

中试规模纯化重组鼠疫 rF1-V 融合蛋白及其免疫原性分析

房婷, 任军, 张金龙, 尹可欣, 杨秀旭, 于蕊, 张晓鹏, 于长明

军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071

房婷, 任军, 张金龙, 等. 中试规模纯化重组鼠疫 rF1-V 融合蛋白及其免疫原性分析. 生物工程学报, 2016, 32(1): 95-104.

Fang T, Ren J, Zhang JL, et al. Pilot-scale purification of rF1-V fusion protein of *Yersinia pestis* and characterization of its immunogenicity. Chin J Biotech, 2016, 32(1): 95-104.

摘要: 重组 F1-V 融合蛋白 (rF1-V) 是目前在进行临床研究的鼠疫亚单位疫苗的主要成分。本研究摸索了 rF1-V 的可溶表达条件, 并对条件进行了优化和放大, 确定的中试发酵工艺为: 在重组菌对数生长期中期加入 50 $\mu\text{mol/L}$ IPTG, 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 5 h。通过硫酸铵分级沉淀、离子交换、疏水相互作用层析和凝胶过滤四步纯化, 最终得到纯度为 99%、回收率大于 20%且各项检测指标合格的蛋白。在此基础上, 将蛋白使用氢氧化铝佐剂进行吸附, 在小鼠体内进行了免疫原性研究。ELISA 测定两次皮下免疫后血清的抗体滴度。比较融合蛋白免疫组 (rF1-V) 与单一抗原免疫组 (rF1、rV) 以及联合抗原免疫组 (rF1+rV) 之间体液免疫反应的差异。结果显示: 20 μg rF1-V 免疫剂量组诱导的抗 F1 抗体滴度明显高于其他组, 抗 V 抗体滴度与其他组相比没有显著差异。表明本工艺制备的 rF1-V 抗原有望作为鼠疫亚单位疫苗的主要组分。

关键词: 鼠疫耶尔森菌, 重组 F1-V 融合蛋白, 发酵, 分离纯化, 免疫原性, 亚单位疫苗

Received: February 9, 2015; **Accepted:** April 27, 2015

Supported by: National Science and Technology Major Project for Infectious Diseases Prevention and Control (No. 2013ZX10004001).

Corresponding author: Changming Yu. Tel: +86-10-66948692; E-mail: yuchangming@126.com

国家传染病重大专项 (No. 2013ZX10004001) 资助。

网络出版时间: 2015-06-08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150608.1503.006.html>

Pilot-scale purification of rF1-V fusion protein of *Yersinia pestis* and characterization of its immunogenicity

Ting Fang, Jun Ren, Jinlong Zhang, Kexin Yin, Xiuxu Yang, Rui Yu, Xiaopeng Zhang, and Changming Yu

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical, Beijing 100071, China

Abstract: Recombinant F1-V (rF1-V) fusion protein is the main ingredient of the current candidate vaccine against *Yersinia pestis* infection, which has been under investigation in clinical trial in USA. We investigated the soluble expression conditions of rF1-V in *Escherichia coli* BL21 (DE3) that we constructed before. After scale-up and optimization of fermentation processes, we got the optimized fermentation process parameters: the culture was induced at the middle exponential phase with 50 $\mu\text{mol/L}$ of IPTG at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 5 h. Soluble rF1-V protein was isolated to 99% purity by ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography and gel filter chromatography. The protein recovery was above 20%. Protein identity and primary structure were verified by mass spectrometry and Edman sequencing. Results of purity, quality and western blotting analysis indicated that the target protein is a consistent and properly folded product. Furthermore, the immunogenicity of various antigens formulated with aluminum hydroxide adjuvant was evaluated in mice. Serum antibody titers of 4 groups including 20 μg rF1, rV and rF1-V and 10 μg rF1+10 μg rV, were assayed by ELISA after 2 doses. The antibody titers of anti-F1 with 20 μg rF1-V were obviously higher than titers with other groups; meanwhile there were no significant difference of anti-V antibody titers among them. These findings confirm that rF1-V would be the active pharmaceutical ingredient of the plague subunit vaccine.

Keywords: *Yersinia pestis*, recombinant F1-V fusion protein, fermentation, purification, immunogenicity, subunit vaccine

鼠疫是由鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*, 以下简称鼠疫菌) 引起的自然疫源性烈性传染病。据记载, 在人类历史上, 世界范围内曾暴发过 3 次鼠疫大流行, 并致使至少 1.6 亿人死亡^[1]。人间鼠疫包括腺鼠疫、肺鼠疫、败血型鼠疫等类型, 其中肺鼠疫通过气溶胶在人与人之间传播, 在不能及时治疗的情况下病死率高达 100%^[2-3]。美国疾病预防控制中心将鼠疫菌归类为易传染、高致死率、可引起公众恐慌社会动荡、需要进行特别公共卫生准备的 A 类微生物病原体^[4]。同时鼠疫菌被作为传统的生物战剂之一, 这种廉价且又容易操作的微生物成为国际恐怖分子制造生物恐怖的首选之一^[5], 因此研究鼠疫疫苗对于有效抵御平时、战时的鼠疫威胁均有重要

