



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102834110 B

(45) 授权公告日 2015.01.14

(21) 申请号 201080060971.5

(22) 申请日 2010.12.08

(30) 优先权数据

61/267,647 2009.12.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.07.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/059411 2010.12.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/071988 EN 2011.06.16

(73) 专利权人 健康研究股份有限公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 S·O·戈尔尼克 J·里德尔

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 杨昀

(51) Int. Cl.

A61K 38/44 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2003/124137 A1, 2003.07.03, 摘要, 说明

书第【0017】段。

WO 2007/089871 A2, 2007.08.09, 权利要求
24, 31-32.

US 2003/124137 A1, 2003.07.03, 摘要, 说明
书第【0017】段。

WO 2007/089871 A2, 2007.08.09, 权利要求
24, 31-32.

审查员 樊颖

权利要求书1页 说明书14页 附图9页

(54) 发明名称

使用过氧化物氧化还原酶 1 (PRX1) 作为佐剂
的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供用于激发针对抗原的免疫反应的
组合物和方法。该组合物包括抗原和分离的 Prx1
蛋白, 该抗原激发所需要的免疫反应。Prx1 蛋白
作为佐剂起作用以使这种包含抗原与 Prx1 的组
合物激发的对该抗原的免疫反应强于仅用该抗原
激发的免疫反应。

1. 一种组合物,其包含抗原和分离的过氧化物氧化还原酶 1Prx1 蛋白,其中所述抗原是肿瘤抗原。
2. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述 Prx1 蛋白和所述抗原以复合物的形式存在。
3. 如权利要求 1 所述的组合物,其还包含抗原呈递细胞。
4. 如权利要求 3 所述的组合物,其特征在于,所述抗原呈递细胞是树突状细胞、巨噬细胞或其组合。
5. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述分离的 Prx1 蛋白以 Prx1 十聚体的形式存在。
6. 一种包含抗原和分离的 Prx1 蛋白的组合物在制备在个体中激发对所述抗原的免疫反应的药物组合物中的应用,其中所述抗原是肿瘤抗原。
7. 如权利要求 6 所述的应用,其特征在于,所述个体被诊断为患有癌症或者疑似患有癌症,其中所述癌症的细胞表达所述抗原。
8. 如权利要求 6 所述的应用,其特征在于,所述分离的 Prx1 蛋白以 Prx1 十聚体的形式存在。
9. 如权利要求 6 所述的应用,其特征在于,所述组合物还包含抗原呈递细胞。
10. 如权利要求 9 所述的应用,其特征在于,所述抗原呈递细胞是树突状细胞、巨噬细胞或其组合。

使用过氧化物氧化还原酶 1 (PRX1) 作为佐剂的方法和组合 物

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2009 年 12 月 8 日提交的美国专利申请 61/267,647 的优先权,将其揭示的内容通过引用纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及免疫治疗领域,更明确而言,本发明涉及使用 Prx1 作为佐剂来增强针对抗原的免疫反应。

[0004] 发明背景

[0005] Prx1 是典型的 2- 半胱氨酸过氧化物氧化还原酶家族的一员,其主要的胞内功能是通过其过氧化物酶的活性作为过氧化氢信号通路的调控因子和作为蛋白质的伴侣蛋白。Prx1 的表达在各种癌症中会上调,包括食管癌、胰腺癌、肺癌、甲状腺滤泡癌和口腔癌。Prx1 水平的升高与临床结果不理想和病人整体存活情况降低相关。最近的研究证实 Prx1 可以由非小细胞肺癌细胞分泌,该分泌可能通过一种非经典的分泌途径。然而,分泌的 Prx1 的作用至今尚未知晓,之前也未就治疗目的加以探索。

发明内容

[0006] 本发明提供了用于激发免疫反应的组合物和方法。这种组合物包括抗原和分离的 Prx1 蛋白。抗原和 Prx1 蛋白可以以复合物的形式提供,或者它们可以彼此共价连接。Prx1 蛋白在复合物中可以以多聚体的形式存在。在一个实施方式中,所述多聚体是十聚体。组合物还可以包括接触过抗原和 / 或 Prx1 蛋白的抗原呈递细胞。

[0007] 抗原可以是用于激发所需要的免疫反应的任何抗原,包括但不限于传染源或癌细胞表达的抗原。在一个实施方式中,抗原由肿瘤细胞表达。

[0008] 在个体中激发针对抗原的免疫反应的方法包括给予该个体包含该抗原和分离的 Prx1 蛋白的组合物。所激发的免疫反应可强于该抗原在不给予分离的 Prx1 蛋白时所激发的免疫反应。激发的免疫反应可包括细胞介导的免疫反应、体液免疫及其组合。

[0009] 在一个实施方式中,激发针对抗原的免疫反应的个体是有风险发生、被怀疑患有或已经诊断患有癌症的个体。

[0010] 附图简要说明

[0011] 图 1. Prx1 刺激巨噬细胞分泌细胞因子

[0012] (A) 采用流式细胞仪检测 TG 诱出的巨噬细胞所表达的 CD11b、Gr1 和 F4/80。示出 3 次独立分离的代表性柱状图,显示 CD11b⁺ 细胞的 Gr1 和 F4/80 的表达情况。插入框中的数字表明是每个象限中 CD11b⁺ 细胞的百分比。(B) 将 TG 诱出的巨噬细胞和刺激物共同培养 24 小时,收获上清液后分析 TNF- α (空心柱) 和 IL-6 (灰色柱) 的水平。结果以 pg/ml 为单位,代表了三组独立试验,误差线代表标准差。(C) 将 TG 诱出的巨噬细胞分别如下培养 24 小时:仅用培养基 (黑色柱);用 100nM LPS 或 2000nM Prx1 (空心柱);用 100nM LPS

或 2000nM Prx1, 经 10ug/mL 多粘菌素 B 预孵育 20 分钟 (阴影线柱); 100nM LPS 或变性的 2000nM Prx1 (灰色柱)。星号表示与仅用 Prx1 或 LPS 处理过的细胞相比 $p \leq 0.01$ 。(D) 将 TG 诱出的巨噬细胞分别以单独的培养基、Prx1 (50nM) 或 LPS (100nM) 培养 24 小时, 灰色柱表示培养时添加 10% 的 FBS, 空心柱表示未添加 10% 的 FBS。收获上清液, 并分析 IL-6 的水平。结果以 pg/ml 为单位, 误差线代表标准差。

[0013] 图 2. Prx1 刺激树突状细胞的成熟与激活。(A 和 B) 将未成熟的骨髓来源的树突状细胞 (iBMDC) 分别以单独的培养基、20-200nM Prx1 或 100nM LPS 培养 24 小时。(A) 培养后, 通过流式细胞仪分析细胞中 CD11c 和 CD86 的表达情况。结果显示为占有细胞的百分比, 误差线代表标准差。(B) 收获上清液, 并对 TNF- α 进行分析。结果以 pg/ml 为单位, 代表三组独立实验, 误差线代表标准差。(C) 将 TG 诱出的巨噬细胞与如下培养基共同培养: 收获自培养转染有编码对照 shRNA (乱序, Scramble) 或 Prx1 特异性 shRNA (shPrx1) 的 cDNA 的前列腺肿瘤细胞系的培养基, 或者是收获自培养表达 Prx1 特异性 shRNA 的细胞的培养基 (其中添加了 50nM 外源性的 Prx1, shPrx1+Prx1)。培养 24 小时后收获上清液, 对 TNF- α 进行分析。结果以 pg/ml 为单位, 代表三组独立试验, 误差线代表标准差。

[0014] **: $P \leq 0.01$, 与仅用培养基培养的细胞所分泌的 TNF- α 水平相比; ##: $P \leq 0.01$, 与用获自表达对照 shRNA 的细胞的培养基培养的细胞所分泌的 TNF- α 水平相比; ††: $P \leq 0.01$, 与用获自表达 Prx1 特异性 shRNA 的细胞的培养基培养的细胞所分泌的 TNF- α 水平相比。

[0015] 图 3. Prx1 诱导的细胞因子分泌依赖于 TLR4。

[0016] (A) 从 C57BL/6 小鼠 (TLR4^{+/+}; 空心柱) 和 C57BL/10ScNJ 小鼠 (TLR4^{-/-}; 实心柱) 分离得到 iBMDC, 分别用 200nM Prx1、100nM LPS 或 100mM Pam₃Cys 激发。收集上清液, 用 IL-6ELISA 试剂盒分析。(B) 从 C57BL/6 小鼠 (TLR4^{+/+}; 空心柱) 和 C57BL/10ScNJ 小鼠 (TLR4^{-/-}; 实心柱) 分离得到 TG 诱出的巨噬细胞, 分别用 200nM Prx1、100nM LPS 或 100mM Pam₃Cys 激发。收集上清液, 用 IL-6ELISA 试剂盒分析。结果以 pg/ml 为单位; 误差线代表标准差, 星号表示 P 值小于 0.01。(C) 向未处理的 C57BL/6 (TLR4^{+/+}; 空心柱) 小鼠和 C57BL/10ScNJ (TLR4^{-/-}; 实心柱) 小鼠腹腔内注射 200nm 的 Prx1。6 小时后, 采集血样, 用 ELISA 分析 IL-6 的存在。结果以 pg/ml 为单位; 误差线代表标准差, 星号表示 $P \leq 0.0002$ 。

[0017] 图 4: Prx1 和 TLR4 的相互作用依赖于 CD14 和 MD2。(A) 从 C57BL/6 小鼠中分离得到 TG 诱出的巨噬细胞, 在存在或不存在对照或针对 Prx1、CD14 或 MD2 的封闭抗体的情况下用 50nM Prx1 刺激 24 小时。收集上清液, 用 IL-6ELISA 试剂盒分析。结果以 pg/ml 为单位; 误差线代表 SEM, 星号表示 P 值小于 0.01。(B) 收获 TG 诱出的巨噬细胞, 如材料和方法中所述, 用针对 TLR4、TLR2 和小鼠 / 山羊 IgG 的抗体沉淀细胞裂解物; 所得沉淀物经 SDS-PAGE 分离并通过蛋白质印迹分析检测 Prx1 的存在。还用 TLR4 或 TLR2 的抗体检测印迹以作为内参照。(C) 收获 TG 诱出的巨噬细胞, 如材料和方法中所述, 将细胞裂解物与针对 TLR4 或小鼠 / 山羊 IgG 的抗体共孵育; 所得沉淀物经 SDS-PAGE 分离并通过蛋白质印迹分析检测 Prx1、CD14 和 MD2 的存在。还用 TLR4 抗体检测印迹以作为内参照。

[0018] 图 5: TLR4/Prx1 相互作用的动力学。(A) TG 诱出的巨噬细胞经 200nM 的 FITC-Prx1 或 PE 连接的抗 TLR4 (PE-TLR4) 激发。在指定的时间收集样品。样品和细胞群体通过安尼斯 (Amnis) 技术分析。图示为在每个时间点下, 代表性的免疫染色细胞和两种染色合并后

的图像。最右边的柱状图为通过所分析的每个细胞的像素统计分析 ($n=5,000$) 得出的像素柱状图,其中 y 轴表示的是细胞的数目, x 轴表示的是 Prx1 和 TLR4 之间的相似系数。(B) 图示为每个时间点所有细胞的平均相似系数;误差线表示标准差。

