



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101357944 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 30

(21) 申请号 200810157075. 5

(22) 申请日 2008. 09. 23

(73) 专利权人 南京医科大学

地址 210029 江苏省南京市鼓楼区汉中路
140 号(72) 发明人 冯振卿 许静 朱晓娟 顾春燕
李红 管晓虹

(74) 专利代理机构 南京君陶专利商标代理有限公司 32215

代理人 奚胜元

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 33/12 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101240452 A, 2008. 08. 13, 全文.

宋晓彤等. 日本血吸虫单克隆抗独特型抗体 NP30 重链可变区基因的体外扩增克隆及序列分析. 《中国血吸虫病防治杂志》. 2002, 第 14 卷 (第 1 期), 11-13.

朱进等. 可内化的人源抗 Met 基因工程抗体 Fab 的亲和力成熟与特性分析. 《生物化学与生物物理进展》. 2007, 第 34 卷 (第 1 期), 73-79.

宋晓彤等. 日本血吸虫单克隆抗独特型抗体 NP30 轻链可变区基因的克隆及序列分析. 《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》. 2000, 第 18 卷 (第 5 期), 257-259.

审查员 李晨

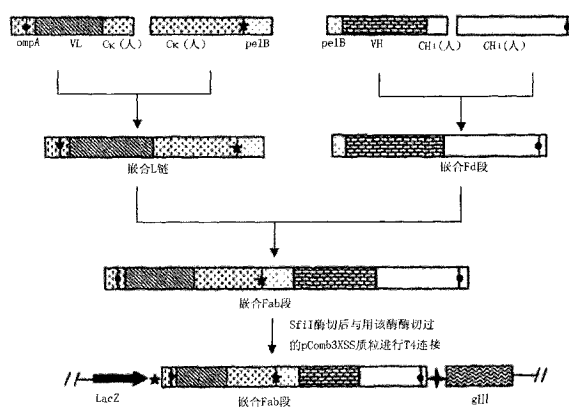
权利要求书 4 页 说明书 23 页 附图 2 页

(54) 发明名称

血吸虫抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 抗体片段
及制备方法、应用

(57) 摘要

本发明涉及的是一种血吸虫抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 抗体片段及制备方法、应用,属于基因工程技术和制备免疫治疗药物领域。本发明是利用基因工程技术制备鼠源性血吸虫抗独特型抗体 NP30 的嵌合 Fab 片段,即将鼠源性抗独特型抗体的重链和轻链可变区与人 IgG1 的重链部分恒定区 (CH1) 及轻链恒定区 (C_κ) 进行重组,并插入到原核表达载体 pComb3XSS 中,进行表达。该嵌合 Fab 抗体片段保留了鼠源性抗独特型抗体的模拟抗原性及特异性,可用于血吸虫病免疫保护及急性血吸虫病的治疗。



1. 一种日本血吸虫抗独特型抗体 NP30 的嵌合 Fab 抗体,即鼠源性抗独特型抗体 NP30 的重链和轻链可变区与人 IgG₁ 的重链部分恒定区 CH₁ 及轻链恒定区 C_κ 进行重组形成的融合蛋白;鼠源性抗体 NP30 的轻链可变区与人 IgG₁ 的轻链恒定区 C_κ 重组的嵌合 L 链及鼠源性抗体 NP30 的重链可变区 VH 与人 IgG₁ 的 CH₁ 重组的嵌合 Fd 段,两者中间通过前导序列 pe1B 连接,嵌合 Fd 段、L 链分泌到细菌周质腔时前导序列 pe1B 被剪切,两者通过链间二硫键连接构成嵌合 Fab 抗体;嵌合 L 链的氨基酸序列为:

Glu Asn Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr MetThr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Val Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Ser SerPro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser GlySer Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala ThrTyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu LeuLys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys SerGly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln TrpLys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser LysAsp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His LysVal Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn ArgGly Glu Cys;

嵌合 Fd 段的氨基酸序列为:

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Arg Ile SerCys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro GlyLys Gly Leu Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu AspPhe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile SerAsn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Arg Asp Tyr Ala Met AspTyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val PhePro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val LysAsp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val HisThr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val ProSer Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys ValAsp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln His His HisHis His His Gly Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser。

2. 权利要求 1 所述的嵌合 Fab 抗体的制备方法,该抗体片段是利用基因工程技术制备,具体方法如下:

1) 抗体可变区的基因扩增及验证:

鼠源性抗独特型抗体 NP30 杂交瘤细胞培养至对数生长期,Trizol- 氯仿 - 异丙醇法抽提细胞总 RNA;以总 RNA 中的 mRNA 为模板,以 oligodT₁₅ 为引物,反转录扩增获得单链 cDNA,设计鼠源性抗独特型抗体 NP30 的重链可变区 VH、轻链可变区 VL 的扩增引物,分别扩增 VH、VL 片段,轻链可变区 VL 的上游引物为 VLF:5' -GGGCCCAGGCGGCCGAGAATCTGCTCACCCAGTCTC C-3',下游引物为 VLR:5' -GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTTCGTTTCAGTTCCAGCTTGGTCC-3',

在 VLF 的 5' 端引入了 SfiI 的酶切识别位点即下划线部分序列, VLR 的 5' 端引入了与人 IgG₁ 的 C_κ 上游引物 5' 端互补的 24 个碱基即斜体部分序列; 重链可变区 VH 的上游引物为 VHF: 5' - *GCTGCCCCAACCAGCCATGGCC* AGGTACAGCTGGTGGAGTCTG-3', 下游引物为 VHR: 5' - *CGATGGGGCCCTTGGTGGAGGC* TGAGGAGACAGTGA CTGTGG-3', 在 VHF 的 5' 端引入了和人 IgG₁ 的 C_κ 下游引物互补的 21 个碱基序列即斜体部分序列, VHR 的 5' 端引入了和人 IgG₁ 的 CH₁ 上游引物互补的 21 个碱基序列, 即斜体部分:

分别以反转录扩增的 cDNA 为模板,用引物 VHF、VHR 扩增鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VH 片段,用引物 VLF、VLR 扩增鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VL 片段;扩增条件均为 95℃ 4 分钟;95℃ 30 秒,56℃ 30 秒,72℃ 30 秒,30 个循环;72℃ 延伸 10 分钟,琼脂糖凝胶电泳,胶回收纯化扩增基因片段,胶回收产物分别与 pMD-18T 进行 TA 连接,然后转化大肠杆菌 XL1-Blue,筛选 PCR 扩增出大小正确条带的菌液送生物公司进行测序,序列完全正确,抽提含有正确插入序列的重组质粒;

2) 嵌合 Fab 片段的基因扩增:

(1) 人 IgG₁ 抗体的 CH₁ 和 C_K 段的扩增:

以质粒 pComb3XTT 为模板, 分别扩增人 IgG₁ 抗体的 CH₁ 和 Cκ 核苷酸片段; Cκ 段的上游引物为 Cκ F: 5' -CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC-3', 下游引物为 Cκ R: 5' -GGCCATGGCTGGTTGGGCAGC-3'; CH₁ 的上游引物为 CH₁ F: 5' -GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGC-3', 下游引物为 CH₁ R: AGAAGCGTAGTCCGGAACGTC-3'; 扩增条件均为 95℃ 4 分钟; 95℃ 30 秒, 56℃ 30 秒, 72℃ 30 秒, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 分钟, 琼脂糖凝胶电泳, 分别扩增出约 420bp、387bp 的条带, 胶回收纯化扩增条带, 溶于去离子水内, -20℃ 冻存储备用;

(2) 嵌合 Fd 段和 L 链的基因扩增:

以鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VL 及人 IgG₁ 抗体的 C_κ 的胶回收纯化扩增产物为模板, 用上游引物 LF : 5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGAATCTG-3' 和下游引物 LR : 5' -GGCCATGGCTGTTGGGCAGC-3' 进行重叠 PCR 扩增嵌合 L 链 ; 以鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VH 及人 IgG₁ 抗体的 CH₁ 的胶回收纯化扩增产物为模板, 用上游引物 FdF : 5' -GCTGCCCAACCAGCCATGGCC-3' 和下游引物 FdR : 5' -AGAAGCGTAGTCCGAAC GTC-3' 进行重叠 PCR 扩增嵌合 Fd 片段, 扩增条件为 95℃ 4 分钟 ; 95℃ 30 秒, 56℃ 30 秒, 72℃ 30 秒, 30 个循环 ; 72℃ 延伸 10 分钟, 琼脂糖凝胶电泳, 分别扩增出约 773bp、738bp 的条带, 胶回收扩增条带, 溶于去离子水内, -20℃ 冻存备用 ;

(3) 嵌合 Fab 片段的基因扩增:

以扩增获得的嵌合 Fd 段和 L 链核苷酸序列的胶回收纯化产物为模板,用上游引物 FabF: 5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGAATCTG-3' 和下游引物 FabR: 5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGAGAAGCGTAGTCCGAACGTC-3' 进行重叠延伸 PCR 扩增,扩增时,先不加引物,95℃ 4 分钟;94℃ 30 秒、45℃ 30 秒、72℃ 90 秒,8 个循环;而后加入 FabF、FabR 引物后 94℃ 30 秒、56℃ 30 秒、72℃ 90 秒,22 个循环;72℃ 延伸 10 分钟,琼脂糖凝胶电泳扩增出约 1.5kb 的条带,胶回收纯化扩增条带,溶于去离子水内,-20℃冻存备用;3) 嵌合 Fab 片段原核表达载体的构建和鉴定;

pComb3XSS 质粒、Fab 胶回收纯化片段分别用 SfiI 限制性内切酶在 50℃ 酶切 12-16h,

电泳后胶回收酶切的质粒大片段,溶于去离子水中, pComb3XSS 质粒、Fab 酶切产物在同一离心管内用 T4 连接酶 16 度连接 12-16h;

