

结核病 DNA 疫苗及其作用机制研究进展

李军丽, 赵爱华

摘要:为实现到 2050 年在全球范围内根除结核病 (Tuberculosis, TB) 这一宏伟目标, 迫切需要开发新的 TB 疫苗和疫苗接种策略。虽然卡介苗 (*Bacille Calmette-Guérin*, BCG) 在保护儿童免受粟粒性结核和结核性脑膜炎等方面获得了成功, 但其对成人肺结核 (Pulmonary tuberculosis, PTB) 的保护效果仍然存在较大差异 (0~80%)。目前, 有包括第一代疫苗和第二代疫苗在内的几十种新型 TB 疫苗已处于临床前或临床研究的不同阶段, 而作为第三代疫苗的核酸疫苗随着医药技术的发展也逐渐走入人们的视野。本文主要综述了 TB DNA 疫苗的免疫学机制、研究现状、免疫增强策略和 TB DNA 疫苗存在的问题与应用前景, 以期为开发更安全、更高效的新型 TB DNA 疫苗提供新的思路和视角。

关键词: 结核分枝杆菌; 结核病; BCG; 核酸疫苗; DNA 疫苗

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2694(2022)03-0226-10

Research progress in tuberculosis DNA vaccine and its action mechanism

LI Jun-li, ZHAO Ai-hua

(Division of Tuberculosis Vaccine and Allergen, Institute of Biological Product Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: In order to achieve the grand goal of eliminating tuberculosis (TB) globally by 2050, it is urgently needed to develop novel TB vaccines and vaccination strategies. Although *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) has been succeeded in protecting children from miliary tuberculosis and tuberculous meningitis, its protective effect on adult pulmonary tuberculosis (PTB) is still weak (0-80%). To date, a dozens of novel TB vaccines, including first-generation and second-generation vaccines, are in different stages of preclinical or clinical research. As the third-generation vaccine, nucleic acid vaccines have gradually entered people's field of vision with the development of medical technology. This review mainly summarizes the immunological mechanism of TB DNA vaccine, the current status of TB DNA vaccine research, the strategy of TB DNA vaccine immunity enhancement, and the problems and application prospects of TB DNA vaccine. We hope to provide new ideas and perspectives for the development of safer and more efficient novel TB DNA vaccines.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; *Bacille Calmette-Guérin*; nucleic acid vaccine; DNA vaccine

Supported by the Beijing Natural Science Foundation-Joint Fund of Original Innovation of Haidian, 2020 (No.L202040)

Corresponding author: Zhao Ai-hua, Email: zhaoaihua2016@126.com

结核病 (Tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M.tb*) 引起的以呼吸道为主的人兽共患传染性疾病, 可累及全身多个脏器, 严重危害人类健康^[1-2]。随着医药技术的发展,

人类在对抗 TB 方面已取得了一定的成果, 包括有效的治疗性药物及预防性疫苗的研发。但由于耐多药 (Multidrug resistance, MDR) 和广泛耐药 (Extensive drug resistant, XDR) 结核菌株的出现、人类获得性免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 合并 *M.tb* 的双重感染、高危人群流动的日益增多、COVID-19 全球大流行以及部分国家对 TB 的忽视等诸多因素, TB 发病率在全世界范围内呈回升趋势^[3-4]。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 统计, 2020 年全球结核潜伏感

2020 年北京市自然科学基金—海淀原始创新联合基金项目 (No. L202040)

通讯作者: 赵爱华, Email: zhaoaihua2016@126.com;

ORCID: 0000-0003-1873-1314

作者单位: 中国食品药品检定研究院 生物制品检定所 结核病疫苗和过敏原产品室, 北京 102629

染(Latent tuberculosis infection, LTBI)人群接近 20 亿,新发 TB 患者 987 万例。我国 2020 年估算的 TB 新发患者数为 84.2 万例,较 2019 年的 83.3 万例略有回升,在 30 个 TB 高负担国家中我国估算 TB 发病人数排第 2 位,仅低于印度的 259 万例^[5]。受 COVID-19 全球大流行的影响, TB 诊断和治疗服务受到中断,致使全球 HIV 阴性人群的 TB 死亡人数由 2019 年的 121 万例上升至 128 万例,出现了自 2005 年以来 TB 死亡人数首次增加的现象^[5]。TB 不仅给患者本人的身心带来极大的痛苦和危害,也给患者亲友和社会造成了巨大的负担和影响。

至今,卡介苗(*Bacille Calmette-Guérin*, BCG)仍是唯一被批准使用以预防 TB 的疫苗^[6],虽然其可大大降低小儿粟粒性结核病和结核性脑膜炎的发病率,但其保护力不稳定,差异较大,对保护成年人免患肺结核(Pulmonary tuberculosis, PTB)的效率并不十分理想,且无法应用于免疫缺陷患者^[7-10]。究其原因可能与 BCG 菌株差异、感染 *M.tb* 菌株毒力的差异、*M.tb* 的内源性复燃和外源性再感染、接种人群遗传背景、免疫状态与营养水平以及临床试验方法的差异性等有关。随着疫苗学的迅速发展,新型 TB 疫苗已得到广泛研究^[11],如进入 II 和 III 期临床的第 1 代减毒或重组活疫苗 MTBVAC (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03536117) 和 VPM1002 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03152903), 进入 IIa 和 IIb 期临床的第 2 代亚单位疫苗 ID93+GLA-SE (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02465216) 和 M72/AS01E (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04556981) 等,第 3 代腺病毒载体疫苗如 Ad5 Ag85A (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02337270) 及 ChAdOx1 85A-MVA85A (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03681860) 等也进入临床试验阶段。同样作为第 3 代疫苗的核酸疫苗以其多价、经济、稳定等优点成为近年来 TB 疫苗研究的热点之一,备受疫苗研究工作者的关注。因此,本文就 TB DNA 疫苗的免疫学机制、研究现状、免疫增强策略、存在的问题及应用前景作一综述,以期对 TB DNA 疫苗研究提供新的思路和视角。

