



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106822882 A

(43)申请公布日 2017. 06. 13

(21)申请号 201610883668.4

A61P 31/04(2006.01)

(22)申请日 2011.12.14

G01N 33/569(2006.01)

(30)优先权数据

61/422723 2010.12.14 US

(62)分案原申请数据

201180060222.7 2011.12.14

(71)申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

(72)发明人 S.A.G.戈达特 A.拉南

D.I.莱莫伊内

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 翟建伟 万雪松

(51)Int.Cl.

A61K 39/04(2006.01)

权利要求书3页 说明书35页

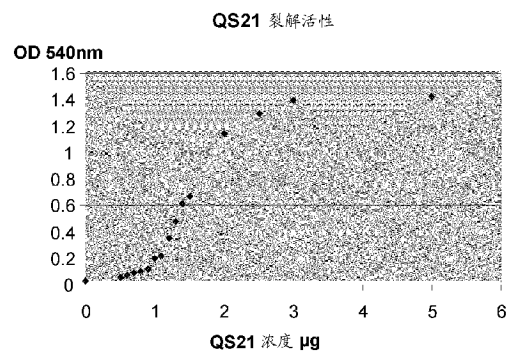
序列表16页 附图16页

(54)发明名称

分枝杆菌抗原组合物

(57)摘要

提供了分枝杆菌抗原组合物、包含M72相关抗原的免疫原性组合物及其在药物中的用途,其中所述组合物的导电率是13 mS/cm或更低,或者所述组合物的盐浓度是130 mM或更低。



1. 包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中:
 - (i) 所述组合物的导电率是13 mS/cm或更低;和/或
 - (ii) 所述组合物中盐的浓度是130 mM或更低;和/或
 - (iii) 所述组合物中氯化钠的浓度是130 mM或更低。
2. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述组合物的导电率是10 mS/cm或更低。
3. 根据权利要求2所述的免疫原性组合物,其中所述组合物的导电率是3 mS/cm或更低。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物中盐的浓度是100 mM或更低。
5. 根据权利要求4所述的免疫原性组合物,其中所述组合物中盐的浓度是40 mM或更低。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物中氯化钠的浓度是100 mM或更低。
7. 根据权利要求6所述的免疫原性组合物,其中所述组合物中氯化钠的浓度是40 mM或更低。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物中CaCl₂的浓度是30 mM或更低。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物中MgSO₄的浓度是60或更低。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的免疫原性组合物,NH₄⁺、Mg²⁺和Ca²⁺离子的总浓度是40 mM或更低。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的免疫原性组合物,进一步包含非离子胀度剂。
12. 根据权利要求11所述的免疫原性组合物,其中所述非离子胀度剂是多元醇。
13. 根据权利要求12所述的免疫原性组合物,其中所述多元醇是山梨醇。
14. 根据权利要求13所述的免疫原性组合物,其中所述山梨醇的浓度是约4至约6% (w/v)。
15. 根据权利要求1至14中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述蔗糖的浓度是约4至约6% (w/v)。
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的免疫原性组合物,进一步包含一种或多种免疫刺激剂。
17. 根据权利要求16所述的免疫原性组合物,其中所述免疫刺激剂是皂苷和/或TLR4激动剂。
18. 根据权利要求17所述的免疫原性组合物,其中所述一种或多种免疫刺激剂是脂质体形式。
19. 根据权利要求17或权利要求18所述的免疫原性组合物,其中所述皂苷是QS21。
20. 根据权利要求17至19中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述TLR4激动剂是3-脱-O-酰化单磷酸脂质A。
21. 根据权利要求1至20中任一项所述的免疫原性组合物,其中重量摩尔渗透压浓度是

250至750 mOsm/kg。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物作为50 μ l至1 ml的单位剂量提供。

23. 根据权利要求22所述的免疫原性组合物,其中所述单位剂量是100 μ l至750 μ l。

24. 根据权利要求22或23所述的免疫原性组合物,其中所述单位剂量含有1至100 μ g的M72相关抗原。

25. 根据权利要求24所述的免疫原性组合物,其中单位剂量含有5至50 μ g的M72相关抗原。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物的pH在7.0至9.0的范围内。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原包含与SEQ ID No:1具有至少70%同一性的序列。

28. 根据权利要求27所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原由与SEQ ID No:1具有至少70%同一性的序列组成。

29. 根据权利要求28所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原包含与SEQ ID No:1具有至少90%同一性的序列。

30. 根据权利要求29所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原由与SEQ ID No:1具有至少90%同一性的序列组成。

31. 根据权利要求1至26中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原包含SEQ ID No:1的氨基酸序列。

32. 根据权利要求1至26中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原包含SEQ ID No:3的氨基酸序列。

33. 根据权利要求31所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原由SEQ ID No:1的氨基酸序列组成。

34. 根据权利要求32所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原由SEQ ID No:3的氨基酸序列组成。

35. 根据权利要求1至32中任一项所述的免疫原性组合物,其中在25 $^{\circ}$ C储存24小时的期间后保持所述免疫原性组合物的至少80%的抗原性。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的免疫原性组合物,其用于药物中。

37. 根据权利要求1至35中任一项所述的免疫原性组合物在药物制备中的用途。

38. 用于预防、治疗或改善分支杆菌感染、诸如结核分枝杆菌感染的方法,所述方法包括施用安全且有效量的权利要求1至35中任一项的免疫原性组合物。

39. 制备权利要求1至35中任一项的免疫原性组合物的工艺,其包括以下步骤:

a) 冻干M72相关抗原;和

b) 用水溶液重构步骤a) 的冻干的M72相关抗原,其中:

(i) 所述溶液的导电率是13 mS/cm或更低;和/或

(ii) 所述溶液中盐的浓度是130 mM或更低;和/或

(iii) 所述溶液中氯化钠的浓度是130 mM或更低。

40. 制备权利要求1至35中任一项的稳定的免疫原性组合物的方法,其包括下列步骤:

a) 冻干M72相关抗原;和

b) 用水溶液重构步骤a) 的冻干的M72相关抗原,其中:

(i) 所述溶液的导电率是13 mS/cm或更低;和/或

(ii) 所述溶液中盐的浓度是130 mM或更低;和/或

(iii) 所述溶液中氯化钠的浓度是130 mM或更低;

其中在25 °C储存24小时的期间后保持所述免疫原性组合物的至少80%的抗原性。

41. 试剂盒,包含:

a) 冻干的M72相关抗原;和

b) 水溶液,其中:

(i) 所述溶液的导电率是13 mS/cm或更低;和/或

(ii) 所述溶液中盐的浓度是130 mM或更低;和/或

(iii) 所述溶液中氯化钠的浓度是130 mM或更低。

42. 根据权利要求39所述的工艺、根据权利要求40所述的方法或根据权利要求41所述的试剂盒,其中所述水溶液包含免疫刺激剂。

43. 根据权利要求42所述的工艺、方法或试剂盒,其中所述水溶液包含脂质体制剂中的皂苷和TLR4激动剂,和非离子涨度剂。

44. 根据权利要求43所述的工艺、方法或试剂盒,其中所述非离子涨度剂是山梨醇。

45. 根据权利要求44所述的工艺、方法或试剂盒,其中所述山梨醇的浓度是约2.5至约15% (w/v)。

46. 根据权利要求43至45中任一项所述的工艺、方法或试剂盒,其中所述皂苷是QS21。

47. 根据权利要求43至46中任一项所述的工艺、方法或试剂盒,其中所述TLR4激动剂是3-脱-O-酰化单磷酸脂质A。

分枝杆菌抗原组合物

[0001] 本申请是申请日为2011年12月14日的中国专利申请201180060222.7“分枝杆菌抗原组合物”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含M72相关抗原且具有低离子强度的免疫原性组合物。本发明也涉及进一步包含一种或多种免疫刺激剂的这类免疫原性组合物。还提供了用于制备这类免疫原性组合物的方法和相关的试剂盒。

背景技术

[0003]

结核病(TB)是一种由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和其他分枝杆菌种的感染引起的慢性传染性疾病。它是世界上发展中国家的一种主要疾病,并成为发达区域日益严重的问题。超过20亿人被认为感染了TB杆菌,每年新增约940万TB病例和170万死亡病例。其中10%感染TB杆菌的人会发展活动性TB,每位患有活动性TB的人平均每年感染10-15个其他人。尽管在全球的每年发病率已经达到顶峰,但是由于人口增长,死亡数和病例数依然在上升(World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2010)。

[0004] 蛋白抗原Mtb72f和M72(描述为,例如,国际专利申请W02006/117240中)或其片段或衍生物是具有用于治疗或预防结核病的潜在益处的蛋白抗原。

[0005] 为了确保能维持免疫原性,蛋白抗原的配制极端重要。有时使用免疫刺激剂以改善针对任何给定抗原而产生的免疫应答。然而,在免疫原性组合物中包含佐剂会增加成分制备的复杂性以及组合物的分布和配制的复杂性。配制者必须考虑每种佐剂成分以及抗原性成分的制备。具体而言,应当考虑抗原性成分与佐剂成分的相容性。这尤其是在预期将冻干抗原或抗原制剂与佐剂制剂重构的情况下。在这种情况下,重要的是,佐剂制剂的缓冲液对于抗原而言是合适的并且抗原的免疫原性或溶解度不会受到佐剂的影响。

发明内容

[0006]

本发明人已经首次鉴定M72相关抗原对盐的存在特别敏感。不受理论的限制,据信M72相关抗原受被称为“盐析”的现象的不利影响,该现象可以被定义为通过蛋白与盐如氯化钠的相互作用而从其溶液中沉淀。本发明人已经发现,当氯化钠浓度低至150mM时,这些抗原就会聚集和沉淀。因此,包含M72相关抗原的免疫原性组合物的稳定性令人惊讶地可以通过降低氯化钠浓度而改善。

[0007] 因此,本发明提供包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中所述组合物的导电率是13 mS/cm或更低。

[0008] 额外提供包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中所述组合物中的盐浓度是130 mM或更低。

[0009] 本发明还提供包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中所述组合物中的氯化钠浓度是130 mM或更低。

[0010] 附图简述

图1. QS21裂解活性曲线

图2. 在不同ASA制剂中,每种3D-MPL同类物(congener)的百分比

图3. 储存后具有不同的pH和NaCl浓度的免疫原性组合物的DLS

图4. 储存后具有不同的pH和NaCl浓度的免疫原性组合物的浊度测定

图5. 储存后具有不同的pH和NaCl浓度的免疫原性组合物的抗原稳定性

图6a-6d. 储存后具有不同的pH和NaCl浓度的免疫原性组合物的SEC-HPLC分析

图7. 储存后具有不同的pH和NaCl浓度的免疫原性组合物的抗原性

图8. NaCl标准溶液的导电率

图9. 使用本发明的免疫原性组合物在小鼠中诱导CD4 T细胞应答

图10. 使用本发明的免疫原性组合物在小鼠中诱导CD8 T细胞应答

图11. 储存后具有不同的pH和NaCl浓度的免疫原性组合物的浊度测定

图12. 储存后具有不同的pH和NaCl浓度的免疫原性组合物的DLS

图13. 储存后具有不同的NaCl浓度的免疫原性组合物的抗原性。

[0011] 序列标识符简述

SEQ ID No:1	M72蛋白的氨基酸序列
SEQ ID No:2	编码M72蛋白的核苷酸序列
SEQ ID No:3	具有2个N-末端His 残基的M72蛋白的氨基酸序列
SEQ ID No:4	编码具有2个N-末端His 残基的M72蛋白的核苷酸序列
SEQ ID No:5	Mtb72f蛋白的氨基酸序列
SEQ ID No:6	编码Mtb72f蛋白的核苷酸序列
SEQ ID No:7	具有6个N-末端His 残基的Mtb72f蛋白的氨基酸序列
SEQ ID No:8	编码具有6个N-末端His 残基的Mtb72f蛋白的核苷酸序列
SEQ ID No: 9	CpG寡核苷酸1的核苷酸序列 (CpG 1826)
SEQ ID No: 10	CpG寡核苷酸2的核苷酸序列 (CpG 1758)
SEQ ID No: 11	CpG寡核苷酸3的核苷酸序列
SEQ ID No: 12	CpG寡核苷酸4的核苷酸序列 (CpG 2006)
SEQ ID No: 13	CpG寡核苷酸5的核苷酸序列 (CpG 1686)。

具体实施方式

[0012]

在第一个方面,本发明提供包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中所述组合物的导电率是13 mS/cm或更低。具体而言,本发明提供包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物的导电率是12 mS/cm或更低,例如10 mS/cm或更低、8 mS/cm或更低、6 mS/cm或更低、5 mS/cm或更低、4 mS/cm或更低或3 mS/cm或更低。在特定的实施方案中,免疫原性组合物的导电率是2.5 mS/cm或更低,诸如2.25 mS/cm或更低或2.0 mS/cm或更低。在进一步特定的实施方案中,免疫原性组合物的导电率是1.5至2.5 mS/cm。

[0013] 在第二个方面,本发明提供包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中所述组合物中的盐浓度是130 mM或更低。具体而言,本发明提供包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中所述组合物中的盐浓度是100 mM或更低,例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低、或40 mM或更低。在特定的实施方案中,所述组合物中的盐浓度是35 mM或更低,诸如30 mM或更低或25 mM或更低。在进一步特定实施方案中,所述组合物中的盐浓度是20至40 mM,诸如25至35 mM。

[0014] 在第三个方面,本发明提供包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中氯化钠浓度是130 mM或更低。具体而言,本发明提供包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中氯化钠浓度是100 mM或更低,例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低、40 mM或更低、30 mM或更低、20 mM或更低或15 mM或更低。在特定的实施方案中,所述免疫原性组合物中的氯化钠浓度是10 mM或更低,诸如7.5 mM或更低。合适地,免疫原性组合物中的氯化钠浓度或等于或低于5 mM。在进一步特定的实施方案中,免疫原性组合物基本不含氯化钠。基本不含是指氯化钠浓度为或非常接近0 mM(诸如3 mM或更低、2 mM或更低或1 mM 或更低)。

[0015] 合适地,免疫原性组合物中的CaCl₂浓度将是40 mM或更低、30 mM或更低、20 mM或更低、15 mM或更低或10 mM或更低。

[0016] 合适地,免疫原性组合物中的MgSO₄浓度将是80 mM或更低、60 mM或更低、40 mM或更低、30 mM或更低、20 mM或更低或10 mM或更低。

[0017] 合适地,免疫原性组合物中的NH₄⁺、Mg²⁺和Ca²⁺离子总浓度将是80 mM或更低、60 mM或更低、40 mM或更低、30 mM或更低、20 mM或更低或10 mM或更低。

[0018] 本发明的免疫原性组合物将是含水制剂。

[0019] 本发明的免疫原性组合物的导电率可以使用本领域中已知的技术,例如,使用专用的导电率仪或其他具有测量导电率能力的仪器来进行测量。一种合适的仪器是来自Malvern Instruments (UK)的Zetasizer Nano ZS。

[0020] 使用已知技术和试剂盒,技术人员可以容易地测试钠离子(Na⁺)和氯离子(Cl⁻)的浓度。例如,可以使用试剂盒诸如来自Biosupply的钠的酶学测定试剂盒(Sodium Enzymatic Assay Kit)(目录号:BQ011EAEL)来测定钠。可以使用试剂盒诸如来自Biosupply的氯的酶学测定试剂盒(Chloride Enzymatic Assay Kit)(目录号:BQ006EAEL)来测定氯。

[0021] 结核病(TB)是一种由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和其他分枝杆菌种的感染引起的慢性传染性疾病。它是世界上发展中国家的一种主要疾病,并成为发达区域日益严重的问题。超过20亿人被认为感染了TB杆菌,每年新增约940万TB病例和170万死亡病例。其中10%感染TB杆菌的人会发展活动性TB,每位患有活动性TB的人平均每年感染10-15个其他人。尽管在全球的每年发病率已经达到顶峰,但是由于人口增长,死亡数和病例数依然在上升(World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2010)。

[0022] 结核分枝杆菌通过呼吸道途径感染个体。肺泡巨噬细胞吞噬该细菌,但它能够通过抑制具有酸性溶酶体的吞噬体融合而存活和增殖。随后发生涉及CD4⁺和CD8⁺ T细胞的复杂免疫应答,最终导致肉芽肿的形成。结核分枝杆菌成功作为病原体的关键在于该分离但未根除的细菌可长期存在,使得个体容易在随后发展为活动性TB这一事实。

[0023] 在感染后的第一年,少于5%的感染个体会发展活动性TB。该肉芽肿可存在数十年,并被认为是缺乏氧和营养素的休眠状态下包含活结核分枝杆菌。然而,最近表明,大部分处于休眠状态的细菌位于遍布体内的非巨噬细胞的细胞类型中(Locht等人, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007 7(11):1665-1677)。当宿主的天然免疫和病原体之间的平衡发生变化时(例如由于免疫抑制事件)则发生活动性TB的发展(Anderson P *Trends in Microbiology* 2007 15(1):7-13; Ehlers S *Infection* 2009 37(2):87-95)。

[0024] 也已提出描述潜伏TB和活动性TB之间的平衡的动力学假设(Cardana P-J *Inflammation & Allergy - Drug Targets* 2006 6:27-39; Cardana P-J *Infection* 2009 37(2):80-86)。

[0025] 尽管感染在相当长时间内可以是无症状的,但是活动性疾病最常显现为肺的急性炎症,从而导致疲劳、体重下降、发烧和持续咳嗽。如果未经治疗,通常可导致严重的并发症和死亡。

[0026] 结核病通常可采用长期抗生素疗法进行控制,尽管该种治疗并不足以防止该疾病的扩散。活跃地感染的个体可以是很大程度上无症状的,但在一定时间具有传染性。此外,尽管对治疗方案的依从性是关键,但是患者的行为很难监测。一些患者并未完成治疗周期,这可能导致无效治疗和耐药性的形成。

[0027] 多重耐药性TB (MDR-TB) 是一种对一线药物没有应答的形式。所有TB病例中有3.3%是MDR-TB,每年估计有440,000新MDR-TB病例发生。当耐受一线药物之上发生耐受二线药物时,产生广泛耐药TB (XDR-TB)。已经在58个国家中验证了几乎无法治疗的XDR-TB(世界卫生组织 *Tuberculosis Facts* 2010)。

[0028] 即使完成抗生素治疗的整个疗程,结核分枝杆菌的感染可能无法从感染个体根除,并可保留为能够再活化的潜伏感染。为了控制结核病扩散,对疾病的有效疫苗接种计划和准确早期诊断是最为重要的。

[0029] 目前,用活菌接种是诱导保护性免疫最广泛使用的方法。用于该目的的最常用的分枝杆菌是卡介杆菌(BCG),这是60多年前第一个开发的牛分枝杆菌的无毒性菌株。然而,BCG的安全性和效力成为争论的来源-尽管在儿童中显示了对严重疾病的保护,但是BCG并不能预防成年人中潜伏TB的形成或者肺部疾病的再活化。此外,在一些国家,例如美国,并未用这种药剂来给普通人群接种。

[0030] 有多种蛋白在分枝杆菌感染早期被强烈表达,据显示它们可在动物接种模型中提供保护效力。然而,用感染早期高度表达的抗原接种可能无法提供处理感染后期的最佳免疫应答。对潜伏性感染的充分控制可能需要T细胞,其特异性针对在该时期表达的特定抗原。直接靶向持续休眠菌的暴露后疫苗可能有助于保护免于TB再活化,从而强化TB控制,或者甚至能清除感染。因此,靶向潜伏TB的疫苗可以显著和经济地降低全球TB感染率。

[0031] 基于后期抗原的亚基疫苗还可与早期抗原联合使用以提供多阶段疫苗。可替代地,早期和/或后期抗原可用于补充和改善BCG接种(通过促进BCG应答或者通过形成高级重组BCG菌株)。

[0032] 蛋白抗原Mtb72f和M72是具有治疗或预防结核病的潜在益处的蛋白抗原。Mtb72f已显示在许多动物模型中提供保护(参见例如:Brandt等人 *Infect. Immun.* 2004 72(11):6622-6632; Skeiky等人 *J. Immunol.* 2004 172:7618-7628; Tsenova等人 *Infect.*

Immun. 2006 74 (4) :2392-2401; Reed等人PNAS 2009 106 (7) :2301-2306)。Mtb72f也已经是临床研究的主题(Von Eschen等人2009 *Human Vaccines* 5 (7) :475-482)。M72是改进的抗原,其相对于Mtb72f包括单一的丝氨酸至丙氨酸的突变,导致改进的稳定性特征。M72相关抗原也已经显示在潜伏性TB模型中是有价值的(国际专利申请W02006/117240)。

[0033] 如本文所用术语“M72相关抗原”指SEQ ID No:1所示M72蛋白及其免疫原性衍生物。如本文所用术语“衍生物”指相对于参考序列,修饰的抗原。免疫原性衍生物与参考序列足够相似,足以保留参考序列的免疫原性特性,且仍然能够允许增强针对参考序列的免疫应答。衍生物可以,例如,包含参考序列的修饰版本,或者可以由参考序列的修饰版本组成。

[0034] M72相关抗原可以,例如含有小于1500个氨基酸残基,诸如小于1200个氨基酸残基,特别是小于1000个氨基酸残基,特别是小于800个氨基酸残基。

[0035] T细胞表位是被T细胞(例如,CD4+或CD8+ T细胞)识别的氨基酸的短连续片段。T细胞表位的鉴定可通过本领域技术人员已知的表位定位实验实现(参见例如Paul, *Fundamental Immunology*, 第3版, 243-247 (1993); Beißbarth等人*Bioinformatics* 2005 21 (Suppl. 1) :i29-i37)。在不同的远系交配群体(诸如人)中,不同的HLA类型表示该特定表位可能不被该群体所有成员所识别。由于T细胞应答在结核病中的关键参与,为了使识别的水平和免疫应答的规模最大化,M72的免疫原性衍生物期望地是含有完整的大多数(或适当地所有)T细胞表位的那种。

[0036] 技术人员将认识到改变、添加或缺失单个氨基酸或少量百分比的氨基酸的M72蛋白的单独取代、缺失或添加是“免疫原性衍生物”,其中一种或多种改变导致以功能类似的氨基酸取代氨基酸或者基本不影响免疫原性功能的残基的取代/缺失/添加。

[0037] 提供功能类似的氨基酸的保守取代表是本领域众所周知的。总体而言,该种保守取代将落入下文限定的氨基酸分组之一,尽管在一些情况下,也可能有其他取代而基本不影响该抗原的免疫原性特性。以下八组各包含了彼此可进行典型保守取代的氨基酸:

- 1) 丙氨酸(A), 甘氨酸(G);
- 2) 天冬氨酸(D), 谷氨酸(E);
- 3) 天冬酰胺(N), 谷氨酰胺(Q);
- 4) 精氨酸(R), 赖氨酸(K);
- 5) 异亮氨酸(I), 亮氨酸(L), 甲硫氨酸(M), 缬氨酸(V);
- 6) 苯丙氨酸(F), 酪氨酸(Y), 色氨酸(W);
- 7) 丝氨酸(S), 苏氨酸(T); 以及
- 8) 半胱氨酸(C), 甲硫氨酸(M)

(参见例如,Creighton, *Proteins* 1984)。

[0038] 合适地,该种取代不发生在表位区域,因此对该抗原的免疫原性特性不具有明显影响。

[0039] 免疫原性衍生物还可包括相对于参考序列其中插入了另外氨基酸的那些免疫原性衍生物。合适地,该种插入不发生在表位区域,因此对该抗原的免疫原性特性不具有明显影响。插入的一个实例包括一段短的组氨酸残基(例如,2-6个残基)以帮助目的抗原的表达和/或纯化。

[0040] 免疫原性衍生物包括相对于参考序列氨基酸已经缺失的那些免疫原性衍生物。合

适地,该种缺失不发生在表位区域,因此对该抗原的免疫原性特性不具有明显影响。

[0041] 技术人员将认识到特定的免疫原性衍生物可包括取代、缺失和添加(或其任意组合)。

[0042] 两个或更多多肽序列的上下文中的“相同”或百分比“同一性”指,当比较和比对得到比较窗口或指定区域的最大对应(如采用下列序列比较算法之一或通过人工比对和目视观察所测量)时,两个或更多个序列或子序列彼此相同或具有一定百分比的相同(即,相对指定区域70%同一性,任选地75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的同一性)的氨基酸残基。该定义还指测试序列的互补(compliment)。任选地,该同一性存在于长度至少500个氨基酸的区域,诸如至少600个氨基酸或至少700个氨基酸。合适地,该比较在对应于参考序列全长的窗口进行(相对于衍生物序列)。

