



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116120411 B

(45) 授权公告日 2024.04.12

(21) 申请号 202211567184.0

(22) 申请日 2022.12.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116120411 A

(43) 申请公布日 2023.05.16

(73) 专利权人 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

地址 102206 北京市昌平区昌百路155号

专利权人 罗益(无锡)生物制药有限公司

(72) 发明人 万康林 陈宣洪 刘海灿 范雪亭
王瑞欢 李马超

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

专利代理师 李正

(51) Int. Cl.

C07K 14/35 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2010132054 A1, 2010.11.18

CN 100999550 A, 2007.07.18

CN 114099659 A, 2022.03.01

CN 113045677 A, 2021.06.29

AU 2011203012 A1, 2011.07.14

BR 102015002893 A2, 2020.04.28

CN 106822883 A, 2017.06.13

邓毛子. 结核分枝杆菌保护性抗原的研究进展. 咸宁学院学报(医学版). 2008, (第04期), 全文.

审查员 刘新蕾

权利要求书1页 说明书11页
序列表(电子公布) 附图3页

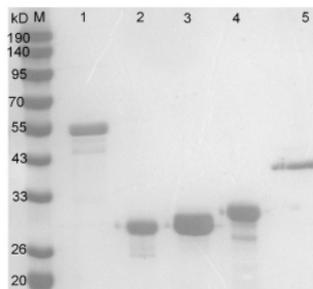
(54) 发明名称

结核分枝杆菌蛋白抗原混合物、多抗原融合蛋白及编码基因和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种结核分枝杆菌蛋白抗原混合物, 所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物包括 Rv3875 蛋白抗原、nRv1196 蛋白抗原、Rv3874 蛋白抗原和 nRv0934 蛋白抗原。通过对所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物的免疫原性和保护效果进行评价分析发现, 与 BCG 相比, 所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物具有诱导保护性免疫反应向 Th1 型转化的趋势, 可以提高小鼠体内巨噬细胞对细菌的抗原吞噬功能, 增强其杀菌作用; 免疫之后刺激产生保护性的抗原特异性细胞因子种类更丰富, 诱导的免疫应答更全面。体外分枝杆菌抑制实验表明: 所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物表现出较强的抑制分枝杆菌生长的能力, 抑菌效

果不低于 BCG。



CN 116120411 B

1. 结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,其特征在于,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 权利要求1所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的编码基因,其特征在于,所述编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

3. 用于表达权利要求1所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的生物材料,所述生物材料包括表达载体、工程菌,其特征在于,所述生物材料包括权利要求2所述编码基因。

4. 权利要求1所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者权利要求2所述编码基因,或者权利要求3所述生物材料在制备结核分枝杆菌疫苗中的应用。

5. 结核分枝杆菌疫苗,其特征在于,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分包括权利要求1所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者权利要求2所述编码基因,或者权利要求3所述生物材料制备得到的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白。

6. 根据权利要求5所述的结核分枝杆菌疫苗,其特征在于,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分还包括明矾佐剂。

结核分枝杆菌蛋白抗原混合物、多抗原融合蛋白及编码基因和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,尤其涉及一种结核分枝杆菌蛋白抗原混合物、多抗原融合蛋白及编码基因和应用。

背景技术

[0002] 结核病(Tuberculosis, TB)是一种主要由结核分枝杆菌(Mtb)感染引起的严重影响人类健康的传染性疾病,是导致全世界人口死亡的主要原因之一。接种疫苗能够有效控制结核病的传播、降低结核病的发病率与病死率。卡介苗(BCG)是目前唯一被批准使用的抗结核病疫苗,可以降低Mtb在婴儿和儿童中的传播风险,但它在成人中应用的保护效果不稳定,且不建议在免疫缺陷人群中使用。

[0003] 由于结核分枝杆菌是一个复杂的病原体,传统的采用单一抗原成分构建的疫苗很难达到最优的保护效果,因此将多个免疫优势抗原组合、构建多组分疫苗,通过诱导机体产生高效且特异的免疫应答、实现对更广人群覆盖,是研制有效的结核蛋白亚单位疫苗的关键环节。目前,处于临床期的疫苗根据研究策略分类,包括亚单位蛋白疫苗、病毒载体疫苗、灭活全菌疫苗和减毒活疫苗。常用的腺病毒载体疫苗,由于人体内可能存在中和腺病毒的抗体,从而导致疫苗的免疫效果降低;灭活全菌疫苗成分复杂,作用机制不清晰、且需要较大的免疫剂量才能使其中有效的抗原发挥免疫作用;而减毒活疫苗存在疫苗交叉复活等安全性问题不适用于儿童和免疫低下的人群。亚单位疫苗具有成分明确、安全性高,适用人群较为广泛等优点。其不仅可作为初次免疫疫苗应用于免疫缺陷人群,也可作为加强免疫疫苗应用于BCG初免的人群。因此,亚单位疫苗已成为结核病疫苗研发的一种优选策略。抗原的选择是构建有效疫苗的决定性因素。进入临床研究的亚单位疫苗所选择的抗原大都是分泌型抗原,如Rv3875和Rv3874基因编码的ESAT-6和CFP-10应用较为广泛,在小鼠、豚鼠、牛和人等多个动物模型中已被证明能够诱导机体产生有效的免疫保护反应。目前,正在进入临床期的五种蛋白结核亚单位疫苗分别为AEC/BC02(Ag85B、ESAT-6、CFP-10),H56:IC31(Ag85B、ESAT-6和v2660c),ID93+GLA-SE(Rv1813、Rv2608、Rv3619和Rv3620),M72/AS01E[32A和39A(1196)],GamTBvac(Ag85A和ESAT6-CFP10)。这些亚单位蛋白疫苗均采用完整的抗原作为疫苗的成分,但实际上发挥免疫作用的是蛋白表面的有限抗原表位,其他冗余片段不能增强保护性免疫反应的强度。

[0004] 虽然已进入临床期的亚单位蛋白疫苗均可诱导机体产生细胞免疫和体液免疫,但已公布的数据显示,不同的蛋白疫苗诱导免疫保护反应所产生的细胞因子表达谱差异悬殊。不能诱导较为全面的细胞反应,是目前亚单位疫苗尚不能替代BCG的主要原因。研究显示,通过对接种临床期亚单位疫苗H1:IC31、H56:IC31、M72/AS01E、ID93+GLA-SE的人群进行细胞因子的检测,发现均未产生IL-17,表示均未能成功诱导Th17型免疫保护应答。

