



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102448490 B

(45) 授权公告日 2015.05.13

(21) 申请号 201080019636.0

CN 101947323 A, 2011.01.19, 全文.

(22) 申请日 2010.04.26

CN 101074442 A, 2007.11.21, 全文.

(30) 优先权数据

CN 101400783 A, 2009.04.01, 全文.

09305371.8 2009.04.28 EP

WO 2007104451 A1, 2009.10.01, 说明书第

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

83段第7-8行,第88段第1-4行,第98段,第

2011.10.28

100-101段,.

(86) PCT国际申请的申请数据

Martignon G, et al..does childhood

PCT/EP2010/055507 2010.04.26

immunization against infectious diseases

(87) PCT国际申请的公布数据

protect from the development of atopic

WO2010/125014 EN 2010.11.04

disease?.《pediatr allergy immunol》.2005,

(83) 生物保藏信息

第16卷第194页左栏第2段第1-4行、第3段第

CNCM I-3585 2006.03.09

1-4行、右栏第3段第1-6行、第5段,第196页右

(73) 专利权人 国家健康与医学研究院

栏第2段第1-3行,第197页左栏第1段、图2,第

地址 法国巴黎

199页左栏第1段第1-13行.

专利权人 里尔巴斯德研究所

Nathalie mielcarek et al..live

爱尔兰国立梅努斯大学

attenuated B.pertussis as a single-dose

(72) 发明人 卡米尔·洛赫特 伯纳德·马洪

nasal vaccine against whooping cough.《Plos

希瑟·卡瓦纳

pathogenes》.2006,第2卷(第7期),第662-670

审查员 方晓云

(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 王思琪 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 39/10(2006.01)

(56) 对比文件

CN 88103075 A, 1988.12.21, 全文.

权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

用于预防或治疗过敏原引起的气道疾病的疫
苗

(57) 摘要

本发明涉及一种气管细胞毒素(TCT)、百日咳
毒素(PTX)和皮坏死毒素(DNT)缺陷的减活百日
咳杆菌疫苗,其用于预防法或治疗过敏原引起的
气道疾病。

1. 活的减毒百日咳杆菌疫苗在制备用于预防或治疗受试者的过敏原引起的气道疾病的药物中的用途,所述活的减毒百日咳杆菌疫苗是气管细胞毒素 (TCT)、百日咳毒素 (PTX) 和皮坏死毒素 (DNT) 缺陷的。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其中,所述过敏原引起的气道疾病选自由过敏性哮喘、枯草热和间质性肺疾病组成的组。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其中,所述受试者是婴儿或幼儿。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其中,所述活的减毒百日咳杆菌疫苗是 BPZE1 菌株。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其中,所述活的减毒百日咳杆菌疫苗带有异种抗原。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其中,所述活的减毒百日咳杆菌疫苗通过经鼻给药或通过吸入施用。

用于预防或治疗过敏原引起的气道疾病的疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于预防或治疗过敏原引起的气道疾病的疫苗。

背景技术

[0002] 过敏性哮喘的发病机理还不清楚,然而目前的认识包括 CD4⁺Th2 细胞的扩增,以及对其他无害的环境过敏原耐受的破坏 (Romagnani 等人 J Allergy Clin Immunol 2004 ; 113(3) :395-400)。与环境影响关联的遗传易感性似乎影响 Th2 介导的应答的正常抑制。已推测在胎儿和新生儿发育期间肺成熟的异常可引起气道更易感于环境过敏原,从而有利于向 Th2 表型的极化并因此使个体倾向于特异反应性和哮喘。过敏原引起 IL-4、IL-5 和 IL-3 的产生是典型的过敏性病理以及这种 Th2 细胞因子的分泌启动 B 细胞向 IgE 的同种型类别转换,增加粘液产生和嗜曙红细胞向气道的募集。因为 CD4⁺Th2 细胞在一些过敏症中代表协调细胞 (co-ordinating cell) 类型,所以这提示对反平衡响应 (counterbalancing response) 的诱导可防止特应性疾病的后续发展。根据 Strachan's 卫生假说 (hygiene hypothesis) 的这一变型 (Romagnani 等 Int Arch Allergy Immunol 1992 ;98(4) : 279-85),接触微生物可激活改变 Th1、Th2 和 Treg 应答的先天免疫途径。这导致 T 辅助细胞 2 细胞扩增的抑制,以及后续的向 IgE 的同种型转换的抑制。然而,几项研究已经表明病毒和细菌感染在呼吸道疾病的恶化方面有作用。例如,呼吸道合胞体病毒和 Th1 诱导恶性百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*) 感染 (Ennis 等人 Clin Exp Allergy 2004 ;34(9) : 1488-97) 使动物模型中的过敏性炎症恶化。

[0003] 革兰氏阴性百日咳杆菌引起百日咳,一种在全世界范围内造成重大的幼儿发病率和死亡率的严重呼吸道疾病。尽管通过死的全细胞疫苗 (Pw) 或更新近的非细胞亚单位疫苗 (Pa) 的免疫已经成功了,但已报道该疾病在年轻成年人中再度出现 (Das P. Lancet Infect Dis 2002 ;2(6) :322)。通常,百日咳杆菌不会急性感染该年龄组;然而被感染的成年人可起到储主的作用并增加幼儿在接种疫苗前感染该疾病的可能性。最新近的疫苗接种方案要求接种三次,在出生后的 2 个月开始,是 6 个月达到最佳保护所需要的。因此,需要一种诱导强烈保护新生儿对抗百日咳杆菌的疫苗。

[0004] 尽管诱导了 Th1 免疫,恶性百日咳杆菌感染在过敏原引起的炎症的鼠科模型中恶化气道病理 (Ennis 等人 Clin Exp Allergy 2004 ;34(9) :1488-97)。Th2 诱导的 Pa 疫苗对抗百日咳杆菌诱导的过敏性哮喘的恶化,但在全身或局部水平都诱导 IL-13 (Ennis 等人 Clin Diagn Lab Immunol 2005 ;12(3) :409-17)。相反,利用 Th1 诱导 Pw 的全身免疫抑制过敏性气道反应性 (Mills 等人 Dev Biol Stand. 1998 ;95 :31-41),表明过敏原引起的疾病的保护并不是简单的 Th1/Th2 应答的调节,但与激发时气道损伤的程度有关,以至于在气道上皮间充质单位的破坏过程中经呼吸道气道的过敏原激发可能是比 Th1/Th2/Treg 极化更重要的因素。