[0043] 对于序列比较,将一个序列作为参考序列,将测试序列与之比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机,在需要时,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可采用默认程序参数,或指定可选参数。随后序列比较算法将根据程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0044] 本文所用的“比较窗口”指对两个序列进行最佳比对后,其中序列可与相同数量连续位置的参考序列比较的区段。比较序列的比对的方法已为本领域众所周知。比较序列最佳比对可通过下述方法实现,例如,通过Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981) 的局部同源性算法,通过Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) 的同源性比对算法,通过Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988) 的相似性搜索法,通过这些算法的计算机执行(Wisconsin 遗传学软件包中的GAP, BESTFIT, FASTA以及TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI),或者通过人工比对和目视观察(参见例如,*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人编辑1995增补))。

[0045] 一种有用算法的实例为PILEUP。PILEUP采用渐进的、成对比对建立了来自一组相关序列的多重序列比对,从而显示相关性和百分比序列同一性。它还绘制了可显示用于建立比对的聚类关系的树状图或系统树图。PILEUP采用了简化的Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351-360 (1987) 的渐进比对法。所采用的方法与Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989) 所描述的方法类似。该程序可对最高达300个序列进行比对,每个序列的最大长度为5,000个核苷酸或氨基酸。该多重比对程序始于对两个最为相似的序列的成对比对,从而产生两个比对序列的聚类。然后将该聚类与下一个最相关的序列或比对序列的聚类进行比对。两个序列聚类通过将两个单独序列的成对比对的简单扩展进行比对。最终比对可通过一系列的渐进、成对比对实现。该程序通过指定特定的序列及其氨基酸坐标为序列比较区域并指定程序参数来运行。使用PILEUP时采用下列参数比较参考序列和其他测试序列以确定百分比序列同一性关系:默认空位权重(3.00), 默认空位长度权重(0.10), 以及加权的末端空位。PILEUP可以从GCG序列分析软件包例如7.0版中获取(Devereaux等人,*Nuc. Acids Res.* 12:387-395 (1984))。

[0046] 适于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的另一实例为BLAST和BLAST2.0算法,其分别描述于Altschul等人,*Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) 和Altschul等人,*J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)。进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息

中心公开获取(网址在www.ncbi.nlm.nih.gov/)。该算法包括首先通过鉴定查询序列中长度为W的短字来鉴定高得分序列对(HSPs),其中该短字与数据库序列中相同长度的字比对时匹配或满足某些正数值阈值得分T。T指邻近字得分阈值(Altschul等人,同前)。这些初始邻近字采样数(word hits)作为种子启动对包含它们的更长HSPs的搜索。该字采样数沿着每个序列的两个方向伸展,直至累计比对得分增加。对核苷酸序列的累计分数采用参数M(对一对匹配残基的奖赏分数;总是>0)和N(对不匹配残基的惩罚分数;总是<0)进行计算。对于氨基酸序列,可使用得分矩阵来计算累计分数。以下情况下字采样数向各方向的伸展被停止:累计比对分数较其最大获得值小数量X;由于一个或多个负得分残基比对的累积,累计分数降至0或以下;或者达到了任一序列的末端。BLAST算法的参数W、T和X确定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)的默认值为字长(w) 11,预期(E) 10,M=5,N=-4,且同时对两条链进行比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序的默认值为字长3,和预期(E) 10,以及该BLOSUM62得分矩阵(参见Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989))的比对(B) 50,预期(E) 10,M=5,N=-4,且对两条链进行比较。

[0047] BLAST算法还进行两个序列间的相似性的统计学分析(参见例如,Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993))。由BLAST算法所提供的一种相似性的量度为最小概率总和(P(N)),它对两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然产生匹配的概率提供了指示。例如,如果测试核酸与参考核酸之间比较得到的最小概率总和小于约0.2,更优选小于约0.01,最优选小于约0.001时,该核酸被认为与参考核酸相类似。

[0048] 在任意情况下,多肽序列的免疫原性衍生物将具有与参考序列基本相同的活性。基本相同的活性指参考序列在PBMC或全血的用特定抗原的体外再刺激测定(例如,再刺激数小时至长达两周之间,诸如长达一天、1天至1周或者1至2周的时间)中活性的至少50%、合适地至少75%且特别是至少90%,其中该测定通过淋巴组织增殖、培养上清液中细胞因子生成(通过ELISA、CBA等测量)或者胞内和胞外染色(例如,采用特异性针对免疫标记物的抗体,诸如CD3、CD4、CD8、IL2、TNF α 、IFN γ 、CD40L、CD69等)然后以流式细胞仪表征T和B细胞应答来测量细胞的活化。合适地,基本相同的活性指参考序列在T细胞增殖和/或IFN- γ 生成测定中的活性的至少50%、合适地至少75%且尤其是至少90%。

[0049] M72蛋白的特定衍生物包括在N末端具有额外的His残基的那些(例如,两个His残基,如SEQ ID No:7中所提供的;或5个或尤其是6个His残基的多组氨酸标记,其可以用于镍亲和纯化)。Mtb72f (SEQ ID No:5),其中M72中的初始丝氨酸残基已经被突变,是在N末端具有额外的His残基的Mtb72f蛋白(例如,两个His残基;或5个或尤其是6个His残基的多组氨酸标记,其可以用于镍亲和纯化)。

[0050] 合适地,M72相关抗原将包含,诸如与M72具有至少70%,诸如至少80%、特别是至少90%、特别是至少95%,例如至少99%同一性的序列。任选地,M72相关抗原将包含,诸如与M72具有至少98%同一性的序列。

[0051] 典型地,M72相关抗原将包含,诸如SEQ ID No: 1或3的具有小量缺失插入和/或取代的免疫原性衍生物。实例是在0-5个位置具有最多达5个残基缺失,在0-5个位置具有最多达5个残基插入和最多达20个残基取代的那些。

[0052] M72的其他免疫原性衍生物是包含诸如由SEQ ID No:1或3的片段组成的衍生物,所述片段长度为至少500个氨基酸,诸如长度为至少600个氨基酸或长度为至少700个氨基

酸。

[0053] M72相关抗原可以通过前面描述的方法(W02006/117240)、实施例所提供的那些、或与其类似的方法来制备。

[0054] 免疫原性组合物可以包含一个或多个进一步的抗原成分。这样的额外抗原组分本身不需要对组合物中盐的存在敏感。

[0055] 额外的抗原组分可以旨在增强或补充结核病预防和治疗领域中由M72相关抗原要求的免疫应答,或者额外的抗原可以与其他病原体相关且旨在为了方便起见用于和M72相关抗原一起施用。当许多抗原组分存在于制剂中时,这些也可以以个别多肽或融合蛋白的形式提供。在一些情况下,额外的抗原组分可以作为多核苷酸(或多个核苷酸)提供。

[0056] 众所周知的是,对于胃肠外施用,溶液应当具有药学上可接受的重量摩尔渗透压浓度,以避免细胞变形或裂解。药学上可接受的重量摩尔渗透压浓度将通常是指溶液将具有约等渗或轻度高渗的重量摩尔渗透压浓度。合适地,本发明的免疫原性组合物将具有250至750 mOsm/kg范围内的重量摩尔渗透压浓度,例如,重量摩尔渗透压浓度可以在250至550 mOsm/kg的范围内,诸如280至500 mOsm/kg的范围内。

[0057] 可以根据本领域中已知的技术,诸如通过使用商业上获得的渗压计,例如从Advanced Instruments Inc. (USA)可获得的Advanced® Model 2020测量重量摩尔渗透压浓度。

[0058] “等渗剂”是生理上可耐受的并赋予制剂合适胀度的化合物,以防跨越与制剂接触的细胞膜的水的净流动。

[0059] 通常,氯化钠(NaCl)用作胀度剂。本发明人已经首次显示M72相关抗原对“盐析”特别敏感,盐析是指溶液中的蛋白在含高浓度盐的溶液中聚集或凝结的过程。因此,提供了可替代的方式以确保本发明的免疫原性组合物具有药学上可接受的重量摩尔渗透压浓度。

[0060] 在特定的实施方案中,提供进一步包含非离子型胀度剂的免疫原性组合物。用于免疫原性组合物中的非离子型胀度剂需要自身是药学上可接受的,例如适用于人类,并且与M72相关抗原相容并且进一步与其他成分如一种或多种免疫刺激剂相容。

[0061] 在本发明的一个实施方案中,合适的非离子型胀度剂是多元醇、糖类(尤其是蔗糖、果糖、右旋糖或葡萄糖)或氨基酸如甘氨酸。在一个实施方案中,多元醇是糖醇,尤其是C3-6糖醇。示例性的糖醇包括甘油、赤藓糖醇、苏糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、核糖醇、山梨醇、甘露醇、卫矛醇和艾杜糖醇。在该实施方案的特定实例中,合适的非离子型胀度剂是山梨醇。技术人员将认识到可以通过使用不同胀度剂的混合物获得适当的重量摩尔渗透压浓度。在本发明的特定实施方案中,本发明组合物中的非离子型胀度剂合并蔗糖和/或山梨醇。

[0062] 在一个实施方案中,免疫原性组合物中多元醇的合适浓度为约2.5至约15% (w/v),尤其是约2.5至约10% (w/v) 例如约3至约7 % (w/v),诸如约4至约6% (w/v)。在该实施方案的特定实例中,多元醇是山梨醇。

[0063] 在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含蔗糖和山梨醇。在这样的情况下,免疫原性组合物可以合适地含有约2.5至约15% (w/v) 的蔗糖,和约2.5至约15% (w/v) 的山梨醇,特别是约2.5至约10% (w/v) 的蔗糖和约2.5至约10% (w/v) 的山梨醇,例如,约3至约7% (w/v) 的蔗糖,和约3至约7% (w/v) 的山梨醇,诸如约4至约6% (w/v) 的蔗糖和约4至约6%

(w/v)的山梨醇。

[0064] 免疫原性组合物的pH应该适合用于肠胃外施用。通常,pH将在6.0至9.0的范围内。合适地,pH将在7.0至9.0的范围内,特别是7.25至8.75,诸如7.5至8.5,特别是pH 7.75至8.25。约8.0的pH是特别感兴趣的。

[0065] 可以通过使用缓冲剂,包括例如Tris或磷酸盐缓冲剂控制pH。

[0066] 在本发明的特定实施方案中,免疫原性组合物包含一种或多种免疫刺激剂。

[0067] 在一个实施方案中,免疫刺激剂可以是皂苷。用于本发明的尤其合适的皂苷是Quil A及其衍生物。Quil A是分离自南美树*Quillaja saponaria* Molina的一种皂苷制剂,首次由Dalsgaard等人描述于1974 (“Saponin adjuvants”, *Archiv. für die gesamte Virusforschung*, 第44卷, Springer Verlag, Berlin, 第243-254页),其具有佐剂活性。Quil A的纯化部分已通过HPLC分离,其保留佐剂活性,而没有与Quil A (W088/09336) 例如QS7和QS21 (也称为QA7和QA21) 相关的毒性。QS21是源自*Quillaja saponaria* Molina的一种天然皂苷,其诱导CD8+细胞毒性T细胞(CTL)、Th1细胞和主要IgG2a抗体应答。QS21是本发明的上下文中的优选皂苷。

[0068] 在本发明的合适形式中,免疫原性组合物中的皂苷佐剂是*saponaria* Molina Quil A的衍生物,尤其是Quil A的免疫活性部分,诸如QS17或QS21,合适地是QS21。

[0069] 理想的是,在反应原性较低的组合物中提供QS21,其中它被外源固醇例如胆固醇猝灭。存在着其中QS21被胆固醇猝灭的反应原性较低的组合物的若干种特定形式。在一个特定的实施方案中,皂苷/固醇是脂质体结构的形式(诸如在W096/33739中所述,实施例1)。在该实施方案中,脂质体合适地含有中性脂质,例如磷脂酰胆碱,其在室温下合适地为非晶性的,例如卵黄磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)或二月桂基磷脂酰胆碱。脂质体也可含有带电荷的脂质,其对于由饱和脂质构成的脂质体而言能增加脂质体-QS21结构的稳定性。在这些情况下,带电荷脂质的量合适地为1-20% w/w,诸如5-10%。固醇与磷脂的比例为1-50% (mol/mol),合适地为20-25%。

[0070] 合适的固醇包括 β -谷固醇、豆固醇、麦角固醇、麦角钙化醇和胆固醇。在一个特定的实施方案中,免疫原性组合物包含胆固醇作为固醇。这些固醇是本领域众所周知的,例如胆固醇公开于默克索引(Merck Index, 第11版, 第341页),是存在于动物脂肪中的天然存在的固醇。

[0071] 当活性皂苷部分是QS21时, QS21:固醇的比例通常为约1:100至1:1 (w/w),合适地1:10至1:1 (w/w),特别1:5至1:1 (w/w)。存在适当过量的固醇, QS21:固醇的比例为至少1:2 (w/w)。在一个实施方案中, QS21:固醇的比例为1:5 (w/w)。固醇合适地为胆固醇。

[0072] 在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含免疫刺激剂,其是Toll-样受体4 (TLR4) 激动剂。“TLR激动剂”是指能通过TLR信号转导途径而引起信号转导反应的成分,或者是作为直接配体或者间接通过产生内源或外源配体(Sabroe等人, *J Immunol* 2003 p1630-5)。TLR4激动剂能通过TLR-4信号转导途径而引起信号转导反应。TLR4激动剂的合适实例是脂多糖,合适地是脂质A的无毒衍生物,尤其是单磷酸脂质A或更尤其是3-脱-O-酰化单磷酸脂质A (3D-MPL)。

[0073] 3D-MPL由GlaxoSmithKline Biologicals N.A. 售卖,名称是MPL,并且在全文中都称为MPL或3D-MPL,参见例如美国专利号4,436,727; 4,877,611; 4,866,034和4,912,094。

3D-MPL主要促进具有IFN- γ (Th1) 表型的CD4⁺ T细胞应答。可根据GB2220211A所公开的方法产生3D-MPL。从化学上说,它是具有3、4、5或6条酰化链的3-脱-O-酰化单磷酸脂质A的混合物。在本发明的组合物中,小颗粒3D-MPL可用于制备免疫原性组合物。小颗粒3D-MPL的粒径使其可通过0.22 μ m滤器进行除菌过滤。这样的制剂描述于W0 94/21292。合适地,粉末状3D-MPL用于制备本发明的免疫原性组合物。

[0074] 可使用的其他TLR4激动剂是氨基葡萄糖苷磷酸烷基酯 (AGP), 诸如公开于W098/50399或美国专利号6,303,347 (也公开了AGP的制备方法) 的那些,合适地是RC527或RC529或美国专利号6,764,840所公开的AGP的药学上可接受的盐。一些AGP是TLR4激动剂,而一些则是TLR4拮抗剂。

[0075] 其他合适的TLR4激动剂描述于W02003/011223和W02003/099195, 诸如W02003/011223的第4-5页或W02003/099195的第3-4页上公开的化合物I、化合物II和化合物III, 尤其是公开于W02003/011223的那些化合物ER803022、ER803058、ER803732、ER804053、ER804057m ER804058、ER804059、ER804442、ER804680和ER804764。例如,一种合适的TLR-4激动剂是ER804057。

[0076] 在一个特定的实施方案中,免疫原性组合物同时包含皂苷和TLR4激动剂。在一个特定的实例中,免疫原性组合物包含QS21和3D-MPL。

[0077] 每份人用剂量的免疫原性组合物中可以使用的TLR-4激动剂诸如脂多糖诸如3D-MPL的量为1至100 μ g。可使用的3D-MPL的水平为约50 μ g, 例如40至60 μ g, 合适地为45至55 μ g或49至51 μ g或50 μ g。在一个进一步实施方案中,免疫原性组合物的人用剂量包含3D-MPL的水平为约25 μ g, 例如20至30 μ g, 合适地为21至29 μ g或22至28 μ g或23至27 μ g或24至26 μ g或25 μ g。

[0078] 每份人用剂量的免疫原性组合物中可以使用的皂苷诸如QS21的量为1至100 μ g。可使用的QS21水平为约50 μ g, 例如40至60 μ g, 合适地为45至55 μ g或49至51 μ g或50 μ g。在一个进一步实施方案中,免疫原性组合物的人用剂量包含QS21的水平为约25 μ g, 例如20至30 μ g, 合适地为21至29 μ g或22至28 μ g或23至27 μ g或24至26 μ g或25 μ g。

[0079] 当TLR4激动剂和皂苷同时存在于免疫原性组合物中时,TLR4激动剂与皂苷的重量比合适地为1:5至5:1,合适地为1:2 至 2:1, 诸如约1:1。例如,在每份人用剂量的免疫原性组合物中,当3D-MPL含量为50 μ g或25 μ g时,合适地QS21的含量也可分别为50 μ g或25 μ g。本发明的某些免疫原性组合物包含量为1至100 μ g QS21和3D-MPL /每个人用剂量, 诸如量为10至75 μ g/每个人用剂量。本发明的免疫原性组合物可以合适地包含QS21和3D-MPL, 其量为15至35 μ g/每人用剂量, 诸如20至30 μ g/每人用剂量。

[0080] 在一个实施方案中,免疫刺激剂是TLR9激动剂, 例如W02008/142133所给出的那些。在一个特定的实例中,所述TLR9激动剂是免疫刺激性寡核苷酸,尤其是含有未甲基化CpG基序的寡核苷酸。这样的寡核苷酸是众所周知的并描述于例如W096/02555、W099/33488和US5,865,462。用于本文所述的免疫原性组合物的合适的TLR9激动剂是含有CpG的寡核苷酸,任选含有被至少3个、合适地为至少6个或更多个核苷酸分隔的两个或更多二核苷酸CpG基序。CpG基序是胞嘧啶核苷酸后接鸟嘌呤核苷酸。

[0081] 在一个实施方案中,寡核苷酸中的核苷酸间键是二硫代磷酸酯键,或可能是硫代磷酸酯键,尽管磷酸二酯键和其他核苷酸间键也可使用,包括具有混合核苷酸间键的寡核

苷酸。产生硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯寡核苷酸的方法描述于US5,666,153、US5,278,302和W095/26204。考虑了包含不同核苷酸间键的寡核苷酸,例如混合硫代磷酸酯二酯类。可使用能稳定寡核苷酸的其他核苷酸间键。

[0082] 适合本文所述的免疫原性组合物所包含的CpG寡核苷酸的实例具有以下序列。在一个实施方案中,这些序列含有经硫代磷酸酯修饰的核苷酸间键。

寡核苷酸 1 (SEQ ID No: 9): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
寡核苷酸 2 (SEQ ID No: 10): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
寡核苷酸 3 (SEQ ID No: 11): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
寡核苷酸 4 (SEQ ID No: 12): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
寡核苷酸 5 (SEQ ID No: 13): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1868)

[0083] 可替代的CpG寡核苷酸可包含上述序列,因为其中它们可具有不连续缺失或添加。

[0084] 在一个实施方案中,免疫刺激剂是母育酚。母育酚是本领域众所周知的并描述于EP0382271。在一个特定的实施方案中,母育酚是 α -生育酚或其衍生物诸如 α -生育酚琥珀酸酯(也称为维生素E琥珀酸酯)。

[0085] 本发明也提供本发明免疫原性组合物的制备方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 冻干M72相关抗原;和
- b. 用水溶液重构步骤a)的冻干的M72相关抗原,其中所述溶液的导电率是13 mS/cm或更低。

[0086] 在某些实施方案中,所述水溶液的导电率是12 mS/cm或更低,例如10 mS/cm或更低,8 mS/cm或更低,6 mS/cm或更低,5 mS/cm或更低,4 mS/cm或更低,或3 mS/cm或更低。在一个特定的实施方案中,所述水溶液的导电率是2.5 mS/cm或更低,诸如2.25 mS/cm或更低,或2.0 mS/cm或更低。

[0087] 合适地,所述水溶液的导电率使得当重构冻干抗原时获得的溶液的导电率是13 mS/cm或更低,诸如12 mS/cm或更低,例如10 mS/cm或更低,8 mS/cm或更低,6 mS/cm或更低,5 mS/cm或更低,4 mS/cm或更低,或3 mS/cm或更低。在一个特定的实施方案中,所述获得的溶液的导电率是2.5 mS/cm或更低,诸如2.25 mS/cm或更低,或2.0 mS/cm或更低。

[0088] 进一步提供本发明免疫原性组合物的制备方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 冻干M72相关抗原;和
- b. 用水溶液重构步骤a)的冻干的M72相关抗原,其中所述溶液中的盐浓度是130 mM或更低。

[0089] 在某些实施方案中,所述水溶液中的盐浓度是100 mM或更低,例如90 mM或更低,80 mM或更低,70 mM或更低,60 mM或更低,50 mM或更低,或40 mM或更低。在一个特定的实施方案中,所述水溶液中的盐浓度是35 mM或更低,诸如30 mM或更低或25 mM或更低。

[0090] 合适地,所述水溶液中的盐浓度使得当重构冻干抗原时获得的溶液的盐浓度是130 mM或更低,诸如100 mM或更低,例如90 mM或更低,80 mM或更低,70 mM或更低,60 mM或更低,50 mM或更低,或40 mM或更低。在一个特定的实施方案中,所述获得的溶液中的盐浓度是35 mM或更低,诸如30 mM或更低,或25 mM或更低。

[0091] 额外地提供本发明免疫原性组合物的制备方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 冻干M72相关抗原;和

b. 用水溶液重构步骤a) 的冻干的M72相关抗原, 其中所述溶液中的氯化钠浓度是130 mM或更低。

[0092] 在某些实施方案中, 所述水溶液中的氯化钠浓度是100 mM或更低, 例如90 mM或更低, 80 mM或更低, 70 mM或更低, 60 mM或更低, 50 mM或更低, 或40 mM或更低。在一个特定的实施方案中, 所述水溶液中的盐浓度是35 mM或更低, 诸如30 mM或更低, 20 mM或更低, 或15 mM或更低。合适地, 水溶液中的氯化钠浓度或等于或低于5 mM。

[0093] 合适地, 所述水溶液中的氯化钠浓度使得当重构冻干抗原时获得的溶液的氯化钠浓度是130 mM或更低, 诸如100 mM或更低, 例如90 mM或更低, 80 mM或更低, 70 mM或更低, 60 mM或更低, 50 mM或更低, 或40 mM或更低。在一个特定的实施方案中, 所述获得的溶液中的氯化钠浓度是35 mM或更低, 诸如30 mM或更低, 或25 mM或更低。

[0094] 在一个实施方案中, 步骤b) 的水溶液(上述) 包含皂苷和/或TLR4激动剂, 例如QS21和/或3D-MPL。在一个进一步实施方案中, 皂苷和/或TLR4激动剂在脂质体制剂中。在一个实施方案中, 水溶液包含在脂质体制剂中的TLR4激动剂和皂苷, 以及本文所述的非离子型渗透剂, 诸如多元醇。尤其是水溶液可以包含山梨醇。

[0095] 还提供试剂盒, 所述试剂盒包含:

- a. 冻干的M72相关抗原; 和
- b. 水溶液, 其中所述溶液的导电率是13 mS/cm或更低。

[0096] 在某些实施方案中, 所述水溶液的导电率是12 mS/cm或更低, 例如10 mS/cm或更低, 8 mS/cm或更低, 6 mS/cm或更低, 5 mS/cm或更低, 4 mS/cm或更低, 或3 mS/cm或更低。在一个特定的实施方案中, 所述水溶液的导电率是2.5 mS/cm或更低, 诸如2.25 mS/cm或更低, 或2.0 mS/cm或更低。

[0097] 合适地, 所述水溶液的导电率使得当重构冻干抗原时获得的溶液的导电率是13 mS/cm或更低, 诸如12 mS/cm或更低, 例如10 mS/cm或更低, 8 mS/cm或更低, 6 mS/cm或更低, 5 mS/cm或更低, 4 mS/cm或更低, 或3 mS/cm或更低。在一个特定的实施方案中, 所述获得的溶液的导电率是2.5 mS/cm或更低, 诸如2.25 mS/cm或更低, 或2.0 mS/cm或更低。

[0098] 额外地提供试剂盒, 所述试剂盒包含:

- a. 冻干的M72相关抗原; 和
- b. 水溶液, 其中所述溶液中的盐浓度是130 mM或更低。

[0099] 在某些实施方案中, 所述水溶液中的盐浓度是100 mM或更低, 例如90 mM或更低, 80 mM或更低, 70 mM或更低, 60 mM或更低, 50 mM或更低, 或40 mM或更低。在一个特定的实施方案中, 所述水溶液中的盐浓度是35 mM或更低, 诸如30 mM或更低或25 mM或更低。

[0100] 合适地, 所述水溶液中的盐浓度使得当重构冻干抗原时获得的溶液的盐浓度是130 mM或更低, 诸如100 mM或更低, 例如90 mM或更低, 80 mM或更低, 70 mM或更低, 60 mM或更低, 50 mM或更低, 或40 mM或更低。在一个特定的实施方案中, 所述获得的溶液中的盐浓度是35 mM或更低, 诸如30 mM或更低, 或25 mM或更低。

[0101] 进一步地提供试剂盒, 所述试剂盒包含:

