

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年4月2日 (02.04.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/063370 A2

(51) 国际专利分类号:

A61K 39/25 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/105716

(22) 国际申请日: 2019年9月12日 (12.09.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201811131501.8 2018年9月27日 (27.09.2018) CN
201910571839.3 2019年6月28日 (28.06.2019) CN

(71) 申请人: 武汉博沃生物科技有限公司(BRAVOVAX CO., LTD) [CN/CN]; 中国湖北省武汉市高新大道858号生物医药产业园博沃生物大楼梁锦, Hubei 430075 (CN)。

(72) 发明人: 慕婷(MU, Ting); 中国湖北省武汉市高新大道858号生物医药产业园博沃生物大楼梁锦, Hubei 430075 (CN)。 赵萍(ZHAO, Ping); 中

国湖北省武汉市高新大道858号生物医药产业园博沃生物大楼梁锦, Hubei 430075 (CN)。 徐龙(XU, Long); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋梁锦, Hubei 430075 (CN)。 肖杨(XIAO, Yang); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋梁锦, Hubei 430075 (CN)。 朱利安·琼·菲利普(JULIEN, Jean-philippe); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋梁锦, Hubei 430075 (CN)。 吴月(WU, Yue); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋梁锦, Hubei 430075 (CN)。 谢亮(XIE, Liang); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋梁锦, Hubei 430075 (CN)。 陈雪婷(CHEN, Xueting); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋梁锦, Hubei 430075 (CN)。 刘奇(LIDU, Qi); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业

(54) Title: IMMUNE COMPOSITION, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 免疫组合物及其制备方法与应用

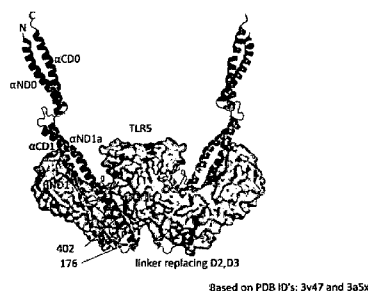


图 1.

(57) Abstract: Provided are an immune composition, a preparation method therefor, and a use thereof. In the present invention, a prokaryotic expression system or a recombinant adenovirus system is used to highly efficiently express VZV envelope gE glycoprotein and the flagellin fusion protein thereof. The produced recombinant gE protein, gE flagellin fusion protein, and recombinant adenovirus vector, or compositions thereof is used to immunize a mouse so as to promote the body to generate high levels of gE and VZV specific antibody titer, as well as gE and VZV specific cell immunity. The present invention has relatively good immunogenicity and can be developed into a new generation of modified VZV vaccines. Unlike the commercial attenuated vaccines currently available, the vaccines developed using the present invention would not make vaccine receiver suffer the risk of contracting Shingles. In addition, the vaccines developed using the present invention have lower side effect than existing subunit Shingles vaccines containing adjuvant gE.

(57) 摘要: 本发明提供了一种免疫组合物及其制备方法与应用。本发明通过原核表达体系或重组腺病毒体系高效表达VZV包膜gE糖蛋白及其gE鞭毛素融合蛋白。将制得的重组gE蛋白、gE鞭毛素融合蛋白及重组腺病毒载体或其组合物免疫小鼠后可刺激机体产生高水平的gE和VZV特异性抗体滴度及gE和VZV特异性的细胞免疫, 具有较好的免疫原性, 可开发为新一代的改良型VZV疫苗。不同于目前上市的减毒活疫苗, 利用本发明开发的疫苗不会导致接种者有罹患带状疱疹的风险, 并且本发明开发的疫苗比现有的含佐剂gE亚单位带状疱疹疫苗的副作用更低。



WO 2020/063370 A2

园中小企业园A9-2栋梁锦, Hubei 430075 (CN)。谢铎源(SIA, Charles Dwo Yuan); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋梁锦, Hubei 430075 (CN)。庄再成(CHONG, Pele Choi Sing); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋梁锦, Hubei 430075 (CN)。克莱因·米歇尔(KLEIN, Michel); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋梁锦, Hubei 430075 (CN)。杜林森(DU, Linsen); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋博沃生物大楼, Hubei 430075 (CN)。吴克(WU, Ke); 中国湖北省武汉市东湖高新区高新大道858号生物医药产业园中小企业园A9-2栋博沃生物大楼, Hubei 430075 (CN)。

(74) 代理人: 上海精晟知识产权代理有限公司 (SHANGHAI CPTO INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD); 中国上海市普陀区中山北路2438号中瑞商务大厦25楼安曼, Shanghai 20033 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 不包括国际检索报告, 在收到该报告后将重新公布(细则48.2(g))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

说明书 免疫组合物及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及一种重组 VZV gE 糖蛋白及自身具有佐剂功能的融合蛋白、重组载体、制备方法、免疫组合物及其制备方法与应用。

背景技术

水痘-带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV) 是疱疹病毒属 (Herpesviridae) α 疱疹病毒亚科成员, 是一种直径 150-200nm 的双链 DNA 病毒, 形态学上是由核酸中心、蛋白衣壳和包膜构成的同心圆状结构, 表面由 162 个壳微粒组成的对称正二十面体。VZV 是一种全球性病原体, 有嗜皮肤和神经的特征。儿童原发性感染可导致水痘。水痘是一种通过皮肤接触或呼吸道飞沫传播的高传染性疾病, 其特征是面部和躯干出现播散性水疱样皮疹, 伴随瘙痒和发热。VZV 原发性感染偶见内脏并发症, 例如肺炎、肝炎、胰腺炎或肺炎等可能危及生命的严重并发症, 尤其是在未接种疫苗的幼儿和成人以及免疫抑制人群中。初次感染后, VZV 可终生潜伏于颅神经和背根神经节。数十年后, VZV 仍可被重新激活, 引起疼痛性带状疱疹 (HZ) 疾病或其他严重的神经系统并发症或眼部并发症, 并可导致衰竭性带状疱疹愈合后神经痛—最常见的带状疱疹慢性并发症。超过 95% 的 50 岁以上免疫力正常人群血清呈 VZV 抗体阳性, 因而有罹患带状疱疹的风险。带状疱疹的终生发病风险在 25% 至 30% 之间, 80 岁后风险则上升到 50% (Johnson RW *et al.*, *Ther Adv Vaccines*, 3:109-120, 2015)。在免疫受损的个体中, VZV 感染的发生率和死亡率都很高。例如, 在器官移植患者中, 水痘可能是致命性的, 伴有严重的播散性皮损、脏器损伤和血管内凝血。带状疱疹 (HZ) 也是器官移植患者常见的并发症。VZV 引起的疾病及其相关后遗症 (如带状疱疹愈合后神经痛) 已逐渐成为重大的疾病负担及重要的公共卫生问题, 并急需得到更多医疗方面的关注。

对于水痘和带状疱疹, 主要是对症处理, 无特效治疗方法。抗病毒药物, 如阿昔洛韦、伐昔洛韦、泛昔洛韦等, 虽有助于水痘及 HZ 患者康复, 但不能预防 VZV 感染。而暴露 VZV 后给予病毒特异性免疫球蛋白, 对于中止或减轻疾病负担也是有限的。研究发现, 抗 VZV 膜抗原抗体滴度 $\geq 1/64$ 被认为与疾病的保护相关, 抗 gE 糖蛋白的抗体也被发现与长期保护有关。虽然感染可产生对病毒的终生免疫, 但完整的细胞免疫对于从感染和复发性疾病中恢复至关重要, 因为带状疱疹发生于随年龄增长 T 细胞免疫下降或免疫抑制的时候。CD4+T 细胞增殖反应在带状疱疹预防前和/或治疗中起到重要作用, 不过迄今为止还未建立其与效力相关性 (Plotkin SA, *Clin Vaccine Immunol*, 17:1055-1065, 2010)。

鉴于此, 接种疫苗仍然是最有效和最可靠的预防和控制水痘和带状疱疹的手段。

水痘减毒活疫苗最早由日本的高桥 (Takahashi) 研究组于 1974 年研发成功。他们从 1 例 3 岁名叫 Oka 的水痘患儿体内分离出一株 VZV, 经人胚胎成纤维细胞、豚鼠成纤维细胞和人二倍体成纤维细胞连续传代后减毒。这一减毒活疫苗被称为 Oka 疫苗 (vOka)。Oka 疫苗目前已纳入多个国家的常规免疫计划。一般情况下, Oka 疫苗十分安全, 即使在免疫力部分损伤的儿童和人类免疫缺陷病毒感染儿童中也没有出现严重不良反应, 还显示出良好的免疫保护效果。然而, Oka 疫苗诱导的免疫保护的持久性不够长, 并且一些个体在连续接种疫苗后不能达到有效的保护状态。且对青少年, Oka 疫苗的免疫效果低于 1-12 岁的儿童, 因此对于学龄前儿童, 需要对该疫苗进行二次接种。目前市面上所有水痘疫苗均为减毒活疫苗, 虽然罕见严重副作用, 但也有报道反映接种疫苗后出现严重皮疹、肺部或肝脏感染、脑膜炎、惊厥、肺炎或全身性疫苗株严重感染, 尤其是在免疫受损儿童中。

目前, 带状疱疹疫苗有 Merck 的 Zostavax 以及 GSK 的 Shingrix。Zostavax 是浓缩版的 Oka 疫苗, 于 2006 年获得美国 FDA 批准。它的有效性随着疫苗接种者的年龄下降, 60 岁以上人群不推荐使用, 目前已被证明其能在大约五年内提供 50% 的保护, 其效力在疫苗接种后 5-8 年逐步降低, 且在疫苗接种 8 年后保护力不再具有统计学意义 (Morrison VA, *et al.*, *Clin Infect Dis*, 60:900-909, 2015)。GSK 的 Shingrix 采用基因重组技术, 在中国仓鼠卵巢细胞中表达水痘带状疱疹病毒糖蛋白 E, 于 2017 年获得 FDA 批准, 用于 50 岁及以上的人群。Shingrix 对带状疱疹的保护率为 90%, 降低了带状疱疹愈合后神经痛的风险, 是 Zostavax 的首选替代品。但是, Shingrix 使用的佐剂为 GSK 公司的 AS01, 具有副作用。

水痘减毒活疫苗给接种者带来多重风险, 包括罕见但十分严重的并发症、传染给免疫受损个体及潜伏感染, 更为重要的是, 30% 接种者会遭受潜伏病毒被重新激活而导致带状疱疹发生。带状疱疹疫苗方面, 中国国家药品监督管理局于 2019 年批准了 Shingrix 的进口注册申请, 填补了国内带状疱疹疫苗的空白。但 Shingrix 具有副作用, 国外售价大约在 150 美元/剂, 而且目前只是针对于 50 岁及以上的人, 由于副作用太强不能作为水痘疫苗用于儿童人群。因此, 需进一步开发安全、副作用较低、无潜伏风险和带状疱疹愈合后神经痛并发症风险以及更低价的改良 VZV 疫苗, 但目前尚无进展。新型疫苗应既能引起强烈的体液反应来中和病毒, 又可诱发广泛的细胞免疫以控制疾病。

VZV 基因组的开放读码框架 (openreadingframe, ORF) 共编码 8 种糖蛋白: 糖蛋白 E (gE)、gB、gH、gI、gC、gL、gK 和 gM。其中 gE 糖蛋白由 ORF68 基因编码, 属于 I 型膜蛋白, 是生成感染性病毒颗粒必需的糖蛋白, 也是病毒包膜中含量最丰富、免疫原性最强的糖蛋白, 存在于病毒颗粒的表面及 VZV 感染细胞的胞质内, 在病毒不同成熟阶段以不同的糖基化形式存在。在处于恢复期的水痘和带状疱疹患者血清中, VZV 抗体主要针对 gE、gB 和 gH。特异性抗 gE 单克隆抗体可中和 VZV, 介导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。gE 还是细胞免疫的主要靶点, 能控制疾病和破坏感染病毒的细胞。这些特性使得 gE 成为开发安全、有效广谱疫苗的理想免疫抗原。

非活性人用疫苗通常由一种或多种免疫原组成, 制剂中加入可增强其效力的免疫佐剂。目前仅有有限数量的免疫佐剂可供人类使用, 如铝盐、矿物油、植物或细菌提取物。免疫佐剂具有不同的增强特性, 并可引起各种不良副作用。随着对免疫应答调节机制认识的不断深入, 人们发现了表达于免疫系统前哨细胞 (如树突状细胞和巨噬细胞) 表面及表达于淋巴细胞、共同调节先天免疫和适应性免疫的 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs)。TLR 识别保守的微生物相关分子模式 (MAMP)。激动剂触发 TLR 产生多种多效性免疫介质, 如细胞因子和趋化因子, 它们参与炎症反应, 刺激先天免疫, 从而起到免疫佐剂的作用。

Toll 样受体 5 (TLR5) 是一种特异性识别细菌鞭毛素蛋白的跨膜受体。鞭毛素蛋白是革兰氏阴性菌鞭毛的主要结构蛋白。鞭毛素诱导激活 TLR5, 启动先天免疫, 诱导单核-巨噬细胞、上皮细胞活化, 并释放 IL-1、IL-8 和 TNF- α 等前炎症因子。因此, 鞭毛素蛋白是一种强效的全身和粘膜免疫佐剂。它由四个结构域 D0、D1、D2 和 D3 组成, 其中结构域 D0 和 D1 在变形菌门中高度保守。鞭毛素蛋白 N 端 D0-D1 的螺旋和 C 端 D1-D3 的螺旋之间的相互作用形成茎状核心结构, 该结构对 TLR5 的结合和活化至关重要。与此相反, 鞭毛素的 D2 和 D3 结构域在不同细菌之间差异很大, 具有很强的免疫原性但在功能性上非必须。删除 D2-D3 结构域不会削弱 TLR5 的活化, 且可最大程度降低无用的抗鞭毛素蛋白抗体应答。研究显示, 鞭毛素必须与目标免疫原结合才能产生最佳的免疫佐剂效应。这可以通过构建一种自身具有佐剂效应的融合蛋白来实现, 其中免疫原共价连接到鞭毛素或其保留 TLR 5 结合活性的功能片段上, 并由此保留其固有免疫刺激属性。

发明内容

本发明是为了克服已上市疫苗的上述缺陷以及改善不良反应, 采用两种的不同方法开发新型免疫组合物, 一种是生产能够诱导强的中和抗体和 CD4+T 细胞反应, 副作用更低的原性的重组 gE 蛋白或基于 gE 的融合免疫原; 另一种是构建更加安全的复制缺陷型腺病毒载体来表达 gE 基因或 gE 鞭毛素融合蛋白基因, 以引起中和抗体应答和更广泛的 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞免疫; 从而获得了新的糖蛋白、融合蛋白、重组载体、制备方法、组合物, 且可运用于抗 VZV 感染的新疫苗制备中。

本发明提供了一种免疫组合物, 包含基于水痘带状疱疹病毒糖蛋白 E (简称 gE) 的抗原, 可用来预防或者治疗水痘带状疱疹病毒 (VZV) 感染。

在一些实施方案中, 基于 gE 的免疫原至少包含: (i) gE 胞外区或其片段, 或者其相应的编码核酸分子; (ii) 基于 gE 的融合蛋白, 或者其编码核酸分子; (iii) 基于 gE 的重组载体; 或者 (iv) 上述两种或更多的组合。

进一步地,基于gE的融合蛋白至少包含:gE胞外区或其片段共价偶联至自身具有佐剂效应的细菌鞭毛素蛋白或其片段,其中所述细菌鞭毛素蛋白或其片段具有TLR-5激动活性。

VZV gE以及鞭毛素的氨基酸序列或核酸序列可以在公众可获得的如GenBank(GB)、SwissPro(sp)、EMBL等数据库中查到,gE代表性的数据库条目包括但不限于:GB AQT34120.1、AAG32558.1、ABE03086.1等,所述登记号代表的序列通过引用并入本发明。

gE糖蛋白是一种膜蛋白,其结构包含信号肽、胞外区、跨膜区和胞内区。胞外区暴露在细菌表面并是免疫系统识别的靶点。故应当理解为本发明中提及的gE至少包含其胞外区或其片段,如有需要可在保留gE一定的抗原活性基础上进一步包含其它结构片段如跨膜和/或胞内区。根据常识,本领域技术人员可以确定gE的各结构片段,gE胞外区片段可理解为保留一定的gE的自身免疫原性的片段。

应理解的是,在保留gE一定的免疫活性的情况下,可对其做一定微小的修饰,包括但不限于:突变、替换(如功能上类似的氨基酸的保守置换)、增加、缺失或截短等,仍视为本发明公开内容。

在一些实施方案中,gE胞外区具有与SEQ ID NO.1所示氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同源性。

细菌鞭毛素蛋白是许多革兰氏阴性细菌(如大肠杆菌或沙门氏菌等)的主要鞭毛成分,其一级氨基酸序列在组成和大小上随着细菌种类的不同而不同。在不同的细菌中,保守的N端D0-D1区和C端D1-D0区的结构域相互作用形成了一个功能样结构,该结构是TLR5结合和信号传递所必需的。中间“超变的”D2和D3区为TLR-5信号转导所必需的结构域,但分子中的“超可变”D2和D3结构域不是TLR5信号转导所必需的,且具有很强的免疫原性并诱发不良反应,因此该部分区域可被删除且不会影响TLR5结合活性。本发明中的细菌鞭毛素蛋白可为原始的或经改造的鞭毛素蛋白。所述改造包括但不限于突变、替换(如功能上类似的氨基酸的保守置换)、增加、缺失或截短等,但应保留一定程度的TLR-5结合能力以激活天然免疫。应当理解为:本发明中的细菌鞭毛素蛋白或其片段不应引起显著的促炎性副作用。实际上,在公开的专利US2011110962A1和/或US2011230643A1中描述了鞭毛素蛋白的免疫性及其某些修饰,被引入到本发明中。在本发明中若无特殊说明,鞭毛素蛋白的N端是指其N端D0-D1区,鞭毛素蛋白的C端是指其C端D1-D0区。

在一些实施方案中,基于gE的融合蛋白至少包含:鞭毛素蛋白的N端区、鞭毛素蛋白的C端区,和gE胞外区或其片段。换言之,基于gE的融合蛋白还可包含鞭毛素蛋白或gE的其它片段

在一些具体的实施方案中,gE胞外区或其片段位于所述基于gE的融合蛋白的N端或C端;或者插入到鞭毛素蛋白N端和C端之间。

作为优选的实施方式:所述基于gE的融合蛋白选自如下任一融合形式:

融合形式1:鞭毛素蛋白N端区-鞭毛素蛋白C端区-gE胞外区或其片段;

融合形式2:gE胞外区或其片段-鞭毛素蛋白N端区-鞭毛素蛋白C端区;

融合形式3:鞭毛素蛋白N端区-gE胞外区或其片段-鞭毛素蛋白C端区;

其中,所述鞭毛素蛋白的N端区或C端区可直接或者通过连接体与gE胞外区或其片段相连;

