

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480007042.2

[51] Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100355453C

[22] 申请日 2004.3.22

[21] 申请号 200480007042.2

[30] 优先权

[32] 2003. 3. 24 [33] EP [31] 03450072.8

[32] 2003. 4. 11 [33] EP [31] 03450084.3

[32] 2003. 7. 11 [33] EP [31] 03450171.8

[86] 国际申请 PCT/EP2004/003002 2004.3.22

[87] 国际公布 WO2004/084938 英 2004.10.7

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.15

[73] 专利权人 英特塞尔股份公司

地址 奥地利维也纳

[72] 发明人 M·比施尔 A·哈贝尔

J·弗里茨 K·普林茨 K·林瑙

审查员 孙俊荣

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 程泳

权利要求书 1 页 说明书 35 页 附图 14 页

[54] 发明名称

改进的疫苗

[57] 摘要

本发明涉及针对病原体，尤其是病毒病原体感染的改进的疫苗，包含抗原、式 $R_1 - XZXZ_N - XZX - R_2$ 的肽和含有脱氧肌苷和/或脱氧尿苷残基的免疫刺激性脱氧核酸。

1. 用于预防病毒感染的疫苗，包含
—流行性感胃病毒抗原、KLKL₅KLK 和寡聚 d (IC)₁₃。
2. 根据权利要求 1 的疫苗，特征在于它进一步含有 Al(OH)₃ 佐剂。
3. 根据权利要求 1 或 2 的疫苗，特征在于所述流行性感胃病毒抗原是血凝素抗原或神经氨酸酶抗原、联合抗原，或一个或多个这些抗原的组合。
4. 根据权利要求 1 的疫苗，特征在于它进一步含有聚阳离子肽。
5. 根据权利要求 1 的疫苗，特征在于它进一步含有含 CpG 基序的寡聚脱氧核苷酸。
6. 根据权利要求 1 的疫苗，特征在于它进一步含有聚阳离子肽和含 CpG 基序的寡聚脱氧核苷酸。
7. KLKL₅KLK 和寡聚 d(IC)₁₃ 组合的用途，用于制备针对流行性感胃病毒感染的具有改善的保护功效之疫苗。
8. KLKL₅KLK 和寡聚 d(IC)₁₃ 组合的用途，用于制备针对流行性感胃病毒之疫苗，所述疫苗针对流行性感胃病毒具有改善的抗原特异性 1 型应答，并且同时保存或增加所述疫苗的 2 型应答。
9. 权利要求 8 的用途，其中所述抗原特异性 1 型应答为 IgG2 抗体应答或 IFN- γ 应答，所述疫苗的 2 型应答是 IgG1 抗体应答或白细胞介素 4 应答。

改进的疫苗

本发明涉及改进的疫苗，尤其是病毒疫苗以及制造它们的方法。

针对入侵病原体的宿主保护包括细胞和体液效应子并且由非适应性（先天）和适应性（后天）免疫的协调作用产生。后者基于受体介导的特异性免疫识别，是免疫系统新近的获得，且只存在于脊椎动物之中。在适应性免疫发展之前就进化的前者，由分布在整个生物体中任务是控制潜在病原体的各种各样的细胞和分子组成。

B 和 T 淋巴细胞是获得性抗原特异性适应性免疫的介导体，包括免疫记忆的发展，它是产生成功疫苗的主要目标。抗原递呈细胞（APC）是高度特化的细胞，它们能够处理抗原并且在细胞表面呈现它们的经过处理的片段以及淋巴细胞激活必需的分子。这意味着 APC 对于特异性免疫应答的启动非常重要。

对于 T 淋巴细胞的激活主要的 APC 是树突细胞（DC）、巨噬细胞和 B 细胞，而对于 B 细胞主要的 APC 是滤泡树突细胞。通常，就刺激静止幼稚和记忆 B 和 T 淋巴细胞的免疫应答之启动而言，DC 是最强的 APC。

外周 APC（例如 DC 或朗格汉氏细胞）天然的任务是捕获和处理抗原，因此一旦被激活它们就开始表达淋巴细胞共刺激分子，迁移到淋巴器官，分泌细胞因子并将抗原递呈到不同的淋巴细胞群，启动抗原特异性免疫应答。它们不仅激活淋巴细胞，在某些环境下，它们也使 T 细胞对抗原耐受。

T 淋巴细胞对抗原的识别是主要组织相容性复合物（MHC）限制的。只有在肽结合于特别的 MHC 分子时特定的 T 淋巴细胞才识别抗原。通常，T 淋巴细胞只在自身 MHC 分子存在下而被刺激，抗原只在肽结合于自身 MHC 分子时而被识别。就被识别的抗原而言以及就结合其肽片段的 MHC 分子而言，MHC 限制定义了 T 淋巴细胞的特异性。

就识别和适当的应答而言，细胞内和细胞外抗原向免疫系统提出了非常不同的挑战。将抗原递呈到 T 细胞由两个截然不同种类的分子 I 类 MHC (MHC-I) 和 II 类 MHC (MHC-II) 介导，它们利用截然不同的抗原处理途径。主要是一个能够区别已经进化的两个主要抗原处理途径。来源于细胞内抗原的肽由 I 类 MHC 分子递呈到 CD8⁺T 细胞，它们实际上在所有的细胞上表达，而细胞外抗原来源的肽由 II 类 MHC 分子递呈到 CD4⁺T 细胞。然而，这个两分法有某些例外。一些研究显示由内吞微粒或可溶性蛋白质产生的肽被递呈在巨噬细胞以及树突细胞的 MHC-I 分子上。所以，位于外周、高效捕获和处理细胞外抗原并在 MHC-I 分子上将它们递呈到 T 淋巴细胞的 APC (象树突细胞) 是体外和体内用抗原细胞外脉冲处理 (pulsing) 它们的引人注目的靶点。

APC 重要并独特的作用 (包括对不同类型白细胞的刺激活性) 反映了它们作为开发成功疫苗适当策略的靶点的中心位置。理论上，可以如此进行的一个路线是增强或刺激它们天然的任务，抗原的摄取。一旦用疫苗所指向的适当抗原脉冲处理 (pulse)，APC 应当开始处理摄取的抗原，因此一旦被激活，APC 就表达淋巴细胞共刺激分子，迁移至淋巴器官，分泌细胞因子并将抗原递呈到不同的淋巴细胞群因此启动免疫应答。

激活的 T 细胞通常以高度调节的方式分泌许多效应细胞因子，例如白细胞介素 2 (IL-2)、IL-4、IL-5、IL-10 和干扰素- γ (IFN- γ)。普遍地用 ELISpot 试验 (酶联免疫斑点试验) 监测细胞毒 T 淋巴细胞对特异性抗原 (例如肿瘤抗原，通常在疫苗中给予的抗原) 应答的功能检测，所述 ELISpot 试验是在单个细胞水平分析细胞因子的产生的技术。本发明中对于促进细胞因子 IFN- γ 的细胞免疫 (1 型免疫应答)，使用 ELISpot 试验监测成功的抗原特异性 T 细胞激活。此外，测定细胞因子 IL-4，作为通常参与促进强体液应答的 2 型应答的指示剂。另外，体液免疫应答用 ELISA 测定 (IgG1 作为 2 型应答的指示剂，IgG2 作为 1 型应答的指示剂)。

先前显示聚阳离子有效地增强肿瘤细胞对 I 类 MHC 匹配的肽的摄

取, 被称为“转装载 (TRANSloading)”肽或蛋白质脉冲处理过程。此外, 已经显示聚阳离子在体内以及体外能够将肽或蛋白质“转装载 (TRANSload)”到抗原递呈细胞内。另外, 在小鼠模型中, 聚-L-精氨酸或聚-L-赖氨酸和适当肽的混合物作为疫苗的共注射保护动物避免肿瘤的生长。这个化学定义的疫苗能够诱导许许多多的抗原/肽特异性 T 细胞。诱导至少部分可归于聚阳离子介导的 APC 对肽增加的摄取表明, APC 在体内用抗原脉冲处理, 能够诱导 T 细胞介导的对给予抗原的免疫。

与特征在于应答高特异性但是相对缓慢的适应性免疫相反, 先天免疫是基于微生物组分与宿主在结构上的差异所触发的效应子机制。这些机制能发动 (mount) 相当快的初始应答, 它们主要导致有害物的中和。先天免疫的反应是较低等门的生物唯一的防御策略并且在脊椎动物已经保留为适应性免疫系统动员前的第一线宿主防御。

在较高等的脊椎动物中, 先天免疫的效应细胞是嗜中性粒细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞以及还可能是树突细胞, 而这个途径中体液组分是补体级联和各种不同的结合蛋白。

先天免疫快速且有效的组成是长度通常在大约十二至大约一百个之间的氨基酸残基之多种多样的杀微生物 (microbicidal) 肽的产生。几百个不同的抗菌肽由范围从海绵、昆虫到动物和人的多种生物体中分离, 这指出了这些分子的广泛分布。抗菌肽也可作为抵抗竞争生物的拮抗物质而由细菌产生。

CD4⁺细胞的两个主要亚型 (T 辅助 1 (Th1) 和 T 辅助 2 (Th2)) 基于它们分泌的不同细胞因子谱和它们不同的效应子功能, 在小鼠和人类中已经鉴别出来。Th1 细胞主要参与所谓 1 型免疫应答的产生, 它一般特征在于迟发型超敏反应的诱导、细胞介导的免疫、免疫球蛋白种类转变为 IgG2a/IgG2b 和尤其是干扰素- γ 的分泌。相反, Th2 细胞参与所谓 2 型免疫应答的产生, 它特征在于激活 B 细胞诱导体液免疫, 导致包括种类转变为 IgG1 和 IgE 的抗体的产生。2 型应答特征也在于如下细胞因子的分泌: IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10。

在多数情形下，诱导的应答类型（1型或2型）对疫苗的保护效能有显著的影响。替代的佐剂趋向于促成特异类型的应答。然而，佐剂的选择因为功能的不可预测性以及商业约束和可用性而复杂化。

流行性感胃病毒的感染属于最重要并且频繁感染，具有显著的死亡率，尤其是对于年长的人或有免疫系统缺陷的人。目前，市场上有很多的流行性感胃疫苗；然而，不是所有的疫苗接种导致对流行性感胃感染的保护性。所以，存在为了扩大保护效能改进目前的流行性感胃疫苗的需要。

此外，因为大多数目前的疫苗几乎都专门地引发2型应答，所以提供改进疫苗的需要是存在的，所述疫苗显示了针对1型的免疫应答或除了2型应答也允许显著1型免疫应答。此外，已经可以利用的疫苗应当提供为允许诱导1型应答的改进的形式。

所以，本发明提供了针对（病毒）感染的改进的疫苗，包含抗原，式 $R_1-XZXZ_NXZX-R_2$ 的肽和含有脱氧肌苷和/或脱氧尿苷残基的免疫刺激性脱氧核酸。

根据本发明过程中进行的实验，这两个类型的免疫物（Immunizer）的组合显示了对抗原的协同作用。对于共同的流行性感胃抗原（尤其是血凝素和神经氨酸酶）和肝炎病毒抗原尤其显示出协同作用。尤其对于病毒抗原的协同作用不是由这些物质类型已知的特性可诱导的。尽管已知这两个物质类型的每一个都具有良好的免疫刺激特性（WO 02/32451，WO 01/93905 和 PCT/EP02/05448），对病毒病原体，尤其是对流行性感胃和肝炎病毒抗原的联合作用，显著地优于能从这些单个效能简单加和所期盼的作用。

由于本发明，只是通过额外地提供根据本发明的两种类型免疫物质的联合可显著地改进已经可得的或市售的病毒疫苗，尤其是流行性感胃或甲、乙或丙型肝炎疫苗。

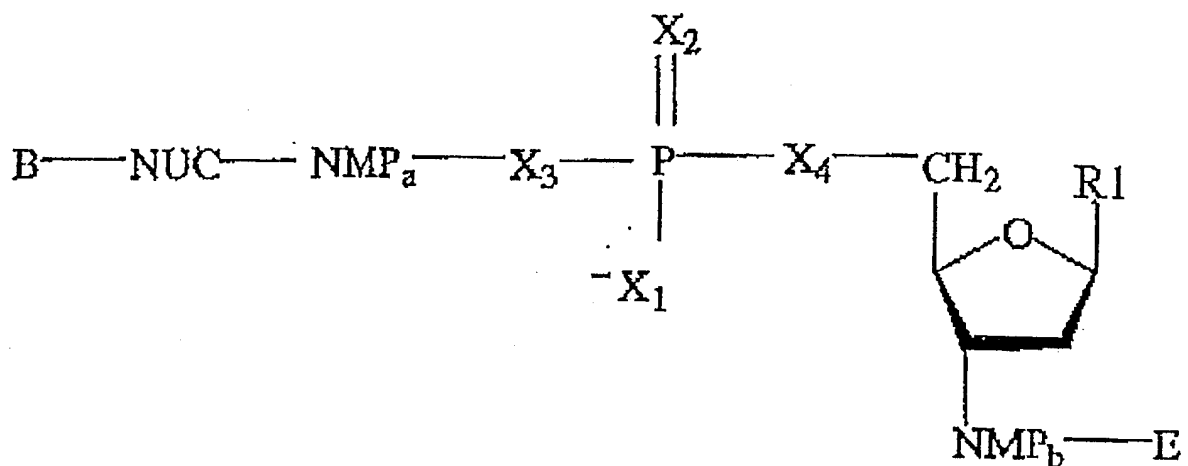
所以本发明提供了预防病毒感染的疫苗，包含

-抗原，尤其是病毒抗原，

-包含序列 $R_1-XZXZ_NXZX-R_2$ 的肽，其中 N 是 3 至 7 之间的整数，优

选地是 5, X 是带正电荷的天然和/或非天然的氨基酸残基, Z 是选自 L、V、I、F 和/或 W 的氨基酸残基, R₁ 和 R₂ 相互独立地选自 -H、-NH₂、-COCH₃、-COH 至多达 20 个氨基酸残基的肽或者肽反应基团或者带有或不带有肽的肽连接子; X-R₂ 可以是所述肽 (在下面也称为“肽 A”) 羧基末端氨基酸残基的酰胺、酯或硫酸酯以及

-具有根据式 (I) 结构的免疫刺激性寡聚核酸分子 (ODN),



其中

R 选自次黄嘌呤和尿嘧啶,

任一 X 是 O 或 S,

任一 NMP 是 2' 脱氧核苷一磷酸或一硫代磷酸, 选自脱氧腺苷-、脱氧鸟苷-、脱氧肌苷-、脱氧胞嘧啶-、脱氧尿苷-、脱氧胸苷-、2-甲基-脱氧肌苷-、5-甲基-脱氧胞苷-、脱氧假尿苷-、脱氧核糖嘌呤-、2-氨基-脱氧核糖嘌呤-、6-S-脱氧鸟嘌呤-、2-二甲基-脱氧鸟苷-或者 N-异戊烯基-脱氧腺苷-一磷酸或一硫代磷酸,