意义。

尽管近期美国 FDA (Food and drug administration) 已批准左氧氟沙星 (Levofloxacin) 用于应对各种形式的鼠疫 (<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm302220.htm>), 预防性疫苗仍是减少鼠疫风险最有效的途径之一。人用鼠疫疫苗有全细胞灭活疫苗 (KWCV) 和鼠疫减毒活疫苗 (EV76 株)^[6-7]。甲醛灭活的全菌苗 (KWCV) 曾在美国获得批准, 通常在两个月内免疫 3 次, 由于可能导致头疼、发热、淋巴结炎等副反应, 副反应发生率为 10%左右, 该疫苗已于 1999 年停止生产。减毒活疫苗 (EV76 株) 是一种色素沉着缺损性突变株的鼠疫菌, 这种疫苗可以保护小

鼠抵抗皮下或吸入途径攻击鼠疫菌。但人体接种后的副反应较大,如头痛、发热、无力等不适,另外有研究表明,小鼠和长尾猴免疫鼠疫减毒活疫苗后有导致死亡的情况^[7-9]。因此对鼠疫减毒活疫苗的安全性存在一定的担忧。

近20年来,疫苗研究的重点转向以鼠疫菌荚膜蛋白 F1 (Fraction 1 capsule, F1)、V 毒力因子也称低钙反应 V 蛋白 (Low-calcium-response V, LcrV) 和鼠疫菌外膜蛋白 (*Yersinia pestis* outer membrane protein, Yops) 为架构的重组亚单位疫苗^[3,10]。其中由 F1 抗原和 V 抗原联合构成的鼠疫亚单位疫苗已成为国内外新型鼠疫疫苗研究的热点,不仅可以有效防护鼠疫,而且可以有效地阻止肺鼠疫的发生。由英国 (PharmAthene UK Limited) 研发的 rF1+rV 疫苗^[11-12]已完成一期临床实验,美国 (DynPort vaccine company LLC, ACSC company) 研发的 rF1-V 融合蛋白疫苗^[13-14]已完成二期临床实验阶段,同时美国 (National institute of allergy and infectious diseases, NIAID) 研发的以鞭毛蛋白为佐剂的 rF1-V 融合蛋白疫苗^[15]也已完成一期临床实验 (Clinical Trials govIdentifier: NCT00246467 NCT01122784 NCT01381744)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

工程菌株 BL21 (DE3)/pET42a(+)-rF1-V 由本实验室构建并保存。

1.1.2 主要材料和仪器

层析柱和填料:离子交换填料:Source30 Q、疏水填料 Phenyl Sepharose High Performance 装于 XK 26/20 柱壳,凝胶过滤预装柱:HiLoad

26/60 Superdex 200 prep grade 均购于 GE Healthcare 公司。Anti-mouse IgG-HRP (#2231) 为 Santa Cruze 公司产品。酵母提取物、胰蛋白酶为 OXIOD 公司产品。细菌内毒素标准品购自厦门鲎试剂实验厂有限公司。卡那霉素 (Kanamycin, Kana) 为华北制药公司产品。抗 V 和抗 F1 单克隆抗体购自 Abcam 公司。其余为国产或进口分析纯试剂。6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠来自军事医学科学院实验动物中心。

B. Braun C30plus 型生物反应器购自德国赛多利斯公司。高压均质机购自意大利 Niro-soavi 公司。低温高速离心机购自 Beckman Coulter 公司。SDS-PAGE 电泳仪为 BIO-RAD 公司产品。Image Quant LAS4000mini 成像系统和纯化仪 AKTA EXPLORER 均为 GE Healthcare 公司产品。酶标仪 Spectra Max Paradigm 为 Molecular Devices 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 发酵条件的优化和放大

首先在 5 L 摇瓶 (装有 1 L LB 培养基) 的规模上对诱导 OD 值、诱导时间、诱导温度、IPTG 浓度进行优化。然后将优化好的工艺条件放大至 C30plus 型生物反应器,该生物反应器总体积 42 L,装载 30 L 培养基进行发酵。

1.2.2 中试发酵

挑取工程菌 BL21 (DE3)/pET42a(+)-rF1-V 接种于 5 mL 含有 30 μg/mL Kana 的 LB 培养基中,37 °C、220 r/min 培养 12 h。然后将其接入 1 L 含 30 μg/mL Kana 的 LB 培养基,37 °C、220 r/min 培养 12 h。最后将其接入 42 L 生物反应器中 (装有 30 L LB 培养基),通过生物反应器反馈控制将温度调节为 37 °C 搅拌转速设定为 200-400 r/min,

溶氧通过通气量及搅拌转速控制为大于 20%，pH 通过发酵罐酸碱流加泵自动反馈流加 1 mol/L NaOH 或 30%磷酸控制为 7.0。整个发酵过程的发酵参数通过赛多利斯 MFCS 型发酵智能控制软件进行实时监控记录，根据优化条件控制发酵罐参数，放罐后离心收集菌体。

