



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101861166 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 13

(21) 申请号 200880024159. X

代理人 龚燮英

(22) 申请日 2008. 04. 29

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

2007117342 2007. 05. 10 RU

*A61K 39/04* (2006. 01)

*C12P 21/00* (2006. 01)

*C12N 1/21* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 01. 11

*G01N 33/531* (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/RU2008/000270 2008. 04. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02008/140353 RU 2008. 11. 20

(71) 申请人 百特有限公司

地址 俄罗斯莫斯科

(72) 发明人 尼古拉·尼古拉耶维奇·丝里奇凯

(74) 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有限公司 11246

权利要求书 1 页 说明书 11 页 序列表 7 页  
附图 6 页

### (54) 发明名称

展示形成对抗结核分枝杆菌 H37 Rv 的细胞免疫性质的制剂、其(变体)制备方法、重组菌株及用于结核病诊断的制剂

### (57) 摘要

本发明涉及生物药学、制备生物化学医学领域,尤其涉及由微生物制备的基于结核性络合物制剂,其能够用于肺结核的预防、治疗和诊断。在组合物中包括对人、动物和环境无害的重组 2-9XL 约氏不动杆菌菌株,及其染色体、染色体 DNA 片段。肺结核 H37 Rv 能够同时人工合成若干蛋白质用于在细菌外膜和包膜中形成稳定的种特异性的结核性糖蛋白。不使用重组 2-9XL 菌株,而使用标准培养基,种特异性结核络合物合成的稳定性,稀释和纯化结核性络合物的经济性和易于实施使所述微生物潜在生产试剂体现的特能够性形成 T 和 B 细胞免疫来对抗 M. 肺结核病原。

1. 重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌 VKPM-9312, 为型特异性糖蛋白结核配合物结核分枝杆菌 H37 Rv (TB- 抗原) 的生产者, 其被保藏在工业微生物遗传和选择研究所。

2. 生产型特异性糖蛋白结核配合物结核分枝杆菌 H37 Rv (TB- 抗原) 的方法, 其特征在于重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌的培养物在菌种生长培养基在 32°C 发酵 2-3 天、通过生理溶液洗掉, 离心所产生的细菌悬浮液, 使通过 NaOH 溶液处理至 pH6.0-9.0 的残余物在 15-16 小时内 在 4°C 悬浮于水中, 离心所产生的悬浮液, 残留物通过 NaOH 溶液重复处理, 并且将含有菌株 2-9XL 的溶解细菌荚膜的上清液通过 0.5N TCA 溶液中和至 pH6.0, 离心, 以及向所述悬浮液中添加 0.5N TCA 溶液至 pH3.0-3.5, 将所述溶液保持 15-15 小时以产生 TB- 抗原的配合物, 此时, 在通过 NaOH 溶液重复处理的一部分残留物的情况下, 含有 TB- 抗原配合物的第一和第二溶液以所述顺序通过 TCA 溶液中和, 在 TCA 处理之后沉淀, 离心并将所产生的含有 TB- 抗原的残留物溶解在 PBS 缓冲液中, 合并溶液并通过在 Sephadex G-200 分馏凝胶过滤或通过离子交换层析进行纯化, 洗脱物含有分子量为 55.0 至 75.0KDA 的精制 TB- 抗原和 20 至 50% 的可利用碳水化合物。

3. 生产型特异性糖蛋白结核配合物结核分枝杆菌 H37Rv (TB- 抗原) 的方法, 其特征在于重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌的培养物在菌种生长培养基在 32°C 发酵 3 天、通过生理溶液洗掉, 离心所产生的细菌悬浮液, 使通过 NaOH 溶液处理至 pH6.0-9.0 的残余物在 15-16 小时内 在 4°C 悬浮于水中, 离心所产生的悬浮液, 残留物通过 NaOH 溶液重复处理, 并且将含有菌株 2-9XL 的溶解细菌荚膜的上清液通过 0.5N TCA 溶液中和至 pH6.0, 添加硫酸铵至 30% 饱和度, 保持在 4°C, 离心, 向所述上清液中添加硫酸铵至 100% 饱和, 保持在 4°C, 此时, 由 NaOH 溶液重复处理的残留部分借助 TCA 进行中和, 并且将 100% 硫酸铵饱和之后产生在上述顺序两种残留物中的硫酸铵沉淀溶解在 PBS- 缓冲液 pH7.0 中, 用大量 PBS 缓冲液透析, 合并含有 TB- 抗原的浓缩溶液并通过在 Sephadex G-200 进行凝胶过滤分馏或通过离子交换层析进行纯化, 洗脱物含有分子量为 55.0 至 75.0KDA 的精制 TB- 抗原和 20 至 50% 的可利用碳水化合物。

4. 形成对抗结核分枝杆菌 H37 Rv 的 B- 和 T- 细胞免疫的工具, 其含有通过菌株 2-9XL 约氏不动杆菌生产的型特异性糖蛋白结核配合物 (TB- 抗原) 结核分枝杆菌 H37 Rv, 其特征在于 pt. 1。

5. 诊断结核病的工具, 其含有通过 pt. 2 下的方法生产的型特异性糖蛋白结核配合物 (TB- 抗原) 结核分枝杆菌 H37 Rv。

## 展示形成对抗结核分枝杆菌 H37Rv 的细胞免疫性质的制剂、其（变体）制备方法、重组菌株及用于结核病诊断的制剂

[0001] 本发明涉及生物药理学、制备生物化学和医学，具体而言涉及一种制剂，其基于由微生物产生的结核配合物 (tuberculous complex) 并且其可以用于结核病预防、治疗和诊断。重组 2-9XL 约氏不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*) 菌株——其对人、动物和环境无害，在其染色体组成中包括染色体 DNA *M. 结核* (结核分枝杆菌) H37Rv 的片段 (一个或多个)，这使得能够同时合成几种蛋白质，以在细菌的外膜和荚膜物质中形成稳定的种特异性结核糖蛋白配合物。重组 2-9XL 菌株的使用便利性、标准培养基的应用、种特异性结核配合物合成的稳定性、释放和纯化该结核配合物的成本有效且安全的实践使得所述微生物成为潜在的制剂生产者，所述制剂展示出形成对抗 *M. 结核* 创造者的 T- 和 B- 细胞免疫的特性。

[0002] 本发明涉及生物药理学分枝、制备生物化学、医学，并且其关注基于由微生物产生的结核配合物的工具的开发，其可以用于治疗和诊断结核病。

[0003] 解决结核病问题的一个重要部分是生产生物疫苗并开发快速且便宜的诊断方法。显而易见的是，所需的是在结核病介质 (tuberculosis agent) 中鉴定它们形成的这些蛋白质和配合物，其满足实现这些目的的最新要求。生物疫苗的原则标准是它们对人的安全性以及高效性，诊断制剂的原则标准是敏感性和特异性。所述问题的解决方案的主要方向如下：a) 在安全受体中基因克隆分枝杆菌并研究所产生的结核蛋白的特性，b) 从分歧杆菌产生具有下述性质规格的蛋白质和它们的配合物。

[0004] 在文献中描述了在受体细菌大肠杆菌 (*E. coli*) XL1-Blue 中形成基因组文库 *M. 结核* H37Ra 和结核病介质染色体 DNA 的转移片段的装置。其显示来自染色体 DNA *M. 结核* H37Ra 的某一片段——其由 1535 个碱基对组成并且在 pZx7 质粒载体的结构中，并且合成质量为大约 52.0KDA 的结核蛋白是可能的。这种蛋白质位于外膜大肠杆菌 XL1-Blue，其使重组菌株穿透进入真核细胞 HeLa 中并在其中增殖，真核细胞 HeLa 是代表性的致病性分枝杆菌。然而作者没有指出给定蛋白质是个体的 (型特异性) 并可以被用于诊断结核病介质。反之，所检查蛋白质的氨基酸序列与病原微生物 (李斯特菌属单核细胞增多 (*Listeria monocytosis*)、志贺杆菌属 (*Shigella*)、假结核耶尔森氏菌 (*Jersinia pseudotuberculosis*)) 和一组人类蛋白例如 p-adaptyne[1] 具有同源性。

[0005] 从 *M. 结核* 培养物的滤器中产生和表征的是释放蛋白 MPT63，其分子量为 18.0KDA。对核序列 tr+63 基因的分析显示，其具有可读框，该可读框编码 159 种氨基酸的蛋白质并且由信号肽的 29 个氨基酸和成熟 MPT63 蛋白的 130 个氨基酸组成。来自细胞大肠杆菌并且自培养滤器 *M. 结核* 精制的重组 MPT63 蛋白在血清反应中是不可见的并且极大影响感染有毒菌株 *M. 结核* 的豚鼠的抗体免疫性。应当使用这种蛋白质作为诊断结核病下皮试的专属试剂，然而，直到现在，这种蛋白质以及与信号肽的蛋白配合物还没有被广泛使用 [2]。

[0006] 关于 4 个主要胞外蛋白 *M. 结核*——其产生自非病原迅速发展的分枝杆菌——的描述和规格也是已知的，其具有酶活性并也发现于致病菌株中。这些蛋白质被用于构建生

物疫苗,因为它们诱导保护性免疫,然而,直到现在它们未被认定 [3]。

[0007] 因此,迄今不存在任何基因工程微生物,其能够合成结核病型特异性蛋白质和它们的配合物,适合用于诊断学以及作为开发生物疫苗的基础。产生自致病菌株 *M. 结核* 或非致病分枝杆菌的蛋白质直到现在也没有使其基础上生产高度特异性和敏感性诊断制剂或构建生物疫苗成为可能。

[0008] 本发明目的是通过基因工程和微生物学方法生产重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌——特异性结核 *M. 结核* H37Rv 的生产者,其可以是对抗结核病介质的生物疫苗的基础以及以显示患有结核病的人在不同阶段具有不同形式的疾病的诊断剂。

