



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101874114 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 27

(21) 申请号 200880116402. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 09. 11

C12N 15/74 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 1/20 (2006. 01)

11/854, 027 2007. 09. 12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/075972 2008. 09. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02009/036137 EN 2009. 03. 19

(71) 申请人 AERAS 全球 TB 疫苗基金会

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 杰拉尔德·C·萨多夫

穆罕默德·法可鲁丁-贾米鲁丁

拉维·P·阿南达

小约翰·F·富尔克松

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 涂勇

权利要求书 3 页 说明书 25 页 序列表 2 页

附图 8 页

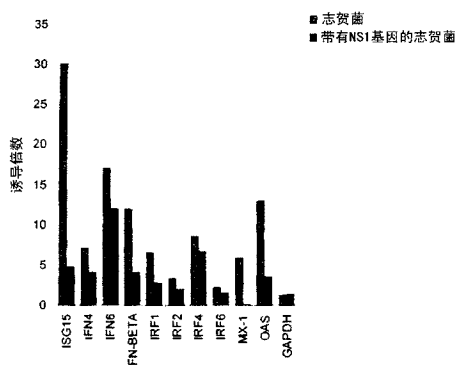
(54) 发明名称

通过共表达真核 I 型干扰素反应抑制剂从而提高来自基于细菌传递系统的转基因表达的方法

(57) 摘要

提供了具有改进的转基因表达的细菌传递系统。该重组细菌传递系统将所关注的转基因和真核 I 型干扰素反应的抑制剂传递至真核细胞。真核 I 型干扰素反应的抑制允许改进表达被编码的转基因。

NS1降低了被衣壳志贺菌 (Shigella capsid) 菌株诱导的 I 型 IFN 相关基因的表达



1. 一种基因工程细菌,其包含:

编码下述的核酸序列:

一个以上过客基因;以及

一种以上抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子,

其中,编码所述一个以上过客基因的所述核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子,编码所述一种以上抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的所述核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子或原核生物启动子。

2. 如权利要求 1 所述的基因工程细菌,其特征在于,编码所述一种以上抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的所述核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子。

3. 如权利要求 1 所述的基因工程细菌,其特征在于,编码所述一种以上抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的所述核酸序列被可操作地连接于原核生物启动子。

4. 如权利要求 1 所述的基因工程细菌,其特征在于,编码所述一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的所述核酸序列存在于所述基因工程细菌的染色体上。

5. 如权利要求 1 所述的基因工程细菌,其特征在于,下述中的一个或两者:

i) 编码所述一个以上过客基因的核酸序列、以及

ii) 编码所述一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列存在于质粒上。

6. 如权利要求 1 所述的基因工程细菌,其特征在于,所述一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子来源于病毒。

7. 如权利要求 1 所述的基因工程细菌,其特征在于,所述一个以上过客基因编码结核病抗原。

8. 如权利要求 1 所述的基因工程细菌,其特征在于,所述基因工程细菌是志贺菌。

9. 如权利要求 1 所述的基因工程细菌,其特征在于,所述基因工程细菌是分枝杆菌。

10. 如权利要求 1 所述的基因工程细菌,其特征在于,所述一个以上过客基因是异源转基因。

11. 一种提高所关注的一种以上基因产物在细胞或组织中的产量的方法,包括下述步骤:

将包含编码 i) 所述被关注的一种以上基因产物和 ii) 一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列的基因工程细菌施用于所述细胞或组织,

其中,编码所述一个以上过客基因的所述核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子,编码所述一种以上抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的所述核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子或原核生物启动子,

其中所述施用步骤在允许所述基因工程细菌侵入所述细胞或组织的条件下进行;以及允许所述细胞或组织生产所述所关注的一种以上基因产物。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,编码所述一种以上抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的所述核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子。

13. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,编码所述一种以上抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的所述核酸序列被可操作地连接于原核生物启动子。

14. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,编码所述一种以上抑制哺乳动物干扰素

反应的因子的所述核酸序列存在于所述基因工程细菌的染色体上。

15. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,下述中的一个或两者:

i) 编码所述所关注的一种以上基因产物的所述核酸序列、以及

ii) 编码所述一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的所述核酸序列存在于质粒上。

16. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子来源于病毒。

17. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述所关注的一种以上基因产物是结核分枝杆菌抗原。

18. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述基因工程细菌是细菌选自志贺菌、李斯特菌属、沙门菌、以及卡介苗 (BCG) 所构成的组。

19. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述一个以上过客基因是异源转基因。

20. 一种用于在哺乳动物体内诱导对所关注的抗原的免疫反应的方法,包括下述步骤:

将基因工程细菌施用于所述哺乳动物,所述基因工程细菌包含:

编码所述所关注的抗原的核酸序列;以及

编码一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列;

其中,编码所述一个以上过客基因的所述核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子,编码所述一种以上可抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的所述核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子或原核生物启动子;并且

允许所述哺乳动物中的细胞或组织生产所述所关注的抗原,借此引起抗所述所关注抗原的免疫反应。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述所关注的抗原是结核分枝杆菌抗原。

22. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,编码所述一种以上抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的所述核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子。

23. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,编码所述一种以上抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的所述核酸序列被可操作地连接于原核生物启动子。

24. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,编码所述一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的所述核酸序列存在于所述基因工程细菌的染色体上。

25. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,下述中的一个或两者:

i) 编码所述所关注的抗原的所述核酸序列、以及

ii) 编码所述一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的所述核酸序列存在于质粒上。

26. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子来源于病毒。

27. 一种重组细菌载体,其包含:

用下述进行基因转化的细菌:

一个以上用于编码寄主细胞或组织 I 型干扰素 (IFN) 反应抑制因子的基因工程化的核酸序列、以及

一个以上用于编码一个以上寄主细胞或组织活性氨基酸序列的基因工程化的核酸，

其中，一旦所述细菌侵入所述寄主细胞或组织，所述一个以上用于编码所述一个以上寄主细胞或组织活性氨基酸序列的基因工程化的核酸就被过量表达。

28. 如权利要求 27 所述的重组细菌载体，其特征在于，所述寄主细胞或组织 1 型 IFN 反应抑制因子是轮状病毒 NSP1 或流感病毒 NS1。

29. 如权利要求 27 所述的重组细菌载体，其特征在于，所述一个以上寄主细胞或组织活性的氨基酸序列选自结核病抗原和疟疾抗原。

30. 如权利要求 27 所述的重组细菌载体，其特征在于，所述一个以上寄主细胞或组织活性的氨基酸序列包括一个以上免疫刺激性氨基酸序列，所述免疫刺激性氨基酸序列来源于下述中的一个或多个：轮状病毒、流感病毒、鼠痘病毒、肝炎病毒、牛痘病毒、腺病毒、副粘病毒、HPV、HIV、HTLV、肠道病毒、疱疹病毒、EEE、VEE、西尼罗河病毒、诺沃克病毒、细小病毒、登革热病毒、以及出血热病毒。

31. 如权利要求 27 所述的重组细菌载体，其特征在于，所述一个以上寄主细胞或组织活性的氨基酸序列选自激素、酶、抗癌剂、以及凋亡因子。

32. 如权利要求 27 所述的重组细菌载体，其特征在于，所述寄主细胞或组织 1 型 IFN 反应抑制因子选自下组：轮状病毒 NSP1、流感病毒 NS1、鼠痘病毒 C12R 蛋白、丙型肝炎病毒 NS3/4A 蛋白酶、牛痘病毒 vIFN- α / β R_c 蛋白、腺病毒 E1A 蛋白、副粘病毒 C 蛋白、以及人乳头瘤病毒 (HPV) E6 癌蛋白。

通过共表达真核 I 型干扰素反应抑制剂从而提高来自基于 细菌传递系统的转基因表达的方法

技术领域

[0001] 本发明一般涉及细菌的传递系统,该系统通过抑制先天的 I 型干扰素反应可促进提高在真核细胞中的转基因表达。特别地,本发明提供了重组细菌传递系统,该系统向真核细胞传递 i) 转基因和 ii) 真核 I 型干扰素反应的抑制剂。

背景技术

[0002] 人们已经开发了数种病原菌的活的减毒的突变体作为潜在的用于通过粘膜途径传递异源抗原的疫苗载体。这些活的载体的优点在于:可以以单一的口服、鼻腔内或吸入剂量的方式将大分子靶向释放至哺乳动物细胞和组织,从而同时刺激系统免疫反应和粘膜免疫反应。极具潜力的细菌调节的编码疫苗抗原和/或治疗性分子的质粒 DNA 转移已经在传染性疾病、肿瘤和基因缺乏的实验动物模型中被显明。

[0003] 不幸的是,用于在哺乳动物中表达外源蛋白或抑制性 RNAs 的以细菌为载体的过客 RNA/DNA 及其他分子的释放会导致 I 型干扰素 (IFN) 反应。寄主对于侵入性病原体的监测系统的中心成分是识别受体的病原体 (PRR) 的进化保守家族,该受体可结合模式微生物/病毒配体,所述配体的范围包括从细胞壁成分至核酸。PRR 信号会导致激活转录因子比如核因子 B (NF- κ B) 和干扰素调节因子 3 (IRF-3),提供炎症情况 (inflammatory context) 用于快速的激活寄主防线 (host defense)。NF- κ B 路径控制着促炎 (proinflammatory) 细胞因子比如 IL-1 和肿瘤坏死因子- α 的表达,而 IRF-3 路径会导致 I 型干扰素 (IFN- α 和 IFN- β) 的产生。这种最初产生的“第一波”IFN 触发表达相关因子 IRF-7,其通常以非常低的浓度存在于大多数细胞中 (Sato M. 等, *Immunity*, 13(4) 539-548, 2000)。IRF-3 很可能与 IRF-7 相配合,并且决定着阳性反馈回路 (positive feed back loop),该阳性反馈回路启动数种作为“第二波”IFNs 的 IFN- α 亚型的合成 (Marie et al., *EMBO J* 17(22), 6660-6669; 1998 and Sato M et al., *FEBS Lett* 441(1) 106-110; 1998)。I 型 IFNs 通过发出分泌和旁泌性信号 (ISGs) 而激活数百个被 IFN 刺激的基因 (de Veer et al., *J Leukocyte Biol* 69(6) 912-920, 2001; Der et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(26) 15623-15628; 1998), 其中一些基因编码抗病毒蛋白。迄今为止,已经稳固地建立起三个受 IFN 刺激的路径。这些路径包括蛋白激酶 R (PKR) (Williams, *Oncogene* 18(45) 6112-6120; 1999)、2' -5' 寡腺苷酸合成酶 (2' -5' OAS) (Silverman., *J Interferon Res* 14(3) 101-104; 1994) 和 Mx 蛋白 (Haller and Kochs, *Traffic* 3(10) 710-714; 2002)。这种 I 型 IFN 反应利用 PKR 和 2' -5' OAS 限制了外源基因或抑制性 RNAs 的表达。激活的 PKR 通过真核生物的启动因子 eIF2 的 α -亚基的磷酸化阻断翻译。另一方面,2-5A 合成酶产生短的、可激活 RNA 酶 L 的与 2' -5' OAS 相关的寡腺苷酸, RNA 酶 L 是单链特异性的可消化 mRNA 和核蛋白体 RNA 的核糖核酸内切酶。在用特定的 RNA 病毒感染后存活的寄主中 Mx 蛋白的重要性已经被充分地显明 (Hefti et al., *J Virology* 73(8) 6984-6991; 1999),但是精确的作用方式仍然是未知的。这种 I 型 IFN 反应因此通过减少 RNA 产量和稳定性的机制限制了外来核酸的表

达,并且还抑制了细菌载体传递的来自过客核酸的信息的翻译。

[0004] 细菌载体的多种成分在寄主细胞中引起 IFN 反应。细菌本身能够通过 Toll 样受体而引发 IFN 反应。在转录期间由过客核酸产生的双链 RNA 不仅诱导 I 型 IFNs,而且直接激活 PKR 和 2' -5' OAS。质粒 DNA 一旦传递进入哺乳动物细胞的细胞质就往往含有隐藏的可产生反义 RNA 的启动子,该反义 RNA 与 mRNA 退火而形成 dsRNA。细菌载体的所有这些成分因此减弱了细菌载体作为生物医学工具的效果。

[0005] 美国专利 6,525,029 (Falck-Perersen 等,2003 年 2 月 25 日)描述了抑制对重组载体比如腺病毒载体的免疫反应的方法。然而,这些技术的目的在于抑制对于被载体编码的基因长期表达的体液(例如抗体)反应、以及载体被免疫系统清除,而没有阐明抑制对于细菌载体或其过客核酸的 I 型 IFN 反应。

[0006] 现有技术领域因此远不能提供可除去或削弱寄主细胞的 I 型 IFN 反应的细菌载体。

发明内容

[0007] 本发明提供了可成功地除去或削弱 I 型 IFN 反应的重组细菌表达载体,该 I 型 IFN 反应通常被哺乳动物寄主细胞在响应细菌表达载体侵入时发动。该重组细菌表达载体通过编码抑制或压制在寄主细胞中的 I 型 IFN 反应的因子而阻遏普通的 IFN 反应。该 IFN 抑制剂或者 i) 在用于传递的细菌细胞中作为蛋白质被表达;或者 ii) 在真核细胞中由被细菌细胞传递的核苷酸序列表达。IFN 反应的抑制允许被细菌载体传递的过客基因更稳固的表达,并且表达仅在 I 型 IFN 反应已被抑制的真核细胞中增强。例如,当本发明的重组细菌表达载体将编码抗原的过客核苷酸序列传递至期望有免疫反应的哺乳动物细胞时,由哺乳动物细胞产生的那些抗原很少或不受寄主 IFN 系统抑制(或者抑制程度被降低),抗原被表达,并且可以产生期望的对抗原的免疫反应。作为另一种选择,当过客核酸序列用于编码期望的蛋白质产物比如酶、激素、或治疗性或食疗性(nutraceutical)因子时,由哺乳动物细胞生产这些蛋白质产物可很少或不受寄主 IFN 系统抑制。

[0008] 本发明的目的在于提供一种基因工程细菌,其包含编码 i) 一个以上过客基因的核酸序列;以及 ii) 编码一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列。编码一个以上过客基因的核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子上,并且编码一个以上可抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子或原核生物启动子上。在又一个实施方式中,可表达的编码一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列存在于基因工程细菌的染色体上。在另一个实施方式中,i) 编码所述一个以上过客基因的核酸序列(其中,核酸序列可在真核细胞中表达)与 ii) 编码所述一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列中的一个或两者存在于质粒上。另外,一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子可以起源于病毒。在一些实施方式中,一个以上过客基因编码结核病或疟疾抗原。在另一个实施方式中,基因工程细菌是志贺菌(痢疾杆菌)或分枝杆菌。另外过客基因可以是异源的转基因。

[0009] 本发明进一步提供了一种提高所关注的一种以上基因产物在细胞或组织中的产量的方法。该方法包括下述步骤:将包含编码 i) 所关注的一种以上基因产物和 ii) 一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列的基因工程细菌施用于细胞或组织。编码

一个以上过客基因的核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子上,并且编码一个以上可抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子或原核生物启动子上。施用步骤在如下条件下进行:其允许基因工程细菌侵入细胞或组织、并且允许基因工程细菌在细胞或者组织内部产生所关注的一种以上基因产物和一种以上因子。在一种实施方式中,可表达的核酸序列的转录受真核生物启动子控制。在另一个实施方式中,可表达的编码一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列的转录受原核生物启动子控制。在又一个实施方式中,可表达的编码一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列存在于基因工程细菌的染色体上。在另一个实施方式中,i) 可表达的编码所关注的一种以上基因产物的核酸序列与 ii) 可表达的编码一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列中的一个或两者存在于质粒上。另外,一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子可以起源于病毒。在一些实施方式中,所关注的一种以上基因产物可以是结核抗原。在另一个实施方式中,基因工程细菌是志贺菌或分枝杆菌。

