



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104812890 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201380059559. 5

A61K 35/74(2015. 01)

(22) 申请日 2013. 09. 16

A61P 31/04(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/701, 939 2012. 09. 17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/059980 2013. 09. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/043637 EN 2014. 03. 20

(71) 申请人 美国健康及人类服务部

地址 美国马里兰

(72) 发明人 M·N·达马塞纳 D·J·科佩奇科

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健

(51) Int. Cl.

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 15/31(2006. 01)

权利要求书3页 说明书39页 附图12页

(54) 发明名称

基于染色体重组工程的多功能口服疫苗

(57) 摘要

本发明描述了重组工程化的伤寒沙门氏菌属 Ty21a、包含这种 Ty21a 的组合物和疫苗, 及重组工程方法, 包括将大的抗原性区域插入细菌染色体中以产生对抗一或多种致病因素起保护作用的多价疫苗。

1. 包含插入伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) Ty21a 染色体中的宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因区域的伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其中:

a) 异源宋内氏志贺菌 (*Shigella sonnei*) 1 型 O- 抗原与或者不与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达;

b) 针对毒性宋内氏志贺菌攻击激发免疫保护作用; 及

c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

2. 包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因区域的伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其中:

a) 异源宋内氏志贺菌 1 型 O- 抗原与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达;

b) 针对毒性宋内氏志贺菌攻击激发免疫保护作用; 及

c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

3. 权利要求 1 的 Ty21a, 其中所述区域由选自如下的 DNA 序列编码:

a) SEQ ID NO:2 所示 DNA 序列;

b) 与 SEQ ID NO:2 所示 DNA 序列具有至少大约 90% 序列相同性的 DNA 序列; 及

c) SEQ ID NO:2 所示 DNA 序列的功能变体的 DNA 序列。

4. 权利要求 1 的 Ty21a, 进一步包括来自细菌菌株的 O- 抗原生物合成基因区域, 所述细菌菌株选自: 志贺菌 (痢疾志贺菌 (*Shigella dysenteriae*))、弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*) 及鲍氏志贺菌 (*Shigella boydii*))、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 血清型、肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 血清变型、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 血清型、肠杆菌 (*Enterobacter*)、耶尔森氏菌 (*Yersinia*) 及假单胞菌 (*Pseudomonas*)。

5. 包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的痢疾志贺菌 10- 抗原生物合成基因区域的伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其中:

a) 异源痢疾志贺菌血清型 10- 抗原与或不与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达;

b) 针对毒性痢疾志贺菌攻击激发免疫保护作用; 及

c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

6. 包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的痢疾志贺菌 10- 抗原生物合成基因区域的伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其中:

a) 异源痢疾志贺菌血清型 10- 抗原与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达;

b) 针对毒性痢疾志贺菌攻击激发免疫保护作用; 及

c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

7. 权利要求 5 的 Ty21a, 其中所述区域由选自如下的 DNA 序列编码:

a) SEQ ID NO:33 所示 DNA 序列;

b) 与 SEQ ID NO:33 所示 DNA 序列具有至少大约 90% 序列相同性的 DNA 序列, 及

c) SEQ ID NO:33 所示 DNA 序列的功能变体的 DNA 序列。

8. 权利要求 5 的 Ty21a, 进一步包含来自细菌菌株的 O- 抗原生物合成基因区域, 所述细菌菌株选自: 志贺菌 (宋内氏志贺菌, 弗氏志贺菌及鲍氏志贺菌)、大肠杆菌血清型、肠道沙门氏菌血清变型、霍乱弧菌血清型、肠杆菌、耶尔森氏菌及假单胞菌。

9. 一种质粒构建体, 其具有: i) SEQ ID NO:1 所示 DNA 序列, 或者 ii) 与 SEQ ID NO:1

所示 DNA 序列具有至少大约 90% 序列相同性的 DNA 序列。

10. 权利要求 9 的质粒构建体, 进一步包含宋内氏志贺菌 0- 抗原生物合成基因区域。

11. 权利要求 9 的质粒构建体, 进一步包含痢疾志贺菌 10- 抗原生物合成基因区域。

12. 一种将大的抗原性基因区域重组工程化进细菌染色体中的方法, 包括:

i) 将所述区域克隆进载体中, 所述载体含有:

ia) 遗传选择标记, 5' 和 3' 两侧分别是 FRT 位点;

ib) 多克隆位点, 位于 3' FRT 位点的下游; 及

ic) 两个染色体同源位点, 两个之一位于 5' FRT 位点上游, 及两个位点之一位于多克隆位点下游;

ii) 使用 λ red 重组将所述区域整合进细菌染色体中;

iii) 根据遗传选择标记进行选择; 及

iv) 除去所述选择标记,

由此将所述区域重组工程化进入染色体中。

13. 权利要求 12 的方法, 其中抗原性基因区域的长度为大约 5 至大约 20kb。

14. 权利要求 12 的方法, 其中载体选自质粒、噬菌体、噬粒及粘粒构建体。

15. 权利要求 14 的方法, 其中质粒构建体是权利要求 9 的构建体。

16. 权利要求 12 的方法, 其中细菌染色体是伤寒沙门氏菌 Ty21a。

17. 权利要求 12 的方法, 其中遗传选择标记是抗生素抗性标记。

18. 权利要求 17 的方法, 其中抗生素抗性标记是卡那霉素。

19. 权利要求 12 的方法, 其中抗原性区域是宋内氏志贺菌 0- 抗原生物合成基因区域。

20. 权利要求 12 的方法, 其中抗原性区域是痢疾志贺菌 10- 抗原生物合成基因区域。

21. 权利要求 12 的方法, 其中抗原性区域是弗氏志贺菌 2a 0- 抗原生物合成基因区域。

22. 权利要求 12 的方法, 其中抗原性区域是弗氏志贺菌 3a 0- 抗原生物合成基因区域。

23. 权利要求 12 的方法, 其中在步骤 ii 之前将所述区域在具有细菌染色体同源性的的大约 500 至大约 1000bp 区域之间工程化。

24. 权利要求 18 的方法, 其中卡那霉素抗性基因通过在使用 pCP20 转化之后诱导的重组而除去。

25. 包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的弗氏志贺菌 2a 0- 抗原生物合成基因区域的伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其中:

a) 异源弗氏志贺菌 2a 0- 抗原与或不与同源伤寒沙门氏菌 0- 抗原一起稳定表达;

b) 针对毒性弗氏志贺菌 2a 攻击激发免疫保护作用; 及

c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

26. 包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的弗氏志贺菌 2a 0- 抗原生物合成基因区域的伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其中:

a) 异源弗氏志贺菌 2a 0- 抗原与同源伤寒沙门氏菌 0- 抗原一起稳定表达;

b) 针对毒性弗氏志贺菌 2a 攻击激发免疫保护作用; 及

c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

27. 包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的弗氏志贺菌 3a 0- 抗原生物合成基因区域的伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其中:

- a) 异源弗氏志贺菌 3a O- 抗原与或不与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达 ;
- b) 针对毒性弗氏志贺菌 3a 攻击激发免疫保护作用 ;及
- c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

28. 包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的弗氏志贺菌 3a O- 抗原生物合成基因区域的伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其中 :

- a) 异源弗氏志贺菌 3a O- 抗原与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达 ;
- b) 针对毒性弗氏志贺菌 3a 攻击激发免疫保护作用 ;及
- c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

29. 包含权利要求 1-8 和 25-28 任一项的伤寒沙门氏菌 Ty21a 连同生理学可接受的载体的组合物。

30. 包含权利要求 1-8 和 25-28 任一项的伤寒沙门氏菌 Ty21a 连同生理学可接受的载体的疫苗。

31. 一种预防或治疗至少一种细菌感染的方法, 包括给予对象预防或治疗有效量的权利要求 1-8 和 25-28 任一项的伤寒沙门氏菌 Ty21a, 由此预防或治疗所述至少一种细菌感染。

32. 权利要求 1-8 和 25-28 任一项的伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其中所述基因区域是部分或全部化学合成的。

33. 权利要求 9 的质粒构建体, 其中所述 DNA 序列是部分或全部化学合成的。

34. O- 抗原生物合成基因区域在设计为化学生产蛋白质 -LPS 缀合物产物的细菌菌株中的应用。

35. 权利要求 12-24 任一项的方法, 用于全细胞细菌疫苗中。

36. 权利要求 12-24 任一项的方法, 用于活减毒沙门氏菌菌株、志贺菌菌株、李斯特菌菌株、耶尔森氏菌菌株、大肠杆菌菌株、肠杆菌菌株、原生动物株, 或者另一活的载体化疫苗中。

基于染色体重组工程的多功能口服疫苗

[0001] 相关申请资料

[0002] 本文中引用的每个申请和专利以及每个申请和专利中引用的每个文档或参考文献（包括在每个授权专利的审查期间；“申请引用的文档”）以及相应于和 / 或主张任何这些申请和专利的优先权的每个 PCT 和国外申请或专利，以及每个申请引用的文档中引用或参考的每个文档，在此均并入本文作参考及可用于实施本发明。更通常地，文档或参考文献在权利要求书之前的参考文献中列举或者在文中列举；每个这些文档或参考文献（本文列举的参考文献）以及在每个本文列举的参考文献中列举的每个文档或参考文献（包括任何厂商说明书、指导书等）均并入本文作参考。

[0003] 政府利益声明

[0004] 本发明得到政府支持；政府在本发明中具有一些权利。

[0005] 序列表数据

[0006] 本文所附序列表文本在 2013 年 9 月 12 日产生，大小为 144 千字节，文件名为“6137FDA9PCT_SEQ_Listing_20130912_ST25.txt”，在此以其全部内容并入本文作参考。

[0007] 发明背景

[0008] 细菌性痢疾及伤寒在发达国家及发展中国家仍是导致发病的重要因素。每年志贺菌属 (*Shigella*) 导致估计 >1 亿 5 千万例痢疾，伤寒在 >2 千 7 百万的人群中发生 (Bardhan, et al. (2010) *Emerging Infect. Diseases* 16:1718-1723; Crump, et al. (2004) *Bulletin of the WHO* 82:346-353; Crump and Mintz (2010) *Clin Infect Diseases* 50:241-246; WHO (2005) *Guidelines for the control of shigellosis*...). 志贺菌病和伤寒每年共导致 >250,000 例死亡 (Bardhan, et al. (2010) *Emerging Infect. Diseases* 16:1718-1723; Crump, et al. (2004) *Bulletin of the WHO* 82:346-353)，表明持续需要多价疫苗以针对这些疾病起保护作用。重要地，2/3 的志贺菌病例发生在 5 岁以下的儿童 (Kotloff et al. (1999) *Bull. WHO*, 77:651-666; Kweon (2008) *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 21:313-318)，伤寒在学龄儿童中最常见 (Crump and Mintz (2010) *Clin Infect Diseases* 50:241-246)。

[0009] 志贺菌属包括四个种：痢疾志贺菌 (*S. dysenteriae*)、弗氏志贺菌 (*S. flexneri*)、鲍氏志贺菌 (*S. boydii*) 和宋内氏志贺菌 (*S. sonnei*)，也分别称作血清组 A、B、C 和 D。前三个种分别基于 LPS 结构中的不同而进一步分为血清型。在摄取污染的食物或水时，志贺菌导致大肠急性浸润性感染，典型导致严重腹痛痉挛、发热和痢疾（即 <5ml 的小体积粪便，包含粘液、多形核中性粒细胞、坏死组织和血丝）。与痢疾志贺菌和弗氏志贺菌相比，鲍氏志贺菌和宋内氏志贺菌经常导致较轻的疾病。弗氏志贺菌与发展中国家中大多数地方性感染相关。宋内氏志贺菌是与在工业化国家中观测到的大多数地方性感染相关的菌种。US CDC 估计在美国每年发生 ~ 450,000 例宋内氏志贺菌疾病，其主要发生在幼儿园。宋内氏志贺菌在发展中国家如泰国也造成相当大数量的死亡率，在此是 ~ 95% 志贺菌病所致 (Mead et al. (1999) *Emerg. Infect. Dis.*, 5:607-625; Putthasri et al. (2009) *Emerg. Infect. Dis.*, 15:423-432)。痢疾志贺菌血清型 1 (Sd1) 尤为重要，因为其导致严重的痢疾加上溶

血性尿毒症综合征（是由于产生强力细胞毒素志贺毒素所致），典型导致较其它志贺菌菌种所致感染更高的死亡率。进一步地，Sd1 最常见地导致高发病率的大型流行病（World Health Organization(2005)Guidelines for the Control of Shigellosis, Including Epidemics Due to *Shigella dysenteriae* Type 1, ISBN 924159330X）。

[0010] 目前，没有得到许可的疫苗可以用于预防志贺菌病的发生。越来越多的志贺菌属多元抗生素抗性通常阻碍当地的治疗。由此，世界卫生组织认为开发志贺菌病的疫苗是当务之急。最重要地，全球公共卫生需要疫苗以在地方人群、旅行者和军队中预防志贺菌病。由于存在大量志贺菌属血清型（>40），一些研究人员已经尝试发现大多数血清型共有的表面抗原（Kaminski et al. (2009)Expert Rev. Vaccines, 8:1693-1704）。尽管取得重大成就，但是共有的表面蛋白质自身（例如 ipaA、B、C、D）不呈现出刺激对于志贺菌属感染的显著或持续的保护性免疫性。然而，存在保护性免疫性主要针对志贺菌属血清型特异性 LPS O- 抗原的相当多的迹象，表明 O- 抗原作为疫苗开发的靶位的重要性（Ferrecchio et al. (1991)Am. J. Epidemiol., 134:614-627 ;DuPont et al. (1972)J. Infect. Dis., 125:5-11 ;DuPont et al. (1972)J. Infect. Dis., 125:12-16）。

[0011] 实际上，单独的脂多糖（LPS）已经示出是有效的疫苗抗原以特异性保护免于志贺菌病。先前已经报道了异源 LPS 生物合成基因的质粒克隆及在宋内氏志贺菌或痢疾志贺菌 1LPS 的 Ty21a 中的表达。所得编码志贺菌 LPS 的质粒在非选择性培养基中预期稳定 50 个以上的生长世代，但是其仍含有令人反感的抗生素抗性标记。缺失这个抗生素抗性标记导致明显的质粒不稳定性。

[0012] 基于在世界范围内流行的特异性志贺菌属血清型及先前关于志贺菌属中血清型交叉保护作用的研究，Noriega, et al. (1999Infection and Immunity67:782-788) 提出一种含有宋内氏志贺菌、痢疾志贺菌 1、弗氏志贺菌 2a、弗氏志贺菌 3a 及弗氏志贺菌 6 的 LPS 的多价疫苗可针对世界范围内 ~ 85% 志贺菌病提供保护作用。

[0013] 活的、减毒的口服疫苗肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 血清变型 Typhi 菌株 Ty21a 已经广泛用作宽基口服疫苗载体以表达各种外来抗原 (Xu et al. (2007) Vaccine, 25:6167-6175 ;Xu et al. (2002) Infect. Immun., 70:4414-4423 ;Osorio et al. (2009) Infect. Immun., 44:1475-1482)。Ty21a 是唯一得到许可的活的减毒的疫苗以针对伤寒起保护作用。此外，其已经安全给予世界范围内超过 2 亿接受者。作为全细胞疫苗，Ty21a 诱导粘膜、体液和细胞免疫性，导致针对伤寒的高水平长期的保护作用（即实际上在 7 整年结束时未削弱的保护作用）(Levine, et al. (1999)Vaccine 17Suppl 2:S22-27)，具有显著的针对副伤寒沙门氏菌 (*S. Paratyphi*) A 和 B 的交叉保护作用迹象 (Bardhan, et al. (2010)Emerging Infec Diseases 16:1718-1723 ;D'Amelio et al. (1988) Infect. Immun., 56:2731-2735 ;Levine, et al. (2007)Clin Infec Diseases 45Supp 1:S24-28 ;Schwartz, et al. (1990)Archives Internal Med150:349-351 ;Wahid, et al. (2012)Clin and Vaccine Immunol CVI 19:825-834)。

[0014] 发明概述

[0015] 在较早的疫苗研究中，转移编码宋内氏志贺菌的 180kb 1 型 O- 抗原质粒，作为原理论证，作为大的 ~ 300kb 质粒的一部分共整合进疫苗菌株 Ty21a。所得杂交疫苗菌株 5076-1C 表达同源伤寒沙门氏菌 9, 12O- 抗原和异源宋内氏志贺菌 O- 抗原，其均是

免疫原性的 (Seid et al. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259:9028-9034 ;Formal et al. (1981) *Infect. Immun.*, 34:746-750)。重要地,5076-1C 口服免疫志愿者是安全的并激发显著的针对毒性宋内氏志贺菌口服攻击的保护作用 (即针对严重痢疾的 100 % 保护作用) (Black et al. (1987) *J. Infect. Dis.*, 155:1260-1265 ;Herrington et al. (1990) *Vaccine*, 8:353-357 ;Van de Verg et al. (1990) *Infect. Immun.*, 58:2002-2004)。不幸地,尽管不是完全意外地,在相当大的保护作用提供给接受前两批疫苗的志愿者中在随后的疫苗批中未观测到,这是由于在 5076-1C 中遗传不稳定的大共整合质粒中丧失 I 型基因区所致 (Formal et al. (1981) *Infect. Immun.*, 34:746-750)。因此,进行进一步的分子学研究以稳定疫苗载体构建体中宋内氏志贺菌 1 型基因区。在这些随后的研究中,确定为宋内氏志贺菌或痢疾志贺菌血清型 10- 抗原的稳定表达所需的最小大小的基因区在 11-15kb 之间 (Xu et al. (2007) *Vaccine*, 25:6167-6175 ;Xu et al. (2002) *Infect. Immun.*, 70:4414-4423)。这些研究还表明宋内氏志贺菌 O- 抗原可以在 Ty21a 或者志贺菌属中表达为核心 - 连接 (core-linked) 的 LPS 或者 4 型 O- 抗原荚膜,其是某些其它志贺菌属血清型及伤寒沙门氏菌的 LPS,但是任一型的 O- 抗原表达呈现出相等的免疫原性。

[0016] 这些早期的志贺菌属 LPS 构建体在低拷贝的遗传稳定的质粒 pGB-2 中产生,其携带具有遗传用途的抗生素抗性标记。除去这个抗生素抗性标记以促进人疫苗使用结果是有问题的,并导致无法解释的较低的质粒遗传稳定性 (即抗生素抗性质粒在不存在抗生素压力条件下生长期间可稳定超过 60 个世代,但是除去抗生素抗性基因序列则莫名地导致遗传不稳定性)。

[0017] 因此,着手研究以解决遗传稳定性的问题及需要可选择的但可除去的抗生素抗性标记。为此,将先前描述的重组技术 (Datsenko et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:6640-6645) 修改为将一个 >11kb 的宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因区重组工程化进伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中以构建 Ty21a-Ss (表达宋内氏志贺菌 O- 抗原的 Ty21a)。进一步地,这种基本的宋内氏志贺菌 LPS 生物合成基因的染色体整合是 100 % 遗传稳定的,甚至在除去可选择的抗生素抗性基因盒之后也是稳定的。异源宋内氏志贺菌 1 型 LPS 在 Ty21a-Ss 中与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达。值得注意的是,候选疫苗菌株 Ty21a-Ss 在小鼠中激发针对毒性宋内氏志贺菌攻击的有力免疫保护作用。

[0018] 一方面,本发明提供了伤寒沙门氏菌 Ty21a,其包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因区,其中 :a) 异源宋内氏志贺菌 1 型 O- 抗原与或不与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达 ;b) 针对毒性宋内氏志贺菌攻击激发免疫保护作用 ;及 c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。另一方面,本发明提供了伤寒沙门氏菌 Ty21a,其包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因区,其中 :a) 异源宋内氏志贺菌 1 型 O- 抗原与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达 ;b) 针对毒性宋内氏志贺菌攻击激发免疫保护作用 ;及 c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

[0019] 在本发明的一个实施方案中,所述区域是由选自如下的 DNA 序列编码 :a) SEQ ID NO:2 所示 DNA 序列 ;b) 与 SEQ ID NO:2 所示 DNA 序列呈现至少大约 90 % 序列相同性的 DNA 序列 ;及 c) 是 SEQ ID NO:2 所示 DNA 序列的功能变体的 DNA 序列。SEQ ID NO:2 在本发明中提供及已经呈递给 GENBANK 并命名为 JX436479,但是直至描述这项研究部分的原稿公开

之前未发布。登记号为 AF294823 (SEQ ID NO:23) 的序列实际上含有大约 19 个 ORF 并包括 IS 元件。在现在的研究中,仅基本的 10 个 ORF (在 AF294823 (SEQ ID NO:23) 中显示的 19 个 ORF 中的) 被克隆并插入 Ty21a 染色体中。

[0020] 在本发明的进一步的实施方案中, Ty21a 进一步包含来自选自如下的细菌菌株的 O- 抗原生物合成基因区: 志贺菌 (痢疾志贺菌、弗氏志贺菌和鲍氏志贺菌), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 血清型, 肠道沙门氏菌血清变型, 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 血清型, 肠杆菌 (*Enterobacter*) 种, 耶尔森氏菌属 (*Yersinia*) 种及假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 种。

[0021] 另一方面, 本发明提供了伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的痢疾志贺菌 O- 抗原生物合成基因区, 其中: a) 异源痢疾志贺菌血清型 O- 抗原与或不与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达; b) 针对毒性痢疾志贺菌 1 攻击激发免疫保护作用; 及 c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。再一方面, 本发明提供了伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的痢疾志贺菌 O- 抗原生物合成基因区, 其中: a) 异源痢疾志贺菌血清型 O- 抗原与同源伤寒沙门氏菌 O- 抗原一起稳定表达; b) 针对毒性痢疾志贺菌 1 攻击激发免疫保护作用; 及 c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

[0022] 在本发明的一个实施方案中, 所述区域是由选自如下的 DNA 序列编码: a) SEQ ID NO:3 或 4 所示 DNA 序列; b) 与 SEQ ID NO:3 或 4 所示 DNA 序列具有至少大约 90% 序列相同性的 DNA 序列; 及 c) SEQ ID NO:3 或 4 是所示 DNA 序列的功能变体的 DNA 序列。

[0023] 在本发明的一个优选的实施方案中, 所述区域是由选自如下的 DNA 序列编码: a) SEQ ID NO:33 所示 DNA 序列; b) 与 SEQ ID NO:33 所示 DNA 序列具有至少大约 90% 序列相同性的 DNA 序列; 及 c) SEQ ID NO:33 所示 DNA 序列的功能变体的 DNA 序列。

[0024] 在本发明的另一个实施方案中, Ty21a 进一步包含来自选自如下的细菌菌株的 O- 抗原生物合成基因区: 志贺菌属 (宋内氏志贺菌、弗氏志贺菌及鲍氏志贺菌), 大肠杆菌血清型, 肠道沙门氏菌血清变型, 霍乱弧菌血清型, 肠杆菌属, 耶尔森氏菌属及假单胞菌属。

[0025] 另一方面, 本发明提供了一种质粒构建体, 其具有: i) SEQ ID NO:1 所示 DNA 序列或者 ii) 与 SEQ ID NO:1 所示 DNA 序列具有至少大约 90% 序列相同性的 DNA 序列。在本发明进一步的实施方案中, 质粒构建体进一步包含宋内氏志贺菌属 O- 抗原生物合成基因区。在本发明进一步的实施方案中, 质粒构建体进一步包含痢疾志贺菌 O- 抗原生物合成基因区。

[0026] 另一方面, 本发明提供了一种将大抗原性基因区重组工程化进细菌染色体中的方法, 包括: i) 将所述区域克隆进载体中, 所述载体含有: ia) 5' 和 3' 两侧分别为 FRT 位点的遗传可选择标记; ib) 在 3' FRT 位点下游的多克隆位点; 及 ic) 两个染色体同源性位点, 其中一个位于 5' FRT 位点上游, 一个位于所述多克隆位点的下游; ii) 使用 λ red 重组技术将所述区域整合进细菌染色体中; iii) 针对遗传可选择标记进行选择; 及 iv) 除去可选择标记 (例如基因), 因此将所述区域重组工程化进染色体中。在本发明方法的一个实施方案中, 遗传可选择标记是抗生素抗性标记。在本发明方法的另一个实施方案中, 使选择标记是无功能的 (而不是除去)。在本发明方法的另一个实施方案中, 细菌染色体可以改变。在本发明方法的另一个实施方案中, 插入位点 (在染色体内) 可以改变。

[0027] 在本发明方法的另一个实施方案中,抗原性基因区长度为大约 5-20kb。在本发明方法的再一个实施方案中,抗原性区域长度超过 20kb。在本发明方法的另一个实施方案中,载体选自质粒、噬菌体、噬粒和粘粒构建体。在另一实施方案中,质粒构建体是上述质粒构建体,具有:i)SEQ ID NO:1 所示 DNA 序列或者 ii) 与 SEQ ID NO:1 所示 DNA 序列具有至少大约 90%序列相同性的 DNA 序列。

[0028] 在本发明方法的另一实施方案中,细菌染色体是伤寒沙门氏菌 Ty21a。在本发明方法的再一个实施方案中,抗生素抗性标记是卡那霉素。在本发明方法的另一个实施方案中,抗原性区域是宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因区。在本发明方法的再一个实施方案中,抗原性区域是痢疾志贺菌 10- 抗原生物合成基因区。在本发明方法的另一个实施方案中,抗原性区域是弗氏志贺菌 2a O- 抗原生物合成基因区。在本发明方法的再一个实施方案中,抗原性区域是弗氏志贺菌 3a O- 抗原生物合成基因区。

