



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104508120 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201280073116. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 04. 16

C12N 1/21(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2014. 11. 11

C12N 15/62(2006. 01)

C07K 19/00(2006. 01)

C12P 21/00(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/033757 2012. 04. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/158061 EN 2013. 10. 24

(71) 申请人 AERAS 全球 TB 疫苗基金会

地址 美国马里兰州

申请人 法国国家健康与医学研究院

(72) 发明人 约翰·富尔克森 迈克尔·布伦南

卡马拉坎南·韦尔穆鲁甘

卡米耶·洛赫特

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 余刚 张英

权利要求书3页 说明书18页

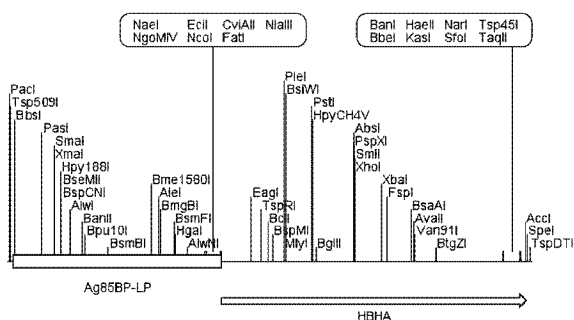
序列表5页 附图10页

(54) 发明名称

编码肝素结合血凝素 (HBHA) 融合蛋白质的
重组分枝杆菌和其用途

(57) 摘要

本发明提供含有编码肝素结合血凝素 (HBHA) 融合蛋白质的序列的重组分枝杆菌 (rMyc), 以及制造和使用 rMyc 和融合蛋白质的方法。融合蛋白质包含氨基末端分枝杆菌抗原 Ag85B 前导肽并且融合蛋白质的转录由 Ag85B 启动子序列驱动。重组融合蛋白质由 rMyc 大量产生、翻译后甲基化, 并且具有高度抗原性。



1. 一种分枝杆菌,其包含编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质或其抗原性片段的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列,其中所述融合序列可操作地连接至启动子。

2. 如权利要求 1 所述的分枝杆菌,其中所述分枝杆菌选自自由以下组成的组:结核分枝杆菌、牛分枝杆菌和耻垢分枝杆菌。

3. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的分枝杆菌,其中所述分枝杆菌是牛分枝杆菌(卡介苗)(BCG)。

4. 如权利要求 3 所述的分枝杆菌,其中所述 BCG 是 BCG 丹麦国立血清研究所 (SSI) 菌株。

5. 如权利要求 4 所述的分枝杆菌,其中所述 BCG SSI 菌株表达 pfo 基因。

6. 如权利要求 5 所述的分枝杆菌,其中所述 pfo 基因是来自产气荚膜梭菌的 pfo 基因。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的分枝杆菌,其中所述分枝杆菌是营养缺陷型。

8. 如权利要求 7 所述的分枝杆菌,其中所述分枝杆菌是泛酸营养缺陷型。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的分枝杆菌,其中所述核酸融合序列包含与 SEQ ID NO :1 至少 90%同源的核苷酸序列。

10. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的分枝杆菌,其中由所述核酸融合序列编码的多肽包含与 SEQ ID NO :3 至少 90%相同的氨基酸序列。

11. 如权利要求 1 至 10 中任一项所述的分枝杆菌,其中所述分枝杆菌 HBHA 蛋白质是结核分枝杆菌 HBHA。

12. 如权利要求 1 至 11 中任一项所述的分枝杆菌,其中所述启动子是分枝杆菌 Ag85B 启动子

13. 一种分离的核酸分子,其包含与 SEQ ID NO :1 至少 90%同源的核苷酸序列。

14. 一种融合蛋白质,其包括

连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质或其抗原性片段的氨基末端的 Ag85B 前导序列。

15. 如权利要求 14 所述的融合蛋白质,其中所述融合蛋白质包含与 SEQ ID NO :3 至少 90%相同的氨基酸序列。

16. 如权利要求 14 或权利要求 15 所述的融合蛋白质,其中所述融合蛋白质经过了甲基化。

17. 一种产生融合蛋白质的方法,所述融合蛋白质包含连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质或其抗原性片段的氨基末端的 Ag85B 前导序列,所述方法包括:

用编码所述融合蛋白质的核酸序列转染分枝杆菌细胞;以及

使所述转染的分枝杆菌细胞在允许所述分枝杆菌细胞产生所述融合蛋白质的条件下生长。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其进一步包括获得所述融合蛋白质。

19. 如权利要求 17 或 18 所述的方法,其中所述转染步骤经由电穿孔来执行。

20. 一种确定受试者是否患有潜伏结核病感染的方法,其包括:

检测所述患者体内存在或不存在对于融合蛋白质的免疫反应性,所述融合蛋白质包含连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质或其抗原性片段的氨基末端的 Ag85B 前导

序列,其中免疫反应性的存在指示所述受试者患有潜伏结核病感染。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其中所述检测步骤包括:

从所述受试者获得生物样品,以及
检测所述生物样品中的所述免疫反应性。

22. 如权利要求 20 或 21 所述的方法,其中所述生物样品是唾液样品或血清样品。

23. 如权利要求 20 至 22 中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括:

向所述受试者皮内注射所述融合蛋白质,以及
检测皮内注射部位的免疫反应性。

24. 一种在有需要的受试者体内引起针对结核分枝杆菌的免疫应答的方法,其包括:

向所述受试者施用足以在所述受试者体内引起免疫应答的量的融合蛋白质,所述融合蛋白质包含连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质或其抗原性片段的氨基末端的 Ag85B 前导序列。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其中所述免疫应答是产生 B 细胞、抗体和 T 细胞中的一种或多种。

26. 如权利要求 24 所述的方法,其中所述免疫应答是保护性免疫应答。

27. 一种在有需要的受试者体内引起针对结核分枝杆菌的免疫应答的方法,其包括:

向所述受试者施用包含编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质或其抗原性片段的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列的分枝杆菌,其中所述融合序列可操作地连接至启动子,并且其中所述分枝杆菌的施用量足以在所述受试者体内引起免疫应答。

28. 如权利要求 27 所述的方法,其中所述免疫应答是产生抗体。

29. 如权利要求 27 所述的方法,其中所述免疫应答是保护性免疫应答。

30. 一种产生重组肝素结合血凝素 (rHBHA) 蛋白质的方法,其包括以下步骤

使分枝杆菌的培养物生长,所述分枝杆菌包含编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质或其抗原性片段的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列,其中所述融合序列可操作地连接至启动子。

31. 如权利要求 30 所述的方法,其进一步包括从所述培养物获得所述 rHBHA 蛋白质。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其进一步包括在获得所述 rHBHA 蛋白质的所述步骤之后纯化所述 rHBHA 蛋白质。

33. 如权利要求 32 所述的方法,其中所述纯化通过细胞破坏和色谱法中的一种或两种来执行。

34. 如权利要求 30 至 33 中任一项所述的方法,其进一步包括检验所述 rHBHA 蛋白质的身份。

35. 如权利要求 30 至 34 中任一项所述的方法,其中所述生长通过振荡或发酵在培养物中执行。

36. 如权利要求 30 至 35 中任一项所述的方法,其中所述生长使用分批或连续培养物来执行。

37. 一种重组分枝杆菌的种子批料,其包括

重组分枝杆菌,其包含编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质或其抗原

性片段的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列,其中所述融合序列可操作地连接至启动子;以及

适合于在所述种子批料的储存期间将所述重组分枝杆菌保持于生存状态下的培养基。

38. 一种制备包含肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的组合物的方法,其包括:

使分枝杆菌的培养物生长,所述分枝杆菌包含编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质或其抗原性片段的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列,其中所述融合序列可操作地连接至启动子;

从所述培养物中获得所述 rHBHA 蛋白质;

纯化所述 rHBHA 蛋白质;以及

将所述纯化的 rHBHA 蛋白质与生理上可接受的载剂组合。

39. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述生长在振荡培养物中或通过发酵来执行。

40. 如权利要求 38 或 39 所述的方法,其进一步包括将选自以下组成的组的至少一种试剂添加至所述组合中:除 HBHA 以外的一种或多种抗原、一种或多种佐剂,和一种或多种免疫原性增强剂。

41. 如权利要求 1 所述的分枝杆菌,其中所述抗原性片段由 SEQ ID NO:4 的最后 30 至 50 个羧基末端氨基酸构成。

42. 如权利要求 41 所述的分枝杆菌,其中所述抗原性片段是或包括 SEQ ID NO:5。

43. 如权利要求 14 所述的融合蛋白质,其中所述抗原性片段由 SEQ ID NO:4 的最后 30 至 50 个羧基末端氨基酸构成。

44. 如权利要求 43 所述的融合蛋白质,其中所述抗原性片段是或包括 SEQ ID NO:5。

45. 根据权利要求 20、24、27、30、37 或 38 所述的方法,其中所述抗原性片段由 SEQ ID NO:4 的最后 30 至 50 个羧基末端氨基酸构成。

46. 根据权利要求 45 所述的方法,其中所述抗原性片段是或包括 SEQ ID NO:5。

编码肝素结合血凝素 (HBHA) 融合蛋白质的重组分枝杆菌 和其用途

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及含有并且表达编码肝素结合血凝素 (HBHA) 融合蛋白质的序列的重组分枝杆菌。融合蛋白质含有氨基末端分枝杆菌抗原 Ag85B 前导序列, 并且融合蛋白质的转录由合适启动子例如 Ag85B 启动子来驱动。本发明还提供制造和使用重组分枝杆菌和重组融合蛋白质例如作为疫苗原的方法。

背景技术

[0002] 结核病 (TB) 是每年导致 8 百万新病例和 2 百万死亡的世界公共卫生难题。TB 诊断和治疗的特别难以解决的方面是结核分枝杆菌 (Mtb) 能够进入潜伏、无症状状态并且在潜伏感染个体中持续存在很长一段时间。由于例如由疾病或病状如 HIV 引起的免疫抑制、治疗如化疗和使用皮质类固醇、伴随衰老的免疫力减弱等, 这类个体易再激活此疾病。估计二十亿人 (世界人口的三分之一) 现在潜伏感染有 Mtb, 并且潜伏结核病的激活产生活动性疾病的大多数新病例。再激活与肺部的炎症、坏死和成洞相关联, 这一过程导致病灶排出至支气管中。当患有支气管病变的个体咳嗽时产生的悬浮微粒导致将 Mtb 生物体传播至未感染、易患病的个人, 并且传输循环因而得以维持。

[0003] 抗御 TB 的目前唯一可用的疫苗, 牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) (卡介苗) (Bacille Calmette-Guérin ;BCG), 首先在 1921 年引入。BCG 已经广泛地利用并且虽然研究表明对于一些用途, BCG 是有效的 (例如, 针对散播性 TB), 但是已知它对于预防潜伏 TB 的发展、持续和再激活是无效的。

[0004] 持续需要开发针对 TB 的改进的、更有效的疫苗。具体地说, 需要开发可提供针对潜伏结核病感染的发展、保持和 / 或再激活的防护的疫苗。

[0005] 已经提出用于 TB 疫苗中的一种蛋白质是肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质。HBHA 是介导结核杆菌与宿主相互作用的 22-kDa 甲基化表面暴露蛋白质, 其充当非吞噬细胞的粘附素。C 末端赖氨酸残基的甲基化已知可影响蛋白质的生物化学和免疫性质, 并且若干实验结果已经在 Mtb 的肺外传播过程中涉及到 HBHA (Pethe 等人, 2001. *Nature* 412:190-194.)。Temmerman 等人 (*Nature Medicine* 10, 935-941 (2004)) 证明 HBHA 的共价甲基化是在用 Mtb 激发的小鼠中引起保护性 T 细胞应答所需要的, 并且 Zannetti 等人证明与对照相比, 经过纯化的甲基化 HBHA 由从 TB 患者获得的血清有力地识别, 而未甲基化的 HBHA 不能实现这一效果 (*Clin Diagn Lab Immunol* 2005 年 9 月第 12 卷第 9 期 1135-1138)。鉴于这些和其它研究, 已经提出基于 HBHA 的疫苗的开发可代表预防和 / 或治疗 TB 的有效策略。

[0006] 其完整内容全部通过引用并入本文的 Pethe 等人的美国专利 7, 829, 103 报告包含甲基化重组 HBHA 的免疫原性组合物。根据 Pethe, HBHA 可由两种方法之一产生: 1) 在异源细胞 (大肠杆菌或耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*)) 中产生重组非甲基化 HBHA 蛋白质, 然后使用化学或酶方法来对经过纯化的重组 HBHA 进行翻译后甲基化; 或 2) 使用重组细胞来共表达编码 HBHA 和分枝杆菌甲基转移酶的核苷酸序列。方法 1 涉及蛋白质制备

的多个步骤；方法 2 涉及使用不可作为疫苗施用的异源细胞。此外，由 Pethe 使用的细菌菌株是抗生素抗性的，并且未提供优化蛋白质产量的论述。因此，在本领域中仍然需要一种重组 Mtb，它能够用作疫苗原，和 / 或用于产生足够数量的在体外和体内临床相关的 HBHA，和 / 或用于在制造环境中产生大量 HBHA 以稍后用于临床应用中。

发明内容

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供含有并表达编码肝素结合血凝素 (HBHA) 融合蛋白质的核酸序列的重组分枝杆菌 (rMyc)。融合蛋白质包括连接在氨基末端的分枝杆菌抗原 Ag85B 前导肽。融合蛋白质经过翻译后甲基化，产生甲基化型态与天然 HBHA 的甲基化型态相同或高度相似的蛋白质。所得融合蛋白质因而具有高度抗原性，并且大量高度抗原性融合蛋白质可使用本发明方法来产生。融合蛋白质的转录由可为组成性或可诱导性的合适启动子来驱动。在一个实施方案中，启动子是 Ag85B 启动子序列，本发明还提供制造 rMyc (例如以工业规模) 的方法、使用 rMyc 例如作为疫苗原和 / 或引起免疫应答，或产生融合蛋白质；或产生种子培养物的方法；和制造和使用融合蛋白质例如作为疫苗原和或引起免疫应答，或作为例如检测潜伏结核感染的诊断的方法。