[0010] 本发明进一步提供了一种用于在哺乳动物体内诱导对所关注的抗原的免疫反应的方法。该方法包括下述步骤:将包含编码所关注的抗原的核酸序列以及编码一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列的基因工程细菌施用于哺乳动物。该编码一个以上过客基因的核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子上,并且编码一个以上可抑制哺乳动物 I 型干扰素反应的因子的核酸序列被可操作地连接于真核生物启动子或原核生物启动子上。在本发明的一种实施方式中,所关注的抗原是结核分枝杆菌抗原。在一些实施方式中,可表达的核酸序列的转录受真核生物启动子控制。在其他实施方式中,可表达的编码一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列的转录受原核生物启动子控制。在另一些实施方式中,可表达的编码一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列存在于基因工程细菌的染色体上。在一些实施方式中,i) 可表达的编码所关注的抗原的核酸序列与 ii) 可表达的编码一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子的核酸序列中的一个或者两者存在于质粒上。在另一些实施方式中,一种以上抑制哺乳动物干扰素反应的因子起源于病毒。

附图说明

[0011] 图 1. 在用携带有编码 β -半乳糖苷酶真核表达的质粒的弗氏志贺菌 NCD1(*Shigella flexneri* NCD1) 侵染 HeLa 或 BHK-21 细胞 (IFN 缺陷型) 之后细胞裂解液的 β -半乳糖苷酶活性。黑色柱子指示来自于用含有编码 lacZ 基因的质粒的菌株侵染后细胞的 β -半乳糖苷酶活性;白色柱子指示来自于用不含 lacZ 质粒的菌株侵染后细胞的 β -半乳糖苷酶活性。

[0012] 图 2. 在用含有编码 β -半乳糖苷酶的质粒的弗氏志贺菌 NCD1 侵染后、以及在用编码腺病毒衍生的 PKR 抑制剂 (与腺病毒有关的 I, VAI) 的弗氏志贺菌 NCD1 共侵染后 HeLa 细胞裂解液的 β -半乳糖苷酶活性。

[0013] 图 3. 免疫印迹显示了绿色荧光蛋白 (GFP) 在用弗氏志贺菌菌株 MPC511 侵染后 HeLa 细胞中的转基因表达,菌株 MPC511 仅携带有真核 GFP 报告基因 (泳道 4)、或者携带有 GFP 加 NS1 (泳道 5) 或 NSP1 (泳道 2)。泳道 1:阳性对照;泳道 3:未侵染的 HeLa 细胞。

[0014] 图 4. 在 HeLa 细胞中 NS1 蛋白质 IFN- α/β 路径的影响。NS1 抑制 (黑色柱子)

了被志贺菌（灰色柱子）诱导的 IFN 相关基因的表达。

[0015] 图 5. VAI RNA 基因 IFN- α/β 路径在 HeLa 细胞中的影响。VAI RNA 基因抑制（黑色柱子）了被志贺菌（白色柱子）诱导的 IFN 相关基因的表达。

[0016] 图 6. 编码 IFN 拮抗剂的报告载体的示意图。IFN 拮抗剂基因在 GFP 报告载体主链中的克隆。用于受 RNA 聚合酶 III 启动子控制的 VAI RNA 基因的转录、并用于寄主细胞经由启动子 Pef 表达 GFP 基因的单一质粒系统。

[0017] 图 7. 用携带有编码 GFP 的质粒 (pGFP) 或编码 GFP 和 VAI IFN 抑制剂的质粒 (pAdgfp) 的弗氏志贺菌侵染 HeLa 细胞。使用兔抗 GFP 抗血清通过免疫印迹分析确定 GFP 的表达。观察到在被同时含有 GFP 和 VAI RNA 基因 (pAdgfp) 的志贺菌侵染的 HeLa 细胞中增强的 GFP 蛋白表达。显示了两个独立实验的结果。

[0018] 图 8. 用携带有编码分枝结核杆菌 (Mtb) 抗原 85A 的 RNA、并且携带有和未携带编码 IFN 抑制剂 NS1 的质粒的志贺菌侵染的 BHK21 细胞的裂解液的蛋白质印迹 (Westernblot)。泳道 1, 51 MS85A 28 ; 泳道 2, 51 MS85A 37 ; 泳道 3, 51 MS85A pNS1 28 ; 泳道 4, 51 MS85A pNS1 37 ; 泳道 5, 51 MS85A pNS1 37 ; 泳道 6, 弗氏志贺菌 NCD pcDNA-85A ; 泳道 7, MPC51 pLM2653 ; 泳道 8, BHK21 细胞 ; 泳道 9, 用 pcDNA-85A 转染的 BHK21 细胞。

[0019] 图 9A-C 为抗病毒免疫反应抑制剂的序列。A, 来自于流感病毒的 NS1 的 DNA 序列 (SEQ ID NO :1) ; B, 来自于轮状病毒的 NSP1 的 DNA 序列 (SEQ ID NO :2) ; C, 来自于腺病毒的 VAI 的 RNA 基因序列 (SEQ ID NO :3)。

具体实施方式

[0020] 本发明的重组细菌表达载体经基因工程化而编码因子, 所述因子可除去、削弱或抑制通常被哺乳动物寄主细胞在响应细菌侵染时发动的 I 型干扰素反应。这些因子可以被细菌载体细胞表达, 或者可以被编码在被真核寄主细胞翻译的核酸中。减弱或消除在真核寄主细胞中的 IFN 反应允许有效地由被载体导入的核酸转录和翻译所关注的蛋白质和多肽。这些被携带的分子可以编码对于细菌繁殖和存活所必需的肽和蛋白质、以及包含在细菌内部的所关注的“过客”分子。所关注的过客核酸的例子包括但不限于, 例如, 细菌已经被基因工程化而可对其编码的抗原。因为真核寄主细胞的 I 型 IFN 反应被削弱, 所以抗原仍被持续地表达, 并且表达水平足以引起寄主细胞发动对抗原的免疫反应。本发明的细菌表达载体因此理想的是用于疫苗制备。

[0021] 本发明的细菌表达载体经基因工程化从而编码可除去、削弱、抑制或压制 I 型 IFN 反应的因子。本领域的技术人员将认识到, 许多病毒可以编码 IFN 反应的靶特异性的调节剂的因子。这些因子能够被认为是 IFN 反应拮抗剂。在最具特征性的病毒靶靶中有蛋白激酶 R (PKR)、可激活 RNA 酶 L 的 (2' -5') 寡腺苷酸合成酶和干扰素调节因子 (IRF) 的蛋白质家族。

[0022] 对于术语“抑制”或“压制”免疫反应, 我们指的是在真核细胞内部引起的典型的或正常的免疫反应被完全地或者部分地抑制、减轻、降低、阻碍等。这样的抑制可以被以本领域技术人员熟知的数种方式中的任一方式检测并测量, 这些方式包括但不限于: 检测标志物质的含量、活性或表征的降低, 所述标志物质为免疫反应特有或者与之相关 (例如, IFN α 、IFN β 等)。抑制水平一般至少是约 25%, 优选约 50%, 更优选约 60%、70%、80%、

90%或100%。典型地通过检测一种以上在已经用本发明的载体（编码一个以上转基因加上一种以上免疫系统抑制剂的载体）转染的寄主细胞中所产生的物质与在对照细胞（用编码一个以上转基因、但不编码免疫系统抑制剂的载体转染的细胞）中产生的相同物质含量相比在含量之间的差异而测量抑制水平。

[0023] 类似地，术语“增强的”或“提高的”的转基因表达，一般指的是在用本发明的载体转染的寄主细胞内部与对照细胞相比时被表达（即转录并翻译）的转基因含量的提高、增加等。这样的增强可以通过本领域技术人员熟知的数种方法中的任何一种方法来测量，例如：检测由载体产生的转基因产物的含量、活性或特征的提高；检测产生的与转基因产物有关的物质（例如 mRNA、物质或转基因产物产生的影响、转基因产物的抗体等）的含量、活性或特征的提高。增强水平一般至少是约 25%，优选约 50%，更优选约 60%、70%、80%、90%或100%，或更高。

[0024] 适合本发明中使用的抑制免疫反应的蛋白质可被多种病毒编码，病毒的例子包括但不限于：轮状病毒非结构性蛋白 1 (NSP1)；甲型流感病毒非结构性蛋白 1 (NS1)；腺病毒相关 RNA I 和 II (VAI 和 VAI1)；牛痘病毒 E3L 或 vIFN- α/β Rc 蛋白；丙型肝炎病毒非结构性蛋白 5A (NS5A) 或 NS3/4A 蛋白酶；猴肾病毒 V 蛋白；仙台病毒 C 蛋白；鼠痘病毒 C12R 蛋白；腺病毒 E1A 蛋白、副粘病毒 C 蛋白、或人乳头瘤病毒 (HPV) E6 癌蛋白。

[0025] 通过发现许多病毒编码拮抗 IFN 诱导的抗病毒反应的基因产物，进一步显示了 IFN 系统作为寄主抗病毒感染防御的基本重要性。这些病毒利用数种不同的策略来阻断 IFN 诱导的蛋白质的诱导和作用。DNA 病毒和 RNA 病毒两者都编码可削弱 IFN 信号路径活性的蛋白质。显然涉及到多种机制。其中之一是模仿。有数个例子，其中病毒编码模仿 IFN 信号转导路径中的细胞组分的产物。这种分子模仿能够导致 IFN 信号处理的拮抗作用。痘病毒，例如，编码可溶性的 IFN 受体同系物 (vIFN-Rc)。这些 vIFN-Rc 同系物被从受痘病毒感染的细胞中分泌出来并且结合 IFNs，从而防止它们通过它们的天然受体起作用以引起抗病毒反应。vIFN- α/β Rc 蛋白被牛痘病毒和数种其他正痘病毒分泌。vIFN- α/β 受体同系物——在西方储备菌株 (Western Reserve strain) 中的 B18R 基因产物和在哥本哈根菌株 (Copenhagen strain) 中的 B19R 产物结合数种不同的 IFN- α 亚种以及 IFN- β ，并且和阻断 IFN- α/β 信号活动。三种额外的影响 IFN 信号的 DNA 病毒是腺病毒、乳头瘤病毒、以及人类疱疹病毒 8 (HHV-8)。腺病毒 E1A 蛋白可阻断在 ISGF-3 活化的上游点处 IFN 介导的信号传导。ISGF-3 的 DNA 结合活性被 E1A 抑制。SeV 的 C 蛋白 (SeV)，即在寄主细胞质中复制的副粘病毒通过干涉 IFN 诱导的细胞基因的转录活化而阻遏了 IFN 诱导的抗病毒反应。就仙台病毒而言，C 蛋白以至少两种方式干涉 IFN 作用。C 蛋白抑制了 STAT-1 的合成，并且它们还诱导 STAT-1 提高的转化。人乳头瘤病毒 (HPV) E6 癌蛋白选择性地结合于 IRF-3，但是仅非常弱地结合于其他的细胞 IRFs 包括 IRF-2 和 IRF-9。E6 与 IRF-3 的结合抑制反式激活 (transactivation)，从而为 HPV 提供阻遏 IFN 反应的机制。腺病毒 E1A 蛋白还通过取决于 E1A 结合 p300 的能力的机制来抑制 IRF-3 调节的转录活化。HHV-8，与卡波西肉瘤 (Kaposi's sarcoma) 有关的 γ 疱疹病毒合成具有 IFN- α/β 诱导的转录活化阻遏物功能的 IRF 同系物 (vIRF)。被 HHV-8 编码的 vIRF 蛋白质还抑制 IRF-1 调节的转录活化。两种其他的疱疹病毒，即水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 和巨细胞病毒 (CMV)，还破坏了 IFN 信号转导路径的功能。VZV 抑制 STAT-1 和 JAK-2 蛋白的表达，但是对 JAK-1 几乎没有影响。拮

抗作用的不同策略发生在受 CMV 感染的细胞中,其中 MHC II 类表达也被抑制。由于在受 CMV 感染的成纤维细胞中蛋白质降解增强,所以在 JAK-1 水平上有特定的降低。数种非节段 (nonsegmented) 负链 RNA 病毒编码可拮抗 IFN 受体调节的由 I 型 IFN 受体发出的信号传导的基因产物。例如,感染猿猴病毒 5 或腮腺炎病毒会导致受蛋白体调节的 STAT-1 降解的提高,反之,在用副流感病毒类型 2 感染的细胞中则存在 STAT-2 的降解。埃博拉病毒的 VP35 蛋白,一种负链 RNA 病毒,具有 I 型 IFN 拮抗剂的功能,虽然还没有定义精确的拮抗作用的生物化学机制。VP35 抑制 IFN- β 启动子的病毒诱导、和 dsRNA 调节的及病毒调节的受 ISRE 驱动的基因表达的活化。编码三个示例性抑制剂 (来自流感病毒的 NS1、来自轮状病毒的 NSP1、以及来自腺病毒的 VAI) 的核酸序列显示在图 9A-C 中。

[0026] IFN 抑制因子还可以由其他的非病毒来源得到,例如,从寄主细胞 (例如细胞因子信号传导抑制剂 (SOCS)、显性负性的 PKR 和显性负性的 RNA 酶 L) 得到,并且可以在本发明的实施方式中使用。任何可抑制或衰减 IFN 反应、并且被能够经基因工程化进入细菌表达载体并成功地由该细菌表达载体表达的核酸序列所编码的的因子 (例如抗受干扰素刺激的基因的 siRNA) 可以在本发明的实施方式中使用。其例子包括,但不限于,如上所述的那些因子、以及各种自分泌 IFN 诱导的效应因子和对 I 型 IFNs 的抗病毒作用所必需的调节剂蛋白质,比如:RNA 依赖性蛋白激酶 (PKR);2,5' -寡腺苷酸合成酶 (OAS);RNA 酶 L;Mx 蛋白 GTP 酶;IFN 诱导的 RNA 特异性的腺苷脱氨酶 (ADAR1);IFN 调节因子比如 IRF-5 和 IRF-7; (IRF) 家族的转录因子比如 TLR3、TLR4、TLR7 和 TLR9;因子比如 IRAK1/4 和 TRAF6;RLR、MyD88、TAK1、TOLLIP、TIFA 等。

[0027] 对于术语“细菌表达载体”,我们指的是已被经基因工程化而包含并传递和/或表达所关注的核酸序列的细菌细胞。能够用这样的方式被使用的细菌的例子包括,但不限于:弯曲菌属、奈瑟菌属、嗜血杆菌属、气单孢菌属、弗朗西丝菌属、耶尔森菌属、克雷伯杆菌属、博代杆菌属、军团杆菌属、棒状杆菌属、枸橼酸菌属、衣原体属、布鲁菌属、假单胞菌属、螺旋菌属、或弧菌属。

[0028] 使用的特定的弯曲菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的弯曲菌菌株的例子包括但不限于:C. jejuni (ATCC Nos. 43436、43437、43438)、C. hyointestinalis (ATCC No. 35217)、胎儿弯曲菌 (C. fetus) (ATCC No. 19438)、粪弯曲菌 (C. fecalis) (ATCC No. 33709)、C. doylei (ATCC No. 49349) 以及 C. coli (ATCC Nos. 33559、43133)。

[0029] 使用的特定的耶尔森菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的耶尔森菌菌株的例子包括:小肠结肠炎耶尔森菌 (Y. enterocolitica) (ATCC No. 9610) 或鼠疫耶尔森菌 (Y. pestis) (ATCC No. 19428)、小肠结肠炎耶尔森菌 (Y. enterocolitica) Ye03-R2 (al Hendy 等, Infect. Immun., 60:870;1992) 或 小 肠 结 肠 炎 耶 尔 森 菌 (Y. enterocolitica) aroA (0' Gaora 等, Micro. Path., 9:105;1990)。

[0030] 使用的特定的克雷伯杆菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的克雷伯杆菌菌株的例子包括 K. pneumoniae (ATCC No. 13884)。

[0031] 使用的特定的博代杆菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的博代杆菌菌株的例子包括百日咳博代杆菌 (B. pertussis)、以及支气管败血性博代杆菌 (B. bronchiseptica) (ATCC No. 19395)。