[0009] 为解决所述问题,提供由基因工程方法以及接下来选择通过微生物学方法生产的重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌,其为型特异性糖蛋白结核配合物 (TB- 抗原) 的生产者,其位于外膜上并且在荚膜细菌物质中,在生产时可以被用作开发生物疫苗、诊断和药物制剂的基础。

[0010] 技术结果是产生高度特异性和敏感性制剂。

[0011] 为解决所述问题,提供了在总的发明思想下统一的一组发明。

[0012] 披露了这样的发明,其为一种制剂,该制剂具有形成对抗 *M. 结核* H37Rv 的细胞免疫的特性。该制剂含有型特异性糖蛋白结核配合物 *M. 结核* H37Rv (TB- 抗原)。

[0013] 除此之外,披露了产生型特异性糖蛋白结核配合物 *M. 结核* H37Rv (TB- 抗原) 以及重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌 VKPM-9312——型特异性糖蛋白结核配合物 *M. 结核* H37Rv (TB- 抗原) 的生产者——的变体,以及诊断结核病的工具,其含有上述型特异性糖蛋白结核配合物。

[0014] 2-9XL 约氏不动杆菌是基因 - 工程菌株,通过将载体质粒 pRT 结构中的染色体 DNA *M. 结核* H37Rv 的两个片段 (附加物 1 和 2) 转移到 R-form 土拉热弗朗西丝氏菌 (*F. tularensis*) 细菌中并且接下来选择通过微生物学方法而产生。

[0015] 迄今,在结核病介质 (TB) 的基因克隆时所使用的载体质粒结构中是细菌 - 所有者,其仅能合成特定的蛋白质 TB。TB 基因 - 工程蛋白质 (以及结核病介质的天然蛋白质) 的生产和分析还没有产生所期望的——开发生物疫苗、药用制剂、高度特异性和敏感性诊断剂。因此,世界上持续寻找新型分枝杆菌蛋白质,借助其解决上述问题是可能的。

[0016] 可能地,给定的方向可能是错误的,因为结核病介质的型特异性是在来自几种蛋白质 (不小于三种) 的配合物水平形成,它们中的一部分应当被糖酵解,其含有多糖成分。

[0017] 已显示,将载体质粒 pRT 结构中的 *M. 结核* H37Rv DNA 片段转移到受体 R-from 土拉热弗朗西丝氏菌中并且接下来通过某种微生物学方法选择转化体时,转移片段 (片段) 被嵌入细菌 - 受体的染色体 DNA 中并导致合成结核多肽。主要地,这种多肽通过与具有较高分子量的土拉菌病蛋白质连接在细菌 - 所有者中形成特异性土拉菌病 - 结核配合物。然而,给定结构对于细菌 - 所有者而言有可能是不便的,并且在进一步选择重组菌株时,具有较高分子量的 TB- 蛋白质合成开始,其取代土拉菌病蛋白质。

[0018] 在细菌中的这样严重的“重建”情况下,改变的不仅仅是重组微生物的生物化学和表型特性 (通过一组特性,其变得像结核分枝杆菌),而且改变是 DNA- 细菌的结构。

[0019] 通过分析 16S RNA 属于“Ekha”菌株 (2-9XL) 结论的类型在工业微生物遗传和选择研究所制得。

[0020] 序列分析 16S pRNA 显示以“Ekha”(2-9XL)披露的检查菌株是指约氏不动杆菌细菌类型,在菌株约氏不动杆菌菌株 42 的情况下,同源性达 99%。

[0021] 菌株 2-9XL 约氏不动杆菌——一种优良的重组结核抗原生产者——的主要特性。

[0022] 培养-形态学特性:在光学显微镜下(图 1. A-B. 细菌 2-9XL 约氏不动杆菌的光学显微术。在革兰氏下的染色反应(“Serva”公司的颜色集合)。培养物 2-9XL 约氏不动杆菌在 +32°C 在三天内生长在土拉菌病培养基(含有 1%葡萄糖和添加剂的 FT-琼脂, pH 6.6)上。A-UV 100HZ... ;V-100H9, HZ...(显微镜“Biomed-2”,俄罗斯)。在所呈现的图中,可清楚地看出,重组细菌 2-9XL 稳定地脱色并且倾向于聚集(粘附)。细菌荚膜被番红精染成红色;细菌是不动的多肽小球状和杆菌细胞,其大小为 0.4-1.0μm。在革兰氏下染色细菌抵抗脱色,其显示革兰氏阳性染色的。它们形成大小和形状不同的细胞聚集体,这表明它们的聚集(粘附)水平高。细菌聚集与形成特异性荚膜相关,其被番红精充分染色。在损失重组结核抗原时,细菌变差革兰氏阴性的。

[0023] 菌株 2-9XL 需氧菌于 +32°C 在简单和饱和培养基(营养缺陷型)上发育,尽管其可以在 +28°C 至 +37°C 的区间生长。在细菌在简单培养基上生长时,培养物停止合成重组结核抗原。2-9XL 的必需生长因子是半胱氨酸。对于含有重组结核抗原的特异性荚膜的最大合成而言,优选具有维生素和其它添加剂的饱和培养基。

[0024] 作为细菌生长和形成特异性荚膜的刺激物,添加到高压灭菌细菌 2-9XL 和(或)10%高压灭菌荚膜物质的培养基 1%悬浮液中是可能的。生长重组菌株 2-9XL 最合适的是培养基,其用于生长土拉菌病、圣西巴斯提恩(氏)病、布鲁氏杆菌病等。在培养基上的细菌接种在恒温器中保持两天至多达七天。在生长细菌 2-9XL 时,存在特定的、典型的、无刺激性气味。2-9XL 菌株在液体培养基上不能很好地生长并且迅速缺乏生产重组结合抗原的能力。

[0025] 在固体培养基 2-9XL 上,细菌形成淡黄色灰白色的菌落。在滴定培养物以分离隔离菌落时,生长延迟多达两天是可能的。因为它们正在生长,所以菌落可以具有 5-7mm 的直径。如果接种板载冰箱(+4°C)中保持 2-3 天,则菌落变成主要是灰黄色。菌落以不平滑的边缘隆起,其是无光泽不透明的,当成环时,菌落具有固体稠度,易于从培养琼脂表面移走。在固体培养基上滴定 2-9XL 培养物时,由于细胞具有很强的粘附能力(自发凝集),制备标准悬浮液是不可能的,因此细菌滴定度与标准培育不相应(图 2. A-C. 2-9XL 约氏不动杆菌的培养-形态学特性。重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌的分离菌落,在具有半胱氨酸和 1%葡萄糖的 pH 6.6 的 FT-琼脂上于 +32°C 生长三天。在冰箱(4°C)中保持五天。A-普通背景;B-C-白色背景。C-是培养皿的扩大部分。

[0026] 2-9XL 菌株的种群稳定性。

[0027] 在固体培养基上顺序接种时,在各种温度范围下生长,在亲液干燥条件中保持之后,在使隆起用培养基营养特性变差以及其它不利条件下,菌株 2-9XL 变得不稳定并且以其它形式离解。在分离菌落长时间升起之后离解更显著(图 A-C. 培养物 2-9XL 约氏不动杆菌在培养-多形态标记上的离解)。

[0028] 具有离解培养物 2-9XL 的培养皿。具有不同形态的菌落在培养滴定下从亲液干燥条件,含有 1%葡萄糖、半胱氨酸、pH6.6 的 FT-琼脂生长,在 +32°C 温育时间为 10 天,在冰箱(+4°C)中保持。

- [0029] A- 培养皿在白色背景上照相。
- [0030] B- 在灰色背景上取培养皿
- [0031] C(1-5)- 具有各种形态的菌落 2-9XL 的增强的培养皿部分。
- [0032] C(1)- 大的、圆形的、白色的、不透明的、平坦的具有隆起中心和平滑边缘的光泽菌落,通过成环其易于从琼脂移走;
- [0033] C(2)- 小的、圆形的、灰黄色、不透明的具有平滑边缘的无光泽菌落,通过成环其易于从琼脂移走;
- [0034] C(3)- 中等大小的、圆形的、灰-黄、白色不透明的具有充分隆起的可见中心以及在平滑边缘中的表达卷轴 (expressed roller) 的无光泽菌落,易于从琼脂移走;
- [0035] C(4)- 中等大小的、非圆形的、黄色、不透明的具有充分可见的隆起中心、不平滑表面和边缘、无光泽菌落,通过成环其易于从琼脂移走;
- [0036] C(5)- 大的、非圆形的、灰黄色、不透明的具有可见隆起中心、不平坦表面和边缘、无光泽菌落,通过成环其易于从琼脂移走)。2-9XL 菌株的生物化学特性。在固体培养基上生长下的细菌裂解蛋白质,同时散发特定的无刺激性气味。在饱和营养培养基上生长时,能够合成重组结核抗原。氧化酶阳性和过氧化氢酶阴性。
- [0037] 重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌的生物化学特性未被详细研究。
- [0038] 免疫特性。2-9XL 细菌具有非常高的粘附性(凝集能力)。(见图 1. A-B)。而且不可能检查它们在凝集反应中的凝集能力。
- [0039] 在利用实验血清的免疫扩散 (RID) 和免疫电泳反应中,其在有毒结核菌株 M. 结核 H37Rv 的超声分枝杆菌粉碎机上产生,重组细菌 2-9XL 的抗原不形成沉淀线。其可能是由于抗原对重组 TB- 抗原仅在人体或动物的感染发育过程中出现,并且它们不具有大的滴定度。在于培养基上培养分枝杆菌以及它们的巢由于丙酮(或其它有害细菌制剂)失活的情况下,这种抗原被破坏,并且因此无特异性抗体不能产生。
- [0040] 在免疫酵素分析 (IFA) 中,在细菌中的 TB- 抗原超声分裂,并且以精制形式与患有结核病的人的血清抗体相互作用,而不与健康人的血清中的抗体相互作用。在免疫印迹中, TB- 抗原不与患有结核病的人的抗体反应,因为其未转移到硝化纤维素膜。
- [0041] 关于特定类型的噬菌体。对于重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌,直到现在未检测到合适的噬菌体。
- [0042] 遗传特征。在染色体 DNA 结构中的菌株 2-9XL 约氏不动杆菌含有最少一个染色体 DNA M. 结核 H37Rv 的片段嵌入,但是两个嵌入也是可能的(附加物 1 和 2)。
- [0043] 生产力。重组菌株 2-9XL 是糖蛋白质质的结核抗原 (TB- 抗原) 的生产者。合成自染色体 DNA M. 结核 H37Rv(见附加物 1) 片段的蛋白质在外膜上形成细菌 2-9XL 以及在其荚膜物质中形成型特异性糖蛋白配合物(图 4)。在生产细菌的超声分解 (USD) 时,这种配合物参与其中,并且以几种蛋白质的形式可得。在通过三氯乙酸浓缩 USD 时, TB- 抗原的蛋白质被收集到特异性重组结核配合物中。在从细菌 2-9XL 节约生产重组 TB- 抗原时,其在变性 SDS-PAAG 中的分子量在 55.0 至 75.0KDA 的间隔内(图 4)。
- [0044] 对于所述的糖蛋白配合物,实验室动物具有对抗 M. 结核 H37Rv 的已形成的连续且紧张的 B 和 T 免疫。在研究重组 TB- 抗原的抗体生产 (B- 细胞免疫的形成) 时,使豚鼠和兔免疫,以便生产超免疫血清。对于免疫接种,使用了重量 2.5-3kg 的兔。与等体积的 Freund