NUC 是 2' 脱氧核苷, 选自脱氧腺苷-、脱氧鸟苷-、脱氧肌苷-、脱氧胞嘧啶-、脱氧肌苷-、脱氧胸苷-、2-甲基-脱氧尿苷-、5-甲基-脱氧胞嘧啶-、脱氧假尿苷-、脱氧核糖嘌呤-、2-氨基-脱氧核糖嘌呤-、6-S-脱氧鸟嘌呤-、2-二甲基-脱氧鸟苷-或者 N-异戊烯基-脱氧腺苷,

a 和 b 是从 0 至 100 的整数, 前提是 a+b 在 4 至 150 之间, 且

B 和 E 是核酸分子 5' 或 3' 末端的共有基团 (在下面称为

"I-/U-ODN")。

当然，本疫苗可进一步地含有其它的物质，例如合适的药学可接受的稀释剂或载体、缓冲剂或稳定物质等等。

根据本发明的疫苗可进一步地含有额外的佐剂，尤其是 $Al(OH)_3$ 佐剂 (Alum)。

Alum 如此处所指包括用于人和动物医药及研究的所有形式的基于 Al^{3+} 的佐剂。尤其是，它包括如 Rompp, 第 10 版, 139/140 页定义的所有形式的氢氧化铝，它们的凝胶形式，磷酸铝等等。

这个对于已经面市并含有这样的 $Al(OH)_3$ 佐剂的疫苗是特别优选的。在这样的情况下，根据本发明的免疫物的组合可以简单地加入到这样的现有疫苗中。

本抗原优选地是病毒抗原。如果显著的 (或专门的) Th1 1 型应答应当是特别必需的，优选的 T 细胞抗原决定簇 (见上面的引言) 作为抗原。所述抗原优选地是病毒抗原。在实施例部分，本发明在原理上证明对流行性感冒和肝炎病毒抗原特别有效，也就是对根据本发明优选的抗原乙型肝炎表面抗原和丙型肝炎抗原有效。

当然，依赖于期望的免疫应答，药物制备也可包含两个或多个抗原。可以对抗原进行修饰以进一步地增强免疫应答。

源自病毒或细菌病原体、源自真菌或寄生虫的蛋白质或肽，以及肿瘤抗原 (癌症疫苗) 或在自身免疫疾病中有假定作用的抗原可以用作抗原 (包括衍生化的抗原，象糖基化的、脂质化的、糖脂化的或羟基化的抗原)。此外，碳水化合物、脂质或糖脂本身可用作抗原。衍生化过程可包括源自病原体的特定蛋白质或肽的纯化、病原体的失活以及这样的蛋白质或肽的水解或化学衍生作用或稳定化。或者，病原体本身也可用作抗原。抗原优选地是肽或蛋白质、碳水化合物、脂质、糖脂或它们的混合物。

根据优选的实施方案，T 细胞表位被用作抗原。或者，T 细胞表位 B 细胞表位的联合也是优选的。

当然根据本发明也可能使用不同抗原的混合物。优选地，分离自

病毒或细菌病原体或真菌或寄生虫（或它们的重组对应物）的蛋白质或肽被用作这样的抗原（包括衍生化抗原或糖基化或脂质化抗原或多糖或脂质）。抗原的另一个优选来源是肿瘤抗原。优选的病原体选自人类免疫缺陷性病毒(HIV)、甲型和乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒(HCV)或其它的黄病毒，例如日本脑炎病毒(JCV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、EB病毒(EBV)、流行性感冒病毒、人类乳突状病毒(HPV)、轮状病毒、金黄色葡萄球菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、结核杆菌、肺炎链球菌、炭疽杆菌、霍乱弧菌、疟疾原虫（恶性疟原虫、间日疟原虫，等等）、曲霉属(*Aspergillus* sp.)或白色念珠菌。

在肽抗原的情况下，肽模型表位(mimotope)/激动剂/高级激动剂/拮抗剂，或者在某些位置改变但不影响免疫特性的肽或者非肽模型表位/激动剂/高级激动剂/拮抗剂的用途包括在本发明中。肽抗原也可以在肽抗原羧基或氨基末端含有延长，以促进与聚阳离子化合物或免疫刺激性化合物的相互作用。

也可对抗原进行衍生化，以包括增强抗原递呈和将抗原靶向抗原呈递细胞的分子。

根据本发明，所使用的流行性感冒或肝炎抗原通常不受限于特定形式，似乎所述作用根据本发明对于流行性感冒、乙型肝炎或丙型肝炎病原体特异性地进一步增强，但是不特异于来自流行性感冒或HBV病原体的某个类型的抗原。然而，在本疫苗中使用标准流行性感冒或HBV抗原也是优选的，即血凝素抗原，神经氨酸酶抗原，联合抗原或者一个或多个这些抗原的组合。

优选地，分离自流行性感冒病毒、HBV或HCV来源（例如细胞培养物）或它们重组对应物的蛋白质或肽被用作这样的抗原，包括衍生化抗原。

根据本发明的疫苗优选地进一步（或者，在流行性感冒、HCV或HBV的情况下特异性地，而不是肽A）含有聚阳离子肽。

根据本发明待使用的聚阳离子肽或化合物可以是根据WO 97/30721任何显示特征性作用的聚阳离子化合物。优选的聚阳离子化

合物选自碱性多肽、有机聚阳离子、碱性聚氨基酸或它们的混合物。这些聚氨基酸应当具有至少4个氨基酸残基的链长度。尤其优选地是含有肽键的物质，象聚赖氨酸、聚精氨酸以及在多于8个，尤其是多于20个氨基酸残基的范围之内含有多于20%，尤其是多于50%碱性氨基酸的多肽或者它们的混合物。其它优选的聚阳离子和它们的药物组合物在WO 97/30721（例如，聚乙烯亚胺）和WO 99/38528中有描述。优选地这些多肽含有20至500个之间的氨基酸残基，尤其是30至200个之间的残基。

这些聚阳离子化合物可化学或重组产生或者可从天然来源衍生。

阳离子（多聚）肽也可是聚阳离子抗细菌微生物肽。这些（多聚）肽可以是原核或真核来源的或者化学或重组产生的。肽还可以属于天然发生的抗微生物肽类。这样的宿主防御肽或防御物也是优选形式的根据本发明的聚阳离子聚合体。通常，允许适应性免疫系统的终末产物激活（或下调），优选地由APC介导的（包括树突细胞）的化合物被用作聚阳离子聚合体。

此外，神经活性化合物，例如（人）生长激素（如例如W001/24822中描述的）也可用作免疫刺激剂（免疫物）。

天然来源衍生的聚阳离子化合物包括HIV-REV或HIV-TAT（衍生阳离子肽、触角足（antennapedia）肽、壳聚糖（chitosan）或者甲壳素（chitin）的其它衍生物）或者通过生化或重组生产从这些肽或蛋白质衍生的其它肽。其它优选的聚阳离子化合物是cathelin或来自cathelicidin的相关或衍生物，尤其是小鼠、牛或尤其是人cathelicidin和/或cathelicidin。相关或衍生的cathelicidin物质含有全部或部分带有至少15-20个氨基酸残基的cathelicidin序列。衍生化包括天然氨基酸被不属于20个标准氨基酸中的氨基酸替代或修饰。另外，可将更多的阳离子残基引入这样的cathelicidin分子。这些cathelicidin分子优选与根据本发明的抗原/疫苗组合物联合。然而，令人惊讶地这些cathelin分子作为抗原的佐剂也是有效的，而无需加入更多的佐剂。所以，这样的cathelicidin分子可用作有或没

有更多免疫刺激物质的疫苗制剂中的有效佐剂。

根据本发明的疫苗优选地含有象肽 A KLKL₅KLK 以及象 I-/U-ODN 寡聚 d (IC)₁₃ (肽 A 和寡聚 d (IC)₁₃ 的联合也称为 IC31)。这两个物质在根据本发明的实验中显示了特别有利的结果。

根据本发明疫苗可进一步地 (或者, 特别在流行性感冒、HCV 或 HBV 的情况下, 而不是 U-/I-ODN) 含有作为免疫调节核酸的含有 CpG-基序的寡聚脱氧核苷酸。根据本发明使用的免疫调节核酸是可以合成、原核和真核来源的。在真核来源的情况下, DNA 基于种系树 (phylogenetic tree) 应当从较低等发育种类衍生而来 (例如昆虫, 但是也可是其它)。在本发明优选的实施方案中, 免疫原性寡聚脱氧核苷酸 (ODN) 是合成生产的 DNA 分子或这类分子的混合物。也包括如例如美国专利 US 5,723,335 和 US 5,663,153 描述的 ODN 衍生物或修饰物例如硫代磷酸酯取代的类似物 (替代磷酸酯的硫代磷酸酯残基), 以及其它的衍生物和修饰物, 优选地它们稳定免疫刺激组合物但是不改变它们的免疫特性。优选的序列基序是含有侧翼为两个 5' 嘌呤和两个 3' 嘧啶的 (非甲基化的) CpG 二核苷酸的六碱基 DNA 基序 (5'-Pur-Pur-C-G-Pyr-Pyr-3')。根据本发明 ODN 中含有的 CpG 基序在微生物 DNA 中比在更高等的脊椎动物 DNA 中更普遍, 并且显示出甲基化模式的不同。令人惊讶地, 刺激小鼠 APC 的序列对人类细胞不是非常有效。根据本发明使用的优选回文或非回文 ODN 在例如奥地利专利申请 A 1973/2000、A 805/2001, EP 0 468 520 A2, WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/37919, WO 98/40100, WO 98/52581, WO 98/52962, WO 99/51259 和 WO 99/56755 中有公开, 此处引用作为参考。ODN/DNA 可化学或重组产生或者从天然来源衍生。优选的天然来源是昆虫。

根据本发明的疫苗可优选地包含聚阳离子肽与含有 CpG 基序的寡聚脱氧核苷酸的组合。在本发明的过程中甚至发现在流行性感冒疫苗组合物中 CpG-ODN 和聚阳离子肽的组合显示了改进的作用, 这与肽 A 和 I-/U-ODN 组合的作用相当, 并不是仅仅与肽 A 和 I-/U-ODN 联合而甚

至是替代它们而被使用。当然，根据本发明也可使用不同免疫刺激核酸(I-/U-ODNs, CpG-ODNs, ...)和肽A变异物(以及其它刺激物)的混合物。

根据另一方面，本发明也涉及两个都根据本发明定义的肽A和I-/U-ODN组合的用途，以改进疫苗抗病毒病原体，尤其是流行性感胃病毒、HCV或HBV、HIV、HPV或JEV的保护效能。特别地，能改进疫苗的抗病毒病原体，尤其是流行性感胃病毒、HCV或HBV、HIV、HPV或JEV的抗原特异性1型应答，尤其是IgG2抗体应答或IFN- γ 应答，并且在同一时间能保存(或优选地也增加)所述疫苗的2型应答，尤其是IgG1抗体应答或白细胞介素4(IL-4)应答。

先前显示(WO 02/13857)天然发生的cathelicidin衍生的抗微生物肽或其衍生物具有免疫应答刺激活性，所以构成了高效1型诱导佐剂(免疫物)。抗微生物肽的主要来源是嗜中性粒细胞和呼吸、胃肠道和生殖道上皮细胞的颗粒。通常它们发现于最常暴露于微生物入侵的解剖学位点，分泌到内部体液或贮存在专门噬菌细胞(嗜中性粒细胞)的细胞质颗粒内。

在WO 02/32451中，公开了能够很强地增加对特异性共给予抗原的免疫应答并所以构成了高效佐剂的1型诱导佐剂(免疫物)，即包含序列 R_1 -XZ X_N XZX- R_2 的肽A。尤其优选的肽是KLKLLLLLKLK。除了天然发生的抗微生物肽外，已经生产和研究了合成抗微生物肽。在金黄色葡萄糖菌感染的小鼠中显示合成抗微生物肽KLKLLLLLKLK-NH₂具有显著的化学治疗活性；人嗜中性粒细胞被激活经由细胞表面钙网蛋白(calreticulin)产生超氧阴离子(O₂⁻)。发现K和L的确切数目和位置对于合成肽的抗微生物活性是关键的(Nakajima, Y. (1997); Cho, J-H. (1999))。

如果例如皮下地、肌内注射地、皮内地或透皮地给予联合药剂，本发明尤其有益。然而，其它的应用形式，例如非肠道、静脉、鼻内、口腔或局部应用，也适合本发明。

根据本发明流行性感胃抗原可与佐剂(免疫物)(组合物)混合，

或者另外特殊地制成制剂，例如脂质体、延迟制剂等等。

根据本发明疫苗以流行性感疫苗接种领域的技术人员已知的有效量给予个体。抗原量和免疫物量的最优化能从已经确立的量开始并使用可利用的方法。

本发明将通过下面的实施例和图例更加详细地描述，但是本发明当然并不局限于这些。

图 1 显示阳离子肽与不同 ODN 共注射协同诱导抗市售流行性感疫苗**的强 1 型体液应答 (IgG2b)；**

图 2 显示 KLK/o-d (IC)₁₃ 强烈地改善市售流行性感疫苗的效能；

图 3 显示单次注射 KLK/o-d (IC)₁₃ 协同诱导很强的抗市售流行性感疫苗的细胞 1 型和体液 1 型及 2 型应答。

图 4 显示单次注射 KLK/o-d (IC)₁₃ 很强烈地改进市售流行性感病毒**的效能。**

图 5 显示用来自流行性感 A 病毒的 ncORF 衍生肽联合 KLK/o-d (IC)₁₃ 的疫苗接种诱导强产生 IFN- γ 的 T 细胞和抗病毒攻击的保护

图 6 显示 KLK/O-d (IC)₁₃ 诱导 HCV-肽特异性 1 型细胞免疫应答

图 7 显示阳离子肽与不同 ODN 共注射诱导 HBsAg 特异性细胞 1 型应答 (IFN- γ 的产生)，而 HBsAg 诱导的 2 型应答 (IL-4 的产生) 不受影响或降低。

图 8a 显示一次注射阳离子抗微生物肽 KLK 与合成寡聚脱氧核苷酸 o-d (IC)₁₃ (ODN1a) 和低量市售流行性感疫苗 (Arippal S1) 的联合协同诱导很强的疫苗特异性细胞 1 型免疫应答的结果。

