



(21) 申请号 202311596059.7

(22) 申请日 2023.11.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117305214 A

(43) 申请公布日 2023.12.29

(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

(72) 发明人 万康林 刘海灿 王瑞欢 范雪亭
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 孙怡

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

C12R 1/32 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101822829 A, 2010.09.08

CN 101921801 A, 2010.12.22

CN 106198971 A, 2016.12.07

CN 106405107 A, 2017.02.15

CN 116003540 A, 2023.04.25

CN 116763911 A, 2023.09.19

US 2013115240 A1, 2013.05.09

WO 2010127492 A1, 2010.11.11

WO 2013039069 A1, 2013.03.21

WO 2021080373 A1, 2021.04.29

李马超. 卡介苗和结核分枝杆菌中B细胞抗原表位多态性研究.《中国博士学位论文全文数据库(电子期刊)医药卫生科技辑》.2017,(第2期),第E059-88页.

陈富超等. 结核分枝杆菌抗原Rv2654重组蛋白的表达和纯化 及其诱导的免疫应答特征.《中南大学学报(医学版)》.2021,第46卷(第9期),第925-931页.

审查员 刘超亚

权利要求书1页 说明书7页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种重组卡介苗及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及生物医药技术领域,具体公开了一种重组卡介苗及其制备方法与应用。本发明重组卡介苗,相比出发菌株,过表达nPPE18、nfadD28、HspX和p1cA蛋白。本发明重组卡介苗可诱导机体产生良好的免疫原性,可提供较高的保护性和安全性,作为新型BCG疫苗。

1. 一种重组卡介苗,其特征在于,相比出发菌株,所述重组卡介苗的基因组中包含融合蛋白nPnFHp010的编码基因,所述融合蛋白nPnFHp010的编码基因如SEQ ID No.1所示;所述出发菌株为BCG-China。

2. 根据权利要求1所述的重组卡介苗,其特征在于,所述重组卡介苗中过表达融合蛋白nPnFHp010,所述融合蛋白nPnFHp010的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

3. 一种构建权利要求1-2任一项所述的重组卡介苗的方法,其特征在于,包括在出发菌株中转入含有融合蛋白nPnFHp010的编码基因的质粒的步骤。

4. 权利要求1-2任一项所述的重组卡介苗或权利要求3所述的方法构建获得的重组卡介苗在制备预防MTB感染的疫苗或治疗MTB感染引起疾病的药物中的应用。

5. 一种预防结核病的疫苗,其特征在于,包括权利要求1-2任一项所述的重组卡介苗或权利要求3所述的方法构建获得的重组卡介苗。

一种重组卡介苗及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体地说,涉及一种重组卡介苗及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 结核病(Tuberculosis, TB)是一种因感染结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)而引起的传染病,主要通过呼吸道途径在人与人之间进行传播。TB一直是由单一传染病导致死亡的主要原因之一,其流行广泛且致死率高。疫苗接种是预防和控制传染病最有效的策略。目前全世界唯一获准使用的TB疫苗是卡介苗(**bacillus Calmette-Guérin vaccine, BCG**),这是一种牛分枝杆菌(*M. bovis*)减毒活疫苗,于1921年被首次使用,是世界范围内使用最广泛的疫苗之一。BCG可以有效预防儿童严重TB,如粟粒性结核病和结核性脑膜炎。然而,其对儿童TB的保护效力会随着时间的推移而逐渐降低,且BCG在不同人群和地区之间表现出明显不同的保护水平,对成人TB的保护效力从0%到80%不等。此外,作为一种减毒活疫苗,BCG具有潜在的毒性,在免疫缺陷个体中可能存在安全问题,不能在所有人群中使用。因此,迫切需要开发更有效的新型TB疫苗,促进全世界范围内的TB控制。

[0003] 目前,正在研究中的TB疫苗包括包括亚单位疫苗、减毒活疫苗、重组BCG(Recombinant BCG, rBCG)疫苗和DNA疫苗。BCG保护效力会随着时间的延长而逐渐降低的可能原因是BCG中含有的保护性免疫优势抗原数量有限,不能持续高水平稳定表达。通过将免疫优势抗原基因整合到BCG中,制备rBCG可以完美解决这一问题。rBCG是一种增强型的活疫苗,通过将BCG作为疫苗活载体,将外源基因导入BCG中,接种到体内后可以自我繁殖,可持续表达自身蛋白和整合到rBCG中的重组蛋白,持续刺激机体产生适应性细胞免疫和体液免疫应答。并且,rBCG疫苗构建的基础是BCG,具有较高的安全性。rBCG疫苗(MTBVAV和VPM1002)分别已经进入I期和III期临床试验,进入临床期的rBCG MTBVAC和VPM1002在相关的动物模型中显示出与BCG相当或更好的安全性和有效性,是很有前途的新型TB疫苗候选物。但在BCG中导入免疫原性较优的抗原,并非均能提高BCG的效果,有时甚至会降低原始BCG的效果,如可参见Marques-Neto LM, Piwowarska Z, Kanno AI, Moraes L, Trentini MM, Rodriguez D, et al. Thirty years of recombinant BCG: new trends for a centenary vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2021;20:1001-11和张灵霞,吴雪琼,董恩军. Ag85a-卡介苗重组疫苗对结核病预防及治疗作用的研究. *中国现代医学杂志*. 2009;19:1948-51。因此,仍有必要对如何获得效果更佳的重组BCG进行进一步研究。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一在于提供一种新的重组卡介苗,其可提升BCG的保护效果,更好地实现结核病的预防。

