



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102176907 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 07

(21) 申请号 200980140172. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 10. 07

A61K 31/20(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 37/00(2006. 01)

61/195, 631 2008. 10. 08 US

A61K 39/118(2006. 01)

61/195, 882 2008. 10. 10 US

A61K 39/02(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 04. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2009/007232 2009. 10. 07

(87) PCT申请的公布数据

W02010/041143 EN 2010. 04. 15

(71) 申请人 免疫解决方案有限公司

地址 新西兰但尼丁

(72) 发明人 F·E·阿尔德维尔 K·W·比格利

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

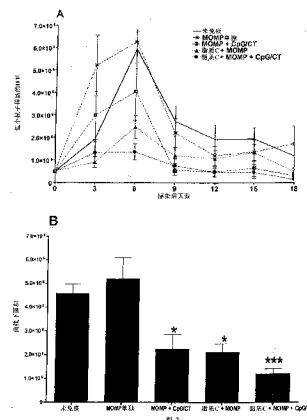
权利要求书 2 页 说明书 35 页 附图 5 页

(54) 发明名称

用于产生粘膜免疫的口服疫苗

(57) 摘要

本发明的实施方案包括基于脂质的免疫原性组合物(佐剂或者载体),其用于口服或者胃肠施用以改善经接种动物对各种细菌感染的粘膜免疫应答。在一些实施方案中,本发明的脂质组合物包括具有不同链长的脂肪酸的混合物,由此提供希望的物理-化学性质。当细菌抗原与基于脂质的佐剂或者载体混合时,所得组合物引发改善的粘膜免疫应答并由此降低由衣原体或者螺杆菌引起的感染和疾病后遗症。



1. 一种免疫原性组合物,包含:
含有至少 30% C₁₆ 至 C₁₈ 脂肪酸的脂质配制物,所述配制物具有高于约 30°C 的固体至流体转变温度;及
来自衣原体 (Chlamydia) 或者螺杆菌 (Helicobacter) 的抗原性成分,所述组合物在经口服或者胃肠途径接受所述组合物的动物中能引起粘膜免疫应答。
2. 权利要求 1 的组合物,其中所述脂质配制物包含约 1% 豆蔻酸、约 25% 棕榈酸、约 15% 硬脂酸、约 50% 油酸和约 6% 亚油酸 (脂质 C)。
3. 权利要求 1 的组合物,所述脂质配制物包含脂质 C、脂质 Ca、脂质 K、脂质 Ka、脂质 PK 或者脂质 SPK。
4. 权利要求 1-3 任一项的组合物,其中来自所述衣原体生物体的所述抗原性成分主要是外膜蛋白 (MOMP)、60kDa-62kDa 富半胱氨酸蛋白质膜蛋白、15kDa 富半胱氨酸膜蛋白、74kDa 物种特异性蛋白质、31kDa 真核细胞结合蛋白或者 18kDa 真核细胞结合蛋白中的一或多种。
5. 权利要求 4 的组合物,其中所述 MOMP 是选自由 A、B、Ba、C、D、E、F、G、Hi、I、J、K、L1、L2 或 L3 所组成的组的血清型。
6. 权利要求 4 的组合物,其中所述螺杆菌的抗原性成分是来自幽门螺杆菌 (H. pylori) 的全灭活抗原。
7. 权利要求 1-6 的组合物,进一步包含额外的佐剂。
8. 权利要求 7 的组合物,其中所述额外的佐剂是霍乱毒素 (CT) 和 CpG 寡脱氧核苷酸 (“CpG-ODN”;SEQ ID NO :1) 中的一或多种。
9. 一种包含 MOMP 和脂质 C 的口服免疫原性组合物。
10. 一种治疗由衣原体科生物体引起的粘膜感染的方法,包括将权利要求 1-5 或者 7-9 任一项的组合物施用给需要其的动物。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述的治疗通过在所述动物中诱导粘膜免疫应答而发生。
12. 权利要求 10 的方法,其中所述动物是人类。
13. 权利要求 10 的方法,其中所述组合物包含 MOMP、脂质 C 以及 CT 和 CpG-ODN 中的一或多种。
14. 一种给动物提供针对衣原体或螺杆菌引起的感染的免疫学保护的方法,包括将权利要求 1-9 任一项的组合物施用给所述动物,其中所述动物具有指示免疫应答的发现。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述发现选自由以下组成的组:胸腺细胞 (T 细胞) 增殖、干扰素 γ (IFN γ)、 γ 免疫球蛋白 (IgG)、白介素 12 (IL-12) 和白介素 10 (IL-10) 的产生或者所述衣原体或所述螺杆菌的释放的降低。
16. 含有至少 30% C₁₆ 至 C₁₈ 脂肪酸和至少一种来自衣原体的抗原的脂质配制物在制备用于预防、降低或者治疗由所述衣原体引起的粘膜感染的口服药物中的用途。
17. 权利要求 16 的用途,其中所述至少一种抗原选自由如下组成的组:主要外膜蛋白 (MOMP)、60kDa-62kDa 富半胱氨酸蛋白质膜蛋白、15kDa 富半胱氨酸膜蛋白、74kDa 物种特异性蛋白质、31kDa 真核细胞结合蛋白或者 18kDa 真核细胞结合蛋白。

18. 权利要求 16 的用途,其中所述 MOMP 是选自由 A、B、Ba、C、D、E、F、G、Hi、I、J、K、L1、L2 或 L3 所组成的组的血清型。

19. 权利要求 17 的用途,其中所述血清型选自由 D、E、F、G、H、I、J、K 和 L 所组成的组,并且所述用途是预防、降低或者治疗由衣原体引起的生殖器感染。

20. 权利要求 17 的用途,其中所述脂质选自由脂质 C、脂质 K、脂质 PK 和脂质 SPK 组成的组。

21. 含有至少 30% C₁₆ 至 C₁₈ 脂肪酸和至少一种来自螺杆菌的抗原的脂质配制物在制备用于预防、降低或者治疗由所述螺杆菌引起的粘膜感染的口服药物中的用途。

22. 权利要求 21 的用途,其中所述至少一种抗原是灭活的全细胞幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)。

23. 一种试剂盒,含有:

权利要求 1-9 任一项的组合物;及
使用说明。

用于产生粘膜免疫的口服疫苗

[0001] 优先权要求

[0002] 此 PCT 国际专利申请要求 2008 年 10 月 8 日提交的题目为“免疫原性组合物”的美国临时专利申请 No :61/195, 631 的优先权, 其发明人为 Frank E. Aldwell 和 Kenneth W. Beagley, 以及要求 2008 年 10 月 10 日提交的题目为“用于免疫原性应答的佐剂”的美国临时专利申请 No :61/295, 882 的优先权, 其发明人为 Frank E. Aldwell 和 Kenneth W. Beagley。这两个申请均完全援引加入本文。

发明领域

[0003] 本发明一般性地涉及适合储存、施用及改善疫苗中使用的抗原或免疫原的免疫原性的组合物。特别地, 本发明涉及用于改善对细菌抗原的免疫应答的基于脂质的佐剂或者载体。更特别地, 本发明涉及具有特定的脂质成分的基于脂质的佐剂或者载体, 以及其用于提供对衣原体 (Chlamydia) 和螺杆菌 (Helicobacter) 引起的感染改善了的免疫应答的用途。

[0004] 背景

[0005] 大量感染性病原体侵入粘膜表面导致感染和疾病。全世界影响人类和动物群体的两种重要粘膜病原体是衣原体和螺杆菌。世界卫生组织 (WHO) 估计在 1999 年全世界有 9 千 2 百万个衣原体生殖器感染新病例, 并且感染的发病率在发达国家和发展中国家均持续增加 (KW, Timms P. Journal of Reproductive Immunology 2000 ;48(1) :47-68)。螺杆菌据信感染全世界 50% 的人群, 在一些发展中国家比率超过 90% (Del Giudice, G., et al., Annu Rev Immunol, 2001. 19 :p. 523-63 ;Frenck, R. W., Jr. and J. Clemens, Microbes Infect, 2003. 5(8) :p. 705-13)。

[0006] 衣原体

[0007] 衣原体属的成员引起许多伴有严重并发症的眼部、生殖器和呼吸道疾病, 如致盲性沙眼、盆腔炎性疾病、异位妊娠和输卵管因素不孕、间质性肺炎, 以及可包括动脉粥样硬化、多发性硬化、成年型哮喘 (adult-onset asthma) 和阿尔茨海默病在内的慢性疾病,。

[0008] 沙眼衣原体 (Chlamydia trachomati) 和肺炎衣原体 (C. pneumoniae) 感染各种粘膜表面, 引起许多疾病, 包括盆腔炎性疾病 (PID)、不育、致盲的沙眼、呼吸道疾病、动脉粥样硬化和哮喘加剧 (Faal, N., et al., PLoS Med, 2006. 3(8) :p. e266 ;Mabey, D. and R. Peeling, Sexually transmitted infections, 2002. 78(2) :p. 90-2 ;Hansbro, P. M., et al., Pharmacol Ther, 2004. 101(3) :p. 193-210 ;Horvat, J., et al., Am J Respir Crit Care Med, 2007)。

[0009] 衣原体科的生物体是专性细胞内细菌。它们缺乏几种代谢和生物合成途径并依赖于宿主细胞的中间体, 包括 ATP。衣原体以两个阶段存在 : (1) 称为原体 (elementary body) 的感染性颗粒, 及 (2) 称为网状体 (reticulate body) 的细胞质内的繁殖形式。通常感染人类的有三种已描述的衣原体种。沙眼衣原体引起眼病沙眼及性传播感染, 衣原体。鹦鹉热衣原体 (C. psittaci) 引起鹦鹉热, 肺炎衣原体导致某形式的肺炎。另外, 小鼠易感于鼠

型沙眼衣原体 (*C. muridarum*), 其引起小鼠的生殖道感染。前二个种含有许多基于细胞壁和外膜蛋白中的差异的血清变型。肺炎衣原体含有一个血清变型—TWAR 生物体。

[0010] 衣原体具有可促进附着于细胞的血凝素。细胞介导的免疫应答很大程度上是炎症期间组织损伤的成因, 尽管已描述了一种内毒素样毒素。

[0011] 大多数人类和动物病原体包括衣原体均通过粘膜表面而发起感染。类似地, 衣原体生殖道感染可发生自粘膜表面的感染。因此, 针对这种病原体的保护性免疫可能需要诱导强粘膜免疫应答。尽管明显需要疫苗以针对经粘膜部位的感染提供保护, 但是目前使用的疫苗是通过真皮内或皮下注射而给予的。然而, 在肠胃外免疫后的粘膜免疫应答通常是弱的。

[0012] 沙眼衣原体感染是世界范围内最常见性传播细菌感染。沙眼衣原体引起性传播生殖器和直肠感染。男人中沙眼衣原体感染的频率可等于或超过淋病的频率。男人中非淋球菌性尿道炎、附睾炎和直肠炎可缘于沙眼衣原体感染。淋病患者由沙眼衣原体超感染也会发生。年轻女性中的急性输卵管炎和宫颈炎可以由源于宫颈的沙眼衣原体感染所引起。已报道了患有淋病的女性中由沙眼衣原体导致的高比率生殖道共感染。沙眼衣原体分离自被感染妇女的输卵管。在一个报道中, 从患有输卵管炎的患者腹膜腔中取得附着于精子的沙眼衣原体原体。

[0013] 在感染的产道中暴露于沙眼衣原体的新生儿可在 5-14 天内发生急性结膜炎。该疾病由显著的结膜红斑、淋巴网状内皮细胞增殖及脓性排出物所表征。未治疗的感染可发展为肺炎; 这种类型的肺炎仅在生命的前 4-6 个月发生。

[0014] 最近, 沙眼衣原体已被怀疑引起成人的下呼吸道感染, 并且已报道了几例在无免疫应答的患者中的沙眼衣原体肺炎, 从所述患者中分离了所述病原体。还有证据表明沙眼衣原体可在免疫活性的人中引起肺炎或者支气管肺部感染。

[0015] 与沙眼衣原体感染相关的后遗症包括盆腔炎性疾病、异位妊娠和不育, 这是除了 HIV/AIDS 之外任何 STI 的代价最大的健康后果 (Westrom L, Mardh P. A., *Br Med Bull* 1983Apr ;39(2) :145-50)。另外, 存在的衣原体感染增加了感染 HIV (Ho JL, et al., *J Exp Med* 1995Apr 1 ;181(4) :1493-505) 和单纯疱疹感染 (Kaul R, et al., *J Infect Dis* 2007Dec 1 ;196(11) :1692-7) 的风险。由于大多数衣原体感染无症状的性质 (Stamm WE. In: Woodall JP, editor. *Proceedings of the Chlamydia Vaccine Development Colloquium* ;2004 ;Alexandria, Virginia :The Albert B. Sabin Vaccine Institute ;2004. p. 15-8), 有效的抗生素治疗的可利用性不能减缓日益增加的感染发病率, 通常据信需要有效的疫苗来控制这种隐性的流行病 (silent epidemic)。

[0016] 螺杆菌

[0017] 螺杆菌属细菌包括幽门螺杆菌被认为是几种类型的胃肠疾病的重要病因。胃粘膜的螺杆菌感染与诸如慢性活动性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡等疾病的发展相关联, 并且与胃癌发展相关联 (Enno, A., et al., *Am J Pathol*, 1998. 152(6) :p. 1625-32 ;Correa, P., *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(7) :p. E3 ;Ernst, P. and B. Gold, *Annu Rev Microbiol*, 2000. 54 :p. 615-40 ;Uemura, N., et al., *N Engl J Med*, 2001. 345(11) :p. 784-9)。

[0018] 概述

[0019] 我们发现了先前本领域未认识到的问题, 即尽管许多人类和动物病原体经粘膜

感染生物体,但是在粘膜中发挥作用以保护动物的有效疫苗的开发即便不是不可能也是非常困难的。存在的主要问题是口服输送的疫苗在它们到达免疫诱导部位如淋巴集结(Peyer's patches)之前就由于胃酸性及蛋白酶解破坏而降解。肠相关淋巴组织的不适宜刺激也可以诱导口服耐受而非获得性免疫。另外,尽管啮齿类免疫可以通过使用霍乱毒素(CT)而增加,但是CT不被人类耐受。尚未有针对衣原体或螺杆菌的有效疫苗被批准用于人类。因此,目前对于在粘膜有效并且模拟霍乱毒素的有益效果但是没有在人类中观察到有害副作用的组合物和方法有巨大需求。

[0020] 我们出乎意料地发现一些脂质组合物、特别是含有长链脂肪酸的那些脂质组合物当用作佐剂或者载体时,可以解决这些及其它问题以促进粘膜免疫并且提供针对衣原体和螺杆菌引起的粘膜感染的保护。

[0021] 我们还出乎意料地发现一些脂质组合物当用作佐剂或者载体时与分离的衣原体抗原一起可以提供针对衣原体的免疫,其与霍乱毒素一样有效,但是没有有害的毒性副作用。基于现有观测一些脂质组合物当与活生物体一起使用时可以改善免疫应答(PCT/NZ2002/00132,引入本文作参考),这个发现是完全出乎意料的。

[0022] 类似地,我们出乎意料地发现一些脂质组合物当用作佐剂或者载体时与幽门螺杆菌抗原一起可以提供针对粘膜幽门螺杆菌感染的免疫。这个发现基于现有观测是完全出乎意料的。

[0023] 另外,口服疫苗接种存在由于疫苗抗原在胃和消化系统的其它部分的降解所致的主要问题。这些问题可以是由于抗原在到达免疫诱导部位如淋巴集结之前的胃酸性和/或蛋白酶解破坏所致。因此,肠相关淋巴组织("GALT")的不适宜刺激也可以诱导口服免疫耐受而非获得性免疫,不导致保护而是可以恶化与抗原相关的病症状。

[0024] 因此,本文首次证实灭活抗原(killed antigen)(与活生物体或减毒生物体相反)可以在口服活性疫苗中施用,并且可以诱导粘膜免疫,由此保护动物免受病原生物体的粘膜感染。

[0025] 附图简述

[0026] 本发明参照其特定的实施方案进行描述。本发明其它特征可以参照附图理解,其中:

[0027] 图1A和1B描绘了血清中(图1A)和阴道灌洗中(图1B)MOMP特异性抗体的图,IgG和IgA由ELISA确定。y轴显示终点效价(E.P.T)比率,其通过用免疫组E.P.T除以非免疫对照E.P.T而确定。脂质C和衣原体MOMP一起产生与非免疫动物相比大约加倍的IgA生产,这个效果类似于用CpG/CT和MOMP一起所观测到的。我们的结论是脂质C可以增加阴道粘膜对衣原体MOMP抗原的免疫学应答。结果代表两个单独实验,每个实验中每组5只小鼠。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$,与未免疫对照相比。误差杆,平均值的标准误差。

[0028] 图2A和2B描绘了在用鼠型沙眼衣原体进行活细菌攻击后从阴道拭子回收的细菌。在用鼠型沙眼衣原体进行阴道内攻击后以3天间隔从经免疫的(与CpG/CT混合的MOMP、脂质C配制的MOMP或者脂质C配制的与CpG/CT混合的MOMP)和对照小鼠收集阴道拭子。以3天间隔经细胞培养确定从阴道拭子的活细菌回收(细菌释放(bacterial shedding))(图2A)。感染性总水平通过测量每个曲线下面积确定(图2B)。结果代表每组5个动物的2个独立实验。我们出乎意料地发现与暴露于单独MOMP的动物相比脂质C

和 MOMP 一起降低细菌释放大约 60% (图 2B)。CpG/CT 和 MOMP 一起降低细菌释放 57%。另外,我们出乎意料地发现与 CpG/CT+MOMP 处理的动物相比脂质 C 降低细菌释放 (脂质 C+MOMP+CpG/CT) 大约 48% * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, 与未免疫对照相比。误差杆,平均值的标准误差。这些结果表明脂质 C 可以与 CpG/CT 协同作用以提高阴道粘膜的免疫学应答。

[0029] 图 3A 和 3B 描绘了血清 (上部) 和粪便沉淀洗液 (fecal pellet wash) (下部) 中的幽门螺杆菌特异性抗体的图。IgG 和 IgA 由 ELISA 确定。y 轴显示终点效价 (E. P. T) 比率,其通过用免疫组 E. P. T 除以非免疫对照 E. P. T 而确定。结果代表两个单独实验,其在每个实验中含有每组 5 只小鼠。图 3A 显示与未免疫对照相比脂质 C 增加血清中幽门螺杆菌特异性 IgG 的产生。另外,图 3B 显示脂质 C 增加粪便沉淀中的幽门螺杆菌特异性 IgA 的产生 (图 3B)。用脂质 C 和幽门螺杆菌抗原观测的保护程度在回收的细菌降低大约 25%,其代表生物体中降低的细菌载荷。误差杆,平均值的标准误差。这些结果表明脂质 C 可以促进胃肠道中的粘膜免疫。

[0030] 图 4A、4B 和 4C 描绘了血清 (图 4A)、支气管肺泡灌洗 (图 4B) 和阴道灌洗 (图 4C) 中衣原体 MOMP 特异性抗体的图。IgG 和 IgA 效价由 ELISA 确定。y 轴显示终点效价 (E. P. T) 比率,其通过用免疫组 E. P. T 除以非免疫对照 E. P. T 而确定。结果代表两个单独实验,其在每个实验中含有每组 5 只小鼠。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与未免疫对照相比。误差杆,平均值的标准误差。口服脂质 C 加 MOMP 产生了血清 IgG 的适度升高 (图 4A)。口服脂质 C 加 MOMP 在呼吸道中效果很小 (图 4B)。相反,口服脂质 C 加 MOMP 使阴道 MOMP 特异性 IgA 增加大约 2 倍 (图 4C)。