1.2.3 菌体破碎及硫酸铵分级沉淀

发酵罐中诱导表达后，4 °C、8 000×g 离心 10 min，收集菌体，称重。按菌体湿重 (g) 与缓冲液体积 (mL) 为 1 : 10 重悬于缓冲液 A (50 mmol/L Tris，2 mmol/L EDTA，5%甘油，pH 9.0)。高压匀浆 (工作压力为 90 MPa) 后，4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 收集上清。采用硫酸铵分级沉淀，终浓度为 40%，冰浴搅拌 30 min，4 °C、10 000 r/min 离心 30 min，弃上清。沉淀用缓冲液 A 洗 3 遍后以 2 倍于上述体积重悬。

1.2.4 离子交换层析

采用 Source30Q 装填于 XK26/20 层析柱内 (柱体积 60 mL)，先用 1 mol/L NaOH，接触 30 min 以上去热原，缓冲液 A 线性流速为 110 cm/h 平衡 5–10 个柱体积→上样→缓冲液 A 再平衡 5–10 个柱体积→缓冲液 B (50 mmol/L Tris，1 mol/L NaCl，pH 9.0) 梯度洗脱 30%B、10 个柱体积，收集目的蛋白。

1.2.5 疏水相互作用层析

采用 Phenyl Sepharose High Performance 装填于 XK26/20 层析柱内 (柱体积 60 mL)，先用 1 mol/L NaOH，接触 30 min 以上去热原，缓冲液 C (50 mmol/L Tris，2 mol/L NaCl，pH 9.0) 线性流速为 110 cm/h 平衡 5–10 个柱体积→样品用母液调节电导到 2 mol/L NaCl 离心后上样→缓冲液 C 再平衡 5–10 个柱体积→缓冲液 D (50 mmol/L Tris，pH 9.0) 梯度洗脱 100% D、10 个柱体积，

收集目的蛋白。

1.2.6 凝胶过滤层析

采用无热原的凝胶过滤层析柱 (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade，柱体积 318 mL) 对样品进行精纯，缓冲液 E 为 20 mmol/L PB，0.15 mol/L NaCl，pH 7.2，收集目的蛋白峰，用 0.2 μm 滤膜过滤分装后保存于 -80 °C 待用。

1.2.7 纯化蛋白的鉴定

将纯化好的蛋白分别进行蛋白浓度测定 (Lowry 法)，方法见 2010 年版《中华人民共和国药典》(三部)^[16]附录 VI B 第二法；细菌内毒素检查采用凝胶限度试验，方法见 (2010 年版《中华人民共和国药典》三部)^[16]附录 XII E)；纯度测定-采用还原型 SDS-PAGE 凝胶电泳法 (2010 年版《中华人民共和国药典》(三部)^[16]附录 IV C)；鉴别试验采用免疫印迹法测定 (2010 年版《中华人民共和国药典》(三部)^[16]附录 VIII A)。N 末端氨基酸序列测定和相对分离质量测定委托军事医学科学院仪器测试中心测定。

1.2.8 免疫动物

将本室保存的 rF1、rV 和纯化好的 rF1-V 融合蛋白与氢氧化铝佐剂按比例混合，配制成抗原终浓度为 0.2 mg/mL 的疫苗。将雌性 BALB/c (6–8 周) 小鼠随机分为 4 组，每组 10 只，分别接种 20 μg 的 rF1、rV、rF1-V，和各 10 μg 的 rF1+rV。后腿进行肌肉注射 0.1 mL/只，4 周后用相同剂量进行加强免疫。首次免疫前、末次免疫后，采尾血，分离血清，用 ELISA 法测定血清抗体。

1.2.9 ELISA 抗体分析

96 孔板每孔分别包被 100 μL 终浓度为 5 μg/mL 的 rF1、rV，免疫后血清作为一抗，以 HRP 标记的羊抗鼠-IgG 为二抗，分别测定抗 F1

和 V 的抗体滴度, 在 450 nm 测定吸光度, 以 630 nm 为参比波长。阳性的判定标准为实验孔 A 值与阴性对照 A 值的比值大于或等于 2.1。

2 结果

2.1 发酵条件的优化和中试发酵情况

构建的表达载体 pET42a(+)-rF1-V 见图 1, 首先在 5 L 摇瓶规模上对发酵的关键参数进行了优化, 将收集的菌体按比例重悬, 超声后采用 SDS-PAGE 分析上清和沉淀, 最终确定小试的发酵条件为: 诱导 OD_{600} 值为 0.6, 诱导温度为 25 °C, IPTG 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 诱导时间为 5 h。在以上条件的基础上, 进行了中试发酵的摸索, 诱导 OD 值为 1.2, 其他条件不变。发酵实时监控曲线见图 2, 由图可见整个发酵过程条件稳定, 各种参数无剧烈变化, 有利于细菌生长。而且目的蛋白的表达量占 20% 以上, 且绝大部分在上清中, 实现了目的蛋白的高效可溶

