



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109415700 B

(45) 授权公告日 2022.04.08

(21) 申请号 201780035376.8

(22) 申请日 2017.06.07

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109415700 A

(43) 申请公布日 2019.03.01

(30) 优先权数据

10-2016-0070517 2016.06.07 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2017/005892 2017.06.07

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2017/213407 KO 2017.12.14

(73) 专利权人 丘拉提斯股份有限公司

地址 韩国首尔市

(72) 发明人 金和中 崔汉圭 慎城宰

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司

公司 44102

代理人 李珊珊

(51) Int. Cl.

C12N 5/0784 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

(56) 对比文件

KR 20130039061 A, 2013.04.19

Zhang Hui et al. The adjuvant effect of chimeric flagellin fliC/esat. 《US National Library of Medicine》. 2011, 第27卷 (第4期), 第377-381页.

X. Wang et al. Early secreted antigenic target of 6-kDa protein of Mycobacterium tuberculosis Primes Dendritic cells to stimulate Th17 and inhibit Th1 immune responses. 《The Journal of Immunology》. 2012, 第189卷 (第6期), 第3092-3103页.

Manh-Cuong Vo et al. Dendritic cell vaccination with a toll-like receptor agonist derived from mycobacteria enhances anti-tumor immunity, Sung-Jae Shin 3. 《Oncotarget》. 2015,

Han-Gyu Choi et al. Rv2299c, a novel dendritic cell-activating antigen of Mycobacterium tuberculosis, fused-ESAT-6 subunit vaccine confers improved and durable protection against the hypervirulent strain HN878 in mice. 《Oncotarget》. 2017, 第8卷 (第12期),

审查员 李谦

权利要求书1页 说明书20页

序列表4页 附图23页

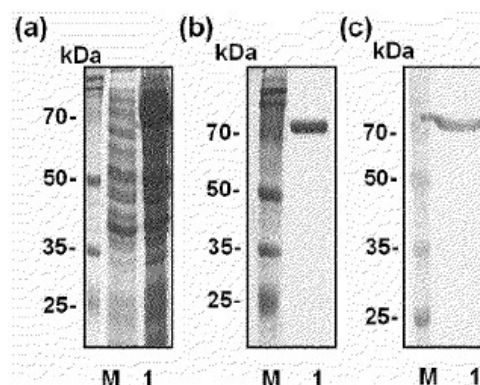
(54) 发明名称

包含融合Rv2299c和早期分泌抗原靶-6的蛋白质的树突状细胞成熟化促进用组合物

(57) 摘要

本发明涉及树突状细胞成熟化诱导组合物及使树突状细胞成熟的方法。更具体地, 涉及包含来源于结核杆菌 (*M. tuberculosis*) 的融合Rv2299c和早期分泌抗原靶-6 (ESAT-6) 的蛋白质作为有效成分的树突状细胞成熟化诱导组合物及将利用其的未成熟树突状细胞分化成树突状细胞的方法。根据本发明的方法能够增强由树突

状细胞引起的身体免疫反应。



1. 一种树突状细胞的成熟化诱导用组合物,其特征在于,包含融合Rv2299c和早期分泌抗原靶-6的蛋白质作为有效成分,其中Rv2299c和早期分泌抗原靶-6为来源于结核杆菌的蛋白质。

2. 根据权利要求1所述的树突状细胞的成熟化诱导用组合物,其特征在于,包含1 μ g/ml至20 μ g/ml浓度的上述融合Rv2299c和早期分泌抗原靶-6的蛋白质。

3. 一种未成熟树突状细胞的成熟化诱导方法,其特征在于,包括:

利用Rv2299c和早期分泌抗原靶-6融合蛋白处理上述未成熟树突状细胞来使其成熟为成熟树突状细胞,其中Rv2299c和早期分泌抗原靶-6为来源于结核杆菌的蛋白质。

4. 根据权利要求3所述的未成熟树突状细胞的成熟化诱导方法,其特征在于,处理上述Rv2299c和早期分泌抗原靶-6融合蛋白后,将细胞培养12小时以上36小时以下。

5. 根据权利要求3所述的未成熟树突状细胞的成熟化诱导方法,其特征在于,上述Rv2299c和早期分泌抗原靶-6融合蛋白在未成熟树突状细胞的成熟过程中使选自由肿瘤坏死因子 α 、白介素-12p70、白介素-6及IL-1 β 组成的组中的一种以上的生成增加。

6. 根据权利要求3所述的未成熟树突状细胞的成熟化诱导方法,其特征在于,包含1 μ g/ml至20 μ g/ml浓度的上述Rv2299c和早期分泌抗原靶-6融合蛋白。

7. 根据权利要求3所述的未成熟树突状细胞的成熟化诱导方法,其特征在于,上述未成熟树突状细胞的成熟通过Rv2299c和早期分泌抗原靶-6融合蛋白刺激Toll样受体-4来发生。

8. 根据权利要求3所述的未成熟树突状细胞的成熟化诱导方法,其特征在于,上述未成熟树突状细胞的成熟通过刺激丝裂原活化蛋白激酶及核因子 κ B来发生。

9. 一种增强免疫用化合物,其特征在于,包含权利要求1的树突状细胞的成熟化诱导用组合物。

包含融合Rv2299c和早期分泌抗原靶-6的蛋白质的树突状细胞成熟化促进用组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及树突状细胞的成熟化诱导组合物及使树突状细胞成熟的方法。更具体地,涉及包含来源于结核杆菌(*M.tuberculosis*)的融合Rv2299c和早期分泌抗原靶-6(ESAT-6)的蛋白质的树突状细胞成熟化诱导组合物以及将利用其的未成熟树突状细胞分化为成熟树突状细胞的方法。

背景技术

[0002] 结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)是最成功的的人类病原菌中的一个,全世界人口的三分之一感染了结核杆菌(Kaufmann, 2001)。由于作为目前所使用的唯一疫苗的牛型结核杆菌卡介苗(BCG)对抗成人结核(Tuberculosis, TB)没有显著的防御效果(Brandt et al., 2002),因此需要可代替或促进卡介苗的更有效的疫苗。重要的是确认与预防免疫诱导相关的分枝杆菌抗原并对特征进行说明,以便能够开发有希望的结核(TB)疫苗候选。但是,许多抗原已用于制备目前处于不同阶段的临床试验中的结核疫苗(Ahsan, 2015)。

[0003] Th1免疫反应对结核杆菌感染的限制是必须的,这通过对与干扰素 γ (IFN- γ)及白介素-12(IL-12)途径相关的具有基因破坏或突变的小鼠或人类的分枝杆菌感染的增加的敏感性来证明(van Crevel et al., 2002)。因此,许多关于结核疫苗的研究都集中在强大的T细胞刺激抗原,如抗原85复合体(Ag85)及早期分泌抗原靶-6等(Yuk and Jo, 2014)。由于调节感染所必须的T细胞反应很少从被感染的人或动物去除结核杆菌(Feldman and Baggenstoss, 1938, Rhoades et al., 1997, Grace and Ernst, 2016),因此这些抗原可在小鼠中诱导强健的预防免疫,但它不能诱导完整的杀菌免疫(Weinrich Olsen et al., 2001, Aagaard et al., 2011)。

[0004] 树突状细胞(dendritic cells, DC)在免疫体系中是最有效的抗原递呈细胞,是起到先天免疫和适应性免疫的桥梁作用的重要细胞。结核杆菌通过操作树突状细胞功能来延迟T细胞反应的开始,从而可确保菌增殖的时间(Gallegos et al., 2008, Hanekom et al., 2003, Wolf et al., 2007, Cooper, 2009),因而示唆能够以潜伏形态存活。因此,与T细胞刺激一同树突状细胞的初期活性及向淋巴结的树突状细胞迁移是用于诱导对结核杆菌感染有效的预防的关键因素。此结果表明,通过树突状细胞活化引起有效宿主预防免疫的分枝杆菌抗原是开发结核疫苗的有望的靶标。实际上,被卡介苗感染或暴露于结核杆菌抗原的树突状细胞在小鼠模型中对正常和大量的病毒性结核杆菌感具有显著的预防效果(Demangel et al., 1999, Rubakova et al., 2007)。但是,虽然已鉴定了几种激活树突状细胞的分枝杆菌蛋白质,以使Th1免疫反应启动(Byun et al., 2012b),但是对于作为这些具体的抗结核免疫机制及疫苗的蛋白质的预防效果知之甚少。

[0005] 若将由树突状细胞活化抗原及T细胞刺激抗原构成的融合蛋白用作结核疫苗,则该蛋白质可引出两种积极反应;通过树突状细胞活化蛋白质本身的Th1极化反应诱导及通

过树突状细胞活化的T细胞刺激抗原诱导的预防免疫增强。因此,我们假设该融合蛋白的预防效果可能比仅含有T细胞抗原的疫苗更有效。据报告,包括热休克蛋白65 (HSP65) 在内的分枝杆菌热休克蛋白 (HSP) 对结核诱导强烈的预防免疫或者作为辅助剂有效 (Silva, 1999)。在本研究中,我们鉴定了有效诱导树突状细胞成熟的热休克蛋白90 (HSP90) 家族 Rv2299c 蛋白质,通过引起强烈的Th1型反应的树突状细胞活化调查了抗结核免疫机制。然后,我们测试了与结核杆菌HN878临床分离相关的Rv2299c蛋白质或RV2299c-早期分泌抗原靶6 (RV2299c-ESAT6) 融合蛋白的预防疫苗效果。我们的结果表明,Rv2299c-成熟树突状细胞诱导对抗结核免疫活化的Th1细胞反应,作为基于树突状细胞活化蛋白疫苗的新概念,由 Rv2299c 及 ESAT6 构成的融合蛋白为促进卡介苗的有希望的疫苗靶标。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 如上所述,树突状细胞在提高身体自身免疫功能中起到重要作用,从而正确理解通过促进树突状细胞的分化来使其成熟并引起强烈的免疫反应的无毒性的免疫调节剂的开发和其物质的作用机制是利用树突状细胞的细胞免疫治疗中的重要技术问题。

[0008] 因此,本发明的目的在于,提供树突状细胞的成熟化促进用组合物。

[0009] 本发明的再一目的在于,提供树突状细胞的成熟化方法。

[0010] 本发明的另一目的在于,提供包含利用上述方法成熟的树突状细胞的结核杆菌治疗剂。

[0011] 解决问题的方案

[0012] 为了解决如上所述的技术问题,本发明提供包含基于Rv2299c蛋白质的融合Rv2299c和早期分泌抗原靶-6的蛋白质作为有效成分的树突状细胞的活化组合物。

[0013] 并且,本发明提供突状细胞的成熟化诱导组合物,其特征在于,上述Rv2299c-早期分泌抗原靶-6融合蛋白为来源于结核杆菌 (*M. tuberculosis*) 的蛋白质。

[0014] 优选地,突状细胞的成熟化诱导组合物包含1 μ g/ml至20 μ g/ml的上述Rv2299c-早期分泌抗原靶-6融合蛋白。

[0015] 并且,提供对未成熟树突状细胞处理融合Rv2299c蛋白质或融合Rv2299c和早期分泌抗原靶-6的蛋白质的未成熟树突状细胞的成熟化诱导方法。

[0016] 在上述方法中,优选地,利用Rv2299c-早期分泌抗原靶-6融合蛋白处理后将细胞培养12小时以上36小时以下,优选地,添加1 μ g/ml至20 μ g/ml的上述Rv2299c-早期分泌抗原靶-6融合蛋白。

[0017] 提供树突状细胞的成熟化诱导方法,其特征在于,上述Rv2299c-早期分泌抗原靶-6融合蛋白使树突状细胞成熟的过程中使选自由肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)、白介素-12p70 (IL-12p70) 及白介素-1 β (IL-1 β) 组成的组中的一种以上的生成增加。

[0018] 并且,本发明的特征在于,上述树突状细胞的成熟化诱导通过Rv2299c刺激Toll样受体-4 (toll-like receptor-4, TLR-4) 或者刺激丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 及核因子 κ B (NF- κ B) 来发生。

[0019] 本发明的特征在于,根据上述方法制备的分化抗原对于CD(分化抗原)80、CD86、主要组织相容性复合体 (Major Histocompatibility Complex, MHC) -I型、II型具有阳性免疫

学特性。

[0020] 并且,本发明提供包含上述树突状细胞的成熟化诱导用组合物的增强免疫用化合物。

[0021] 发明的效果

[0022] 其效果在于,可通过使本发明的树突状细胞成熟的方法来使未成熟细胞分化为成熟树突状细胞,从而可有效活化身体的免疫反应。

附图说明

[0023] 图1a为用于了解Rv2299c纯度的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及免疫印迹分析照片。

[0024] 图1b示出在用Rv2299c或血清脂肪酶(LPS)处理的树突状细胞中基于蛋白质的吞噬作用活性减少和功能成熟强化的照片。

[0025] 图1c示出在用Rv2299c处理24小时的树突状细胞中I型及II型分子和共刺激分子如CD80及CD86的表达剂量依赖性显著增加的照片。

[0026] 图1d和1e为示出在利用Rv2299c处理的树突状细胞中白介素-12p70阳性细胞的比率大大增加的图表和照片。

[0027] 图2为示出确认Rv2299c是否由树突状细胞的成熟活性的内毒素污染引起的图表。

[0028] 图3a和3b为示出Rv2299c通过利用基于Toll样受体-4的途径使树突状细胞活化来诱导表面分子及促炎细胞因子表达的曲线图。

[0029] 图3c为示出利用Rv2299c处理的树突状细胞的细胞因子(肿瘤坏死因子 α 、白介素-6及白介素-1 β)的产生依赖于TRIF和MyD88的图表。

[0030] 图3d、图3e、图3f为示出用于示出树突状细胞和Rv2299c相互作用的共聚焦显微镜照片(3D)、流式细胞技术(FACS)分析曲线图(3E)、与RLR4而非Toll样受体-2的结合的照片。

[0031] 图4a为示出Rv2299c在P38及ERK1/2的磷酸化和树突状细胞中I κ B- α 的磷酸化和降低的照片。

[0032] 图4b为示出p65诱导从细胞质到核的重要位置变化的照片。

[0033] 图4c及图4d为示出根据除了c-Jun氨基末端激酶(JNK)抑制剂之外的所有药理学抑制剂,在树突状细胞表面上的共刺激分子的Rv2299c诱导表达(4C)及促炎细胞因子产生大大取消的曲线图。。

[0034] 图5a和图5b为用于正确说明对树突状细胞与T细胞之间的相互作用的Rv2299c活性的特征而执行的多元线性回归(MLR)分析曲线图。5A示出利用Rv2299c处理的树突状细胞诱导T细胞增殖,5B示出原始T细胞增殖由Th1表现型诱导。

[0035] 图6a和图6b为使用流式细胞分析法获得的曲线图,用于确定Rv2299c刺激树突状细胞能否刺激CD4⁺。

[0036] 图7为示出Rv2299c通过树突状细胞成熟来抑制结核杆菌生长并诱导具有杀菌活性的T细胞的活性的图表。

[0037] 图8a为示出重组Rv2299c和早期分泌抗原靶-6融合蛋白的细胞毒性的照片。

[0038] 图8b及图8c为示出重组Rv2299c何早期分泌抗原靶-6融合蛋白的促炎细胞因子如主要组织相容性复合体分子的表达和肿瘤坏死因子 α 、白介素-1 β 及IL-12等表达的曲线图。

[0039] 图9a为示出通过添加被活化为早期分泌抗原靶-6-刺激树突状细胞的T细胞的来大大抑制结核杆菌生长的图表。

[0040] 图9b为示出促炎细胞因子如 γ 干扰素及肿瘤坏死因子 α 的高产生为当共培养结核杆菌感染小鼠骨髓来源的巨噬细胞的培养(BMDM)与被融合蛋白刺激树突状细胞活化的T细胞时的图表。

[0041] 图10a为用于观察对融合Rv2299c和早期分泌抗原靶-6的蛋白质的高病毒性HN878菌株的卡介苗初免加强效应的示意图。

[0042] 图10b为示出单独的卡介苗、早期分泌抗原靶-6及Rv2299c+ESAT融合蛋白均降低肺中细菌负荷的曲线图。

[0043] 图10c及10d为示出从长期细菌减少观点来看Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白对HN878菌株攻击的预防效果的曲线图。

[0044] 图11a、图11b及图12a、图12b为示出基于细胞因子染色评估通过Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白预防接种诱导的T细胞表现型的变化曲线图和示出 γ 干扰素、肿瘤坏死因子 α 及白介素-2(IL-2)共表达的图表。

具体实施方式

[0045] 迄今为止,在有关免疫细胞的免疫反应中,进行了许多有关来源于结核杆菌的蛋白质的研究,但是有关Rv2299c的研究尚不清楚。

[0046] 通过使未成熟的树突状细胞成熟来形成成熟的树突状细胞。成熟的树突状细胞丧失表达捕获抗原的同时刺激细胞表面分子及各种细胞因子的上调表达的能力。尤其,相对于未成熟的树突状细胞,成熟化的树突状细胞以更高水平表达主要组织相容性复合体I型及II型抗原,调节CD80+、CD83+、CD86+及CD14-。更多的主要组织相容性复合体表达诱导树突状细胞的抗原密度的增加,相反,由于共刺激分子CD80及CD86的上调,在T细胞上通过共刺激分子如CD28对应物来强化T细胞活性信号。

[0047] 本发明的成熟的树突状细胞可通过接触重组方法制备的Rv2299c或融合Rv2299c和ESTA-6的蛋白质来制备。本发明可通过包含Rv2299c或融合Rv2299c和ESTA-6的蛋白质的组合物来诱导树突状细胞的成熟。利用有效的重组方法制备的Rv2299c或融和Rv2299c和ESTA-6的蛋白质并不限于此,但以1 μ g/ml至20 μ g/ml量的Rv2299c,优选地能够以5 μ g/ml至10 μ g/ml浓度包含在组合物中。

[0048] 树突状细胞的程度可通过本技术领域公知的方法监测。细胞表面标记物可通过本领域熟悉的鉴定如流式细胞仪(flow cytometry)及免疫组织化学法来检测。上述多个细胞也可通过细胞因子生成(例如:酶联免疫吸附测定(ELISA)、流式细胞技术及其他免疫鉴定)来监测。

[0049] 以下,通过实施例进一步详细说明本发明。但是,下述实施例用于例示,以使更易于理解本发明,本发明的内容并不限于实施例。

[0050] 实施例1

[0051] 材料及方法

[0052] 1.1细菌菌株及分枝杆菌属的制备

[0053] 结核杆菌H37Rv(ATCC 27294)及H37Ra(ATCC 25177)购自美国菌株保藏所(ATCC,

马纳萨斯(Manassas), 维吉尼亚(VA)), 结核杆菌HM878购自财团法人国际结核病研究所(ITRC, 韩国庆尚南道昌原(Changwon, Gyeongsangnam-do, South Korea))。牛型结核菌卡介苗(巴斯德菌株1173P2)由巴斯德研究所(法国巴黎(Paris, France))的布洛克博士提供。用于该研究的所有分枝杆菌如上述说明进行制备(Cha et al., 2015b)。

[0054] 1.2动物, 预防接种及气溶胶感染

[0055] OT-I及OT-II T-细胞受体(TCR)转化小鼠(C57BL/6背景)、C57BL/6(H-2K^b及I-A^b)、C57BL/6J Toll样受体-2敲除小鼠(Toll样受体-2^{-/-}; B6.129-Toll样受体-2^{tm¹Kir}/J)及C57BL/10 Toll样受体-4敲除小鼠(TLR4^{-/-}; C57BL/10ScNJ)和5周龄至6周龄特定病原体缺失雌性C57BL/6小鼠购自杰克逊研究所(美国缅因州巴尔港(Bar Harbor, ME, USA))。小鼠在延世大学医学研究中心的BL-3生物危害动物设施中的障碍条件下保持恒定温度(24±1℃)和湿度(50±5%)。将动物在标准化照明控制条件(给12小时光照和12小时黑暗)下随机获取水并提供灭菌商业小鼠饮食。每天监测小鼠, 在该实期间, 在任何小鼠中也没有出现临床症状或疾病。

[0056] 为了预防接种, 首先, 小鼠通过皮下注射(2.0×10^5 CFU/小鼠)利用卡介苗巴斯德1173P2进行了预防接种, 然后, 卡介苗免疫预防接种6周后, 将亚单位疫苗与包含单磷酸脂质-A(MPL, 5μg/注射)的二甲基双十八烷基铵(DDA)脂质体(50μg/注射)一同以3周为周期给药3次。在最终免疫预防接种4周后, 获取了脾脏和肺细胞, 利用其检查了免疫原性(γ干扰素分泌物的水平和多个γ干扰素产生T细胞和多个Ag-特异性T细胞的周期)。为了研究亚单位疫苗单独预防效果, 如上所述, 单独卡介苗免疫法及卡介引发-亚单位疫苗促进组被攻击, 以使与结核杆菌H37Rv(ATCC27294)或结核杆菌HN878菌株产生气体(Cha et al., 2015b, Lee et al., 2009)。简而言之, 为了将小鼠暴露于约200CFU的可存活的结核杆菌, 以规定的H37Rv或HN878给药量暴露于空气污染装置(美国印第安纳州特雷霍特桂宁(Glas-Col, Terre Haute, IN, USA))的吸入室60分钟。然后, 在攻击8周或16周的时间点上, 在各组中获取了脾脏和肺细胞, 使用流式细胞分析对多功能T细胞和T细胞亚型的周期进行了评估。

[0057] 1.3抗体及试剂

[0058] 重组小鼠巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF), 小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)及白介素-4(白介素-4)购自creagene(韩国京畿道(Gyeonggi, Republic of Korea))。异硫氰酸荧光素(FITC)-膜联蛋白V/碘化丙啶试剂盒购自研发体系(美国明尼苏达州明尼阿波利斯(Minneapolis, MN, USA))。葡聚糖-异硫氰酸荧光素(分子量, 40000 Da)购自西格玛(美国密苏里州圣路易斯(St. Louis, MO, USA))。大肠杆菌O111:B4的脂多糖类购自英潍捷基(InvivoGen)公司(美国加利福尼亚州圣迭戈(San Diego, CA, USA))。内毒素过滤器(END-X)和内毒素去除树脂(END-X B15)购自美国ACC公司((美国马萨诸塞州东法尔茅斯(East Falmouth, MA, USA))。OT-I肽(OVA₂₅₇₋₂₆₄)和OT-II肽(OVA₃₂₃₋₃₃₉)由Peptron(韩国大田(Daejeon, Korea))合成。抗磷酸化的ERK1/2单克隆抗体、抗-ERK1/2单克隆抗体、抗磷酸化的p38单克隆抗体、抗-p38单克隆抗体、抗-核因子κB(p65)多克隆抗体、抗磷酸化的IκB-α多克隆抗体、抗-IκB-α单克隆抗体、抗-核纤层蛋白B多克隆抗体及抗-β-肌动蛋白多克隆抗体购自美国CST公司(美国马萨诸塞州丹弗斯(Danvers, MA, USA))。HRP-共轭抗-小鼠IgG抗体和HRP-rhddor抗-兔抗体购自Calbiochem公司(美国加利福尼亚州圣迭戈), 抗-β-肌动蛋