[0029] 在另一实施方案中,本发明方法用于全细胞细菌疫苗。在再一实施方案中,本发明方法用于活的减毒的沙门氏菌属菌株、志贺菌属菌株、李斯特菌属菌株、耶尔森氏菌属菌株、大肠杆菌菌株、肠杆菌科菌株中,用于原生动植物株或者另一活的载体化疫苗中。

[0030] 在本发明方法的再一个实施方案中,在步骤 ii 之前将所述区域在具有细菌染色体同源性的的大约 500-1000bp 区域之间工程化。在本发明方法的另一个实施方案中,卡那霉素抗性基因通过在用 pCP20 转化之后诱导的重组而除去。

[0031] 一方面,本发明提供了一种组合物,其包含本发明揭示的伤寒沙门氏菌 Ty21a 组合生理学可接受的载体。

[0032] 另一方面,本发明提供了一种疫苗,其包含本发明揭示的伤寒沙门氏菌 Ty21a 组合生理学可接受的载体。

[0033] 再一方面,本发明提供了一种预防或治疗至少一种细菌感染的方法,包括给予对象预防或治疗有效量的本发明揭示的伤寒沙门氏菌 Ty21a,由此预防或治疗所述至少一种细菌感染。

[0034] 在本发明的伤寒沙门氏菌 Ty21a 的另一实施方案中,基因区是部分或全部化学合成的。

[0035] 在本发明的质粒构建体的另一实施方案中,DNA 序列是部分或全部化学合成的。

[0036] 一方面,本发明提供了 O- 抗原生物合成基因区在设计为生物学生产蛋白质-LPS 缀合物的细菌菌株中的应用。

[0037] 在本发明的另一实施方案中,与细菌 LPS、荚膜多糖 (CPS) 或者寡多糖 (oligo PS) 的生物合成相关的基因簇与感兴趣的蛋白质载体以及在体内进行生物缀合反应的酶一起被转化进大肠杆菌中。一旦在诱导时产生,进行简便的纯化步骤,及将生物产物配制用作疫苗 (Dro(2012)Gen. Eng. Biotech. News, Vol. 32, www.genengnews.com/gen-articles/developing-next-gen-conjugate-vaccines/4042; Gambillara(2012) BioPharm Int., 25:28-32; Kowarik et al. (2006) Science, 314:1148-1150; Wacker et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:7088-7093; Kowarik et al. (2006) EMBO J., 25:1957-1966; Feldman et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:3016-3021; Nita-Lazar et al. (2005) Glycobiology, 15:361-367; Wacker et al. (2002) Science, 298:1790-1793; Wacker(2002) N-linked Protein Glycosylation: From

Eukaryotes to Bacteria, Ph.D. 论文, 提交至 the Swiss Federal Institute of Technology, Zurich)。

[0038] 在其它的实施方案中, 本发明的方法使得也可以将一或多个抗原性基因区插入其它肠细菌中。

[0039] 沙门氏菌伤寒 (Typhi) 和副伤寒 (Paratyphi) 血清变型是通过摄食污染的食物和水而获得的, 并导致难区分的伤寒。尽管在年幼的学龄儿童中发生率最高, 但是伤寒影响所有年龄段的人群。多种抗生素抗性使得治疗复杂化, 并使得接种在缺乏适当卫生设施的地区成为首选。尽管有两种伤寒疫苗可利用, 但是在发展中国家大规模引进其仍成就甚微。同时保护免于伤寒和志贺菌病的多价疫苗在针对这些疾病的先行免疫中具有重大实践优势, 不仅对于旅行者及军人, 而且对于受累于高所得疾病死亡率的发展中国家也有益。

[0040] 再一方面, 本发明提供了伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的弗氏志贺菌 2a 0- 抗原生物合成基因区, 其中 :a) 异源弗氏志贺菌 2a 0- 抗原与或不与同源伤寒沙门氏菌 0- 抗原一起稳定表达 ;b) 针对毒性弗氏志贺菌 2a 攻击激发免疫保护作用 ;及 c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。再一方面, 本发明提供了伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的弗氏志贺菌 2a 0- 抗原生物合成基因区, 其中 :a) 异源弗氏志贺菌 2a 0- 抗原与同源伤寒沙门氏菌 0- 抗原一起稳定表达 ;b) 针对毒性弗氏志贺菌 2a 攻击激发免疫保护作用 ;及 c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

[0041] 再一方面, 本发明提供了伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的弗氏志贺菌 3a 0- 抗原生物合成基因区, 其中 :a) 异源弗氏志贺菌 3a 0- 抗原与或不与同源伤寒沙门氏菌 0- 抗原一起稳定表达 ;b) 针对毒性弗氏志贺菌 3a 攻击激发免疫保护作用 ;及 c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。再一方面, 本发明提供了伤寒沙门氏菌 Ty21a, 其包含插入伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的弗氏志贺菌 3a 0- 抗原生物合成基因区, 其中 :a) 异源弗氏志贺菌 3a 0- 抗原与同源伤寒沙门氏菌 0- 抗原一起稳定表达 ;b) 针对毒性弗氏志贺菌 3a 攻击激发免疫保护作用 ;及 c) 针对毒性伤寒沙门氏菌攻击激发免疫保护作用。

[0042] 本发明的其它方面在如下揭示中描述或显而易见及在本发明的范围内。

[0043] 附图简述

[0044] 下文详细描述以实施例方式示出, 但是本发明不限于本文描述的特定实施方案, 可以结合附图加以理解, 其中

[0045] 图 1 提供了宋内氏志贺菌 I 型 LPS 生物合成基因的克隆和染色体整合的示意图。A 图示出参与 I 型 0- 抗原生物合成的 ORF 及相邻的来自 pXK65 的克隆的插入体的 IS 元件, 如先前所报道 (Xu, et al. (2002) Infect and immunity 70:4414-4423)。在 B 图中, 较后部分的含有 0- 抗原操纵子的启动子的 wzz (orf3) 至 wzy (orf7) 经 PCR 扩增为片段 A, 并克隆进 pMD-TV (SEQ ID NO:1) 的 HindIII 和 BamHI 位点。接着, 基因 wbgV (orf9) 至 apqZ (orf14) 经 PCR 扩增为片段 B, 并克隆进与片段 A 相邻的 BamHI 和 XhoI 位点。在 C 图中, 所得质粒 pMD-TV-Ss-1 用作模板以 PCR 扩增 tviD 至 vexA, 使用正向 (F) 和反向 (R) 引物。在 D 图中, 将 PCR 产物通过 λ red- 介导的重组整合进 Ty21a 染色体的 tviD-tviE-vexA 区域中。最后, 在 E 图中, Kan^r 盒在暂时导入温度敏感的质粒 pCP20 之后通过 FLP 重组酶表达而被除去, 产

生最终的抗生素敏感性染色体整合体 Ty21a-Ss (菌株 MD77)。

[0046] 图 2 示出分离自各种宋内氏志贺菌、大肠杆菌和 Ty21a 分离株的 SDS-PAGE- 分离的多糖的分析结果,图 A :银染,图 B :1 型特异性抗体的免疫印迹。

[0047] 图 3 示出描述通过 ELISA 测量的在用 PBS、Ty21a 或者同时表达 Ty21a LPS 和宋内氏志贺菌 LPS 的疫苗株 Ty21a-Ss 经腹膜内免疫小鼠之后对宋内氏志贺菌 LPS (图 3A) 和 Ty21a LPS (图 3B) 的小鼠血清 IgG 应答的条形图。将 ELISA 平板用宋内氏志贺菌 LPS 或 Ty21a LPS 包被,并用 1% BSA 封闭。将自接种的小鼠收集的血液的系列稀释液加入微滴定孔中,洗涤,使用抗小鼠 IgG- HPR 检测 LPS- 结合的 IgG 抗体。图中示出给予 1、2 或 3 剂疫苗之后接受 PBS、Ty21a 或 Ty21a-Ss 的三组小鼠的终点滴定。每个符号表示一只小鼠,条柱表示每组 10 只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0048] 图 4 示出描述整合进 Ty21a 疫苗株的 Vi 荚膜操纵子中的痢疾志贺菌生物合成基因的示意图。

[0049] 图 5 提供了痢疾志贺菌 O- 抗原基因的克隆和染色体整合的示意图。图中示出了怎样插入 lpp 启动子以置换天然启动子。

[0050] 图 6 示出通过 Western 印迹确定的痢疾志贺菌 O- 抗原表达。

[0051] 图 7 示出通过 ELISA 确定的小鼠免疫原性。图 7A 确定针对痢疾志贺菌 LPS 激发的 IgG 的量。图 7B 确定针对伤寒沙门氏菌 9, 12LPS 激发的 IgG 的量。

[0052] 图 8 示出用痢疾志贺菌 1 在大约 $10 \times LD_{50}$ 剂量经 IP 攻击免疫的小鼠的图表数据。

[0053] 图 9 示出弗氏志贺菌的不同血清型的化学成分 (自 Allison, et al. 2000 Trends in Microbiol 8:17-23 中修改)。

[0054] 图 10 示出使用抗 -2a (图 10B) 和抗 -3a (图 10C) 抗体的银染 (图 10A) 和 Western 印迹 (图 10B 和 10C)。

[0055] 图 11 是弗氏志贺菌基本 O- 抗原主链血清型 Y 的示意图,参与这个 O- 抗原主链生物合成的基因位于 rfb 操纵子 (~ 10 kb) 中,克隆进 pMD-TV 质粒。

[0056] 图 12 示出使用抗 - 弗氏志贺菌 3a 抗体的 Western 印迹。

[0057] 图 13 示出使用抗 - 弗氏志贺菌 2a 抗体的 Western 印迹。

[0058] 图 14 提供了 Ty21a-Y (MD114)、Ty21a-2a (MD194)、Ty21a-2a1 (MD212) 和 Ty21a-3a (MD196) 的示意图。

[0059] 发明详述

[0060] 在阐明将大于 10kb 宋内氏志贺菌 LPS 基因区插入使得可以除去可选择标记及获得 100% 遗传稳定性的染色体的方法的努力中,对现有的重组方法进行优化以介导将编码宋内氏志贺菌 LPS 基因的 >11 kb 区域插入影响正常细胞代谢的区域中的 Ty21a 基因组中。这种染色体插入体示出是 100% 遗传稳定的。进一步的检测证实所得菌株 Ty21a-Ss 同时表达同源 Ty21a 和异源宋内氏志贺菌 O- 抗原。此外, Ty21a-Ss 在小鼠中激发针对毒性宋内氏志贺菌攻击的强力双重抗 -LPS 血清免疫应答及 100% 保护作用。这种新的疫苗候选物对于疫苗生产是绝对稳定的,应提供针对由于沙门氏菌伤寒血清变型 (及一些副伤寒感染) 所致伤寒及针对由于宋内氏志贺菌所致志贺菌病的组合保护作用。

[0061] 定义

[0062] 术语“O-Ps (O 多糖) 生物合成”和“O- 抗原生物合成”基因在本文可互换会用。

O- 抗原是一种多糖,其可以被表达为核心连接的脂多糖 (LPS) 或者表达为一组 4 个荚膜,其中 O- 抗原表达在细胞表面,但是与除了脂质 A- 核心寡糖之外的脂质连接。

[0063] 术语“载体”和“运载体”在关于核酸分子时可互换使用,其将 DNA 片段从一个细胞转移至另一细胞。如本文所用,术语“表达载体”是指含有希望的编码序列及为可操纵连接的编码序列在特定宿主生物体中表达(即转录和/或翻译)所需的合适的核酸序列的重组 DNA 分子。表达载体例如但不限于是质粒、质粒构建体、噬粒、噬菌粒、穿梭载体、粘粒、病毒载体、染色体、线粒体 DNA、质体 DNA,及核酸片段,其可用于在细胞如人细胞、禽类细胞、真菌细胞、原生动物细胞和/或昆虫细胞中表达希望的序列。用于在原核生物中表达的核酸序列包括启动子,任选操纵基因序列,核糖体结合位点及可能的其它序列。已知真核细胞利用启动子、增强子和终止及聚腺苷酸化信号。也可使用 Flippase Recognition Target (FRT) 位点及多克隆位点 (MCS) 也称作多接头。MCS 是短 DNA 片段,含有许多(直至大约 20 个)在指定质粒中是典型独特的仅发生一次的限制位点。

[0064] 如本文所用,术语“转化”是指 DNA 分子(即质粒或 PCR 扩增子)可以掺入宿主细胞中的任何机制。成功的转化导致宿主细胞能表达由该质粒携带的或者掺入染色体中的任何操纵的基因。转化可以获得遗传稳定的或瞬时基因表达。瞬时转化的一个实例包含在细胞内的质粒载体,其中所述质粒未整合进宿主细胞染色体中,在细胞分裂期间与细胞是分开的。或者,稳定转化包含在细胞内的质粒,其中所述质粒整合在宿主细胞基因组内或者在多次细胞分裂之后在细胞质中稳定存在。

[0065] 如本文所用,术语“对象”、“患者”和“个体”可互换使用,是指多细胞动物(包括哺乳动物(例如人、非人灵长类动物、鼠、绵羊、牛、反刍动物、兔类动物、猪、山羊、马、犬科动物、猫科动物、鸟纲动物等)、禽类(例如鸡),两栖动物(例如非洲爪蟾),爬行动物和昆虫(例如果蝇))。“动物”包括豚鼠、仓鼠、雪貂、栗鼠、小鼠和棉鼠。

[0066] 如本领域熟知,氨基酸或核酸序列可以使用任何各种算法对比,包括可利用的商业计算机程序如针对核苷酸序列的 BLASTN 及针对氨基酸序列的 BLASTP、缺口 **BLAST**[®] 和 PSI-BLAST。举例的这种程序在 Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol., 215:403-410; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res., 25:3389-3402; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 及 Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999 中描述;其均并入本文作参考。除了鉴别同源序列之外,上述程序典型提供同源性程度的指示。

[0067] 如本文所用,短语“同源性”或“基本同源性”是指氨基酸序列之间的对比。如本领域技术人员意识到,如果两个序列在相应位置含有同源残基,则通常认为其是“基本同源的”。同源残基可以是相同的残基。或者,同源残基可以是具有适当相似结构和/或功能特性的不同残基。例如,如本领域技术人员熟知,某些氨基酸被典型分类为“疏水性”或“亲水性”氨基酸,和/或具有“极性”或“非极性”侧链。一个氨基酸由另一相同类型的氨基酸取代可通常被认为是“同源”取代。

[0068] 在一些实施方案中,如果两个序列的至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的相应残基在

一段相关的残基序列是同源的,则认为这两个序列是基本同源的。在一些实施方案中,所述相关序列是完整序列。在一些实施方案中,相关序列是至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500 或更多个残基。

[0069] 如本文所用,短语“相同性”或者“基本相同性”是指氨基酸或核酸序列之间的对比。正如本领域技术人员所意识到,如果两个序列在相应位置含有相同的残基,则通常认为其是“基本相同的”。实际上,“相同性”是指聚合分子之间例如核酸分子(例如 DNA 分子和 / 或 RNA 分子)之间和 / 或多肽分子之间的整体相关度。两个核酸序列的相同性百分比的计算可例如通过以最佳对比目的排列对比两个序列而进行(例如可以在第一个与第二个核酸序列之一或这两个序列中导入缺口以优化排列对比,及为了对比可以忽视不相同的序列)。在某些实施方案中,为了对比而排列的序列的长度是参考序列长度的至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95% 或者基本 100%。然后对比在相应核苷酸位置的核苷酸。当第一个序列中的一个位置由与在第二个序列中相应位置相同的核苷酸占据时,则分子在该位置是相同的。两个序列之间的相同性百分比与序列共有的相同位置数目成函数关系,考虑到缺口数目及每个缺口的长度,这是为了两个序列的最佳排列对比而需要导入的。序列的对比及两个序列之间相同性百分比的确定可以使用数学算法完成。

[0070] 在一些实施方案中,如果两个序列的至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的相应残基在一段相关残基序列是相同的,则认为其是基本相同的。在一些实施方案中,所述相关序列是完整序列。在一些实施方案中,所述相关序列是至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500 或更多个残基。

[0071] 本文提及的任何数字范围(例如剂量范围)显然包括该范围涵盖的每个数值(包括分数和整数)。例如但不限于在本文中提及范围“ 2×10^9 至 5×10^{10} ”CFU(菌落形成单位)包括在这两个数值之间的所有整数和分数。进一步地,本文提及范围“低于 x”(其中 x 是指定数字)包括数字 x-1、x-2、x-3、x-4、x-5、x-6 等,以及分数 x-0.1、x-0.2、x-0.3、x-0.4、x-0.5、x-0.6 等。再例如,本文提及范围“x 至 y”(其中 x 是指定数字, y 是指定数字)包括每个整数 x、x+1、x+2...至 y-2、y-1、y,以及每个分数如 x+0.1、x+0.2、x+0.3...至 y-0.2、y-0.1。在另一个实例中,术语“至少 95%”包括从 95% 至 100% 的每个数值(包括分数和整数),包括例如 95%、96%、97%、98%、99% 和 100%。

[0072] 如本文所用,术语“抗原”、“免疫原”、“抗原性”、“免疫原性”、“抗原活性”、“免疫学的”及“免疫学活性的”是指能诱导特异性免疫应答(包括激发可溶性抗体应答)和 / 或细胞介导的免疫应答(包括激发毒性 T- 淋巴细胞(CTL) 应答)的任何物质。

[0073] 在本文称作“患有”疾病、失调和 / 或状况(例如流感或伤寒感染)的个体已经诊断具有和 / 或出现疾病、失调和 / 或状况的一或多个症状。

[0074] 如本文所用,术语处于疾病“危险中”(如细菌感染)是指具有感染疾病和 / 或表现疾病的一或多个症状的倾向的对象(例如人)。这种对象包括处于不能激发针对疾病疫苗的免疫原性应答的危险中的那些对象。这种倾向可以是遗传性的(例如表现一或多个疾

病症状的特定遗传倾向,如遗传性失调,存在细菌物种封闭抗体,存在降低水平的杀细菌抗体等),或者由于其它因素所致(例如免疫抑制因素、环境因素、暴露于环境中存在的有害化合物包括免疫原等)。术语“处于危险中的”对象包括“患有疾病的”对象,即发生疾病的对象。本发明不限于任何特定迹象或症状。因此,本发明涵盖发生任何疾病的对象,包括亚临床感染至严重疾病,其中所述对象呈现出与疾病相关的至少一种指征(例如迹象和症状)。

[0075] 如本文所用,术语“治疗”是指用于使疾病、失调和/或状况(例如细菌感染)的一个或多个症状或特征部分或完全减轻、改善、缓解、抑制、预防、延缓发生、降低严重度和/或降低发生率的任何方法。治疗可以给予未呈现疾病、失调和/或状况迹象的对象。在一些实施方案中,治疗可以给予仅呈现出所述疾病、失调和/或状况的早期迹象的对象,以降低发生与该疾病、失调和/或状况相关的病理学危险。

[0076] 如本文所用,术语“免疫原性有效量”、“免疫学有效量”和“抗原性有效量”是指在接种时分子在宿主内激发和/或增加免疫应答产生(包括产生特异性抗体和/或诱导TCL应答)的量。虽然不是必须的,但是优选免疫学有效(即免疫原性有效)量是“保护性”量。术语组合物或疫苗的“保护性”和“治疗性”量是指所述组合物或疫苗防止、延缓、降低、减轻、改善、稳定和/或逆转疾病(例如细菌感染)和/或疾病的一个或多个症状的量。

[0077] 如本文所用,术语“接种”是指给予组合物或疫苗以产生例如针对导致疾病的因素的免疫应答。对于本发明,接种可以在暴露于致病因素之前、期间和/或之后给予,在某些实施方案中是在珀莱雅致病因素之前、期间和/或之后立即给予。在一些实施方案中,接种包括适当间隔时间多次给予接种组合物(疫苗)。

[0078] 术语“包含”是指具有在美国专利法中该术语的广泛含义,可意味着“包括”等。

[0079] 本发明通过参考如下只是举例而非限制本发明实施方案的详细描述和举例的实施例得以更充分理解。

[0080] 本发明另外的实施方案

[0081] 在一个实施方案中,本发明包括一种原核微生物。在另一实施方案中,原核微生物是细菌物种。优选地,所述原核微生物是减毒的沙门氏菌属菌株。然而,其它原核微生物如减毒的大肠杆菌、志贺菌属、耶尔森氏菌属、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、分支杆菌(*Mycobacteria*)、李斯特杆菌(*Listeria*)或弧菌属(*Vibrio*)菌株也涵盖在本发明内。举例的合适的微生物菌株包括但不限于鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、伤寒沙门氏菌、都柏林沙门氏菌(*Salmonella dublin*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)、大肠杆菌、弗氏志贺菌、宋内氏志贺菌、霍乱弧菌(Yamamoto, et al. (2009) Gene 438:57-64)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) (Lesic, et al. (2008) BMC Mol Biol 9:20)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*) (Sun, et al. (2008) Applied and Env Microbiol 74:4241-4245)及牛型结核菌(*Mycobacterium bovis*) (BCG)。值得注意的是, λ red在分支杆菌中不起作用,但是另一噬菌体(例如Che9c gp61)已经用于在分支杆菌中进行重组工程(van Kessel, et al. (2008) Methods mol biol 435:203-215)。

[0082] 在一个优选的实施方案中,原核微生物是伤寒沙门氏菌Ty21a。VIVOTIF[®] Typhoid Vaccine Live Oral Ty21a是一种活减毒疫苗,用于口服给予。该疫苗含有减毒的菌株伤寒沙门氏菌Ty21a。(Germanier et al. (1975) J. Infect. Dis., 131:553-558)。其

是由 Bema Biotech Ltd. Berne, Switzerland 生产的。伤寒沙门氏菌 Ty21a 在美国专利 3,856,935 中也有描述。

[0083] 减毒的原核微生物菌株经历重组工程,由此一个大抗原性区域被整合进该微生物的染色体中。在一个实施方案中,所述大抗原性区域是宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因区,所述原核生物体是伤寒沙门氏菌 Ty21a。

[0084] 再一方面,本发明提供了一种组合物,其包含一或多种上述减毒的原核微生物,任选组合药物或生理学可接受的载体。优选地,所述组合物是疫苗,尤其是粘膜免疫疫苗,例如通过口腔、直肠、鼻、阴道或生殖器途径给予。有利地,对于预防性接种,所述组合物包含表达多个不同 O-Ps 基因或不同蛋白质抗原(例如炭疽保护性抗原或疟疾寄生虫表面蛋白质)的一或多个沙门氏菌属菌株。

[0085] 再一方面,本发明提供了上述减毒的原核微生物菌株用作药物,特别是用作疫苗。

[0086] 再一方面,本发明提供了包含插入原核微生物染色体中的 O- 抗原生物合成基因区的减毒的原核微生物菌株在制备预防性或治疗性处理一或几种不同类型细菌感染(例如伤寒和痢疾)的药物中的应用,其中 O 抗原在所述微生物中产生。

[0087] 通常,本发明表达 O-Ps 的微生物以分离的和/或纯化的形式提供,即基本纯的。这可包括在组合物中,其中其代表至少大约 90% 活性成分,更优选至少大约 95%、更优选至少大约 98%。然而,这种组合物可包括惰性载体物质或者其它药物和生理学可接受的赋形剂。本发明的组合物除了所述表达 O-Ps 的微生物之外,还可包含用于治疗或预防性应用的一或多种其它活性成分(例如其它抗原)和佐剂。

[0088] 本发明的组合物优选以“预防有效量”或者“治疗有效量”给予个体(根据情况而定,但是预防可以被认为是治疗),这个量足以示出对个体的益处。给予的实际量及给予速度和时程根据治疗的个体/状况的性质和严重程度而定。治疗的处方如根据可接受的剂量等的最终决定由 Vaccine Regulatory Authorities 在检验人体免疫之后的安全性和有效性之后予以指导。

[0089] 组合物可以单独或者组合其它治疗根据治疗的情况同时或相继给予。

[0090] 本发明的药物组合物及根据本发明的应用,其除了或活性成分之外还可包含药物或生理学可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂及本领域技术人员熟知的其它材料。这种材料应是无毒性的及应不干扰活性成分的效力。载体或其它材料的精确性质依赖于给予途径。

[0091] 上述技术和方案例如可见于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (Ed.), 1980。

[0092] 本发明进一步涉及针对痢疾志贺菌 1LPS 在 rfb 基因座(GENBANK® 登记号:AY585348;SEQ ID NO:3)中9个ORF及在rfp基因座(GENBANK® 登记号:AY763519;SEQ ID NO:4)中一个ORF的鉴别和测序。这些基因可以完整或者部分存在于本文所述疫苗菌株中。

[0093] 因此,本发明涉及通过存在编码 O-Ps 的异源基因或一系列异源基因而进一步鉴定的疫苗菌株。

[0094] 在疫苗菌株的一个优选实施方案中,一或多个异源基因在生长非必需的指定整合位点被稳定整合进所述菌株的染色体中,以通过载体菌株诱导保护性免疫应答。

[0095] 在一个实施方案中,本发明的异源基因包括来自 rfb 基因座的所有 9 个 ORF 及来自 rfp 的 ORF。在另一实施方案中,来自 rfb 的第九个 ORF 不存在,因为其对于 O-Ps 生物合成不是必需的。在一个实施方案中,ORF 可以通过插入序列元件分开。后者仅是在宋内氏志贺菌的情况中。

[0096] 所述 ORF 可以是在同源启动子或其它非同源启动子的控制下。必需的 O- 抗原生物合成基因在一个操纵子中可以物理连接在一起或者在染色体上是分开的及存在于分开的 DNA 区域组合,在不同启动子控制下。所述基因当互相紧邻放置时基因顺序可以变化,只要其是生物学功能性的即可。

[0097] 或者,上述疫苗菌株含有 rfbB、rfbC 和 rfbA 和 / 或完整的核心 - 连接的 O- 抗原 LPS 的合成必需的任何其它基因,其以串联形式被整合进一个染色体位点中或者位于分开的染色体位点。