[0019] 图 6. Prx1 结合 TLR4 是结构依赖性。(A) 从 TLR4^{+/+}(白色柱)或 TLR4^{-/-}巨噬细胞(实心柱)中分离得到 TG 诱出的巨噬细胞,然后分别与培养基(无添加)、200nM 的 Prx1、200nM 的 Prx1C52S 或 200nM 的 Prx1C83S 培养 24 小时,收获上清液,分析 TNF- α 和 IL-6 的存在。(B) 从 TLR4^{+/+}(白色柱)或 TLR4^{-/-}巨噬细胞(实心柱)中分离得到 TG 诱出的巨噬细胞,与 2000nM 的 FITC 标记的蛋白质共同培养 20 分钟,然后用流式细胞仪分析。通过去除 7-AAD 高表达的细胞群选取活细胞用于分析。结果经归一化处理,以除去 FITC 标记中的差异,结果以每 nM 蛋白质中的 MFI/FITC 表示,误差线表示标准差。星号表示 $P \leq 0.01$ 。(C) TG 诱出的巨噬细胞分别与各种浓度的 FITC-BSA(正方形)、Prx1(黑色圆圈)、Prx1C52S(灰色圆圈)和 Prx1C83S(空心圆圈)共同培养 20 分钟,并用流式细胞仪分析。结果经归一化处理,以除去 FITC 标记中的差异,结果以每 nM 蛋白质中的 MFI/FITC 表示。每条曲线代表三次独立试验。(D) 将 TG 诱出的巨噬细胞与 1000nM 的 Prx1 共培养,清洗后与递增浓度的如下竞争剂共培养:OVA(正方形)、Prx1(黑色圆圈)、Prx1C52S(灰色圆圈)、Prx1C83S(空心圆圈)。结果以对于无竞争剂情况下 FITC-Prx1 的 MFI 百分比形式表示;误差线表示标准差。所有的实验都进行三次,综合后的结果如图所示。

[0020] 图 7. Prx1 刺激巨噬细胞依赖于 MyD88 并导致 NF κ B 的核易位。

[0021] (A) 包含对照(空心柱)或 MyD88DN(实心柱)表达质粒的 RAW264.7 巨噬细胞系的稳定感染子用 100nM LPS 或 1000nM Prx1 激发 24 小时,用 ELISA 分析得到的上清液中 IL-6 的表达。在三组独立实验中进行了 ELISA 分析;误差线表示标准差。星号表示 P 值 ≤ 0.001 。(B) 从 C3H/HeNcr(TLR4^{+/+})和 C3H/HeNj(TLR4^{-/-})小鼠中分离得到 TG 诱出的巨噬细胞,在完全培养基中用 200nM Prx1 激发。在指定的时间点,用 FITC 连接的抗 NF κ B p65 抗体和 DRAQ5(核染剂)染细胞 10 分钟,然后用安尼斯(Amnis)技术进行分析。最右边的柱形显示了基于 NF κ B 和核染色相似性的逐像素统计分析。(C) 在每个时间点下,在 C3H/HeNcr(实心圆圈)和 C3H/HeNj(空心圆圈)巨噬细胞中的总体相似系数的平均数值;误差线代表标准差。(D) 将 TG 诱出的巨噬细胞与特定浓度的 Prx1 共孵育 1 小时。按照实施例 1 所述进行 EMSA 分析。

[0022] 图 8. 在 PC-3M 细胞中表达 Prx1 特异性 shRNA 导致 Prx1 的表达减少。(A) 用凝胶电泳分离从表达对照(乱序)shRNA 或 Prx1 特异性 shRNA(shPrx1)的基因工程化 PC-3M 细胞(右图)中得到的细胞裂解物,用 Prx1 特异性抗体进行印迹和探测。(B) 表达 Prx1 特异性 shRNA 导致 Prx1 水平的降低。收获表达对照 shRNA(乱序)或 Prx1 特异性 shRNA 的基因工程化 PC-3M 细胞系,用蛋白质印迹分析 Prx1 或 Prx2 的表达。(C) Prx1 激发的 TG 诱出巨噬细胞分泌 IL-6 依赖于 CD14 和 MD2,其中 CD14 和 MD2 是 TLR4 的辅因子。从 C57BL/6 小鼠中分离得到 TG 诱出的巨噬细胞,在存在或不存在对照或者针对 CD14 或 MD2 的封闭抗体的情况下用 LPS 激发 24 小时。收获上清液后用 IL-6ELISA 试剂盒分析。结果以 pg/ml 为单位,误差线代表标准差。

[0023] 图 9 提供了用于显示动物模型中 Prx1 抗肿瘤的佐剂效果的图示。

[0024] 发明描述

[0025] 本发明是基于以下意想不到的发现：过氧化物氧化还原酶 1 (Prx1) 是 Toll 样受体 4 (TLR4) 的配体，并且 Prx1 的这种功能使得它能作为一种佐剂。本发明提供增强个体中针对抗原的免疫反应的组合物及方法。该组合物包括分离的 Prx1 和抗原。Prx1 的氨基酸序列及其 DNA 和 RNA 编码序列是本领域技术人员所熟知的。在一个实施方式中，分离的 Prx1 蛋白以十聚体的方式提供。这种分离的 Prx1 蛋白可包括 191 个氨基酸的序列或者由 191 个氨基酸的序列所组成，这种包括 191 个氨基酸的序列或由 191 个氨基酸的序列所组成的蛋白质具有过氧化物氧化还原酶的活性。在一个实施方式中，Prx1 蛋白含有 2009 年 8 月 23 日登入的 NCBI 参考序列：NP_859047.1 所示的氨基酸序列，该序列通过引用纳入本文。据信任何的剪接变体和 / 或 Prx1 异构体都可以用在本发明中。

[0026] 本发明的方法包括给予个体该组合物从而激发抗该抗原的免疫反应。这种激发的免疫反应可具有治疗或预防的效果，可包括细胞介导的反应和 / 或体液反应，或其组合。这样激发的免疫反应可强于用单独的抗原激发的免疫反应。

[0027] Prx1 是一种在大多数细胞类型中都存在的抗氧化剂和伴侣蛋白分子，并由转化的和活化的细胞分泌。TLR4 是 Toll 样受体 (TLR) 家族的一员。TLR 与其配体的相互作用启动炎症介质（如促炎细胞因子）的释放以及启动免疫反应细胞的成熟 / 活化。炎症和免疫细胞的成熟 / 活化对于抗原特异性免疫（包括抗肿瘤免疫）的诱导都是必不可少的。在本领域中，能够触发炎症和免疫细胞成熟 / 活化的试剂被称为佐剂。在此，我们证明 Prx1 与负责诱导抗原特异的免疫反应的免疫细胞（例如树突状细胞和巨噬细胞）表面上表达的 TLR4 相互作用。我们还证明，Prx1 和 TLR4 的相互作用导致产生树突状细胞和巨噬细胞的成熟 / 活化并导致分泌促炎细胞因子。因此，认为 Prx1 是免疫佐剂。重要的是，我们证实向抗肿瘤疫苗中添加 Prx1 增强了疫苗在动物中所起的效果。就此，用许多 TLR 激动剂来改善抗肿瘤免疫，包括 TLR9 激动剂 CpG 基序和 TLR7 激动剂咪喹莫特。CpG 基序是包含未甲基化的胞嘧啶 - 鸟嘌呤和侧翼核苷酸的 DNA 寡脱氧核苷酸序列 (ODN)，可以与 TLR9 相结合。咪喹莫特 [1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -4 胺；Aldera™；R-837, S26308] 是合成的 TLR7 激动剂，其可以诱导 DCs28 的成熟与迁移，IFN- α 、TNF- α 、IL-1 α 、IL-6、IL-12 和 IL-8 的表达，以及增强 CD8+T 细胞的活化。咪喹莫特已成功用于治疗基底细胞癌，最近的一项临床试验显示局部应用咪喹莫特可以有效清除 0 期的黑素瘤。这两种 TLR 激动剂都已列入美国国家癌症研究所 (NCI) 进一步开发作为抗癌疫苗佐剂的优先列表。

[0028] Prx1 显示很多与 CpG 和咪喹莫特相同的活性，然而，Prx1 所结合的受体 TLR4 的表达比与 CpG 和咪喹莫特相作用的 TLR 更广泛。因此，Prx1 有成为更有效的抗癌疫苗佐剂的潜力。

[0029] 预期本发明可以用于激发任何抗原所引起的免疫反应，因此，该抗原可以作为免疫源起作用。抗原包括但不限于：蛋白质、多肽或肽抗原。这种抗原可能已被充分表征，或者可能还未知，除了已知或者怀疑存在于（例如）细胞裂解物内的抗原，所述细胞裂解物来自包含或者可能包含该抗原的特定的细胞种类或任何其它生物组织样品。

[0030] 在一个实施方式中，本发明激发引起的免疫反应所针对的抗原是肿瘤抗原。肿瘤抗原可以通过传统的技术得到，如通过反复冻融肿瘤细胞 / 组织来制备肿瘤细胞裂解物而获得所述肿瘤抗原，所述肿瘤细胞 / 组织获自新鲜的肿瘤活检组织或获自体外组织培养所产生的肿瘤细胞。该肿瘤细胞裂解物可以通过离心和收集上清液得到。该肿瘤细胞裂解物

既可以立即使用,也可以冰冻储存备用。这种抗原可以以纯化的形式、部分纯化的形式或以细胞裂解物形式存在的未纯化形式使用。或者,可以通过重组 DNA 技术在众多表达系统中的任何一种中表达该抗原。因此,本领域技术人员应认识到可提供分离的 Prx1 蛋白以用于本发明中,从而使得个别的 (discreet)、分离的 Prx1 蛋白与一种或多种不同的抗原复合。这样的复合物可以在各种条件下形成,如改变 Prx1/ 抗原的比例,使用不同的缓冲液、孵育时间以及温度。

[0031] 在一个实施方式中, Prx1 蛋白和抗原在本发明的组合物中以复合物的形式存在,可以彼此共价或者非共价地连接。例如, Prx1 蛋白及抗原可能通过化学键相互连接,如通过共价键、离子键、氢键和 / 或范德华键,或上述键的组合。形成含或不含共价键的蛋白质 / 抗原复合物的方法在本领域是已知的,并且这些方法可以用于形成分离的 Prx1 蛋白和一种或多种抗原的复合物。本发明中的复合物可包含分离的 Prx1 蛋白和抗原,或基本由 Prx1 蛋白和抗原所组成,或由分离的 Prx1 蛋白和抗原所组成。“分离的”指 Prx1 蛋白与其天然存在的环境相分离。分离的蛋白质不一定是纯化的蛋白质。然而,为用于本发明,分离的 Prx1 蛋白仍然可纯化到任何需要的纯度。分离的 Prx1 蛋白包括通过重组的方法得到的 Prx1 蛋白。根据本发明, Prx1 多聚体,如十聚体,也被认为是分离的 Prx1 蛋白。此外,分离的 Prx1 蛋白还包括与抗原通过肽键相连的 Prx1 蛋白,例如在融合蛋白中。简而言之,为了产生这样的融合蛋白,可使用传统的技术构建编码 Prx1 蛋白和该抗原的 DNA 序列,并用任何合适的表达载体在适宜的细胞类型中表达。如此,这种融合蛋白即能在细胞内表达,且可使用任何本领域技术人员熟知的方法分离得到这种融合蛋白。在一个实施方式中, Prx1/ 抗原的融合蛋白可以由接头序列间隔开。

[0032] 本发明中适合给予个体的组合物可以通过以下方法制备:将分离的 Prx1 蛋白和 / 或抗原与任何合适的药学上可接受的载体、赋形剂和 / 或稳定剂混合。可在下列文献中找到一些适用于混合试剂的组合物的例子: Remington: The Science and Practice of Pharmacy (《雷明登: 药物科学与实践》) (2005), 第 21 版, 宾夕法尼亚州费城, 利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司 (Lippincott Williams & Wilkins)。

[0033] 在一个实施方式中, 根据本发明中的方法激发免疫反应的个体是有风险发生、被怀疑患有或已经诊断患有癌症的个体。因此, 在各种实施方式中, 与 Prx1 蛋白联用的抗原是在任一种癌细胞中表达的抗原, 具体的例子包括但不限于: 纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、腹膜假性粘液瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状上皮细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌, 支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤、视网膜成神经细胞瘤、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症和重链病。

