



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110923181 A

(43)申请公布日 2020.03.27

(21)申请号 201911071187.3

(22)申请日 2013.10.17

(30)优先权数据

12306279.6 2012.10.17 EP

(62)分案原申请数据

201380053317.5 2013.10.17

(83)生物保藏信息

CNCM I-3585 2006.03.09

(71)申请人 国立健康与医学研究所

地址 法国巴黎

申请人 里尔巴斯德研究所 里尔大学

(72)发明人 卡米尔·洛赫特

纳塔利·米耶尔卡雷克

哈娜·卡芒

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 李敏春 郑霞

(51)Int.Cl.

C12N 1/21(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

权利要求书1页 说明书22页  
序列表5页 附图2页

(54)发明名称

新颖重组博德特氏菌菌株

(57)摘要

本发明涉及新颖重组博德特氏菌菌株。本发明提供了一种遗传学上减毒的百日咳博德特氏菌菌株,其包含突变的百日咳毒素(ptx)基因和异源amp G基因并且对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和不同于FHA的一种异源表位或抗原蛋白质或蛋白质片段的杂合蛋白质进行表达,其中编码天然FHA蛋白质的基因是失活的。本发明进一步提供用于治疗粘膜或全身性感染性疾病的活减毒疫苗,包含如上所定义的百日咳博德特氏菌菌株。本发明还涉及用于预防哺乳动物的感染性疾病的方法以及用于增强哺乳动物对病原体的免疫反应的方法,包含向所述哺乳动物给予有效量的疫苗,该疫苗包含如上所定义的百日咳博德特氏菌菌株。

1. 一种百日咳博德特氏菌菌株, 该菌株包含缺失的皮肤坏死毒素 (dnt) 基因和编码包含丝状血凝素 (FHA) 的N-端片段和异源抗原的杂合蛋白质的基因, 其中编码所述杂合蛋白质的基因被插入在缺失的dnt基因的基因座, 并且该百日咳博德特氏菌菌株缺乏天然FHA蛋白质。

2. 如权利要求1所述的百日咳博德特氏菌菌株, 其中该百日咳博德特氏菌菌株包含编码突变的百日咳毒素 (ptx) 基因的基因, 所述突变的百日咳毒素 (ptx) 基因包含至少一种产生酶失活的蛋白质的突变, 所述酶失活的蛋白质仍保持免疫原性特性。

3. 如权利要求1所述的百日咳博德特氏菌菌株, 其中该百日咳博德特氏菌菌株包含编码取代天然ampG基因的异源ampG基因的基因。

4. 如权利要求3所述的百日咳博德特氏菌菌株, 其中所述异源ampG基因来自大肠杆菌 (E.Coli)。

5. 如权利要求1所述的百日咳博德特氏菌菌株, 其中该异源抗原包含由造成呼吸道感染的病原体表达的蛋白的至少一个表位。

6. 如权利要求1所述的百日咳博德特氏菌菌株, 其中该杂合蛋白质包含被融合到甲型流感病毒的基质蛋白 (Me2) 的细胞外域的FHA的N-端片段。

7. 如权利要求1所述的百日咳博德特氏菌菌株, 其中该杂合蛋白质包含被融合到甲型流感病毒的基质蛋白 (Me2) 的细胞外域的三个拷贝的FHA蛋白质的N-端片段。

8. 如权利要求1所述的百日咳博德特氏菌菌株, 其中该杂合蛋白质包含被融合到呼吸道合胞病毒 (RSV) 的G蛋白的至少一个抗原片段的FHA蛋白质的该N端片段。

9. 如权利要求1所述的百日咳博德特氏菌菌株, 其中该杂合蛋白质包含被融合到肺炎链球菌的PcsB蛋白质的一种抗原片段的FHA蛋白质的N-端片段。

## 新颖重组博德特氏菌菌株

[0001] 本申请是申请日为2013年10月17日,申请号为201380053317.5,发明名称为“新颖重组博德特氏菌菌株”的申请的分案申请。

### 技术领域:

[0002] 本发明涉及对一种异源蛋白质进行表达的新颖遗传学上减毒的百日咳博德特氏菌菌株和其作为疫苗,即用于粘膜免疫接种的用途。

[0003] 本发明进一步涉及一种用于增加一种博德特氏菌菌株的免疫原性的方法。

### 背景技术:

[0004] 例如疫苗的经鼻递送等粘膜免疫接种具有多种优于经典肠胃外疫苗接种的优势。它们无针,不易受到污染,不太依赖于经过训练的医疗或辅助医务人员,可以诱导全身性和粘膜免疫性并且可能更适合于保护免受粘膜感染。

[0005] 但是,当经鼻提供时大部分抗原是不佳的免疫原并且需要添加有效的粘膜佐剂。最有效的粘膜佐剂之一是霍乱毒素或紧密相关的大肠杆菌不耐热肠毒素和其解毒衍生物。令人遗憾的是,将这种佐剂添加到经鼻疫苗配制品中已引起了贝尔麻痹(Bell's palsy)(穆施(Mutsch)等人,2004)并且因此不可以在人类中使用。

[0006] 本发明的作者最近研发了一种对抗百日咳的经鼻的活减毒候选疫苗(米埃尔卡雷克(Mielcarek)等人,2006),该疫苗现在成功地完成首次人体I期安全试验(索斯滕松(Thorstensson)等人,准备中)。这一候选疫苗的概念是基于以下发现:通过气雾剂暴露的百日咳博德特氏菌自然感染甚至在极幼小婴儿中也能够诱导强烈的全身性B和T细胞反应(马斯卡特(Mascart)等人,2003),以及粘膜免疫性。此外,在非人类灵长类动物中的先前研究得出了“抗百日咳的最终保护可能最佳由活百日咳博德特氏菌接种产生”(黄(Huang)等人,1962)的结论。

[0007] 百日咳博德特氏菌菌株是基于百日咳博德特氏菌毒性的分子机制的知识(洛赫特(Locht)等人,2001)减毒的并且通过在遗传学上使百日咳毒素失活,通过使皮肤坏死毒素基因缺失并且通过将百日咳博德特氏菌的ampG基因交换成大肠杆菌ampG,由此消除气管细胞毒素的产生来构建。在临床前模型中,这一名为BPZE1的候选疫苗显示极好的安全性(米埃尔卡雷克等人,2006,2010;斯凯利(Skerry)等人,2009;卡瓦纳(Kavanagh)等人,2010;李(Li)等人,2010)并且在单一经鼻给予后诱导快速、强烈且持久的免疫性(弗努(Feunou)等人,2010)。

[0008] 此外,出人意料地发现,当向小鼠经鼻给予时,BPZE1菌株能够引发抵抗气道的过敏和发炎病状(即哮喘)并且还抵抗异位性过敏的保护性反应。

[0009] 雷夫诺(Reveneau)等人披露一种缺乏毒素产生并且对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和保护性破伤风毒素片段C(TTFC)的杂合蛋白质进行表达的遗传学上减毒的博德特氏菌菌株,该菌株不生成成熟FHA。

[0010] 科彭斯(Coppens)等人披露一种缺乏毒素产生并且对包含丝状血凝素(FHA)的N-

端片段和脑膜炎双球菌的TbpB的杂合蛋白质进行表达的遗传学上减毒的博德特氏菌菌株,该菌株不产生成熟FHA。

[0011] 阿隆索(Alonso)等人披露一种缺乏毒素产生并且对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和不可分型流感嗜血杆菌的HtrA蛋白质的杂合蛋白质进行表达的遗传学上减毒的博德特氏菌菌株,该菌株不产生成熟FHA

[0012] US 6 841 358披露一种缺乏毒素产生并且对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和曼氏裂体吸虫的Sm28 GST的一种模式肽的杂合蛋白质进行表达的遗传学上减毒的博德特氏菌菌株,该菌株缺乏成熟FHA的产生

[0013] 但是,出于增加免疫原性的目的,fhaB基因不缺失,而缺失仅仅是巧合并且是用作异源抗原产生的载体的菌株的固有特征。

[0014] 随后BPZE1被认为是表达异源保护性抗原的一种载体,以便研发出能够同时抵抗数种不同病原体的多价经鼻疫苗。来自肠道病毒71的中和肽SP70被BPZE1作为与丝状血凝素(FHA)的杂合蛋白质并且使用FHA的分泌机制暴露表面和分泌(胡(Ho)等人,2008)。类似地,FHA机制也用于通过BPZE1分泌并且暴露来自甲型流感病毒的基质蛋白2的胞外域(李(Li)等人,2011)。尽管全身和局部IgG和IgA反应可以在给予重组BPZE1衍生物后引发到异源抗原,但对过客抗原的免疫反应通常最多是适度的。

#### 发明内容:

[0015] 在试图解决用BPZE1构建体获得的不佳免疫原性的问题时,诸位发明人意外地发现,当编码天然存在的FHA蛋白质的天然fhaB基因缺失或者以其他方式失活时免疫原性可以显著增加。

[0016] 此外,尽管如通过其抗哮喘和过敏疾病的活性所证明的百日咳博德特氏菌的天然减毒菌株的消炎特性,由此获得的菌株显示实质上增加的免疫原性。因此本发明解决了用于粘膜应用的疫苗的问题,它安全并且能够引发一种针对一种造成全身性或粘膜感染的病原体,包括造成上呼吸道或下呼吸道感染的病原体中存在的抗原的有效免疫反应。

[0017] 本发明提供一种遗传学上减毒的重组百日咳博德特氏菌菌株,该菌株包含一种突变的百日咳毒素(ptx)基因和一种异源ampG基因并且对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和不同于FHA的一种异源表位或抗原蛋白质或蛋白质片段的一种杂合蛋白质进行表达,其中编码天然FHA蛋白质的基因是失活的。

[0018] 本发明进一步提供一种用于治疗粘膜感染性疾病的活减毒疫苗,该活减毒疫苗包含如上所定义的百日咳博德特氏菌菌株,意图引发一种针对造成粘膜(即上呼吸道或下呼吸道)感染的一种病原体的免疫反应。

[0019] 本发明还涉及一种用于预防一种哺乳动物中一种感染性疾病的方法,该方法包括向所述哺乳动物给予有效量的疫苗,该疫苗在一种适合的媒剂中包含一种遗传学上减毒的百日咳博德特氏菌菌株,该菌株包含一种突变的百日咳毒素(ptx)基因和一种异源ampG基因,对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和不同于FHA的一种异源表位或抗原蛋白质或蛋白质片段的一种杂合蛋白质进行表达,其中编码天然FHA蛋白质的基因是失活的。

[0020] 在另一个方面,本发明进一步提供用于使一种哺乳动物免于被感染粘膜(即下呼吸道或上呼吸道)的一种病原体感染和/或在一种哺乳动物中引发针对这类病原体的一种

免疫反应的方法,该方法使用本发明的组合物或疫苗。

[0021] 在再另一个方面,本发明提供一种在一种哺乳动物中引发一种针对一种具有粘膜趋向性的病原体的免疫反应的方法,该方法包括:向该哺乳动物给予一种重组减毒百日咳博德特氏菌菌株,其中该突变的百日咳博德特氏菌菌株包含一种突变的百日咳毒素(ptx)基因和一种异源ampG基因并且对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和免疫反应被寻求用来抵抗的病原体的一种异源表位或抗原蛋白质或蛋白质片段的一种融合蛋白质进行表达,其中在所述重组菌株中,编码天然FHA蛋白质的基因是失活的。

[0022] 在另一个方面,除突变的百日咳毒素(ptx)基因和异源ampG基因以外,重组菌株进一步包含一种缺失或突变的皮肤坏死毒素(dnt)基因。在一些这类方面,野生型博德特氏菌菌株ampG基因经其他革兰氏阴性细菌的一种ampG基因,例如大肠杆菌ampG基因替换。

[0023] 在其他方面,ptx基因的突变包含与底物结合相关的一种氨基酸和/或与催化相关的一种氨基酸的取代。在一些这类方面,与底物结合相关的氨基酸的取代包含R9K,并且与催化相关的氨基酸的取代包含E129G。在一些方面,百日咳博德特氏菌菌株包含一种三重突变菌株。在一些这类方面,博德特氏菌菌株是通过登录号CNCM 1-3585鉴别的BPZE1菌株。