[0009] 本发明的目标是提供重组分枝杆菌，其经过遗传工程改造以含有并表达编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列，所述融合序列可操作地连接至启动子。在一些实施方案中，分枝杆菌是例如结核分枝杆菌、牛分枝杆菌或耻垢分枝杆菌。在其它实施方案中，分枝杆菌是牛分枝杆菌例如牛分枝杆菌 (卡介苗) (BCG)。在一些实施方案中，BCG 是 BCG 丹麦国立血清研究所 (SSI) 菌株并且可例如表达 pfo 基因如来自产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 的 pfo 基因。在一些实施方案中，分枝杆菌是营养缺陷型，例如，泛酸营养缺陷型。

[0010] 在本发明的一些实施方案中，核酸融合序列是

[0011]

```
atgagacgac tttgogcccg aatcgacatt tggectccac acacggtagt ttctggcccg
agcacacgac gacatacagg acaaaggggc acaagtatgg ccacagacgt gagccgaaag
attcgagcgt ggggacgccc attgatgato ggcacggcag cggctgtagt ccttccgggc
ctggtggggc ttgcccggcg agcggcaacc gcgggcgcgt tetccatggc tgaaaactcg
aacattgatg acatcaaggc tccgttgctt gccgcgcttg gagcggccga cctggccttg
gccactgtca acgagttgat caogaacctg cgtgagcgtg cggaggagac tcgtacggac
accgcagcc gggtegagga gagccgtgct ccctgacca agctgcagga agatctgccc
gagcagctca ccgagctgcg tgagaagttc accgcccagg agctgcgtaa ggccgcccag
ggctacctcg aggccgagc tagccggtag aacgagctgg tcgagcgcgg tgaggccgct
ctagagcggc tgocagcca gcagagcttc gaggaagtgt cggcgcgcgc cgaaggctac
gtggaccagg cgggtggagt gaccocaggag gcgctgggta cggtcgcate gcagaccocg
gcccgcggtg agcgtgccgc caagctggtc ggcctcgagc tgccctaagaa ggctgctccg
gcccaagaag ccgctccggc caagaaggcc gctccggcca agaaggccgc ggccaagaag
gcgcccgcga agaaggccgc ggccaagaag gtcacccaga agtag (SEQ ID NO: 1).
```

[0012] 在其它实施方案中,由核酸融合序列编码的多肽具有氨基酸序列 :mrrlcaridi wpphtvcsgp strrhtgqrg tsmatdvsrk irawgrrlmi gtaaavvlpg lvglaggaat agafsmaens niddikapll aalgaadlal atvnelitnl reraetrtd trsrveesra rltkqedlp eqltelrefk taeelrkaae gyleaatsry nelvergeaa lerlrsqqsf eevsaraegy vdqaveltqe algtvasqtr avgeraaklv gielpkkaap akkaapakka apakkaaakk apakkaaakk vtqk (SEQ ID NO:3)。

[0013] 在一些实施方案中,分枝杆菌 HBHA 蛋白质是结核分枝杆菌 HBHA。在其它实施方案中,启动子是分枝杆菌 Ag85B 启动子

[0014] 本发明还提供具有以下核苷酸序列的分离的重组核酸分子 :

[0015]

```
atgagacgac ttgagcccg aafegacatt tggcctccac acacggatg ttctggcccg
agcacacgac gacafacagg acaaaggggc acaagiatgg ccacagacgt gagecgaag
attcgagctt ggggacgccg allgatgac ggcacggcag cggcigtatg cctlccggc
ctgtggggc ttgocggcgg agcggcaacc gcggggcgtg tctccatggc tgaanaactg
aacattgatg acaicaagge tccgttgctt gccgcgctt gageggccga cctggcctg
gccactgtca acgagtgat cacgaacctg cgtgagcgtg cggaggagac tctacggac
accgcagcc gggtegagga gagccgtgtt cgcctgacca agctgcagga agactgccc
gagcagctca ccgagctgcg tgagaagttc accgccgagg agctgcgtaa ggccgccgag
ggttacctcg aggccgcgac tagccgttac aacgagctgg tggagcggg tgaggccgt
ctagagcggc tgcgcagcca gcagagcttc gaggaagtgt cggcgcgcgc cgaaggctac
gtggaccagg cgggtgagtt gaccaggag gcgtgggta cggtcgcatc gcagaccgc
gcggtcggg agcgtgccc caagctggtc ggcctcagc tgcctaagaa ggtgctccg
gccaagaagg ccgctccggc caagaaggec gctccggcca agaaggggc ggccaagaag
gcgcccgcga agaaggggc ggccaagaag gtcaccaga agtag (SEQ ID NO: 1)。
```

[0016] 本发明还提供包括共价连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列的重组融合蛋白质。在一个实施方案中,整个融合蛋白质转录为一个 mRNA 并且翻译为单一多肽 (蛋白质)。在一个实施方案中,重组融合蛋白质具有氨基酸序列 :mrrlcaridi wpphtvcsgp strrhtgqrg tsmatdvsrk irawgrrlmi gtaaavvlpg lvglaggaat agafsmaens niddikapll aalgaadlal atvnelitnl reraetrtd trsrveesra rltkqedlp eqltelrefk taeelrkaae gyleaatsry nelvergeaa lerlrsqqsf eevsaraegy vdqaveltqe algtvasqtr avgeraaklv gielpkkaap akkaapakka apakkaaakk apakkaaakk vtqk (SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中,重组融合蛋白质经过甲基化。

[0017] 本发明还提供产生重组融合蛋白质的方法,所述重组融合蛋白质包括共价连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列。所述方法包括 :1) 用编码重组融合蛋白质的核酸序列来转染细菌细胞如分枝杆菌细胞 ;2) 使转染的细菌 (例如分枝杆菌) 细胞在允许细菌细胞产生重组融合蛋白质的条件下生长 ;以及 3) 获得重组融合蛋白质。

[0018] 在一些实施方案中,转染通过电穿孔来执行。

[0019] 本发明还提供确定是否受试者患有潜伏结核病感染的方法。所述方法包括确定对于包括连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列的重组融合蛋白质,患者存在或不存在免疫反应性。免疫反应性的存在指示受试者患有潜伏结核病感染。确定免疫反应性的存在或不存在可包括,例如,1) 从受试者获得生物样品,以及 2) 检测生物样品中的免疫反应性的存在或不存在。示例性生物样品包括但不限于唾液样品和血清样品。在其它实施方案中,确定免疫反应性的存在或不存在可包括检测步骤,其包括 1) 将重组融合蛋白质皮内注射至受试者体内,以及 2) 确定皮内注射部位的免疫反应性的存在或不存在。

[0020] 本发明还提供在有需要的受试者体内引起针对结核分枝杆菌的免疫应答的方法。此方法包括向受试者施用足以在所述受试者体内引起免疫应答的量的包括连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列的重组融合蛋白质的步骤,并且可被称为“治疗”量。在一个实施方案中,引起的免疫应答是产生 B 细胞、抗体和 T 细胞中的一种或多种。在一些实施方案中,免疫应答是保护性免疫应答。

[0021] 本发明还提供在有需要的受试者体内引起针对结核分枝杆菌的免疫应答的方法。所述方法包括向受试者施用包括编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列的重组分枝杆菌。融合序列可操作地连接至启动子,并且重组分枝杆菌的施用量足以在受试者体内引起免疫应答。在一个实施方案中,免疫应答是产生抗体。在一些实施方案中,免疫应答是保护性免疫应答。

[0022] 本发明还提供产生重组肝素结合血凝素 (rHBHA) 蛋白质的方法。所述方法包括 1) 在产生 rHBHA 的条件下使包括编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列的重组分枝杆菌的培养物生长,其中所述融合序列可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,所述方法进一步包括从培养物中获得 rHBHA 蛋白质。所述方法还可包括纯化 rHBHA 蛋白质,例如在获得 rHBHA 的步骤之后。纯化可使用一种或多种物理化学技术例如像色谱(例如亲和力/尺寸排除/离子交换或疏水性相互作用色谱中的一种或多种);和/或细胞破坏技术(例如高压细胞破坏、珠粒搅拌器、均质化、超声处理、离心等中的一种或多种)来执行。所述方法还可包括检验 rHBHA 蛋白质的身份。在一些实施方案中,生长步骤是通过振荡或发酵在培养物中执行。在一些实施方案中,生长是使用分批或连续培养来执行。

[0023] 本发明进一步提供重组分枝杆菌的种子批料。在一些实施方案中,种子批料包括 1) 包括编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列的重组分枝杆菌,其中融合序列可操作地连接至启动子;和 2) 适合于在种子批料储存期间将重组分枝杆菌保持于生存状态下的培养基。

[0024] 本发明还提供制备包括肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的组合物的方法。在一些实施方案中,所述方法包括 1) 使包括编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列的重组分枝杆菌培养物生长,其中融合序列可操作地连接至启动子;2) 从培养物中获得 rHBHA 蛋白质;3) 纯化 rHBHA 蛋白质;以及 4) 将纯化的 rHBHA 蛋白质与生理上可接受的载剂组合。生长可在振荡培养中或通过发酵来执行。另外,方法可进一步包括向 rHBHA 和生理上可接受的载剂中添加一种或多种另外的治

疗上适用的药剂,包括但不限于,一种或多种除 HBHA 以外的抗原、一种或多种佐剂和一种或多种免疫原性增强剂。这些组合物可用作例如疫苗、治疗或诊断或用于任何其它目的。

附图说明

[0025] 图 1A 和图 1B. A, 编码 HBHA 融合蛋白质的 DNA 序列 (SEQ ID NO:1)。Ag85B 前导肽由加下划线的核苷酸编码。B, 如在 A 中编码 HBHA 融合蛋白质的 DNA 序列, 但是还以粗体展示示例性 Ag85B 启动子序列 (SEQ ID NO:2)。

[0026] 图 2. 计算机克隆和互补策略。

[0027] 图 3A 和图 3B. 示意性展示 A, 泛酸补救质粒 (pKAMCB2) 和 B, 将 HBHA 基因克隆至 pKAMCB2 中。

[0028] 图 4. 示意性展示针对卡那霉素抗性将 pKAMCB2+HBHA 克隆取消标识。

[0029] 图 5A 至图 5C. A, 重组 HBHA (SEQ ID NO :3) 相比于 B, 氨基末端甲硫氨酸已经裂解掉的天然 HBHA (SEQ ID NO :4) 的氨基酸测序, 以及 C, 示意性展示 N 末端的 Ag85B 前导序列的位置。

[0030] 图 6A 至图 6C. 针对 A, HBHA 基因, B, 质粒骨架的存在和 C, 卡那霉素抗性标志物的不存在来 PCR 筛选的重组 BCG 菌落。5 号克隆关于 HBHA 基因的存在、完整质粒骨架和卡那霉素基因的不存在经过测试为阳性。

[0031] 图 7. AERAS 445, 即表达产气荚膜梭菌 pfo 基因, 并且进一步修饰以编码本发明的 HBHA 融合蛋白质的 BCG 丹麦 SSI 菌株的泛酸营养缺陷型的生长动力学。

[0032] 图 8. 使用 4057D2 抗 HBHA 单克隆抗体展示 AERAS-445 中的 HBHA 过表达的蛋白质印迹。箭头 1 和 2 指示内源性 HBHA 和重组 HBHA 蛋白质。

[0033] 图 9. 使用 1G10 抗体展示 AERAS-445 中的 HBHA 过表达的蛋白质印迹。泳道 :1 AERAS-401 ;2 AERAS-413 ;3 AERAS 445。箭头 1 和 2 指示天然 HBHA 和重组 HBHA 蛋白质。

[0034] 图 10. 蛋白质印迹—在制造 AERAS-445 的不同阶段中使用 1G10 抗体的 HBHA 表达。箭头 1 和 2 指示天然 HBHA 和重组 HBHA 蛋白质。泳道 :1AERAS 413 ;2 阶段 2 制造样品 ;3 保藏发酵罐样品。箭头 1 和 2 指示内源性 HBHA 和重组 HBHA 蛋白质

[0035] 图 11. 通过夹心 ELISA 确定的菌株中的 HBHA 蛋白质产量 ;A, 图形化描绘, 和 B, 以条形图来描绘。

[0036] 图 12. 从 AERAS 445 中纯化的 rHBHA 的质谱分析。

[0037] 图 13. 从 AERAS 445 纯化的 rHBHA 的 C 末端的质谱分析

[0038] 图 14 使用单克隆抗体 3921E4 ;A 和 4057D2 ;B 通过 ELISA 进行的抗原性分析

具体实施方式

[0039] 在一个实施方案中, 本发明提供含有并表达编码肝素结合血凝素 (HBHA) 融合蛋白质的核酸序列的重组分枝杆菌 (rMyc)。重组分枝杆菌可以疫苗制剂形式来施用, 因为其不具有抗生素抗性并且经过了减毒。融合蛋白质包括连接至其氨基末端的分枝杆菌抗原 Ag85B 前导肽序列。本发明的 rMyc 产生大量融合蛋白质, 其转录由合适启动子来驱动。融合蛋白质还可在工业制造过程中从 rMyc 中回收并且用作疫苗制剂或诊断的一部分。

[0040] 在一个实施方案中, 编码本发明的抗原性重组融合蛋白质的核酸序列是在图 1A

中描绘的 DNA 序列 (SEQ ID NO :1)。可以看出,核酸编码核苷酸 1 至 225 的 Ag85B 前导序列 (加下划线) 和核苷酸 226 至 825 的 HBHA 蛋白质。另外,在图 1B 中描绘的示例性实施方案中,在其 5' 末端,核酸含有核苷酸 1 至 184 的 Ag85B 启动子序列 (以粗体展示)。在图 1B 中示出的实施方案中,由细胞产生的翻译融合蛋白质本身因此由核苷酸 185 至 1009 编码,即启动子区域未翻译。

[0041] 在一个实施方案中,本发明涵盖具有作为或包括如 SEQ ID NO :1 中阐明的序列的序列的核酸 (参见图 1A)。在另一个实施方案中,本发明涵盖具有作为或包括如 SEQ ID NO :2 中阐明的序列的序列的核酸 (参见图 1B)。在另一个实施方案中,本发明涵盖具有作为或包括如 SEQ ID NO :3 中阐明的序列的序列的核酸 (参见以下)。本发明还涵盖与 SEQ ID NO :1 和 2 互补的 DNA,以及从 SEQ ID NO :1 和 2 (或其互补序列) 翻译的 mRNA,或基于这类 mRNA 的 cDNA (以及其各种 DNA-RNA 杂交体),并且涵盖单链和双链核酸两者。此外,本领域技术人员应认识到,为了产生如本文描述的抗原性重组融合蛋白质 (即包括连接至分枝杆菌 HBHA 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列),不一定使用 SEQ ID NO :1 和 2 的精确序列。举例来说,也可使用具有与 SEQ ID NO :1 和 2 至少约 75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或约 99% 同源性的序列,只要翻译的多肽能够甲基化并且具有足够抗原性以在它施用的受试者体内引起免疫应答即可。这些同源性水平也可适用于如上所述的相应互补 DNA、RNA 等。本领域技术人员熟悉用于确定同源性水平的自动程序或软件。另外,本领域技术人员认识到编码融合蛋白质的核酸序列还可包括各种有用的序列,例如便于对序列进行遗传操纵的限制性位点。本文描述的同源性%可例如使用如在 MSPRCH 程序 (Oxford Molecular) 中实施的 Smith-Waterman 同源性搜索算法、使用具有以下搜索参数的 anaffine 间隙搜索来确定:间隙开放罚分为 12,并且间隙延伸罚分为 1。

