



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103990121 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201410217707. 8

(22) 申请日 2014. 05. 20

(66) 本国优先权数据

201310655338. 6 2013. 12. 06 CN

(73) 专利权人 上海联合赛尔生物工程有限公司

地址 201206 上海市浦东新区金桥出口加工
区桂桥路 1150 号

(72) 发明人 李克英 耿雨红

(74) 专利代理机构 北京高文律师事务所 11359

代理人 徐江华

(51) Int. Cl.

A61K 39/39(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

A61P 31/16(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1890374 A, 2007. 01. 03,

CN 1890374 A, 2007. 01. 03,

CN 103127498 A, 2013. 06. 05,

CN 102260353 A, 2011. 11. 30,

CN 101036786 A, 2007. 09. 19,

WO 2005033317 A1, 2005. 04. 14,

审查员 田颖

权利要求书2页 说明书22页

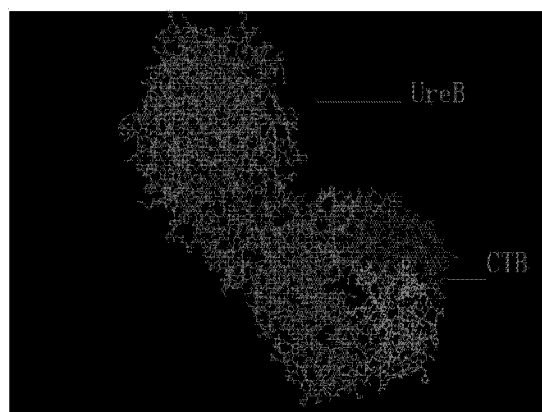
序列表3页 附图12页

(54) 发明名称

抗原嵌合体、抗原组合物、疫苗及其制备方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种抗原嵌合体,包括:抗原与能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体的融合蛋白,和所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体,其中,所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体选自霍乱毒素 B 亚单位 (CTB) 和大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (LTB) 中的一种,所述多聚体为五聚体,而且在所述嵌合体中所述融合蛋白与所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体的摩尔比为 1:4。本发明利用黏膜免疫佐剂蛋白质能形成五聚体的特性,形成嵌合结构,从而形成效价更高的抗原。同时,利用黏膜免疫佐剂蛋白质增强免疫的作用,起到增强抗原免疫原性的效果。另外,本发明的重组抗原构成的嵌合蛋白抗原刺激黏膜产生分泌型 IgA,诱导黏膜免疫产生。



1. 一种抗原嵌合体,包括:

抗原与能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体的融合蛋白,和

所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体,其中,

所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体选自霍乱毒素 B 亚单位和大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位中的一种,而且

在所述嵌合体中所述融合蛋白与所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体的摩尔比为 1:4,

所述多聚体为五聚体,通过所述融合蛋白中的霍乱毒素 B 亚单位或大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位和所述霍乱毒素 B 亚单位或大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位的单体蛋白质形成多聚体来形成嵌合体,

其中所述抗原嵌合体稳定存在的 pH 大于 7.0,

所述霍乱毒素 B 亚单位和大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位为其天然组成结构或其能够形成五聚体结构的突变体,并且

所述抗原为选自幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位 (UreB)、幽门螺杆菌细胞毒素相关基因 A (CagA) 蛋白和幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白 (NAP) 中的一种。

2. 如权利要求 1 所述的抗原嵌合体,其中所述抗原嵌合体稳定存在的 pH 为 8.0。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗原嵌合体,其中所述融合蛋白包含位于所述抗原与所述黏膜免疫佐剂蛋白质单体之间的 3 个 G4S 连接体。

4. 一种抗原组合物,包含如权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗原嵌合体,其中所述抗原嵌合体稳定存在的 pH 大于 7.0。

5. 根据权利要求 4 所述的抗原组合物,其中所述抗原嵌合体稳定存在的 pH 为 8.0。

6. 一种疫苗,包含如权利要求 4 或 5 所述的抗原组合物和适用于疫苗的赋形剂。

7. 如权利要求 6 所述的疫苗,为口服疫苗、经鼻给药的疫苗或经直肠给药的疫苗。

8. 制备如权利要求 1 至 3 中任一项所述抗原嵌合体的方法,包括用表达如权利要求 1 ~ 3 中任一项中所定义的融合蛋白的载体和如权利要求 1 ~ 3 中任一项中所定义的能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体的载体分别表达所述融合蛋白和所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体,然后通过复性方法使这两种蛋白结合形成所述嵌合体,其中所述复性方法包括将所述两种蛋白共同放置在含有尿素和二硫苏糖醇 (DTT) 或含有尿素和巯基乙醇的复性液中进行复性的步骤,所述复性液的 pH 大于 7.0。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述复性液的 pH 为 8.0。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的方法,其中所述复性液中尿素的浓度为 1.0M 至 2.5M。

11. 如权利要求 8 或 9 所述的方法,其中所述 DTT 或巯基乙醇的浓度为 0.2mM 至 1.0mM。

12. 如权利要求 8 或 9 所述的方法,其中在所述复性液中进行复性步骤之前,先将所述蛋白质单体在含 6M 至 9M 的尿素,且 pH 为 3.0 至 4.0 的缓冲液中预复性 0.5 至 3 小时。

13. 如权利要求 12 所述的方法,其中在所述复性液中进行复性步骤之前,先将所述蛋白质单体在含 8M 的尿素且 pH 为 3.0 至 4.0 的缓冲液中预复性 0.5 至 3 小时。.

14. 如权利要求 13 所述的方法,其中所述预复性时长为 1 小时。

15. 一种通过复性制备如权利要求 1 至 3 中任一项所述抗原嵌合体的方法,所述嵌合体包含:

(1) 选自幽门螺杆菌尿素酶B亚单位、幽门螺杆菌细胞毒素相关基因A蛋白和幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白中的至少一种抗原与霍乱毒素B亚单位或大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位的融合蛋白,和

(2) 霍乱毒素B亚单位或大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位的单体蛋白质,

其中,通过所述(1)融合蛋白中的霍乱毒素B亚单位或大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位和所述(2)霍乱毒素B亚单位或大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位的单体蛋白质形成多聚体来形成嵌合体,所述方法包括:

将所述(2)霍乱毒素B亚单位或大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位的单体蛋白质在含6M至9M的尿素,且pH为3.0至4.0的缓冲液中预复性0.5至3小时;和

将所述(1)融合蛋白和所述(2)能形成多聚体的单体蛋白质在含有1.0M至2.5M的尿素和0.2mM至1.0mM的DTT或巯基乙醇的复性液中复性形成所述嵌合体。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述复性液的pH大于7.0.

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述复性液的pH为8.0。

18. 如权利要求15所述的方法,其中所述预复性所用的缓冲液包含8M的尿素。

19. 如权利要求15所述的方法,其中所述预复性的时长为1小时。

抗原嵌合体、抗原组合物、疫苗及其制备方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本申请涉及免疫领域，特别是用于黏膜免疫的抗原、疫苗及其制备方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 黏膜免疫系统是广泛分布于呼吸道、胃肠道、泌尿生殖道黏膜下及一些外分泌腺处的淋巴组织，是执行局部特异性免疫功能的主要场所。

[0003] 由于 95% 以上的机体相关感染发生在黏膜部位或经由黏膜入侵机体，因此黏膜是病原体侵入体内的最大门户。当前对动物生命与健康危害极大的以及难以防治的重要传染病，如流感、结核、鼻疽、沙门氏菌病等都属于由黏膜入侵或与黏膜相关的疾病，且由此引起的黏膜损伤及黏膜免疫功能的紊乱，常常成为机会性病原菌感染，甚至肿瘤发生的重要机制。

[0004] 黏膜免疫系统是机体抵抗病原体入侵的第一道免疫屏障，具有独特结构和功能的独立免疫体系，对于防治病原体的定植和侵入有着积极的意义。有别于传统的系统免疫系统，黏膜免疫系统是大量免疫细胞和免疫分子弥散在黏膜上皮内或黏膜下固有层（弥散淋巴组织），或由单个或多个淋巴滤泡聚集成的黏膜相关淋巴组织，机体 50% 以上的淋巴组织和 80% 以上的免疫细胞集中于黏膜免疫系统。并且黏膜分泌物中的抗体以分泌型 IgA 和 sIgM 抗体为主。黏膜免疫系统按功能不同可分为两个部位：诱导部位和效应部位。在诱导部位和效应部位间，主要通过淋巴细胞归巢发生联系。黏膜免疫系统主要功能是对黏膜表面吸入或摄入的大量种类繁多的抗原进行识别并做出反应。既可对大量无害抗原下调免疫反应或产生耐受，也可对有害抗原或病原体产生高效体液和细胞免疫，进行有效免疫排斥或清除。

[0005] 黏膜免疫理论上是预防经黏膜感染产生致病作用病原体最为有效的免疫途径，因为通过其它途径免疫时，疫苗难以诱导产生明显的黏膜免疫反应。然而，迄今为止已获批准或正在临床研究中的疫苗，绝大多数却仍旧采用的是注射途径免疫，仅有少数为黏膜途径免疫。究其原因，困扰黏膜免疫疫苗产品开发的主要困难除了局部黏膜免疫特异性抗体检测的困难外，更为重要的是因为机体的宿主防御作用，黏膜免疫无法如注射途径免疫时能准确的控制进入机体的抗原水平。抗原通过口服或者局部给药达到黏膜表面后，将经历黏膜分泌液稀释、粘液凝胶吸附、蛋白酶 / 核酸酶水解以及被内膜屏障清除，因此只有极少数的抗原能通过黏膜进入体内，发挥有效的黏膜免疫反应。一般，水溶性以及无黏膜作用的抗原黏膜摄取率低，并且部分可能会在肠内产生免疫耐受现象。解决黏膜免疫摄取率低最为有效的方法是通过天然黏膜病原体的特征模拟，以及应用有效的黏膜佐剂，增强与机体黏膜表面结合水平（最好能选择性的粘附于 M 细胞）。目前仍然需要更为有效的黏膜免疫疫苗。

发明内容

[0006] 为了增强用于黏膜免疫抗原的免疫原性，本发明提供了一种抗原嵌合体，其包括：

抗原与能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体的融合蛋白,和所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体,其中,所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体选自霍乱毒素 B 亚单位 (CTB) 和大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (LTB) 中的一种,所述多聚体为五聚体,并且在所述嵌合体中所述融合蛋白与所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体的摩尔比为 1:4,其中所述抗原嵌合体稳定存在的 PH 大于 7.0,优选 pH 为 8.0。CTB 和 LTB 都是非常有效的黏膜免疫佐剂,而且都能够形成稳定的五聚体,利用这一性质制备的抗原嵌合体,不但可保持其黏膜免疫佐剂性质,还增大了抗原体积,易于被抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 摄取,有利于进一步促进黏膜免疫和系统免疫的激发。并且,嵌合体的稳定性与其 pH 值密切相关,在本发明中,所述嵌合体稳定存在的 PH 大于 7.0,优选 pH 为 8.0。而此条件下的嵌合体,特别是 CTB 形成五聚体的嵌合体,能够最有效地增强黏膜免疫效果。

[0007] 在本发明一个实施方式中,所述的抗原嵌合体中的 CTB 和 LTB 为其天然组成结构或其能够形成五聚体的突变体。与真核表达时发生糖基化修饰的 CTB 和 LTB 相比,通过原核表达载体表达的具有天然结构的 CTB 和 LTB 及其突变体能够更加有效地激发抗原的免疫反应,发挥其佐剂的功能。

[0008] 在本发明一个实施方式中,所述抗原嵌合体中所述抗原的分子量在 10 至 100kD 范围内,优选 16kD 至 65kD。在 10-100kD 范围内的抗原能够更好地保证 CTB 或 LTB 折叠成正确的构象,以易于形成稳定的五聚体。抗原分子量过小可能会受 CTB 或 LTB 影响,促使融合蛋白其自身形成聚体,从而不能正确折叠,分子量过大则可能产生位阻效应,阻碍 CTB 或 LTB 五聚体的形成。

[0009] 在本发明的实施方式中,所述抗原为适用于黏膜免疫的抗原。特别是经由黏膜途径感染人体或动物体的病原菌的抗原,包括但不限于幽门螺杆菌抗原、伤寒抗原、流感 HA 抗原。

[0010] 在本发明的一个优选实施方式中,所述幽门螺杆菌抗原选自幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位 (UreB)、幽门螺杆菌细胞毒素相关基因 A (CagA) 蛋白和幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白 (NAP) 中的至少一种。这些抗原具有较强的免疫原性,无毒性,是良好的疫苗候选抗原。

[0011] 在本发明的实施方式中,所述融合蛋白包含位于所述抗原与所述黏膜免疫佐剂蛋白质单体之间的 3 个 G4S (Gly-Ser-Ser-Ser-Ser) 连接体。此柔性连接体的加入可以避免抗原蛋白质与 CTB 或 LTB 在复性折叠时的相互影响,有助于形成正确的构象。

[0012] 本发明还提供了一种抗原组合物,包含如上所述的抗原嵌合体,其中所述抗原嵌合体稳定存在的 PH 大于 7.0,优选 pH 为 8.0。

[0013] 本发明还提供了一种疫苗,包含上述抗原组合物和适用于疫苗的赋形剂。优选地,所述疫苗为口服疫苗、经鼻给药的疫苗或经直肠给药的疫苗。

[0014] 本发明还提供了一种用于制备抗原组合物的试剂盒,包括表达上述融合蛋白的载体和表达上述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体的载体。优选地,其中所述载体均为原核表达载体。

[0015] 本发明还提供了制备上述抗原嵌合体的方法,包括用上述试剂盒中的载体分别表达所述融合蛋白和所述能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体,然后通过复性方法使这两种蛋白结合形成所述嵌合体,其中所述复性方法包括将所述两种蛋白共同放置在含有尿

素和 DTT(或巯基乙醇)的复性液中进行复性的步骤。优选所述复性液中尿素的浓度为 1.0M 至 2.5M。所述 DTT 或巯基乙醇的浓度为 0.2mM 至 1.0mM。

[0016] 本发明还提供了一种通过复性制备嵌合体的方法,所述嵌合体包含(1)一种蛋白质与能形成多聚体的单体蛋白质的融合蛋白和(2)能形成多聚体的单体蛋白质,通过所述(1)融合蛋白中的单体蛋白质和所述(2)单体蛋白质形成多聚体来形成嵌合体,所述方法包括:

[0017] 将所述(2)能形成多聚体的单体蛋白质在含 6M 至 9M,优选 8M 的尿素,且 pH 为 3.0 至 4.0 的缓冲液中预复性 0.5 至 3 小时,优选预复性 1 小时;和

[0018] 将所述(1)融合蛋白和所述(2)能形成多聚体的单体蛋白质在含有 1.0M 至 2.5M 的尿素和 0.2mM 至 1.0mM 的 DTT 或巯基乙醇的复性液中复性形成所述嵌合体,

[0019] 优选地,所述复性液的 pH 大于 7.0,更优选所述复性液的 pH 为 8.0。

[0020] 在本发明中,我们选择在复性液中保持一定浓度的尿素和 DTT(或巯基乙醇),能够有效避免形成多聚体的单体其自身聚集成为五聚体,并且在一定 pH 条件下,能够促进嵌合体的形成,提高嵌合体组装的效率,有效克服了采用常规复性处理导致嵌合体组装效率较低的缺陷。该复性方法可用于形成需要形成蛋白质嵌合体的多个领域,并不限于此处所述的疫苗领域。

附图说明

[0021] 图 1 为电脑模拟的霍乱毒素(CT)立体结构图;

[0022] 图 2 为电脑模拟的 CTB 五聚体立体结构图;

[0023] 图 3 为电脑模拟的 CTB-UreB 融合蛋白立体结构图;

[0024] 图 4 为电脑模拟的 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白的立体结构图;

[0025] 图 5 为根据本发明的实施方式制备的 PET-28a-CTB-X 质粒双酶切电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:DL1000DNA Marker;泳道 1,2,3:PET-28a-CTB-UreB 双酶切;泳道 4,5,6:PET-28a-CTB-CagA 双酶切;泳道 7:PET-28a-CTB-NAP 双酶切;

