

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/02

A61K 39/04 A61K 39/09

A61K 39/085 A61K 39/104



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01811367.2

[43] 公开日 2003 年 8 月 20 日

[11] 公开号 CN 1437480A

[22] 申请日 2001.5.21 [21] 申请号 01811367.2

[30] 优先权

[32] 2000. 5. 19 [33] AU [31] PQ7612

[86] 国际申请 PCT/AU01/00588 2001.5.21

[87] 国际公布 WO01/87332 英 2001.11.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.18

[71] 申请人 肺生物学有限公司

地址 澳大利亚西澳大利亚

[72] 发明人 R·L·克蘭希 G·庞

M·L·邓克利

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称 治疗粘膜感染的组合物和方法

[57] 摘要

本发明涉及用于预防性治疗和/或治疗粘膜感染的新组合物和疫苗，尤其是涉及口服疫苗和增强呼吸道粘膜抗感染或治疗已建立的呼吸道感染的方法。

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

1. 可粘膜给药的组合物,其包括一种或多种来自至少一种能在粘膜表面引起感染的微生物的抗原和能诱导 Th1 细胞免疫应答的佐剂,其中所述的佐剂不是来自能在粘膜表面引起感染的微生物。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述的抗原来自细菌,真菌或病毒。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中,以完整的微生物作为所述抗原。

4.如权利要求 3 所述的组合物,其中,所述的完整微生物是已杀死的微生物。

5. 如权利要求 4 所述的组合物,其中,所述的活微生物是活的或活的减毒微生物。

6.如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中,以一种或多种微生物的匀浆物或超声处理物作为所述抗原。

7. 如权利要求 1 到 6 中任意一项所述的组合物,其中,所述的微生物是呼吸道细菌和/或真菌病原体、或通常寄居于呼吸道并具有潜在引起感染的能力的微生物。

8.如权利要求 7 所述的组合物,其中,所述的微生物选自:非典型的流感嗜血杆菌(NTHI)、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌、白色葡萄球菌和金黄色葡萄球菌,或其任意组合。

9.如权利要求 1 到 8 中任意一项所述的组合物,其中,所述的佐剂是能诱导 Th1 型细胞免疫应答但不属于能够在粘膜表面引起感染的生物体的微生物或其部分。

10.如权利要求 9 所述的组合物,其中所述的佐剂是细菌。

11.如权利要求 10 所述的组合物,其中,所述的细菌选自乳酸细菌,分枝杆菌和双歧杆菌,或其任意组合。

12.如权利要求 11 所述的组合物,其中,所述的细菌选自:能够诱导 Th1 型细胞应答的嗜酸乳芽孢杆菌、发酵乳芽孢杆菌和牝牛分枝杆

菌，或其部分。

13.如权利要求12所述的组合物，其中，所述的细菌是嗜酸乳芽孢杆菌。

14.如权利要求9到13中任意一项所述的组合物，其中，所述的细菌是活的。

15.如权利要求1到14中任意一项所述的组合物，其中，所述的组合物是可口服给药的组合物。

16.如权利要求15所述的组合物，其还包括一种或多种药学上可接受的载体、佐剂、溶剂或赋形剂。

17.如权利要求1到15中任意一项所述的组合物，其是食品或食品增补剂。

18.一种包括权利要求1到15中任意一项所述的组合物的疫苗。

19.治疗或预防性地治疗粘膜感染的方法，其包括对需要进行所述治疗的患者施用如权利要求1到16中任意一项所述的组合物，或如权利要求18所述的疫苗。

20.治疗或预防性地治疗粘膜感染的方法，其包括对需要进行所述治疗的患者施用如权利要求1到16中任意一项所述的组合物的佐剂部分，然后施用如权利要求1到16中任意一项所述的组合物的抗原部分。

21.如权利要求20所述的方法，其中，用佐剂部分进行的治疗是通过施用单一的佐剂大丸剂进行的。

22.如权利要求20所述的方法，其中，用佐剂部分进行的治疗是通过重复施用佐剂进行的。

23.如权利要求20或22所述的方法，其中，在施用抗原部份后继续施用佐剂。

24.如权利要求19到23中任意一项所述的方法，其中，所述的化合物或疫苗可施用于任何粘膜表面。

25.如权利要求24所述的方法，其中所述的粘膜表面选自口腔，呼吸道和肠道。

26.如权利要求19到25中任意一项所述的方法，其中所述的组合

物或疫苗通过口服给药。

27.如权利要求 19 到 26 中任意一项所述的方法，其中，施用所述疫苗两个疗程，然后接加强疗程。

28.如权利要求 19 到 27 中任意一项所述的方法，其中，所述的佐剂是细菌，并且所施用的细菌量为约 1×10^8 到约 1×10^{12} 个生物体。

29.如权利要求 19 到 28 中任意一项所述的方法，其中，以完整的死微生物作为所述抗原，并且所施用的微生物量为约 1×10^8 到约 1×10^{12} 个生物体。