[0024] 在其他方面,方法进一步包括预防或治疗哺乳动物中的粘膜感染。在一些方面,百日咳博德特氏菌菌株在粘膜感染前给予。在一些这类方面,百日咳博德特氏菌菌株在粘膜感染前约6周或更多周给予。在其他这类方面,百日咳博德特氏菌菌株在粘膜感染前约12周或更多周给予。在一些方面,造成粘膜感染的病原体是流感病毒、呼吸道合胞病毒或肺炎链球菌。

[0025] 在一些其他方面,向需要抵抗一种粘膜感染的保护性免疫的一种哺乳动物给予菌株。在一些方面,哺乳动物是人类。

[0026] 在再另一个方面,本发明提供一种用于增强一种哺乳动物对病原体的免疫反应的方法,该方法包括将基于一种博德特氏菌重组载体的一种疫苗给予,其中所述博德特氏菌对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和免疫反应被寻求用来抵抗的所述病原体的一种异源表位或抗原蛋白质或蛋白质片段的一种融合蛋白质进行表达,并且其中在所述重组菌株中,编码天然FHA蛋白质的基因是失活的。

[0027] 博德特氏菌菌株优选地是一种百日咳博德特氏菌菌株,但也可以是一种其他博德特氏菌物种,例如支气管炎博德特氏菌或副百日咳博德特氏菌

[0028] 博德特氏菌菌株有利地包含上文对于BPZE1所述的特征并且可以呈抵抗如上所述的一种病原体的一种药物或兽医疫苗形式给予。

[0029] 具体地,本申请提供了以下内容:

[0030] 1. 一种遗传学上减毒的百日咳博德特氏菌菌株,该菌株包含一种突变的百日咳毒素(ptx)基因和一种异源ampG基因并且对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和不同于FHA的一种异源表位或抗原蛋白质或蛋白质片段的杂合蛋白质进行表达,其中编码该天然FHA蛋白质的基因是失活的。

[0031] 2. 如项目1所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中编码该天然FHA蛋白质的该基因部分或完全缺失。

[0032] 3. 如项目1或2所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中该FHA蛋白质的该N-端片段包含从位置1到862,优选地从位置1到330的氨基酸,开始于FhaB前蛋白的第一个氨基酸。

- [0033] 4.如项目1到3中任一项所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中编码该毒素的该基因包含至少一种产生酶失活的蛋白质,仍保持免疫原性特性的突变。
- [0034] 5.如项目1到4中任一项所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中该ampG基因被一种异源基因ampG基因替换,产生小于5%的残余TCT活性。
- [0035] 6.如项目5所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中该异源ampG基因来自大肠杆菌。
- [0036] 7.如项目1到6中任一项所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中编码百日咳博德特氏菌皮肤坏死毒素(Dnt)的该基因突变或缺失。
- [0037] 8.如项目1到7中任一项所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中该菌株是通过登录号CNCM 1-3585鉴别的BPZE1。
- [0038] 9.如项目1到8中任一项所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中该异源蛋白质包含由造成上呼吸道或下呼吸道感染的病原体表达的一种蛋白质的至少一个表位。
- [0039] 10.如项目1到9中任一项所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中该杂合蛋白质包含被融合到甲型流感病毒的基质蛋白(Me2)细胞外域的FHA的该N-端片段。
- [0040] 11.如项目1到9中任一项所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中该杂合蛋白质包含被融合到甲型流感病毒的基质蛋白(Me2)细胞外域的三个拷贝的该FHA蛋白质的该N-端片段。
- [0041] 12.如项目1到9中任一项所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中该杂合蛋白质包含被融合到呼吸道合胞病毒(SRV)的G蛋白的至少一个抗原片段的该FHA蛋白质的该N端片段。
- [0042] 13.如项目1到9中任一项所述的百日咳博德特氏菌菌株,其中该杂合蛋白质包含被融合到肺炎链球菌的PcsB蛋白质的一种抗原片段的该FHA蛋白质的该N-端片段。
- [0043] 14.一种用于治疗粘膜或全身性感染性疾病的活减毒疫苗,该活减毒疫苗包含如项目1到13中任一项所定义的百日咳博德特氏菌菌株。
- [0044] 15.一种用于治疗粘膜或全身性感染性疾病的活减毒疫苗,该活减毒疫苗包含如项目1到14中任一项所述的百日咳博德特氏菌菌株,用于引发一种针对被造成所述粘膜或全身性感染性疾病的一种病原体表达的所述异源蛋白质的免疫反应。
- [0045] 16.如项目14或1所述的活减毒疫苗,其中该疫苗经鼻内或通过吸入来给予。
- [0046] 17.一种用于增强哺乳动物对病原体的免疫反应的方法,该方法包括向所述哺乳动物给予基于一种博德特氏菌重组载体的一种疫苗,其中所述博德特氏菌对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和免疫反应被寻求用来抵抗的所述病原体的一种异源表位或抗原蛋白质或蛋白质片段的一种融合蛋白质进行表达,并且其中在所述重组菌株中,编码该天然FHA蛋白质的该基因是失活的。
- [0047] 18.如项目17所述的方法,其中该博德特氏菌菌株是一种百日咳博德特氏菌菌株、一种副百日咳博德特氏菌或一种支气管炎博德特氏菌菌株。

#### 附图说明:

- [0048] 图1.在给予所指示的BPZE1衍生物后的血清抗M2e IgG反应。
- [0049] 图2.在给予所指示的BPZE1衍生物后的血清抗<sub>G<sub>RSV</sub></sub> IgG反应。
- [0050] 图3.在给予所指示的BPZE1衍生物后的血清抗PcsB IgG反应。

**具体实施方式：****[0051] 定义：**

[0052] 在整个说明书中，使用数个术语并且被定义于以下段落中。

[0053] 如在此所用，缩写“PTX”是指百日咳毒素，百日咳毒素是一种分泌出的ADP核糖基化毒素。PTX包含五个不同子单元(名为S1-S5)，其中每个复合物都含有两个S4拷贝和一个其他子单元拷贝。子单元以A-B结构安排。A组分具有酶活性并且由S1子单元形成，而B组分是受体结合部分并且由子单元S2-S5构成。

[0054] 如在此所用，缩写“DNT”是指百日咳博德特氏菌皮肤坏死毒素，该毒素是一种在皮内注射时能够诱导小鼠和其他实验室动物中发生局部损伤的不耐热毒素。

[0055] 如在此所用，缩写“TCT”是指气管细胞毒素，该毒素是通过博德特氏菌合成的一种毒性因子。TCT是一种肽聚糖片段并且具有诱导白介素-1产生和一氧化氮合成酶的能力。它具有导致纤毛郁积的能力，并且对呼吸道上皮细胞具有致死作用。

[0056] 如在此所用，术语“融合蛋白质”或“杂合蛋白质”是指一种包含由FHA的N-端部分组成的一种第一蛋白质和连接到其上的一种第二蛋白质的蛋白质，其中第二蛋白质包含不同于FHA的博德特氏菌的一种蛋白质，或优选地，来自造成粘膜或全身性感染的不同物种，即病毒、真菌以及细菌的一种蛋白质，或能够引发针对博德特氏菌或造成粘膜或全身性感染的物种的一种免疫反应的这类蛋白质的一种片段。

[0057] 术语“减毒”是指减弱的低毒性百日咳博德特氏菌菌株，它能够刺激一种免疫反应并且产生保护性免疫，但一般不会导致疾病。

[0058] 使用本发明的方法进行“治疗(treating或treatment)”包括预防症状在可能处于与如在此所述的一种疾病、症状或病症相关的一种疾病或病症增加的风险下，但是还没有经历或展现出症状的一名受试者中发作；抑制疾病或病症的症状(减缓或阻止其发展)；减轻一种疾病的症状或副作用(包括缓解性治疗)；以及减轻疾病的症状(引起消退)。治疗可以是预防性的(以预防或延迟疾病发作，或预防其临床或亚临床症状表现)或在疾病或病状显现后治疗性抑制或缓解症状。

[0059] 术语“保护”和“预防”在此处可以互换使用并且意指阻碍被一种毒性病原体感染。

[0060] 术语“免疫原性组合物”或“组合物”意指能够诱导一种免疫反应并且因此具有免疫原性的组合物。术语“免疫反应”意指免疫系统的任何反应。这些反应包括回应于抗原的一种有机体的免疫系统的活性变化并且可以涉及例如产生抗体、诱导细胞介导的免疫性、补体活化、产生免疫耐受性、产生免疫记忆或先天免疫活化。

[0061] 如在此所用，术语“疾病”具有本领域一般已知和理解的含义，并且包含一名宿主个体的功能或健康的任何异常状况。一名医疗专业人员对一种特定疾病的诊断可以通过直接检查和/或考虑一种或多种诊断测试的结果来进行。

[0062] 术语“经鼻给予”是指使得一种活性成分被推进或者以其他方式引入到一名个体的鼻道中以使得活性成分接触鼻腔的呼吸道上皮的任何形式的给予。经鼻给予也可以涉及接触嗅上皮，嗅上皮位于鼻腔顶部在中心鼻中隔与每个主要鼻道的侧壁之间。直接围绕嗅上皮的鼻腔区域无气流。因此，典型地必须采用特定的方法来实现跨越嗅上皮的显著吸收。

[0063] 术语“气雾剂”按其常规含义使用，是指在压力下由气体推进剂携带到治疗施用部位的非常精细的液滴或固体粒子。本发明的药物气雾剂含有可以溶解、悬浮或乳化于一种

流体载体和一种推进剂的一种混合物中的一种治疗活性化合物。气雾剂可以呈一种溶液、悬浮液、乳液、粉末或半固体制剂形式。本发明的气雾剂意图作为精细的固体粒子或作为液体喷雾经由受试者的呼吸道给予。可以使用不同类型的推进剂,包括(但不限于)烃类或其他适合气体。本发明的气雾剂也可以通过一种喷雾器进行递送,喷雾器在一种气体中产生具有实质上均匀尺寸的非常精细的液体粒子。优选地,含有活性化合物的一种液体被分散为液滴,它可以被气流携带出喷雾器并且进入患者的呼吸道。

[0064] 如在此所用,术语“哺乳动物”包括人类和非人类,并且包括(但不限于)人类、非人类灵长类、犬科、猫科、鼠科、牛科、马科以及猪科动物。

[0065] 术语“治疗有效量”是有效改善一种疾病的一种症状的量。鉴于预防可以被认为是治疗,治疗有效量可以是“预防有效量”。

[0066] 如此处所用,术语“包含(comprises/comprising)”、“包括(includes/including)”、“具有(has/having)”或其任何其他变化形式意图涵盖非排他性的包括。举例来说,包含一系列要素的工艺、方法、物品或设备不必仅限于那些要素,而可以包括其他未明确列出或该工艺或方法固有的要素。另外,除非明确相反地陈述,否则“或”是指包括性的或而不是排他性的或。举例来说,条件A或B是通过以下中的任何一项而得到满足:A是真的(或存在的)并且B是假的(或不存在的)、A是假的(或不存在的)并且B是真的(或存在的)以及A和B都是真的(或存在的)。

[0067] 如在此所用,当参考可测量的值(例如量、时距等等)时的“约”意指包涵指定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ ,更优选地 $\pm 5\%$ ,甚至更优选地 $\pm 1\%$ 以及再更优选地 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这些变化适合进行所披露的方法。

[0068] “受试者”意指人类。典型地,受试者是一名新生儿、一名婴儿或一名成人。

[0069] 应了解本发明不限于特定方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,当然这些可以变化。也应了解,在此使用的术语仅出于描述特定方面的目的,并且并不意图是限制性的。

[0070] 如本说明书和所附权利要求书中所使用,除非另外明确规定,否则单数形式“一个(种)(a及an)”和“该(这些)”包括多个指示物。因此,举例而言,提及“一种疫苗”包括两种或更多种疫苗的组合等等。