[0098] 这种疫苗菌株使得异源 O-Ps 表达,其与异源 LPS 核心区域共价偶联,优选呈现出与肠道病原体产生的天然 LPS 相似的聚合程度。如果需要,这种疫苗菌株可以以在同源 LPS 核心合成中缺陷的方式修饰。

[0099] 本发明还涉及活疫苗,其包含上述疫苗菌株及任选存在的药物或生理学可接受的载体和 / 或中和胃酸度的缓冲剂和 / 或将所述疫苗以存活状态输送至肠道的系统。

[0100] 所述疫苗包含免疫保护性或免疫治疗性及无毒性量的所述疫苗菌株。合适剂量可以由本领域技术人员确定,典型为 10^7 至 10^{10} 个细菌。

[0101] 药物和生理学可接受的载体、合适的中和缓冲剂及合适的输送系统可以由本领域技术人员选择。

[0102] 在一个优选实施方案中,所述活疫苗用于针对革兰氏阴性肠道病原体免疫。

[0103] 本发明的疫苗的给予模式可以是任何合适途径,其将免疫保护量或免疫治疗量的疫苗输送至对象。然而,疫苗优选经口服或鼻内给予。

[0104] 本发明还涉及使用上述疫苗菌株制备活疫苗以针对革兰氏阴性肠道病原体免疫。对于这种应用,将疫苗菌株与上述载体、缓冲剂和 / 或输送系统组合。

[0105] 本发明还提供了为核心连接的 O- 特异性多糖的合成所需的多肽和相应的多核苷酸。本发明包括天然发生的和非天然发生的多核苷酸及其多肽产物。天然发生的 O- 抗原生物合成产物包括在除了志贺菌或沙门氏菌菌株之外的生物体中表达的独特基因和多肽种类以及相应种类同系物。非天然发生的 O- 抗原生物合成产物包括天然发生的产物的变体如类似物及 O- 抗原生物合成产物,其包括共价修饰。O- 抗原生物合成多核苷酸的序列包括 SEQ ID NO:3-4 (包括痢疾志贺菌血清型 1 多肽的 DNA),其在 US 8,071,113 中揭示。

[0106] 纯化的和分离的宋内氏志贺菌多核苷酸 (例如 DNA 序列和 RNA 转录物,有义和互补反义链) 编码细菌 O- 抗原生物合成基因产物。某些 DNA 序列,包括基因组和 cDNA 序列以及完全或部分化学合成的 DNA 序列,在 US 8,071,113 中描述。基因组 DNA 包含本发明多肽的蛋白质编码区,及包括可在相同物种的其它细菌菌株中发现的变体。如本文所用及本领域所理解,“合成的”是指与“酶促方法”相反的产生多核苷酸的纯化学的方法。“完全”合成的 DNA 序列因此是完全通过化学方式产生的,“部分”合成的 DNA 包括其中所得 DNA 的仅一部分是通过化学方式产生的那些。优选的编码宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因产物的 DNA 序列在 SEQ ID NO:2 中示出,及其物种同系物。优选的编码痢疾志贺菌 O- 抗原生物

合成基因产物的 DNA 序列在 SEQ ID NO:3 和 4 中示出,及其物种同系物。

[0107] 本发明还提供了自主复制重组表达构建体如掺入 O- 抗原生物合成基因序列的质粒和病毒 DNA 载体。本发明还提供了表达构建体,其中 O- 抗原生物合成多肽编码多核苷酸与内源或外源表达控制 DNA 序列和转录终止子可操纵地连接。O 抗原生物合成基因可以通过 PCR 克隆,使用宋内氏志贺菌基因组 DNA 作为模板。为了便于将基因插入表达载体中,选择 PCR 引物以便 PCR 扩增的基因在 5' 末端在起始密码子 ATG 之前具有限制酶位点,及在 3' 末端在终止密码子 TAG、TGA 或 TAA 之后具有限制酶位点。如果需要,基因中的密码子可以改变而不改变氨基酸,根据大肠杆菌密码子优先性进行,如 Grosjean et al. (1982) Gene, 18:199-209 及 Konigsberg et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:687-691 所述。密码子使用的优化可导致当在大肠杆菌中产生时基因产物的表达增加。如果蛋白质基因产物是在细胞外产生的,在大肠杆菌或其它细菌的周质中或者在细胞培养基中产生,将该基因克隆进表达载体中并与信号序列连接。

[0108] 根据本发明另一方面,提供了宿主细胞,包括原核细胞和真核细胞,以使得本发明的 O 抗原生物合成多肽表达的方式用本发明的多核苷酸序列将其稳定或瞬时转化、转染或电穿孔。本发明的潜在的表达系统包括细菌、酵母、真菌、病毒、寄生物、无脊椎动物和哺乳动物细胞系统。本发明的宿主细胞是免疫原的有益来源以开发与 O 抗原特异性免疫反应的抗体。本发明的宿主细胞显然可用于大规模生产 O 抗原生物合成多肽的方法中,其中将细胞在合适的培养基中生长,并从细胞或者从细胞生长的培养基中分离希望的多肽产物,例如通过免疫亲和性纯化或者本领域熟知及常规使用的任何众多的纯化技术进行。任何合适的宿主细胞均可用于表达基因产物,如大肠杆菌,其它细菌包括多杀性巴氏杆菌 (*P. multocida*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*),酵母,包括巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),昆虫细胞或者哺乳动物细胞,包括 CHO 细胞,利用本领域已知的合适载体进行。蛋白质可以直接产生或者与肽或多肽融合,在细胞内或细胞外分泌进细菌细胞的周质间隙中或者进细胞培养基中。蛋白质的分泌需要信号肽(也称作前序列),已知来自原核和真核生物的许多信号序列发挥重组蛋白质分泌的功能。在蛋白质分泌期间,信号肽通过信号肽酶除去以产生成熟蛋白质。

[0109] 为了简化蛋白质纯化程序,可以在基因编码序列的 5' 或 3' 末端加入纯化标签。常用的纯化标签包括一段 6 组氨酸残基序列(美国专利号 5,284,933 和 5,310,663), Schmidt et al. (1993) Protein Eng., 6:109-122 所述的链霉抗生物素蛋白亲和性标签, FLAG 肽 (Hopp et al. (1988) Biotechnology, 6:1205-1210), 谷胱甘肽 S- 转移酶 (Smith et al. (1988) Gene, 67:31-40) 以及硫氧还蛋白 (LaVallie et al. (1993) Bio/Technology, 11:187-193)。为了除去这些肽或多肽,在融合接合处可以插入蛋白酶解识别位点。常用的蛋白酶是因子 Xa、凝血酶和肠激酶。

[0110] 在一个实施方案中,本发明应用如上述纯化和分离的宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成多肽。优选包含由 SEQ ID NO:2 所示任一多核苷酸编码的氨基酸序列的多肽及其物种同系物。在某些实施方案中,本发明利用由选自如下的 DNA 编码的 O 抗原生物合成多肽:

[0111] a) SEQ ID NO:2 任一所示 DNA 序列及其物种同系物;

[0112] b) 编码由 SEQ ID NO:2 任一编码的宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成多肽的 DNA 分子及其物种同系物;及

[0113] c) 编码 O- 抗原生物合成基因产物的 DNA 分子, 其在中等严格条件下与 (a) 或 (b) 的 DNA 杂交。中等严格杂交条件为本领域技术人员熟知。

[0114] 本发明还包含与本发明优选的多肽具有至少大约 99%、至少大约 95%、至少大约 90%、至少大约 85%、至少大约 80%、至少大约 75%、至少大约 70%、至少大约 65%、至少大约 60%、至少大约 55% 及至少大约 50% 相同性和 / 或同源性的多肽。与本发明优选的多肽的氨基酸序列“相同性”百分比在本文定义为在排列两个序列及如果需要则引入缺口以实现最大百分比序列相同性之后在候选序列中与 O 抗原生物合成基因产物序列中的残基相同的氨基酸残基百分比, 及不认为任何保守取代是序列相同性的一部分。关于本发明优选的多肽的序列“同源性”百分比在本文定义为在排列两个序列及如果需要则引入缺口以实现最大百分比序列相同性之后在候选序列中与 O 抗原生物合成多肽序列之一中的残基相同的氨基酸残基的百分比, 也认为任何保守取代是序列相同性的一部分。保守取代可以如下表 A 和 B 所示定义。

[0115] 表 A : 保守取代 I

[0116]

侧链	特性	氨基酸
脂肪族	非极性	G, A, P I, L, V
	极性-无荷电	C, S, T, M N, Q
	极性-荷电	D, E K, R
芳香族		H, F, W, Y
其它		N, Q, D, E

[0117] 本发明的多肽可以分离自天然细菌细胞来源或者可以是化学合成的, 但是优选通过本发明宿主细胞参与的重组方法产生。本发明的 O 抗原生物合成基因产物可以是全长多肽、其生物学活性片段或者变体, 其保留特异性生物学或免疫学活性。在一个实施方案中, 生物学活性是抗原如宋内氏志贺菌 O- 抗原的生物合成。在一个实施方案中, 免疫学活性是抗原性基因产物如 O- 抗原产物的保护性免疫学活性。变体可包含 O 抗原生物合成多肽类似物, 其中一或多个指定的 (即天然编码的) 氨基酸被缺失或置换或者其中加入一或多个非指定的氨基酸: (1) 不丧失特异于 O 抗原生物合成基因产物的一或多种生物学活性或免疫学特性 (活性); 或者 (2) 使 O 抗原生物合成基因产物的特定生物学活性特异性失效。考虑的缺失变体还包括缺少对于生物学活性非必需的多肽部分, 插入变体包括融合多肽, 其中野生型多肽或其片段与另一多肽融合。

[0118] 变体 O 抗原生物合成多肽包括其中通过编码本发明的多肽的多核苷酸的修饰导入保守取代的那些多肽。保守取代为本领域公认以根据其相关物理性质对氨基酸进行分类及可如表 A 所示定义 (来自 WO 1997/009433, 第 10 页)。或者, 保守氨基酸可以如表 B 所示如 Lehninger (Biochemistry, Second Edition (1975) W. H. Freeman & Co., pp. 71-77) 所述定义分组。

[0119] 表 B : 保守取代 II

[0120]

侧链特性	氨基酸
<u>非极性(疏水性)</u>	
A. 脂肪族:	A, L, I, V, P
B. 芳香族:	F, W
C. 含硫:	M
D. 临界:	G
<u>无电荷-极性</u>	
A. 羟基:	S, T, Y
B. 酰胺:	N, Q
C. 巯基:	C
D. 临界:	G
正电荷(碱性):	K, R, H
负电荷(酸性):	D, E

[0121] 本发明的变体 0 抗原生物合成产物包括成熟 0 抗原生物合成基因产物,即其中除去了前导或信号序列,具有另外的氨基末端残基。考虑在 -1 位置具有另外的甲硫氨酸残基的 0 抗原生物合成基因产物,以及在位置 -2 和 -1 具有另外的甲硫氨酸和赖氨酸残基的 0 抗原生物合成产物。这些类型的变体特别可用于在细菌细胞类型中重组蛋白质生产。本发明的变体还包括基因产物,其中已经导入衍生自其它蛋白质的氨基末端序列,以及包含在天然发生的蛋白质中未发现的氨基末端序列的变体。

[0122] 本发明还包含具有另外的氨基酸残基的变体多肽,其得自特定表达系统的使用。例如,使用可商购的表达作为与谷胱甘肽 -S- 转移酶 (GST) 的融合蛋白的希望的多肽的载体提供了希望的多肽,在 GST 成分与希望的多肽裂解后其在 -1 位置具有另外的甘氨酸残基。本发明也涵盖得自使用其它载体系统表达的变体。

[0123] 本发明还包含抗体(例如单克隆和多克隆抗体,单链抗体,嵌合抗体,人源化抗体,人抗体,及 CDR 嫁接抗体,包括包含特异性识别本发明多肽的 CDR 序列的化合物)及特异于 0 抗原生物合成基因产物或其片段的其它结合蛋白质。术语“特异于”是指本发明抗体的可变区排他地识别并结合 0 抗原(即通常能从相关 0 抗原中区分单一的 0 抗原,但是通过与抗体可变区之外、及特别是在分子的恒定区中的序列相互作用而也与其它蛋白质(例如金黄色葡萄球菌蛋白质 A 或者在 ELISA 技术中的其它抗体)相互作用。确定本发明抗体的结合特异性的筛选测定为本领域熟知并常规实施。关于这种测定的综合论述见 Harlow et al. (Eds.);Antibodies A Laboratory Manual(1988)Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N.Y, chapter 6。识别并结合本发明 0 抗原的片段的抗体也包含在本发明中,只要所述抗体如上述首要地特异于从中衍生所述片段的本发明的 0 抗原即可。

[0124] 处理 / 治疗

[0125] 在某些实施方案中,本发明提供了治疗(例如一或多个症状或特征的减轻、改善、缓解、延迟发生、抑制进展、降低严重性和 / 或降低发生率)和 / 或预防细菌感染的组合物(包括疫苗)及方法。

[0126] 在一些实施方案中,接种和 / 或治疗方法(如下文中描述的那些)包括基于先前暴露于细菌菌株的情况对患者群分层。这种方法包括确定患者是否已经预先暴露于一或多种细菌菌株的步骤。在一些实施方案中,如果确定患者已经预先暴露于一或多种细菌菌

株,该患者可接受较低浓度的、较低效力的和 / 或较低频率剂量的本发明疫苗或组合物。如果确定患者先前未预先暴露于一或多种细菌菌株,该患者可接受更高浓度的、更强力的和 / 或更频繁剂量的本发明疫苗或组合物。

[0127] 在一个实施方案中,本发明的重组工程化的细菌菌株或疫苗或组合物治疗一种以上的细菌感染,即一种以上细菌物种的感染。在这种实施方案中,其可被认为是“多功能”疫苗(或者菌株或组合物,后两者任一均在下文继续描述中涵盖)。本发明的多功能疫苗也可用于同时治疗和 / 或预防对象中的多种不同失调。因此,在另外的实施方案中,本发明进一步提供了一种通过给予对象本发明的多功能疫苗治疗和 / 或预防对象中一种以上失调的方法。

[0128] 可以由本发明的多功能疫苗潜在地治疗和 / 或预防的疾病例如包括但不限于多种细菌物种感染、烧伤、感染、新生物形成或者放射性损伤。“新生物形成(neoplasia)”是指在不激发正常细胞增殖或者导致正常细胞增殖停止的条件下肿瘤细胞的不受控制的和进行性增殖。新生物形成导致“新生物(neoplasma)”,在本文定义其为任何新的和不正常生长,特别是新的组织生长,其中细胞生长不受控制及是进行性的。因此,新生物形成包括“癌症”,在本文其是指具有失去正常控制的独特性状的肿瘤细胞增殖,导致不受调节的生长、缺少分化、局部组织浸润和 / 或转移。

[0129] 给予

[0130] 组合物和疫苗(该术语在本文可互换使用)可以通过使用对治疗和 / 或接种有效的任何给予量和任何给予途径给予。需要的精确量在对象之间可变,根据对象的物种、年龄和一般状况、感染严重性、特定的组合物、给予模式、活性模式等而确定。组合物典型以便于给予和均匀给药的剂量单位形式配制。然而,应理解本发明组合物的总的每日剂量将在合理医学判断范围内由主治医生决定。对于任何特定对象或生物体的特定治疗有效剂量水平依赖于医学领域中熟知的各种因素,包括治疗和 / 或免疫接种的失调及失调的严重性,应用的特定疫苗组合物的活性,给予后组合物的半衰期,对象的年龄、体重、一般状况、性别和饮食,给予时间,给予途径,和应用的特定化合物的排泄速度,治疗持续时间,与应用的特定化合物组合或同时使用的药物等因素。

[0131] 本发明的组合物(和疫苗)可以通过任何途径给予。在一些实施方案中,本发明的药物组合物通过各种途径给予,包括口服(PO)、静脉内(IV)、肌肉(IM)、动脉内、髓内、鞘内、皮下(SQ)、心室内、经皮、皮间(interdermal)、皮内、直肠(PR)、阴道、腹膜内(IP)、胃内(IG)、局部或经表皮(transcutaneous)(例如通过粉末、软膏、乳霜、凝胶、洗剂和 / 或滴剂)、粘膜、鼻内、口腔、肠道、玻璃体、舌下给予;通过气管内滴注、支气管滴注和 / 或吸入;以及口腔喷雾、鼻腔喷雾和 / 或喷雾,和 / 或通过门静脉导管给予。

[0132] 通常,最合适的给予途径根据各种因素而定,包括给予制剂的性质(即给予时的稳定性)、对象的状况(例如对象是否能耐受特定的给予模式)等。在特定的实施方案中,组合物可以鼻内给予。在特定的实施方案中,组合物可以通过气管内滴注给予。在特定的实施方案中,组合物可以通过支气管滴注给予。在特定的实施方案中,组合物可以通过吸入给予。在特定的实施方案中,组合物可以通过鼻腔喷雾给予。在特定的实施方案中,组合物可以通过粘膜给予。在特定的实施方案中,组合物可以口服给予。在特定的实施方案中,组合物可以通过静脉内注射给予。在特定的实施方案中,组合物可以通过肌肉注射给予。在

特定的实施方案中,组合物可以通过皮下注射给予。口服或鼻腔喷雾或喷雾途径(例如通过吸入)最常用于将治疗剂直接输送至肺和呼吸系统。然而,本发明涵盖通过考虑到药物输送学进展的任何合适途径输送药物组合物。

[0133] 对于口服给予,组合物(包括疫苗)可以是胶囊、片剂、可溶膜、粉末、颗粒或者是悬浮液。组合物可具有常规的添加剂,如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉。组合物也可以存在粘合剂,如晶状纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯树胶、玉米淀粉或明胶。此外,组合物可以存在崩解剂,如玉米淀粉、马铃薯淀粉或者羧甲基纤维素钠。组合物可进一步存在无水磷酸氢钙或者羟基乙酸淀粉钠。最后,组合物可以存在润滑剂,如滑石或硬脂酸镁。

[0134] 对于肠道外给予,组合物可以组合无菌水溶液,其优选与对象血液是等渗的。这种配制物可以通过将固体的活性成分溶解于水中而制备,所述水中含有生理相容物质如氯化钠、甘氨酸等及具有与生理条件相容的缓冲 pH,以产生水溶液,然后使所述溶液灭菌。所述配制物可以存在于单位或多剂量容器中,如密封的安瓶或小瓶中。配制物也可以通过任何注射方式给予,包括本文揭示的任何那些方式。

[0135] 直肠或阴道给予的组合物典型是栓剂,其可以通过将组合物与合适的无刺激性的赋形剂如可可油、聚乙二醇或栓剂蜡混合而制备,其在室温是固体,但是在体温是液体,因此在直肠或阴道腔中是融化的并释放活性成分。

[0136] 口服给予的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉末、可溶膜和颗粒。在这种固体剂型中,活性成分与至少一种惰性的药物可接受的赋形剂如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或充填剂或填充剂(例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸)、粘合剂(例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯树胶)、湿润剂(如甘油)、崩解剂(如琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉、木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠)、溶液阻滞剂(例如石蜡)、吸收促进剂(例如季铵化合物)、增湿剂(例如十六烷醇和单硬脂酸甘油酯)、吸附剂(例如高岭土和膨润土)及润滑剂(例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠)、味觉/嗅觉成分及其混合物混合。在胶囊、片剂和丸剂的情况中,剂型可包含缓冲剂。

[0137] 局部和/或经皮给予本发明组合物的剂型可包括软膏、糊剂、乳霜、洗剂、凝胶、粉末、溶液、喷雾剂、吸入剂和/或贴剂。通常,将活性成分在无菌条件下与药物可接受的赋形剂和/或任何需要的防腐剂和/或缓冲剂混合。此外,本发明涵盖了经皮贴剂的使用,其通常具有另外的提供化合物控制释放给机体的优势。这种剂型可以例如通过将化合物溶解和/或分散于适当的基质中而制备。或者或另外地,可以通过提供速度控制膜和/或通过化合物分散于聚合物基质和/或凝胶中而控制速度。

[0138] 对于经皮给予,本发明的组合物(包括疫苗)可以组合皮肤渗透增强剂,如丙二醇、聚乙二醇、异丙醇、乙醇、油酸、N-甲基吡咯烷酮等,其增加皮肤对组合物的渗透性,并使得组合物渗透皮肤进入血流。增强剂和疫苗的组合物也可以进一步组合聚合物物质,如乙基纤维素、羟丙基纤维素、乙烯/乙酸乙烯酯、聚乙烯吡咯烷酮等,以提供凝胶形式的组合物,可以将其溶解于溶剂如二氯甲烷中,蒸发至希望的粘性,然后应用于衬底材料以提供贴剂。组合物可以在对象的感染、新生物或其它失调所在部位或其附近经皮给予。或者,组合物可以在受影响区域之外的部位经皮给予以实现全身性给予。

[0139] 对于鼻内给予(例如鼻腔喷雾)和/或肺部给予(通过吸入给予),本发明的组合物(包括疫苗)包括气雾剂配制物可以根据本领域技术人员熟知的方法制备。气雾剂配制

物可以包含固体颗粒或溶液（水溶液或非水溶液）。喷雾器（例如喷嘴喷雾器、超声喷雾器等）和雾化器可用于从溶液（例如使用溶剂如乙醇）中产生喷雾；计量吸入器和干粉吸入器可用于产生小颗粒喷雾。希望的喷雾颗粒大小可以通过应用本领域已知的众多方法中的任一种方法获得，包括但不限于喷射研磨、喷雾干燥和临界点冷凝。

[0140] 鼻内给予的组合物可以是固体配制物（例如粗粉）及可含有赋形剂（例如乳糖）。固体配制物可以从架在鼻子上的粉末容器中给予，使用通过鼻腔通路的快速吸入法。鼻内给予的组合物也可以包含鼻腔喷雾或鼻腔滴注的水溶液或油性溶液。对于使用喷雾器，配制物可包含水溶液和另外的物质，包括例如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂或表面活性剂。鼻腔喷雾可以例如通过喷射压力加压所述组合物的悬浮液或溶液而产生。

[0141] 肺部给予的本发明的组合物（包括疫苗）的配制物可以是适于通过吸入装置输送的形式，及可具有有效达到肺下呼吸道或窦的颗粒大小。对于通过粘膜表面、包括肺粘膜的吸收，配制物可包含乳状液，其包含例如生物活性肽、多种亚微米颗粒、粘膜粘着大分子和/或水连续相。通过粘膜表面的吸收可以通过乳状液颗粒的粘膜粘附而实现。

[0142] 用于计量吸入装置的本发明的组合物（包括疫苗）可包括含有所述组合物的精细分离的粉末，在非水溶液基质中形成悬浮液。例如，组合物可以借助于表面活性剂（例如去水山梨糖醇三油酸酯、大豆卵磷脂或油酸）悬浮于推进剂中。计量的吸入器典型使用贮存在容器（如小罐）中作为混合物（例如液化的压缩气体）的气体推进剂（例如氯氟烃、氢氯氟烃、氢氟烃或者烃）。吸入器需要在吸气期间作用。例如，计量阀的作用可释放作为气雾剂的混合物。干粉吸入器使用混合粉末的呼吸力作用。

[0143] 本发明的组合物（包括疫苗）也可以从渗透性微型泵或其它延时释放装置中释放或输送。从基本的渗透性微型泵中的释放速度可以用在释放孔中排列的微孔快反应凝胶调节。渗透性微型泵可用于控制释放或者靶向输送组合物。

[0144] 本发明的组合物（包括疫苗）可以通过用于导入药物的已知技术给予或导入对象，包括例如注射和输注。在失调位于对象机体的特定部分的情况中，可希望将所述组合物通过注射或通过一些其它方式（例如通过将组合物导入血液或另一体液中）直接导入该区域。

[0145] 本发明的组合物（包括疫苗）可以单独或者与用于治疗失调的一或多种药物组合给予患该失调的对象。例如，在对象患有新生物形成的情况中，所述组合物可以组合至少一种抗肿瘤药给予对象。可以与所述组合物组合的抗肿瘤药例如包括但不限于卡铂、环磷酰胺、阿霉素、依托泊苷和长春新碱。此外，当给予患有新生物形成的对象时，所述组合物可以组合其它新生物治疗，包括但不限于手术治疗、放射治疗、基因治疗和免疫治疗。

[0146] 疫苗

[0147] “疫苗”是诱导接受疫苗的受体或宿主中免疫应答的组合物。疫苗可在随后细菌物种（或其它微生物）攻击时诱导针对感染的保护作用。保护作用是指对于宿主动物的至少一种细菌物种（或其它微生物）的持续感染的抗性（例如部分抗性）。在接种的宿主体内产生的中和抗体可提供这种保护作用。在其它情况中，CTL 应答可提供这种保护作用。在一些情况中，中和抗体和细胞介导的免疫（例如 CTL）应答提供这种保护作用。

[0148] 疫苗通过诱导个体中对于一或多种抗原的免疫应答可用于预防或降低感染或疾病。例如，疫苗可预防性用于初次实验（naive）个体中，或者治疗性用于已经感染至少一种

细菌物种（或其它微生物）的个体中。

[0149] 保护性应答可以通过多种方法评估。例如，针对细菌（或其它微生物）蛋白质的中和抗体的产生和 / 或针对这种蛋白质的细胞介导的免疫应答的产生任一均可表示保护性应答。保护性应答也包括与暴露于相同接种体但未给予所述疫苗的宿主动物相比，在暴露于指定的（细菌或其它微生物）接种体的已接种的宿主动物中导致建群的细菌数目减少。