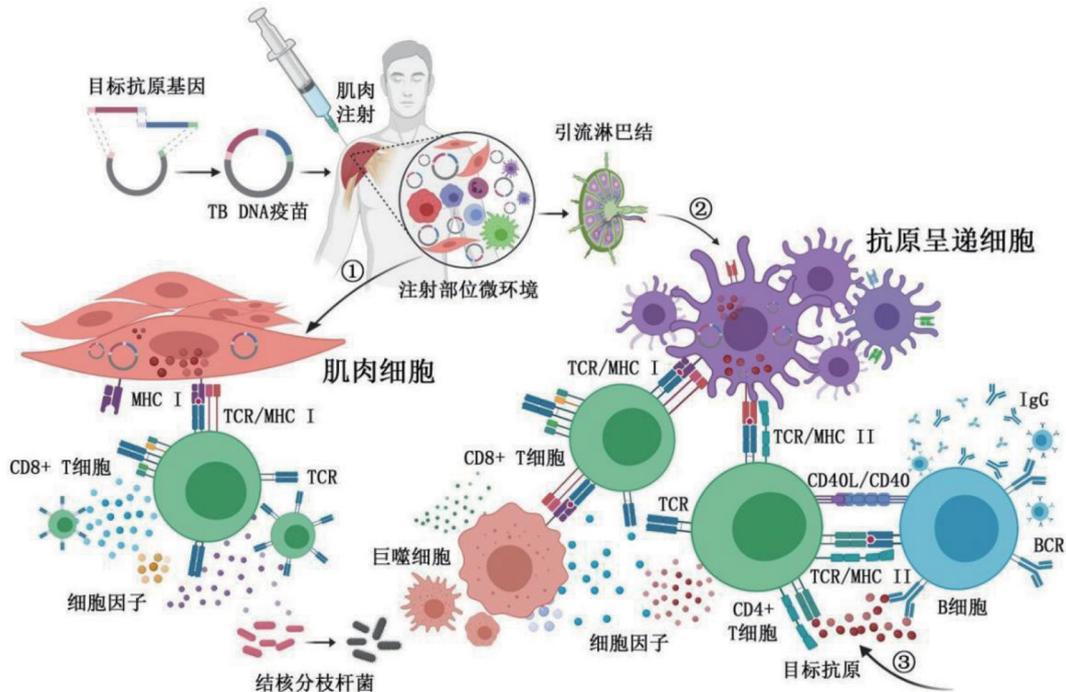
1 TB DNA 疫苗免疫学机制

自 1990 年 Wolff JA 等^[12]首次报道小鼠经肌肉直接注射纯化的 RNA 或 DNA 重组表达载体可使其基因在局部肌细胞内表达数月,甚至持续终生,且未出现外源核酸与宿主染色体整合等现象以来,核酸疫苗成为世界瞩目的传染病防治新工具,被称

为疫苗学的“新纪元”。核酸疫苗又称基因疫苗,包括 DNA 疫苗和 RNA 疫苗,其中 DNA 疫苗是指将能诱导机体保护性免疫反应的病原体抗原编码基因和真核表达载体相连接,采用某种方法将重组 DNA 质粒导入接种者机体,通过宿主细胞的转录、翻译并合成目标抗原蛋白。目标抗原加工形成抗原多肽后与宿主细胞 MHC I 类和 MHC II 类分子结合并被呈递给宿主免疫识别系统,诱导机体产生特异性体液免疫和细胞免疫应答,以达到预防或治疗相应疾病的目的^[13-15]。针对 TB DNA 疫苗诱导的各种免疫反应,包括细胞毒性 CD8⁺ T 细胞介导的 Th1 型免疫应答,CD4⁺ T 细胞介导的 Th2 型免疫及 IFN- γ 反应等^[16]。目前,提出了 TB DNA 疫苗刺激宿主免疫系统的两种主要机制:1)内源性抗原诱导机制:即注射部位组织细胞(如肌细胞或上皮细胞等)、专职抗原呈递细胞(Antigen presenting cells, APCs)或其他炎性细胞内化重组质粒 DNA 并在胞内表达目标抗原。内源性目标抗原经抗原处理相关转运体(Transporter associated with antigen processing, TAP)转运至内质网,通过加工修饰成为具有免疫原性的抗原肽;抗原肽与内质网中合成的 MHC I 类分子结合,形成抗原肽-MHC I 类分子复合物;后者转入高尔基体再通过分泌小泡将其运至组织细胞或 APCs 表面,供相应 CD8⁺ T 细胞识别并结合(图 1-①和 1-②)。2)外源性抗原诱导机制:被分泌至胞外的目标抗原经注射部位 APCs 吞噬或吞胞饮后形成吞噬体,随后与胞内容酶体融合形成吞噬溶酶体;外源性目标抗原在吞噬溶酶体内酸性环境中被蛋白水解酶降解为小分子多肽;内质网中合成的 MHC II 类分子进入高尔基体后,由分泌小泡携带,通过与吞噬溶酶体融合,使抗原肽与小泡内 MHC II 类分子结合形成抗原肽-MHC II 类分子复合物;该复合物表达于 APCs 表面后被相应 CD4⁺ T 细胞识别并结合。此外,部分外源性非胸腺依赖性抗原(Thymus-independent antigen, TI-Ag)可直接激活初始 B 细胞而无需辅助性 T 细胞的参与,进而诱导机体形成体液免疫应答,产生抗原特异性抗体(图 1-③)。

2 TB DNA 疫苗研究现状

随着对 *M.tb* 致病机制认识的深入, TB DNA 疫苗的研制不仅局限于针对未感染人群抗 *M.tb* 感染的预防,研发针对 LTBI 的疫苗,达到抑制、清除宿主体内潜伏感染的细菌,防止 TB 复发也是其重要的目标之一。基于 TB 亚单位疫苗研发中积累的



注:①为注射部位肌肉细胞内化重组 DNA 质粒,表达目标抗原蛋白(内源性)并递呈抗原肽以激活 CD8⁺ T 细胞。②为注射部位 APCs 内化重组 DNA 质粒,表达目标抗原蛋白(内源性)并递呈抗原肽以激活 CD8⁺ T 细胞。③为被分泌的外源性目标抗原蛋白直接激活 B 细胞或经 MHC II 类分子激活 CD4⁺ T 细胞。

图 1 TB DNA 疫苗经肌肉注射免疫后诱导机体形成免疫应答的可能机制

Fig.1 Mechanism of immune response induced by intramuscular immunization with TB DNA vaccine

大量经验,已有超过 60 种 *M.tb* 抗原被确定为候选优势抗原,并在临床前动物模型中用作抗 TB 疫苗进行研究。*M.tb* 培养滤液蛋白 10(Culture filtrate protein, 10 kDa, CFP-10)、早期分泌 6 kDa 蛋白(Early secretory antigenic target, 6 kDa, ESAT-6)、Ag85 复合物及热休克蛋白 65(Heat shock protein 65, Hsp65)等被广泛研究的抗 *M.tb* 保护性抗原同样成为了 TB DNA 疫苗的候选目标。针对这些优势候选抗原基因,研究者们进行了大量的临床前研究。目前,已有多种 TB DNA 疫苗在临床前动物实验中获得了比较理想的效果。

2.1 CFP-10 和 ESAT-6 CFP-10 和 ESAT-6 是 BCG 中丢失的 RD1(region of difference, RD)区编码的关键毒力蛋白分子,分别由 Rv3874 和 Rv3875 基因编码。两者以完全折叠的结构按 1:1 形成紧密的复合物,具有较好的抗原特异性和免疫活性^[17-18],其作为新型疫苗的候选抗原除用于 TB 预防外,亦可作为诊断用特异性抗原用于鉴别 *M.tb* 感染和 BCG 接种^[19-20]。

1999 年, Kamath AT 等^[21] 就曾尝试用 *M.tb* 分泌蛋白 MPT64、Ag85B 和 ESAT-6 作为候选基因制备 DNA 疫苗并在小鼠模型中测试其免疫原性