图 8b 显示了一次注射阳离子抗微生物肽 KLK 与合成寡聚脱氧核苷酸 o-d (IC)₁₃ (ODN1a) 和低量市售流行性感疫苗 (Arippal S1) 的联合协同诱导很强的混合 1 型/2 型体液免疫应答的结果。

图 9a: 显示一次注射低剂量的阳离子抗微生物肽 KLK 与合成寡聚脱氧核苷酸 o-d (IC)₁₃ (ODN1a) 的联合协同诱导很强的抗市售流行性感疫苗 (Arippal S1) 的细胞免疫应答的结果。

图 9b: 显示一次注射低剂量的阳离子抗微生物肽 KLK 与合成寡聚

脱氧核苷酸 o-d (IC) 13 (ODN1a) 和低量市售流行性感疫苗 (Agrippal S1) 的联合协同诱导很强的混合 1 型/2 型体液免疫应答的结果。

图 10 显示一次注射市售流行性感疫苗 (Agrippal S1) 联合于阳离子抗微生物肽 KLK 和合成寡聚脱氧核苷 o-d (IC)₁₃ (ODN1a) 与联合于其它佐剂比较的结果。

实施例:

实施例 1:

阳离子肽 (pR 或 KLK) 与不同的寡聚脱氧核苷 (ODN) (CpI, ntCpI, o-d (IC)₁₃) 共注射协同诱导很强的抗市售流行性感疫苗 (Fluvirin) 的 1 型体液应答 (IgG2b)。

小鼠

C57BL/6 (Harlan/Olac)

流行性感疫苗

Fluvirin (Evans vaccine); 下列纯化的失活流行性感病毒表面抗原 (血凝素和神经氨酸酶):

A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) 样株

(15 μg 血凝素)

A/Moscow/10/99 (H3N2) 样株 (A/Panama/007/99 RESVIR-17)

(15 μg 血凝素)

B/Sichuan/379/99 样株

(15 μg 血凝素)

剂量: 1 μg 总蛋白/小鼠

Al(OH)₃

Alhydrogel; Biosys, 丹麦

剂量: 与抗原 1: 1 的混合物

pR

有平均 43 个精氨酸残基的多聚化程度的聚-L-精氨酸 (由 MALLS 测定的); Sigma Aldrich Inc

	剂量: 100 μ g/小鼠
KLK	KLKLLLLLKLK-COOH 由 MPS (Multiple Peptide System, USA) 合成
	剂量: 168 μ g/小鼠
oligo-d (IC) ₁₃ (=ODN1a)	ODN 5' ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成
	剂量: 5nmol/鼠
I-ODN 2	含有脱氧肌苷的硫代磷酸取代的 ODN: tcc atg aci ttc ctg atg ct, 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成
	剂量: 5nmol/鼠
I-ODN 2b	含有脱氧肌苷的 ODN: tcc atg aci ttc ctg atg ct, 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成
	剂量: 5nmol/鼠
制剂	5mM Tris/270mM 山梨醇, pH 7

实验组 (12 只小鼠/组):

1. 幼稚的
2. 流感 (Flu) 疫苗
3. 流感疫苗+ pR
4. 流感疫苗+ KLK
5. 流感疫苗+ A1 (OH)₃
6. 流感疫苗+ o-d (IC)₁₃
7. 流感疫苗+ I-ODN 2
8. 流感疫苗+ I-ODN 2b
9. 流感疫苗+ pR +I-ODN 2

10. 流感疫苗+ KLK + o-d (IC)₁₃
11. 流感疫苗+ KLK + I-ODN 2
12. 流感疫苗+ KLK +I-ODN 2b

在第 0、28 和 56 天, C57BL/6 小鼠双后足垫皮下注射含有上面列出的化合物总体积 100 μ l/小鼠 (50 μ l/足垫)。在第 26、54 和 82 天收集血清,通过 ELISA 分析流行性感疫苗特异性 IgG1 和 IgG2b 抗体。滴度相应于得到半数最大 OD_{405nm} 血清的那个稀释度。

图 1 指出阳离子肽 (pR 或 KLK) 和不同的 ODN (I-ODN 2, I-ODN 2b 或 o-d (IC)₁₃) 的联合注射以协同方式诱导了非常强的抗原 (流行性感疫苗) 特异性体液 1 型应答 (IgG2b)。流行性感疫苗单独或与 A1 (OH)₃ 联合、阳离子肽 (pR, KLK) 单独或不同的 ODN (除 I-ODN 2 外) 单独注射后, 没有特异性 IgG2b 应答可以检测的到。加强疫苗接种很强地增加观察到的应答。

流行性感疫苗与 A1 (OH)₃、KLK 的共注射或联合 pR/I-ODN 2、KLK/I-ODN 2、KLK/I-ODN 2b 或 KLK/o-d (IC)₁₃ 诱导流行性感疫苗特异性 IgG1 的产生 (2 型应答)。

实施例 2:

联合 KLK/o-d (IC)₁₃ 很强地改进了市售流行性感疫苗 (Fluvirin) 的效能。

小鼠

BALB/c (Harlan/01ac)

流行性感疫苗

Fluvirin (Evans vaccine); 下列株纯化的失活流行性感疫苗表面抗原 (血凝素和神经氨酸酶):

A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) 样株

(15 μ g 血凝素)

A/Moscow/10/99 (H3N2) 样株

	(A/Panama/2007/99 RESVIR-17) (15 μg 血凝素) B/Sichuan/379/99 样株 (15 μg 血凝素) 剂量: 1μg 总蛋白/小鼠 (=低剂量/文献: 10μg/小鼠)
A1 (OH) ₃	Alhydrogel; Biosys, Denmark 剂量: 与抗原 1: 1 的混合物
KLK	KLKLLLLLKLK-COOH 由 MPS (Multiple Peptide System, USA) 合成 剂量: 168μg/鼠
oligo-d (IC) ₁₃ (=ODN1a)	ODN 5' ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成 剂量: 5nmol/鼠
制剂	5mM Tris/270mM 山梨醇, pH 7

实验组 (12 只小鼠/组):

1. 幼稚的
2. 流感疫苗
3. 流感疫苗+ A1 (OH)₃
4. 流感疫苗+ KLK + o-d (IC)₁₃

在第 0、28 和 56 天 BALB/c 小鼠双后足垫皮下注射含有上面列出的化合物总体积 100μl/小鼠 (50μl/足垫)。在第 26、54 和 82 天收集血清并使用标准血凝应答抑制试验分析中和抗血凝素抗体。简要地, 病毒表面上血凝素的存在诱导红细胞的血凝应答, 这能被中和抗血凝素抗体抑制。测定抗不同病毒株 (A1 = A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) 样株; A2 = A/Panama/2007/99RESVIR-17; B = B/Sichuan/379/99 样株) 血凝素的抗体的滴度。血清的滴度相应于显示抑制的终点稀释度。

与流行性感冒疫苗单独或和 A1 (OH)₃ 联合的注射相反, 流行性感冒疫苗加上 KLK 和 o-d (IC)₁₃ 的共注射诱导高水平的抗所有三种受试血凝素的中和抗体 (图 2)。因为已经显示流行性感冒疫苗的有效性与抗血凝素抗体的血清滴度相关, 得到的结果指出 KLK/o-d (IC)₁₃ 诱导抗流行性感冒的保护的很高的潜能。

实施例 3:

单次注射阳离子抗微生物肽 KLK 和合成寡聚脱氧核苷酸 o-d (IC)₁₃ 的联合协同诱导很强的抗市售流行性感冒疫苗 (Agrippal S1) 的细胞 1 型和体液 1 型/2 型免疫应答

材料

小鼠

BALB/c (Harlan-Winkelmann, 德国)

流行性感冒疫苗

Agrippal S1 (Chiron SpA, Italy; season2002/2003); 来自下列株失活的纯化流行性感冒病毒抗原 (血凝素和神经氨酸酶):

A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) 样株

(A/New Caledonia/20/99 IVR-116)

A/Moscow/10/99 (H3N2) 样株

(A/Panama/2007/99 RESVIR-17)

B/ HongKong/33 0/2001 样株

(B/Shangdong/7/97)

总抗原含量: 45µg (对于每个抗原 15µg);

批号 4307; 失效日期: 05/2003

剂量: 1µg 总蛋白/小鼠

Fluad (Chiron SpA, 意大利; season 2002/2003); 来自下列株失活的纯化流行性感冒病毒抗原 (血凝素和神经氨酸酶):

	A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) 样株 (A/New Caledonia/20/99 IVR-116)
	A/Moscow/10/99 (H3N2) 样株 (A/Panama/2007/99 RESVIR17) (B/Shangdong/7/97)
	总抗原量: 45 μ g (对于每个抗原 15 μ g); MF59C.1 作为佐剂加入
	批号 3403; 失效日期: 05/2003
	剂量: 1 μ g 总蛋白/小鼠
oligo-d (IC) ₁₃ (=ODN1a)	ODN 5' ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成
	剂量: 0.4nmol/鼠
KLK	KLKLLLLLKLK-COOH 由 MPS (Multiple Peptide System, USA) 合成
	剂量: 10nmol/小鼠
制剂	10mMs Tris/135mM NaCl; pH ⁻ 7

实验设置 (10 只小鼠/组):

1. 幼稚的
2. Agrippal S1
3. Fluad
4. Agrippal S1 + KLK +o-d (IC)13

在第 0 天, BALB/c 小鼠双后股骨肌内注射含有上面列出的化合物总量 100 μ l 疫苗/小鼠(50 μ l/肌肉)。在第 21 天收集血清并且用 ELISA 分析流行性感疫苗特异性 IgG1 和 IgG2a 抗体。滴度相应于得到半数最大 OD405nm 血清的稀释度。另外, 合并每个实验组的脾并且制备单个细胞悬浮液。脾细胞的分装物用磁性分拣试剂盒 (CD4 MACS sort,

Miltenyi) 分开为 CD4⁺T 细胞。为了计数每个实验组 Agrippal S1 抗原特异性产细胞因子的细胞的数目,在 96 孔 ELIspot 平板中对未分开的脾细胞或分开的 CD4⁺T 细胞联合经照射的抗原递呈细胞 (APC; 来源于幼稚小鼠的) 进行刺激。分析下面细胞因子的产生:

IFN- γ (作为细胞 1 型应答的指示物),

IL-4 和 IL-5 (作为细胞 2 型应答的指示物)

结果 (图 3a)

低量流行性感疫苗 Agrippal S1 (未加佐剂的)和 Fluad (加了 MF59 佐剂的)单独注射不能诱导 CD4⁺T 细胞产生疫苗 (AgrippalS1) 特异性的 IFN- γ , 而 Agrippal S1 与 KLK/o-d (IC)₁₃ 联合注射后,观察到 CD4⁺T 细胞产生很强的疫苗 (Agrippal S1) 特异性 IFN- γ 。与幼稚小鼠相比,单独 Agrippal S1 仅略微诱导 CD4⁺T 细胞产生 IL-4, KLK/o-d (IC)₁₃ 加入到疫苗未显示进一步地增加。然而, Fluad 是 CD4⁺T 细胞产生 IL-4 以及未分开的脾细胞产生 IL-5 有力的诱导剂。在 Agrippal S1 单独注射后仅可检测到很低水平的 IL-5, 但是在与 KLK/o-d (IC)₁₃ 的联合就检测不到。未分开脾细胞的再刺激之后,得到相似的结果。

结果 (图 3b)

图 3b 显示加佐剂的流行性感疫苗 Fluad 单独注射诱导很强的疫苗 (Agrippal S1) 特异性体液 2 型应答 (IgG1), 但仅仅微弱的 1 型应答 (IgG2a)。然而, 未加佐剂的流行性感疫苗与 KLK/o-d (IC)₁₃ 的联合注射诱导了非常强的疫苗 (Agrippal S1) 特异性 IgG2a (体液 1 型免疫应答) 以及比单独 Agrippal S1 更高水平的 IgG1。因为抗流行性感冒的保护与疫苗抗原特异性 IgG2a 抗体的存在相关, 得到的结果指出 KLK/o-d (IC)₁₃ 作为流行性感疫苗有效佐剂的很高的潜能。

实施例 4:

联合 KLK/o-d (IC)₁₃ 一次注射后很强地改善了市售流行性感疫苗

苗 (Agrippal S1) 的效能

材料

小鼠

流行性感疫苗

BALB/c (Harlan-Winkelmann, 德国)

Agrippal S1 (Chiron SpA, Italy; season2002/2003); 下列株纯化的失活流行性感病毒抗原 (血凝素和神经氨酸酶):

A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) 样株

(A/New Caledonia/20/99 IVR-116)

A/Moscow/10/99 (H3N2) 样株

(A/Panama/2007/99 RESVIR-17)

B/ HongKong/33 0/2001 样株

(B/Shangdong/7/97)

总抗原量: 45 μ g (对于每个抗原 15 μ g);

批号: 4307; 失效日期 05/2003

剂量: 1 μ g 总蛋白/小鼠

Fluad (Chiron SpA, 意大利; season 2002/2003); 下列株纯化的失活流行性感病毒抗原 (血凝素和神经氨酸酶):

A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) 样株

(A/New Caledonia/20/99 IVR-116)

A/Moscow/10/99 (H3N2) 样株

(A/Panama/2007/99 RESVIR 17)

(B/Shangdong/7/97)

总抗原量: 45 μ g (对于每个抗原 15 μ g); MF59C.1

作为佐剂的加入

批号: 3403; 失效日期 05/2003

剂量: 1 μ g 总蛋白/小鼠

o-d (IC) ₁₃ (=ODN1a)	ODN 5' ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成 剂量: 0.5nmol/小鼠
KLK	KLKLLLLLKLK-COOH 由 MPS (Multiple Peptide System, USA) 合成 剂量: 10nmol/小鼠
制剂	10mM Tris/270mM 山梨醇, pH = 7

实验设置 (10 只小鼠/组)

1. 幼稚的
2. Agrippal S1
3. Fluad
4. Agrippal S1 + KLK + o-d (IC)₁₃

在第 0 天, BALB/c 小鼠双后股骨肌内注射含有上面列出的化合物总量 100 μ l 疫苗/小鼠 (50 μ l/肌肉)。在第 21 天, 收集血清并且使用人类血清标准血凝素抑制 (HI) 试验分析中和抗血凝素抗体。测定抗来源于流行性感疫苗 Agrippal S1 和 Fluad 不同病毒株 (见材料) 的抗体的滴度。

结果 (图 4)