将连接产物转化感受态大肠杆菌 TOP10F', 涂布含氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/ml 的 LB 平板,置 37°C 12-16h,次日随机挑取转化菌及空质粒转化对照菌,37°C 摇菌 5 小时后,分别用 Fab 的特异引物对菌液进行 PCR 扩增鉴定,含有插入 Fab 片段质粒的菌株扩增出一条约 1.5kb 的条带;提取含嵌合 Fab 片段核苷酸序列的质粒进行 DNA 序列分析,证实在重组质粒中含有构建的嵌合 Fab 片段,序列完全正确,其中横线部分为前导序列 pe1B,方框内 TAA、TAG 分别为嵌合 L 链、Fd 段翻译终止密码子:

GAG AAT CTG CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC
 ACCATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTT AGT TAC GTT TAC TGG TAC CTG CAG AAG CCA
 GGATCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT
 CGCTTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT
 GAAGAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG
 GGGACC AAG CTG GAA CTG AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA
 TCTGAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
 CCCAGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG
 GAGAGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG
 CTGAGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC
 CTGAGT TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAA TTC TAG ATA ATT AAT
 TAGGAG GAA TTT AAA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC
GCTGCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG GTG GAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG
 CCTGGA GAG ACA GTC AGG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA ACT GCT GGA
 ATGCAG TGG GTG CAA AAG ATG CCA GGA AAG GGT TTG AAG TGG ATT GGC TGG ATA AAC ACC
 CACTCT GGA GTG CCA AAA TAT GCA GAA GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA
 ACCTCT GCC AGC ACT GCA TAT TTA CAG ATA AGC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACG
 TATTTT TGT GCG AGA TCA AGG GAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC ACA GTC
 ACTGTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG
 AGCACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG
 GTGACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC
 CTACAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG
 GGCACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG
 AAAGCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT AGT GGC CAG GCC GGC CAG CAC CAT CAC CAT
 CACCAT GGC GCA TAC CCG TAC GAC GTT CCG GAC TAC GCT TCT TAG

构建的重组质粒表达嵌合的 L 链及 Fd 段重组的嵌合 Fab 抗体片段,两者之间有前导肽 pe1B 的 22 个氨基酸连接,这 22 个氨基酸在嵌合 Fab 片段分泌至细菌周质腔时被剪切,嵌合 L 链和 Fd 段通过链间二硫键连接;

4) 表达嵌合 Fab 细菌的筛选鉴定及表达蛋白的纯化

将含有正确重组质粒的菌液按 1 : 100 转入 2ml SB 溶液中,氨苄青霉素工作浓度为

100 μ g/ml, 葡萄糖终浓度为 4%, 37°C 摇菌过夜; 过夜的细菌 10000g 离心 15 分钟, 弃去上清液, 而后用 2ml SB 重悬, 将重悬后的菌液按 1 : 100 转入 2ml 含氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/ml 的 SB 培养基中, 37°C 培养 OD600 = 1.0 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 蔗糖终浓度至 4%, 23°C 振荡培养 20h, 离心收集菌体, 分别处理培养上清、菌体超声上清及超声沉淀, 进行 SDS-PAGE 及 western-blot 检测, 嵌合 Fab 片段在培养上清、菌体超声上清及超声沉淀中均有表达, 其中可溶性蛋白主要是在菌体超声上清中, Fd 段分子量约为 30KD, L 链分子量约为 26KD, 而对照菌 TOP10F' 中无目的蛋白条带;

大量诱导培养的菌液, 10000g 离心 15 分钟, 弃培养上清, 沉淀中加入原菌液 1/10 体积的 20mM 磷酸盐平衡缓冲液, 其中 NaCl 终浓度为 0.5M/L, 咪唑终浓度为 20mM/L, 将细菌重悬后进行超声, 超 10 秒, 停 10 秒, 共超 90 次, 而后 4°C 12000rpm 离心 30 分钟, 超声上清用 0.22 μ m 滤膜过滤, 然后用 5ml Histrap HP 柱子在 Akta 系统上进行纯化, 用 5 倍柱体积的水以 2.5ml/min 的速度洗柱子, 而后用至少 10 倍柱体积的平衡缓冲液平衡柱子, 然后以 2ml/min 的速度上样, 平衡缓冲液平衡镍柱至基线, 分别用 5 倍柱体积的含 50mM、100mM、200mM、300mM、500mM, 1M 咪唑的缓冲液洗柱子, 并收集相应浓度咪唑的洗脱蛋白, 用 12% SDS-PAGE 检测, 结果 200mM 咪唑的洗脱液中 Fab 蛋白最纯, 将 200mM 咪唑的洗脱液用 10KD 的超滤管除盐浓缩, 即获得纯化的嵌合 Fab。

3. 权利要求 1 所述的嵌合 Fab 抗体在制备检测血吸虫抗体或血吸虫病免疫保护及免疫治疗药物中的应用。

血吸虫抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 抗体片段及制备方法、应用

技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种血吸虫抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 抗体片段及制备方法、应用,是利用基因重组技术,对血吸虫抗独特型抗体 NP30 进行改造,将鼠源性抗体的可变区与人 IgG₁ 的 CH₁、C_κ 重组,以降低抗独特型抗体的鼠源性成分,用于血吸虫病的免疫保护及急性血吸虫病的治疗等,本发明涉及基因工程技术和制备免疫治疗药物领域。

背景技术

[0002] 血吸虫病是继疟疾之后的全球第二大寄生虫病,据统计,全球有 76 个国家 6 亿左右的人口受血吸虫感染威胁,约有 2 亿人感染血吸虫,全球每年估计至少有 20 万人死于血吸虫病,寄生于人体的血吸虫主要有日本血吸虫,埃及血吸虫和曼氏血吸虫三种。流行于我国的日本血吸虫寄生于人体引起的疾病,称为日本血吸虫病。

[0003] 自 1984 年 WHO 提出“以疾病控制代替以往的传播阻断”新的防治策略以来,建议血吸虫病防治策略应着眼于人及人的行为,采用以大规模和反复化疗为主的防治措施。安全有效、价格低廉的吡喹酮的问世使得大规模的化疗成为可能。1992-2001 年,世行贷款中国血吸虫病控制项目中,执行以化疗为主的干预措施。随后的血吸虫病防治规划中,化学药物治疗已成为传染源控制的一个常规措施。大规模的化疗及灭螺、环境改造等综合措施的实施使得我国血吸虫病防治取得了显著的成果。但近几年来,由于生物、自然和社会、经济等因素变化较大,我国血吸虫病疫情回升显著,表现为血吸虫病患者人数增多,急性感染人数呈上升趋势,局部地区钉螺扩散明显,感染性钉螺分布范围逐渐扩大,部分已经达到传播控制标准和传播阻断标准的地区疫情严重回升。

[0004] 吡喹酮,是目前唯一一种可用于治疗埃及血吸虫(最常见的种类)、日本血吸虫、湄公血吸虫和间插血吸虫以及所谓的次要血吸虫感染的药物。对于曼氏血吸虫感染的治疗,奥沙尼喹虽然商业上可提供,但是昂贵的价格限制了它的使用,而且不易获得。因此,吡喹酮实际上是 2 亿血吸虫感染者唯一可用的药物。理论和实践都强烈提示,任何抗感染化合物实际上不可避免的都会有药物抵抗现象。如果抗性降低了吡喹酮的有效性,开发一个适当的代替药物将要花上几年的时间。考虑到每年需要使用几百万剂吡喹酮,这就提高了抗药性发生的危险。因此,迫切需要寻找开发新的抗血吸虫药物。随着现代生物技术的迅猛发展,运用功能基因组学、蛋白质组学、生物信息学等现代生化与分子生物学技术,结合基因工程、蛋白质工程、细胞工程等技术,使得生物技术药物研发高潮迭起。治疗性抗体成热点抗体药物是以细胞工程技术和基因工程技术为主体的抗体工程技术制备的药物,其在感染、心血管疾病、自身免疫性疾病、肿瘤治疗中有巨大的潜力与应用前景。当前,治疗性抗体药物研发已成为生物技术药物领域的热点,而抗体药物作用靶点的选择性、抗体药物的人源化、小型化和高效化也是今后的研究重点。

[0005] Olds 根据抗独特型抗体的免疫调节作用,将抗独特型抗体用于曼氏血吸虫急性感染的治疗,研究结果表明抗独特型抗体可降低急性虫卵肉芽肿反应和急性血吸虫感染的

死亡率,提示抗独特型抗体有可能用于急性血吸虫感染的治疗。NP30 为我室管晓虹教授等建立的一株日本血吸虫抗独特型抗体,为肠相关抗原 (GAA) 的内影像抗独特型抗体,其抗体同型为 IgM。对 NP30 的一系列研究表明 NP30 对虫卵肉芽肿的形成具有致敏作用,对感染宿主 (昆明种小鼠、C57BL/6 小鼠和山羊) 具有较好的免疫保护作用 (减虫率分别为 50.46%、41.67%、42.78%);用 NP30 主动免疫小鼠具有抗雌虫生殖产卵和抗卵胚发育的双重功效,另外还对血吸虫病肉芽肿和肝纤维化有明显的负调节作用。结果表明 NP30 抗独特型抗体是一个非常具有应用前景的免疫保护及治疗用抗体分子。但由于 NP30 抗独特型抗体为鼠源性单克隆抗体,其自身携带的免疫原性使得作用于人体时可能会引起人抗鼠免疫反应 (HAMA) 和过敏反应,且在人体血清中半衰期很短,易于被清除,这就限制了 NP30 的体内研究。