白mAb (AC-15) 购自西格玛。CD11c、p65、IFN- γ 及CD62L针对异硫氰酸荧光素-共轭mAb、白介素-12p70、白介素-10 (IL-10) 及CD3针对APC-共轭mAb、CD4及CD8针对PerCP-Cy5.5-共轭mAb、CD8⁺针对APC-Cy7-共轭mAb、CD80、CD86、主要组织相容性复合体I型、主要组织相容性复合体II型、 γ 干扰素及CD44针对藻红蛋白 (PE)-共轭mAb、CD11c及白介素-2针对PE-Cy7-共轭mAb和CD3e针对eFluor450-共轭mAb购自eBioscience公司 (美国加利福尼亚州圣迭戈)。藻红蛋白 (PE)-共轭鼠抗-IgG1、鼠抗-IgG2a及鼠抗-IgG2b、APC-共轭鼠抗-IgG2a及鼠抗-IgG1、异硫氰酸荧光素-共轭鼠抗-anti-IgG2b和PE-Cy7-共轭鼠抗-IgG1及鼠抗-IgG2b购自eBioscience公司。这些抗体用于异型对照组。肿瘤坏死因子 α 、白介素-1 β 、 γ 干扰素、白介素-2、白介素-4 (IL-4)、白介素-6、白介素-10及白介素-12p70酶联免疫吸附测定试剂盒购自eBioscience公司。

[0059] 1.4重组蛋白质的表达及纯化

[0060] 为了生成重组Rv2299c蛋白质,将M.结核H37Rv ATCC27294基因组脱氧核糖核酸 (DNA) 用作模板并使用如下引物通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增对应的基因: Rv2299c正向, 5'-CATATGAACGCCCATGTGCGAGCAGTTG-3'及逆向, 5'-GAATTCGGCAAGGTACGCGGAGACGTTC-3'早期分泌抗原靶-6正向, 5'-AAGCTTATGACAGAGCAGCAGTGGAAAT-3'及逆向, 5'-CTCGAGTGCGAACATCCCAGTGACGTT-3'。Rv2299c的聚合酶链反应产物利用NdeI和EcoRI切割,早期分泌抗原靶-6利用HindII和XhoI切割。将该产物插入pET22b(+)载体 (美国威斯康星州麦迪逊市Novagen公司 (Novagen, Madison, WI, USA)), 并对其结果进行序列化。重组质粒在42°C的温度下通过热冲击1分钟来变形为大肠杆菌 (E. coli) BL21细胞。如上所述,通过稍微修改制备了过表达的蛋白质 (Cho et al., 2006)。简而言之,在37°C的温度下将包含大肠杆菌的重组质粒培养至在600nm下的光学密度 (OD) 成为0.4至0.5为止后,利用1mM的异丙基-D-硫代半乳糖苷 (IPTG; 韩国大田ELPIS-Biotech公司 (ELPIS-Biotech, Daejeon, South Korea)) 诱导。然后,利用离心获得细菌细胞,悬浮于20mM的三氯化氢 (pH8.0)、0.5M的氯化钠、5mM的咪唑及1mM的苯甲基磺酰氟 (西格玛) 中;利用声波处理进行了溶解。根据制造商的协议 (美国加利福尼亚州查茨沃思Qiagen公司 (Qiagen, Chatsworth, CA, USA)) 利用镍-次氨基三乙酸 (Ni-NTA) 琼脂糖色谱分析纯化了重组蛋白质。通过使用抗-His抗体 (Santa Cruz) 利用考马斯亮蓝菌株和免疫印迹根据13.5%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳来分析各纯化步骤。收集并浓缩已纯化的蛋白质,利用磷酸盐缓冲食盐水 (PBS, pH7.4) 透析。为了去除内毒素污染,在4°C的温度下与多粘菌素B-琼脂糖 (PMB, 西格玛) 一同培养了透析的重组蛋白质。最后,过滤纯化的无内毒素的重组蛋白质并进行灭菌,冷冻于-70°C。以牛血清白蛋白为标准利用BCA蛋白质分析试剂盒 (伊利诺伊州罗克福德Pierce公司 (Pierce, Rockford, IL)) 测定了蛋白质浓度。利用生物学内毒素 (LAL) 试验 (瑞士巴塞尔龙沙公司 (Lonza, Basel, Switzerland)), 按照制造商的协议确定了重组蛋白质的残留血清脂肪酶。使用抗-组氨酸抗体通过考马斯亮蓝 (CB) 染色及免疫印迹对重组蛋白质的纯度进行了评估。

[0061] 1.5细胞培养

[0062] 如最近所述,制备、培养及纯化来源于鼠科骨髓的树突状细胞并 (Byun et al., 2012b)。如上所述,利用重组巨噬细胞集落刺激因子制备了来源于骨髓的巨噬细胞 (BMDMs)。简而言之,从C57BL/6小鼠分离的骨髓细胞溶于溶解缓冲液 (4.15g/500ml的氯化铵、0.01M

的三氯化氢缓冲液($\text{pH}7.5 \pm 2$)的红细胞(RBC),并用RPMI 1640培养基清洗。在6-孔培养板(10^6 细胞/ml, 3ml/孔)中铺板,5%的二氧化碳存在下且 37°C 的温度下,通过使用补充有100unit/ml的青霉素/链霉素(龙沙(Lonza))、10%的胎牛血清(龙沙)、50mM的巯基乙醇(龙沙)、0.1mM的非必需氨基酸(龙沙)、1mM的丙酮酸钠(西格玛(Sigma))、20ng/ml的小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子及10ng/ml的白介素-4(小鼠骨髓来源树突状细胞(BMDC))或20ng/ml的巨噬细胞集落刺激因子(小鼠骨髓来源的巨噬细胞的培养)的RPMI 1640培养基来进行了培养。

[0063] 1.6细胞毒性分析

[0064] 按照制造商的协议(BD Biosciences)使用膜联蛋白V/碘化丙啶(PI)染色试剂盒对细胞毒性分析进行了评估。细胞与膜联蛋白V与碘化丙啶一同通过为异硫氰酸荧光素-共轭进行了染色。染色的细胞的分析与FACSDiva一同利用FACSCanto II来进行,其结果使用FlowJo软件进行了分析(美国俄勒冈州亚什兰Treestar(Tree Star, Ashland, OR, USA))。

[0065] 1.7基于流式细胞分析法的表面分子表达的分析

[0066] 在第六天,获取了小鼠骨髓来源树突状细胞,并用磷酸盐缓冲食盐水清洗,重悬于荧光激活细胞分选仪清洗缓冲液(2%的胎牛血清(FBS)及磷酸盐缓冲食盐水中0.1%的叠氮化钠)。细胞在磷酸盐缓冲食盐水中利用0.5%的牛血清蛋白(BSA)预培养细胞30分钟,并用磷酸盐缓冲食盐水进行清洗。细胞与异硫氰酸荧光素-共轭抗-CD11c一起用PE-共轭抗-H-2Kb(主要组织相容性复合体I型)、抗-I-抗体(主要组织相容性复合体II型)、抗-CD80及抗-CD86,在 4°C 的温度下染色45分钟。细胞用磷酸盐缓冲食盐水清洗3次,用500 μl 的磷酸盐缓冲食盐水重悬。通过流式细胞分析法测定荧光发光,通过使用CellQuest数据分析软件分析了数据。

[0067] 1.8基于Rv2299c的小鼠骨髓来源的巨噬细胞的抗原摄取能力

[0068] 将小鼠骨髓来源的巨噬细胞(2×10^5 细胞)在 37°C 或 4°C 的温度下保持平衡45分钟,利用荧光素-共轭葡聚糖在1mg/ml的浓度下脉冲。添加凉的染色缓冲液终止反应。将细胞清洗3次,利用PE-共轭抗-CD11c抗体染色后,通过FACSCanto进行分析。对于树突状细胞的葡聚糖的非特异性结合通过将树突状细胞与异硫氰酸荧光素-共轭葡聚糖一同在 4°C 的温度下培养来确定,其结果从特定结合值减去特定获得的背景值。

[0069] 1.9对于Rv2299c的血清脂肪酶-污染去除的确认

[0070] 为了确认由Rv2299c诱导的树突状细胞的成熟不是由蛋白质制剂中的内毒素污染或者血清脂肪酶引起的,进行了与多粘菌素B的预处理(西格玛)、热变性、蛋白酶K(西格玛)分解的分析。树突状细胞在用100ng/ml的血清脂肪酶及10 μg /ml的Rv2299c处理之前,在室温条件下用50 μg /ml的多粘菌素B预培养1小时。为了热变性,将血清脂肪酶或Rv2299c在 100°C 的温度下培养1小时。为了蛋白酶K的分解,将血清脂肪酶或Rv2299c在10 μg /ml的浓度下,利用可溶性蛋白酶K在 37°C 的温度下分解1小时,为了使酶处于非活化状态,在 100°C 热处理15分钟后,加入小鼠骨髓来源的巨噬细胞培养液。24小时后,利用酶联免疫吸附测定分析了小鼠骨髓来源的巨噬细胞上清液中的肿瘤坏死因子 α 及白介素-6水平。

[0071] 1.10共聚焦扫描激光显微镜

[0072] 将树突状细胞在涂敷有多聚左旋赖氨酸的玻璃盖玻片上放置过夜。用Rv2299c处理后,利用4%的多聚甲醛固定细胞,使0.1%的曲拉通X-100渗透后,在室温条件下在含

PBS/T的抗-Rv2299c抗体中用2%的牛血清白蛋白培养2小时之前,在含有0.1%的吐温-20 (PBS/T)的磷酸盐缓冲食盐水中用2%的牛血清白蛋白(BSA)阻隔2小时。用PBS/T清洗后,在暗室用Cy-3共轭二次抗体重新培养细胞,接着,在室温条件下用1 μ g/ml的4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色10分钟。使用共聚焦激光显微镜观察了细胞形状及荧光灵敏度(Zeiss LSM510 Meta;英国韦林加登城卡尔蔡司(Carl Zeiss Ltd, Welwyn Garden City, UK))。图像使用LSM510 Meta软件获得,并利用LSM图像检测仪进行处理。

[0073] 1.11免疫沉淀反应

[0074] 将树突状细胞(1×10^7)用10mg/ml的Rv2299c培养6小时,用溶解缓冲液(10mM的三氯化氢(pH7.4)、1%的诺纳德P-40(NP-40)、0.25%的二氧胆酸钠、150mM的氯化氢、1mM的乙二胺四乙酸(EDTA)、1mM的苯甲基磺酰氟(PMSF)、分别1 μ g/ml的抑肽酶、亮肽素及胃酶抑素, 1mM的 Na_3VO_4 、1mM的NaF)溶解细胞颗粒。为了防止非特异性结合,向1mg的细胞溶解物加入50 μ l的正常血清(Santa Cruz)及100 μ l的50%的蛋白质A或G琼脂糖球浆(加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰(Invitrogen, Carlsbad, CA))来事先确认了细胞溶解物的稳定性。在4 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下培养2小时后,将珠子和细胞溶解物的混合物在4 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下以10000 $\times g$ 离心分离5分钟,为了下一次实验收集了上清液。将Rv2299c(His)、Toll样受体-2及Toll样受体-4相关蛋白质在4 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下作为对于抗-Toll样受体-2及Toll样受体-4的对照组抗体与抗-鼠IgG培养1小时,作为对于抗-Rv2299c(His)的对照组抗体与抗-小鼠IgG培养后,通过在4 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下与蛋白质A或G琼脂糖培养24小时来进行免疫沉淀。获取并清洗珠子,在5X样品缓冲液中煮沸5分钟。蛋白质从10%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离移动到偏二氯乙烯膜(Millipore)。如上所述,对于膜进一步检查了抗Toll样受体-2、Toll样受体-4、His抗体。

[0075] 1.12免疫印迹分析

[0076] 利用10 μ g/ml的Rv2299c刺激后,将树突状细胞溶解于包含50mM的三氯化氢(pH7.5)、150mM的氯化氢、1%的曲拉通-X100、1mM的乙二胺四乙酸、50mM的NaF、30mM的 Na_4PO_7 、1mM的苯甲基磺酰氟、1 μ g/ml的抑肽酶及1mM的过钒酸盐的100 μ l的溶解缓冲液。原始细胞溶解物样品在十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶中分解并移至硝酸纤维素膜。用5%的脱脂油阻隔膜,与抗体一同培养2小时后,在室温条件下用HRP-共轭二抗培养1小时。通过使用ECL Advance试剂盒对包含被抗体特异性识别的丝裂原活化蛋白激酶及核因子 κB 的靶蛋白上的表位进行了视觉化(英国小查尔本德GE生命科学(GE Healthcare, Little Chalfont, UK))。

[0077] 1.13制备核提取液

[0078] 如下制备在细胞中获得的核提取液。将树突状细胞在冰上用100ml的溶解缓冲液(10mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)(pH7.9), 10mM的KCl、0.1mM的乙二胺四乙酸、0.5%的诺纳德P-40(Nonidet P-40)、1mM的二硫苏糖醇(DTT, dithioreitol)、0.5mM的苯甲基磺酰氟)处理10分钟。以4000rpm离心分离5分钟后,将颗粒悬浮于100 μ l的提取缓冲液(20mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸(pH7.9)、40mM的氯化钠、1mM的乙二胺四乙酸、1mM的二硫苏糖醇、1mM的苯甲基磺酰氟)并在冰上培养30分钟。以12000rpm离心分离10分钟后,收集包含核提取液的上清液并储存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 直至需要。

[0079] 1.14用于信号传递途径分析的作为药理学抑制剂的树突状细胞处理

[0080] 所有药理学抑制剂购自Calbiochem公司。二甲基亚砜(西格玛)作为溶剂对照组以

0.1% (vol/vol) 加入培养中。用磷酸盐缓冲食盐水清洗树突状细胞,在用Rv2299c处理24小时之前,在含谷氨酰胺的RPMI 1640培养基中用抑制剂进行预处理。使用如下浓度的抑制剂:U0126 (10 μ M)、SB203580 (20 μ M)、SP600125 (10 μ M) 及Bay11-7082 (20 μ M)。在使用抑制剂的所有实验中,在使用MTT分析评估树突状细胞的存活力的细心的滴定实验后使用了试验浓度。

[0081] 1.15体外Y细胞增殖反应测定法

[0082] 从由BALB/c小鼠制备的总单核细胞通过使用MACS柱(Miltenyi Biotec)来分离了参与原始T细胞反应的反应T细胞。OVA-特异性CD8⁺及CD4⁺反应T细胞均由OT-1和OT-2鼠的各个脾脏细胞获得。如上所述,将这些T细胞用1 μ M的羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)(英杰)染色(Jeong et al., 2009)。在10 μ g/ml的Rv2299c存在下,用OVA肽处理24小时的树突状细胞(每孔2 $\times$ 10⁵细胞)用羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯-染色的CD8⁺及CD4⁺T细胞(2 $\times$ 10⁶)以树突状细胞和T细胞比率为1:10的方式共培养。在共培养第三天或第四天,将各个T细胞用PerCP-cy5.5-共轭抗-CD4⁺mAb、PE-cy5-共轭抗-CD4⁺mAb、PE-cy5-共轭抗-CD8⁺mAb、Alexa647-共轭抗-CCR3 mAb或PE-共轭抗-CXCR3 mAb染色,并利用流式细胞仪进行分析。获取上清液,通过利用酶联免疫吸附测定来测定 γ 干扰素、白介素-2及白介素-4生成。

[0083] 1.16效应及记忆Y细胞活性测定

[0084] 如上所述,利用MACS柱(Miltenyi Biotec)从由结核杆菌-感染的BALB/c小鼠制备的总单核细胞隔离了参与同种T细胞反应的反应T细胞。APC-共轭抗-CD3 mAb(BD Biosciences公司)的染色表示制备主要由CD3⁺细胞(>95%)构成。在进行大规模清洗后,用Rv2299c处理由野生型(WT)、Toll样受体-2^{-/-}及Toll样受体-4^{-/-}C57BL/6小鼠制备的树突状细胞(每孔2 $\times$ 10⁵细胞)24小时,并用2 $\times$ 10⁶反应同种T细胞(结核杆菌-感染的T细胞)共培养,以使对于树突状细胞的T细胞比率为1:10。在共培养第四天,用PerCP-cy5.5-共轭抗-CD4⁺mAb、PerCP-cy5.5-共轭抗-CD8⁺mAb、异硫氰酸荧光素-共轭抗-CD62L mAb及PE-共轭抗-CD44 mAb染色细胞,并用流式细胞仪进行分析。

[0085] 1.17细胞因子测定

[0086] 如上所述,夹心酶联免疫吸附测定用于检测培养上清液的白介素-6、白介素-1 β 、肿瘤坏死因子 α 、 γ 干扰素、白介素-4、白介素-2、白介素-12p70及白介素-10(Byun et al., 2012b)。将由预防接种的或感染的鼠的肺制备的单细胞用纯蛋白衍生物(PPD)(2 μ g/ml)或抗原-特异性CD4或CD8 T细胞肽(2 μ g/ml)在37 $^{\circ}$ C的温度下刺激了24小时。按照制造商的协议使用市售酶联免疫吸附测定试剂盒(eBioscience)测定了培养上清液中的 γ 干扰素细胞因子水平。

[0087] 1.18细胞中细胞因子分析

[0088] 首先,将细胞在4 $^{\circ}$ C的温度下用10% (vol/vol)的正常山羊血清阻隔15分钟,在4 $^{\circ}$ C的温度下用异硫氰酸荧光素-共轭CD11c⁺抗体染色了30分钟。将适当异型匹配的免疫球蛋白(Ig)染色的细胞用作阴性对照组。将细胞用按照制造商的协议使用的cytofix/cytoperm试剂盒(BD Biosciences)固定,以使能够渗透。用荧光素-共轭抗体(BD Biosciences公司)在渗透缓冲液中检测出细胞中白介素-12p70、白介素-10、白介素-2、白介素-4及 γ 干扰素。纯蛋白衍生物(PPD)由阿尔拉斯(Aeras)的布伦南(Brennan)博士提供(马里兰州罗克维尔

(Rockville,MD))。为了细胞中细胞因子的染色,将从预防接种的动物(2×10^6 细胞)获得的单细胞悬浮液在GolgiStop存在下且37℃的温度下,用纯蛋白衍生物(2 μ g/ml)、抗原-特异性CD4或CD8 T细胞肽(2 μ g/ml)刺激了12小时(BD Biosciences公司)。HN878攻击后,作为用于染色细胞中细胞因子的刺激剂单独使用了纯蛋白衍生物。首先,将细胞用Fc嵌段(抗-CD16/32)在4℃的温度下阻隔30分钟,并在4℃的温度下用BV421-共轭抗-CD3、PerCp-Cy5.5-共轭抗-CD4、APC-Cy7-共轭抗-CD8及异硫氰酸荧光素-共轭抗-CD62L抗体染色30分钟。将细胞用按照制造商的协议使用的cytofix/cytoperm试剂盒(BD Biosciences公司)固定,以使能够渗透。在渗透缓冲液中利用APC-共轭抗-肿瘤坏死因子 α 、PE-Cy7-共轭抗-白介素-2及PE-共轭抗- γ 干扰素抗体检测出了细胞中肿瘤坏死因子 α 、白介素-2及 γ 干扰素。除非另有说明,否则所有抗体购自eBioscience公司(加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego, CA))。细胞通过FACSverse流式细胞分析法利用可在市场上购买的软件程序FlowJo进行了分析(加利福尼亚州圣地亚哥Treestar公司(Treestar, Inc., San Carlos, CA))。

[0089] 1.19细菌数及组织病理学分析

[0090] 最终预防接种后,且在HN878攻击16周后,每组6只至7只小鼠用二氧化碳安乐死,并均质化其肺和脾脏。通过脏器(左肺及脾脏的一半)匀浆(homogenate)的连续稀释铺板于米德布鲁克(Middle Brook)7H11琼脂(密歇根州底特律迪福实验室(Difco Laboratories, Detroit, MI))来确定生菌数,这由10%的OADC(迪福实验室)、两性霉素B(密苏里州圣路易斯西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))及2 μ g/ml的2-噻吩甲酸酰肼(西格玛奥德里奇)补充。群体在37℃的温度下培养4周后计数。为了组织病理学分析,右侧肺的上叶用苏木精及曙红染色,用于评估炎症的严重程度。如上所述(Cha et al., 2015a),肺中的炎症水平使用ImageJ(National Institutes of Health, Bethesda, MD)软件程序进行了评估。并且,炎症反应基于病变的大小及免疫细胞的构成进行了评估。对于CFU的数据及肺炎症由中位数记录 $\log_{10}$ CFU $\pm$ 四分范围(IQR)报告。

[0091] 1.20统计分析

[0092] 所有实验至少重复3次进行,获得了一致的结果。与样品之间的比较相关的重要度水平通过使用统计软件(GraphPad Prism Software, version 4.03; GraphPad Software, San Diego, CA)由TURKEY多重比较测试分散确定。曲线图中的数据以平均 $\pm$ SEM表示。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 或 $***p < 0.001$ 的各个值被认为统计学上显著的。

[0093] 实施例2

[0094] 重组Rv2299c蛋白质诱导树突状细胞的成熟及活化。

[0095] 2.1实验方法

[0096] (A) (a) Rv2299c利用1mM的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)的补充6小时在大肠杆菌BL21中成功地诱导。蛋白质主要在包涵体中被局部化。N-末端His-标记Rv2299c的分子量接近基于十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳的72kDa(M:分子量标记物;泳道1:非诱导;泳道2:诱导)。重组Rv2299c从BL21细胞中生成,利用NTA树脂纯化。纯化的蛋白质利用1:1000小鼠抗-His抗体进行了(b)十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳和(c)免疫印迹分析。(B) 小鼠骨髓来源的巨噬细胞用1 μ g/ml、5 μ g/ml或10 μ g/ml的Rv2299c处理了30分钟,然后,在血清脂酶的存在和不存在下培养了24小时。细胞用葡聚糖(异硫氰酸荧光素)在37℃的温度下培养30分钟,在4℃的温度下培养30分钟,通过葡聚糖(异硫氰酸荧光素)摄取的FAC