与单独 Agrippal S1 的注射相反, 流行性感疫苗与低量 KLK/o-d (IC)₁₃ 的共注射很强地诱导了抗两个受试流行性感 A 株 (A/New Caledonia/20/99; A/Panama/2007/99) 的中和抗体水平的增加。然而, 用 Fluad 的疫苗接种诱导了与 Agrippal S1 和低量 KLK/o-d (IC)₁₃ 的共注射水平相同的中和抗体。因为已经显示流行性感疫苗的有效性与抗血凝素抗体的血清滴度相关, 本结果指出 KLK/o-d (IC)₁₃ 作为佐剂诱导抗流行性感冒的保护很高的潜能。

实施例 5:

用来自流行性感 A 病毒的 ncORF 衍生肽联合 KLK/o-d (IC)₁₃ 对小鼠的疫苗接种。在疫苗接种后 7 天测量特异性 T 细胞应答, 动物随后用致死剂量小鼠适应的流行性感 A 病毒(x31)刺激(challenge)。监测存活 15 天。

材料

小鼠	C57B1/6 (Harlan-Winkelmann, Germany)
肽	p82 (GLCTLVAML) 来源于 EBV 的对照肽; HLA-A*0201; AA 开始点 280
	p1574 (IASNENMETM) 来源于流行性感核蛋白质的对照肽, AA 开始点 365
	p1569 (TMLYNKMEF) 来自片断 1、框架 1、ORF1 的流感 ncORF 衍生肽, AA 开始点 569
	p1600 (SSIAAQDAL) 来自片断 3、框架 6、ORF2 的流感 ncORF 衍生肽, AA 开始点 83
	P1664 (VTILNLALL) 来自片断 4、框架 5、ORF6 的流感 ncORF 衍生肽, AA 开始点 9
	剂量: 100µg/肽/小鼠
o-d (IC) ₁₃ (=ODN1a)	ODN5' ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成 剂量: 0.5nmol/鼠

KLK	KLKLLLLLKLK-COOH
	由 MPS (Multiple Peptide System, USA) 合成
	剂量: 127nmol/小鼠
制剂	270mM 山梨醇/ 10mM Hepes
流行性感 A 病毒	x31, 小鼠适应的流行性感 A 病毒, rec. 病毒, 来源于 A/Pr/8/34 (seg 1, 2, 3, 5, 7, 8) 和 A/Aichi/2/68 (seg 4, 6)

实验设置 (15 只小鼠/组)

1. p1574 + KLK + o-d (IC)₁₃
2. p1569 + KLK + o-d (IC)₁₃
3. p1600 + KLK + o-d (IC)₁₃
4. p1664 + KLK + o-d (IC)₁₃
5. p1600 + p1569 + KLK + o-d (IC)₁₃

在第 0 天小鼠双后足垫皮下注射含有上面列出的化合物总量 100 μ l 疫苗/小鼠 (50 μ l/足垫)。在第 7 天, 为了计数每个实验组产肽特异性 IFN- γ 细胞的数目, 在 96 孔 ELIspot 平板中刺激来自 5 只小鼠的未分开脾细胞。

剩下的 10 只小鼠用小鼠适应的 x31 流行性感 A 病毒 (5*10E5 pfu) 进行攻击。监测存活 15 天。

结果 ELIspot (图 5a)

组 1 和 3 (肽 p1574 和 p1600) 的脾细胞在用各自的肽再刺激后未显示任何特异性的斑点。组 2 和 4 (p1569 和 p1664) 在再刺激后特异性地释放 IFN- γ 。组 5 用两个单独的肽 (不是混合物, p1600 和 p1569) 进行疫苗接种。用两个肽的混合或 p1569 再刺激后, 检测到特异性的细胞因子释放。相反, 用 p1600 单独再刺激后, 没有检测到 IFN- γ 。

这与组 3 (p1600 单独) 一致。

结果 攻击 (图 5b)

图 5b 显示用致死剂量小鼠适应的流行性感 A 病毒 x31 刺激小鼠的存活率。组 1 (p1574, 报告的 H2-Db 保护抗原决定簇) 保护了 30% 的所有受刺激小鼠。肽 p1569 根本不提供保护 (0%)。相反, 肽 p1600 和 p1664 分别保护了 50% 和 62% 的受刺激动物。当动物用两个不同的肽 (组 5, 肽 p1600 和 p1569) 进行疫苗接种时一共 70% 的动物受到保护。

实施例 6:

用五个不同 HCV 衍生肽的联合注射、抗微生物肽 KLK 和合成寡聚核苷酸 o-d (IC)₁₃ 诱导很强的 HCV 特异性 1 型细胞应答

小鼠

HLA-A*0201 转基因小鼠 (HHD.1)

肽

肽 p83、p84、p87、p89、p1426 用于疫苗接种。

p83: HCV 衍生肽,

(KFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRRL)

p84: HCV 衍生肽,

(GYKVLVLNPSVAAT)

p87: HCV 衍生肽,

(DLMGYIPAV)

p89: HCV 衍生肽,

(CINGVCWTV)

p1426 : HCV 衍生肽,

(HMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPA)

(p1274 作为不相关肽用于再刺激

(YMDGTMSQV ; HLA-A*0201 限制的)

所有肽用标准固相 F-moc 合成进行合

	成、HPLC 纯化并用质谱法分析纯度。
	剂量: 20 μ g/肽/小鼠
KLK	KLKLLLLLKLK-COOH 由 MPS (Multiple Peptide System, USA) 合成
	剂量: 10nmol/小鼠
oligo-d (IC) ₁₃ (=ODN1a)	ODN 5' ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成
	剂量: 0.4nmol/鼠
制剂	10mM Tris/135mM NaCl, pH ⁻ 7

实验设置 (5 只小鼠/组):

1. HCV 肽
2. HCV 肽+ KLK + o-d (IC)₁₃

在第 0、14 和 28 天, HHD.1 小鼠双后足垫皮下注射含有上面列出的化合物总量 100 μ l/小鼠 (50 μ l/足垫)。在第 35 天 (最后一次疫苗接种后 7 天) 用磁性分开试剂盒 (MACS, Miltenyi) 从脾细胞的单个细胞悬浮液分离 CD4⁺ 以及 CD8⁺T 细胞。T 细胞用培养液孵育 (背景对照) 或在有用于疫苗接种不同的肽或不相关肽 p1274 的存在下用来自幼稚 HHD.1 小鼠经照射的脾细胞作为 APC 进行再刺激。过夜孵育后, 用 ELIspot 试验分析 IFN- γ 的产生。

图 6 显示 KLK/o-d (IC)₁₃ 和五个 HCV 衍生肽共注射后, 诱导抗 p84、p87、p89、p1426 CD4⁺T 细胞产生高量的 IFN- γ 。此外, 可检测到抗 p87、p89 CD8⁺T 细胞产生很强的 IFN- γ 。

实施例 7:

阳离子肽与不同寡聚脱氧核苷酸 (ODN) (CpI, ntCpI, o-d (IC)₁₃)

共注射协同诱导很强的抗肝炎 B 表面抗原的 1 型细胞应答 (IFN- γ)。

小鼠	C57BL/6 (Harlan-Winkelmann, 德国); 对 HBsAg 特异性免疫应答低应答的小鼠
抗原	乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 剂量: 5 μ g/小鼠
A1 (OH) ₃	Alhydrogel; Biosys, 丹麦 剂量: 与抗原 1: 1 的混合物
pR	有平均 43 个精氨酸残基多聚程度的聚-L-精氨酸 (由 MALLS 测定); Sigma Aldrich Inc 剂量: 100 μ g/小鼠
KLK	KLKLLLLLKLK-COOH 由 MPS (Multiple Peptide System, USA) 合成 剂量: 168 μ g/小鼠
I-ODN 2	(= CpI 2) 含有脱氧肌苷的硫代磷酸替代的 ODN: 5' tcc atg aci ttc ctg atg ct3' 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成 剂量: 5nmol/小鼠
I-ODN 2b	(= CpI 2b) 含有脱氧肌苷的 ODN: 5' tcc atg aci ttc ctg atg ct3' 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成 剂量: 5nmol/小鼠
o-d (IC) ₁₃ (=ODN1a)	ODN 5' ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC3' 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Göttingen 合成 剂量: 5nmol/小鼠
制剂	5mM Tris/270mM 山梨醇, pH 7

实验设置 (5 只小鼠/组/时间点)

1. HBsAg
2. HBsAg + Alum
3. HBsAg + I-ODN 2
4. HBsAg + I-ODN 2b
5. HBsAg + o-d (IC)₁₃
6. HBsAg + pR
7. HBsAg + KLK
8. HBsAg + pR + I-ODN 2
9. HBsAg + pR + I-ODN 2b
10. HBsAg + pR + o-d (IC)₁₃
11. HBsAg + KLK + I-ODN 2
12. HBsAg + KLK + I-ODN 2b
13. HBsAg + KLK + o-d (IC)₁₃

在第 0 天和第 56 天,小鼠右侧皮下注射含有上面列出的化合物总体积 100 μ l/小鼠。分别在第一和二次注射后第 7 天、第 21 天和第 50 天,进行免疫应答的分析。每组每个时间点五只小鼠的脾细胞用 10 μ g/ml HBsAg 离体 (ex vivo) 再刺激,为了分析 HBsAg 特异性 IFN- γ (1 型免疫应答) 以及 IL-4 (2 型免疫应答) 的产生进行 ELIspot 试验。

结果 (图 7)

HBsAg 单独或和 Alum 联合注射并不诱导或仅诱导非常低水平的 IFN- γ , 而 HBsAg 联合 pR/ODN 或 KLK/ODN 注射后,诱导了 HBsAg 特异性 IFN- γ 的产生,强化疫苗接种能进一步地增加 IFN- γ 的产生。与 HBsAg 单独注射相比强化之后 Alum、pR 和 KLK 共注射以及

KLK/ODN 联合共注射后观察到略微增加的 IL-4 的产生。

实施例 8:

阳离子抗微生物肽 KLK 与合成寡聚脱氧核苷酸 o-d (IC)₁₃ (ODN1a) 和低量市售流行性感疫苗 (AgrippalS1) 联合的一次注射协同诱导很强的疫苗特异性细胞 1 型应答。

材料

小鼠

BALB/c (Harlan-Winkelmann, 德国)

流行性感疫苗

Agrippal S1 (Chiron SpA, 意大利; 疫苗接种季节 2003/2004); 批号 035105, 失效日期 06/2004

下列株纯化的失活流行性感病毒抗原 (血凝素和神经氨酸酶):

A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) 样株

(A/New Caledonia/20/99 IVR-116)

A/Moscow/10/99 (H3N2) 样株

(A/Panama/2007/99 RESVIR 17)

B/Hong Kong/330/2001-样株

(B/Shangdong/7/97)

总抗原含量: 45 μ g 血凝素 (每个病毒株 15 μ g)

剂量: 9 μ g 总蛋白质/小鼠 (直接从预填注射器使用的) 0.1 μ g 总蛋白质/小鼠

o-d (IC)₁₃ (=ODN1a)

含有 13 个脱氧(-肌昔、-胞嘧啶)基序 (ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC) 的磷酸二酯替代的 ODN; 由 Transgenomics 合成; 部分号: I02A03001N。

剂量: 4nmol/小鼠

1.4nmol/小鼠

0.4nmol/小鼠

KLK	含有赖氨酸和亮氨酸的合成阳离子聚氨基酸 (KLKLLLILKLK-COOH); 由 Bachem AG 合成 批号: 0562101 剂量: 100nmol/小鼠 35nmol/小鼠 10nmol/小鼠
制剂	由 Intercell 的药物开发部制成; 10mM Tris/135mM NaCl pH 7.5

实验设置 (10 小鼠/组)

1. 幼稚的
2. 9 μ g Agrippal S1
3. 0.1 μ g Agrippal S1
4. 0.1 μ g Agrippal S1 + 100nmol KLK + 4nmol ODN1a
5. 0.1 μ g Agrippal S1 + 35nmol KLK + 1.4nmol ODN1a
6. 0.1 μ g Agrippal S1 + 10nmol KLK + 0.4nmol ODN1a

在第 0 天, BALB/c 小鼠双股骨肌内注射含有上面列出的化合物总量 100 μ l 疫苗/小鼠 (50 μ l /肌肉)。在第 21 天, 收集血清并用 ELISA 分析流行性感疫苗特异性 IgG1 和 IgG2a 抗体。滴度相应于得到半数最大 OD_{405nm} 的血清稀释度。此外, 合并每个实验组的脾并制备单个细胞悬浮液。脾细胞的分装物用磁性分拣试剂盒 (CD4 和 CD8 MACS sort, Miltenyi) 分开为 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞。为了计数每个实验组 Agrippal S1 抗原特异性产细胞因子的细胞的数目, 在 96 孔 ELISpot 平板中刺激未分开的脾细胞或分开的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞联合经照射的抗原递呈细胞 (APC; 来源于幼稚小鼠的)。分析下面细胞因子的产生:

IFN- γ (作为细胞 1 型应答的指示物),

IL-4 和 IL-5 (作为细胞 2 型应答的指示物)

结果 (图 8a)

单独用 9 μ g 和 0.1 μ g Agrippal S1 的疫苗接种不能够诱导 CD4⁺脾细胞产生疫苗特异性 IFN- γ ，而 Agrippal S1 联合不同浓度 KLK/o-d (IC)₁₃ 注射后，观察到 CD4⁺T 脾细胞产生很强的 IFN- γ 。然而，CD8⁺脾细胞不能诱导 IFN- γ 。与幼稚小鼠相比，单独 Agrippal S1 仅略微诱导了未分开的和 CD4⁺脾细胞产生 IL-4，KLK/o-d (IC)₁₃ 加入到疫苗中未显示进一步地增加。然而，KLK/o-d (IC)₁₃ 共注射后 Agrippal S1 诱导 IL-5 被完全消除。

结果 (图 8b)

如图 8b 阐明地，低量无佐剂的流行性感冒疫苗与不同浓度 KLK/o-d (IC)₁₃ 的联合注射诱导非常强的疫苗 (AgrippalS1) 特异性 IgG2a (体液 1 型免疫应答) 和比低量 AgrippalS1 单独更高水平的 IgG1。然而，高剂量的 AgrippalS1 显示了最高滴度的疫苗特异性 IgG1 抗体。因为抗流行性感冒保护与疫苗抗原特异性 IgG2a 抗体的存在相关，得到的结果指出 KLK/o-d (IC)₁₃ 作为流行性感冒疫苗有效佐剂的很高的潜能。

实施例 9:

阳离子抗微生物肽 KLK 和合成寡聚脱氧核苷酸 o-d (IC)₁₃ (ODN1a) 联合的低剂量一次注射协同诱导很强的抗市售流行性疫苗 (Agrippal S1) 的疫苗特异性细胞 I 型免疫应答

