



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105307673 B

(45) 授权公告日 2021.04.02

(21) 申请号 201380029408.5
 (22) 申请日 2013.03.13
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 105307673 A
 (43) 申请公布日 2016.02.03
 (30) 优先权数据
 61/621,226 2012.04.06 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2014.12.04
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2013/031004 2013.03.13
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02013/151706 EN 2013.10.10
 (73) 专利权人 康奈尔大学
 地址 美国纽约州
 (72) 发明人 D·A·普特南 J·罗森塔尔
 C·黄 M·德利萨 S·门德斯
 (74) 专利代理机构 北京市万慧达律师事务所
 11111
 代理人 戈晓美 杨颖

(51) Int.Cl.
 A61K 39/00 (2006.01)
 A61K 39/385 (2006.01)
 C12P 21/04 (2006.01)
 C12N 5/02 (2006.01)
 (56) 对比文件
 HK 1005465 A,1994.11.30
 HK 1005465 A,1994.11.30
 CN 101827943 A,2010.09.08
 WO 2010019058 A1,2012.02.09
 B Arribas,等.A probiotic strain of Escherichia coli, Nissle 1917, given orally exerts local and systemic anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice.《British Journal of Pharmacology》.2009,(第157期),摘要.
 Bermúdez-Humarán,等.Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines.《MICROBIAL CELL FACTORIES》.2011,第10卷(第Suppl 1期),第1-10页.

审查员 梁欢

权利要求书3页 说明书30页 附图15页

(54) 发明名称

用于稳健的体液及细胞免疫应答的亚单位疫苗递送平台

(57) 摘要

本发明涉及一种转化了构建体的益生菌细胞,所述构建体适合在所述益生菌细胞表面过表达并展示融合蛋白,所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性蛋白或肽的至少一部分。本发明还涉及展示此融合蛋白的益生菌来源的囊泡以及利用所述益生菌细胞或囊泡诱导免疫应答的方法。

CN 105307673 B

1. 一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括转运蛋白,该转运蛋白偶联于一个或多个抗原性蛋白或肽,其中所述益生菌来源的囊泡来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)Nissle 1917,且其中所述转运蛋白是ClyA。

2. 根据权利要求1所述的益生菌来源的囊泡,其中所述抗原性蛋白或肽来源于病原性细菌、真菌、病毒、原生动物、癌细胞或其组合。

3. 根据权利要求1所述的益生菌来源的囊泡,其中所述抗原性蛋白或肽来源于链球菌属(*Streptococcus species*)、念珠菌属(*Candida species*)、布鲁氏菌属(*Brucella species*)、沙门氏菌属(*Salmonella species*)、志贺氏菌属(*Shigella species*)、假单胞菌属(*Pseudomonas species*)、博德特氏菌属(*Bordetella species*)、梭菌属(*Clostridium species*)、诺瓦克病毒、炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、衣原体属(*Chlamydia species*)、人乳头瘤病毒、流感病毒、副粘病毒属、疱疹病毒、巨细胞病毒、爱泼斯坦巴尔(Epstein-Barr)病毒、肝炎病毒、疟原虫属(*Plasmodium species*)、毛滴虫属(*Trichomonas species*)、或其组合。

4. 根据权利要求1所述的益生菌来源的囊泡,其中所述抗原性蛋白或肽来源于水痘-带状疱疹病毒。

5. 权利要求1所述的益生菌来源的囊泡在制备用于在哺乳动物体内引发免疫应答的药物中的用途,其中:

在能有效地引发所述免疫应答的条件下向所述哺乳动物施用所述药物。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述抗原性蛋白或肽来源于病原性细菌、真菌、病毒、原生动物、癌细胞或其组合。

7. 根据权利要求5所述的用途,其中所述抗原性蛋白或肽来源于链球菌属(*Streptococcus species*)、念珠菌属(*Candida species*)、布鲁氏菌属(*Brucella species*)、沙门氏菌属(*Salmonella species*)、志贺氏菌属(*Shigella species*)、假单胞菌属(*Pseudomonas species*)、博德特氏菌属(*Bordetella species*)、梭菌属(*Clostridium species*)、诺瓦克病毒、炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、衣原体属(*Chlamydia species*)、人乳头瘤病毒、流感病毒、副粘病毒属、疱疹病毒、巨细胞病毒、爱泼斯坦巴尔(Epstein-Barr)病毒、肝炎病毒、疟原虫属(*Plasmodium species*)、毛滴虫属(*Trichomonas species*)、或其组合。

8. 根据权利要求5所述的用途,其中所述抗原性蛋白或肽来源于水痘-带状疱疹病毒。

9. 一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性食物过敏蛋白或肽,其中所述益生菌来源的囊泡来自大肠杆菌Nissle 1917,且其中所述转运蛋白是ClyA。

10. 根据权利要求9所述的益生菌来源的囊泡,其中所述抗原性食物过敏蛋白或肽来源于奶,蛋,鱼,甲壳类水生生物,树坚果,花生,小麦,椰子,或大豆。

11. 根据权利要求10所述的益生菌来源的囊泡,其中所述食物过敏是针对花生的,并且所述抗原性食物过敏蛋白或肽是Arha2。

12. 权利要求9所述的益生菌来源的囊泡在制备用于使受试者对食物过敏免疫的药物

中的用途,所述免疫包括:

选择具有食物过敏的受试者;

提供所述药物;以及

在能有效地使所述受试者对所述食物过敏免疫的条件下,向所述被选受试者施用所述药物。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述食物过敏是针对奶,蛋,鱼,甲壳类水生生物,树坚果,花生,小麦,椰子,或大豆的。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述食物过敏是针对花生的,并且所述抗原性蛋白或肽是Arha2。

15. 一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性病毒蛋白或肽,其中所述益生菌来源的囊泡来自大肠杆菌 Nissle 1917,且其中所述转运蛋白是ClyA。

16. 根据权利要求15所述的益生菌来源的囊泡,其中所述抗原性病毒蛋白或肽来自人类免疫缺陷病毒(HIV),流感病毒A型,流感病毒B型,流感病毒C型,狂犬病病毒,水疱性口炎病毒,呼吸道合胞病毒,麻疹病毒,副流感病毒,腮腺炎病毒,黄热病毒,西尼罗病毒,登革热病毒,风疹病毒,辛德毕斯病毒,塞姆利基森林病毒,罗斯河病毒,轮状病毒,细小病毒,JC多瘤病毒,BK多瘤病毒,人乳头瘤病毒(HPV),腺病毒,乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒,甲型肝炎病毒,戊型肝炎病毒,人类疱疹病毒,痘苗病毒,猴痘病毒,牛痘病毒,人类T细胞白血病病毒,柯萨奇病毒,脊髓灰质炎病毒,鼻病毒,肠病毒,埃可病毒,埃博拉病毒,冠状病毒,天花病毒,汉坦病毒,腺相关病毒,星状病毒,亨德拉病毒,拉沙病毒,尼帕病毒,马尔堡病毒,或诺瓦克病毒。

17. 根据权利要求16所述的益生菌来源的囊泡,其中所述病毒是流感病毒,并且所述抗原性病毒蛋白或肽是H1N1血凝素。

18. 权利要求15所述的益生菌来源的囊泡在制备用于使受试者对病毒感染免疫的药物中的用途,所述免疫包括:

选择有发生病毒感染风险的受试者;

提供所述药物;以及

在能有效地使所述受试者对所述病毒感染免疫的条件下,向所述被选受试者施用所述药物。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述抗原性病毒蛋白或肽来自人类免疫缺陷病毒(HIV),流感病毒A型,流感病毒B型,流感病毒C型,狂犬病病毒,水疱性口炎病毒,呼吸道合胞病毒,麻疹病毒,副流感病毒,腮腺炎病毒,黄热病毒,西尼罗病毒,登革热病毒,风疹病毒,辛德毕斯病毒,塞姆利基森林病毒,罗斯河病毒,轮状病毒,细小病毒,JC多瘤病毒,BK多瘤病毒,人乳头瘤病毒(HPV),腺病毒,乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒,甲型肝炎病毒,戊型肝炎病毒,人类疱疹病毒,痘苗病毒,猴痘病毒,牛痘病毒,人类T细胞白血病病毒,柯萨奇病毒,脊髓灰质炎病毒,鼻病毒,肠病毒,埃可病毒,埃博拉病毒,冠状病毒,天花病毒,汉坦病毒,腺相关病毒,星状病毒,亨德拉病毒,拉沙病毒,尼帕病毒,马尔堡病毒,或诺瓦克病毒。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述病毒感染是流感病毒,并且所述抗原性蛋白或肽是H1N1血凝素。

21. 一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性细胞内细菌蛋白或肽,其中所述益生菌来源的囊泡来自大肠杆菌Nissle 1917,且其中所述转运蛋白是ClyA。

22. 根据权利要求21所述的益生菌来源的囊泡,其中所述抗原性细胞内细菌蛋白或肽来源于嗜衣原体属(Chlamydophila),埃立克体,立克次体,分枝杆菌,布鲁氏菌,弗朗西斯菌,军团杆菌,或李斯特菌。

23. 根据权利要求22所述的益生菌来源的囊泡,其中所述细菌来自副结核分枝杆菌,并且所述抗原性细胞内细菌蛋白是74F蛋白。

24. 权利要求21所述的益生菌来源的囊泡在制备用于使动物对细胞内细菌感染免疫的药物中的用途,所述免疫包括:

选择有发生胞内菌感染风险的动物;

提供所述药物;以及

在能有效地使所述动物对所述细胞内细菌感染免疫的条件下,向所述被选动物施用所述药物。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述动物是反刍动物。

26. 根据权利要求24所述的用途,其中所述细胞内细菌是嗜衣原体属(Chlamydophila),埃立克体,立克次体,分枝杆菌,布鲁氏菌,弗朗西斯菌,军团杆菌,或李斯特菌。

27. 根据权利要求26所述的用途,其中所述细胞内细菌是副结核分枝杆菌,并且所述抗原性蛋白或肽是副结核分枝杆菌74F蛋白。

用于稳健的体液及细胞免疫应答的亚单位疫苗递送平台

[0001] 本申请要求2012年4月6日提交的美国临时申请61/621,226的优先权。其全部内容通过引用并入本申请。

[0002] 本发明是在国家卫生研究院授予的拨款号EB005669-02的政府支持下完成的。美国政府具有本发明的某些权利。

发明领域

[0003] 本发明涉及一种用于稳健的体液及细胞免疫应答的亚单位疫苗递送平台。

背景技术

[0004] 在疫苗递送系统工程上的最近进展已经成功改进了抗原-免疫细胞界面,这极大地提高了针对重组亚单位疫苗抗原的获得性免疫应答(Azad et al., "Vaccine Delivery—Current Trends and Future," *Curr. Drug Deliv.* 3:137-146 (2006); Schijns and Degen, "Vaccine Immunopotentiators of the Future," *Clin. Pharmacol. Ther.* 82:750-755 (2007); Huang et al., "Recombinant Immunotherapeutics: Current State and Perspectives Regarding the Feasibility and Market," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:401-410 (2010); Swartz et al., "Engineering Approaches to Immunotherapy," *Sci. Transl. Med.* 4 (2012))。越来越多地,这种成功来自于在合成的或生物来源的纳米颗粒抗原运载体应用上的创新(Swartz et al., "Engineering Approaches to Immunotherapy," *Sci. Transl. Med.* 4 (2012); Singh et al., "Nanoparticles and Microparticles as Vaccine-Delivery Systems," *Expert Rev. Vaccines* 6:797-808 (2007); Metcalfe and Fahmy, "Targeted Nanotherapy for Induction of Therapeutic Immune Responses," *Trends Mol. Med.* 18:72-80 (2012))。纳米粒子运载体已成功地捕获了与病原体间的更全面的相互作用,这种作用超过了简单的抗原识别(Bryan, "Developing an HPV Vaccine to Prevent Cervical Cancer and Genital Warts," *Vaccine* 25:3001-3006 (2007)),并允许抗原更有效地且靶向地向关键免疫细胞群扩散(Sanders et al., "ISCOM-Based Vaccines: the Second Decade," *Immunol Cell Biol* 83:119-129 (2005))。通过将疫苗设计的焦点向生物分子和材料工程转变,已经有效地挑战了在获得性免疫接触及有效记忆性应答的增强方面的重要障碍。尽管有此成功,在解决与病原体来源相关的限制因素(如重组抗原整合的相容性挑战以及最小化疾病传播的风险)时(Huang et al., "Recombinant Immunotherapeutics: Current State and Perspectives Regarding the Feasibility and Market," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:401-410 (2010); Yoo et al., "Bio-Inspired, Bioengineered and Biomimetic Drug Delivery Carriers," *Nat. Rev. Drug Discov.* 10:521-535 (2011))已清楚认识到,目前的亚单位疫苗技术仍明显不能生成保护性的、病原体特异的 T_H1 偏向性细胞免疫(Bevan, "Understand Memory, Design Better Vaccines," *Nat. Immunol.* 12:463-465 (2011))。同样地,涉及新型的、通常极其昂贵的疫苗技术在全球

健康领域应用方面的挑战也仍有大部分尚待解决。

[0005] 本发明旨在克服本领域的这些缺点和其他缺点。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明的第一个方面涉及一种转化了构建体的益生菌细胞,所述构建体适合在所述益生菌细胞表面过表达并展示融合蛋白,所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性蛋白或肽的至少一部分。

[0008] 本发明还涉及一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性蛋白或肽的至少一部分。

[0009] 本发明的另一方面涉及一种转化了构建体的益生菌细胞,所述构建体适合在所述益生菌细胞表面过表达并展示融合蛋白,所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性食物过敏蛋白或肽的至少一部分。

[0010] 本发明的进一步方面涉及一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性食物过敏蛋白或肽的至少一部分。

[0011] 本发明还涉及一种转化了构建体的益生菌细胞,所述构建体适合在所述益生菌细胞表面过表达并展示融合蛋白,所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性病毒蛋白或肽的至少一部分。

[0012] 本发明的另一方面还涉及一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性病毒蛋白或肽的至少一部分。

[0013] 本发明的进一步方面涉及一种转化了构建体的益生菌细胞,所述构建体适合在所述益生菌细胞表面过表达并展示融合蛋白,所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性细胞内细菌蛋白或肽的至少一部分。

[0014] 本发明的最后一个方面涉及一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性细胞内细菌蛋白或肽的至少一部分。

[0015] 为了解决亚单位疫苗的限制条件及其代表的广泛的未满足的临床需求,考虑了改造生物性来源的病原体样颗粒,所述颗粒来源于革兰氏阴性细菌的外膜。直接产自病原体特别是脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)的、基于外膜囊泡(OMV)的疫苗已经成功预防了疾病(Granoff, "Review of Meningococcal Group B Vaccines," *Clin. Infect. Dis.* 50:S54-S65 (2010),其全部内容通过引用并入本申请。)。此外,最近文献表明OMV 在天然的细菌毒力上具有先天的作用,并且具有能被广泛应用的通用佐剂功能。具体地,有强有力的证据表明,OMV虽然是非传染性的,但保留了活细菌的很多能力,通过大量表面展示的和与可溶因子的胞内病原体结合的分子模式(PAMP)来全面调动先天免疫系统和适应性免疫系统(Ellis and Kuehn, "Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74:81-94 (2010); Kulp and Kuehn, "Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles," *Annu. Rev. Microbiol.* 64:163-184 (2010); Kuehn and Kesty, "Bacterial Outer Membrane Vesicles and the Host-Pathogen Interaction," *Genes*

Dev.19:2645-2655 (2005), 其每个的全部内容通过引用并入本申请)。这些特征已经启发了最近在多株脑膜炎球菌 OMV疫苗 (Zollinger et al., "Design and Evaluation in Mice of a Broadly Protective Meningococcal Group B Native Outer membrane Vesicle Vaccine," *Vaccine* 28:5057-5067 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请) 以及甚至病原体抗原的交叉递呈上的工作 (Muralinath et al., "Immunization with Salmonella Enterica Serovar Typhimurium-Derived Outer Membrane Vesicles Delivering the Pneumococcal Protein PspA Confers Protection Against Challenge with Streptococcus Pneumonia," *Infect. Immun.* 79:887-894 (2011), 其全部内容通过引用并入本申请), 并表明这样的天然佐助有能力增强通过标准亚单位疫苗尚达不到的物种特异性免疫应答。结合它们在可放大的细菌培养中具有成本效益的生产, OMV是有前景的疫苗剂型 (Granoff, "Review of Meningococcal Group B Vaccines," *Clin. Infect. Dis.* 50: S54-S65 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请)。然而, 迄今为止, 具有原始来源菌株之外应用的工程化OMV疫苗是有限的 (Ellis and Kuehn, "Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74:81-94 (2010); Muralinath et al., "Immunization with Salmonella Enterica Serovar Typhimurium-Derived Outer Membrane Vesicles Delivering the Pneumococcal Protein PspA Confers Protection Against Challenge with Streptococcus Pneumonia," *Infect. Immun.* 79:887-894 (2011), 其每个全部内容通过引用并入本申请), 且焦点几乎全部放在“初始OMV”方法上, 所述“初始OMV”方法仅探索将病原体自身的OMV作为仅针对该病原体本身的疫苗的应用性。

[0016] 鉴于OMV尚未开发的潜能与亚单位疫苗的关键限制因素非常一致, 因此研究了能否由来源于革兰氏阴性益生菌的OMV生产一种通用的并有高免疫刺激性的自体佐剂的重组型疫苗递送平台。在人类消化道定植期间, 某些益生菌通过调节长期存在的肠相关淋巴样组织的细胞因子活性来抑制局部免疫 (Trebichavsky et al., "Modulation of Natural Immunity in the Gut by Escherichia Coli Strain Nissle 1917," *Nutr. Rev.* 68:459-464 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请)。鉴于现代疫苗最一致的缺陷之一是刺激细胞免疫的能力, 因此寻找了细菌, 所述细菌的免疫调节能力的特征在于能与对 T_H1 偏向性免疫至关重要的细胞类型进行有效的相互作用。具体地, 焦点放在了益生菌类的大肠杆菌 Nissle 1917 (EcN) 株上, 它部分通过以菌株特异的PAMP依赖的机制来特异性靶向用于破坏的T淋巴细胞, 从而实现此现象 (Sturm et al., "Escherichia Coli Nissle 1917 Distinctively Modulates T-Cell Cycling and Expansion Via Toll-Like Receptor 2 Signaling," *Infect. Immunol.* 73:1452-1465 (2005); Guzy et al., "The Probiotic Escherichia Coli Strain Nissle 1917 Induces Gammadelta T Cell Apoptosis Via Caspase- and FasL-Dependent Pathways," *Int. Immun.* 20:829-840 (2008), 其每个全部内容通过引用并入本申请)。这样有效的抑制能力不会使EcN或任何益生菌成为疫苗应用的明显的候选者。然而, 与高免疫抑制性细菌本身形成强烈对比的是, 来源于这样的革兰氏阴性益生菌的OMV缺乏分泌性主导的免疫抑制能力, 同时又保持了表面展示的免疫刺激性的PAMP, 并且在EcN情况下, OMV保持了积极结合并刺激T细胞Toll样受体 (TLRs) 的罕见能力 (Sturm et al., "Escherichia Coli Nissle 1917 Distinctively Modulates T-Cell

Cycling and Expansion Via Toll-Like Receptor 2 Signaling,” *Infect. Immunol.* 73: 1452-1465 (2005), 其全部内容通过引用并入本申请)。因此, 据推测, 包含具有独特免疫刺激性的EcN外膜的OMV能有效地利用益生菌株在调动并激活关键的先天性及适应性免疫细胞方面的独特能力 (Mohamadzadeh et al., “Dendritic Cell Targeting of Bacillus Anthracis Protective Antigen Expressed by Lactobacillus Acidophilus Protects Mice From Lethal Challenge,” *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106:4331-4336 (2009), 其全部内容通过引用并入本申请), 并同时增强天然的佐剂化机制, 通过此机制OMV与免疫细胞相互作用并有效地模拟细胞内病原体。如果此推测能够被证实, 则产生的病原体样颗粒将会有潜力稳健地将载体递呈的重组型外源抗原与体液及细胞免疫应答偶联。

[0017] 本发明显示, 用被改造成能表面展示外源模型抗原的OMV免疫小鼠后, 诱导了稳健的抗原特异性的体液及细胞免疫。更重要地, 通过抗体种类选择发生的体液免疫以及优先发生的特异性CD4/CD8阳性T细胞的细胞因子表达表型都强烈地表明, 诱导出抗原特异性的Th1偏向性免疫。针对OMV的免疫应答的体内及体外机制性分析揭示了针对菌株的特异性的免疫反应, 所述菌株利用它们的PAMP—TLR相互作用的独特组合, 所述反应由刺激先天性及获得性免疫细胞介导。这些结果表明对益生菌免疫活性进行了有效的工程化分离, 该免疫活性具有先前未被重视的能力: 其可作为可放大的 (Granoff, “Review of Meningococcal Group B Vaccines,” *Clin. Infect. Dis.* 50:S54-S65 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请) 并可广泛应用的疫苗递送运载体, 用于挑战那些需要强烈的、靶向的Th1介导免疫的病原体靶点。

[0018] 附图概述

[0019] 图1A-1E显示了EcN nlpI突变株产生用于重组型亚单位疫苗应用的功能性 OMV。图1A显示了通过显著敲除nlpI以在EcN中实现过量产生OMV, 所述敲除如此处大肠杆菌基因组基因图谱(71.0-71.1min)所示。图1B显示了FE-SEM显微照片(左图)并展示了尺寸和形状大部分一致的EcNOMV, 而透射电子显微(TEM)照片(右图)强调了特征性的双脂膜。比例尺=200nm。图1C显示了由转化了包含ClyA-GFP的质粒的EcN培养物获得的、超速离心纯化了的OMV的荧光显微照片。图1D显示了OMV悬液的利用抗GFP抗体得到的蛋白免疫印迹, 所述悬液来自转化了包含ClyA-GFP的质粒的EcN和EcJ培养物。图1E显示了用KDO比色法试验测定的、在荧光标准化了的100μL剂量的ClyA-GFP EcN及EcJ OMV中的膜结合脂多糖(LPS) (均数+标准差)。通过相对和绝对定量同位素标记(iTRAQ)蛋白质谱针对生物相关性定量测定蛋白水平。Omp=外膜蛋白, OMLP=外膜脂蛋白。