分析进行了评估。示出葡聚糖(异硫氰酸荧光素)-阳性CD11c(PE)-阳性细胞的比率。结果代表表4中实验结果。条形图示出对个3个独立实验的葡聚糖-异硫氰酸荧光素-阳性CD11c+细胞比率的平均±SEM,统计学显著性(** $p < 0.001$)用于表示与对照组的比较处理。(C)小鼠骨髓来源的巨噬细胞为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Rv2299c的存在下培养24小时并通过两色流式细胞分析法来进行了分析。用于排出CD11c细胞而结合细胞。培养基:未处理对照组;血清脂肪酶:阳性对照组(100ng/ml的血清脂肪酶)。树突状细胞染色成抗-CD80、抗-CD86、抗-主要组织相容性复合体I型或抗-主要组织相容性复合体II型。结果代表对于3种实验的结果。平均荧光强度由上述曲线图计算。各个条形图表示样品的平均荧光水平。数据用平均±SEM($n=5$)表示。比较未处理对照组,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 及*** $p < 0.001$ 。(D)小鼠骨髓来源的巨噬细胞用1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Rv2299c和100ng/ml的血清脂肪酶刺激了24小时。对肿瘤坏死因子 α 、白介素-6、白介素-1 β 、白介素-12p70及白介素-10生成的分析利用酶联免疫吸附测定来测定。结果由进行的3个实验中的一个代表性实验得出。数据以平均±SEM($n=5$)表示。与未处理对照组进行比较,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 及*** $p < 0.001$ 。(E)通过细胞中细胞因子染色进行CD11c+DC中的白介素-12p70及白介素-10表达分析。

[0097] 2.2实验结果分析

[0098] 几乎没有对于分枝杆菌热休克蛋白家族中Rv2299c蛋白质的免疫学作用的信息。我们通过纯化*E. coli* BL21中重组Rv2299c蛋白质来调查了它的免疫反应。Rv2299c的纯度通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹分析(图1a)进行了评估。制备的Rv2299c的内毒素含量通过LAL分析为小于15pg/ml的($< 0.1\text{UE}/\text{ml}$)。树突状细胞和巨噬细胞对于分枝杆菌的预防免疫反应的开始及活化具有重要作用。因此,我们调查了对于巨噬细胞活化或树突状细胞成熟的Rv2299c的效果。Rv2299c没有诱导额外的巨噬细胞活化。作为用于树突状细胞的标记物吞噬作用活性通过暴露葡聚糖-异硫氰酸荧光素来确定。其中,阳性细胞(CD11c⁺及葡聚糖-异硫氰酸荧光素-阳性)在用作阳性对照组的Rv2299c或血清脂肪酶处理的树突状细胞中有所减少,其表示基于蛋白质的吞噬作用活性减少和功能成熟强化(图1b)。并且,处理24小时的Rv2299c的树突状细胞剂量依赖性地大大提高了主要组织相容性复合体I型及II型分子和共刺激分子如CD80及CD86的表达(图1c)。这种结果表明,Rv2299c有效诱导树突状细胞成熟。

[0099] 然后,我们分析了Rv2299c-介导树突状细胞成熟是否与促炎或抗炎细胞因子相结合。如图1d所示,Rv2299c为了分泌高水平的肿瘤坏死因子 α 、白介素-6及白介素-1 β 而显著刺激树突状细胞,相反,未处理的树突状细胞分泌了可忽略不计的细胞因子。随后,我们确定了对T细胞-介导免疫反应发达具有重要效果的白介素-12p70及白介素-10的生成。与血清脂肪酶不同,Rv2299c显著诱导白介素-12p70的分泌,而不是白介素-10(图1d)。在流式细胞技术分析中,白介素-10阳性细胞中没有任何变化,相反,与对于未处理树突状细胞获得的结果相比,在利用Rv2299c处理的树突状细胞中白介素-12p70-阳性细胞的比率增加(图1e)。内毒素含量决定了制备重组蛋白质的所有时间,但是,我们通过蛋白酶K或热变性确认了诱发树突状细胞成熟的Rv2299c能力不是由血清脂肪酶污染引起的(图2)。并且,多粘菌素B处理不影响Rv2299c的活性,相反,血清脂肪酶的活性被多粘菌素B显著抑制。从这种观点来看,这种结果表明,Rv2299c在树突状细胞中诱导促炎细胞因子分泌,这种Rv2299c-成熟树突状细胞可促进Th1型免疫反应。

[0100] 实施例3

[0101] Rv2299c通过Toll样受体-4途径诱导树突状细胞的成熟。

[0102] 3.1实验方法

[0103] (A) 杆型图示出来源于野生型、Toll样受体-2/及Toll样受体-4/小鼠的Rv2299c-处理CD11c⁺-结合的树突状细胞中的CD86或主要组织相容性复合体II表达。来源于野生型、Toll样受体-2/及Toll样受体-4/小鼠的树突状细胞用Rv2299c (10 μ g/ml) 处理了24小时。在各面板中示出阳性细胞的比率。条形图示出在3个独立实验中对CD11c⁺细胞的各表面分子的比率的平均 $\pm$ SEM。统计学显著性 (** $p < 0.001$) 以Rv2299c-处理的Toll样受体-2/与Rv2299c-处理的野生型树突状细胞表示。所有数据以平均 $\pm$ SD (n=3) 表示, 统计学显著性 (** $p < 0.001$) 用于表示与Rv2299c-处理的野生型树突状细胞比较处理。(B) 来源于野生型、Toll样受体-2/及Toll样受体-4/小鼠的树突状细胞用Rv2299c或血清脂肪酶处理24小时。来源于野生型、Toll样受体-2/及Toll样受体-4/小鼠的Rv2299c-或血清脂肪酶-处理的树突状细胞中的肿瘤坏死因子 α 、白介素-6或白介素-1 β 生成通过酶联免疫吸附测定来测定。所有数据由平均 $\pm$ SD (n=3) 表示, 统计学显著性 (** $p < 0.001$) 用于表示与Rv2299c-处理的野生型树突状细胞比较处理。(C) 来源于野生型、MyD88/及TRIF/小鼠的树突状细胞用Rv2299c (10 μ g/ml) 及血清脂肪酶 (100ng/ml) 处理了24小时。来源于野生型、MyD88/及TRIF/小鼠的Rv2299c-或血清脂肪酶-处理的树突状细胞中的肿瘤坏死因子 α 、白介素-6或白介素-1 β 生成通过酶联免疫吸附测定来测定。所有数据以平均 $\pm$ SD (n=3) 表示, 统计学显著性 (** $p < 0.001$) 用于表示与Rv2299c-处理的野生型树突状细胞比较处理。(D) 与Rv2299c-处理的树突状细胞相结合的抗-Rv2299c的荧光强度。来源于野生型、Toll样受体-2/及Toll样受体-4/小鼠的树突状细胞用Rv2299c (10 μ g/ml) 处理的24小时并进行固定, 利用DAPI及Cy3-共轭抗-His抗体 (基准: 10 μ m) 染色。(E) 来源于野生型、Toll样受体-2/及Toll样受体-4/小鼠的小鼠骨髓来源的巨噬细胞用Rv2299c (10 μ g/ml) 处理1小时, 并用Alexa488-共轭抗-His mAb进行染色。在各面板中示出阳性细胞的比率。条形图示出在3个独立实验中获得CD11c⁺细胞中的Rv2299c-Alexa488比率的平均 $\pm$ SEM。统计学显著性 (** $p < 0.001$) 用于表示与Rv2299c-处理的野生型树突状细胞相比Rv2299c-处理的Toll样受体-4/。(F) 利用抗-His、抗-Toll样受体-2或抗-Toll样受体-4抗体的免疫沉淀反应 (IP) 及利用抗-His、抗-Toll样受体-2或抗-Toll样受体-4抗体进行免疫印迹法。树突状细胞用Rv2299c (10 μ g/ml) 处理了6小时。获得了细胞, 细胞溶解物利用抗-鼠IgG、抗-小鼠IgG、抗-His、抗-Toll样受体-2或抗-Toll样受体-4进行了免疫沉淀; 然后, 通过利用抗-His、抗-Toll样受体-2或抗-Toll样受体-4抗体进行免疫印迹来视觉化。总计是指平均总细胞溶解物。

[0104] 3.2实验结果分析

[0105] 确认了通过Toll样受体 (TLRs) 途径来激活树突状细胞的几种结核杆菌组分 (Harding and Boom, 2010)。因此, 我们调查了能否通过树突状细胞中的Toll样受体来使Rv2299c稳定, 能否由此进行活跃。相对于野生型 (WT) 或Toll样受体-2^{-/-}小鼠中获得的树突状细胞, 表面分子 (图3a) 及促炎细胞因子 (图3b) 的表达在Toll样受体-4^{-/-}小鼠中获得的树突状细胞中被显著抑制。这表明Rv2299c可以为对于Toll样受体-4的作用剂。MyD88为对于所有Toll样受体的共同的衔接分子, 相反, TRIF对MyD88-独立信号传递途径的Toll样受体-4-媒介活化是必须的 (Takeda et al., 2003)。从野生型、MyD88^{-/-}及TRIF-缺失小鼠中获得的树

突状细胞中的促炎细胞因子生成的确定表明,MyD88-及TRIF-依赖性途径参与肿瘤坏死因子 α 、白介素-6及白介素-1 β 的Rv2299c-诱导生成(图3c)。然后,我们调查了Rv2299c是否与树突状细胞中Toll样受体-4分子相互作用。在具有Cy3-共轭抗-Rv2299c多克隆性抗体的共聚焦显微镜中示出,Rv2299c首先结合在野生型及Toll样受体-2^{-/-}中获得的树突状细胞的表面,而不是Toll样受体-4^{-/-}树突状细胞(图3d)。并且,Rv2299c和Toll样受体-4分子之间的结合通过流式细胞技术分析来确认(图3e)。为了确认Rv2299c与Toll样受体-4之间的相互作用,我们对于抗-Toll样受体-2或抗-Toll样受体-4抗体及抗-His抗体进行了免疫沉淀分析。我们发现Rv2299c与Toll样受体-4相结合,而不是Toll样受体-2(图3f)。这种结果说明,Rv2299c通过Toll样受体-4-依赖性的方法来诱导树突状细胞成熟,从而引起细胞表面分子和促炎细胞因子的表达增加。

[0106] 实施例4

[0107] 丝裂原活化蛋白激酶及核因子 κ B途径与Rv2299c-介导树突状细胞成熟有关。

[0108] 4.1实验方法

[0109] (A)用10 μ g/ml的Rv2299c蛋白质处理了树突状细胞,并根据时间来示出蛋白质表达。细胞溶解物放置于十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,免疫印迹分析通过使用对磷酸化p38(p-p38)、p38、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)、磷酸化I κ B- α 、I κ B- α 及p65核因子 κ B具有特异性的各个抗体来进行。(B)在树突状细胞中对核因子 κ B的p65亚单位细胞局部化的Rv2299c的效果。树突状细胞铺板在盖住的玻璃腔室载玻片,并用Rv2299c处理了1小时。进行刺激后,如“材料及方法”中所述,细胞中核因子 κ B的p65亚单位免疫反应性取决于免疫荧光法。在用10 μ g/ml的Rv2299c蛋白质处理(C-D)树突状细胞24小时之前的前一小时,用p38(SB203580,20 μ M)、ERK1/2(U0126,10 μ M)、c-Jun氨基末端激酶(SP600125,20 μ M)、Bay11-7082(20 μ M)或二甲基亚砜(DMSO)(控制差量)的药理学抑制剂进行处理。根据流式细胞分析法来分析了CD80及CD86的表达。条形图示出对于各个CD11c+细胞表面分子的比率(对于3个额外的实验的平均 $\pm$ SEM)。在培养培养基中肿瘤坏死因子 α 、白介素-6及白介素-1 β 的量通过利用酶联免疫吸附测定来测定。平均 $\pm$ SEM示出3个独立实验,统计学显著性(* p <0.05,** p <0.01或*** p <0.001)用于示出与Rv2299c-处理的对照组比较处理。

[0110] 4.2实验结果分析

[0111] 丝裂原活化蛋白激酶及核因子 κ B为用于调节树突状细胞成熟和促炎细胞因子分泌的重要的信号分子(Bansal et al., 2010b, Pathak et al., 2007)。因此,我们对于Rv2299c的应答调查了丝裂原活化蛋白激酶及核因子 κ B的活化。正如所料,Rv2299c诱发了p38及ERK1/2的磷酸化和树突状细胞中I κ B- α 的磷酸化及降低(图4a),并诱导了从p65的胞液到核的重要位置变更(图4b)。为了确认Rv2299c-诱导促炎细胞因子生成及共刺激分子表达中的丝裂原活化蛋白激酶及核因子 κ B的作用,在暴露于Rv2299c之前,用p38抑制剂(SB203580)、ERK1/2抑制剂(U0126)、c-Jun氨基末端激酶抑制剂(SP600125)、或核因子 κ B抑制剂(Bay 11-0782)预处理树突状细胞1小时。除了c-Jun氨基末端激酶抑制剂之外的所有药理学抑制剂在树突状细胞表面上大大取消了共刺激分子的Rv2299c-诱导表达(图4c)及促炎细胞因子的生成(图4d)。从这些研究结果,我们可以知道丝裂原活化蛋白激酶及核因子 κ B信号传递途径对由促炎细胞因子生成及Rv2299c诱导的树突状细胞成熟标记物表达是必须的。

[0112] 实施例5

[0113] Rv2299c-成熟树突状细胞诱导原始T细胞增殖。

[0114] 5.1实验方法

[0115] (A) 分离转化OVA-特异性CD8⁺T细胞及转化OVA-特异性CD4⁺T细胞,并用羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色,用Rv2299c (10 μ g/ml)或血清脂肪酶(100ng/ml)处理的树突状细胞共培养96小时,分别对于OVA-特异性CD8⁺T细胞用OVA257264 (1 μ g/ml)脉冲或对于OVA-特异性CD4⁺T细胞用OVA323339 (1 μ g/ml)脉冲。单独T细胞及利用未处理树突状细胞共培养的T细胞起到对照组的作用。OT-I⁺及OT-II⁺T细胞增殖通过流式细胞分析法来进行评估。(B) 经24小时后获得的培养上清液及 γ 干扰素、白介素-2和白介素-4通过酶联免疫吸附测定来测定。平均 $\pm$ SEM示出3个独立实验,统计学显著性(* $p < 0.05$)用于示出与适当的对照组(T细胞/OVA257264脉冲的树突状细胞或T细胞/OVA323339脉冲的DCs)比较处理。没有显著效果的处理用n.s表示。

[0116] 5.2实验结果分析

[0117] 为了正确说明对于树突状细胞与T细胞之间的相互作用的Rv2299c活性特征,我们利用OT-I⁺T细胞受体(TCR)转化CD8⁺T细胞及OT-II⁺TCR转化CD4⁺T细胞执行了同系的MLR分析。将OVA₂₅₇₋₂₆₄或OVA₃₂₃₋₃₃₉和脉冲的树突状细胞与转化羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯-标记OVA-特异CD4⁺或CD8⁺T细胞共培养72小时。相对于未处理树突状细胞,Rv2299c-或血清脂肪酶-处理的树突状细胞诱导T细胞增殖的程度明显更大(图5a)。并且,相对于未处理树突状细胞,Rv2299c-处理的树突状细胞和脉冲的原始CD4⁺及CD8⁺T细胞以更高的 γ 干扰素及白介素-2水平生成($p < 0.05-0.01$),相反,白介素-4分泌与Rv2299c刺激无关没有增加(图5b)。这种结果表明,Rv2299c-处理的树突状细胞以Th1表现型诱导原始T细胞增殖。

[0118] 实施例6

[0119] Rv2299c-成熟树突状细胞诱导效应及记忆T细胞人口的扩增。

[0120] 6.1实验方法

[0121] (A) 由结核杆菌-感染BALB/c小鼠准备的的T细胞。将树突状细胞用10 μ g/ml的Rv2299c蛋白质培养了24小时。清洗Rv2299c-成熟的树突状细胞,以1:10的比率共培养同种T细胞和树突状细胞与T细胞3天。用抗-CD4、抗-CD8mAb、抗-CD62L及抗-CD44mAb染色脾脏细胞。在杆型图和条形图中示出脾脏中的CD62L^{low}CD44^{high}T细胞。条形图示出3个独立实验中对于CD4⁺/CD8⁺CD44^{high}及CD4⁺/CD8⁺CD62L^{low}T细胞的比率(平均 $\pm$ SEM)。(B) 通过细胞中 γ 干扰素、白介素-2或白介素-4染色,在Rv2299c-脉冲的树突状细胞或血清脂肪酶-脉冲的树突状细胞共培养的肠内淋巴结的T细胞分析了CD3⁺/CD4⁺及CD3⁺/CD8⁺细胞中的 γ 干扰素、白介素-2或白介素-4表达。T细胞中双阳性细胞的比率显示在右上角,结果代表3个独立实验。统计学显著性(** $p < 0.01$ 或*** $p < 0.001$)用于示出与未处理树突状细胞做比较,没有显著效果的处理以n.s表示。

[0122] 6.2实验结果分析

[0123] 为了评估Rv2299c-刺激树突状细胞是否反映在能够刺激尤其在被结核杆菌感染的小鼠中获得的CD4⁺的能力,我们分析了通过使用流式细胞分析法来由Rv2299c处理的树突状细胞诱导的CD4⁺脾脏T细胞上的CD62L及CD44的表达变化。树突状细胞由野生型、To11样受体-2-/-或To11样受体-4-/-小鼠的骨髓制备,并用Rv2299c或血清脂肪酶来使其成

熟。将所有从感染的小鼠获得的Rv2299c-成熟树突状细胞及同系CD4+T细胞共培养72小时后,相对于对照树突状细胞或血清脂肪酶-处理的树突状细胞,从野生型或To11样受体-2-/-小鼠获得的Rv2299c-成熟树突状细胞具有CD4+T细胞中显著下调的CD62L及上调的CD44表达,而不是从To11样受体-4-/-小鼠获得的(图6a)。相对于对照树突状细胞或血清脂肪酶-处理的树突状细胞,CD4- γ 干扰素或CD4-白介素-2阳性细胞的比重,与从野生型或To11样受体-2-/-小鼠获得的Rv2299c-成熟树突状细胞共培养时更高,而不是To11样受体-4-/-小鼠获得的(图6b)。进一步地,不会因为与CD4-白介素-4阳性细胞抗原刺激的树突状细胞共培养而有所增加。这些数据表明,Rv2299c-成熟树突状细胞诱导了效应及记忆T细胞的扩增,且通过To11样受-4依赖性方法来启动Th1免疫反应。

[0124] 实施例7

[0125] 由Rv2299c-成熟树突状细胞活化的Y细胞抑制细胞内的结核杆菌生长。

[0126] 7.1实验方法

[0127] 小鼠骨髓来源的巨噬细胞的培养用H37Rv(MOI=1)感染了4小时。然后,感染的小鼠骨髓来源的巨噬细胞的培养用阿米卡星(200 μ g/ml)处理了2小时,利用磷酸盐缓冲食盐水清洗了2次。随后,将之前所制备的混合物分别加入壳中并将板培养了3天。混合物为在树突状细胞与T细胞比率为1:10的条件下由用CD4+T细胞共培养的抗原活化的树突状细胞。活化抗原的树突状细胞为血清脂肪酶(100ng/ml)及Rv2299c(10 μ g/ml)。(A)在感染的巨噬细胞中结核杆菌的数。(B)上清液利用酶联免疫吸附测定来分析。所见的数据为平均值 $\pm$ SD(n=3);*p<0.05、**p<0.01或***p<0.001=对于处理的细胞与未处理细胞的显著性。没有显著效果的处理以n.s表示。

[0128] 7.2实验结果分析

[0129] 为了确认Rv2299c-成熟树突状细胞是否实际上起到控制结核杆菌的作用,我们调查了由Rv2299c-成熟树突状细胞活化的T细胞能否提高巨噬细胞中的杀菌作用。从未感染的小鼠获得的原始脾脏T细胞通过与Rv2299c-成熟树突状细胞共培养72小时来被活化,随后,加入到结核杆菌-感染的小鼠骨髓来源的巨噬细胞的培养。如图7所示,简单添加非活化的T细胞显著抑制细胞中的结核杆菌生长。相对于由非活化的T细胞或血清脂肪酶-刺激树突状细胞活化的T细胞相比,有趣的是,由Rv229c-刺激树突状细胞活化的T细胞显著抑制结核杆菌生长。相对于由非活化T细胞或血清脂肪酶-刺激树突状细胞活化的T细胞当加入由Rv2299c-刺激树突状细胞活化的T细胞时显著制备与抗-结核活性相关的促炎细胞因子、 γ 干扰素及IL-17。这表明,结核杆菌生长抑制与这种细胞因子生成有关(图7)。其结果表明,Rv2299c通过树突状细胞成熟诱导具有杀菌活性的T细胞的活化。

[0130] 实施例8

[0131] Rv2299c和早期分泌抗原靶-6融合蛋白增强早期分泌抗原靶-6的免疫反应。

[0132] 8.1用于确认融合蛋白诱导树突状细胞成熟的实验方法

[0133] (A)将培养小鼠骨髓来源的巨噬细胞在1 μ g/ml、2 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml或20 μ g/ml的早期分泌抗原靶-6或融合蛋白质的存在下培养24小时,并通过流式细胞分析法进行分析。星形孢菌素为阳性对照组。树突状细胞用抗-CD11c、膜联蛋白V及碘化丙啶染色。示出在各四分面中的阳性细胞(膜联蛋白V-及碘化丙啶-染色的细胞)的比率。结果代表3个实验。(B)将小鼠骨髓来源的巨噬细胞在1 μ g/ml、5 μ g/ml或10 μ g/ml融合蛋白、2 μ g/ml的早期分泌