30.如权利要求 28 或 29 所述的方法，其中，完整的死微生物与佐剂微生物的比例为约 5:1 或更高。

治疗粘膜感染的组合物和方法

技术领域

本发明涉及诱导粘膜保护的新的疫苗组合物，特别是口服疫苗，以及加强粘膜抗感染或治疗已建立的感染的方法。

背景技术

支气管粘膜炎被用作粘膜免疫学的模型，更具体地用于反映在粘膜表面宿主与寄生物关系的特定平衡。通常无菌的支气管粘膜会被在一般情况下不侵袭宿主的"无毒"细菌寄居。最突出的是非典型的流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (NTHI)。在慢性肺部疾病患者中急性感染事件可能是由于打破了支气管粘膜与寄居细菌之间的精细平衡引起的。局限性宿主应答涉及通过募集和激活支气管粘膜中的嗜中性粒细胞起作用的 Th1 T 细胞(其产生 γ 干扰素)。这一过程若过度和/或不适当，在已患有慢性肺部疾病的患者中将导致咳嗽和脓痰增多，即“急性支气管炎”的特点。

起初的口服疫苗使用杀死的 NTHI 活化正常的粘膜系统以增强沿小肠的派尔淋巴集结的淋巴细胞释放（当时被认为是产生抗体的 B 淋巴细胞），所述细胞在支气管粘膜内进行重新定位，产生阻止细菌侵入支气管的 IgA 抗体。这种概念已被替代。这种疫苗需要(i)单一的细菌内容物，和(ii)不添加佐剂。为了避免当时被认为由高度下调的粘膜环境造成的限制，没有佐剂被认为是必需的，即向简单的单细菌疫苗中添加佐剂将增强粘膜下调，减弱疫苗效力，甚至促进或加剧感染。

本发明的目的在于克服或至少改善现有技术中的一种或多种局限性，或提供有用的替代方案。

发明简述

依照本发明的第一方面提供一种可粘膜给药的组合物，其包括一种或多种来源于至少一种能在粘膜表面引起感染的微生物的抗原和能诱导 Th1 型细胞免疫应答的佐剂，其中所述的佐剂不是来源于能在粘膜表面引起感染的微生物。

优选地，所述抗原来自细菌，真菌或病毒。甚至更优选的是以完整的微生物作为所述抗原。作为进一步优选，当所述抗原是完整的微生物时，它是一种已被杀死的微生物，但可以理解也可有效地利用活的或活的减毒微生物。然而，也应当理解为获得类似的结果也可以使用单个抗原或微生物的匀浆物及超声处理物。

特别优选的是呼吸道细菌和真菌病原体或正常寄居于呼吸道但具有引起感染的潜力的那些病原体，例如 NTHI，铜绿假单胞菌

(*Pseudomonas aeruginosa*)，肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)，白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus*)，金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等，单独地或它们的组合。

本发明所述的组合物意为口服施用，因此可以与药学上可接受的载体，溶剂和赋形剂结合。

优选地，用于本发明组合物中的佐剂是能诱导 Th1 型的细胞免疫应答但不属于能在粘膜表面引起感染的生物的微生物或其部分。还优选的是，所述的佐剂是细菌，例如其可选自，但不限于乳酸细菌，分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 种或双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 种。甚至更优选的是使用能诱导 Th1 型的细胞免疫应答的嗜酸乳芽孢杆菌

(*Lactobacillus acidophilus*) (*L. acidophilus*)，发酵乳芽孢杆菌

(*Lactobacillus fermentum*) (*L. fermentum*) 或牝牛分枝杆菌

(*Mycobacterium vaccae*) (*M. vaccae*)，或其部分。特别优选的是嗜酸乳芽孢杆菌。嗜酸乳芽孢杆菌、发酵乳芽孢杆菌或牝牛分枝杆菌可以以活的或灭活制剂的形式使用，条件是它们能诱导 Th1 型应答。优选嗜酸乳芽孢杆菌和发酵乳芽孢杆菌以活制剂的形式使用。其它细菌被认为也可适合用作佐剂(无论其是否具有益生作用)，例如，熟知的佐剂细菌如干酪乳芽孢杆菌 (*L. casei*)，植物乳芽孢杆菌 (*L. Plantarum*)，

鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*)，短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) 等。使用益生菌作为佐剂是优选的。

其它已知的常用佐剂也可以包括在内。一系列合适的药物佐剂、赋形剂和载体，以及制备合适的药物制剂的方法是药物制剂领域的技术人员已知的，这些佐剂、赋形剂和载体的详情可以在标准教科书和手册，例如"Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Mack Publishing Co., 1995)中找到，上述文献在这里全文引入作为参考。另外，本发明的组合物也可以是食品或食品增补剂的形式，例如乳制品或增补剂。这些产品和增补剂的制备方法，特别是那些有关如酸乳酪和其它奶制品生产的方法，由于是公知的方法和步骤故也是本领域的技术人员所明了的。

依照本发明的第二方面，提供包含根据第一方面的组合物的疫苗。

依照本发明的第三方面，提供一种治疗或预防性治疗粘膜感染的方法，其包括对需要接受所述治疗的患者施用本发明第一方面的组合物或依照本发明第二方面的疫苗。

然而，可以理解对于需要治疗的患者，无论是预防性的还是治疗性的，均可以先施用所述组合物的仅一个部分，例如细菌形式的佐剂如嗜酸乳芽孢杆菌和发酵乳芽孢杆菌，此后再施用旨在最终针对潜在的病原体提供特异免疫的抗原或多种抗原。使用佐剂进行的起始治疗可以采取单一的大丸剂的形式，但也可以，并优选地，在施用抗原前的一段时间内重复给药。也可以在停止使用抗原后继续施用所述佐剂。