所述鞭毛素蛋白N端区可直接或者通过连接体与鞭毛素蛋白C端区相连。

所述的连接体包括基因工程肽链(如1-20个肽键连接的氨基酸)和非肽化学接头(如烷基接头或聚乙二醇基团,其中烷基接头还可被非立体阻碍性的基团如卤素、CN、NH₂等基团取代)。应当理解为所选择的连接体不会干扰所述融合蛋白的生物活性。

优选地,所述连接体为1-20个肽键连接的氨基酸,如连接体I或连接体II;连接体I如SEQ ID NO:4所示;连接体II如SEQ ID NO:7所示。

SEQ ID NO:4: SPGISGGGGGILDSMG

SEQ ID NO:7: GGGGSGGGGSGGGGS

在一些具体的实施方案中,所述鞭毛素蛋白的N端区或C端区分别通过连接体II与gE胞外区或其片段相连进行连接。

在一些具体的实施方案中,所述鞭毛素蛋白N端区通过连接体I与鞭毛素蛋白C端区相连

在一些实施方案中,所述的鞭毛素蛋白来自沙门氏菌,例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* (*S. typhimurium*))或肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi* (*S. typhi*)),所述鼠伤寒沙门氏菌包括但不限于strain LT2;肠道沙门氏菌包括但不限strain Ty2。

在一些具体的实施方案中,所述鞭毛素蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:3(源自strain LT2)或SEQ ID NO:29(源自strain Ty2)所示。虽然蛋氨酸是天然鞭毛素分子的N端第一位氨基酸,但本发明中鞭毛素蛋白的N端始于天然序列的第二氨基酸(Ala)。

本发明所述的鼠伤寒沙门氏菌LT2鞭毛素蛋白的N端区一般为起始于SEQ ID NO:3中的第2位丙氨酸(Alanine),终止于137-176位氨基酸的任一位氨基酸;C端区一般为起始于第392-406任一位氨基酸,终止于495位氨基酸。

作为本发明一个具体的实施方式,所述鞭毛素蛋白的N端区为至少与SEQ ID NO:3中第2至176位氨基酸区域有95%同源性(例如97%、98%或99%的同源性)的氨基酸序列;C端区为至少与SEQ ID NO:3中第392至495位氨基酸区域有95%同源性(例如97%、98%或99%的同源性)的氨基酸序列。

在一个具体的实施方式中,所述鞭毛素蛋白的N端区的氨基酸序列如序列SEQ ID NO:5所示;所述鞭毛素蛋白的C端区的氨基酸序列如序列SEQ ID NO:6所示

本发明所述的肠道沙门氏菌Ty2鞭毛素蛋白的N端区一般为起始于SEQ ID NO:29的第2位丙氨酸(Alanine),终止于180-200位氨基酸的任一位氨基酸;C端区起始于第278-400任一位氨基酸,终止于506位氨基酸。

在一些实施方式中,所述Ty2鞭毛素蛋白的N端区为SEQ ID NO:29的2-180,C端区为400-506位;或者Ty2鞭毛素蛋白的N端区为SEQ ID NO:29的2-220,C端区为320-506位;或者Ty2鞭毛素蛋白的N端区为SEQ ID NO:29的1-190,C端区为278-506位。

在本发明的一些具体的实施方式中,所述鞭毛素蛋白N端区为至少与SEQ ID NO:29中第2至180位氨基酸区域有95%(例如97%、98%或99%的同源性)同源性的氨基酸序列;C端保守区为至少与SEQ ID NO:29中第400至506位氨基酸区域有95%(例如97%、98%或99%的同源性)同源性的氨基酸序列。

在一个具体的实施方式中,所述的N端保守区的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示;所述的C端保守区的氨基酸序列如序列SEQ ID NO:31所示。

本发明的一些具体的实施方式中,所述基于gE的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:8-10、SEQ ID NO:32-34任一所示。

本发明所述的核酸分子一般为根据表达系统优化后的核酸分子,包括但不限于:DNA、RNA、mRNA、ssDNA或cDNA。所述核酸分子可通过操作与表达控制序列连接,所述表达控制序列包括但不限于:启动子、增强子、转录终止子、起始密码子(如AUG)、内含子的剪接信号和终止密码子等,其中可考虑使用体外和体内条件性表达控制元件。利用标准的分子生物学技术,可添加额外的基因片段,例如但不限于人巨细胞病毒的早期增强子、Kozak共识序列、先导序列、Woodchuck肝炎病毒转录后调控元件、编码糖基化受体序列的核酸序列、或无关蛋白如标记或切割位点等,所述可添加的无关蛋白包括用于优化基因表达、信息稳定性、蛋白质产量、分泌和纯化等。技术人员所熟知的多种基因的克隆和构建方法,以及宿主细胞的表达系统均可使用。本发明公开的编码蛋白质的DNA序列可以在原核和真核宿主细胞中表达。

在真核表达系统中,所述核酸分子5'端还可进一步添加核酸先导序列来促进蛋白分泌,所述核酸先导序列包括但不限于日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV) prM 蛋白基因先导序列或小鼠IgC 轻链基因先导序列;和/或所述核酸分子的5'端还可添加Kozak序列以增强翻译效率;和/或所述核酸分子的3'端还可添加polyadenylation (polyA) 序列增加核酸分子的稳定性;所述polyA序列包括但不限于SV40 polyA。

优选地,JEV信号肽基因序列如SEQ ID NO:14所示。

优选地, I_gκ信号肽基因序列如SEQ ID NO: 15所示。
优选地, Kozak序列基因序列如SEQ ID NO: 16所示。
优选地, SV40 polyA基因序列如SEQ ID NO: 17所示。
由核酸先导序列编码的信号肽在天然蛋白的细胞内的加工过程中被水解切割。
一些具体的实施方式中, 编码所述gE胞外区或其片段的核酸分子如SEQ ID NO: 2,18-19任一所示。
一些具体的实施方式中, 编码所述基于gE的融合蛋白的核酸分子如SEQ ID NO: 11-13、SEQ ID NO: 20-26任一所示。
其中编码如SEQ ID NO: 8所示的基于gE的融合蛋白的基因序列如SEQ ID NO: 11, 20-21任一所示; 编码如SEQ ID NO: 9所示的基于gE的融合蛋白的核酸分子序列如SEQ ID NO: 12, 22-23任一所示; 编码如SEQ ID NO: 10所示的基于gE的融合蛋白的核酸分子序列如SEQ ID NO: 13, 33-34任一所示。编码如SEQ ID NO: 10所示的基于gE的融合蛋白的核酸分子序列如SEQ ID NO: 13, 33-34任一所示。编码如SEQ ID NO: 34所示的基于gE的融合蛋白的核酸分子序列如SEQ ID NO: 26所示。
本发明所述的基于gE的重组载体, 携带如上所述的核酸分子。应当理解为所述的基于gE的重组载体可携带如上所述的gE胞外区或其片段的编码基因, 或携带如上所述的gE的融合蛋白的基因。所述载体可以是表达载体、克隆载体或转移载体, 包括但不限于: 病毒载体、DNA载体或mRNA载体等。其中病毒载体包括但不限于: 腺病毒载体、腺病毒相关病毒载体、痘病毒载体、水痘性口炎病毒载体、牛副流感病毒载体、人副流感病毒载体、新城疫病毒载体、仙台病毒载体、麻疹病毒载体、减毒RSV载体、副粘病毒载体、甲型病毒载体(如委内瑞拉马脑炎病毒载体、塞姆利基森林病毒载体、辛德比病毒载体)、棒状病毒载体、狂犬病病毒载体、小核糖核酸病毒、慢病毒载体、疱疹病毒载体、或植物来源的病毒用于在植物表达系统中表达。
一些具体的实施方式中, 所述腺病毒载体为人源腺病毒载体(如5型腺病毒载体Ad5)、黑猩猩源腺病毒载体(如ChAd68)、大猩猩腺病毒载体或其他人类适用的腺病毒载体。
一些具体的实施方式中, 所述重组腺病毒载体为复制缺陷型重组腺病毒载体, 所述复制缺陷型可为腺病毒基因组的E1区删除或功能性缺失从而形成复制缺陷型腺病毒, 或E3区进一步删除或功能性缺失; 或E1区和E3区中均删除或功能性缺失; 所有E1功能性缺失的载体均为复制缺陷型载体。所述的功能性缺失一般指由于突变、缺失或增加位点等原因的导致的E1原有功能的缺失, 进而影响腺病毒复制。因此, 这些病毒只能在补充表达E1蛋白的哺乳动物细胞中复制, 例如HEK293及PER.C6细胞, 这些细胞的基因组被修饰以表达E1基因。
本发明的复制缺陷型重组腺病毒载体的其余腺病毒基因组可为腺病毒原始基因组(即可理解为除了E1区删除或功能性缺失, 或E1和E3都删除或功能性缺失外, 其余基因组未有进一步修饰, 如购自Thermo Fisher Scientific公司的pAd5-CMV/V5-Dest载体)或可被进一步修饰的腺病毒基因组, 所述的修饰指对腺病毒原始基因组的进行替换, 突变等修饰, 例如在特定的实施例中, 复制缺陷型黑猩猩腺病毒(如ChAd68)本身的E4区被人5型腺病毒E4区取代以提高载体的性能。
当所述基于gE的重组载体携带如上所述的编码gE胞外区或其片段的核酸分子(例如SEQ ID NO: 2,18-19任一所示的核酸分子)时, 被称为重组腺病毒载体A, 换言之, 该gE为非融合形式表达。
优选地, 所述的重组腺病毒载体A通过同源重组的方式进行构建。
优选地, 构建所述的重组腺病毒载体A所用的骨架质粒为pAd5-CMV/V5-DEST。
优选地, 构建所述的重组腺病毒载体A所用的穿梭质粒为pDONR221。
优选地, 构建所述的重组腺病毒载体A所用的宿主细胞系包括但不限于HEK 293或 PER.C6细胞系。
一些具体的实施方式中, 所述的重组腺病毒载体A由下述方法构建: 将测序正确的重组穿梭质粒pDONR221-gE基因-PolyA与病毒骨架质粒pAd5-CMV/V5-DEST进行同源重组, 将重组混合物转化至大肠杆菌TOP10感受态细胞中, 筛选测序正确的腺病毒载体pAd5-CMV-gE基因-PolyA, 将腺病毒载体pAd5-CMV-gE基因-PolyA线性化后转染HEK 293或 PER.C6细胞进行包装得到所述的重组腺病毒载体A。该技术是本领域技术人员熟知的。
当所述基于gE的重组载体携带如上所述的编码基于gE的融合蛋白的核酸分子时(例如SEQ ID NO:11-13, 20-26任一所示的核酸分子)被称为重组腺病毒载体B。
优选地, 所述的重组腺病毒载体B通过同源重组的方式进行构建。
优选地, 构建所述的重组腺病毒载体B所用的病毒骨架质粒为pAd5-CMV/V5-DEST。
优选地, 构建所述的重组腺病毒载体B所用的穿梭质粒为pDONR221。
优选地, 构建所述的重组腺病毒载体B所用的宿主细胞系包括但不限于HEK 293或 PER.C6细胞系。
一些具体的实施方式中, 所述的重组腺病毒B由下述方法构建: 将测序正确的重组穿梭质粒pDONR221-gE-鞭毛素融合蛋白基因-PolyA与病毒骨架质粒pAd5-CMV/V5-DEST进行同源重组, 将重组混合物转化至大肠杆菌TOP10感受态细胞, 筛选测序正确的腺病毒载体pAd5-CMV-gE-鞭毛素融合蛋白基因-PolyA, 将腺病毒载体pAd5-CMV-融合蛋白基因-PolyA线性化后转染HEK 293或 PER.C6细胞进行包装得到所述的重组腺病毒载体B。该技术是本领域技术人员熟知的。
本发明如上所述的免疫组合物还可以进一步包含一种或多种其他组分, 例如药学可接受的载体, 和/或佐剂, 和/或免疫刺激分子等。所述的佐剂包括但不限于: 铝盐(如氢氧化铝或磷酸铝)水包油乳液或油包水乳液、MF-59、TLR激动剂(如单磷酸脂质A(MPL)或其类似物, 或CpG寡核苷酸)、Quil A或其QS21组分、壳聚糖、或其两种或多种的组合。所述的佐剂具有增强体液和/或细胞反应的用途。免疫刺激分子可包括但不限于大肠杆菌耐热肠毒素LT、霍乱毒素CT或其类似物等; 细胞因子或趋化因子; 抗体或其片段, 该抗体或其片段针对特异性细胞表面分化抗原或参与免疫应答的受体, 并可增强体液和细胞免疫反应。
医学上可接受的载体可为本领域的常规使用的载体, 一般取决于药物的给药方式。例如胃肠外给药剂型等通常包含医学上和生理上可接受的可注射的流体, 包括但不限于水、生理盐水、平衡盐溶液、甘油或其他碳水化合物等作载体。另外所述的免疫组合物中还可含有少量的无毒辅助物质, 如乳化剂、pH缓冲液、稳定剂或防腐剂等。无菌溶液是通过无菌过滤或本领域已知的其他方法制备的。溶液的pH值一般在3.0-9.0之间, 优先为pH5.0-7.5。制剂可以液体形式或冻干剂的形式保存, 可以单剂量提供或者多剂量密封容器提供。本发明中的所述的免疫组合物也可以使用载体系统(包括但不限于脂质体、微球、胶束系统、免疫刺激复合物(ISCOMS)和纳米颗粒)来传递, 所述纳米颗粒包括铁蛋白、包囊素、硫氧还还原酶(SOR)和鲁米嗪合成酶-纳米颗粒。
本发明如上所述的免疫组合物可通过本领域技术人员熟知的传递系统进行给药包括通过皮下、肌肉、皮内或鼻内等途径给药。本发明基于核酸的免疫组合物也可以通过基因枪法给药, 重组蛋白免疫原可通过无针输送系统进行给药。
本发明如上所述的免疫组合物可用于预防和/或治疗水痘带状疱疹病毒感染。具体地, 所述的免疫组合物可用于婴儿、儿童、青少年、成年或老人接种免疫对抗水痘感染或老年人接种免疫对抗带状疱疹感染, 另一方面, 所述的免疫组合物可用于治疗带状疱疹和/或带状疱疹愈后神经痛。一般0-12月龄之间为婴儿, 1-12岁为儿童, 青少年为12-18岁, 大于18岁为成年, 50岁以上为老人。应当理解为年龄的划分并不绝限与上述描述, 所述的免疫组合物可用于免疫适龄人群对抗水痘或带状疱疹感染。
本发明另一方面提供了如上所述的免疫组合物在用于制备预防和/或治疗水痘-带状疱疹病毒感染的药物中的应用; 进一步地, 为在制备水痘疫苗和/或带状疱疹疫苗中的应用; 或所述的免疫组合物可用于制备治疗带状疱疹和/或带状疱疹愈后神经痛的药物。
本发明进一步还提供了一种联合疫苗, 其包含如上所述的免疫组合物以及一种或多种其他疫苗。应当理解为, 该联合疫苗各抗原组分间互不干扰, 或可进一步达到协同作用。互不干扰一般指维持免疫原的稳定性及各免疫组分之间兼容性, 且无抗原间的竞争, 或严重不良反应的风险。另外, 联合疫苗中的各抗原组分应当具有相同或相似的受试人群以及免疫程序。本发明中, 所述的可联合的其他疫苗包括但不限于: 流行性腮腺炎、麻疹和风疹疫苗。
本发明如上所述的基于gE的融合蛋白、相应的所述的核酸分子、所述的基于gE的重组载体可用于预防和/或治疗由水痘带状疱疹病毒感染, 具体地可用于婴儿、儿童、青少年、成年或老人接种免疫对抗水痘感染或老年人接种免疫对抗带状疱疹感染。

本发明一方面提供了如上所述的基于gE的融合蛋白、所述的核酸分子、所述的基于gE的融合蛋白重组载体在制备用于预防和/或治疗水痘-带状疱疹病毒感染中的药物中的应用；进一步地，为在制备水痘疫苗和/或带状疱疹疫苗中的应用。所述的免疫组合物可用于制备治疗带状疱疹和/或带状疱疹愈后神经痛的药物。疫苗接种可能涉及在一个或多个月间隔时间内的单次或多次注射，剂量范围为在1 μg 至100 μg的重组蛋白或10¹⁰到10¹²个病毒颗粒(VP)的腺病毒载体。具体的使用剂量将在临床试验中确定，并取决于给药途径和目标人群。如果需要，每年可给予加强免疫。

初免-强化免疫程序包括向受试者施用第一种免疫组合物(初免疫苗)，然后施用第二种免疫组合物(加强疫苗)以诱导最佳的免疫反应。本领域技术人员应当了解初次免疫与加强免疫之间的合适时间间隔。初次免疫和加强免疫施用的免疫组合物可以相同或者不同且各自的数量可能不同。本发明中：所述的gE胞外区或其片段、基于gE的融合蛋白、核酸分子和基于gE的重组载体可分别用于初次免疫或加强免疫。例如，本发明提供了如下初免-强化免疫程序：(1)可以使用上述基于gE的重组载体做初次免疫，gE胞外区或其片段或基于gE的融合蛋白进行加强免疫；或者(2)可以使用上述gE胞外区或其片段或基于gE的融合蛋白做初次免疫，基于gE的重组载体进行加强免疫。所述的初免-加强免疫程序的组合包括但不限于上述的表述。例如，初免可以用基于gE的腺病毒载体来执行，然后用来自于表达相同基因的如上所述的不同载体(如痘病毒载体等)来执行加强免疫，或者反过来，初免可以用基于gE的异源载体(可理解为除了腺病毒载体之外的其它载体)来实现，并用本发明的所述的基于gE的腺病毒载体进行加强免疫。此外，两种表达相同或不同的基于gE基因的不同类型或不同物种的腺病毒载体也可以在初免-强化免疫程序中联合使用。

使用剂量取决于免疫组分、给药途径、目标人群和其他因素。临床试验人员将根据他们的知识确定每种免疫组分的适当剂量和有效的免疫方案。单次给药即足够或需要采用单个和/或联合免疫原进行多次给药。

本发明又一方面提供了一种分离的宿主细胞其包含如上所述的基于gE的基因(如gE胞外区或其片段的编码核酸分子，或基于gE的融合蛋白的编码核酸分子)。所述的宿主细胞包括但不限于：大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌、酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母、昆虫细胞、HEK293细胞、PER.C6细胞、Vero细胞、CHO细胞、W38细胞、BHK细胞或COS细胞。本发明一方面提供了一种制备如上所示的gE胞外区或其片段，或如上所述的基于gE的融合蛋白的方法，具体地可通过原核表达系统或真核表达系统表达。所述gE胞外区或其片段被制备成含或者不含有利于纯化的共价结合蛋白标签；所述基于gE的融合蛋白被制备成含或者不含有利于纯化的共价结合蛋白标签；所述的共价结合蛋白标签包含但不限于多聚氨基酸标签(His标签)。