抗原靶-6或10 μ g/ml的Rv2299c的存在下培养24小时,并通过双色流式细胞分析法进行分析。细胞用于排除CD11c细胞而结合。树突状细胞用抗-CD40、抗-CD80、抗-CD86或抗-主要组织相容性复合体II型染色。结果代表3个实验结果。平均荧光强度由上述曲线图计算。各个条形表示样品的平均水平。数据由平均 $\pm$ SEM(n=5)表示。与未处理对照组、早期分泌抗原靶-6或Rv2299c相比,* p <0.05、** p <0.01及*** p <0.001。(C)上清液通过酶联免疫吸附测定来测定。结果由所进行的3个实验之一的代表实验得出。数据以平均 $\pm$ SEM(n=5)表示。与未处理对照组、早期分泌抗原靶-6或Rv2299c相比,* p <0.05、** p <0.01及*** p <0.001。

[0134] 8.2用于确认抑制基于融合蛋白的巨噬细胞中结核杆菌生长的实验方法

[0135] 小鼠骨髓来源的巨噬细胞的培养用H37Rv(MOI=1)感染4小时。然后,感染的小鼠骨髓来源的巨噬细胞的培养用阿米卡星(200 μ g/ml)处理了2小时,利用磷酸盐缓冲食盐水清洗了2次。随后,将之前所制备的混合物加入各个孔中并将板培养3天。混合物为在树突状细胞与T细胞比率为1:10的条件下由用CD4+T细胞共培养的抗原活化的树突状细胞。活化抗原的树突状细胞为早期分泌抗原靶-6(2 μ g/ml)、Rv2299c及融合蛋白(10 μ g/ml)。(A)感染的巨噬细胞中结核杆菌的数。(B)上清液通过利用酶联免疫吸附测定来分析。所见的数据为平均值 $\pm$ SD(n=3);* p <0.05、** p <0.01或*** p <0.001=对于处理的细胞与未处理细胞的显著性。没有显著效果的处理以n.s表示。

[0136] 8.3实验结果分析

[0137] 我们假设树突状细胞-活化蛋白质能够提高T细胞-刺激抗原的预防免疫。为了测试此,使作为主要T细胞疫苗候选的早期分泌抗原靶-6在融合于大肠杆菌中的Rv2299c的蛋白质表达并纯化,并调查其免疫原性。首先,我们通过膜联蛋白V和碘化丙啶染色来确定小鼠骨髓来源的巨噬细胞的培养中重组Rv2299c-融合早期分泌抗原靶-6的细胞毒性。早期分泌抗原靶-6在高于5 μ g/ml的值下具有细胞毒性,但是融合蛋白在10 μ g/ml下没有毒性(图8a)。因此,在后续实验中,以2 μ g/ml的浓度使用了早期分泌抗原靶-6。相对于单一蛋白质,同时刺激及主要组织相容性复合体分子的表达和促炎细胞因子如肿瘤坏死因子 α 、白介素-1 β 及IL-12生成在用融合蛋白刺激的树突状细胞中大大增加(图8B)。然后,我们确定了通过融合蛋白成熟树突状细胞刺激的T细胞的杀菌活性。如图9A所示,相对于没有任何T细胞或树突状细胞的小鼠骨髓来源的巨噬细胞的培养,通过加入由早期分泌抗原靶-6-刺激树突状细胞活化的T细胞显著抑制了细胞中结核杆菌生长,但是,由Rv2299c-刺激树突状细胞或融合蛋白-刺激树突状细胞活化的T细胞,与其他条件相比,显著抑制了细胞中结核杆菌生长。促炎细胞因子如 γ 干扰素及肿瘤坏死因子 α 的高生成,共培养结核杆菌-感染小鼠骨髓来源的巨噬细胞的培养与由融合蛋白-刺激树突状细胞活化的T细胞时出现(图9b)。

[0138] 实施例9

[0139] Rv2299c、早期分泌抗原靶-6融合蛋白对高病毒性 从结核杆菌HN878菌株引发显著的卡介苗初免加强效应。

[0140] 9.1实验方法

[0141] (A)免疫接种时间表和实验设计。(B)示出用结核杆菌HN878攻击后在16周的时间点在用卡介苗单独、蛋白质单独、卡介苗/Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白及辅助剂对照组(仅MPL-DDA)预防接种的小鼠肺中的细菌增殖程度差异。(C)从结核杆菌HN878(n=6动物/组)攻击后在16周的时间点预防接种的各个小鼠获得的肺部分用H&E染色。(D)肺组织切

片中炎症组织部位的百分比。G1:感染对照,G2:MPL/DDA接种对照,G3:卡介苗单独,G4:卡介苗/Rv2299c+早期分泌抗原靶-6/MPL-DDA融合蛋白接种,G5:早期分泌抗原靶-6/MPL-DDA接种组。与MPL-DDA-单独组相比,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 及*** $p < 0.001$ 。

[0142] 9.2实验结果分析

[0143] 最后,我们评估了Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白对结核是否有疫苗可能性。首先,我们通过使用结核杆菌厄尔德曼(Erdman)菌株在小鼠模型中对Rv2299c蛋白单独疫苗效果进行了评估。但是,在肺和脾脏中的细菌负担减少的观点上,Rv2299c/MPL-DDA接种对厄尔德曼菌株没有表现出有意义的防御效果。

[0144] 然后,我们对作为高病原性结核杆菌株的结核杆菌HN878攻击模型中Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白是否作为卡介苗-初免加强具有可能性进行了评估。之前的研究表明,小鼠的卡介苗单独预防接种之后,在感染10周之后,相对于结核杆菌H37Rv,对于W-Beijing分离株提供一点预防(Lopez et al., 2003)。因此,如上所述,通过使用W-Beijing家族之一的临床高病毒性HN878菌株测试了在小鼠模型中蛋白质的疫苗功效(Cha et al., 2015b)。最终疫苗接种4周后,我们用结核杆菌HN878菌株攻击小鼠,在16周时间点上,确定了它们的肺中的细菌负荷(图10a)。如图10b所示,相对于辅助剂对照组,单独使用卡介苗、早期分泌抗原靶-6及Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白均大大降低了肺中的细菌负荷。卡介苗单独和融合蛋白具有类似的预防效果,早期分泌抗原靶-6预防接种在肺中具有更高的细菌负荷。但是,这三种疫苗差异并不大。我们还为了加强卡介苗疫苗,调查了融合蛋白的能力。在感染16周后,相对于卡介苗-疫苗小鼠,融合蛋白-加强小鼠的细菌数相对较低。我们在预防接种后还对肺炎症进行了评估。在攻击后16周时间点上,相对于卡介苗对照组,Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白-预防接种组示出显著减少的肺炎症($p < 0.01$)。整体上来看,Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白在长时间的细菌减少观点,对HN878菌株攻击具有预防效果。进一步地,在攻击16周的时间点上,相对于感染对照组,Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白-预防接种组示出显著减少的肺炎症($p < 0.01$) (图10c及图10d)。

[0145] 实施例10

[0146] 被结核杆菌HN878感染的小鼠中的抗原特异Th1免疫反应的免疫原性

[0147] 10.1用于确认在具有免疫力的小鼠肺中抗原-特异性多功能T细胞的诱导的实验方法。

[0148] 如材料及方法中所述,对小鼠的各组进行预防接种和牺牲。在最终预防接种4周后,使小鼠($n=6$)的各组安乐死,将该肺细胞在GolgiStop存在下且37℃的温度下用标记的抗原刺激12小时。用于生成从预防接种的小鼠的肺分离的细胞中的 γ 干扰素、肿瘤坏死因子 α 和/或白介素-2的抗原特异性的CD4+T细胞的比率通过多色流式细胞分析法与CD4+淋巴细胞结合来进行了分析。饼分图示出用于共表达 γ 干扰素、肿瘤坏死因子 α 和/或白介素-2的细胞的平均次数。数据以从各组中的5只小鼠获得的平均 $\pm$ SD表示,独立样本t检验用于确定显著性。相对于MPL-DDA-单独组,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 及*** $p < 0.001$ (独立样本t检验)。

[0149] 10.2用于确认用结核杆菌HN878菌株攻击后在脾脏中多功能T细胞的保持的实验方法。

[0150] 在感染16周后,使各组($n=6$)的小鼠安乐死,该脾脏细胞(2.0×10^6 细胞)在

GolgiStop存在下且37℃的温度下用各个抗原(5μg/ml)刺激了12小时。用于生成从小鼠的各组的肺中分离的细胞中的γ干扰素、肿瘤坏死因子α和/或白介素-2的抗原特异性CD4+T细胞的比率通过多色流式细胞分析法与CD4+淋巴细胞结合来进行了分析。饼分图示出用于共表达γ干扰素、肿瘤坏死因子α和/或白介素-2的细胞的平均次数。数据以从各组中的5只小鼠获得的平均±SD表示,独立样本t检验用于确定显著性。相对于MPL-DDA-单独组,*p<0.05、**p<0.01及***p<0.001(独立样本t检验)。

[0151] 10.3对于上述实验结果的分析

[0152] Th1介导免疫反应及多功能T细胞在对于结核杆菌的预防免疫起到重要作用。因此,接下来我们对通过Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白-预防接种诱导的T细胞表现型的变化进行了评估。在攻击16周分离肺(图11a、图11b)和脾脏细胞(图12a、图12b),对于利用各免疫抗原刺激并反应的CD4+T细胞的表现型通过多色细胞中细胞因子染色来进行了评价。相对于其他组,仅在Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白-预防接种组中,肺中的三阳性CD4+T细胞(γ干扰素、肿瘤坏死因子α及白介素-2共表达)增加并保持(图11a、图11b及12a、图12b)。进一步地,Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白-预防接种组示出肺中攻击后增加的频率的双阳性多功能CD4+T细胞(肿瘤坏死因子α+白介素-2+CD4+T细胞)(图11a、图11b及图12a、图12b)。

[0153] 实施例11

[0154] 考察

[0155] 发现亚单位蛋白质疫苗对加强卡介苗交替或卡介苗-诱导免疫反应潜在性的有用(Dalmia and Ramsay,2012)。我们为了改善结核疫苗候选的预防效果,提出了新的疫苗开发战略。选择包含多蛋白质疫苗的最佳抗原是在疫苗开发中最为关键的步骤。树突状细胞用于调节原始T细胞极化及淋巴结倍数中Th1或Th2类型的后续开发。因此,基于树突状细胞-活化蛋白质的疫苗可提高已制成的其他抗原的预防免疫。在本研究中,我们发现,可活化树突状细胞的Rv2299c蛋白质为用于开发结核疫苗的有价值的目标。这表明,Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白被相当高的病毒性结核杆菌HN878临床菌株攻击后大大降低肺的细菌负荷。

[0156] 为了诱导基于T细胞的免疫而设计的结核疫苗开发的基本原理以特异性抵抗结核杆菌抗原的Th1反应为抗-结核免疫性的基本机制为前提。没有引起Th1反应的抗原对结核杆菌没有疫苗功效,但是,诱导健康的Th1反应的所有蛋白不是均具有相当的预防效果(Orr et al., 2014)。抵抗Ag85A引起强健的Th1反应的MVA85A疫苗对人没有显著的卡介苗促进效果(Tameris et al., 2013)。重要的是疫苗诱导记忆T细胞反应并诱导长期免疫反应。树突状细胞对T细胞的有效活化及记忆T细胞反应诱导起到重要作用。据悉,由用结核杆菌-感染树突状细胞(Tascon et al., 2000)或抗原提取液处理的树突状细胞(Rubakova et al., 2007)接种的小鼠免受结核杆菌干感染。这种结果支持可将生物体内树突状细胞作为目标的抗-结核疫苗战略开发(Sinha et al., 2007)。在本研究中,为了测试树突状细胞-活化蛋白质为可行性疫苗候选的假设,选择可靠的树突状细胞-活化蛋白质为重要的研究问题。首先,我们选择了分枝杆菌热休克蛋白,因为活化分枝杆菌热休克蛋白与活化巨噬细胞或树突状细胞等免疫细胞树突状细胞(Wang et al., 2001,Wang et al., 2002,Franco et al., 2008)及辅助剂活跃(Srivastava et al., 1998)的能力有关。在本研究中,我们

发现,分枝杆菌热休克蛋白中的Rv2299c(热休克蛋白90)通过Toll样受体-4信令和丝裂原活化蛋白激酶及核因子 κ B活化来诱导树突状细胞成熟。此活化导致促进Th1类型的免疫反应的共刺激分子的表达及促炎细胞因子的分泌的增加。最近据报告,从给药Rv2299c的小鼠的脾脏细胞分离的树突状细胞带来了主要组织相容性复合体分子及共刺激分子表达的增加,树突状细胞负荷肿瘤抗原诱导Rv2299c治疗与抗-肿瘤免疫协同效果(Vo et al., 2015)。这种结果和我们的研究表明,Rv2299c通过生物体内及生物体外中树突状细胞活化来具有辅助剂活性。

[0157] 据报告,几种分枝杆菌蛋白质通过活化树突状细胞的Toll样受体-2(Bansal et al., 2010a,Byun et al., 2012a)或Toll样受体-4途径(Choi et al., 2015, Kim et al., 2013)来诱导Th1感染反应,或者通过Toll样受体-2途径(Bansal et al., 2010b)来诱导Th2感染反应(Bansal et al., 2010b)。这表明,各个抗原在树突状细胞中具有不同的活跃。重组分枝杆菌热休克蛋白70均通过Toll样受体-4及Toll样受体-2来信令,相反,分枝杆菌热休克蛋白65仅通过Toll样受体-4来信令,从而活化免疫细胞(Bulut et al., 2005)。人热休克蛋白90通过Toll样受体-4途径来导致生物活性(Thuringer et al., 2011,Hutchinson et al., 2009)。本研究示出热休克蛋白90家族的Rv2299c通过Toll样受体-4-、MyD88-及TRIF-依赖性方法来活化树突状细胞,这通过使用TRL4或TRL2敲除小鼠的下拉分析和实验来验证。

[0158] 我们为了基于可靠的树突状细胞的疫苗,假设重要的是活化具有抗-分枝杆菌活性的T细胞。但是,关于诱导Th1免疫反应的树突状细胞-活性蛋白质诱发的实际抗-分枝杆菌效果尚未人知。相对于灭活T细胞,本研究被Rv2299c-成熟树突状细胞活化的T细胞大大抑制巨噬细胞中的结核杆菌生长并诱导大量细胞因子生成。被血清脂肪酶成熟树突状细胞非特异性活化的T细胞没有任何的抗-杀菌活性。这种结果表明,Rv2299c对具有活性的原始CD4⁺T细胞诱导特定活性。

[0159] 据报告,由2个至4个融合蛋白抗原组成的亚单位疫苗具有强烈预防反应效果,与仅由卡介苗诱导的预防相当。大多数人在婴儿期仅接种卡介苗,但是其功效随时间变弱(Bertholet et al., 2010),所以,促进由卡介苗诱导的预防免疫可将成为最为实用的战略。因此,我们调查了由Rv2299c及早期分泌抗原靶-6组成的融合蛋白的预防免疫反应和效果。我们选择了早期分泌抗原靶-6作为融合伙伴,因为在当前临床试验中早期分泌抗原靶-6是包含于疫苗的主要抗原之一。在本研究中,在单独接种卡介苗的小鼠和用融合蛋白接种的小鼠中出现了类似的预防效果。示出记忆T细胞回忆应答不依赖于树突状细胞,其他非专门的抗原递呈细胞可足以开始二次反应(Bertram et al., 2004,Dawicki and Watts, 2004),但是,其他研究表明,通过响应于全身或局部感染来记忆T细胞的活化主要依赖于树突状细胞(Zammit et al., 2005,Wakim et al., 2008)。在本研究中,我们发现Rv2299c-成熟树突状细胞诱导结核杆菌-感染小鼠中获得的效应及记忆CD4⁺T细胞的扩增。这表明,Rv2299c可在接种卡介苗的对象中诱导记忆T细胞回忆反应。相对于单独接种卡介苗,用Rv2299c-融合早期分泌抗原靶-6蛋白质促进卡介苗时减少病理并对结核杆菌提供长期保护。尤其,我们确定了在W-Beijing家族中获得的作为病毒性临床菌株的结核杆菌HN878有关的融合蛋白的效果,因为相对抑郁结核杆菌H37Rv,小鼠的卡介苗预防接种对W-Beijing分离提供较少的保护(Lopez et al., 2003)。此分离在感染C57BL/6小鼠中诱发死亡及广

泛的肺病理。

[0160] 我们调查了在小鼠模型中作为高病毒性W-Beijing系统的菌株的结核杆菌HN878菌株有关的Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白疫苗的预想效果。Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白-免疫小鼠根据肺病理和细菌生长进行评价攻击结核杆菌HN878菌株后,实际上对其进行了预防(图10)。Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合预防接种示出显著减少的肺病理,同时在肺中具有显著降低的细菌负担,从而对结核杆菌HN878具有出色的预防。

[0161] 一般情况下,对于结核杆菌感染的疫苗-诱导预防尤其与肺中的Ag-特定多功能 γ 干扰素+肿瘤坏死因子 α +白介素-2+及肿瘤坏死因子 α +白介素-2⁺CD4⁺T细胞有关。重要的是,对于Ag-免疫化的小鼠的检查显示,针对Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白的免疫诱导攻击前及后攻击后肺中的多功能CD4⁺T细胞(图11及12)。基于这种趋势,Rv2299c可作为成功针对结核杆菌感染的疫苗的主要组分。单独卡介苗或不是单独蛋白质的Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合免疫在肺中诱导了Rv2299c-早期分泌抗原靶-6蛋白质特异性多功能CD4⁺T细胞反应。在肌肉注射后诱导肺中的Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合特定多功能T细胞反应的疫苗候选的能力与所观察的预防效果一致。进一步地,通过Rv2299c+早期分泌抗原靶-6融合蛋白免疫化诱导的该反应保持到感染后16周。这表明,识别基本多功能记忆CD4⁺T细胞和结核杆菌感染后急增。这种结果可显示适当保护疫苗候选的重要性,以诱导肺免疫反应预防。

[0162] 总之,我们的结果表明,Rv2299c为多抗原有效结核疫苗的合理性设计的出色的候选。因此,为了调查在鼠或豚鼠模型中Rv2299c+ESAT6融合蛋白的具体的疫苗功效及有效的预防机制,需要进行更多的研究。

[0163] 序列表Free Text

[0164] Rv2299c氨基酸序列

[0165] MNAHVEQLEFQAEARQLLDLMVHSVYSNKDAFLRELISNASDALDKLRIEALRNKDLEVD

[0166] TSDLHIEIDADKAARTLTVRDNGIGMAREEVVDLIGTLAKSGTAELRAQLREAKNAAASE

[0167] ELIGQFGIGFYSSFMVADKVQLLTRKAGESAATRWESSGEGTYTTIESVEDAPQGTSTVLH

[0168] LKPEDAEDDLHDYTSEWKIRNLVKKYSDFIAWPIRMDVERRTPASQEEGGEGEETVTIE

[0169] TETLNSMKALWARPKEEVSEQEYKEFYKHVAHAWDDPLEIIAMKAEGTFEYQALLFIPSH

[0170] APFDLFDRDAHVGIIQLYVKRVFIMGDCDQLMPEYLRVFKGVVDAQDMSLNVSREILQQDR

[0171] QIKAIRRRLTKKVLSTIKDVQSSRPEDYRTFTWTQFGRVLKEGLLSIDNRETLLGISSFV

[0172] STYSEEEPTTLAEYVERMKDGGQQQIFYATGETRQQLLKSPHLEAFKAKGYEVLLLLTDPVD

[0173] EVWGMVPEFDGKPLQSVAKGEVDLSSEEDTSEAEREERQKEFADLLTWLQETLSDHVKE

[0174] VRLSTRLTESPACLITDAFGMTPALARIYRASGQEVVPGKRILELNPSHPLVTGLRQAHQ

[0175] DRADDAEKSLAETAELLYGTALLAEGGALEDPARFAELLAERLARTL。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 丘拉提斯股份有限公司(Quratis Inc.)
[0003]	<120> 包含融合Rv2299c和早期分泌抗原靶-6的蛋白质的树突状细胞成熟化促进用组合物
[0004]	<130> QURATIS1-6P
[0005]	<150> KR 2016-0070517
[0006]	<151> 2016-06-07
[0007]	<160> 5
[0008]	<170> SIPOSequenceListing 1.0
[0009]	<210> 1
[0010]	<211> 647
[0011]	<212> PRT
[0012]	<213> Artificial Sequence
[0013]	<220>
[0014]	<221> UNSURE
[0015]	<223> Rv2299c
[0016]	<400> 1
[0017]	Met Asn Ala His Val Glu Gln Leu Glu Phe Gln Ala Glu Ala Arg Gln
[0018]	1 5 10 15
[0019]	Leu Leu Asp Leu Met Val His Ser Val Tyr Ser Asn Lys Asp Ala Phe
[0020]	20 25 30
[0021]	Leu Arg Glu Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Leu Asp Lys Leu Arg
[0022]	35 40 45
[0023]	Ile Glu Ala Leu Arg Asn Lys Asp Leu Glu Val Asp Thr Ser Asp Leu
[0024]	50 55 60
[0025]	His Ile Glu Ile Asp Ala Asp Lys Ala Ala Arg Thr Leu Thr Val Arg
[0026]	65 70 75 80
[0027]	Asp Asn Gly Ile Gly Met Ala Arg Glu Glu Val Val Asp Leu Ile Gly
[0028]	85 90 95
[0029]	Thr Leu Ala Lys Ser Gly Thr Ala Glu Leu Arg Ala Gln Leu Arg Glu
[0030]	100 105 110
[0031]	Ala Lys Asn Ala Ala Ala Ser Glu Glu Leu Ile Gly Gln Phe Gly Ile
[0032]	115 120 125
[0033]	Gly Phe Tyr Ser Ser Phe Met Val Ala Asp Lys Val Gln Leu Leu Thr
[0034]	130 135 140
[0035]	Arg Lys Ala Gly Glu Ser Ala Ala Thr Arg Trp Glu Ser Ser Gly Glu
[0036]	145 150 155 160
[0037]	Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Ser Val Glu Asp Ala Pro Gln Gly Thr Ser