目前已明确粘膜免疫系统对所有的粘膜表面是共同的，因此本发明的组合物和疫苗可以应用于任何潜在的粘膜病原体和任何粘膜表面，包括但不限于口腔，呼吸道和肠道。

优选本发明的组合物或疫苗通过口服给药，但也可以应用于任何粘膜表面，例如呼吸道粘膜或肠道粘膜。

本发明的组合物和疫苗用于诱导针对感染的粘膜保护是有利的，但也可以用作预防剂治疗已有的细菌，真菌和/或病毒粘膜感染。而且，当粘膜表面已被细菌寄居的时候，优选使用本发明的组合物和疫苗。

因此，依照本发明的第四方面提供一种治疗或预防性治疗粘膜感染的方法，其包括对需要所述治疗的患者施用依照本发明第一方面的组合物的佐剂部分，再施用依照本发明第一方面的组合物的抗原部分。

优选地使用佐剂部分进行治疗采取施用单一的佐剂大丸剂的方式进行，但用佐剂部分进行治疗也可通过重复给予佐剂的方式进行。但更优选的是佐剂和抗原一起施用。

在本发明另一实施方案中，当所述的佐剂在所述的抗原之前施用或与所述抗原一起施用时，可以在施用抗原部份后继续施用所述的佐剂。

由于存在共同的粘膜免疫系统，本发明的组合物和疫苗可以施用于任何粘膜表面并达到期望的效果。优选的粘膜表面是口腔，呼吸道和肠道，但是，如上所述，本领域技术人员知道对任何粘膜表面进行施用均是有效的。

优选地，所述组合物或疫苗通过口服给药。

优选地，施用所述疫苗两个疗程，然后接一个加强疗程。

当所述佐剂是完整的活益生菌时，优选的佐剂剂量是约 1×10^8 到约 1×10^{12} 个生物体。

当以完整的死微生物作为抗原时，优选的抗原剂量是从约 1×10^8 到约 1×10^{12} 个生物体，更优选其中完整的死微生物（抗原）与益生菌（佐剂）的比率为约 5:1 或更高的剂量。

还优选的是在每年的季节性感染爆发之前施用本发明的组合物或疫苗。

附图简述

图 1：喂嗜酸乳芽孢杆菌后 IL-4 和 IFN- γ 的产生。

优选实施方案的详细描述

令人惊讶地发现，例如将与粘膜感染相关的特异抗原（例如完整的细菌，如流感嗜血杆菌）和非特异的细菌（即那些通常不与粘膜感染相

关的细菌)结合,可以获得对粘膜感染的延长保护。不希望受到任何具体作用机制的约束,但本发明是基于下述观念,即使用非特异性的细菌可以诱导 T 细胞产生特定的细胞因子应答,所述的应答扩大了预期通过施用传统的疫苗制剂所能获得的保护。更具体地说,但仍不希望受到任何具体作用机制的约束,可以认为施用非特异的细菌使粘膜免疫系统偏向于 T 细胞应答谱的 Th1 (即 IFN- γ)一端。Th1 应答被认为能最好地控制微生物在粘膜的寄居。使用这样的生物体和其他能刺激 Th1 应答的佐剂可以确定 Th1 应答,该 Th1 应答可在远离施用位点处被检测到并起作用。

本文中已证明了在高度"Th2 偏向性"的小鼠模型中(参见实施例 1),非特异性的细菌如乳酸细菌具有下调 IL-4 并加强 IFN- γ 产生的能力。本文中还证明了非特异性的细菌,如乳芽孢杆菌在从支气管中清除非典型的流感嗜血杆菌 (NTHI)的大鼠模型中提供了额外的保护(显示出涉及 CD4 T 细胞,不涉及抗体)(参见实施例 2)。

在本研究中举例使用的动物模型是与治疗和预防感染均相关的微生物寄居模型。寄居是感染的本质决定因素,对于其他治疗和预防性疫苗,该模型已被用于确定效力、剂量、给药方案等。

在本发明的特定实施方案中,治疗性口服疫苗中结合了:1)单独的或联合的在呼吸道内发现的特异细菌(例如,但不限于 NTHI,肺炎链球菌,铜绿假单胞菌,白色葡萄球菌,和金黄色葡萄球菌),所述细菌为死的或活的细菌形式,和 2)非特异性的细菌(本文中也称作益生菌),该细菌具有使粘膜免疫转向 Th1 型 T 细胞应答方向的能力(也可以用活的或死的),例如但不限于乳芽孢杆菌 (*Lactobacillus*) 种(如嗜酸乳芽孢杆菌)和/或分枝杆菌种(如牦牛分枝杆菌)。