[0150] 在一个实施方案中，本发明的疫苗可含有佐剂。如本文所用，术语“佐剂”是指任何化合物，当其与抗原一起注射时，非特异性地增强对该抗原的免疫应答。举例的佐剂包括完全 Freund 佐剂、不完全 Freund 佐剂、Gerbu 佐剂（GMDP ;C. C. Biotech Corp.）、RIBI fowl 佐剂（MPL ;RIBI Immunochemical Research, Inc.）、铝钾矾、磷酸铝、氢氧化铝、QS21 (Cambridge Biotech)、**TITERMAX[®]**佐剂（CytRx Corporation）和 **QUIL A[®]**佐剂。可具有佐剂性质的其它化合物包括粘合剂如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素或者明胶；赋形剂如淀粉、乳糖或糊精，崩解剂如褐藻酸、藻酸钠、**PRIMOGE[®]**、玉米淀粉等；润滑剂如硬脂酸镁或**STEROTEX[®]**；助流剂如胶体二氧化硅；甜味剂如蔗糖或糖精，香味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙味剂，以及着色剂。

[0151] 此外，许多佐剂的可用纲要由 National Institutes of Health 制备，可见于互联网（www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf）。本领域已知几百种不同的佐剂，及可用于实施本发明。根据本发明可使用的佐剂例如包括但不限于细胞因子，铝盐（例如氢氧化铝、磷酸铝等），凝胶型佐剂（例如磷酸钙等）；微生物佐剂（例如包含 CpG 基序的免疫调节性 DNA 序列；内毒素如单磷脂酰脂质 A）；外毒素如霍乱毒素、大肠杆菌热不稳定毒素和百日咳毒素；胞壁酰二肽等）；基于油 - 乳状液和乳化剂的佐剂（例如 Freund 佐剂，MF59 [Novartis]，SAF 等）；微粒佐剂（例如脂质体，可生物降解的微球体等）；合成佐剂（例如非离子嵌段共聚物，胞壁酰肽类似物，聚磷腈，合成的多核苷酸等）；和 / 或其组合。其他举例的佐剂包括一些聚合物（例如聚磷腈）、Q57、皂苷（例如 QS21）、鲨烯、tetrachlorodecaoxide、CPG 7909、poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene] (PCCP)、干扰素 - γ 、嵌段共聚物 P1205 (CRL1005)、白细胞介素 -2 (IL-2)、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 等。在本发明的一个实施方案中，载体细菌（例如伤寒沙门氏菌 Ty21a）自身作为表达的外源抗原如志贺菌 O 抗原或炭疽保护性抗原的佐剂。

[0152] 在另一实施方案中，本发明的疫苗可以使用稀释剂配制。举例的“稀释剂”包括水、生理盐水溶液、人血清白蛋白、油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成的溶剂，抗菌剂如苯甲醇，抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠，螯合剂如乙二胺四乙酸，缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，及调节渗透性的物质如氯化钠或葡萄糖。举例的“载体”包括液体载体（如水，盐水，培养基，糖水，葡萄糖水溶液和甘油醇）和固体载体（如碳水化合物，如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖和葡聚糖），抗氧化剂如抗坏血酸和谷胱甘肽，以及水解的蛋白质。

[0153] 在再一实施方案中，本发明的疫苗可含有赋形剂。术语“赋形剂”在本文是指任何惰性物质（例如阿拉伯树胶、糖浆、羊毛脂、淀粉等），其形成运载体以输送抗原。术语赋形剂包括这样的物质，其在存在足够液体的条件下赋予组合物为制备丸剂或片剂所需的粘合性。

[0154] 在一些实施方案中，如上文所述，本发明的干预剂和 / 或粘合剂可用于预防性应

用中。在一些实施方案中,预防性应用包括细菌感染的预防、抑制进展和 / 或延迟细菌感染发生的系统和方法。在一些实施方案中,干预剂可用于被动免疫(即其中将抗体给予对象的免疫)。在一些实施方案中,被动免疫的疫苗可包含抗体干预剂,如本文所述那些。在一些实施方案中,在妊娠期间当抗体从母亲转移至胎儿时发生被动免疫。在一些实施方案中,抗体直接给予个体(例如通过注射、口服等)。值得注意地,可以对一人进行免疫及在另一个个体中使用其抗体用于被动保护作用。例如,Ty21a 禁用于妊娠妇女(即其是免疫低下的,减毒的沙门氏菌属可潜在地导致疾病)。然而,对妊娠母亲可适当地被动性转移保护性抗体,而不是让其易感致死性疾病。

[0155] 在一个实施方案中,本发明提供了主动免疫的疫苗(即其中将微生物、蛋白质、肽、表位、模拟表位等给予对象的免疫)。在一些实施方案中,疫苗可包含一或多种如本文所述的干预剂和 / 或粘合剂。

[0156] 在一个实施方案中,提供了包含针对疫苗所述的干预剂和 / 或粘合剂的组合物。例如,在一些实施方案中,干预剂和 / 或粘合剂多肽、编码这种多肽的核酸、这种多肽或核酸的特征性或生物学活性片段、与这种多肽或片段结合和 / 或竞争的抗体、与这种多肽或者与结合其的聚糖相互作用或竞争的小分子等包含在组合物中。在一些实施方案中,组合物中包含不是多肽的干预剂和 / 或粘合剂,例如其是小分子、伞状拓扑结构聚糖及其模拟物、碳水化合物、适体、聚合物、核酸等。在特定的实施方案中,可以展望细菌输送的癌症或其它病症的治疗方法,其中治疗性核酸或蛋白质在载体细菌疫苗 / 治疗性菌株的染色体中编码。

[0157] 本发明涵盖通过给予本发明的组合物治疗和 / 或预防细菌(或其它微生物)感染。在一些实施方案中,将这种组合物给予患有或易感于细菌感染的对象。在一些实施方案中,如果对象显示出通常与细菌感染相关的一或多个症状,则认为该对象患有细菌感染。在一些实施方案中,已知或确认对象已经暴露于至少一种细菌物种(或其它微生物)。在一些实施方案中,如果已知或确认对象已经暴露于细菌物种,则认为该对象易感于细菌感染。在一些实施方案中,如果对象已经与已知或怀疑已经感染细菌的其它个体接触,和 / 或如果个体正在或已经居于其中已知或认为细菌感染流行的地区,则已知或确认该对象已经暴露于该细菌物种。本发明提供的组合物可以在细菌(或其它微生物)感染的一或多个症状出现之前或之后给予。

[0158] 通常,组合物除了一或多种无活性物质之外还包含“治疗剂”(例如重组工程化的伤寒沙门氏菌 Ty21a),所述无活性物质如无菌的生物相容的药物载体,包括但不限于无菌水、盐水、缓冲盐水或葡萄糖溶液。或者或此外,组合物可包含药物可接受的赋形剂,如本文所用,其包括适于希望的特定剂型的任何及所有溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体载体、分散或悬浮剂、崩解剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、缓冲剂、固体粘合剂、粒化剂、润滑剂、着色剂、甜味剂、调味剂、香味剂等。Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006; 并入本文作参考) 揭示了用于配制药物流组合物的各种赋形剂及制备其的已知技术。除了任何常规的赋形剂介质与某种物质或其衍生物不相容之外,如通过产生任何不希望的生物学作用或另外以不利方式与药物组合物的其它成分相互作用,其应用涵盖在本发明范围内。

[0159] 组合

[0160] 本发明的组合物和疫苗可以单独或者与一或多种其它治疗剂包括但不限于疫苗和 / 或抗体组合给予对象。尽管这些输送方法在本发明范围内,但是“组合”不是指所述制剂必须在同时给予或者配制以一起输送。本发明的组合物和疫苗可以与一或多种其它希望的治疗剂或医学程序同时、在其之前或随后给予。应意识到用于组合中的治疗活性剂可以在单一组合物中给予或者在不同的组合物中单独给予。通常,每种制剂以针对该制剂确定的剂量和 / 或时间表给予。

[0161] 通常,每种制剂(在本文中,“制剂”之一是本发明的组合物或疫苗)将以针对该制剂确定的剂量和时间表给予。此外,本发明涵盖所述组合物与可改善其生物利用度、降低或改变其代谢、抑制其排泄或改变其在体内的分布的制剂组合输送。尽管本发明的组合物(包括疫苗)可用于治疗和 / 或接种任何对象,但优选其用于治疗和 / 接种人。

[0162] 组合方案中应用的治疗(例如治疗剂或程序)的特定组合要考虑希望的治疗剂和 / 或程序的相容性及要实现的治疗效果。应意识到应用的治疗剂可实现相同目的的期望的效果(例如可用于治疗、预防和 / 或延迟细菌(或其它微生物)感染发生的制剂可以与用于治疗、预防和 / 或延迟细菌感染发生的另一制剂同时给予),或者其可以实现不同效果(例如预防严重疾病或控制副作用)。

[0163] 通常,期望组合中使用的制剂的水平不超过其单独使用时的水平。在一些实施方案中,组合中使用的水平低于其单独使用时的水平。

[0164] 剂量

[0165] 本发明的疫苗(或其它组合物)的剂量可以通过例如首先鉴别有效激发预防性和 / 或治疗性免疫应答的剂量而确定。这可以通过测量细菌特异性免疫球蛋白的血清效价和 / 或通过测量血清样品、尿液样品和 / 或粘膜分泌物中抗体的抑制率而实现。剂量可以从动物研究中确定,包括不是所述细菌物种的天然宿主的动物。例如,可以给予动物疫苗候选物,例如本发明的疫苗,以部分鉴定诱导的免疫应答和 / 或确定是否已经产生任何中和抗体。此外,可以进行常规人体临床研究以确定对于人体的有效剂量。

[0166] 有效剂量可以从得自体外和 / 或体内动物模型的剂量应答曲线中推断。每隔一天给予 Ty21a 三或四剂(根据使用国家而定),剂量可以在大约 2×10^9 至 $>10^{10}$ 菌落形成单位(cfu)/剂。在一个实施方案中,每一至两个月的给药间隔在一些免疫方案中更好(例如在婴儿中),及在另一实施方案中,高如 10^{11} cfu 的剂量在发展中国家更有效(即激发持续更久的更好的保护作用)。

[0167] 在一个实施方案中,基于人体研究的免疫学有效量是足以刺激在群体中的可接受水平的保护性免疫性。对于一些疫苗(在某些实施方案中),这种免疫学有效水平将提供针对特定腹泻疾病的 80% 的效力。对于其它疫苗(在其它实施方案中),免疫学有效量是针对严重疾病的保护作用、但可以是不是针对疾病的所有症状起保护作用的量。

[0168] 在一个实施方案中,本发明的疫苗(或其它组合物)也可以给予处于发生失调危险中的对象,以在对象中有效预防失调的量给予。如本文所用,短语“有效预防失调”包括有效阻止或预防得自该失调的临床损害或症状的发生或表现,或者降低该失调的一或多个症状的强度、严重性和 / 或频率和 / 或延迟其发生。

[0169] 试剂盒

[0170] 在另外的实施方案中提供了包含本发明的重组工程化的伤寒沙门氏菌 Ty21a 或疫苗或组合物的试剂盒。试剂盒可包含一或多种其它元件,包括但不限于使用指导;其它试剂如稀释剂,制备疫苗或组合物以给予的装置或其它材料;药物可接受的载体;及给予对象的装置或其它材料。使用指导可包括治疗性应用指导(例如 DNA 接种和蛋白质加强),包括例如在人体对象中的如本文所述建议的剂量和/或给予模式。

[0171] 在另一实施方案中,本发明的试剂盒可进一步含有至少一种其它试剂,如诊断或治疗剂,例如监测对象中对于本发明的组合物或疫苗的免疫应答的诊断剂,或者如本文所述的另外的治疗剂(见例如本文描述组合治疗的章节所述)。

实施例

[0172] 本发明提供如下实施例只是为了举例说明目的,无限制本发明范围之意。

[0173] 实施例 1:克隆最小必需宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因

[0174] 预先鉴定编码宋内氏志贺菌 I 型 O- 抗原生物合成的一个大的 30kb 区域和侧翼序列(最初通过缺失分析进行)以确定 O- 抗原表达的最小必需序列。与对这个区域的 DNA 序列分析一起,这些缺失数据表明含有推定的启动子和 10 个 orf(图 1 中 orf 4-13)的一个连续的 12.3kb 区域是宋内氏志贺菌中 O- 抗原生物合成必需的。这些缺失研究也提示典型参与调节 O- 抗原链长度的 wzz(ofr3)不是在 Ty21a 中 I 型表达必需的,但是 wzz 的较后部分显然含有推定的 I 型 O- 抗原生物合成操纵子启动子(Xu, et al. (2002) Infect and Immun 70:4414-4423。

[0175] 构建 pMD-TV 质粒

[0176] 使用标准分子生物学技术进行克隆。限制性核酸内切酶和连接酶购自 New England Biolabs(NEB) 或 FERMENTAS®, PHUSION® 聚合酶(Fisher)用于所有 PCR。两侧是 FRT 位点的 Kan^r表达盒从 pKD4 中经 PCR 扩增,使用含有 NheI 和 NsiI 限制位点的引物,将质粒 pGB-2 也经 PCR 扩增,使用含有 NheI 和 NsiI 限制位点的引物,工程化为缺失赋予 Spc 抗性的开放读框(orf)。将这两个 PCR 产物用 NheI 和 NsiI 消化并连接,以构建 Kan^r, Spc^S质粒 pMD35-36。将 vexA 基因(~1000bp)和 tviD 基因的一部分(~500bp)从 Ty21a 基因组 DNA 中经 PCR 扩增。扩增的 tviD 序列克隆在两侧是 FRT 位点的 Kan^r表达盒的上游,及将 vexA 扩增子克隆在多克隆位点(MCS)的下游,如图 1 所示。根据需要通过对 PHUSION® 定向诱变试剂盒(NEB)中所述方法进一步加入或除去限制性核酸内切酶位点以构建 pMD-TV。用于构建 pMD-TV 的引物序列在下表 C 中提供。

[0177] 表 C:用于构建 pMD-TV 的引物

[0178]

引物名称	序列 ^a
prMD31.pGB.2.F.Nsi	TCATATATGCATTAATGTCTAACAATTCGTTCAAGCC (SEQ. ID NO:5)
prMD32.pGB2.R.NheI	CTACACGCTAGCAGCTACTTGCATTACAGCTTACG (SEQ. ID NO:6)

[0179]

prMD33.KD.F.NheI	TAGCGT <u>GCTAGC</u> GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG (SEQ. ID NO:7)
prMD34.KD.R.NsiI	ACATTAATGCATATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCG (SEQ. ID NO:8)
prMD35.pGB.MCS.F.p	TCGAGGGGCGCGCCGGTACCGAATTCCCGACAGTAAGACGG (SEQ. ID NO:9)
prMD36.pGB.MCS.R.p	GCCCCGGGATCCGCGGCCGCGTCGACCTGCAGCCAAGCTT (SEQ. ID NO:10)
prMD58.tviD.F	GATCGGCTAGCCCGTTCCTCATTGATTTGATTGC (SEQ. ID NO:11)
prMD59.tviD.R	GATCGCCCGGGTTACGACTTCCCTGATGTATTTTTTTGTAATG (SEQ. ID NO:12)
prMD60.yexA.F	GATCGCTCGAGTAATTAATGGGCATCATTTTTTCAGCTATTTC (SEQ. ID NO:13)
prMD83.yexA.R.xhoI.1000	GATCGCTCGAGTTAGAAAGAATTAGTGCCGCGGG (SEQ. ID NO:14)
prMD75.mcs.F.p	CGGTCTCGAGGGGCGCGCCGGTACCGAATTCTAATTAATGGGCATCATTTTTTCAGCTATTTC (SEQ. ID NO:15)
prMD76.mcs.R.p	GTGGATCCAAGCTTGCGGCCCGCCGTCGACAGTAAAGCCCTCGCTAGATTTTAATGCG (SEQ. ID NO:16)
prMD77.sites.remove.F.p	CCGACAGTAAGACGGGTAAGCC (SEQ. ID NO:17)
prMD78.sites.remove.R.p	TTAGAAAGAATTAGTGCCGCGGG (SEQ. ID NO:18)

[0180] ^a限制性位点以下划线示出

[0181] 将部分 wzz (orf 3) 至 orf 7 经 PCR 扩增 (图 1 中标记的片段 A) 并克隆进 pMD-TV。

[0182] 将宋内氏志贺菌 O- 抗原基因克隆进 pMD-TV

[0183] 将宋内氏志贺菌 O- 抗原基因从 pXK65 中经 PCR 扩增 (Xu et al. (2002) Infect. Immun., 70:4414-4423)。使用引物 prMD43. ss. F. HindIII, gatcaaagcttgatcaaatagtcatat tcagcg (SEQ ID NO:19) 和 prMD44. ss. BamHI. R, gatcaggatcctgctcagtcagggttggtg (SEQ ID NO:20) 以扩增部分 wzz 基因 (orf3) 至 wzy (orf7), 如图 1 中片段 A 所示。将所得 PCR 产物和 pMD-TV 用 HindIII 和 BamHI 消化, 经 PCR 纯化(QIAGEN[®]) 及使用 T4 连接酶连接。使用引物 prMD41. ss. F. BamHI, gtagcggatccaagcgcagctatttaggatgag (SEQ ID NO:21) 和 prMD42. ss. R. XhoI, gatcgctcgagttaatttacggggtgattaccagac (SEQ ID NO:22) 扩增基因 wbgV (orf9) 至 apqZ (orf14), 如图 1 中片段 B 所示。将所得 PCR 产物和含有基因 wzz 至 wzy (orf3 至 orf7) 的质粒 pMD-TV 用 BamHI 和 XhoI 消化, 经 PCR- 纯化, 如前所述连接以构建 pMD-TV-Ss-1。因此, 将 orf 9-14 (图 1 中标记的片段 B) 经 PCR 扩增, 消除非必需的 IS630 元件 (orf8), 并将这个扩增子在 pMD-TV 中附着于克隆的片段 A 以产生 pMD-TV-Ss-1。

[0184] 观测到该质粒在大肠杆菌或 Ty21a 中表达宋内氏志贺菌 I 型 O- 抗原, 通过使用 I 型特异性抗血清的玻片凝集法确定。在 Western 免疫印迹研究中 (图 2), 从携带 pMD-TV-Ss-1 的大肠杆菌或 Ty21a 中纯化的 LPS 与特异性 I 型抗体反应, 表明 IS630 (orf8) 对于 I 型 O- 抗原生物合成不是必需的。

[0185] 实施例 2: 线性志贺菌 DNA 整合进 Ty21a 染色体中

[0186] Datsenko 和 Wanner (Datsenko et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645) 先前描述了一种基于高效 λ 噬菌体 red 重组系统的方法, 其使得通

过用小的可选择抗生素抗性基因重组置换大肠杆菌染色体序列而可以产生特异性靶向的基因突变,通过使用与靶向突变的基因同源的含有 36-50bp 延伸的引物通过 PCR 产生。所述 λ red 系统包括 β 、 γ 和 exo 基因,其产物分别称作 Beta、Gam 和 Exo (Murphy (1998) J. Bacteriol., 180:2063-2071)。Gam 抑制宿主 RecB、C、D 核酸外切酶及 SbcC、D 核酸酶活性,结果外源性加入的线性 DNA 不被降解。Exo 蛋白质是一种 dsDNA- 依赖性核酸外切酶,其结合每个链的末端同时以 5' 至 3' 方向降解另一链。Beta 结合所得 ssDNA 突出端,最终与互补染色体 DNA 靶配对 (Sawitzke et al. (2007) Methods Enzymol., 421:171-199)。低拷贝质粒 pKD20 编码在阿拉伯糖可诱导 P_{araB} 启动子控制下这三个 λ red 蛋白质,具有优化的核糖体结合位点以有效翻译 β 、 γ 及 exo 基因,并具有温度敏感性复制子以使其易于消除 (Datsenko et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645)。所述 λ red 系统已经广泛用于在大肠杆菌、沙门氏菌属和志贺菌属种中特异性基因失活及导入小的生物学标签 (Uzzau et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:15264-15269) 或将单个基因导入这些染色体中 (Yu et al. (2011) Appl. Microbiol. Biotechnol., 91:177-188)。

[0187] 在这项研究中,为可检测的 λ -Red 介导的大模块外源 DNA ($\geq 15,000$ bp) 重组进希望染色体中靶向位点所需的同源延伸长度以逐步方式从 50 增加至 150bp,然后增加至 500-1000bp。为了将大的 1 型 O- 抗原操纵子整合进疫苗菌株 Ty21a 的染色体中,构建一种新的质粒 pMD-TV。

[0188] 如图 1 所示,最佳的染色体插入载体 pMD-TV 由复制子加上多克隆位点 (MCS) 和相邻的可选择 Kan^r 盒组成,当需要时可以通过在两侧 FRT 位点之间特殊重组而除去。此外, MCS 加上可除去的 Kan^r 盒的侧翼是与 Ty21a 染色体靶向同源的两个大区域 (500-1000bp)。选择的同源区是位于 Ty21a 的非表达的 Vi 荚膜基因座内的 tviD (~ 500 bp) 和 vexA (~ 1000 bp)。将最小必需宋内氏志贺菌 O- 抗原基因区克隆进 pMD-TV 的 MCS 中以构建 pMD-TV-Ss-1,这是随后进行染色体重组工程化的 PCR 模板。所得含有宋内氏志贺菌 O- 抗原基因的 PCR 扩增子是 15,532 bp。

[0189] 细菌菌株、质粒和生长条件

[0190] 本发明使用的细菌菌株和质粒在下表 D 中描述。将大肠杆菌菌株在 37°C 在得自 DIFCO[®] 的 Luria-Bertani (LB) 肉汤或在 LB 琼脂上生长。将志贺菌菌株在得自 DIFCO[®] 的胰蛋白酶解的大豆肉汤 (TSB) 或胰蛋白酶解的大豆琼脂 (TSA) 中生长。将沙门氏菌菌株 Ty21a 在补加 0.01% 半乳糖和 0.01% 葡萄糖的 TSB 或 TSA 中生长。在含有氨苄青霉素 (Amp ;100 μ g/ml)、壮观霉素 (Spc ;100 μ g/ml)、氯霉素 (Cm ;35 μ g/ml) 或者卡那霉素 (Kan ;30 μ g/ml) 的生长培养基中选择含有质粒的菌株。对所有构建的质粒测序,装配序列并通过使用 VECTOR NTI[®] suite 9.0 软件 (Invitrogen) 分析。

[0191] 表 D :细菌菌株和质粒

[0192]

菌株或质粒	基因型或描述	参考或来源
菌株		
大肠杆菌 DH5 α	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	New England Biolabs
肠道沙门氏菌伤寒血清变型 Ty21a	<i>galE ilvD viaB (Vi-) H₂S-</i>	(Germanier and Fuer, 1975)
弗氏志贺菌 2a 2457		实验室原液
弗氏志贺菌 3a J99		实验室原液
Ty21a-Ss (MD77)	整合进染色体上 <i>tviD-VexA</i> 中宋内氏志贺菌 O-抗原基因, Kan ^r , Amp ^r , Cm ^r	本研究
Ty21a-Ss-Kan (MD67)	整合进染色体上 <i>tviD-VexA</i> 中宋内氏志贺菌 O-抗原基因, Kan ^r , Amp ^r , Cm ^r	本研究
Ty21a-Sd (MD149)	整合进染色体上 <i>tviD-VexA</i> 中痢疾志贺菌 O-抗原基因, 从 <i>lpp</i> 启动子表达, Kan ^r , Amp ^r , Cm ^r	本研究图 4
Ty21a-Sdl (MD174)	整合进染色体上 <i>tviD-VexA</i> 中痢疾志贺菌 O-抗原基因, 从 <i>lpp</i> 启动子表达, Kan ^r , Amp ^r , Cm ^r	本研究图 5

[0193]

Ty21a-Y (MD114)	整合进染色体上 <i>tviD-vexA</i> 中弗氏志贺菌 <i>rfb</i> 操纵子,从天然启动子表达, Kan ^r , Amp ^r , Cm ^r	本研究 图 14
Ty21a-2a (MD194)	整合进染色体上 <i>tviD-vexA</i> 中弗氏志贺菌 2a O-抗原基因,从天然启动子表达, Kan ^r , Amp ^r , Cm ^r	本研究 图 14
Ty21a-3a (MD196)	整合进染色体上 <i>tviD-vexA</i> 中弗氏志贺菌 3a O-抗原基因,从天然启动子表达, Kan ^r , Amp ^r , Cm ^r	本研究 图 14
Ty21a-2a1 (MD212)	整合进染色体上 <i>tviD-vexA</i> 中弗氏志贺菌 2a O-抗原基因,从 <i>lpp</i> 启动子表达, Kan ^r , Amp ^r , Cm ^r	本研究 图 3 14
痢疾志贺菌 1 型 1617	毒性菌株	(Mendizabal-Morris et al., 1971; Neill et al., 1988)
1617Δ <i>stx</i> A	缺失菌株 1617 的大多数 <i>stx</i> A	(Xu et al., 2007)
宋内氏志贺菌 53GI	I 型(I 相), 毒性分离株	(Kopecko et al., 1980)
质粒		
pGB-2	pSC101 衍生的低拷贝质粒; Sm ^r , Spc ^r	(Churchward et al., 1984)
pKX65	宋内氏志贺菌基因克隆进 pGB-2 中	(Xu et al., 2002)
pXK65	含有宋内氏志贺菌的克隆的 <i>Rfb</i> 区的 pGB-2	(Xu et al., 2002)
pKD4	两侧是 FRT 位点的 Kan ^r , Amp ^r , oriR6Kgamma	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD46	在阿拉伯糖启动子控制下 Gam-beta-exo 蛋白质, ts-rep ^a , Amp ^r	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCP20	酵母 Flp 重组酶基因 FLP, Cm ^r , Amp ^r , ts-rep ^a	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pMD35-36	pSC101 衍生的低拷贝质粒, 两侧是 FRT 的 Kan ^r	本研究
pMD-TV	pSC101 衍生的低拷贝质粒, 两侧是 FRT 的 Kan ^r , 含有 Ty21a <i>tviD</i> 和 <i>vexA</i> 基因的同源区	本研究
pMD-TV-Ss-1 (SEQ ID NO:24)	宋内氏志贺菌 O-抗原基因克隆进 pMD-TV 中	本研究
pMD-TV-Sd-4	痢疾志贺菌 1 O-抗原基因克隆进 pMD-TV 中	本研究
pMD-TV-lpp	克隆进 pMD-TV 中的 <i>lpp</i> 启动子	本研究