- a. 冻干的M72相关抗原; 和
- b. 水溶液, 其中所述溶液中的氯化钠浓度是130 mM或更低。

[0102] 在某些实施方案中, 所述水溶液中的氯化钠浓度是100 mM或更低, 例如90 mM或更

低,80 mM或更低,70 mM或更低,60 mM或更低,50 mM或更低,或40 mM或更低。在一个特定的实施方案中,所述水溶液中的盐浓度是35 mM或更低,诸如30 mM或更低,20 mM或更低,或15 mM或更低。合适地,溶液中的氯化钠浓度或等于或低于5 mM。

[0103] 合适地,所述水溶液中的氯化钠浓度使得当重构冻干抗原时获得的溶液的氯化钠浓度是130 mM或更低,诸如100 mM或更低,例如90 mM或更低,80 mM或更低,70 mM或更低,60 mM或更低,50 mM或更低,或40 mM或更低。在一个特定的实施方案中,所述获得的溶液中的氯化钠浓度是35 mM或更低,诸如30 mM或更低,或25 mM或更低。

[0104] 试剂盒可以适于提供单一剂量的免疫原性组合物,诸如单人剂量,或多剂量的免疫原性组合物。

[0105] 用于本发明试剂盒的水溶液可以是本文所定义的任何水溶液。在本发明的特定的实施方案中,水溶液包含呈脂质体形式的TLR4激动剂和/或皂苷。在一个特定的实施方案中,TLR4激动剂是3D-MPL且皂苷是QS21。本文所用的水溶液可包含胀度剂,例如多元醇,诸如山梨醇。

[0106] 关于上面提到的用于产生本发明的免疫原性组合物的试剂盒和方法,可以指出的是,如果存在的话,一种或多种免疫刺激剂和一种或多种胀度剂可以根据需要与抗原共同冻干或含在水溶液中。水溶液可以简单地是注射用水,且免疫原性组合物的所有其他组分与抗原共同冻干。通常,至少一些一种或多种免疫刺激剂和一种或多种胀度剂在水溶液中提供,如果某些组分与冻干相容性较差,诸如脂质体,那么这是特别合适的。在一个实施方案中,水溶液包含免疫刺激剂。在第二个实施方案中,水溶液包括胀度剂,例如非离子胀度剂,诸如多元醇,特别是山梨醇。在第三个实施方案中,水溶液包含免疫刺激剂和胀度剂,诸如多元醇,特别是山梨醇。

[0107] 试剂盒可以进一步包括指示使用水溶液重构冻干M72相关抗原的说明。

[0108] 根据本发明的免疫原性组合物可以用于药物中,特别是用于预防、治疗或改善分枝杆菌的感染,诸如结核分枝杆菌的感染。免疫原性组合物将通常提供用于施用于人,尽管它们也可能在兽药中诸如施用于牛中是有价值的。

[0109] 提供了本发明的免疫原性组合物在制备药物中的用途,所述药物特别用于预防、治疗或改善分枝杆菌的感染,诸如结核分枝杆菌的感染。

[0110] 还提供了用于预防、治疗或改善分枝杆菌的感染,诸如结核分枝杆菌的感染的方法,所述方法包括施用安全和有效量的本发明的免疫原性组合物。

[0111] 可以出于下述目的提供免疫原性组合物:

- 治疗活动性结核;
- 预防活动性结核,诸如通过施用于未感染的受试者,或者具有潜伏感染的受试者;
- 治疗潜伏结核;
- 预防潜伏结核,诸如通过施用于未感染的受试者;或
- 预防或延缓结核病的再活化,特别是TB再活化的延缓,例如延缓数月、数年或甚至无限期。

[0112] 术语“活动性感染”指具有已显现的疾病症状和/或损伤(合适地具有显现的疾病症状)的感染,例如,结核分枝杆菌感染。

[0113] 术语“非活动性感染”、“休眠感染”或“潜伏感染”指未显示疾病症状和/或损伤(合

适地未显示疾病症状)的感染,例如,结核分枝杆菌感染。具有潜伏感染的受试者将合适地是测试为阳性感染的受试者,例如通过基于PPD或T细胞的测定,但所述受试者还没有表现出疾病症状和/或与活动性感染相关的损伤。

[0114] 术语“原发结核病”指在感染(例如,结核分枝杆菌感染)后直接形成的临床疾病,例如,疾病症状的显现。参见*Harrison's Principles of Internal Medicine*, 第150章, pp. 953-966 (第16版, Braunwald, 等人编辑, 2005)。

[0115] 术语“继发性结核病”或“原发后结核病”指休眠、非活动性或潜伏性感染(例如,结核分枝杆菌感染)的再活化。参见*Harrison's Principles of Internal Medicine*, 第150章, pp. 953-966 (第16版, Braunwald, 等人编辑, 2005)。

[0116] 术语“结核病再活化”指感染测试呈阳性(例如,在结核菌素皮试中呈阳性,合适地在体外基于T细胞的测定中呈阳性)但没有明显的疾病症状的个体随后显现疾病症状。合适地,个体将没有再暴露于感染。该阳性诊断测试表明该个体被感染,然而,该个体可能曾显示或未曾显示已进行过充分治疗以将结核病带入非活动性或潜伏状态的活动性疾病的症状。

[0117] 合适地,将免疫原性组合物施用于未感染的受试者或具有分枝杆菌潜伏感染,诸如结核分枝杆菌感染的受试者。

[0118] 施用的免疫原性组合物的体积将根据许多其他因素而变化,诸如特定递送途径,例如肌内、皮下或皮内途径。通常,用于人的单一注射(单位剂量)施用的体积将是50 μ l至1 ml,诸如100 μ l至750 μ l,特别是400至600 μ l,例如约500 μ l。

[0119] 单一剂量内含有的M72相关抗原的量取决于临床需要,但是单一人剂量将通常是1至100 μ g,诸如5至50 μ g,例如5至20 μ g。单一人剂量可以含有约10 μ g的M72相关抗原。

[0120] 合适地,本发明的组合物将是稳定的,其中是指指在25°C储存24小时的期间过程中,如通过本文中描述的技术所测量的抗原性保留储存前抗原性的至少80%。期望地,在25°C储存24小时的期间后,抗原性将保留至少85%,诸如至少90%,特别是至少95%。对于特别感兴趣的组合物,在30°C储存24小时的期间后,保留组合物的至少80%,诸如至少85%,至少90%,特别是至少95%的抗原性。

[0121] 此外,本发明还涉及以下实施方案:

1. 包含M72相关抗原的免疫原性组合物,其中:

- (i) 所述组合物的导电率是13 mS/cm或更低;和/或
- (ii) 所述组合物中盐的浓度是130 mM或更低;和/或
- (iii) 所述组合物中氯化钠的浓度是130 mM或更低。

[0122] 2. 根据实施方案1所述的免疫原性组合物,其中所述组合物的导电率是10 mS/cm或更低。

[0123] 3. 根据实施方案2所述的免疫原性组合物,其中所述组合物的导电率是3 mS/cm或更低。

[0124] 4. 根据实施方案1至3中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物中盐的浓度是100 mM或更低。

[0125] 5. 根据实施方案4所述的免疫原性组合物,其中所述组合物中盐的浓度是40 mM或更低。

[0126] 6. 根据实施方案1至5中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物中氯化钠的浓度是100 mM或更低。

[0127] 7. 根据实施方案6所述的免疫原性组合物,其中所述组合物中氯化钠的浓度是40 mM或更低。

[0128] 8. 根据实施方案1至7中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物中CaCl₂的浓度是30 mM或更低。

[0129] 9. 根据实施方案1至8中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物中MgSO₄的浓度是60或更低。

[0130] 10. 根据实施方案1至9中任一项所述的免疫原性组合物,NH₄⁺、Mg²⁺和Ca²⁺离子的总浓度是40 mM或更低。

[0131] 11. 根据实施方案1至10中任一项所述的免疫原性组合物,进一步包含非离子涨度剂。

[0132] 12. 根据实施方案11所述的免疫原性组合物,其中所述非离子涨度剂是多元醇。

[0133] 13. 根据实施方案12所述的免疫原性组合物,其中所述多元醇是山梨醇。

[0134] 14. 根据实施方案13所述的免疫原性组合物,其中所述山梨醇的浓度是约4至约6% (w/v)。

[0135] 15. 根据实施方案1至14中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述蔗糖的浓度是约4至约6% (w/v)。

[0136] 16. 根据实施方案1至15中任一项所述的免疫原性组合物,进一步包含一种或多种免疫刺激剂。

[0137] 17. 根据实施方案16所述的免疫原性组合物,其中所述免疫刺激剂是皂苷和/或TLR4激动剂。

[0138] 18. 根据实施方案17所述的免疫原性组合物,其中所述一种或多种免疫刺激剂是脂质体形式。

[0139] 19. 根据实施方案17或实施方案18所述的免疫原性组合物,其中所述皂苷是QS21。

[0140] 20. 根据实施方案17至19中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述TLR4激动剂是3-脱-O-酰化单磷酸脂质A。

[0141] 21. 根据实施方案1至20中任一项所述的免疫原性组合物,其中重量摩尔渗透压浓度是250至750 mOsm/kg。

[0142] 22. 根据实施方案1至21中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物作为50 μ l至1 ml的单位剂量提供。

[0143] 23. 根据实施方案22所述的免疫原性组合物,其中所述单位剂量是100 μ l至750 μ l。

[0144] 24. 根据实施方案22或23所述的免疫原性组合物,其中所述单位剂量含有1至100 μ g的M72相关抗原。

[0145] 25. 根据实施方案24所述的免疫原性组合物,其中单位剂量含有5至50 μ g的M72相关抗原。

[0146] 26. 根据实施方案1至25中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物的pH

在7.0至9.0的范围内。

[0147] 27. 根据实施方案1至26中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原包含与SEQ ID No:1具有至少70%同一性的序列。

[0148] 28. 根据实施方案27所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原由与SEQ ID No:1具有至少70%同一性的序列组成。

[0149] 29. 根据实施方案28所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原包含与SEQ ID No:1具有至少90%同一性的序列。

[0150] 30. 根据实施方案29所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原由与SEQ ID No:1具有至少90%同一性的序列组成。

[0151] 31. 根据实施方案1至26中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原包含SEQ ID No:1的氨基酸序列。

[0152] 32. 根据实施方案1至26中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原包含SEQ ID No:3的氨基酸序列。

[0153] 33. 根据实施方案31所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原由SEQ ID No:1的氨基酸序列组成。

[0154] 34. 根据实施方案32所述的免疫原性组合物,其中所述M72相关抗原由SEQ ID No:3的氨基酸序列组成。

[0155] 35. 根据实施方案1至32中任一项所述的免疫原性组合物,其中在25 °C储存24小时的期间后保持所述免疫原性组合物的至少80%的抗原性。

[0156] 36. 根据实施方案1至35中任一项所述的免疫原性组合物,其用于药物中。

[0157] 37. 根据实施方案1至35中任一项所述的免疫原性组合物在药物制备中的用途。

[0158] 38. 用于预防、治疗或改善分支杆菌感染、诸如结核分枝杆菌感染的方法,所述方法包括施用安全且有效量的实施方案1至35中任一项的免疫原性组合物。

[0159] 39. 制备实施方案1至35中任一项的免疫原性组合物的工艺,其包括以下步骤:

- a) 冻干M72相关抗原;和
- b) 用水溶液重构步骤a)的冻干的M72相关抗原,其中:
 - (i) 所述溶液的导电率是13 mS/cm或更低;和/或
 - (ii) 所述溶液中盐的浓度是130 mM或更低;和/或
 - (iii) 所述溶液中氯化钠的浓度是130 mM或更低。

[0160] 40. 制备实施方案1至35中任一项的稳定的免疫原性组合物的方法,其包括下列步骤:

- a) 冻干M72相关抗原;和
- b) 用水溶液重构步骤a)的冻干的M72相关抗原,其中:
 - (i) 所述溶液的导电率是13 mS/cm或更低;和/或
 - (ii) 所述溶液中盐的浓度是130 mM或更低;和/或
 - (iii) 所述溶液中氯化钠的浓度是130 mM或更低;

其中在25 °C储存24小时的期间后保持所述免疫原性组合物的至少80%的抗原性。

[0161] 41. 试剂盒,包含:

- a) 冻干的M72相关抗原;和

b) 水溶液, 其中:

- (i) 所述溶液的导电率是13 mS/cm或更低;和/或
- (ii) 所述溶液中盐的浓度是130 mM或更低;和/或
- (iii) 所述溶液中氯化钠的浓度是130 mM或更低。

[0162] 42. 根据实施方案39所述的工艺、根据实施方案40所述的方法或根据实施方案41所述的试剂盒, 其中所述水溶液包含免疫刺激剂。

[0163] 43. 根据实施方案42所述的工艺、方法或试剂盒, 其中所述水溶液包含脂质体制剂中的皂苷和TLR4激动剂, 和非离子涨度剂。

[0164] 44. 根据实施方案43所述的工艺、方法或试剂盒, 其中所述非离子涨度剂是山梨醇。

[0165] 45. 根据实施方案44所述的工艺、方法或试剂盒, 其中所述山梨醇的浓度是约2.5至约15% (w/v)。

[0166] 46. 根据实施方案43至45中任一项所述的工艺、方法或试剂盒, 其中所述皂苷是QS21。

[0167] 47. 根据实施方案43至46中任一项所述的工艺、方法或试剂盒, 其中所述TLR4激动剂是3-脱-O-酰化单磷酸脂质A。

[0168] 现在借助以下非限制性实例将进一步描述本发明。

实施例

[0169] 实施例1: 佐剂组合物ASA (山梨醇) 的制备

制备佐剂组合物, 其包含使用山梨醇作为涨度剂的脂质体制剂中的3-脱-O-酰化单磷酸脂质A和QS21。其制备如下:

A. 脂质体的制备方法:

将脂质 (DOPC)、胆固醇和3-脱-O-酰化单磷酸脂质A的有机溶液中的混合物真空干燥。然后加入水溶液 (磷酸盐缓冲盐水 [100 mM NaCl, 50 mM磷酸盐pH 6.1]) 并搅拌容器直到所有脂质呈悬浮状态。用高剪切混合器将该悬浮液预均质, 再进行高压均质, 直到脂质体大小降低到经DLS测定约为90nm±10nm。然后将脂质体除菌过滤。

[0170] B. ASA制剂:

步骤1: 浓缩脂质体的稀释

当稀释10倍时, 将Na₂/K磷酸盐缓冲液100 mM pH 6.1加入到注射用水中, 在最终制剂中达到10mM磷酸盐缓冲液浓度。再加入30% (w/v) 山梨醇的注射用水 (WFI) 溶液, 在最终制剂中达到4.7%的浓度-将其在室温下搅拌15-45分钟。

[0171] 再将浓缩脂质体 (分别由40mg/ml、10mg/ml和2mg/ml的DOPC、胆固醇和3D-MPL制成) 加入到该混合物中, 在最终制剂中达到100 ug/ml 3D-MPL的浓度。

[0172] 然后将混合物在室温下搅拌15-45分钟。

[0173] 步骤2: 加入QS21

使用蠕动泵, 将QS21贮液加入到稀释的脂质体中, 同时磁力搅拌, 在最终制剂中达到100 ug/ml的浓度。将混合物搅拌15-45分钟。

[0174] 最终ASA (山梨醇) 制剂中含有2 mg DOPC、500 ug胆固醇、100 ug 3D-MPL/ml和100

ug QS21/ml、4.7%山梨醇以及5 mM氯化钠和10 mM磷酸盐。

[0175] 步骤3:检查pH为 6.1 ± 0.1

步骤4:除菌过滤

使用来自PALL Corporation的聚醚砜(PES)滤器进行除菌过滤。

[0176] 步骤5:在+2℃至+8℃储存

获得佐剂组合物,其包含在脂质体制剂中的3-脱-O-酰化MPL和QS21并含有作为涨度剂的山梨醇(称为ASA(山梨醇)),然后储存在4℃。

[0177] 实施例2:佐剂组合物ASA(150 mM NaCl)的制备

使用作为涨度剂的氯化钠制备佐剂组合物,其包含脂质体制剂中的3-脱-O-酰化单磷酸脂质A和QS21。

[0178] A. 脂质体的制备方法:

将脂质(DOPC)、胆固醇和3-脱-O-酰化单磷酸脂质A(3D-MPL)的有机溶液的混合物真空干燥。再加入磷酸盐缓冲盐水(100 mM NaCl、50 mM磷酸盐pH 6.1)并搅拌容器直到所有脂质呈悬浮状态。再用高剪切混合器将该悬浮液预均质,然后进行高压均质,直到脂质体大小降低到经DLS测定约为 $90 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ 。然后将脂质体在0.22 μm PES膜上除菌过滤。

[0179] B. ASA制剂:

步骤1:浓缩脂质体的稀释

当稀释10倍时,将 Na_2/K 磷酸盐缓冲液100mM pH6.45和NaCl 1.5M加入到注射用水中,在最终制剂中分别达到10mM磷酸盐和NaCl 150mM的浓度。将该混合物在室温下搅拌5分钟。再将浓缩脂质体(分别由40mg/ml、10mg/ml和2mg/ml的DOPC、胆固醇和3D-MPL制成)加入到该混合物中,在最终制剂中达到100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 3D-MPL的浓度。然后将混合物在室温下搅拌5-15分钟。

[0180] 步骤2:加入QS21

将QS21贮液加入到稀释的脂质体中,同时磁力搅拌,在最终制剂中达到100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度。将混合物在室温下搅拌。

[0181] 步骤3:检查pH目的为 6.1 ± 0.1

步骤4:除菌过滤

使用来自PALL Corporation的聚醚砜(PES)滤器上进行除菌过滤。

[0182] 步骤5:在+2℃至+8℃储存

ASA(150 mM NaCl)的最终组合物是2 mg DOPC、500 μg 胆固醇、100 μg 3-脱-O-酰化MPL、100 μg QS21/ml、10 mM磷酸盐和150 mM NaCl。

[0183] 实施例3:QS21裂解活性

已知QS21能裂解红血细胞(RBC)。测试实施例1中制备的ASA(山梨醇)佐剂组合物,以确保QS21的裂解活性以与包含150mM NaCl的当量佐剂组合物(ASA(150mM NaCl))中所观察到的同样方式被猝灭。

[0184] 通过溶血测定,使用鸡红血细胞(chicken Red Blood cell, RBC)测定QS21的裂解活性。将RBC在550g于4℃离心。弃去上清液。将沉淀小心重悬于PBS缓冲液中达原先体积并且重复同样操作,直到上清液不再呈红色(通常3次)。如果不直接使用的话,将沉淀储存于4℃持续3-4天(并在使用当天再次洗涤),或者如果在同一天使用的话,将其在缓冲液中

稀释约10倍。

[0185] 临时在ASA缓冲液(在测试ASA样品后在盐或在山梨醇缓冲液中)中制作QS21剂量范围曲线并且制备佐剂样品(含50 ug或90 ug QS21当量,即相当于500 u1或900 u1 ASA当量)。在标准品和样品中用充足缓冲液(含或不含山梨醇,随所测试样品的缓冲液而定)将终体积调节至900u1。因为其为乳色,ASA干扰光密度(OD)。因此制备ASA“空白”并从ASA测试样品的OD值中减去“空白”OD。这些空白相当于与样品中测试的体积相同的ASA体积,但用缓冲液调节至1ml。这些空白中不加RBC。然后将标准品和样品与RBC一起(将100 u1稀释RBC加入到900 u1标准品和样品中)在室温下(RT)孵育30分钟。再将样品在900g离心5分钟。离心后在540nm处测定光密度。

[0186] 通过限值试验(limit test)进行裂解活性的测定。

[0187] 1. 检测限值(LOD)定义为导致下列OD的最低QS21浓度:

- 比基础水平更高(OD>0.1)
- 比缓冲液(“0 ug”QS21)的OD高约3倍
- 在曲线的上升部分
- 对每次试验进行测定

2. 如果佐剂样品的OD大于OD_{LOD},则佐剂样品中QS21的裂解活性始终是阳性的。

[0188] 实例QS21曲线

ug QS21	OD	杀灭的QS21
0	0.029	NA
0.5	0.052	< LOD
0.6	0.073	< LOD
0.7	0.091	< LOD
0.8	0.096	< LOD
0.9	0.12	> 98.2%
1	0.195	> 98%
1.1	0.212	> 97.8%
1.2	0.348	> 97.6%
1.3	0.479	> 97.4%
1.4	0.612	> 97.2%
1.5	0.669	> 97%
2	1.139	> 96%
2.5	1.294	> 95%
3	1.391	> 94%
5	1.416	> 90%
佐剂 *	0.03	> 98.2 %

*测试的50ug QS21当量。150mM氯化钠缓冲液。

[0189] 上述数据图示于图1中。

[0190] 该测定的检测限值是0.9ug QS21,且OD为0.12。

[0191] 对于所测试的50 ug QS21当量而言,估计在包含150mM氯化钠的佐剂组合中QS21的猝灭大于98.2%。在所测试的90 ug当量的情况下,结论大于99%。

[0192] 然后将QS21猝灭与包含山梨醇和仅含5mM氯化钠的当量佐剂组合进行比较。在4℃储存ASA之后或在加速稳定(7天,在37℃)之后产生数据。对于山梨醇中的ASA,在含山梨醇的缓冲液中得到QS21标准曲线。

样品	时间点	LOD	猝灭的QS21
佐剂组合物(ASA) 150 mM NaCl	T0	< 1.4	> 97.2%
	7 天 37℃	< 0.9	> 98.2%
佐剂组合物(ASA) 山梨醇, 5 mM NaCl	T0	< 2	> 97.8%
	7 天 37℃	< 1	> 98%
	11 个月 4℃	< 2	> 97.8%*

[0193] 测试50 ug QS21等量,除了*测试90 ug QS21等量之外。

[0194] 结论是QS21在低氯化钠缓冲液中被足够地猝灭。

[0195] 实施例4:MPL同类物

从化学上说,3D-MPL是具有主要的4、5或6条酰化链的3-脱-O-酰化单磷酸脂质A的混合物。每个单独的3D-MPL分子都称为同类物。重要的是,同类物组成保持恒定,在同类物比例上没有变化。也重要的是,所用的任何缓冲液都能使同类物组成与用于制备佐剂组合物的浓缩脂质体中的组成相同。

[0196] 如图2所示,在3D-MPL浓缩脂质体(浓缩脂质体LIP07-217,图2的第1栏)、包含3D-MPL脂质体和QS21的150mM NaCl缓冲液中的佐剂组合物(佐剂150mM NaCl或ASA (150mM NaCl), 第2栏),以及包含3D-MPL脂质体和QS21的山梨醇和5mM NaCl缓冲液中的佐剂组合物(佐剂山梨醇,或ASA (山梨醇), 第3-7栏)中,检查同类物组成。

[0197] 也在制备和在37℃维持后第0天和第7天在两批次的ASA (山梨醇)佐剂中检查同类物组成,以确保随时间无变化(参见图2的最后4栏)。

[0198] 通过IP-HPLC-Fluo检测(ARD),在浓缩脂质体或ASA (山梨醇)样品中测定MPL的4-、5-和6-酰化同类物的相对分布。标准品和样品都用丹酰肼衍生,其在二糖骨架上引入Fluo-活性生色团。在C18反相柱上,用叔丁基氢氧化铵(TBAOH)作为离子对试剂,分析衍生样品。在不同组(四酰基、五酰基和六酰基)中洗脱含有相同数量的脂酰基的同类物。通过将各组的峰面积与所有MPL同类物的总峰面积进行比较,推导出同类物的分布。

[0199] 图2显示各同类物的百分比。在佐剂缓冲液之间,未发现同类物组成的显著差异,且同类物组成在山梨醇缓冲液中随时间推移而保持不变。

[0200] 实施例5:佐剂组合物ASA (山梨醇-2)的制备

使用作为涨度剂的山梨醇制备佐剂组合物,其包含脂质体制剂中的以相对于实施例1中降低水平的3-脱-O-酰化单磷酸脂质A和QS21。其制备如下:

通过用含有10mM磷酸盐、5 mM NaCl、4.7%山梨醇 pH 6.1的溶液1:1稀释根据实施例1制备的ASA(山梨醇)而制备佐剂。

[0201] 最终ASA (山梨醇-2) 制剂含有1 mg DOPC、250 ug 胆固醇、50 ug 3D-MPL/ml和50 ug QS21/ml、4.7%山梨醇、5 mM氯化钠和10 mM磷酸盐。

[0202] 实施例6:佐剂组合物ASA (山梨醇-3)的制备

使用作为涨度剂的山梨醇制备佐剂组合物,其包含脂质体制剂中的以相对于实施例1中降低水平的3-脱-O-酰化单磷酸脂质A和QS21。其制备如下:

A. 脂质体的制备方法:

将脂质 (DOPC)、胆固醇和3-脱-O-酰化单磷酸脂质A的有机溶液中的混合物真空干燥。然后加入水溶液 (磷酸盐缓冲盐水 [100 mM NaCl、50 mM磷酸盐pH 6.1]) 并搅拌容器直到所有脂质呈悬浮状态。再用高剪切混合器将该悬浮液预均质,然后进行高压均质,直到脂质体大小降低到经DLS测定约为90 nm $\pm$ 10 nm。然后将脂质体除菌过滤。

[0203] B. ASA制剂:

步骤1:浓缩脂质体的稀释

当稀释10倍时,将Na₂/K磷酸盐缓冲液100 mM pH 6.1加入到注射用水中,在最终制剂中达到10mM磷酸盐缓冲液浓度。再加入30% (w/v) 山梨醇的注射用水 (WFI) 溶液,在最终制剂中达到4.7%的浓度-将其在室温下搅拌15-45分钟。

[0204] 再将浓缩脂质体 (分别由40mg/ml、10mg/ml和2mg/ml的DOPC、胆固醇和3D-MPL制成) 加入到该混合物中,在最终制剂中达到50 ug/ml 3D-MPL的浓度。

[0205] 然后将混合物在室温下搅拌15-45分钟。

[0206] 步骤2:加入QS21

使用蠕动泵,将QS21贮液加入到稀释的脂质体中,同时磁力搅拌,在最终制剂中达到50 ug/ml的浓度。将混合物搅拌15分钟。

[0207] 最终ASA制剂含有1 mg DOPC、250 ug胆固醇、50 ug 3D-MPL/ml和50 ug QS21/ml、4.7%山梨醇和2.5 mM氯化钠、10 mM磷酸盐。

[0208] 步骤3:检查pH为6.1 $\pm$ 0.1

步骤4:除菌过滤

使用来自PALL Corporation的聚醚砜 (PES) 滤器进行除菌过滤。

[0209] 步骤5:在+2℃至+8℃储存

获得佐剂组合物,其中包含在脂质体制剂中的3-脱-O-酰化MPL和QS21并含有作为涨度剂的山梨醇 (称为ASA (山梨醇-3)),然后储存在4℃。

[0210] 实施例7:佐剂组合物ASA (150 mM NaCl -2)的制备

使用作为涨度剂的氯化钠制备佐剂组合物,其包含脂质体制剂中的以相对于实施例2中降低水平的3-脱-O-酰化单磷酸脂质A和QS21。其制备如下:

A. 脂质体的制备方法:

将脂质 (DOPC)、胆固醇和3-脱-O-酰化单磷酸脂质A (3D-MPL) 的有机溶液中的混合物真空干燥。再加入磷酸盐缓冲盐水 (100 mM NaCl、50 mM磷酸盐pH 6.1) 并搅拌容器直到所有脂质呈悬浮状态。再用高剪切混合器将该悬浮液预均质,然后进行高压均质,直到脂质体大小降低到经DLS测定约为90 nm $\pm$ 10 nm。然后将脂质体在0.22 um PES膜上除菌过滤。

[0211] B. ASA制剂:

步骤1:浓缩脂质体的稀释

当稀释10倍时,将Na₂/K磷酸盐缓冲液100mM pH6.45和NaCl 1.5M加入到注射用水中,在最终制剂中分别达到10mM磷酸盐和NaCl 150mM的浓度。将该混合物在室温下搅拌5分钟。再将浓缩脂质体(分别由40mg/ml、10mg/ml和2mg/ml的DOPC、胆固醇和3D-MPL制成)加入到该混合物中,在最终制剂中达到50 ug/ml 3D-MPL的浓度。然后将所得混合物在室温下搅拌5-15分钟。

[0212] 步骤2:加入QS21

将QS21贮液加入到稀释的脂质体中,同时磁力搅拌,在最终制剂中达到50 ug/ml的浓度。将混合物在室温下搅拌。

[0213] 步骤3:检查pH目的为6.1±0.1

步骤4:除菌过滤

使用来自PALL Corporation的聚醚砜(PES)滤器进行除菌过滤。

[0214] 步骤5:在+2℃至+8℃储存

ASA (150 mM NaCl - 2)的最终组合是1 mg DOPC、250 ug 胆固醇、50 ug 3-脱-O-酰化MPL、50 ug QS21/ml、10 mM磷酸盐和150 mM NaCl。

[0215] 实施例8:蛋白抗原的制备

具有两个N末端His残基的M72 (SEQ ID No.:3)

M72表达载体的构建

通过将编码Mtb32a的C末端片段的开放阅读框(ORF)串联地顺序连接至Mtb39a的全长ORF(以其C末端跟着Mtb32a的N末端部分)而生成编码在N末端具有额外的6-His标记的Mtb72f的氨基酸序列的质粒。通过使用含有独特限制性位点(EcoRI和EcoRV)且在C末端没有终止密码子(在Mtb32a和Mtb39a的C末端片段的情况下)的序列特异寡核苷酸用于从结核分枝杆菌菌株H37Rv的基因组DNA的聚合酶链式反应(PCR)来完成这一点。使用该载体作为模板,通过位点定向诱变进行Ser706至Ala的突变。通过DNA测序验证插入片段的正确方向以及突变Ser706Ala。

[0216] 为了获得编码M72(其在N末端仅具有2个His残基)的载体,利用商业的位点定向诱变系统缺失四个His。序列验证后,通过酶促反应从质粒切下编码M72的序列,凝胶纯化,且连接到pET载体中。然后序列验证重组质粒。该质粒编码在T7启动子控制下的M72。在表达宿主中从基因组整合体驱动T7 RNA聚合酶的表达,且使用基于lac操纵子的系统(lacI)和IPTG化学诱导信号进行诱导。为表达质粒提供卡那霉素抗性。

[0217] 使用电穿孔法将编码在T7启动子控制下的M72融合蛋白的质粒转化到大肠杆菌的HMS174(DE3)菌株中。在两条链上测序M72插入片段的编码序列和侧翼区,且发现与从初始质粒构建体确定的序列相同。

[0218] 发酵

在室温下融化一小瓶沉淀的工作菌种。通过用4.9 ml预培养培养基混合工作菌种而制备预稀释物。使用1 ml预稀释物接种液体预培养物,所述液体预培养物由400 ml补充50 mg/l硫酸卡那霉素和10 g/l葡萄糖的预培养培养基组成。

[0219] 预培养培养基组成

成分	浓度		
KH_2PO_4	14.83 g/l		
K_2HPO_4	1.65 g/l		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.82 g/l		
酵母提取物	6.21 g/l		
甘油 87% (w/w)	14.54 ml/l		
金属和盐溶液 ⁽¹⁾	9.7 ml/l		
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		3.3 g/l	
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		58 g/l	
- 微量元素溶液 ⁽²⁾		116 ml/l	
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			7.65 g/l
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$			5.28 g/l
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$			1.1 g/l
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			1.1 g/l
- H_3BO_3			0.3 g/l
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			2.64 g/l
- HCl 4N			6.2 ml/l
生物素和 CaCl_2 溶液 ⁽²⁾	0.97 ml/l		
- 生物素		0.05 g/l	
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		61.7 g/l	
用 NaOH (25%) 溶液将培养基的 pH 调节至 6.5			
培养基过滤通过 0.22 μm			

(1) 用 HCl (37%) 溶液将 pH 调节至 1.50; 溶液过滤通过 0.22 μm ;

(2) 溶液过滤通过 0.22 μm 。

[0220] 在 30℃ 搅拌 (200 RPM) 下在 2 升摇瓶中培养预培养物, 直到 $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 达到 2 至 4 的值 (近似培养时间: 16 小时)。在该阶段, 用 52 ml 液体预培养物接种含有 45 升补充 34 mg/l 硫酸卡那霉素的培养基的 72 升 (总体积) 发酵罐。

[0221] 培养基组成

成分	浓度	
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.63 g/l	
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.056 g/l	
微量元素溶液 ⁽¹⁾	1.91 ml/l	
- ZnSO ₄ 7H ₂ O		7.65 g/l
- MnSO ₄ H ₂ O		5.28 g/l
- CuSO ₄ 5H ₂ O		1.1 g/l
- CoCl ₂ 6H ₂ O		1.1 g/l
- H ₃ BO ₃		0.3 g/l
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O		2.64 g/l
- HCl 4N		6.2 ml/l
HCl 37%	0.40 mL/L	
酵母提取物	35 g/L	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.10 g/l	
KH ₂ PO ₄	18.70 g/l	
谷氨酸钠	2.5 g/l	
甘油87%	0.276 ml/l	
葡萄糖	20 g/l	
生物素溶液 ⁽²⁾	0.22 ml/l	
- 生物素		1 g/l
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0.21 g/l	
溶液过滤通过0.22 um		

(1) 溶液过滤通过0.22 um

(2) 用NaOH (25%)溶液将pH调节至11.0;溶液过滤通过0.22 um。

[0222] 在生长阶段期间,通过定期加入25% (v/v) NH₄OH和25% (v/v) H₃PO₄而将pH保持在6.8 ± 0.2。在30℃培养16小时后,开始用补料培养基分批补料。

[0223] 补料培养基组成

成分	浓度	
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.98 g/l	
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.178 g/l	
微量元素溶液 (1%)	6.02 ml/l	
- ZnSO ₄ 7H ₂ O		7.65 g/l
- MnSO ₄ H ₂ O		5.28 g/l
- CuSO ₄ 5H ₂ O		1.1 g/l
- CoCl ₂ 6H ₂ O		1.1 g/l
- H ₃ BO ₃		0.3 g/l
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O		2.64 g/l
- HCl 4N		6.2 ml/l
HCl 37%	1.24 ml/l	
谷氨酸钠	5 g/l	
酵母提取物	40 g/l	
甘油 87%	590 ml/l	
生物素溶液 (10%)	2 ml/l	
- 生物素		1 g/l
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0.66 g/l	
溶液过滤通过0.22 μ m		

(1) 溶液过滤通过0.22 μ m

(2) 用NaOH (25%) 溶液将pH调节至11.0;溶液过滤通过0.22 μ m。

[0224] 将温度保持在30℃持续进一步2小时,然后升高至37℃,直到发酵结束。通过搅拌和压力的反馈控制将气流恒定设置至75 l/min且将溶解氧保持在17%饱和度。根据需要自动添加少量消泡剂溶液。至OD_{650nm}达到50 ($\pm$ 5) 值的时间,添加1 mM异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 以诱导M72的表达。从开始诱导的时间点5小时后结束发酵。在轻微搅拌下使细胞培养物向下冷却至15℃且离心(在4℃)以获得细胞沉淀,此后将其以等分试样储存于-20℃。

[0225] 包涵体的分离

在室温下解冻从收获物收集的细胞沉淀,且用高压均质器在裂解缓冲液(10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8.0)中破碎。此后,将细胞裂解物离心且用含有尿素、Tris和NaCl的洗涤缓冲液洗涤获得的细胞沉淀(或包涵体,IB)。用含有8M尿素的增溶缓冲液使IB溶解且过滤通过0.2 μ m膜。首先使用Q Sepharose Fast Flow (QSFF) 柱通过阴离子交换层析纯化该过滤的溶液。用6 M尿素, 20 mM双三羟甲基氨基甲烷丙烷, 90 mM NaCl, pH 7.0溶液进行M72的洗脱。

[0226] 通过羟基磷灰石层析法(HA)进一步纯化收集的M72,用6 M尿素, 20 mM双三羟甲基氨基甲烷丙烷, 250 mM NaCl, pH 7.0溶液将其进行洗脱。用30 kDa膜盒浓缩收集的级分且针对20 mM Tris, pH 7.5进行渗滤。然后M72除菌过滤通过0.22 μ m膜。然后纯化的容积物等分且储存在-70℃。

[0227] 实施例9:在pH 6.1、7.5和8.5的具有不同盐浓度的包含M72的组合物中研究“盐

析”。

[0228] 研究如大小和抗原性所评价的氯化钠浓度和pH对M72抗原稳定性的影响。

[0229] 方法

将纯化的大量抗原(具有两个N末端His残基的M72,SEQ ID No:3,如实施例8中所制备的)在三种含有0、50、150、300和450 mM的最终氯化钠浓度的不同缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液,pH 6.1,20mM Tris缓冲液,pH 7.5和20mM Tris缓冲液,pH 8.5)中稀释至100 ug/ml的浓度。

[0230] 样品立即进行分析(T0),在分析前过夜储存在4°C(T0 0/N),或在分析前在25°C下储存24小时(T24h25°C)。

[0231] 使用来自Malvern Instruments (UK)的Malvern Zetasizer Nano ZS进行DLS。使用633 nm的激光波长和4 mW的功率操作仪器。在22°C的温度下以173°检测散射光。通过仪器软件计算Z-平均直径(ZAV)和多分散指数(pI)。

[0232] 使用从Thermo Fischer Scientific 获得的Nepheloskan® Ascent进行浊度测定。在从Corning Inc (USA)获得的UV 透明Costar® 微板中进行分析。

[0233] 通过夹心ELISA定量抗原性,其中抗原通过M72-特异性兔多克隆抗体捕获且随后通过M72(Mtb39)-特异性小鼠单克隆抗体显现。所有测量值基于用于制备测试的制剂的纯化的大量蛋白相对于预期抗原性表示。

[0234] 结果

该实验的结果呈现于图3至5中。

[0235] 结果首次表明含有M72相关抗原的溶液的稳定性对于pH和氯化钠浓度都是敏感的。当pH越低时,氯化钠对抗原大小和抗原性的影响都更显著。

[0236] 甚至在没有氯化钠的情况下,抗原大小和抗原性在pH 6.1时也是不稳定的。添加pH 6.1的50mM氯化钠导致大小从35 nm(在T0时的0 mM氯化钠)增加至58 nm(T0)或在25°C 24小时后的79 nm。

[0237] 在25°C时pH 7.5或8.5时,特别是在没有氯化钠或在50 mM的氯化钠浓度的情况下,抗原大小和抗原性经24小时是相对稳定的。尽管如此,氯化钠浓度增加至150 mM或更高导致明显的抗原大小的增加和抗原性的降低。

[0238] 实施例10:使用山梨醇作为涨度剂在包含M72、免疫刺激剂的组合物中防止“盐析”

为了比较含有150 mM NaCl的免疫原性组合物与使用山梨醇作为涨度剂的组合物的稳定性,使用SEC-HPLC和ELISA监测多份样品。

[0239] 方法

制备三个不同的冻干饼,使得当与来自实施例5和7的适当的佐剂制剂相组合时,将获得期望的pH:

(a) 具有两个N末端His残基的M72 -目标为在重构疫苗中的pH 8.5

将15.75% (w/v) 蔗糖溶液(制备在注射用水中)添加至注射用水中以达到6.3%的蔗糖浓度。然后添加3% (w/v) Tween80溶液(制备在注射用水中)以达到0.025%的浓度。然后添加Tris-HCl缓冲液1 M pH 8.8以达到50 mM Tris缓冲液浓度。将混合物在室温下磁力搅拌5分钟。然后添加纯化的大量抗原(具有两个N末端His残基的M72,SEQ ID No:3,如实施例8中制备的)以达到25 ug/ml的蛋白浓度。将混合物在室温下磁力搅拌10分钟。检查pH且发现为

8.8。

[0240] 将0.5 ml获得的混合物填充在3 ml玻璃小瓶中,然后冷冻干燥。

[0241] (b) 具有两个N末端His残基的M72 - 目标为在重构疫苗中的pH 8.0

将15.75% (w/v) 蔗糖溶液(制备在注射用水中)添加至注射用水中以达到6.3%的蔗糖浓度。然后添加3% (w/v) Tween80溶液(制备在注射用水中)以达到0.025%的浓度。然后添加Tris-HCl缓冲液1 M pH 8.8以达到20 mM Tris缓冲液浓度。将混合物在室温下磁力搅拌5分钟。然后添加纯化的大量抗原(具有两个N末端His残基的M72, SEQ ID No:3,如实施例8中制备的)以达到25 ug/ml的蛋白浓度。将混合物在室温下磁力搅拌10分钟。检查pH且发现为8.8。

[0242] 将0.5 ml获得的混合物填充在3 ml玻璃小瓶中,然后冷冻干燥。

[0243] (c) 具有两个N末端His残基的M72 - 目标为在重构疫苗中的pH 7.5

将15.75% (w/v) 蔗糖溶液(制备在注射用水中)添加至注射用水中以达到6.3%的蔗糖浓度。然后添加3% (w/v) Tween80溶液(制备在注射用水中)以达到0.025%的浓度。然后添加Tris-HCl缓冲液1 M pH 8.8以达到12.5 mM Tris缓冲液浓度。将混合物在室温下磁力搅拌5分钟。然后添加纯化的大量抗原(具有两个N末端His残基的M72, SEQ ID No:3,如实施例8中制备的)以达到25 ug/ml的蛋白浓度。将混合物在室温下磁力搅拌10分钟。检查pH且发现为8.8。

[0244] 将0.5 ml获得的混合物填充在3 ml玻璃小瓶中,然后冷冻干燥。

[0245] 用625 ul实施例5和7中制备的佐剂溶液重构上述的冻干饼。用佐剂溶液重构后,获得下列免疫原性组合物:

(i) 具有两个N末端His残基的M72 - ASA(150 mM NaCl - 2) pH 8.5

10 ug抗原(20 ug/ml)

5% w/v蔗糖

40 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 ug DOPC

125 ug胆固醇

25 ug 3D-MPL

25 ug QS21

150 mM NaCl

10 mM磷酸盐

pH 8.5

(ii) 具有两个N末端His残基的M72 - ASA(150 mM NaCl - 2) pH 8.0

10 ug抗原(20 ug/ml)

5% w/v蔗糖

16 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 ug DOPC

125 ug胆固醇

25 ug 3D-MPL

25 ug QS21

150 mM NaCl

10 mM磷酸盐

pH 8.0

(iii) 具有两个N末端His残基的M72 - ASA (150 mM NaCl - 2) pH 7.5

10 ug抗原 (20 ug/ml)

5% w/v蔗糖

12.5 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 ug DOPC

125 ug胆固醇

25 ug 3D-MPL

25 ug QS21

150 mM NaCl

10 mM磷酸盐

pH 7.5

(iv) 具有两个N末端His残基的M72 - ASA (山梨醇- 2) pH 8.5

10 ug抗原 (20 ug/ml)

5% w/v蔗糖

40 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 ug DOPC

125 ug胆固醇

25 ug 3D-MPL

25 ug QS21

5 mM NaCl

4.7% w/v山梨醇

10 mM磷酸盐

pH 8.5

(v) 具有两个N末端His残基的M72 - ASA (山梨醇- 2) pH 8.0

10 ug抗原 (20 ug/ml)

5% w/v蔗糖

16 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 ug DOPC

125 ug胆固醇

25 ug 3D-MPL

25 ug QS21

5 mM NaCl

4.7% w/v山梨醇

10 mM磷酸盐

pH 8.0

(vi) 具有两个N末端His残基的M72 - ASA (山梨醇- 2) pH 7.5

10 ug抗原 (20 ug/ml)

5% w/v蔗糖

12.5 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 ug DOPC

125 ug胆固醇

25 ug 3D-MPL

25 ug QS21

5 mM NaCl

4.7% w/v山梨醇

10 mM磷酸盐

pH 7.5。

[0246] 样品分析

在25℃或30℃储存 (T0、T6h和T24h) 后表征上述重构的免疫原性组合物。

[0247] 通过注射在20 mM Tris缓冲液pH 8.5中平衡的TOSOH TSK-Gel5000Pwx1 (ID 7.8 mm x 30 cm) 上、通过210 nm 的UV 检测且0.5 ml/min 的流速进行SEC-HPLC分析。

[0248] 通过夹心ELISA定量抗原性,其中抗原通过M72-特异性兔多克隆抗体捕获且随后通过M72 (Mtb39) -特异性小鼠单克隆抗体显现。所有测量值基于用于制备测试的制剂的纯化的大量蛋白相对于预期抗原性表示。

[0249] 结果

结果显示在图6a-6d和7中。

[0250] 在使用山梨醇作为涨度剂在各自pH (即pH 7.5、8.0和8.5) 下在低盐组合物中重构后,SEC-HPLC概况是稳定的。这可能与含有150 mM NaCl的免疫原性组合物的SEC-HPLC概况形成对比,其显示出获得的初始概况和在25℃或30℃储存后的那些之间的明显变化。当150 mM NaCl组合物的pH降低时,这种变化变得更加强烈。

[0251] 在抗原性方面,可以得出同样的结论,其中在使用山梨醇作为涨度剂在30℃下在各自pH (即pH 7.5、8.0和8.5) 下在低盐组合物中重构长达24h后,回收率维持高度稳定。

[0252] 实施例11:本发明的免疫原性组合物导电率测定

测量一系列本发明的免疫原性组合物的导电率且与对照氯化钠溶液的导电率和含有常规量氯化钠的免疫原性组合物进行比较。

[0253] 方法

通过在注射用水中稀释从1500 mM氯化钠原液制备一系列氯化钠浓度为0、75、100、150、250和300 mM的标准品。

[0254] 根据实施例8中提供的程序使用具有两个N末端His残基的M72制备免疫原性组合

物。为了研究来自抗原本身和纯化的容积物中任何剩余材料的贡献,还通过排除抗原成分而制备安慰剂冻干饼。

[0255] 使用Malvern Zetasizer Nano和成倍的毛细管小室中的1.5 ml每种样品,应用30至150 V的电压(通过仪器自动测定)且测定导电率。

[0256] 结果

氯化钠标准溶液的导电率

氯化钠浓度 mM	导电率 mS/cm
0	0.0
75	8.2
100	10.7
150	15.6
250	23.9
300	30.0

[0257] 在图8中提供了基于该数据的标准曲线。

[0258] 测试溶液的导电率

描述	氯化钠浓度 mM	导电率 mS/cm	当量氯化钠 浓度 mM
ASA(山梨醇-2)	5	1.46	9
安慰剂 pH 8.0 / ASA(山梨醇-2)	5	1.95	14
M72 pH 8.0 / ASA(山梨醇-2)	5	1.96	14
安慰剂 pH 8.5 / ASA(山梨醇-2)	5	2.36	18
M72 pH 8.5 / ASA(山梨醇-2)	5	2.28	17
ASA(150 mM NaCl-2)	150	16	159
安慰剂 pH 8.5 / ASA(150 mM NaCl-2)	150	14.8	147
M72 pH 8.5 / ASA(150 mM NaCl-2)	150	15.3	152

[0259] 从上面的数据可以看出,利用150 mM NaCl的溶液的导电率显著大于最少利用NaCl的溶液的导电率。

[0260] 纯化的容积物中抗原和任何组分的影响是最小的,因为安慰剂制剂与它们的含有M72相关抗原的对应物具有相当的导电率。

[0261] 实施例12:本发明的免疫原性组合物的免疫原性测试

本实施例的目的在于确定为了改进蛋白稳定性,改变制剂以减少本发明的免疫原性组合合物中盐的量是否对体内免疫原性具有影响。

[0262] 方法

评价四种免疫原性组合物:

1. 具有两个N末端His残基的M72 pH 8.5/ASA (150 mM NaCl - 2)
2. 具有两个N末端His残基的M72 pH 8.5/ASA (山梨醇 - 2)
3. 具有两个N末端His残基的M72 pH 8/ASA (山梨醇 - 2)
4. 具有两个N末端His残基的M72 pH 7.5/ASA (山梨醇 - 2)

在C57BL/6小鼠中评价含有这些抗原的组合物的免疫原性。对于四种组合物中的每一种,用50 μ l佐剂溶液中的1 μ g抗原(通过实施例10中提供的程序制备)在第0天、第14天和第28天肌肉注射30只C57BL/6小鼠3次。在最后免疫后6天(6dPIII)测量引起的M72特异性T细胞应答(CD4和CD8)。

[0263] 对于M72-特异性细胞应答的测定,从30只小鼠/组收集外周血淋巴细胞且合并(5只小鼠的6份合并物/组)。进行红血细胞裂解,然后将细胞体外铺板。用一组覆盖M72序列(没有N末端His残基)的重叠肽(具有11个氨基酸重叠的15聚体肽,1 μ g/ml/肽)将细胞在体外再刺激。使用培养基中剩余的细胞(无肽刺激)来确定背景响应。与肽合并物共培养后两个小时,将布雷菲德菌素A添加至孔中(以抑制细胞因子分泌),且将细胞在4 $^{\circ}$ C储存过夜。随后针对下列标记将细胞染色:CD4、CD8、IL-2、IFN- γ 和TNF- α 。

[0264] 结果

图9和10中的每个数据点分别代表在第三次免疫后六天来自5只小鼠的外周血淋巴细胞的合并物的减去背景的M72-特异性CD4或CD8 T细胞应答。应答表示为对M72肽合并物刺激应答的产生IFN- γ 和/或IL-2和/或TNF- α 的CD4 T细胞的百分比。条代表每个组的应答的中值。