这种类型的口服疫苗在粘膜表面已经寄居有细菌时作用最佳(因为这些细菌可再次刺激新近在粘膜中重新定位的细胞),即作为治疗性疫苗。但是它也可以用作预防性疫苗。

为避免胃酸灭活细菌,可使用肠溶胶囊(或类似物)沿小肠释放细菌内容物。另一种选择是在施用特异的抗原或细菌以图诱导针对潜在粘

膜病原体的特异性免疫应答前，长期使用非特异性细菌以建立更持久的 Th1 粘膜环境。所述的“非特异性”细菌单独并不诱导特异性的保护。

非特异性的细菌也可以加强对来自肠胃外途径的某些抗原的应答，特别是影响粘膜保护的那些(通过促进特定免疫结果的出现)。

革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌结合作为益生菌佐剂在这一系统中具有协同活性，并且也包含在本发明的范围内。由于粘膜免疫系统对所有的粘膜表面(例如尤其是支气管, 鼻窦和中耳等)是共同的，所以各种呼吸粘膜表面均可得到保护。

下面通过特定的但是非限定性的实施例对本发明进行更具体的描述。

实施例 1: 益生菌对 Th1/Th2 细胞因子应答的影响

为确定益生菌是否下调 Th2 并上调 Th1 细胞因子应答，用饲喂针经胃内将不同数量的嗜酸乳芽孢杆菌 (获自 University of New South Wales, School of Microbiology and Immunology Culture Collection, Sydney, 澳大利亚) 喂给 C57/B16 小鼠，连续喂养两周，此后通过腹膜注射 0.2 mL 磷酸盐缓冲液中的 8 μ g 卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝以致敏小鼠。上述小鼠在处死前，进一步用嗜酸乳芽孢杆菌喂 10 次，每两天一次共两周。过筛切割脾脏以分离淋巴细胞，用 PBS 洗并按 10×10^6 重悬。将 1mL 小份的细胞悬液分配到 24-孔平底微滴定板的孔中，用 OVA (5 μ g/mL) 进行刺激。培养 4 天后，收集上清液，通过标准的 ELISA 技术用 IL-4 或 IFN- γ 单克隆抗体对分析 IL-4 和 IFN- γ 的产量。

简要地说，24-孔微滴定板的板孔用俘获抗-IL-4 抗体包被。在室温下温育 1 小时后，洗孔并将生物素酰化的抗-IL-4 抗体加到每孔中。再温育 1 小时后，洗孔并向每孔中加入链霉亲和素-过氧化物酶偶联物。温育 30 分钟后，洗孔并加入 TMB 底物。在 ELISA 平板读数器中于 450/620 nm 下读取显示的颜色。在未知的样品中 IL-4 的水平利用标准

曲线通过插值法定量。用类似的步骤测定 IFN- γ 。

在图 1A 和 B 中显示的结果表明饲喂嗜酸乳芽孢杆菌导致 IL-4 的产生以剂量依赖方式受到抑制(图 1A)而 IFN- γ 的产生增强(图 1B)。

实施例 2: 通过单次腔内给予活的嗜酸乳芽孢杆菌和死 NTHi 诱导 NTHi 从呼吸道中的增强清除

我们利用大鼠模型研究了嗜酸乳芽孢杆菌增强从呼吸道中清除非典型的流感嗜血杆菌(NTHi)的能力。

DA 大鼠(200-250 克, 8-10 周龄, Animal Resource Centre, Perth, WA)通过单次腔内(IL)注射(进入小肠腔) 0.75 mL 仅含 5×10^9 个死 NTHi 或还含 2.5×10^{10} 个嗜酸乳芽孢杆菌的 PBS 进行免疫 (如表 1 所示)。所述的 IL 给药在剖腹手术暴露出十二指肠后通过直接注射到肠腔中完成。这被认为等价于口服摄入后被释放到肠腔中的包肠溶衣药(如可以制备用于人的包肠溶衣药)。在第 14 天用单独的(A 组)或含 5×10^8 个死 NTHi (B-D 组)的 50 μ L PBS 给所述的大鼠进行气管内(IT)加强。在第 21 天用 50 μ L PBS 中的 5×10^8 个活 NTHi 对小鼠进行气管内感染。4 小时后, 将大鼠处死, 在巧克力琼脂平板上接种 10 倍系列稀释的支气管灌洗液(BAL)或肺匀浆物(LH)以确定 NTHi 在 BAL 和 LH 中的总数。37 $^{\circ}$ C 过夜培养后计长出的菌落数。BAL 和 LH 中的总细菌数由菌落形成单位(CFU)表示, 如表 2 所示。

表 1：大鼠组: IL 给药和 IT 加强

组	IL 给药	IT 加强
A	PBS	PBS
B	NTHi	NTHi
C	NTHi/嗜酸乳芽孢杆菌	NTHi
D	嗜酸乳芽孢杆菌	NTHi

表 2.由呼吸道回收的活 NTHi (平均值 $\pm$ SEM)

