

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/195

A61K 39/04 A61P 31/06



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02126719.7

[43] 公开日 2004 年 1 月 14 日

[11] 公开号 CN1467221A

[22] 申请日 2002.7.14 [21] 申请号 02126719.7

[71] 申请人 王 虹

地址 510230 广东省广州市海珠区东晓路雅
敦街 2 号 1503

[72] 发明人 王 虹

权利要求书 1 页 说明书 2 页

[54] 发明名称 结核杆菌 CFP - 10、ESAT - 6 与
CD40L 融合疫苗的制备及应用

[57] 摘要

结核杆菌 CFP - 10、ESAT - 6 与 CD40L 融合疫苗的制备及应用其技术领域：生物医药基因重组疫苗 CFP - 10 和 ESAT - 6 是结核杆菌 (MTB) 感染宿主细胞后早期合成并分泌的两个小分子蛋白，也是致病性结核杆菌特有的成分。它们有 T 细胞表位，可以刺激产生 T 细胞免疫。CD40 配体 (CD40L) 是主要分布于 CD4 + 细胞上的免疫共刺激分子，具有刺激 T、B 淋巴细胞增殖和分化，增强免疫应答反应的作用，采用基因重组技术将 CFP - 10、ESAT - 6 基因与人 CD40L 基因连接成融合基因，并将融合基因克隆到自行构建的组成型分泌性甲醇酵母表达载体 PGAP 中。甲醇诱导并表达重组融合蛋白，液相色谱纯化重组融合蛋白。重组融合蛋白作为疫苗可用于结核杆菌感染的预防和治疗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

CFP—10 和 ESAT—6 是致病性结核杆菌特有的成分。用基因重组技术将 CFP—10 和 ESAT—6 与免疫共刺激分子 CD40 配体(CD40L) 连接成为重组融合蛋白, 并采用自行构建的组成型分泌性甲醇酵母表达系统表达。液相色谱法纯化重组融合蛋白。重组的 CFP—10 和 ESAT—6 与 CD40L 的融合蛋白可作为预防性和治疗性疫苗用于结核杆菌感染的预防与防治。

权利要求如下:

- 1、一种基因重组融合多肽, 该多肽含有 CFP—10、ESAT—6 和 CD40L 的主要氨基酸序列。
- 2、将 CFP—10 和 ESAT—6 分别与 CD40L 重组形成有多肽。
- 3、采用原核或真核细胞表达权利要求 1 和 2 所述的多肽。
- 4、一种结核杆菌感染防治方法, 该方法应用权利要求 1 或 2 要求的多肽作为抗原或药物进行结核杆菌感染的防治。
- 5、采用重组技术对权利要求 1 或 2 的多肽进行增或减形成各种新的多肽。

结核杆菌 CFP-10、ESAT-6 与 CD40L 融合疫苗的制备及应用

(一) 技术领域：生物医药基因重组疫苗

(二) 技术背景：培养上清滤过性蛋白 (CFP-10) 和早期分泌性抗原 (ESAT-6) 是结核杆菌 (MTB) 感染宿主细胞后早期合成并分泌的一组小分子蛋白中的其中两个主要蛋白,二者都是 T 细胞反应性抗原,主要刺激产生 T 细胞免疫反应。CFP-10 和 ESAT-6 基因位于 MTB 基因组脱氧核糖核酸的同一个操纵子内,前后相连,其表达受控于同一个启动子和调节基因调控,因此,二者往往是平行表达。

CFP-10 和 ESAT-6 基因是致病性 MTB 特有的基因,卡介苗 (BCG) 及其它致病性分枝杆菌基因组没有这二个基因,以它们作为免疫原的疫苗可以弥补 BCG 的不足,并可作为治疗性疫苗在临床使用 CD40 配体 (CD40L) 是肿瘤坏死因子超家族的成员之一,全长 261 个氨基酸残基组成胞内区,胞外区和跨膜区等三个主要的功能区域,主要分在激活的 T 淋巴细胞,尤其是在 CD4+T 细胞中表达水平较高;其他一些免疫细胞,如嗜碱性细胞,肥大细胞和 NK 细胞中也有表达。CD40L 具有刺激 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖,诱导 B 淋巴细胞分化。此外,它还作用于抗原递呈细胞 (APC),促进 CD28、B7-1 和 B7-2 等免疫共刺激分子的表达,提高 APC 的抗原递呈能力,增强免疫应答反应。

(三) 发明内容：采用基因重组技术将结核杆菌 CFP-10 和 ESAT-

6 基因与 CD40L cDNA 基因连接形成融合基因，然后将融合基因克隆到自行构建的组成型分泌性甲醇酵母表达载体 PGAP 的克隆位点上，甲醇诱导表达，液相色谱法纯化重组融合蛋白。用重组融合蛋白的混合福氏免疫佐剂皮下接种人和动物，检测抗体产生的百分比和滴度，CD4+CD8+细胞计数验证重组蛋白的生物学活性。

细胞免疫是抗细胞内感染免疫的主要形式，此重组结核杆菌治疗性疫苗通过将二种 MTB 的 T 细胞抗原与 CD40L 的融合，能刺激机体产生抗 MTB 的细胞免疫，可以有效地抑制对 BCG 免疫产生耐受的 MTB 及其他致病性分枝杆菌感染。此外，CFP—10 和 ESAT—6 融合抗原特异性高，不会引起非特异性免疫反应，可作为治疗性疫苗在临床应用。