[0265] 图9和10中的结果显示,在用每种试验制剂3次免疫后诱导了相当的CD4和CD8 T细胞应答。因此,可以得出结论,本发明的免疫原性组合物中存在的盐量的降低没有导致诱导的T细胞应答的妥协。

[0266] 实施例13:在pH 6.1和8.0的具有CaCl₂或MgSO₄的包含M72的组合物中研究“盐析”。

[0267] 为了研究其他盐对M72抗原稳定性的影响,用一系列浓度的CaCl₂或MgSO₄且在不同pH水平制备溶液。目视检查被用作稳定性的读出值。

[0268] 方法

将纯化的大量抗原(具有两个N末端His残基的M72,SEQ ID No:3)在两种含有指定量盐(0 mM; 150 mM或300 mM NaCl; 40 mM, 80 mM或160 mM CaCl₂; 87.5 mM, 175 mM或430 mM MgSO₄)的缓冲液(10mM琥珀酸盐缓冲液,pH 6.1和10 mM Tris缓冲液,pH 8.0)中稀释至100 μ g/ml的浓度。

[0269] 样品在制备后直接进行分析。

[0270] 使用Mettler Toledo导电率仪和未硅化处理的玻璃小瓶中的6 ml每份样品,测定导电率。

[0271] 结果

组	盐	缓冲剂	pH (理论的)	导电率 (mS/cm) (测量的)	pH (测量的)	Visual 目视观察
A	0 mM	琥珀酸盐 10mM	6.1	1.1	6.3	澄清
B	NaCl 150 mM	琥珀酸盐 10mM	6.1	13.4	6.1	澄清
C	NaCl 300 mM	琥珀酸盐 10mM	6.1	20.0	6.1	澄清
D	CaCl ₂ 40 mM	琥珀酸盐 10mM	6.1	8.0	6.1	乳色
E	CaCl ₂ 80 mM	琥珀酸盐 10mM	6.1	11.2	5.8	乳色 + 大颗粒
F	CaCl ₂ 160 mM	琥珀酸盐 10mM	6.1	20.2	5.8	乳色 + 大颗粒
G	MgSO ₄ 87.5 mM	琥珀酸盐 10mM	6.1	7.7	6.1	乳色

组	盐	缓冲剂	pH (理论的)	导电率 (mS/cm) (测量的)	pH (测量的)	Visual 目视观察
H	MgSO ₄ 175 mM	琥珀酸盐 10mM	6.1	12.4	5.9	乳色+ 非常大颗粒
I	MgSO ₄ 430 mM	琥珀酸盐 10mM	6.1	20.4	5.9	乳色+ 非常大颗粒
J	0 mM	Tris 10mM	8.0	0.463	8.0	澄清
K	NaCl 150 mM	Tris 10mM	8.0	12.13	8.0	澄清
L	NaCl 300 mM	Tris 10mM	8.0	21.1	8.0	澄清
M	CaCl ₂ 40 mM	Tris 10mM	8.0	6.7	8.1	大颗粒
N	CaCl ₂ 80 mM	Tris 10mM	8.0	10.8	8.0	乳色+ 大颗粒
O	CaCl ₂ 160 mM	Tris 10mM	8.0	19.7	8.0	乳色+ 大颗粒
P	MgSO ₄ 87.5 mM	Tris 10mM	8.0	7.5	8.0	大颗粒
Q	MgSO ₄ 175 mM	Tris 10mM	8.0	10.9	8.2	乳色+ 非常大颗粒
R	MgSO ₄ 430 mM	Tris 10mM	8.0	21.7	8.1	乳色+ 非常大颗粒

[0272] 结果表明,含有M72相关抗原的溶液可以对除氯化钠以外的盐是敏感的。CaCl₂或MgSO₄的影响似乎比对于相当浓度或导电率的氯化钠更加明显。

[0273] 实施例14:在pH 6.1、7.5和8.5的具有不同盐浓度的包含Mtb72f的组合物中研究“盐析”。

[0274] 研究如大小所评价的氯化钠浓度和pH对Mtb72f抗原稳定性的影响。

[0275] 方法

将纯化的大量抗原(具有6个His残基的Mtb72f, SEQ ID No:7)在三种含有0、150和450 mM的最终氯化钠浓度的不同缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液,pH 6.1,20mM Tris缓冲液,pH 7.5和20mM Tris缓冲液,pH 8.5)中稀释至100 ug/ml的浓度。

[0276] 在分析之前,样品在4℃或25℃储存24小时。

[0277] 使用从Thermo Fischer Scientific 获得的Nepheloskan® Ascent进行浊度测定。在从Corning Inc (USA)获得的UV 透明Costar® 微板中进行分析。

[0278] 使用来自Wyatt仪器的Dynapro酶标仪进行DLS。使用830 nm的激光波长和50 mW的功率操作仪器。在22℃的温度下以150℃检测散射光。通过仪器软件计算平均流体动力学直

径和多分散指数 (pI)。

[0279] 结果

该实验的结果呈现于图11和12中。

[0280] DLS和浊度测定法都表明Mtb72f以与前面实施例中所示的M72相似的方式对盐浓度和pH敏感的总趋势。因此,本发明的益处适用于M72相关抗原,而不仅仅是M72序列本身。

[0281] 在许多DLS样品的情况下,仪器测定无法确定特定的颗粒大小(在图12中显示为NV)。

[0282] 实施例15:使用山梨醇作为涨度剂在包含M72、免疫刺激剂的组合物中防止“盐析”

为了比较含有150 mM NaCl的免疫原性组合物与使用山梨醇作为涨度剂的组合物的稳定性,使用可替代的ELISA监测样品。

[0283] 方法

如实施例10中所述制备冻干饼(具体而言方法(a)),使得当与来自实施例7的适当的佐剂制剂相组合时,将获得8.5的pH。

[0284] 用625 μ l实施例7中制备的佐剂溶液重构上述的冻干饼。用佐剂溶液重构后,获得下列免疫原性组合物:

(i) 具有两个N末端His残基的M72 - ASA (150 mM NaCl - 2) pH 8.5

10 μ g抗原 (20 μ g/ml)

5% w/v蔗糖

40 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 μ g DOPC

125 μ g胆固醇

25 μ g 3D-MPL

25 μ g QS21

150 mM NaCl

10 mM磷酸盐

pH 8.5

(ii) 具有两个N末端His残基的M72 - ASA (山梨醇- 2) pH 8.5

10 μ g抗原 (20 μ g/ml)

5% w/v蔗糖

40 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 μ g DOPC

125 μ g胆固醇

25 μ g 3D-MPL

25 μ g QS21

5 mM NaCl

4.7% w/v山梨醇

10 mM磷酸盐

pH 8.5。

[0285] 在30℃储存(T24h)后表征上述重构的免疫原性组合物且与临时制备的样品(T0)进行比较。

[0286] 通过间接夹心ELISA定量抗原性,其中抗原通过M72-特异性兔多克隆抗体捕获且随后通过M72(Mtb39)-特异性小鼠单克隆抗体显现。简而言之,将板用在Dulbecco氏磷酸盐缓冲盐水中1/8000稀释的抗-M72兔多克隆抗体在4℃包被过夜,且洗涤四次后将板用饱和缓冲液(PBS, 0.1% Tween 20, 1% BSA)在37℃封闭1小时。洗涤步骤后,将蛋白标准品(M72纯化容积物:1950 ug/ml)、内部对照(M72:1768 ug/ml)和样品以约0.25μg/ml的浓度上样至板的第一列中的孔,且然后从孔1到12在饱和缓冲液(PBS, 0.025% Tween 20)中进行2倍系列稀释,且在37℃下孵育1h30。在洗涤步骤之后,然后免疫复合物在饱和缓冲液(PBS, 0.025% Tween 20)中与1/1000稀释的抗-M72小鼠单克隆抗体在37℃孵育1h。洗涤四次后,以1/1000的稀释度将生物素化的兔抗小鼠多克隆抗体添加至饱和缓冲液(PBS, 0.025% Tween 20)中。洗涤四次后,通过添加在饱和缓冲液(PBS, 0.025% Tween 20)中1/4000稀释的链霉亲和素-辣根过氧化物酶而扩增信号。洗涤四次后,通过在RT邻苯二胺二盐酸盐(orthophenylene diamine dihydrochlorid, OPDA) 15min而显现信号,且通过添加HCl 1M而终止反应。显色与结合的抗-M72抗体的量成正比,且在490 nm和620 nm进行测量。使用PBS, 0.025% Tween 20进行所有洗涤步骤。

[0287] 所有测量值基于用于制备测试的制剂的纯化的大量蛋白相对于预期抗原性表示。

[0288] 结果

结果显示在图13中。菱形表明对于三份试验样品中每一份的特定测量值,线表明平均值。

[0289] 使用山梨醇作为涨度剂在30℃在pH 8.5最长达24h在低盐组合物中重构后,抗原回收率在很大程度上是稳定的。在24小时后ASA(山梨醇-2)中的回收率为83.5%(T0 87.1%,意味着维持95.9%的相对抗原性),而24小时后 ASA(NaCl-2)中的回收率为54.5%(T0 81.0%,意味着储存后维持仅67.3%的相对抗原性)。

[0290] 总之,实施例9、10和15首次表明由pH和NaCl浓度导致的对含有M72相关抗原的免疫原性组合物的稳定性的不利影响。实施例13将该工作延伸,以显示其他盐也可以对含有M72相关抗原的免疫原性组合物的稳定性具有不利影响,实施例14表明该影响也适用于M72相关序列。

[0291] 用非离子涨度剂重新配制免疫原性组合物解决了抗原稳定性问题。此外,实施例3、4和12表明从免疫原性制剂去除基本上所有NaCl且用作为涨度剂的山梨醇将其替代对刺激T细胞应答没有不利影响。

[0292] 免疫原性组合物的稳定性是关键,且在制冷方法可能不容易获得的偏僻地方时特别具有挑战性。通过降低免疫原性组合物中盐的存在,本发明人已经能够降低当储存免疫原性组合物时观察到的变化的程度。

[0293] 在整个说明书和随附权利要求书中,除非上下文另外需要,用语“包含(comprise)”及其变体诸如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”将理解为暗示包含所述整数、节距、整数组或节距组,但不排除任意其他的整数、节距、整数组或节距组。

[0294] 本文引用的所有文献,包括专利和专利申请完整地通过引用并入。

序列表

<110> GlaxoSmithKline Biologicals sa

Godart, Stephane

Laanan, Amina

Lemoine, Dominique

<120> 分枝杆菌抗原组合物

<130> VB64442

<150> US61/422723

<151> 2010-12-14

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 723

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> M72融合蛋白

<400> 1

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
1 5 10 15
Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
20 25 30
Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
35 40 45
Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
50 55 60
Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
65 70 75 80
Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
85 90 95
Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
100 105 110
Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
115 120 125
Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
130 135 140
Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
145 150 155 160

Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Met	Trp	Asp	Ser	Val	Ala	Ser	Asp	Leu	Phe	Ser	
				165					170					175		
Ala	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Ser	Val	Val	Trp	Gly	Leu	Thr	Val	Gly	Ser	
				180					185					190		
Trp	Ile	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Tyr	
				195					200					205		
Val	Ala	Trp	Met	Ser	Val	Thr	Ala	Gly	Gln	Ala	Glu	Leu	Thr	Ala	Ala	
				210					215					220		
Gln	Val	Arg	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Tyr	Glu	Thr	Ala	Tyr	Gly	Leu	Thr	
225					230					235					240	
Val	Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Asn	Arg	Ala	Glu	Leu	Met	Ile	Leu	
				245					250					255		
Ile	Ala	Thr	Asn	Leu	Leu	Gly	Gln	Asn	Thr	Pro	Ala	Ile	Ala	Val	Asn	
				260					265					270		
Glu	Ala	Glu	Tyr	Gly	Glu	Met	Trp	Ala	Gln	Asp	Ala	Ala	Ala	Met	Phe	
				275					280					285		
Gly	Tyr	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Leu	Leu	Pro	Phe	
				290					295					300		
Glu	Glu	Ala	Pro	Glu	Met	Thr	Ser	Ala	Gly	Gly	Leu	Leu	Glu	Gln	Ala	
305					310					315					320	
Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln	Leu	Met	
				325					330					335		
Asn	Asn	Val	Pro	Gln	Ala	Leu	Gln	Gln	Leu	Ala	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	
				340					345					350		
Thr	Thr	Pro	Ser	Ser	Lys	Leu	Gly	Gly	Leu	Trp	Lys	Thr	Val	Ser	Pro	
				355					360					365		
His	Arg	Ser	Pro	Ile	Ser	Asn	Met	Val	Ser	Met	Ala	Asn	Asn	His	Met	
				370					375					380		
Ser	Met	Thr	Asn	Ser	Gly	Val	Ser	Met	Thr	Asn	Thr	Leu	Ser	Ser	Met	
385					390					395					400	
Leu	Lys	Gly	Phe	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln	Ala	Val	Gln	Thr	Ala	
				405					410					415		
Ala	Gln	Asn	Gly	Val	Arg	Ala	Met	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Gly	
				420					425					430		
Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Ala	
				435					440					445		
Ser	Val	Gly	Ser	Leu	Ser	Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln	
				450					455					460		
Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	

465	470	475	480
Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly			
	485	490	495
Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val			
500	505	510	
Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile			
515	520	525	
Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu			
530	535	540	
Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val			
545	550	555	560
Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr			
565	570	575	
Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val			
580	585	590	
Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln			
595	600	605	
Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala			
610	615	620	
Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly			
625	630	635	640
Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly			
645	650	655	
Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu			
660	665	670	
Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr			
675	680	685	
Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala			
690	695	700	
Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr			
705	710	715	720

Ala Ala Ser

<210> 2

<211> 2172

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> M72融合体的编码序列

<400> 2

atgacggccg	cgctccgataa	cttccagctg	tcccagggtg	ggcagggtt	cgccattccg	60
atcgggcagg	cgatggcgat	cgcgggccag	atccgatcgg	gtggggggtc	accacaccgtt	120
catatcgggc	ctaccgcctt	cctcggcttg	ggtgttgtcg	acaacaacgg	caacggcgca	180
cgagtccaac	gcgtggtcgg	gagcgcctcg	gcggcaagtc	tcggcatctc	caccggcgac	240
gtgatcaccg	cggtcgacgg	cgctccgatc	aactcggcca	ccgcgatggc	ggacgcgctt	300
aacgggcatc	atcccgggtga	cgatcatctc	gtgacctggc	aaaccaagtc	gggcggcacg	360
cgtacaggga	acgtgacatt	ggccgaggga	ccccgggccg	aattcatggg	ggatttcggg	420
gcgttaccac	cggagatcaa	ctccgcgagg	atgtacgccg	gcccgggttc	ggcctcgctg	480
gtggccgcgg	ctcagatgtg	ggacagcgtg	gcgagtgacc	tgttttcggc	cgcgtcggcg	540
tttcagtcgg	tggctcgggg	tctgacgggtg	gggtcgtgga	taggttcgtc	ggcgggtcgtg	600
atgggtggcg	cggcctcgcc	gtatgtggcg	tggatgagcg	tcaccgcggg	gcaggccgag	660
ctgaccgccg	cccagggtccg	ggttgcgtcg	gcggcctacg	agacggcgta	tgggctgacg	720
gtgccccgc	cggatgatcg	cgagaaccgt	gtgaactga	tgattctgat	agcgaccaac	780
ctcttggggc	aaaacacccc	ggcgatcgcg	gtcaacgagg	ccgaatacgg	cgagatgtgg	840
gccaagacg	ccgcccgat	gtttggtac	gccgcggcga	cggcgacggc	gacggcgacg	900
ttgctgccgt	tcgaggaggc	gccggagatg	accagcgcgg	gtgggctcct	cgagcaggcc	960
gccgcggtcg	aggaggcctc	cgacaccgcc	gcggcgaacc	agttgatgaa	caatgtgccc	1020
caggcgtgc	aacagctggc	ccagcccacg	cagggcacca	cgccttcttc	caagctgggt	1080
ggcctgtgga	agacggtctc	gccgcacg	tcgccgatca	gcaacatggg	gtcgatggcc	1140
aacaaccaca	tgtcgatgac	caactcgggt	gtgtcgatga	ccaacacctt	gagctcgatg	1200
ttgaagggt	ttgctccggc	ggcgcccgcc	caggccgtgc	aaaccgcggc	gcaaaacggg	1260
gtccgggcga	tgagctcgct	gggcagctcg	ctgggttctt	cgggtctggg	cgggtggggtg	1320
gccgccaact	tgggtcgggc	ggcctcggtc	ggttcgttgt	cgggtccgca	ggcctgggcc	1380
gcggccaacc	aggcagtcac	cccggcgggc	cgggcgctgc	cgctgaccag	cctgaccagc	1440
gccgcggaaa	gagggcccgg	gcagatgctg	ggcgggctgc	cgggtggggca	gatgggcgcc	1500
agggccggtg	gtgggctcag	tgggtgtgctg	cgtgttcgc	cgcgacccta	tgtgatgccg	1560
cattctccgg	cagccggcga	tatcgccccg	ccggccttgt	cgcaggaccg	gttcgccgac	1620
ttccccgcgc	tgccccctga	cccgtccgcg	atggtcgccc	aagtggggcc	acaggtggtc	1680
aacatcaaca	ccaaactggg	ctacaacaac	gccgtggggc	ccgggaccgg	catcgtcac	1740
gatcccaacg	gtgtcgtgct	gaccaacaac	cacgtgatcg	cgggcgccac	cgacatcaat	1800
gcgttcagcg	tcggctccgg	ccaaacctac	ggcgtcgatg	tggtcgggta	tgaccgcacc	1860
caggatgtcg	cggatgctga	gctgcgcggt	gccggtggcc	tgccgtcggc	ggcgatcggt	1920
ggcggcgtcg	cggttgggtga	gcccgtcgtc	gcgatgggca	acagcgggtg	gcagggcgga	1980
acgccccgtg	cggatgcctgg	cagggtggtc	gcgtcggcc	aaaccgtgca	ggcgtcggat	2040
tcgtgaccg	gtccgaaga	gacattgaac	gggttgatcc	agttcgatgc	cgcgatccag	2100
cccgtgatg	cgggcgggcc	cgctgcaaac	ggcctaggac	aggtggtcgg	tatgaacacg	2160
gccgcgtcct	ag					2172
<210>	3					
<211>	725					

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有2个额外his残基的M72融合体

<400> 3

```

Met His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly
1           5           10           15
Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln
           20           25           30
Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala
           35           40           45
Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val
           50           55           60
Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr
65           70           75           80
Gly Asp Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr
           85           90           95
Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser
           100          105          110
Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr
           115          120          125
Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu
           130          135          140
Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala
145          150          155          160
Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu
           165          170          175
Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val
           180          185          190
Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser
           195          200          205
Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr
           210          215          220
Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly
225          230          235          240
Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met
           245          250          255
Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala
           260          265          270

```

Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala		
275	280	285
Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu		
290	295	300
Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu		
305	310	315
Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln		
	325	330
Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr		
	340	350
Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val		
	355	365
Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn		
	370	380
His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser		
385	390	400
Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln		
	405	415
Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser		
	420	430
Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg		
	435	445
Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala		
	450	460
Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu		
465	470	480
Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro		
	485	495
Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu		
	500	510
Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly		
	515	525
Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro		
	530	540
Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln		
545	550	560
Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala		
	565	575
Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn		

580	585	590
His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser		
595	600	605
Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp		
610	615	620
Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala		
625	630	635
Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn		
645	650	655
Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val		
660	665	670
Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu		
675	680	685
Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly		
690	695	700
Asp Ala Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met		
705	710	715
Asn Thr Ala Ala Ser		720
725		

<210> 4

<211> 2178

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有2个额外his残基的M72融合体的编码序列

<400> 4

atgcatcaca	cggccgcgtc	cgataacttc	cagctgtccc	agggtgggca	gggattcgcc	60
attccgatcg	ggcaggcgat	ggcgatcgcg	ggccagatcc	gatcgggtgg	ggggtcaccc	120
accgttcata	tcgggcctac	cgccttcctc	ggttgggtg	ttgtcgacaa	caacggcaac	180
ggcgcacgag	tccaacgcgt	ggtcgggagc	gtccggcg	caagtctcgg	catctccacc	240
ggcgacgtga	tcaccgcggt	cgacggcgct	ccgatcaact	cggccaccgc	gatggcggac	300
gcgcttaacg	ggcatcatcc	cggtgacgtc	atctcggtga	cctggcaaac	caagtcgggc	360
ggcacgcgta	cagggaacgt	gacattggcc	gagggacccc	cggccgaatt	catggtggat	420
ttcggggcgt	taccaccgga	gatcaactcc	gcgaggatgt	acgccggccc	gggttcggcc	480
tcgctggtgg	ccgcggctca	gatgtgggac	agcgtggcga	gtgacctgtt	ttcgcccgcg	540
tcggcggttc	agtcggtggt	ctggggtctg	acgggtgggt	cgtggatagg	ttcgtcggcg	600
ggtctgatgg	tggcggcggc	ctcgccgtat	gtggcgtgga	tgagcgtcac	cgcggggcag	660
gccgagctga	ccgccgccca	ggtccgggtt	gctgcggcgg	cctacgagac	ggcgtatggg	720
ctgacggtgc	ccccgccggt	gatcgccgag	aaccgtgctg	aactgatgat	tctgatagcg	780

accaacctct	tggggcaaaa	caccccggcg	atcgcggtca	acgaggccga	atacggcgag	840
atgtgggccc	aagacgccgc	cgcatgttt	ggctacgccg	cggcgacggc	gacggcgacg	900
gcgacgttgc	tgccgttcga	ggaggcgccg	gagatgacca	gcgcgggtgg	gctcctcgag	960
caggccgccc	cggtcgagga	ggcctccgac	accgccgcgg	cgaaccagtt	gatgaacaat	1020
gtgccccagg	cgctgcaaca	gctggcccag	cccacgcagg	gcaccacgcc	ttcttccaag	1080
ctgggtggcc	tgtggaagac	ggtctcgccg	catcggtcgc	cgatcagcaa	catggtgtcg	1140
atggccaaca	accacatgtc	gatgaccaac	tcgggtgtgt	cgatgaccaa	caccttgagc	1200
tcgatgttga	agggctttgc	tccggcggcg	gccgccagg	ccgtgcaaac	cgcggcgcaa	1260
aacgggggtc	gggcgatgag	ctcgtggggc	agctcgctgg	gttcttcggg	tctgggcggt	1320
gggggtggcc	ccaacttggg	tcgggcggcc	tcggtcggtt	cgttgtcggt	gccgcaggcc	1380
tgggcgcg	ccaaccaggc	agtcaccccg	gcggcgcg	cgctgccgct	gaccagcctg	1440
accagcgccg	cggaaagagg	gccccgggag	atgctggggc	ggctgccggt	ggggcagatg	1500
ggcgccagg	ccggtggtgg	gctcagtgg	gtgctgcgtg	ttccgcgcg	accctatgtg	1560
atgccgcatt	ctccggcagc	cggcgatata	gccccgccg	ccttgtcgca	ggaccggttc	1620
gccgaacttc	ccgcgtgcc	cctcgacccg	tccgcgatgg	tcgccaagt	ggggccacag	1680
gtggtcaaca	tcaacaccaa	actgggttac	aacaacgccg	tgggcgccg	gaccggcatc	1740
gtcatcgatc	ccaacggtgt	cgtgctgacc	aacaaccacg	tgatcgcg	cgccaccgac	1800
atcaatgcgt	tcagcgtcgg	ctccggccaa	acctacggcg	tcgatgtggt	cgggtatgac	1860
cgcaccagg	atgtcgcggt	gctgcagctg	cgcggtgccg	gtggcctgcc	gtcggcggcg	1920
atcggtggcg	gcgtcgcggt	tggtagccc	gtcgtcgca	tgggcaacag	cggtgggcag	1980
ggcggaacgc	cccgtcggt	gcctggcagg	gtggtcgcg	tcggccaaac	cgtgcaggcg	2040
tcggattcgc	tgaccggtgc	cgaagagaca	ttgaacgggt	tgatccagtt	cgatgccgcg	2100
atccagcccc	gtgatcggg	cgggcccgtc	gtcaacggcc	taggacaggt	ggtcggtatg	2160
aacacggccg	cgctcctag					2178

<210> 5

<211> 723

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mtb72f融合体

<400> 5

Met	Thr	Ala	Ala	Ser	Asp	Asn	Phe	Gln	Leu	Ser	Gln	Gly	Gly	Gln	Gly
1				5					10					15	
Phe	Ala	Ile	Pro	Ile	Gly	Gln	Ala	Met	Ala	Ile	Ala	Gly	Gln	Ile	Arg
			20					25					30		
Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Thr	Val	His	Ile	Gly	Pro	Thr	Ala	Phe	Leu
		35					40					45			
Gly	Leu	Gly	Val	Val	Asp	Asn	Asn	Gly	Asn	Gly	Ala	Arg	Val	Gln	Arg
	50					55					60				