[0020] 图2A-2H显示了EcN OMV平台在小鼠模型中引起稳健的体液和细胞免疫应答。图2A-2H显示了来自BALB/c小鼠的终端数据点, 所述小鼠已接种并加强免疫过一次抗原基准化(或蛋白基准化, 视情况而定)剂量的(图2A-2C, 图2E-2H)纯化GFP、ClyA、ClyA+GFP、ClyA-GFP(+)及(-)EcJ OMV、ClyA-GFP(+)及(-)EcN OMV、ClyA-GFP+Alum、以及PBS(n=5)或(图2D)PBS、纯化的H1N1流感血凝素(HA)、H1N1 HA+Alum、以及ClyA-H1N1 HA(+)EcN OMV(n=5)。(图2A-2B)类别特异性的抗GFP抗体血清滴度。图2C显示了IgG1对IgG2的血清滴度比率。图2D显示了血凝素抑制试验的血清滴度。图2E显示了经CFSE染色测定的GFP再刺激的脾来源T细胞的增殖指数, 所述T细胞收获自终端的受试者。图2F-2H显示了培养的GFP再刺激的脾来源T细胞的细胞因子分泌水平, 所述T细胞收获自终端受试者。图2A-2C和图2E-2H

中的GFP*数据代表ClyA、ClyA+GFP、ClyA-GFP(-) ECJ及EcN OMV、以及PBS对照受试者。在图2A-2H中, Alum=Alhydrogel®.**P<0.001,***P<0.05 由杜凯氏诚实显著差异事后比较检验法(Tukey's HSD post hoc test)测定。所有值以均数+标准差(mean+s.d.)给出。

[0021] 图3A-3H显示了EcN OMV有效刺激稳健的先天性及获得性免疫。图3A-3D显示了来自BALB/c小鼠耳朵的组织切片,所述小鼠耳朵经皮下注射了等剂量的:(图3A)PBS,(图3B)EcJ OMV,(图3C)EcN OMV,(图3D)LpxM EcN OMV。于30小时后处死小鼠。相对于图3A,在图3B中能看见增强的组织重构、血管肿胀、以及白细胞募集(如箭头所示),这些在图3C中显著升高,并在图3D中有所减弱但并未移除。图3E显示与ClyA-GFP(+) OMV孵育12小时后,GFP阳性的原代小鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMM)百分比。图3F显示与OMV孵育12小时后,表达细胞因子IL-12、IL-4和IL-10的BMM百分比。图3G显示了与小鼠骨髓来源的树突细胞共培养之后,原代小鼠脾来源B细胞的增殖,所述骨髓来源的树突细胞已与等量的 EcJ及EcN OMV预孵育过。RPMI=阴性对照, α CD3/ α CD26=阳性对照。图3H显示了与OMV孵育后,原代小鼠骨髓来源的B细胞在有或没有额外的T细胞辅助因子的条件下OMV的增殖。RPMI*数据代表额外的 α IgM、 α CD40和IL-4对照。LPS**数据代表额外的 α IgM/IL-4和 α CD40/IL-4对照。在图3E-3H中,*P<0.001,**P<0.05,***P<0.005由杜凯氏诚实显著差异事后比较检验法(Tukey's HSD post hoc test)测定。所有值以均数+标准差(mean+s.d.)给出。

[0022] 图4A-4B显示了通过形成OMV将EcN免疫刺激性因子从免疫抑制性因子中分离出来,这诱发出强烈的免疫应答。图4A显示了大肠杆菌Nissle 1917(EcN)的天然免疫抑制功能,主要集中在对 α β T-淋巴细胞的直接效应器的作用上。菌株特异性糖基化的膜相的细菌脂多糖(LPS)及细菌脂蛋白(BLPs),以及分泌的BLPs和其他混合型分泌因子(ASFs),靶向作用于T细胞并通过Toll样受体(TLR)TLR-2和TLR-4转导调节性信号(Granoff, "Review of Meningococcal Group B Vaccines," Clin. Infect. Dis. 50:S54-S65 (2010); Trebichavsky et al., "Modulation of Natural Immunity in the Gut by Escherichia Coli Strain Nissle 1917," Nutr. Rev. 68:459-464 (2010); Grabig et al., "Escherichia Coli Strain Nissle 1917 Ameliorates Experimental Colitis Via Toll-Like Receptor 2-and Toll-Like Receptor 4-Dependent Pathways," Infect. Immun. 74:4075-4082 (2006), 其每个全部内容通过引用并入本申请)。这些信号引起多种免疫抑制效应,所述效应直接靶向T细胞本身(例如降低的进入细胞周期的G2或M期的倾向)(Trebichavsky et al., "Modulation of Natural Immunity in the Gut by Escherichia Coli Strain Nissle 1917," Nutr. Rev. 68:459-464 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请)以及通过减少细胞因子(IL-2和IFN- γ)和共刺激分子(CD2和CD28)分泌,减弱免疫刺激性及炎性活动(Trebichavsky et al., "Modulation of Natural Immunity in the Gut by Escherichia Coli Strain Nissle 1917," Nutr. Rev. 68:459-464 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请)。通过增加IL-10分泌也会上调直接免疫抑制功能(Trebichavsky et al., "Modulation of Natural Immunity in the Gut by Escherichia Coli Strain Nissle 1917," Nutr. Rev. 68:459-464 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请)。图4B显示,益生菌正常的免疫抑制功能被强大的佐剂效应所替代,这是通过从EcN的分泌性免疫抑制能力中分离出EcN膜的靶向性及免疫刺激性潜能(Trebichavsky et al., "Modulation of Natural Immunity in the Gut by Escherichia Coli Strain Nissle 1917,"

Nutr.Rev.68:459-464 (2010); Grabig et al., "Escherichia Coli Strain Nissle 1917 Ameliorates Experimental Colitis Via Toll-Like Receptor 2-and Toll-Like Receptor 4-Dependent Pathways," Infect.Immun.74:4075-4082 (2006), 其每个全部内容通过引用并入。), 并将其转变成一种生物纳米颗粒递送装置, 用于在细菌OMV中已经存在的、天然免疫刺激性的环境 (Grabig et al., "Escherichia Coli Strain Nissle 1917 Ameliorates Experimental Colitis Via Toll-Like Receptor 2-and Toll-Like Receptor 4-Dependent Pathways," Infect.Immun.74:4075-4082 (2006), 其全部内容通过引用并入本申请) 而实现的。具体地, 这些EcNOMV利用TLR-2和TLR-4如之前所述那样直接靶向T细胞 (顶图) 以及补充性靶向抗原递呈细胞 (APCs) 例如巨噬细胞 (底图)。除了TLR介导的吞噬作用, 巨噬细胞膜还包含杀菌/渗透性增加蛋白 (BPI) 和 LPS结合蛋白, 以进一步增强膜相鞭毛蛋白、BPI、以及细菌OMV所天然富含的LPS 的吞噬作用诱导的亲和力 (Granoff, "Review of Meningococcal Group B Vaccines," Clin. Infect.Dis.50:S54-S65 (2010); Trebichavsky et al., "Modulation of Natural Immunity in the Gut by Escherichia Coli Strain Nissle 1917," Nutr.Rev.68:459-464 (2010); Grabig et al., "Escherichia Coli Strain Nissle 1917 Ameliorates Experimental Colitis Via Toll-Like Receptor 2-and Toll-Like Receptor 4-Dependent Pathways," Infect.Immun. 74:4075-4082 (2006); Zidek et al., "Decisive Role Lipopolysaccharide in Activating Nitric Oxide and Cytokine Production by the Probiotic Escherichia Coli Strain Nissle 1917," Folia Microbiol.55:181-189 (2010), 其每个全部通过引用并入本申请)。这些相互作用不仅通过结合事件直接刺激这些免疫细胞, 而且促进多种被胞内感知的免疫刺激性因子 (例如TLR-4和TRIF激活的LPS, 不耐热肠毒素 (LT), 和外膜脂类) 的递送 (Zidek et al., "Decisive Role Lipopolysaccharide in Activating Nitric Oxide and Cytokine Production by the Probiotic Escherichia Coli Strain Nissle 1917," Folia Microbiol. 55:181-189 (2010); Blasius and Beutler, "Intracellular Toll-Like Receptors," Immunity 32:305-315 (2010), 其每个全部内容通过引用并入本申请), 以及TLR-7和TLR-9激活的"与存活能力相关的病原体相关分子模式 (vita-PAMPs)" (欺骗了免疫细胞使之认为其内部存在活的病原体的分子) 如双链DNA、胞质mRNA、以及细菌蛋白酶 (Blasius and Beutler, "Intracellular Toll-Like Receptors," Immunity32:305-315 (2010); Sander et al., "Detection of Prokaryotic mRNA Signifies Microbial Viability and Promotes Immunity," Nature 474:385-389 (2011), 其每个全部内容通过引用并入本申请)。综上所述, 胞外及胞内免疫刺激性因子引起了升高的炎性的和一般的免疫激活的状态, 所述状态通过IL-6、IL-12、IFN- γ 和TNF- α 分泌的升高, 并结合降低的IL-4分泌, 传播至其他免疫细胞 (Granoff, "Review of Meningococcal Group B Vaccines," Clin.Infect.Dis.50:S54-S65 (2010); Gizy et al., "The Probiotic Escherichia Coli Strain Nissle 1917 Induces Gammadelta T Cell Apoptosis Via Caspase-and FasL-Dependent Pathways," Int.Immun.20:829-840 (2008); Bickert et al., "Probiotic Escherichia Coli Nissle 1917 Suppresses Allergen-Induced Th2 Responses in the Airways," Int.Arch. Allergy Immunol.149:219-230 (2009), 其每个全部内容通过引用并入本申请)。

[0023] 图5显示了从大肠杆菌生成的被改造的、定制的抗原递呈的OMV。用编码合适的ClyA-抗原融合体(在本例中为ClyA-GFP)的质粒转化大肠杆菌,所述大肠杆菌已经过基因改造(例如通过本申请使用的nlpI突变)以过量生产OMV。一旦被转录,ClyA将所述嵌合体共定位于大肠杆菌外膜。由于OMV在所述细菌上持续出芽,并且所述质粒被设计为受高拷贝数启动子控制,通过诱导超囊泡化而生成的平均OMV将会有大量的重组型ClyA-抗原融合体包含于其膜中。

[0024] 图6A-6D显示了对EcN及EcJ OMV疫苗剂型的进一步比较分析。图6A显示了所述两种菌株的OMV的动态光散射水动力z-平均颗粒尺寸。在PBS中评价了剂型。图6B显示了通过BCA测试法检测GFP荧光标准化了的EcJ及EcN OMV的ClyA-GFP(+)疫苗剂量OMV以测定总蛋白含量,并且通过测定总荧光度将ClyA-GFP(+)疫苗剂量基准化作为抗原含量的函数,结果表明OMV的蛋白丰度以菌株依赖的方式变化。图6C通过非特异性蛋白凝胶染色显示的EcJ及EcN OMV的全蛋白谱。标注了大肠杆菌膜片段特征性的外膜蛋白。梯带以kDa为单位。图6D显示了在PBS中测定的OMVzeta电位。在图6A-6D中,井号#表示没有显著差异($P>0.05$),* $P<0.001$ 由双尾学生t检验测定。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0025] 图7显示了用于免疫鼠类模型的接种方案示意图。在初次疫苗接种时,接种了n=10只小鼠;在第t=4周时,处死了n=5只小鼠用于脾切除术,剩余n=5只小鼠用以继续实验至第t=8周结束。t=0wk称为“初次免疫前”期,0<t<4wk称为“初次免疫后”期,t=4wk称为“免疫加强前”期,以及4<t \leq 8wk称为“免疫加强后”期。

[0026] 图8A-8B显示了由EcN及EcJ OMV疫苗引起的体液免疫的渐进发生。在以下四个时间点测定了本实验小鼠下颌血来源的血清样品中GFP-特异性的(图8A)IgG和(图8B)IgM:临初始接种注射前(t=0wk),初始接种之后(t=2wk),临注射加强型接种剂量前(t=4wk),以及在本实验终点(t=8wk)。用ELISA测定了滴度。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0027] 图9A-9B显示了来自被初始接种并加强免疫了的小鼠的抗GFP IgG1及IgG2的血清滴度。测定了来自实验终点(t=8wk)的所有小鼠(n=5)的血清样品的抗GFP(图9A)IgG1及(图9B)IgG2的滴度。用ELISA测定了滴度。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0028] 图10A-10D显示了EcN和EcJ OMV疫苗对来源于脾的、再刺激的小鼠T细胞中细胞因子表达的发散性诱导,这表明EcN OMV具有卓越的细胞免疫潜能。在“免疫加强前”期(t=4wk;图10A和图10C)以及实验“免疫加强后”期结束时(t=8wk,图10B和图10D),收获小鼠脾脏(n=5),将T淋巴细胞从所述脾脏中分离、再刺激、针对IFN- γ (图10A-10B)或IL-10(图10C-10D)表达进行标记、并用FACS分析。将PMA/Ionomycin作为阳性刺激增强的对照使用。* $P<0.001$ 由杜凯氏诚实显著差异事后比较检验法(Tukey's HSD post hoc test)测定。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0029] 图11显示了已接种小鼠体内的炎症在Alhydrogel[®], EcJ OMV, 和EcN OMV三种佐剂来源之间是相似的。将总炎症水平(n=5)分级为0-3,0相当于没有明显炎症,1相当于不引起可见刺激的轻微发红,2相当于不引起可见刺激的中等发红,以及3相当于中等至严重的发红,并导致大量的干燥和结疤以及明显的刺激。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0030] 图12A-12D显示了LpxM突变的EcNOMV的生成没有明显改变OMV。图12A 显示了lpxM

突变位点在大肠杆菌基因组上的位置,所述位置位于41.75min。图12B 显示了两种OMV的动态光散射水动力z-平均颗粒尺寸。在PBS中评价剂型。图12C 显示了用BCA测试法检测的EcJ及EcN OMV的GFP荧光标准化的、ClyA-GFP(+) 疫苗剂量OMV的总蛋白含量。图12D显示了使用抗GFP抗体对来自EcN培养物的 OMV悬液进行的蛋白免疫印迹试验,所述EcN培养物转化了包含ClyA-GFP的质粒。改变了背景色以提高对比度。在图12B-12C中,星号*表示没有统计学显著性差异。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0031] 图13A-13B显示了LpxM突变使得促炎性OMV的应答在数量上减少但并未完全消除。在图13A中,于BALB/c小鼠的每个耳朵皮下注射了10 μ L OMV溶液。30小时后,处死了所述小鼠,并立即切除了它们的耳朵并且置于10%缓冲的福尔马林中。在1-5级中定级了炎症病理,5代表由于炎性应答产生的最高程度的正常组织结构消失。每个数据点代表取自一个耳朵切片的代表性数据(n=6)。在图13B中,J774.1 鼠类巨噬细胞培养物与蛋白含量标准化的OMV剂量孵育了12小时,随后收集了该培养液并通过ELISA分析了IL-6含量。*P<0.005,**P<0.0001由杜凯氏诚实显著差异事后比较检验法(Tukey's HSD post hoc test)测定。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0032] 图14A-14B显示了EcN OMV刺激巨噬细胞内更强的吞噬反应。培养自BALB/c 小鼠骨髓的原代巨噬细胞与可变数量的ClyA-GFP(+) EcNOMV或EcJ OMV孵育,并通过FACS测定了荧光水平。图14A显示了FACS分析;图14B显示了概括性图表。给出的质量代表加入的OMV的数量,所述OMV的数量由总蛋白含量确定。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0033] 图15显示了EcN及EcJ OMV在孵育后诱导发散性的巨噬细胞因子表达。培养自BALB/c小鼠骨髓的原代巨噬细胞与可变数量的ClyA-GFP(+) EcNOMV或EcJ OMV孵育,针对细胞因子表达进行了标记,并通过FACS进行分析。给出的质量代表加入的OMV的数量,所述OMV的数量由总蛋白含量确定。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0034] 图16显示了当用EcN OMV刺激经OMV初次免疫的树突细胞激活的初始T细胞时,这些初始T细胞的增殖增加。原代骨髓来源的BALB/c小鼠树突细胞与不同数量的EcN OMV或EcJ OMV孵育,然后与原代脾来源的BALB/c小鼠T细胞共培养。对T细胞进行CFSE染色,并用FACS进行了分析。给出的质量代表加入的OMV的数量,所述OMV的数量由总蛋白含量确定。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0035] 图17显示了EcN或EcJ OMV通过不同的机制激活B细胞。原代骨髓来源的 BALB/c小鼠B细胞,在存在或不存在T细胞来源的增殖诱导辅助因子IL-4和抗CD40 的情况下,与可变数量的EcN或EcJ OMV孵育。*P<0.001,**P<0.01由杜凯氏诚实显著差异事后比较检验法(Tukey's HSD post hoc test)确定。给出的质量代表加入的 OMV的数量,所述OMV的数量由总蛋白含量确定。所有值以均数 \pm 标准差(mean \pm s.d.)给出。

[0036] 图18A-F显示了EcN OMV运载体引起强烈的抗MAP 74F的体液和细胞免疫。终端数据点来自BALB/c小鼠,所述BALB/c小鼠已被抗原基准化的(或蛋白基准化的,视情况而定)EcN OMV和对照(n=5)初次接种并加强免疫过一次。图18A-18B 显示了类别特异性的抗74F抗体的血清滴度。图18C显示了IgG1对IgG2的血清滴度比。图18D显示了通过CFSE染色测定的、抗原再刺激的脾来源T细胞的增殖指数,所述T细胞收获自终端受试者。图18E-18F显示了培养的抗原再刺激的脾来源T细胞的细胞因子分泌水平,所述T细胞收获自终端受试者。

Alum = Alhydrogel[®]。*P<0.005, **P<0.05由杜凯氏诚实显著差异事后比较检验法

(Tukey's HSD post hoc test)测定。所有值以均数+标准差(mean+s.d.)给出。

[0037] 图19A-F显示了EcN OMV运载体引起强烈的抗Arah2的体液及细胞免疫。终端数据点来自BALB/c小鼠,所述BALB/c小鼠已被抗原基准化的(或蛋白基准化的,视情况而定)EcN OMV和对照(n=5)初次接种并加强过一次。图19A-19B显示了类别特异性的抗Arah2抗体的血清滴度。图19C显示了IgG1对IgG2的血清滴度比。图19D显示自终端受试者收集的脾来源T细胞在抗原再刺激后通过CFSE染色测定的增殖指数。图19E-19F显示了自终端受试者收集的脾来源T细胞在培养和抗原再刺激后的细胞因子分泌水平。Alum = Alhydrogel®.*P<0.005,**P<0.05由杜凯氏诚实显著差异事后比较检验法(Tukey's HSD post hoc test)测定。所有值以均数+标准差(mean +s.d.)给出。

[0038] 发明详述

[0039] 本发明的第一个方面涉及一种转化了构建体的益生菌细胞,所述构建体适合在所述益生菌细胞表面过量表达并展示融合蛋白,所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性蛋白或肽的至少一部分。

[0040] 本文所使用的“益生菌”是指任何在宿主动物上发挥有利作用如提升健康或对抵抗疾病的生物,尤其是微生物。益生生物能显示出一种或多种以下非限制性特征:对宿主是非病原性的或无毒的;以活细胞、最好是大批量活细胞的形式存在;能够在肠道环境中存活、代谢、并且持久存在(例如,抵抗低pH和胃肠酸和胃肠以及分泌物);粘附于上皮细胞,尤其是胃肠道上皮细胞;对病原菌的杀菌或抑菌活性或作用;抗癌活性;免疫调节活性,尤其是免疫增强;对内源性菌丛的调节活性;增强的尿生殖道健康;在伤口处或伤口周围的杀菌活性以及增强伤口愈合;降低腹泻;降低过敏反应;降低新生儿坏死性小肠结肠炎;降低炎性肠道疾病;以及降低肠渗透性。

[0041] 本申请所使用的“转运蛋白”是指正常存在于益生菌细胞上的或益生菌来源的囊泡上的蛋白,所述蛋白与抗原性蛋白或肽的融合允许在所述细胞或所述囊泡表面展示所述抗原性蛋白或肽。

[0042] 本发明所述融合蛋白可用如本申请描述的,或使用本领域任何其他已知的标准技术产生。例如,可通过翻译多核苷酸序列的框内融合(即杂合基因)来制备融合多肽。将编码所述融合多肽的所述杂合基因插入用来转化或转染宿主细胞的表达载体。或者,将编码转运蛋白的多核苷酸序列插入表达载体,所述表达载体中含有编码第二多肽的多核苷酸。所述融合蛋白的所述第二多肽或蛋白能融合于所述转运蛋白的N端,或优选的C端。

[0043] 所述转运蛋白与抗原性蛋白或肽之间的融合可以是这样的:所述转运蛋白的氨基酸序列与所述第二蛋白的氨基酸序列直接邻接。或者,所述转运蛋白部分可通过接头序列的方式与所述第二蛋白或多肽偶联,如本申请所述的柔性5-残基Gly接头或Huang等在U.S.专利号5,516,637中公开的来自免疫球蛋白的柔性接头,所述专利全部内容通过引用并入本申请。所述接头也可包含蛋白酶特异性的酶切位点,使得转运蛋白可以可控地释放第二蛋白。蛋白酶位点的实例包括针对Xa因子、胰激酶、胶原蛋白酶、Igase(来自淋病奈瑟氏菌)、凝血酶、以及TEV(烟草蚀纹病毒)蛋白酶酶切特异性的蛋白酶位点。

[0044] 一旦构建成融合蛋白,将编码所述蛋白的核酸构建体插入对所述分子而言是异源的表达系统。将所述异源核酸分子插入表达系统或载体,其相对于启动子和任何其它5'调节分子是正向的(5'—3')方向,并且位于正确的阅读框。可以使用本领域公知的标准克隆

方法来进行核酸构建体的制备,所述方法如Sambrook et al.,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,Cold Springs Laboratory Press,Cold Springs Harbor,N.Y.(1989),全部内容通过引用并入本申请。Cohen和Boyer的U.S.专利号4,237,224也描述了使用限制性酶切并用DNA连接酶连接产生重组质粒形式的表达系统,所述专利的全部内容通过引用并入本申请。

[0045] 合适的表达载体包括那些包含来源于与宿主细胞兼容的物种的复制子和控制序列的表达载体。例如,如果将大肠杆菌用作宿主细胞,则可以使用如pUC19, pUC18或pBR322等质粒。

[0046] 不同的基因信号及加工事件控制基因表达的许多层次(例如DNA转录和信使RNA(“mRNA”)翻译)以及随后在细胞或囊泡表面展示的融合蛋白的量。DNA的转录依赖于启动子的存在,所述启动子是指导RNA聚合酶结合的DNA序列,从而促进mRNA的合成。启动子在“强度”(即促进转录的能力)方面各异。就表达克隆基因而言,最好使用强启动子以达到高水平的转录,以及由此达到高水平的表达和表面展示。根据所使用的宿主系统,可以使用多种合适的启动子中的任意一种。例如,当使用大肠杆菌、其噬菌体或质粒时,可用例如以下的启动子来指导邻近DNA区段的高水平转录:T7噬菌体启动子、lac启动子、trp启动子、recA启动子、核糖体RNA启动子、大肠杆菌噬菌体λ的P_R及P_L启动子,以及其它启动子,包括但不限于lacUV5、ompF、bla、lpp等。此外,可使用由重组DNA或其它合成DNA技术制备的杂合trp-lacUV5(tac)启动子或其它大肠杆菌启动子以供插入基因的转录。