[0042] 重组序列的示例性变化包括但不限于:编码一些编码残基的保守氨基酸置换的密码子的取代;例如编码例如启动子与前导序列之间或前导序列与 HBHA 编码序列之间的接头或间隔子序列的序列的插入;促进序列的处理或操纵的各种序列变化,例如序列侧面的限制酶位点的插入或变化;载体的部分 (例如 5' 或 3' 突出端或与其互补的序列)、编码如下所述各种标签的序列等。这在 SEQ ID NO :3 序列中示出,其中序列的 5' 和 3' 末端的额外非编码序列以斜体展示,并且粗体和加下划线序列代表如上所述的启动子区域和前导肽。

[0043] ACTGTTAATTAAGTGGTCTTCGTCGGCTTGCTTCGAGCGAGCCTACGCGGT

[0044] GAACGCAAGTTCGGCCTCCCTGGGGGAGCACAGCCGGTAGCCCCGGGC

[0045] CGCGATTCTGAGAAATCCGCGATAGATCCATACCGCCATACCGTTTGTGAGC

[0046] CCCCTAAGCACACTTGCTCTGTCCGCGGGTAACCGATACGGAAATGAGAC

[0047] GACTTTGCGCCCGAATCGACATTTGGCCTCCACACACGGTATGTTCTGGCCCG

[0048] AGCACACGACGACATACAGGACAAAGGGGCACAAGTATGGCCACAGACGTG

[0049] AGCCGAAAGATTTCGAGCTTGGGGACGCCATTGATGATCGGCACGGCAGCGG

[0050] CTGTAGTCCCTCCGGGCTGGTGGGGCTTCCGGCGGAGCGGCAACCGCGGG

[0051] CGCGTTCTCCATGGCTGAAAACCTCGAACATTGATGACATCAAGGCTCCGTTGC

[0052] TTGCCGCGCTTGGAGCGGCCGACCTGGCCTTGGCCACTGTCAACGAGTTGAT

[0053] CACGAACCTGCGTGAGCGTGCGGAGGAGACTCGTACGGACACCCGAGCCG

[0054] GGTTCGAGGAGACCGTGCTCGCCTGACCAAGCTGCAGGAAGATCTGCCCCAG

[0055] CAGCTCACCGAGCTGCGTGAGAAGTTCACCGCCGAGGAGCTGCGTAAGGCCG
 [0056] CCGAGGGCTACCTCGAGGCCGCGACTAGCCGGTACAACCAGCTGGTTCGAGCG
 [0057] CGGTGAGGCCGCTCTAGAGCGGCTGCGCAGCCAGCAGAGCTTCGAGGAAAGT
 [0058] GTCGGCGCGCGCCGAAGGCTACGTGGACCAGGCGGTGGAGTTGACCCAGGA
 [0059] GGC GTTGGGTACGGTCGCATCGCAGACCCGCGCGGTTCGGTGAGCGTGCCGCC
 [0060] AAGCTGGTTCGGCATCGACCTGCCTAAGAAGGCTGCTCCGGCCAAGAAGGCCG
 [0061] CTCCGGCCAAGAAGGCCGCTCCGGCCAAGAAGGCGGCGGCCAAGAAGGCCG
 [0062] CCGCGAAGAAGGCGGCGGCCAAGAAGGTCACCCAGAAGTAGACTAGTTTCAT
 [0063] (SEQ ID NO:12)。

[0064] 融合蛋白质的表达由可操作地连接至 SEQ ID NO :1 的启动子序列驱动。“可操作地连接”是指启动子序列和 SEQ ID NO :1 布置于核酸分子内以使得 SEQ ID NO :1 的表达由启动子驱动或控制。在一些实施方案中,在分子中,启动子可直接在 SEQ ID NO :1 前面。在其它实施方案中,一些另外的序列可介入。另外,有助于 SEQ ID NO :1 表达的其它控制元件也可包含于核酸分子中,例如各种增强子序列等。可用于实践本发明的示例性启动子包括但不限于例如基因 hsp60、hspX、pBlaF 或 mtrA 等的启动子。在一个实施方案中,启动子是 Ag85B 启动子,并且如图 1B 中描绘相对于 SEQ ID NO :1 来布置(所述序列呈粗体),即直接安置在 SEQ ID NO :1 上游。

[0065] 所翻译的本发明的融合蛋白质是抗原性重组融合或嵌合蛋白质(多肽),其包括: 1) 分枝杆菌 HBHA 蛋白质序列,或其功能部分;和 2) 与 HBHA 蛋白质的氨基末端连接或相关联的 Ag85B 前导肽(或其功能部分)。“分枝杆菌 HBHA 蛋白质序列或其功能部分”是指具有如图 5B 描绘的序列(SEQ ID NO :4)的 HBHA 蛋白质或其肽或多肽片段,这些肽或多肽片段具有抗原性,即在作为本发明的融合蛋白质的组分施用时引起结合天然 HBHA 的抗体的产生。这类片段还可足以与肝素相互作用并且与其结合。举例来说,可使用在位于 SEQ ID NO :4 的羧基末端的大约最后 30 至 50 个氨基酸内构成的长度约 50 个氨基酸或更小的抗原性肽片段。还可使用包含这类肽片段的肽或多肽,其中多肽的长度大于约 50 个氨基酸,但是总体上比全长 HBHA 蛋白质短。在一些实施方案中,这类活性肽片段的长度可为约 10 至约 20 个氨基酸。在其它实施方案中,肽/多肽可包括或可为在以下 SEQ ID NO :5 中展示的 39 个氨基酸的肽,或具有与 SEQ ID NO :5 至少约 90%或更大(例如 91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%)同一性的序列。可用于实践本发明的 HBHA 蛋白质及其片段的进一步描述提供于发布的美国专利 6,949,345(Menozzi 等人)中,其完整内容全部通过引用并入本文。

[0066] 在一些实施方案中,Ag85B 前导序列直接连接至 HBHA 蛋白质的氨基末端,这是由于所述两者已经从核酸分子内的串联核酸序列翻译为单一多肽。在这种情况下,连接是共价的并且在前导序列与 HBHA 序列之间没有介入氨基酸序列。然而,在一些实施方案中,相对短(例如约 1 至约 10 个)的氨基酸接头或间隔子序列可存在于两者之间,例如包括相对较小的不带电荷的氨基酸如甘氨酸、丙氨酸等的间隔子。另外,在一些实施方案中,本发明的融合蛋白质可具有各种其它修饰,如连接标签序列以例如促进分离或检测,例如亲和力标签如 His 标签、Isopeptag、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、几丁质结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)等;溶解标签如硫氧还蛋白、MBP、GST 等;色谱标签如 FLAG- 标签;表位标签如 V5- 标签、c-myc- 标签、HA- 标签等;和荧光标签如各种绿色荧光蛋白质(GFP) 标签及其

衍生物等。

[0067] 本发明的免疫原性重组融合蛋白质序列例如在 HBHA 的肝素结合区域甲基化。具体地说,甲基由存在于所述肝素结合区域中的赖氨酸残基携带。

[0068] 所述羧基末端区域的序列如下:

[0069] KKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK (SEQ ID NO :5)

[0070] 甲基由存在于 HBHA 的 C 末端区域中的全部或仅一部分赖氨酸残基携带。有利的是,存在于 C 末端区域中的十五个赖氨酸残基中的至少约十个(例如约 10、11、12、13、14 或 15) 被甲基化,其中甲基化赖氨酸残基是单甲基化或二甲基化。

[0071] 在替代实施方案中,本发明的融合蛋白质可例如使用在本领域中熟知的方法来化学合成。在此实施方案中,甲基化是或可在体外执行,例如如上面引用的 Pethe 所描述。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,重组融合蛋白质的氨基酸序列是: mrrlcaridi wpphtvcsgp strrhtgqrg tsmatdvsrk irawgrrlmi gtaaavvlpg lvglaggaat agafsmaens niddikapll aalgaadlal atvnelitnl reraeetrtd trsrveesra rltklqedlp eqltelrefk taeelrkaae gyleaatsry nelvergeaa lerlrsqqsf eevsaraegy vdqaveltqe algtvasqtr avgeraaklv gielpkkaap akkaapakka apakkaaakk apakkaaakk vtqk (SEQ ID NO:3)。在其它实施方案中,重组融合蛋白质的氨基酸序列是与 SEQ ID NO :3 的序列至少约 75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 相同的序列,同时仍然保留足够功能性,即在它施用的受试者体内引起免疫应答的抗原性,或仍然能够在测定中起反应以检测例如患者体内的潜伏 TB 感染的存在。举例来说,可在序列中产生保守氨基酸取代,其中具有带正电荷侧链的氨基酸由具有带正电荷侧链的其它氨基酸(例如赖氨酸、组氨酸、精氨酸)来取代;或其中具有带负电荷侧链的氨基酸由具有带负电荷侧链的其它氨基酸(例如天门冬氨酸和谷氨酸)来取代;或其中具有疏水性侧链的氨基酸由具有疏水性侧链的其它氨基酸(丙氨酸、亮氨酸等)来取代;或其中具有极性不带电荷的侧链的氨基酸由具有极性不带电荷的侧链的其它氨基酸(丝氨酸、苏氨酸等)来取代;并且其它取代不会对蛋白质的抗原性产生负面影响。此外,可容许序列中的单一氨基酸或短氨基酸序列(例如约 2-5 个)的某些其它突变或缺失或添加而不会使融合蛋白质的产生和抗原性失效。总体上,这类变化不在蛋白质的肝素结合区域中执行,或至少这类变化不干扰经过甲基化以产生抗原形式蛋白质的赖氨酸残基。

[0073] 主要氨基酸序列在 SEQ ID NO :3 中阐明的 HBHA 蛋白质在结核分枝杆菌中得到鉴别并由结核分枝杆菌获得并且是天然 Mtb 序列。然而,本领域技术人员认识到其它 HBHA 蛋白质也可用于实践本发明。总体上,HBHA 在分枝杆菌物种或菌株,例如,各种牛分枝杆菌或结核分枝杆菌菌株中得到鉴别或由所述菌株获得(即原生的),但是可来自任何来源,只要它如本文描述起作用即可,即有利地可如本文描述产生大量蛋白质(例如至少约 10 至约 300 或更多(例如约 15 至约 250,或约 20 至约 200,或约 15 至约 150,或约 10 至约 100 μ g HBHA/mg 总蛋白质,其中范围总体上为约 30 至约 100 μ g HBHA/mg 总蛋白质)。不论精确数量为何,蛋白质的抗原性质均得以保持,即在引起免疫应答方面,蛋白质的抗原性与由 SEQ ID NO :3 表示的融合蛋白质的抗原性是类似的。

[0074] 生长细菌培养物以便产生蛋白质的方法,以及获得和分离或纯化用这种方式产生的蛋白质的方法在本领域中是熟知的。本发明涵盖制造本文描述的融合蛋白质的方法,所

述方法是转染（例如通过电穿孔）合适分枝杆菌细胞、在适合于生物体生长和由生物体产生蛋白质的培养条件下使转染的细胞生长，然后获得并纯化蛋白质。示例性条件和技术在以下实施例部分中描述。

[0075] 在一些实施方案中，引入分枝杆菌细胞中的核酸包含于载体如质粒中。然而，其它可转染或可转移载体可用于实践本发明，例如各种病毒载体、其它游离元件等。另外，在一些实施方案中，所感兴趣的核酸序列可并入分枝杆菌的基因组中。

[0076] 在一些实施方案中，将产生并用于实践本发明的融合蛋白质大致上纯化，例如蛋白质制剂总体上（例如至少 80、90、95 或甚至 99% 或更多）不含其它蛋白质，也不含其它细胞组分，例如核酸、脂质和其它大分子。本发明的 rMyc 可用作产生 rHBHA 的生物来源并且以这种方式产生的 rHBHA 可用于任何目的。在一个实施方案中，目的是产生刺激治疗性免疫应答的经过分离、大致上纯化的融合蛋白质的制剂，如下论述。

[0077] 用于实践本发明的细菌细胞可为满足适用于疫苗制备的标准的任何细菌细胞，例如其经过减毒（即降低毒力或致病能力；变得无害或不能导致疾病的症状，或只导致轻微症状，如在本领域中所理解）；不显示抗生素抗性；并且具有抗原性。在一些实施方案中，细胞是不同种类或变体的分枝杆菌，（例如突变型或重组形式）的结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、耻垢分枝杆菌或其它分枝杆菌等。在一些实施方案中，细菌细胞是牛分枝杆菌 BCG 和 / 或其各种菌株，例如，针对具体性质来选择的突变型 BCG，或已经遗传操纵的重组 BCG。示例性重组 BCG 描述于例如全部为 Sun 等人的美国专利 7,625,572、7,666,656、7,829,104 和 8,043,857 中，其完整内容各自通过引用并入本文。举例来说，BCG 可进行遗传操纵以含有并表达在中性 pH 下具有活性的核内体溶解蛋白质（例如来自产气荚膜梭菌的裂解素 O），并且还可为营养缺陷型的并且不具有抗生素抗性，例如营养缺陷型的以利于产生亮氨酸、泛酸等，或双重营养缺陷型如亮氨酸 - 泛酸营养缺陷型等。在一些实施方案中，分枝杆菌细胞表达 pfo 基因。示例性 pfo 基因包括但不限于细菌如产气荚膜梭菌的那些基因。然而，本领域技术人员认识到，存在也可用于实践本发明的其它功能类似的蛋白质，呈其野生型形式，或在基因修饰以使得其合适之后。这类核内体溶解蛋白质的实例包括但不限于李斯特菌溶血素 (Llo, 由单核细胞增生利斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 产生)、肺炎球菌溶血素 (由肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 产生)、链球菌溶血素 O (由化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 产生)、溶蜡素 (由蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 产生)、 α -溶血素 (由金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 产生) 等。在一个实施方案中，所使用的细胞是表达产气荚膜梭菌 pfo 基因的 BCG 丹麦 SSI 菌株的泛酸营养缺陷型，在本文中称为“AERAS-413”。然而，本领域技术人员认识到其它分枝杆菌菌株，例如其它 BCG 菌株如没有 pfo 基因、Tokyo、Tice 等的 BCG SSI，以及例如在美国专利 7,666,656 中列出的菌株也可使用，所述美国专利的完整内容全部通过引用并入本文。