发明内容

[0005] 有鉴于背景技术中存在的技术问题,本发明提供了一种结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物具有较强的免疫原性;其诱导的免疫应答更全面;可以提高小鼠体内巨噬细胞对细菌的抗原吞噬功能,增强其杀菌作用。

[0006] 本发明提供了一种结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物包括Rv3875蛋白抗原、nRv1196蛋白抗原、Rv3874蛋白抗原和nRv0934蛋白抗原;所述Rv3875蛋白抗原的氨基酸序列包括SEQ ID NO.7;所述nRv1196蛋白抗原的氨基酸序列包括SEQ ID NO.8;所述Rv3874蛋白抗原的氨基酸序列包括SEQ ID NO.9;所述nRv0934蛋白抗原的氨基酸序列包括SEQ ID NO.10。

[0007] 优选的,所述Rv3875蛋白抗原的基因核苷酸序列包括SEQ ID NO.3;所述nRv1196蛋白抗原的基因核苷酸序列包括SEQ ID NO.4;所述Rv3874蛋白抗原的基因核苷酸序列包括SEQ ID NO.5;所述nRv0934蛋白抗原的基因核苷酸序列包括SEQ ID NO.6。

[0008] 本发明提供了一种结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白包括所述的Rv3875蛋白抗原、nRv1196蛋白抗原、Rv3874蛋白抗原和nRv0934蛋白抗原。

[0009] 优选的,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的氨基酸序列包括SEQ ID NO.2。

[0010] 本发明提供了所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的编码基因,所述编码基因的核苷酸序列包括SEQ ID NO.1。

[0011] 本发明提供了用于表达所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的生物材料,所述生物材料包括表达载体、工程菌,所述生物材料包括所述编码基因。

[0012] 本发明提供了所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,或者所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述编码基因,或者所述生物材料在制备结核分枝杆菌疫苗中的应用。

[0013] 本发明提供了一种结核分枝杆菌疫苗,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分包括所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,或者所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述编码基因,或者所述表达载体表达得到的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述工程菌制备得到的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白。

[0014] 优选的,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分还包括明矾佐剂。

[0015] 本发明还提供了所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,或者所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述编码基因,或者所述表达载体,或者所述工程菌在制备结核分枝杆菌检测试剂或者治疗结核分枝杆菌疾病的药物中的应用。

[0016] 有益效果:

[0017] 本发明提供的结核分枝杆菌蛋白抗原混合物包括Rv3875 (ESAT-6)、nRv1196 (nPPE18)、Rv3874 (CFP-10) 和nRv0934 (nPstS1)。通过对所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物的免疫原性和保护效果进行评价分析发现,与BCG相比,所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物具有诱导保护性免疫反应向Th1型转化的趋势,可以提高小鼠体内巨噬细胞对细菌的抗原吞噬功能,增强其杀菌作用;免疫之后刺激产生保护性的抗原特异性细胞因子种类更丰富,诱导的免疫应答更全面。体外分枝杆菌抑制实验表明:所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物表现出较强的抑制分枝杆菌生长的能力,抑菌效果不低于BCG。

附图说明

[0018] 为了更清楚地说明本发明或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图进行说明。

[0019] 图1是本发明实施例2中EPCP009f重组蛋白,CFP10蛋白,ESAT6蛋白,nPPE18蛋白和nPstS1蛋白纯化后的SDS-PAGE分析电泳图谱;其中,M代表预染蛋白标准分子量;样品1、2、3、4、5分别对应纯化后的EPCP009f蛋白、CFP10蛋白、ESAT6蛋白、nPPE18蛋白和nPstS1蛋白;

[0020] 图2是本发明实施例5中BCG、EPCP009f和EPCP009m免疫BALB/c小鼠的血清IgG、IgG1和IgG2a亚型的测定结果;

[0021] 图3表示本发明实施例5中Luminex检测免疫小鼠脾细胞释放的9种胞外抗原特异性细胞因子水平;

[0022] 图4表示本发明实施例5中Elispot检测免疫小鼠脾细胞释放的IFN- γ 和IL-4水平;

[0023] 图5表示本发明实施例5所述体外分枝杆菌抑制实验(MGIA)中,免疫小鼠的脾细胞与Mtb的共培养之后接种于7H10平板上培养的菌落计数结果。

具体实施方式

[0024] 本发明提供了一种结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物包括Rv3875蛋白抗原(ESAT-6)、nRv1196蛋白抗原(nPPE18)、Rv3874蛋白抗原(CFP-10)和nRv0934蛋白抗原(nPstS1);所述Rv3875蛋白抗原的氨基酸序列包括SEQ ID NO.7;所述nRv1196蛋白抗原的氨基酸序列包括SEQ ID NO.8;所述Rv3874蛋白抗原的氨基酸序列包括SEQ ID NO.9;所述nRv0934蛋白抗原的氨基酸序列包括SEQ ID NO.10。本发明在前期研究的基础上,基于基因组学、蛋白质组学及生物信息学技术等,使用TEpredict和IEDB等生物信息学软件对Rv1196和Rv0934基因及其产物进行T细胞表位预测,经设计、剪接和优化,构建出可高效表达潜在人T细胞表位聚集簇的基因片段,形成nRv1196和nRv0934;再通过基因工程技术体外表达成亚单位蛋白nPPE18和nPstS1。PPE18蛋白能刺激人类T细胞的快速增殖;编码磷酸盐特异性运输底物结合蛋白-1(PstS1)能参与无机磷酸盐跨膜的主动转运,诱导小鼠CD8+T细胞的激活以及产生Th1和Th17免疫保护反应。本发明经试探性筛选,最终从数百条结核分枝杆菌的抗原候选片段中,选用ESAT-6、CFP-10、nPstS1和nPPE18作为所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物的组成成分,与BCG相比,所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物具有诱导保护性免疫反应向Th1型转化的趋势,可以提高小鼠体内巨噬细胞对细菌的抗原吞噬功能,增强其杀菌作用;免疫之后刺激产生保护性的抗原特异性细胞因子种类更丰富,诱导的免疫应答更全面。体外分枝杆菌抑制实验表明:所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物表现出较强的抑制分枝杆菌生长的能力,抑菌效果不低于BCG。

[0025] 在本发明更优选的具体实施方案中,所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物以Mycobacterium tuberculosis H37Rv基因组DNA为模板,以特异性引物PCR扩增Rv3875、Rv3874、nRv1196和nRv0934基因序列,分别构建单个抗原的重组质粒,在大肠杆菌中表达后,再按照等摩尔比例混合得到。