不完全佐剂混合、浓度为 1mg 的 1ml TB- 抗原被皮下注射到背部和 shovel 区域。在一周间隔和双倍剂量增加的情况下重复免疫接种三次。在第一次免疫接种周期结束后,在 4 周内制剂的重复肌内注射,从 2mg 开始并增加剂量至 8mg。豚鼠以 300mcg/ml 剂量的 TB- 抗原以及 Freund 不完全佐剂被皮下免疫接种至背部和 shovel 区域。在三周内,重复注射制剂。

[0045] 在最后注射 TB- 抗原之后在 21 天内评价实验室动物的抗体反应。为了进行评价,采血,产生血浆,并且在扩散性沉淀作用限制中以及通过免疫酵素法测试可得特异性 TB- 抗原。已显示在第一次制剂注射之后特异性抗体已经产生。在进一步的注射中,血清中的抗体滴定度增加。在免疫周期结束后,产生了具有高 TB- 抗原含量的超免疫血清。在针对免疫进行的利用 TB- 抗原的免疫酵素分析中,豚鼠的抗体滴定度是 1 : 6400,兔的抗体滴定度是 1 : 409600 及以上,因此在扩散性沉淀作用反应中滴定度是 1 : 8 和 1 : 16-1 : 32。

[0046] 因此,在动物体内可得的重组 TB- 抗原导致在 B- 类型下重建它们的免疫系统。连续可得 TB- 抗原或其重复注射产生免疫系统的稳定重建,这通过特异性抗体在动物血清中的滴定度扩大来证实。

[0047] 结核人群和细菌携带者具有特异性 B- 细胞免疫,其由免疫酵素试验体系 (IFA) 中的 TB- 抗原、硝化纤维素滤器 (免疫印迹,斑点印迹) 上的 TB- 抗原以及利用含有特异性抗体的临床液体 (血清、黏痰、胸膜液、背 - 脑液等) 的其它反应中的 TB- 抗原定义。

[0048] 对于可得特异性抗体的结核人群和健康人群的测试血清样本提供在表中。

[0049] 在 T- 细胞免疫的形成中测试 TB- 抗原的比活性通过结核性取样豚鼠进行。为进行测试,豚鼠组被注射结核活菌素 BCG (皮内注射在 0.2ml 稀释流体中的 0.5mg) 和有毒菌株结核分枝杆菌 H37RV, R1RV 的微生物细胞悬浮液以及非典型菌株堪萨斯分枝杆菌 (*M. Kansassi*)、海分枝杆菌 (*M. marinum*) (腹膜内,剂量为每只动物 10<sup>6</sup> 给微生物细胞)。在注射之后 4 周内,使用观察和测试的豚鼠。

[0050] 为了在一般程序下取样曼塔斯试验 / 关于使用结核精制干燥变应原用于经皮、皮下和皮内应用的指示 (干燥精制结核菌素)。在莫斯科卫生部 USSR 下的医疗 - 预防帮助的主要给药。1986 年 8 月 11 日 /5 个制剂浓度,经皮注射,在 100mc1 稀释流体中在普通蛋白质上产生 10mcg。在 24 小时内以毫米计算形式为局部反应的延迟类型的特异性变态反应像细胞浸润 (丘疹)。比较的制剂是由 RAO “BIOPREPARAT” 生产的干燥精制结核菌素 (精制干燥结核菌素),圣彼得堡疫苗和血清研究所 -PPD-L-2 (皮内注射剂量是 -25TE)。

[0051] 用于菌株贮存和维持的培养基条件和结构。菌株 2-9XL 不动杆菌属的博物馆培养物在温度 +4°C 下在含有葡萄糖和半胱氨酸添加剂的 FT- 培养基原料上保持可达 2 个月,并且在亲液干燥条件下在蔗糖 - 明胶培养基中可达 5 天。

[0052] 发酵培养基。重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌于 +32°C 在具有葡萄糖和半胱氨酸的固体 FT- 培养基上发酵。

[0053] 发酵时的技术特性。重组菌株 2-9XL 在液体培养基中生长不良并且迅速缺乏生产的 TB- 抗原能力。因此,仅在固体生长培养基上制备用于 TB- 抗原进一步发育的生物物质增加。

[0054] 基质培养物在 +32°C 斜面生长 2-3 天,然后通过生理溶液洗掉细菌,并且 1-2 个床垫从一个斜面被接种。使床垫在恒温器中在 +32°C 温育 3-4,然后通过蒸馏水洗掉隆起的生物物质,并且所述生物物质通过萃取从菌种生长培养基的可溶性组分中释放。从清除了菌种生

长培养基组分的生物质中开始生产重组 TB- 抗原。

[0055] 本发明通过接下来是实施例阐述。

[0056] 实施例 1. 从重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌生产型特异性糖蛋白结核性配合物 (TB- 抗原)。

[0057] 在 pH6.6 的固体菌种生长培养基 (斜面) 上, 该培养基含有相应比例的心-脑琼脂 (cardio-cerebral agar)、水解血红蛋白、半胱氨酸和葡萄糖, 或者在添加半胱氨酸和葡萄糖的 FT- 琼脂 pH6.6 (由 FSUE SSC AM 生产, Obolensk, 俄罗斯) 上, 通过成环接种培养物 2-9XL。使接种物在恒温箱中于 +32°C 温育 2 天。通过生理溶液洗掉两天的培养物, 并制备浓度为  $5 \times 10^9$  个微生物细胞 (mc) / 毫升的细菌悬浮液。[制备 2-9XL 细菌悬浮液是困难的, 因为培养物在烧瓶中被洗掉, 其在混合时难于分离]。为制备大量生物质, 所制备的悬浮液以每 1-2 培养床 (mattress) 一个斜面被接种在培养床上 (将 400.0ml 菌种生长培养基倒入一个培养床中)。将接种物在恒温箱中于 +32°C 温育 2 天。用 30ml 生理溶液将三天的培养物 2-9XL 从一个培养床洗掉。

[0058] 从洗掉的培养物悬浮液中制备用于光学显微镜的涂片, 并且在革兰氏下使其染色。[重组菌株 2-9XL 的细菌种群在菌种生长培养基结构中轻微变化、温度或其它条件可以迅速以不生产 TB- 抗原的形式离解。在革兰氏染色下, 这些细菌是革兰氏阴性的, 为 TB- 抗原生产者的细菌耐受脱色作用并且看起来像是革兰氏阳性的 (见图 1. A-B)。在隆起的生物质 2-9XL 中, 革兰氏阴性细菌的量不超过 5-10% ]。从培养床洗掉的细菌的悬浮液在 9000 转 /min 在 30 分钟内萃取 (“Beckman”G2-21, USA)。弃掉含有菌种生长培养基的可溶性组分的悬浮液, 并将残余物悬浮于 40ml 去离子水中, 并且所有接下来的步骤在 +4°C 下进行。进一步的是通过 NaOH 溶液处理 2-9XL 0.5N 培养物, 使 pH 从 6.0 增加到 9.0。此时将含有型特异性重组 TB- 抗原的细菌荚膜以小份单独溶解并且在几小时内谨慎混合悬浮液。以此种方式处理的细菌悬浮液被留在冰箱 (+4°C) 中过夜 (15-16 小时)。

[0059] 第二天将该细菌悬浮液 2-9XL 在 12000 转 /min 离心 40 分钟。将含有重组菌株 2-9XL 的溶解荚膜的水部分与残留物分离。由于荚膜不完全溶解, 因此以相同的顺序重复碱处理残余物的步骤。

[0060] 荚膜制剂 2-9XL 的第一萃取部分用 0.5N 三氯乙酸 (TCA) 溶液进行冷中和至 6.0, 并且因为其含有大量细菌, 使其在 15000 转 /min 离心 40 分钟。弃掉残余物, 并用 0.5N TCA 使上清液酸化至 pH3.0-3.5。此时, 以配合物收集 TB- 抗原并开始沉淀。将制剂留在冰箱 (+4°C) 中过夜 (15-16 小时)。在该溶液中放置过夜的 TCA- 残余物可以被保持在 +4°C 下多达两星期, 而不损失其中的 TB- 抗原的比活性。制剂的第二部分被留置在冰箱中过夜以形成 TB- 抗原残留物。