[0078] 将本发明的抗原活性形式的融合蛋白质甲基化。总体上，甲基化由 rMyc 细胞并且在其内部执行，在一些实施方案中，所述 rMyc 细胞具有产生活性甲基转移酶的天然内在能力。然而，在一些实施方案中，细胞可进一步修饰以包括表达另外的甲基转移酶的核酸序列，或进一步修饰以产生较高水平的天然甲基转移酶。

[0079] 本发明还提供用于引起针对结核分枝杆菌的免疫应答和 / 或将个体疫苗接种以抵御结核病的组合物。在一个实施方案中，组合物包括作为活性剂的一种或多种 rMyc 物种

或菌株和药理学上合适的载剂。在另一个实施方案中,组合物包括作为活性剂的如本文描述的一种或多种大致上纯化的融合蛋白质,和药理学上合适的载剂。用作疫苗的这类组合物的制备为本领域技术人员所熟知。典型地,这类组合物制备成液体溶液或悬浮液,然而也涵盖固体形式如片剂、丸剂、散剂等。还可制备适合于在施用之前溶解或悬浮于液体中的固体形式。制剂还可乳化。活性成分可与药理学上可接受并与活性成分相容的赋形剂混合。合适赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等或其组合。另外,组合物可含有少量辅助物质如润湿或乳化剂、pH 缓冲剂等。另外,组合物可含有各种佐剂(可诱导或增加针对抗原或免疫原的体液和/或细胞免疫应答的化合物)。如果需要施用口服形式的组合物,那么可添加各种增稠剂、调味料、稀释剂、乳化剂、分散助剂或结合剂等。本发明的组合物可含有任何这类额外成分以便提供呈适合于施用的形式的组合物。制剂中的活性剂的最终量可变化。然而,通常,制剂中的量为约 1-99%。有利地,本发明的免疫原性组合物包括每个剂量约 0.1 至约 50 μ g 融合蛋白质,并且通常为约 1 至 50 μ g,例如约 15 μ g 纯化的 HBHA 融合蛋白质。如果产物的组合物包括活细菌(例如减毒细菌),那么每个剂量的细菌的量通常在约 1×10^5 至约 1×10^7 个范围内,并且通常为约 1×10^6 个。

[0080] 本发明的组合物(制剂、配方等)可通过本领域技术人员熟知的任何许多合适方法来施用,包括但不限于注射、皮内、吸入、口服、阴道内、鼻内、摄入含有活性剂的食物或益生菌产品、局部、以滴眼剂形式、经由喷雾剂等。在一些实施方案中,施用模式是注射或皮内。另外,组合物可结合其它治疗模式施用,如增强免疫系统的物质、各种化学治疗剂、其它抗原性药剂、各种佐剂等。

[0081] 本发明还提供在有需要的受试者体内引起免疫应答的方法。在一个实施方案中,方法涉及施用包括本发明的融合蛋白质的组合物,并且在另一个实施方案中,施用本发明的 rMyc。所引起的免疫应答可为先天和适应性免疫应答中的一种或两种,并且可涉及细胞介导的反应和体液反应,例如,产生抗体和/或 B 细胞和/或 T 细胞应答等。应答可为保护性的,因为针对随后的 Mtb 激发来保护疫苗在接受者,从而预防患上 TB 感染,不论是活动性或潜伏的。此外,如果在 TB 感染发生之后施用本发明的组合物,免疫应答可使得潜伏性感染不产生,或,如果潜伏性感染已经存在,则可防止潜伏性感染再激活成活动性疾病,或感染程度或严重性可减轻。

[0082] 本发明还提供利用本发明的融合蛋白质的诊断测试。具体地说,测试可用于识别患有潜伏结核病感染的个体。测试通常涉及将识别为可能患有潜伏 TB(例如归因于暴露于疾病,或某种其它原因)的受试者的免疫细胞或免疫细胞产物暴露于蛋白质并且确定免疫细胞或其产物是否与融合蛋白质起反应或识别融合蛋白质。在一个实施方案中,暴露的执行方法是从受试者获得生物样品(例如唾液、痰、血液、血浆等)并且将样品暴露于融合蛋白质以便检测,例如样品中的抗 HBHA 抗体的存在。在另一个实施方案中,皮内注射融合蛋白质(例如以 Mantoux 的方式或其它类似测试)并且观察皮肤与蛋白质的反应。在两个实施方案中,对于测试的阳性反应指示或证实受试者可或可能患有潜伏结核病感染。

[0083] 在一些实施方案中,本发明提供产生本发明的 rMyc 培养物以用作种子批料的方法。具体地说,涵盖涉及分批生产、纯化和测试 rMyc 的方法。这类方法总体上涉及逐步增加初始克隆分离株的产生、使分离株以适度规模在不含血清和动物来源蛋白质的培养基中生长,然后接种所需较大体积的培养物(必要时重复此步骤直到获得足够体积为止);以及

使 rMyc 培养物在允许 rMyc 生长并且经历细胞分裂的条件下生长。总体上, rMyc 生长至约 4 至约 6, 例如约 5 的密度 (A_{600})。例如出于商业目的, 直接从培养物, 或通过浓缩 rMyc (例如通过离心) 并且将球团重悬浮于合适培养基中来制备培养物的等分试样。种子批料培养物中的细菌的最终数量总体上大约为 4×10^7 至 6×10^7 个。本领域技术人员熟悉长期保持这类培养物的技术, 例如冷冻保存、冻干等。在最终制备和储存 rMyc 培养物之前, rMyc 身份和纯度可通过本领域技术人员已知的方法来测试 / 证实, 例如通过取样培养物并且分析其中编码融合蛋白质的核酸的存在, 或分析其中融合蛋白质本身的存在。

[0084] 在其它实施方案中, 本发明提供产生重组肝素结合血凝素 (rHBHA) 蛋白质产物的方法。方法包括步骤 a) 使包括编码连接至分枝杆菌肝素结合血凝素 (HBHA) 蛋白质的氨基末端的 Ag85B 前导序列的核酸融合序列的重组分枝杆菌培养物生长, 所述融合序列可操作地连接至启动子, 以及从培养物中获得 rHBHA 蛋白质。分枝杆菌可经过遗传工程改造以含有并表达核酸融合序列。培养物的生长可以任何合适方式执行, 例如在振荡培养物中、通过发酵等, 并且培养物可为例如分批或连续培养物。

[0085] 产生方法通常还包括纯化 rHBHA 蛋白质的步骤。蛋白质的纯化可通过本领域技术人员已知的许多合适技术中的任何一种来执行。典型地, 技术涉及使用一种或多种物理化学纯化技术。示例性技术包括但不限于: 色谱技术如离子交换色谱、亲和色谱、尺寸排除色谱、疏水性相互作用色谱等; 以及各种细胞破坏技术如高压细胞破坏、使用珠粒搅拌器、均质化、超声处理、离心等。还可使用这些和其它技术的组合。

[0086] 方法还可包括步骤检验 rHBHA 蛋白质的身份。本领域技术人员熟悉检验蛋白质和多肽的身份和 / 或纯度的合适技术。示例性技术包括但不限于: 电泳、色谱、质谱法、氨基酸测序等。

[0087] 方法还可包括将纯化的 rHBHA 蛋白质与生理上可接受的载剂组合的步骤。合适的生理上可接受或相容的载剂在本文中别处描述。在一些实施方案中, 配制的 HBHA 蛋白质产物进一步包括一种或多种其它活性剂。举例来说, 可包括除 HBHA 以外的一种或多种抗原 (即非 HBHA 抗原)。另外的示例性抗原包括但不限于例如引起针对疾病如白喉、百日咳、破伤风、脊髓灰质炎、流感、肝炎、轮状病毒、肺炎、麻疹、流行性腮腺炎、风疹、水痘、脑膜炎、乳头状瘤病毒等的免疫应答的抗原。rHBHA 蛋白质产物还可包括一种或多种佐剂和 / 或一种或多种免疫原性增强剂, 其实例包括但不限于: 无机盐例如氢氧化铝 (“明矾”)、磷酸铝、磷酸钙; 油乳液例如 MF59、清洁剂稳定水包油乳液; 微粒佐剂例如病毒体、ISCOM (皂角苷和脂质的结构化复合物); 微生物衍生物例如, MPL (TM) (单磷酸脂质 A)、CpG 基序、修饰的毒素等; 各种植物衍生物例如皂角苷 (QS-21); 以及内源性免疫刺激佐剂例如细胞因子、热休克蛋白质 (HSP) 及其片段等。

[0088] 前述实例用来进一步说明本发明的具体实施方案但是不应理解为以任何方式限制本发明。

[0089] 实施例

[0090] 实施例 1. 肝素结合血凝素 (HBHA) 在 BCG 中的克隆、过表达和测试

[0091] 这些研究的目的是开发过表达 HBHA 的重组牛分枝杆菌 BCG 菌株。使用以前在 Aeras 构建的重组 BCG 菌株 (AERAS-413), 因为它是 panCD 营养缺陷型, 并且具有 HBHA 基因的质粒上的 panCD 的存在用于补救以及在不存在抗生素抗性的情况下的菌落选择。

[0092] BCG 菌株

[0093] 最初克隆步骤在补充有卡那霉素 (40ug/ml) 的 LB 中生长的大肠杆菌 stb13 细胞中执行。为了过表达 HBHA, 使用经由内涵体逃逸机制促进抗原呈递的表达来自产气荚膜梭菌的 pfo 基因的 BCG 丹麦 SSI 菌株的泛酸营养缺陷型 (AERAS-413) (1) BCG 菌株在 Middlebrook 7H9- 肉汤中生长并且补充有甘油、OADC 和 D- 泛酸 (25ug/ml)。亲本和重组 BCG 涂铺在分别具有和不具有泛酸补充物的 7H10-OADC 板上。

[0094] 设计和克隆策略

[0095] HBHA 基因的 Mtb 序列从 Tuberculist 网站获得并且与在起始 HBHA 密码子前面的 Ag85B 启动子和前导肽 (图 1 和 2) 一起合成 (DNA 2.0)。

[0096] 合成片段克隆到 pKAMCB2 载体中的位点 PacI 与 SpeI 之间, 所述载体是具有卡那霉素抗性标志物 (aph) 和经由 hsp60 启动子操作的补救 panCD 基因的大肠杆菌-分枝杆菌穿梭载体 (图 3)。使用此质粒以使得它可与 AERAS-413 中的 panCD 营养缺陷型互补并且还保持质粒在 AERAS-413 中的稳定性。一旦克隆, 就将抗生素标志物从 HpaI 酶中消化掉并且使构建体自连接以使得它“不含抗生素抗性标志物” (图 4)。将自连接的构建体电穿孔至 AERAS-413 中并且将回收的菌落涂铺在没有泛酸补充物并且没有抗生素的 7H10- 板上。针对抗原、质粒骨架的存在和卡那霉素抗生素抗性标志物的不存在来筛选菌落。

[0097] 天然和重组 HBHA 的氨基酸比较

[0098] 在 BCG 和 Mtb 中, 天然 HBHA 具有 100% 序列同一性。重组 HBHA 使用融合至蛋白质的 N 末端的 Ag85B 启动子和 Ag85B 前导肽 (图 5) 来表达。

[0099] 来自 AERAS-413 的菌落的基因型分析

[0100] 来自含有 HBHA 基因的 pKAMCB2 衍生物转化的 AERAS-413 板的菌落针对质粒中的全长 Ag85B-HBHA 构建体的存在进行筛选。用于此 PCR 的引物是 Ag-HBHA. for : GGTCTTCGTCGGCTTGCTTC (SEQ ID NO:6) 和 Ag-HBHA. rev : GCTCTGCCAGTGTTACAACC (SEQ ID NO:7) 并且预期在 5 号菌落中发现 2.6kb 的产物大小 (图 6)。针对从 oriM 涵盖至 panCD 补救基因的质粒骨架的存在和抗生素抗性标志物的不存在来测试相同菌落。用于质粒骨架的引物是 oriM7932. for GTCTACGAGGCCACACTCAG (SEQ ID NO:8) 和 pan9969. rev TATCGCGCAGCTCCAGGTAG (SEQ ED NO:9)。用于验证质粒中的卡那霉素抗生素标志物的引物是 kan_intrnl. for GCTCGAGGCCGCGATTAAATTC (SEQ ID NO:10) 和 kan_intrnl. rev GGATGGCAAGATCCTGGTATCG (SEQ ID NO:11)。5 号菌落展示质粒骨架的存在以及来自骨架的卡那霉素基因的不存在, 使得它抗生素标志物较少。过表达 HBHA 的重组 AERAS-413 菌株被命名为 AERAS-445 并且用于进一步表型分析和按比例放大制造。(图 6)

[0101] AERAS-445 的生长动力学

[0102] 观察到在如上所述的条件下生长的 AERAS-445 具有与亲本菌株 AERAS-413 以及 AERAS-401 类似的生长型态。将种子培养物稀释至 OD_{600} 为 0.2 并且在 9 天内测量吸光度以观察生长型态。AERAS-445 的生长型态与亲本菌株非常相似, 指示过表达的 HBHA 蛋白质对于生长动力学不具有任何有害影响 (图 7)。

[0103] 来自 AERAS-413 的菌落的表型分析

[0104] 培养物在不含蛋白质的 7H9 培养基中生长至 $OD_{600} = 1.0$ 。培养物在 3,000rpm 下旋转十分钟以将上清液与球团分离。为了处理球团以获得细胞裂解物, 将球团重新悬浮于