发明内容

[0006] 本发明目的是针对述不足之处提供一种血吸虫抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 抗体片段及制备方法、应用利用基因重组技术对一株鼠源性的血吸虫抗独特型抗体 NP30 进行改造,即将鼠源性单克隆抗体 NP30 的重链可变区、轻链可变区分别和人 IgG₁ 抗体的 CH₁ 和 C_κ 片段重组,再通过重叠延伸 PCR 扩增到一个全长为 1.5kb 左右的 NP30 嵌合 Fab 抗体片段的核苷酸片段。嵌合 Fab 抗体片段的核苷酸片段和原核表达质粒 pComb3XSS 分别用 SfiI 限制性内切酶酶切后进行连接,构建嵌合 Fab 片段的原核表达载体,转入大肠杆菌 TOP10F' 后诱导表达嵌合的 Fab 抗体片段,其中嵌合 Fd 段分子量约为 30KD,嵌合 L 链分子量约为 26KD,两者通过链间二硫键连接组成嵌合的 Fab 抗体片段。该蛋白保持了鼠源性 NP30 的抗原特异性,可用于血吸虫病免疫保护及急性血吸虫病的治疗。

[0007] 血吸虫抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 抗体片段及制备方法是采取以下方案实现:

[0008] 日本血吸虫抗独特型抗体 NP30 的嵌合 Fab 抗体片段,即鼠源性抗独特型抗体 NP30 的重链和轻链可变区与人 IgG₁ 的重链部分恒定区 (CH₁) 及轻链恒定区 (C_κ) 进行重组形成的融合蛋白;鼠源性抗体 NP30 的轻链可变区与人 IgG₁ 的轻链恒定区 C_κ 重组的嵌合 L 链及鼠源性抗体 NP30 的重链可变区 VH 与人 IgG₁ 的 CH₁ 重组的嵌合 Fd 段,两者中间通过前导序列 pelB 连接,嵌合 Fd 段、L 链分泌到细菌周质腔时前导序列 pelB 被剪切,两者通过链间二硫键连接构成嵌合 Fab 抗体片段;嵌合 L 链的氨基酸序列为:

[0009] Glu Asn Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met

[0010] Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Val Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Ser Ser

[0011] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly

[0012] Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr

[0013] Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu

[0014] Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

Leu Lys Ser

[0015] Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp

[0016] Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys

[0017] Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser LysAla Asp Tyr Glu Lys His Lys

[0018] Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg

[0019] Gly Glu Cys ;

[0020] 嵌合 Fd 段的氨基酸序列为：

[0021] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Arg Ile Ser

[0022] Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly

[0023] Lys Gly Leu Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp

[0024] Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser

[0025] Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Arg Asp Tyr Ala Met Asp

[0026] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

[0027] Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

[0028] Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

[0029] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

[0030] Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys

[0031] Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln His His

[0032] His His His His Gly Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser。

[0033] 应用抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 片段的制备方法采取如下方法和步骤实现：

[0034] 1) 抗体可变区基因片段的扩增及验证：

[0035] 鼠源性抗独特型抗体 NP30 杂交瘤细胞培养至对数生长期, Trizol- 氯仿 - 异丙醇法抽提细胞总 RNA ; 以总 RNA 中的 mRNA 为模板, 以 oligodT₁₅ 为引物, 反转录扩增获得单链 cDNA。

[0036] 设计鼠源性抗独特型抗体 NP30 的重链可变区 (VH)、轻链可变区 (VL) 的扩增引物,分别扩增 VH、VL 片段,轻链可变区 (VL) 的上游引物为 VLF:5' -GGGCCAGGCGG CCGAGAATCTGCTCACCCAGTCTCC-3',下游引物为 VLR:5' -GAAGACAGATGGTGCAGCCACAG TTCGTTTCAGTTCCAGCTTGGTCC-3',在 VLF 的 5' 端引入了 SfiI 的酶切识别位点即下划线部分序列,VLR 的 5' 端引入了与人 IgG₁ 的 C_κ 上游引物 5' 端互补的 24 个碱基即斜体部分序列,以利于 NP30 的 VL 与人 IgG₁ 的 C_κ 片段的重叠 PCR 扩增;重链可变区 (VH) 的上游引物为 VHF:5' -GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGGTACAGCTGGTGGAGTCTG-3',下游引物为 VHR:5' -CGATGGGCCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACAGTGAAGTGTGG-3',在 VHF 的 5' 端引入了和人 IgG₁ 的 C_κ 下游引物互补的 21 个碱基序列即斜体部分序列,VHR 的 5' 端引入了和人 IgG₁ 的 CH₁ 上游引物互补的 21 个碱基序列,即斜体部分,以利于 NP30 的 VH 与人 IgG₁ 的 CH₁ 片段的重叠 PCR 扩增。

[0037] 分别以反转录扩增的 cDNA 为模板,用引物 VHF、VHR 扩增鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VH 基因片段,用引物 VLF、VLR 扩增鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VL 基因片段。扩增条件均为 95℃ 4 分钟;95℃ 30 秒、56℃ 30 秒、72℃ 30 秒,30 个循环;72℃ 延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳,胶回收纯化扩增基因片段,VH、VL PCR 胶回收纯化产物分别与 pMD-18T 载体进行 TA 连接。连接产物转化大肠杆菌 XL1-Blue,涂布含氨苄青霉素 (100 μg/ml)、四环素 (30 μg/ml) 的 LB 平板,置 37℃ 12-16h。次日随机挑取转化菌及空质粒转化对照菌,37℃ 摇菌 5 小时后分别用 VH、VL 基因片段的上下游特异引物对菌液进行 PCR 鉴定,含有插入 VH 基因片段质粒的菌株扩增出一条 393bp 左右的条带,含有插入 VL 基因片段质粒的菌株扩增出一条 359bp 左右的条带。菌液 PCR 验证扩增出大小正确条带的菌液送生物公司进行测序。其中 VL 的核苷酸序列为:

[0038] GAG AAT CTG CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG
GTC ACC ATG

[0039] ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTT AGT TAC GTT TAC TGG TAC CTG CAG AAG CCA
GGA TCC TCC

[0040] CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC
TTC AGT GGC

[0041] AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT
GCT GCC ACT

[0042] TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACC AAG
CTG GAA CTG

[0043] AAA

[0044] VH 的核苷酸序列为:

[0045] CAG GTA CAG CTG GTG GAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC
AGG ATC TCC

[0046] TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA ACT GCT GGA ATG CAG TGG GTG CAA AAG
ATG CCA GGA

[0047] AAG GGT TTG AAG TGG ATT GGC TGG ATA AAC ACC CAC TCT GGA GTG CCA AAA TAT
GCA GAA GAC

[0048] TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCA TAT TTA CAG ATA AGC

[0049] AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACG TAT TTC TGT GCG AGA TCA AGG GAC TAT GCT ATG GAC

[0050] TAC TGG GGT CAA GGA ACC ACA GTC ACT GTC TCC TCA

[0051] 2) 嵌合 Fab 片段的扩增:

[0052] (1) 人 IgG₁ 抗体的 CH₁ 和 C_κ 段的扩增:

[0053] 以质粒 pComb3XTT 为模板, 分别扩增人 IgG₁ 抗体的 C_κ 和 CH₁ 核苷酸片段; C_κ 段的上游引物为 C_κF: 5' -CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC-3', 下游引物为 C_κR: 5' -GGCCATGGCTGGTTGGGCAGC-3'; CH₁ 的上游引物为 CH₁F: 5' -GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC-3', 下游引物为 CH₁R: AGAAGCGTAGTCCGGAACGTC-3'。扩增条件均为 95℃ 4 分钟; 95℃ 30 秒, 56℃ 30 秒, 72℃ 30 秒, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 分钟, 琼脂糖凝胶电泳, 分别扩增出约 420bp、387bp 的条带, 胶回收纯化扩增条带, 溶于去离子水内, -20℃ 冻存备用;

[0054] (2) 嵌合 L 链、Fd 段基因片段的扩增:

[0055] 以鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VL 及人 IgG₁ 抗体的 C_κ 的 PCR 扩增产物为模板, 用上游引物 LF: 5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGAATCTG-3' 和下游引物 LR: 5' -GGCCATGGCTGGTTGGGCAGC-3' 进行重叠延伸 PCR 扩增嵌合 L 链, 扩增条件为 95℃, 4 分钟; 95℃, 30 秒、56℃, 30 秒、72℃, 30 秒, 30 个循环; 72℃, 10 延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳, 扩增出约 773bp 的条带, 胶回收扩增条带, 溶于去离子水内, -20℃ 冻存备用。

[0056] 以鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VH 及人 IgG₁ 抗体的 CH₁ 的 PCR 扩增产物为模板, 用上游引物 FdF: 5' -GCTGCCCAACCAGCCATGGCC-3' 和下游引物 FdR: 5' -AGAAGCGTAGTCCGGAAC GTC-3' 进行重叠延伸 PCR 扩增嵌合 Fd 片段, 扩增条件为 95℃, 4 分钟; 95℃, 30 秒、56℃, 30 秒、72℃, 30 秒, 30 个循环; 72℃, 10 延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳, 扩增出约 738bp 的条带, 胶回收扩增条带, 溶于去离子水内, -20℃ 冻存备用。

[0057] (3) 嵌合 Fab 基因片段的扩增:

[0058] 以扩增获得的嵌合 Fd 段和 L 链核苷酸序列的胶回收纯化产物为模板, 用上游引物 FabF: 5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGAATCTG-3' 和下游引物 FabR: 5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGAGAAGCGTAGTCCGGAACGTC-3' 进行重叠延伸 PCR 扩增, 扩增时, 先不加引物, 95℃ 4 分钟; 94℃ 30 秒、45℃ 30 秒、72℃ 90 秒, 8 个循环; 而后加入 FabF、FabR 引物后 94℃ 30 秒、56℃ 30 秒、72℃ 90 秒, 22 个循环; 72℃ 延伸 10 分钟, 琼脂糖凝胶电泳扩增出约 1.5kb 的条带, 胶回收纯化扩增条带, 溶于去离子水内, -20℃ 冻存备用;