[0005] 最近,已经开发了一种抗百日咳杆菌的遗传减毒活疫苗 BPZE1 作为对抗百日咳的候选新生儿疫苗 (Mielcarek 等人 PLoS Pathog 2006 ;2(7) :e65)。这种活的重组百日咳杆

菌菌株在鼻内给药时诱导强烈的局部和全身免疫应答。通过鼻途径给药模拟自然感染并预期在 1 个月龄以上的孩子中产生长效免疫 (Mascart 等人, J Immunology 2003 ;170(1) : 1504-9)。三种毒性因子已经被确定为减毒的目标:百日咳毒素、气管细胞毒素和皮坏死毒素。利用等位基因交换,编码这些毒素的基因被缺失或用遗传灭活的类似物替换以诱导保护,而没有与野生型感染相关的严重病理。然而,施用 BPZE1 对第三方过敏原激发和过敏原诱导的病理的影响还是未知的。

发明内容

[0006] 本发明涉及一种用于预防或治疗过敏原引起的气道疾病的活的减毒百日咳杆菌疫苗,其是气管细胞毒素 (TCT)、百日咳毒素 (PTX) 和皮坏死毒素 (DNT) 缺陷的。

[0007] 本发明涉及一种用于预防或治疗受试者中过敏原引起的气道疾病的方法,该方法包括向所述受试者施用有效量的活的减毒百日咳杆菌疫苗,其中所述活的减毒百日咳杆菌疫苗是气管细胞毒素 (TCT)、百日咳毒素 (PTX) 和皮坏死毒素 (DNT) 缺陷的。

[0008] 本发明还涉及活的减毒百日咳杆菌疫苗在制备用于预防或治疗过敏原引起的气道疾病的药物中的用途,该疫苗是气管细胞毒素 (TCT)、百日咳毒素 (PTX) 和皮坏死毒素 (DNT) 缺陷的。

[0009] 本发明的详细说明

[0010] 过敏原引起的气道疾病的例子是过敏性哮喘、枯草热、间质性肺病 (包括肺纤维化)。

[0011] 间质性肺病 (包括肺纤维化) 可以由职业的或环境的暴露而引起。不受限于理论, TCT、PTX 和 DNT 缺陷的活的减毒百日咳杆菌疫苗会在环境暴露 (暴露于引发间质性肺疾病的试剂) 期间降低气道损伤和重建 (remodelling) 并还对抗毒性百日咳杆菌的肺纤维化恶化。

[0012] “受试者”是指人。通常受试者是新生儿、幼儿或成人。

[0013] 气管细胞毒素 (TCT)、百日咳毒素 (PTX) 和皮坏死毒素 (DNT) 缺陷的活的减毒百日咳杆菌疫苗已经记载在 W02007/104451 和 Mielcarek 等人 (PLoS Pathog 2006 ;2(7) :e65) 中。

[0014] 最近在分子水平上对百日咳杆菌毒性的认识上的进步已经使得能够合理地设计通过消除或改变在百日咳病理发生中涉及的基因进行减毒的策略。三种毒性因子被遗传靶定:气管细胞毒素 (TCT)、百日咳毒素 (PTC) 和皮坏死毒素 (DNT)。

[0015] TCT 引起对受感染宿主气管中的纤毛细胞的破坏并因此可以涉及到咳嗽症状。TCT 是革兰氏阴性细菌的细胞壁中肽聚糖的降解产物,其一般通过 AmpG 转运蛋白内化到细胞溶质中并在细胞壁生物合成过程中被再利用。百日咳杆菌 AmpG 在肽聚糖降解产物的内化中是无效的。百日咳 ampG 基因可被大肠杆菌 ampG 基因替代。得到的菌株表达低于 1% 的残留 TCT 活性。任何来自革兰氏阴性细菌 (其释放非常少量的肽聚糖碎片到培养基中) 的异源 ampG 基因可用于本发明中。适合的异源 ampG 基因的例子包括但不限于来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、肠杆菌科 (*enterobacteriaceae*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、莫拉克斯氏菌属 (*Molaxella*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、军团菌属 (*Legionella*) 的 ampG 基因。

[0016] PTX 是引起百日咳杆菌感染的全身效应的主要毒性因子并由酶促激活的部分（称为 S1）和负责与靶细胞受体结合的部分构成。它也是主要的保护性抗原之一。天然 ptx 基因可被编码酶促失活毒素的突变形式替换。这可通过在 S1 中分别地 Arg-9 被 Lys 置换和 Glu-129 被 Gly 置换来实现，它们是两个参与底物结合和催化作用的关键残基。可使用等位基因交换来首先删除 ptx 操纵子，然后插入突变形式。

[0017] 百日咳杆菌培养上清液中相关毒素的存在可通过免疫印记分析检测。

[0018] 也可进行其他突变如美国专利 6,713,072 中记载的那些，以及能够将毒素活性降低到不可检测的水平的所有已知的或其他突变。

[0019] 等位基因交换还可用于移除 dnt 基因。尽管 DNT 在百日咳杆菌毒性中的作用还不确定，但它已在紧密相关的物种支气管炎博德特菌 (*Bordetella bronchiseptica*) 中被确认为重要的毒素并在微量注射时显示致死活性。

[0020] 在优选的实施方式中，活的减毒百日咳杆菌疫苗是 BPZE1 菌株。

[0021] 该 BPZE1 菌株已于 2006 年 3 月 9 日以编号 CNCM I-3585 保藏在 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, FRANCE)。

[0022] 通常，本发明的活的减毒百日咳杆菌疫苗还可带有异种抗原。该活的减毒百日咳杆菌疫苗可用作载体，以携带至少另外一种编码目标蛋白质的异源核酸序列。通常，由至少另外一种异源核酸序列编码的蛋白质是希望在呼吸道中表达的蛋白质。通常，目标蛋白质可以是针对希望的免疫反应的抗原（如病毒或细菌抗原）。携带异种抗原的活的减毒百日咳杆菌疫苗的例子例如已经被 Si Ying Ho 等人 (*Infection and Immunity*, 2008, 76(1), 111-119) 公开。