[0031] 图 5 描绘了用幽门螺杆菌 SSI 胃内攻击后细菌回收的图。小鼠在最终免疫之后 1 周用两次胃内接种 1×10^7 cfu 幽门螺杆菌 SSI 而攻击。在活细菌攻击后 6 周,将胃组织匀浆并在含有 GLAXO- 补充物的 CSA 琼脂平板上培养 6 天 (见材料和方法)。y 轴显示匀浆胃组织的菌落形成单位数量 /g (cfu/g), 由 log 尺度表示。用脂质 C 和幽门螺杆菌 SS1 抗原组合免疫导致在胃内接种后 6 周从胃组织回收的细菌与非免疫动物相比降低大约 25%。与未免疫对照相比,幽门螺杆菌加 CpG/CT 降低细菌回收,而加入脂质 C 进一步降低细菌回收大约 85%。结果代表两个独立实验。与未免疫对照相比 * $p < 0.05$; 每个实验每组 $n = 5$ 只动物。误差杆,平均值的标准误差。这些结果表明含有脂质 C 的口服组合物可以促进胃中针对幽门螺杆菌的粘膜免疫。

[0032] 图 6 描绘了用鼠型沙眼衣原体活细菌攻击后从肺组织回收的细菌。用活鼠型沙眼衣原体鼻内攻击由与 CpG/CT 混合的 MOMP 口服免疫的、由脂质 C 配制的 MOMP 口服免疫的、或者由脂质 C 配制的与 CpG/CT 混合的 MOMP 口服免疫的雌性 BALB/c TCI 以及及未免疫的对照小鼠。细菌攻击后 12 天 (峰值感染点) 取出肺,通过培养确定回收的活衣原体的量。结果代表两个独立实验。这些结果显示用脂质 C 和 MOMP 一起口服免疫与未免疫对照相比降低衣原体的回收 * $p < 0.05$; 每个实验每组 $n = 5$ 只动物,误差杆是平均值的标准误差。

[0033] 详细描述

[0034] 粘膜免疫

[0035] 粘膜表面是病原生物体进入的主要入口 (portal)。因此,它们由粘膜免疫系统防御,所述系统与全身性免疫系统在功能和解剖学上是不同的。粘膜和全身性免疫系统一起工作以提供针对病原体的保护作用。在肠中,抗原呈递细胞 (APC) 选取 (sample) 腔抗

原 (luminal antigen) 将表位呈递给淋巴集结中的淋巴细胞并排出 (draining) 肠系膜淋巴结 (Owen, R. and A. Jones, *Gastroenterology*, 1974. 66(2) :p. 189-203 ;Iwasaki, A. and B. Kelsall, *J ExpMed*, 2000. 191(8) :p. 1381-94)。作为在 APC 和淋巴细胞群体中丰富的主要的粘膜诱导部位, 肠相关淋巴组织 (GALT) 代表了用于通过口服免疫诱导保护性粘膜免疫的有吸引力的位点。

[0036] 胃肠道暴露于各种抗原, 其包括产生自正常代谢过程的“自身”抗原、摄入的食物抗原及来自共生菌群或病原生物体的那些抗原。为了有效起作用, 需要免疫系统从可能对宿主“有害”的那些抗原中区分“好”抗原。口服耐受性是免疫系统用于产生对视为无害的那些抗原免疫无应答状态的特定机制。在口服免疫后用于免疫呈递的抗原摄取可以通过许多机制实现。肠细胞摄取、加工并呈递抗原给基底外侧表达的 MHC II 类分子上的 T 细胞 (S. G. Mayrhofer, and L. Spargo, in *Immunology*. 1990 ;Hershberg, R. M., et al., *J Clin Invest*. 1998. p. 792-803)。

[0037] 位于整个固有层的树突状细胞 (DC) 通过上皮细胞之间的紧密连接而“挤压”它们的树突来选取腔抗原 (Rescigno, M., et al., *Nat Immunol*, 2001. 2(4) :p. 361-7)。小结相关上皮 (M) 细胞非特异性地转运腔抗原穿过小肠上皮屏障至下面的抗原呈递细胞 (APC) 包括 DC 和巨噬细胞 (Bockman, D., et al., *Ann N Y Acad Sci*, 1983. 409 :p. 129-44 ;Bockman, D. and M. Cooper, *Am J Anat*, 1973. 136(4) :p. 455-77 ;Neutra, M. R., et al., *Cell Tissue Res*. 1987. p. 537-46)。通过主动免疫引入 GALT 的蛋白质抗原通常导致诱导耐受而非免疫。

[0038] 因为胃肠道是入口且因为其形成容易接近的、无损伤免疫接种途径, 因此口服免疫长期被认为是针对通过胃肠道、呼吸道和泌尿生殖道衬层的粘膜表面侵袭身体感染性介质保护宿主的有吸引力的手段。如在许多动物研究中证实的那样, 口服免疫的潜力还没有在人类中实现, 仅口服脊髓灰质炎、口服破伤风和口服霍乱疫苗被批准用于人类, 它们均是活减毒疫苗。阻止口服免疫在人类中应用的限制包括需要大的抗原剂量, 正常消化过程对抗原的破坏及需要强粘膜佐剂以克服口服耐受的诱导, 所述口服耐受经常由摄入的蛋白质亚单位抗原而诱导 (Weiner HL. *J Clin Invest* 2000Oct ;106(8) :935-7)。

[0039] 口服免疫是不用针的有成本效益的方法, 其容易施用并且不伴有在人与人之间扩散诸如 HIV、乙型肝炎和丙型肝炎等疾病的风险 (Giudice, E. L. and J. D. Campbell, *Adv Drug Deliv Rev*. 2006. p. 68-89)。口服途径也是免疫野生动物的重要方法。口服方案避免了与目前使用的侵袭性捕获以及释放的疾病控制方法相关的动物压力 (Cross, M. L. et al., *Vet J*. 2006)。由于这些原因, 口服途径提供了免疫大的动物群和人群以使传染性疾病的传播最小化的潜力。在人类中广泛应用的商业口服疫苗包括萨宾 (Sabin) 脊髓灰质炎疫苗、活减毒伤寒疫苗及灭活全细胞 B 亚单位和活减毒霍乱疫苗。

[0040] 这些结果表明口服施用的本发明疫苗在幽门螺杆菌情况中可以作用于胃 (图 3 和图 5), 而在衣原体情况中可以作用于生殖道和肺 (图 1、图 2、图 4 和图 6)。这些结果还说明本发明疫苗输送至粘膜表面能够在各种其它粘膜表面触发应答。这些发现因此证实本发明疫苗组合物提供了本领域长期存在问题的解决方案。本发明脂质组合物能进一步增加由传统佐剂 CpG 和 CT 引起的粘膜免疫的发现表明本发明组合物可以协同作用以促进粘膜免疫。

[0041] 疫苗佐剂

[0042] 为改善免疫应答,抗原已与许多佐剂物质混合以刺激免疫原性。常用佐剂包括明矾和水包油乳液。后一组典型代表为弗氏矿物油佐剂。但是,在人类和兽用疫苗中使用弗氏完全佐剂(FCA)是禁忌,因为已报道有毒性反应。为此,弗氏佐剂可能也不适用于口服施用。

[0043] 在水包油乳液中因为油含量高而需要表面活性剂。表面活性剂的去污剂性质使它们不适用于肠胃外或者口服施用。另外,甚至经批准的表面活性剂的毒性反应也已有报道。乳液的另外的缺点是它们是一种不混溶液体分散在另一种中的异质系统。这种制备物通常不稳定并且导致水相随时间分离,因此维持疫苗呈稳定悬浮液有困难。另外,在油包水乳液的水相或者传统脂质体中捕获的抗原不太可能被保护而免于在胃中或消化系统其它部分中降解。相反,本发明的含有脂质的组合物及其使用方法可以在消化道中保护脆弱的蛋白质抗原,由此使得它们能到达淋巴集结及胃肠道中的其它免疫敏感性结构,由此提供对粘膜的免疫学保护。

[0044] ADP-核糖基化外毒素

[0045] 为了促进用弱免疫原性蛋白质抗原口服免疫后的获得性免疫,使用佐剂如ADP-核糖基化外毒素(bARE)增强免疫活化及防止诱导口服耐受性。口服免疫的动物研究中最常用的佐剂ADP-核糖基化细菌外毒素(ABARES)(Williams NA, Hirst TR, Nashar TO. *Immunol Today* 1999Feb ;20(2) :95-101)如霍乱毒素(CT)和大肠杆菌热不稳定毒素(LT)因为胃及神经学毒性而不能用于人类中(van Ginkel FW et al., *J Immunol* 2000 ; 165(9) :4778-82)。为此人类的口服免疫潜力仅在可以发现安全佐剂以代替如ABARES的佐剂时才能实现。ABAREs如CT或LT是粘膜免疫的有力刺激物并且已实验用于许多免疫途径如口服、鼻内和经皮(Holmgren, J., et al., *Vaccine*,1993. 11(12) :p. 1179-84 ; Hickey, D. K., et al., *Vaccine*,2004. 22(31-32) :p. 4306-15 ;Skelding, K. A., et al., *Vaccine*,2006. 24(3) :p. 355-66 ;Glenn, G., et al., *J Immunol*,1998. 161(7) :p. 3211-4 ; Yu, J., et al., *Infect Immun*,2002. 70(3) :p. 1056-68 ;Berry, L. J., et al., *Infect Immun*,2004. 72(2) :p. 1019-28)。但是,它们在使用口服和鼻内途径的兽医和人类免疫方面的应用由于毒性而受限,毒性包括胃肠流体平衡的破坏及在中枢神经系统毒素的聚积(vanGinkel, F., et al., *J Immunol*,2000. 165(9) :p. 4778-82)。

[0046] 用于与本发明组合物相比的熟知的有力粘膜佐剂CT和CpG分别通过细胞to11样受体9(TLR9)和神经节苷脂受体(GM-1)激活免疫应答。GM-1和TLR的激活和信号传导依赖于细胞膜脂膜筏(lipid rafts)群(association),其允许蛋白质和信号传导分子的共定位(Fujinaga, Y., et al., *MolecularBiology of the Cell*.2003 ;Orlandi, P. A. and P. H. Fishman, *J Cell Biol*.1998. p. 905-15 ;Wolf, A. A., et al., *J Biol Chem*.2002. p. 16249-56 ;Triantafilou, M., et al., *J Cell Sci*.2002. p. 2603-11 ;Triantafilou, M., et al., *J Biol Chem*.2004. p. 40882-9 ;Dolganiuc, A., et al., *Alcohol Clin Exp Res*.2006. p. 76-85 ;Latz, E., et al., *Nat Immunol*.2004. p. 190-8)(Fujinaga, Y., et al., *Molecular Biology of the Cell*.2003 ;Orlandi, P. A. and P. H. Fishman, *J Cell Biol*.1998. p. 905-15 ;Wolf, A. A., et al., *J Biol Chem*.2002. p. 16249-56 ;Triantafilou, M., et al., *J Cell Sci*.2002. p. 2603-11 ;Triantafilou, M., et al., *J Biol Chem*.2004. p. 40882-9 ;Dolganiuc, A., et al., *Alcohol Clin Exp Res*.2006. p. 76-85 ;Latz, E., et

al., Nat Immunol. 2004. p. 190-8)。

[0047] 脂膜筏由鞘脂和含有高比例饱和脂肪酸的胆固醇组成,导致比周围不饱和磷脂更致密堆积的区域 (Simons, K. and W. L. Vaz, Annual review of biophysics and biomolecular structure. 2004. p. 269-95 ;Dykstra, M., et al., Annu Rev Immunol. 2003. p. 457-81)。游离脂肪酸插入到膜双层内直接根据它们的结构组织成不同结构域,并且由于脂肪酸的高周转率,脂肪酸的含量是动态的 (Klausner, R. D., et al., J Biol Chem. 1980. p. 1286-95)。饱和脂肪酸的掺入通过促进形成脂膜筏而直接影响膜细胞信号传导机制,并且反过来由高比例不饱和脂肪酸而抑制 (Stulnig, T. M., et al., J Cell Biol, 1998. 143(3) :p. 637-44 ;Stulnig, T. M., et al., J Biol Chem. 2001. p. 37335-40 ;Weatherill, A. R., et al., J Immunol, 2005. 174(9) :p. 5390-7)。

[0048] 脂质体

[0049] 为保护疫苗存活性,研究者已探索开发了各种递送运载体包括惰性颗粒、脂质体、活载体和病毒样颗粒 (VLP) (Bangham, A. D. and R. W. Home, J Mol Biol. 1964. p. 660-8 ;Niikura, M., et al., Virology. 2002. p. 273-80 ;Guerrero, R. A., et al., J Virol. 2001. p. 9713-22)。

[0050] 脂质体和脂质小泡也已被探索用于疫苗,特别是用于可以容易包囊的小免疫原性成分。通常,脂质体和小泡不用于包囊大抗原如活微生物。另外,脂质体和小泡的生产昂贵且耗时,它们的制备中使用的提取程序可导致疫苗制备物的化学结构或者存活性的改变及因此的其免疫原性的改变。例如,加热和溶剂可改变免疫原性成分如蛋白质的生物学完整性。

[0051] 脂质体通常是小的 (在微米大小范围),及是球形层状 (lamellar) 结构,其具有可以放置抗原或者其它材料的内侧。脂质体通过将脂质与含有抗原或其它材料的水溶液混合而制成。在涡旋该混合物后,混合物中的脂质倾向于自发形成典型脂质体结构。在一些情况中,可以加入去污剂以帮助脂质成分与水相成分的混合。通过透析除去去污剂,脂质和水相倾向于分离,且脂质自发形成脂质体结构将水相包囊。脂质体然后通常保持在悬浮液中备用。

[0052] 对脂质体接种的免疫学应答高度依赖于该脂质的物理化学性质,因此采用许多成熟及复杂的技术,包括反相蒸发、醚汽化、冻-融挤出和脱水-再水合 (Szoka, F. and D. Papahadjopoulos, Proc Natl Acad Sci USA. 1978. p. 4194-8 ;Deamer, D. and A. D. Bangham, Biochim Biophys Acta. 1976. p. 629-34 ;Chapman, C.J., et al., Chem Phys Lipids. 1991. p. 201-8 ;Sou, K., et al., Biotechnol Prog. 2003. p. 1547-52 ;Kirby, C.J. and G. Gregoriadis, Journal of microencapsulation. 1984. p. 33-45)。

[0053] PCT 国际专利申请号 PCT/KR00/00025 (W000/41682 ;以下“Kim”) 揭示了一种“亲脂微粒”(即脂质体),其掺入蛋白质药物或者抗原。所述微粒具有 0.1-200 μ m 的大小。该亲脂微粒可以通过用在水溶液中的亲脂物质或者使用有机溶剂包被含有活性成分的固体颗粒而制备。所得组合物包括适于注射的水包油乳液。不幸地, Kim 的微粒不适用于口服摄取。它们进一步也不太适于提供当抗原通过消化系统时的保护。因此, Kim 的微粒不提供有效的粘膜口服免疫。

[0054] 另外,制备脂质体的方法需要成熟的制造技术,这限制了大规模生产的成本效率

(Szoka, F. and D. Papahadjopoulos, Proc Natl Acad Sci USA. 1978. p. 4194-8 ;Deamer, D. and A. D. Bangham, Biochim Biophys Acta. 1976. p. 629-34 ;Chapman, C. J. , et al. , Chem Phys Lipids. 1991. p. 201-8 ;Sou, K. , et al. , Biotechnol Prog. 2003. p. 1547-52 ;Kirby, C.J. and G. Gregoriadis, Journal of Microencapsulation. 1984. p. 33-45)。

[0055] 脂质体在口服免疫中应用有限,部分是因为它们是脆弱的,以及因为水性内腔中的抗原可以随时间降解。另外,典型用于制备脂质体的脂质是在室温是液体的那些,因此,它们通常在储存条件下是液体形式。这些特征限制了基于脂质体的疫苗的保存期限。

[0056] 免疫刺激复合物

[0057] 已知为 ISCOMS®的免疫刺激复合物主要由具有限定的极性和非极性区域的磷脂和胆固醇分子组成。另外, ISCOMS®含有高免疫原性佐剂皂苷 (Quil A) (Morein, B. , et al. , Nature. 1984. p. 457-60)。磷脂形成球形环,产生由周围的疏水性力保持在一起的脂双层,并且将水相内的各种抗原包裹。在两个系统中,保持膜完整性均很关键,否则抗原被释放进局部环境并经受降解。因此,保持最佳储存条件对于疫苗存活性和输送是重要的。ISCOMS®需要比于脂质体较不复杂的制造技术,如透析、超滤和超离心 (Sjölander, A. , et al. , Vaccine. 2001. p. 2661-5)。这些方法不必然产生抗原的自发掺入。

[0058] 另外,最近描述了另一种佐剂。ISCOMATRIX®是类似于 ISCOMS®的脂质佐剂。但是, ISCOMATRIX®不物理掺入抗原而是作为佐剂共施用以通过皂苷的免疫原性性质来诱导免疫,因此其不用作在口服免疫期间保护疫苗抗原的输送运载体 (Skene, CD. and P. Sutton, Methods. 2006. p. 53-9)。脂质体和 ISCOMS®已实验用于经各种途径包括肌肉内、皮下、鼻内、口服及经皮输送疫苗 (Mishra, D. , et al. , Vaccine. 2006 ;Wang, D. , et al. , J Clin Virol. 2004. p. S99-106 ;Perrie, Y. , et al. , Journal of liposome Research. 2002. p. 185-97)。

[0059] 用于粘膜免疫的作为口服疫苗佐剂及载体的脂质组合物

[0060] 上述产生粘膜免疫的困难出人意料地由本发明的含有脂质的组合物所克服。代替现有技术所使用的典型短链脂质 (例如油) 或者磷脂,我们发现使用长链脂肪酸作为脂质基质以保持抗原在悬浮液中相对于现有技术组合物具有独特优势。首先,长链脂肪酸在胃肠道中更抗降解,因此提供保护性周围环境,在其中抗原保持它们的天然构象,由此增加粘膜中的免疫应答。

[0061] 人类和其它动物消耗脂质作为它们日常饮食并且脂肪 (三酰基甘油) 的消化是正常代谢过程。脂质在胃中很少被胃酸降解,大约 90% 脂质消化发生在肠道中由胆汁盐和脂酶进行 (Erickson, R. H. and Y. S. Kim, Annu Rev Med. 1990. p. 133-9)。

[0062] 在口服免疫期间,饱和脂肪酸不像不饱和脂肪酸那样容易掺入胆汁盐微团,因此不容易被肠细胞吸收。过量的腔 (luminal) 饱和脂肪酸可以与疫苗成分非特异性转移穿过特化的小结相关上皮“M”细胞。在上皮下穹隆 (sub epithelial dome) 内脂质基质的饱和脂肪酸部分掺入抗原呈递细胞 (APC) 的膜双层中,促进功能性 GM-1 受体和 TLR 复合物的上调。本发明的脂质配制的疫苗的增强的保护作用通过完整抗原的物理输送及粘膜佐剂对 APC 的激活均可以是两倍。

[0063] 与许多用于药物和疫苗的现有技术脂质组合物相反,本发明的脂质组合物由甘油三酯而非磷脂组成。甘油三酯不含有极性和非极性区域,因此不组织成同心球形双层。相

反,用于本发明疫苗中的脂质可以形成网状基质,在其中疫苗成分被捕获。这在暴露于变化的储存因素如湿度和水分期间及在胃的强酸性不适环境中提供了对掺入脂质的抗原的物理保护。