[0032] 使用的特定的奈瑟菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的奈瑟菌菌株的例子包括脑膜炎奈瑟菌 (*N. meningitidis*) (ATCC No. 13077) 和淋病奈瑟菌 (*N. gonorrhoeae*) (ATCC No. 19424)、淋病奈瑟菌 (*N. gonorrhoeae*) MS11 aro 突变体 (Chamberlain 等, *Micro. Path.*, 15:51-63;1993)。

[0033] 使用的特定的气单孢菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的气单孢菌菌株的例子包括杀鲑气单孢菌 (*A. salmonicida*) (ATCC No. 33658)、*A. schuberii* (ATCC No. 43700)、嗜水气单孢菌 (*A. hydrophila*)、*A. eucrenophila* (ATCC No. 23309)。

[0034] 使用的特定的弗朗西丝菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的弗朗西丝菌菌株的例子包括土拉热弗朗西丝菌 (*F. tularensis*) (ATCC No. 15482)。

[0035] 使用的特定的棒状杆菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的棒状杆菌菌株的例子包括假结核棒状杆菌 (*C. pseudotuberculosis*) (ATCC No. 19410)。

[0036] 使用的特定的枸橼酸菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的枸橼酸菌菌株的例子包括弗氏枸橼酸菌 (*C. freundii*) (ATCC No. 8090)。

[0037] 使用的特定的衣原体菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的衣原体菌株的例子包括 *C. pneumoniae* (ATCC No. VR1310)。

[0038] 使用的特定的嗜血杆菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的嗜血杆菌菌株的例子包括流感嗜血杆菌 (*H. influenzae*) (Lee 等, *J. Biol. Chem.* 270:27151;1995)、*H. somnus* (ATCC No. 43625)。

[0039] 使用的特定的布鲁菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的布鲁菌菌株的例子包括流产布鲁菌 (*B. abortus*) (ATCC No. 23448)。

[0040] 使用的特定的军团杆菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的军团杆菌菌株的例子包括 *L. pneumophila* (ATCC No. 33156)、或 *L. pneumophila* mip 突变体 (Ott, *FEMS Micro. Rev.*, 14:161;1994)。

[0041] 使用的特定的假单孢菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的假单孢菌菌株的例子包括绿脓假单孢菌 (*P. aeruginosa*) (ATCC No. 23267)。

[0042] 使用的特定的螺旋菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的螺旋菌菌株的例子包括幽门螺旋菌 (*H. pylori*) (ATCC No. 43504)、*H. mustelae* (ATCC No. 43772)。

[0043] 使用的特定的弧菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的弧菌菌株的例子包括霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) (ATCC No. 14035)、*Vibrio cincinnatiensis* (ATCC No. 35912)、霍乱弧菌 (*V. cholerae*) RSI 毒性突变体 (Taylor 等, *J. Infect. Dis.*, 170:1518-1523;1994) 和霍乱弧菌 (*V. cholerae*) ctxA、ace、zot、cep 突变体 (Waldor 等, *J. Infect. Dis.*, 170:278-283;1994)。

[0044] 在一种优选的实施方式中,在本发明中由其开发出载体菌株的菌株包括有潜力具有既作为载体又作为疫苗载体作用的细菌,比如肠杆菌科,包括但不限于:埃希杆菌属、志贺菌属、以及沙门菌属。格兰氏阳性和耐酸的载体菌株能够类似地由产单核细胞李斯特菌或分枝杆菌构建。

[0045] 使用的特定的埃希杆菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使

用的埃希杆菌菌株的例子包括：大肠杆菌菌株 DH5 α 、HB101、HS-4、4608-58、1184-68、53638-C-17、13-80、以及 6-81(参见,例如 Sambrook 等,参见前述;Grant 等,参见前述; Sansonetti 等, Ann. Microbiol. (巴斯德研究所), 132A :351 ;1982)、肠毒性的大肠杆菌(参见,例如 Evans 等, Infect. Immun., 12 :656 ;1975)、致肠病的大肠杆菌(参见,例如 Donnenberg 等, J. Infect. Dis., 169 :831 ;1994)、肠侵入性 (enteroinvasive) 大肠杆菌(参见,例如 Small 等, Infect. Immun., 55 :1674 ;1987) 和肠出血性 (enterohemorrhagic) 大肠杆菌(参见,例如 McKee 和 O' Brien, Infect. Immun., 63 :2070 ;1995)。

[0046] 使用的特定的沙门菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的沙门菌菌株的例子包括伤寒沙门菌 (*S. typhi*) (参见,例如 ATCC No. 7251)、鼠伤寒沙门菌 (*S. typhimurium*) (参见,例如 ATCC No. 13311)、*Salmonella galinarum* (ATCC No. 9184)、肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*) (参见,例如 ATCC No. 4931) 和鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*) (参见,例如 ATCC No. 6994)、伤寒沙门菌 (*S. typhi*) aroc、arod 双重突变型(参见,例如 Hone 等, Vacc., 9 :810-816 ;1991)、鼠伤寒沙门菌 (*S. typhimurium* aroA) 突变体(参见,例如 Mastroeni 等, Micro. Pathol., 13 :477-491 ;1992)。

[0047] 使用的特定的志贺菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的志贺菌菌株的例子包括弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*) (参见,例如 ATCC No. 29903)、弗氏志贺菌 CVD1203(参见,例如 Noriega 等, Infect. Immun., 62 :5168 ;1994)、弗氏志贺菌 15D(参见,例如 Sizemore 等, 科学, 270 :299 ;1995)、宋内志贺菌 (*Shigella sonnei*) (参见,例如 ATCC No. 29930)、以及志贺痢疾杆菌(参见,例如 ATCC No. 13313)。

[0048] 使用的特定的分枝杆菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的分枝杆菌菌株的例子包括结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) CDC1551 菌株(参见,例如 Griffith 等, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 八月 ;152(2) :808 ;1995)、结核分枝杆菌北京菌株 (Soolingen 等, 1995) H37Rv 菌株 (ATCC# :25618)、结核分枝杆菌泛酸盐营养缺陷型菌株 (Sambandamurthy. Nat. Med., 20028(10) :1171 ;2002)、结核分枝杆菌 rpoV 突变株 (Collins 等. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(17) :8036 ;1995)、结核分枝杆菌亮氨酸营养缺陷型菌株 (Hondalus 等, Infect. Immun., 68(5) :2888 ;2000)、Bacille Calmette-Guérin(卡介苗) 丹麦菌株 (ATCC#35733)、卡介苗日本菌株 (ATCC#35737)、卡介苗芝加哥菌株 (ATCC#27289)、卡介苗哥本哈根菌株 (ATCC # :27290)、卡介苗巴斯德菌株 (ATCC# :35734)、卡介苗葛兰素菌株 (ATCC # :35741)、卡介苗干诺 (Connaught) 菌株 (ATCC# 35745)、卡介苗蒙特利尔菌株 (ATCC # 35746)。

[0049] 使用的特定的产单核细胞李斯特菌菌株对于本发明而言是不关键的。可以在本发明中使用的产单核细胞李斯特菌菌株的例子包括产单核细胞李斯特菌菌株 10403S(例如, Stevens 等, J. Virol., 78 :8210-8218 ;2004) 或突变体产单核细胞李斯特菌株比如 (i) actAplcB 双重突变型 (Peters 等, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 35 :243-253 ;2003) ;(Angelakopoulos 等, Infect and Immunity, 70 :3592-3601 ;2002) ;(ii) 用于丙氨酸消旋酶基因和 D- 型氨基酸转氨酶基因的 dal dat 双重突变型 (Thompson 等, Infect and Immunity, 66 :3552-3561 ;1998)。

[0050] 在本发明的一些实施方式中,细菌尤其是志贺菌属种类、特别是侵入性削弱的弗氏志贺菌 2a。这些菌株 MPC51 和 NCD1 是弗氏志贺菌菌株 2457T 的衍生物,其内已经导入

了 *asd* 和 *murI* 缺失突变。*asd* 缺失由被表达载体编码的 *asd* 等位基因补足,并且 *murI* 突变导致菌株不能合成 D- 谷氨酸。因此,这些菌株在没有二氨基庚二酸和 D- 谷氨酸的情况下不能合成适当的细胞壁,这会促进细菌细胞在真核细胞侵染之后的溶解。当通过庆大霉素保护测定法测量时,HeLa 细胞受 Δasd 、 $\Delta murI$ 双重突变型 MPC51 侵染的状态与亲本菌株受 MPC51pYA3342(编码 *asd* 的质粒)侵染的状态相似。该菌株已经通过除去预先插入染色体 *asd* 基因座的卡那霉素抗性基因而被进一步修饰。得到的菌株——弗氏志贺菌 NCD1 因此不含抗生素抗性标记,仍然保持 *asd* 和 *murI* 基因的染色体缺失,并且在当前的调节需求下适用于人体内的药学应用。NCD1 也已被显示可以类似于亲本菌株的方式侵入 HeLa 细胞和 Caco-2 细胞中。

[0051] 一般地,本发明的细菌表达载体经基因工程化而编码并同时传递 IFN 抑制因子和一个以上其他所关注的基因,即过客基因。该过客基因典型地是来源于另一种生物体的异源转基因,比如来源于另一种细菌或病原体,并且可以是来源于任何生物体。然而,“过客基因”还可以是天然存在于细菌载体本身中的基因(即,来源于充当载体的细菌),但是在细菌载体中一个以上额外的拷贝经基因工程化而受启动子控制,该启动子例如可将转录水平提高高于一般的细菌的转录水平,或者该启动子对特定类型的寄主细胞或组织(例如肺、淋巴结、树状细胞等)是特异的。另外,“过客基因”不仅是指整个“基因”,而且是指任何编码所关注的肽、多肽、蛋白质、或核酸的序列。即,可以不包括整个“基因”自身,而是包括编码所关注的多肽或肽例如抗原性肽的基因部分。另外,多种其他构建体可以被过客基因编码,例如嵌合蛋白、或氨基酸序列的多种突变体(天然产生或基因工程)形式。另外,自然界未出现的完全人工合成的氨基酸序列也可以被编码。细菌表达载体经基因工程化而包含一个或多个这样的“过客基因”,并且还可以编码多拷贝的单个过客基因。该重组细菌表达载体具有载体功能,以便将过客基因运载进入被细菌侵染的寄主细胞,在其中基因产物被表达,即,基因序列是可以表达的,并且基因产物的转录和/或翻译发生在被细菌侵染的寄主细胞内部。编码过客基因的序列被可操作地(可实施操作地)连接于表达控制序列、特别是允许在细菌和/或真核寄主细胞内部表达的表达控制序列。对于“可操作地连接”,我们是指,编码过客基因的核酸序列易于在合适的寄主细胞比如细菌载体或哺乳动物细胞内部成功地转录并翻译。

[0052] 特别是,这些过客基因可以编码一种以上作为期望其引起免疫反应的抗原的肽或蛋白质。本领域的技术人员应认识到,存在各式各样这样的抗原,包括但不限于与传染剂比如多种病毒、细菌、真菌、多种寄生虫等有关的抗原。由其衍生病毒抗原的病毒性病原体包括但不限于:正粘病毒,比如流感病毒(分类学编号:59771);逆转录病毒,比如比 RSV、HTLV-1(分类学编号:39015)、以及 HTLV-II(分类学编号:11909);乳头瘤病毒,比如 HPV(分类学编号:337043)、疱疹病毒,比如 EBV(分类学编号:10295);CMV(分类学编号:10358)或单纯疱疹病毒(ATCC #:VR-1487);慢病毒,比如 HIV-1(分类学编号:12721)和 HIV-2(分类学编号:11709);棒状病毒,比如狂犬病;小 RNA 病毒,比如脊髓灰质炎病毒(分类学编号:12080);痘病毒,比如牛痘(分类学编号:10245);轮状病毒(分类学编号:10912);以及细小病毒,比如腺病毒相关病毒 1(分类学编号:85106)。

[0053] 能够在该组中发现的病毒抗原的例子包括但不限于:艾滋病毒抗原 Nef(过敏症和传染病 HIV 国家研究所入藏目录号:183;GenBank 登记号:AF238278);Gag;Env(过敏

症和传染病 HIV 国家研究所入藏目录号 :2433 ;GenBank 登记号 :U39362) ;Tat (过敏症和传染病 HIV 国家研究所入藏目录号 :827 ;GenBank 登记号 :M13137) ;Tat 突变衍生物比如 Tat-31-45 (Agwale 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99 :10037 ;2002) ;Rev (过敏症和传染病 HIV 国家研究所入藏目录号 :2088 ;GenBank 登记号 :114572) ;以及 Pol (过敏症和传染病 HIV 国家研究所入藏目录号 :238 ;GenBank 登记号 :AJ237568) ;gp120 (Hanke 和 McMichael, AIDS Immunol Lett. 66 :177 ;1999) ;(Hanke 等, Vaccine. 17 :589 ;1999) 的 T 细胞和 B 细胞表位 ;(Palker 等, J. Immunol. , 142 :36123619 ;1989) HIV-1Env 与 gp120 的嵌合衍生物, 比如但是不限于 gp120 和 CD4 之间融合的嵌合衍生物 (Fouts et al, J Virol 2000, 74 :11427-11436 ;2000) ;HIV-1Env 的平截或修饰的衍生物, 比如但是不限于 gp140 (Stamatos 等, J Virol. 72 :9656-9667 ;1998), 或者 HIV-1Env 和 / 或其 gp140 的衍生物 (Binley 等, J Virol. 76 :2606-2616 ;2002) ;(Sanders 等, J Virol. 74 :5091-5100 (2000) ;(Binley 等, 等, J Virol. 76 :2606-2616 ;2002) ;(Sanders 等, J Virol. 74 :5091-5100 (2000) ;(Binley 等, J Virol. 74 :627-643 ;2000) ;乙型肝炎表面抗原 (GenBank 登记号 :AF043578) ;(Wu 等, Proc. Natl. Acad. Sci. , USA. 86 :47264730 ;1989) ;轮状病毒抗原, 比如 VP4 (GenBank 登记号 :AJ293721) ;(Mackow 等, Proc. Natl. Acad. Sci. , USA. 87 :518 522 ;1990) 和 VP7 (GenBank 登记号 :AY003871) ;(Green 等, J Virol. 62 :1819 1823 ;1988) ;流感病毒抗原, 比如血凝集素或 (GenBank 登记号 :AJ404627) ;(Pertmer 和 Robinson, Virology. 257 :406 ;1999) ;核蛋白 (GenBank 登记号 :AJ289872) ;(Lin 等, Proc Natl Acad Sci. 97 :9654-9658 ;2000) 单纯疱疹病毒抗原比如胸苷激酶 (GenBank 登记号 :AB047378) ;(Whitley 等,《新一代疫苗》,第 825-854 页)。

[0054] 由其衍生细菌性抗原的细菌性病原体包括但不限于 :分枝杆菌属、幽门螺旋菌、沙门菌属、志贺菌属、大肠杆菌、立克次体属、李斯特菌属、肺炎军团菌、假单胞菌属、弧菌属、炭疽杆菌和伯疏氏螺旋体。