表达, 有利于后连续工艺的开展。

2.2 菌体破碎和硫酸铵分级沉淀

经过逐级摸索和重复, 最终将目的蛋白沉淀的饱和硫酸浓度定为 40%, 经过一步沉淀, 可将目的蛋白进行有效富集并能起到一定的分离提纯的目的 (图 3), 目的蛋白纯度从 20% 提高到 50% 以上。

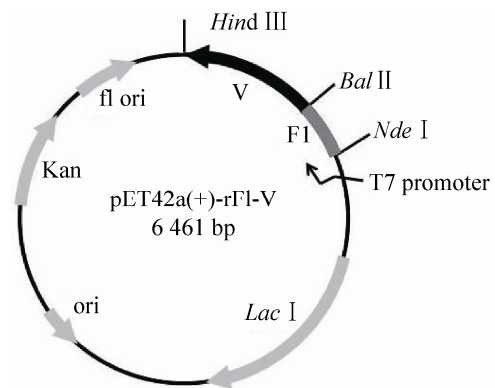


图 1 F1-V 表达载体示意图

Fig. 1 Diagram of pET42a(+)-rF1-V expression plasmid.

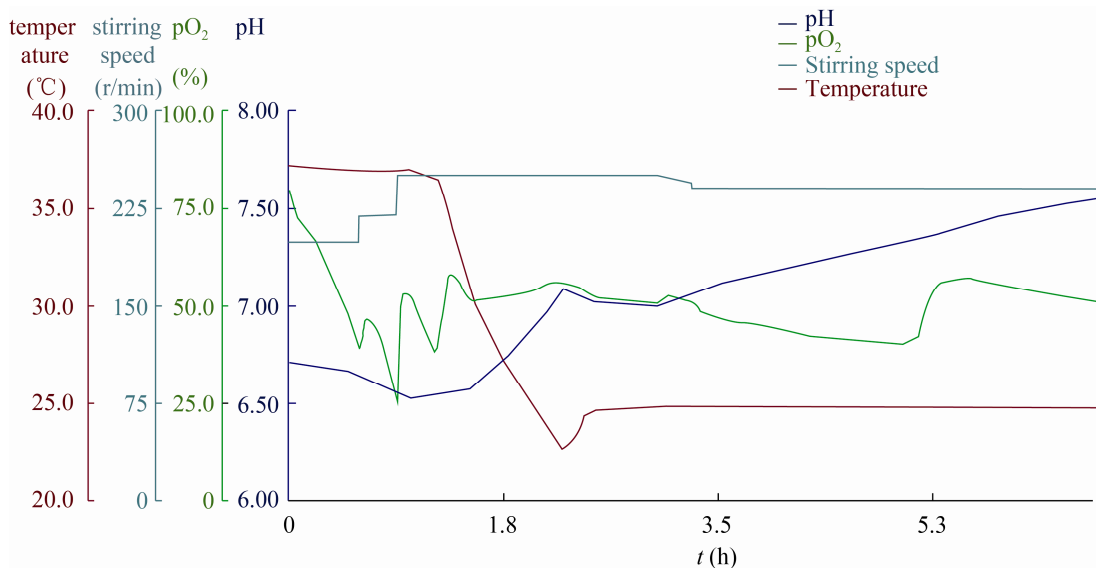


图 2 rF1-V 发酵参数曲线

Fig. 2 The fermentation parameters curve of rF1-V.

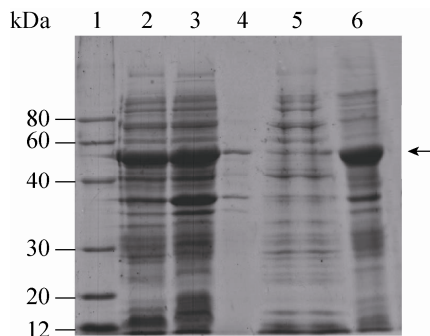


图3 rF1-V 硫酸铵分级沉淀结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of rF1-V antigen obtained after ammonium sulfate precipitation. 1: marker; 2: the whole cell lysate; 3: the supernatant after homogenate and centrifuge; 4: the precipitation after homogenate and centrifuge; 5: the supernatant after the ammonium sulfate (AS) precipitation; 6: the precipitation after the AS precipitation. The position of rF1-V protein band was marked with an arrow.