[0038]		165		170		175
[0039]	Val Thr Leu His Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu Asp Asp Leu His Asp					
[0040]		180		185		190
[0041]	Tyr Thr Ser Glu Trp Lys Ile Arg Asn Leu Val Lys Lys Tyr Ser Asp					
[0042]		195		200		205
[0043]	Phe Ile Ala Trp Pro Ile Arg Met Asp Val Glu Arg Arg Thr Pro Ala					
[0044]		210		215		220
[0045]	Ser Gln Glu Glu Gly Gly Glu Gly Gly Glu Glu Thr Val Thr Ile Glu					
[0046]	225		230		235	240
[0047]	Thr Glu Thr Leu Asn Ser Met Lys Ala Leu Trp Ala Arg Pro Lys Glu					
[0048]		245		250		255
[0049]	Glu Val Ser Glu Gln Glu Tyr Lys Glu Phe Tyr Lys His Val Ala His					
[0050]		260		265		270
[0051]	Ala Trp Asp Asp Pro Leu Glu Ile Ile Ala Met Lys Ala Glu Gly Thr					
[0052]		275		280		285
[0053]	Phe Glu Tyr Gln Ala Leu Leu Phe Ile Pro Ser His Ala Pro Phe Asp					
[0054]		290		295		300
[0055]	Leu Phe Asp Arg Asp Ala His Val Gly Ile Gln Leu Tyr Val Lys Arg					
[0056]	305		310		315	320
[0057]	Val Phe Ile Met Gly Asp Cys Asp Gln Leu Met Pro Glu Tyr Leu Arg					
[0058]		325		330		335
[0059]	Phe Val Lys Gly Val Val Asp Ala Gln Asp Met Ser Leu Asn Val Ser					
[0060]		340		345		350
[0061]	Arg Glu Ile Leu Gln Gln Asp Arg Gln Ile Lys Ala Ile Arg Arg Arg					
[0062]		355		360		365
[0063]	Leu Thr Lys Lys Val Leu Ser Thr Ile Lys Asp Val Gln Ser Ser Arg					
[0064]		370		375		380
[0065]	Pro Glu Asp Tyr Arg Thr Phe Trp Thr Gln Phe Gly Arg Val Leu Lys					
[0066]	385		390		395	400
[0067]	Glu Gly Leu Leu Ser Asp Ile Asp Asn Arg Glu Thr Leu Leu Gly Ile					
[0068]		405		410		415
[0069]	Ser Ser Phe Val Ser Thr Tyr Ser Glu Glu Glu Pro Thr Thr Leu Ala					
[0070]		420		425		430
[0071]	Glu Tyr Val Glu Arg Met Lys Asp Gly Gln Gln Gln Ile Phe Tyr Ala					
[0072]		435		440		445
[0073]	Thr Gly Glu Thr Arg Gln Gln Leu Leu Lys Ser Pro His Leu Glu Ala					
[0074]		450		455		460
[0075]	Phe Lys Ala Lys Gly Tyr Glu Val Leu Leu Leu Thr Asp Pro Val Asp					
[0076]	465		470		475	480

[0077]	Glu Val Trp Val Gly Met Val Pro Glu Phe Asp Gly Lys Pro Leu Gln
[0078]	485 490 495
[0079]	Ser Val Ala Lys Gly Glu Val Asp Leu Ser Ser Glu Glu Asp Thr Ser
[0080]	500 505 510
[0081]	Glu Ala Glu Arg Glu Glu Arg Gln Lys Glu Phe Ala Asp Leu Leu Thr
[0082]	515 520 525
[0083]	Trp Leu Gln Glu Thr Leu Ser Asp His Val Lys Glu Val Arg Leu Ser
[0084]	530 535 540
[0085]	Thr Arg Leu Thr Glu Ser Pro Ala Cys Leu Ile Thr Asp Ala Phe Gly
[0086]	545 550 555 560
[0087]	Met Thr Pro Ala Leu Ala Arg Ile Tyr Arg Ala Ser Gly Gln Glu Val
[0088]	565 570 575
[0089]	Pro Val Gly Lys Arg Ile Leu Glu Leu Asn Pro Ser His Pro Leu Val
[0090]	580 585 590
[0091]	Thr Gly Leu Arg Gln Ala His Gln Asp Arg Ala Asp Asp Ala Glu Lys
[0092]	595 600 605
[0093]	Ser Leu Ala Glu Thr Ala Glu Leu Leu Tyr Gly Thr Ala Leu Leu Ala
[0094]	610 615 620
[0095]	Glu Gly Gly Ala Leu Glu Asp Pro Ala Arg Phe Ala Glu Leu Leu Ala
[0096]	625 630 635 640
[0097]	Glu Arg Leu Ala Arg Thr Leu
[0098]	645
[0099]	<210> 2
[0100]	<211> 27
[0101]	<212> DNA
[0102]	<213> Artificial Sequence
[0103]	<220>
[0104]	<221> unsure
[0105]	<223> Rv2299c forward primer
[0106]	<400> 2
[0107]	catatgaacg cccatgtcga gcagttg 27
[0108]	<210> 3
[0109]	<211> 29
[0110]	<212> DNA
[0111]	<213> Artificial Sequence
[0112]	<220>
[0113]	<221> unsure
[0114]	<223> Rv2299c reverse primer
[0115]	<400> 3

[0116]	gaattcggca aggtacgcgc gagacgttc 29
[0117]	<210> 4
[0118]	<211> 27
[0119]	<212> DNA
[0120]	<213> Artificial Sequence
[0121]	<220>
[0122]	<221> unsure
[0123]	<223> ESAT-6 forward primer
[0124]	<400> 4
[0125]	aagcttatga cagagcagca gtggaat 27
[0126]	<210> 5
[0127]	<211> 27
[0128]	<212> DNA
[0129]	<213> Artificial Sequence
[0130]	<220>
[0131]	<221> unsure
[0132]	<223> ESAT-6 reverse primer
[0133]	<400> 5
[0134]	ctcgagtgcg aacatcccag tgacgtt 27