[0055] 细菌性病原体的保护性抗原的例子包括 :肠毒性的大肠杆菌的菌体抗原, 比如 CFA/I 菌毛抗原 (Yamamoto 等, Infect. Immun. 50 :925 928 ;1985) 和不耐热的毒素的无毒的 B 亚基 (等, Infect. Immun. , 40 :888-893 ;1983) ;百日咳杆菌粘着素 (pertactin) (Roberts 等, Vacc. , 10 :43-48 ;1992) ;百日咳杆菌的腺苷酸环化酶溶血素 (Guiso 等, Micro. Path. , 11 :423-431 ;1991)、破伤风杆菌的破伤风毒素片段 C (Fairweather 等, Infect. Immun. , 58 :13231326 ;1990)、伯疏氏螺旋体的 OspA (Sikand et al, Pediatrics, 108 :123-128 ;2001) ;(Wallich 等, Infect. Immun. 69 :2130-2136 ;2001), 普氏立克次体和地方性斑疹伤寒立克次体的保护性拟晶体表面层蛋白 (Carl 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. , 87 :8237-8241 ;1990) ;产单核细胞李斯特菌的李斯特菌溶胞素 (亦称“Llo”和“Hly”) 和 / 或过氧化物歧化酶 (亦称“SOD”和“p60”) (Hess, J 等, Infect. Immun. , 65 :1286-92 ;1997) ;(Hess, J 等, Proc. Natl. Acad. Sci. , 93 :1458-1463 ;1996) ;(Bouwer 等, J. Exp. Med. , 175 :1467-71 ;1992) ;幽门螺旋菌的尿素酶 (Gomez-Duarte 等, Vaccine. 16, 460-71 ;1998) ;(Corthesy-Theulaz 等, Infection & Immunity. 66, 581-6 ;1998) ;以及炭疽杆菌保护性抗原和致死因子受体结合性结构域 (Price 等, Infect. Immun. , 69, 4509-4515 ;2001)。

[0056] 由其衍生出寄生性抗原的寄生性病原体包括但不限于 :疟原虫属, 比如恶性疟原

虫(ATCC#:30145);锥体虫属,比如克氏锥虫(ATCC#:50797);贾第鞭毛虫属,比如兰氏贾第鞭毛虫(ATCC#:30888D);方头蛭属;巴贝虫属,比如田鼠巴贝虫(ATCC#:30221);内变形虫属,比如痢疾内变形虫(ATCC#:30015);艾美球虫属,比如巨型艾美耳球虫(ATCC#:40357);利什曼原虫属(分类学编号:38568);血吸虫属;布鲁格丝虫属;吸虫属;恶丝虫属;吴策线虫属;以及盘尾丝虫属。

[0057] 寄生病原体的保护性抗原的例子包括:疟原虫的环子孢子抗原(Sadoff等, Science. 240:336-337;1988),比如伯氏疟原虫的环子孢子抗原或恶性疟原虫的环子孢子抗原;疟原虫属的裂殖性孢子表面抗原(Spetzler等, Int. J. Pept. Prot. Res., 43:351-358;1994);痢疾内变形虫的半乳糖特异性凝集素(Mann等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88:3248-3252;1991)、利什曼原虫属的 gp63(Russell et al, J. Immunol., 140:1274-1278;1988);(Xu 和 Liew, Immunol., 84:173-176;1995),大型利什曼原虫(*Leishmania major*)的 gp46(Handman等, Vaccine. 18:3011-3017;2000)马来丝虫的副肌球蛋白(Li等, Mol. Biochem. Parasitol., 49:315-323;1991);曼氏裂体吸虫的磷酸丙糖异构酶(Shoemaker等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 89:1842-1846;1992);蛇形毛圆线虫的分泌球蛋白样蛋白(Frenkel等, Mol. Biochem. Parasitol., 50:27-36;1992);牛羊肝吸虫的谷胱甘肽-S-转移酶(Hillyer等, Exp. Parasitol., 75:176-186;1992);牛血吸虫和日本牛血吸虫(Bashir等, Trop. Geog. Med., 46:255-258;1994);以及牛血吸虫和日本牛血吸虫的 KLH(Bashir等, 参见前述, 1994)。

[0058] 可选地,其可以被期望引起对于与传染剂无关的抗原的免疫反应,该抗原例如与癌细胞、阿尔茨海默氏病、类型1糖尿病、心脏病、局限性回肠炎、多发性硬化等有关的抗原。

[0059] 另外,被细菌携带的过客基因不必编码抗原,但是可以编码任何所关注的肽或蛋白质。例如,本发明的方法可以用于传递用于纠正遗传性紊乱的过客分子。例如,这样的基因将包括:缺损基因比如用于囊性纤维化的囊性纤维化横跨膜传导调控子(CFTR)基因的替代者;或者新基因比如用于治疗HIV的整合酶反义基因的导入物;或者用于增强I型T细胞反应的基因比如白介素-27(IL-27);或者用于调节特定受体、代谢产物或激素比如胆固醇和胆固醇受体以及胰岛素和胰岛素受体的表达的基因;或者用于编码能够杀死癌细胞的产物比如与肿瘤坏死因子(TNF)相关的程序性细胞死亡诱导配体(TRAIL)的基因;或者天然产生的抑制骨吸收的蛋白质护骨蛋白(OPG);或者用于有效地表达全长的人源化抗体例如作用于癌细胞上HER2/neu(erbB2)受体的人源化单克隆抗体。

[0060] 另外,过客基因可以编码抑制性RNAs比如“小抑制性(small inhibitory)”siRNA。本领域技术人员已知,这样的RNAs与所关注的mRNA是互补的,并且可结合并抑制mRNA的翻译,例如作为抑制基因产物表达的工具。

[0061] 类似的方法可以用于传递过客分子来下调免疫系统,以便抑制或者控制自身免疫疾病或其他免疫系统疾病。其例子包括糖尿病、多发性硬化、红斑狼疮和局限性回肠炎以及关节炎和皮肤病的抑制或治疗。其他例子包括干涉特定免疫反应的免疫反应的精细调谐,比如下调免疫反应将治疗性免疫反应引向癌症及其疾病。例如,当Th1反应适合于抑制并治疗癌症、利什曼病、肺结核、以及HIV时,下调Th2反应。这能够利用现有技术、通过操纵免疫系统的免疫抑制本性与表达合适细胞因子环境的能力相结合的而实现,用于刺激适当

的免疫反应并且抑制不适当的免疫反应。

[0062] 在一种优选的实施方式中,本发明涉及一种用于将 IFN 抗性基因导入寄主细胞的方法。这样一种方法将包括如下步骤:将期望的 IFN 抗性基因与编码所关注的基因或核酸序列的序列一起导入基于的细菌传递系统,以使得一旦将细菌施用于寄主所关注的 IFN 抗性蛋白和核酸序列就被表达。该 IFN 抑制剂能够被细菌(例如志贺菌)或被寄主细胞生产。换句话说,IFN 抗性基因能够被从原核生物启动子或从真核生物启动子表达。所关注的基因或核酸序列(过客基因)在寄主细胞内部被表达。另外,所有遗传序列可以被组成性地表达或者瞬时表达或者被诱导。

[0063] 在又一个优选的实施方式中,本发明提供一种用于将 I 型 IFN 抗性基因与一个以上所关注基因一起在体外导入细胞中的方法。这样一种方法将包含如下步骤:将编码一种以上所关注的蛋白质的基因与一个以上 IFN 抗性基因一起导入例如减毒的或减毒的/灭活的志贺菌中,以使得期望的蛋白质/肽一旦将志贺菌施用于细胞就被生产出来。志贺菌可感染数种类型不同的细胞比如 BHK(幼仓鼠肾细胞)、HeLa(人类宫颈上皮癌瘤)、Caco-2(人类结肠腺癌),因此能够将期望的过客分子传递进入细胞。在被志贺菌感染的细胞中的基因表达被 I 型 IFN 反应抑制剂增强。在核酸释放后,细胞能够被移植,用于治疗性目的、用于基因治疗或者用作诊断分析试剂。

[0064] 在一些情况中,细菌通过将编码期望物质的核酸序列传递至细胞、并调节该物质在细胞中的产生而用作“基因疗法”试剂。例如,能够考虑通过使用志贺菌载体将编码 CXCR4/ 或 CCR5 结合性趋化因子的基因传递入肠管而用于治疗 HIV-1 感染。用于基因工程化细菌的工艺是本领域的技术人员所熟知的,并且用于进行这种工艺的规程是众所周知的。用于大肠杆菌、沙门菌、分枝杆菌、志贺菌、以及李斯特菌的减毒方法是本领域技术人员所熟知的(Evans 等, J. of Immuno., 120, 1978, p 1423);(Noriega 等, Infect. Immun., 62(11):5168-5172 1994);(Hone 等, Vacc., 9:810-816;1991)。

[0065] 例如,一种用于将期望的基因传递入细胞的方法可以包括将所关注的基因导入细菌菌株中。根据本发明,抗 IFN 反应基因能够通过本领域的技术人员所熟知的方法而被导入细菌染色体或毒性质粒,或者可选地能够在可复制的或非复制性质粒中被携带。例如,经由转化、电穿孔技术、转染、结合等方式,所关注的载体能够被导入细菌中。在构建菌株和细菌载体中使用的重组 DNA 的工艺包括但不限于:聚合酶链反应(PCR)、限制性内切酶(在此称作“RE”)消化、DNA 连接、琼脂糖凝胶电泳、DNA 纯化、以及双脱氧核苷酸测序(在下属文献中有描述:(Miller, 细菌遗传学简要过程, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约州;1992);(Bothwell 等编, 克隆方法和真核生物基因分析, 琼斯和巴特利特出版公司, 波士顿, 麻州, 1990) 以及 (Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology. vol. 2: 10.8.1-10.8.13, 1992))、噬菌体介导转导((de Boer 等, Cell., 56:641-649;1989);(Miller, 参见前述, 1992) 和 (Ausubel 等, 参见前述))、或者化学方法(Bothwell 等, 参见前述);(Ausubel 等, 参见前述);(Felgner 等, 参见前述);以及(Farhood, 参见前述)、电穿孔技术((Bothwell 等, 参见前述);(Ausubel 等, 参见前述);(Sambrook, 分子克隆:实验室手册. 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约州;1992))以及物理转化技术(Bothwell 等, 参见前述)。这些基因能够被并入噬菌体(de Boer 等, 参见前述)、质粒载体(Curtiss, 《新一代疫苗》:分子方法, Marcel Dekker 公司, 纽约, 纽约州, 第 161-188 和 269-288 页, 1989)

或者拼接入目标菌株的染色体 (Hone 等, 参见前述)。

[0066] 应用例如 APPLY BIOSYSTEM ABI™ 900 高通量 DNA 合成仪 (Foster 市, 加州, 94404, 美国) 采用制造商提供的工艺规程, 能够通过合成方法制备基因序列。为了合成大序列, 即大于约 200bp, 通过 PCR 产生全长序列的一系列片段, 并且通过使用本技术领域众所周知的工艺连接一起形成全长序列。然而, 较小序列, 即小于约 200bp, 能够在单轮步骤中被合成出来。

[0067] 通过电穿孔技术, 使用例如 BioRad Gene 基因脉冲器, 可以将重组质粒导入菌株中。通过标准的自动测序技术 (例如, 使用 APPLY BIOSYSTEM 自动测序仪, 373A 型), 可以完成用于检验 cDNA 序列的核苷酸序列测定。用于 DNA 测序和聚合酶链反应 (在此称作“PCR”) 的 DNA 引物可以通过合成方法生产出来。

[0068] 在本发明的一些实施方式中, 基因工程化的细菌是侵入性削弱的弗氏志贺菌, 并且被导入细菌的基因是腺病毒 VAI 基因、轮状病毒的 NSP1、和 / 或流感病毒的 NS1, 这些基因被克隆得受控于真核生物启动子之下并且通过电穿孔技术导入细菌。

[0069] 本发明还提供了制品, 用于施用本发明的重组细菌表达载体。例如, 提供的疫苗制品用于引起免疫反应。该制品包括在此描述的至少一种基因工程化的细菌菌株、以及药理学上合适的载体。这样的组合物 (例如, 用作疫苗) 的制备为本领域技术人员所熟知。典型地, 这样的组合物或者作为液体溶液制备或者作为悬浮液制备, 然而, 也期待固体形式比如药片、丸剂、粉末等。还可以制备在施用之前呈适合于溶于或悬浮在液体中的固体形式。该制品还可以被乳化。可以将活性成分与药学可接受的、并且与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂例如是水、盐水、葡萄糖、棉子糖、甘油、乙醇等、或其组合。另外, 组合物可以含有较小含量的辅助物质比如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂等。本发明的疫苗制品可以进一步包含佐剂, 其合适的例子包括但不限于 Seppic、Quil A、Alhydrogel 等。

[0070] 如果希望口服形式施用该组合物, 则可以加入各种增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或者粘合剂等。本发明的组合物可以含有任何这些附加的成分, 以便以适合施用的形式提供该组合物。在配方中重组细菌的最终含量可以变化。然而, 一般来讲, 在配方中的含量是约 1-99%。另外, 本发明的制品可以含有单一类型的重组细菌、或者一种以上类型的重组细菌。最初, 细菌载体菌株的施用剂量为约 10^2 - 10^9 cfu (菌落形成单位), 并且通过合适的途径施用。取决于单个载体菌株的效价、以及被编码的所关注重组产物的效价、特定的用途等, 施用次数可以变化。

[0071] 就疫苗制品而言, 本发明还提供了引起对被细菌编码的抗原的免疫反应的方法, 并且提供为哺乳动物接种抗与这些抗原有关的疾病或病况的疫苗的方法。对于“引起免疫反应”, 我们指的是, 施用本发明的疫苗制品引起特异性抗体的合成 (滴度范围为 1 至 1×10^6 之间、优选 1×10^3 , 更优选范围为约 1×10^3 至约 1×10^6 , 并且最优选大于 1×10^6) 并且 / 或者细胞的增殖 (例如通过 ^3H 胸腺嘧啶脱氧核苷并入法测量)。该方法涉及将在药理学可接受的载体中包含本发明细菌菌株的组合物施用于哺乳动物。本发明的疫苗制品可以通过本领域技术人员所熟知的许多合适方法中的任何一种施用, 包括但不限于: 注射、口服、鼻饲、吸入、含有重组细菌的食品摄入等。在优选的实施方式中, 施用模式是口服、皮下注射、皮内注射或肌肉注射。

[0072] 通过下述非限制性实施例来进一步阐述本发明。

[0073] 实施例

[0074] 实施例 1. 通过重组志贺菌载体在寄主细胞中诱导 I 型干扰素反应

[0075] 细菌在哺乳动物细胞中诱导 I 型干扰素反应的能力被测试,并且分析了反应的性质。实验条件如下所述:在 37℃、在 6 孔板中感染复数 (MOI) 为 100 下,将 HeLa 细胞的半融合的单细胞层暴露于载有 RNA 过客分子的弗氏志贺菌 1 小时。细胞用 Dulbecco 改性 Eagles 培养基 (Dulbecco's Modified Eagles's Medium, DMEM) 洗涤两次。将含有 150 μg/mL 庆大霉素的培养基加至细胞 1 小时,以杀死胞外细菌。接着,洗涤细胞两次,加入含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM,并且使受感染的细胞孵育 20h。然后用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤细胞两次,并且使用 RNeasy 微型试剂盒 (Qiagen 公司) 分离总 RNA。使用人干扰素和受体 RT²Profiler™ PCR 阵列 (Superarray Biosciences 公司) 来鉴定 84 个干扰素相关基因表达的上调或下调。

[0076] 结果显示于表 1 中。可以看出,志贺菌载体侵染入人类细胞导致了 I 型 IFNs 和 IFN 刺激的诸如 5' - 寡腺苷酸合成酶 (2' - 5' - OAS) 的基因的转录诱导。在 89 个调查的基因中,有 74 个显示出转录提高了 2 倍以上。

[0077] 另外,进一步的实验显示,与具有完整 IFN 系统的细胞相比,来自被志贺菌传递入 IFN-α/β 缺乏型细胞的质粒 DNA 过客分子的报告基因的表达被增强了 (图 1)。

[0078] 这些结果表明,受 IFN 刺激的基因抑制了来自被通过细菌载体传递至哺乳动物细胞的过客分子的基因的表达。

[0079] 表 1. 差别的 IFN 相关基因表达:志贺菌侵染的 HeLa 细胞对比未被侵染的 HeLa 细胞。

[0080]

基因	诱导倍数
ADAR (作用于 RNA 的腺苷脱氨酶)	3.37
CNTFR (睫状神经营养因子受体)	3.54
CRLF2 (细胞因子受体样因子 2)	3.10
CSF2RA (集落刺激因子 2 受体)	2.80
CSF3R (集落刺激因子 3 受体)	5.44
CXCL10 (趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 10)	649.87
EBI3 (埃巴病毒诱导基因 3)	4.30
F3 凝血因子 III (促凝血酶原激酶,组织因子)	2.90
IL20RB (白介素 20 受体 β)	1.35
ISG15 (干扰素刺激基因 15)	13.87