[0005] 为了实现该目的,本发明的技术方案如下:

[0006] 第一方面,本发明提供一种重组卡介苗,相比出发菌株,所述重组卡介苗过表达nPPE18、nfadD28、HspX和plcA蛋白。

[0007] 优选,本发明的重组卡介苗基因组中包含Rv1196-300、Rv2941-369、Rv2031c和Rv2351c基因。

[0008] 本发明的重组卡介苗中过表达融合蛋白nPnFHp010,所述融合蛋白nPnFHp010的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0009] 本发明的重组卡介苗的基因组中包含融合蛋白nPnFHp010的编码基因,所述融合蛋白nPnFHp010的编码基因如SEQ ID No.1所示。

[0010] PPE18抗原作为目前已进入II期临床试验的候选疫苗M72/AS01E的组分之一,已被证明对食蟹猴的TB有保护作用;fadD28蛋白编码脂肪酸连接酶,可能与MTB的毒力有关,且具有良好的免疫原性。

[0011] 目前研究中的疫苗大多选用抗原全长来制备疫苗。然而,在机体抗原诱导的免疫反应过程中起着决定性作用的部分是抗原表位,抗原表位是蛋白质抗原性的核心。抗原表位蛋白将抗原免疫显性表位聚集,缩短抗原长度,去除抗原中的冗余序列,提高疫苗的免疫原性,并减少副作用。本发明提供了nPPE18和nfadD28蛋白2种T细胞抗原表位蛋白,可以大大提升疫苗接种的免疫效率。具体地,本发明筛选、设计、优化了PPE18和fadD28蛋白抗原T细胞表位富集区,构建了新的PPE18和新的fadD28蛋白抗原(new PPE18, nPPE18和new fadD28, nfadD28)。经动物实验验证,两种蛋白都有良好的免疫原性。本发明通过缩短抗原fadD28和PPE18的长度,去除抗原冗余序列,构建的nfadD28和nPPE18两种抗原表位蛋白,使得免疫显性表位聚集,极大的提高了疫苗的免疫原性,并减少了副作用。

[0012] 之后本发明提供了一种由MTB潜伏期分泌抗原HspX(HspX是一种MTB潜伏期表达蛋白,可刺激宿主产生明显的CD4⁺T细胞反应和IL-2和IL-17等保护性细胞因子,诱导Th1型细胞免疫反应和体液反应)和活动期分泌抗原nPPE18,nfadD28和plcA(plcA是MTB磷脂酶C的一部分,位于RD7区,在BCG菌株中缺失,能够诱导小鼠产生明显的细胞与体液免疫反应应答)融合而成的抗原组合物。所述抗原对应的编码基因分别是Rv2031c、nRv1196、nRv2941和Rv2351c。详细地,所述融合抗原组合物为nPPE18、nfadD28、HspX和plcA四种抗原顺序连接,两两之间通过柔性肽段“Gly-Gly-Ser-Gly-Gly”连接,制成的一种融合抗原(nPnFHp010)。nPnFHp010融合抗原中包含四种MTB优势抗原,分别是潜伏期分泌抗原HspX(Rv2031c),活动期分泌抗原nfadD28(Rv2941-369)、nPPE18(Rv1196-300)和plcA(Rv2351c),可以提供活动期和潜伏期感染MTB患者全面和广泛的保护。将上述融合抗原(nPnFHp010)基因整合到BCG中,可获得能够稳定表达该融合抗原基因的重组卡介苗(rBCG-nPnFHp010)。

[0013] MTB进入人体后,有1/3以上的MTB以休眠状态存活在宿主体内,目前正在研究中的TB疫苗大多选择MTB活动期分泌抗原来制备疫苗,无法提供针对休眠期MTB的免疫保护,HspX抗原是一种MTB潜伏期分泌抗原,选择以此抗原为基础研制的疫苗可以提供针对MTB潜伏感染的免疫保护。本发明将HspX抗原与另外3种活动期分泌抗原nPPE18、nfadD28和plcA制备融合抗原nPnFHp010,将这种融合抗原基因整合到BCG中,制成的重组卡介苗rBCG-nPnFHp010可以给机体提供针对活动期和潜伏期MTB感染的全面保护。

[0014] 具体地,本发明选择一种MTB潜伏期分泌优势抗原HspX(Rv2031c),三种MTB活动期分泌优势抗原nPPE18(Rv1196-300)、nfadD28(Rv2941-369)和plcA(Rv2351c),其中,nPPE18