[0023] 本发明的疫苗的制剂可利用本领域公认的方法完成。施用于受试者的本发明疫苗的量 and 施用的方案可根据药物和兽医领域的技术人员熟知的标准技术在考虑如辅剂（如果存在）、特定受试者的年龄、性别、体重、人种和身体状况以及施用途径的因素的情况下确定。该疫苗的施用常常是单剂的。或者，本发明的疫苗的施用利用该疫苗通过首次（初始接种）接着回忆接种至少一次进行。

[0024] 通常，该疫苗可通过鼻给药或吸入方式施用。这种施用方式成本低而且能够使本发明的活的减毒百日咳杆菌疫苗在呼吸道定殖。鼻给药可以利用液体溶液、悬浮液、乳液形式的活的减毒百日咳杆菌疫苗完成。溶液和悬浮液以液滴施用。溶液也可以作为来自鼻喷雾瓶或来自鼻吸入器的细雾施用。凝胶体分配在含有一次施用所需剂量的小注射器中。吸入可以通过溶液、悬浮液和粉末形式的活的减毒百日咳杆菌疫苗完成；这些制剂通过气溶胶、小滴或干粉吸入器施用。粉末可通过吹药器或吹气器施用。

[0025] 以下，通过如下实施例和附图说明本发明。

附图说明

[0026] 图 1. 减毒的百日咳杆菌 BPZE1 降低由致敏的过敏原引起的气道病理的严重性。第 38 天时来自 (A) 非致敏的，(B) OVA 致敏的，(C) OVA 致敏的和百日咳杆菌感染的，(D) OVA 致敏的和用 BPZE1 免疫的肺细支气管横切片的典型形态变化。气道炎症利用固定的肺切片的苏木精和曙红 (H&E) 染色来检测。原始放大倍率为 A、C、E 和 G×100，B、F 和 H×400。

[0027] 图 2. 减毒的百日咳杆菌疫苗 BPZE1 降低针对致敏过敏原的粘液增生 (mucus hyperplasia) 的严重性。第 37 天时来自 (A) 非致敏的, (B) OVA 致敏的, (C) OVA 致敏的和百日咳杆菌感染的, (D) OVA 致敏的和用 BPZE1 免疫的细支气管横切片中的典型形态变化。气道炎症利用肺切片上的 Discombes/ 阿尔新蓝 (Alcian blue)/PAS 复合染色来检测。原始放大倍率为 ×400。

[0028] 图 3. 减毒的百日咳杆菌疫苗 BPZE1 减少 BAL 液的细胞浸润。在最终 OVA 暴露 24 小时后, 毒性 BPSM 感染、减毒 BPZE1 激发和 / 或 OVA 致敏对 BAL 组成的效应。阴性对照是用盐水进行的假感染 / 致敏。检验 BAL 液的总细胞数 (A), 或嗜中性粒细胞 (B)、嗜曙红细胞 (C) 或淋巴细胞 (D) 的存在。结果表示为细胞数的平均 ±S. E. M. 。*P < 0. 05。

[0029] 图 4. 减毒的百日咳杆菌疫苗 BPZE1 减少过敏原诱导的 IgE。血清中的 OVA 特异性 IgE 应答于 OVA 致敏和 / 或毒性 (BPSM) 或减毒的 (BPZE1) 百日咳杆菌激发而诱生。在第 38 天收集血清并通过 ELISA 测定 OVA 特异性血清 IgE 水平。低于 100pg/ml 的浓度被认为是阴性的。结果表示为平均抗体浓度 ±S. E. M. 。P < 0. 05。

[0030] 图 5. 脾细胞对 OVA 的细胞介导免疫应答通过先暴露于减毒 (BPZE1) 或毒性 (BPSM) 百日咳杆菌感染 10 天后的 OVA 致敏诱发。负号表示用 PBS 的假致敏或激发。对于 (A) IL-5、(B) IL-10、(C) IL-13 和 (D) IFN- γ 显示来自所分析的类似培养物的细胞因子应答。在减去典型地 2000-4000cpm 的背景后, T 细胞增殖 (E) 表示针对 200 μ g/ml 的 OVA 的脾增殖的 Δcpm。结果表示为平均值 ±S. E. M. 。

[0031] 表 1. 百日咳杆菌 / 过敏原致敏的病理特征的总结

[0032] 在非致敏的 (对照)、OVA 致敏的 (OVA)、BPZE1 免疫的致敏小鼠 (ZeOVA) 或 BPSM 感染的致敏小鼠 (SmOVA) 中的气道炎症的特征。

[0033]

组	组织炎症	BALF	杯状细胞化生	脾细胞培养				OVA-IgE
		嗜曙红细胞		—				
				IL-5	IL-13	IL-10	IFN- γ	
对照	-	-	-	-	-	-	-	-
OVA	++	++	++	+++	+++	-	-	++
ZeOVA	+	+	+	-	+	-	++	+
SmOVA	++	+++	+++	+	-	-	-	+++
BPZE1	-	-	-	-	-	-	-	-
BPSM	-	-	-	-	-	-	-	-

实施例

[0034] 概要

[0035] 该临床前研究利用先前鉴定的动物模型考察候选的百日咳杆菌疫苗 BPZE1 是否影响第三方过敏原的激发以及病理。与毒性野生型菌株不同, 减毒的活 BPZE1 不会恶化而

是对抗过敏原引起的疾病。

[0036] 所用的缩写

[0037] OVA :卵清蛋白, BAL :支气管肺泡灌洗, BPZE1 :活的减毒的百日咳杆菌, Pa :非细胞百日咳疫苗, Pw :全细胞百日咳疫苗。

[0038] 材料

[0039] OVA 和百日咳杆菌的免疫、致敏和气道递送

[0040] 使用八到十二周龄的雌性 BALB/c 小鼠 (Harlan, Oxon, 英国) 并按照爱尔兰卫生部和爱尔兰 Maynooth 国立大学研究伦理委员会的规定和指南饲养。将小鼠暴露于活的毒性的或减毒的细菌并在感染过程中对过敏原致敏。毒性百日咳杆菌 BPSM 或减毒的 BPZE1 如前所述 (Mills 等人 Dev Biol Stand. 1998 ;95 :31-41) 进行培养。中指数期 (mid-log) 生长的减毒的或毒性的菌株通过气溶胶施用于小鼠。在感染的最高峰 (第 10 天) 和在第 24 天, 通过腹膜内注射佐剂 (AlumImject™, Pierce, Ill) 中的 100 μ g/ml 的卵清蛋白 (OVA) 来使小鼠致敏。在第 24、35、36 和 37 天用 OVA (50 μ g/ml) 鼻内激发小鼠。各个对照组接受消毒 PBS 的假递送以代替活性剂 (Ennis 等人 Clin Exp Allergy 2004 ;34(9) :1488-97)。