[0061] 第三天含有放置残留物的第一制剂部分在 9000 转 /min 下离心 30 分钟。弃掉上清液。将每个培养床的残留物溶解在 1-2ml PBS- 缓冲液 (0.0067M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.0067M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.138M NaCl、0.0027M KCl pH7.0) 中。在 PBS- 缓冲溶液中, 主要存在型特异性 TB- 抗原 (见图 4A), 其已经显示其比活性, 但是需要另外的澄清。

[0062] 留置过夜的第二制剂部分要重复所有所需的步骤 (通过 0.5N TCA 中和至 pH6.0, 从静止细胞释放, 通过 0.5N TCA 酸化至 pH3.0-3.5, 以及含有放置残留物的溶液被留置过夜)。放置过夜的 TCA- 残留物可以被贮存在 +4°C 下达两周, 而不损失其 TB- 抗原的比活性。

[0063] 第二天将第二部分的制剂溶解在 1-2ml PBS- 缓冲液中。其主要含有型特异性 TB- 抗原。

[0064] 通过上述方法生产的可用 TB- 抗原 SDS-PAAG 电泳凝胶上显示 (图 4A)。

[0065] 合并第一和第二部分的 TB- 抗原并使其经历进一步的澄清。作为所进行试验的结果,其叙述道:a) 重组型特异性 TB- 抗原位于细菌 2-9XL 的外部结构(外膜和荚膜物质)并且可以通过上述步骤进行萃取和浓缩,b) 在进行上述步骤时,重组菌株 2-9XL 的细菌实际上未被破坏,并且与溶液中的其它物质如细菌的蛋白质、脂质和多糖相比,所产生的 TB- 抗原的份额足够高。因此,可以考虑所进行的实施例是从重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌生产 TB- 抗原的最经济的方法,但是其不排除通过任何其它方法生产 TB- 抗原的装置(细菌通过超声或通过冻-融而分解,接下来浓缩 TB- 抗原)。

[0066] 实施例 2. 从重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌生产型特异性糖蛋白结核配合物(TB- 抗原)。

[0067] 在 pH 6.6 的固体菌种生长培养基(斜面)上,该培养基含有相应比例的心-脑琼脂(cardio-cerebral agar)、水解血红蛋白、半胱氨酸和葡萄糖,或者在 FT- 琼脂 pH 6.6(FSUE SSC AM 产品,Obolensk, 俄罗斯)上,通过成环接种培养物 2-9XL。使接种物在恒温箱中于 +32°C 温育三天。

[0068] 通过生理溶液洗掉三天的培养物,并制备浓度为  $5 \times 10^9$  个微生物细胞(mc)/毫升的细菌悬浮液。

[0069] 所产生的悬浮液以每 1-2 培养床一个斜面被接种在培养床(mattress)上(将 400.0ml 菌种生长培养基倒入一个培养床中)。将接种物在恒温箱中于 +32°C 温育三天。用 30ml 生理溶液将三天的培养物 2-9XL 从一个培养床洗掉。从洗掉的培养悬浮液制备用于光学显微镜的涂片并在革兰氏下染色。(测试重组细菌 2-9XL 中可得的 TB- 抗原)。

[0070] 从培养床洗掉的细菌的悬浮液在 9000 转/min 离心 30 分钟(“Beckman”G2-21, USA)。弃掉含有菌种生长培养基的可溶性组分的悬浮液,并将残余物悬浮于 40ml 冷却的去离子水中,并且所有接下来的步骤在 +4°C 下进行。此外,通过 0.5N NaOH 溶液处理培养物 2-9XL 0.5N 培养物,使 pH 从 6.0 到 9.0。此时,通过以小份添加 NaOH 并在几小时内小心混合悬浮液,单独进行溶解含有型特异性重组 TB- 抗原的细菌荚膜的步骤,并且在几小时内谨慎混合悬浮液。以此种方式处理的细菌悬浮液被留在冰箱(+4°C)中过夜(15-16 小时)。

[0071] 第二天将该细菌悬浮液 2-9XL 在 12000 转/min 离心 40 分钟。将上清液(重组菌株 2-9XL 的部分溶解荚膜,含有 TB- 抗原)与残留物(2-9XL 细菌,已经保留或没有保留荚膜)分离。通过 40ml 去离子水添加残留物,并重复荚膜溶解、生产第二制剂部分的步骤。

[0072] 所生产的荚膜 2-9XL 制剂通过 0.5N 三氯乙酸(TCA)溶液中和至 6.0,然后添加硫酸铵  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  至 30% 饱和。使溶液在 +4°C 下留置过夜,以便残留物沉淀。第二天在 12000 转/min 离心制剂 40 分钟。弃掉残留物(主要是其含有恰好的细菌和它们的大片段)。主要含有 TB- 抗原的上清液被补充硫酸铵至 100% 饱和。使制剂在 +4°C 下留置过夜,进行沉淀。

[0073] 荚膜 2-9XL 的第二制剂部分通过 0.5N 三氯乙酸(TCA)溶液中和至 6.0,然后添加硫酸铵  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  至 30% 饱和,并且使其在 +4°C 下留置过夜,以便沉淀。

[0074] 第二天,使通过硫酸铵以 100% 沉淀的 TB- 抗原沉淀制剂在 12000 转/min 下离心

40 分钟。弃掉上清液,将残留物溶解在 2.0ml PBS- 缓冲液 pH7.0 中(每一个培养床)并用大量 PBS- 缓冲液透析。

[0075] 在一天内,PBS- 缓冲液体积变化不少于三次,以从透析 sac. 中完全去除硫酸铵。

[0076] 使含有 30%硫酸铵的第二制剂部分在 12000 转/min 离心 40 分钟,并弃掉残留物,用硫酸铵使上清液饱和至 100%并在 +4°C 下留置过夜。

[0077] 第二天,使在 100%硫酸铵沉淀下沉淀的 TB- 抗原第二部分制剂在 12000 转/min 下离心 40 分钟。弃掉上清液;将残留物溶解在 2.0ml PBS- 缓冲液 pH7.0 中(每个培养床)并用大量 PBS- 缓冲液透析。

[0078] 在一天内,PBS- 缓冲液体积变化不少于三次,以从透析 sac. 中完全去除硫酸铵。

[0079] 在制剂的第一和第二部分透析之后在 PBS- 缓冲液中的可得的浓缩 TB- 抗原在 SDS-PAAG 电泳上控制(图 4B)。

[0080] 联合第一和第二部分的 TB- 抗原并进一步纯化。

[0081] 因此,从重组菌株生产并浓缩 2-9XL 型特异性糖蛋白结核配合物(TB- 抗原)是可能的,这不仅仅是通过借助三氯乙酸达到 pH3.5-4.0 而从碱性溶胞产物沉淀来实现,如在实施例 1 中所示。利用借助各种盐例如硫酸铵的 TB- 抗原沉淀方法或其它方法是可能的,洗脱物含有分子量为 55.0 至 75.0KDA 的精制 TB- 抗原以及 20%至 50%的可利用碳水化合物。

[0082] 实施例 3. 从重组菌株 2-9XL 约氏不动杆菌生产的型特异性糖蛋白结核配合物(TB- 抗原)的净化。

[0083] 在低压下利用 Sephadex G-200 作为基质,通过凝胶过滤通过分馏大分子进行特异性结合抗原 2-9X 进一步纯化。

[0084] 将通过沉淀溶胞产物 0.5N TCA 或 100%硫酸铵沉淀(实施例 2)而生产的 PBS- 缓冲液中的合并的浓缩 TB- 抗原应用于尺寸为 25×600 的柱。作为洗脱物,使用的是 50mM TRIS-HCl pH7.5 溶液,其中添加有 100mM NaCl,洗脱速度为 25ml/小时。收集峰;通过 Bradford 描述的方法测量蛋白质 [4]。总碳水化合物含量(Total carbohydrate content)通过酚染色法确定 [5]。取决于从微生物细胞的溶解荚膜中沉淀 TB- 抗原的类型(实施例 1 和 2)、所应用样本的体积和蛋白质浓度,洗脱物含有分子量为 55.0 至 75.0KDA 的精制 TB- 抗原以及 20%至 50%的可利用碳水化合物。

[0085] 将特异性结核重组抗原在亲液干燥状态下贮存于 +4°C 下。

[0086] 通过上述方法生产的可用 TB- 抗原及其结构在 SDS-PAAG 电泳凝胶中显示(图 4C)。

[0087] 生产精制 TB- 抗原是可能的,其不仅仅利用各种载体作为基质通过凝胶过滤分馏大分子,也可以通过离子交换层析。

[0088] 实施例 4. 在人类结核病诊断学中使用精制型特异性 TB- 抗原。

[0089] 在人类结核患者的潜在、慢性和急性形式下,对特定药剂 -M. 结核 H37Rv 具有特异性的抗体在他们的血液中形成,其使得通过所述症状来诊断疾病成为可能。

[0090] 为寻找特异性抗体,使用了试验系统,其恰好是具有相分离的间接免疫酶素分析,其中作为固体载体,使用的是 96-Д ля п о и с к а с п е ц и ф и ч е с к и х а н т и т е л и с п о л ь з у ю т т е с т - с и с т е м у , к о т о р а я п р

едставляет собой не прямой иммуноферментный анализ с разделением фаз, где в качестве твердого носителя используют 96-孔板。ELISA 底物是结核抗原,其通过层析分馏由重组菌株 2-9X 产生。

