证书号第1851728号

北京市海淀区地方税务局 印花税 代扣专用章 国家知识产权局

# 发明专利证书

发 明 名 称：流感疫苗、组合物及使用方法

发 明 人：S·阿朗素;李瑞;V·乔;C·洛克特

专 利 号：ZL 2009 8 0160953.1

专利申请日：2009年06月15日

专 利 权 人：新加坡国立大学;里尔巴斯德研究所;国家医疗保健研究所

授权公告日：2015年11月25日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年06月15日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。

局长
申长雨

中华人民共和国国家知识产权局

2015年11月25日

(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102802665 B
(45)授权公告日 2015.11.25

(21)申请号 200980160953.1

(22)申请日 2009.06.15

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.02.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2009/007153 2009.06.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/146414 EN 2010.12.23

(83)生物保藏信息
CNCM I-3585 2006.03.09
NMI V09/009169 2009.04.27

(73)专利权人 新加坡国立大学
地址 新加坡新加坡城
专利权人 里尔巴斯德研究所
国家医疗保健研究所

(72)发明人 S·阿朗素 李瑞 V·乔
C·洛克特

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 李平 郑霞

(51)Int.Cl.
*A61K 39/10*(2006.01)
*A61K 31/16*(2006.01)

(56)对比文件
WO 2007/104451 A1 ,2007.09.20,
Rob J.L等.The efficacy of a whole cell pertussis vaccine and fimbriae against Bordetella pertussis and bordetella parapertussis infections in a respiratory mouse model.《Vaccine》.1998,第16卷(第4期),第410-416页.
赵占勤等.重组百日咳杆菌黏附素蛋白免疫小鼠可完全抵抗支气管败血波氏杆菌的致死性感染.《微生物学报》.2008,第48卷(第3期),第337-341页.

审查员 刘苗

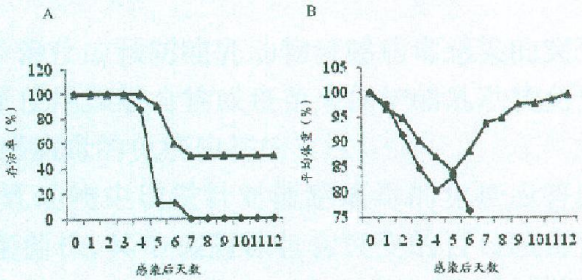
权利要求书1页 说明书29页 附图6页

(54)发明名称

流感疫苗、组合物及使用方法

(57)摘要

本发明涉及含有用于治疗或预防哺乳动物流感病毒感染的突变的博代氏杆菌菌株的组合物和疫苗。另外,本发明进一步提供了使用该组合物或疫苗来保护哺乳动物免受流感病毒感染和/或在哺乳动物中诱发针对流感病毒的免疫应答的方法。




CN 102802665 B

Certificate No. **1851728**

## Certificate of Invention Patent

**Title: Influenza Vaccine, Composition, and Methods of Use**

**Inventors: Sylvie Alonso; Rui Li; Vincent Chow; Camille Locht**

**Patent No.: ZL 2009 8 0160953.1**

**Date of Filing: June 15, 2009**

**Patentee: National University of Singapore; Institut Pasteur De Lille;**
**Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM)**

**Date of grant announcement: November 25, 2015**

This Office made examination on this Invention pursuant to the provisions of Patent Law of the People's Republic of China, and now decides to grant the Patent, issue this Certificate and register this Patent in the Patent Register. The Patent takes effect as of the Date of the grant announcement.

The term of the Patent is twenty years, counted from the filing date. The Patentee must pay annuity each year pursuant to Patent Law and its Implementing Regulations. The time limit for paying the annuity is before the Fifteenth of June of each year. If the annuity is not paid within the prescribed time limit, the Patent will be terminated since the expiration date of the time limit within which the annuity should be paid.

The Patent Certificate records the legal status of this Patent when the Patent is registered. Any transfer, pledge, invalidation, cessation or restoration of the Patent and change of the Patentee's name, nationality or address will be recorded in the Patent Register.

The State IP Office of China
(Seal)

Commissioner Changyu Shen

November 25, 2015

(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102802665 B
(45)授权公告日 2015.11.25

(21)申请号 200980160953.1

(22)申请日 2009.06.15

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.02.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2009/007153 2009.06.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/146414 EN 2010.12.23

(83)生物保藏信息
CNCM I-3585 2006.03.09
NMI V09/009169 2009.04.27

(73)专利权人 新加坡国立大学
地址 新加坡新加坡城
专利权人 里尔巴斯德研究所
国家医疗保健研究所

(72)发明人 S·阿朗素 李瑞 V·乔
C·洛克特

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 李平 郑霞

(51)Int.Cl.
*A61K 39/10*(2006.01)
*A61K 31/16*(2006.01)

(56)对比文件
WO 2007/104451 A1 ,2007.09.20,
Rob J.L等.The efficacy of a whole cell pertussis vaccine and fimbriae against Bordetella pertussis and bordetella parapertussis infections in a respiratory mouse model.《Vaccine》.1998,第16卷(第4期),第410-416页.
赵占勤等.重组百日咳杆菌黏附素蛋白免疫小鼠可完全抵抗支气管败血波氏杆菌的致死性感染.《微生物学报》.2008,第48卷(第3期),第337-341页.

审查员 刘苗

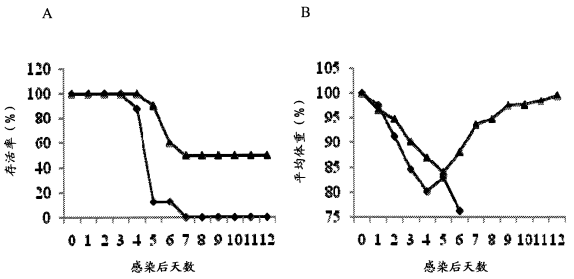
权利要求书1页 说明书29页 附图6页

(54)发明名称

流感疫苗、组合物及使用方法

(57)摘要

本发明涉及含有用于治疗或预防哺乳动物流感病毒感染的突变的博代氏杆菌菌株的组合物和疫苗。另外,本发明进一步提供了使用该组合物或疫苗来保护哺乳动物免受流感病毒感染和/或在哺乳动物中诱发针对流感病毒的免疫应答的方法。




CN 102802665 B

1.一种活的减毒的突变的百日咳博代氏杆菌菌株在制备用于诱发针对甲型流感病毒的保护性免疫的药物中的用途，其中该菌株包含突变的百日咳毒素（ptx）基因、缺失或突变的皮肤坏死（dnt）基因和异源ampG基因，且其中该百日咳博代氏杆菌菌株不包含携带异源抗原的异源表达平台。

2.权利要求1的用途，其中野生型百日咳博代氏杆菌菌株的ampG基因被替换为大肠杆菌ampG基因。

3.权利要求2的用途，其中ptx基因的突变包括对参与底物结合的氨基酸和/或参与催化的氨基酸进行替换。

4.权利要求3的用途，其中所述参与底物结合的氨基酸的替换包括K9R，且所述参与催化的氨基酸的替换包括E129G。

5.权利要求1的用途，其中该百日咳博代氏杆菌菌株包括三突变的菌株。

6.权利要求5的用途，其中该百日咳博代氏杆菌菌株包括BPZE1菌株，所述BPZE1菌株以保藏号CNCM I-3585鉴定，2006年3月9日按照布达佩斯条约保藏于法国巴黎的国家微生物菌种保藏中心（CNCM）。

7.权利要求1的用途，其中该百日咳博代氏杆菌菌株不包含除了异源ampG基因以外的其它异源基因。

8.权利要求1的用途，其中该百日咳博代氏杆菌菌株在甲型流感病毒感染前给药。

9.权利要求8的用途，其中该百日咳博代氏杆菌菌株在甲型流感病毒感染前约6周或更多时间进行给药。

10.权利要求9的用途，其中该百日咳博代氏杆菌菌株在甲型流感病毒感染前约12周或更多时间进行给药。

11.权利要求1的用途，其中该药物给药多于一次。

12.权利要求11的用途，其中该药物以两个剂量给药两次。

13.权利要求12的用途，其中该两个剂量约隔3周给药。

# 流感疫苗、组合物及使用方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物学和病毒学领域。

## 背景技术

[0002] 存在三种类型的流感病毒：甲型、乙型和丙型流感病毒，它们在它们的流行病模式中差别很大。甲型流感病毒既是被表征最好的，也是对公众健康威胁最严重的，其能够诱发大规模的时疫或流行病。该病毒还具有高度变异的抗原性，使得生产有效疫苗很困难。

[0003] 流感疫苗应该是预防疾病以及控制疾病传播的最有效、安全、无毒和最经济的武器。接种疫苗的主要目标是激活适应的特异性免疫应答，主要是要产生针对与疾病或病原相关的抗原的 B 和 T 淋巴细胞。

[0004] 目前可以获得一些流感疫苗，其主要含有灭活疫苗。这些疫苗可以包含两种甲型抗原（例如，H1N1 和 H3N2）和一种乙型抗原。可得到的疫苗一般含有整个病毒体、分离产品和亚单位疫苗。一般，这些疫苗如果对新生传染病的同一性非常匹配的话，它们就会对高达 90％的已接种个体具有效果。然而，它们需要每年进行更新以与流感病毒的抗原性变化保持同步。

[0005] 此外，最近报道了一种针对季节性流感的冷适应的减毒活鼻内疫苗 (LAIV)。关于感染 H1N1 菌株的棉花大鼠抵御 H3N2 病毒的一项研究中描述了交叉保护性免疫。然而，关于 LAIV 的一个主要的顾虑是基因翻转和与野生型流感病毒混种的可能性，其会产生一种新的、潜在的感染性菌株。

[0006] 本发明致力于解决流感疫苗的这些和其它问题，提供了疫苗和组合物，其使用突变的博代氏杆菌 (Bordetella) 菌株作为有效成分试剂，来诱发针对一种或多种流感菌株的免疫应答。

[0007] 另外，相关技术描述了使用博代氏杆菌菌株来诱导针对例如能够导致人百日咳的博代氏杆菌的免疫应答的多种类型的疫苗和组合物 (WO2007104451 和 WO2003102170)；然而这些技术没能披露在哺乳动物中通过使用本发明的方法、组合物和／或疫苗来诱发针对流感病毒的免疫应答的方法或组合物。

[0008] 因此，对于能够广泛抵抗由流感病毒感染引起的疾病的新型流感疫苗存在需求。

[0009] <u>简述</u>

[0010] 本发明涉及组合物和疫苗，其包括用于治疗或预防哺乳动物流感病毒感染的突变的博代氏杆菌菌株。另外，本发明进一步提供了使用该组合物或疫苗来保护哺乳动物免受流感病毒感染和／或在哺乳动物中诱发针对流感病毒的免疫应答的方法。

[0011] 在一个方面，本发明提供了一种在哺乳动物中诱发针对流感病毒的免疫应答的方法，包括：对哺乳动物施用突变的博代氏杆菌菌株，其中该菌株包含突变的百日咳毒素 (ptx) 基因、缺失或突变的皮肤坏死 (dnt) 基因、和异源 ampG 基因。在一些方面，该博代氏杆菌菌株包括百日咳博代氏杆菌菌株。在一些方面，野生型博代氏杆菌 ampG 基因被替换为大肠杆菌 ampG 基因。在其它方面，ptx 基因的突变包括对参与底物结合的氨基酸和／或参

与催化的氨基酸进行替换。在一些方面，参与底物结合的氨基酸的替换包括 K9R，且参与催化的氨基酸的替换包括 E129G。在一些方面，该博代氏杆菌菌株包括三突变的菌株。在一些方面，该博代氏杆菌菌株包括 BPZE1 菌株。在其它方面，该博代氏杆菌菌株是减毒的。在一些方面，该博代氏杆菌菌株包括活菌株。在其它方面，该博代氏杆菌菌株不包含除了异源 ampG 基因以外的其它异源基因。在一些方面，该博代氏杆菌菌株不包含携带异源抗原至哺乳动物呼吸黏膜的异源表达平台。在其它方面，该方法进一步包括预防或治疗哺乳动物流感病毒感染。在一些方面，该博代氏杆菌菌株在流感病毒感染前给药。在一些方面，该博代氏杆菌菌株在流感病毒感染前约 6 周或更多时间给药。在其它方面，该博代氏杆菌菌株在流感病毒感染前约 12 周或更多时间给药。在一些方面，该流感病毒包含 H3 或 H1。在其它方面，该流感病毒包含 N2 或 N1。

[0012] 在一些方面，该流感病毒包含 H3 和 N2。在其它方面，该流感病毒包含 H1 和 N1。在一些方面，免疫应答包括 Th1 免疫应答。在一些方面，该菌株对哺乳动物通过皮下 (s.c.)、皮内 (i.d.)、肌肉内 (i.m.)、静脉内 (i.v.)、口服、或鼻内给药；或通过注射或吸入。在其它方面，该菌株经鼻内给药。在一些其它方面，该菌株被给药至需要针对流感病毒感染的保护性免疫的哺乳动物。在一些方面该哺乳动物是儿童。在一些方面，该菌株以单一剂量给药一次。在一些方面，该菌株给药多于一次。在一些方面，该菌株以两个剂量给药两次。在其它方面，该两个剂量约隔 3 周给药。在一些方面，抵抗流感病毒感染的保护水平高于约 60％。在其它方面，抵抗流感病毒感染的保护水平高于约 50％。在一些方面，该哺乳动物是人。

[0013] 在另一方面，本发明提供了对人体诱发针对 H3N2 流感病毒的保护性免疫应答的方法，包括：在人体感染 H3N2 流感病毒之前对人体鼻内给药活体和减毒的 BPZE1 菌株，其中该菌株不包含携带异源抗原至人体呼吸黏膜的异源表达平台。

[0014] 在另一方面，本发明提供了在人体诱发针对流感病毒的免疫应答的方法，包括：对人体给药活博代氏杆菌菌株，其中该菌株不包含携带异源抗原至人体呼吸黏膜的异源表达平台。

[0015] 在另一方面，本发明提供了保护哺乳动物免受流感病毒感染导致的疾病的方法，包括：对哺乳动物给药突变的博代氏杆菌菌株，其包含突变的 ptx 基因、缺失或突变的 dnt 基因、和异源 ampG 基因。

[0016] 在另一方面，本发明提供了一种针对流感病毒感染的保护性免疫，包括：对哺乳动物给药突变的博代氏杆菌菌株，其包含突变的 ptx 基因、缺失或突变的 dnt 基因、和异源 ampG 基因。

[0017] 在另一方面，本发明提供了一种用于治疗或预防哺乳动物流感病毒感染的组合物，包括：突变的博代氏杆菌菌株，其中该菌株包含突变的百日咳毒素 (ptx) 基因、缺失或突变的皮肤坏死 (dnt) 基因、和异源 ampG 基因。在一些方面，该博代氏杆菌菌株包括百日咳博代氏杆菌菌株。在其它方面，野生型博代氏杆菌菌株的 ampG 基因被替换为大肠杆菌 ampG 基因。在一些方面，ptx 基因的突变包括对参与底物结合的氨基酸和 / 或参与催化的氨基酸进行的替换。在其它方面，参与底物结合的氨基酸的替换包括 K9R，且参与催化的氨基酸的替换包括 E129G。在一些方面，该博代氏杆菌菌株包括三突变的菌株。

[0018] 在另一方面，本发明提供了一种疫苗，其包含用于治疗或预防哺乳动物流感病毒感染的本发明的组合物。在一些方面，该疫苗包含在此描述的博代氏杆菌菌株组合物。在

一些方面，该疫苗被配制为用于鼻腔给药。

[0019] 在另一方面，本发明提供了一种博代氏杆菌菌株，其保藏号为 CNCM I-3585。

[0020] 在另一方面，本发明提供了一种博代氏杆菌菌株，其保藏号为 V09/009169。

[0021] 附图简述

[0022] 通过以下描述及附图可以更好地理解本发明的这些和其它特征、方面和优点，其中：

[0023] 图 1 显示了用 BPZE1 处理的小鼠对抗小鼠适应性 H3N2 病毒的致死性攻击的保护率。成年 Balb/c 小鼠被经鼻给药 $5x10^6$cfu 的 BPZE1 细菌，并在 3 周（实心方块）或 6 周（实心三角）后用致死剂量 (2LD50) 的小鼠适应性 H3N2 病毒进行攻击。每天监测体重变化，当小鼠体重损失超过原始体重的 20％时对其进行安乐死。将存活率与未经处理的小鼠（实心菱形）进行比较。每组评价 10 只动物。结果代表三个独立实验。