Val	Val	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Thr	Gly	Asp
65					70					75					80
Val	Ile	Thr	Ala	Val	Asp	Gly	Ala	Pro	Ile	Asn	Ser	Ala	Thr	Ala	Met
				85						90					95
Ala	Asp	Ala	Leu	Asn	Gly	His	His	Pro	Gly	Asp	Val	Ile	Ser	Val	Thr
			100					105					110		
Trp	Gln	Thr	Lys	Ser	Gly	Gly	Thr	Arg	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Leu	Ala
		115					120					125			
Glu	Gly	Pro	Pro	Ala	Glu	Phe	Met	Val	Asp	Phe	Gly	Ala	Leu	Pro	Pro
	130					135					140				
Glu	Ile	Asn	Ser	Ala	Arg	Met	Tyr	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Leu
145					150					155					160
Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Met	Trp	Asp	Ser	Val	Ala	Ser	Asp	Leu	Phe	Ser
				165					170					175	
Ala	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Ser	Val	Val	Trp	Gly	Leu	Thr	Val	Gly	Ser
			180					185					190		
Trp	Ile	Gly	Ser	Ser	Ala	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Tyr
	195						200					205			
Val	Ala	Trp	Met	Ser	Val	Thr	Ala	Gly	Gln	Ala	Glu	Leu	Thr	Ala	Ala
	210					215					220				
Gln	Val	Arg	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Tyr	Glu	Thr	Ala	Tyr	Gly	Leu	Thr
225				230						235					240
Val	Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Asn	Arg	Ala	Glu	Leu	Met	Ile	Leu
			245					250					255		
Ile	Ala	Thr	Asn	Leu	Leu	Gly	Gln	Asn	Thr	Pro	Ala	Ile	Ala	Val	Asn
		260						265					270		
Glu	Ala	Glu	Tyr	Gly	Glu	Met	Trp	Ala	Gln	Asp	Ala	Ala	Ala	Met	Phe
	275					280					285				
Gly	Tyr	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Leu	Leu	Pro	Phe
	290					295					300				
Glu	Glu	Ala	Pro	Glu	Met	Thr	Ser	Ala	Gly	Gly	Leu	Leu	Glu	Gln	Ala
305				310						315					320
Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Ala	Ala	Asn	Gln	Leu	Met
			325						330				335		
Asn	Asn	Val	Pro	Gln	Ala	Leu	Gln	Gln	Leu	Ala	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly
		340						345					350		
Thr	Thr	Pro	Ser	Ser	Lys	Leu	Gly	Gly	Leu	Trp	Lys	Thr	Val	Ser	Pro
	355						360					365			
His	Arg	Ser	Pro	Ile	Ser	Asn	Met	Val	Ser	Met	Ala	Asn	Asn	His	Met

370	375	380
Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met		
385	390	395
Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala		400
	405	410
Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly		415
	420	425
Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala		430
	435	440
Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln		445
	450	455
Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser		460
465	470	475
Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly		480
	485	490
Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val		495
	500	505
Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile		510
	515	520
Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu		525
	530	535
Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val		540
545	550	555
Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr		560
	565	570
Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val		575
	580	585
Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln		590
	595	600
Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala		605
	610	615
Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly		620
625	630	635
Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly		640
	645	650
Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu		655
	660	665
Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr		670
	675	680
		685

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser
 690 695 700
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 705 710 715 720
 Ala Ala Ser

<210> 6

<211> 2172

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Mtb72f融合体的编码序列

<400> 6

atgacggccg	cgccgataa	cttccagctg	tcccaggggtg	ggcagggatt	cgccattccg	60
atcgggcagg	cgatggcgat	cgcgggccag	atccgatcgg	gtggggggtc	accacccgtt	120
catatcgggc	ctaccgcctt	cctcggett	ggtgtgtctg	acaacaacgg	caacggcgca	180
cgagtccaac	gcgtggtcgg	gagcgtccg	gcggcaagtc	tcggcatctc	caccggcgac	240
gtgatcaccg	cggctcgacg	cgctccgatc	aactcggcca	ccgcgatggc	ggacgcgctt	300
aacgggcatac	atcccgggtga	cgatcatctc	gtgacctggc	aaaccaagtc	gggcggcacg	360
cgtacaggga	acgtgacatt	ggccgaggga	ccccgggccg	aattcatggt	ggatttcggg	420
gcgttaccac	cggagatcaa	ctccgcgagg	atgtacgccg	gcccgggttc	ggcctcgctg	480
gtggccgcgg	ctcagatgtg	ggacagcgtg	gcgagtgacc	tgttttcggc	cgcgtcggcg	540
tttcagtcgg	tggctctgggg	tctgacgggt	gggtcgtgga	taggttcgtc	ggcgggtctg	600
atggtggcgg	cggcctcgcc	gtatgtggcg	tggatgagcg	tcaccgcggg	gcaggccgag	660
ctgaccgccg	cccagggtccg	ggttgctgcg	gcggcctacg	agacggcgta	tgggctgacg	720
gtgccccgcg	cgggtgatcgc	cgagaaccgt	gctgaactga	tgattctgat	agcgaccaac	780
ctcttggggc	aaaacacccc	ggcgatcgcg	gtcaacgagg	ccgaatacgg	cgagatgtgg	840
gccaagacg	ccgccgcgat	gtttggctac	gccgcggcga	cggcgacggc	gacggcgacg	900
ttgctgccgt	tcgaggaggc	gccggagatg	accagcgcgg	gtgggctcct	cgagcaggcc	960
gccgcggtcg	aggaggcctc	cgacaccgcc	gcggcgaacc	agttgatgaa	caatgtgccc	1020
caggcgtgct	aacagctggc	ccagcccacg	cagggcacca	cgccttcttc	caagctgggt	1080
ggcctgtgga	agacggtctc	gccgcatcgg	tcgccgatca	gcaacatggt	gtcgatggcc	1140
aacaaccaca	tgtcgatgac	caactcgggt	gtgtcgatga	ccaacacctt	gagctcgatg	1200
ttgaagggt	ttgctccggc	ggcggccgcc	caggccgtgc	aaaccgcggc	gcaaaacggg	1260
gtccgggcga	tgagctcgct	gggcagctcg	ctgggttctt	cgggtctggg	cgggtggggtg	1320
gccgccaact	tgggtcgggc	ggcctcggtc	ggttcgttgt	cgggtccgca	ggcctgggccc	1380
gcggccaacc	aggcagtcac	cccggcgggc	cgggcgctgc	cgtgaccag	cctgaccagc	1440
gccgcggaaa	gagggccccg	gcagatgctg	ggcgggctgc	cgggtggggca	gatgggcgcc	1500
agggcgggtg	gtgggctcag	tgggtgtgctg	cgtgttccgc	cgcgacccta	tgtgatgccg	1560
cattctccgg	cagccggcga	tatcgccccg	ccggccttgt	cgcaggaccg	gttcgccgac	1620

```

ttccccgcgc tgccccctcga cccgtccgcg atggtcgccc aagtggggcc acaggtggtc 1680
aacatcaaca ccaaactggg ctacaacaac gccgtgggcg cggggaccgg catcgtcac 1740
gatcccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cgggcgccac cgacatcaat 1800
gcgttcagcg tcggctccgg ccaaactac ggcgtcgatg tggtcgggta tgaccgcacc 1860
caggatgtcg cgggtgctgca gctgcgcggt gccggtggcc tgccgtcggc ggcgatcgg 1920
ggcggcgctcg cggttggtga gcccgtcgtc gcgatgggca acagcgggtg gcagggcgga 1980
acgccccgtg cgggtgcctgg cagggtggtc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgatcgat 2040
tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100
cccggtgatt cgggcgggcc cgctcgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg 2160
gccgcgtcct ag 2172

```

<210> 7

<211> 729

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有6个额外his残基的Mtb72f融合体

<400> 7

```

Met His His His His His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu
1          5          10          15
Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala
          20          25          30
Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile
          35          40          45
Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn
          50          55          60
Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu
65          70          75          80
Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile
          85          90          95
Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly
          100         105         110
Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr
          115         120         125
Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp
          130         135         140
Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly
145         150         155         160
Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val
          165         170         175

```

Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp		
180	185	190
Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val		
195	200	205
Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln		
210	215	220
Ala Glu Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu		
225	230	235
Thr Ala Tyr Gly Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg		
245	250	255
Ala Glu Leu Met Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr		
260	265	270
Pro Ala Ile Ala Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln		
275	280	285
Asp Ala Ala Ala Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr		
290	295	300
Ala Thr Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly		
305	310	315
Gly Leu Leu Glu Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala		
325	330	335
Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu		
340	345	350
Ala Gln Pro Thr Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu		
355	360	365
Trp Lys Thr Val Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser		
370	375	380
Met Ala Asn Asn His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr		
385	390	395
Asn Thr Leu Ser Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala		
405	410	415
Gln Ala Val Gln Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser		
420	425	430
Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala		
435	440	445
Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala		
450	455	460
Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro		
465	470	475
Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu		

	485	490	495
Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu			
	500	505	510
Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser			
	515	520	525
Pro Ala Ala Gly Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe			
	530	535	540
Ala Asp Phe Pro Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln			
545	550	555	560
Val Gly Pro Gln Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn			
	565	570	575
Ala Val Gly Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val			
	580	585	590
Leu Thr Asn Asn His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe			
	595	600	605
Ser Val Gly Ser Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp			
	610	615	620
Arg Thr Gln Asp Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu			
625	630	635	640
Pro Ser Ala Ala Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val			
	645	650	655
Ala Met Gly Asn Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro			
	660	665	670
Gly Arg Val Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu			
	675	680	685
Thr Gly Ala Glu Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala			
	690	695	700
Ile Gln Pro Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln			
705	710	715	720
Val Val Gly Met Asn Thr Ala Ala Ser			
	725		

<210> 8

<211> 2190

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有6个额外his残基的M72融合体的编码序列

<400> 8

atgcatacacc atcaccatca cacggccgcg tccgataact tccagctgtc ccagggtggg

60

cagggattcg	ccattccgat	cgggcaggcg	atggcgatcg	cgggccagat	ccgatcgggt	120
gggggggtcac	ccaccgttca	tatcgggcct	accgccttcc	tcggcttggg	tgttgtcgac	180
aacaacggca	acggcgcacg	agtccaacgc	gtggtcggga	gcgctccggc	ggcaagtctc	240
ggcatctcca	ccggcgacgt	gatcaccgcg	gtcgacggcg	ctccgatcaa	ctcggccacc	300
gcgatggcgg	acgcgcttaa	cgggcatcat	cccggtgacg	tcattctcgg	gacctggcaa	360
accaagtcgg	gcggcacgcg	tacagggaac	gtgacattgg	ccgagggacc	cccggccgaa	420
ttcatggtgg	atttcggggc	gttaccaccg	gagatcaact	ccgcgaggat	gtacgccggc	480
ccgggttcgg	cctcgcctgg	ggccgcggct	cagatgtggg	acagcgtggc	gagtgcctg	540
ttttcggccg	cgtcggcggt	tcagtcgggt	gtctggggtc	tgacggtggg	gtcgtggata	600
ggttcgtcgg	cgggtctgat	ggtggcggcg	gcctcgccgt	atgtggcgtg	gatgagcgtc	660
accgcggggc	aggccgagct	gaccgccgcc	caggtccggg	ttgctgcggc	ggcctacgag	720
acggcgatatg	ggctgacggt	gccccgccg	gtgatcgccg	agaaccgtgc	tgaactgatg	780
attctgatag	cgaccaacct	cttggggcaa	aacaccccgg	cgatcgcggt	caacgaggcc	840
gaatacggcg	agatgtgggc	ccaagacgcc	gccgcgatgt	ttggctacgc	cgcggcgacg	900
gcgacggcga	cggcgacgtt	gctgccgttc	gaggaggcgc	cggagatgac	cagcgcgggt	960
gggctcctcg	agcaggccgc	cgcggtcgag	gaggcctccg	acaccgccgc	ggcgaaccag	1020
ttgatgaaca	atgtgcccc	ggcgtgcaa	cagctggccc	agcccacgca	gggcaccacg	1080
ccttcttcca	agctgggtgg	cctgtggaag	acggtctcgc	cgcatcggtc	gccgatcagc	1140
aacatggtgt	cgatggccaa	caaccacatg	tcgatgacca	actcgggtgt	gtcgatgacc	1200
aacaccttga	gctcgatgtt	gaagggtttt	gctccggcgg	cggccgcccc	ggccgtgcaa	1260
accgcggcgc	aaaacgggg	ccgggcgatg	agctcgctgg	gcagctcgct	gggtttcttcg	1320
ggtctggggc	gtgggggtgg	cgccaacttg	ggtcgggcgg	cctcggtcgg	ttcgttgtcg	1380
gtgccgcagg	cctggggccg	ggccaaccag	gcagtcaccc	cggcggcgcg	ggcgctgccg	1440
ctgaccagcc	tgaccagcgc	cgcggaaga	gggcccgggc	agatgctggg	cgggctgccg	1500
gtggggcaga	tgggcgccag	ggccggtggt	gggctcagtg	gtgtgctgcg	tgttccgccg	1560
cgaccctatg	tgatgccgca	ttctccggca	gccggcgata	tcgccccgcc	ggccttgtcg	1620
caggaccggt	tcgccgactt	ccccgcgctg	ccctcgacc	cgtccgcgat	ggtcgcccaa	1680
gtggggccac	aggtggtcaa	catcaacacc	aaactgggct	acaacaacgc	cgtgggcgcc	1740
gggaccggca	tcgtcatcga	tccaacgggt	gtcgtgctga	ccaacaacca	cgtgatcgcg	1800
ggcgccaccg	acatcaatgc	gttcagcgtc	ggctccggcc	aaacctacgg	cgtcgatgtg	1860
gtcgggtatg	accgcaccca	ggatgtcgcg	gtgctgcagc	tgcgcggtgc	cgggtggcctg	1920
ccgtcggcgg	cgatcggtgg	cggcgtcgcg	gttggtgagc	ccgtcgtcgc	gatgggcaac	1980
agcgtggggc	agggcggaac	gccccgtgcg	gtgcctggca	gggtggtcgc	gctcggccaa	2040
accgtgcagg	cgtcggattc	gctgaccggt	gccgaagaga	cattgaacgg	gttgatccag	2100
ttcgatgccg	cgatccagcc	cggtgattcg	ggcgggcccc	tcgtcaacgg	cctaggacag	2160
gtggtcggta	tgaacacggc	cgcgtcctag				2190

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列	
<220>	
<223> CpG寡核苷酸1 - CpG 1826	
<400> 9	
tccatgacgt tcctgacgtt	20
<210> 10	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> CpG寡核苷酸2 - CpG 1758	
<400> 10	
tctcccagcg tgcgccat	18
<210> 11	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> CpG寡核苷酸3	
<400> 11	
accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg	30
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> CpG寡核苷酸4 - CpG 2006	
<400> 12	
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggtt	24
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> CpG寡核苷酸5 - CpG 1686	
<400> 13	
tccatgacgt tcctgatgct	20