[0059] 3) 嵌合 Fab 原核表达载体的构建和鉴定:

[0060] 提取质粒 pComb3XSS (本室保存), 质粒及 Fab 片段的 PCR 胶回收产物用 SfiI 限制性内切酶在 50℃ 酶切 12-16h, 电泳后胶回收酶切的质粒大片段, 溶于去离子水中。取 pComb3XSS、Fab 扩增产物的酶切产物按 1:4 摩尔比混匀, 在同一离心管内用 T4 连接酶 16℃ 连接 12-16h。

[0061] 将连接产物转化感受态大肠杆菌 TOP10F', 涂布含氨苄青霉素 (100 μg/ml) LB 平板, 置 37℃ 12-16h。次日随机挑取转化菌及空质粒转化对照菌, 37℃ 摇菌 5 小时后, 分别用

Fab 的特异引物对菌液进行 PCR 扩增鉴定,含有插入 Fab 片段质粒的菌株扩增出一条约 1.5kb 左右的条带。菌液 PCR 验证扩增出大小正确条带的菌液送生物公司进行测序,DNA 序列分析证实在重组质粒中含有构建的嵌合 Fab 片段,序列完全正确,其中横线部分为前导序列 pe1B,方框内 TAA、TAG 分别为嵌合 L 链、Fd 段翻译终止密码子:

[0062] GAG AAT CTG CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG
GTC ACC ATG

[0063] ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTT AGT TAC GTT TAC TGG TAC CTG CAG AAG CCA
GGA TCC TCC

[0064] CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC
TTC AGT GGC

[0065] AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAG TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT
GCT GCC ACT

[0066] TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACC AAG
CTG GAA CTG

[0067] AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG
TTG AAA TCT

[0068] GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA
GTA CAG TGG

[0069] AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG
GAC AGC AAG

[0070] GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG
AAA CAC AAA

[0071] GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGT TCG CCC GTC ACA AAG AGC
TTC AAC AGG

[0072] GGA GAG TGT TAA TTC TAG ATA ATT AAT TAG GAG GAA TTT AAA ATG AAA TAC CTA
TTG CCT ACG

[0073] GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG GTA CAG
CTG GTG GAG

[0074] TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AGG ATC TCC TGC AAG GCT
TCT GGG TAT

[0075] ACC TTC ACA ACT GCT GGA ATG CAG TGG GTG CAA AAG ATG CCA GGA AAG GGT TTG
AAG TGG ATT

[0076] GGC TGG ATA AAC ACC CAC TCT GGA GTG CCA AAA TAT GCA GAA GAC TTC AAG GGA
CGG TTT GCC

[0077] TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCA TAT TTA CAG ATA AGC AAC CTC AAA
AAT GAG GAC

[0078] ACG GCT ACG TAT TTC TGT GCG AGA TCA AGG GAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT
CAA GGA ACC

[0079] ACA GTC ACT GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA

CCC TCC TCC

[0080] AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC
CCC GAA CCG

[0081] GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG
GCT GTC CTA

[0082] CAG TCC TCA GGA CTC TAG TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC
TTG GGC ACC

[0083] CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG
AAA GCA GAG

[0084] CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT AGT GGC CAG GCC GGC CAG CAC CAT CAC CAT CAC
CAT GGC GCA

[0085] TAC CCG TAC GAC GTT CCG GAC TAC GCT TCT TAG

[0086] 构建的重组质粒表达嵌合的 L 链及 Fd 段重组的嵌合 Fab 片段,两者之间前导肽序列 pe1B 翻译的 22 个氨基酸连接,翻译的蛋白片段分泌至细菌周质腔时前导肽 pe1B 被剪切,嵌合 L 链和 Fd 段通过链间二硫键连接。嵌合 L 链的氨基酸序列为:

[0087] Glu Asn Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met SerAla Ser Pro Gly Glu Lys
Val Thr Met

[0088] Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Val Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
Gly Ser Ser

[0089] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn LeuAla Ser Gly Val Pro Val Arg
Phe Ser Gly

[0090] Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp
Ala Ala Thr

[0091] Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
Leu Glu Leu

[0092] Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
Leu Lys Ser

[0093] Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
Val Gln Trp

[0094] Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
Asp Ser Lys

[0095] Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
Lys His Lys

[0096] Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
Phe Asn Arg

[0097] Gly Glu Cys

[0098] 嵌合 Fd 段的氨基酸序列为:

[0099] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val
Arg Ile Ser

[0100] Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly

[0101] Lys Gly Leu Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp

[0102] Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser

[0103] Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Arg Asp Tyr Ala Met Asp

[0104] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

[0105] Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

[0106] Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

[0107] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

[0108] Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys

[0109] Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln His His

[0110] His His His His Gly Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser

[0111] 将含有正确重组质粒的菌液按 1:100 转入 2ml SB 溶液中, 氨苄青霉素工作浓度为 100 μ g/ml, 葡萄糖终浓度为 4%, 37°C 摇菌过夜; 过夜的细菌 10000g 离心 15 分钟, 弃去上清液, 而后用 2ml SB 重悬, 将重悬后的菌液按 1:100 转入 2ml SB 中 (氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/ml), 37°C 培养 OD600 = 1.0 左右, 加入异丙基 -B-D- 硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1mmol/L, 蔗糖终浓度至 4%, 23°C 振荡培养 20h。离心收集菌体, 分别处理培养上清、菌体超声上清及超声沉淀, 进行 SDS-PAGE 及 western-blot 检测, 结果嵌合 Fab 片段在培养上清、菌体超声上清及超声沉淀中均有表达, 其中可溶性蛋白主要是在菌体超声上清中, Fd 段分子量约为 30KD, 嵌合 L 链分子量约为 26KD, 而对照菌 TOP10F' 中无目的蛋白条带。

[0112] 4) 表达蛋白的纯化

[0113] 细菌大量诱导表达后菌液 10000g 离心 15 分钟, 弃培养上清, 沉淀中加入原菌液 1/10 体积的 20mM 磷酸盐平衡缓冲液 (含 0.5M/LNaCl, 20mM 咪唑), 将细菌重悬; 而后对菌液进行超声, 超 10 秒, 停 10 秒, 共超 90 次, 而后 4°C 12000rpm 离心 30 分钟, 弃沉淀, 超声上清用 0.22 μ m 滤膜过滤, 然后用 5ml Histrap HP 柱子进行纯化。先用 5 倍柱体积的水以 2.5ml/min 的速度洗柱子, 而后用至少 10 倍柱体积的平衡缓冲液平衡柱子, 然后以 2ml/min 的速度上样; 用平衡缓冲液平衡镍柱至基线, 分别用 5 倍柱体积的含 50mM、100mM、200mM、500mM 咪唑的缓冲液洗柱子, 并收集相应浓度咪唑的洗脱液。取 300 μ l 的洗脱液用冰冻乙醇进行 10 倍浓缩, 而后进行 12% SDS-PAGE 电泳, 观察蛋白纯化情况。结果含 200mm 咪唑的洗脱液中 Fab 蛋白最纯。将 200mm 咪唑的洗脱液用 10KD 的 millipore 超滤柱子进行除盐浓

缩, PBS 洗 3 次。

[0114] 5) 嵌合 Fab 抗体片段的活性鉴定:

[0115] 将纯化的嵌合 Fab 抗体片段用 50mM/L 的碳酸盐缓冲液 (PH9.6) 包板, 每孔 100 μ l, 终浓度为 5 μ g/ml 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS (含 0.5% Tween20) 5% 脱脂牛奶 - 洗涤缓冲液封闭。双“抗原”夹心法检测血吸虫病人血清及正常人血清。结果显示, 嵌合 Fab 抗体片段能与血吸虫病人血清反应, 不与正常人血清反应, 说明该嵌合 Fab 抗体片段保留了鼠源性抗独特型抗体 NP30 的模拟抗原性质和特异性。

[0116] 6) 嵌合 Fab 抗体片段对急性血吸虫病动物模型的治疗作用

[0117] 36 只 BALB/C 小鼠随机分为三组, 每组 12 只, 雌雄对半。各组小鼠经腹部皮肤感染日本血吸虫尾蚴 40 条 / 只, 于感染后 33-35 天连续给药 3 天: ①嵌合 Fab 抗体片段治疗组: 每只小鼠肌肉注射嵌合 Fab 抗体片段 100 μ g / 只 / 次, 连续 3 天给药三次。②阳性对照组: 以鼠源性 NP30 代替嵌合 Fab 抗体片段, 其他处理同嵌合 Fab 抗体片段治疗组。③阴性对照治疗组: 以 PBS 代替嵌合 Fab 抗体片段, 其他处理同嵌合 Fab 抗体片段治疗组。观察小鼠死亡情况, 直至感染后第 49 天。结果小鼠感染后 7 周, 鼠源性抗独特型抗体 NP30 注射组死亡 1 只, 嵌合 Fab 抗体片段治疗组无死亡, 而对照组死亡 6 只, 死亡率为 50%, Fisher 确切概率法显示嵌合 Fab 抗体片段治疗组的小鼠死亡率与鼠源性抗独特型抗体 NP30 治疗组间无显著性差异, 而显著低于 PBS 对照组, 表明嵌合 Fab 抗体片段保留了鼠源性抗独特型抗体 NP30 的抗原活性, 有治疗急性血吸虫病的潜力。

[0118] 利用上述获得的血吸虫抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 抗体片段, 可以在原核细胞、酵母细胞、真核细胞中进行重组表达、制备。