蛋白酶抑制剂混合物缓冲液中,然后通过珠粒搅拌来处理以破坏细胞。裂解物在 3,000xg 下在 4 度下离心以去除碎片。细胞裂解物蛋白质浓度通过 BCA(二喹啉甲酸)蛋白质测定来测量。样品的标准化通过加载三十微克的等量蛋白质来执行。样品在 70 度下与还原剂和加载染料一起加热十五分钟进行制备。然后,样品加载至梯度(4-12% Bis-Tris)聚丙烯酰胺凝胶上并且用 MOPS 缓冲液进行电泳。转移使用 iBlot® Dry 印迹系统进行六分钟。蛋白质印迹分析使用 Snap i.d. 系统(Millipore)来进行。所使用的初级抗体是抗 HBHA 单克隆 4057D2(2)(1:2000),或 1G10(1:1000)抗 HBHA 抗体,随后使用山羊抗小鼠 HRP 次级抗体(KPL)。通过 HRP 化学发光法(Immun-Star, Biorad)来进行检测。

[0105] 在图 8 中,箭头 1 指示重组 HBHA 存在于 AERAS-445 中并且其不存在于对照亲本菌株 AERAS-413 中并且箭头 2 指示天然 HBHA 存在于对照 AERAS-413 和重组 AERAS-445 中。识别 HBHA 蛋白质的甲基化部分的 4057D2 单克隆抗体指示在 AERAS-445 中产生的重组 HBHA 经过甲基化。蛋白质印迹程序以在法国 Pasteur De Lille 研究中心开发的单克隆抗体 1G10 进行重复。AERAS-401 和 AERAS-413 在此印迹中用作对照。箭头 1 指示重组 HBHA 存在于 AERAS-445 中并且其不存在于对照亲本菌株 AERAS-401 和 AERAS-413 中并且箭头 2 指示天然 HBHA 存在于对照和重组菌株中。不同于 4057D2 抗体,1G10 识别 HBHA 蛋白质的非甲基化区域内的特定表位(图 9)。

[0106] 从 AERAS-445 菌株中 cGMP 制造 HBHA

[0107] 通过逐渐降低动物-蛋白质浓度,重组 BCG(rBCG)适于在不具有血清和动物来源蛋白质的培养基中生长。最终产物是在蒸气相液氮下储存的每个小瓶 4.5 ± 0.4 mL 的浓缩保藏细胞库,其可用于接种,例如用于 cGMP 主细胞库制备。

[0108] 为了使 rBCG 适应在不含血清和动物来源蛋白质的培养基中生长,在 ACB 确立期间,在培养基中禁止使用油酸白蛋白葡萄糖过氧化氢酶(OADC)补充物。表 1 总结转化至血清不含动物来源蛋白质的培养基的过程。用于 ACB 构建的培养基是没有 OADC 或任何其它血清或动物来源补充物的改性 Middle brook 7H9 培养基(MM7H9)。第一阶段培养物在没有挡板的 500mL venti-cap 烧瓶中生长。第一阶段之后的所有培养物在带挡板的摇瓶中生长。

[0109] 表 1. 保藏细胞库的 AERAS-445 生长准则

[0110]

遍次/ 阶段	烧瓶 大小 (mL)	OADC 浓度 (%)	体积 MM7H9 (mL)	体积 OADC (mL)	接种体积 (mL)	总体积 (mL)	目标 A600	按照规范来离心 (是/否)?
1	500	0	95	0	5.0	100	4 ± 1.5	否
2	2000	0	900	0	100	1000	4 ± 1.5	否
3	2000	0	850	0	150	125	4 ± 1.5	是

[0111] 在培养物到达其最终传代之后,将它收获/回收。培养物在 $6 \pm 4^\circ\text{C}$ 下、在 1200xg 下离心 30 分钟并且在室温下在以 1/4 原始体积储存的 10% GST 溶液中重新悬浮(表 1)。培养物然后以 4.0 ± 0.5 mL 等分试样分配至 5mL 无菌冷冻小瓶中。小瓶储存于液氮上的蒸气相中。

[0112] 测试两个小瓶的冷冻后 AERAS-445 的无菌性。关于任何生长污染物的结果是阴性

的。含有 4x 浓缩 AERAS-445rBCG 的小瓶在蒸气相液氮下冷冻。如图 10 展示,具有抗 HBHA 单克隆抗体 1G10 的蛋白质印迹展示从 AERAS-445 冷冻培养物的细胞裂解物中产生目标抗原 (HBHA)。

[0113] 开发 AERAS 445 的保藏细胞库的程序。

[0114] 1. 制备生长培养基和冷冻培养基。

[0115] a. R&D Style Middle brook 7H9

[0116]

4.7g/L Middle brook 7H9 粉末

0.24% (v/v) 甘油

0.05% (w/v) 泰洛沙泊

[0117]

10% (v/v) OADC 补充物

b. 改性 Middle brook 7H9

4.7g L Middle brook 7H9 粉末

2.0g/L 谷氨酸钠

2% (v/v) 甘油

3mg/L 硫酸锌七水合物

0.2g/L 硫酸镁七水合物

0.05% (v/v) 泰洛沙泊

1.0% (w/v) 葡萄糖

0% OADC 补充物

c. 10% GST 溶液

10% (v/v) 甘油

0.85% (w/v) 氯化钠

0.05% (v/v) 泰洛沙泊

[0118] 2. 来自 Kamal Velmurugan (Vaccine Discovery) 的 5mL 活 AERAS-445 培养物接种于含有包含没有 OADC 的改性 Middle brook 7H9 培养基的预热 95mL 培养物的 500mL 摇瓶中。

[0119] 3. 对于此过程的其余部分,使用改性 Middle brook 7H9 培养基。

[0120] 4. 培养物在振荡器 / 恒温箱 (Aeras#1230) 中、在 37°C 和 125rpm 下孵育。

[0121] 5. 当培养物具有混浊度的视觉变化时,在 600nm 下测量吸光度。

- [0122] 6. 一旦培养物达到 $A_{600} = 4.0 \pm 1.5$ AU 时, 将它接种至具有整个阶段 1 培养物 (~90mL) 的第二阶段 (具有 venti-cap 的 2L 摇瓶中的 900mL 工作体积) 中。
- [0123] 7. 培养物在振荡器 / 恒温箱 (Aeras#1230) 中、在 37°C 和 125rpm 下孵育。
- [0124] 8. 当培养物具有混浊度的视觉变化时, 在 600nm 下测量吸光度。
- [0125] 9. 一旦培养物达到 $A_{600} = 3.0 \pm 1.5$ AU 时, 将它接种至具有 150mL 阶段 2 培养物的阶段 3 (没有 OADC 的 850mL MM7H9 培养基) 中。接种总共 3x 2L 摇瓶 (工作体积 1L/ 烧瓶)。
- [0126] 10. 培养物在振荡器 / 恒温箱中、在 37°C 和 125rpm 下孵育。
- [0127] 11. 当培养物具有混浊度的视觉变化时, 在 600nm 下测量吸光度。
- [0128] 12. 一旦培养物 (阶段 3) 达到 $A_{600} = 4 \pm 1.5$ AU 时, 选择具有中值 A_{600} 读数的烧瓶并且开始收获过程。
- [0129] 13. 所选择的阶段 3 培养物在预高压处理的 1L 离心管中、在 $1200 \times g$ 和 4°C 下离心 30 分钟。
- [0130] 14. 将上清液丢弃并且球团重新悬浮于 1/4 体积 (约 250mL) 的 10% GST 中。
- [0131] 15. 在保持混合时, 将 5mL 低温小瓶以 4.0 ± 0.5 mL 重新悬浮的细胞填充。
- [0132] 填充小瓶直接在液氮的蒸气相中冷冻。
- [0133] 实施例 2. 来自 AERAS-445 的 rHBHA 的纯化和功能分析
- [0134] AERAS-445 中的 HBHA 蛋白质产量的估计
- [0135] AERAS-445 中产生的 HBHA 的量通过在 the Institut Pasteur de Lille 开发的夹心 ELISA 方法来估计。初级单克隆抗体是 1G10 并且次级单克隆抗体是在 the Institut Pasteur de Lille (EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce) 开发的生物素化 5F2。总之, 每个孔中的以 5ug/ml 在涂布缓冲液中稀释的 100ul mAb 1G10 播种至高亲和力结合 ELISA 板并且在 4°C 下孵育隔夜。将板洗涤两次并且用 PBS-Tween20 (+1% BSA) 阻断 1 小时。重组和天然 HBHA 用 1X PBS 稀释 (8 份稀释液) 并且将 100ul 添加至每个孔上并且孵育 2 小时。用 1X PBS-Tween20 洗涤三次之后, 添加 0.2ug/ml 浓度的 100ul mAb5F2 并且孵育 1 小时。将孔洗涤三次并且添加 PBS 中的 1/1000 浓度的 100ul 链霉亲和素 -HRP (BD biosciences) 偶联物并且在室温下孵育 30 分钟。蛋白质用 100ul TMB 底物 (ELISA 过氧化物底物) 检测并且在室温下显影 5 分钟至 15 分钟。反应用 50ul 3M H_3PO_4 停止并且在 450nm 下读取光密度。根据此结果, 与亲本菌株相比, AERAS-445 表达几乎 8 倍多的 HBHA (图 11)。
- [0136] 来自牛分枝杆菌 BCG Pasteur 1173P2 的 HBHA 的产量也与 AERAS445 比较。在 1 升烧瓶中, BCG 菌株在 200ml 搅拌 Sauton 培养基中生长 10 天直到 600nm 下的光密度读数达到大约 1.5 为止。然后, 通过在 8,500rpm 下离心收获 BCG 细胞 (Beckmann J2MC 离心机, 转子 JA10)。然后, 将 BCG 球团悬浮于 20ml PBS+0.05% Tween 80 (Tw 80:Sigma Ultra, ref. P8074) 中并且在 6,500rpm (Beckman Coulter Allegra 64R, 转子 F0650) 下在 4°C 下离心 20 分钟。将球团称重, 随后悬浮于 20ml PBS+0.05% Tween 80 中、热灭活并超声波处理, 如下所述。然后, 使用利用单克隆抗体 1G10 和 5F2 的夹心 ELISA 来分析超声处理后的细菌液的上清液中的蛋白质含量和 HBHA 浓度, 如上所述。平均 3 至 4 个独立测量指示 BCG Pasteur 1173 P 2 产生大约 10 μ g HBHA/mg 总蛋白质, 而 AERAS 445 产生平均大约 19 μ g HBHA/mg 总蛋白质。此 AERAS 445 产生大约多达 BCG Pasteur 1173P2 的两倍多的 HBHA。

[0137] 来自 AERAS 445 的 rHBHA 的纯化

[0138] AERAS 445 球团重新悬浮于 20ml PBS+0.05% Tween80 (Tw 80, Sigma Ultra, ref. P8074) 中并且在 6,500rpm (Beckman Coulter Allegra 64R, 转子 F0650) 下在 4°C 下离心 20 分钟。将球团称重并重新悬浮于 20ml PBS+0.05% Tween 80 中, 在 80°C 下加热 30 分钟并在 12,000rpm (Beckman Coulter Allegra 64R, 转子 F0650) 下在 4°C 下离心 20 分钟。

[0139] 将 1.5g 热灭活 AERAS 445 悬浮于 15ml PBS+0.05% Tween80 中并且在冰上用具有扁平干扰号角 (13mm, VWR ref. 142-3751) 的 Analog 超声波单元型号 S-450A (Branson, US) 超声波处理 20 分钟 (输出 7, 占空比 90)。超声处理后的细菌液在 13,500xg 下离心 20 分钟, 并且上清液施加至以 DPBS 平衡的肝素-琼脂糖凝胶 CL-B 柱 (1x5cm)。然后, 柱用 100ml DPBS 洗涤, 并且结合材料用 100ml DPBS 中的 0-500mM NaCl 梯度来洗脱。洗脱的 1-ml 馏分通过 SDS-PAGE 使用 12% 凝胶随后使用考马斯亮蓝 R-250 染色来识别。

[0140] 将含有 HBHA 的馏分汇集并且施加至在 0.05% 三氟醋酸中平衡的反相 HPLC Nucleosil C18 柱 (TSK 凝胶超级 ODS ; Interchim) 上。结合材料用线性 0-80% 乙腈梯度洗脱。将含有 HBHA 的馏分汇集, 并且通过蒸发来消除溶剂。1ml 最终馏分的 pH 通过使用 1M Tris-HCl (pH9) 调节至 pH8。最终产物储存于 -80°C 下。含有 HBHA 的馏分通过 SDS-PAGE、质谱法和夹心 ELISA 使用 1G10 和 5F2 单克隆抗体来分析, 如上所述。

[0141] 图 12 展示来自 AERAS 445 的纯化 rHBHA 的质谱分析。对于质谱分析, 蛋白质 (0.1 至 10pmol) 通过干燥微滴方法来制备。将蛋白质溶液 (0.5 μ l) 与 50% CH₃CN 和 0.1% 三氟醋酸中的以 10mg/ml 新鲜溶解的 α -氨基 4-羟基肉桂酸混合。打点并干燥之后, 使用基质辅助激光解吸电离 / 飞行时间 (Voyager-DE-STR, Applied Biosystems) 来执行质谱分析。使用以下设定参数: 正和线性模式、25kV 的加速电压、92% 的栅极电压、750ns 延迟提取时间和 1,000Da 的低质量栅极。使用不同肽的 [M+H]⁺ 单一同位素离子针对大肠杆菌硫氧还蛋白和马脱辅基肌红蛋白的平均质量来外部校准光谱 (Applied Biosystems)。

[0142] rHBHA 甲基化型态的质谱分析

[0143] 纯化的 rHBHA 以 5% 内切蛋白酶 Glu-C (Roche) 消化过夜, 并且所得肽通过反相 HPLC 使用 Beckman Ultra sphere ODS 柱 (2x 200mm) 和 0.1% 三氟醋酸中制备的线性 0-60% 乙腈洗脱梯度来分离并且直接通过质谱法来分析。

[0144] 对于质谱法, 肽溶液与 50% CH₃CN 和 0.1% 三氟醋酸中的以 10mg/ml 新鲜溶解的 α -氨基 4-羟基肉桂酸混合。打点并干燥之后, 使用基质辅助激光解吸电离 / 飞行时间 Voyager-DE-STR (Applied Biosystems) 来执行质谱分析。对于 3,000Da 至 10,000Da 之间的肽, 使用以下设定参数: 正和反射体模式、25kV 的加速电压、65% 的栅极电压、250ns 延迟提取和 1,000Da 的低质量栅极。使用不同肽的 [M+H]⁺ 单一同位素离子针对大肠杆菌硫氧还蛋白和马脱辅基肌红蛋白的平均质量来外部校准光谱 (Applied Biosystems)。

[0145] 从 AERAS 445 纯化的 rHBHA 的质谱分析的结果描绘于图 13 中并且指示蛋白质的 C 末端展示异质性, 这与 HBHA 的预期复杂甲基化概况一致。

