

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580013046.6

[51] Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 15/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月9日

[11] 公开号 CN 1960751A

[22] 申请日 2005.3.18

[21] 申请号 200580013046.6

[30] 优先权

[32] 2004.3.18 [33] CU [31] 2004-0051

[86] 国际申请 PCT/CU2005/000002 2005.3.18

[87] 国际公布 WO2005/087259 西 2005.9.22

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.25

[71] 申请人 血清疫苗研究生产中心芬雷学院

地址 古巴哈瓦那

共同申请人 医药化学中心

[72] 发明人 M·E·萨明多戈西亚圣米格尔

A·阿科斯塔多明格斯

C·R·维林普罗斯

N·奥利瓦尔斯阿祖戈

Y·罗佩兹赫南德斯

C·罗德里格乌兹韦尔德斯

M·马丁耐斯本特兹

L·宫泽利兹玛萨

J·F·尹凡特波扎克

A·拉莫斯毛里

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 4 页

[54] 发明名称

由链霉菌获得的疫苗组合物

[57] 摘要

本发明涉及免疫学领域，更具体的说就是控制由微生物引起的传染病，它是以用于预防所述疾病的疫苗的使用为基础。本发明的疫苗是使用可表达或不表达结核分枝杆菌抗原的链霉菌活株开发的，而且已经在通过不同路径施用后证实了它们针对BCG和结核分枝杆菌威胁的保护能力。本发明还涉及链霉菌菌株用于表达在疫苗方面关注的异源抗原的用途。

1. 由链霉菌获得的疫苗组合物, 特征为它们含有一种或多种链霉菌属野生型菌株或者由此类菌株衍生的突变或重组菌株作为活性成分, 以及适当的赋形剂。

2. 依照权利要求1的疫苗组合物, 特征为所述链霉菌菌株是活株。

3. 依照权利要求1和2的疫苗组合物, 特征为所述链霉菌菌株是浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*)、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 和链霉菌种 (*Streptomyces Sp.*)。

4. 依照权利要求1的疫苗组合物, 特征为所述链霉菌重组菌株表达一种或多种有疫苗价值的异源抗原。

5. 依照权利要求4的疫苗组合物, 特征为所述链霉菌重组菌株表达分枝杆菌的一种或多种异源抗原。

6. 权利要求1至5的疫苗组合物用于预防或治疗传染病的用途。

7. 依照权利要求6的用途, 用于预防或治疗由分枝杆菌引起的感染。

8. 依照权利要求7的用途, 用于预防或治疗结核病。

9. 权利要求1至5的疫苗组合物用于预防或治疗肿瘤性疾病的用途。

10. 权利要求1至5的疫苗组合物用于预防或治疗自身免疫性疾病的用途。

11. 权利要求1至5的疫苗组合物用于预防或治疗变应性疾病的用途。

12. 权利要求1至5的疫苗组合物用于预防怀孕的用途。

### 由链霉菌获得的疫苗组合物

本发明涉及免疫学领域，更具体的说就是使用从表达或不表达结核分枝杆菌抗原的链霉菌活株开发的且在通过不同途径施用后证实了它们针对BCG和结核分枝杆菌的攻击有保护能力的疫苗来控制由分枝杆菌引起的传染病。

在分枝杆菌中发现了动物和人类的重要病原体：引起结核病的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、负责麻风病的麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、在免疫抑制患者中引起结核病的鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)和胞内分枝杆菌 (*Mycobacterium intracelulare*)、及在人类中引起疾病但程度较低的其它分枝杆菌 (Somner HM、Good RC, *Mycobacterium*, 在《Manual of clinical Microbiology》第4版中, Washington D.C., A Society for Microbiology, 216-248, 1985; Orme IM, Immunity to mycobaterium, Current Opinion in Immunology 5: 497-502, 1993)。

在动物中, 在反刍动物中引起琼斯病 (Jones disease) 的鸟分枝杆菌副结核亚种 (*Mycobacterium avium subsp. pararatuberculosis*) 和在牛中引起结核病的牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 最为重要 (Dannenber Am, Pathogenesis of tuberculosis: native and acquired resistance in animals and humans, 在 Leive L、Schelesinger D编的《Microbiology》中, 344-354, 1984)。

结核病 (TB) 是最重要的人类分枝杆菌病中的一种。它构成了世界性的健康问题, 而且是与传染病有关的死亡的主要原因, 尽管有用于控制它的BCG的疫苗接种和多种药物的使用 (Dolin PJ、Raviglione MK、Kochi A, Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000, Bull WHO 72: 213, 2001)。