材料

小鼠

BALB/c (Harlan-Winkelmann, 德国)

流行性感冒疫苗

Agrippal S1 (Chiron SpA, 意大利; 疫苗接种季节 2003/2004);

批号 035105, 失效日期 06/2004

下列株纯化的失活流行性感冒病毒抗原

	(血凝素和神经氨酸酶):
	A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) 样株
	(A/New Caledonia/20/99 IVR-116)
	A/Moscow/10/99 (H3N2) 样株
	(A/Panama/2007/99 RESVIR 17)
	B/Hong Kong/330/2001-样株
	(B/Shangdong/7/97)
	总抗原含量: 45 μ g 血凝素 (每个病毒株 15 μ g)
	剂量: 9 μ g 总蛋白质/小鼠 (直接从预填注 射器使用的)
	1 μ g 总蛋白质/小鼠
o-d (IC) ₁₃ (=ODN1a)	含有 13 个脱氧(-肌苷、-胞嘧啶)基序 (ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC) 的磷酸 二酯替代的 ODN; 由 Transgenomics 合成; 部分号: I02A03001N.
	剂量: 0.4nmol/小鼠
	0.2nmol/小鼠
	0.04nmol/小鼠
KLK	含有赖氨酸和亮氨酸的合成阳离子聚氨基 酸 (KLKLLLILKLK-COOH); 由 Bachem AG 合 成
	批号: 0562101
	剂量: 10nmol/小鼠
	5nmol/小鼠
	1nmol/小鼠
制剂	由 Intercell 的药物开发部制成; 10mM Tris/135mM NaCl pH 7.5

实验设置 (5 只小鼠/组)

1. 幼稚的

2. 9 μ g Agrippal S1
3. 1 μ g Agrippal S1
4. 1 μ g Agrippal S1 + 10nmol KLK + 0.4nmol ODN1a
5. 1 μ g Agrippal S1 + 5nmol KLK + 0.2nmol ODN1a
6. 1 μ g Agrippal S1 + 1nmol KLK + 0.04nmol ODN1a

在第 0 天, BALB/c 小鼠双股骨肌内注射含有上面列出的化合物总量 100 μ l 疫苗/小鼠 (50 μ l /肌肉)。在第 21 天, 收集血清并用 ELISA 分析流行性感冒疫苗特异性 IgG1 和 IgG2a 抗体。梯度相应于得到半数最大 OD_{405nm} 的血清稀释度。此外, 合并每个实验组的脾并制备单个细胞悬浮液。为了计数每个实验组 Agrippal S1 抗原特异性产细胞因子的细胞的数目, 在 96 孔 ELIspot 平板中刺激脾细胞。分析下面细胞因子的产生:

IFN- γ (作为细胞 1 型应答的指示物),

IL-4 和 IL-5 (作为细胞 2 型应答的指示物)

结果 (图 9a)

单独用 9 μ g 和 1 μ g Agrippal S1 对小鼠的疫苗接种仍然不能 (也见图 8a) 诱导小鼠脾细胞产生疫苗特异性 IFN- γ , 而 Agrippal S1 联合不同低浓度的 KLK/o-d (IC)₁₃ 注射后, 观察到很强的 IFN- γ 的产生。与幼稚小鼠相比, Agrippal S1 单独仅略微诱导了小鼠脾细胞产生 IL-4, KLK/o-d (IC)₁₃ 加入到疫苗没有作用。KLK/o-d (IC)₁₃ 共注射后 Agrippal S1 诱导的 IL-5 剂量依赖性地被消除。甚至在很低的剂量, KLK/o-d (IC)₁₃ 的联合诱导很强的细胞 I 型免疫应答。

结果 (图 9b)

低量无佐剂的流行性感冒疫苗与不同浓度 KLK/o-d (IC)₁₃ 的联合

注射诱导非常强的疫苗 (Arippal S1) 特异性 IgG2a (体液 1 型免疫应答) 和与低量单独 Agrippal S1 大致同等 (comparable) 水平的 IgG1。然而, 单独高剂量的 Agrippal S1 显示了略微增加的疫苗特异性 IgG1 抗体滴度以及与 Agrippal S1 和最低浓度 KLK/o-d (IC)₁₃ 共注射相比相当水平的 IgG2a 抗体。因为抗流行性感冒的保护与疫苗抗原特异性 IgG2a 抗体的存在相关, 得到的结果指出 KLK/o-d (IC)₁₃, 甚至在非常低的剂量, 作为流行性感冒疫苗有效佐剂的很高的潜能。

实施例 10

市售流行性感冒疫苗 (Arippal S1) 联合于阳离子抗微生物肽 KLK 和合成寡聚脱氧核苷酸 o-d (IC)₁₃ (ODN1a) 的一次注射与联合于其它佐剂的比较

材料

小鼠

BALB/c (Harlan-Winkelmann, 德国)

流行性感冒疫苗

Agrippal S1 (Chiron SpA, 意大利; 疫苗接种季节 2003/2004); 批号 035105, 失效日期 06/2004

Fluad (Chiron SpA, 意大利; 疫苗接种季节 2003/2004); 批号 4003, 失效日期 05/2004; MF59C 作为佐剂的加入

两个疫苗含有下列株纯化的失活流行性感冒病毒抗原 (血凝素和神经氨酸酶):

A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) 样株

(A/New Caledonia/20/99 IVR-116)

A/Moscow/10/99 (H3N2) 样株

(A/Panama/2007/99 RESVIR 17)

B/Hong Kong/330/2001-样株

(B/Shangdong/7/97)

- 总抗原含量: 45 μ g 血凝素(每个病毒株 15 μ g)
 剂量: 9 μ g 总蛋白质/小鼠(直接从预填注射器使用的)
 1 μ g 总蛋白质/小鼠
- o-d (IC)₁₃ (=ODN1a) 含有 13 个脱氧(-肌苷、-胞嘧啶)基序(ICI CIC ICI CIC ICI CIC ICI CIC IC)的磷酸二酯替代的 ODN; 由 Transgenomics 合成; 部分号: I02A03001N.
 剂量: 0.4nmol/小鼠
- KLK 含有赖氨酸和亮氨酸的合成阳离子聚氨基酸(KLKLLLILKLK-COOH); 由 Bachem AG 合成
 批号: 0562101
 剂量: 100nmol/小鼠
 10nmol/小鼠
- CpG1668 含有 CpG 基序(5'-tcc atg acg ttc ctg atgct-3')的硫代磷酸替代的 ODN; 由 Purimex Nucleic Acids Technology, Gttingen 合成;
 批号 020614
 剂量: 5nmol/小鼠
- Alum Al (OH)₃[15g/l]; 由 Chiron Behring, 德国提供
 剂量: 与抗原 1: 1 混合物
- pR 有平均 43 个精氨酸残基多聚程度的聚-L-精氨酸(由 MALLS 测定); 由 Sigma 提供;
 批号 50K7280;
 剂量: 100 μ g/小鼠
- IFA 不完全 Freud 氏佐剂; 由 Difco 实验室提供;
 批号 2158430
 剂量: 与抗原 1: 1 混合物

CFA	完全 Freud 氏佐剂；由 Difco 实验室提供； 批号 3126639 剂量：与抗原 1:1 混合物
制剂	InterCell 的药物开发部制成；10mM Tris/135mM NaCl pH 7.5

实验设置 (5 只小鼠/组)

1. 幼稚的
2. 9 μ g Fluad
3. 9 μ g Agrippal S1
4. 1 μ g Agrippal S1
5. 1 μ g Agrippal S1 + 10nmol KLK + 0.4nmol ODN1a
6. 1 μ g Agrippal S1 + 5nmol CpG1668
7. 1 μ g Agrippal S1 + 100 μ g pR43
8. 1 μ g AgrippalS1 + 100nmol KLK
9. 1 μ g AgrippalS1 + Alum
10. 1 μ g Agrippal S1 + CFA
11. 1 μ g Agrippal S1 + IFA

在第 0 天, BALB/c 小鼠双股骨肌内注射含有上面列出的化合物总量 100 μ l 疫苗/小鼠 (50 μ l /肌肉)。在第 21 天, 合并每个实验组的脾并制备单个细胞悬浮液。为了计数每个实验组 Agrippal S1 抗原特异性产细胞因子的细胞的数目, 在 96 孔 ELIspot 平板中刺激脾细胞。分析下面细胞因子的产生:

IFN- γ (作为细胞 1 型应答的指示物),

IL-4 和 IL-5 (作为细胞 2 型应答的指示物)

结果 (图 10)

与单独用 Agrippal S1 和 Fluad 疫苗接种相比低量无佐剂的流行性感疫苗和低剂量 KLK/o-d (IC)₁₃ 的联合注射诱导小鼠脾细胞产生

更高水平的疫苗 (Agrippal S1) 特异性 IFN- γ 。只在用 CFA 疫苗接种后获得等同量的 IFN- γ ，与单独 Agrippal S1 相比所有其它实验组大致显示小鼠脾细胞没有 (pR43、Alum、IFA) 或有略微增加的 (CpG1668、KLK) IFN- γ 的产生。与幼稚小鼠相比，只有 Fluad 显著诱导小鼠脾细胞产生 IL-4 而所有其它实验组几乎显示同样低水平的 IL-4。疫苗抗原特异性 IL-5 在用 Fluad 对小鼠疫苗接种后可检测到非常高的水平，在单独 Agrippal S1 或与 KLK 联合的注射后可检测到中等水平。Agrippal S1 与 pR、Alum 或 IFA 共注射仅显示略微增加水平的 IL-5，而所有其它组显示 IL-5 产生的降低。