所述原核表达系统包括但不限于大肠杆菌表达系统。一些具体实施方式中，所用大肠杆菌为BL21(DE3)，所述原核表达载体可含有但不限于T7启动子，优选地该表达载体为pET28a。优选地，所述gE胞外区的氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示，所述gE胞外区的基因序列如SEQ ID NO:36所示；所述基于gE的融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:37-39所示；所述基于gE的融合蛋白的基因序列如SEQ ID NO:37-39所示。

作为本发明一具体的实施方式，所述原核表达可包括以下步骤：将携带所述gE胞外区或其片段的基因或携带所述基于gE的融合蛋白基因的pET28a表达载体转化至大肠杆菌BL21(DE3)，涂布在琼脂平板上的添有加卡那霉素(50μg/ml)的LB培养基培养。挑取单克隆接种至含有卡那霉素的LB液体培养基中，37°C培养至OD₆₀₀达到0.6时，加入0.1-1mM IPTG，16-37°C诱导表达。超声或高压均匀仪破碎收获的菌体，离心收获包涵体(IB)，用含去污剂的盐水洗涤包涵体数次。将包涵体重悬并用含有6M盐酸胍或8M尿素的缓冲液中(20 mM Tris, 5 mM咪唑, 500 mM NaCl, pH 8.0)进行溶解。将溶解后的包涵体上样至Ni柱中，清洗Ni柱用5-10个柱体积(20 mM Tris, 8M尿素, 5-50 mM 咪唑, 500 mM NaCl, pH 8.0)，并用适当浓度的咪唑(20 mM Tris, 8M 尿素, 500 mM 咪唑, 500 mM NaCl, pH 8.0)洗脱蛋白质。蛋白复性可在柱上或纯化后进行。

所述真核表达系统包括但不限于酵母表达系统，哺乳动物细胞表达系统，或重组病毒(如人、动物或植物重组病毒表达系统，又如杆状病毒、腺病毒、慢病毒或痘病毒)表达系统，或植物表达系统。优选地，用于表达的哺乳动物细胞系包括但不限于293细胞或PER.C6细胞系，中国仓鼠卵巢 CHO 细胞系，昆虫细胞系如 SF9 细胞，Vero细胞，或转基因动物或植物细胞系。重组蛋白可通过瞬时表达、稳转细胞系表达或重组病毒载体表达。细胞培养基可从商业来源获得，培养细胞的适当条件是众所周知的，本领域技术人员能够很容易地选择培养基和宿主细胞的培养条件来表达目的免疫原。合适的培养基可能含有或者不含血清。

一些具体的实施方式中，所述真核表达包括以下步骤：将如上所述基于gE的重组载体(优选地为编码所述的gE蛋白的重组腺病毒载体A和编码所述gE-鞭毛素融合蛋白的重组腺病毒载体B)以一定MOI值感染90%汇合点的宿主细胞(在一些实施例中，所述的宿主细胞包括但不限于Vero或CHO等细胞)，感染四到五天后，收获培养上清，将收获上清纯化后得到相应蛋白。其中：MOI值可以为10~500，更加优选地MOI值可以为100~200。纯化步骤包括疏水层析后经离子交换层析和/或分子排阻层析纯化；其中，疏水填料包括但不限于：Phenyl, Octyl 或 butyl 相关填料；离子交换填料包括但不限于：Qsephase FF, DEAE 或 Source 30Q；其中，分子排阻色谱填料包括但不限于 Sphadex G200, G100 或 G75。作为优选的实施方式，所述的纯化过程是先经疏水层析，后经离子交换层析，优选地，所述疏水填料为 Capto Phenyl Impress，所述离子交换填料是 Source30Q。

本发明还提供了如上所述的重组腺病毒载体 pAd5-CMV-gE 基因-PolyA，gE 基因为如 SEQ ID NO: 2,18-19 任一所示的核酸序列。

本发明还提供了一种如上所述的重组腺病毒载体 Ad5-CMV-gE-鞭毛素融合基因-PolyA，gE-鞭毛素融合基因具有如 SEQ ID NO: 11-13, 20-26 任一所示的核酸序列。

本发明另一方面还提供了一种改造的鞭毛素蛋白，所述鞭毛素蛋白N端区为至少与SEQ ID NO:3中第2至176位氨基酸区域有95%(例如：96%、97%、98%或99%的同源性)同源性的氨基酸序列；鞭毛素蛋白C端区为至少与SEQ ID NO: 3中第392至495位氨基酸区域有95%(例如：96%、97%、98%或99%的同源性)同源性的氨基酸序列；所述鞭毛素蛋白N端区直接或者通过连接体与鞭毛素蛋白C端区相连。

所述连接体可为1-20个肽键连接的氨基酸，如具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

在一些实施方式中，所述鞭毛素蛋白的N端区的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO:5所示；C端区的氨基酸序列如序列表SEQ ID NO: 6所示。

在本发明的一些实施方式中，所述改造的鞭毛素蛋白具有如SEQ ID NO: 27所示的氨基酸序列。

本发明还提供了一种核酸序列，其能编码如SEQ ID NO: 27所示的氨基酸序列。优选地，所述的核酸序列如SEQ ID NO: 28所示。

本发明还提供了所述的改造的鞭毛素蛋白作为免疫佐剂的应用，当其与gE或其片段偶联时形成的融合蛋白具有内在的佐剂特性，因此，基于gE的融合蛋白或可表达gE-鞭毛素融合蛋白的重组腺病毒载体(如重组腺病毒载体B)可直接用于制备用于免疫宿主(人或动物)诱导和/或增强对VZV的免疫应答的疫苗，对抗急性或者潜在VZV感染。

本发明公开了通过原核表达系统或重组腺病毒系统高效表达gE或gE-鞭毛素融合免疫原的方法，通过实验数据可知，制得的gE、gE-鞭毛素融合蛋白及重组腺病毒载体可刺激免疫宿主产生高水平抗体滴度和良好的细胞免疫，可开发为新一代和改良的VZV疫苗。

术语

预防或治疗疾病：“预防”是指在有疾病风险的受试者(如VZV感染)中抑制感染或疾病的全面发展。“治疗”是指在疾病或病理状态开始发展之后，改善其体征或症状的治疗干预。术语“改善”是指任何可观察的有益治疗效果，如延迟出现疾病的临床症状、疾病症状减少、病情发展减缓、受试者的整体健康改善，或领域内公认的特殊疾病的其他特定指标。“预防性”治疗是对没有出现疾病症状或仅出现早期症状的受试者进行的治疗，目的是降低发生病的风险。

5型腺病毒(Ad5)：一种双链DNA病毒，属于腺病毒科，主要引起人类呼吸道感染。E1基因产物(包括E1A和E1B)参与病毒的复制。大多数E3蛋白参与调节感染细胞的免疫应答。可以通过删除E1区域使该病毒失去复制能力，然后将异源转基因插入到删除的E1和E3区域，使病毒作为载体，实现免疫或基因治疗目的。

佐剂: 增强宿主对免疫原或疫苗的免疫反应的物质。

抗体: 由特异性浆细胞产生的血液蛋白, 在抵抗外来分子或病原体的体液适应性免疫反应中起主要作用。抗体识别同源抗原上的特定位点, 从而中和或消除这些抗原。

抗体依赖性细胞毒性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC): 一种免疫防御机制, 通过这种机制, 免疫系统的效应细胞主动裂解膜表面抗原已被特异性抗体结合的靶细胞。

细胞免疫: 涉及激活哨兵树突状细胞和响应免疫原的淋巴细胞亚群的免疫反应。树突状细胞负责非特异性先天免疫以及免疫原特异性适应性免疫的启动。淋巴细胞亚群负责包括前炎症反应、辅助抗体产生的 CD4⁺ 辅助性 T 细胞, 以及杀死受感染靶点的细胞毒性 CD8⁺ T 细胞。

条件性基因表达: 指任意激活或抑制特定基因或基因产物表达的能力。

CpG 寡核苷酸: CpG 寡脱氧核苷酸是短单链合成 DNA 分子, 含有胞嘧啶三磷酸脱氧核苷酸和鸟嘌呤三磷酸脱氧核苷酸。CpG 基序是病原体相关分子模式, 因此作为 TLR9 激动剂, 具有免疫佐剂性质。

胞外域: 膜蛋白延伸到细胞外空间的结构域。膜蛋白由胞外结构域 (胞外域)、跨膜段和胞质内尾部组成。

增强子: 一种 DNA 序列, 能提高位于编码序列附近的基因的转录水平。

鞭毛素: 一种聚合蛋白, 是革兰氏阴性细菌鞭毛的主要成分, 决定鞭毛在引起免疫反应方面的特异性。鞭毛素是一种有效的免疫调节剂。

融合蛋白: 最初编码分离蛋白的两个或多个基因结合而产生的蛋白。

同源重组: 含有长段相似碱基序列的两股 DNA 之间的遗传物质交换。同源重组自然存在于真核生物、细菌及某些病毒中, 是基因工程的有力工具。

宿主细胞: 含有外来分子、病毒或微生物的细胞。

免疫原: 一种物质或有机体, 进入宿主后能引起免疫, 包括体液 (抗体) 和细胞反应。

免疫组合物: 一种能诱导免疫的组合物。

免疫刺激分子: 能刺激或增强免疫反应的分子。

先天免疫: 由免疫系统的前哨细胞 (如树突状细胞和巨噬细胞) 进行防御的自然机制。这一免疫并非是由先前对免疫原的致敏, 如感染或接种疫苗而引发。由于先天免疫不受特异性免疫原的刺激, 因此先天免疫通常是即时的、非特异性和无记忆的, 完全不同于具有免疫原特异性和记忆性的获得性免疫。

ISCOM: 免疫刺激复合物 (ISCOM) 是胆固醇、磷脂和椰子皂苷在特定的化学计量比下混合时自发形成的球形笼状结构。ISCOM 显示出免疫佐剂的特性, 可用于疫苗以增强其免疫应答。

Kozak 序列: 存在于真核生物 mRNA 上的核酸序列, 通常为 (gcc)gccRccAUGG。Kozak 序列在翻译过程的启动中起着重要作用。

前导序列: 信使 RNA (和 DNA) 5' 端的核苷酸序列, 位于翻译起始密码子上游。

脂质体: 包裹水滴的磷脂分子的微小球体, 尤指人工形成的将疫苗、药物或其他物质输送到组织中的脂质体。

纳米颗粒: 小于 100 纳米的微粒, 不仅可以提高疫苗的稳定性和免疫原性, 而且可以有效地递送和缓释。

中和: 通过与病原体的特异性抗体相互作用而导致病原体感染性的丧失。

包装细胞系: 将重组载体转染到包装细胞系中, 以补充重组病毒载体中缺失的病毒基因, 从而产生含有转基因的重组病毒。

多聚腺苷酸化序列 (polyA tail): 在信使 RNA 上加入多个单磷酸腺苷, 是翻译前信使 RNA (mRNA) 成熟过程的一部分。

启动子: DNA 分子中的一个位点, RNA 聚合酶和转录因子在此位点结合, 启动特定基因对 mRNA 的转录。

复制缺陷型载体: 指病毒基因组的关键部分已经被删除, 使得病毒载体不能复制。

穿梭质粒: 一种能在两种不同宿主物种中繁殖的质粒。

信号肽: 一种短肽 (长度 5-30 个氨基酸), 存在于大多数新合成蛋白质的 N 端, 并最终进入分泌途径。

起始密码子: 起始密码子是由核糖体翻译的信使 RNA (mRNA) 转录物的第一个密码子。在真核生物中, 起始密码子始终编码蛋氨酸, 而在原核生物中, 起始密码子始终编码修饰的蛋氨酸 (fMet)。最常见的起始密码子是 AUG。

SV40 polyA: SV40 polyA 序列是一个终止子序列, 表示一个转录单元的结束。

标签: 蛋白标签是基因接枝到重组蛋白上的肽序列, 尤其是为了便于纯化。例如, 多组氨酸标签结合到镍柱, 从而可利用亲和层析纯化蛋白。

Tag: 蛋白质标签是基因融合至重组蛋白质上的肽序列, 特别是为了促进其纯化。例如, 多组氨酸标签与 Ni²⁺ 柱结合, 从而能够通过亲和层析纯化蛋白质。

T 细胞亚群: 对免疫应答具有特异性免疫功能的淋巴细胞亚群。CD4⁺ 辅助性 T 细胞对于抗体产生不可或缺。它还通过释放可溶性免疫刺激介质, 如细胞因子和趋化因子, 参与前炎症反应。1 型辅助性 T 细胞 (Th1) 是宿主抵抗细胞内病毒和细菌病原体所必需的细胞并产生干扰素 γ (IFN- γ)。2 型辅助性 T 细胞 (Th2) 在宿主抵抗细胞外病原体中起重要作用并分泌 IL-4。细胞毒性 CD8⁺ T 细胞是负责杀死受感染细胞并分泌 IFN- γ 的淋巴细胞的一个亚群。

TLR 激动剂: 能够通过同源 TLR 受体相互作用来激活免疫细胞的试剂, 从而促进和协调先天免疫和适应性免疫的启动。

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs): 是一类在先天免疫系统中起关键作用的蛋白, 是单一、跨膜、非催化的受体, 通常表达在前哨细胞 (如巨噬细胞和树突状细胞) 上, 识别从微生物衍生的结构保守分子。

转录终止子: 在转录过程中标记基因 DNA 中基因或操纵子末端的核酸序列的一部分。

转染: 将核酸导入哺乳动物细胞的过程。有很多不同的方法和技术, 包括脂质转染及化学和物理方法, 如电穿孔。

转化: 将外源质粒或连接产物插入大肠杆菌等细菌中。

病毒载体: 分子生物学家常用将来遗传物质输送到细胞中的工具。这一过程可在活的有机体 (体内) 或细胞培养 (体外) 中进行。病毒已经进化出专门的分子机制来有效地运输其基因组, 能够在其感染的细胞内传递基因和其他遗传物质。

附图说明

图 1. 使用 Phyre2 软件模拟计算的修饰后鞭毛素蛋白与 Toll 样受体相互作用三维结构示意图。(参考文献: Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Kelley LA *et al.*, Nature Protocols 10, 845-858, 2015).

图 2. gE-鞭毛素融合蛋白与 Toll 样受体相互作用计算机模拟三维结构示意图。计算机预测免疫原设计方法如下: 首先使用 Phyre2 网页生成水痘带状疱疹病毒 (strain Dumas; UniProtKB P09259) 的包膜糖蛋白 E 模型, 然后从蛋白模型中去除 VZV gE 的信号肽分泌序列、跨膜区以及胞内区, 然后根据数据库 PDB ID's 3v47 and 3a5x (Yoon S-il *et al.*, Science, 335:859-864, 2012) 中的信息, 选择鼠伤寒沙门氏菌鞭毛素蛋白序列 (strain LT2; UniProtKB P06179) 的边界。在设计 VZV gE 和鞭毛素蛋白的融合蛋白时, 根据融合的位置 (N-端, C-端或 gE 蛋白插入中间) 分别设计了不同长度的 GGGGS 连接器, 以最小化空间位阻。图 2A. 修饰的鞭毛素蛋白融合至 gE 蛋白的 N 端 (ANF); 图 2B. 修饰的鞭毛素蛋白融合至 gE 蛋白的 C 端 (ACF); 图 2C. 将 gE 蛋白取代鞭毛素蛋白的 D2 和 D3 结构域插入其高变区 (ASF)。

图 3. 携带 gE 及 gE-鞭毛素融合基因的重组腺病毒载体命名简称及其对应插入基因位点图例。“Js”代表乙型脑炎病毒 (JEV) prM 先导肽基因序列。“Ig κ ”是指小鼠 IgG κ 轻链先导肽基因序列。

图 4. Western Blotting (WB) 检测重组腺病毒 1: rAd5-ACF (Js); 2: rAd5-ACF-SV40 (Js) 3: rAd5-ANF (Js); 4: rAd5-ANF-SV40 (Js); 5: rAd5-gE (Js); 6: rAd5-gE-SV40 (Js)-感染后 Vero 细胞上清中外源基因的表达。图 4A 使用的一抗为小鼠 anti-VZV gE 单克隆抗体; 图 4B 使用的一抗为兔 anti-鞭毛素 D0, D1 多克隆抗体。M, 蛋白分子量 markers。

图 5. Western Blotting 及 SDS-PAGE 分析重组腺病毒感染后的 293A 细胞上清 (S) 及细胞裂解液 (L) 中外源基因表达结果。5A. 鼠抗 VZV gE 单克隆抗体作为一抗, WB 检测结果; 5B. 兔抗鞭毛素 D0, D1 抗血清作

为一抗, WB 检测结果; 5C. SDS-PAGE 检测结果; 图中, gE 代表 rAd5-gE-SV40 (Js) 感染的 HEK293 细胞上清液 (S) 和细胞裂解液 (L); ANF 代表 rAd5-ANF-SV40 (Js) 感染的 HEK293 细胞上清液 (S) 和细胞裂解液 (L); ACF 代表 rAd5-ACF-SV40 (Js) 感染的 HEK293 细胞上清液 (S) 和细胞裂解液 (L); ASF 代表 rAd5 ASF (Js) 感染的 HEK293 细胞上清液 (S) 和细胞裂解液 (L)。

图 6. 纯化后的重组腺病毒检测。图 6A. 纯化后的重组腺病毒 WB 鉴定结果 (以兔抗 Ad5 多克隆抗体作为一抗)。M: 分子量 Markers; 泳道 1: 纯化后的 rAd5-gE-SV40 (Js) 病毒; 泳道 2: 纯化后的 rAd5-ANF-SV40 (Js) 病毒; 泳道 3: 纯化后的 rAd5-ACF-SV40 (Js) 病毒; 泳道 4: 纯化后的 rAd5-ASF (Js) 病毒; 泳道 5: 纯化后的 rAd5-SE (Igκ) 病毒。**6B.** 透射电镜 (TEM) 分析 10¹⁰ TCID₅₀/ml 样品中的病毒颗粒检测结果。**6C.** 阴离子交换-高效液相色谱法 (agilent 1260) 分析纯化后的 rAd5-gE-SV40 (Js) 病毒。将 40 μl 纯化后的病毒样品上样至用 90% 的流动相 A (20 mM Tris, pH 值 8.0) 和 10% 的流动相 B (20 mM Tris, 1M NaCl, pH 值 8.0) 平衡好的柱子上 (4.8 x 250 mm Sepax SAX-NP5 阴离子交换柱, Sepax, 中国)。上样结束后, 线性梯度 (10-60% 流动相 B) 洗脱柱子 8 分钟, 然后用 60% 的流动相 B 冲洗柱子 4 分钟, 之后再用另一线性梯度 (60-100% 流动相 B) 洗脱柱子 4 分钟。最后, 用平衡缓冲液清洗 4 分钟。