[0146] 不同形式 HBHA 与单克隆抗体 4057D2 和 3921E4 的反应

[0147] 测量来自 AERAS 445 的纯化 rHBHA 的浓度并调节以便在 4°C 下在 ELISA 板的每个孔中 1 μ g 涂布过夜。然后, 板用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) / Tween (PBST) 洗涤, 随后在室温下用含有 3% BSA 的 PBST 阻断 2 小时。再次用 PBST 洗涤三次之后, 板在室温下与 PBST+BSA

中的连续四倍稀释的单克隆抗体 3921E4 或 4057D2 一起孵育 1 小时 30 分钟。后两者优先识别甲基化形式的 HBHA (3)。然后,板用 PBST 洗涤 10 次并且在室温下与连接至过氧化物酶的抗小鼠抗体一起孵育 1 小时。用 BPST 再次洗涤 10 次之后,添加 100 μ l 过氧化物酶底物 TMB 至每个孔,并且通过添加 50 μ l H_3PO_4 来停止显色反应。最后,每个孔中的 450nm 吸收度使用标准 ELISA 板读取器来读取。图 14 展示来自 AERAS 445 的 rHBHA 由 4057D2 和 3921E4 单克隆抗体辨识,证实它正确地甲基化。

[0148] 潜伏感染人中的来自 AERAS 445 的 rHBHA 的抗原性

[0149] 来自 AERAS 445 的纯化 rHBHA 在 2 μ g/ml 下与从三个潜伏感染人受试者、三个患有活动性结核病的患者和三个阴性对照受试者分离的 106 个外周血单核细胞 (PBMC) 一起孵育。96 小时之后,上清液中释放的 IFN- γ 浓度通过 ELISA 进行测量,并且来自未刺激 PBMC 的 IFN- γ 分泌从抗原诱导的 IFN- γ 分泌中减去。IFN- γ ELISA 的灵敏度是 10pg/ml。对于 HBHA,非感染对照与 LTBI 受试者之间的最佳鉴别的截止值以前确定为 100pg/ml (4)。如表 2 展示,从 AERAS 445 纯化的 rHBHA 由来自潜伏感染个体的 PBMC 良好辨识、来自结核病患者的 PBMC 不佳辨识并且来自健康对照的 PBMC 未辨识。

[0150] 表 2. HBHA 的人 T 细胞抗原性。来自 9 个人受试者 (3 个潜伏感染受试者号 1、8 和 9;三个活动性结核病患者号 2、3 和 4 和 3 个阴性对照号 5、6 和 7) 的 PBMC 与来自牛分枝杆菌 BCG Pasteur 1173P3 (IPL) 或 AERAS 445 (Aeras) 的 2 μ g/ml HBHA 一起孵育,并且所得 IFN-g 浓度在培养物上清液中测量并且以 ng/ml 为单位来表达

[0151]

患者编号	HBHA IPL (BCG Pasteur)	HBHA Aeras* (AERAS-445)
1	5.21	13.53
2	0.09	0.02
3	0.02	0.11
4	0.24	0.27
5	0.07	0.12
6	<0.01	<0.01
7	<0.01	<0.01
8	1.43	.73
9	1.62	1.28

[0152] 参考文献

[0153] 1. Sun R, Skeiky YA, Izzo A, Dheenadhayalan V, Imam Z, Penn E, Stagliano K, Haddock S, Mueller S, Fulkerson J, Scanga C, Grover A, Derrick SC, Morris S, Hone DM, Horwitz MA, Kaufmann SH, Sadoff JC. Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with Mycobacterium tuberculosis. Vaccine. 2009 年 7 月 16 日;27(33):4412-23.

[0154] 2. Rouse DA, Morris SL, Karpas AB, Mackall JC, Probst PG, Chaparas SD. Immunological characterization of recombinant antigens isolated from a Mycobacterium avium lambda gtl 1 expression library by using monoclonal antibody probes. Infect Immun. 1991 年 8 月;59(8):2595-600

[0155] 3. Pethe 等人, 2002. Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10759-10764

[0156] 4. Hougardy J-M, Schepers K, Place S 等人, Heparin-binding-hemagglutinin-induced IFN-gamma release as a diagnostic tool for latent tuberculosis. PLoS ONE 2007 ;2:e926.

[0157] 5. Temmerman S, Pethe K, Parra M, Alonso S, Rouanet C, Pickett T, Drowart A, Debrie AS, Delogu G, Menozzi FD, Sergheraert C, Brennan MJ, Mascart F, Locht C. Methylation-dependent T cell immunity to Mycobacterium tuberculosis heparin-binding hemagglutinin. Nat Med. 2004 年 9 月 ;10(9):935-41

[0158] 6. Zanetti S, Bua A, Delogu G, Pusceddu C, Mura M, Saba F, Pirina P, Garzelli C, Vertuccio C, Sechi LA, Fadda G. Patients with pulmonary tuberculosis develop a strong humoral response against methylated heparin-binding hemagglutinin. Clin Diagn Lab Immunol. 2005 年 9 月 ;12(9):1135-8

[0159] 虽然本发明在其优选实施方案方面进行了描述,但是本领域技术人员认识到本发明可在附加权利要求的精神和范围内加以修改来实施。因此,本发明不应限于如上所述的实施方案,而是应进一步包括本文提供的说明书的精神和范围内的所有改进和其等效物。

[0001]

PW28011_序列表

序列表

<110> AERAS全球TB疫苗基金会
(Aeras Global TB Vaccine Foundation Inserm Transfert)

<120> 编码肝素结合血凝素(HBHA)融合蛋白质的重组分枝杆菌和其用途

<130> 08560085ta

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 825

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白的合成的重组DNA序列

<400> 1

atgagacgac ttigcgcccg aatcgacatt tggcctccac acacggatg ttctggcccg 60

agcacacgac gacatacagg acaaaggggc acaagtatgg ccacagacgt gagccgaaag 120

attcgagcct ggggacgcc attgatgate ggcacggcag cggctgtagt ccttcggggc 180

ctggfggggc ttgccggcgg agcggcaacc gcgggcgctg tctccatgac tgaaaactcg 240

aacattgatg acatcaagge tccgttgctt gccgcgcttg gagcggccga cctggccttg 300

gccactgtca acgagttgat caagaacctg cgtgagcgtg cggaggagac tegtaccgac 360

accgcagcc gggctgagga gagccgtgct cgctgacca agctgcagga agatctgecc 420

gagcagctca ccgagctgag tgagaagttc accgccgagg agctgcgtaa ggcggccgag 480

ggctaccctg aggccgcgac tagccggtac aacgagcttg tcgagcgcgg tgaggccgct 540

ctagagcggc tgcgcagcca gcagagcttc gaggaagtgt cggcgcgcgc cgaaggctac 600

gtggaccagg cggctggagtt gaaccaggag gcgttgggta cggctgcctc gcagaccgcc 660

gcggtcggtg agcgtgccgc caagctggtc ggcatcgage tgcctaagaa ggctgctcgg 720

gccaaagaag ccgctccggc caagaaggcc gctccggcca agaaggcggc ggccaagaag 780

gcgcccgcga agaaggcggc ggccaagaag gtcaccacaga agtag 825

<210> 2

<211> 1009

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码融合蛋白的合成的重组DNA序列

<400> 2

gtggtcttcg teggcttget tcgagcgagc ctacgcggtg aacgcaagtt cggcctccct 60

gggggagcac agccggtage cccggggcgc gattctgaga aatccgcgat agatccatac 120

cgccataacc ttigtgagcc ccctaagcac acttgctctg tccgcggcgg taaccgatac 180

ggaaatgaga cgactttgcg cccgnatcga cttttggcct ccacacacgg tatgttctgg 240

cccgagcaca cgacgacata caggacaaaag gggcacaagt atggccacag acgtgagcgg 300

aaagattcga gcttggggac gccgattgat gatcggcacg gcagcggctg tagtccttcc 360

gggcctggtg gggcttgccg gcggagcggc aaccgcgggc gcgttctcca tggctgaaaa 420

ctcgaacatt gatgacatca agctccgctt gcttgccgcg cttggagcgg ccgacctgac 480

[0002]

cttggccact gtcaacgagt tgatcacgaa cctgcgtgag cgtgcggagg agactcgtac 540
 ggacacccgc agccgggtcg aggagagccg tgctcgctg accaagctgc aggaagatct 600
 gcccgagcag ctcaaccgagc tgcgtgagaa gttcaccgcc gaggagctgc gtaaggccgc 660
 cgagggttac ctcgaggccg cgactagccg gtacaacgag ctggtcgagc gcggtgagge 720
 cgctctagag eggctgcgca gccagcagag cttegaggaa gtgtcggcgc gcgccgaagg 780
 ctactgtgac caggcgggtg agttgacceca ggagcgttg ggtacggtcg catcgcagac 840
 ccgctcgctc ggtgagcgtg ccgccaagct ggtcggcctc gagctgccta agaagctgc 900
 tccggccaag aaggccgctc cggccaagaa ggccgctccg gccagaagg cggcggccaa 960
 gaaggcgcgc gcgaagaagg cggcggccaa gaaggtcacc cagaagtag 1009

<210> 3
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的重组融合蛋白

<400> 3

Met Arg Arg Leu Cys Ala Arg Ile Asp Ile Trp Pro Pro His Thr Val
1 5 10 15

Cys Ser Gly Pro Ser Thr Arg Arg His Thr Gly Gln Arg Gly Thr Ser
20 25 30

Met Ala Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu
35 40 45

Met Ile Gly Thr Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Met Ala Glu Asn Ser
65 70 75 80

Asn Ile Asp Asp Ile Lys Ala Pro Leu Leu Ala Ala Leu Gly Ala Ala
85 90 95

Asp Leu Ala Leu Ala Thr Val Asn Glu Leu Ile Thr Asn Leu Arg Glu
100 105 110

Arg Ala Glu Glu Thr Arg Thr Asp Thr Arg Ser Arg Val Glu Glu Ser
115 120 125

Arg Ala Arg Leu Thr Lys Leu Gln Glu Asp Leu Pro Glu Gln Leu Thr
130 135 140

Glu Leu Arg Glu Lys Phe Thr Ala Glu Glu Leu Arg Lys Ala Ala Glu
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Glu Ala Ala Thr Ser Arg Tyr Asn Glu Leu Val Glu Arg
165 170 175

Gly Glu Ala Ala Leu Glu Arg Leu Arg Ser Gln Gln Ser Phe Glu Glu

[0003]

180	185	190
Val Ser Ala Arg Ala Glu Gly Tyr Val Asp Gln Ala Val Glu Leu Thr 195 200 205		
Gln Glu Ala Leu Gly Thr Val Ala Ser Gln Thr Arg Ala Val Gly Glu 210 215 220		
Arg Ala Ala Lys Leu Val Gly Ile Glu Leu Pro Lys Lys Ala Ala Pro 225 230 235 240		
Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala 245 250 255		
Ala Ala Lys Lys Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Lys Lys Val Thr 260 265 270		
Gln Lys		
<210> 4		
<211> 198		
<212> PRT		
<213> 结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)		
<400> 4		
Ala Glu Asn Ser Asn Ile Asp Asp Ile Lys Ala Pro Leu Leu Ala Ala 1 5 10 15		
Leu Gly Ala Ala Asp Leu Ala Leu Ala Thr Val Asn Glu Leu Ile Thr 20 25 30		
Asn Leu Arg Glu Arg Ala Glu Glu Thr Arg Thr Asp Thr Arg Ser Arg 35 40 45		
Val Glu Glu Ser Arg Ala Arg Leu Thr Lys Leu Gln Glu Asp Leu Pro 50 55 60		
Glu Gln Leu Thr Glu Leu Arg Glu Lys Phe Thr Ala Glu Glu Leu Arg 65 70 75 80		
Lys Ala Ala Glu Gly Tyr Leu Glu Ala Ala Thr Ser Arg Tyr Asn Glu 85 90 95		
Leu Val Glu Arg Gly Glu Ala Ala Leu Glu Arg Leu Arg Ser Gln Gln 100 105 110		
Ser Phe Glu Glu Val Ser Ala Arg Ala Glu Gly Tyr Val Asp Gln Ala 115 120 125		
Val Glu Leu Thr Gln Glu Ala Leu Gly Thr Val Ala Ser Gln Thr Arg 130 135 140		
Ala Val Gly Glu Arg Ala Ala Lys Leu Val Gly Ile Glu Leu Pro Lys 145 150 155 160		
Lys Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro		

[0004]

165	170	175
Ala Lys Lys 180	Ala Ala Ala Lys Lys 185	Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala 190
Lys Lys Val Thr Gln Lys 195		
<210> 5 <211> 39 <212> PRT <213> 人工序列		
<220> <223> HBHA的肝素结合区域羧基末端的合成的肽		
<400> 5		
Lys Lys Ala Ala 1	Pro Ala Lys Lys Ala 5	Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala 10 15
Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Lys Lys Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala 20 25 30		
Ala Lys Lys Val Thr Gln Lys 35		
<210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> 合成的寡核苷酸引物		
<400> 6 ggtcttcgtc gccttgcttc		20
<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> 合成的寡核苷酸引物		
<400> 7 gctctgccag tgttacaacc		20
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> 合成的寡核苷酸引物		
<400> 8 gtctacgagg ccacactcag		20
<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列		
<220>		

[0005]