[0026] 本发明提供了一种结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白包括所述的Rv3875蛋白抗原、nRv1196蛋白抗原、Rv3874蛋白抗原和nRv0934蛋白抗原;

且所述的Rv3875蛋白抗原、nRv1196蛋白抗原、Rv3874蛋白抗原和nRv0934蛋白抗原顺次串连。在本发明中,所述Rv3875蛋白抗原、nRv1196蛋白抗原、Rv3874蛋白抗原和nRv0934蛋白抗原优选通过linker顺次串连,所述linker优选包括柔性连接臂,所述柔性连接臂的编码基因序列优选包括GGTGGTTCTGGCGGT (SEQ ID NO.21)。在本发明更优选的具体实施方案中,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白为EPCP009f,其氨基酸序列包括:

[0027] MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQQKWDATATELNNA LQNLARTISEAGQAMASTEgNVTGMFAGGSGGMNVPQALQQLAQPTQGTTTPSSKLGGLWKTVSPHRSPISNMVSM ANNHMSMTNSGVSMTNTLSSMLKGFAPAAAAQAVQTAAQNGVRAMSSLGSSLGSSGGGSGGAEMKTDAAATLAQEAG NFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQGWGAAGTAAQAAVVRFQEAANKQKQELDEISTNIRQAGVQYSRADEEQQQ ALSSQMGFGGSGGSTLLYPLFNLWGP AFHERYPNVTITAQGTGSGAGIAQAAAAGTVNIGASDAYLSEGDMAAHKG LMNIALAISAAQQVNYNNSGNFLLPDAQSIQAAAAGFASKTPANQAI SMIDGPAPDGYP I INYEYAI VNNRQKDAAT AQT LQAFLHWAITDGNKASFLDQVHFQPLPPAVVKLS DALIATISGGGHHHHHHH (SEQ ID NO.2)。

[0028] 由于人工串联的蛋白片段普遍存在空间构象问题,无法完整表达,或者无法达到预期的生物学效果,因此,虽然Rv3875 (ESAT-6) 和Rv3874 (CFP-10) 是目前已知具有较强免疫原性的抗原,nRv1196 (nPPE18) 和nRv0934 (nPstS1) 是本发明构建的具有较强免疫原性的抗原。但现阶段并未发现将Rv3875 (ESAT-6)、Rv3874 (CFP-10)、nRv1196 (nPPE18) 和nRv0934 (nPstS1) 进行融合的技术。本发明优选将Rv3875 (ESAT-6)、Rv3874 (CFP-10)、nRv1196 (nPPE18) 和nRv0934 (nPstS1) 4种蛋白抗原顺次串连,表达得到结核分枝杆菌多抗原融合蛋白。与BCG相比,所述核分枝杆菌多抗原融合蛋白免疫之后刺激产生保护性的抗原特异性细胞因子种类更丰富,诱导的免疫应答更全面。体外分枝杆菌抑制实验表明:所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白表现出较强的抑制分枝杆菌生长的能力。

[0029] 在本发明更优选的具体实施方案中,所述核分枝杆菌多抗原融合蛋白的构建方法为:通过linker将Rv3875,nRv1196,Rv3874和nRv0934条基因片段优化、连接、构建成融合基因的重组质粒,并在大肠杆菌中表达。

[0030] 本发明提供了所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的编码基因,所述编码基因包括Rv3875基因、nRv1196基因、Rv3874基因和nRv0934基因。在本发明更优选的具体实施方案中,所述Rv3875基因、nRv1196基因、Rv3874基因和nRv0934基因经密码子优化后顺次串连;所述编码基因的核苷酸序列包括:

[0031] ATGACCGAACAGCAGTGGAAATTTTGCAGGTATTGAAGCCGCAGCAAGCGCCATTCAGGGCAATGTTAC CAGCATTATAGCCTGCTGGATGAAGTAAACAGAGCCTGACCAAACTGGCCGCAGCATGGGGCGGTAGCGGTAGC GAAGCATATCAGGGCGTGCAGCAGAAATGGGATGCAACCGCAACCGAACTGAATAATGCACTGCAGAATCTGGCAC GCACCATTAGCGAAGCAGGTCAGGCCATGGCCAGCA CCGAAGGCAATGTGACCGCATGTTTGCAGGCGGCAGTG GCGGTATGAATAATGTGCCGAGGCACTGCAGCAGCTGGCCAGCCTACCCAGGGTACCACCCGAGTAGTAACT GGGTGGTCTGTGAAAACCGTTAGCCCGCATCGTAGCCGATTAGTAATATGGTGAGTATGGCCAATAATCACATG AGTATGACCAATAGTGGTGTAGCATGACCAATACCCTGAGTAGCATGCTGAAAAGTTTTGCCCGGCCCGCCG CCCAGGCAGTGCAGACCGCAGCACAGAATGGCGTGCGCAATGAGTAGTCTGGGCAGCAGTCTGGGTAGCAGTGG TGGTGGCAGTGGCGGCGCCGAAATGAAAACCGATGCAGCAACCCTGGCACAGGAAGCCGGCAATTTTGAACGTATT AGTGGCGATCTGAAAACCCAGATTGATCAGGTTGAAAGTACCGCAGGCAGTCTGCAGGGTCAGTGGCGTGGTGCCG CCGGTACCGCAGCTCAGGCAGCTGTTGTTTCGTTTTTCAGGAAGCAGCAAATAAGCAGAAACAGGAACTGGATGAAAT

TAGTACCAATATTCGCCAGGCAGGCGTG CAGTATAGTCGTGCCGATGAAGAACAGCAGCAGGCACTGAGTAGTCAG
ATGGGCTTTGGTGGTAGCGGTGGCGGCAGCACCCCTGCTGTATCCGCTGTTAATCTGTGGGGTCCGGCCTTTCATG
AACGCTATCCGAATGTTACCATTACCGCACAGGGTACCGGTAGTGGCGCCGGTATTGCACAGGCAGCAGCAGGCAC
CGTTAATATTGGTGCCAGCGATGCCTATCTGAGCGAAGGCGATATGGCCGCCATAAAGGCCTGATGAATATTGCA
CTGGCCATTAGCGCCCAGCAGGTGAATTATAATAATAGTAGCGGTAATTTCTGCTGCCGGATGCACAGAGCATTC
AGGCAGCAGCCGAGGCTTTGCAAGTAAAACCCCGGCAATCAGGCCATTAGCATGATTGATGGCCCCGGCACCCGGA
TGGTTATCCGATTATTAATTATGAATACGCAATCGTGAACAACCGCCAGAAAAGATGCCGCAACCGCACAGACCCTG
CAGGCCTTTCTGCATTGGGCAATTACCGATGGCAATAAGGCAAGCTTTCTGGATCAGGTTTCATTTTCAGCCGCT G
CCGCCGGCCGTGGTGAAACTGAGCGATGCCCTGATTGCCACCATTAGCGGTGGTGGCCATCATCATCACCATT
AA (SEQ IDNO.1)。