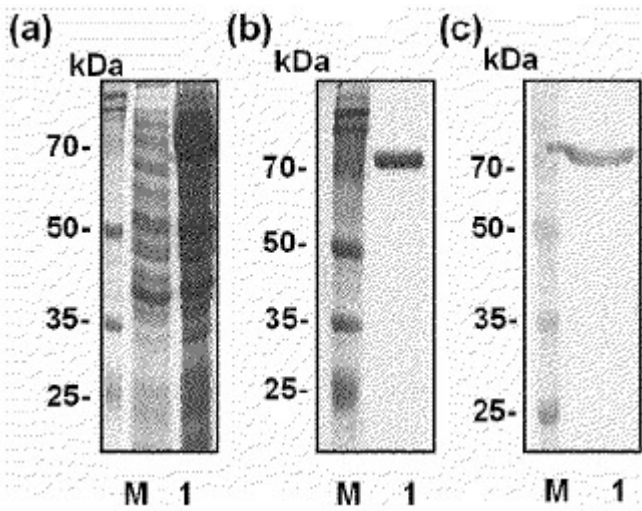


图1a

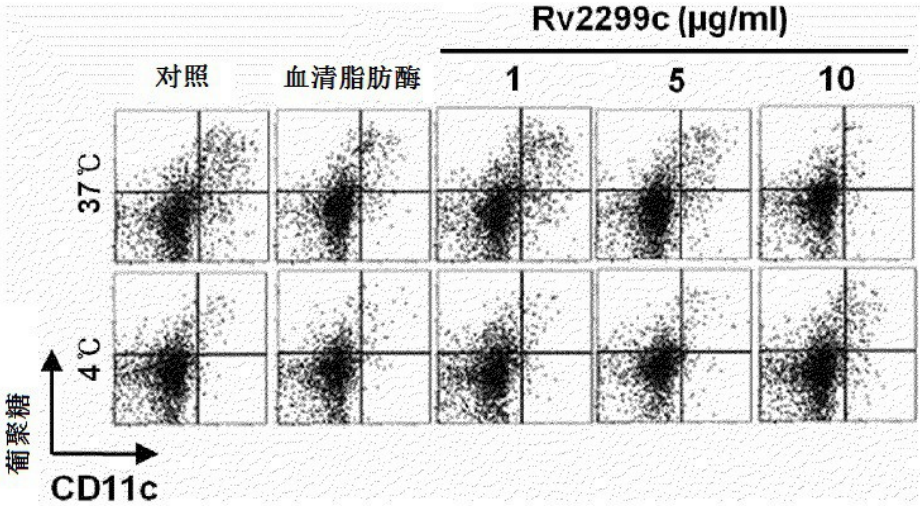


图1b

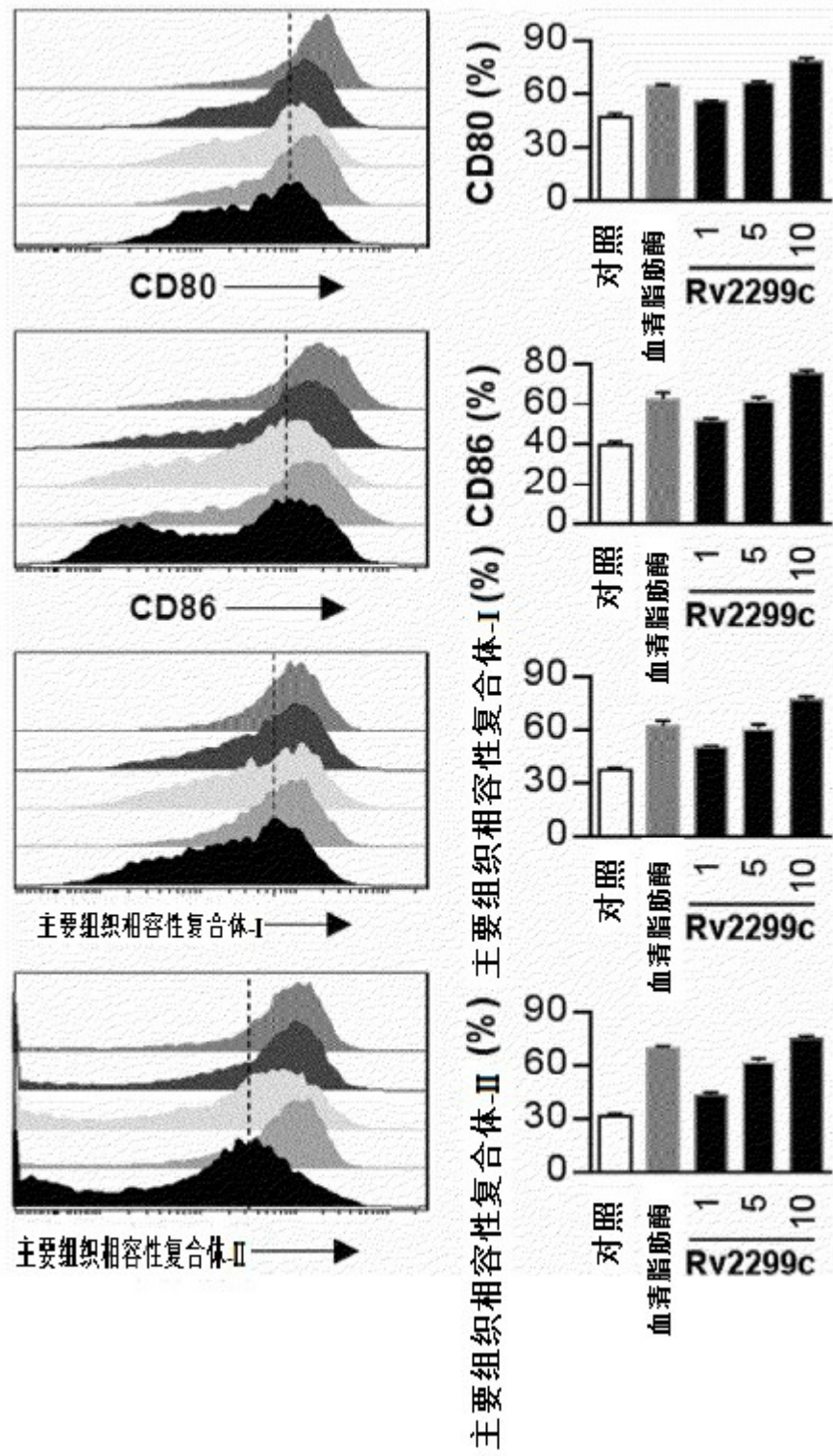


图1c

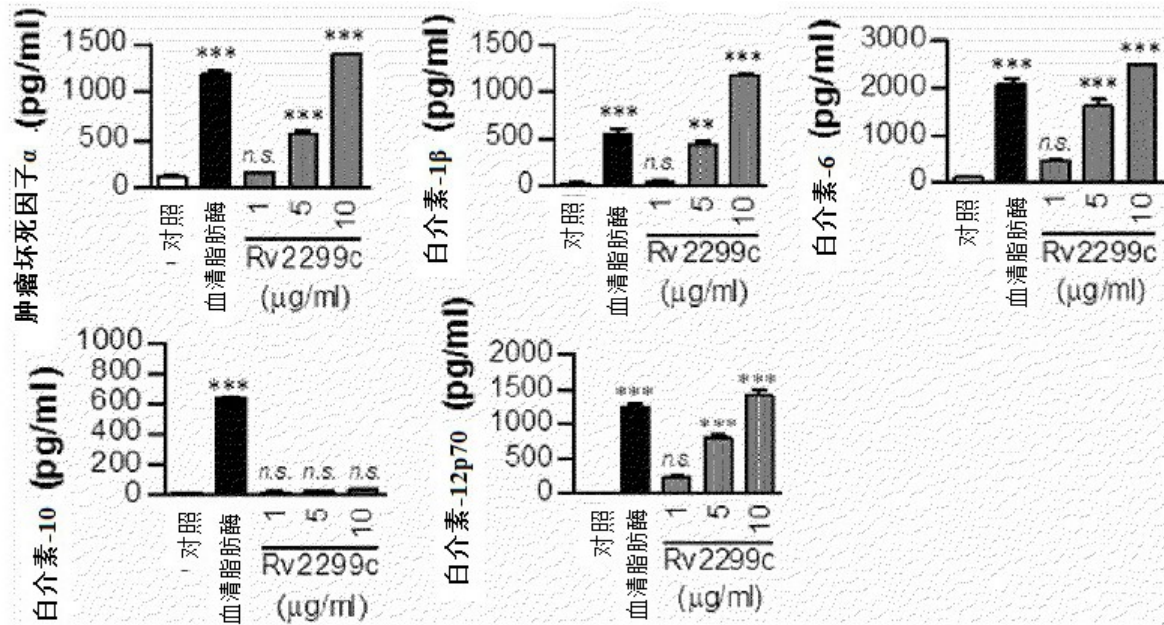


图1d

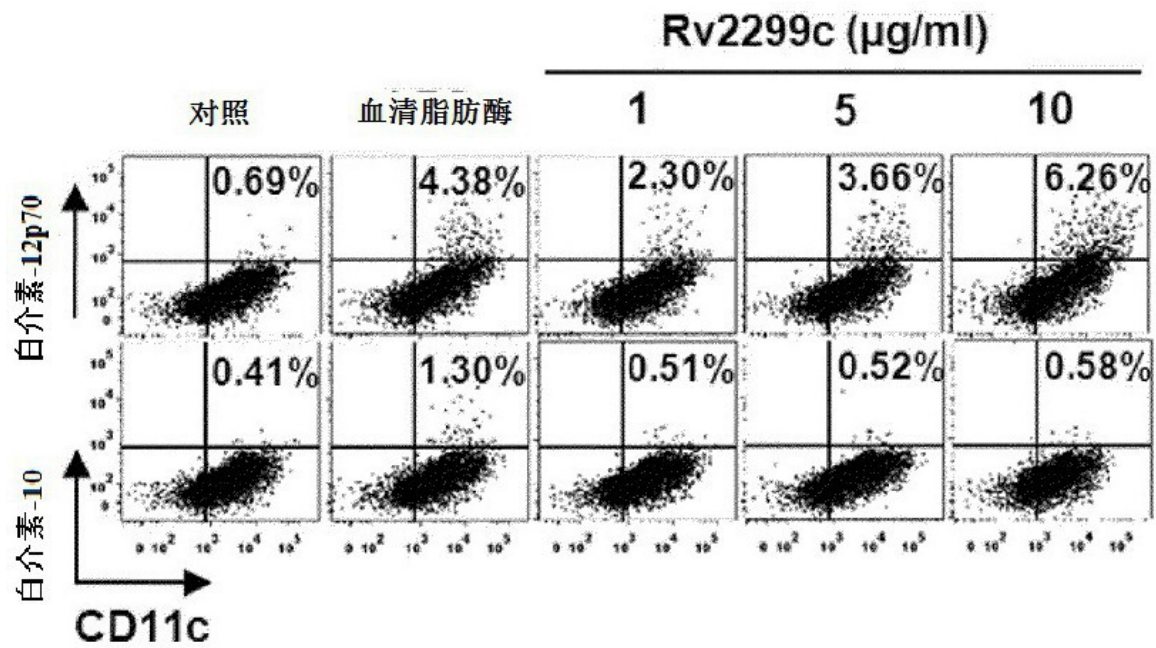


图1e

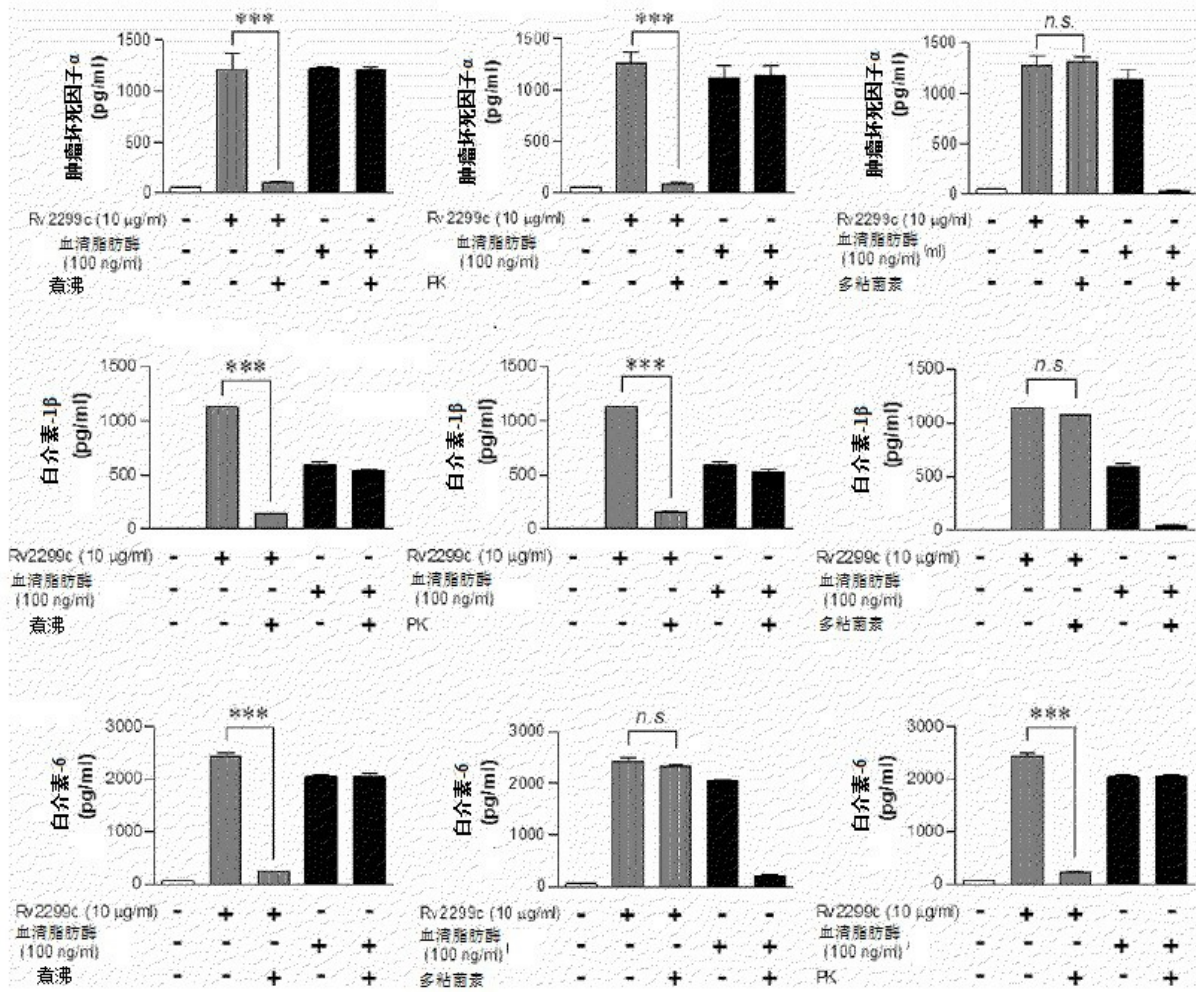


图2

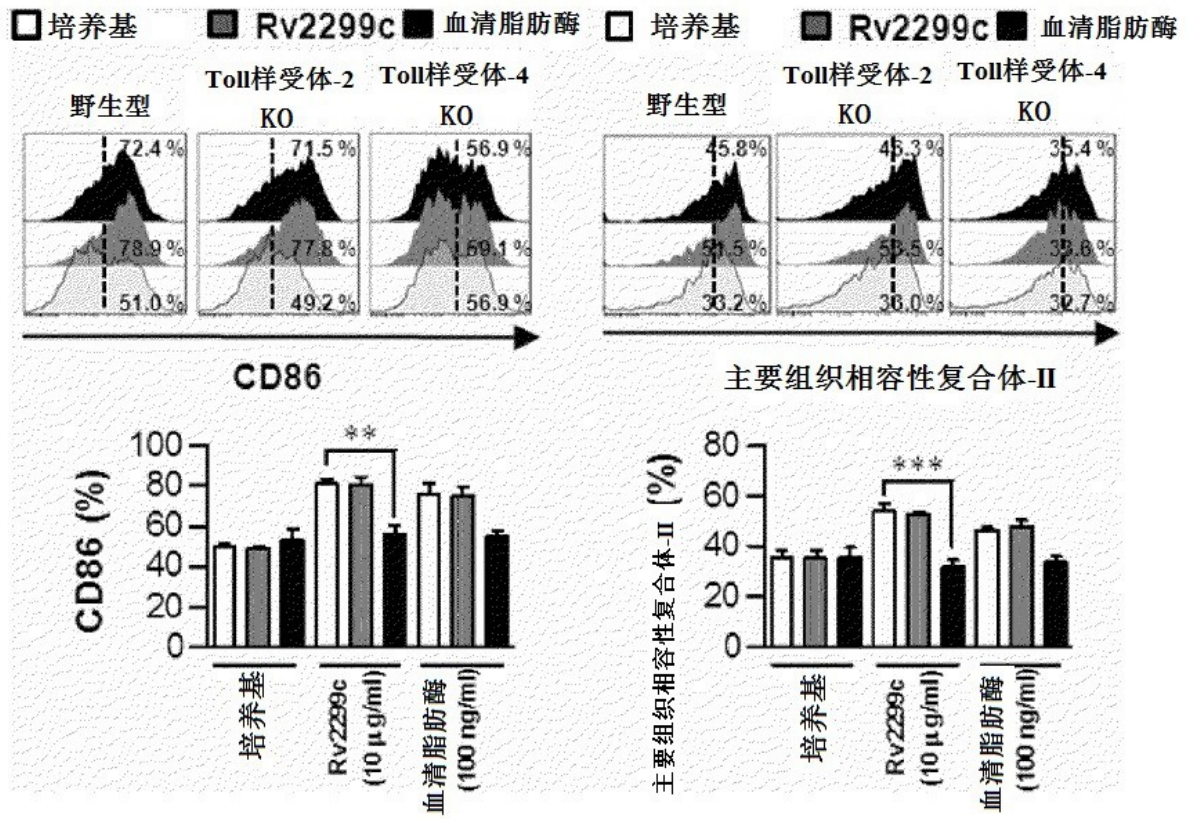


图3a

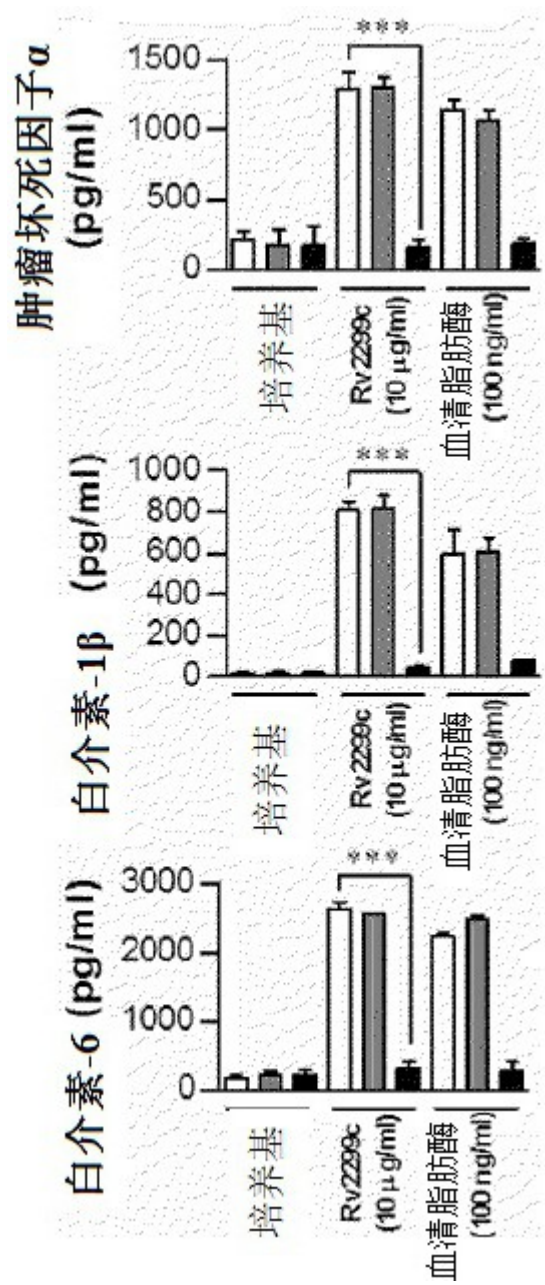


图3b

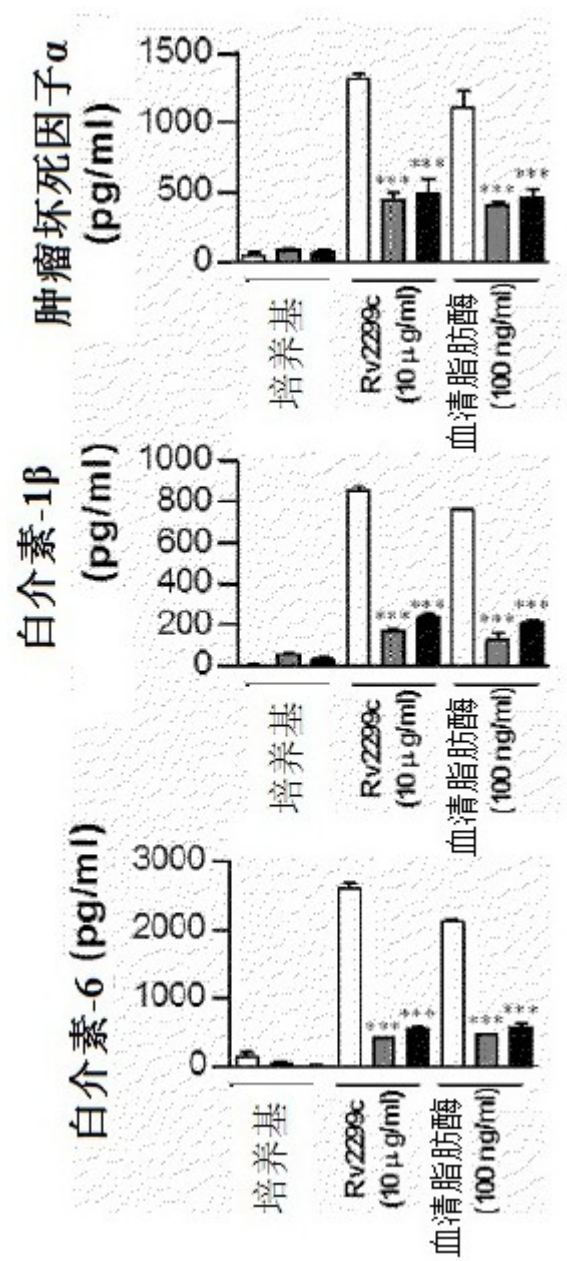


图3c

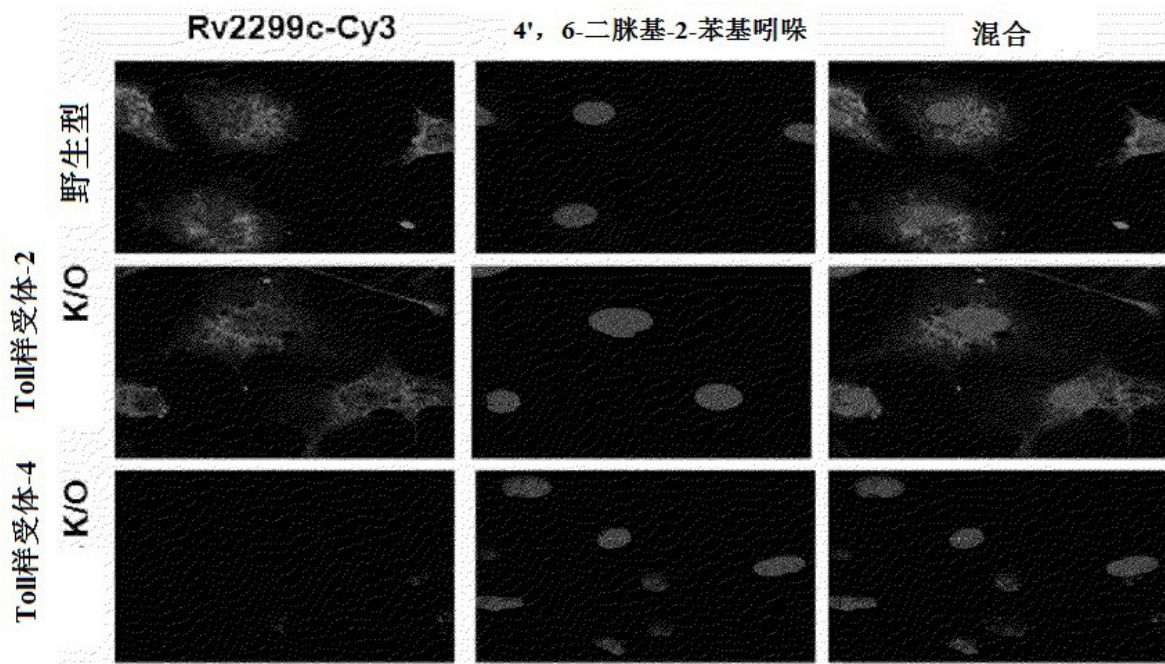


图3d

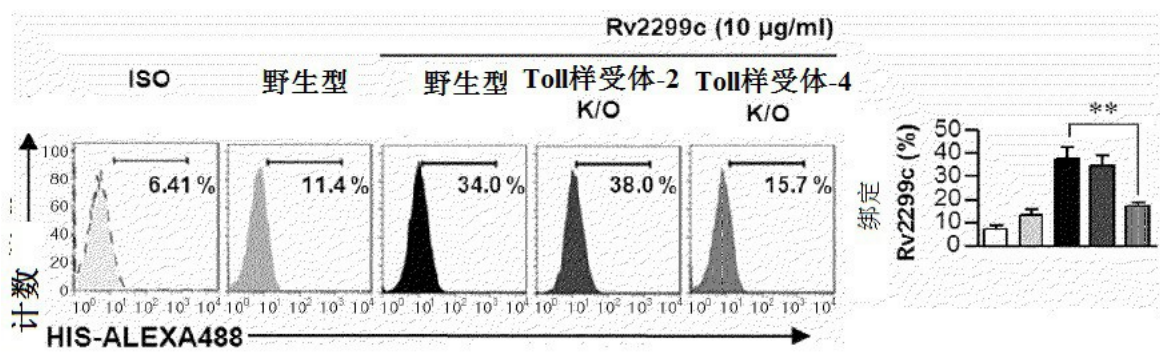


图3e

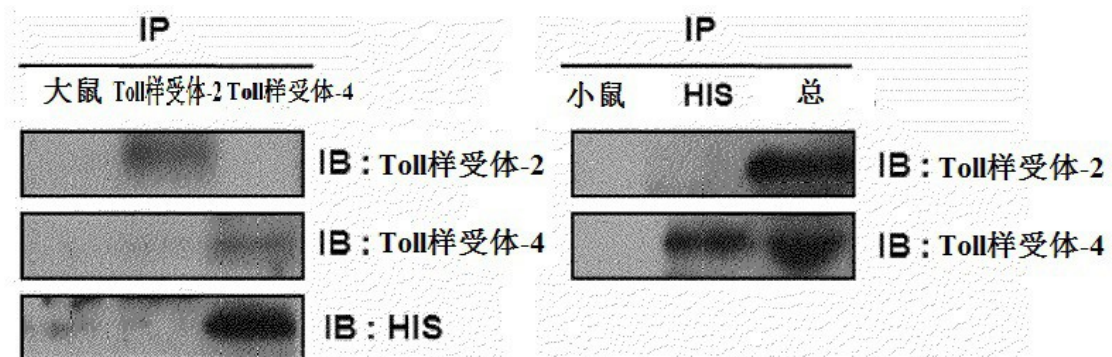