估计有三分之一的世界人口感染有结核分枝杆菌。在全世界, 每

年有八百万人形成活动性的TB，且有三百万人死亡。人免疫缺陷病毒（HIV）的共感染占到病例的3至5%（Dolin PJ、Raviglione MK、Kochi A, Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000, Bull WHO 72: 213, 2001）。

由于疾病的大范围传播，需要新的和更好的诊断方法、疫苗制品和治疗剂（Collins FM, Tuberculosis: The Return of an Old Enemy, Critical Reviews in Microbiology 19: 1-16, 1993）。

治疗以长时间较大剂量施用药物组合为基础，而这伴有毒性。因而难以执行受控治疗程序（McCarthy M, Experts see progress in fight against tuberculosis, Lancet 359: 2005, 2002）。在此方面，希望减少治疗次数，这有助于控制程序的实施，而且它们的实行将避免抗性菌株的出现。减少所用药品剂量也将是减小治疗毒性的有用因素。

目前，多药抗性菌株的出现成为日益严重的问题，这要求为大量的受感染个体（五千万）和未来将会出现的日益增多的具有这些特征的患者开发新的替代治疗剂（McCarthy M, News. Experts see progress in fight against tuberculosis, Lancet 359: 2005, 2002; Hopewell PC, Tuberculosis Control: How the world has changed since 1990, Bull. World Health Org. 80: 427, 2002; Freire M、Rosigno G, Joining forces to develop weapons against TB: together we must, Bull. World Health Org. 80: 429, 2002）。

另外，在人类中有多个致病分枝杆菌物种，针对它们没有可供利用的适当治疗方法。

BCG是目前可用于人类应用的唯一结核病疫苗。全世界已经使用了差不多三十亿剂。其功效随所用菌株、营养状态、遗传背景、老化和间发感染的存在而广泛变化。认为它的使用只对婴幼儿中预防严重型疾病（粟疹和脑膜炎）有效，而对预防肺结核无效；所以迫切需要开发新的疫苗制品（Hirsch LS、Johnson JL、Ellner JJ、Wallis RS, Tuberculosis vaccines: how close to human testing, Tuber Lung

Did 78: 159-169, 1997; Ginsberg AM, What's new in tuberculosis vaccines? Bull. World Health Org. 80: 483, 2002)。

开发针对结核病的疫苗的最重要策略包括使用灭活菌株、遗传上减毒或未减毒的菌株、核酸疫苗、亚单位疫苗和表达结核分枝杆菌抗原的减毒活株。

由于灭活疫苗是由死的微生物构成的，因此它们的缺点在于因不可能在体内持久存在和像分泌型的那样生成有保护作用的相关蛋白质而保护能力较低。

减毒株的缺点在于有可能在施用后恢复毒力，因而在人体安全性方面有所担心。

核酸疫苗，尽管迄今为止是有希望的策略，然而尚未在人体中达到足够的免疫原性水平。

认为亚单位疫苗不具有与活微生物相同的免疫原性潜力，因为它们是来自微生物的纯化成分，或是通过重组方法获得的，因而难以实现保护性应答，主要是T细胞型、T辅助细胞1型（TH1）细胞应答。

减毒活株中在疫苗方面关注的抗原表达策略是开发针对结核病的新一代疫苗领域最有希望的策略之一。此策略的一个重要因素是表达载体的选择，根据所选菌株，从调控的观点看它可具有与使用减毒活株所面临的相似的复杂性。

考虑到链霉菌和结核分枝杆菌属于同一纲且共享多种基因和抗原，并且已经证明链霉菌对人无害，这些细菌广泛用于生产人用药品，和大量开发用于在此系统中表达异源蛋白质（包括结核分枝杆菌的蛋白质）的方法，本发明设计了通过不同途径施用（包括粘膜）使用能够表达或不表达结核分枝杆菌抗原的链霉菌活株作为活性成分的针对结核病的疫苗的开发。