[0091] 向板孔中引入 100mc1 在磷酸缓冲液中的浓度为 10mcg/ml 抗原,并使它们在室温下温育 18 小时。将小细胞用含有 0.05% Tween 20 的缓冲生理溶液 pH7.2 (BPS) 洗涤三次,洗干净,并在 1 小时内补充牛血清白蛋白在 BPS 中的 1% 溶液。在三次洗涤干净之后,向板的第一条垂直线的孔中引入 100mc1 血液天然血清——其不含 1 : 200 稀释的特异性抗体 (阴性对照),以及向第三至第十二垂直线的孔引入相同体积的 BPS。

[0092] 然后向第二垂直线的每个孔中添加 200mc1 的 1 : 100 稀释的测试血清,并且通过八端自动吸管通过双重步骤对它们进行滴定,从最后一条线移走 100mc1。为稀释血清,使用的是 BFS pH 7.2。板在 37°C 温育 1 小时。作为阳性对照,使用的是具有先前已知的高滴度的特异性抗体的血清 (校准)。板孔之一 (最后一个) 被留下以控制底物,向偶联物中添加 100mc1 底物。在通过体积为 170mc1 的 BPS-0.05% Tween 20 五次将板洗涤干净而移走非结合抗体之后,添加免疫球蛋白,以用于重复结合 100mc1 拟模式 IgG 抗体与免疫球蛋白 A、M、G,其通过辣根过氧化物酶 (Sigma) 以 1 : 5000 的工作稀释结合。

[0093] 将反应混合物在 37°C 温育 1 小时,之后通过 BPS-Tween 20 洗涤细胞五次,洗干净。向 10ml 新制备的 0.1M 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲溶液 pH5.0 中的 0.04% 染色体基因 AzBTS (ApliHem) 添加 3mc1 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,制备底物溶液,并向每个孔中添加 100mc1 溶液。

[0094] 为开发染色反应,将板在 +37°C 温育 1 小时,引入 100mc1 1% SDS 以终止发酵反应,并在 Bio-Rad 公司型号 680 的垂直光度计上测量 405nm 下的吸光度值。将结果与空白垂直线孔比较,在空白垂直线孔中存在无特异性抗体的血清 (图 5)。如其在图 5 中所示,精制重组 TB- 抗原仅与结核病患者的血清抗体相互作用而不与健康人群的血清抗体相互作用。

[0095] 因此,重组 TB- 抗原 2-9XL 在固相载体上、硝化纤维素膜上以及在其它试验系统中用于诊断目的,通过其可鉴定特异性抗体,该抗体由人体产生而可利用或者产生结核病介质——M. 结核 H37Rv。由人体响应结核病介质在其中穿透和发展而产生的特异性抗体不仅可见于血浆中,而且可见于其它临床液体 (黏痰、渗出物、尿等) 中。

[0096] 响应精制重组 TB- 抗原而产生的各种动物 (兔、小鼠、豚鼠等) 的单克隆抗体或超免疫血清可用于诊断方法,以在人类的临床液体中 (黏痰、渗出物、微或组织检查材料等) 搜寻结核大细菌和特异性组分。

[0097] 上面提供的实施例提取和利用了产生自基因-工程菌株 2-9XL 约氏不动杆菌的重组型特异性结核抗原——其对人类和动物是安全的,所述实施例证明,给定的微生物作为有用的产品来源,可在公众健康和医学中广泛使用,用于诊断、预防和治疗人类结核病。

[0098] 考虑到重组菌株约氏不动杆菌 9XL 的特性,特定微生物 29.11.05 以索引 VKPMB-9312 保藏于全俄微生物菌种保藏中心 (ACIM) FSUE State RI Genetics。

[0099] 文献名单:

[0100] S. Arruda, G. Bomfim, R. Rnights, T. Huima-Byron, L. W. Riley " Cloning of M. tuberculosis DNA Fragment Associated with Entry and Survival inside Cells" . " Science" ,1993, N261 (5127), p. 1454-1457。

[0101] C. Manca, K. Lyaschenko, H. G. Wiker, D. Usai, R. Colangeli, M. L. Gennaro. " Molecular Cloning, Purification and Serological Characterization of MPT63, a Novel Antigen Secreted by Mycobacterium tuberculosis.

[0102] G. Hart, Bai-yu Lee, M. A. Horwitz. " High-Level Heterologous Expression and Secretion in Rapidly Growing Nonpathogenic Mycobacteria of Four Major Mycobacterium tuberculosis Extracellular Proteins Considered to Be Leading Vaccine Candidates and Drug Targets." Infection and Immunity " , June 1997, p. 2321-2328.

[0103] Bradford. Anal. Biochem. 72, 248 (1976), and also Anal. Biochem. 86, 142 (1978)。

[0104] F. Gerhard "Methods of general bacteriology" 1984, v. 2。

[0105] 表

[0106] 通过免疫酵素方法在不同人集合的血清样本中对抗人类结核病介质的可用抗体的诊断 (诊断方法在实施例 4 中给出)

[0107]

来自诊断组的血清样本	血清样本的数目	光密度指数(OD)		
		OD>0.6	0.3>O<0.6	OD<0.3
来自 phthisiopulmonology 的具有肺结核诊断的患者(MBT+和 MBT-)				
TB 患者 GISK (MBT+和 MBT-) (以%计)	227 (100%)	162 (71.4%)	39 (17.%)	26 (11.4%)
供体(健康人群)				
供体 GISK HIV, VHB, VHC (以%计)	45 100%	- -	6 13.3%	39 86.7%
危险组				
匿名供体 GISK (syphilis?) (以%计)	60 100%	4 6.7%	9 15.0%	47 78.3%
正规士兵, BIONOM personnel (以%计)	33 100%	2 6.1%	2 6.1%	29 87.8%
运动员 GISK (以%计)	22 100%	4 18.2%	5 22.7%	13 59.1%
学生 GISK (以%计)	20 100%	3 15%	3 15%	14 70%
具有可能的交叉反应的组				
患者 GISK (VHV+和 VHC+) (以%计)	44 100%	1 2.3%	4 9.1%	39 88.6%
已接种的 GISK VHV+ (以%计)	10 100%	1 10%	3 30%	6 60%
备注: 血清样本由以 L.A. Tarasevich (GISK)和“BIONOM” LLC 命名的国家医学和生物制剂标准化和对照研究所提供。检查了 460 个人, OD>0.6 - 表示在血清中				

[0108]

对抗结核病介质的可用的抗体; 0.3>OD<0.6 - 不确定的结果(“灰色区域”); OD<0.3 -表示没有针对结核病介质的抗体; MBT+ - “结核病”诊断通过从患者中回收到分枝杆菌而被证实; MBT- “结核病”诊断通过临床放射学方法证实。HIV - 人类免疫缺陷病毒; VHV - 乙型肝炎病毒; VHC - 丙型肝炎病毒。

[0109] 结论 :1. 从 227 个结核病患者的血清样本中,71.4%检测到对抗结核病介质 M. 结核 H37Rv 的抗体。

[0110] 在 45 个供体 (健康人群) 的血样中,没有检测到对抗结核病介质 M. 结核 H37Rv 的抗体。

[0111] 在危险组的血清样本中,对抗结核病介质 M. 结核 H37Rv 的可得抗体是 2.3%至 18.2%。

## 序列表

[0001]	<110> 百特有限公司				
[0002]					
[0003]	<120> 展示形成对抗结核分枝杆菌 H37Rv 的细胞免疫性质的制剂、其变体) 制备方法、重组菌株及用于结核病诊断的制剂				
[0004]					
[0005]	130>				
[0006]	<150>RU2007117342				
[0007]	<151>2007-05-10				
[0008]	<160>2				
[0009]	<210>1				
[0010]	<211>5321				
[0011]	<212>DNA				
[0012]	<213> 结核分枝杆菌 H37Rv				
[0013]	<400>1				
[0014]	gcgggcacca	gatcgacggt	gtcgcggccg	aggaattcgc	caccgcgctg
	cgccaggacg	60			
[0015]	gcatgctggc	gctggctcgg	ttgcagcgca	agatgcgctt	ggtcgaatct
	ccctatcgca	120			
[0016]	caccgcaaac	gctagtcggc	gggccgcgca	gtgacgcccgc	attggctgcc
	tcctccggac	180			
[0017]	gcacggcgac	cacgaaggca	atgggcaagg	gctccacca	gcaccagcac
	ttggtgcaaa	240			
[0018]	ctgaggtgcc	gcgcaagctg	ctagaggaat	ggctggccat	gtggagcggg
	cactaccagc	300			
[0019]	tcaaagacaa	actgcgcgta	cagcttcggc	cgcagcgggc	cggtcggag
	gtgctcgagc	360			
[0020]	tcggcatcca	cggcgaaagc	gatgacaagc	tcgccaacgt	gatattccaa
	ccgatccaag	420			
[0021]	atcgccgcgg	ccgcaccatc	ctgttggtac	gcgaccagaa	cacgttcggt
	gcggaactac	480			
[0022]	gccaaaagcg	gctgatgacc	ctgateccacc	tctggctcgt	ccaccgcttc
	aaggcgcagg	540			
[0023]	cggtgcaacta	cgtcacgccc	accgacgaca	acctctacca	gacctegaag
	atgaagtcgc	600			
[0024]	atggaatctt	caccgaggtc	aaccaggagg	tgggcgagat	catcgctgcc
	gaggtgaacc	660			
[0025]	accgcgcat	cgccgaactg	ctgacgcccg	atcggtggc	gctgcggaag