[0047] 原核生物中的mRNA翻译依赖于合适的原核生物信号的存在,所述信号不同于真核生物的信号。原核生物中mRNA的有效翻译需要mRNA上称为Shine-Dalgarno(SD)序列的核糖体结合位点。这个序列是短mRNA核苷酸序列,位于起始密码子(通常为AUG)之前,起始密码子编码蛋白氨基末端的蛋氨酸。SD序列与16S rRNA(核糖体RNA)的3'端互补,并可能通过与rRNA形成双链体以供核糖体正确定位,以促进mRNA结合至核糖体。有关最大化基因表达的综述,参见Roberts and Lauer, *Methods in Enzymology*,68:473(1979),其全部内容通过引用并入本申请。

[0048] 在用包含编码融合蛋白的核苷酸构建体的表达载体转化宿主细胞后,在细胞表面以及外膜囊泡表面表达并展示所述融合蛋白。

[0049] 在本发明的一个实施方式中,在多种细胞或细胞囊泡表面展示多种蛋白或多肽。所述细胞或细胞囊泡表面展示的多种蛋白或多肽是融合蛋白,其中各融合蛋白具有不同的第二蛋白。所述多种融合蛋白形成适于在细胞或细胞囊泡表面展示的蛋白文库或肽文库。

[0050] 在一个实施方式中,将所述益生菌细胞突变以高表达包含所述融合蛋白的囊泡。

[0051] 如本申请使用的“囊泡”是指外膜囊泡,也称为泡(blebs),其形成于或来源于革兰氏阴性细菌的外膜的片段的囊泡,其在生长过程中自然脱落。

[0052] 与提高囊泡生成相关的突变是本领域已知的(McBroom and Kuehn,“Release of Outer Membrane Vesicles by Gram-Negative Bacteria is a Novel Envelope Stress Response,”*Mol.Microbiol.*63:545-558(2007),其全部内容通过引用并入本申请)。例如,已证明nlpl、degS、degP、tolB、pal、rseA、tolA、ponB、tatC、ompR、wzxE、ompC、yieM、pnp和wag基因上的破坏都能导致囊泡的过量生产。

[0053] 在另一个实施方式中,所述转运蛋白是黏附素、免疫调节复合物、蛋白酶、或毒素。

已表明,这样的蛋白与细菌膜以及外膜囊泡相关,其实例包括,但不限于,ApxI、白细胞毒素、不耐热肠毒素、志贺毒素、ClyA、VacA、OspA及OspD、血细胞凝集素、肽聚糖水解酶、磷脂酶C、溶血素、碱性磷酸酶、精氨酸牙龈素、赖氨酸牙龈素、IpaB、IpaC、IpaD、dentilisin、几丁质酶、细菌素、黏附素以及成孔毒素(Keuhn and Kesty, "Bacterial Outer Membrane Vesicles and the Host-Pathogen Interaction," *Genes& Development* 19:2645-2655 (2005),其全部内容通过引用并入本申请)。在优选实施例中,所述转运蛋白是ClyA。

[0054] 所述抗原性蛋白或肽可以是本领域已知的任何抗原性蛋白或肽,但优选来源于病原性细菌、真菌或病毒生物体、链球菌属(*Streptococcus species*)、念珠菌属(*Candida species*)、布鲁氏菌属(*Brucella species*)、沙门氏菌属(*Salmonella species*)、志贺氏菌属(*Shigella species*)、假单胞菌属(*Pseudomonas species*)、博德特氏菌属(*Bordetella species*)、梭菌属(*Clostridium species*)、诺瓦克病毒、炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、人体类免疫缺陷病毒(HIV)、衣原体属(*Chlamydia species*)、人乳头瘤病毒、流感病毒、副粘病毒属、疱疹病毒、巨细胞病毒、水痘-带状疱疹病毒、爱泼斯坦巴尔(Epstein-Barr)病毒、肝炎病毒、疟原虫属(*Plasmodium species*)、毛滴虫属(*Trichomonas species*)、性传播疾病媒介物、病毒性脑炎媒介物、原生动植物性疾病媒介物、真菌性疾媒介物、细菌性疾媒介物、癌细胞、或其组合。

[0055] 根据本发明的这个方面,还可以从本领域已知的任何益生菌细胞分离所述益生菌来源的囊泡。在优选实施例中,所述益生菌细胞选自由以下组成的组:长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、乳双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)、动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)、罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、双乙酰乳球菌(*Lactococcus diacetylactis*)、乳脂乳球菌(*Lactococcus cremoris*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)及其混合物。在优选实施例中,所述益生菌细胞是大肠杆菌Nissle。

[0056] 根据此实施方式,所述融合蛋白包括至少一部分ClyA蛋白,所述ClyA蛋白与一个或多个抗原性蛋白或肽的至少一部分偶联。DeLisa等在U.S.专利申请公开号US 2010/0233195A1(所述专利申请的全部内容通过引用并入本申请)中描述了合适的ClyA蛋白及编码所述ClyA蛋白的核苷酸分子。

[0057] 本发明的另一个方面涉及一种在哺乳动物体内引发免疫应答的方法,所述方法包括提供上文描述的所述益生菌细胞,以及在能有效地引发所述免疫应答的条件下向所述哺乳动物施用所述益生菌细胞。

[0058] 根据本发明的此方面以及所有其他方面,术语“免疫应答”是指在受试者体内产生的针对目的组合物中的抗原而发生的体液及/或细胞免疫应答。“体液免疫应答”是指由抗体分子介导的免疫应答,而“细胞免疫应答”是由T淋巴细胞及/或其它白细胞介导的免疫应答。所述目的抗原也可以引发抗体介导的免疫应答。因此,免疫应答可以包括一个或多个以下作用:由B细胞产生抗体;和/或激活抑制子、胞毒性、或辅助性T细胞和/或特异性针对存在于组合物或目的疫苗中的抗原的T细胞。这些应答可以用于中和传染性,和/或介导抗体-补体,或抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC),以对被免疫宿主提供保护。可以使用本领域公知的标准免疫试验及中和试验来确定这种应答。

[0059] 可以使用本领域已知的方法能向所述哺乳动物施用所述益生菌细胞,所述方法包括肠胃外、局部、静脉、口腔、皮下、腹腔、鼻内、或肌内途径。尽管其它方法能同样有效,但对于被制成能诱导免疫应答的组合物来说,其最典型的施用途径是皮下途径。其次最常见的是肌内注射。这种类型的注射以在臂肌肉或腿肌肉中进行为最典型。静脉注射以及腹腔注射、动脉内注射、颅内注射、或皮内注射也能有效生成免疫应答。

[0060] 本发明所述益生菌细胞可制成用于肠胃外施用的剂型。可在与表面活性剂如羟丙基纤维素适当混合的水中制备这些试剂的溶液或悬液。还可在甘油、液体聚乙二醇、及其在油中的混合物制备分散液。示例性的油为石油源、动物源、植物源或合成源的油,例如花生油、大豆油或矿物油。一般而言,水、盐水、葡萄糖水溶液和相关糖溶液、以及乙二醇类,如丙二醇或聚乙二醇是优选的液态运载体,特别对于注射用溶液。在普通的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0061] 适合注射用的药物剂型包括无菌水溶液或分散液以及用于即时配制的无菌注射溶液或分散液的无菌粉。在所有情况下,剂型必须是无菌的,且必须是达到易于注射程度的流体。在生产和储存条件下,剂型必须是稳定的,且必须防止受微生物如细菌和真菌的污染。运载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇)、其合适的混合物、以及植物油的溶剂或分散介质。

[0062] 当需要全身性递送本发明所述药物试剂时,可将他们制成用于肠胃外注射施用的剂型,例如弹丸注射或连续输注。用于注射的剂型可以是单位剂量的形式,例如,在安瓿瓶中或在多剂量容器中,并添加防腐剂。所述组合物可以采用如在油性或水性载剂中的悬浮液、溶液或乳剂的形式,并可包含调配试剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0063] 也能通过使用输注泵装置(如Medtronic(Northridge,CA)描述的装置),实现腹腔或鞘内施用本发明所述试剂。此类装置允许连续输注所需要的化合物以避免多次注射及多次操作。

[0064] 除上述剂型外,本发明所述组合物也可以制成长效制剂。这种长效制剂可用合适的聚合性或疏水性物质(例如在可接受的油中制成乳剂)或离子交换树脂制成,或可制成微溶性衍生物,例如微溶性盐。

[0065] 可用本领域已知的一些试验确定有效的免疫应答。例如,可以使用以下方法在致敏受试者体内检测细胞介导的免疫应答:包括淋巴组织增生(淋巴细胞活化)试验、CTL细胞毒性细胞试验等方法,或检测抗原特异性的T淋巴细胞。这样的试验在本领域是公知的。

[0066] 通过测试来自所述哺乳动物的生物性样品(如血液、血浆、血清、尿液、唾液排泄物、脑脊液或淋巴液)中是否存在针对所施用的聚合产物的免疫原性组分的抗体,确定并监

测是否存在体液免疫应答。检测生物样品中抗体的方法是本领域公知的,例如ELISA,点印迹法,SDS-PAGE胶或酶联免疫斑点法(ELISPOT)。利用本领域已知的增殖试验(CD4⁺T细胞)或CTL(细胞毒性T淋巴细胞)试验,能够确定细胞介导的免疫应答的存在。

[0067] 本发明所述益生菌细胞诱导免疫应答的有效剂量根据很多不同的因素而变化,包括施用途径、靶向位点、所述哺乳动物的生理状态、所述哺乳动物是人类或是动物、施用的其它药物、以及给药是预防性的或治疗性的。通常,受试者为人类,但在有些疾病下,受试者可以是非人类哺乳动物,如牛。根据本发明所述方法,其它适于治疗的非人类哺乳动物包括灵长类、狗、猫、啮齿类(如小鼠、大鼠、豚鼠)、马、鹿、鹿科动物、牛及奶牛、绵羊、以及猪。需要确定治疗剂量以优化安全性及功效,并且可以包括口服治疗。

[0068] 在本发明这个方面的一个实施方式中,突变所述益生菌细胞以高表达包含所述融合蛋白的囊泡。上文描述了为此目的而突变益生菌细胞的方法。

[0069] 所述转运蛋白可以是黏附素,免疫调节复合物,蛋白酶,或毒素。上述举例了可用作转运蛋白的蛋白。所述转运蛋白优选为ClyA。

[0070] 在优选的实施方式中,所述抗原性蛋白或肽和所述益生菌细胞来源于和/或选自于上述组。在更优选实施方式中,所述益生菌细胞是大肠杆菌Nissle。

[0071] 本发明还涉及展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性蛋白或肽的至少一部分。

[0072] 首先使用上述生成经转化的益生菌细胞的方法制备益生菌来源的囊泡。从过表达并展示融合蛋白的益生菌细胞中产生的外膜囊泡也将展示所述融合蛋白。可以通过各种方式制备这些外膜囊泡。例如,本文引用的参考文献提供了获得合适的制备物的方法。用于形成OMV的技术包括用如下胆汁酸盐去垢剂(如石胆酸盐、鹅脱氧胆酸盐、熊脱氧胆酸盐、脱氧胆酸盐、胆酸盐、及熊胆酸盐)处理细菌。在没有去垢剂的情况下,可以大量使用如下其它技术如超声、匀浆、微流化、空化、渗压震扰法、研磨、弗氏压碎器、混合等(参见W02004/019977)。

[0073] 制备OMV的一种优选方法包括对OMV粗品进行超滤而非高速离心(参见 W02005/004908)。这允许在短得多的时间内处理更多量的含OMV的上清液(一般为4 小时内大于15升)。

[0074] 在所述囊泡上展示的所述转运蛋白可以是本领域已知的在囊泡表面表达的任何蛋白。在优选的实施方式中,所述转运蛋白是黏附素,免疫调节复合物,蛋白酶,或毒素。上文已经描述了来自这些范畴的示例性蛋白。更优选地,所述转运蛋白是ClyA。

[0075] 上文讨论了所述抗原性蛋白或肽以及益生菌细胞。

[0076] 在另一个优选实施方式中,来自大肠杆菌Nissle的所述益生菌来源的囊泡展示融合蛋白,所述融合蛋白包括至少一部分ClyA蛋白,所述ClyA蛋白偶联于一个或多个抗原性蛋白或肽的至少一部分。

[0077] 本发明的一个进一步的方面涉及一种在哺乳动物体内引发免疫应答的方法,所述方法包括提供上述益生菌来源的囊泡以及在能有效地引发所述免疫应答的条件下向所述哺乳动物施用所述益生菌来源的囊泡。

[0078] 适合作为药物及疫苗递送载体而施用的细胞囊泡的制备方法以及用于细胞囊泡施用的制剂方法是本领域已知的并在上文以及在Kadurugamuwa and Beveridge的

W02002/0028215, Oster等的W02006/024946, 以及Foster等的W02003/051379 (其全部内容通过引用并入本申请) 中描述。

[0079] 如上文所述, 所述转运蛋白优选为黏附素, 免疫调节复合物, 蛋白酶, 或毒素。在更优选实施方式中, 所述转运蛋白为ClyA。

[0080] 上文还描述了所述抗原性蛋白或肽以及所述益生菌细胞的实例例及优选的实施方式。

[0081] 本发明的另一个方面涉及一种转化了构建体的益生菌细胞, 所述构建体适合在所述益生菌细胞表面过量表达并展示融合蛋白, 所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白, 所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性食物过敏蛋白或肽的至少一部分。

[0082] 上文描述了所述经转化的益生菌细胞、融合蛋白、以及生成他们的方法。

[0083] 最常见的食物过敏蛋白来源于奶、蛋、鱼、甲壳类水生生物、树坚果、花生、小麦、椰子和大豆。具体的食物过敏蛋白实例包括, 但不限于, 以下: 奶 (Bosd4、Bosd5 和Bosd6), 蛋 (卵类黏蛋白、卵白蛋白、卵转铁蛋白、溶菌酶和 α 卵黄蛋白), 鱼 (Gadm1、Gadm2、Gadm3、Sals1、Sals2、Sals3、Gadc1和Xipg1), 甲壳类水生生物 (Homa1、Homa3、Homa6、Penm1、Penm2、Penm3、Penm4、Penm6、Litv1、Litv2、Litv3、Litv4和Chaf1), 树坚果 (Prudu3、Prudu4、Prudu5、Prudu6、Jugn1、Jugn2、Jugr1、Jugr2、Bere2、Bere1、Cass5、Cora 1.0401、Cora 1.0402、Cora 1.0403、Cora 1.0404、Corall、Cora8、Cora9、Anah1、山核桃蛋白白蛋白2S和Litc1), 花生 (Arah1、Arah2、Arah3、Arah4和Arah5), 小麦 (Trial2、Trial4、Trial8和Trial9), 椰子 (CNP1), 和大豆 (Glym1、Glym2、Glym3、Glym4和Glym5)。在一个实施方式中, 所述食物过敏是针对花生的, 并且所述抗原性食物过敏蛋白或肽是来自花生的蛋白Arah2。

[0084] 本发明进一步涉及一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡, 其中所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白, 所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性食物过敏蛋白或肽的至少一部分。

[0085] 上文描述了所述益生菌来源的囊泡, 融合蛋白, 以及生成他们的方法。

[0086] 本发明还涉及一种使受试者对食物过敏免疫的方法, 所述方法包括选择有食物过敏的受试者; 提供上文所述的益生菌细胞, 或在另一实施方式中, 提供上文所述的益生菌来源的囊泡; 以及在能有效地使所述受试者对所述食物过敏免疫的条件下, 向所述选定的受试者施用所述益生菌来源的囊泡。

[0087] 可基于之前的过敏测试方法选择有食物过敏的受试者, 所述方法包括皮肤点刺试验, 血液试验, 以及食物诱发。食物过敏的额外诊断工具包括内窥镜, 结肠镜, 以及活组织检查。在一个优选的实施方式中, 所述选定的受试者有花生过敏。

[0088] 上文描述了根据这个方法采用的剂型模式及施用模式。

[0089] 本发明的另一个方面涉及一种转化了构建体的益生菌细胞, 所述构建体适合在所述益生菌细胞表面过量表达并展示融合蛋白, 所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白, 所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性病毒蛋白或肽的至少一部分。

[0090] 上文描述了所述经转化的益生菌细胞、融合蛋白、以及生成他们的方法。

[0091] 根据本发明的这个方面, 抗原性病毒蛋白或肽可以来源于, 但不限于, 以下病毒: 人类免疫缺陷病毒 (HIV) (p24、gp120和gp40)、流感病毒A型 (HA和NA), 流感病毒B型 (HA和NA), 流感病毒C型 (HA和NA), 狂犬病病毒糖蛋白G, 水疱性口炎病毒, 呼吸道合胞病毒, 麻疹

病毒,副流感病毒,腮腺炎病毒,黄热病病毒,西尼罗病毒,登革热病毒(CPC、MPM和EPE),风疹病毒,辛德毕斯病毒,塞姆利基森林病毒,罗斯河病毒,轮状病毒,细小病毒,JC多瘤病毒,BK多瘤病毒,人乳头瘤病毒(HPV),腺病毒,乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒(E1和E2),甲型肝炎病毒,戊型肝炎病毒,人类疱疹病毒,痘苗病毒,猴痘病毒,牛痘病毒,人类T细胞白血病病毒,柯萨奇病毒,脊髓灰质炎病毒,鼻病毒(VP1-3),肠病毒,埃可病毒,埃博拉病毒(GP1和GP2),冠状病毒(CoV-N、CoV-S、CoV-M、CoV-E),天花病毒,汉坦病毒,腺相关病毒,星状病毒,亨德拉病毒,拉沙病毒,尼帕病毒,马尔堡病毒(NPC1、GP1,2),以及诺瓦克病毒。在一个实施方式中,所述抗原性病毒蛋白或肽是H1N1血凝素。

[0092] 本发明还涉及一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性病毒蛋白或肽的至少一部分。

[0093] 上文描述了所述益生菌来源的囊泡、融合蛋白、以及生成他们的方法。

[0094] 本发明的另一个方面涉及一种使受试者对病毒感染免疫的方法,所述方法包括选择有发生病毒感染风险的受试者;提供上述益生菌细胞,或在另一个实施方式中,提供上述益生菌来源的囊泡;以及在能有效地使所述受试者对所述病毒感染免疫的条件下,向所述选定受试者施用所述益生菌细胞或益生菌来源的囊泡。

[0095] 有发生病毒感染风险的受试者可以是具有降低的或被抑制的免疫系统的受试者(例如,由于疾病,环境,或治疗,或其组合)。其它有风险的受试者可以包括儿童、老年人、以及医院工作者。在一个优选实施方式中,所述病毒感染是流感。

[0096] 上文描述了根据这个方法采用的制剂模式和施用模式。

[0097] 而本发明的另一方面涉及一种转化了构建体的益生菌细胞,所述构建体适合在所述益生菌细胞表面过表达并展示融合蛋白,所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性细胞内细菌蛋白或肽的至少一部分。

[0098] 上文描述了所述经转化的益生菌细胞、融合蛋白、以及生成他们的方法。

[0099] 抗原性细胞内细菌蛋白或肽可以来源于,但不限于,细胞内病原体例如衣原体、埃立克体、立克次体、分枝杆菌、布鲁氏菌、弗朗西斯菌、军团杆菌和李斯特菌。特定的抗原性蛋白或肽的实例包括,但不限于,以下:衣原体(MOMP、omp2、Cp j0146、Cp j0147、Cp j0308),埃立克体(P28外膜蛋白和hsp60),分枝杆菌(Ag85complex、MPT32、Phos、Dnak、GroES、MPT46、MPT53、MPT63、ESAT-6家族、MPT59、MAP 85A、MAP 85B、SOD和MAP 74F),布鲁氏菌(BMEII0318、BMEII0513、BMEII10748、BMEII1116、BP26和omp31),弗朗西斯菌(O-抗原),军团杆菌(Mip、LPS、外膜蛋白),和李斯特菌(IspC、IemA和李斯特菌溶菌素O)。在一个实施方式中,所述抗原性蛋白或肽是来自于副结核分枝杆菌的74F蛋白,所述副结核分枝杆菌是反刍动物的副结核病的病原体。

[0100] 本发明还涉及一种展示融合蛋白的益生菌来源的囊泡,其中所述融合蛋白包括至少一部分转运蛋白,所述转运蛋白偶联于一个或多个抗原性细胞内细菌蛋白或肽的至少一部分。

[0101] 上文描述了所述益生菌来源的囊泡、融合蛋白、以及生成他们的方法。

[0102] 本发明的最后一个方面涉及一种使哺乳动物对细胞内细菌感染免疫的方法,所述方法包括选择有发生细胞内细菌感染风险的哺乳动物;提供上述益生菌细胞,或在另一实施方式中,提供上述益生菌来源的囊泡;以及在能有效地使所述动物对所述细胞内细菌感

染免疫的条件下,向所述选定动物施用所述益生菌细胞或益生菌来源的囊泡。

[0103] 上文描述了根据这个方法采用的剂型模式和施用模式。

[0104] 如果哺乳动物具有降低的或被抑制的免疫系统(例如,由于疾病、环境、或治疗、或其组合),所述哺乳动物可能有发生细胞内细菌感染的风险。哺乳动物,例如反刍动物,由于群居的关系,也有风险。在优选实施方式中,所述哺乳动物是反刍动物并且所述细胞内细菌感染是副结核病。

实施例

[0105] 以下实施例旨在说明本发明的实施方式,而绝非限制本发明的范围。

[0106] 实施例1-4的材料与方法

[0107] 制备OMV。根据之前建立的步骤(Valderrama-Rincon et al., "An Engineered Eukaryotic Protein Glycosylation Pathway in Escherichia Coli," Nat. Chem. Biol. 8:434-436 (2012), 其全部内容通过引用并入本申请)纯化了OMV。简单来讲,将包含阿拉伯糖启动子的pBAD-ClyA-GFP质粒转化进过量生产囊泡的大肠杆菌菌株 JC8031 (Baba et al., "Construction of Escherichia Coli K12In-Frame, Single-Gene Knockout Mutants: the Keio Collection," Mol. Syst. Biol. 2:68 (2006), 全部内容通过引用并入本申请), JH1, 以及JH1-LpxM, 并分别在LB-氯霉素或LB-卡那霉素培养基上进行了选择。将过夜培养物接种在了含有250mL培养基的细颈瓶内, 并使其在37°C和230rpm条件下生长至OD₆₀₀达到~0.5。此时, 通过加入L-阿拉伯糖至终浓度为 0.2%, 诱导了蛋白表达。诱导后12小时(并于5000g离心15min后), 收集无细胞的培养上清液, 并且随后经过0.45μm过滤器过滤。用超离心法(Beckman-Coulter; Ti SW28转头, 26000xg, 3h, 4°C)分离了囊泡, 并在PBS中重悬。