和nfadD28抗原分别为nPPE18、nfadD28的T细胞表位蛋白抗原,以此四种抗原为基础设计MTB融合抗原基因nPnFHp010,利用整合质粒将该融合基因整合入BCG基因组中,构建能够表达融合抗原nPnFHp010的基因重组卡介苗。nPnFHp010中包含4个组分,分别是nPPE18 (*Rv1196-300*)、nfadD28 (*Rv2941-369*)、HspX (*Rv2031c*)和plcA (*Rv2351c*),nPnFHp010融合抗原基因由*Rv1196-300*、*Rv2941-369*、*Rv2031c*和*Rv2351c*四种基因由5'端到3'端依次顺序连接,各抗原组分之间以柔性肽段连接。之后将其整合到BCG中获得重组卡介苗,并利用rBCG-nPnFHp010免疫小鼠,对其免疫原性、保护性和安全性展开评价。结果显示:rBCG-nPnFHp010可以诱导小鼠产生良好的免疫原性,可提供较高的保护性和安全性,是一种有效的新型TB候选疫苗,在预防TB感染方面具有潜在的应用价值。

[0015] 优选本发明的重组卡介苗中,所述出发菌株为BCG-China。

[0016] 第二方面,本发明提供一种构建上述重组卡介苗的方法,其包括在出发菌株中转入含有*Rv1196-300*、*Rv2941-369*、*Rv2031c*和*Rv2351c*基因的质粒的步骤。

[0017] 优选,本发明的方法包括在出发菌株中转入含有融合蛋白nPnFHp010的编码基因的质粒的步骤。

[0018] 第三方面,本发明提供上述重组卡介苗或上述方法构建获得的重组卡介苗在制备预防MTB感染的疫苗或治疗MTB感染引起疾病的药物中的应用。

[0019] 第四方面,本发明提供一种预防结核病的疫苗,其包括上述重组卡介苗或上述方法构建获得的重组卡介苗。

[0020] 本发明的疫苗还包括佐剂。

[0021] 本发明的有益效果至少在于:

[0022] 本发明构建的基因重组卡介苗rBCG-nPnFHp010具有以下几点优势:疫苗的免疫原性高,并减少了副作用,可以提供活动期和潜伏期感染MTB患者全面和广泛的保护。可以诱导小鼠产生良好的免疫原性,可提供较高的保护性和安全性,是一种有效的新型TB候选疫苗,在预防TB感染方面具有潜在的应用价值。

附图说明

[0023] 图1为本发明实施例2中pMV361-nPnFHp010重组质粒示意图。

[0024] 图2为本发明实施例4中小鼠血清抗体效价。图中** $P < 0.01$ 。

[0025] 图3为本发明实施例4中抗原刺激后小鼠脾淋巴细胞分泌9种细胞因子水平。图中a,b,c,d,e,f,g,h,i分别表示脾淋巴细胞经对应抗原刺激后上清中TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF和IL-17的数值,两组数据柱状图上方的星号表明两组数据间差异具有统计学意义,*和**分别表示 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。

[0026] 图4为本发明实施例4中PPD刺激后小鼠脾淋巴细胞分泌9种细胞因子水平。图中a,b,c,d,e,f,g,h,i分别表示脾淋巴细胞经PPD刺激后上清中TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF和IL-17的数值。

[0027] 图5为本发明实施例5中MGIA实验结果。ns表示两组间差异无显著性,*表示组间差异具有显著性,****表示 $P < 0.0001$ 。

[0028] 图6为本发明实施例6中小鼠肝脏、脾脏和肺脏三种脏器病理学结果。A、B和C三行

分别表示小鼠的肝脏、脾脏和肺脏病理切片的HE染色结果(40×)。

具体实施方式

[0029] 下面将结合实施例对本发明的优选实施方式进行详细说明。需要理解的是以下实施例的给出仅是为了起到说明的目的,并不是用于对本发明的范围进行限制。本领域的技术人员在不背离本发明的宗旨和精神的情况下,可以对本发明进行各种修改和替换。

[0030] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到或按本领域常规方法制备。

[0031] 本发明具体实施方式部分用于改造的出发菌株为BCG中国株(BCG-China),购自中国食品药品检定研究院。

[0032] 实施例1 fadD28和PPE18蛋白T细胞表位预测及T细胞表位富集区的选择

[0033] 在美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中,检索得到编码fadD28和PPE18蛋白的基因序列,使用Tepredict和IEDB等生物信息软件预测fadD28和PPE18蛋白的T细胞表位,筛选与HLA-II类分子(包括HLA-A*0201、*0202、*0203、*0206)结合较好的T细胞表位肽段,分别对应fadD28蛋白第217-第339位和PPE18蛋白第201-第300位氨基酸序列,将对应的核苷酸序列剪接后分别得到fadD28和PPE18蛋白T细胞表位富集区基因序列(NCBI上编号分别为Rv1196-300和Rv2941-369)。

[0034] 实施例2 pMV361-nPnFHp010重组质粒的构建

[0035] (1) nPnFHp010融合抗原基因的设计

[0036] 在NCBI(美国国家生物技术信息中心)网站中查询Rv1196-300、Rv2941-369、Rv2031c和Rv2351c对应的基因序列,其中,Rv1196-300和Rv2941-369为Rv1196和Rv2941抗原基因经T细胞表位预测和优化,对其表位富集区域进行定位、剪接后所得的抗原表位肽。将Rv1196-300、Rv2941-369、Rv2031c和Rv2351c从5'端到3'端进行顺次连接,采用“GGTGGTTCTGGCGGT(SEQ ID NO: 3)”(氨基酸序列为“Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(SEQ ID NO: 4)”)作为柔性连接肽段连接各抗原设计融合抗原基因nPnFHp010。最后得到的nPnFHp010融合基因序列如SEQ ID NO: 1所示,nPnFHp010融合抗原氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示。