[0026] 图 6 为根据本发明的实施方式制备的 CTB-UreB 融合蛋白的蛋白质电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染 Marker;泳道 1,2,3,4,5,6,7:IPTG 诱导后 PET-28a-CTB-UreB/BL21-DE3 菌体;

[0027] 图 7 为根据本发明的实施方式制备的 CTB-CagA 和 CTB-NAP 融合蛋白的蛋白电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染 Marker;泳道 1,2,3,4:IPTG 诱导后含 PET-28a-CTB-CagA/BL21-DE3 菌体;泳道 5,6,7,8:IPTG 诱导后含 PET-28a-CTB-NAP/BL21-DE3 菌体;

[0028] 图 8 为根据本发明的实施方式制备的 CTB-UreB 融合蛋白纯化电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染 Marker;泳道 1:SP HP 峰前样品;泳道 2,3:SP HP 洗脱峰样品;泳道 4:SP HP 峰后样品;

[0029] 图 9A 为根据本发明的实施方式制备的 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白纯化电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染 Marker;泳道 1,2,3,4:QHP 洗脱峰;

[0030] 图 9B 为根据本发明的实施方式制备的 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白稳

定性研究结果的电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染;泳道 1-7 样品分别为 pH9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0 条件下处理后的样品电泳结果。

[0031] 图 10 为根据本发明的实施方式制备的 CTB-CagA 融合蛋白纯化电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染 Marker;泳道 1, 2, 3, 4:QHP 洗脱峰;

[0032] 图 11A 为根据本发明的实施方式制备的 CTB-CagA/4CTB 嵌合体蛋白纯化电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染 Marker;泳道 1, 2, 3:SP HP 洗脱峰;

[0033] 图 11B 为根据本发明的实施方式制备的 CTB-CagA/4CTB 嵌合体蛋白稳定性研究结果的电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染;泳道 1-7 样品分别为 pH9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0 条件下处理后的样品电泳结果;

[0034] 图 12 为根据本发明的实施方式制备的 CTB-NAP 融合蛋白纯化电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染 Marker;泳道 1:包涵体(8 M 尿素);泳道 2, 3, 4:QHP 洗脱峰;

[0035] 图 13 为根据本发明的实施方式制备的 CTB-NAP/4CTB 嵌合体蛋白纯化电泳图,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染 Marker;泳道 1, 2, 3:QHP 洗脱峰;

[0036] 图 14 为根据本发明的实施方式 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白免疫小鼠血清特异性 IgG 检测结果;

[0037] 图 15 为根据本发明的实施方式 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白免疫小鼠肠黏膜特异性 sIgA 检测结果;

[0038] 图 16 为根据本发明的实施方式 CTB-CagA/4CTB 嵌合体蛋白免疫小鼠肠黏膜特异性 IgG 检测结果;

[0039] 图 17 为根据本发明的实施方式 CTB-CagA/4CTB 嵌合体蛋白免疫小鼠肠黏膜特异性 sIgA 检测结果;

[0040] 图 18 为根据本发明的实施方式 CTB-NAP/4CTB 嵌合体蛋白免疫小鼠血清特异性 IgG 检测结果;

[0041] 图 19 为根据本发明的实施方式 CTB-NAP/4CTB 嵌合体蛋白免疫小鼠肠黏膜特异性 sIgA 检测结果;

[0042] 图 20 为根据本发明的实施方式 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白免疫小鼠,用 HPSS1 攻击后其特异性血清 IgG 抗体检测结果图;

[0043] 图 21 为根据本发明的实施方式 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白免疫小鼠,用 HPSS1 攻击后其特异性肠黏膜 sIgA 抗体检测结果图;

[0044] 图 22 为根据本发明的实施方式 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白免疫小鼠,用 HPSS1 攻击后胃组织病理切片检测结果。其中 A:CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白组小鼠胃组织切片($\times 250$);B:UreB 组小鼠胃组织切片($\times 250$);C:UreB 组小鼠胃组织切片($\times 400$)-;

[0045] 图 23A 和 23B 分别为 UreB-CTA₂/5CTB 与 CTB-UreB/4CTB 组装效率比较结果的电泳图,泳道 1 为对比例 1 的实验结果,泳道 2 为根据本发明的实施例的实验结果。

具体实施方式

[0046] 为了更加清楚地阐述本发明,下文将详细地说明本发明的各个优选的实施方式,以及各个实施方式的技术效果。

[0047] 本发明主要提供了增强免疫原性的抗原及其制备方法。一方面,其通过利用黏膜免疫佐剂加强免疫反应;另一方面,利用 CTB 或 LTB 形成五聚体的特点,提高黏膜免疫佐剂效果的同时,增大了抗原的体积,易于被 APC 摄取,更加有利于免疫应答的发生。另外,本发明的发明人选择在复性液中保持一定浓度的尿素和 DTT (或尿素和巯基乙醇),能够有效避免形成多聚体的单体其自身聚集成为五聚体,从而促进嵌合体的形成,提高嵌合体组装的效率。有效克服了采用常规复性处理导致嵌合体组装效率较低的缺陷。

[0048] 下面从免疫佐剂的选择、抗原的选择和复性方法等几个方面更加详细地说明本发明的技术方案。

[0049] 关于免疫佐剂

[0050] 为了增强抗原的免疫原性,本发明选用了 CTB 或 LTB 分别与抗原结合形成新的抗原组合物。

[0051] 霍乱毒素是一种强有力的黏膜免疫佐剂,由 1 个 A 亚单位和 5 个 B 亚单位 (见图 1) 组成。5 个 B 亚单位以非共价结合成非常紧凑稳定的圆桶状五聚体 (见图 2), B 亚单位单体两侧各有一个三链反平行片层,在五聚体中彼此相邻的单体通过片层和大量的盐键相互作用,使 B 亚单位五聚体成为最稳定的蛋白复合物之一。CTA 是霍乱毒素的活性部分,CTB 无毒性,其主要功能是通过与哺乳动物小肠上皮细胞上的单唾液酸神经节苷脂 (GM1) 结合而使得 CTA 进入细胞而产生免疫反应。CTB 具有很强的免疫原性,因为它除了通过与 GM1 结合而提高肠道对经它协助的口服疫苗的摄取率,还能特异地影响小肠黏膜细胞间的紧密联结或小带闭锁结构,增加通透性,防止口服疫苗在小肠黏膜处被消化分解,保持其抗原性,从而提高机体产生的抗体效价,使机体产生良好的免疫反应。目前认为 CTB 是至今为止最有效、最安全的黏膜免疫佐剂之一。

[0052] LTB 也是高效的黏膜免疫佐剂。大肠杆菌不耐热肠毒素 (LT) 为产肠毒性大肠杆菌分泌到胞周质的一种热不稳定外毒素,是由具有 ADP 核糖基转移酶活性的 A 亚单位以及与神经节苷脂结合的 B 亚单位组成的 AB₅型六聚体蛋白, A 亚单位是其毒性的主要单位, B 亚单位具有免疫原性和佐剂功能。LT 不仅具有免疫原性,而且是一种有效的黏膜佐剂,能明显增强机体针对候选抗原的 IgA 和 IgG 反应,同时还能降低机体对这些候选抗原的免疫耐受性,诱发针对它们的长期记忆,因此 LTB 作为黏膜佐剂得到了广泛关注。

[0053] 本发明提供了一种重组抗原组合物,包括:抗原与 CTB 或 LTB 的融合蛋白;和相应的 CTB 或 LTB 蛋白。利用 5 个 CTB 或 LTB 非共价键结合的特性,能够形成上述融合蛋白与另外 4 个相应的 CTB 或 LTB 单体的复合物的嵌合结构,从而增大了抗原的有效体积,易于被 APC 摄取。同时,已知 CTB 和 LTB 是强有力的免疫佐剂,能够降低机体对候选抗原的免疫耐受,从而更有效地发挥其免疫促进作用。并由于形成抗原与 5 个 CTB 或 LTB 的嵌合蛋白而形成了效价更高的抗原,从而增强了整个抗原组合物的免疫原性。

[0054] 关于抗原

[0055] 为了更好地发挥黏膜免疫的作用,优先选用经黏膜感染的病原菌的抗原,包括但不限于幽门螺杆菌抗原、伤寒抗原、流感 HA 抗原。利用本发明制备的抗原嵌合体,能够增强相关抗原的免疫原性,利于构建更加有效的疫苗。

[0056] 下文中以幽门螺杆菌为例,详细说明和验证了本发明的技术方案和技术效果。

[0057] 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, HP) 是一种寄生于胃上皮细胞表面的革兰

氏阴性微需氧菌,1983年由澳大利亚学者 Warren 和 Marshall 首先从人胃黏膜中分离出,HP 能在酸性环境下定植和生存,使机体产生炎症和免疫反应,破坏胃黏膜屏障,使胃黏膜上皮细胞的凋亡增殖平衡失调。HP 是人类上消化道疾病的重要致病菌,是慢性胃炎、胃溃疡及十二指肠溃疡的主要病因。1994 年 WHO 已确认其与胃癌的发生密切相关,并将其列为一类致癌因子。HP 是全球感染率最高的细菌之一,据报道,90%的亚洲人和 60%的欧洲人感染 HP,因此预防和治疗 HP 感染成为了全球关注的焦点。

[0058] 目前临床上主要使用二联或三联抗生素治疗 HP 感染。但存在以下明显不足之处:1) 耐药菌株产生;2) 易复发与再感染;3) 毒副作用与费用较高;4) 无法达到群体防治效果,无法有效控制 HP 传播与感染。因此,研制疗效明确的疫苗对于预防和控制 HP 感染具有十分重要的意义。目前所研究的 HP 疫苗主要为全菌疫苗、亚单位疫苗(基因工程疫苗)、活载体疫苗和 DNA 疫苗。大多数研究采用 HP 全菌或全菌裂解物,或 HP 毒性蛋白如尿素酶、空泡毒素、毒素相关蛋白、中性粒细胞激活蛋白等单独或联合不同佐剂进行接种,在动物模型中均能引起保护性应答反应。

[0059] 预防性疫苗是通过机体的免疫应答发生作用,因此选择有效的 HP 抗原免疫机体,可刺激机体产生保护性免疫应答,从而起到预防机体感染 HP 的作用。随着 HP 致病机制研究的深入以及分子生物学技术的发展-基因工程菌株的构建和运用为有效抗原的筛选提供了有利条件,同时为预防和根除 HP 感染迈出了关键的一步。

[0060] 以幽门螺杆菌相关疫苗的制备为例,发明人优先选择了幽门螺杆菌尿素酶、幽门螺杆菌 CagA 蛋白和幽门螺杆菌 NAP 作为用于幽门螺杆菌的有效抗原。本发明应用基因生物工程技术,制备了三种 HP 抗原和 CTB 的融合蛋白(CTB-X(X = UreB, CagA, NAP))(见图 3),并利用 5 个 CTB 非共价键结合的特性,形成 CTB-X(X = UreB, CagA, NAP)-4CTB 的嵌合结构(见图 4),从而通过 HP 抗原与 5 个 CTB 的嵌合蛋白形成效价更高的抗原,并进行了相关的动物免疫原性试验验证。

[0061] 尿素酶

[0062] 尿素酶(Ure)在 HP 定植感染过程中有分解尿素、中和胃酸的作用,对 HP 的致病性具有重要意义,HP 尿素酶既是定植因子又是毒力因子。尿素酶基因是所有 HP 菌株共同拥有的,其编码的蛋白具有很强的尿素酶活性,尿素酶分布于 HP 表面,占全菌总蛋白量的 5~10%。目前发现尿素酶基因大小约为 7.5kb,共有 9 个读码框(ORF)分别为 UreA、UreB、UreC、UreD、UreE、UreF、UreG、UreH 和 UreI。其中 UreA 和 UreB 为尿素酶的两个结构亚单位,具有高度的保守性,是 PCR 检测 HP 感染常选择的的目的基因,以及基因疫苗的候选基因。

[0063] UreB 是 HP 主要的外膜抗原成分,由 569 个氨基酸残基编码产生,是 HP 抗原性最强的保护性蛋白,具有无毒性、抗原性强且相对保守等特点,其在 HP 的致病过程中起关键作用。通过不同菌株的比较,其尿素酶 B 亚单位氨基酸同源性达到 97.9%以上,表明 HP 菌株间 UreB 的抗原变异性极小。此外,UreB 的主要活性部分位于菌体表面,其大分子量和颗粒状结构有利于黏膜免疫接种,因此尿素酶分子可以作为疫苗抗原的合理选择。同时在体内 HP 表面具有黏附胞质蛋白的特性,能够将自溶释放的尿素酶黏附到活菌表面,这给 HP 疫苗的研究又提供了一个重要的理论依据。经实验证实,通过黏膜免疫途径给予 UreB 蛋白疫苗,能够诱导并激发机体的保护性免疫应答,表明 UreB 是 HP 感染重要的保护性候选抗原之一,也是基因工程疫苗的首选抗原,具有显著的优势。

[0064] 大量的文献报道,用重组的尿素酶亚单位 B(rUreB) 口服免疫预先感染了猫胃螺杆菌 (*Helicobacter Felis*, Hf) 的小鼠,结果发现免疫的小鼠不仅彻底清除了 Hf 感染,而且能够预防小鼠再次感染;Kleanthous 等用 rUreB 加上 LT 作为黏膜佐剂免疫小鼠,与对照组相比结果发现:免疫组胃内尿素酶活性显著降低,且胃黏膜组织 HP 定量培养显示 HP 减少 97% 以上;Michetti 等对口服不同剂量 (180mg、60mg、20mg, 4 次/天) 的尿素酶与 LT (5 μ g) 的安全性和免疫原性进行了临床实验研究,结果发现:所有的志愿者都能够耐受,且能够减少胃内 HP 的定植,从而减轻了胃炎的程度;Saldinger 等采用 rUreB 结合霍乱毒素 (CT) 免疫感染了 Hf 的 BALB/c 小鼠,结果发现:免疫组小鼠全部清除了 Hf;进一步研究发现,脾脏 CD⁴⁺T 细胞增生,血清中 IgG1 增加,同时伴随 IL-4 的增高, γ -干扰素的减少,从而推测 rUreB 可能诱导了 Th2CD⁴⁺T 细胞的增生,有助于清除 HP。有学者对 HP 感染志愿者进行了 I 期临床实验,用 UreB 结合 LT 免疫后,同样发现 HP 感染的密度显著减少;Lee 等对非人灵长类动物进行的类似研究也表明,通过减少胃内 HP 的密度有助于减轻胃炎的程度。然而 Solnick 等报道用尿素酶口服和肌肉注射免疫恒河猴,而后进行 HP 攻击试验,结果发现:UreB 虽然能够诱导体液免疫,但是所有给予 HP 攻击的恒河猴都感染了 HP,而且细菌密度在实验组和对照组中没有统计学差异。上述结果显示目前的 UreB 相关的 HP 疫苗还不够完善,有待于进一步研究。

[0065] CagA 蛋白

[0066] CagA 基因也称为细胞毒素相关基因,其表达产物为 CagA 蛋白。作为细菌分泌的一种毒素,它由 IV 型分泌系统 Cag 致病岛 (pathogenicity island, PAI) 从细菌转运到宿主细胞中被磷酸化,参与宿主细胞的信号转导及引起细胞骨架结构的重排。研究表明, cagA 阳性 HP 为毒力菌株,与萎缩性胃炎、胃癌与消化道溃疡等常见的消化道疾病密切相关,90% 以上的 HP 临床分离菌株 cagA 呈阳性表达。具有 CagA 基因的 HP 几乎都表达 CagA 蛋白,并产生可测的抗体反应。据文献报道 CagA 阳性菌株能够直接或间接 (通过 NF- κ B) 诱导胃上皮细胞分泌 IL-8,而 IL-8 在中性粒细胞趋化和激活过程中起重要作用,可导致胃黏膜的损伤。动物实验发现 CagA 基因和 CagA 蛋白与胃炎、消化性溃疡,尤其是胃癌的发生有良好的相关性。Marchetti 等用重组 CagA 免疫 HP 小鼠感染模型,证实能产生诱导保护性免疫反应,保护率达到了 70%。Crabtree 等应用重组 CagA 作为抗原,经胃免疫长期感染 HP 的小鼠,结果成功清除了 HP,且有效保护了小鼠免遭 HP 的再次感染。提示 CagA 作为 HP 疫苗保护性抗原具有较高的可行性,但这种抗原产生的保护作用仅局限于产生 CagA 的菌株有效,对不产生 CagA 的菌株无保护作用。可见,目前针对 CagA 蛋白也尚无满意的疫苗。