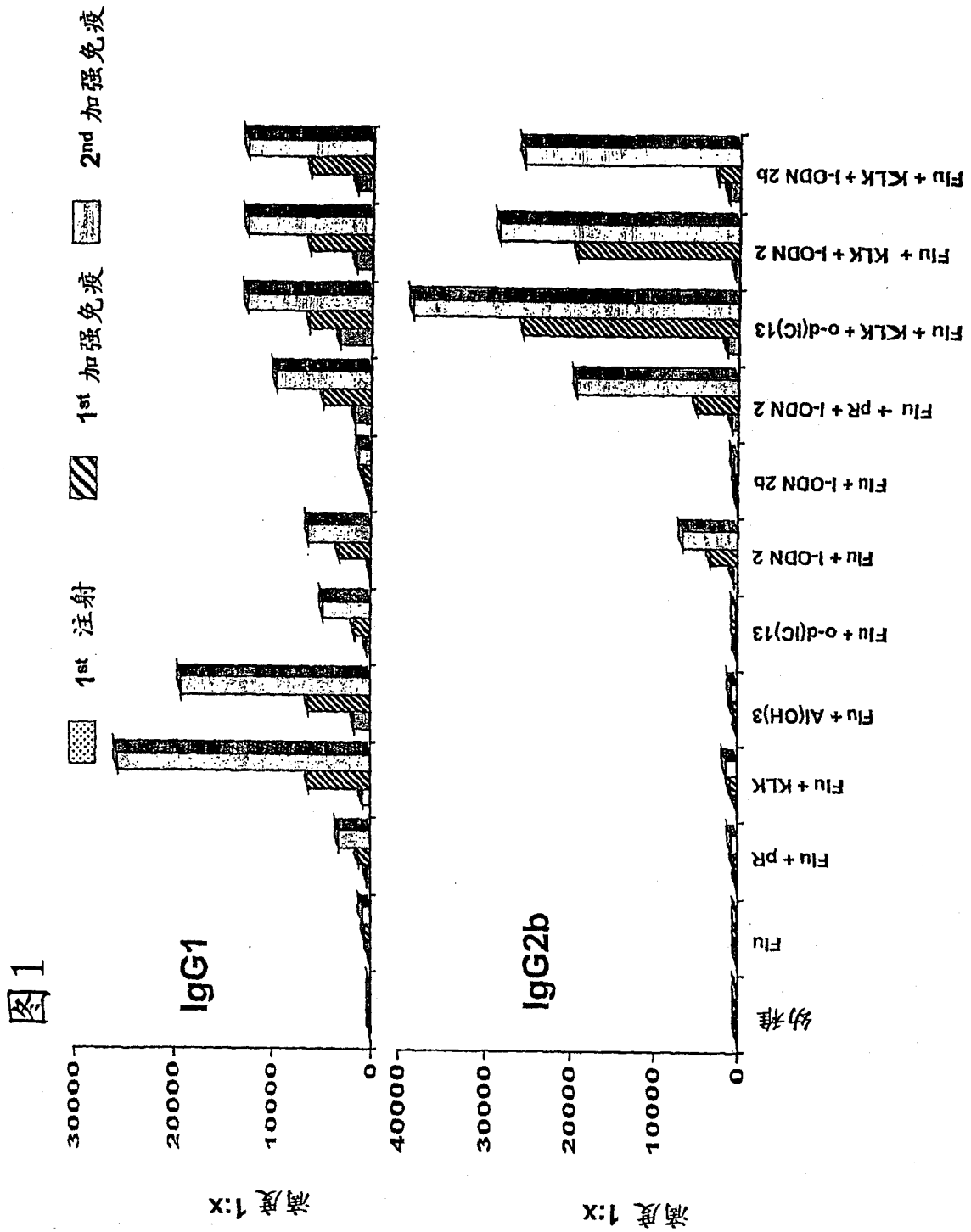


图2

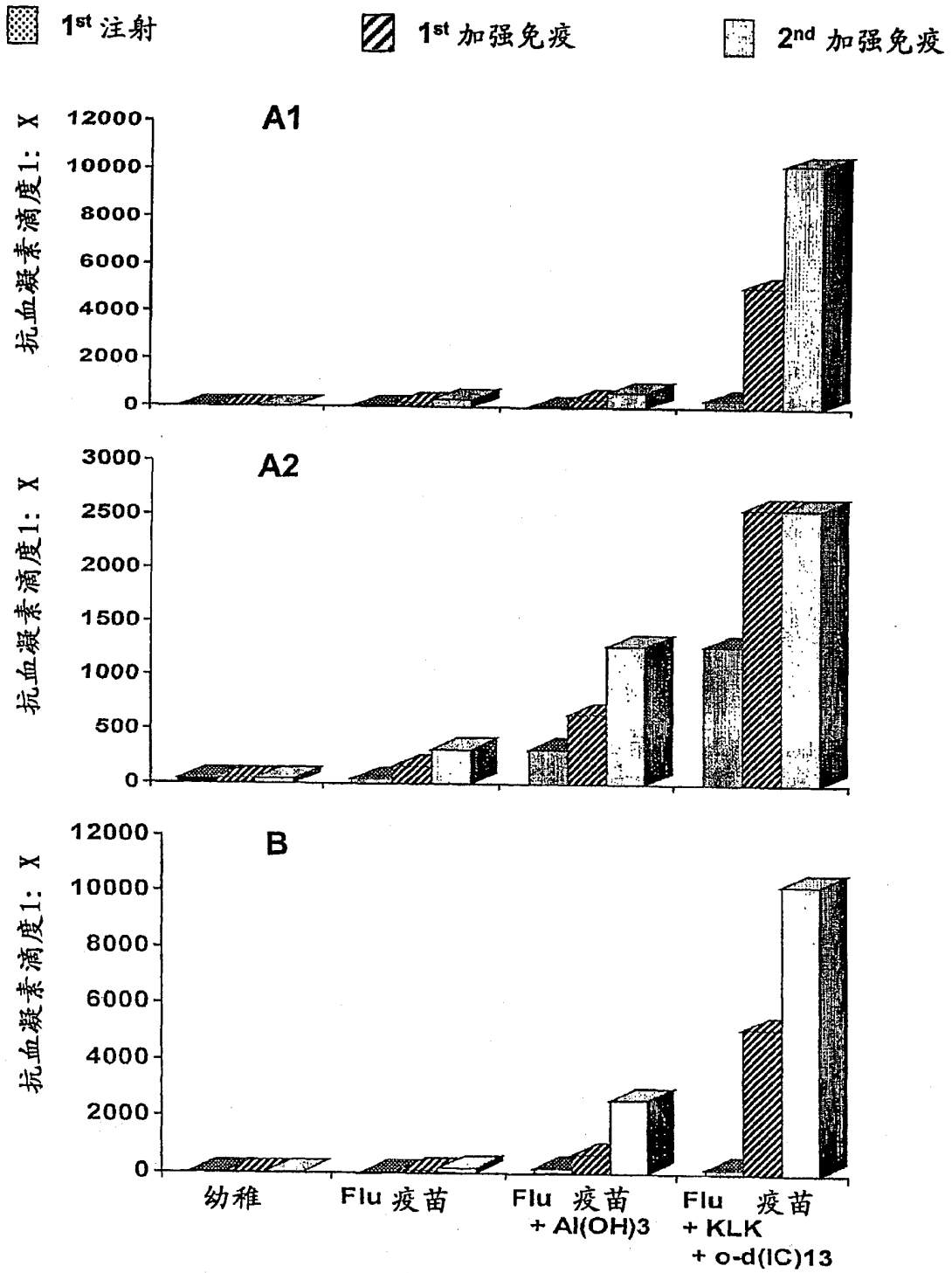


图 3a

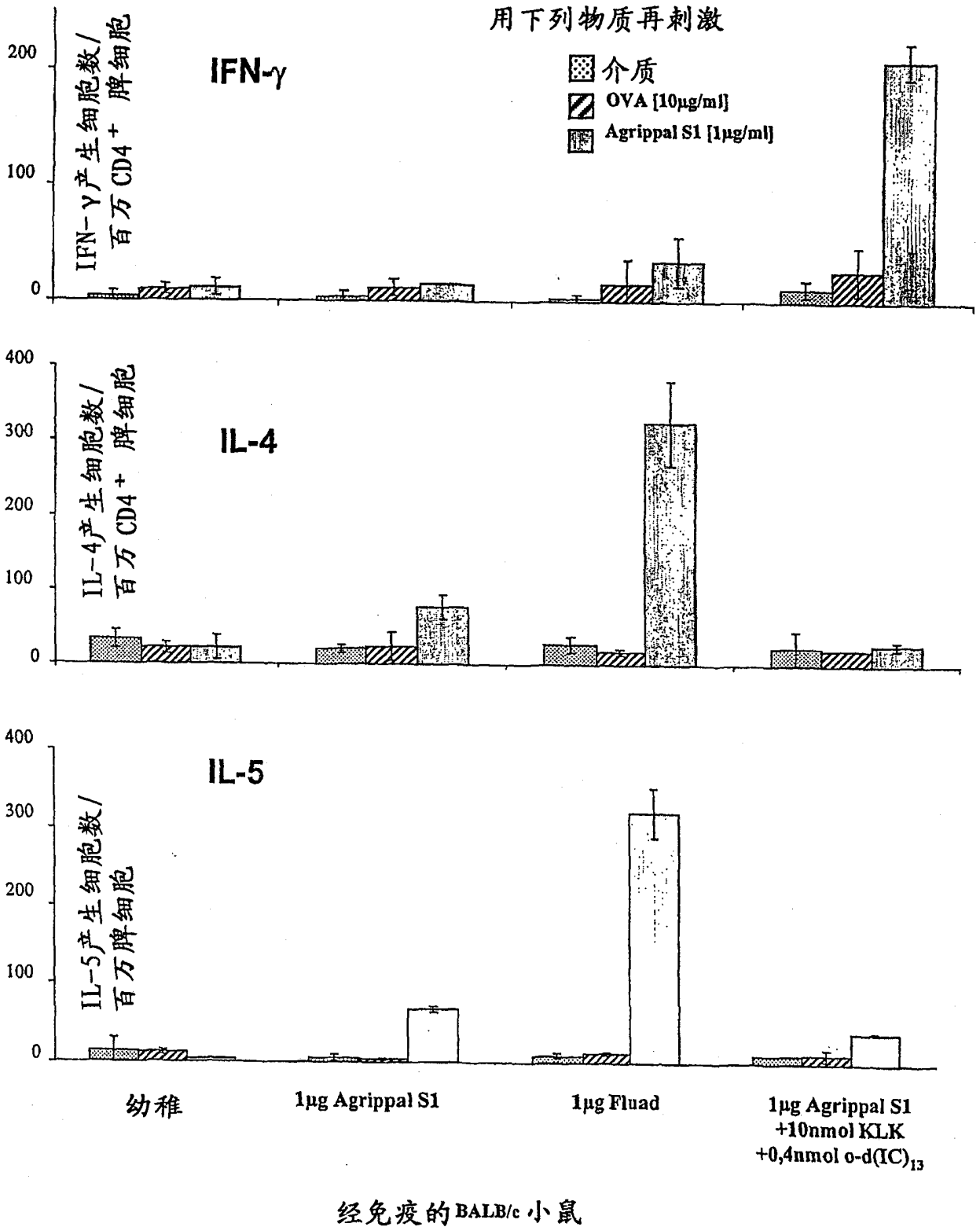


图 3b

ELISA-板, 用下列物质包被
1 μ g/ml Agrippal S1

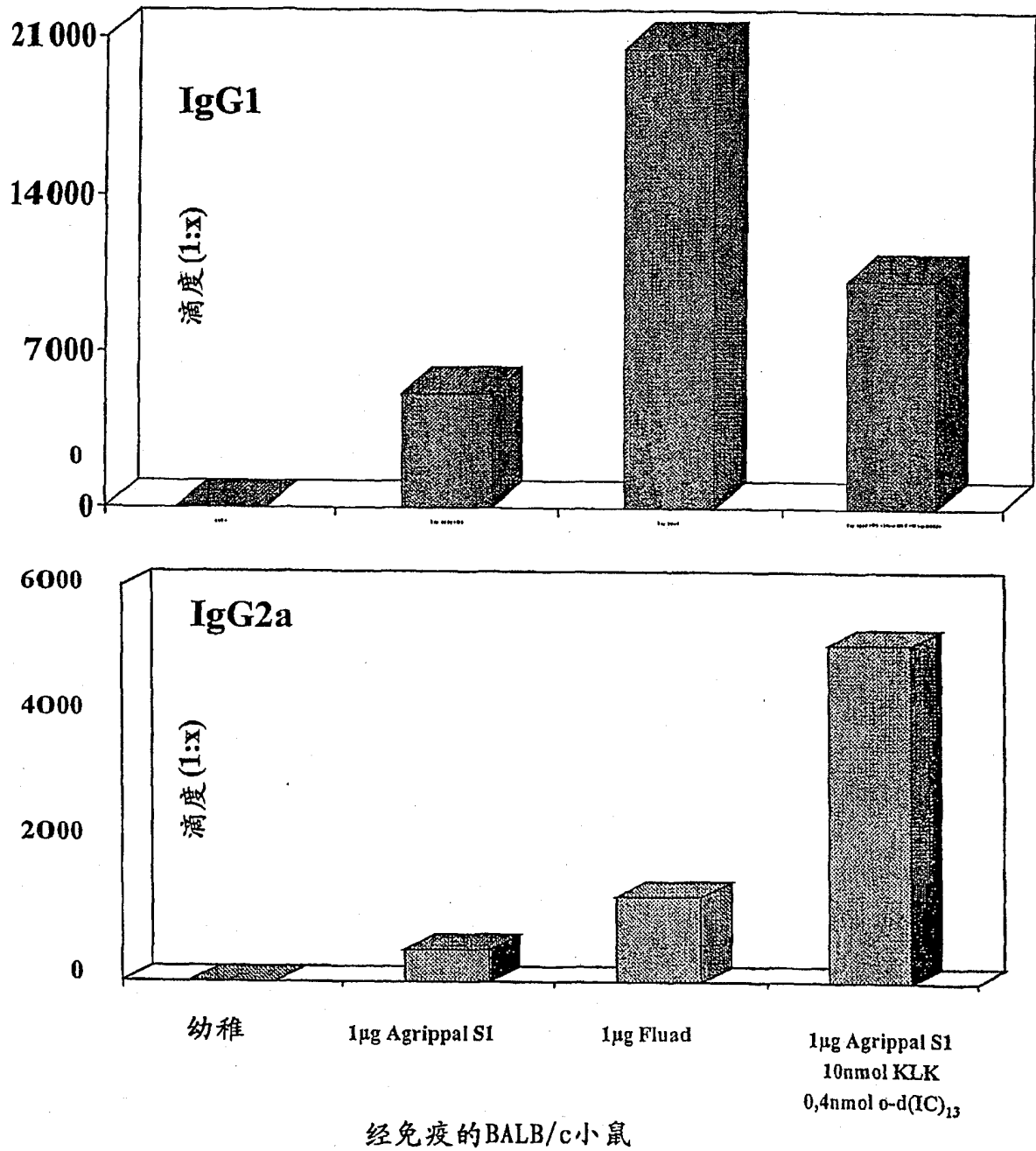


图 4

针对衍生自下列菌株的血凝素
测试的小鼠血清

- ☒ A/New Caledonia/20/99 (H1/N1)
- ▨ A/Panama/2007/99 (H3/N2)