[0024] 图 2 显示了用死 BPZE1 细菌和活 BPZE1 细菌处理的小鼠对抗小鼠适应性 H3N2 病毒的致死性攻击的保护率。成年 Balb/c 小鼠被经鼻给药 $5\times10^6$cfu 的活 BPZE1 细菌（实心三角）或死（实心方块）BPZE1 细菌，并在 6 周后用致死剂量 (2LD50) 的小鼠适应性 H3N2 病毒进行攻击。每天监测体重变化，当小鼠体重损失超过原始体重的 20％时对其进行安乐死。将存活率与未经处理的小鼠（实心菱形）进行比较。每组评价 10 只动物。结果代表二个独立实验。

[0025] 图 3 显示了用 BPZE1 活菌处理两次的小鼠对抗小鼠适应性 H3N2 病毒的致死性攻击的保护率。成年 Balb/c 小鼠在 4 周的间隔中两次经鼻给药 $5\times10^6$cfu 的 BPZE1 细菌（实心方块），并在 4 周后用致死剂量 (2LD50) 的小鼠适应性 H3N2 病毒进行攻击。每天监测体重变化，当小鼠体重损失超过原始体重的 20％时对其进行安乐死。将存活率与未经处理的小鼠（实心菱形）进行比较。每组评价 10 只动物。结果代表二个独立实验。

[0026] 图 4 显示了用 BPZE1 处理的小鼠对抗 H1N1 甲型流感病毒的致死性攻击的保护率。成年 Balb/c 小鼠在 4 周和 3 周（实心三角）的间隔中三次经鼻给药 $5\times10^6$cfu 的 BPZE1 活菌。在最后一次 BPZE1 处理后 2 周对动物用致死剂量 (4LD50) 的 A/PR/8/34(H1N1) 甲型流感病毒进行攻击。每天监测体重变化，当小鼠体重损失超过原始体重的 20％时对其进行安乐死。将存活率与未经处理的小鼠（实心菱形）进行比较。每组评价 10 只动物。结果代表二个独立实验。

[0027] 图 5 显示了受保护的小鼠肺部和未受保护的小鼠肺部的病毒载量。成年 Balb/c 小鼠在 4 周的间隔中 2 次经鼻给药 $5\times10^6$cfu 的 BPZE1 活菌，并在 4 周后用致死剂量 (2LD50) 的小鼠适应性 H3N2 病毒进行攻击。病毒攻击 3 天后每组杀死五只动物，取其肺部并各自进行 MDCK 细胞感染的 $TCID_{50}$的体外检测。将病毒载量与未经处理的小鼠进行比较。结果代表三个独立实验。

[0028] 图 6 显示了致死剂量病毒攻击后 BPZE 1 处理的和未经处理的小鼠肺部中肺组织和细胞浸润以及 $CD3^+T$ 细胞群。成年 Balb/c 小鼠被经鼻给药 $5x10^6$cfu 的 BPZE1 活菌，并在 6 周后用致死剂量 (2LD50) 的小鼠适应性 H3N2 病毒进行攻击。病毒攻击 3 天后，对小鼠进行安乐死，对其肺部分别进行组织学分析 (A) 或用于细胞浸润分析的支气管肺泡灌洗 (B)。图例 A：感染的对照小鼠表现出严重发炎、肺水肿（黑色箭头）和伴有坏死细胞碎片的严重坏死性支气管炎（空心箭头）。感染的BPZE1处理的小鼠仅表现出最小限度的发炎和呼吸道

受伤，以及轻微的细支气管周边损伤。示出了代表性的区域。结果等价于每组分析超过 40 个区域（＞5 区域／截面，2 截面／小鼠和 4 小鼠／组）。图例 B：a，未免疫的（naïve）小鼠未受攻击；b，未免疫的小鼠用 H3N2 病毒攻击；c，BPZE1 处理的小鼠未受攻击；d，BPZE1 处理的小鼠用 H3N2 病毒攻击。对于每组每个时间点的四只动物进行分别评价。**，p ≤ 0.01；***，p ≤ 0.001。结果代表二个独立实验。(C) 小鼠肺部的 $CD3^+T$ 细胞群的 FACS 分析。致死性 H3N2 流感病毒攻击 3 天或 5 天后，未处理的对照小鼠和 BPZE1 处理两次的小鼠进行安乐死，通过流式细胞仪分析其肺部的 $CD3^+T$ 细胞群。对于每组每个时间点的四只动物进行分别评价。结果表示为全肺细胞群中 $CD3^+T$ 细胞的百分比。平均值 ±SD。图例：a，未免疫的小鼠未受攻击；b，BPZE1 处理的小鼠未受攻击；c，未免疫的小鼠用 H3N2 病毒攻击并在 3 天后处死；d，BPZE1 处理的小鼠用 H3N2 病毒攻击并在 3 天后处死；e，未免疫的小鼠用 H3N2 病毒攻击并在 5 天后处死；f，BPZE1 处理的小鼠用 H3N2 病毒攻击并在 5 天后处死。***，p ≤ 0.001。

[0029] 图 7 显示了 BPZE1 处理的小鼠和未经处理的小鼠在致死性 H3N2 病毒攻击后的促－和抗－炎性细胞因子和趋化因子谱。成年 Balb/c 小鼠在 4 周的间隔中两次经鼻给药 $5x10^6$cfu 的 BPZE1 活菌并在最后一次给药的 4 周后用致死剂量 (2LD50) 的小鼠适应性 H3N2 病毒进行攻击。病毒攻击 1 天和 3 天后，每组在每个时间点处死 5 只小鼠并收集支气管肺泡灌洗液 (BALF)。对于每个 BALF 样品检测 14 种炎性相关的细胞因子和趋化因子。图例：1，未处理的未受攻击小鼠；2，BPZE1 处理的未受攻击小鼠；3，未处理的受攻击小鼠且攻击后 1 天处死；4，BPZE1 处理的受攻击小鼠且攻击后 1 天处死；5，未处理的受攻击小鼠且攻击后 3 天处死；6，BPZE1 处理的受攻击小鼠且攻击后 3 天处死。*，p ≤ 0.05；**，p ≤ 0.01；***，p ≤ 0.001。

[0030] 图 8 显示了百日咳博代氏杆菌 (B.pertussis) 特异性免疫在交叉保护中的作用。(A). 用小鼠适应性 H3N2 病毒进行致死性攻击 (2LD50) 的一天前将未免疫的血清（空心三角）或抗 -H3N2（实心圆）或抗 -BPZE1（空心圆）的免疫血清经腹腔 (ip.) 注射至成年未免疫的 Balb/c 小鼠。每天监测体重变化，当小鼠体重损失超过原始体重的 20％时对其进行安乐死。将存活率与未经处理的小鼠进行比较（实心三角）。每组评价 10 只动物。(B)&(C). 成年 Balb/c 小鼠被经鼻给药 $5x10^6$cfu 的 BPZE 1 活菌，6 周后进行安乐死收集其脾脏。用 BPZE1 裂解物或热失活 H3N2 病毒颗粒刺激来自 6 只动物的混合 (B) 或个体 (C) 脾脏细胞。按照以下描述进行 $^3$H- 胸腺嘧啶掺入 (B) 和 IFN-γ ELISPOT 分析 (C)。两组不同实验的代表值的结果相似；平均值 ±SD；*，p ≤ 0.05，***，p ≤ 0.001。

[0031] <u>发明详述</u>

[0032] 介绍和综述

[0033] 本发明涉及用于在哺乳动物中治疗或预防流感病毒感染的组合物和疫苗，它们包括突变的博代氏杆菌菌株。另外，本发明进一步提供了使用该组合物或疫苗保护哺乳动物免受流感病毒感染和／或在哺乳动物中诱发针对流感病毒的免疫应答的方法。

[0034] 除非另有说明，否则权利要求书和说明书中的术语按照以下定义。

[0035] 在此使用的缩写“PTX”指百日咳毒素，其合成并分泌一种 ADP- 核糖基化毒素。PTX 由五个不同亚基（称为 S1-S5）组成，各复合物含有两个拷贝的 S4。各亚基按照 A-B 结构排列。A 部分具有酶活性，形成于 S1 亚基，B 部分是受体结合部分，由 S2-S5 亚基组成。

[0036] 在此使用的缩写“DNT”指百日咳皮肤坏死毒素，其是一种不耐热毒素，能够在皮内

注射时诱导小鼠和其它实验室动物发生局部损伤。

[0037] 在此使用的缩写“TCT”指气管细胞毒素，其是一种博代氏杆菌合成的致病因子。TCT 是一种肽聚糖片段，能够诱导白介素 -1 的生产和一氧化氮的合成。其能够导致纤毛郁积 (stasis)，并对于呼吸道上皮细胞具有致死效果。

[0038] 术语“减毒”指减弱的、低毒性的博代氏杆菌菌株，其能刺激免疫应答和产生保护性免疫，但一般不会导致生病。

[0039] 术语“快速保护性免疫”指在本发明的突变博代氏杆菌菌株给药后短时间内具有针对博代氏杆菌的免疫。

[0040] 术语“博代氏杆菌菌株”或“菌株”包括来自百日咳博代氏杆菌 (Bordetella pertussis)、副百日咳博代氏杆菌 (Bordetella parapertussis) 和支气管炎博代氏杆菌 (Bordetella bronchiseptica) 的菌株。

[0041] 术语“儿童”指 0 月到 18 岁大的人或哺乳动物。

[0042] “治疗”指对疾病、病症或紊乱进行成功处理或改善或预防的任何指标，包括任何客观或主观参数，例如，减轻；缓解；症状消失或使得疾病症状对病人而言更易忍受；减缓退化或衰弱的速度；或使恶化末期没那么衰弱。症状的治疗或减缓可以基于客观或主观参数；包括医师的检查。从而，术语“治疗”包括施用本发明的化合物或试剂以预防或延迟、减缓或阻止或抑制与在此描述的疾病、病症或紊乱有关的病情的发展。术语“治疗效果”指在受试者中疾病、病症或副反应的减少、消除或预防。使用本发明的方法进行“治疗”或“处理”包括预防可能导致与在此描述的疾病、病症或紊乱有关的疾病或紊乱的风险增加、但是还没有发生或表现出病情的症状在受试者中发作；抑制疾病或紊乱的症状（减缓或阻止其发展）；减轻疾病的症状或副反应（包括舒减疗法）；和减轻（导致退化的）疾病症状。治疗可以是预防性的（预防或延迟疾病发作，或防止其临床或亚临床症状）或在疾病或病况表现之后治疗抑制或减轻症状。

[0043] 将本发明的组合物与已知药物（或其它化合物）进行“联合用药”指在一定时候将组合物与该药物（或其它化合物）一同给药，从而二者都具有治疗或诊断效果。这种联合用药可以包括相对于施用本发明的组合物而言对该药物（或其它化合物）进行并行（即，同时）、在前或相继给药。本领域一般技术人员将能够很容易判断特定药物（或其它化合物）以及本发明的组合物的合适的给药时间、顺序和剂量。

[0044] 在此使用的术语“保护”和“预防”可交换使用，意为阻止流感病毒感染。

[0045] “预防性疫苗”指该疫苗预防未来暴露在流感病毒后感染。

[0046] 术语“免疫原性组合物”或“组合物”指能够诱导免疫应答并从而具有抗原性的组合物。“免疫应答”指免疫系统的任何反应。这些反应包括有机体的免疫系统针对抗原的活性变化，其可以包括，例如，抗体生产、诱导细胞介导的免疫、补体激活、或免疫耐受的形成。

[0047] 在此使用的术语“疾病”具有本领域一般公知的和理解的含义，包括宿主个体的功能或健康的任何非正常状况。医疗保健人员对特定疾病的诊断可以通过直接检查和 / 或对一种或多种诊断检测的结果进行分析来得出。

[0048] 术语“活疫苗组合物”、“活疫苗”、“活细菌疫苗”、以及相似术语表示一种组合物，其含括提供至少部分针对流感的保护性免疫的活博代氏杆菌。

[0049] 术语“口服”、“肠内”、“经肠”、“经口”、“非 - 肠道外”、“非 - 不经肠道”等等，表示

经由消化道的途径或方式将化合物或组合物给药至个体。组合物经“口服”途径给药的例子包括但不限于，经口腔吞咽液体或固体形式的疫苗组合物、经鼻空肠或胃造口管的疫苗组合物给药、疫苗组合物的十二指肠给药、和直肠给药，例如，使用释放在此描述的活菌疫苗菌株的栓剂。

[0050] 术语“局部用药”指对皮肤或黏膜的外表面（包括鼻、肺和嘴的外表面）施用药物试剂，从而该药剂穿过皮肤或黏膜的外表面并进入在下的组织。局部用药会导致药剂在皮肤和周围组织的有限分配，或者，当药剂随血液流动从治疗区移走后，会导致药剂的全身性分配。在优选的形式中，药剂通过经皮给药进行递送，例如，使用皮肤药贴。经皮给药指药剂穿过皮肤（角质层和上皮层）进行扩散，皮肤表现为一种使得很少药剂能够穿透的障碍存在。相反，真皮是可渗透的，能够吸收多种溶解物和药物，从而局部用药更容易透过被擦伤或以其它方式剥落表皮露出真皮的皮肤。经完整皮肤的吸收可以通过在皮肤用药（涂擦过程）之前进行活性药剂和油性载体的结合来获得增强（例如，霜剂，润滑剂，穿透促进剂等等，描述于例如，Remington′ s Pharmaceutical Sciences，现行版，Gennaro 等人编辑）。

[0051] 术语“鼻腔给药”指对受试者的鼻腔通道推入或以其它方式引入活性成分、从而其接触鼻腔呼吸上皮并从该处吸收至全身循环的任何形式的给药。鼻腔给药也可包括接触位于鼻腔顶部鼻中隔和各主要鼻通道侧壁之间的嗅觉上皮细胞。直接围绕嗅觉上皮的鼻腔区域不接触气流。从而，一般需要采用特殊方法来达到透过嗅觉上皮的显著吸收。

[0052] 术语“气雾剂”按其常规含义使用，指非常精细的液体或固体颗粒在压力下由气体推进剂携带至治疗应用的位点。本发明的医疗气雾剂含有在流体载体和推进剂混合物中可溶解、分散或乳化的治疗活性化合物。气雾剂的形式可以有溶液、悬液、乳液、粉末或半固体制剂。本发明的气雾剂作为精细的、固体的颗粒或液雾用于经患者的呼吸道给药。可使用各种类型的推进剂，包括但不限于，烃类或其它合适的气体。本发明的气雾剂也可通过喷雾器进行递送，其在气体中产生基本上均匀大小的非常精细的液体颗粒。优选的，含有活性化合物的液体被分散为液滴，其可以被气流携带出喷雾器，进入患者呼吸道。

[0053] 术语“改善”指在治疗例如流感相关疾病状态的疾病状态中得到的任何有益的治疗结果，包括预防、减轻严重程度或进程、缓解或治愈。

[0054] 一般而言，术语“耐受良好的”指不存在由治疗导致的会影响治疗决定的健康状况的负面变化。

[0055] “协同作用”指一种相互作用，其中两种或更多药剂的组合效果大于其各自效果的代数和。

[0056] 术语“体外”指在活体有机体外生长、例如生长于组织培养物中的活细胞中发生的过程。

[0057] 术语“体内”指在活体有机体内发生的过程。

[0058] 在此使用的术语“哺乳动物”包括人和非人，并且包括但不限于人、非人灵长类，犬科、猫科、鼠科、牛科、马科以及猪科动物。

[0059] 术语“足够的剂量”表示足以产生目标效果的剂量，例如足以调控细胞中蛋白聚集的剂量。

[0060] 术语“治疗上有效量”是有效缓解疾病症状的剂量。治疗上有效量可以是“预防性有效量”，因为预防可被认为是治疗。

[0061] 在此使用的术语“包含”、“含有”、“包括”、“具有”或其任何其它变化，意为覆盖一种非排他性的涵盖。例如，包含一系列元素的过程、方法、制品或设备不必限制于仅仅那些元素，而是可以包括其它未明确列出的或该过程或方法中固有的元素。此外，除非有明确的相反说明，“或”指包括性的“或”，而不指排他性的“或”。例如，通过下述任一均可满足条件 A 或 B：A 是真的（或存在）和 B 是假的（或不存在）、A 是假的（或不存在）和 B 是真的（或存在）、以及 A 和 B 都是真的（或存在）。

[0062] 需要理解，本发明不限于特定方法、试剂、化合物、组合物、或生物系统，当然其可以进行变化。还应理解在此使用术语的目的仅在于描述特定方面，并不意味着限制。如在此说明书和之后的权利要求中所使用的，单数形式“一个”、“一种”包括复数的指示物，除非内容中清楚地另外指明。从而，例如，“一种疫苗”的意义包含了两种或更多疫苗的组合，等等。

[0063] 在此使用的“约”在指明例如剂量、时间段等可测量值的时候，意为涵盖了该特定值 ±20％或 ±10％、更加优选的 ±5％、更加优选的 ±1％以及甚至更加优选的 ±0.1％的变化，因为这些变化适于进行所公开的万法。