图3f

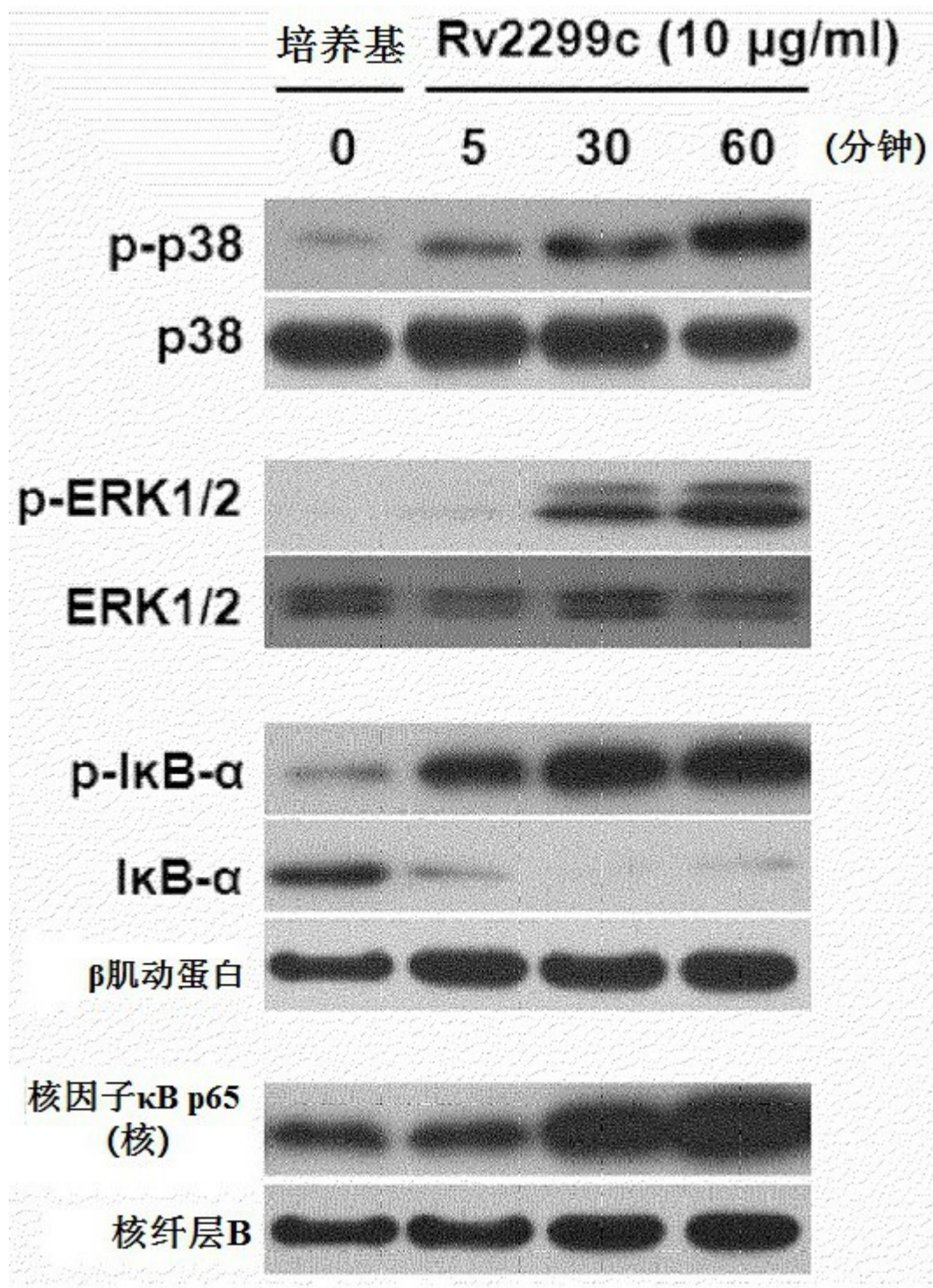


图4a

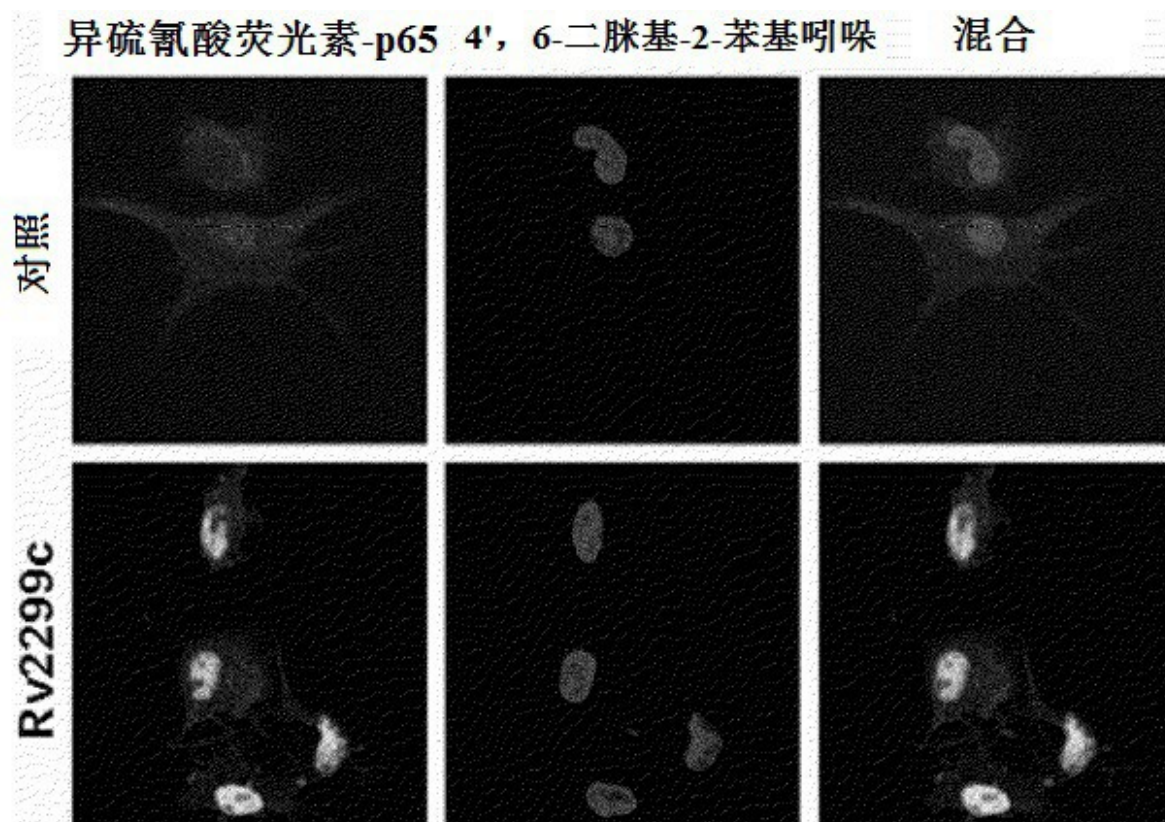


图4b

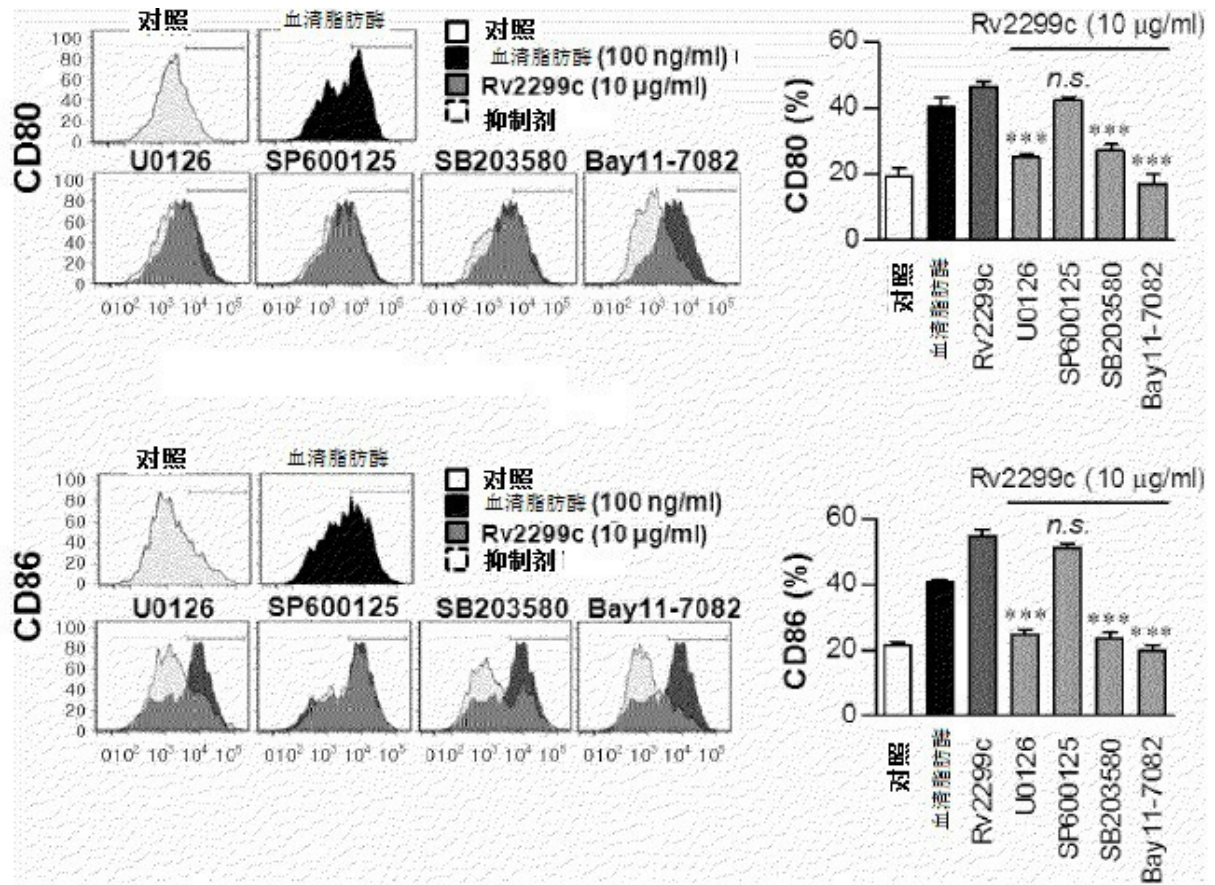


图4c

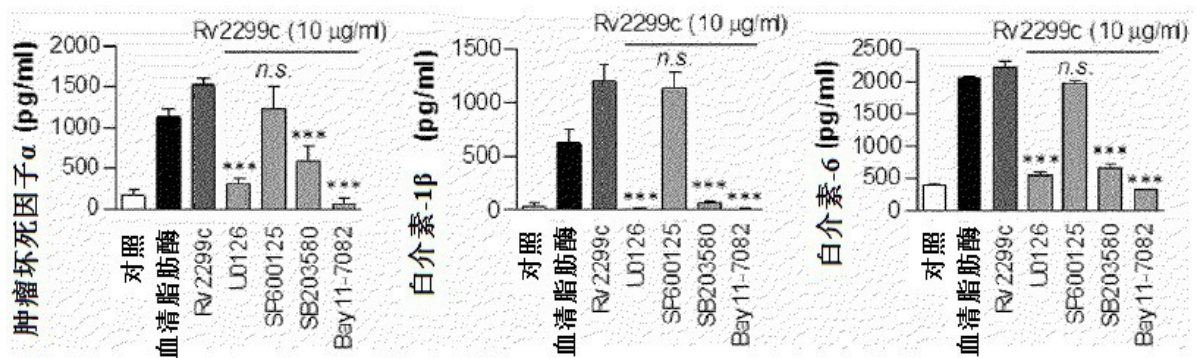


图4d

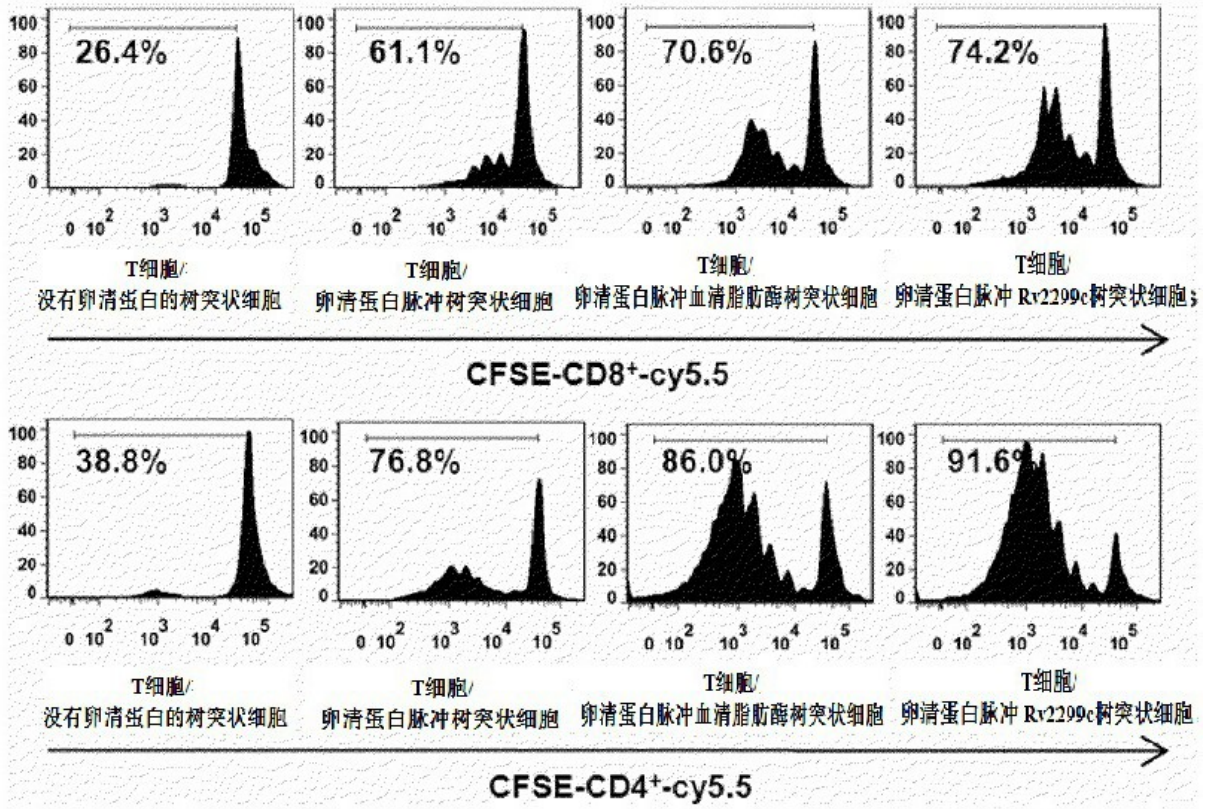


图5a

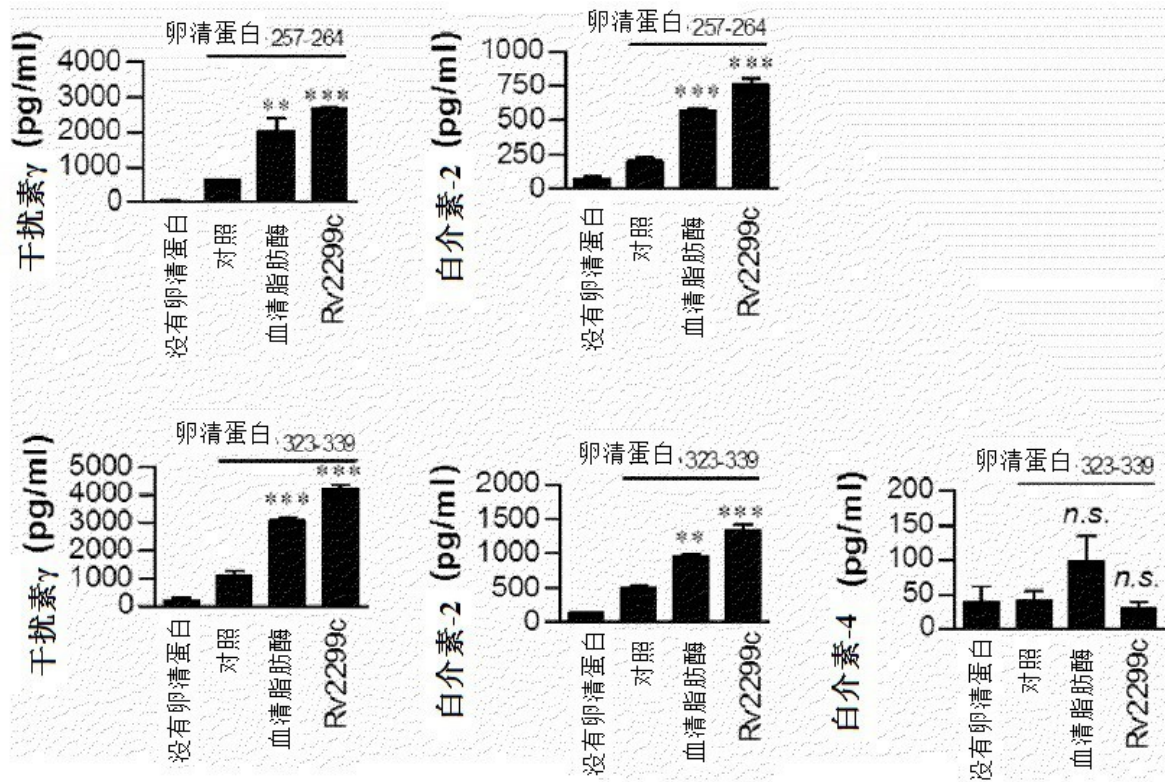


图5b

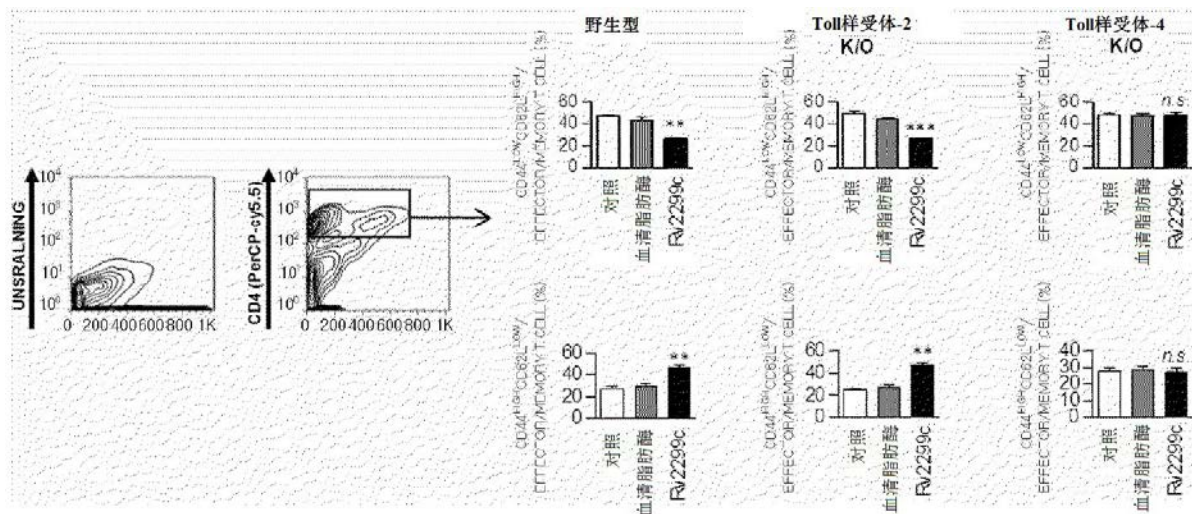


图6a

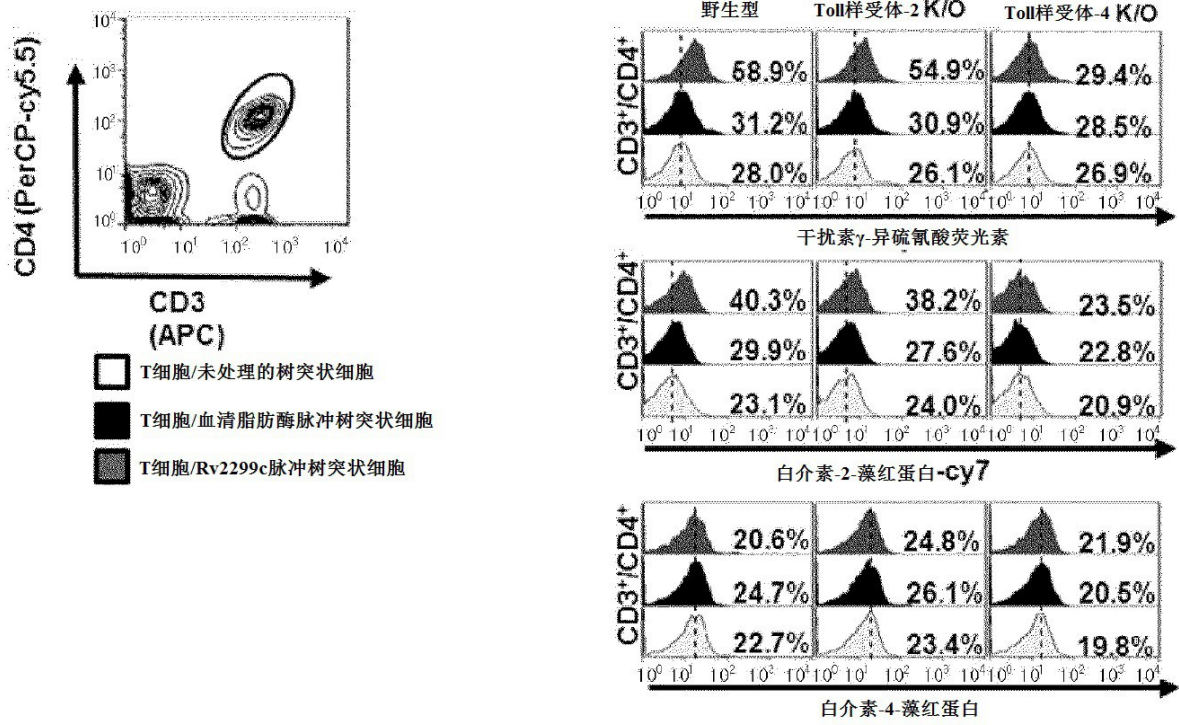


图6b

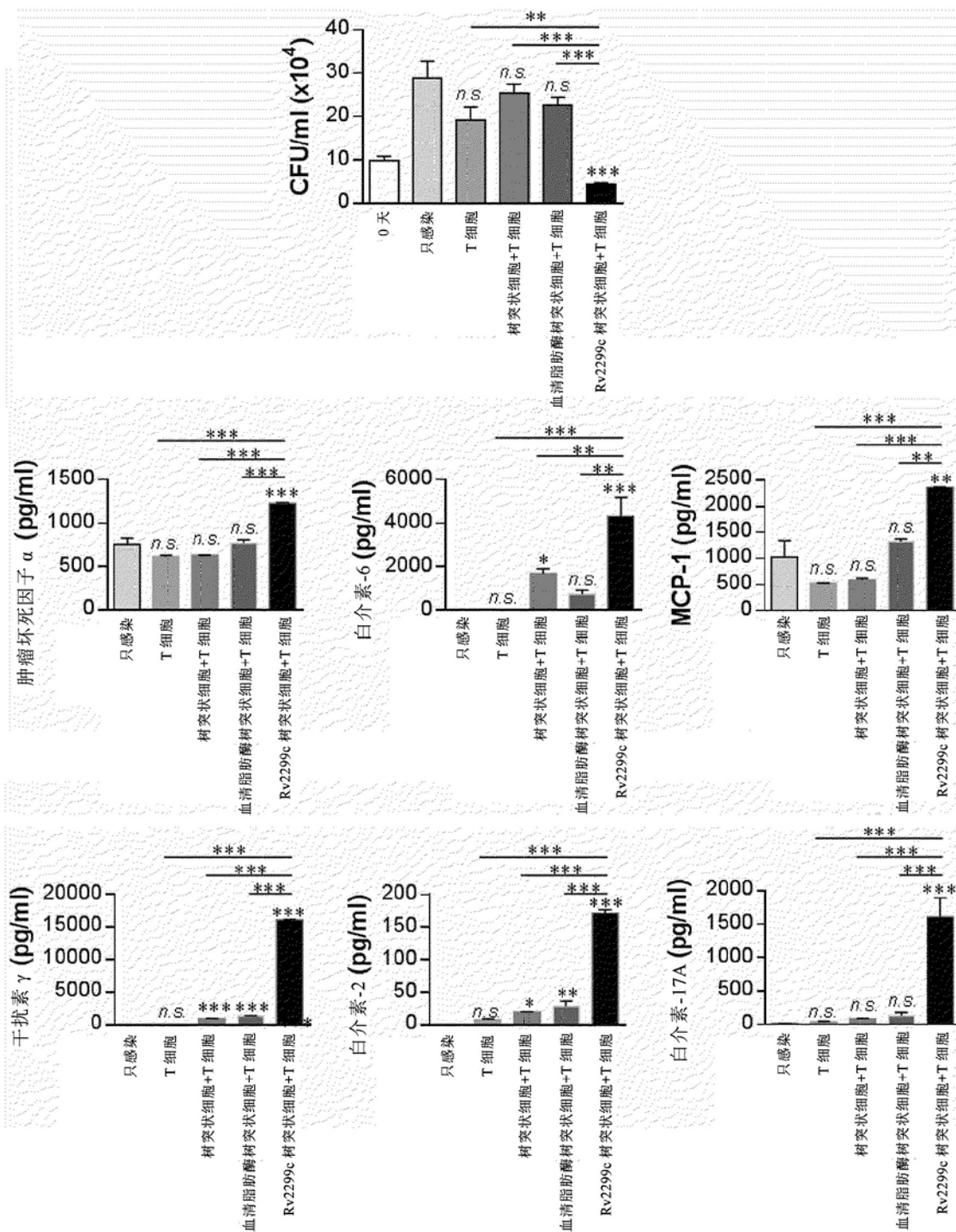


图7

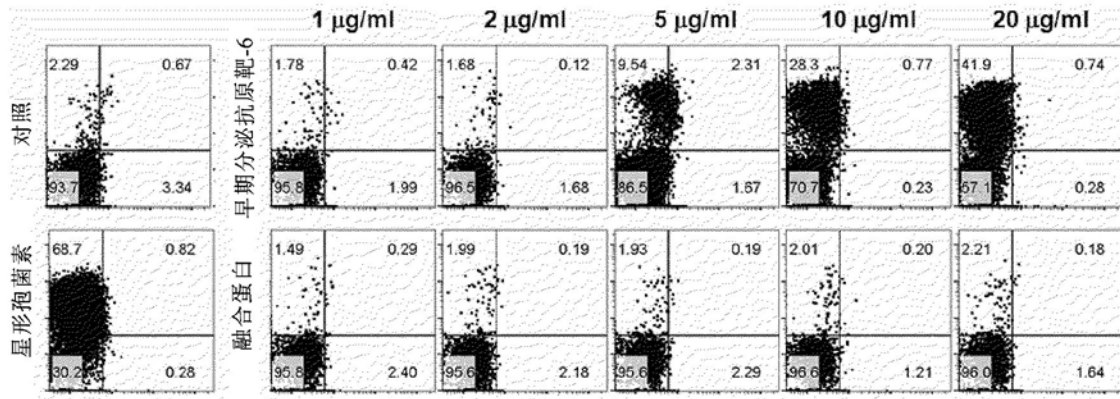


图8a

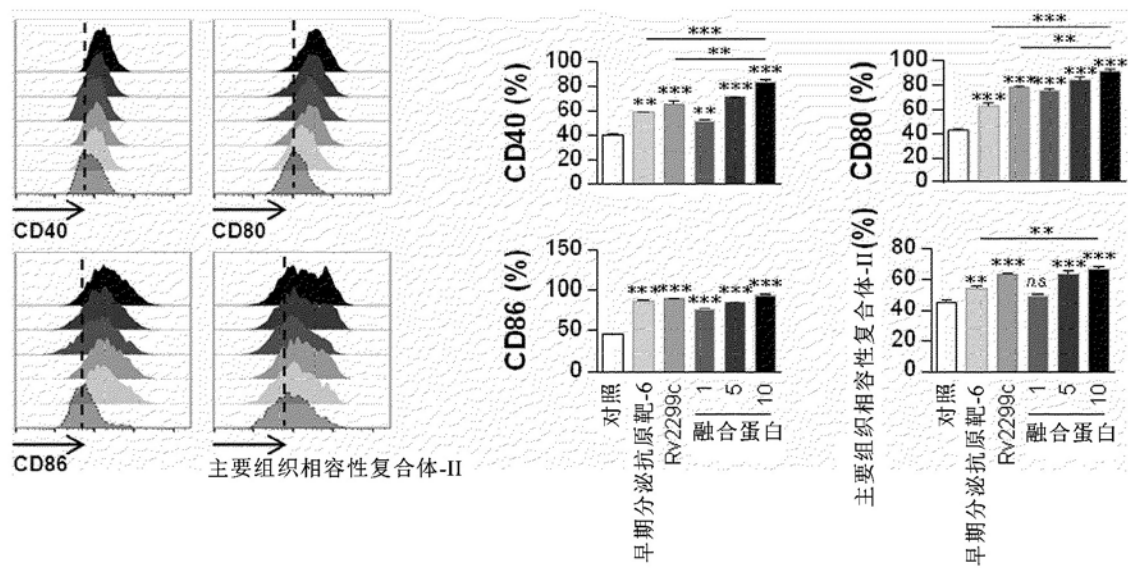


图8b