<223> 合成的寡核苷酸序列	
<400> 9	
tatcgcgag ctecgagtag	20
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸引物	
<400> 10	
gctcgaggcc gcgattaaat tc	22
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡核苷酸引物	
<400> 11	
ggatggcaag atcctggtat cg	22
<210> 12	
<211> 1031	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 编码融合蛋白的合成的重组DNA序列	
<400> 12	
actgttaatt aagtgttett cgtcgcttg cttecgagcga gectaegegg tgaacgcaag	60
ttcggcctcc ctgggggagc acagccggta gccccggccc gcgattctga gaaatccgcg	120
atagatccat accgcatac cgtttgtgag cccccaaagc acacttgctc tgtcccgggc	180
ggtaaccgat acggaatga gacgactttg cgcccgaaac gacatttggc ctccacacac	240
ggtatgttct ggcccagca cagcagaca tacaggacaa aggggcacaa gtaaggccac	300
agacgtgagc cgaaagattc gagcttgggg acgcccattg atgatcggca cggcagcggc	360
tgtagtctt cggggcctgg tggggcttgc cggcggagcg gcaaccgcg gcgcgttctc	420
catggctgaa aactcgaaca ttgatgacat caaggctcgg ttgcttgcgg cgcctggagc	480
ggccgacctg gccttggcca ctgtcaacga gttgatcagc aaactgcgtg agcgtgcgga	540
ggagactegt acggacaccc gcagccgggt cgaggagagc cgtgctcgc tgaccaagct	600
gcaggaagat ctgcccagc agctcaccga gctgcgtgag aagttcaccg ccgaggagct	660
gcgtaaggcc gccgagggt acctcgaggc cgcgactagc cggtaacaac agctggtcga	720
gcgcggtgag gccgtctag acggtctgc cagccagcag agcttcagag aagtgcggc	780
gcgcgccgaa ggctactgg accaggcgtt ggagttgacc caggagcgt tgggtacggt	840
cgcctcgcag acccgcgcgg fcggtgagcg tgcccacaag ctggfcggca tcgagctgcc	900
taagaagct gctccggcca agaaggccc tccggccaag aaggcccctc cggccaagaa	960
ggcggcggcc aagaaggcgc ccgcgaagaa ggccggcggcc aagaaggtca cccagaagta	1020
gactagttca t	1031

A.

```

atgagacgac tttgogcccg aatcgacatt tggcctccac acacgggatg ttctggcccg      60
agcacacgac gacatacagg acaaaggggc acaagtatgg ccacagacgt gagccgaaag      120
attcgagctt ggggacgccg attgatgacg ggcacggcag cgctgtagt ccttcggggc      180
ctggtggggc ttgcccggcg agcggcaacc gggggcgcgt tctccatggc tgaaaactcg      240
aacattgatg acatcaaggc tccgttgctt gccgcgcttg gagcggccga cctggccttg      300
gccactgtca acgagttgat cacgaacctg cgtgagcgtg cggaggagac tcgtacggac      360
accgcagcc gggtcgagga gagccgtgct gcctgacca agctgcagga agatctgcc      420
gagcagctca ccgagctgcg tgagaagttc accgcgaggg agctgcgtaa ggccgcgag      480
ggctacctcg aggccgcgac tagccgtac aacgagctgg tcgagcggcg tgaggccgct      540
ctagagcggc tgcgcagcca gcagagcttc gaggaagtgt cggcgcgcgc cgaaggctac      600
gtggaccagg cgggtgagtt gaccaggag gcgttgggta cgtcgcctc gcagaccgc      660
gcggtcggtg agcgtgccc caagctggtc ggcatcgagc tgcttaagaa ggctgctccg      720
gccaagaagg ccgctccggc caagaaggcc gctccggcca agaaggcggc ggccaagaag      780
gcgcccgcga agaaggcggc ggccaagaag gtcacccaga agtag      825

```

(SEQ ID NO: 1)

B.

```

gtggtcttcg tcggttgcct tcgagcgagc ctacgggtg aacgcaagtt cggcctccct      60
gggggagcac agccggtagc cccgggcccgc gattctgaga aatcccgcat agatccatac      120
cgccataccg tttgtgagcc ccttaagcac acttgctctg tcggggggcg taaccgatac      180
ggaaatgaga cgactttgcg ccggaatcga catttggcct ccacacacgg tatgttctgg      240
cccgagcaca cgacgacata caggacaaggg gggcacaagt atggccacag acgtgagccc      300
aaagattcga gcttggggac gccgattgat gatcggcacg gcagcggctg tagtcttcc      360
gggcctggtg gggcttgccg gcgagcggc aaccgcgggc gcgttctcc atggctgaaaa      420
ctcgaacatt gatgacatca aggctccggtt gcttgcgcg cttggagcgg ccgacctggc      480
cttggccact gtcaacgagt tgatcacgaa cctgcgtgag cgtcgggagg agactcgtac      540
ggacaccgc agccgggtcg aggagagccg tgctcgcctg accaagctgc aggaagatct      600
gcccagcag ctcaccgagc tgcgtgagaa gttcacgcgc gaggagctgc gtaaggcgc      660
cgagggctac ctgaggccg cgactagccg gtacaacgag ctggtcgagc gcggtgaggc      720
cgctctagag cggctgogca gccagcagag cttegaggaa gtgtcggcgc gcgcccgaagg      780
ctacgtggac caggcgggtg agttgaccca ggaggcgttg ggtacggtcg catcgcagac      840
ccgcgcggtc ggtgagcgtg ccgccaagct ggtcggcctc gagctgccta agaaggctgc      900
tccggccaag aaggccgctc cggccaagaa ggccgctccg gcccaagaagg cggcggccaa      960
gaaggcgcgc gcgaagaagg cggcggccaa gaaggtcacc cagaagtag      1009

```

(SEQ ID NO: 2)

图 1A 和 B

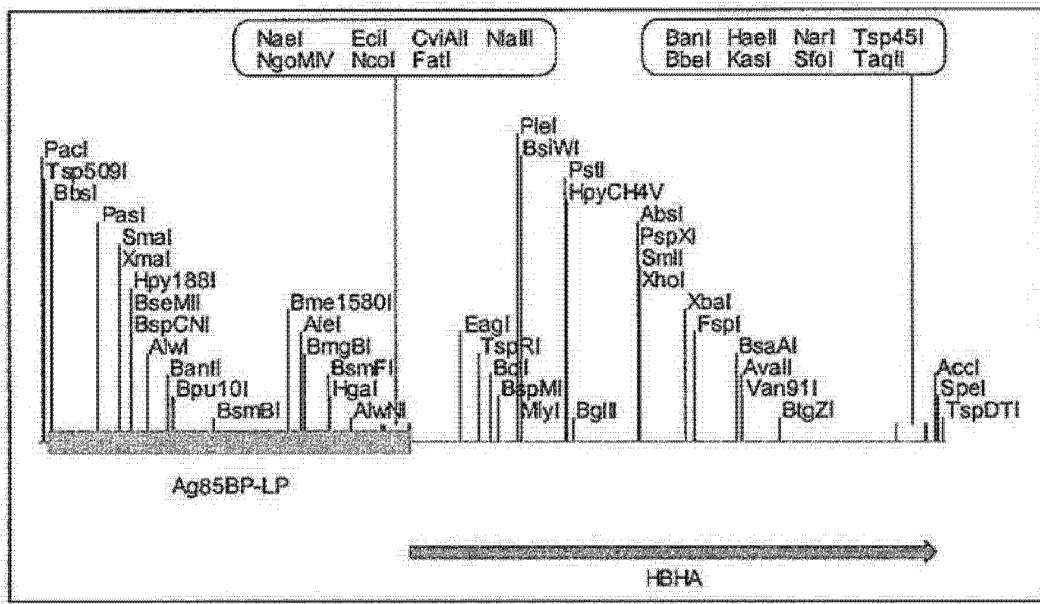
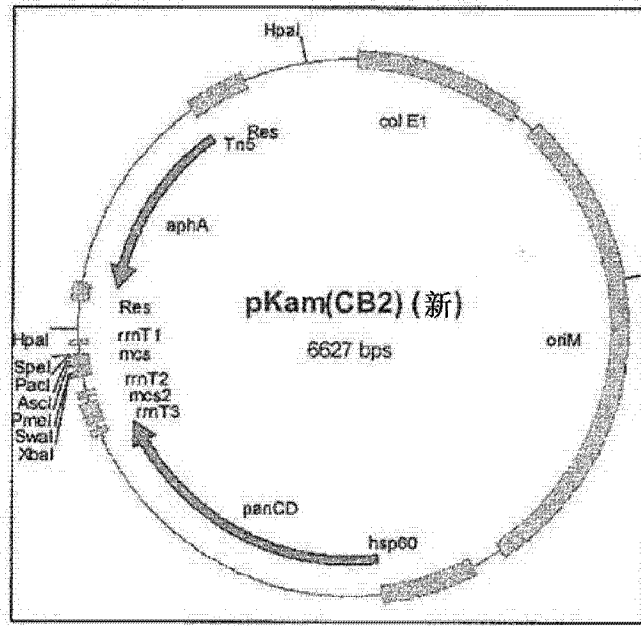


图 2

A.



B.

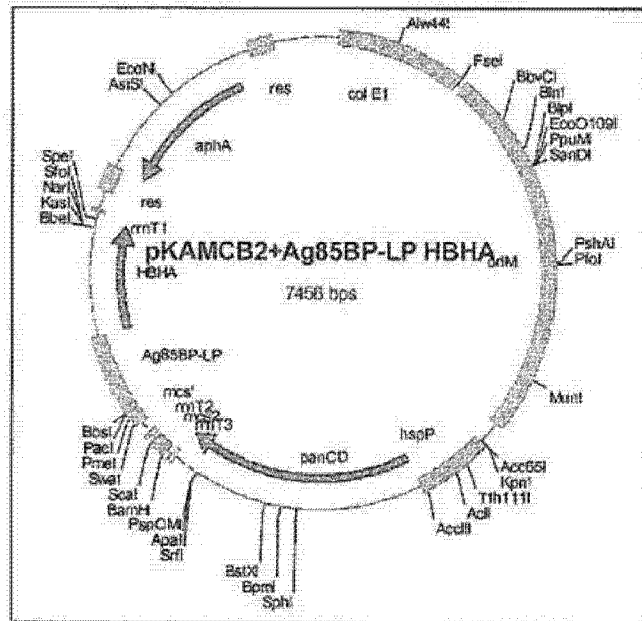


图 3A 和 B

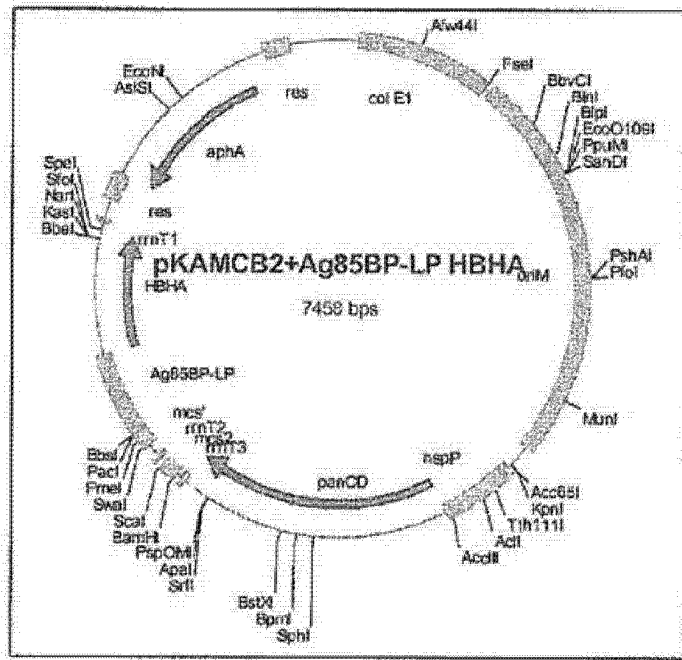


图 4

A.

AERAS-445 HBHA aa

1 mrricaridi wpphtvesgp strrhtgqrg tsmatdvsrk irawgrrlmi
 51 gtaaavvlpg lvglaggaat agafismaens niddikapll aalgaadlal
 101 atvnelitnl reraeetrd trsrveesra rltklqedlp eqtelrekf
 151 taecelrkaae gyleaatsry nelvergeaa lerlrsqqsf eevsaraegy
 201 vdqaveltqe algtvasqtr avgeraaklv gielpkkaap akkaapakka
 251 apakkaaakk apakkaaakk vtqk (SEQ ID NO: 3)

B.

BCG HBHA aa

1 aensniddik apllaalgaa dlalatvnel itnlreraee trtdtrsrve
 51 esarrltklq edlpeqltel rekftaeelr kaegyleaa tsrynelver
 101 geaalerlrs qqsfevsar aegyvdqave ltqealgtva sqtravgera
 151 akivgielpk kaapakkaap akkaapakka aakkapakka aakkvtk (SEQ ID NO: 4)

C.

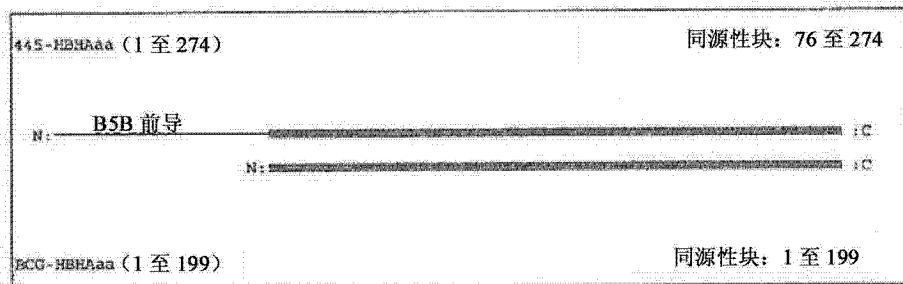
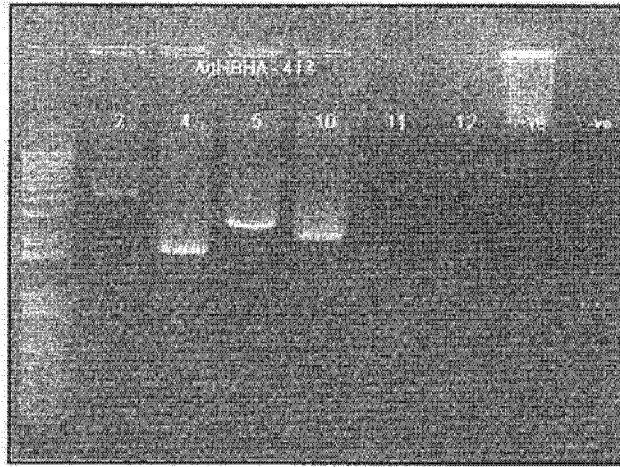