[0071] 本发明的作者已经通过使用FHA的N-端域将异源抗原携带到细菌表面和细胞外环境中并且通过消除原始FHA编码基因来产生一种用于百日咳博德特氏菌的最佳化异源表达系统。通过使用三种不同模型(甲型流感病毒、呼吸道合胞病毒以及肺炎链球菌),本发明提供了优于先前系统的免疫原性极大改善的论证。

[0072] 本发明提供一种重组减毒的百日咳博德特氏菌菌株,它可以用作一种免疫原性组合物或疫苗以在一种哺乳动物中引发一种免疫反应。

[0073] 根据一个第一方面,本发明提供一种遗传学上减毒的百日咳博德特氏菌菌株,该菌株包含一种突变的百日咳毒素(ptx)基因和一种异源ampG基因并且对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和不同于FHA的一种异源表位或抗原蛋白质或蛋白质片段的杂合蛋白质进行表达,其中编码天然FHA蛋白质的基因是失活的。

[0074] 优选地,编码天然FHA蛋白质的基因通过部分或完全缺失而失活。

[0075] 优选地,FHA蛋白质的N-端片段包含从位置1到862,更优选地从位置1到330的氨基酸,开始于如兰伯特-比西纳(Lambert-Busine)等人(1998)所定义的FhaB前蛋白的第一氨

基酸。

[0076] 缺乏气管细胞毒素 (TCT)、活性百日咳毒素 (PTX) 以及皮肤坏死毒素 (DNT) 的活减毒百日咳博德特氏菌疫苗已经描述于 WO 2007/104451 和米埃尔卡雷克等人 (2006) 中。

[0077] 百日咳博德特氏菌 ampG 基因可以被大肠杆菌 ampG 替换。所得菌株表达小于 1% 残余 TCT 活性。本发明中可以使用来自将极少量的肽聚糖片段释放到培养基中的革兰氏阴性细菌的任何异源 ampG 基因。适合异源 ampG 基因的实例包括 (但不限于) 来自大肠杆菌、沙门氏菌、肠杆菌科、假单胞菌、摩拉克氏菌、螺旋杆菌、寡养单胞菌、军团菌的 ampG 基因。

[0078] PTX 是一种造成百日咳博德特氏菌感染的全身效应的主要毒性因子并且由称为 S1 的一个酶活性部分和负责结合到靶细胞受体的一个部分构成。它也是主要保护抗原之一。天然 ptx 基因可以被编码一种酶失活毒素的一种突变型式替换。这可以通过在 S1 中用 Lys 替换 Arg-9 并且用 Gly 替换 Glu-129 实现, Arg-9 与 Glu-129 是分别与底物结合和催化相关的两个关键残基。可以使用等位基因交换来首先使 ptx 操纵子缺失并且随后插入突变型式。

[0079] 百日咳博德特氏菌培养上清液中相关毒素的存在可以通过免疫印迹分析检测。

[0080] 也可以进行其他突变, 例如美国专利 6,713,072 中描述的那些, 以及能够将毒素活性降低到不可检测水平的任何已知或其他突变。

[0081] 等位基因交换也可以用于去除 dnt 基因。尽管 DNT 在百日咳博德特氏菌毒性中的作用不确定, 但其已被鉴别为紧密相关的物种支气管炎博德特氏菌中的一种重要毒素并且在微量注射后展示致死活性。

[0082] TCT 负责毁坏被感染的宿主的气管中的纤毛细胞并且可以由此与咳嗽综合症相关。TCT 是肽聚糖在革兰氏阴性细菌的细胞壁中的分解产物, 这些细菌一般通过 AmpG 转运蛋白将 TCT 内化成细胞溶质, 以在细胞壁生物合成期间再利用。百日咳博德特氏菌 AmpG 在肽聚糖分解产物的内化中效率较低。

[0083] 在一个优选实施例中, 活减毒百日咳博德特氏菌疫苗是以编号 CNCM I-3585 在 2006 年 3 月 9 日通过国立微生物培养物保藏中心 (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, CNCM, 法国 F-75724 巴黎企业特投 15 博士大街 25 号巴斯德研究所 (Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, FRANCE)) 寄存的 BPZE1 菌株。

[0084] 在一个方面, 重组博德特氏菌菌株含有一种突变的 ptx 基因、一种缺失或突变的 dnt 基因以及一种异源 ampG 基因。异源 ampG 基因产物可以强烈地降低所产生的气管细胞毒素的量。突变的初始菌株可以是任何博德特氏菌菌株, 包括百日咳博德特氏菌、副百日咳博德特氏菌以及支气管炎博德特氏菌。在一个方面, 用于获得突变的博德特氏菌菌株的初始菌株是百日咳博德特氏菌。在另一个方面, 该菌株是一种三重突变博德特氏菌菌株。在另一个方面, 博德特氏菌菌株通过登录号 CNCM 1-3585 鉴别。在另一个方面, 博德特氏菌菌株通过登录号 V09/009169 鉴别。

[0085] 本发明不只限于上文所述的突变体。可以进行其他额外的突变, 例如缺乏腺苷酸环化酶 (AC) 的突变体, 缺乏脂多糖 (LPS) 的突变体、丝状血凝素 (FHA) 以及任一种 bvg 调节组分。

[0086] 有利的是, 已经通过至少部分地使编码毒素的基因消除或缺失, 或通过使其突变, 使博德特氏菌菌株缺乏毒素的产生, 以便产生失活毒素或根本不产生毒素。这类基因可以

特别是编码百日咳博德特氏菌毒素或与这类毒素具有结构或功能相似性的任何蛋白质的基因。它也可以是编码被博德特氏菌菌株表达的溶血素/腺苷酸环化酶毒素或皮肤坏死毒素或编码具有结构或功能相似性的蛋白质的基因。博德特氏菌菌株可能缺乏这些毒素中的一种或多种的产生。

[0087] 杂合蛋白质包含蛋白质FHA的一部分和相关蛋白质的至少部分。这种特定蛋白质可以由百日咳博德特氏菌物种的一种菌株表达,例如以编号I-1770在1996年10月8日在法国F-75724巴黎企业特投15博士大街28号的巴斯德研究所的国立微生物培养物保藏中心寄存的菌株BPNX,或百日咳博德特氏菌菌株通过登录号CNCM 1-3585鉴别或百日咳博德特氏菌菌株通过登录号V09/009169鉴别。

[0088] 所述杂合蛋白质可以特别由通过法国巴黎的国立微生物培养物保藏中心(CNCM)在布达佩斯条约下于2006年3月9寄存并且指定编号CNCM 1-3585的突变的BPZE1菌株来表达。

[0089] 根据本发明的一种菌株可以通过从表达所述杂合蛋白质的一种毒性菌株的基因组消除毒素的基因或通过部分缺失或通过突变来获得以便产生一种失活毒素。可以通过本领域的普通技术人员已知的任何方法并且特别通过将毒性菌株与移动菌株杂交,随后通过利用根据菌株适应的标记物选择具有毒素基因的细胞来进行消除。毒性菌株表达毒素的能力的此类损失由毒性菌株与移动菌株的质粒之间的同源重组的双重事件产生。关于减毒菌株的获得,本领域的普通技术人员可以参考安东尼和洛赫特(1990)描述的方法。

[0090] 如此选择的缺乏毒素产生的菌株的特征可以通过不同技术,特别是通过蛋白质印迹法检查。

[0091] 表达杂合蛋白质的无毒菌株可以通过本领域的普通技术人员已知的技术获得,并且具体地说,可以如上文提及的法国专利申请FR-94 04 661中所描述来获得,该法国专利申请的内容通过引用包括到本发明中。一方面包含编码一种异源肽的一种序列并且另一方面包含编码一部分FHA的一种序列的重组DNA通过本领域的普通技术人员已知,尤其如法国专利申请FR-94 04 661的实例V中所描述的方法获得。这一实例使得曼氏裂体吸虫的28kDa的谷胱甘肽-S-转移酶(Sm28GST)的区域190-211与截短的FHA蛋白质融合。对编码杂合蛋白质的重组DNA进行选择,根据本领域的普通技术人员已知的方法检查其序列,随后转移到博德特氏菌细胞中。

[0092] 关于本发明的实施,本领域的普通技术人员可以参考与这些技术相关的通用手册并且尤其参考以下手册:马尼亚迪斯等人,1982,分子克隆:实验室手册,冷泉港实验室,纽约冷泉港,美国(Maniatis et al.,1982,Molecular Cloning:Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor N.Y.,USA),或其最近再版之一。

[0093] 序列包括到杂合蛋白质中的异源蛋白质可以是任何抗原蛋白质序列,尤其是博德特氏菌、链球菌、志贺氏菌、奈瑟氏菌、嗜血杆菌、摩拉克氏菌、弧菌、埃希氏菌、包柔氏螺旋体菌、分枝杆菌抗原;白喉、破伤风或霍乱毒素或类毒素;病毒抗原,包括流感、RSV、乙型肝炎、丙型肝炎、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒或HIV;或寄生虫抗原,例如疟原虫(Plasmodium)、裂体吸虫或弓浆虫(Toxoplasma)的抗原。它还可以包括在粘膜感染或全身性感染后能够由病原体表达的一种蛋白质的一种表位。

[0094] 有利的是,异源蛋白质是甲型流感病毒的M2基质蛋白的全部或一部分。

[0095] 在本发明的一个优选实施例中,异源蛋白质是M2蛋白质的细胞外域。

[0096] 在另一个实施例中,异源蛋白质是RSV的G蛋白的全部或一部分,即从氨基酸残基170延伸到197,含有B细胞和T细胞表位的蛋白质(尤斯波夫等人,2005;瓦尔加等人,2000)中。

[0097] 在再另一个实施例中,异源蛋白质是作为肺炎链球菌的一种广泛交叉反应性疫苗抗原(吉芬(Giefing)等人,2008)的PcsB蛋白质的全部或一部分

[0098] 本发明的突变的博德特氏菌菌株的构建可以始于用一种异源ampG基因替换该菌株中的博德特氏菌ampG基因。在本发明中可以使用本领域中已知的任何异源ampG基因。这些的实例可以包括每代将极少量的肽聚糖片段释放到培养基中的所有革兰氏阴性细菌。革兰氏阴性细菌的实例包括(但不限于):大肠杆菌、沙门氏菌、肠杆菌科、假单胞菌、摩拉克氏菌、螺旋杆菌、寡养单胞菌、军团菌等等。典型地,通过用一种异源ampG基因替换博德特氏菌ampG基因,所得菌株中产生的气管细胞毒素(TCT)的量表达小于1%残余TCT活性。在另一个方面,由所得菌株表达的TCT毒素的量在约0.6%到1%残余TCT活性或约0.4%到3%残余TCT活性或约0.3%到5%残余TCT活性之间。

[0099] PTX是一种造成百日咳博德特氏菌感染的全身效应的主要毒性因子,也是主要保护抗原之一。由于其特性,天然ptx基因可以被突变型式替换,以使得酶活性部分S1被一种酶失活子单元替换,但是百日咳毒素的免疫原性特性不受影响。这可以通过用赖氨酸(Lys)替换在序列位置9处的精氨酸(Arg)(R9K)来实现。此外,可以用甘氨酸(Gly)替换在位置129处的谷氨酸(Glu)(E129G)。这些氨基酸位置分别与底物结合和催化相关。在其他方面,也可以进行其他突变,例如美国专利第6,713,072号描述的那些,该美国专利通过引用结合在此;以及能够降低毒素活性的任何已知或其他突变。在一个方面,可以首先使用等位基因交换来使ptx操纵子缺失并且随后插入一种突变型式。

[0100] 在本发明的另一个方面,可以使用等位基因交换将dnt基因从博德特氏菌菌株中去除。除了全部去除外,酶活性也可以通过一种点突变来抑制。因为DNT由N-端区中的一个受体结合域和C-端部分中的一个催化域构成,所以dnt基因中将Cys-1305替换成Ala-1305的一种点突变抑制DNT的酶活性(柏本(Kashimoto)等人,1999)。