[0108] 显微镜术。对置于氮浆中的铜晶片上的速冻的纯化囊泡实施了扫描电子显微镜术, 并在LEO 1550FESEM上进行了显像。经2%醋酸双氧铀负染的纯化囊泡置于400目聚乙烯醇缩甲醛(Formvar)碳包被的铜栅极上, 对其实施透射电子显微镜术, 并在FEI Tecnai F20TEM上进行了显像。悬于PBS中的纯化囊泡置于载玻片上并用盖玻片密封, 对其实施荧光显微镜术, 并在设有GFP滤片的Olympus BX41显微镜上进行了检查。

[0109] 蛋白分析。使用牛血清白蛋白(BSA)作为蛋白标准, 通过二喹啉甲酸试验(BCA 蛋白试验; Pierce)定量测定了OMV及纯化的重组蛋白制备物(在本疫苗研究中作为对照使用)中的蛋白浓度。在微板分光光度计(Gemini EM; Molecular Devices)上, 分别采用481nm和507nm的激发波长和发射波长, 测量了蛋白及OMV样品中的 GFP荧光(Miller, "Experiments in Molecular Genetics," Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S. (1972), 其全部内容通过引用并入本申请)。对于SDS/PAGE, 在包含β-巯基乙醇的上样缓冲液中配制样品, 并于10%聚丙烯酰胺凝胶电泳前, 在90°C加热10分钟。将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜用于蛋白印迹分析, 并用单克隆小鼠抗GFP IgG (Invitrogen; 1:2000)一抗, 及辣根过氧化物酶结合的山羊抗小鼠IgG (Jackson ImmunoResearch; 1:10000)二抗进行了检测。用放射自显影法, 使用ECL检测试剂(GE Healthcare)对膜显影。

[0110] LPS分析。根据之前描述的比色测定法(Kolling and Matthews, "Export of Virulence Genes and Shiga Toxin by Membrane Vesicles of Escherichia Coli

0157:H7,” Appl. Environ. Microbiol. 65:1843-1848 (1999); Bernadac et al., “Escherichia Coli Tol-Pal Mutants Form Outer Membrane Vesicles,” J. Bacteriol. 180:4872-4878 (1998), 其每个全部内容通过引用并入本申请) 检测KDO的存在, 以测定细菌LPS的浓度。简单来讲, 将在PBS中的OMV样品 (50 μ L) 与0.2M H₂SO₄ (5 μ L) 混合, 并于100 $^{\circ}$ C加热20分钟。将所述样品冷却至室温5分钟, 并且随后在该混合物中加入25 μ L的0.04 M NaIO₄并通过移液器充分混合。在室温孵育20分钟后, 在该样品管中加入了2% NaAsO₂ (65 μ L), 并涡旋振荡所述样品直至特征性黄色消失。加入了硫代巴比妥酸 (0.3%, 250 μ L), 并将所述样品回温至100 $^{\circ}$ C 10分钟, 随后立即加入了二甲基亚砷 (125 μ L) 并通过移液器充分混合。将所述样品冷却至室温5分钟, 并在微板分光光度计 (Molecular Devices) 中读取了550nm处的吸收值。用KDO铵盐 (Sigma-Aldrich) 制备校准标准液。

[0111] 动态光散射。用Nanosizer Nano ZS (Malvern Instruments) 进行了动态光散射的测定, 并使用了Dispersion Technology软件4.20版本进行数据采集和分析。1mL OMV 的PBS溶液中包含了100 μ g/mL总蛋白。使用了折光指数和水粘度 (1.333和0.890cP) 作为模型参数输入。

[0112] 重组蛋白纯化。转化了pBAD-ClyA-GFP-His, pBAD-ClyA-His, 或pBAD-GFP-His 的大肠杆菌DH5 α 培养物在包含氯霉素的100mL LB培养基中生长。在OD₆₀₀达到~0.5 后, 通过加入L-阿拉伯糖 (至终浓度为0.2%) 诱导了蛋白表达。诱导后4小时, 通过离心 (5000g, 15min) 收获细菌培养物, 并通过溶菌酶 (1mg/mL) 和Triton X-100 (1% vol/vol) 处理对其进行了裂解。用固定化金属亲和色谱 (Ni-NTA Agarose; Qiagen), 根据制造商的指导, 纯化了可溶部分内的多组氨酸标记的蛋白。用200mM咪唑的缓冲液 (包含50mM NaH₂PO₄和300mM NaCl (pH 8.0)) 洗脱了所述蛋白, 并随后用 PD-10尺寸的分子排阻色谱柱 (Amersham Biosciences) 将该蛋白脱盐于PBS中。

[0113] 细胞分离及培养。通过安乐死后的心脏穿刺, 将小鼠红血细胞 (MRBC) 抽取入 EDTA 中, 离心 (2000rpm, 15min) 并与血浆及白细胞层分离, 随后在PBS中洗涤并以10%溶液 (w/v) 的形式保存于4 $^{\circ}$ C。对于骨髓来源的巨噬细胞和树突细胞 (DCs), 从小鼠股骨获取骨髓, 并在含有10%的L929条件培养液的RPMI 1640中生长6至8 天 (Cormack et al., “FACS-Optimized Mutants of the Green Fluorescent Protein,” Gene 173:33-38 (1996), 其全部内容通过引用并入本申请), 并于7天后用刮片术收集细胞。在20ng/ml GM-CSF存在的条件下培养了骨髓来源的DCs, 并于培养后6-8天收集了细胞 (Carlo and Jackson, “A New and Improved Microassay to Determine 2-Keto-3-Deoxyoctonate in Lipopolysaccharide of Gram-Negative Bacteria,” Anal. Biochem. 601:595-601 (1978), 其全部内容通过引用并入本申请)。对于脾T细胞和B 细胞, 收获了脾脏, 将其机械性匀浆, 并经100 μ m细胞过滤器 (Falcon) 进行了过滤。用冷的ACK裂解缓冲液 (Cellgro) 将红血球裂解5分钟, 并用完全培养液洗涤细胞悬液。用负选择富集柱 (R&D Systems), 按照制造商的建议, 纯化了T细胞。使用磁分离试剂盒, 按照制造商说明书 (Miltenyi Biotec), 以负选择法富集了B细胞。如此得到的细胞纯度用流式细胞仪测定为>97%。

[0114] ELISA。用GFP (以5 μ g/ml浓度溶于碳酸盐缓冲液中, pH 9.6) 包被聚苯乙烯 96孔微量板 (Maxisorp; Nunc Nalgene), 并于4 $^{\circ}$ C过夜孵育。用3% BSA的包含0.05% Tween-20的PBS (PBST) 封闭了板。样品在封闭液中进行2倍连续稀释 (稀释比例范围1:200-204, 800),

加入至孔中,并于37°C孵育了2小时。用PBST洗涤板6次,并在所述孔中加入了生物素化的山羊抗小鼠的IgG,IgM(Sigma),或单克隆IgG1或IgG2(BD Pharmingen)(1 μ g/ml),并于37°C孵育了1小时。然后加入了亲和素-辣根过氧化物酶(1:1000;Sigma),并继续在37°C孵育了30分钟。用PBST额外洗涤了6次后,加入了3,3',5,5'四甲基联苯胺底物(1-Step TMB; Pierce),并让此酶反应进行了20分钟。用2M H₂SO₄结束了所述反应。在微板分光光度计中定量测定了450nm处的吸收值。通过检测产生高于背景信号3倍标准差的前次稀释度,测定了血清抗体滴度。为测定细胞因子,将细胞以2 \times 10⁶个/孔的浓度重悬于RPMI 1640培养液中(补充有FCS和抗生素),接种入96-孔板中,并与5 μ g GFP孵育48小时。使用标准ELISA试剂盒(eBioscience)检测上清液中细胞因子水平。

[0115] 血凝抑制测试。A/PR8/34和X31流感病毒样品在0.02%福尔马林中于37°C灭活了18小时,然后在室温条件下对PBS透析过夜。按照别处的描述(Cottey et al., "Influenza Virus," Curr. Protoc. Immunol. (2001),其全部内容通过引用并入本申请),通过将病毒在新抽提的1%MRBC的PBS溶液中进行2倍的连续稀释,对各病毒样品进行了贮存血凝单位(HAs)滴定。接着,按照别处的描述(Cottey et al., "Influenza Virus," Curr. Protoc. Immunol. (2001),其全部内容通过引用并入本申请),将来自被适当接种的小鼠的血清的2倍连续稀释液与4个血凝单位的病毒稀释样品孵育,并随后暴露于1%MRBC的PBS溶液中。两个试验都采用滴定法读数来测定血凝与血凝缺失/抑制间的分界点。

[0116] 细胞因子表达分析。对于脾淋巴细胞,细胞经5 μ g/ml GFP,5ng/ml IL-2和10 μ g/ml抗-CD28过夜刺激后,与布雷菲德菌素A培养。细胞经抗表面标记分子CD3(17A2克隆)和CD4(RM4-5克隆)的荧光抗体染色,透化,固定,并与抗细胞因子IFN- γ (XMG1.2克隆)或IL-10的抗体孵育。所有孵育均在冰上进行30分钟。所有抗体购自BD Bioscience或eBioscience。对于每个样品,至少分析了50,000个细胞。使用CELLQuest或FlowJo软件及FACScalibur流式细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA)收集和分析数据。对于巨噬细胞,如上述铺板细胞,并还将其与浓度逐渐升高的OMV孵育。16小时后,加入了布雷菲德菌素A(10 μ g/ml)并继续孵育了6小时。然后收集了DCs用以染色,并用流式细胞术进行了分析。染色前,将细胞与抗Fc γ III/II受体的抗体(BD Biosciences)及10%正常小鼠血清(NMS)的包含0.1%BSA和0.01%NaN₃的PBS溶液孵育。细胞经抗表面标记分子CD11c(223H7克隆)的抗体染色,在2%多聚甲醛中进行了固定,经皂角苷进行了透化,并随后与抗细胞因子IL-12p40/p70(C17.8克隆),IL-10(JES5-16E3克隆)或IL-4(11B11克隆)的荧光抗体孵育。孵育在冰上进行30分钟。所有抗体购自BD Bioscience或eBioscience。如上述收集并分析数据。

[0117] 炎症病理。对每组3只共4组8周龄BALB/c小鼠(Charles River Laboratories)中的每只经耳朵s.d.注射10%疫苗剂量(如前所述)的PBS、EcJ OMV、EcN OMV和EcN-LpxM OMV。注射后30小时,对小鼠实行安乐死,切除了它们的耳朵并立即置于10%福尔马林中固定。对组织样品进行了用于组织病理学的常规化处理,并进行了苏木精和伊红染色用于光学显微镜评价。由一位具有执照的病理学家以盲审的形式对切片进行了查看并评分。根据以下方面对变化给出总分:炎症、水肿、和组织损伤/重塑的程度,以及存不存在血管炎或血管血栓。

[0118] 吞噬试验。将骨髓来源的巨噬细胞在6-孔板上铺板(10⁶/孔)16小时,并与浓度升

高的ClyA-GFP(+) EcN或EcJ OMV孵育。加入所述OMV后2小时,剧烈洗涤6-孔板,收集细胞,并用流式细胞仪分析以检测被内吞的GFP。用FACScalibur流式细胞仪收集数据并在CELLQuest软件中(Becton Dickinson, San Jose, CA)分析。每个样品至少分析30,000个细胞。

[0119] T细胞活化分析。按照前人的描述(Herlax et al., "Role of Lipopolysaccharide on the Structure and Function of Alpha-Hemolysin From Escherichia Coli," Chem. Phys. Lipids 135:107-115 (2005); Noss et al., "Toll-Like Receptor 2-Dependent Inhibition of Macrophage Class II MHC Expression and Antigen Processing by 19-kDa Lipoprotein of Mycobacterium Tuberculosis," J. Immunol. 167:901-918 (2001), 其每个全部内容通过引用并入本申请)检测由激活的DC引起的T细胞活化。简单来讲,将96-孔板与10 μ g/mL 抗小鼠CD3(145-2C11克隆; BD Biosciences)于4 $^{\circ}$ C过夜孵育,并随后用完全RPMI 将板洗涤了3次。之后如所述用CFSE标记了细胞,并将该细胞以2 \times 10⁵个/孔接种入孔中。将T细胞与4 \times 10⁴个/孔的DC, 5 μ g/mL抗小鼠CD28(克隆37.51, Biolegend),以及1-100 μ g/mL EcJ或EcN OMV进行了共孵育。将用于细胞流式分析的样品于37 $^{\circ}$ C孵育48小时,与25ng/mL PMA, 1 μ g/mL离子霉素,以及10 μ g/mL 布雷菲德菌素A孵育4-6小时,并随后收集了样品并用IFN- γ 和IL-10(eBiosciences)进行染色。还将用于ELISA法分析培养物上清液而制备的样品在37 $^{\circ}$ C孵育48小时。将用于增殖分析而制备的样品在37 $^{\circ}$ C孵育7天,之后用胰蛋白酶进行消化,并用流式细胞仪分析CFSE染色的损失。

[0120] 设计Nissle nlpI突变体JH1以及lpxM突变体JH1-LpxM。通过使用P1转导法转导nlpI::kan和lpxM::kan等位基因,从单一基因剔除株集(Keio collection)中产生了nlpI突变和lpxM突变,创造了JH1株(Δ nlpI)和JH1-LpxM株(Δ nlpI Δ lpxM) (Baba et al., "Construction of Escherichia coli K12In-Frame, Single-Gene Knockout Mutants: The Keio Collection," Mol. Syst. Biol. 2:68 (2006), 其全部内容通过引用并入本申请)。简单来讲,如别处所述(Miller, J.H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S. (1972), 其全部内容通过引用并入本申请),使大肠杆菌Nissle 1917细菌过夜生长并将其与来自合适的单一基因突变株的P1裂解物孵育。通过使用50mM CaCl₂于37 $^{\circ}$ C作用20分钟以及1M钠-柠檬酸盐于室温作用40分钟进行转导,并使用包含20mM钠-柠檬酸盐的培养基进行了选择性铺板。使用分别用于SEM、TEM和荧光显微镜术的LEO 1550FESEM、FEI Tecnai F20TEM、以及Olympus BX41进行了可见的特性分析。使用BCA试验和蛋白印迹法进行了进一步的蛋白特性分析,同时使用KDO比色测定法分析LPS,以及使用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)方法进行了蛋白质组的分析。

[0121] 小鼠免疫。每组10只共10组8周龄BALB/c小鼠(Charles River Laboratories)用包含纯化蛋白或OMV制备物的PBS(100 μ L) s.c.免疫各小鼠。对10个处理组分别用以下进行免疫:PBS、2.5 μ g GFP/H1N1HA、2.5 μ g ClyA、2.5 μ g GFP与ClyA的混合物、2.5 μ g ClyA-GFP/H1N1HA融合物、2.5 μ g alum与ClyA-GFP/H1N1HA的混合物(Alyhydrogel[®], 1.3%铝氢氧化物[质量:体积]),以及EcJ+ClyA-GFP/H1N1 HA的重组型荧光等量物、EcJ(空白)、EcN+ClyA-GFP/H1N1HA和EcN(空白)。相隔4周给予了2剂疫苗(初始剂量和加强剂量)。于以下时间点从下颌窦进行采血:临初始免疫前和初次免疫后2周、临加强免疫前以及在加强免疫后2周和4

周。在所有10组中,一半(n=5)在临施用加强剂量前,并且另一半(n=5)于末次取血后,实施末期脾切除术。用于这些动物研究的方法获康奈尔大学学会动物管理与使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee at Cornell University)批准(方法号2009-0096)。

[0122] 评价OMV疫苗免疫应答。在96-孔板中,对收集自己接种小鼠的血清样品进行了标准微孔ELISA。将孔与纯化的GFP过夜孵育,之后用血清进行连续稀释孵育。随后孵育了抗IgG、IgM、IgG1和IgG2的二抗,并用HRP进行了检测。通过让血清与福尔马林中和的PR8和X31病毒孵育,进行了血凝抑制试验,并通过血凝模式的视觉检查进行血凝抑制试验的检测。ELISA还用来定量测定抗原特异的T细胞应答。将纯化的脾T细胞在完全RPMI中培养7天,然后接种到孔中并与GFP以三复孔的形式孵育48小时。随后使用了抗IFN- γ ,抗IL-4,以及抗IL-10的抗体以检测是否存在激活的细胞因子释放。还在类似培养的T细胞上,完成了进一步的T细胞增殖分析。培养的T细胞经胰蛋白酶消化,在1000rpm离心,并在完全RPMI中稀释至 1×10^6 个细胞/ml,然后用CFSE标记(Invitrogen)。将 2×10^5 个细胞接种进96-孔板中,与30 μ L 100 μ g/mL GFP孵育,并让其在37 $^{\circ}$ C增殖4天。使用了FACS来评价增殖细胞中CFSE的损失。通过在BALB/c小鼠耳朵皮下注射(n=4),进行了附加的体内炎症应答分析,在注射OMV样品后30小时,对其进行了组织病理学检查。

[0123] EcN OMV刺激免疫细胞的体外分析。从BALB/c股骨髓获取了骨髓来源的巨噬细胞,将细胞经柱纯化,并在完全RPMI中培养7天。随后,将细胞铺板在6孔板中,与ClyA-GFP(+) OMV孵育,并通过FACS分析检测了吞噬诱导的荧光及IL-12/4/10 表达。使用与OMV孵育了2天的DC,评价由OMV脉冲处理的树突细胞引起的T 细胞活化;使用CFSE标记的T细胞在24孔板中进行了共培养,并在首次接种后7 天进行增殖分析。CFSE标记的B细胞的评价方法同前述的抗原再刺激的T细胞。

[0124] 统计分析。用非配对双尾Student's t检验或ANOVA组检验测定统计学显著性,适当时使用杜凯氏诚实显著差异检验法(Tukey's HSD tests)加以补充。置信区间 $P < 0.05$ 定为显著性。在三个大肠杆菌蛋白质组文库间交叉引用蛋白质组数据,以确定识别出的 $P < 0.001$ 的情况。

[0125] 实施例1-通过ClyA-融合机制将EcN OMV改造成重组型抗原运载体

[0126] 先前报导了通过诱导表达由融合至肠细菌细胞毒素ClyA C末端的抗原组成的嵌合体,使得多种重组抗原在K12大肠杆菌OMV表面成功表达并功能性折叠;(Kim et al., "Engineered Bacterial Outer Membrane Vesicles with Enhanced Functionality," J.Mol. Biol. 380:51-66 (2008),其全部内容通过引用并入本申请)(图5)。本研究出于两种原因,选择了绿色荧光蛋白(GFP)作为主要的模型抗原。首先,GFP的天然荧光允许对所有疫苗制备物中的抗原含量进行简单的定量测定,这是因为ClyA-抗原嵌合体在外膜插入时能够保留合适的抗原折叠(Chen et al., "Delivery of Foreign Antigens by Engineered Outer Membrane Vesicle Vaccines," Proc.Nat.Acad.Sci.USA 107:3099-3104 (2010),其全部内容通过引用并入本申请)。GFP的第二个优势是它在小鼠体内较弱的免疫原性,这允许最大化展示所述疫苗运载体的免疫刺激潜能。通过基因敲除nlpI,在EcN中诱导了OMV的过量生产(Kim et al., "Engineered Bacterial Outer Membrane Vesicles with Enhanced Functionality," J.Mol.Biol.380:51-66 (2008); McBroom and Kuehn,

“Release of Outer Membrane Vesicles by Gram-Negative Bacteria is a Novel Envelope Stress Response,”*Mol. Microbiol.* 63:545-558 (2007), 其全部内容通过引用并入本申请), 以生产所述抗原递送平台(图1A)。由表达ClyA-GFP的高囊泡化的EcN突变体所释放的OMV呈现出统一的尺寸和形状, 同时保留了特征性的双脂膜结构(图1B), 并且携带了荧光的膜结合的GFP(图1C)。为了说明益生菌株的选择对免疫应答的影响, 使用了非益生菌的K12大肠杆菌株JC8031(EcJ)生产类似的包含GFP的OMV作为对照(Kim et al., “Engineered Bacterial Outer Membrane Vesicles with Enhanced Functionality,”*J. Mol. Biol.* 380:51-66 (2008); Chen et al., “Delivery of Foreign Antigens by Engineered Outer Membrane Vesicle Vaccines,”*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 107:3099-3104 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请)。蛋白印迹分析证实了两种OMV制备物中的ClyA-GFP含量相当(图1D), 这允许对这两种菌株对模型抗原触发免疫应答的能力进行有意义的比较。因为使用EcN作为疫苗运载体源的目的在分子层面上是源自于推测的PAMP依赖的优势, 所以研究了EcJ和EcN OMV在TLR激动剂成分上的差别(图1E)。令人惊讶的是, EcJ和EcN OMV包含相似量的膜结合的脂多糖(LPS), 这是已知的在OMV诱导的免疫应答中的关键因素(Ellis and Kuehn, “Virulence and Immunomodulatory Roles of bacterial Outer Membrane Vesicles,”*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74:81-94 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请)。然而, 尽管如预期的那样, 两种大肠杆菌来源的OMV中总蛋白含量大致相似(图6), 但是EcN OMV中大量富集若干主要的富含PAMP的TLR激动剂。这个差别有可能作为生物分子基础解释推测的免疫细胞靶向及自体佐剂化优势, 该优势是期望被利用的。

[0127] 实施例2-EcN OMV免疫诱导抗原特异性的 T_H1 偏向性免疫

[0128] 为了测试EcN OMV产生针对GFP的强烈的获得性免疫应答的能力, 通过皮下注射包含ClyA-GFP且不含附加佐剂的OMV制剂来免疫BALB/c小鼠(图7)。为了确保存在极具竞争性的阳性对照, 单独注射了吸附在增强的氢氧化铝(alum)佐剂递送系统、即铝胶[®](Alhydrogel[®])上的无囊泡的ClyA-GFP。在末次加强免疫后4周进行的IgG滴度试验表明EcN和EcJ OMV两者都诱导了强烈的体液应答, 其与氢氧化铝金标准相当(图2A), 这与先前的工作一致(Chen et al., “Delivery of Foreign Antigens by Engineered Outer Membrane Vesicle Vaccines,”*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 107:3099-3104 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请)并且反映了稳健应答的逐步产生(图8)。然而, IgM的滴度显示出在体液免疫上的一些差异(图2B), 其中 EcN OMV产生的IgM水平的较低, 这表明, 要么早期发生了类别转换, 要么膜态的内毒素在刺激B淋巴细胞上具有差异。进一步的差异可见于IgG1对IgG2的滴度比较。EcN OMV引发了IgG2主导的体液应答(图2C), 这一结果连同相对降低的IgM终滴度表明, T_H1 介导的免疫应答被诱导, 这与提高的细胞免疫刺激相一致(Mbulaiteye et al., “H. Pylori-Infection and Antibody Immune Response in a Rural Tanzanian Population,”*Infect. Agent. Cancer* (2006), 其全部内容通过引用并入本申请)。相反, EcJ OMV与氢氧化铝(alum)阳性对照相同, 都具有更高的IgG1成分, 表明了与标准佐剂更加一致的略为逊色的应答。因此, 这些数据不仅表明EcN OMV能作为有效的抗原运载体用于刺激体液免疫, 并且额外提示了EcN在刺激通常难以获得的 T_H1 应答方面能够提供菌株依赖性的优势。