[0064] 流感病毒类型

[0065] 本发明普遍地用于治疗或预防哺乳动物流感病毒感染。本发明可以靶向三种类型的流感病毒：甲型、乙型和丙型流感病毒。甲型流感病毒根据病毒表面的两种蛋白质被分为若干亚型。这些蛋白质被称为血球凝集素 (H) 和神经氨酸苷酶 (N)。甲型流感病毒根据这两种蛋白质被分为若干亚型。存在 16 种不同的血球凝集素亚型：H1、H2、H3、H5、H4、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16；和 9 种不同的神经氨酸苷酶亚型：N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8、或 N9，其全部都已经在野生甲型禽流感病毒中有所发现。甲型流感病毒包括甲型 (H1N1) 和甲型 (H3N2)，其都是本发明可以在哺乳动物中治疗或预防所靶向的流感病毒的例子。一般由流感病毒感染导致的疾病和症状可以包括：发烧、咳嗽、打喷嚏、疼痛、疲劳、头痛、流眼水、鼻腔充血以及腹痛。本发明可用于治疗或预防这些疾病。

[0066] 组合物

[0067] <u>博代氏杆菌菌株</u>

[0068] 本发明提供了突变的博代氏杆菌菌株，其可被用作免疫原性组合物或疫苗以在哺乳动物中诱发免疫应答。在一个方面，该突变的博代氏杆菌菌株包含突变的 ptx 基因、缺失或突变的 dnt 基因、和异源 ampG 基因。异源 ampG 基因产物能够大量降低产生的气管细胞毒素数量。在一个方面，该菌株是 BPZE1。进行突变的初始菌株可以是任何博代氏杆菌菌株，包括百日咳博代氏杆菌、副百日咳博代氏杆菌和支气管炎博代氏杆菌。在一个方面，用于得到该突变的博代氏杆菌菌株的初始菌株是百日咳博代氏杆菌。在另一方面，该菌株是三突变的博代氏杆菌菌株。在另一方面，该博代氏杆菌菌株的保藏号为 CNCM I-3585。在另一方面，该博代氏杆菌菌株的保藏号为 V09/009169。

[0069] 本发明不仅限于上述突变体。其也可以是其它另外的突变，例如腺苷酸环化酶 (AC) 缺陷型突变体、脂多糖 (LPS) 缺陷型突变体、纤维状血球凝集素 (FHA) 以及任何一种 bvg 调节元件。

[0070] 本发明的突变博代氏杆菌菌株的构建可以始于将该菌株中的博代氏杆菌 ampG 基因替换为异源 ampG 基因。任何本领域已知的异源 ampG 基因都可被用于本发明。其例子可

以包括每代向培养基中释放非常少量的肽聚糖片段的所有革兰氏阴性细菌。革兰氏阴性细菌的例子包括但不限于：大肠埃希氏菌 (Escherichia coli)、沙门氏菌 (Salmonella)、肠杆菌科细菌 (Enterobacteriaceae)、假单胞菌 (Pseudomonas)、莫拉菌 (Moraxella)、螺杆菌 (Helicobacter)、狭长平胞菌 (Stenotrophomonas)、军团杆菌 (Legionella) 等等。一般，通过将博代氏杆菌 ampG 基因替换为异源 ampG 基因，得到的菌株中产生气管细胞毒素 (TCT) 的量表现出低于 1％的 TCT 残留活性。在另一方面，得到的菌株中表达 TCT 的量为约 0.6％至 1％的 TCT 残留活性或约 0.4％至 3％的 TCT 残留活性或约 0.3％至 5％的 TCT 残留活性。

[0071] PTX 是导致全身性百日咳博代氏杆菌感染的主要的致病因子，也是一种主要的保护性抗原。因为这些属性，天然的 ptx 基因可以被替换为突变的版本，从而酶活性部分 S1 编码酶失活的毒素，但是其百日咳毒素的免疫原性不受影响。这可以通过将序列第 9 位的赖氨酸 (Lys) 替换为精氨酸 (Arg)(K9R) 来实现。此外，第 129 位的谷氨酸 (Glu) 可以被替换为甘氨酸 (Gly)(E129G)。这些氨基酸位点一般分别参与底物结合和催化。在其它方面，还可以进行其它突变，例如描述于美国专利号 6,713,072，在此引入作为参考，以及任何已知的或其它能够降低毒素活性的突变。在一个方面，可以首先应用等位基因交换以删除 ptx 操纵子然后插入突变的版本。

[0072] 在本发明的另一方面，可以应用等位基因交换以将 dnt 基因从该博代氏杆菌菌株中移除。除了全部移除外，酶活性也可以通过点突变来进行抑制。由于 DNT 包括 N 端区域的受体结合域以及 C 端的催化域，因此对 dnt 基因进行点突变，将 Cys-1305 替换为 Ala-1305 能够抑制 DNT 活性 (Kashimoto T.，Katahira J，Cornejo WR，Masuda M，Fukuoh A，Matsuzawa T，Ohnishi T，Horiguchi Y.(1999)Identification of functional domains of Bordetella dermonecrotizing toxin.Infect.Immun.67：3727-32.)。

[0073] 除了等位基因交换插入突变的 ptx 基因和受抑制或缺失的 dnt 基因外，基因的开放阅读框可以通过插入基因序列或质粒来进行打断。该方法也包括在本发明中。其它产生突变体菌株的方法一般是本领域公知的。

[0074] 在本发明的一个方面，该突变的菌株被称为 BPZE1 菌株，其已于 2006 年 3 月 9 日按照布达佩斯条约保藏于法国巴黎的国家微生物菌种保藏中心 (CNCM)，分配的保藏号为 CNCM I-3585。引入 BPZE1 的突变一般导致减弱，但是仍然允许细菌菌落繁殖并维持。从而，在另一方面，本发明提供了 BPZE1，其在给药至有需求的哺乳动物时能够诱导黏膜免疫和全身免疫。在本发明的另一方面，构建了表达三拷贝 M2e 多肽的 BPZE1 重组菌株。该菌株已于 2009 年 4 月 27 日按照布达佩斯条约保藏于澳大利亚 3207 维多利亚州墨尔本港的国家测量研究院 (National Measurement Institute，之前的 AGAL)，分配的保藏号为 V09/009169。M2e 是流感病毒 M2 蛋白的胞外部分。其在所有甲型流感病毒中都高度保守，已发现其能够诱导抗体介导的对甲型流感病毒的抵抗。重组产 M2e 的 BPZE1 菌株能够诱发（例如，通过活菌鼻腔给药）大量抗 -M2e 抗体应答（局部和全身），从而相对于单独的 BPZE1 细菌而言能够对 H1N1 和 H3N2 攻击进行显著性保护。

[0075] 本发明的突变博代氏杆菌菌株可被用在用于治疗或预防流感病毒感染免疫原性组合物中。该免疫原性组合物能用于产生免疫应答，或者是哺乳动物中的抗体应答，或者是 T 细胞应答。例如，T 细胞应答可以是保护哺乳动物免受流感病毒感染或免受其影响 / 疾病 / 症状。

[0076] 本发明的突变博代氏杆菌菌株可在疫苗或免疫原性组合物中作为活菌株使用。在一个方面，活菌株被用于鼻腔给药，而化学或热法杀死的菌株可用于全身或黏膜给药。在其它方面该菌株是减毒的。

[0077] 在本发明的其它方面，该菌株除了上述的异源 ampG 基因以外不包含其他任何异源基因。在其它方面，该菌株不包含异源的表达平台（参见，例如，WO2007104451）。一般，异源表达平台携带异源抗原。在一个方面，异源表达平台可用于递送异源抗原至哺乳动物的呼吸道黏膜。

[0078] 佐剂

[0079] 本发明的组合物可与包括佐剂的其它免疫调节剂一起给药。在此使用的术语“佐剂”指一种增强免疫应答的化合物或混合物。特别的，组合物可以包含佐剂。用于本发明的佐剂可以包括但不限于以下的一种或多种：

[0080] 含矿物佐剂组合物

[0081] 可作为佐剂用于本发明的含矿物组合物包括矿物盐，例如铝盐和钙盐。本发明包括例如羟化物（例如，氢氧化合物）、磷酸盐（例如，羟基磷酸盐、正磷酸盐）、硫酸盐等的矿物盐（例如，参见 Vaccine Design...(1995)，Powell&Newman 编辑，ISBN：030644867X. Plenum. 的第 8 和 9 章），或不同矿物化合物的混合物（例如，磷酸盐和氢氧化物佐剂和可选的过量磷酸盐的混合物），其化合物具有任何合适的形式（例如，凝胶、晶体、无定形，等等），且被吸附至优选的盐。含矿物组合物也可制成金属盐的颗粒 (WO/0023105)。

[0082] 本发明的组合物中可以包含铝盐，其中 $Al_3^+$的量为 0.2 至 1.0mg/ 剂。

[0083] 油－乳佐剂

[0084] 可作为佐剂用于本发明的油－乳液组合物可以包括鲨烯－水乳液，例如 MF59(5％鲨烯、0.5％吐温 80 和 0.5％ Span 85，使用均质机制成亚微米颗粒）。参见，例如，WO90/14837。还参见，Podda，“The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants：experience with the MF59-adjuvanted vaccine”，Vaccine 19：2673-2680，2001。

[0085] 在其它相关方面，用于组合物的佐剂为亚微米水包油乳液。在此使用的亚微米水包油乳液的例子包括鲨烯 / 水乳液，其可选地包含可变量的 MTP-PE，例如包含 4-5％ w/v 鲨烯、0.25-1.0％ w/v 吐温 80（聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯）、和 / 或 0.25-1.0％ Span 85（山梨醇三油酸酸酯）、以及可选的 N- 乙酰胞壁酰 -L- 丙氨酰 -D- 异谷氨 -L- 丙氨酸 -2-(1′ -2′ －二棕榈酰 -s-n- 甘油酸 -3- 羟基磷酰基氧基）- 乙胺 (MTP-PE) 的亚微米水包油乳液，例如，被称为“MF59”的亚微米水包油乳液（国际公开号 WO90/14837；美国专利号 6,299,884 和 6,451,325，在此整体引入作为参考；和 Ott 等人，“MF59--Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines”，发表于 Vaccine Design：The Subunit and Adjuvant Approach(Powell，M.F. 和 Newman，M.J. 编辑)Plenum Press，New York，1995，pp.277-296)。MF59 可以含有 4-5％ w/v 鲨烯（例如，4.3％）、0.25-0.5％ w/v 吐温 80、和 0.5％ w/v Span 85 以及可选的包含不同量的 MTP-PE，使用例如 Model 110Y 均质机 (Microfluidics，Newton，MA) 制成亚微米颗粒。例如，MTP-PE 的含量可以为约 0-500μg/ 剂、或 0-250μg/ 剂、或 0-100μg/ 剂。

[0086] 用于组合物的亚微米水包油乳液、该乳液以及免疫促进剂例如胞壁肽的制备方法

的细节描述于国际公开号 WO90/14837 和美国专利号 6,299,884 和 6,451,325，在此整体引入作为参考。

[0087] 完全弗氏佐剂 (CFA) 和不完全弗氏佐剂 (IFA) 也可用作本发明的佐剂。

[0088] 皂素佐剂制剂

[0089] 皂素制剂也可用作本发明的佐剂。皂素是甾苷和三萜苷的杂合物，发现于多种植物品种的皮、叶、茎、根和甚至花。来自皂树 (Quillaia saponaria Molina) 皮的皂素被作为佐剂广泛研究。皂素也可以商购自墨西哥菝葜 (Smilax ornata)、满天星 (Gypsophilla paniculata) 和肥皂草 (Saponaria officianalis)（皂根）。皂素佐剂制剂可以包括纯化制剂，例如 QS21，以及脂质制剂，例如免疫刺激复合物 (ISCOM；见下文）。

[0090] 已经使用高效薄层色谱 (HPLC) 和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 对皂素组合物进行了纯化。使用这些技术的特定纯化组分已被鉴别，包括 QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。生产 QS21 的方法公开于美国专利号 5,057,540。皂素制剂也可含有甾体，例如胆固醇（参见 WO96/33739）。

[0091] 皂素和胆固醇的组合可用于形成独特的颗粒，称为 ISCOM。ISCOM 一般还包括磷酸脂质，例如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任何已知皂素均可被用于 ISCOM。例如，ISCOM 可以包括一种或多种的 Quil A、QHA 和 QHC。ISCOM 进一步描述于 EP0109942、WO96/11711 和 WO96/33739。可选地，ISCOM 可以不含额外的去垢剂。参见 WO00/07621。

[0092] 对于基于皂素的佐剂的研发可参见 Barr 等人的描述，“ISCOMs and other saponin based adjuvants”，Advanced Drug Delivery Reviews 32：247-27，1998。还参见 Sjolander 等人，“Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines”，Advanced Drug Delivery Reviews 32：321-338，1998。

[0093] 病毒颗粒和病毒样颗粒 (VLP)

[0094] 病毒颗粒和病毒样颗粒 (VLP) 也可用作本发明的佐剂。这些结构一般含有来自病毒的一种或多种蛋白质，可选的与磷酸脂质进行组合或制剂。它们一般是非病原的、非复制的且一般不含有任何原始病毒基因组。病毒蛋白质可以重组生产或从整病毒中分离。这些适用于病毒颗粒或 VLP 的病毒蛋白质包括衍生自流感病毒（例如 HA 或 NA）、乙肝病毒（例如核心或衣壳蛋白质）、戊肝病毒、麻疹病毒、Sindbis 病毒、Rota 病毒、口蹄疫疾病病毒、逆转录病毒、Norwalk 病毒、人乳头瘤病毒、HIV、RNA- 噬菌体、QB- 噬菌体（例如包被蛋白质）、GA- 噬菌体、fr- 噬菌体、AP205 噬菌体、和 Ty（例如逆转录转座子 Ty 蛋白质 pl）的蛋白质。

[0095] 细菌或微生物衍生物

[0096] 可用作本发明的佐剂包括细菌或微生物衍生物，例如：

[0097] (1) 肠杆菌脂多糖 (LPS) 的无毒性衍生物

[0098] 该衍生物包括单磷酸脂质 A(MPL) 和 3-O- 去酰基 MPL(3dMPL)。3dMPL 是带有 4、5 或 6 酰化链的 3 脱 -O- 酰化单磷酸脂质 A 混合物。3 脱 -O- 酰化单磷酸脂质 A “小颗粒”形式的一个例子公开于 EP0689454。该 3dMPL 的“小颗粒”足够小，可以通过 0.22 微米膜进行无菌过滤（参见 EP 0689454）。其它无毒性 LPS 衍生物包括单磷酸脂质 A 模拟物，例如氨烷基氨基葡糖苷磷酸衍生物，例如，RC-529。参见 Johnson 等人，Bioorg Med Chem Lett 9：2273-2278，1999。

[0099] (2) 脂质 A 衍生物

[0100] 脂质A衍生物可包括来自大肠杆菌的脂质A衍生物,例如OM-174。OM-174描述于例如Meraldi等人,“OM-174,a New Adjuvant with a Potential for Human Use,Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310from the circumsporozoite protein of Plasmodium berghei”,Vaccine 21:2485-2491,2003;和Pajak等人,“The Adjuvant OM-174induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo”,Vaccine21:836-842,2003。

[0101] (3)免疫刺激寡核苷酸

[0102] 可用作本发明的佐剂的免疫刺激寡核苷酸可包括含有CpG基序的核苷酸序列(含有未甲基化胞嘧啶与鸟苷经磷酸键连接的序列)。已发现细菌双链RNA或含有回文或聚(dG)序列的寡核苷酸具有免疫刺激性。

[0103] CpG可包含核苷酸修饰/类似物例如硫代磷酸修饰,其可以是双链或单链的。可选地,鸟苷可以被替换为类似物例如2′-脱氧-7-去氮鸟苷。参见Kandimalla等人,“Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern:design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles”,Nucleic Acids Research31:2393-2400,2003;WO02/26757和WO99/62923中类似物取代的例子。CpG寡核苷酸佐剂效果进一步在以下文献中有所讨论:Krieg,“CpG motifs:the active ingredient in bacterial extracts?”,Nature Medicine(2003)9(7):831-835;McCluskie等人,“Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA”,FEMS Immunology and Medical Microbiology(2002)32:179-185;WO98/40100;美国专利号6,207,646;美国专利号6,239,116和美国专利号6,429,199。