[0037] (2) pMV361-nPnFHp010重组质粒的构建

[0038] 利用基因合成技术合成5'端带有EcoRI、3'端带有HindIII酶切位点的nPnFHp010融合抗原基因,利用EcoRI和HindIII限制性内切酶对融合抗原基因和pMV361载体(购自上海晶诺生物科技有限公司)进行双酶切(37℃、25min)。酶切产物分别进行琼脂糖凝胶电泳鉴定和胶回收后利用T4 DNA连接酶连接,连接条件为25℃、30min。连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,步骤为:取出冻存的大肠杆菌DH5 α 感受态细胞100 μ L置于冰上溶解,加入10 μ L连接产物混匀后冰浴静置30min,42℃热激90s,冰浴静置2min,在生物安全柜中加入800 μ L无抗性的LB液体培养基,置于摇床37℃,140rpm培养1h。培养结束后4000rpm离心1min,弃去400 μ L上清,将菌体沉淀轻轻吹打混匀后取200 μ L菌液涂布于含有卡那霉素的LB固体平板,37℃倒置培养12~16h。挑取生长状态良好的单菌落于含有卡那霉素的LB液体培养基中增菌培养,取菌液进行质粒小提后作EcoRI和HindIII双酶切鉴定。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定符合预期后送公司测序,测序结果经BLAST比对完全正确的菌样在含卡那霉素的LB液体培养基中增菌培养,碱裂解法抽提质粒并于-20℃保存。pMV361-nPnFHp010

重组质粒的结构示意图见图1。

[0039] 实施例3 rBCG-nPnFHp010基因重组卡介苗的制备

[0040] (1) BCG感受态细胞的制备

[0041] 用接种环从罗氏培养基中刮取少量BCG-China培养物,接种于7H9液体培养基中,37℃静置培养至对数生长期(约20天左右),培养结束后将菌液冰浴1h,4000rpm、4℃离心15min,弃去上清,收集菌体。每50mL菌液对应的菌体沉淀加入50 mL高压灭菌的10%甘油(提前冰上预冷),移液器轻轻吹打混匀使菌体充分悬浮,4000rpm、4℃离心15min,弃去上清,收集菌体,重复洗涤3次。最后一次洗涤之后,加入1000 μL 10%甘油使菌体重新悬浮,以每管200 μL的量将制备完成的BCG感受态细胞分装于EP管中,-80℃保存备用。

[0042] (2) 电穿孔法转化BCG感受态细胞

[0043] 从冰箱取出制备好的BCG感受态细胞,冰上静置融化。吸取10μL实施例1中构建成功的重组质粒加入200μL BCG感受态细胞中,冰浴静置10min后,全部转移至电转杯中进行电击转化(参数为25kV、25μF、1000Ω),将电转结束之后的菌液转移至1.5mL EP管中,加入800μL 7H9液体培养基,37℃、180rpm摇床中复苏培养24h。将复苏之后的菌液室温4000rpm离心10min,弃去400μL上清,将沉淀重新悬浮后吸取200μL涂布于含有终浓度25μg/mL卡那霉素的7H10固体培养基,37℃培养至平板中长出单菌落。构建能够表达融合抗原nPnFHp010的基因重组卡介苗rBCG-nPnFHp010。

[0044] 实施例4 重组卡介苗rBCG-nPnFHp010的免疫原性评价

[0045] (1) rBCG-nPnFHp010疫苗的制备

[0046] 将rBCG-nPnFHp010和BCG-China分别在4℃、4000rpm条件下离心收菌,然后用7H9液体培养基洗涤菌体,最后用无菌PBS悬浮菌体并调整菌体浓度为 5×10^6 CFU/mL。

[0047] (2) 小鼠免疫流程

[0048] 取18只6-8周龄SPF级雌性BALB/c小鼠进行实验,小鼠被随机分为3组,每组6只,分别是PBS组、rBCG-nPnFHp010组和BCG-China组(简称BCG组),PBS组注射200μL PBS,rBCG-nPnFHp010组注射 1×10^6 CFU(200μL)rBCG-nPnFHp010菌液,BCG-China组注射 1×10^6 CFU(200μL)的BCG-China菌液,3组均于背部免疫1次,免疫30天后处死小鼠,然后分别对rBCG-nPnFHp010的免疫原性、保护性和安全性进行评价。

[0049] (3) rBCG-nPnFHp010的体液免疫效果评价

[0050] a: 血液样本采集

[0051] 初次免疫前及小鼠处死前分别通过眼眶采血法进行采血并收集血液,37℃静置2h,4000rpm离心10min,分离血清,分装后存放于-20℃备用。

[0052] b: ELISA法检测血清抗体效价

[0053] 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清特异性抗体效价,具体方法如下:

[0054] 用包被缓冲液(50mM碳酸盐缓冲液,pH=9.0)将rBCG-nPnFHp010和BCG-China全菌裂解液稀释至2μg/mL,每孔100μL包被96孔ELISA板,4℃孵育过夜。用0.01M PBST(含0.05%吐温-20的PBS溶液,pH=7.2)洗板5次,然后每孔加入100μL含3%BSA的封孔剂,37℃孵育2h。用PBST洗板5次,每组血清用PBS稀释多次,稀释倍数为 2^6-2^{32} ,将稀释后的血清依次加入各孔,37℃孵育1h。用PBST洗板5次,将标记有辣根过氧化物酶(HRP)的羊抗鼠IgG抗体用PBS稀释至1:5000。用PBST洗板5次,每孔加入显色底物TMB 100μL,37℃孵育15min。

[0055] 每孔加入100 μ L终止液(2M浓硫酸)终止反应。最后用普通微孔分光光度计测定450 nm处的吸光度。判断标准为:若样本OD值 $\geq 2.1 \times$ 阴性对照OD值,则判定为阳性。

[0056] 血清抗体效价检测结果见图2。结果显示,rBCG-nPnFHp010和BCG均可以刺激机体产生特异性IgG;但rBCG-nPnFHp010组(图中简称为nPnFHp010)抗体水平明显高于BCG组(图中简称为BCG),两者之间差异具有显著性($P < 0.01$)。

[0057] (4) rBCG-nPnFHp010的细胞免疫效果评价

[0058] a:小鼠脾脏淋巴细胞的分离

[0059] 在麻醉状态下处死小鼠,浸泡在75%酒精中5分钟,无菌分离脾脏。将200目细胞筛放入6孔细胞培养板的孔中,每孔加入4 mL淋巴细胞分离液,用5 mL注射器的橡胶端轻轻磨碎小鼠脾脏,将磨碎的脾脏细胞滤液收集到15 mL离心管中。沿15 mL离心管侧壁缓慢加入1 mL 1640细胞培养基。梯度离心后,收集15mL离心管中的中间云雾状淋巴细胞,并用10mL 1640洗涤。上清液用含10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素双抗生素的完全1640培养基重新悬浮。用细胞计数器测定细胞浓度,然后用完全1640培养基稀释脾细胞浓度至 1×10^6 /mL,供后续实验使用。

[0060] b:Luminex法检测九种胞外细胞因子

[0061] Luminex多重细胞因子检测试剂盒为市售商品化试剂盒,具体操作如下:

[0062] 96孔细胞培养板中按照每孔100 μ L的量加入调好浓度的脾淋巴细胞(1×10^6 /mL),再加入2 μ g对应的刺激物(nPnFHp010全菌裂解产物、BCG全菌裂解产物或PPD)。每组设立无菌PBS刺激的阴性对照孔和刀豆蛋白(ConA)(5 μ g/mL)刺激的阳性对照孔各一,盖好板盖并在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中共培养16-24小时。培养结束后将96孔细胞板4000rpm离心10min,取上清用于Luminex多重细胞因子检测9种细胞因子的表达水平,包括IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-12、GM-CSF、IL-17、IL-4、IL-6和IL-10,检测步骤按照说明书进行。

[0063] 特异性抗原刺激的Luminex检测结果见图3,PPD刺激的Luminex检测结果见图4。实验结果显示经特异性抗原刺激后rBCG-nPnFHp010免疫组小鼠脾淋巴细胞和BCG组相比,IL-6和IL-17的分泌水平显著增高,两者之间差异具有显著性($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);而IL-2、IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-12和IL-10分泌情况没有显著性差异($P > 0.05$);经PPD刺激后的rBCG-nPnFHp010免疫组小鼠脾淋巴细胞和BCG组相比,9种细胞因子的分泌情况均没有显著性差异($P > 0.05$)。本实验结果提示rBCG-nPnFHp010能够诱导机体产生强烈的体液和细胞免疫反应应答。

[0064] 实施例5 rBCG-nPnFHp010的体外保护效果评价

[0065] 采用结核分枝杆菌体外生长抑制试验(MGIA)进行rBCG-nPnFHp010体外保护效果评价,具体操作如下:24孔板中每孔加入调好浓度的脾淋巴细胞(1×10^6 /mL)500 μ L和含50 CFU的MTB标准株H37Rv(ATCC 27294)500 μ L,共1mL。混匀并置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中共培养4天。培养结束后将共培养物转移至离心管中,12000rpm离心10分钟并弃净上清。离心的同时在24孔板中每孔加入500 μ L无菌水,用移液器吹打底部和侧壁并静置5分钟后转移至对应离心管中,涡旋震荡后静置10min以彻底裂解细胞并释放胞内的MTB。取50 μ L涂布7H10平板,同时将50 μ L H37Rv菌液直接涂板作为空白对照,将平板37 $^{\circ}$ C倒置培养2-3周后进行菌落计数。

[0066] MGIA实验结果如图5所示,BCG和rBCG-nPnFHp010组MTB菌落数均明显低于PBS组(P

<0.001),说明经BCG和rBCG-nPnFHp010免疫后的小鼠脾细胞相较于PBS组来说均能有效地抑制MTB生长;rBCG-nPnFHp010组MTB菌落数稍低于BCG组,表明rBCG-nPnFHp010可能产生与BCG同等或更高的保护效力。

