(well))及Effectene转染试剂(5μL/孔(well))(凯杰公司(Qiagen),301427)并过夜培养。转染细胞用prokFlaB、eukFlaB或突变eukFlaB变体进行处理并培养24小时后,去除培养液,并用细胞裂解缓冲液(普洛麦格公司(Promega),麦迪逊(Madison),美国威斯康星州(WI USA),E153A)裂解细胞后,使用光度计(博托公司(Berthold),Lumat-Plus LB96V)从细胞裂解物中测定荧光酶活化。

[0097] 如图2所示,实验结果确认了eukFlaB诱导了明显低于prokFlaB的TLR5刺激。

[0098] 【实施例4:使用去糖基化酶(肽N-糖苷酶F(Peptide N-glycosidase F))的真核细

胞表达-鞭毛蛋白去糖基化(N-deglycoslyation)反应及去糖基化的真核细胞-表达鞭毛蛋白的TLR5-刺激活性的验证】

[0099] 根据制造商的协议,真核细胞表达eukFlaB的去糖基化反应使用PNGase F酶(普洛麦格公司(Promega),cat.V483A)进行。混合PNGase F酶(10U/μl)与eukFlaB(15μg),然后在37℃的温度条件下培养。2小时后,通过使用SDS-PAGE及BALB/c小鼠中生成的抗-FlaB抗体的蛋白免疫印记来确认去糖基化程度,并将其结果示于图3a中。通过与实施例3相同的方法测定去糖基化的eukFlaB的TLR5-刺激活性,并将其结果示于图3b中。

[0100] 如图3b所示,实验结果可确认去糖基化的eukFlaB恢复TLR5刺激活性。

[0101] 【实施例5:通过定点诱变(site-directed mutagenesis)的多种去糖基化鞭毛蛋白衍生物的制备及多种去糖基化的真核细胞-表达鞭毛蛋白衍生物的TLR5-刺激活性的验证】

[0102] 使用NetNGlyc-1.0(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0)、确定N-糖基化共识序列Asn-Xaa-Ser/Thr的生物信息工具,预测了FlaB氨基酸序列中的N-糖基化位点。

[0103] 如图4所示,eukFlaB在N83、N101、N139、N273及N330位预测了5个糖基化残基,并且确定了3个残基(N83、N101及N139)位于TLR5结合域附近。

[0104] 由此,如图5所示,通过导入定点诱变(site-directed mutagenesis)法,制备了多种去糖基化鞭毛蛋白[eukFlaB^{N83A}、eukFlaB^{N101A}、eukFlaB^{N139A}、eukFlaB^{N273A}、eukFlaB^{N330A}、eukFlaB^{N83A,N101A}(eukFlaB$^{N83/101A}$)、eukFlaB^{N83A,N101A,N139A}(eukFlaB$^{N83/101/139A}$)、eukFlaB^{N83A,N101A,N139A,N273A}(eukFlaB$^{N83/101/139/273A}$)、eukFlaB^{N83A,N101A,N139A,N273A,N330A}(eukFlaB$^{N83/101/139/273/330A}$)及eukFlaB^{N139A,N273A,N330A}(eukFlaB$^{N139/273/330A}$)。

[0105] 根据制造商的协议(EZchange^{TM}定点诱变(Site-directed Mutation),Cat.#EZ004S)进行eukFlaB的定点诱变(site-directed mutation)生成。简言之,pSectag2B::eukFlaB质粒用作PCR反应的模版,此时使用的表2中的引物设计成:将特定密码子“AAC”或“AAT”对应的氨基酸天冬酰胺(N)改变为另一特定密码子“GCT”或“GCC”对应的氨基酸丙氨酸(A),以用于生成定点诱变。使用EZ-MIX酶,从PCR产物中分离母体质粒后,将质粒转化为大肠杆菌感受态细胞(受体细胞)TOP10,并薄薄地涂抹在含有氨苄青霉素(100μg/ml)的LB板上。eukFlaB的阳性突变序列通过Macrogen在线序列(http://dna.macrogen.com/kor/)来确定。

[0106] 【表2】

[0107]

SEQ ID NO:	名称	序列(5'->3')
3	N83A-F	CTGAAGGCGC CATGGCCGAA ACCACCAACA TC
4	N83A-R	GATGTTGGTG GTTTCGGCCA TGGCGCCTTC AG
5	N101A-F	CTCTGCAGTC TGCCGCCGGC AGCAACAGCA AG
6	N101A-R	CTTGCTGTTG CTGCCGGCGG CAGACTGCAG AG
7	N139A-F	CAACAAGCTG CTGGCTGGCA CCTACGGCAC
8	N139A-R	GTGCCGTAGG TGCCAGCCAG CAGCTTGTTG
9	N273A-F	GGGCGAGGGC AAGGCCGTGA CCGTGGATAC

[0108]

10	N273A-R	GTATCCACGG TCACGGCCTT GCCCTCGCCC
11	N330A-F	CAACGAGAAC GTCGCTGCCT CTAAGTCCAG G
12	N330A-R	CCTGGACTTA GAGGCAGCGA CGTTCTCGTT G

[0109] 重组肽通过使用SDS-PAGE及BALB/c小鼠中生成的抗-FlaB抗体的蛋白免疫印记来确认,并将其结果示于图6中。

[0110] 通过所述方法制备的eukFlaB、eukFlaB^{N83A}、eukFlaB^{N101A}、eukFlaB^{N139A}、eukFlaB^{N273A}、eukFlaB^{N330A}、eukFlaB$^{N83/101A}$、eukFlaB$^{N83/101/139A}$、eukFlaB$^{N83/101/139/273A}$、eukFlaB$^{N83/101/139/273/330A}$及eukFlaB$^{N139/273/330A}$的肽序列示于以下表3中。

[0111] 【表3】

SEQ ID NO:	名称	序列(5'->3')
13	eukFlaB	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMNETTNILQ RMRDLSLQSA NGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLNG TYGTKAMQIG ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKNVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVN ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG
14	eukFlaB^{N83A}	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMAETTNILQ RMRDLSLQSA NGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLNG TYGTKAMQIG ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKNVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVN ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG
15	eukFlaB^{N101A}	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMNETTNILQ RMRDLSLQSA AGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLNG TYGTKAMQIG ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKNVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVN ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG
16	eukFlaB^{N139A}	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMNETTNILQ RMRDLSLQSA NGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLAG TYGTKAMQIG ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKNVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVN ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG
17	eukFlaB^{N273A}	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMNETTNILQ RMRDLSLQSA NGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLNG TYGTKAMQIG

[0112]

[0113]

		ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKAVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVN ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG
18	eukFlaB^{N} 330A	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMNETTNILQ RMRDLSLQSA NGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLNG TYGTKAMQIG ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKNVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVA ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG
19	eukFlaB^{N} 83/101A	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMAETTNILQ RMRDLSLQSA AGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLNG TYGTKAMQIG ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKNVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVN ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG
20	eukFlaB^{N} 83/101/139A	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMAETTNILQ RMRDLSLQSA AGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLAG TYGTKAMQIG ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKNVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVN ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG
21	eukFlaB^{N} 83/101/139/273A	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMAETTNILQ RMRDLSLQSA AGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLAG TYGTKAMQIG ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKAVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVN ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG
22	eukFlaB^{N} 83/101/139/273/330A	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMAETTNILQ RMRDLSLQSA AGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLAG TYGTKAMQIG ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKAVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVA ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG
23	eukFlaB^{N} 139/273/330A	MAVNVNTNVA AMTAQRYLNN ANSAQQTSME RLSSGFKINS AKDDAAGLQI SNRLNVQSRG LDVAVRNAND GISIAQTAEG AMNETTNILQ RMRDLSLQSA NGSNSKSERV AIQEEVTALN DELNRIAETT SFGGNKLLAG TYGTKAMQIG ADNGEAVMLS LKDMRSDNVM MGGVSYQAEE GKDKNWNVAA GDNDLTIALT

[0114]

		DSFGNEQEIE INAKAGDDIE ELATYINGQT DLVKASVGEG GKLQIFAGNN KVQGEIAFSG SLAGELGLGE GKAVTVDTID VTTVQGAQES VAIVDAALKY VDSHRAELGA FQNRFNHAIS NLDNINENVA ASKSRIKDTD FAKETTQLTK TQILSQASSS ILAQAKQAPN SALSLLG

[0115] 为了确定多种鞭毛蛋白的生物活性,通过报告实验测定了基于Toll样受体5(Toll-like receptor5)信号介导的NF-κB活性。HEK293T细胞保持在包含10％的FBS(Gibco™,cat.16000044)和100单位/毫升(units/ml)的青霉素及100μg/ml的链霉素抗生素(Gibco™,cat.15140122)的DMEM(Gibco™,cat.11995-065)培养基中。HEK293T细胞以$2x10^5$/well接种于24孔板(康宁科斯特公司(Corning costar),cat.3526)中,并在37℃的温度及5％的CO_2培养箱中培养24小时。为了转染(transfection)细胞,加入报告质粒(Reporter plasmid)pNF-κB-luc(100ng/well)、p3xFlag-hTLR5(100ng/well)、pCMV-β-Gal(50ng/well)、Effectene转染试剂(5μl/well)(凯杰公司(Qiagen),301427)并过夜培养。转染细胞用prokFlaB、eukFlaB或突变eukFlaB变体处理并培养24小时后,去除培养液,并用细胞裂解缓冲液裂解细胞后,使用光度计(博托公司(Berthold),Lumat-Plus LB96V)从细胞裂解物中测定荧光酶活化,从而验证了TLR5-信号传导活性。

[0116] 实验结果,如图7所示,确认了eukFlaB、$eukFlaB^{N101A}$、$eukFlaB^{N139A}$、$eukFlaB^{N273A}$、$eukFlaB^{N330A}$、$eukFlaB^{N139/273/330A}$不诱导TLR5活化,但$eukFlaB^{N83A}$、$eukFlaB^{N83/101A}$、$eukFlaB^{N83/101/139A}$、$eukFlaB^{N83/101/139/273A}$、$eukFlaB^{N83/101/139/273/330A}$诱导TLR5活化。尤其,确认了$eukFlaB^{N83/101/139A}$、$eukFlaB^{N83/101/139/273A}$、$eukFlaB^{N83/101/139/273/330A}$具有与原核细胞来源的鞭毛蛋白(prokFlaB)相同水平的TLR5刺激活性。

[0117] 【实施例6:使用免疫共沉淀法(Co-Immunoprecipitation,Co-IP)的鞭毛蛋白变体与TLR5结合的测定】

[0118] 如下,使用免疫共沉淀法(Co-IP)来测定鞭毛蛋白变体与TLR5的结合。具体地,将HEK293T细胞用p3XFlag-hTLR5质粒转染24小时。使用包含蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解细胞后,经过超声处理后,离心分离以收集上清液。将蛋白prokFlaB、eukFlaB、eukFlaBN83/101/139A及eukFlaBN83/101/139/273/330A与上清液混合,并在4℃的温度条件下过夜旋转(复合物I(ComplexI))。同时混合蛋白(Protein)A/G加琼脂糖(plus-agarose)(圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology),sc-2003)及抗-Flag标签抗体(艾博抗公司(Abcam),ab1162),并在4℃的温度条件下过夜旋转(复合物II(ComplexII))。接着,用IP缓冲液(1％的曲拉通X-100(TritonX-100)、25mM的三羟甲基氨基甲烷(Tris)pH为7.5、10％的甘油(Glycerol)、150mM的NaCl、1mM的DTT、1mM的EDTA及蛋白酶抑制剂(protease inhibitor))洗涤复合物II(Complex II)5次。在4℃的温度条件下,将复合物I(Complex I)及复合物II混合6小时后,并用IP缓冲液洗涤5次,以去除非特异性结合蛋白。加入50μl的1xSDS上样缓冲液(loading buffer)并加热10分钟后,进行了SDS-PAGE及额外的蛋白免疫印记分析。抗-FlaB eukFlaB变体与通过抗-Myc良好地检测到的Myc-标签一起表达,由于eukFlaB上的糖基化而检测出的eukFlaB蛋白低,因此用于分别检测pFlaB及eukFlaB变体的蛋白免疫印记分析中使用了鼠抗-FlaB及抗-Myc-HRP(Novex®,46-0709)的两种不同抗体。

[0119] 如图8所示,实验结果可观察到prokFlaB以高亲合力与TLR5结合,但eukFlaBsms未与TLR5结合。另外,确认了$eukFlaB^{N83/101/139A}$及$eukFlaB^{N83/101/139/273/330A}$变体恢复TLR5结合。由此可确认,糖基化干扰FlaB-TLR5结合,而去糖基化导致更高亲和力的FlaB-TLR5结合。

[0120] 【实施例7:使用小鼠的流感疫苗实验模型系统中验证上述制备的真核细胞-表达鞭毛蛋白变体的免疫增强剂功效】

[0121] 7周龄雌性BALB/C小鼠(n＝10)购自Orient(韩国京畿道城南市),并在进行实验前

1周使其适应设施环境。小鼠通过腹膜内注射混合舒泰(Zoletil)®50(维克公司(Virbac corporation),卡罗斯(Carros),法国(France))与朗普恩(Lumpun)™(拜耳公司(Bayer AG),勒沃库森(Leverkusen),德国(Germany))的麻醉剂来进行麻醉,然后开始免疫。使用如下组:1)sH1N1抗原组(sH1N1,0.2ug/小鼠(mouse));2)sH1N1(0.2ug/mouse)及prokFlaB(4ug/mouse);3)或者eukFlaB(4ug/mouse)混合物(sH1N1+prokFlaB、sH1N1+eukFlaB、sH1N1+eukFlaB^{N83A}、sH1N1+eukFlaB$^{N83/101A}$、sH1N1+eukFlaB$^{N83/101/139A}$、sH1N1+eukFlaB$^{N83/101/139/273A}$及sH1N1+eukFlaB$^{N83/101/139/273/330A}$),开始鼻腔内免疫。疫苗抗原用PBS稀释,每只小鼠的每侧鼻腔中使用10μl,共使用20μl。每隔两周对小鼠进行三次免疫接种,并在最后一次免疫接种两周后采集了血清,以确定抗体反应。