[0034] 在一个实施方式中, 个体具有带传染源的风险, 或者疑似带有传染源, 或者已被诊断带有传染源。因此, 在多种实施方式中, 用于本发明中的抗原可以是由传染源所表达的那些抗原。此类传染源的例子包括但不限于: 病毒、细菌、真菌和其它寄生生物。病毒的例

子包括但不限于：乙型肝炎或丙型肝炎病毒、流感病毒、水痘病毒 (vaticella)、腺病毒、I 型或 II 型单纯疱疹病毒、牛瘟病毒、鼻病毒、艾柯病毒、轮状病毒、呼吸道合胞体病毒、乳头瘤病毒、乳多空病毒、细胞巨化病毒、棘状病毒、虫媒病毒、汉坦病毒、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、骨髓灰质炎病毒、人 I 型或 II 型免疫缺陷病毒。细菌的例子包括但不限于：结核分枝杆菌、分枝杆菌、支原体、奈瑟氏菌和军团杆菌。其它寄生生物的例子包括但不限于立克次体和衣原体。

[0035] 本发明的组合物可以通过任何适宜的给药途径给药。一些非限制性的例子包括：口服、胃肠道外给药、皮下给药、腹膜内给药、肺内和鼻内给药。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内和皮下给药。

[0036] 本发明的组合物的给药可以和旨在治疗抗原相关的疾病或紊乱的常规治疗联合进行。例如，组合物可在常规抗癌治疗之前、同时或之后给予。这些治疗包括但不限于：化疗、手术干预和放疗。

[0037] 总体而言，适宜的剂量和治疗方案提供有效量的该组合物以激发免疫反应，从而提供治疗或者预防益处。这种反应可以通过临床结果的改善监测到，如：抑制肿瘤的生长和 / 或转移、增强对感染的抵抗力、促进免疫细胞的活化、和 / 或对于本领域技术人员而言显而易见的其它参数，取决于所治疗病状。

[0038] 在此公开的治疗用组合物的给药途径、频率及剂量在不同个体之间各不相同，但使用标准的技术可以很方便的确定。

[0039] 在一个实施方式中，本发明提供一种组合物，其包含：分离的抗原呈递细胞 (APC) 群和包含分离的 Prx1 和抗原的复合物。Prx1/ 抗原复合物可以被用于致敏 APC，如树突状细胞。给予个体经致敏 APC 可以获得增强的免疫反应。因此，包含分离的 APC 群和复合物（所述复合物包含分离的 Prx1 蛋白和抗原）的组合物中细胞的全部、基本全部、或者部分是树突状细胞。据此，组合物中的细胞可以 100% 是树突状细胞，也可以 10%-100%（包括之间所有的整数）是树突状细胞。

[0040] 在一个实施方式中，给予个体包含分离的 APC 群和复合物（所述复合物包含分离的 Prx1 蛋白和抗原）的组合物以在该个体中激发预防性或治疗性免疫反应。给予个体的 APC 可以是异基因的或同基因的。

[0041] 以下实施例是为了说明而非限制本发明。

[0042] 实施例 1

[0043] 本实施例提供了实施本发明具体实施方式中使用的材料和方法的描述。

[0044] 材料

[0045] 脂多糖 (LPS, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 血清型 026:B6) 多粘菌素 B 硫酸盐、牛血清白蛋白 (BSA) 和卵清蛋白 (OVA) 购自西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich, 密苏里州圣路易斯)。7-氨基-放线菌素 D (7-AAD) 和硫代乙醇酸盐布氏改良培养基购自 BD 公司 (加利福尼亚州拉霍亚) (Becton Dickinson, La Jolla, CA)。Luminex 分析系统中所使用的用于捕获和检测 IL-6 和 TNF- α 的抗体、以及蛋白质标准品购自英杰公司 (加利福尼亚州卡尔斯巴德) (Invitrogen, Carlsbad, CA)。CD11b、Gr-1、F4/80 及所有的同种型的特异性抗体购自法明基公司 (加利福尼亚州山景城) (PharMingen, Mountain View, CA)。抗 TLR2、TLR4 和 NF κ B 亚基的抗体购自圣克鲁斯生物技术公司 (加利福尼亚州圣克鲁斯) (Santa

Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)。抗 MD2 和 CD14 的封闭抗体购自圣克鲁斯生物技术公司。藻红蛋白 (PE) 连接的抗 TLR4 抗体,购自易生物科学公司 (eBioscience, 加利福尼亚州圣地亚哥)。抗 Prx1 的特异性抗体购自实验室前沿公司 (Lab Frontier, 首尔, 韩国); 这种抗体为 Prx1 特异性, 在表达 Prx1 的细胞的蛋白质印迹分析中只检测一条条带 (图 8A)。

[0046] 动物和细胞系

[0047] C57BL/6Ncr (TLR4^{+/+} 和 TLR2^{+/+})、C57BL/10ScNJ (TLR4^{-/-})、B6.129-Tlr2^{tm1Kir/J} (TLR2^{-/-})、C3H/HeNcr (TLR4^{+/+}) 和 C3H/HeNJ (TLR4^{-/-}) 无病原体小鼠, 购自美国杰克逊实验室 (The Jackson Laboratory, 缅因州巴港)。动物饲养在置于层流柜中的微小隔离饲养盒中, 暴露在环境光下。小鼠饲养在罗斯维尔帕克癌症研究所 (Roswell Park Cancer Institute, 美国纽约州布法罗) 的无病原实验室中。动物的护理和实验均得到动物护理和使用委员会 (The Institutional Animal Care and Use Committee) 的批准。

[0048] Prx1 在体内的作用通过向 C57BL/6Ncr 或 C57BL/10ScNJ 小鼠静脉注射 90ug Prx1 (大约为 1000nM) 来测定。两小时后进行心脏穿刺。如下获得血清: 将血液在 4°C 下孵育过夜, 然后离心样品, 收集上清液。

[0049] 培养的小鼠巨噬细胞系 (RAW264.7) 于 37°C 和 5.0% 的 CO₂ 条件下培养于达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM) 中, 该培养基包含 10% 的特级胎牛血清和 100U/ml 的青霉素以及 100ug/ml 的链霉素。RAW264.7 细胞转染了 pcDNA3.1 质粒, 该质粒包含对照或者包含编码 MyD88 显性阴性突变体 (MyD88 dominant negative, DN) 的寡核苷酸, 根据制造商的实验设计, 用 FuGENE 6 (英杰公司, 加利福尼亚州卡尔斯巴德) 进行转染。然后使用 G418 筛选转染细胞中表达对照或 MyD88DN 的细胞。然后分别用缓冲液、Prx1 或 LPS 发激细胞 24 小时, 培养基收获后通过 ELISA 分析 IL-6 细胞因子。

[0050] 在肺癌细胞系 (A549) 中用于产生 Prx1 敲减的逆转录病毒感染过程和逆转录病毒短发夹 RNA 表达构建体是本领域技术人员已知的。(Kim 等, (2007) Cancer Res. 67:546-554; Park 等, Cancer Res. (2007) 67:9294-9303; Park 等, 2006. Cancer Res. 66:5121-5129, 其内容通过引用纳入本文。

[0051] 分离巨噬细胞和树突状细胞

[0052] 小鼠腹腔诱出的巨噬细胞是通过腹腔内注射 1.0 毫升 3.0% (w/v) 的硫代乙醇酸盐培养基 (TG) 得到的。注射后四天, 处死小鼠, 灌洗腹腔收集巨噬细胞。巨噬细胞在完全培养基 (DMEM 培养基添加 10% 的特级 FBS 和 100U/ml 的青霉素以及 100ug/ml 的链霉素) 中培养 1 小时通过贴壁筛选得到富集, 然后通过 FACS 分析法用标准技术鉴定 CD11b、Gr1 以及 F4/80 的表达。CD11b⁺Gr1⁻F4/80⁺ 型的细胞确认为巨噬细胞。

[0053] 使用标准技术在 GM-CSF 中培养骨髓来源的细胞从而产生未成熟的骨髓来源的树突状细胞。表达 CD11c 的细胞确认为树突状细胞。

[0054] 蛋白质纯化

[0055] 重组人 Prx1、Prx1C52S 和 Prx1C83S 蛋白的纯化方法如前所述 (Kim 等, 2006. Cancer Res. 66:7136-7142; Lee 等, 2007. J. Biol. Chem. 282:22011-22022, 其各自揭示的内容通过引用纳入本文)。简而言之, 将包含有重组蛋白的细菌细胞提取物上样至 DEAE 琼脂糖凝胶 (GE 健康护理公司, GE Healthcare, 美国), 经 pH 7.5 的 20mM Tris-Cl 平衡。蛋白质经 pH6.5 的 50mM 磷酸钠缓冲液 (包含 0.1M NaCl) 透析。收集获自 DEAE 柱的含

Prx1、Prx1C52S 或 Prx1C83S 的未结合蛋白,合并且上样至 Superdex 200((16/60, GE 健康护理公司,美国),经 pH7.0 的 50mM 的磷酸钠缓冲液(包含 0.1M NaCl)平衡。含有 Prx1、Prx1C52S 或 Prx1C83S 的部分收集后保存在 -80 摄氏度。根据制造商的指示,使用内毒素鲎试剂测定法(Limulus Amebocyte Lysate Assay)(龙沙公司,Lonza,马里兰州,沃克斯维尔)定量纯化蛋白中内毒素的水平。测定后发现,Prx1、Prx1C52S 和 Prx1C83S 中分别含有 14.14 ± 0.050 EU/ml、 14.07 ± 0.67 EU/ml 和 14.17 ± 0.025 EU/ml。

[0056] 细胞因子分析

[0057] 贴壁的 TG 诱出的巨噬细胞经 PBS 清洗 5 至 10 次,以除去任何非贴壁的细胞。一经清洗后,即加入含有特定浓度的纯化的 Prx1、Prx1C52S、Prx1C83S 或 LPS 的完全培养基,其中存在或不存在 Prx1、MD-2 和 CD14 的封闭或对照抗体。在指定的实验中,添加前将 Prx1 蛋白或 LPS 与多粘菌素 B 共同孵育或者先煮沸 20 分钟。24 小时后收集上清液,通过细胞因子特异的 ELISA 或 Luminex 多重分析系统进行分析。血清样品依如上所述的方法收集并使用 ELISA 测定 IL-6 的水平。TNF- α 和 IL-6 ELISA 试剂盒购于 BD 生物科学事业部(美国新泽西州富兰克林湖市)(BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ),测试依照制造商的说明书完成。

[0058] Luminex 分析在研究所流式细胞实验室(Institute Flow Cytometry Facility)完成,使用具有 PVDF 膜的 96 孔微量滴定板(多筛选 HV 板, Multiscreen HV plates)(密理博公司, Millipore, 美国马萨诸塞州, 比莱瑞卡),以帝肯基因西斯液体操作机器人(Tecan Genesis liquid handling robot, 三角研究园(Research Triangle Park), 北卡罗来纳州)完成所有的稀释、试剂添加以及微量滴定板的操作。包被有捕获抗体的微珠组被测试稀释剂稀释,收集,往每孔中加入各组的约 1000 枚微珠。从 9000 到 1.4pg/ml 的重组蛋白质标准品使用稀释剂用 3 倍稀释法进行滴定。将样品和标准品添加至含有珠子的孔中。将平板置于摇床上在环境温度下孵育 120 分钟,然后以多歧真空抽滤盒抽吸用稀释剂清洗两次。然后添加抗各种细胞因子的生物素化测试抗体,孵育平板 60 分钟,并照之前所述的方法进行清洗。最后,向每个孔中添加 PE 连接的链霉亲和素,孵育平板 30 分钟并进行清洗。珠子在 100 μ l 的清洗缓冲液中重新悬浮,在 Luminex 100 系统(路明克斯公司(Luminex Corp.), 得克萨斯州, 奥斯汀)上进行分析。每个样品都测试两次,且从所有读数中减去空白值。采用读珠(BeadView)软件(密理博),依据珠子的 MFI 值对重组蛋白标准品的浓度计算出对数回归曲线。将偏离最佳拟合曲线的点,即低于测试极限或超过饱和度的点,从曲线中剔除。样品中的细胞因子的浓度通过将它们的珠子的平均荧光强度内插至所得最佳拟合曲线中计算得到。值超过测试极限的样品稀释后重新测定。