[0064] 上述配制物中采用的脂质被希望适用于动物或者人类消耗并且可以选自广泛的天然(源于植物或者动物的)或者合成脂质产品,包括油、脂肪和蜡。在开发新疫苗时,避免产生不利副作用是疫苗应用于人类中的试验的主要决定因素。使用“安全的”亚单位抗原而不共施用毒性佐剂将是理想的。本发明的脂质配制物使用不与任何副作用相关的食品或者药品级膳食脂肪酸制造。用这种脂质配制的 MOMP 口服免疫诱导显著的保护呼吸道和生殖器粘膜免于衣原体感染的作用。另外,将灭活的全细胞幽门螺杆菌掺入本发明的脂质配制物在用幽门螺杆菌 SS1 活细菌攻击后在胃肠道引起保护作用(图 3 和图 5)。用脂质 C 和幽门螺杆菌抗原所观测到的这种保护程度在回收的细菌中降低大约 25%,其代表在动物中降低了的细菌负荷。免疫导致在用幽门螺杆菌 SS1 胃内接种后六周从胃组织回收的细菌显著降低。

[0065] 灭活的全细胞生物体由众多未鉴别的、也未分离其免疫原性的抗原组成。但是纯化的 MOMP 是含有 I 类和 II 类 T 细胞表位的免疫显性表面抗原(Caldwell, H. D., et. al., Infect Immun. 1981. p. 1161-76)。本发明的 MOMP 脂质配制物引发针对呼吸道和生殖器衣原体感染部分保护小鼠的免疫应答。

[0066] 本发明疫苗的生产是简单的廉价机械过程,无专门的技能或设备需求。尽管脂质体和 ICOMS®与其它非脂质输送载体相比被突出为较廉价的选择,本发明组合物的简便性可以提供更廉价的选择。

[0067] 在一些实施方案中,脂质配制物可以在高于约 30°C 的温度是液体。即,可以选择脂质以实现在最常见通过口服途径施用的动物中处于生理学温度的熔点。希望的是,脂质在大气压于 10°C -30°C 是固体形式,优选在大气压下在 20°C -30°C 仍然是固体。但是脂质的溶解温度不是排他的,并且可以包括具有各个范围溶解温度的油、脂肪和蜡。

[0068] 在一些实施方案中,用于本文的脂质在大约 30°C 和大约 37°C 的人类生理温度之间可经历从固相到液相的转变。脂质相行为的总结可得自现有技术。因此,本领域技术人员可以基于现有技术的信息和简单的实验来选择具有所希望的性质和熔点的脂质。

[0069] 通常,合适的脂质配制物可以包括甘油三酯如羧酸的甘油酯,由脂族链和 -COOH 末端组成的化合物,饱和和不饱和脂肪酸及其混合物。

[0070] 在一些实施方案中,甘油三酯可以主要含有 C₈-C₂₀ 酰基基团,例如豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、parinic acid、月桂酸、亚麻酸、花生四烯酸及二十碳五烯酸,及其混合物。

[0071] 在一些实施方案中,用于本发明的脂质配制物包括较长链的脂肪酸,例如 C₁₆-C₁₈。已发现在用于小鼠和负鼠(possum)的疫苗中的生物体如 BCG 的保护中长链脂肪酸更有效。由此,优选用于本发明的脂质配制物含有:约 30%至约 100%、或者约 60%至约 100%、或者大约 80%至约 100%、及在其它实施方案中约 90%至约 100%的 C₁₆ 和 / 或 C₁₈ 脂肪酸。

[0072] 在其它实施方案中,C₁₆ 脂肪酸可以代表约 10%至约 40%、或者约 20%至约 35%、及在其它实施方案中约 25%至约 32%的总脂肪酸含量。C₁₈ 脂肪酸可以代表约 30%至约 90%、或者约 50%至约 80%、及在其它实施方案中约 60%至约 70%的总脂肪酸含量的 C₁₈。

[0073] 其它实施方案具有含有少于约 35% C₁₄ 脂肪酸或者更短的脂质配制物,或者少于约 25%、及在其它实施方案中少于约 10%。

[0074] 在一些实施方案中脂质链长是 C₁₄ 链或者更短的少于约 5% 脂肪酸,约 25% 至约 35% 的 C₁₆ 脂肪酸,及约 60% 至约 70% 的 C₁₈ 脂肪酸链。

[0075] 在一些实施方案中,用于本发明的脂质配制物可以含有:量为约 20% 至约 60%、或者约 30% 至约 55%、及在其它实施方案中约 40% 至约 50% 的饱和脂肪酸。单不饱和脂肪酸可以在约 25% 至约 60%、或者约 30% 至约 60%、及在其它实施方案中约 40% 至约 55% 的范围。多不饱和脂肪酸可以在约 0.5% 至约 15%、或者约 3% 至约 11%、及在其它实施方案中约 5% 至约 9% 的范围。

[0076] 本发明的一些实施方案包括约 40% 至约 50% 饱和脂肪酸、约 40% 至约 50% 单不饱和脂肪酸及约 5% 至约 9% 多不饱和脂肪酸。

[0077] 在一些实施方案中,用于本发明的脂质配制物经 HPLC 分析测定具有约 3% 豆蔻酸、约 26% 棕榈酸、约 15% 硬脂酸、约 40% 油酸和约 6% 亚油酸。

[0078] 在其它实施方案中,本发明的脂质配制物具有约 1% 豆蔻酸、约 25% 棕榈酸、约 15% 硬脂酸、约 50% 油酸和约 6% 亚油酸(脂质 C)。在这些实施方案的一些中,组合物含有脂质 C 和 MOMP。在其它实施方案中,组合物含有脂质 C 和幽门螺杆菌抗原。如本文所用,术语“脂质 C”和“LipoVax”是等价的。

[0079] 本发明的其它实施方案包含脂质 C 的变异“脂质 Ca”,具有 2.8% 豆蔻酸、22.7% 棕榈酸、2.5% 棕榈油酸、1.1% 曼陀罗酸(daturic acid)、15.9% 硬脂酸、38.0% 油酸(C18:1n-7)、1.7% 油酸(C18:1n-9)和 4.0% 亚油酸,具有 42.4% 的总饱和脂肪组成,42.2% 的单不饱和脂肪组成,及 4.0% 的多不饱和脂肪组成。在这些实施方案的一些中,组合物含有脂质 Ca 和 MOMP。在其它实施方案中,组合物含有脂质 Ca 和幽门螺杆菌抗原。

[0080] 或者,本发明的脂质配制物包括氢化椰子油(“脂质 K”)。一些含有脂质 K 的组合物包括 7.6% 辛酸(C8:0)、6.8% 癸酸(C10:0)、45.1% 月桂酸(C12:0)、18.3% 豆蔻酸(C14:0)、9.7% 棕榈酸(C16:0)、2.7% 硬脂酸(C18:0)、7.7% 油酸(C18:1)和 2.3% 亚油酸(C18:2)并且具有约 27.1°C 的熔点。在这些实施方案的一些中,组合物含有脂质 K 和 MOMP。在其它实施方案中,组合物含有脂质 K 和幽门螺杆菌抗原。

[0081] 含有脂质 K 其它变体的实施方案(脂质 Ka)包含具有如下重量组成的脂肪酸,6.5% 的己酸(C6:0)、5.4% 癸酸(C10:0)、44.5% 月桂酸(C12:0)、17.8% 豆蔻酸(C14:0)、9.8% 棕榈酸(C16:0)、11.5% 硬脂酸(C18:0)、2.2% 油酸(C18:0),及 95.5% 的总饱和脂肪组成,和 2.2% 的单不饱和脂肪组成。在这些脂质 Ka 实施方案的一些中,组合物含有脂质 Ka 和 MOMP。在这些脂质 Ka 实施方案的其它一些中,组合物含有脂质 Ka 和幽门螺杆菌抗原。

[0082] 在其它替代方案中,本发明脂质配制物包括药用级的氢化椰子油(脂质 PK)。在一些含有脂质 PK 的实施方案中,包含具有如下重量组成的脂肪酸,7.0% 的己酸、5.8% 癸酸、45.0% 月桂酸、18.2% 豆蔻酸、9.9% 棕榈酸、2.9% 硬脂酸、7.6% 油酸及 2.3% 亚油酸,及 88.8% 的总饱和脂肪组成、7.6% 的单不饱和脂肪组成、和 2.3% 的多不饱和脂肪组成。在这些实施方案的一些中,组合物含有脂质 PK 和 MOMP。在其它实施方案中,组合物含有脂质 PK 和幽门螺杆菌抗原。

[0083] 在另外替代方案中,本发明脂质配制物包括“脂质 SPK”,其具有如下重量组成,

6.7%的己酸、5.6%癸酸、44.3%月桂酸、17.9%豆蔻酸、9.6%棕榈酸、3.0%硬脂酸、8.4%油酸及2.6%亚油酸,及87.3%的总饱和脂肪组成、8.4%的单不饱和脂肪组成、和2.6%的多不饱和脂肪组成。在这些实施方案的一些中,组合物含有脂质 SPK 和 MOMP。在其它实施方案中,组合物含有脂质 SPK 和幽门螺杆菌抗原。

[0084] 组合物可容易地由轻易可得的脂质成分制造。在一些实施方案中,本发明的脂质组合物由纯化的和分级分离的甘油三酯组成,所述甘油三酯当加热至 37°C 以上的熔融态时允许掺入各种抗原和免疫调节剂,但是一旦冷却其形成固体稳定相 (Aldwell, F. E., et al., *Infect Immun*, 2003. 71(1) :p. 101-8)。本发明疫苗的制造是简单的廉价机械过程,无专门技能或者设备的需求。尽管脂质体和 ICOMS®与其它非脂质输送载体相比被突出为较廉价的选择,制造本发明疫苗的简便性提供更廉价的选择。

[0085] 本发明的脂质配制物可用于制备免疫原性组合物,用于保护组合物内抗原免于降解。所述脂质配制物特别用于维持活生物体特别是细菌的存活性。所述脂质配制物发挥作用以维持生物体在活的但休眠状态。这对于配制用于口服施用的包含活生物体的疫苗是特别重要的。脂质也将抗原维持在均匀悬浮液中。即,本发明组合物中免疫原性成分可以均匀分布在整个固体或糊状脂质基质中。脂质还保护抗原在口服施用免于被胃肠分泌物破坏。当通过其它途径施用如皮下施用保护免受巨噬细胞攻击也是可能的。这允许通过胃肠粘膜摄取抗原特别是活生物体,随后在宿主中复制生物体。

[0086] 本发明组合物在储存条件期间对降解更具抗性。例如,已知脂质体长时间储存时聚集,在一些情况中,脂质体制备物可能需要正或负电荷必须加入脂质体中,以提供静电排斥以有利于将脂质体维持在悬浮液中。

[0087] 免疫原性成分

[0088] 通常,疫苗包括一或多种可以产生针对其的免疫应答的物质。这种物质包括脂质、蛋白质、碳水化合物或者其它生物体特异性成分。要求是简单的,所述物质必须能被呈递到免疫细胞并且该免疫细胞必须能产生免疫应答。在许多情况中,蛋白质是免疫原。

[0089] 在其它情况中,使用活生物体。经这个途径皮下免疫人类后的有效保护通常对于生物体如 BCG 是高度可变的,其范围为 0-80% (Colditz, G. A., et al., *Pediatrics*. 1995. p. 29-35 ;Colditz, G. A., et al., *JAMA*. 1994. p. 698-702 ;Fine, P. E., *Lancet*. 1995. p. 1339-45)。

[0090] 最近发明人之一和同事使用了基于脂质的口服输送系统,脂质 C,用于在动物中口服输送疫苗 (Aldwell FE, et al., *Infect Immun* 2003 ;71(1) :101-8 ;Aldwell, F., et al., *Vaccine*, 2003. 22(1) :p. 70-6 ;PCT International Patent Application No :PCT/NZ2002/00132)。给小鼠喂食掺入脂质 C 中的牛分支杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 卡介苗 (*Bacille Calmette-Geurin*, BCG) 疫苗产生了对感染的抗性 (Aldwell, FE, et al., *Infect Immun* 2003 ;71(1) :101-8)。类似结果在白尾鹿 (Nol P, et al. *J Wildl Dis* 2008Apr ;44(2) :247-59)、豚鼠 (Clark S, et al., *Infect Immun* 2008 Jun 2) 及刷尾负鼠 (*brush-tail possum*) (Aldwell FE, et al., *Vaccine* 2003Dec 8 ;22(1) :70-6) 中发现,其中用基于脂质 C 的疫苗针对用活牛分支杆菌的气雾剂攻击进行保护。保护水平观测为高于在用非掺入 BCG 免疫的动物中见到的,并且等价于通过皮下途径施用的 BCG,并且伴有全身和粘膜 T 细胞的强干扰素 γ (IFN γ) 产生。因为脂质 C-活减毒疫苗生物体 BCG 的掺入在口服

输送后大大增加其免疫原性,我们确定脂质 C 也可以增强针对经口服途径输送的衣原体或者幽门螺杆菌的限定的亚单位蛋白质抗原的免疫应答。但是,在病原生物体情况中,重要的是保证免疫动物不被病原体严重及不利地影响。

[0091] 与使用上述活生物体抗 BCG 成功免疫相反,使用非活性、非复制性 BCG 抗原不引起免疫原性有效的免疫应答 (M. I. Cross, et al., *Immunology and Cell Biology*, 1-4, 13 November 2007)。因此,现有技术中有另外问题,即使用非感染性抗原产生对病原生物体的有效免疫应答。

[0092] 许多疫苗依赖于使用生物体的冻干制备物。例如,目前用于人类 TB 的疫苗基于称为卡介苗 (BCG) 的活减毒细菌的冻干制备物。但是,已经示出冻干程序导致 BCG 存活性丧失 30% -50% 及剩余活细菌回收受损 (Gheorghiu, M., et al., *Dev. Biol. Stand. Basel, Karger*. 87 :251-261)。在使用前保持生物体更大存活性的组合物会对这种疫苗的有效性有很大贡献。

[0093] 在其它情况中,希望的是使用来自生物体的特异性蛋白。在衣原体情况中,主要外膜蛋白 (major outer membrane protein, MOMP) 被用作免疫原性化合物,因为这个蛋白质参与衣原体生物体的功能。

[0094] 衣原体抗原性成分

[0095] 衣原体外细胞壁含有几种免疫原性蛋白,包括 40 千道尔顿 (kDa) 主要外膜蛋白 (MOM), 两个富半胱氨酸蛋白质, 60-62kDa 外膜复合物 B 蛋白 (OmcB) 和 12-15kDa 外膜复合物 A 蛋白 (OmcA), 74kDa 物种特异性蛋白, 及 31kDa 和 18kDa 真核细胞结合蛋白质, 它们有相同的一级序列。

[0096] 针对来自血清型 L2 的 40kDa MOMP 蛋白的超免疫小鼠抗血清在间接免疫荧光期间与沙眼衣原体血清型 Ba、E、D、K、L1、L2 和 L3 的原体反应,但是不与血清型 A、B、C、F、G、H、I 和 J 或者鸚鵡热衣原体 (*C psittaci*) 反应。事实上,沙眼衣原体 MOMP 基因的克隆及测序揭示血清变型 L2 和 B 的氨基酸数目相同,而血清变型 C 的 MOMP 基因含有编码 3 个额外氨基酸的密码子。衣原体 MOMP 的多样性反映在 4 个序列可变结构域,其中两个是推定的类型特异性抗原决定簇的候选者。沙眼衣原体血清变型中 MOMP 差异的基础是对于紧密相关血清变型的簇生 (clustered) 核苷酸取代及对于远缘相关血清变型的插入和缺失。当 MOMP 插入到外部原体包膜时, MOMP 的暴露结构域作为血清分型和保护性抗原决定簇。C 和 B 血清型的主要保守区中散布有短的可变结构域。

[0097] 已知血清变型 D、E、F、G、H、I、J 和 K 与人类疾病相关。针对血清变型 E、F 和 G 一起的接种会保护大约 75-80% 个体。血清变型 D、E、F、G、H、I、J、K 和 L 与衣原体生殖器感染相关,血清变型 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 和 K 与眼部感染相关。肺炎衣原体也与阿尔茨海默病、冠心病和哮喘相关。

[0098] 识别富半胱氨酸膜蛋白上的表位的 3 种单克隆抗体与全部 15 个人类沙眼衣原体血清型相互作用,建立这个抗原的物种特异性。针对 OmcA 的单克隆抗体显示生物变型特异性和物种特异性。OmcB 和 OmcA 富半胱氨酸蛋白质在天然感染中是高度免疫原性的,但是抗体不中和沙眼衣原体原体的感染性。

[0099] 因此,开发疫苗的候选抗原是衣原体主要外膜蛋白 (MOMP)。我们出人意料地发现用掺入脂质 C 或者与强粘膜佐剂 CT 和 CpG 寡脱氧核苷酸混合的衣原体 MOMP 来口服免疫的

动物针对鼠型沙眼衣原体 (*Chlamydia muridarum*) 的阴道内攻击而被保护。令人惊讶地,我们发现脂质 C、CpG/CT 和 MOMP 组合在一起改善针对鼠型沙眼衣原体攻击的免疫应答,比用脂质 C 加 MOMP 或者 CpG/CT 加 MOMP 观测到的更大。

[0100] 除了 MOMP 介导的免疫,衣原体感染可以通过用除 MOMP 之外的免疫原性成分免疫易感动物而降低。在沙眼衣原体和鸚鵡热衣原体中已识别了几种独特的免疫原性成分,一些是群特异性,其它是物种特异性。已使用去污剂从原体和网状体中提取抗原。肺炎衣原体 (TWAR 生物体) 是血清学独特的并且与沙眼衣原体物种和所有鸚鵡热衣原体株不同。

[0101] 可以理解来自鼠型沙眼衣原体的免疫原性成分也可以掺入组合物中用于在小鼠衣原体感染模型中测试。也可以理解有许多衣原体抗原组合可以混合在一起并且掺入本发明口服活性疫苗中。

[0102] 螺杆菌抗原成分

[0103] 为了提供广谱接种物,可以使用紫外 (UV) 灭活的全细胞幽门螺杆菌悉尼株 (幽门螺杆菌 SS1)。使用全生物体避免了需要确定哪种螺杆菌抗原是免疫原性的。可以理解其它螺杆菌菌株可以使用而不偏离本发明范围。

[0104] 本发明实施方案

[0105] 本发明脂质组合物的制造

[0106] 本发明的组合物可以用本领域已知技术制备。方便地,在需要时加热脂质配制物以液化,并且加入免疫原性成分及上述其他成分 (在使用时)。免疫原性组合物的分散可以通过混合、振荡或者不负面影响免疫原性成分的存活性的其他技术来实现。在一些实施方案中,抗原均匀分散在整个脂质配制物中。

[0107] 用于本发明中的替代组合物可以基本上不含水性成分包括水。术语“基本上不含”如本文所用是指组合物含有小于约 10% 的水性成分,优选小于约 5% 的水性成分。如上所述,成分特别是水性溶剂的存在降低脂质配制物特别是在肠道中的保护作用。

[0108] 本发明的免疫原性组合物也可以用于产生对上述免疫原性成分类型的第二种或进一步的免疫原性分子的应答,特别是那些弱免疫原性的。这可以通过将免疫原性分子与组合物的另一种免疫原性成分缀合来共输送免疫原性组合物中的第二种或进一步的免疫原性分子而实现。缀合可以用标准现有技术实现。特别地,感兴趣抗原可以与免疫原性载体或者佐剂通过不干扰体内抗体产生的接头基团缀合。所述免疫原性载体或佐剂可以是任何免疫原性成分包括上述生物体,但是优选是分支杆菌,更优选是 BCG。合适的接头基团包括甘露糖受体结合蛋白如卵清蛋白和结合 Fc 受体的那些。第二种或进一步的免疫原性分子优选是蛋白质或者肽。特别优选的蛋白质是免疫避孕蛋白 (immunocontraceptive protein)。脂质再一次作为输送基质。当施用组合物时,产生对缀合分子或共输送分子的增强的免疫应答。