[0194] ^ats-rep ;温度敏感型复制

[0195] O- 抗原基因的染色体整合

[0196] 将在 Ty21a 染色体同源的 500-1000bp 区域之间工程化以增强重组效力的上述宋

内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因使用 λ red 重组 (Datsenko et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645) 整合进 Ty21a 染色体中。将 Ty21a 用 pKD46 转化并在 30℃ 在补加 0.01% 半乳糖和 0.01% 葡萄糖的 TBS-Amp 中生长及用 L- 阿拉伯糖诱导直至 OD₆₀₀ = ~ 0.7。所得细胞通过用 10mM Hepes 和 10% 甘油洗涤及通过离心浓缩 500 倍而制成电感受态。如图 1 所示, pMD-TV-Ss- 用作模板, 使用 tviD 正向引物和 vexA 反向引物进行 PCR 扩增。这个 PCR- 扩增的区域含有部分 tviD 基因, 两侧是 FTR 位点的 Kan^r 基因, 遗传最小系列的基本宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因, 以及 vexA 基因。

[0197] 将 PCR 产物用 DpnI- 消化以除去环状质粒 DNA, 纯化, 并将 ~ 1-2 μ g 转化进新鲜生长的表达 λ red 蛋白质的电感受态 Ty21a 细胞中。因此, 线性 ds-DNA 扩增子用于转化从 pKD46 表达 λ red 蛋白质的感受态 Ty21a 细胞。

[0198] 针对 Kan^r 选择上述扩增子的转化体; 转化的细胞通过在 SOC 培养基中在 30℃ 生长及铺板于 TSA-Kan 平板上而回收。注意, 将上述 PCR 产物用 DpnI- 消化以除去任何剩余的环状质粒。尽管进行这个步骤, 仍由少数质粒拷贝不可避免地逃避 DpnI- 消化并产生 Kan^r 转化体。然后这些质粒转化体可在任一染色体同源区重组, 产生不稳定的局部二倍体, 使得分子鉴定混乱, 因为 PCR 结果反映出可能性混合。在用抗生素初次选择后, 将突变体维持在无抗生素的培养基上。将分离株在 37℃ 非选择性地菌落纯化一次, 然后检测氨苄青霉素敏感性以证实质粒 pKD46 丢失。

[0199] 为了检测合适的染色体整合物 (即含有插入在 tviD 和 vexA 之间的宋内氏志贺菌 1 型基因的 15, 532kb 插入体), 对来自各个转化体的 DNA 进行 PCR, 用识别就位于靶向整合位点上游和下游的 Ty21a 序列的引物 prMD92 和 prMD124 (图 1) 进行。将菌落通过 PCR 进一步分析以证实染色体整合, 使用引物 prMD92, GTTGCGGTAATGGTATAACGAAATAACAG ATAC (SEQ ID NO:25) 和 prMD124, CACGCAATATTTCAATGATGGCAAC (SEQ ID NO:26) 进行, 如图 1 所示。此外, 1 型 O 抗原的表达通过使用 1 型特异性抗血清 (DIFCO[®]-BBL) 的玻片凝集反应及 Western 免疫印迹证实。通过使用引物 prMD92 和 prMD124 检测的在整合区域 tviD-tviE-vexA 中的野生型 Ty21a 序列产生 ~ 4kb 条带。通过 PCR 也可检测在 Ty21a 染色体中 tviD 和 / 或 vexA 的完整质粒的不希望的整合。

[0200] 接着, 将希望的线性宋内氏志贺菌 DNA 的 Kan^r 染色体整合物用表达 FLP 重组酶的温度敏感性质粒 pCP20 转化, 以消除两侧为 FRT 的 Kan^r 盒。简而言之, 将表达 Kan^r 的染色体整合物用 pCP20 转化 (Cherepanov et al. (1995) Gene, 158:9-14), 在 30℃ 选择 Cm^r 转化体, 之后将少量分离株在 37℃ 非选择性菌落纯化, 然后检测所有抗生素抗性的丧失情况。

[0201] 通过 PCR 进一步分析抗生素敏感性染色体整合物以证实 Kan 盒的缺失。此外, 对从引物 prMD92 和 prMD124 中产生的最终 PCR 产物进行完全测序。当染色体整合的 Ty21a-Ss 序列与 GENBANK[®] 宋内氏志贺菌 O- 抗原基因簇 AF294823 (SEQ ID NO:23) 对比时, 在 wbgZ (图 1 中 orf13) 中检测到仅一个改变 (E273K), 其不明显影响 O- 抗原表达, 通过所得 LPS 的玻片凝集反应和 western 印迹确定。

[0202] 实施例 3: 两年研究以获得通过重组插入疫苗载体菌株伤寒沙门氏菌 Ty21a 染色体中的大约 12kb 宋内氏志贺菌 O- 抗原基因区的稳定表达

[0203] 在低拷贝质粒载体中表达

[0204] 将宋内氏志贺菌 O- 抗原基因克隆进低拷贝质粒 pGB-2 中, 这个异源 O- 抗原在疫苗载体 Ty21a 中稳定表达, 在 60 世代之后仅 2% 丧失。这个质粒含有壮观霉素抗性基因盒以进行遗传选择。相反, 含有这个克隆的志贺菌属区域的高拷贝质粒载体不是遗传稳定的 (3)。尽管 pGB-2 看起来是适当稳定的, 但是仍需要除去壮观霉素抗性基因。

[0205] 在除去抗生素盒之后获得稳定表达

[0206] pGB-2 上的宋内氏志贺菌基因稳定表达, 在不存在抗生素条件下在生长 60 个世代具有 98% 稳定性。然而, 为了 FDA 管理目的, 抗生素抗性盒在大规模给予人体疫苗之前需要除去。因此, 通过使用靶向限制性核酸内切酶缺失、通过使用重组技术缺失或者 PCR 产生的缺失进行除去抗性基因盒的尝试。无论使用的方法或者缺失区域的长度如何, 除去抗生素盒意外地导致质粒不稳定性。超过 60 个世代, 质粒丧失达到 50%。然后用两侧是 FRT 位点的卡那霉素抗性基因盒置换壮观霉素盒。如果通过在 FRT 位点之间重组可以除去卡那霉素抗性, 也许所得质粒将是遗传稳定的。然而, 除去卡那霉素抗性也导致质粒不稳定性。

[0207] 针对 O- 抗原基因的染色体整合构建 pMD35-36

[0208] 为了实现异源宋内氏志贺菌 O- 抗原基因在 Ty21a 中在不存在抗生素抗性盒的条件下的稳定表达, 将 O- 抗原基因整合进 Ty21a 染色体中。为了便于这个工作, 构建低拷贝质粒 pMD35-36, 其含有两侧是 FRT 位点的卡那霉素抗性基因盒, 且与多克隆位点 (MCS) 基因座相邻。此外, 从这个质粒中通过 PCR 合成卡那霉素抗性盒、FRT 位点和 MCS 基因座, 使用含有与 Ty21a 染色体同源的区域的引物以进行重组插入。Ty21a *tviD* 和 *vexA* 基因区用于同源。其在 Vi 荚膜生物合成操纵子中位置彼此相邻, 所述操纵子在 Ty21a 中是无功能性的。

[0209] 将宋内氏志贺菌基因克隆进 pMD35-36 中

[0210] 将宋内氏志贺菌 O- 抗原操纵子的基本基因 (消除非必需的 IS630 元件) 在两个步骤中克隆进质粒 pMD35-36 中。

[0211] 优化 Ty21a 中 λ red 表达

[0212] Datsenko and Wanner (2000) (Datsenko et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645) 先前描述了基于高效 λ 噬菌体 red 重组系统的一种方法, 其使得通过用通过 PCR 产生的可选择抗生素抗性基因重组置换染色体序列而可以在靶向基因中产生突变, 使用具有与靶向突变的基因同源的 36-50bp 延伸的引物进行 PCR。从质粒 pKD46 表达 λ red 蛋白质, 表达通过阿拉伯糖可诱导启动子紧密调节。这个 λ red 系统已经广泛用于在大肠杆菌、沙门氏菌属和志贺菌属菌种中特异性基因失活 (Kotloff et al. (1999) Bull. WHO, 77:651-666), 及用于导入小的生物学标签 (Kewon (2008) Curr. Opin. Infect. Dis., 21:313-318)。

[0213] 为了促进染色体插入, 如上述将宋内氏志贺菌 O- 抗原基因克隆进质粒 pMD35-36 中。最初, 使用与 *tviD* 和 *vexA* 同源的 50bp 染色体区域。对这个大的重组构建体进行 PCR 扩增获得一个 ~ 13.5kb 片段, 其包括宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因、两侧是 FRT 位点的卡那霉素抗性基因盒, 均包含在染色体同源的两个区域内, 由与 *tviD* 和 *vexA* 同源的 50bp 组成。将这个 PCR 产物转化进含有 pKD46 的 Ty21a 细胞中。作为卡那霉素抗性菌落检测, 获得无预期的染色体插入, 即使重复这个实验也如此。作为实验对照, 尝试插入较小的 1.5kb 卡那霉素抗性基因盒, 而不包含任何志贺菌属序列。这也导致失败。这个结果是意外的, 因为较小的 1.5. kb Kan^R 插入片段应已经整合进染色体中。

[0214] 基于假设这种成功缺失是由于在伤寒沙门氏菌 Ty21a 中不足的 λ red 重组蛋白质表达所致（公开的在沙门氏菌属 (Kewon (2008) Curr. Opin. Infect. Dis., 21:313-318) 和大肠杆菌 (Kotloff et al. (1999) Bull. WHO, 77:651-666) 中 λ red 表达的条件（即 1mM 阿拉伯糖）在 Ty21a 中不成功），尝试 2mM、10mM 或 25mM 的较高浓度阿拉伯糖，发现不足以在 Ty21a 中从 pKD46 表达 λ red 蛋白质，通过 1.5kb 卡那霉素抗性盒的染色体整合检测。这个结果非常意外。

[0215] 最后，尝试在推荐的 1mM 浓度阿拉伯糖的 100 倍增加，发现需要 100mM 以在 Ty21a 中产生足够的 λ red 表达以促进小的 1.5kb 卡那霉素抗性基因盒的染色体插入，使用 50bp 染色体同源区。然而，含有宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成基因的大的 13.5kb PCR 产物未整合进染色体中。

[0216] 增加至 150 个碱基的同源延伸

[0217] 为了促进较大插入体的染色体整合，在 PCR 引物上的染色体同源延伸从 50 个碱基增加至 150 个碱基。尽管这些增加的同源区域促进 1.5kb 卡那霉素抗性盒插入染色体的频率增加，但是在一些尝试后发现大的 13.5kb PCR 产物不能整合进染色体中。这个结果也是意外的，因为一般重组通常使用同源 50-100bp 进行，及 λ Red 介导的重组通常比细菌一般重组更有效。

[0218] 构建染色体插入质粒 pMD-TV

[0219] 大的 500-1000bp 同源区的使用需要将这些区域克隆进染色体插入质粒中。首先，制备 Ty21a 基因组 DNA。接着，从 Ty21a 基因组 DNA 中经 PCR 扩增 vexA 基因（~ 1000bp）和部分 tviD 基因（~ 500bp）。将这两个 PCR 扩增子在单独的步骤中克隆进 pMD35-36 中。此外，进一步改变 MCS 基因座以含有新的和不同的限制位点。这样构建新的染色体插入载体 pMD-TV，其含有 500-1000bp 染色体同源臂。将这些较长的臂工程化以增加与 Ty21a 染色体的同源区域，及因此增加整合大的 DNA 区域（即大于 5kb）的机会。

[0220] 将宋内氏志贺菌基因克隆进 pMD-TV 中

[0221] 在两个步骤中将宋内氏志贺菌 O- 抗原生物合成操纵子的基本基因克隆进 pMD-TV 质粒中，消除了非必需的 IS630 元件。

[0222] 优化感受态细胞

[0223] 在将宋内氏志贺菌基因克隆进新的 pMD-TV 质粒中之后，将含有卡那霉素抗性盒、宋内氏志贺菌 O- 抗原基因和 Ty21a 同源臂的 15.5kb PCR 产物转化进表达 λ red 蛋白质的 Ty21a 中。意外地，无转化体获得，甚至在彻底铺板和重复实验之后也如此。为了解决大的线性 DNA 片段的转化效力是否太低的问题，将新鲜的感受态 Ty21a 细胞通过从两次增加至三次的最终洗涤次数、增加每个转化反应中细胞的数目及将在每个反应中加入的线性 DNA 的量增加至大约 1-2 μ g 而进一步优化。这些改变使得可以将编码异源宋内氏志贺菌 O- 抗原的大的 13.5kb 片段成功染色体整合进 Ty21a 中 (Datsenko et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645; Uzzau et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:15264-15269; Xu et al. (2002) Infect. Immun., 70:4414-4423)。

[0224] 实施例 4：通过银染和免疫印迹确定 O- 抗原表达。通过银染和 western 免疫印迹的 LPS 分析用于检验在亲代和表达异源 O- 抗原的重组菌株中的 LPS 表达。

[0225] O- 抗原表达分析

[0226] 使用针对宋内氏志贺菌 (I 期) 或针对伤寒沙门氏菌 O- 特异性 9 因子(DIFCO®) 的兔多克隆抗血清进行玻片凝集反应。对于免疫印迹, 将具有或不具有各种重组质粒的沙门氏菌属、志贺菌属和大肠杆菌菌株在 37℃ 在含有合适抗生素的培养基中通风生长过夜。使用 LPS 提取试剂盒 (Bocca Scientific) 根据厂商指导纯化 LPS。纯化的 LPS 通过 Tris-glycine PAGE 分离。使用上述抗体进行标准 Western 印迹程序以鉴别特异性 LPS 类型。使用 SILVERXPRESS® 银染试剂盒 (Invitrogen) 根据厂商指导进行银染分析。正如通过 SDS-PAGE 分离的分离多糖的银染表明 (图 2, A 图), 观测到大肠杆菌 DH5 α , 一种 rough 突变体 (泳道 1), 表达宋内氏志贺菌 O- 抗原为 LPS 梯和减慢迁移组 4 荚膜 (slower-migrating Group 4capsule) (泳道 2)。发现 Ty21a (泳道 3) 产生典型的 9, 12LPS 短梯模式, 其通过加入延伸的 1 型 LPS 梯模式和减慢移动的 1 型 O- 抗原荚膜表达而改变 (泳道 4, 5, 6, 7)。通过银染分析 (图 2, A 图, 泳道 8), 观测到野生型宋内氏志贺菌表达 1 型 LPS 梯模式, 大多数达到最高点链长度为 ~ 20 O- 重复。

[0227] Western 免疫印迹 (图 2, B 图) 示出在表达宋内氏志贺菌 O- 抗原的所有菌株中与 1 型多糖的特异性抗体反应, 无论 1 型基因是否由质粒 (即 pXK65, pMD-TV-Ss-1) 携带或者整合进 Ty21a 染色体中 [即 Ty21a-Ss (或 MD77) Ty21a-Ss-Kan (或 MD67)]。尽管 1 型 LPS 梯模式在大肠杆菌 (图 2, B 图, 泳道 2) 和野生型宋内氏志贺菌 (泳道 8) 中易见, 但是大多数 1 型 O- 抗原在所有表达分离株中似乎是减慢迁移组 4 荚膜表达。如下文所示, 1 型 O- 抗原是高度免疫原性的, 无论是 LPS 或是荚膜形式表达 (图 3)。

[0228] 实施例 5 : 异源 1 型 O- 抗原在 Ty21a 中表达的稳定性

[0229] 表达宋内氏志贺菌 O- 抗原的重组 Ty21a-Ss 克隆的稳定性通过对过夜培养 (~ 24 小时) 的铺板的菌落的免疫印迹而检测, 将其稀释 1:100 并再生长 ~ 24 小时。转移至硝酸纤维素膜的菌落通过标准 Western 印迹程序分析, 使用上述 LPS- 特异性抗体。

[0230] 新的重组工程化的疫苗菌株 Ty21a-Ss 是抗生素敏感的并含有染色体整合的 1 型生物合成基因, 将其以高稀释度在 TSB 加上 0.01% 半乳糖和 0.01% 葡萄糖中在无抗生素条件下生长 ~ 24 小时, 其表示生长 ~ 25 个世代。将这个培养物 1:100 稀释并再生长 ~ 24 小时, 这表示 50 个世代。将所得细胞铺板于含有 0.01% 半乳糖和 0.01% 葡萄糖的 TSA 上, 在 37℃ 生长过夜, 如上述进行菌落免疫印迹以检验 1 型表达。检测的所有 500 个菌落均保留宋内氏志贺菌 1 型 O- 抗原表达, 表明染色体整合的基因的 100% 稳定性。

[0231] 实施例 6 : 在用 Ty21a-Ss 免疫后的小鼠中激发伤寒沙门氏菌和宋内氏志贺菌 LPS 的抗体

[0232] 将小鼠用重组工程化的疫苗菌株 Ty21a-Ss、亲代菌株 Ty21a 或者对照 PBS 免疫 (间隔 2 周给予 3 剂 IP)。将 8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠用疫苗候选物菌株 (Ty21a-Ss) 或阴性对照物单独的 Ty21a 和 PBS 免疫。将 Ty21a-Ss 和 Ty21a 对照组在补加 0.01% 半乳糖和 0.01% 葡萄糖的 TSB 中生长过夜, 洗涤, 并悬浮于无菌 PBS 中至浓度为 $\sim 0.8-1.6 \times 10^8$ CFU/ml。如下文所述, 在每次剂量后一周通过 ELISA 对其进行检测针对宋内氏志贺菌或 Ty21a LPS 的抗体的存在情况。如图 3 所示, 用 Ty21a-Ss 免疫导致在每次剂量后增加的抗 -LPS 抗体效价, 但是对于抗 1 型血清 IgG 在 2 次剂量后达到峰值的 $\sim 400,000$ 极高效价, 对于抗 - 伤寒沙门氏菌 LPS 抗体在 3 次剂量后达到相似的高效价。这些结果进一步证实异源

宋内氏志贺菌 O- 抗原和同源 Ty21a LPS 二者在 Ty21a-Ss 中的稳定表达。此外,亲代菌株 Ty21a 激发的血清 IgG 抗体仅与 Ty21a LPS 反应,且处于与重组 Ty21a-Ss 激发的基本相同的效价。

[0233] 实施例 7 :由 Ty21a-Ss 赋予的针对毒性宋内氏志贺菌攻击的保护作用

[0234] 典型将小鼠用于证实伤寒沙门氏菌疫苗菌株的免疫刺激作用及测量针对用毒性志贺菌属在肠道外攻击的特异性保护作用。将 Balb/C 小鼠用 Ty21a-Ss、单独 Ty21a 或者盐水经 IP 途径免疫,间隔 2 周给予 3 剂疫苗。为小鼠经腹膜内注射接种 0.25-ml 剂量的含有 $\sim 2-4 \times 10^7$ CFU/ 小鼠的每种疫苗、对照 Ty21a 细胞或者 0.25ml 无菌盐水,间隔 2 周给予共 3 剂。在每次注射后一周对小鼠尾静脉放血。在最后一剂给予后两周,小鼠用宋内氏志贺菌 53G 经 i. p. 攻击,剂量为大约 $100 \times LD_{50}$ 。在最后一剂免疫之后两周,将免疫的小鼠和对照小鼠经腹膜内用在溶解于无菌盐水中的 0.25ml (2×10^6 CFU/ 小鼠) 的 5% 猪胃粘蛋白 (Sigma) 中的 5×10^6 CFU/ml 新鲜生长的中间对数期末内氏志贺菌菌株 53GI 攻击 (即大约 100 倍的 50% 致死感染剂量 [LD_{50}])。监测 72 小时的存活率。

[0235] 表 E :小鼠针对毒性宋内氏志贺菌攻击的保护作用

[0236]

免疫的 10 只小鼠组	存活数 / 总数
Ty21a-Ss (菌株 MD 77)	10/10
Ty21a	0/10
盐水	0/10

[0237] 通过 ELISA 检测抗 -LPS 抗体

[0238] 将 1 期宋内氏志贺菌 53G 在 37°C 在 TBS 中通风生长过夜,而将伤寒沙门氏菌 Ty21a-Ss 在补加 0.01% 半乳糖和 0.01% 葡萄糖的 TSB 中生长。使用 LPS 提取试剂盒 (Bocca Scientific) 根据厂商指导纯化 LPS。将微滴定平板用在 $0.1\text{M Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH 9.5 中的宋内氏志贺菌 (I 期) 或伤寒沙门氏菌 Ty21a 纯化的 LPS 包被。将包被的微滴定平板用含有在 TBST (具有 0.5% tween-20 的 TBS) 中 1% BSA (Sigma) 的封闭缓冲液封闭 2 小时。将系列稀释的血清加入每个平板中,并在 4°C 保温过夜。在用 TBST 洗涤 6 次之后,用 HRP- 缀合的山羊抗小鼠 IgG (**SOUTHERNBIOTECH[®]**) 检测结合的抗体。终点效价定义为列中最后一个孔的抗体稀释度与每个样品的阳性 OD 在减去背景之后的倒数。背景数值使用免疫前血清确定,其中平均免疫前血清的 OD 值及然后加倍。将这个数值从含有每个小鼠血清样品的滴定的所有孔的 OD 值中减去。每个数据点表示针对每个小鼠血清样品进行的两个独立 ELISA 的平均终点效价。每组十只小鼠的各个样品效价和平均 $\pm$ SEM 在图 3 中示出。

[0239] 序列可在对于 pMD-TV 的 **GENBANK[®]** 登记号 JX436480 (SEQ ID NO:1) 和对于 Ty21a-Ss tviD-vexA 区的 JX436479 (SEQ ID NO:2) 获得。这个严格攻击在单独 Ty21a 或盐水免疫的小鼠中导致 100% 死亡率。然而,用重组工程化的疫苗菌株 Ty21a-Ss 免疫的小鼠对宋内氏志贺菌攻击是 100% 保护性的。

[0240] 因此,本发明揭示了尝试在口服疫苗载体 Ty21a 中稳定异源宋内氏志贺菌 LPS 抗

原的表达,以产生针对伤寒和由于宋内氏志贺菌所致志贺菌病起保护作用的候选物。先前研究示出克隆的大模块志贺菌属 LPS 生物合成基因(即 10-15kb)在低拷贝质粒 pGB-2 比在高拷贝质粒载体中稳定得多(Xu et al. (2007) *Vaccine*, 25:6167-6175; Xu et al. (2002) *Infect. Immun.*, 70:4414-4423)。当尝试除去 pGB-2 中抗生素抗性选择标记时(除去其为人疫苗应用所需),出现意外的及无法解释的遗传不稳定性。例如,携带宋内氏志贺菌 1 型 O- 抗原生物合成基因的 Kan^r(卡那霉素抗性)pGB-2 在不存在抗生素选择压力条件下生长 60 个世代时是 95-98%遗传稳定的。然而,通过插入或缺失除去抗生素抗性基因功能导致具有~60%遗传稳定性的质粒(未公开的数据)。

[0241] Yu, et al. (2011) 最近的研究将小的~2kb 基因区插入沙门氏菌属染色体中。因此,修饰 λ red 重组系统以使得可以将大于 15kb 的大模块外源 DNA 导入伤寒沙门氏菌的染色体中,称作基因组超重组工程。这种工作需要扩展必需的同源重组区的大小,最初建议从~50bp 扩展(Datsenko et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:6640-6645)至 500-1000bp,以增加重组效力。将这些扩展的同源区域工程化进质粒载体 pMD-TV 中,其是特定产生的以将大的 DNA 区域插入易感染色体的选择的靶向的整合位点中(即在这种情况下,选择 Ty21a 的非功能性 Vi 基因座的 tviE 基因区)。进一步地, λ red 重组蛋白质在 Ty21a 中的表达及这个大扩增子的有效染色体插入需要的 PCR 扩增的 DNA 的浓度要被优化。利用这种优化的基因组超-重组工程技术,将宋内氏志贺菌 O- 抗原基因插入 Ty21a Vi 基因座中。这种 Ty21a-Ss 染色体整合物中异源宋内氏志贺菌 O- 抗原表达是 100%遗传稳定的。此外,这种方法使得可以在菌株构建期间使用抗生素选择,及在所有遗传操纵完成后除去 FRT- 括住的(bracketed)抗生素抗性基因。特别重要地,这种新的疫苗候选菌株在小鼠中激发针对异源宋内氏志贺菌 I 型 LPS 和同源伤寒沙门氏菌 LPS 的强力的血清 IgG 抗体应答,及对小鼠针对致死攻击剂量的毒性宋内氏志贺菌起 100%保护作用。