[0041] 支气管肺泡灌洗 (BAL) 和呼吸道组织学

[0042] 在第 37 天, 通过戊巴比妥钠的致死注射杀死小鼠并收集 BAL 液 (Ennis 等人 Clin Exp Allergy 2004 ;34(9) :1488-97)。如所记载的利用 Diff Quik/Rapi-Diff II™ (Triangle Biomedical Sciences, NC, 美国) 进行总白细胞和分化细胞的计数。取来自非灌洗小鼠的肺并在 10% (v/v) 福尔马林 /PBS 中固定, 包埋在石蜡中, 切片并用苏木精 /曙红 (H&E)、阿尔新蓝 (粘液的识别)、Discombes (嗜曙红细胞的识别) 或高碘酸 - 希夫 (用于评估基底膜厚度) 染色。组织病理学变化根据已确立的半定量评分系统分级为轻微、中等或严重。病理学由两个独立的观察者评分, 如前所述 (Ennis 等人 Clin Diagn Lab Immunol 2005 ;12(3) :409-17) 该观察者先前不知道处理组。

[0043] T 细胞增殖试验

[0044] 如前所述 (Mahon 等人 J Exp Med 1997 ;186(11) :1843-1851) 制备来自小鼠的脾细胞并用培养基 (阴性对照)、OVA (200 μ g/ml) 或伴刀豆球蛋白 A (5 μ g/ml) 孵育 72 小时。在 48 小时移除上清液用于细胞因子分子, 以及培养物接受新鲜的培养基。细胞与 [³H]-胸苷一起孵育最后 6 小时并通过液体闪烁测量掺入的放射活性来测定增殖。

[0045] 细胞因子和抗体应答的测定

[0046] 利用 Cytometric Bead Array Flex Sets (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), 按照制造商的说明进行来自 BAL 液和脾细胞上清液的 IL-5、IL-10、IL-13 和 IFN- γ 的分析, 并通过流式细胞仪 (Becton-Dickinson, NJ, 美国) 进行分析。利用 FCAP Array v 1.0.1 软件 (BD Biosciences) 生成各种细胞因子的标准曲线和原始数据。如前所述 (Morokata T 等人 Immunology 1999 ;98(3) :345-351) 利用大鼠抗小鼠 IgE 单克隆抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA, 美国) 通过 ELISA 测定 OVA 特异性血清 IgE。在与鼠科动物 IgE 标准品 (BD, Pharmingen, San Diego, CA, 美国) 比较后 IgE 浓度表示为 μ g/ml。

[0047] 统计分析

[0048] 所有测量的值表示为平均值 $\pm$ 该平均值的标准误 (SEM)。利用 GraphPad Prism™ 软件 (GraphPad, San Diego, CA) 进行统计分析。利用 Kruskal Wallis 检验或者 (在需要

时)Mann Whitney 检验进行比较。通过 P 值 < 0.05 表示显著性。

[0049] 结果

[0050] 减毒的百日咳杆菌 BPZE1 预防恶化的 OVA 引起的过敏性气道疾病

[0051] 毒性百日咳杆菌可在动物模型中使第三方过敏原的激发加剧 (Ennis 等人 Clin Exp Allergy 2004 ;34(9) :1488-97) 且与人体中过敏症的恶化有关 (Harju 等人 Thorax 2006 ;61(7) :579-584)。为评价减毒百日咳杆菌对第三方过敏原激发的影响,小鼠用百日咳杆菌的毒性或减毒的菌株激发并在细菌携带 (bacterial carriage) 的高峰期对 OVA 致敏 (先前已证明揭示感染对过敏原引起的炎症的影响的模型)。在不存在感染时,OVA 致敏的小鼠在第 38 天表现出典型的支气管周和血管周的炎症,这在天然对照小鼠中未观察到 (图 1A 和 B)。在该时间点,由毒性细菌感染单独引起的病症已解决。在毒性百日咳杆菌感染的高峰时激发与 OVA 单独致敏相比增强了气道病症,使得小鼠显示上皮增生和中度粘液化生 (图 1C)。相反,与 OVA 单独致敏的那些小鼠相比,在用减毒的 BPZE1 感染的致敏小鼠中观察到最小限度的病症 (图 1D)。对包含粘液的杯状细胞的检验证实了与单独 OVA 致敏的那些小鼠相比,在 OVA 致敏的小鼠中预先用 BPZE1 免疫减少了粘液分泌和增生。因此,与毒性百日咳杆菌的感染不同,用候选的活的减毒百日咳杆菌疫苗 BPZE1 进行免疫并不增进而是降低与过敏原致敏有关的病症。

[0052] 减毒的百日咳杆菌疫苗菌株 BPZE1 防止 OVA 引起的过敏性气道炎症

[0053] 用活的减毒的百日咳杆菌 BPZE1 进行免疫减少了 OVA 诱导的炎性流流入呼吸道的量。对照小鼠在支气管肺泡灌洗中显示了最低的细胞性 (图 3),而 OVA 致敏 / 激发导致炎症细胞的明显浸润 ($> 3 \times 10^6$ 细胞,图 3A, $p < 0.05$)。在淋巴细胞或嗜中性粒细胞的数目上几乎没有明显差别。BPZE1 单独免疫在第 38 天时不支持嗜中性粒细胞浸润且在 BPZE1/OVA 组合致敏的小鼠中嗜中性粒细胞的浸润通常低于 OVA 单独或与毒性细菌组合的情况,然而该研究中这一差异并未达到统计学显著性。重要的观察结果是用毒性百日咳杆菌预先感染与如前所观察的 (Ennis 等人 Clin Exp Allergy 2004 ;34(9) :1488-97) 伴随嗜曙红细胞增加的 OVA 单独致敏相比,增加了细胞浸润 (图 3C)。然而明显相反的是,在 OVA 致敏前用活的减毒 BPZE1 免疫导致显著降低的 OVA 引起的嗜曙红细胞气道浸润 (图 3C, $p < 0.05$)。因此,候选的活的减毒百日咳杆菌疫苗 BPZE1 防止 OVA 引起的过敏性气道嗜曙红细胞增多 - 该模型中炎症的关键特征。