[0109] 术语“动物”如本文所用是指温血动物,特别是哺乳动物。人、狗、猫、鸟类、牛、绵羊、鹿、山羊、大鼠、小鼠、兔、负鼠、獾、豚鼠、雪貂、猪和水牛是该术语含义范围内的动物的例子。单胃动物和反刍动物特别包含在本术语中。

[0110] 术语“抗原”在本发明疫苗组合物上下文中等价于术语“免疫原”,是指在动物中能引起免疫应答的物质或者可以被抗体或者动物的免疫系统细胞特异性结合的物质,所述动物已针对所述物质而进行免疫。

[0111] 用于各种输送途径的配制物除了脂质配制物和一或多种免疫原性成分之外还可以包括添加剂,如填充剂、增充剂、粘合剂、湿润剂、乳化剂、缓冲剂、表面活性剂、悬浮剂、防腐剂、着色剂、盐、抗氧化剂包括谷氨酸一钠(MSG)、维生素如维生素E、丁羟茴醚(butylated hydroxanisole, BHA)、白蛋白右旋糖-过氧化氢酶(ADC)、保护性包衣、引诱剂和除味剂(odourant)以及帮助生物体或者脂质中含有的其它抗原存活的制剂,但不限于此。

[0112] 保护性包衣或者肠包衣可以选自例如凝胶、石蜡和塑料包括明胶。当选择口服施用途径时包衣进一步帮助防止暴露于胃酸和酶。

[0113] 当用于口服施用时,配制物还可以包括添加剂,其例如改善适口性,如调味剂(包括茴香油、巧克力和薄荷)和甜味剂(包括葡萄糖、果糖或者任何其它糖或者人工甜味剂)。

[0114] 从以上可以理解免疫原性成分可以是蛋白质或者肽的复合物,或类似物。

[0115] 在一个实施方案中,组合物包括至少两个选自上述任一的免疫原性成分,且可包括亚单位抗原的多个组合。三个或更多个免疫原性成分是可行的。

[0116] 组合物中免疫原性成分的浓度可根据已知技术方案变化,只要其以在施用于动物时有效刺激免疫应答的量存在。特别地,肠道中免疫应答与小肠淋巴组织相关。在分支杆菌情况中, 1×10^5 至 1×10^{10} 菌落形成单位(CFU)/ml的范围是合适的。优选地,浓度为 1×10^7 至 1×10^9 CFU/ml。对于蛋白质和肽类型抗原,包括衣原体MOMP和幽门螺杆菌抗原, 10 - 1000 Fg/g的配制物范围是合适的。对于病毒类型抗原, 1×10^3 至 1×10^{10} 、优选 1×10^5 至 1×10^8 噬斑形成单位(PFU)/ml的范围是合适的。免疫应答可以是体液的(例如经可溶性成分如抗体或者免疫调节物)或者细胞介导的包括粘膜免疫应答。

[0117] 例如,在一系列体内实验中,我们研究了胃螺杆菌和衣原体生殖器、胃肠和呼吸道感染的BALB/c小鼠模型。这些系统公知与人类疾病相关,并被用于确定本发明组合物和方法诱导保护性粘膜免疫的有效性。

[0118] 灭活的或者亚单位疫苗提供了活减毒疫苗的安全替代品,具有更低的相关副作用。用灭活全细胞幽门螺杆菌或者纯化的衣原体MOMP单独口服免疫在活细菌攻击后不保护粘膜表面。我们因此研究了脂质配制的组合物在用非活性全细胞抗原和限定的蛋白质抗原口服免疫后诱导粘膜免疫的潜力,口服免疫添加或者不添加强粘膜佐剂CT和CpG-ODN用于针对螺杆菌和衣原体粘膜感染进行保护。

[0119] 在本公开中,我们证实用配制在本发明脂质组合物中的疫苗口服免疫小鼠增强了在多个粘膜表面针对活细菌攻击的保护作用。与CpG-ODN和霍乱毒素(CpG/CT)混合的脂质配制的灭活全细胞或者蛋白质抗原不仅在肠道局部引起保护作用,而且在解剖学上远处的生殖器和呼吸道表面也引起保护作用。

[0120] 口服免疫的主要限制是确定和维持最佳抗原剂量用于免疫接种。口服施用的抗原以不能预测的和有些低的速率在小肠腔被吸收。导入到GALT的蛋白质抗原通常导致诱导耐受而非免疫(Challacombe, S. J. and T. B. Tomasi, J Exp Med. 1980. p. 1459-72)。为此,口服疫苗需要大剂量抗原和/或佐剂以增强获得性免疫。不幸地,高抗原剂量和毒性佐剂的存在增加了副作用的可能性。在本研究中,单独施用的衣原体MOMP和灭活全细胞幽门螺杆菌均不能保护粘膜表面免受细菌感染,结果与未免疫对照相当。期望强粘膜佐剂的共施用以使用口服途径诱导保护性免疫性。

[0121] 因为 CT 对于人类是毒性的,因此其是本发明人类免疫原性组合物不希望的成分。但是因为 CT 对于一些其他动物不是毒性的,因此 CT 可以包括在免疫原性组合物中以在其他动物中诱导免疫性。

[0122] 因为 CpG 是寡核苷酸,其毒性低于 CT,CpG 可以掺入本发明免疫原性组合物中用于人用。因此,为在人类中诱导免疫性,本发明组合物可以包括衣原体抗原、脂质配制物和 CpG 寡核苷酸。在其它实施方案中,本发明组合物可以包括来自衣原体或者幽门螺杆菌的抗原、包含脂质 C、脂质 Ca、脂质 K、脂质 Ka、脂质 PK 或者脂质 SPK 的脂质配制物及 CpG 寡核苷酸。

[0123] 效用

[0124] 本发明组合物和方法可用于提供针对感染粘膜的生物体的免疫性。因为本发明的含脂质组合物提供粘膜免疫,它们可适于多种用途。本发明的免疫原性组合物包括维持抗原在稳定基质中的脂质配制物,它们可以均匀分散在其中。这促进了恒定剂量抗原的施用,避免剂量倾弃 (dumping) 和无效低剂量。脂质配制物还保护抗原免于被胃酸和消化酶降解。在基于脂质的配制物中的免疫原性成分存活性的丧失也显著低于冻干产物所报道的。由于配制物的疏水性质也可以实现在潮湿或者水分条件下储存而不破坏。

[0125] 疫苗制备物中的免疫原的稳定性对于诱导强的持久保护性免疫是重要的。这可以用本发明的组合物来实现。所述组合物还易于制备,生产更廉价,并且发现了提高的消费者接受性及安全性,其中可以避免使用针和注射器。

[0126] 本公开提供了诱导针对衣原体和螺杆菌感染的粘膜免疫的直接证据。我们出人意料地发现,在 BALB/c 小鼠针对鼠型沙眼衣原体生殖器攻击的保护中,用掺入脂质 C 的 MOMP 口服免疫小鼠与用与强粘膜佐剂 CT 和 CpG 混合的 MOMP 的免疫一样有效。这是令人惊奇的,鉴于与用 CT/CpG 加 MOMP 免疫的那些相比用脂质 C 免疫的小鼠中观测的较低水平 IFN α 产生和生殖道抗体水平。重要的是, MOMP 和 CT/CpG 的脂质 C 掺入导致甚至更高水平的保护作用,提示当佐剂与脂质 C 组合时的协同作用。

[0127] 我们还出人意料地发现用掺入紫外 (UV) 灭活的全细胞幽门螺杆菌悉尼株 1 (幽门螺杆菌 SS1) 的本发明脂质组合物口服免疫有效诱导针对活生物体感染的粘膜免疫。另外,与霍乱毒素 (CT) 和细菌 CpG 寡核苷酸 (CpG-ODN 或者 CpG) 混合的上述组合物也诱导在胃肠、呼吸道和生殖器粘膜的保护性免疫性。

[0128] 本发明脂质 / 抗原组合物提供的保护程度与用抗原加 CpG/CT 作为抗原观测到的那些相当。因此,本发明的脂质组合物提供粘膜免疫而无 CT 和 CpG 的有害副作用。

[0129] 粘膜保护作用与强脾 IFN γ 细胞因子表达及血清和粘膜分泌物中的抗原特异性抗体相关。在血清和 BAL 液中主要检测到 IgG,而 IgA 产生在生殖器灌洗液和粪便洗涤液中明显。在本研究中,在用本发明脂质组合物配制的 MOMP 口服免疫后也观测到无需添加额外佐剂 CT 和 CpG 的保护作用。这导致在活细菌攻击后在呼吸道和生殖道的衣原体负荷降低 50%。用本发明组合物口服免疫在多个粘膜表面有效引起保护性免疫性。

[0130] 尽管口服免疫通常已用于诱导针对胃病原体及程度较低的呼吸道病原体的保护作用,许多研究已证实口服免疫可以靶向妇女生殖道。Challacombe et al. Vaccine 1997 Feb ;15 (2) :169-75 显示用在聚 D,L- 丙交酯 - 共 - 乙交酯 (PLG) 微粒中的卵清蛋白口服免疫引发在阴道灌洗液中显著 OVA 特异性抗体。用活流感病毒口服免疫在膀胱、子宫、阴道和在子宫洗涤液匀浆中引发病毒特异性 IgA (Briese V, et al., Arch Gynecol 1987 ;240 (3) :

153-7)。

[0131] 用表达精子受体 ZP3 的重组沙门氏菌 (*Salmonella*) 口服免疫小鼠在阴道分泌物中引起 ZP-3 特异性 IgA 以及不育 (Zhang X et al., (published erratum appears in *Biol Reprod* 1997Apr ;56(4) :1069). *Biology of Reproduction* 1997 ;56(1) :33-41)。

[0132] 用含有针对衣原体糖脂外抗原的抗独特型抗体的 PLG 微粒口服免疫小鼠也针对沙眼衣原体人类株的生殖器攻击部分地保护小鼠 (Whittum-Hudson JA, et al., *Nature Medicine* 1996 ;2(10) :1116-21)。

[0133] 所有上述研究需要使用活 (流感病毒) 或者减毒 (沙门氏菌) 生物体或者将抗原掺入 PLG 微粒以引发生殖道中的免疫。PLG 微粒的产生是昂贵的, 并且使用的溶剂提取方法可以破坏一些蛋白质抗原的免疫原性。另外, 使用活衣原体疫苗不太可能被批准, 这是因为在活疫苗和灭活疫苗防止沙眼试验后见到的增强的炎性应答所致 (Grayston JT, Wang SP. *Sexually Transmitted Diseases* 1978 ;5(2) :73-7)。

[0134] 因为脂质 C 仅由作为正常饮食部分常规消费的食品级脂质组成并且可以通过简单混合成分而容易地制备, 它们可以提供优于其它颗粒输送系统如脂质体和 PLG 微粒的在制备容易性和成本方面的明显优势。另外, 因为脂质 C 在 33°C 以下形成固体, 其可以保护成分抗原免于储存期间降解, 由此延长疫苗的有效储存寿命。BCG 掺入脂质 C 的确增强其在 4°C 和室温长期储存期间的存活性 (Aldwell FE, et al., *Vaccine* 2006 Mar 15 ;24(12) :2071-8)。

[0135] 本发明脂质配制物的作用机制不完全了解。不受任何特定作用机制限制, 但是, 脂质 C 的佐剂或者载体作用可能是由于各种因素所致。首先, 因为脂肪在小肠中通过胰酶降解而在胃中不降解 (Armand M. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007 Mar ;10(2) :156-64), 本发明组合物可以保护抗原免受胃消化过程和酸性 pH 的破坏并且输送抗原至诱导部位如小肠中的淋巴集结或者小肠树突细胞 (Rescigno M, et al. *Nat Immunol* 2001 ;2(4) :361-7)。

[0136] 脂质还可以通过它们对脂膜筏和膜流动性的影响而直接影响这些诱导部位中的免疫细胞的功能。脂膜筏对于免疫细胞之间的信号传导是关键, 因为信号传导分子如 MHC 分子、T 细胞和 B 细胞受体需要在脂膜筏中聚集以进行有效细胞-细胞信号传导 (Horejsi V. *Immunol Rev* 2003Feb ;191 :148-64; Dykstra M, et al., *Annu Rev Immunol* 2003 ;21 :457-81; Anderson HA, et al., *Nat Immunol* 2000Aug ;1(2) :156-62)。

[0137] 脂膜筏正常含有比周围细胞膜区域更高量的饱和脂肪酸, 可能脂膜筏功能可由脂质 C 中的饱和脂肪酸增强。相反, 增加比例的不饱和脂肪酸可以增加膜流动性, 其可以增强胞吞, 由此潜在增加 APC 对抗原的摄取 (Mahoney EM, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977Nov ;74(11) :4895-9; Weatherill AR, et al., *J Immunol* 2005May 1 ;174(9) :5390-7; Schweitzer SC, et al. *J Lipid Res* 2006Nov ;47(11) :2525-37)。

[0138] 也已报道各种脂质具有抗炎作用及抑制淋巴细胞刺激 (Calder PC, et al., *Biochem Soc Trans* 1989 Dec ;17(6) :1042-3; Calder PC, et al., *Biochem Soc Trans* 1990 Oct ;18(5) :904-5)。其可以用于确定哪些基质对于脂质 C 的佐剂作用是重要的。从食品级脂质配制的佐剂的低毒性可以提供粘膜免疫的另一种显著优势。粘膜应答通常寿命较短, 这是由于浆细胞的短半衰期所导致以及由于妇女生殖道中作为正常生殖周期一部分的组

织重塑所致。由此,可能需要频繁加强以维持保护性免疫水平。在使用脂质 C 的这些及其它研究中,我们观测到脂质 C 多剂量口服没有副作用,提示频繁使用是耐受良好的。

[0139] 载体动物免疫接种

[0140] 降低动物中的疾病的一个方式是降低动物对病原体的暴露。在一些病原体情况中,载体动物可以提供病原体的“库”,即使所述动物不显示疾病迹象或者症状。因此,野生动物如负鼠、獾、牛、啮齿动物、鹿等的免疫可以有效降低由病原体引起的疾病的发生。为了接种载体动物,希望的是经粘膜途径输送疫苗。因此口服疫苗代表实用的和成本有效的输送选择。因此,在一些实施方案中,本发明的脂质组合物可以包括引诱剂、调味剂和除味剂,它们可以基于待免疫载体动物而选择。人类的口服免疫也是更成本有效的接种方法并且可以发现用户爱好。

[0141] 另外,当以其它方式如皮下施用,本发明的脂质配制物可以提供保护免于例如巨噬细胞或者其它清除细胞的攻击。使用皮下施用或者注射施用,脂质库 (depot) 的配制允许缓释以模拟感染过程,并且促进免疫应答的引发。

[0142] 所述组合物可以有效诱导针对广泛感染性生物体包括生殖器、眼部、胃肠和呼吸道病原体的免疫应答。例如,脂质 C 可以有效引发生殖道和胃肠道中的免疫应答,脂质 PK 可以有效引发上消化道和下消化道及呼吸道中的免疫应答。

[0143] 本发明组合物还可以用作疫苗输送系统用于广泛抗原,或者用于共输送或者缀合输送免疫原性分子,特别是由于剂量或者免疫原性原因而具弱免疫原性的那些分子。本发明组合物还可用作疫苗佐剂,并且可以与常规佐剂(例如弗氏完全佐剂或者弗氏不完全佐剂)一起输送。

实施例

[0144] 下述实施例用于示出本发明具体实施方案。可以理解本领域技术人员可以容易地适应本公开及教导而无需过度实验以产生其它实施方案。所有这些实施方案均被认为是本发明一部分。

[0145] 实施例 1:制备重组衣原体 MOMP

[0146] 小鼠中的衣原体及其感染性质与在人类疾病中发现的那些非常类似,因此,这种感染研究、它们的性质及它们的治疗对于人类治疗是高度预测性的。为进行衣原体感染研究,通过来自 Berry et al. (Berry, L.J., et al., Infect Immun, 2004. 72(2) :p. 1019-28) 的经适应的方法纯化主要外膜蛋白 (MOMP)。简而言之,表达编码重组麦芽糖结合蛋白 (MBP)-MOMP 融合蛋白的 pMAL-c2 载体的经转化大肠杆菌 (DH5 α {pMMM3}) (来自 Harlam Caldwell-Rocky Mountain Labs, Hamilton, Mont. (Su, H., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(20) :p. 11143-8) 的惠赠) 在氨苄青霉素营养琼脂上生长后分离,通过超声处理收获 (根据 Berry et al)。

[0147] 鼠型沙眼衣原体的主要外膜蛋白 (MOMP) 通过 Berry et al 的方法从表达编码重组麦芽糖结合蛋白 (MBP)-MOMP 融合蛋白的 pMAL-c2 载体的经转化大肠杆菌 (DH5 α {pMMM3}) (来自 Harlam Caldwell-Rocky Mountain Labs, Hamilton, MT 惠赠) 中纯化。鼠型沙眼衣原体是导致小鼠生殖道感染的介质。

[0148] 用根据厂商指导制备的透析管从 8M 尿素到 PBS (pH7.2) 纯化并重折叠

MOMP (Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia)。用 Pierce BSA 蛋白质评估试剂盒评估蛋白质浓度, 储存在 -20°C 备用。

[0149] 实施例 2: 用于针对幽门螺杆菌免疫的抗原的制备

[0150] 为进行幽门螺杆菌感染研究, 用生长在弯曲杆菌 (*campylobacter*) 选择性琼脂 (CSA) 上的幽门螺杆菌悉尼株 1 (Dr Hazel Mitchell, University of New South Wales 惠赠 (Lee, A., et al., *Gastroenterology*, 1997. 112(4) :p. 1386-97)) 产生全灭活抗原 (whole killed antigen), 所述琼脂由 5% (v/v) 无菌马血与血琼脂基 No. 2 (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) 及 Sutton et al. (Sutton, P., et al., *Vaccine*, 2000. 18(24) : p. 2677-85) 公开的 Skirrow's 补充物组成。平板收获至无菌 PBS 中, 用 McFarland 标准建立浓度 (菌落形成单位 /ml)。活细菌通过暴露于紫外 (UV) 照射以及培养建立的细菌存活性缺乏而进行失活。灭活的全细胞幽门螺杆菌储存在 -20°C 备用。

[0151] 实施例 3: 免疫组合物 I 的制备

[0152] 脂质 C 配制物由 Immune Solutions Ltd (Dunedin, New Zealand) 供应, 其由含有 1% 豆蔻酸、25% 棕榈酸、15% 硬脂酸、50% 油酸和 6% 亚油酸的分级分离及纯化的甘油三酯组成。为进行衣原体感染研究, 使用 $200\ \mu\text{g}$ MOMP 作为抗原, 10^7cfu 灭活全细胞幽门螺杆菌被用作螺杆菌免疫。免疫组包括: (1) 未免疫对照动物, (2) 用混合有 $10\ \mu\text{g}$ CpG-ODN 1826 (5' -TCC ATGACG TTC CTG ACG TT-3' ; SEQ ID NO :1) (Geneworks) 和 $10\ \mu\text{g}$ 霍乱毒素 (Sapphire Biosciences) (CpG/CT) 的抗原处理的动物, (3) 脂质 C 和抗原单独, 及 (4) 脂质 C 加混合有 CpG/CT 的抗原。

[0153] 脂质 C、MOMP、CT 和 CpG 用 3 路活塞 (3-way stopcock) 和 2 个注射器混合, 从而 $150\ \mu\text{l}$ 脂质 C 含有 $200\ \mu\text{g}$ MOMP 单独或者其与 CT ($10\ \mu\text{g}$) 和 CpG ($10\ \mu\text{g}$) 一起。先前已发现与用免疫原但是不加 CT 或 CpG 处理的动物相比, 这些剂量的 CT 和 CpG 提供最佳佐剂作用, 因此, 代表足以使免疫应答最大化的剂量。对于非脂质配制的疫苗, 在 PBS 中制备 MOMP 单独或者与 MOMP 与 CT 和 CpG 组合。所有配制疫苗均在第一次免疫前制备并储存在 4°C 备用。未配制疫苗需要在每次免疫当天制备。