和保护功效。结果发现, DNA 疫苗免疫后 4 周,小鼠 IFN- γ CD4⁺ T 细胞活化增强,同时体内产生高滴度抗原特异性 IgG 抗体。这 3 种 DNA 载体均显示出一定的保护作用,且其中 Ag85B 效果最佳,其他依次为 ESAT-6 和 MPT64,但遗憾的是上述三种 DNA 疫苗均未达到用 BCG 免疫后形成的保护水平。国内学者王雪梅等^[22] 构建 pVAX1/ESAT-6 疫苗,并经电转染免疫小鼠。结果发现,免疫小鼠血清中抗 ESAT-6 特异性抗体 IgG 水平明显升高,血清中 IFN- γ 水平、小鼠脾淋巴细胞增殖水平及分泌 IFN- γ 淋巴细胞数明显均高于空质粒组和生理盐水对照组。

除单独采用包括 ESAT-6 在内的 *M.tb* 蛋白基因构建成 TB DNA 疫苗外,与细胞因子或其他蛋白因子构建成多顺反子 DNA 质粒也被广泛研究。其中 Maue AC 及其团队^[23] 发现质粒编码的 GM-CSF 和 CD80/CD86 新型 ESAT-6:CFP10 DNA 疫苗共同给药可增强抗原特异性细胞介导的免疫反应。与单独 ESAT-6 DNA 疫苗接种相比, ESAT-6:CFP10 + GM-CSF + CD80/CD86 DNA 疫苗接种动物表现出外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) CD25 表达上调, ESAT-6:CFP10 特

异性 IFN- γ 分泌细胞增加以及抗原特异性细胞增殖反应增强等。同时,在一项低剂量毒性牛结核分枝杆菌气溶胶攻击试验中,出生时接种 BCG 或 ESAT-6:CFP10+GM-CSF+CD80/CD86 DNA 的小牛在感染后表现出肺和肺相关淋巴结的病变更严重程度降低。此外,抗菌肽 β -防御素-2 与 ESAT-6 构建的融合 DNA 疫苗 pDE 同样显示出与 BCG 相似的保护功效。pDE 免疫小鼠对 H37Rv 标准株及高毒力临床分离株 LAM 5186 的攻击形成有效抵抗,感染后的小鼠存活率、肺细菌负荷和组织损伤均得到有效改善。而 BCG 初免,然后用 pDE 进行加强的动物则显示出更高的存活率和更少的肺组织损伤^[24]。国内学者王庆敏等^[25]评估了针对 *M.tb* 的泛素(UbGr)融合 ESAT-6 DNA 疫苗后发现,UbGR-ESAT-6 融合 DNA 疫苗接种改善了抗原特异性细胞免疫反应,与非融合 DNA 疫苗相比,UbGR-ESAT-6 融合 DNA 疫苗免疫的小鼠中,Th1 型细胞因子 IFN- γ 、IgG2a 与 IgG1 相对比率以及增殖性 T 细胞反应的产生显著增强。同样,Xu J 等^[26]构建了一种编码 ESAT-6 和树突细胞生长因子 Flt3 配体的重组 DNA 疫苗 pIRES-ESAT-6-FL,该疫苗免疫的小鼠表现出更强的 Th1 型免疫反应,伴随着更高水平的脾脏淋巴细胞增殖,Th1 型细胞因子(IFN- γ 和 IL-2)以及血清特异性抗体的增加,较低水平 Th2 型细胞因子(IL-4 和 IL-10)分泌等。随后,该团队进一步构建编码 ESAT-6 3 个 T 细胞表位和 Flt3 配体的新型重组质粒,并采用肌肉注射该 DNA 疫苗和鼻内施用表位肽的策略来诱导小鼠更高的免疫反应。最后得到了前期研究相一致的结果,而且还显著增强了其对 *M.tb* 攻击的保护作用^[27]。

针对 ESAT-6 DNA 疫苗的治疗作用,Lowrie 等^[28]曾报道,经 ESAT-6 DNA 疫苗治疗后,小鼠肺和脾脏中的 *M.tb* 荷菌量减少,T 细胞谱向 Th1 型免疫应答方向改变。Yuan W 等^[29]也同样发现,小鼠接种由 ESAT-6 与 Ag85B 及 HspX 构建的多顺反子质粒 DNA 疫苗 pAEH 后,其外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞比例,分泌 ESAT-6、Ag85B 和 HspX 特异性 IFN- γ T 细胞频率上升,同时伴随着体外 IFN- γ 和 IL-2 的产生水平显著增加。此外,被治疗小鼠肺部和脾脏结核样炎症减轻,*M.tb* 的复制被明显抑制等。但值得注意的是吴雪琼团队等则发现相比于单一 Ag85A DNA 疫苗,含有一个 ESAT-6 基因拷贝的 Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 疫苗在 MDR-TB 感染小鼠中的免疫治疗效果被降低^[30],而插入两个 ESAT-6 基因拷贝的嵌合 DNA 疫苗,则

进一步加速 MDR-TB 临床分离株和药物敏感株感染小鼠的死亡率速度^[31]。这也与国外学者 Dey B 等^[32]早期报道新型 TB DNA 疫苗 DNAE-6 加强针消除 ESAT-6 重组卡介苗(rBCG)对豚鼠抗 *M.tb* 感染的保护作用相一致。

2.2 Ag85 复合物 Ag85 复合物是 *M.tb* 主要的分泌性蛋白,可从早期培养物中分离,作为重要的毒力因子,其主要通过纤维连接蛋白和弹性蛋白结合并介导 *M.tb* 的黏附、侵袭及细胞壁的合成^[33-35]。复合物由在氨基酸和基因水平上具有广泛交叉反应性和同源性的 Ag85A、Ag85B 和 Ag85C 3 个组分构成,分别由 fbpA(Rv3804c)、fbpB(Rv1886c)和 fbpC(Rv3803c)基因编码^[36]。Ag85 分子能刺激 Th1 细胞活化并诱导其分泌 TNF- α 、IFN- γ 等多种细胞因子,活动性 TB 患者血清中也存在大量 Ag85 特异性抗体^[37-38]。正由于这个特性,Ag85 复合物在 TB 诊断和疫苗研发^[39]、免疫治疗^[40]等方面有着重要的应用潜力。

1996 年,Huygen K 及其团队^[41]对编码 Ag85 的 DNA 疫苗免疫原性进行了评估,其发现这些构建体能很好的诱导小鼠体液和细胞免疫反应,并在接下来的抗 *M.tb* 保护效果研究中发现 Ag85C 基因重组 DNA 疫苗效果不及 Ag85A 和 Ag85B。随后,D'Souza S 等^[42]也同样证明,Ag85 DNA 疫苗经肌肉注射免疫 C57BL/6(H-2b)和 BALB/c(H-2d)小鼠后,*M.tb* 感染的 C57BL/6 小鼠对 Ag85A 和 Ag85B 来源的抗原肽反应强烈,但对来自 Ag85C 的抗原肽没有反应;而 *M.tb* 感染的 BALB/c 小鼠仅对来自 Ag85A 的抗原肽反应。