ttgatcacga	720				
[0026]	aggaggcgta	gccagcgctg	ccaactgtct	tgggggccaa	ccgggtgtgc
gtcagagtgg	780				
[0027]	cgcacatcgc	gaaacgcgaa	ggatgctgtc	agacggcgtc	tgcggtggcc
tgtcgaagat	840				
[0028]	ccagcgcacc	ggcgttcacc	tgcgtcggcc	cgcggtcgcg	actaccatcg
ccgccccgt	900				
[0029]	ttacggcccg	gcacccggtg	agaagaagcc	caggagcatt	tggccgatgt
tgttgacgcc	960				
[0030]	cgagttaaac	gcagcgggtga	ggtgaccaac	ggtgctcgtg	ttgttgaagc
ccgagacggt	1020				
[0031]	gttgcctagg	ttcgccacgc	ccgacgccag	ctgcccgcag	ttgtagattc
ccgagactcc	1080				
[0032]	gccttgcagc	gcgttcggca	cctggttcca	gaggcccga	atgccgggcc
gacgttgcc	1140				
[0033]	gaagccggat	gcgcttccat	cgccactggt	gaagaagccc	gaagacgggg
tggtggtgga	1200				
[0034]	gtttccgaag	cccggggcgc	tcgtgatggt	gatcgggatg	ttgatcggtc
ccaagccgcc	1260				
[0035]	gttggcggtc	aagttcaggg	gggatccggg	aatggtgaag	ccggggatcg
taaccgggct	1320				
[0036]	cgtgcccccg	ctcaacggaa	cattcaacce	aaacggatta	atcgcgaaac
cagggatcgt	1380				
[0037]	aaccgggctc	gtgccccgc	tcaacggaac	attcaacca	aacggattaa
tcgcgaaacc	1440				
[0038]	agggatcgtg	acagcgttgg	tagcaccgct	cagcgggaata	ttcaaaccga
acggattaac	1500				
[0039]	actgaatccc	tggatgccag	actccagggt	gccgccggcc	agcgtgacgc
ctaatacгаа	1560				
[0040]	tgtgctaagc	gggatggggc	cgatgtagcc	cgtgaagata	ccagcgcagt
taaacggaag	1620				
[0041]	ttcgttgaga	gtgatgttga	ccggtatcct	gatgttaate	gtaaggggga
tgcgggaaat	1680				
[0042]	agggacgccg	ggaacgggtga	tcggaccgac	accaccacgc	gcgttcaggc
tcaacggaat	1740				
[0043]	accaggaata	gtaatatacag	gcaccacaat	cggaccgaca	ccaccacgcg
cgttcaggt	1800				
[0044]	caacggaata	ccaggaatag	taatatacgg	caccacaate	ggaccgacac
caccacgcgc	1860				

[0045]	gttcaggctc gaccgacacc 1920	aacggaatac	caggaatagt	aatatccggc	accacaatcg
[0046]	accagcgcg ccacaatcgg 1980	ttcaggctca	acggaatacc	aggaatagta	atatccggca
[0047]	accgacacca tatccggcac 2040	cccagcgcgt	tcaggctcaa	cggaatacca	ggaatagtaa
[0048]	cacaatcgga gaatgctgag 2100	ccgatgccac	cattcacttc	gacgctcagt	gggatggcgg
[0049]	tgtgtctgag cgttgctgta 2160	tagccaatca	gaccctggta	atcgcccctc	cacagtatgc
[0050]	gctgcccgag cgggtgttgag 2220	atcagggcgc	cggtgttaag	gtcgccaatg	tttcccagc
[0051]	gtcgccgagg ccgtgttggt 2280	tttaggtacc	ccgtgttggc	gttgcccggg	ttgaggtcgc
[0052]	gtcgccggcg cagtgttgac 2340	ttgtagctgc	ctgtgtttag	cttcctgcg	ttgccgattc
[0053]	gttgccggtg cgggtgttgta 2400	ttgaacaggc	ccgtgttggc	gttgcccacg	ttaccaggc
[0054]	gttgccggag cgatgttgcc 2460	ttgccgatgc	cgacgtttcc	gttgccctgag	ttgaagaagc
[0055]	gttgccggag cgaatccgac 2520	ttgaagaagc	cgatgttgcc	gctgccggag	ttcagcgcgc
[0056]	ctgattgtcg cgaagccgat 2580	ccggtgagcc	cgataccaat	atttccagtg	cccgtgttgc
[0057]	gttgccgtta caaagccaat 2640	ccgatgttcg	cgaagccgta	gttgttgccg	ccgatgttcc
[0058]	gttgtgcagg tgttgctgcc 2700	gcctccgtca	accccggacc	cgtgtttgca	aacccaaggt
[0059]	gacgtttcca ttccgttgcc 2760	aaaccgaagt	tgttgcttcc	gatgtttccg	aaaccgaaac
[0060]	gatgtttccg tgtagtcgcc 2820	ctaccgaagt	tgtagctacc	gacgtttccg	ctaccacagt
[0061]	gaggtttgcg tgaataacgt 2880	ttgcccgaagt	tgagtgtgcc	gtcgttggcg	aagccgaagt
[0062]	cccacctgcg cgacgccgga 2940	gcgttgcgca	tgaagccggc	gagttggctg	tcggtgttac
[0063]	gtgaaaggcc agactgtggt 3000	gatgtegcta	ggcccagcgt	gctgggtgtg	tagaggcctg
[0064]	gccgaagttc	aagattcccg	atgtcagtgg	cccgacgtta	aggaatccgg

agttgccgag	3060				
[0065]	attcccagca	atgttccaga	agccagatcc	gcccgaaccg	acgttcccga
aacccgatgt	3120				
[0066]	gccgcccgta	ccgctgttga	agaagcccga	tgacgggggtg	gtggtcgagt
ttccgaagcc	3180				
[0067]	tggggtgccc	gcgatttcga	tcgggatggt	gatcggccccg	aggctgccgg
acacgtcgat	3240				
[0068]	gccaacggg	attgagggga	tcgtgattgg	cggggtagtg	agggggccga
tggcgccgcc	3300				
[0069]	cacatcaata	ccaacggga	ttgccggaag	tgagtagcca	tccgggaaca
ccgtaaaccg	3360				
[0070]	gcctaaccct	ccgcccacat	caatacccaa	cgggattgcc	ggaagtgagt
agccatccgg	3420				
[0071]	gaacaccgta	aacgggccta	accctccgcc	cacatcaata	ccaacggga
ttgccggaag	3480				
[0072]	tgagtagcca	tccgggaaca	ccgtaaaccg	gcctaaccct	ccaccacat
caatacccaa	3540				
[0073]	cggaatagcc	ggcaaactat	aaccaccga	taagaaggtg	atgggaccga
tttgaccact	3600				
[0074]	cactgtcacg	taatctggag	ggaatccggg	gaaaaatggc	ggaatcgcgg
gaatctcagg	3660				
[0075]	agtgccctagc	tgtatcgata	tgctaccgg	gcctatgctg	ccaacggtgg
gatttacgcc	3720				
[0076]	gaataagccg	atcgcaagcg	gagacgcggg	gatcgaaatc	gatcccacgt
taatgacctg	3780				
[0077]	gaacgccgat	agctctagcc	caatagaatt	tagagtgate	ggcgggatgt
tgatggggcc	3840				
[0078]	aacgagtgcc	ccggtactgt	tgatgcccag	cccgatggcg	ggaacagtaa
taggcggaac	3900				
[0079]	attgateggc	cccaccaacg	ctccggaact	gttaatgccc	aggccgattt
cgggaatggt	3960				
[0080]	gatggacggg	atggtgatgg	ggccgacgga	gccgaggccg	ttgaggtcta
ggccagcagc	4020				
[0081]	gggaatggtc	agtgtgccgg	agaagccgat	caagccctgg	tagtcgcctc
gccagaagaa	4080				
[0082]	gccgttgctg	tagttgccag	agttgaaatc	accggtgttg	acgttgccgg
tgtttcccac	4140				
[0083]	gccggtgttg	aggttgccgg	ggttgaagaa	gcctgtgttg	gagctgcccc
tgttgaagtc	4200				

[0084]	gcccgtgttg tgttgccgat 4260	aagctgccta	gattgaagct	gcccgtgttg	tagttgcccg
[0085]	gccagtgttg tgttgccgat 4320	gcgatgccgg	cgttgaagaa	gcccgtgttg	gcttgcccg
[0086]	accctgtgtg ccgtattgcc 4380	tagctggtac	ctgagttccc	gatgccgaag	tttccggtgc
[0087]	gatgccgatg ccgagttcca 4440	ttgccggtgc	ctgagttgaa	caagccgata	ttgccggtcc
[0088]	gccgccgaac cgttgcccgt 4500	ccctgctggt	tgctgccggt	gaggccgaag	ccgatgtttc
[0089]	gttgccgaag tgctgccgac 4560	ccgatgtttc	cgttgccggt	gttgcccaag	ccaacgttgt
[0090]	atttccaagg aaatgccaaag 4620	ccgaagtgtg	tgccgccggg	atntaggtg	cccaagttca
[0091]	gttagcggcg gatttgccag 4680	cccatctgtc	cgaagcccga	gtttgccagg	cctaagctaa
[0092]	cacacccttg ccgccaactg 4740	gaactggtga	tcgccgcggt	gacgacggcc	gccggagcgg
[0093]	ggcgggcagg ccgacgccac 4800	tctgtcagat	tctgcggcgg	cgcagtgaac	ggcgtcaggg
[0094]	cgccgatgcc acatctgttc 4860	ccggcatggt	aggccgacat	caccgacaca	tcgatggccc
[0095]	gtatgcggcc ttgagaacac 4920	tcaatgcag	cgatgcggcg	agcattctgc	ccgaagaagt
[0096]	caatgacacc tcgccgcccg 4980	aggteggagc	ggttgcccgc	caccagcggc	ggttgacca
[0097]	gacagcctcg gggcctgggc 5040	aactcggcca	cgagggccgc	ggcttgggtt	gccgaccgct
[0098]	cgctgcccg	gcaagccatc	ctaggtacgg	cgctaccgca	gcggccatcg
[0099]	cggtccgagc aggccgctgc 5160	cacgattegc	cgaccagggc	cgacgtcag	gagttgaaag
[0100]	cgaggccaat tgggttctga 5220	tccatcgcca	gttggtccca	ggcgaccgcg	gccgccgaca
[0101]	tcccgeccc aaaaattcat 5280	ccgaatatga	gggccgagtt	gatctctggt	ggcaatgttg
[0102]	ggccccgact 5321	tteccctgggt	gcaccgaatt	catggcggct	c
[0103]					