[0154] 实施例 4: 免疫小鼠

[0155] 无特异病原体 (SPF) 的雌性 BALB/c 小鼠得自 Animal Resource Centre (ARC) (Perth, WA)。动物在标准日-夜周期下笼养并无限制地提供无菌食物和水。The University of Newcastle's Animal Care and Ethics Committee 批准所有程序。

[0156] 每周间隔在异氟烷 (isofluorane) 麻醉下通过用球端针经口服强饲法用 $150\ \mu\text{l}$ 免疫溶液免疫小鼠 3 次, 3 周后加强。对照动物相同处理但是不免疫。

[0157] 用衣原体或螺杆菌感染的小鼠代表现有技术已知的系统, 其能合理预测在人类中观察的作用。因此, 用本发明组合物在这些小鼠系统中获得的结果是在衣原体或螺杆菌影响的人类中观察到的作用的代表。

[0158] 实施例 5: 样品收集及 MOMP 特异性 IgG 和 IgA ELISA 分析 I

[0159] 根据上述实施例 4 免疫动物的最终免疫后一周, 通过用 $50\ \mu\text{l}$ 无菌 PBS 冲洗阴道穹窿而收集阴道灌洗液 (VL)。在施用致死剂量戊巴比妥钠后通过心脏放血收集血液。

[0160] 经 ELISA 确定血清和 VL 中的 MOMP 特异性 IgG 和 IgA。Greiner immunopure ELISA 平板 (Interpath Ltd, Australia) 用在硼酸盐缓冲溶液 (pH 9.6) 中稀释的鼠型沙眼衣原体

MBP-MOMP 包被 ($2 \mu\text{g}/\text{孔}$), 在 4°C 保温过夜。平板用在 PBS 中的 0.05% Tween 20 (PBST) 洗涤 3 次, 在 37°C 用 $100 \mu\text{l}$ 含有 5% 胎牛血清的 PBST 在 37°C 封闭 1 小时。平板在 PBST 中洗涤 3 次, 一式二份加入 $100 \mu\text{l}$ 样品并在 PBST 中二倍系列稀释。血清在 PBST 中稀释至从 $1/100$ 到 $1/12,800$, VL 稀释至从 $1/20$ 到 $1/2,560$ 。使用无菌 PBS 作为每个 ELISA 的阴性对照。覆盖平板并在 37°C 保温 1 小时, 然后用 PBST 洗涤 3 次。用分别稀释 $1/500$ 和 $1/1000$ 的 HRP 缀合的抗 IgA 或者抗 IgG (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 及随后的四甲基 benzidine (TMB) 显色系统检测 MOMP 结合的抗体。终点效价 (E. P. T) 定义为 PBS 对照孔的平均值 +2 标准偏差。通过用“测试”组免疫样品的 E. P. T 除以非免疫对照的 E. P. T 计算抗原特异性抗体比率。

[0161] 实施例 6 : T 细胞增殖及细胞因子产生 I

[0162] 脾淋巴细胞如上述实施例 1 处理的动物所述制备, 用 CFSE 标记, 然后以 5×10^6 细胞/ml 悬浮于完全 RPMI (补加 5% FCS、L-谷氨酰胺、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 2-巯基乙醇、HEPES 缓冲液、青霉素-链霉素的 RPMI 1640, 均来自 Trace Biosciences)。细胞 ($100 \mu\text{l}$) 一式三份加入到 96 孔平板中 (未染色细胞用作阴性对照)。培养基 (背景对照)、抗原 MOMP ($2 \mu\text{g}/\text{孔}$) 或者 ConA ($2 \mu\text{g}/\text{孔}$) (阳性对照) 加入到合适孔中。平板在 37°C 于 $5\% \text{CO}_2$ 中保温 96 小时, 然后离心收集细胞。细胞用 PEcy7 预缀合的 CD3 抗体 (Becton Dickinson) 染色, 用 FACSCanto 流式细胞仪 (Becton Dickinson, Sydney, Australia) 分析增殖的 T 细胞。与抗原的体外培养诱导的增殖 T 细胞百分比 (> 3 次细胞分裂) 用 Weasel 软件 (Walter and Elisa Hall Institute, Melbourne, Australia) 确定。

[0163] 实施例 7 : MOMP 特异性 T 细胞应答 I

[0164] T 细胞增殖使用 CFSE 经染料稀释测定而测定, 并表示为已经历 > 3 个细胞分裂的 CD3+ 细胞的百分比。体外再刺激来自用 MOMP+CT/CpG 免疫的小鼠的细胞导致 10.2% (范围 $7-13\%$) 细胞经历 > 3 轮分裂, 而 9.7% (范围 $8-11\%$) 来自用在脂质 C 中的 MOMP 免疫的动物的 CD3+ 脾细胞增殖。用 MOMP 及 CT/CpG 组合在脂质 C 中免疫导致体外刺激后 9.9% (范围 $8-11\%$) CD3T 细胞增殖 (表 1)。

[0165] 表 1

[0166]

	未免疫的	MOMP+ CT/CpG	脂质 C+MOMP	脂质 C+MOMP+ CT/CpG
增殖	$5\% \pm 2.9\%$	$10.2\% \pm 4.2\%$	$9.7\% \pm 2.5\%$	$9.9\% \pm 2.7\%$
IFN γ	256 (6-1111)	6613 (3491-10100)	783 (158-1487)	4896 (311-21629)
IL-12	33 (12-42)	100 (37-170)	53 (14-109)	56 (33-86)
IL-4	0 (0-2)	84 (35-129)	0 (0-1)	5 (0-20)
IL-10	144 (25-313)	499 (77-819)	236 (7-486)	260 (39-572)

[0167]

[0168] 如表 1 所示, T 细胞增殖通过 MOMP+CpG/CT 和脂质 C+MOMP 及通过组合脂质 C+MOMP+CT/CpG 增加。另外, 干扰素 γ 是由来自所有实验组的细胞产生的主要细胞因子, 与用在脂质 C 中的 MOMP 免疫的那些相比, 在用 CT/CpG 佐剂免疫的动物中见到的水平更高。Th2 细胞因子 IL-4 和 IL-10 的最高产生也在来自用 MOMP 加 CT/CpG 免疫的动物的细胞中见到。与未免疫对照相比, 来自所有实验组的细胞可见到 IL-10 和 IL-12 产生的少量增加。

[0169] 这些结果表明用衣原体感染的小鼠具有类似于在暴露于这个生物体的人类中观测的免疫学反应性 (例如 T 细胞增殖及 IFN γ 产生)。这些结果还表明在这个小鼠系统中观测的结果预测在人类中观测的作用。

[0170] 实施例 8 :MOMP 特异性抗体 I

[0171] 在最终次免疫后一周, 在血清和阴道灌洗液中检测到 MOMP 特异性抗体 (图 1)。图 1A 描绘了血清 IgG 抗体图, 其在用 MOMP+CT/CpG 免疫的动物中最高 (EPT 比率 > 30 , $p < 0.05$, 与未免疫对照相比), 并且在用掺入进脂质 C 的 MOMP 和 CT/CpG 免疫的动物中也显著增加 (EPT 比率 > 20 , $p < 0.05$)。在用脂质 C 中的 MOMP 免疫的动物中见到血清 IgG 水平增加 5 倍 (图 1A)。

[0172] 从 MOMP+CpG/CT 免疫小鼠收集的阴道灌洗液 (VL) 也显示增加的 IgG 水平, 与未免疫对照相比为统计学显著的 10 倍增加 ($p < 0.05$)。另外, 在 VL 液中观测到与未免疫对照相比脂质 C 和 MOMP 一起产生的 IgA 的 2 倍增加 (图 1B)。

[0173] 这些结果表明用本发明组合物免疫有效引发抗体应答 (例如增加的 IgG 产生)。我们的结论是脂质 C 可以增加阴道粘膜对衣原体 MOMP 抗原的免疫学应答。这些结果预测在用衣原体感染的人类中见到的作用。

[0174] 实施例 9 :鼠型沙眼衣原体生殖器攻击方法及细菌回收 I

[0175] 在阴道内攻击之前 7 天, 根据实施例 1 处理的所有小鼠或者对照, 经皮下接受 2.5mg 醋酸甲孕酮 (Depo-Ralovera ;Kenral, Rydalmere, New SouthWales, Australia)。小鼠用甲苯噻嗪 (90mg/kg) 和氯胺酮 (10mg/kg) 麻醉并且用在 20 μ l 蔗糖磷酸谷氨酸盐 (SPG) 中的 5×10^4 ifu 的鼠型沙眼衣原体阴道内攻击。使感染进行 21 天。衣原体感染的清除通过在感染第 0-18 天以 3 天间隔收集阴道拭子 (鼻咽 Calgiswab, Interpath) (用冷无菌 SPG 湿润) 而监测。拭子置于含有 500 μ l 无菌 SPG 和 2 个玻璃珠的无菌 Eppendorf 管中, 涡旋, 然后储存在 -80°C 。用在 McCoy 细胞单层上的体外细胞培养物根据所述 (Barker CJ, et al., Vaccine 2008Mar 4 ;26(10) :1285-96) 及经适应的 (Hickey, D.K., et al., Vaccine 200222 :4306-4315) 而评估细菌的回收。

[0176] 简而言之, McCoy 细胞在 48 孔平底平板中在完全 DMEM(5% FCS, HEPES 缓冲液, 5 μ g/ml 庆大霉素, 和 100 μ g/ml 链霉素) 中生长至 70% 铺满。20 μ l 血清或者阴道灌洗液与 1000 包涵物形成单位 (IFU) 的鼠型沙眼衣原体 (沙眼衣原体小鼠肺炎生物变型, ATCC VR-123) 原体 (EB) 在 37°C 温育 30 分钟。将抗体和鼠型沙眼衣原体溶液加入到生长在完全 DMEM 中的 McCoy 细胞中 (终体积 250 μ l), 在 37°C 于 5% CO_2 中温育 3 小时。除去培养基, 向每孔中加入含有 1 μ g/ml 环己酰胺 (Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia) 的新鲜 DMEM(500 μ l), 随后在 37°C 于 5% CO_2 中保温过夜。用光学显微镜观察平板中衣原体包涵体的存在, 此时在 PBS 中洗涤细胞 2 次, 然后在 100% 甲醇中固定 10 分钟, 之后进行衣原体

特异性染色。

[0177] 统计学分析数据以平均值 ± 平均值的标准误差 (SEM) 表示。使用单向方差分析 (ANOVA) 随后使用邦费罗尼事后检验 (Bonferroni's post-test), 以检查免疫球蛋白浓度之间的差异及每组体外中和活性。对于所有测试, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。所有统计学检验均使用 GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA.) 进行。

[0178] 实施例 10 : 针对衣原体生殖器攻击的保护 I

[0179] 活细菌攻击后的细菌释放通过以 3 天间隔收集的阴道拭子的体外培养物确定 (图 2)。图 2A 示出在免疫动物及对照动物中用鼠型沙眼衣原体攻击后感染形成单位 (IFU) 的回收作用的时间进程。

[0180] 图 2B 示出总感染性的图通过测量每个曲线下总面积而确定。用 MOMP 单独口服免疫与未免疫对照无显著不同。用 MOMP 和 CpG/CT 口服免疫导致在感染峰值细菌释放降低 30% (第 6 天; 图 2A)。在 18 天感染期间, 用 MOMP 和 CpG/CT 免疫导致与未免疫对照相比感染性降低 50% (图 2B)。

[0181] 将 MOMP 掺入脂质 C 导致总感染性降低 50% (图 2B, $p < 0.05$) 及在第 6 天细菌释放降低 60% (图 2A)。生殖器保护最大水平在用与 CpG/CT 共施用的脂质 C 配制的 MOMP 口服免疫后观测到。这一组显示整体感染降低 75% 及在第 6 天回收的鼠型沙眼衣原体降低 75% ($p < 0.01$)。口服免疫导致在所有组中针对感染的部分保护作用。但是, 与用在脂质 C 中的单独 MOMP 或者 MOMP 加 CT/CpG 免疫的动物中所见的相比, 将 MOMP 和 CT/CpG 掺入脂质 C 显著增加保护作用。出乎意料地, 将脂质 C 加入含有 MOMP 和 CpG/CT 的组合物中进一步降低了衣原体回收。因为 CpG/CT 剂量本身是最佳的, 通过加入脂质 C 导致的感染的进一步降低表明在现有技术的佐剂 CpG/CT 与脂质 C 之间有完全出乎意料的协同性。

[0182] 这些结果表明用本发明组合物免疫动物可以显著降低通过随后衣原体接种导致的感染。另外, 这些结果表明抗衣原体感染的可观的免疫学保护可以用本发明脂质组合物获得而无需毒性佐剂 CpG 或者 CT。这些结果预测人类中观测到的作用, 并且代表了优于含有衣原体抗原的现有免疫原性组合物的主要的出乎意料的优势。

[0183] 实施例 11 : 用于分析的样品收集 II

[0184] 在最终免疫后 1 周获得血清、阴道灌洗液、支气管肺泡灌洗液及粪便粒样品, 收集血清、阴道灌洗液 (VL) 和支气管肺泡灌洗液 (BAL) 用于衣原体研究, 收集血清和粪便粒 (FP) 洗涤液用于幽门螺杆菌研究。在致死剂量戊巴比妥钠 (sodium pentobarbitone) 之下用无菌 23 号针和 1ml 注射器从心脏进行末端血 (terminal blood) 收集, 血液然后转移到无菌 1.5ml Eppendorf 管中, 经离心获得血清。通过用 50 μ l 无菌磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲洗阴道穹窿而收集阴道灌洗液。将该液收集在无菌 0.5ml Eppendorf 管中。支气管肺泡灌洗液通过将平端 23 号针插入气管而收集, 肺用 750 μ l Hanks 平衡盐溶液 ("HBSS") 冲洗 2 次, 并收集在无菌 1.5ml Eppendorf 管中。血清、VL 和 BAL 样品储存在 -20°C 。

[0185] 两个新鲜粪便粒收集在 1ml 含有 1 μ g/ml 大豆胰蛋白酶抑制剂的 sPBS 中, 涡旋 15 分钟, 然后在 10000rpm 离心 10 分钟以除去固体。将上清 (800 μ l) 加入到含有 200 μ l 甘油 + 20 μ l PMSF (200mM, Sigma) 的新鲜 Eppendorf 管中, 短暂涡旋, 储存在 -80°C 。

[0186] 实施例 12 : 测量抗原特异性 IgG 和 IgA ELISA 方法 II

[0187] 在血清、VL、BAL 和 FP 中的抗原特异性 IgG 和 IgA 水平经酶联免疫吸附测定 (ELISA) 确定。Greiner Immunopure (TM) ELISA 平板 (Interpath Ltd, Australia) 根据免疫模型用在硼酸盐缓冲溶液 (pH9.6) 中稀释的鼠型沙眼衣原体 MBP-MOMP (2 μ g/孔) 或者幽门螺杆菌粗超声处理物 (sonicate) (0.05 μ g/孔) 包被,并在 4°C 保温过夜。平板用在 PBS 中的 0.05% Tween 20 洗涤 3 次,并用 100 μ l 含有 5% 胎牛血清的 PBST 封闭用于衣原体研究或者用在 PBST 中的 5% 炼乳封闭用于幽门螺杆菌研究,封闭在 37°C 进行 1 小时。平板在 PBST 中洗 3 次,A 列一式二份加入 100 μ l 样品,并在 PBST 中 2 倍系列稀释 7 次。血清在 PBST 中从 1/100 稀释到 1/12800。VL 液从 1/20 稀释到 1/2560。BAL 液和 FP 洗涤液纯地加入并稀释至 1/128。无菌 PBS 用作每个 ELISA 的阴性对照。平板被覆盖并在 37°C 温育 1 小时,然后用 PBST 洗涤 3 次。MOMP 结合的抗体用分别稀释至 1/500 和 1/1000 的 HRP 缀合的抗 IgA 或者抗 IgG (Southern Biotechnology Associates, Birmingham) 检测,随后四甲基联苯胺 (TMB) 显色系统 (Hickey, D. K., et al., Vaccine, 2004. 22(31-32) :p. 4306-15)。终点效价 (E. P. T) 截断线被确定为 PBS 对照孔的平均值 +PBS 的 2 个标准差。抗原特异性抗体比率通过“测试”组免疫样品的 E. P. T 除以未免疫对照的 E. P. T 而计算。

[0188] 实施例 13 :脾 T 细胞增殖测定 II

[0189] 脾细胞的单细胞悬液通过用不锈钢筛匀浆整个组织并在 HBSS 中洗涤 2 次而制备。红血细胞通过加入红细胞裂解液 (NH_4Cl) 裂解并在 HBSS 中洗涤 2 次。细胞以 10^7 /ml 重悬于含有 CFSE 的无菌 PBS 中 (5 μ M 终浓度) 并在 37°C 于黑暗中温育 10 分钟。CFSE 通过加入 2 体积 FCS 猝灭,在完全 RPMI (补加了 5% FCS、L- 谷氨酰胺、 5×10^{-5} M 2- 巯基乙醇、HEPES 缓冲液、青霉素 - 链霉素的 RPMI 1640base,均来自 Trace Biosciences) 中洗涤 3 次。

[0190] 细胞以 5×10^6 /ml 密度重悬,1000L109\ ' Symbol' \sl 11 一式三份加入到 96 孔板中 (未染色细胞用作阴性对照)。培养基 (背景对照)、抗原 (衣原体 MOMP 2 μ g/孔或者幽门螺杆菌粗超声处理物 0.1 μ g/孔) 或者 ConcanavalinA (" Con A" ;2 μ g/孔) (作为阳性对照) 加入到合适孔中。平板在 37°C 在 5% CO_2 中温育 96 小时,然后离心收集细胞。细胞用 PerCy7 预缀合的 CD3 抗体染色,阳性细胞用 FACSCanto™ 流式细胞仪 (Becton Dickinson, Sydney, Australia) 在 488nm 荧光分析以鉴别 CFSE 标记的 T 细胞。经抗原体外培养诱导增殖 (> 3 细胞分裂) 的 T 细胞百分比用 Weasel™ 软件 (Walter and ElisaHall Institute, Melbourne, Australia) 确定。

[0191] 实施例 14 :测定细胞因子表达的方法 II

[0192] 如上所述制备脾细胞的单细胞悬液。细胞以 5×10^6 /ml 密度重悬于完全 RPMI 中并且将 100 μ l 一式三份加入到 96 孔板 (Greiner-Interpath Ltd.) 中。培养基 (背景对照)、抗原 (衣原体 MOMP 2 μ g/孔或者幽门螺杆菌粗超声处理物 0.1 μ g/孔) 或者 Con A (2 μ g/孔) (阳性对照) 加入到合适孔中,在 37°C 在 5% CO_2 中温育 72 小时。上清收集在新鲜 Eppendorf 管中并储存在 -80°C 直至经 Bioplex 分析进行细胞因子分析。Bio-rad 6-plex 小鼠细胞因子试剂盒 (Bio-Rad) 鉴别培养上清中的 IFN γ 、TNF α 、白介素 -12、白介素 -4、白介素 -10 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的浓度 (pg/ml),在 Bioplex™ 仪器 (BIO-RAD) 上根据厂商指导分析。