[0067] 实施例6 rBCG-nPnFHp010的安全性评价

[0068] 麻醉状态下处死小鼠后,无菌分离小鼠肝脏、脾脏和肺脏,然后置于10%福尔马林溶液中固定1周,固定结束后进行常规石蜡切片,苏木精-伊红染色(HE染色),并在显微镜下观察三种脏器的形态学变化。

[0069] rBCG-nPnFHp010组小鼠各脏器与对照组相比,首先,对三种脏器解剖结构肉眼观察可见:外观、颜色和大小均正常,且未见明显的增生、萎缩和水肿等病理改变。其次,常规石蜡切片实验结果如图6所示:①肝细胞结构清楚,排列紧密整齐,胞质丰富,细胞核大而圆,居中,肝索排列整齐有序,与对照组相比无明显差异;②脾脏细胞白髓区、红髓区及边缘区均未见明显异常,脾脏组织细胞整体形态正常,与对照组相比无明显差异;③肺脏组织各支气管及肺泡结构未见异常,可见少量炎性细胞浸润但与对照组相比无明显差异。总之,各脏器结构均在正常形态学范围内,未见细胞水肿、坏死等明显病理性病变。

[0070] 总之,本发明提供的融合基因重组卡介苗rBCG-nPnFHp010与单独接种BCG的小鼠相比,IgG的水平显著提高,提示rBCG-nPnFHp010可以提供更强的体液免疫反应;刺激机体脾细胞分泌9种广泛的细胞因子,其中,IL-17的分泌量更是显著提升,表明rBCG-nPnFHp010可以提供良好的细胞免疫反应;在体外抑制MTB增殖的效果也稍高于BCG,提示rBCG-nPnFHp010具有至少与BCG同等或稍强的保护效果;病理结果提示rBCG-nPnFHp010具有很高的安全性。可以得出结论:rBCG-nPnFHp010作为一种多抗原融合基因重组BCG,在预防TB的发生发展过程中或许具有很大的潜力和良好的应用前景。