[0104] CpG序列可以针对Toll-样受体(TLR9),例如基序GTCGTT或TTCGTT。参见Kandimalla等人,“Toll-like receptor 9:modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs”,Biochemical Society Transactions(2003)31(part 3):654-658。CpG序列可以特异性地诱导Th1免疫应答,例如CpG-A ODN,或其可以更加特异性地诱导B细胞应答,例如CpG-B ODN。CpG-A和CpG-B ODN参见Blackwell等人,“CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated byPlasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha”,J.Immunol.170:4061-4068,2003;Krieg,“From A to Z on CpG”,TRENDS in Immunology 23:64-65,2002,和WO01/95935。

[0105] 在一些方面,CpG寡核苷酸可被构建为其5′末端可被受体识别。可选地,两种CpG寡核苷酸序列可被连接至其3′末端以形成“免疫体(immunomer)”。参见,例如,Kandimalla等人,“Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity”,BBRC 306:948-95,2003;Kandimalla等人,“Toll-like receptor 9:modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic GpG DNAs”,Biochemical Society Transactions 31:664-658,2003;Bhagat等人,“CpG penta-and hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents”BBRC 300:853-861,2003,和WO03/035836。

[0106] (4)ADP-核糖基化毒素及其脱毒衍生物。

[0107] 细菌 ADP- 核糖基化毒素及其脱毒衍生物可被用作本发明的佐剂。例如,毒素可以衍生自大肠杆菌(即,大肠杆菌不耐热肠毒素 (LT))、霍乱 (CT)、或百日咳 (PTX)。脱毒 ADP- 核糖基化毒素作为黏膜佐剂的应用描述于 WO95/17211,作为肠道外佐剂描述于 WO98/42375。在一些方面,佐剂可以是脱毒 LT 突变体例如 LT-K63、LT-R72 和 LTR192G。ADP- 核糖基化毒素及其脱毒衍生物,特别是 LT-K63 和 LT-R72,作为佐剂的应用可以在以下文献中发现,其分别在此全文引入作为参考:Beignon 等人,“The LTR72Mutant of Heat-Labile Enterotoxin of Escherichia coli Enahnces the Ability of Peptide Antigens to Elicit CD4+T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin”,Infection and Immunity70:3012-3019,2002;Pizza 等人,“Mucosal vaccines:non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants”,Vaccine 19:2534-2541,2001;Pizza 等 人,“LTK63and LTR72,two mucosal adjuvants ready for clinical trials”Int.J.Med.Microbiol290:455-461,2003;Scharton-Kersten 等人,“Transcutaneous Imrnunization with Bacterial ADP-Ribosylating Exotoxins,Subunits and Unrelated Adjuvants”,Infection and Immunity 68:5306-5313,2000;Ryan 等 人,“Mutants of Escherichia coli Heat-Labile Toxin Act as Effective Mucosal Adjuvants for Nasal Delivery of an Acellular Pertussis Vaccine:Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme Activity on Th1 and Th2 Cells”Infection and Immunity 67:6270-6280,2003;Partidos 等人,“Heat-labile enterotoxin of Escherichia coli and its site-directed mutant LTK63enhance the proliferative and cytotoxic T-cell responses to intranasally co-immunized synthetic peptides”,Immunol.Lett.67:09-216,1999;Peppoloni 等 人,“Mutants of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines”,Vaccines 2:285-293,2003;以及 Pine 等人 (2002)“Intranasal immunization with influenza vaccine and a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from Escherichia coli(LTK63)”J.Control Release 85:263-270,2002。氨基酸取代的数字基准优选地基于 ADP- 核糖基化毒素 A 和 B 亚基的比对,参见 Domenighini 等人,Mol.Microbiol 15:1165-1167,1995,其在此整体引入作为参考。

[0108] 生物粘附剂和黏膜粘附剂

[0109] 生物粘附剂和黏膜粘附剂也可用作本发明的佐剂。合适的生物粘附剂可包括酯化的透明质酸微球 (Singh 等人,J.Cont.Rele.70:267-276,2001) 或黏膜粘附剂例如聚丙烯酸、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯酮聚糖和羧甲基纤维素的交联衍生物。壳聚糖及其衍生物也可用作本发明的佐剂。参见,例如,WO99/27960。

[0110] 佐剂微颗粒

[0111] 微颗粒也可用作本发明的佐剂。其可以考虑形成自生物可降解和 / 或无毒材料(例如,聚 α- 羟基酸、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酐、聚己内酯等等)、具有聚(丙交酯 - 乙交酯)的微颗粒(即,颗粒直径约 100nm 至约 150μm,或直径 200nm 至约 30μm,或直径约 500nm 至约 10μm),可选地将其处理为具有负电荷表面(例如,用 SDS 处理)或正电荷表面(例如,用阳离子去垢剂,例如 CTAB 处理)。

[0112] 佐剂脂质体

[0113] 适合用作佐剂的脂质体制剂的例子参见美国专利号6,090,406、美国专利号5,916,588和EP 0626169。

[0114] I. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂

[0115] 适合用作本发明的佐剂还包括聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯。WO99/52549。该制剂可以进一步包括聚氧乙烯山梨醇酯表面活性剂与辛基酚聚醚的组合(WO01/21207)以及聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂与至少一种非离子表面活性剂例如辛基酚聚醚的组合(WO01/21152)。

[0116] 在一些方面,聚氧乙烯醚可包括:聚氧乙烯-9-月桂基醚(月桂醚9)、聚氧乙烯-9-硬脂基醚、聚氧乙烯-8-硬脂基醚、聚氧乙烯-4-月桂基醚、聚氧乙烯-35-月桂基醚或聚氧乙烯-23-月桂基醚。

[0117] 聚磷腈(PCPP)

[0118] 用作佐剂的PCPP制剂描述于,例如,Andrianov等人,“Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphophazene solutions”,Biomaterials19:109-115,1998,和Payne等人,“Protein Release from Polyphosphazene Matrices”,Adv.Drug.Delivery Review 31:185-196,1998。

[0119] 胞壁肽

[0120] 适合用作本发明佐剂的胞壁肽的例子可包括N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酰-D-异谷酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-降胞壁酰-1-丙氨酰-d-异谷酰胺(nor-MDP)、和N-乙酰胞壁酰-1-丙氨酰-d-异谷酰-1-丙氨酸-2-(1′-2′-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸氧)-乙胺(MTP-PE)。

[0121] 咪唑并喹啉化合物

[0122] 适合用作本发明佐剂的咪唑并喹啉化合物的例子可包括咪喹莫特及其同系物,其进一步描述于Stanley,“Imiquimod and the imidazoquinolones:mechanism of action and therapeutic potential”Clin Exp Dermatol 27:571-577,2002和Jones,“Resiquimod 3M”,Curr Opin Investig Drugs 4:214-218,2003。

[0123] 人免疫调节剂

[0124] 适合用作本发明佐剂的人免疫调节剂可包括细胞因子,例如白介素(例如,IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12,等等)、干扰素(例如,干扰素-γ)、巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子。

[0125] 佐剂组合

[0126] 本发明还可含有上述一种或多种佐剂的组合。例如,佐剂组合物可包括:

[0127] (1)皂素和水包油乳液(WO99/11241);

[0128] (2)皂素(例如,QS21)+无毒性LPS衍生物(例如,3dMPL)(参见WO94/00153);

[0129] (3)皂素(例如,QS21)+无毒性LPS衍生物(例如,3dMPL)+一种胆固醇;

[0130] (4)皂素(例如,QS21)+3dMPL+IL-12(可选的+甾醇)(WO98/57659);

[0131] (5)将3dMPL与例如QS21和/或水包油乳液进行组合(参见欧洲专利申请0835318、0735898和0761231);

[0132] (6)SAF,含有10%角鲨烷、0.4%吐温80、5%Pluronic嵌段共聚物L121和thr-MDP,其或者进行微流乳化成亚微米乳液,或者漩涡振荡产生较大颗粒的乳液。

[0133] (7)Ribi 佐剂系统(RAS)(Ribi Immunochem),含有 2%鲨烯、0.2%吐温 80、和选自单磷酰脂质 A(MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)的一种或多种细菌细胞壁成分,优选 MPL+CWS(Detox);和

[0134] (8)一种或多种矿物盐(例如铝盐)+LPS 无毒性衍生物(例如 3dPML)。

[0135] 铝盐和 MF59 是用于可注射的流感疫苗佐剂的例子。细菌毒素和生物粘附剂是与例如鼻腔疫苗的黏膜递送疫苗一起使用的佐剂的例子。所有上述佐剂以及本领域一般技术人员公知的其它佐剂都可以使用本领域熟知的技术进行配制用于鼻内给药。

[0136] 制剂和载体

[0137] 用于治疗或预防流感病毒感染相关疾病(细节见下文)的方法也被本发明所涵盖。所述本发明的方法包括给药治疗上有效量的本发明的组合物。本发明的组合物可配制为药物组合物。这些组合物除了一种或多种的该菌株外还可以包括药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲液、稳定剂,或其它本领域技术人员熟知的材料。这些材料一般应该是无毒性的,且一般不应当与活性成分的效果发生冲突。载体或其它材料的准确性质可以根据给药途径判断,例如,口服、静脉内、皮肤或皮下、鼻腔、肌肉内、或腹膜内途径。

[0138] 口服给药的药物组合物可以是药片、胶囊、粉末或液体形式。药片可包括固体载体例如明胶或佐剂。液体药物组合物一般包括液体载体例如水、石油、动物或植物油、矿物油、或合成油。还可以含有生理盐水溶液、葡萄糖或其它多糖溶液或二醇,例如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0139] 对于静脉内、皮肤或皮下注射,或在病痛部位注射,活性成分以肠道外可接受的水溶液的形式存在,其不含热原,且其具有合适的 pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员有能力使用例如等张赋形剂来配制合适的溶液,例如氯化钠注射、林格氏注射或乳酸林格氏注射。也可根据需要含有防腐剂、稳定剂、缓冲液、抗氧化剂和/或其它添加剂。

[0140] 给药量优选的为“治疗上有效量”或“预防性有效量”(根据可能的情况,尽管预防可以被认为是治疗),其足以对个体显示出益处。实际给药量以及给药速率和时间将会取决于正在治疗的疾病的性质和严重程度。治疗处方,例如对于剂量等的决定,是全科医生和其它医师的责任,且一般要考虑待治疗的疾病、患者个体的情况、给药位置、给药方法和医生知晓的其它因素。上述技术和方案的例子可以在最新版的 Remington’s Pharmaceutical Science,Mack Publishing Company,Easton,PA(“Remington’s”)中找到。

[0141] 一般,组合物可单独给药,或者与其它治疗剂组合给药,其根据待治疗的病情可以同时给药也可以相继给药。

[0142] 方法

[0143] 给药途径

[0144] 本发明的组合物一般直接给药至哺乳动物。直接递送可以通过肠道外注射进行(例如,皮下、腹膜内、皮内,静脉内、肌肉内、或给药至组织间隙),或黏膜给药,例如通过直肠、口服(例如,药片、喷雾)、阴道、局部、经皮(参见例如,WO99/27961)或透过皮肤(参见例如,WO02/074244 和 WO02/064162)、吸入、鼻内(参见例如,WO03/028760)、眼睛、耳朵、肺部或其它黏膜给药。组合物也可以通过直接转移到皮肤表面进行局部用药。局部用药可以不用任何设备进行,或通过使用绷带或类似绷带的设备直接接触裸露的皮肤来进行(参见,例如,美国专利号 6,348,450)。

[0145] 在一些方面，给药的方式是肠道外、黏膜、或黏膜和肠道外免疫的组合。在其它方面，给药的方式是肠道外、黏膜、或间隔 1-3 周共 1-2 次的黏膜和肠道外免疫的组合。在相关的方面，给药途径包括但不限于鼻内给药。

[0146] 给药流程和剂量

[0147] 本发明可包括对哺乳动物给药突变的博代氏杆菌菌株以诱发能够攻击例如 H3N2 的流感病毒的免疫应答（例如，TH1 免疫应答）。本发明的突变博代氏杆菌菌株的例子如上所述。一般，该突变的博代氏杆菌菌株的给药是通过针对流感病毒的保护性免疫，用于治疗或预防哺乳动物例如人的流感病毒感染。在一些方面，该突变的博代氏杆菌在流感病毒感染前给药以预防流感病毒感染。一般，突变的博代氏杆菌株菌株在流感病毒感染前约少于 1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、或更多周被给药至哺乳动物。

[0148] 在一个方面，治疗或预防流感病毒感染的方法包括对有需求的受试者施用单一剂量的本发明的组合物，例如，BPZE1。在相关方面，给药步骤通过黏膜进行，例如，鼻内。

[0149] 在其它方面，本发明的组合物给药多于一次，例如，两次。用药的次数可根据需要进行变化，例如对哺乳动物给药的次数可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、或更多次。在一个方面，治疗或预防流感病毒感染的方法包括对有需求的受试者施用本发明的第一免疫原性组合物（含有例如，BPZE1），继而施用第二免疫原性组合物（含有例如，BPZE1）。一般，每个剂量的组合物之间的时间范围可以是约 1-6 天，或约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、60、70、80、90、或更多周。在相关方面，每个剂量之间的时间范围是约 3 周。在其它方面，可以施用免疫加强方法，其中本发明的组合物可先用于“诱发 (priming)”步骤，然后将本发明的组合物用于“加强 (boosting)”步骤。

[0150] 组合物一般可被用于诱发全身和 / 或黏膜免疫，例如诱发增强性的全身和 / 或黏膜免疫。例如，可以通过所诱导的血清 IgG 和 / 或肠 IgA 免疫应答来表征免疫应答。一般，对流感病毒感染的保护水平可以超过 50％，例如，60％、70％、80％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、或更多。在一个方面，保护水平可达 100％。在其它方面，保护水平低于 50％，例如，20％。在其它方面，对每个剂量中的细菌数量进行调节以在哺乳动物中得到有效的免疫应答。每个剂量中的细菌数量或 cfu 可以是约 1、10、100、1000、10000、100000、1000000、$5x10^6$、或更多或所述各剂量之间的任何剂量。

[0151] 在其它方面本发明还可包括组合物与其它试剂的共同给药。一般各种组合物 / 试剂可以按照任何顺序进行递送。从而，在递送多种不同的组合物或试剂的各个方面，该突变的博代氏杆菌菌株不需要都在例如药物、siRNA、miRNA、免疫原性肽或能够影响流感病毒感染的小分子等试剂前进行给药。其它试剂的例子包括神经氨酸苷酶抑制剂和 M2 抑制剂（金刚烷）。例如，诱发步骤可包括递送一种或多种试剂，加强步骤可包括递送一种或多种突变的博代氏杆菌菌株。在其它方面，突变的博代氏杆菌菌株的多次给药可以在试剂的多次给药后进行。可以按照任何顺序进行给药。从而，在此描述的一种或多种突变的博代氏杆菌菌株和一种或多种试剂可以按照任何顺序以及任何本领域已知的给药途径来进行共同给药，例如，以诱发免疫反应。

[0152] 在本发明中，剂量治疗可按照单剂量用药法或多剂量用药法。例如，多剂量可被用于诱发免疫计划和 / 或加强免疫计划。在多剂量用药计划中，各种药剂可以通过相同或不同的途径进行给药，例如，肠道外诱发和黏膜加强、黏膜诱发和肠道外加强，等等。在其它方

面，剂量控制可以增强抗体应答的活性，导致具有中和性质的抗体。体外中和分析可用于检测中和抗体（参见例如 Asanaka 等人，J Virology 102：10327，2005；Wobus 等人，PLOS Biology 2；e432；和 Dubekti 等人，J Medical Virology 66：400）。

[0153] 用于测定免疫应答效力或存在的测试

[0154] 评价本发明的组合物给药后的治疗效果的一种方法涉及对感染进行监控。评价本发明的组合物给药后的预防效果的一种方法涉及对组合物中的抗原的免疫应答进行监控。另一种评价本发明的组合物的免疫原性的方法是分离蛋白质或蛋白质混合物以通过免疫印迹筛选患者血清或黏膜分泌物。蛋白质和患者血清之间发生阳性反应则表明患者之前已经对组合物产生了免疫应答。

[0155] 检验本发明的组合物给药后的治疗效果的另一种方法涉及对感染进行监控。检验本发明的组合物给药后的预防效果的一种方法涉及对组合物中的抗原的全身性（例如监控 IgG1 和 IgG2a 的生产水平）和黏膜性（例如监控 IgA 的生产水平）的免疫应答进行监控。一般，在免疫后攻击前检测血清特异性抗体应答，而在免疫后和攻击后检测黏膜特异性抗体应答。本发明组合物的免疫原性可以在对例如人的宿主给药前在体外和体内动物模型中进行评价。

[0156] 本发明的组合物的功效也可以通过用组合物攻击例如小鼠的感染动物模型进行体内检测。组合物可以衍生自与攻击菌株相同的菌株，或可以不衍生自与攻击菌株相同的菌株。体内功效模型可包括但不限于：(i) 使用人菌株的鼠类感染模型；(ii) 鼠类疾病模型，其为使用小鼠适应性菌株的鼠类模型，例如对小鼠具有特殊毒性的菌株；和 (iii) 使用人分离物的灵长类模型。