2.3 层析柱纯化情况

目的蛋白经过硫酸铵分级沉淀后，分别经过 Source 30Q、Phenyl HP 和 Superdex 200 三层析柱纯化，目的蛋白纯度达到 99%以上 (图 4)，回收率为 24% (表 1)。

2.4 纯化蛋白鉴定结果

将纯化所得蛋白进行了蛋白质浓度和细菌内毒素测定，均符合要求。Western blotting 使用本实验室制备的 rF1、rV 抗原作阳性对照，一抗使用 1:10 000 稀释的抗 V 和抗 F1 单抗，Western 印迹表明，rF1-V 抗原与抗 V、F1 抗体均有特异性结合。rF1-V 的理论分子量为 52 769 Da，这与检测结果一致。N 端测序结果为 ADLTA (图 5)，这与预测的蛋氨酸缺失的 N 端序列一致。原液分装后保存在 -80 °C。

2.5 抗原在小鼠体内的免疫原性分析

利用 ELISA 法分别检测各组小鼠抗 F1 和抗

V 的抗体滴度，滴度结果表示为终点滴度倒数的 $\log_{10} \pm s$ ，组间抗体效价的比较采用 GraphPad Prism 5.01 软件的多重比较 (One-way ANOVA)。比较结果 $P < 0.05$ ，认为有统计学差异。图 6A 说明 rF1-V 融合蛋白诱导抗 F1 的抗体滴度明显高于单一抗原 rF1 组和联合抗原免疫 rF1+rV 组 ($P < 0.001$)，而图 6B 则显示 rF1-V 融合蛋白诱导抗 V 的抗体滴度与其他两组对照组相比没有显著性差异。

3 讨论

外源蛋白重组表达系统可分为原核和真核表达系统。大肠杆菌表达体系是目前最成熟的原核表达系统，其生产周期短、成本低，但外源蛋白往往因为产物无法正确折叠以包涵体形式聚集^[17]。利用基因工程生产外源蛋白，实现可溶性表达非常重要，可溶性表达不仅有利于下游的分离纯化，而且亦是衡量重组蛋白是否具有生物活性的重要标志之一。目前国外重组 F1-V 融合蛋白表达主要分为 3 种情况：一种是不带标签在大肠杆菌中以包涵体形式表达，后期纯化需要对其进行复性^[18]；一种是用植物细胞进行可溶性表达，但表达量非常低^[19]；还有一种是对 F1 和 V 进行基因改造，使其在大肠杆菌中以可溶形式表达，但带有 His 标签^[20]。以上几种情况均不利于工艺的的稳定、放大，也会给后期的产品质量控制带来一系列的问题。

前期工作已经构建了能高效表达 rF1-V 的工程菌，本研究对其可溶性表达条件进行了优化和放大，并实现了中试规模的高密度培养技术 (High cell density culture, HCDC)。在 42 L 反应器中，通过生物反应器反馈控制将温度调节为