[0059] 用 FITC 标记蛋白质

[0060] 将 BSA、Prx1、Prx1C52S 和 Prx1C83S 蛋白通过 FITC 连接试剂盒(西格玛公司,密苏里州,圣路易斯)连接至 FITC 上。将 20 倍过量的 FITC 和单独蛋白质溶解至 0.1M 的碳酸氢钠/碳酸钠缓冲液(pH 调至 9.0)中;混合物在室温下温和摇动孵育 2 小时。过量的游离 FITC 用 Sephadex G-25 凝胶柱(法玛西亚公司(Pharmacia),新泽西州,皮斯卡塔维)移除。蛋白质的量通过标准的 Lowry 检测法定量。F:P(荧光强度:蛋白质)比根据制造商的说明书进行计算,FITC 吸收率和蛋白质的吸收率分别为在 495nm 和 280nm 下的光学密度。BSA、Prx1、Prx1C52S 和 Prx1C83S 的每 nM 蛋白质的 FITC 值分别为 31.00 ± 1.92 、 38.52 ± 2.39 、

74.49 ± 2.64 和 44.44 ± 2.64。

[0061] 饱和度分析

[0062] FITC 连接的 BSA、Prx1、Prx1C52S 和 Prx1C83S 用含 1.0% 的 BSA 的 PBS 稀释至特定浓度,反应的总体积为 100 μ L。这些混合物与 1.0×10^6 个细胞/mL (的细胞) 于冰上孵育 20 分钟,以防止内化。细胞用含 1%BSA 的 PBS 清洗两次,并进行孵育以显示相对于带有 7-AAD 的无活力细胞的存活性,然后在少于 30 分钟内用 FACsCalibur 检测。数据从至少 20,000 例细胞中得到,以并排列表 (collateral list) 模式储存,并用 WinList 处理程序 (VSH 公司 (Verity Software House, Inc.), 缅因州特普杉, Topsham) 分析。7-AAD 阳性 (无活力) 的细胞被排除出事件外。FITC- 连接的 BSA 被用于作为阴性结合对照,对于突变研究, FITC 标记中的变化以每 nM 蛋白质中的 FITC 的标记归一化。

[0063] 竞争试验

[0064] 将未标记的 OVA、Prx1、Prx1C52S 和 Prx1C83S 与和 FITC 相连的 Prx1 以特定浓度在 100 μ l 含 1.0%BSA 的 PBS 中短暂混合。该混合物在冰上孵育 20 分钟,然后用含 1.0%BSA 的 PBS 清洗两次。接着,将细胞与 7-AAD 共孵育,在 30 分钟内用流式细胞仪检测。在所有的竞争试验中, OVA 都用作阴性竞争对照。数据从至少 20,000 例细胞中得到,以并排列表模式储存,并用 WinList 处理程序 (VSH 公司, 缅因州特普杉) 分析。当使用 WinList 分析结果时, 7-AAD 阳性的细胞被排除出事件外。

[0065] 免疫沉淀

[0066] 取 500 μ g 细胞裂解物和 4 μ g 抗 TLR4 或抗 TLR2 在 4 摄氏度培养过夜进行免疫沉淀。添加 25 μ L 的蛋白 G 琼脂糖 (圣克鲁斯生物技术公司) 后,将裂解物继续孵育 4 小时。为了验证有特异性蛋白质相互作用,使用山羊 IgG (圣克鲁斯生物技术公司) 或小鼠 IgG (圣克鲁斯生物技术公司) 作为阴性对照。珠子用裂解缓冲液清洗三次,用 SDS-PAGE 分离,用 Prx1 特异性的抗体进行免疫印迹。使用 ECL 系统 (伯乐公司 (Biorad)) 检测蛋白质。

[0067] Prx1/TLR4 的共定位及 NF κ B 的易位

[0068] 如下进行共定位实验:将 200nM FITC 标记的 Prx1 和 PE 连接的抗 TLR4 加入含有 TG 诱出的巨噬细胞的培养基中,置于 37 摄氏度下,孵育指定的时间,然后转移至冰上,固定并分析。

[0069] 免疫染色检测 NF κ B 核易位的方法如下。来源于 C3H/HeNcr (TLR4^{+/+}) 和 C3H/HeNJ (TLR4^{-/-}) 小鼠的 TG 诱出的巨噬细胞经 200nM Prx1 处理。在 37 $^{\circ}$ C 下孵育指定时间后,将细胞刮下并收集至试管中,用清洗缓冲液 (含 2%FBS 的磷酸盐缓冲盐水) 清洗两遍,然后在常温下的固定缓冲液 (含 4%多聚甲醛的磷酸盐缓冲盐水) 中固定 10 分钟。清洗后,细胞用含 10 μ g/ml 抗 NF κ B p65 抗体 (圣克鲁斯生物技术公司) 的 Perm 洗涤缓冲液 (含 0.1% 曲通 X-100、3%FBS、0.1% 叠氮化钠的磷酸盐缓冲盐水) 于室温下重新悬浮 20 分钟。细胞再用 Perm 洗涤缓冲液进行清洗,并在室温下于含 7.5 μ g/ml FITC 接合的 F(ab)₂ 驴抗兔 IgG 的 Perm 洗涤缓冲液中重新悬浮 15 分钟。细胞再用 Perm 洗涤缓冲液清洗两次,于室温下在含 5 μ M DRAQ5 核染剂 (生物态公司, BioStatus) 的 1% 的多聚甲醛中重新悬浮 5 分钟。

[0070] 图像分析

[0071] 用 ImageStream[®] 多光谱成像流式细胞仪 (安尼斯公司, 华盛顿州西雅图) (Amnis Corp., Seattle, WA) 分析 Prx1 和 TLR4 的共定位和 NF- κ B 的核转位。在每种试验条件下,

至少获得 5000 次事件,用 IDEAS® 软件包分析相应的图片。采用层级门控 (hierarchical gating) 策略,使用基于图像的物体对比度 (梯度 RMS) 特征和面积对长宽比筛选在焦点中的单个细胞。分别使用 Prx1 和 TLR4 图像或 NF κ B 和 DRAQ5 图像的 IDEAS® 相似性特征测定各单独细胞中的共定位和核易位,该相似性特征是对全细胞中空间相关像素强度的对数转换的皮尔森相关系数。相似性得分是两张图像线性相关的程度的量度。

[0072] 电泳迁移率变动分析 (EMSA)

[0073] 使用传统技术进行 EMSA。简而言之,将 10 μ g 的核蛋白与 γ -³²P 标记的双链 NF κ B 寡核苷酸共孵育于 20 μ L 含 10mM HEPES (pH 7.9)、80mM NaCl、10% 甘油、1mM DTT、1mM EDTA、100 μ g/mL 聚 (脱氧肌核酸-脱氧胞苷酸) 的结合溶液中。DNA-蛋白质复合物在 200V, 4 $^{\circ}$ C, 非变性条件下在 6% 聚丙烯酰胺凝胶中解析 2 小时。凝胶干燥后进行放射自显影。

[0074] 统计学分析

[0075] 为比较各实验组,采用带韦尔奇校正 (Welch's correction) 的标准化 T 测试进行统计分析,其中不假设方差相等。P 值小于等于 0.05 时认为差异有显著性。

[0076] 实施例 2

[0077] 本实施例提供对由实施例 1 中所描述的材料与方法所得结果的描述。

[0078] Prx1 激发 DC 和 TG- 巨噬细胞分泌细胞因子以及 Prx1 激发 DC 的成熟依赖于 TLR4

[0079] 硫代乙醇酸盐 (TG) 诱出的小鼠巨噬细胞用于评估 Prx1 激发细胞因子分泌的能力。通过分析腹腔渗出液细胞群的 CD11b、Gr1 和 F4/80 的表达鉴定巨噬细胞的表型。分离的细胞群中大于 99% 为 CD11b⁺,在这些 CD11b⁺ 细胞群中大多数为 Gr1⁻、F4/80⁺ (图 1A)。用 Prx1 激发 TG 诱出的巨噬细胞导致该细胞剂量依赖地分泌 TNF- α 和 IL-6,其分泌显著高于所有浓度未激发细胞的分泌 ($P \leq 0.01$; 图 1B)。Prx1 与内毒素的灭活剂多粘菌素 B 一起预孵育对 Prx1 激发细胞因子的分泌没有显著影响 (图 1C);相反,Prx1 的变性显著降低其激发细胞因子分泌的能力 ($P < 0.01$)。

[0080] 在无血清的条件下,与 Prx1 共孵育后对 TG 诱出的巨噬细胞分泌细胞因子的激发显著降低 ($P \leq 0.01$; 图 1D);然而,即使在无血清的条件下,将 Prx1 与 TG 诱出的巨噬细胞共孵育也能显著增高 IL-6 的分泌 ($P \leq 0.005$,与在无血清培养基中培养的细胞的分泌相比)。Prx1 同样能够激发培养的树突状细胞系 DC1.2 和鼠巨噬细胞系 RAW264.7 分泌细胞因子 (数据未显示)。

[0081] 外源性的 Prx1 可以诱导未成熟的骨髓来源的树突状细胞 (iBMDC) 的成熟与活化。将 iBMDC 与浓度递增的 Prx1 共培养 24 小时,检测细胞表面共刺激分子的表达和 TNF- α 的分泌。在所有测试剂量下,添加 Prx1 导致细胞表面共刺激分子 CD86 的表达 (图 2A) 和 TNF- α 的分泌 (图 2B) 呈显著的剂量依赖性增加 (与对照相比 $P \leq 0.01$)。

[0082] 添加外源重组 Prx1 增强 iBMDC 和 TG 诱出的巨噬细胞分泌细胞因子可能是重组蛋白的现象,而无生理相关性。为了开始检测 Prx1 是否能在生理条件下促进细胞因子的分泌,将 TG 诱出的巨噬细胞与收集自分泌 Prx1 的肿瘤细胞上清液或收集自表达 Prx1 特异性 shRNA 的基因工程化肿瘤细胞上清液共培养 24 小时。shRNA 的表达导致 Prx1 而非 Prx2 的表达降低 (图 8B)。将 TG 诱出的巨噬细胞与表达非特异性 shRNA 的基因工程化肿瘤细胞的上清液共培养将导致 TNF- α 表达的增强 (Sc, 图 2C; $P \leq 0.0001$,与培养基组相比)。相反,将 TG 诱出的巨噬细胞与收集自 Prx1 表达水平降低的肿瘤细胞的上清液共培养使得

分泌的 TNF- α 水平显著降低 ($P \leq 0.0001$, 与收获自表达对照 shRNA 的细胞的上清液组相比;图 2C);向这些上清液中添加外源性的 Prx1 恢复 TG 诱出的巨噬细胞的 TNF- α 分泌 (shPrx1+Prx1; $P \leq 0.003$, 与收获自表达 Prx1 特异性 shRNA 的细胞的上清液组相比)。