[0122] 流感抗原-特异性抗体免疫反应通过酶联免疫吸附分析法(ELISA)来测定,并在第三次免疫2周后采集小鼠血清。ELISA板(康宁实验室(Corning Laboratories),3690)中分别加入sH1N1(4μg/ml)并涂抹后,在4℃的温度条件下放置过夜。第二天,板使用洗涤缓冲液PBS-T[PBS包含0.05%的吐温20(Tween20)(赛默飞世尔科技公司(Thermo fisher scientific),cat.J20605-AP)]洗涤3次,并加入封闭缓冲液(blocking buffer)[含有1mM的EDTA(JUNSEI公司,cat.17385S0401)及0.5%的BSA(西格玛公司(Sigma),cat.A2153-50G)的PBS-T]在常温条件下封闭1小时,以阻断抗原及抗体的非特异性结合。小鼠中采集的血清使用封闭缓冲液(blocking buffer)进行系列稀释(2倍稀释(2-fold dilution)),每孔(well)加入40ul并在常温条件下反应2小时。所述板使用PBS-T洗涤5次,并加入辣根过氧化物酶结合抗鼠IgG(horseradish-peroxidase(HRP)conjugated anti-mouse IgG)抗体,在常温条件下反应1小时,并用PBS-T洗涤板。接下来,加入底物(substrate)TMB(BD OptEIA,cat.555214),当显色时,加入终止(STOP)缓冲液(1N的H_2SO_4),终止反应。使用酶标仪(分子设备公司(Molecular Devices Corporation),门洛帕克(Menlo Park),CA)测定450nm处的吸光度。抗体滴度(antibody titer)是算出比未加入任何物质的孔(well)高出2倍的吸光度值,从而算出血清稀释液的倒数(reciprocal)Log2值。

[0123] 如图9所示,实验结果确认到eukFlaBN^{83A}、eukFlaB$^{N83/101A}$、eukFlaB$^{N83/101/139A}$、eukFlaB$^{N83/101/139/273A}$及eukFlaB$^{N83/101/139/273/330A}$诱导生成与原核细胞中表达的鞭毛蛋白(prokFlaB)相同水平的流感抗原特异性抗体,因此具有免疫增强剂功效。

[0124] 【实施例8:原核细胞-表达鞭毛蛋白与真核细胞-表达鞭毛蛋白的抗体生成能力的比较验证】

[0125] 在实施例7的流感疫苗模型中,通过酶联免疫吸附分析法(ELISA)测定了鞭毛蛋白-特异性抗体免疫反应。具体地,在第三次免疫2周后采集小鼠血清。ELISA板(康宁实验室(Corning Laboratories),3690)中分别加入prokFlaB(1μg/ml)或野生型eukFlaB(1μg/ml)并涂抹后,在4℃的温度条件下放置过夜。以与实施例7相同的方法进行了酶联免疫吸附分析法(ELISA)。

[0126] 如图10所示,实验结果确认,原核细胞中表达的鞭毛蛋白(prokFlaB)诱导prokFlaB-及eukFlaB-特异抗体的生成,但eukFlaB、eukFlaB$^{N83/101/139A}$、eukFlaB$^{N83/101/139/273A}$及eukFlaB$^{N83/101/139/273/330A}$未诱导prokFlaB-及eukFlaB-特异抗体的生成。因此,确认了本发明的eukFlaB变体在体内重复给药过程中不会诱导针对鞭毛蛋白本身(生物制剂)的免疫反应,从而可提供更安全的鞭毛蛋白免疫增强剂。

[0127] 【实施例9:去糖基化的真核细胞-表达鞭毛蛋白衍生物的稳定性验证】

[0128] 纯化prokFlaB、eukFlaB及N-糖基化突变体eukFlaB,并在不同温度(如-80℃、4℃及室温)条件下保存2周。蛋白的结构稳定性及功能性分别通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)及NF-κB报告分析进行试验。

[0129] 如图11所示,实验结果确认,与原核细胞中制备的鞭毛蛋白(prokFlaB)相比,真核细胞中制备的鞭毛蛋白具有更优异的稳定性。因此,预期本发明的eukFlaB变体在生物制剂的制备、流通以及体内给药过程中可在药代动力学方面提供更优异的鞭毛蛋白免疫增强剂。

[0130] 【工业实用性】

[0131] 本发明涉及一种利用真核细胞表达系统的具有TLR5活性的鞭毛蛋白免疫增强剂衍生物的制备及应用,更详细地,涉及一种可在真核细胞中表达并与现有原核生物来源的鞭毛蛋白同等或具有更强的免疫增强效果的鞭毛蛋白。