[0129] 遗憾的是, 尽管已表明的抗原特异性免疫球蛋白的高滴度可用于预测强烈的疫苗

应答,但却不一定意味着功能性的体液免疫。对功能性免疫球蛋白的更好的预测包括探测抗体对于靶抗原部分的成功调理/中和。由于主要的模型抗原GFP不能促进这样的分析,因此,其次表达了密码子优化的H1N1流感病毒血凝素作为ClyA-抗原融合蛋白,使其能够在EcN OMV表面展示。对BALB/c小鼠重复皮下接种,并且再次与ClyA-抗原铝胶[®] (Alhydrogel[®])混合物比较结果。在这一具体情况下,使用了H1N1流感病毒株A/PR8/34病毒并且进行了血凝抑制试验。来自已接种小鼠的血清成功封闭了小鼠血凝(图2D),其滴度与氢氧化铝(alum)阳性对照相当,表明功能性抗体的产生如所需的那样被保留。由于还希望知道在EcN OMV表面展示HA抗原是否会导致靶向表位的范围扩大(Chen et al., "Delivery of Foreign Antigens by Engineered Outer Membrane Vesicle Vaccines," Proc.Nat.Acad.Sci.USA 107:3099-3104 (2010),其全部内容通过引用并入本申请),因此还针对H3N2流感病毒株X31病毒进行了测试以检测交叉反应性。有趣的是,来自接种了EcN OMV的小鼠的血清比来自氢氧化铝(alum)对照小鼠的血清更加优异(图2D),这不仅表明了存在的调理性/中和性抗体的滴度足以支持产生保护性体液应答,而且还表明了滴度具有株间交叉保护的能力。

[0130] 对小鼠OMV诱导的获得性免疫的进一步分析揭示了有利的T细胞应答,其反应了EcN OMV的分支的体液应答。具体地,来自接种了ClyA-GFP EcN OMV的小鼠的脾来源的T细胞对抗原再刺激产生增殖应答,该应答与alum-阳性ClyA-GFP对照相当,并显著强于EcJ OMV引发的应答(图2E)。此结果整体上表明对初始T细胞群具有更加优越的免疫刺激性作用,并且直接与驱动假说一致,该假说认为EcN膜作为一种佐剂物质在积极靶向T细胞的能力上具有优势。此外,EcN而非EcJ OMV促使抗原再刺激的T细胞在IFN- γ 的分泌(图2F)及表达水平(图10,A和B)上都相似地显著升高。总而言之,这些结果强调了EcN OMV能够诱导强烈的细胞免疫应答,其与IgG2:IgG1比值提示的Th1应答具有较好的相关性。与IFN- γ 相比,IL-4(图2G)和IL-10(图2H,图10,C和D)水平降低,这进一步支持了EcN OMV诱导的有利的Th1偏向性应答。迄今,此Th1指示性的IFN- γ /IL-4差异水平在关于无佐剂的亚单位疫苗运载体的文献中鲜见报导,并且在关于基于OMV的系统的文献中从未见报导。重要的是,这还将其与标准佐剂如氢氧化铝(alum)区分开来,氢氧化铝产生的Th1/Th2混合应答通常不足以利用Th1免疫的优势来抗衡特定的细胞内病原体。还需要注意的是,与EcJ OMV和氢氧化铝(alum)-阳性对照相比,EcN OMV再刺激引起的IL-10分泌活性提高。考虑到已成功引起T细胞的IFN- γ 水平提高,这表明IL-10能起到补充性的及间接有益的独特作用以产生有利而无害的T细胞应答过程,例如在影响Th1/Th2平衡转换的同时控制潜在失控的炎症(Klier et al., "Immunostimulation of Bronchoalveolar Lavage Cells From Recurrent Airway Obstruction-Affected Horses by Different CpG-Classes Bound to Gelatin Nanoparticles," Vet.Immunol.Immunopathol. 147:79-87 (2011),其全部内容通过引用并入本申请)。总而言之,EcN OMV运载体诱导的抗原特异性的体液和细胞免疫表明,产生了保护性疫苗应答(Weeratna et al., "CpG DNA Induces Stronger Immune Responses With Less Toxicity Than Other Adjuvants," Vaccine 18:1755-1762 (2000),其全部内容通过引用并入本申请)以及更重要地,一种被调节成有利于靶向抗原的应答,对所述抗原最有效的中和是难以获得的Th1偏向性应答(Mosmann et al., "Th1 and Th2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties,"

Annu.Rev.Immunol.7:145-173 (1989),其全部内容通过引用并入本申请)。

[0131] 实施例3-EcN OMV强烈地引起了LPS-依赖/独立的先天性免疫

[0132] 在获得性免疫应答产生中一个关键性决定因素是先天免疫的参与程度(Schijns et al.,“Vaccine Immunopotentiators of the Future,”Clin.Pharmacol.Ther.82:750-755 (2007),其全部内容通过引用并入本申请)。虽然在宏观水平上发现OMV疫苗炎症与氢氧化铝(alum)对照炎症在持续时间和恢复时间上相似(图11),这样的发现并不一定反映出佐剂调动和募集局部免疫细胞的能力。因此,进一步探索了EcN OMV自体佐剂化通过初次皮肤炎症强烈诱导先天应答的能力。使用BALB/c小鼠耳朵皮下注射的模型以及随后的组织学分析,检测了由EcN和EcJ OMV两者产生的急性炎症应答。产生的炎症病理表现出令人惊讶的显著差异。在注射后30小时,与空白PBS对照相比(图3A),EcN OMV展示出大幅重塑真皮组织、引起局部血管肿胀、以及募集高密度淋巴细胞群(图3C)的能力。这样的反应是一种已确立的标志,表明佐剂物能刺激所需的先天免疫活化以产生较好的疫苗应答(Schijns et al.,“Vaccine Immunopotentiators of the Future,”Clin.Pharmacol.Ther.82:750-755 (2007) and Calabro et al.,“Vaccine Adjuvants Alum and MF59 Induce Rapid Recruitment of Neutrophils and Monocytes That Participate in Antigen Transport to Draining Lymph Nodes,”Vaccine 29:1812-1823 (2011),其全部内容通过引用并入本申请)。另一方面, EcJ OMV在等量的OMV剂量时刺激的炎症应答小得多(图3B)。总而言之,这些数据提示,EcN OMV的独特免疫应答对益生菌株的依赖性部分依赖于对先天免疫的强烈刺激。

[0133] 重要的是,OMV结合的LPS一般被认为是最重要的先天细菌性免疫调节剂,等剂量的OMV结合的LPS却对不同菌株得到不同的先天免疫刺激(Ellis et al.,“Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles,”Microbiol.Mol.Biol.Rev.74:81-94 (2010),其全部内容通过引用并入本申请)。此结果暗示EcN OMV的免疫调节机制不完全依赖于颇具毒性的细菌成分。因此,下一步研究了直接降低LPS诱导的内毒性是否会大量减弱EcN OMV存在下观察到的增强的先天应答。大肠杆菌中基因敲除lpxM基因使得MsbB脂A酰基转移酶失活,已知这样能最小化基于LPS的内毒性(Kim et al.,“Structural Modifications of Outer Membrane Vesicles to Refine Them as Vaccine Delivery Vehicles,”Biochim.Biophys.Acta. 1788:2150-2159 (2009),其全部内容通过引用并入本申请);因此,在EcN n1pl突变体中敲除了lpxM,以产生突变的EcN OMV(图12)并允许研究LPS对先天应答激活的影响。在进行同样的小鼠耳朵皮下注射之后,先前观察到的炎症病理被部分减弱了,但其最终仍反映出可观的炎症应答(图3D和图13)。因此,EcN作为OMV的来源,提供了在先天免疫刺激上非内毒性依赖的、益生菌株依赖的优势,这可能是由于存在有其它高度活跃的免疫刺激性膜态PAMP(Ellis et al.,“Naturally Produced Outer Membrane Vesicles from Pseudomonas aeruginosa Elicit a Potent Innate Immune Response via Combined Sensing of Both Lipopolysaccharide and Protein Components,” Infect.Immun.78:3822-3831 (2010),其全部内容通过引用并入本申请)以及存在由如上讨论的蛋白质组分析所提示的TLR激动剂。

[0134] 对EcN OMV巨噬细胞刺激(先天免疫的一个重要的细胞成分)的分析额外地支持了增强的、益生菌株依赖的先天免疫刺激机制。当骨髓来源的小鼠巨噬细胞(BMM)与等量的

包含ClyA-GFP的EcN和EcJ OMV孵育时,其显著地内吞了更多的前者(图 3E和图14)。这些结果说明EcN外膜在激活巨噬细胞吞噬上更具潜力。进一步分析了OMV孵育后BMM细胞因子的表达谱,额外地揭示了EcN和EcJ OMV诱导的IL-12 和IL-4表达上的显著性差异(图3F和图15)。具体来讲,相对于EcJ OMV,EcN OMV 刺激了IL-12而非IL-4的表达升高,提示EcN OMV在获得性免疫转变过程中,倾向于促进 T_H1 优势。这可能突出了通过优异的PAMP依赖的TLR交联导致的更好的靶向作用及随后的膜态及可溶性细菌因子的细胞内递送的协同偶联(Ellis et al., “Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles,” *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*74:81-94 (2010),其全部内容通过引用并入本申请)。EcJ OMV诱导的表达水平则相反,这反过来提示了对一种与 T_H2 偏向更一致的机制的促进(Hsieh et al., “Development of $TH1CD4^+$ T Cells Through IL-12Produced by Listeria-Induced Macrophages,” *Science* 260:547-549 (1993),其全部内容通过引用并入本申请)。这些结果确证了之前观察结果,即 T_H1 - T_H2 差异对于通过使用EcN OMV 而提供的机制性益处是至关重要的。

[0135] 实施例4-APC靶向及 T_H1 偏向性的活化促进了获得性免疫刺激

[0136] 在提高的炎性应答与强烈的获得性T细胞应答的发生之间一个重要的连接是从炎症位点迁移至局部淋巴结的、已装载抗原的树突细胞(DC)(Bevan, M.J., “Understand Memory, Design Better Vaccines,” *Nat. Immunol.*12:463-465 (2011),其全部内容在此参考并入。)。为了测定EcN OMV诱导的菌株依赖的免疫调节是否有益于DC依赖的T细胞活化,检测了与EcN及EcJ OMV孵育的骨髓来源的小鼠DC (BMDC)在脾来源的小鼠T细胞中诱导增殖的能力。相对于初始接种了EcJ OMV 的BMDC,初始接种了EcN OMV的BMDC显著增强了初始T细胞的活化(图3G和图16),表明选择EcN作为OMV来源增强了OMV有效接触并刺激抗原递呈细胞(APC)的能力。此外,EcJ OMV对照也能通过BMDC依赖的活化刺激T细胞,尽管刺激程度低于EcN OMV,但这也帮助排除了它们引起DC依赖的T细胞抑制的可能性(Trebichavsky et al., “Modulation of Natural Immunity in the Gut by Escherichia coli Strain Nissle 1917,” *Nutr.Rev.*68:459-464 (2010),其全部内容通过引用并入本申请),这种可能本来会使得关于菌株依赖的 T_H1 / T_H2 -偏向性差异难以以下结论。

[0137] 综上所述,EcN OMV对巨噬细胞和DC两者刺激的增强提供了强有力的证据,表明在专职APC活化增强中的PAMP依赖性机制是稳健诱导针对重组抗原的获得性免疫的至关重要的因素。这些数据引导我们考虑EcN OMV的免疫调节能力可能是利用了同样提高的与第三大类APC,即B细胞间的相互作用。直接刺激B细胞、进而直接递呈表面展示的抗原的能力,也会帮助解释在使用H1N1HA作为模型抗原时观察到的增强的株间交叉保护。相应地,检测了通过与EcN和EcJ OMV孵育诱导的小鼠脾B细胞的增殖。此分析显示,由于EcN OMV能在没有T细胞辅助因子存在的情况下刺激B细胞增殖(图3H和图17),EcN OMV从而具有独立于T细胞的B细胞活化的重要潜能。这样的活化在病原体感染中并不少见(Vos et al., “B-cell Activation by T-Cell-Independent Type 2Antigens as an Integral Part of the Humoral Immune Response to Pathogenic Microorganisms,” *Immunol.Rev.*176:154-170 (2000),其全部内容通过引用并入本申请)并且有可能是由于存在EcN PAMP以及OMV纳米级亲和力的增强(Singh et al., “Nanoparticles and Microparticles as Vaccine-Delivery Systems,” *Expert Rev.Vaccines.*6:797-808 (2007),其全部内容通过引用并入

本申请)。有趣的是,此现象与EcJ OMV对照在活化B细胞上的能力形成强烈反差,后者完全依赖于加入的T细胞辅助因子IL-4和抗CD40。这样一个强烈的反差进一步强调了EcN为大肠杆菌OMV抗原运载体提供的重要益处,即通过补充性的独立于T细胞的机制,提供强烈的体液免疫,该机制能平行地,并且可能是独特地,增强 T_H1 偏向性的获得性应答的建立。

[0138] 实施例5-约尼氏病疫苗

[0139] 目前,疫苗研究的重要前沿之一是针对复杂的细胞内病原体设计疫苗,对于所述细胞内病原体,哺乳动物免疫系统通常很难将其清除。一些病原体,如原生寄生虫的疟原虫(Plasmodium)家族,当其在哺乳动物宿主体内进行生命周期时,于相当短的时间内利用细胞内逃避以避免免疫系统,并在所在的组织内造成严重的、通常致命的伤害(Girard et al., "A Review of Human Vaccine Research and Development: Malaria," *Vaccine* 25: 1567-80 (2007), 其全部内容通过引用并入本申请)。其他如分枝杆菌(Mycobacterium)家族(以在人类体内引起肺结核最出名),利用在巨噬细胞内的细胞内逃避休眠数十载,随后携带着病原性重新出现(Baldwin et al., "The Importance of Adjuvant Formulation in the Development of a Tuberculosis Vaccine," *Journal of Immunology* 188:2189-97 (2012); Noss et al., "Toll-Like Receptor 2-Dependent Inhibition of Macrophage Class II MHC Expression and Antigen Processing by 19-kDa Lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis," *The Journal of Immunology* 167:910-8 (2001); and Chen et al., "Immune Responses in Mice to Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis Following Vaccination with a Novel 74F Recombinant Polyprotein," *Vaccine* 26:1253-62 (2008), 其全部内容通过引用并入本申请)。不管感染的时间点如何, T_H1 偏向性免疫应答最能抵抗细胞内逃避,并且已有理论表明对于病原体如疟原虫(Plasmodium)和分枝杆菌(Mycobacterium),疫苗一直失败的一个主要因素是缺乏足够的抗原特异性 T_H1 免疫诱导。因此,推测认为EcN OMV平台可能是针对这样的非病毒性细胞内病原体的疫苗的理想候选。

[0140] 选择了鸟分枝杆菌亚种副结核分枝杆菌(Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis, MAP)作为初步模型病原体来测试此应用,该菌在牛体内引起约尼氏病(Chen et al., "Immune Responses in Mice to Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis Following Vaccination with a Novel 74F Recombinant Polyprotein," *Vaccine* 26:1253-62 (2008), 其全部内容通过引用并入本申请)。约尼氏病实质上是人结核病(TB)的牛族类似病,考虑到全世界目前有数亿人口已感染有TB并且每年有数百万新的慢性活性病例发生,因此,用于研究的约尼氏病是一个引人注意的且高度相关的动物模型。测试了BALB/c小鼠体内基本的抗抗原免疫应答。然而,对于选择的抗原,采用了稍微不同的方式。扩大了对平台的重组型亚单位抗原运载体应用的测试范围并使用了融合的多聚蛋白抗原MAP 74F(Chen et al., "Immune Responses in Mice to Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis Following Vaccination with a Novel 74F Recombinant Polyprotein," *Vaccine* 26:1253-62 (2008), 其全部内容通过引用并入本申请),而不是简单地选择MAP的天然抗原(如同H1N1HA)。74F包含 MAP3527与MAP1519的区段融合,本研究将其包含进来是为了试着证明可以利用 ClyA-抗原表达途径通过包含多种抗原来增强疫苗的抗原多价性。其次,选择74F将 ClyA外部化C-末端融合部分的能力推

向其边界,因为74F的长度为803个氨基酸,远大于最初模型抗原GFP的242个氨基酸。ClyA的作为外部化转运体的能力极有可能存在某个上限;较大的多聚蛋白例如74F可有助于探测此上限。

[0141] 该实验中得到的初始免疫数据显示出了希望。体液性(图18A-18C)和细胞性(图18D-18F)数据清楚地表明,尽管74F多聚体蛋白具有较大尺寸和复杂性,但是EcN OMV仍然能够将其作为抗原递送并促进抗原特异性免疫的发生。需要注意的是,相对于alum,确实发生了轻微的应答降低,在使用H1N1HA时没有看到该应答降低。在此阶段,很难确定这是由于74F抗原本身的性质、或是由于ClyA尺寸或一些其它的抗原相关因素使得EcN突变体通过ClyA在表面展示该抗原的能力降低、或者是否该实验本身的一些附加因素也参与其中。最重要地,可能此数据仍表明对74F抗原应答的强烈程度足以值得在相关的动物激发模型中作进一步的研究,尽管将来对涉及甚至更大抗原的EcN OMV应用可能需要额外的注意。

[0142] 实施例6-花生过敏疫苗

[0143] 虽然病原体疫苗靶点毫无疑问是重组型亚单位抗原运载体平台例如EcN OMV的最明显的应用,但是他们并非是唯一的应用。的确,先不谈疫苗的经典医学定义,即对病原性生物感染的预防性免疫治疗,在本质上疫苗递送平台更简单地则是一种靶向的免疫调节剂。也就是说,其目的在于以有利的方式改变针对目标外源成分的免疫应答。疫苗工程领域当然没有忘记此考虑。疫苗学家们,以及一些甚至更专业的研究 PLP的分子工程师们,已经研究了针对从癌症(Bryan, J.T., "Developing an HPV Vaccine to Prevent Cervical Cancer and Genital Warts," *Vaccine* 25:3001-6 (2007) and Ko et al., "Clinical Studies of Vaccines Targeting Breast Cancer," *Clinical Cancer* 9:3222-3234 (2003), 其全部内容通过引用并入本申请), 到阿尔茨海默氏症, 到尼古丁(O'Hagan et al., "Recent Advances in the Discovery and Delivery of Vaccine Adjuvants," *Nature Reviews Drug Discovery* 2:727-35 (2003) and Singh et al., "Nanoparticles and Microparticles as Vaccine-Delivery Systems," *Expert Review of Vaccines* 6:797-808 (2007), 其全部内容通过引用并入本申请)的所有方面的疫苗。尽管这样用途的疫苗目前没有进入市场(虽然一种用于治疗白血病的疫苗(Zhang et al., "A Phase-I Clinical Trial of Active Immunotherapy for Acute Leukemia Using Inactivated Autologous Leukemia Cells Mixed with IL-2, GM-CSF, and IL-6," *Leukemia Research* 29:3-9 (2005), 其全部内容通过引用并入本申请)可能马上成为FDA认证的第一例), 但其发展代表了疫苗工程更广阔的前景—通过靶向相关分子, 利用免疫系统来改变非病原性疾病。非病原体接种的首要靶点是过敏。这代表了一种可以理解的中间立场: 过敏是一种非病原性疾病, 免疫系统在基础水平上明显地高度参与其中, 并且用于治疗过敏的免疫调节法是常见的。

[0144] 过敏接种的模型将会是对花生(*Arachis hypogaea*), 或花生(peanut)的过敏。目前有1-2%的美国人经受着轻度至严重的花生过敏, 此数目在过去几十年间以惊人的速度大幅上升。花生接触, 甚至吸入微量的花生残渣, 可以是致命的, 很多学校街区已经将含花生的食物公开作为健康危害品而禁用。因此, 它代表了高影响力的疫苗靶点(Roy et al., "Oral Gene Delivery with Chitosan--DNA Nanoparticles Generates Immunologic Protection in a Murine Model of Peanut Allergy," *Nature Medicine* 5:387-91

(1999); Pons et al., "Soy Immunotherapy for Peanut-Allergic Mice: Modulation of the Peanut-Allergic Response," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114:915-21 (2004); and Mcdermott et al., "Contribution of Ara h 2 to Peanut-Specific, Immunoglobulin E-Mediated, Cell Activation Clinical and Experimental Allergy," *Clinical and Experimental Allergy* 37:752-763 (2007), 其全部内容通过引用并入本申请)。由于大部分现有疗法涉及比较粗糙的方法, 通过不同的测定的抗原接触而脱敏, 因此结果也是极度的因人而异, 并且很不幸地, 总的来说该结果是不足的。EcN OMV 花生疫苗将包括一种非常不同的机制。基于由研究哮喘的免疫学家首先提出的理论 (Bickert et al., "Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Suppresses Allergen-Induced Th2 Responses in the Airways," *International Archives of Allergy and Immunology* 149:219-30 (2009), 其全部内容通过引用并入本申请), 如果免疫系统对过敏原的 Th1 偏向性应答强烈到能关闭 IgE 介导的超敏反应 (其为大部分过敏性攻击的特征), 尤其如果在接触过敏原后, Th1 T 细胞能与升高的整体 IL-10 分泌量同步进行作用, 则似乎可以避免先天性对过敏的倾向。

[0145] 在 BALB/c 小鼠中进行了抗原特异性免疫原性试验。选择花生蛋白 Ara h 2 作为抗原亚单位靶点 (Mcdermott et al., "Contribution of Ara h 2 to Peanut-Specific, Immunoglobulin E-Mediated, Cell Activation Clinical and Experimental Allergy," *Clinical and Experimental Allergy* 37:752-763 (2007), 其全部内容通过引用并入本申请), 其性质决定了这是首要的步骤。Ara h 2 是一种真核植物蛋白, 其在细菌中有不能被充分表达的风险, 或者, 即使能被表达, 其折叠方式也有可能不能适于产生有意义的抗抗原的特异性免疫。通过 Invitrogen 的 GeneArt® GeneOptimizer® 算法对 Ara h 2 序列进行了密码子协调化以帮助确保成功。将得到的序列表达成 ClyA-融合蛋白, 并如之前的操作进行接种, 与 alum 和花生蛋白 (RPP) 的阳性对照对比。然后如前述测试了针对 RPP, 即未纯化的重组型 Ara h 2, 的免疫应答以确保所需的抗抗原的免疫性得到了保留。正如所希望的, EcN OMV 诱导的体液 (图 19A-19C) 及细胞 (图 19D-19F) 免疫性同使用 GFP 作为模型抗原时的最初观察是相当的, 表明至少在某些情况下, 密码子协调化足以保留经 EcN OMV 递送的真核生物蛋白的抗原性, 但还需要进一步研究才能对这种结果是否明确来自于保留的三级抗原结构下结论。此外, 本研究中 Ara h 2 特异性的免疫应答显然足以值得在鼠类超敏模型上的进行更有意义的试验。