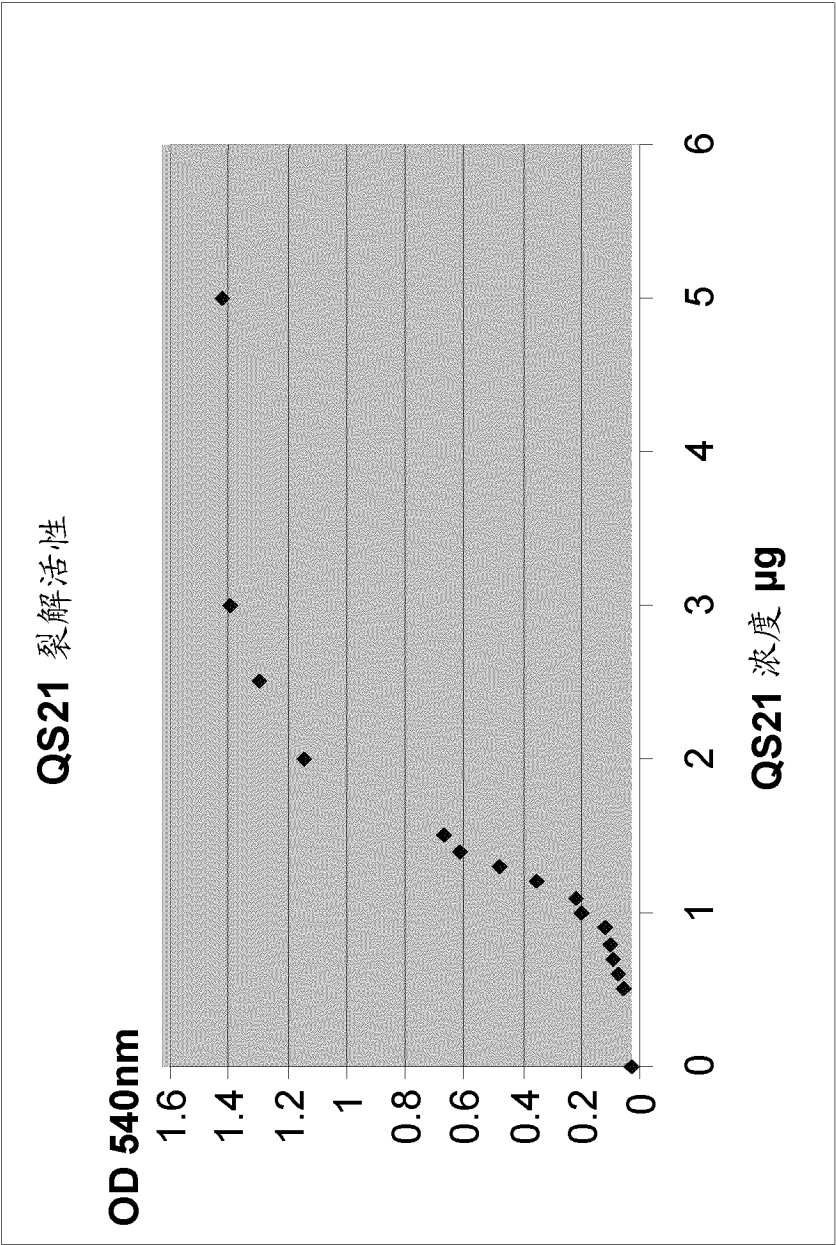


图 1

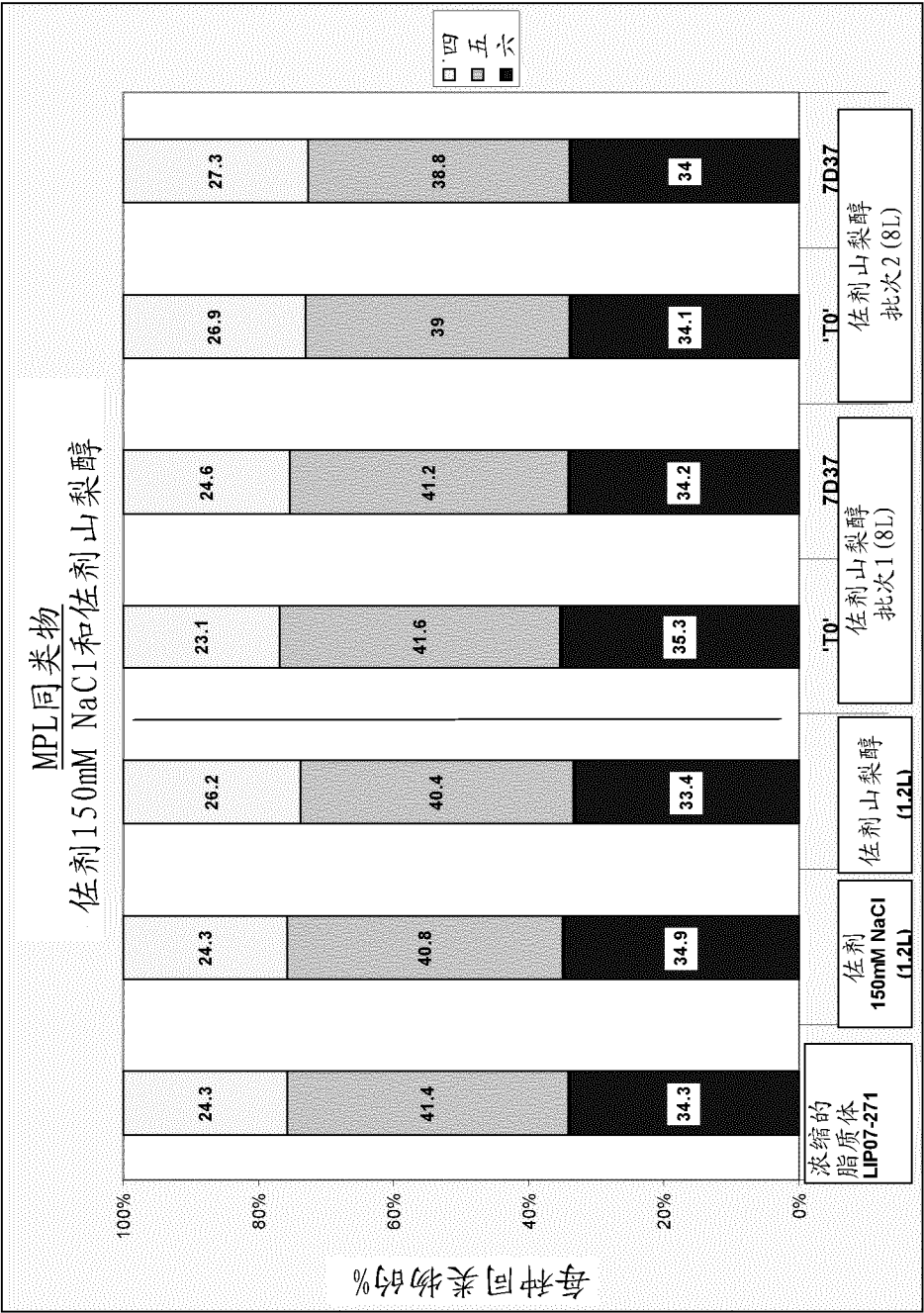


图 2

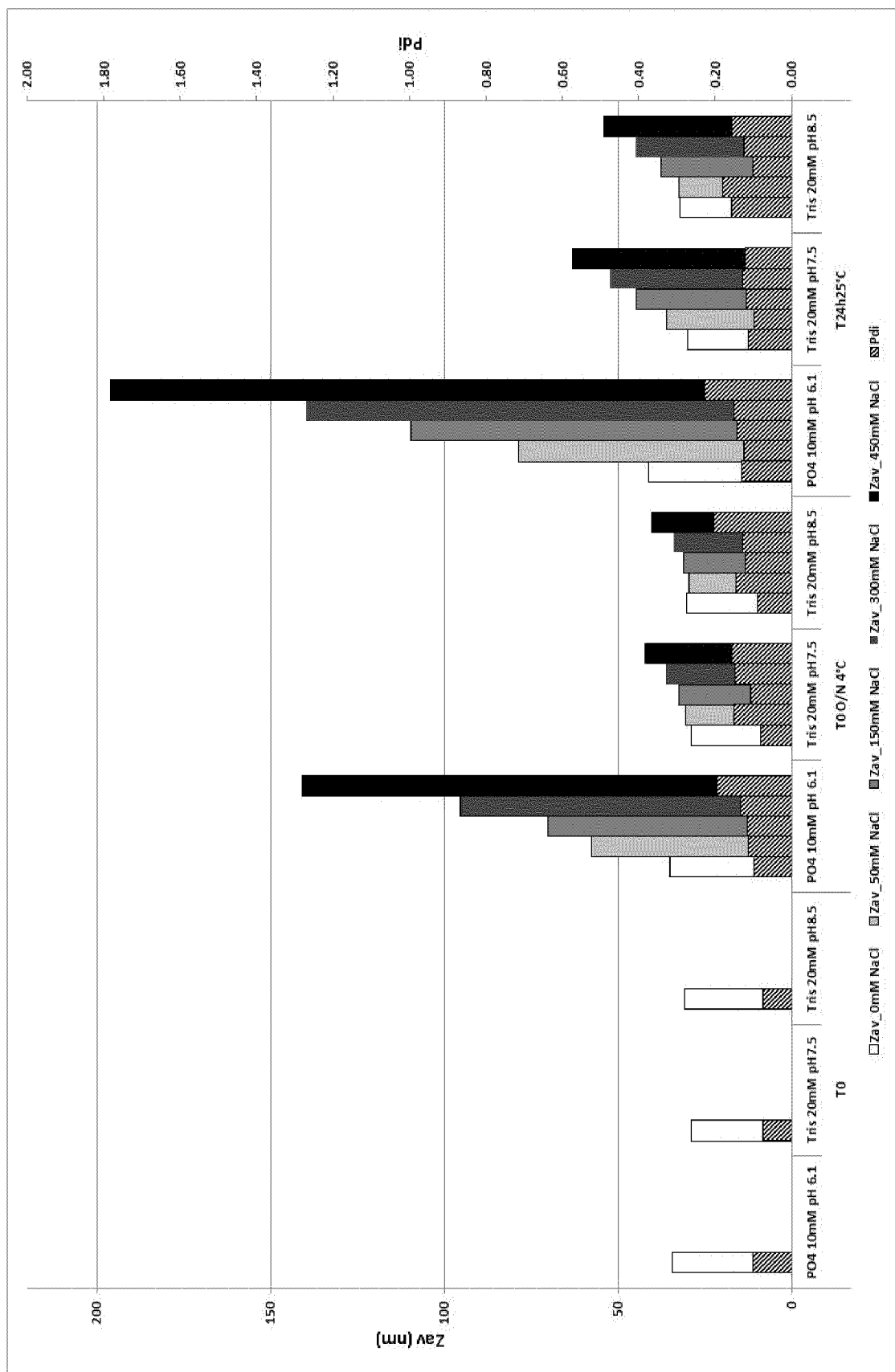


图 3

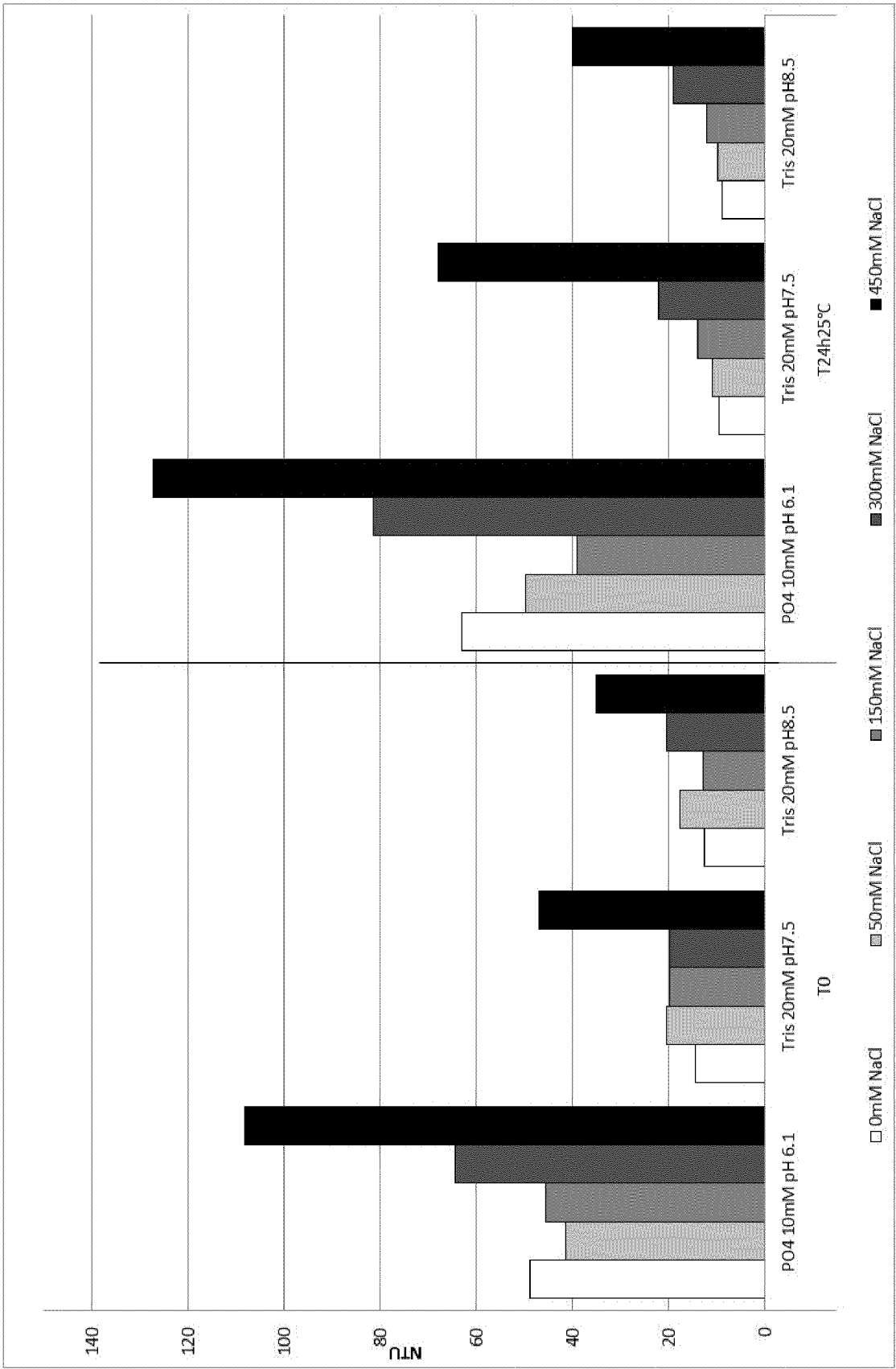


图 4

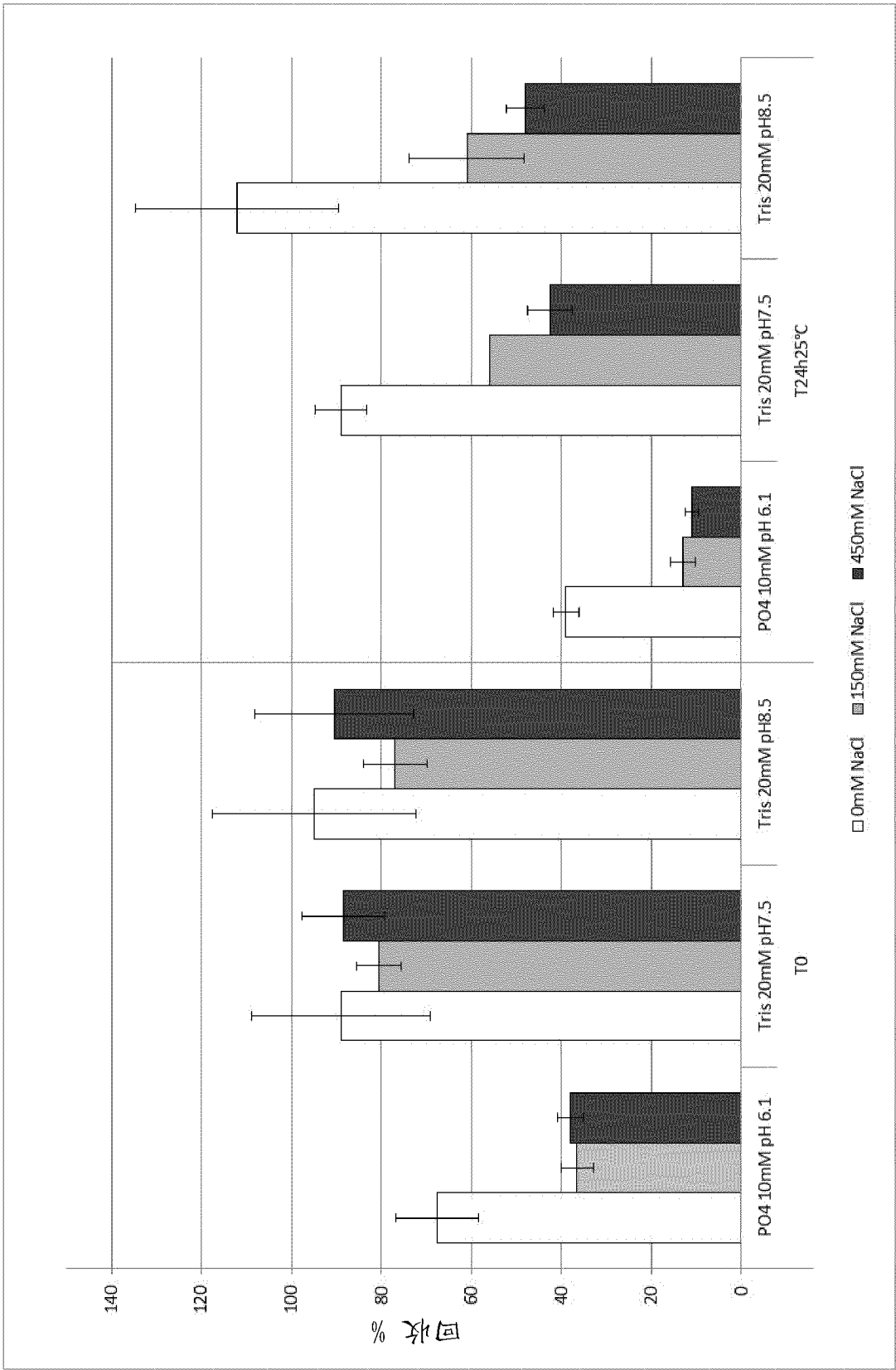


图 5

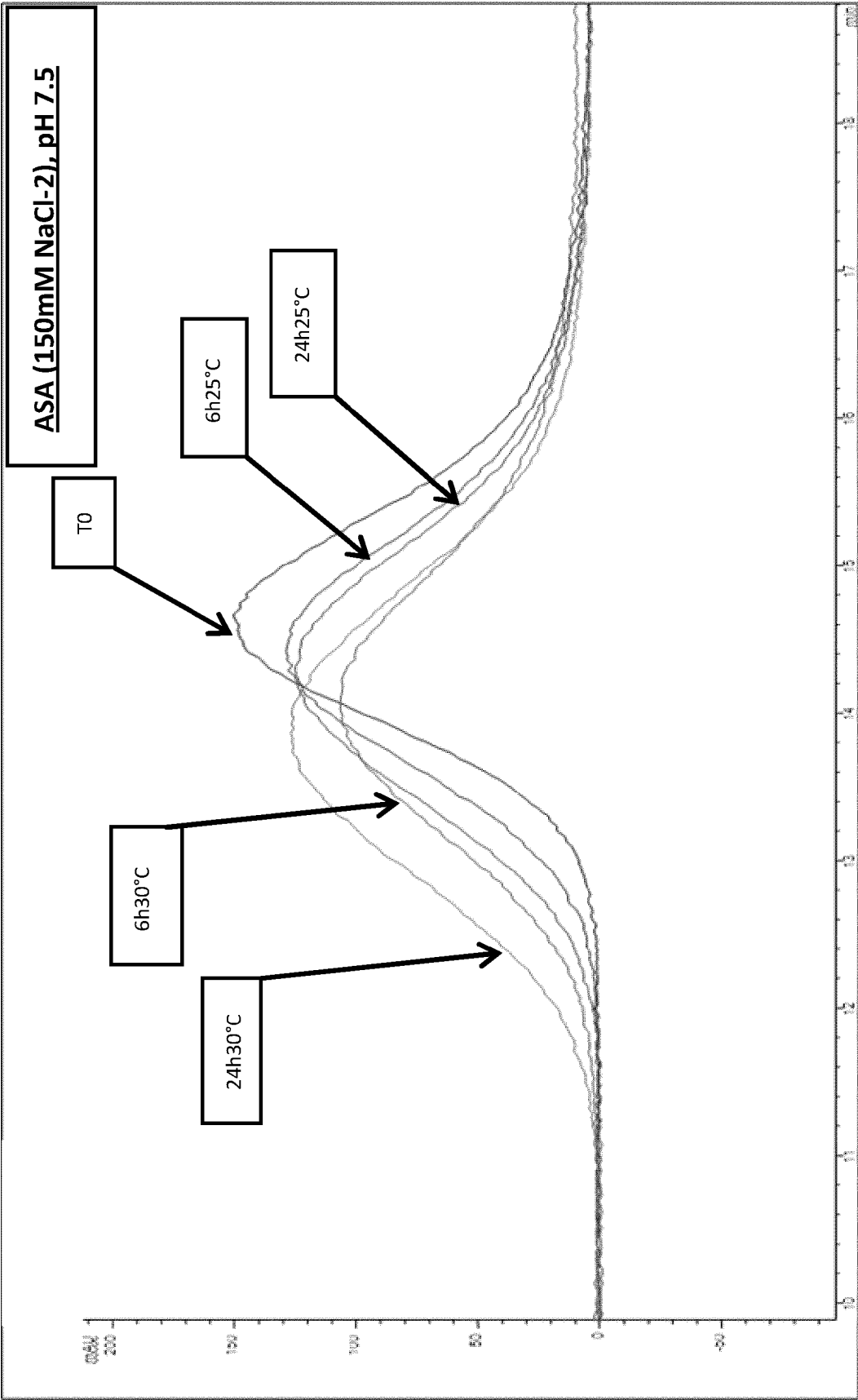


图 6a

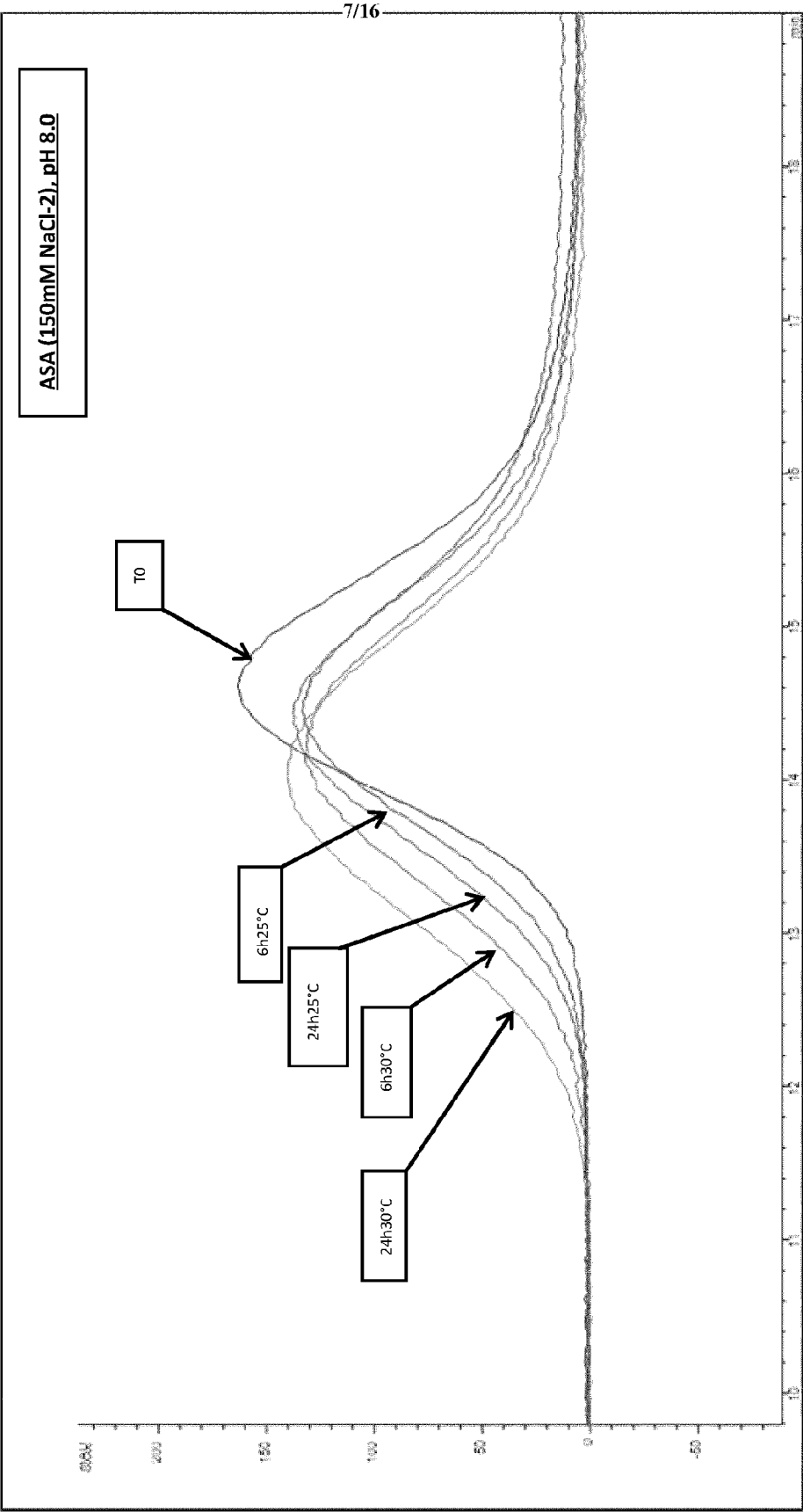


图 6b

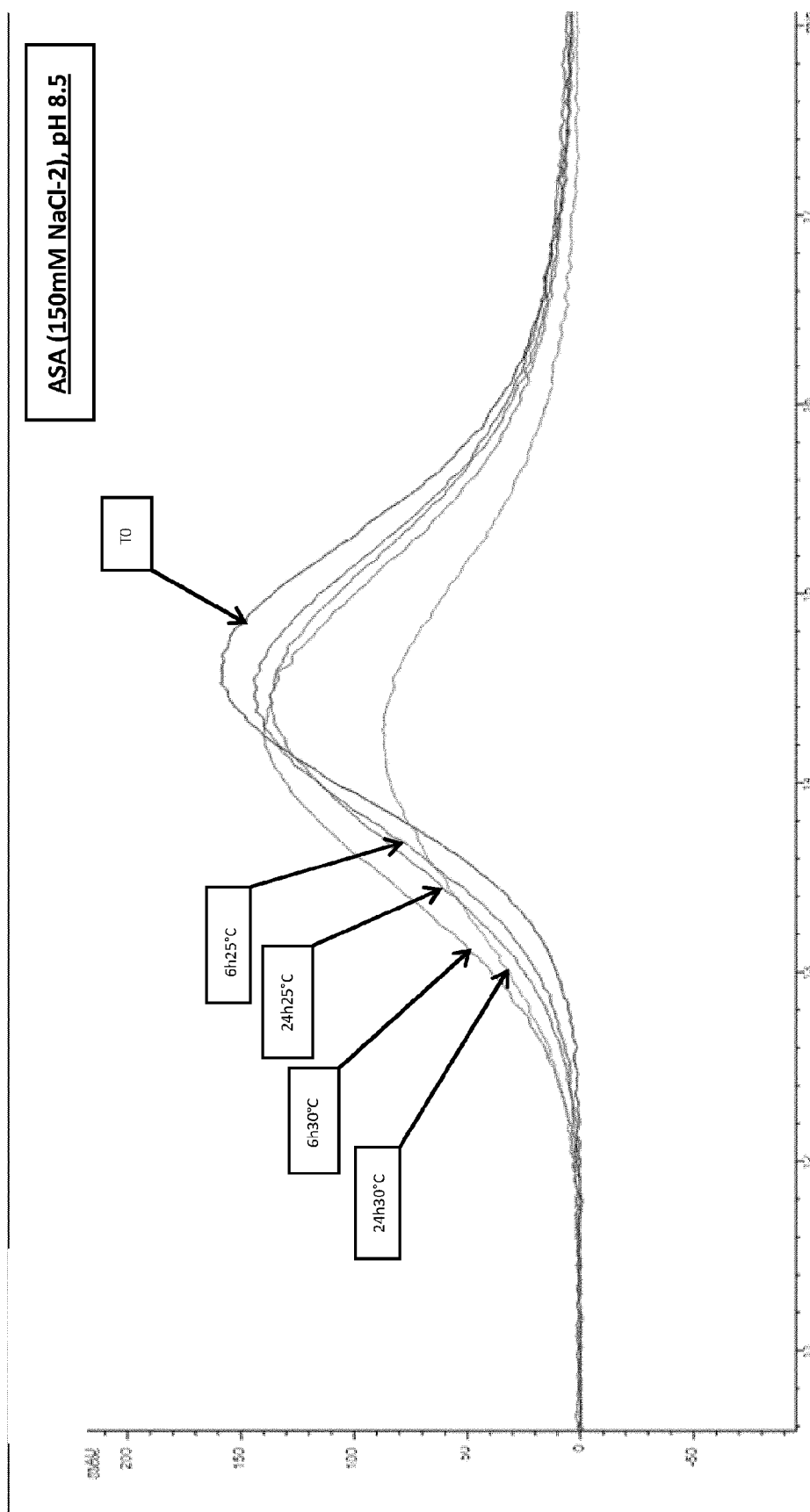


图 6c