基因	诱导倍数
IFI6(干扰素, α -诱导蛋白 6)	18.69
IFI16(干扰素, γ -诱导蛋白 16)	5.11
IFI27(干扰素, α -诱导蛋白 27)	52.13
IFI30(干扰素, γ -诱导蛋白 30)	1.56
IFI35(干扰素诱导蛋白 35)	4.54
IFI44(干扰素诱导蛋白 44)	5.22
IFI44L(干扰素诱导蛋白 44 类)	7.33
IFIH1(用解旋酶 C 结构域 1 诱导的干扰素)	65.53
IFIT1(具有三四氨基酸重复 -1 的干扰素诱导的蛋白)	12.94
IFIT1L(具有三四氨基酸重复 -1 类的干扰素诱导的蛋白)	13.21
IFIT2(具有三四氨基酸重复 -2 的干扰素诱导的蛋白)	6.47
IFIT3(具有三四氨基酸重复 -3 的干扰素诱导的蛋白)	19.08
IFITM1(干扰素诱导的跨膜蛋白 1)	3.47
IFITM2(干扰素诱导的跨膜蛋白 2)	0.85
IFNA1(干扰素, α 1)	2.34
IFNA14(干扰素, α 14)	3.02
IFNA2(干扰素, α 2)	19.48
IFNA21(干扰素, α 21)	14.66
IFNA4(干扰素, α 4)	7.86
IFNA5(干扰素, α 5)	37.90
IFNA6(干扰素, α 6)	3.28
IFNA8(干扰素, α 8)	3.77

基因	诱导倍数
IFNAR1(干扰素(α 、 β 和 ω)受体1)	2.44
IFNAR2(干扰素(α 、 β 和 ω)受体2)	3.72
IFNB1(干扰素, β 1)	21.92
IFNE1(干扰素 ϵ)	1.72
IFNG(干扰素, γ)	6.21
IFNGR1(干扰素- γ 受体1)	8.08
IFNGR2(干扰素- γ 受体2)	3.13
IFNK(干扰素, κ)	5.40
IFNW1(干扰素, ω 1)	18.18
IFRD1(干扰素相关的发育调控子1)	8.36
IFRD2(干扰素相关的发育调控子2)	1.07
IL10RA(白介素10受体, α)	9.67
IL10RB(白介素10受体, β)	3.28
IL11RA(白介素11受体, α)	2.02
IL12B(白介素12, β)	31.00
IL13RA1(白介素13受体, α -1)	1.64
IL15(白介素15)	2.59
IL20RA(白介素20受体, α)	2.82
IL21R(白介素21受体)	6.21
IL22RA2(白介素22受体, α -2)	8.78
IL28A(白介素28, α)	5.26
IL28RA(白介素28受体, α)	1.94

基因	诱导倍数
IL29(白介素 29)	25.71
IL2RB(白介素 2 受体, β)	9.47
IL2RG(白介素 2 受体, γ)	26.61
IL31RA(白介素 31 受体, α)	5.22
IL3RA(白介素 3 受体, α)	12.85
IL4R(白介素 4 受体)	4.33
IL5RA(白介素 5 受体, α)	3.24
IL6(白介素 6)	42.34
IL6R(白介素 6 受体)	11.91
IL7R(白介素 7 受体)	22.38
IL9R(白介素 9 受体)	1.91
IRF1(干扰素调节因子 1)	20.03
IRF2(干扰素调节因子 2)	3.85
IRF2BP1(干扰素调节因子 2 结合蛋白 1)	2.32
IRF2BP2(干扰素调节因子 2 结合蛋白 2)	4.94
IRF3(干扰素调节因子 3)	1.88
IRF4(干扰素调节因子 4)	49.32
IRF5(干扰素调节因子 5)	5.75
IRF6(干扰素调节因子 6)	5.67
IRF7(干扰素调节因子 7)	3.02
IRF8(干扰素调节因子 8)	30.36
IRGM(免疫性相关 GTP 酶家族, M)	350.68

基因	诱导倍数
LEPR(瘦蛋白受体)	2.23
MPL(骨髓增殖性白血病蛋白)	4.64
MX1(粘病毒(流感)抗性1)	13.40
OAS1(2'-5'-寡腺苷酸合成酶)	8.66
PSME1(蛋白酶体(蛋白酶体,巨蛋白因子(macropain))激活剂亚基1)	1.13
PYHIN1(热蛋白和HIN结构域)	2.63
SP110(核体蛋白)	1.82
TTN(编码中枢肌节蛋白,肌联蛋白)	45.07
B2M(β -2-球蛋白)	2.21
HPRT1(次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1)	0.68
RPL13A(核糖体蛋白L13a)	0.49
GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)	0.98
ACTB(肌动蛋白, β)	1.39

[0081]

[0082]

[0083]

[0084]

[0085] 实施例2. 可抑制对被细菌载体传递的过客核酸表达的I型IFN反应的细菌传递系统的构建

[0086] 该实施例描述了可抑制I型IFN反应及其对过客核酸表达的影响的两个细菌传递系统的构建和应用。在两种情况下,通过电穿孔技术使核酸经基因工程化进入减毒的、侵入性弗氏志贺菌菌株中。选择弗氏志贺菌的原因是因为其在许多组织培养细胞系和动物模型中天然地具有侵入性。该志贺菌菌株携带有导入的染色体突变,该突变会在侵染真核细胞后引起细胞溶解并且从内吞囊泡中逃逸,能够使过客分子释入真核细胞胞质中。

[0087] 在第一组实验中,使用可在市场上买到的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶表达报告载体pcDNA3.1/His/lacZ(Invitrogen公司)制备电转感受态(electro-competent)弗氏志贺菌菌株NCD1,并且进行电穿孔。报告载体pcDNA3.1/His/lacZ在哺乳动物细胞中表达受控于人巨细胞病毒(CMV)启动子下的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶,允许在传递载体之后进行简易

的哺乳动物调节的基因表达的分析。在该实验中使用的干扰素抗性基因是与腺病毒有关的 I (VAI) RNA 基因。已知在腺病毒感染之后,腺病毒 RNA 基因大量地被 RNA 聚合酶 III 转录 (Reich et al., J. Mol. Biol. 17, 428, 1966; Price et al., J. Virol. 9, 62, 1972; Weinmann et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71, 3426; Soderlund et al., Cell 7, 585, 1976)。腺病毒利用病毒编码的与病毒有关的 RNA, 通过阻断干扰素诱导的被双链 RNA 激活的蛋白激酶 PKR 的活化, 从而作为对抗细胞抗病毒反应的防御手段 (Galabru J, Katze MG, Robert N, Hovanessian AG. Eur J Biochem. 1989 Jan 2; 178(3): 581-9)。在 1,724bp 插入物上含有腺病毒与病毒有关的 I (Adenovirus Virus-Associated I, VAI) RNA 基因的 pAdVantage 载体也经电穿孔而进入弗氏志贺菌 NCD1 菌株中。按照在实施例 1 中描述的方法, 通过电穿孔技术用弗氏志贺菌菌株感染 HeLa 细胞。简言之, 为了测试 VAI 基因的抗干扰素作用, HeLa 细胞或者用 1) 含有 β -半乳糖苷酶报告载体 (pcDNA3.1/His/lacZ) 的弗氏志贺菌 NCD1 和含有 pAdVantage 载体的弗氏志贺菌 NCD1 感染; 或者用 2) 仅含有 β -半乳糖苷酶报告载体的弗氏志贺菌 NCD1 菌株感染。在 24 小时后, 使用 β -半乳糖苷酶分析试剂 (Stratagene 公司), 既用于细胞溶解, 也用于测定细胞抽提物中的 β -半乳糖苷酶活性。结果显示于图 2 中。可以看出, 在被同时含有 β -半乳糖苷酶活性报告载体和 VAI 抗干扰素载体的志贺菌感染的 HeLa 细胞中, 观察到 β -半乳糖苷酶活性有极大的提高。

[0088] 类似地, 在第二组实验中, 含有携带报告基因绿色荧光蛋白 (GFP) 的重组双链 RNA 核壳体 (rdsRN) 的志贺菌载体菌株经电穿孔而具有克隆入真核表达载体 pcDNA 3.1zeo(+) (Invitrogen) 中的编码甲型流感 NS1 或轮状病毒 NSP1 的序列。得到的志贺菌菌株因此便同时含有在 RNA 核壳体 (rdsRN) 中的 GFP 基因和在 pcDNA 中的 NSP1 或 NS1。BHK-21 和 HeLa 细胞用含有 GFP 和 NSP1 或 NS1 表达质粒的志贺菌菌株感染、或者用仅含有 GFP 表达质粒的志贺菌菌株感染。在 16 小时后, 测试被感染的 HeLa 细胞的绿色荧光, 并且通过免疫印迹分析 HeLa 细胞裂解液中的 GFP 蛋白。荧光结果显示, 与被仅具有 GFP 基因的志贺菌菌株感染的细胞相比, 在用含有 NS1 或 NSP1 表达质粒的志贺菌菌株感染的细胞中的 GFP 蛋白表达得到增强 (数据未显示)。由真核细胞产生的总蛋白的免疫印迹证实了在用含有 NS1 或 NSP1 表达质粒的志贺菌菌株感染的细胞中更高的 GFP 表达 (图 3)。

[0089] 这些发现显示, 在哺乳动物细胞内部通过细菌载体来表达编码 I 型干扰素反应抑制剂的基因 (例如 VAI、NS1 或 NSP1) 可增强编码所关注蛋白质 (例如 β -半乳糖苷酶或 GFP) 的转基因的共表达。该实施例中描述的结果是第一个显示如下情形的证据: 使用基于细菌的传递系统通过减弱 IFN 反应可以增强所关注的蛋白质的表达。

[0090] 实施例 3. 通过重组志贺菌载体在哺乳动物寄主细胞中对 I 型干扰素反应的诱导被干扰素拮抗剂抑制。

[0091] 该实施例描述了干扰素拮抗剂抑制在哺乳动物细胞中被细菌诱导的干扰素刺激基因 (ISGs) 的表达的能力。在这些实验中使用的弗氏志贺菌菌株携带有在其侵入真核细胞后引起细胞溶解的染色体突变。志贺菌在寄主细胞中存活足够长的时间从而逃逸内吞囊泡, 使含有干扰素拮抗剂的质粒分子能够释入哺乳动物细胞胞质。志贺菌菌株含有并且表达编码报告基因绿色荧光蛋白 (GFP) 的重组核壳体。弗氏志贺菌菌株用已经分别克隆入质粒载体 pcDNA3.1 zeo(+) 和 pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, 加州) 的甲型流感 NS1 基因或腺病毒 VAI RNA 基因进行电穿孔。这些含有 NS1 基因或 VAI RNA 基因的弗氏志

贺菌菌株被用于研究在哺乳动物细胞中的基因表达。

[0092] 实验条件如下所述：在 37℃、在 6 孔板中感染复数 (MOI) 为 100 下，将 HeLa 细胞的半融合的单细胞层暴露于载有 IFN 抑制基因的弗氏志贺菌 1 小时。用 Eagle 最低必需培养基 (EMEM) 洗涤细胞两次，并且将含有 150 μ g/mL 庆大霉素的 EMEM 加至细胞 1 小时，以便杀灭胞外细菌。接着，洗涤细胞两次，加入新鲜的 EMEM，并且使受侵染的细胞孵育 20h。然后用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤细胞两次，并且使用 RNeasy 微型试剂盒 (Qiagen 公司) 分离总 RNA。使用人干扰素和受体 RT2Profiler™ PCR 阵列 (Superarray Biosciences 公司) 来鉴定 84 个干扰素相关基因表达的上调或下调。

[0093] 结果显示于表 2 中。可以看出，弗氏志贺菌侵入人类细胞导致了 I 型 IFNs 和 IFN 刺激的比如 2' -5' -寡腺苷酸合成酶 (2' -5' -OAS) 的基因的转录诱导。被诱导的基因与弗氏志贺菌所载的过客核酸的转录和翻译的抑制有关。然而，如图 4 所示，与单独被弗氏志贺菌侵染的细胞相比，用载有干扰素拮抗剂 NS1 基因的弗氏志贺菌菌株侵染的 HeLa 细胞显示出 ISGs 的低水平表达。这些结果表明，NS1 抑制了在哺乳动物细胞中通过细菌诱导的 ISGs 表达。

[0094] 实施例 4. 干扰素拮抗剂对干扰素刺激的基因 (ISGs) 表达的抑制

[0095] 该实施例描述了干扰素拮抗剂抑制在哺乳动物细胞中被细菌诱导的干扰素刺激基因 (ISGs) 的表达的能力。在该实验中使用的志贺菌菌株携带有导入的染色体突变，该突变会在侵染哺乳动物细胞后引起细胞溶解并且从内吞囊泡中逃逸，能够使含有干扰素拮抗剂的过客质粒分子释入哺乳动物细胞胞质中。弗氏志贺菌菌株 NCD 用已经分别克隆入质粒载体 pcDNA3.1 zeo(+) 和 pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, 加州) 的甲型流感 NS1 基因或腺病毒 VAI RNA 基因进行电穿孔。如此含有 NS1 基因或 VAI RNA 基因的志贺菌菌株被用于研究 I 型 IFN 反应的诱导和抑制。

[0096] 实验条件如下所述：在 37℃、在 6 孔板中感染复数 (MOI) 为 100 下，将 HeLa 细胞的半融合的单细胞层暴露于载有 IFN 抑制基因 (NS1 或 VAI) 的弗氏志贺菌 1 小时。用 Eagle 最低必需培养基 (EMEM) 洗涤细胞两次，并且将含有 150 μ g/mL 庆大霉素的新鲜 EMEM 加至细胞 1 小时，以便杀灭胞外细菌。接着，用 EMEM 洗涤 HeLa 细胞两次，加入新鲜的 EMEM，并且在侵入后使受侵染的细胞孵育 20h。然后用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤 HeLa 细胞两次，并且使用 RNeasy 微型试剂盒 (Qiagen 公司) 分离总 RNA。使用人干扰素和受体 RT2Profiler™ PCR 阵列 (Superarray Biosciences 公司) 来鉴定 84 个干扰素相关基因表达的上调或下调。由表 2 可以看出，与未被侵染的细胞相比，志贺菌载体侵染入人类细胞导致了 I 型 IFNs 和 IFN 刺激的诸如 2' -5' -寡腺苷酸合成酶 (2' -5' -OAS) 的基因的转录诱导。然而，如图 4 所示，与单独被志贺菌侵染的细胞相比，用载有 I 型干扰素拮抗剂 NS1 基因的志贺菌菌株侵染的 HeLa 细胞显示出 ISGs 的低水平表达。这些结果表明，NS1 的确抑制了通过细菌诱导的 ISGs 表达。类似地，用可表达腺病毒 VAI RNA 基因的志贺菌感染的 HeLa 细胞的 qRT-PCR 表达研究表明，ISGs 比如 CXCL10 和 MX2 的表达也被干扰素拮抗剂抑制 (图 5)。上述结果显示了抑制 IFN 反应的基础的分子机制，其允许被细菌载体编码的异源过客基因的更稳定的表达。

[0097] 这些结果显示，来自细菌载体的 I 型 IFN 反应的病毒抑制剂的表达抑制了受感染细胞的 IFN 反应。

[0098] 表 2. 与抑制志贺菌所载过客核酸的转录和翻译有关的分子的过表达 : 志贺菌侵染的 HeLa 细胞与未侵染的 HeLa 细胞的对比

[0099]

基因代号	诱导倍数
CXCL10	1937
ISG15	30
IF16	40
IF127	225
IFI44L	23
IFIH1	35
IFIT1	25
IFT2	28
IFIT3	30
IFN6	17
IFNB1	12
IFN12B	10
IL 12RG	32
IRF4	9
OAS	13