[0193] 实施例 15 :幽门螺杆菌 SS1 攻击及细菌回收

[0194] 幽门螺杆菌 SS1 在 37°C、10% CO_2 和 95% 湿度下在含有 5% (v/v) 马血清和

Skirrow 补充物的脑心浸液 (BHI) 培养物 (Oxoid) 中生长 2 天。在 300rpm 离心 20 分钟沉淀细菌并且以 10/ml 重悬。小鼠在 3 天内轻度异氟烷麻醉下用管饲针以 100 μ l 细菌悬液 ($\sim 10^7$ cfu/小鼠) 胃内接种 2 次。在最后一次免疫后 1 周动物被攻击, 使感染进行 6 周。在处死后切下胃, 沿胃大弯切割, 并在盐水中冲洗以除去内容物。除去胃底, 沿胃小弯将胃切成两半。一半组织称重并置于 500 μ l BHI 中。胃组织用 Tissue Tearor™ (Biospec Products Inc.) 匀浆, 在 BHI 中制备 10 倍系列稀释液。将 100 μ l 每种稀释液 (纯的至 1 : 1000) 涂布于补加 Glaxo Selective Supplement A (GSSA, 万古霉素 10 μ g/ml、多粘菌素 B 0.33 μ g/ml、杆菌肽 20 μ g/ml、萘啶酮酸 1.2 μ g/ml 和 amphotericin B 5mg/ml) 的 CSA 血琼脂平板 (如上)。

[0195] 在湿润、微需氧条件下在 37°C 培养 6 天后, 计数菌落并计算每克胃组织的菌落形成单位 (cfu)。还进行了幽门螺杆菌特异性聚合酶链反应 (PCR) 证实。匀浆组织 (20mg) 用 DNA Wizard™ 提取试剂盒 (Promega) 根据厂商指导进行提取。用 GoTaq Green Master Mix™ (Promega, Australia) 和螺杆菌特异性引物 Hp 001 (5' TATGACGGGTATCCGGC 3'; SEQ ID NO:2) 和 Hp 002 (5' ATTCCACTTACCTCTCCCA 3'; SEQ ID NO:3) (序列由 Dr Sutton, Melbourne University 提供) 进行 DNA 的 PCR 扩增 (20 μ l 反应)。扩增条件是 95°C 2 分钟, 随后 30 个循环的 94°C 2 秒、53°C 2 秒、72°C 30 秒, 最后步骤 72°C 5 分钟。条带在含有溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶上在紫外光下观察。

[0196] 实施例 16: 鼠型沙眼衣原体生殖器攻击及细菌回收

[0197] 在阴道内攻击之前 7 天, 所有小鼠皮下接受 2.5mg 醋酸甲孕酮 (Depo-Ralovera; Kenral, Rydalmere, New South Wales, Australia)。小鼠用甲苯噻嗪 (90mg/kg) 和氯胺酮 (10mg/kg) 麻醉并且用在 20 μ l 蔗糖磷酸谷氨酸盐 (SPG) 中的 5×10^4 感染形成单位 (IFU) 的鼠型沙眼衣原体阴道内攻击。使感染进行 21 天。通过在感染第 0-18 天以 3 天间隔收集阴道拭子 (用冷无菌 SPG 湿润的 nasopharyngeal Calgiswab™ (Interpath)) 而观测来进行清除监测。每个拭子置于含有 500 μ l 无菌 SPG 和 2 个玻璃珠的无菌 Eppendorf 管中, 储存在 -80°C。

[0198] 用体外细胞培养评估细菌回收。McCoy 细胞单层生长至 70% 铺满, 将 10 μ l 涡旋的拭子溶液加入到含有 300 μ l 新鲜 DMEM 的培养孔中, 所述新鲜 DMEM 含有 5% FCS、hepes 缓冲液、庆大霉素 (5 μ g/ml) 和链霉素 (100 μ g/ml)。在 37°C 5% CO₂ 培养 3 小时后, 除去培养基并用 500 μ l 含有 1 μ g/ml (Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia) 的新鲜完全 DMEM 置换, 并在 37°C 5% CO₂ 培养过夜。包涵体在光学显微镜下观测, 在此时在 100% 甲醇中固定细胞 10 分钟, 根据 Hickey et al. (Hickey, D. K., et al., Vaccine, 2004. 22(31-32): p. 4306-15) 用衣原体特异性染色进行染色。

[0199] 实施例 17: 鼠型沙眼衣原体呼吸道攻击及细菌回收

[0200] 为进行呼吸道攻击, 动物在轻度异氟烷下麻醉, 将在冷的蔗糖磷酸谷氨酸盐 (SPG) 中的 10^3 CFU 的鼠型沙眼衣原体经鼻内接种施用 (每鼻孔 5 μ l)。小鼠然后返回笼子并在生物安全性 PC2 条件下笼养, 使感染进行 12 天 (预计到峰值感染时间)。处死后, 将称重的左肺组织收集进含有 2 个玻璃珠的 500 μ l SPG 中。组织用剪刀切碎并涡旋 1 分钟。将 5mg 组织加入到含有生长至 70% 铺满的 McCoy 细胞单层的 48 孔培养板中, 其含有 500 μ l 完全 DMEM (5% FCS、hepes 缓冲液、5 μ g/ml 庆大霉素和 100 μ g/ml 链霉素), 并且在 37°C 5%

CO₂ 下培养 3 小时。除去培养基并用 500 μl 含有 1 μg/ml (Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia) 的新鲜完全 DMEM 置换,并在 37°C 5% CO₂ 培养过夜。包涵体在光学显微镜下观测,在此时在 100% 甲醇中固定细胞 10 分钟,根据 Hickey et al. (Hickey, D.K., et al., Vaccine, 2004. 22 (31-32) :p. 4306-15) 用衣原体特异性染色进行染色。

[0201] 实施例 18 :统计学分析及结果

[0202] 对于每个实验组中的 5 只小鼠的数值,数据以平均值 ± 平均值的标准差 (SEM) 表示。使用单向方差分析 (ANOVA) 随后邦费罗尼事后检验检查每组免疫球蛋白浓度、ASC 数即中和能力之间的差异。对于所有测试显著性水平设为 $P < 0.05$ 。所有统计学检验均用 GraphPad Prism™ version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA, www.graphpad.com) 进行。

[0203] 实施例 19 :T 细胞应答 II

[0204] 用 CFSE 染料稀释测定确定 T 细胞增殖。增殖表示为已经历 > 3 次分裂的 CD3 阳性细胞的百分数 (%)。3 轮细胞分裂被认为是背景增殖的阈值,因为 MOMP 和幽门螺杆菌超声处理物单独在初生细胞中导致低水平细胞分裂。

[0205] 用灭活幽门螺杆菌口服免疫后,只有分离自用脂质 C 配制的混合了 CpG/CT 的灭活全细胞幽门螺杆菌免疫的小鼠的脾 T 细胞显示与未免疫对照 (1-2%) 相比增加的分裂 (6-7%)。与未免疫对照相比,在用 MOMP 抗原口服免疫后在所有免疫组中细胞增殖均增加。体外再刺激来自用 MOMP+CpG/CT 免疫的动物的细胞导致 7-13% 的细胞经历 > 3 轮增殖,用 MOMP+ 脂质 C 免疫的动物导致 7-11% 细胞增殖。将佐剂和脂质 C 与 MOMP 抗原组合导致 8-11% T 细胞增殖。这个组合不进一步增加 T 细胞增殖超过来自用 MOMP+CpG/CT 或者脂质 C 配制的 MOMP 单独免疫的动物的细胞中见到的水平 (表 2)。

[0206] 用 Bioplex 分析来确定用 MOMP 或者幽门螺杆菌超声处理物体外刺激后细胞因子的产生。在两种免疫模型中所有组中 T 细胞产生的主要细胞因子均为 IFN γ 。在用 CpG/CT 佐剂免疫后细胞产生的 IFN γ 浓度与在用脂质 C 免疫动物细胞中所见到的相比通常增加。在用灭活全细胞幽门螺杆菌免疫后 IL-4 水平均很低 (< 10pg/ml),而在用 MOMP 混合 CpG/CT 免疫后的衣原体研究中观测到结果 > 100pg/ml。通常来自所有免疫组的 IL-10 水平增加超过未免疫对照培养物中见到的水平。但是,当 MOMP 或者灭活全细胞幽门螺杆菌抗原配在脂质 C 中时 IL-10 的产生在实验之间变化。在来自所有免疫组的培养物中观测到体外抗原刺激后 IL-12 产生增加,尽管在脂质 C 配制的抗原单独组对于两种模型观测到实验之间的差异 (表 2)。IFN γ 是主要细胞因子。

[0207] 表 2 描绘了抗原特异性脾 T 细胞增殖,细胞因子表达在最后一次免疫后一周体外确定。

[0208] 表 2

[0209] 体外抗原特异性脾 T 细胞增殖 & 细胞因子产生

[0210]

[0211]

	未免疫的	灭活 HP+ CpG/CT	LipoVax+ 灭活 HP	LipoVax+灭活 HP+CpG/CT
增殖				
实验 1	1.68	2.04	0.00	6.07
实验 2	1.91	4.47	3.09	6.98
IFN γ				
实验 1	0	312.45	105	28.25
实验 2	4.72	719.25	39.38	140.4
IL-12				
实验 1	18.6	56.15	62.1	34.7
实验 2	28.62	80.48	19.2	60.47
IL-4				
实验 1	0	11	0.05	0
实验 2	0	8.01	0	4.69
IL-10				
实验 1	132.3	246.2	269.5	165.4
实验 2	174.27	563.27	109.79	404.94

[0212]

	未免疫的	MOMP+ CpG/CT	LipoVax+ MOMP	LipoVax+MOMP +CpG/CT
增殖				
实验 1	8.12	13.22	11.60	11.86
实验 2	2.91	7.26	7.94	8.02
IFN γ				
实验 1	64.25	10099.6	1487.25	962.9
实验 2	1111.14	6252.81	157.97	21628.78
IL-12				
实验 1	42.45	170.45	109.05	82.2
实验 2	42.94	124.6	35.12	86.22
IL-4				
实验 1	0	129.5	0.05	0.1
实验 2	2.8	68.51	0	20.04
IL-10				
实验 1	190.8	801.05	486.5	343.85
实验 2	313.02	819.76	203.9	572.27

[0213] 口服免疫在所有组中在最后一次免疫后一周诱导分离自脾的 T 细胞的显著 MOMP 特异性增殖。定量细胞因子产生通过 Bioplex 分析确定, 结果表示为 pg/ml。结果代表两个独立实验。

[0214] 这些结果表明在用幽门螺杆菌或者衣原体感染后, 小鼠以典型免疫学反应应答, 有 T 细胞的增殖及增加的炎性介质的产生。另外, 用本发明组合物免疫有效增加了对幽门螺杆菌或者衣原体接种的免疫学应答。这些结果还表明用本发明组合物无需使用毒性 CpG 或者 CT 佐剂即可引起强免疫学保护。这些结果预测在人类中观测的效果并且代表优于现有技术组合物的出乎意料的改善。

[0215] 实施例 20 : 幽门螺杆菌特异性抗体

[0216] 用灭活全细胞幽门螺杆菌口服免疫后, 用幽门螺杆菌粗细胞超声处理物包被的 ELISA 平板检测了血清和粪便粒 (FP) 中的抗原特异性抗体的产生。口服免疫导致产生全身性 IgG 和粪便 IgA 幽门螺杆菌抗体 (图 3)。与未免疫对照相比, 在用混合 CpG/CT 的灭活全细胞幽门螺杆菌免疫后观测到显著增加, 血清 IgG 和粪便 IgA 粪便增加 4 倍 ($p < 0.05$) 和 6 倍。加入脂质 C 降低全身性和胃粘膜抗体产生大约 50%。单独接受脂质 C 配制的灭活全细胞幽门螺杆菌的动物显示与未免疫对照相比血清 IgG 增加 2 倍和粪便 IgA 增加 3 倍 ($p < 0.05$)。与 CpG/CT 混合的灭活全细胞幽门螺杆菌的脂质 C 配制物也导致血清 IgG 增加 2 倍和粪便 IgA 增加 3 倍, 但是这与未免疫对照无统计学显著不同。

[0217] 实施例 21 : 衣原体和幽门螺杆菌特异性抗体 II

[0218] 在最后一次免疫后一周检测血清、支气管肺泡灌洗液 (BAL) 和阴道灌洗液 (VL) 样品中的 MOMP 特异性抗体。在用与 CpG/CT 混合的灭活全细胞幽门螺杆菌免疫后诱导与未免疫对照相比显著的全身性 IgG 产生 ($p < 0.05$)。与未免疫对照相比, 脂质 C 配制的免疫溶液也显著增加全身性 IgG (图 4A)。从口服接受与 CpG/CT 混合的未配制的 MOMP 的小鼠观测到呼吸道 BAL 洗液中与未免疫对照相比增加的 IgG (7 倍, $p < 0.01$) 和 IgA (5 倍) 抗体产

生。当 MOMP+CpG/CT 与脂质 C 配制时观测到 3 倍增加,在收集自用脂质 C 配制的 MOMP 单独免疫的小鼠的 BAL 液中未观测到抗体产生(图 4B)。收集自 MOMP+CpG/CT 免疫的小鼠的 VL 液也含有增加的 IgG 水平,与未免疫对照相比显著的 10 倍增加 ($p < 0.05$)。另外,在来自所有免疫组的 VL 液中观测到与未免疫对照相比 IgA 增加 2 倍(图 4C),尽管这不是统计学显著的。

[0219] 实施例 23 :胃肠道保护

[0220] 口服免疫后,预期获得性免疫应答会在肠道中局部引发。但是,用灭活全细胞幽门螺杆菌抗原和强粘膜佐剂 CpG/CT 免疫小鼠导致细菌建群降低。将灭活全细胞幽门螺杆菌抗原单独掺入脂质 C 基质以保护抗原免于消化酶破坏与未免疫对照相比再次确实诱导了一定程度的保护。仅通过口服喂食掺入脂质 C 的灭活全细胞幽门螺杆菌和 CpG/CT 在观测到的建群中有统计学显著降低 ($p < 0.05$)。在这个免疫组中发现与未免疫对照相比活幽门螺杆菌 SS 1 细菌的 $11\log$ 的降低(图 5)。

[0221] 下表 3 显示了在用所示组合物接种后具有可检测幽门螺杆菌感染的动物数。

[0222] 表 3

[0223] 具有可检测感染的动物数

[0224]

处理	未免疫的	灭活 HP +CpG/CT	脂质 C +灭活 HP	脂质 C +灭活 HP +CpG/CT
感染的小鼠	8/10	7/10	9/10	4/10

[0225] 从图 5 可见活幽门螺杆菌从用脂质 C 和幽门螺杆菌抗原处理的动物的回收与对照动物或者单独暴露于幽门螺杆菌抗原的动物相比均降低,由此表明在免疫动物中细菌负荷的降低。用脂质 C 和幽门螺杆菌抗原一起免疫不提供完全保护,因为有活幽门螺杆菌的回收,并且如此处理的小鼠显示感染迹象(表 3)。

[0226] 这些结果表明用脂质 C 和来自幽门螺杆菌的热灭活抗原口服免疫可以通过降低感染组织中的细菌负荷而有效降低胃感染。另外,向含有幽门螺杆菌抗原和 CpG/CT 的口服施用的组合物中加入脂质 C 进一步降低细菌回收表明脂质 C 和现有技术佐剂 CpG/CT 可以协同作用以提供出乎意料的增强的抗幽门螺杆菌的粘膜免疫。

[0227] 实施例 24 :呼吸道保护

[0228] 衣原体从处于峰值感染(第 12 天)的匀浆肺组织中分离,用本文所述方法通过体外细胞培养确定感染形成单位。结果示于图 6。我们未发现用 MOMP+CpG/CT 免疫后衣原体回收与未免疫对照相比有显著差异。但是,我们观测到在用口服施用的脂质 C+MOMP+CpG/CT 或者脂质 C+MOMP 免疫后呼吸道的统计学显著保护作用。在这些免疫组中,与未免疫对照相比观测到回收细菌降低 50% ($p < 0.05$; 每组 $n = 10$ 只动物)。

[0229] 这些结果表明用本发明组合物免疫可以有效保护动物免于衣原体感染。这些出乎意料的发现表明现在可以用本发明组合物且无需使用毒性 CpG 或者 CT 佐剂而提供有效免疫学保护。

[0230] 在本文中我们证实了含有长链脂肪酸和非感染性抗原的免疫原性组合物可以用于在口服免疫后增强保护性粘膜免疫的有效输送介质。另外,本发明的含有脂质的组合物可以与“安全的”纯化蛋白质抗原一起用于诱导在生殖器和呼吸道粘膜处的保护作用。使用本发明的含有脂质的免疫原性组合物用于口服施用蛋白质抗原潜在地提供了目前用于人类接种的活疫苗的廉价的、易于施用的、安全的替代品。

[0231] 参考文献

[0232] 本文引用的所有文献和序列列表均以整体援引加入本文。上文中的引用与此节内容的任何差异均参照以下所列完整引用为准。

[0233] 1. Owen, R. and A. Jones, Epithelial cell specialization within human Peyer ' s patches :anultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*, 1974. Feb ;66 (2) :p. 189-203.

[0234] 2. Iwasaki, A. and B. Kelsall, Localization of distinct Peyer ' s patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med*, 2000. Apr 17 ;191 (8) :p. 1381-94.

[0235] 3. Giudice, E. L. and J. D. Campbell, Needle-free vaccine delivery, in *Adv Drug Deliv Rev*. 2006. Apr 20 ;58 (1) p. 68-89.

[0236] 4. Cross, M. L. , B. M. Buddle, and F. E. Aldwell, The potential of oral vaccines for disease control in wildlife species, in *Vet J*. 2007. Nov ;174 (3) :472-80.

[0237] 5. Faal, N. , et al. , Conjunctival FOXP3 expression in trachoma : do regulatory T cells have a role in human ocular *Chlamydia trachomatis* infection ? *PLoS Med*, 2006. Aug ;3 (8) :p. e266.

[0238] 6. Mabey, D. and R. Peeling, *Lymphogranuloma venereum*. Sexually transmitted infections, 2002. Apr ;78 (2) :p. 90-2.

[0239] 7. Hansbro, P. M. , et al. , Role of atypical bacterial infection of the lung in predisposition/protection of asthma. *Pharmacol Ther*, 2004. _Mar ;101 (3) : p. 193-210.

[0240] 8. Horvat, J. , et al. , Neonatal *Chlamydial* Infection Induces Mixed T Cell Responses that Drive Allergic Airways Disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. Sep 15 ;176 (6) :556-64.

[0241] 9. Del Giudice, G. , et al. , The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19 :p. 523-63.

[0242] 10. Frenck, R. W. , Jr. and J. Clemens, *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect*, 2003. Jul ;5 (8) :p. 705-13.

[0243] 11. Enno, A. , et al. , Antigen-dependent progression of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma in the stomach. Effects of antimicrobial therapy on gastric MALT lymphoma in mice. *Am J Pathol*, 1998. Jun ;152 (6) :p. 1625-32.

[0244] 12. Correa, P. , Bacterial infections as a cause of cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2003. Apr 2 ;95 (7) :p. E3.