[0067] NAP

[0068] Evans 等在 HP 的水溶性抽提物中发现一种 NAP,它能够募集并活化嗜中性粒细胞,促进中性粒细胞对胃上皮细胞的黏附,激活中性粒细胞释放反应性氧代谢物,而引起胃黏膜炎症病变。

[0069] NAP 高度保守,临床研究发现 60% 的 HP 感染者血清中存在 NAP 特异抗体。NAP 是一种铁蛋白,编码它的 NAP 基因几乎在所有 HP 中可检测到,但是在体外表达的 NAP 其活性存在很大差异。它能够通过 CD11a/CD18 和 CD11b/CD18 与内皮细胞间粘附分子 (ICAM-1) 相互作用,而使白细胞黏附内皮细胞;选择性地与中性粒细胞的酸性糖鞘脂相结合而调节白细胞的功能;与粘蛋白相结合为 HP 定植于胃黏膜上皮细胞埋下了伏笔,因此 NAP 在其黏

附和致病过程中起重要作用。Satin 等采用纯化重组的 NAP 口服免疫了 10 只小鼠,结果 8 只小鼠获得了保护性免疫。提示 NAP 可作为有效的保护性抗原用于 HP 感染的疫苗防治。

[0070] 在本发明优选的实施方式中,本发明提供了一种重组幽门螺杆菌抗原组合物,包括幽门螺杆菌抗原与 CTB 的融合蛋白和 CTB 蛋白。借助 CTB 本身能够形成五聚体的性质,增大抗原的体积,易于被 APC 摄取。另外,CTB 是良好的免疫佐剂。因此,本发明的重组幽门螺杆菌抗原组合物能够有效增强幽门螺杆菌抗原的免疫原性,利于构建更加有效的疫苗。

[0071] 在进一步的实施方式中,所述幽门螺杆菌抗原选自幽门螺杆菌 UreB 蛋白、幽门螺杆菌 CagA 蛋白和幽门螺杆菌 NAP 中的至少一种。这几种抗原均是目前已知的幽门螺杆菌抗原中无毒性、抗原性强而且相对保守的抗原,更加适合用于疫苗。

[0072] 抗原与免疫佐剂的结合方式的选择

[0073] 常规免疫佐剂的使用一般是通过与抗原的直接混合,然后与抗原同时给药以激发机体的免疫反应,但是其增强抗原免疫原性的效果不理想。本发明通过制备抗原与黏膜免疫佐剂蛋白质单体的融合蛋白,再将其与这种能形成多聚体的黏膜免疫佐剂蛋白质单体通过非共价结合形成嵌合蛋白,不但可保持其黏膜免疫佐剂性质,还可增大了抗原体积,更易于被抗原递呈细胞摄取。

[0074] 对于融合蛋白的制备,本发明中在抗原和 CTB(或 LTB)的蛋白之间加入柔性连接体,以使得蛋白融合后抗原和 CTB(或 LTB)各自的折叠不会受到影响,从而分别形成正确的构象。在一个实施方式中,本发明选择了 3 个 G4S 的连接体。但是,本发明中并不限于用此种连接体,其余连接体,比如螺旋形式的连接体(linker)肽(A(EAAAK)_nA)以及葡萄糖球菌蛋白 A(PA)等也可用于本发明中。

[0075] 进一步地,在保证融合蛋白两个部分,尤其是 CTB(或 LTB)构象的基础上,有利于五聚体的正确形成和形成五聚体的效率。

[0076] 嵌合体的制备方法

[0077] 本发明还提供了一种试剂盒,包括表达上述抗原与 CTB(或 LTB)的融合蛋白的载体和表达相应黏膜免疫佐剂单体蛋白(CTB 或 LTB)蛋白的载体。如本领域普通技术人员所公知,除了目的蛋白之外,所述表达载体中还应包括表达目的蛋白质所必需的元件,例如启动子、终止子、可选的标记基因等。

[0078] 所述表达载体优选是原核表达载体,例如,pET 系列等原核载体。使用原核表达载体制备目的蛋白的方法和试剂为本领域所公知,可参见本领域常用工具书,例如冷泉港实验室编译的《分子克隆实验指南》((美)萨姆布鲁克等著,黄培堂等译,北京,科学出版社出版)、《细胞实验指南》((美)D. L. 斯佩克特等著,黄培堂等译,北京,科学出版社出版)等。

[0079] 对于嵌合体的制备,一直以来都属于一个技术难题。如何在与融合蛋白嵌合之前避免单体自身形成五聚体,是影响嵌合体收率的关键。一般情况下,原核表达蛋白后大部分会形成包涵体,需要经过洗涤之后用尿素溶液溶解包涵体。被尿素溶液所溶解的蛋白质基本属于变性状态,很难产生其天然构象。而常规的复性过程就是逐步除去尿素的过程,以使其逐步重折叠形成正确的构象。但是,对于能够形成多聚体的单体蛋白质,其去除尿素的过程中,很容易自发形成多聚体,而不是跟融合蛋白中的单体蛋白质形成多聚体。因此,常规方法制备嵌合体时产率会非常低。

[0080] 本发明的发明人选择在复性液中保持一定浓度的尿素和 DTT(或尿素和巯基乙

醇),能够有效避免形成多聚体的单体其自身聚集成五聚体,促进嵌合体的形成,提高嵌合体组装的效率。有效克服了采用常规复性处理导致嵌合体组装效率较低的缺陷。

[0081] 本发明提供了一种通过复性制备嵌合体的方法,所述嵌合体包含(1)一种蛋白质与能形成多聚体的单体蛋白质的融合蛋白和(2)能形成多聚体的单体蛋白质,通过所述(1)融合蛋白中的单体蛋白质和所述(2)单体蛋白质形成多聚体来形成嵌合体,所述方法包括:将所述(2)能形成多聚体的单体蛋白质在含6M至9M,优选8M的尿素,且pH为3.0至4.0的缓冲液中预复性0.5至3小时,优选预复性1小时;和将所述(1)融合蛋白和所述(2)能形成多聚体的单体蛋白质在含有1.0M至2.5M的尿素和0.2mM至1.0mM的DTT或巯基乙醇复性液中复性形成所述嵌合体。

[0082] 不同于一般的复性液,本发明采用含一定浓度尿素和还原剂的复性液,使融合蛋白和单体蛋白质缓慢复性过程中组合成为所需的嵌合体。在优选过程中通过在一定pH条件下进行预复性,然后在还原剂存在下,在浓度稍低的尿素溶液中缓慢复性,意外地得到了高收率的嵌合体。

[0083] 而对于大规模生产来说,收率的高低直接影响了生产的成本,更直接影响了大规模生产的可能性。采用本发明的方法,嵌合体的收率可以达到实现大规模生产的水平。

[0084] 下文通过具体的实施例详细说明本发明的优选实施方式。

[0085] 1. 抗原的制备方法

[0086] 实施例1CTB-UreB/4CTB制备:

[0087] 1.1.1 重组工程菌PET-28a-CTB-UreB/BL21-DE3的构建

[0088] 1.1.1.1 融合基因CTB-UreB的构建:

[0089] UreB DNA序列来自HP菌株MEL-HP27,CTB DNA序列来自霍乱弧菌0395株,在融合DNA片段间引入富含甘氨酸/丝氨酸具有柔性功能的(G4S)₃连接体(linker)序列(用斜体下划线表示),并合成CTB-UreB基因密码子。

[0090] 基因序列为SEQ ID No.1:

[0091]	ATGACACCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACA	50
[0092]	AATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTG	100
[0093]	GAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTTCAA	150
[0094]	GTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAAAAAAGCGATTGA	200
[0095]	AAGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCG	250
[0096]	AAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATT	300
[0097]	AGTATGGCAAAT ' <u>GGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGG</u>	350
[0098]	<u>TGGTTCT</u> ATGAAAAAGATTAGCAGAAAAGAATATGTTTCTATGTATGGCC	400
[0099]	CTACTACAGGCGATAAAGTGAGATTGGGCGATACAGACTTGATCGCTGAA	450
[0100]	GTAGAACATGACTACACCATTTATGGCGAAGAGCTTAAATTCGGTGGCGG	500
[0101]	TAAAACTTTGAGAGAAGGCATGAGCCAATCCAACAACCTAGCAAAGAAG	550
[0102]	AACTGGATTTAATCATCACTAACGCTTTAATCGTGGATTACACCGGTATT	600
[0103]	TATAAAGCGGATATTGGTATTAAGATGGCAAAATCGCTGGCATTGGCAA	650
[0104]	AGGCGGCAACAAAGACATGCAAGATGGCGTTAAAAACAATCTTAGCGTGG	700
[0105]	GTCCTGCTACTGAAGCCTTAGCTGGTGAAGGTTTGATCGTAACTGCTGGT	750

[0106] GGTATTGACACACACATCCACTTCATCTCCCCCAACAAATCCCTACAGC 800
 [0107] TTTTGCAAGCGGTGTAACAACGATGATTGGTGGCGGAACTGGCCCTGCTG 850
 [0108] ATGGCACTAACGCAACCACTATCACTCCAGGCAGAAGAAATTTAAAAATGG 900
 [0109] ATGCTCAGAGCGGCTGAAGAATATTCTATGAATTTAGGTTTCTTAGCTAA 950
 [0110] AGGTAACGCTTCTAATGATGCGAGCTTAGCCGATCAAATTGAAGCCGGTG 1000
 [0111] CGATTGGCTTTAAATCCATGAAGACTGGGGAACAACCTCTTCTGCAATC 1050
 [0112] AATCATGCGTTAGATGTTGCGGACAAATACGATGTGCAAGTCGCTATCCA 1100
 [0113] TACGGACACTTTGAATGAAGCCGGTTGTGTAGAAGACACTATGGCAGCCA 1150
 [0114] TTGCCGGACGCACTATGCACACTTTCCCACTGAAGGCGCTGGTGGCGGA 1200
 [0115] CACGCTCCTGATATCATTAAAGTAGCCGGCGAACAACATTCTGCCCCG 1250
 [0116] TTCCACTAACCCCACTATCCCTTTCACTGTGAATACAGAAGCAGAACACA 1300
 [0117] TGGACATGCTTATGGTGTGCCACCACTTGGATAAAAAGCATTAAAGAAGAT 1350
 [0118] GTTCAGTTCGCTGATTCAAGGATCCGCCCTCAAACCATTGCGGCTGAAGA 1400
 [0119] CACTTTGCATGACATGGGGATTTTCTCAATCACTAGTTCTGACTCTCAAG 1450
 [0120] CTATGGGTGCTGTGGGTGAAGTTATCACCAGAAGTTGGCAAAACAGCTGAC 1500
 [0121] AAAAACAAAAAAGAATTTGGCCGCTTGAAAGAAGAAAAAGGCGATAACGA 1550
 [0122] CAACTTCAGAATCAAACGCTACTTGTCTAAATACACCATTAACCCAGCGA 1600
 [0123] TCGCTCATGGGATTAGCGAGTATGTAGGTTCTGTAGAAGTGGGCAAAAGTG 1650
 [0124] GCTGACTTGGTATTGTGGAGTCCAGCATTCTTTGGCGTGAAACCAACAT 1700
 [0125] GATCATCAAAGGTGGGTTTATTGCATTGAGTCAAATGGGCGATGCGAACG 1750
 [0126] CTTCTATCCCTACCCCAACAACAGTTTATTACAGAGAAATGTTGCTCAT 1800
 [0127] CATGGTAAAGCCAAATACGATGCAAAACATCACTTTTGTGTCTAAAGCGGC 1850
 [0128] TTATGACAAAGGCATTAAAGAAGAATTAGGGCTTGAAAGACAAGTGTTCG 1900
 [0129] CGGTAAAAAATTGCAGAAACATCACTAAAAAAGACATGCAATTCAACGAC 1950
 [0130] ACTACCGCTCACATTGAAGTCAATCCTGAAACTTACCATGTGTTTCGTGGA 2000
 [0131] TGGCAAAGAAGTAACTTCTAAACCAGCCACTAAAGTGAGCTTGGCGCAAC 2050
 [0132] TCTTTAGCATTTTCTAA 2067。

[0133] 1. 1. 1. 2 表达载体 PET-28a-CTB-UreB 的构建：

[0134] 表达载体 PET-28a、HP UreB-CTB 融合基因片段，分别用 NdeI 和 HindIII 酶切后，经琼脂糖电泳凝胶中的目的 DNA 回收纯化，然后进行连接反应，根据目的片段和载体摩尔数比为 1:3-1:10 的原则，16℃连接反应 16 小时，设计连接反应体系如下：

[0135]	目的 DNA	15 μ l
	PET-28a 载体	3 μ l
	10×的连接缓冲液	2.5 μ l
	ddH ₂ O	3.5 μ l
	T4 连接酶	1 μ l
	总体积	25 μ l

[0136] 1.1.1.3 大肠杆菌感受态细胞的制备 (CaCl₂法)

[0137] 从 -70℃ 保存的 DH5 α 甘油菌中挑取微量菌划板,挑取 E. coli DH5 α 受体菌的单菌落于装有 5ml LB 培养基的有盖试管中,37℃ 振荡 (200rpm) 培养 10 ~ 12 小时,得到种子液,将 5ml 种子液接入 100ml 新鲜 LB 培养基中振荡 (200rpm) 培养,至菌液的 OD₆₀₀ 为 0.4 ~ 0.9 时,取新鲜培养液 1.5ml 转入 Eppendorf 管中,冰上放置 10 分钟,然后于 4℃ 下 4000rpm 离心 10 分钟,小心弃上清,重复前两步一次,收集菌体。加入冰预冷的 0.1mol/L CaCl₂溶液 300 μl 轻轻悬浮细胞,冰上放置 30 分钟,4℃ 下 4000rpm 离心 10 分钟,弃去上清,沉淀加入 100 μl 预冷的 0.1mol/L CaCl₂溶液轻轻悬浮细胞,即为感受态细胞。如果感受态细胞需贮存以后再使用,则需用预冷的 30 μl 150% 甘油与 70 μl 的 0.1mol/L 的 CaCl₂溶液 (甘油终浓度为 15%) 重悬细胞,置 -70℃ 保存 (可保存半年),备用。

[0138] 1.1.1.4 用连接产物转化大肠杆菌感受态细胞

[0139] 从 -70℃ 冰箱中取出感受态细胞悬液,室温下使其解冻,解冻后立即置冰上,加入连接反应液 (含量不超过 50ng, 体积不超过 10 μl),轻轻弹匀,冰上放置 30 分钟,42℃ 水浴中热冲击 90 后,迅速置于冰上冷却 5 分钟,向管中加入 800 μl LB 液体培养基,混匀后 37℃ 150rpm 振荡培养 1.5 小时,涂布于含卡那霉素 (Kan) 的筛选平板,37℃ 培养过夜。

[0140] 1.1.1.5 融合蛋白克隆菌的构建及筛选:

[0141] 挑取经转化的 DH5 α 单菌落,提取质粒,经双酶切后片段大小为 2067bp (见图 5),酶切后片段大小与设计一致,证明重组质粒构建成功。

[0142] 1.1.1.6 融合蛋白工程菌的构建及筛选:

[0143] 大肠杆菌 BL21-DE3 的感受态菌制备、转化及重组菌的质粒抽提方法同融合蛋白克隆菌的构建及筛选。

[0144] 从含 Kan 的筛选平板上挑取单克隆菌落,加入 5ml 的 LB 试管中,37℃ 150rpm 振荡培养 4 小时,加入 1mM 的 IPTG 诱导表达,其表达结果见图 6。

[0145] 1.1.2 重组工程菌 PET-28a-CTB-UreB/BL21 (DE3) 的发酵

[0146] 1.1.2.1 种子活化

[0147] 种子活化采用 LB (胰蛋白胨 10g/L; 酵母提取物 5g/L; NaCl 10g/L) 培养基,配制体积为 50mL,121℃ 灭菌 20 分钟,冷却后加入 Kan (50mg/L) 和工作种子批菌液各 50 μl,37℃ ± 1℃,培养 15 ~ 16 小时。

[0148] 1.1.2.2 种子制备

[0149] 种子采用 2YT 培养基 (胰蛋白胨 16g/L; 酵母提取物 10g/L; NaCl 5g/L),配制体积为 3L,121℃ 灭菌 20 分钟后加入活化好的种子液 3ml,37℃ ± 1℃,培养 4 ~ 6 小时。

[0150] 1.1.2.3 发酵罐发酵

[0151] 1.1.2.3.1 基础培养基

[0152]

胰蛋白胨	500g
酵母提取物	250g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	75g
甘油	250g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50g
KH_2PO_4	100g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	200g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	350g

[0153] 上述基础培养基用纯化水溶解后,加纯化水至 50L。

[0154] 1. 1. 2. 3. 2 补料

[0155]

甘油	2400g
胰蛋白胨	600g
酵母提取物	600g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24g

[0156] 按以上补料配方进行配制,先用纯化水溶解后,再加纯化水至 4L,121℃灭菌 20 分钟后使用。

[0157] 1. 1. 2. 3. 3 补碱

[0158] 4M 的氢氧化钠 1L。

[0159] 1. 1. 2. 3. 4IPTG 溶液

[0160] 用已灭菌纯化水溶解 5.0g IPTG,经 0.22 μm 滤膜过滤后置 2 ~ 8℃冰箱备用,保存期为 24h。

[0161] 1. 1. 2. 3. 5 培养参数

[0162] 在发酵罐上设置培养参数:

[0163]

培养温度	37℃
搅拌速度	200rpm
补碱控制	pH7.0
转子流量计	3m ³ /h
罐压	0.03~0.05 Mpa

[0164]

溶氧	当溶氧浓度低于 30%时,通过提升 转速和增加纯氧比例维持溶氧不 低于 30%。
----	--

[0165] 补料:

	OD ₆₀₀	补碳速度 (ml/L · h)	补氮速度 (ml/L · h)
[0166]	4~5	5	5
	9~11	10	10
	20~25	12	12

[0167] 当培养至 OD₆₀₀ 在 20 ~ 30 之间时加入 IPTG 溶液,继续培养 3 小时后放罐。

[0168] 1. 1. 2. 3. 4 离心

[0169] 培养结束,发酵液转移到预冷的贮罐中,待发酵液冷却至 15℃ 以下后,使用管式离心机离心收集菌体。

[0170] 1. 1. 3CTB-UreB/4CTB 的制备

[0171] 1. 1. 3. 1CTB-UreB 的制备

[0172] (1) 包涵体制备

[0173] 细菌培养结束,将发酵液转移到预冷的贮罐中,待发酵液冷却至 15℃ 以下后,使用管式离心机离心收集菌体。。

[0174] 菌体用 50mM Tris-HCl,0.5% Triton X-100,150mM NaCl,1mM EDTA pH8.0 缓冲液以 1:10 (W/V) 比例悬浮,4℃ 预冷后,高压匀浆破菌 900bar,3 次,14000g 离心 20min,收集沉淀。

[0175] 将收集的包涵体沉淀以 1:10 (W/V) 的比例分别用 50mM Tris-HCl,0.5% Triton X-100,2M 尿素,1mM EDTA pH8.0 缓冲液洗涤沉淀 3 次,50mM Tris-HCl,5mM DTT, pH8.0 缓冲液洗涤 1 次。洗涤条件为:室温搅拌 30min,6000g 离心 20min。

[0176] (2) CTB-UreB 蛋白变性

[0177] 用 50mM Tris-HCl,8M 尿素,10mM DTT,10% 甘油,pH8.0 的包涵体溶解液充分溶解包涵体,4℃ 搅拌过夜,12000rpm 离心 30min,取上清备用。

[0178] (3) CTB-UreB 蛋白纯化

[0179] 经过 DEAE 和 SPHP 层析得到纯化的 CTB-UreB。

[0180] DEAE 柱纯化

[0181] 平衡液:20mM Tris-HCl,8M 尿素,10mM DTT,10% 甘油 pH8.0

[0182] 洗脱液:20mM Tris-HCl,8M 尿素,250mM NaCl,10mM DTT10% 甘油 pH8.0 SPHP 纯化

[0183] 平衡液:20mM PB+8M 尿素 +5mM DTT10% 甘油 pH7.2

[0184] 洗涤液:20mM PB,8M 尿素,30mM NaCl,5mM DTT,10% 甘油 pH7.2,电导小于 3.7ms/m

[0185] 洗脱液:20mM PB,8M 尿素,0.3M NaCl,5mM DTT,10% 甘油 pH7.2

[0186] 洗杂液:20mM PB,8M 尿素,1M NaCl,5mM DTT,10% 甘油 pH7.2

[0187] CTB-UreB 纯化电泳见图 8。

[0188] 1. 1. 3. 2. CTB-UreB/4CTB 的制备

[0189] 将 CTB 原液用 50mM Tris-HCl,8M 尿素,pH8.0 缓冲液稀释调 pH 至 3.0 ~ 4.0,室温放置 1 小时,然后调 pH 到 8.0,4℃ 放置备用。

[0190] 将两种蛋白 CTB-UreB 与 CTB 单体以摩尔数比为 1:4 混合后,5 倍体积稀释到

最终复性液中 (50mM Tris-HCl pH8.0+10%甘油 +150mM NaCl), 控制 DTT 的浓度范围在 0.2-1.0mM 之间, 尿素浓度范围在 1.0M-2.5M 之间。室温放置过夜。

[0191] 上述溶液经过整合 FF 和 QHP 纯化, 得到纯化的 CTB-UreB/4CTB。

[0192] 整合 FF

[0193] 平衡液: 20mM Tris-HCl+5%甘油 +20mM 咪唑 pH8.0,

[0194] 洗脱液: 20mM Tris-HCl+5%甘油 +200 ~ 300mM 咪唑洗脱目的蛋白, 收全峰

[0195] 洗杂液: 20mM Tris-HCl+5%甘油 +500mM 咪唑 pH8.0

[0196] Q HP 纯化

[0197] 缓冲液 A: 20mM Tris-HCl+5%甘油 pH7.5

[0198] 缓冲液 B: 20mM Tris-HCl+5%甘油 +0.3M NaCl pH7.5

[0199] 0-100% B10CV 洗脱目的蛋白。

[0200] CTB-UreB/4CTB 纯化电泳见图 9A。

[0201] 1.1.3.3. 稳定性研究

[0202] 将纯化后的 CTB-UreB/4CTB 抗原嵌合体原液加稀盐酸调整至不同 pH 值, 室温放置 1 小时后取样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结果见图 9B, 其中各个泳道的样品如下: M: Fermentas 蛋白预染; 泳道 1-7 样品分别为 pH9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0 条件下处理后的样品电泳结果。

[0203] 由图 9B 结果可见, 随着 pH 降低, 在电泳图上显示位于嵌合体位置的蛋白浓度逐渐降低, 且出现了多条分子量小于本嵌合体的蛋白条带, 说明产生了小分子量的降解产物。而在大于 pH7.0, 特别是 pH8.0 下本嵌合体蛋白稳定, 未出现分子量小于本嵌合体的蛋白条带。这说明 CTB-UreB/4CTB 抗原嵌合体在中性偏碱性环境中稳定, 在偏酸性环境下容易解离。具体而言, 在 pH>7.0 的情况下比较稳定, 优选 pH 为 8.0。

[0204] 1.2CTB-CagA/4CTB 的制备方法

[0205] 1.2.1 重组工程菌 PET-28a-CTB-CagA/BL21-DE3 的构建

[0206] 采用与实施例 1 相同的步骤制备 CTB-CagA, 区别仅在于采用 CagA 基因代替 UreB 基因。经构建的工程菌质粒经双酶切后片段大小为 1266bp (见图 5), 其融合蛋白的表达见图 7。

[0207] 基因序列为 SEQ IDNo.: 2, 其中 linker 用斜体下划线表示:

[0208] ATGACACCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACA 50

[0209] AATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTG 100

[0210] GAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTTCAA 150

[0211] GTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAAAAAAGCGATTGA 200

[0212] AAGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCG 250

[0213] AAAAGTT`TGTGTATGGAATAATAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATT 300

[0214] AGTATGGCAAAT **GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGG** 350

[0215] **TGGTTCT** ATGAAATTATTTGGAAATTCCAATAACAATAAATGGACTCA 400

[0216] AAAACGAACCCATTTACGCTCAAGTTAATAAAAAAGAAAGCAGGACAAGCA 450

[0217] ACTAGCCCTGAAGAGCCCATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTGAGTGC 500

[0218] AAAAATTGACCAACTCAACGAAGCTACATCAGCAATAAATAGAAAAATTG 550

- [0219] ACCGGATTAACAAAATTGCATCAGCAGGTAAAGGAGTGGGCGGTTTCAGT 600
- [0220] GGAGCAGGGCGATCAGCTAGTCCTGAACCCATTTACGCTACAATTGATTT 650
- [0221] TGATGAGGCAAATCAAGCAGGCTTCCCTCTTAGGAGAAGCACTGCAGTTA 700
- [0222] ATGATCTCAGTAAAGTAGGGCTTTCAAGGGAACAAGAATTGACTCGTAGA 750
- [0223] ATTGGCGATCTCAATCAGGCAGTGTCAGAAGCTAAAAACAGGTCATTTTGA 800
- [0224] CAAACTAGAACAAAAGATGGATGAACTCAAAGATTCTACAAAAAAGAATG 850
- [0225] CTTTGAAGCTATGGGCTGAAAGCACGAAACAAGTGCCTACTGGTTTGCAG 900
- [0226] GCGAAATTGGACAATTACGCTACTAACAGCCACACACGCATTAACAGTAA 950
- [0227] TGTCCAAAATGGAGCAGTCAATGAGAAAAGTGACCGGTATGCTAACGCAAA 1000
- [0228] AAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCACATAAT 1050
- [0229] GTGGGAAGCGCTCATTTGTCAGAGTATGATAAAATTGGATTCAACCAAAA 1100
- [0230] GAATATGAAAGATTATTCTGATTCGTTCAAGTTTTCCACCAAGTTGAACA 1150
- [0231] ATGCCGTAAAAGACATTAAGTCTAGCTTTGTGCAATTTTAAACCAATACA 1200
- [0232] TTTTCTACAGGATCTTACAGCTTGATGAAAGCAAATGCGGAACATGGAGT 1250
- [0233] CAAAAATACTACAAAATAA 1269
- [0234] 1. 2. 2 重组工程菌 PET-28a-CTB-CagA/BL21 (DE3) 的发酵
- [0235] 采用与实施例 1 相同的方法进行重组工程菌 PET-28a-CTB-CagA/BL21 (DE3) 的发酵。
- [0236] 1. 2. 3CTB-CagA/4CTB 的制备
- [0237] 1. 2. 3. 1CTB-CagA 的制备
- [0238] (1)采用与实施例 1 相同的方法进行 CTB-CagA 包涵体的提取。
- [0239] (2)包涵体用包涵体溶解液以 1:20 (W/V) 的比例混合, 4℃ 搅拌 3 小时, 过夜, 12000rpm 离心 30min 收集上清。
- [0240] (3) Q FF 柱纯化
- [0241] 缓冲液 A :20mM Tris-HCl+8M 尿素 +5mM DTT5% 甘油 pH7. 5
- [0242] 缓冲液 B :20mM Tris-HCl, 8M 尿素, 1. 0M NaCl, 5mMDTT5% 甘油, pH7. 5
- [0243] 用 A 液平衡、淋洗, B 液洗脱。
- [0244] (4) SP Big beads 柱纯化
- [0245] 缓冲液 A :20mM Tris-HCl, 8M 尿素, 5mM DTT, 5% 甘油, pH7. 5
- [0246] 缓冲液 B :20mM Tris-HCl, 8M 尿素, 150mM NaCl, 5mM DTT5% 甘油, pH7. 5
- [0247] 用 A 液平衡、淋洗, B 液洗脱。
- [0248] CTB-CagA 纯化电泳见图 10。
- [0249] 1. 2. 3. 2CTB-CagA/4CTB 的制备
- [0250] 将 CTB 原液用 50mM Tris-HCl, 8M 尿素, pH8. 0 缓冲液稀释调 pH 至 3. 0 ~ 4. 0, 室温放置 1 小时, 然后调 pH 到 8. 0, 4℃ 放置备用。
- [0251] 将两种蛋白 CTB-CagA 与 CTB 单体以摩尔数比为 1:4 混合后, 5 倍体积稀释到最终复性液中 (50mM Tris-HCl pH8. 0+10% 甘油 +150mM NaCl), 控制 DTT 的浓度范围在 0. 2-1. 0mM 之间, 尿素浓度范围在 1. 0M-2. 5M 之间。室温放置过夜。
- [0252] 上述溶液经过螯合 FF 和 SP HP 纯化, 得到纯化的 CTB-CagA/4CTB。

[0253] 螯合 FF 柱纯化

[0254] 缓冲液 A :20mM Tris-HCl+5% 甘油 +20mM 咪唑 pH8.0

[0255] 缓冲液 B :20mM Tris-HCl+5% 甘油 +200mM 咪唑洗脱目的蛋白

[0256] 100% B 洗杂

[0257] SP HP 柱纯化

[0258] 缓冲液 A :20mM Tris-HCl+5% 甘油 pH7.5

[0259] 缓冲液 B :20mM Tris-HCl+5% 甘油 +0.3M NaCl pH7.5

[0260] CTB-CagA/4CTB 嵌合体蛋白纯化电泳图见图 11A。

[0261] 1.2.3.3 稳定性研究

[0262] 将纯化后的 CTB-CagA/4CTB 抗原嵌合体原液加稀盐酸调整至不同 pH 值,室温放置 1 小时后取样品进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结果见图 11B,其中各个泳道的样品如下:M:Fermentas 蛋白预染;泳道 1-7 样品分别为 pH9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0 条件下处理后的样品电泳结果。

[0263] 由图 11B 结果可见,随着 pH 降低,在电泳图上显示位于嵌合体位置的蛋白浓度逐渐降低,且出现了多条分子量小于本嵌合体的蛋白条带,说明产生了小分子量的降解产物,而在大于 pH7.0,特别是 pH8.0 下本嵌合体蛋白稳定,未出现分子量小于本嵌合体的蛋白条带。这说明 CTB-CagA/4CTB 抗原嵌合体在中性偏碱性环境中稳定,在偏酸性环境下容易解离。具体而言,在 pH>7.0 的情况下比较稳定, 优选 pH 为 8.0。

[0264] 1.3CTB-NAP/4CTB 的制备方法

[0265] 1.3.1 重组工程菌 PET-28a-CTB-NAP/BL21-DE3 的构建

[0266] 采用与实施例 1 相同的步骤制备 CTB-NAP,区别仅在于采用 NAP 基因代替 UreB 基因。经构建的工程菌质粒经双酶切后片段大小为 789bp(见图 5),其融合蛋白的表达见图 7。

[0267] 基因序列为 SEQ ID No.:3,其中 linker 用斜体下划线表示:

[0268] ATGACACCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACA 50

[0269] AATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTG 100

[0270] GAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAAGAATGGTGCAACTTTTCAA 150

[0271] GTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAAAAAAGCGATTGA 200

[0272] AAGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCG 250

[0273] AAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATT 300

[0274] AGTATGGCAAAT **GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGG** 350