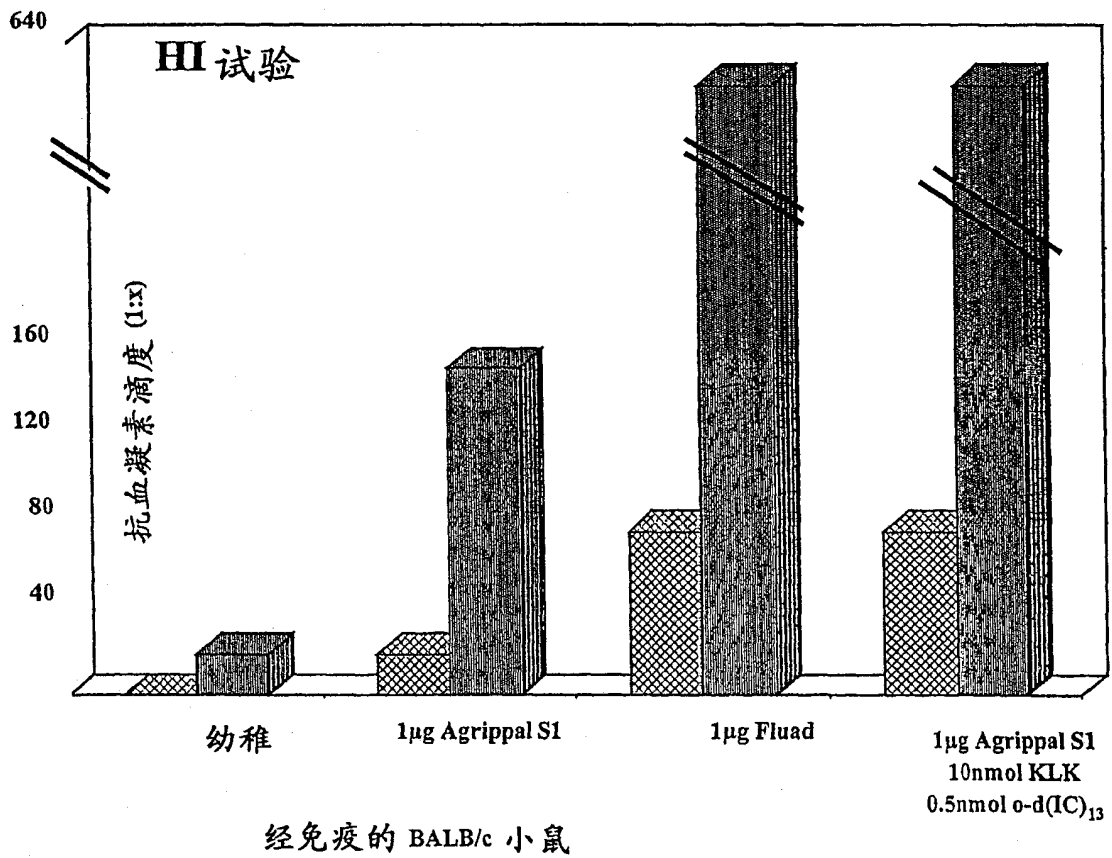


图 5a 用肽 + KLK1 α -d((C)13 免疫接种的 C57BL/6 小鼠

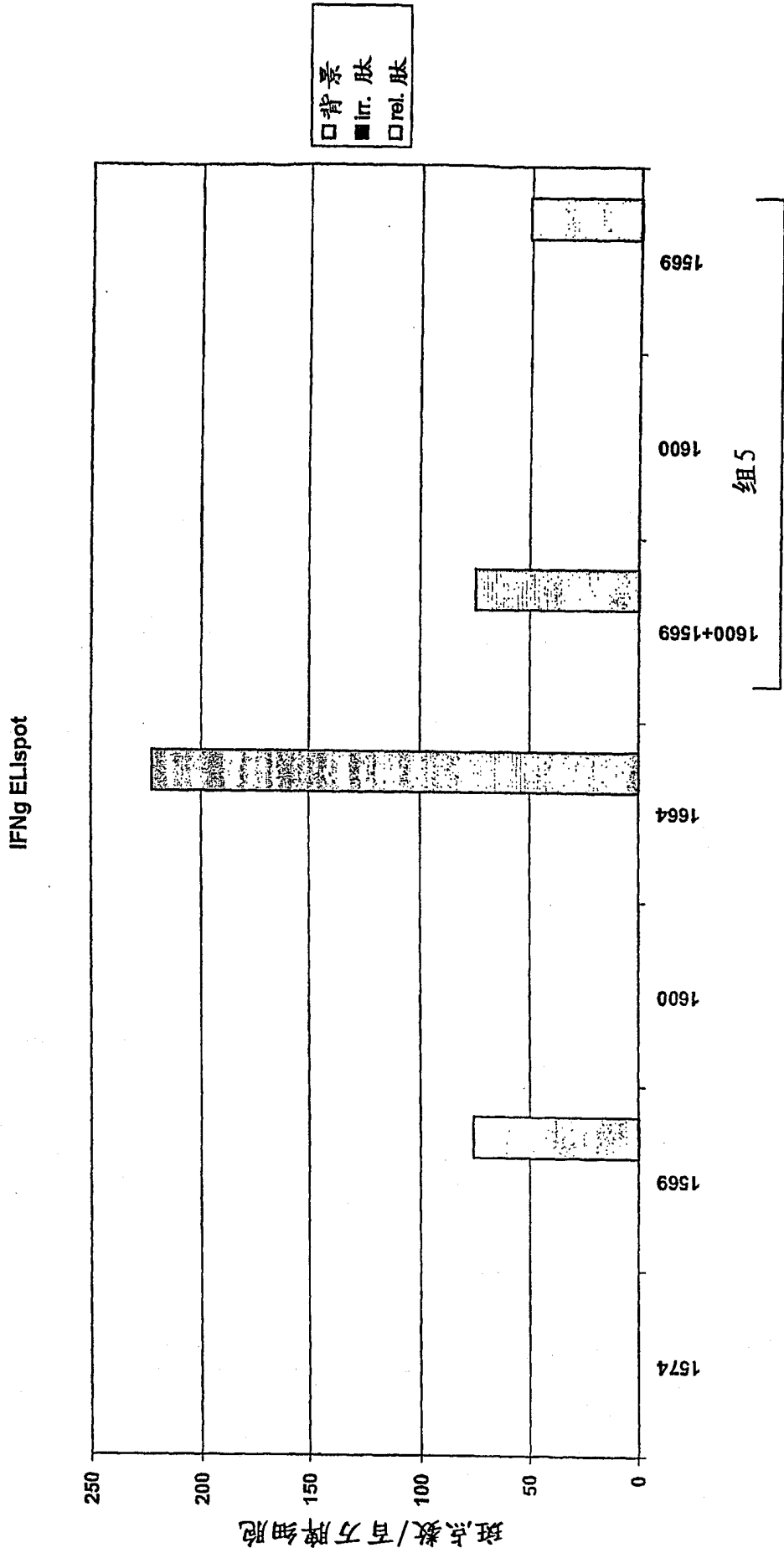


图 5b

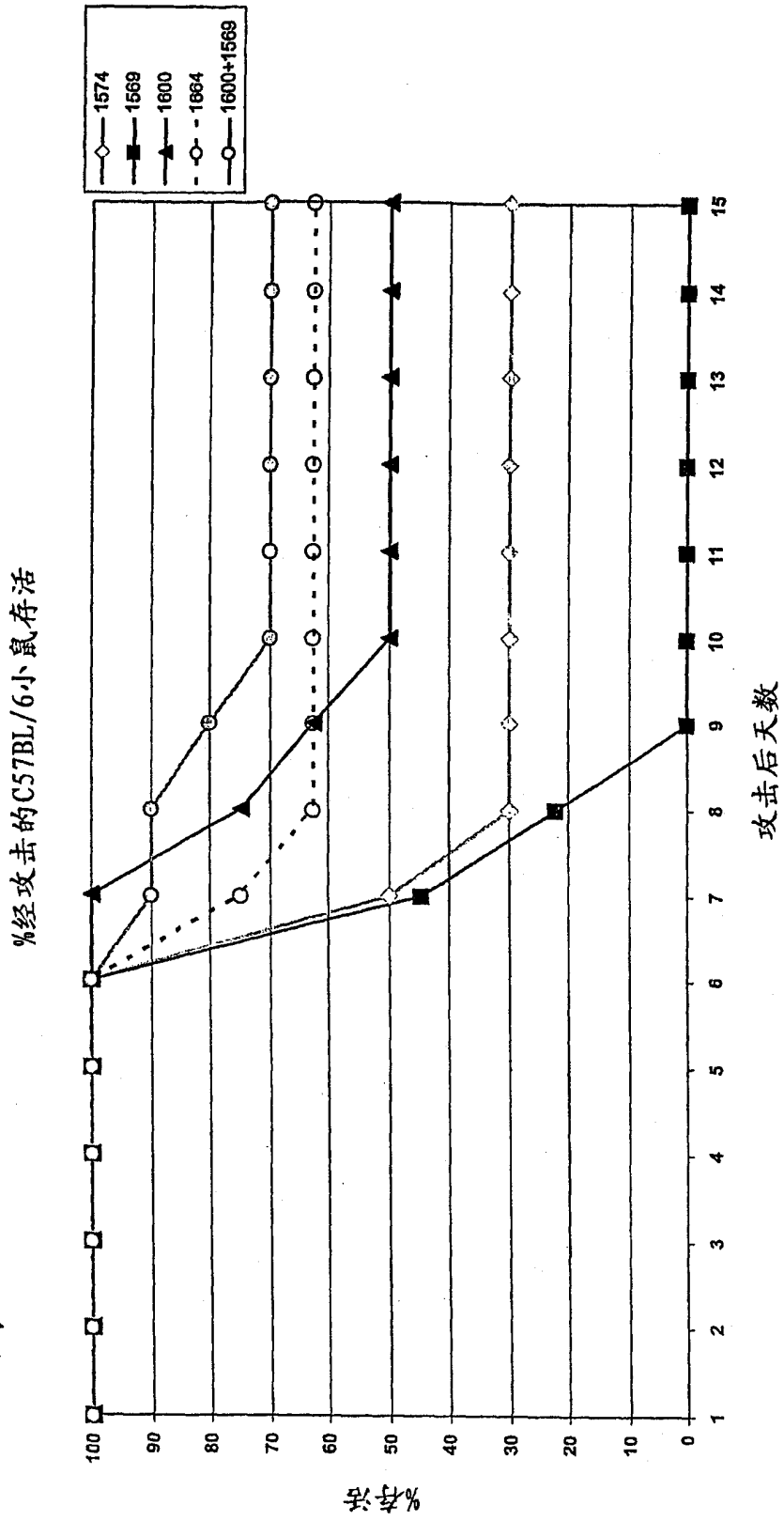


图6

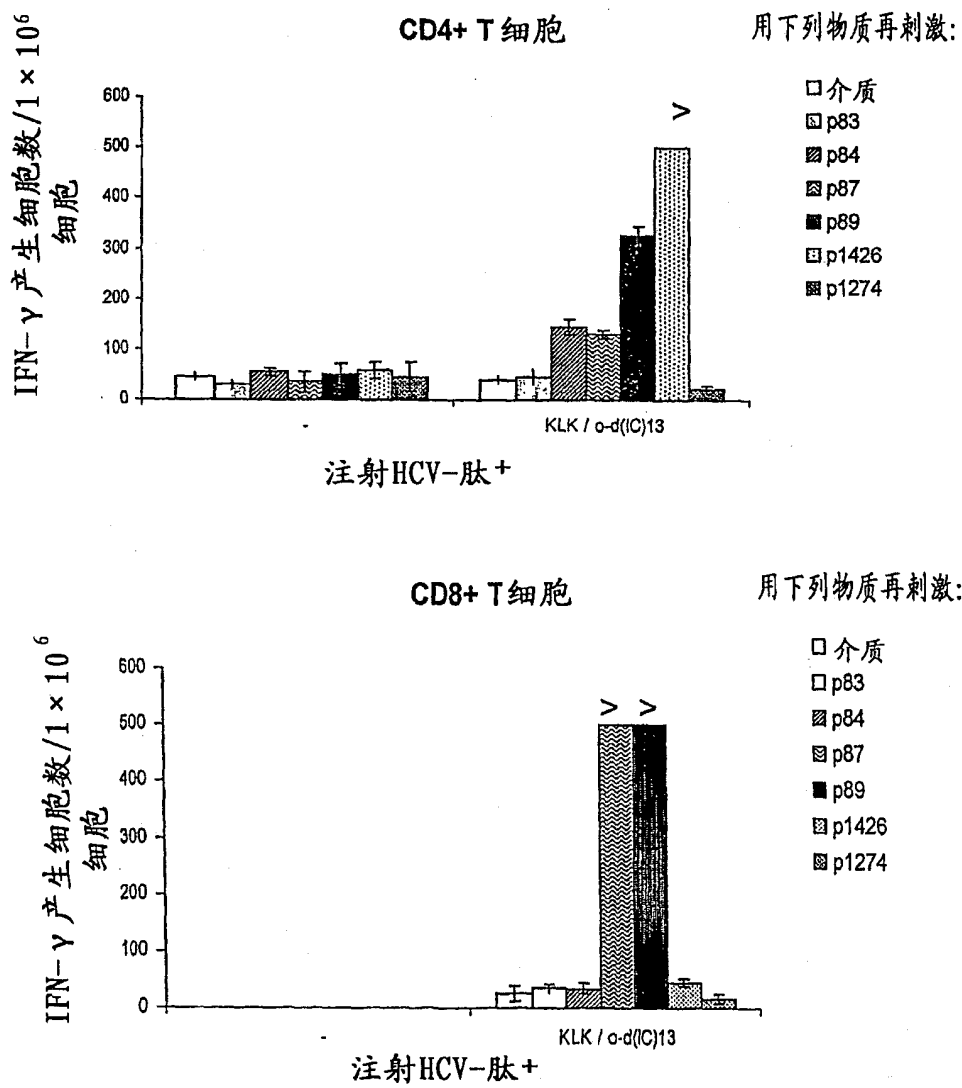
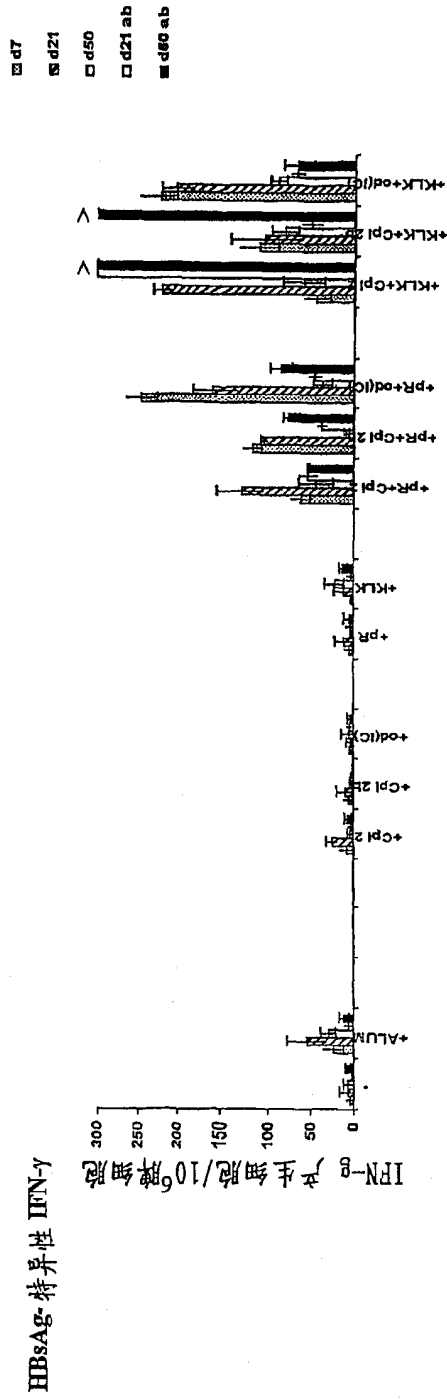