[0101] 可以通过使用本领域中众所周知的程序插入一种基因序列或质粒来将编码杂合蛋白质的转基因插入如以上所定义的突变菌株中。

[0102] 有利的是,编码异源蛋白质或其表位片段的基因以单个或多个拷贝形式融合到FHA的N-端部分的编码序列。

[0103] 转基因有利地通过使用含有dnt基因的上游和下游区的质粒进行等位基因交换而插入百日咳博德特氏菌的dnt基因座中,如米埃尔卡雷克等人(2006)关于dnt基因的缺失所描述。

[0104] 本发明的重组博德特氏菌菌株可以用于免疫原性组合物中以治疗或预防粘膜感染。这些免疫原性组合物适用于在哺乳动物中产生免疫反应,或是一种抗体反应或是一种T细胞反应。举例来说,T细胞或抗体反应可以使得它保护哺乳动物免受流感、RSV、肺炎链球菌或其他感染或免受这些感染的后果/疾病/症状。

[0105] 本发明的突变的博德特氏菌菌株可以用于疫苗或免疫原性组合物。在一个方面,这些菌株用于经鼻给予。

[0106] 本发明的组合物可以与其他免疫调节剂一起给予,这些免疫调节剂包括佐剂,不过添加一种佐剂不是优选的。

[0107] 在另一个方面,本发明进一步提供用于使一种哺乳动物免于被感染粘膜(即下呼吸道或上呼吸道)的一种病原体感染和/或在一种哺乳动物中引发针对这类病原体的一种免疫反应的方法,该方法使用本发明的组合物或疫苗。

[0108] 在再另一个方面,本发明提供在一种哺乳动物中引发针对具有粘膜趋向性的一种病原体的一种免疫反应的一种方法,该方法包括:给予一种重组百日咳博德特氏菌菌株,该菌株包含一种突变的百日咳毒素(ptx)基因和一种异源ampG基因并且对包含丝状血凝素(FHA)的N-端片段和不同于FHA的一种异源表位或抗原蛋白质或蛋白质片段的一种融合蛋白质进行表达,其中编码天然FHA蛋白质的基因是失活的。

[0109] 在一个方面,重组菌株包含一种突变的百日咳毒素(ptx)基因、一种缺失或突变的皮肤坏死(dnt)基因以及一种异源ampG基因在一些这类方面,野生型博德特氏菌菌株ampG基因经其他革兰氏阴性细菌的一种ampG基因,例如大肠杆菌ampG基因替换。

[0110] 在其他方面,ptx基因的突变包含与底物结合相关的一种氨基酸和/或与催化相关的一种氨基酸的取代。在一些这类方面,与底物结合相关的氨基酸的取代包含R9K,并且与催化相关的氨基酸的取代包含E129G。在一些方面,博德特氏菌菌株包含一种三重突变菌株。在一些这类方面,博德特氏菌菌株是通过登录号CNCM 1-3585鉴别的BPZE1菌株。

[0111] 在其他方面,方法进一步包括预防或治疗一种哺乳动物中的粘膜感染。在一些方面,博德特氏菌菌株在粘膜感染前给予。在一些这类方面,博德特氏菌菌株在粘膜感染前约6周或更多周给予。在其他这类方面,博德特氏菌菌株在粘膜感染前约12周或更多周给予。在一些方面,造成粘膜感染的病原体是流感病毒、呼吸道合胞病毒或肺炎链球菌。

[0112] 在一些其他方面,向需要抵抗粘膜或全身性感染的保护性免疫的一种哺乳动物给予菌株。在一些方面,哺乳动物是人类。

[0113] 用于治疗或预防与粘膜或全身性感染相关的疾病的方法包括给予治疗有效量的一种本发明的组合物。本发明的组合物可以呈药物组合物形式配制。除了一种或多种菌株外,这些组合物可以包括一种药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂,或本领域技术人员众所周知的其他材料。这些材料典型地应该是无毒的,并且典型地不应当干扰活性成分的功效。

[0114] 组合物可以典型地用于引发粘膜免疫性。在其他方面,对每剂中的细菌数目进行调整以在一种哺乳动物中达到一种有效的免疫反应。每剂中的细菌或cfu的数目可以是约1、10、100、1000、10000、100000、1000000、 $5 \times 10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 或更多或所述每个剂量之间的任何剂量。

[0115] 本发明的疫苗的配制品可以使用领域认可的方法来实现。向受试者给予的本发明疫苗的量 and 给予方案可以根据药物和兽医领域的技术人员众所周知的标准技术,考虑例如佐剂(如果存在),特定受试者的年龄、性别、体重、物种以及状况,以及给予途径等因素来确定。疫苗的给予通常呈单一剂量。或者,本发明疫苗的给予进行第一次(初始疫苗接种),随后用疫苗进行至少一次再接种(随后给予)。

[0116] 典型地疫苗可以通过经鼻给予或通过吸入来给予。这种类型的给予成本低并且允许通过呼吸道的本发明的活减毒百日咳博德特氏菌疫苗定殖。经鼻给予可以用活减毒百日

咳博德特氏菌疫苗在液体溶液、悬浮液、乳液的形式下实现。溶液和悬浮液以液滴形式给予。溶液也可以呈来自经鼻喷雾瓶或来自经鼻吸入器的细雾形式给予。对于一种应用,凝胶分配于含有所需剂量的小针筒中。吸入可以用一种活减毒百日咳博德特氏菌疫苗在溶液、悬浮液以及粉末的形式下实现;这些配制品借助一种气雾剂、液滴或一种干粉吸入器给予。粉末可以用吹入器或吹药器给予。

[0117] 在可获得的不同粘膜递送选择方案中,鼻内途径是最实际的,因为它提供了使用已经大量生产的相对简单装置的容易方式。本发明的组合物由此优选地适用于和/或包装用于例如通过经鼻喷雾、经鼻液滴、凝胶或粉末来鼻内给予。

[0118] 无论递送的途径如何,本发明的组合物都优选地以单位剂型包装。可以按常规来确定有效剂量。用于注射或用于鼻内用途的组合物的一种典型人类剂量具有0.1ml-1.0ml之间的体积,例如两份500 $\mu$ l喷雾,每个鼻孔一份。

[0119] 本发明的组合物优选地例如在pH 6与pH 8之间,一般大约pH 7下缓冲。

[0120] 本发明将通过以下图式和实例进一步说明。但是,这些实例和图式不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

[0121] 图式:

[0122] 图1.在给予所指示的BPZE1衍生物后的血清抗M2e IgG反应。BALB/c小鼠以4周时间间隔用指示的菌株的 $10^7$ 个CFU鼻内免疫两次。经磷酸盐缓冲盐水(PBS)疫苗接种的小鼠充当阴性对照。在最后一次免疫接种两周后收集血清,并且通过ELISA测量对M2e的血清IgG反应。

[0123] 图2.在给予所指示的BPZE1衍生物后的血清抗GRSV IgG反应。BALB/c小鼠以4周时间间隔用指示的菌株的 $10^7$ 个CFU鼻内免疫两次。经磷酸盐缓冲盐水疫苗接种的小鼠(未处理)充当阴性对照。在最后一次免疫接种两周后收集血清,并且通过ELISA测量对GRSV的血清IgG反应。

[0124] 图3.在给予所指示的BPZE1衍生物后的血清抗PcsB IgG反应。BALB/c小鼠以4周时间间隔用指示的菌株的 $10^7$ 个CFU鼻内免疫两次。在最后一次免疫接种两周后收集血清,并且通过ELISA测量对PcsB的血清IgG反应。

[0125] 实例:

[0126] 材料与amp;方法

[0127] 细菌菌株和生长条件。用于这项研究的百日咳博德特氏菌菌株列于表1中。它们在37 $^{\circ}$ C下于补充有1%甘油、20%去纤维蛋白的羊血以及100 $\mu$ g/ml链霉素(密苏里州圣路易斯的西格马化学公司(Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.))的鲍-金(Bordet-Gengou)琼脂(密歇根州底特律的蒂夫科(Difco, Detroit, Mich.))上生长72h。百日咳博德特氏菌的液体培养物如先前所述(梅诺齐(Menozzi)等人,1991)在含有1克/升的七(2,6-二邻甲基) $\beta$ -环糊精(西格马)的斯坦纳-斯科尔特(Stainer-Scholte)培养基(斯坦纳和斯科尔特,1970)中培育。

[0128] 质粒和重组BPZE1菌株的构建。此处描述的不同BPZE1衍生物都在BPZE1的dnt基因座中含有转基因,该转基因通过使用衍生自pJQmp200rpsL12(科万特和海因斯(Quandt and Hynes),1993)并且含有dnt基因的上游和下游区的质粒进行等位基因交换来插入,如(米埃尔卡雷克等人2006)关于BPZE1中dnt基因的缺失所描述。

**[0129] pXR1的构建**

**[0130]** 首先,通过使用引物SP Xba mut5'-GCATGCCTGCAGGTCGACTCCAGAGGATCCCCGGGTACCG-3' (SEQ ID NO:3)和ASP Xba mut5'-CGGTACCCGGGGATCCTCTGGAGTCGACCTGCAGGCATGC-3' (SEQ ID NO:4)以及**QuickChangeII®XL** (斯曲杰公司 (Stratagen) 根据制造商的说明书将名为pJQdntUPL0的这种质粒 (米埃尔卡雷克等人, 2006) 的主链的XbaI位点从TCTAGA (SEQ ID NO:1) 改变成TCCAGA (SEQ ID NO:2)。将名为pXR1的所得质粒的dnt上游和dnt下游区测序。注意到dnt下游区中的一个突变G→A (对应于百日咳博德特氏菌基因组 (基因银行NC-002929.2) 的位置3,651,839)。

**[0131] pXR1-Fha44的构建**

**[0132]** 从尤捷泰 (Eurogentec) (比利时列日 (Liege, Belgium)) 购买编码fhaB基因的5'部分的一种合成基因。除四个沉默变化 (G354C、C864G、G2,331C以及A2,556G)、具有序列5'-CTTAAGACGCGTCATATGGGCGGCCGC-3' (SEQ ID NO:5) 的一个27-bp多克隆位点以及两个TGA末端密码子以外,名为fha44c的这个基因含有对作为FHA (核苷酸位置253到2,835,基因银行M60351.1) 的前驱体的FhaB的氨基酸1到861进行编码的2,583个bp。这个序列被提供在名为pUC57-Fha44c的质粒中。这一质粒用XhoI和XbaI消化,并且对应于fha44c的片段被插入XhoI/XbaI消化的pXR1中。所得质粒pXR1-Fha44由此含有在dnt基因的ATG起始密码子上游的813-bp区 (百日咳博德特氏菌基因组 (基因银行NC-002929.2) 的位置3,646,310到位置3,647,122), 编码载体蛋白Fha44的区域融合到27-bp多克隆位点,随后两个TGA末端密码子;在dnt基因的TGA末端密码子下游的83-pb区 (百日咳博德特氏菌基因组 (基因银行NC-002929.2) 的位置3,651,479到位置3,651,564); XbaI限制性位点以及pXR1的712-pb dnt下游区 (与百日咳博德特氏菌基因组 (基因银行NC-002929.2) 的位置3,651,565到位置3,652,276的序列一致,除存在于pXR1中的对应于百日咳博德特氏菌基因组 (基因银行NC-002929.2) 位置3,651,839的G→A突变以外)。将质粒测序以确认不存在意外的突变。

**[0133] 表达Fha44-M2e的BPZE1衍生物的构建**

**[0134]** 编码M2e肽的3个拷贝的序列通过PCR从含有M2e的三个串联拷贝的编码信息的pGA4-3M2e (来自基因技术AG) 来扩增。pGA4-3M2e中的每个M2e拷贝由SGSGSGGS隔开并且M2e中位置17和19处的半胱氨酸密码子被丝氨酸替换。寡核苷酸5'-ACGCGTGTGGAACTCCTATCCG-3' (SEQ ID NO:6) 和5'-CATATGGCCGCCAGAGCCGCTATCAGAGCTATCGTT-3' (SEQ ID NO:7) 用作引物。扩增DNA片段随后被插入PCR II-TOPO (英杰公司 (Invitrogen)) 中并且通过DNA测序来验证。将在MluI/NdeI消化后获得的273-bp片段克隆到pXR1-Fha44的MluI/NdeI位点中以产生pHKG3。将这一质粒测序以验证不必要的改变不存在并且通过转化来引入到大肠杆菌SM10 (西蒙等人, 1983) 中,并且将所得重组大肠杆菌SM10细菌与BPZE1结合。如所描述 (斯蒂比兹 (Stibitz), 1994) 选择两个连续同源重组事件。重组菌株随后通过PCR分析以鉴别其中杂合基因恰当地插入dnt基因座中的克隆。重组BPZE1菌株被称为BPZM2e。