[0146] 实施例 1-6 的讨论

[0147] 虽然益生菌数十年来一直是免疫学领域的兴趣所在, 但在医学应用领域它还有着某种未解之谜。对其潜在的免疫调节能力的利用已经主要限于基于营养性补充的手段来控制临床症状如肠易激综合症及一般的过敏 ((Trebichavsky et al., "Modulation of Natural Immunity in the Gut by *Escherichia coli* Strain Nissle 1917," *Nutr. Rev.* 68:459-464 (2010), 其全部内容通过引用并入本申请)。然而, 近年对其作用机理的研究正在蓬勃发展, 并且关于其局部 (Sturm et al., "Escherichia coli Nissle 1917 Distinctively Modulates T-Cell Cycling and Expansion via Toll-Like Receptor 2 Signaling," *Infect. Immunol.* 73:1452-1465 (2005) and Guzy et al., "The Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 Induces Gammadelta T Cell Apoptosis via

Caspase- and FasL-Dependent Pathways,”*Int.Immun.*20:829-840 (2008),其全部内容通过引用并入本申请)及整体(Trebichavsky et al.,“Modulation of Natural Immunity in the Gut by Escherichia coli Strain Nissle 1917,”*Nutr.Rev.*68:459-464 (2010), which is hereby incorporated by reference in its entirety,其全部内容通过引用并入本申请)改变机体免疫的能力的新发现表明他们能够保持关键免疫细胞的积极靶向与拮抗间复杂的平衡关系,并同时抑制那些会加剧积极应答的成分。这样的复杂性通常标志着这些有机体已进化到能与宿主免疫系统进行错综复杂的且有效的相互作用,并且也正是这种复杂性使得益生菌在具有研究吸引力的同时却在医学领域难以应用。

[0148] 本研究中,评价了分离益生菌的PAMP-驱动的免疫刺激性性质以用于重组型亚单位疫苗递送应用的OMV生产过程的效率。OMV是来源于细菌的纳米级蛋白脂质体,其天然富含从LPS和BLP到腔隔离的“vita-PAMPs”免疫活性成分,从而形成了有趣的病原体样颗粒—即出于所有的实际意图及目的,能欺骗免疫系统使之将颗粒认作是活化的并且危险的病原体的颗粒。OMV具有独特能力,能结合使用特定的病原体作为递送载体的生物分子学优势与纳米级递送固有的优势例如通过配体依赖的表面受体交联而增强细胞摄入(Mann et al.,“Lipid Vesicle Size of an Oral Influence Vaccine Delivery Vehicle Influences the Th1/Th2Bias in the Immune Response and Protection Against Infection,”*Vaccine* 27:3643-3649 (2009),其全部内容通过引用并入本申请)。通过使用融合物-嵌合体手段生产结合了靶向膜的ClyA的外源性抗原,能够创造出一种在表面展示抗原的疫苗运载体颗粒,所述运载体颗粒能作为一种单一成分、自体佐剂化的实体在简单的细菌培养生产过程中生产,并充分利用细菌OMV的有吸引力的疫苗运载体特点。

[0149] 总的来说,本发现表明这些EcN OMV产生了针对重组型抗原相对罕见的获得性应答,当前的佐剂技术无法持续地和/或简单地实现这种应答:即比单独的抗原所能产生的应答超过100倍的功能性抗抗原的体液应答,这表明该应答的强度足以产生免疫性(Weeratna et al.,“CpG DNA Induces Stronger Immune Responses with Less Toxicity than Other Adjuvants,”*Vaccine* 18:1755-1762 (2000),其全部内容通过引用并入本申请),而且还伴随有T细胞应答,其强度及Th1特异性表明产生了细胞免疫,该细胞免疫的水平能够大大增强对细胞内病原体的应答效率(Mosmann et al.,“TH1 and TH2Cells:Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties,”*Annu.Rev.Immunol.*7:145-173 (1989),其全部内容通过引用并入本申请) 这允许本申请所述的EcN OMV疫苗运载体填补疫苗工程领域的重要缺口,从而解决关键的且未满足的对实用且广泛适用的平台的临床需求,该平台用以创造疫苗以针对多种备受瞩目的细胞内病原体。此外,通过检测这些OMV在细胞水平上与先天及获得性免疫直接的相互作用的方式,揭示了其稳健及多方面刺激的独特能力,该能力不仅依赖于细菌OMV的整体上的性质,而且特异地反映了所述平台利用EcN细菌特定优势的能力。虽然没能充分表征分离自EcN外膜的具体的分子通路,但所述发现仍代表了利用益生菌株的免疫刺激能力用于重组型亚单位疫苗应用的首次成功的尝试。通过从高度免疫活化的、然而却也是完全免疫抑制的细菌菌株中分离靶向佐剂成分,生成了一种抗原递送系统,其能够稳健并完全地刺激先天性和获得性免疫。

[0150] 在改造及优化细菌OMV作为疫苗递送运载体的用途时,特别希望揭示当本领域从

利用整体病原体向重视分离的抗原进行明确的转变时,如何能无需牺牲全面的抗原-宿主应答的众多优势。之前已经确立了OMV作为外源性抗原运载体,是一种有前景的疫苗技术(Chen et al.,“Delivery of Foreign Antigens by Engineered Outer Membrane Vesicle Vaccines,”*Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 107:3099-3104(2010) and Muralinath et al.,“Immunization with Salmonella Enterica Serovar Typhimurium-Derived Outer Membrane Vesicles Delivering the Pneumococcal Protein PspA Confers Protection Against Challenge with Streptococcus pneumonia,”*Infect.Immun.*79:887-894(2011),其全部内容通过引入并入本申请)因此,本研究的目的是建立合理改造过的基于OMV 运载体的能力,从而在整体病原体疫苗手段仍然保留的一些独有的更复杂的优势以及生物分子性纳米运载体的更加普遍的应用平台之间弥合差距。改造的OMV能够分离独特的、菌株依赖的自体佐剂化作用并且靶向地使得免疫性强烈偏向 T_H1 应答,这是本研究的核心发现,但这只是被阐明的多个优势中的一个。例如,当考虑到模型抗原是以佐剂性OMV颗粒上的功能性折叠的“表面抗原”的形式而额外递呈至免疫系统时,观察到的疫苗运载体对强烈的体液性的、 T_H1 指示性的免疫的诱导是特别有意义的。不同于很多最近开发的被设计用来增强 T_H1 型免疫诱导的替代性佐剂系统(Schijns et al.,“Vaccine Immunopotentiators of the Future,”*Clin.Pharmacol.Ther.* 82:750-755(2007) and Sanders et al.,“ISCOM-Based Vaccines:The Second Decade,”*Immunol Cell Biol.*83:119-128(2005),其全部内容在此参考并入。),EcN来源的OMV 能够更强地针对整个范围的线性表位(通过MHC促进的T细胞受体递呈)以及构象表位(通过直接表面递呈至B细胞受体)产生识别性免疫。在过去,该领域被迫将这样一种优势作为必要的损失而基本放弃,以继续研究整体病原体。由于所述平台正是来源于恰好负责细菌天然和多样的抗原递呈的生物分子物质,所以这个优势被保存了下来,并且已表明此优势对流感病毒HA的交叉保护的提高很可能超过传统的金标准佐剂。

[0151] 此外,这个疫苗运载体改造手段并不仅仅保留与整体病原体研究的优势-它还额外提供了途径来合理调和及优化抗原递呈以及被靶向的免疫应答本身。通过证明平台同时适用于传统的细菌表达的外源蛋白、GFP、和免疫学上重要的病毒抗原、流感病毒 HA,已经证明了简单的蛋白工程技术可以成功耦合细菌刺激的免疫应答和非细菌性病原体。此外,关于LPS内毒素突变的发现表明,通过生物分子工程能够调和内毒素依赖性至最低水平,从而降低疫苗的副作用但不牺牲益生菌株来源的OMV的先天免疫刺激优势,这赋予了所述平台与其它细菌性来源的技术相比有影响力的优势。合理的多价调整的额外渠道-例如通过额外的囊泡化控制的基因失调产生的多价抗原鸡尾酒包涵体(Fischer et al.,“Polyvalent Vaccines for Optimal Coverage of Potential T-Cell Epitopes in Global HIV-1Variants,”*Nat.Med.*13:100-106(2007),其全部内容通过引用并入本申请),病原体靶向的糖基化(Valderrama-Rincon et al.,“An Engineered Eukaryotic Protein Glycosylation Pathway in Escherichia coli,”*Nat.Chem.Biol.* 8:434-436(2012),其全部内容通过引用并入本申请),以及甚至颗粒尺寸的调整(Mann et al.,“Lipid Vesicle Size of an Oral Influenza Vaccine Delivery Vehicle Influences the T_H1/T_H2 Bias in the Immune Response and Protection Against Infection,”*Vaccine* 27:3643-3649(2009),其全部内容通过引用并入本申请)-进一步推动了 this 平台的多种潜能,以促进疫

苗工程由制造简单的刺激性颗粒转变为利用更先进且全面的对病原体身份识别的分子模拟。

[0152] 本申请的研究为细菌性来源的病原体样颗粒疫苗递送运载体在较广范围的疫苗应用上的效能建立了示例。通过利用益生菌有效的并广泛整合的免疫刺激,并将它与细菌的被广泛利用的重组表达来自疫苗靶点几乎所有分类的外源抗原的功能无缝相融,已经创造了一种平台,它只需要替换目的抗原性基因就能产生深远的临床影响。通过这种方式,非感染性免疫调节与多样、合理的分子改造——不牺牲简单并可扩展的生产能力——的独特组合,有望能够提供模板,从之前被忽视的生物资源中开发出有效的新疫苗。

[0153] 尽管本申请详细描述和披露了优选的实施方式,但是在不偏离本发明的精神的情况下,各种修饰、添加、取代等对于相关领域技术人员而言是显而易见的,因此这些都被视为在权利要求书中所限定的本发明范围内。