图 7. 原核表达的含 His 标签的重组 gE 及 gE-鞭毛素融合蛋白命名简称及其对应插入基因图例。

图 8. SDS-PAGE 及 Western Blotting 检测纯化后的大肠杆菌表达的重组 gE 及重组 gE-鞭毛素融合蛋白。

8A. SDS-PAGE 结果; **8B.** 使用小鼠抗 VZV-gE 单克隆抗体作为一抗 WB 结果; **8C.** 使用兔抗鞭毛素 D0, D1 抗血清作为一抗 WB 结果。M: 蛋白分子量 Markers; 泳道 1: 纯化后的 gE 蛋白; 泳道 2: 纯化后的 ENF 蛋白; 泳道 3: 纯化后的 ESF 蛋白; 泳道 4: 纯化后的 ECF 蛋白。

图 9. SDS-PAGE 及 Western Blotting 检测纯化后的 Vero 细胞表达的重组 gE 及重组 gE-鞭毛素融合蛋白。**9A.** SDS-PAGE 检测结果; **9B.** 使用小鼠抗 VZV-gE 单克隆抗体作为一抗 WB 结果; **9C.** 使用兔抗鞭毛素 D0, D1 抗血清作为一抗 WB 结果。M: 蛋白分子量 Markers; 泳道 1: 纯化后的 gE 蛋白; 泳道 2: 纯化后的 ANF 蛋白; 泳道 3: 纯化后的 ASF 蛋白; 泳道 4: 纯化后的 ACF 蛋白。

图 10. 重组腺病毒免疫的小鼠血清中的 VZV-gE 特异性抗体检测。将各种重组腺病毒 (10⁹ TCID₅₀/剂) 或商品化水痘疫苗 (700 pfu/剂) 通过肌肉注射免疫 C57BL/6 小鼠, 共免疫两剂, 免疫间隔 30 天。在第一次免疫后的第 12 天、26 天和 42 天收集血清, 并按照材料和方法中的描述, 使用酶联免疫吸附试验 (ELISA 法) 检测 gE 特异性抗体滴度。gE 特异性抗体反应的结果几何平均滴度 (GMT) 表示, 上下置信区间 95%。*** p < 0.001 (ANOVA/Bonferroni 单因素方差分析法)。

图 11. 重组腺病毒免疫的小鼠血清中, 抗体介导的中和 VZV 病毒感染活性的分析。将各种重组腺病毒 (10⁹ TCID₅₀/剂) 或商品化水痘疫苗 (700 pfu/剂) 通过肌肉注射免疫 C57BL/6 小鼠, 共免疫两剂, 免疫间隔 30 天。第二剂免疫后 30 天, 收集小鼠血清, 并检测 VZV 特异性中和抗体滴度。取复孔测定的平均值表示中和抗体滴度。计算能够使空斑数减少 50% 的稀释倍数, 取其倒数, 表示中和抗体效价。*** p < 0.01, **** p < 0.001 (ANOVA/Bonferroni 单因素方差分析法)。

图 12. 流式细胞术分析重组腺病毒诱导的 gE 特异性 CD4+ 和 CD8+ T 细胞反应。第二次免疫后 36 天收集脾细胞, 用覆盖整个 gE 胞外区的 15 个重叠多肽混合物 (2μg/肽) 刺激脾细胞。按照 CD3+/CD4+ 和 CD3+/CD8+ T 细胞双阳门, 用荧光标记的抗 IFN-γ 抗体进行胞内因子染色法 (ICS) 流式细胞术分析。结果按照表达 IFN-γ 的 CD4+ 和 CD8+ T 细胞的百分比表示, 上下置信区间 95%。** p < 0.01, **** p < 0.0001 (ANOVA/Bonferroni 单因素方差分析法)。阴性对照为未刺激的脾细胞, 阳性对照为 PMA (50ng)。

图 13. ELISpot 分析重组腺病毒诱导的产生 IFN-γ 及 IL-4 的 T 细胞。第二次免疫后 36 天收集脾细胞, 用覆盖整个 gE 胞外区的 15 个重叠多肽混合物 (2μg/肽) 刺激脾细胞并分析产生 IFN-γ 及 IL-4 的 T 细胞数量。结果以斑点数/5 x 10⁵ 的平均值表示。* p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001 (ANOVA/Bonferroni 单因素方差分析法)。阴性对照为未刺激的空载体腺病毒组脾细胞, 阳性对照为 PMA (50ng)。

图 14. gE 及 gE-鞭毛素融合蛋白诱导的 gE 特异性抗体滴度。将含或不含 MF59 佐剂 (50μl/剂) 的 gE 蛋白 (5μg/剂) 或 gE-鞭毛素融合蛋白 (8μg/剂) 免疫 C57BL/6 小鼠, 共免疫两剂, 免疫间隔 14 天。第二剂免疫后 14 天, 收集免疫血清, ELISA 法检测 gE-特异性抗体滴度。*** p < 0.001, **** p < 0.0001 (ANOVA/Bonferroni 单因素方差分析法)。

图 15. gE 或 gE-鞭毛素融合蛋白 (含或不含 MF59 佐剂) 免疫血清中, 抗体介导的 VZV 感染活性中和和效价。将含或不含 MF59 佐剂 (50μl/剂) 的 gE 蛋白 (5μg/剂) 或 gE-鞭毛素融合蛋白 (8μg/剂), 或商品化的水痘疫苗免疫 C57BL/6 小鼠, 共免疫两剂, 免疫间隔 14 天。第二剂免疫后 14 天, 收集免疫血清, 将每只小鼠的血清两两合并后检测 VZV 特异性中和抗体滴度。取复孔测定的平均值表示中和抗体滴度。计算能够使空斑数减少 50% 的稀释倍数, 取其倒数, 表示中和抗体效价。* p < 0.05 (ANOVA/Bonferroni 单因素方差分析法)。

图 16. ELISpot 分析 gE 及 gE-鞭毛素融合蛋白 (含或不含 MF59 佐剂) 诱导的产生 IFN-γ 及 IL-4 的 T 细胞。用覆盖整个 gE 胞外区的 15 个重叠多肽混合物 (2μg/肽) 刺激脾细胞并分析产生 IFN-γ 及 IL-4 的 T 细胞数量。结果以斑点数/5 x 10⁵ 的平均值表示。* p < 0.05, ** p < 0.01 (ANOVA/Bonferroni 单因素方差分析法)。阴性对照为盐水组免疫的脾细胞, 阳性对照为 PMA (50ng)。

实施例

实施例中使用的材料和方法:

动物及细胞:

6-8 周的无特定病原体 (SPF 级) C57BL/6 雌性小鼠购自湖北省疾病预防控制中心。所有的动物研究在 GLP (Good Laboratory) 实验室条件下开展, 并按照“动物福利伦理审查实验动物指南”处理动物。人胚胎肾细胞 HEK293 购自 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 使用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养。THP-1 细胞购自 ATCC, 使用含 10% FBS 及 1% 青霉素/链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基培养 (Gibco, 美国)。

试剂:

所有基因片段均有上海生工合成 (上海, 中国), 引物由武汉擎科生物公司合成 (武汉, 中国); pDONR221, pAd5-CMV/V5-Dest 载体, Gateway BP 重组, LR 重组酶, 大肠杆菌 TOP10 感受态, lip2000 转染试剂, 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司 (美国)。pET28a 表达质粒购自 Novagen (美国)。质粒提取试剂盒, 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司 (美国)。Mouse anti-VZV-gE 单抗购自 Merck 公司 (美国), rabbit anti-鞭毛素 D0-D1 抗体通过免疫兔子制备。将三条合成的来自鞭毛素 D0 和 D1 结构域多肽 (见表 1) 与载体蛋白 (CCH, Thermo Fisher Scientific, 美国) 结合。免疫过程: 第一剂, 0.4mg 结合物含完全弗氏佐剂, 肌肉注射, 第二剂及第三剂, 用 0.2mg 结合物含不完全弗氏佐剂, 肌肉注射; 最后用 0.1mg 结合物, 静脉冲击; 分别免疫兔子。Rabbit anti-Ad5 单抗购自 Abcam 公司 (英国)。细胞培养瓶及移液管购自 Corning 公司 (美国)。不含内毒素的鞭毛素蛋白购自 Alpha Diagnostic 公司 (美国); IL-8 及 TNF-α 含量 ELISA 试剂盒及 ELISpot 试剂盒购自达科为公司; 中和抗体检测实验所用豚鼠补体血清购自 BD 公司 (美国)。流式所用抗体均购自 Thermo fisher 公司。商品化的水痘减毒活疫苗为长春祁健 (中国) 或长春百克公司 (中国) 生产。

表 1. 鞭毛素蛋白 D0-D1 多肽序列

| 序号 | 多肽序列 |
|----|---------------------------------|
| 1 | LNKSQSALGTAIERLSSGLRINS AKDDAAC |
| 2 | NNLQRVRELA VQSANSTNC |
| 3 | LTSARSRIEDSDYATEVSNM |

PCR 及琼脂糖电泳:

向含 1 μ l 上下游引物的管子中, 分别加入 2 x PCR 预混溶液 25 μ l, DNA 模板 50-100ng, 补加 ddH₂O 至 50 μ l. 循环条件: 第一步, 95°C, 2min; 第二步: 95°C, 15s, 45°C-55°C, 15s, 72°C, 1min30s 共 30 个循环; 第三步: 72°C 5min. PCR 结束后将 PCR 产物加入上样缓冲液并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳条件 180V, 20-30 min, 紫外检测 PCR 结果。

SDS-PAGE 及 Western blotting:

向 80 μ l 样品中加入 20 μ l 5 倍浓缩的上样缓冲液, 煮沸 5 mins. 将煮沸后的样品进行 10% SDS-PAGE 进行电泳 (100V, 20 mins 然后 160V, 1 小时 20 mins)。电泳结束后, 湿转法将蛋白转至 PVDF 膜上 (Merck, 美国), 用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液 (含 0.05% Tween 20 的 PBS 溶液) 4°C 封闭过夜; PBST 洗膜两次后加入鼠抗 VZV-gE 蛋白单克隆抗体 (1:5000 稀释, Millipore) 或兔抗 anti-鞭毛素抗血清 (1:10000 稀释) 或兔抗-Ad5 多克隆抗体 (1:10000 稀释), 37°C 孵育 1 小时; PBST 洗膜两次后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000 稀释, 碧云天) 或 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:5 000 稀释, 碧云天), 37°C 孵育 1 小时; PBST 洗膜两次后, 使用 Western Blotting ECL 显色液处理后, 化学发光法显色。

腺病毒滴度-TCID₅₀ 法:

取内含 90% 汇合度生长于含 10% FBS 的 DMEM 培养基的 293 细胞一瓶 (T-75 瓶)。在测定前一天, 用 PBS 清洗后, 加入 1 x TypLE 消化 2 mins, 加入含 2% FBS 的 DMEM 培养基终止消化, 将细胞用相同培养基重悬后计数。调整细胞浓度至 1.0-2.0 x 10⁵ 细胞/mL, 每孔 100 μ l 细胞, 接种 96 孔板, 将 96 孔板置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱 16-20 小时; 将待测病毒液及参考品分别用 DMEM+2% FBS 培养基进行十倍连续稀释 (从 10⁻¹ 稀释至 10⁻¹⁰)。将稀释后的病毒液分别加入 1-10 列, 每孔 100 μ l, 每个病毒稀释度重复 8 孔。第 11 和 12 列加入 100 μ l DMEM+2% FBS 培养基做阴性对照。将 96 孔板置于 CO₂ 培养箱 37°C 培养 10 天, 然后在倒置显微镜下观察, 判断并记录每列细胞病变效应 (CPE) 情况。判断的标准是只要有少量细胞发生 CPE 即为阳性。最后按照 Karber 法计算病毒滴度。(Kärber G, Archiv f experiment Pathol u Pharmakol, 162: 480-483, 1931).

TLR-5 活性检测:

取对数生长期表达 TLR5 受体且生长于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中的 THP-1 细胞, 125g 离心 5mins, 弃上清, 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞, 调整细胞浓度至 1x10⁷ cells/ml, 接种于 96 孔细胞培养板中, 100 μ l/孔。用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基溶液稀释阳性对照至终浓度 2.5 μ g/ml (不含内毒素的鞭毛素蛋白)。用相同的培养基将纯化后内毒素含量 < SEU/ml 的 gE-鞭毛素融合蛋白稀释至等摩尔浓度 (5 μ g/ml), 纯化后的 gE 蛋白作为阴性对照。将稀释后的样品, 无内毒素-鞭毛素或 gE 分别加入 96 孔板中, 100 μ l/孔。将 96 孔细胞培养板放入 CO₂ 培养箱中 37°C 培养 12-24 小时。培养结束后, 将各孔中的细胞吸出, 2000g 离心 10 mins, 收集细胞上清液。通过检测培养上清中 IL-8, TNF- α 细胞因子的含量来检测 TLR5 的活性, 细胞因子含量按照 IL-8, TNF- α 细胞因子 Elisa 检测试剂盒说明书进行操作。

酶联免疫反应 (ELISA) 检测血清中 anti-gE 抗体滴度:

将纯化后的原核表达 gE 蛋白用无菌碳酸钠缓冲液 (8.4 g/L NaHCO₃, 3.5 g/L Na₂CO₃, pH 9.6) 稀释至 1 μ g/ml, 100 μ l/孔加入 96 孔酶标板, 4°C 包被过夜。次日, 取出酶标板, 弃去孔内液体, 用 PBST (含 0.1% Tween 20 的 PBS 溶液) 洗板 3 次。每孔加入封闭液 (含 10% 脱脂奶粉的 PBST 溶液) 37°C 封闭 1 小时。封闭结束后, 弃封闭液, 将免疫后的小鼠血清用封闭液进行系列梯度稀释, 并设置封闭液作为空白对照。将稀释后的血清以 100 μ l 每孔加入 96 孔板, 每个稀释度血清做三个复孔, 37°C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板三次, 之后每孔加入 100 μ l 1:1000 稀释的过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体, 37°C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后, 加入 TMB 底物 (3,3',5,5'-四甲基联苯胺, KPL, 美国)。加入 0.2M 硫酸终止反应。用酶标仪在波长 450nm, 参比波长 620 处测定吸光度。

中和抗体检测:

抗体介导的中和 VZV 病毒感染活性中和效价测定步骤如下: 将 VZV 病毒用 VZV 稀释液稀释至 2x10³ PFU/ml (磷酸盐缓冲液 (PBS)、蔗糖 5%、谷氨酸 1%、胎牛血清 (FBS) 10%、pH 7.1)。将 150 μ l 病毒与 150 μ l 连续稀释的热灭活血清及 5 μ l 豚鼠补体在 37°C 孵育 1 小时。取孵育后的病毒血清混合物加入长满 MRC-5 单层细胞的 24 孔板 (100 μ l/孔) 中, 每个稀释度做两个复孔, 37°C 孵育 2 小时。2 小时后加入 2ml 病毒维持液 (含 2% FBS 的 MEM)。7 天后, 去除培养基, 固定细胞, 用考马斯蓝溶液 (考马斯蓝 0.5%, 甲醇 45%, 乙酸 10%) 染色 10 分钟, 用蒸馏水洗漂平板, 数斑。每个稀释度检测两个复孔。取使空斑数减少 50% 的血清稀释度的倒数, 即为中和抗体效价。

小鼠脾细胞分离:

将小鼠脾脏无菌取出并转移到放置在 6 孔板的单个孔中的细胞过滤器中, 添加 3ml 培养基 (RPMI-1640, 含 5% FBS), 研磨释放脾细胞, 200 目细胞筛网过滤脾脏。将细胞收集于 15ml 试管中, 350 x g, 4°C 下离心 5min。丢弃上清液, 将细胞沉淀重悬后加入 2 ml 红细胞 (RBC) 裂解缓冲液 (Thermo Fisher Scientific) 室温裂解 10 mins, 加入 6ml RPMI-1640 培养基终止裂解红细胞, 离心 (4°C, 350g, 5 mins)。弃上清, 加入 10ml RPMI-1640 培养基重悬细胞, 离心 (4°C, 350g, 5min)。弃上清, 加 5ml RPMI-1640+10% FBS 重悬细胞。取重悬后的脾细胞悬液进行计数后待用。

Elispot 检测:

gE-特异性细胞免疫通过干扰素- γ (IFN- γ) 和 IL-4 的 Elispot 来检测, 使用覆盖整个 gE 胞外区的 15 个重叠多肽混合物作为刺激物。将预包被有 IFN- γ 或 IL-4 抗体的 Elispot 板 (达科为), 每孔加入 200 μ l RPMI-1640 培养基, 室温静置 10 分钟后将其扣出。调整脾细胞终浓度至 2-8 x 10⁶ 细胞/ml。将 100 μ l 脾细胞悬液与多肽混合 (每条肽的浓度为 2 μ g/ml), 每个样品做三个复孔。将 ELISPOT 板置于 37°C 培养箱培养 36-72 小时。培养结束后, 按照 Elispot 板子说明书进行斑点显色操作 (具体操作流程见厂家说明书)。板子晾干后, 使用酶联斑点成像系统进行斑点计数。计算每 5 x 10⁵ 个细胞中形成斑点的细胞数 (SFC)。培养基背景水平通常 < 15 SFC/5 x 10⁵ 个细胞。

胞内细胞因子染色:

在体外用覆盖整个 gE 蛋白胞外区 (含 11 个重叠氨基酸的 15 肽) 的多肽混合物 (2 μ g/ml) 37°C 刺激脾细胞 2 小时, 刺激结束后加入 Brefeldin A (3 μ g/ml) 及离子霉素 (1 μ g/ml) 37°C 孵育过夜。收获各孔细胞至 EP 管, 350g 离心 5 分钟, 弃上清。使用 50 μ l 含 2% Fc 抗体及 1% FBS 的 PBS 溶液重悬细胞, 4°C 孵育 10 分钟。再加入 50 μ l 含 anti-CD3 Alex fluor 700、anti-CD4-FITC 和 anti-CD8-PE-Cy7 (BD Biosciences, 1: 100 稀释) 的抗体混合液, 避光 4°C 孵育 30 分钟。用 FACS 洗涤液洗涤细胞 1 次后, 加入 200 μ l 固定液, 避光室温孵育 25 分钟。固定结束后, 再加入 1.5ml 稀释好的破膜剂洗涤细胞, 350g 离心细胞悬液 5 分钟, 弃上清。使用破膜剂稀释 IFN- γ -APC, IL-2-PerCp-Cy5.5 and IL-4-PE 抗体, 将稀释后的抗体混合物加入细胞悬液, 避光室温孵育 30 分钟。使用 CytoFLEX S 流式细胞仪 (Beckman) 及 Flow Jo 软件分析 CD3+/CD4+ 阳性和 CD3+/CD8+ 阳性 T 细胞亚群。

实施例 1**重组腺病毒的构建, 鉴定, 扩增及纯化****1.1 试验设计**

1.1.1 根据计算机计算及模拟结果设计用于 gE 鞭毛素融合蛋白的 linker 序列, 鞭毛素蛋白与 TLR5 受体结合计算机模拟图见图 1, 设计后的 gE 鞭毛素融合蛋白与 TLR5 受体结合模拟结构图见图 2, 其中图 2A 为 ANF、图 2B 为 ACF、图 2C 为 ASF。