**[0135]** 为了构建BPZEM2e-ΔFha, 一种缺乏FHA的重组菌株, 如先前描述 (安东尼等人, 2000) 使用整合载体pFUS2使FHA编码基因在BPZM2e中失活。

**[0136] 表达Fha44-GRSV的BPZE1衍生物的构建**

**[0137]** 根据百日咳博德特氏菌密码子使用来合成对RSV菌株A2 (基因银行AAC55969.1) 的

糖蛋白的氨基酸170到197进行编码的寡核苷酸并且具有以下序列：

[0138] 5'-TTCGTGCCGTGCTCGATCTGCTCGAACAACCCGACCTGCTGGGCCATCTGCAAGCGCATCCCGAA  
CAAGAAGCCGGCAAGAAG-3' (SEQ ID NO:8)。

[0139] 其通过PCR使用100nM重叠寡核苷酸

[0140] 5'-AGGATCCTTCGTGCCGTGCTCGATCTGCTCGAACAACCCGACCTGCTGGGCCATCTGCAAGCGC  
AT-3' (SEQ ID NO:9) 和

[0141] 5'-AGGATCCCTTCTTGCCCGGCTTCTTGTTCCGGATGCGCTTGCAGATGGCCCAGCAGGTCGGGTTG  
TTCG-3' (SEQ ID NO:10) 作为模板和400nM寡核苷酸

[0142] 5'-AGGATCCTTCGTGCCGTGCTCGATC-3' (SEQ ID NO:11) 和

[0143] 5'-AGGATCCCTTCTTGCCCGGCTTCTT-3' (SEQ ID NO:12) 作为引物来产生。

[0144] 所得96-bp片段随后插入pCRII-TOPO (英杰公司) 中, 产生pCRII-TOPO-GRSVBamHI, 并且测序以确认意外的突变不存在。RSV G序列随后通过PCR, 使用pCRII-TOPO-GRSVBamHI作为模板和寡核苷酸

[0145] 5'-AACGCGTTTCGTGCCGTGCTCGATC-3' (SEQ ID NO:13) 和

[0146] 5'-ACGCGTCTTCTTGCCCGGCTTCTT-3' (SEQ ID NO:14) 作为引物来扩增。所得96-bp片段随后被插入pCRII-TOPO中, 产生pCRII-TOPO-GRSVM1uI, 并且测序以确认意外的突变不存在。pCRII-TOPO-GRSVM1uI用M1uI消化, 并且RSV G序列被插入经M1uI消化的pXR1-Fha44中以产生pXR1-Fha44/GRSV。将这一质粒测序以验证插入物的适当定向和不必要的改变不存在, 并且它随后通过转化被引入到大肠杆菌SM10 (西蒙等人, 1983) 中, 并且所得重组大肠杆菌SM10细菌与BPZE1结合。如所描述 (斯蒂比兹, 1994) 选择两个连续同源重组事件。重组菌株随后通过PCR分析以鉴别其中杂合基因恰当地插入dnt基因座中的克隆。重组BPZE1菌株被称为BPZGRSV。

[0147] 为了构建BPZGRSV-ΔFha, 一种缺乏FHA的重组菌株, 如先前描述 (安东尼等人, 2000) 使用整合载体pFUS2使FHA编码基因在BPZGRSV中失活。

[0148] 表达Fha44-PcsB的BPZE1衍生物的构建

[0149] PcsB的成熟形式的编码序列 (从氨基酸残基28到残基278) 通过PCR使用来自肺炎链球菌血清型1 (临床分离株E1586) 的染色体DNA作为模板和合成寡核苷酸SP-PcsB 5'-CATATGTGGACGAAC TTTTGCACGGACA-3' (SEQ ID NO:15) 和ASP-PcsB 5'-ACGCGTGAAACGACTGATGACAAAATTCG-3' (SEQ ID NO:16) 作为引物来扩增。将肺炎链球菌煮沸并且在PCR混合物中添加10μM寡核苷酸。所得750-bp片段被插入pCRII-TOPO中, 产生pCRII-TOPO-PcsB, 并且随后测序。pCRII-TOPO-PcsB用M1uI和NdeI消化, 并且对应于PcsB序列的片段被插入经M1uI/NdeI消化的pXR1-Fha44中, 产生pXR1-Fha44-PcsB。在测序之后, 这一质粒通过转化被引入到大肠杆菌SM10 (西蒙等人, 1983) 中, 并且所得重组大肠杆菌SM10细菌与BPZE1结合。如所描述 (斯蒂比兹, 1994) 选择两个连续同源重组事件。重组菌株随后通过PCR分析以鉴别其中杂合基因恰当地插入dnt基因座中的克隆。重组BPZE1菌株被称为BPZPcsB。

[0150] 为了构建BPZPcsB-ΔFha, 一种缺乏FHA的重组菌株, 如先前描述 (安东尼等人, 2000) 使用整合载体pFUS2使FHA编码基因在BPZM2e中失活。

[0151] 重组嵌合蛋白的蛋白质分析和免疫检测。为了检测Fha44-3M2e、Fha44-GRSV以及Fha44-PcsB嵌合蛋白, 使重组菌株在补充有100μg/ml链霉素的10ml斯坦纳-斯科尔特培养

基中生长48小时。细胞随后在 $4,000 \times g$ 下离心15分钟。收集400 $\mu$ l上清液,并且细胞再悬浮于400 $\mu$ l PBS中。将200 $\mu$ l的 $3 \times$ 勒姆利(Laemmli)(1970)上样缓冲液添加到上清液和细胞悬浮液。混合物随后在95 $^{\circ}$ C下加热10分钟。通过使细菌悬浮液通过27号针10次来剪切染色体DNA。在此之后是在95 $^{\circ}$ C下加热15min。将10 $\mu$ l每份样品装载到10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶(SDS-PAGE)上以用于免疫印迹分析或考马斯蓝染色。非重组BPZE1上清液和/或全细胞溶解物用作阴性对照。

[0152] 在电泳后,蛋白质电转移到硝化纤维膜上并且与小鼠抗M2e(耐恩克(Neiryneck)等人,1999)或抗G<sub>RSV</sub>(梅克西普拉德(Mekseepralard)等人,2006)抗体在含有0.1%吐温20(Tween 20)和1%牛血清白蛋白的PBS中一起培育。1:4,000稀释的碱性磷酸酶结合的山羊抗小鼠单克隆抗体(普洛麦格(Promega))用于通过添加碱性磷酸酶底物(氮蓝四唑和5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐试剂;普洛麦格)的蛋白质显色检测。从全蓝蛋白质标记物(伯乐(Biorad))的迁移距离测定反应带的尺寸。

[0153] 小鼠定殖和免疫原性。BALB/c小鼠从查尔斯河(Charles River,法国拉尔布雷勒(1'Abresle,France))获得并且维持在无特定病原体条件下巴斯德研究所里耳分院(Institut Pasteur de Lille)的动物设施中。对于肺定殖,通过腹膜内(i.p.)注射麻醉混合液(克他命+阿托品+安定)轻轻地给6周龄BALB/c小鼠服镇静剂并且用含有BPZE1或如先前描述(米埃尔卡雷克等人,2006)的重组菌株的 $10^6$ 或 $10^7$ 个菌落形成单位的20 $\mu$ l PBS鼻内(i.n.)免疫。小鼠在鼻内给予后的指示时间点杀死并且收集其肺,在PBS中均质化并且以连续稀释液涂到BG-血液琼脂上以在37 $^{\circ}$ C下培育三到四天后将CFU计数,如所描述(米埃尔卡雷克等人,2006)。

[0154] 对于免疫接种研究,将成群6周龄BALB/c小鼠用含有BPZE1或重组菌株的 $10^7$ 个CFU的20 $\mu$ l PBS鼻内免疫,并且随后用相同量的细菌以4周时间间隔增强。

[0155] 抗体检测。将96孔培养板用2 $\mu$ g/ml合成M2e肽(Ac-GGSLLETVETPIRNEWGSRNSDSSDGG-NH<sub>2</sub>,SEQ ID NO:17)、2 $\mu$ g/ml合成G<sub>RSV</sub>肽(Ac-GGFVPCISCSN NPTCWAICKRIPNKKPGKGG-NH<sub>2</sub>,SEQ ID NO:18)或2 $\mu$ g/ml重组PcsB涂布,在4 $^{\circ}$ C下培育过夜,并且用含有0.05%吐温-20的PBS(PBST)洗涤。随后,培养板在37 $^{\circ}$ C下用100微升/孔阻断缓冲液(PBST中2%BSA)阻断1h。在洗涤三次后,将100 $\mu$ l连续稀释的血清添加到孔中并且在37 $^{\circ}$ C下培育2h。在再洗涤三次后,用在PBST中1:4000稀释的100 $\mu$ l辣根过氧化酶(HRP)标记的抗小鼠IgG(邵瑟生物技术(Southern Biotech))在37 $^{\circ}$ C下培育培养板1h。在洗涤五次后,在室温下用100 $\mu$ l HRP底物TMB溶液(因特奇(Interchim))培育培养板30min。通过添加50 $\mu$ l的1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>停止反应。用生物动力学读取器EL/340微板在450nm下测量光密度(OD)。最终效价测定为具有比阴性对照血清两倍还多的光密度读数的最高血清稀释度。

[0156] 产生重组PcsB。PcsB片段通过PCR使用来自肺炎链球菌血清型1(临床分离株E1586)的染色体DNA作为模板和合成寡核苷酸SP-PcsBexp 5'-CCATGGGTGAAACGACTGATGACAAAATTG-3'(SEQ ID NO:19)和ASP-PcsBexp 5'-GCGGCCGCACGA ACTTTTGACGGACAGGTGCTGCTGCATCA-3'(SEQ ID NO:20)来扩增。扩增子被插入pCRII-TOPO(英杰公司,法国塞吉-蓬图瓦兹(Cergy-Pontoise))中并且测序,产生pCRII-TOPOPcsBexp。将这一载体的NotI/NcoI片段插入pET24D+中,产生pET24DPcsB。将这一质粒引入到大肠杆菌BL21中以便产生和纯化PcsB。重组细菌在37 $^{\circ}$ C下于补充有卡那霉素(25 $\mu$ g/ml)的液体LB

培养液中生长。当OD<sub>600</sub>达到0.8时,通过在37℃下添加1mM异丙基-d-硫代半乳糖苷(IPTG)4h来诱导表达。诱导的细胞随后通过在4℃下以8,000rpm离心20min收集并且悬浮于补充有1片/25ml蛋白酶抑制剂[完全TM,无EDTA(法国梅兰的罗氏分子生物化学(Roche Molecular Biochemicals, Meylan))]的溶解缓冲液A(PBS, pH 7.0; 350mM NaCl; 10%甘油)中。

[0157] 细胞借由通过弗氏压碎器(French pressure cell)两次而破裂。在通过离心(15,000rpm, 20min)收集膜碎片后,细胞溶解物的上清液以0.5ml/min的流动速率穿过镍-NTA琼脂糖(凯杰(Qiagen))(螯合琼脂糖凝胶,快速流动, Ni<sup>2+</sup>金属偶合,安玛西亚-法玛西亚(Amersham-Pharmacia))。未结合的物质用缓冲液A洗涤直到OD达到基线。使用逐步梯度用含有50mM、100mM或200mM咪唑的15ml缓冲液A进行结合的经组氨酸标记的蛋白质的洗脱。以2ml洗脱份收集洗脱液。所获得的样品随后通过SDS-PAGE使用12%聚丙烯酰胺凝胶和考马斯蓝染色来分析,并且将含有PcsB蛋白质的洗脱份汇集并且在4℃下用PBS透析过夜。使用BCA测试(皮尔斯(Pierce)),使用制造商的说明估计蛋白质浓度。