组	BAL CFU (10^6)	LH CFU (10^6)
A	3.2 $\pm$ 1.1	19.4 $\pm$ 5.9
B	1.0 $\pm$ 0.3	19.2 $\pm$ 10.4
C	0.5 $\pm$ 0.3 ^{a,c}	3.3 $\pm$ 0.7 ^{b,d}
D	1.7 $\pm$ 0.3	25.9 $\pm$ 10.0

a, $p = 0.034$, 与 A 组相比

b, $p = 0.018$, 与 A 组相比

c, $p = 0.264$, 与 B 组相比

d, $p = 0.165$, 与 B 组相比

$p < 0.05$ 被认为是统计学上显著的

这些数据表明死 NTHi 与活嗜酸乳芽孢杆菌的组合比单独的 NTHi 或单独的嗜酸乳芽孢杆菌都更有效。

实施例 3: NTHi 自饲喂嗜酸乳芽孢杆菌的免疫大鼠的肺部的清除增加
通过管饲法将 1.0mL PBS 中的 5×10^{10} 个嗜酸乳芽孢杆菌或单独的 PBS 喂给 DA 大鼠(200-250 克, 8-10 周龄, Animal Resource Centre, Perth, WA), 每两天一次共 7 天, 其间所述大鼠通过腔内 (IT) 施用 0.5ml PBS 中的福尔马林灭活的 NTHi (每只大鼠 5×10^9 个) 进行免疫。继续饲喂大鼠, 每 2 天一次共 2 周, 之后, 经气管内 (IT) 途径用含有福尔马林灭活的 NTHi (每只大鼠 5×10^8 个) 的 50 μ l PBS 进行加强。继续饲喂嗜酸乳芽孢杆菌 7 天后, 用 50 μ L PBS 中的 5×10^8 个活 NTHi 对大鼠进行 IT 感染。4 小时后, 如实施例 2 中所述在 BAL 和 LH 中确定肺内微生物的寄居水平。不同组的免疫和喂养情况列于表 3。细菌回收情况列于表 4。

表 3: 大鼠组: 给药方案

组(每组 5 只大鼠)	饲喂	IL 给药	IT 加强
A	Nil	PBS	PBS
B	Nil	NTHi	NTHi
C	嗜酸乳芽孢杆菌	PBS	PBS
D	嗜酸乳芽孢杆菌	NTHi	NTHi

表 4 由肺部回收的活 NTHi

组	BAL CFU ($10^6/\text{ml}$)	LH CFU ($10^6/\text{mL}$)
A	25.9±7.4	90.2±29.0
B	4.6±3.0 ^a	4.9±1.2 ^b
C	0.7±0.3 ^c	12.5±5.7 ^d
D	0.2±0.1 ^{e,g}	3.2±2.0 ^{f,h}

^ap= 与 A 相比为 0.011^gp = 与 B 相比为 0.235^bp= 与 A 相比为 0.018^hp = 与 B 相比在统计学上不显著^cp = 与 A 相比为 0.043^dp = 与 A 相比为 0.093^ep = 与 A 相比为 0.018^fp = 与 A 相比为 0.033

用嗜酸乳芽孢杆菌喂养并用死 NTHi 免疫的大鼠比仅用死 NTHi 免疫或仅用嗜酸乳芽孢杆菌喂养的大鼠更抗 NTHi 在肺部的感染。而且，用管饲法重复饲喂嗜酸乳芽孢杆菌的大鼠比给予单一的嗜酸乳芽孢杆菌大丸剂的大鼠(实施例 2)更抗感染。不希望受任何特定的作用机制约束，但这些数据表明清除的加强可能是由于重复喂养后提高了嗜酸乳芽孢杆菌在肠内的寄居所致。

实施例 4: 死 NTHi 和活发酵乳芽孢杆菌的腔内给药提供了对后续急性 NTHi 感染的增强保护

用急性 NTHi 呼吸道感染大鼠模型对单独的或与死 NTHi 结合的发 酵乳芽孢杆菌增强清除 NTHi 的能力进行了评估。

无特异病原体的 DA 大鼠(177-200g)从 Central Animal house, (University of Newcastle, Newcastle, NSW) 获得。5 只大鼠为一组，如下述表 5 所述将 0.75 mL PBS，或仅含 5×10^9 个死 NTHi 的 PBS，或者含 5×10^9 个死 NTHi 加 2.5×10^{10} 个发酵乳芽孢杆菌的 PBS，或者仅含 2.5×10^{10} 个发酵乳芽孢杆菌的 PBS，一次注射到大鼠小肠肠腔中。在第 14 天，用 50 μ l PBS 通过 IT 假加强 A 组大鼠，用 50 μ L 含 5×10^8 个死 NTHi 的 PBS 加强 B-D 组的大鼠。在第 21 天，用 50 μ L PBS 中的 5×10^8

个活 NTHi 通过 IT 感染大鼠。4 小时后通过腹膜内施用过量的戊巴比妥将大鼠处死。用 10mL PBS 灌洗肺部获得支气管肺泡灌洗液 (BAL)。然后, 将肺在 10mL PBS 中进行匀浆以获得肺匀浆物 (LH)。BAL 和 HL 中的细菌数通过将 BAL 和 HL 系列稀释并再将已知的体积接种到巧克力平板上进行测定。在 37℃ 下过夜培养后, 计数菌落数并确定 BAL 和 HL 中的菌落形成单位 (CFU) 的总数。每个大鼠组中的细菌数量列于表 6。

表 5: 用死 NTHi 和活的发酵乳芽孢杆菌的如下多种结合对大鼠 (每组 5 只) 作单次腔内给药:

大鼠组	IL 免疫	IT 加强
A	PBS	PBS
B	NTHi 5×10^9	NTHi 5×10^8
C	NTHi 5×10^9 + 发酵乳芽孢杆菌 2.5×10^{10}	NTHi 5×10^8
D	发酵乳芽孢杆菌 2.5×10^{10}	NTHi 5×10^8

表 6: 从肺中回收的活 NTHi:

大鼠组	BAL CFU (10^6)	LH CFU (10^6)
A (5)	3.67±1.30	103.5±34.2
B (5)	0.40±0.22 P = 0.038*	17.4±6.8 P=0.039*
C (5)	0.27±0.11 P=0.032*	5.7±1.5 P=0.021*
D (5)	0.49±0.19 P=0.042*	0.82±0.37 P=0.017*

*与 A 组相比

另外, 对于 LH, $B > D$ ($P = 0.041$), 和 $C > D$ ($P = 0.015$).

这些数据提示单独的或与死 NTHi 结合的发酵乳芽孢杆菌与单独的死 NTHi 相比可以更为有效地预防接下来的急性呼吸道感染。因此, 此乳芽孢杆菌菌株也能有效地抗急性呼吸道感染。

实施例 5: 与固定的 NTHi 剂量一起施用的嗜酸乳芽孢杆菌的剂量范围研究

无特异病原体的 DA 大鼠 (197-230g) 从 Central Animal house (University of Newcastle, Newcastle, NSW) 获得。6 只大鼠为一组, 如下述表 7 所述单次 IL 施用 PBS, 或固定剂量的死 NTHi(5×10^9) 加一种不同剂量的活嗜酸乳芽孢杆菌。在第 14 天用 50 μ L PBS 假加强 A 组大鼠, 用 50 μ L 含 5×10^8 个死 NTHi 的 PBS 加强 B-D 组的大鼠。加强是通过气管内递送的方式进行的。在第 21 天, 用 50 μ L PBS 中的 5×10^8 个活 NTHi 通过气管内滴注感染大鼠。4 小时后通过腹膜内施用过量的戊巴比妥将大鼠处死。用 10mL PBS 灌洗肺以获得支气管肺泡灌洗液 (BAL)。然后将肺脏在 10mL PBS 中进行匀浆化以获得肺匀浆物 (LH)。BAL 和 LH 中的细菌数通过将 BAL 和 LH 系列稀释并再将已知的体积接种到巧克力平板上进行测定。在 37 $^{\circ}$ C 下过夜培养后, 数菌落数并确定在 BAL 和 LH 中的菌落形成单位(CFU)总数。每个大鼠组中的细菌数量列于表 8。

表 7: 大鼠组: IL 给药和 IT 加强

大鼠组	IL 免疫	IT 加强
A (6)	PBS	PBS
B (5)	NTHi+嗜酸乳芽孢杆菌 2×10^8	NTHi
C (6)	NTHi+嗜酸乳芽孢杆菌 1×10^9	NTHi
D (6)	NTHi+嗜酸乳芽孢杆菌 5×10^9	NTHi
E (6)	NTHi+嗜酸乳芽孢杆菌 2.5×10^{10}	NTHi

表 8: 从肺部回收的活 NTHi:

大鼠组	BAL CFU (10^6)	LH CFU (10^6)
A (6)	1.96 $\pm$ 0.54	17.9 $\pm$ 4.5
B (5)	0.65 $\pm$ 0.46	3.3 $\pm$ 1.7 P=0.021*
C (6)	1.22 $\pm$ 0.49	4.7 $\pm$ 1.4 P=0.019*
D (6)	0.71 $\pm$ 0.22	6.8 $\pm$ 2.8
E (6)	3.75 $\pm$ 1.74	13.2 $\pm$ 5.2

*与 A 组相比。

较低剂量的乳芽孢杆菌比较高剂量的乳芽孢杆菌更有效。还是不希望受任何特定的作用机制的限制，但这些数据提示“佐剂作用”方式可能与仅用乳芽孢杆菌的作用方式不同。

由上述结果，用于人的等价剂量可能是大约 1×10^8 到 1×10^{12} 个细菌。

实施例 6: 对 NTHi 免疫的最佳剂量大小/给药方案的评估

我们确定了对于死 NTHi 免疫的最佳剂量大小和给药方案。所评估的不同方案列于表 9。评估了单次 IL 给药，单次 IL 给药后接一次管饲法给药，和单次 IL 给药后接两次管饲法给药。仅一次给药可通过 IL 方式进行，因为这涉及到手术暴露十二指肠。从动物伦理学考虑仅允许一次手术干预。因此接下来通过管饲法递送给药。

表 9: 给药方案

方案	第 1 次给药 (IL)	第 2 次给药 (管饲法)	第 3 次给药 (管饲法)	IT 加强	感染/死亡
1	第 0 天	-	-	第 28 天	第 35 天
2	第 0 天	第 14 天	-	第 28 天	第 35 天
3	第 0 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天

结果:

(i) 方案 1

无特异病原体的 DA 大鼠(187-213g)从 Central Animal house (University of Newcastle, Newcastle, NSW)获得。按表 9 中方案 1 单次 IL 给予大鼠(6 只为一组)表 10 中所示不同剂量大小的死 NTHi。所述的死 NTHi 含于 0.3 mL PBS 中。用 PBS(A 组) 或 2×10^7 个死 NTHi (B-D 组)进行 IT 加强。用 50 μ L 含 5×10^8 个活 NTHi 的 PBS 对大鼠进行气管内感染。从 BAL 和 LH 中回收的细菌列于表 11。