[0054] 候选的活百日咳杆菌疫苗 BPZE1 未增强对致敏过敏原的血清 IgE 应答

[0055] 小鼠中的 OVA 致敏已知诱导 IgE 和强烈的特异性 Th2 应答,而百日咳杆菌感染诱导强的 Th1 应答。然而单独的百日咳毒素可提升 IgE 浓度。因此,重要的是探究是否减毒的 BPZE1 具有辅助效应或增高过敏原特异性的 IgE。BPZE1 对过敏性致敏的影响通过测定来自 OVA 致敏的、BPSM 感染的、BPZE1 免疫的或接受这些处理的组合的小鼠的血清中的 OVA 特异性 IgE 浓度来考察 (图 4)。如文献中充分描述的, OVA 致敏诱导显著水平的 IgE。先前,在 OVA 致敏的小鼠中观察到用毒性百日咳杆菌 W28 感染后 OVA 特异性 IgE 的显著增加 (Ennis 等人 Clin Exp Allergy 2004 ;34(9) :1488-97)。在 OVA 致敏前暴露于减毒的 BPZE1 的小鼠中 IgE 应答与那些单独接受 OVA 的小鼠没有显著差别。然而,明显相反的是,与用毒性 BPSM 感染结合 OVA 致敏的小鼠相比,减毒 BPZE1 的免疫导致 OVA 诱导的 IgE 的显著减少 ($p < 0.05$) (图 4)。因此,在过敏原激发前给药的候选活的减毒百日咳杆菌疫苗 BPZE1 未

显示出如百日咳杆菌 W28¹¹和 BPSM 观察到的 IgE 应答。

[0056] 活的减毒百日咳杆菌疫苗 BPZE1 调节对于致敏过敏原的回忆细胞因子应答

[0057] 明确的是,与毒性百日咳杆菌比较,减毒 BPZE1 对过敏原引起的气道疾病具有根本不同的效应。为了揭示这种效应的机理基础,确定了细菌暴露对过敏原诱导的免疫应答的模式的影响。脾细胞制剂的过敏原特异性细胞因子的诱导在用 BPZE1 免疫和 OVA 致敏/激发后进行评价以评估 BPZE1 对过敏原引起的激发的影响。如所预期的, OVA 单独致敏在 OVA 回忆时诱导高水平的 Th2 细胞因子 IL-5 和 IL-13(图 5)。毒性 BPSM 和减毒的 BPZE1 单独都不诱导任何对 OVA 的回忆应答(图 5E),而是产生对百日咳杆菌抗原的强 Th1 应答。BPSM 激发不调整对致敏过敏原的免疫应答,没有通过在 OVA 共致敏的小鼠中观察到的 OVA 特异性 IL-5、IL-13 或增殖性应答的显著降低,且没有 IFN- γ 的显著增加(图 5)。相反,减毒 BPZE1 改变由致敏过敏原诱导的细胞因子谱。BPZE1 显著降低 OVA 诱导的 IL-5 ($p < 0.05$) 和 IL-13 ($p < 0.05$) 的水平,以及 OVA 特异性增殖应答 ($p < 0.001$),而是诱导响应于 OVA 的 IFN- γ 的显著增加 ($p < 0.05$)。总之,BPZE1 不促进对第三方抗原的 Th2 细胞因子诱导而是将其调整为类 Th1 应答。

[0058] 讨论

[0059] 本研究利用组合感染/致敏模型以证明百日咳杆菌的一种减毒菌株, BPZE1,不是增强而是减轻过敏原引起的气道疾病。减毒的百日咳杆菌减轻过敏原诱导的嗜曙红细胞增多并降低气道炎症的严重性。而且,BPZE1 阻止 OVA 诱导的 IL-5 和 IL-13 增加并将对过敏原的回忆应答调整为类 Th1 应答。当与在 OVA 致敏前用毒性百日咳杆菌感染的小鼠相比时, BPZE1 显示出过敏原诱导的血清 IgE 应答的降低(参见表 1)。将这些数据结合起来看,证实了减毒的 BPZE1 未使鼠科动物模型中过敏原诱导的气道疾病恶化并支持这一候选疫苗用于特异性普遍的人群。

[0060] 卫生假说提出 Th1 诱导的感染可对特异性发生具有抑制作用。然而,早先的研究已经证实毒性百日咳杆菌增强气道疾病的严重性(Ennis 等人 Clin Exp Allergy 2004 ; 34(9):1488-97),尽管其诱导 Th1 免疫。相反,用 Th1 诱导性 Pw 疫苗进行的全身免疫抑制过敏性气道反应,暗示对过敏原引起疾病的保护不仅与 CD4⁺T 细胞分布有关,而且与激发时气道损伤的程度有关。

[0061] 本研究的目的是调查用遗传减毒的百日咳杆菌菌株进行免疫是否可对抗 OVA 引起的气道炎症。先前,已经调查了其他疫苗减轻特异性风险的潜力而且许多研究已发现免疫和过敏性疾病风险增加之间的反相关性。Ennis 等人发现 Pw 疫苗在过敏性气道炎症的鼠科动物模型中对抗 OVA 诱导的气道高反应性的百日咳杆菌恶化(Mills et al.Dev Biol Stand. 1998 ;95 :31-41)。类似地,Grüber 等人未发现响应于常见儿童疫苗(包括百日咳疫苗)的过敏症促进效应(Grüber 等人 Allergy 2008 ;63(11):1464-72)。在 718 名青少年的基于人口的样本中儿童期免疫和特异性疾病的发生之间关系发现活的减毒疫苗抑制了哮喘和过敏性疾病的发生(Martignon 等人 Pediatr Allergy Immuno 1. 2005 ;16(3):193-200)。目前的研究证实候选 BPZE1 疫苗通过在黏膜和全身水平调节针对 OVA 的细胞介导应答来抑制过敏原引起的疾病。