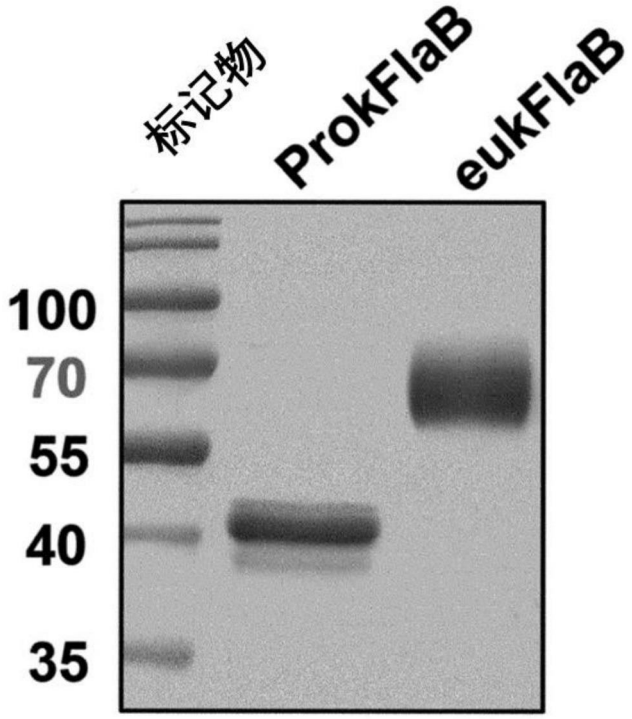

标记物
ProkFlaB
eukFlaB
100
70
55
40
35

图1

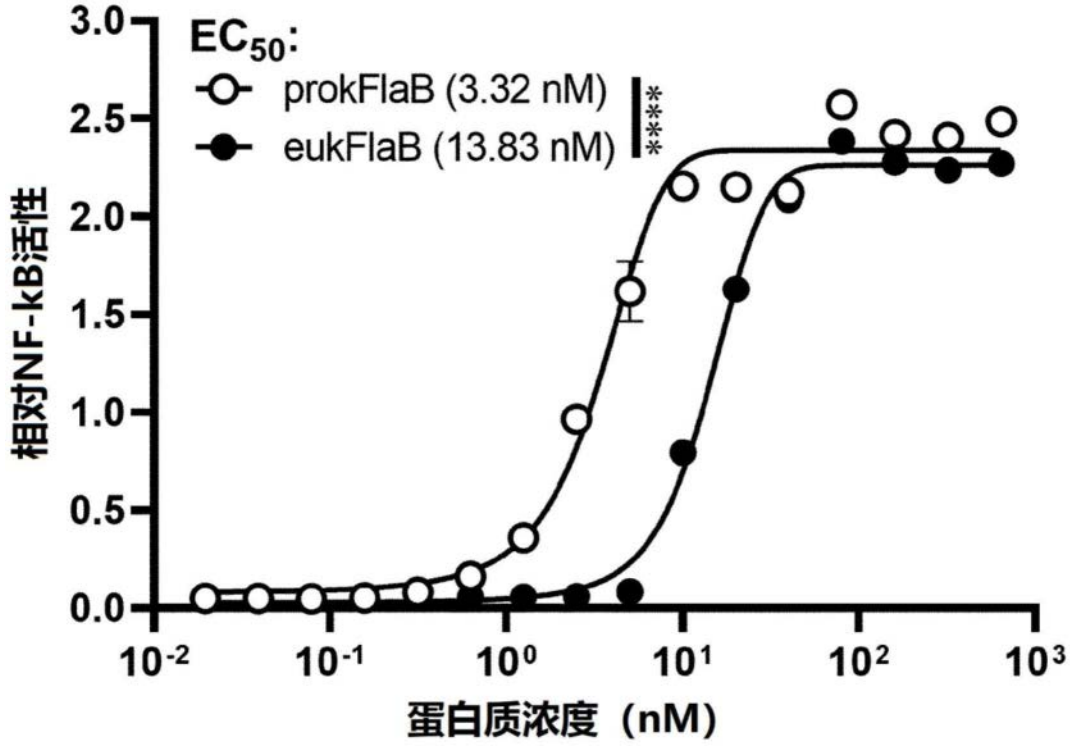

EC50:
prokFlaB (3.32 nM)
eukFlaB (13.83 nM)
****
相对NF-kB活性
蛋白质浓度（nM）
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-2
10-1
100
101
102
103

图2

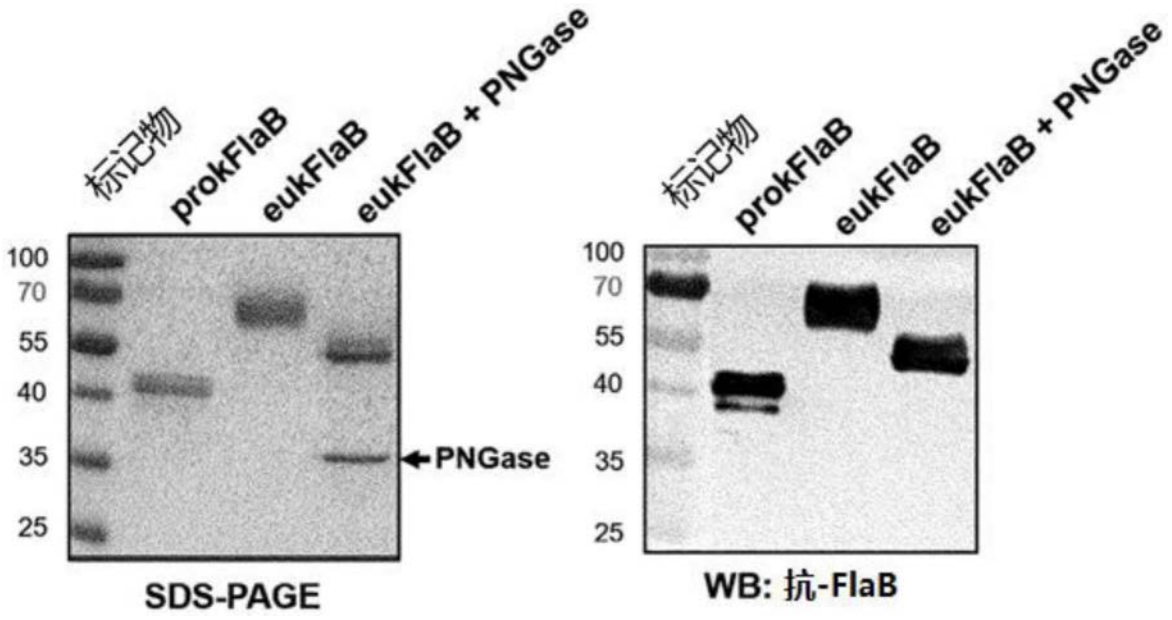

标记物
prokFlaB
eukFlaB
eukFlaB + PNGase
100
70
55
40
35
25
PNGase
SDS-PAGE
WB: 抗-FlaB