[0071] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

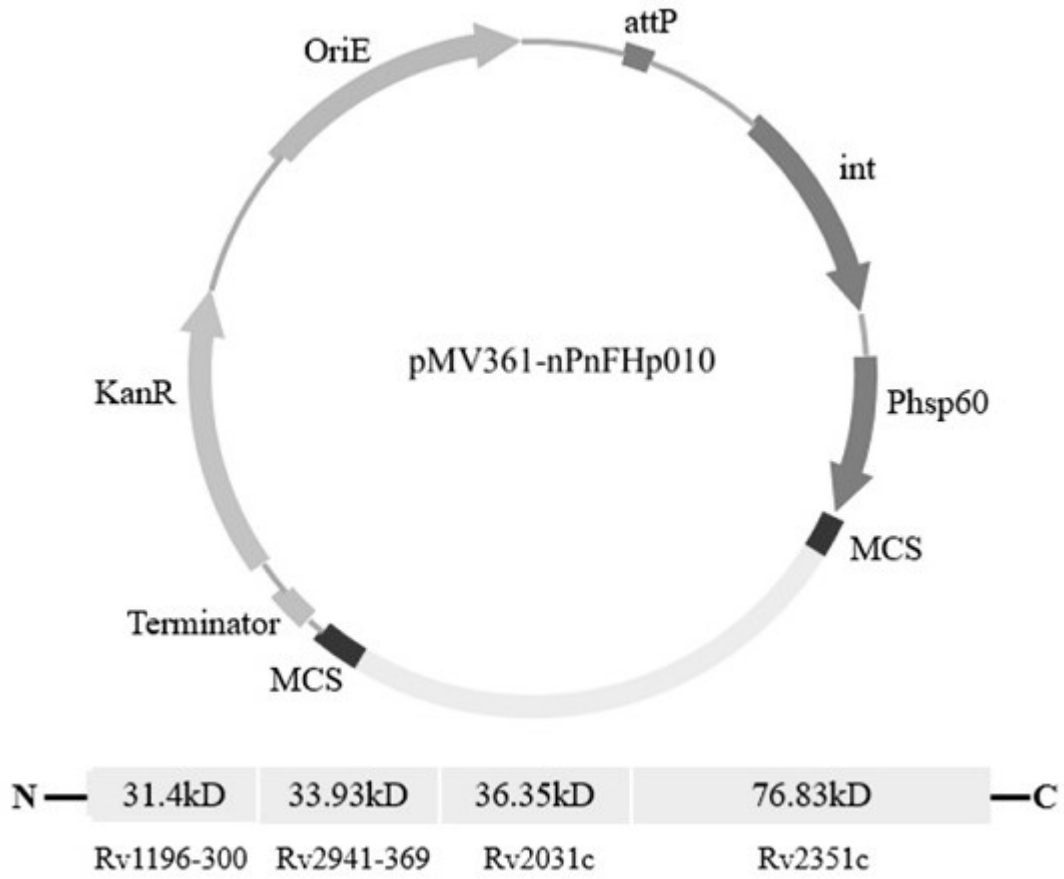


图 1

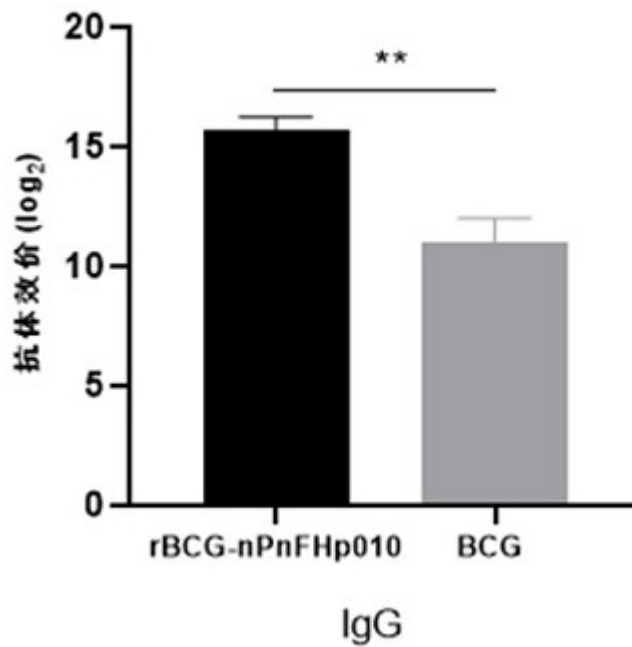


图 2