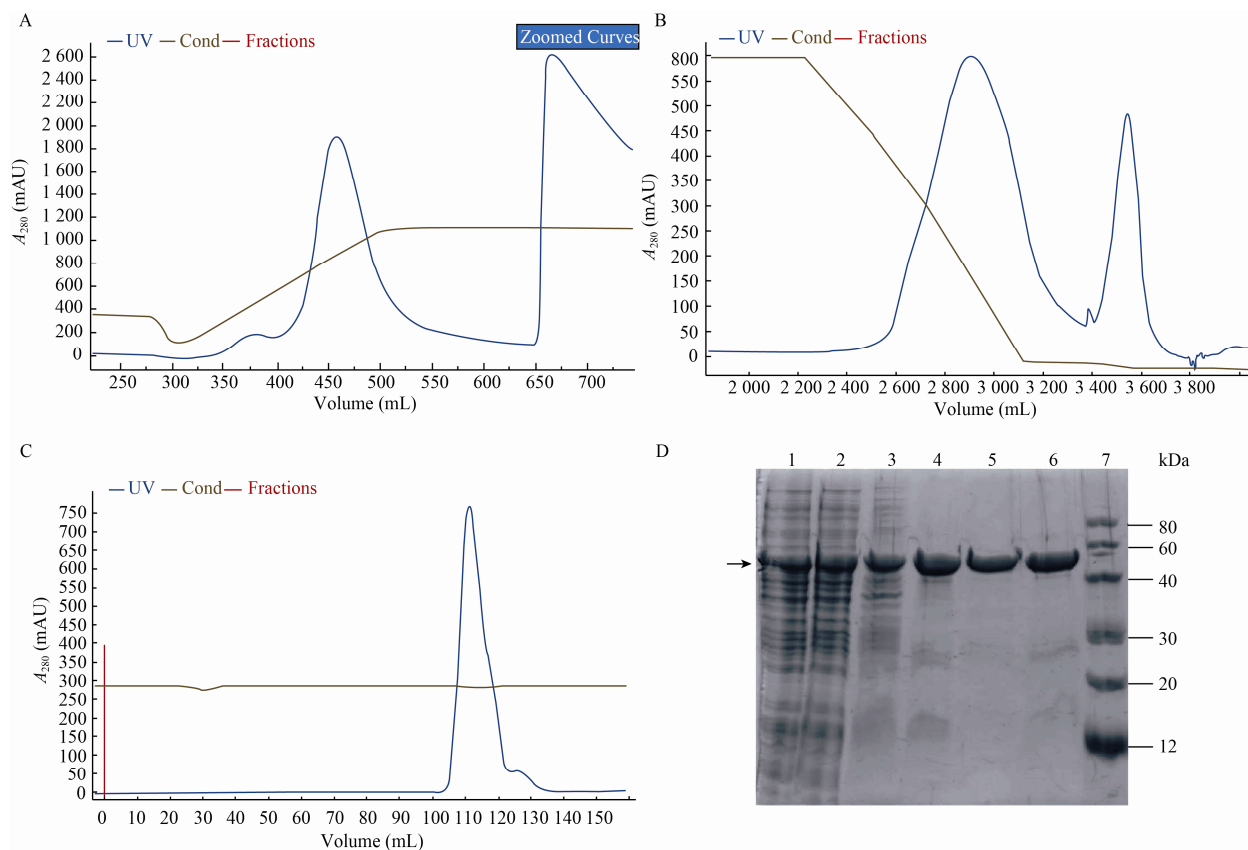


图4 纯化洗脱图谱和 SDS-PAGE 汇总图

Fig. 4 Elution profile and SDS-PAEG analysis of every purification step. (A) Elution profile of Source30Q. (B) Elution profile of Phenyl Sepharose HP. (C) Elution profile of Superdex 200. (D) SDS-PAGE analysis of every step. 1: the whole cell lysate; 2: the supernatant after homogenate and centrifuge; 3: the precipitation after the AS precipitation; 4: the fraction collection of Source 30Q; 5: the fraction collection of Superdex 200; 6: the fraction collection of Phenyl HP; 7: marker. The position of rF1-V protein band was marked with an arrow.

表1 rF1V 纯化过程总结

Table 1 Summary of the purification of rF1V

Purification step	Total protein (mg)	Total volume (mL)	Purity (%)	Total protein of interest (mg)	Percentage yield (%)
Homogenate	7 053.60	1 500.00	20.67	1 457.98	100.00
The supernatant after the AS precipitation	1 612.37	3 000	52.69	849.56	58.27
Source 30Q	1 135.20	190.00	56.10	636.85	43.68
Phenyl HP	418.07	58.90	90.50	378.35	25.95
Superdex 200	259.34	288.06	99.02	355.75	24.40

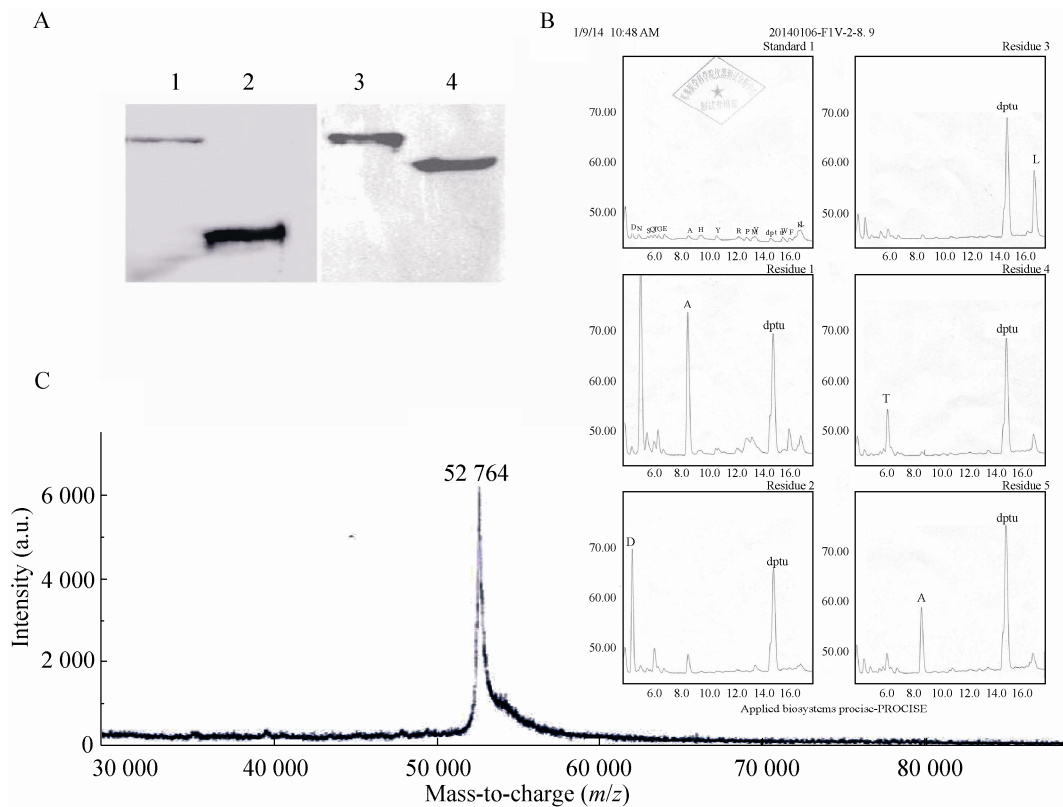


图5 rF1-V 的 Western blotting、N 端测序和 MALDI-TOF-MS 测定结果图

Fig. 5 The results of Western blotting analysis, N terminal sequencing chromatograms using Edman degradation and MALDI-TOF-MS of rF1-V. (A) Western blotting analysis of rF1-V. 1, 3: purified rF1-V; 2: rF1; 4: rV. (B) N terminal sequencing chromatograms of rF1-V, using Edman degradation. The first five cycles of rF1-V's N-terminal sequencing is ADLTA. (C) MALDI-TOF-MS of rF1-V for whole protein mass was observed at m/z 52 764. dptu: N,N-diphenylthiourea.