针对 Ag85 复合物 DNA 疫苗不同的免疫方案,Tanghe A 等^[43]用 Ag85 质粒 DNA、Ag85 蛋白以及 Ag85 质粒 DNA 初免-Ag85 蛋白加强方案免疫 C57BL/6 小鼠后发现,相比于单独的 Ag85 蛋白佐剂疫苗,DNA 疫苗免疫诱导了更强大的 Th1 型细胞因子反应,且 Ag85 质粒 DNA 初免-Ag85 蛋白加强免疫后小鼠脾淋巴细胞中 IL-2 和 IFN- γ 反应增加了两到四倍。上述 3 种免疫方案均能诱导机体产生抗 Ag85 抗体,但 Ag85 蛋白佐剂疫苗主要诱导 IgG1,而 Ag85 质粒 DNA 和 DNA 初免-蛋白质加强疫苗接种则优先诱导 IgG2a 抗体的分泌。同时,攻毒实验也发现,外源性 Ag85 蛋白强化了 Th1 型 CD4⁺ 辅助性 T 细胞在介导保护性免疫应答中的主导作用,加强了 DNA 疫苗对 *M.tb* 攻击感染的保护功效。同样,基于表达 Ag85B 和 Rv3425 抗原的 DNA 疫苗和慢病毒载体疫苗在增强 BCG 免疫效果

和保护 C57BL/6 小鼠抗 *M.tb* 感染方面的研究中发现,慢病毒载体和 DNA 疫苗极大地提高了 BCG 对 *M.tb* 的保护功效,表现为免疫小鼠体重下降变缓、肺部细菌负荷和组织学损伤显著减轻等^[44]。而在另一项以编码堪萨斯分枝杆菌 Ag85B 蛋白的 rB-CG-Mkan85B 初免,表达 Ag85B 基因的质粒 DNA (DNA-Mkan85B) 进行加强免疫的研究中同样发现,DNA-Mkan85B 能显著增强小鼠 CD8⁺ T 细胞抗 *M.tb* 免疫应答,并有助于克服当前 BCG 在抗 *M.tb* 保护性免疫方面有限的有效性^[45]。

与其他分枝杆菌或非分枝杆菌抗原结合构建编码 Ag85A 多顺反子 DNA 疫苗也逐渐被证明是预防 TB 的有效方法。Zhang X 等^[46] 在研究 Ag85A 共表达 GM-CSF 质粒 DNA 疫苗中发现,GM-CSF 单独或组合共表达对 BALB/c 小鼠模型中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞 IFN- γ 反应、CTL 细胞活性和 *M.tb* 攻击的免疫保护作用显著增强。IL-15 融合表达构建 pcDNA3.1-Ag85A-IL-15 质粒肌内免疫 C57BL/6 小鼠 3 次后,接种 pcDNA3.1-Ag85A-IL-15 的小鼠在肺中产生了更多的分泌性 IgA (sIgA),并获得了 Ag85A 增强的血清 IgG 反应。免疫小鼠 IgG2a/IgG1 比率上调,自然杀伤细胞活性及 Ag85A 特异性脾脏 T 细胞增殖增强。CD4⁺ T 细胞向 Th1 型极化,并显著上调血清中 IFN- γ 的水平^[47]。Mir FA 等^[48] 利用来自口蹄疫病毒的自裂解肽 2A 与 Rv3407、Ag85A 及 HspX 构建新型 TB DNA 疫苗,结果发现接种 V-2A 疫苗的小鼠对所有 3 种抗原都产生了抗原特异性细胞和体液反应,对 *M.tb* 气溶胶攻击的保护作用与 BCG 相当。同样,国内学者 Yao W 等^[49] 将牛疱疹病毒 1 VP22 (BVP22) 编码基因与 Ag85B 编码基因整合到 DNA 载体中,并与单独编码 Ag85B 的质粒 DNA 比较其在 C57BL/6 小鼠中的免疫反应和保护功效。结果发现,小鼠免疫后,除了 IFN- γ 分泌细胞的数量增加外,共表达 BVP22 和 Ag85B 的 DNA 诱导的 Ag85B 特异性抗体和脾淋巴细胞增殖反应也显著高于仅接种编码 Ag85B 的 DNA 免疫的小鼠。此外,根据肺和脾脏的组织病理学检查和细菌载量测定,BVP22-Ag85B DNA 免疫引起的对静脉内 *M.tb* 攻击的保护超过了单独由 Ag85B DNA 引起的反应,且与 BCG 疫苗无显著性差异。

2.3 热休克蛋白 65 Hsp65 是 Hsp 家族中被研究最多、最有希望成为 TB 疫苗有效抗原的成员之一^[50]。Hsp65 蛋白细胞表位较多,结构和功能类似于真核 Hsp70 蛋白,在基质金属蛋白酶 9 的水解下,

产生大量可刺激宿主适应性免疫应答的免疫原性肽^[51]。

早期研究表明,小鼠注射编码 *M.tb* 单一抗原 Hsp65 的质粒 DNA 后,机体被诱导产生特定的细胞和体液免疫反应,并对随后的 *M.tb* 攻击产生抵抗,其保护作用与 BCG 疫苗相当,且显著优于 Hsp65 蛋白抗原的免疫效果^[52]。国内学者 Dai W 等^[53] 也发现,小鼠经肌肉注射 100 μ g Hsp65 或 Hsp70 DNA 疫苗后,其脾淋巴细胞增殖能力较生理盐水对照组、空载体组显著增强,腹腔巨噬细胞分泌 NO 水平、血清 IL-2 和 IFN- γ 含量也显著上升。Hsp70 DNA 疫苗可明显增强小鼠免疫应答,但其强度似乎不如 Hsp65 DNA 疫苗。BALB/c 和 C57BL/6 小鼠经 Hsp65 和 Hsp70 DNA 疫苗初免,BCG 加免后发现,这种异源初免-加强免疫方法显著提高了 BCG 对小鼠抗 *M.tb* 感染的疫苗接种效果^[54]。进行鼻内或皮下 BCG 初免,DNA-Hsp65 加强的免疫策略也得到了类似的结果^[55]。然而,另一项研究则发现新生儿期接种 BCG 疫苗的小鼠,成年期再接种 pVAXhsp65 DNA 疫苗加强剂的保护功效发生明显改变。免疫小鼠虽能检测到高水平的血清抗 hsp65 抗体、IFN- γ 和 IL-5 等细胞因子,且肺匀浆中也均能检测到这些细胞因子的存在,但该疫苗未能显著降低感染小鼠肺组织荷菌量以及减轻肺实质的结核样炎症。这表明 BCG 疫苗的预致敏增强了 pVAXhsp65 DNA 疫苗的免疫原性,但未能增强成年小鼠抗 *M.tb* 攻击的保护力^[56]。