1.1.2 本研究使用引物见表 2，插入基因与对应制备的重组腺病毒简称见图 3。

表 2. 本研究使用引物信息

| 引物名称 | 序列 |
|---------------|--|
| AttB1-JEV-F | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCCGCCCATGGGAAAACGGTCC |
| AttB2-SV40-R | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGACATGATAAGATACATTGATGAG |
| AttB2-GE-R | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTATTATCTGATCAGGGGGCTAG |
| AttB2-hOACF-R | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTATTACCTCAGCAGGCTCAG |
| AttB2-hOANF-R | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTATTATCTAATCAGAGGGCTAG |

注：1. 引物名称中，F 代表正向引物，R 代表反向引物；2. 扩增含或者不含 SV40 polyA 的 gE 及 gE-鞭毛素基因所使用的正向引物均相同，即 AttB1-JEV-F；3. 扩增含 SV40 polyA 的 gE 及 gE-鞭毛素基因所使用的反向引物均为 AttB2-SV40-R。

1.2 重组腺病毒构建

1.2.1 pDONR221 转移载体构建

将 1.1 所示的基因片段进行基因合成，用高保真 DNA 聚合酶分别扩增基因合成的各个目的基因片段（扩增引物序列见 1.1.2 中表 2 所示）。PCR 扩增后，将 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，用 DNA 胶回收试剂盒分别回收目的 DNA 片段，PCR 循环条件：第一步：95°C，2 mins；第二步：95°C，15 s，55°C，15 s，72°C，1 min 30 s，共 30 个循环，第三步：72°C，5 mins。根据厂家说明书，将回收后的目的 DNA 片段分别和 pDONR221 质粒做 BP 重组(Thermo Fisher Scientific, Cat 11789020)，将重组混合物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞并涂布含 Kana 抗性的固体 LB 平板。提取质粒，并送测序。

其中，制备得到的 TOP10/pDONR221-Js-ASF-SV40polyA, TOP10/pDONR221-Js-ACF-SV40polyA 和 TOP10/pDONR221-Js-ANF-SV40polyA 于 2019 年 9 月 10 日在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 进行保藏，保藏编号分别为：CCTCC M 2019707, CCTCC M 2019708 and CCTCC M 2019709。

1.2.2 重组腺病毒表达载体构建

按照厂家说明书操作，将测序正确的重组 pDONR221 质粒，分别和目的质粒 pAd5-CMV/V5-DEST 做 LR 重组(Thermo Fisher Scientific, Cat 11791020)。将重组混合物并转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，并涂布含 Ampicillin (Amp, 100 µg/ml) 抗性的固体 LB 平板。次日，挑取不同的菌落，这些菌落可能含有不同的 pAd5-CMV 质粒，将这些分别携带含或者不含 SV40 polyA 的 gE 或 gE-鞭毛素融合基因的 pAd5-CMV 质粒（称为 pAd5-CMV (VZV)）。将挑取的菌落在含 Amp 抗性的 LB 培养基中培养，提取质粒并测序。

1.2.3 重组腺病毒质粒的制备

将测序正确的 pAd5-CMV (VZV) 质粒分别转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，并涂布含 Amp 抗性的固体 LB 平板。次日，分别挑取单克隆接种于 200 ml 含 Amp 的 LB 液体培养基，过夜培养后，质粒大抽试剂盒，分别提取大量的 pAd5-CMV (VZV) 质粒。

其中，制备得到的 TOP10/pAd5-Js-gE-SV40polyA 于 2019 年 9 月 10 日在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 进行保藏，保藏编号为：CCTCC M 2019710。

1.2.4 重组腺病毒载体线性化处理

将 1.2.3 中获得的质粒分别用 PacI 限制性内切酶(NEB, 美国), 37°C 酶切 3h，酶切体系如下：pAd5-CMV(VZV)质粒，10µg，10*NEB CutSmart buffer: 5µl, PacI 酶: 5µl, 加 ddH₂O 至总体积 50µl。酶切完成后用 PCR 产物回收试剂盒，回收酶切后的 DNA 片段。并用微量核酸定量仪对回收后的 DNA 片段进行定量。

1.2.5 重组腺病毒的包装

根据 Lipofectamine2000 转染试剂的使用说明，将 Pac I 线性化的 pAd5-CMV (VZV) 质粒分别转染汇合度为 60-70% 的 6 孔板中的 HEK293 细胞。转染前 2h，将培养基更换成无抗生素培养基，加入 DNA/ 脂质体复合物。转染后 5 小时，将培养基更换为含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基。在倒置显微镜下隔日观察细胞病变，直至 60% 的 HEK293 细胞出现斑状时收集细胞，在室温与 -80°C 超低温之间反复冻融 3 次，1200g 离心 5min，收集上清即获得 rAd5-gE (Js), rAd5-gE-SV40 (Js), rAd5-ANF (Js), rAd5-ANF-SV40 (Js), rAd5-ACF (Js), rAd5-ACF-SV40 (Js), rAd5-ASF (Js) and rAd5-SE-SV40 (Ig κ) 重组腺病毒，置于 -80°C 冰箱保存。

1.3 重组腺病毒目的基因表达鉴定

1.3.1 PCR 鉴定

初次病毒扩增保存液用病毒 RNA/DNA 提取试剂盒(Takara, 日本)，按照操作说明书，提取病毒基因组 DNA，PCR 扩增提取后的病毒基因组 DNA，鉴定插入重组腺病毒载体的 VZV gE 或 gE-鞭毛素融合基因。引物：T7-F/V5-C-R, PCR 条件：病毒 DNA 1µl，正反向引物各 0.5µl，5 µl 2×PrimerSTAR mix, ddH₂O 3 µl，循环条件：第一步：95°C，2min；第二步：95°C，15 s，45°C，15 s，72°C，1 min 30 s 共 30 个循环；第三步：72°C，5 mins。PCR 结束后将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，切胶回收目的条带并送测序公司进行测序。

1.3.2 重组腺病毒的 VZV gE 和 gE-鞭毛素融合基因表达

将 HEK293 细胞 或 Vero 细胞接种于 6 孔板 (5 × 10⁵/孔)，待 6 孔板中汇合率为 90% 时，将 P3 代重组腺病毒以 MOI 0.2 (HEK293 细胞) 和 20 (Vero 细胞) 接种至 6 孔板中，并设置正常细胞为阴性对照。37°C 培养 48 小时后，用细胞刮将细胞刮下，离心后分别收集细胞和上清，上清标记为细胞培养上清，细胞沉淀中加入 100 µl 哺乳动物细胞裂解液 (碧云天，中国)，冰上裂解后，3,500 × g 离心 5 mins 取裂解上清标记为细胞裂解液。向 80 µl 细胞培养上清和细胞裂解液中分别加入 20 µl 5×上样缓冲液，100°C 煮沸 5 mins，SDS-PAGE 及 WB 检测 gE 或 gE-鞭毛素融合蛋白的表达。Vero 细胞检测结果见图 4，HEK293 细胞检测结果见图 5。由图 4 和图 5 可知，经腺病毒 A 或 B 感染后，在 HEK 293 及 Vero 细胞的上清中均能够成功的检测到 gE 蛋白或 gE 鞭毛素融合蛋白的表达，表达的 gE 蛋白分子量约在 80 Kd 左右，gE-鞭毛素融合蛋白分子量在 120 Kd 左右。该 gE 蛋白及 gE-鞭毛素融合蛋白能够被 mouse anti-VZV gE 单克隆抗体特异性识别。且 gE-鞭毛素融合蛋白能被 anti-鞭毛素 多抗特异性识别。

1.4 重组腺病毒小规模扩增：

将汇合度 90% 的 HEK293 细胞，按照 MOI 0.01~1 分别接种不同的重组腺病毒，并将细胞置于 37°C，5%CO₂ 培养箱持续培养，待 70% 以上细胞出现变圆，脱落时，将细胞用细胞刮刮下，2265g，离心十分钟，分别收获上清及细胞沉淀。将细胞沉淀用 PBS 重悬，并置于 -80°C 冰箱反复冻融三次，2265g，离心十分钟收获上清，用于下一步纯化。

1.5 重组腺病毒纯化

预冷离心转子至 4°C。在生物安全柜中，向离心管中缓慢加入 12ml 1.4g/ml 氯化铯 (53g+87ml 10mM Tris-HCl, pH 7.9)，再非常轻柔地加入 9ml 1.2g/ml 氯化铯 (26.8g +92ml 10mM Tris-HCl, pH 7.9)。之后在不连续梯度顶部加入 13ml 病毒保存液，平衡离心管，100000 ×g (SW28 转子上为 23000 rpm) 4°C 离心 120 分钟。小心抽吸病毒带，将含病毒的溶液转移至无菌 15ml 离心管，加入等体积的 10 mM Tris HCl, pH 7.9。将 20ml 1.35g/ml 氯化铯加入离心管中。非常缓慢地顶部加入

15ml 上步中稀释的病毒悬液。平衡离心管后，100000 × g 4°C离心 18 小时。超速离心后，小心收集蓝白色病毒带。将病毒在 10000 道尔顿的纤维素酯膜（购自美国 BD 公司）中进行 4°C透析至 PBS 溶液中，以去除氯化铯盐。透析后的病毒溶液加入 10%甘油，分装后冻存于 -80°C 冰箱。

1.6 重组腺病毒的检定及分析

Western blotting 检测纯化后的重组腺病毒（见图 6A），WB 使用抗体为兔 Anti-Ad5 多克隆抗体。图 6A 可见每种重组腺病毒均可被 rabbit anti-rAd5 多克隆抗体特异性识别。将纯化后的重组病毒 rAd5-gE 复染（1%~2%的磷钨酸溶液，pH 6.8）之后进行电镜检测，经电镜观察可看到完整的病毒颗粒见图 6B，阴离子-HPLC 分析结果显示，纯化后的病毒纯度在 95% 以上见图 6C。TCID₅₀ 检测结果显示纯化后的腺病毒滴度在 10¹⁰ TCID₅₀/ml 以上。

实施例 2

gE 蛋白及 gE-鞭毛素融合蛋白在原核系统中的表达，纯化及检定

2.1 基因及蛋白命名

插入基因及对应表达的 gE 及 gE-鞭毛素融合蛋白的命名见图 7。

2.2 pET28a 表达载体的构建

将 2.1 所示各个基因分别插入用 NcoI 和 XhoI 酶切后插入用相同酶切后的 pET28a 载体中，连接转化后，挑取单克隆接种含 kanamycin (50 μg/ml) 抗性的 LB 培养基，过夜培养后提取质粒，送测序公司进行测序。获得 pET28a-gE, pET28a-ENF, pET28a-ECF, pET28a-ESF 表达质粒。

2.3 gE 及 gE 鞭毛素融合蛋白的表达

将测序正确的 pET28a-gE, pET28a-ENF, pET28a-ECF, pET28a-ESF 质粒分别转化 BL21(DE3)感受态细胞，挑取单克隆接种于含 kanamycin 抗性的 LB 培养基中，37°C，200rpm 过夜培养。次日，将菌种转接至新鲜的含 kanamycin 抗性的 LB 培养基中。37°C，200rpm 培养 4h，待 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时，加入 0.1~1mM 的 IPTG 进行诱导表达，表达温度 16~37°C 诱导 4~16h，收获菌体，用于下一步纯化。

2.3 gE 及 gE 鞭毛素融合蛋白的纯化及复性。

将收集的菌体，使用高压匀浆仪进行破碎后，2,265 x g，离心 10min，收集包涵体。将包涵体用含去污剂的生理盐水洗涤 3~4 次后加入含 6M 盐酸胍或 8M 尿素的 20 mM Tris, 5 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 8.0 缓冲液进行溶解。将清洗后的镍柱用平衡液 A (20 mM Tris, 8M Urea, 5 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 8.0) 平衡 5 个柱体积 (CV)。将溶解后的包涵体上样至镍柱，上样结束后，用平衡液冲洗 5CV，然后用 20CV 线性梯度至 100% 洗脱液 B 进行洗脱，洗脱液 B 液为 20 mM Tris, 8 M Urea, 500 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 8.0。分别收集各个洗脱峰。

透析复性：将纯化的包涵体（溶解于 8M Urea）用透析袋逐步透析至含 6M、4M、2M Urea 的 PBS 溶液中。每隔 2h 更换一次透析液。最后再将纯化后的包涵体蛋白缓慢透析至 PBS 溶液中。

柱上复性：在包涵体上样结束后，使用平衡液 A 冲洗柱子 5CV；使用 20CV~40CV 线性梯度至 100% 复性液 B，进行柱上复性，复性液 B 为：20mM Tris +2M Urea+5mM 咪唑+500mM NaCl+0.1mM GSSG/1mM GSH, pH: 8.0。复性结束后，使用缓冲液 C (20 mM Tris, 2 M Urea, 5 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 8.0) 冲洗柱子 5 CV。用 20CV 线性梯度至 100% 洗脱液 D 进行洗脱，洗脱液 D 为：20mM Tris +2M Urea+5mM 咪唑+500mM NaCl, pH: 8.0。分别收集各个洗脱峰。将收集的洗脱峰使用透析袋，透析至 PBS 溶液中。

2.4 gE 及 gE 鞭毛素融合蛋白的检定。

10% SDS-PAGE 电泳及 WB 分析纯化后的蛋白，结果见图 8。检测后可知纯化后的 gE 蛋白分子量在 58 Kd 左右，gE-鞭毛素融合蛋白在 90 Kd 左右，除 ECF 蛋白外，其它蛋白经纯化后纯度达 80% 以上。各蛋白能被鼠 anti-gE 单克隆抗体特异性识别，gE-鞭毛素融合蛋白能被兔 anti-鞭毛素 D0-D1 抗血清特异性识别。经 BCA 法检测蛋白浓度可知，纯化后 gE 蛋白的产量在 15mg~20mg/L，gE-鞭毛素融合蛋白的产量在 8~15mg/L。由于纯化后残留的脂多糖污染(LPS，一种佐剂，会干扰鞭毛素活性测定)且部分蛋白存在降解，因此未比较来自大肠杆菌产生的免疫原与来真核系统（重组腺病毒载体）表达的相应蛋白免疫原性差距。然而，本领域普通技术人员应当能够优化产率、防止或最小化蛋白质水解降解并显著降低残余 LPS 含量。本发明中未对原核表达的蛋白进行进一步优化是因为本发明使用腺病毒真核表达系统获得了完整的、高产率且无 LPS 的重组蛋白。

实施例 3

gE 蛋白及 gE-鞭毛素融合蛋白在真核细胞中的表达，纯化，检定及活性分析

3.1 gE 蛋白及 gE-鞭毛素融合蛋白在 Vero 细胞中的表达。

取汇合度为 90% 的 Vero 细胞一瓶 (T-75 瓶)，用 PBS 清洗两次后，分别感染包装获得的重组腺病毒 A 及重组腺病毒 B，MOI 100~200，37 摄氏度吸附 1 小时后，每瓶补加 20ml 的 DMEM 培养基。将培养瓶放入 CO₂ 培养箱，37°C 继续培养 4~5 天。之后收获培养上清，用于下一步纯化。

3.2 gE 蛋白及 gE-鞭毛素融合蛋白的纯化

取收获的 gE 或 gE 鞭毛素融合蛋白表达上清加入等体积的 10mM PBS +1M (NH₄)₂SO₄, pH: 7.5 溶液，0.2μm 滤膜过滤后上样至平衡好的 Capto Phenyl Impress 柱子中。平衡缓冲液为 10mM PBS +500mM (NH₄)₂SO₄, pH: 7.5。上样结束后继续用平衡液冲洗 5CV；使用 10CV 的线性梯度洗脱至 100% B 液，B 液为 10mM PBS, pH: 7.5。收集 100%B 时的洗脱峰。

将收集的洗脱峰上样至 10 mM PBS, pH 7.5 平衡好的 Source 30Q 柱中，上样结束后使用平衡液冲洗 5CV，使用 10mM PB+250mM NaCl, pH 7.5 进行阶梯洗脱，并收集纯化液即为最终纯化液。将纯化液 (100μg~5mg/ml) 添加 10%甘油后，冻存于 -80°C 冰箱中。

3.3 gE 蛋白及 gE 鞭毛素融合蛋白的检定及活性分析。

将纯化后的 gE 及 gE 鞭毛素融合蛋白经 SDS-PAGE 分析可知（见图 9A），纯化后的 gE 蛋白纯度在 95% 以上，纯化后的 gE-鞭毛素融合蛋白纯度在 85% 以上，经 BCA 检测纯化后蛋白含量可知，该方法表达的 gE 蛋白产量可达到 100mg/L，gE-鞭毛素融合蛋白的产量在 50~80mg/L。本发明所制备的重组蛋白在浓度范围 100ug 至 5 mg/ml 的水溶液中均为可溶状态，例如磷酸盐缓冲液 (pH7.0-7.5) 或 4 mM 醋酸盐缓冲液 (pH5.4) 水溶液。掌握本领域知识的技术人员均熟悉蛋白质长时间稳定保存的方法。

纯化后的蛋白经 WB 分析可知（见图 9B 和 9C）gE 蛋白及 gE-鞭毛素融合蛋白均能被鼠 anti-gE 单克隆抗体特异性识别。只有 gE-鞭毛素融合蛋白能够被兔 anti-鞭毛素 D0-D1 抗血清特异性识别，但不识别 gE 蛋白。

TLR-5 活性分析（见表 3）显示 ANF, ACF, ASF 三种融合蛋白均能通过激活 THP-1 TLR-5 受体诱导 THP-1 细胞以剂量依赖的方式分泌较高浓度的 IL-8 及 TNF-α 因子。但按照相同方法制备并纯化的 gE 蛋白则不能诱导 TLR-5 活性细胞因子的分泌。表明这三种 gE-鞭毛素融合蛋白均通过 TLR-5 特异性的发挥鞭毛素蛋白的功能活性。其中 ASF 的鞭毛素活性与商品化鞭毛素蛋白活性基本一致。

表 3. TLR-5 活性分析结果

| 样品名称 | 批号 | 分子量 (Kd) | 实验刺激浓度 (μg/ml) | IL-8 含量 (ng) | TNF-α 含量 (pg) | 体外相对效力 (%) | |
|------|------------|----------|----------------|--------------|---------------|------------|-------|
| | | | | | | IL-8 | TNF-α |
| gE | MB20180731 | 80 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | |
|-----------|------------|-----|-----|-------|---------|-------|-------|
| ACF | MB20181220 | 120 | 5 | 6.41 | 111.94 | 32.7 | 11.6 |
| ANF | MB20181218 | 120 | 5 | 10.83 | 552.00 | 55.3 | 57.0 |
| ASF | MB20180916 | 120 | 5 | 27.84 | 1004.00 | 142.0 | 103.6 |
| Flagellin | XA1204-L | 60 | 2.5 | 19.60 | 969.05 | 100 | 100 |