[0083] 为了检测 Prx1 激活 iBMDC 和 TG 诱出的巨噬细胞是否依赖于 TLR4, 从 C57BL/6NCr (TLR4^{+/+}) 和 C57BL/10ScNJ (TLR4^{-/-}) 小鼠中分离得到 iBMDC 和 TG 诱出的巨噬细胞, 用 Prx1、LPS 或 Pam₃Cys (一种 TLR2 激动剂) 激发。结果提示 Prx1、LPS 和 Pam₃Cys 激发从 C57BL/6NCr 小鼠中分离得到的 iBMDC (图 3A) 和巨噬细胞 (图 3B) 分泌细胞因子, 但只有 Pam₃Cys 激发从 C57BL/10ScNJ 小鼠中分离得到的 iBMDC 和巨噬细胞分泌细胞因子 ($P \leq 0.01$, 与从 C57BL/NCr 小鼠中分离得到的细胞所分泌的细胞因子相比)。

[0084] 通过向 C57BL/6NCr (TLR4^{+/+}) 或 C57BL/10ScNJ (TLR4^{-/-}) 小鼠腹腔注射重组 Prx1 来检测 Prx1 诱导体内 TLR4 依赖性炎症的能力。注射后 2 小时采集血样, 通过检测全身 IL-6 的水平评估全身性炎症的程度 (图 3C)。注射 Prx1 导致 C57BL/6NCr (TLR4^{+/+}) 小鼠的全身性 IL-6 水平显著升高 ($P \leq 0.0002$), 但对 C57BL/10ScNJ (TLR4^{-/-}) 小鼠的全身性 IL-6 水平并没有显著影响。

[0085] 在无血清条件下, TG 诱出的巨噬细胞与 Prx1 共培养后细胞因子表达减少 (图 1D), 这提示血清蛋白可能有助于 Prx1/TLR4 的最优化相互作用。很多的 TLR4 配体与 TLR4 相互作用时是作为一个更大的复合物的一部分, 其可包括 CD14 和 / 或 MD2。为了测定 Prx1 增强 TG 诱出的巨噬细胞分泌细胞因子是否涉及 CD14 或 MD2, 在针对 MD2、CD14 或对照 IgG 的封闭抗体存在的情况下, 将细胞与 Prx1 或 LPS 共培养 (图 4A)。与存在对照 IgG 时 Prx1 所诱导的相比, 添加针对 Prx1、CD14 或 MD2 的封闭抗体显著抑制 Prx1 激发 TG 诱出的巨噬细胞分泌 IL-6 的能力 ($P \leq 0.01$)。针对 CD14 和 MD2 的封闭抗体也阻断 LPS 激发的细胞分泌细胞因子 (图 8C)。

[0086] 为了进一步证实 Prx1 和 TLR4/MD2/CD14 之间的相互作用, 将 TG 诱出的巨噬细胞的裂解物与同种型的对照抗体或者 TLR4 或 TLR2 特异的抗体共培养 (图 4B)。分离抗体复合物, 用 Prx1 抗体进行免疫印迹; 仅在用 TLR4 免疫沉淀的裂解物中发现 Prx1 (图 4B)。Prx1 处理过的细胞中分离得到的 TLR4/Prx1 复合物也包含 CD14 和 MD2 (图 4C), 确证了 Prx1 与包含 CD14 和 MD2 的复合物中的 TLR4 相互作用的这一发现。

[0087] 使用成像流分析 (image stream analysis, 安尼斯 (Amnis)) 确定 Prx1 与 TLR4 相互作用的动力学, 检测这两种分子的共定位。将 TG 诱出的巨噬细胞与 FITC 标记的 Prx1 和 PE 连接的抗 TLR4 抗体共培养。代表性的细胞的合并图像表明 Prx1 和 TLR4 在 5 分钟内共定位到巨噬细胞的膜上, 30 分钟时 TLR4 和部分 Prx1 分子已内化 (图 5A)。合并图像右边的柱状图是在逐像素基础上, 在 5000 例细胞上得到的 FITC-Prx1 和 PE-抗-TLR4 的相似性的统计分析。该分布右移说明有更大程度的相似性。每个时间点平均的相似系数显示于图 5B 中。在每个时间点上, Prx1 和 TLR4 的染色都有高度的相似性 (相似系数 >1), 表明 Prx1 和 TLR4 共定位。这些结果证实 Prx1 和 TLR4 在细胞表面相互作用, 并且至少部分 Prx1 随 TLR4 内化。

[0088] 激发细胞因子的分泌以及与 TLR4 结合依赖于 Prx1 的结构

[0089] Prx1 既是过氧化物酶, 也是蛋白质伴侣蛋白 (Wood 等 (2003) Trends Biochem. Sci. 28:32-40)。为检验 Prx1 激发 TG 诱出的巨噬细胞分泌细胞因子的能力是否与其过氧

化酶活性和 / 或伴侣蛋白的活性有关,检测两种 Prx1 突变体。Prx1C52S 突变体缺乏过氧化物酶的活性,但保留伴侣蛋白活性所需的十聚体结构;Prx1C83S 主要以二聚体的形式存在,其伴侣蛋白的活性降低但保留完整的过氧化物酶活性。Prx1C52S 激发 TG 诱出的巨噬细胞后的细胞因子分泌与用 Prx1 激发后观察到的结果没有显著差异(图 6A);然而,Prx1C83S 激发的 TG 诱出的巨噬细胞的细胞因子分泌显著降低($P \leq 0.01$)。

[0090] Prx1 结合 TG 诱出的巨噬细胞依赖于 TLR4 的存在,因为在 TLR4 不存在的情况下,Prx1 和无酶活性突变体(Prx1C52S)的结合显著降低(图 6B)。Prx1C83S 的结合无论在 TLR4 表达还是不表达的巨噬细胞上都是最小的,确证 Prx1 与 TLR4 的相互作用是非过氧化物酶依赖性的,但却是结构依赖性的。

[0091] 采用饱和结合实验(图 6C)和竞争分析(图 6D)测定 Prx1 结合到 TG 诱出的巨噬细胞表面的 K_d 与 K_i 值。Prx1 结合到 TG 诱出的巨噬细胞的 K_d 值为 1.6mM, K_i 值为 4.1mM(表 1)。

[0092] Prx1 激发细胞因子的分泌依赖于 MyD88,并导致 TLR4 依赖的 NF κ B 的核易位

[0093] 配体介导的 TLR4 活化的后续下游信号传导事件可能是 MyD88 依赖性或非 MyD88 依赖性的。用 Prx1 激发 RAW264.7 细胞表达细胞因子,该细胞表达显性阴性突变(DN)的 MyD88 蛋白。Prx1 激发后的 IL-6 分泌依赖于 MyD88 的功能(图 7A),表明 Prx1 激活了 MyD88 信号传导级联,该级联导致 NF κ B 的激活。

[0094] 为测定 Prx1/TLR4 的相互作用是否导致了 NF κ B 的激活,分析从 C3H/HeNcr 和 C3H/HeNj 小鼠中分离得到的巨噬细胞中 Prx1 激发后的 NF κ B 核易位。C3H/HeNj 小鼠的 TLR4 配体结合域中存在阻止配体结合的突变。将从 C3H/HeNcr 和 C3H/HeNj 小鼠中得到的 TG 诱出的巨噬细胞在 37° C 下与 200nM 的 Prx1 共孵育指定的时间,转移至冰上,与抗 NF κ B p65 的抗体共孵育;在用图像流分析前 15 分钟加入核染料 DRAQ5。Prx1 在与从 C3H/HeNcr 小鼠中分离得到的巨噬细胞共培养的 5 分钟内即可触发 NF κ B 的易位,并且核定位直至 60 分钟依然显著(图 7B)。相反,Prx1 与从 C3H/HeNj 小鼠中分离得到的巨噬细胞共培养并不触发 NF κ B 的易位(图 7B)。合并图像右边的柱状图显示以逐像素为基础的 NF κ B 与核染料的相似性。Prx1 激发导致 NF κ B 以 TLR4 依赖性方式易位至核,这已通过用 Prx1 激发 C3H/HeNcr 的 TG 诱出的巨噬细胞后所观察到的正相似系数所证实,而用 Prx1 激发 C3H/HeNj 的 TG 诱出的巨噬细胞后该相似系数降低(图 7C)。用 EMSA 法确证 Prx1 激活 NF- κ B 的能力,该法表明将巨噬细胞与 Prx1 共孵育导致 NF κ B DNA 结合活性呈现剂量依赖式的升高(图 7D)。

[0095] 本领域的技术人员会认识到前述的结果强有力地证明 Prx1 激发 TG 诱出的巨噬细胞和 DC 的 TLR4 依赖性 TNF- α 和 IL-6 分泌。细胞因子的分泌是 TLR4 激发 MyD88 依赖性信号传导级联的结果,并导致 NF κ B 的激活和易位。Prx1 是一种由肿瘤细胞和活化的 T 细胞所分泌的胞内蛋白。Prx1 和 TLR4 相互作用并激发促炎细胞因子释放的能力提示它还可能作为内源性的损伤相关分子模式分子(DAMP)。

[0096] HSP72 和 HMGB1 都被归入内源性 DAMP,这两者均被显示与 TLR4 相互作用。饱和与竞争性研究表明 Prx1 的 K_d 大约为 1.3mM, K_i 大约为 4.1mM;由 Binder 等(Binder 等,2000. J. Immunol. 165:2582-2587)提供的数据外推提示 HSP72 的 K_d 值介于 2.1-4.4mM, K_i 值介于 10-21.8mM,这表明与 HSP72 相比,Prx1 与 TLR4 有更强的相互作用。HMGB1 的结合亲和力尚

不可得。

[0097] TLR4 鉴定为重组蛋白受体可能因重组蛋白制品中可能存在的 LPS 而变得复杂。为解释在此呈现的结果中的这种可能性,在所有进行过的实验中都包括两组对照。在第一组对照中,在加至免疫细胞之前,重组蛋白先与多粘菌素 B 混合。多粘菌素 B 是一种强效的 LPS 的灭活剂;重组的 Prx1 与多粘菌素 B 的预孵育对 Prx1 激发细胞因子表达的能力没有影响(图 1)。然而,将 LPS 与相同浓度的多粘菌素 B 预孵育后显著抑制 LPS 激发细胞因子释放的能力。作为第二组对照,在加至免疫细胞之前,将 Prx1 和 LPS 煮沸,变性的 Prx1 显著抑制其激发细胞因子释放的能力,但煮沸对 LPS 激发细胞因子释放的能力没有影响。最后,本研究中用到的所有重组蛋白均以同样制备方式得到,并且纯化后都发现包含相同水平的内毒素(大约为 14EU/ml),尽管如此,Prx1C83S 激发所分泌的细胞因子量显著要低,且看来不与表达 TLR4 的细胞结合。因此,结果似乎证明 Prx1 与 TLR4 的相互作用与 LPS 污染的存在无关。

[0098] Prx1、HSP72 和 HMGB1 没有显示显著的结构相似性,这些分子与 LPS 也并没有显示出同源性。Prx1、HSP72 和 HMGB1 都是分子伴侣蛋白,并且 HSP72/HMGB1 和其它 TLR4 配体之间不存在结构同源性,使得有人推测 TLR4 识别的不是伴侣蛋白本身而是伴侣蛋白运载物(cargo)。支持该假设的有:最近的研究表明 HMGB1 结合至 TLR9 是 TLR9 识别 HMGB1/DNA 复合物的结果。胞外 Prx1 以十聚体的形式存在,该十聚体与 Prx1 的伴侣蛋白活性相关(Wood 等,2002. *Biochemistry* 41:5493-5504, 其内容通过引用纳入本文),而我们的研究表明 Prx1 与 TLR4 的结合依赖于它形成十聚体的能力(图 3 和图 4B)。因此,Prx1 与 TLR4 的结合可能是由于对运载物而不是 Prx1 本身的识别。尽管如此,预期本发明所述干扰 Prx1 结合 TLR4 的试剂会抑制血管发生。