[0157] 本发明诱导的免疫应答可以是 Th1 免疫应答和 TH2 应答的一种或两种。免疫应答可以是改进的或增强的或改变的免疫应答。免疫应答可以是全身性和黏膜性免疫应答的一种或两种。例如，免疫应答可以是增强的全身和／或黏膜应答。增强的全身和／或黏膜免疫反映在增强的 TH 1 和／或 TH2 免疫应答中。例如，增强的免疫应答可包括 IgG1 和／或 IgG2a 和／或 IgA 的产量的增加。在另一方面黏膜免疫应答可以是 TH2 免疫应答。例如，黏膜免疫应答可包括 IgA 的产量增加。

[0158] 一般，活化的 TH2 细胞增强抗体的产生，从而在响应胞外感染方面是有价值的。活化的 TH2 细胞一般能够分泌一种或多种 IL-4、IL-5、IL-6、和 IL-10。TH2 免疫应答也能导致 IgG1、IgE、IgA 和／或记忆 B 细胞的产生以提供未来的保护。总之，TH2 免疫应答可包括一种或多种与 TH2 免疫应答相关的一种或多种细胞因子（例如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10）的增加，或 IgG1、IgE、IgA 和记忆 B 细胞的产量的增加。例如，增强的 TH2 免疫应答可包括 IgG1 产量的增加。

[0159] Th1 免疫应答可包括一种或多种 CTL 的增加、一种或多种与 Th1 免疫应答相关的细胞因子（例如 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α）的增加、活化巨噬细胞的增加、NK 活性的增加、或 IgG2a 产量的增加。例如，增强的 TH1 免疫应答可包括 IgG2a 产量的增加。

[0160] 含有本发明的一种或多种菌株的本发明的组合物，特别是免疫原性组合物，可以单独使用或与其它试剂组合使用，可选的与能够诱导 Th1 和／或 Th2 应答的免疫调节剂组合使用。

[0161] 本发明的组合物能够诱导细胞介导的免疫应答和体液免疫应答以有效地对抗流

感病毒感染。优选地，该免疫应答诱导长期（例如，中和）抗体和能够快速响应未来暴露在一种或多种感染性抗原中的细胞介导的免疫。

[0162] 受试者和哺乳动物

[0163] 本发明的组合物一般用于预防或治疗例如人的哺乳动物受试者的流感病毒菌株。在一些方面，受试者可包括老人（例如，＞65 岁）、儿童（例如、＜5 岁）、住院患者、健康工作者、武装服务人员和军人、食品处理人员、孕妇、慢性病患者和出境旅游人群。组合物一般适用于这些人群以及一般人群，或医师认为需要的人群。

[0164] 试剂盒

[0165] 本发明还提供含有一种或多种本发明的组合物的容器的试剂盒。组合物可以是液体形式或冻干的。合适的组合物容器包括，例如，瓶、药瓶、注射筒和试管。容器可以采用多种材料，包括玻璃或塑料。容器可以具有无菌的进口端（例如，容器可以是静脉注射溶液袋或具有能够被皮下注射针扎破的塞子的药瓶）。

[0166] 试剂盒可以进一步包括含有药学上可接受的缓冲液（例如磷酸－缓冲的盐水、林格氏液、或葡萄糖溶液）的第二容器。其也可含有其它对终端用户有用的材料，包括其它药学上可接受的制剂溶液例如缓冲液、稀释剂、滤器、针和注射器或其它递送设备。试剂盒可以进一步包括含有佐剂的第三部分。

[0167] 试剂盒也可以包含写有用于免疫诱导、预防感染或治疗感染的方法的说明书的包装插入物。该包装插入物可以是未被批准的草稿包装插入物，也可以是被食品与药物管理局 (FDA) 或其它监管部门批准的包装插入物。

[0168] 本发明还提供一种预填充有本发明的组合物的递送设备。

[0169] 药物组合物一般制成无菌和基本等渗的，并完全遵照美国食品与药物管理局的良好操作规范 (GMP) 规定。

[0170] 本领域技术人员可以根据之前的描述对组合物和方法进行不同的修饰和变化。所有这些修饰都属于附加的权利要求的范围内，在此也一并包括在内。每个提到的范围都包括该范围的全部的组合和次组合，以及在此包含的特定数字符号。

[0171] 虽然上文的发明已通过实例的方式进行了便于理解的细节描述，但是对本领域技术人员而言，所公开的内容显然也包含了一些变化和修饰，其可以在附加的权利要求的范围内实施而不必付出过度的实验工作，其仅是描述性的，而不是限制性的。

## 实施例

[0172] 以下是实施本发明的特定方面的例子。这些例子仅用于描述性目的，而非用于以任何方式限定本发明的范围。虽然已经努力保证所使用的数字（例如，数量、温度等等）的精确性，但是显然应当允许存在一些实验误差和偏差。

[0173] 本发明的操作除非另有说明，否则使用本领域常规的蛋白质化学、生物化学、重组 DNA 技术和药学方法。这些技术在文献中有完整解释。参见，例如，T.E.Creighton，Proteins：Structures and Molecular Properties(W.H.Freeman and Company，1993)；A.L.Lehninger，Biochemistry(Worth Publishers，Inc.，现行版)；Sambrook 等人，Molecular Cloning：A Laboratory Manual（第二版，1989)；Methods InEnzymology(S.Colowick 和 N.Kaplan 编辑，Academic Press，Inc.)；Remington′ s；Carey and Sundberg

Advanced Organic Chemistry 第三版 (Plenum Press),A 和 B 卷,1992)。

[0174] 材料和方法

[0175] 细菌菌株和生长条件

[0176] 本研究中用的细菌菌株是百日咳博代氏杆菌 BPZE1,一种抗链霉素的 TohamaI 衍生物,缺失了皮肤坏死 (DNT) 编码基因,能产生失活的百日咳毒素 (PT) 和背景水平的气管细胞毒素 (TCT)(22)。BPZE1 细菌在 37℃下,在补充有 1%甘油、10%去纤维蛋白的羊血和 100μg/ml 链霉素 (Sigma Chemical CO.,St Louis,Mo.) 的 Bordet-Gengou(BG) 琼脂 (Difco,Detroit,Mich.) 中生长 72h。在含有 1g/l 七-(2,6-二-O-甲基)-β-环糊精 (Sigma) 的 Stainer-Scholte(SS) 培养基中按照之前的描述进行液体培养 (Menozzi FD 等人,“Identification and purification of transferring-and lactoferrin-binding proteins of Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica”,Infect.Immun 59:3982-3988,1991)。95℃热失活 1 小时。

[0177] 鼻内感染。将 6-8 周大的雌性 Balb/c 小鼠置于不含特异性病原体的独立通风笼具中,全部实验均按照新加坡国立大学动物研究董事会的指导进行。关于 BPZE1 的处理,对服用镇静剂的小鼠鼻内施用含有约 5x $10^6$菌落形成单位 (cfu) 的存活或死亡的 BPZE1 细菌的补充有 0.05%吐温 80(Sigma) 的 20μl 无菌 PBS(PBST) 一次、两次或三次,如前所述 (Mielcarek N 等人,“Intranasal priming with recombinant Bordetella pertussis for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen”,Infect immune 65:544-550,1997)。对于流感病毒感染,服用镇静剂的小鼠被经鼻给药含有约 $2\times10^6TCID_{50}$的小鼠适应性第 10 代 A/Aichi/2/68(H3N2) 病毒的补充有青霉素和链霉素的 20μl 无菌 PBS(Narasaraju T 等人,“Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model:insights into viral virulence,tissue tropism and host pathogenesis”,Microbes Infect 11:2-11,2009)、或 4 倍致死性剂量 (LD)50 的 H1N1(A/PR/8/34) 流感病毒 (ATCC#VR-95) 的补充有青霉素和链霉素的 20μl 无菌 PBS。使用每组 10 只小鼠检测基于体重损失的存活率,当小鼠体重损失超过原始体重的 20%时对其进行安乐死。

[0178] 病毒滴度检测

[0179] 收集小鼠的肺并使用机械破碎 (Omni homogenizer) 进行均质化,通过使用 WHO(WHO,“WHO Manual on Animals Influenza Diagnosis and Surveillance”(World Health Organization,Geneva),2002) 报道的修饰方法来进行组织培养感染剂量 50($TCID_{50}$) 分析以检测活体病毒的存在。简而言之,将 100μl 的 10 倍连续稀释的肺匀浆物灌输至 96-孔板上的 90%融汇状态的 Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 细胞。将孔板在 35℃潮湿培养箱 (5% $CO_2$) 中培养 3 天。通过 50%的细胞病变效应 (CPE) 减少来测定 $TCID_{50}$,得出 log $TCID_{50}$/肺。每组对每个时间点分别检测 5 只小鼠。

[0180] 组织病理学检查

[0181] 每组处死 4 只小鼠,在病毒攻击后 3 天收集其肺部。将肺部移走并用含有 10%福尔马林的 PBS 进行固定。固定后,将其封入石蜡,切片并用 H&E 染色。

[0182] 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的细胞浸润

[0183] 分别通过注射 1ml 的无菌 PBS 至处死动物的肺部并进行一次灌洗步骤来保

证该过程中两片肺的浸润以回收个体的BALF。然后在400g下将BALF离心10min，去除上清液，-80℃储存用于细胞因子检测。使用血细胞计数仪检测全BALF细胞数。使用细胞离心涂片器(Thermo Shandon)将细胞印迹至载玻片，使用修饰的Wright染色过程进行染色(Kimman TG等人，“Development and antigen specificity of the lymphophoproliferation response of pigs topseudorabies virus:dichotomy between secondary B-and T-cell responses”，Immunology 86:372-378，1995)。使用标准的形态学参数鉴定不同的细胞类型。结果表示为每个细胞类型占整个细胞群的百分比。每张片子被认为是全部500个细胞。每组分别检测4只小鼠。

[0184] FACS分析。

[0185] 处死小鼠，收集肺部，在2ml含有0.5mg/ml消化酶(Roche)、1％FCS和2U/ml DNaseI(Qiagen)的RPMI的消化缓冲液中37℃消化肺部15min制备单细胞悬液，然后在Ficoll-PaqueTMPLUS(GE)中600g下室温离心20min。收集细胞，用无菌FACS缓冲液(2％FCS、5mM EDTA，PBS)洗涤2次。将$10^6$个细胞用FITC-标记的抗-小鼠CD3抗体(eBioscience)进行染色，并在CyAnTM ADP细胞计数仪(Dako)上进行分析。每组对每个时间点分别检测5只小鼠。

[0186] 细胞因子和趋化因子分析

[0187] 根据制造商(Panomics)的说明使用Procarta Cytokine Profiling试剂盒检测BALF上清液中产生的细胞因子和趋化因子。在与Ab-偶联的珠粒孵育以及检测Ab和链霉亲和素-PE复合物后，在Bio-Plex仪(Bio-Rad)上运行试样。测定了以下生长因子、细胞因子和炎症介质:GM-CSF、KC、IL-1β、IL-6、IFN-γ和TNF-α、IFN-α、MCP-1RANTES、IL-10。另外，根据制造商(eBioscience)的说明使用人/小鼠TGFβ1ELISA试剂盒(eBioscience)检测了TGF-β的水平。

[0188] 被动转移试验

[0189] 在4周的间隔中对10只成年Balb/c小鼠鼻腔感染两次$5x10^6$cfu的BPZE1活菌产生高滴度的抗-百日咳博代氏杆菌免疫血清。对另一组的10只成年未免疫的Balb/c小鼠腹膜内注射(ip.)$10^{5.5}$ $TCID_{50}$的完全弗氏佐剂中的热失活人/Aichi/2/68(H3N2)病毒(HI-H3N2)，并在2周后用相同量的完全弗氏佐剂中的HI-H3N2病毒进行加强。在加强后2周收集来自各小鼠组的免疫血清，将其合并，通过ELISA检测抗-百日咳和抗-流感抗体滴度。另外，通过中和分析检测HI-H3N2血清的中和抗体是否存在。对免疫血清进行过滤除菌，56℃加热30min进行失活，并储存在-80℃待用。收集来自对照未免疫的小鼠的血清作为阴性对照。

[0190] 用小鼠适应性H3N2病毒攻击1天前对6-8周大的受体Balb/c小鼠腹膜内注射200μl的未免疫的、抗-BPZE1或抗-H3N2免疫血清。监控体重损失以测定存活率。每组分析10只小鼠。

[0191] T细胞增殖分析

[0192] 通过掺入氚标记的($^3$H)胸腺嘧啶检测淋巴细胞的增殖，如其它文献的描述(Bao Z等人，“Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates asthma in mice”，Am J Respir Crit Care Med 176:431-438，2007)。简而言之，在无菌条件下收集来自未免疫的和BPZE1处理的小鼠(每组6只小鼠)脾脏并进行混合。制备单细胞悬液并用

Ficoll-PaqueTMPLUS(GE)600g 下室温离心 20min。用分离的脾脏细胞接种 96- 孔圆底板(NUNC),密度为 $2\times10^5$细胞 / 孔 100μl 培养基 ( 补充有 10% FCS、$5\times10^{-5}$M β- 巯基乙醇、2mM L- 谷氨酸盐、10mM HEPES、200U/ml 青霉素、200μg/ml 链霉素的 RPMI640)。在脾脏细胞中加入含有 20μg/ml BPZE1 整细胞裂解物或热失活 $10^5TCID_{50}$的小鼠适应性 H3N2 流感病毒 (HI-H3N2)( 测试抗原 ) 的 100μl 培养基。分别使用 100ul 未感染的卵羊水和含有 5μg/ml 伴刀豆球蛋白 A(conA) 的 100ul 培养基作为模拟和活性对照。在 37℃下 5% CO2 环境中孵育 3 天后,将培养物用 0.4μCi[3H] 胸腺嘧啶的 20μl RPMI 完全培养基进行脉冲。孵育 18 小时后,收集细胞,洗涤并用 TopCount NXT™ Microplate Scintillation 和 Luminescence Counter(PerkinElmer) 检测掺入的放射活性。结果表示为对应于在测试抗原存在下摄入 [$^3$H] 胸腺嘧啶的平均值与不含测试抗原下摄入 [$^3$H] 胸腺嘧啶的平均值之比的刺激指数 (SI)。SI ＞ 2 则认为是阳性的。每个试样分析四个平行。

[0193] IFN-α ELISPOT 分析

[0194] 按照制造商的说明使用 BD 小鼠 ELISPOT 系列 (BD PharMingen) 进行 ELISPOT 分析测定抗原 - 特异性生产 IFN-γ 的脾脏细胞的频率 (frequency)。简而言之,制备来自未免疫的和 BPZE1 处理的各小鼠脾脏的单细胞悬液并置于 4℃过夜预包被有 100μl[ 无菌 PBS 中含 5μg/ml 抗 -IFN-γ 抗体 ] 的 96- 微孔板 (Millipore,Bedford,MA),洗涤三次并在室温下用含有 10% FCS 的 RPMI 1640 封闭 2 小时。然后将细胞在 20μg/ml BPZE1 整细胞裂解物或热失活 $10^5TCID_{50}$的小鼠适应性 H3N2 流感病毒 (HI-H3N2) 或 5μg/ml conA 中在 37℃下 5% $CO_2$环境中孵育 12-20hr。洗涤微孔板并在室温下添加生物素偶联的抗 - 小鼠 IFN-γ 抗体 2 小时。洗涤后,加入链霉亲和素 -HRP 偶联物,室温孵育 1 小时。再次洗涤各孔,并用 3- 氨基 -9- 乙基 - 咔唑 (AEC) 底物溶液培养直至斑点可见。干燥后,用Bioreader® 4000(Biosystem) 计算形成斑点的细胞数。每组分别分析 6 只动物。

[0195] 统计分析

[0196] 除非另有说明,否则误差棒代表均数 ±SD,平均值使用 5%显著性水平的双侧不成对 T 检验进行比较,其中 $^*p \leqslant 0.05$,$^{**}p \leqslant 0.01$ 和 $^{***}p \leqslant 0.001$。

[0197] 实施例 1:活体减毒百日咳博代氏杆菌单次鼻腔给药保护免受 H3N2 流感攻击。

[0198] 通过 A/Aichi/2/68(H3N2) 病毒的肺 - 肺连续传代至成年 Balb/c 小鼠来获得小鼠适应性 H3N2 流感病毒 (Narasaraju T 等人,“Adaptation of human influenza H3N2virus in a mouse pneumonitis model:insights into viral virulence,tissue tropism and host pathogenesis”,Microbes Infect 11:2-11,2009)。第 10 代 (P10) 菌株表现出高毒性,导致坏死性和炎性损伤被传播至受感染动物的肺部之外的不同器官。鼻腔给药 2x $10^6TCID_{50}$的 P10 病毒悬液导致 4 天内动物死亡 (Narasaraju T 等人,“Adaptation of human influenza H3N2virus in a mouse pneumonitis model:insights into viral virulence,tissue tropism and host pathogenesis”,Microbes Infect 11:2-11,2009)。