[0062] IL-5 介导的嗜红细胞向肺的募集通过产生共同造成组织损伤的潜在的细胞毒性产物(包括主要碱性蛋白(MBP)和嗜曙红细胞过氧化物酶)导致过敏原诱导的气道疾病

(Gleich G. J Allergy Clin Immunol 2000 ;105(4) :651-63)。毒性百日咳杆菌感染使得流入呼吸道的 OVA 诱导的炎症程度恶化,具有嗜曙红细胞的增加(图 3C),伴随着气道疾病严重程度的显著提高(图 1G)。相反地,在过敏原致敏之前施用减毒的 BPZE1 导致嗜曙红细胞浸润的显著减少。该研究证实 BPZE1 阻止在动物用毒性百日咳杆菌菌株感染时观察到的 OVA 诱导 IL-5 的佐剂相关增加(图 1A)。IL-13 还通过促进 Th2 应答、增加嗜曙红细胞募集和引起 IgE 介导的炎症而造成哮喘的病理发生(Humbert 等人 J Allergy Clin Immunol. 1997 ;99(5) :657-65 ;Temann 等人 Am J Respir Cell Mol Biol 1997 ;16(4) :471-8)。减毒的 BPZE1 显著减低致敏小鼠中 OVA 诱导的 IL-13(图 5C)。气道粘液分泌过多还与 IL-13 有关并且是过敏性哮喘和百日咳两种疾病的主要病理生理特征。因此在该研究中粘液的产生反映出 IL-13 水平并且在预先暴露于 BPZE1 的致敏小鼠中显著降低并不令人惊奇。

[0063] 该研究表明 BPZE1 中减弱的毒性因子(百日咳毒素、气管细胞毒素和皮坏死毒素)中的一种或其组合在毒性百日咳杆菌菌株的情况中观察到的佐剂效应中通过诱导 IL-5 或 IL-13 或两者来起作用。

[0064] 在此观察到的对过敏原引起的疾病的保护作用与 BPZE1 中包含的三种遗传改变相关且过敏性免疫应答的调节与某些形式的卫生假说一致。然而,作为减毒 BPZE1 对过敏原引起疾病的有益影响的基础的机制可以是多样的和相互关联的。先前的研究已经证实,在动物模型中总血清 IgE 作为 OVA 致敏的结果显著增加(Holgate 等人 J Allergy Clin Immunol 2005 ;115(3) :459-465 ;Hamelmann 等人 Allergy 1999 ;54(4) :297-305)。在此,由呼吸系统致敏诱导的过敏原特异性 IgE 应答在接受减毒百日咳杆菌的小鼠中与毒性百日咳杆菌相比显著降低。这与将由减毒 BPZE1 诱导的对 OVA 的全身免疫应答从 IL-5 和 IL-13 向 IFN- γ 的调节(一种与减少的 IgE 相关的应答)是一致的(Lack 等人 J Immunol 1994 ;152(5) :2546-54)。不过,过敏性气道炎症不仅仅是 Th1 和 Th2 应答之间的平衡。Hansen 等人已经证明气道 CD4⁺Th 应答的调节不是必然降低气道疾病(Hansen 等人 J Clin Invest 1999 ;103(2) :175-183)。这可能是由于 BPZE1 的关键有益特征是偏向 Th1 的(Th1 skewed)应答与诱导的气道疾病的缺失的组合。这与其中气道疾病对过敏原的恶化与在气道损伤或重建过程中的过敏原激发有关的先前报道一致(Marsland 等人 Clin Exp Allergy 2004 ;34(8) :1299-306 ;Gem. J Allergy Clin Immunol 2000 :105(2Pt 2) :S497-502)。