**实施例 4
免疫原性测试**

4.1 重组腺病毒 A 及重组腺病毒 B 免疫原性检测

4.1.1 动物免疫及样品收集

所有动物实验均按照湖北省食品药品安全评价中心，动物保护与利用委员会（IACUC）批准的方案进行。36 只无特殊病原体（SPF 级）的雌性 C57BL/6 小鼠，体重 12~16g 饲养于湖北省食品药品安全评价中心。检验检疫结束后，小鼠按体重随机分为 6 组，分别于第 1 天和第 28 天肌肉接种 10^9 TCID₅₀/剂量的重组腺病毒 A、重组腺病毒 B 或 700 pfu 市售 VZV 疫苗（长春祁健生物技术有限公司，中国）。表 4 总结了分组细节。分别于第 0、12、42 和 56 天从眼眶静脉丛采血。

表 4 重组腺病毒免疫原性检测分组情况

| 组别 | 处理 | 剂量 (TCID ₅₀ /dose) | 给药途径 | 数量 |
|--------------|---------------|----------------------------------|---------------|----|
| Empty vector | rAd5 vector | 10^9 | 肌肉注射，0.1ml/只 | 6 |
| rAd5-gE | rAd5-gE (Js) | 10^9 | 肌肉注射，0.1ml/只 | 6 |
| rAd5-ANF | rAd5-ANF (Js) | 10^9 | 肌肉注射，0.1ml/只 | 6 |
| rAd5-ACF | rAd5-ACF (Js) | 10^9 | 肌肉注射，0.1ml/只 | 6 |
| rAd5-SE | rAd5-SE(Igk) | 10^9 | 肌肉注射，0.1ml/只 | 6 |
| Licensed VZV | 水痘减毒活疫苗（长春百克） | 700 pfu | 肌肉注射，0.15ml/只 | 6 |

4.1.5 不同腺病毒载体疫苗及市售水痘疫苗对小鼠的免疫原性对比

血清 anti-gE IgG 抗体：通过 ELISA 检测免疫后血清中 anti-gE IgG 抗体滴度，检测结果见图 10 及表 5，空载体对照组小鼠在免疫后 12、42、56 天均未检测到抗体滴度上升。而其余各组在 10^9 剂量下，免疫后 12 天抗体滴度均明显提高，在第二剂加强免疫后，抗体滴度水平进一步升高。携带 gE-鞭毛素融合蛋白的不同重组腺病毒组，在免疫后第 12 天抗体水平均显著高于 rAd5-gE 组及市售水痘疫苗组抗体滴度水平。在免疫后第 56 天，重组腺病毒各组抗体水平与商品化疫苗组相比抗体滴度均具有显著性差异 ($p < 0.001$)。各腺病毒载体候选疫苗组之间比较，仅有 rAd5-gE 组抗体滴度略低于 rAd5-ANF 组 ($P=0.031$)，其余各 gE-鞭毛素融合腺病毒组之间抗体滴度无显著差别 ($P>0.05$)。

表 5. 重组腺病毒诱导的 gE-特异性 IgG 抗体滴度

| Groups | Mouse No. | Geometric Mean Titers (GMT) | | | |
|--------------|-----------|-----------------------------|--------|--------|--------|
| | | Day 0 | Day 12 | Day 42 | Day 56 |
| Licensed VZV | 1 ~ 6 | < 100 | 898 | 20159 | 7155 |
| Empty vector | 7 - 12 | < 100 | < 100 | < 100 | < 100 |
| rAd5-gE | 13 ~ 18 | < 100 | 6142 | 32000 | 32000 |
| rAd5-ANF | 19 ~ 24 | < 100 | 22627 | 73517 | 84449 |
| rAd5-ACF | 25 ~ 30 | < 100 | 8652 | 45255 | 71838 |
| rAd5-SE | 31 ~ 36 | < 100 | 5080 | 14154 | 48503 |

血清中和抗体滴度：如图 11 所示， 10^9 剂量条件下，在第一剂免疫后 56 天，各重组腺病毒组均诱导较高的中和抗体水平。而 rAd5-ACF 组诱导的中和抗体水平与其余各重组腺病毒组及市售 VZV 疫苗相比均有显著性差异 ($p < 0.001$)。其余各组虽无显著性差异，但诱导的中和抗体水平与市售的减毒活疫苗水平相当。rAd5-ANF 及 rAd5-SE 组诱导的中和抗体水平与 rAd5-gE 组相比虽无统计学差异，但更为一致和均一。

细胞免疫水平检测：细胞内细胞因子染色结果见图 12，重组腺病毒免疫 C57BL/6 小鼠 8 周后，rAd5-gE 组及 rAd5-SE 组可检测到 VZV gE 特异性 CD4⁺T 细胞免疫。两者的 CD4⁺及 CD8⁺T 细胞中 IFN- γ 阳性细胞百分比均显著高于腺病毒空载体对照组 ($P<0.01$ 或 $P<0.0001$)。如图 13 所示，IFN- γ Elispot 检测结果见图 13 进一步证实了细胞内细胞因子染色的结果。rAd5-gE 组与 rAd5-SE 组脾细胞 IFN- γ 和 IL-4 斑点数与其余各实验组相比均有显著性差异 ($P<0.01$ 或 $P<0.0001$)。rAd5-gE 组与市售疫苗组相比也具有显著性差异 ($P<0.05$)。说明 rAd5-gE 和 rAd5-SE 组可诱导强烈的 CD4⁺ Th1 和 Th2 细胞免疫反应，同时亦可诱导较强的 CD8⁺T 细胞毒性细胞免疫反应。

4.2 gE 鞭毛素融合蛋白免疫原性检测

4.2.1 动物免疫及样品收集

所有动物实验均按照湖北省食品药品安全评价中心，动物保护与利用委员会（IACUC）批准的方案进行。60 只无特殊病原体（SPF 级）的雌性 C57BL/6 小鼠，体重 12~16g 饲养于湖北省食品药品安全评价中心。检验检疫结束后，小鼠按体重随机分为 10 组，分别于第 1 天和第 14 天肌肉接种含和不含 MF59（50 μ l/剂）佐剂的 gE 蛋白（5 μ g/剂）或含和不含 MF59 佐剂的 gE-鞭毛素融合蛋白（8 μ g/剂）或 700 pfu 市售 VZV 疫苗（长春祁健生物技术有限公司，中国）。表 6 总结了分组细节。分别于第 0 天和第 28 天从眼眶静脉丛采血。

表 6. gE 鞭毛素融合蛋白动物实验分组

| 组别 | 处理 | 剂量 ($\mu\text{g}/\text{dose}$) | 给药途径 | 数量 |
|----------|--------------|----------------------------------|----------------|----|
| 阴性对照组 | 生理盐水 | 7 | 肌肉注射, 0.1ml/只 | 6 |
| gE | gE | 5 | 肌肉注射, 0.1ml/只 | 6 |
| ANF | ANF | 8 | 肌肉注射, 0.1ml/只 | 6 |
| ACF | ACF | 8 | 肌肉注射, 0.1ml/只 | 6 |
| ASF | ASF | 8 | 肌肉注射, 0.1ml/只 | 6 |
| gE+MF59 | gE+MF59 | 5+50 μl | 肌肉注射, 0.1ml/只 | 6 |
| ANF+MF59 | ANF+MF59 | 8+50 μl | 肌肉注射, 0.1ml/只 | 6 |
| ACF+MF59 | ACF+MF59 | 8+50 μl | 肌肉注射, 0.1ml/只 | 6 |
| ASF+MF59 | ASF+MF59 | 8+50 μl | 肌肉注射, 0.1ml/只 | 6 |
| 阳性疫苗 | Licensed VZV | 700PFU | 肌肉注射, 0.15ml/只 | 6 |

4.2.2 含佐剂与不含佐剂的 gE 蛋白及 gE-鞭毛素融合蛋白及市售水痘疫苗免疫原性对比。

血清 anti-gE IgG 抗体滴度: 免疫后第 28 天, 即第二剂免疫后第 14 天小鼠血清进行 ELISA 检测 gE 特异性抗体滴度, 结果见图 14 及表 7。ACF 组 gE 特异性抗体滴度明显升高且与盐水组及 gE 组相比均具有统计学差异。ANF 与 ASF 组 gE 特异性抗体滴度亦明显升高, 与盐水组相比具有统计学差异, 且 gE 特异性抗体滴度水平亦均高于 gE 组。该结果表明, 在免疫后 4 周, 所有不含 MF59 佐剂的自身具有佐剂效应。gE-鞭毛素融合蛋白诱导的抗体水平均显著高于对照组 ($p < 0.0001$)。在添加 MF59 佐剂后, 抗体滴度进一步提高, 表明该免疫组合物与佐剂联合具有增强体液免疫的作用, 后期还可以考虑与其它能够诱导产生细胞免疫的佐剂联合使用。

表 7. gE 及 gE-鞭毛素融合蛋白诱导的 gE-特异性 IgG 抗体滴度

| Groups | Mouse No. | Geometric Mean Titers (GMT) | |
|----------------------|-----------|-----------------------------|--------|
| | | Day 0 | Day 28 |
| gE | 1 ~ 6 | < 100 | 566 |
| gE + MF59 | 7 ~ 12 | < 100 | 182456 |
| ACF | 13 ~ 18 | < 100 | 14368 |
| ACF + MF59 | 19 ~ 24 | < 100 | 36204 |
| ANF | 25 ~ 30 | < 100 | 1270 |
| ANF + MF59 | 31 ~ 36 | < 100 | 7184 |
| ASF | 37 ~ 42 | < 100 | 4525 |
| ASF + MF59 | 43 ~ 48 | < 100 | 18102 |
| Licensed VZV vaccine | 49 ~ 54 | < 100 | 8063 |
| Saline | 55 ~ 60 | < 100 | < 100 |

血清中和抗体滴度: 如图 15 所示, 在第二剂免疫后 14 天, 含 MF59 佐剂的 ACF 组诱导的中和抗体水平显著高于含 MF59 佐剂的 gE 蛋白组诱导的中和抗体水平。虽然其它两个含 MF59 佐剂的 gE-鞭毛素融合蛋白与含 MF59 佐剂的 gE 蛋白组相比中和抗体水平无显著差异, 但含 MF59 佐剂的 gE-鞭毛素融合蛋白组诱导的中和抗体水平仍然高于 MF59 佐剂的 gE 蛋白组。且含 MF59 佐剂的 gE-鞭毛素融合蛋白组诱导的中和抗体水平与市售减毒水痘活疫苗诱导的中和抗体水平相当。除此之外, 含 MF59 佐剂的 ASF 和 ACF 组诱导的中和抗体反应比市售疫苗组诱导的中和抗体水平更为一致和均一。

细胞免疫: IFN- γ 及 IL-4 Elispot 检测结果见图 16。含 MF59 佐剂的 gE 及 ACF 组脾细胞产生的 IL-4 斑点数有明显增加。与市售水痘减毒活疫苗相比具有显著性差异。

结论: 目前仍需要开发一种更安全的改良型水痘和带状疱疹疫苗。市售的水痘减毒活疫苗仍然会给疫苗接种者带来罕见但非常严重的不良反应风险, 尤其是对婴儿及免疫抑制人群, 一旦出现这些反应, 即需要紧急医疗处理。此外, 市售的水痘减毒活疫苗还存在传染免疫受损个体的风险。三分之一接种了减毒活疫苗的受试者日后将有患带状疱疹的风险, 他们当中有五分之二的受试者将受到带状疱疹愈后衰弱慢性神经痛的影响。因而目前孕妇和免疫功能低下的人禁止使用水痘和带状疱疹减毒活疫苗。尽管含佐剂的亚单位带状疱疹疫苗 Shingrix 比减毒活疫苗更有效, 但它不良反应更多, 会引起更多的局部和全身不良反应(Tricco AC *et al.*, BMJ. 363:k4029, 2018)。

本发明公开了制备和实施新的免疫组分的方法, 所述免疫组分可用于预防针对 VZV 感染的疫苗并诱导广泛的保护性体液和细胞免疫。所述免疫组分选取 VZV-gE 糖蛋白作为免疫原, 是因为 gE 蛋白是 VZV 病毒中含量最丰富、免疫原性最强的一种蛋白。本发明所述的免疫组分包括含佐剂的重组 VZV-gE 蛋白和具有内在佐剂特性的 gE-flagelin 融合蛋白。所述免疫组分可在原核或真核表达系统中表达制备, 亦可在表达 gE 或 gE-鞭毛素蛋白的复制缺陷型腺病毒载体中制备。通过基因工程与 gE 蛋白共价连接的鞭毛素蛋白部分已被证明能够结合并激活 TLR5, 从而触发天然免疫。这种融合蛋白在人类疫苗中可能不需要进一步的佐剂, 从而降低由佐剂引发的不良反应的风险。根据本发明, 所有免疫组分都具有高度的免疫原性, 能诱导很强的与保护作用相关的 gE 特异性抗体、体外功能性中和抗体; 同时该免疫组分还可诱导出在带状疱疹预防及康复中起重要作用的 CD4+Th1 和 Th2 T 细胞免疫。具有自身佐剂效应的 gE-鞭毛素融合蛋白无论是直接纯化后的或经腺病毒载体递送均比其相应的 gE 蛋白具有更高的免疫原性。如有需要, 还可使用 Shingrix 中 AS01 反应性低得多的常规佐剂即可显著提高纯化蛋白的免疫原性。表达 gE 或 gE-鞭毛素融合蛋白的非复制腺病毒载体不仅能诱导良好的 gE 特异性抗体、VZV 中和反应和 CD4+T 细胞反应, 而且还能诱导机体产生 CD8+T 细胞免疫, 从而能够进一步破坏被 VZV 感染细胞。

本发明中几乎所有的免疫组分均比市售减毒水痘活疫苗的免疫原性更强。此外, 本发明所述的各种免疫组分可被用作初免+加强免疫策略的一部分, 以增强及扩大 VZV 特异性免疫。所述的各种免疫组分还可与其他免疫原混合用于联合疫苗中。这些免疫组分比市售的水痘减毒活疫苗更安全, 因为它们不会传染, 不会引起偶然的可能与使用相关的严重的不良事件, 而且最重要的是不会使疫苗接种者暴露于罹患带状疱疹及愈后神经痛的重大风险。本发明还公开了 gE 和 gE 鞭毛素融合蛋白在原核系统中表达制备的方法, 该方法可降低疫苗的生产成本。本发明公开的腺病毒载体亦可被开发为单次免疫的疫苗, 从而减少免疫频次。

总之, 本发明提供的免疫组分可用于生产更安全、有效和可能更便宜的预防和控制水痘和带状疱疹的新型疫苗。需要注意的是, 上述实施例仅用于说明本发明的技术方案, 但不应理解为对本发明的限制。本领域技术人员可以对本发明的上述内容进行进一步的改进和调整, 属于本发明的保护范围。

序列表

Table 8. 序列表

| 序列编号 | 序列详情 |
|---------------|--|
| SEQ ID NO: 1 | gE 蛋白胞外区氨基酸序列 |
| SEQ ID NO: 2 | gE 蛋白胞外区基因序列 |
| SEQ ID NO: 3 | 来自 LT2 菌株的鞭毛素蛋白氨基酸序列 |
| SEQ ID NO: 4 | 连接体 I (SPGISGGGGGILDMSG) |
| SEQ ID NO: 5 | LT2 菌株的鞭毛素蛋白 N-端区域氨基酸序列 |
| SEQ ID NO: 6 | LT2 菌株的鞭毛素蛋白 C-端区域氨基酸序列 |
| SEQ ID NO: 7 | 连接体 II (GGGSGGGSGGGGS) |
| SEQ ID NO: 8 | ANF 融合蛋白氨基酸序列, (N-端 D0-D1 - C-端 D1-D0 - gE, LT2) |
| SEQ ID NO: 9 | ACF 融合蛋白氨基酸序列, (gE - N-端 D0-D1 - C-端 D1-D0, LT2) |
| SEQ ID NO: 10 | ASF 融合蛋白氨基酸序列, (N-端 D0-D1 - gE - C-端 D1-D0, LT2) |
| SEQ ID NO: 11 | ANF 融合蛋白 (N-端 D0-D1 - C-端 D1-D0 - gE, LT2) 编码基因 |
| SEQ ID NO: 12 | ACF 融合蛋白 (gE - N-端 D0-D1 - C-端 D1-D0, LT2) 编码基因 |
| SEQ ID NO: 13 | ASF 融合蛋白 (N-端 D0-D1 - gE - C-端 D1-D0, LT2) 编码基因 |
| SEQ ID NO: 14 | JEV prM 先导序列 |
| SEQ ID NO: 15 | 鼠 IgC κ 轻链先导序列 |
| SEQ ID NO: 16 | Kozak 序列 |
| SEQ ID NO: 17 | SV40 polyA |
| SEQ ID NO: 18 | Kozak 序列-JEV prM 先导序列-gE 胞外区基因 |
| SEQ ID NO: 19 | Kozak 序列-JEV prM 先导序列-gE 胞外区基因 - SV40 polyA |
| SEQ ID NO: 20 | Kozak 序列-JEV prM 先导序列-5'端 D0-D1 gene - linker I - 3'端 D1-D0 gene - 3×(GGGGS) - gE 胞外区基因 |
| SEQ ID NO: 21 | Kozak 序列-JEV prM 先导序列-5'端 D0-D1 gene - linker I - 3'端 D1-D0 gene - 3×(GGGGS) - gE 胞外区基因 - SV40 polyA |
| SEQ ID NO: 22 | Kozak 序列-JEV prM 先导序列-gE 胞外区基因 - 3×(GGGGS)-5'端 D0-D1 gene - linker I - 3'端 D1-D0 gene |
| SEQ ID NO: 23 | Kozak 序列-JEV prM 先导序列-gE 胞外区基因 - 3×(GGGGS)-5'端 D0-D1 gene - linker I - 3'端 D1-D0 gene - SV40 polyA |
| SEQ ID NO: 24 | Kozak 序列-JEV prM 先导序列-5'端 D0-D1 gene - 3×(GGGGS)- gE 胞外区基因 - 3×(GGGGS)-3'端 D1-D0 gene |
| SEQ ID NO: 25 | Kozak 序列-JEV prM 先导序列-5'端 D0-D1 gene - 3×(GGGGS)- gE 胞外区基因 - 3×(GGGGS)-3'端 D1-D0 gene - SV40 PolyA |
| SEQ ID NO: 26 | Kozak 序列-鼠 IgG 轻链先导序列 - SE - SV40 polyA (ty2) |
| SEQ ID NO: 27 | 修饰的鞭毛素蛋白氨基酸序列(N-端 D0-D1 - Linker I - C-端 D1-D0, LT2) |
| SEQ ID NO: 28 | 修饰的鞭毛素蛋白编码基因(N-端 D0-D1 - Linker I - C-端 D1-D0, LT2) |
| SEQ ID NO: 29 | Ty2 菌株鞭毛素蛋白氨基酸序列 |
| SEQ ID NO: 30 | Ty2 菌株鞭毛素蛋白 N-端区域氨基酸序列 |
| SEQ ID NO: 31 | Ty2 菌株鞭毛素蛋白 C-端区域氨基酸序列 |
| SEQ ID NO: 32 | ANF 融合蛋白氨基酸序列 (N-端 D0-D1 - C-端 D1-D0 - gE, Ty2) |
| SEQ ID NO: 33 | ACF 融合蛋白氨基酸序列 (gE-N-端 D0-D1 - C-端 D1-D0, Ty2) |
| SEQ ID NO: 34 | ASF 融合蛋白氨基酸序列 (N-端 D0-D1 - gE - C-端 D1-D0, Ty2) |
| SEQ ID NO: 35 | <i>E. coli</i> 表达的 gE 蛋白胞外区氨基酸序列 |
| SEQ ID NO: 36 | <i>E. coli</i> 表达的 gE 蛋白胞外区基因序列 |
| SEQ ID NO: 37 | ENF 融合蛋白氨基酸序列, (N-端 D0-D1 - C-端 D1-D0-gE, LT2) |
| SEQ ID NO: 38 | ECF 融合蛋白氨基酸序列, (gE-N-端 D0-D1 - C-端 D1-D0, LT2) |
| SEQ ID NO: 39 | ESF 融合蛋白氨基酸序列, (N-端 D0-D1 - gE - C-端 D1-D0, LT2) |
| SEQ ID NO: 40 | ENF (N-端 D0-D1 - C-端 D1-D0 - gE, LT2) 融合蛋白编码基因 |
| SEQ ID NO: 41 | ECF (gE - N-端 D0-D1 - C-端 D1-D0, LT2) 融合蛋白编码基因 |
| SEQ ID NO: 42 | ESF (N-端 D0-D1 - gE - C-端 D1-D0, LT2) 融合蛋白编码基因 |