[0158] 结果

[0159] 1. 产生Fha44-3M2e的重组BPZE1菌株(BPZM2e)

[0160] 产生Fha44-3M2e的重组BPZE1菌株(BPZM2e)的构建

[0161] 甲型流感病毒的基质蛋白M2的细胞外域(M2e)被提议为一种抵抗流感的通用保护抗原(耐恩克等人,1999;德菲莱特(de Filette)等人,2006)。为了在BPZE1中表达M2e,我们使用Fha44作为载体。Fha44是FHA的80-kDa N端片段并且比全长FHA更好地由百日咳博德特氏菌分泌(雷诺-蒙吉尼等人(Renauld-Mongenie),1996)。

[0162] 将M2e编码序列的三个拷贝融合到Fha44编码序列。通过等位基因交换将构建体插入BPZE1染色体中dnt基因座处,使转基因处于被称为BPZM2e的重组菌株中的dnt启动子的控制下。

[0163] 通过免疫印迹分析使用抗M2e单克隆抗体检查BPZE1和BPZM2e的未浓缩的培养上清液和全细胞提取物。在重组菌株的培养上清液中检测到对应于Fha44-3M2e嵌合蛋白的预期尺寸的94-kDa亮带。在全细胞提取物中也检测到也与抗M2e抗体反应的一种类似尺寸蛋白质。这一观察结果表明嵌合蛋白从重组菌株分泌并且也与BPZM2e的细菌细胞关联。

[0164] BPZM2e的肺定殖和免疫原性

[0165] 首先将斯坦纳斯科尔特培养基中的体外BPZM2e的生长动力学与亲本菌株BPZE1相比。两种菌株之间无统计差异,表明了一般细菌适合度没有因Fha44-3M2e的表达而减弱。

[0166] 为了研究重组菌株BPZM2e在鼠呼吸道定殖的能力,将BALB/c小鼠用BPZM2e的10<sup>6</sup>个CFU或用非重组BPZE1鼻内感染并且比较其定殖概况。重组菌株BPZM2e的定殖概况与对应亲本菌株BPZE1的不可区分,表明了Fha44-3M2e的插入不改变细菌在小鼠的肺定殖的能力。

[0167] 在给予BPZM2e后的不同时间点通过ELISA检查对M2e肽的抗体反应。但是,在任何时间点都没有检测到M2e特异性抗体。随后BPZM2e剂量增加十倍,并且以4周时间间隔用BPZE1或重组BPZM2e的10<sup>7</sup>个CFU将BALB/c小鼠鼻内免疫两次。在第一次免疫接种2周和4周后,并且在最后一次免疫接种2周后收集血清以评估全身抗M2e IgG。同样,在血清中没有检测到对M2e的显著抗体反应。

[0168] FHA的突变和新型重组菌株(BPZM2e-ΔFHA)的表征

[0169] 随后通过将含有fhaB的内部片段的pFus2衍生物(安东尼等人,2000)引入使编码

FHA的染色体基因 (*fhaB*) 从BPZM2e失活。因为pFus2不能够在百日咳博德特氏菌中复制,所以通过同源重组强行将质粒整合到*fhaB*基因中,由此中断这一基因。在含有100 $\mu$ g/ml链霉素和10 $\mu$ g/ml庆大霉素的BG血液琼脂上选择整合体。所得菌株被称为BPZM2e- $\Delta$  FHA。

[0170] BPZM2e- $\Delta$  FHA中FHA的不存在通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色来验证,并且通过免疫印迹分析测定培养上清液中Fha44-3M2e的存在。SDS-PAGE和考马斯蓝染色显示突变菌株的培养上清液中以及用作对照的BPGR4(一种已知FHA缺乏菌株)的培养上清液中不存在与FHA对应的220-kDa蛋白质。未浓缩的培养上清液的免疫印迹分析表明缺乏FHA的突变体产生至少与BPZM2e亲本菌株一样多的Fha44-3M2e。正如所料,在BPZE1的培养上清液中没有检测到免疫反应亮带。

[0171] 通过BPZM2e- $\Delta$  FHA在小鼠肺的定殖

[0172] 为了研究FHA缺失后新颖重组菌株的定殖概况,用BPZM2e- $\Delta$  FHA的 $10^7$ 个CFU鼻内感染BALB/c小鼠,并且追踪肺中的细菌负载长达28天。BPZE1和BPZM2e- $\Delta$  FHA都在肺中定殖并且以类似水平存留在小鼠的肺中,尽管在接种后的第3天,在小鼠的肺中检测到BPZM2e- $\Delta$  FHA明显比BPZE1少。

[0173] BPZM2e- $\Delta$  FHA的免疫原性

[0174] 在以4周时间间隔鼻内给予两次后评估BPZM2e- $\Delta$  FHA的免疫原性。在最后一次免疫接种2周后收集血清,并且分析全身抗M2e抗体反应。发现BPZM2e- $\Delta$  FHA诱导针对M2e的较高水平的全身IgG,而产生FHA的BPZM2e或BPZE1的两次给予未产生明显抗M2e IgG反应(图1),正如所料。这些观察结果表明在用重组BPZE1鼻内免疫接种后,FHA的不存在强烈增加对M2e的免疫反应。

[0175] 2.产生Fha44-G<sub>RSV</sub>的重组BPZE1菌株 (BPZG<sub>RSV</sub>)

[0176] 产生Fha44-G<sub>RSV</sub>的重组BPZE1菌株 (BPZG<sub>RSV</sub>) 的构建

[0177] 显示一种跨越氨基酸残基170到197的RSV的G蛋白的肽片段含有一种中和B细胞表位(鲍尔(Power)等人,2001;尤斯波夫等人,2005)和一种T细胞表位(瓦尔加等人,2000)。蛋白质的这一区也在不同的RSV分离株中很好地保留。对于上述流感病毒的M2e表位,我们使用Fha44作为载体来在BPZE1中表达G表位。

[0178] 将G表位编码序列的单个拷贝融合到Fha44编码序列。通过等位基因交换将构建体插入BPZE1染色体中dnt基因座处,使转基因处于被称为BPZG<sub>RSV</sub>的重组菌株中的dnt启动子的控制下。

[0179] 通过免疫印迹分析使用抗G单克隆抗体检查BPZG<sub>RSV</sub>的未浓缩的培养上清液。在重组菌株的培养上清液中检测到与Fha44-G<sub>RSV</sub>嵌合蛋白的预期尺寸相对应的大约90-kDa亮带,表明了嵌合蛋白从重组菌株分泌。

[0180] BPZG<sub>RSV</sub>的肺定殖和免疫原性

[0181] 为了研究重组菌株BPZG<sub>RSV</sub>在鼠呼吸道定殖的能力,将BALB/c小鼠用BPZG<sub>RSV</sub>的 $10^6$ 个CFU或用非重组BPZE1鼻内感染并且比较其定殖概况。重组菌株BPZG<sub>RSV</sub>的定殖概况与对应亲本菌株BPZE1的不可区分,表明了Fha44-G<sub>RSV</sub>的插入不改变在小鼠的肺定殖的能力。

[0182] 在给予BPZG<sub>RSV</sub>后通过ELISA检查对G肽的抗体反应。但是,没有检测到G特异性抗体。BPZG<sub>RSV</sub>剂量随后增加十倍,并且以4周时间间隔用BPZE1或重组BPZG<sub>RSV</sub>的 $10^7$ 个CFU将BALB/c小鼠鼻内免疫两次。在最后一次免疫接种2周后收集血清以评估全身抗G IgG反应。

同样,在血清中没有检测到对G肽的显著抗体反应。

[0183] FHA的突变和新型重组菌株(BPZ<sub>GRSV</sub>-ΔFHA)的表征

[0184] 随后通过将如上所述的pFus2衍生物引入使编码FHA的染色体基因(fhaB)从BPZ<sub>GRSV</sub>失活,并且通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色来验证BPZ<sub>GRSV</sub>-ΔFHA中FHA的不存在,并且通过免疫印迹分析测定培养上清液中Fha44-<sub>GRSV</sub>的存在。SDS-PAGE和考马斯蓝染色显示突变菌株的培养上清液中不存在与FHA相对应的220-kDa蛋白质。未浓缩的培养上清液的免疫印迹分析表明缺乏FHA的突变菌株产生至少与BPZ<sub>GRSV</sub>亲本菌株一样多的Fha44-<sub>GRSV</sub>。

[0185] BPZ<sub>GRSV</sub>-ΔFHA的免疫原性

[0186] 在以4周时间间隔鼻内给予两次后评估BPZ<sub>GRSV</sub>-ΔFHA的免疫原性。在最后一次免疫接种2周后收集血清,并且通过ELISA分析全身抗G抗体反应。发现BPZ<sub>GRSV</sub>-ΔFHA诱导针对G表位的较高水平的全身IgG,而BPZE1或产生FHA的BPZ<sub>GRSV</sub>的两次给予未产生明显抗G IgG反应(图2)。这些观察结果表明与M2e一样,在用重组BPZE1鼻内免疫接种后FHA的不存在强烈增加对G表位的免疫反应。

[0187] 3. 产生Fha44-PcsB的重组BPZE1菌株(BPZPcsB)

[0188] 产生Fha44-PcsB的重组BPZE1菌株(BPZPcsB)的构建

[0189] PcsB是一种高度保留在不同临床分离株中并且诱导对致死败血症的保护的肺炎链球菌的蛋白质抗原。显示其针对败血症与肺炎两种模型中的四种不同血清型是交叉保护的(吉芬等人,2008)。

[0190] 编码PcsB的成熟部分(从氨基酸28到278)的基因以单个拷贝形式融合到Fha44编码序列。通过等位基因交换将构建体插入BPZE1染色体中dnt基因座处,使转基因处于被称为BPZPcsB的重组菌株中的dnt启动子的控制下。

[0191] 通过SD-PAGE和考马斯蓝染色检查BPZPcsB的未浓缩的培养上清液。在重组菌株的未浓缩的培养上清液中可以容易地检测到与Fha44-PcsB嵌合蛋白相对应的112-kDa亮带,表明了嵌合蛋白从重组菌株分泌。

[0192] BPZPcsB的免疫原性

[0193] BALB/C小鼠以4周时间间隔用BPZPcsB的10<sup>7</sup>个cfu经鼻免疫三次或接受BPZE1作为对照。在每次免疫接种两周后收集血清,并且通过ELISA检查对PcsB的抗体反应。BPZPcsB的剂量增加使得对PcsB的抗体效价增加,不过抗体效价仍然相当低,尤其在第一次和第二次免疫接种后。

[0194] FHA的突变和新型重组菌株(BPZPcsB-ΔFHA)的表征

[0195] 随后通过将如上所述的pFus2衍生物引入使编码FHA的染色体基因(fhaB)从BPZPcsB失活,并且BPZPcsB-ΔFHA中FHA的不存在,但Fha44-PcsB的存在通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色来验证。SDS-PAGE和考马斯蓝染色显示在突变菌株的培养上清液中不存在与FHA相对应的220-kDa蛋白质,和存在与Fha44-PcsB相对应的低Mr蛋白质。

[0196] BPZPcsB-ΔFHA的免疫原性

[0197] 在以4周时间间隔鼻内给予两次后评估BPZPcsB-ΔFHA的免疫原性。在最后一次免疫接种2周后收集血清,并且分析全身抗PcsB抗体反应。发现BPZPcsB-ΔFHA诱导针对PcsB的较高水平的全身IgG,明显高于由产生FHA的BPZPcsB诱导的IgG水平(图3)。这些观察结果表明与M2e和<sub>GRSV</sub>一样,在用重组BPZE1鼻内免疫接种后FHA的不存在明显增加对PcsB的免疫