[0065] 该组合的有益之处使得活的减毒百日咳杆菌疫苗(其是 TCT、PTX 和 DNT 缺陷的)成为有吸引力的对抗特应性的候选者。

[0066] 参考文献

[0067] 在整个本申请中,各参考文献描述了本发明所属领域的技术状况。这些文献的公开在此通过引用全部结合于本文中。

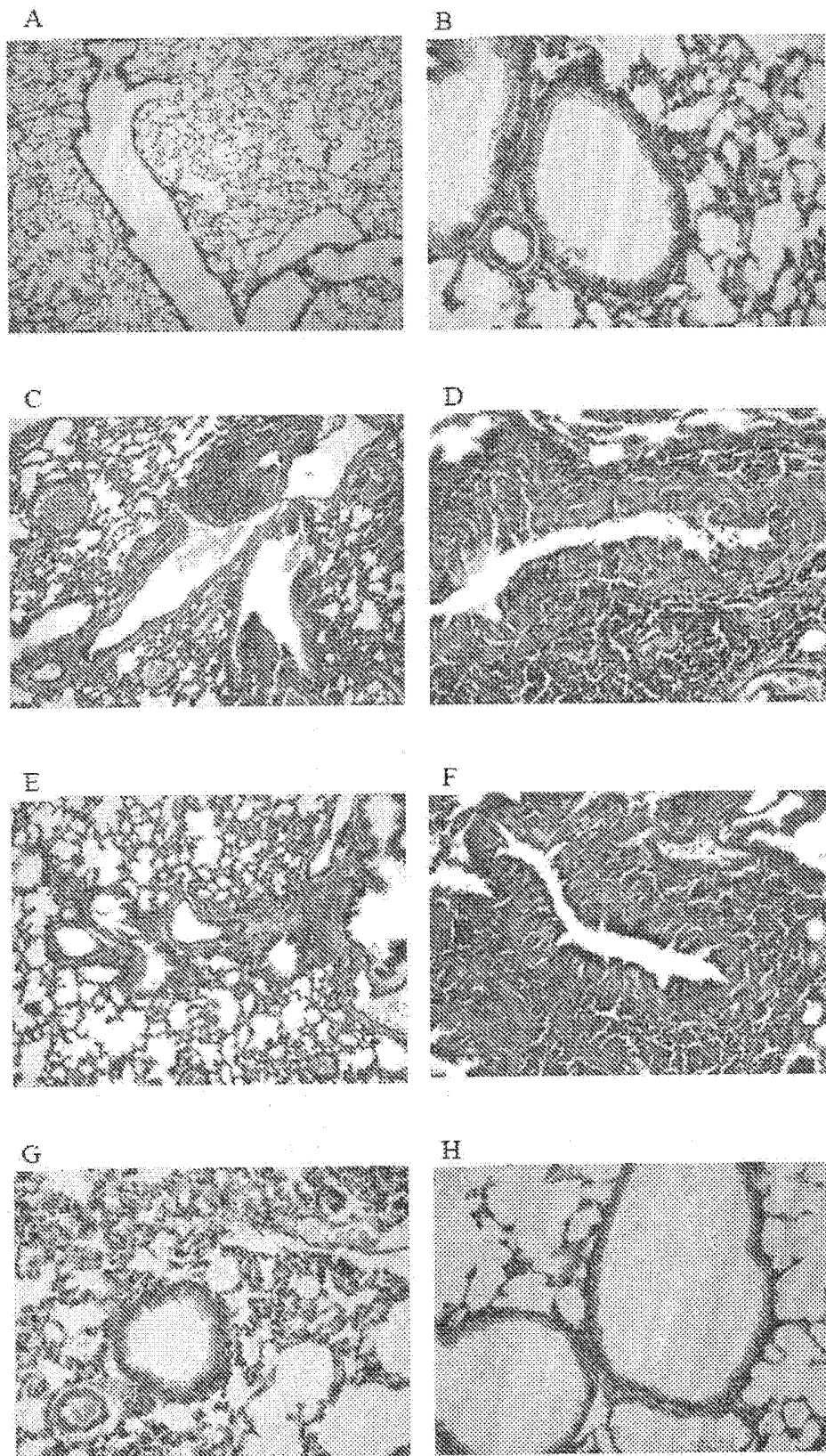


图 1