本发明的疫苗制品包含多种衍生自微生物链霉菌的活性成分。其中有：

链霉菌（野生菌株）

表达结核分枝杆菌抗原 Apa 的重组链霉菌

本发明中所使用的野生菌株是广泛用于生产人用药物的非致病性工业菌株。

在通过不同途径施用菌株后，令人惊讶的观察到它们有显著的体液和细胞免疫原性。得到的应答是针对免疫中所使用的菌株（链霉菌）的抗原，针对所表达的结核分枝杆菌的抗原（Apa），以及针对结核分枝杆菌和BCG的其它抗原（实施例1），这证实了链霉菌与分枝杆菌之间存在的抗原共同性和它们广泛的交叉反应性。这一事实保证了这些菌株作为针对结核分枝杆菌的疫苗的用途。

保证它们的用途的另一事实是它们没有能力在宿主中定居和引起组织病理学损伤，这再次证实了它们的无害性（实施例2）。

这些菌株具有预防用途，可用于预防结核病。在所用所有施用途径中都证明诱导了针对结核分枝杆菌和BCG的保护状态（实施例3）。

本发明的组合物在小鼠感染模型中引起BCG和结核分枝杆菌肺部感染水平的显著降低（实施例3）。

本发明试图以新方式预防由分枝杆菌引起的疾病，特别是针对结核病，其中使用基于链霉菌菌株的疫苗。链霉菌菌株的使用是特别新颖的，现有技术中根本不知道。这些菌株通过粘膜和肠胃外两种途径施用均有效这一事实也是新颖的。

链霉菌菌株可用作现有技术未曾报道的疫苗方面关注的抗原表达的活载体这一事实意义重大。这拓宽了将这些菌株用于表达非分枝杆菌抗原从而得以用于预防和治疗变应性、肿瘤性和自身免疫性疾病及用于预防怀孕的可能性。

#### 附图简述

图1: Western印迹。将含浅青紫链霉菌（1）和BCG（2）提取物的硝酸纤维素条针对用浅青紫链霉菌免疫的动物血清合并物（第2组）进行了研究。

图2: Western印迹。将含BCG（1）和浅青紫链霉菌（2）提取物的硝酸纤维素条针对用BCG免疫的动物血清合并物（第3组）进行了研究。

图3: Western印迹。将含BCG（1）和浅青紫链霉菌（2）提取物的

硝酸纤维素条针对用盐水溶液免疫的动物血清合并物(第1组)进行了研究。

图4: BCG攻击实验。数值代表CFU/mg肺组织的平均对数。用链霉菌(浅青紫链霉菌)免疫的组与用盐水溶液(CN)免疫的对照组之间存在统计学差异( $p < 0.05$ )。

下文将通过具体实施例描述本发明:

#### 实施例 1: 免疫原性研究

##### 动物

实验中使用了由CENPALAB (Cuba) 供应的雄性8-10周龄Balb/c小鼠。

##### BCG

冻干的、减毒活BCG。InterVax Biological Limited, Canada。

浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*)

实验中使用了未转化的和经过遗传转化而表达结核分枝杆菌ApA蛋白质的菌株1326。

##### 免疫方案

将40只Balb/c小鼠分成4组, 每组10只动物(表1)。

第2组的动物以3周为间隔IP接受3剂 $10^5$  CFU浅青紫链霉菌。第3组的动物接受表达结核分枝杆菌ApA蛋白质的浅青紫链霉菌。

第4组的动物以相同方案进行免疫, 但每次免疫使用 $10^5$  BCG。

第1组接受SS, 并用作对照。

最后一次免疫后21天, 由每只动物采集血样。

表 1: 免疫原性研究

| 组        | 途径 | 接种物               | N  |
|----------|----|-------------------|----|
| 1 (阴性对照) | IP | SSF 200 $\mu$ l   | 10 |
| 2        |    | 链霉菌 $10^5$ CFU    | 10 |
| 3        |    | 链霉菌ApA $10^5$ CFU | 10 |
| 4        |    | BCG $10^5$ CFU    | 10 |

Western印迹

将浅青紫链霉菌和BCG的蛋白质提取物及结核分枝杆菌的重组Apa蛋白质通过SDS-PAGE (Laemmli A, UK. Nature, 227(6): 680-685, 1970) 分开, 并使用半干系统 (NovaBlot II, Pharmacia, Sweden) 转印至0.45mcm硝酸纤维素膜上。

将膜用2% BSA在PBS中于37℃封闭2小时, 清洗, 并与在PBS中1:150稀释的第2、3和4组动物的血清样品一起于37℃保温1小时。

清洗后, 将膜与1:1500稀释的多价抗小鼠过氧化物酶缀合物 (Sigma) 一起于37℃保温1小时, 并以二氨基联苯胺和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为底物显色。