除单独表达 Hsp 家族抗原外,融合其他因子以增强疫苗免疫效果也是构建 TB DNA 常用方法。日本学者 Masaji Okada 研究团队等用日本血凝病毒(Hemagglutinating virus of Japan, HVJ)递送表达 Hsp65 和 IL-12 的 DNA 疫苗用于 TB 预防和治疗^[57]。小鼠和食蟹猴 TB 疫苗预防评价模型中,HVJ-E/Hsp65 DNA + IL-12 DNA 与 BCG 疫苗具有协同作用,该 DNA 疫苗表现出较强的预防功效,*M.tb* 感染小鼠存活率为 100%^[58-59]。治疗效果评价模型中,MDR-TB 和 XDR-TB 感染 DBA/1 小鼠模型经 3 次 HVJ-E/Hsp65 DNA + IL-12 DNA 疫苗治疗后,小鼠存活时间延长且体内肝脏、脾脏和肺组织等 *M.tb* 荷菌量均显著减少。非人灵长类动物中,HVJ-E/Hsp65 DNA + IL-12 DNA 疫苗能显著增加 TB 感染猴子的体重,改善红细胞沉降率,并促进机体外周血淋巴细胞(Peripheral blood lymphocyte, PBL)增殖和 IL-2 的产生;感染猴治疗后 16 周的存活率为 100%,显著高于生理盐水对照组的

60%^[60]。同样,国内学者师长宏等^[61]构建的 Hsp65-IL-2-DNA 疫苗也可通过改善小鼠 Th1 型反应以增强 Hsp65-DNA 疫苗对小鼠 TB 的免疫原性及治疗效果。胡方靖等^[62]构建 Hsp65 和 hG-MCSF 双顺反子真核表达质粒 pIHsp65GM 并研究其作为 TB DNA 疫苗的免疫原性及其对 *M.tb* 感染小鼠的保护效果。结果表明,pIHsp65GM DNA 疫苗能有效诱导小鼠产生特异性 IgG 抗体,促进脾淋巴细胞增殖和 IFN- γ 分泌,且免疫小鼠脾脏和肺组织荷菌量均低于对照组。王庆敏等^[63]也发现 Hsp65 融合 UbGr 同样可以增强特异性细胞介导的免疫应答,与单独使用 Hsp65 DNA 疫苗组相比,UbGr-Hsp65 DNA 疫苗更能显著诱导小鼠体内 Th1 免疫反应的极化,改善脾脏 T 细胞的增殖以及 IFN- γ 等的产生。

3 增强 TB DNA 疫苗免疫效果的策略

临床前动物实验中,单一或多种 TB DNA 疫苗联合使用均获得了一定的保护效果,但很难达到或超过经典疫苗 BCG 的保护效率。此外,相同 DNA 疫苗免疫效果在不同动物个体中差异较大,有些疫苗在小型啮齿类动物中免疫保护效果较好,但在如豚鼠、非人灵长类等中大型动物中的保护效果却表现不佳。影响 TB DNA 疫苗免疫效果的因素有多种,而只有针对性的提出解决策略,各个击破,才能从根本上提升 TB DNA 疫苗的免疫效率。

3.1 选择合适的保护性抗原基因 保护性抗原基因即 DNA 疫苗表达的目标蛋白基因,*M.tb* 大约有 4 000 个基因,各种各样的蛋白质有数千种。TB DNA 疫苗要求表达出的蛋白分子可诱导机体产生抗 *M.tb* 的保护性免疫应答,同时考虑该基因是否需要密码子优化,有无内含子以及是否能在哺乳动物细胞中被正确剪切、转录与表达。此外,目标抗原是否为单一抗原、多抗原重组或与其他细胞因子嵌合表达,以及被表达抗原为分泌型或非分泌型等。

3.2 选择合适的表达载体与启动子 TB DNA 疫苗能否在哺乳动物细胞内高水平地表达出保护性抗原,表达载体和启动子的选择尤为重要。载体满足在原核宿主细胞,如大肠杆菌中拷贝复制,而在真核细胞内不复制、不整合至宿主染色体外,不同载体所含的酶切位点也与其进入机体后的稳定程度有关。目前,用于构建 DNA 疫苗的载体质粒有多种,如 pcDNA3.0、pcDNA3.1、pcDNA4.0、PC1、pSV2、pGFP、VR1320 和 pBK 等,但多数疫苗主要以 PUC 或

pBR322 为基本骨架。此外,作为控制外源基因表达的启动子也存在组织特异性,其来源和强弱也有明显差异,如猿猴空泡病毒 40 (Simian virus 40, SV40)、人巨细胞病毒 (Human cytomegalovirus, CMV) 以及人延长因子 1 α (Elongation factor-1 α , EF-1 α) 启动子等,强启动子可短时间内诱导机体产生较强的免疫应答,而弱启动子则可能诱导长期的持续性免疫应答。其中以 CMV 启动子的调节功能最佳,因此应用也最多。载体除具有增强子-启动子、选择标记 (Ampr、Kanr)、PolyA 尾、翻译起始和转录终止序列等元件外。有些载体还具有内含子序列,以起到显著提升外源基因表达水平的作用。

3.3 选择合适的疫苗递送方式 鉴于 TB DNA 疫苗转染效率较低的特性,有必要将质粒疫苗有效地递送至目标组织或细胞。不同递送途径下接种部位参与的免疫应答细胞不同,所诱发的保护性免疫效果也存在有一定的差异。TB DNA 疫苗可以通过不同递送方式进行给药,包括化学法(如,纳米颗粒和脂质体包裹)、物理法(如,电穿孔、基因枪和微针贴)、生物法(如,细菌和病毒载体)及常规注射器注射(如,肌内、皮内和静脉接种)等^[64-66]。安全有效的递送载体和递送方式,一方面促进组织细胞对 DNA 疫苗的摄取,同时保护 DNA 疫苗免受血清或胞质核酸酶的破坏^[67];另一方面,高效新颖的递送方式大大节约了 DNA 疫苗的用量,减轻接种部位的组织损伤。

3.4 选择合适的基因疫苗佐剂 与传统的 TB 亚单位疫苗佐剂不同,TB DNA 疫苗佐剂主要为蛋白分子类佐剂,它们的功能是通过靶向先天免疫受体或调节分子信号通路的介导来激活机体体液或细胞免疫应答。佐剂因子既可构建成表达质粒与目的基因质粒联合接种,也可将佐剂因子基因与保护性抗原基因连接成融合基因后插入表达质粒进行共表达,其主要包括细胞因子、趋化因子、协同刺激分子、补体分子、PRR 激动剂和免疫靶向基因等^[68-71]。

3.5 选择合适的疫苗接种剂量与免疫程序 尽管 DNA 疫苗的优点之一是较长的免疫持久性,单针接种即可获得长期免疫力,但加强免疫亦可明显增强其应答水平。同时,适宜的接种剂量、间隔时间和接种针次才能确保机体获得满意的免疫应答水平。接种高剂量 DNA 疫苗,一方面,质粒 DNA 可能在体内长期过高水平地表达外源性抗原,最终导致机体对该抗原出现免疫耐受;另一方面,质粒 DNA 可能诱导自身免疫反应,接种后出现抗 DNA 抗体,影响 TB DNA 疫苗的免疫效果。

4 TB DNA 疫苗研究存在的问题

DNA 疫苗的研究是近 20 年发展起来的一项新的生物技术,它已成为疫苗研究领域中的热点之一,特别是其研究方向与 WHO 儿童疫苗计划中关于利用一种疫苗预防多种疾病的长远目标相吻合,现在已获得了迅速的发展。TB DNA 疫苗也正基于一种疫苗用于包括 LTBI 在内的不同类型 TB 的防治目标,研发了不少预防性或治疗性疫苗,被认为在 TB 防治中占有很大的优势。近年来,尽管 TB DNA 疫苗取得了可喜的进展,但同时也存在着一些“瓶颈问题”制约着此类疫苗的研发步伐。