图7



6 注射HBsAg (5 μ g) +

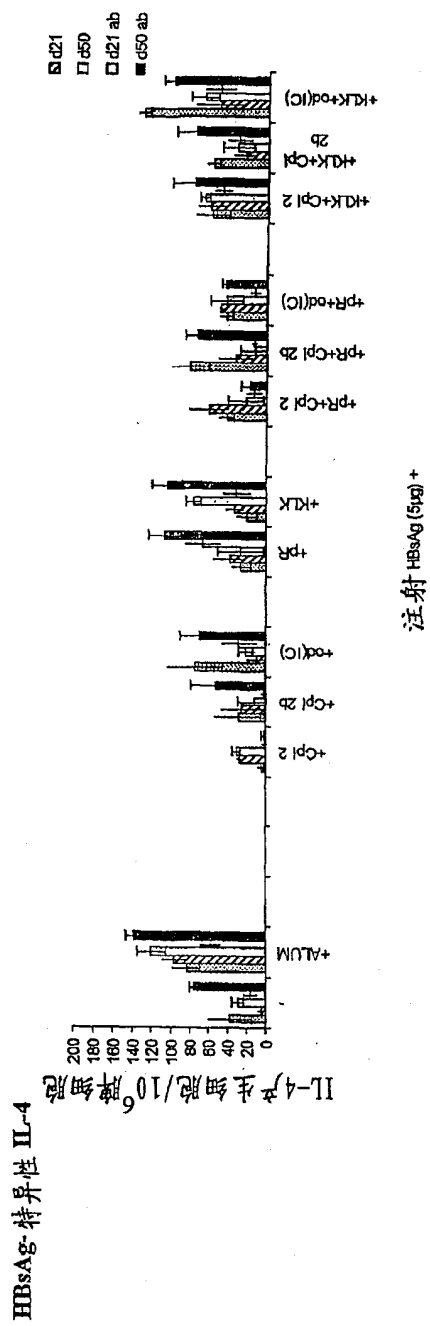
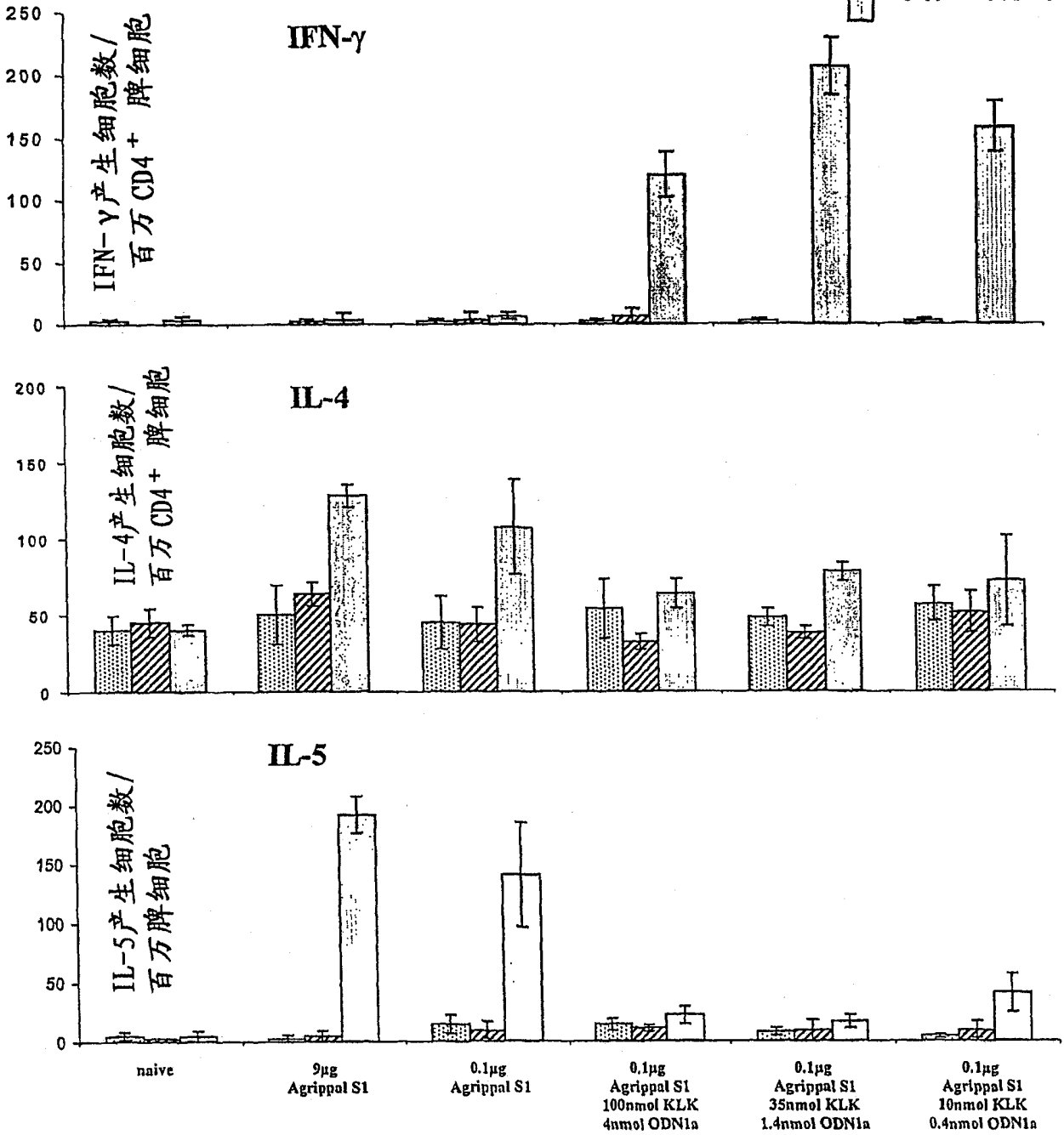


图 8a

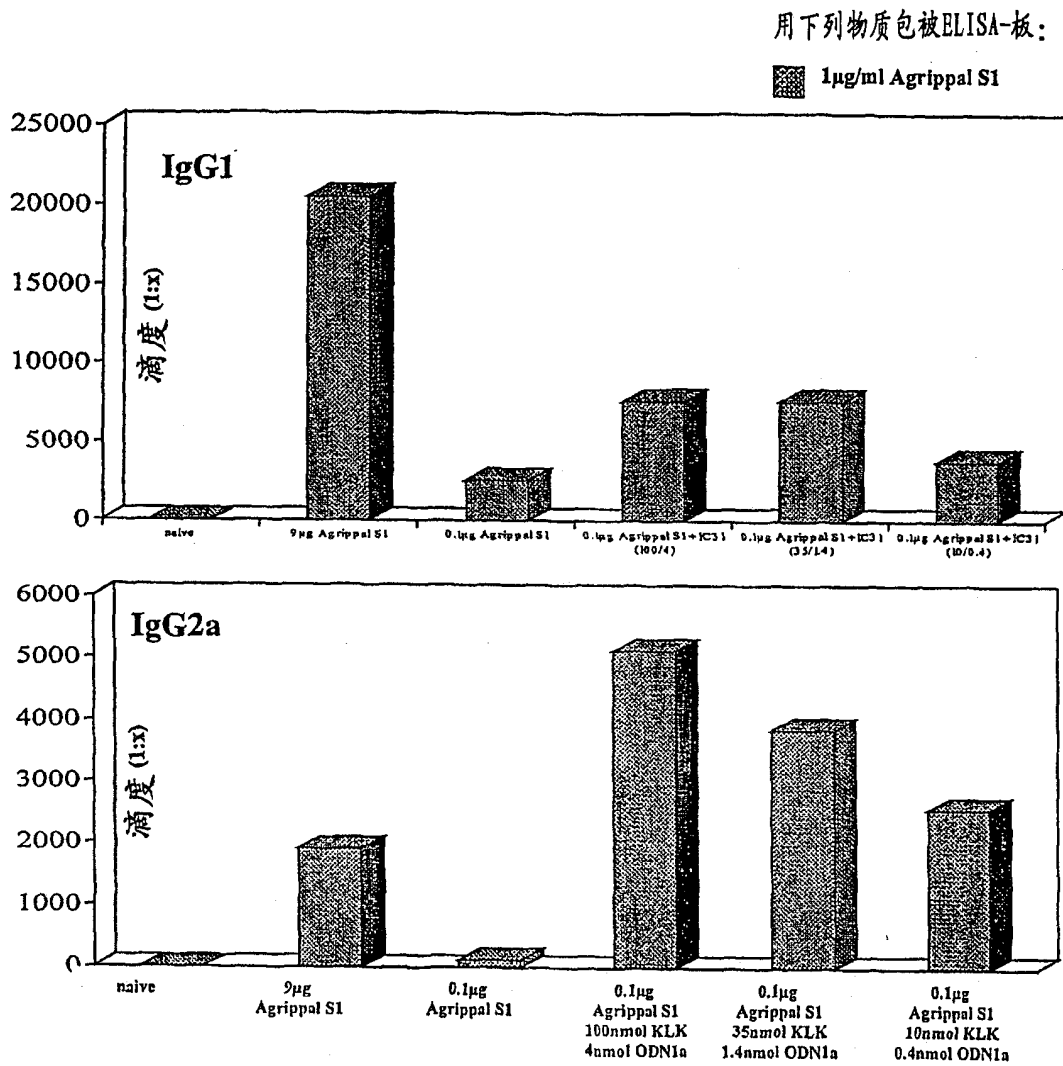
用下列物质再刺激:

- 介质
- ▨ OVA [10μg/ml]
- Agrippal S1 [1μg/ml]



经免疫的 BALB/c 小鼠




图 8b

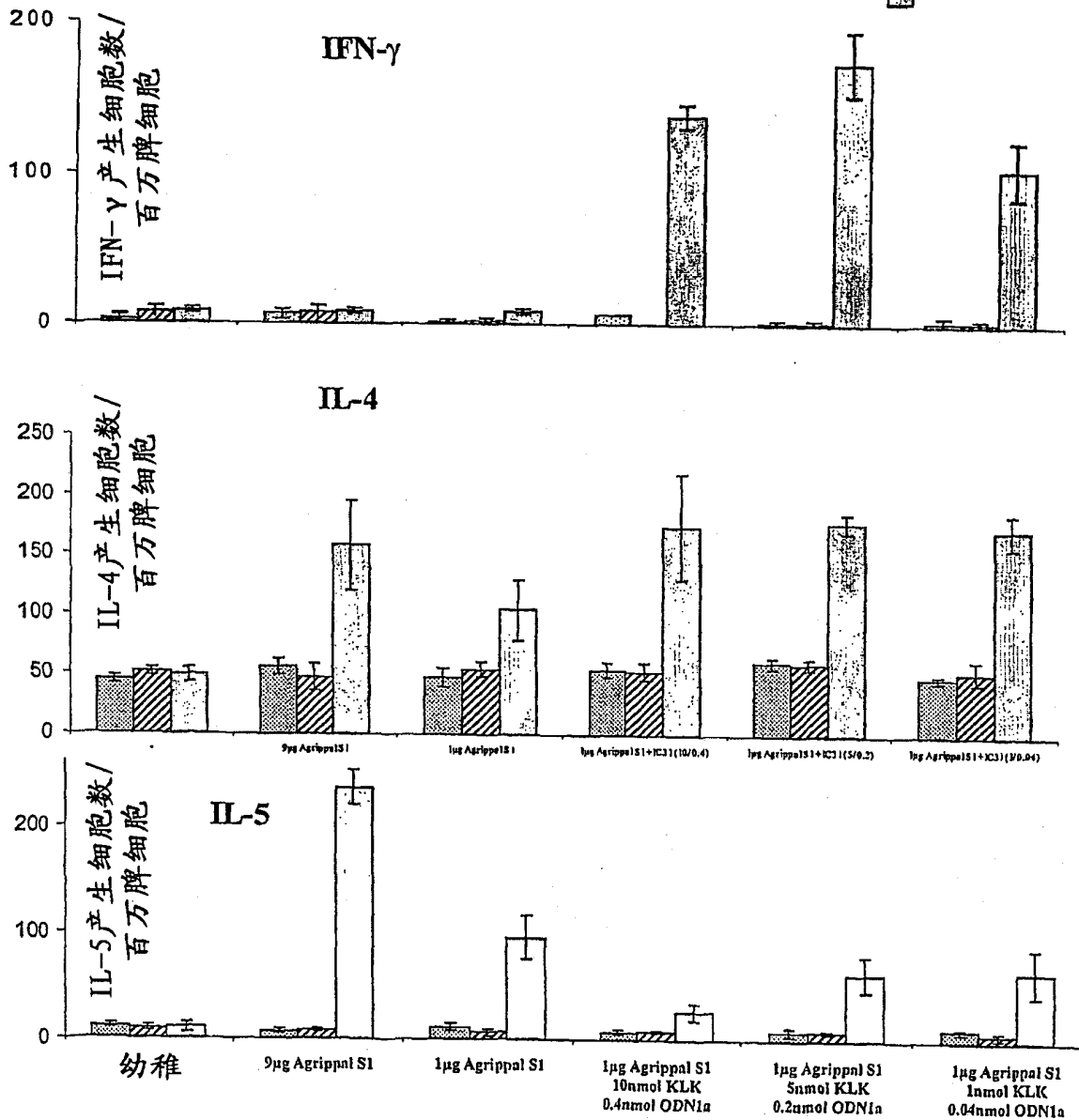


经 (i. m.) 免疫的BALB/c小鼠

图 9a

用下列物质再刺激:

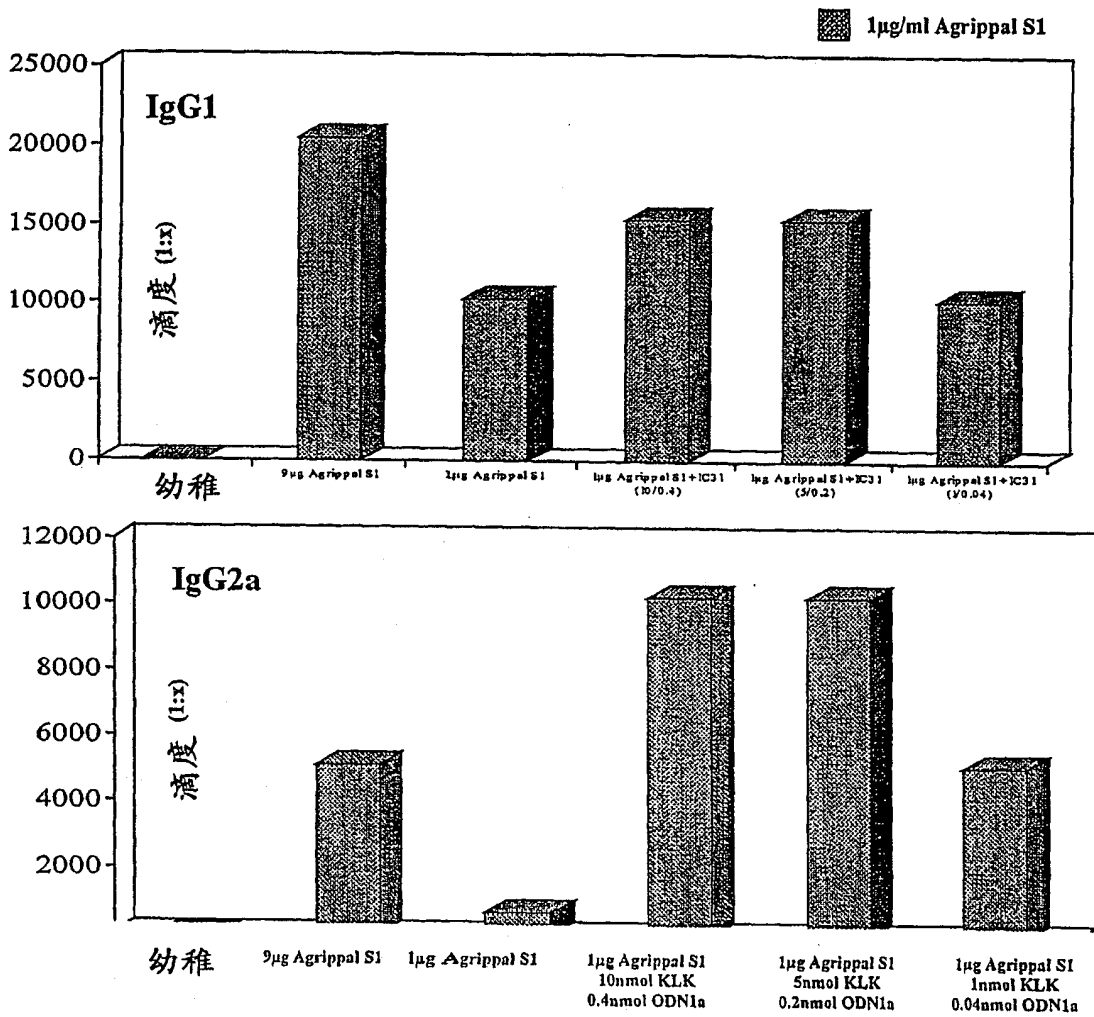
-  介质
-  OVA [10µg/ml]
-  Agrippal S1 [1µg/ml]



经免疫的BALB/c小鼠

图9b

用下列物质包括的ELISA板:



经免疫的BALB/c小鼠

用下列物质再刺激:

介质
 OVA (10µg/ml)
 Agripol S1 (1µg/ml)

图10