[0242] 这种染色体超-重组工程方法使得可以开发更改良的疫苗候选物,其是 100%遗传稳定的。该技术可用于许多不同的细菌属,及可用于在多个靶向的染色体位点插入不同的外源抗原,之后用于有效选择的相关抗生素抗性基因可以除去。先前已经描述了在质粒 pGB-2 上克隆痢疾志贺菌血清型 10- 抗原必需的生物合成基因(Xu et al. (2007) *Vaccine*, 25:6167-6175)。已经着手进行弗氏志贺菌 2a 和 3a LPS 区的 pGB-2 克隆,以构建另外的多价伤寒-志贺菌病疫苗成分。因此,期望产生相似的超-重组工程化的染色体插入,例如弗氏志贺菌 2a、弗氏志贺菌 3a 和弗氏志贺菌 6 的最小的 LPS 基因插入单独的 Ty21a 菌株中。最终的多价疫苗由 5 个不同的菌株组成,包括针对伤寒(针对伤寒,但是对副伤寒具有中等交叉保护作用)及志贺菌病的主要因素起保护作用的多功能疫苗,预期针对世界范围的~85%志贺菌病起保护作用(Noriega et al. (1999) *Infect. Immun.*, 67:782-788)。在另一个实施方案中,掺入其它抗原在 Ty21a(或者其它合适载体菌株)中用于疫苗目的(例如炭疽保护性抗原,瘟疫 F1 和 V 抗原,针对病毒性疾病起保护作用的病毒抗原,疟疾抗原)或者针对抗癌治疗目的的表达抑制肿瘤生长和转移的抗肿瘤蛋白或 siRNA 的遗传构建体中。

[0243] 近来的合作研究(Ohtake et al. (2011) *Vaccine*, 29:2761-2771) 引导开发获得温度稳定的干燥的 Ty21a 疫苗的配制物和泡沫干燥方法,所述疫苗不需要在分布/免疫期间离心及延长在 4℃保存期至 5 年或者更长,增强这种多功能肠道疫苗用于旅行者、军人及发

展中世界人群中的潜在价值。

[0244] 实施例 8 : 克隆及染色体插入痢疾志贺菌 O- 抗原生物合成基因的第二个 LPS 基因座

[0245] 将痢疾志贺菌 O- 抗原基因克隆进 pMD-TV 中

[0246] 从痢疾志贺菌血清型 1 菌株 1617 基因组 DNA 中经 PCR 扩增痢疾志贺菌 O- 抗原基因 (Xu, et al. (2007) Vaccine 25:6167-6175)。使用引物 prMD127. dy. F. HindIII gatcga agcttggcattttttgtcatttttggatgc (SEQ ID NO:27) 和 prMD128. dy. R. wbbP. BamHI gatcgg gatccatcgatatggctgggtaaggtcatg (SEQ ID NO:28) 首先扩增 wbbP 基因。所得 PCR 产物和 pMD-TV 用 HindIII 和 BamHI 消化, 经 PCR 纯化, 并连接。接着, 使用引物 prMD129. F. BamHI gatcgggatcctaataaataatctga ccgaatgtaacgg (SEQ ID NO:29) 和 prMD130. R. EcoRI gatcgaattctcacattaatgctaccaaaaagagtcgc (SEQ ID NO:30) 扩增较大的痢疾志贺菌 1rfb 基因簇。所得 PCR 产物和质粒 pMD-TV-wbbP 用 BamHI 和 EcoRI 消化, 经 PCR 纯化, 并连接以构建 pMD-TV-Sd-4。

[0247] 将痢疾志贺菌 O- 抗原基因整合进 Ty21a 染色体中

[0248] 将克隆进质粒 pMD-TV 中以构建 pMD-TV-Sd-4 的痢疾志贺菌 O- 抗原生物合成基因用作 PCR 模板, 使用 tviD 正向引物和 vexA 反向引物进行。经 PCR 扩增的区域为 13, 574bp, 含有部分 tviD 基因、两侧是 FRT 位点的 Kan^r 基因盒、痢疾志贺菌 O- 抗原生物合成基因和 vexA 基因。将 PCR 扩增子转化进从 pKD46 表达 λ red 蛋白质的 Ty21a 感受态细胞中, 如述针对 Kan 抗性进行选择 (Dharmasena et al.)。使用位于整合位点上游和下游的引物 prMD92 和 prMD124 进行 PCR 获得 ~ 14. 5Kb Kan^r 插入条带。在如前所述除去 Kan^r 盒之后 (Dharmasena et al.), 抗生素敏感性染色体整合物通过 PCR 进一步分析 Kan^r 盒的缺失情况, 对得自引物 prMD92 和 prMD124 的 PCR 产物 (MD 149/Ty21a-Sd ~ 13Kb 条带) 进行测序。先前测序的痢疾志贺菌 wpp 基因 (GENBANK[®] 登记号 AY763519 ;SEQ ID NO:4) 和痢疾志贺菌菌株 1617 的 wpp 基因除了两个碱基之外是相同的, 其中在菌株 1617wpp 基因的位置 619-620 的 CA 改变为 AC。在 Ty21a-Sd 菌株在染色体插入的 wpp 中检测到无突变。当将 Ty21a-Sd 染色体插入 Rfb 序列与 GENE BANK[®] 登记号 AY585348 (SEQ ID NO:3) 针对痢疾志贺菌 1617 菌株 Rfb O- 抗原基因簇对比时, 在基因 rm1D 检测到仅一个 A 至 G 的转换 (N130D) (图 4), 通过玻片凝集反应和 ELISA 表达研究其不影响 O- 抗原表达。

[0249] 用 1pp 置换 wpp 天然启动子

[0250] 低拷贝质粒 pMD-TV 是以 ~ 5 个拷贝 / 细胞形式存在的 pSC101 衍生物。因此, Ty21a 中质粒 pMD-TV-Sd-4 具有 ~ 5 个拷贝的痢疾志贺菌 O- 抗原基因 / 细胞, 而 Ty21a-Sd (MD149) [即具有整合进 Ty21a 染色体中的痢疾志贺菌 O- 抗原基因的菌株] 仅具有一个拷贝的痢疾志贺菌 O- 抗原生物合成基因 / 细胞。注意, 从先前的研究中 (Dharmasena, et al.), 通过 ELISA 确定, 在 Ty21a 中与从 pGB-2 质粒 (pMD-TV-Ss) 表达的相同基因相比, 从 Ty21a 染色体 (Ty21a-Ss) 表达宋内氏志贺菌 O- 抗原基因的菌株中宋内氏志贺菌 LPS: 伤寒沙门氏菌 Ty21a LPS 比率为大约 1。然而, 通过 ELISA 确定, 与从质粒 (在 Ty21a 中 pMD-TV-Sd-4) 表达相比, 在从染色体 (Ty21a-Sd, MD 149) 表达痢疾志贺菌 O- 抗原基因的菌株中痢疾志贺菌 LPS: 伤寒沙门氏菌 Ty21a LPS 比率显然低于 1。因此, 尝试通过用是高度转录的组成型活

性启动子的大肠杆菌 lpp 启动子置换天然 wpp 启动子而增加痢疾志贺菌 LPS 表达。

[0251] pMD-TV-lpp 用作 PCR 模板,使用 tviD 正向引物和含有 150bp wpp 同源延伸的 lpp 启动子反向引物 (prMD151. lpp. R aggaatggcgcctgctttttttattatttccttgatgaatcattat agtcagtagcaaaagcatagactgaaatccctttcttggttagtggtttttattaaatccaatctaacaacaaatcata gcatttgctgtgttcctattattgagatcttcatatgtcctctcctttcattattaataccctctagagttc;SEQ ID NO:31)。PCR 扩增的区域 (具有 13,574bp) 含有部分 tviD 基因、两侧是 FTR 位点的 Kan^r 盒、200bp 的 lpp 启动子及痢疾志贺菌 lpp 基因的前 150bp。将 PCR 产物转化进自 pKD46 表达 λ red 蛋白质的 Ty21a-Sd(MD149) 感受态细胞中,根据 Kan^r 抗性初次选择。随后,除去 Kan^r 盒,如述对剩余染色体插入物测序 (Dharmasena, et al. 2013 Intl J Med Microbiol 303:105-113) 以构建 Ty21a-Sd1 (MD174)。如通过 ELISA 确定,表达数据提示与含有天然启动子的 Ty21a-Sd(MD 149) 相比, Ty21a-Sd1 (MD174) 表达更希望的大约为 1 的痢疾志贺菌 LPS: 伤寒沙门氏菌 Ty21a LPS 比率。事实上,使用抗 - 痢疾志贺菌抗体的 Western 印迹示出用 lpp 置换 wpp 天然启动子 (Ty21a-sd1, MD174) 导致与 Ty21a-sd(MD149) 相比较高的痢疾志贺菌 LPS 表达, LPS 水平与质粒表达相当 (图 6)。通过菌落免疫印迹确定在体外生长超过 75 个世代的这两个菌株的 O- 抗原表达是 100% 稳定的。

[0252] 在 Ty21a 中异源痢疾志贺菌 10- 抗原表达的遗传稳定性

[0253] 将抗生素敏感性的及含有染色体整合的 Sd10- 抗原生物合成基因的新重组工程化的疫苗菌株 Ty21a-Sd(MD149) SEQ ID NO:32 和 Ty21-Sd1 (MD174) SEQ ID NO:33 以高稀释度在胰蛋白酶解大豆肉汤 (TSB) 加上 0.01% 半乳糖和 0.01% 葡萄糖及无抗生素条件下生长 ~ 24 小时。这表示 ~ 25 个生长世代。将所得细胞铺板于含有 0.01% 半乳糖和 0.01% 葡萄糖的 TSA 上,在 37°C 生长过夜,使用针对痢疾志贺菌 1 (Difco) 的兔多克隆抗血清进行菌落免疫印迹以检验痢疾志贺菌 O- 抗原表达。检测的所有 200 个菌落均保留痢疾志贺菌血清型 10- 抗原表达,表明染色体整合的基因的 100% 稳定性。

[0254] 小鼠免疫原性

[0255] 将 8 周龄的雌性 AJ 小鼠 (10 只 / 组) 用两个疫苗候选菌株 (Ty21a-sd 和 Ty21a-sd1) 或者阴性对照单独 Ty21a 和 PBS 免疫。将 Ty21a-sd、Ty21a-sd1 和 Ty21a 对照在补加 0.01% 半乳糖和 0.01% 葡萄糖的 TSB 上生长过夜,洗涤,并悬浮于无菌 PBS 中至浓度为 ~ $4-8 \times 10^7$ CFU/ml。为小鼠经腹膜内注射接种 0.5ml 剂量的含有 ~ $2-4 \times 10^7$ CFU/ 小鼠的疫苗、对照 Ty21a 细胞或者 0.5ml 无菌盐水,间隔两周共给予三剂。小鼠在最后一次注射后一周经尾静脉放血。用两种疫苗菌株 (Ty21a-sd 和 Ty21a-sd1) 免疫导致针对痢疾志贺菌的大约 15,000 的中等抗体效价,相比宋内氏志贺菌为 400,000。此外,亲代菌株 Ty21a 激发血清 IgG 抗体,其在低水平 (~ 500) 与痢疾志贺菌 LPS 交叉反应 (图 7)。尽管 Ty21a-sd 激发针对伤寒沙门氏菌 LPS 的高抗体效价 (~ 100,000),但是其与亲代菌株 Ty21a 激发的效价基本相同,由 Ty21a-sd1 激发的伤寒沙门氏菌 LPS 抗体效价低 ~ 4 倍。这可能是由于与在 Ty21a-sd 中相比,在 Ty21a-sd1 中较高的痢疾志贺菌 LPS 表达所致。然而,这些结果证实异源痢疾志贺菌 O- 抗原和同源 Ty21a LPS 在 Ty21a-sd 和 Ty21a-sd1 中的稳定表达。

[0256] 小鼠免于毒性痢疾志贺菌攻击的保护作用

[0257] 将免疫的小鼠和对照小鼠在最终免疫之后 2 周经腹膜内用 1.5×10^6 CFU/ml 的新鲜生长的中间对数期毒性痢疾志贺菌 1 菌株 1617 Δ stxA 攻击,该菌株在溶解于无菌盐水

中的 0.5ml (7.5×10^5 CFU/小鼠) 的 5% 猪胃粘蛋白 (Sigma) 中 (即大约 10 倍的 50% 致死感染剂量 [LD₅₀])。监测 72 小时存活率 (图 8)。尽管这个攻击在盐水免疫的小鼠中导致 100% 死亡率,但是在单独 Ty21a 免疫的小鼠中仅 50% 死亡率。这也许是由于通过 ELISA 确定的 Ty21a 激发的低水平痢疾志贺菌 LPS 交叉反应抗体所致,提供一些保护作用。之前也观测到由 Ty21 赋予的低水平保护作用 (Noriega, et al. 1999 Infection and immunity 67:782-788)。用重组工程化的疫苗菌株 Ty21a-Sd 和 Ty21a-Sd1 免疫的小鼠分别为 100% 和 70% 针对痢疾志贺菌攻击的保护作用。

[0258] 实施例 9: 弗氏志贺菌 2a 和 3a O- 抗原基因的染色体整合

[0259] 基于 O- 抗原上抗原决定簇有 14 个弗氏志贺菌血清型。在所有弗氏志贺菌血清型中,除了血清型 6 之外,均具有包含四糖 N- 乙酰基葡萄糖胺 - 鼠李糖 - 鼠李糖 - 鼠李糖的重复单位的一个共同多糖主链 (图 9)。基本的 O- 抗原主链称作血清型 Y。参与 O- 抗原主链生物合成的基因位于 rfb 操纵子 (~10kb) 中,两侧是 gnd 和 galF 基因。通过在四糖中的不同糖加入葡萄糖基和 / 或 O- 乙酰基基团修饰 O- 抗原主链产生不同血清型。参与 O- 抗原修饰的基因在温和噬菌体上编码 (Allison, et al. 2000 Trends in Microbiol 8:17-23)。发现在可溶性噬菌体 SfII 上编码的两个基因是 2a 血清型转换必需的。这些基因是 bgt, 其编码推定的细菌萜醇葡萄糖基转移酶, 及 gtrII, 其编码推定的 II 型抗原决定葡萄糖基转移酶 (Mavris, et al. 1997 Mol Microbiol 26:939-950)。

[0260] 弗氏志贺菌 3b O- 抗原含有 O- 乙酰基修饰, 弗氏志贺菌 3a O- 抗原除了 O- 乙酰基修饰之外还含有葡萄糖基修饰。发现在可溶性噬菌体 Sf6 上编码的基因 oac 是 3b 血清型从 Y 血清型转换必需的 (Clark, et al. 1991 Gene 107:43-52)。由噬菌体 Sfx 编码的葡萄糖基化基因簇 (gtrA, gtrB 和 gtrX) 参与血清型 Y 至 X 和血清型 3b 至 3a 的 O- 抗原修饰。糖基化基因簇 gtrA 的第一个基因编码小的高疏水性蛋白质, 其参与脂质连接的葡萄糖经过胞质膜的转位。基因 gtrB 编码催化葡萄糖残基从 UDP- 葡萄糖转移至脂质载体的酶, gtrX 编码噬菌体特异性葡萄糖基转移酶以进行将葡萄糖基分子附着于 O- 抗原重复单位的正确糖残基上的最终步骤 (Guan, et al. 1999 Mol Microbiol 26:939-950)。

[0261] 将弗氏志贺菌 2a 和 3a O- 抗原基因克隆进 pMD-TV 中

[0262] 由于克隆 ~10kb rfb 操纵子具有挑战性, 将 ~6kb 的 rfb 操纵子克隆进低拷贝质粒 pMD-TV 中 (Dharmasena, et al. 2013 Intl J Med Microbiol 303:105-113), 使用 KpnI 和 XhoI 消化, 随后使用 XhoI 和 BamHI 消化剩余 4kb 的 rfb 操纵子。从弗氏志贺菌 2a 2457 基因组 DNA 中经 PCR 扩增弗氏志贺菌 4kb 和 6kb O- 抗原基因, 分别使用 prMD3-2a. rfb. F-prMD16. R 和 prMD 18. rfb. 5021. F prMD4-2a. rfb. R 引物对 (下表 F)。

[0263] 表 F

[0264]

PRMD3-2A.RFB.F	GATCGGGATCCTAATGAAAATCTGACCGGATGTAACGGTTG (SEQ. ID NO:34)
PRMD16.5042.R	GATCACTCGAGCGAGAAATCCTAGCG (SEQ. ID NO:35)
PRMD18.RFB.F	CCCCTCGCTAGGATTCTCGCTCGAG (SEQ. ID NO:36)
PRMD4-2A.RFB.R	GATCGGGTACCTTGTCTTCTGAGCGAATATATATAAG (SEQ. ID NO:37)
PRMD1-2AGTR-F	GATCGGCGGCCGCGACCCAAAATGGACTATGACAGAAAGATCTGATATTTT TCCTCGCAAAAATGAAAATATCTCTTGTCGTTC (SEQ. ID NO:38)
PRMD2-2AGTR-R	GATCGGGATCCTAAATATTAAATGGAAGCC (SEQ. ID NO:39)
PRMD47.3A.OAC. NOTI	ATAAGAATGCGGCCGCGACTGGCTGGACCCAAAATGG (SEQ. ID NO:40)
PRMD30.3A.BAM HI.R	GATCAGGATCCTCAATCCAGGGATAATTTAGGCGAAC (SEQ. ID NO:41)
PRMD120.SFX.BA MHI.F	GATCAGGATCCATCGATTGAGACTTGGATGATAGACTTCATG (SEQ. ID NO:42)
PRMD121..SFX.BA MH.R	GATCAGGATCCTTATTTTTTTTATTAAATCAAGAGTTAACCATGGAGGGAG (SEQ. ID NO:43)
PRMD87.VEXA.R. 32BP	TTAGAAAGAATTAGTGCCGCGGGTCAAAAAGC (SEQ. ID NO:44)
PRMD133.TVID.F	CCGTTCTCATTGATTTGATTGCTAAC (SEQ. ID NO:45)
PRMD123.Y.R	CGGCAACATAAGTAATTTGCTCACG (SEQ. ID NO:46)
PRMD124.F.TVID	CACGCAATATTTCAATGATGGCAAC (SEQ. ID NO:47)
PRMD92.VEXB.R. 17800	GTTGCGGTAATGGTATAACGAAATAACAGATAC (SEQ. ID NO:48)
PRMD118.R.2AY	TATTTATTATGTGACGAACAACAGCAGAACC (SEQ. ID NO:49)
PRMD152.2A.LPP. R	AATTGACTCTGTGGCATCTTTACTTCCGTCATTATGAATACAATTTCTACTT CATATGGCTTCAACTCTTGGAATTCACGTACCGTTTTATAGAAAACAGGTAT CGCTTCTTCTTCATTGAAGACAGGAACGACAAGAGATATTTTCATATGTCCT CTCCTTTCATTATTAATACCCTCTAGAGTTC (SEQ. ID NO:50)

[0265] 所得PCR 6 kb产物和pMD-TV质粒用KpnI和XhoI消化,经PCR纯化,并连接以构建pMD-TV. 2a. 6,随后用XhoI和BamHI消化4 Kb PCR产物和pMD-TV. 2a. 6以构建pMD-TV-Y。

[0266] 为了表达弗氏志贺菌 2a 0- 抗原,将噬菌体 SfII- 编码的 bgt-gtrII 克隆进pMD-TV-Y中弗氏志贺菌 2a rfb 区域上游。从弗氏志贺菌 2a 2457 基因组 DNA 中经PCR扩增第一个bgt-gtrII,使用含有NotI和BamHI的引物(prMD1-2agtr-F和prMD2-2agtr-R,图9)。所得PCR产物和pMD-TV-Y用NotI和BamHI消化,经PCR纯化,并连接以构建pMD-TV-2a。

[0267] 为了表达弗氏志贺菌 3a 0- 抗原,将弗氏志贺菌 2a rfb 区、噬菌体 Sf6 编码的 oac 及噬菌体 SfX- 编码的 gtrX、gtrA 和 gtrB 用其同源启动子串联克隆进 pMD-TV 载体中。将 Sf6- 编码的 oac 从弗氏志贺菌 3a J99 基因组 DNA 中经PCR扩增,使用含有NotI和BamHI位点的引物(prMD47. 3a. OAC. NotI和prMD30. 3a. BamHI. R,图9)。所得PCR产物和pMD-TV-Y用NotI和BamHI消化,经PCR- 纯化,并连接以构建pMD-TV-3b。相似地,从弗氏志贺菌 3a J99 基因组 DNA 中经PCR扩增gtrX、gtrA和gtrB基因簇,使用含有BamHI位点的引物(prMD120. sfx. bamHI. F和prMD121. sfx. bamH. R,图9)并克隆进pMD-TV-3b的BamHI位点中以构建pMD-TV-3a。所有构建体均通过PCR和测序证实。

[0268] 从质粒表达弗氏志贺菌 2a 和 3a O- 抗原

[0269] 在大肠杆菌和 Ty21a 中分别从 pMD-TV-2a 和 pMD-TV-3a 表达弗氏志贺菌 2a 和 3a O- 抗原通过玻片凝聚反应和 Western 印迹证实。大肠杆菌或 Ty21a 中 pMD-TV-2a 与弗氏志贺菌 II 型特异性抗血清反应 (图 10) 及也与弗氏志贺菌 3、4 表位特异性抗血清凝聚。因此, pMD-TV-2a 含有弗氏志贺菌 2a O- 抗原稳定表达需要的所有基因 (Dharmasena, et al. 2012Am Soc Microbiol mtg, San Francisco, CA)。

[0270] 大肠杆菌或 Ty21a 中 pMD-TV-3a 与弗氏志贺菌 III 型特异性抗血清反应 (图 10)。pMD-TV-3a 菌株也与弗氏志贺菌 6 和 7、8 表位特异性抗血清凝聚。因此 pMD-TV-3a 含有弗氏志贺菌 3a O- 抗原稳定表达需要的所有基因。

[0271] 将弗氏志贺菌 O- 抗原基因整合进 Ty21a 染色体中

[0272] 将克隆进 pMD-TV 中的弗氏志贺菌 O- 抗原 Y 血清型主链基因 (pMD-TV-Y) 用作 PCR 模板, 使用 tviD 正向 (prMD133. tviD. F) 引物和 vexA 反向引物 (prMD87. vexA. R. 32bp)。含有部分 tviD 基因、两侧是 FTR 位点的 Kan 盒、弗氏志贺菌 rfb 基因和 vexA 基因的 PCR- 扩增的区域是 13, 653 bp。将这些 PCR 产物转化进表达 pKD46 的 λ red 蛋白质的 Ty21a 感受态细胞中并如上述针对 Kan 抗性进行选择 (Dharmasena, et al. 2013)。使用位于整合位点上游和下游的引物 prMD92 和 prMD124 的 PCR 导致 ~ 14.5 Kb 条带。在如上述除去 Kan^r盒之后 (Dharmasena, et al. 2013), 通过 PCR 进一步分析抗生素敏感的染色体整合物以检测 Kan 盒的缺失并对得自引物 prMD92 和 prMD124 的 PCR 产物测序 (菌株 MD 114/Ty21a-Y ~ 13 Kb 条带)。将这个 PCR 的序列与弗氏志贺菌 2a 2457 (GenBank 登记号 AE014073. 1, 完整基因组 4, 599, 354 bp, 参考: Wei, et al. 2003 Infect Immun 71(5):2775-2786) 对比, 在位于基因 rfbC 上游的基因间区域中检测到仅一个 A 插入 (图 11), 通过用抗 - 弗氏志贺菌 1-6 抗体进行 Western 印迹确定这不影响 O- 抗原表达。

[0273] 为了将弗氏志贺菌 2a 修饰酶 bgt 和 gtrII 整合在 Ty21a-Y 中 rfb 操纵子上游, 将 pMD-TV-2a 用作模板进行 PCR, 使用 tviD 正向引物 (prMD133. tviD. F) 和 rfb 操纵子反向引物 (prMD118. R. 2aY)。含有部分 tviD 基因、两侧是 FTR 位点的 Kan 盒、弗氏志贺菌 2a 修饰酶 bgt 和 gtrII 及 rfb 操纵子的前 ~ 500 bp 的 PCR 扩增的区域为 5, 132bp。将这些 PCR 产物转化进表达 λ red 蛋白质的 Ty21a-Y 感受态细胞中, 如前针对 Kan 抗性选择。使用整合位点上游和下游引物 prMD92 和 prMD124 的 PCR 获得 ~ 17 Kb 条带。在除去 Kan^r盒之后, 抗生素敏感性染色体整合物通过 PCR 进一步分析 Kan 盒的缺失, 并对得自引物 prMD92 和 prMD124 的 PCR 产物测序 (菌株 MD194/Ty21a-2a ~ 15.5 Kb 条带)。将这个 PCR 的序列与弗氏志贺菌 2a 2457 的 SFII 编码的 bgt - gtrII 区和 rfb 区对比, 发现无另外的突变。使用弗氏志贺菌 II 型特异性抗血清通过 Western 印迹确定弗氏志贺菌 2a 表达, 与质粒表达相比示出仅微弱表达 (图 12)。这也许是由于与整合进 Ty21-2a 菌株 Ty21a 染色体中的弗氏志贺菌 2a O- 抗原生物合成基因的仅一个拷贝相比, 多个拷贝的质粒 (~ 5 个 / 细胞) 表达更多弗氏志贺菌 2a O- 抗原所致 (图 12)。

[0274] 相似地, 将弗氏志贺菌 3a 修饰酶 gtrX、gtrA 和 gtrB 基因簇和 oac 如前述整合在 Ty21a-Y 菌株中 rfb 操纵子上游, 使用 pMD-TV-3a 作为模板进行 PCR。转化进表达 λ red 的 Ty21a-Y 感受态细胞中的 PCR 产物为 6448bp。在整合后, 使用整合位点上游和下游引物 prMD92 和 prMD124 进行 PCR 获得 ~ 18.5 Kb 条带, 在除去 Kan^r盒之后 (菌株 MD 194/

