

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/255

C12N 1/21 C12N 15/31

A61K 35/74

//C12R1 : 42



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00817447.4

[43] 公开日 2003 年 4 月 16 日

[11] 公开号 CN 1411468A

[22] 申请日 2000.12.22 [21] 申请号 00817447.4

[30] 优先权

[32] 1999.12.23 [33] GB [31] 9930457.8

[32] 1999.12.23 [33] GB [31] 9930460.2

[32] 1999.12.23 [33] GB [31] 9930455.2

[32] 1999.12.23 [33] GB [31] 9930456.0

[32] 1999.12.23 [33] GB [31] 9930459.4

[32] 1999.12.23 [33] GB [31] 9930458.6

[32] 1999.12.23 [33] GB [31] 9930461.0

[86] 国际申请 PCT/GB00/05002 2000.12.22

[87] 国际公布 WO01/47962 英 2001.7.5

[85] 进入国家阶段日期 2002.6.20

[71] 申请人 微科学有限公司

地址 英国伯克郡

[72] 发明人 G·都甘 D·W·赫尔顿

J·D·桑坦格罗 J·E·舍艾

F·R·布伦南

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李华英

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 用于治疗感染的减毒微生物

[57] 摘要

双重突变体沙门氏菌属微生物在保持该微生物能够有效引起免疫反应的同时帮助防止微生物的复活。不同特定突变体的结合是有益的。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种沙门氏菌属(*Salmonella*)微生物, 该微生物含有破坏位于 Spi2 致病岛内的基因表达的一个减毒突变, 和另外一个破坏 clpP, ompR, sifA, sseC 和 ssaB 中任何一个基因表达的突变。

2. 一种沙门氏菌属微生物, 该微生物含有破坏 aro 基因表达的一个减毒突变, 和另外一个破坏 clpP 和 sifA 中任何一个基因表达的突变。

3. 根据权利要求 2 的微生物, 其中 aro 基因是 aroC。

4. 根据权利要求 1 的微生物, 其中 Spi2 基因是 ssaV, 并且另一个突变破坏 clpP, ompR, sifA 或 sseC。

5. 根据权利要求 1 的微生物, 其中 Spi2 基因是 ssaT, 并且另一个突变破坏 ssaB。

6. 根据以上任何一项权利要求的微生物, 其进一步含有一个异种抗原或者一种治疗蛋白。

7. 根据权利要求 6 的微生物, 其中的抗原是甲型, 乙型或丙型肝炎病毒抗原。

8. 根据以上任何一项权利要求的微生物, 其中的微生物是伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)Ty2。

9. 根据以上任何一项权利要求的微生物, 用于治疗作用。

10. 含有根据权利要求 1-8 中任一微生物, 一种助剂和一种生理上可接受的稀释剂的疫苗组合物。

11. 根据权利要求 10 的组合物, 每单位剂量含有 10^7 - 10^{10} CFUs 的微生物。

12. 根据权利要求 11 的组合物, 每单位剂量含有 10^8 - 10^9 CFUs 的微生物。

13. 权力要求 1 到 8 中任意一项所述的微生物在制备用于治疗全身细菌感染的药物中的用途。

14. 根据权利要求 13 的用途, 其中的感染是伤寒。

用于治疗感染的减毒微生物

发明领域

本发明涉及可以用于疫苗组合物的防治微生物或病毒感染的减毒微生物。

发明背景

十分肯定的是减毒活微生物是非常有效的疫苗；这样的疫苗通常比那些非复制型免疫原引起更强并且持续时间更长的免疫反应。对这一点的一种解释是活的减毒株在宿主中引起局限感染并且模拟天然感染的早期阶段。另外，不象灭活制剂，活疫苗能够诱导可能同其在抗原呈递细胞，例如巨嗜细胞中的复制能力有关的有效的细胞介导反应。

将沙门氏菌（*Salmonella*）减毒活疫苗用作预防动物和人的沙门氏菌病的安全而有效的疫苗已经有了很长的历史。的确，由瑞士血清疫苗研究所生产制造的口服减毒活伤寒疫苗，Ty21a (Vivotif)，已经被证明是一种用于预防伤寒的非常成功的疫苗，并且已经在包括美国和欧洲的许多国家得到许可。

但是，用化学诱变技术获得的这一菌株的减毒和菌株的减毒基础并不完全清楚。因此，该疫苗在使用剂量（通常是4）和每次给药量所需的活生物数量方面并不理想。

现代分子生物技术结合对沙门氏菌致病原因的知识的增长导致鉴定出了对于这种生物在体内生长和存活所必需的数种基因。这就提供了新的用于减毒的靶基因，引出了未来的疫苗菌株可以通过在选择已知的影响毒力的基因中引入确定的非回复突变而被“合理地”减毒的概念，这有利于改进疫苗的开发，尤其是在免疫原性以及应当使用的剂量大小方面。