[0275] **TGGTTCT** ATGAAAACATTTGAAATTTTAAAACATTTGCAAGCGGATGCGA 400

[0276] TCGTGTTGTTTATGAAAGTGCATAACTTCCATTGGAATGTGAAAGGCACG 450

[0277] GATTTTTTTAATGTACATAAAGCTACTGAAGAAATTTATGAAGAGTTTGC 500

[0278] GGACATGTTTGATGATCTCGCTGAAAGGATCGTTCAATTAGGACACCACC 550

[0279] CCTTAGTCACTTTATCCGAAGCGATCAAACTCACTCGTGTTAAAGAAGAA 600

[0280] ACTAAAACGAGCTTCCACTCTAAAGACATTTTTTAAAGAAATTTCTAGAGGA 650

[0281] CTATAAACACCTAGAAAAAGAATTTAAAGAGCTCTCTAACACCGTGAAA 700

[0282] AAGAAGGCGATAAAGTCACCGTAACTTATGCGGATGATCAATTGGCCAAG 750

- [0283] TTGCAAAAATCCATTTGGATGCTGCAAGCCCATTAGCTTAA 792。
- [0284] 1.3.2 重组工程菌 PET-28a-CTB-NAP/BL21 (DE3) 的发酵
- [0285] 采用与实施例 1 相同的方法进行重组工程菌 PET-28a-CTB-NAP/BL21 (DE3) 的发酵。
- [0286] 1.3.3 CTB-NAP/4CTB 的制备
- [0287] 1.3.3.1 CTB-NAP 的制备
- [0288] (1) 采用与实施例 1 相同的方法进行 CTB-NAP 包涵体的提取。
- [0289] (2) CTB-NAP 包涵体经洗涤后用 20mM Tris-HCl, 8M 尿素, pH8.0 的缓冲液溶解过夜, 12,000rpm 离心 30 分钟取上清。
- [0290] (3) QFF 层析:
- [0291] 缓冲液 A: 20mM Tris-HCl+5% 甘油 pH7.5
- [0292] 缓冲液 B: 20mM Tris-HCl+5% 甘油 +0.3M NaCl pH7.5
- [0293] 用 A 液平衡、淋洗, B 液洗脱。CTB-NAP 融合蛋白纯化电泳图见图 12。
- [0294] 1.3.3.2 CTB-NAP/4CTB 的制备
- [0295] (1) CTB-NAP 的处理: 用 20mM Tris-HCl, 8M 尿素, pH8.0 的缓冲液将上述 CTB-NAP 样品稀释, 并调 pH 至 8.0, 并补加巯基乙醇使其终浓度为 3mM。
- [0296] (2) CTB 的处理: 用 20mM Tris-HCl, 8M 尿素, pH8.0 的缓冲液将 CTB 原液稀释, 并调 pH 到 3.5 ~ 3.7, 放置 1 小时后, 调 pH 到 8.0, 并补加巯基乙醇使其终浓度为 3mM。
- [0297] (3) 复性: 取上述处理好的两种蛋白 CTB-NAP 与 CTB 单体以摩尔数比为 1:4 混合, 用 50mM Tris-HCl, 5% 甘油, 0.03mM GSSG, pH8.0 缓冲液以 1:6 稀释, 并控制巯基乙醇的浓度范围在 0.2-1.0mM 之间, 尿素浓度范围在 1.0M-2.5M 之间。21℃ 放置过夜。
- [0298] (4) NI FF 纯化:
- [0299] 缓冲液 A: 50mM Tris-HCl, 5% 甘油, 20mM 咪唑, pH8.0
- [0300] 缓冲液 B: 50mM Tris-HCl, 5% 甘油, 300mM 咪唑, pH8.0
- [0301] 复性样品补加终浓度为 20mM 咪唑, 上 NI FF, 流速 8ml/min, 用 A 液淋洗, 用 B 液洗脱。
- [0302] (5) QHP 纯化:
- [0303] 缓冲液 A: 50mM Tris-HCl, 5% 甘油
- [0304] 缓冲液 B: 50mM Tris-HCl, 5% 甘油, 1M NaCl pH8.0
- [0305] 过 NI FF 洗脱样 (电导在 4 ~ 5 之间) 上 QHP, 上样速度 3ml/min, 用 A 液平衡、淋洗, 30% 缓冲液 B 洗脱 (流速为 1ml/min)。
- [0306] CTB-NAP/4CTB 嵌合体蛋白纯化电泳图见图 13。
- [0307] 2. 重组幽门螺杆菌疫苗 (rHP) 小鼠免疫原性研究
- [0308] 2.1 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白的免疫原性研究
- [0309] 2.1.1 BALB/c 小鼠免疫方法
- [0310] 2.1.1.1 试验动物: 8-10 周, 体重 18-20g, SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,
- [0311] 2.1.1.2 试验药物: UreB, CTB-UreB 融合体蛋白, CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白均用 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 稀释, UreB 蛋白免疫剂量为 200 μg/只, CTB-UreB 融合蛋白和 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白均以与 UreB 蛋白等摩尔数给药, 抗酸剂用 PBS 稀释至 50mg/ml。

[0312] 2.1.1.3 试验分4组:UreB组,CTB-UreB组,CTB-UreB/4CTB组和生理盐水组(或称,空白对照组(CON,Control))。

[0313] 2.1.1.4 小鼠的免疫程序:小鼠共免疫4次,每隔7天免疫1次。每只动物灌胃给予0.2ml试验药物,给药前10min给予0.2ml的抗酸剂。所有动物给药前禁食12h,不禁水,给药后1h再进水进食。

[0314] 2.1.1.5 样品采集及检测:

[0315] 各组小鼠在免疫前一天和首次免疫后的2周、4周、6周、8周、10周需采血用于检测血清IgG和IgA抗体水平。除最后一次眼球采血之外,其余均为鼠尾采血,所有的血清离心前需4℃过夜,次日以4℃,5000rpm,15min离心,取上层血清,-20℃保存。

[0316] 各组动物在免疫后10周经眼球采血后被处死,剖腹,取近回盲部末端的回肠10cm,用PBS冲洗肠道3次后,无菌刀片刮取肠黏膜,溶于1ml0.01mol/L PBS中(pH7.4,含50mmol/L EDTA、20nmol/L蛋白酶抑制剂亮肽素和胃酶抑素)。10000rpm离心10min,取上清并加入20μl100mmol/L PMSF(Sigma)。以ELISA检测血清IgG和肠黏膜sIgA抗体水平。96孔酶标板每孔加入100μl UreB抗原(1.25μg/ml),4℃包被过夜,次日弃去孔内溶液,用PBST洗涤3次;每孔加封闭液200μl(含2%BSA),37℃封闭2h,PBST洗涤3次;每孔加入100μl血清(1:300稀释),37℃反应1h后PBST洗涤三次,每孔加入100μl HRP标记的羊抗鼠IgG(1:2000~1:50000)/HRP标记的羊抗鼠IgA(1:4000~1:8000),37℃孵育1h,PBST洗涤6次;立即加入新鲜配制的底物液,每孔100μl,室温反应15min,加终止液50μl;酶标检测仪测定每孔的吸光度OD450值。

[0317] 2.1.2 结果

[0318] BALB/C小鼠经HP疫苗口服免疫后,其血清IgG和肠黏膜sIgA抗体反应见图14、15。空白对照组和UreB蛋白组小鼠的抗体在给药后没有增加,相反,CTB-UreB融合蛋白和CTB-UreB/4CTB嵌合体蛋白组的小鼠其血清IgG抗体在首次给药后4周明显增加,至8周达高峰,与空白对照组比较均存在显著性差异($P<0.001$);肠黏膜sIgA抗体也明显升高,与空白对照组比较差异显著($P<0.001$)。其中CTB-UreB融合蛋白组小鼠的抗-UreB抗体的阳转率为60%,CTB-UreB/4CTB嵌合体蛋白组小鼠的抗-UreB抗体的阳转率为95%,表明CTB-UreB/4CTB嵌合体蛋白疫苗可诱导机体产生显著的免疫应答反应。

[0319] 2.1.3 结论

[0320] 口服给予重组CTB-UreB融合蛋白和CTB-UreB/4CTB嵌合体蛋白,能刺激机体产生抗UreB抗原的特异性抗体。但CTB-UreB/4CTB嵌合体蛋白引起的免疫应答明显优于CTB-UreB融合蛋白,表明CTB-UreB/4CTB嵌合体蛋白具有更好的免疫反应性和抗原性,可以作为预防幽门螺杆菌的候选疫苗。

[0321] 2.2CTB-CagA/4CTB嵌合体蛋白的免疫原性研究

[0322] 2.2.1BALB/c小鼠免疫方法

[0323] 免疫方法基本同2.1.1。其中试验药物CagA蛋白,CTB-CagA融合蛋白,CTB-CagA/4CTB嵌合体蛋白均用Tris-HCl缓冲液(pH8.0)稀释,CagA蛋白免疫剂量为200μg/只,CTB-CagA融合蛋白和CTB-CagA/4CTB嵌合体蛋白均以与CagA蛋白等摩尔数给药,给药容量为0.2ml/只。ELISA检测时用CagA抗原包板。其血清IgG和肠黏膜sIgA抗体反应见图16、17。

[0324] 2.2.3 结论

[0325] 口服给予重组 CTB-CagA/4CTB 嵌合体蛋白,能刺激机体产生抗 CagA 抗原的特异性抗体。表明 CTB-CagA/4CTB 嵌合体蛋白具有更好的免疫反应性和抗原性,可以作为预防幽门螺杆菌的候选疫苗。

[0326] 2.3CTB-NAP/4CTB 嵌合体蛋白的免疫原性研究

[0327] 2.3.1BALB/c 小鼠免疫方法

[0328] 免疫方法基本同 2.1.1。其中试验药物 NAP 蛋白,CTB-NAP 融合蛋白,CTB-NAP/4CTB 嵌合体蛋白均用 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 稀释,NAP 融合蛋白免疫剂量为 200 μ g/只,CTB-NAP 融合蛋白和 CTB-NAP/4CTB 嵌合体蛋白均以与 UreB 蛋白等摩尔数给药,给药容量为 0.2ml/只。ELISA 检测时用 CagA 抗原包板。

[0329] 2.3.2 结果

[0330] BALB/C 小鼠经 HP 疫苗口服免疫后,其血清 IgG 和肠黏膜 sIgA 抗体反应见图 18、19。

[0331] 2.3.3 结论

[0332] 口服给予重组 CTB-NAP/4CTB 嵌合体蛋白,能刺激机体产生抗 NAP 抗原的特异性抗体。表明 CTB-NAP/4CTB 嵌合体蛋白具有更好的免疫反应性和抗原性,可以作为预防幽门螺杆菌的候选疫苗。

[0333] 3. 重组幽门螺杆菌疫苗对幽门螺杆菌 SS1 株感染 BALB/c 小鼠的免疫保护作用

[0334] 3.1 试验方法

[0335] 3.1.1 免疫方法同 2.1.1。

[0336] 3.1.2HP SS1 菌攻击:

[0337] 试验组和阴性对照组动物在末次免疫后 2 周,连续 3 天灌胃给予 HP SS1 菌 0.2ml (1×10^9 CFU/ml),每日 1 次,给予 HP SS1 菌前 10min 灌胃给予 0.2ml 抗酸剂。

[0338] 3.1.3 样品采集及检测

[0339] 血清及肠黏膜采集及检测方法同 2.1.1.5。

[0340] 所有动物用 HPSS1 菌攻击 4W 后全部处死,剖腹取胃,沿纵轴将胃组织分为三部分,每部分均包括胃底、胃体和胃窦三部分。一份做定量细菌培养:用无菌镊夹取胃窦部组织,黏膜面向下,涂布于 HP 选择性培养平板,37℃,在微需氧条件下培养 1 天左右,见透明、光滑、针尖状小菌落,即为阳性。

[0341] 一份置 96 孔板行快速尿素酶试验:将尿素酶试剂加入含鼠胃组织的 96 孔板各孔中,每孔定量至 100 μ l,密闭下室温静置 0.5h,试剂由黄色变为红色判定位阳性,即样本有 Hp 感染。

[0342] 另一份置 4%多聚甲醛固定,经石蜡包埋、切片、HE 染色、Gimsa 染色后用显微镜观察 HP SS1 菌的定植情况和组织的炎症反应。

[0343] 3.2 结果

[0344] 3.2.1 免疫 / 攻击后小鼠毒副反应观察

[0345] 各组小鼠精神状态良好,未发现精神萎靡、腹泻等不良反应。

[0346] 3.2.2 血清 / 肠黏膜 IgG/sIgA 抗体结果

[0347] 空白对照组、UreB 蛋白组以及 UreB+CTB 小鼠的抗体在给药后没有增加,而

CTB-UreB 融合蛋白和 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白组的小鼠其血清 IgG 抗体和肠黏膜 sIgA 抗体在首次给药后 9.5 周明显增加,与空白对照组比较均存在显著性差异。结果见图 20、21。

[0348] 3.2.3 组织涂片及快速尿素酶检测

[0349] 各组小鼠在攻击后 4 周做快速尿素酶检测及组织涂片结果显示:模型组的 8 只动物均被感染了 HPSS1,尿素酶及组织涂片均为阳性;空白对照组(未给予 HPSS 攻击)所有动物其尿素酶及组织涂片均为阴性结果;UreB 组有 7 只动物显示尿素酶及组织涂片结果为阳性;CTB-UreB 组显示有 5 只动物尿素酶结果为阳性,其中 4 只动物涂片结果为阳性;CTB-UreB/4CTB 组仅有 1 只动物显示尿素酶检测阳性,而所有动物涂片结果均为阴性。结果详见表 1。

[0350] 表 1:根据本发明的实施方式 rHP 疫苗口服给予小鼠,再用 HPSS1 攻击后 HP 检测结果

[0351]

组别	动物数量 (n)	HP 检测阳性 (%)			保护率 (%)
		快速尿素酶检测	涂片	组织切片	
UreB	8	87.5 (7/8)	87.5 (7/8)	87.5 (7/8)	12.5

[0352]

CTB-UreB	8	62.5 (5/8)	50 (4/8)	62.5 (5/8)	37.5
CTB-UreB/4CTB	8	12.5 (1/8)	0 (0/8)	12.5 (1/8)	87.5
模型对照组	8	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	0
空白对照组	8	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	—

[0353] 3.2.4 病理组织切片染色结果

[0354] 对照组小鼠胃小凹有大量成团的幽门螺杆菌定植,胃黏膜固有层深部至中部有大量的巨噬细胞和中性粒细胞浸润,CTB-UreB 融合蛋白组小鼠胃小凹有少量的幽门螺杆菌定植,胃黏膜固有层深部有中等程度的巨噬细胞和中性粒细胞浸润,炎症反应较轻;而 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白组胃小凹有极少量的幽门螺杆菌定植,组织切片上未见巨噬细胞和中性粒细胞浸润(见图 22)。

[0355] 3.3 结论

[0356] 在整个实验过程中,给予 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白免疫的小鼠未发现不良反应,病理学检查显示免疫小鼠胃内无明显炎症改变,表明以 CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白为抗原成分的 HP 疫苗以试验剂量进行免疫时具有良好的安全性。

[0357] CTB-UreB/4CTB 嵌合体蛋白经口服免疫可有效诱导免疫应答反应,对 HP SS1 菌攻击的小鼠具有良好的保护作用,作为抗 HP 感染的口服疫苗具有良好的应用前景。

[0358] 上述检测例的结果表明,口服给予重组 CTB-UreB 融合蛋白和 CTB-UreB/4CTB 嵌合蛋白,能刺激机体产生抗 UreB 抗原的特异性抗体;其中 CTB-UreB/4CTB 嵌合蛋白免疫小鼠的血清抗 UreB 抗原的特异性 IgG 和胃黏液 s-IgA 抗体滴度和阳转率均明显高于 CTB-UreB 融合蛋白,与空白对照组比较有显著性差异,表明上述抗原具有良好的免疫反应性和抗原性,可以作为 HP 的候选疫苗。