[0119] 血吸虫抗独特型抗体 NP30 的嵌合 Fab 抗体片段在制备检测血吸虫抗体、抗原制剂, 血吸虫病免疫保护及免疫治疗药物中的应用。

[0120] 鉴于 NP30 为鼠源性的 IgM 型单克隆抗体, 通过基因重组技术, 将 NP30 鼠源性抗体的重链、轻链可变区和人 IgG1 抗体的 CH₁ 和 C κ 片段进行重组, 扩增了嵌合的 Fab 分子, 并构建了嵌合 Fab 抗体片段的原核表达质粒并进行可溶性表达, 建立了表达蛋白的纯化方法, 获得了高纯度的可溶性蛋白, 并开展动物试验用于急性血吸虫病的治疗。

[0121] 本发明与现有技术相比具有的优点:

[0122] 我国血吸虫病防治工作中, 主要是应用吡喹酮进行化疗, 青蒿类药物由于价格较贵等原因限制了其在现场的应用。长期反复广泛的使用吡喹酮, 在一定程度上增加了其产生耐药性的危险, 而开发一个适当的代替药物将要花上几年的时间, 因此迫切需要研发新的药物作为吡喹酮的补充或替代品。随着现代生物技术的迅猛发展, 运用功能基因组学、蛋白质组学、生物信息学等现代生化与分子生物学技术, 结合基因工程、蛋白质工程、细胞工程等技术, 使得生物技术药物研发高潮迭起。治疗性抗体是以细胞工程技术和基因工程技术为主体的抗体工程技术制备的药物, 以其特异性强、安全有效而成为当前生物技术药物研发的热点。本发明制备的血吸虫抗独特型抗体 NP30, 通过试验表明具有治疗急性血吸虫病的潜力。为将来进行体内研究, 使用基因重组技术对该抗独特型抗体进行改造制备嵌合 Fab 抗体片段, 制备的抗体片段有以下优点:

[0123] (1) 大大降低了抗独特型抗体 NP30 的鼠源性成分, 有利于进一步开展体内试验。

[0124] (2) 保留了鼠源性抗体的模拟抗原特性, 可用表达的蛋白和酶标的鼠源性抗体

NP30 组成双“抗原”夹心法诊断血吸虫病。

[0125] (3) 原核表达载体易于构建,可大量表达,生产快速且便于纯化。

[0126] (4) 有利于改造成嵌合的全分子抗体或其他形式的抗体片段,进一步降低抗独特型抗体中的鼠源成分以开展治疗血吸虫病的相关研究。

附图说明

[0127] 以下将结合附图对本发明作进一步说明:

[0128] 图 1:嵌合 Fab 抗体片段原核表达载体构建示意图。

[0129] 图 2:鼠源性单克隆抗体 NP30 杂交瘤细胞总 RNA 电泳结果,显示 RNA 抽提较好,没有发生降解。

[0130] 图 3:鼠源性单克隆抗体 NP30 重链可变区 (VH) 及轻链可变区 (VL)PCR 扩增产物电泳。M1:核酸标准分子量 (Takara 100bp Ladder);1:VL 基因片段;2:VH 基因片段;M2:核酸标准分子量 (Takara DL2000)。

[0131] 图 4:以 pComb3XTT 为模板扩增的人 IgG₁ 的轻链恒定区 (C_κ) 及重链恒定区 1 (CH₁) 片段电泳结果。M1:核酸标准分子量 (Takara DL2000);1:420bp 的 C_κ 基因片段;2:387bp 的 CH₁ 基因片段;M2:核酸标准分子量 (Takara100bp Ladder)。

[0132] 图 5:嵌合 Fd 段及 L 链扩增产物的电泳结果。M1:核酸标准分子量 (Takara100bpLadder);1:773bp 的 L 基因片段;2:738bp 的 Fd 基因片段;M2:核酸标准分子量 (TakaraDL2000)。

[0133] 图 6:嵌合 Fab 扩增产物的电泳结果。M1:核酸标准分子量 (Takara100bp Ladder);1:Fab 基因片段;M2:核酸标准分子量 (Takara DL2000)。

[0134] 图 7:嵌合 Fab 纯化蛋白 SDS-PAGE 电泳结果,M 为蛋白质标准 (Fermentas, #SM0441),1 为纯化的嵌合 Fab 抗体片段。

具体实施方式

[0135] 血吸虫抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 抗体片段及制备方法、应用

[0136] 抗独特型抗体嵌合 Fab 抗体片段基因序列的合成、原核表达载体的构建及鉴定

[0137] 材料与方法

[0138] 1、细胞株、菌株与质粒:NP30 杂交瘤细胞、宿主菌 XL1-blue、TOP10F'、质粒 pComb3XSS、pComb3XTT、载体 pMD18-T (Takara)

[0139] 2、分子生物学试剂:M-MLV 逆转录酶 (promega)、rTaq (Takara)、ExTaq 酶 (Takara)、T4 连接酶、质粒纯化试剂盒 (Takara)、琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Qiagen)、SfiI 内切酶 (Biolab)。其他试剂为进口或国产分析纯试剂。

[0140] 3、引物合成:南京金思特公司帮助合成

[0141] 4、基因重组技术:RNA 的抽提、cDNA 的合成、PCR、DNA、质粒的酶切、连接、电泳;质粒的提取、转化按一般分子克隆常规方法进行。

[0142] 5、DNA 序列分析:PCR 验证正确的菌液送金思特公司测序,测序结果用 DNASTAR 及 DNAClub 软件进行分析。

[0143] 结果:

[0144] 1、抗体可变区的扩增及验证：

[0145] (1) cDNA 的合成：

[0146] NP30 杂交瘤细胞培养至对数生长期，Trizol 法抽提细胞总 RNA，置于 -80°C 保存备用，凝胶电泳鉴定 RNA 抽提质量。以 oligodT₁₅ 为引物，抽提的 RNA 为模板，进行逆转录合成 cDNA。反应条件为：总 RNA $2\mu\text{l}$ 、oligodT₁₅ $2\mu\text{l}$ 、DEPC 处理过的水 $22\mu\text{l}$ ，混匀后 70°C 水浴 5 分钟，立即置冰浴中 5 分钟，而后管中加入 $5\times\text{M-MLV buffer}$ $10\mu\text{l}$ 、dNTP $10\mu\text{l}$ 、RNAi $2\mu\text{l}$ 、M-MLV $2\mu\text{l}$ ，混匀后 42°C 温育 1 小时， 94°C 5 分钟，而后取出置 -20°C 。

[0147] (2) 轻链可变区 (VL)、重链可变区 (VH) 的扩增及鉴定：

[0148] 设计鼠源性抗独特型抗体 NP30 的重链可变区 (VH)、轻链可变区 (VL) 的扩增引物，分别扩增 VH、VL 片段，轻链可变区 (VL) 的上游引物为 VLF： $5' - \text{GGGCCCAGGCGGCCGAGAATCTGCTCACCCAGTCTCC} - 3'$ ，下游引物为 VLR： $5' - \text{GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTTCGTTTCAGTTCCAGCTTGGTCC} - 3'$ ，在 VLF 的 $5'$ 端引入了 SfiI 的酶切识别位点即下划线部分序列，VLR 的 $5'$ 端引入了与人 IgG₁ 的 C κ 上游引物 $5'$ 端互补的 24 个碱基即斜体部分序列，以利于 NP30 的 VL 与人 IgG₁ 的 C κ 片段的重叠 PCR 扩增；重链可变区 (VH) 的上游引物为 VHF： $5' - \text{GCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGGTACAGCTGGTGGAGTCTG} - 3'$ ，下游引物为 VHR： $5' - \text{CGATGGGCCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACAGTGACTGTGG} - 3'$ ，在 VHF 的 $5'$ 端引入了和人 IgG₁ 的 C κ 下游引物互补的 21 个碱基序列即斜体部分序列，VHR 的 $5'$ 端引入了和人 IgG₁ 的 CH₁ 上游引物互补的 21 个碱基序列，即斜体部分，以利于 NP30 的 VH 与人 IgG₁ 的 CH₁ 片段的重叠 PCR 扩增

[0149] 分别以反转录扩增的 cDNA 为模板，用引物 VLF、VLR 扩增鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VL 基因片段，用引物 VHF、VHR 扩增鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VH 基因片段。扩增体系为 $50\mu\text{l}$ ： $10\times\text{buffer}$ $5\mu\text{l}$ ， 2.5mM/L dNTP $4\mu\text{l}$ ， 2.5mM/L MgCl₂ $3\mu\text{l}$ 、cDNA $2\mu\text{l}$ ，VLF/VLR (VHF/VHR) 各 $1\mu\text{l}$ ，rTaq 酶 $0.5\mu\text{l}$ ，去离子水 $33.5\mu\text{l}$ 。扩增条件均为 95°C 4 分钟； 95°C 30 秒、 56°C 30 秒、 72°C 30 秒，30 个循环； 72°C 延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳，胶回收纯化扩增基因片段，VL、VH 的胶回收纯化产物分别与 pMD-18T 载体进行 TA 连接。连接产物转化大肠杆菌 XL1-Blue，涂布含氨苄青霉素 ($100\mu\text{g/ml}$)、四环素 ($30\mu\text{g/ml}$) 的 LB 平板，置 37°C 12-16h。次日通过抗性筛选、蓝白斑筛选以及菌液 PCR，筛选含有插入 VL 基因片段质粒的菌株 (PCR 扩增出一条 359bp 左右的条带)、含有插入 VH 基因片段质粒的菌株 (PCR 扩增出一条 393bp 左右的条带) 送生物公司进行测序。其中 VL 的核苷酸序列为：

[0150] GAG AAT CTG CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG

[0151] ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTT AGT TAC GTT TAC TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGA TCC TCC