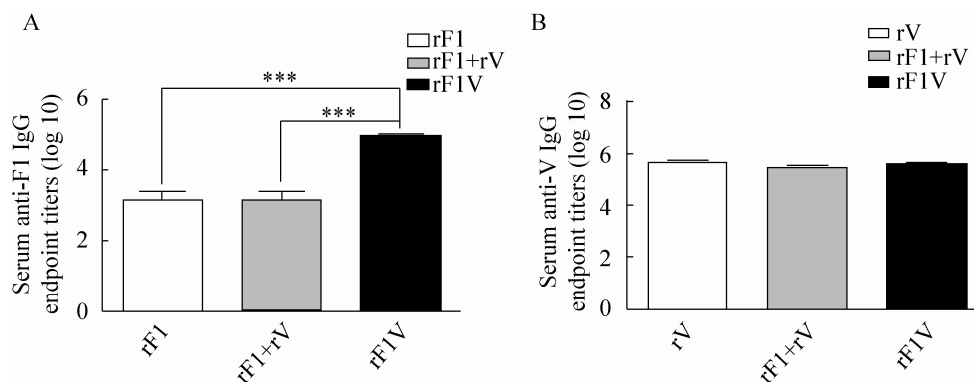


图6 小鼠免疫后血清中抗 F1 和抗 V 的抗体滴度

Fig. 6 The serum IgG titer of anti-F1 and anti-V after immunized. (A) The Logarithm of anti-F1 serum IgG titer of female BALB/c (6–8 weeks) mice which were immunized with 20 μ g rF1, 10 μ g rF1+10 μ g rV and 20 μ g rF1-V twice (day 0 and day 28). (B) The Logarithm of anti-V serum IgG titer of female BALB/c (6–8 weeks) mice which were immunized with 20 μ g rV, 10 μ g rF1+10 μ g rV and 20 μ g rF1-V twice (day 0 and day 28).

37 °C/25 °C, 搅拌转速设定为 200–400 r/min, 溶氧通过通气量及搅拌转速控制为大于 20%, pH 值通过发酵罐酸碱流加泵自动反馈流加 1 mol/L NaOH 或 30%磷酸控制为 7.0, 最终菌体产量为 143 g/批, 蛋白表达量为 20.67%, 且绝大多数都在上清中, 这为后续各项工作的开展打下了良好的基础。

在纯化工艺的开发中, 充分利用目的蛋白的性质, 最终将工艺确定为硫酸铵分级沉淀、阴离子交换层析、疏水相互作用层析和凝胶过滤层析的工艺流程。该流程各步骤之间衔接顺畅, 无需换液、浓缩等中间步骤, 在去除杂蛋白的同时也能有效去除内毒素和宿主 DNA 残留, 目的蛋白纯度达到 99%, 且各项检定指标合格。同时, 该工艺采用商品化的常规填料, 生产周期较短, 且便于线性放大, 具有工业生产的潜力。

免疫原性结果显示, 与对照 rF1、rV 以及 rF1+V 组比较, 融合蛋白 rF1-V 诱导的抗体滴度更高或没有显著性差异, 抗 F1 的抗体效价为 1 128 000、抗 V 的抗体效价为 1 640 000。通常来说, 血清抗体的水平跟攻毒后小鼠的存活率密切相关。血清 IgG 效价越高, 产生的保护性越好。一般来说, 抗 F1 的抗体效价达到 1 1 000 000, 抗 V 的抗体效价达到 1 2 000 000, 即可以对 600 MLD 的攻毒产生 80%以上的保护^[21], 预示该疫苗对鼠疫具有良好的保护效果。

rF1-V 融合蛋白疫苗在啮齿类动物和豚鼠模型中产生了较高的抗体滴度^[22-23]和较好的保护性^[13,24]。文献显示 rF1-V 诱导的免疫主要以体液免疫为主, Dinc G 等采用流式细胞术检测两次免疫 rF1-V 疫苗后的小鼠淋巴细胞, 结果显示该疫苗无法显著增加表达 IFN- γ 、TNF- α 的