[0104]	<130>				
[0105]	<150>RU2007117342				
[0106]	<151>2007-05-10				
[0107]	<210>2				
[0108]	<211>1280				
[0109]	<212>DNA				
[0110]	<213> 结核分枝杆菌 H37Rv				
[0111]	<400>2				
[0112]	ccgtcatcaa gtagcgctgc 60	cgaattcgcg	aatgccgacg	cgctgcacca	cggcgctcgtg
[0113]	accaactcgg gggttgccgg 120	attcgtcgac	catttcgccg	gattcgggtgt	cgtaccaacc
[0114]	tcgtcctccc ggccgccgac 180	agcggatcaa	cccagtggtc	caggccagct	ccagcacgcc
[0115]	agctcgtttt gccgatttcg 240	cgacctccat	ctcgaaccgg	gtgcgtgacg	agccgtacgg
[0116]	gcgccgccga ccattgcggc 300	cgatcaccac	caggtcggcc	gggtcgacat	cgaggtcgtc
[0117]	ggcggtcggg gccaggggcc 360	gggtgaaacc	ccggggcggc	gacggcagcg	cggcgatggc
[0118]	tcggcgtcct ggccgccagc 420	cgtcgacggc	cgccgctgcc	gacatctgct	cgcgcgctt
[0119]	tcggccatgt gatcggcgaa 480	cgaggttggc	ctcggccagg	cccccggtca	ggtcggcctt
[0120]	cgcgccgcag cgccatctcg 540	ccaccttgga	ttccgcatca	cacaggtcga	gcagcagcgc
[0121]	tcggtcgagt atcgttgtgg 600	aggtggtgac	cccggcctct	tcgacggcgg	ccacgatggc
[0122]	cccacagcc gaccctgccc 660	cggtgccgcg	ggtccagccg	atgagcgcgt	gcgccaggct
[0123]	gcccaggacg cttggcttcg 720	actcggcgtg	ccagcggctc	accacggcat	ccagcgcgga
[0124]	ccgtaggegc caccacgtgc 780	cgtcgcccgc	gaacatgcca	cggttgggcg	agccgggcag
[0125]	agccgcgacg cagccgttgc 840	cgatgtegcg	ttcggcgccg	atcgtcgaca	ggccgccgat
[0126]	acggcccaca cgacaggtcc 900	gcagcacttt	catctccate	tcggcgcgcg	aaccggcctc
[0127]	ccgaccacgc	gtggcgcccgc	gaacgggaac	agcagcgtcg	gggtctgcgc

---

gtctttgatg	960				
[0128]	tgaatcgact	gcggcccaag	gctttcggtc	tgttcgggtgc	cgatccattc
	gaccagggcg	1020			
[0129]	tcgacgtcgg	agtaggacgc	catgttcgcc	gcgaccagcc	acagcgccgc
	gccgtaacgg	1080			
[0130]	gcgtggtcgc	gatacagcgt	gcggtagaac	gccagccgct	cctcgtcgag
	cttggaggtg	1140			
[0131]	gtcgcgatga	cggtggctcc	gccgtcgagc	agccgagcca	ccaccgacgc
	ggcgatcgaa	1200			
[0132]	cccttcgaag	cgccggteac	cacggcaact	tcgccgccgt	agcggccggg
	ttcggggttc	1260			