表 10:在方案 1 中测定的剂量大小

大鼠组	IL 免疫	IT 加强
A	PBS	PBS
B	NTHi 3×10^9	NTHi 2×10^7
C	NTHi 3×10^8	NTHi 2×10^7
D	NTHi 3×10^7	NTHi 2×10^7

表 11: 从肺部回收的活 NTHi:

大鼠组	BAL CFU (10^6)	LH CFU (10^6)
A (5)	1.12 ± 0.20	17.1 ± 1.9
B (6)	0.76 ± 0.14 P=0.029 ^a	8.0 ± 1.5 P=0.042*
C(6)	0.70 ± 0.20 P=0.030 ^a	5.2 ± 1.4 P=0.0006*
D(6)	1.76 ± 0.37	16.1 ± 4.7

^a 与 D 组相比

* 与 A 组相比

显然, 对于单次 IL 给药进行的免疫, 较高剂量水平 (3×10^9 和 3×10^8) 在提供保护性免疫方面起到同等效果。最低的剂量 (3×10^7) 不起作用。

(ii) 方案 2

无特异病原体的 DA 大鼠 (187-219g) 从 Central Animal house (University of Newcastle, Newcastle, NSW) 获得。按表 9 中方案 2 单次 IL 给予大鼠 (6 只为一组) 表 12 中所示不同剂量大小的死 NTHi。所述的死 NTHi 溶于 0.3 mL PBS 中。用 PBS (A 组) 或 50 μ l PBS 中的 2×10^7 个死 NTHi (B-D 组) 进行 IT 加强。用 50 μ L 含 5×10^8 个活 NTHi 的 PBS 对大鼠进行气管内感染。从 BAL 和 LH 中回收的细菌列于表 13。

表 12:方案 2 中测试的剂量大小

大鼠组	IL 给药	口服给药	IT 加强	感染/死亡
A	PBS	PBS	PBS	NTHi 3×10^8
B	NTHi 3×10^7	NTHi 3×10^7	NTHi 8×10^7	NTHi 3×10^8
C	NTHi 3×10^8	NTHi 3×10^8	NTHi 8×10^7	NTHi 3×10^8
D	NTHi 3×10^9	NTHi 3×10^9	NTHi 8×10^7	NTHi 3×10^8
天	0	14	28	35

表 13: 由肺部回收的活细菌:

大鼠组	BAL CFU (10^6)	LH CFU (10^6)
A (6)	12.7±4.0	44.7±10.0
B (5)	2.9±1.3	13.5±1.2 P=0.019*
C (5)	5.1±3.4	17.2±4.7 P=0.042*
D (6)	2.9±4.0 P=0.042*	15.4±9.8 P=0.045*

*与 A 组相比。

显然,当给药两次时,所有三种剂量大小在 LH 中给出同等程度的保护。在 BAL 中这三种剂量的保护水平也是相似的,但本试验中只有最高剂量才有统计学上的显著性。

(ii) 方案 3

无特异病原体的 DA 大鼠(176-213g)从 Central Animal house (University of Newcastle, Newcastle, NSW)获得。按表 9 中方案 3 单次 IL 给予大鼠(6 只为一组)表 14 中所示不同剂量大小的死 NTHi。所述的死 NTHi 含于 0.3 mL PBS 中。用 50 μ l PBS(A 组) 或 50 μ l PBS 中的 2×10^7 个死 NTHi (B-D 组) 进行 IT 加强。用 50 μ L 含 5×10^8 个活 NTHi 的 PBS 对大鼠进行气管内感染。从 BAL 和 LH 中回收的细菌列于表 15。

表 14:方案 3 中测定的剂量大小

大鼠组	IL 给药	口服给药	IT 加强	感染/死亡
A	PBS	PBS	PBS	NTHi 3×10^8
B	NTHi 3×10^7	NTHi 3×10^7	NTHi 8×10^7	NTHi 3×10^8
C	NTHi 3×10^8	NTHi 3×10^8	NTHi 8×10^7	NTHi 3×10^8
D	NTHi 3×10^9	NTHi 3×10^9	NTHi 8×10^7	NTHi 3×10^8
天	0	14 和 21	28	35

表 15: 从肺部回收的活细菌:

大鼠组	BAL CFU (10^6)	LH CFU (10^6)
A(6)	2.2±0.7	16.8±8.0
B (6)	0.48±0.23 P=0.045*	3.3±1.4
C (6)	0.79±0.21	5.6±1.8
D (6)	0.45±0.23 P=0.042*	3.7±1.5