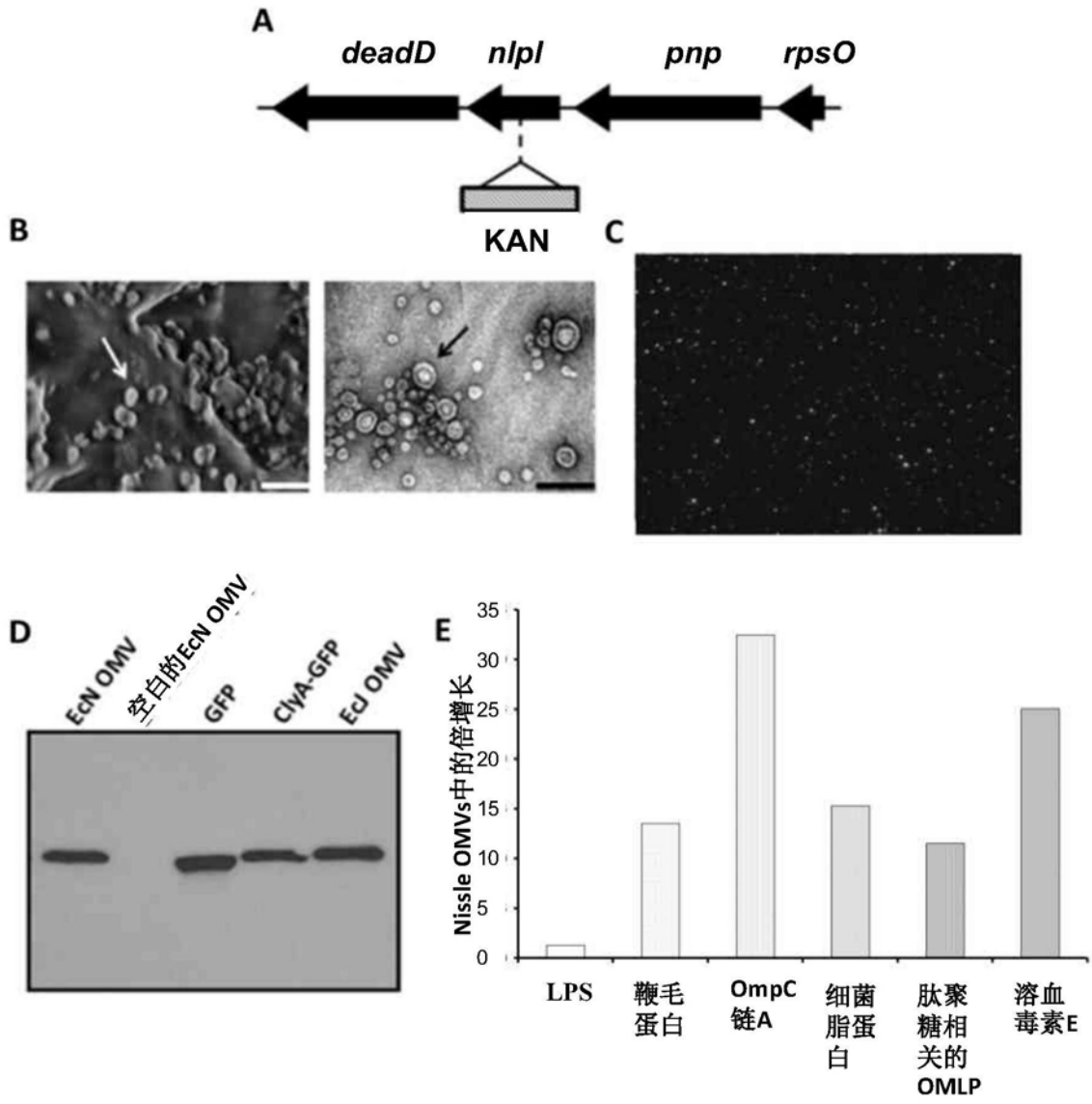


图1

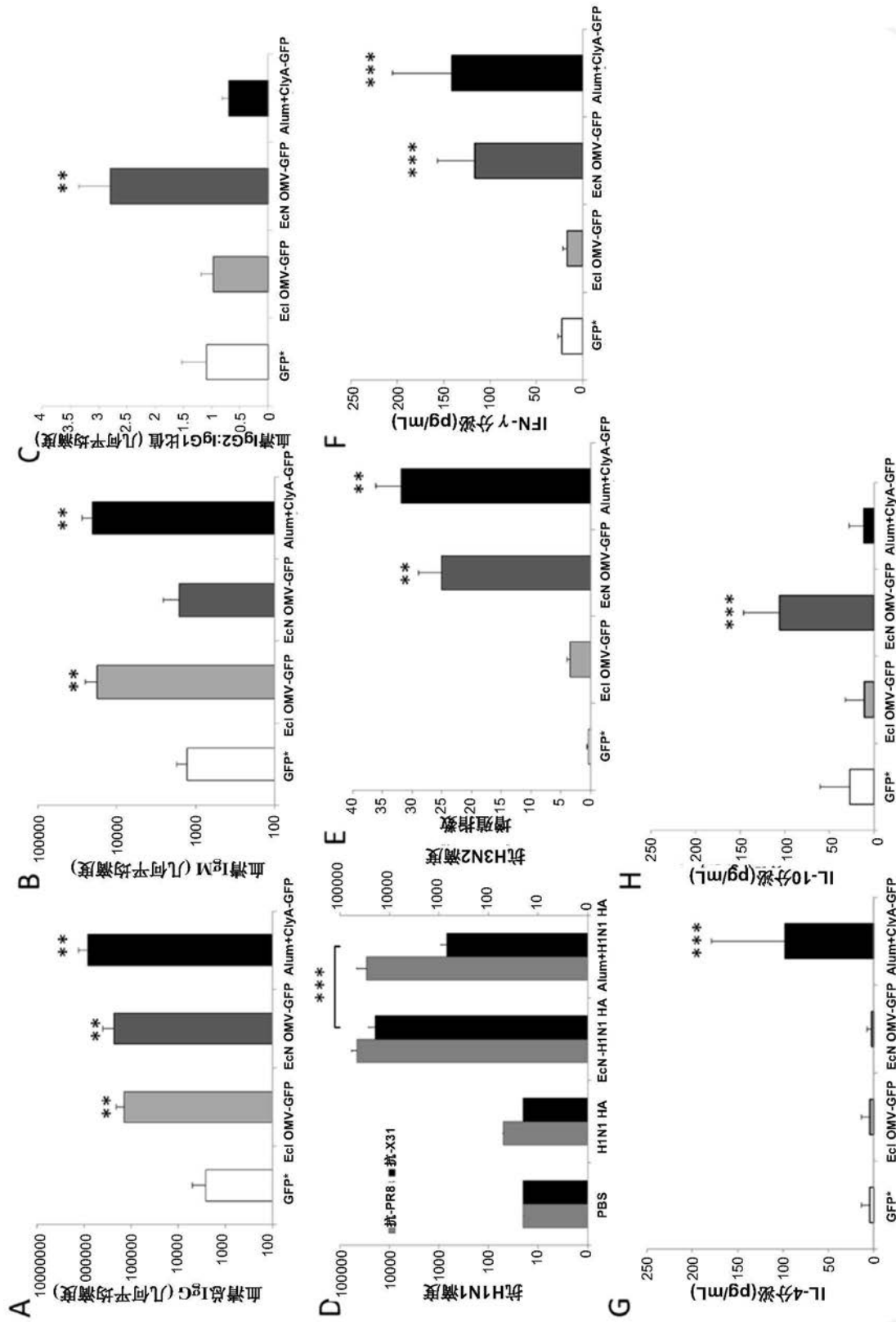


图2

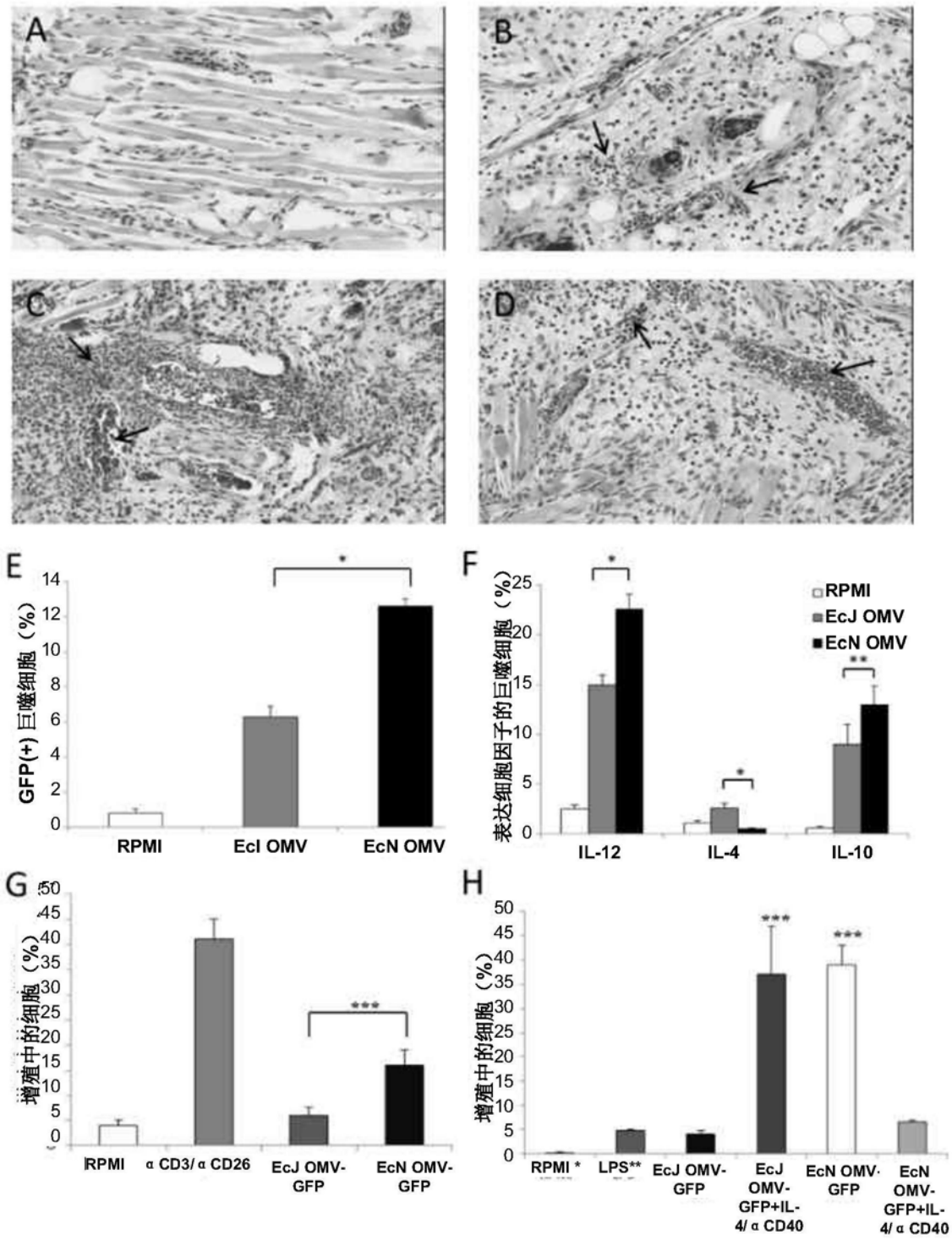


图3

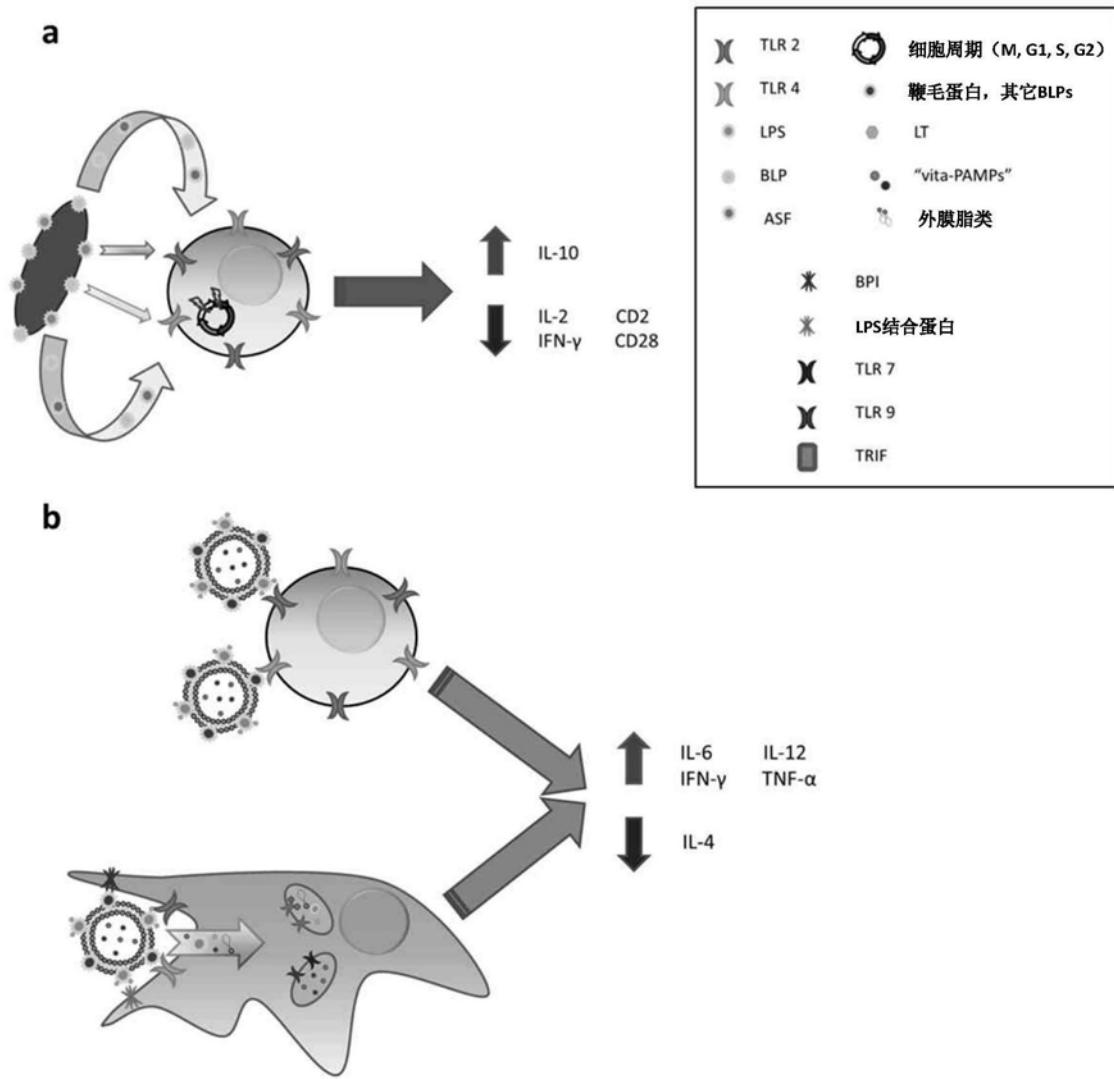


图4

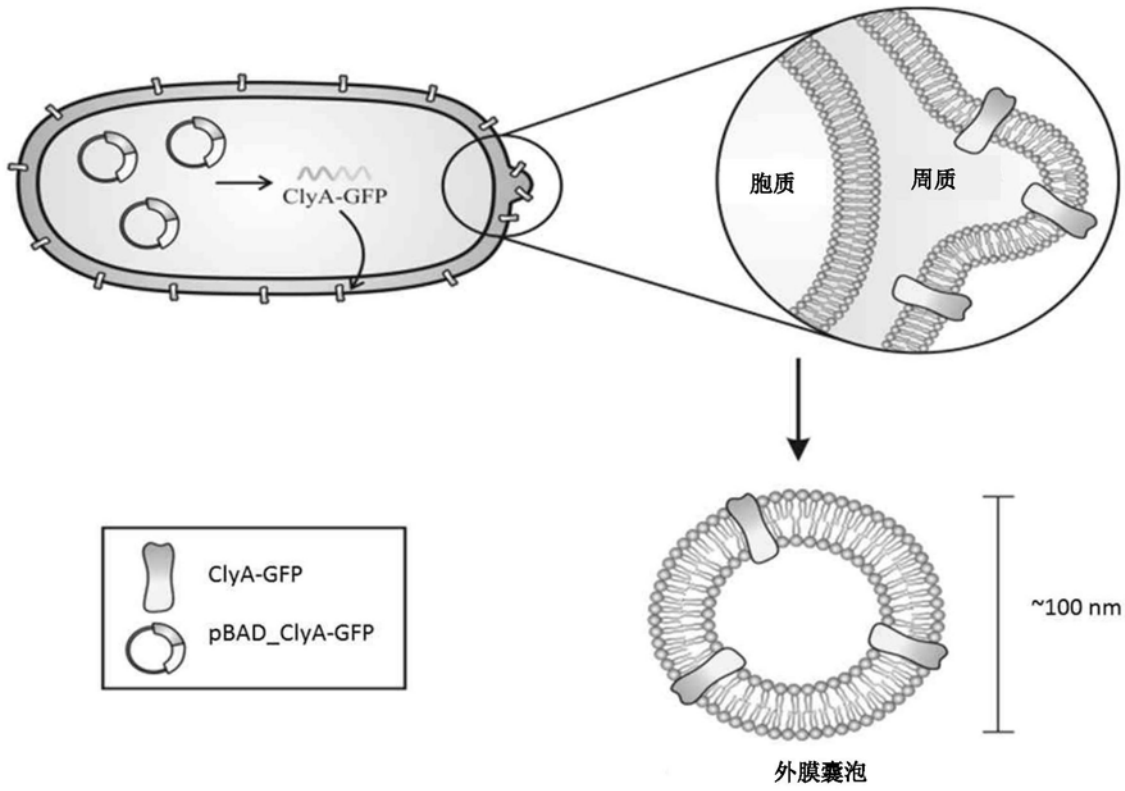


图5

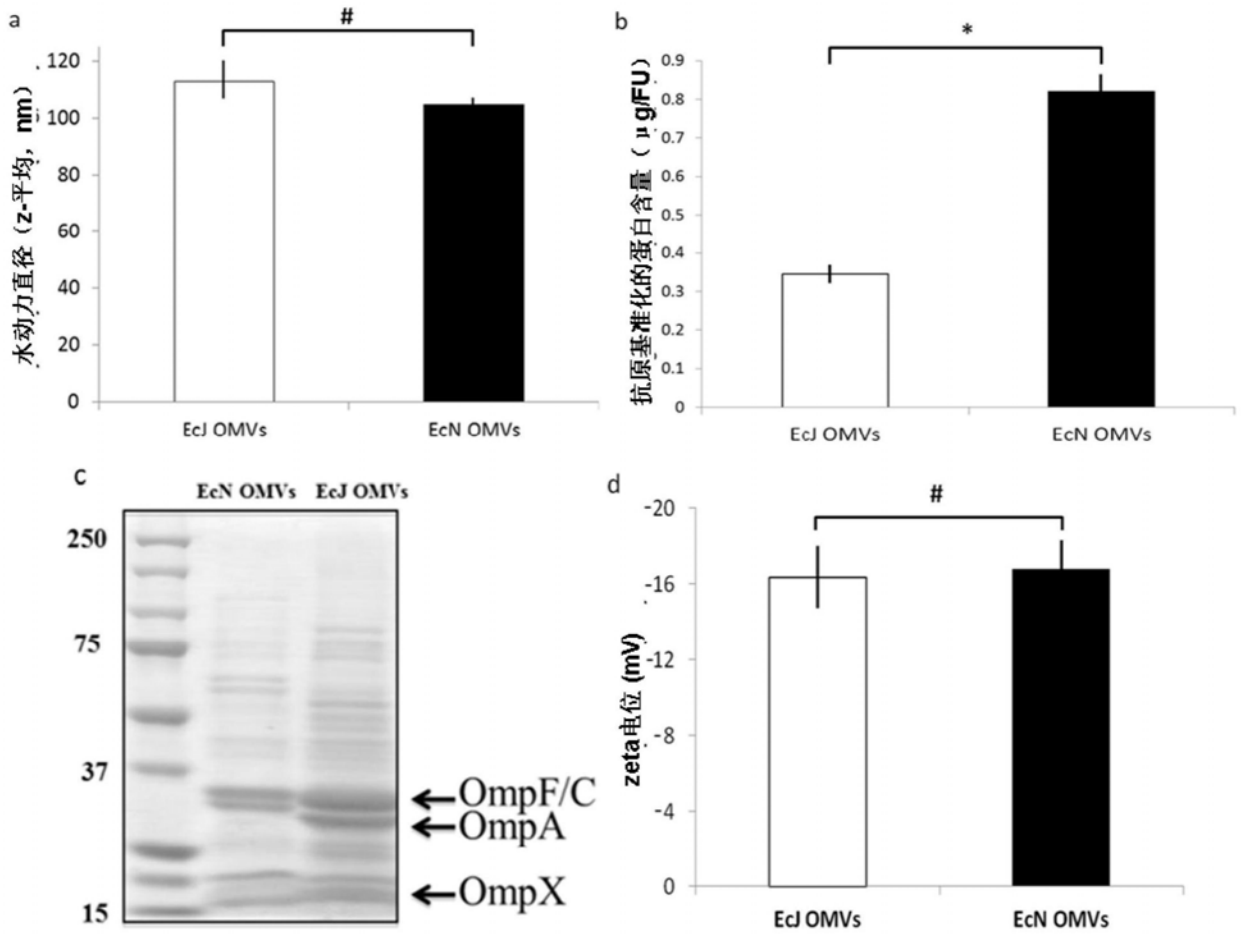


图6

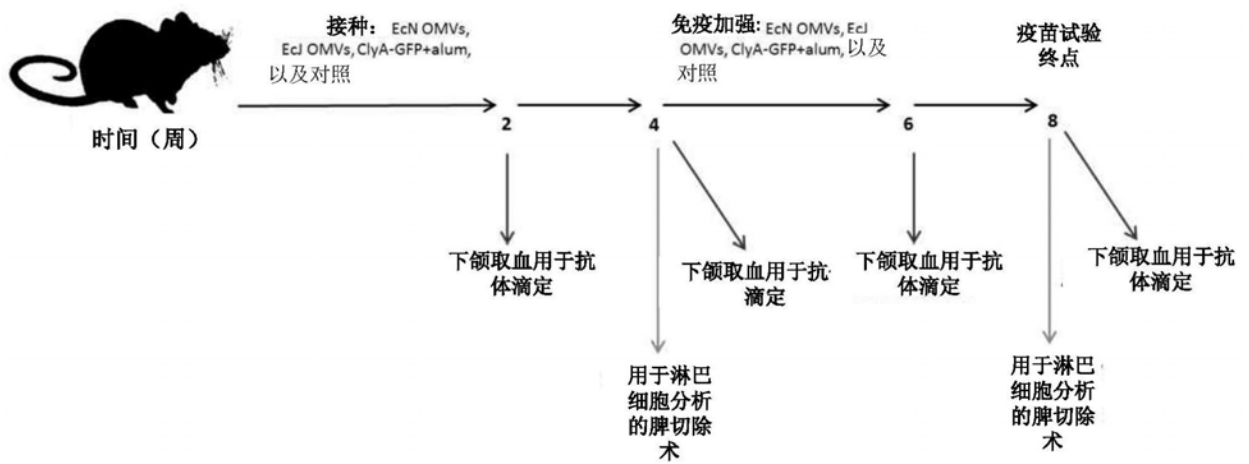


图7

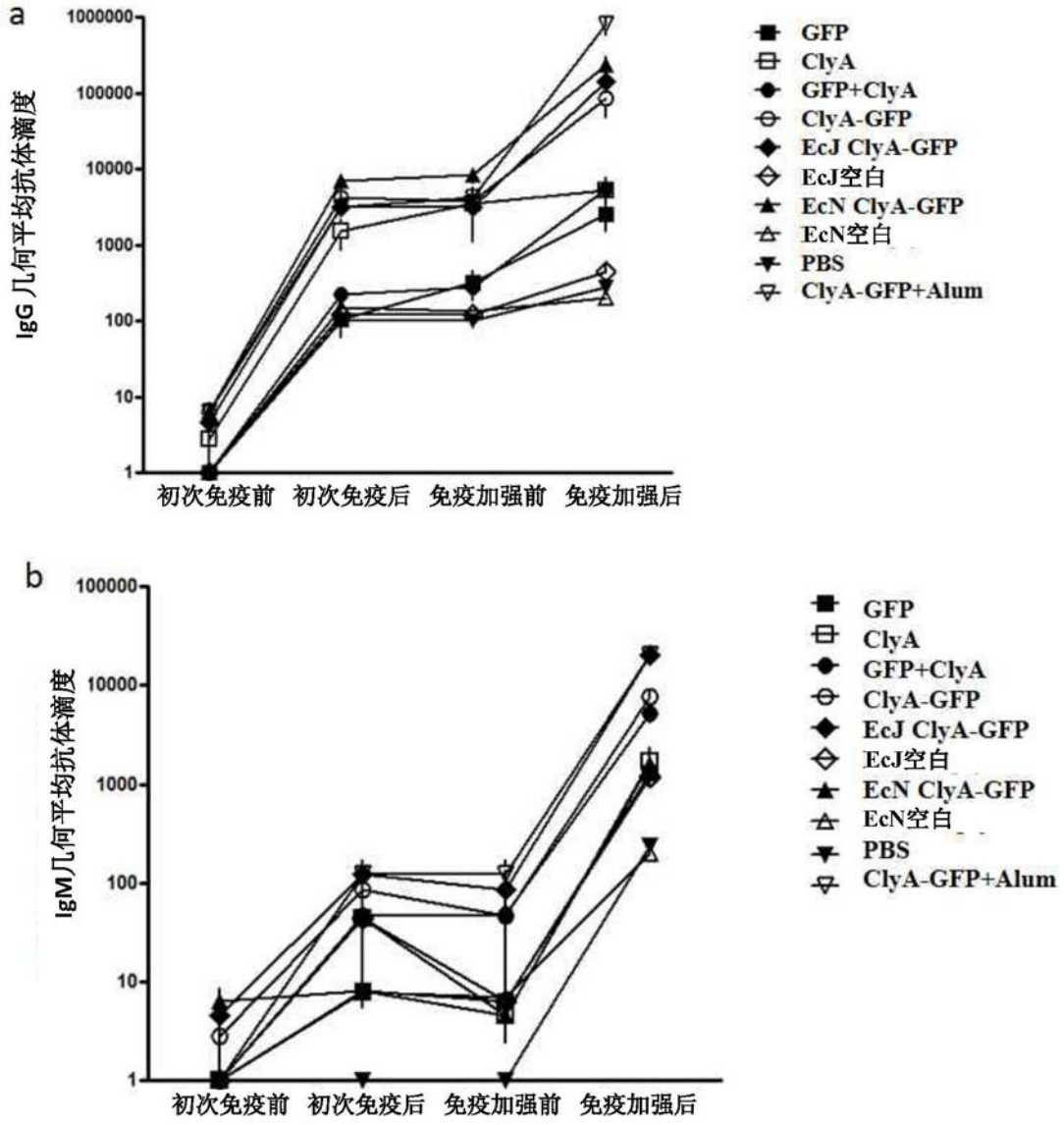


图8

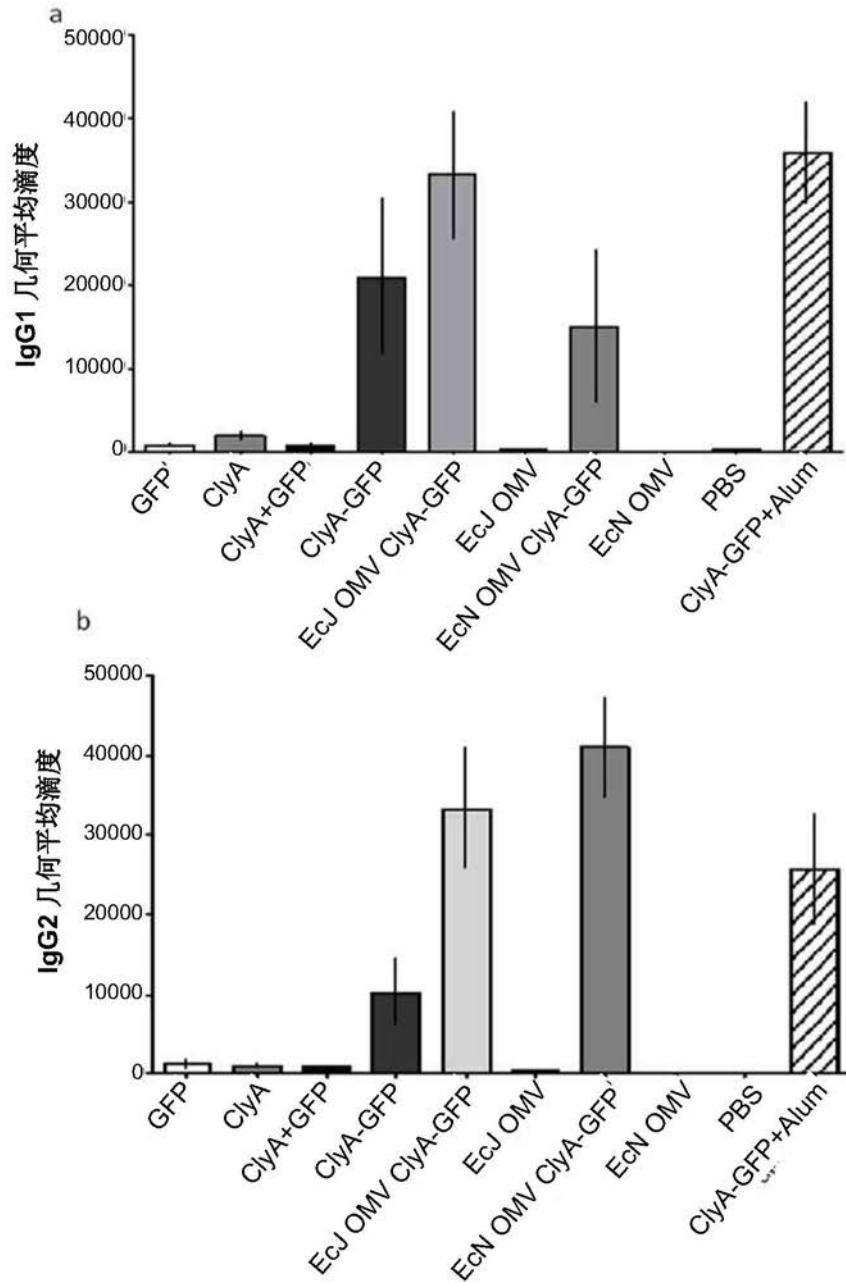


图9

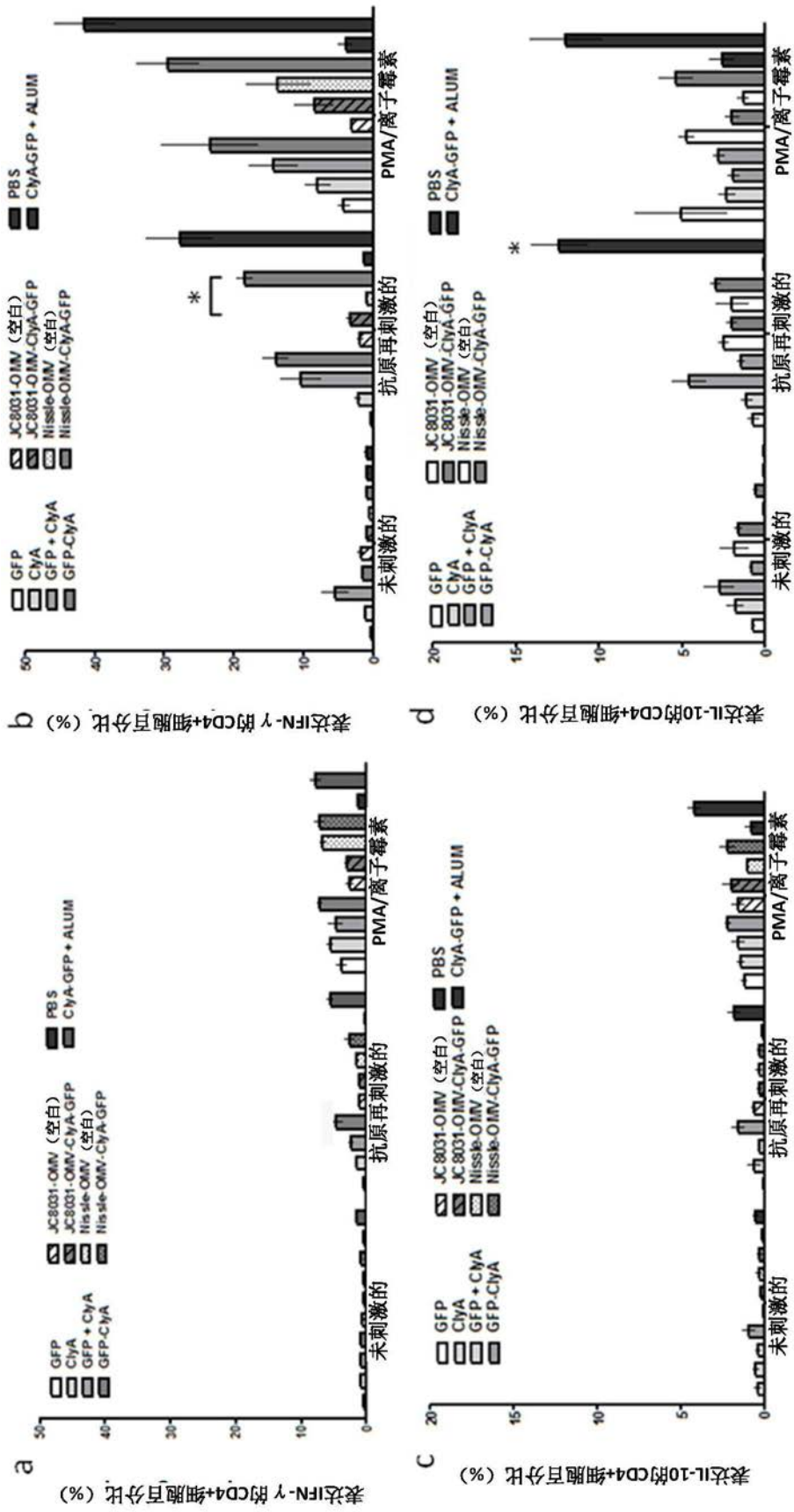