[0032] 本发明提供了用于表达所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的生物材料,所述生物材料包括表达载体、工程菌,所述生物材料包括所述编码基因。本发明对所述表达载体的基础工程质粒来源和类别不作特别限定,本领域常规市售的商品化工程质粒均可。在本发明优选的具体实施方式中,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的表达载体包括pET43.1a-EPCP009f,所述pET43.1a-EPCP009f由包括所述编码基因的核苷酸序列连接到pET43.1a载体中得到。在本发明更优选的具体实施方式中,本发明将所述pET43.1a-ERA005f重组质粒转至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,得到EPCP009f工程菌,所述EPCP009f工程菌在37℃温度条件下,经IPTG诱导后,可获得大量的包涵体融合蛋白EPCP009f,经纯化复性后,可获得具有活性的EPCP009f蛋白。

[0033] 本发明提供了所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,或者所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述编码基因,或者所述生物材料在制备结核分枝杆菌疫苗中的应用。

[0034] 在本发明中,所述结核分枝杆菌疫苗中优选还包括佐剂。佐剂作为一种非特异性的免疫增强剂,当与抗原联合使用时,可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型,提高其免疫原性和有效性。目前报道可用于疫苗中的佐剂包括油包水佐剂如MF59、微粒抗原递呈系统佐剂如AS01佐剂、模式识别受体的佐剂及传统明矾佐剂等,均可通过提高抗原提呈、促进抗体产生等作用发挥功能。但前述几种佐剂大多在国外处于初步应用阶段、或在国内未获得上市许可,而传统的明矾佐剂是目前国内市场上获准使用、应用范围最广且安全的佐剂。本发明优选采用明矾佐剂与抗原混合免疫,实验结果显示免疫原性和保护效果明显高于对照组。因此,本发明提供的抗原与佐剂联合应用可达到更优的保护效果。

[0035] 目前国内结核疫苗免疫程序为出生时接种1剂次BCG,这种BCG的接种策略被证明在未成年人中可有效的抵御结核菌的感染,但在成年人群中效果不佳。基于此,相关专家提出新的免疫策略,包括重组BCG免疫策略和BCG初免-亚单位疫苗增强免疫策略。无论是重组BCG的构建或是亚单位疫苗的研发,本发明所述抗原均可作为候选成分,即用于构建重组BCG或是相应的亚单位疫苗。采用本发明所述抗原成分免疫动物后,实验结果显示:经本发明抗原刺激后的样本可产生多种不同种类的细胞因子,如采用其他免疫策略与BCG或重组BCG联合应用可能达到互为佐剂的效果,促进BCG和蛋白疫苗本身的免疫原性。

[0036] 常用结核疫苗免疫途径包括吸入、注射等,其中注射的途径包括皮内、皮下、肌内注射、口服和气溶胶接种等,不同方式的免疫途径可能达到不同的免疫效果。本发明优选采用亚单位疫苗常用的皮下免疫方式,但不排除其他途径的接种方式可达到更优的保护效

果。

[0037] 本发明提供了一种结核分枝杆菌疫苗,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分包括所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,或者所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述编码基因,或者所述表达载体表达得到的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述工程菌制备得到的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白。

[0038] 在本发明中,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分优选还包括明矾佐剂。

[0039] 本发明提供了结核分枝杆菌蛋白抗原混合物EPCP009m(ESAT-6, nPPE18, CFP-10和nPstS1)和结核分枝杆菌多抗原融合蛋白EPCP009f。选用明矾佐剂(氢氧化铝和氢氧化镁悬浮液)分别与EPCP009f和EPCP009m蛋白混合后,免疫BALB/c小鼠(EPCP009f组、EPCP009m组),以BCG作为阳性对照组、PBS组作为阴性对照组、佐剂组为空白对照组,采用酶联免疫吸附实验(ELISA)、多重微球的Luminex技术、酶联免疫斑点(Elispot)技术分别对其抗体效价、胞外分泌细胞因子、单个细胞分泌的细胞因子水平进行检测,评价免疫保护效果。采用体外分枝杆菌生长抑制试验(MGIA)分析免疫后小鼠脾细胞体外抑制分枝杆菌生长的能力。结果表明:EPCP009m组的IgG2a和IgG1的比例显著高于BCG组,与BCG组相比,EPCP009m组具有诱导保护性免疫反应向Th1型转化的趋势,即可以提高小鼠体内巨噬细胞对细菌的抗原吞噬功能,增强其杀菌作用。其中EPCP009f和EPCP009m组刺激产生的9种抗原特异性细胞因子显著高于PBS和佐剂组,与BCG组相比,EPCP009f和EPCP009m免疫之后刺激产生保护性的抗原特异性细胞因子种类更丰富,即诱导的免疫应答更全面。其中IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-12、IL-17显著高于BCG组。IL-12细胞因子主要促进Th0细胞分化为Th1细胞;Th1型细胞因子IFN- γ 、IL-2、TNF- α 一方面可通过激活巨噬细胞直接杀死结核分枝杆菌,同时可通过增加抗原提呈给CD4T+细胞和CD8T+细胞等功能提高免疫应答作用,杀死结核分枝杆菌;IL-4、IL-6细胞主要促进B细胞的活化,促进抗体的生成,抗体可通过中和作用抑制结核分枝杆菌进入细胞;IL-17主要招募、激活中性粒细胞抑制结核分枝杆菌生长。体外分枝杆菌抑制实验表明,EPCP009m组和EPCP009f组均表现出较强的抑制分枝杆菌生长的能力,其中EPCP009m组的抑菌效果不低于BCG组,其抑菌能力可能与其能够诱导产生IL-17、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等更广泛的细胞因子相关。