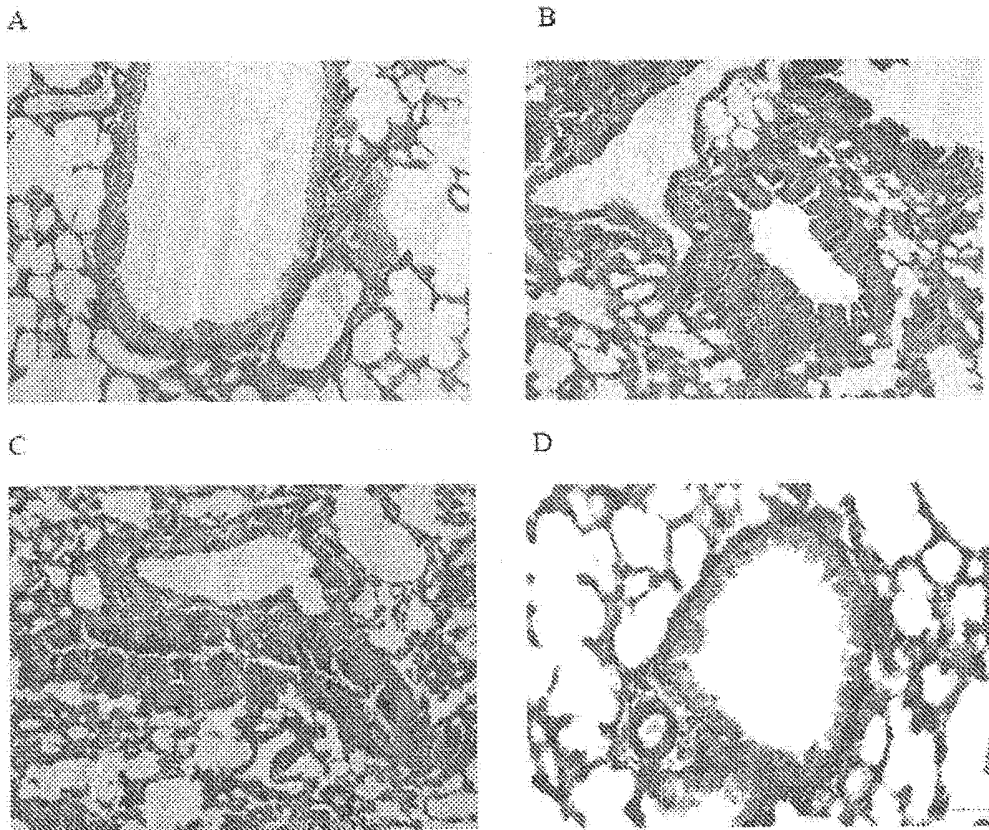


图 2

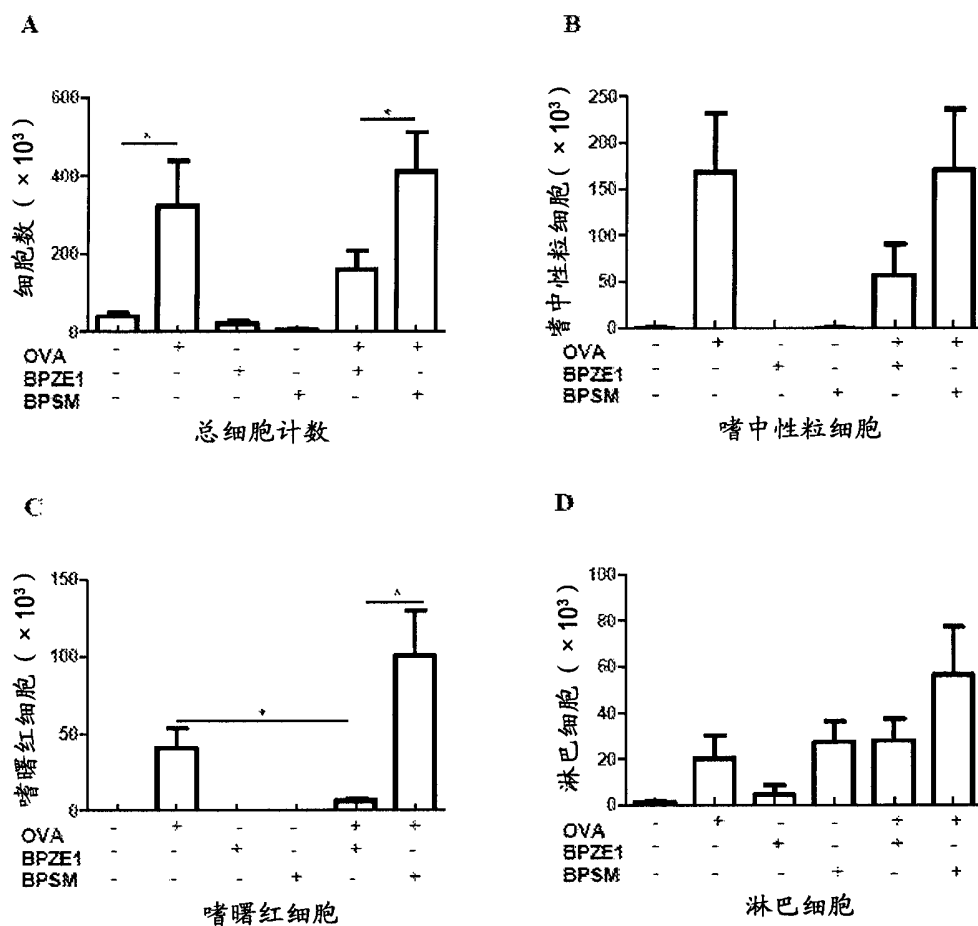


图 3

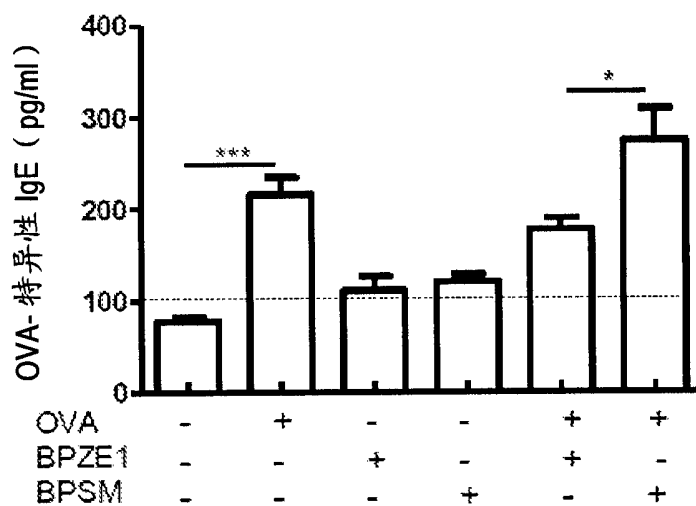


图 4

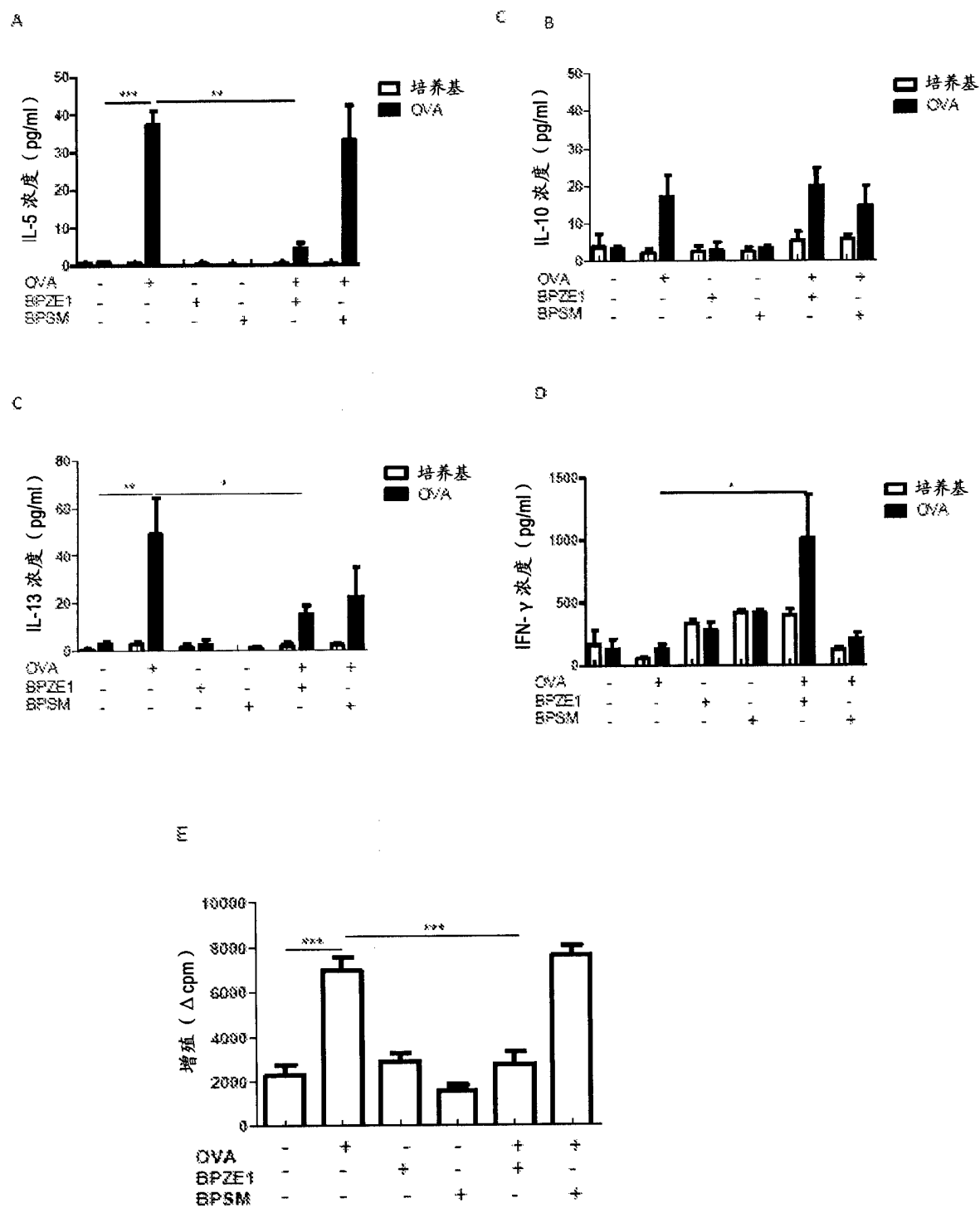


图 5