[0099] Prx1C83S 突变体缺乏伴侣蛋白的活性,且主要以二聚体的形式存在(Wood 等,2002. *Biochemistry* 41:5493-5504),看来不结合 TLR4(图 4B);然而,这种纯化的突变蛋白能激发巨噬细胞分泌细胞因子(图 4A)。惯例上,生物功能的检测要比结合测试更敏感,因此二聚体形式的 Prx1 和 TLR4 的相互作用可能低于这些研究中所用的结合测试所能检测到的水平。一小部分的 Prx1C83S 以四聚体的形式存在,这种四聚体也可能可以和 TLR4 相互作用,其水平低于可检测到的水平,但足以激发细胞因子的分泌。

[0100] Prx1 激发细胞因子的分泌依赖于 TLR4 和 MyD88(图 3、图 4 和图 5);然而,FITC 标记的 Prx1 确实有结合到从 TLR4^{-/-}(B10ScNJ)小鼠中分离到的巨噬细胞上(图 4B),尽管结合水平低于结合到从 TLR4^{+/+}(B6)小鼠中分离到的巨噬细胞上的水平。对 Prx1 和 TLR4 在细胞水平上的相互作用的检测显示尽管大多数的 TLR4 在 Prx1 结合后均被内化,至少有部分 Prx1 依然留在细胞表面上(图 3B/C)。这些发现可能是由于 Prx1 过量所致或者 Prx1 结合其它受体的结果。其它与 TLR4 结合的 DAMP 已显示与多种危险受体相结合,并且在一些情况下,DAMP 与 TLR4 的结合需要辅助受体。PbA 是 Prx1 的疟疾同源物,其需要 MD2 来与 TLR4 相结合;我们的研究表明,Prx1 在有血清存在的情况下能最好地激发细胞因子的分泌,并且 CD14 和 MD2 的抗体能阻断受 Prx1 激发细胞分泌细胞因子。另外,TLR4 和 Prx1 的免疫沉淀复合物中包含有 MD2 与 CD14,提示这些蛋白质有助于 Prx1 结合 TLR4。

[0101] 实施例 3

[0102] 我们测试了使用 Prx1 作为抗肿瘤疫苗的佐剂的效力。结果显示于图 9 中,证明

Prx1 增强抗肿瘤疫苗的效力。

[0103] 为得到图 9 所示数据,对无处理小鼠用全细胞肿瘤裂解物进行单独接种或者用全细胞肿瘤裂解物与 20nM 重组 Prx1 的混合物进行接种。休息一周后,通过注射活的肿瘤细胞攻击小鼠。监测肿瘤生长 60 天;每组 10 只小鼠。如图 9 所示,Prx1 激发抗肿瘤疫苗抵御结肠 26 (Colon 26) 肿瘤的效力,该肿瘤是在小鼠中使用结肠 26 鼠结肠癌细胞诱发的。

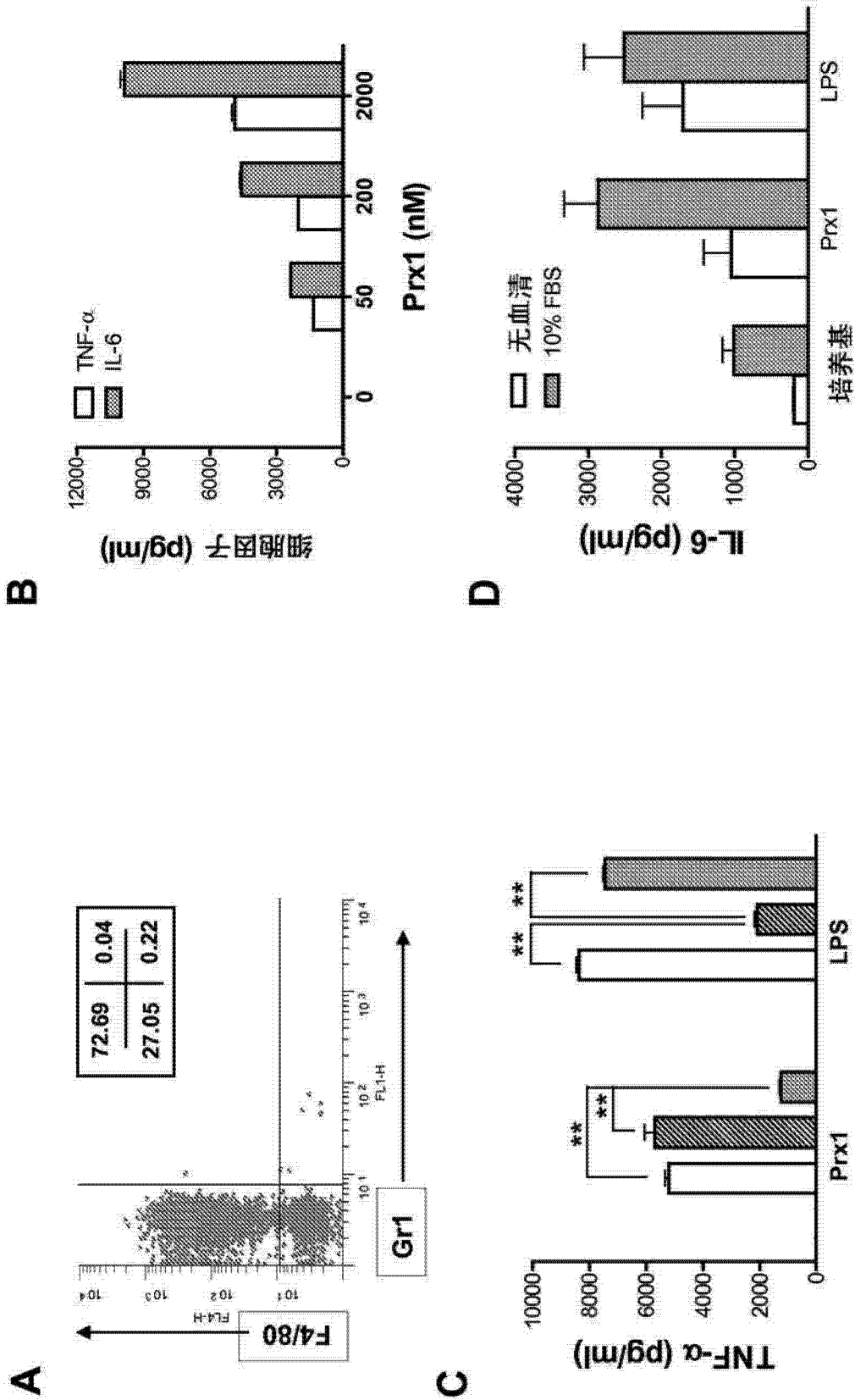
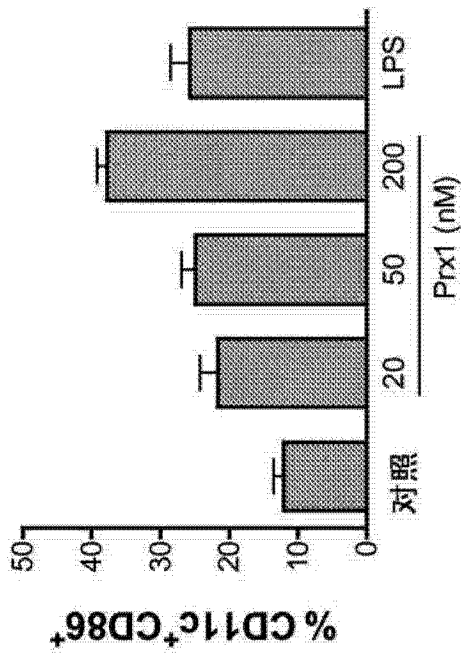
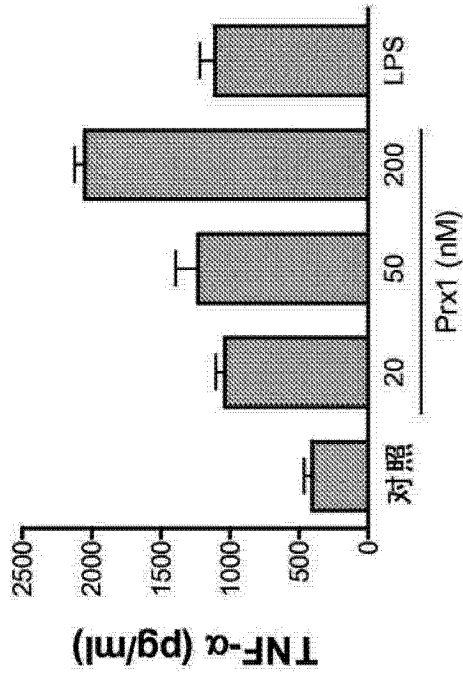