- [0245] 13. Ernst, P. and B. Gold, The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*, 2000. 54 :p. 615-40.
- [0246] 14. Uemura, N., et al., *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*, 2001. Sep 13 ;345(11) :p. 784-9.
- [0247] 15. G. Mayrhofer, and L. Spargo, Distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the rat jejunum and their association with organelles of the endocytic pathway *Immunology* May 1990. 70(1) : 11-19.
- [0248] 16. Hershberg, R. M., et al., Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells, in *J Clin Invest*. 1998. Aug 15 ;102(4) :p. 792-803.
- [0249] 17. Rescigno, M., et al., Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2001. Apr ;2(4) :p. 361-7.
- [0250] 18. Bockman, D., W. Boydston, and D. Beezhold, The role of epithelial cells in gut-associated immune reactivity. *Ann N Y Acad Sci*, 1983. Jun 30 ;409 :p. 129-44.
- [0251] 19. Bockman, D. and M. Cooper, Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am J Anat*, 1973. Apr ;136(4) :p. 455-77.
- [0252] 20. Neutra, M. R., et al., Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch, in *Cell Tissue Res*. 1987. Mar ;247(3) :p. 537-46.
- [0253] 21. Holmgren, J., N. Lycke, and C. Czerkinsky, Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine*, 1993. Sep ; 11(12) :p. 1179-84.
- [0254] 22. Hickey, D. K., et al., Intranasal immunization with *C. muridarum* major outer membrane protein (MOMP) and cholera toxin elicits local production of neutralising IgA in the prostate. *Vaccine*, 2004. Oct 22 ;22(31-32) :p. 4306-15.
- [0255] 23. Skelding, K. A., et al., Comparison of intranasal and transcutaneous immunization for induction of protective immunity against *Chlamydia muridarum* respiratory tract infection. *Vaccine*, 2006. Jan 16 ;24(3) :p. 355-66.
- [0256] 24. Glenn, G., et al., Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J Immunol*, 1998. Oct 1 ; 161(7) :p. 3211-4.
- [0257] 25. Yu, J., et al., Transcutaneous immunization using colonization factor and heat-labile enterotoxin induces correlates of protective immunity for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 2002. Mar ;70(3) :p. 1056-68.
- [0258] 26. Berry, L. J., et al., Transcutaneous immunization with combined cholera

toxin and CpG adjuvant protects against *Chlamydia muridarum* genital tract infection. *Infect Immun*, 2004. Feb ;72(2) :p. 1019-28.

[0259] 27. van Ginkel, F., et al., Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J Immunol*, 2000. Nov 1 ; 165(9) :p. 4778-82.

[0260] 28. Bangham, A. D. and R. W. Horne, Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope, in *J Mol Biol*. 1964. May ;8 :p. 660-8.

[0261] 29. Niikura, M., et al., Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes, in *Virology*. 2002. Feb 15 ;293(2) :p. 273-80.

[0262] 30. Guerrero, R. A., et al., Recombinant Norwalk virus-like particles administered intranasally to mice induce systemic and mucosal (fecal and vaginal) immune responses, in *J Virol*. 2001. Oct ;75(20) :p. 9713-22.

[0263] 31. Szoka, F. and D. Papahadjopoulos, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, in *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978. Sep ;75(9) :p. 4194-8.

[0264] 32. Deamer, D. and A. D. Bangham, Large volume liposomes by an ether vaporization method, in *Biochim Biophys Acta*. 1976. Sep 7 ;443(3) :p. 629-34.

[0265] 33. Chapman, C. J., et al., Effects of solute concentration on the entrapment of solutes in phospholipid vesicles prepared by freeze-thaw extrusion, in *Chem Phys Lipids*. 1991. Dec ;60(2) :p. 201-8.

[0266] 34. Sou, K., et al., Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion, in *Biotechnol Prog*. 2003. Sep-Oct ;19(5) :p. 1547-52.

[0267] 35. Kirby, C. J. and G. Gregoriadis, Preparation of liposomes containing factor VIII for oral treatment of haemophilia, in *Journal of Microencapsulation*. 1984. Jan-Mar ;1(1) :p. 33-45.

[0268] 36. Erickson, R. H. and Y. S. Kim, Digestion and absorption of dietary protein, in *Annu Rev Med*. 1990. 41 :p. 133-9.

[0269] 37. Aldwell, F. E., et al., Oral delivery of *Mycobacterium bovis* BCG in a lipid formulation induces resistance to pulmonary tuberculosis in mice. *Infect Immun*, 2003. Jan ;71(1) :p. 101-8.

[0270] 38. Aldwell, F., et al., Oral vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG in a lipid formulation induces resistance to pulmonary tuberculosis in brushtail possums. *Vaccine*, 2003. Dec 8 ;22(1) :p. 70-6.

[0271] 39. Colditz, G. A., et al., The efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature, in *Pediatrics*. 1995. Jul ;96(1 Pt 1) :

p. 29-35.

[0272] 40. Colditz, G. A., et al., Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature, in JAMA. 1994. Mar 2 ; 271(9) :p. 698-702.

[0273] 41. Fine, P. E., Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity, in Lancet. 1995. Nov 18 ; 346(8986) :p. 1339-45.

[0274] 42. Aldwell, F. E., et al., Oral delivery of lipid-encapsulated Mycobacterium bovis BCG extends survival of the bacillus in vivo and induces a long-term protective immune response against tuberculosis. Vaccine, 2006. Mar 15 ; 24(12) :p. 2071-8.

[0275] 43. Su, H., et al., A recombinant Chlamydia trachomatis major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. Oct 1 ; 93(20) :p. 11143-8.

[0276] 44. Lee, A., et al., A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the Sydney strain. Gastroenterology, 1997. Apr ; 112(4) : p. 1386-97.

[0277] 45. Sutton, P., J. Wilson, and A. Lee, Further development of the Helicobacter pylori mouse vaccination model. Vaccine, 2000. Jun 1 ; 18(24) : p. 2677-85.

[0278] 46. Aldwell, F. E., et al., Oral vaccination of mice with lipid-encapsulated Mycobacterium bovis BCG: anatomical sites of bacterial replication and immune activity, in Immunol Cell Biol. 2005. Oct ; 83(5) :p. 549-53.

[0279] 47. Buddle, B., et al., Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and protection against bovine tuberculosis. Vaccine, 2005. May 20 ; 23(27) :p. 3581-9.

[0280] 48. Fujinaga, Y., et al., Gangliosides That Associate with Lipid Rafts Mediate Transport of Cholera and Related Toxins from..., in Molecular Biology of the Cell. 2003 Dec ; 14(12) :4783-93.

[0281] 49. Orlandi, P. A. and P. H. Fishman, Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains, in J Cell Biol. 1998. May 18 ; 141(4) :p. 905-15.

[0282] 50. Wolf, A. A., Y. Fujinaga, and W. I. Lencer, Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol, in J Biol Chem. 2002. May 3 ; 277(18) :p. 16249-56.

[0283] 51. Triantafilou, M., et al., Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation, in J Cell Sci. 2002. Jun 15 ; 115(Pt 12) :p. 2603-11.

[0284] 52. Triantafilou, M., et al., Lipoteichoic acid and toll-like receptor 2

internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent, in *J Biol Chem*. 2004. Sep 24 ;279 (39) :p. 40882-9.

[0285] 53. Dolganiuc, A., et al., Acute ethanol treatment modulates Toll-like receptor-4 association with lipid rafts, in *Alcohol Clin Exp Res*. 2006. Jan ; 30(1) :p. 76-85.

[0286] 54. Latz, E., et al., TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome, in *Nat Immunol*. 2004. Feb ;5(2) :p. 190-8.

[0287] 55. Simons, K. and W. L. Vaz, Model systems, lipid rafts, and cell membranes, in *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 2004. _33 :p. 269-95.

[0288] 56. Dykstra, M., et al., Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling, in *Annu Rev Immunol*. 2003. 21 :p. 457-81.

[0289] 57. Klausner, R. D., et al., Lipid domains in membranes. Evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis, in *J Biol Chem*. 1980. Feb 25 ;255(4)p. 1286-95.

[0290] 58. Stulnig, T. M., et al., Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J Cell Biol*, 1998. Nov 2 ;143(3) :p. 637-44.

[0291] 59. Stulnig, T. M., et al., Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition, in *J Biol Chem*. 2001. Oct 5 ;276(40) :p. 37335-40.

[0292] 60. Weatherill, A. R., et al., Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol*, 2005. May 1 ;174(9) :p. 5390-7.

[0293] 61. Challacombe, S. J. and T. B. Tomasi, Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization, in *J Exp Med*. 1980. Dec 1 ;152(6) :p. 1459-72.

[0294] 62. Caldwell, H. D., J. Kromhout, and J. Schachter, Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, in *Infect Immun*. 1981. Mar ;31(3) :p. 1161-76.

[0295] 63. Charman, W., et al., Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1997. Mar ;86(3) :p. 269-82.

[0296] 64. Armand, M., Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 2007. Mar ;10(2) :p. 156-64.

[0297] 65. Morein, B., et al., Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses, in *Nature*. 1984. Mar 29-Apr 4 ; 308(5958) :p. 457-60.

[0298] 66. Skene, C. D. and P. Sutton, Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use, in *Methods*. 2006. Sep ;40(1) :p. 53-9.

- [0299] 67. Mishra, D., et al., Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B, in *Vaccine*. 2006. May 29 ;24(22) :p. 4847-55.
- [0300] 68. Wang, D., et al., Intranasal immunization with liposome-encapsulated plasmid DNA encoding influenza virus hemagglutinin elicits mucosal, cellular and humoral immune responses, in *J Clin Virol*. 2004. Dec ;31Suppl 1 :p. S99-106.
- [0301] 69. Perrie, Y., et al., Liposome(Lipodine)-mediated DNA vaccination by the oral route, in *Journal of liposome research*. 2002. Feb-May ;12(1-2) :p. 185-97.
- [0302] 70. **Sjölander, A.**, et al., Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models, in *Vaccine*. 2001. Mar21 ;19(17-19) :p. 2661-5.
- [0303] 71. Beagley KW, Timms P. Chlamydia trachomatis infection: incidence, health costs and prospects for vaccine development, in *Journal of Reproductive Immunology* 2000 ;Aug ;48(1) :47-68.
- [0304] 72. Westrom L, Mardh PA. Chlamydial salpingitis. *Br Med Bull* 1983 Apr ; 39(2) :145-50.
- [0305] 73. Ho JL, He S, Hu A, Geng J, Basile FG, Almeida MG, et al. Neutrophils from human immunodeficiency virus(HIV)-seronegative donors induce HIV replication from HIV-infected patients' mononuclear cells and cell lines: an in vitro model of HIV transmission facilitated by Chlamydia trachomatis. *J Exp Med* 1995 Apr 1 ; 181(4) :1493-505.
- [0306] 74. Kaul R, Nagelkerke NJ, Kimani J, Ngugi E, Bwayo JJ, Macdonald KS, et al. Prevalent herpes simplex virus type 2 infection is associated with altered vaginal flora and an increased susceptibility to multiple sexually transmitted infections, in *J Infect Dis* 2007 Dec 1 ;196(11) :1692-7.
- [0307] 75. Stamm WE. Rationale for a Vaccine. In: Woodall JP, editor. *Proceedings of the Chlamydia Vaccine Development Colloquium*; 2004 ; Alexandria, Virginia: The Albert B. Sabin Vaccine Institute; 2004. p. 15-8.
- [0308] 76. Weiner HL. Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms, in *J Clin Invest* 2000 Oct ;106(8) :935-7.
- [0309] 77. Williams NA, Hirst TR, Nashar TO. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol Today* 1999 Feb ;20(2) : 95-101.
- [0310] 78. Nol P, Palmer MV, Waters WR, Aldwell FE, Buddle BM, Triantis JM, et al. Efficacy of oral and parenteral routes of mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin vaccination against experimental bovine tuberculosis in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): a feasibility study. *J Wildl Dis* 2008 Apr ;44(2) :247-59.
- [0311] 79. Clark S, Cross ML, Nadian A, Vipond J, Court P, Williams A, et al. Oral vaccination of guinea pigs with Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccine in a lipid matrix protects against aerosol

infection with virulent *M. bovis*. *Infect Immun* 2008 Jun 2.

[0312] 80. Barker CJ, Beagley KW, Hafner LM, Timms P. In silico identification and in vivo analysis of a novel T-cell antigen from *Chlamydia*, NrdB. *Vaccine* 2008 Mar 4; 26(10) :1285-96.

[0313] 81. Challacombe SJ, Rahman D, O' Hagan DT. Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles. *Vaccine* 1997 Feb; 15(2) :169-75.

[0314] 82. Briese V, Pohl WD, Noack K, Tischner H, Waldman RH. Influenza specific antibodies in the female genital tract of mice after oral administration of live influenza vaccine. *Arch Gynecol* 1987; 240(3) :153-7.

[0315] 83. Zhang X, Lou YH, Koopman M, Doggett T, Tung KS, Curtiss Rr. Antibody responses and infertility in mice following oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing recombinant murine ZP3 [published erratum appears in *Biol Reprod* 1997 Apr; 56(4) :1069]. *Biology of Reproduction* 1997; 56(1) :33-41.

[0316] 84. Whittum-Hudson JA, An LL, Saltzman WM, Prendergast RA, MacDonald AB. Oral immunization with an anti-idiotypic antibody to the exoglycolipid antigen protects against experimental *Chlamydia trachomatis* infection. *Nature Medicine* 1996; 2(10) :1116-21.

[0317] 85. Grayston JT, Wang SP. The potential for vaccine against infection of the genital tract with *Chlamydia trachomatis*. [Review] [19 refs]. *Sexually Transmitted Diseases* 1978; 5(2) :73-7.

[0318] 86. Armand M. Lipases and lipolysis in the human digestive tract : where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007 Mar; 10(2) :156-64.

[0319] 87. Horejsi V. The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol Rev* 2003 Feb; 191 :148-64.

[0320] 88. Anderson HA, Hiltbold EM, Roche PA. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat Immunol* 2000 Aug; 1(2) :156-62.

[0321] 89. Mahoney EM, Hamill AL, Scott WA, Cohn ZA. Response of endocytosis to altered fatty acyl composition of macrophage phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 Nov; 74(11) :4895-9.

[0322] 90. Weatherill AR, Lee JY, Zhao L, Lemay DG, Youn HS, Hwang DH. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol* 2005 May 1; 174(9) :5390-7.

[0323] 91. Schweitzer SC, Reding AM, Patton HM, Sullivan TP, Stubbs CE, Villalobos-Menuy E, et al. Endogenous versus exogenous fatty acid availability affects lysosomal acidity and MHC class II expression. *J Lipid Res* 2006 Nov; 47(11) :2525-37.

[0324] 92. Calder PC, Bond JA, Newsholme EA. Fatty acid inhibition of concanavalin A-stimulated lymphocyte proliferation. *Biochem Soc Trans* 1989 Dec; 17(6): 1042-3.

[0325] 93. Calder PC, Bond JA, Newsholme EA. Fatty acid inhibition of lipopolysaccharide-stimulated B lymphocyte proliferation. *Biochem Soc Trans* 1990 Oct; 18(5): 904-5.

[0326] 94. Hickey, D. K, R. C. Jones, S, Bao, A. E. Blake, K A. Skel ding, L. J. Berry and K. W. Beagley, Intranasal immunization with *C. muridarum* major outer membrane protein (MOMP) and cholera toxin elicits local production of neutralizing IgA in the prostate. *Vaccine* 2004 22: 4306-4315.

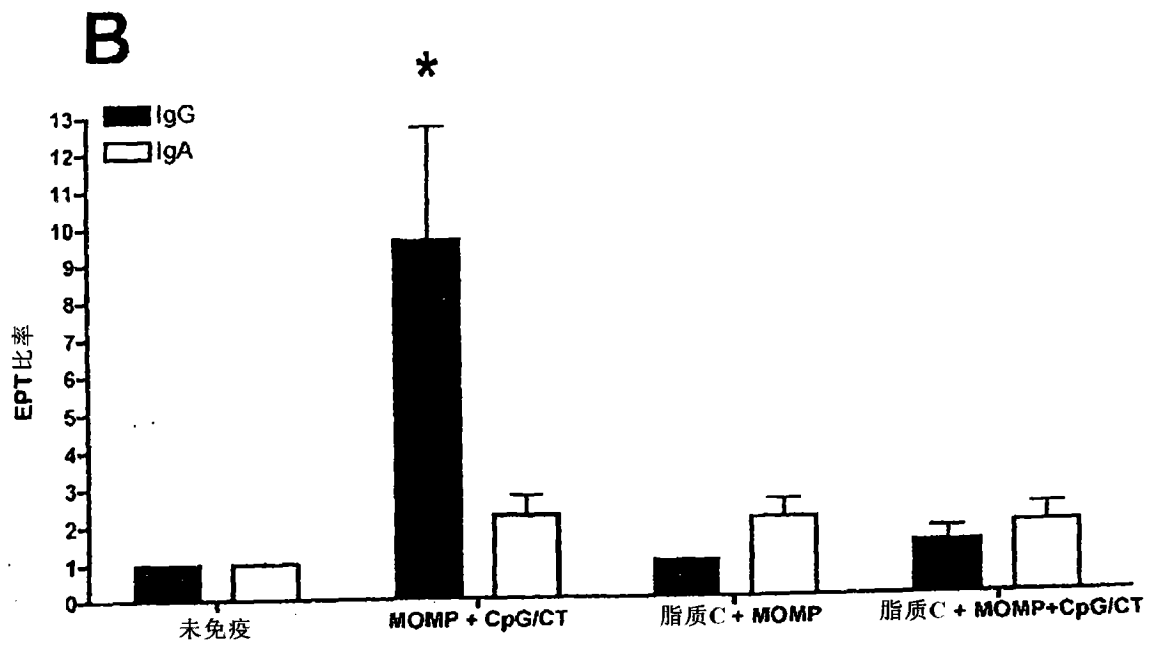
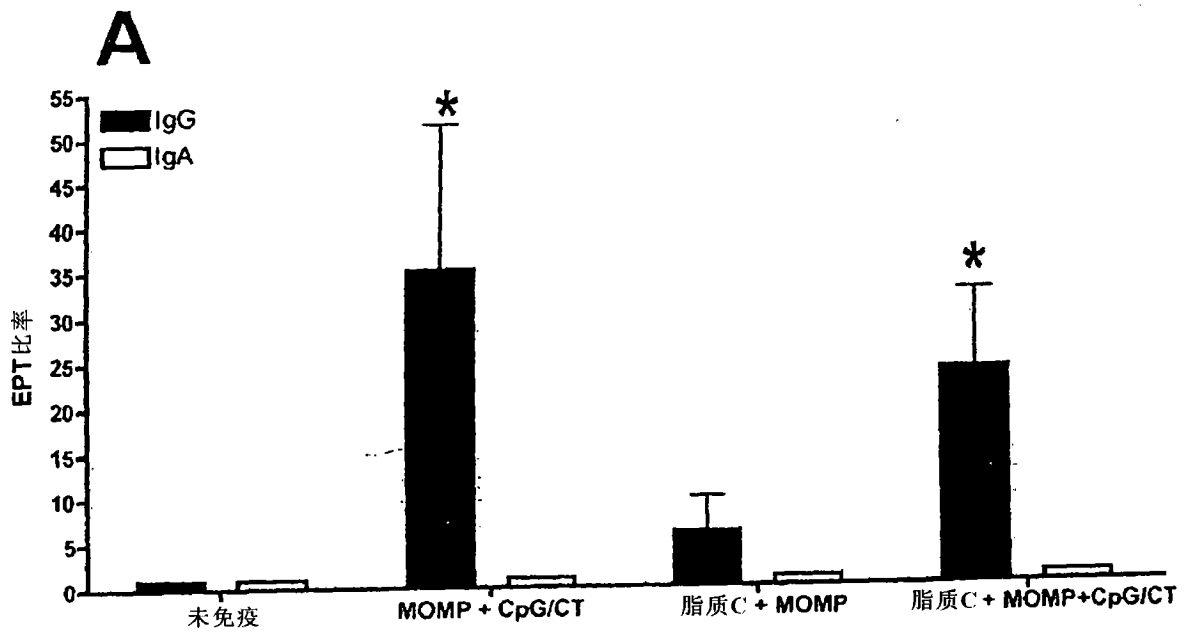