虽然现在已知许多沙门氏菌减毒株，但只有很少可以有资格作为潜在的人用候选疫苗。这可能部分是由于需要平衡疫苗免疫原性和沙门氏菌微生物变成复活的可能性。

我们清楚选择合适的减毒目标以得到合适的候选疫苗是不简单的而且不容易被预测。许多因素都可能影响减毒株作为合适的疫苗的合适性，并且进行了许多研究以鉴定出合适的菌株。例如，许多被检测的作为候选疫苗的减毒株导

致病人的脓肿或 vaccinemia。

因此需要开发出一种免疫原性程度高并且减少了微生物菌株恢复成为活性形式的可能性的疫苗。

发明概述

本发明是基于发现将一些减毒突变组合物引入到沙门氏菌微生物中能够产生出一种免疫原性程度高并且恢复成为活性形式的危险性低的疫苗。所得到的疫苗菌株显示出了好的副作用方面。

根据本发明的第一方面,是具有破坏位于 Spi2 致病岛中的基因表达的一个减毒突变的,以及破坏 cipP, ompR, sifA, sseC 或 ssaB 中的任何一个基因的表达的另一个突变的沙门氏菌属微生物。

根据本发明的第二个方面,是具有一个破坏 aro 基因表达的减毒突变,以及另一个破坏 cIpP 或 sifA 任何一个基因的表达的突变的沙门氏菌微生物

沙门氏菌微生物可以用于生产治疗细菌或病毒感染的静脉用或口服药物,例如用于治疗伤寒。

发明描述

本发明的微生物和疫苗组合物可以通过现有技术来制备。

普通技术人员不需要过度的试验就可以选择出特定的沙门氏菌微生物以及合适的突变。一种优选的微生物是鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)。

第一套突变株包括第一个位于沙门氏菌致病岛 2 (Spi2) 区域中的基因的突变; 该区域在 WO-A-9617951 中公开。

Spi2 是位于沙门氏菌染色体上的两个典型致病岛中的一个。Spi2 含有数个基因, 这些基因编码参与将 Spi2 编码的毒力相关蛋白(被称作效应器蛋白)运输到沙门氏菌外并且可能是直接进入象巨噬细胞一样的目标宿主细胞中的 III 型分泌系统。Spi2 的一部分(装置基因)编码 III 型系统的分泌装置。Spi2 对于沙门氏菌对小鼠的致病性和毒力是完全必需的, 这一点现在已被世界的不同组织的观察所证实。经口服, 静脉和腹膜内给药途径的攻击小鼠的鼠伤寒沙门氏菌 Spi2 突变体是高度减毒的。

在一个优选的实施方案中, Spi2 区的基因是装置基因。位于 Spi2 内的装置基因现在已经被较好地鉴定; 例如见 Hensel 等, 分子微生物学, (1997); 24 (1): 155-167。适用于本发明的基因包括 ssaV, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaO,

ssaP, ssaQ, ssaR, ssaS, ssaT, ssaU 和 ssaH 基因。

Spi2 区中的突变不一定在一个基因内以破坏其功能。例如, 位于上游调节区的突变也能够破坏基因的表达从而导致减毒。基因间隔区的突变也足以破坏该基因的功能。

在本发明的一个优选的实施方案中, Spi2 基因是 ssaV 并且进一步的突变破坏 cipP, ompR, sifA 或 sseC 中的任何一个。在另一个优选的实施方案中, 突变破坏 ssaT 而另一个突变破坏 ssaB。

Gifford 等在微生物遗传学, 1993; 139: 913-920 中描述了 clpP 基因, 所编码的蛋白是一种应激蛋白酶。

OmpR 基因在 Chatfield 等, 传染与免疫性, 1991; 59 (1) : 449-452 中作了描述。所编码的蛋白是具有全局调节功能的双成份系统(OmpR-EnvZ)的一个成份, 并且也是 Spi2 中的双成份系统 ssrA-ssrB 的调节物(Lee 等, 细菌学杂志, 2000; 182 (3): 771-781)

Medina 等在传染与免疫性, 1999; 67 (3): 1093-1099 中描述了 sseC 基因。所编码的产物的功能是未知的。

Hensel 在分子微生物学, 2000; 36 (5): 1015-1023 中描述了 ssaB 基因。所编码的产物是一种已知的 Spi2 的底物蛋白, 并且同巨噬细胞正常的内体运输相互配合。