由免疫原性研究获得的结果证明了在用该微生物免疫的动物中诱导了针对浅青紫链霉菌抗原的特异抗体应答 (图1)。

另外, 经免疫动物识别BCG的蛋白质, 证明了所引发的免疫应答与分枝杆菌的交叉反应性 (图1)。这一结果是高度相关的, 证明了链霉菌针对分枝杆菌的免疫潜力。还证明了针对BCG所引发的应答对链霉菌的交叉反应性 (图2)。用盐水溶液免疫的动物血清对链霉菌或BCG的抗原没有反应性 (图3)。

用表达结核分枝杆菌Apa蛋白质的链霉菌免疫的动物组显示与用未转化链霉菌免疫的动物相似的应答 (数据未显示)。在这组动物中, 通过Western印迹证实了针对Apa蛋白质的特异免疫应答 (数据未显示)。这一结果证明了将要使用的链霉菌作为活载体用于表达异源抗原 (特别是结核分枝杆菌抗原) 的能力。

## 实施例 2: 生物分布研究

### 动物

实验中使用了由CENPALAB (Cuba) 供应的雄性8-10周龄Balb/c小鼠。

### BCG

冻干的减毒活BCG。InterVax Biological Limited, Canada.

### 浅青紫链霉菌

实验中使用了未转化的和经过遗传转化而表达结核分枝杆菌Apa蛋白质的菌株1326。

此研究设计使用48只小鼠，分成8组，每组6只（表2）。

第2、3和4组的动物通过腹膜内途径（IP）分别以 $10^5$ 、 $10^3$ 和 $10^2$ 的剂量在200  $\mu$ l蒸馏水中接受浅青紫链霉菌。

第6、7和8组的动物通过鼻内途径（IN）以 $10^3$ 、 $10^2$ 和 $10^1$ 的剂量在50  $\mu$ l蒸馏水中接受浅青紫链霉菌。

第1组的动物IP接受200  $\mu$ l盐水溶液（0.9% NaCl）（SS），而第5组的动物IN接受50  $\mu$ l盐水溶液。

30天后处死动物，并以微生物学方式（3只动物）和组织病理学方式（3只动物）研究心、肺、肝、脾和肾。

组织病理学研究用苏木精和曙红染色的组织样品进行。

微生物学研究用YEME培养基进行（Tobias Kieser、Mervyn J. Viv、Mark J. Buttner、Perth F. Charter、David A. Hopwood, 《Practical *Streptomyces* Genetics》, Crowes, Norwich, England, 2000）。

表 2: 浅青紫链霉菌在 Balb/c 小鼠中的生物分布

| 组        | 途径 | 剂量              | 器官                    |
|----------|----|-----------------|-----------------------|
| 1 (阴性对照) | IP | SSF 200 $\mu$ l | 心<br>肺<br>肝<br>脾<br>肾 |
| 2        |    | $10^5$ CFU      |                       |
| 3        |    | $10^3$ CFU      |                       |
| 4        |    | $10^2$ CFU      |                       |
| 5 (阴性对照) | IN | SSF 50 $\mu$ l  |                       |
| 6        |    | $10^3$ CFU      |                       |
| 7        |    | $10^2$ CFU      |                       |
| 8        |    | $10^1$ CFU      |                       |

在生物分布研究中，该微生物在所研究器官中的存在不明显。

组织病理学研究没有证明所研究器官中的损伤。在表达结核分枝杆菌Apa蛋白质的链霉菌的研究中得到了相似的结果（数据未显示）。

考虑到这些结果，我们能够得出结论，即链霉菌是安全的，这证明了它们用作活疫苗的可行性，而没有不良作用。

重要的是要强调这一事实，即所测试菌株尽管安全，它们仍引发

强免疫应答（图1）。

### 实施例 3: 攻击实验

#### 动物

实验中使用了由CENPALAB (Cuba) 供应的雄性8-10周龄Balb/c小鼠。

#### BCG

冻干的减毒活BCG。InterVax Biological Limited, Canada.