[0359] 结果表明,CTB-UreB/4CTB 嵌合蛋白产生的抗体水平显著高于仅仅用 UreB 产生的抗体。而且无论是针对在血清中的抗体还是分泌型的抗体,都观察到 CTB-UreB/4CTB 嵌合蛋白诱导产生了显著升高的抗体。这表明本发明的抗原组合物明显提高了原抗原的免疫原性水平,增强了机体的免疫反应,有助于更加有效的疫苗的制备。而且表 2 和图 14 分泌型 IgA 检测的结果还表明,本发明的重组抗原构成的嵌合蛋白利于抗原穿透肠黏膜,并刺激黏膜产生分泌型 IgA 免疫。

[0360] 对比例 1

[0361] 发明人构建载体并表达幽门螺杆菌抗原如 UreB 与霍乱毒素的 A₂ 亚单位 (CTA₂) 的融合蛋白,并将其在体外与表达的 CTB 蛋白组合,使其形成 UreB-CTA₂/5CTB 嵌合蛋白。

[0362] 根据现有技术理解,CTA₂ 与 CTB 的结合与 CTB 之间的结合同为非共价结合,用同样的方法应该有相似的产率。

[0363] 然而,实验结果表明 UreB-CTA₂/5CTB 嵌合蛋白组装效率 <5% (见图 23A),而 CTB-UreB/4CTB 嵌合蛋白组装效率 >90% (见图 23B),本发明 CTB-UreB/4CTB 的组装效率远远高于 UreB-CTA₂/5CTB 的组装效率。CTB-UreB/4CTB 嵌合蛋白可明显克服 UreB-CTA₂/5CTB 由于组装效率低导致产业化可能性低的缺陷。

[0364] 对比例 2

[0365] 发明人尝试利用酵母为代表的真核表达系统同时表达 CTB- 抗原融合蛋白和 CTB,希望得到自然形成的有预期效果的嵌合体结构。发明人发现,采用酵母系统表达时,CTB 能正确形成由 5 个相同 CTB 单体组成的五聚体结构,但是表达的 CTB 分子量 (约为 65KD) 明显大于天然状态时 (55KD)。提示采用真核系统表达时,可能发生了 CTB 的糖基化翻译后修饰,致使表达的 CTB 与天然的 CTB 分子存在较大差异,进而影响与 GM1 受体的结合力。同时,采用这种方式制备嵌合体时对与 CTB 融合的抗原大小有严格要求,并且利用此表达方式时,融合蛋白和 CTB 单体自然组装效率较低,致使整个表达体系的得率很低,不适用于大规模疫苗的制备。

[0366] 对比例 3

[0367] 发明人尝试在以大肠杆菌为代表的原核表达系统中,同时表达 CTB- 抗原融合蛋白和 CTB,希望能得到自然形成的嵌合体。由于霍乱毒素 B 亚单位的五聚体组装机理不明,研究一致认为嵌合体的组装在穿膜过程中发生。在大肠杆菌表达系统中,带信号肽的 CTB- 抗原融合蛋白无法正确穿膜,形成预期的嵌合体结构。并且,在胞内表达的融合蛋白大都形成包涵体,CTB 表达也因起始氨基酸甲硫氨酸的存在无法形成天然 CTB 五聚体,因此也无法形成预期的嵌合体结构。

[0368] 以上仅仅以幽门螺杆菌相关抗原为例,说明了本发明的 CTB-X-4CTB 系统在增强抗原的免疫原性方面的应用和效果。基于本领域技术人员的经验和理解,可以推测出本发明的 CTB-X-4CTB 系统还可以应用于多种其他黏膜免疫抗原,包括但不限于幽门螺杆菌抗

原、伤寒抗原、流感 HA 抗原,提高这些抗原的免疫原性,并制备高效价疫苗。其相应的载体选择和制备、蛋白质的表达和纯化均为本领域公知技术,本领域普通技术人员在了解了本发明的发明点之后,均可以利用本发明的 CTB-X-4CTB 系统制备相应的融合蛋白和抗原组合物,并检测其相应的免疫原性的提高。

[0369] 所以,以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明保护的范围之内。

[0001]

序 列 表

<110> 上海联合赛尔生物工程有限公司

<120> 抗原嵌合体、抗原组合物、疫苗及其制备方法和试剂盒

<130> DF10-131539

<160> 3

<210> 1

<211> 2067

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> ATGACACCTCAAAATATTACTGATTGTGTGCAGAATACCACAACACAGA 50

AATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTG 100

GAAAAAGAGAGATGGCTATCATTTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTTCAA 150

GTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAGCGATTGA 200

AAGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCG 250

AAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAAACGCCICATGCGATTGCCGCAATT 300

AGTATGGCAAATGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGG 350

TGGTTCTATGAAAAAGATTAGCAGAAAAGAATATGTTTCTATGTATGGCC 400

CTACTACAGGCGATAAAGTGAGATTGGGCGATACAGACTTGATCGCTGAA 450

GTAGAACATGACTACACCATTTATGGCGAAGAGCTTAAATTCGGTGGCGG 500

TAAACTTTTGAGAGAAGGCATGAGCCAATCCAACAACCTTAGCAAAGAAG 550

AACTGGATTTAATCATCACTAACGCTTTAATCGTGGATTACACCGGTATT 600

TATAAAGCGGATATTGGTATTAAAGATGGCAAAATCGCTGGCATTGGCAA 650

AGGCGGCAACAAAGACATGCAAGATGGCGTTAAAAACAATCTTAGCGTGG 700

GTCCTGCTACTGAAGCCTTAGCTGGTGAAGGTTTGATCGTAAGTGGTGGT 750

GGTATTGACACACACATCCACTTCATCTCCCCCAACAAATCCCTACAGC 800

TTTTCGAAGCGGTGTAACAACGATGATTGGTGGCGGAACCTGGCCCTGCTG 850

ATGGCACTAACGCAACCACTATCACTCCAGGCAGAAGAAATTTAAATGG 900

ATGCTCAGAGCGGCTGAAGAATATCTATGAATTTAGGTTCTTAGCTAA 950

AGGTAACGCTTCTAATGATGCGAGCTTAGCCGATCAAATTGAAGCCGGTG 1000

CGATTGGCTTTAAATCCATGAAGACTGGGGAACAACCTCCTTCTGCAATC 1050

AATCATGCGTTAGATGTTGCGGACAAATACGATGTGCAAGTCGCTATCCA 1100

TACGGACACTTTGAATGAAGCCGGTGTGTAGAAGACACTATGGCAGCCA 1150

TTGCCGGAACGCACTATGCACACTTTCCACACTGAAGGCGCTGGTGCAGGA 1200

CACGCTCCTGATATCAATAAGTAGCCGGCGAACACAACATTCTGCCCCG 1250

[0002]

```

TTCCACTAACCCCACTATCCCTTTCTACTGTGAATACAGAAGCAGAACACA      1300
TGGACATGCTTATGGTGTGCCACCACTTGGATAAAAGCATTAAGAAGAT        1350
GTTCAAGTTCGCTGATTCAAGGATCCGCCCTCAAACCATTGCGGCTGAAGA      1400
CACTTTGCATGACATGGGGATTTTCTCAATCACTAGTTCTGACTCTCAAG      1450
CTATGGGTGCTGTGGGTGAAGTTATCACCAGAACTTGGCAAACAGCTGAC      1500
AAAAACAAAAAAGAATTTGGCCGCTTGAAAGAAGAAAAAGGCGATAACGA      1550
CAACTTCAGAATCAAACGCTACTTGTCTAAATACACCATTAACCCAGCGA      1600
TCGCTCATGGGATTAGCGAGTATGTAGGTTCTGTAGAAGTGGGCAAAGTG      1650
GCTGACTTGGTATTGTGGAGTCCAGCATTCTTTGGCGTGAAACCCAACAT      1700
GATCATCAAAGGTGGGTTTATTGCATTGAGTCAAATGGGCGATGCGAACG      1750
CTTCTATCCCTACCCCAACACAGTTTATTACAGAGAAATGTTGCTCAT      1800
CATGGTAAAGCCAAATACGATGCAAACATCACTTTTGTGTCTAAAGCGGC      1850
TTATGACAAAGGCATTAAAGAAGAATTAGGGCTTGAAAGACAAGTGTTC      1900
CGGTAAAAAATTGCAGAAACATCACTAAAAAAGACATGCAATTCAACGAC      1950
ACTACCGCTCACATTGAAGTCAATCCTGAAACCTACCATGTGTTCGTGGA      2000
TGGCAAAGAAGTAACTTCTAAACCAGCCACTAAAGTGAGCTTGGCGCAAC      2050
TCTTTAGCATTTTCTAA      2067

```

<210> 2

<211> 1269

<212> DNA

<213> 人工合成

```

<400> ATGACACCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGTCAGAATACCACAACACACA      50
AATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTG      100
GAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTTCAA      150
GTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAAAGCGATTGA      200
AAGGATGAAGGATACCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCG      250
AAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATT      300
AGTATGGCAAATGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGG      350
TGGTTCTATGAAATTATTTGGAAATTCCAATAACAATAATAATGGACTCA      400
AAAACGAACCCATTTACGCTCAAGTTAATAAAAAGAAAGCAGGACAAGCA      450
ACTAGCCCTGAAGAGCCCATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTGAGTGC      500
AAAAATTGACCAACTCAACGAAGCTACATCAGCAATAAATAGAAAAATTG      550
ACCGGATTAAACAAAATTGCATCAGCAGGTAAAGGAGTGGGCGGTTTCAGT      600
GGAGCAGGGCGATCAGCTAGTCCTGAACCCATTTACGCTACAATTGATTT      650
TGATGAGGCAAATCAAGCAGGCTTCCCTCTTAGGAGAAGCACTGCAGTTA      700
ATGATCTCAGTAAAGTAGGGCTTCAAGGGAACAAGAATTGACTCGTAGA      750
ATTGGCGATCTCAATCAGGCAGTGTGAGAAGCTAAACAGGTCATTTTGA      800

```

[0003]

CAAAC TAGAACAAAAGATGGATGAACTCAAAGATTCTACAAAAAAGAATG	850
CTTTGAAGCTATGGGCTGAAAGCACGAAACAAGTGCCTACTGGTTTGCAG	900
GCGAAATTGGACAATTACGCTACTAACAGCCACACACGCATTAACAGTAA	950
TGTCCAAAATGGAGCAGTCAATGAGAAAGTGACCGGTATGCTAACGCAAA	1000
AAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCACATAAT	1050
GTGGGAAGCGCTCATTTGTCAGAGTATGATAAAATTGGATTCAACCAAAA	1100
GAATATGAAAGATTATTCTGATTTCGTTCAAGTTTTCCACCAAGTTGAACA	1150
ATGCCGTAAAAGACATTAAAGTCTAGCTTTGTGCAATTTTAAACCAATACA	1200
TTTTCTACAGGATCTTACAGCTTGATGAAAGCAAATGCGGAACATGGAGT	1250
CAAAAATACTACAAAATAA	1269

<210> 3

<211> 792

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> ATGACACCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACA	50
AATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTG	100
GAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAAGAATGGTGCAACTTTTCAA	150
GTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAAAAAAAAGCGATTGA	200
AAGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCG	250
AAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATT	300
AGTATGGCAAATGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGG	350
TGGTTCTATGAAAACATTTGAAATTTTAAAACATTTGCAAGCGGATGCGA	400
TCGTGTTGTTTATGAAAGTGCATAACTTCCATTGGAATGTGAAAGGCACG	450
GATTTTTTTAATGTACATAAAGCTACTGAAGAAATTTATGAAGAGTTTGC	500
GGACATGTTTGATGATCTCGCTGAAAGGATCGTTCAATTAGGACACCACC	550
CCTTAGTCACTTTATCCGAAGCGATCAAACCTCACTCGTGTTAAAGAAGAA	600
ACTAAAACGAGCTTCCACTCTAAAGACATTTTAAAGAAATTCTAGAGGA	650
CTATAAACACCTAGAAAAAGAATTTAAAGAGCTCTCTAACACCGCTGAAA	700
AAGAAGGCGATAAAGTCACCGTAACTTATGCGGATGATCAATTGGCCAAG	750
TTGCAAAAATCCATTTGGATGCTGCAAGCCCATTAGCTTAA	792