图3a

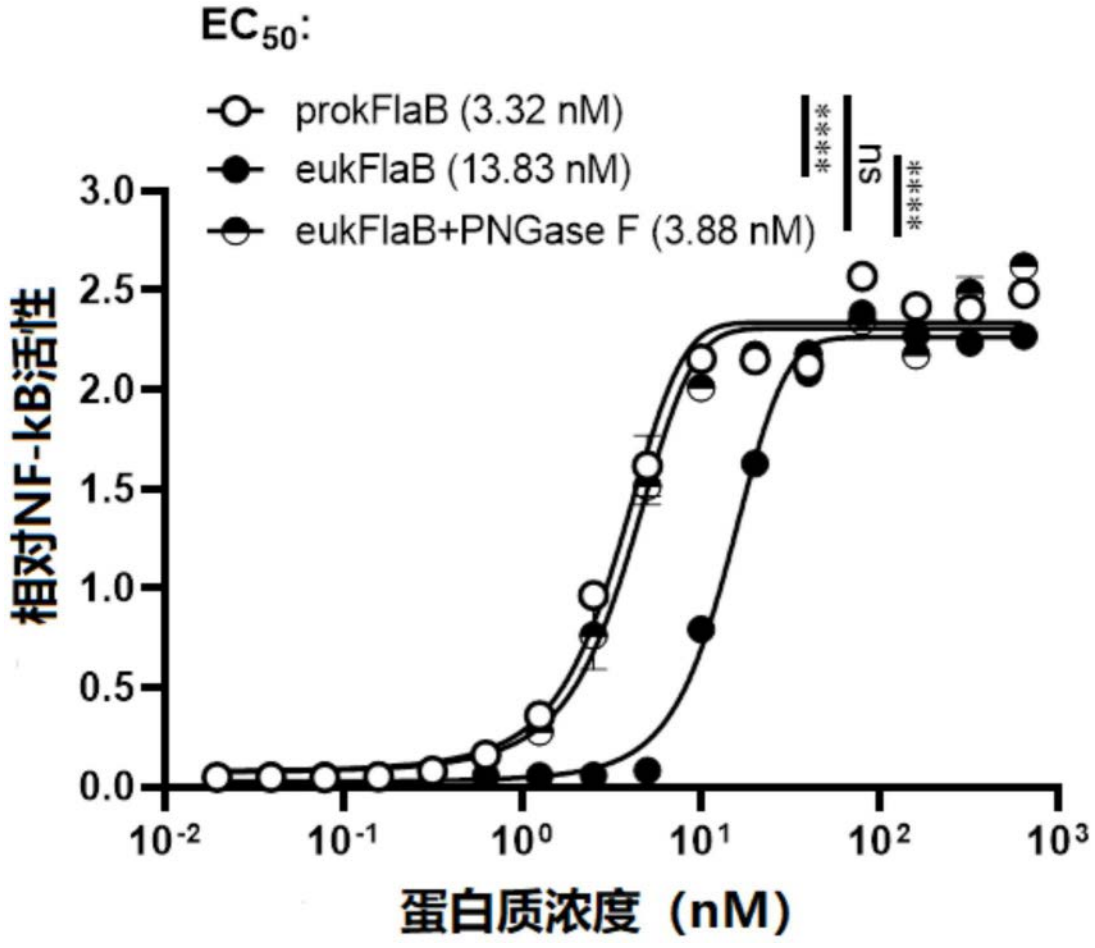
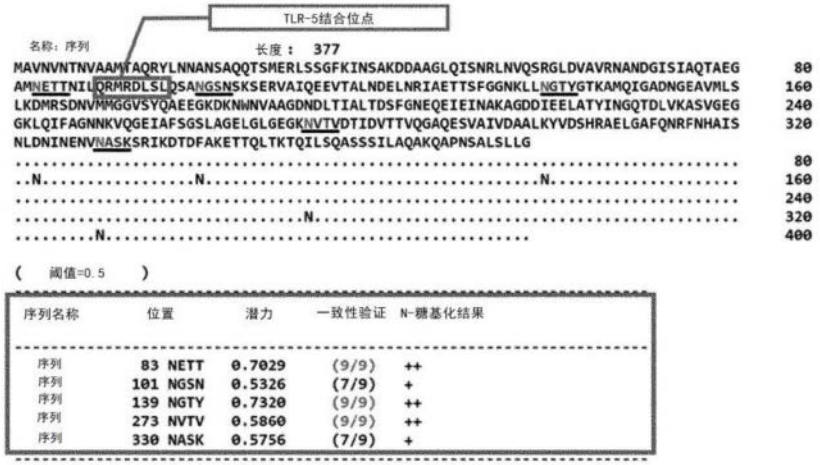

EC50:
prokFlaB (3.32 nM)
eukFlaB (13.83 nM)
eukFlaB+PNGase F (3.88 nM)
****
ns
****
相对NF-kB活性
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-2
10-1
100
101
102
103
蛋白质浓度（nM）

图3b



https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0



https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0

图4

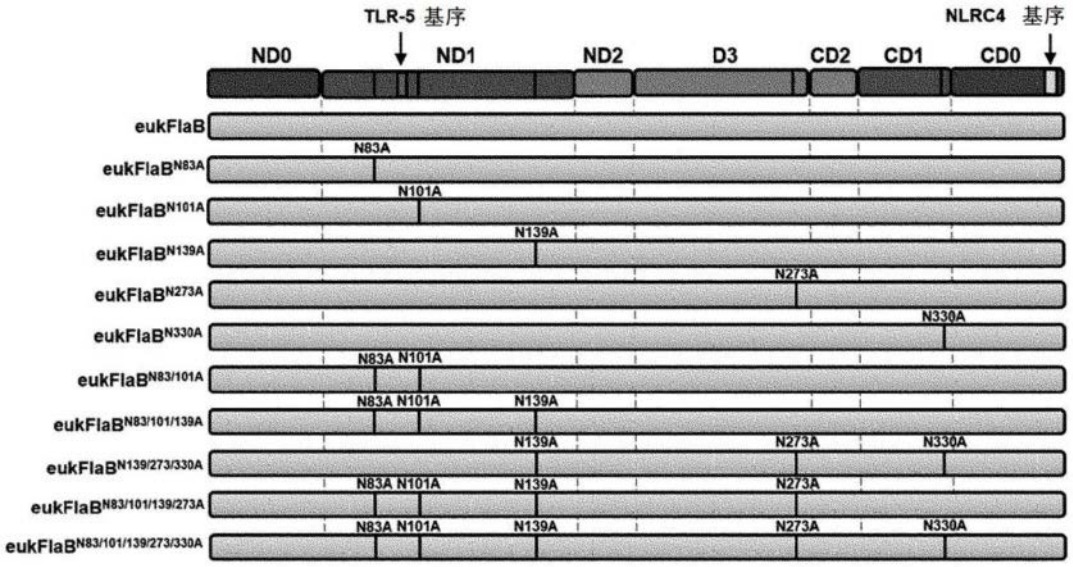


图5

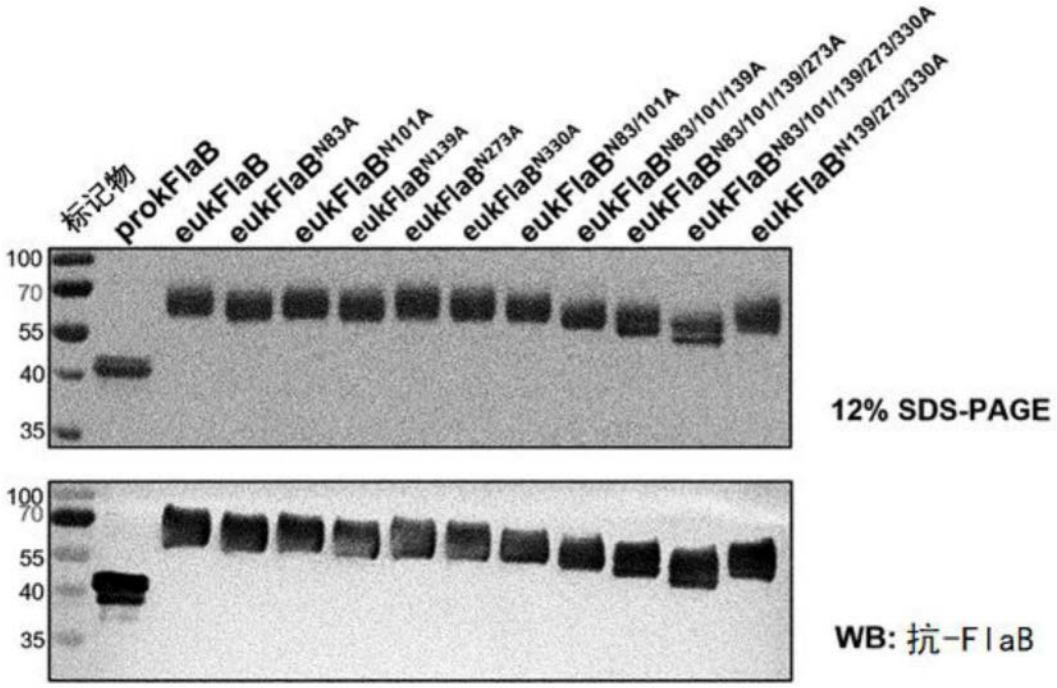

标记物
prokFlaB
eukFlaB
eukFlaB^{N83A}
eukFlaB^{N101A}
eukFlaB^{N139A}
eukFlaB^{N273A}
eukFlaB^{N330A}
eukFlaB$^{N83/101A}$
eukFlaB$^{N83/101/139A}$
eukFlaB$^{N83/101/139/273A}$
eukFlaB$^{N83/101/139/273/330A}$
eukFlaB$^{N139/273/330A}$
100
70
55
40
35
12% SDS-PAGE
WB: 抗-FlaB