[0100] 实施例 5. 通过共表达 IFN 拮抗剂而改进的基于细菌的转基因表达传递系统的构建构建质粒载体以表达报告基因绿色荧光蛋白 (GFP)。使用 Accuprime DNA 聚合酶 (Invitrogen 公司, Carlsbad, 加州) 和包括 HpaI 和 NotI 限制性内切酶位点的引物对 GFP 基因进行 PCR 扩增。通过琼脂糖凝胶电泳检验扩增序列的大小, 并且使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒按照生产厂商 (Qiagen, 目录编号 28106, 巴伦西亚市, 加州) 的说明书进行纯化。GFP 基因被克隆入哺乳动物表达质粒 pShooter (Invitrogen, Carlsbad, 加州) 的 HincII 和 NotI 位点 (新英格兰实验室公司, Beverly, 马萨诸塞州)。在 pShooter 载体中的表达被强大的、组成型人 EF-1 α 启动子驱动。在该实验中使用的干扰素抗性基因是与腺病毒有关的 I (VAI) RNA 基因, 其由 RNA 聚合酶 III 启动子驱动。对编码 RNA 聚合酶 III 启动子的 VAI RNA 基因下游的基因进行 PCR 扩增, 并且克隆入 GFP pShooter 载体的 EcoRI 位点。得到的

构建体示图如图 6 所示。

[0101] 对含有合适的插入物的重组质粒进行鉴定,并且将新颖的质粒称为 pAdgfp。将 pAdgfp 载体经电穿孔导入弗氏志贺菌 NCD1 菌株。按照在实施例 3 中描述的方法进行 HeLa 细胞的侵染。简言之,为了测试 VAI 基因的表达增强作用,用含有 pAdgfp 质粒(编码 GFP 和 VAI)的弗氏志贺菌 NCD1、或者用载有仅编码 GFP(pGFP)的 pShooter 质粒的弗氏志贺菌 NCD1 菌株侵染 HeLa 细胞。在 24 小时后,来自每个孔的细胞被裂解并通过免疫印迹法用 GFP 特异性抗血清进行分析。结果显示于图 7 中。可以看出,在被同时含有 GFP 和抗干扰素 VAI RNA 基因的志贺菌侵染的 HeLa 细胞中观察到 GFP 表达有提高。

[0102] 实施例 6. 当被减毒的表达流感干扰素抑制剂 NS1 的弗氏志贺菌传递进入真核细胞时质粒编码的 β -半乳糖苷酶的增强的表达

[0103] 在 CMV 启动子(pcdNA-lacZ)的翻译控制之下的编码 β -半乳糖苷酶的质粒经电穿孔导入弗氏志贺菌 NCD 内。编码甲型流感 NS1 基因(pEF NS1)的第二种质粒也经电穿孔导入单独的弗氏志贺菌 NCD 菌株内。在 pEF NS1 载体中,NS1 基因表达被强大的、组成型人 EF-1 α 启动子驱动。按照在实施例 1 中描述的方法用弗氏志贺菌菌株对 HeLa 细胞进行侵染。简言之,为了测试 NS1 基因的抗干扰素作用,用含有 β -半乳糖苷酶报告载体(pcdNA3.1/His/lacZ)的弗氏志贺菌 NCD 和含有 pEF NS1 载体的弗氏志贺菌 NCD 对 HeLa 细胞进行共侵染,或者用单独的弗氏志贺菌 NCD(不含载体)侵染 HeLa 细胞。在 18 小时后,使用 β -半乳糖苷酶分析试剂(Stratagene)用于溶解 HeLa 细胞和测定细胞抽提物中的 β -半乳糖苷酶活性。结果显示在表 3 中。可以看出,在被同时含有 β -半乳糖苷酶报告载体和 NS1 基因的志贺菌共侵染的 HeLa 细胞中观察到 β -半乳糖苷酶活性有极大的提高。

[0104] 表 3. 在哺乳动物细胞中的 β -半乳糖苷酶活性

[0105]

菌株	启动子类型	β -半乳糖苷酶比活性(OD)
HeLa 对照细胞	NA	0.047
NCD	NA	0.03
NCD pcdNA3.1-lacZ	CMV 启动子	0.46
NCD pEF-NS1	EF-1 α 启动子	0.050
NCD pcdNA3.1-lacZ+pEFNS1	CMV EF-1 α 启动子	1.8

[0106] 实施例 7. 当被减毒的表达流感干扰素抑制剂 NS1 的弗氏志贺菌传递时病毒壳体编码的分支结核杆菌抗原 85A 的表达

[0107] 构建重组核壳体以便同时在 S RNA 片段和 M RNA 片段(51 MS85A)上表达结核分枝杆菌抗原 85A。使用表达这些该病毒壳体 $\pm$ 流感 NS1 基因的弗氏志贺菌和表达受 CMV 启动子控制下的哺乳动物质粒上的抗原 85A 在(pcdNA-85A)的弗氏志贺菌菌株进行侵染测定。在 28 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 下培养细菌至对数期早期,并且在 37 $^{\circ}$ C 下静置孵育 1hr 以便诱导弗氏志贺

菌病原性基因的表达。将细菌重悬浮在 Eagle 最低必需培养基 (EMEM) 中,并且在下述条件下孵育 1hr :37°C +5% CO₂、与已经接种在 10⁶ 个细胞 / 孔的 6 孔板中的 BHK21 细胞一起 MOI 为 100。用 PBS 洗涤细胞 3 次,并且用 EMEM+ 庆大霉素 (150 μg/mL) 孵育以便杀灭任何胞外细菌。然后用 PBS 洗涤细胞 3 次,并且在 EMEM 培养基中孵育 20hr。细胞用 PBS 洗涤一次,并且用 250 μL MPER 哺乳动物蛋白质萃取试剂 (Pierce 公司) 溶解。将 30 μL 的每个细胞抽提物在 SDS-PAGE 凝胶上走胶、转移至硝酸纤维素膜上、并且用抗抗原 85A 的抗血清进行免疫印迹分析 (图 8)。在仅处于含有表达 NS1 基因 (MS85ApNS1) 的质粒、在 28°C 下培养的 85A 病毒壳体菌株 MS85A 中的 BHK-21 细胞中可看到抗原 85A 的表达 (泳道 3)。从于 28°C 或 37°C 下培养的不含 pNS1 的 MS85A 中、或者从于 37°C 下培养的 MS85A pNS1 中没有看到表达 (泳道 1、2、和 4)。这显示,NS1 蛋白的表达对于表达由弗氏志贺菌菌株传递的被重组核壳体编码的抗原是必需的。

[0108] 实施例 8. 同时在细菌和哺乳动物细胞中表达干扰素抗性基因、以及仅在哺乳动物细胞中表达所关注蛋白质的表达载体的构建

[0109] 构建质粒载体以便表达 HIV-1 的免疫显性的 Gag 肽。由合成的 gag 基因对 600bp 片段进行 PCR 扩增。使用 Accuprime DNA 聚合酶 (Invitrogen 公司, Carlsbad, 加州) 和包括 HpaI 和 NotI RE 位点的引物对序列进行扩增。通过琼脂糖凝胶电泳检验扩增序列的大小,并且使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒按照生产厂商 (Qiagen, 目录编号 28106, 巴伦西亚市, 加州) 的说明书进行纯化。该 600bp 的 gag 基因被克隆入表达体质粒 pcDNA3.1zeo(+) (Invitrogen, Carlsbad, 加州) 的 EcoRV 和 NotI 位点 (新英格兰实验室公司, Beverly, 马萨诸塞州)。对含有合适的插入物的重组质粒进行鉴定,并且将新颖的质粒称为 pGAG4X。

[0110] 干扰素抗性基因 (即, NS1 或 NSP1) 被克隆入受控于合适的真核生物启动子 (即, SV40 启动子) 或原核生物启动子 (例如, arg1 的持家启动子)、或同时两者之下的 pGAG4X 载体,产生二元表达载体。(对本领域的技术人员来说,在此描述的特定真核生物启动子和原核生物启动子序列对于载体的构建而言不是关键的,也可以用其他合适的启动子。因此,这些表达载体可同时在细菌和哺乳动物细胞中表达干扰素抗性基因;然而所关注的蛋白质 (例如, HIV-1 的 Gag) 仅在哺乳动物细胞中表达。该方法改进了过客 RNA/DNA 及其他用于在哺乳动物细胞中表达所关注的外源蛋白或抑制性 RNAs 的分子的转录及随后翻译的稳定性。

[0111] 实施例 9. 经基因工程化而抑制 IFN 反应的重组细菌表达载体作为疫苗的应用

[0112] 任何细菌性活载体疫苗的效力取决于其将足够的外来抗原提呈至人类免疫系统从而启动期望的保护性免疫反应的能力。然而,由于寄主防御体系,即 IFN 反应,过客 DNA/RNA 分子可能在体内变得不稳定,导致外源基因的丢失和预期免疫反应的降低。本发明提供了一种技术方案,用于通过减弱的 IFN 防御体系而在寄主细胞内部合成高水平的抗原。

[0113] 编码 IFN 抗性和所关注抗原的基因的传递和表达可以通过用携带有编码所关注转基因和 I 型 IFN 反应抑制剂的核酸的不致病的或减毒的细菌疫苗载体接种靶细胞 (组织、生物体等) 而完成。所关注的生物学反应包括但不限于:保护性或调节性免疫反应;治疗性反应;以及寄主蛋白质的基因表达 (例如 siRNA) 的下调和基因表达 (例如,细胞因子表达) 的上调。

[0114] 一旦不致病的或减毒的细菌疫苗载体菌株已经被选择,则菌株就被修饰以用作干

扰素反应抑制菌株。这可以通过使用如上所述必须将一个以上 IFN 抗性基因导入菌株的策略来完成。

[0115] 为了产生含有 I 型 IFN 抗性基因和所关注抗原的菌株,通过电穿孔技术将体外合成的基因导入菌株,并且在下述条件下在固体培养基上分离转化体:仅允许在重组质粒中含有并表达阳性选择等位基因的菌株(例如抗生素抗性或营养缺陷互补型)生长。一个通过活的载体来增强表达质粒遗传性的方法涉及到构建被设计成与导入的细菌染色体中突变互补的过客核酸。在基于质粒的互补系统中,质粒在细菌的细胞质中复制,可表达细菌生长和复制所要求的关键蛋白质;这样的质粒的丢失除去了细菌表达关键蛋白质的能力,并且导致细胞死亡。(在细菌复制期间质粒丢失的现象,会导致所有缺少质粒的细菌死亡,其也被称作“分离后杀灭”)。这样一种系统已经成功地在鼠伤寒沙门菌中使用,并且编码天冬氨酸 β -半醛脱氢酶(Asd)的 asd 基因表达为基础(Galen et al., Gene 1990;49:29-35)。Asd 是一种与在革兰氏阴性细菌中形成细胞壁所必需的结构性成分的合成有关的关键酶。因此,编码这样一种关键酶的质粒的丢失对于任何不能由染色体合成 Asd 的细菌而言将是致命的。

[0116] 待被施用的这些重组细菌的含量依据个体种类、以及正在治疗的疾病或症状而改变。一般来讲,使用的剂量可以是约 10^3 至 10^{11} 个存活的生物体、优选约 10^3 至 10^9 个存活的生物体。含有 DNA/RNA 过客分子的细菌载体一般地与药学可接受的载体或稀释剂一起施用。使用的特定的药学可接受的载体或稀释剂对于本发明而言不是关键的。稀释剂的例子包括:磷酸盐缓冲盐水,用于在胃中缓冲抗胃酸的缓冲液,比如含有蔗糖的柠檬酸盐缓冲液(pH 7.0)、单独的碳酸氢盐缓冲剂(pH 10)(Levine et al., J. Clin. Invest., 79:888-902;1987;Black et al., J. Infect. Dis., 155:1260-1265;1987)或含有抗坏血酸、乳糖、以及任选地阿斯巴特的碳酸氢盐缓冲剂(pH 7.0)(Levine et al., Lancet, II:467470;1988)。载体的例子包括:蛋白质,例如在脱脂乳中发现的蛋白质;糖,例如蔗糖;或者聚乙烯吡咯烷酮。典型地,这些载体将被使用的浓度范围为约 0.1-90% (w/v),但优选 1-10% (w/v)。

[0117] 在合适的动物模型(例如小鼠、兔、豚鼠或恒河猴)中评估载体菌株的生物活性。最初,细菌载体菌的施用剂量为 10^2 - 10^9 cfu(菌落形成单位),并且通过合适的途径施用(例如大肠杆菌、沙门菌和志贺菌能够经胃部或者鼻饲提供)。取决于单个载体菌株的效价、以及被编码的所关注重组产物的效价,施用次数将变化。

[0118] 在动物模型中免疫及其他对编码产物的生物学反应的测量方法是本领域技术人员所熟知的。为了测量血清 IgG 和 IgA 对抗原的反应,在疫苗接种以前、以及在疫苗接种后第 10、20、30、40、50、60、70、以及 80 天收集血清。大约 400-500 μ L 的血液被收集入单个的试管中,并且允许通过在冰上孵育 4hr 而凝结。在在微型离心机中离心五分钟后,将血清将转移至新鲜的试管中并且在 -80°C 下储存。使用将在疫苗接种前和在疫苗接种后每隔一定间隔被收集的粪粒和阴道洗涤物,确定黏膜 IgG 和 IgA 对由所关注基因表达的抗原的反应(Srinivasan et al., Biol. Reprod. 53:462;1995);(Staats et al., J. Immuno. 157:462;1996)。使用标准的 ELISA 来定量在血清和粘膜样本中 IgG 和 IgA 对所关注抗原的反应(Abacioğlu et al., AIDS Res. Hum. Retrovir. 10:371;1994);(Pincus et al., AIDS Res. Hum. Retrovir. 12:1041;1996)。卵清蛋白能够被包含于每个 ELISA 中作为阴性对照抗原。另外,视情况而定,每个 ELISA 能够包括阳性对照血清、粪粒或者阴道洗涤样本。阳性

对照样本是来自被通过鼻饲接种 10 μ g 被所关注的基因表达、并与 10 μ g 霍乱毒素相混合的抗原的动物的收获物,如文献 (Yamamoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94 :5267 ;1997) 所述。当血清稀释度产生在 490nm 处吸光度上升、大于阴性对照序列的平均值加三个标准误差值时,取最后的血清稀释度的倒数,计算出终点滴度。

[0119] 可以通过胞内细胞因子染色 (也称作胞内细胞因子细胞计数) 或者通过 ELISPOT 来测量细胞免疫性 (Letsch A et al., Methods 31 :143-49 ;2003)。两个方法都允许定量抗原特异性的免疫反应,虽然 ICS (胞内细胞因子染色) 也增加了可以同时通过表型表征抗原特异性的 CD4+ 和 CD8+T 细胞。这些测定能够评估抗原特异性的分泌 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IFN 的 T 细胞数量 (Wu et al., AIDS Res. Hum. Retrovir. 13 :1187 ;1997)。按照文献 (Wu et al., Infect. Immun. 63 :4933 ;1995) 描述的和以前使用的 (Xu-Amano et al., J. Exp. Med. 178 :1309 ;1993) ; (Okahashi et al., Infect. Immun. 64 :1516 ;1996) 方法,使用商业上可购买的捕获和检测 mAbs (R & D Systems 公司和 Pharmingen 公司) 进行 ELISPOT 测定。每个测定都包括有丝分裂原 (Con A) 和卵清蛋白对照。在此描述的基于抗 IFN 细菌的载体系统与没有 IFN 抗性基因的传递系统相比具有数个优点。这些抗原基因以较高水平、并且以比较长的时间周期被表达,因此诱导更剧烈的免疫反应。对展示出效力、并且在动物模型中无毒的细菌性载体进一步在临床试验中进行评估。