[0040] 由ESAT-6、CFP-10、nPPE18和nPstS1蛋白组成的结核分枝杆菌亚单位疫苗EPCP009m组和EPCP009f组,表现出较强的免疫原性,能诱导机体产生较高的保护性细胞免疫应答和体液免疫应答,具有作为预防型疫苗或加强型疫苗的潜力。本发明选择表位聚集区的序列作为多组分抗原的成分,解决了免疫优势表位不够集中且存在冗余序列的缺点;多组分蛋白的联合应用解决了单一抗原成分抗原谱窄的问题。另外,nPstS1目前尚未在任何进入临床期的结核病疫苗研究中加以应用,本发明为结核新疫苗的研发提供了新的抗原成分。

[0041] 本发明还提供了所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,或者所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述的编码基因,或者所述表达载体,或者所述工程菌在制备结核分枝杆菌检测试剂或者治疗结核分枝杆菌疾病的药物中的应用。

[0042] γ 干扰素释放试验是目前公认的诊断结核感染的高灵敏度、高特异性的检测方法;其原理为通过结核分枝杆菌特异抗原刺激T淋巴细胞释放 γ 干扰素来检测是否为结核分枝杆菌感染;该试验阳性表明既往曾感染结核分枝杆菌。经本发明抗原刺激后的样本其

释放 γ 干扰素的能力及强度明显高于对照组,因此本发明中的抗原具备作为检测试剂的潜力。同理所述,目前多种细胞因子分泌水平的检测,如IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-12、IL-17等,均已纳入结核感染检测的分子标记物评估范围。本发明抗原刺激后上述细胞因子的分泌水平与对照组比较均呈现明显变化,提示可用作潜在的分子检测标志物。

[0043] 结核分枝杆菌作为一种细胞内寄生菌,免疫系统清除病原能力依赖于细胞免疫;而保护性细胞因子的分泌是细胞免疫能力的最直接体现;本发明所述抗原免疫后,无论是细胞因子分泌的水平、还是细胞因子分泌的种类,与对照组相比均有显著升高或不低于BCG组。该研究结果提示,当机体应用相应抗原制备的药物后,机体能够分泌强度较高、更为广泛保护性细胞因子,或辅助免疫系统、调节免疫网络及细胞因子分泌,帮助结核感染病人建立应对病原菌感染的免疫应答。从这个角度来说,基于本抗原制备的生物制剂具备成为治疗结核感染药物的潜力。

[0044] 本发明采用原核表达系统表达蛋白,适合大规模商业化生产,且成本较低。基于本发明的检测试剂可广泛用于结核病的辅助诊断、流行病学监测与感染筛查等相关领域,为抗结核新疫苗的研制提供了新思路。

[0045] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细说明,但是不能把它们理解为本发明保护范围的限定。若未特别指明,实施例中所使用的实验方法均为常规方法;所用的材料、试剂等均可从商业途径得到。

[0046] E.coli DH5 α 和BL21(DE3)感受态、T4连接酶、EcoRI和HindIII限制性内切酶购自北京全式金生物技术有限公司;Alum佐剂购自Thermo Fisher公司;结核分枝杆菌标准株(H37Rv, ATCC27294)和原核表达质粒载体pET-32a由本实验室保存;蛋白纯化Ni-NTA填料购自GE Healthcare公司;辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠IgG抗体(IgG, IgG1, IgG2a)购于北京博奥龙免疫技术有限公司;小鼠淋巴细胞分离液和Elispot试剂盒购于达科为生物技术股份有限公司;BALB/c小鼠购于北京华阜康生物科技股份有限公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购于Qiagen公司。

[0047] 实施例1 T细胞表位预测及富含T细胞表位序列的选择

[0048] 在美国国家生物技术信息中心(NCBI)的数据库中,检索结核分枝杆菌Rv3875, Rv1196, Rv3874和Rv0934的基因序列。使用TEpredict和IEDB等生物信息学软件对Rv1196和Rv0934中能与HLA-A*02型等等位基因(包括HLA-A*0201、*0202、*0203、*0206基序)结合的T细胞表位进行预测分析。发现Rv1196基因表达蛋白的氨基酸序列201-300位区域, Rv0934基因表达蛋白的氨基酸序列57-135位和268-373位两个区域为T细胞表位集中区。分别将表位区对应的核苷酸进行剪接后串联,形成表位富集区基因nRv1196和nRv0934,分别编码亚单位蛋白nPPE18和nPstS1。

[0049] 实施例2 重组蛋白EPCP009f和单个蛋白ESAT-6, CFP-10, nPPE18, nPstS1的基因扩增、表达和纯化

[0050] 单个蛋白的质粒构建:以H37Rv基因组DNA为模板,通过特异性引物PCR扩增Rv3875、Rv3874、nRv1196和nRv0934基因序列,引物的两端包括EcoRI和HindIII两个酶切位点,引物列表见表1。

[0051] 表一引物扩增列表

Gene/Protein	Primers
<i>Rv3874</i> /CFP-10	F: 5'-taccggaattcatggcagagatgaagaccga-3' (SEQ ID NO.11) R: 5'-atcccaagctttcagaagcccatttgcgag-3' (SEQ ID NO.12)
<i>Rv3875</i> /ESAT-6	F: 5'-tatgaattcatgacagagcagcagt-3' (SEQ ID NO.13) R: 5'-atcccaagctttgcaacatcccagtgac-3' (SEQ ID NO.14)
<i>nRv1196</i> /nPPE18	F: 5'-ccggaattcatgaacaatgtgccca-3' (SEQ ID NO.15) R: 5'-cccaagcttaccgaagaaccagcg-3' (SEQ ID NO.16)
<i>nRv0934</i> nPstS1	F1: 5'-ccggaattcggtagcagcgtctcta-3' (SEQ ID NO.17) R1: 5'-atctccgctcagcaggtcaactacaacaatagctctggcaatttctgtt-3' (SEQ ID NO.18) F2: 5'-aacaagaaatgccagagctattgttagttgacctgctgagcggagat-3' (SEQ ID NO.19) R2: 5'-cccaagcttggaaatcgtcgcgatca-3' (SEQ ID NO.20)

[0053] PCR产物经EcoRI和HindIII酶切之后,分别克隆于pET32.a载体。融合蛋白EPCP009f的质粒构建:EPCP009f质粒由Rv3875,nRv1196,Rv3874,nRv0934四个基因依次串联,各基因之间加入一段序列为GGTGGTTCTGGCGGT的linker,可保证各蛋白之间在空间结构上互不影响,最外侧的基因两端连接NdeI和XhoI酶切位点,各基因连接之后克隆于pET43.1a载体(得到pET43.1a-ERA005f重组质粒)。