图6

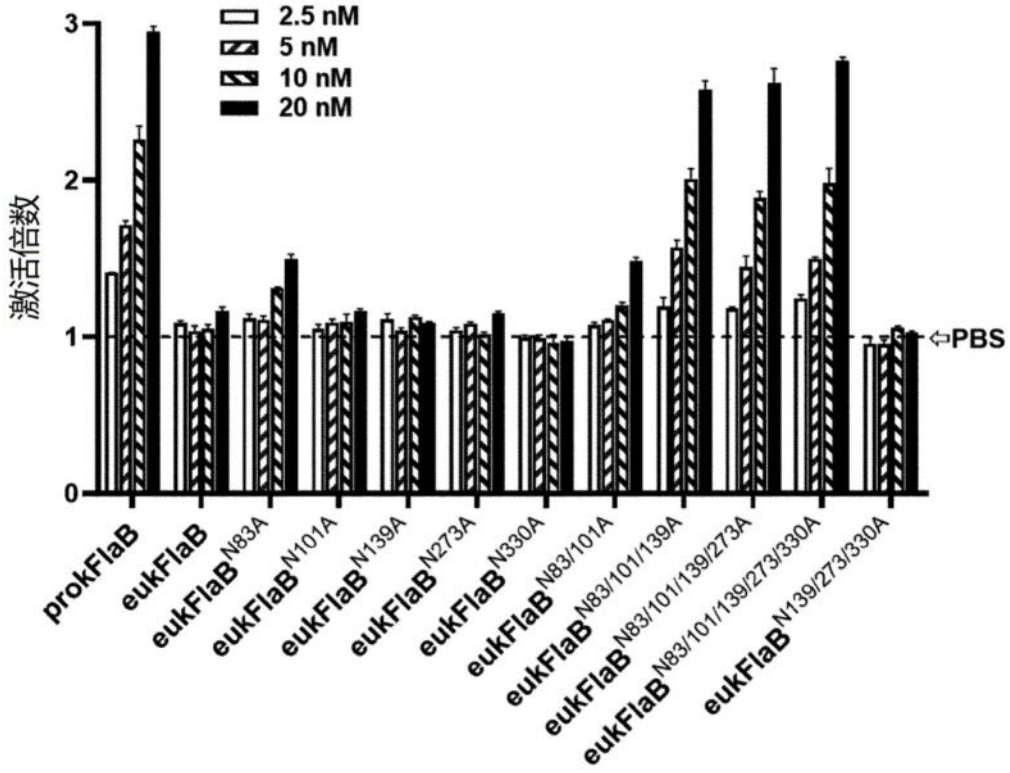

2.5 nM
5 nM
10 nM
20 nM
激活倍数
3
2
1
0
⇦PBS
prokFlaB
eukFlaB
eukFlaB^{N83A}
eukFlaB^{N101A}
eukFlaB^{N139A}
eukFlaB^{N273A}
eukFlaB^{N330A}
eukFlaB$^{N83/101A}$
eukFlaB$^{N83/101/139A}$
eukFlaB$^{N83/101/139/273A}$
eukFlaB$^{N83/101/139/273/330A}$
eukFlaB$^{N139/273/330A}$