[0199] 成年 Balb/c 小鼠鼻腔接种 BPZE1 活菌并继而在 3 或 6 周后用致死性剂量的小鼠适应性 H3N2 病毒进行攻击。基于体重变化的存活率显示鼻腔 BPZE 1 处理 3 周后受攻击的小鼠没有受到显著保护,而 60%的保护是在 BPZE1 处理 6 周后获得的 ( 图 1)。

[0200] 实施例 2:活体而非死亡的 BPZE1 细菌保护免受致死性 H3N2的攻击 。

[0201] 成年 Balb/c 小鼠用活体或死亡的 BPZE1 细菌鼻腔给药一次,并在 BPZE1 处理 6 周

后用致死剂量的小鼠适应性 H3N2 病毒进行攻击。结果显示死亡的细菌没有提供任何针对 H3N2 的显著性保护（图 2)，表明小鼠肺部的细菌菌落对于诱导保护性机制是必需的。

[0202] 实施例 3：加强效果。

[0203] Balb/c 小鼠在 4 周间隔中用 BPZE1 活菌鼻腔给药两次，并在最后一次 BPZE 1 给药 4 周后用致死性剂量的小鼠适应性 H3N2 病毒进行攻击。对于 BPZE1 处理的动物得到了 100％的保护率和最少的体重变化（图 3)。在加强后两周进行病毒攻击也得到了相似的保护率。这些数据表明二次鼻腔给药 BPZE1 活菌不仅增强了保护效力，而且缩短了触发保护性机制所需要的时间。

[0204] 实施例 4：BPZE1 细菌提供针对 H1N1 病毒攻击的保护

[0205] 进一步开发了 BPZE1 细菌针对甲型流感病毒的保护潜力。对小鼠用 BPZE1 活菌鼻腔给药一次不能保护其免受 6 周后用人 A/PR/8/34(H1N1) 甲型流感病毒的致死性攻击（数据未显示）。然而，BPZE1 活菌的三次连续给药给予了针对 H1N1 病毒的 50％的保护（图 4)。这些现象表明 BPZE1 细菌可以具有对抗所有甲型流感病毒的潜力，虽然其效力是变化的。

[0206] 实施例 5：在受保护的小鼠中病毒载量没有降低。

[0207] 为了进一步表征针对甲型流感病毒的交叉保护，对于用 BPZE1 细菌处理两次的小鼠和对照小鼠的肺部病毒载量进行了定量。在感染后 3 天检测病毒载量，其对应于被小鼠适应性 H3N2 病毒感染的小鼠的病毒滴度峰值 (Narasaraiu T 等人，“Adaptation of human influenza H3N2virus in a mouse pneumonitis model：insights into viral virulence，tissue tropism and host pathogenesis”，Microbes Infect 11：2-11，2009)。没有观察到两组动物病毒载量的显著差异（图 5)。该结果表明在 BPZE1 处理的动物中触发的交叉保护性机制不直接靶向病毒颗粒和／或受感染的细胞。

[0208] 实施例 6：BPZE1 处理保护小鼠免受流感诱导的免疫病理和淋巴细胞损耗。

[0209] 通过对受感染的 BPZE1 处理的动物和对照小鼠的肺部切片的组织学研究检测了肺免疫病理。如之前期待和描述的 (Narasaraju T 等人，“Adaptation of human influenza H3N2virus in a mouse pneumonitis model：insights into viral virulence，tissue tropism and host pathogenesis”，Microbes Infect 11：2-11，2009)，感染的对照小鼠表现出带有炎性细胞的严重炎症、严重的支气管肺炎和间质性肺炎，支气管和肺泡填充有坏死的碎片，以及高度肺气肿和中度水肿 (Fig7A)。反之，在受保护的 BPZE1 处理的小鼠肺部仅观察到轻微发炎、最小限度的气道和肺泡损伤、以及与最小限度的水肿相关的轻微的血管周／细支气管周损伤。

[0210] 还检测了存在于来自受保护和未受保护动物的支气管肺泡灌洗液 (BALF) 的细胞群。虽然两组动物的 BALF 中存在的细胞总数相当 ($11.8\times10^5$和 $16.1\times10^5$)，但是在 BPZE 1 处理的小鼠中发现了明显更多的巨噬细胞数量和较低的中性粒细胞数量（图 6B)。

[0211] 此外，还分析了存在于受保护和未受保护小鼠的肺部的淋巴细胞群。淋巴细胞损耗已在感染高病原性 H1N1(1918) 和 H5N 1 流感病毒的小鼠 (Kash JC 等人，“Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918influenza virus”，Nature 443：578-581，2006；Uiprasertkul M 等人，“Apoptosis and Pathogenesis of Avian Influenza A(H5N1)Virus in Humans”，Emerg Infect Dis 13：708-712，2007；Lu X 等人，“A mouse model for the evaluation of pathogenesis

and immunity to influenza A(H5N1)viruses isolated from humans”，J Virol 73：5903-5911，1999）以及感染本工作中所用的小鼠适应性H3N2病毒菌株的小鼠（Narasaraju T等人，“Adaptation of human influenza H3N2virus in a mouse pneumonitis model：insights into viral virulence，tissue tropism and host pathogenesis”，Microbes Infect 11：2-11，2009）中有过报道。在此，用BPZE1细菌处理Balb/c小鼠两次，并在4周后用小鼠适应性H3N2病毒进行攻击。流感攻击3和5天后收集小鼠的肺部用于T细胞群的FACS分析。病毒攻击后3天，感染的对照小鼠和BPZE1处理的小鼠中$CD3^+$T淋巴细胞的百分比与在攻击前的该动物中相当（图6C）。然而，病毒攻击5天后在感染的对照动物中观察到显著的$CD3^+$T细胞损耗（图6C），如之前报道的那样（Narasaraju T等人，“Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model：insights into viral virulence，tissue tropism and host pathogenesis”，Microbes Infect 11：2-11，2009）。相反，在受保护的BPZE1免疫的动物中T细胞群在攻击前后保持恒定（图6C），表明BPZE1处理防止了流感诱导的淋巴细胞损耗。

[0212] 实施例7：受保护的BPZE1处理的小鼠中促炎性细胞因子和趋化因子的产量降低。

[0213] 致死性H3N2病毒攻击1和3天后对来自受保护的BPZE1处理的小鼠BALF中主要促炎性细胞因子和趋化因子进行了检测，并与未受保护的小鼠进行了比较。受保护的动物组BALF中所有检测的促炎性细胞因子和趋化因子都比未受保护的小鼠中检测到的显著降低（图7）。对于有助于流感诱导的免疫病理并与疾病严重程度有关的主要的促炎性细胞因子IL-1β、IL-6、IFN-γ和TNF-α而言，在第1和第3天都观察到差异。（de Jong MD等人，“Fatal outcome of human influenza A(H5N1)is associated with high viral load and hypercytokinemia”，Nat Med 12：1203-1207，2006；Beigel JH等人，“Avian influenza A(H5N1)infection in humans：，N Engl J Med353：1374-1385，2005；Peiris JS等人，“Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease”，Lancet 363：617-619，2004；Schmitz N等人，“Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopatholoy but increases survival of respiratory influenza virus infection”，J Virol 79：6441-6448，2005）。发现IFN-α、MCP-1和RANTES的水平在病毒攻击1天后显著降低，而IL-12(p70)、GM-CSF和KC的产生在攻击3天后降低。显著的，发现在受保护的动物组中IL-12的产生被完全抑制，其与IFN-γ的低水平一致。

[0214] 此外，没有检测到保护和未保护动物的抗－炎性细胞因子IL-10和TGF-β的水平存在显著差异，这排除了1型调节T细胞（Tr1）在交叉保护机制中参与（的可能性）（图7）。

[0215] 实施例8：百日咳博代氏杆菌特异性适配免疫不参与交叉保护。

[0216] 检测了BPZE1处理的动物中的交叉反应（和保护性）抗体和/或T细胞的存在。首先，BLAST检索未得到百日咳博代氏杆菌和甲型流感H3N2和H1N1病毒之间有任何匹配的表位（数据未显示）。其次，BPZE1处理的小鼠的免疫血清在ELISA分析中不能与整H3N2病毒颗粒发生反应，其在体内的中和分析中也不能中和病毒（数据未显示）。第三，高滴度抗-BPZE1免疫血清在体外被动转移试验中没有提供任何针对H3N2致死性攻击的保护，而针对热失活H3N2病毒的免疫血清给出了100％的保护率（图8A）。第四，增殖和IFN-γELISPOT分析分别显示BPZE1处理的小鼠脾脏细胞在用H3N2病毒颗粒刺激时没有增

殖，也没有产生 IFN-γ（图 8B 和 C）。总而言之，这些数据强烈支持了百日咳博代氏杆菌特异性免疫在针对甲型流感病毒的交叉保护中没有发挥任何作用。

[0217] 讨论

[0218] 严重呼吸道疾病和免疫病理以及高病死率已经成为人类和其它哺乳动物发生高致病性禽流感病毒感染的特征。然而，导致该严重免疫病理效果的潜在机理仍没有完全阐明。特别地，病毒载量、免疫病理和疾病发生之间的关系仍然不可捉摸。之前的几个研究已报道了一种在流感病毒感染动物模型中减少死亡率且没有显著减少病毒载量的免疫病理；例如，随着 MIP-1α 基因破坏观察到减少的炎性细胞浸润和肺部损伤，但是伴随着延迟的病毒清除（Cook DN 等人，“Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection”，Science 269：1583-1585，1995）。类似的，CCR2（MCP-1 的主要受体）- 缺陷型小鼠表现出减少的死亡率、但是与降低的肺部细胞浸润和组织损伤相关的显著增加的病毒载量（Dawson TC 等人，“Contrasting effects of CCR5and CCR2deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus”，Am J Pathol 156：1951-1959，2000）。相反，IL-1R 敲除的小鼠表现出与延迟的病毒清除相关的增加的死亡率，但是较轻的病理（Schmitz N 等人，“Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopatholoy but increases survival of respiratory influenza virus infection”，J Virol79：6441-6448，2005）。

[0219] 在此，我们报道了百日咳博代氏杆菌介导的针对甲型流感病毒的交叉保护没有导致较低的肺部病毒载量。反之，受保护的 BPZE1 处理的小鼠表现出最低的肺部免疫病理和主要促炎性细胞因子和趋化因子的产量的降低。我们的发现与一个普遍共识一致，即疾病严重程度与高细胞因子 / 趋化因子水平非常相关（La Gruta NL 等人，“A question of self-preservation：immunopathology in influenza virus infection”，Immunol Cell Biol85：85-922007）。特征为由宿主免疫系统不受控制的激活导致的血清和肺部趋化因子和细胞因子水平过度的细胞因子风暴（storm），的确与被重构的 1918H1N1 和 H5N1 流感病毒感染的实验动物致死有关（Kash JC 等人，“Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918influenza virus”，Nature 443：578-581，2006；Simon AK 等人，“Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development：sensitivity of human thymocytes”，Proc Natl Acad Sci USA 98：5158-5163，2001；Kobasa D 等人，“Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918influenza virus”，Nature 445：319-323，2007；Tumpey TM 等人，“Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus”，Science 310：77-80，2005）；以及与人类的致死有关（de Jong MD 等人，“Fatal outcome of human influenza A(H5N1)is associated with high viral load and hypercytokinemia”，Nat Med 12：1203-1207，2006；Beigel JH 等人，“Avian influenza A(H5N 1)infection in humans：，N Engl J Med 353：1374-1385，2005；Uiprasertkul M 等人，“Apoptosis and Pathogenesis of Avian Influenza A(H5N1)Virus in Humans”，Emerg Infect Dis 13：708-712，2007；Peiris JS 等人，“Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease”，Lancet 363：617-619，2004）。此外，组织和病理学指标强烈表明过量宿主应答在介导与高致病性流感病毒相关的至少部分极端病理中发挥

关键作用。然而，个体细胞因子在流感病毒感染中的作用仍未清楚，其经常同时具有正面和负面的效果；虽然它的产生可能对于通过补充和/或激活感染位点处的免疫效应物细胞而进行的病毒清除是重要的，但是其炎症性质同样可能导致组织损伤（La Gruta NL 等人，“A question of self-preservation：immunopathology in influenza virus infection”，Immunol Cell Biol85：85-922007）。

[0220] 受保护的 BPZE1 处理的动物呼吸道中促炎性细胞因子和趋化因子的产量降低很可能影响细胞浸润和免疫细胞活化；的确在受保护的动物的 BALF 中观察到显著降低的嗜中性粒细胞数，其与 KC 和 TNF-α 的低水平相一致，这两种细胞因子参与受感染的组织中的嗜中性粒细胞的补充和激活（La Gruta NL 等人，“A question of self-preservation：immunopathology in influenza virus infection”，Immunol Cell Biol 85：85-922007；Kips JC 等人，“Tumor necrosis factor causes bronchial hyperresponsiveness in rats”，Am Rev Respir Dis145：332-336，1992；Headley AS 等人，“Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome”，Chest 111：1306-1321，1997）。此外，在受保护的动物中检测到的 IL-12 的抑制生产很可能损害了一些免疫细胞的活化，例如自然杀伤细胞（NK）和细胞毒素 $CD8^+$T 细胞。这两种细胞类型已被描述为潜在有害的，并参与炎性介质释放的免疫病理（La Gruta NL 等人，“A question of self-preservation：immunopathology in influenza virus infection”，Immunol Cell Biol 85：85-922007）。与此一致的，观察到受保护的动物 BALF 的 IFN-γ——NK 和 $CD8^+$T 细胞活化的标志——产量显著降低。另外，降低的 IFN-γ 产量可以影响嗜中性粒细胞针对病毒的应答，包括突发性氧化、抗原呈递诱导和趋化因子生产（Ellis TN 和 Beaman BL，“Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function”，Immunology 112：2-11，2004；Farrar MA 和 Schreiber RD，“The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor”，Annu Rev Immunol 11：571，1993）。

[0221] 有趣的是，在受保护的 BPZE1 处理的小鼠 BALF 中观察到显著升高的巨噬细胞数，虽然其 MCP-1 和 GM-CSF 的水平降低，后者分别涉及单核细胞补充和分化为巨噬细胞。然而，应当注意是肺泡巨噬细胞（AM）而非组织定居巨噬细胞构成了 BALF 中回收的主要巨噬细胞群（Jakubzick C 等人，“Modulation of dendritic cells trafficking to and from the airways”，J Immunol 176：3578-3584，2006）。从而，可以想到受保护的小鼠能够在其肺部组织表现出相对于感染的对照小鼠而言降低的巨噬细胞群。

[0222] AM 已显示能通过调节 T 细胞功能（Strickland DH 等人，“Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages”，Immunology 80：266-272，1993）、以及通过抑制树状细胞成熟（Holt PG 等人，“Down-regulation of the antigen presenting function(s)of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages”，J Exp Med 177：397-407，1993；Bilyk N 和 Holt PG，“Inhibition of the immunosuppressive activity of resident pulmonary alveolar macrophages by granulocyte/macrophage colony stimulating factor”，J Exp Med177：1773-1777，1993；Stumbles PA 等人，“Airway dendritic cells：co-ordinators of immunological homeostasis and immunity in the respiratory tract”，APMIS 111：741-755，2003）和迁移至肠系膜淋巴结（Jakubzick C 等人，“Modulation of dendritic cells trafficking

to and from the airways”，J Immunol 176：3578-3584，2006）来表现出对于炎症反应的抑制效果。因此我们可以假设由流感攻击诱导的较高数量的肺泡巨噬细胞有助于受保护的BPZE1处理的动物中的炎症抑制／控制。