图 1

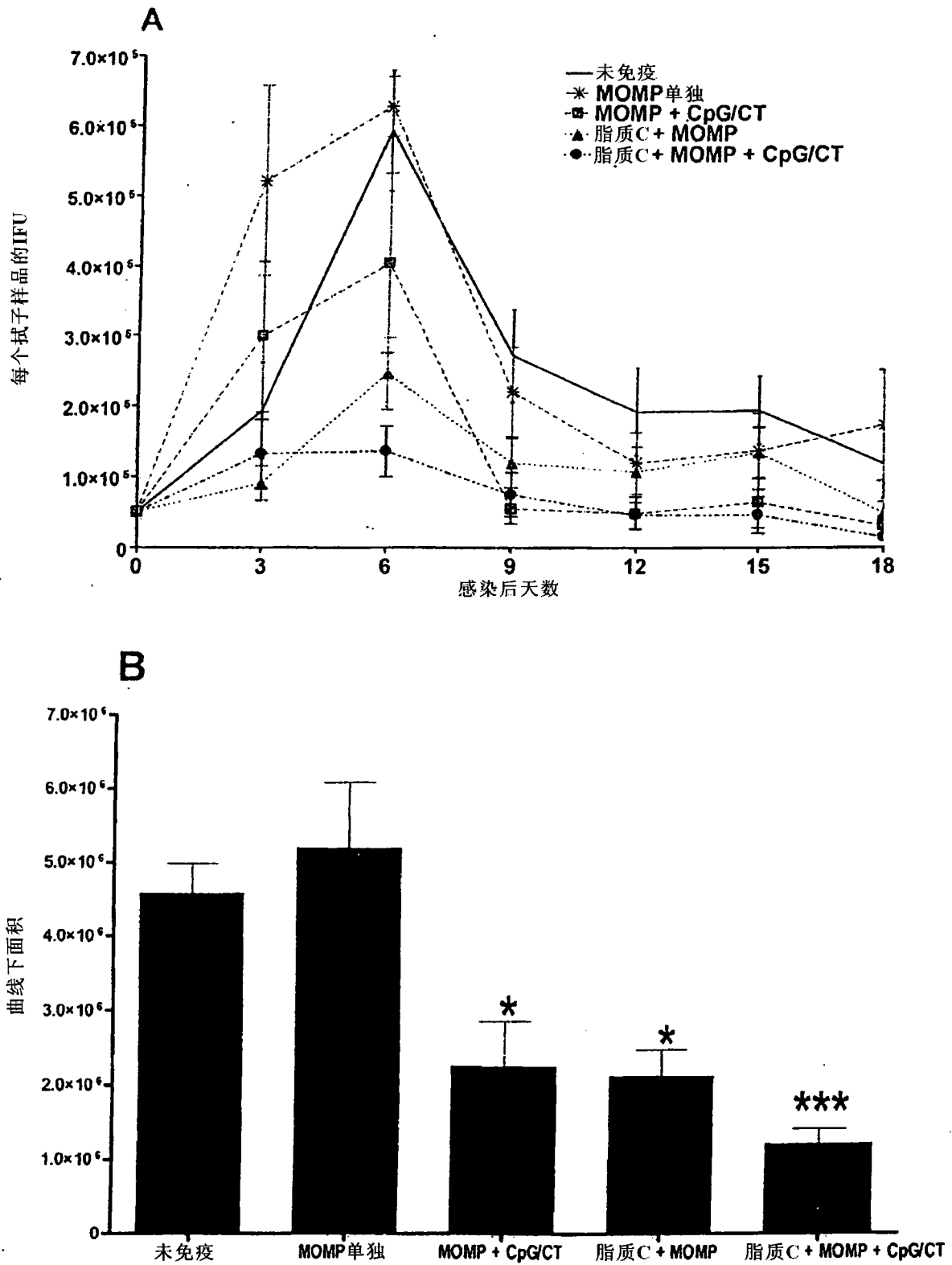


图 2

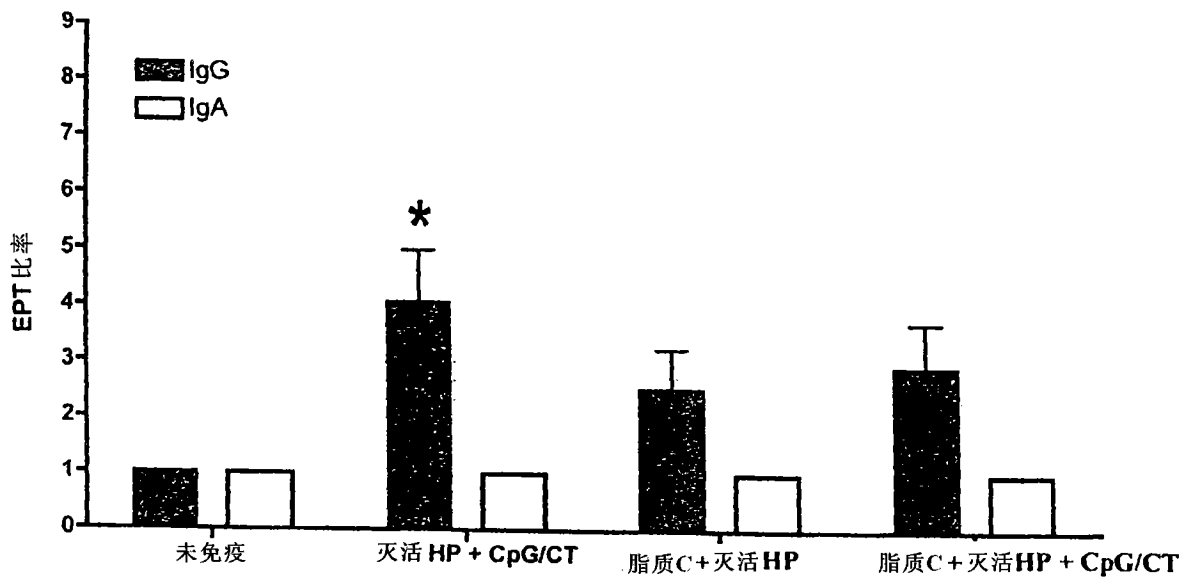


图 3 A

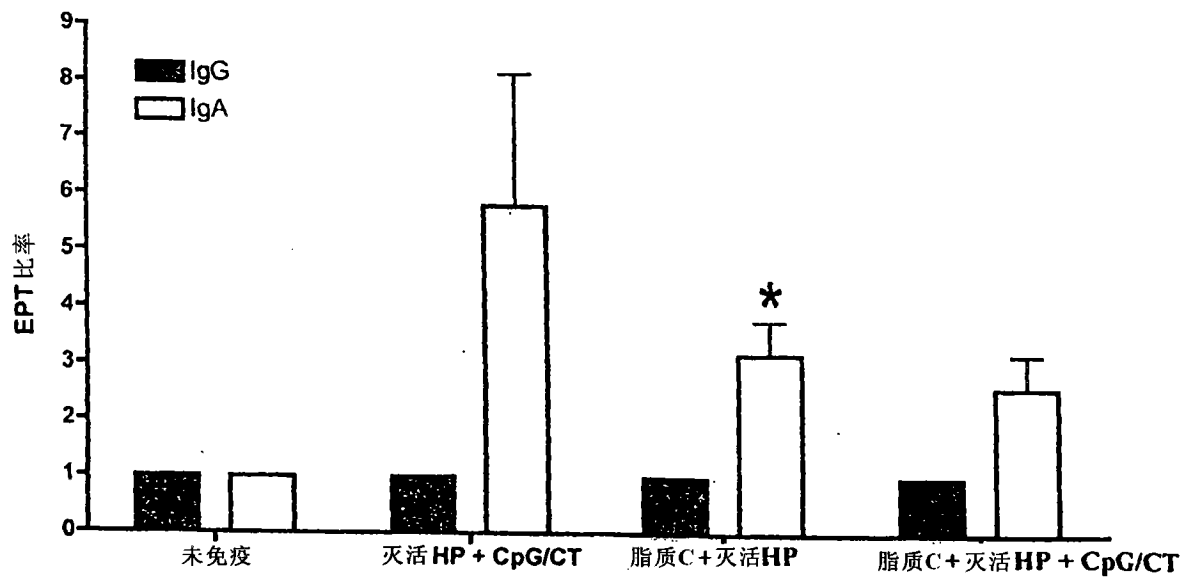


图 3 B

图 3

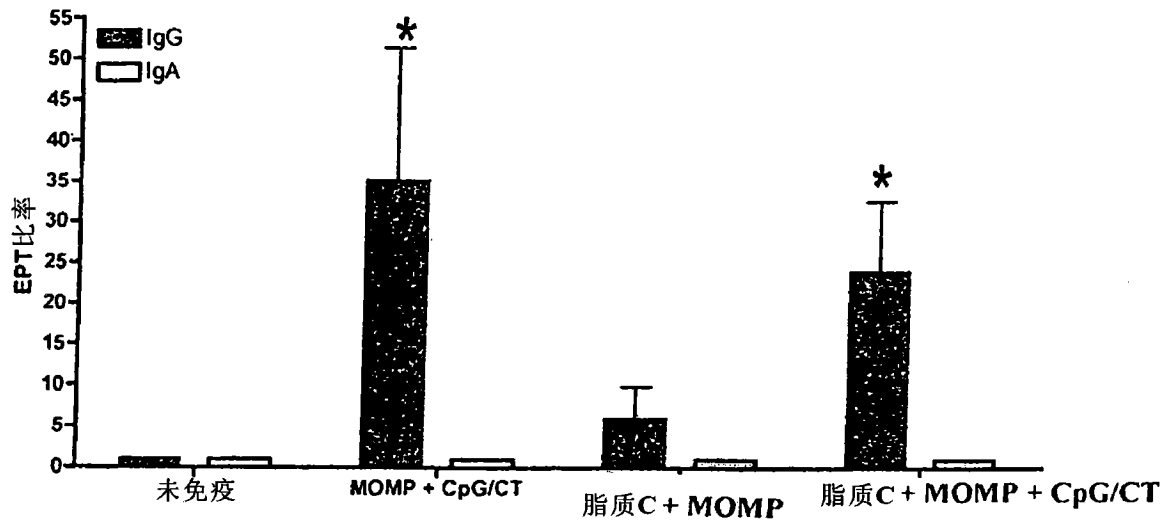


图 4 A

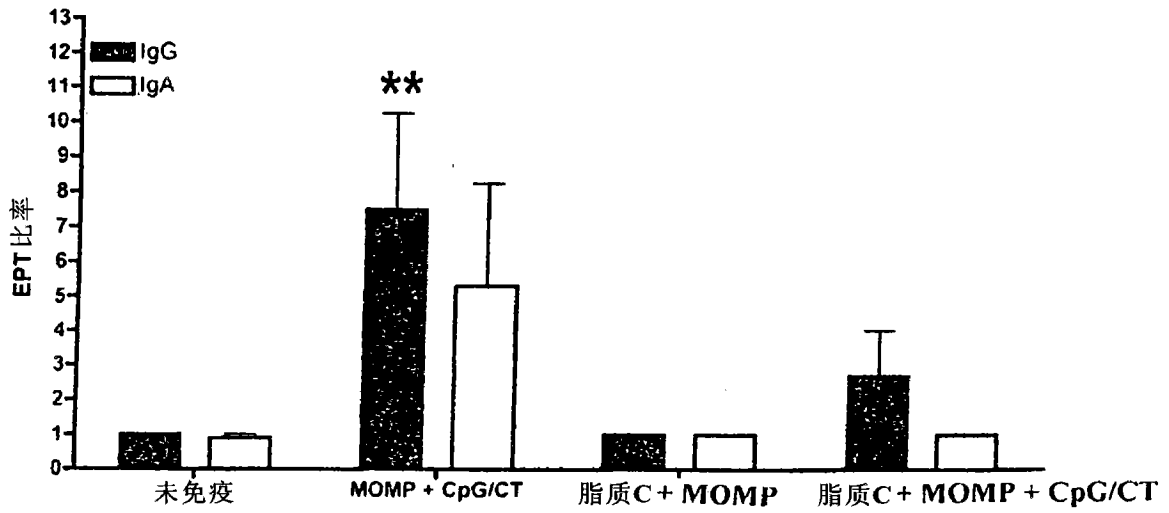


图 4 B

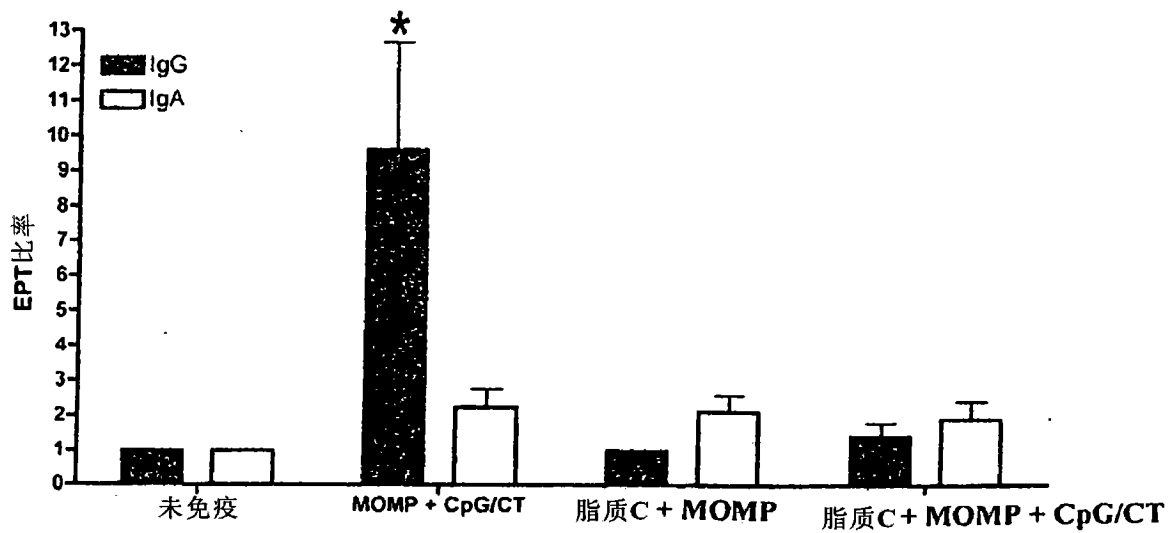


图 4 C

图 4

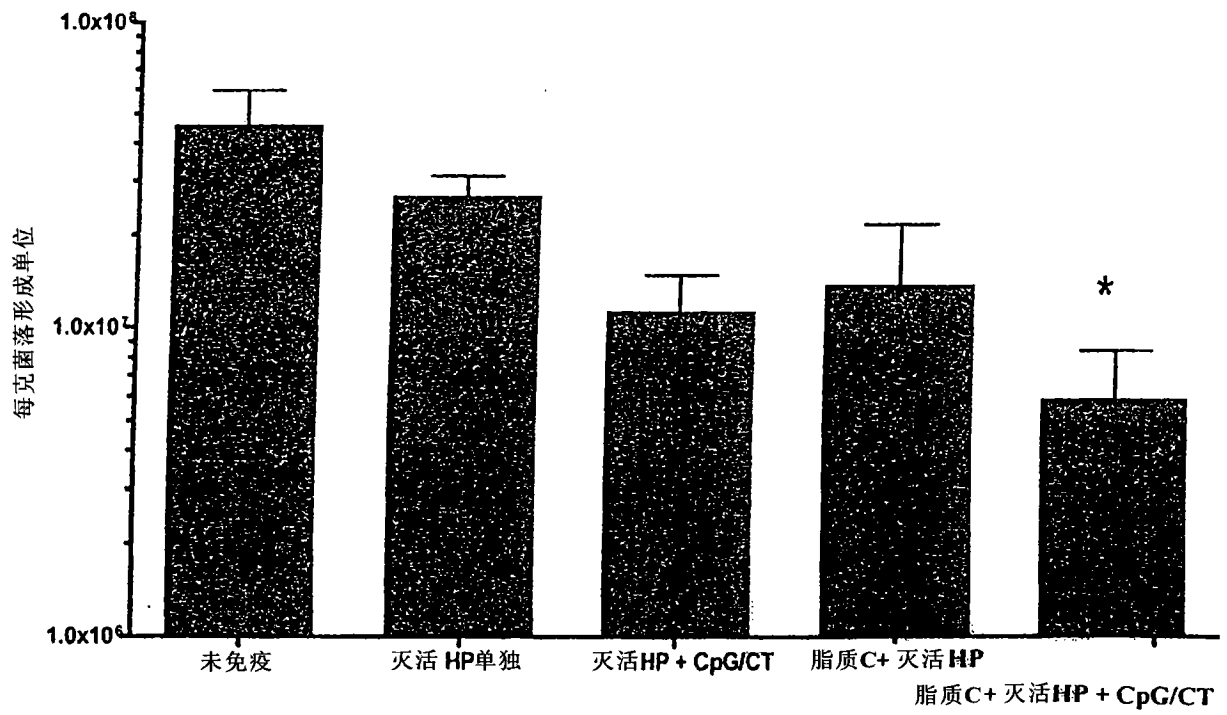


图 5

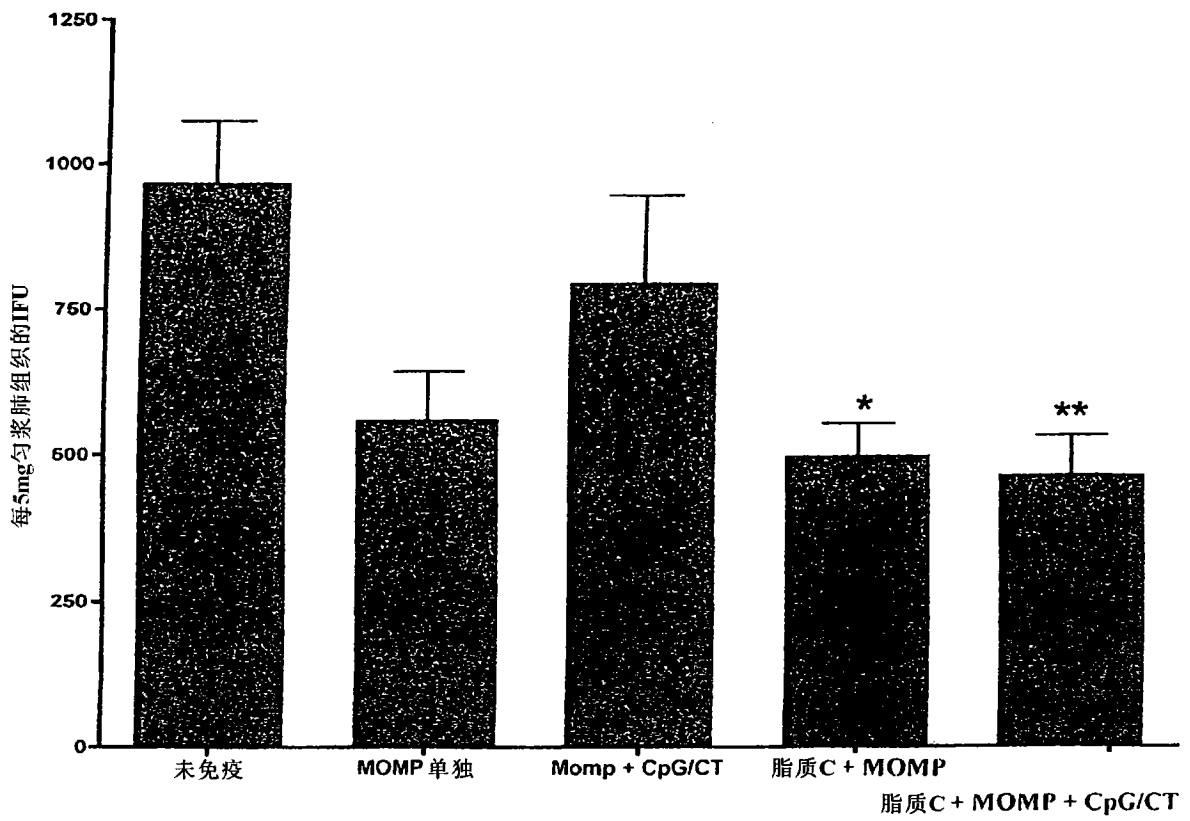


图 6