反应。

[0198] 在整个本申请中,不同的参考文献描述本发明所涉及的目前先进技术。这些参考文献的披露内容由此通过引用结合到本披露中。

[0199] 参考文献

[0200] -阿隆索S,维莱里R,雷诺-蒙吉尼G,洛赫特C.2005.在使用丝状血凝素作为载体下通过重组百日咳博德特氏菌产生不可分型的流感嗜血杆菌HtrA,感染与免疫,73,4295-4301 (Alonso S,Willery R,Renauld-MongénieG,Locht C.2005.Production of Non typeable Haemophilus influenzae HtrA by Recombinant Bordetella pertussis with the Use of Filamentous Hemagglutinin as a Carrier.Infect.Immun.,73,4295-4301)

[0201] 安东尼R和洛赫特C.1990.S1子单元的二硫键和羧基端区在百日咳毒素的组装和生物合成中的作用,感染与免疫,58,1518-1526 (Antoine R,and Locht C.1990.Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin.Infect,Immun.,58,1518-1526)。

[0202] -安东尼R,阿隆索S,拉兹D,库特L,莱斯杰S,维莱里E等人2000.通过百日咳博德特氏菌中的转录融合体的全身基因失活和产生来鉴别的新颖毒性活化和毒性抑制的基因,细菌学杂志,182,5902-5905 (Antoine R,Alonso S,Raze D,Coutte L,Lesjean S,Willery E,et al.2000.New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in Bordetella pertussis.J Bacteriol 182,5902-5905)。

[0203] -科彭斯I,阿隆索S,安东尼R,雅各布-迪比松F,雷诺-蒙吉尼G,雅各布斯E,洛赫特C.2001.通过重组百日咳博德特氏菌产生脑膜炎奈瑟氏菌转铁蛋白-结合蛋白B,感染与免疫69,5440-5446 (Coppens I,Alonso S,Antoine R,Jacob-Dubuisson F,Renauld-Mongénie G,Jacobs E,Locht C.2001.Production of Neisseria meningitides transferrin-binding protein B by recombinant Bordetella pertussis,Infect.Immun.69,5440-5446) ,

[0204] -德菲莱特M,菲尔斯W,马顿斯W,伯其特A,拉姆尼A,洛温阿德勒B等人2006.基于M2e的人类甲型流感疫苗的改良设计和鼻内递送,疫苗24,6597-6601 (De Filette M,Fiers W,Martens W,Birkett A,Ramne A,Lowenadler B,et al.2006.Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine.Vaccine 24, 6597-6601)。

[0205] -弗努PF,卡蒙H,德布里AS,米埃尔卡雷克N,洛赫特C.2010.通过单次经鼻给予活减毒百日咳博德特氏菌BPZE1诱导的针对百日咳的长期免疫性,疫苗28,7047-7053 (Feunou PF,Kammoun H,Debrie AS,Mielcarek N,Locht C.2010.Long-term immunity against pertussis induced by a single nasal administration of live attenuated B.pertussis BPZE1.Vaccine 28,7047-7053.)。

[0206] -吉芬C,迈因克AL,汉娜M,黑尼克斯T,明DB,格尔布曼D,伦德伯格U,森BM,舒恩M,哈贝尔A,亨里克斯-诺尔马克B,奥尔特奎斯特A,卡林M,冯·贾拜因A,以及纳吉E.2008.用人类抗体使用肺炎球菌的基因组级抗原指纹识别的新颖类别的高度保守的疫苗抗原的发现,实验医学杂志205,117-131 (Giefing C,Meinke,AL,Hanner M,Henics T,Minh DB,

Gelbmann D, Lundberg U, Senn BM, Schunn M, Habel A, Henriques-Normark B, Ortqvist A, Kalin M, von Gabain A, and Nagy E. 2008. Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med* 205, 117-131)。

[0207] -胡S.Y., 蔡S.Q., 富D.G.W., 洛赫特C., 周V.T., 波赫C.L., 以及阿隆索S. 2008. 作为递送异源候选疫苗的一种潜在活媒剂的高度减毒的百日咳博德特氏菌菌株BPZE1, 感染与免疫76, 111-119 (Ho, S.Y., Chua, S.Q., Foo, D.G.W., Locht, C., Chow, V.T., Poh, C.L., and Alonso, S. 2008. Highly attenuated *Bordetella pertussis* strain BPZE1 as a potential live vehicle for delivery of heterologous vaccine candidates. *Infect Immun* 76, 111-119)。

[0208] -黄CC, 陈PM, 郭JK, 崔WH, 林ST等人1962. 实验百日咳, 新英格兰医学杂志266, 105-111 (Huang CC, Chen PM, Kuo JK, Chui WH, Lin ST et al. 1962. Experimental whooping cough. *N Engl J Med* 266, 105-111)。

[0209] -柏本T., 片平J, 科尔内霍WR, 益田M, 福宓A, 松泽T, 大西T, 堀口Y. (1999) 博德特氏菌皮肤坏死毒素的功能域的鉴别, 感染与免疫67:3727-32 (Kashimoto T., Katahira J, Cornejo WR, Masuda M, Fukuoh A, Matsuzawa T, Ohnishi T, Horiguchi Y. (1999) Identification of functional domains of *Bordetella dermonecrotizing* toxin. *Infect. Immun.* 67:3727-32)。

[0210] -卡瓦纳H, 努尼C, 卡荷尔E, 英格利史K, 洛赫特C, 马翁BP. 2010. 减毒百日咳博德特氏菌疫苗菌株BPZE1在鼠模型中调节过敏原诱导的免疫性并且防止过敏肺病理学, 临床与实验过敏40, 933-941 (Kavanagh H, Noone C, Cahill E, English K, Locht C, Mahon BP. 2010. Attenuated *Bordetella pertussis* vaccine strain BPZE1 modulates allergen-induced immunity and prevents allergic pulmonary pathology in a murine model. *Clin Exp Allergy* 40, 933-941)。

[0211] -勒姆利UK. 1970. 结构蛋白在噬菌体T4的头部组装期间的裂解, 自然227, 680-685 (Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685)。

[0212] -兰伯特-比西纳, C, E. 维莱里, C. 洛赫特, 以及F. 雅各布-迪比松. 1998. 百日咳博德特氏菌丝状血凝素的N端表征, 分子微生物学, 28, 1283-1293 (Lambert-Buisine, C, E. Willery, C. Locht, and F. Jacob-Dubuisson. 1998. N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol. Microbiol.* 28, 1283-1293)。

[0213] -李R., 利姆A., 奥斯S.T., 封M.C, 洛赫特C, 周V.T. 以及阿隆索S. 2011. 表达通用流感候选疫苗M2e的活减毒百日咳博德特氏菌菌株的研发, 疫苗29, 5502-5511 (Li, R., Lim, A., Ow, S.T., Phoon, M.C, Locht, C, Chow, V.T., and Alonso, S. 2011. Development of live attenuated *Bordetella pertussis* strains expressing the universal influenza vaccine candidate M2e. *Vaccine* 29, 5502-5511)。

[0214] -李R, 利姆A, 封MC, 那拉萨拉杰T, 尼格JK, 波赫WP, 西姆MK, 周VT, 洛赫特C, 阿隆索S. 2010. 减毒百日咳博德特氏菌通过抑制细胞因子风暴抵抗高度病原性甲型流感病毒, 病

毒学杂志84,7105-7113 (Li R, Lim A, Phoon MC, Narasaraju T, Ng JK, Poh WP, Sim MK, Chow VT, Locht C, Alonso S. 2010. Attenuated *Bordetella pertussis* protects against highly pathogenic influenza A viruses by dampening the cytokine storm. *J Virol* 84,7105-7113)。

[0215] -洛赫特C, 安东尼R, 雅各布-迪比松F. 2001. 百日咳博德特氏菌, 在多个方面的分子发病机制, 微生物学新见4, 82-89 (Locht C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F. 2001. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Cur Opin Microbiol* 4, 82-89)。

[0216] -洛赫特C, 杰弗里MC, 雷诺G. 1992. 百日咳博德特氏菌丝状血凝素和伞毛的共同附属基因与papC和papD基因家族共享序列相似性, 欧洲分子生物学杂志11, 3175-3183 (Locht C, Geoffrey MC, Renauld G. 1992. Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. *EMBO J* 11, 3175-3183)。

[0217] -马斯卡特F, 韦尔谢尔V, 马尔弗鲁特A, 埃诺M, 皮拉德D, 德默尔曼S, 帕尔贴A, 德布里AS, 利维J, 德尔朱迪斯G, 洛赫特C. 2003. 2月龄婴儿的百日咳博德特氏菌感染促进1型T细胞反应, 免疫学杂志170, 1504-1509 (Mascart F, Verscheure V, Malfroot A, Hainaut M, Piérard D, Temerman S, Peltier A, Debrie AS, Levy J, Del Giudice G, Locht C. 2003. *Bordetella pertussis* infection in 2-months-old infants promotes Type 1T cell responses. *J Immunol* 170, 1504-1509)。

[0218] -梅克西普拉德C, 汤姆斯GL, 劳特利奇EG. 2006. 通过G糖蛋白上的亚群保守表位的野生型和糖苷配基小鼠-人类嵌合IgG抗体使小鼠免受人类呼吸道合胞病毒, 普通病毒学杂志87, 1267-1273 (Mekseepralard C, Toms GL, Routledge EG. 2006. Protection of mice against human respiratory syncytial virus by wild-type and aglycosyl mouse-human chimaeric IgG antibodies to subgroup-conserved epitopes on the G glycoprotein. *J Gen Virol* 87, 1267-1273)。

[0219] -梅诺齐FD, 冈蒂耶C, 洛赫特C. 1991. 百日咳博德特氏菌和支气管炎博德特氏菌的转铁蛋白-和乳铁蛋白-结合蛋白的鉴别和纯化, 感染与免疫59, 3982-3988 (Menozzi FD, Gantiez C, Locht C. 1991. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 59, 3982-3988)。

[0220] -米埃尔卡雷克N, 德布里AS, 马耶克斯S, 洛赫特C. 2010. 减毒百日咳博德特氏菌BPZE1诱导的保护在小鼠中的剂量反应, 临床与疫苗免疫学17, 317-324 (Mielcarek N, Debrie AS, Mahieux S, Locht C. 2010. Dose-response of attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1-induced protection in mice. *Clin Vaccine Immunol* 17, 317-324)。

[0221] -米埃尔卡雷克N, 德布里AS, 拉兹D, 伯特欧特J, 鲁阿内C, 本尤尼斯A, 克雷兹C, 恩格尔J, 高曼WE, 洛赫特C. 2006. 作为抗百日咳的单一单剂量经鼻疫苗的活减毒百日咳博德特氏菌, 公共科学图书馆·病原体2, 662-670 (Mielcarek N, Debrie AS, Raze D, Bertout J, Rouanet C, Ben Younes A, Creuzi C, Engle J, Goldman WE, Locht C. 2006. Live attenuated *B. pertussis* as a single single-dose nasal vaccine against

whooping-cough. *PLoS Pathog* 2,662-670)。

[0222] -穆施M.,周W.,罗兹P.,博普M.,陈R.T.,林德T.,斯派罗C,斯蒂芬R.2004.失活鼻内流感疫苗在瑞士的使用和贝尔麻痹在瑞士的风险,新英格兰医学杂志350,896-903 (Mutsch,M.,Zhou,W.,Rhodes,P.,Bopp,M.,Chen,R.T.,Linder,T.,Spir,C,Steffen,R.2004.Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland.*N Engl J Med* 350,896-903)。

[0223] -耐恩克S,德洛T,塞伦斯X,范兰德斯古特P,裘WM,菲尔斯W.1999.基于M2蛋白的细胞外域的通用甲型流感疫苗,自然·医学5,1157-1163 (Neiryck S,Deroo T,Saelens X, Vanlandschoot P,Jou WM,Fiers W.1999.A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein.*Nat Med* 5,1157-1163)。

[0224] -科万特J,海因斯MF.1993.允许直接选择革兰氏阴性细菌中的基因替换的通用自杀载体,基因127,15-21 (Quandt J,Hynes MF.1993.Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria.*Gene* 127,15-21)。