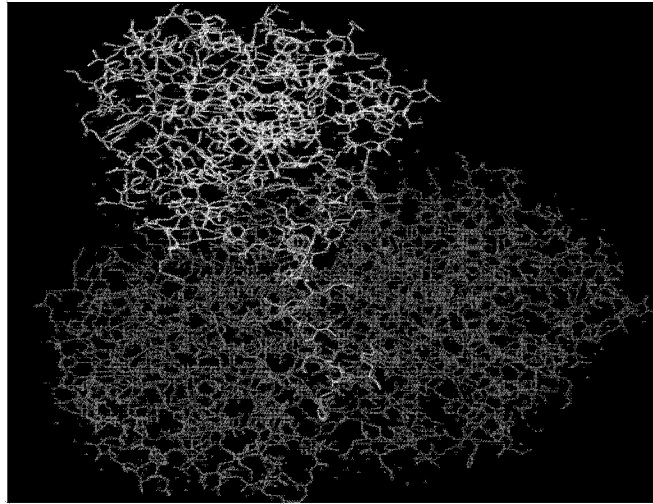


图 1

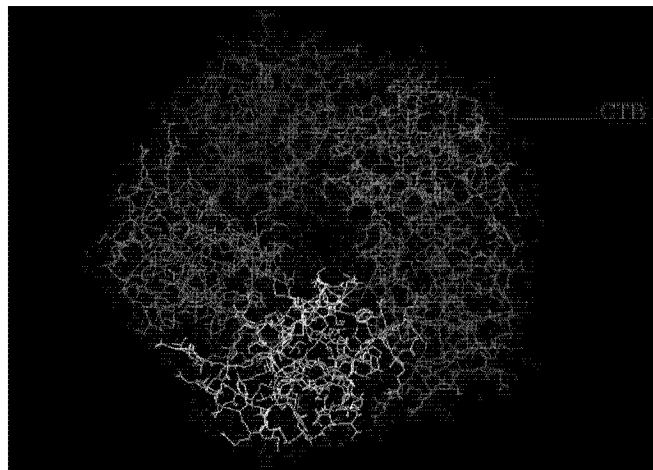


图 2

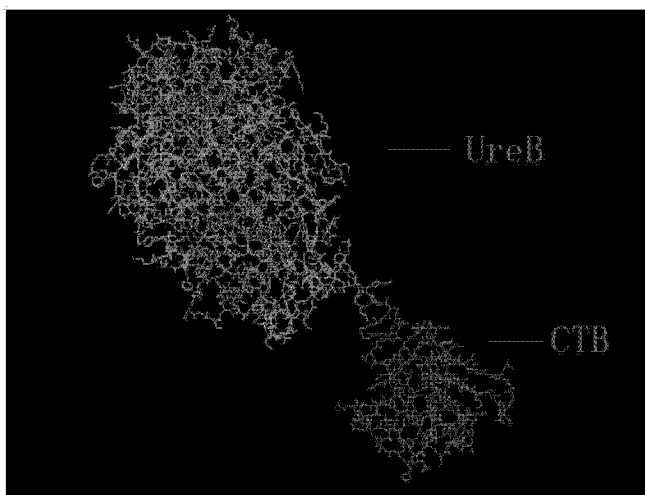


图 3

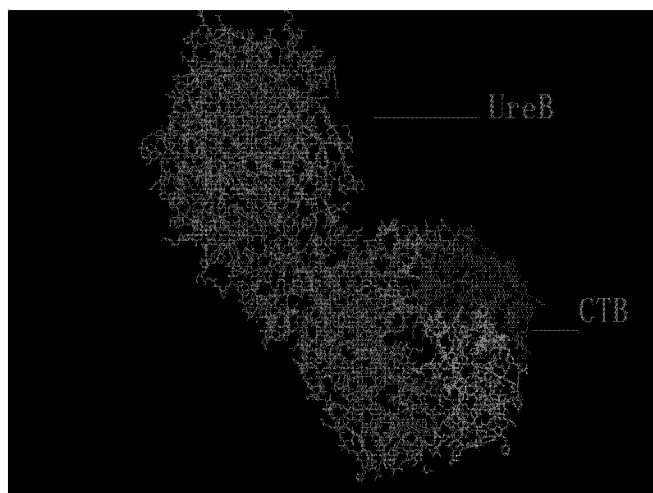


图 4

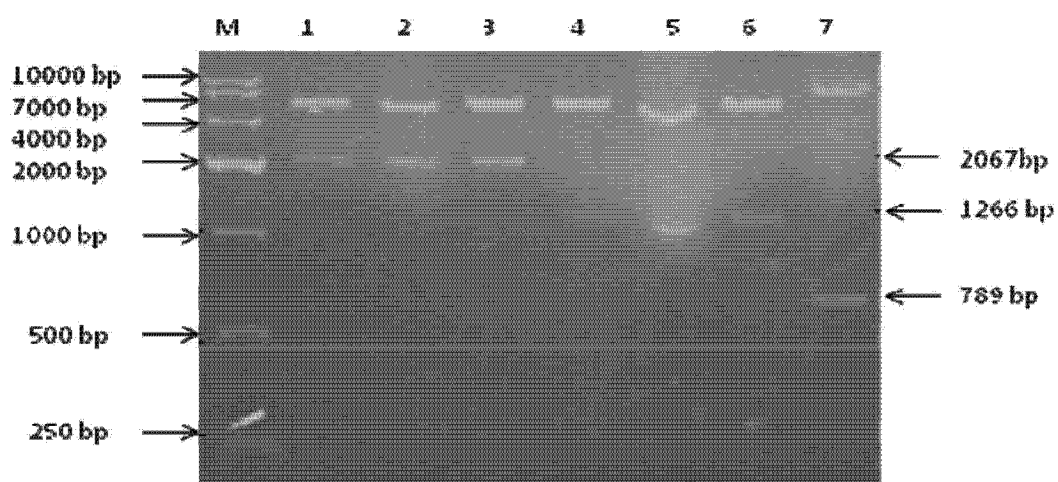


图 5

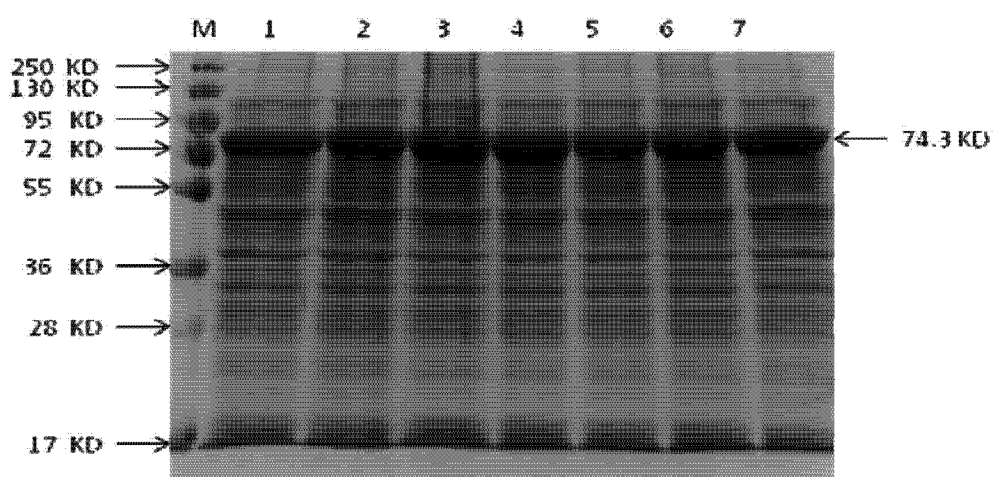


图 6

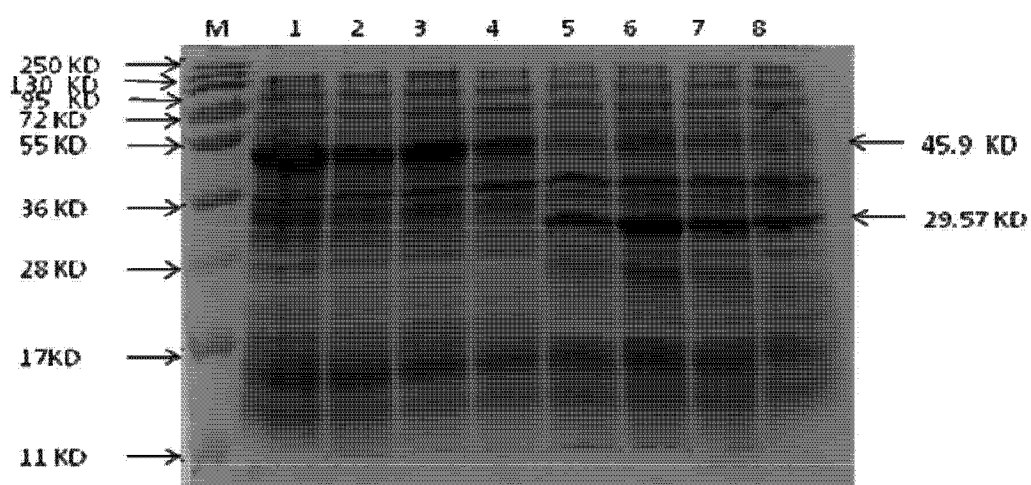


图 7

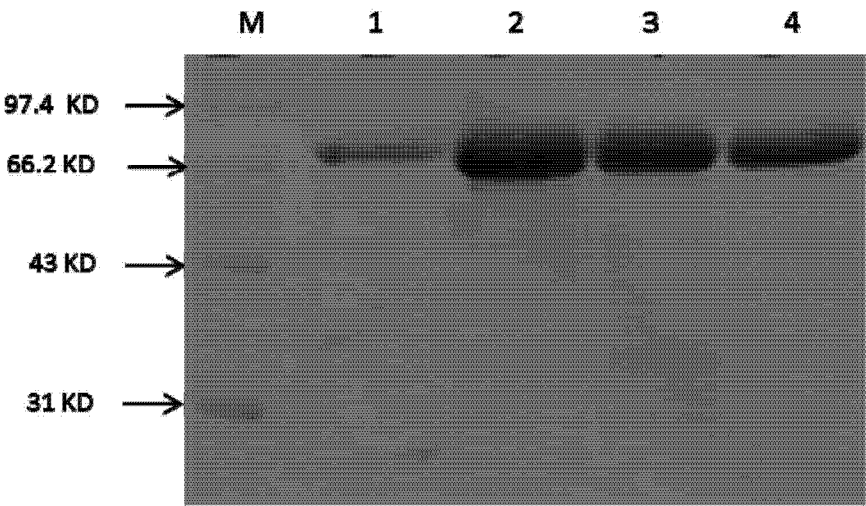


图 8

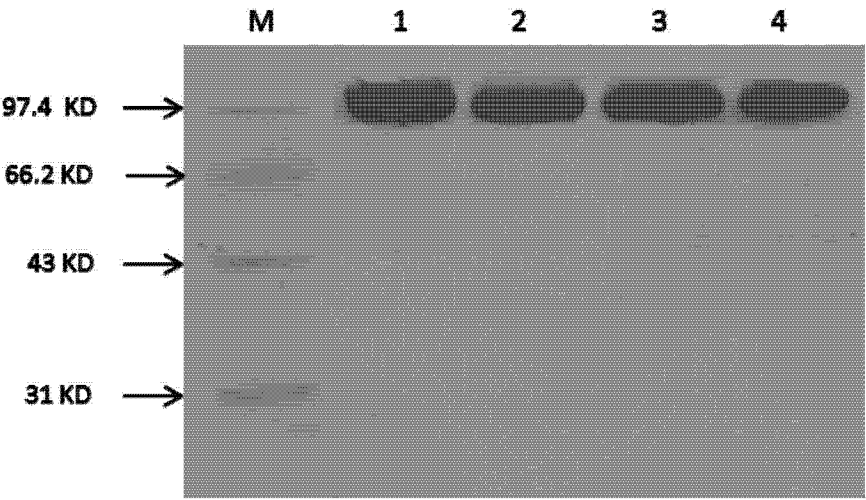


图 9A

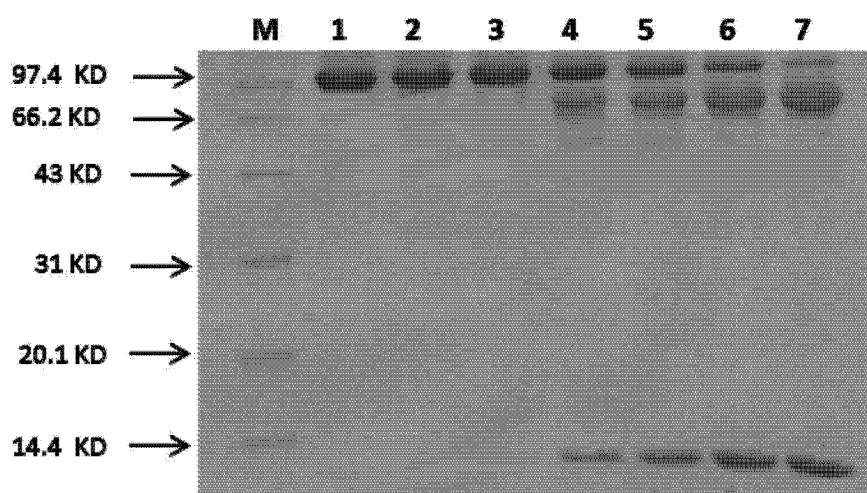


图 9B

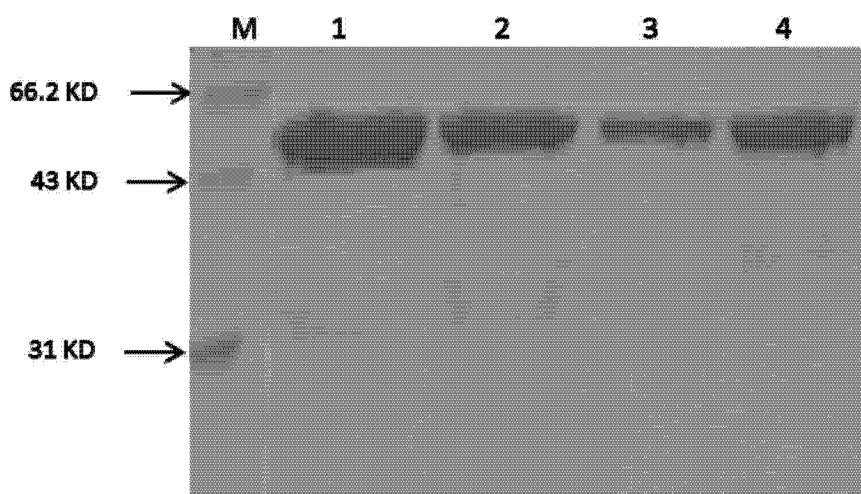


图 10

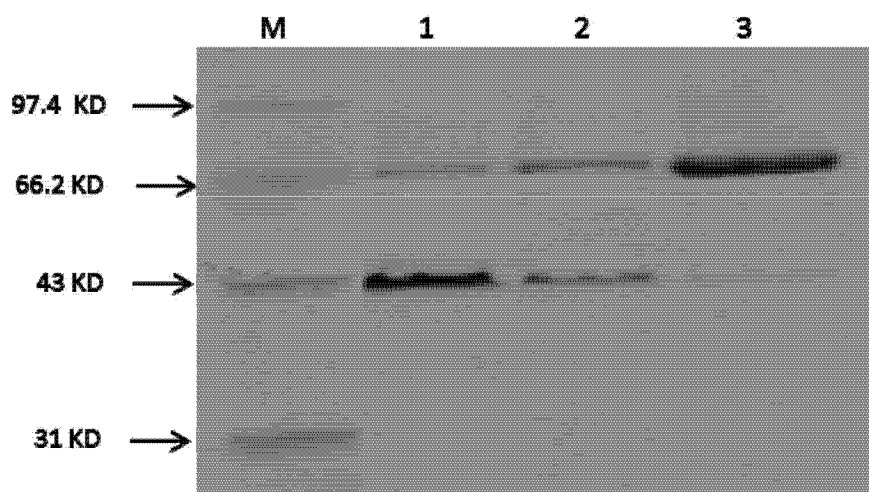


图 11A

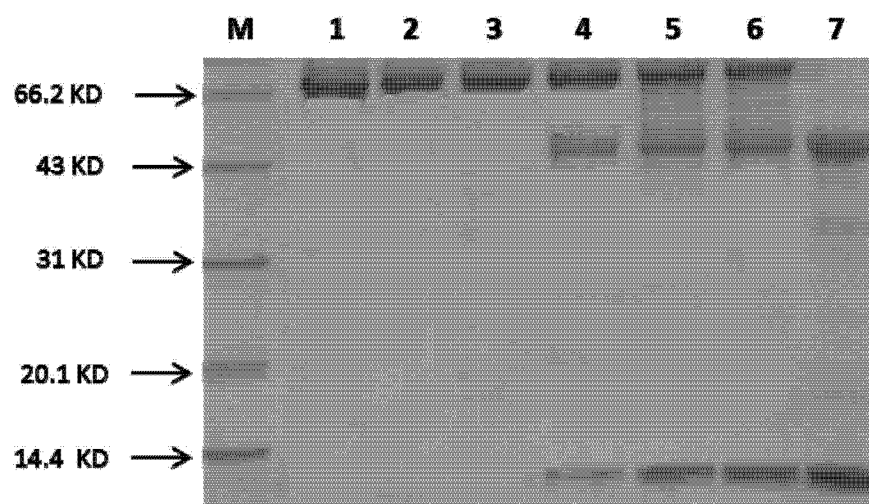


图 11B

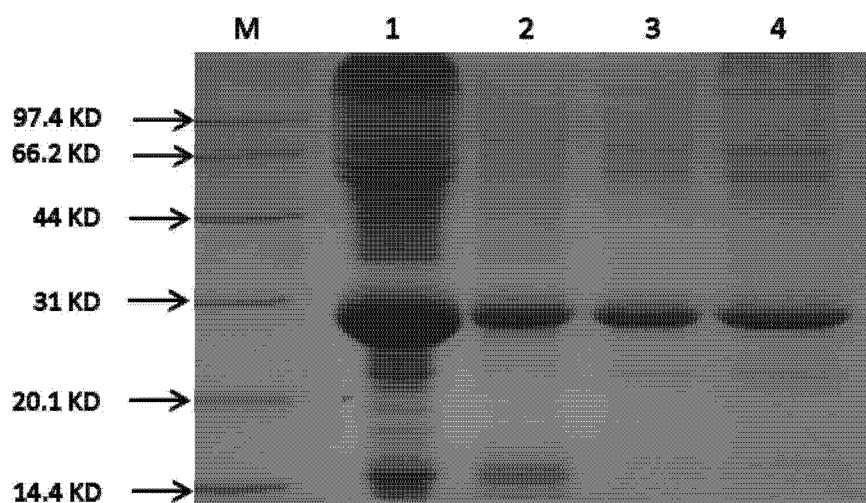


图 12