PCT

打印件(原件为电子形式)

| | | |
|-------|--|--|
| 0-1 | PCT/RO/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二) | |
| 0-1-1 | 软件版本 | CEPCT 版本 10.22.35 MT/FOP 20140331/0.20.5.21 |
| 0-2 | 国际申请号 | PCT/CN2019/105716 |
| 0-3 | 申请人或代理人的档案号 | JSPCT1900013 |
| 1 | 下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关: | |
| 1-1 | 页码 | 36 |
| 1-2 | 行号: | |
| 1-3 | 保藏事项 | |
| 1-3-1 | 保藏单位名称 | 中国典型培养物保藏中心 |
| 1-3-2 | 保藏单位地址 | 中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码:430072, Hubei (CN)。 |
| 1-3-3 | 保藏日期 | 2019年 9月 10日 (10.09.2019) |
| 1-3-4 | 保藏号 | CCTCC M2019707 |
| 1-4 | 补充说明 | |
| 1-5 | 本说明是对下列指定国 | 所有指定国 |
| 1-6 | 单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局 | |
| 2 | 下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关: | |
| 2-1 | 页码 | 36 |
| 2-2 | 行号: | |
| 2-3 | 保藏事项 | |
| 2-3-1 | 保藏单位名称 | 中国典型培养物保藏中心 |
| 2-3-2 | 保藏单位地址 | 中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码:430072, Hubei (CN)。 |
| 2-3-3 | 保藏日期 | 2019年 9月 10日 (10.09.2019) |
| 2-3-4 | 保藏号 | CCTCC M2019708 |
| 2-4 | 补充说明 | |
| 2-5 | 本说明是对下列指定国 | 所有指定国 |
| 2-6 | 单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局 | |

PCT

打印件(原件为电子形式)

| | | |
|-------|------------------------------------|--|
| 3 | 下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关: | |
| 3-1 | 页码 | 36 |
| 3-2 | 行号: | |
| 3-3 | 保藏事项 | |
| 3-3-1 | 保藏单位名称 | 中国典型培养物保藏中心 |
| 3-3-2 | 保藏单位地址 | 中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码:430072, Hubei (CN)。 |
| 3-3-3 | 保藏日期 | 2019年 9月 10日 (10.09.2019) |
| 3-3-4 | 保藏号 | CCTCC M2019709 |
| 3-4 | 补充说明 | |
| 3-5 | 本说明是对下列指定国 | 所有指定国 |
| 3-6 | 单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局 | |

由受理局填写

| | | |
|-------|------------------------|--|
| 0-4 | 本表格与国际申请一起收到: (是或否) | |
| 0-4-1 | 授权官员 | |

由国际局填写

| | | |
|-------|-------------|--|
| 0-5 | 国际局收到本表格日期: | |
| 0-5-1 | 授权官员 | |

权利要求书

1. 一种免疫组合物,其特征在在于,至少包含基于水痘带状疱疹病毒糖蛋白 E (简称 gE) 所得的抗原。
2. 如权利要求 1 所述的免疫组合物,其特征在在于,基于 gE 的抗原至少包含:(i)gE 胞外区或其片段,或者其编码核酸分子;(ii)基于 gE 的融合蛋白,或者其编码核酸分子;(iii)基于 gE 的重组载体;(iv)或者上述两种或更多的组合。
3. 如权利要求 2 所述的免疫组合物,其特征在在于,基于 gE 的融合蛋白包含:gE 胞外区或其片段共价偶联至细菌鞭毛素蛋白或其片段,其中所述细菌鞭毛素蛋白或其片段作为 TLR-5 激动剂。
4. 如权利要求 1 所述的免疫组合物,其特征在在于,gE 胞外区具有与 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列至少 90%的同源性。
5. 如权利要求 1 所述的免疫组合物,其特征在在于,基于 gE 的融合蛋白至少包含:所述鞭毛素蛋白的 N 端 D0-D1 区、鞭毛素蛋白的 C 端 D0-D1 区,和 gE 胞外区或其片段。
6. 如权利要求 5 所述的免疫组合物,其特征在在于,gE 胞外区或其片段位于所述融合蛋白的 N 端或 C 端;或者插入到所述鞭毛素蛋白 N 端和 C 端之间。
7. 如权利要求 2 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述融合蛋白选自如下任一融合形式:
融合形式 1:鞭毛素蛋白 N 端区-鞭毛素蛋白 C 端区-gE 胞外区或其片段;
融合形式 2:gE 胞外区或其片段-鞭毛素蛋白 N 端区-鞭毛素蛋白 C 端区;
融合形式 3:鞭毛素蛋白 N 端区-gE 胞外区或其片段-鞭毛素蛋白 C 端区;
其中,所述鞭毛素蛋白的 N 端区或 C 端区分别直接或者通过连接体与 gE 胞外区或其片段相连;或,所述鞭毛素蛋白 N 端区直接或者通过连接体与鞭毛素蛋白 C 端区相连。
8. 如权利要求 7 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述连接体为 1-20 个肽键连接的氨基酸。
9. 如权利要求 8 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述连接体为连接体 I 或连接体 II;连接体 I 如 SEQ ID NO:4 所示;连接体 II 如 SEQ ID NO:7 所示。
10. 如权利要求 9 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述鞭毛素蛋白的 N 端区或 C 端区分别通过连接体 II 与 gE 胞外区或其片段进行连接。
11. 如权利要求 9 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述鞭毛素蛋白 N 端区通过连接体 I 与鞭毛素蛋白 C 端区相连。
12. 如权利要求 3 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述细菌鞭毛素蛋白来自沙门氏菌。
13. 如权利要求 12 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述沙门氏菌为鼠伤寒沙门氏菌或肠道沙门氏菌。
14. 如权利要求 13 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述鞭毛素蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:29 所示。
15. 如权利要求 13 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述鞭毛素蛋白 N 端区为至少与 SEQ ID NO:3 中第 2 至 176 位氨基酸区域有 95%同源性的氨基酸序列;所述鞭毛素蛋白 C 端区为至少与 SEQ ID NO:3 中第 392 至 495 位氨基酸区域有 95%同源性的氨基酸序列。
16. 如权利要求 13 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述鞭毛素蛋白 N 端区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示;所述鞭毛素蛋白 C 端区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。
17. 如权利要求 13 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述鞭毛素蛋白 N 端区为至少与 SEQ ID NO:29 中第 2 至 180 位氨基酸区域有 95%同源性的氨基酸序列;所述鞭毛素蛋白 C 端区为至少与 SEQ ID NO:29 中第 400 至 506 位氨基酸区域有 95%同源性的氨基酸序列。
18. 如权利要求 13 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述鞭毛素蛋白 N 端区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:30 所示;所述鞭毛素蛋白 C 端区的氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO:31 所示。
19. 如权利要求 2 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述基于 gE 的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8~10、SEQ ID NO:32-34 任一所示。
20. 如权利要求 2 所述的免疫组合物,其特征在在于,编码所述 gE 胞外区或其片段的核酸分子如 SEQ ID NO:2,18-19 任一所示。
21. 如权利要求 2 所述的免疫组合物,其特征在在于,编码所述基于 gE 的融合蛋白的核酸分子如 SEQ ID NO:11-13、SEQ ID NO:20-26 任一所示。
22. 如权利要求 2 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述基于 gE 的重组载体包含如权利要求 2-21 任一项中所描述的核酸分子。
23. 如权利要求 22 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述载体为腺病毒载体、腺病毒相关病毒载体、痘病毒载体、水疱性口炎病毒载体、牛副流感病毒载体、人副流感病毒载体、新城疫病毒载体、仙台病毒载体、麻疹病毒载体、减毒 RSV 载体、副粘病毒载体、甲型病毒载体(如委内瑞拉马脑炎病毒载体、塞姆利基森林病毒载体、辛德比病毒载体)、棒状病毒载体、狂犬病病毒载体、小核糖核酸病毒、慢病毒载体、疱疹病毒载体、或植物来源的病毒用于在植物表达系统中表达。
24. 如权利要求 23 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述腺病毒载体为人源腺病毒载体、黑猩猩源腺病毒载体或大猩猩腺病毒载体。
25. 如权利要求 24 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述人源腺病毒为 5 型腺病毒载体(Ad5);所述黑猩猩源腺病毒载体为 ChAd68。
26. 如权利要求 24 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述腺病毒载体为复制缺陷型腺病毒载体。
27. 如权利要求 26 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述腺病毒载体的 E1 区被删除或功能性缺失从而形成复制缺陷型载体;或 E1 区和 E3 区均被删除或功能性缺失。
28. 如权利要求 27 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述黑猩猩源腺病毒载体自身的 E4 区进一步被人 5 型腺病毒相应的 E4 区取代以增强载体的功能。
29. 如权利要求 22-28 任一项所述的免疫组合物,其特征在在于,当所述基于 gE 的重组载体携带编码 gE 胞外区或其片段的核酸分子时被称为重组腺病毒载体 A。
30. 如权利要求 29 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述重组腺病毒载体 A 携带如 SEQ ID NO:2,18-19 任一所示的核酸分子。
31. 如权利要求 29 所述的免疫组合物,其特征在在于,构建所述重组腺病毒载体 A 所用的骨架质粒为 pAd5-CMV/V5-DEST。
32. 如权利要求 29 所述的免疫组合物,其特征在在于,构建所述重组腺病毒载体 A 所用的穿梭质粒为 pDONR221。
33. 如权利要求 29 所述的免疫组合物,其特征在在于,构建所述的重组腺病毒载体 A 所用的宿主细胞系包括但不限于 HEK 293 或 PER.C6 细胞系。
34. 如权利要求 29-33 任一项所述的免疫组合物,其特征在在于,所述的重组腺病毒载体 A 由下述方法构建:将测序正确的重组穿梭质粒 pDONR221-gE 基因-PolyA 与病毒骨架质粒 pAd5-CMV/V5-DEST 进行同源重组,将重组混合物转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,筛选测序正确的腺病毒载体 pAd5-CMV-gE 基因-PolyA,将腺病毒载体 pAd5-CMV-gE 基因-PolyA 线性化后转染 HEK 293 或 PER.C6 细胞进行包装得到所述的重组腺病毒载体 A。
35. 如权利要求 22-28 任一项所述的免疫组合物,其特征在在于,当所述基于 gE 的重组载体携带编码基于 gE 的融合蛋白的核酸分子时被称为重组腺病毒载体 B。
36. 如权利要求 35 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述重组腺病毒载体 B 携带如 SEQ ID NO:11-13,20-26 任一所示的核酸分子。
37. 如权利要求 35 所述的免疫组合物,其特征在在于,构建所述的重组腺病毒载体 B 所用的骨架质粒为 pAd5-CMV/V5-DEST。

38. 如权利要求 35 所述的免疫组合物,其特征在在于,构建所述的重组腺病毒载体 B 所用的穿梭质粒为 pDONR221。
39. 如权利要求 35 所述的免疫组合物,其特征在在于,构建所述的重组腺病毒载体 B 所用的宿主细胞系包括但不限于 HEK 293 或 PER.C6 细胞系。
40. 如权利要求 35-39 任一项所述的免疫组合物,其特征在在于,所述的重组腺病毒载体 B 由下述方法构建:将测序正确的重组穿梭质粒 pDONR221-gE-鞭毛素融合蛋白基因-PolyA 转化与病毒骨架质粒 pAd5-CMV/V5-DEST 进行同源重组,将重组混合物转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,筛选测序正确的腺病毒载体 pAd5-CMV-gE-鞭毛素融合蛋白基因-PolyA,将腺病毒载体 pAd5-CMV-gE-鞭毛素融合蛋白基因-PolyA 线性化后转染 HEK 293 或 PER.C6 细胞进行包装得到所述的重组腺病毒载体 B。
41. 如权利要求 1 所述的免疫组合物,其特征在在于,进一步包含药理学上可接受的载体,和/或佐剂,和/或免疫刺激分子。
42. 如权利要求 41 所述的免疫组合物,其特征在在于,所述佐剂包含但不限于:铝盐、水包油乳液或油包水乳液、MF-59、Quil A 或其 QS21 组分、TLR 激动剂、壳聚糖、免疫刺激复合物(ISCOMs)或其两种或多种的组合。
43. 如权利要求 1-42 任一项所述的免疫组合物被用于制备预防和/或治疗由水痘带状疱疹感染的药物组合物中的应用。
44. 如权利要求 43 所述的应用,其特征在在于,所述的免疫组合物用于制备水痘疫苗或带状疱疹疫苗,或用于制备治疗带状疱疹或其愈合后神经痛的药物中的应用。
45. 一种联合疫苗,其特征在在于,至少包含如权利要求 1-42 任一项所述的免疫组合物和其他疫苗,所述其它疫苗包括但不限于:流行性腮腺炎、麻疹和风疹疫苗。
46. 如权利要求 1-21 任一所述免疫组合物中所描述的基于 gE 的融合蛋白。
47. 如权利要求 1-21 任一所述免疫组合物中所描述的核酸分子。
48. 如权利要求 22-40 任一所述免疫组合物中所描述的基于 gE 的重组载体。
49. 一种分离的宿主细胞,其特征在在于,包含如权利要求 47 所述的核酸分子。
50. 一种制备 gE 胞外区或其片段,或如权利要求 46 所述的基于 gE 的融合蛋白的方法。
51. 如权利要求 50 所述的方法,其特征在在于,通过原核表达系统或者真核表达系统来制备。
52. 如权利要求 50 所述的方法,其特征在在于,所述原核表达为大肠杆菌表达,大肠杆菌为 BL21(DE3),表达载体为 pET28a;所述 gE 胞外区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示,所述 gE 胞外区的基因序列如 SEQ ID NO:36 所示;所述基于 gE 的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:37-39 所示;所述基于 gE 的融合蛋白的基因序列如 SEQ ID NO:37-39 所示。
53. 如权利要求 50 所述的方法,其特征在在于,其特征在在于,所述 gE 胞外区或其片段通过将如权利要求 29-34 任一所述项中所描述的重组腺病毒载体 A 感染培养 Vero 细胞获得;所述基于 gE 的融合蛋白通过将如权利要求 35-40 任一所述项中所描述的重组腺病毒载体 B 感染培养 Vero 细胞获得。
54. 一种初免-强化免疫方案,其特征在在于,使用如权利要求 48 所述的基于 gE 的重组载体进行初次免疫,然后用 gE 胞外区或其片段或者如权利要求 46 所述的基于 gE 的融合蛋白进行加强免疫;或者相反地,用 gE 胞外区或其片段或者如权利要求 46 所述的基于 gE 的融合蛋白进行首次免疫,然后用如权利要求 48 所述的基于 gE 的重组载体进行加强免疫,其中,使用 gE 胞外区或其片段进行免疫时可添加如权利要求 41-42 中所描述的佐剂。
55. 一种初免-强化免疫方案,其特征在在于,用如权利要求 23 所述的基于 gE 的重组异源载体进行初次免疫,用如权利要求 24-40 任一所述项所述的基于 gE 的重组腺病毒载体进行加强免疫;或者相反地,用如权利要求 24-40 任一所述项所述的基于 gE 的重组腺病毒载体进行初次免疫,用如权利要求 23 所述的基于 gE 的重组异源载体进行加强免疫;其中,所述异源载体指非腺病毒载体。
56. 一种初免-强化免疫方案,其特征在在于,将如权利要求 24-40 任一所述项中所描述的两种不同类型或不同物种的基于 gE 的重组腺病毒载体分别用作初次免疫或加强免疫,所述重组腺病毒载体携带 gE 胞外区或基于 gE 的融合蛋白基因。
57. 一种重组腺病毒载体 pAd5-CMV-gE 基因-PolyA,其特征在在于,gE 基因具有如 SEQ ID NO: 2,18-19 任一所示的核酸序列。
58. 一种重组腺病毒载体 pAd5-CMV-gE-鞭毛素融合基因-PolyA,其特征在在于,gE-鞭毛素融合基因具有如 SEQ ID NO: 11-13, 20-26 任一所示的核酸序列。
59. 一种改造的鞭毛素蛋白,其特征在在于,鞭毛素蛋白 N 端区为至少与 SEQ ID NO:3 中第 2 至 176 位氨基酸区域有 95%同源性的氨基酸序列;鞭毛素蛋白 C 端区为至少与 SEQ ID NO: 3 中第 392 至 495 位氨基酸区域有 95%同源性的氨基酸序列;所述鞭毛素蛋白 N 端区直接或者通过连接体与鞭毛素蛋白 C 端区相连。
60. 如权利要求 59 所述的改造的鞭毛素蛋白,其特征在在于,所述连接体为 1-20 个肽键连接的氨基酸。
61. 如权利要求 60 所述的改造的鞭毛素蛋白,其特征在在于,所述连接体具有如 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。
62. 如权利要求 59 所述的改造的鞭毛素蛋白,其特征在在于,所述的 N 端区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示;所述的 C 端区的氨基酸序列如序列表 SEQ ID NO: 6 所示。
63. 如权利要求 59 所述的改造的鞭毛素蛋白,其特征在在于,所述的改造的鞭毛素蛋白具有如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。
64. 如权利要求 59-63 任一所述项所述的改造的鞭毛素蛋白作为免疫佐剂的应用。

说明书附图

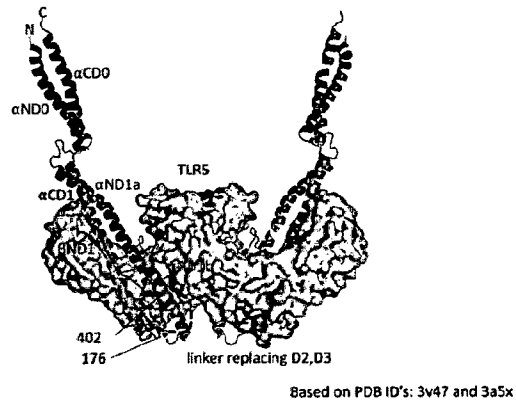


图 1.