图10

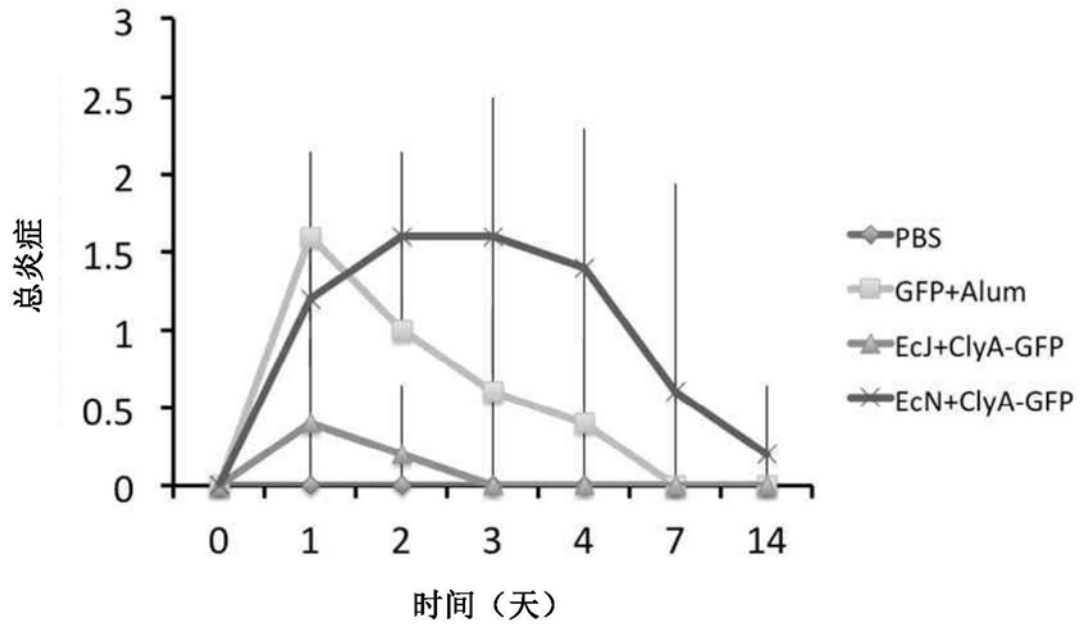


图11

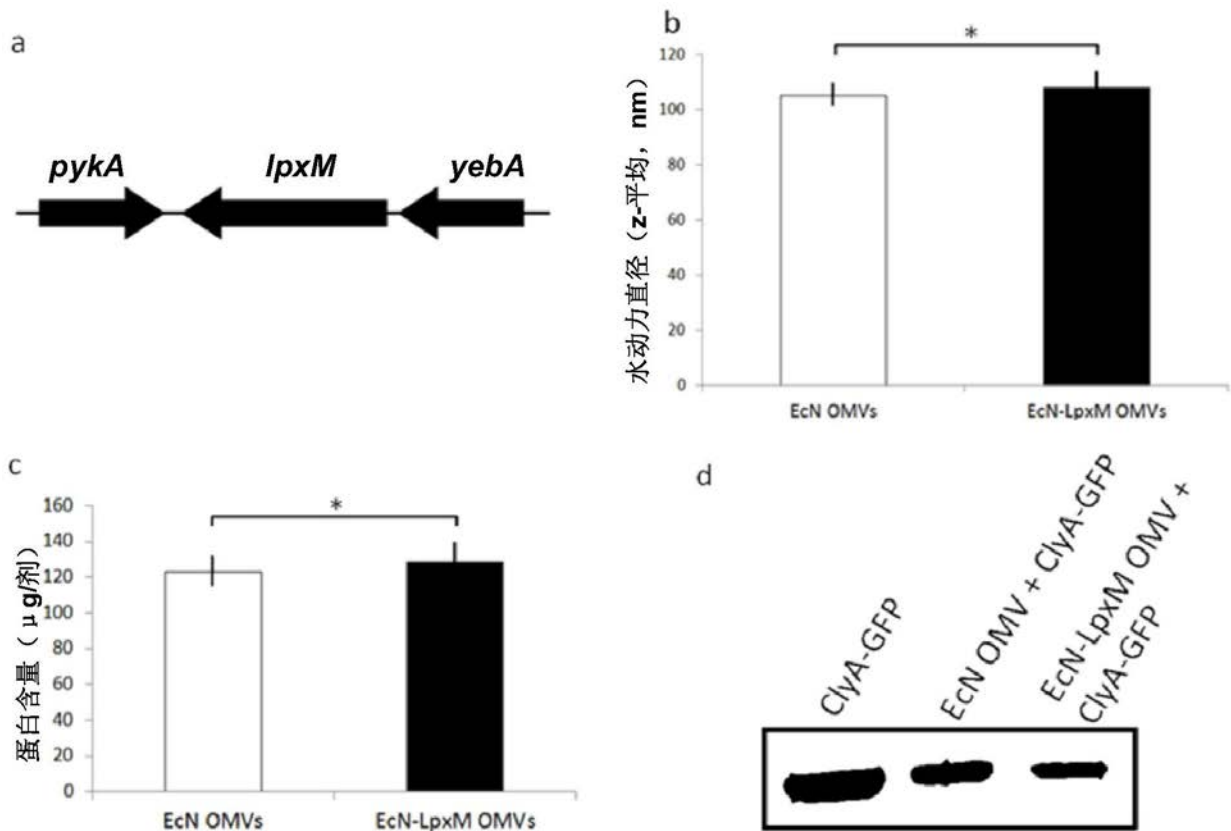


图12

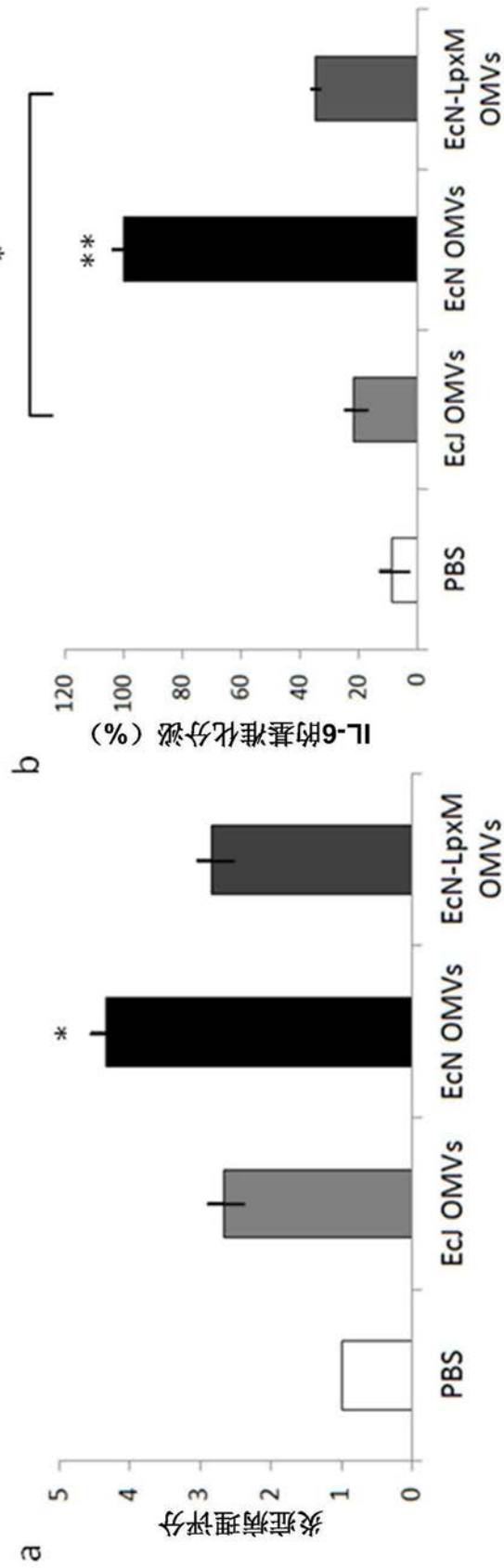


图13

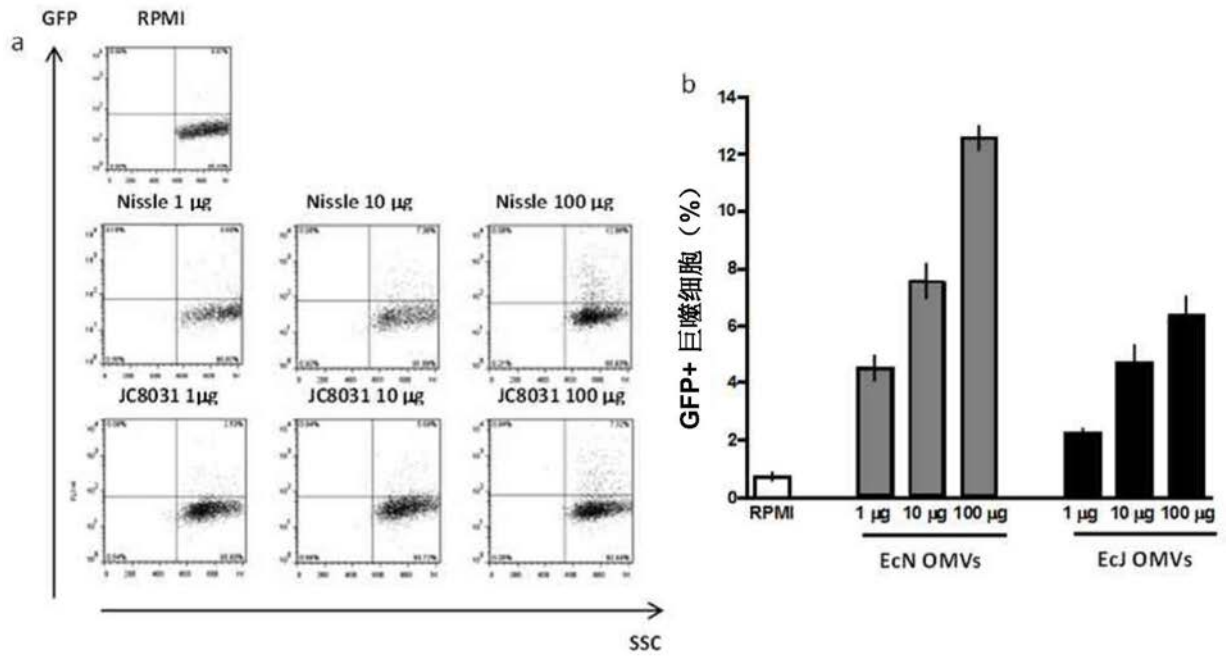


图14

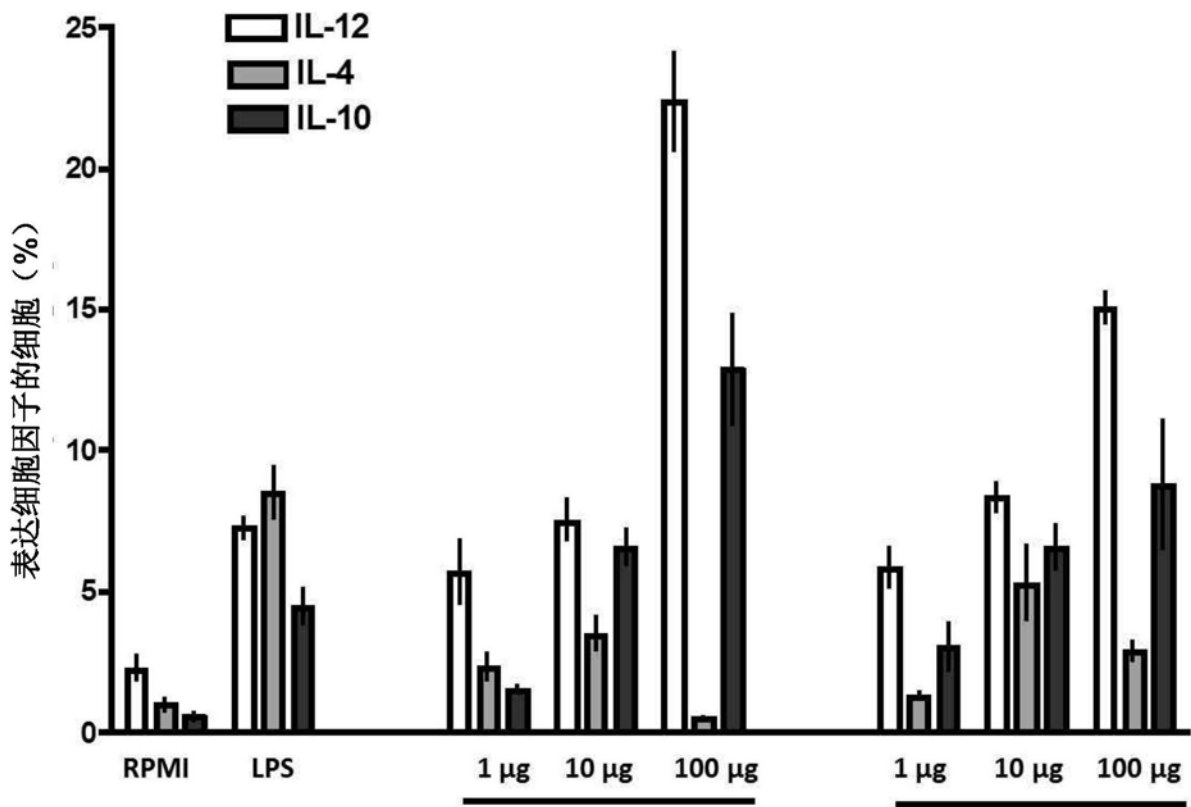


图15

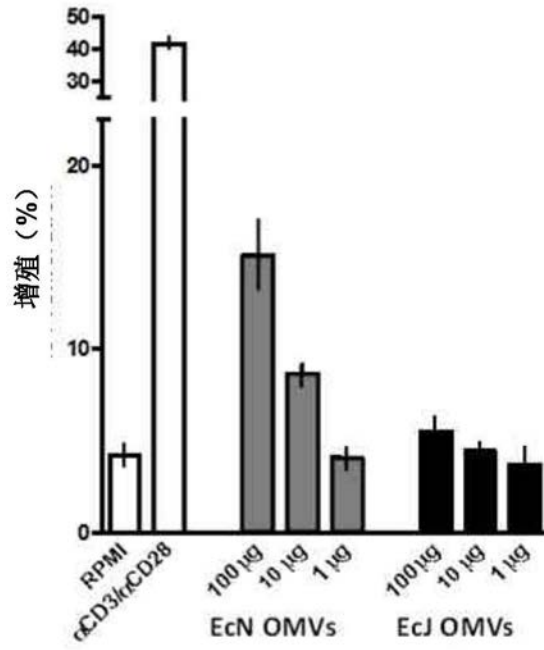


图16

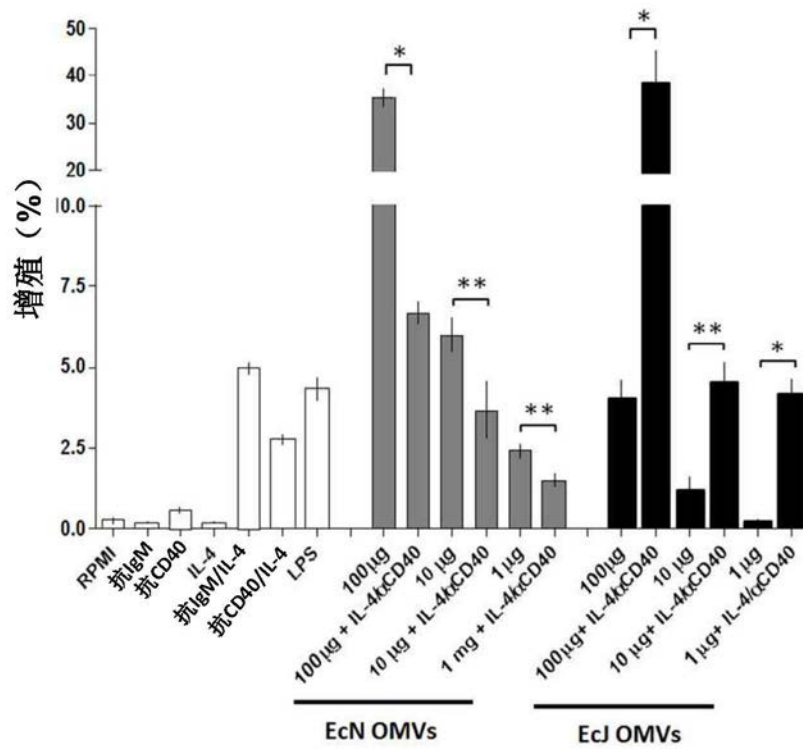


图17

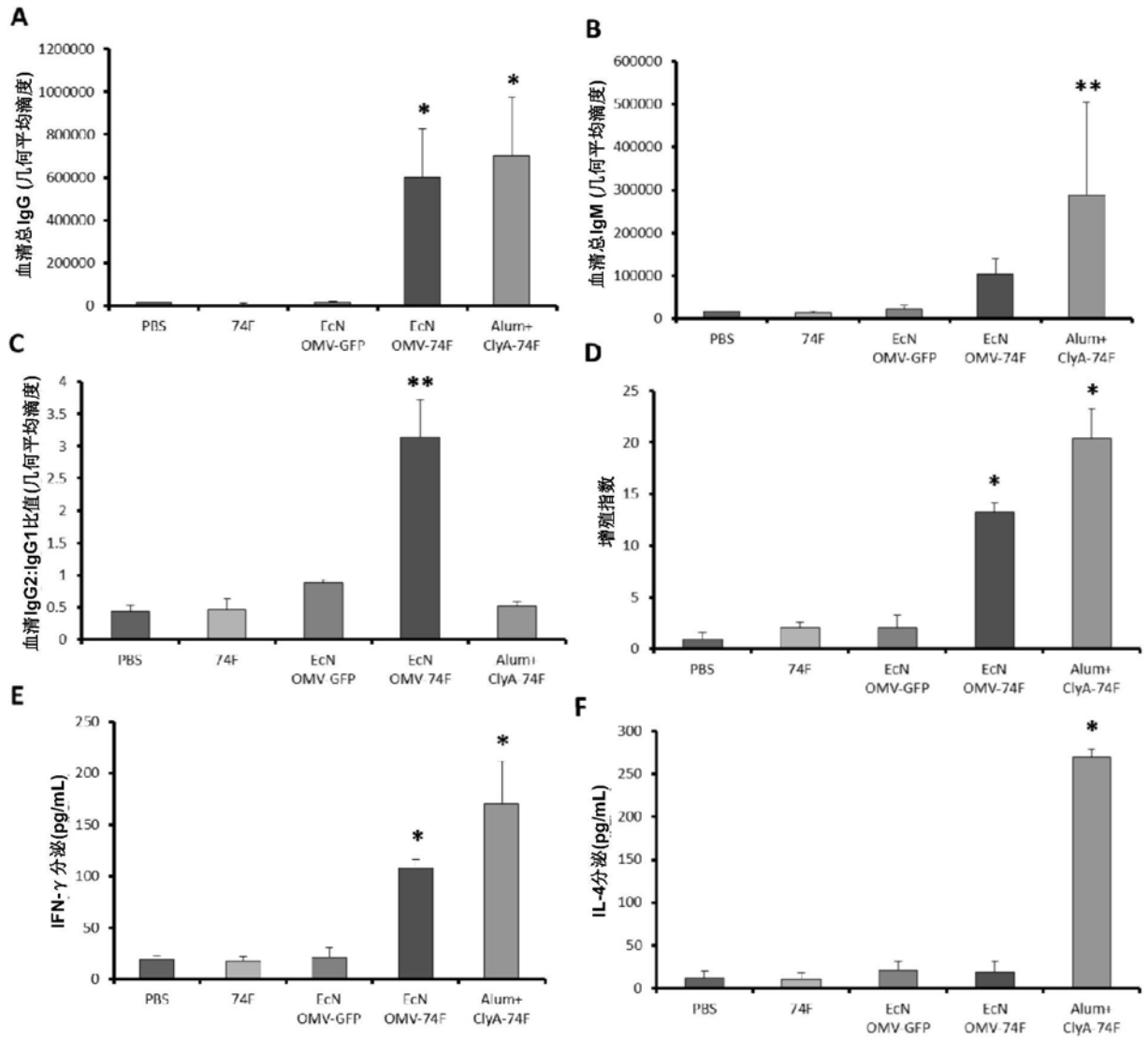


图18

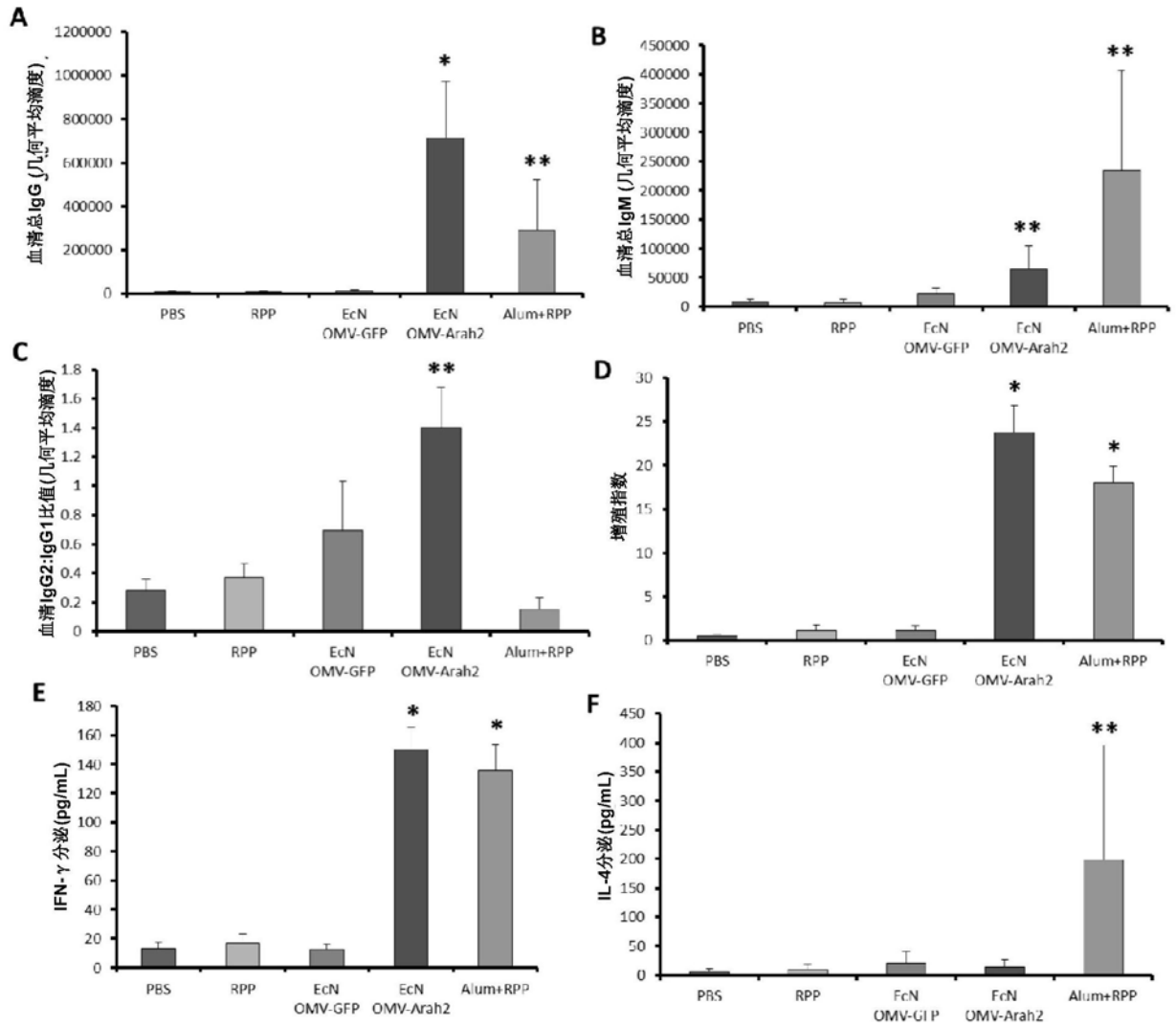


图19