图7

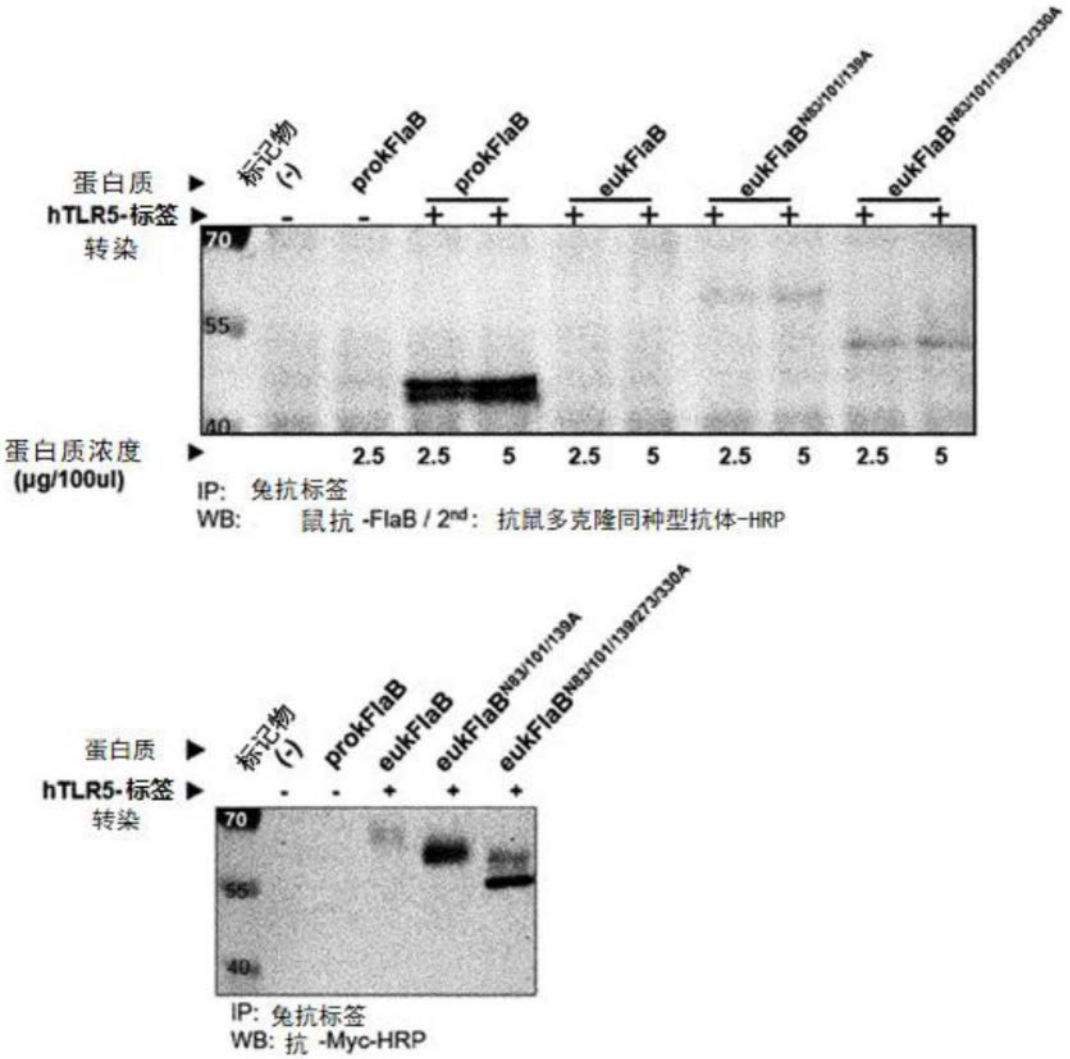

蛋白质
hTLR5-标签
转染
标记物 (-)
prokFlaB
prokFlaB
eukFlaB
eukFlaB$^{N83/101/139A}$
eukFlaB$^{N83/101/139/273/330A}$
70
55
40
蛋白质浓度 (μg/100ul)
2.5 2.5 5 2.5 5 2.5 5 2.5 5
IP: 兔抗标签
WB: 鼠抗 -FlaB / 2nd: 抗鼠多克隆同种型抗体-HRP
蛋白质
hTLR5-标签
转染
标记物 (-)
prokFlaB
eukFlaB
eukFlaB$^{N83/101/139A}$
eukFlaB$^{N83/101/139/273/330A}$
70
55
40
IP: 兔抗标签
WB: 抗 -Myc-HRP

图8

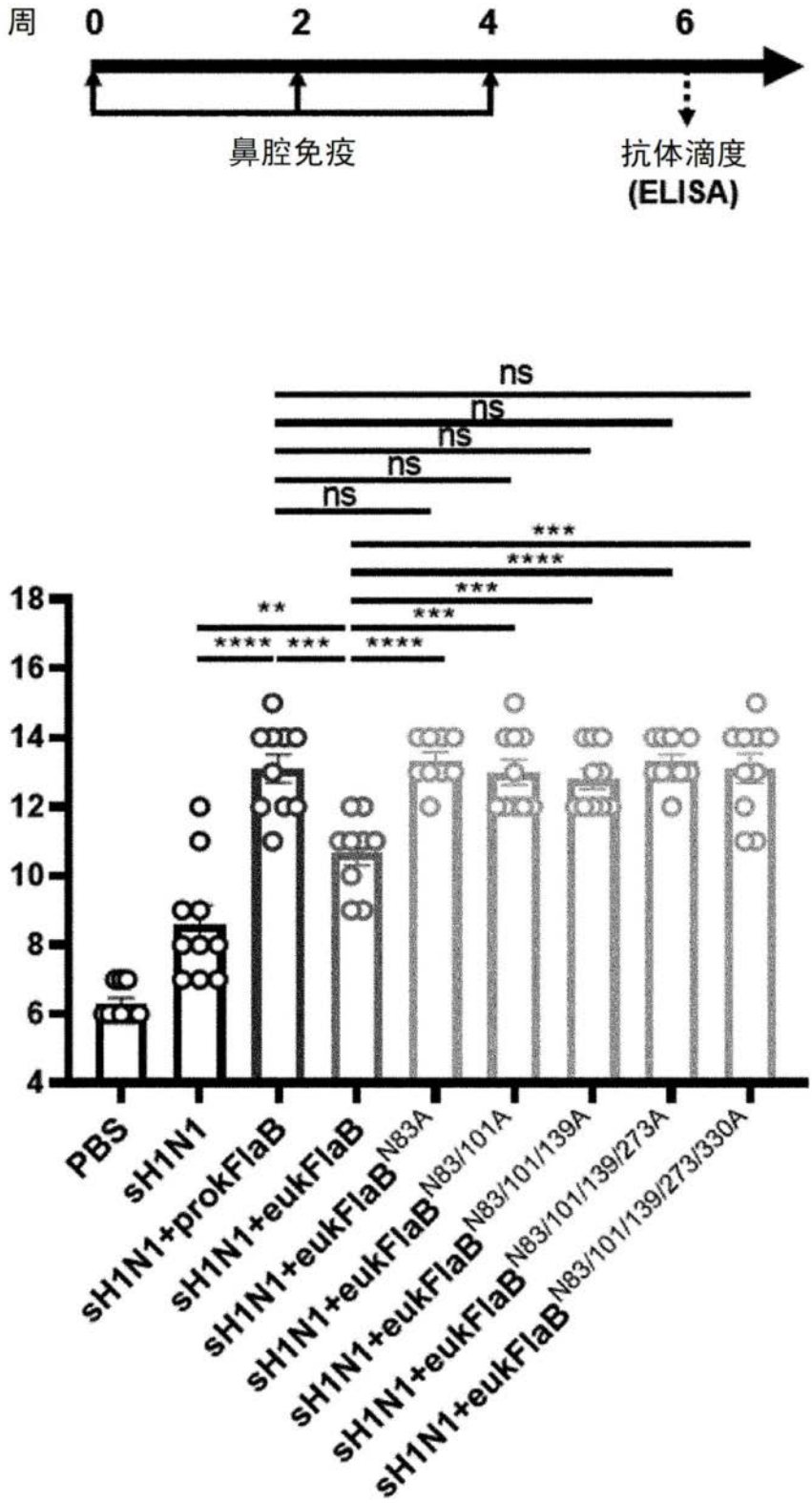

周
0
2
4
6
鼻腔免疫
抗体滴度
(ELISA)
ns
ns
ns
ns
ns
***
****
***
***
**
****
***
****
Sh1N1特异性血清IgG
（log2滴度的倒数）
18
16
14
12
10
8
6
4
PBS
sH1N1
sH1N1+prokFlaB
sH1N1+eukFlaB
sH1N1+eukFlaB N83A
sH1N1+eukFlaB N83/101A
sH1N1+eukFlaB N83/101/139A
sH1N1+eukFlaB N83/101/139/273A
sH1N1+eukFlaB N83/101/139/273/330A