[0152] CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC

[0153] AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT

[0154] TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACC AAG CTG GAA CTG

[0155] AAA

[0156] VH 的核苷酸序列为：

[0157] CAG GTA CAG CTG GTG GAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC
AGG ATC TCC

[0158] TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA ACT GCT GGA ATG CAG TGG GTG CAA AAG
ATG CCA GGA

[0159] AAG GGT TTG AAG TGG ATT GGC TGG ATA AAC ACC CAC TCT GGA GTG CCA AAA TAT
GCA GAA GAC

[0160] TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCA TAT TTA
CAG ATA AGC

[0161] AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACG TAT TTC TGT GCG AGA TCA AGG GAC TAT
GCT ATG GAC

[0162] TAC TGG GGT CAA GGA ACC ACA GTC ACT GTC TCC TCA

[0163] 将含有正确 VL、VH 序列的重组体菌液按 1:100 转入 3mLB 液体培养基中,37℃培养 12-16h;用 Takara 公司的 Minibest plasmid purification Kit 抽提质粒,超纯水溶解,-20℃保存。

[0164] (3) 抗独特型抗体嵌合 Fab 抗体片段的核苷酸序列扩增

[0165] ①人 IgG₁ 抗体的 C_κ 和 CH₁ 基因片段的扩增：

[0166] 以质粒 pComb3XTT 为模板,分别扩增人 IgG₁ 抗体的 CH₁ 和 C_κ 核苷酸片段;C_κ 段的上游引物为 C_κF:5' -CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC-3',下游引物为 C_κR:5' -GGCCATGGCTGGTTGGGCAGC-3';CH₁ 的上游引物为 CH₁F:5' -GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC-3',下游引物为 CH₁R:AGAAGCGTAGTCCGGAACGTC-3'。扩增体系为 50 μl:10×buffer5 μl,2.5mM/LdNTP4 μl,2.5mM/L MgCl₂3 μl,pComb3XTT2 μl,C_κF/C_κR(CH₁F/CH₁R) 各 1 μl,ExTaq 酶 0.5 μl,去离子水 33.5 μl。扩增条件均为 95℃ 4 分钟;95℃ 30 秒、56℃ 30 秒、72℃ 30 秒,30 个循环;72℃延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳,分别扩增出一条约 420bp、387bp 的条带,胶回收纯化扩增的 C_κ、CH₁ 基因片段,溶于去离子水内,-20℃冻存备用。

[0167] ②嵌合 L 链和 Fd 段基因片段的扩增：

[0168] 以鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VL 及人 IgG₁ 抗体的 C_κ 的胶回收纯化扩增产物为模板,用上游引物 LF:5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGCGGGGCCAGGCGGCCGAGAATCTG-3' 和下游引物 LR:5' -GGCCATGGCTGGTTGGGCAGC-3' 进行重叠 PCR 扩增嵌合 L 链;以鼠源性抗独特型抗体 NP30 的 VH 及人 IgG₁ 抗体的 CH₁ 的胶回收纯化扩增产物为模板,用上游引物 FdF:5' -GCTGCCCAACCAGCCATGGCC-3' 和下游引物 FdR:5' -AGAAGCGTAGTCCGGAAC GTC-3' 进行重叠 PCR 扩增嵌合 Fd 片段。扩增体系均为 50 μl:10×buffer5 μl,2.5mM/LdNTP4 μl、2.5mM/L MgCl₂3 μl、pMD18-T-VL1 μl,C_κ 纯化产物 1 μl,LF、LR 引物各 1 μl,ExTaq 酶 0.5 μl,去离子水 33.5 μl。扩增条件为 95℃ 4 分钟;95℃ 30 秒、56℃ 30 秒、72℃ 30 秒,30 个循环;72℃延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳,分别扩增出约 773bp(嵌合 L 链)、738bp(嵌合 Fd 段)的条带,胶回收扩增条带,溶于去离子水内,-20℃冻存备用；

[0169] ③嵌合 Fab 的扩增：

[0170] 以扩增胶回收纯化的嵌合 L 链和 Fd 段的基因片段为模板,用上游引物 FabF:

5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGAATCTG-3' 和下游引物 FabR :5' -GAGGAGGAGGAGGAGGAGAGAAGCGTAGTCCGGAACGTC-3' 进行重叠延伸 PCR 扩增,扩增体系为 50 μ l : 10 $\times$ buffer 5 μ l, 2.5mM/LdNTP 4 μ l, 2.5mM/L MgCl₂ 3 μ l, L 链基因片段 1 μ l, Fd 段基因产物 1 μ l, FabF、FabR 引物各 1 μ l, LATaq 酶 0.5 μ l, 去离子水 33.5 μ l。扩增时,先不加引物,95 $^{\circ}$ C,4 分钟;95 $^{\circ}$ C,30 秒、45 $^{\circ}$ C,30 秒、72 $^{\circ}$ C,90 秒,8 个循环,而后加入 FabF、FabR 引物后 95 $^{\circ}$ C,30 秒、56 $^{\circ}$ C,30 秒、72 $^{\circ}$ C,90 秒,共 22 个循环;72 $^{\circ}$ C,延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳,扩增出一条约 1.5kb 的条带,胶回收扩增条带,溶于去离子水内,-20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

[0171] (4) 嵌合 Fab 原核表达载体的构建及鉴定

[0172] 提取质粒 pComb3XSS(本室保存),质粒及 Fab 片段的 PCR 胶回收产物用 SfiI 限制性内切酶在 50 $^{\circ}$ C 酶切 12-16h,电泳后胶回收酶切的质粒大片段,溶于去离子水中。取 pComb3XSS、Fab 扩增产物的酶切产物按 1:4 摩尔比混匀,在同一离心管内用 T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接 12-16h。

[0173] 将连接产物转化感受态大肠杆菌 TOP10F',涂布含氨苄青霉素(100 μ g/ml)LB 平板,置 37 $^{\circ}$ C 12-16h。次日随机挑取转化菌及空质粒转化对照菌,37 $^{\circ}$ C 摇菌 5 小时后,分别用 Fab 的特异引物对菌液进行 PCR 扩增鉴定,含有插入 Fab 抗体片段核苷酸序列的质粒的菌株扩增出一条约 1.5kp 左右的条带。菌液 PCR 验证扩增出大小正确条带的菌液送生物公司进行测序,DNA 序列分析证实在重组质粒中含有构建的嵌合 Fab 抗体片段的核苷酸序列,其中横线部分为前导序列 pe1B,方框内 TAA、TAG 分别为嵌合 L 链、Fd 段翻译终止密码子:

[0174] GAG AAT CTG CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG

[0175] ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTT AGT TAC GTT TAC TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGA TCC TCC

[0176] CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC

[0177] AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT

[0178] TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACC AAG CTG GAA CTG

[0179] AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT

[0180] GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG

[0181] AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG

[0182] GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA

[0183] GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGT TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG

[0184] GGA GAG TGT TAA TTC TAG ATA ATT AAT TAG GAG GAA TTT AAA ATG AAA TAC CTA

TTG CCT ACG

[0185] GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCTGCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG GTG GAG

[0186] TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AGG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT

[0187] ACC TTC ACA ACT GCT GGA ATG CAG TGG GTG CAA AAG ATG CCA GGA AAG GGT TTG AAG TGG ATT

[0188] GGC TGG ATA AAC ACC CAC TCT GGA GTG CCA AAA TAT GCA GAA GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC

[0189] TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCA TAT TTA CAG ATA AGC AAC CTC AAA AAT GAG GAC

[0190] ACG GCT ACG TAT TTC TGT GCG AGA TCA AGG GAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC

[0191] ACA GTC ACT GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC

[0192] AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG

[0193] GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA

[0194] CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC

[0195] CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GCA GAG

[0196] CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT AGT GGC CAG GCC GGC CAG CAC CAT CAC CAT CAC CAT GGC GCA

[0197] TAC CCG TAC GAC GTT CCG GAC TAC GCT TCT TAG

[0198] 抗独特型抗体嵌合 Fab 抗体片段的表达、鉴定及纯化

[0199] 材料与方法：

[0200] 1、菌株与质粒：宿主菌 TOP10F'、质粒 pComb3XSS-Fab

[0201] 2、试剂和耗材：咪唑 (Sigma), HisTrap 纯化柱 (法玛尼亚), PMSF、异丙基-B-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、氨苄青霉素、蔗糖、葡萄糖以及其他试剂为进口或国产分析纯试剂, ELISA96 孔酶标板 (costar)、HRP-NP30 (本实验室自制)。

[0202] 3、蛋白的表达和纯化：质粒的提取、转化、诱导表达及 SDS-PAGE、western-blot 按一般分子克隆常规方法进行。

[0203] 4、活性鉴定：采用双“抗原”夹心法检测血吸虫病人血清。

[0204] 结果：

[0205] 1、小量表达及鉴定：

[0206] 将含有正确重组质粒的菌液按 1:100 转入 2ml SB 溶液中, 并设空质粒菌对照, 氨苄青霉素工作浓度为 100 μ g/ml, 葡萄糖终浓度为 4%, 37 度摇菌过夜; 过夜的细菌 10000g

离心 15 分钟,弃去上清液,而后用 2ml SB 重悬,将重悬后的菌液按 1:100 转入 2mlSB 中(氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/ml),37 度培养 OD600 = 1.0 左右,加入异丙基-B-D- 硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1mmol/L,蔗糖终浓度至 4%,23 度振荡培养 20h。