[0223] 此外，我们发现$CD3^+$T细胞群在受保护的BPZE1处理的动物受到病毒攻击时保持不变，而在感染的对照小鼠中发现了$CD3^+$T细胞比例的显著降低。高致病性流感病毒感染过程中的淋巴细胞损耗之前已有报道（Kash JC等人，“Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918influenza virus”，Nature 443：578-581，2006；Uiprasertkul M等 人，“Apoptosis and Pathogenesis of Avian Influenza A(H5N1)Virus in Humans”，Emerg Infect Dis13：708-712，2007；Narasaraju T等人，“Adaptation of human influenza H3N2virus in a mouse pneumonitis model：insights into viral virulence，tissue tropism and host pathogenesis”，Microbes Infect 11：2-11，2009；Lu X等人，“A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A(H5N1)viruses isolated from humans”，J Virol73：5903-5911，1999），且实验证据已经显示细胞凋亡是一种潜在的机理（Uiprasertkul M等人，“Apoptosis and Pathogenesis of Avian Influenza A(H5N1)Virus in Humans”，Emerg Infect Dis13：708-712，2007；Lu X等人，“A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A(H5N1)viruses isolated from humans”，J Virol73：5903-5911，1999）。由于保护和未保护动物中未观察到病毒载量的不同，因此淋巴细胞凋亡不可能是病毒自身直接的溶细胞效果。反之，我们的数据与之前的研究一致，其认为在H5N1-感染的人类和小鼠中，淋巴细胞凋亡可能是由细胞因子调节异常宿主免疫应答过度活化所导致的（Uiprasertkul M等人，“Apoptosis and Pathogenesis of Avian Influenza A(H5N1)Virus in Humans”，Emerg Infect Dis 13：708-712，2007；Maines TR等人，“Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response”，Immunol Rev 225：68-84，2008）。特别地，已知TNF-α和与之相关的包括TNF相关的凋亡诱导配体的TNF-超家族成员（TRAIL）能够诱导T细胞凋亡（Simon AK等人，“Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development：sensitivity of human thymocytes”，Proc Natl Acad Sci USA 98：5158-5163，2001；Wang J等人，“The critical role of LIGHT，a TNF family member，in T cell development”，J Immunol 167：5099-5105，2001）。与此相一致的，在受保护的BPZE1处理的小鼠受到流感攻击时的BALF中检测到较低水平的TNF-α，从而潜在地翻译为较低的T细胞凋亡。

[0224] 还没有鉴定出交叉保护相关的保护性机理。然而，我们的数据显示百日咳博代氏杆菌－特异性适配免疫（包括交叉反应抗体和T细胞）与此无关。所观察到的是活体而非死亡的BPZE1细菌提供保护，这表明细菌的肺部菌落形成，即，延长的暴露于宿主免疫系统下，对于诱导保护性机理是必需的。此外，保护性机理的诱导需要多于3周，因为用BPZE1活菌处理一次并在3周后受流感H3N2病毒攻击的小鼠没有被显著地保护。然而，第二次BPZE1处理能够缩短诱导保护性机理所需的时间并增加保护率，表明一些记忆细胞在诱发时已经产生，其能够在第二次遇到BPZE1细菌时响应地更迅速，且响应程度更大。最后，观察到三次连续BPZE1活菌鼻腔给药对于针对人A/PR/8/34(H1N1)流感病毒提供50％的保

护是必须的。对于 H3N2 和 H1N1 病毒攻击得到的不同保护率说明由两种病毒诱导的分子疾病－机理是不同的。然而，即使对于不同亚型的保护效力可能不同，百日咳博代氏杆菌仍然是一种有前途的甲型流感病毒广谱疫苗。

[0225] 百日咳博代氏杆菌毒性因子的很多活性都致力于免疫调节，从而抑制、破坏和逃避宿主的防御系统 (Carbonetti NH，“Immunomodulation in the pathogenesis of Bordetella pertussis infection and disease”，Curr Opin Pharmacol 7：1-7，2007)。Toll- 样受体 (TLR)-4 信号传导启动和控制针对百日咳博代氏杆菌的免疫应答，其通过能够抑制炎性应答和限制气道中的病理的树状细胞 (DC) 来诱导抗－炎性细胞因子 IL-10 的产生 (Higgins SC 等人，“Toll-like receptor4-mediated innate IL-10activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to Bordetella pertussis by inhibiting inflammatory pathology”，J Immunol 171：3119-3127，2003)。已显示纤维血球凝集素 (FHA)，百日咳博代氏杆菌产生的主要粘附素，能刺激 IL-10 生产和抑制 TLR- 诱导的巨噬细胞和 DC 中的 IL-12 的生产，导致分泌 IL-10 的 1 型 T 调控细胞 (Tr1) 的发展 (McGuirk P 等人，“Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10production by dendritic cells：a novel strategy for evasion of protective T helper type 1responses by Bordetella pertussis”，J Exp Med 195：221-231，2002)。有趣的是，近期发现 FHA 的全身给药能在一个 T 细胞介导的结肠炎模型中减少肠道发炎，这支持了 FHA 的抗炎性作用 (Braat H 等人，“Prevention of experimental colitis by parenteral administration of a pathogen-derived immunomodulatory molecule”，Gut 56：351-357，2007)。然而，在此未发现保护和未保护的小鼠中 IL-10 和 TGF- 的生产有任何不同，这排除了在百日咳博代氏杆菌给予的针对甲型流感病毒的交叉保护中涉及 FHA 介导的 Tr1 诱导的潜在可能性。

[0226] 我们在此报道了在严重肺炎的Balb/c小鼠模型中，百日咳病原剂——百日咳博代氏杆菌的减毒菌株 (BPZE1) 的鼻腔给药提供了针对小鼠适应性 H3N2 甲型流感病毒的致死性攻击的有效和持续性的保护，并对人 H1N1(A/PR/8/34) 甲型流感病毒提供了较低程度的保护。虽然在此交叉保护中涉及的细胞和分子仍然有待鉴定，但是我们的数据表明百日咳博代氏杆菌特异性适配免疫和 Tr1 介导的下调可能与此无关。重要的是，我们发现该交叉保护没有导致病毒载量的降低。相反，受保护的 BPZE1 处理的小鼠表现出最低的肺部免疫病理，这与其 BALF 中降低的嗜中性粒细胞浸润和减少的各种主要的促炎性细胞因子和趋化因子的产生相一致。从而我们的发现强烈地表明针对甲型流感病毒诱导的致死性肺炎的保护可以通过减缓炎症和抑制细胞因子风暴来获得，并且证明了 BPZE1 细菌作为针对病毒性甲型流感病毒感染提供保护的有效的预防性手段的潜在应用。

[0227] 所有在此说明书中引用的出版物和专利申请在此均为了各种目的而整体引入作为参考，好像特殊地和单独地指明每种出版物或专利申请被为了各种目的而引入作为参考一样。

[0228] 虽然前述发明已经用说明和实施例的方式进行了细节描述，但其目的在于理解方便，本领域普通技术人员显然可以对本发明的技术方案作出的各种变形和改进，而不会偏离附加的权利要求的精神或范围。

[0229] 参考文献

[0230] 1.Carrat F 和 Flahault A,“Influenza vaccine:the challenge of antigenic drift”,Vaccine 25:6852-6862,2007。

[0231] 2.Nicholson KG 等人,“Influenza”,Lancet 362:1733-1745,2003。

[0232] 3.Kash JC等人,“Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918influenza virus”,Nature 443:578-581,2006。

[0233] 4.Simon AK 等 人,“Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development:sensitivity of human thymocytes”,Proc Natl Acad Sci USA98:5158-5163,2001。

[0234] 5.Kobasa D等人,“Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918influenza virus”,Nature 445:319-323,2007。

[0235] 6.Tumpey TM 等 人,“Characterization of the reconstructed 1918Spanish influenza pandemic virus”,Science 310:77-80,2005。

[0236] 7.de Jong MD 等 人,“Fatal outcome of human influenza A (H5N1)is associated with high viral load and hypercytokinemia”,Nat Med 12:1203-1207,2006。

[0237] 8.Beigel JH 等人,“Avian influenza A(H5N1)infection in humans:,N Engl J Med 353:1374-1385,2005。

[0238] 9.Uiprasertkul M 等人,“Apoptosis and Pathogenesis of Avian Influenza A(H5N1)Virus in Humans”,Emerg Infect Dis13:708-712,2007。

[0239] 10.Peiris JS 等 人,“Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1disease”,Lancet 363:617-619,2004。

[0240] 11.Salomon R 等 人,“Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection”,Proc Natl Acad Sci USA 104:12479-12481,2007。

[0241] 12.de Jong MD 等 人,“Oseltamivir resistance during treatment of influenza A(H5N1)infection”,N Engl J Med 353:2667-2672,2005。

[0242] 13.Cook DN等人,“Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection”,Science269:1583-1585,1995。

[0243] 14.Dawson TC 等 人,“Contrasting effects of CCR5and CCR2deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus”,Am J Pathol 156:1951-1959,2000。

[0244] 15.Smith DJ 等 人,“Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus”,Science 305:371-376,2004。

[0245] 16.Renauld-Mongenie G 等 人,“Induction of mucosal immune response against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant Bordetella pertussis”,Proc Natl Acad Sci USA93:7944-7949,1996。

[0246] 17.Mielcarek,N 等人,“Nasal vaccination using live bacterial vectors”,

Adv Drug Deliv Rev 51:55-70,2001。

[0247] 18.Mielcarek N 等 人,“Intranasal priming with recombinant Bordetella pertussis for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen”,Infect immune 65:544-550,1997。

[0248] 19.Coppens I 等 人,“Production of Neisseria meningitidis transferrin-binding protein B by recombinant Bordetella pertussis”,Infect immune 69:5440-5446,2001。

[0249] 20.Reveneau N 等 人,“Tetanus toxin fragment C-specific priming by intranasal infection with recombinant Bordetella pertussis”,Vaccine20:926-933,2002。

[0250] 21.Alonso S 等 人,“Production of nontypeable haemophilus influenzae HtrA by recombinant Bordetella pertussis using filamentous haemagglutinin as carrier”,Infect immune 73:4295-4301,2005.

[0251] 22.Mielcarek N等人,“Live attenuated B.pertussis as a single-dose nasal vaccine against whooping cough”,PLoS Pathog 2:e65,2006。

[0252] 23.Ho SY 等 人,“The highly attenuated Bordetella pertussis BPZE1 strain as a potential live vehicle for the delivery of heterologous vaccine candidates”,Infect Immune 76:111-119,2008。

[0253] 24.Narasaraju T 等 人,“Adaptation of human influenza H3N2virus in a mouse pneumonitis model:insights into viral virulence,tissue tropism and host pathogenesis”,Microbes Infect 11:2-11,2009。

[0254] 25.Lu X 等 人,“A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A(H5N1)viruses isolated from humans”,J Virol73:5903-5911,1999。

[0255] 26.Schmitz N 等 人,“Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopatholoy but increases survival of respiratory influenza virus infection”,J Virol79:6441-6448,2005。

[0256] 27.La Gruta NL等人,“A question of self-preservation:immunopathology in influenza virus infection”,Immunol Cell Biol 85:85-922007。

[0257] 28.Kips JC 等 人,“Tumor necrosis factor causes bronchial hyperresponsiveness in rats”,Am Rev Respir Dis145:332-336,1992。

[0258] 29.Headley AS 等人,“Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome”,Chest 111:1306-1321,1997。

[0259] 30.Ellis TN 和 Beaman BL,“Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function”,Immunology 112:2-11,2004。

[0260] 31.Farrar MA 和 Schreiber RD,“The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor”,Annu Rev Immunol 11:571,1993。

[0261] 32.Jakubzick C 等人,“Modulation of dendritic cells trafficking to and from the airways”,J Immunol176:3578-3584,2006。

[0262] 33.Strickland DH等人,“Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages”,Immunology 80:266-272,1993。

[0263] 34.Holt PG等人,“Down-regulation of the antigen presenting function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages”,J Exp Med 177:397-407,1993。

[0264] 35.Bilyk N 和 Holt PG,“Inhibition of the immunosuppressive activity of resident pulmonary alveolar macrophages by granulocyte/macrophage colony stimulating factor”,J Exp Med 177:1773-1777,1993。

[0265] 36.Stumbles PA 等 人,“Airway dendritic cells:co-ordinators of immunological homeostasis and immunity in the respiratory tract”,APMIS 111:741-755,2003.

[0266] 37.Maines TR等人,“Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response”,Immunol Rev225:68-84,2008。

[0267] 38.Wang J等人,“The critical role of LIGHT,a TNF family member,in T cell development”,J Immunol167:5099-5105,2001。

[0268] 39.Carbonetti NH,“Immunomodulation in the pathogenesis of Bordetella pertussis infection and disease”,Curr Opin Pharmacol 7:1-7,2007。

[0269] 40.Higgins SC等人,“Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to Bordetella pertussis by inhibiting inflammatory pathology”,J Immunol171:3119-3127,2003。

[0270] 41.McGuirk P等人,“Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells:a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis”,J Exp Med 195:221-231,2002。

[0271] 42.Braat H 等 人,“Prevention of experimental colitis by parenteral administration of a pathogen-derived immunomodulatory molecule”,Gut 56:351-357,2007。

[0272] 43.Menozzi FD等人,“Identification and purification of transferring-and lactoferrin-binding proteins of Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica”,Infect.Immun 59:3982-3988,1991。

[0273] 44.WHO,“WHO Manual on Animals Influenza Diagnosis and Surveillance”(World Health Organization,Geneva),2002。

[0274] 45.Kimman TG 等 人,“Development and antigen specificity of the lymphoproliferation response of pigs to pseudorabies virus:dichotomy between secondary B-and T-cell responses”,Immunology 86:372-378,1995。

[0275] 46.Bao Z 等 人,“Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates asthma in mice”,Am J Respir Crit Care Med 176:431-438,2007。

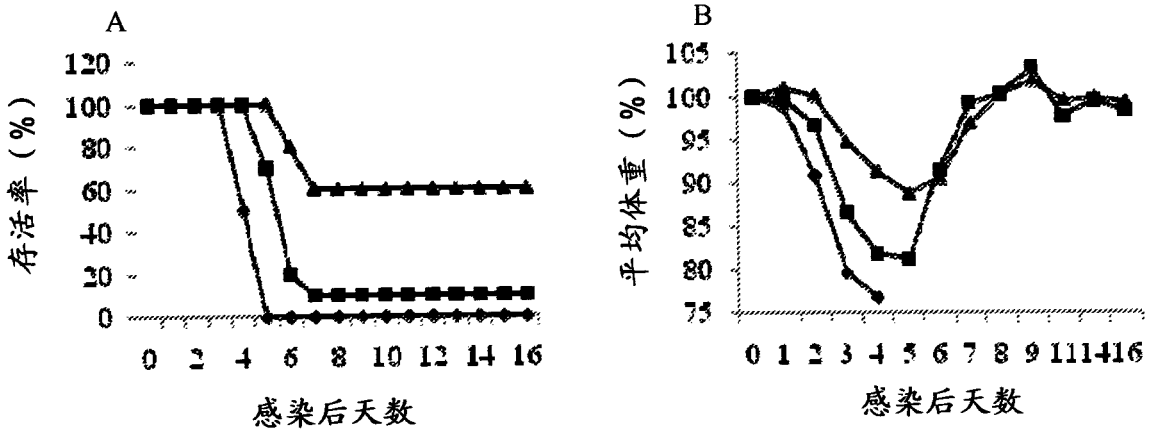

A
存活率（%）
120
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
感染后天数
B
平均体重（%）
105
100
95
90
85
80
75
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 11 14 16
感染后天数