Ty21a-3a) 获得~17Kb 条带。将这个 PCR 的序列与噬菌体 Sf6- 编码的 oac 和噬菌体 SfX- 编码的 gtrX、gtrA 和 gtrB 及弗氏志贺菌 2a 2457 对比,发现无另外的突变。也通过使用弗氏志贺菌 III 型特异性抗血清进行 Western 印迹确定弗氏志贺菌 3a 表达,与弗氏志贺菌 2a 质粒表达相比示出仅微弱表达(图 12)。

[0275] 用 lpp 置换 bgt 天然启动子

[0276] 通过用高度转录的组成型活性启动子 lpp 启动子置换天然 bgt 启动子进行增加弗氏志贺菌 2a LPS 表达的尝试。Ty21a-sd1(从 lpp 启动子表达的痢疾志贺菌 O- 抗原生物合成基因)用作 PCR 模板,使用 tviD 正向引物和具有 150bp bgt 同源延伸的 lpp 启动子反向引物(表 F)。PCR 扩增的区域含有部分 tviD 基因、两侧是 FTR 位点的 Kan 盒、200bp lpp 启动子及前 150bp bgt 基因。将 PCR 产物转化进表达 λ red 蛋白的 Ty21a-2a(MD194)感受态细胞中,针对 Kan 抗性选择,除去 Kan 盒,并如前述测序以构建 Ty21a-2a1(MD212)。使用弗氏志贺菌 II 型特异性抗血清的 Western 印迹示出 Ty21a-2a1(MD212)与 Ty21a-2a(MD194)相比表达较高水平的弗氏志贺菌 2a LPS,但是仍低于质粒表达(Ty21a pMD-TV-2a)(图 13)。

[0277] 使用新的构建体进行动物实验开展另外的尝试。

[0278] 参考文献

[0279] 1. Kotloff, K. L., Winickoff, J. P., Ivanoff, B., Clemens, J. D., Swerdlow, D. L., Sansonetti, P. J., Adak, G. K., and Levine, M. M. (1999) Bulletin of the World Health Organization 77, 651-666

[0280] 2. Kweon, M. N. (2008) Current opinion in infectious diseases 21, 313-318

[0281] 3. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., and Tauxe, R. V. (1999) Emerging infectious diseases 5, 607-625

[0282] 4. Putthasri, W., Lertiendumrong, J., Chompook, P., Tangcharoensathien, V., and Coker, R. (2009) Emerging infectious diseases 15, 423-432

[0283] 5. WHO. (2005). in Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to Shigella dysenteriae type 1, World Health Organization, Geneva, Switzerland

[0284] 6. Kaminski, R. W., and Oaks, E. V. (2009) Expert review of vaccines 8, 1693-1704

[0285] 7. Ferreccio, C., Prado, V., Ojeda, A., Cayyazo, M., Abrego, P., Guers, L., and Levine, M. M. (1991) American journal of epidemiology 134, 614-627

[0286] 8. DuPont, H. L., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Formal, S. B., and Gangarosa, E. J. (1972) The Journal of infectious diseases 125, 5-11

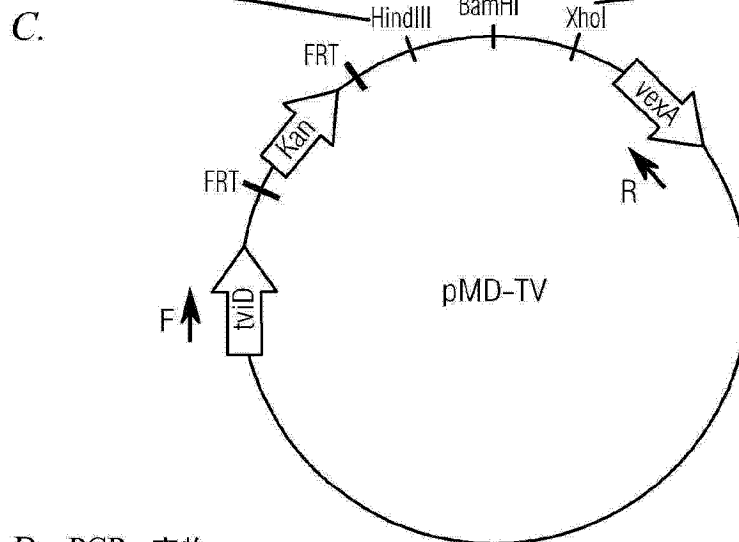
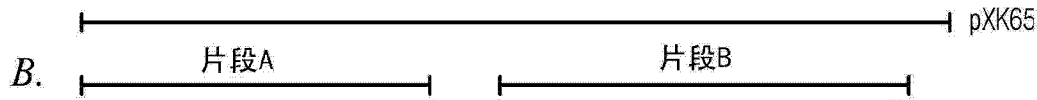
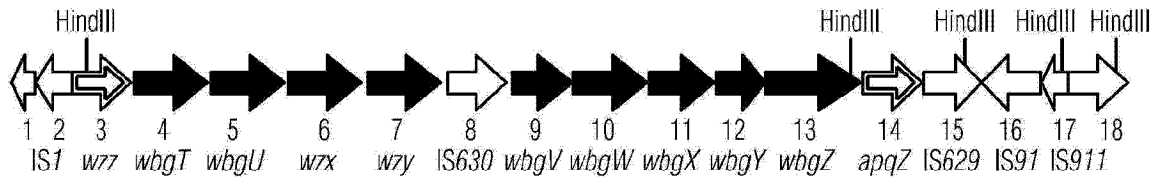
[0287] 9. DuPont, H. L., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Formal, S. B., and Gangarosa, E. J. (1972) The Journal of infectious diseases 125, 12-16

[0288] 10. Noriega, F. R., Liao, F. M., Maneval, D. R., Ren, S., Formal, S. B., and Levine, M. M. (1999) Infection and immunity 67, 782-788

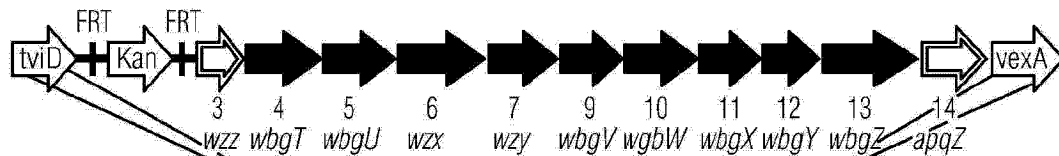
[0289] 11. Xu de, Q., Cisar, J. O., Osorio, M., Wai, T. T., and Kopecko, D. J. (2007) Vaccine 25, 6167-6175

- [0290] 12. Xu, D. Q. , Cisar, J. O. , Ambulos Jr, N. , Jr. , Burr, D. H. , and Kopecko, D. J. (2002) *Infection and immunity* 70, 4414-4423
- [0291] 13. Osorio, M. , Wu, Y. , Singh, S. , Merkel, T. J. , Bhattacharyya, S. , Blake, M. S. , and Kopecko, D. J. (2009) *Infection and immunity* 77, 1475-1482
- [0292] 14. Kopecko, D. J. , Sieber, H. , Ures, J. A. , Furer, A. , Schlup, J. , Knof, U. , Colliodor, A. , Xu, D. , Colburn, K. , and Dietrich, G. (2009) *International journal of medical microbiology:IJMM* 299, 233-246
- [0293] 15. D'Amelio, R. , Tagliabue, A. , Nencioni, L. , Di Addario, A. , Villa, L. , Manganaro, M. , Boraschi, D. , Le Moli, S. , Nisini, R. , and Matricardi, P. M. (1988) *Infection and immunity* 56, 2731-2735
- [0294] 16. Seid, R. C. , Jr. , Kopecko, D. J. , Sadoff, J. C. , Schneider, H. , Baron, L. S. , and Formal, S. B. (1984) *The Journal of biological chemistry* 259, 9028-9034
- [0295] 17. Formal, S. B. , Baron, L. S. , Kopecko, D. J. , Washington, O. , Powell, C. , and Life, C. A. (1981) *Infection and immunity* 34, 746-750
- [0296] 18. Black, R. E. , Levine, M. M. , Clements, M. L. , Losonsky, G. , Herrington, D. , Berman, S. , and Formal, S. B. (1987) *The Journal of infectious diseases* 155, 1260-1265
- [0297] 19. Herrington, D. A. , Van de Verg, L. , Formal, S. B. , Hale, T. L. , Tall, B. D. , Cryz, S. J. , Tramont, E. C. , and Levine, M. M. (1990) *Vaccine* 8, 353-357
- [0298] 20. Van de Verg, L. , Herrington, D. A. , Murphy, J. R. , Wasserman, S. S. , Formal, S. B. , and Levine, M. M. (1990) *Infection and immunity* 58, 2002-2004
- [0299] 21. Datsenko, K. A. , and Wanner, B. L. (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6640-6645
- [0300] 22. Cherepanov, P. P. , and Wackernagel, W. (1995) *Gene* 158, 9-14
- [0301] 23. Murphy, K. C. (1998) *Journal of bacteriology* 180, 2063-2071
- [0302] 24. Sawitzke, J. A. , Thomason, L. C. , Costantino, N. , Bubunenko, M. , Datta, S. , and Court, D. L. (2007) *Methods in enzymology* 421, 171-199
- [0303] 25. Uzzau, S. , Figueroa-Bossi, N. , Rubino, S. , and Bossi, L. (2001) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 15264-15269
- [0304] 26. Yu, B. , Yang, M. , Wong, H. Y. , Watt, R. M. , Song, E. , Zheng, B. J. , Yuen, K. Y. , and Huang, J. D. (2011) *Applied microbiology and biotechnology* 91, 177-188
- [0305] 27. Ohtake, S. , Martin, R. , Saxena, A. , Pham, B. , Chiueh, G. , Osorio, M. , Kopecko, D. , Xu, D. , Lechuga-Ballesteros, D. , and Truong-Le, V. (2011) *Vaccine* 29, 2761-2771
- [0306] 28. Germanier, R. , and Fuer, E. (1975) *The Journal of infectious diseases* 131, 553-558
- [0307] 29. Kopecko, D. J. , Washington, O. , and Formal, S. B. (1980) *Infection and immunity* 29, 207-214
- [0308] 30. Churchward, G. , Belin, D. , and Nagamine, Y. (1984) *Gene* 31, 165-171