图 5A-C

A

5



B

5

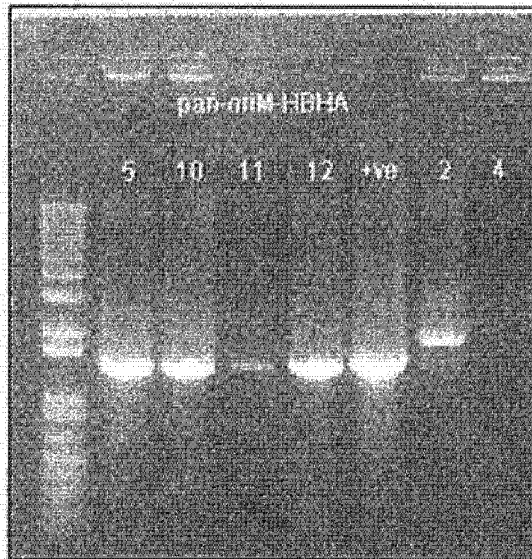


图 6A 和 B

C

5

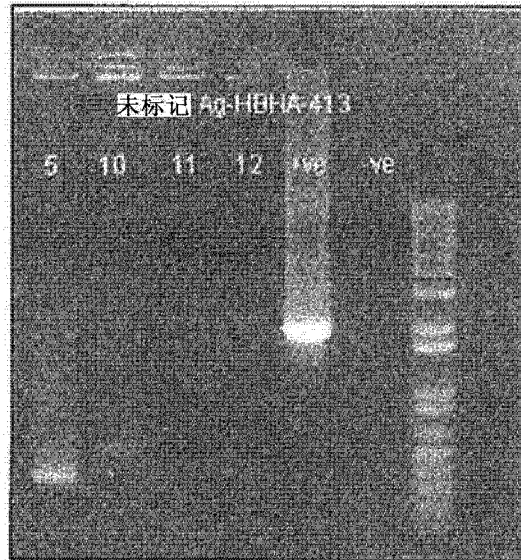


图 6C

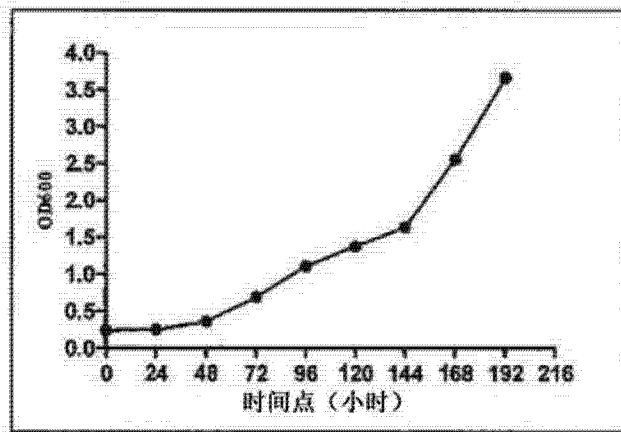


图 7

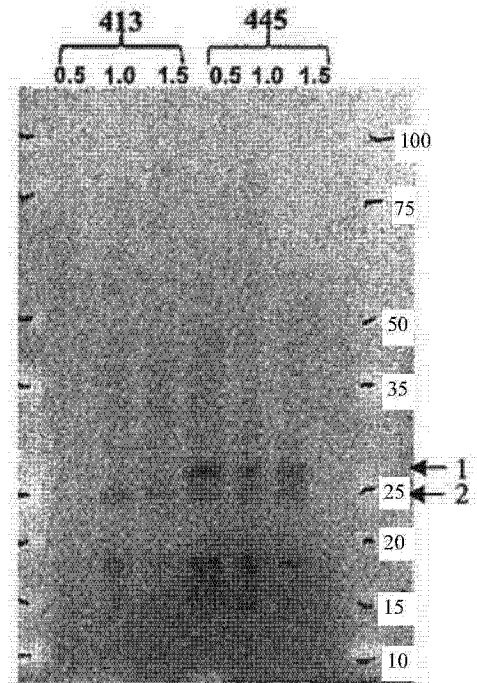


图 8

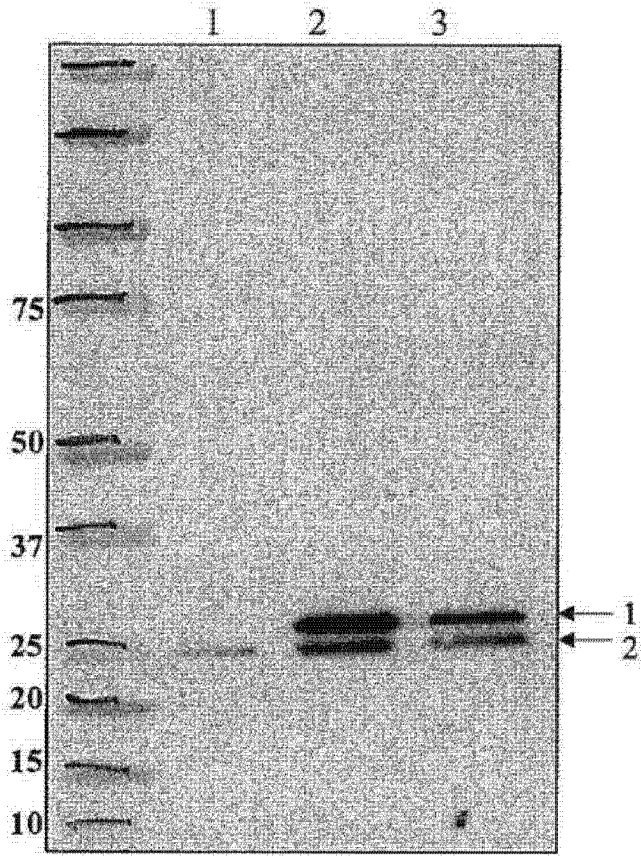


图 9

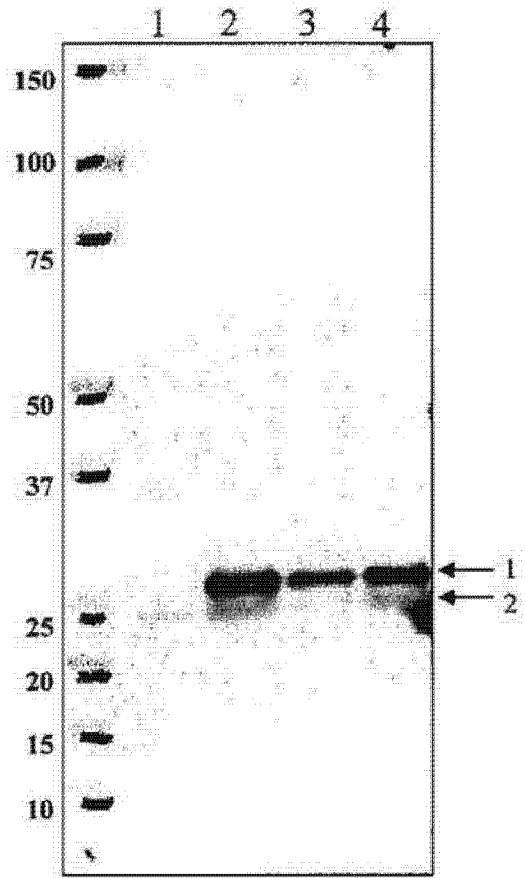
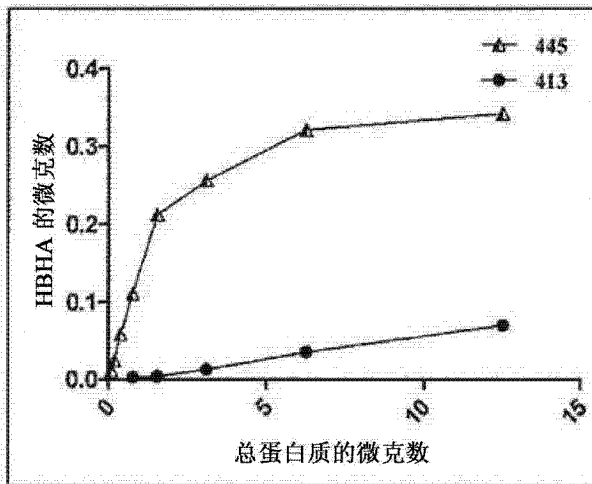


图 10

A.



B.

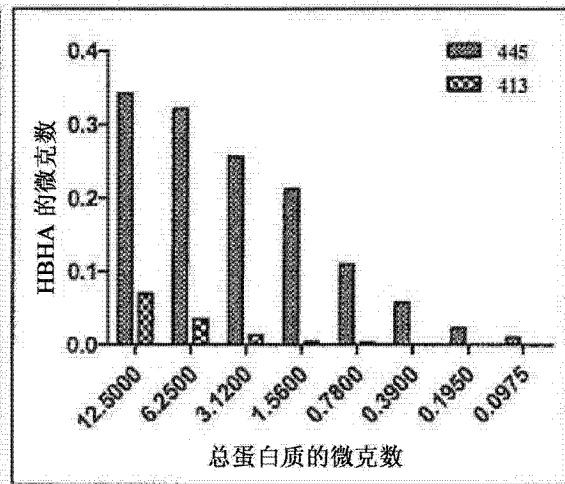


图 11

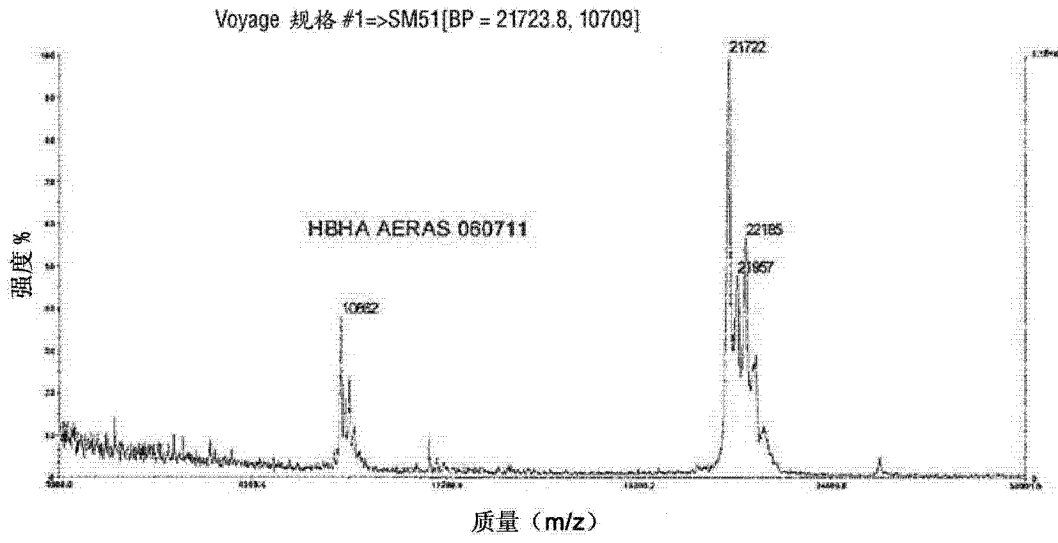


图 12

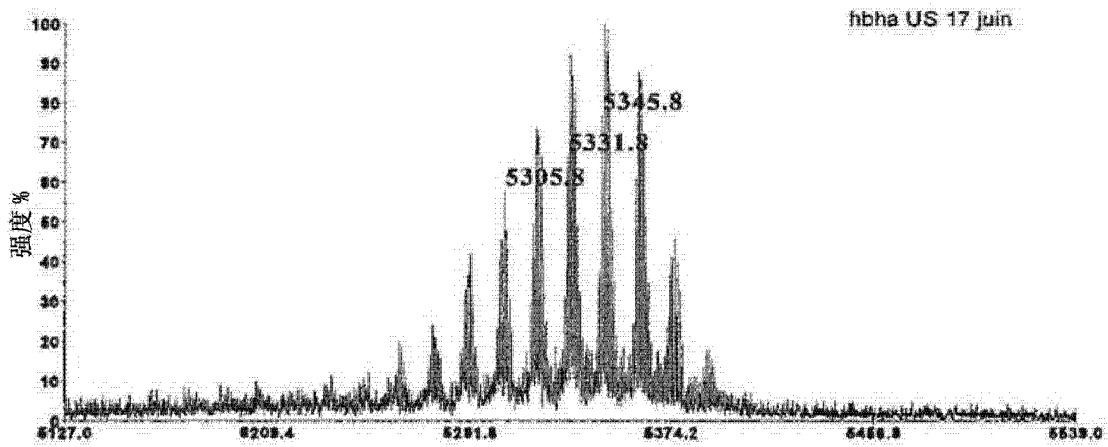
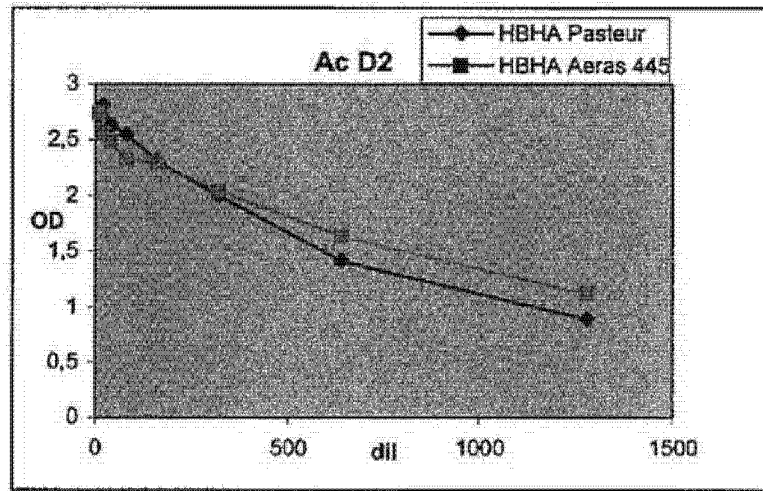


图 13

A.



B.

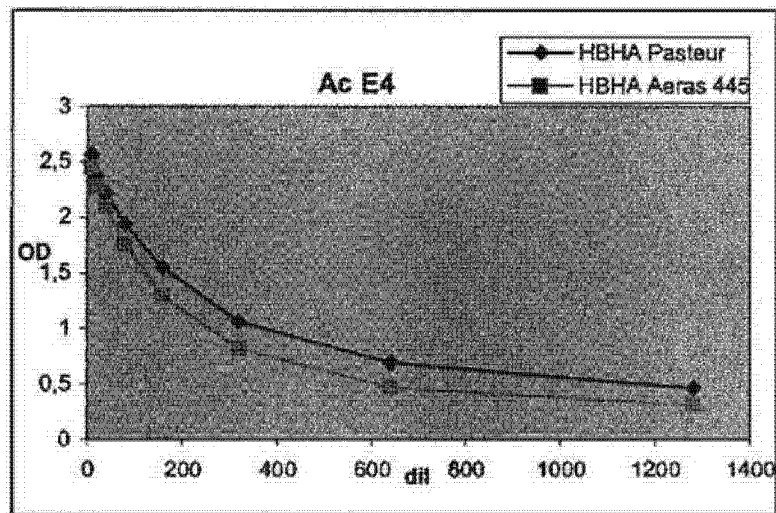


图 14A 和 B