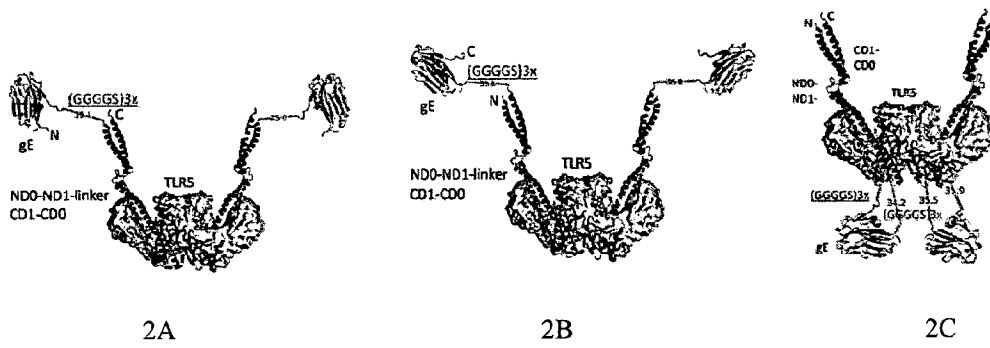


图 2.

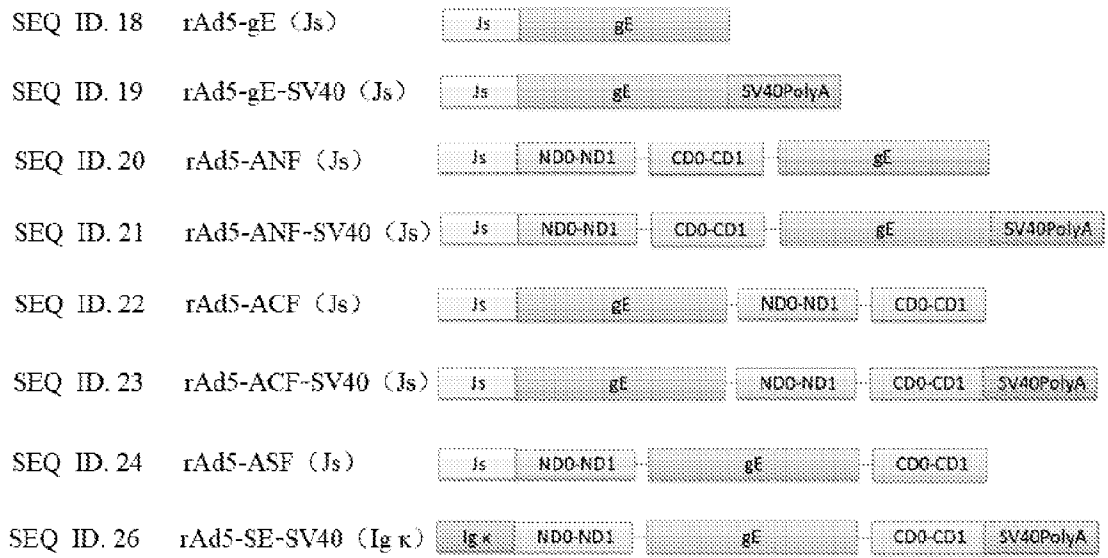


图 3.

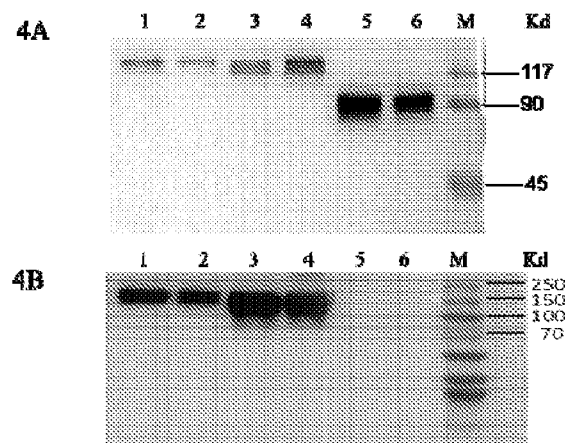


图 4.

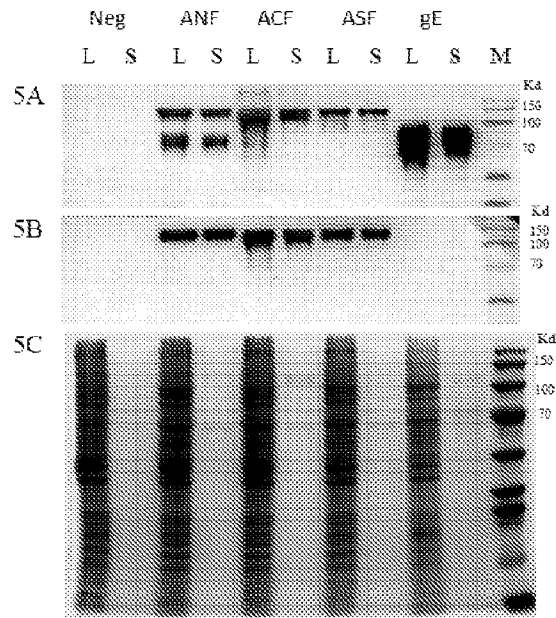
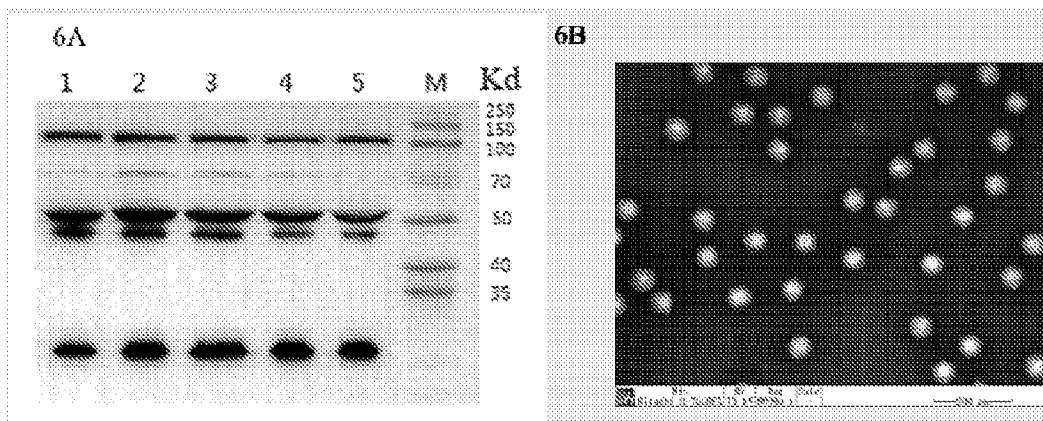


图 5.



6C

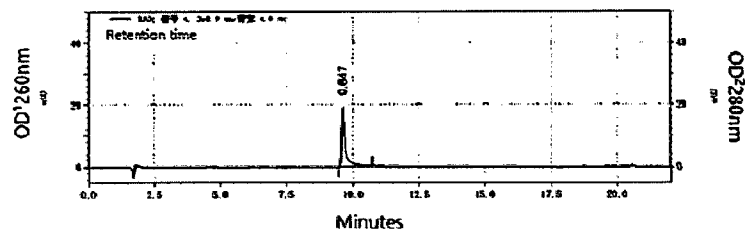


图 6.

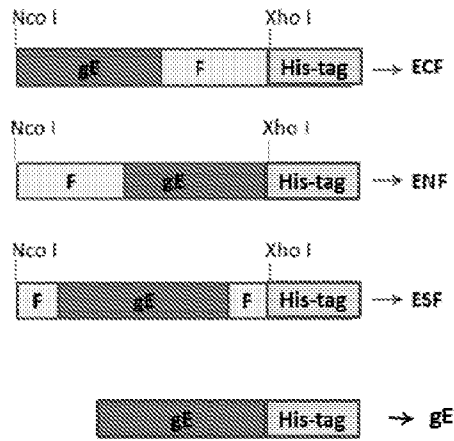


图 7.

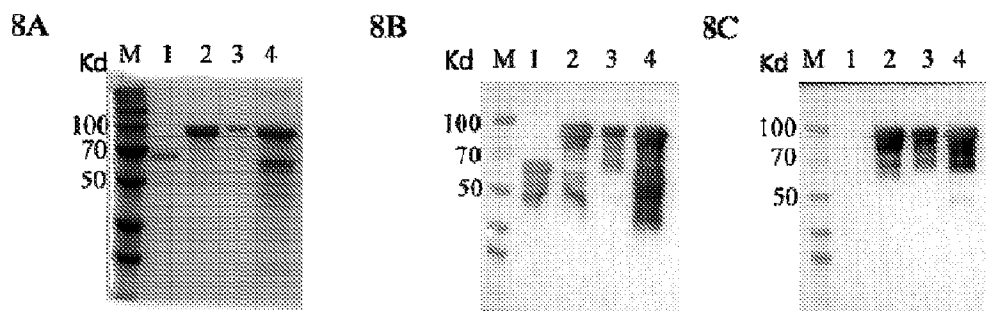


图 8.

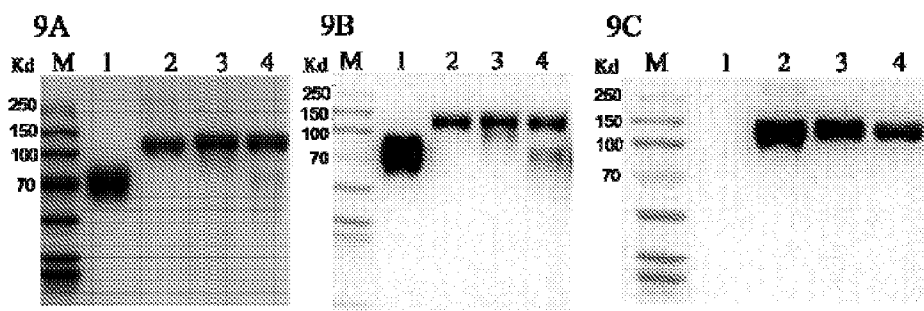


图 9.

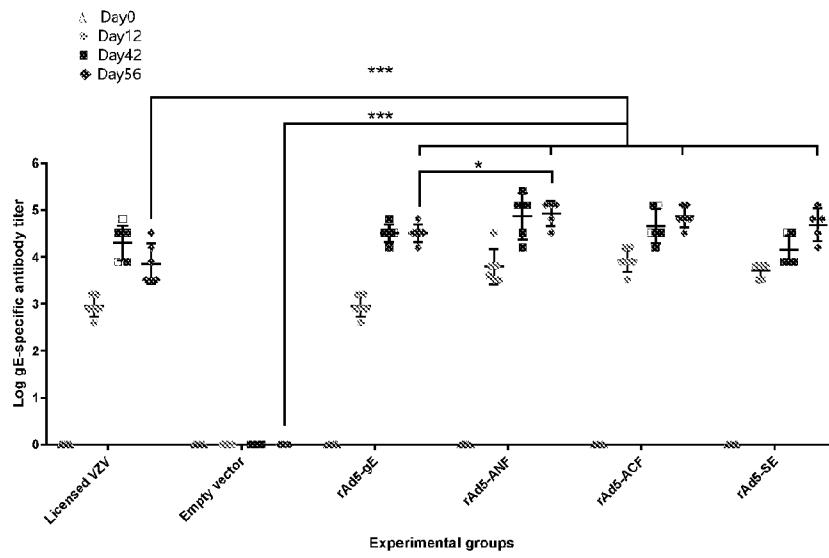


图 10.

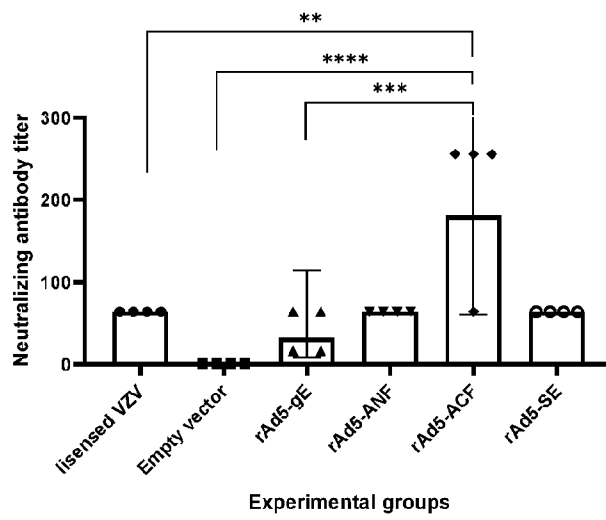


图 11.

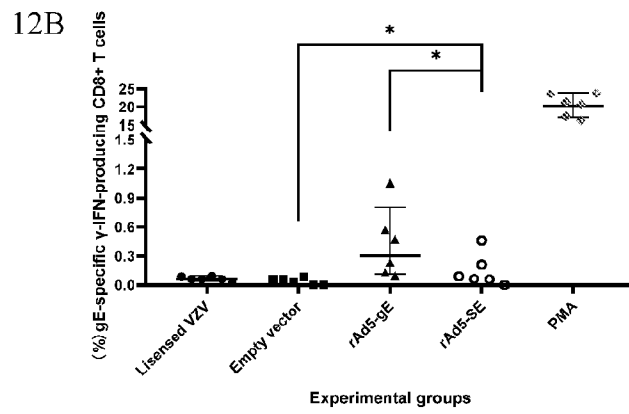
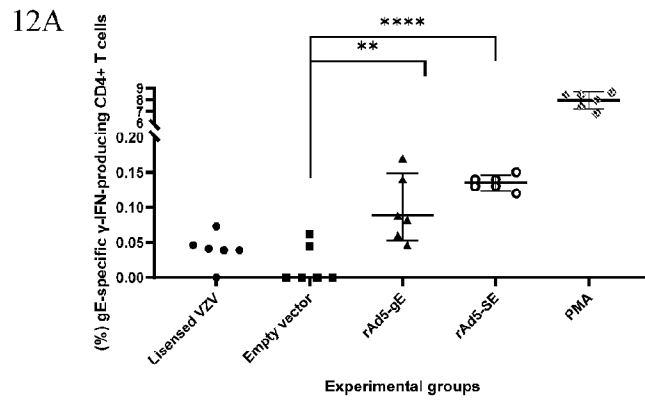


图 12.

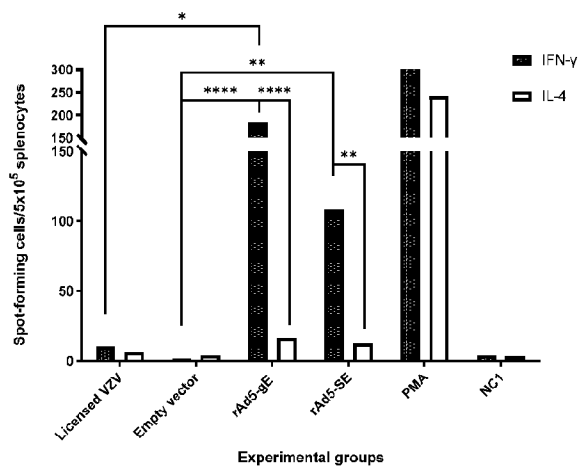


图 13.

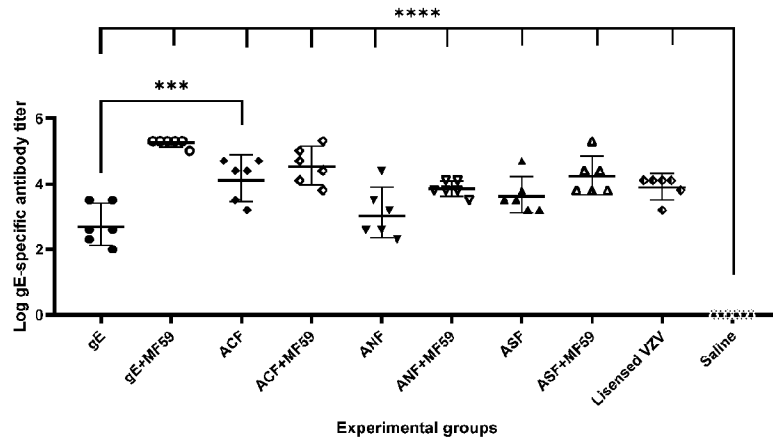


图 14.

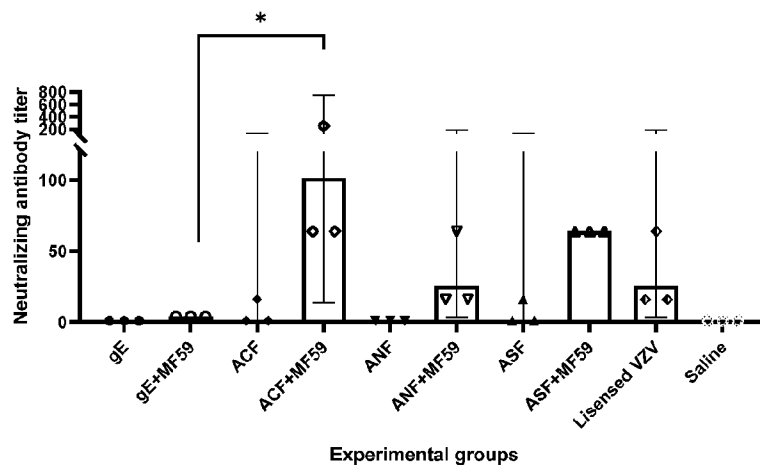


图 15.

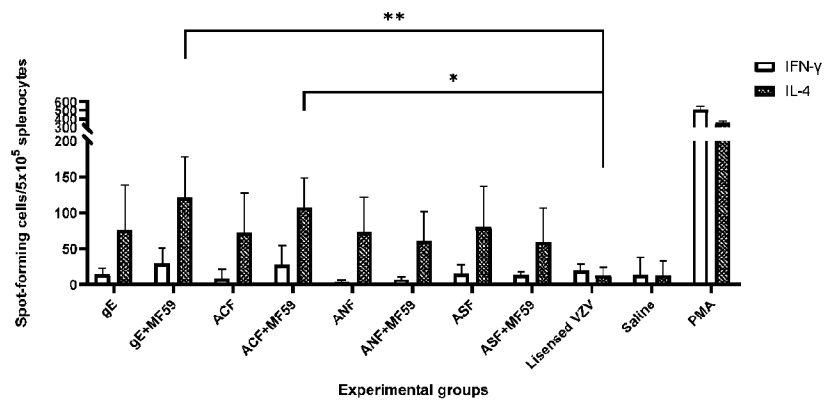


图 16.