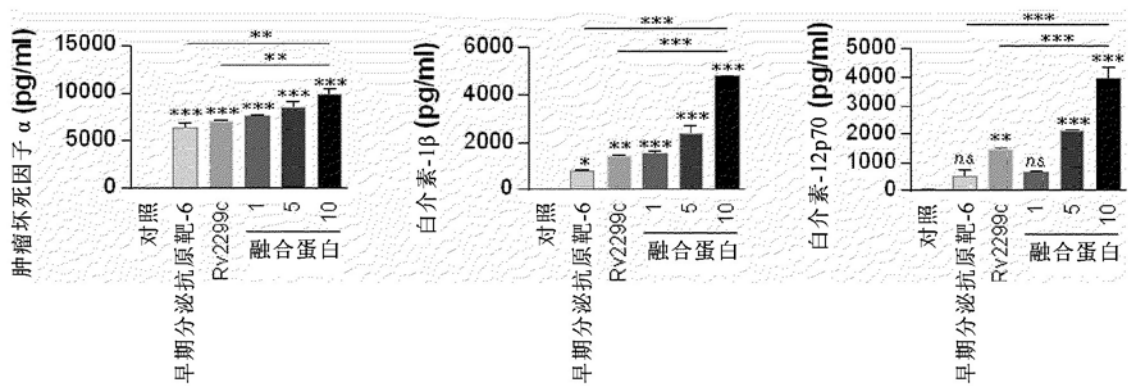


图8c

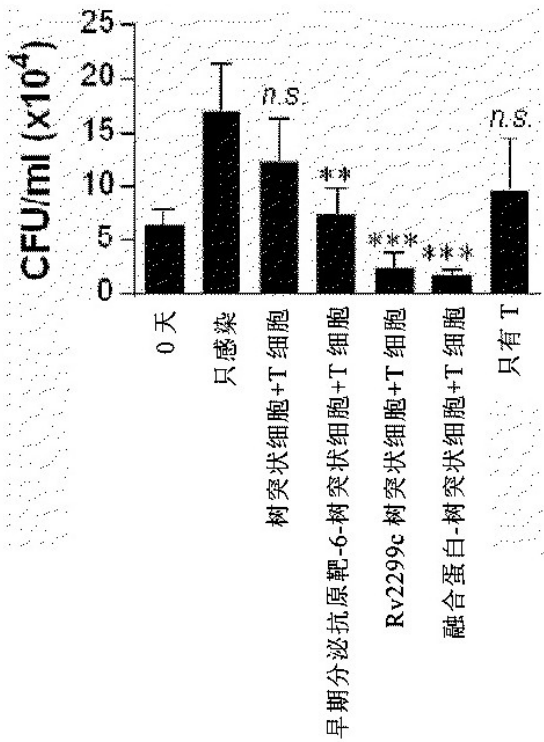


图9a

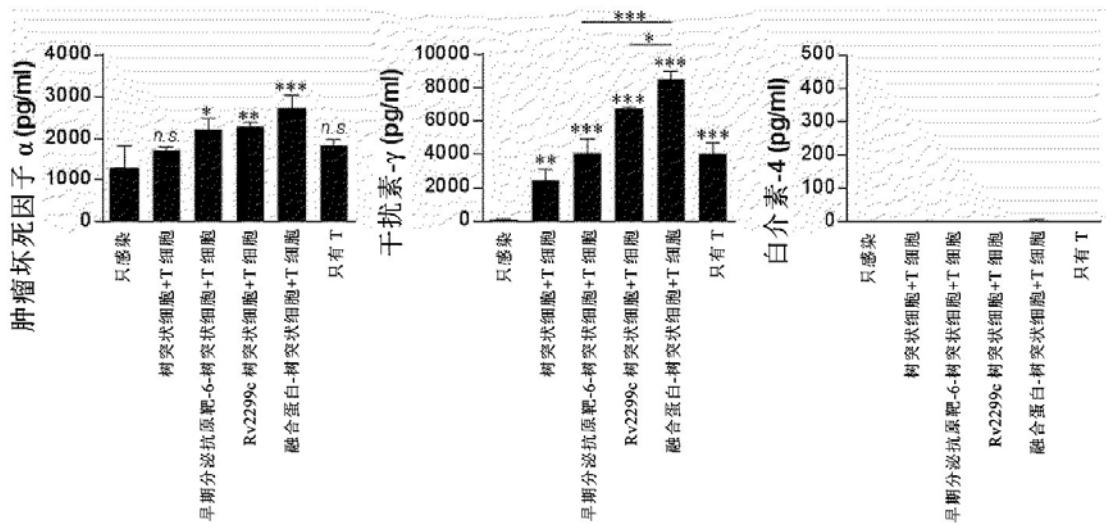


图9b

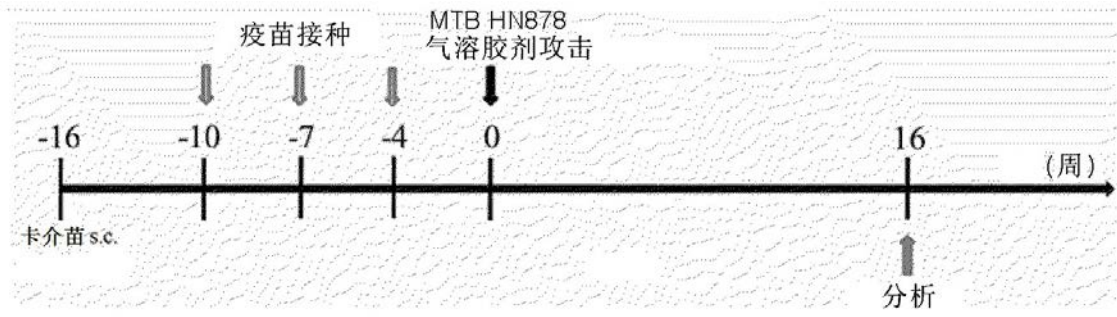


图10a

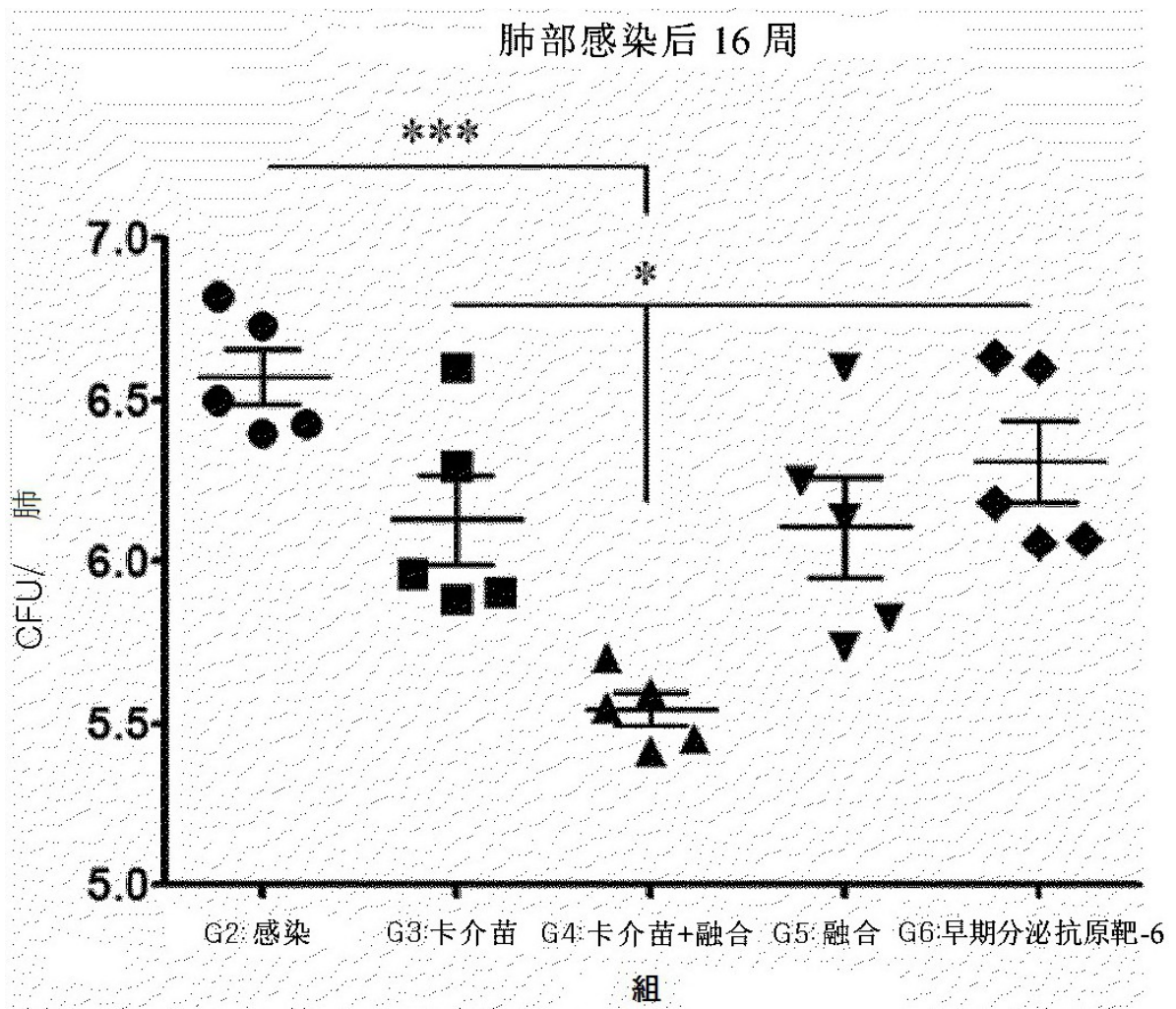


图10b

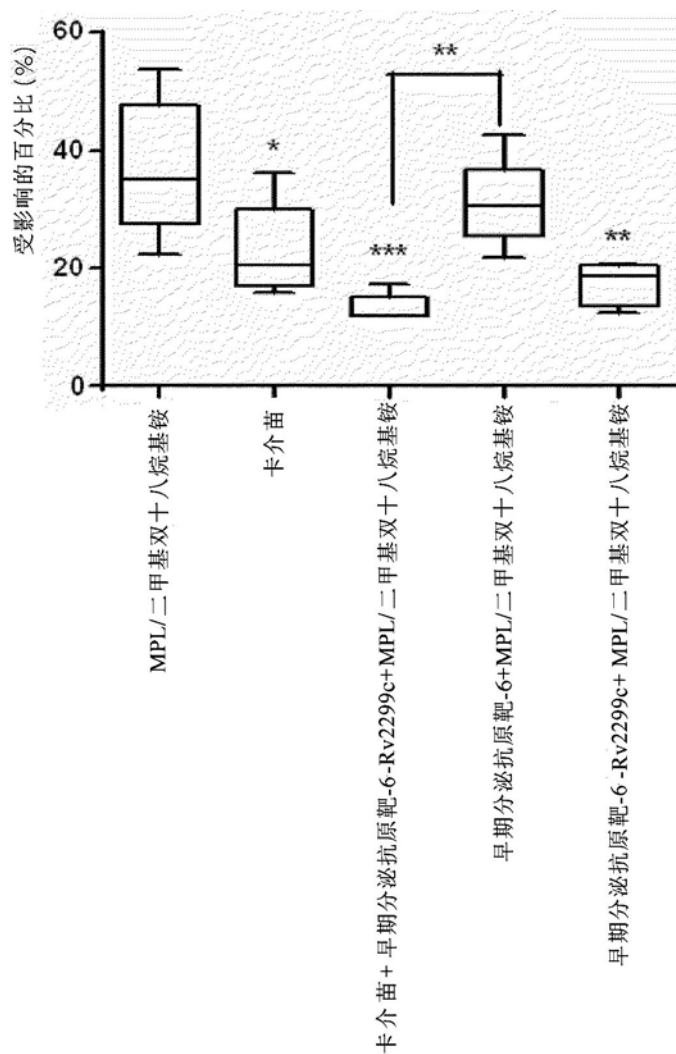


图10c

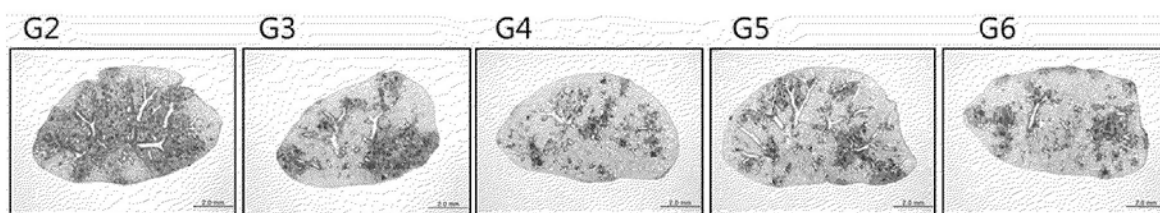


图10d

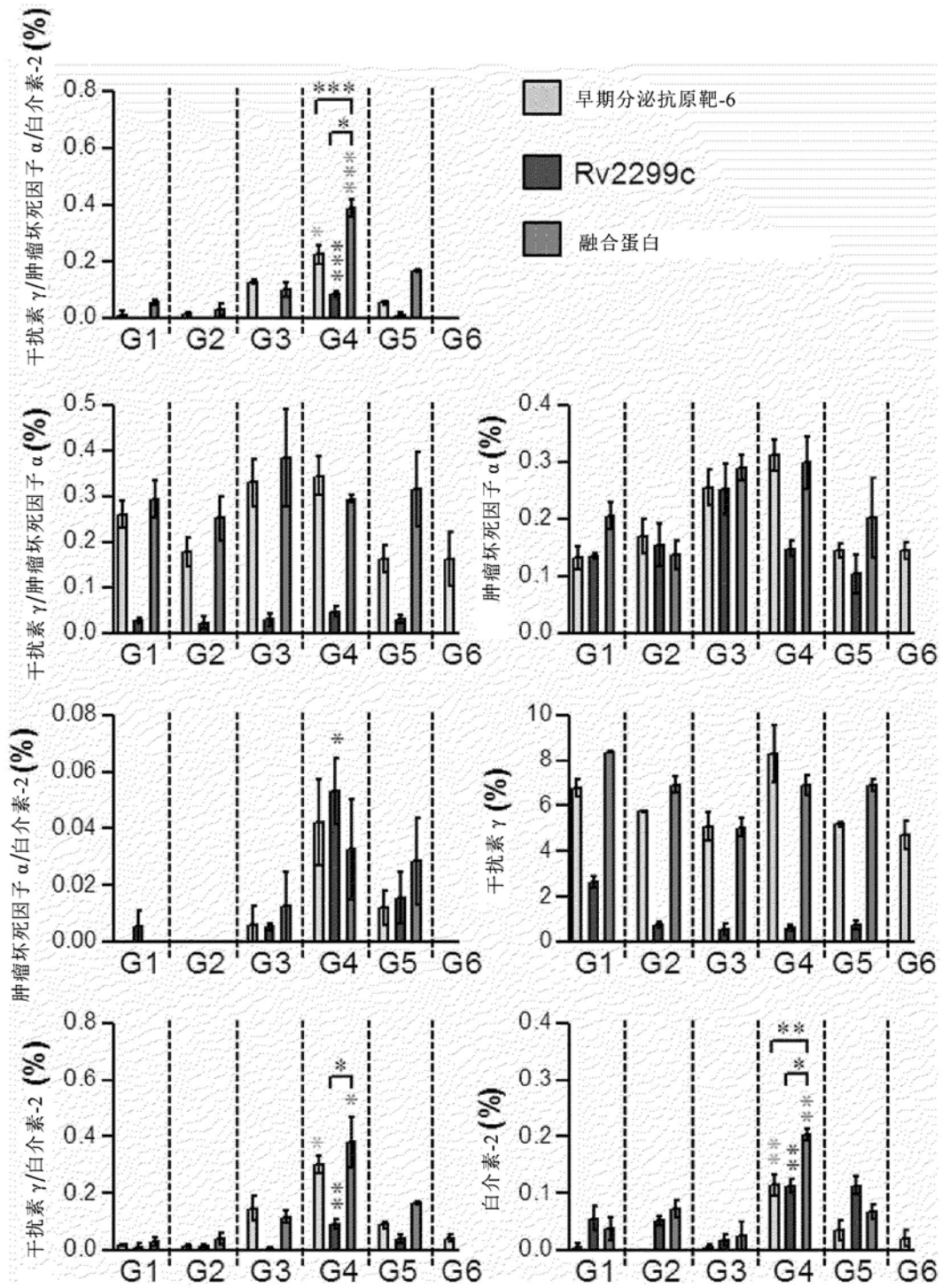


图11a

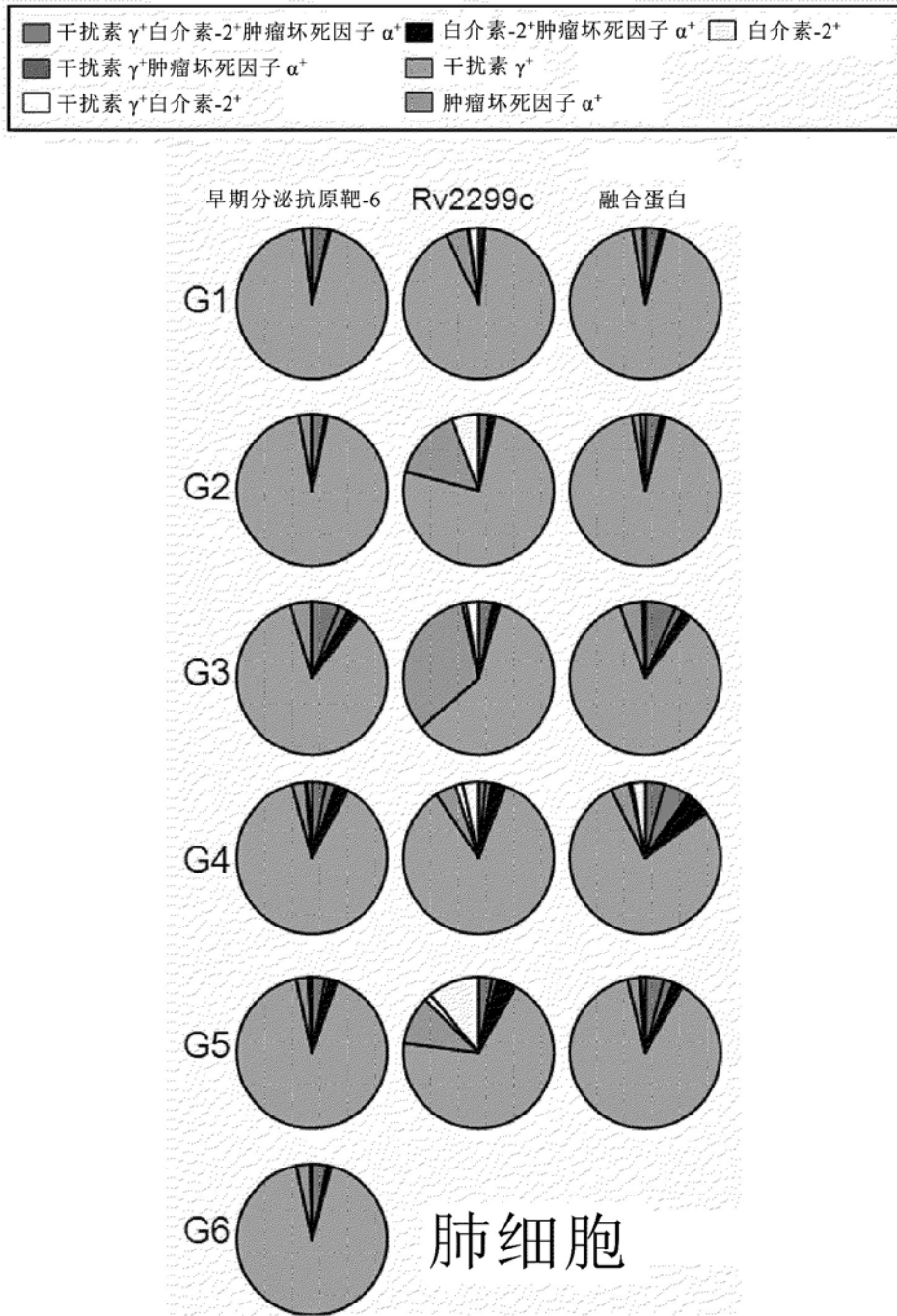


图11b

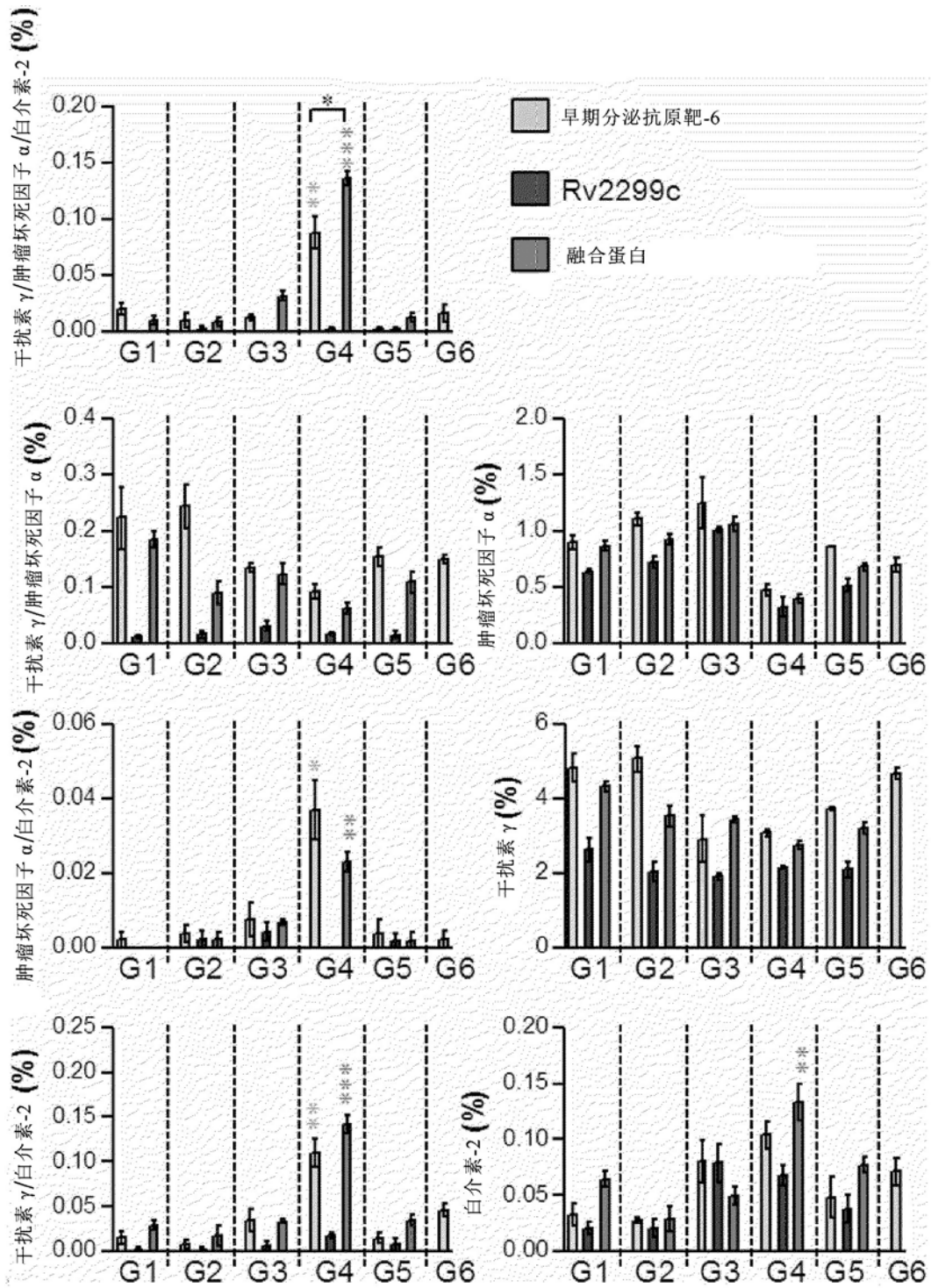


图12a

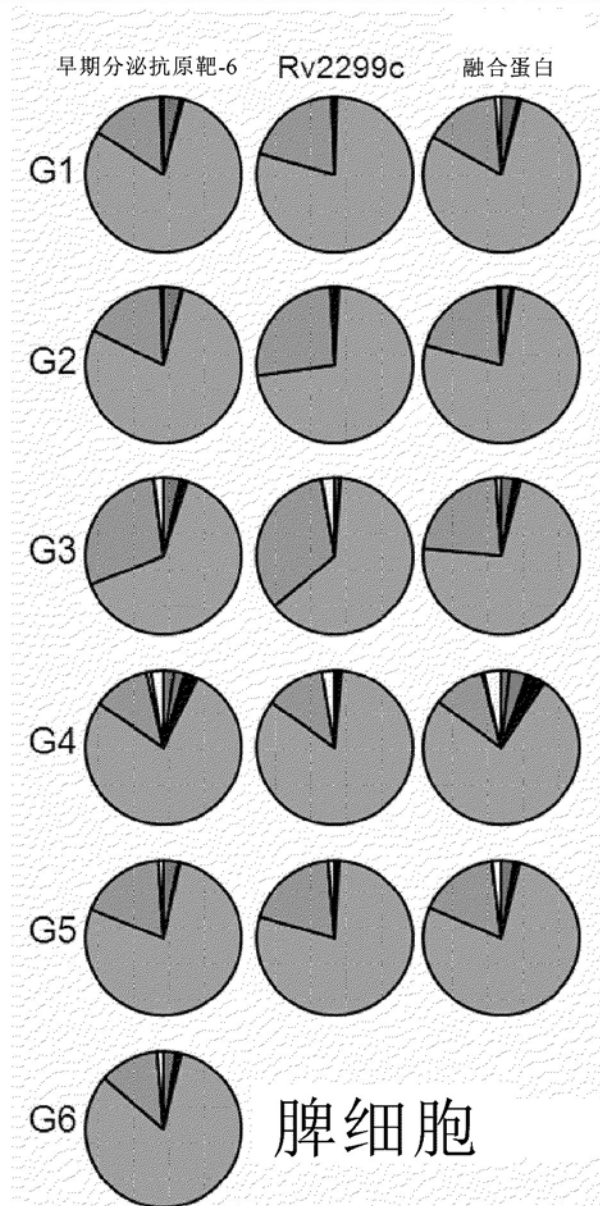
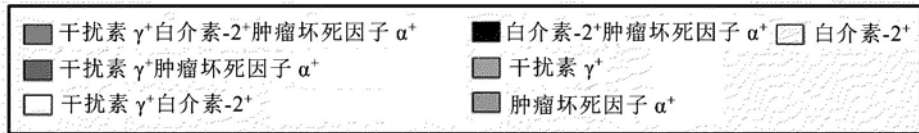


图12b