[0120] 实施例 10. 结核疫苗的开发

[0121] 卡介苗细菌按照在此描述的方法经基因工程化而包含编码下述的核酸 :1) 作为过客基因的一种以上结核病抗原、以及 2) 可抑制或干涉哺乳动物寄主细胞 I 型干扰素反应的一种以上因子。当施用于哺乳动物寄主 (例如人类) 时,基因工程卡介苗侵入寄主细胞、逃脱内体,并且被溶解来释放过客基因,从而产生一种以上结核病抗原。另外,卡介苗还产生一种以上可抑制寄主细胞 IFN 反应的因子。这些因子削弱寄主细胞 IFN 反应,否则 IFN 反应降低 TB 抗原的产量。其结果是,产生足够的 TB 抗原从而导致稳固的对 TB 抗原的免疫反应。

[0122] 虽然本发明已经描述了其优选的实施方式,但本领域的技术人员应理解,在不违背本发明精神和附后的权利要求的范围的情况下,本发明能够具有各种变型。因此,本发明将不会限于如上所述实施方式,而是应该不违背在此提供的精神和描述的范围的情况下进一步包括所有的变型和其等效形式。

序列表

<110>AERAS 全球 TB 疫苗基金会

<120> 通过共表达真核 I 型干扰素反应抑制剂从而提高来自基于细菌传递系统的转基因表达的方法

<130>PUSWC1000416S

<140>PCT/US08/75972

<141>2008-09-11

<150>US 11/854, 027

<151>2007-09-12

<160>3

<170>PatentIn version 3.4

<210>1

<211>693

<212>DNA

<213> 流感病毒

<400>1

atggatccaa acactgtgtc aagctttcag gtagattgct ttctttggca tgtccgcaaa	60
cgagttgcag accaagaact aggtgatgcc ccattccttg atcggcttcg ccgagatcag	120
aaatccctaa gaggaagggg cagcactctc ggtctggaca tcgagacagc cacacgtgct	180
ggaaagcaga tagtggagcg gattctgaaa gaagaatccg atgaggcact taaaatgacc	240
atggcctctg tacctgcgtc gcgttaccta actgacatga ctcttgagga aatgtcaagg	300
gactgggtcca tgctcatacc caagcagaaa gtggcaggcc ctctttgtat cagaatggac	360
caggcgatca tggataagaa catcatactg aaagcgaact tcagtgtgat ttttgaccgg	420
ctggagactc taatattgct aagggtttc accgaagagg gagcaattgt tggcgaaatt	480
tcaccattgc cttctcttcc aggacatact gctgaggatg tcaaaaatgc agttggagtc	540
ctcatcgag gacttgaatg gaatgataac acagttcgag tctctgaaac tctacagaga	600
ttcgcttggga gaagcagtaa tgagaatggg agacctccac tcaactccaaa acagaaacga	660
gaaatggcgg gaacaattag gtcagaagtt tga	693

<210>2

<211>1479

<212>DNA

<213> 轮状病毒

<400>2

```

atggcaacct ttaaggatgc ttgttttcat tatagaagga ttacaaaact aaacagggaa 60
ttactgagaa ttggagcaaa ctcagtatgg actccagttt cttcaaataa aattagagga 120
tggtgcattg agtgttgtca attgactgaa ttgacctttt gtcattggatg ctcattggct 180
cacgtttgtc aatgggtgat tcaaaacaaa cgttgcttct tagacaatga accacatctt 240
ttaaagttaa gaacctttga atctccaata acaaaggaaa aattgcagtg cattattgat 300
ttatataatc tactatttcc aatcagccct ggtatcataa atagatttaa aaaagcagtt 360
aaacaaagaa agtgtagaaa tgaaagtgat aaatcgtggg ataatcaatt actacttcca 420
attactctaa atgccgcagt ttttaatttt cattcgaggg aaatttacat ttttggattt 480
tatgaaggat catcagcatg catagattta ccatatagac ttgtaaattg cattgactta 540
tatgataaat tgctgttaga tcaataaat tttgaaagaa tgagttgtct tccagataag 600
ttacaatcta tctatgcaaa taattatfff aaattgagca gacttccttc aatgaagttg 660
aaacaagttt attattcaga cttctccaaa caaaatttga ttaataagta taaaactaag 720
agtcgcatag tacttagaaa tctgactgaa ttcacttggg attctcaaat tgatttgcatt 780
catgatctaa tcaataacaa agataaaaata cttgcagcat tatcaacatc atcgttaaaa 840
caattcgaaa cacatgattt aaatttagga agagtaaaag ctgacatttt tgaacttggg 900
catcattgca aaccaaatta tatttcatca aatcattggc aaccggcatc aaaaattttc 960
cagtgttaagt ggtgcaatgt aaagtatgca tttagagata tggattggaa gatggaatca 1020
atgtataatg aactcttaag ttttctacag tcctgttaca aaagtaatgt taatgtaggg 1080
cattgtagtt caattgaaag tgtttatcca ctagtcaaag atatgctttg gcattcaatt 1140
acaaaatata ttgatcaaac tattgagaaa ttatttgatg caatgaatcc ggtgcaagtg 1200
aatgagcaac ttgtaattaa cttctatttg caaatagata tcgctctgta cactcacatc 1260
aaaatgatac taaaaactga agctcttccg tttactttca cacttaacca gttcaattct 1320
ataattaagg gaatcattaa ccaatgggtg gacgtcgctg aattggatct tttaccgtta 1380
tgcactgaac aaaccgacaa attgggttaa ctgaaagaag aagggaaact gtctgaagag 1440
tatgagctcc taatctcgga ttccgaagac gacgactga 1479

```

<210>3

<211>158

<212>DNA

<213> 腺病毒

<400>3

```

ggctcgactc cgtggcctgg aggctaagcg aacgggttgg gctgcgcgtg tacccegggt 60
cgaatctega atcaggctgg agccgcagct aacgtggtag tggcactccc gtctcgaccc 120
aggcctgcac aaaacctcca ggatacggag gcgggtcg 158