图 1

A



B



C

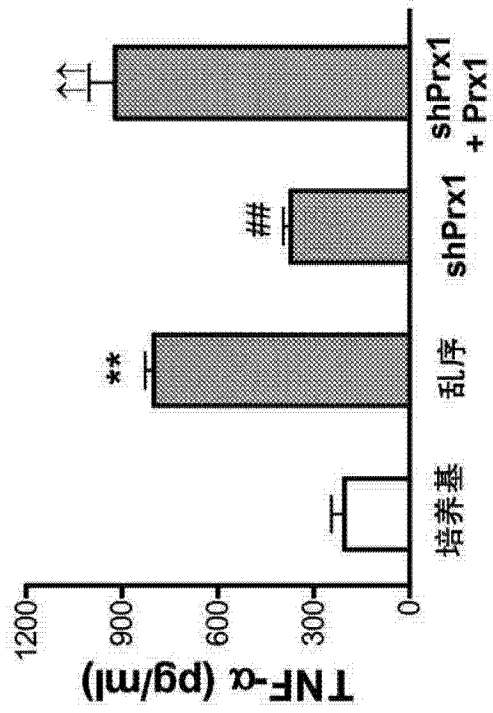


图 2

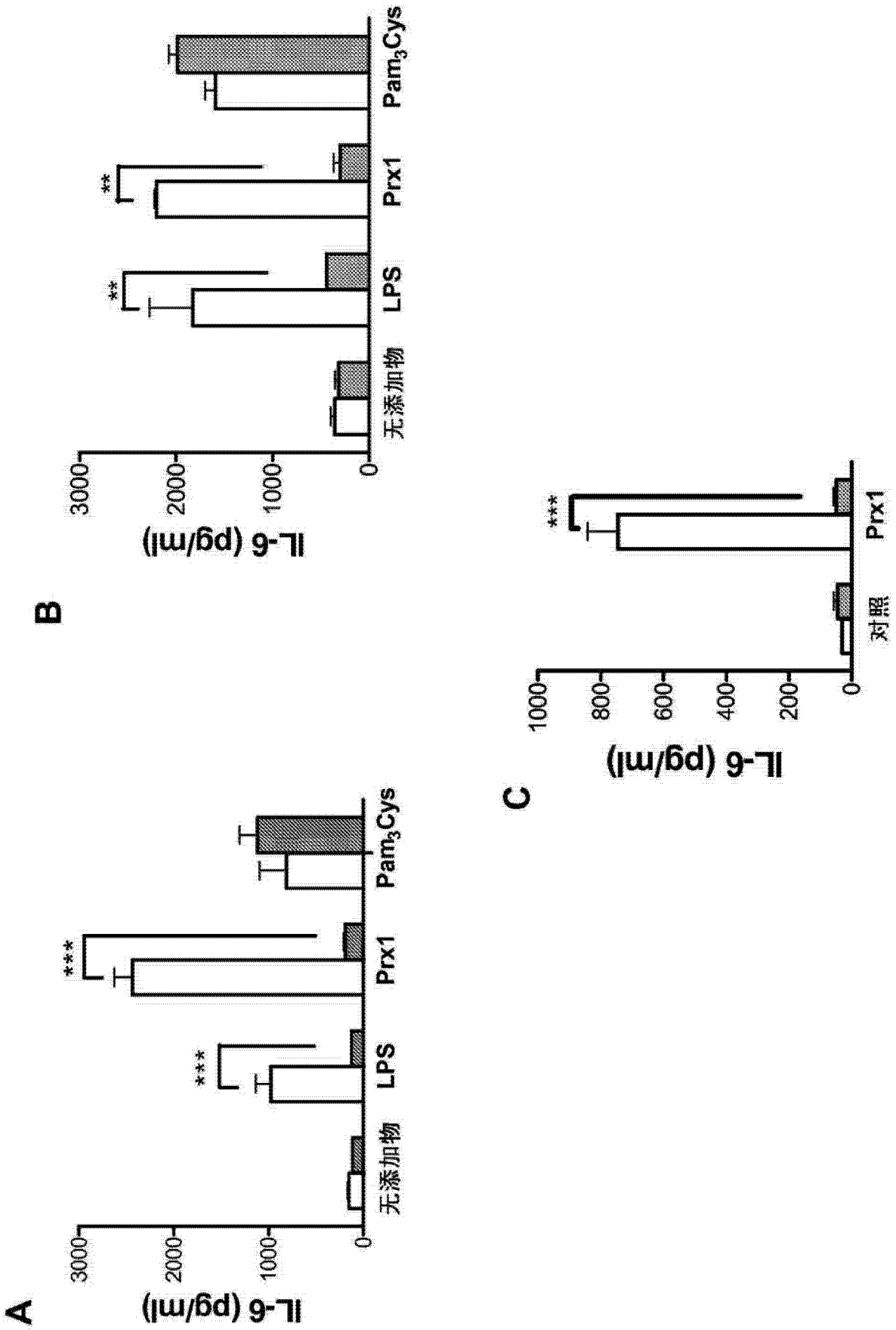


图 3

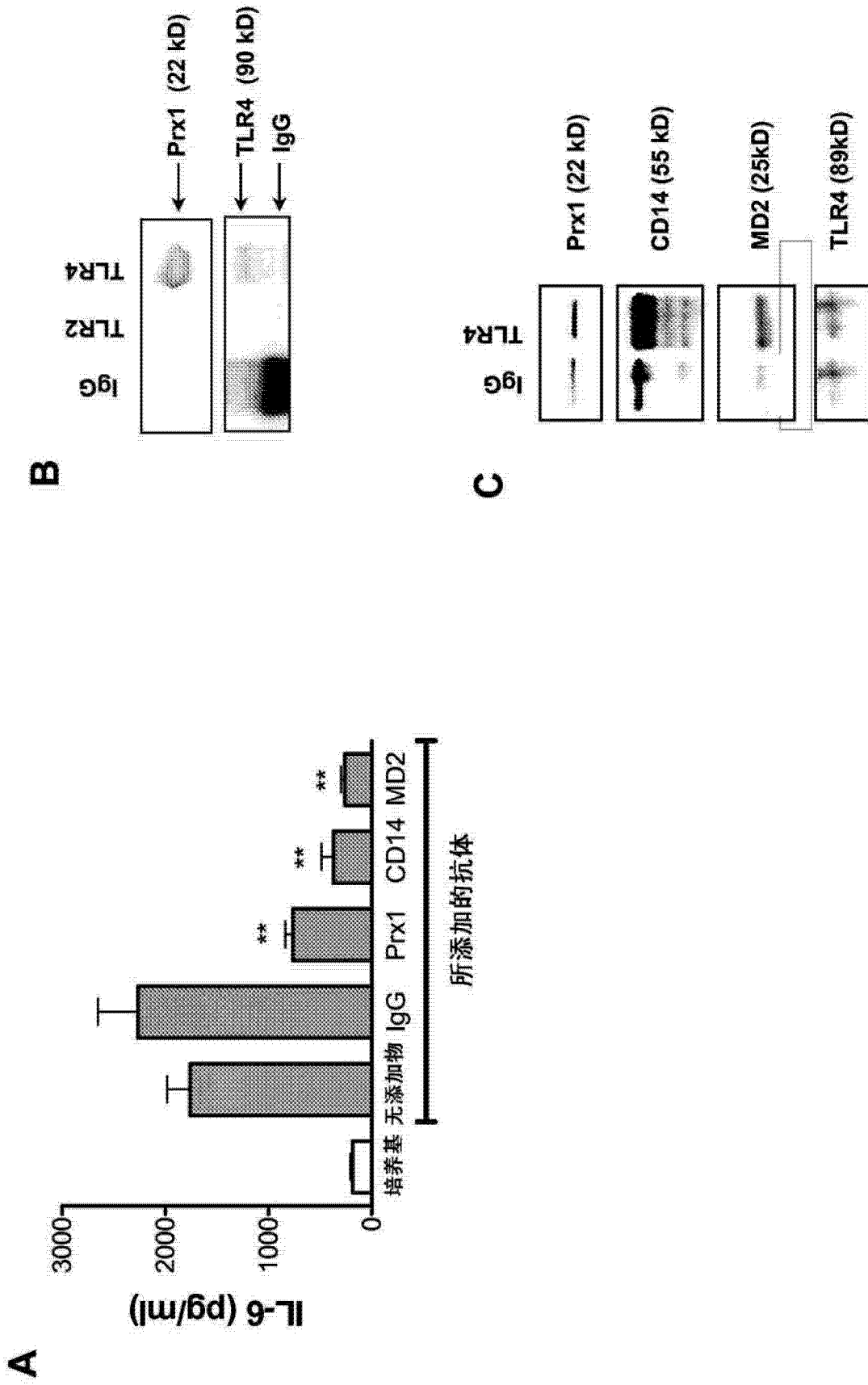


图 4

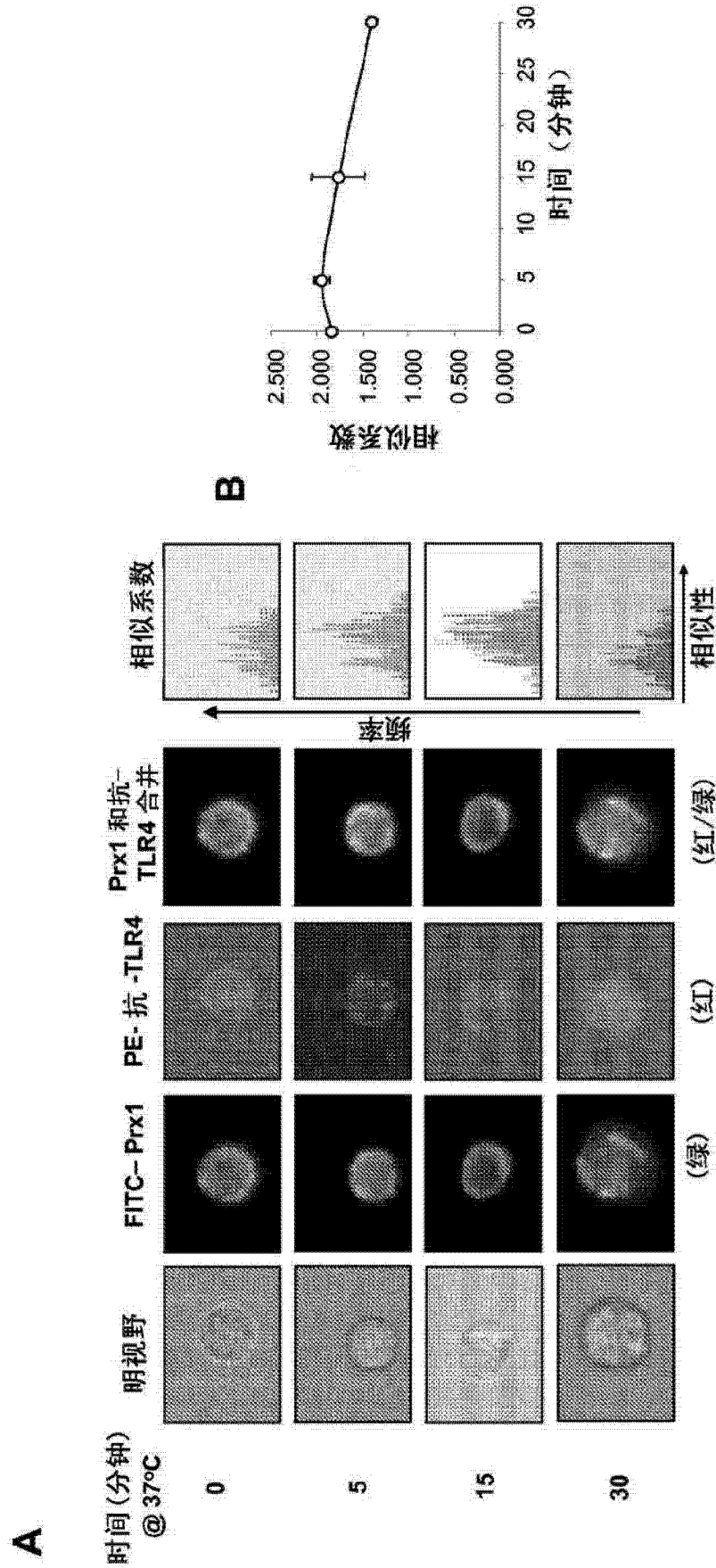