第二套独立的突变体包括一个破坏 aro 基因的第一个突变。由于 aro 基因对于存在于沙门氏菌中而不存在于哺乳动物中的生物合成途径是必需的, 所以这一突变被称作“营养缺陷型突变”。所以, 突变体不能依赖于在受治病病人中发现的代谢产物来避免突变的影响。用于营养缺陷型突变的合适的基因包括 aroA, aroC, aroD 和 aroE。在优选的实施方案中, aroC 被破坏。

第二个突变破坏 clpP 或 sifA 基因中的任何一个。上面描述了 ClpP。Stein 等在分子微生物学, 1996; 20 (1) : 151-164 以及 Beuzon 等在欧洲分子生物学杂志, 2000; 19 (13): 3235-3249 中描述了 sifA 基因。SifA 基因的产物参与上皮细胞中含有糖蛋白的溶酶体结构的产生。

可以用任何已知的技术将这种突变引入到微生物中。优选地, 突变是缺失突变, 基因的破坏是核酸被切除引起的。另外, 可以通过插入核酸或者点突变来引入突变。将突变引入到特定区域的方法对于技术人员来说是显而易见的。

例如, 可以通过首先用 PCR 和高保真度聚合酶扩增靶基因以及侧翼 DNA 造成基因缺失。然后将扩增产物克隆到合适的克隆载体中。当用在反相 PCR 中时, 可以设计 PCR 引物来删除基因以产生初始构建体。PCR 引物应当含有 XbaI 位点以引入新的限制性位点并且因此提供了基因缺失的标记。然后将缺失构建体转入到自杀载体中再转入到沙门氏菌染色体中。构建体可以通过电穿孔或整合作用进入到所需菌株中, 并且重组体含有整合到在同源位点(部分二倍体)的染色体的质粒, 用质粒上携带的抗生素抗性标记筛选。自杀载体应当含有编码果聚糖蔗糖酶的 sacB 基因, 当有蔗糖存在时这对许多革兰氏阴性细菌是有毒性的。对蔗糖的选择性因此可以用来分离出导致质粒从染色体上丢失的第二个重组事件发生的菌落, 这第二个重组事件会导致两种结果, 野生型等位基因的再生或者缺失突变体的产生。然后通过菌落-PCR 鉴定含有缺失突变的菌落并且通过 DNA 印迹分析来鉴定缺失。

除了这两种突变, 沙门氏菌属微生物也可以含有异种抗原。这种减毒微生物因此可以作为施用抗其它细菌或病毒感染抗原的传送工具。适用于这种方法的抗原对于技术人员来说是清楚的并且抗原包括:

致病大肠杆菌(E. Coli)抗原, 即产肠毒素大肠杆菌(ETEC)

甲型, 乙型和丙型肝炎病毒抗原

莱姆氏病(Lyme disease)抗原

霍乱弧菌(Vibrio cholera) 抗原

螺杆菌属(Helicobacter) 抗原

单纯疱疹病毒(Herpes Simplex virus) 抗原

人类乳头状瘤病毒(Human papilloma virus) 抗原

这种系统也有可能提供用于治疗病人, 例如被肝炎病毒感染的病人的治疗蛋白, 肽或核酸。细胞因子是可以由突变微生物提供的治疗蛋白的合适的例子。用疫苗组合物提供异种抗原或治疗蛋白的方法对技术人员来说是显而易见的。

用本发明的微生物制备的疫苗可用于治疗病人和治疗兽感染。

双重突变提供了使微生物减毒的有效方法从而提供了一种安全的候选疫苗。

这种疫苗组合物甚至为无免疫应答患者提供了有效的保护, 并且重要的是降低了发生脾脓肿的危险。使用以单一突变为基础的疫苗已经被证实会导致脾

脓肿，因此本发明的组合物可以为患者带来巨大的好处。

为了配制疫苗组合物，突变体微生物可同任何合适的药学上可接受的助剂，稀释剂或赋性剂一起出现在组合物中。合适的配方对于普通技术人员来说是显而易见的。根据任何适合的给药方法可以开发出各种配方。优选的给药方式是通过口服或静脉途径并且疫苗是减毒活沙门氏菌属微生物。技术人员可以确定配方中所需和最佳的微生物数量。但是，一般来说，一个患者大约施用 $10^7 - 10^{10}$ CFUs 的微生物。优选的是每单位剂量大约 $10^8 - 10^9$ CFUs。