```

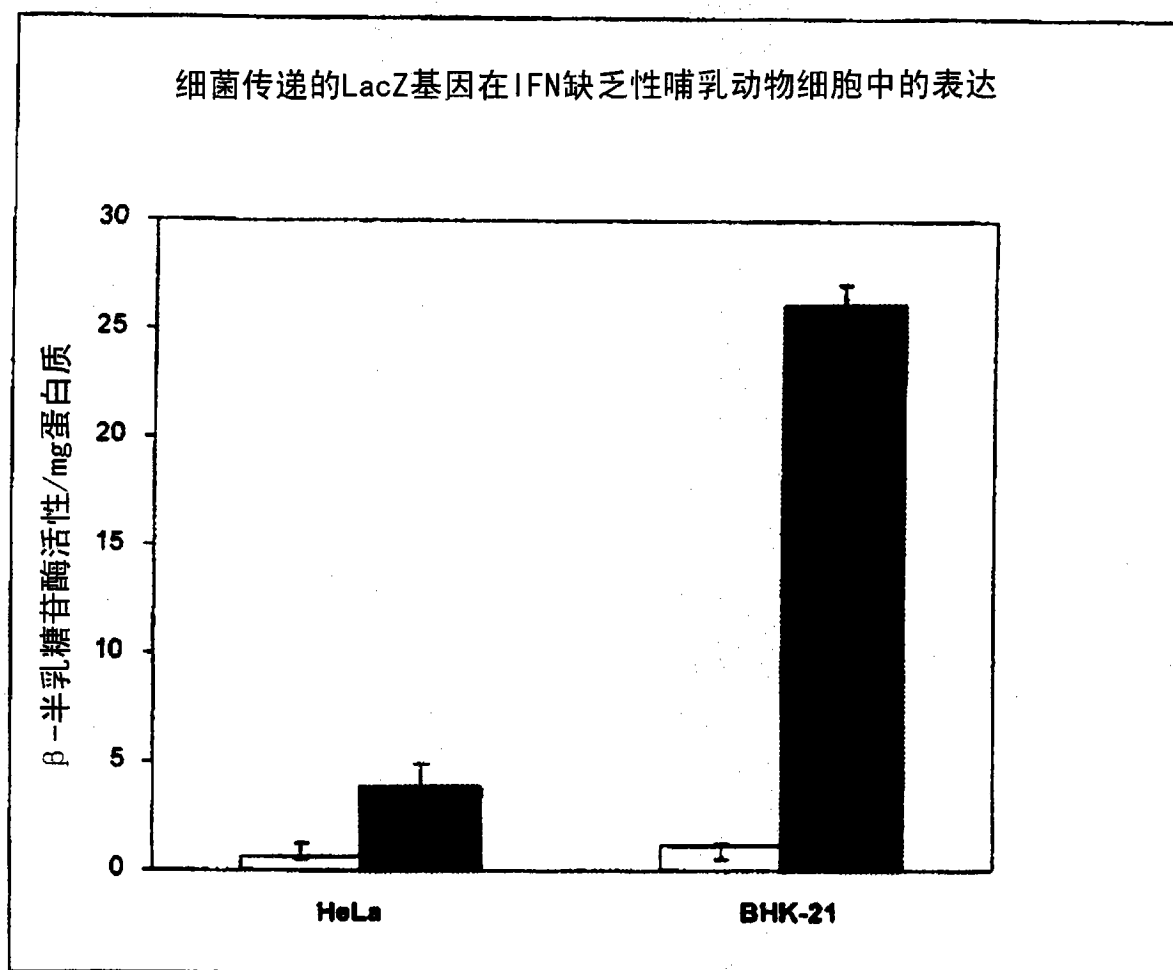


图 1

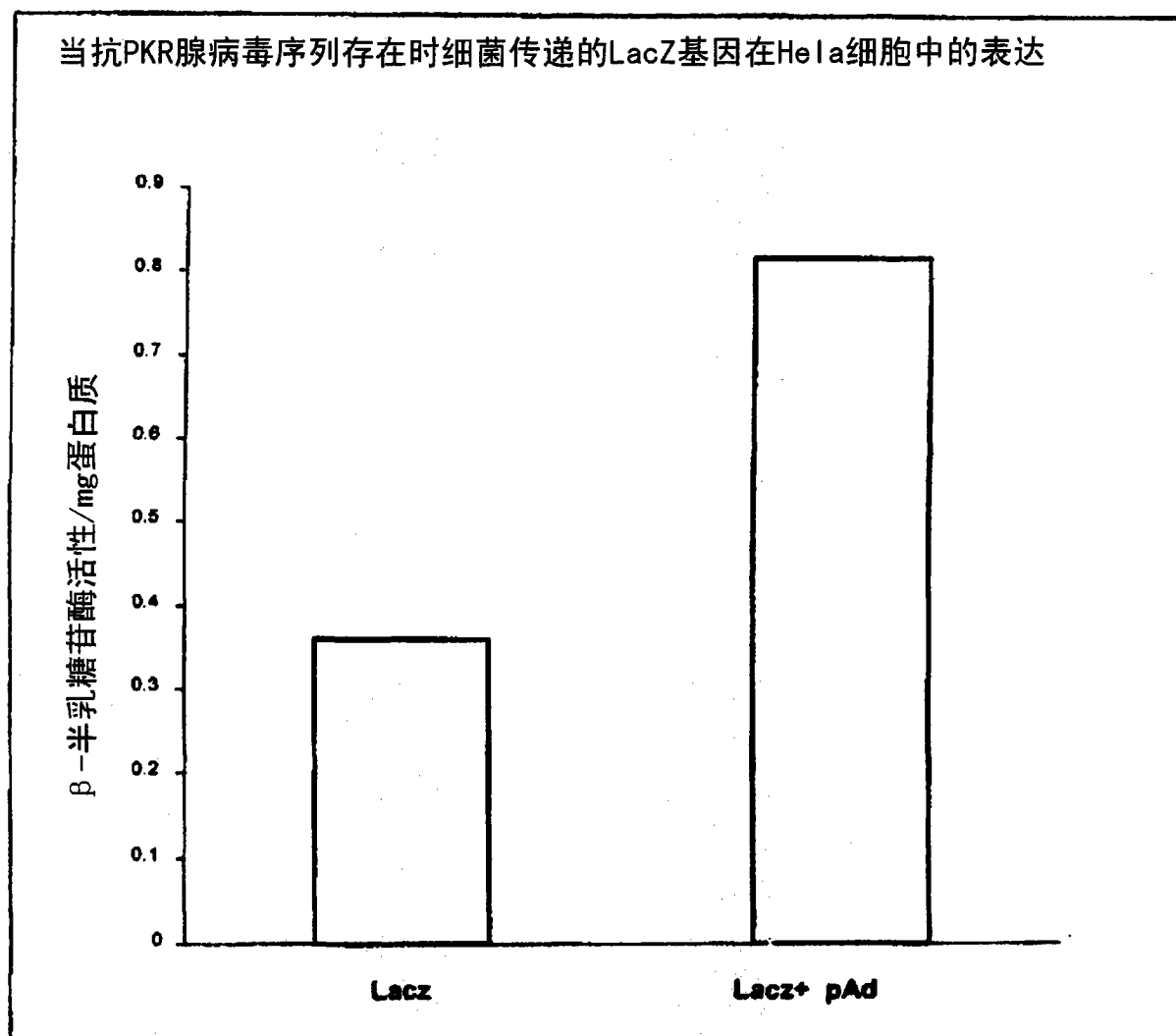


图 2

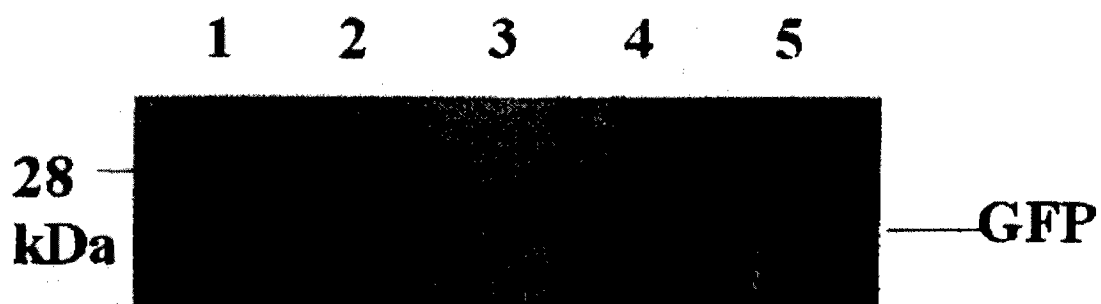


图 3

NS1降低了被衣壳志贺菌 (*Shigella capsid*) 菌株诱导的I型IFN相关基因的表达

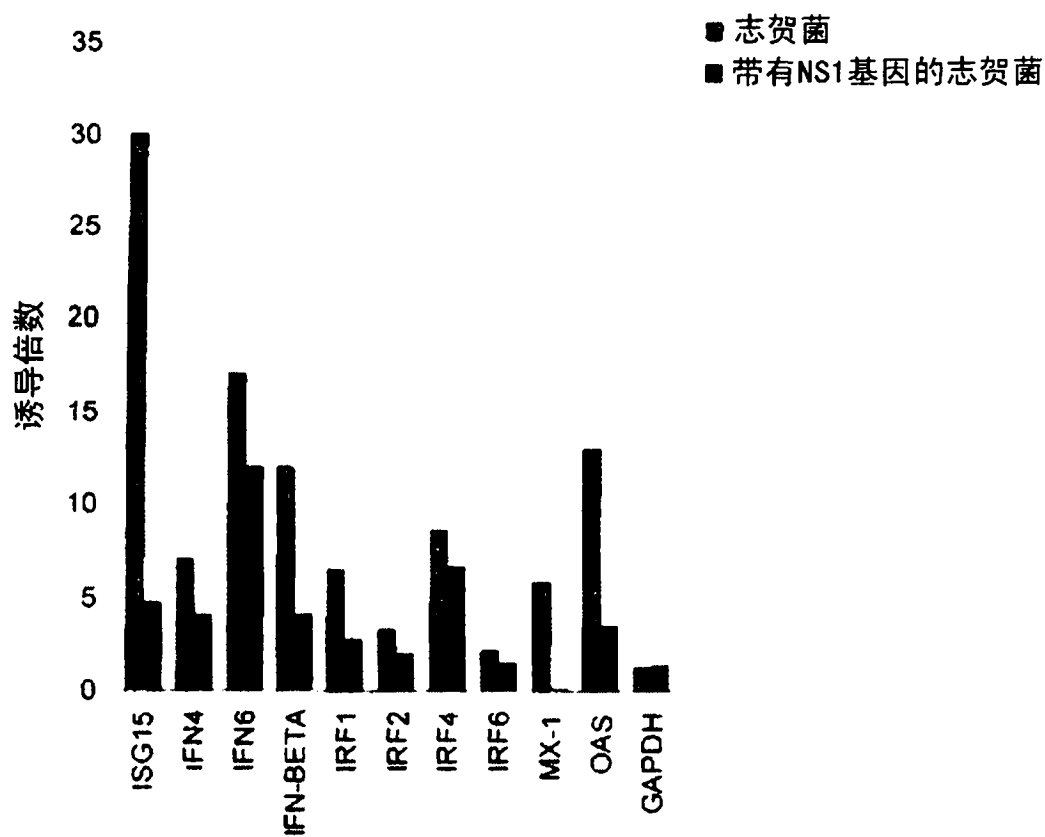


图 4

VAI RNA基因降低了被志贺菌诱导的I型IFN相关基因的表达

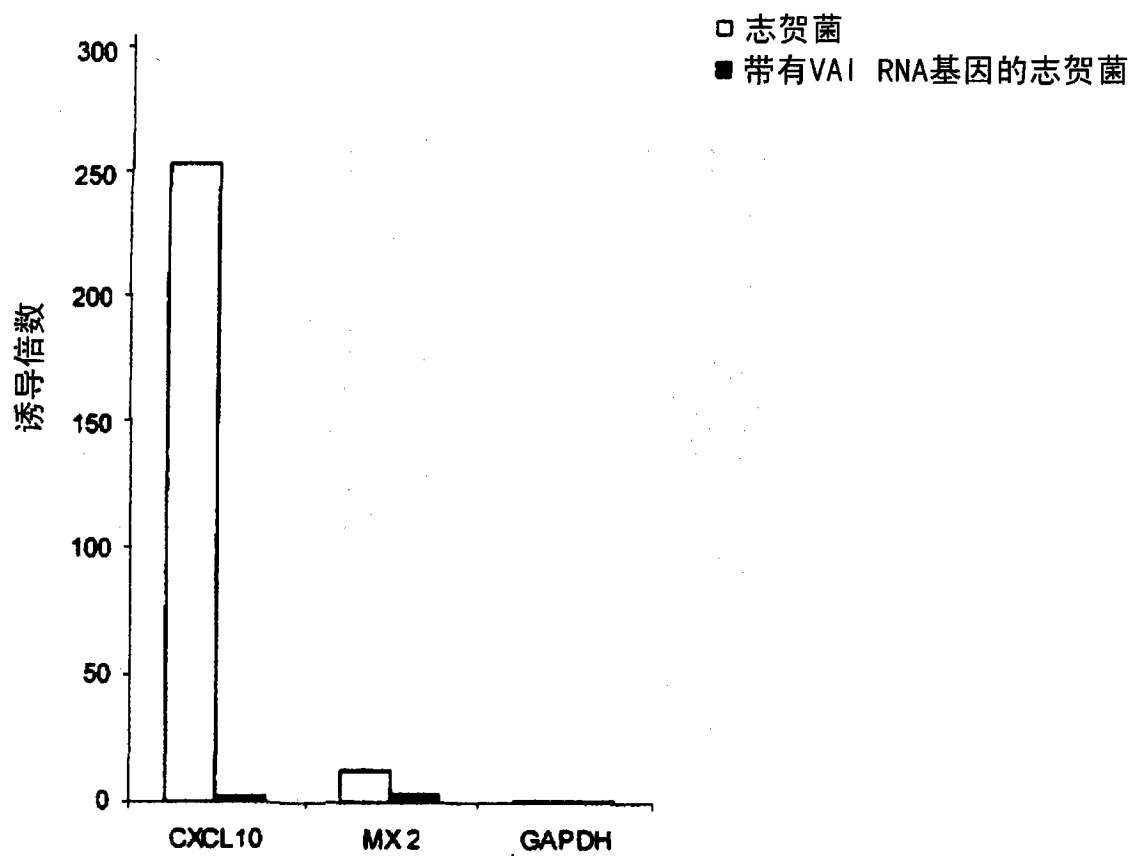


图 5

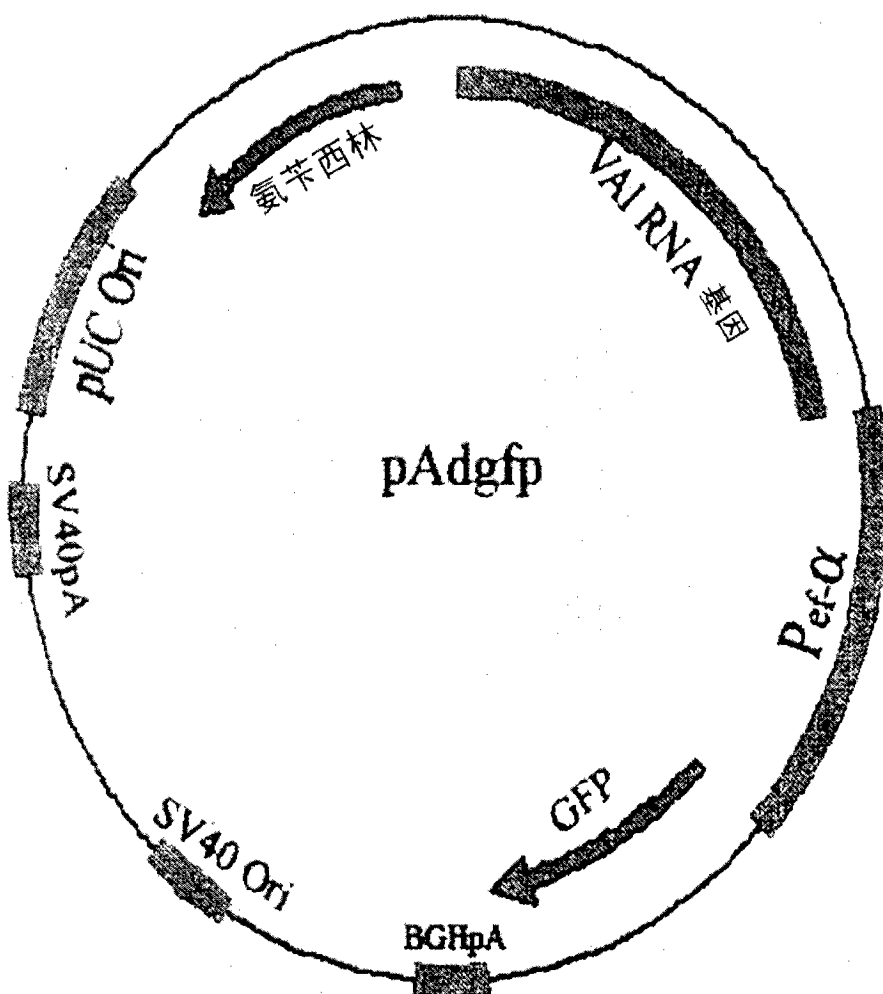


图 6

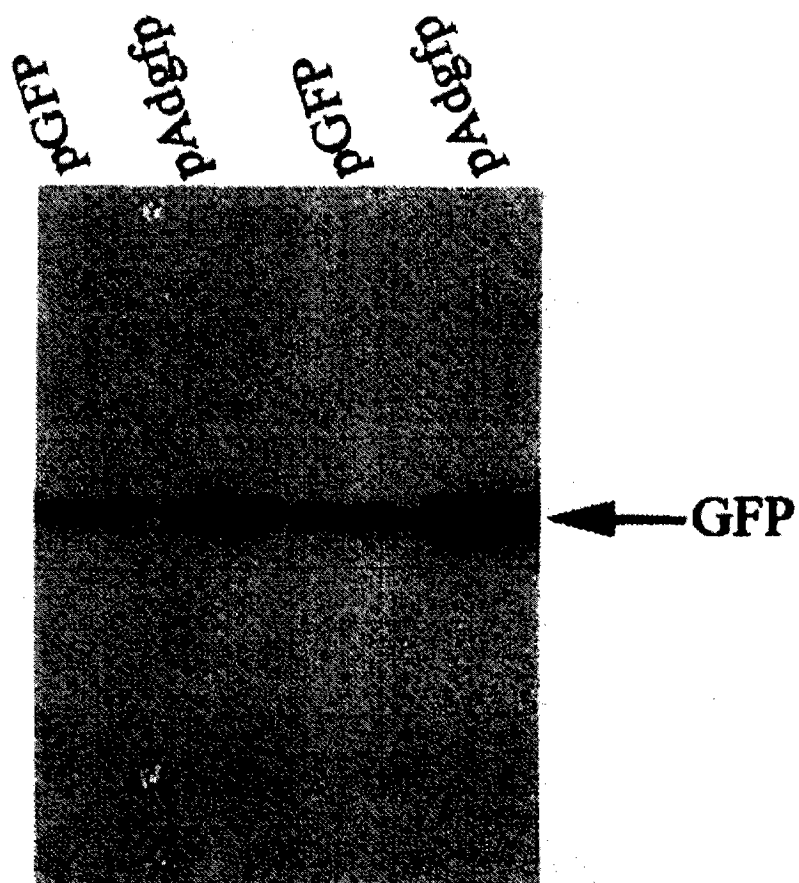


图 7

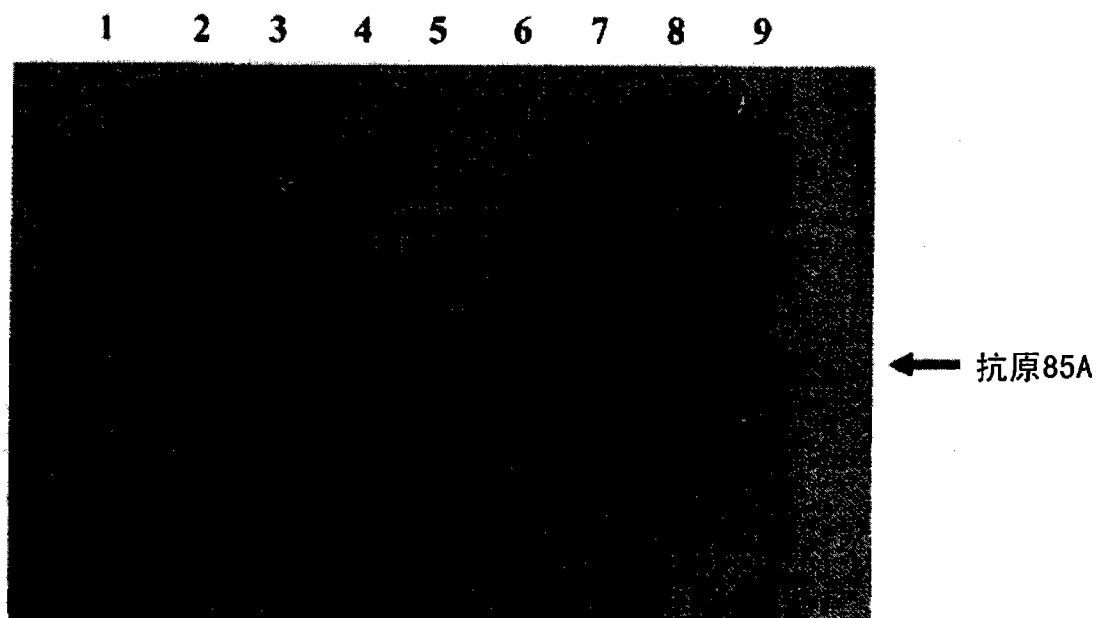


图 8

A.

ATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCA
AACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCATTCCTTGATCGGCTTCGCCGAG
ATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACTCTCGGTCTGGACATCGAGACAGCC
ACACGTGCTGGAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGGC
ACTTAAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACTGACATGACTCTT
GAGGAAATGTCAAGGGACTGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGGCAGGCC
TCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGGATAAGAACATCATACTGAAAGCGAA
CTTCAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAA
GAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTGCCTTCTCTTCCAGGACATACTGCTG
AGGATGTCAAAAATGCAGTTGGAGTCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAAC
ACAGTTCGAGTCTCTGAACTCTACAGAGATTGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAAT
GGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACGAGAAATGGCGGGAACAATTAGGTC
AGAAGTTTGA

B.

ATGGCAACCTTTAAGGATGCTTGTTTTATTATAGAAGGATTACAAAACCTAAACAGG
GAATTACTGAGAATTGGAGCAAACCTCAGTATGGACTCCAGTTTCTTCAAATAAAATT
AGAGGATGGTGCATTGAGTGTTGTCAATTGACTGAATTGACCTTTTGTGATGGATGCT
CATTGGCTCACGTTTGTCAATGGTGCATTCAAACCAAACGTTGCTTCTTAGACAATGA
ACCACATCTTTTAAAGTTAAGAACCCTTTGAATCTCCAATAACAAAGGAAAAAATTGCA
GTGCATTATTGATTTATATAATCTACTATTTCCAATCAGCCCTGGTATCATAAATAGA
TTTAAAAAAGCAGTTAAACAAAGAAAGTGTAGAAATGAAAGTGATAAATCGTGGTA
TAATCAATTACTACTTCCAATTACTCTAAATGCCGCAGTTTTTAAATTTTATTTCGAGG
GAAATTTACATTTTTTGGATTTTATGAAGGATCATCAGCATGCATAGATTTACCATATA
GACTTGTAATTTGCATTGACTTATATGATAAATTGCTGTTAGATCAAATAAATTTTGA
AAGAATGAGTTGTCTTCCAGATAAGTTACAATCTATCTATGCAAATAATTATTTTAAA
TTGAGCAGACTTCCTTCAATGAAGTTGAAACAAGTTTATTATTGAGACTTCTCCAAAC
AAAATTTGATTAATAAGTATAAACTAAGAGTCGCATAGTACTTAGAAATCTGACTG
AATTCATTGGGATTCTCAAATTGATTTGCATCATGATCTAATCAATAACAAAGATA
AAATACTTGCAGCATTATCAACATCATCGTTAAACAAATTCGAAACACATGATTTAA
ATTTAGGAAGAGTAAAAGCTGACATTTTTGAACTTGGACATCATTGCAAACCAAATT
ATATTTTATCAAAATCATTGGCAACCGGCATCAAAAATTTTCCAGTGTAAGTGGTGCA
ATGTAAAGTATGCATTTAGAGATATGGATTGGAAGATGGAATCAATGTATAATGAAC
TCTTAAGTTTTCTACAGTCCTGTTACAAAAGTAATGTTAATGTAGGGCATTGTAGTTC
AATTGAAAGTGTTTATCCACTAGTCAAAGATATGCTTTGGCATTCAATTACAAAATAT
ATTGATCAAACCTATTGAGAAATTATTTGATGCAATGAATCCGGTGCAAGTGAATGAG
CAACTTGTAATTAACCTTCTATTGGCAAATAGATATCGCTCTGTACACTCACATCAAAA
TGATACTAAAACTGAAGCTCTTCCGTTTACTTTTACACTTAACCAGTTCAATTCTAT
AATTAAGGGAATCATTAAACCAATGGTGTGACGTCGCTGAATTGGATCTTTTACCGTT
ATGCACTGAACAAACCGACAAATTGGTTAACTGAAAGAAGAAGGGAAACTGTCTG
AAGAGTATGAGCTCCTAATCTCGGATTCCGAAGACGACGACTGA

图 9A 和 9B

C.

GGCTCGACTC CGTGGCCTGG AGGCTAAGCG AACGGGTTGG GCTGCGCGTG
TACCCCGGTTTCGAATCTCGA ATCAGGCTGG AGCCGCAGCT AACGTGGTAC
TGGCACTCCC GTCTCGACCCAGGCCTGCAC AAAACCTCCA GGATACGGAG
GCGGGTCG

图 9C