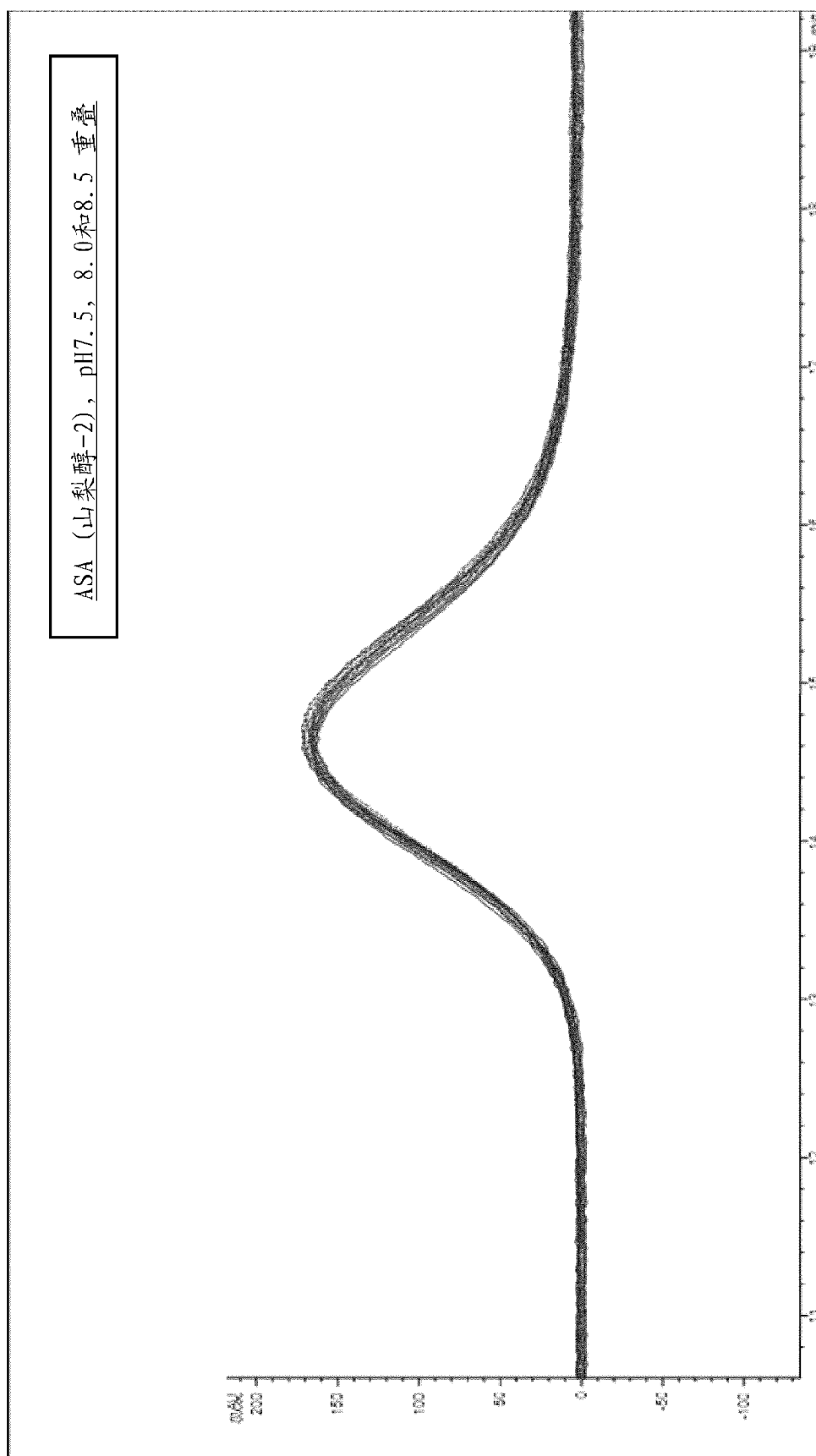


图 6d

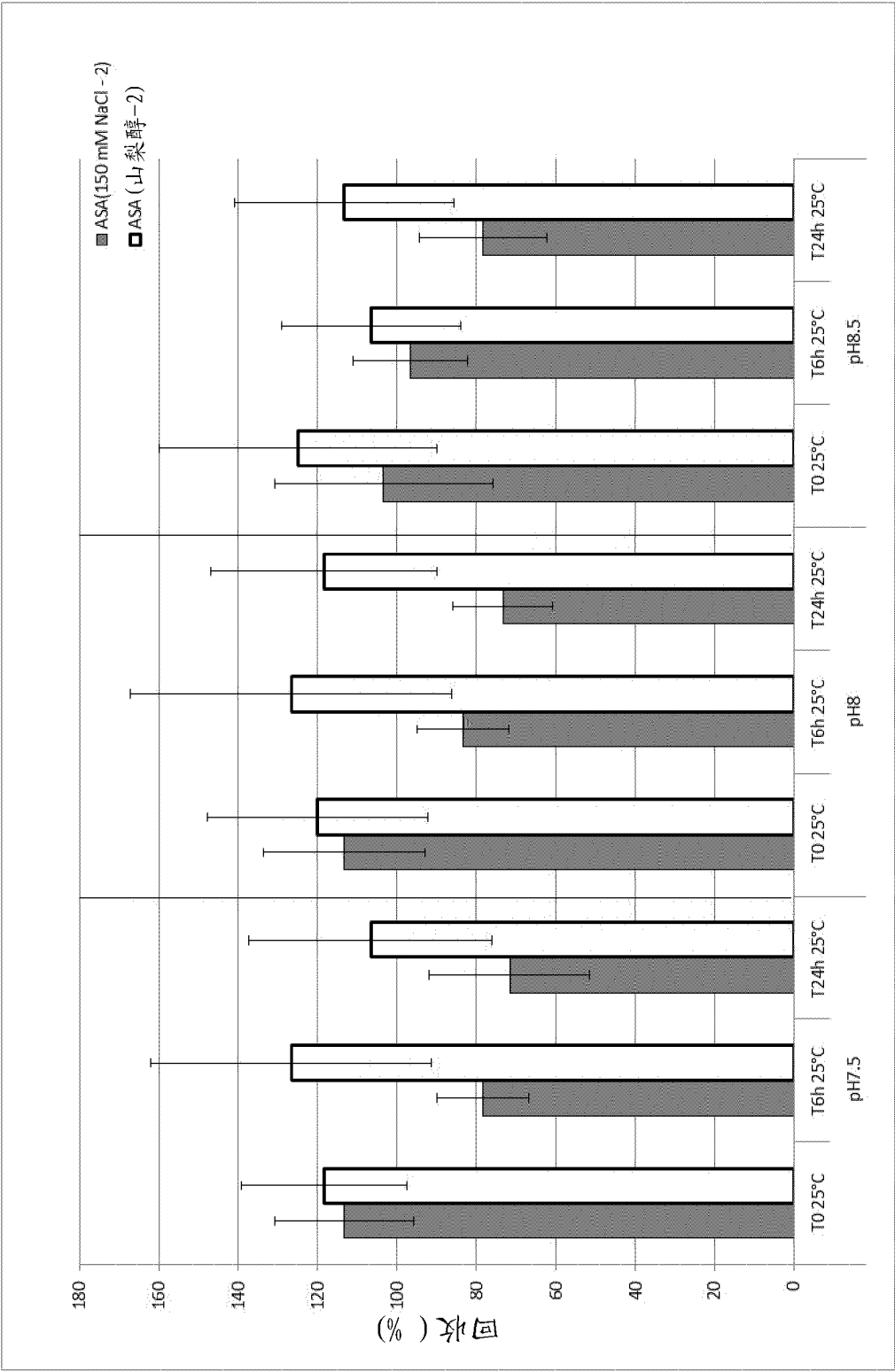


图 7

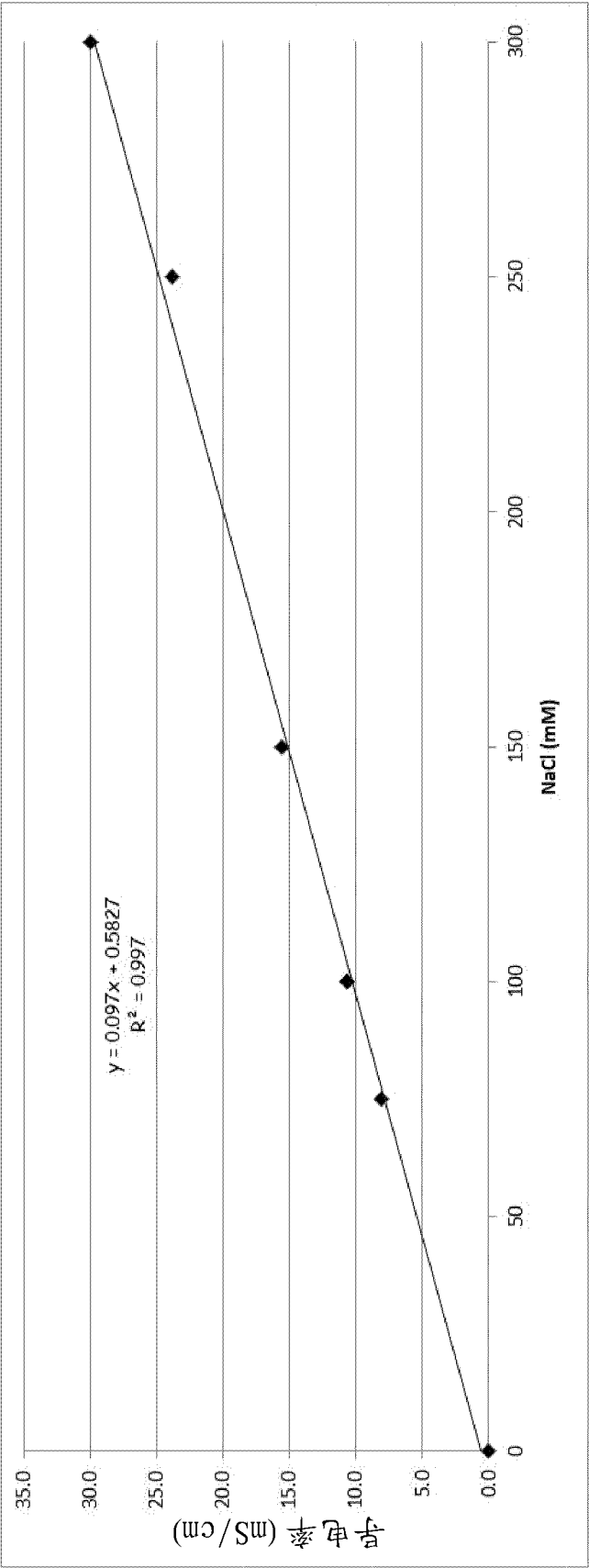


图 8

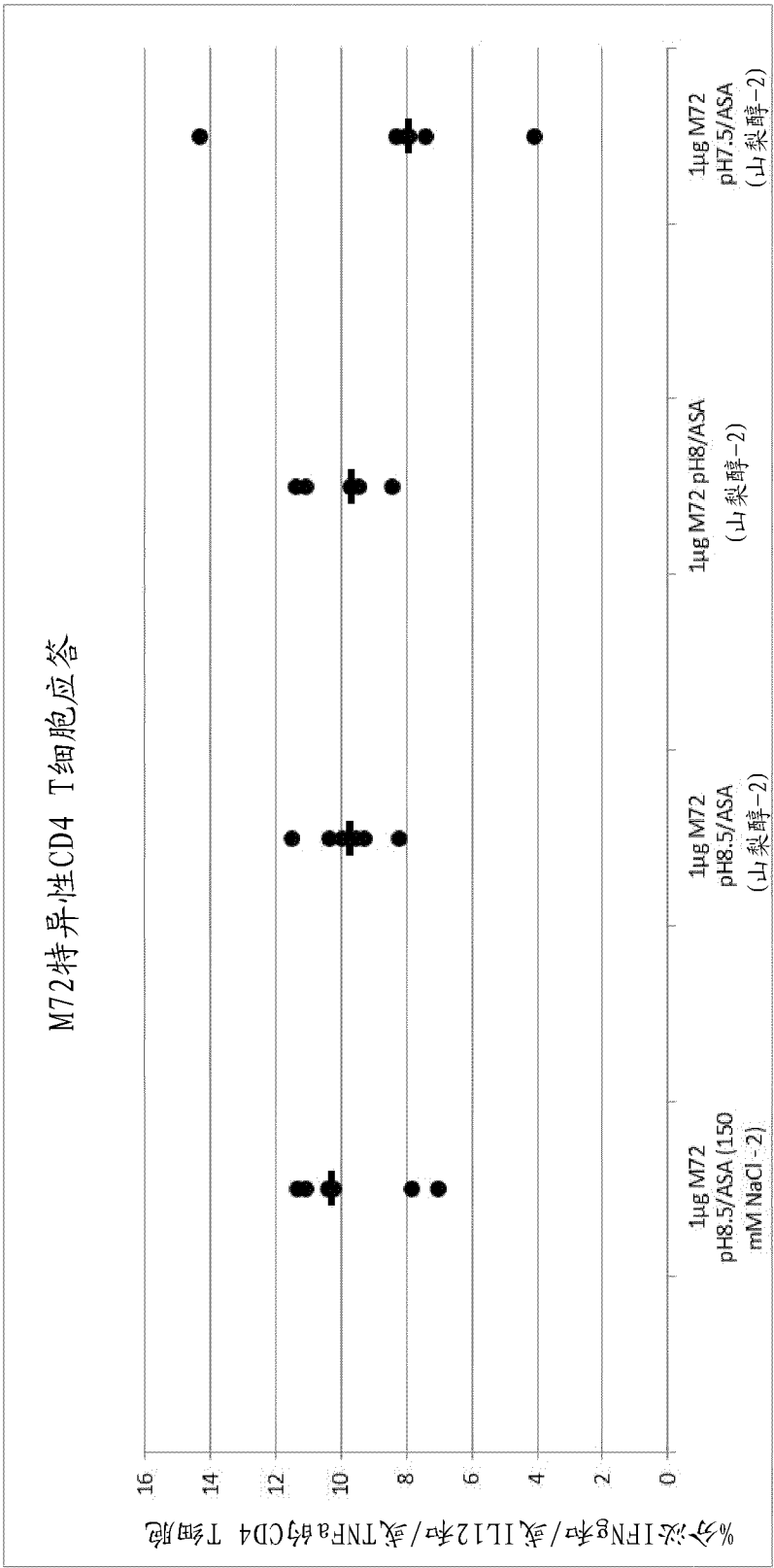


图 9

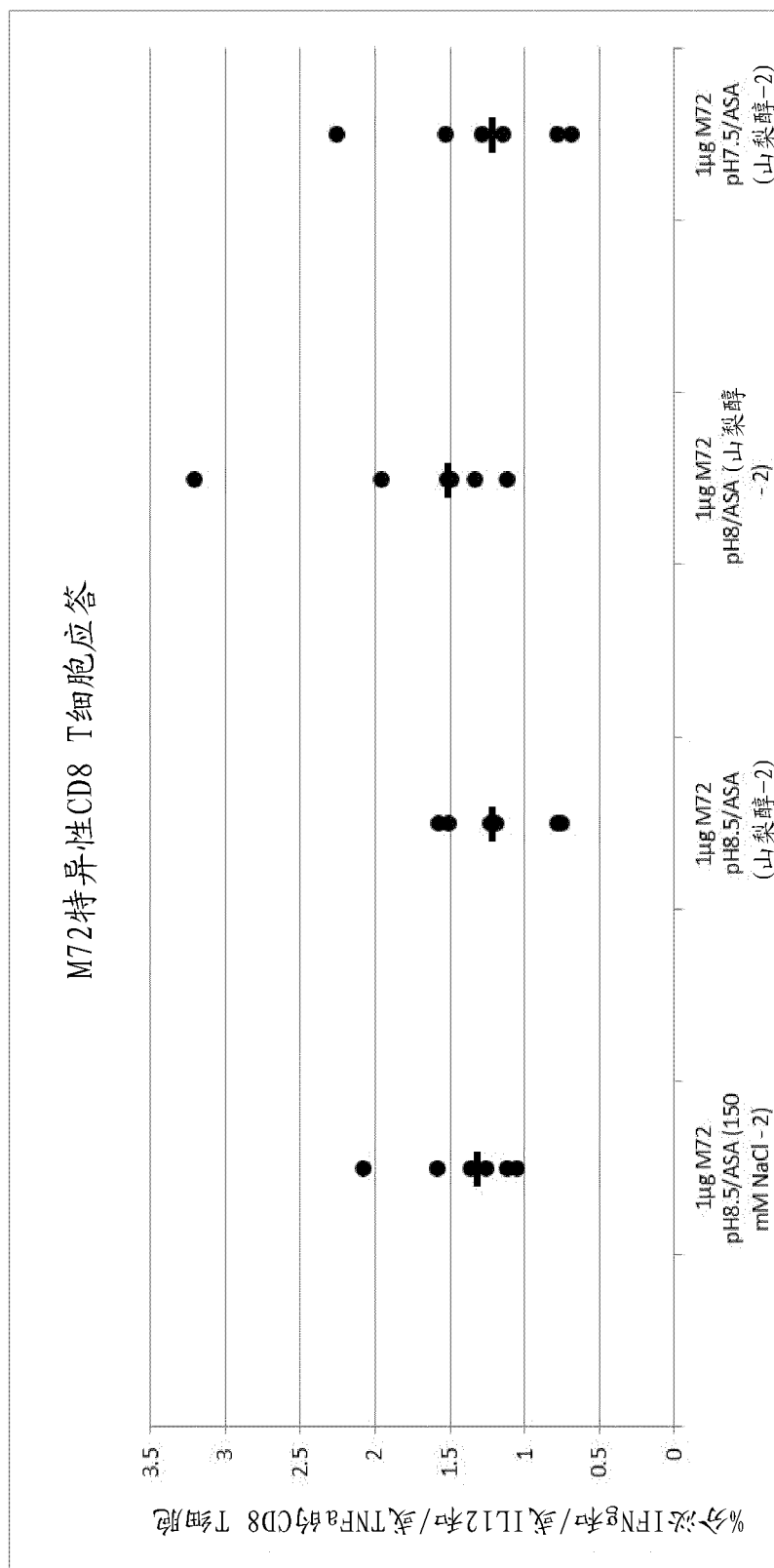


图 10

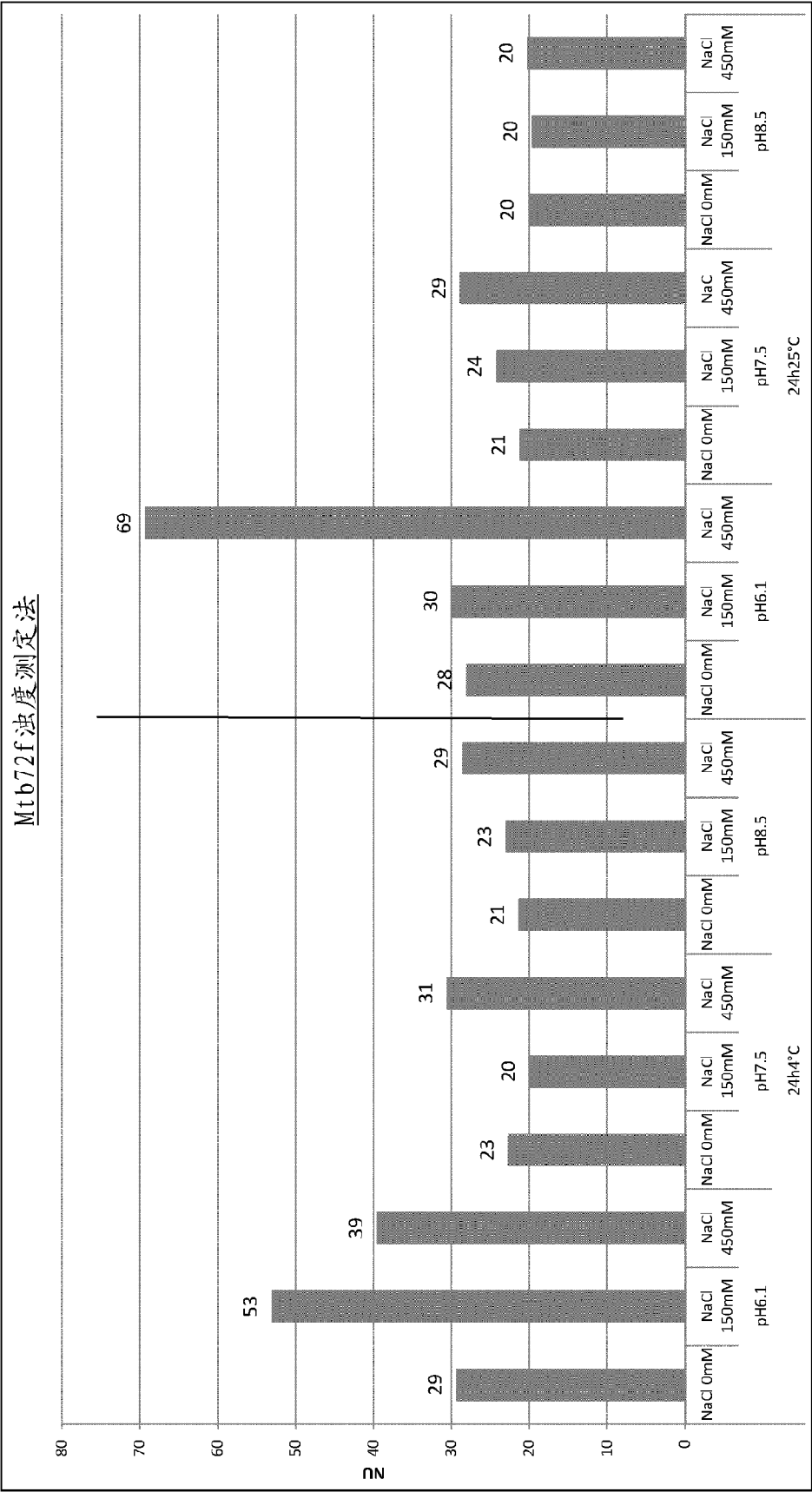


图 11

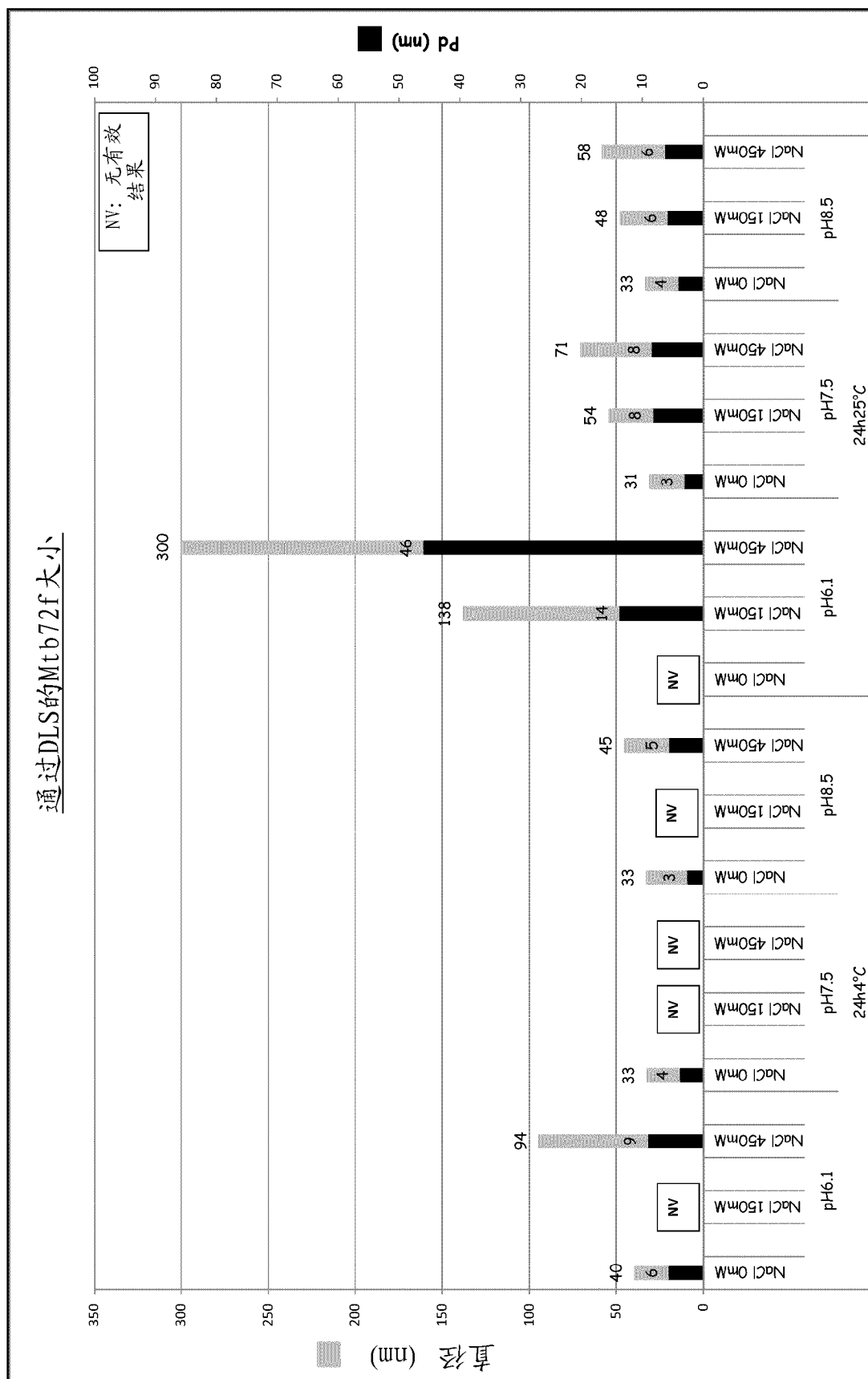


图 12

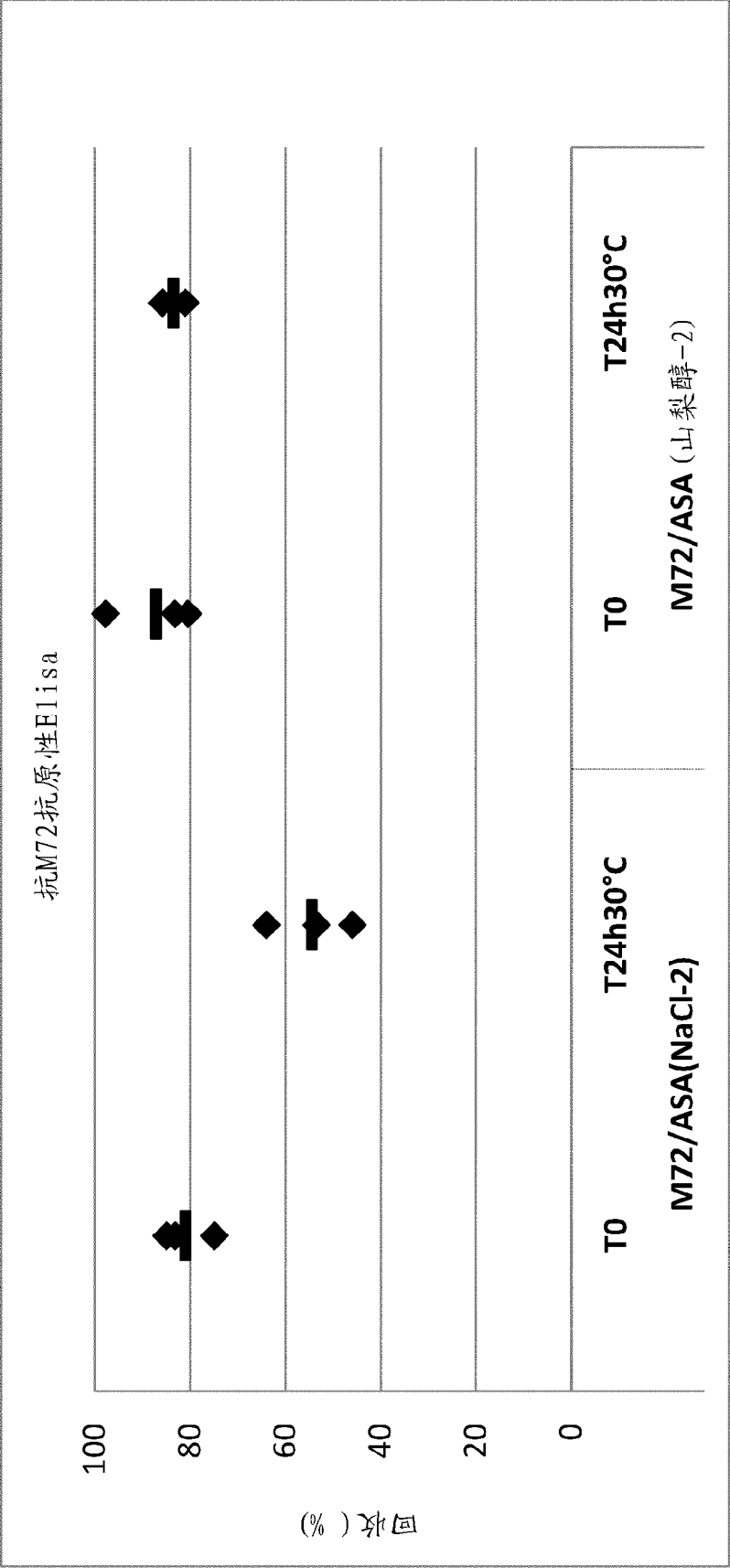


图 13