#### 浅青紫链霉菌

实验中使用了未转化的和经过遗传转化而表达结核分枝杆菌ApA蛋白质的菌株1326。

其中所研究的26只动物分成3组（表3）。

动物以2周为间隔IP免疫3次。第1组用SS，第2组用 $10^5$  CFU浅青紫链霉菌，而第3组用 $10^5$  CFU BCG。

最后一次免疫后3周，通过IN途径用 $0.5 \times 10^6$  CFU BCG攻击动物。24小时后，处死动物并获取肺用于微生物学研究。

#### 微生物学研究

将肺浸解物铺到Ogawa培养基中 (Manual de la OXID, Cuarta Edicion, 1981 Editado por OXID Limited, England)，并于37°C保温28天。保温期后，对CFU计数并测定CFU数目/mg肺组织。

#### 统计学处理

用Kruskal-Wallis检验进行各组间统计学比较，并使用自由分布多重比较检验作为补充检验。

表 3: 攻击研究

| 组        | 接种物<br>第0、21、42天  | 攻击<br>第63天                | N  |
|----------|-------------------|---------------------------|----|
| 1 (阴性对照) | SSF 200 $\mu$ l   | BCG $0.5 \times 10^6$ CFU | 8  |
| 2        | 浅青紫链霉菌 $10^5$ CFU |                           | 10 |
| 3        | BCG $10^5$ CFU    |                           | 8  |

在用链霉菌免疫的组中，肺中的BCG CFU较之用BCG免疫的动物和对照组有统计学降低（图4）。在用表达结核分枝杆菌Apa蛋白质的链霉菌免疫的组中得到相似的结果（数据未显示）。

用经转化或未转化链霉菌免疫的动物组在用结核分枝杆菌攻击时受到保护（数据未显示）。

上述结果证明了链霉菌对抗分枝杆菌的保护能力，支持了它们作为用于预防分枝杆菌感染的疫苗的用途。

#### 所建议解决方案的优点

使用这类菌株作为针对分枝杆菌感染（尤其是针对结核病）的疫苗的优点是使用了非致病性菌株，从而得以在人体中使用活菌株，这保证了足够的免疫原性和激发免疫应答以提供保护。

另一项优点在于这些菌株在工业用途中用于生产人用药物的广泛经验，这保证了这些疫苗的工业生产。

有关链霉菌遗传性的广泛知识及有转化和高水平表达异源抗原的遗传方法可供利用是它们用作重组减毒活载体的额外优点。

粘膜施用路径确保了分枝杆菌侵入部位的简易且万用应用，有助于阻断感染，并因此起到预防效果。

已证明的针对BCG和结核分枝杆菌的广泛交叉保护能力是它们用作针对几种分枝杆菌感染的疫苗的重要优点。

经过遗传转化、表达有疫苗价值的非分枝杆菌抗原的链霉菌菌株可用于预防或治疗非分枝杆菌传染性、自身免疫性、变应性和肿瘤性疾病及用于预防怀孕。

图 1

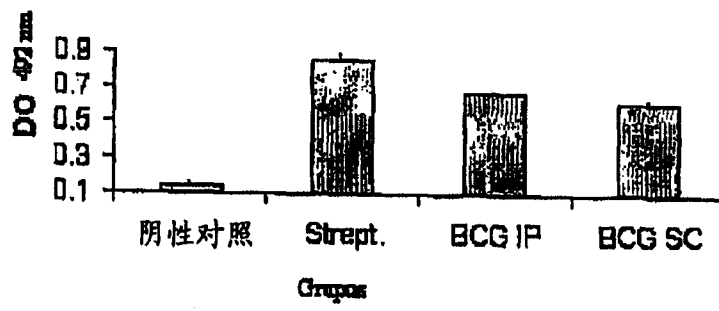


图 2

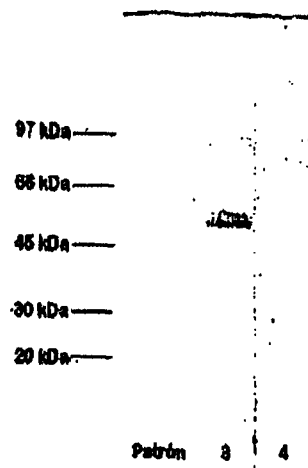


图 3

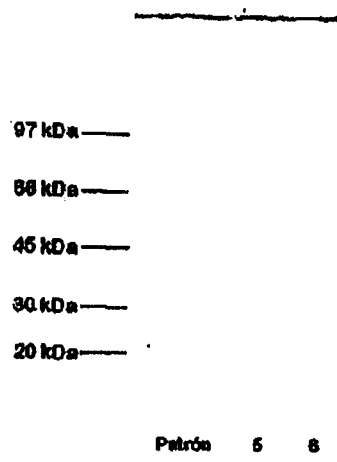


图 4