[0207] 离心收集菌体,培养上清各取 30 μ l 于 2 个新的 Eppendorf 管中,其余上清弃去。细菌沉淀溶于 100 μ l PBS (PH7.4) 中,重悬菌体,而后进行冰浴超声,1200rpm4℃离心 15 分钟,各取 30 μ l 于新的 Eppendorf 管中,其余上清弃去,沉淀加 60 μ l PBS (PH7.4) 重悬后分装成 2 管。而后每管加 10 μ l 4×loading buffer,混匀后 100℃煮沸 5 分钟。上样,进行 SDS-PAGE 电泳,一块胶染色,一块胶做 western-blot 检测。SDS-PAGE 电泳中,培养液上清、超声上清、沉淀中均有相应条带表达,但与空白菌无显著差异。做 western-blot 时,先 300mA 电转印 70 分钟,然后用含 5%脱脂奶粉的 PBS 缓冲液(含 Tween-200.1%)室温下封闭 1h,弃去封闭液,加入 1:2000 稀释的 HRP- 羊抗人 IgG (Fab 特异性的),室温下孵育 1h。而后 PBS (Tween-200.1%) 洗 3 次,每次 5 分钟。而后加 DAB 显色液显色,结果在培养上清、菌体超声上清及超声沉淀中均有 2 个条带,嵌合 Fd 段分子量约为 30KD,嵌合 L 链分子量约为 26KD。培养液上清及菌体超声上清为可溶性表达蛋白,超声沉淀中为包涵体。空白质粒对照菌中无条带表达。

[0208] 构建的重组质粒在大肠杆菌 TOP10F' 中翻译,L 链和 Fd 段之间的前导序列翻译的信号肽 pelB 在转入细菌周质腔时被剪切,表达的嵌合 L 链和 Fd 段通过链间二硫键连接组成抗独特型抗体 NP30 的嵌合 Fab 抗体片段。嵌合 L 链的氨基酸序列为:

[0209] Glu Asn Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met

[0210] Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Val Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Ser Ser

[0211] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly

[0212] Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr

[0213] Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu

[0214] Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

[0215] Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp

[0216] Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys

[0217] Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

[0218] Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg

[0219] Gly Glu Cys

[0220] 嵌合 Fd 段的氨基酸序列为：

[0221] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Arg Ile Ser

[0222] Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly

[0223] Lys Gly Leu Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp

[0224] Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser

[0225] Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Arg Asp Tyr Ala Met Asp

[0226] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

[0227] Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

[0228] Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

[0229] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

[0230] Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys

[0231] Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln His His

[0232] His His His His Gly Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser

[0233] 2、大量表达及纯化

[0234] 细菌大量诱导表达后菌液 10000g 离心 15 分钟，弃培养上清，沉淀中加入原菌液 1/10 体积的 20mM 磷酸盐平衡缓冲液（含 0.5M/L NaCl, 20mM 咪唑），将细菌重悬；而后对菌液进行超声，超 10 秒，停 10 秒，共超 90 次，而后 4℃ 12000rpm 离心 30 分钟，弃沉淀，超声上清用 0.22 μm 滤膜过滤，然后用 5ml Histrap HP 柱子进行纯化。先用 5 倍柱体积的水以 2.5ml/min 的速度洗柱子，而后用至少 10 倍柱体积的平衡缓冲液平衡柱子，然后以 2ml/min 的速度上样；用平衡缓冲液平衡镍柱至基线，分别用 5 倍柱体积终浓度为 50mM/L、100mM/L、200mM/L、500mM/L 咪唑的缓冲液洗柱子，并收集相应浓度咪唑的洗脱液。取 300 μl 的洗脱液用冰冻乙醇进行 10 倍浓缩，而后进行 12% SDS-PAGE 电泳，观察蛋白纯化情况。结果含 200mM 咪唑的洗脱液中嵌合 Fab 抗体片段最纯。将含 200mM/L 咪唑的洗脱液用 10KD 的超滤管进行除盐浓缩，PBS 洗 3 次。

[0235] 3、嵌合 Fab 抗体片段的活性鉴定：

[0236] 将纯化的嵌合 Fab 抗体片段按 5 μg/ml 用 50mM 的碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 包板，鼠源性抗独特型抗体 NP30 做对照，每孔 100 μl，4℃ 包板过夜；而后每孔加入 200 μl 含 5% 脱脂牛奶 PBST 缓冲液，37℃ 封闭 2h；甩去孔中液体，PBST (Tween-20 : 0.05%) 洗 4 次。3 份血

吸虫病人血清分别用 PBST 按 1:100 稀释,每孔加入 100 μ l 稀释血清(设复孔),并设正常人血清、PBST 空白对照。37℃ 孵育 30 分钟,甩去血清,PBST 洗 4 遍,加入本室自制的 100 μ l HRP 标记的 NP30,而后 37℃ 孵育 30 分钟。甩去酶标抗体,PBST 洗 4 遍,每孔加 TMB50 μ l、 H_2O_2 50 μ l,室温下反应 15 分钟,每孔加 2M H_2SO_4 50 μ l 终止反应。酶标仪测定 A450。嵌合 Fab 抗体片段能与血吸虫病人血清反应,不与正常人血清反应,说明该嵌合 Fab 抗体片段保留了鼠源性单克隆抗体的模拟抗原性质和特异性(检测的 OD 值见下表)。

[0237]

	1	2	3	4	5	6
嵌合 Fab	0.243	0.086	0.097	0.664	0.460	0.564
抗体片	0.256	0.120	0.139	0.734	0.368	0.548
段	0.152	0.067	0.133	0.920	0.635	0.839
NP30	0.170	0.055	0.114	0.871	0.700	0.691

[0238] * 其中 1-3 为正常人血清,4-6 为血吸虫病人血清。

[0239] 嵌合 Fab 抗体片段对急性血吸虫感染动物模型的治疗作用

[0240] 材料与方法:

[0241] 1、蛋白:NP30 杂交瘤细胞培养上清,饱和硫酸铵沉淀后,透析除盐;NP30 嵌合抗体 Fab 段可溶性表达用 HisTrapHP 进行纯化,分光光度计法测定蛋白浓度后 -70℃ 保存备用。

[0242] 2、试验动物及分组:取 36 只 BALB/C 小鼠,6-7 周龄,随机分为三组,雌雄各半。每只小鼠经腹部皮肤感染日本血吸虫尾蚴 40 条,于感染后 33-35 天连续给药 3 天:

[0243] ①嵌合 Fab 抗体片段治疗组:每只小鼠肌肉注射嵌合 Fab 抗体片段 100 μ g/只/次,连续 3 天给药三次。②鼠源性抗独特型抗体 NP30 对照组:以鼠源性 NP30 代替嵌合 Fab 抗体片段,其他处理同嵌合 Fab 抗体片段治疗组。③ PBS 对照组:以 PBS 代替嵌合 Fab 抗体片段,其他处理同嵌合 Fab 抗体片段治疗组。

[0244] 3、治疗效果观察:抗体注射后观察小鼠死亡情况,直至感染后第 49 天。

[0245] 结果:

[0246] PBS 对照组在感染后第 43 天即抗体注射后 10 天开始死亡,43、44 天死亡比较集中,死亡率为 41.7%,而鼠源性抗独特型抗体 NP30、嵌合抗体 Fab 抗体片段治疗组均未出现死亡。抗体注射后 2 周,鼠源性抗独特型抗体 NP30 组小鼠死亡 1 只,嵌合 Fab 抗体片段治疗组未出现死亡。Fisher 确切概率法显示鼠源性抗独特型抗体 NP30 治疗组、嵌合 Fab 抗体片段治疗组的死亡率显著低于 PBS 对照组 ($p < 0.05$)。结果提示,嵌合 Fab 抗体片段有延长急性血吸虫病小鼠寿命的潜力。

[0247] 血吸虫抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 抗体片段核苷酸及蛋白序列表

[0248] <110> 南京医科大学

- [0249] <120> 血吸虫抗独特型抗体 NP30 嵌合 Fab 抗体片段及制备方法、应用
- [0250] <160>3
- [0251] <210>1
- [0252] <211>1482
- [0253] <212>DNA
- [0254] <213> 人工序列
- [0255] <220>
- [0256] <221>V_region
- [0257] <222><1>...<318>
- [0258] <223> 鼠源性抗独特型抗体轻链可变区基因片段序列。
- [0259] <220>
- [0260] <221>C_region
- [0261] <222><319>...<639>
- [0262] <223> 人抗体 IgG1 轻链恒定区 C κ 基因片段序列。
- [0263] <220>
- [0264] <221>mis-feature
- [0265] <222><639>...<642>
- [0266] <223> 轻链基因片段翻译的终止密码子。
- [0267] <220>
- [0268] <221>mis-feature
- [0269] <222><642>...<672>
- [0270] <223> 嵌合 Fab 片段轻链和 Fd 基因片段重叠延伸扩增的核苷酸序列,含核糖体结合位点。
- [0271] <220>
- [0272] <221>mis-feature
- [0273] <222><672>...<738>
- [0274] <223> 为使 NP30 嵌合 Fab 中 Fd 段可溶性表达增加的 pelB 信号肽序列,将在蛋白分泌至周质
- [0275] 时被剪切。
- [0276] <220>
- [0277] <221>V_region
- [0278] <222><739>...<1089>
- [0279] <223> 鼠源性抗独特型抗体 NP30 重链可变区 VH 基因片段序列
- [0280] <220>
- [0281] <221>C_region
- [0282] <222><1090>...<1410>
- [0283] <223> 人抗体 IgG1 轻链恒定区 CH1 基因片段序列。
- [0284] <220>
- [0285] <221>mis-feature

- [0286] <222><1411>...<1423>
[0287] <223> 连接嵌合 Fab 抗体片段基因和载体 pComb3XSS 的 SfiI 酶切位点。
[0288] <220>
[0289] <221>mis-feature
[0290] <222><1423>...<1479>
[0291] <223> 载体 pComb3XSS 上序列, 含 His 标签。
[0292] <220>
[0293] <221>mis-feature
[0294] <222><1480>...<1482>
[0295] <223> 载体 pComb3XSS 上的琥珀酸终止子。
[0296] <400>1
[0297]

```
GAG AAT CTG CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC 60
Glu Asn Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
1           5           10           15           20
ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTT AGT TAC GTT TAC TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGA 120
Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Val Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
           25           30           35           40
TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC 180
Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg
           45           50           55           60
TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA 240
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
           65           70           75           80
GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG 300
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly
           85           90           95          100
```