4.1 疫苗的安全性仍存在一定争议 虽然 DNA 疫苗接种后整合入宿主细胞基因组、引起宿主细胞发生恶性转化或免疫系统功能紊乱的可能性很少,且目前所有临床前动物模型研究均已证明该类疫苗安全可靠,但没有足够的临床依据能排除这种理论上的可能危险。WHO 在《关于 DNA 疫苗质量保证指南》中也要求 DNA 疫苗的研制必须考虑其特殊的安全性等问题。此外,由于用于一般化学药物的传统安全性或毒性试验对重组 DNA 产品不一定适用,用传统毒性试验来评价重组 DNA 产品往往也存在一定的困难,并受到多种因素的影响。我国《人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则》也提出,对重组 DNA 产品的临床前安全性试验要求,除了一般生物制品的毒性试验要求之外,应采取较为灵活的处置方法。

4.2 疫苗的作用机理尚需进一步探讨 DNA 疫苗在宿主的注射组织部位表达保护性目标抗原,从而激发免疫应答,这个过程与胞内感染的 *M.tb* 侵入宿主细胞的过程相似,但作用机制却有本质的区别。DNA 质粒引入体内后,其必须通过所有 DNA 递送系统共有的屏障才能转染至组织细胞或目标 APCs。然而,如树突状细胞(Dendritic cells, DCs)等对外来 DNA 质粒引入其细胞具有抗性,从而使编码外来抗原的 DNA 载体难以进行转染^[72-73]。因此,在研究 TB DNA 作用机制的同时,更需克服 DNA 转染过程中来自胞内与胞外的其他屏障。

4.3 疫苗评价的内容需进一步完善 由于 DNA 疫苗的特殊性,使得其与传统 BCG 疫苗或亚单位蛋白疫苗评价内容有所不同,国际上包括我国在内对 DNA 疫苗的产品质量及生产过程提出相关技术指导原则^[74],但针对 TB DNA 疫苗包括其原材料、生产以及最终产品等质量的控制尚需进一步完善。如表达载体和宿主细胞、诱发机体病理性自身免疫的

抗 DNA“抗体”评价。DNA 质粒中残留的内毒素(≤ 10 E. U./mg pDNA)、细菌基因组 gDNA(≤ 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pDNA)、RNA(≤ 0.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pDNA)和蛋白质(≤ 3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pDNA)等不同杂质纯度评价。DNA 疫苗超螺旋(SC 构型)、开口环状(OC 构型)及线性(L 构型)等不同质粒构象比率评价。DNA 疫苗抗生素、RNase 酶残留量评价以及 DNA 疫苗自身保护效力标准的制定等。

4.4 临床前动物模型需进一步优化 临床前动物试验是疫苗安全性和有效性的重要保证,是疫苗进入临床研究的最后一道关卡。TB DNA 疫苗的有效性研究在小鼠、豚鼠或非人灵长类动物模型中表现出不一致的现象。一方面,与 TB 动物模型选用品系及建模标准的不统一有关;另一方面,不同年龄、不同品系及不同动物个体肌间结缔组织不同。大个体动物的结缔组织更为丰富,因而与肌肉注射后 DNA 载体的转染效率较低等有关。

5 TB DNA 疫苗的应用前景

目前,人们对 DNA 疫苗的研究日益深入,其中艾滋病和 T 细胞淋巴瘤的 DNA 疫苗已进入了临床前研究,前列腺癌、肺癌、乳腺癌等 DNA 疫苗也正处于不同的研究阶段。美国 FAD 已批准了包括 COVID-19(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04591184)、单纯疱疹病毒 2 型疫苗(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00274300)以及乙型肝炎疫苗(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00513968)在内的多种 DNA 疫苗进入临床试验,这预示着 DNA 疫苗在 21 世纪将成为人类与各种疾病抗争的有利武器,也显示出 DNA 疫苗的巨大潜力和应用前景。TB DNA 除借助传统优势抗原以外,利用计算机模拟技术结合生物信息学和免疫学等分子建模方法已被广泛用于新型 TB DNA 疫苗设计和分析^[75-80]。通过计算机方法预测 *M.tb* 蛋白潜在 T 细胞表位及其与 MHC 分子不同等位基因的结合能力,筛选出各种保护性抗原的优势表位用于新型 TB DNA 疫苗构建。随着研究的不断深入,相信将来有一天, TB DNA 疫苗可以突破其劣势的一面,向着更安全、更有效、更经济的方向发展,在 TB 疫苗中扮演举足轻重的角色,为全球终止 TB 疫情提供力量。

利益冲突:无

引用本文格式:李军丽,赵爱华. 结核病 DNA 疫苗及其作用机制研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2022,38(3):226-235. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2022.00.006

参考文献:

- [1] Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology [J]. *Int J Infect Dis*, 2010,14(9):e744-751. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.12.003
- [2] Moon MS. Tuberculosis of spine: current views in diagnosis and management [J]. *Asian Spine J*, 2014, 8(1): 97-111. DOI:10.4184/asj.2014.8.1.97
- [3] Mustafa AS. Mycobacterial gene cloning and expression, comparative genomics, bioinformatics and proteomics in relation to the development of new vaccines and diagnostic reagents [J]. *Med Princ Pract*, 2005, 14 (Suppl 1): 27-34. DOI:10.1159/000086182
- [4] Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, et al. Tuberculosis origin: the neolithic scenario [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2015,(Suppl 1):S122-6. DOI:10.1016/j.tube.2015.02.021
- [5] World Health Organization. Global tuberculosis report 2021 [R]. Geneva: WHO, 2021.
- [6] Calmette A. Preventive vaccination against tuberculosis with BCG [J]. *Proc R Soc Med*, 1931,24(11):1481-1490.
- [7] Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness [J]. *Lancet*, 2006, 367 (9517): 1173-1180. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68507-3
- [8] Andersen P, Kaufmann SH. Novel vaccination strategies against tuberculosis [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4(6):a018523. DOI:10.1101/cshperspect.a018523
- [9] Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005,3(8):656-662. DOI:10.1038/nrmicro1211
- [10] Abubakar I, Pimpin L, Ariti C, et al. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis [J]. *Health Technol Assess*, 2013, 17 (37): 1-372, v-vi. DOI:10.3310/hta17370
- [11] Li J, Zhao A, Tang J, et al. Tuberculosis vaccine development: from classic to clinical candidates [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020,39(8):1405-1425. DOI:10.1007/s10096-020-03843-6
- [12] Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. *Science*, 1990,247(4949 Pt 1): 1465-1468. DOI:10.1126/science.1690918
- [13] Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9 (10): 776-788. DOI: 10.1038/nrg2432
- [14] Ingolotti M, Kawalekar O, Shedlock DJ, et al. DNA vaccines for targeting bacterial infections [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2010,9(7):747-763. DOI:10.1586/erv.10.57
- [15] Jahanafrooz Z, Baradaran B, Mosafar J, et al. Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2020,25(3):552-560. DOI:10.1016/j.drudis.2019.12.003
- [16] Mohan T, Verma P, Rao DN. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead [J]. *Indian J Med Res*, 2013,138(5):779-795.
- [17] Renshaw PS, Panagiotidou P, Whelan A, et al. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1 : 1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6 * CFP-10 complex [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (24): 21598-21603. DOI: 10.1074/jbc.M201625200
- [18] 施瑞洁,韩梦箐,马娟,等. 结核 T 细胞酶联免疫斑点试验在诊断结核病中的临床应用价值[J]. *陕西医学杂志*, 2018, 47 (6): 800-804.
- [19] 石洁,朱岩昆,马晓光,等. 结核分枝杆菌早期分泌靶抗原和抗原 85B 融合蛋白的原核表达及其在血清学检测中的初步应用 [J]. *中国病原生物学志*, 2015, 10 (5): 389-392. DOI: 10.13350/j.cjpb.150502
- [20] Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, et al. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001,8(3):571-578. DOI:10.1128/CDLI.8.3.571-578.2001
- [21] Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, et al. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Infect Immun*, 1999,67(4): 1702-1707. DOI:10.1128/IAI.67.4.1702-1707.1999
- [22] 王雪梅,王英,薛玉芹,等. 结核病 DNA 疫苗 pVAX1/ESAT-6 的构建、鉴定及免疫效应评价[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33 (7): 945-950.
- [23] Maue AC, Waters WR, Palmer MV, et al. An ESAT-6: CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis* [J]. *Vaccine*, 2007,25(24):4735-4746. DOI:10.1016/j.vaccine.2007.03.052
- [24] Cervantes-Villagrana AR, Hernández-Pando R, Biragyn A, et al. Prime-boost BCG vaccination with DNA vaccines based in β -defensin-2 and mycobacterial antigens ESAT6 or Ag85B improve protection in a tuberculosis experimental model [J]. *Vaccine*, 2013,31(4): 676-684. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.042
- [25] Wang QM, Kang L, Wang XH. Improved cellular immune response elicited by a ubiquitin-fused ESAT-6 DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Microbiol Immunol*, 2009,53(7):384-390. DOI:10.1111/j.1348-0421.2009.00138.x
- [26] Xu J, Xu W, Chen X, et al. Recombinant DNA vaccine of the early secreted antigen ESAT-6 by *Mycobacterium tuberculosis* and Flt3 ligand enhanced the cell-mediated immunity in mice [J]. *Vaccine*, 2008,26(35): 4519-4525. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.06.044
- [27] Jiang Q, Zhang J, Chen X, et al. A novel recombinant DNA vaccine encoding *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and FL protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice [J]. *J Biomed Res*, 2013,27(5):406-420. DOI:10.7555/JBR.27.20120114
- [28] Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination [J]. *Nature*, 1999, 400 (6741):269-271.
- [29] Yuan W, Dong N, Zhang L, et al. Immunogenicity and protec-

- tive efficacy of a tuberculosis DNA vaccine expressing a fusion protein of Ag85B-Esat6-HspX in mice [J]. *Vaccine*, 2012, 30 (14):2490-2497. DOI:10.1016/j.vaccine.2011.06.029
- [30] Liang Y, Wu X, Zhang J, et al. The treatment of mice infected with multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines or in combination with rifampin [J]. *Vaccine*, 2008, 26(35):4536-4450. DOI:10.1016/j.vaccine.2008
- [31] Liang Y, Bai X, Zhang J, et al. Ag85A/ESAT-6 chimeric DNA vaccine induces an adverse response in tuberculosis-infected mice [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2):1146-1152. DOI:10.3892/mmr.2016.5364
- [32] Dey B, Jain R, Khera A, et al. Boosting with a DNA vaccine expressing ESAT-6 (DNAE6) obliterates the protection imparted by recombinant BCG (rBCGE6) against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection in guinea pigs [J]. *Vaccine*, 2009, 28(1):63-70. DOI:10.1016/j.vaccine.2009.09.121
- [33] Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker HG, et al. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG [J]. *Infect Immun*, 1988, 56 (12):3046-3051. DOI:10.1128/iai.56.12.3046-3051.1988
- [34] Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, et al. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis [J]. *Science*, 1997, 276 (5317):1420-1422. DOI:10.1126/science.276.5317.1420
- [35] Kuo CJ, Ptak CP, Hsieh CL, et al. Elastin, a novel extracellular matrix protein adhering to mycobacterial antigen 85 complex [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (6):3886-3896. DOI:10.1074/jbc.M112.415679
- [36] Dorhoi A, Reece ST, Kaufmann SH. For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection [J]. *Immunol Rev*, 2011, 240 (1):235-251. DOI:10.1111/j.1600-065X.2010.00994.x
- [37] Al-Attayah R, Mustafa AS, Abal AT, et al. *In vitro* cellular immune responses to complex and newly defined recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138 (1):139-144. DOI:10.1111/j.1365-2249.2004.02609.x
- [38] Macedo GC, Bozzi A, Weinreich HR, et al. Human T cell and antibody-mediated responses to the *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 85A, 85B, and ESAT-6 antigens [J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2011:351573. DOI:10.1155/2011/351573
- [39] Karbalaee Zadeh Babaki M, Soleimanpour S, Rezaee SA. Antigen 85 complex as a powerful *Mycobacterium tuberculosis* immunogene; biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design [J]. *Microb Pathog*, 2017, 112:20-29. DOI:10.1016/j.micpath.2017.08.040
- [40] Li F, Kang H, Li J, et al. Subunit vaccines consisting of antigens from dormant and replicating bacteria show promising therapeutic effect against *Mycobacterium bovis* BCG latent infection [J]. *Scand J Immunol*, 2017, 85(6):425-432. DOI:10.1111/sji.12556
- [41] Huygen K, Content J, Denis O, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine [J]. *Nat Med*, 1996, 2(8):893-898. DOI:10.1038/nm0896-893
- [42] D'Souza S, Rosseels V, Romano M, et al. Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Infect Immun*, 2003, 71 (1):483-493. DOI:10.1128/IAI.71.1.483-493.2003
- [43] Tanghe A, D'Souza S, Rosseels V, et al. Improved immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 by protein boosting [J]. *Infect Immun*, 2001, 69(5):3041-3047. DOI:10.1128/IAI.69.5.3041-3047.2001
- [44] Xu Y, Yang E, Wang J, et al. Prime-boost bacillus Calmette-Guérin vaccination with lentivirus-vectored and DNA-based vaccines expressing antigens Ag85B and Rv3425 improves protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* in mice [J]. *Immunology*, 2014, 143 (2):277-286. DOI:10.1111/imm.12308
- [45] Komine-Aizawa S, Jiang J, Mizuno S, et al. MHC-restricted Ag85B-specific CD8⁺ T cells are enhanced by recombinant BCG prime and DNA boost immunization in mice [J]. *Eur J Immunol*, 2019, 49(9):1399-1414. DOI:10.1002/eji.201847988
- [46] Zhang X, Divangahi M, Ngai P, et al. Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene [J]. *Vaccine*, 2007, 25 (7):1342-1352. DOI:10.1016/j.vaccine.2006.09.089
- [47] Sun L, Yuan Q, Xu T, et al. Novel adjuvant for immunization against tuberculosis: DNA vaccine expressing *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A and interleukin-15 fusion product elicits strong immune responses in mice [J]. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(8):1159-1166. DOI:10.1007/s10529-017-2342-1
- [48] Mir FA, Kaufmann SH, Eddine AN. A multicistronic DNA vaccine induces significant protection against tuberculosis in mice and offers flexibility in the expressed antigen repertoire [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(10):1467-1475. DOI:10.1128/CVI.00237-09
- [49] Yao W, Liu S, Qu X, et al. Enhanced immune response and protection efficacy of a DNA vaccine constructed by linkage of the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-encoding gene with the BVP22-encoding gene [J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(Pt 4):462-468. DOI:10.1099/jmm.0.004267-0
- [50] Mustafa AS. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis [J]. *Mol Immunol*, 2002, 39(1/2):113-119. DOI:10.1016/s0161-5890(02)00048-2
- [51] Sefidi-Heris Y, Jahangiri A, Mokhtarzadeh A, et al. Recent progress in the design of DNA vaccines against tuberculosis [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 11: S1359-6446 (20) 30345-30347. DOI:10.1016/j.drudis.2020.09.005
- [52] Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, et al. Vaccination against tuberculosis by DNA injection [J]. *Nat Med*, 1996, 2(8):888-892. DOI:10.1038/nm0896-888
- [53] Dai W, Huang H, Yuan Y, et al. Comparative study on the immunogenicity between Hsp70 DNA vaccine and Hsp65 DNA vaccine in human *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Tongji Med Univ*, 2001, 21(3):181-183. DOI:10.1007/BF02886423
- [54] Ferraz JC, Stavropoulos E, Yang M, et al. A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immuniza-