[0225] -鲍尔UF,普洛特尼基-吉尔坎H,戈奇L,钱皮恩T,白克A,豪乌JF,阮TN,博纳富瓦JY,科瓦亚N.2001.呼吸道合胞病毒G蛋白中的多个线性B细胞保护性表位的鉴别和表征,疫苗19,2345-2351 (Power UF,Plotnicky-Gilquin H,Goetsch L,Champion T,Beck A,Haeuw JF,Nguyen TN,Bonnefoy JY,Corvaia N.2001.Identification and characterization of multiple linear B cell protectopes in the respiratory syncytial virus G protein.*Vaccine* 19,2345-2351)。

[0226] -雷诺-蒙吉尼G,科内特J,米埃尔卡雷克N,梅诺齐FD,洛赫特C.1996.N端和C端前驱体域在百日咳博德特氏菌丝状血凝素的生物发生中的不同作用,细菌学杂志178,1053-1060 (Renauld-Mongenie G,Cornette J,Mielcarek N,Menozzi FD,Locht C.1996.Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin.*J Bacteriol* 178,1053-1060)。

[0227] -雷夫诺N,阿隆索S,雅各布-迪比松F,梅塞尼尔A,洛赫特C.2001.通过用重组百日咳博德特氏菌鼻内感染的破伤风毒素片段C特异性激活,疫苗20,926-933 (Reveneau N, Alonso S,Jacob-Dubuisson F,Merckenier A,Locht C.2001.Tetanus toxin fragment C-specific priming by intranasal infection with recombinant *Bordetella pertussis*.*Vaccine* 20,926-933)。

[0228] -西蒙R,普里弗U,皮勒A.1983.用于体内基因工程化的广泛宿主范围移动系统:革兰氏阴性细菌的转座子突变诱发,生物技术I,784-791 (Simon R,Priefer U,Pühler A.1983.A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering:transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria.*Bio/technology* I,784-791)。

[0229] -斯凯利CM,卡西迪JP,英格利史K,弗努-弗努P,洛赫特C,马翁BP.2009.活减毒百日咳博德特氏菌候选疫苗不在 $\gamma$ 干扰素受体基因被剔除的小鼠中产生散播感染,临床与疫苗免疫学16,1344-1351 (Skerry CM,Cassidy JP,English K,Feunou-Feunou P,Locht C,

Mahon BP.2009.A live attenuated Bordetella pertussis candidate vaccine does not cause disseminating infection in gamma interferon receptor knockout mice.Clin Vaccine Immunol 16,1344-1351)。

[0230] -斯坦纳DW,斯科尔特MJ.1970.用于产生I期百日咳博德特氏菌的简单的化学成分确定的培养基,普通与应用微生物学杂志63,211-220 (Stainer DW,Scholte MJ.1970.A simple chemically defined medium for the production of phase I Bordetella pertussis.J Gen Microbiol 63,211-220)。

[0231] -斯蒂比兹R.1994.可条件性地反选的自杀载体用于等位基因交换的用途,酶学方法235,458-465 (Stibitz R.1994.Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange.Methods Enzymol 235,458-465)。

[0232] -瓦尔加SM,维辛格EL,布拉恰莱TJ.2000.呼吸道合胞病毒的附着(G)糖蛋白含有引发Th1和Th2 CD4+T细胞反应的单一免疫显性表位,免疫学杂志165,6487-6495 (Varga SM,Wissinger EL,Braciale TJ.2000.The attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus contains a single immunodominant epitope that elicits both Th1 and Th2 CD4+T cell responses.J Immunol 165,6487-6495)。

[0233] -尤斯波夫V.,V.梅特,V.梅特,C.戴维森,K.穆西查克,S.吉列姆,A.法雷塞,T.马克维蒂,以及D.曼.2005.抗呼吸道合胞病毒的基于肽的候选疫苗,疫苗23:2261-2265 (Yusibov,V.,V.Mett,V.Mett,C.Davidson,K.Musiychuk,S.Gilliam,A.Farese,T.MacVittie,and D.Mann.2005.Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus.Vaccine 23:2261-2265)；

[0234] 表1.细菌菌株

菌株	描述 (参考)
BPSM	Sm <sup>R</sup> 毒性百日咳博德特氏菌 (梅诺齐等人, 1991)
BPGR4	衍生自 BPSM 和缺乏 FHA 的 Sm <sup>R</sup> 菌株 (洛赫特等人, 1992)
BPZE1	衍生自 BPSM 的 Sm <sup>R</sup> 减毒菌株 (米埃尔卡雷克等人, 2006)
BPZM2e	表达 Fha44-(M2e) <sub>3</sub> 的 BPZE1 重组菌株 (本研究)
[0235] BPZM2e-ΔFha	表达 Fha44-(M2e) <sub>3</sub> 和缺乏 FHA 的 BPZE1 重组菌株 (本研究)
BPZG <sub>RSV</sub>	表达 Fha44-G <sub>RSV</sub> 的 BPZE1 重组菌株 (本研究)
BPZG <sub>RSV</sub> -ΔFha	表达 Fha44-G <sub>RSV</sub> 和缺乏 FHA 的 BPZE1 重组菌株 (本研究)
BPZPcsB	表达 Fha44-PcsB 的 BPZE1 重组菌株 (本研究)
BPZPcsB-ΔF	表达 Fha44-PcsB 和缺乏 FHA 的 BPZE1 重组菌株 (本研究)
[0236] ha	

## 序列表

<110> 法国国家健康与医学研究院

<120> 新颖重组博德特氏菌菌株

<130> BI012225 LOCHT-MIELCAREK

<160> 20

<170> PatentIn 版本3.3

<210> 1

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> XbaI位点

<400> 1

tctaga 6

<210> 2

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> XbaI位点(具有突变)

<400> 2

tccaga 6

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 3

gcatgcctgc aggtcgactc cagaggatcc ccgggtaccg 40

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 4

cggtagccgg ggatcctctg gagtgcacct gcaggcatgc 40

<210> 5  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工  
<220>  
<223> 引物  
<400> 5  
cttaagacgc gtcatatggg cggccgc 27  
<210> 6  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工  
<220>  
<223> 引物  
<400> 6  
acgcgtgtgg aaactcctat ccg 23  
<210> 7  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人工  
<220>  
<223> 引物  
<400> 7  
catatggccg ccagagccgc tatcagagct atcggt 36  
<210> 8  
<211> 84  
<212> DNA  
<213> 人工  
<220>  
<223> 引物  
<400> 8  
ttcgtgccgt gtcgatctg ctgacaac cgaactgct gggccatctg caagcgcac 60  
ccgaacaaga agccgggcaa gaag 84  
<210> 9  
<211> 66  
<212> DNA  
<213> 人工  
<220>  
<223> 引物

<400> 9  
aggatccttc gtgccgtgct cgatctgctc gaacaacccg acctgctggg ccatctgcaa 60  
gcgcat 66

<210> 10  
<211> 69  
<212> DNA  
<213> 人工  
<220>  
<223> 引物

<400> 10  
aggatccctt cttgcccggc ttcttgcttc ggatgcgctt gcagatggcc cagcaggtcg 60  
ggttgcttc 69

<210> 11  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工  
<220>  
<223> 引物

<400> 11  
aggatccttc gtgccgtgct cgatc 25

<210> 12  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工  
<220>  
<223> 引物

<400> 12  
aggatccctt cttgcccggc ttctt 25

<210> 13  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工  
<220>  
<223> 引物

<400> 13  
aacgcgtttc gtgccgtgct cgatc 25

<210> 14  
<211> 24  
<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 14

acgcgtcttc ttgcccggt tctt 24

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 15

catatgtgga cgaacttttg cacggaca 28

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400> 16

acgcgtgaaa cgactgatga caaaattcg 29

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 肽

<400> 17

Gly Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp

1

5

10

15

Gly Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Gly Gly

20

25

<210> 18

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 肽

<400> 18



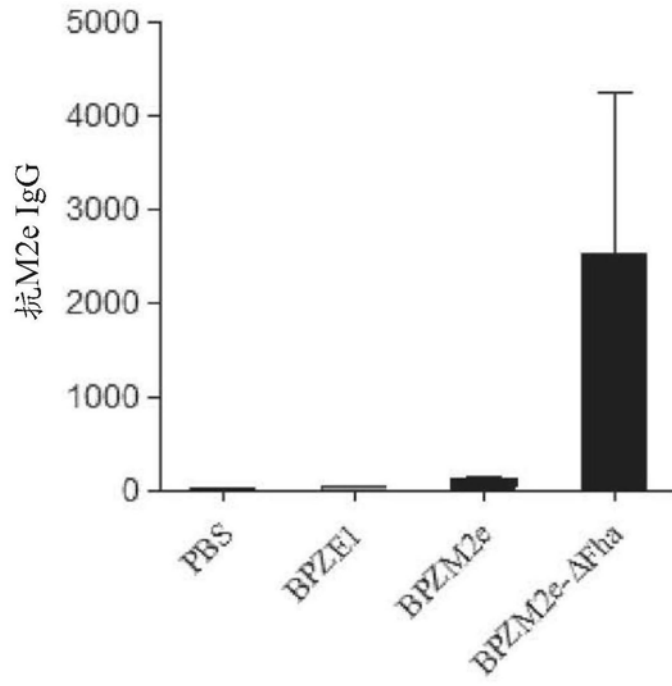


图1

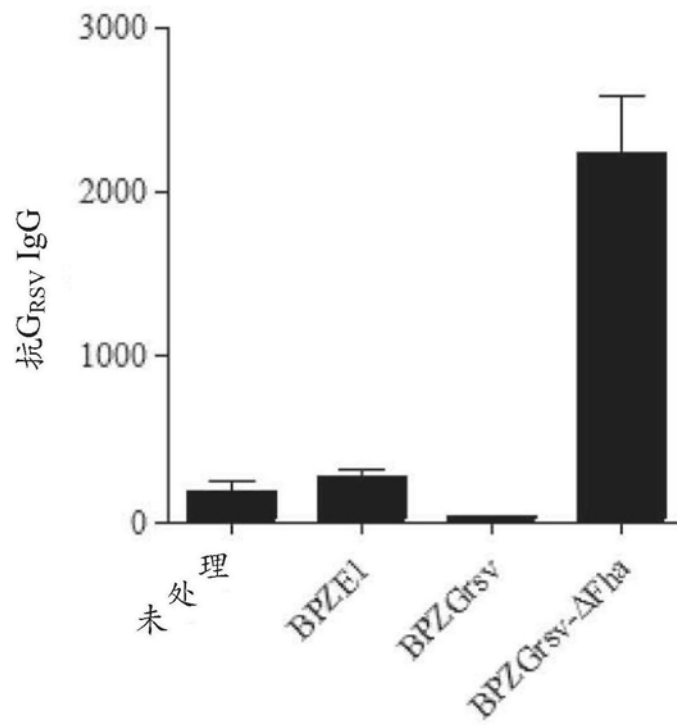


图2

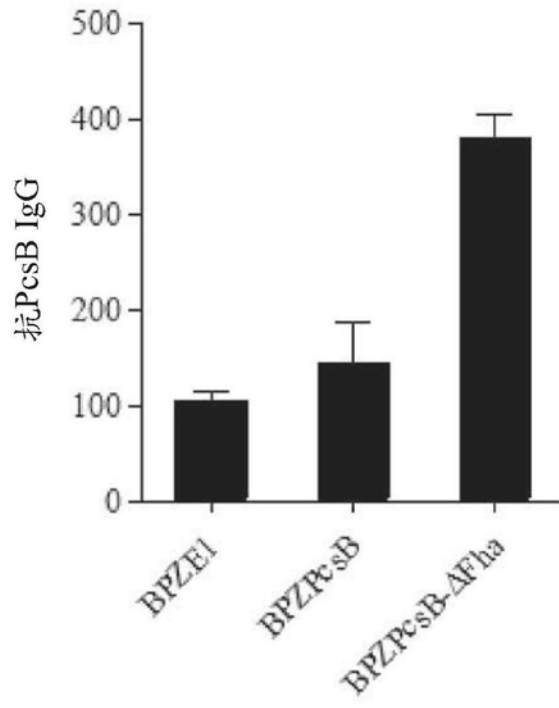


图3