CD4⁺或 CD8⁺T 细胞数量^[25]。

我国现分为 11 种类型的鼠疫自然疫源地, 分别分布于 19 个省市, 其面积占国土整体的 15%左右。2014 年 7 月 17 日甘肃省玉门现鼠疫病例 1 人死亡, 经确诊为肺鼠疫 (<http://www.qhcdc.org.cn/Item/2175.aspx>)。而肺鼠疫病程急、致死率高, 肺鼠疫患者咳嗽产生的带菌飞沫可经呼吸道途径发生人-人传播, 导致更加严重的人间鼠疫^[2-3], 可见鼠疫的威胁从未远离。因此实现鼠疫疫苗的应急化规模生产, 可以提高应对鼠疫无论是作为生物武器, 还是突发传染性疾病的应急响应与有效处置能力, 具有保障人民身体健康、维护社会稳定的重要意义。综上所述, 本研究建立的中试规模高效纯化 rF1-V 融合蛋白的工艺为该疫苗的应急化规模制备提供一定的技术支撑。

REFERENCES

- [1] Achtman M, Morelli G, Zhu PX, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(51): 17837–17842.
- [2] Kool JL. Risk of person-to-person transmission of pneumonic Plague. Clin Infect Dis, 2005, 40(8): 1166–1172.
- [3] Rosenzweig JA, Jejelowo O, Sha J, et al. Progress on plague vaccine development. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91(2): 265–286.
- [4] Ryman TK, Dietz V, Cairns KL. Too little but not too late: results of a literature review to improve routine immunization programs in developing countries. BMC Health Serv Res, 2008, 8: 134.
- [5] Christian MD. Biowarfare and bioterrorism. Crit Care Clin, 2013, 29(3): 717–756.
- [6] Ben Ouagrham-Gormley S. Growth of the anti-plague system during the soviet period. Crit Rev Microbiol, 2006, 32(1): 33–46.

- [7] Smiley ST. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(2): 209–221.
- [8] Russell P, Eley SM, Hibbs SE, et al. A comparison of plague vaccine, Usp and Ev76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model. *Vaccine*, 1995, 13(16): 1551–1556.
- [9] Welkos S, Pitt MLM, Martinez M, et al. Determination of the virulence of the pigmentation-deficient and pigmentation-/plasminogen activator-deficient strains of *Yersinia pestis* in non-human primate and mouse models of pneumonic plague. *Vaccine*, 2002, 20(17/18): 2206–2214.
- [10] Feodorova VA, Corbel MJ. Prospects for new plague vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(12): 1721–1738.
- [11] Williamson ED, Flick-Smith HC, Waters E, et al. Immunogenicity of the rF1+rV vaccine for plague with identification of potential immune correlates. *Microb Pathog*, 2007, 42(1): 11–21.
- [12] Williamson ED, Packer PJ, Waters EL, et al. Recombinant (F1+V) vaccine protects cynomolgus macaques against pneumonic plague. *Vaccine*, 2011, 29(29/30): 4771–4777.
- [13] Heath DG, Anderson Jr GW, Mauro JM, et al. Protection against experimental bubonic and pneumonic plague by a recombinant capsular F1-V antigen fusion protein vaccine. *Vaccine*, 1998, 16(11/12): 1131–1137.
- [14] Goodin JL, Nellis DF, Powell BS, et al. Purification and protective efficacy of monomeric and modified *Yersinia pestis* capsular F1-V antigen fusion proteins for vaccination against plague. *Protein Expr Purif*, 2007, 53(1): 63–79.
- [15] Mizel SB, Graff AH, Sriranganathan N, et al. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(1): 21–28.
- [16] National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Part 3. Beijing: China Medical Science Press, 2010 (in Chinese).
国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [17] Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40(3/4): 257–274.
- [18] Powell BS, Andrews GP, Enama JT, et al. Design and testing for a nontagged F1-V fusion protein as vaccine antigen against bubonic and pneumonic plague. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(5): 1490–1510.
- [19] Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, et al. Transgenic carrot tap roots expressing an immunogenic F1-V fusion protein from *Yersinia pestis* are immunogenic in mice. *J Plant Physiol*, 2011, 168(2): 174–180.
- [20] Tao P, Mahalingam M, Kirtley ML, et al. Mutated and bacteriophage T4 nanoparticle arrayed F1-V Immunogens from *Yersinia pestis* as next generation plague vaccines. *PLoS Pathog*, 2013, 9(7): e1003495.
- [21] Ren J, Dong DY, Zhang JL, et al. Protection against anthrax and plague by a combined vaccine in mice and rabbits. *Vaccine*, 2009, 27(52): 7436–7441.
- [22] Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol*, 2004, 82(5): 488–496.
- [23] Fellows P, Adamovicz J, Hartings J, et al. Protection in mice passively immunized with serum from cynomolgus macaques and humans vaccinated with recombinant plague vaccine (rF1V). *Vaccine*, 2010, 28(49): 7748–7756.
- [24] Jones SM, Griffin KF, Hodgson I, et al. Protective efficacy of a fully recombinant plague vaccine in the guinea pig. *Vaccine*, 2003, 21(25/26): 3912–3918.
- [25] Dinc G, Pennington JM, Yolcu ES, et al. Improving the Th1 cellular efficacy of the lead *Yersinia pestis* rF1-V subunit vaccine using Sa-4-1BBL as a novel adjuvant. *Vaccine*, 2014, 32(39): 5035–5040.

(本文责编 郝丽芳)