图 5

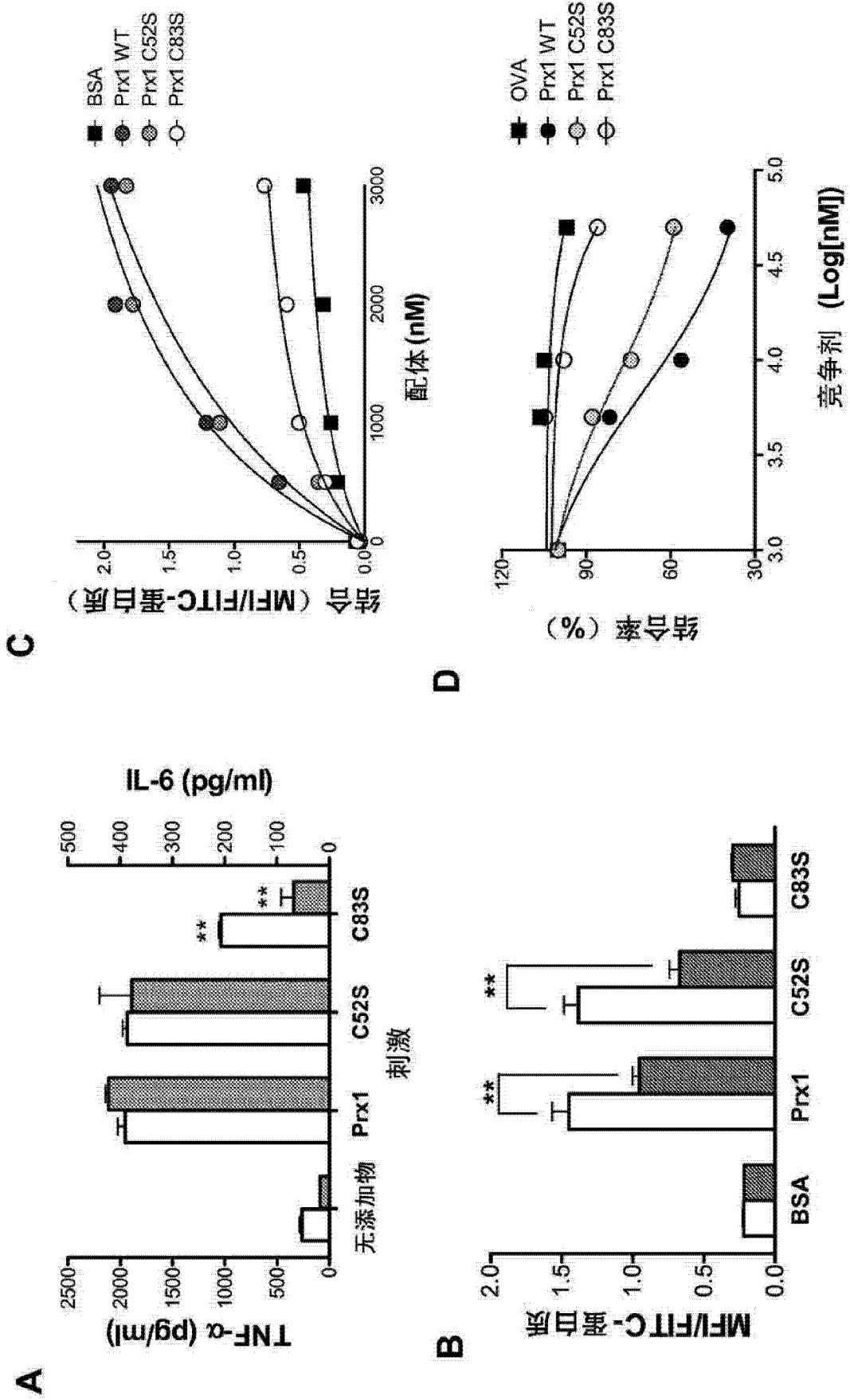


图 6

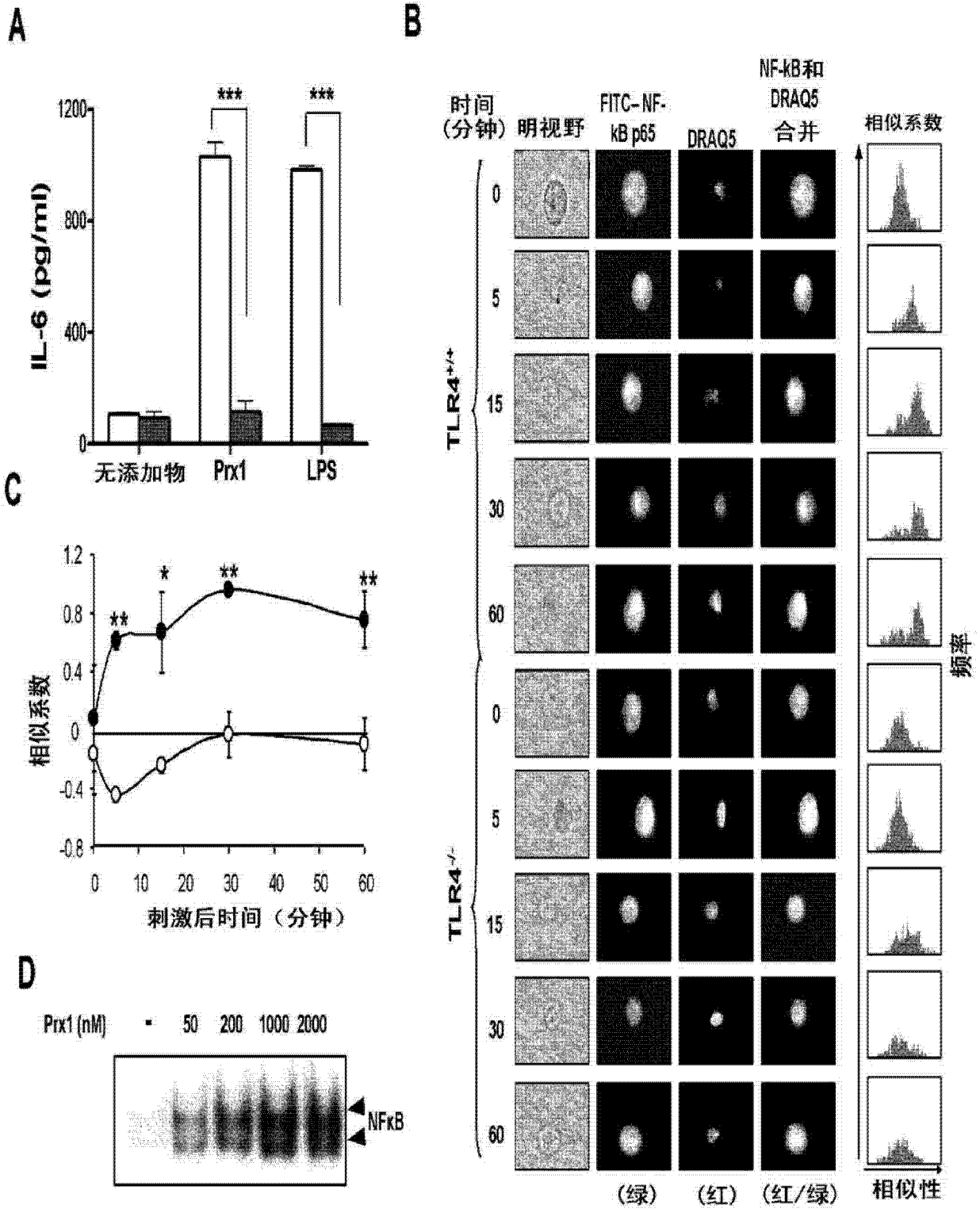


图 7

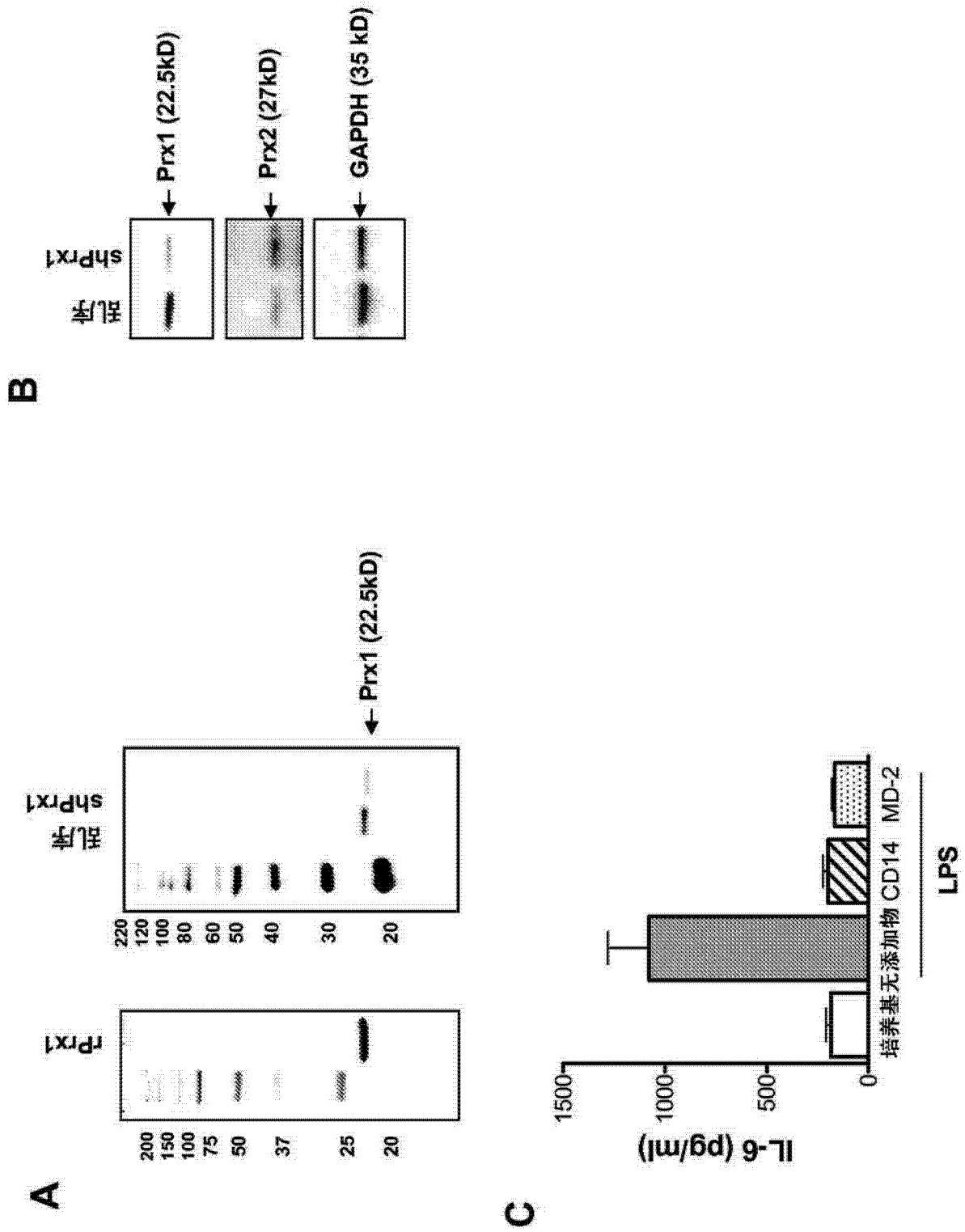


图 8

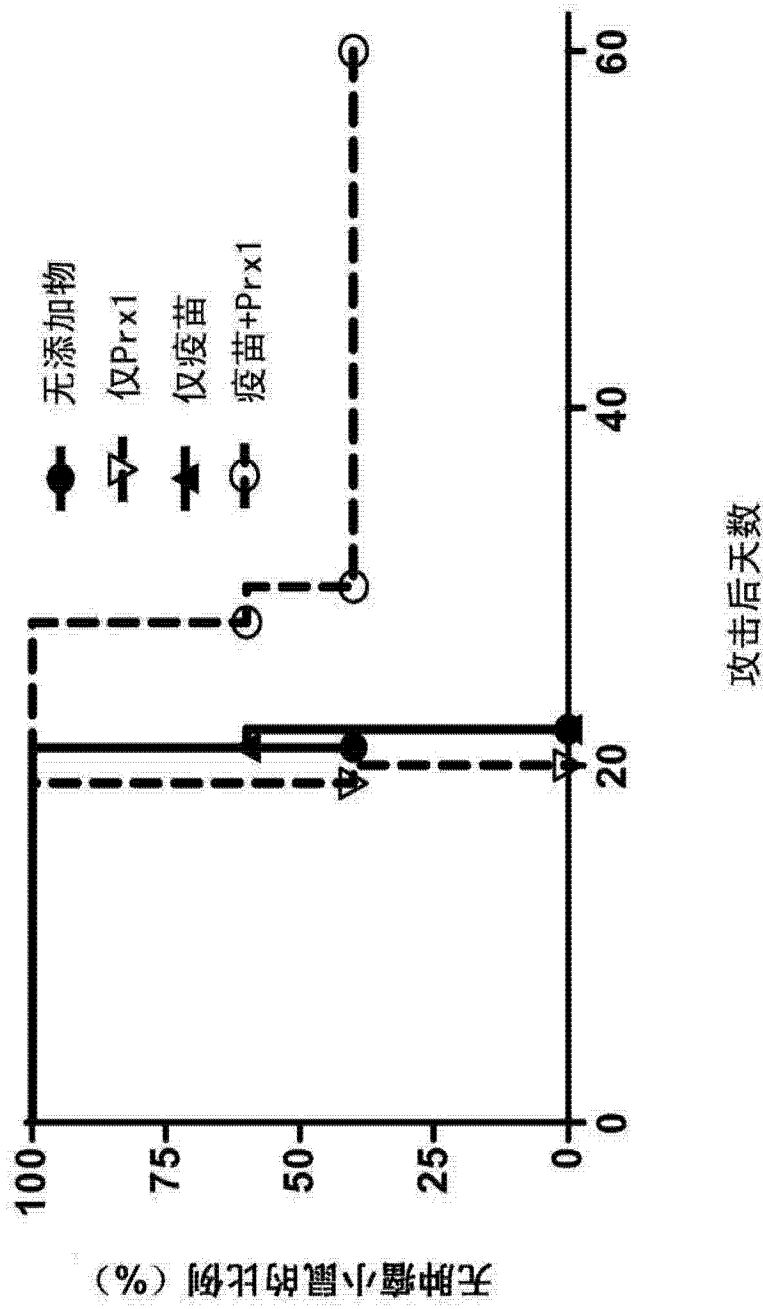


图 9