*与 A 组相比

对 3 次肠内给药(1 次 IL 加 2 次管饲法给药), 所有的三个剂量水平提供了类似的保护. 三次给药与二次给药(方案 2)相比没有明显的优势。

由上述数据, 用于人的等价剂量可能是大约 1×10^8 到 1×10^{12} 个细菌。

实施例 7: 通过单次 IL 给药用 NTHi 和嗜酸乳芽孢杆菌进行长期免疫

我们用试验确定通过添加嗜酸乳芽孢杆菌提供的增强保护的持续时间。无特异病原体的 DA 大鼠(201-293g)从 Central Animal house (University of Newcastle, Newcastle, NSW) 获得。6 只大鼠为一组, 如表 16 所示 IL 给予 0.75 mL PBS, 或含 5×10^9 个死 NTHi 的 PBS, 或者含 5×10^9 个死 NTHi 与 2.5×10^{10} 个活嗜酸乳芽孢杆菌的混合物的 PBS。如表 16 所示, 14 天后用 50 μ L PBS 或含 5×10^8 个死 NTHi 的 PBS 对大鼠进行 IT 加强。IL 给药后 3 个月, 用 50 μ L 含 5×10^8 个活 NTHi 的 PBS 进行气管内 (IT) 感染大鼠。感染后 4 小时, 处死大鼠,

制备 BAL 和 LH 并如上述实施例中所所述确定总的细菌数并以菌落形成单位(CFU)表示。

表 16: 大鼠组: IL 给药和 IT 加强

大鼠组	IL 免疫	IT 加强
A	PBS	PBS
B	NTHi	NTHi
C	嗜酸乳芽孢杆菌	PBS
D	NTHi+嗜酸乳芽孢杆菌	NTHi

表 17: 由肺部回收的活细菌数:

大鼠组	BAL CFU (10^6)	LH CFU (10^6)
A (6)	6.2±1.3	10.4±1.7
B (6)	1.7±0.4 P=0.007*	7.3±1.4 P=0.02 ^a
C (6)	3.0±0.8	18.8±3.9
D (5)	2.6±2.0	16.6±8.4

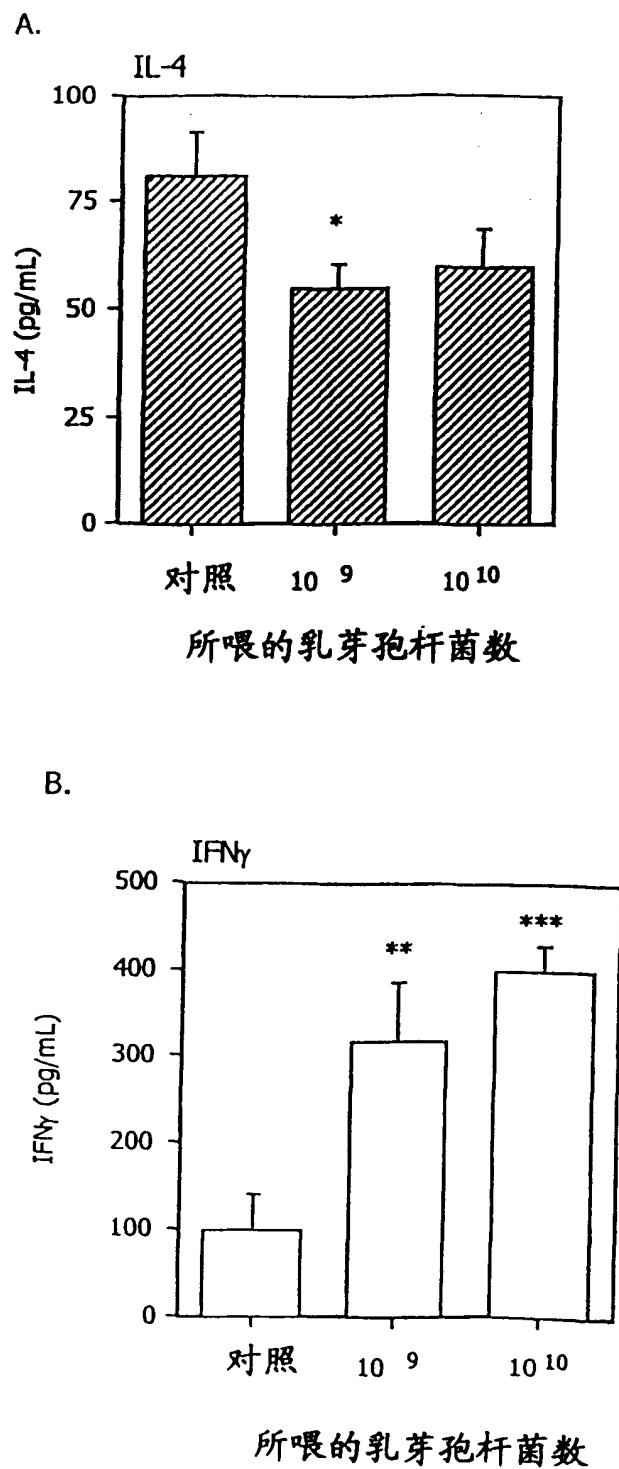
注释: D 组中的一只大鼠在通过外科手术实施 IL 给药时死亡。

*与 A 组相比

^a 与 C 组相比。

通过此 3 个月的实验,用单独的 NTHi 进行免疫最有效。在此期间添加嗜酸乳芽孢杆菌没有明显的效果。

尽管本发明参照具体的实施例和优选的实施方案进行了描述,但应当理解的是符合本文所述的本发明的广义概念和精神的变化形式也包括在本发明的范围内。



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

图 1