- tion strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice [J]. Infect Immun, 2004, 72(12): 6945-6950. DOI: 10.1128/IAI.72.12.6945-6950.2004
- [55] Gonçalves ED, Bonato VL, da Fonseca DM, et al. Improve protective efficacy of a TB DNA-HSP65 vaccine by BCG priming [J]. Genet Vaccines Ther, 2007, 5:7. DOI: 10.1186/1479-0556-5-7
- [56] Pelizon AC, Martins DR, Zorzella-Pezavento SF, et al. Neonatal BCG immunization followed by DNAhsp65 boosters: highly immunogenic but not protective against tuberculosis a paradoxical effect of the vector [J]. Scand J Immunol, 2010, 71(2): 63-69. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02352.x
- [57] Kaneda Y, Yamamoto S, Nakajima T. Development of HVJ envelope vector and its application to gene therapy [J]. Adv Genet, 2005, 53: 307-332.
- [58] Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model [J]. Vaccine, 2005, 23: 2132-2135. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.01.057
- [59] Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, et al. DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation [J]. Vaccine, 2006, 24: 1191-1204. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.103
- [60] Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al. Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB [J]. Vaccine, 2007, 25: 2990-2993. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.01.014
- [61] Changhong S, Hai Z, Limei W, et al. Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of *Mycobacterium tuberculosis* and the human interleukin 2 fusion gene [J]. Tuberculosis (Edinb), 2009, 89(1): 54-61. DOI: 10.1016/j.tube.2008.09.005
- [62] 胡方靖, 武军驻. pHsp65GM 的构建及其对结核杆菌感染小鼠的保护 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(8): 666-671. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20110158
- [63] Wang Q. Ub combination enhanced cellular immune response elicited by HSP65 DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. World J Vaccines, 2013, 3: 89.
- [64] Lambert PH, Laurent PE. Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform vaccine administration [J]. Vaccine, 2008, 26(26): 3197-3208. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.03.095
- [65] Mellott AJ, Forrest ML, Detamore MS. Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering [J]. Ann Biomed Eng, 2013, 41(3): 446-468. DOI: 10.1007/s10439-012-0678-1
- [66] Soltani F, Parhiz H, Mokhtarzadeh A, et al. Synthetic and biological vesicular nano-carriers designed for gene delivery [J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(42): 6214-6235. DOI: 10.2174/1381612821666151027153410
- [67] Wei W, Qi X, Li J, et al. Smart macroporous salectan/poly(N, N-diethylacrylamide) semi-IPN hydrogel for anti-inflammatory drug delivery [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2016, 2(8): 1386-1394. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00318
- [68] Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(2): 143-54. DOI: 10.1016/s1359-6101(01)00033-8
- [69] Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4): 331-342. DOI: 10.1038/nri1594
- [70] Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity [J]. J Invest Dermatol, 2005, 125(4): 615-628. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23841.x
- [71] Ingolotti M, Kawalekar O, Shedlock DJ, et al. DNA vaccines for targeting bacterial infections [J]. Expert Rev Vaccines, 2010, 9(7): 747-763. DOI: 10.1586/erv.10.57
- [72] Tavernier G, Andries O, Demeester J, et al. mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression [J]. J Control Release, 2011, 150(3): 238-247. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.10.020
- [73] Irvine DJ, Hanson MC, Rakhra K, et al. Synthetic nanoparticles for vaccines and immunotherapy [J]. Chem Rev, 2015, 115(19): 11109-11146. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00109
- [74] Food and Drug Administration. Considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications, 2007 [EB/OL]. (2014-03-26)[2021-07-25]. <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>
- [75] Khalili S, Rahbar MR, Dezfulian MH, et al. In silico analyses of Wilms tumor protein to designing a novel multi-epitope DNA vaccine against cancer [J]. J Theor Biol, 2015, 379: 66-78. DOI: 10.1016/j.jtbi.2015.04.026
- [76] Vani J, Shaila MS, Chandra NR, et al. A combined immunoinformatics and structure-based modeling approach for prediction of T cell epitopes of secretory proteins of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Microbes Infect, 2006, 8(3): 738-746. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.09.012
- [77] Wang J, Zhang H, Wang H. Analysis of predicted CD8⁺ T cell epitopes from proteins encoded by the specific RD regions of *Mycobacterium tuberculosis* for vaccine development and specific diagnosis [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(4): 1793-1799. DOI: 10.1007/s11033-009-9613-4
- [78] Mustafa AS. In silico analysis and experimental validation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific proteins and peptides of *Mycobacterium tuberculosis* for immunological diagnosis and vaccine development [J]. Med Princ Pract, 2013, 22 (Suppl 1): 43-51. DOI: 10.1159/000354206
- [79] Khalili S, Rasaee MJ, Bamdad T, et al. A novel molecular design for a hybrid phage-DNA construct against DKK1 [J]. Mol Biotechnol, 2018, 60(11): 833-842. DOI: 10.1007/s12033-018-0115-2
- [80] Rezaei T, Khalili S, Baradaran B, et al. Recent advances on HIV DNA vaccines development: stepwise improvements to clinical trials [J]. J Control Release, 2019, 316: 116-137. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.10.045