图 1

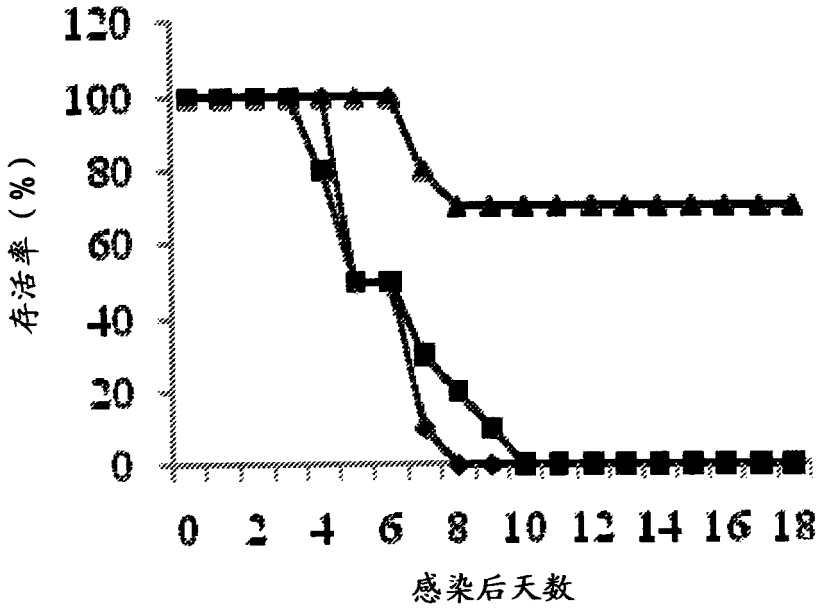

存活率（%）
120
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
感染后天数

图 2

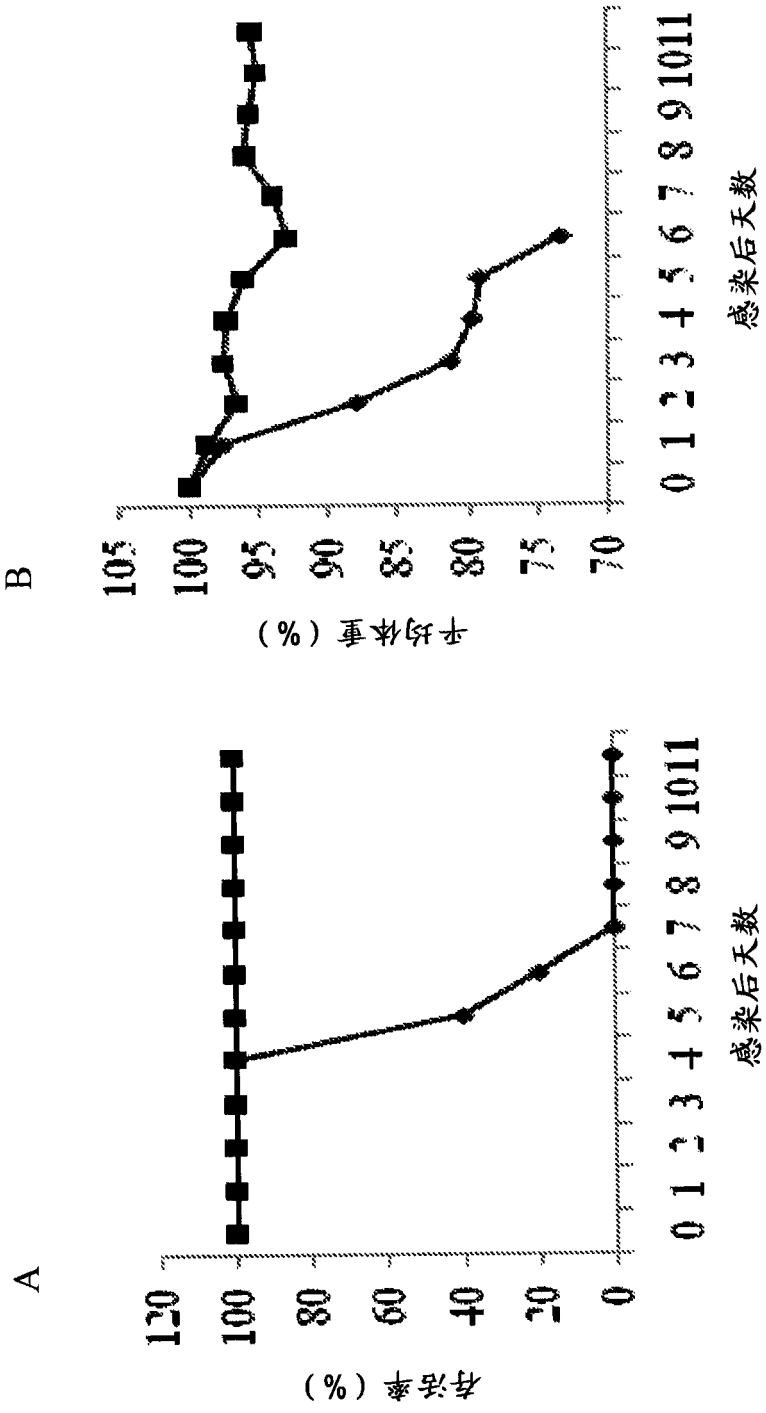

A
存活率（%）
120
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
感染后天数
B
平均体重（%）
105
100
95
90
85
80
75
70
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
感染后天数

图 3

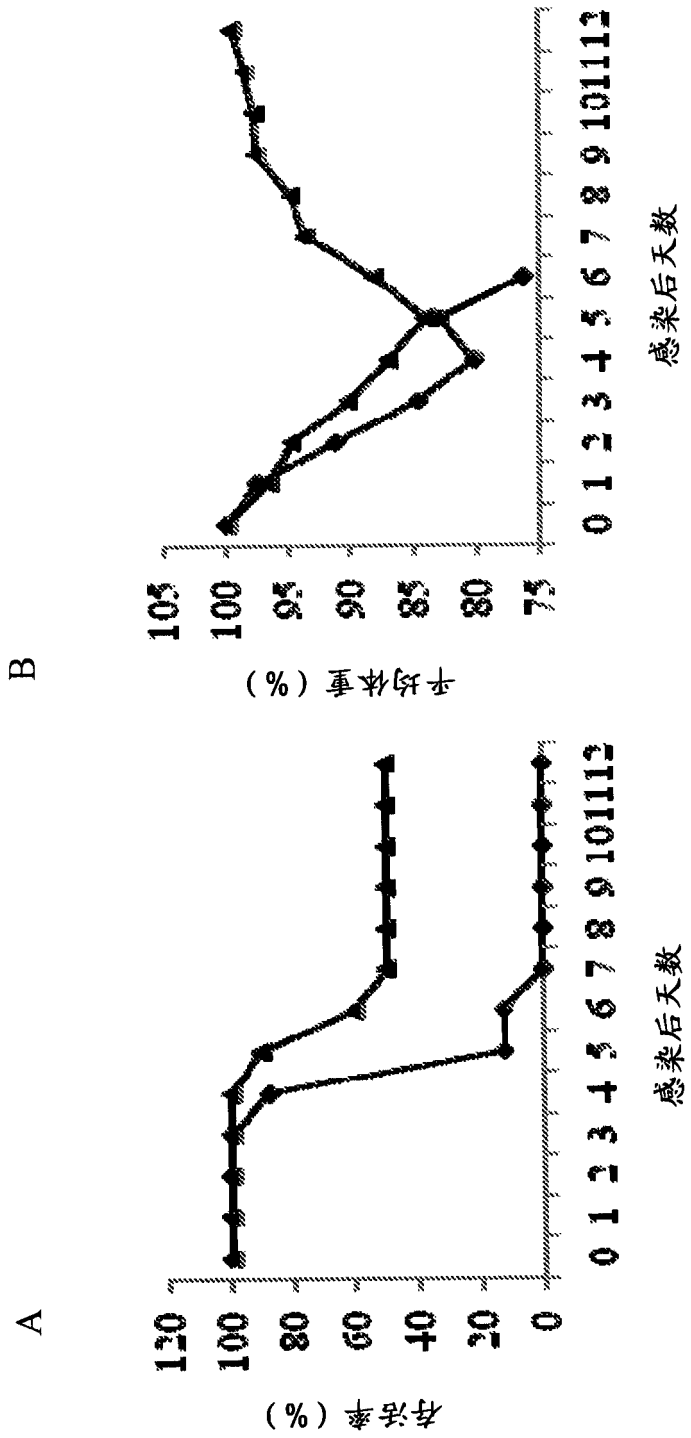

A
存活率（%）
120
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
感染后天数
B
平均体重（%）
105
100
95
90
85
80
75
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
感染后天数

图 4

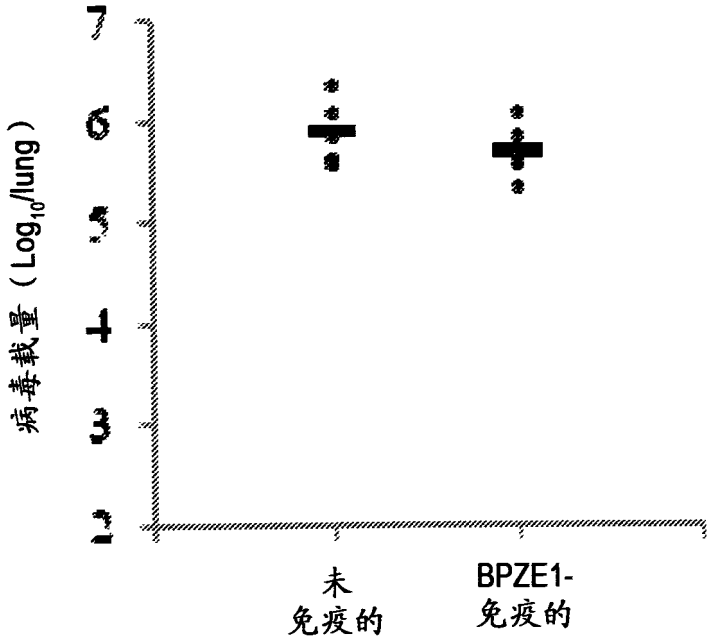

病毒载量（Log10/lung）
未
免疫的
BPZE1-
免疫的

图 5

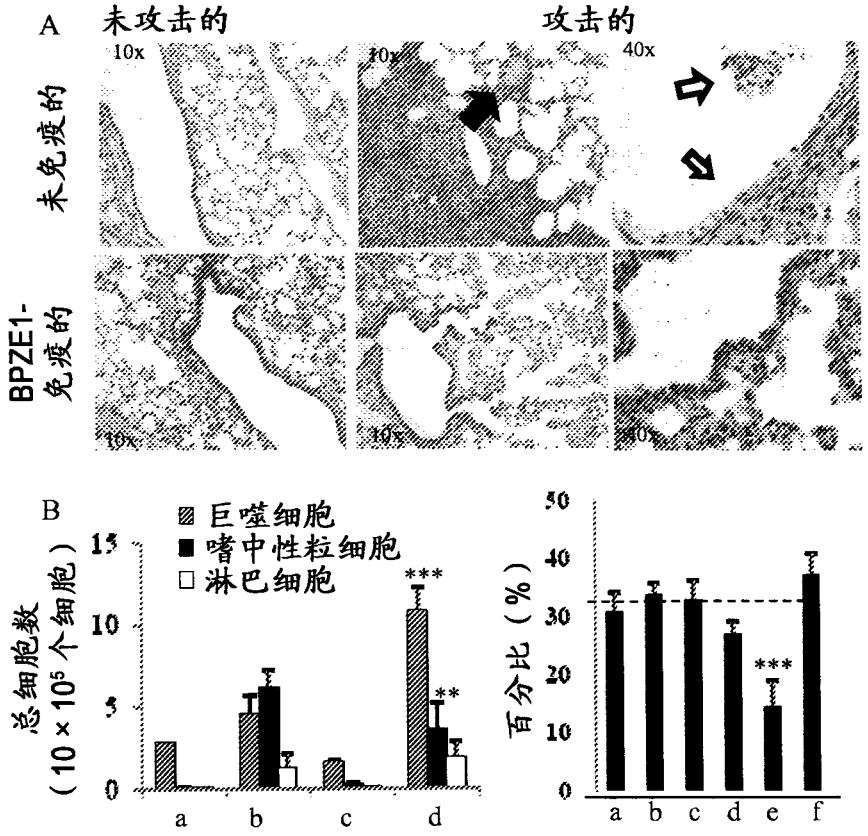

A
未攻击的
攻击的
10x
40x
未免疫的
BPZE1-
免疫的
B
巨噬细胞
嗜中性粒细胞
淋巴细胞
总细胞数
（10 × 10⁵ 个细胞）
百分比（%）
a
b
c
d
e
f

图 6

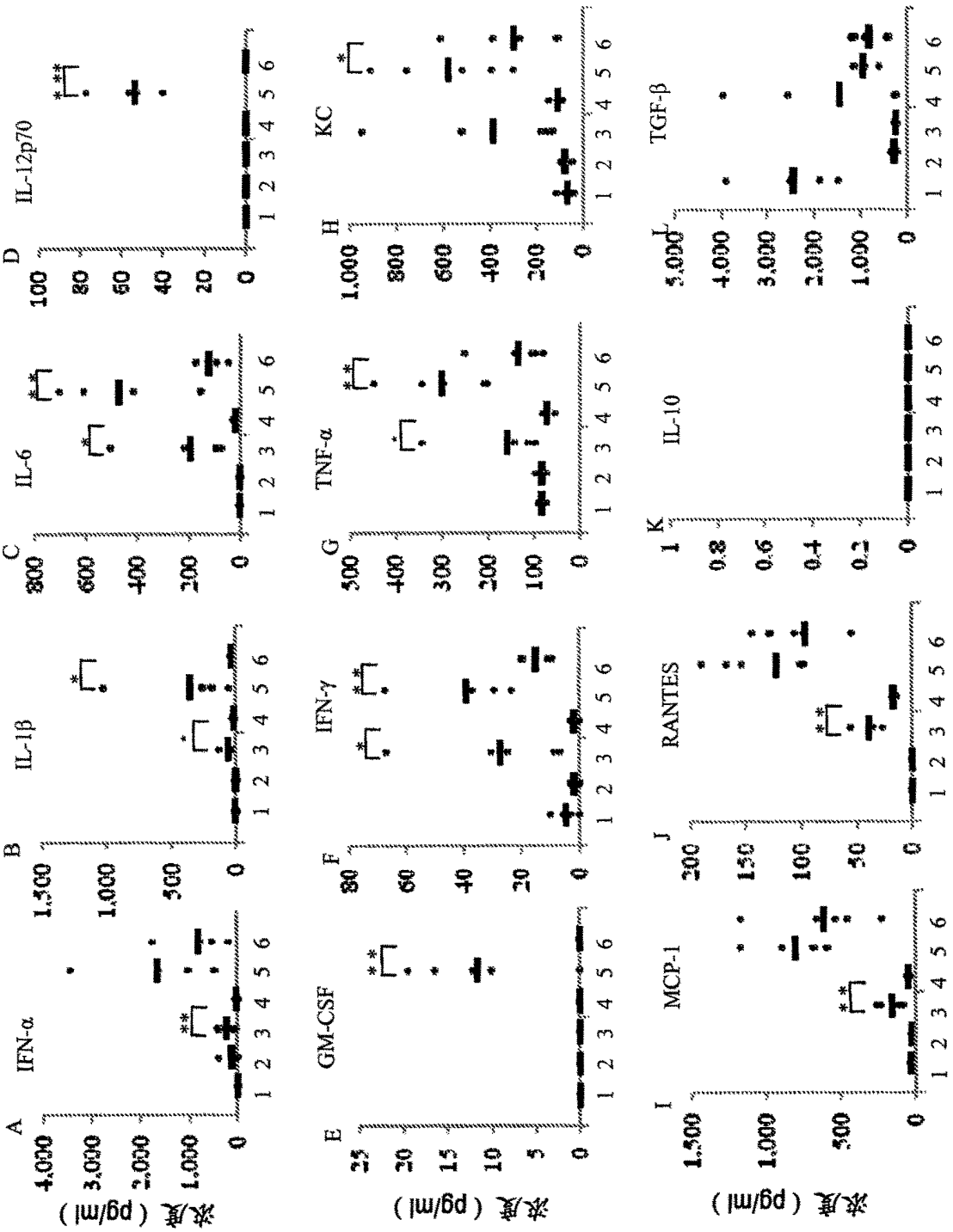

A
IFN-α
B
IL-1β
C
IL-6
D
IL-12p70
E
GM-CSF
F
IFN-γ
G
TNF-α
H
KC
I
MCP-1
J
RANTES
K
IL-10
L
TGF-β
浓度（pg/ml）
浓度（pg/ml）
浓度（pg/ml）
1 2 3 4 5 6

图 7

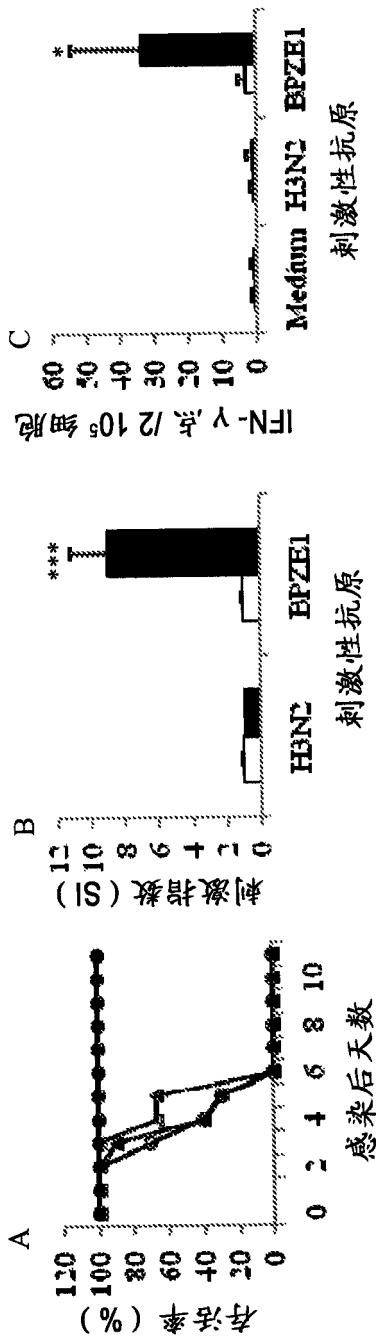

A
存活率（%）
120
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10
感染后天数
B
刺激指数（SI）
12
10
8
6
4
2
0
***
H3N2
BPZE1
刺激性抗原
C
IFN-γ点/2 10⁵细胞
60
50
40
30
20
10
0
*
Medium
H3N2
BPZE1
刺激性抗原

图 8