[0054] 把所有构建的质粒首先转入大肠杆菌DH5 α 感受态中,提取质粒、转入BL21 (DE3)中,挑取单个克隆菌接种于3ml含有100 μ g/mL氨苄的LB液体培养基中,然后置于37 $^{\circ}$ C、180rpm/min摇床中小量扩增培养6~8个小时。从少量扩增培养的菌液中吸取1ml菌液于300ml含有100 μ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,置于37 $^{\circ}$ C、180rpm/min摇床中大量扩增培养。当大量培养的菌液光密度OD值达到0.6时,向菌液中加入终浓度为1mmol/L的异丙基 β -d-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导剂,诱导蛋白的表达。然后将培养物在4 $^{\circ}$ C条件下4000rpm离心10分钟收集菌体,并用20毫升的裂解缓冲液(10mM Tris-HCl[pH 8.0],0.5% Triton X-100)重新悬浮。菌体经超声处理后,用12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分别对上清液和沉淀进行分析,包涵体表达的蛋白溶解在20mL含8M尿素的20mM Tris-HCl(pH8.0)中。最后通过镍亲和层析法从包涵体或上清液中纯化蛋白质,带有His-Tag残基的重组蛋白将被结合到Ni-NTA琼脂糖树脂上。然后,用30mM、60mM、90mM、150mM、300mM的咪唑在洗涤缓冲液中洗脱结合的蛋白。最后用BCA蛋白质测定试剂盒对蛋白浓度进行检测。

[0055] 各蛋白表达条件和表达形式如表2所示。

[0056] 表二蛋白表达条件和表达形式

	基因名	蛋白名	克隆载体	表达条件	分子量 (kDa)	表达形式
	<i>Rv3875</i>	ESAT6	pET32a(+)	30°C, 6h	30.85	上清
[0057]	<i>nRv1196</i>	nPPE18	pET32a(+)	30°C, 6h	31.4	包涵体
	<i>Rv3874</i>	CFP10	pET32a(+)	30°C, 6h	31.4	上清
	<i>nRv0934</i>	nPstS1	pET32a(+)	37°C, 4h	40.75	包涵体
	EPCP009f	EPCP009f	pET41.3a(+)	37°C, 4h	50.91	包涵体

[0058] EPCP009f, CFP10, ESAT6, nPPE18和nPstS1的分子量分别为56kD, 31kD, 30kD, 31kD和41kD, 蛋白电泳结果见图1。

[0059] 实施例3小鼠动物模型免疫流程

[0060] 选取购自北京华阜康生物科技股份有限公司的SPF级别的雌性BALB/c小鼠(6周龄)用于免疫实验。小鼠共分为5组, 每组6只用制备好的免疫制剂采用颈背部皮下多点的方式进行第一次免疫, 实验组分别免疫50 μ g与明矾佐剂乳化后的EPCP009f EPCP009m蛋白, 间隔10天, 免疫三次; 阳性对照组免疫BCG (1×10^6 CFU/只); 空白对照、阴性对照组分别免疫200 μ l的PBS或200 μ l明矾佐剂与PBS的混合液。最后一次免疫10天后, 对小鼠摘眼球收集血液, 然后脱颈处死, 分离脾细胞检测各项免疫指标。

[0061] 实施例4EPCP009f组和EPCP009m组的免疫保护效果检测

[0062] 1、体液免疫效果检测:

[0063] A、血清的分离

[0064] 将实施例3中免疫的小鼠眼球采血1mL, 将血液置于37°C温箱中2小时, 之后转入4°C冰箱中过夜。次日, 将血液4000rpm离心10分钟后吸取上清。

[0065] B、血清抗体滴度ELISA检测

[0066] 1) 分别用2 μ g/ml的EPCP009f和EPCP009m蛋白包被96孔酶标板, 每孔100 μ L, 置于4°C过夜, 次日, 用PBST洗板5次。

[0067] 2) 用5%的脱脂奶粉37°C封闭2小时, 之后PBST洗板5次。

[0068] 3) 用PBS将各组血清按2倍稀释, 每孔中加入100 μ L稀释后的血清, 37°C孵育1小时后, 用PBST洗板5次。

[0069] 4) 分别加入1:5000倍稀释的HRP标记的IgG、IgG1、IgG2a抗体, 每孔100 μ L, 37°C孵育1小时后, 用PBST洗板5次。

[0070] 5) 加入TMB显色液, 37°C避光反应15分钟, 之后加入终止液(2M的H₂SO₄)终止反应。

[0071] 6) 酶标仪检测波长450nm的吸管光度值。

[0072] 7) 判断标准: 以佐剂组为对照组, 若OD \geq 2.1 \times OD(对照组), 则判读为阳性。

[0073] 2、细胞免疫效果检测:

[0074] A、Luminex法检测胞外细胞因子

[0075] 1) 将实施例3中免疫的小鼠处死后, 在75%酒精中浸泡5分钟, 将小鼠固定在超净台泡沫板上, 剪开腹膜, 无菌分离脾脏。

[0076] 2) 将200目的尼龙膜放置6孔细胞培养板上, 加入4ml淋巴细胞分离液, 使用注射器轻轻研磨小鼠脾脏, 将研磨的细胞收集到15ml离心管中。沿侧壁缓慢加入1ml的1640细胞培

培养基,梯度离心之后,收集中间层为脾细胞。

[0077] 3) 使用细胞计数仪测定细胞浓度,然后用含10% FBS的1640培养基对脾细胞稀释调整至 2×10^6 cells/ml,以备后续实验使用。

[0078] 4) 每组取100 μ L脾细胞置于24孔培养板中,每孔分别加入10 μ g特异性抗原,将脾细胞与相应的刺激物在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中孵育24小时后,收集细胞上清,通过Luminex多因子检测技术检测IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-12、GM-CSF、IL-17、IL-4、IL-6和IL-10九种细胞因子水平。

[0079] B、Elispot检测IFN- γ 和IL-4

[0080] 1) 在Elispot板的每个孔中加入100 μ L稀释的捕获抗体溶液,并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。弃去包被抗体,用清洗液洗板5次,然后每孔加入200微升封闭液,在室温下孵育2小时。

[0081] 2) 在96孔板的每孔中加入100 μ L脾细胞淋巴细胞悬液,同时在每孔中加入2 μ g对应的免疫蛋白,每组三个生物学重复,两个技术重复。将Elispot板在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的培养箱中培养24小时以刺激细胞因子的产生。