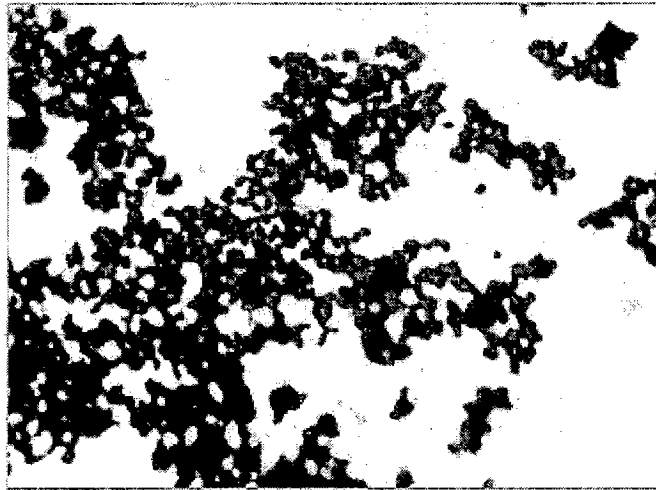


图 1

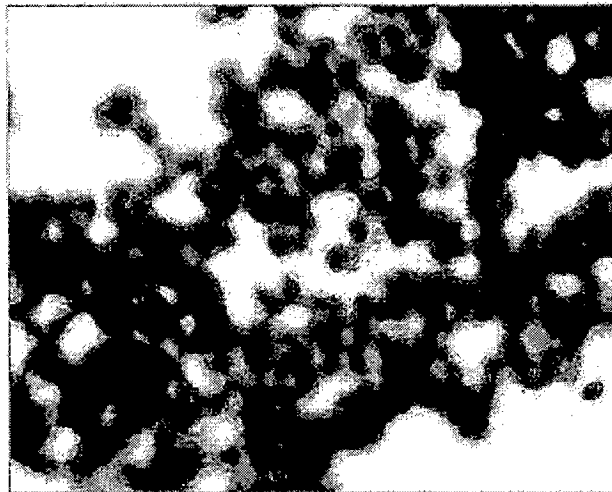


图 2

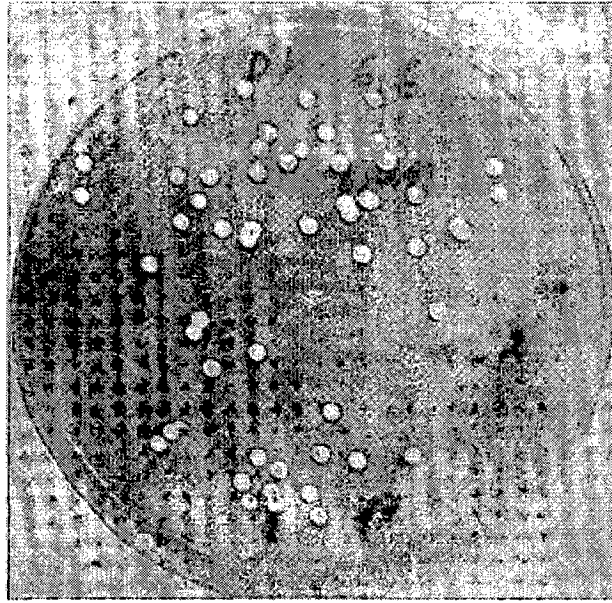


图 3

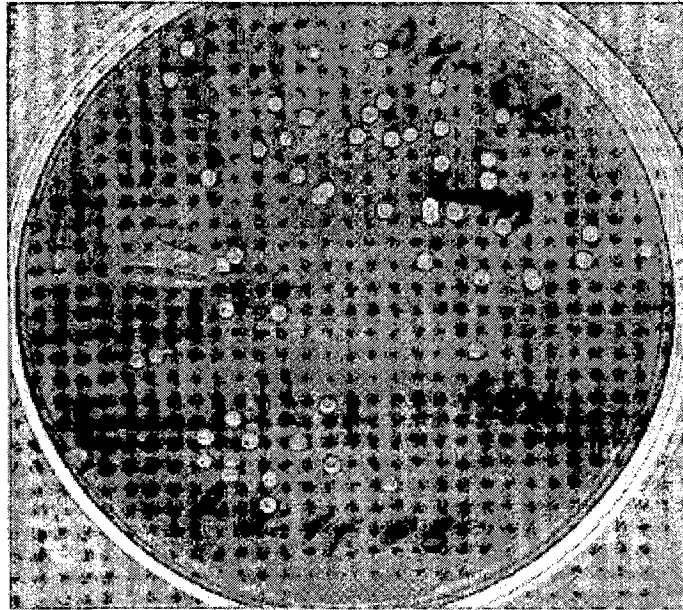


图 4

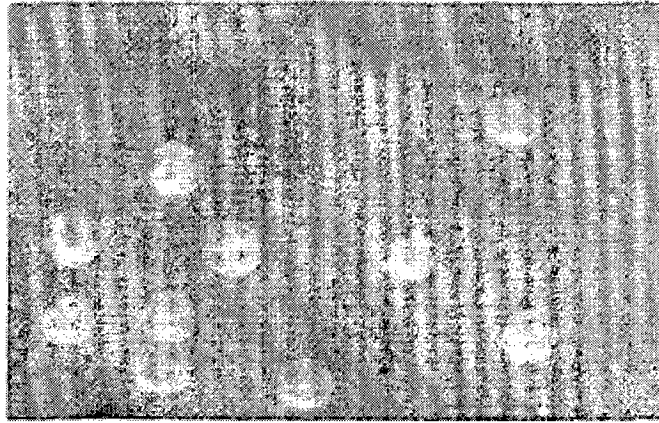


图 5

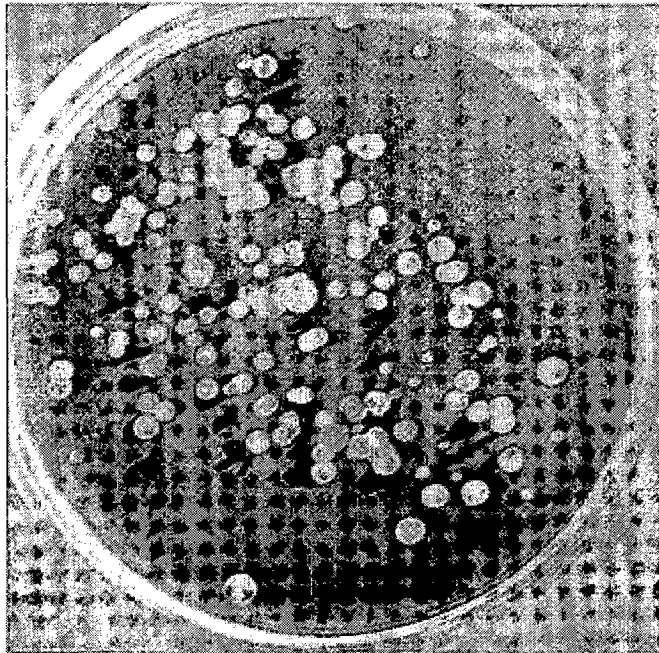


图 6

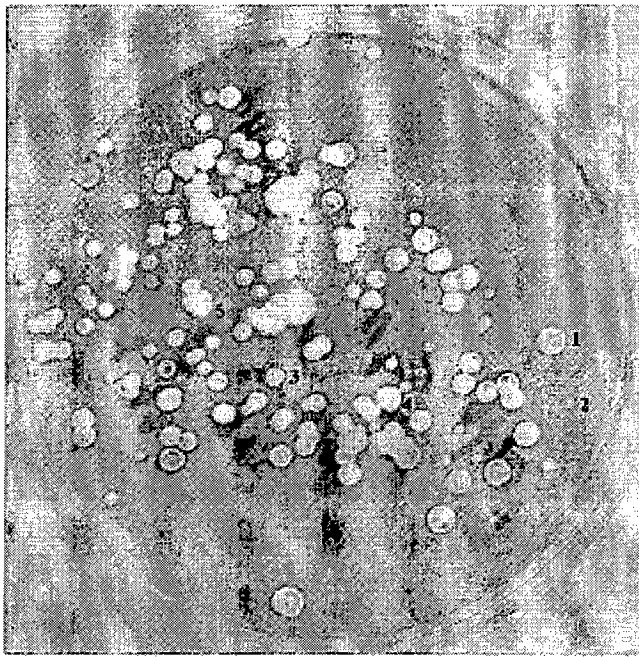


图 7

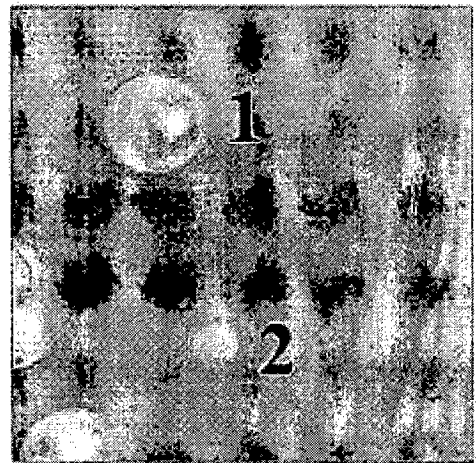


图 8

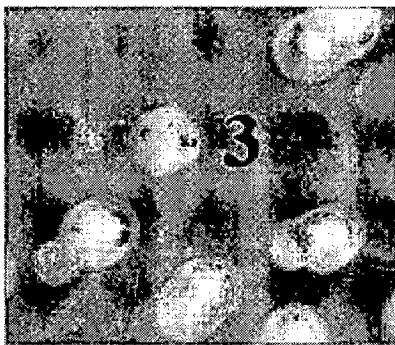


图 9

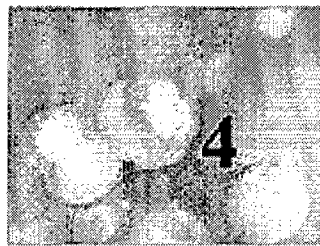


图 10

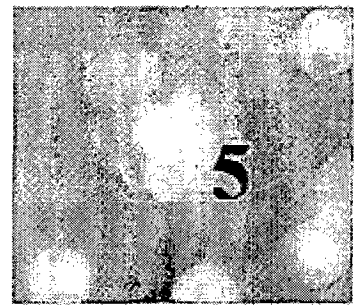


图 11

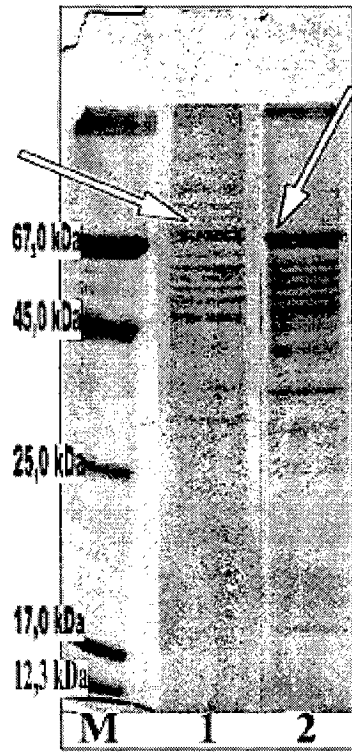


图 12

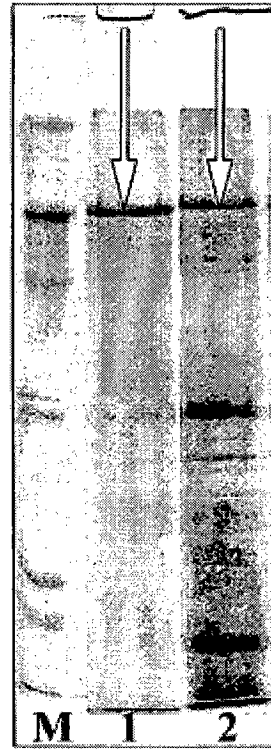


图 13

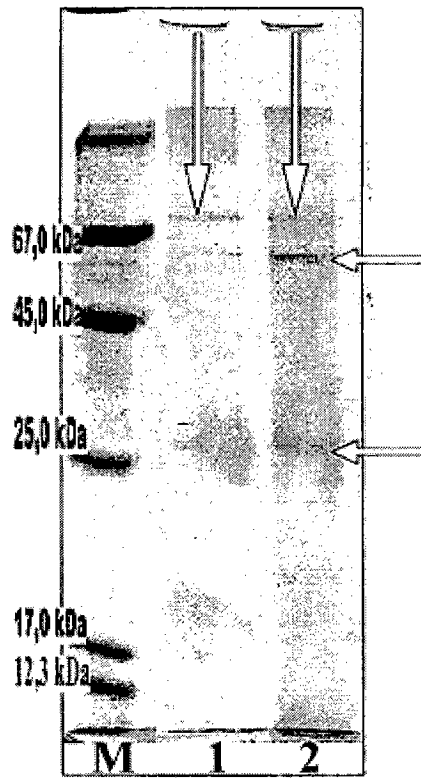


图 14

专利名称(译)	展示形成对抗结核分枝杆菌H37 Rv的细胞免疫性质的制剂、其(变体)制备方法、重组菌株及用于结核病诊断的制剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN101861166A</a>	公开(公告)日	2010-10-13
申请号	CN200880024159.X	申请日	2008-04-29
[标]发明人	尼古拉尼古拉耶维奇丝里奇凯		
发明人	尼古拉·尼古拉耶维奇·丝里奇凯		
IPC分类号	A61K39/04 C12P21/00 C12N1/21 G01N33/531		
CPC分类号	A61K2039/57 A61K39/04 G01N33/5695		
优先权	2007117342 2007-05-10 RU		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及生物药学、制备生物化学医学领域，尤其涉及由微生物制备的基于结核性络合物制剂，其能够用于肺结核的预防、治疗和诊断。在组合中包括对人、动物和环境无害的重组2-9XL约氏不动杆菌菌株，及其染色体、染色体DNA片段。肺结核H37 Rv能够同时人工合成若干蛋白质用于在细菌外膜和包膜中形成稳定的种特异性的结核性糖蛋白。不使用重组2-9XL菌株，而使用标准培养基，种特异性结核络合物合成的稳定性，稀释和纯化结核性络合物的经济性和易于实施使所述微生物潜在生产试剂体现的特能够性形成T和B细胞免疫来对抗M.肺结核病原。

来自诊断组的血清样本	血清样本的数目	光密度指数(OD)		
		OD>0.6	0.3>O<0.6	OD<0.3
来自 phthisiopulmonology 的具有肺结核诊断的患者(MBT+和 MBT-)				
TB 患者 GISK (MBT+和 MBT- (以%计))	227 (100%)	162 (71.4%)	39 (17.%)	26 (11.4%)
供体(健康人群)				
供体 GISK HIV, VHB, VHC (以%计)	45 (100%)	-	6 (13.3%)	39 (86.7%)
危险组				
匿名供体 GISK (syphilis?) (以%计)	60 (100%)	4 (6.7%)	9 (15.0%)	47 (78.3%)
正规士兵, BIONOM personnel (以%计)	33 (100%)	2 (6.1%)	2 (6.1%)	29 (87.8%)
运动员 GISK (以%计)	22 (100%)	4 (18.2%)	5 (22.7%)	13 (59.1%)
学生 GISK (以%计)	20 (100%)	3 (15%)	3 (15%)	14 (70%)
具有可能的交叉反应的组				
患者 GISK (VHV+和 VHC+) (以%计)	44 (100%)	1 (2.3%)	4 (9.1%)	39 (88.6%)
已接种的 GISK VHV+ (以%计)	10 (100%)	1 (10%)	3 (30%)	6 (60%)
备注: 血清样本由以 L.A. Tarasevich (GISK)和“BIONOM” LLC 命名的国家医学和生物制剂标准化和对照研究所提供。检查了 460 个人, OD>0.6 - 表示在血清中				