A. 宋内氏志贺菌O-抗原生物合成操纵子



D. PCR 产物



E. Ty21a 染色体

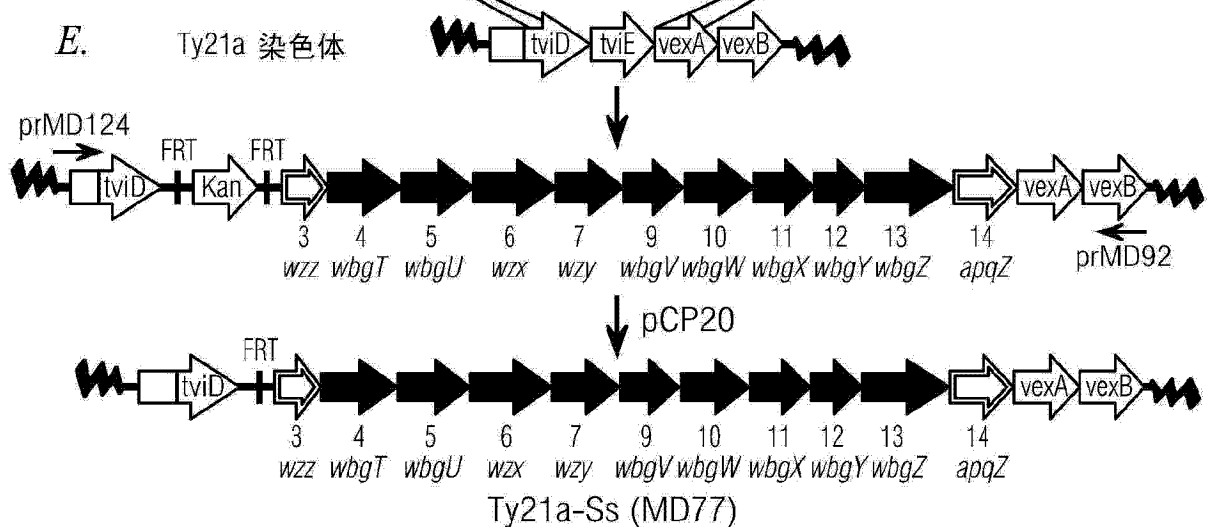


图 1

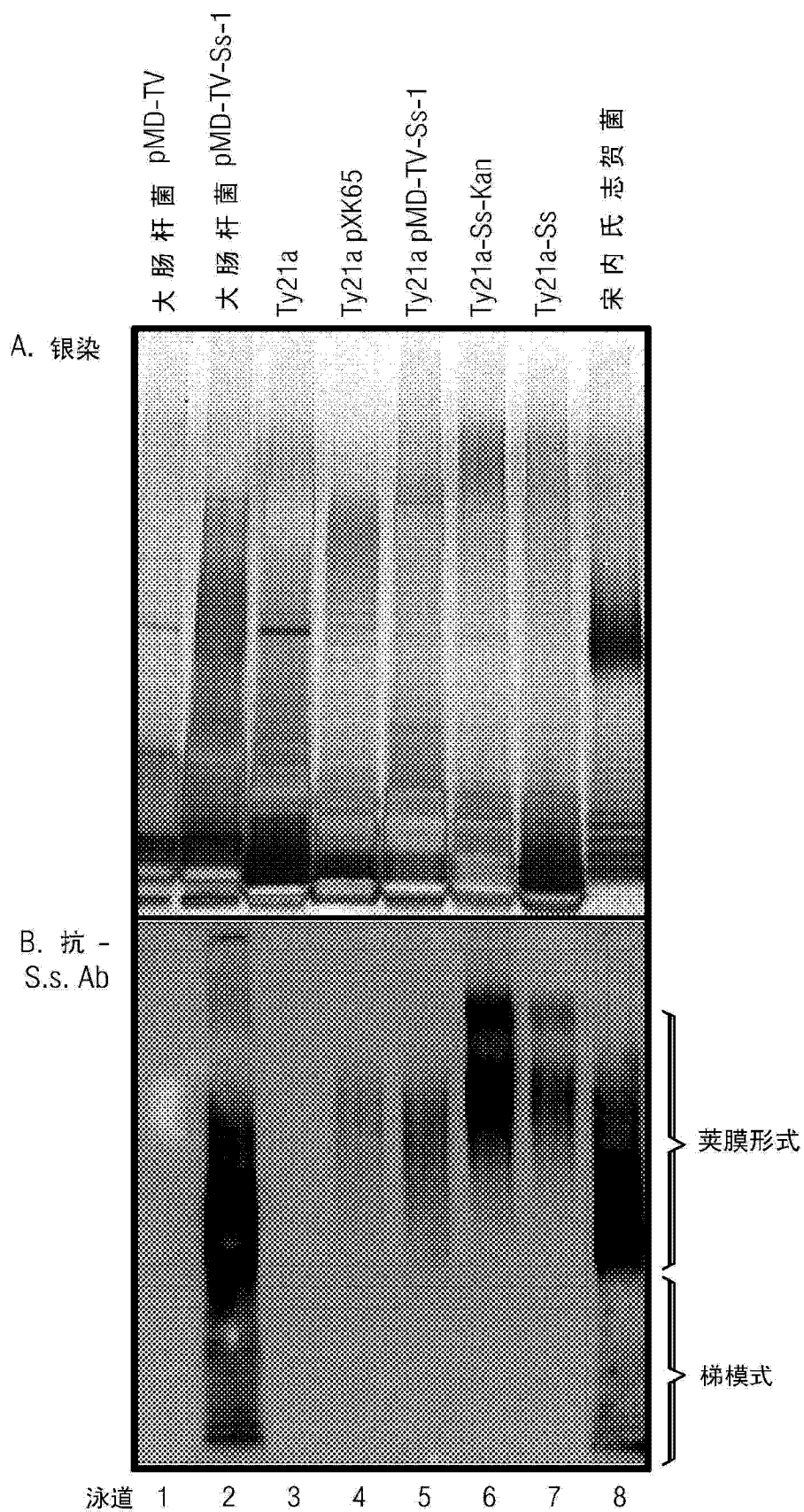


图 2

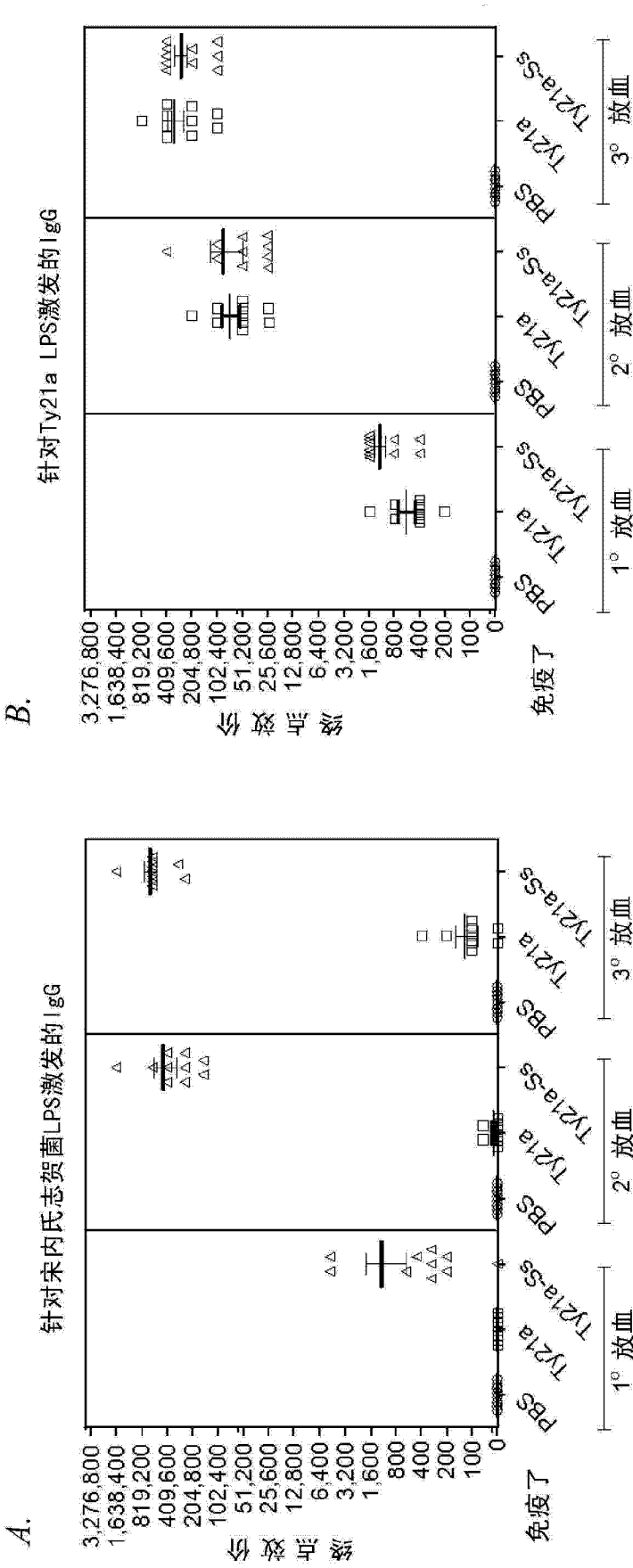


图 3

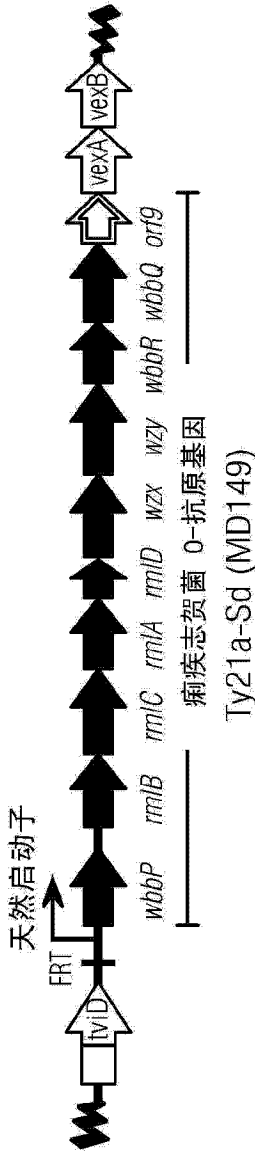


图 4

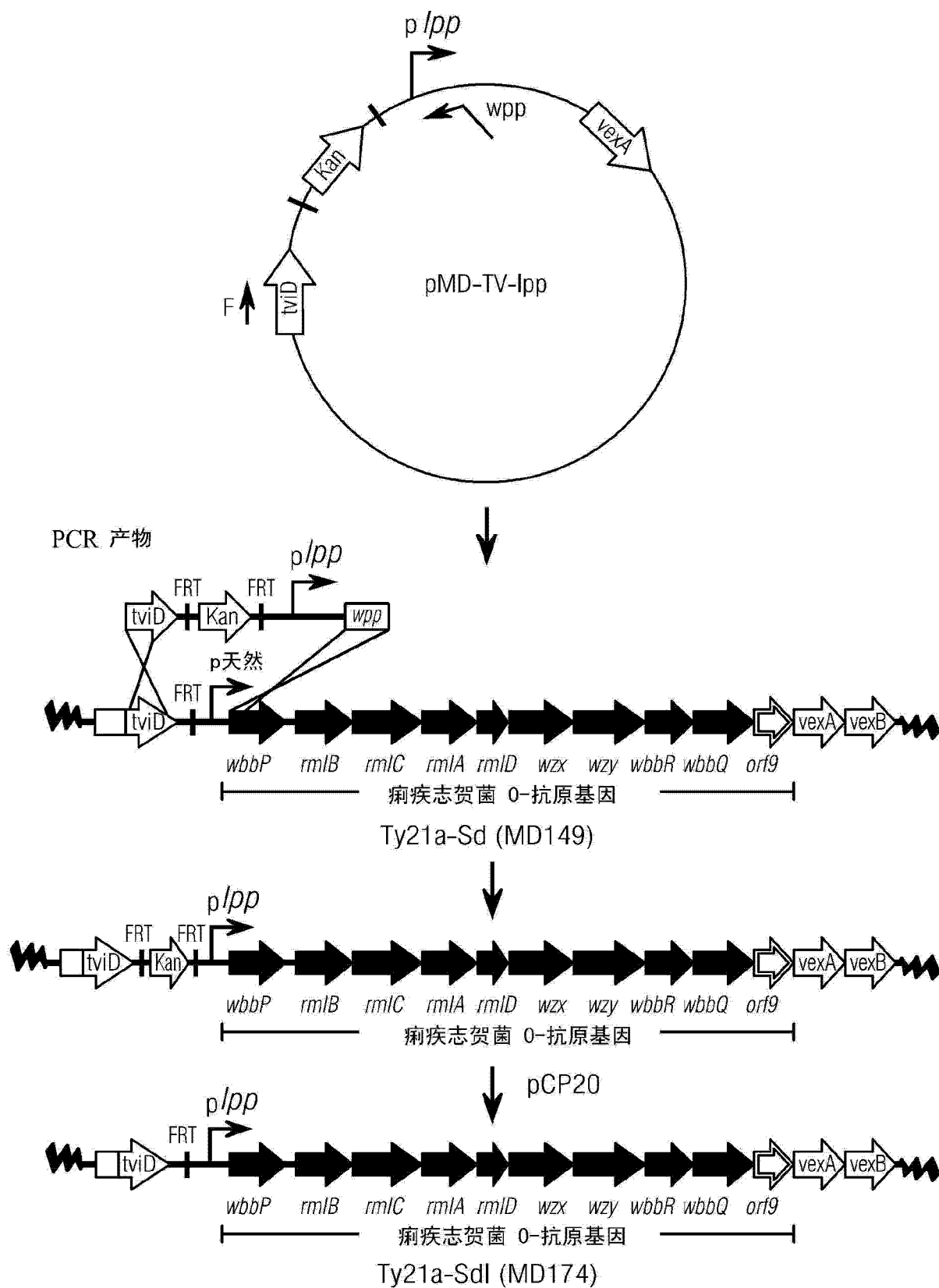


图 5

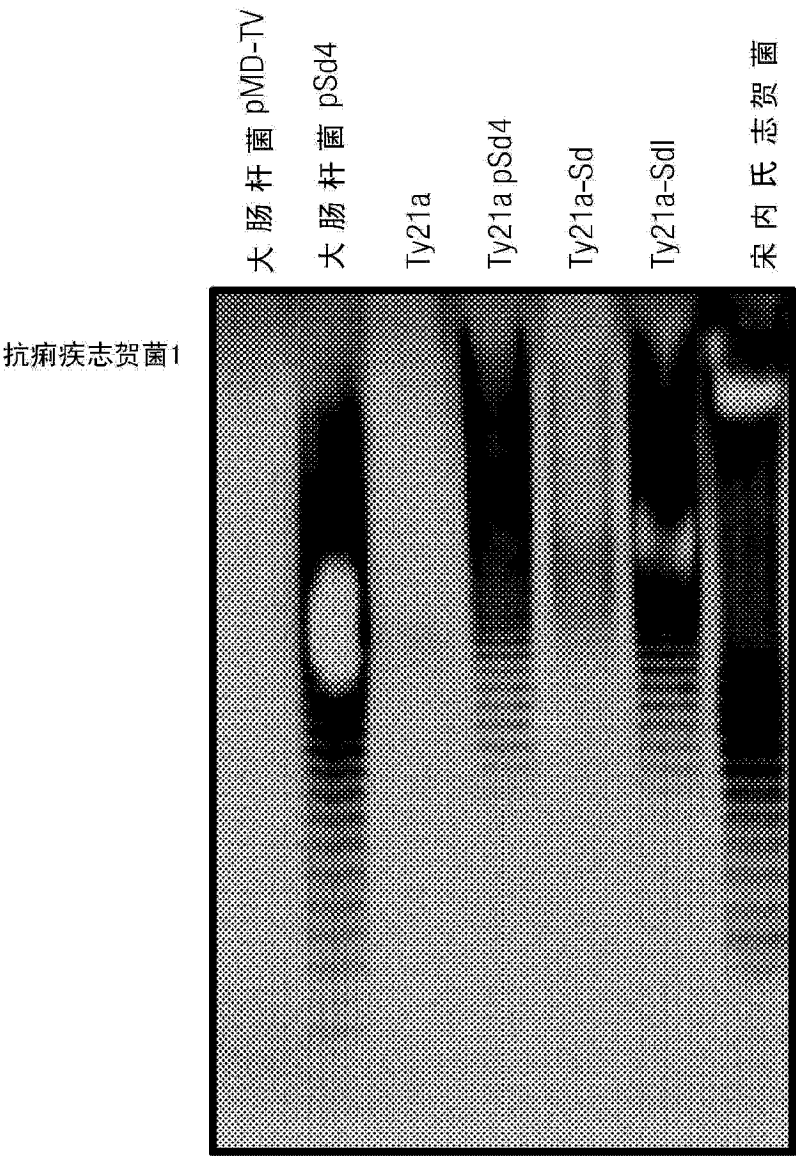


图 6

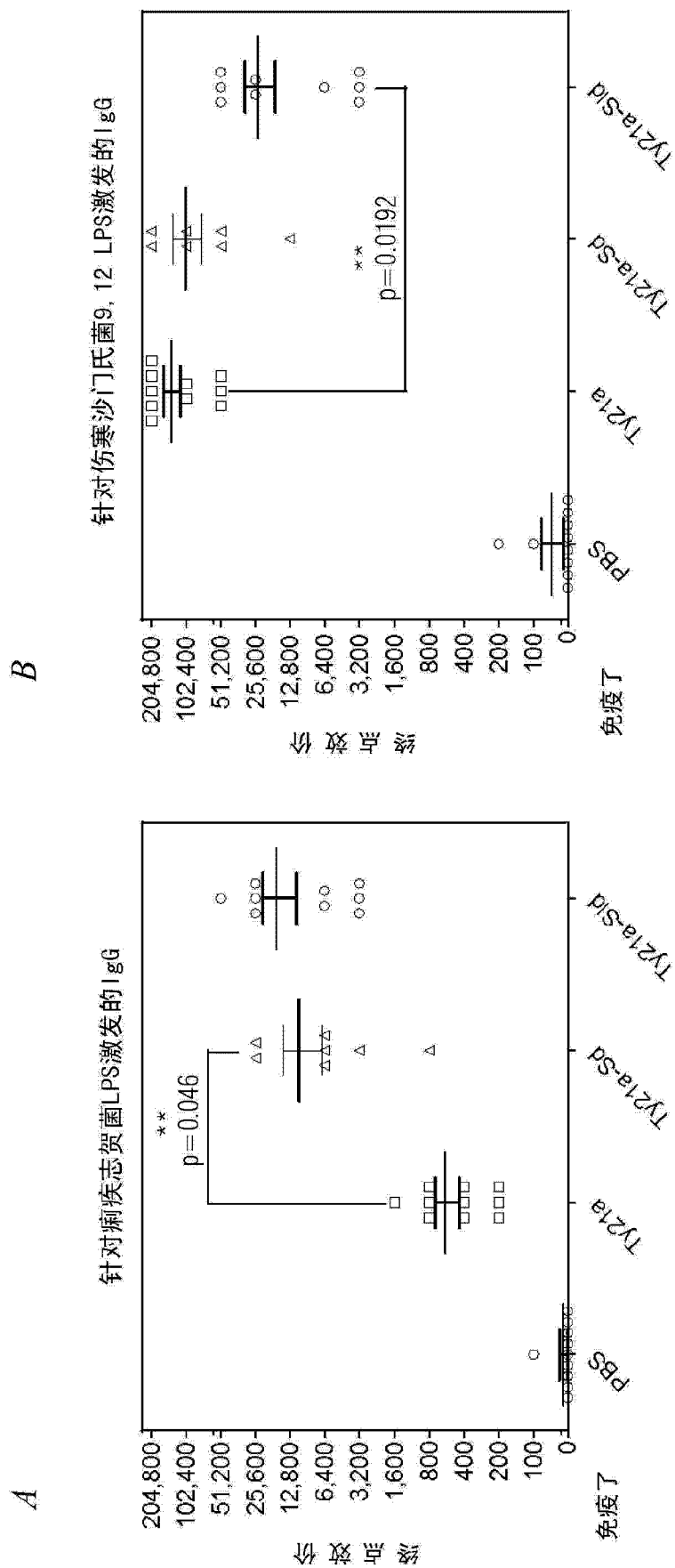


图 7

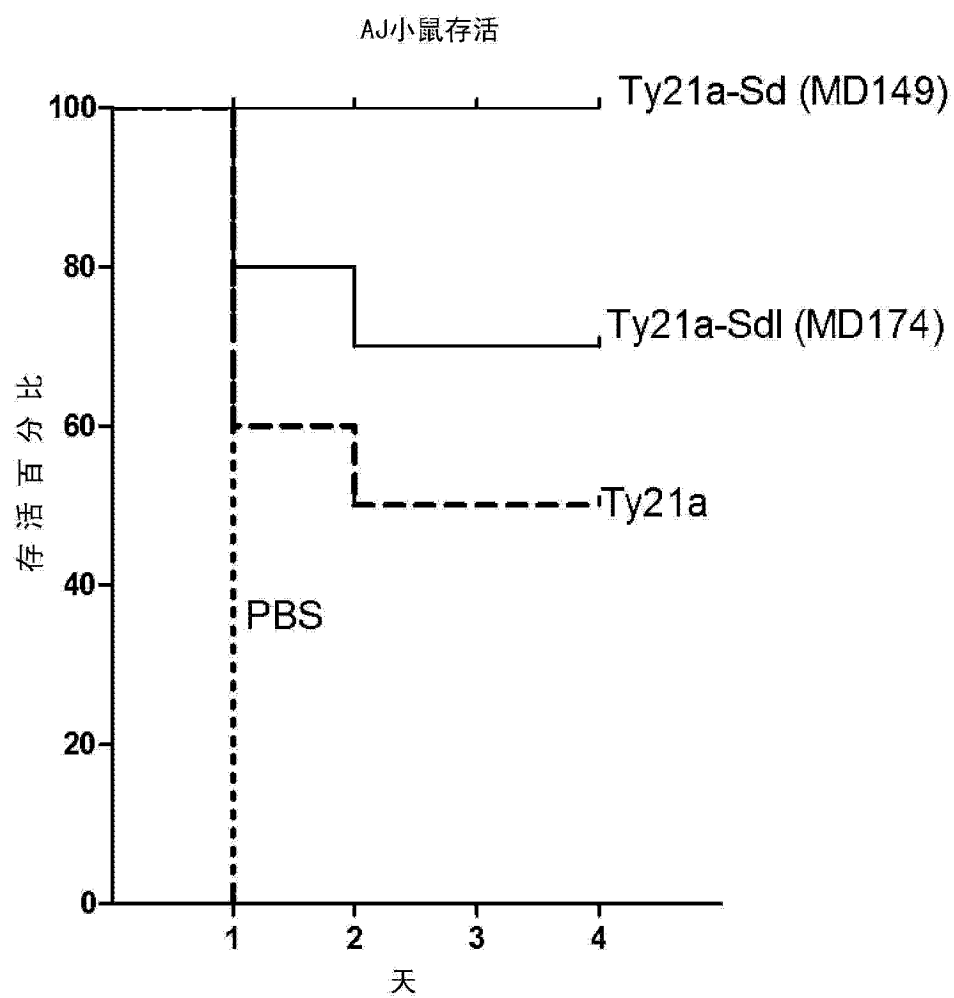


图 8

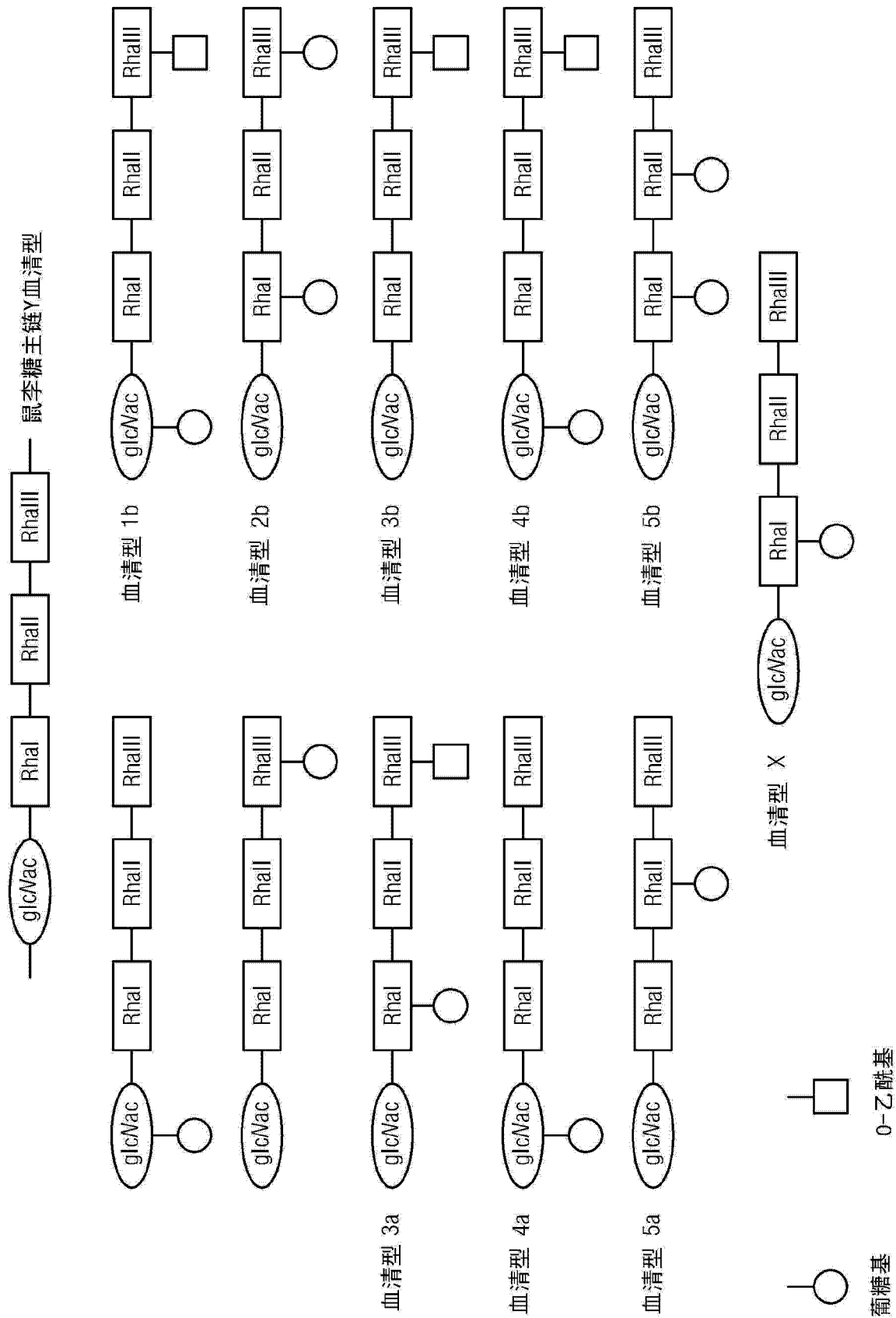


图 9

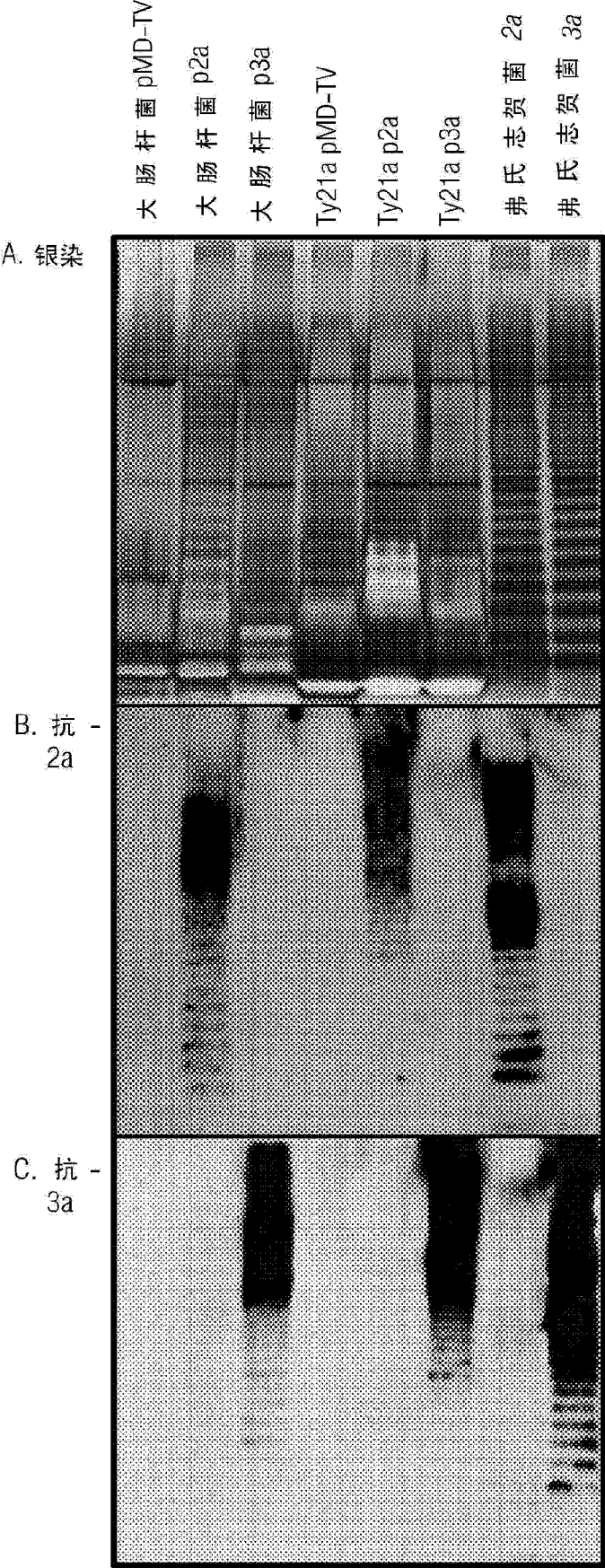


图 10

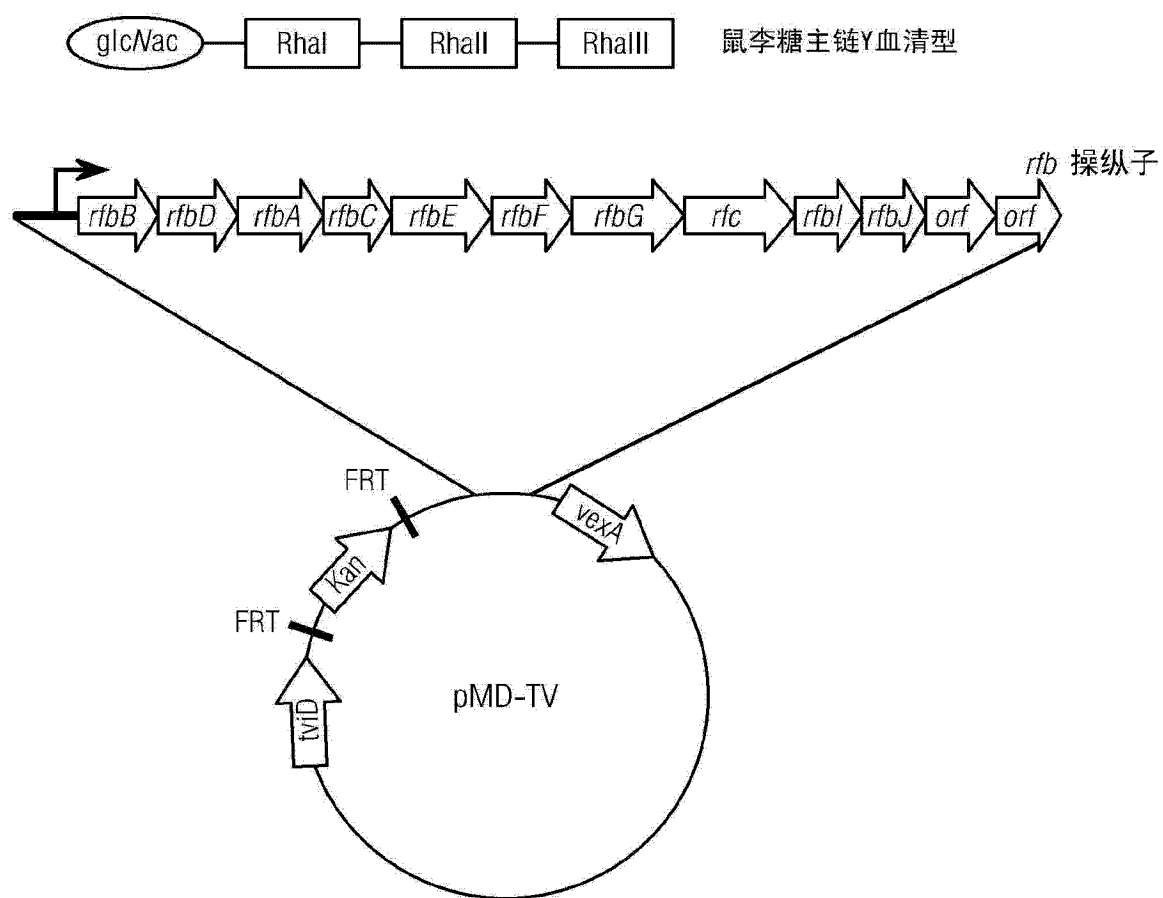
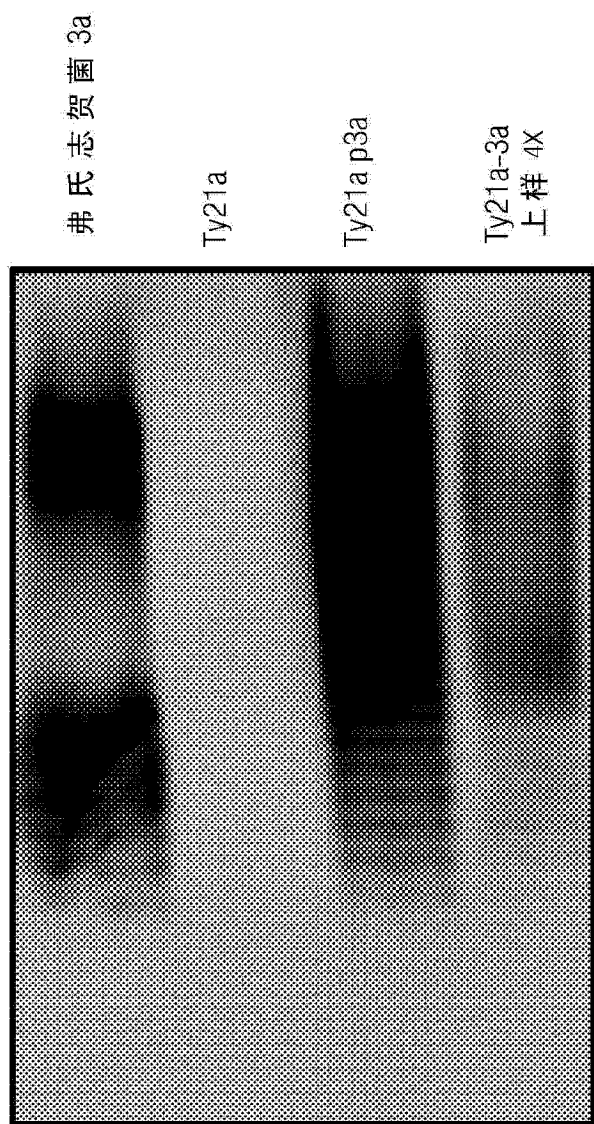
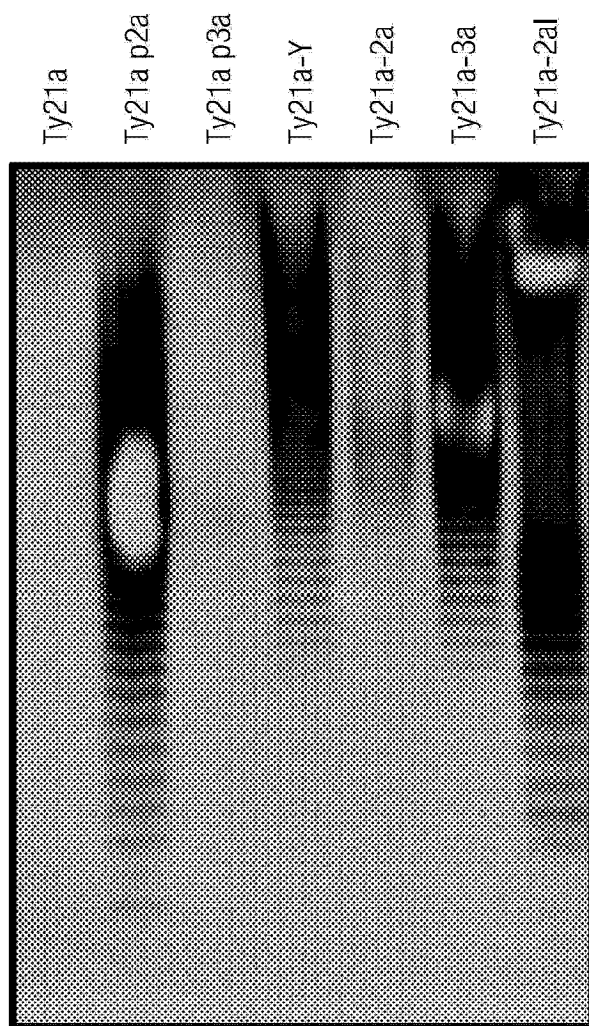


图 11



抗弗氏志贺菌3a

图 12



抗弗氏志贺菌2a

图 13

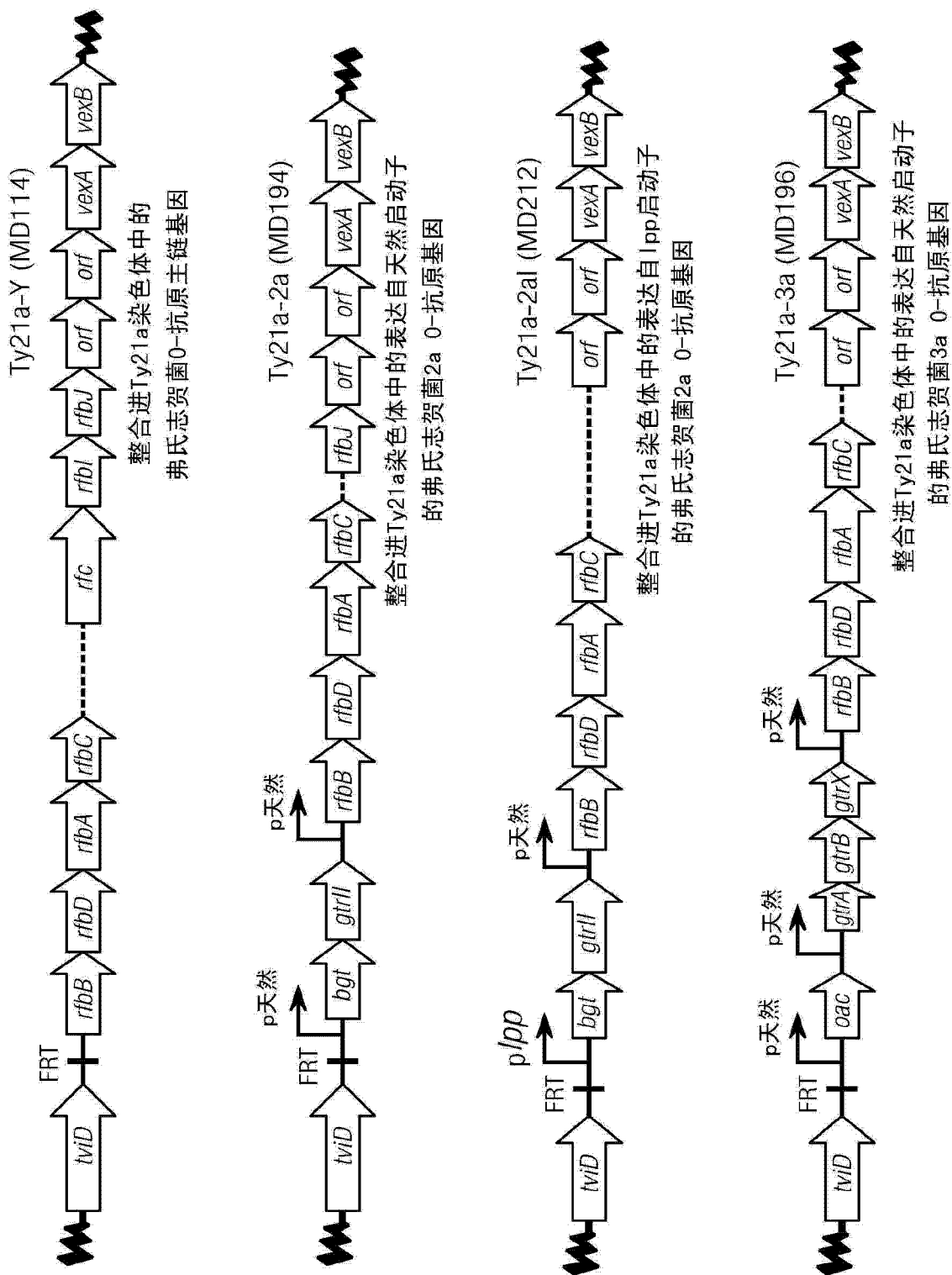


图 14