[0082] 3) 用准备好的清洗液洗板,同时加入检测抗体和酶结合试剂(Streptavidin-HRP),并根据说明书进行孵育,清洗。最后加入100 μ LAEC底物溶液在室温下避光显色25min,用去离子水洗板停止底物反应。将Elispot板避光干燥,对菌落进行计数和分析。

[0083] 3、体外保护性分析

[0084] A、体外分枝杆菌生长抑制试验

[0085] 1) 将结核分枝杆菌强毒株H37Rv稀释到每300 μ L含50个CFU的浓度。

[0086] 2) 取300 μ L的H37Rv加入到300 μ L的脾细胞中,然后将脾细胞-H37Rv混合物在24孔细胞板中于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下共培养物培养4天。4天后,从24孔细胞板中用移液器吹打混匀3次收集脾细胞-H37Rv的混合物,然后转移到1.5mL离心管中,离心后丢弃上清液。

[0087] 3) 每孔加入500 μ L无菌水,混合后取50 μ L在含有10%OADC营养液的7H10培养基上,在37 $^{\circ}$ C下培养三周。对细菌数量进行计数,数据以每个样品的总数量log₁₀CFU表示。

[0088] 实施例5EPCP009f组和EPCP009m组的免疫效果评价

[0089] 1、体液免疫效果评价:

[0090] 体液免疫效果评价结果见图2。

[0091] EPCP009f或EPCP009m混合佐剂免疫小鼠后,使用ELISA方法检测EPCP009f、EPCP009m的特异性血清IgG及IgG1、IgG2a亚型的效价,并与BCG免疫组的特异性血清IgG及IgG1、IgG2a亚型的效价进行比较。结果表明,EPCP009f组和EPCP009m组产生的IgG、IgG1和IgG2a效价相当,均显著高于BCG对照组。

[0092] IgG2a通常代表Th1型细胞免疫,IgG1通常代表Th2型细胞免疫,通过计算IgG2a与IgG1的比率来确定免疫反应的类型。结果表明,BCG组和EPCP009f组的IgG2a/IgG1比值相当,无统计学差异,EPCP009m组则高于两者,差异具有统计学意义。

[0093] 2、细胞免疫效果评价:

[0094] 免疫小鼠的脾细胞在体外被抗原刺激,Luminex检测抗原特异性IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、GM-CSF和IL-17共九种细胞因子。如图3所示,与PBS和佐剂对照组相比,EPCP009f组和EPCP009m组免疫小鼠之后,所检测的九种细胞因子的水平均显著升高,差异具有统计学意义;而BCG组免疫小鼠之后,只刺激产生TNF- α 、IL-6和IL-10。与

BCG组相比,EPCP009f组和EPCP009m组产生的IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-17和IL-12显著高于BCG组。

[0095] 使用Elispot检测方法对抗原特异性INF- γ 和IL-4进行分析。如图4所示,与PBS组相比,BCG组、EPCP009f组和EPCP009m组均产生了高水平的Th1型细胞因子INF- γ 和Th2型细胞因子IL-4,表明三组免疫后均可诱导小鼠产生Th1型和Th2型免疫反应。与BCG组相比,EPCP009f组和EPCP009m组之间产生的抗原特异性INF- γ 和IL-4无明显差异,均显著高于BCG组。

[0096] 3、体外保护性分析:

[0097] 为了确定免疫小鼠在体外抑制Mtb生长的能力,将免疫小鼠脾细胞与H37Rv共培养并进行菌落计数(体外分枝杆菌抑制实验,MGIA)。如图5所示,与PBS和佐剂组相比,BCG组、EPCP009f组和EPCP009m组免疫后均对结核分枝杆菌生长产生了明显的抑制作用,其中EPCP009m组和BCG组对结核分枝杆菌的生长抑制能力相当,强于EPCP009f组。与PBS组和佐剂相比,EPCP009m组分别减少了 $0.951\log_{10}\text{CFU}[\text{SD}\pm 0.15]$ 和 $1.001\log_{10}\text{CFU}[\text{SD}\pm 0.17]$ 1;BCG组分别减少 $0.981\log_{10}\text{CFU}[\text{SD}\pm 0.15]$ 、 $1.041\log_{10}\text{CFU}[\text{SD}\pm 0.14]$;EPCP009f组分别减少了 $0.651\log_{10}\text{CFU}[\text{SD}\pm 0.08]$ 和 $0.711\log_{10}\text{CFU}[\text{SD}\pm 0.09]$ 。

[0098] 上述结果证明,EPCP009f组和EPCP009m组免疫后的小鼠,IgG2a和IgG1的比例均高于BCG组,这表明EPCP009f组和EPCP009m的抗原成分具有诱导免疫反应向Th1型转化的趋势。EPCP009f组和EPCP009m组刺激产生的九种抗原特异性细胞因子显著高于PBS和佐剂组,与BCG组相比,EPCP009f组和EPCP009m组免疫之后诱导产生的抗原特异性细胞因子更为广泛。体外分枝杆菌抑制实验表明,EPCP009m组和EPCP009f组接种后,机体均可呈现较强的抑菌能力,其中EPCP009m组的抑菌效果和BCG组相当,这可能与它能够诱导产生更广泛的细胞因子有关,尤其是IL-17、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 。

[0099] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,便于具体和详细地理解本发明的技术方案,但不能因此而理解为对发明专利保护专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