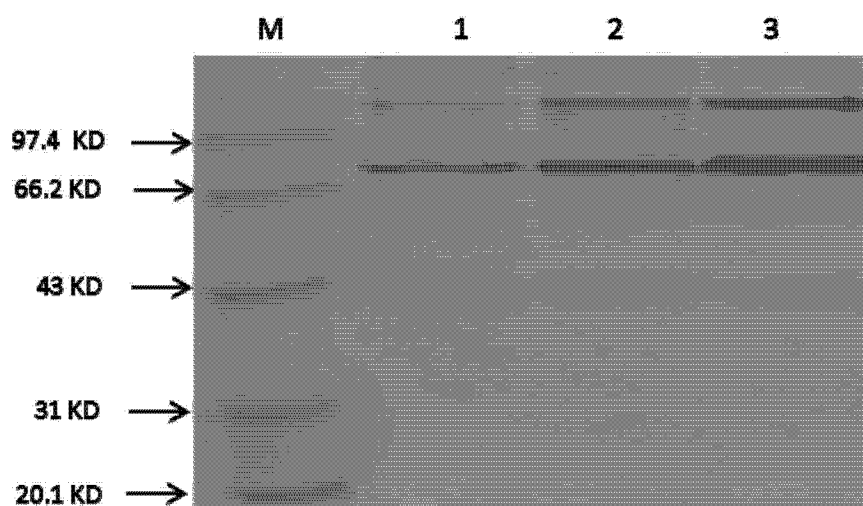


图 13

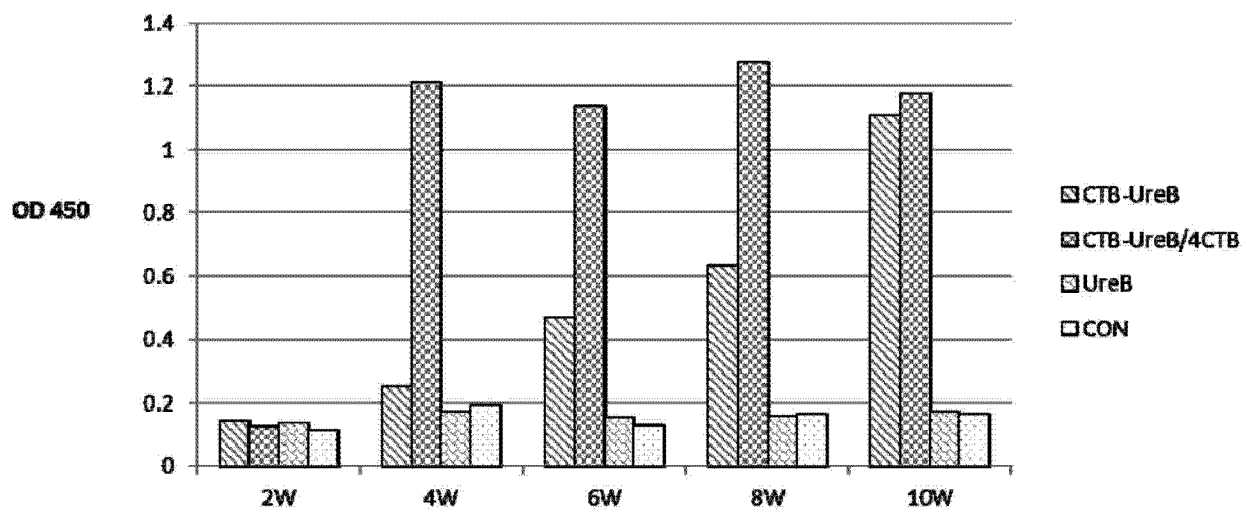


图 14

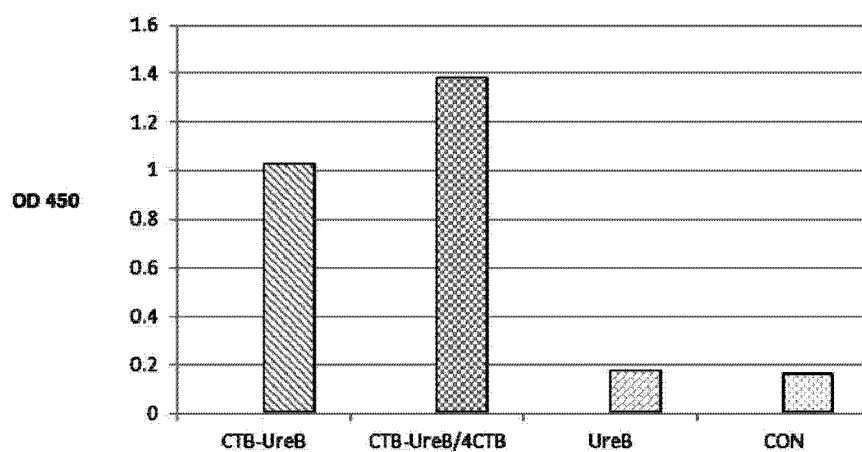


图 15

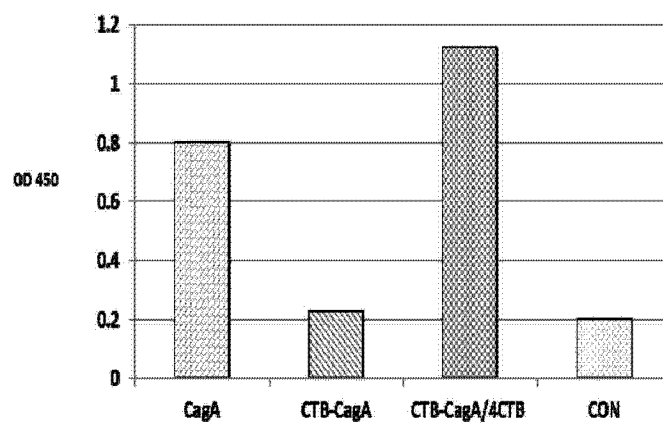


图 16

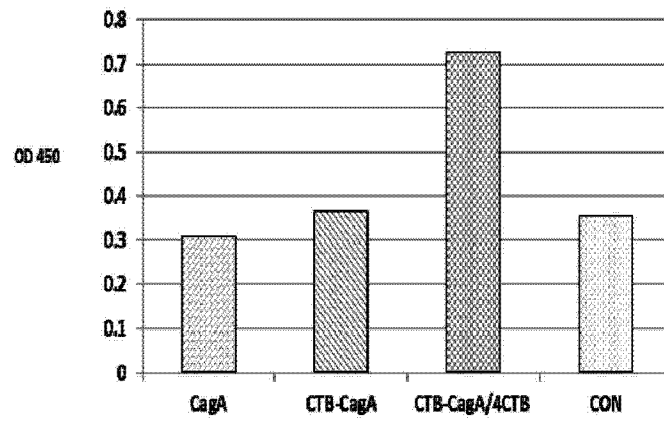


图 17

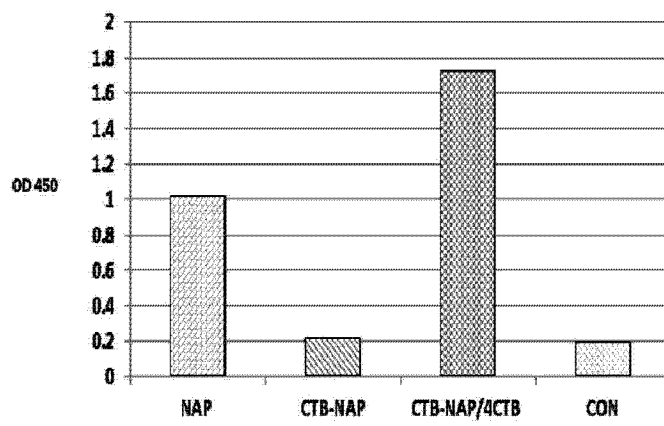


图 18

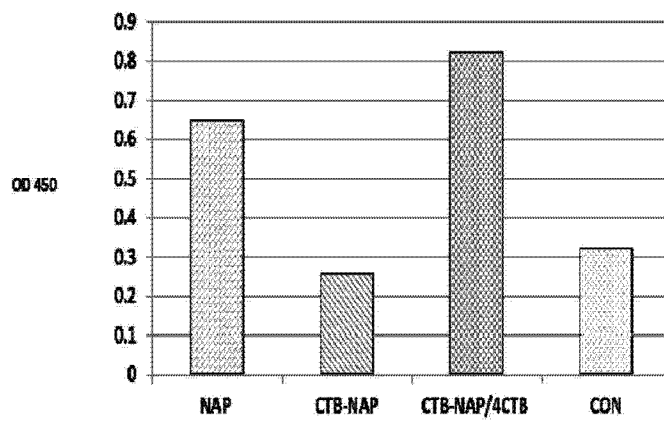


图 19

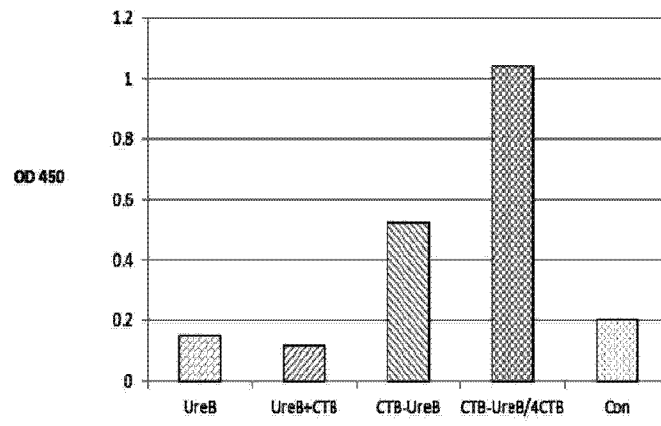


图 20

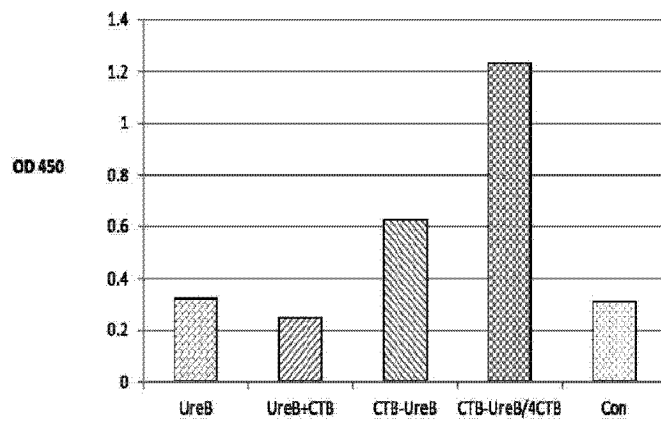


图 21

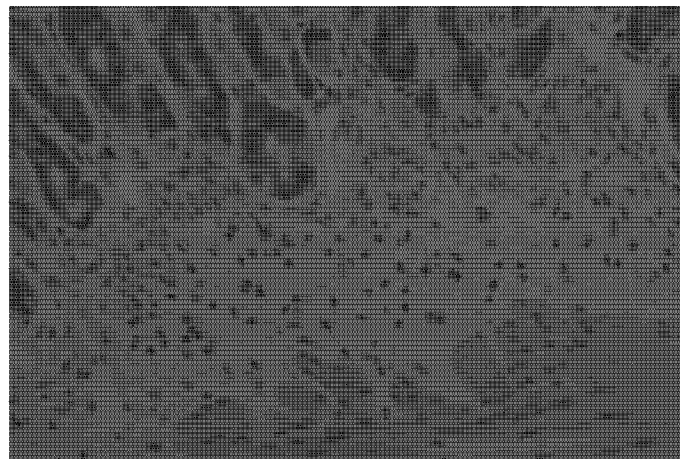


图 22A

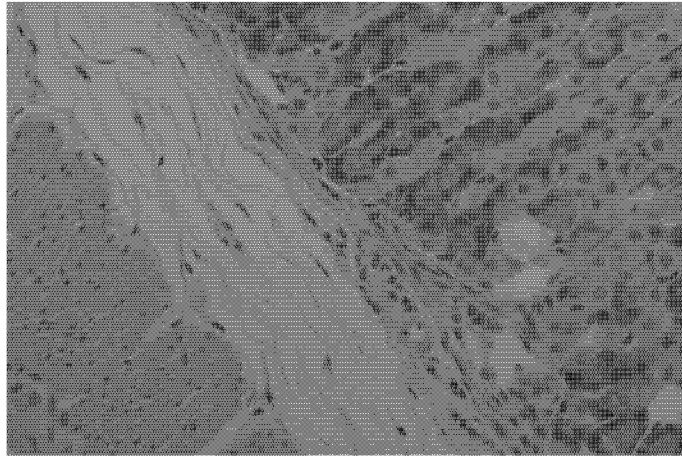


图 22B

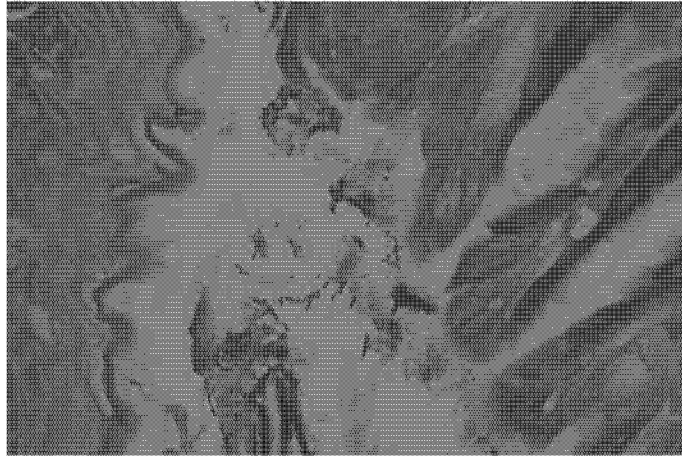


图 22C

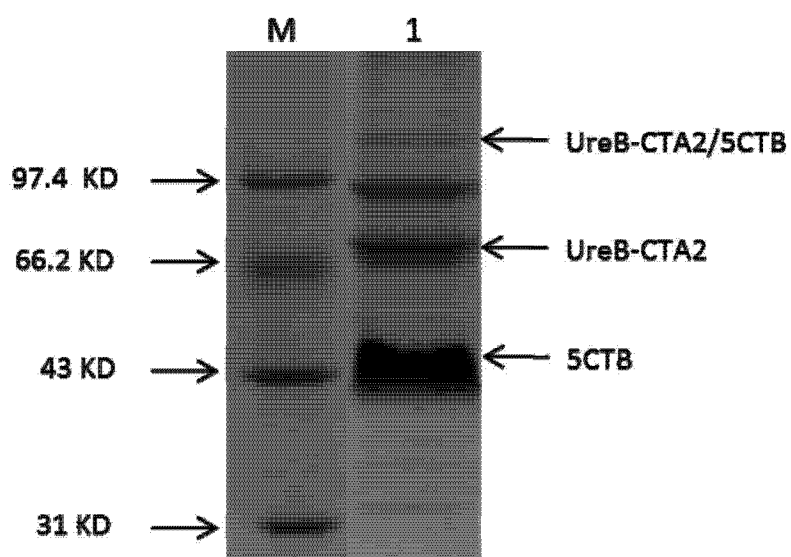


图 23A

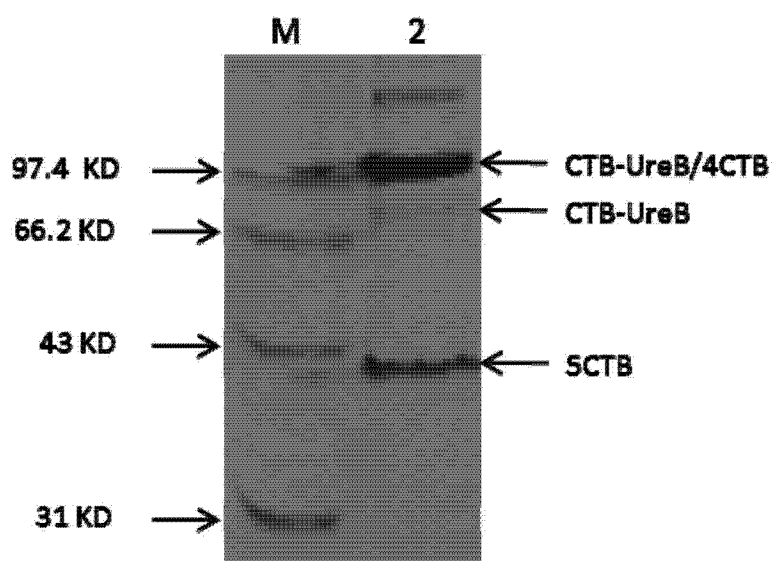


图 23B