图9

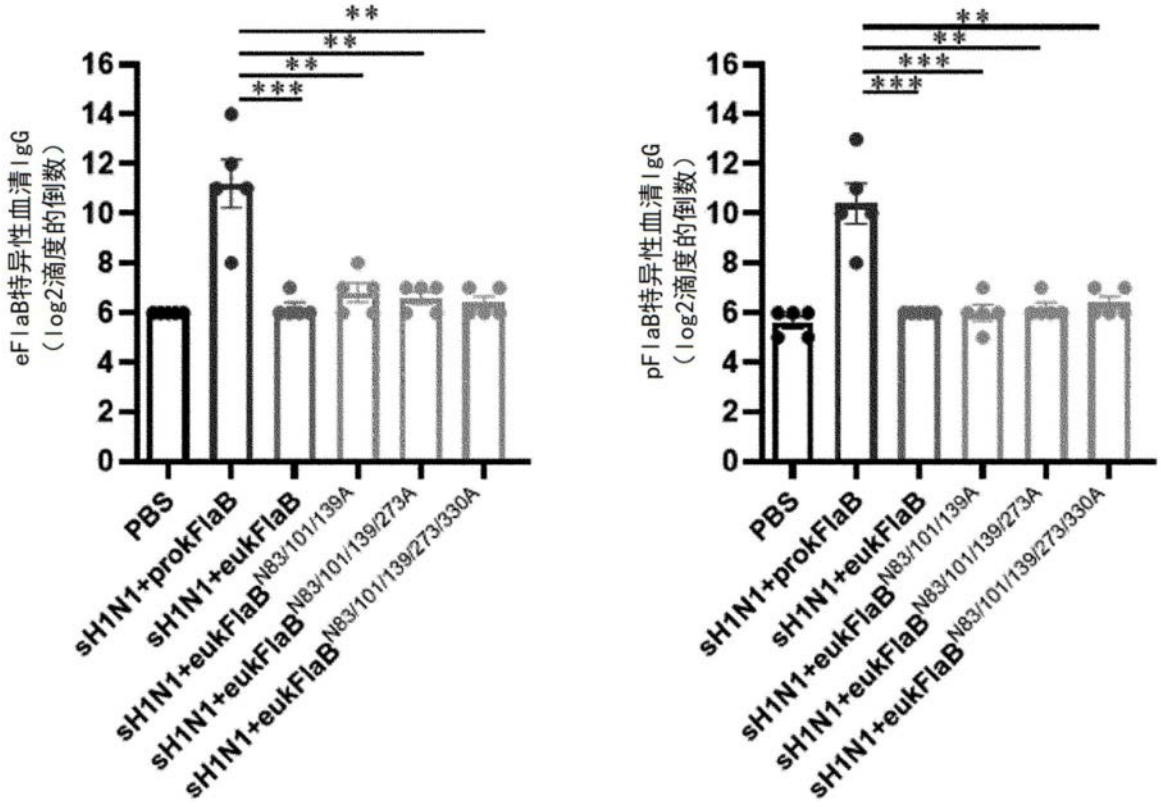

eFlaB特异性血清IgG
（log2滴度的倒数）
16
14
12
10
8
6
4
2
0
**
**
**
***
PBS
sH1N1+prokFlaB
sH1N1+eukFlaB
sH1N1+eukFlaB N83/101/139A
sH1N1+eukFlaB N83/101/139/273A
sH1N1+eukFlaB N83/101/139/273/330A
pFlaB特异性血清IgG
（log2滴度的倒数）
16
14
12
10
8
6
4
2
0
**
**
***
***
PBS
sH1N1+prokFlaB
sH1N1+eukFlaB
sH1N1+eukFlaB N83/101/139A
sH1N1+eukFlaB N83/101/139/273A
sH1N1+eukFlaB N83/101/139/273/330A

图10

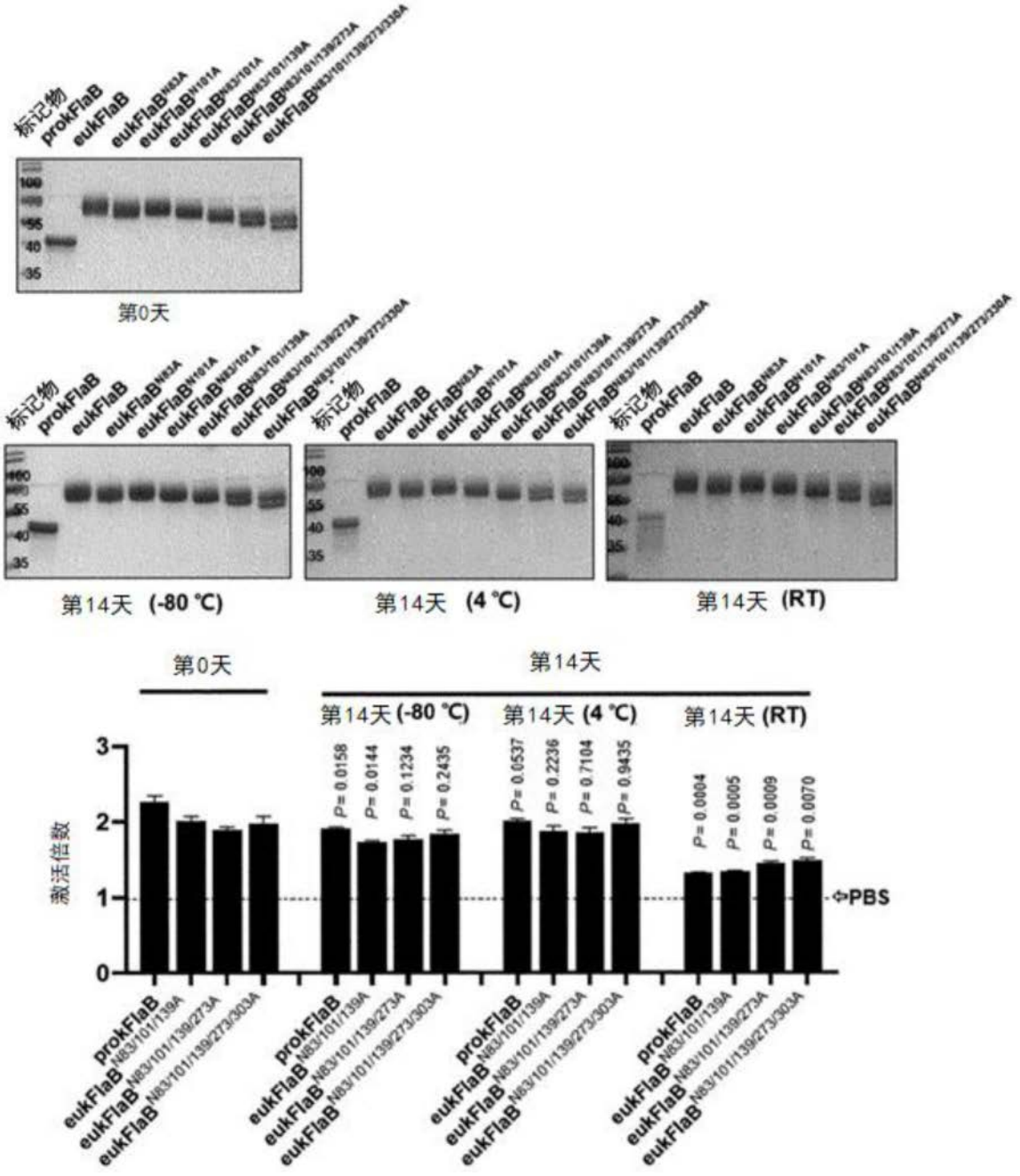

标记物
prokFlaB
eukFlaB
eukFlaB^N83A
eukFlaB^N101A
eukFlaB^N83/101A
eukFlaB^N83/101/139A
eukFlaB^N83/101/139/273A
eukFlaB^N83/101/139/273/303A
100
55
40
35
第0天
第14天 (-80 ℃)
第14天 (4 ℃)
第14天 (RT)
激活倍数
3
2
1
0
P= 0.0158
P= 0.0144
P= 0.1234
P= 0.2435
P= 0.6537
P= 0.2236
P= 0.7104
P= 0.9435
P= 0.0004
P= 0.0005
P= 0.0009
P= 0.0070
PBS

图11