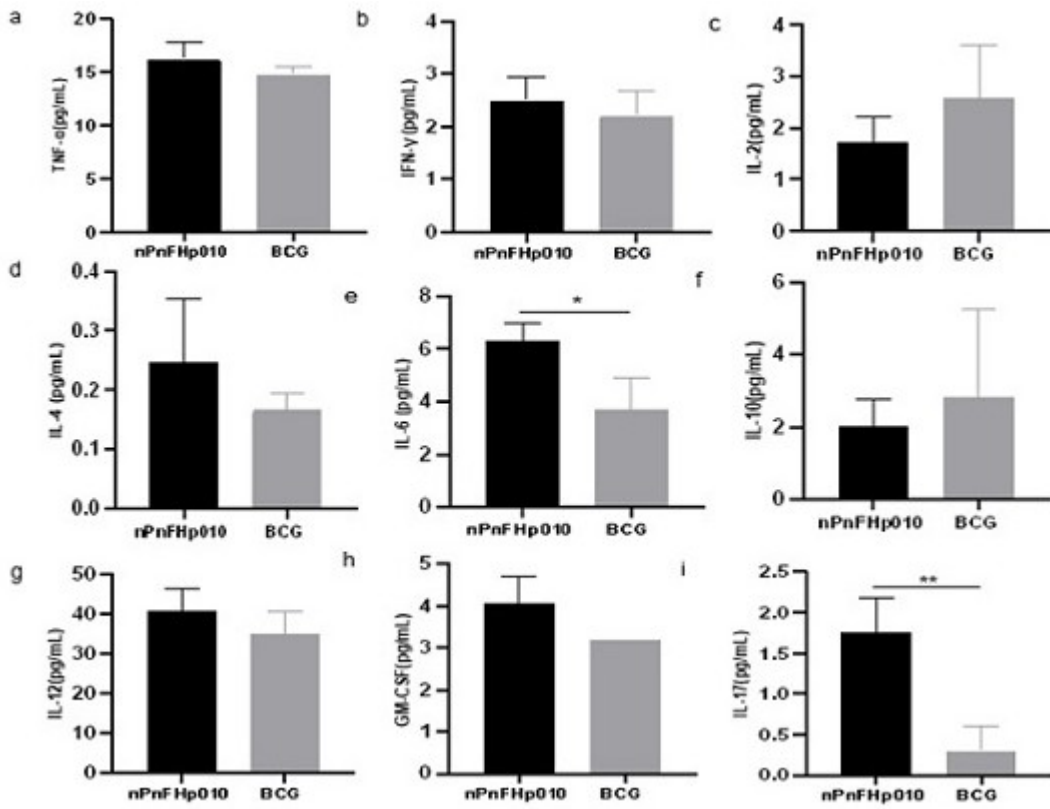


图 3

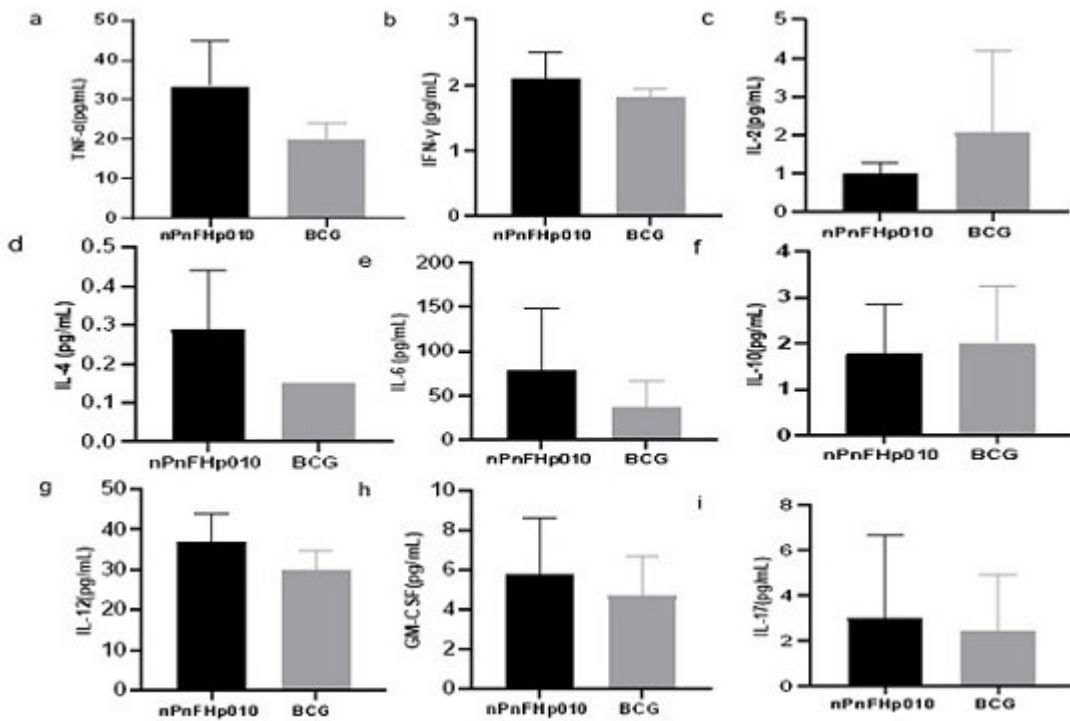


图 4

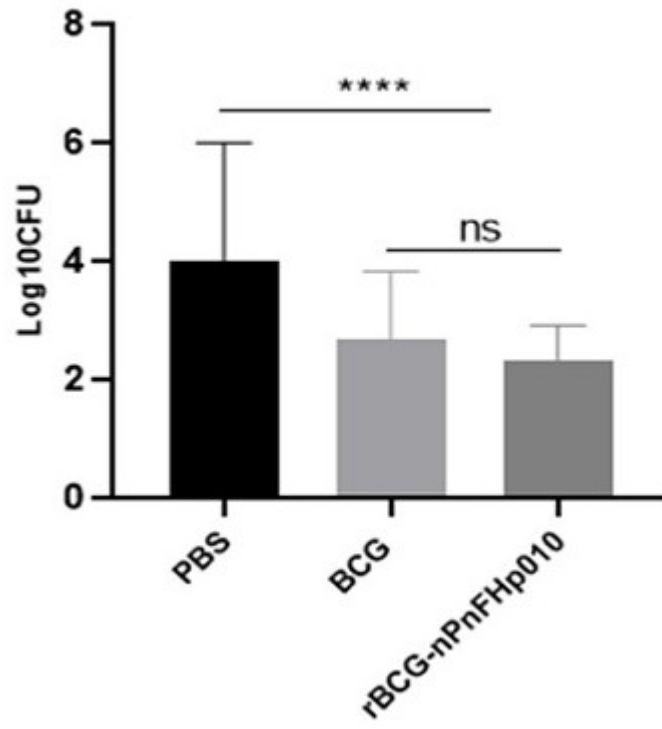


图 5

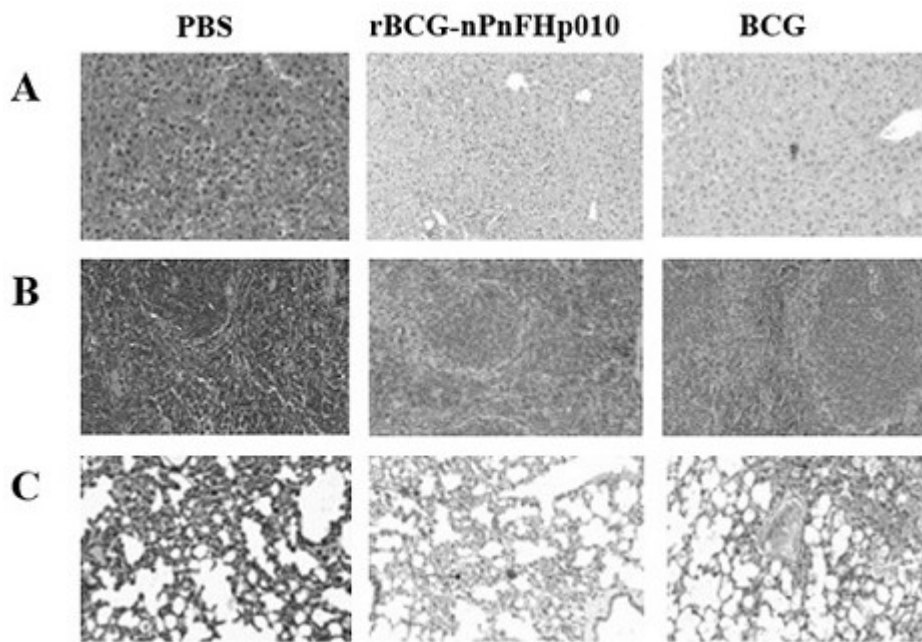


图 6