[0298]


```

ACC AAG CTG GAA CTG AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT 360
Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
105 110 115 120
GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC 420
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
125 130 135 140
AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG 480
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG 540
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
165 170 175 180
AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG 600
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
185 190 195 200
AGT TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAA TTC TAG ATA ATT AAT TAG 660
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205 210
GAG GAA TTT AAA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT 720
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
GCC CAA CCA GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG GTG GAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT 780
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro
1 5 10
GGA GAG ACA GTC AGG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA ACT GCT GGA ATG 840
Gly Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Gly Met
15 20 25 30
CAG TGG GTG CAA AAG ATG CCA GGA AAG GGT TTG AAG TGG ATT GGC TGG ATA AAC ACC CAC 900
Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His
35 40 45 50
TCT GGA GTG CCA AAA TAT GCA GAA GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC 960
Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
55 60 65 70
TCT GCC AGC ACT GCA TAT TTA CAG ATA AGC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACG TAT 1020
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
75 80 85 90
TTC TGT GCG AGA TCA AGG GAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC ACA GTC ACT 1080
Phe Cys Ala Arg Ser Arg Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
95 100 105 110
GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC 1140

```

[0299]

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 115 120 125 130
 ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG 1200
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 135 140 145 150
 ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA 1260
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 155 160 165 170
 CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC 1320
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 175 180 185 190
 ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA 1380
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205 210
 GCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT AGT GGC CAG GCC GGC CAG CAC CAT CAC CAT CAC 1440
 Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Ser Gly Gln Ala Gly Gln His His His His His
 215 220 225 230
 CAT GGC GCA TAC CCG TAC GAC GTT CCG GAC TAC GCT TCT TAG 1482
 His Gly Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser
 235 240 245

[0300] <210>2

[0301] <211>213

[0302] <212>PRT

[0303] <213> 人工序列

[0304] <220>

[0305] <223> 抗独特型抗体 NP30 的嵌合轻链,即抗独特型抗体 NP30 的轻链可变区与人 IgG1 的恒定区 (C_κ) 重组后形成的融合蛋白,全长 213 个氨基酸。

[0306] <400>2

[0307]

Glu Asn Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Tyr Val Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg
 50 55 60

[0308]

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser		
	65	70 75
Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp		
	80	85 90
Thr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu		
	95	100 105
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser		
	110	115 120
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu		
	125	130 135
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp		
	140	145 150
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln		
	155	160 165
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu		
	170	175 180
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val		
	185	190 195
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg		
	200	205 210
Gly Glu Cys		
	213	

[0309] <210>3

[0310] <211>247

[0311] <212>PRT

[0312] <213> 人工序列

[0313] <220>

[0314] <223> 抗独特型抗体 NP30 的嵌合 Fd 段,即抗独特型抗体 NP30 的重链可变区与人 IgG1 的重链恒定区的 CH1 重组后形成的融合蛋白,全长 247 个氨基酸。

[0315] <400>3

[0316]

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly		
1	5	10 15
Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr		
	20	25 30
Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu		
	35	40 45
Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr		

[0317]

50	55	60
Ala Glu Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser		
65	70	75
Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp		
80	85	90
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Arg Asp Tyr Ala Met Asp		
95	100	105
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr		
110	115	120
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
125	130	135
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
140	145	150
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
155	160	165
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
170	175	180
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
185	190	195
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
200	205	210
Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Ser Gly		
215	220	225
Gln Ala Gly Gln His His His His His His Gly Ala Tyr Pro Tyr		
230	235	240
Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser		
245		

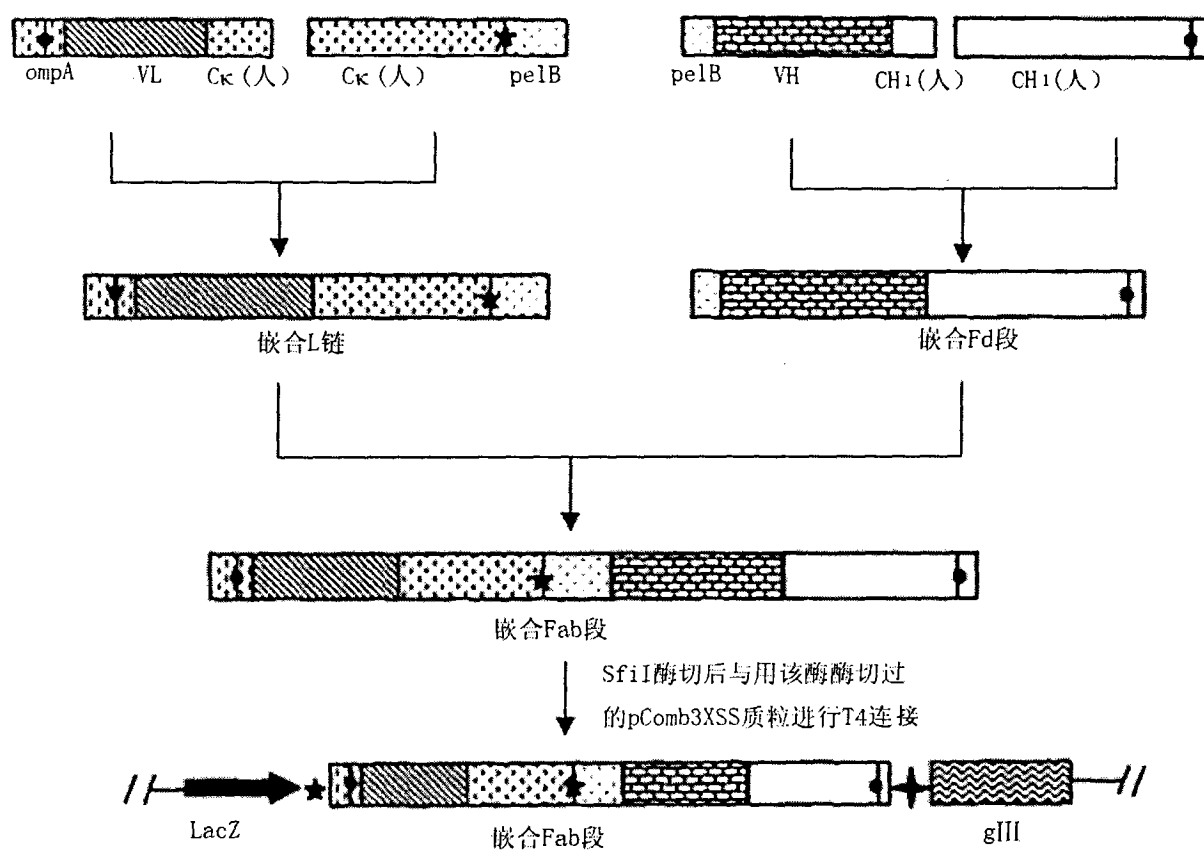


图 1

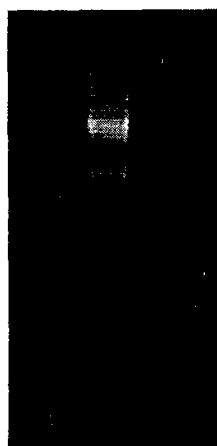


图 2

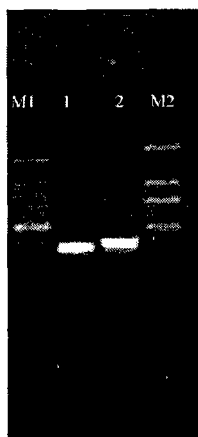


图 3



图 4

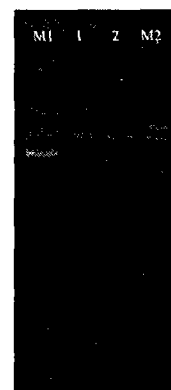


图 5

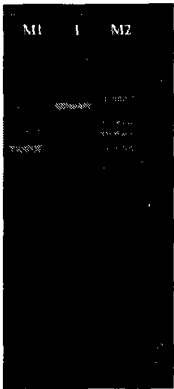


图 6



图 7

专利名称(译)	血吸虫抗独特型抗体NP30嵌合Fab抗体片段及制备方法、应用		
公开(公告)号	CN101357944B	公开(公告)日	2013-01-30
申请号	CN200810157075.5	申请日	2008-09-23
[标]申请(专利权)人(译)	南京医科大学		
申请(专利权)人(译)	南京医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京医科大学		
[标]发明人	冯振卿 许静 朱晓娟 顾春燕 李红 管晓虹		
发明人	冯振卿 许静 朱晓娟 顾春燕 李红 管晓虹		
IPC分类号	C07K16/46 C12N15/13 C12N15/63 C12N15/70 G01N33/53 A61K39/395 A61P33/12		
CPC分类号	Y02A50/423		
审查员(译)	李晨		
其他公开文献	CN101357944A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及的是一种血吸虫抗独特型抗体NP30嵌合Fab抗体片段及制备方法、应用，属于基因工程技术和制备免疫治疗药物领域。本发明是利用基因工程技术制备鼠源性血吸虫抗独特型抗体NP30的嵌合Fab片段，即将鼠源性抗独特型抗体的重链和轻链可变区与人IgG1的重链部分恒定区(CH1)及轻链恒定区(Cκ)进行重组，并插入到原核表达载体pComb3XSS中，进行表达。该嵌合Fab抗体片段保留了鼠源性抗独特型抗体的模拟抗原性及特异性，可用于血吸虫病免疫保护及急性血吸虫病的治疗。