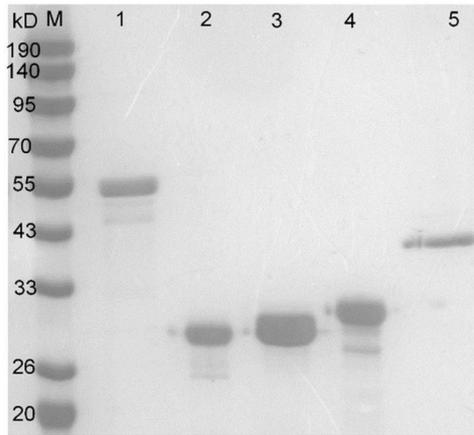


图1

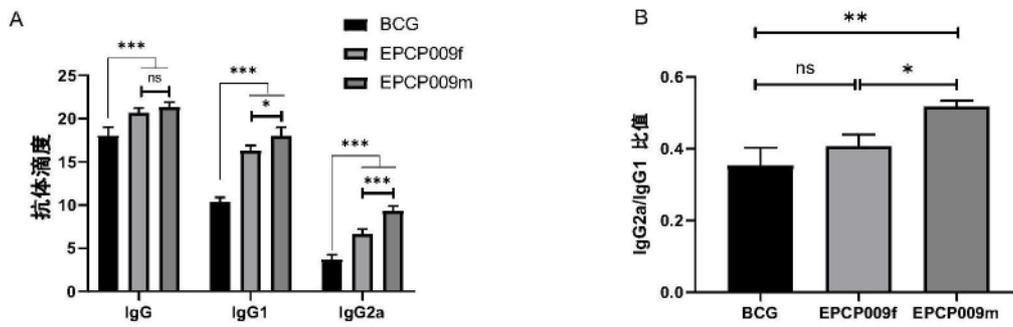


图2

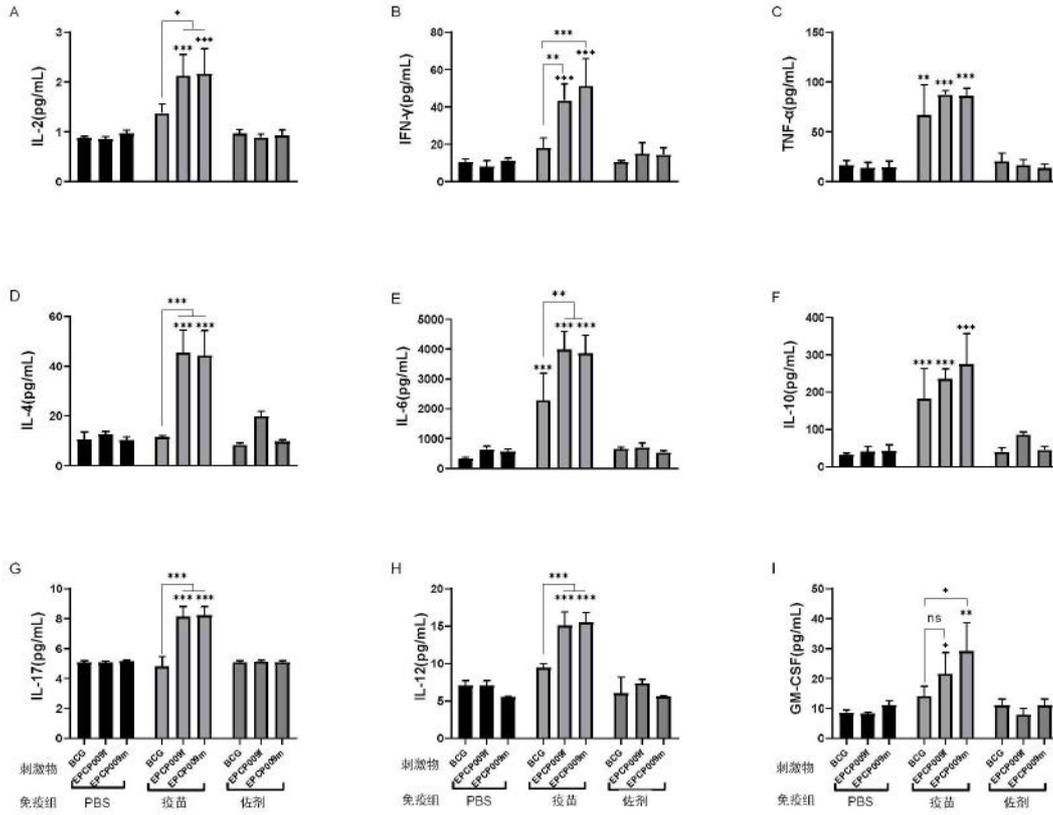


图3

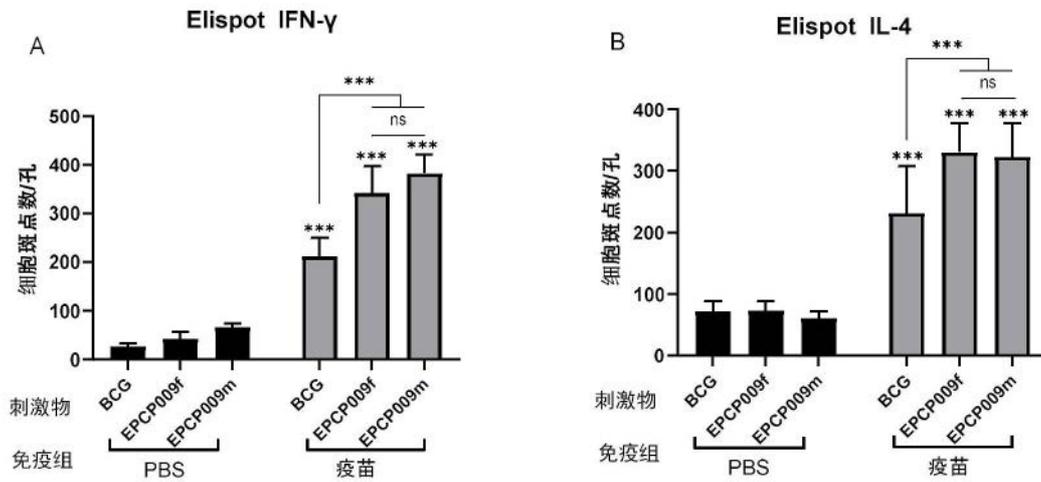


图4

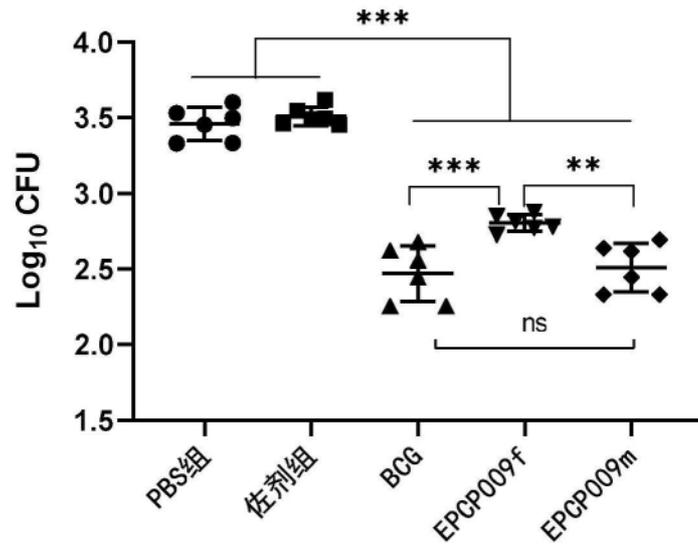


图5